



***Escherichia colin* määrittäminen** **kvantitatiivisella PCR:llä**

Työohje molekyylibiologian laboratorioon

Matti Laine

Tiia Saaranluoma

OPINNÄYTETYÖ
Syyskuu 2019

Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytikkokoulutus

LAINE, MATTI & SAARANLUOMA, TIIA:
Escherichia colin määrittäminen kvantitatiivisella PCR:llä
Työohje molekyylibiologian laboratorioon

Opinnäytetyö 35 sivua, joista liitteitä 10 sivua
Syyskuu 2019

Polymeraasiketjureaktio (PCR) on paljon käytetty menetelmä, jolla on nykyään monia erilaisia käyttökohteita ja se on keskeinen menetelmä molekyylibiologian laboratoriossa. PCR-reaktiossa hyvinkin pienestä määrästä DNA:ta saadaan monistettua moninkertainen määrä samaa DNA:ta, jolloin sitä voidaan käyttää esimerkiksi diagnostisiin tarkoituksiin. Esimerkiksi mikrobiologian laboratoriossa PCR-tekniikkaa käytetään jo hyvin paljon, ja tekniikan käyttö vain lisääntyy. PCR-tekniikkaa avuksi käyttäen voidaan tunnistaa bakteereja ja monistaa DNA-jaksoja.

Kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla (qPCR) pystytään mittaamaan monistettavan DNA:n määrää reaaliajassa merkkiaineiden avulla. Menetelmän etuna on sen nopeus eikä se tarvitse agarosigeeliä tulosten tulkintaan. Esimerkiksi tiettyjen bakteereiden osoituksessa siitä on tullut jo rutiinimenetelmä.

Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa työohje *E. colin* määrittämisestä kvantitatiivisella PCR-menetelmällä. Opinnäytetyön tarkoituksena on tehdä StepOnePlus™ Real-Time PCR-analysaattorilla määrittäminen, ja tuottaa prosessista toimiva työohje. Työohje tulee Tampereen ammattikorkeakoulun molekyylibiologian laboratorioon opetuskäyttöön. Opinnäytetyö toteutetaan toiminnallisena opinnäytetyönä.

Menetelmä testattiin Tampereen ammattikorkeakoulun molekyylibiologian laboratoriossa, ja opinnäytetyö sisältää tarkempaa tietoa prosessin kulusta ja eri työvaiheista. Prosessi lähtee liikkeelle bakteerin genomin eristyksestä päättyen qPCR-määrittäksen tuloksiin.

Kirjallinen osio antaa pohjatietoa PCR:n perusperiaatteista ja käyttökohteista. Materiaali on hyväksi tueksi työohjeen käyttäjälle myös laboratorioharjoituksiin. Kirjallinen osio avaa opiskelijalle testauksen eri vaiheita, joita suoritettiin työohjeen toimivuuden takaamiseksi.

Kehitysehdotuksena työohjetta tulisi testata vielä opiskelijaryhmällä, ja muokata sitä saadun palautteen mukaan. Menetelmää voisi saada kustannustehokkaammaksi optimoimalla reaktion alukkeiden ja SYBR® Greenin määriä.

Asiasanat: polymeraasiketjureaktio, PCR, qPCR

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

LAINE MATTI & SAARANLUOMA TIIA:
Detection of *Escherichia coli* Using Quantitative PCR
Instruction Booklet for Molecular Biology Laboratory

Bachelor's thesis 35 pages, appendices 10 pages
September 2019

Polymerase chain reaction (pcr) is widely used as a diagnostic tool in molecular biology laboratory. PCR is able to amplify very small amounts of specific DNA sequence multiple times. This amplified DNA sequence can be used to detect different kinds of bacterial and viral infections. Quantitative PCR (qPCR) can be used to detect this DNA amplification in real-time using different kind of specific fluorescent dyes or probes.

The aim of this study was to create an instruction booklet on the detection of *E. coli* using qPCR analysis. This was accomplished by doing detection using StepOnePlus™ Real-time analyser and creating an instruction booklet based on that detection.

This study was conducted as a practice-based study. Before creation of the instruction booklet, two laboratory tests were performed. In the first one, the qPCR reaction was tested and checked if primers or reaction conditions needed optimising. In the second test genomic DNA of *E. coli* was extracted and quantified using analysis. An instruction booklet was created based on the second test.

This study includes theory of PCR and qPCR main principles, an instruction booklet covering extraction of genomic DNA of *E. coli* and analysis of it with qPCR analyser.

An instruction booklet was intended to be tested with a student group to gather feedback from them but due to time restrictions that was not possible. Possible advancements for study would be to test the instruction booklet with a student group and modify it based on the feedback obtained.

Key words: polymerase chain reaction, PCR, qPCR

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	5
2	DNA:N MONISTUSMENETELMISTÄ.....	6
2.1	Polymeraasiketjureaktio	6
2.2	Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio	9
3	TYÖOHJEEN LAATIMINEN	12
3.1	Oppimateriaalin tuottaminen	12
3.2	Toiminnallinen opinnäytetyö.....	13
4	HARJOITUSTYÖN SUUNNITTELU JA TOTEUTUS	15
4.1	Suunnittelu	15
4.2	Alkuvalmistelut	15
4.3	Menetelmän testaus.....	15
4.4	Menetelmän suorittaminen	16
4.5	Koestuksen tulokset ja pohdinta	16
5	POHDINTA	22
6	LÄHTEET	24
	LIITTEET	26
	Liite 1. Työohje	26

1 JOHDANTO

PCR on keskeinen menetelmä, jota käytetään laajalti laboratorioissa geenien monistukseen ja esimerkiksi sairauksien diagnosointiin tai bakteerien tunnistamiseen. Menetelmä on laajalle levinnyt, ja sen käyttö vain lisääntyy kiihtyvällä tahdilla. PCR:n tuntemuksesta on hyötyä työtehtävissä monessa erilaisessa laboratoriossa, esimerkiksi mikrobiologian erikoisalalla käytetään PCR-tekniikkaa jo paljon.

Opinnäytetyön tavoitteena on laatia työohje *E. colin* määrittämisestä kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktiolla eli qPCR-menetelmällä. Työohjeen käyttötarkoitus on olla materiaali opiskelijoille molekyylibiologian harjoitustunneille Tampereen ammattikorkeakouluun. Opinnäytetyön tarkoituksena on määrittää *E. colin* genomisen DNA StepOnePlus™ Real-Time PCR-analysaattorilla ja tuottaa määrittämisestä työohje. Opinnäytetyö toteutetaan toiminnallisena opinnäytetyönä.

Tarvittavat materiaalit, itse PCR-laite ja tilat saatiin käyttöön TAMK:ilta. Työ keskittyy työohjeen laatimiseen antaen sille myös tarvittavan teoriapohjan taustamateriaaliksi. Tavoite ohjeelle on selkeys ja helppo ymmärrettävyys, jotta opiskelijoiden olisi mielekästä hyödyntää sitä tulevilla oppitunneilla. Itse työohjeeseen rajataan toiminta molekyylibiologian laboratorion sisällä, eli siitä rajataan pois esimerkiksi *E. colin* viljely-, ja kasvatusvaiheet. Ohje sisältää vaiheet DNA:n eristyksestä lopullisiin tuloksiin PCR-laitteelta.

Työohjeen tueksi tehtiin harjoitustyö, jossa testattiin prosessia käytännössä ja varmistettiin sen toimivuus ja sopivuus. Näin voidaan hyödyntää myös opittuja käytännön taitoja harjoituslaboratoriossa. Liitteenä opinnäytetyössä on itse työohje.

2 DNA:N MONISTUSMENETELMISTÄ

2.1 Polymeraasiketjureaktio

PCR-tekniikka on ollut molekyylibiologian kulmakiviä jo vuodesta 1985. (Park J. 2011, 3.) Sillä voidaan tehokkaasti määrittää esimerkiksi erilaisia patogeeneja, ja käyttökohteiden määrä vain lisääntyy kiihtyvällä tahdilla. PCR on samalla hyvin kontaminaatioherkkä menetelmä, ja laboratoriotyöskentely vaatii erityistä tarkkuutta. (Yan H. 2016)

PCR-tekniikkaa käytetään esimerkiksi geneettisten sairauksien diagnosointiin, sairauden kantajien selvittämiseen sekä oikeiden hoitomuotojen löytämiseen. Esimerkiksi HIV:n, hepatiitin, malarian ja tuberkuloosin diagnosointiin siitä on suuri apu. Lääketieteellisten tarpeiden lisäksi tekniikasta on apua rikospaikkojen tutkinnassa sekä monenlaisessa tutkimustyössä, esimerkiksi sukupuuttoon kuolleen lajin genomin selvityksessä. (Laboratoryinfo n.d.)

Polymeraasiketjureaktiota on kutsuttu ”DNA:n kopiokoneeksi”. PCR käyttää muutamia peruskomponentteja, joilla saadaan monistettua tiettyä DNA-jaksoa (templaatti) moninkertaiseksi testiputkessa. PCR on monimutkainen prosessi, jossa käytetään monia erilaisia reagensseja. Jotkin reagenssimäärät ovat hyvin pieniä, esimerkiksi templaatti, jonka määrä kasvaa moninkertaisesti reaktion edetessä. Toisten reagenssien konsentraatio ei juurikaan muutu (dNTP, alukkeet). Prosessissa lämpötila muuttuu jatkuvasti. (McPherson & Møller 2000)

Yksinkertaistetusti onnistuneeseen polymeraasiketjureaktioon tarvitaan lämpöä kestävä DNA-polymeraasi, monistettavan alueen rajaavat alukkeet ja monta kertaa toistettavat lämpöä muuttavat syklit, joiden tuotoksena on useita kopioita halutusta templaatista. (Suominen ym. 2013, 153.)

Polymeraasiketjureaktioon tarvitaan korkeaa lämpötilaa kestäviä termostabiileja DNA-polymeraaseja, joka eivät inaktivoidu korkeissa (lähellä 100 °C) olevissa lämpötiloissa. *Thermus aquaticus* -bakteerista eristetty *Taq*-polymeraasi on täl-

laisista lämpöä kestävästä polymeraaseista eniten käytetty. *Taq*-polymeraasi tekee suhteellisen paljon virheitä, joten monissa PCR-sovelluksissa käytetään vähemmän virheitä tekeviä DNA-polymeraaseja. Geeniteknisellä proteiinimuokkauksella voidaan valmistaa uusia vähemmän virheitä tekeviä *Taq*-polymeraasin versioita. (Suominen ym. 2013, 153.)

PCR:n perusajatuksena on kahden tarkalleen tunnetun alukkeen käyttäminen. Alukkeet suunnitellaan siten, että ne kiinnittyvät monistettavan kaksinauhaisen DNA:n eri juosteiden vastakkaisiin päihin. Haluttu alukkeiden väliin jäävä DNA-jakso on se, jota monistetaan. (Suominen ym. 2013, 154.)

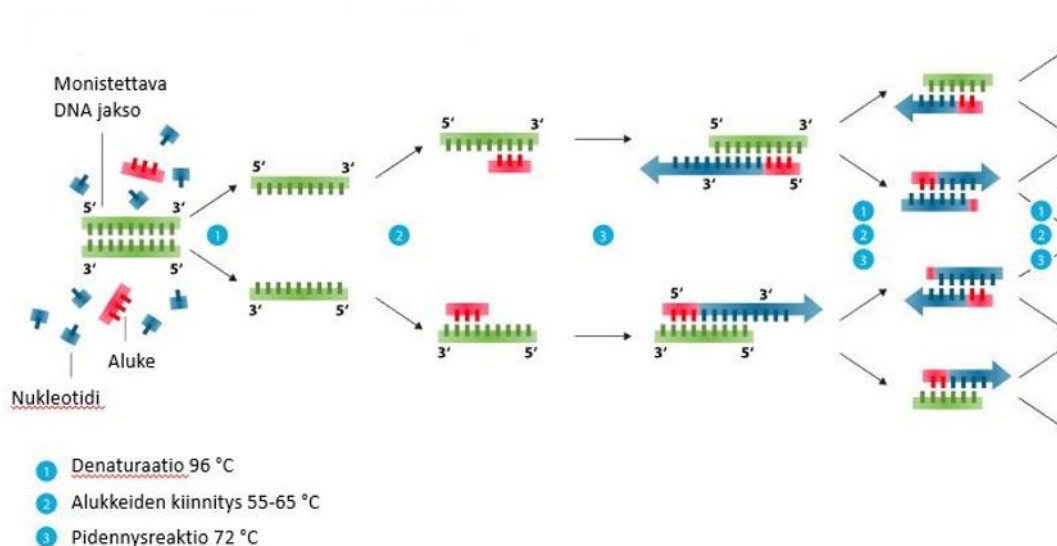
Templaattina käytetään yleensä kaksijuosteista DNA:ta. Tärkeintä on saada DNA vapautettua soluista, ja sitoutumista häiritsevät inhiboivat tekijät poistettua eristämällä. DNA:n ei välttämättä tarvitse olla täydellisen puhdasta, vaan tavoitteena on minimoida haittatekijät. Näyte ei saa hajota prosessissa. (Suominen ym. 2013, 154.)

PCR-syklin eri vaiheita ovat denaturointi, alukkeiden kiinnitys ja pidennys. Yhtä tällaista sarjaa kutsutaan sykliksi. Yleensä syklejä on 15-40. Prosessin kesto on noin kaksi tuntia. (Suominen ym. 2013, 155.) PCR-syklin vaiheet esitellään taulukossa 1.

TAULUKKO 1. PCR-syklin vaiheet. (Suominen ym., 2013, 155., muokattu)

Denaturointi (96 °C)	Lämmitetään reaktiota voimakkaasti, jotta DNA-juosteet erkaantuvat kaksijuosteisesta yksijuosteiseksi. Tuotosena erilliset juosteet seuraavaan vaiheeseen.
Alukkeiden kiinnitys eli annealing (55-65 °C)	Lasketaan lämpötilaa, jolloin alukkeet kiinnittyvät vastaaviin sekvensseihin juosteessa.
Pidennysreaktio (72 °C)	Nostetaan lämpötilaa, jolloin DNA-polymeraasi lähtee rakentamaan uutta DNA-juostetta alukkeista.

Nettotuottona reaktiossa syntyy siis kahdesta DNA-nauhasta neljä nauhaa, seuraavassa vaiheessa syntyy kahdeksan nauhaa, sitä seuraavassa vaiheessa 16 ja niin edelleen. DNA:n monistuminen on eksponentiaalista. Hyvinkin pieni määrä riittää monistettavaa DNA:ta riittää reaktion aikaansaamiseksi, ja tuotteesta on mahdollista saada tarkalleen juuri määrätyn pituisia. (Suominen ym. 2013, 154.) Kuviossa 1 esitetään qPCR-reaktion eteneminen ja sen eri vaiheet.



KUVIO 1. qPCR-reaktion eteneminen. (Wikimedia Commons, 2014, muokattu.)

Alukkeiden sitoutumisen voimakkuutta kuvaa T_m eli sulamislämpötila. Sulamislämpötilalla tarkoitetaan lämpötilaa, jossa puolet alukkeista on kiinnittynyt templateen ja puolet on vapaana liuoksessa. Teoreettinen sulamislämpötila vaihtelee laskentaohjelmasta riippuen, jolloin sitä optimoidaan kokeilemalla käytännössä. Sopiva alukkeidenkiinnityslämpötila saadaan teoreettisesti vähentämällä sulamislämpötilasta 5 °C. Alukkeiden sulamislämpötilat eivät saisi poiketa toisistaan yli kahta celsiusastetta, jotta niiden sitoutuminen olisi mahdollisimman samankaltaista. (Suominen ym. 2013, 159.)

PCR-menetelmä ei ole aukoton, ja virheitä voi syntyä esimerkiksi kontaminaation tai hiusneularakenteen vuoksi. Hiusneularakenne on ilmiö, jossa alukkeen päät sitoutuvat toisiinsa, eli ovat komplementaarisia toisiinsa nähden. Mikäli varsinkin 3'-pää on tiukasti hiusneularakenteessa, aiottua tuotetta saadaan hyvin niukalti tai ei ollenkaan. (Suominen ym. 2013, 160.) Reaktiossa kontaminaatiota voi syn-

tyä helposti templaatin, genomisen DNA:n tai aiemmin tehtyjen reaktioiden jäämistä. Kontaminaatiota voidaan ehkäistä pitämällä laboratoriotilat ja ilma siisteinä, puhdistamalla pipetit hyvin ja käyttämällä niissä filttieriä sekä noudattamalla laboratorion käytäntöjä. (Integrated DNA Technologies, 2019.) Reaktiossa on tärkeää olla ajamatta liian montaa sykliä, koska muutoin epäspesifisen tuotteen syntymahdollisuus kasvaa. (Suominen ym. 2013, 164.)

2.2 Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio

Reaaliaikainen PCR-reaktio eroaa tavanomaiseen PCR-reaktioon verrattaessa tulosten analysoinnissa. Tavanomaisen PCR-reaktion monistettu DNA-tuote ajetaan agarosigeelille reaktion loputtua, kun taas reaaliaikaisessa PCR-reaktiossa monistunutta tuotetta pystytään detektoimaan reaaliajassa reaktion edetessä. (Real-Time PCR Applications Guide 2006, 2.)

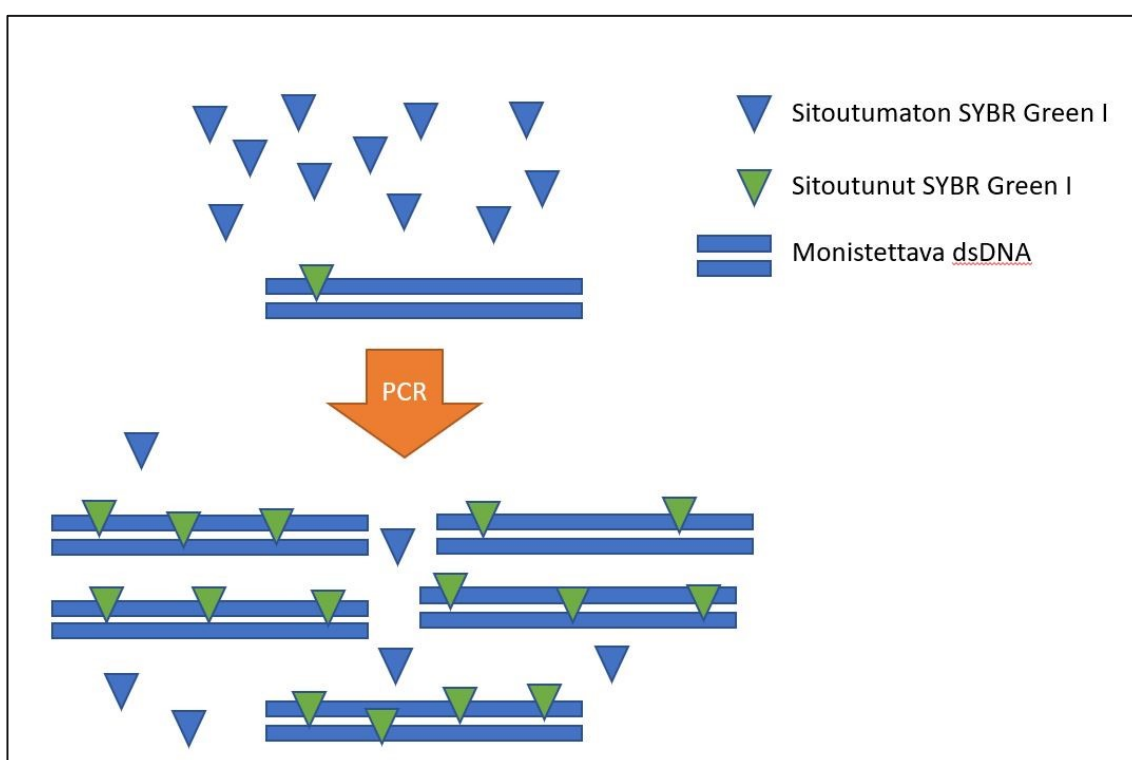
PCR-reaktion reaaliaikainen seuraaminen on mahdollista lisäämällä reaktioon fluoresoivia molekyylejä. Tämänlaisia molekyylejä ovat kaksoisjuosteiseen DNA:han kiinnittyvät värit sekä fluoresoivasti leimatut spesifiset alukkeet. PCR-analyysilaitteista löytyy fluoresenssisignaalia mittaava moduuli. Nämä moduulit mittaavat fluoresenssisignaalin joka syklin jälkeen. Kasvava mitattu signaali kuvastaa suhteessa monistettavan DNA-jakson määrää. (Real-Time PCR Applications Guide 2006, 2.)

Suurin etu reaaliaikaisessa PCR:ssä normaaliin PCR verrattaessa on mahdollisuus määrittää näytteen kopiokumäärä. Reaaliaikaisen PCR:n tulokset voivat olla joko kvalitatiivisia tai kvantitatiivisia, eli onko näytteessä tutkittava geenijaksoa tai kuinka monta kopiota tutkittavaa geenijaksoa näytteessä on. Kvantitoimissa reaaliaikaista PCR:ää kutsutaan sitä kvantitatiiviseksi PCR:ksi (qPCR). Lisäksi reaaliaikaisen PCR:n etuna on se, että sen data voidaan arvioida ilman agarosigeelielektroforeesia, joka lyhentää tutkimusaikoja. (Real-Time PCR Applications Guide 2006, 3.)

Tärkeimpiä vaiheita reaaliaikaisen PCR:n määrittelyn suunnittelussa on päättää, mitä menetelmää käytetään monistuneen DNA-jakson havainnointiin. Tähän on

saatavilla useita erilaisia menetelmiä, joista yleisimpiä ovat kaksijuosteiseen DNA:han (dsDNA) kiinnittyvät fluoresoivat värit. (Real-Time PCR Applications Guide 2006, 9.)

SYBR Green on yleisesti käytettykaksijuosteiseen DNA:han kiinnittyvä fluoresoiva väri. Se kiinnittyy epäspesifisti kaksijuosteiseen DNA:han. Kuviossa 2 on havainnollistettu SYBR Greenin antama signaali vapaana ja kiinnittyneenä. Vapaana molekyylinä SYBR Green fluoresoi vähän, mutta kun se on kiinnittynyt kaksijuosteiseen DNA:han kasvaa sen fluoresenssi jopa tuhatkertaisesti. Näin ollen koko reaktiosta mitattu fluoresenssisignaali on verrannollinen monistuneeseen tuotteeseen. (Real-Time PCR Applications Guide 2006, 9.)



Kuvio 2. SYBR Greenin sitoutuminen kaksijuosteiseen DNA:han.

Tällaisten dsDNA:han kiinnittyvien fluoresenssivärien etuna on reaktioiden helppo suunnittelu. Reaktiossa tarvitaan vain kahta aluketta eikä reaktioon tarvitse suunnitella koettimia erikseen, jolloin kustannukset jäävät vähäisemmiksi. Tällä tavoin on myös mahdollista suorittaa sulamiskäyräanalyysi. (Real-Time PCR Applications Guide 2006, 11.)

Sulamiskäyräanalyysillä reaktiosta pystytään erottelemaan spesifinen ja epäspesifinen monistuminen. Sulamiskäyrä muodostetaan nostamalla reaktion lämpötilaa hitaasti asteittain samalla fluoresenssisignaalia mitaten. Lämpötilan kasvaessa dsDNA:n juosteet aukeavat ja fluoresenssisignaali laskee. Analyysissä alukedimeereillä ja epäspesifisellä monistumisella on eriateinen sulamislämpötila kuin monistuneella tuotteella. (Real-Time PCR Applications Guide 2006, 11.)

DNA:han sitoutuvien värien huonona puolena on niiden epäspesifinen sitoutuminen mihin tahansa dsDNA:han. DNA:han sitoutuvat värit eivät myöskään sovi multiplex-reaktioihin, joissa tunnistetaan useampia DNA jaksoja, koska PCR-laitteet eivät pysty erottelemaan mistä fluoresenssisignaali tulee. (Real-Time PCR Applications Guide 2006, 11.)

3 TYÖOHJEEN LAATIMINEN

3.1 Oppimateriaalin tuottaminen

Työohje on yksi oppimateriaalin muodoista. Työohje laboratoriotyöskentelyyn on yleensä suljettu, eli työskentelyyn annetaan tarkat ohjeistukset. Toivotun lopputuloksen tulisi jokaisen ohjeen noudattajan kohdalla olla samanlainen. Yleensä ohjeen noudattamiseen liittyy tulosten kirjaamista ylös ja johtopäätösten tekemistä. (Jeronen 2005, 198.)

Työn tekeminen ei saisi jäädä liian mekaaniseksi, vaan oppijan tulisi olla selvillä siitä, mitä hän on tekemässä. Työohjeessa vaarana piilee mekaanisen suorittamisen vaara, jolloin oppija ei ymmärrä teoriataustaa. Tästä syystä hyvä tuntiohjaaminen on erityisen tärkeää työohjetta noudattaessa, jotta ilmiöt varmasti ymmärrettäisiin mitä tapahtui ja miksi. Mikäli koe epäonnistuu, on oppilaiden kannalta hyvin tärkeää käydä läpi, miksi näin kävi. (Palmberg 2005, 121.)

Oppimateriaalilla tulee olla jokin pedagoginen lähtökohta, ja se on hyvä sitoa tietynlaiseen oppimiseen. Pedagogisella laadulla tarkoitetaan, että oppimateriaali soveltuu opetuskäyttöön ja tukee oppimista. Laatu lähtee myös opettajan toiminnasta, ja hänen osaamisestaan käyttää oppimateriaalia tarkoituksenmukaisesti. Materiaalin tulee olla tuotettu uusimman tutkimustiedon mukaisesti. Kaikissa materiaaleissa pedagogista laatua edustavat oppimateriaalit, jotka tukevat oppijan tietoista ajattelua ja saavat oppijan toimimaan aktiivisesti työn eteen. (Edu.fi n.d.)

Työohjeen laadinnassa keskeistä on sen helppolukuisuus ja olennaisuuksiin keskittyminen. Tiivistä ja tarpeellista tietoa on helpompi käsitellä ja prosessoida. Myös visuaalisuus on tärkeä elementti, jotta työohjeesta saataisiin mahdollisimman informatiivinen. (Kjelin & Kuusisto 2003, 212.)

Hyvä työohje ei ole liian yksinkertainen eikä liian monimutkainen, ja se etenee harkitussa järjestyksessä. Asioiden otsikointi ja jäsentely oikein on tärkeää. Ohje ei saa myöskään sisältää liikaa asiaan kuulumatonta informaatiota, jottei lukijan

huomio kiinnity liikaa epäolennaisuuksiin. Työohje on mietittävä niin, että sitä pystyy lukemaan myös asiaan perehtymätön henkilö. Työohjeesta tulee käydä ilmi sen julkaisupäivä, jotta lukija osaa arvioida sen ajantasaisuutta. (Highet 2008)

3.2 Toiminnallinen opinnäytetyö

Toiminnallinen opinnäytetyö on vaihtoehto tutkimukselliselle opinnäytetyölle. Toiminnallisen opinnäytetyön tavoitteena on ohjata, opastaa ja järkeistää toimintaa. (Vilkka & Airaksinen 2004, 9.) Toiminnallisen opinnäytetyön tuotoksena on aina jokin konkreettinen tuote, esimerkiksi kirja, ohjeistus tai tapahtuma. (Vilkka & Airaksinen 2004, 51.) Tärkeintä on, että toiminnallisessa opinnäytetyössä yhdistyy käytännön toteutus ja raportointi tutkimusviestillisin keinoin. (Vilkka & Airaksinen 2004, 9.)

Ammattikorkeakoulussa annetun opetuksen tavoite on, että opiskelija valmistuttuaan kykenee toimimaan alansa asiantuntijatehtävissä ja tuntee alaansa liittyvät tutkimuksen perusteet. Opinnäytetyö tukee tätä mallia, mikäli se on työelämlähtöinen, käytännönläheinen ja tutkimuksellisella otteella toteutettu. Tavoitteena on lisäksi yhdistää sekä käytäntö että teoria. (Vilkka & Airaksinen 2004, 10.)

Toiminnallisessa opinnäytetyössä ei esitellä tutkimusongelmaa, ellei kyseessä ole nimenomaan selvitysluontoinen työ. Työssä tulee olla tietoperusta ja teoreettinen viitekehys (Vilkka & Airaksinen 2004, 30.) Ammattikorkeakouluopintojen pääidea on yhdistää ammatilliset teoreettiset tiedot käytännön työskentelyyn, opettaa arvioimaan kriittisesti käytännön ratkaisuja ja auttaa kehittämään ammatikulttuuria. (Vilkka & Airaksinen 2004, 42.) Tarpeellisia tutkimusviestinnän piirteitä työssä ovat esimerkiksi lähteiden käyttö ja merkintä, käsitteiden määrittely, tekstin asiatyylisyys ja johdonmukaisuus. (Vilkka & Airaksinen 2004, 66.)

Erityisen tärkeää on rajata työlle tietty kohderyhmä. Tuotos tehdään aina jonkun käytettäväksi, eli on mietittävä näiden henkilöiden sosioekonomista taustaa, ikää, koulutusastetta, ammattiasemaa ja toimeksiantajan toiveita. Tärkeintä on ymmärtää, mikä on keskeisin ongelma, minkä vuoksi tuotos tuotetaan. Kohderyhmä

myös rajaa aihetta, mikä estää työn liiallisen paisumisen. (Vilkka & Airaksinen 2004, 40.)

Toimintasuunnitelma opinnäytetyöhön tehdään sen vuoksi, että opiskelija sisäistää työn idean ja jäsentää päässään tavoitteet. Keskeisimmät kysymykset ovat mitä tehdään, miten tehdään ja miksi tehdään. (Vilkka & Airaksinen 2004, 26.) Taulukossa 2 on kuvailtu keskeisimmät toimintasuunnitelman merkitykset.

TAULUKKO 2. Toimintasuunnitelman merkitykset. (Vilkka & Airaksinen 2004, 26-27.)

1. Jäsennys tekijälle, mitä ja miksi hän on tekemässä
2. Osoitus siitä, että tekijä kykenee johdonmukaiseen prosessiin ja päätte- lyyn tavoitteissa.
3. Lupaus siitä, mitä aiotaan tehdä, sitoutuminen.

Toimintasuunnitelma aloitetaan lähtötilanteen kartoituksella. Tekijän on oltava perillä siitä, millaista kirjallisuutta aiheesta löytyy, ja onko vastaavanlaisia tuotoksia tehty aiemmin. Seuraava vaihe on miettiä, millaisilla keinoilla tavoitteet ovat saavutettavissa. Ongelmakohtana on, mistä saadaan tarvittavat materiaalit ja teoria työn tekemiseen. Myös yhteistyön toimivuus toimeksiantajan kanssa on tärkeää. (Vilkka & Airaksinen 2004, 27.) Selvittää pitää myös kustannuskysymykset, eli maksaako työstä aiheutuvat kulut opiskelija itse, työelämäyhteys ja vai oppilaitos. (Vilkka & Airaksinen 2004, 28.)

Työtä varten on luotava realistinen aikataulu. Tämä helpottaa myös ohjaajan tekemistä ja arviota siitä, kuinka realistinen aikataulutus on. Mitä useampi muuttujia prosessissa on, sitä suurempaa joustovaraa tarvitaan. (Vilkka & Airaksinen 2004, 53.)

4 HARJOITUSTYÖN SUUNNITTELU JA TOTEUTUS

4.1 Suunnittelu

Harjoitustyön suunnittelu aloitettiin miettimällä projektin työssä tarvittavat materiaalit ja aikataulu. Harjoitustyössä tarvittavia materiaaleja olivat käytetty bakteerikanta, bakteerin genomisen DNA:n eristyskitti, reaktiossa tarvittavat alukkeet ja SYBR® Green Mastermix. Materiaalit saatiin toimeksiantajalta.

Joulukuussa 2018 suoritettiin menetelmän testaus ja maaliskuussa 2019 suoritettiin varsinaisen harjoitustyö, jonka pohjalta työohje tehtiin. Molemmat työvaiheet suoritettiin Tampereen ammattikorkeakoulun molekyylibiologian laboratoriossa.

4.2 Alkuvalmistelut

Aluksi viljeltiin *E. coli* ATCC 11229 – kanta TSA-maljalle. Viljelmää kasvatettiin lämpökaapissa (37 °C) noin 20 tuntia, jonka jälkeen viljelmästä siirrettiin pesäke aseptisesti steriiliin putkeen ja sinne lisättiin 2ml TSB-kasvatusliuosta. Putket laitettiin ravistelijassa lämpökaappiin noin 20 tunniksi.

Eristettiin bakteerin genominen DNA E.Z.N.A.® bacterial DNA -protokollan mukaisesti. Näytteiden puhtaus ja konsentraatio määritettiin GeneQuant pro-laitteella.

4.3 Menetelmän testaus

Menetelmää testattiin *E. coli* *uidA*-geenin tunnistavilla alukkeilla. Menetelmän testauksessa tehtiin kolmen pisteen standardisuora, jossa käytettiin konsentraatioiltaan tunnettua *E. coli* genomista DNA:ta. Standardikuvaaja tehtiin tunnetun DNA-konsentraation mukaan laimennussuhteella 1:10. Tutkittavat näytteet lai-

mennettiin 1:10 nukleaasivapaaseen veteen. Näytteiden määityksessä oli mukana kaksi negatiivista kontrollia ja kummastakin näytteestä ajettiin kolme replikaattia.

4.4 Menetelmän suorittaminen

Menetelmän testausvaiheessa käytetty *uidA*-aluke pystyy tunnistamaan geenijaksoja *E. colista* ja *Shigella*-kannoista. Tämän vuoksi työhön valittiin *lacY*-aluke, jonka on raportoitu olevan spesifi vain *E. coli*-kannoille. (Pavlovic 2011)

E. colin genomisesta DNA:sta tehtiin määitykseen viiden pisteen standardikuvaaja, ja jokaisesta standardipisteestä tehtiin kolme replikaattia. Thermofisher-kopiolukulaskurilla laskettiin aloituskonsentraatioksi miljoona kopiota. Aloituskonsentraatiosta tehtiin viiden laimennoksen laimennossarja 1:10. Ensimmäisessä standardipisteessä on miljoona kopiota, toisessa sata tuhatta, ja niin edelleen saataan kopiolukuun asti.

Toista DNA-näytettä käytettiin tuntemattomana näytteenä. Näytteestä tehtiin viiden pisteen laimennossarja 1:10. Ensimmäinen laimennos oli 1:100, toinen 1:1000 ja niin edelleen. Viimeinen laimennos on 1:1000000.

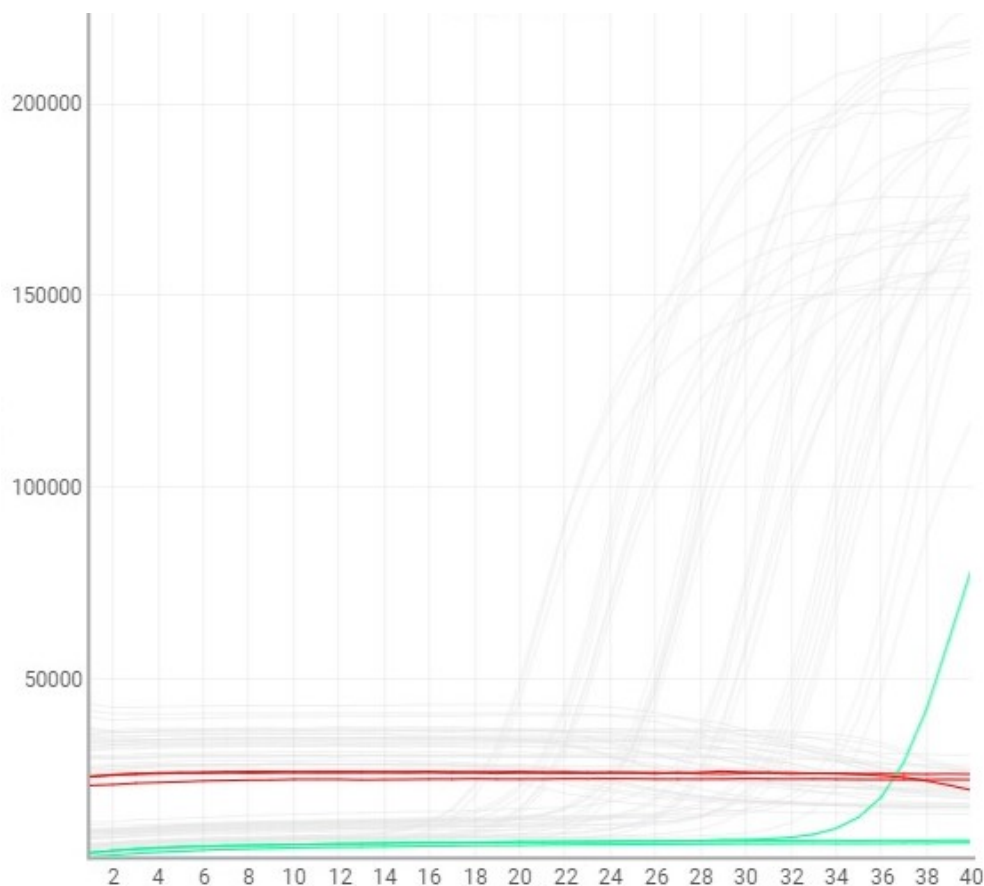
Reaaliaikainen PCR-määitys suoritettiin StepOnePlus™ Real-Time PCR-analysaattorilla.

4.5 Koestuksen tulokset ja pohdinta

Negatiiviset kontrollit

Negatiivinen kontrolli sisältää kaikki reaktioon tarvittavat reagenssit, paitsi templatein. Näin voidaan havaita, onko jokin reagensseista kontaminoitunut. Negatiivinen kontrolli auttaa havaitsemaan, onko reaktiossa tapahtunut kontaminantimonistumista. (Good practice guide for the application of qPCR 2013, 4.)

Kuviossa SYBR kuvastaa negatiivisten kontrollien monistumista. ROX on referenssiväri, jolla saadaan normalisoitua ei PCR-reaktiosta johtuva fluoresenssi signaalissa. (Thermofisher 2019) Kuviossa 3 on esitetty negatiivisten kontrollien tulokset qPCR-määrittämisestä.

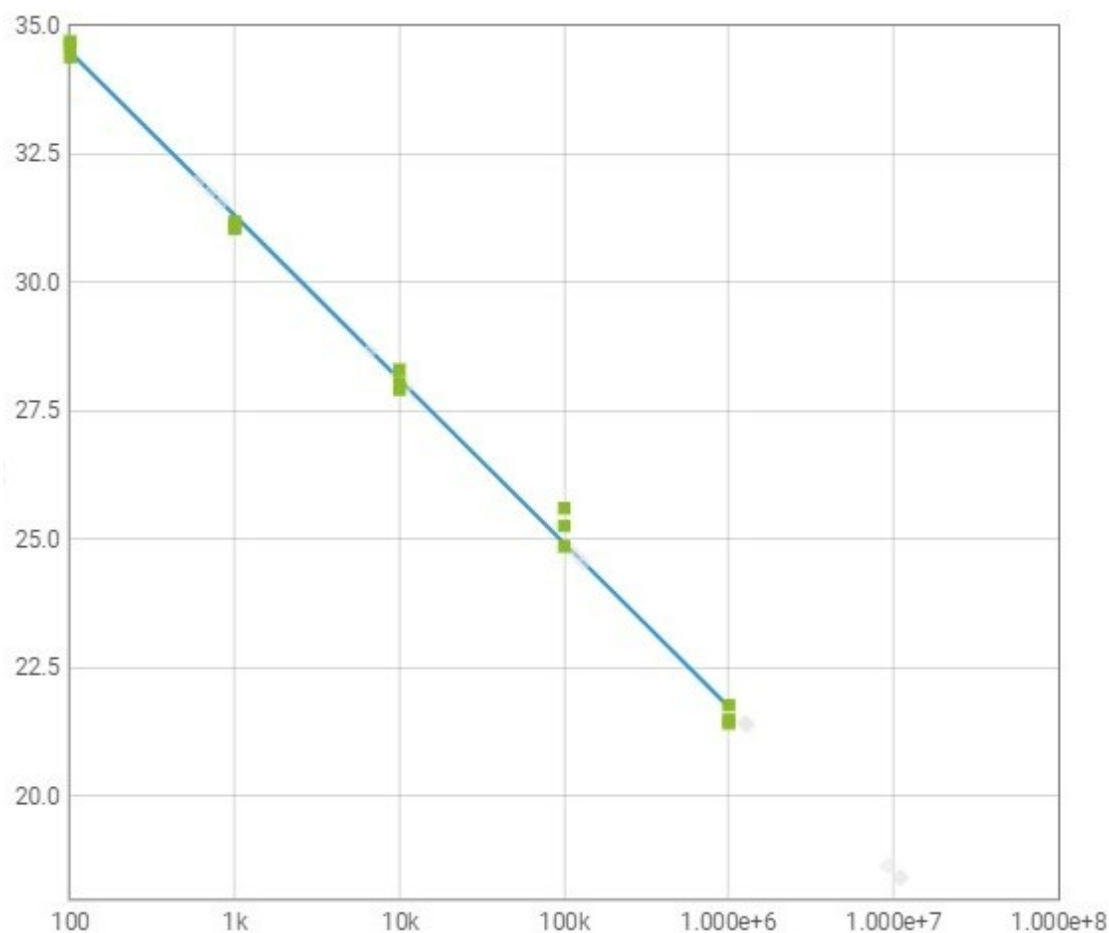


KUVIO 3. qPCR-reaktion negatiiviset kontrollit. Vihreä väri kuvaa monistunutta DNA:ta ja punainen väri kuvaa ROX-kontrollia. Pystyakselilla fluoresenssisignaali ja vaaka-akselilla monistussyklit.

Negatiiviset kontrollit onnistuivat lukuun ottamatta yhtä negatiivista kontrollia, jossa on tapahtunut monistumista. Monistuminen todennäköisesti johtuu *E. coli* genomien kontaminaatiosta.

Standardisuora

PCR:n tehokkuutta ja toistettavuutta voidaan määrittää tekemällä standardikuvaaja sarjalaimennoksena tunnetusta templaatista. Tehokkuus tulisi olla 90-105 %. Standardisuoran korrelaatiokerroin tulisi olla yli 0,980. (Thermofisher n.d.) Kuviossa 4 on esitetty qPCR-määrityksen standardisuora.

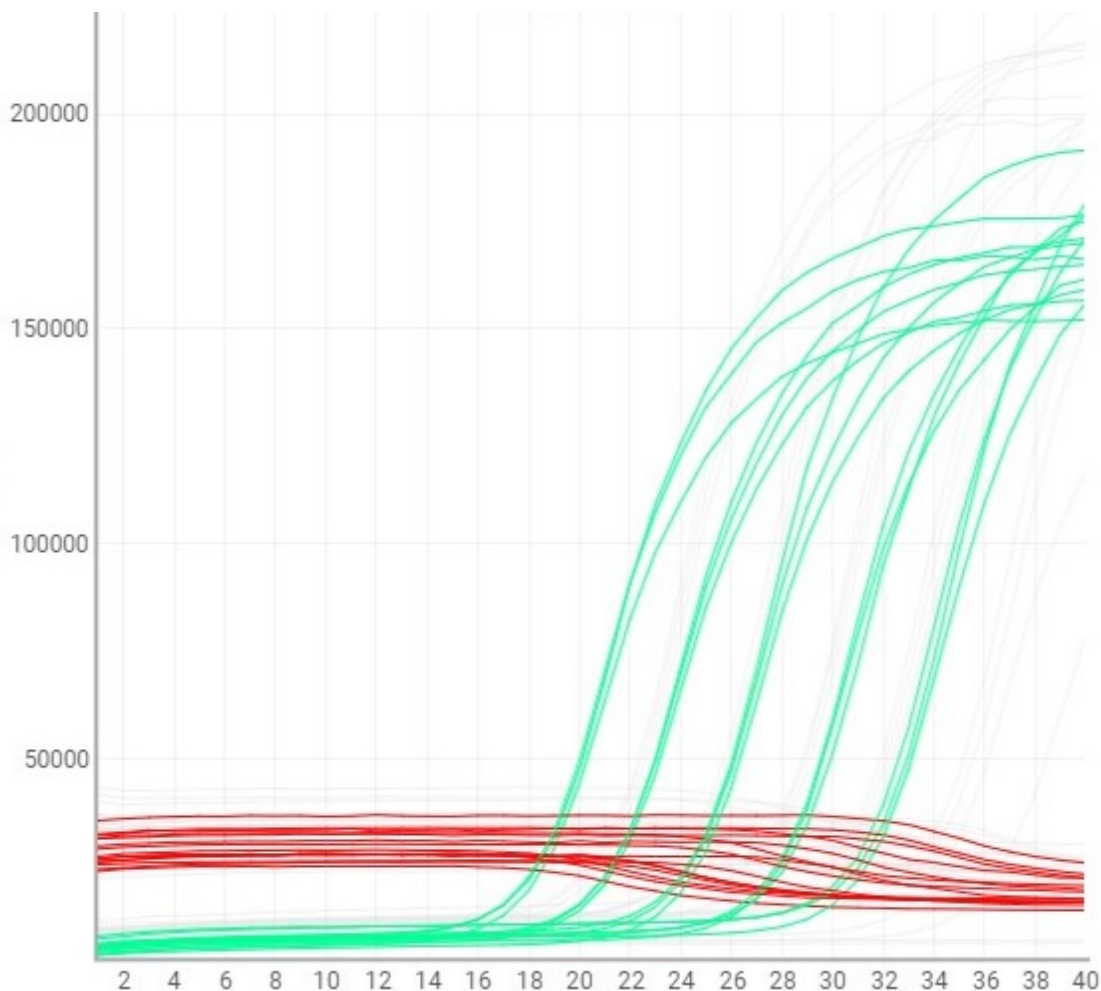


KUVIO 4. qPCR-määrityksen standardisuora. Suoran kulmakerroin on -3,189, korrelaatiokerroin 0,997 ja tehokkuus 105%. Pystyakselilla Ct-arvo ja vaaka-akselilla kopianlukumäärä.

Standardisuoran kulmakerroin viittaa PCR-reaktion tehokkuuteen. Kulmakertoimen (slope) tulisi olla ainakin -3.6. (Thermofisher n.d.)

Tuntematon näyte

Kuviossa 5 on esitetty tuntemattoman näytteen monistumiskäyrät eri laimennoksille.

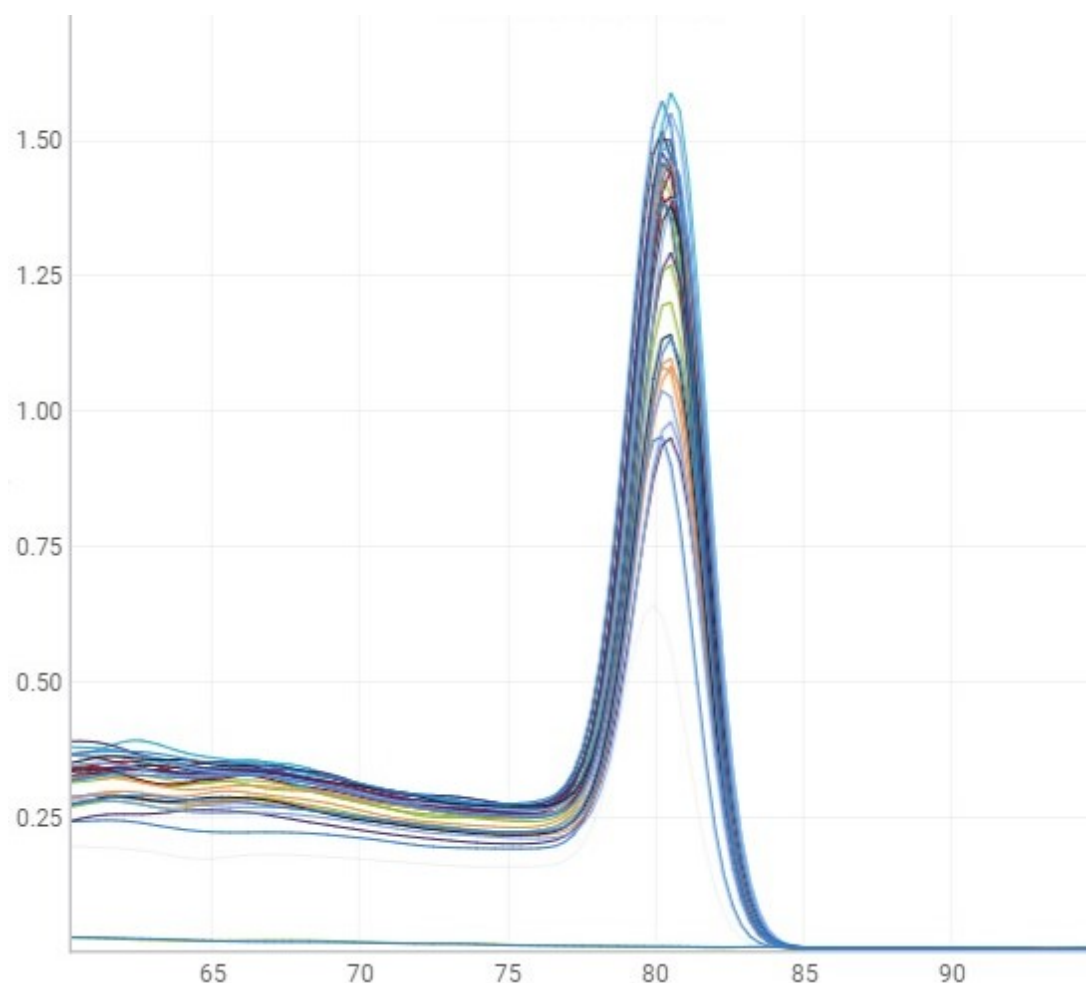


KUVIO 5. qPCR-määrittelyn tuntematon näyte. Vihreä väri kuvaa monistunutta DNA:ta ja punainen väri kuvaa ROX-kontrollia. Pystyakselilla fluoresenssisignaali ja vaaka-akselilla monistussyklit.

Tuntemattoman näytteen laimennosten Ct-keskiarvot olivat kaikki hyväksyttävissä rajoissa, joka on 8-35. Monistuminen on tapahtunut optimaalisella alueella.

Sulamiskäyrä

Reaaliaikaisen PCR:n spesifisyys määräytyy alukkeiden ja reaktiolosuhteiden mukaan. On kuitenkin mahdollista, että hyvinkin suunnitelluissa alukkeissa esiintyy alukedimeerejä tai epäspesifistä monistumista. Alukedimeerit ja epäspesifinen monistuminen näkyvät käyrässä sulamislämpötilan muutoksena. (Real-Time PCR Applications Guide 2006, 11.) Kuviossa 6 PCR-reaktion sulamiskäyrä.



KUVIO 6. qPCR-määrittelyn sulamiskäyrä. Kuvassa on määrittelyn kaikkien näytteiden sulamiskäyrät. Vaaka-akselilla sulamiskäyrä lämpötila.

Määrittystä voidaan pitää onnistuneena, koska negatiivisissa kontroleissa ei ollut tapahtunut monistumista yhtä rinnakkaista näytettä lukuun ottamatta. Standardisuoran kulmakerroin, korrelaatiokerroin ja tehokkuus olivat tavoiterajoissa ja

näytteiden sulamiskäyrät olivat yhtenevät. Koska sulamiskäyrässä ei ole poikkeavuuksia, voidaan todeta, että reaktiossa ei ole syntynyt alukedimeerejä. Määrityksen onnistumisen vuoksi prosessista voitiin tuottaa oppimateriaali. (Liite 1.)

5 POHDINTA

Opinnäytetyön idea lähti liikkeelle koulun tarpeesta saada työohje harjoitustunneille molekyylibiologian laboratorioon. Tarkoitus oli tuottaa työohje *E. coli* genomisen DNA:n eristämisestä ja sen osoittamisesta reaaliaikaisella PCR-menetelmällä. Vastaavaa ohjetta ei vielä ollut saatavilla, joten se monipuolistaisi tulevien opiskelijoiden kurssisisältöä.

Opinnäytetyön tuottaminen aloitettiin etsimällä tietoa käyttökelpoisista alukkeista, joita tarvittaisiin työssä. Näihin alukkeisiin päädyttiin, koska niistä löytyi tieteellinen tutkimus, jossa todettiin alukkeiden olevan spesifisiä *E. coli*-kannalle.

Monistumisen detektioon valittiin SYBR Green, koska se on yksi yleisimmin käytetyistä reagensseista qPCR-menetelmissä. Reagenssien ja alukkeiden hankinta sujui ongelmitta opettajan hankkimana. Alukkeet ja SYBR Green tilattiin tätä työtä varten, mutta muut materiaalit löytyivät koululta valmiiksi. SYBR Greenin hankinta oli kustannustehokasta, koska käyttämättä jäänyt reagenssi pystytään käyttämään muilla molekyylibiologian oppitunneilla.

Tietoa etsittiin monipuolisesti useasta eri lähteestä. PCR-tekniikasta on heikosti suomenkielistä materiaalia saatavilla, joten myös vieraskielistä materiaalia käytettiin paljon. Suurta apua oli erityisesti kurssikirjanakin käytetystä teoksesta ”Geenitekniikka” (Suominen, I., Pärssinen., Haajanen., K., Pelkonen., J. 2013), joka tarjosi hyvää ja kiteytettyä tietoa myös suomeksi ja auttoi jäsentämään asioita, jotka olivat opinnäytetyöhön keskeisiä.

Työtä suunniteltaessa päätettiin, että ei käytetä mahdollisesti infektiivistä ja työturvallisuutta vaarantavaa patogeenia. Työssä käytettiin ATCC® 11229 *E. coli*-kanta. Tämä bakteerin bioturvallisuusluokka on yksi, jolloin sitä on turvallista käyttää koulun laboratoriotiloissa.

Päätettiin, että ensin suoritetaan menetelmän testaus, jossa varmistetaan laitteiden ja menetelmän toimivuus. Testausvaiheessa käytettiin eri alukkeita kuin var-

sinaisessa määrittäksessä. Menetelmän testauksen jälkeen siirryttiin itse varsinaiseen koestukseen. Menetelmän testauksessa olisi ollut järkevää käyttää samoja alukkeita kuin varsinaisessa määrittäksessä, koska se olisi lisännyt tulosten luotettavuutta. Löydetyn tutkimustiedon perusteella käytettiin *E. coli*lle spesifisiä alukkeita.

Menetelmän testaus ja qPCR-määrittäminen onnistuivat hyvin, koska negatiivisissa kontroleissa ei ollut monistumista yhtä kontrollia lukuun ottamatta ja standardisuoraan liittyvät parametrit olivat tavoiterajoissa. Määrittäksen sulamiskäyrät olivat yhtenevät, josta voidaan todeta, että määrittäksessä ei ollut muodostunut alukedimeerejä.

Työelämästä oppineena työskentelyaseptiikkaan olisi voinut kiinnittää enemmän huomiota, esimerkiksi suojakäsineet olisi voinut vaihtaa vieläkin useammin. Menetelmän testauksia olisi voinut vielä toistaa, mutta aikataulullisesti se ei ollut mahdollista. Menetelmää olisi voinut testata vielä toisella bakteerikannalla, jolloin varmistuttaisiin alukkeiden *E. coli*-spesifisyydestä.

Työohjeesta haluttiin tehdä mahdollisimman selkeä ja yksinkertainen. Asioiden laajuutta ja ohjeiden tarkkuutta piti miettiä, jotta lukija varmasti ymmärtää asian. Sisältöä ei saa toisaalta olla liikaa, jotta keskeiset asiat eivät jää muun tiedon alle. Työohjeesta pyrittiin tekemään sellainen, että työn suorittaminen ei jää liian mekaaniseksi. Opiskelijan tulisi ajatella, mitä hän on tekemässä. Työohjeen tarkoituksena on olla oppimateriaali opiskelun tueksi.

Työohjetta oli tarkoitus testata opiskelijaryhmällä, mutta aikataullisista syistä ideasta luovuttiin. Koska testausta ei tapahtunut, työohjeesta ei saatu palautetta. Palautteen puutteen vuoksi ei tiedetä, päästiinkö asetettuihin tavoitteisiin hyvästä työohjeesta. Kehitysideana työn voisi testata opiskelijoilla, jotka voisivat antaa työohjeesta palautetta. Palautteen jälkeen työohjetta muokattaisiin palautteen vaatimalla tavalla.

6 LÄHTEET

Bio-Rad. 2006. Real-Time PCR Applications Guide. Luettu 15.3.2019.
<https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>

Edu.fi. 2018. E-oppimateriaalin laatukriteerit. Päivitetty 31.8.2018. Luettu 15.4.2019. https://www.edu.fi/verkko_oppimateriaalit/e-oppimateriaalin_laatukriteerit

Highet, D. 2008. Work Instructions That Work. Luettu 21.8.2019.
http://www.grizmo.com/management_news_200810.html

Integrated DNA technologies. 2015. Could your PCR be affected by contamination. Luettu 2.5.2019. <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/could-your-pcr-be-affected-by-contamination>

Jeronen, E. 2005. Resurssien valitseminen, valmistaminen ja käyttö. Teoksessa Biologia eläväksi – Biologian didaktikka. Eloranta, E., Jeronen, E. Toim. Palmberg, I. Keuruu: Otavan kirjapaino Oy

Kjelin, E., Kuusisto P. 2003. Tulokkaasta tuloksetekijäksi. 1. painos. Jyväskylä: Gummerrus kirjapaino Oy

Laboratoryinfo. 2019. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle, Procedure, Components, Types and Applications. Päivitetty 21.1.2019. Luettu 18.5.2019.
<https://laboratoryinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr/>

McPherson, M.J., Møller, S.G., 2000. PCR. United Kingdom: BIOS Scientific Publisher Ltd.

Palmberg, I. 2005. Koeputkikalibroinnit ja kokeilut. Teoksessa Biologia eläväksi – Biologian didaktikka. Eloranta, E., Jeronen, E. Toim. Palmberg, I. Keuruu: Otavan kirjapaino Oy

Park, J. 2011. PCR Protocols. 3. painos. University of Melbourne, Parkville: Humana Press.

Pavlovic, M., Luze, A., Konrad, R., Berger, A., Sing, A., Busch, U., Huber, I. 2011. Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella* spp. Luettu 20.4.2019 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2011.04973.x>

Suominen, I., Pärssinen., Haajanen., K., Pelkonen., J. 2013. Geeniteknikka. 2. painos. Saarijärvi: Saarijärven Offset Oy

Thermofisher. N.d. Rox reference dye. Luettu 12.8.2019. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12223012>

Thermofisher. N.d. Poor efficiency of PCR. Luettu 13.8.2019. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html>

Vilka, H. Airaksinen, T. 2004. Toiminnallinen opinnäytetyö. 1-2. painos. Jyväskylä: Gummerrus Kirjapaino Oy

Wikimedia Commons. Polymerase Chain reaction. Viitattu 25.8.2019. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg

Yan, Hu. 2016. Regulatory Concern of Polymerase Chain Reaction (PCR) Carryover Contamination. Luettu 20.8.2019. <https://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction-for-biomedical-applications/regulatory-concern-of-polymerase-chain-reaction-pcr-carryover-contamination>

LIITTEET

Liite 1. Työohje

E. coli genomisen DNA:n eristys ja kvantitointi qPCR:llä

Työohje

1.9.2019

Matti Laine

Tiia Saaranluoma

1 GENOMISEN DNA:N ERISTYS E.Z.N.A.[®] BACTERIAL DNA -KITILLÄ

Työssä eristetään *E. coli*:n genomista DNA:ta silikamatriisiin perustuvalla kaupallisella kitillä.

1.1. Materiaalit

- Sentrifugi
- Nukleasivapaita 1,5 ml mikroputkia
- Inkubaattori
- Putkisekoittaja
- 3ml *E. coli* -bakteerisuspensiota

1.2. Esivalmistelut

Ennen kitin käyttöönottoa

- lisää 60 ml 96-100 % etanolia DNA pesupuskuriin (DNA Wash Buffer)
- lisää 10 ml isopropanolia HBC-puskuriin (HBC Buffer)

Ennen työn suoritusta

- esilämmitä eluutiopuskuri (Elution Buffer) 65 °C lämpötilaan.

1.3. Työn suoritus

1. Sentrifugoi enintään 3ml bakteerisuspensiota kierrosnopeudella 4 000 x g 10 minuuttia huoneenlämmössä.
2. Ime kasvatusliuos pois.
3. Lisää 100 µl TE-puskuria (TE-buffer). Vorteksoi hyvin, jotta solunappi putken pohjalla sekoittuu kunnolla.
4. Lisää 10 µl lysotsyymiä (Lysozyme).
5. Inkuboi 37 °C asteessa 10 minuuttia.

Huomioitavaa: Pidempi inkubaatioaika voi tuottaa parempia tuloksia. Soluseinän täydellinen hajoaminen on edellytys genomisen DNA:n eristämiseksi.

6. Lisää 100 µl TL-puskuria (TL Buffer) ja 20 µl Proteinaasi K liuosta (Proteinase K Solution). Vorteksoi huolellisesti.

7. Inkuboi 55 °C noin tunnin verran.

Huomioitavaa: Yleenä tuntia pidempää inkubaatiota ei tarvita. Jos käytössä ei ole sekoittavaa vesihaudetta, täytyy näytettä käänellä tai vorteksoida 20-30 minuutin välein.

8. Lisää 5 µl RNAasia (RNase) ja kääntele putkea ylösalaisin useita kertoja.

9. Inkuboi näyte huoneenlämmössä 5 minuuttia.

10. Sentrifugoi näytettä 10 000 x g 2 minuuttia. Hajoamaton solumateriaali kerääntyy pelletiksi putken pohjalle.

11. Siirrä supernatantti uuteen 1.5 ml mikroputkeen varoen putken pohjalle muodostunutta pellettiä.

12. Lisää 200 µl BL-puskuria (BL Buffer) ja vorteksoi huolellisesti.

Huomioitavaa: Näytteeseen voi muodostua sakkaa BL-puskurin lisäämisen jälkeen, mikä ei häiritse DNA:n eristystä.

13. Inkuboi näytettä 65 °C 10 minuutin ajan.

14. Lisää 220 µl 100% etanolia. Vorteksoi 20 sekuntia täydellä teholla, jotta näyte sekoittuu kunnolla.

Huomioitavaa: Jos sakkaa on vielä nähtävissä etanolin lisäämisen jälkeen, pipetoi näytettä ylös ja alas 10 kertaa.

15. Aseta HiBind DNA Mini-silikapylväs 2 ml keräysputkeen.

16. Siirrä koko näyte mukaan lukien mahdollinen muodostunut sakka silikapylvääseen.

17. Sentrifugoi näytettä 10 000 x g 1 minuutti.

18. Hävitä suodos ja keräysputki. **Älä heitä pois silikapylvästä.**
 19. Aseta silikapylväs uuteen 2 ml keräysputkeen.
 20. Lisää 500 µl HBC-puskuria (HBC Buffer).
 21. Sentrifugoi näytettä 10 000 x g 1 minuutti.
 22. Hävitä suodos ja käytä samaa keräysputkea uudelleen.
 23. Lisää 700 µl DNA-pesupuskuria (DNA Wash Buffer).
 24. Sentrifugoi näytettä 10 000 x g 1 minuutti.
 25. Hävitä suodos ja käytä samaa keräysputkea uudelleen.
 26. Tee uusi DNA pesu toistamalla vaiheet 23-25.
 27. Sentrifugoi tyhjää silikapylvästä maksiminopeudella ($\geq 10\,000 \times g$) 2 minuuttia pylvään kuivaamiseksi.
 28. Aseta silikapylväs uuteen 1.5 ml nukleaasivapaaseen mikroputkeen.
 29. Lisää 50-100 µl eluointipuskuria (Elution Buffer) silikapylvääseen joka on esilämmitetty 65 °C.
 30. Anna seisoa huoneenlämmössä 3-5 minuuttia.
- Huomitoitavaa:** DNA:n saanti saattaa kasvaa, jos silikapylvästä inkuboidaan 65 °C eluointivaiheessa.
31. Sentrifugoi näytettä 10 000 x g 1 minuutti DNA:n eluoimiseksi.
 32. Toista kohdat 29-31 toista eluointia varten.
 33. Säilytä eristetty DNA -20 °C

2 DNA:N KONSENTRAATION JA PUHTAUDEN MÄÄRITYS

Tässä kappaleessa arvioidaan edellisessä työvaiheessa eristetyn DNA:n konsentraatiota ja puhtautta Genequant-laitteella.

2.1. Materiaalit

- Mitattava DNA-näyte
- UHP-vesi
- 1.5ml:n mikroputket, pipetinkärjet
- Genequant pro-analysaattori

2.2. Mittaus

1. Sekoita edellisessä työvaiheessa eristetty genominen DNA. Laimenna genominen DNA 1:5 UHP-veteen ja sekoita laimennos. Näytelaimennosta mittaukseen tarvitaan vähintään 100 µl.
2. DNA-pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen
 1. Käynnistä laite ja odota sen lämpenemistä.
 2. Valitse **DNA**-painike.
 3. Tarkista kyvetin puhtaus ulkopinnoiltaan. Puhdista kyvetti tarvittaessa linssipaperilla.
 4. Pipetoi kyvettiin 80 µl vertailunäytettä ja tarkista, että valotielle ei jää ilmakuplia (vertailunäytteenä käytetään UHP-vettä).
 5. Laita kyvetti laitteeseen ja paina **SET REF** ja odota, että laite nollautuu.
 6. Poista nollanäyte pipetoimalla kyvetistä ja pipetoi kyvettiin eristämäsi DNA. Tarkista että valotielle ei jää ilmakuplia. Laita kyvetti laitteeseen samoin päin kuin nollanäyte. Paina **ENTER** tai **DNA**. Ota mittauslukemat muistiin, erityisesti 260/280-absorbanssi-suhde.
 7. Jos jatkat mittauksia, poista näyte kyvetistä pipetoimalla ja mittaa seuraava näyte. Lopeta mittaukset painamalla **STOP** ja huuhto kyvetti viimeisen mittauksen jälkeen UHP-vedellä.

Mitattu konsentraatio (ng/μl):	Kokonaiskonsentraatio (ng/μl) (mitattu konsentraatio*laimennoskerroin):
--------------------------------	---

3 DNA:N KVANTITOINTI qPCR-LAITTEELLA

3.1. Materiaalit

- Standardisuoran DNA-templaatti: *E. colin* eristetty genominen DNA, opettaja ilmoittaa konsentraation _____ ng/μl
- Tuntemattoman näytteen DNA-templaatti: *E. coli* jonka mitattu konsentraatio on _____ ng/μl
- A Luke 1
- A Luke 2
- PowerUp SYBR® Green mastermix
- dH₂O
- 1.5ml mikroputkia
- Suodatinkärkiä
- Kuoppalevyt
- Kopiolukulaskuri esim. ThermoFisher DNA Copy Number and Dilution Calculator
- StepOnePlus™ Real-Time PCR-analysaattori

3.2. Reaktioseoksen valmistus

Ota reaktioseosta valmistettaessa huomioon ajon kaikkien näytteiden lukumäärä. Reaktioseokseen pipetoidaan kaikki qPCR-ajoon tulevat tuntemattomat näytteet, standardit, negatiiviset kontrollit ja niiden replikaatit. Kerro yhteen reaktioon tulevat tilavuudet ajoon tulevien näytteiden kokonaismäärällä ja ota huomioon kahden näytteen pipetointivara. Alla olevan taulukon mukaan pysyt valmistamaan tarvittavan määrän reaktioseosta.

	Pipetoitava tila- vuus/reaktio	Reaktioseoksen tila- vuus (* näytettä)
dH ₂ O	7 µl	
aluke 1 10 µM	1 µl	
aluke 2 10 µM	1 µl	
2x PowerUp SYBR® Green mastermix	10 µl	
Lopputilavuus	19 µl	

3.3. Standardikuvaaja, tuntematon näyte ja negatiiviset kontrollit

Standardikuvaajan valmistamiseen tarvitset tunnettua DNA:ta, jonka pitoisuus on ilmoitettu. Tarkoituksena on luoda standardikuvaaja, jossa tunnettu standardi-DNA laimennetaan kymmenenker-
taisina laimennoksina. Laimennossarjan suurinta standardia varten halutaan tietty genomikopiolu-
kumäärä, esimerkiksi miljoona kopiota. Pipetointimäärät voidaan määrittää kopiolutaskurilla
(Thermo Fisher DNA Copy Number and Dilution Calculator). Kopiolutaskuriin tarvitset näytteen
ilmoitetun konsentraation, halutun kopiolutumäärän ja halutun lopputilavuuden, esimerkiksi 50 µl.

Ilmoitettu konsentraatio _____ ng/µl

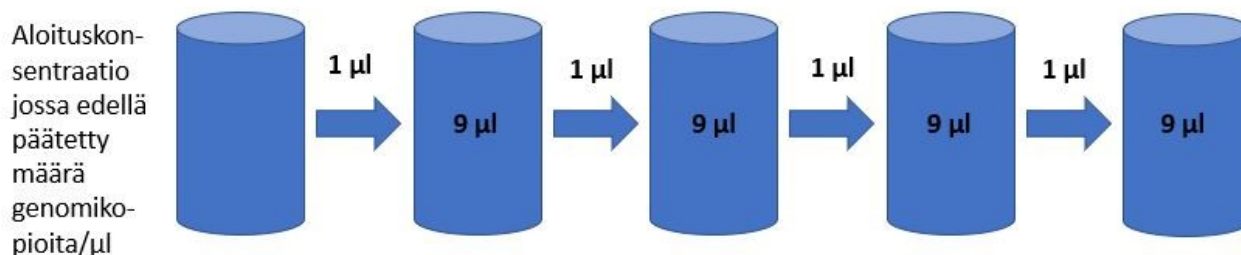
Haluttu konsentraatio _____ genomikopiota/µl (esimerkiksi 1 000 000 genomikopiota.)

Pipetoitava määrä DNA:ta	µl
UHP vesi	µl
Lopputilavuus	µl

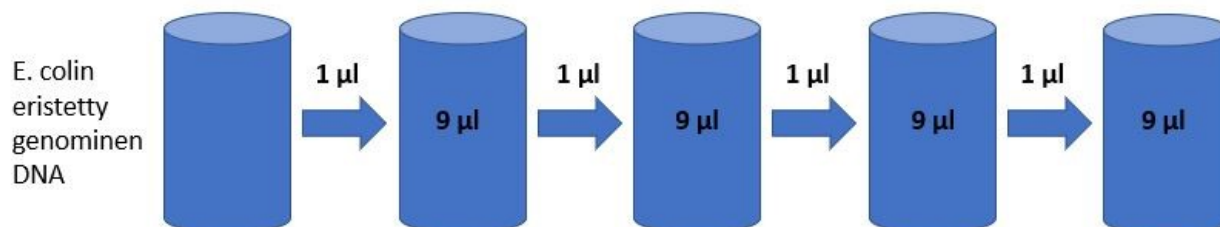
Standardikuvaaja tehdään, jotta analysoitsija voi verrata tuntemattomien näytteiden monistuneita
tuotteita johonkin tunnettuun arvoon. Ajossa täytyy olla negatiiviset kontrollit, joilla voidaan var-
mistaa, että reaktioseos ei ole kontaminoitunut vieraalla DNA:lla.

Seuraavaksi valmista viiden pisteen laimennossarja standardikuvaajalle ja tuntemattomalle näytteelle. Sarjalaimennosta tehtäessä otetaan laimennettava liuos aina sarjan edellisestä näytteestä, näin vältty pienten määrien pipetoimiselta ja pipetoinnista johtuvat virheet vähenevät.

Standardikuvaajan laimennussarja 1:10



Tuntemattoman näytteen laimennussarja 1:10



Reaktioon on lisättävä negatiivisia kontrolleja, jotta voidaan varmistua, etteivät alukkeet, vesi tai SYBR Green ole kontaminoituneet vieraalla DNA:lla. Suositellaan ainakin kolmea negatiivista kontrollia.

Standardikuvaajaa varten valmistetaan viiden pisteen standardisuora. Standardisuoran jokaisesta pisteestä tehdään kolme replikaattia.

Tässä työssä tuntemattomasta näytteestä on tehty viisi laimennosta. Jokaisesta laimennoksesta tehdään kolme replikaattia reaktioon. Tarvittaessa tuntemattomista näytteistä ei tehdä replikaatteja,

koska yhdelle kuoppalevyllä mahtuu 96 näytettä. Näytteet pipetoidaan kuoppalevyllä oleviin näytekaivoihin siinä järjestyksessä kuin ne on tietokoneohjelmaan syötetty. Näytteiden pipetoinnin jälkeen kuoppalevy suljetaan sille tarkoitetuilla kansilla.

- Valmista ajoon vähintään 3 negatiivista kontrollia, joihin on pipetoitu **19 µl** edellä valmistettua reaktioseosta ja täytä **20 µl**:aan UHP-vedellä.
- Pipetoi standardikuvaajan näytekaivoihin **19 µl** reaktioseosta ja **1 µl** templaattia, jossa on haluttu kopiokopiolukumäärä laimennossarjasta. Huomioi että jokaisesta laimennoksesta tulee kolme replikaattia.
- Pipetoi tuntemattoman näytteen näytekaivoihin **19 µl** reaktioseosta ja **1 µl** eristettyä DNA:ta laimennussarjasta. Huomioi että jokaisesta laimennoksesta tulee kolme replikaattia.
- Mittaus suoritetaan StepOnePlus™ Real-Time PCR-analysaattorin ohjekirjan mukaan.

3.4. qPCR-analyysi

Ajon aikana monistussyklejä voi seurata PCR-laitteen näytöltä. Tulokset ovat nähtävissä ajon jälkeen PCR-ohjelmistosta tietokoneelta. Tuloksista löytyvät kuvaajat monistuneista PCR-tuotteista, standardikuvaaja ja sulamiskäyräanalyysi. Jos määrittäminen on onnistunut, eikä ajossa ole muodostunut epäspesifistä monistumista, kaikki näytteen laimennokset osuvat johonkin kohtaan standardisuoralle. Tästä voidaan tarkastella eri laimennosten genomikopiokopiolukumäärä. Opiskelijat voivat itse valita mitä laimennosta he työssään käyttävät. Tulokset analysoidaan erillisen ohjeen mukaan.

Ajo on onnistunut, jos monistuminen on tapahtunut oikeilla sykleillä (8-35) ja monistuminen on eksponentiaalista. Pyritään välttämään, että PCR-reaktio ei ala liian aikaisin, eikä liian myöhään. Negatiivisissa kontroleissa ei saa olla monistumista. Sulamiskäyräanalyysin avulla voidaan tarkastella, onko reaktiossa syntynyt alukedimeerejä tai tapahtunut jotakin muuta epäspesifistä monistumista. Sulamiskäyrien tulisi olla yhtenevät.