



Reaaliaikaisen PCR-menetelmän ja isotermaalisen LAMP-monistuksen vertailu HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoittamisessa

Teija Lehtimäki

OPINNÄYTETYÖ
2.12.2019

Kliininen asiantuntija (YAMK)
Bioanalytiikan kehittämisohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikka, Kliininen asiantuntija (YAMK)

LEHTIMÄKI, TEIJA:

Reaaliaikaisen PCR-menetelmän ja isotermaalisen LAMP-monistuksen vertailu HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoittamisessa

Opinnäytetyö 69 sivua, joista liitteitä 2 sivua
Marraskuu 2019

Seinäjoen keskussairaalan patologian laboratoriossa tutkitaan HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation esiintyminen reaaliaikaisella PCR-menetelmällä (qPCR). Reaaliaikainen PCR-menetelmä perustuu kolmivaiheeseen syklimäiseen reaktioon, jossa reaktion eri vaiheet tapahtuvat eri lämpötiloissa. Menetelmä vaatii DNA:n eristämisen ennen PCR-reaktion suorittamista. Viime vuonna markkinoille on tullut LaCAR MDx:n valmistamat isotermaaliset LAMP (Loop mediated isothermal amplification)-monistukseen perustuvat testit kudosantigeenin ja geenimutaation osoittamiseen. LAMP-monistuksessa reaktio tapahtuu isotermaalisissa olosuhteissa eli vakiolämpötilassa eikä lämpötilojen vaihtelua tapahdu. LAMP-monistus on syklimäinen itsestään jatkuva reaktio, jossa käytetään DNA-polymeraasia, jolla on kyky syrjäyttää kaksijuosteisen DNA:n toinen juoste paikoiltaan rakentaen samalla uutta vastinjuostetta syrjäytetyn tilalle.

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, vastaavatko qPCR-menetelmällä ja LAMP-monistuksella saadut tulokset toisiaan HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoittamisessa. Samalla selvitetään, nopeuttavatko LaCAR MDx:n valmistamat testit vastauksen saamista. Tutkimuksen tavoitteena on ottaa uusi menetelmä rutiinikäyttöön HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvien geenimutaation osoittamiseen.

Tutkimuksen mukaan menetelmillä saadut tulokset vastasivat toisiaan HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoittamisessa. LAMP-monistuksella HLA-B27-kudosantigeenin osoittaminen tapahtui 1 tunti 20 minuuttia nopeammin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoittaminen nopeutui 2 tuntia 9 minuuttia.

LAMP-monistus on tutkimuksen mukaan luotettava menetelmä ja sen avulla on mahdollista saada vastaukset nopeammin. LAMP-monistusta ei kuitenkaan oteta tällä hetkellä Seinäjoen keskussairaalan patologian laboratoriossa käyttöön, koska LAMP-monistus sisältää useita käsin tehtäviä vaiheita. Tämä lisää inhimillisten virheiden määrää ja sillä voi olla vaikutusta potilasturvallisuuteen.

Asiasanat: HLA-B27, laktoosi-intoleranssi, reaaliaikainen PCR, LAMP

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Master's Degree Programme in Clinical Expertise and Development

LEHTIMÄKI, TEIJA:

Comparing Real-Time PCR and Isothermal LAMP in Detection of HLA-B27 Tissue Antigen and Gene Mutation Related to Lactose Intolerance

Master's thesis 69 pages, appendices 2 pages
November 2019

Pathology Laboratory of Seinäjoki Central Hospital is testing the presence of the HLA-B27 tissue antigen and gene mutation related to lactose intolerance by real-time PCR (qPCR). LaCAR MDx has released Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assays for the detection of tissue antigen and gene mutation.

The purpose is to determine whether the results obtained by qPCR and LAMP amplification are consistent with the detection of HLA-B27 tissue antigen and gene mutation related to lactose intolerance. At the same time, it will be explored whether tests made by LaCAR MDx will speed up the response. The aim is to introduce a novel method for routine detection of HLA-B27 tissue antigen and gene mutation related to lactose intolerance.

The results obtained by the methods were consistent with the detection of HLA-B27 tissue antigen and a gene mutation related to lactose intolerance. With LAMP amplification, the detection of the HLA-B27 tissue antigen occurred 1h 20 minutes faster and the detection of the gene mutation associated with lactose intolerance accelerated 2h 9 minutes.

LAMP replication is a reliable method and provides faster answers. However, LAMP amplification is not implemented in the Pathology Laboratory of Seinäjoki Central Hospital because it involves several manual steps. In contrast, the real-time PCR method is almost fully automated. Manual steps increase the likelihood of errors and lead to poorer patient safety.

Key words: HLA-B27, lactose intolerance, real-time PCR, LAMP

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	7
2	HLA-B27-KUDOSANTIGEENI	9
	2.1. HLA-järjestelmä.....	9
	2.2. HLA-molekyylit luokka I	10
	2.3. HLA-molekyylit luokka II	12
	2.4. HLA-B27-kudosantigeeni	13
3	LAKTOOSI-INTOLERANSSI	15
	3.1. Laktoosi-intoleranssin genetiikka	15
	3.2. Laktoosi-intoleranssin toteaminen.....	17
4	REAALIAIKAINEN POLYMEERAASIKETJUREAKTIO.....	19
	4.1. Polymeerasiketjureaktio	19
	4.1.1 Polymeerasiketjureaktion periaate.....	19
	4.1.2 PCR-reaktioiden optimointi.....	21
	4.2. Reaaliaikainen PCR.....	22
	4.2.1 Fluoresoivien merkkiaineiden käyttö.....	23
	4.2.2 PCR-reaktion tulosten analysointi.....	24
5	ISOTERMAALINEN LAMP-MONISTUS	27
	5.1. LAMP-monistuksen periaate	27
	5.2. LAMP-monistuksen optimointi.....	30
	5.3. LAMP-menetelmällä monistetun tuotteen tunnistaminen	30
6	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSKYSYMYKSET	32
7	TUTKIMUSMENETELMÄT	33
	7.1. Tutkimusaineisto	33
	7.2. DNA:n eristys qPCR-menetelmää varten.....	34
	7.3. HLA-B27 qPCR.....	35
	7.4. Laktoosi qPCR	39
	7.5. HLA-B27 LAMP	43
	7.6. Laktoosi LAMP	45
	7.7. Menetelmien suorittamiseen kuluneen ajan mittaaminen.....	48
8	TULOKSET	49
	8.1. Menetelmillä saatujen tulosten vastaavuus.....	49
	8.1.1 HLA-B27 qPCR	50
	8.1.2 Laktoosi qPCR.....	51
	8.1.3 HLA-B27 LAMP	52
	8.1.4 Laktoosi LAMP	53
	8.2. Menetelmien suorittamiseen kuluneen ajan vertailu.....	54

9 POHDINTA	57
9.1. Tulosten tarkastelu	57
9.2. Luotettavuus	60
9.3. Eettisyys	62
9.4. Oma oppiminen	63
9.5. Johtopäätökset	63
LÄHTEET	64
LIITTEET	68
Liite 1. HLA-B27-kudosantigeenin osoittamisen tulokset	68
Liite 2. Laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisen tulokset. .	69

LYHENTEET JA TERMIT

A	Adeniini
C	Sytosiini
dNTP	Deoksiribonukleosiditriposfaatti
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
G	Guaniini
HLA	Human leucocyte antigen
LAMP	Loop mediated isothermal amplification
<i>LCT</i>	Laktaasigeeni
LPH	Laktaasi-floritsiini hydrolaasi
MCM6	Minichromosome maintenance complex component 6
MHC	Major histocompatibility complex
PCR	Polymeraasiketjureaktio
Ppm	Parts per million
SNP	Single nucleotide polymorphism
T	Tymiini
qPCR	Reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio

1 JOHDANTO

HLA (Human leucocyte antigen) on ihmisen kudostyyppiantigeenijärjestelmä, jota kutsutaan myös MHC (Major histocompatibility complex)-järjestelmäksi. Se on tärkeä osa ihmisen immuunipuolustusjärjestelmää. (Merenmies & Partanen 2011.) HLA-B27-kudosantigeeni on luokan I MHC-molekyyli ja HLA-B27 on vahvasti yhteydessä erilaisiin reumaattisiin sairauksiin, kuten esimerkiksi selkärankareumaan, Reiterin syndroomaan (reaktiivinen artriitti eli niveltulehdus), uveittiin (silmätulehdus) ja tulehduksellisiin suolistosairauksiin. HLA-B27 esiintyy 90-95% selkärankareumapotilaista ja sitä esiintyy myös potilailla, joilla on todettu reaktiivinen artriitti. (Seip, Erali, Wies & Wittwer 2005, 10; Smith, Laurie, Potter & McGettigan 2014, 4.)

Laktoosi-intoleranssi eli maitosokerin sietohäiriö on sairaus, joka aiheutuu maitosokerin eli laktoosin imeytymishäiriöstä (Duodecim Terveyskirjasto, 2018). Se on perinnöllinen oireyhtymä, jossa laktoosia sisältävät ruoka-aineet aiheuttavat erilaisia ruoansulatuskanavan oireita. Laktoosi on disakkaridi, jota esiintyy runsaasti nisäkkäiden maidossa. Laktoosi hajotetaan suolessa ruoansulatusentsyymi laktaasin avulla imeytyviksi sokereiksi, glukoosiksi ja galaktoosiksi. Suurimmalla osalla imeväisikäisistä suolen laktaasiaktiivisuus on suurin perinataalisen jakson aikana. Osalla ihmisistä laktaasientsyymien muodostuminen heikentyy tai loppuu kokonaan 2-12 ikävuoden jälkeen (hypolaktasia), kun taas osalla laktaasiaktiivisuus säilyy aikuisikään saakka. Laktaasiaktiivisuuden heikentyminen aiheuttaa laktoosin imeytymishäiriöitä, jotka ovat toisinaan oireettomia. Laktoosi-intoleranssi kuitenkin diagnosoidaan, kun henkilöllä esiintyy erilaisia oireita. (Mattar, de Campos Mazo & Carrilho 2012, 113.) Oireet ovat vatsan turvotus, ilmavaivat, löysät ulosteet ja vatsakivut. Oireiden syy on laktoosin kulkeutuminen ohutsuolet paksusuoleen. Paksusuoleessa bakteerit käyttävät laktoosia ravinnokseen, jolloin syntyy kaasuja ja suolessa tapahtuva ulosteen kiinteytyminen häiriintyy. (Mustajoki 2017.)

Seinäjoen keskussairaalassa patologian laboratoriossa tehdään tällä hetkellä laktoosi-intoleranssin osoittamiseen liittyvä testi B-LAKT-D ja mahdollisesti erilaisiin artropatioihin (nivelsairauksiin) liittyvä testi Ly-HLAB27 reaaliaikaisella PCR (qPCR)-menetelmällä. Markkinoille on tullut LaCAR MDx:n valmistamat isotermaaliset LAMP (Loop mediated isothermal amplification)-monistukseen perustuvat geenitestit niin HLA-B27-kudosantigeenin kuin laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoittamiseenkin.

Reaaliaikainen PCR-menetelmä perustuu kolmivaiheeseen syklimäiseen reaktioon, jossa reaktion eri vaiheet tapahtuvat eri lämpötiloissa. Menetelmä vaatii DNA:n eristämisen ennen PCR-reaktion suorittamista. LAMP-monistuksessa reaktio tapahtuu isotermaalisissa olosuhteissa eli vakiolämpötilassa eikä lämpötilojen vaihtelua tapahdu. LAMP-monistus on syklimäinen itsestään jatkuva reaktio, jossa käytetään DNA-polymeraasientsyymiä, jolla on kyky syrjäyttää kaksijuosteisen DNA:n toinen juoste paikoiltaan rakentaen samalla uutta vastinjuostetta syrjäytetyn tilalle.

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, vastaavatko qPCR-menetelmällä ja LAMP-monistuksella saadut tulokset toisiaan HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoittamisessa. Samalla selvitetään, onko LAMP-monistukseen perustuvat testit nopeampi suorittaa HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvien geenimutaatioiden osoittamisessa kuin reaaliaikainen PCR-menetelmä. Tutkimuksen tavoitteena on ottaa uusi menetelmä rutiinikäyttöön HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvien geenimutaation osoittamiseen.

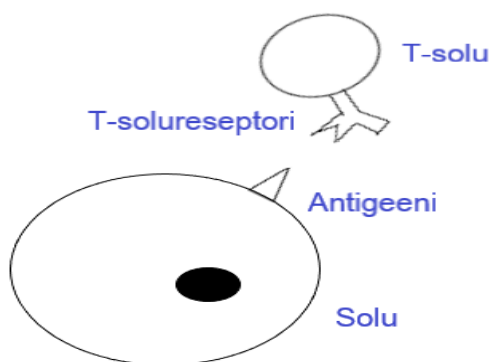
2 HLA-B27-KUDOSANTIGEENI

2.1. HLA-järjestelmä

HLA-järjestelmän tärkein tehtävä on esitellä solun sisällä olevista omista tai vieraista patogeeneistä peräisin olevia peptidejä solun pinnalla immuunijärjestelmän T-soluille. HLA-järjestelmä vaikuttaa myös solujen ja vasta-ainevälitteisen immuuniteetin koordinoinnissa. HLA-geeneiksi kutsutaan ihmisen kudossopeutuvuutta määrääviä geenejä. HLA-järjestelmällä on rooli myös elinsiirroissa, niin hemato- poieettisissä kantasolusiirroissa kuin kiinteissä elimissäkin, esimerkiksi munuais- siirroissa. HLA-järjestelmä on osallisena myöskin verensiirroissa esiintyvissä ongelmissa. (Merenmies & Partanen 2011; Taneja, Mangalam & David 2014, 365; Deshpande 2017, 77.)

HLA-järjestelmän geenit sijaitsevat ihmisen kromosomissa 6 ja järjestelmä on pi- tuudeltaan 3500 kiloemästä. Ihmisen HLA-geenialue käsittää yli 200 geeniä, joista vain noin 40 geeniä koodittaa HLA-molekyylejä. (Merenmies & Partanen 2011; Taneja ym. 2014, 365; Deshpande 2017, 77.)

HLA-molekyylit ovat solun pinnalla esiintyviä integraalisia glykoproteiineja. Solun ulkopuolella esiintyvässä osassa on uloinpana uurremainen rakenne, jolla on kyky sitoa peptidejä. Se pystyy sitomaan pienen peptidifragmentin, joka muodos- tuu isojen valkuaisainemolekyylien pilkkoutumisen yhteydessä. Sitoutuva peptidi voi olla peräisin patogeenistä, jolloin immuunivaste syntyy. Se voi olla myös läh- töisin solun omista valkuaisainemolekyyleistä, jolloin immuunivastetta ei yleensä synny. Toisinaan se voi olla immuunivasteen herättävä solulle vieras partikkeli. (Merenmies & Partanen 2011; Deshpande 2017.) Antigeenin esittely T-soluille kuvataan kuviossa 1.



KUVIO 1. Antigeenin esittely T-soluille

Ihmisen HLA-molekyylit jaetaan pääsääntöisesti kahteen pääryhmään, jotka ovat luokat I ja II. Luokan III HLA-geenit eivät ole varsinaisia HLA-geenejä, vaikka useat luokan III geenit toiminnaltaan vaikuttavat immuunivasteeseen tai osallistuvat solujen väliseen viestintään. (Merenmies & Partanen 2011; Deshpande 2017.)

HLA-järjestelmän geeneillä on monia mahdollisia muotoja, joiden avulla ihmisen immuunijärjestelmä voi reagoida moniin taudinaiheuttajiin. Joillakin HLA-järjestelmän geeneillä on satoja tunnistettuja muotoja eli alleeleja ja ne ovat nimetty numeroilla. (U.S. National Library of Medicine; Merenmies & Partanen 2011.) Monet HLA-molekyylit vaikuttavat taistelussa taudinaiheuttajia vastaan, mutta ne voivat olla myös mukana autoimmuunisairauksien syntymisessä. Suurin osa autoimmuunisairauksista ovat yhteydessä luokan II HLA-alleeleihin. Kuitenkin luokan I HLA-B27 on yhteydessä erilaisiin reumaattisiin sairauksiin. (Taneja ym. 2014, 366.)

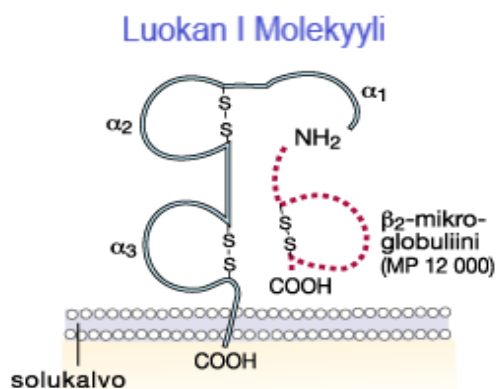
2.2. HLA-molekyylit luokka I

HLA-luokan I molekyylejä ovat etenkin HLA-A, HLA-B ja HLA-C. Ne pystyvät sitomaan itseensä 8-10 aminohapon pituisia solun sisällä muodostuneita peptidejä. Peptidit voivat olla lähtöisin solun omista proteiineista tai ne ovat solun infektoineen patogeenin tuottamia. Patogeeninä ovat tässä tapauksessa muun muassa bakteerit tai virukset. CD8-positiiviset sytotoksiset T-solut aktivoituvat ja tuhoavat

solun, kun se tunnistaa solun pinnalla luokan I HLA-molekyylin ja siihen sitoutuneen peptidin elimistölle vieraaksi. Solujen esitellessä elimistön omista soluista lähtöisin olevia peptidejä immuunivastetta ei muodostu. Luokan I HLA-molekyylejä esiintyy lähes kaikissa tumallisissa soluissa, joten voidaan ajatella, että elimistö tarkkailee näin jatkuvasti omien solujensa tilaa. (Merenmies & Partanen 2011.)

Luokan I HLA-molekyylit ovat heterodimeerisiä, joten ne muodostuvat kahdesta rakenteeltaan erilaisesta osasta. Luokan I HLA-geenit koodaavat HLA-molekyylin niin sanottua raskasta α -ketjua. Tämä ketju muodostaa molekyylin varsinaisen rakenteen ja sen koko on 44 kD (kilodalton). Se voidaan jakaa toiminnaltaan ja rakenteeltaan viiteen toisistaan poikkeavaan lohkokoon eli domeeniin. Uloimpana sijaitsevat domeenit α -1 ja α -2. Ne muodostavat antigeenistä peptidiä sitovan uurrerakenteen, joka on olennainen osa molekyylin toimintaa. Kaksi samansuuntaista α -helikaalista rakennetta muodostavat uurteen seinät ja lattiana toimii β -laskostettu rakenne. (Merenmies & Partanen 2011.)

Molekyylin toinen osa on kevytketju β 2-mikroglobuliini, joka on kooltaan pienempi polypeptidi. Sitä koodaava geeni sijaitsee kromosomissa 15, joka sijaitsee HLA-alueen ulkopuolella. T-lymfosyyttien antigeenireseptori tunnistaa tämän solun ulkopuolella sijaitsevan HLA-peptidiyhdistelmän ja aiheuttaa mahdollisen immuunivasteen. Yksi immunoglobuliinin kaltainen domeeni sijaitsee uurteen ja solukalvon läpäisevän domeenin välissä rakenteellisena välikappaleena. Se on molekyylin viides lohko ja muodostaa molekyylin sytoplasmisen hännän. HLA-geeni-alueella esiintyy noin 20 luokan I geenejä. Tärkeitä immuunivasteen muodostuksessa olevat HLA-geenit ovat HLA-A, HLA-B ja HLA-C. (Merenmies & Partanen 2011.) Luokan I HLA-molekyylin yleisrakenne esitetään kuviossa 2.



KUVIO 2. Luokan I HLA-molekyylin yleisrakenne (Merenmies & Partanen 2011, muokattu)

2.3. HLA-molekyylit luokka II

Luokan II HLA-molekyylejä ovat erityisesti HLA-DR, HLA-DQ ja HLA-DP. Ne sitovat solunsisäisissä rakkuloissa pilkkoutuneita peptidejä, jotka ovat peräisin endosytoosilla tai fagosytoosilla solujen sisälle kulkeutuneista valkuaisainemolekyyleistä. CD4-positiiviset T-lymfosyytit pystyvät tunnistamaan ja sitomaan luokan II HLA-molekyylit ja näihin sitoutuneet peptidit. CD4-positiiviset T-lymfosyytit auttavat aktivoimaan immuunivasteen tunnistessaan peptidin vieraaksi ja saadessaan niin kutsutun sekundaarisen aktivaatiosignaalin. (Merenmies & Partanen 2011.)

Luokan II HLA-molekyylejä esiintyy erityisesti dendriittisoluiissa, makrofageissa ja B-lymfosyyteissä. Nämä solut ovat erikoistuneet immuunivasteen käynnistäjinä ja esittelevät vieraita peptidiantigeneja T-soluille. Dendriittisolut ovat erikoistuneet aktivoimaan T-soluja ja makrofagit ottavat sisään­sä solun ulkopuolelta biomolekyylejä, esimerkiksi bakteereja tai polypeptidejä. B-lymfosyyteillä on kyky ottaa tehokkaasti sisään­sä antigeneja reseptorivälitteisellä endosytoosilla. (Merenmies & Partanen 2011.)

Luokan II HLA-molekyylit poikkeavat luokan I molekyyleistä siten, että ne koostuvat kahdesta samankokoisesta α - ja β -polypeptidistä. Molekyylin rakenne kuitenkin muistuttaa luokan II HLA-molekyylin rakennetta. Keskeinen ero molekyylien välillä on, että luokan II molekyylin uurteen toinen pää on avoin ja se pystyy

näin ollen sitomaan pidempiä peptidejä kuin luokan I molekyylit. (Merenmies & Partanen 2011.)

2.4. HLA-B27-kudosantigeeni

HLA-B27-kudosantigeeni kuuluu luokan I HLA-molekyyleihin. HLA-B27-alleelit altistavat erilaisille tulehduksellisille reumaattisille sairauksille. Usein sairauden puhkeamiseen liittyy jokin infektio, esimerkiksi suolistoinfektio. HLA-B27:n yhteys selkärankareumaan löydettiin tutkimuksessa, joka on tehty 1970-luvulla. Tutkimuksessa todettiin, että selkärankareumaa sairastavista henkilöistä 95 % olivat HLA-B27 positiivisia. (Bowness 2015, 30.) Suomalaisilla ihmisillä kudostyyppi HLA-B27:n esiintyvyys on noin 14% (Mustajoki 2018). HLA-B27-alleeli on yksi yleisimmistä B-alleeleista valkoihoisten populaatioissa (Bowness 2015, 31).

HLA-B27:n alleeleja tunnetaan tällä hetkellä yli 100 ja ne nimetään DNA-sekvenssin mukaan esimerkiksi HLA-B*2701 ja HLA-B*2709. HLA-B27:n alleeli B*2705 on niistä kaikista yleisin alleeli. Alleelit B*2705 ja B*2704 ovat vahvasti yhteydessä selkärankareumaan, mutta alatyypit B*2706 ei ole yhteydessä sairauteen niin selvästi kuin edellä mainitut alatyypit. Alatyypit eroavat toisistaan primaaristen aminohapposekvenssien rakenteiden vuoksi, mutta yhteistä niille on samanlaiset keskeiset rakenteelliset peptidejä sitovat ja antigeeniset piirteet. Valalla oleva, mutta todistamaton uskomus on, että laaja HLA-molekyylien monimuotoisuus johtuu infektioiden aiheuttamasta tarpeesta. (Bowness 2015, 31, 35.)

HLA-B27 on tärkein vaikuttaja selkärankareuman puhkeamiseen. Sen patogeenettistä roolia sairauden puhkeamisessa ei ole kuitenkaan vielä pystytty pitävästi todistamaan. Erilaisia hypoteeseja on esitetty siihen, miten HLA-B27 on vaikuttamassa selkärankareumaan puhkeamisessa. HLA-B27 voi aiheuttaa selkärankareuman esittelemällä artritogeenisiä peptidejä T-soluille. B27 voi asettua väärin solulimakalvostolle solun sisällä laukaisten stressitilan tai autofagisen reaktion, joka voi johtaa interleukiini-23:n tuotantoon. Kolmannessa vaihtoehdossa HLA-B27:n poikkeavien raskasketjumuotoja esitellään solun pinnalla ainakin selkärankareumapotilaiden monosyyttien pinnassa. (Bowness 2015, 42.)

HLA-B27-kudosantigeenin tunnistus voidaan suorittaa kliinisissä laboratorioissa serologisilla ja PCR-pohjaisilla menetelmillä. Serologisia menetelmiä ovat virtausytometria ja MLCT (The micro-lympho-cytotoxicity)-testi. Molemmat testit perustuvat solukalvolla esiintyvien antigeenien havaitsemiseen vasta-aineiden avulla. Virtausytometria vaatii kalliita reagensseja, monimutkaisia laitteita ja siihen erikoistuneita työntekijöitä. MLCT haittoina on vaatimus elävistä soluista, HLA antigeenien ristireaktiivisuus, spesifisen ja kaikki HLA-B*27 alleelit kattavan antiseerumin huono saatavuus sekä menetelmään ja vastaamiseen erikoistuneen henkilökunnan puute. (Parasannanavar, Rajadhyaksha & Ghosh 2013.)

Monet laboratoriot käyttävät nykyään HLA-B27 kudosantigeenin tunnistukseen erilaisia PCR-menetelmiä. Menetelmät perustuvat HLA-B27-spesifisen DNA-sekvenssin havaitsemiseen B27-alleelin tunnistamiseksi. Konventionaalisia (tavanomaisia) menetelmiä ovat PCR sekvenssispesifisellä alukkeella (PCR-SSP), PCR sekvenssispesifisellä oligonukleotidihybridisaatiolla (PCR-SSO) ja sekvenssipohjainen tyypitys (SBT)-menetelmä. PCR-reaktio sekvenssispesifisellä alukkeella on näistä yleisimmin käytetty menetelmä. Muita menetelmiä käytetään, jos tarvitaan lisätietoa eri alleleista tai ensimmäinen menetelmä antaa epäselvän tuloksen. (Kim ym. 2011, 1912.)

Reaaliaikainen PCR-menetelmä on nopeampi ja tehokkaampi menetelmä kuin konventionaaliset PCR-tekniikat. HLA-B27-kudosantigeenin osoittamiseen on esitetty erilaisia testausprotokollia ja koetinmalleja, joita ovat esimerkiksi SYBR Green I-väriaine, TaqMan-koettimet tai FRET (Fluorescence resonance energy transfer)-koettimet. SYBR Green I-väriaineen ja sulamiskäyräanalyysin käyttäminen on yksinkertainen ja erittäin luotettava tapa HLA-B27-kudosantigeenin osoittamiseen. QPCR-menetelmässä ei tehdä erikseen PCR-reaktion jälkeistä analyysivaihetta, joten DNA:n kontaminaatoriski on hyvin pieni. (Kim ym. 2011, 1912-1913.)

3 LAKTOOSI-INTOLERANSSI

Suurimmalla osalla ihmisistä on syntyessään kyky pilkkoa laktoosia, joka on merkittävin maidossa esiintyvä hiilihydraatti. Maito onkin pääasiallinen ravinto vastasyntyneille. Noin 75 % maapallon väestöstä kuitenkin menettää kyvyn laktoosin pilkkomiseen jossain vaiheessa elämäänsä, kun taas joillakin kyky säilyy koko elämän ajan. (Mattar, de Campos Mazo & Carrilho 2012, 113.) Laktoosi-intoleranssi on yksi yleisimmistä tiloista, jossa elimistö ei siedä jotain ruoka-ainetta. Suurimmalla osalla ihmisistä laktoosi-intoleranssi johtuu alhaisesta laktaasiaktiivisuudesta (Muendlein ym. 2019, 2379.)

Beeta-D-galaktosidaasi laktaasi eli laktaasi-floritsiini hydrolaasi (LPH) on ruoansulatusentsyymi, jota muodostuu ohutsuolen suolinukan villusten enterosyyteissä (Mattar ym. 2012, 113). Sen avulla laktoosi pilkkoutuu suolistossa imeytävään muotoon. Laktoosi-intoleranssissa laktoosi ei kuitenkaan pilkkoudu suolistossa ja tästä johtuvat oireet ilmaantuvat maitotuotteiden nauttimisen jälkeen 1-3 tunnin kuluttua. (Mustajoki 2017.) Primäärinen hypolaktasia tulee kuitenkin erottaa sekundäärisistä syistä laktoosin imeytymisessä. Näitä syitä voivat olla keiliakia, infektoiva enteriitti (ruoansulatuskanavan tulehdus) tai Chrohnin tauti. Primäärinen hypolaktasia tulee erottaa myös synnynnäisestä laktaasinpuutteesta, joka on harvinainen autosomaalisesti (sukupuolesta riippumaton) periytyvä sairaus, joka vaikuttaa vauvoihin syntymästä saakka (Mattar ym. 2012, 113.)

3.1. Laktoosi-intoleranssin genetiikka

Geneettiset tutkimukset ovat osoittaneet, että syntyperäisillä eurooppalaisilla laktoosi-intoleranssiin liittyy laktaasigeenin läheisyydessä löydetty pistemutaatio (single nucleotide polymorphism, SNP) -13910C>T. Mutaatio sijaitsee -13910 emäsparin päässä laktaasientsyymiä (LPH) tuottavasta laktaasigeenistä (*LCT*), joka on 49,3 kiloemästä pitkä ja sijaitsee kromosomissa 2 paikassa 21-22. Mutaatioalue on *LCT*-geenin promoottorialueella ja se sijaitsee MCM6 (minichromo-

some maintenance complex component 6) geenin intronin 13 alueella. Pistemuutaatiossa mutaatio tapahtuu DNA-ketjun yhdessä emäsparissa, jossa sytosiini (C) muuttuu tymiiniksi (T). Genotyyppi -13910CC on osoitettu liittyvän laktoosi-intoleranssiin. Genotyypit -13910CT ja -13910TT tuottavat laktaasientsyymiä ja sietävät täten laktoosia. (Bodlaj ym. 2006; Muendlein 2019, 2380.)

Enattah ym. (2002) löysivät ensimmäisenä laktoosin sietokykyyn liittyvät variantit (muunnos) tutkimalla suomalaisia perheitä, joiden jäsenissä esiintyi hypolaktasiaa. Tutkimuksessa selvisi, että DNA variantit -13910C>T ja -22018G>A ovat yhteydessä laktoosin sietoon suomalaisille perheillä. Variantti -13910C>T sijaitsee noin 13910 emäsparin päässä laktoosigeenin (*LCT*) aloituskodonista ja sen todettiin olevan täydellisesti yhteydessä laktoosin sietokykyyn. Variantti -22018G>A sijaitsee 22018 emäsparin päässä ja on yhteydessä laktoosin sietoon vahvasti, mutta ei täydellisesti.

Laktaasiaktiivisuuden erot johtuvat geneettisestä vaihtelusta. Laktoosin sietokykyyn mahdollistaa mutaatio, joka on tulos positiivisesta valinnasta populaatioissa, joissa on pitkä historia karjanhoidosta ja maidon tuotannossa ja käytössä. Suurin osa maapallon väestöstä ei siedä laktoosia. Poikkeuksena on kuitenkin Euroopassa skandinaavinen väestö, jossa yli 90% aikuisista sietää laktoosia. Laktoosin sietokyky vähenee, kun maantieteellisesti liikutaan pohjoisesta etelään ja itään. Espanjassa ja Italiassa 50% väestöstä sietää laktoosia. Laktoosin sieto on kuitenkin suurta myös nomadeilla eli paimentolaisilla Afro-Arabian alueella, esimerkiksi tutseilla 90%. Aasian maissa laktoosin sieto on erittäin harvinaista. Kiinassa väestöstä 1% sietää laktoosia. (Dzialansk ym. 2016, 248; Bayless, Brown & Paige 2017, 24-25.) Suomalaisista noin 82% sietää laktoosia, joten 18% suomalaisesta väestöstä kantaa laktoosi-intoleranssin aiheuttavaa geenimuotoa (MUSTAJOKI 2017).

3.2. Laktoosi-intoleranssin toteaminen

Laktoosin imeytymishäiriön toteamista varten on olemassa erilaisia tutkimuksia. Kaikista tarkin eli niin kutsuttu kultainen standardi on suora biokemiallinen menetelmä, jossa ohutsuolesta otetaan biopsianäyte, josta voidaan määrittää laktaasin aktiivisuus. Se on kuitenkin liian aggressiivinen menetelmä lievän sairauden tutkimiseksi. Määrityksen tulokseen voi vaikuttaa myös epäsäännöllinen laktaasiaktiivisuuden esiintyminen ohutsuolen limakalvolla. (Mattar ym. 2012, 116; Domínguez-Jiménez & Fernández-Suárez 2017, 262.)

Laktoosirasituskoe on ei-invasiivinen testi, joka perustuu veren glukoositasojen nousuun. Ennen testiä potilaan tulee paastota ja paaston jälkeen potilaalta mitataan ensimmäisenä verensokerin paastoarvo. Sen jälkeen potilas nauttii 25-50g laktoosiannoksen suun kautta. Nauttimisen jälkeen verensokeri mitataan ennalta määrätyn väliajoin. Yleisimmin väliajat ovat 30, 60 ja 120 minuuttia. On kuitenkin esitetty, että testi voidaan suorittaa 60 minuutin sisällä luotettavan tuloksen saamiseksi. Imeytymishäiriö voidaan todeta, jos verensokerin nousu on alle 1,1 mmol/l, koska laktoosin pilkkoutuessa verensokerin tulee nousta yli tämän arvon. Haittana rasituskokeessa on se, että laktoosin nauttiminen aiheuttaa osalle potilaista epämiellyttäviä laktoosi-intoleranssiin liittyviä oireita. (Mattar ym. 2012, 116; Domínguez-Jiménez & Fernández-Suárez 2017, 262.)

Hengitystesti on laajimmin käytetty ei-invasiivinen menetelmä imeytymishäiriön toteamiseen. Hengitystestissä mitataan uloshengitetystä ilmasta vetypitoisuuksien muutoksia. Hengitystesti perustuu bakteerien aikaansaamaan käymisreaktioon. Pilkkoutumaton laktoosi kulkeutuu imeytymättömänä ohutsuolen kautta ruoansulatuskanavassa paksusuoleen, jossa bakteerit käyttävät sitä ravinnokseen. Tällöin käymisen tuloksena syntyy kaasuja. Pääasiassa kaasut ovat vetyä, metaania ja hiilidioksidia. Vety päättyy verenkierron mukana keuhkoihin ja siten uloshengitysilmaan. Ensimmäinen näytteenotto tapahtuu paaston jälkeen ennen laktoosiannoksen nauttimista. Laktoosin nauttimisen jälkeen näytteiden otto tapahtuu puolen tunnin välein 3-5 tunnin ajan. Imeytymishäiriö todetaan, jos uloshengitysilman vetypitoisuuden nousu on yli 20 ppm (parts per million) lähtöarvosta. Testin sensitiivisyys vaihtelee 80-100% välillä ja spesifisyys 70-100%.

Vaikka testiä käytetäänkin laajasti, testin tulos on riippuvainen bakteeriflooran aktiivisuudesta. Vääriä negatiivisia voi esiintyä esimerkiksi antibioottikuurin jälkeen. (Mattar ym. 2012, 116; Domínguez-Jiménez & Fernández-Suárez 2017, 262.)

Laktoosin sietokykyyn liittyvien genotyyppien löytyminen lisäsi nopeasti geenitestien käyttöä laktoosin imeytymishäiriön osoittamisessa. Menetelmiä ovat muun muassa polymeraasiketjureaktioon perustuvat RFLP (restriction fragment length polymorphism)-analyysi, HRM (high resolution melting)-analyysi, FRET- tai TaqMan-koettimia käyttävä reaaliaikainen PCR ja sekvensointi. Reaaliaikainen PCR on laajimmin käytetty menetelmä, koska tulos saadaan nopeasti, tuloksia on yksinkertaista tulkita ja menetelmän suorittamiseen tarvittavilla laitteilla on laaja ja monipuolinen saatavuus. Hengitystestiin verrattuna geenitesti on yksinkertainen, ei-invasiivinen ja miellyttävämpi tutkimus. Testi ei aiheuta laktoosi-intoleranssiin liittyviä oireita, koska laktoosia ei tarvitse nauttia. Geenitesti tehdään laskimoverestä ja testin tulos on yksiselitteinen ja pysyvä, joten testiä ei tarvitse tehdä uudestaan. Geenitestit eivät kuitenkaan anna tietoa laktoosin sietokykyyn liittyvistä oireista. (Mattar ym. 2012, 117; Muendlein 2019, 2380.)

4 REAALIAIKAINEN POLYMERAASIKETJUREAKTIO

4.1. Polymeraasiketjureaktio

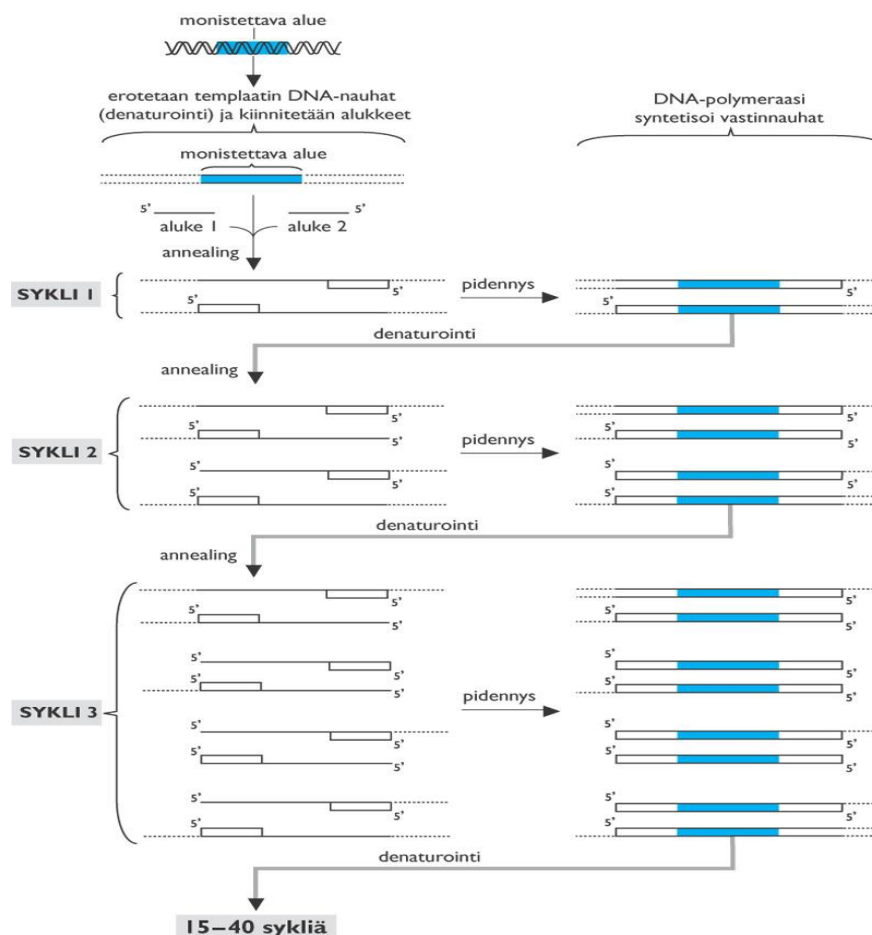
Polymeraasiketjureaktio (polymerase chain reaction eli PCR) on tekniikka, jolla saadaan tuotettua lukuisia kopioita tietyistä DNA:n osista nopeasti ja tarkasti. PCR-menetelmää käytetään hyvin laajasti molekyylibiologiassa ja lääketieteellisessä diagnostiikassa. (Encyclopædia Britannica Online 2018.) PCR-reaktiolla monistetaan sellaisia DNA-jaksoja, jotka sijaitsevat kahden emäsjärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. PCR-reaktiot tapahtuvat yleensä tilavuuksiltaan pienissä mikrosentrifuugiputkissa ja niiden lämpötilaa kontrolloidaan PCR-laitteissa. (Suominen ym. 2010, 153.)

PCR-reaktio vaatii templaatti-DNA:n, joka on usein kaksijuosteinen DNA. Usein riittää, että templaatti-DNA vapautetaan solusta, mutta muun muassa veri sisältää kopiointia häiritseviä ja estäviä tekijöitä. Nämä tekijät saadaan eliminoitua tekemällä erillinen DNA:n eristys. PCR-reaktio vaatii myös kahta lyhyttä ja emäsjärjestykseltään tarkasti tunnettua primeria eli aluketta ja kuumuutta kestävän DNA-polymeraasientsyymin, joka on eristetty esimerkiksi *Thermus aquaticus* –bakteerista. DNA-polymeraasientsyymin rakentaa vastinjuostetta reaktiossa mukana olevista yksittäisistä nukleotideista eli emäksistä. Nukleotidit ovat DNA:ssa esiintyvät adeniini, tyymiini, sytosiini ja guaniini (A, T, C ja G). Reaktiossa tarvitaan reaktiopuskuria, joka sisältää magnesiumioneja. Kaikki nämä komponentit tulee yhdistää reaktioseokseksi. (Suominen ym. 2010, 153-154.)

4.1.1 Polymeraasiketjureaktion periaate

PCR-reaktio tapahtuu sykleissä, joiden vaiheet ovat: denaturaatio – alukkeiden kiinnittyminen – pidennys. Denaturoinnissa reaktioseosta kuumennetaan 95 °C:een, jotta kaksinauhainen templaatti-DNA denaturoituu eli juosteet eroavat toisistaan ja muuttuvat yksijuosteisiksi. Sitten lämpötila lasketaan hetkellisesti noin

55 °C:een, jolloin alukkeet kiinnittyvät yksijuosteiseen templaatti-DNA:han emäs-järjestystään vastaaviin kohtiin. Alukkeet ovat lyhyitä, noin 15-40 emäksen pituisia synteettisiä DNA-fragmentteja, jonka avulla halutun DNA-jakson kopiointi PCR-reaktiossa alkaa. Alukkeet suunnitellaan kiinnittymään kaksinauhaisen DNA:n vastinjuosteisiin monistettavan DNA-alueen vastakkaisiin päihin. Näiden alukkeiden väliin jäävä DNA-jakso on se, mitä halutaan monistaa. Alukkeiden sitoutumista kutsutaan annealing-reaktioksi. Kun alukkeet ovat kiinnittyneet templaattiin, lämpötilaa nostetaan noin 72 °C:seen. Tässä lämpötilassa DNA-polymeeraasientsyymi alkaa liittää reaktioseoksessa vapaana olevia nukleotideja alukkeen 3'-päästä lähtien templaatin mallin mukaan. Tätä vaihetta kutsutaan pidennysreaktioksi (ekstensio, eng. extension). Templaatin kummallekin juosteelle syntyy vastinjuoste alukkeista alkaen. Juosteen pidennyksen jälkeen lämpötilaa nostetaan uudestaan 95 °C:seen, jolloin kaikki juosteet irrotetaan toisistaan ja PCR-sykli alkaa alusta. (Suominen ym. 154-155.) PCR:n periaate on kuvattu kuviossa 3.



KUVIO 3. Polymeeraasiketjureaktion periaate (Suominen ym 2010, 157)

Yhden PCR-syklin tuloksena syntyy kahdesta DNA-juosteesta neljä juostetta, toisessa syklistä neljästä juosteesta syntyy kahdeksan juostetta, kolmannessa syklistä syntyy kahdeksasta juosteesta 16 juostetta. Syklejä toistamalla saadaan hyvin pienestä määrästä templaatti-DNA:ta monistettua tietyltä alueelta suuri määrä tarkalleen tietyn mittaisia DNA-jaksoja. Syklien määrä on yleensä 15-40. (Suominen ym 2010, 154-155.)

Haluttujen monistusreaktioiden ohella on syytä tehdä myös kontrollireaktioita. Negatiivinen kontrolli, jossa ei esiinny lainkaan templaatti-DNA:ta tulisi tehdä jokaisen ajon yhteydessä. Kontrollireaktioiden avulla selviää, toimiiko reaktiot halutulla tavalla. Samalla varmistutaan siitä, ettei ole tapahtunut kontaminaatiota esimerkiksi reagensseissa. Diagnostisissa PCR-menetelmissä on hyvä tehdä negatiivinen ja positiivinen kontrolli. Negatiivisen kontrollin avulla selvitetään mahdollisia epäspesifisiä tuloksia. (Edwards & Logan 2009, 90; Suominen 2010, 156.)

4.1.2 PCR-reaktioiden optimointi

PCR-reaktioiden eri komponenttien optimointi on tärkeää, koska virheiden mahdollisuus on suurta. Reaktiossa käytettävän polymeraasientsyymin määrä riippuu käytössä olevan entsyymistä ja erilaiset templaattit ja alukkeet vaativat erilaisia entsyymimääriä. Entsyymien liiallinen määrä voi johtaa epäspesifiin tuotteisiin ja vähäinen määrä voi aiheuttaa sen, että haluttua tuotetta ei synny tarpeeksi. (Suominen ym. 2010, 162.)

Alukkeiden liiallinen määrä aiheuttaa niiden kiinnittymisen templaatin väärin kohtiin ja epäspesifisten tuotteiden määrää lisääntyy. Liiallinen määrä voi johtaa myös alukedimeerien (primer-dimer) syntymiseen. Tällaisessa tilanteessa monistettava PCR-tuote joutuu kilpailemaan reaktioseoksessa epäspesifisten tuotteiden ja alukedimeerien monistumisen kanssa entsyymistä, alukkeista ja nukleotideista. Tämän vuoksi halutun tuotteen määrä vähenee. Kaikkia nukleotideja tulee olla reaktioseoksessa yhtä paljon. Optimoinnissa kannattaa määrittää pienin

käyttökelpoinen nukleotidien määrä. Näin alukkeet eivät kiinnity väärin kohtiin ja PCR-reaktion spesifisyys paranee. (Suominen ym 2010, 162.)

Magnesiumionien määrä vaikuttaa esimerkiksi alukkeiden kiinnittymiseen, DNA-nauhojen eroamislämpötilaan, entsyymien toimintaan ja tuotteen spesifisyyteen. DNA-polymeraasi vaatii magnesiumioneja sitoutuessaan templaattiin, alukkeisiin ja nukleotideihin. (Edwards & Logan 2010 85-90; Suominen ym. 2010, 162.)

DNA-nauhojen epätäydellinen denaturoituminen on yksi todennäköinen syy PCR-reaktioiden epäonnistumiseen. Siinä tapauksessa tulee miettiä denaturatioajan nostamista, mutta tulee huomioida, että entsyymien aktiivisuus vähenee nopeammin. Alukkeen pituus, pitoisuus ja emäskoostumus vaikuttavat alukkeen kiinnittymislämpötilaan (annealing-lämpötila). Kiinnittymislämpötilat 55-72 °C antavat parhaat tulokset. (Suominen ym. 2010, 163.)

Alukkeiden pidentymiseen eli ekstensioon vaikuttavat templaatti-DNA:n pituus ja määrä. Siihen vaikuttavat myös reaktiossa käytettävä entsyymi ja lämpötila. Ekstentioaika tulee olla riittävän pitkä, jotta entsyymillä on aikaa kopioida koko kohteena olevan DNA:n. Pidemmät ekstensioajat saattavat olla hyödyllisiä reaktion ensimmäisten syklien aikana, koska templaatti-DNA:n määrä on tällöin pienempi. (Suominen ym. 2010, 163.)

4.2. Reaaliaikainen PCR

Perinteisessä PCR-menetelmässä suoritetaan ensin monistus ja sen jälkeen otetaan reaktioseoksesta näyte, joka analysoidaan esimerkiksi agarosigeelielektroforeesilla. Tällä tavoin saadaan selville reaktion onnistuminen. Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä (engl. real-time PCR) syntyvän tuotteen määrää voidaan seurata koko ajan reaktion edetessä tietokoneelta ja erillistä analyysivaihetta reaktion jälkeen ei tarvita. Tällainen reaaliaikainen seuraaminen on mahdollista fluoresoivien merkkiaineiden avulla. PCR-tuotteen määrän reaaliaikainen seuraaminen edellyttää mittaamiseen kykenevää laitetta ja merkkiainetta, jota voi-

daan mitata. Reaaliaikaisen PCR-menetelmän ansiosta koko PCR-prosessi nopeutuu ja kontaminaatoriski pienenee, koska lopputuotetta ei tarvitse erikseen käsitellä ja mitata monistuksen jälkeen. (Suominen ym. 2010, 167.)

4.2.1 Fluoresoivien merkkiaineiden käyttö

Reaaliaikaisessa PCR-menetelmässä erilaiset signaalit saadaan mitattaviksi kahdella erilaisella menetelmällä: fluoresoivilla väreillä tai sekvenssispesifisillä fluoresoivilla koettimilla. Yleisimmin käytössä oleva epäspesifi menetelmä on käyttää kaksinauhaiseen DNA:han sitoutuvia fluoresoivia väriaineita (engl. binding dyes tai intercalating dyes). Fluoresoiva väri sitoutuu suoraan kaksinauhaiseen DNA:han ja sitoutuminen saa aikaan fluoresenssitason voimakkaan nousun. Eniten käytetty fluorofori on asymmetrinen syaniiniväri SYBR Green, koska se on edullinen ja helppokäyttöinen. SYBR Green ei fluoresoi ollessaan vapaana reaktioliuoksessa ja DNA:n ollessa denaturoituneena. Annealing- ja pidennysvaiheessa SYBR Green kiinnittyy muodostuvaan kaksinauhaiseen DNA:han ja fluoresenssi lisääntyy voimakkaasti. (Edwards & Logan 2009, 88; Suominen ym 2010, 167.)

SYBR Green-menetelmän haittana on sen epäspesifisyys, koska väriaine sitoutuu kaikkeen kaksinauhaiseen DNA:han, muun muassa epäspesifisiin tuotteisiin ja alukedimeereihin, eikä siten ainoastaan kohteena olevaan DNA:han. Tämän vuoksi menetelmän optimointi on tärkeää. (Suominen ym. 2010, 167-168.) Reaktion jälkeen suoritettavan sulamiskäyräanalyysin (Melting curve analysis) avulla voidaan kuitenkin erottaa epäspesifit tuotteet halutuista tuotteista (Lee ym. 2009, 25-27; Suominen 2010, 167).

Toisena vaihtoehtona on käyttää fluoresoivalla väriaineella leimattuja koettimia, jotka ovat spesifisiä templaatti-DNA:n sekvenssin suhteen. FRET-menetelmässä käytetään kahta koetinta, jotka ovat lyhyitä emäsjärjestykseltään tunnettuja DNA-pätkiä ja koettimet ovat leimattu eri fluoroforeilla. Menetelmässä toinen fluorofori on niin sanottu luovuttaja (donor) ja toinen vastaanottaja (acceptor). Fluoroforit esiintyvät eri koettimissa ja koettimet on suunniteltu sijoittumaan kohde-DNA:han vierekkäisiin alueisiin. FRET-menetelmässä luovuttajafluoroforin sisältävä koetin

on leimattu fluoresoivalla väriaineella 3'-päästä ja vastaanottajafluoroforin sisältävä koetin vastaavasti toisella fluoroforilla. Fluoroforien tulee asettua koetinten sitoutumisen jälkeen lähelle toisiaan. Fluoroforit tulee valita siten, että luovuttaja fluoresoi aallonpituudella, joka virittää vastaanottajan. (Lee ym. 2009, 28-31; Suominen ym. 2010, 167-168.)

Menetelmässä luovuttava fluorofori viritetään valonlähteellä sille ominaisella aallonpituudella, jolloin se fluoresoi tietyllä aallonpituudellaan. Fluoresenssi saa aikaan vastaanottavan fluoroforin virittymisen, joka puolestaan alkaa fluoresoida. Vastaanottavan fluoroforin tuottama spesifinen signaali mitataan. Energian siirto onnistuu vain, jos koetimet ovat sitoutuneet kohde-DNA:han ja fluoroforit ovat tarpeeksi lähellä toisiaan. Käytetty valonlähde ei saa virittää vastaanottavaa fluoroforia. (Lee ym. 2009, 28-31; Suominen ym. 2010, 167-168.)

Menetelmässä voidaan käyttää myös koetinparia, jossa luovuttajafluoroforin sisältävä koetin on leimattu fluoresoivalla väriaineella 3'-päästä, mutta vastaanottajafluoroforin sisältävä koetin on leimattu sammuttimella (quencher) fluoresoivan väriaineen sijaan. Vaimentimen sijoittuminen luovuttajafluoroforin läheisyyteen estää fluoresenssin esiintymisen. Fluoroforin ja vaimentimen joutuminen erilleen synnyttää fluoresenssin kasvua. Vaimennin voi esiintyä myös samassa koettimessa fluoroforin kanssa. (Lee ym. 2009.)

PCR-laitteessa tulee olla valolähde eksitointia eli virittämistä varten ja detektori säteilevän fluoresenssin (emission) mittaamista varten. Nykyiset PCR-laitteet pystyvät eksitoimaan ja detektoimaan monia erilaisia väriaineita. PCR-laitteen tulee pystyä saavuttamaan määrätyt lämpötilat nopeasti ja tarkasti. (Saunders 2009, 3; Logan & Kirstin 2009, 8 ja 19.)

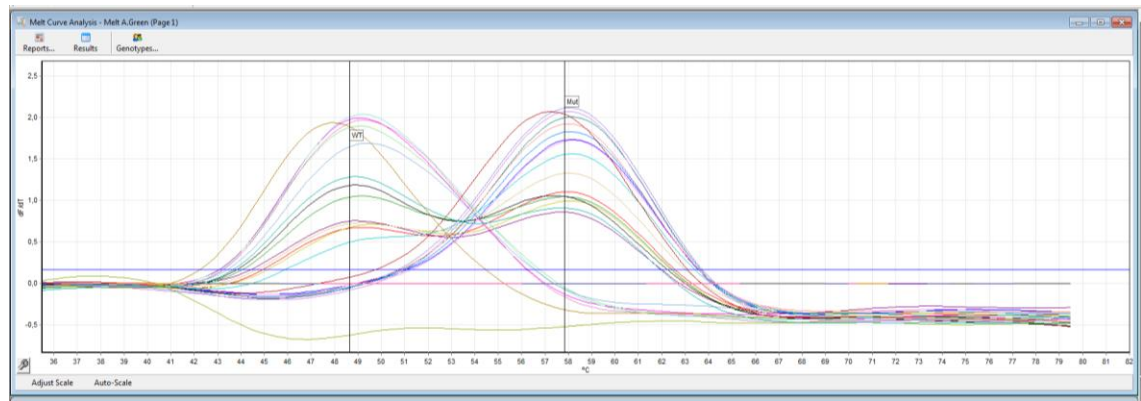
4.2.2 PCR-reaktion tulosten analysointi

Sulamiskäyräanalyysiä käytetään valmistuneen tuotteen identifiointiin varsinaisen PCR-reaktion jälkeen. Sulamiskäyräanalyysissä PCR-laite ohjelmoidaan nostamaan lämpötilaa viimeisen PCR-syklin jälkeen noin 50°C:sta lineaarisesti

aina 90°C:een. Lämpötilan nousun aikana mitataan fluoresenssin määrää säännöllisesti. Fluoresoivaa merkkiainetta käytettäessä merkkiaine kiinnittyy kaksinauhaiseen DNA:han alhaisessa lämpötilassa. Lämpötilan noustessa kaksijuosteinen DNA denaturoituu sille ominaisessa lämpötilassa ja denaturoinnin vuoksi fluoresoiva merkkiaine irtaoo PCR-tuotteesta. Tällöin fluoresenssin määrä väheenee. Lämpötilaa, jossa DNA:n määrästä 50% on denaturoituneena eli yksijuosteisena, kutsutaan PCR-tuotteen sulamislämpötilaksi (T_m). (Kubista ym. 2006, 102-103; Lee ym. 2009, 26-27.)

Fluoresoivalla merkkiaineella leimattuja koettimia eli hybridisaatiokoettimia käytettäessä koettimet kiinnittyvät PCR-tuotteeseen lämpötilan laskettua sulamiskäyräanalyyisin alussa. Lämpötilan noustessa löyhemmin kiinnittyneet koettimet irtaavat PCR-tuotteesta alemmassa lämpötilassa kuin optimaalisesti kiinnittyneet koettimet. Koettimilla, joiden emäsjärjestys vastaa täydellisesti PCR-tuotteen emäsjärjestystä, sulamislämpötila on korkeampi kuin niillä koettimilla, joissa emäspariutumisessa on yksikin poikkeama. Pistemutaatio aiheuttaa yhden emäsparin yhteensopimattomuuden koettimen ja PCR-tuotteen vastinjuosteiden sitoutumisessa toisiinsa. (Lyon, Mao & Swensen 2009; Saunders 2009, 107-108.)

Sulamislämpötilaan vaikuttaa DNA-jakson pituus, rakenne ja DNA-jakson CG-pitoisuus. Sulamislämpötila on sitä korkeampi mitä enemmän DNA-juosteessa esiintyy sytosiinia ja guaniinia. Sulamiskäyrä esitetään muodossa fluoresenssin määrä/lämpötila ja käyrät muutetaan matemaattisesti 1. negatiisen derivaatan (dF/dT) avulla helpommin tulkittavaan muotoon, missä käyrän huippu osoittaa sulamispisteen. Sulamiskäyrien avulla voidaan erottaa toisistaan erilaisten sulamislämpötilojen omaavat kaksijuosteiset DNA:t. (Kubista ym. 2006, 102-103; Lee ym. 2009, 26-27.) Kuvassa 1 esimerkki sulamiskäyristä.



KUVA 1. Reaaliaikaisen PCR-menetelmän sulamiskäyriä

5 ISOTERMAALINEN LAMP-MONISTUS

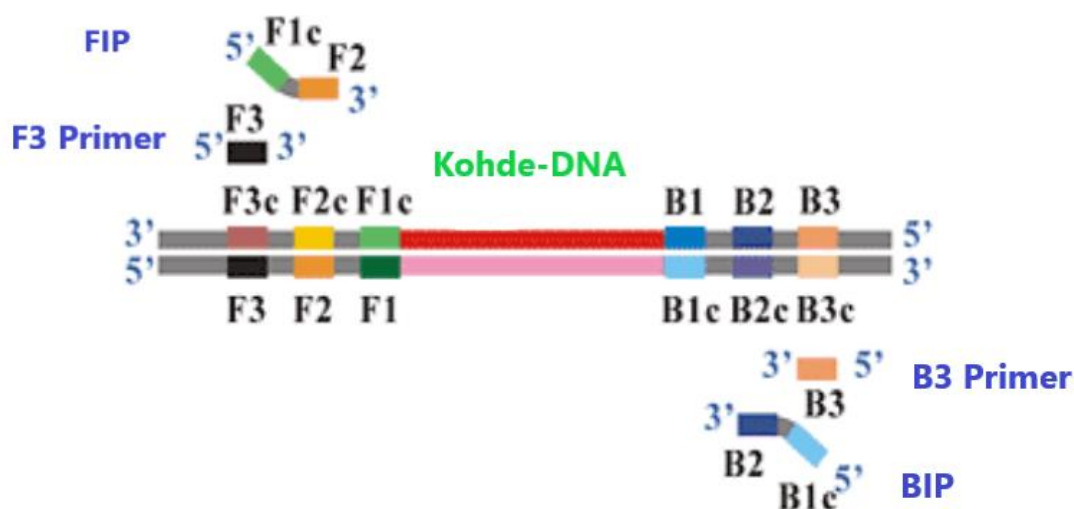
Loop mediated isothermal amplification eli LAMP on suhteellisen uusi menetelmä, joka monistaa nukleiinihappoja tarkasti, tehokkaasti ja nopeasti isotermaalisissa eli tasalämpöisissä olosuhteissa. LAMP -monistus on syklimäinen itsessään jatkuva reaktio, jossa käytetään *Bacillus stearothermophilus* -bakteerista eristettyä DNA-polymeraasia, jolla on kyky syrjäyttää kaksijuosteisen DNA:n toinen juoste paikoiltaan ja samalla rakentaa vastinjuotetta reaktioseoksessa vapaana olevien nukleotidien avulla. LAMP -monistus suoritetaan isotermaalisesti yhdessä lämpötilassa (60-65 °C), joten reaaliaikaisessa PCR -menetelmässä käytettyä lämpötilojen vaihtumiseen perustuvaa syklejä ei menetelmässä suoriteta. LAMP-monistukseen tarvittavien 4-6 alukkeen avulla tunnistetaan 6-8 erilaista sekvenssiä kohde-DNA:sta ja tämän vuoksi menetelmä on hyvin spesifinen. (Notomi ym. 2000; Nagamine ym. 2002.)

5.1. LAMP-monistuksen periaate

Alkuperäisessä LAMP-monistuksessa käytetään neljää erilaista aluketta tunnistamaan kuusi erilaista aluetta kohde-DNA:sta. Sisäiset FIB- ja BIP-alukkeet tunnistavat alueita kaksijuosteisen DNA:n molemmista juosteista. LAMP-monistuksessa käytettävät alukkeet ovat:

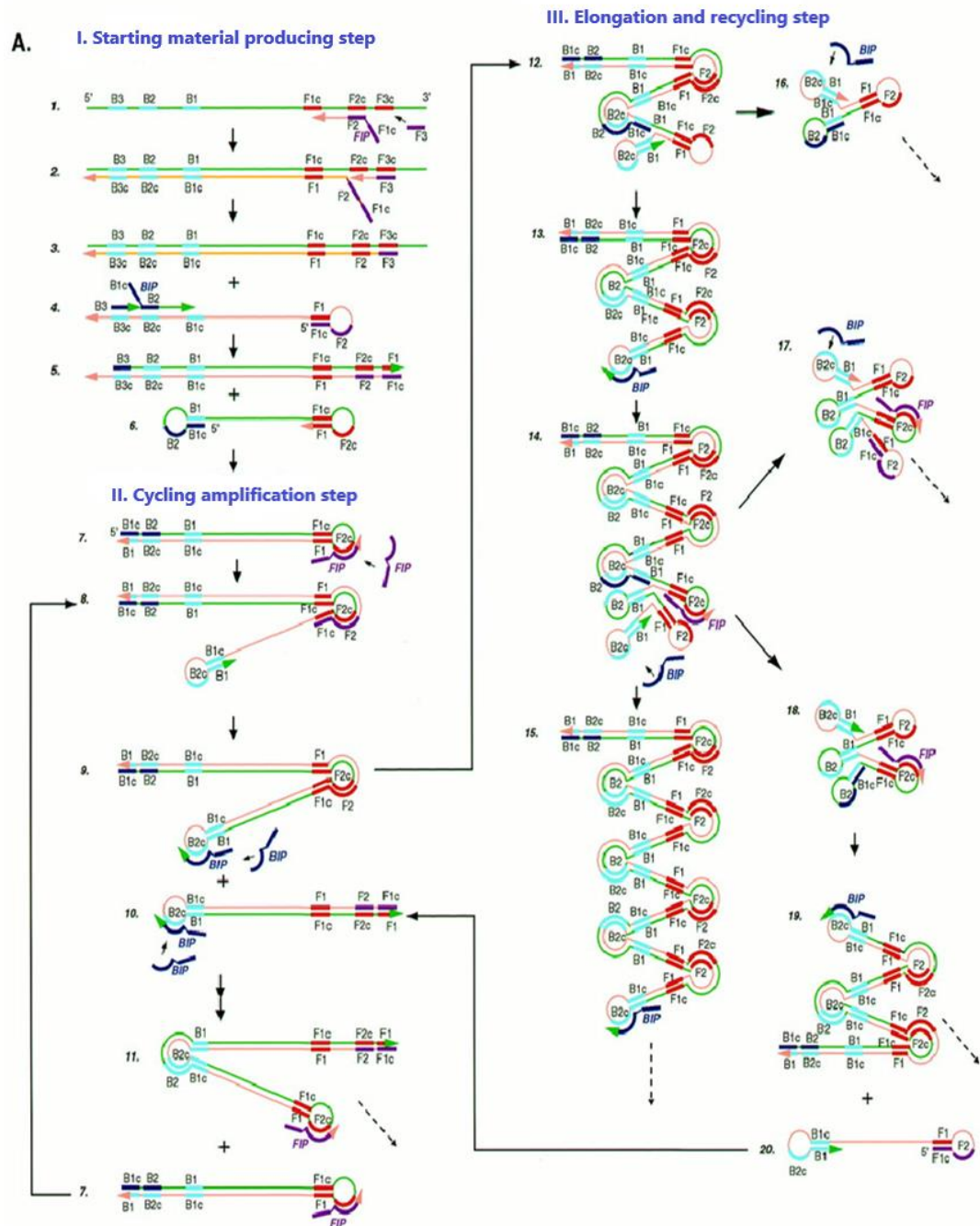
1. FIP (Forward Inner Primer) koostuu F2-alueesta 3'-päässä ja on vastaava kohde-DNA:n F2c-alueelle. Sekvenssi on sama F1c-alueella 5'-päässä.
2. F3 Primer (Forward Outer Primer), joka koostuu F3-alueesta, joka on vastaava kohde-DNA:n F3c-alueelle.
3. BIP (Backward Inner Primer) koostuu B2-alueesta 3'-päässä ja on vastaava kohde-DNA:n B2c-alueelle. Sekvenssi on sama B1c-alueella 5'-päässä.
4. B2 Primer (Backward Outer Primer) koostuu B3-alueesta, joka on vastaava kohde-DNA:n B3c-alueelle. (Notomi ym. 2000.)

Alukkeiden nimet ja vastaavuudet kohde-DNA:n eri alueisiin esitetään kuviossa 4.



KUVIO 4. LAMP-monistukseen käytettävien alukkeiden nimet ja vastaavuudet kohde-DNA:n eri alueille. (Eiken Chemicals, muokattu)

LAMP-monistus voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen: aloitusmateriaalin valmistamiseen (starting material production step), monistusvaiheeseen (cycling amplification step) ja pidennysreaktioon (elongation and recycling step). LAMP-monistuksen reaktioseokseos sisältää kohde-DNA:n, alukkeet, DNA-polymeraasientsyymiä ja mastermixin. Monistusreaktion ensimmäisessä vaiheessa sisäinen FIP-alue käynnistää reaktion, jossa valmistetaan molemmista päistä silmukkamaisesti muotoutunut DNA-sekvenssi, joka toimii toisen vaiheen aloitusmateriaalina. DNA-sekvenssin valmistamiseen tarvitaan kaikkia neljää aluketta ja DNA-polymeraasia. Reaktion toisessa vaiheessa sisäiset alukkeet (FIP ja BIP) kiinnittyvät silmukkarakenteisiin ja DNA-polymeraasin avulla rakennetaan erilaisia DNA-sekvenssejä, jotka siirtyvät pidennysvaiheeseen. Pidennysvaiheen jälkeen lopullinen tuote on sekoitus eri pituisia silmukkamaisia DNA-sekvenssejä ja kukakaalimaisen muotoisia rakenteita. (Notomi ym. 2000.) LAMP-monistuksen periaate esitetään kuviossa 5.



KUVIO 5. LAMP-monistuksen periaate (Notomi ym. 2000, muokattu)

Nagamine ym. (2002) kehittivät LAMP-reaktioon niin sanotut silmukka-alukkeet (loop primers), joiden avulla LAMP-reaktiota voidaan entisestään nopeuttaa. Alukkeet ovat nimeltään FLP (forward loop primer) ja BLP (backward loop primer). Nämä alukkeet kiinnittyvät DNA-sekvenssien silmukkarakenteisiin, joiden muodostus ei vaadi sisäisiä alukkeita. Silmukka-alukkeita käytetään LAMP-menetelmän pidennysvaiheessa. Niin sisäiset alukkeet kuin silmukka-alukkeetkin

kiinnittyvät silmukkarakenteisiin, mutta niiden toimintamekanismi on erilainen. Silmukka-alukkeiden avulla voidaan jopa puolittaa se aika, joka kuluu alkuperäisen LAMP -monistuksen suorittamiseen. Silmukka-alukkeiden käyttö lisää tutkimuksen mukaan myös menetelmän sensitiivisyyttä (Nagamine ym. 2002).

5.2. LAMP-monistuksen optimointi

LAMP-monistuksen tehokkuuteen vaikuttavat alukkeiden sekvenssi ja koko, joten alukkeet tulee suunnitella siten, että jokaisen alukkeen sulamislämpötila laskee tietyissä rajoissa. Tällä varmistetaan alukkeiden toiminta menetelmän oikeassa vaiheessa. Menetelmän tehokkuuteen vaikuttaa myös monistettavan kohde-DNA:n koko. Rajoittavana tekijänä on reaktiossa tapahtuva DNA-juosteen korvautumisreaktio ja paras tulos saavutetaan, jos kohde-DNA:n pituus on 130-200 emästä. Yli 500 emäksen pituiset DNA-pätkät monistuvat heikosti. LAMP-monistuksessa käytettävällä DNA-polymeraasientsyymillä on myös tärkeä rooli monistuksen tehokkuudessa, joten sen valinta vaikuttaa lopputulokseen. Yksi suositeltava polymeraasientsyymi on *Bst*-polymeraasientsyymi. (Notomi ym. 2000.)

LAMP-monistuksen onnistumiseen vaikuttaa myös suuresti ensimmäisessä vaiheessa valmistettavan DNA-sekvenssin muoto. Tutkimuksen mukaan DNA-sekvenssin molemmissa päissä olevien silmukoiden pituus tulee olla 40 emästä tai enemmän, jotta saadaan mahdollisimman hyvä tulos. (Notomi ym. 2000.)

5.3. LAMP-menetelmällä monistetun tuotteen tunnistaminen

LAMP-monistuksen lopputuotetta voidaan tunnistaa monilla erilaisilla menetelmillä. Lopputuotteen tunnistaminen on mahdollista visuaalisesti. Tunnistaminen voidaan suorittaa myös reaaliaikaisesti käyttämällä turbidimetriä tai fluoresenssitekniikoita. Muita tunnistamismenetelmiä ovat esimerkiksi geelielektroforeesi, elektrokemialliset menetelmät, immunokromatografiset tekniikat ja ELISA. (Zhang, Lowe & Gooding 2014.)

Lopputuote voidaan tunnistaa visuaalisesti ilman laitteita. LAMP-monistuksen sivutuotteena syntyneet pyrofosfaatti-ionit reagoivat reaktioseoksessa olevien magnesiumionien kanssa synnyttäen lopputuotteessa havaittavan sameuden. Kun lopputuotetta syntyy suuri määrä, reaktiossa muodostunut vaalea sameus voidaan tunnistaa visuaalisesti. Tätä metodologia käytettäessä tunnistamiseen ei tarvita ylimääräisiä laitteita tai varusteita. Menetelmän avulla ei voida arvioida reaktion sensitiivisyyttä ja positiivisten näytteiden sameus katoaa lyhyen ajan sisällä, joten tunnistaminen pitää suorittaa lyhyen ajan sisällä monistamisen jälkeen. (Zhang ym. 2014; Shirato 2019.)

Reaktiossa syntyvää sameutta voidaan tunnistaa myös reaaliaikaisesti optisilla instrumenteilla, kuten turbidimetrillä ja spektrofotometrillä. Automaattisella menetelmällä pystytään kvantitatiiviseen tunnistamiseen eikä menetelmässä tarvitse käyttää esimerkiksi erilaisia koettimia. Menetelmää voidaan pitää helpoimpana tapana monistustuotteen havaitsemiseen. (Zhang ym. 2014; Shirato 2019.)

Visuaalisessa tunnistamisessa voidaan käyttää apuna myös fluoresoivia väriaineita, jotka sitoutuvat kaksijuosteiseen DNA:han. Värin sitoutuminen DNA:han aiheuttaa värin muuttumisen, joka voidaan havaita visuaalisesti. Yksi käytetty väriaine on SYBR Green, jonka väri muuttuu oranssista vihreäksi ollessaan sitoutuneena kaksijuosteiseen DNA:han. Muutos voidaan havaita normaalissa valossa tai UV-valon avulla. Väriaineen käyttäminen lisää reaktion sensitiivisyyttä, mutta myös kustannuksia. Myös muita väriaineita voidaan käyttää. Lopputuotetta voidaan tunnistaa myös käyttämällä kolorimetrisiä indikaattoreita, esimerkiksi kal-seiinia. Menetelmä perustuu myös värin muutoksen havaitsemiseen. (Zhang ym. 2014.)

Väriaineita voidaan käyttää myös monistustuotteen reaaliaikaiseen havaitsemiseen. Esimerkiksi SYBR Green-värin sitoutuminen kaksijuosteiseen DNA:han johtaa fluoresenssin määrän muutokseen, jota mitataan reaaliaikaisesti. Monistustuotteen tunnistamiseen voidaan käyttää myös fluoresoivilla väriaineilla leimattuja koettimia ja alukkeita. Reaaliaikaiset fluoresenssiin perustuvat menetelmät ovat nopeita ja sensitiivisiä, mutta niissä on korkeat käyttökustannukset, joihin muun muassa laitteistovaatimuksista. (Zhang ym. 2014; Shirato 2019.)

6 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, vastaavatko reaaliaikaisella PCR-menetelmällä ja isotermaalisella LAMP-monistuksella saadut tulokset toisiaan HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoittamisessa. Opinnäytetyön varsinaisen laboratoriossa suoritettavan työn aikana pyritään myös selvittämään, onko LAMP-monistus nopeampi suorittaa kuin reaaliaikainen PCR-menetelmä eli vapauttaako uusi menetelmä työvoimaa laboratorion muuhun työhön.

Tavoitteena on opinnäytetyön tutkimuksen jälkeen ottaa uusi menetelmä rutiniikäyttöön HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvien geenimutaation osoittamiseen.

Tutkimuskysymykset tässä tutkimuksessa ovat:

1. Miten reaaliaikaisella PCR-menetelmällä ja LAMP-monistuksella saadut tulokset vastaavat toisiaan HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoituksessa?
2. Onko LAMP-monistus nopeampi suorittaa kuin qPCR -menetelmällä tehty tutkimus?

7 TUTKIMUSMENETELMÄT

Tutkimuksessa noudatettiin kokeellista tutkimusmenetelmää. Kokeellisessa tutkimuksessa tavoitteena on tutkia erilaisten ilmiöiden vaikutusta toisiinsa ympäristössä tai tilanteessa, jotka on luotu kontrolloidusti tutkimusta varten. Kokeellisessa tutkimuksessa pyritään mahdollistamaan systemaattisten ja kontrolloitujen havaintojen tekeminen. Näin ollen saadut tutkimustulokset ovat mahdollisimman luotettavat (Jyväskylän Yliopisto 2015).

Kokeellisessa tutkimusmenetelmässä varsinainen tutkimustilanne muodostetaan niin, että tutkijan on mahdollista havainnoida ilmiöiden vaikutuksia ja syy-seuraussuhteita kontrolloimalla kaikkia ilmiöön liittyviä tekijöitä. Menetelmässä voidaan toteuttaa tutkimusstrategiaa monella tavalla. Koeaineiston analyysissä on mahdollista hyödyntää laadullisia ja määrällisiä analyysimenetelmiä (Jyväskylän Yliopisto 2015). Tässä tutkimuksessa vertailtiin kahdella erilaisella menetelmällä saatuja tuloksia HLA-B27 kudasantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisessa. Tutkimuksessa vertailtiin myös menetelmien suorittamiseen kuluvaa aikaa.

Tutkimus suoritettiin Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin Seinäjoen keskussairaalan patologian laboratoriossa. Patologian laboratoriossa tehdään vuosittain reaaliaikaisella PCR-menetelmällä noin 1500 kpl laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation ja noin 750 kpl HLA-B27-kudasantigeenin osoitustestiä.

7.1. Tutkimusaineisto

Tutkimusaineistona käytettiin potilasnäytteitä, jotka saapuivat Seinäjoen keskussairaalan patologian laboratorioon tutkimuksen suorittamiseen kuluneen neljän viikon aikana. Tutkimusaineistoon kuuluvat näytteet olivat potilasnäytteitä ja po-

tilaalle annettiin vastaus käytössä olevan reaaliaikaisen PCR-menetelmän perusteella. Potilasnäytteitä käsiteltiin tutkimuksen aikana tutkimusnumerolla, joka mahdollisti tietosuojan säilymisen.

Tutkimusaineistona oli 93 kpl EDTA-verinäytettä laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamiseen ja 49 kpl EDTA-verinäytettä HLA-B27-kudosantigeenin osoittamiseen vuoden 2019 helmi- ja maaliskuulta. Näyteputkina oli 5 ml EDTA-putket. Verinäytteet oli otettu Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin alueelta, johon kuuluu keskussairaalan lisäksi maakunnan terveyskeskukset.

Tutkimusajot suoritettiin kerran viikossa, joten EDTA-verinäytteitä kerättiin aina viikon ajan ennen ajojen suorittamista. EDTA-veriputket säilytettiin ajopäivään saakka + 4°C:ssa. Reaaliaikainen PCR suoritettiin aina keskiviikkoisin ja isotermaalinen LAMP-monistus torstaisin.

Tutkimusaineistona menetelmien suorittamiseen kuluvan ajan mittaamiseen kerättiin kahdenkymmenen EDTA-verinäytteen sarja. Verinäytteet oli otettu Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiriin alueelta. Sarjaan kuuluvat verinäytteet oli otettu viikon aikana ja putket olivat säilytetty + 4°C:ssa.

7.2. DNA:n eristys qPCR-menetelmää varten

HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamiseen reaaliaikaisella PCR-menetelmällä vaati DNA:n eristämisen verinäytteestä. DNA:n eristys tehtiin patologian laboratorion puhdastilassa. DNA:n eristäminen tehtiin sarjoissa Qiagenin QIAsymphony SP/AS-laitteella, jossa on yhdistettynä eristyslaite ja pipetointiyksikkö. Eristäminen tapahtui laitteen SP-osassa. Laite kuvassa 2.

SP



AS

KUVA 2. Qiagen QIAasymphony SP/AS-laite

DNA:n eristyksessä käytettiin QIAasymphony DSP DNA Mini Kit-eristyskittiä. Eristyskitissä hyödynnetään magneettipartikkeleihin perustuvaa tekniikkaa biologisten näytteiden täysin automaattiseen DNA:n eristykseen ja puhdistukseen. Magneettipartikkeleiden avulla saavutetaan mahdollisimman puhdas DNA, jossa ei esiinny proteiineja tai muita epäpuhtauksia. Eristettyä DNA:ta voidaan käyttää suoraan muun muassa monistukseen. Eristyksessä on neljä vaihetta. Ensimmäisenä solut hajotetaan ja DNA vapautuu soluista. Vapautunut DNA sitoutuu magneettipartikkeleihin ja magneettipartikkelit kiinnittyvät laitteessa olevaan magneettisauvaan. Magneettisen reaktion avulla DNA voidaan siirtää seuraavaan vaiheeseen, jossa tapahtuu DNA:n pesu. Viimeisessä vaiheessa eristetty DNA siirretään eluaattiliuokseen. (Qiagen 2012.)

Jokaisesta tutkimusaineiston verinäytteestä eristystä varten käytettiin 200 µl verta. DNA eluointiin 100 µl eluaattiliuosta. Eristysohjelman pituus määräytyi eristettävien verinäytteiden määrän mukaan.

7.3. HLA-B27 qPCR

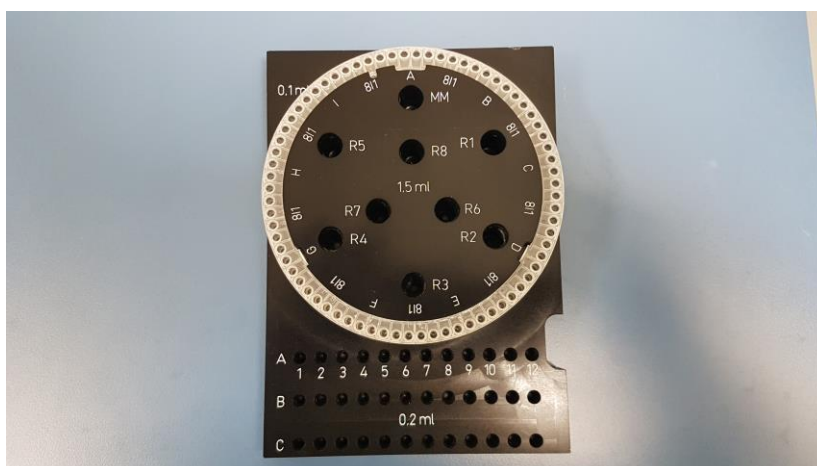
HLA-B27-kudosantigeenin osoittamista varten valmistettiin käsin pipetoimalla reaktioseos eli mastermix. Mastermixissä esiintyi seuraavat reagenssit: PCR-puhdas vesi, neljä erilaista aluketta ja QuantiNova SYBR Green PCR Kit-entsyymiseos. Entsyymiseos sisälsi QuantiNova DNA-polymeraasin, SYBR Green PCR Buffer-liuoksen ja dNTP-seosta (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

PCR-reaktiossa käytettiin neljää aluketta ja alukkeista kaksi toimi HLA-B27-kudosantigeenin alleelien osoittamisessa. Alukkeiden avulla tunnistettiin HLA-B27:n alleelit 1-5 ja 7. Toiset kaksi aluketta toimi sisäisen kontrollin eli beta-globiinin osoittamisessa. Alukkeiden nimet ja sekvenssit esitetään taulukossa 1

Taulukko 1. HLA-B27 osoittamisessa käytetyt alukkeet ja sekvenssit.

Aluke	Sekvenssi 5' - 3'
HLA-B27 5'	GCTACGTGGACGACACGCT
HLA-B27 3'	CAGTCTGTGCCTTGGCGTTGC
Beta-Globiini 5'	CAACTTCATCCACGTTACACC
Beta-Globiini 3'	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

QIASymphony SP/AS -laitteen AS-pipetointiyksikössä tapahtui mastermixin, eristetyt DNA:n ja tarvittavien kontrollien pipetointi PCR-ajossa käytettävän Rotor Disc -renkaan reaktiokammioihin. Rotor Disc kuvassa 3.



KUVA 3. Rotor Disc ja kylmälevy

Ensimmäisenä laite pipetoi reaktiokammioihin 15 µl valmistettua mastermixiä josta eristettyä DNA:ta ja käytössä olevaa kontrollia varten. Tämän jälkeen laite pipetoi eristettyä DNA:ta ja kontrolleja 5 µl näytekammioihin. Reaktion kokonaistilavuus on 20 µl. HLA-B27-kudosantigeenin osoittamisessa PCR-reaktioita kontrolloitiin aikaisemmin positiiviseksi ja negatiiviseksi todetulla DNA:lla. Jokaisessa HLA-B27-ajossa käytettiin kontrollina myös PCR-puhdasta vettä. Se toimii negatiivisena kontrollina, koska siinä ei esiinny templaatti-DNA:ta.

Taulukossa 2 esitetään kaikki PCR-reaktioon tarvittavat komponentit ja niiden suhteet kokonaistilavuudesta. Taulukosta käy myös ilmi käytettävien alukkeiden konsentraatiot.

Taulukko 2. PCR-reaktion komponentit ja niiden suhteet kokonaistilavuudesta ja alukkeiden konsentraatiot.

Reagenssi	Suhteellinen määrä	Konsentraatio
PCR-vesi	1	
HLA-B27 5'	1	0,5 μ M
HLA-B27 3'	1	0,5 μ M
Beta-Globiini 5'	1	0,5 μ M
Beta-Globiini 3'	1	0,5 μ M
Entsyymiseos	10	
DNA	5	
Kokonaistilavuus	20	

Pipetoinnin valmistuttua Rotor Disc-rengas otettiin pipetointiyksiköstä ja päällystettiin Heat Sealing Film-kalvolla kuumennuskäsittelyn avulla.

Reaaliaikainen PCR-ajo tehtiin Qiagenin Rotor-Gene Q-PCR-laitteella laboratorion molekyylipatologian tilassa. Laite kuvassa 4.



KUVA 4. Rotor-Gene Q -PCR-laite

PCR-laitetta ohjattiin tietokoneella, johon oli määritetty oikea ohjelma HLA-B27-kudosantigeenin osoittamista varten. HLA-B27-kudosantigeenin osoittamista varten suunniteltu PCR-ohjelma oli pituudeltaan 63 minuuttia. PCR-ohjelma kuvattu taulukossa 3.

TAULUKKO 3. HLA-B27-kudosantigeenin osoittamisen PCR-ohjelma

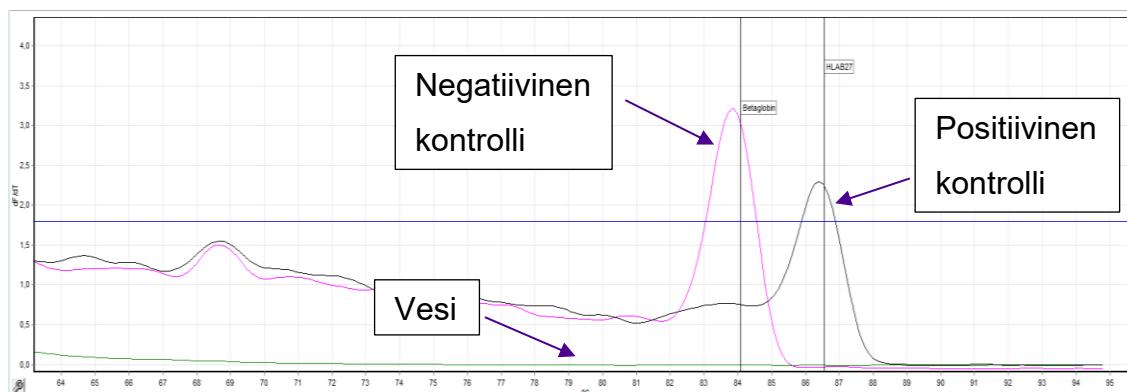
Ohjelman vaihe	Syklien määrä	Lämpötila ja aika	Vaiheen tapahtumat ja mittaus
Templaatin denaturointi	1	95°C, 2 min	Entsyymien aktivointi ja templaatin denaturaatio Ei mittausta
Denaturaatio	40	95°C, 5 sek	Denaturaatio Ei mittausta
Alukkeiden pidennys	40	60°C, 10 sek	Alukkeiden kiinnitys ja pidennys Mittaus vihreällä aallonpituudella
Sulatus	1	90sek odotus ennen 1. vaihetta (63°C). 63°C:sta 95°C:een 0,4°C nousu joka vaiheessa. 2 sek odotus joka vaiheen jälkeen	Hidas denaturaatio Mittaus vihreän valon aallonpituudella (530 nm)

PCR-reaktiossa oli mukana fluoresoivaa SYBR Green-väriainetta, joka sitoutui kaksijuosteiseen DNA:han. Fluoresenssin määrää mitattiin aallonpituudella 530 nm pidentymisvaiheen jälkeen. PCR-tuotteet tunnistettiin monistuksen jälkeen sulamiskäyräanalyysillä. Sulamiskäyräanalyysissä reaktion lämpötila laskettiin 63°C:een, jonka jälkeen lämpötilaa nostettiin hitaasti 95°C:een. Fluoresenssia mitattiin aallonpituudella 530 nm koko lämpötilan nostamisen ajan. Tuotteiden erilaisen sulamislämpötilojen perusteella voidaan erottaa sisäinen kontrolli beta-globiini HLA-B27 geenistä. (EPSHP 2017.)

HLA-B27-alleeleja monistettiin PCR-reaktiossa yhdessä sisäisen kontrollin eli beta-globiinin kanssa. Näin voitiin varmistua PCR-reaktion toimivuudesta. Jokaisesta näytteestä monistui sisäinen kontrolligeeni ja HLA-B27 positiivisissa näytteissä tämän lisäksi monistui itse HLA-B27-kudosantigeeni. HLA-B27-kudosantigeenin PCR-tuote on pituudeltaan 144 emäsparia. Beta-globiinin PCR-tuotteen pituus on 268 emäsparia.

PCR-monistuksen jälkeen laitteisto tekee sulamiskäyräanalyysiä varten hitaan lämpötilan noston. Ohjelmisto piirtää sen perusteella sulamiskäyrät, joiden avulla

erilaiset tuotteet voitiin erottaa toisistaan. HLA-B27-kudosantigeenin osoittamisessa tarkistettiin ensimmäisenä positiivisen ja negatiivisen kontrollin sekä veden sulamiskäyrät. Seinäjoen keskussairaalan patologian laboratorio on määrittänyt menetelmän validointivaiheessa fluoresenssille tietyt raja-arvot, jotka piikkien tulee ylittää. Sulamiskäyrät esitetään kuvassa 5.



KUVA 5. HLA-B27 positiivisen ja negatiivisen kontrollin sekä veden sulamiskäyrät

7.4. Laktoosi qPCR

Laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamista varten valmistettiin käsin pipetoimalla reaktioseos eli mastermix. Mastermixissä esiintyvät seuraavat reagenssit: PCR-puhdas vesi, kaksi aluketta ja kaksi koetinta sekä QuantiNova Probe PCR Kit-entsyymiseos. Entsyymiseos sisälsi QuantiNova DNA-polymeeraasin, QuantiNova Probe PCR Buffer-liuoksen ja dNTP-seosta (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

PCR-reaktiossa käytettiin kahta aluketta ja kahta fluoroforilla leimattua koetinta. Alukkeiden avulla tunnistettiin spesifisesti mutaatio -13910C>T. Alukkeet ja koetimet sekä niiden sekvenssit esitetään taulukossa 4.

Taulukko 4. Laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisessa käytetyt alukkeet, koettimet ja niiden sekvenssit

Aluke	Sekvenssi 5' – 3'
Laktoosi 5'	GGATGCACTGCTGTGATGAG
Laktoosi 3'	CCCACTGACCTATCCTCGTG
Koetin	Sekvenssi 5' – 3'
Sensor T	TGAGGCCAGGGACTACATTATCTT—Fluorescein
Anchor	LC RED640–TCTGTATTGCCAGCGCAGAGGCCTACTAGTA-CATT-PH (Estää polymeraasin toiminnan)

QIASymphony SP/AS-laitteen AS-pipetointiyksikössä tapahtui mastermixin, eristetyn DNA:n ja tarvittavien kontrollien pipetointi PCR-ajossa käytettävän Rotor Disc-renkaan reaktiokammioihin. Ensimmäisenä laite pipetoi näytekammioihin 15 µl valmistettua mastermixiä jokaista eristettyä DNA:ta ja kontrollia varten. Tämän jälkeen laite pipetoi näytekammioihin 5 µl eristettyä DNA:ta ja kontrolleja. Reaktion kokonaistilavuus on 20 µl. Laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisessa PCR-reaktioita kontrolloitiin aikaisemmin tutkituilla genotyypin CC, CT ja TT DNA:lla. Jokaisessa laktoosiajossa käytettiin kontrollina myös PCR-puhdasta vettä. Se toimi negatiivisena kontrollina, koska siinä ei esiinny templaatti-DNA:ta.

Taulukossa 5 esitetään kaikki PCR-reaktioon tarvittavat komponentit ja niiden suhteet kokonaistilavuudesta. Taulukosta käy myös ilmi käytettävien alukkeiden ja koettimien konsentraatiot.

Taulukko 5. PCR-reaktion komponentit ja niiden suhteet kokonaistilavuudesta sekä alukkeiden ja koettimien konsentraatiot.

Reagenssi	Suhteellinen määrä	Konsentraatio
PCR-vesi	2,90	
Laktoosi 5'	1,0	0,5 μ M
Laktoosi 3'	0,3	0,15 μ M
Sensor T	0,4	0,2 μ M
Anchor	0,4	0,2 μ M
Entsyymiseos	10	
DNA	5	
Kokonaistilavuus	20	

Pipetoinnin valmistuttua Rotor Disc-rengas otettiin pipetointiyksiköstä ja päällystettiin Heat Sealing Film-kalvolla kuumennuskäsittelyn avulla.

Reaaliaikainen PCR-ajo tehtiin Qiagenin Rotor-Gene Q -PCR-laitteella laboratorion molekyylipatologian tilassa. PCR-laitetta ohjattiin tietokoneella, johon on määritetty oikea ohjelma laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamiseen. Laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisen PCR-ohjelma on pituudeltaan 117 minuuttia ja PCR-ohjelma kuvattu taulukossa 6.

TAULUKKO 6. Laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisen PCR-ohjelma.

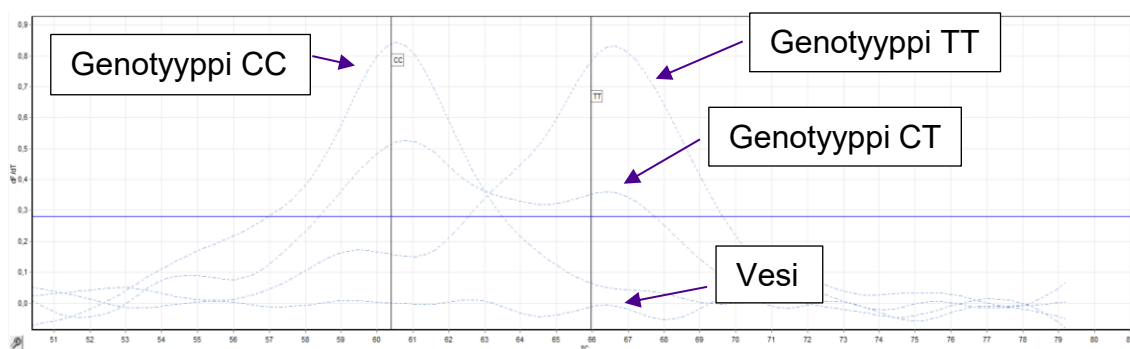
Ohjelman vaihe	Syklien määrä	Lämpötila ja aika	Vaiheen tapahtumat ja mittaus
Templaatin denaturointi	1	95°C, 5 min	Entsyymien aktivointi ja templaatin denaturaatio, Ei mittaus
Denaturaatio	50	95°C, 10 sek	Denaturaatio, ei mittaus
Alukkeiden kiinnittyminen	50	50°C, 20 sek	Alukkeiden kiinnittyminen, mittaus aallonpituudella 640 nm
Pidennys	50	72°C, 20 sek	Pidennys, ei mittaus
PCR-tuotteen denaturointi ja koettimien kiinnittyminen	1	95°C, 60 sek 60°C, 30 sek 53°C, 30 sek 40°C, 60 sek	Pidennys, ei mittaus
Sulatus	1	90sek odotus ennen 1. vaihetta (63°C).	Hidas denaturaatio

		50°C:sta 80°C:een 0,8°C nousu joka vaiheessa. 3 sek odotus jokaisen vaiheen jälkeen.	Mittaus aallonpituudella 640 nm
--	--	--	------------------------------------

Laktoosi-intoleranssiin liittyvää emäsmuutosaluetta monistettiin PCR-reaktiossa spesifisillä alukkeilla, jotka tunnistivat kohteena olleen alueen. Monistetun PCR-tuotteen pituus oli 448 emäsparia. Monistettu alue tunnistettiin spesifisesti kahdella fluoresoivalla merkkiaineella leimatulla koettimella ja fluoresenssin mittaus suoritettiin aallonpituudella 640nm. Koettimet olivat suunniteltu niin, että ne tunnistavat spesifisesti mutaation eli genotyypin TT ja täten koettimet kiinnittyivät löyhemmin genotyyppeihin CT ja CC.

Monistuksen jälkeen tehtiin varsinainen tuotteen detektio, jossa lämpötila laskeaan ensin 50°C:een, jolloin koettimet hybridisoituvat. Tämän jälkeen lämpötilaa nostetaan hitaasti 80°C:een, jolloin koettimet denaturoivat niille ominaisessa sulamislämpötilassa ja fluoresenssin määrä tippuu. Tuotteiden erilaisten sulamislämpötilojen perusteella voidaan erottaa genotyypit TT, CT ja CC toisistaan. (EPSHP 2016.)

PCR-monistuksen jälkeen laitteisto teki sulamiskäyräanalyysiä varten hitaan lämpötilan noston. Ohjelmisto piirsi sen perusteella sulamiskäyrät, joiden avulla erilaiset tuotteet voitiin erottaa toisistaan. Laktoosi-intoleranssin osoittamisessa tarkistettiin ensimmäisenä kontrolleina käytettävien genotyyppien CC, CT ja CC sekä veden sulamiskäyrät. Seinäjoen keskussairaalan patologian laboratorio on määrittänyt menetelmän validointivaiheessa fluoresenssille tietyt raja-arvot, jotka piikkien tulee ylittää. Sulamiskäyrät esitetään kuvassa 6.



KUVA 6. Genotyyppien CC, CT ja TT kontrollien ja veden sulamiskäyrä

7.5. HLA-B27 LAMP

HLA-B27-kudosantigeenin osoitus tehtiin LaCAR MDx:n valmistamalla LAMP Human HLA-B27 detection KIT-testikitin avulla. LAMP-monistusprosessi on kaksivaiheinen: ensimmäisenä suoritettiin näytteen käsittely puhdastilassa, jonka jälkeen monistus suoritettiin PCR-laitteella. LAMP-monistukseen perustuva HLA-B27-kudosantigeenin osoituskitti tunnistaa alleelit B27*02 ja B27*05. Menetelmä suoritettiin suoraan verinäytteestä, eikä erillistä DNA:n eristystä tarvittu toisin kuin qPCR-menetelmässä. LAMP-testikitissä käytettiin kuutta erilaista aluketta tunnistamaan kahdeksaa eri aluetta templaatti-DNA:sta. Primereiden nimet ovat: FIP (Forward Inner Primer), F3 (Forward Outer Primer), BIP (Backward Inner Primer), B3 (Backward Outer Primer) ja silmukka-alukkeet Loop primer F ja Loop Primer B. Nämä kuusi aluketta mahdollistivat kohdealueen monistuksen. (LaCAR MDx 2018a.)

Näytteiden käsittelyvaiheessa ensimmäisenä sekoitettiin kaikki LAMP Human HLA-B27 detection KIT-kitissä mukana olevat reagenssiputket ja pullot sekä EDTA-veriputket. Testikittiin kuului Lysis Buffer ja mastermix sekä positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Testikitin sisältö kuvassa 7.



KUVA 7. LaCAR MDx:n valmistaman LAMP Human HLA-B27 Detection KIT-testikitin sisältö.

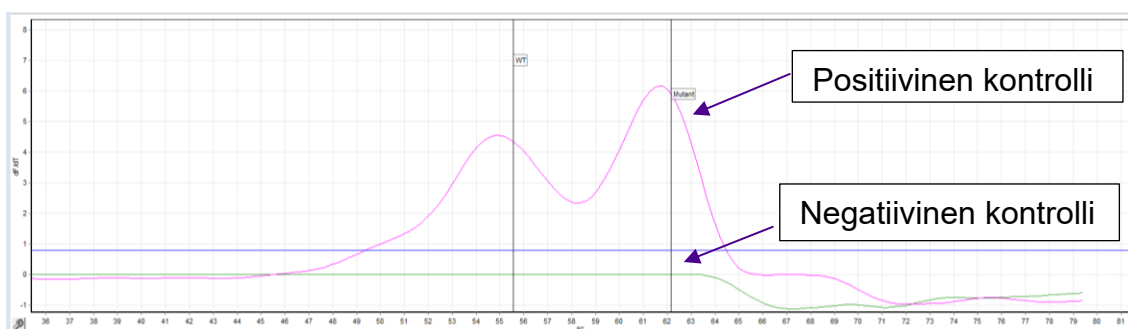
Jokaista näytettä ja kontrollia varten merkattiin 1,5 ml DNA-vapaa Eppendorf-putki näytteiden järjestyksen mukaan. Solujen hajotusta varten Eppendorf-putkiin pipetoitiin käsin ensimmäisenä 200 µl Lysis Bufferia. Lysis Bufferin pipetoinnin jälkeen Eppendorf-putkiin pipetoitiin 1 µl verta EDTA-veriputkista. Kontrollinäytteet pipetoitiin aina sarjan viimeisiksi. Kontrolleina käytettiin kitin mukana tulleita positiivista ja negatiivista kontrollia. Näytteiden ja kontrollien pipetoinnin jälkeen Eppendorf-putket sekoitettiin hyvin vortexilla ja putkien annettiin seistä ohjeen mukaan 10 minuuttia.

Jokaista lyysattua näytettä ja kontrollia varten LaCAR-testikitin valmista master-mixiä pipetoitiin 20 µl Qiagenin Rotor-Gene Q-PCR-laitteessa käytettävään pyöreän Rotor Disc-renkaan reaktiokammioihin. Viimeisessä vaiheessa renkaan reaktiokammioihin pipetoitiin 5 µl lyysattua näytettä ja kontrollia. Reaktion kokonaistilavuus oli 25 µl. Viimeisen pipetoinnin jälkeen Rotor Disc-rengas päällystettiin Heat Sealing Film-kalvolla kuumennuskäsittelyn avulla.

Monistusvaihe suoritettiin Qiagenin Rotor-Gene Q-PCR-laitteella molekyylipatologian tilassa. Laitetta ohjattiin tietokoneella ja monistaminen tapahtui LaCAR MDx:n määrittämän monistusohjelman mukaan. HLA-B27-kudosantigeenin ohjelma oli pituudeltaan 59 minuuttia ja reaktio suoritettiin tunnin aikana 65°C:een lämpötilassa.

Jokainen monistettu kohdesekvenssi tunnistettiin mutaatiolle spesifisellä fluore-soivalla koettimella ja monistuksen jälkeen suoritettiin sulamiskäyräanalyysi. Sulamiskäyräanalyysissä lämpötilaa laskettiin 40 °C:een, jolloin koettimet kiinnittyivät monistettuihin DNA-fragmenteihin tuoden fluoroforin ja vaimentimen lähelle toisiaan. Tällöin fluoresenssi oli vähäistä. Lämpötilaa nostettiin hitaasti 90 °C:een, jonka aikana muutokset fluoresenssin määrässä mitattiin. Lämpötilaa nostettaessa koetin irtosi DNA-fragmenteista sille tyypillisessä sulamislämpötilassa ja näin ollen fluoresenssin määrä nousi, koska fluorofori etääntyi vaimentajasta. Koetin kiinnittyi spesifisesti tutkittavien HLA-B27:n alleelien nukleotidijärjestykseen, mutta löyhemmin muiden alleelien nukleotidijärjestykseen. Spesifisesti kiinnittynyt koetin irtaantui korkeammassa lämpötilassa kuin löyhemmin kiinnittyneet, joten sulamiskäyräanalyysissä tuotteet erotettiin toisista eri sulamislämpötilojen perusteella. (LaCAR MDx 2018a.)

Sulamiskäyrien ja sulamislämpötilojen perusteella jokainen näyte analysoitiin erikseen ja tulos kirjattiin ylös. HLA-B27-kudosantigeenin osoittamisessa tarkistettiin ensimmäisenä positiivisen ja negatiivisen kontrollin sulamiskäyrät. Sulamiskäyrät esitetään kuvassa 8.



KUVA 8. HLA-B27 positiivisen ja negatiivisen kontrollin käyrät

7.6. Laktoosi LAMP

Laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation LAMP-monistus tehtiin LaCAR MDx:n valmistamalla LAMP Human Lactose Intolerance Kit-testikitin avulla. LAMP-monistukseen perustuva laktoosi-intoleranssin mutaation osoituskitti tunnisti näyt-

teestä mutaatiot -13910C>T ja -13015T>G ja niiden läheisyydessä esiintyvät mutaatiot kohdissa -13907, -13908, -13915 ja -13914. Menetelmä suoritettiin suoraan verinäytteestä, eikä erillistä DNA:n eristystä tarvittu. LAMP-monistuskitsissä käytetään kuutta erilaista aluketta tunnistamaan kahdeksaa eri aluetta templaatti-DNA:sta. Primereiden nimet ovat: FIP (Forward Inner Primer), F3 (Forward Outer Primer), BIP (Backward Inner Primer), B3 (Backward Outer Primer) ja silmukka-alukkeet Loop primer F ja Loop Primer B. Nämä kuusi aluketta mahdollistivat kohdealueen monistuksen. (LaCAR MDx 2018b.)

Näytteiden käsittelyvaiheessa ensimmäisenä sekoitettiin kaikki testikitissä mukana olevat reagenssiputket ja pullot sekä EDTA-veriputket. Testikittiin kuuluu Lysis Buffer ja Mastermix sekä positiivinen ja negatiivinen kontrolli. Testikitin sisältö kuvassa 9.



KUVA 9. LaCAR MDx:n valmistaman LAMP Human Lactose Intolerance Kit-testikitin sisältö.

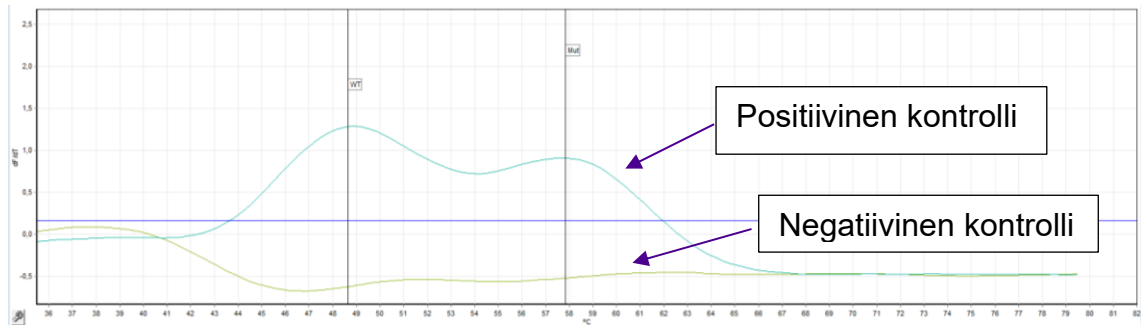
Jokaista potilasnäytettä ja kontrollia varten merkattiin 1,5 ml DNA-vapaa Eppendorf-putki näytteiden järjestyksen mukaan. Solujen hajotusta varten Eppendorf-putkiin pipetoitiin käsin ensimmäisenä 200 µl Lysis Bufferia. Lysis Bufferin pipetoinnin jälkeen samoihin Eppendorf-putkiin pipetoitiin 1 µl verta EDTA-veriputkista. Kontrollinäytteet pipetoitiin aina sarjan viimeisiksi. Kontrollina käytettiin testikitin mukana tulleita positiivista ja negatiivista kontrollia. Näytteiden ja kontrollien pipetoinnin jälkeen Eppendorf-putket sekoitettiin hyvin vortexilla ja putkien annettiin seistä ohjeen mukaan 10 minuuttia.

Jokaista lyysattua näytettä ja kontrollia varten LaCAR-testikitin valmista master-mixiä pipetoitiin 20 µl Qiagenin Rotor-Gene Q -PCR-laitteessa käytettävään pyöreään Rotor-Disc-renkaan reaktiokammioihin. Viimeisessä vaiheessa Rotor Disc-renkaan reaktiokammioihin mastermixin kanssa pipetoitiin 5 µl lyysattua näytettä ja kontrollia. Reaktion kokonaistilavuus oli 25 µl. Viimeisen pipetoinnin jälkeen Rotor Disc-rengas päällystettiin Heat Sealing Film-kalvolla kuumennuskäsittelyn avulla.

Monistusvaihe suoritettiin Qiagenin Rotor-Gene Q-PCR-laitteella molekyylipatologian tilassa. Laitetta ohjattiin tietokoneella ja monistaminen tapahtui LaCAR:n määrittämän monistusohjelman mukaan. Laktoosi-intoleranssin ohjelma oli pituudeltaan 64 minuuttia ja reaktio suoritettiin 65°C:een lämpötilassa.

Jokainen monistettu kohdesekvenssi havaittiin mutaatiolle spesifisellä fluoresoivalla koettimella ja monistuksen jälkeen suoritettiin sulamiskäyräanalyysi. Tällöin lämpötilaa laskettiin 40 °C:een, jolloin koettimet kiinnittyvät monistettuihin DNA-fragmentteihin tuoden fluoroforin ja vaimentimen lähelle toisiaan. Tällöin fluoresenssi oli vähäistä. Lämpötilaa nostettiin hitaasti 90 °C:een, jonka aikana muutokset fluoresenssin määrässä mitataan. Lämpötilaa nostettaessa koettimet irtosivat DNA-fragmenteista niille tyypillisessä sulamislämpötilassa ja täten fluoresenssin määrä nousi, koska fluorofori etääntyi vaimentajasta. Koettimet oli suunniteltu niin, että ne kiinnittyivät spesifisesti mutaation aiheuttamaan sekvenssiin eli genotyyppiin TT. Kiinnittyminen oli täten löyhempää muissa sekvensseissä. Spesifisesti kiinnittynyt koetin irtaantui korkeammassa lämpötilassa kuin löyhemmin kiinnittyneet, joten sulamiskäyräanalyysissä tuotteet eroteltiin toisista eri sulamislämpötilojen perusteella. (LaCAR 2018b.)

Sulamiskäyrien ja sulamislämpötilojen perusteella jokainen näyte analysoitiin erikseen ja tulos kirjattiin ylös. Laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisessa ensimmäisenä tarkistettiin positiivisen ja negatiivisen kontrollin sulamiskäyrät. Sulamiskäyrät esitetään kuvassa 10.



KUVA 10. Laktoosi-intoleranssin positiivisen ja negatiivisen kontrollin sulamis-käyrät

7.7. Menetelmien suorittamiseen kuluneen ajan mittaaminen

Tutkimuksen aikana pyrittiin selvittämään, onko LAMP-monistus nopeampi suorittaa kuin qPCR-menetelmä. Tässä osiossa tehtiin ajot molemmilla menetelmillä 20 näytteen sarjalla. Molempien menetelmien kaikki työvaiheet kirjattiin ylös ja työvaiheiden ajallinen kesto mitattiin sekuntikellolla. Ajan mittaaminen suoritettiin kahteen kertaan ja kuviossa 6 esiintyvät ajat ovat kuluneen ajan keskiarvoja.

8 TULOKSET

8.1. Menetelmillä saatujen tulosten vastaavuus

Reaaliaikainen PCR-menetelmä ja isotermaalinen LAMP-monistus antoivat samat tulokset HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisessa. Vastaavuus oli 100%.

HLA-B27-kudosantigeenin osoittamisessa 15 näytettä osoittautuivat positiivisiksi ja 34 näytettä negatiivisiksi (Liite 1). Positiivisten näytteiden osuus oli noin 30 % ja negatiivisten 70 %. Taulukossa 7 esitetään HLA-B27 positiivisten ja negatiivisten näytteiden määrä ja menetelmillä saatujen tulosten vastaavuus.

Taulukko 7. HLA-B27 positiivisten ja negatiivisten näytteiden määrä ja menetelmillä saatujen tulosten vastaavuus.

HLAB27	QPCR pos	QPCR neg
LAMP pos	15	0
LAMP neg	0	34

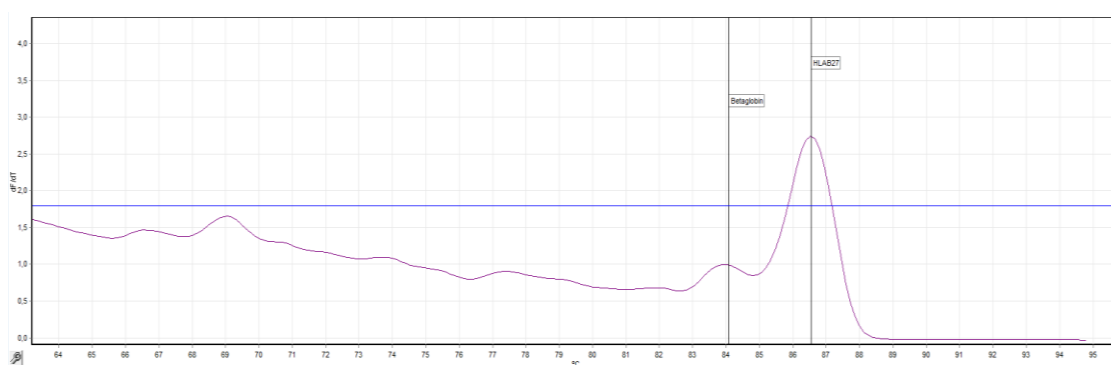
Laktoosi-intoleranssiin liittyvät mutaation osoittamisessa 18 näytettä osoittautui genotyyppi CC, 44 näytettä genotyyppi CT ja 31 näytettä genotyyppi TT (Liite 2). Genotyypin CC prosenttiosuus vastauksista oli 19 %, genotyypin CT osuus 47 % ja genotyypin TT osuus oli 33 %. Taulukossa 8 esitetään genotyyppi CC, CT ja TT osoittautuneiden näytteiden määrä ja menetelmillä saatujen tulosten vastaavuus.

Taulukko 8. Genotyypeiksi CC, CT ja TT osoittautuneiden näytteiden määrä ja menetelmillä saatujen tulosten vastaavuus.

Laktoosi	QPCR CC	QPCR CT	QPCR TT
LAMP CC	18	0	0
LAMP CT	0	44	0
LAMP TT	0	0	31

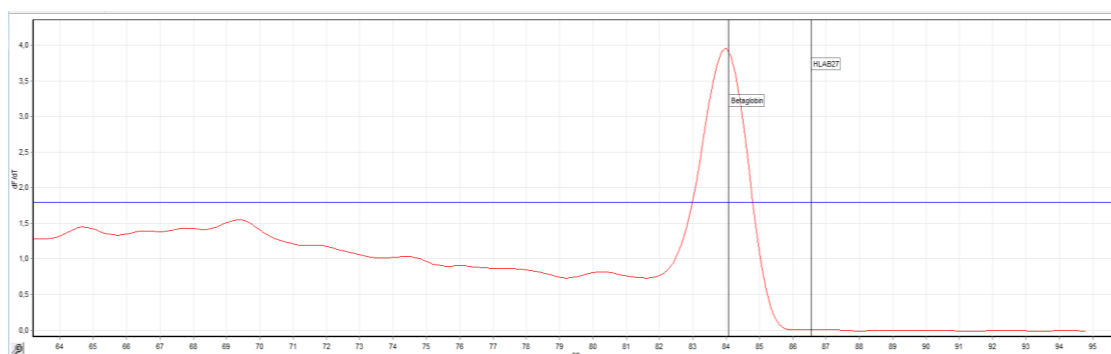
8.1.1 HLA-B27 qPCR

Jokaisen qPCR-menetelmällä tehdyn HLA-B27-näytteen sulamiskäyrä ja sulamislämpötila analysoitiin yksitellen. HLA-B27-kudosantigeenin sisältävän eli positiivisen näytteen sulamislämpötila tuli olla välillä 85,5 - 87,5 °C. Positiivisessa näytteessä tuli näkyä HLA-B27:n aiheuttama korkea piikki, mutta myös matala beta-globiinin aiheuttama piikki. Tämä johtuu siitä, että positiivisessa näytteessä monistuu hyvin HLA-B27, mutta myös beta-globiinia syntyy pieni määrä. Sulamiskäyräanalyysin tulos esitetään kuvassa 11.



KUVA 11. HLA-B27 positiivisen näytteen sulamiskiikkit

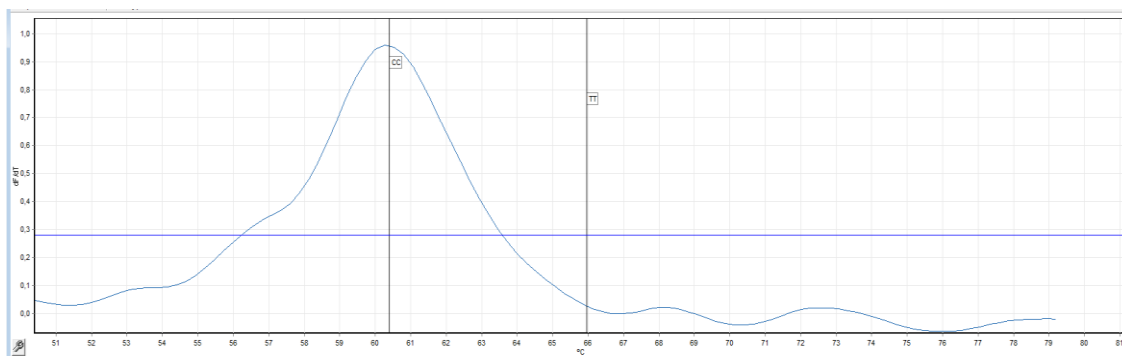
HLA-B27-kudosantigeenin suhteen negatiivisessa näytteessä beta-globiinin sulamislämpötilan tuli olla välillä 83 – 85 °C. HLA-B27 ei monistu tällöin ollenkaan eikä sen sulamiskiikkiä nähdä. Sulamiskäyräanalyysin tulos esitetään kuvassa 12.



KUVA 12. HLA-B27 negatiivisessa näytteessä nähdään vain beta-globiinin sulamiskiikki

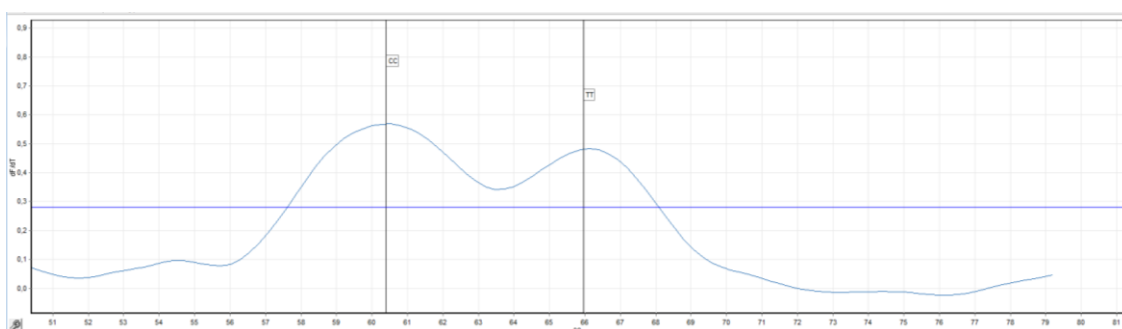
8.1.2 Laktoosi qPCR

Jokaisen qPCR-menetelmällä tehdyn laktoosinäytteen sulamiskäyrä ja sulamislämpötilat analysoitiin yksitellen. Genotyypin CC sulamislämpötila tuli olla välillä 59,5 - 61,5 °C. Genotyypin CC sulamiskäyrässä tuli esiintyä yksi piikki saman vaihteluvälin sisällä. Sulamiskäyräanalyysin tulos esitetään kuvassa 13.



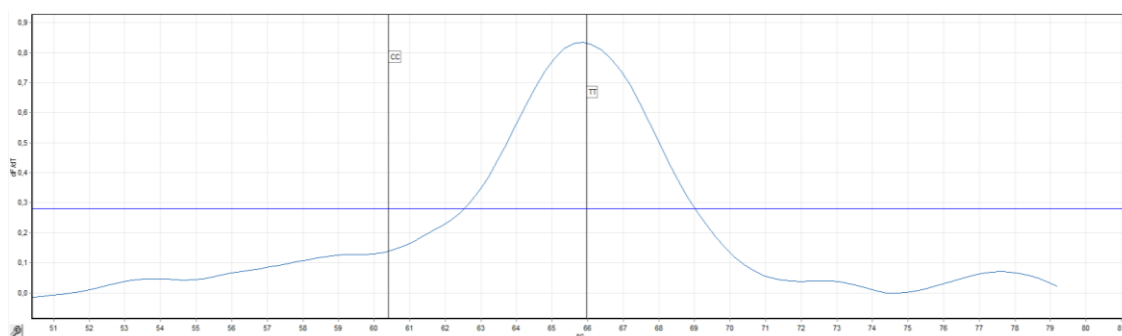
KUVA 13. Genotyypin CC sulamiskiikki

Genotyypin CT sulamiskäyrässä tuli olla kaksi piikkiä. Ensimmäisen piikin sulamislämpötila piti olla genotyypin CC sulamislämpötilan vaihteluvälin sisällä ja toisen genotyypin TT vaihteluvälin sisällä. Sulamiskäyräanalyysin tulos esitetään kuvassa 14.



KUVA 14. Genotyypin CT sulamiskiikit

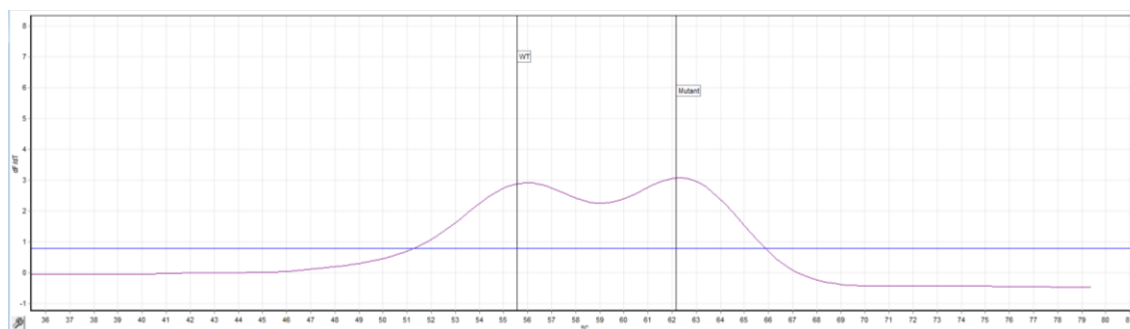
Genotyypin TT sulamislämpötila tuli olla välillä 65,3 - 67,3 °C. Genotyypin TT sulamiskäyrässä tuli olla yksi piikki saman vaihteluvälin sisällä. Sulamiskäyräanalyysin tulos esitetään kuvassa 15.



KUVA 15. Genotyypin TT sulamiskiikki

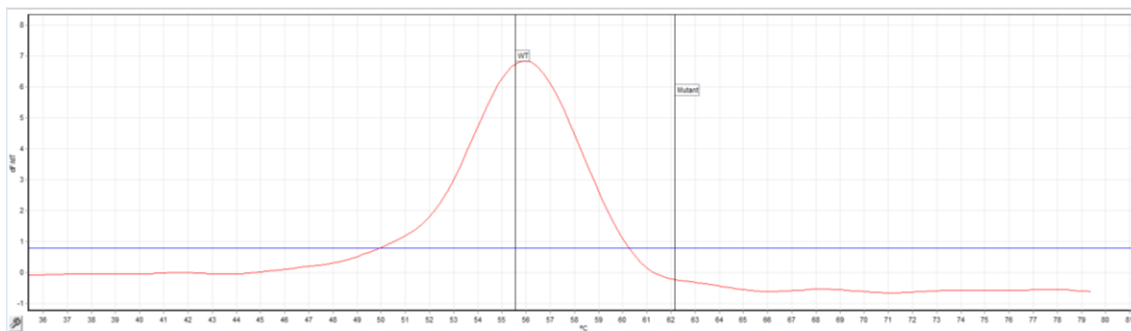
8.1.3 HLA-B27 LAMP

Isotermaalisella LAMP-monistuksella tehdyn HLA-B27-kudosantigeenin sisältävän eli positiivisen näytteen sulamiskäyrässä esiintyi kaksi piikkiä. Ensimmäisen piikin sulamislämpötila tuli olla välillä 53,56 – 57,56°C ja toisen välillä 60,17 – 64,17°C. On myös mahdollista, että positiivisessa näytteessä esiintyy vain yksi piikki vaihteluvälillä 60,17 – 64,17°C. Sulamiskäyräanalyysin tulos esitetään kuvassa 16.



KUVA 16. HLA-B27 positiivisen näytteen sulamiskiikit

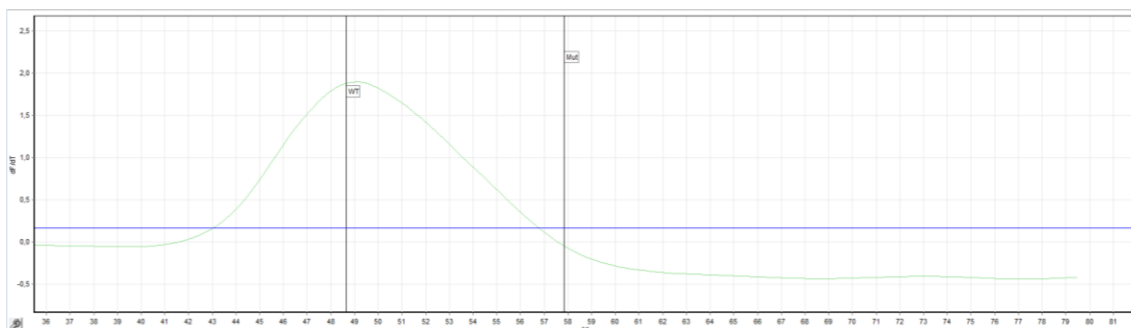
HLA-B27-kudosantigeenin suhteen negatiivisen näytteen sulamislämpötilan tuli olla välillä 53,56 – 57,56°C. Negatiivisessa näytteen sulamiskäyrässä tuli olla yksi piikki saman vaihteluvälin sisällä. Sulamiskäyräanalyysin tulos esitetään kuvassa 17.



KUVA 17. HLA-B27 negatiivisen näytteen sulamiskiikki

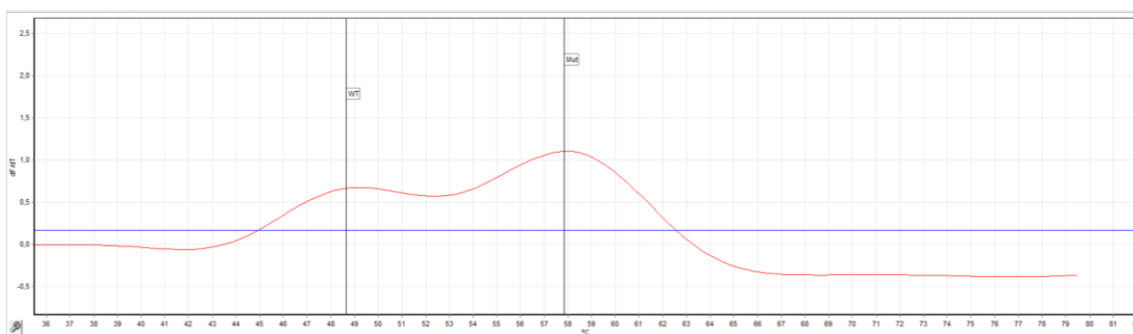
8.1.4 Laktoosi LAMP

Jokaisen isotermaalisella LAMP-monistuksella tehdyn laktoosinäytteen sulamiskäyrä ja sulamislämpötilat analysoitiin yksitellen. Genotyypin CC sulamislämpötila tuli olla välillä 46,78-49,78 °C. Genotyypin CC sulamiskäyrässä tuli olla yksi piikki saman vaihteluvälin sisällä. Sulamiskäyräanalyysin tulos esitetään kuvassa 18.



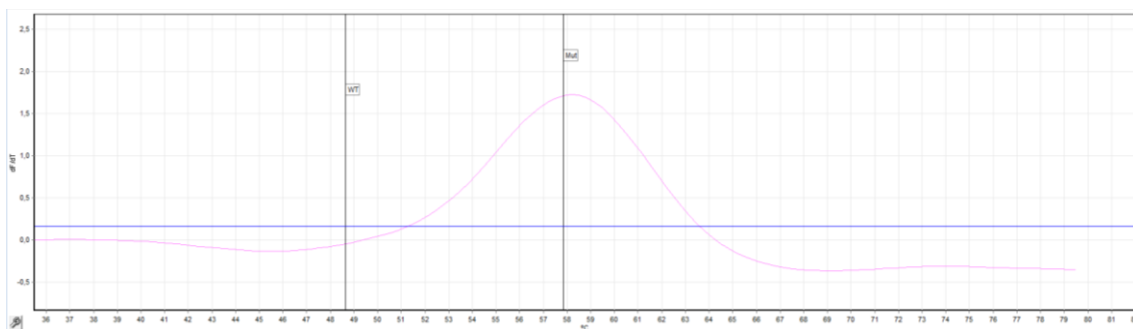
KUVA 18. Genotyypin CC sulamiskiikki

Genotyypin CT sulamiskäyrässä esiintyi kaksi piikkiä. Ensimmäisen piikin sulamislämpötila tuli olla sama kuin genotyypillä CC ja toisen piikin sulamislämpötila tuli olla sama kuin genotyypillä TT. Sulamiskäyräanalyysin tulos esitetään kuvassa 19



KUVA 19. Genotyypin CT sulamispiikit

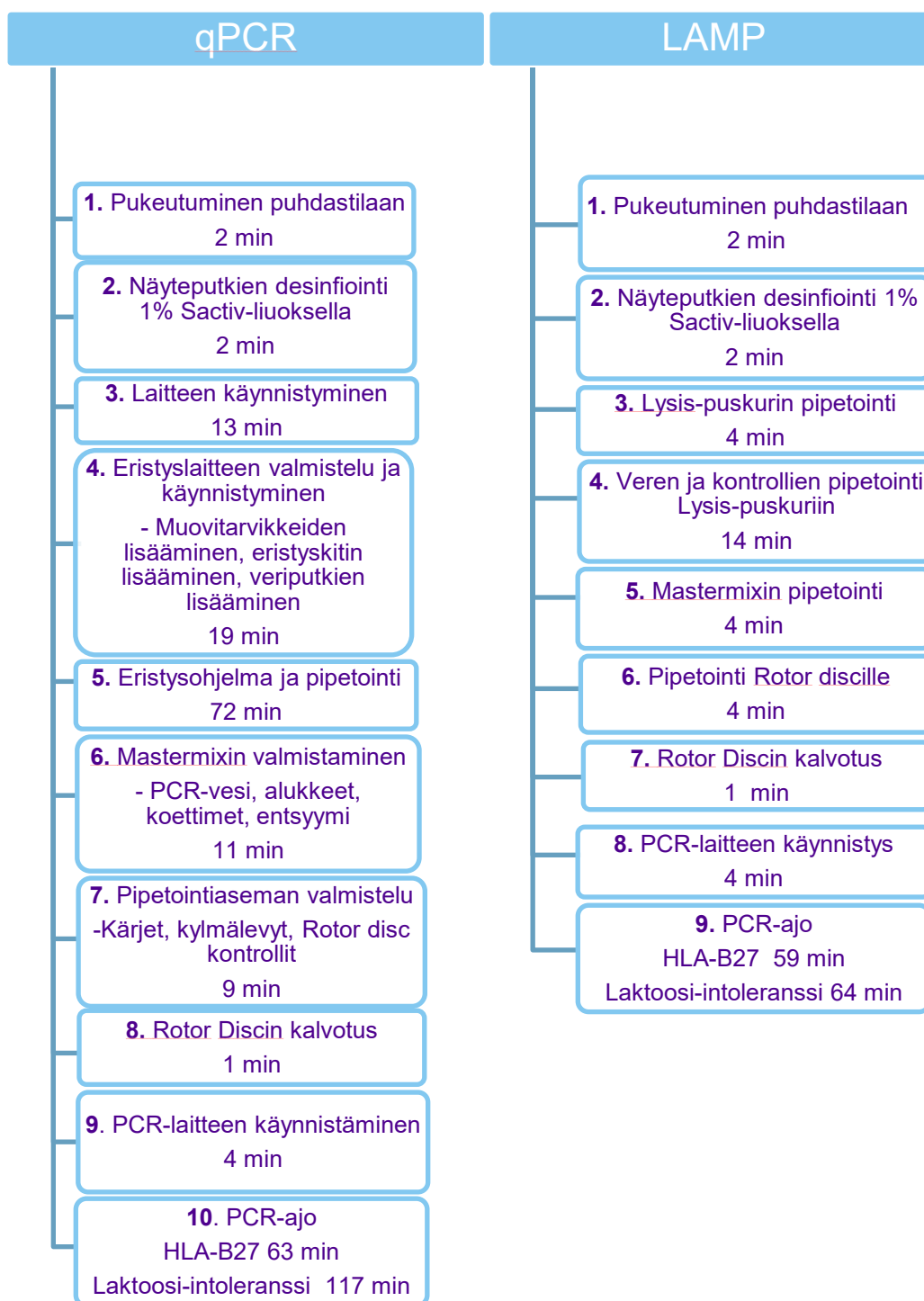
Genotyypin TT sulamislämpötila tuli olla välillä 56,5-59,5 °C. Genotyypin TT sulamiskäyrässä tuli olla yksi piikki saman vaihteluvälin sisällä. Sulamiskäyräanalyysin tulos esitetään kuvassa 20.



KUVA 20. Genotyypin TT sulamispiikki

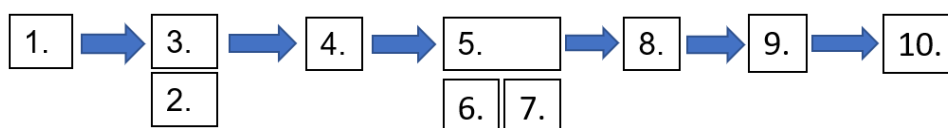
8.2. Menetelmien suorittamiseen kuluneen ajan vertailu

Reaaliaikaisella PCR-menetelmällä HLA-B27-kudosantigeenin osoittamiseen kului 2 tuntia 54 minuuttia ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamiseen kului 3 tuntia 48 minuuttia. Isothermaalisella LAMP-monistuksella HLA-B27-kudosantigeenin osoittamiseen kului 1 tunti 34 minuuttia ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamiseen 1 tunti 39 minuuttia. Kuviossa 6 esitetään kaikki työvaiheet yhdessä niiden suorittamiseen kuluneen ajan kanssa ja kaikki työvaiheet esitetään peräkkäin.



KUVIO 6. Menetelmien työvaiheet ja niiden suorittamiseen kulunut aika.

Käytännössä qPCR-menetelmän eri työvaiheet lomittuivat kahdessa vaiheessa prosessia toisiinsa niin, että kokonaisaika oli todellisuudessa lyhyempi kuin peräkkäin esitetyt ajat antavat ymmärtää. Eristyslaitteen käynnistymisen aikana desinfioitiin näyteputket ja eristysohjelman aikana valmistettiin mastermix ja valmisteltiin pipetointiyksikkö. Vaiheiden lomittuminen esitetään kuviossa 7. LAMP-monistuksessa kaikki vaiheet suoritetaan peräkkäin, joten siinä vaiheiden lomittumista ei tapahdu.



KUVIO 7. qPCR-menetelmän vaiheiden lomittuminen

HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamiseen kuluneet ajat qPCR-menetelmällä ja LAMP-monistuksella esitetään taulukossa 9.

Taulukko 9. Menetelmien suorittamiseen kuluneet kokonaisajat

Tutkimus	qPCR	LAMP
HLA-B27	2 h 54 min	1 h 34 min
Laktoosi-intoleranssi	3 h 48 min	1 h 39 min

HLA-B27-kudosantigeenin osoittaminen nopeutui LAMP-monistuksella 1 tunti 20 minuuttia ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittaminen 2 tuntia 9 minuuttia.

9 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, vastaavatko reaaliaikaisella PCR-menetelmällä ja isotermaalisella LAMP-monistuksella saadut tulokset HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoittamisessa. Tarkoituksena oli myös verrata toisiinsa menetelmien suorittamiseen kulunutta kokonaisaikaa ja selvittää, onko LAMP-monistus nopeampi suorittaa kuin reaaliaikainen PCR-menetelmä. Opinnäytetyön tavoitteena oli, että isotermaalinen LAMP-monistus otettaisiin tutkimuksen jälkeen rutiinikäyttöön Seinäjoen keskussairaalan patologian laboratoriossa HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoittamisessa.

Opinnäytetyön aihe oli mielenkiintoinen, koska isotermaalinen LAMP-monistus on uudehko menetelmä eikä LaCAR MDx:n valmistamia HLA-B27-kudosantigeenin tai laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoituskittejä käytetty Suomessa vielä missään laboratoriossa siinä vaiheessa, kun tutkimus aloitettiin. Uusi menetelmä oli tulossa Seinäjoen keskussairaalan patologian laboratorioon testaukseen, joten tutkimuksen aihe valikoitui tätä kautta. Tutkimuksen aiheella oli täten myös uutuusarvoa.

9.1. Tulosten tarkastelu

Reaaliaikaisella PCR-menetelmällä ja isotermaalisella LAMP-monistuksella saattujen tulosten vastaavuus HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisessa oli 100 %.

Abildgaardin ym. (2018) osoittivat tutkimuksessaan, että LAMP-monistus on yksinkertainen menetelmä osoittaa laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation erilaiset variantit ja menetelmien vertailun tulokset olivat vastaavat PCR-menetelmään ja siitä suoritettuun HRM (High resolution melting curve)-analyysiin. Tutkimus oli tuloksiltaan vastaava tämän nyt suoritettun tutkimuksen kanssa.

Menetelmillä oli eroa siinä, mitä HLA-B27-kudosantigeenin alleeleja tai laktoosi-intoleranssiin liittyviä mutaatioita niiden avulla pystyttiin tunnistamaan. Reaaliaikainen PCR-menetelmä tunnistaa HLA-B27-kudosantigeenin alleelit 1-5 ja 7 (EPSHP 2017). Isotermaalinen LAMP-monistus tunnistaa sitä vastoin alleelit 2 ja 5 (LaCAR MDx 2018a). Reaaliaikaisella PCR-menetelmällä pystytään tunnistamaan useampia HLA-B27-kudosantigeenin alleeleja, jotka voivat olla yhteydessä selkärankareumaan. HLA-B27-kudosantigeenin selkärankareumaan yhteydessä olevia alleeleja ovat eurooppalaisella ja amerikkalaisella väestöllä alleelit 2 ja 5, kiinalaisella 4 ja 5, intialaisella 4-5 ja 7, länsiafrikkalaisella väestöllä 3 ja 5, sekä sardinialaisella alleelit 2,5,7 ja 13 (Bowness 2015, 35). Näin ollen qPCR-menetelmällä voidaan tunnistaa myös muiden kuin eurooppalaisen ja amerikkalaisen väestön HLA-B27-kudosantigeenin alleeleja.

Laktoosi-intoleranssiin liittyvien mutaatioiden kohdalla reaaliaikainen PCR-menetelmä pystyy spesifisesti tunnistamaan mutaation -13910C>T (EPSHP 2016). Menetelmällä voidaan tunnistaa myös muita mutaatioita ja nämä mutaatiot havaitaan erilaisten sulamislämpötilojen ja sulamiskäyrien avulla verrattuna -13910C>T mutaation aiheuttamiin sulamislämpötiloihin ja sulamiskäyriin. Jos tällaisia käyriä huomataan, tulos tulee kuitenkin varmistaa esimerkiksi sekvensoimisella. Isotermaalisella LAMP-monistuksella pystytään tunnistamaan mutaatiot -13910C>T ja -13015T>G ja niiden läheisyydessä esiintyvät mutaatiot kohdissa -13907, -13908, -13915 ja -13914 (LaCAR MDx 2018b). Laktoosi-intoleranssin osalta LAMP-monistuksella voidaan tunnistaa suoraan useampia laktoosi-intoleranssiin liittyviä mutaatioita kuin reaaliaikaisella PCR -menetelmällä.

Isotermaalinen LAMP-monistus oli 1 tunti 20 minuuttia nopeampi HLA-B27-kudosantigeenin osoittamisessa kuin reaaliaikainen PCR-menetelmä ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän geenimutaation osoittamisessa LAMP-monistus oli 2 tuntia 9 minuuttia nopeampi. LAMP-monistusta käyttämällä niin HLA-B27-kudosantigeenin kuin laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaationkin osoittaminen nopeutui huomattavasti. LAMP-monistus on HLA-B27-kudosantigeenin osoittamisessa puolet nopeampi ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisessa yli puolet nopeampi. Tutkimuksen mukaan LAMP-monistusta käyttämällä voidaan säästää

työntekijöiden työaikaa muihin laboratoriossa vaadittuihin töihin. LAMP-monistuksen nopeuteen vaikutti se, että näytteille ei tarvinnut tehdä erillistä DNA:n eristämistä lainkaan vaan monistus suoritettiin kokoverestä. Laktoosi-intoleranssin kohdalla nopeuteen vaikutti myös se, että LAMP-monistusohjelma oli ainoastaan 64 minuuttia, kun qPCR-menetelmässä PCR-ajon pituus oli 117 minuuttia.

Menetelmien alkuun ja loppuun tulee lisätä vielä yksi työvaihe, kun menetelmiä käytetään diagnostisessa tarkoituksessa. Seinäjoen keskussairaalan patologian laboratoriossa reaaliaikaisen PCR-menetelmän laboratorioprosessissa ensimmäisenä vaiheena verinäytteistä tehdään työjono potilastietojärjestelmään ja työjono tulostetaan tutkimusprosessia varten. Viimeisenä vaiheena taas saadut tulokset vastataan potilastietojärjestelmään, josta tulokset ovat tutkimuksen pyytäneen lääkärin tai hoitajan nähtävillä. Näin ollen näytteen kokonaislaboratorioprosessi on muutaman minuutin pitempi. Samanlaiset vaiheet lisättäisiin myös isotermaalisen LAMP-monistuksen laboratorioprosessiin, jos sitä käytettäisiin potilaiden diagnosointiin.

LAMP-monistus oli käytännön kannalta helppo ja nopea suorittaa. QPCR-menetelmään verrattuna suurin ero on siinä, että erillistä DNA:n eristystä ei tarvittu eikä mastermixiä ei tarvinnut itse valmistaa, vaan se tuli testikittien kanssa valmiina. QPCR-menetelmässä mastermix piti valmistaa käsin pipetoimalla, koska menetelmän vaatimaa valmista mastermix-reagenssia ei ole markkinoilla. LAMP-monistuksessa työvaiheita oli vähemmän kuin qPCR-menetelmässä ja työvaiheet veivät vähemmän aikaa. Erilaisten uusien menetelmien kehittäminen voikin johtaa diagnosoinnin nopeutumiseen ja yksinkertaistumiseen. Uusien menetelmien kehittäminen voi säästää myös työntekijöiden aikaa muuhun laboratoriotyöhön.

Tutkimuksen tuloksista voi olla hyötyä muille organisaatioille. LAMP-monistuksella voidaan osoittaa HLA-B27-kudosantigeeni ja laktoosi-intoleranssiin liittyvä geenimutaatio pienemmillä laitehankinnoilla kuin qPCR-menetelmässä. LaCAR MDx:n LAMP-monistukseen perustuvat testit voidaan suorittaa käyttämällä ainoastaan monistusvaiheeseen tarvittavaa laitteistoa, esimerkiksi PCR-laitetta. Kalista eristyslaitteistoa ei näin ollen tarvitse hankkia.

9.2. Luotettavuus

Tutkimuksen luotettavuuden ensimmäinen edellytys on se, että tutkimus on suoritettu niiden kriteerien mukaan, jotka ovat asetettu tieteelliselle tutkimukselle (Heikkilä 2014, 176). Luotettavuustarkastelulla varmistetaan se, että tutkimuksen aikana on tehty oikeita ja perusteltuja ratkaisuja (Kananen 2017, 343). Tutkimuksen luotettavuutta alentavat esimerkiksi käsittelyvirheet, mittausvirheet ja otantavirheet (Heikkilä 2014, 176).

Tutkimuksen pätevyys eli validius tarkoittaa sitä, että tutkimuksella on onnistuttu mittaamaan täsmälleen sitä, mitä tutkimuksella on tarkoituskin saada selville (Kananen 2015, 343; Vilkkä 2015). Tässä tutkimuksessa tutkittiin kahdella eri menetelmällä saatujen vastausten vastaavuutta toisiinsa. Molemmilla menetelmällä tutkittiin samat näytteet ja menetelmillä saatuja tuloksia verrattiin keskenään. Toisena tutkimuskohteena oli selvittää, onko LAMP-monistus nopeampi suorittaa kuin qPCR-menetelmä. Tutkimuksella saatiin vastaukset molempiin tutkimuskysymykseen.

Tutkimuksen luotettavuus eli reliabiliteetti kuvaa tutkimustulosten pysyvyyttä (Kananen 2015, 343). Reliabiliteetti tarkoittaa tutkimuksen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia (Vilkkä 2015). Menetelmäosiossa kuvaillaan qPCR -menetelmän ja LAMP-monistuksen suorittaminen HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittaminen niin, että tutkimusprosessi on toistettavissa. Reaaliaikainen PCR-menetelmä suoritettiin laboratorion omien työohjeiden mukaan ja menetelmää on käytetty useita vuosia rutiinidiagnostiikassa ennen tutkimuksen aloitusta. LAMP-monistukseen perehdyttiin ennen tutkimuksen aloittamista testikittien toimittajan puolesta. Menetelmien suorittamiseen kuluksen ajan mittaus suoritettiin kahteen kertaan ja kokonaisaikojen vaihteluväli oli 3 minuuttia. Kahden mittauksen avulla laskettiin eri työvaiheiden keskimääräinen ajallinen pituus ja mittaustulokset ovat tältä osin luotettavampia verrattuna ainoastaan yhden mittauksen tulokseen.

Tutkimuksen aikana tapahtui LAMP-monistuksen näytteen käsittelyn aikana yhden näytteen kohdalla pipetointivirhe, joka kuitenkin huomattiin ja kyseinen tulos

jätettiin täten vertailun ulkopuolelle. Tutkimuksen aikana huomattiin, että LAMP-monistuksen näytteen käsittelyvaihe on altis pipetointivirheille. Tämä johtuu siitä, että näytteen käsittelyssä eri vaiheet suoritettiin käsin kirjoittamalla ja pipetoimalla. Näytteiden tunnistetiedot eivät siirtyneet automaattisesti vaiheesta toiseen, kuten qPCR-menetelmää suorittaessa, eikä pipetointia pystynyt suorittamaan pipetointiautomaatissa. Nämä seikat voivat heikentää potilasturvallisuutta, jos virheitä ei huomata ajoissa. Tutkimuksen aikana tapahtuvat virheet voivat aiheuttaa myös tutkimuksen luotettavuuden heikentymistä. Heikkilän (2014, 178) mukaan reliabiliteetin puutteellisuus johtuu yleensä satunnaisista virheistä.

Tutkimuksen aikana yritettiin automatisoida LAMP-monistuksen pipetointivaiheet Qiagen QIASymphony SP/AS-laitteelle, joka olisi poistanut suuren osan inhimillisten virheiden mahdollisuuksista. Siirto ei kuitenkaan ollut mahdollista LAMP-monistuksessa esiintyvien pienten reagenssimäärien vuoksi. Laitteella ei pystynyt pipetoimaan reagensseja niin pieniä määriä, mitä LAMP-monistus edellyttää. Käsin pipetointi LAMP-monistuksen näytteiden käsittelyvaiheessa on tällä hetkellä ainut mahdollisuus.

Tutkimuksen luotettavuuteen vaikuttaa myös otoksen koko. Mitä suurempi ja edustavampi otoksen koko on, sitä luotettavampia tuloksia tutkimuksella saadaan (Heikkilä 2014, 178). HLA-B27-kudosantigeenin osoittamiseen tutkimusaineiston koko oli 49 näytettä ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisessa 93 näytettä. Tutkimusaineistoon sisältyvien näytteiden tuloksia ei tiedetty etukäteen. Tutkimusaineiston koko oli riittävä siihen, että tutkimuksen tuloksia voidaan pitää suhteellisen luotettavina.

Tutkimuksen yksi haasteellinen osa oli raportin teoreettisen viitekehyksen kirjoittaminen. Tämä johtui siitä, että tutkimuksessa käsitelty LAMP-monistus on uudehko menetelmä ja suomenkielistä lähdemateriaalia ei ollut saatavilla. Lähdemateriaali oli myös paikoin vaikeaselkoista. Teoreettinen viitekehys kokonaisuudessaan on kirjoitettu suurelta osin englanninkielisen lähdemateriaalin pohjalta ja lähteiden suomentaminen sekä suomenkielisen tekstin tuottaminen oli paikoin ongelmallista. Teoreettinen viitekehys on kuitenkin tehty niin hyvin kuin mahdollista, mutta virheiden mahdollisuutta suomentamisessa ei voi täysin poissulkea.

Tutkimuksessa käytetty lähdemateriaali oli uutta ja muun muassa LAMP-monistuksen teorian pohjana käytettiin menetelmän kehittäjien alkuperäisiä tutkimusjulkaisuja.

9.3. Eettisyys

Hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen suoritettu tieteellinen tutkimus voi olla eettisesti hyväksyttävää ja luotettavaa. Täten tutkimuksen tuloksetkin voivat olla uskottavia. Tutkimuksen aikana eri vaiheissa noudatetaan rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta. Tutkimuksessa käytetään tieteellisen tutkimuksen kriteerien mukaisia ja eettisiä tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmiä. Toisten tutkijoiden työtä kunnioitetaan ja tutkimuksessa viitataan julkaisuihin asianmukaisella tavalla. Tutkimus tulee suunnitella, toteuttaa ja raportoida tieteelliselle tiedolle asetettujen vaatimusten mukaan. Tutkimuslupa tulee olla hankittuna ja eettinen arviointi suoritettuna. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

Tutkimus pyrittiin suorittamaan rehellisesti, huolellisesti ja tarkasti. Teoreettinen viitekehys rakennettiin niin hyvin ja tarkasti kuin mahdollista. Tutkimuksen tulokset esitetään niin kuin ne tutkimuksessa tuli esille.

Tutkimusaineistona käytettiin aitoja potilasnäytteitä. Tutkimuksen aikana näytteitä käsiteltiin kuitenkin tutkimusnumeroiden avulla, joten potilaiden henkilötietoja ei käsitelty missään vaiheessa. Tutkimusaineistoon kuuluvista näytteistä potilaat saivat vastaukset normaalin käytännön mukaan käytössä olevan qPCR-menetelmän perusteella. Jäljelle jäänyttä näytettä käytettiin uuden menetelmän testaukseen. Tutkimusta varten ei tarvinnut kerätä erikseen verinäytteitä, joten erillistä suostumusta potilailta ei tarvinnut pyytää.

Tutkimuksessa käytettiin lähteinä mahdollisimman uusia ja vertaisarvioituja artikkeleita, joka lisää tutkimuksen luotettavuutta. Raportissa kerrotut asiat pyrittiin varmistamaan useammasta eri lähteestä. Lähteisiin viitattiin asianmukaisesti, eikä muiden kirjoittajien tekstiä esitetty omina. Lähdemateriaalista nousevat asiat pyrittiin esittämään raportissa juuri niin kuin lähteen kirjoittaja on asian esittänyt.

9.4. Oma oppiminen

Opinnäytetyön tekijän oma oppiminen on lisääntynyt huomattavasti tutkimuksen aikana. Teoriatieto tutkimuksessa käsiteltävistä asioista on kasvanut huomattavasti. Tietoisuus lisääntyi HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvistä asioista. Tutkimuksen aikana opittiin myös uuden menetelmän periaate ja sen käytännön suorittaminen.

Tutkimusprosessin eri vaiheet selkeytyivät tutkimuksen aikana. Tutkimusprosessin osaaminen voi olla tärkeässä roolissa tulevaisuudessa ja mahdollisissa uusissa työmahdollisuuksissa. Prosessi opetti järjestelmällisyyttä ja suunnitelmallisuutta.

9.5. Johtopäätökset

Isotermaalinen LAMP-monistus oli luotettava menetelmä HLA-B27-kudosantigeenin ja laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisessa. Menetelmä oli myös nopeampi suorittaa kuin qPCR-menetelmä. Tavoitteena oli ottaa uusi menetelmä rutiinikäyttöön Seinäjoen keskussairaalan patologian laboratoriossa. Tavoite ei täytynyt, koska LAMP-monistuksessa käsin suoritettavat työvaiheet lisäävät inhimillisten virheiden määrää ja virheillä voi olla vaikutusta myös potilasturvallisuuteen. LAMP -monistuksen käyttöönottoon potilasdiagnoosiikkaan tarvitaan erillinen laite, joka suorittaa menetelmän pipetointivaiheet. Tällä tavoin pipetoinneista aiheutuvat virheet voidaan minimoida.

LaCAR MDx on kehittänyt myös muita isotermaaliseen LAMP -monistukseen perustuvia testikittejä kuin tässä opinnäytetyössä esiintyvät testikitit. Niiden kohdalla olisi myös hyvä tutkia niiden vastaavuus käytössä olevaan menetelmään ja selvittää menetelmän suorittamiseen kuluva aika. Näin voisi olla mahdollista nopeuttaa myös muiden tutkimusten suorittamista. LAMP -monistuksen kustannustehokkuus verrattuna muihin menetelmiin olisi myös tärkeä tutkimuksen aihe.

LÄHTEET

Abildgaard, A., Tovbjerg, S.K., Giltay, A., Detemmerman, L. & Nissen, P.H. 2018. Lactase persistence genotyping on whole blood by loop-mediated isothermal amplification and melting curve analysis. *Clinica Chimica Acta*, 482, 50-56.

Bayless, T.M., Brown, E. & Paige, D.M. 2017. Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance. *Current gastroenterology reports*, 19(5), 23-30.

Bodlaj, G., Stöcher, M., Hufnagl, P., Hubmann, R., Biesenbach, G., Stekel, H. & Berg, J. 2006. Genotyping of the lactase-phlorizin hydrolase -13910 polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. *Clinical chemistry* 52(1), 148-51.

Bowness, P. 2015. HLA-B27. *Annual Review of Immunology*, 33, 29–48.

Deshpande, A. 2017. The human leukocyte antigen system ... simplified. *Global Journal of Transfusion Medicine*, 2(2). Luettu 5.8.2019.

<http://www.gjtmonline.com/article.asp?issn=2468-8398;year=2017;volume=2;issue=2;spage=77;epage=88;aulast=Deshpande>

Duodecim Terveyskirjasto. 2018. Lääketieteen sanasto. Laktoosi-intoleranssi. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 25.1.2019.

https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt01859&p_hakusana=laktoosi-intoleranssi

Domínguez-Jiménez, J.L. & Fernández-Suárez, A. 2017. Diagnosis of lactose intolerance. *Medicina Clínica*, 148(6), 262-264.

Dzialanski, Z., Barany, M., Engfeldt, P., Magnuson, A., Olsson, L.A. & Nilsson, T.K. 2016. Lactase persistence versus lactose intolerance: Is there an intermediate phenotype? *Clinical Biochemistry* 49(3), 248-252.

Edwards, K. J. & Logan, J. M. J. Performing Real-Time PCR. Teoksessa Logan, J., Edwards, K. & Saunders, N. (toim.) *Real-time PCR, Current Technology and Applications*. Caister Academic Press.

Eiken Chemicals. 2005. The principle of LAMP method. Luettu 12.8.2019.

<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>

Enattah, N.S., Sahi, T., Savilahti, E., Terwilliger, J.D., Peltonen, L. & Järvelä, I. 2002. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature Genetics* 30(2), 233-237.

Encyclopædia Britannica Online. 2018. Polymerase chain reaction. Luettu 23.1.2019.

<https://academic-eb-com.libproxy.tuni.fi/levels/collegiate/article/polymerase-chain-reaction/2524>

EPSHP. 2016. Laktoosi-intoleranssi diagnostiikka QPCR menetelmällä. Menetelmäkuvaus. 27.8.2019

EPSHP. 2017. HLAB27 diagnostiikka QPCR menetelmällä. Menetelmäkuvaus. 27.8.2019.

Heikkilä, T. 2014. Tilastollinen tutkimus. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Jyväskylän yliopisto. 2015. Kokeellinen tutkimus. Luettu 26.8.2019.

<https://koppa.jyu.fi/avoimet/hum/menetelmapolkuja/menetelmapolku/tutkimus-strategiat/kokeellinen-tutkimus>

Kananen, J. 2015. Opinnäytetyön kirjoittajan opas. Näin kirjoitan opinnäytetyön tai Pro Gradun alusta loppuun. Jyväskylän ammattikorkeakoulu.

Kim, S.Y., Chang, H.E., Song, S.H., Song, J. & Park, K.U. 2011. Rapid genotyping of HLA-B27 among Korean population by real-time PCR melting curve analysis. Clinica Chimica Acta, 412(21), 1912-1917.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Frootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. & Zoric, N. 2006. The Real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine, 27, 95-125.

LaCAR MDx. 2018a. LAMP Human HLA-B27 Detection KIT. Työohje.

LaCAR MDx. 2018b. LAMP Human Lactose Intolerance KIT. Työohje.

Lee, M. A., Squirrell, D. J., Leslie, D. L. & Brown, T. 2009. Homogenous Fluorescent Chemistries for Real-Time PCR. Teoksessa Logan, J., Edwards, K. & Saunders, N. (toim.) Real-time PCR, Current Technology and Applications. Caister Academic Press.

Logan, M. J. & Edwards, K. J. 2009. An Overview of PCR Platforms. Teoksessa Logan, J., Edwards, K. & Saunders, N. (toim.) Real-time PCR, Current Technology and Applications. Caister Academic Press.

Lyon, E., Mao, R. & Swensen J. 2009. Mutation Detection by Real-Time PCR. Teoksessa Logan, J., Edwards, K. & Saunders, N. (toim.) Real-time PCR, Current Technology and Applications. Caister Academic Press.

Mattar, R., de Campos Mazo, Daniel Ferraz & Carrilho, F.J. 2012, Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. Clinical and experimental gastroenterology, 5, 113-121.

Merenmies, J. & Partanen, J. 2011. HLA-järjestelmä ja HLA-molekyylit. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: Kirja 2. Duodecim. Luettu 15.1.2019.

<https://www.oppiportti.fi/op/imm00606/do>

Muendlein, A., Leiherer, A., Zach, C., Brandtner, E.M., Fraunberger, P., Drexel, H. & Geiger, K. 2019. Real-time PCR based detection of the lactase non-persistence associated genetic variant LCT-13910C>T directly from whole blood. *Molecular Biology Reports*. 46(2), 2379-2385.

Mustajoki, P. 2017. Laktoosi-intoleranssi. Duodecim Terveyskirjasto. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 21.3.2019.

https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00038

Mustajoki, P. 2018. Reaktiivinen niveltulehdus. Duodecim Terveyskirjasto. Kustannus Oy Duodecim. Luettu 7.8.2019.

https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00071

Nagamine, K., Hase, T. & Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16, 223-229.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28(12).

Parasannanavar, D.J., Rajadhyaksha, A. & Ghosh, K. 2013. Application of a Simple In-House PCR-SSP Technique for HLA-B 27 Typing in Spondyloarthritis Patients. *Arthritis*, 2013.

Saunders, N. A. 2009. Introduction to the Applications of Real-Time PCR. Teoksessa Logan, J., Edwards, K. & Saunders, N. (toim.) *Real-time PCR, Current Technology and Applications*. Caister Academic Press.

Seipp, M.T., Erali, M., Wies, R.L. & Wittwer, C. 2005, HLA-B27 typing: Evaluation of an allele-specific PCR melting assay and two flow cytometric antigen assays. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 63B (1), 10-15.

Shirato, K. 2019. Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification. *Microbiology and Immunology*, 63(10), 407-412.

Smith, S. M., Laurie, A. D., Potter, H. C. & McGettigan, B. D. 2014. HLA-B27 real-time PCR using TaqMan-MGB sequence specific probes. *Medical Laboratory Science*, 68(1), 4-8.

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen J. 2010. *Geenitekniikka*. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu.

Taneja, V., Mangalam, A. & David, C. S. 2014. Genetic Predisposition to Autoimmune Diseases Conferred by the Major Histocompatibility Complex-Chapter 27: Utility of Animal Models. Teoksessa Rose, N. & Mackay, I. (toim.): *The Autoimmune Diseases*, Elsevier Inc., 5, 365-380.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje.

U.S. National Library of Medicine. N.d. Histocompatibility complex. Luettu 7.8.2019.

<https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genefamily/hla>

Vilkka, H. 2015. Tutki ja kehitä. Jyväskylä: PS-kustannus.

Qiagen. 2012. QIAasympphony® DSP DNA Handbook.

Zhang, X., Lowe, S.B. & Gooding, J.J. 2014. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Biosensors and Bioelectronics, 61, 491-499.

LIITTEET

Liite 1. HLA-B27-kudosantigeenin osoittamisen tulokset

Näytenumero	Tulos qPCR	Tulos LAMP	Näytenumero	Tulos qPCR	Tulos LAMP
2306174	Negat	Negat	2386028	Negat	Negat
2312378	Posit	Posit	2434391	Negat	Negat
2321791	Posit	Posit	2435615	Negat	Negat
2321019	Posit	Posit	2435786	Negat	Negat
2318674	Negat	Negat	2434698	Negat	Negat
2328026	Negat	Negat	2415245	Negat	Negat
2338959	Posit	Posit	2418868	Posit	Posit
2334084	Negat	Negat	2419312	Negat	Negat
2340720	Negat	Negat	2426433	Negat	Negat
2340804	Negat	Negat	2420960	Posit	Posit
2362880	Posit	Posit	2442177	Posit	Posit
2367245	Negat	Negat	2441619	Negat	Negat
2352070	Negat	Negat	2443929	Negat	Negat
2364022	Negat	Negat	2448852	Negat	Negat
2364700	Negat	Negat	2450406	Posit	Posit
2364751	Negat	Negat	2469990	Posit	Posit
2373301	Negat	Negat	2471751	Negat	Negat
2369859	Negat	Negat	2453910	Posit	Posit
2370909	Negat	Negat	2454453	Negat	Negat
2398061	Negat	Negat	2462830	Posit	Posit
2405809	Negat	Negat	2464082	Negat	Negat
2389879	Negat	Negat	2506286	Posit	Posit
2403202	Negat	Negat	2464176	Negat	Negat
2400112	Posit	Posit	2504474	Posit	Posit
2398082	Negat	Negat			

Liite 2. Laktoosi-intoleranssiin liittyvän mutaation osoittamisen tulokset.

Näyte-numero	Tulos qPCR	Tulos LAMP	Näyte-numero	Tulos qPCR	Tulos LAMP	Näyte-numero	Tulos qPCR	Tulos LAMP
2308008	TT	TT	2400526	CT	CT	2380957	TT	TT
2307096	CT	CT	2402264	CT	CT	2384593	CT	CT
2308576	CT	CT	2399802	CT	CT	2399532	CC	CC
2303471	CC	CC	2403317	CT	CT	2553304	TT	TT
2309031	CT	CT	2408316	CT	CT	2550925	CT	CT
2313999	CT	CT	2409283	CT	CT	2548328	TT	TT
2314473	TT	TT	2402920	CT	CT	2507497	CT	CT
2415465	CC	CC	2401037	CT	CT	2379677	CT	CT
2311972	TT	TT	2402196	TT	TT	2549484	CT	CT
2320038	CT	CT	2405987	CC	CC			
2322588	CC	CC	2405347	CT	CT			
2330060	TT	TT	2390556	CT	CT			
2322002	CC	CC	2392501	TT	TT			
2331621	CC	CC	2392466	TT	TT			
2331849	CT	CT	2392049	CT	CT			
2328617	CT	CT	2406565	CC	CC			
2335476	TT	TT	2393016	TT	TT			
2337856	CT	CT	2392226	CT	CT			
2336568	CT	CT	2504492	CC	CC			
2341083	CT	CT	2533839	TT	TT			
2364315	CT	CT	2543395	CC	CC			
2363369	TT	TT	2543828	CT	CT			
2367634	CT	CT	2543645	TT	TT			
2343651	TT	TT	2511989	CT	CT			
2364144	TT	TT	2518945	TT	TT			
2341270	TT	TT	2529808	CT	CT			
2366086	TT	TT	2543823	TT	TT			
2364366	CT	CT	2534873	CC	CC			
2364645	CC	CC	2518279	CT	CT			
2350606	CT	CT	2514076	TT	TT			
2356258	CT	CT	2512689	TT	TT			
2355859	CT	CT	2522515	TT	TT			
2355281	CC	CC	2532159	TT	TT			
2356587	CC	CC	2513046	TT	TT			
2354123	CC	CC	2519509	TT	TT			
2374209	TT	TT	2510590	CT	CT			
2370058	TT	TT	2512242	CT	CT			
2372197	CC	CC	2524906	CC	CC			
2384737	CT	CT	2517749	TT	TT			
2385677	TT	TT	2525986	CT	CT			
2381140	CT	CT	2525959	CT	CT			
2378332	CC	CC	2527782	CT	CT			