



**PIRKANMAAN
AMMATTIKORKEAKOULU**

**PCR-MENETELMÄN OPTIMOINTI KIHOMADON DNA:N OSOITTA-
MISEKSI ULOSTEESTA**

**Noora Kemppainen
Pekka Keränen
Hanna-Liisa Kojo**

Opinnäytetyö
Lokakuu 2009
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Pirkanmaan ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

KEMPPAINEN, NOORA, KERÄNEN, PEKKA & KOJO, HANNA-LIISA:
PCR-menetelmän optimointi kihomadon DNA:n osoittamiseksi ulosteesta

Opinnäytetyö 68 s., liitteet 3 s.
Lokakuu 2009

Molekyylibiologisten menetelmien käyttö lisääntyy monissa mikrobiologian laboratorioissa, koska niiden avulla voidaan osoittaa spesifisesti ja sensitiivisesti tutkittavan DNA:n olemassaoloa näytteessä. Yleisin menetelmistä on PCR (Polymerase Chain Reaction) eli polymeerasiketjureaktio, jolla monistetaan DNA:ta. DNA:n monistamisen jälkeen voidaan monistettu DNA havaita erilaisilla visualisointimenetelmillä.

XXX. Opinnäytetyössä optimoitiin kvalitatiivisen ja kvantitatiivisen PCR-menetelmän kihomatojen osoittamiseksi ulosteesta. Tämän työn PCR-menetelmän optimointi käsittää alukkeiden suunnittelun ja erilaisten reagenssipitoisuuksien testaamisen, sekä reaktiolämpötilojen säätämisen optimaalisiksi. Lisäksi testattiin eristysmenetelmien toimivuutta kihomadon eristämiseksi ulostenäytteistä kahdella eri menetelmällä. Eristysmenetelminä olivat silikapohjainen käsieristysmenetelmä (QIAamp DNA Stool mini kit) ja automaattilaitteella tehtävä magneettipartikkeleihin perustuva menetelmä (MagNA Pure).

PCR-menetelmistä reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR osoittautui paremmin toimivaksi, koska sen herkkyys ja toistettavuus oli testauksissa parempi kuin kvalitatiivisen PCR:n. XXX. Eristysmenetelmistä kummatkin toimivat, mutta automaattisella eristyslaitteella tehtävä eristysmenetelmä sopii laboratorion käyttöön paremmin, koska se mahdollistaa suurempien näytemäärien eristämisen aikaa säästän.

Avainsanat: autoimmuunisairaudet, DIABIMMUNE-tutkimus, DNA:n eristys, kihomato, kvalitatiivinen PCR, kvantitatiivinen PCR, PCR:n optimointi

ABSTRACT

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu
Pirkanmaa University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

KEMPPAINEN, NOORA, KERÄNEN, PEKKA & KOJO, HANNA-LIISA:

The optimization of polymerase chain reaction to pinworms DNA

Bachelor's Thesis 71 pages
October 2009

The use of molecularbiology methods is increasing in microbiology laboratories because of their sensitivity and specificity. The most common method is PCR (Polymerase Chain Reaction) which is used to copy DNA.

XXX. The purpose of this bachelor's thesis is to optimize quantitative and qualitative polymerase chain reaction to pinworms DNA. In the optimization we used two DNA-polymerase enzymes, different MgCl₂ concentrations and annealing temperatures. We also used two DNA-isolation methods.

We found out that the quantitative PCR is more sensitive and specific than the qualitative PCR in the cloning of pinworms DNA. In qualitative PCR results were obtained only with DyNAzymeTM DNA-polymerase. XXX.

Keywords: auto-immune diseases, DIABIMMUNE-research, pinworm, isolation of DNA, qualitative PCR, real-time PCR, optimization of PCR

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	5
2 DIABIMMUNE-TUTKIMUS.....	7
3 KIHOMADOT	9
3.1 Kihomadon anatomia ja kiertokulku.....	9
3.2 Kihomatoinfektion taudinkuva.....	12
3.3 Kihomatoinfektion diagnostiikka ja hoito.....	13
4 LABORATORIOMENETELMIEN PERIAATTEET	15
4.1 DNA:n eristys ja puhdistus	15
4.2 Polymeerasiketjureaktio	17
4.3 Alukkeiden suunnittelu	20
4.4 Polymeerasiketjureaktion optimointi	22
4.5 Agaroosigeelielektroforeesi	24
4.6 Reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio.....	27
5 TUTKIMUSTEHTÄVÄ JA TUTKIMUSMENETELMÄT	33
5.1 Opinnäytetyön tehtävä, tarkoitus ja tavoitteet.....	33
5.2 PCR:n optimointi toimintatutkimuksena	34
6 PCR-MENETELMIEN OPTIMOINNIN SUORITUS JA TULOKSET	37
6.1 Laitteet, välineet ja reagenssit.....	38
6.2 Työskentely virologian laboratoriossa	39
6.3 Kihomadon DNA:n eristys QIAamp DNA Stool mini kit:llä	40
6.4 Kvalitatiivisen PCR-menetelmän optimointi	41
6.5 Kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR-menetelmän optimointi.....	56
7 POHDINTA	62
LÄHTEET.....	65
LIITTEET	69

1 JOHDANTO

Kihomato (*Enterobius vermicularis*) on ihmisen suolistossa elävä loinen. Kihomatoinfektioita esiintyy erityisesti lapsilla. Esiintyvyyteen vaikuttaa yleinen elintaso, erityisesti hygieniataso. Venäjän Karjalassa lapsilla kihomatoinfektioiden määrä voi olla huomattavasti suurempi suomalaislapsiin verrattuna. Päinvastoin immuunisairauksia kuten allergioita ja 1 tyypin diabetesta on Venäjän Karjalassa vähemmän kuin Suomessa.

XXX.

Saimme opinnäytetyömme aiheen professori Heikki Hyödyltä Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksen virologian yksiköstä. Työelämäohjaajamme olivat tutkijat Sami Oikarinen ja Hanna Honkanen. Opinnäytetyömme tehtävänä on optimoida kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio (PCR) kihomadon DNA:n osoittamiseksi ulosteesta. Tavoitteenamme on PCR-menetelmän saaminen toimivaksi ja herkäksi kihomadon DNA:lle. Työmme kokeellisessa osuudessa testaamme eri reaktio-olosuhteiden vaikutuksia PCR:n toimivuuteen. Kvalitatiivisessa PCR:ssä käytämme kahta eri entsyymiä, testaamme magnesiumin liuoskonsentraatioita ja säätelemme reaktiolämpötiloja PCR-ohjelmalla. Kvantitatiivisessä reaaliaikaisessa PCR:ssä testaamme erilaisia koetin- ja alukepitoisuuksia. Lisäksi testaamme eri DNA:n eristysmenetelmiä.

Opinnäytetyömme käsittelee DIABIMMUNE-tutkimusta, kihomatoja, DNA:n eristystä sekä PCR-reaktion optimointia. Työmme toteutetaan toimintatutkimuksena. Saamamme tulokset tulevat käyttöön professori Heikki Hyödyn tutkimusryhmälle. Työmme on suunnattu erityisesti bioanalyttikko-opiskelijoille sekä muille aiheesta kiinnostuneille.

2 DIABIMMUNE-TUTKIMUS

Diabimmune on EU:n rahoittama tutkimusprojekti, jota koordinoi Helsingin yliopisto. Professori Heikki Hyödyn tutkimusryhmä Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksen virologian yksiköstä osallistuu tähän kansainväliseen tutkimukseen. Projektiin osallistuu myös tutkijoita Alankomaista, Venäjältä, Virosta ja Saksasta. (Diabimmune study 2009.)

Tutkijoilla on oletuksena, että liian hygieeniset elinolot varhaislapsuudessa altistaisivat autoimmuunisairauksille. Tutkimuksen tavoite on testata tätä hygieniahypoteesia tyyppin 1 diabeteksen ja muiden autoimmuunisairauksien synnyssä sekä selvittää mekanismeja ja niiden vaikutuksia immuniteetin kehittymiselle. Alustavien tutkimusten perusteella on havaittu eroavaisuuksia kahden elintasoltaan erilaisen kansan immuunivälitteisten sairauksien esiintyvyydessä. Kaksi elintasoltaan erilaisista tutkimuskohdetta ovat Venäjän Karjala ja Suomi. Lisäksi tutkimukseen osallistuu Viro, jonka elintaso on nousussa. Näistä kolmesta maasta muodostuu elävä tutkimuslaboratorio, jossa voidaan lähteä hygieniahypoteesia testaamaan. (Diabimmune study 2009.)

Tutkimuskohteena ovat vastasyntyneet sekä 3-5-vuotiaat lapset Suomesta, Venäjän Karjalasta ja Virosta. Tyyppin 1 diabetesta esiintyy suomalaislapsilla kuusi kertaa enemmän kuin Venäjän Karjalan lapsilla. Maantieteellisesti vierekkäin asuvalla populaatiolla ei ole geneettisiä eroavaisuuksia niin paljoa, että se voisi selittää tyyppin 1 diabeteksen eroavaisuudet sen esiintyvyydessä. Seurannan aikana selvitetään elinspesifisten autovasta-aineiden esiintyvyyttä, allergioita, infektioita, suoliston mikrobeja ja ravitsemustekijöitä. (Diabimmune study 2009.)

Immuunisairauksien syntyyn vaikuttavat immunoglobuliinit. Immunoglobuliini E (IgE) on yksi viidestä tärkeimmästä vasta-aineesta. IgE:tä muodostuu elinympäristön proteiineja kuten ruoka-aineita, siitepölyä ja eläinhilsettä vastaan. IgE-pitoisuus on lapsuusiässä pieni ja se kasvaa aina 10-15 ikävuoteen saakka. Ihmisillä, jotka elävät alkukantaisissa elinolosuhteissa IgE suuntautuu pääasiassa parasiitteja vas-

taan. Korkeamman elintason myötä parasiitti-infektiot vähenevät ja ihminen altistuu myös vähemmän mikrobien, kuten bakteerien ja homeiden toksineille eli myrkkyaineille. Tästä johtuen immuunivaste ohjautuu väärään suuntaan ja riski sairastua immuunisairauksiin kasvaa. (Hannuksela & Mäkelä 2007, 36.) Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että kokonais-IgE-tasot olivat merkittävästi korkeammat Venäjän Karjalan lapsilla verrattuna suomalaislapsiin. Päinvastoin allergeenispesifiset IgE-tasot olivat matalampia Venäjän Karjalan lapsilla. Tutkijat olettavat, että ero totaali-IgE-tasoissa voidaan osittain selittää parasiitti-infektioiden korkeammalla määrällä Venäjän Karjalassa Suomeen verrattuna. (Aittoniemi ym. 2007, 49-51.)

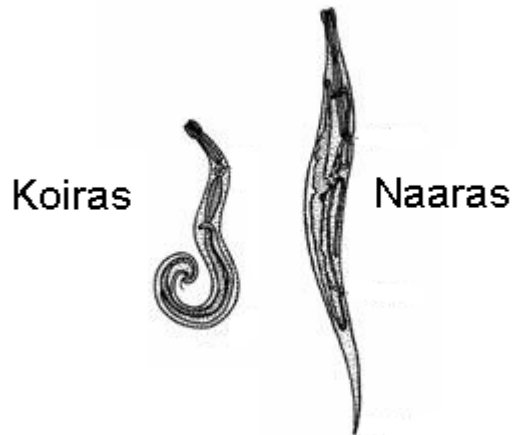
XXX

3 KIHOMADOT

Kihomato (*Enterobius vermicularis*; lat. enterobius, suolistossa elävä; vermicularis, pikkumato) on suolistoloinen, joka kuuluu sukkulamatojen ryhmään. Lääketieteessä kihomatotautia kutsutaan enterobiaasiksi. Kihomato on todennäköisesti seurannut ihmistä koko lajimme historian ajan ja ihmisen evoluution aikana sopeutunut elinolosuhteiden muutoksiin. (Tartuntatautiliitto 2009.) Matoparasiittien aiheuttamat mahasuolikanavan infektiot ovat tavallisia ja toistuvia huonon hygienian maissa, joissa ne leviävät helpommin (Hellstén 2002, 150). Suomessa kihomatoinfektiot ovat ihmisen yleisin matotauti. Eniten infektoita esiintyy päivähoitossa ja koulun alaluokilla olevilla lapsilla. (Huovinen ym. 2003, 358.)

3.1 Kihomadon anatomia ja kiertokulku

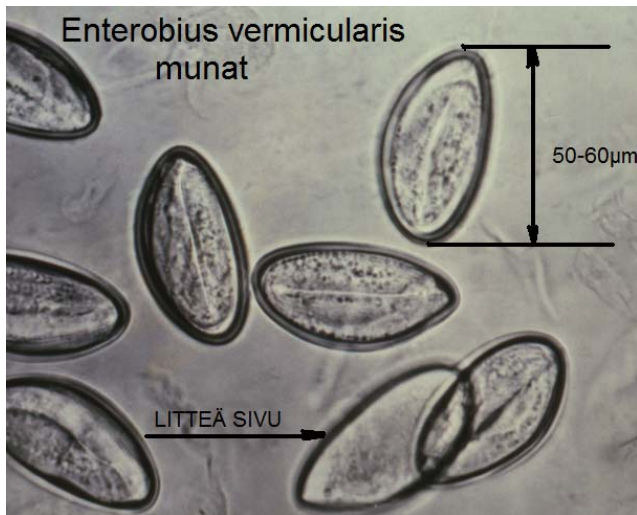
Kihomadot ovat muodoltaan sylinterimäisiä. Naaraskihomadolla on pitkä teräväpäinen häntä ja koirailta häntä on puolestaan kippurassa (kuva 1 s. 10). (Tartuntatautiliitto 2009.) Kihomato uros on n. 2-5 mm pitkä ja 0,2 mm levyinen. Naaras on suurempi, pituudeltaan 8-13 mm ja leveydeltään 0,5 mm. Väriltään kihomadot ovat vaaleita ja kellertävän valkoisia. (David & William 2006, 246.) Mikroskooppisesti tarkasteltuna kihomato on poikkijuovainen ja teräväpäinen. Sen sisällä on usein nähtävissä paljon munia sekä ruokatorvi ja suuaukon ympärillä olevat ”poskipussit”. (Huovinen ym. 2003, 359.)



KUVA 1. Koiras- ja naaraskihomaton tyypillinen muoto (mukaillen Sun-Yat-sen University, 2009)

Kihomato on vain ihmisen parasiitti, joten tartunnan voi saada vain toiselta ihmiseltä eikä väli-isäntiä tarvita. Tartunta tapahtuu käsien välityksellä nielemällä infektiivisiä munia. (Huovinen ym. 2003, 358.) Munat leviävät vaatteiden ja vuodevaatteiden välityksellä, joten ne leviävät helposti perheen keskuudessa. Munat voivat säilyä infektiokykyisinä kuivassa pölyssä joitakin päiviä, joten ne leviävät helposti sisätiloissa huoneilman mukana. (David & William 2006, 246.) Tartunnan voi saada myös kontaminoituneista esineistä, kuten leluista (Hellstén 2002, 85).

Kihomaton munat ovat soikion muotoisia, 50-60 μm pitkiä ja 20-32 μm leveitä. Ne ovat yleensä yhdeltä sivultaan litteitä (kuva 2. s.11) ja tämän avulla ne voidaan erottaa koukkumaton munista. (David & Williams 2003, 247.) Munat tulevat infektiokykyisiksi 4-8 tunnin kuluttua siitä, kun aikuinen naarasmato on kiinnittänyt ne isännän peräaukon ympärille. Infektiokykyiset munat sisältävät ensimmäisen asteen toukan. (Huovinen ym. 2003, 358.) Munat voivat säilyä elossa elimistön ulkopuolella joitakin viikkoja (David & William 2006, 246). Nieltä muna aukeaa ohutsuolessa vapauttaen toisen asteen toukan, josta kehittyy aikuinen kihomato (Huovinen ym. 2003, 358). Munan kehitys aikuiseksi kihomadoksi kestää noin 6 viikkoa, mutta se voi tapahtua nopeamminkin (David & William 2006, 246).

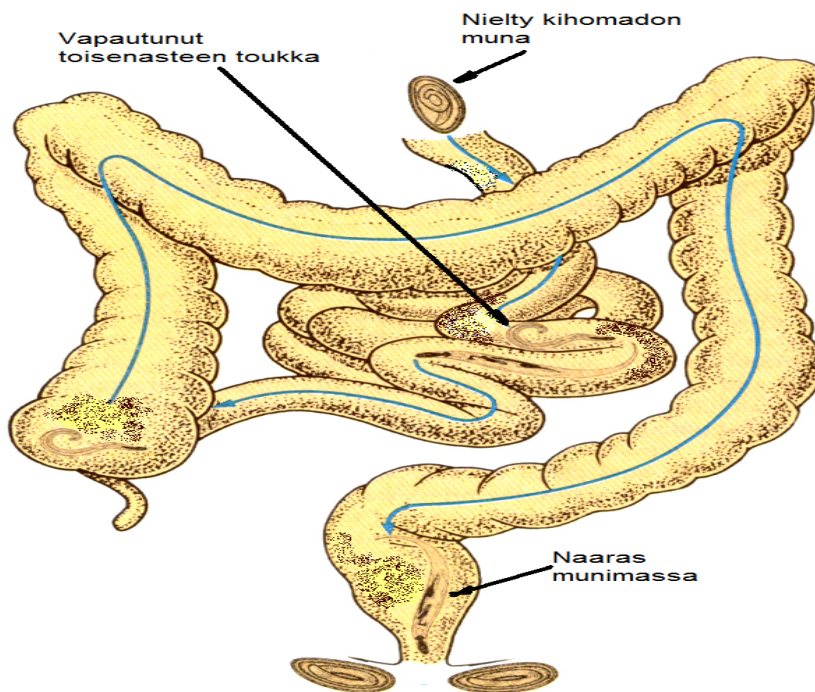


KUVA 2. Kihomadon munat mikroskoopissa (mukaillen Centers for Disease Control and Prevention, 2005)

Aikuiset madot elävät pääasiassa umpisuolen, mutta myös paksu- ja peräsuolen alueella (Baron ym. 2003, 2031). Kihomadot kiinnittyvät suolen seinämän limakalvoon. Ravinnokseen ne käyttävät suolen sisällön ravinteita ja glukoosia. (Tartuntatautiliitto 2009.) Aikuiset madot ovat elinkykyisiä noin 1-3 kuukautta. Naarasmadot ovat munimiskykyisiä noin kuuden viikon kuluttua syntymästään. Kihomato ei kykene lisääntymään suvuttomasti, joten naarasmato pystyy tuottamaan infektiokykyisiä munia vain, jos samassa isännässä on myös koirasmatoja. (Huovinen ym. 2003, 358.) Koirasmadot kuolevat pian hedelmöitettyään naaraan. Munat kehittyvät naaraan sisällä, kunnes ne täyttävät naaraan elimistön melkein kokonaan. (Tartuntatautiliitto 2009.) Naarasmadot vaeltavat öisin peräaukon ympärille munimaan (kuva 3. s. 12) (Huovinen ym. 2003, 358). Tämä tapahtuu luultavasti ruumiinlämmön laskemisen seurauksena. Munittuaan myös naaraat kuolevat. (Tartuntatautiliitto 2009.)

Munat kiinnittyvät peräaukon limakalvon poimuihin ja ihoon madon erittämän liimamaisen nesteen avulla. Eritteen aiheuttama kutina on kihomadon kiertokulun kannalta hyödyllistä, sillä raapimisen myötä munat tarttuvat helposti sormiin sekä vaatteisiin ja vuodevaatteisiin. Sormista munat kulkeutuvat helposti uudelleen saman isännän tai uuden isännän suuhun ja näin madon kiertokulku jatkuu. (Huovi-

nen ym. 2003, 358.) Yksi autoinfektiotapa on munien kulkeutuminen peräaukolta takaisin peräsuoleen ja paksusuoleen (David & William 2006, 246).



KUVA 3. Kihomadon kehitys suolistossa (mukaillen Hospital medicine/Chaners publishing company, 2009)

3.2 Kihomatoinfektion taudinkuva

Kihomatoinfektion aiheuttamat oireet ja niiden voimakkuus vaihtelevat yksilöllisesti. Aikuiset ovat usein oireettomia (Tartuntatautiliitto 2009). Naarasmatojen vaellus peräaukolle ja munien pinnalla oleva limamainen erite aiheuttavat kutinaa, joka voi olla hyvin voimakasta. Kutina voi häiritä infektoituneen unta. (David & William 2006, 247.) Kutinasta aiheutuva raapiminen voi saada aikaan myös verinaarmuja peräaukon seudulle. Kihomatoinfektio ei yleensä aiheuta yleiskunnon huononemista tai painon laskua, koska kihomadot käyttävät vain vähän ravinteita. Suuri kihomatomäärä voi joskus aiheuttaa umpisuolen tulehduksen, mutta näin tapahtuu harvoin ja kihomatojen yhteyttä umpisuolen tulehtumiseen ei ole tieteellisesti todistet-

tu. (Hellstén 2002, 85.) Ärsytys voi myös aiheuttaa peräaukon supistuksia, joka ilmenee kipuna ja joskus vatsavaivoina (Tartuntatautiliitto 2009). Pienillä tytöillä madot voivat siirtyä peräaukolta vaginaan aiheuttaen paikallista ärsytystä (David & William 2006, 247) ja vaginiitin eli emätintulehduksen oireita (Hellstén 2002, 85). Kihomadot voivat myös kulkea virtsaputkeen ja altistaa virtsaputken tulehdukselle (Tartuntatautiliitto 2009). Kihomatojen kiinnittyminen suolen seinämään saattaa aiheuttaa tulehduksen (David & Williams 2006, 248).

3.3 Kihomatoinfektion diagnostiikka ja hoito

Kihomatoinfektio voidaan diagnosoida liikkuvien matojen havaitsemisella, madoiksi epäiltyjen liikkumattomien rakenteiden mikroskooppitutkimuksella ja osoittamalla madon munia peräaukon ympäriltä otetusta näytteestä. Näytteitä kihomadon muniin osoittamiseksi tulisi ottaa useita, koska diagnostiikka vain yhden näytteen perusteella on epävarmaa. (Huovinen ym. 2003, 359-360.)

Liikkuvia matoja voidaan etsiä lapsen peräaukon ympäriltä nukkumaanmenon jälkeen taskulampulla, koska pimeä saa kihomatonaaat tulemaan iholle munimaan (Tartuntatautiliitto 2009). Herkempi tapa on osoittaa kihomadon munia näytteestä, joka on otettu aamulla ennen ulostamista. Peräaukkoa ei myöskään saisi raapia ennen näytteenottoa. Munanäyte voidaan ottaa pumpulitikulla tai teippinäytteenä. Pumpulitikulla näytettä otettaessa tikku kostutetaan keittosuolaliuokseen tai vaseeliiniin ja sitä pyöritetään voimakkaasti peräaukon ympärillä. Tikku lähetetään laboratorioon tutkittavaksi. Madolliset munat irrotetaan tikusta ravistelemalla tai liuottamalla. Näytteestä etsitään kihomadon munia mikroskoopin avulla. Teippinäyte otetaan 10 cm:n pituisella läpinäkyvällä sellofaaniteipillä, joka kiinnitetään objektilasille mikroskooppista tutkimusta varten. (Huovinen ym. 2003, 359.)

Kihomatojen häätö vaatii lääkehoitoa (Tartuntatautiliitto 2009). Infektion hoidossa voidaan käyttää esimerkiksi sukkulamatoille kuuluvaa mebendatsolia, pyriiiniä tai albendatsolia. Lääkehoito annetaan kerta-annoksena yleensä kahdesti

noin kolmen viikon välein. Lääkkeet eivät kuitenkaan tehoa kihomadon muniin, joten uusintainfektio hoidon jälkeen on hyvin todennäköinen. Uusintainfektion estämiseksi täytyy kiinnittää huomiota riittävään hygieniaan. Lääkehoidon jälkeisenä päivänä on suositeltavaa pestä vuodevaatteet, yöpuvut ja lasten unilelut sekä siivota huone pölyttömäksi. Munat voidaan tuhota patjoista ja vuodevaatteista saunassa kuumakäsittelyllä tai kovassa pakkasessa kylmäkäsittelyllä. Uusintainfektiota voidaan ehkäistä myös hoitamalla samaan aikaan kaikki samassa taloudessa asuvat oireettomatkin henkilöt. (Huovinen ym. 2003, 359.)

4 LABORATORIOMENETELMIEN PERIAATTEET

Polymeraasiketjureaktion (PCR) optimoinnissa käytetään molekyylibiologian perusmenetelmiä, joita tulemme tässä kappaleessa käsittelemään. Näitä menetelmiä ovat itse polymeraasiketjureaktion lisäksi DNA:n eristys ja puhdistus sekä aga-roosigeelielektroforeesi (AGE). Käsittelemme tavallisen PCR-reaktion (kvalitatiivinen PCR) lisäksi reaaliaikaista PCR:ää (kvantitatiivinen PCR) sekä niiden optimointia.

4.1 DNA:n eristys ja puhdistus

Ennen DNA:n erilaisia käsittelyjä ja tutkimuksia haluttu DNA (deoksiribonukleiinihappo) on saatava eristettyä tutkittavasta kohteesta (Suominen & Ollikka 2003, 61). Eristetty DNA tulee puhdistaa solun muista häiritsevistä molekyyleistä. Solun omat DNA:ta hajottavat ja muokkaavat entsyymit on poistettava, jotta ne eivät häiritse PCR-reaktiossa tarvittavien entsyymien toimintaa. (Ulmanen ym. 2004, 34.) Kaikkiin PCR-reaktioihin ei välttämättä tarvitse tehdä DNA:n eristystä ja puhdistusta, vaan niihin riittää, että DNA saadaan vapautumaan solun sisältä reaktiota varten. DNA:n eristykseen ja puhdistamiseen on käytössä erilaisia menetelmiä, kuten esimerkiksi fenoli-kloroformiuutto, etanolisaostus ja silikapuhdistus. Useimmiten menetelmä riippuu DNA:n tulevasta käyttötarkoituksesta ja lähtömateriaalin määrästä. Usein suurilla molekyylibiologisten reagenssien valmistajilla on valmiita reagenssisarjoja DNA:n eristykseen, joiden mukana tulevat yksityiskohtaiset työohjeet. (Suominen & Ollikka 2003, 61-63.)

Kromosomaalisen DNA:n eristys aloitetaan halutun näytemateriaalin keräämisellä. Tutkittava materiaali käsitellään proteinaasi K-entsyymillä EDTA:n ja SDS:n (natriumdodekyylisulfaatti) läsnä ollessa, jolloin solut saadaan hajoamaan. Lisäksi käsittelyssä käytetään RNAasia eli ribonukleaasia, joka hydrolysoi RNA-juosteet

pienemmiksi. DNA-liuos voidaan uutaa fenoli-kloroformimenetelmällä, jolloin saadaan osa proteiineista poistettua. Tämän jälkeen DNA-liuos voidaan saostaa etanolisaostusmenetelmällä. DNA:ta tulee käsitellä varoen, sillä se katkeaa helposti esimerkiksi pipetoinnin, sentrifugoinnin ja sekoituksen yhteydessä. (Suominen & Ollikka 2003, 63-64.)

DNA:n eristysmenetelmät ovat myös pitkälle automatisoituja. Magna Pure LC on Roche:n valmistama laite, jolla voidaan eristää DNA:ta ja RNA:ta monista erilaisista lähtömateriaaleista. Yhdellä eristysajolla voidaan eristää jopa kolmekymmentäkaksi näytettä kerrallaan ja kone suorittaa eristyksen täysin automaattisesti. DNA:n eristys perustuu magneettipartikkelimenetelmään, jossa magneettipartikkelit ovat päällystetty DNA:ta sitovalla silikapäällysteellä. Magneetin avulla saadaan DNA erottumaan muista näytteen ainesosista ja DNA voidaan pestä epäpuhtauksista. MagNA Pure LC:lle on erilaisia reagenssipakkauksia, joilla kaikilla on oma käyttötarkoituksensa. Laitteeseen saa lisäksi kytkettyä myös osakokonaisuuksia, joilla voidaan helpottaa käytännön työskentelyä. (Roche. MagnaPure LC 2009.)

Silikapuhdistus on paljon käytetty menetelmä. Sen avulla voidaan puhdistaa ja väkevöidä DNA:ta. Menetelmä perustuu silikaan, joka sitoo DNA:ta itseensä korkeassa ionivahvuudessa ja näin ollen kaikki muu näytteessä oleva epäpuhtaus voidaan pestä pois. Manuaalieristysmenetelmässä käytetään usein spin column – tekniikkaa, jossa silika on suodatinkalvona pylväässä. Pylvään läpi ajetaan näyte, jolloin DNA sitoutuu silikakalvoon korkeassa ionivahvuudessa. Tämän jälkeen DNA pestään yhdellä tai useammalla pesupuskurilla. Kun epäpuhtaudet on huuhdeltu, voidaan DNA eluoida eli irroittaa huuhtelemalla se liuokseen, jonka ionivahvuus on matala. (Opetushallitus 2009.)

4.2 Polymeraasiketjureaktio

Polymeraasiketjureaktio (Polymerase chain reaction) eli PCR on menetelmä, jolla voidaan monistaa DNA-ketjua kahden emäsjärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä polymeraasientsyymin avulla (Suominen & Ollikka 2003, 107). Menetelmän kehitti kalifornialainen tutkija Kary Mullis 1980 -luvun puolivälissä (Ulmanen, Valste & Viitanen 1995, 38). PCR on yksinkertainen ja tehokas molekyylibiologian avainmenetelmä (Ugaz 2007, 90). PCR perustuu polymeraasientsyymin kykyyn rakentaa uutta DNA-ketjua templaatin eli malliketjun mukaisesti tietyissä lämpötiloissa ja tarvittavien rakennusaineiden läsnä ollessa (Wittwer & Kusukawa 2006, 1412). Kuvassa 4. on PCR-laite, jolla saadaan PCR-reaktioiden lämpötilavaihtelu aikaan, säätämällä laitteeseen lämpötilat. PCR on erittäin herkkä menetelmä ja sen avulla saadaan monistettua lyhyessä ajassa miljoonia molekyyliä. (Ulmanen, Tenhunen & Yläne 2004, 45.) PCR -menetelmistä on nykyään useita erilaisia sovelluksia (Suominen & Ollikka 2003, 107). Sitä käytetään perustutkimuksessa sekä biotekniikassa. Esimerkiksi tartuntatautien diagnostiikassa voidaan monistaa mikrobien DNA:ta PCR:llä. (Ulmanen ym. 2004, 47.)



KUVA 4. PCR-laite (termosykleri) johon laitetaan reaktioputket. Laitteeseen ohjelmoidaan halutut lämpötilat (Keränen 2009)

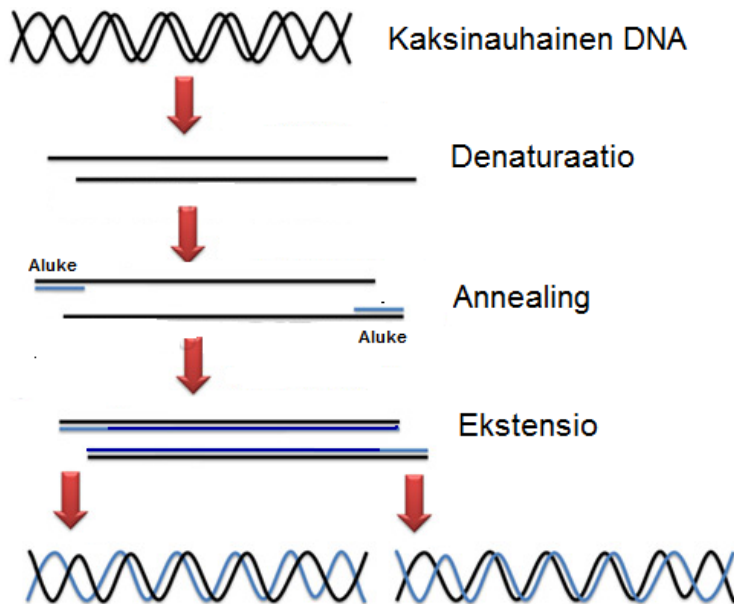
PCR-reaktio tulisi suunnitella huolellisesti etukäteen (Suominen & Ollikka 2009, 112). Menetelmä on erittäin herkkä vieraasta DNA:sta johtuville kontaminaatioille, jotka aiheuttavat vääriä tuloksia. Siksi menetelmässä käytettävien tilojen ja välineiden on oltava mahdollisimman puhtaita. Myös valmiit PCR-tuotteet voivat aiheuttaa kontaminaatioita. Niitä voidaan kuitenkin ehkäistä käyttämällä ultraviolettivaloa tuhoamaan työtiloista valmiit tuotteet, jotta ne eivät voi toimia uudessa reaktiossa templaatteina. (Wilson & Walker 2005, 212.) Puhtauden seuraamiseksi voidaan käyttää negatiivisia kontroleja, joissa näytteen tilalla on vesi (Kidd & Ruano 1995, 7). PCR-reaktioiden valmistukseen voi olla varattuna myös erillinen puhdastila, joka voidaan esimerkiksi ylipaineistaa ilmastoinnilla. Työntekijöiden kulkua voidaan myös rajoittaa niin, että saman työpäivän aikana ei PCR-tuotteiden käsittelytilasta saisi tulla PCR-reaktioiden valmistustilaan. (Suominen & Ollikka. 2003, 112.)

PCR-menetelmä on myös herkkä tekijöille, jotka inhiboivat eli estävät reaktiota. Kliinisissä potilasnäytteissä saattaa olla arvaamattomia, luonnossa esiintyviä inhibiitiota aiheuttavia aineita, joka tulisi ottaa huomioon PCR-menetelmän suunnittelu- vaiheessa. Jotta voidaan varmistua menetelmän toimivuudesta, voidaan käyttää nukleiinihappojen puhdistusmenetelmiä. Kontrollinukleiinihappoketjua voidaan liittää tai lisätä reaktioon, jonka monistumisen johdosta voidaan arvioida inhibiittoreiden määrää näytteessä. (Wittwer & Kusakawa 2006, 1416.) Erityisesti PCR-reaktioita inhiboivia aineita on ihmisen ulosteessa, mikä tulee ottaa huomioon silloin, kun ollaan suunnittelemassa PCR-menetelmää ulostenäytteille (Sami Oikarinen 2009).

PCR-reaktioon tarvitaan templaatti-DNA:ta, alukkeita sekä lämmönkestävää DNA-polymeraasientsyymiä, jonka tehtävänä on kahdentaa soluissa DNA:ta. DNA-polymeraasit saadaan eristämällä kuumissa lähteissä elävistä arkkibakteereista. (Ulmanen ym. 2004, 36, 46.) Tämän bakteerin nimi on *Thermus aquaticus* ja siitä eristetty entsyymi on Taq polymeraasi (Campbell & Farrell 2008, 386). Taq on PCR:ssä yleisimmin käytetty DNA-polymeraasientsyymi (Wilson & Walker 2005, 209). Lisäksi tarvitaan myös DNA:n rakenneosia, nukleotideja (Ulmanen ym. 2004, 36, 46). Monistettavan templaatti-DNA:n sekvenssi eli emäsjärjestys on tunnettava

ainakin osittain. Tämän tiedon avulla monistettavalle DNA:lle suunnitellaan kaksi spesifistä oligonukleotidialuketta eli primeria, jotka pystyvät kiinnittymään templaatti-DNA:n 3' päihin. (Wilson & Walker 2005, 207-208.) DNA:n rakennusaineiksi tarvitaan dNTP:tä (deoksiribonukleotiditriposfaatteja) joka sisältää kaikkia neljää nukleotidia dATP, dCTP, dGTP ja dTTP. Lisäksi tarvitaan Tris-HCl-puskuri, jonka pH on 7-9 ja sopiva magnesiumionikonsentraatio (Mg^{2+}). (Opetushallitus 2009.)

PCR-reaktio koostuu toistuvista kolmivaiheisista sykleistä. Yksi sykli on kestoaltaan yleensä alle viisi minuuttia. (Glick & Pasternak 2003, 111.) Syklin vaiheet ovat, denaturaatio, annealing ja ekstensio, jotka saadaan aikaan muuttamalla reaktiolämpötilaa. Aloitusvaiheessa eli denaturaatiossa lämpötilaa nostetaan yli 90 °C, jolloin DNA denaturoituu korkean lämmön vaikutuksesta eli DNA:n vastinjuosteet irtoavat toisistaan. Annealing-vaiheessa lämpötila lasketaan hetkellisesti 40 – 60 °C, jolloin alukkeet pääsevät sitoutumaan yksijuosteisen templaatti-DNA:n 3' päihin. Annealing-lämpötila on optimoitava jokaiselle PCR-reaktiolle erikseen. (Wilson & Walker 2005, 209.) Kun tämän jälkeen lämpötilaa nostetaan 72 °C ekstensio- eli pidennysvaiheessa, alkaa DNA-polymeraasi liittää alukseen 3' päähän reaktioseoksessa olevia nukleotideja templaatin mallin mukaan, kunnes molemmille templaatin nauhoille on syntynyt vastinnauha (kuva 5 s.20) (Suominen & Ollikka 2003, 108). Syklejä toistettaessa DNA monistuu eksponentiaalisesti kaksinkertais-tuen jokaisen syklin jälkeen (Ugaz 2007, 90). PCR-reaktion monistustuotteet saadaan näkyviin agarosigeelielektroforeesilla (Wittwer & Kusukawa 2006, 1421).



KUVA 5. PCR-reaktiossa tapahtuva monistussykli (mukaillen Molecular Station, 2009)

4.3 Alukkeiden suunnittelu

Erilaisissa molekyylibiologian tutkimusmenetelmissä joudutaan suunnittelemaan erilaisia alukkeita ja koettimia, jotka sitoutuvat spesifisesti DNA-ketjuun (Wilson, K & Walker, J. 2005). PCR-reaktioita suunniteltaessa alukkeiden suunnittelu on yksi tärkeimmistä tekijöistä reaktioiden onnistumisen kannalta (Opetushallitus 2009). Alukkeiden suunnittelussa tarvitsee tuntea tutkittavan DNA:n sekvenssi eli emäs-järjestys. Erilaisien organismien ja ihmisen DNA:t ovat sekvensoitu ja talletettu erilaisiin tietokantoihin eli geenipankkeihin (GenBank). Yksi eniten käytetyistä geenipankeista on US genetic database resource. (Wilson & Walker 2005.) DNA-sekvenssiä voidaan hakea organismin nimellä tai sekvenssin perusteella. Hausta riippuen voidaan saada useampien eri kantojen sekvenssejä. Tämän jälkeen tarkastellaan niiden samankaltaisuuksia ja valitaan sekvenssit tallennettavaksi. Kun halutut DNA-sekvenssit on löydetty tietokannasta ja ne on tallennettu sekä tarkas-

teltu, niin voidaan lähteä suunnittelemaan haluttua aluketta. (Sami Oikarinen 2009.)

Sopiva pituus alukkeille on yleensä 18 - 25 emästä (Wittwer & Kusukawa 2006, 1412-1415). Alukkeen sulamislämpötilaa kuvaava T_m kertoo alukkeen sitoutumisvoimakkuuden. Kun alukkeen sulamislämpötila on korkeampi, aluke sitoutuu voimakkaammin. Sulamislämpötilaan vaikuttaa alukkeen G- ja C-emästen määrä. Mitä enemmän on G- ja C-emäksiä, sitä korkeampi on alukkeen sulamislämpötila. Alukepari tulisi suunnitella siten, että niiden välinen sulamislämpötila ei poikkeaisi 2 °C enempää, koska niiden sitoutuminen kohde DNA:han tulisi olla yhtä voimakasta samassa reaktiolämpötilassa. Reaktion annealing-vaiheessa käytetään useimmiten alukkeen T_m -arvoa hieman alemmaa lämpötilaa. Alukkeen sulamislämpötilan laskennassa voidaan käyttää tietokoneohjelmien apua tai laskea karkeasti ns. Wallacen säännön avulla, jossa jokainen A- ja T-emäs vastaa 2 °C sekä jokainen G- ja C-emäs 4 °C. Alukkeet saattavat sitoutua joskus vääriin kohtiin templaattia ja näin syntyy epäspesifejä tuotteita. Epäspesifistä sitoutumista tapahtuu herkästi sille alueelle, jossa on paljon G- ja C-emästä. Sen vuoksi tulisi aluke suunnitella niin, että 3' päässä ei olisi yli kolmea G- tai C-emästä. Lisäksi aluke ei saisi muodostaa hiuspinnirakenteita, eikä mukana saisi olla alukkeiden keskinäistä sitoutumista. Tietokoneohjelmia käytetään paljon alukkeiden suunnittelussa, jotka laskevat sulamislämpötilan lisäksi erilaisia muita PCR-reaktioita häiritseviä tekijöitä. (Opetushallitus 2009.)

Sopivien alukkeiden löydyttyä, tarkastellaan niiden sitoutumista mahdollisiin muihin genomisiin DNA-ketjuihin. National Center for Biotechnology Information-tietokannassa on niin kutsuttu BLAST-ohjelma (basic local alignment search tool). BLAST-ohjelmalla on mahdollista hakea erilaisilla sekvensseillä samankaltaisuuksia muiden genomisten DNA-sekvenssien kanssa. Näin voidaan tarkistaa, ettei suunniteltu aluke kiinnity joihinkin muihin näytteessä oleviin DNA-sekvensseihin. (Mount, D. 2004. 16.)

Alukkeet ja muut oligonukleotidit valmistetaan siihen tarkoitetuilla syntetisaattoreilla. Yksittäisten ryhmien ei kannata laitetta hankkia, koska se on kallis ja käyttöä suhteessa laitteen kapasiteettiin on vähän. Molekyylibiologisten reagenssien toimittajilta voidaan tilata myös alukkeita ja oligonukleotideja. Tilauksen yhteydessä ilmoitetaan halutun alukkeen tai muun oligonukleotidin tarkka sekvenssi, jotta saadaan juuri sellainen tuote kuin on suunniteltu. (Opetushaliitus 2009.)

4.4 Polymeraasiketjureaktion optimointi

Suunniteltaessa PCR-reaktiota tutkittavalle DNA:lle tulee reaktio-olosuhteet optimoida eli säätää reaktio mahdollisimman toimivaksi ja herkäksi. Reaktio-olosuhteet joudutaan suunnittelemaan etukäteen sekä testaamaan ne kokeellisesti, koska useinkaan PCR-reaktio ei toimi ensi yrittämällä. Mitä pidempää tuotetta ollaan monistamassa sitä enemmän korostuu optimoinnin tärkeys. Yleensä aloitetaan reaktio-olosuhteilla, jotka toimivat useimmissa reaktioissa. (Suominen & Ollikka, 2000, 110.) PCR-reaktion onnistumisen kannalta tulisi optimoida alukkeet sekä magnesium-, dNTP- ja DNA-polymeraasikonsentraatiot. Lisäksi tulisi löytää sopiva denaturaatioaika ja –lämpötila sekä alukkeiden kiinnittymisaika ja –lämpötila. (McPherson, 2000, 68.) Reaktioihin vaikuttavat myös pH, suolakonsentraatio ja detergentti, sekä inhibiittorien estäjät esimerkiksi BSA (nukleaasiton härän seerumin albumiini) (Finnzymes 2002).

PCR-menetelmän suunnittelu alkaa alukkeiden suunnittelusta, koska templaatti tarvitsee spesifiset alukkeet monistuakseen (Sami Oikarinen 2009). Alukkeiden valinta on ratkaisevassa asemassa menetelmän laadun ja reaktion onnistumisen kannalta. Templaatin sekvenssi on oltava tiedossa, kun halutaan suunnitella ja valita alukkeet. Suunnittelussa tulee ottaa huomioon erilaisia tekijöitä, jotka saattavat vaikuttaa reaktion onnistumiseen. Alukkeet eivät saisi kiinnittyä keskenään ja niiden tulisi olla komplementaarisia templaatin sekvenssin halutulla alueella. (Wittwer & Kusukawa 2006, 1412-1415.)

Jos alukkeita on ylimäärä, voivat alukkeet käyttää polymeraasin aktiivisuutta ja rakennusaineita eli dNTP:tä omiin epäspesifisiin monistumisiinsa. Alukkeiden kiinnitymisessä tärkeitä ovat lämpötila ja aika, joihin vaikuttavat alukkeen pituus, pitoisuus ja emäskompositio eli G-C-pitoisuus. Sopiva lämpötila alukkeen kiinnittymiselle on yleensä 5 °C alhaisempi kuin alukkeen sulamislämpötila (T_m). Mikäli kiinnityslämpötilaa nostetaan, vähenee väärin nukleotidien kiinnittyminen sekä itse alukkeiden kiinnittyminen vääriin kohtiin templaattia. Alukkeiden pidentymiseen (ekstensio) vaikuttavia tekijöitä ovat templaatin pituus, määrä ja käytetty lämpötila. Useimmin käytetty lämpötila on 72 °C, jolloin entsyymi kiinnittää 35 - 100 nukleotidia sekunnissa. Entsyymien kiinnittämisenopeuden vaihtelu voi johtua puskurista, pH:sta, suolapitoisuudesta, sekä templaatin luonteesta. (Opetushallitus 2009.)

MgCl₂-konsentraatio tulisi optimoida jokaiselle templaatti-alueparille erikseen, koska DNA-polymeraasit ovat erittäin herkkiä MgCl₂-konsentraation suhteen. MgCl₂-konsentraatio vaikuttaa alukkeiden kiinnittymiseen, DNA:n denaturoitumiseen, entsyymien aktiivisuuteen ja tarkkuuteen. (Opetushallitus 2009.)

Deoksinukleotiditriposfaatissa (dNTP) tulisi olla jokaista neljää deoksinukleotidia sama määrä. Mikäli dNTP-pitoisuus reaktiossa on pieni, vähenee alukkeiden epäspesifisten sitoutumisten määrä sekä väärin nukleotidien kiinnittyminen DNA-nauhaan. PCR:n optimoinnissa tulisi löytää sopiva ja pienin mahdollinen määrä dNTP:tä. (Opetushallitus 2009.)

DNA-polymeraasin määrään vaikuttaa niin templaatti kuin alukkeetkin. PCR-menettelyn optimoinnissa oikea pitoisuus saadaan selville kokeilemalla erilaisia entsyymimääriä. Liiallinen määrä entsyymiä saattaa johtaa epäspesifisiin monistustuotteisiin ja liian alhaisella määrällä puolestaan tuotetta ei synny ollenkaan tai sitä on vähemmän kuin optimiolosuhteissa. (Opetushallitus 2009.) Usein entsyymien valmistajat antavat ohjeet tuottamansa polymeraasin käyttöön, josta selviää entsyymipitoisuudet, joilla päästään parhaimpiin tuloksiin (Sami Oikarinen 2009).

Annealingajan ja -lämpötilan tulee olla sopivat, jotta alukkeet ehtivät kiinnittyä. Mitä korkeampia lämpötiloja käytetään sitä nopeammin polymeraasientsyymien aktiivisuus vähenee. Lämmönkestävät polymeraasientsyymit kestävät hyvin korkeita lämpötiloja ilman, että niiden aktiivisuus laskee. Mikäli templaatissa on paljon G-C-sidoksia, voidaan denaturaatio-lämpötilaa nostaa hieman korkeammaksi. Annealing-lämpötila riippuu alukkeiden pituudesta, nukleotidikoostumuksesta ja pitoisuudesta. Usein sopiva annealing-lämpötila on 5 °C alle alukkeiden sulamislämpötilan. (Opetushallitus 2009.)

Syklien määrään vaikuttaa ainoastaan templaatin määrä, kun muut olot ovat saatu optimoitua. Jos reaktiossa on liikaa syklejä, voi syntyä epäspesifistä monistumista. Toisaalta syklien vähyys voi johtaa siihen, että monistustuotetta ei synny maksimaalista määrää. Syklejä on yleensä 25 - 45 riippuen templaatin määrästä lähtötilanteessa. (Opetushallitus 2009.)

4.5 Agarosigeelielektroforeesi

DNA:n analysoimiseen käytetään agarosigeelielektroforeesia (AGE), jolla voidaan analysoida muutamien kymmenien tai tuhansien emäsparien pituuden omaavia DNA-jaksoja. Menetelmä perustuu nukleiinihappojen sähköiseen varaukseen, jonka avulla ne erottuvat kokonsa mukaan sähkökentässä. (Suominen & Ollikka, 2003, 72-74.)

Agarosigeelielektroforeesissa käytetään agarosigeeliä, joka valmistetaan liuottamalla agarosia veteen seosta lämmittämällä. Liuoksen jäähtyessä muodostuu hyytelömäinen geeli. (Suominen & Ollikka, 2003, 72-74.) Agarosi on lineaarinen polysakkaridi ja se koostuu galaktoosista ja 3,6-anhydrogalaktoosista. Sen molekyylimassa on keskimäärin 12 000 eli se omaa korkean molekyylipainon. Agarosia saadaan eristämällä sitä tietyntyyppisistä merileivistä. (Wilson & Walker 2005, 454.) Agaroseja on saatavana erilaisia, jotka sopivat erilaisiin tarkoituksiin. (Suominen & Ollikka, 2003, 72-74.) Agarosigeeli on rakenteeltaan verkkomainen

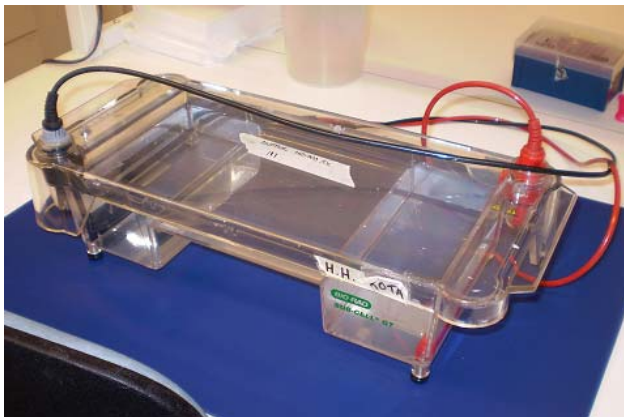
ja se koostuu huokosista, joiden kokoon vaikuttaa agarosin konsentraatio. Kun agarosin konsentraatio on korkea, syntyy pieniä huokosia. Matalassa konsentraatiossa muodostuu puolestaan suuria huokosia. Esimerkiksi yksiprosenttisen geelin huokokset ovat kooltaan noin 150 nm. (Pingoud, Urbanke, Hoggett, & Jeltsch 2002, 121.)

Agarosigeelejä voidaan valmistaa erikokoisia riippuen siitä, kuinka monta näytettä halutaan ajaa geelille (Pingoud ym. 2002, 121). Yleensä agarosigeelit ovat kooltaan 7×10 senttimetrinä 15 x 30 senttimetriin ja paksuus on 0,2 - 0,8 senttimetriä. Yhdelle geelille mahtuu kahdeksasta kolmeenkymmeneen näytekaivoa. Geelin agarosikonsentraatio on yleisimmin 0,3-2,0 %. Matala konsentraatio sopii parhaiten pitkille DNA-fragmenteille, korkea konsentraatio taas lyhyille fragmenteille. (Pingoud ym. 2002, 121.)

Agarosigeeliä valmistettaessa punnitaan tietty määrä agarosia, johon lisätään geelipuskuri eli TAE (Tris-asetatti-EDTA) –puskuri tai TBE (Tris-boraatti-EDTA) ja vesi. Tehty seos kiehautetaan hauteella tai mikroaaltouunissa, kunnes kaikki agarosi on liennut eli seos on muuttunut kirkkaaksi. Kun seos on jäähtynyt noin 55 °C, siihen lisätään etidiumbromidia, jonka avulla saadaan DNA näkymään UV-valossa. Etidiumbromidi voidaan lisätä geeliin myös ajon jälkeen inkuboimalla geeliä elektroforeesipuskurissa tai vedessä, joka sisältää etidiumbromidia 0,5 µg/ml. (Suominen & Ollikka, 2003, 72-74.) Etidiumbromidi on karsinogeeni, jota käsiteltäessä on aina käytettävä suojakäsineitä ja työtakkia (Opetushallitus 2009).

Geelitarjottimena käytetään muovista valmistettua levyä, jonka päihin asetetaan valumisesteet, jotta geeli saadaan jäämään levyille. Liian kuumaa geeliä ei saa kaataa muovilevyille, sillä levy vääntyy yli 50 °C lämpötilassa. Kun geeli on tarjottimella, siihen asetetaan halutun kokoiset näytekammat. Näytekampojen avulla saadaan geelille ajokaivot, jonne DNA-näytteet pipetoidaan. Geeliä kaadettaessa tarjottimelle pitää varoa ilmakuplien muodostumista. Geelin annetaan jähmettyä, jonka jälkeen valumisesteet ja näytekammat poistetaan. (Suominen & Ollikka, 2003, 72-74.)

Agaroosigeeli asetetaan ajokammioon, (kuva 6) jossa on kammion kummassakin päässä elektrodit, anodi ja katodi. Geelin päälle kaadetaan ajopuskuria, niin että koko geeli peittyy tasaisesti. DNA-näytteisiin lisätään näytepuskuria eli latauspuskuria, jonka avulla näytteiden kulkeutumista voidaan seurata ajon aikana. Näytepuskureissa käytettäviä väriaineita ovat mm. bromophenol blue (bromifenolisini) ja xylene cyanol FF (ksyleenisyanoli). Lisäksi puskuri sisältää sokeri- tai glyseroli ainesosia, joiden tarkoituksena on tehdä näyte raskaaksi, jolloin se pysyy paremmin kaivon pohjalla. (Fermentas International, 2009.) Tämän jälkeen näytteet pipetoidaan huolellisesti näytekaivoihin. Näytesarjan alkuun ja loppuun pipetoidaan kokostandardia. Standardi valitaan sen mukaan, minkä pituista DNA:ta halutaan tutkia. (Sami Oikarinen 2009.)



KUVA 6. Agaroosigeelielektroforeesi ajokammio (Keränen 2009)

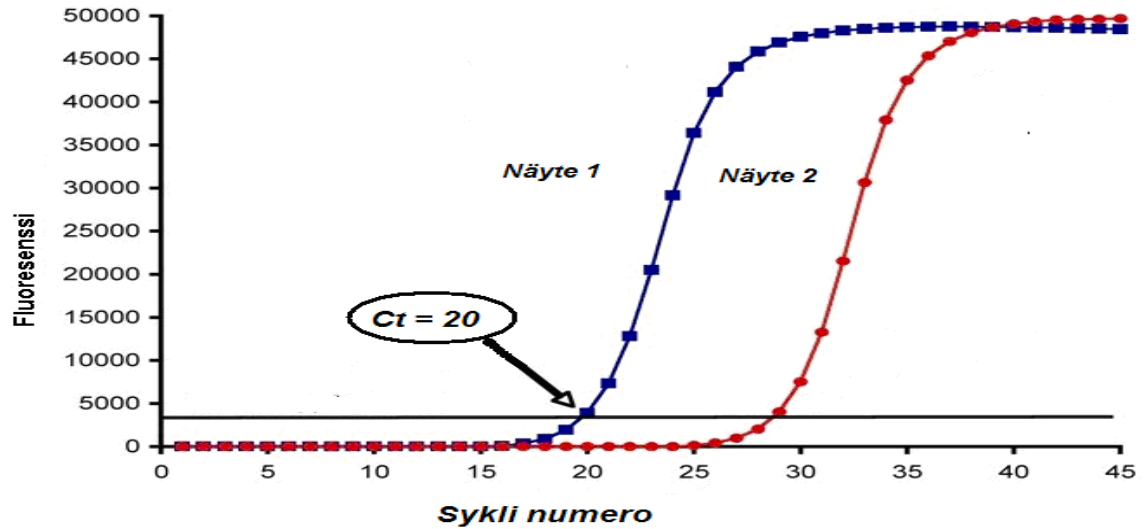
Kun kaikki näytteet ja kokostandardi on pipetoitu kaivoihin, asetetaan turvakansi paikalleen, kytketään johtimet jännitelähteeseen ja käynnistetään ajo kytkemällä jännitelähde päälle. Ajossa käytetään yleensä 20-200V suuruista jännitettä eli 1-10V/geeli-cm. Negatiivisesti varautunut DNA lähtee kulkemaan geelillä sähkökentässä kohti positiivista napaa eli anodia. Agaroosigeelin verkkomainen rakenne hidastaa kulkeutumista siten, että suurikokoiset molekyylit kulkevat lyhyemmän matkan kuin pienikokoiset molekyylit. Ajo voidaan pysäyttää, kun näytteessä monistuneet erikokoiset DNA-fragmentit ovat erottuneet toisistaan. Tämän jälkeen geeli

siirretään varovasti UV-valaisimelle. Kun geeliä tarkastellaan UV-valossa, etidiumbromidi fluoresoi UV-valoa, jolloin näytteiden DNA:n muodostamat vyöhykkeet voidaan havaita. DNA-ketjujen pituus saadaan arvioitua vertaamalla sitä kokostandardin vyöhykkeisiin. (Suominen & Ollikka, 2003. 72-74.)

4.6 Reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeerasiketjuraktio

Reaaliaikainen PCR eli real-time PCR on nykyisin paljon käytetty menetelmä. Sitä käytetään erityisesti mikrobien diagnostiikassa, sen spesifisyyden, sensitiivisyyden ja etenkin nopeuden vuoksi. Real-time-PCR on yleinen menetelmä etenkin virusdiagnoosiikassa. (Mackay ym. 2007, 2.)

Reaaliaikaisessa PCR:ssä käytetään fluoresenssileimoja tai -koettimia, joiden avulla voidaan tehdä suhteellista tai absoluuttista kvantitointia monistettavalle DNA:lle (Dennis, Phil & Chiu 2006, 1436). Absoluuttista kvantitointia voidaan tehdä lisäämällä vakionäytteet ja näin tunnettujen DNA-pitoisuuksien avulla saadaan vakiokuvaaja. Monistusreaktion jossain syklistä alkaa eksponentiaalinen monistuminen (Ct) (kuva 7 s.28). Suhteellista arviointia alkuperäisen templaatin määrästä voidaan tehdä Ct-arvojen perusteella (Dennis ym. 2006, 1440).



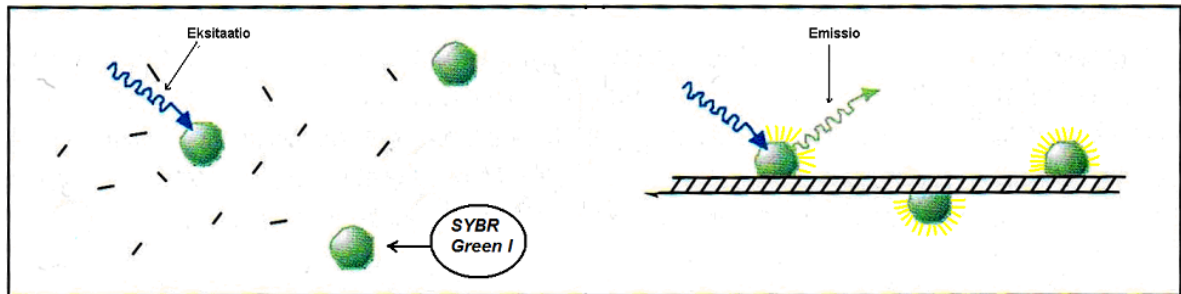
KUVA 7. Eksponentiaalisen monistumisen aloituskohta C_t (mukaan Langford veterinary services, 2009)

Templaatti-DNA ja fluoresoiva väriaine ovat samassa reaktioputkessa, joten reaktion aikana ei tarvitse lisätä reagensseja. PCR-tuotteen monistumista seurataan fluoresenssisignaalin voimakkuuden (intensiteetti) avulla jokaisessa syklissä. Mikäli reaktiossa on kohde DNA:ta ja se monistuu, fluoresenssin määrä nousee reaktion aikana. (Dennis ym. 2006, 1436.)

Kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvista väriaineista etidiumbromidia on käytetty ensimmäisenä DNA:n leimaamiseen reaaliaikaisessa PCR:ssä. Nykyään käytetympi väriaine on SYBR Green I, jonka taustafluoresenssi on pienempi kuin etidiumbromidin. SYBR Green I soveltuu kaksijuosteisen DNA:n leimaamiseen paremmin kuin etidiumbromidi. (Dennis ym. 2006, 1436.)

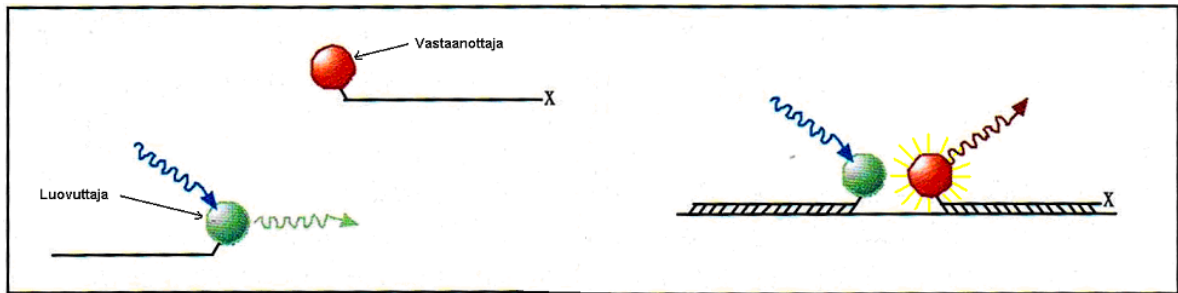
SYBR Green I -menetelmässä käytetään kaksijuosteista DNA:ta värjäävää leimaa, jota käyttämällä saadaan kustannussäästöjä ja vältetään koettimen suunnittelun hankaluuksilta (Rasmussen 2001, 31). SYBR Green I -väriaineella on eksitaatio (virittymis-) ja emissio (säteilemis-) maksimit aallonpituudella 494nm ja 521nm (Gen Quantification 2009). SYBR Green I:n kiinnittyessään kaksinauhaiseen DNA:han, (kuva 8 s.29) säteilee se fluoresenssiä. Kiinnittyminen templaattiin on

epäspesifistä, joten leima kiinnittyy myös mahdollisiin muihin DNA-juosteisiin. SYBR Green I on paljon käytetty väriaine, kun ei vaadita sekvenssispesifistä kiinnittymistä monistuvaan DNA:han. (Dennis ym. 2006, 1436.) Tarjolla on myös fluoresoivia väriaineita, joissa on lisäominaisuuksia verrattaessa tavalliseen SYBR Green I –väriaineeseen (Sugden & Winter 2008, 158). Näitä ovat esimerkiksi LC Green®, Eva Green®, BOXTO® (Gen Quantification 2009).



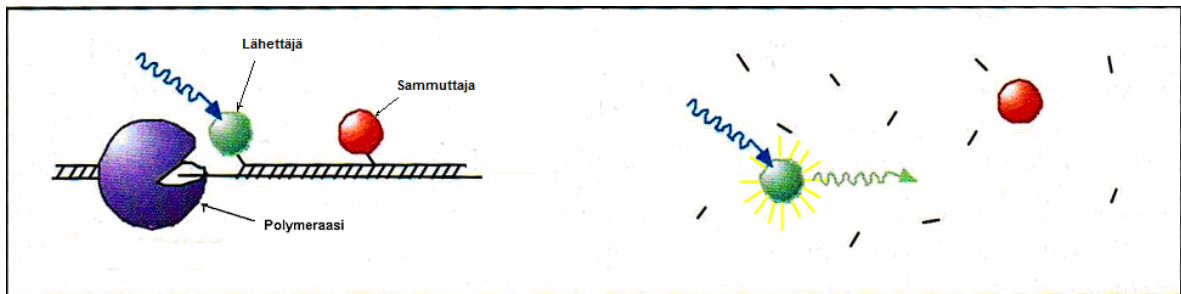
KUVA 8. SYBR Green I periaate (mukaiillen Rasmussen 2001, 32)

Leimatuilla hybridisaatiokoettimilla saadaan monistettava-DNA leimattua spesifisesti tiettyyn kohtaan templaatin sekvenssiä (Dennis ym. 2006, 1436). Hybridisaatiokoettimia on erilaisia. Koettimien periaate perustuu fluoresenssienergia siirtoilmiöön (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Menetelmässä käytetään kahta DNA:han vierekkäin sitoutuvaa koetinta, joista toisen koettimen 3'-päässä on luovuttajaväriaine (donor dye) ja toisen koettimen 5'-päässä on vastaanottajaväriaine (acceptor dye). Koettimien sitoutuessa DNA:han syntyy FRET-ilmiö koettimien leimojen välille ja vastaanottajaleima aiheuttaa fluoresenssivaloa (kuva 9 s.30), joka mitataan laitteen fluoresenssimittausyksikössä. (Rasmussen 2001, 32)



KUVA 9. Hybridisaatiokoettimen periaate (mukaillen Rasmussen 2001. 32)

Hydrolyysikoettimista käytetyin on TagMan® koetin, joka on leimattu fluoresenssin lähettäjä- (reporter) ja sammuttajaleimalla (quencher). Koettimen ollessa sitoutumattomana, sammuttajaleima tukahduttaa lähettäjäleiman, joka ei siten anna fluoresenssisignaalia. Koettimen sitouduttua kohdesekvenssiinsä, alkaa polymeerasi rakentaa ketjua ja polymeerasissa olevan nukleaasiominaisuuden johdosta koetin pilkkoutuu eli hydrolysoituu. Tämän johdosta sammuttaja- ja lähettäjäleimat ajautuvat erilleen ja syntyy fluoresenssisignaali (kuva 10). Fluoresenssisignaali mitataan tässä vaiheessa. Monistettavien ketjujen määrän lisääntyessä, lisääntyy myös koettimien hydrolysoituminen aiheuttaen fluoresenssisignaalin kasvun. (Roche Diagnostics 2009.)



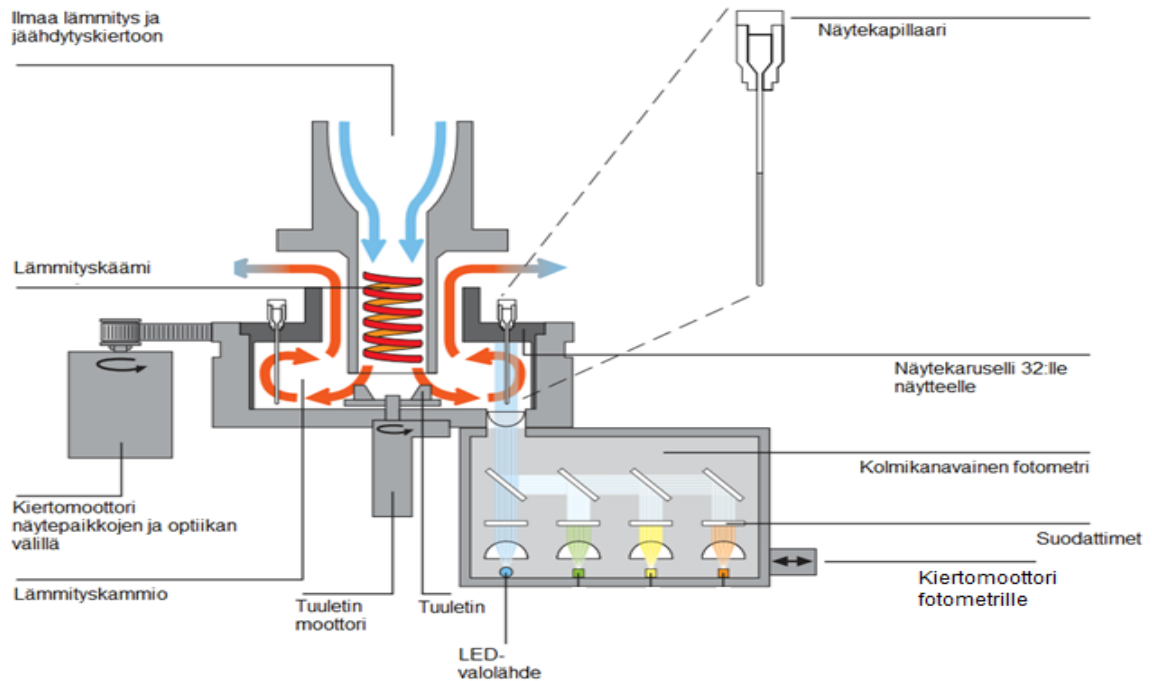
KUVA 10. TagMan koettimen periaate (mukaillen Rasmussen 2001. 32)

Reaaliaikaisessa PCR:ssä käytetyistä laitteistoista yksi on Rochen valmistama, LightCycler® Carousel-Based System, joka sisältää kaikki reaaliaikaiseen PCR:ään tarvittavat laitekokonaisuudet. Laitteisto koostuu karusellisentrifugista ja PCR-laitteesta sekä tietokoneohjelmistosta. Näytteet pipetoidaan niille tarkoitettuihin näytekapillaareihin (20ul, 100ul). Sentrifugointi tapahtuu karusellisentrifugissa,

johon näytteet asetetaan karusellimaiseen kiekkoon. Sentrifugoinnin jälkeen kiekko näytteineen siirretään suoraan PCR-laitteeseen. (Roche Diagnostics 2009.)

LightCycler® -laitteen lämmityskammiossa (kuva 11 s.32) lämpötilan muutos saadaan aikaan ilmakierrolla, jolloin lämmitys ja jäähditys ovat noin 10 kertaa tehokkaampia kuin tavanomaisella PCR-laitteella. Reaktiosykli kestää yleensä vain 30s – 60s ja syklien lukumäärä on noin 30. Ajo kestää yleensä noin 30 minuuttia. (Roche Diagnostics 2009.)

Näytekapillaarit ovat lasisia ja toimivat optisesti puhtaina kyvetteinä fluoresenssi-analyysissä. Kaksinauhaisen PCR-tuotteen määrää voidaan mitata jokaisen syklin aikana fluoresenssin avulla. (Rasmussen 2001, 21-32.) Laitteen valolähteenä on siniväri-LED-lamppu, joka emittoi valoa aallonpituudella 470nm. Laitteen fluorometri havaitsee fluoresenssin aallonpituuksilla 530nm, 560nm, 610nm, 640nm, 670nm ja 705nm, riippuen siitä onko laiteversiona kolme- vai kuusikanavainen fluorometri. (Roche Diagnostics 2009.) Kun syntyvän fluoresenssin määrästä piirretään käyrää jokaisessa syklissä, syntyneen PCR-tuotteen määrästä saadaan kasvukäyrä (growth curve) (Rasmussen 2001, 23).



KUVA 11. LightCycler® rakenne (mukaillen Roche Diagnostics, LightCycler® 1.5 Operator's manual)

Reaaliaikaisella PCR-menetelmällä saadaan ajon jälkeen monistustuloksista raportti, josta voidaan tarkastella tuloksia erilaisien kuvaajien ja numeroarvojen perusteella. Lineaarisen monistumisen alkukohta (Ct) kertoo karkeasti templaatin määrästä. Suurempi templaatin määrä lähtötilanteessa aiheuttaa lineaarisen monistusvaiheen alkamiskohdan siirtymistä aikaisempiin monistussykleihin. (Rasmusen 2001, 21-32.)

5 TUTKIMUSTEHTÄVÄ JA TUTKIMUSMENETELMÄT

Olemme perehtyneet kvalitatiivisen ja kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR-menetelmien optimointiin sekä asettaneet opinnäytetyölle tehtävän, tarkoituksen sekä tavoitteet. Opinnäytetyömme on toimintatutkimus, jonka kulkua olemme selvittäneet. Olemme myös pohtineet PCR-menetelmän optimoinnin asettumista toimintatutkimuksen erilaisiin prosessivaiheisiin.

5.1 Opinnäytetyön tehtävä, tarkoitus ja tavoitteet

Opinnäytetyömme tehtävänä on optimoida PCR-menetelmä kihomatojen DNA:n osoittamiseksi ulosteesta säätämällä reaktio-oloja sopivaksi. XXX. Kokeellisessa osuudessa tehtävänä on muun muassa testata eri $MgCl_2$ -pitoisuuksia, annealing-lämpötiloja sekä kahden eri entsyymin soveltuvuutta PCR-menetelmään. Kirjallisessa osuudessamme käsittelemme PCR:n teoriaa sekä raportoimme kokeellisen osuuden etenemisestä ja saaduista tuloksista.

XXX.

5.2 PCR:n optimointi toimintatutkimuksena

Toimintatutkimus on yksi kvalitatiivisen eli laadullisen tutkimuksen laji (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2004, 153). Toimintatutkimuksessa on keskeistä kehitys- ja muutosprosessi, jolloin itse tutkijat ovat osallisena koko prosessin ajan ja kehittävät sen eri vaiheita (Koivula, Suihko & Tyrväinen 2002, 19). Toimintatutkimus ei ole varsinainen tutkimusmetodi. Voidaan ajatella, että se on tutkimustapa, jossa voidaan käyttää välineenä erilaisia tutkimusmenetelmiä. Sen ensisijaisena tarkoituksena on kehittää jotakin toimintaa ja saada aikaan muutoksia, joista koetaan useimmiten välitöntä, käytännöllistä hyötyä. Lisäksi toimintatutkimukselle on keskeistä itse tutkimuksen samanaikainen kehittäminen. (Heikkinen & Jyrkämä 2001, 170-171.)

Toimintatutkimuksen eteneminen voidaan jakaa erilaisiin vaiheisiin. Aluksi lähdetään, jostakin lähtökohdasta, jonka ympärille aihetta aletaan suunnitella ja rajamaan. Ensin tehdään yleissuunnitelma ja päätetään kuka tekee mitä ja miten ja mitä lopputulosta tavoitellaan. Tämä edellyttää aina tekijältä kirjallisuuteen perehtymistä, jotta voitaisiin ymmärtää asian taustat tarkemmin. Toimintatutkimus voi sisältää jonkun esiolettamuksen eli hypoteesin ja myös sen ymmärtämiseksi on tärkeää perehtyä aiheeseen huolellisesti. Toimintatutkimukseen osallistujilla on mahdollisuus suunnitella työn suorittamista ja käytäntöjen kehittämistä. Työssä toimintaa lähdetään toteuttamaan tehdyn suunnitelman mukaisesti ja jatkuvat keskustelut ja ongelmatilanteiden selvittäminen kuuluvat työskentelyyn. Työn tekijät keräävät tietoa muun muassa henkilökohtaisten päiväkirjojen avulla. Tiedonkeruutavat tulisi suunnitella huolellisesti etukäteen, jotta työskentelystä saatu tieto olisi luotettavaa. (Toimintatutkimus 2009.)

Toimintatutkimukseen liittyy olennaisena osana myös arviointiprosessi, jonka tarkoituksena on tarkastella toimintaa ja arvioida saatuja tuloksia. Myös työn edetessä tavoitteita voidaan muokata uudelleen. Loppuvaiheeseen toimintatutkimuksessa kuuluu työvaiheiden ja tulosten arviointi sekä niistä raportointi. Toimintatutkimuksessa ovat vuorovaikutuksessa käytäntö, teoretieto, toiminta ja ajattelu. Toimintatutkimusprosessin voidaan ajatella olevan kokemuksellista oppimista, jossa toimin-

ta ohjautuu sen mukaan mitä tuloksia saadaan ja miten toiminta jatkossa etenee. (Toimintatutkimus 2009.)

PCR:n optimoinnissa suunniteltujen työvaiheiden muutokset kesken prosessin ovat tyypillisiä ja usein joudutaan tekemään uusia suunnitelmia erilaisien toimintojen jälkeen. Suunnitellut reaktiot eivät välttämättä tule aluksi toimimaan, jolloin suunnitelmien muutokset voivat tulla jo prosessin alkuvaiheessa. (Sami Oikarinen 2009.) PCR-menetelmän optimointi on toimintatutkimus, jossa erityisesti huomataan prosessin kehittyminen tutkimuksen eri vaiheissa. Teoria yhdistyy tiiviisti käytännön työvaiheisiin. Tutkimusta ja sen edistymistä tarkastellaan jatkuvasti eri vaiheissa ja saadaan aikaan prosessin jatkuva kehittyminen. Lisäksi PCR-menetelmän optimointi vaikuttaa erityisesti työyhteisön toimintaan, koska menetelmän jatkuva käyttö muuttaa yhteisön työprosesseja. Koivula ym. (2001, 19) esittävät esimerkin, jossa he kuvailevat toimintatutkimuksen olevan uuden työ- tai toimintatavan aloittamista. Voidaan ajatella että, PCR-menetelmän optimointi opinnäytetyössämme palvelee keskeisesti uuden menetelmän käyttöönoton aloittamista.

Opinnäytetyössämme on myös kokeellisen tutkimuksen piirteitä, mutta mielestämme kokeellisen tutkimuksen kriteerit eivät kuitenkaan täyty siinä määrin, että luokitelisimme opinnäytetyötämme kokeelliseksi opinnäytteeksi. Kokeellisen tutkimuksen piirteitä ovat muun muassa, että asetetaan jokin tutkimuskysymys ja laaditaan siihen hypoteesit. Satunnaisen tai harkinnanvaraisen näytteen analysointi erilaisissa olosuhteissa ja olosuhteiden muuntelu kuuluvat myös kokeellisen tutkimuksen piirteisiin. Lisäksi mitataan yhden muuttujan vaikutusta toiseen muuttajaan ja saadut tulokset esitetään numeerisesti. (Kokeellinen tutkimus 2009.)

XXX. PCR-menetelmän optimoinnissa ei voida mitata yhden muuttujan vaikutusta toiseen muuttajaan, vaan aina yhdellä optimointikerralla muutetaan yhtä asiaa kerrallaan ja sen jälkeen mietitään sen vaikutusta tuloksiin. Näytteinä käytimme vain positiivisiksi tiedettyä kihomatonäytettä, jonka avulla lähdimme menetelmän toimivuutta testaamaan. Optimoinnista emme myöskään saaneet mitään numeerisia tuloksia, vaan UV-kameralla otetut kuvat AGE-ajosta olivat tuloksia. Tämän vuoksi

määrittelimme opinnäytetyömme toiminnalliseksi opinnäytteeksi, koska lähdimme luomaan ja kehittämään menetelmää itsenäisesti ja työmme muokkautui aina toimintamme ja saatujen johtopäätösten mukaan vaihe vaiheelta, niin kuin toimintatutkimukselle on tyypillistä.

6 PCR-MENETELMIEN OPTIMOINNIN SUORITUS JA TULOKSET

Saimme luvan opinnäytetyöllemme marraskuussa 2008 tutkija Sami Oikariselta Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksen virologian yksiköstä. Joulukuussa aloitimme PCR-reaktioiden suunnittelun yhdessä ohjaajamme tutkija Sami Oikarisen kanssa. Opinnäytetyömme tavoitteena oli optimoida mahdollisimman toimiva ja herkkä kvalitatiivinen PCR-menetelmä kihomadon DNA:n osoittamiseksi ulosteesta. Kvalitatiivisen PCR-reaktion lisäksi optimoimme myös reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR-menetelmän yhdessä tutkija Hanna Honkasen kanssa. XXX. Laskimme työssämme käyttämiemme reagenssien tilavuuksia tulevia reaktioita varten valmistajien ohjeiden mukaan. Valitsimme työssämme käyttämämme alukkeet “*Enterobius vermicularis*: specific detection by amplification of an internal region of 5S ribosomal RNA analysis. *E. vermicularis*: specific detection by PCR and SL1 RNA analysis” –artikkelin mukaan (Araújo ym. 2002, 219). Harjoittelimme yhdessä Sami Oikarisen kanssa alukkeiden suunnittelua tietokoneohjelman avulla.

Ennen kuin pääsimme aloittamaan kokeellista osuuttamme, tutustuimme tiloihin ja toimintatapoihin Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksen virologian yksikön laboratoriossa. Suoritimme kaikki PCR-ajokortit, jonka avulla varmistettiin, että osaamme työskennellä PCR:n onnistumisen kannalta oikeilla toimintavoilla. Jokainen meistä teki reaktiosarjan, jossa joka toisessa liuoksessa oli näyte ja toisessa pelkkä vesi. Vesikontrollia kutsutaan myös negatiiviseksi kontrolliksi. Tärkeää oli, että vesien paikalle ei syntynyt monistustuotetta eli ne eivät olleet kontaminoituneet näyttemateriaalilla. Kaikki saivat vaaditut tulokset ja saimme luvan aloittaa opinnäytetyömme kokeellisen osuuden. Maaliskuussa 2009 aloitimme kokeellisen osuuden suorittamisen.

6.1 Laitteet, välineet ja reagenssit

Työssämme käytimme seuraavia laitteita: mikroaaltouuni (MATSUI), sentrifuugi (Eppendorf), PCR-laite (MasterCycler® Gradient PCR-laite, Eppendorf), AGE-ajolaite (BIO-RAD Sub Cell® GT), geelin kuvauslaite (Alpha Innotech), polaroid-kamera (MP 4 + CU-5 , Instant Camera system), koeputkisekoittaja (Vortex-Genie 2), Real-time PCR-laite (LightCycler® 1.5, LightCycler®), näytekapillaarit (LightCycler® Capillaries 20 µl), karusellisentrifuugi(LC Carousel Centrifuge 2.0),

Työssämme käytimme seuraavia välineitä: jäähaude (Tampere virologia laboratorio), kertakäyttökäsineet (Semper care), pipetit eri tilavuuksille (FinnPipette), pipetinkärjet (Biohit), steriilit putket 0,5 ml ja 1.5 ml (Eppendorf), putkitelineet (Tampereen virologia laboratorio)

DNA:n eristyksessä käytimme seuraavia reagensseja: QIAamp DNA Stool mini kit, absoluuttinen etanoli

PCR-reaktioissa käytimme seuraavia reagensseja: entsyymi Biotools DNA polymerase 5U/µl (Biotools), reaktiopuskuri(Buffer 10 x, Biotools), polymeraasientsyymi(DyNAzyme™ DNA Polymerase Kit FINNZYMES), reaktiopuskuri(Buffer, FINNZYMES), alukkeet(PrimerKihof (TAG Copenhagen A/S), PrimerKihor (Copenhagen A/S), magnesiumkloridi (MgCl₂), deoksinukleotiditriposfaatti (dNTP), tislattu vesi (ddH₂O, Milli-Q), real-time PCR-reagenssipakaus (LightCycler® TagMan® Master), Real-time PCR-aluke(PrimerKihor, Sigma Aldrich)

Agaroosigeelielektroforeesissa käytimme seuraavia reagensseja:agaroosijauhe (Agarose LE Analytic Grade 500g,Promega), TAE-puskuri(50 x TAE (Tris-acetate-EDTA)) (Promega), tislattu vesi ddH₂O, etidiumbromidi(Etidium Bromidi Solution), 6x latauspuskuri (DNA Ladder), kokostandardi(1kb DNA-ladder, LabAid GeneRuler)

6.2 Työskentely virologian laboratoriossa

Oikeiden työskentelytapojen hallitseminen on tärkeää virologian laboratoriossa kontaminaatioiden välttämiseksi. Jos kontaminaatio laboratoriossa pääsee synty-mään, voivat tutkijoiden työt keskeytyä pitkäksikin aikaa. Kontaminaation syyn et-siminen voi olla hankalaa ja aikaa vievää, sillä se on voinut saada alkunsa missä vaiheessa vaan prosessia. Myös tulosten luotettavuuteen vaikuttaa oleellisesti kuinka oikeaoppisesti ja huolellisesti on työskennelty. Tuloksiin pitäisi voida luottaa eikä niissä saisi olla epäspesifisiä monistustuotteita.

Työskennellessämme Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksen virologian yksi-kön laboratoriossa noudatimme seuraavia toimintatapoja. Laboratoriossa oli eri huoneet jokaiselle työskentelyvaiheelle. Reaktioseokset pipetoitiin erillisessä hu-oneessa, minkä jälkeen siirryttiin toiseen huoneeseen, missä jaettuihin PCR-reaktioihin pipetoitiin eristetyt DNA-näytteet. Myös DNA:n- ja RNA:n eristämiseen oli käytössä oma huone. PCR-laitteet sijaitsivat omassa tilassaan ja sieltä ei mielel-lään saanut kulkea pipetointitiloihin enää saman päivän aikana. Agarosigeelielekt-roforeesi suoritettiin myös omassa tilassaan, jossa sijaitsi myös UV-kamera. En-nen päivän töiden aloittamisessa huoneissa pidettiin päällä UV-valoja mahdollisten kontaminanttien poistamiseksi. Laboratorihuoneet olivat ylipaineistettuja ja ovet huoneisiin eivät auenneet yhtä aikaa, vaan yhteen huoneeseen pääsi kerrallaan. Kuljettaessa laboratorioon täytyi ovet aina avata käsipaperia avuksi käyttäen. Jo-kaisessa huoneessa oli käytössä huonekohtainen työtakki, mikä puettiin huonee-seen mentäessä.

Ennen työskentelyn aloittamista sekä sen jälkeen kaikki työskentelypinnat ja työ-välineet pyyhittiin 70 % etanolilla. Jokaisessa huoneessa oli omat kaapit, mistä löy-tyivät kaikki tarvittavat välineet. Työskennellessä oli erityisen tärkeää vaihtaa ker-takäyttökäsineitä riittävän usein kontaminaation ehkäisemiseksi. Pipetointi piti suo-rittaa huolellisesti ja tarkasti. Pipetinkärki ei saanut koskettaa mihinkään, ja jos näin tapahtui, piti se vaihtaa. Näytteitä pipetoitaessa putket avattiin putkenavaajalla, jol-loin välttyttiin käsineen osumiselta putken sisäseinämään. Liiallista puhumista ja yskimistä pipetoinnin aikana piti välttää, etteivät putket kontaminoidu. Kaiken kaik-

kiaan pyrimme työskentelemään laboratoriossa tarkasti ja rauhallisesti oikeita työtapoja noudattaen.

6.3 Kihomadon DNA:n eristys QIAamp DNA Stool mini kit:llä

Teimme DNA:n eristyksen QIAamp DNA Stool mini kit:llä valmistajan ohjeiden mukaisesti. Menetelmässä käytettimme silika-spin-column pylvästekniikkaa. Käyttämässämme eristyskitissä olivat kaikki reagenssit valmiina, lukuun ottamatta absoluuttista etanolia. Näytteenä käytimme positiivista kihomatonäytettä.

Aloitimme kihomadon DNA:n eristyksen pipetoimalla 200ul ulostesuspensiota eppendorf-putkeen, johon lisäsimme 1,5ml hajotuspuskuriä (ASL). Putkea sekoitettiin huolellisesti putkisekoittajalla, kunnes seos oli homogeeninen eli tasalaatuinen. Tämän jälkeen inkuboimme putkea 70 °C:n lämpötilassa viisi minuuttia, jotta saimme ulosteen mikrobit hajoamaan. Tämän jälkeen lisäsimme putkeen tabletin, jonka tarkoituksena on sitoa ulosteen DNA:ta tuhoavia aineita ja PCR-reaktioita häiritseviä inhibiittoreita. Sekoitimme ja sentrifugoimme putken, jotta saimme tabletin rakenteisiin kiinnittyneet komponentit saostumaan putken pohjalle. Seuraavaksi lisäsimme liuokseen proteinaasi K:ta, jonka tehtävänä on pilkkoa liuoksen proteiinit. Seosta inkuboitii 70 °C:ssä ja sentrifugoitii, jolloin muodostunut sakka saatiin poistettua. DNA sidottiin pylvään silikamembraaniin sentrifugoimalla se läpi korkean ionivahvuuden omaavassa liuoksessa. Mahdolliset epäpuhtaudet kulkeutuivat pylvään läpi. Tämän jälkeen pylvään läpi sentrifugoitii pesupuskuria kaksi kertaa, jonka jälkeen pylvääseen laitettiin eluointipuskuri. Eluointipuskurin matala ionivahvuus mahdollistaa DNA:n irtoamaan silikamembraanista, jolloin sentrifugoinnin jälkeen jäänyt eluaatti sisälsi sitomamme DNA:n. (QIAGEN 2007.)

6.4 Kvalitatiivisen PCR-menetelmän optimointi

PCR-reaktioiden suunnittelun aloitimme yhdessä työelämäohjaajamme Sami Oikarisen kanssa. Suunnittelussa apuna käytimme artikkeleita sekä entsyymien mukana tulleita ohjeita. Aloitimme PCR-reaktioiden testauksen Biotools DNA-polymeraasientsyymillä, koska se oli havaittu toimivaksi virologian yksikössä. Yhtenä syynä entsyymien valinnalle oli hinta, sillä Biotools-entsyymi oli muihin entsyymeihin verrattuna suhteellisen halpa. Päätimme valita myös toisen entsyymien siltä varalta, että Biotools-entsyymi ei jostakin syystä toimisi. Valitsimme toiseksi entsyymiksi DyNAzyme™ DNA-polymeraasientsyymien. Virologian yksikössä ei aikaisemmin ollut tehty kihomadon DNA:n osoitusta ulosteesta PCR-menetelmällä, joten artikkelin avulla ja Oikarisen avustuksella päätimme, minkälaisilla reaktioolosuhteilla lähdemme menetelmän toimivuutta testaamaan.

Kvalitatiivisen PCR-menetelmän testausta ja optimointia lähdimme toteuttamaan kahdella eri entsyymillä. Testattavat entsyymit olivat Biotools DNA Polymerase ja DyNAzyme™ DNA Polymerase, joihin käytettävät reaktiopuskurit ja magnesiumkloridi ovat entsyymikohtaisia ja tulevat entsyymien toimittajalta. Molemmille entsyymeille on annettu valmistajan suosittamat reaktiopitoisuudet ja lämpötilat, joiden mukaan lähdimme työtämme suorittamaan. Halusimme löytää parhaiten toimivan $MgCl_2$ -pitoisuuden sekä optimaaliset annealing-lämpötilat. Kokeilimme molemmille entsyymeille kolmea eri $MgCl_2$ -pitoisuutta. Pitoisuudet olivat 1,5 mM, 2,0 mM ja 2,5 mM. Annealing-lämpötilaa testasimme käyttämällä lämpötilagradienttia. PCR-laitteeseen ohjelmoitavan lämpötilagradientin avulla pystyi samalla kertaa testaamaan useita eri annealing-lämpötiloja. Teimme yhteensä 15 PCR-reaktiota. Selkeyden vuoksi numeroimme tekemämme PCR-reaktiot numeroilla 1-15 aikajärjestyksessä.

Alukkeina käytimme artikkelissa Araújo ym. (2002) mainittuja oligonukleotidialukkeita EntF ja EntR, joiden sekvenssit ovat mainittu taulukossa 1 s.42, jolloin monistuvan alueen pituudeksi tulee 420 emästä (bp).

TAULUKKO 1. Alukkeet (Araújo ym. 2002, 219)

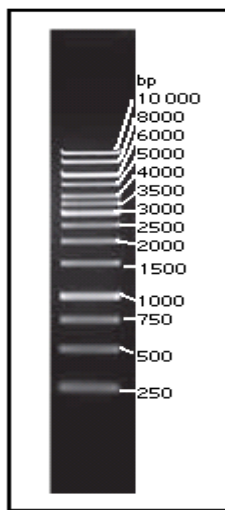
EntF 5'-CACTTGCTATACCAACCAACAC-3'
EntR 5'-GCGCTACTAAACCATAGACG-3'

Opinnäytetyössä käyttämämme kihomatonäytteet saimme Pirkanmaan sairaanhoitopiiriin laboratorokeskuksesta. DNA:n eristyksen kihomatonäytteistä suoritti Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksen virologian yksikön henkilökunta. Käytimme myös itse eristämäämme näytettä (taulukossa 2 näyte numero 7). Käytimme näytteinä kahdella eri eristystavalla eristettyjä näytteitä. Osa näytteistä oli eristetty eristysautomaatilla (MagNA Pure LC Total Nucleic acid isolation® kit) ja osa manuaalieristysmenetelmällä (QIAamp DNA Stool Mini Kit). Taulukkoon 2 olemme koonneet kaikki käyttämämme näytteet ja niiden eristysmenetelmät. Selkeyden vuoksi numeroimme käyttämämme näytteet sen mukaan missä järjestyksessä olemme niitä käyttäneet.

TAULUKKO 2 Kihomatonäytteet ja niiden eristystapa

Näytenumero	Eristystapa	Eristyspäivä
1	MagNA Pure LC	4.2.2009
2	MagNA Pure LC	4.2.2009
3	MagNA Pure LC	4.2.2009
4	MagNA Pure LC	4.2.2009
5	QIAmp DNA Stool Mini Kit	4.3.2009
6	QIAmp DNA Stool Mini Kit	4.3.2009
7	QIAmp DNA Stool Mini Kit oma eristys	6.3.2009 (yhdistetty kaksi putkea 20.4.)
8	QIAmp DNA Stool Mini Kit	4.3.2009 (yhdistetty näytteet 5 ja 6 20.4.2009.)

PCR-reaktiot tehtiin PCR-laitteella (MasterCycler® Gradient). PCR-reaktioiden toimivuuden tarkastimme agarosigeelielektroforeesilla. Käytimme ajoissa 1,5% agarosigeeliä. Elektroforeesissa käytimme 1 kb (kiloemäksen) kokostandardia (kuva 12) ja 6 x latauspuskuria. Ajoon käytimme BIO-RAD Sub Cell® GT -AGE-ajolaitetta jännitteellä 120V. Ajo kesti 60 minuuttia. Ajon jälkeen siirsimme geelin UV-valoon (Pharmacia LKB Macrovue) kuvattavaksi polaroid-kameralla (MP 4 + CU-5 , Instant Camera system). Jos PCR-reaktio oli onnistunut kuvassa tuli näkyä fraktio 420 bp:n kohdalla.



KUVA 12. LabAid™ O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (mukaillen Fermesetas 2009)

PCR 1 Biotools polymeraasi MagNa Pure näytteille

Ensimmäisessä PCR-reaktiossa 2.3.2009 käytimme MagNA Purella eristettyjä näytteitä yksi ja kolme. (taulukko 2 s.42) Entsyyminä reaktiossa käytimme Biotools DNA-polymeraasia (Biotools DNA Polymerase). MgCl₂-konsentraatio oli 2.0 mM. Pipetoimme reaktioseokset taulukon 3 s.43 pipetointikaavion mukaan. Pipetoimme reaktioseokset viidelle näytteelle. Näytteiden yksi ja kolme lisäksi käytimme sarjassa negatiivisina kontrolleina vettä, joka pipetoitiin näytteen tilalle.

TAULUKKO 3 Pipetointitaulukko 1 Biotools DNA Polymeraasi MgCl₂-konsentraatio 2.0 mM

Reagenssi	Konsentraatio	Tilavuus (µl)
10xBuffer		10
dNTP	0,2mM	8
PrimerEntF	0,2µM	0,8
PrimerEntR	0,2µM	0,8
MgCl ₂	2,0mM	4
Biotools DNA Polymerase	1U/µl	0,6
H ₂ O		70,8
KihoDNA		5
Lopputilavuus		100

PCR-ajossa 1 käytimme taulukon 4 PCR-ohjelmaa. Annealing-lämpötilana oli 55°C.

TAULUKKO 4 PCR-ohjelma 1

Toiminta	Lämpötila	Aika
Alkudenaturaatio	94°C	3min
39 sykliä	Denaturaatio	94°C
	Annealing	55°C
	Ekstensio	72°C
Loppuekstensio	72°C	7min
Lopetus	4°C	

Agarosegeelielektroforeesissa (kuva 13 s.45) emme havainneet 420 bp:n kohdalla fraktioita. Kokostandardit näkyivät kuitenkin hyvin ja geelillä näkyvät monistuneet alukkeet, mutta haluttu PCR-reaktio ei toiminut.



KUVA 13. Agarosigeelielektroforeesi PCR 1

PCR 2 Biotools polymeraasi QIAamp näytteille

Toisessa PCR-reaktiossa 5.3.2009 käytimme näytteitä viisi ja kuusi, jotka oli eristetty QIAamp DNA Stool Mini Kit:llä (taulukko 2 s.42). Tähän reaktioon muutimme $MgCl_2$ -konsentraatioksi 2,5 mM. Käytimme myös lämpötilagradienttia (taulukko 5). Gradientissa annealing-lämpötilan vaihtelu oli noin $10^\circ C$. Entsyyminä oli Biotools DNA-polymeraasi.

TAULUKKO 5. Lämpötilagradientti 1.

Paikka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Lämpötila $^\circ C$	50,1	50,4	51,1	52,2	53,4	54,7	56,1	57,4	58,6	59,6	60,2

Pipetoimme reaktioseokset kymmenelle näytteelle taulukon 6 s.46 pipetointikaavion mukaisesti.

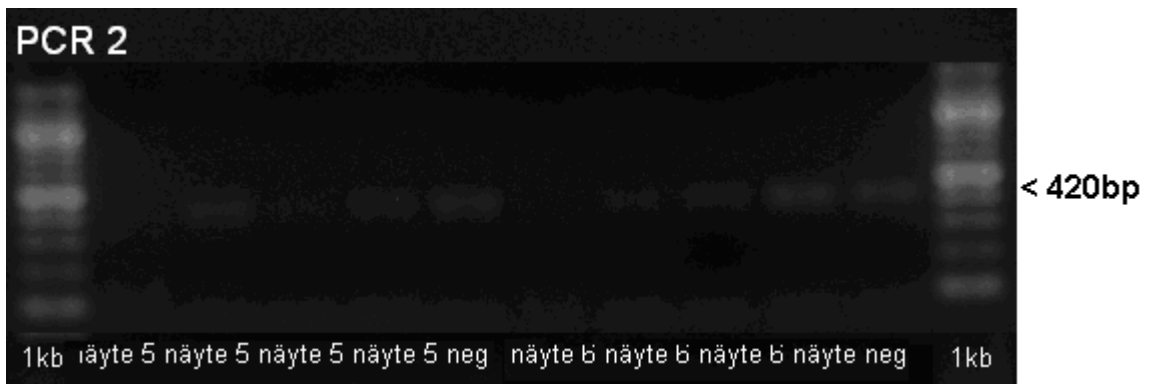
TAULUKKO 6. Pipetointikaavio 2 Biotools DNA Polymeraasi MgCl₂-konsentaraatio 2,5 mM

Reagenssi	Konsentraatio	Tilavuus (µl)
10xBuffer		10
dNTP	0,2mM	8
PrimerEntF	0,2µM	0,8
PrimerEntR	0,2µM	0,8
MgCl ₂	2,5mM	5
Biotools DNA Polymerase	1U/µl	0,6
H ₂ O		69.8
KihoDNA		5
Lopputilavuus		100

Asetimme näytteet ja negatiiviset kontrollit PCR-laitteeseen. Jokaiselle näytteelle oli oma annealing-lämpötila gradientin (taulukko 5 s.45) mukaisesti. Negatiiviset kontrollit olivat molemmissa sarjoissa PCR-laitteessa paikoilla 1 ja näytteet viisi ja kuusi paikoilla 2, 5, 8 ja 11.

TAULUKKO 7 PCR-ohjelma 2

Toiminta	Lämpötila	Aika
Alkudenaturaatio	94°C	3min
39 sykliä	Denaturaatio	94°C
	Annealing	50,1-59,6°C
	Ekstensio	72°C
Loppuekstensio	72°C	7min
Lopetus	4°C	



KUVA 14 Agarosigeelielektroforeesi PCR 2

Agarosigeelillä näkyivät selvät fraktiot kuvankäsittelylaitteella näytteen viisi lämpötilojen 50,4 °C, 57,4 °C ja 60,2 °C kohdalla sekä näytteen kuusi lämpötilojen 53,4 °C, 57,4 °C ja 60,2 °C (kuva14). Kokostandardiin verrattuna fraktiot ovat kohdalla 420bp eli oikean kokoisia kihomadon DNA:han verrattuna. PCR-reaktio siis onnistui.

PCR 3 ja PCR 4 Biotools polymeraasi MagNA Pure näytteille

19.3.2009 teimme kaksi PCR-reaktiota. Näytteenä kolmannessa PCR-reaktiossa oli näyte numero 2 ja neljännessä PCR-reaktiossa näyte numero 4. Molemmat näytteet oli eristetty MagNA Purella. MgCl₂-konsentraatio oli PCR-reaktiossa kolme 1,5 mM ja PCR-reaktiossa neljä 2,0 mM. Entsyyminä oli Biotools DNA-polymeraasi. Muutimme myös PCR-ohjelman lämpötilagradienttia taulukon 8 mukaiseksi, niin että lämpötilanvaihteluksi tuli 20°C.

TAULUKKO 8. Lämpötilagradientti 2

Paikka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Lämpötila °C	50,1	50,9	52,3	54,4	56,8	59,5	62,2	64,8	67,1	68,9	70,1

Pipetoimme molempiin PCR-reaktioihin reaktioseokset kahdeksalle näytteelle, kolmanteen PCR-reaktioon taulukon 9 mukaisesti ja neljänteen PCR-reaktioon taulukon 3 s.44 mukaisesti.

TAULUKKO 9 Pipetointikaavio 3 Biotools DNA Polymeraasi MgCl₂-konsentraatio 1,5 mM

Reagenssi	Konsentraatio	Tilavuus (µl)
10xBuffer		10
dNTP	0,2mM	8
PrimerEntF	0,2µM	0,8
PrimerEntR	0,2µM	0,8
MgCl ₂	1,5mM	3
Biotools DNA Polymerase	1U/µl	0,6
H ₂ O		71,8
KihoDNA		5
Lopputilavuus		100

Negatiiviset kontrollit olivat molemmissa PCR-reaktioissa paikoilla 1 ja näytteet paikoilla 2, 4-8 ja 10. PCR-ohjelmanä käyttimme ohjelmaa numero 3 (taulukko 10). Agarosigeelielektrofooresissa emme havainneet fraktiota. PCR-reaktiot eivät toimineet.

TAULUKKO 10. PCR-ohjelma 3

Toiminta	Lämpötila	Aika
Alkudenaturaatio	94°C	3min
39 sykliä	Denaturaatio	94°C
	Annealing	50,1-7,01°C
	Ekstensio	72°C
Loppuekstensio	72°C	7min
Lopetus	4°C	

PCR 5 ja PCR 6 Biotools polymeraasi QIAamp näytteille

Teimme 21.4.2009 PCR-reaktiot 5 ja 6. Näytteenä käytimme itse eristämäämme näytettä numero 7. MgCl₂-konsentraatiot olivat viidennessä PCR-reaktiossa 1,5 mM ja kuudennessa PCR-reaktiossa 2,0 mM. Entsyyminä käytimme edelleen Biotools DNA-polymeraasia.

PCR-reaktioon 5 pipetoimme reaktioseoksen kahdeksalle näytteelle taulukon 9 s.47 mukaan ja PCR-reaktioon 6 reaktioseoksen samalle määrälle näytteitä taulukon 3 s.43 mukaan. Lämpötilagradienttina oli taulukossa 8 s.46 esitetty gradientti ja käytössä PCR-ohjelma 3 (taulukko 10 s.48). Negatiiviset kontrollit olivat molemmissa PCR-reaktioissa paikoilla 1 ja näytteet paikoilla 2, 4-8 ja 10. Agarosigelelelektroforeesilla emme saaneet tuloksia. PCR-reaktiot eivät siis toimineet.

PCR 7 ja PCR 8 Biotools polymeraasi sekä PCR 9 ja PCR 10 DyNAzyme polymeraasi QIAamp näytteille

22.4.2009 teimme yhteensä neljä PCR-reaktiota. Kahdessa (PCR 7 ja PCR 8) käytimme Biotools DNA-polymeraasia ja kahdessa (PCR 9 ja PCR 10) entsyyminä oli DyNAzyme™ DNA-polymeraasi (DyNAzyme™ DNA Polymerase). Näytteinä seitsemännessä ja kahdeksannessa PCR-reaktioissa käytimme näytettä 7. Puolestaan PCR-reaktioissa yhdeksän ja kymmenen näytteenä oli näyte numero 8. Molemmat näytteet olivat eristetty QIAamp DNA Stool Mini Kit:llä. MgCl₂-konsentraatio oli seitsemännessä ja yhdeksännessä PCR:ssä 1.5 mM. Kahdeksannessa PCR-reaktiossa MgCl₂-konsentraatio oli 2.0 mM ja kymmenennessä 2.5 mM. PCR-reaktioon 7 pipetoimme reaktioseoksen kahdeksalle näytteelle taulukon 9 s.48 mukaan. Puolestaan PCR-reaktioon 8 pipetoimme reaktioseoksen kahdeksalle näytteelle taulukon 3 s.44 mukaan. Reaktioseos kahdeksalle näytteelle PCR yhdeksänten pipetoitiin taulukon 11 s.50 mukaan ja kymmenenteen taulukon 12 mukaan s.50.

TAULUKKO 11. Pipetointikaavio 4 DyNAzyme™ DNA Polymeraasi MgCl₂=1.5 mM

Reagenssi	Konsentraatio	Tilavuus (µl)
10xBuffer		10,0
dNTP	0,2mM	8,0
PrimerKihof	0,2µM	0,8
PrimerKihor	0,2µM	0,8
MgCl ₂	1,5 mM	0
DyNAzyme™ DNA Polyme- raasi	1U/µl	1,0
H ₂ O		69,4
KihoDNA		10,0
Lopputilavuus		100,0

TAULUKKO 12. Pipetointikaavio 5 DyNAzyme™ DNA Polymeraasi MgCl₂=2.5 mM

Reagenssi	Konsentraatio	Tilavuus (µl)
10xBuffer		10
dNTP	0,2mM	8
PrimerEntF	0,2µM	0,8
PrimerEntR	0,2µM	0,8
MgCl ₂	2,5mM	2
DyNAzyme™ DNA Polyme- raasi	1U/µl	1.0
H ₂ O		67.4
KihoDNA		10
Lopputilavuus		100

Lämpötilagradienttina PCR:ssä 7,8,9 ja 10 oli taulukossa 8 s.47 esitetty gradientti ja PCR-ohjelmana oli ohjelma kaksi (taulukko 7 s.46). Negatiiviset kontrollit olivat kaikissa PCR-laitteessa paikoilla 1 ja näytteet paikoilla 2, 4-8 ja 10.

PCR 7 ja 8 ei toiminut. Emme havainneet fraktioita agarosigeelillä. Puolestaan PCR 9 ja 10 ei myöskään toiminut halutulla tavalla. Havaitimme fraktioita, jotka eivät olleet halutun kokoisia. Tästä voimme päätellä, että kyseessä oli epäspesifistä monistumista. Kuvankäsittelyohjelmassa havaitimme epäspesifistä monistumista.

ta, mutta työhön emme kuvaa liittäneet, sillä emme saaneet fraktioita näkymään lainkaan tulostetussa versiossa.

PCR 11 Biotools polymeraasi ja PCR 12 DyNAzyme polymeraasi QIAamp näytteille sekä MagNA Pure näytteille

23.4.2009 teimme PCR-reaktiot 11 ja 12. PCR:ssä 11 entsyyminä oli Biotools DNA-polymeraasi ja MgCl₂-konsentraatio oli 1,5 mM. PCR:ssä 12 entsyyminä oli DyNAzyme™ DNA-polymeraasi MgCl₂-konsentraation ollessa 2,0 mM. Emme käyttäneet näissä PCR-reaktioissa lämpötilagradienttia. Annealing-lämpötila oli 55°C. Pipetoimme reaktioseokset yhdeksälle näytteelle PCR-reaktioon 11 taulukon 13 mukaan ja PCR-reaktioon 12 taulukon 14 s.52 mukaan. Käytimme PCR-reaktiossa 11 aikaisemmista Biotools DNA-polymeraasille tekemistämme reaktioista poiketen näytemääränä 10 mikrolitraa 5 mikrolitran sijaan, koska epäilimme näytemäärän riittävyyttä.

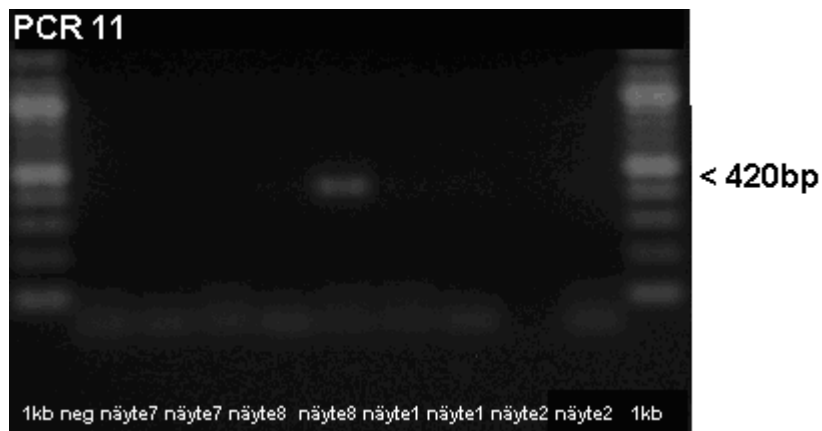
TAULUKKO 13. Pipetointikaavio 6 Biotools DNA Polymeraasi MgCl₂-konsentaraatio 1,5 mM näytemäärä 10µl

Reagenssi	Konsentraatio	Tilavuus (µl)
10xBuffer		10
dNTP	0,2mM	8
PrimerEntF	0,2µM	0,8
PrimerEntR	0,2µM	0,8
MgCl ₂	1,5mM	3
Biotools DNA Polymerase	1U/µl	0,6
H ₂ O		66,8
KihoDNA		10
Lopputilavuus		100

TAULUKKO 14. Pipetointikaavio 7 DyNAzyme™ DNA Polymeraasi MgCl₂=2.0 mM

Reagenssi	Konsentraatio	Tilavuus (µl)
10xBuffer		10
dNTP	0,2mM	8
PrimerEntF	0,2µM	0,8
PrimerEntR	0,2µM	0,8
MgCl ₂	2,0mM	1
DyNAzyme™ DNA Polyme- raasi	1U/µl	1.0
H ₂ O		68.4
KihoDNA		10
Lopputilavuus		100

Näytteinä käytimme molemmilla eristysmenetelmillä eristettyjä näytteitä numero 1, 2, 7 ja 8 (taulukko 2 s.42), joista teimme rinnakkaisnäytteet. Negatiivisen kontrollin laitoimme sarjan alkuun. PCR-ohjelmalla käytimme ohjelmaa 1 (taulukko 4 s.44).



KUVA 15. Agarosegelelektroforeesi PCR 11.

Agarosegelelektroforeesissa havaitsimme selvät fraktiot kuvankäsittelyohjelmalla näytteen numero kahdeksan kohdalla PCR:ssä 11 (kuva 15) toisessa rinnakkaisnäytteessä ja PCR:ssä 12 molemmissa rinnakkaisissa (kuva 12 s.53). Molemmat

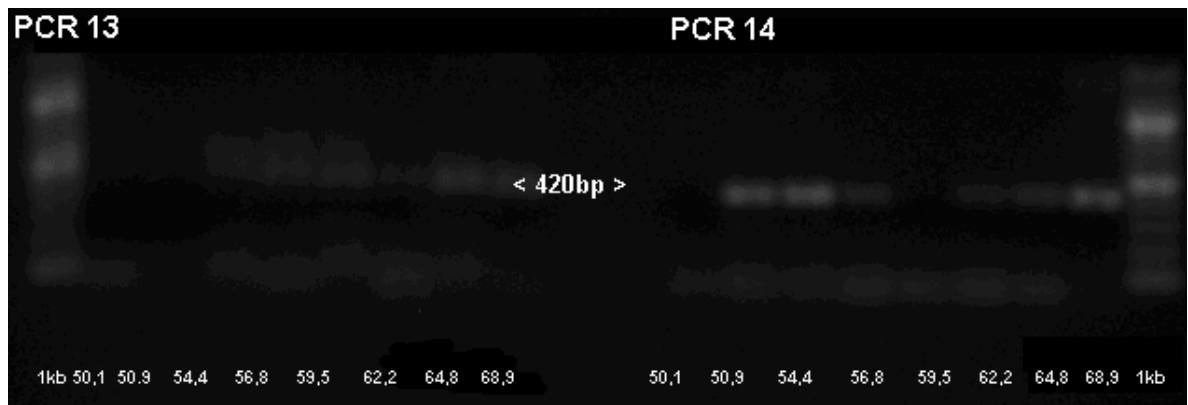
PCR-reaktiot toimivat siis näytteellä kahdeksan, joka oli eristetty QIAamp DNA Stool Mini Kit:llä. DyNAzyme™ DNA-polymeraasientsyymi toimi paremmin.



KUVA 16 Agaroosigeelielektroforeesi PCR 12

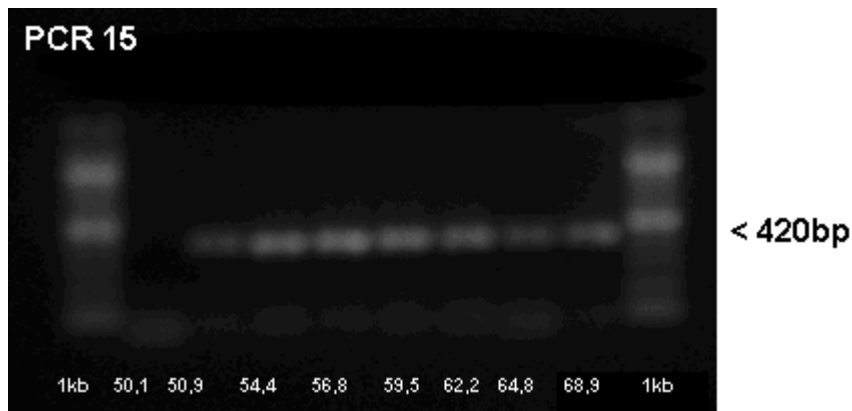
PCR 13, PCR 14 ja PCR 15 DyNAzyme polymeraasi QIAamp näytteille

Teimme viimeiset kolme PCR-reaktiota 24.4.2009. Käytimme DyNAzyme™ DNA-polymeraasientsyymiä, koska se toimi edellisissä reaktioissa parhaiten. Näytteeksi valitsimme näytteen numero kahdeksan, koska sillä olimme aikaisemmin saaneet tuloksia. Testasimme MgCl₂-konsentraation 1,5 mM (PCR 13), 2,0 mM (PCR 14) sekä 2,5 mM (PCR 15). Lämpötilagradienttina käytimme taulukon 8 s.47 mukaista gradienttia, jossa annealing-lämpötila vaihteli noin 20°C. Reaktioseokset pipetoimme kahdeksalle näytteelle, joista yksi oli negatiivinen kontrolli. Pipetoimme reaktioseokset taulukoiden 11 s.50 (PCR 13), 14 s.52 (PCR 14) ja 12 s.50 (PCR 14) mukaan. PCR-ohjelmana käytimme ohjelmaa numero 2 (taulukko 7 s.46).



KUVA 17 Agarosigeelielektroforeesi PCR 13 ja PCR 14

Agarosigeelielektroforeesissa lähes kaikkien näytteiden kohdalla näkyi fraktio oikeassa kohdassa (kuva 17 ja 18). Selvästi parhaiten toimi $MgCl_2$ -konsentraatio 2,5mM(PCR 15, kuva 18) ja heikoiten $MgCl_2$ -konsentraatio 1,5Mm(PCR 13, kuva 17). $MgCl_2$ -konsentraatiolla 2,5mM lämpötiloista toimivat parhaiten 56,8°C ja 59,5°C.



KUVA 18 Agarosigeelielektroforeesi PCR 15

Kokosimme tuloksien hahmottamisen helpottamiseksi yhteenvetotaulukon tuloksista (taulukko 15 s.55), sekä taulukkoon 16 s.55 Testatut DNA:n eristysmenetelmät, entsyymit ja magnesiumkloridikonsentraatiot. Lisäksi kokosimme taulukkoon 17 s.55 olosuhteet, jossa PCR-reaktio monisti templaatti-DNA:ta.

TAULUKKO 15. Yhteenveto kaikista kvalitatiivisen PCR menetelmän testauksista. Vihreällä ne reaktio-olosuhteet, jotka toimivat.

PCR:n suoritus	PCR-reaktiot	Käytetyt näytteet ja niiden eristystapa		Entsyymi kohtainen MgCl ₂ -konsentraatio (mM)		Annealing-lämpötila
		Magnapure	QIAamp	Dynazyme	Biotoools	Lämpötila
Pvm	PCR no					
2.3.2009	1	1, 3			2	55
5.3.2009	2		5, 6		2,5	50-60
19.3.2009	3	2			1,5	50-70
	4	4			2,0	50-70
21.4.2009	5		7		1,5	50-70
	6		7		2	50-70
22.4.2009	7		7		1,5	50-70
	8		7		2,0	50-70
	9		8	1,5		50-70
	10		8	2,5		50-70
23.4.2009	11	12	78		2,0	55
	12	12	78	1,5		55
24.4.2009	13		8	1,5		50-70
	14		8	2,0		50-70
	15		8	2,5		50-70

TAULUKKO 16. Testatut DNA:n eristysmenetelmät, entsyymit ja magnesiumkloridikoncentraatiot (mM).

	Biotoools	DyNazyme
MagnaPure	1,5 2,0	1,5
QIAamp	1,5 2,0 2,5	1,5 2,0 2,5

TAULUKKO 17. Olosuhteet magnesiumkonsentraation suhteen (mM), joissa PCR-reaktio monisti templaatti DNA:ta.

	Biotoools	DyNazyme
MagnaPure	-	-
QIAamp	2,5	1,5 2,0 2,5

Ensimmäiseksi testasimme Biotools-entsyymin toimivuutta eri magnesiumkloridi konsentraatioissa 1,5 mM, 2,0 mM, ja 2,5 mM. Testasimme PCR-reaktion herkkyyttä eri lämpötiloissa käyttämällä lämpötilagradienttia. Biotools-entsyymillä saimme tuloksia ainoastaan, kun käytössä olivat näytteet 5 ja 6, jotka oli eristetty QIAamp DNA Stool Mini Kit:llä.

Myös DyNAzyme™-entsyymiä testasimme kaikissa kolmessa edellä mainitussa magnesiumkonsentraatioissa käyttäen annealing-lämpötilagradienttia. Parhaiten toimi DyNAzyme™-entsyymi, kun käytössä olivat näytteet 5, 6 ja 8 (taulukko 15 s.55). Kaikki näytteet oli myös eristetty QIAamp DNA Stool Mini Kit:llä. Parhaiten reaktio toimi magnesiumkloridikonsetraation ollessa 2.5 mM ja lämpötilan ollessa 56,8 °C ja 59,5 °C.

Yhteenvetona voimme todeta, että Magna pure-eristyslaitteella eristetyt templaatit eivät toimineet lainkaan missään testatuista olosuhteissa. QIAamp eristetyt templaatit toimivat, mutta eristysten välillä oli eroja. Biotools-entsyymi saatiin toimimaan vain kerran. Dynazyme-entsyymi puolestaan oli toistettavampi ja lisäksi se toimi kaikissa eri testatuissa magnesiumkloridi-konsentraatioissa laajalla lämpötila-alueella(taulukko 15 s. 54). Tulosten perusteella suosittelemmekin, että kvalitatiivisen PCR:n DNA tulisi eristää QIAamp DNA Stool kitillä ja PCR-reaktiot tulisi tehdä DyNAzyme entsyymillä magnesiumkloridikonsetraation ollessa 2.5 mM ja lämpötilan ollessa 56,8 °C - 59,5 °C. (Sami Oikarinen 2009.)

6.5 Kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR-menetelmän optimointi

Kvantitatiivista reaaliaikaista PCR menetelmää haluttiin testata kihomadon nukleinihapon osoittamiseen ulosteesta. Menetelmää käytettiin vertailevana menetelmänä, kvalitatiivisen osoitusmenetelmän testauksen ja optimoinnin rinnalla. Lisäksi

se tulee toimimaan vaihtoehtoisena menetelmänä kihomatojen osoituksessa ulosteesta. Laitteena käytimme LightCycler® PCR-laitetta.

Kvalitatiivisessa PCR:ssä päädyimme käyttämään artikkelin Iniguez, M et. al. 2002 mainitsemia alukkeita EntF ja EntR (taulukko 1 s 42), joiden väliin jäävän monistusalueen pituus on 420bp. Näiden alukkeiden väliin jäävä alue on liian pitkä sovellettavaksi kvantitatiiviseen reaaliaikaiseen PCR:ään (Hanna Honkanen, 2009). Tämän takia päädyimme suunnittelemaan tulevan koettimen (KihoProbe) lisäksi toisen alukkeen (KihoRev), joka tulee noin XX bp päähän toisesta, artikkelissa Araujo ym. 2002 mainitusta alukkeesta (EntF).

Alukkeen suunnitteluun tulostimme enterobius vermiculariksen mitokondriaalisen DNA:n sekvenssit National Center for Biotechnology Information tietokannasta, osoitteesta: www.ncbi.nlm.nih.gov. Sen perusteella suunnittelimme koettimen ja alukkeen sopivalle alueelle, opinnäytetyön teoria osuudessa mainittujen valintaperusteiden mukaisesti. Hanna Honkasen ohjaamana suunnittelemiemme alukkeen ja koettimen sekvenssi on esitetty taulukossa 18. Aluke ja koetin tilattiin Sigma Aldrich company:sta. Alukkeet ja koetin tulivat kuiva-aineena, jolloin ne liuotettiin steriiliin veteen valmistajan ohjeen mukaisesti.

TAULUKKO 18. Alukkeen ja koettimen sekvenssi.

KihoRev	XXX
KihoProbe	XXX

Kaikissa reaktiosarjoissa käytimme LightCycler® TagMan® Master reagenssipakkausta. Esireaktioseos (5x Mastermix) valmistettiin kitin valmistajan ohjeen mukaan, pipetoimalla 10µl FastStart entsyymiä kitin mukana tulleeseen putkeen, joka sisälsi reaktiopuskurin, MgCl₂:a ja deoksinukleotiditriphosfaatteja (dNTP).

Ensimmäisenä (5.3.2009) teimme testauksen, jonka tarkoituksena oli selvittää toimiiko käyttämämme LightCycler® TagMan® Master -reagenssit ja onko kihomatonäytteiden DNA-eristys onnistunut. Lisäksi halusimme tietää toimiiko suunnittele-

mamme aluke ja koetin. Kihomato näytteiden testaus tehtiin neljällä (4) näytteellä, joista kaksi oli eristetty eristysautomaatilla (Magna Pure) ja kaksi manuaalisesti tehtävällä eristysreagenssarjalla (QIAamp DNA Stool mini kit). Me valmistimme kuusi (6) reaktiota, joista kahdessa vesi toimi negatiivisena kontrollina. PCR-reaktiot valmistettiin jäällä, puhdastilassa taulukon 19. mukaan.

TAULUKKO 19. PCR-reaktioseos

Reagenssi	1 reaktio	Loppukonsentraatio
5xreaktioseos	4µl	1x
KihoFwd	1µl	500nM
KihoRev	1µl	500nM
KihoProbe	0,2µl	100nM
H2O	8,8µl	
Kokonaistilavuus	15µl	

Reaktioseosta pipetoitiin 15µl -ja näytettä 5µl valmistajan LightCycler® 20µl kapillaareihin ja siirrettiin näytekaruselliin. Näytteet sentrifugoitiin 3000rpm/10 sekuntia, jonka jälkeen ne siirrettiin näytekarusellissa LightCycler® 1.5 laitteeseen. PCR-ajo suoritettiin LightCycler® TaqMan® Master reagenssipakkauksen valmistajan ohjeen mukaan taulukko 20.

TAULUKKO 20. PCR-ohjelma

Toiminta	Lämpötila °C	Aika
Alkudenaturaatio	95	10min
45 sykliä	Denaturaatio	95
	Annealing	60
	Ekstensio	72
Loppuekstensio	40	30s

Ensimmäisessä reaktiosarjassa saimme osoitettua reaktioiden toimivuuden, kahdella eri menetelmällä eristetyistä näytteistä. Automaatiolla (Magna Pure) ja manuaalisella (QIAamp) menetelmällä eristetyt näytteet monistuivat reaktiossa hyvin ja vesikontrollit olivat negatiiviset. Ct-arvot olivat manuaalieristetyillä näytteillä hie-

man matalammat kuin automaattieristetyillä, mutta kummallakin menetelmällä oli saatu DNA:n eristys onnistumaan.

Toisessa PCR-sarjassa (19.3.2009) haluttiin löytää koettimelle sopiva pitoisuus. Koettimen pitoisuutta lähdimme kokeilemaan viidellä (5) eri pitoisuudella 50 nM, 75 nM, 100 nM, 125 nM ja 150nM. Reaktion muut reagenssipitoisuudet pysyivät samana kuin ensimmäisessä sarjassa (taulukko 19 s.57). Jokaista eri koetinpitoisuutta varten pipetoitiin kaksi (2) positiivista manuaalieristettyä (QIAamp) kihomatonäytettä ja negatiivisiksi kontrolleiksi vesi. Reaktiot valmistettiin taulukon 21. mukaisesti, jonka jälkeen näytteet laitettiin ajoon ensimmäisen PCR-ajon mukaisesti, taulukon 20 s.58 PCR-ohjelmalla.

TAULUKKO 21. PCR-reaktioseos eri koetin pitoisuuksilla

Reaktio 1-5	1x reaktio	Loppukonsentraatio
5x Reaktioseos	4µl	1x
Kiho Fwd	1µl	500nM
Kiho Rev	1µl	500nM
Kiho Probe reaktio 1	0,1µl	50nM
Kiho Probe reaktio 2	0,15µl	75nM
Kiho Probe reaktio 3	0,20µl	100nM
Kiho Probe reaktio 4	0,25µl	125nM
Kiho Probe reaktio 5	0,3µl	150nM
H ₂ O	8,9-8,7µl	
Kokonaistilavuus x 1 reaktio	15µl	

Koettimen pitoisuuksien optimoinnissa ei havaittu suuria eroja Ct-arvoihin eri koetin pitoisuuksien välillä. Alimmat Ct-arvot olivat koetinpitoisuudella 75nM.

Kolmannessa (20.4 - 21.4.2009) sarjassa haluttiin löytää alukkeille sopivat pitoisuudet. Valmistettiin 16 erilaista reaktioseosta (liite 1 s.70-72.), joissa alukkeiden pitoisuudet vaihtelivat taulukon 22 s.60 mukaisesti välillä 200 – 500nM. Koettimen pitoisuutena jokaisessa reaktiossa 75nM.

TAULUKKO 22. Reaktioihin tulevat alukeyhdistelmä pitoisuudet nM:na.

KihoRev	KihoFwd			
200	200	300	400	500
300	200	300	400	500
400	200	300	400	500
500	200	300	400	500

Jokaista eri reaktioseosta kohden pipetoitiin kaksi (2) positiivista manuaalieristettyä (QIAamp) kihomato näytettä ja yksi vesi. Monistus suoritettiin edellisten PCR-ajojen mukaisesti, taulukon 20 s.58 PCR-ohjelmalla.

Alukepitoisuuksien optimoinnissa alimmat Ct-arvot saatiin alukkeiden pitoisuuksien ollessa 300 – 500nM välillä. Tätä pienemmillä pitoisuuksilla Ct-arvot ovat hieman korkeampia taulukko 23.

TAULUKKO 23. Ct-arvot, alukkeiden pitoisuuden vaihdellessa 200-500nM. Alimmat arvot punaisella merkittynä.

KihoFwd	KihoRev			
	200nM	300nM	400nM	500nM
200nM	32,18	33,14	32,91	31,54
300nM	33,25	31,64	32,13	30,78
400nM	32,43	33,59	33,65	33,2
500nM	33,83	31,57	32,93	32,73

Aluksi saimme osoitettua sen, että menetelmä toimii ja pystyy monistamaan haluttua DNA-aluetta näytteestä. Tästä päättelimme, että kumpikin eristysmenetelmä toimii ja ne eivät eroa toisistaan suuresti PCR-menetelmän monistumisesta pääteltynä.

Koettimen pitoisuuden optimoinnissa tulokset ovat lähellä toisiaan. Kuitenkin pitoisuudella 75nM näyttäisi tulevan parhaimmat Ct-arvot. Näin ollen valitsimme seuraaviin testauksiin pitoisuudeksi 75nM.

Alukkeiden optimoinnissa näyttäisi toimivan 300 – 500nm alueella olevat pitoisuudet parhaiten. Suurta vaihtelua ei tällä alueella havaittu, joten päätimme valita kummankin alukkeen pitoisuudeksi 300nm, koska reaktio toimii hyvin tällä pitoisuudella ja taloudellisesti on kannattavinta käyttää pienintä toimivaa pitoisuutta.

Käyttämämme LightCycler® TagMan® Master reagenssien valmistaja suosittelee kokeilemaan alukepitoisuutena 100 – 1000nM, joista 500nM on yleisimmin käytetty (Roche Diagnostics). Näin ollen valitsemamme pitoisuus on valmistajan suosituksen mukaisella alueella.

Yhteenvetona voimme todeta että reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR-menetelmä toimi opinnäytetyön kokeellisen osuuden aikana, mutta menetelmän herkkyyttä olisi tarvinnut vielä testata laimennussarjoilla. Näin olisi saatu tietoa kuinka pienistä määristä templaattia menetelmä pystyy vielä monistamaan DNA:ta. Lisäksi erilaisia reaktiolämpötiloja olisi pitänyt optimoida. Kaikkien optimointien jälkeen menetelmää olisi voinut testata kliinisten potilasnäytteiden analysoinnissa. Aikamme ei riittänyt näiden testauksien suorittamiseen.

7 POHDINTA

Tutkimustehtävänä opinnäytetyössämme oli optimoida PCR-menetelmä kihomadon DNA:n osoittamiseksi ulosteesta. Kvalitatiivisessa PCR:ssä lähdimme toteuttamaan optimointia kahdella eri entsyymillä ja hakemaan reaktiolle optimaalisia olosuhteita. Toisena menetelmänä kokeellisessa osuudessamme testasimme kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR:n herkkyyttä osoittaa kihomadon DNA:ta. Alkuperäisen suunnitelman mukaan meidän oli tarkoitus PCR:n optimoinnin jälkeen testata myös menetelmän herkkyyttä kliinisillä potilasnäytteillä. PCR-menetelmän optimoiminen osoittautui kuitenkin hankalaksi ja työlääksi ja jopa välillä tuloksettomaksi. Ajan puutteen vuoksi emme saaneet menetelmää optimoitua halutulla tavalla, vaan saamamme tulokset olivat ainoastaan suuntaa antavia. Kokeellisen osuuden edetessä osoittautui, että kvantitatiivinen PCR-menetelmä toimi hyvin ja tulokset olivat toistettavia verrattuna kvalitatiiviseen PCR-menetelmään.

Kokeelliseen osuuteen varatut kaksi viikkoa käytimme kvalitatiivisen ja kvantitatiiviseen reaaliaikaisen PCR-menetelmän optimointiin. Koska meitä oli kolme tekijää, kaksi meistä pystyi keskittymään kvalitatiiviseen PCR:n optimointiin ja yksi meistä optimoi kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR:n toimivuutta. Kokeelliseen osuuteen varatut kaksi viikkoa eivät meille riittäneet, vaan kävimme myös myöhemmin suorittamassa optimointeja. Yhteensä meidän kokeelliseen osuuteemme kului aikaa kuukausi ja silti aika loppui kesken. Ensimmäisten positiivisten tuloksien saaminen vei aikaa lähes kuukauden, joten se vaikutti huomattavasti ajan loppumiseen. Kvantitatiivinen PCR-menetelmä toimi alusta asti halutulla tavalla. Panostimme kuitenkin kvalitatiivisen PCR:n optimointiin, sillä se on huomattavasti halvempi menetelmä kvantitatiiviseen reaaliaikaiseen PCR:n verrattuna. Lähes kuukauden kestäneen kokeellisen osuutemme jälkeen saimme positiivisia tuloksia Dynazyme-entsyymillä, mutta jotta menetelmä olisi luotettavasti saatu optimoitua ja sitä pitää luotettavana olisi testausta pitänyt vielä jatkaa.

Optimoinnista saatuja tuloksiamme kvalitatiivisesta PCR:stä emme voi pitää luotettavina. Saimme reaktion toimimaan vain tietyillä näytteillä, mitkä oli eristetty QI-

Aamp DNA Stool Mini Kit:llä. Kuitenkin näytteillä, jotka eivät toimineet kvalitatiivisessa PCR:ssä saimme tuloksia kvantitatiivisessa PCR:ssä. Tästä voimme päätellä, että kvalitatiivinen PCR-menetelmä ei ole todennäköisesti riittävän herkkä menetelmä kihomadon DNA:n osoittamiseksi ulosteesta. Mahdollisesti kvalitatiivinen PCR vaatii suuren määrän templaattia monistuaakseen ja toisissa näytteissä templaatin määrä oli alhainen, jolloin myös tulokset jäivät negatiivisiksi. Kvantitatiiviseen PCR:n tarvitaan todennäköisesti pienempi määrä templaattia, joten menetelmää voidaan pitää herkempänä. Kahdesta eri entsyymistä emme voi luotettavasti valita toimivampaa, sillä parhaiten toiminut Dynazyme-entsyymi saatiin toimimaan hyvin vain yhden kerran ja tietyillä näytteillä. Myös Biotools-entsyymillä saimme positiivisia tuloksia tietyllä näytteellä, mikä toimi myös Dynazymen kanssa.

Tuloksiin saattoi vaikuttaa myös näytteissä olevat PCR-inhibiittorit, jotka voivat estää DNA:n monistumisen. Eri nukleiinihappoeristysmenetelmät poistavat eri inhibiittoreita, tämä havaittiin kvalitatiivisessä PCR:ssä, jossa yksikään MagnaPurella eristetty näyte ei toiminut. Sen sijaan QIAamp:lla eristetyt näytteet toimivat huomattavasti paremmin. Myös eri entsyymien herkkyys eri inhibiittoreille ja niiden määrille vaihtelee. Tässä tutkimuksessa Biotools entsyymillä vain yksi näyte toimi kerran ja DyNazyme entsyymi toimi kaikissa QIAamp:lla eristetyissä näytteissä kaikissa testatuissa magnesuimkonsentraatioissa ja lisäksi laajalla lämpötila-alueella. On kuitenkin mahdotonta sanoa oliko kysymys templaatin vähäisestä määrästä vai PCR-inhibiittoreista. (Sami Oikarinen, 2009.)

Kvantitatiivista reaaliaikaista PCR-menetelmää emme ehtineet testata kliinisillä potilasnäytteillä. Kokeellisen osuuden jälkeen virologian yksikkö on saanut optimoinnit suoritettua loppuun ja testannut menetelmää kliinisillä potilasnäytteillä. XXX.

Kokeellisen osuuden kuvaaminen opinnäytetyössämme tuntui hankalalta, sillä tuloksia oli vaikeaa kuvata selkeällä ja ymmärrettävällä tavalla. Jokaisen PCR-reaktion jälkeen kirjassimme huolellisesti ylös, mitä olimme kulloinkin tehneet. Tämä auttoi tulosten analysoinnissa, sillä puutteellisista muistiinpanoista analysoiminen

olisi ollut hankalaa. Mielestämme huolellisten laboratoriapäiväkirjojen pito kokeellisen osuuden aikana lisäsi luotettavuutta itsessään, sillä kaikki työskentelytavat ja muutokset olivat huolellisesti kirjattu ylös. Kirjallisen osuuden kokoaminen oli suhteellisen helppoa ja aihe rajautui hyvin työn edetessä. Tietoa löysimme melko helposti, vaikka suurin osa käyttämistämme lähteistä oli englanninkielisiä. Opinnäytetyömme aihe oli laaja, siitäkin huolimatta vaikka meitä tekijöitä oli kolme. Kokeellisen osuuden laajuus oli ehkä liian työläs ammattikorkeakoulutasolle, koska aikaa kokeellisen osuuden suorittamiseen oli vain rajatusti ja aika loppui täysin kesken.

Opinnäytetyömme kokeellista osuutta tehdessämme olemme päässeet tutustumaan Heikki Hyödyn tutkimusryhmän toimintaan virologian yksikössä. Olemme saaneet syventyä molekyylibiologian työmenetelmiin ja oppineet niistä paljon uutta tietoa. Olemme oppineet toimimaan tutkimusryhmän jäsenenä ja saaneet kokonaiskuvan työstä tutkimusryhmässä. Kokeellisen osuuden aikana työskentelimme paljon itsenäisesti ja tämä opetti meille luottamusta omaan arviointikykyyn ja taitoihin. Opimme myös tekemään PCR-menetelmää optimoitaessa johtopäätöksiä ja miettimään seuraavaa vaihetta työskentelyssä. Mielestämme kehityimme opinnäytetyöprosessin aikana tiedon kriittisinä arvioijina, kirjoittajina ja kädentaidoiltamme ja tiedoiltamme. Yhteistyömme meidän kolmen tekijän välillä sujui hyvin, vaikkakin joskus aikataulujen sovittaminen yhteen oli haasteellista. Yhteistyömme työelämänedustajien kanssa toimi myös sujuvasti ja saimme heiltä aina apua tarvittaessa.

Jatkotutkimusehdotuksenaamme voisi olla kvantitatiivisen PCR-menetelmän herkkyuden testaaminen. Herkkyyttä voisi testata tekemällä näytteille laimennussarjan ja katsoa, kuinka laimeilla näytemäärillä menetelmän saisi toimimaan. Haluamme kiittää koko Heikki Hyödyn tutkimusryhmää ja erityisesti työelämäohjaajiamme Sami Oikarista ja Hanna Honkasta heidän antamastaan ohjauksesta ja avusta opinnäytetyömme kokeellisessa osuudessa.

LÄHTEET

- Araújo, A., Ferreira, F. F., Iñiguez, A. M., Reinhard, K. J. & Vicente, A. C. P. 2002. Enterobius vermicularis: specific detection by amplification of an internal region of 5S ribosomal RNA analysis. E. vermicularis: specific detection by PCR and SL1 RNA analysis. Elsevier Science. Experimental Parasitology 102, 218-222
- Aittoniemi, J., Haapala, A.-M., Hurme, M., Hyöty, H., Kaila, M., Knip, M., Kondrashova, A., Seiskari, T., Uibo, R., Virta, M., Viskari, H. & The EPIVIR study group. 2007. Allergic sensitization and microbial load-a comparison between Finland and Russian Karelia. British Society for Immunology. Clinical and Experimental Immunology 148, 47-52.
- Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Murray, P. R., Pfaller, M. A. & Tenover, R. C. 2003. Manual of Clinical Microbiology. 8. painos. Washington, DC: ASM Press
- Campbell, M. K. & Farrell, S. O. 2008. Biochemistry. 6.painos. Belmont: Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Centers for Disease Control and Prevention. Päivitetty 2005.
<http://phil.cdc.gov/Phil/details.asp>.
- David, J. T. & William, P. A. Jr. 2006. Markell and Voge's Medical Parasitology. 9. painos. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier
- Dennis, Y. M., Phil, K & Chiu, K, C. 2006 Clinical applications of PCR. New Jersey: Humana Press
- Diabimmune study. Luettu 12.8.2009.
<http://www.diabimmune.org/About%20DIABIMMUNE.html>.
- Fermentas International. 6x DNA Loading dye. Luettu 1.9.2009.
<http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/6xloadingsdye.htm>.
- Finnzymes. Luettu 1.8.2009
http://www.finnzymes.com/reagents_index.html
- Gen Quantification. Luettu 4.9.2009.
<http://gene-quantification.com/chemistry.html>.
- Glick, B. R. & Pasternak, J. J. 2003. Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA. 3.painos. Washington:ASM Press.
- Hannuksela, M. & Mäkelä, M. 2007. Immunoglobuliinit, vasta-aineet. Teoksessa Haahtela, T., Hannuksela, M., Mäkelä, M. & Terho, E.O. (toim.) Allergia. 1. painos. Helsinki:Duodecim

- Heikkinen, H.L.T. Toimintatutkimus – Toiminnan ja ajattelun taitoa 2001. Teoksessa Aaltola, J. & Valli, R. (toim.) Ikkunoita tutkimusmetodeihin. Jyväskylä: Gummerus kirjapaino Oy.
- Hellstén, S. (toim.). 2002. Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Helsinki: Suomen Kuntaliitto.
- Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2004. Tutki ja Kirjoita. 10. osin uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerrus Kirjapaino Oy.
- Honkanen, H. Tutkija. Henkilökohtainen tiedonanto 3.3.2009. Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksen virologian yksikkö, Tampere.
- Hospital medicine/Chaners publishing company, Luettu 21.9. 2009.
<http://www.mgm.ufl.edu/~gulig/mmid/parasitology/enterobius-life-cycle.jpg>.
- Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. (toim.). 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet kirja 1. 1. painos. Helsinki: Duodecim
- Kidd, K. & Ruano, G. 1995. Optimizing PCR. Teoksessa McPherson, M.J. Hames B.D & Taylor, G.R (toim). PCR 2. A practical approach. USA: Oxford University Press.
- Koivula, U.-M., Suihko, K. & Tyrväinen, J. 2001. Mission: Possible Opas opinnäytteen tekijälle. Tampere: Pirkanmaan Ammattikorkeakoulu
- Kokeellinen tutkimus. Luettu 28.9.2009
http://www.valt.helsinki.fi/staff/psaukkon/tutkielma/Tutkimusasetelma%202.html#Kokeellinen_tutkimus_
- Langford veterinary services, 2009. Luettu 18.8.2009.
http://www.langfordvets.co.uk/lab_pcr_fact.htm.
- Mackay, I. 2007. Real-Time PCR in microbiology. From diagnosis to characterization. United Kingdom: Caister academic press.
- McPherson, M. J. & Moller, S. G. 2000. PCR. The Basics. Iso-Britannia: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Molecular station. Luettu 21.9.2009. <http://www.molecularstation.com/pcr/>.
- Mount, D. 2004. Bioinformatics. Sequence and Genome Analysis. New York: Cold Spring Harbor laboratory press.
- National Center for Biotechnology Information. Luettu 1.3.2009.
www.ncbi.nlm.nih.gov.

Oikarinen, S. Tutkija. Henkilökohtainen tiedonanto 2009. Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksen virologian yksikkö, Tampere.

Opetushallitus. Luettu 24.5.2009. <http://www.edu.fi/oph/abc/dna/perus.html>.

Pingoud, A., Urbanke, C., Hoggett, J. & Jeltsch, A. 2002. Biochemical Methods. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.

Qiagen. 2007. QIAamp DNA Stool Handbook. Second edition. Germany.

Rasmussen, R. 2001. Teoksessa Meuer, S. Wittwer, C & Nakagawara, K. (toim). Rapid cycle real-time PCR. Methods and applications. Germany: Springer. 21-34.

Roche Diagnostics. MagnaPure LC. Operator's Manual. Version 3.0. Germany

Roche Diagnostics. Real-Time PCR systems. Luettu 24.5.2009. <https://www.roche-applied-science.com>.

Sugden, D & Winter, P. 2008. teoksessa: Walker, J & Rapley, R (toim). Molecular Biomethods. USA: Humana Press. 158.

Sun-Yat-sen University. Päivitetty 2009. <http://jpkc.sysu.edu.cn/jscx/Textbook/four-4.html>.

Suominen, I. & Ollikka, P. 1996. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 2. painos. Oppikirjan verkko-osio. Luettu 16.6.2009. <http://www.edu.fi/oph/abc/dna>

Suominen, I. & Ollikka, P. 2003. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3. painos. Helsinki: Hakapaino Oy.

Tartuntautiliitto Ry. Luettu 25.3.2009. <http://www.health.fi/tartuntautiliitto/kihomato.html>.

Toimintatutkimus. Hämeen Ammattikorkeakoulu. Luettu 1.9.2009. <http://elearningcentre.hamk.fi/tko/menetelmat/toimintatutkimus.html>

Ugaz V. M. 2007. PCR in Integrated Microfluidic Systems. Teoksessa Liu R. H. & Lee A. P. (toim.) Integrated Biochips for DNA Analysis. New York: Springer, 90-106.

Ulmanen, I., Valste, J. & Viitanen, P. 1995. Geeni. Porvoo: WSOY.

Ulmanen, I. Tehnunen, J. & Yläne, J. 2004. Geeni ja biotekniikka. 6. uudistettu painos. Porvoo: WSOY.

Wilson, K. & Walker, J. 2005. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 6. painos. New York: Cambridge University Press.

Wittwer, C. T. & Kuskawa, N. 2006. Nucleic Acid Techniques. Teoksessa Ashwoos, E. R., Bruns, D. E. & Burtis, C. A. (toim.) Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4. painos. St. Louis: Elsevier Saunders.

LIITTEET

Liite (1): 2 3.

Mixture 1	_____ x reaction	Total concentration
5 x Master Mix	4 µl x = µl	1x
Primer Fwd	0,4 µl x = µl	200 nM
Primer Kiho Rev	0,4 µl x = µl	200 nM
Probe Kiho probe	0,15 µl x = µl	75 nM
H ₂ O	10,05 µl x = µl	
Total volume	15 µl x = µl	

Mixture 2	_____ x reaction	Total concentration
5 x Master Mix	4 µl x = µl	1x
Primer Fwd	0,6 µl x = µl	300 nM
Primer Kiho Rev	0,4 µl x = µl	200 nM
Probe Kiho probe	0,15 µl x = µl	75 nM
H ₂ O	9,85 µl x = µl	
Total volume	15 µl x = µl	

Mixture 3	_____ x reaction	Total concentration
5 x Master Mix	4 µl x = µl	1x
Primer Fwd	0,8 µl x = µl	400 nM
Primer Kiho Rev	0,4 µl x = µl	200 nM
Probe Kiho probe	0,15 µl x = µl	75 nM
H ₂ O	9,65 µl x = µl	
Total volume	15 µl x = µl	

Mixture 4	_____ x reaction	Total concentration
5 x Master Mix	4 µl x = µl	1x
Primer Fwd	1 µl x = µl	500 nM
Primer Kiho Rev	0,4 µl x = µl	200 nM
Probe Kiho probe	0,15 µl x = µl	75 nM
H ₂ O	9,45 µl x = µl	
Total volume	15 µl x = µl	

Mixture 5	_____ x reaction	Total concentration
5 x Master Mix	4 µl x = µl	1x
Primer Fwd	0,4 µl x = µl	200 nM
Primer Kiho Rev	0,6 µl x = µl	300 nM
Probe Kiho probe	0,15 µl x = µl	75 nM
H ₂ O	9,85 µl x = µl	
Total volume	15 µl x = µl	

jatkuu

LIITE 1: (2) 3.

Mixture 6	_____ x reaction			Total concentrati- on
5 x Master Mix	4 µl	x	= µl	1x
Primer Fwd	0,6 µl	x	= µl	300 nM
Primer Kiho Rev	0,6 µl	x	= µl	300 nM
Probe Kiho probe	0,15 µl	x	= µl	75 nM
H ₂ O	9,65µl	x	= µl	
Total volume	15 µl	x	= µl	

Mixture 7	_____ x reaction			Total concentrati- on
5 x Master Mix	4 µl	x	= µl	1x
Primer Fwd	0,8 µl	x	= µl	400 nM
Primer Kiho Rev	0,6 µl	x	= µl	300 nM
Probe Kiho probe	0,15 µl	x	= µl	75 nM
H ₂ O	9,45 µl	x	= µl	
Total volume	15 µl	x	= µl	

Mixture 8	_____ x reaction			Total concentrati- on
5 x Master Mix	4 µl	x	= µl	1x
Primer Fwd	1 µl	x	= µl	500 nM
Primer Kiho Rev	0,6 µl	x	= µl	300 nM
Probe Kiho probe	0,15µl	x	= µl	75 nM
H ₂ O	9,25 µl	x	= µl	
Total volume	15 µl	x	= µl	

Mixture 9	_____ x reaction			Total concentrati- on
5 x Master Mix	4 µl	x	= µl	1x
Primer Fwd	0,4 µl	x	= µl	200 nM
Primer Kiho Rev	0,8 µl	x	= µl	400 nM
Probe Kiho probe	0,15 µl	x	= µl	75 nM
H ₂ O	9,65 µl	x	= µl	
Total volume	15 µl	x	= µl	

Mixture 10	_____ x reaction			Total concentrati- on
5 x Master Mix	4 µl	x	= µl	1x
Primer Fwd	0,6 µl	x	= µl	300 nM
Primer Kiho Rev	0,8 µl	x	= µl	400 nM
Probe Kiho probe	0,15 µl	x	= µl	75 nM
H ₂ O	9,45 µl	x	= µl	
Total volume	15 µl	x	= µl	

Mixture 11	_____ x reaction			Total concentrati- on
5 x Master Mix	4 µl	x	= µl	1x
Primer Fwd	0,8 µl	x	= µl	400 nM
Primer Kiho Rev	0,8 µl	x	= µl	400 nM
Probe Kiho probe	0,15 µl	x	= µl	75 nM
H ₂ O	9,25 µl	x	= µl	
Total volume	15 µl	x	= µl	

LIITE 1: 2 (3).

Mixture 12	_____ x reaction			Total concentration
5 x Master Mix	4 μ l	x	= μ l	1x
Primer Fwd	1,0 μ l	x	= μ l	500 nM
Primer Kiho Rev	0,8 μ l	x	= μ l	400 nM
Probe Kiho probe	0,15 μ l	x	= μ l	75 nM
H ₂ O	9,05 μ l	x	= μ l	
Total volume	15 μ l	x	= μ l	

Mixture 13	_____ x reaction			Total concentration
5 x Master Mix	4 μ l	x	= μ l	1x
Primer Fwd	0,4 μ l	x	= μ l	200 nM
Primer Kiho Rev	1,0 μ l	x	= μ l	500 nM
Probe Kiho probe	0,15 μ l	x	= μ l	75 nM
H ₂ O	9,45 μ l	x	= μ l	
Total volume	15 μ l	x	= μ l	

Mixture 14	_____ x reaction			Total concentration
5 x Master Mix	4 μ l	x	= μ l	1x
Primer Fwd	0,6 μ l	x	= μ l	300 nM
Primer Kiho Rev	1 μ l	x	= μ l	500 nM
Probe Kiho probe	0,15 μ l	x	= μ l	75 nM
H ₂ O	9,25 μ l	x	= μ l	
Total volume	15 μ l	x	= μ l	

Mixture 15	_____ x reaction			Total concentration
5 x Master Mix	4 μ l	x	= μ l	1x
Primer Fwd	0,8 μ l	x	= μ l	400 nM
Primer Kiho Rev	1 μ l	x	= μ l	500 nM
Probe Kiho probe	0,15 μ l	x	= μ l	75 nM
H ₂ O	9,05 μ l	x	= μ l	
Total volume	15 μ l	x	= μ l	

Mixture 16	_____ x reaction			Total concentration
5 x Master Mix	4 μ l	x	= μ l	1x
Primer Fwd	1 μ l	x	= μ l	500 nM
Primer Kiho Rev	1 μ l	x	= μ l	500 nM
Probe Kiho probe	0,15 μ l	x	= μ l	75 nM
H ₂ O	9,85 μ l	x	= μ l	
Total volume	15 μ l	x	= μ l	