

SAVONIA



OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI- JA TERVEYSALA

SULAMISKÄYRÄANALYYSI RT-PCR-LAITTEELLA

Menetelmän testaus ja työhjeen laatiminen bioanalyttikko-opiskelijoille

TEKIJÄT Sanna Nuutinen
 Jenna Ritvanen
 Katja Tietäväinen

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Tutkinto-ohjelma Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma	
Työn tekijät Sanna Nuutinen, Jenna Ritvanen & Katja Tietäväinen	
Työn nimi Sulamiskäyräanalyysi RT-PCR-laitteella	
Päiväys	14.11.2025
	50/4
Yhteistyötaho Savonia-ammattikorkeakoulu	
<p>Molekyylibiologia on yksi ammatillisista opinnoista bioanalyytikon tutkinto-ohjelmassa. Molekyylibiologian laboratorioissa bioanalyytikko tutkii muun muassa geneettistä materiaalia, kuten DNA:ta, ja suorittaa erilaisia mittauksia hyödyntäen PCR-sovelluksia. RT-PCR eli reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio on yksi käytetyimmistä molekyylibiologisista menetelmistä eri erikoisalojen laboratorioissa. Kehittämistyön tarkoituksena oli testata Bio-Radin CSI-laajennuskitin sulamiskäyräanalyysia RT-PCR-menetelmällä koulun Roche LightCycler® 96 -laitteella ja tuottaa siitä työohje bioanalyytikko-opiskelijoille. Kehittämistyön tavoitteena oli pidentää nykyisen laitekannan käyttöikää ja samalla nykyaikaistaa koulun laboratorioharjoitusten sisältöä.</p> <p>Opinnäytetyö toteutettiin tutkimuksellisenä kehittämistyönä lineaarisen mallin mukaisesti. Työn tilaajana toimi Savonia-ammattikorkeakoulu. Tutkimuksellinen kehittämistyö toteutettiin testaamalla sulamiskäyräanalyysia RT-PCR-menetelmällä koululla olevalla laitteella. Suoritettujen ajojen avulla arvioitiin menetelmän soveltuvuutta opetuskäyttöön. Menetelmää testattiin ja saatujen tulosten perusteella luotiin toimiva ajoprotokolla olemassa olevalle laitteelle sekä työohje bioanalyytikko-opiskelijoille menetelmän suorittamiseen.</p> <p>Opinnäytetyö koostui suoritetuista testiajoista, laitteen optimoinnista ja kirjallisesta raportista sekä tuotoksesta eli työohjeesta opiskelijoille molekyylibiologian syventävälle kurssille. Palautetta kysyttiin oman vuosikurssin opiskelijoilta työohjeen jäsentelystä, ymmärrettävyydestä, kielen selkeydestä ja opiskelijoiden kyvystä työskennellä itsenäisesti ohjeen mukaan sekä mahdollisista kehittämisehdotuksista. Lisäksi työohjeesta pyydettiin myös palautetta työn tilaajalta eli molekyylibiologian opettajalta. Palautteen perusteella ohjeeseen tehtiin vielä hyvin pieniä muutoksia. Jatkokehittämisideana voisi tuottaa videon taitopajoissa suoritettavaan harjoitustyöhön.</p>	
Avainsanat PCR, RT-PCR, real-time PCR, sulamiskäyräanalyysi, melting curve analysis, DNA, laadukas työohje	

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO.....	5
2	DEOKSIRIBONUKLEIINI-HAPPO ELI DNA.....	7
2.1	DNA:n rakenne.....	7
2.2	DNA:n kahdentuminen eli replikaatio.....	8
3	PCR:N DIAGNOSTISET SOVELLUKSET	10
3.1	Perinteinen PCR.....	10
3.2	Reaaliaikainen PCR eli RT-PCR.....	12
3.3	Sulamiskäyräanalyysi.....	14
4	PCR-SOVELLUSTEN KLIINISET KÄYTTÖKOHTEET	17
4.1	Infektiotautidiagnostiikka	17
4.2	Syöpädiagnostiikka	18
4.3	Oikeuslääketiede.....	18
5	KEHITTÄMISTYÖN TARKOITUS JA TAVOITE.....	20
6	KEHITTÄMISTYÖN TOTEUTUS	21
6.1	Kehittämistyön menetelmä	21
6.2	Kehittämistyön ideointi, tarve ja suunnitelma	22
6.3	Kehittämistyön tutkimuksellisen osuuden toteutus	25
6.3.1	RT-PCR-laitteen ohjelmointi ja ensimmäinen testaus	26
6.3.2	Uudelleenohjelmointi ja toinen testaus	27
6.3.3	Ohjelman hienosäätö ja onnistunut testaus.....	28
6.3.4	Toistettavuuden ja luotettavuuden testaus	30
6.4	Työohjeen eli kehittämistyön tuotoksen laatiminen.....	32
6.5	Arviointi ja tulokset	34
7	POHDINTA.....	36
7.1	Kehittämistyön toteutuksen ja tulosten pohdinta.....	36
7.2	Kehittämistyön eettisyys ja luotettavuus	39
7.3	Ammatillinen kasvu	41
7.4	Kehittämistyön hyödynnettävyys ja kehittämisideat	44
	LÄHTEET	46
	LIITE 1: TYÖOHJE OHJELMOINTIIN JA TESTIAJOIHIN	51
	LIITE 2: NÄYTTEIDEN AJOKOHTAISET CT-ARVOT JA SULAMISPISTEET	56
	LIITE 3: TYÖOHJEKYSELY JA SEN TULOKSET	57

LIITE 4: KEHITTÄMISTYÖN TUOTOS ELI TYÖOHJE.....	59
---	----

KUVALUETTELO

Kuva 1. DNA:n emäsparit (mukaillen Leja 2022, CC0)	7
Kuva 2. Solusykli (mukaillen Caulton 2013, CC BY)	8
Kuva 3. DNA:n replikaatio (mukaillen Ruiz 2007, CC0)	9
Kuva 4. Polymeraasiketjureaktio (mukaillen Enzoklop 2014, CC BY)	11
Kuva 5. SYBR® Greenin sitoutuminen (tietosisältö Bio-Rad Laboratories Inc. 2022, 6)	12
Kuva 6. RT-PCR:n amplifikaatiokäyrät (tietosisältö Bio-Rad Laboratories Inc. 2022, 15, kuva luotu ChatGPT:n avulla)	13
Kuva 7. Sulamiskäyräanalyysi (tietosisältö Bio-Rad Laboratories Inc. 2022, 16, kuva luotu ChatGPT:n avulla)	15
Kuva 8. Data ensimmäisen ajon sulamiskäyräanalyysistä	27
Kuva 9. Sulamispisteet ensimmäisestä ajosta	27
Kuva 10. Raakadata toisesta ajosta	28
Kuva 11. Sulamispisteet toisesta ajosta	28
Kuva 12. Raakadata kolmannesta ajosta	29
Kuva 13. Monistumiskäyrät kolmannesta ajosta	29
Kuva 14. Sulamispisteet kolmannesta ajosta	30
Kuva 15. Raakadata neljännestä ajosta	30
Kuva 16. Sulamispisteet neljännestä ajosta	31
Kuva 17. Agarosigeelielektroforeesi-ajon tulokset. K = DNA-standardi, A-D = epäiltyjen DNA:t ja S = rikospaikka-DNA (Nuutinen 2025, CC BY-NC-SA)	32

1 JOHDANTO

PCR eli polymeerasiketjureaktiolla (engl. polymerase chain reaction) monistetaan haluttuja deoksiribonukleiinihappo- eli DNA-jaksoja (Rodríguez-Lázaro & Hernández 2019, 1). DNA muodostaa elävien solujen geneettisen materiaalin eli se pitää sisällään yksilön perimäaineksen (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2010; Tieteen termipankki 2025). Reaaliaikainen PCR- eli RT-PCR- (engl. real-time PCR) menetelmä perustuu samoihin periaatteisiin kuin tavallinen polymeerasiketjureaktio, mutta erona tavalliseen menetelmään on, että monistustuotteiden syntymistä havainnoidaan ajon aikana reaaliaikaisesti. PCR:n merkitys on, että sillä pystytään monistamaan hyvin pienestä määrästä valtava määrä tarkalleen tiedettyjä DNA-jaksoja. Reaaliaikaiseen seurantaan tarvitaan fluoresoivia merkkiaineita ja tulosten perusteella voidaan päätellä näytteessä olleen DNA:n määrä lähtötilanteessa. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 3–6.) Tässä työssä käytetään jatkossa lyhennettä RT-PCR puhuttaessa reaaliaikaisesta polymeerasiketjureaktiosta.

PCR on aiheena tärkeä, koska PCR-menetelmää käytetään erilaisina versioina useilla tieteen aloilla, kuten mikrobiologiassa, biolääketieteessä, biotekniikassa ja oikeuslääketieteessä (Bustin, Zaccara & Nolan 2019, 19). RT-PCR on tällä hetkellä käytetyin PCR-sovellus (Ciotti, Nicolai & Pieri 2024). Esimerkiksi genetiikan laboratorioissa tehtävä työ kohdistuu ihmisen perimään, kromosomi-, DNA- ja RNA- (ribonukleiinihappo) tutkimuksiin sekä niissä tapahtuviin synnynnäisiin tai hankinnaisiin muutoksiin (Suomen Bioanalyttikot ry 2024). RT-PCR menetelmää käytetään myös tartuntatautien diagnostiikassa ja mikrobiologian laboratorioissa sitä hyödynnetään erilaisten mikrobien, kuten bakteerien ja virusten havaitsemiseen (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 3).

Sulamiskäyräanalyysi on RT-PCR:n yhteydessä käytettävä menetelmä, jossa lämpötilaa nostetaan asteittain ja samalla seurataan monistumisen aikana syntyneen fluoresenssin vähenemistä (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 7). RT-PCR:ssä sulamiskäyräanalyysiä käytetään laadunvarmistuksessa ja PCR-reaktioiden spesifisyyden eli tarkkuuden arvioimisessa (Ortutay & Ortutay 2017, 121). Se mahdollistaa spesifisten ja epäspesifisten PCR-tuotteiden erottelun (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 7). Esimerkiksi mikrobiologialla sulamiskäyräanalyysiä hyödynnetään mikro-organismien lajintunnistuksessa, mikrobilajien genotyyppityksessä eli perimän erojen kartoittamisessa sekä antibioottiresistenssin tunnistamisessa, mikä tarkoittaa mikrobien kykyä kestää antibioottihoitoa. Lisäksi menetelmällä voidaan havaita ihmisen geneettisiä variantteja eli perimän muutoksia, jotka voivat lisätä alttiutta tartuntatauteille tai vaikuttaa hoitovasteeseen. (Tong & Giffard 2012.)

PCR-työskentely vaatii huolellisuutta, tarkkuutta ja teknistä osaamista, joita myös bioanalyttikoilta työssä vaaditaan. Bioanalyttikon on tärkeä ymmärtää RT-PCR menetelmän ja saada kokemustaan käytöstä, optimoinnista sekä tulosten analysoinnista. Koulutuksen yleisiin osaamistavoitteisiin sisältyy keskeisten menetelmien ja periaatteiden hallinta sekä niiden soveltaminen kliinisessä laboratoriotyössä. Lisäksi tavoitteisiin kuuluvat tiedon kriittinen arviointi, ongelmanratkaisukyky sekä valmiudet alan kehittämiseen tutkimus- ja kehittämismenetelmiä hyödyntäen. (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.d.) Bioanalyttikon tutkinto-ohjelmassa molekyylibiologian perusteiden kurssilla on osaamistavoitteena osata selittää molekyylibiologian keskeiset tutkimusmenetelmät, joista PCR-menetelmä on yksi keskeisimmistä (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.a.) ja syventävällä kurssilla osaamistavoitteena on puolestaan syventää opiskelijan tietämystä menetelmien käytöstä eri kliinisillä erikoisaloilla (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.b.).

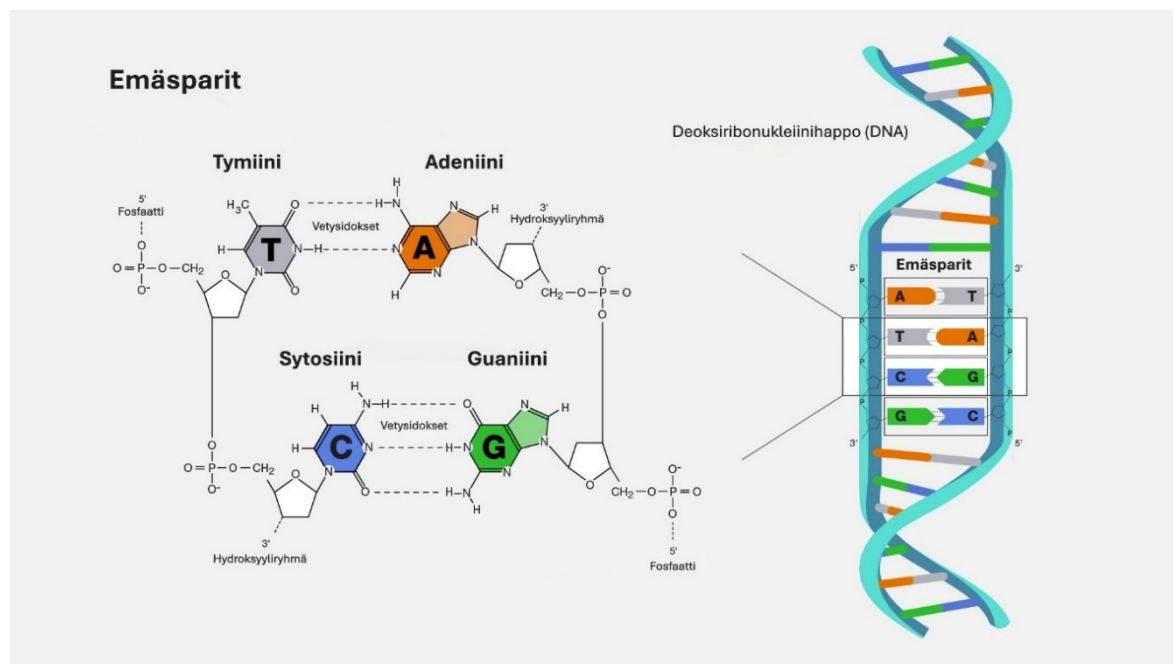
Opinnäytetyön toimeksiantaja on Savonia-ammattikorkeakoulu ja opinnäytetyö toteutetaan tutkimuksellisenä kehittämistyönä. Työ on tärkeä, sillä Savonia-ammattikorkeakoulun käytössä olevalla laitteella ei voida enää suorittaa aiemmin käytössä olleita testejä, koska niiden vaatimien näytteiden saaminen on hankaloitunut. Lisäksi toiveena on selvittää, voisiko vanhaa laitetta hyödyntää myös sulamiskäyräanalyysin tekemisessä. Nykyaikaisten tutkimusmenetelmien ylläpitäminen ja niiden oppimisen mahdollistaminen on tärkeää, jotta myös koululla opetuksessa voidaan vastata alan kehittyviin vaatimuksiin ja tukea opiskelijoiden ammatillista osaamista. Kehittämistyön tarkoituksena on testata Bio-Radin CSI-laajennuskitin sulamiskäyräanalyysia RT-PCR-menetelmällä koulun Roche Light-Cycler® 96 -laitteella ja tuottaa siitä työohje bioanalyttikko-opiskelijoille. Kehittämistyön tavoitteena on pidentää nykyisen laitekannan käyttöikää ja samalla nykyaikaistaa koulun laboratorioharjoitusten sisältöä.

2 DEOKSIRIBONUKLEIINIhapPO ELI DNA

2.1 DNA:n rakenne

DNA on kaksijuosteinen, nukleotideista koostuva molekyyli, joka sisältää kaiken elion kehittymistä ja toimintaa ohjaavan geneettisen informaation. Eukaryooteilla eli aiotumallisilla soluilla DNA on kromosomeissa, jotka sijaitsevat solun tumassa. Jokainen kromosomi koostuu yhdestä suuresta lineaarisesta DNA-molekyylistä ja siihen sitoutuneista proteiineista. (Suominen ym. 2010, 11–13.) RNA eli ribonukleiinihappo puolestaan on kaikissa elävissä soluissa esiintyvä nukleiinihappo, jolla on rakenteellisia yhtäläisyyksiä DNA:n kanssa. Toisin kuin DNA, RNA on kuitenkin useimmiten yksijuosteinen. (Sen n.d.) RNA:ta käytettäessä pitää se kääntää kaksijuosteiseksi DNA:ksi (Suominen ym. 2010, 170).

DNA:n rakenneosat eli nukleotidit muodostuvat kolmesta osasta: fosfaattiryhmästä, viisihiilisestä monosakkaridista eli deoksiriboosista sekä orgaanisesta emäksestä. Emäs voi olla joko puriineihin kuuluva adeniini (A) tai guaniini (G) tai pyrimidiineihin kuuluva tymiini (T) tai sytosiini (C) (kuva 1). DNA-juosteiden pariutuminen tapahtuu emästen välityksellä niiden sitoutuessa toisiinsa vetysidoksilla. Emäspariutumissäännön mukaan adeniini pariutuu ainoastaan tymiinin kanssa ja guaniini sytosiinin kanssa. (Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.a., 49–50; Suominen ym. 2010, 15–20.) Sekvenssi eli emäsjärjestys DNA:n tukirangassa sisältää biologista informaatiota, kuten ohjeet proteiinin tai RNA-molekyylin valmistamiseksi (Bates n.d.). Guaniini–sytosiiniemäsparin välillä olevat kolme vetysidosta tekevät siitä kestävämmän verrattuna adeniini–tymiiniemäspariin, jolla vetysidoksia on vain kaksi. Sidosten määrä vaikuttaa, miten lujasti DNA-juosteet sitoutuvat toisiinsa. Esimerkiksi, kuinka lujasti alukkeet eli monistettavan alueen rajaavat DNA-sekvenssit, sitoutuvat PCR:ssä templaattiin eli mallijuosteeseen, jonka avulla uusi juoste rakentuu. (Suominen ym. 2010, 20.)



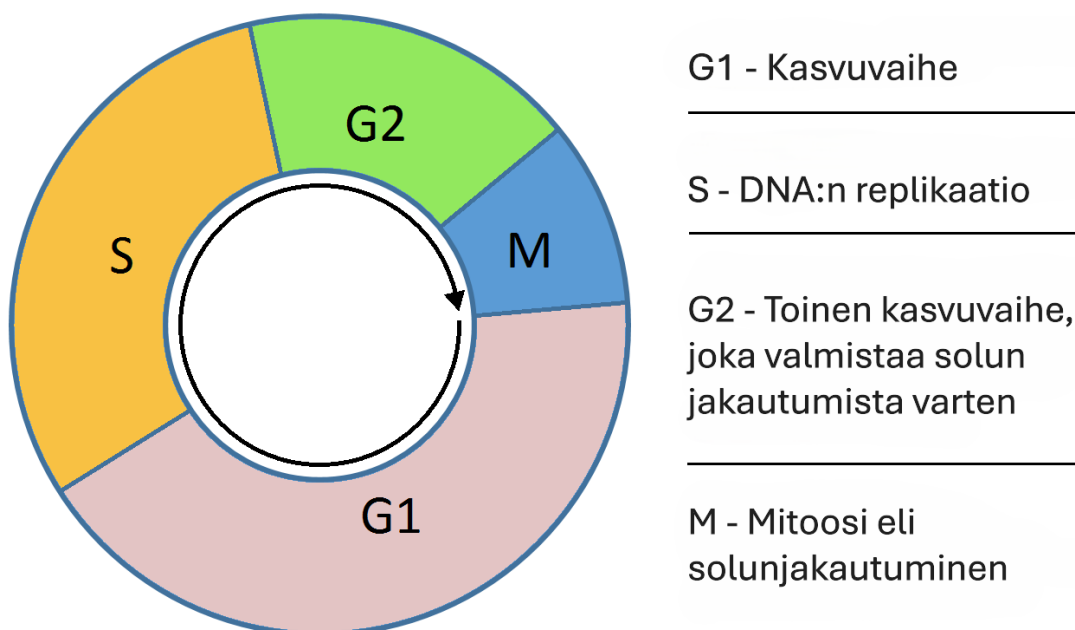
Kuva 1. DNA:n emäsparit (mukaillen Leja 2022, CC0)

Useiden nukleotidien liittyessä toisiinsa peräkkäin muodostuu nauhamainen nukleinihappomolekyyli, jota kutsutaan DNA-juosteeksi. DNA-molekyylissä juosteet ovat antiparalleelit eli ne kulkevat vastakkaisiin suuntiin ja kiertyessään toistensa ympäri ne muodostavat vasenkätisen kaksoiskierteen eli kaksoisheliksin. Nukleotidisekvenssit luetaan aina 5'-päästä alkaen eli 5'→3' -suunnassa. (Suominen ym. 2010, 18–19.) DNA-juosteiden tukiranka muodostuu vuorottelevista ja toisiinsa liittyneistä sokeri- ja fosfaattiryhmistä. 5'-päässä on vapaana fosfaattiryhmä, joka on kiinnittynyt sokerin viidenteen hiileen ja 3'-päässä puolestaan on vapaana sokerin kolmannen hiilen hydroksyyli-ryhmä. (Alberts ym. 2022, 185.) DNA-juosteen synteesi tapahtuu aina 5'→3' -suuntaan ja nukleotidit liitetään yksi kerrallaan rakennettavan nauhan vapaaseen 3'OH-ryhmään (Suominen ym. 2010, 26–27).

RNA:n tukiranka muodostuu DNA:n tavoin toistuvista fosfaatti- ja sokeriosista, mutta deoksiriboosin sijaan sokerina toimii riboosi. Jokaiseen sokeriosaan on kiinnittynyt yksi neljästä emäksestä: adeniini, urasiili, sytosiini tai guaniini. Soluissa esiintyy useita erilaisia RNA-tyyppejä, kuten lähetti-RNA:ta (mRNA), ribosomaalista RNA:ta (rRNA) ja siirtäjä-RNA:ta (tRNA). Lisäksi osa RNA-molekyyleistä osallistuu geenien ilmentymisen säätelyyn. (Sen n.d.)

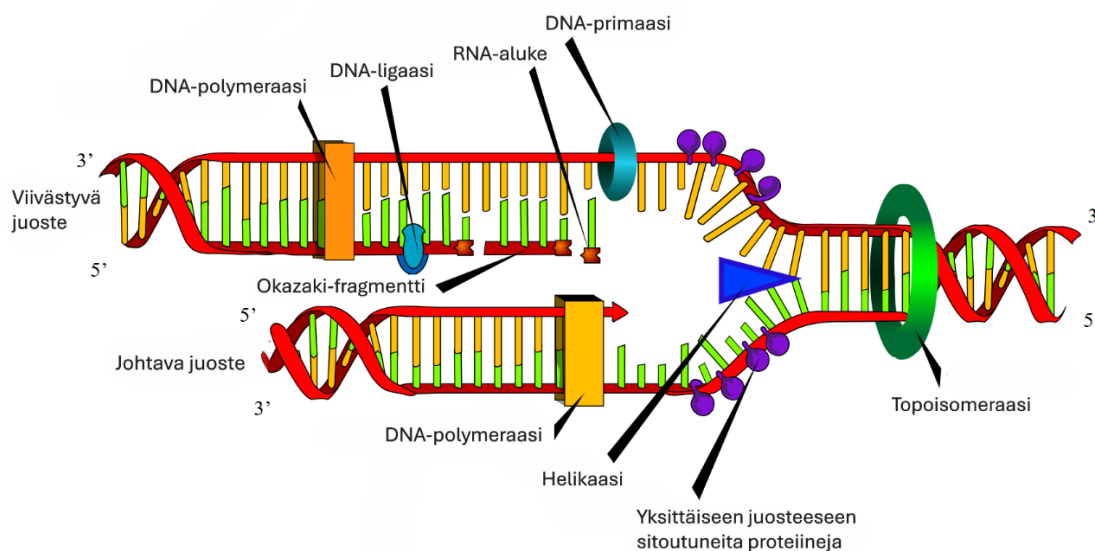
2.2 DNA:n kahdentuminen eli replikaatio

Ennen solunjakautumista emosolussa tapahtuu DNA:n replikaatio, jotta molemmille tytärsoluille siirtyy kopio kaikista perintökiteistä (Suominen ym. 2010, 13). Kopioitavaa DNA:ta on lähes kolme miljardia emäsparia ja solunjakautumisen aikana kaiken solussa olevan informaation täytyy kopioitua täydellisesti (Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.a., 6; Brody n.d.). Ihmisen solussa DNA:n replikaatio tapahtuu muutamassa tunnissa solusyklin S-vaiheessa (Campbell & Farrell 2009, 278). Solusykli on solun elämänkaari, jossa solunjakautuminen eli mitoosi ja välivaihe eli interfaasi seuraavat toisiaan (kuva 2). Solusyklin kesto riippuu solutyypistä ja varsinainen jakautumisvaihe vie vain lyhyen ajan koko syklistä. Solun ennen aikaisen etenemisen seuraavaan vaiheeseen estävät solusyklissä olevat tarkistuspisteet. S-vaihe on interfaasin vaihe, jossa solun DNA kahdentuu valmistautuen seuraavaan jakaantumiseen. (Solunetti n.d.) Solujen säätelymekanismien avulla varmistetaan, että DNA kahdentuu vain kerran solusykliä kohden (Campbell & Farrell 2009, 278).



Kuva 2. Solusykli (mukaillen Caulton 2013, CC BY)

DNA:n replikaatio tapahtuu useiden eri entsyymien vaikutuksesta ja on semikonservatiivista, joka tarkoittaa, että kumpikin alkuperäisen DNA-molekyylin juoste toimii mallina uudelle juosteelle, jolloin syntyvä DNA sisältää aina yhden vanhan ja yhden uuden juosteen. Kaikki DNA-molekyylit kaikissa eliöissä replikoituvat semikonservatiivisesti. (Bhagavan 2002, 682; Suominen ym. 2010, 24–28.) DNA-polymeraasientsyymi III kopioi emo-DNA:n sisältämän emäsjärjestyksen syntyvälle tytär-DNA:lle. Toimiakseen DNA-polymeraasi tarvitsee templaatin sekä alukkeen, joka luonnollisessa replikaatiossa on primaasientsyymien syntetisoima lyhyt RNA-jakso. Templaattijuoste syntyy helikaasin avatessa DNA:n kaksoiskierteen ja tämän prosessin seurauksena syntyvää jännitystä purkavat topoisomeraasit replikaatiohaarukan edellä. Alukkeen sitouduttua templaatin yksijuosteeseen osaan, DNA-polymeraasi alkaa liittää siihen lisää nukleotideja emäsjärjestyksen mukaisesti. DNA-liigaasientsyymi yhdistää DNA-jaksot toisiinsa muodostamalla niiden päiden välille fosfodiesterisidoksen, joka tarkoittaa fosfaattiryhmän ja sokerimolekyylien välille muodostunutta sidosta. Lopputuloksena syntyy kaksi identtistä DNA-kaksoisjuostetta. (Suominen ym. 2010, 18–28.) Replikaatio ja siihen tarvittavien entsyymien toiminta on havainnollistettu kuvassa 3.



Kuva 3. DNA:n replikaatio (mukailen Ruiz 2007, CC0)

Polymeraasiketjureaktio eli PCR jäljittelee solun sisällä tapahtuvaa DNA:n luonnollista replikaatiota ja sen käynnistymiseksi riittää yksikin kaksijuosteinen DNA-molekyylit (Birmingham & Luettich 2003). DNA-polymeraaseja tarvitaan genomien eli geeniperimien kopioimiseen ennen solujen jakautumista ja geneettisen tiedon eheyden ylläpitämiseksi. Termotabiilia eli korkeaa lämpötilaa kestävä DNA-polymeraasia käytetään molekyylibiologiassa ja biotekniikassa useissa menetelmissä, kuten DNA:n kloonauksessa, DNA:n sekvensoinnissa eli emäsjärjestyksen määrittämisessä, koko genomien monistuksessa, yhden nukleotidin muutosten havaitsemisessa ja PCR-sovelluksissa. DNA-polymeraasin on löytänyt ensimmäisen kerran Arthur Kornberg vuonna 1956. Löytynyt DNA-polymeraasi eristettiin kuumista lähteistä löytyneestä bakteerista ja tutkimalla sitä havaittiin, että sen avulla on mahdollisuus rakentaa uudelleen DNA-ketjuja. Termotabiilin DNA-polymeraasin ominaisuuksien ymmärtäminen auttaa tulevaisuudessa tutkijoita luomaan PCR-menetelmää hyödyntäviin sovelluksiin tarvittavia uusia reagensseja ja tuottamaan keinotekoisia DNA-polymeraaseja. (Akram ym. 2023.)

3 PCR:N DIAGNOSTISET SOVELLUKSET

3.1 Perinteinen PCR

Perinteisen PCR- eli polymeerasiketjureaktiomenetelmän on alun perin kuvannut Kjell Kleppe vuonna 1971 ja myöhemmin vuonna 1986 Kary Mullis. PCR-reaktio on herkkä, spesifinen ja tuottaa hyvin pienestä määrästä DNA:ta suuren määrän haluttua DNA-juostetta. (Rolando, Melkonian & Walt 2024.) PCR-reaktio vaatii DNA-mallin eli monistettavan DNA:n, spesifiset alukkeet, dNTP:t eli nukleotidit uusien DNA-juosteiden rakennusaineiksi, polymeeraasin sekä optimaaliset reaktio-olosuhteet (Artika, Dewi, Nainggolan, Siregar & Antonjaya 2022).

Reaktiossa DNA-alukkeet ovat lyhyitä, noin 15–40 nukleotidin mittaisia DNA- tai RNA-jaksoja, jotka kiinnittyvät monistettavaan alueeseen eli kaksijuosteisen DNA-alueen vastakkaisiin päihin toimien lähtökohtana polymeeraasille (Suominen ym. 2010, 154). Alukkeiden sitoutuminen tapahtuu emäspäriperiaatteen mukaisesti ja niiden suunnittelulla voidaan valita tarkasti se DNA:n kohta, jota kussakin PCR-reaktiossa pyritään monistamaan (Addgene n.d.). PCR-menetelmässä käytettävän polymeeraasin tulee olla termostabiilia. DNA-polymeeraasi eli entsyymi, kuten *Thermus aquaticus* -bakteerista eristetty *Taq*-polymeeraasi, syntetisoi uuden komplementaarisen juosteen, jolloin reaktio monistuu eksponentiaalisesti eli moninkertaistuen joka vaiheessa ja yhdestä kopiosta muodostuu miljoonia kopioita. (Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.a., 36; Suominen ym. 2010, 153–154.)

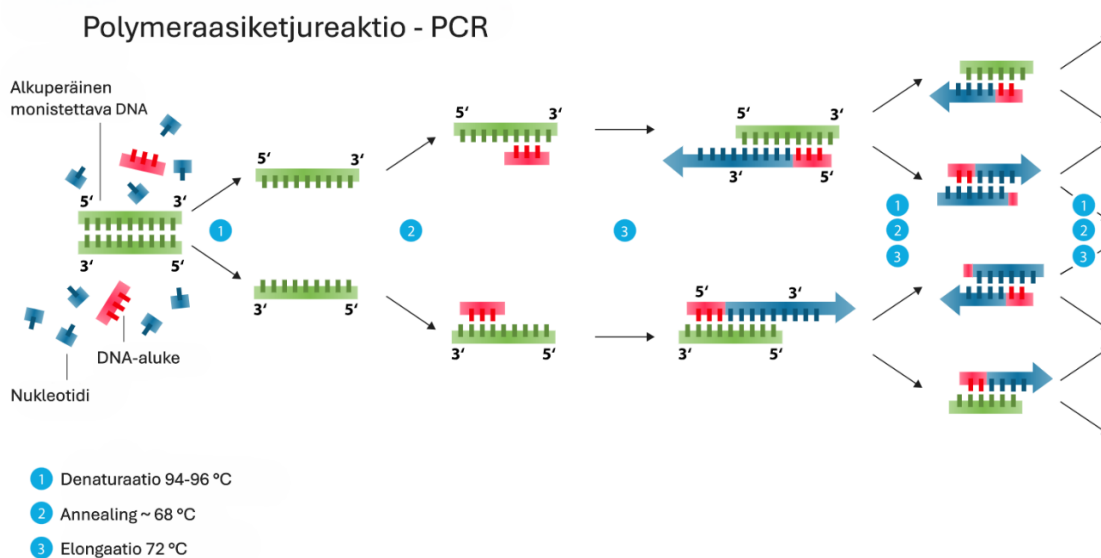
PCR-reaktioiden optimointia käytetään onnistuneen DNA-monistuksen varmistamiseen. PCR-reaktioiden optimoinnissa tulee ottaa huomioon useita tekijöitä, kuten entsyymien ja alukkeiden määrä sekä deoksinukleotidien määrä ja magnesiumipitoisuus reaktiossa. Lisäksi optimointiin vaikuttavat alukkeiden kiinnittyminen ja pidentyminen, toistettavien syklien määrä sekä denaturaatioajan ja -lämpötilan asetukset. Denaturointikäsitteillä kaksijuosteisesta DNA:sta tulee yksijuosteista. Entsyymimäärään vaikuttavat käytettävä entsyymi, templaatti-DNA ja alukkeet. Entsyymien määrä vaikuttaa siihen, että spesifistä tuotetta saadaan monistettua juuri oikean verran. Alukkeiden määrällä taas vaikutetaan muun muassa siihen, että ne saadaan kiinnittymään oikeisiin kohtiin templaattissa. Alukkeiden pituus, pitoisuus ja emäskoostumus taas vaikuttavat reaktioon tarvittavaan aikaan ja alukkeen kiinnittymiseen vaadittavaan lämpötilaan. Alukkeiden ekstensioaikaan eli pidentymiseen vaikuttavat käytetty entsyymi ja lämpötila sekä templaatti-DNA:n pituus ja määrä. DNA-polymeeraasi vaatii vapaana olevia magnesiumioneja pystyäkseen sitoutumaan templaattiin, alukkeisiin ja nukleotideihin. Magnesiumipitoisuus PCR-reaktiossa on tärkeä, sillä se vaikuttaa myös reaktion spesifisyyteen ja tarkkuuteen. (Suominen ym. 2010, 162–163.)

Deoksinukleotidien määrällä voidaan vaikuttaa alukkeiden oikeisiin kiinnittymiskohtiin sekä PCR:n spesifisyyteen ja siksi niiden pienin käyttökelpoinen pitoisuus kannattaa määrittää PCR-reaktion optimoinnissa. Reaktio-olojen ollessa muuten optimaaliset, toistettavien syklien määrään vaikuttaa vain templaatti-DNA:n määrä. Liian monen syklin toistaminen lisää mahdollisesti epäspesifisten tuotteen syntymistä. (Suominen ym. 2010, 162–164.) PCR-menetelmällä voidaan monistaa lyhyehköjä, satojen tai tuhansien nukleotidien mittaisia sekvenssejä. DNA:n monistuksessa tulee varoa kontaminaattoriskia. (Orpana & Kiiski 2025.) PCR-reaktiossa syklejä toistetaan yleensä 15–40 kertaa ja kokonaisuudessaan monistus kestää 30 minuutista kahteen tuntiin (Suominen 2020, 155).

PCR-menetelmällä monistetaan sellaisia DNA-jaksoja, joiden nukleotidijärjestys tunnetaan. Reaktio-tilavuudet ovat hyvin pieniä ja niiden pipetointi ihmiskädellä on haastavaa. Reaktiot tehdään kuoppalevyillä tai mikrosentrifuugiputkissa PCR-laitteella lämpötilaa tarkasti säädellen. Koska PCR:ssä käytetään korkeita lämpötiloja, se vaatii termostabiilia DNA-polymeraasia. Alukkeita tarvitaan kaksi ja niiden tulee olla tarkasti tunnettuja, sillä ne kiinnittyvät DNA-juosteeseen rajaamaan monistettavaa aluetta. Kahdentumis- eli monistusjaksoja toistetaan monta kertaa peräkkäin. (Suominen ym. 2010, 153–154.)

Perinteisessä PCR-menetelmässä monistuksen jälkeen otetaan reaktioseoksesta näyte, joka voidaan analysoida esimerkiksi agarosigelelektroforeesilla (Suominen ym. 2020, 166). Sen menetelmä perustuu negatiivisesti varautuneiden DNA-fragmenttien liikkumiseen sähkökentässä kohti positiivista napaa eli anodia. Fragmenttien liikkumisnopeus riippuu niiden koosta; pienemmät kulkevat geelissä nopeammin kuin suuremmat. Näin agarosigelelektroforeesi mahdollistaa eri geenialleelien erottelun. (Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.a., 40; Lee, Costumbrado, Hsu & Kim 2012.) Alleeli on geenin vaihtoehtoinen muoto, joista ihminen perii yhden kummaltakin vanhemmalta. Näiden kahden alleelin kokonaisuudesta muodostuvat yksilön geneettiset ominaisuudet eli genotyyppi. (Terveyskylä 2022.)

PCR-reaktio vaatii useasti toistettavan lämpösyklin, jonka vaiheita ovat denaturaatio, annealing ja elongaatio (kuva 4). Ensimmäisessä vaiheessa eli denaturaatiossa vetysidokset katkeavat lämmön nousun seurauksena, jolloin DNA:n kaksoisjuoste aukeaa. Annealing-vaiheessa lämpötilaa laskeaan ja alukkeet kiinnittyvät templaatti-DNA:han. Elongaatio-vaiheessa lämpötilaa taas nostetaan, jolloin polymeraasi syntetisoi uutta DNA-juostetta. Reaktio tapahtuu eksponentiaalisesti ja yksi kopio voi monistua miljooniksi kopioiksi. (Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.a., 35–36; Rolando ym. 2024.) PCR-laitteiden haasteita ovat suuret, nopeat ja toistuvat lämpötilanvaihtelut. Pienetkin, muutaman asteen lämpötilaheitot voivat vaikuttaa merkittävästi lopputuotteen epäonnistumiseen. Nopeaa lämmönsäätelyä edistää laitteessa oleva yksi tai useampi Peltier-elementti, joka sähkövirran suunnanmuutoksilla jäähdyttää ja lämmittää laitetta nopeasti. (Suominen ym. 2010, 164.)

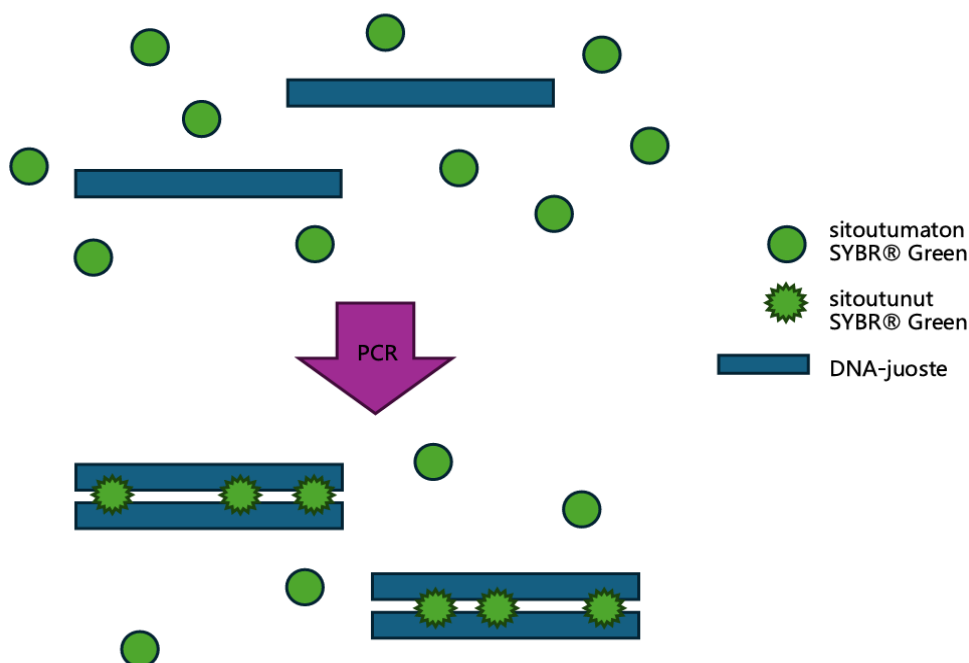


Kuva 4. Polymeraasiketjureaktio (mukaillen Enzoklop 2014, CC BY)

3.2 Reaaliaikainen PCR eli RT-PCR

Puhuttaessa RT-PCR:stä on muistettava, että sen periaatteet ovat samanlaiset kuin perinteisessä PCR:ssä, mutta RT-PCR vaatii lisäksi fluoresoivan merkkiaineen tulosten visualisoimiseksi ja syntyvien monistustuotteiden määrää voidaan havainnoida ajon aikana (Suominen ym. 2010, 166). RT-PCR:ssä yleisesti käytettäviä fluoresoivia väriaineita ovat DNA:han sitoutuva SYBR® Green ja väri-leimattu TaqMan-koetin (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 6). Jokainen laboratorio voi valita omille laitteille ja tutkimuksille sopivan fluoresoivan leiman (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006, 9–10). Tulokset ovat kvantitatiivisia eli määrällisiä ja niistä voidaan päätellä, mikä on ollut näytteen DNA-määrä lähtötilanteessa suhteessa muihin näytteisiin. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 3; Suominen ym. 2010, 166–168.)

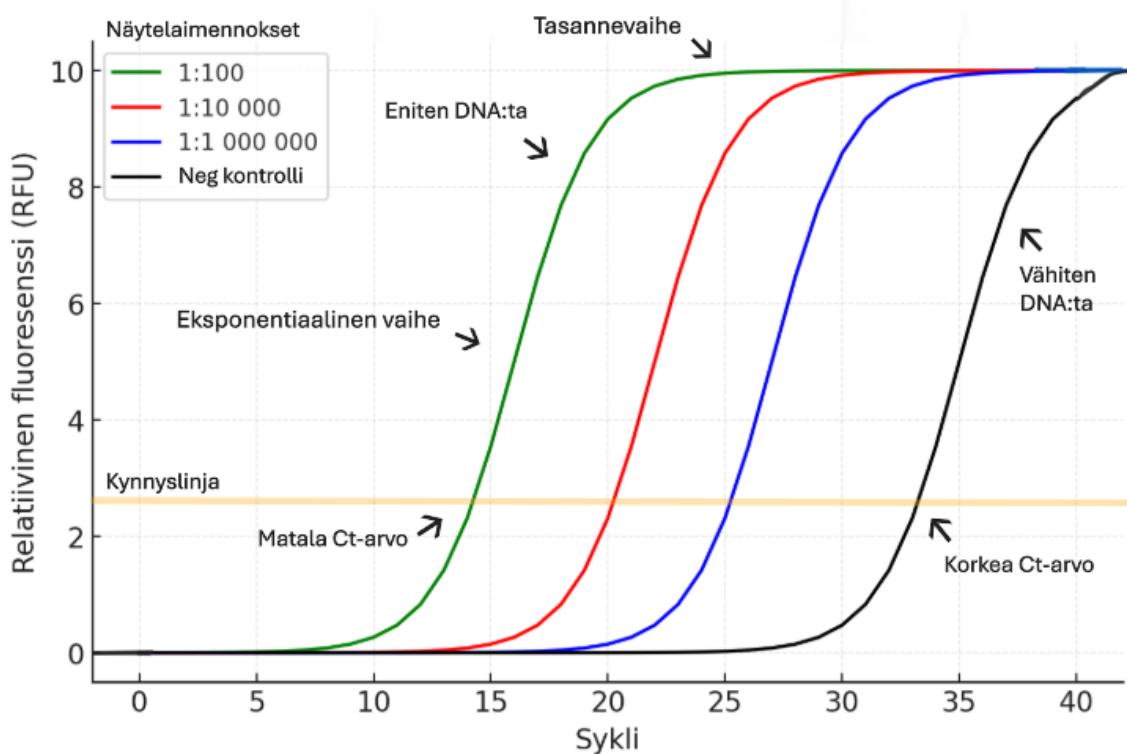
RT-PCR:n jälkeen on mahdollista tehdä sulamiskäyräanalyysi (engl. melting curve analysis), jossa lämpötilaa nostetaan asteittain ja seurataan monistumisen aikana syntyneen fluoresenssin vähene- mistä. RT-PCR-ajossa syntyy kaksijuosteista DNA:ta, johon SYBR® Green -väri sitoutuu ja tämän seurauksena fluoresenssia on runsaasti (kuva 5). Fluoresenssin vähenemisen avulla nähdään, kun DNA muuttuu taas takaisin yksijuosteiseksi. Sulamiskäyräanalyysillä saadaan eroteltua erilaiset DNA:n monistustuotteet toisistaan. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 6–7.)



Kuva 5. SYBR® Greenin sitoutuminen (tietosisältö Bio-Rad Laboratories Inc. 2022, 6)

PCR-menetelmä on erittäin herkkä, minkä vuoksi kahden samanlaisen ja samoissa olosuhteissa monistetun templaattinäytteen PCR-reaktioiden tulokset voivat poiketa toisistaan. Ongelman ratkaisemiseksi tutkittavien näytteiden mukana tulee käyttää kilpailevaa templaattia, joka samalla toimii sisäisenä standardina. RT-PCR:ssä tutkittavana näytteenä voi DNA:n lisäksi olla myös RNA:ta. RNA:ta käytettäessä se tulee kääntää ensin cDNA:ksi. cDNA eli komplementaarinen DNA on yksijuosteinen DNA-molekyyli, joka syntetisoidaan käänteiskopioijaentsyymien avulla ja monistetaan PCR:llä, jolloin se muodostuu kaksijuosteiseksi cDNA:ksi. (Suominen ym. 2010, 169–170.)

Amplifikaatio- eli monistuskäyrällä saadaan visualisoitua jokaisen näytteen DNA-määrän kasvaminen ajan kuluessa eli kuinka monta monistussykliä positiivisen tuloksen saamiseksi tarvitaan. Amplifikaatiokäyrä kuvaa reaktiosykliden etenemistä ja sen päävaiheet ovat lineaarinen-, eksponentiaalinen- ja tasannevaihe. Alussa monistus on lineaarista eli signaalia ei vielä havaita. Eksponentiaalivaiheessa PCR-tuotteen eli DNA:n määrä tuplaantuu kaikissa sykleissä ja käytettäessä SYBR® Green -väriainetta fluoresenssin määrä kasvaa jyrkästi väriaineen sitoutuessa ja emittoidessa eli vapauttaessa valoa. PCR-syklin ylittäessä määrätyn fluoresenssin kynnyksin saadaan näytteelle mitattava tulos eli kynnysarvo (Ct). Näytteen alkuperäinen DNA-määrä vaikuttaa siihen missä vaiheessa raja ylittyy. Mitä enemmän näytteessä on DNA:ta, sitä aikaisemmin tämä ylitys tapahtuu. Tasannevaiheessa fluoresenssin aiheuttama signaali ei enää kasva. (Artika ym. 2022; Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 15–18.) Amplifikaatiokäyrien muodostuminen on havainnollistettu kuvassa 6.



Kuva 6. RT-PCR:n amplifikaatiokäyrät (tietosisältö Bio-Rad Laboratories Inc. 2022, 15, kuva luotu ChatGPT:n avulla)

Toimiva tapa arvioida RT-PCR-ajon optimoinnin onnistumista, on tehdä laimennossarja templaatti-DNA:sta ja luoda tulosten avulla standardikuvaaja. Templaatti-DNA:na voidaan käyttää sekä tunnetun että tuntemattoman pitoisuuden näytteitä. Tällöin oikein optimoiduista tuloksista saadaan kynnysarvon ja kopiomäärän välinen lineaarinen, laskeva ja tasavälinen standardikäyrä, jolle jokainen laimennos asettuu. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 5.)

RT-PCR on erittäin keskeinen menetelmä, jota hyödynnetään muun muassa geeniekspression eli geenien ilmentymisen tutkimuksissa ja monissa muissa sovelluksissa, joissa ei ainoastaan pyritä tunnistamaan, mitä DNA:ta näytteessä on, vaan myös määrittämään sen määrä. Molekyylibiologian laboratorioissa RT-PCR-menetelmää hyödynnetään aneuploidoidien eli kromosomimäärän poikkeavuuksien tunnistamisessa ja muiden geneettisten sairauksien diagnosoimisessa. (Bio-Rad Labora-

ories, Inc. 2022, 2–3.) Sitä käytetään myös rikostutkinnassa DNA:n kvantifioimiseksi eli määrän mittaamiseksi, joka on olennainen vaihe DNA-profiloinnissa eli yksilön identiteetin määrittämisessä (Nicklas & Buel 2003).

3.3 Sulamiskäyräanalyysi

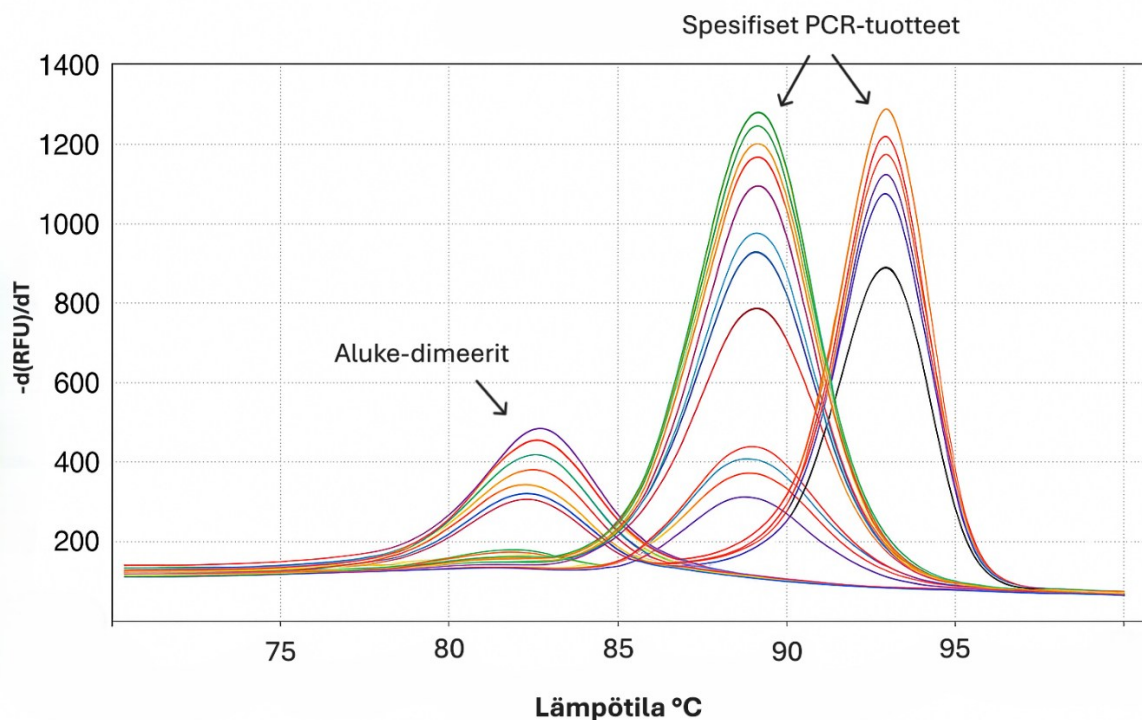
Sulamiskäyräanalyysi perustuu DNA:n denaturoitumiseen eli kaksoisjuosteiden hajoamiseen yksittäisiksi juosteiksi lämpötilan noustessa. Matalassa lämpötilassa juosteet pysyvät pariutuneina, mutta korkea lämpötila saa aikaan niiden erkaantumisen eli sulamisen. Kaksijuosteisen DNA:n sulauksessa SYBR® Green -väri vapautuu, mikä voidaan havaita fluoresenssin vähenemisenä. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 7; Pryor & Wittwer 2006, 21.) Sulamislämpötilaan vaikuttavia tekijöitä ovat DNA-juosteiden koko sekä sen guaniini–sytosiiniemäsparien määrä (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 7), sillä nämä emäsparit ovat rakenteeltaan kestävämpiä. Guaniini–sytosiiniemäspareilla vetysidoksia on kolme eli yksi enemmän kuin adeniini–tymiiniemäspareilla. (Suominen ym. 2010, 20.) Mitä suurempi GC-pitoisuus DNA-juosteessa on ja mitä pidempi juoste on, sitä korkeampi on sen sulamislämpötila. Vertailemalla tunnettujen amplikonien eli monistuneiden DNA- tai RNA-jaksojen sulamislämpötiloja, voidaan helposti havaita ylimääräiset, epäspesifiset amplikonit tai aluke-dimeerit. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 7.)

Sulamiskäyräanalyysissä fluoresenssin muuttuminen lämpötilan kasvaessa esitetään käyränä, jossa voidaan nähdä kaksi erillistä vaihetta: fluoresenssin nopea heikkeneminen DNA:n alkaessa sulaa, sekä viimeistenkin kaksoisjuosteiden erkaantuessa tapahtuva hitaampi fluoresenssin lasku. Amplikonin sulamislämpötilan kohdalle muodostuva selkeä huippu erottaa sen muista eri lämpötiloissa sulavista tuotteista, kuten aluke-dimeereistä. DNA:n sulamispisteellä tarkoitetaan lämpötilaa, jossa 50 % sen kaksoisjuosteiden emäsparisidoksista on purkautunut. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 7.)

Sulamiskäyräanalyysi on tärkeä työkalu RT-PCR:n laadunvarmistuksessa, sillä PCR perustuu erittäin herkkään molekyylienetelmään ja sen herkkyys tuo mukanaan myös virhealttiutta. Yksi yleisimmistä PCR:n ongelmista on alukkeiden dimeerit, jotka ovat sekä ei-toivottuja että hyvin lyhyitä PCR-tuotteita. Ne syntyvät kahden alukkeen sitoutuessa toisiinsa templaatti-DNA:han kiinnittymisen sijaan. Tämä voi tapahtua alukkeiden huonon suunnittelun seurauksena, mutta myös kun mallijuosteissa on erityinen DNA-juosteiden erottumista estävä rakenne. PCR:n aikana nämä lyhyet aluke-dimeerit voidaan syntetisoida eli muodostaa paljon templaatti-DNA:ta tehokkaammin, mikä aiheuttaa kilpailua reagensseista ja saattaa estää varsinaisen mallijuosteiden monistumisen. (Ortutay & Ortutay 2017, 134.)

Aluke-dimeerien läsnäolo heikentää PCR:n tarkkuutta, mutta sulamiskäyräanalyysin avulla aidot PCR-tuotteet voidaan helposti erottaa dimeereistä. PCR-syklien ajon jälkeen termosykleri kuumentaa näytteitä asteittain mitaten samalla niiden fluoresenssia. Koska reaktioseoksessa oleva SYBR® Green -väri on fluoresoiva ainoastaan kaksijuosteisen DNA:n läsnä ollessa, voidaan DNA-juosteiden erkaantumista seurata tällä tavoin. Pidemmät DNA-juosteet sulavat myöhemmin korkeammassa lämpötilassa, koska ne ovat vakaampia nukleotidien välisten vetysidosten suuremman määrän vuoksi. (Ortutay & Ortutay 2017, 134–135.) Aluke-dimeerit sen sijaan pienen kokonsa vuoksi sulavat matalammassa lämpötilassa kuin varsinaiset PCR-tuotteet (Brisson, Tan, Park & Hamby n.d., 1).

Sulamiskäyräanalyysin avulla voidaan myös arvioida PCR-reaktion spesifisyyttä. Mikäli alukkeet sitoutuvat useampaan kuin yhteen geeniin tai genomien lokukseen eli geenin sijaintipaikkaan kromosomissa, monistuu useita eri PCR-tuotteita. Tämän seurauksena sulamiskäyrässä voidaan nähdä useampi kuin yksi huippu. Tällaiset tilanteet ovat yleensä ei-toivottuja, mutta ne voidaan tunnistaa, koska sulamiskäyräanalyysillä pystytään havaitsemaan myös alhaisemmissa lämpötiloissa sulavat monistustuotteet. (Ortutay & Ortutay 2017, 135.) Spesifisten PCR-tuotteiden ja aluke-dimeerien erottuminen toisistaan on havainnollistettu kuvassa 7.



Kuva 7. Sulamiskäyräanalyysi (tietosisältö Bio-Rad Laboratories Inc. 2022, 16, kuva luotu Chat-GPT:n avulla)

HRM (engl. high resolution melting) -analyysi on PCR-ajossa syntyneiden DNA-fragmenttien sulamiskäyrien kvantitatiivista analysointia. HRM-määritykset edellyttävät RT-PCR-laitetta, jolla on erinomainen lämpöstabiilius ja herkkyys, sekä erillisen analyysiin tarkoitetun ohjelmiston. (Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.b.) HRM tarjoaa perinteiseen sulamiskäyräanalyysiin verrattuna merkittävästi enemmän tietoa, jopa yksittäisten nukleotidimuutosten tasolla. Kun perinteisen sulamiskäyräanalyysin pääasiallinen tarkoitus on PCR:n spesifisyyden varmistaminen, HRM-analyysin avulla pystytään erottamaan useita PCR-tuotteita, joiden sekvensseissä on vain pieniä eroja. (Qiagen n.d.)

Menetelmän spesifisyyden ja herkkyuden ansiosta HRM-analyysiä voidaan hyödyntää monissa eri tutkimuksissa, kuten genotyyppityksessä (Garritano ym. 2009), joka on menetelmä pienten geneettisten erojen tunnistamiseen, jotka voivat johtaa merkittäviin fenotyyppisiin eli yksilön ilmiön muutoksiin. Tämä sisältää sekä fyysiset erot, jotka tekevät meistä yksilöitä, että patologiset, sairauksia aiheuttavat muutokset. (Thermo Fisher Scientific n.d.c.) Menetelmää käytetään myös mutaatioseulonassa (Garritano ym. 2009), jonka avulla pyritään nopeasti ja tehokkaasti analysoimaan monien yksilöiden DNA-näytteitä pienten geneettisten muutosten havaitsemiseksi, jotta voidaan tunnistaa ne, joiden DNA:sta tehdään täydellinen sekvensointi eli emäsjärjestyksen määrittäminen (Thermo Fisher

Scientific n.d.b.). Lisäksi HRM-analyysiä hyödynnetään metylaatioanalyysissä (Garritano ym. 2009), jolla tutkitaan sytosiiniin tai adeniiniin lisättyjen metyyliryhmien vaikutusta geenien ilmentymiseen ilman DNA-sekvenssin muutoksia (Feng & Lou 2018).

4 PCR-SOVELLUSTEN KLIINISET KÄYTTÖKOHEET

4.1 Infektiotautidiagnostiikka

RT-PCR korvaa osittain mikrobiologialla perinteiseen viljelyyn perustuvia menetelmiä ja nopeuttaa patogeenien eli taudinaiheuttajien tunnistamista. Se onkin tänä päivänä eniten käytetty menetelmä tartuntatautien patogeenien sekä kvalitatiiviseen eli laadulliseen että kvantitatiiviseen eli määrälliseen havaitsemiseen. Fluoresoivia värejä käytettäessä fluoresenssin signaalin taso on suoraan verrannollinen näytteessä olevan nukleiinihapon määrään. PCR:n suunnittelussa voidaan vaikuttaa siihen, että havaitaanko sillä yksi vai useampi patogeeni. RT-PCR:llä voidaan seurata viruslääkkeiden vastetta lääkettä saavien, kuten kroonista hepatiitti B:tä sairastavien tai HIV-positiivisten potilaiden hoidossa sekä kroonisen hepatiitti C -infektion seurannassa. Viruskuorman seuraamisella voidaan havaita hoidon toimivuus tai toimimattomuus. FilmArray®-paneelilla, joka käyttää menetelmänä RT-PCR:ää voidaan havaita jopa 19 bakteeria ja 9 virusta sekä 10 antibioottiresistenssigeeniä. Laajalla ja nopealla tunnistamisella voidaan kohdentaa antibioottien käyttöä sekä vähentää niiden turhaa määräämistä antibioottiresistenssin syntymisen ehkäisemiseksi. (Ciotti ym. 2024.)

Sepsis eli verenmyrkytys on hengenvaarallinen tila, joka vaatii nopeaa havaitsemista ja oikeaa mikrobilääkehoitoa. Sepsistä epäiltäessä on potilaalta otettava veriviljelynäytteet, joiden tutkiminen mahdollistaa diagnosoinnin ja patogeenien tunnistamisen. RT-PCR:ää käyttävällä FilmArray®:lla oleva paneeli tunnistaa jopa 33 patogeenia, mukaan lukien bakteerit ja hiivat sekä 10 resistenssigeeniä noin tunnin kuluessa veriviljelylaitteen positiivisen pullon havaitsemisesta. FilmArray®:lla on oma paneeli aivokalvontulehdusta ja enkefaliittia eli aivotulehdusta aiheuttavien patogeenien tunnistamiseen. Aivokalvontulehdus ja enkefaliitti ovat keskushermoston infektiota ja niiden hoitamattomuus voi aiheuttaa merkittäviä neurologisia sairauksia tai jopa kuoleman. Sen vuoksi mikro-organismien, kuten bakteerien, sienten ja virusten tunnistaminen on välttämätöntä nopean hoidon aloittamiseksi. (Ciotti ym. 2024.)

HRM-analyysiä käytetään infektiotautidiagnostiikassa erilaisten taudinaiheuttajien tunnistamiseen nopeasti ja tarkasti. Multiplex-PCR:ssä käytetään useita eri alukkeita samassa ajossa ja tätä menetelmää hyödyntävä HRM-analyysi mahdollistaa useiden eri taudinaiheuttajien havaitsemisen yhdestä näytteestä. Menetelmää on testattu yleisimpien sairaalassa esiintyvien hengitystieinfektioita aiheuttavien patogeenien tunnistamisessa, joita ovat *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* ja *Escherichia coli*. Menetelmän avulla nämä viisi bakteerilajia pystytään tunnistamaan suoraan keuhkoista otetusta bronkoalveolaarisesta huuhtelu- eli BAL-näytteestä kullekin lajille ominaisen sulamislämpötilan perusteella, mikä näkyy reaktiossa useina sulamispiikkeinä. (Ghorbani, Hashemi, Jabalameli, Emaneini & Beigverdi 2022.)

Erityisesti virusten aiheuttamat hengitystieinfektiot asettavat sairaaloille merkittäviä haasteita eristämiskäytäntöjen vuoksi ja siksi infektioiden torjunta edellyttää virusten aiheuttamien hengitystieinfektioiden nopeaa tunnistamista. Virusten tunnistamiseen on olemassa useita erilaisia RT-PCR-menetelmiä hyödyntäviä testipaketteja, joilla voidaan tunnistaa SARS-CoV-2 (koronavirus), influenssa A ja B sekä RS-virus. (Jensen ym. 2024.) RSV (engl. respiratory syncytial virus) voi aiheuttaa etenkin vanhuksilla ja pienillä lapsilla vakavan alempien hengitysteiden tulehduksen, keuhkokuumeen tai imutiehyiden tulehduksen eli bronkioliitin. Kaksi viimeisintä voivat johtaa hengitysvaikeuksiin. Infektio voidaan osoittaa hengitystienäytteestä PCR:llä. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2025.)

SARS-CoV-2:n Omikron-variantti on kehittynyt uusiksi alalinjoiksi, joista merkittävimpiä ovat BA.1 ja BA.2. Näiden alalinjojen erottaminen on tärkeää epidemiologisten seurantojen ja hoidon suunnittelun kannalta, sillä BA.2 on yhdistetty vakavampaan COVID-19-tautiin kuin BA.1. HRM-analyysin avulla nämä alalinjat voidaan tunnistaa erittäin luotettavasti korkean herkkyuden ja spesifisyyden ansiosta. Lisäksi se on nopeampi ja kustannustehokkaampi kuin perinteiset sekvensointimenetelmät, jotka perustuvat DNA:n emäsjärjestyksen selvittämiseen. (Aoki ym. 2022.)

4.2 Syöpädiagnostiikka

RT-PCR on keskeinen työkalu syövän diagnostiikassa, sillä sen avulla voidaan havaita geenien duplikaatiot eli kahdentumat sekä deleetiot eli häviämät. Lisäksi pieniä mutaatioita, jopa yksittäisiä emäsmuutoksia voidaan tunnistaa sulamiskäyräanalyysin avulla. Menetelmää voidaan käyttää RNA-markkerien, kuten miR-497:n analysointiin, mikä mahdollistaa biomarkkerien tunnistamisen esimerkiksi nenänielun syövän diagnostiikassa. RT-PCR mahdollistaa lisäksi verenkierrossa olevien syöpäsolujen havaitsemisen, mikä on tärkeää kudosspesifisen geeniekspression eli geenien ilmentymisen määrittämiseksi. Tästä on hyötyä erityisesti melanoomaa eli ihosyöpää sekä neuroblastoomaa eli keskushermoston ulkopuolella esiintyvää pahanlaatuista kasvainta sairastaville potilaille. (Budhbaware, Rathored & Shende 2024.)

HRM-analyysi on lupaava vaihtoehtoinen menetelmä BRAF-mutaatioiden havaitsemiseen. BRAF on proteiinia koodaava geeni, jonka mutaatiot liittyvät useisiin syöpiin, kuten melanoomaan, paksusuolensyöpään ja kilpirauhassyöpään. BRAF-mutaatiot ovat yhteydessä aggressiiviseen taudinkulkuun, minkä vuoksi kliinisessä käytössä tarvitaan nopeita, luotettavia ja edullisia seulontamenetelmiä. HRM-analyysi onkin osoittautunut käyttökelpoiseksi menetelmäksi monien kliinisesti merkittävien mutaatioiden tunnistamisessa. (Chen ym. 2014.) Tällaisia mutaatioita esiintyy myös KRAS- ja EGFR-geeneissä, jotka koodaavat solujen kasvun ja jakautumisen kannalta tärkeitä proteiineja. Näiden geenien mutaatiot voivat johtaa solunsisäisten signalointireittien jatkuvaan aktivaatioon, mikä aiheuttaa hallitsematonta solukasvua ja edistää syövän syntymistä. (Do, Krypuy, Mitchell, Fox & Dobrovic 2008.)

4.3 Oikeuslääketiede

PCR-menetelmät ovat käytössä rikosteknisten DNA-profilointien tekemisessä. PCR:ää käytetään oikeuslääketieteessä rikospaikanäytteestä saadun geneettisen tiedon keräämiseen. 1990-luvun alkuvaiheessa PCR-menetelmä on noussut oikeusbiologiaan mullistaen oikeuslääketieteellisten tapauksien käsittelyn sekä lisännyt analyysiin lähetettävien kudostyyppien määrää merkittävästi. RT-PCR ajossa havaitun fluoresenssin määrä on suoraan verrannollinen reaktiossa olevan DNA:n määrään. Fluoresenssitietojen perusteella luotua monistuskäyrää käytetään DNA-pitoisuuden laskemiseen. Näytteen sisältäessä riittävästi DNA:ta, siitä saadaan tarvittava määrä geneettistä tietoa ja näyte voi edetä kohdennettuun PCR-menetelmään sekä DNA-profiiliin luontiin. Jos perinteisiä tuma-DNA-lähteitä, kuten kehon nesteitä tai kudoksia, ei ole saatavilla, voidaan vaihtoehtoisena tunnistusmenetelmänä käyttää DNA-profilointia, joka perustuu ihmisen mitokondriaalisen genomien (mtDNA) tietyn alueen amplifikaatioon. Haasteena on kuitenkin se, että mtDNA periytyy ainoastaan äidiltä. MtDNA:ta voidaan kuitenkin käyttää kadonneiden henkilöiden, tunnistamattomien ihmisjäännösten ja katastrofien uhrien tunnistamisessa. (McDonald, Taylor & Linacre 2024.)

Sulamiskäyräanalyysi on lupaava työkalu oikeuslääketieteellisiin SNP (engl. single nucleotide polymorphism) -määrityksiin, joissa tunnistetaan yhden emäksen muutoksia DNA:ssa. Tehdyissä tutkimuksissa arvioitiin HRM-analyysin kykyä erotella yksittäisiä nukleotidipolyformismeja PCR:llä monistetusta DNA-näytteistä ilman jälkikäsitelyä. (Mehta, Daniel & McNevin 2013, 376–377.) Oikeuslääketieteellisessä genetiikassa SNP-määrityksiä voidaan käyttää yksilön tunnistamisessa sekä sukulaissuhteiden selvittämisessä (Davenport, Devesse, Court & Ballard 2023). HRM-analyysi pystyy erottamaan yksittäisiä SNP-variantteja tehokkaasti, mikä tekee siitä luotettavan vaihtoehdon oikeuslääketieteellisiin genotyyppitys-analyysihin (Mehta ym. 2013, 376–377).

HRM-analyysin soveltuvuutta on testattu oikeuslääketieteellisissä tutkimuksissa myös hallusinogeenisten sienten, erityisesti *Psilocybe cubensis* -lajin, tunnistamiseen. Hallusinogeenisten sienten väärinkäyttö on monissa maissa kasvava yhteiskunnallinen ongelma, minkä vuoksi niiden tunnistaminen on tärkeää huumekaupan torjunnassa sekä huumerikoksiin liittyvien kuolemien ehkäisyssä. Tutkimusten mukaan HRM-analyysillä pystytään erottelemaan sienilajit nopeasti ja tarkasti, ja sekvensointitulokset ovat vahvistaneet menetelmän luotettavuuden lajintunnistuksessa. (Zhang ym. 2021.)

5 KEHITTÄMISTYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyö toteutetaan tutkimuksellisenä kehittämistyönä. Kehittämistyön tarkoituksena on testata Bio-Radin CSI-laajennuskitin sulamiskäyräanalyysia RT-PCR-menetelmällä koulun Roche LightCycler® 96 -laitteella ja tuottaa siitä työohje bioanalyttikko-opiskelijoille. Kehittämistyön tavoitteena on pidentää nykyisen laitekannan käyttöikää ja samalla nykyaikaistaa koulun laboratorioharjoitusten sisältöä.

6 KEHITTÄMISTYÖN TOTEUTUS

6.1 Kehittämistyön menetelmä

Opinnäytetyö toteutettiin tutkimuksellisenä kehittämistyönä lineaarisen mallin mukaisesti. Lineaarisen mallin vaiheita ovat tarpeen perustelu ja ideointi, suunnittelu ja työn organisointi, käytännön toteutus, tuotoksen arviointi sekä julkaisu. Linearisessa mallissa kehittämistyö etenee jatkumona, jossa tehtävät etenevät loogisessa järjestyksessä. Tällaisissa töissä työn lähtökohdat ovat selkeät ja etukäteen rajatut sekä työn toteutus on hyvin ennakoitavissa ja hallittavissa. (Salonen, Eloranta, Hautala & Kinos 2017, 52.)

Menetelmäksi valittiin tutkimuksellinen kehittämistyö. Tutkimuksellinen työ ja kehittämistyö ovat eri menetelmiä, joista tämä on niiden yhdistelmä. Tutkimuksellisia piirteitä opinnäytetyössä ovat siinä tehtävä selvitys menetelmän toimivuudesta sekä uuden tiedon tuottaminen, kun taas kehittämistyötä on uuden tiedon hyödyntäminen työohjeen laadintaan. Tutkimuksellista työtä ohjaavat luotettavuusvaatimukset, jotka myös tässä työssä olivat onnistumisen perusteena. (Salonen 2013, 41.)

Kehittämistarpeen tunnistaminen on ydinosa kehittämistyön aloittamiseen ja ideointiin. Kehittämistarpeen tunnistaminen lähtee yleensä tarpeesta muutokseen, johon kehittämistyöllä voisi olla ratkaisu. Tärkeänä osana aloittamisvaihetta on sopia kehittämistyön tekijöiden ja toimeksiantajan kesken sopiva kehittämiskohde ja aiherajaus. Aihe kannattaa tässä vaiheessa rajata riittävästi, mutta ei sitovasti. Perustellun tarpeen ja aiheen rajauksen jälkeen alkaa työn ideointi. Ideointivaiheessa pohditaan, kuinka ja miten nykyistä tilannetta olisi tarpeen muuttaa. Ideointiin on hyvä sitouttaa laajasti eri henkilöitä, jotta toimintaan saadaan erilaisia näkökulmia. Samalla ihmisten osallistaminen lisää heidän kiinnostustaan ja myönteisyyttään kehittämistoimintaa kohtaan, kun he kokevat mielipiteidensä olevan merkityksellisiä. (Salonen ym. 2017, 56–58.)

Kehittämistyön suunnitteluvaiheessa aiheen ideointi muodostetaan täsmälliseksi suunnitelmaksi, jota on helppo noudattaa toteutusvaiheessa. Suunnitteluvaiheessa on tärkeää selvittää tilaajan toiveet ja tavoitteet kehittämistyölle. Suunnitteluvaiheeseen kuuluvat lisäksi taustaselvityksen tekeminen ja tutustuminen olemassa olevaan tutkimustietoon ja kirjallisuuteen, sillä kehittämistyön tulee perustua tutkittuun tietoon. Tässä vaiheessa jaetaan myös kehittämistyön tekijöille tehtävät ja vastuut. On huomioitava, että suunnitelma ei välttämättä toimi aukottomasti, sillä toteutusvaiheessa voi ilmetä odottamattomia asioita, johon suunniteltaessa ei osattu varautua. Huolellinen suunnittelu ja toiminnan reflektointi varmistavat toiminnan etenemisen myös ongelmatilanteissa. (Salonen ym. 2017, 60–61.)

Toteutusvaihe alkaa, kun suunnitelma on valmis ja hyväksytty. Kehittämistyön tekijöille vaihe on vaativa, mutta myös ammatillisesti opettava. Työn tekijöiltä vaaditaan useita ammatillisia ominaisuuksia, joita ovat suunnitelmallisuus, aktiivisuus, itsenäisyys, vastuullisuus, epävarmuuden sietokyky, sitkeys ja itsensä kehittäminen. Tässä vaiheessa saatu ohjaus ja vertaistuki ovatkin olennaisessa osassa työn onnistumisessa ja tekijän ammatillisessa kehittämisessä. Toteutusvaiheessa edetään laaditun suunnitelman mukaisesti. Toteutuksen aikana suunnitelmat tarkentuvat ja toimintaa kehitetään tarpeen mukaan. Toteutusvaiheessa on tärkeää tehdä tarpeeksi muistiinpanoja ja dokumentoida riittävästi, jotta tekemistä voidaan kehittää ja palata toteutukseen arviointivaiheessa. (Salonen ym. 2017, 62.)

Arviointi on olennainen osa kehittämistyötä, sillä sen avulla voidaan tarkastella työn onnistumista peilaamalla sitä asetettuihin tavoitteisiin. Arviointi ei rajoitu pelkästään lopputulokseen, vaan sitä voidaan tehdä jo ennen toiminnan aloittamista, toiminnan aikana sekä toiminnan päätyttyä. Koska arvioinnin kohteet ja tarpeet ovat erilaisia, jokaiselle työlle on rakennettava yksilöllinen ja siihen sopiva arviointimenetelmä. Arviointi voi olla esimerkiksi ulkopuolista arviointia, vertais- tai itsearviointia, ja sen avulla pyritään oman toiminnan kriittiseen tarkasteluun ja sitä kautta tunnistamaan työn vahvuudet sekä kehittämistarpeet. (Salonen ym. 2017, 64–65.)

Kehittämistyön arvioinnissa pohditaan, mitä konkreettista saatiin aikaan, toteutuivatko asetetut tavoitteet ja millaisia vaikutuksia työllä on kohderyhmälle. Koska kyseessä on reflektiivinen oppimisprosessi, on tärkeää pohtia myös opittuja asioita sekä onnistumisia ja epäonnistumisia. Arviointivaiheessa luodaan loppuraportti, joka kokoaa yhteen työn vaiheet ja tulokset selkeäksi, julkaistavaksi kokonaiskuvaukseksi kehittämistyöstä. Raportissa on tärkeää huomioida lukijaystävällisyys, joka saavutetaan panostamalla ulkoasuun, luettavuuteen sekä konkreettiseen esitystapaan. Kehittämistyö on saatettu päätökseen, kun työlle asetetut päämäärät on saavutettu ja loppuraportti on laadittu. Päättämisvaiheen keskeisenä osana on tulosten levittäminen eli implementointi sekä suunnittelu, miten työn tuotosta aiotaan hyödyntää tulevaisuudessa. (Salonen ym. 2017, 64–66.)

6.2 Kehittämistyön ideointi, tarve ja suunnitelma

Opinnäytetyön suunnittelu aloitettiin miettimällä aihetta RT-PCR-menetelmän ympärille yhdessä molekyylibiologian opettajan kanssa. Kliinisissä laboratorioissa RT-PCR on eniten käytetty menetelmä useilla erikoisaloilla (Ciotti ym. 2024), ja tämä toimi lähtökohtana kehittämistyön ideoinnille. Käytettävyyden vuoksi menetelmän ymmärtäminen on tärkeää bioanalyttikko-opiskelijoille jo opintojen aikana. Molekyylibiologian osaamistavoitteissa on, että opiskelija osaa selittää keskeisimmät molekyylibiologian tutkimusmenetelmät (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.a.) ja syventää tietämystään niiden käytöstä eri kliinisillä erikoisaloilla (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.b.). Myös työelämästä on tullut toive, että koululla tehtävissä laboratorioharjoituksissa tehtäisiin sulamiskäyräanalyysiä pelkän RT-PCR:n sijaan.

Alussa valittavana oli kaksi erilaista RT-PCR-kittivaihtoehtoa, joista toisessa käytettiin eri koetinta ja sen kohdalla selvittelyt reagenssien saatavuudesta olivat vielä kesken ja se olisi sisältänyt vain RT-PCR-ajon eikä sulamiskäyräanalyysiä. Aiheen rajaus tehtiin tähän valittuun kittiin, koska siihen tarvittavat reagenssit olivat hyvin saatavilla ja sen avulla toivottu sulamiskäyräanalyysi saataisiin mukaan harjoitustyöhön. Vaikka varmuutta testikitin toimivuudesta koulun laitteella ei aluksi ollut, saatiin laitevalmistaja Rochen asiantuntijalta puoltava selvitys Bio-Radin testikitin yhteensopivuudesta laitteen kanssa. Lisäksi tulosten analysointiin löytyi laitevalmistajalta soveltuva ohjelma.

Valitussa kitissä käytettävä menetelmä ja sen työvaiheet vastaavat monia kliinisissä laboratorioissa toteutettavia tutkimuksia, joita bioanalyttikot suorittavat. Koululla ei kuitenkaan ole saatavilla tarvittavaa näytemateriaalia tällaisia tutkimuksia varten, eikä esimerkiksi syöpägeenien tutkimuksia voida eettisistä syistä toteuttaa opiskelijoiden omista näytteistä. Tilaajan toiveena olikin tutkimus, jossa tarvittava näytemateriaali sisältyisi valmiiksi kittiin.

Bioanalytikko (AMK) -koulutuksen aikana on aiemmin toteutettu molekyylibiologian perusteiden kurssilla perinteisellä PCR-menetelmällä Bio-Radin CSI-harjoitustyö. Olimme kiinnostuneita tällä menetelmällä tehdystä työstä jo omissa laboratorioharjoituksissamme ja koimme sen kiinnostavan myös muita opiskelijoita, joten halusimme lähteä kehittämään harjoitustyölle jatkoa kitillä, jonka ajo suoritetaan RT-PCR-menetelmällä. Perinteisellä menetelmällä tehdystä työstä voitaisiin vähitellen luopua, sillä tämän opinnäytetyön tavoitteena on pidentää nykyisen laitekannan käyttöikää ja samalla nykyaikaistaa koulun laboratorioharjoitusten sisältöä.

RT-PCR-sovellukset ovat kliinisissä laboratorioissa laajasti käytössä useilla erikoisaloilla (Artika ym. 2022), minkä vuoksi niiden toimintaperiaatteiden ymmärtäminen on tärkeä osa bioanalytikon ammatillista osaamista. Lisäksi työelämävalmiuksia vahvistetaan koulutuksen aikana työelämässä tapahtuvien harjoittelujen avulla (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.e.), jolloin omaa ammattitaitoa pääsee syventämään työelämässä. Työn toteuttaminen tukee Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutuksen keskeisiä osaamistavoitteita, joihin kuuluu oman alan keskeisten menetelmien ja periaatteiden hallinta sekä niiden soveltaminen kliinisessä laboratoriotyössä. Osaamistavoitteisiin sisältyvät lisäksi tiedon kriittinen arviointi ja ongelmanratkaisukyky sekä valmiudet alan kehittämiseen tutkimus- ja kehittämismenetelmiä hyödyntäen. (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.d.) Opinnäytetyön tuotoksen eli työohjeen avulla toteutettava harjoitustyö vahvistaa opiskelijoiden valmiuksia työelämässä toimimiseen, missä RT-PCR-menetelmän ja sulamiskäyräanalyysin ymmärtäminen ovat tärkeässä roolissa. Mikrobiologialla näitä menetelmiä hyödynnetään esimerkiksi erilaisten bakteerilajien tunnistamisessa (Tong & Giffard 2012), minkä vuoksi työn toteuttamisen tarve olikin nousut esille myös mikrobiologian opettajalta.

Suunnitteluvaiheessa laaditaan opinnäytetyösopimus tekijöiden ja yhteistyötahon välille sekä tutkimuksellisessa työssä haetaan tarvittaessa myös tutkimusluvat (Turunen, Lamminpää, Sirviö & Elo 2025, 12). Vaikka tässä kehittämistyössä oli tutkimuksellinen ote, ei Savonia-ammattikorkeakoulu edellyttänyt tutkimuslupaa, sillä tutkimusta tehtiin vain valmiille, kaupalliselle testikitille eikä esimerkiksi opiskelijoiden omiin näytteisiin. Opinnäytetyösopimus laadittiin ja se sisältää sopijapuolten ja yhteistyötahon tiedot, opinnäytetyön aiheen ja sitä ohjaavan opettajan tiedot. Lisäksi olemme sopimuksessa antaneet yhteistyötaholle rinnakkaiset käyttöoikeudet muunteluoikeudella ja kaikkien osapuolten allekirjoituksella sopimus on tullut voimaan ja on voimassa koko opinnäytetyöprosessin ajan.

Aiheen rajauksen jälkeen ja suunnitelman alkuvaiheessa perehdyttiin molekyylibiologian opettajan lähettämiin käyttöohjeisiin ja manuaaleihin valitusta Bio-Radin testikitistä ja käytettävissä olevasta Rochen RT-PCR-laitteesta. Teoriatietoa haettiin luotettavista alan lähteistä, kuten Savonian Finnan kansainvälisistä artikkeleista sekä kirjaston tarjoamista kirjoista. Lähdeaineiston etsinnässä hyödynnettiin myös Savonian Finnan tarjoamia terveysalan tietokantoja. Näitä olivat esimerkiksi PubMed, CINAHL Ultimate, Medic ja ScienceDirect. Hakusanoina käytettiin sekä suomen- että englanninkielisiä työn keskeisiä käsitteitä, kuten PCR, RT-PCR, DNA, polymeraasi, optimointi, melting curve analysis, agarosigeelielektroforeesi, lineaarinen malli, kehittämistyö, laadukas työohje ja oppimateriaalin laatukriteerit. Vuosilukurajauksena pidettiin pääsääntöisesti alle 15 vuotta vanhaa materiaalia ja ensisijaisesti pyrittiin hyödyntämään mahdollisimman tuoreita lähteitä. Myös tätä vanhempia lähteitä käytettiin harkiten, sillä niiden sisältämien aiheiden perustiedot eivät ole vanhentuneet.

Bio-Radin Crime Scene Investigator (CSI) -laajennuskitti on suunniteltu simuloimaan todellista oikeuslääketieteellistä DNA-analyysia yhdessä geenilokuksessa. Siinä epäiltyjen DNA:ta verrataan rikospaikalta eristettyyn DNA:han hyödyntämällä RT-PCR:ää ja sulamiskäyräanalyysiä. Tarkoituksena on havainnollistaa RT-PCR:n nopea ja kvantitatiivinen luonne arvioimalla laimennossarjaa RT-PCR:n reagenssien ja laitteiston avulla. Tutkimuksessa rikospaikka-DNA ja epäiltyjen DNA-näytteet analysoidaan eri pitoisuuksina eli laimennoksina. RT-PCR:n tulokset näkyvät käyrinä, joista ensimmäisenä ilmestyy eniten DNA:ta sisältävän 1/100-laimennoksen käyrä esimerkiksi syklillä 10. 1/10 000-kertaisesti laimennetut näytteet ilmestyvät myöhemmin, mahdollisesti syklin 20 kohdalla. 1/1 000 000-laimennosten eli vähiten DNA:ta sisältävien näytteiden monistuskäyrä ilmestyy viimeisenä, syklin 25 jälkeen. Negatiivinen kontrolli sisältää aluke-dimeerejä ja alkaa monistua vasta noin syklin 30 kohdalla tai ei välttämättä lainkaan. Näytteet, jotka sisältävät suuremman lähtö-DNA:n pitoisuuden, tuottavat siis käyriä, jotka nousevat aikaisemmin. Kohta, jossa nämä käyrät ylittävät kvantifiointisykliarvon eli Ct-arvon, liittyy suoraan DNA:n lähtömäärään. Ct-arvo toimii käytännössä näytteen tuloksena RT-PCR:ssä, ja sitä voidaan käyttää DNA-pitoisuuksien tarkkaan kvantifointiin. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 8–15.)

Sulamiskäyräanalyysi tarjoaa mahdollisuuden havainnollistaa DNA:n rakenteellisia ominaisuuksia. Syntyvien huippujen avulla voidaan tunnistaa, millaisia PCR-tuotteita on muodostunut. CSI-laajennuskitillä suoritettujen sulamiskäyräanalyysien tuloksena nähdään tyypillisesti kolme erillistä huippua. Yksittäinen reaktio tuottaa kuitenkin tavallisesti yhden tai kaksi huippua, joista toinen kuvastaa pääasiallista monistustuotetta ja toinen eli pienempi huippu aluke-dimeerejä. Tämä johtuu siitä, että eri PCR-tuotteilla on usein eri sulamislämpötilat eli lämpötilat, joissa DNA-juosteet erkaantuvat toisistaan. Auke-dimeerien sulamispiste on yleensä alhaisempi kuin varsinaisten DNA-amplikonien. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 16–17.)

Kehittämistyölle oli tarve, koska aiemmin tilaaja on saanut potilasnäytteitä ulkopuolisilta tahoilta, mutta viime aikoina niiden saaminen on hankaloitunut ja on tulevaisuudessa epävarmaa. Tuotoksen eli työohjeen idea syntyi sekä ajon suorittamisen ja sulamiskäyräanalyysin tulosten perusteella että opinnäytetyön tavoitteesta nykyaikaistaa bioanalyttikko-opiskelijoiden laboratorioharjoitusten sisältöä. Tuotoksen idea rajattiin kyseisen kitin testaamiseen, koska se on saatavilla myös tulevaisuudessa ja mahdollistaa harjoitustyön tekemisen tilaajan tarpeeseen. Uusia laitehankintoja näin ollen ei ole tarpeellista vielä tehdä. Testattavana oleva kitti on jatkoa peruskurssilla tehdylle työlle, jonka suorittamista nykyaikaistetaan RT-PCR-ajolla olemassa olevalle koulun laitteelle. RT-PCR-ajossa käytetään fluoresoivaa SYBR® Green -väriä ja ajon jälkeen näytteille voidaan tehdä sulamiskäyräanalyysi.

Laadukasta työohjetta suunniteltaessa keskeistä on, että se perustuu ajantasaiseen tutkittuun tietoon ja tukee opiskelijan oppimista sekä aktiivista osallistumista. Ohjeen tulee olla selkeä ja johdonmukainen, mutta samalla myös sopivan haastava, jotta se innostaa ja motivoi työn tekemisessä. (Opetushallitus n.d.) Ohjeen laatimisessa on tärkeää huomioida kohderyhmä, koska jos aihe on ennestään tuntematon, on ohjeeseen tarpeellista kirjata kaikki suoritettavat vaiheet, jotta kohderyhmä voi saavuttaa tavoitteensa ja suorittaa työn onnistuneesti loppuun saakka (Kankaanpää & Piehl 2011, 295–296).

Laadukkaan työohjeen kriteerit ohjasivat meitä tuotoksena syntyvän työohjeen suunnittelussa. Ideointi aloitettiin laatimalla itsellemme aluksi oma työohje ohjelmointia ja testiajoja varten (liite 1) Bio-Radin CSI-laajennuskitin manuaalin pohjalta. Tavoitteena oli toteuttaa sulamiskäyräanalyysi RT-PCR-menetelmällä koulun Roche LightCycler® 96 -laitteella. Työohje sisälsi tiedot tarvittavista tarvikkeista, työvaiheista ja odotetuista tuloksista, ja se ohjasi meitä ohjelmoimaan testiajoja koulun laitteelle. Työohjeeseen kirjattiin sopivat näytelaimennokset, reaktiomiksit ja vaadittava reaktiivilaajuus sekä ajo-olosuhteet kitin manuaalista. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 13–15.) Suunnitelmana oli tehdä laaditun ohjeen mukaisesti rikospaikan ja epäiltyjen näytteille laimennossarjat ja pipetoida näytteet testistrippiin. Koulun laitteella tultaisiin suorittamaan testiajoja kitin valmistajan ohjeiden mukaan, ja niillä varmistettaisiin PCR-reaktioiden onnistuminen sekä ajojen toimivuus. Lisäksi testauksissa haettaisiin vastausta kysymykseen, saadaanko näytteille tehtyä sulamiskäyräanalyysi. Ajojen jälkeen saatujen tulosten perusteella optimoitaisiin ajoprotokollaa tarvittaessa.

Kehittämistyön tilaaja osallistettiin työhön ohjelmoinnin alkuvaiheessa, jolloin hänen kanssaan käytiin keskustelua laitteen käytöstä, minkä jälkeen hän tulosti meille sen käyttöohjeet myös paperisena. Tehtyjen ajojen onnistumista arvioitaisiin yhdessä tilaajan kanssa ajojen aikana otettujen kuvien avulla. Ajojen jälkeen laadittavaan työohjeeseen pyydetäisiin vielä tilaajalta kommentteja ja kysyttäisiin mahdollisia muutosehdotuksia.

Työohje tulisi sisältämään kitin manuaalin mukaiset odotetut tulokset ajon onnistumiselle ja sulamiskäyräanalyysille, joten sen pohjalta valittiin, että kolme onnistunutta ajokertaa on riittävä määrä tulosten luotettavuuden ja toistettavuuden arviointia varten. Teoriatieto sekä Bio-Radin kitin manuaali ohjasivat luotettavuuden arviointia, sillä ne antoivat konkreettisen käsityksen odotettavissa olevista tuloksista ja siitä, miltä sulamiskäyräanalyysin tulisi näyttää. Testauksista saatujen tulosten ja käytävissä olevien odotusten pohjalta olisi tarkoitus koota työohjeeseen tarvittavat materiaalit ja työskentelyohjeet bioanalyttikko-opiskelijoiden harjoitustyöhön.

6.3 Kehittämistyön tutkimuksellisen osuuden toteutus

Kehittämistyöhön tarvittavat testaukset toteutettiin Savonia-ammattikorkeakoulun bioanalyttikoiden laboratoriotiloissa Bio-Radin CSI-laajennuskitille Rochen LightCycler® 96 -RT-PCR-laitteella. Ajoista saatujen tulosten analysoinnissa hyödynnettiin laitteen valmistajan sivuilta ladattua LightCycler 96 SW 1.1 -analysointiohjelmistoa. Koska opinnäytetyö tehtiin tilaajan tarpeen mukaisesti ja heidän tiloissaan, vastasi Savonia-ammattikorkeakoulu työn materiaali- ja reagenssikustannuksista.

Ohjelmointia ja testauksia tehtiin suunnitelman mukaisesti riittävä määrä tulosten oikeellisuuden ja toistettavuuden varmistamiseksi. Tulosten oikeellisuutta voidaan arvioida vertaamalla niitä referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin. Referenssimenetelmällä tarkoitetaan vertailumenetelmää, joka voi olla joko virallinen referenssimenetelmä tai laboratorion rutiinikäytössä oleva menetelmä. Lisäksi luotettavan menetelmän perusvaatimuksena on, että menetelmä toimii johdonmukaisesti eli saa toistettavia tuloksia eri ajoissa. (Eurachem 2025, 43, 47.) Näiden tekijöiden arvioimiseksi testattiin Bio-Radin kitin toimivuutta perinteisellä PCR:llä eli koululla käytössä olevalla rutiinimenetelmällä. Siitä saatuja tuloksia verrattiin omassa tutkimuksessa toistettujen RT-PCR-ajojen tuloksiin. Molempien tulokset olivat saatavilla kittien manuaaleista (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 15–16; Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.a., 26).

Ajot aloitettiin aikataulun mukaisesti kesälomien jälkeen elokuussa 2025 ja ne saatiin päätökseen syyskuussa 2025. Tässä luvussa kuvataan työn toteutukseen liittyvien testiajojen eteneminen sekä niiden pohjalta laaditun työohjeen tekeminen. Testiajojen visualisointiin hyödynnettiin edellä mainittua analysointiohjelmistoa, jonka avulla opinnäytetyön testiajojen kuvaajat tuotettiin ja tulokset dokumentoitiin. Osuuden selkeyttämiseksi tekstiin on sisällytetty näytteiden Ct-arvoja ja sulamispisteitä vain osittain. Kaikkien näytteiden ajokohtaiset Ct-arvot ja sulamispisteet (liite 2) on koottuna yhteen taulukkoon, mutta työn selkeyden vuoksi tekstissä käsitellään pääosin rikospaikka-DNA:n S tuloksia.

6.3.1 RT-PCR-laitteen ohjelmointi ja ensimmäinen testaus

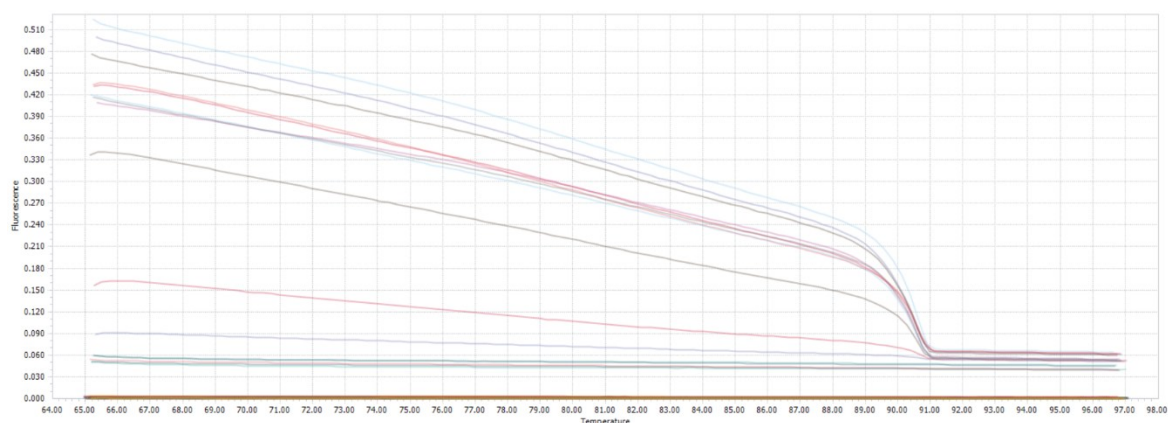
Ensimmäinen ajopäivä alkoi tutustumisella koulun Roche LightCycler® 96 -laitteeseen. Työn tilaaja oli alkuvaiheessa opastamassa ajon ohjelmoinnin ja laitteen toiminnan kanssa sekä antoi myös vinkin testistriippien painamisesta hyvin kiinni laitteen näytelevylle. Tämä takaa nopeat lämpötilanvaihtelut, jotta ne tapahtuisivat testistripeissä mahdollisimman oikea-aikaisesti (Suominen ym. 2010, 164).

Ajoprotokolla ohjelmoitiin RT-PCR-laitteelle kitin pohjalta tehdyn työohjeen (liite 1) mukaisesti. Laitteen valikoimasta ajon vaiheiksi valittiin alkudenaturaatio, kaksisyklinen PCR-reaktio sekä sulamiskäyräanalyysiin HRM. Alkudenaturaatio ja kaksisyklinen PCR-reaktio saatiin ohjelmoitua laitteelle kitin ohjeiden mukaisesti. Sulamiskäyräanalyysille kitissä olisi ollut omat ohjeet. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 14.) Niiden toteuttaminen oli tälle laitteelle kuitenkin mahdotonta, sillä analyysissä käytettävien parametrien muuttaminen ei laitteella ollut mahdollista. Kitin manuaali antaa kuitenkin vaihtoehdon käyttää myös laitteessa olevaa valmista sulamiskäyräanalyysiä (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 14), joten sitä käytettiin sellaisenaan.

Ensimmäisen testiajon tarkoituksena oli testata, onko ajo ylipäättään mahdollinen suorittaa tällä laitteella. Tästä syystä ajo tehtiin suppeammilla näytemäärillä ja mukaan valittiin vain epäiltyjen A ja C sekä rikospaikka-DNA:n S templaatti-DNA:t. Nämä näytteet valittiin, koska ajoon haluttiin rikospaikka-DNA:n S lisäksi kaksi epäiltyä, joista C on sama kuin rikospaikka-DNA ja toinen valittiin sattumanvaraisesti ja oli tässä tapauksessa A. Kitin perinteisen PCR-version manuaalin perusteella oli siis jo tiedossa, että epäilty C:llä on sama genotyyppi kuin rikospaikka-DNA S -näytteessä (Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.a., 79).

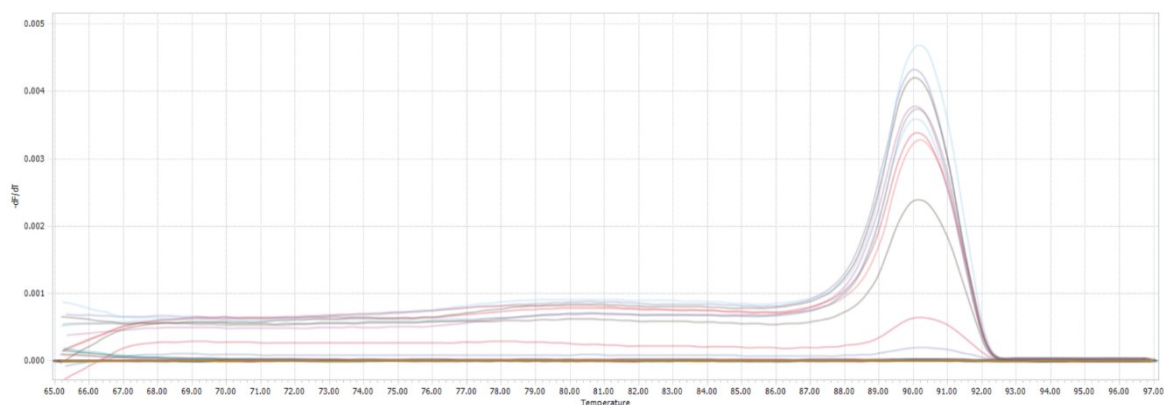
Valituista kolmesta näytteestä A, C ja rikospaikka-DNA S tehtiin kitin mukaiset laimennokset 1/100, 1/10 000 ja 1/1 000 000. Laimennossarjan avulla pystytään osoittamaan, kuinka näytteen DNA-määrä lähtötilanteessa vaikuttaa suoraan amplifikaatiokäyrien muodostumiseen. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 16.) Koska PCR-menetelmä on hyvin herkkä, on ajoissa tärkeää selvittää mahdolliset kontaminaatiot (Suominen ym. 2010, 165). Näiden havaitsemiseksi ajoon sisällytettiin kaksi negatiivista näytettä ilman templaatti-DNA:ta, joka korvattiin vedellä oikean reaktiotilavuuden saavuttamiseksi.

Ajo käynnistettiin laitteella, mutta hyvin pian havaittiin, ettei se toiminut suunnitellulla tavalla. Laite ei mitannut lainkaan fluoresenssin määrää PCR-reaktioiden monistumisen aikana. Lopussa sulamiskäyräanalyysi kuitenkin muodostui ja siinä fluoresenssia sen sijaan oli havaittavissa. Sulamiskäyräajon kuvaajasta (kuva 8) on nähtävissä fluoresenssin väheneminen asteittain, eli sulamiskäyrät olivat muodostuneet. Ajon toimivuudesta ei kuitenkaan ollut vielä varmuutta.



Kuva 8. Data ensimmäisen ajon sulamiskäyräanalyyseistä

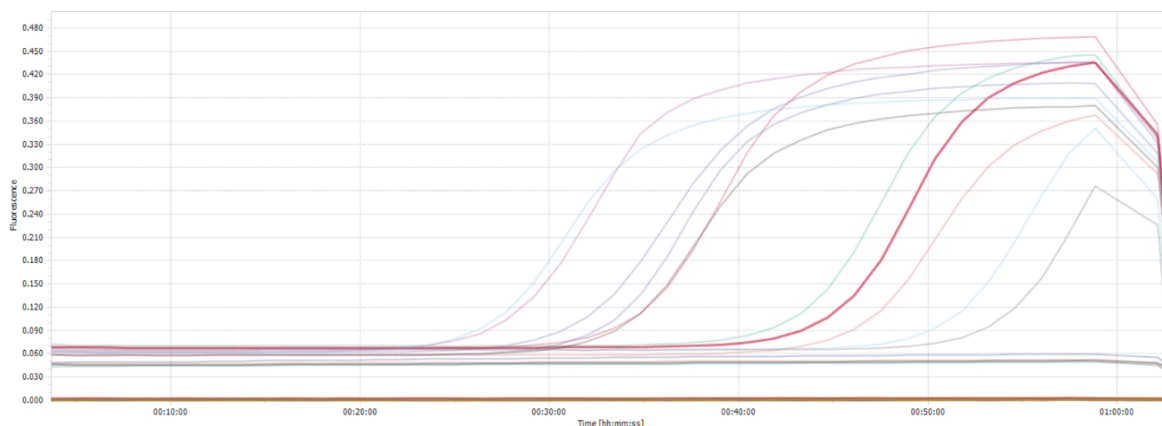
Ensimmäisen ajon sulamiskäyrät olivat myös hämmentävän lähellä toisiaan (kuva 9). Kaikkien templaattien sekä myös negatiivisten kontrollien sulamispisteet olivat välillä 90,06–90,25 °C. Tuloksista tiedettiin, että epäilty C oli sama kuin rikospaikka-DNA S. Näiden näytteiden tulosten tulisi siis olla yhteneväisiä, mutta muiden näytteiden pitäisi antaa erilaisia lukemia, jotta yhteys voitaisiin todeta tällä menetelmällä. Toiseen ajoon olisi siis tehtävä muutoksia ainakin PCR-ajon näkyvyyteen sekä testattava uudelleen, miten sulamiskäyräanalyysi toimii.



Kuva 9. Sulamispisteet ensimmäisestä ajosta

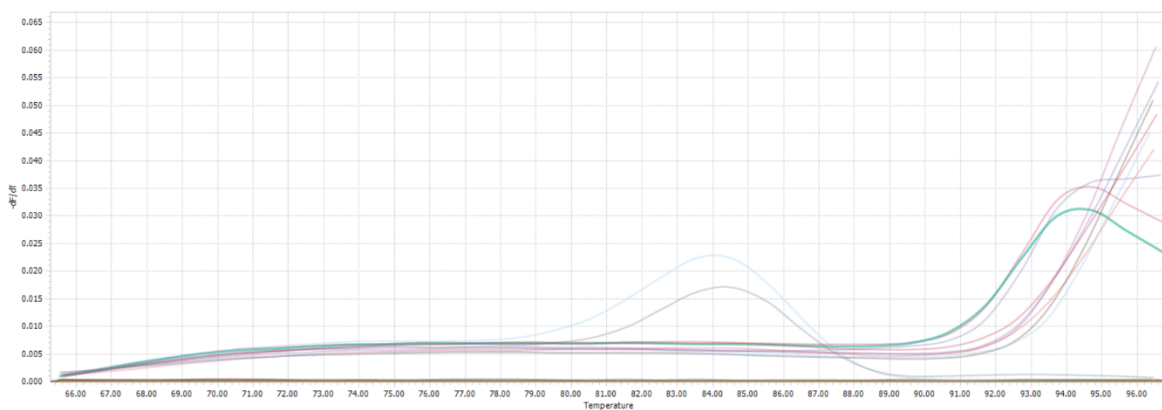
6.3.2 Uudelleenohjelmointi ja toinen testaus

Edellisen ajon tuloksia pohdittaessa sekä tutkittaessa ajoprotokollaa huomattiin, että ajon kaksivaiheisesta PCR:stä puuttui kokonaan fluoresenssin määrää ja muutosta mittaavat mittauspisteet ajon ajalta. Edellisessä vaiheessa tästä syystä fluoresenssin muutosta ei ollut havaittavissa ollenkaan PCR-vaiheessa. Nämä säädettiin kohdalleen toiseen ajoon, mutta muutoin käytettiin samaa ohjelmointia kuin ensimmäisessä ajossa. Koska edellisen ajon toimivuudesta ei ollut varmuutta, kokeiltiin ajoa edelleen vain epäiltyjen A ja C sekä rikospaikka-DNA:n S templaatti-DNA-laimennoksilla. Mukana oli myös kaksi negatiivista kontrollia N1 ja N2. Toisessa ajossa saatiin koko ajon amplifikaatiokäyrä näkyviin, joka on nähtävillä kuvassa 10.



Kuva 10. Raakadata toisesta ajosta

Toisesta ajosta saatiin kaikkien näytteiden Ct-arvot näkyville. Esimerkiksi rikospaikka-DNA:n S näytteistä näyte S1 (laimennos 1/100) oli saanut ajossa Ct-arvon 17,05, näyte S2 (laimennos 1/10 000) Ct-arvon 21,86 ja näyte S3 (laimennos 1/1 000 000) Ct-arvon 28,17. Korkein DNA-pitoisuus monistui ensin eli Ct-arvot olivat laimennossarjaan nähden loogiset. Tuloksia analysoidessa kuitenkin huomattiin, etteivät reaktiot olleet tapahtuneet loppuun saakka, kuten ensimmäisessä ajossa, sillä sulamiskäyräanalyysi ei ollut valmistunut kokonaan (kuva 11). Tälle löydettiin todennäköinen syy siitä, ettei ensimmäisen ajon aikana kerrottu vinkki näytestriippien painamisesta kunnolla pohjaan ollut tavoittanut kaikkia ryhmän jäseniä, vaan stripit olivat jääneet enemmän irralleen laitteen näytelevystä. Tällöin reaktiot eivät olleet tapahtuneet niin täsmällisesti ja lämpötilavaihtelut ovat olleet heikompia.

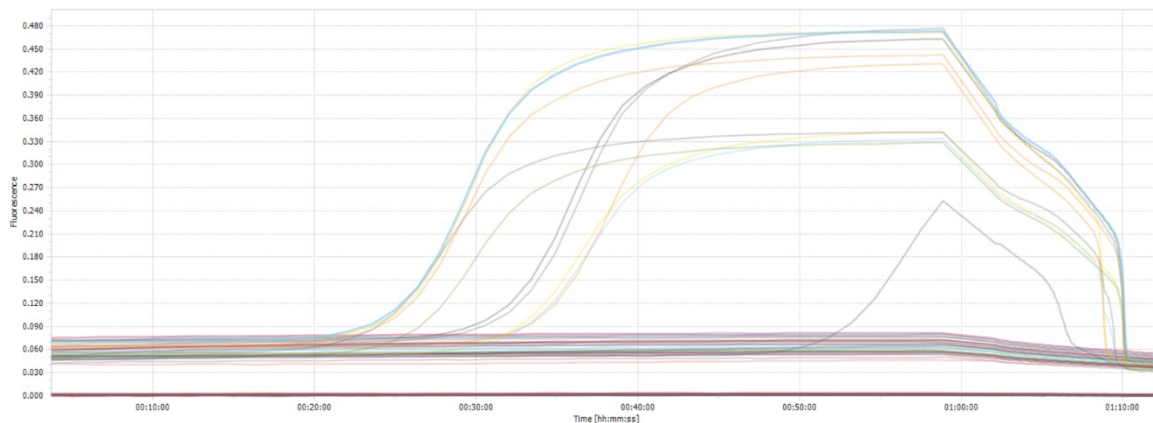


Kuva 11. Sulamispisteet toisesta ajosta

6.3.3 Ohjelman hienosäätö ja onnistunut testaus

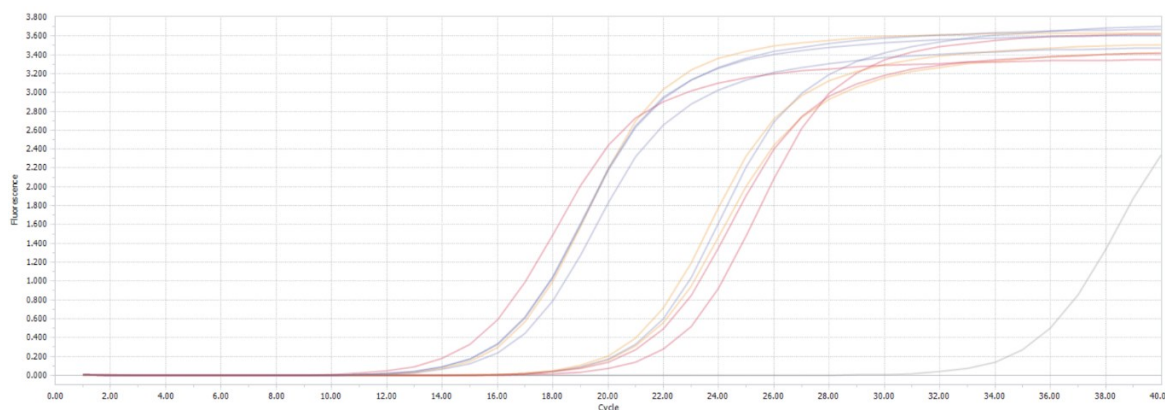
Kolmantena ajopäivänä päätettiin vielä hiukan muokata ajo-ohjelmaa edellisen kerran pienen epäonnistumisen vuoksi. Vaikka vajaaksi jääneet reaktiot johtuivat todennäköisesti puutteellisesta striippien painamisesta, päätettiin sulamiskäyräanalyysin lämpötilannostoa lisätä varmuuden vuoksi yhdellä asteella laitteen maksimiin 98 °C. Samalla kerralla käytiin keskustelua myös molekyylibiologian opettajan kanssa, jolloin tultiin siihen tulokseen, ettei laimeimmille 1/1 000 000 näytteille ollut tarvetta ajossa, sillä niiden positiivisuus ilmeni vasta niin myöhään, etteivät niiden ajot välttämättä ehtisi valmistua loppuun ja saavuttaa amplifikaatiokäyrän tasannevaihetta.

RT-PCR:ssä näytteiden tulokset eli Ct-arvot luetaan eksponentiaalisessa vaiheessa, jolloin DNA:n määrä noin kaksinkertaistuu jokaisessa syklistä eikä reagensseista ole vielä puutetta. Reaktion edetessä ja reagenssien kuluessa reaktionopeus hidastuu, ja reaktio siirtyy tasannevaiheeseen. (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 4.) Ajoon päätettiin lisätä nyt myös 1/100 ja 1/10 000 laimennokset epäilyistä B ja D, jolloin nähtäisiin ajon lopullinen kokonaisuus. Negatiivisia kontrolleja lisättiin tähän ajoon vain yksi eli N1 ajon selkeyttämisen vuoksi. Kolmannen ajon raakadata on nähtävillä kuvassa 12.



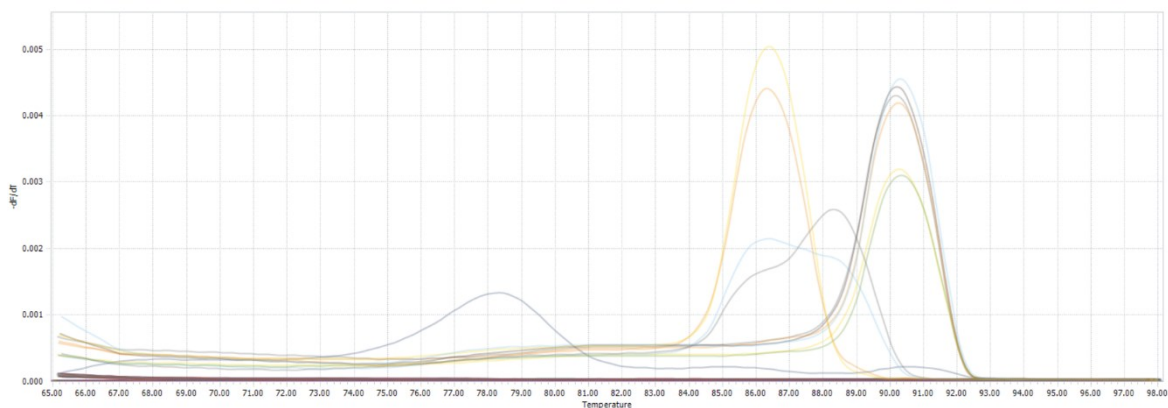
Kuva 12. Raakadata kolmannesta ajosta

Kolmannessa testauksessa saatiin onnistunut ajo. Amplifikaatiokäyrät näyttivät loogisilta ja niissä oli selvästi nähtävissä käyrän päävaiheet: lineaarinen alku, eksponentiaalinen kasvu sekä saavutettu tasannevaihe. Lisäksi negatiivinen kontrolli N1 on lähtenyt monistumaan selkeästi myöhemmin ja erottuu näin muista näytteistä yksittäisenä käyränä (kuva 13). Myös eri näytteiden laimennokset erottuivat hyvin. Suuremman DNA-pitoisuuden näytteiden Ct-arvojen kuuluu olla pienempiä kuin näytteiden, joilla on laimeampi DNA-pitoisuus (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 15–17). Esimerkiksi rikospaikka-DNA:n näytteille S1 ja S2 mitatut Ct-arvot olivat 15,79 ja 20,36. Myös negatiivinen kontrolli N1 erottui selkeästi lopussa sen Ct-arvon ollessa 34,54. Negatiivisen kontrollin korkea Ct-arvo ja myöhäinen amplifikaatio viittaavat epäspesifiseen monistumiseen, jota yleensä aiheuttavat aluke-dimeerit (Thermo Fisher Scientific n.d.a.).



Kuva 13. Monistumiskäyrät kolmannesta ajosta

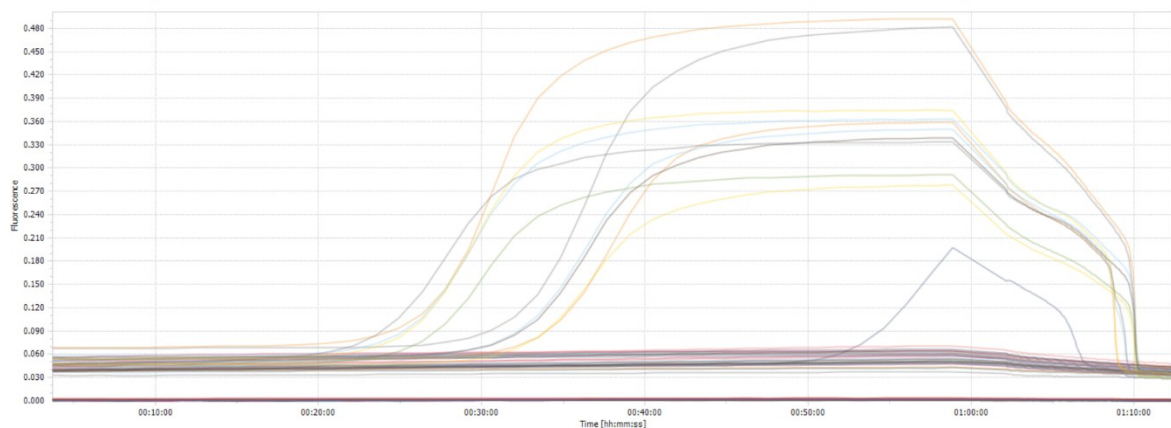
Riippumatta näyttemäärästä, saman näytteen sulamislämpötila tulisi olla aina sama, koska jokaisella DNA-jaksolla on sille ominainen sulamislämpötila (Suominen ym. 2010, 168–169). Tämä toteutui hyvin kolmannessa ajossa (kuva 14). Esimerkiksi rikospaikka-DNA:n laimennoksessa S1 sulamispiste oli 90,33 °C ja laimennoksessa S2 sulamispiste oli 90,28 °C. Epäillyt B ja D sekä negatiivinen kontrolli N1 erottuivat hyvin selkeästi erilaisine sulamispisteineen, mutta rikospaikka-DNA S:n sekä epäiltyjen A ja C sulamispisteiden samankaltaisuus hämmensi. Näiden näytteiden tulokset olivat myös yhteneväiset ensimmäisen ajon sulamispisteiden kanssa, jolloin tästä saatiin jo toinen rinnakkaistulos ensimmäisen ajon sulamiskäyräanalyysille.



Kuva 14. Sulamispisteet kolmannesta ajosta

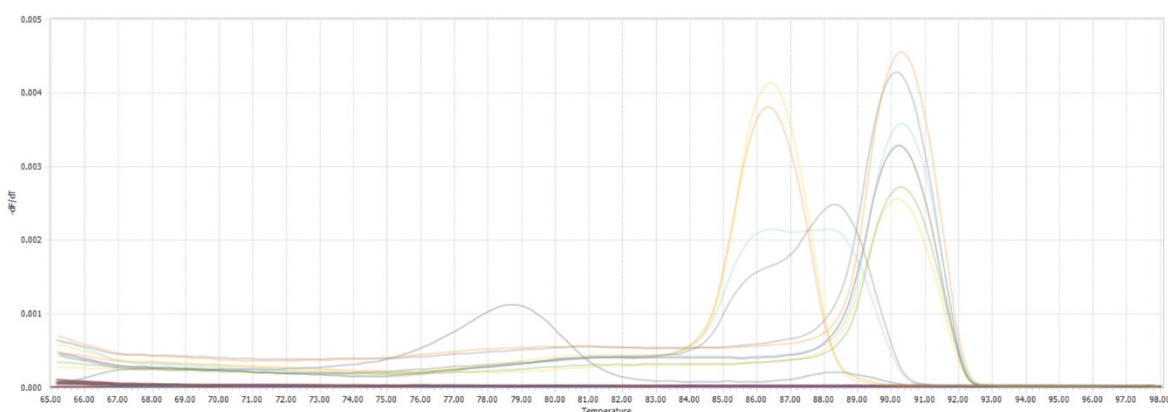
6.3.4 Toistettavuuden ja luotettavuuden testaus

Neljänten ajopäivään lähdettiin ajatuksella, että testaukset saataisiin päätökseen ja testattaisiin kitti myös vielä jo toimivalla referenssimenetelmällä eli perinteisellä PCR:llä, jonka tulokset visualisoitaisiin agarosigeelielektroforeesilla. Neljännessä ajossa käytettiin samoja näytteitä ja laimennoksia kuin kolmannessa ajossa ja ajo toteutettiin samalla protokollalla. Raakadata neljännessä ajosta on nähtävillä kuvassa 15.



Kuva 15. Raakadata neljännessä ajosta

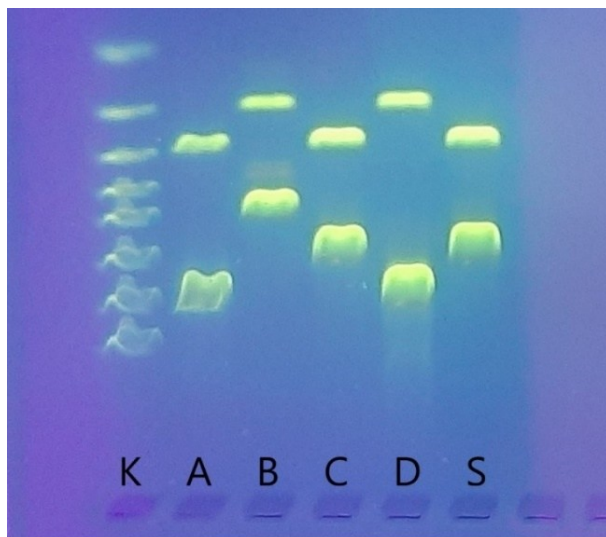
Viimeisen ajon tulokset olivat miltei tismalleen samat kuin ajossa kolme. PCR on kuitenkin niin herkkä menetelmä, ettei se koskaan ole amplifikaatiokäyriltään täysin samanlainen (Suominen ym. 2010, 169–170). Vaikka tässä ajossa käytettiin täysin samoja templaatteja ja asetuksia kuin edellisessä ajossa, menetelmän herkkyys selittää pienet eroavaisuudet tuloksissa. Neljännessä ajossa eri laimennosten ja negatiivisen kontrollin Ct-arvot olivat jälleen hyvin samankaltaiset kolmannen ajon kanssa. Sulamispisteet olivat myös yhteneväiset kolmannen ajon tulosten kanssa (kuva 16), sillä edellisessä kohdassa esimerkkinä olleen rikospaikka-DNA:n S1 laimennos sai tällä kertaa sulamispisteen 90,28 °C ja laimennos S2 sulamispisteen 90,17 °C. Onnistuneiden ajojen välillä rikospaikka-DNA:n S kaikissa laimennoksissa sulamispisteen erotus oli siis vain 0,16 °C eli alle 0,2 %. Myös neljännessä ajossa rikospaikka-DNA S ja epäillyt A ja C saivat miltei yhteneväiset sulamispistetulokset molemmille laimennoksille.



Kuva 16. Sulamispisteet neljännessä ajosta

Tällä viimeisellä ajokerralla kitin toimivuus testattiin myös referenssimenetelmällä. Perinteinen PCR-ajo toteutettiin molekyylibiologian perusteiden kurssin työohjeen mukaisesti ja sen tulokset visualisoitiin agarosigeelielektroforeesilla. Agarosigeelielektroforeesi mahdollistaa eri geenialleelien erottelun (Lee ym. 2012). Agarosigeelielektroforeesissa ajetaan aina PCR-tuotteiden lisäksi DNA-standardi, joka sisältää kaikki tutkittavan geenilokuksen mahdolliset alleelit ja niiden koot. Ajossa muodostuneiden vyöhykkeiden avulla DNA-näytteiden PCR-tuotteita voidaan verrata DNA-standardiin ja siten määrittää PCR-tuotteiden tarkat koot sekä vertailla niitä keskenään. Näin voidaan selvittää, mitkä alleelit DNA-näytteissä ovat läsnä. Rikoksen tekijä voidaan tunnistaa vertaamalla, minkä näytteen vyöhykkeet täsmäävät rikospaikka-DNA:n vyöhykkeisiin eli kenellä epäillyistä on samat alleelit kuin rikoksen tekijällä. (Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.a., 40–47.)

Kuvassa 17 on nähtävillä agarosigeelielektroforeesi-ajon tulokset. Geeliltä on havaittavissa, että näytteet A, C ja rikospaikka-DNA S ovat siinä hyvin lähellä toisiaan, vaikka ainoastaan C ja S ovatkin täysin samanlaiset. Jokaisella yksilöllä on kustakin geenistä kaksi alleelia, joista toinen periytyy äidiltä ja toinen isältä. Kitin manuaalin mukaan epäillyllä A ja C toinen alleeli on sama. (Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.a., 26–31.) Tämä voisi selittää osaltaan sen, miksi kaikki nämä kolme näytettä ovat myös sulamiskäyräanalyysissä niin lähellä toisiaan. Sulamislämpötilaan vaikuttavat DNA-juosteessa olevat GC-sidokset (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 7), joita ei kuitenkaan voida agarosigeeliltä nähdä.



Kuva 17. Agarosigeelielektroforeesi-ajon tulokset. K = DNA-standardi, A-D = epäiltyjen DNA:t ja S = rikospaikka-DNA (Nuutinen 2025, CC BY-NC-SA)

Ajojen jälkeen keskusteltiin työn tilaajan kanssa työohjeen tekemisestä ja tehdyistä ajoista. Keskustelussa päädyttiin siihen tulokseen, että epäiltyä A ei kannata ottaa ollenkaan työohjeeseen, sillä se voisi tarpeettomasti häiritä opiskelijoiden tulosten arviointia ja työn ymmärrettävyyttä. Hyvälle oppimateriaalille ominaista ovat selkeys ja monitulkintaisuuden välttäminen (Paavola, Ilomäki & Lakkala 2012, 48). Keskustelussa sovittiin myös, että työohjeen tulisi sisältää ohjeet yhdelle opiskelijalle ja sisällyttää siihen rinnakkaiset laimennokset 1/100 ja 1/10 000 näytteistä B, C, D, rikospaikka-DNA S sekä kaksi negatiivista kontrollia N1 ja N2. Opetusmateriaalina käytettävälle työohjeelle merkittävää on kehittää opiskelijalle hyödyllisiä taitoja (Opetushallitus n.d.), joten työohjeeseen haluttiin sisällyttää paljon bioanalytikolle tärkeää pipetointia. Tämä toteutuu edellä mainittujen näytelaimennosten valmistamisen kautta, sillä ne tarjoavat opiskelijalle runsaasti käytännön harjoitusta pipetoinnin tarkkuudesta ja toistettavuudesta. Lisäksi ne auttavat ymmärtämään, kuinka DNA:n määrä lähtötilanteessa vaikuttaa Ct-arvoon.

6.4 Työohjeen eli kehittämistyön tuotoksen laatiminen

Työohje on työntekijälle työn suorittamista varten laadittu ohje, johon sisältyy työhön käytettävät aineet ja tarvikkeet, työn laatuvaatimukset sekä työskentelymenetelmät (Sanastokeskus ry 1994). Laadukkaan työohjeen tekeminen vaatii samoja asioita kuin muukin kirjoittaminen: ohjeen laatijan on otettava huomioon kohderyhmä ja laatia ohje, joka auttaa kohderyhmää pääsemään tavoitteeseensa eli suorittamaan työ alusta loppuun onnistuneesti. Hyvin laadittu ohje säästää aikaa ja ehkäisee syntyviä vahinkoja. (Kankaanpää & Piehl 2011, 295.)

Työohjeen ollessa opetusmateriaalia on otettava huomioon myös ohjeen pedagoginen laatu eli se, kuinka ohje tukee opiskelijan oppimista. Opetukseen käytettävien materiaalien tulee olla sovellettavissa reaalimaailmaan eli työohjeen tapauksessa esimerkiksi työpaikoilla tehtäviin työtehtäviin. Opetusmateriaalin tulee perustua uusimpaan tutkittuun tietoon ja tukea opiskelijan oppimisen taitoja sekä osallistaa opiskelijoita mielekkäällä tavalla aktiiviseen tekemiseen ja ajatteluun. Hyvin laadittu opetusmateriaali on sellaisenaan käytettävissä opetusvälineenä ja auttaa myös opettajaa kehittä-

mään opetustaan. Näiden tekijöiden tuloksena saadaan pedagogisesti laadukas ja toimiva kokonaisuus, jossa yhdistyvät oppimisen kannalta olennainen sisältö ja mielekäs, hyvin toteutettu ja toimiva työohje. (Opetushallitus n.d.)

Opetusmateriaalia tehdessä on hyvä ottaa huomioon, että työohjeen täytyy olla tarpeeksi selkeä, mutta myös tarpeeksi haasteellinen ja autenttinen, jotta opiskelija saa mahdollisuuden innostua ja motivoitua työn tekemisestä (Opetushallitus n.d.). Laadukas työohje sisältää kaikki tarpeelliset asiat, mutta ei mitään ylimääräistä. Jos ohje tehdään ryhmälle, jolle aihe on ennestään tuntematon, on ohjeeseen tarpeellista laittaa kaikki suoritettavat tekemisen vaiheet. (Kankaanpää & Piehl 2011, 296.)

Työohjeen selkeyteen auttaa asioiden kertominen aikajärjestyksessä, jolloin ohje etenee työntekijälle loogisessa järjestyksessä alusta loppuun. Työohjeen alkuun voi olla tarpeellista laittaa johdanto, jossa kerrotaan työn tarkoitus ja päämäärä sekä työhön tarvittavat välineet. Työohjeen teksti on helppo lukea jaoteltuna, jolloin jokainen tehtävä työvaihe on luettelomaisesti jaettuna omana kohtanaan. Jäsentelyyn voi käyttää vaiheiden numerointia, joka helpottaa ohjeen seuraamista. Työohjeen kielenä voi käyttää konkreettisiin toimintaohjeisiin sopivaa sinuttelua ja käskymuotoa, joka korostaa työohjeen laatijan kehoitusta toimia juuri näiden ohjeiden mukaisesti hyvän lopputuloksen saamiseksi. (Kankaanpää & Piehl 2011, 296–299.)

Lopullinen, eli kehittämistyön tuotoksena bioanalytiikko-opiskelijoiden käyttöön tuleva, työohje oli helposti muokattavissa testiajoihin tehdystä työohjeesta. Koska RT-PCR-menetelmä ja sulamiskäyräanalyysi ovat laajasti eri erikoisaloilla käytössä olevia menetelmiä (Ciotti ym. 2024), vastasi työohjeen tekeminen hyvin laboratorioharjoitusten nykyaikaistamiseen sekä oppimateriaalin yhdistämiseen reaalimaailmaan. Työohjeen toteutuksessa hyödynnettiin suunnitteluvaiheessa asetettuja, laadukkaan työohjeen kriteerejä. Työohjeen RT-PCR-menetelmä on käytännön työskentelyssä opiskelijoille täysin uusi, joten jokainen ohjeessa suoritettava työvaihe avattiin selkeästi tekstiin. Työohjeen muotoilussa käytettiin selkeää fonttia sekä lihavoitua tekstin selkeyttämiseksi, lukemisen helpottamiseksi ja tärkeiden asioiden huomioimiseksi.

Ohjeeseen lisättiin pieni työtä avaava johdanto, lopullinen ajoprotokolla ja tarvittavat välineet. Ohjeen lyhyt johdanto katsottiin riittäväksi, koska työ kuuluu osaksi molekyylibiologian syventävää kurssia, jonka teoriaosuudessa menetelmä on käyty perusteellisesti läpi. Ohjeeseen luotiin myös selkeät ohjeet tarvittavien laimennosten tekemiseen ja työn suorittamiseen, jotta opiskelija pystyy selviytymään työskentelystä myös itsenäisesti ja näin vahvistamaan ammattitaitoaan. Työohjeen loppuun lisättiin taulukko ajon tuloksille, jotta ne olisivat opiskelijan helposti tulkittavissa. Taulukon avulla opiskelija voi vertailla Ct-arvojen ja sulamispisteiden eroja eri näytteiden ja laimennosten välillä. Tiettyjen asioiden, kuten putkien kokojen ja määrien, poisjättämisen ajateltiin kehittävän opiskelijan aktiivista ajattelua, joten ne jätettiin tietoisesti pois työohjeesta.

6.5 Arviointi ja tulokset

Kehittämistyön toteutusvaiheen arviointia voidaan tehdä työn eri vaiheissa ja jatkuvasti (Salonen ym. 2017, 64). Tutkimuksellisen osuuden arvioinnissa tulee ottaa huomioon myös tieteellisen tutkimusprosessin arviointikriteerit. Tutkimuksellisessa prosessissa arvioidaan tutkimuksen valintoja ja niiden seurauksia. Lisäksi prosessissa arvioidaan lopputulosta, johon aiemmin tehdyillä valinnoilla on päästy, sekä lopputuloksen luotettavuutta. (Kyrö 2003, 142.) Valittuun kehittämistyön menetelmään sopi jatkuva arviointi, jota tehtiin toteutusvaiheessa testiajoja suorittaessa. Tähän kuuluivat muun muassa keskustelut tilaajan kanssa sekä ajojen muokkaus edellisten tulosten perusteella. Yksittäisten testiajojen ja samalla RT-PCR- ja sulamiskäyräanalyysimenetelmien luotettavuutta parannettiin tekemällä tarpeeksi useita toistoja johdonmukaisten tulosten saamiseksi.

Aikataulullisista syistä kehittämistyön tuotosta eli työohjetta ei ollut mahdollista testata kohderyhmällä eli bioanalyttikko-opiskelijoilla käytännön laboratoriotyössä, sillä seuraava molekyylibiologian syventävä kurssi toteutetaan vasta keväällä 2026 ja opinnäytetyö valmistui jo syksyn 2025 aikana. Työohjetta kuitenkin arvioitiin kaksivaiheisesti. Ensimmäinen arviointi tehtiin yhteistyössä työn tilaajan kanssa ja sen sisältöä muokattiin häneltä saadun palautteen perusteella. Ensimmäisen version arviointi osoitti tarpeelliseksi muuttaa pipetointijärjestystä loogisemmaksi: näytelaimennokset valmistetaan ensin, jonka jälkeen tehdään Master Mix, pipetoidaan se reaktioputkiin ja vasta lopuksi lisätään näytteet. Tällä järjestyksellä estetään kontaminaation riski pipetointivaiheessa. Lisäksi työohjeeseen lisättiin esimerkkikuvat tuloksista.

Ohjeet ajojen tulosten analysoimisesta päätettiin jättää pois opiskelijoiden työohjeesta ja tehdä analysoinnista ohjevideo tilaajan käyttöön. Opiskelijat eivät analysoi tuloksia itse, vaan opintojakson opettaja suorittaa analysoinnin analysointiohjelmalla ja esittelee tulokset koko ryhmälle yleisesti videotykin kautta. Näin varmistetaan, että tulosten tulkinta ja niiden merkitys käydään läpi ohjatusti ja yhdenmukaisesti koko opiskelijaryhmän kanssa. Muutosten avulla saatiin vahvistettua työohjeen käytettävyyttä opiskelijoille. Kaikkia työohjeen osioita, kuten tekstin selkeyttä ei ollut tarpeen muokata, sillä niiden katsottiin jo vastaavan Kankaanpään ja Piehlin teoksessa (2011, 295–299) esitellyjä laadukkaan ohjeen kriteerejä.

Toinen arviointi toteutettiin oman vuosikurssin opiskelijoiden kesken. Laadukkaan työohjeen kriteereihin perustuen tehtiin Webropol-kysely, joka yhdessä työohjeen kanssa lähetettiin opiskelijoille arvioitavaksi. Kysely oli auki 15.-26.10.2025 välisen ajan ja se sisälsi viisi kysymystä, jotka perustuivat Kankaanpään ja Piehlin (2011, 295–299) hyvän työohjeen ja Opetushallituksen (n.d.) laadukkaan oppimateriaalin kriteereihin. Kysymyksistä kolme oli pakollisia, ja niissä työohjeelle annettiin arvosana 1–5. Nämä kysymykset liittyivät työohjeen jäsentelyn loogisuuteen, kielen selkeyteen ja ymmärrettävyyteen sekä opiskelijan tunteeseen osata työskennellä ohjeen mukaisesti itsenäisesti. Lisäksi kysely sisälsi kaksi vapaaehtoista avointa kysymystä, joissa pyydettiin palautetta, mikä työohjeessa toimi hyvin sekä parantamishdotuksia sen kehittämiseksi. Lopuksi kyselyssä oli myös yleinen palautelaatikko, johon opiskelija pystyi kirjoittamaan muita ajatuksia tai huomioitaan työohjeesta.

Kyselyyn osallistui yhteensä 7 vastaajaa. Työohjeen jäsentelyn loogisuus sekä kielen selkeys ja ymmärrettävyys saivat vastaajilta keskiarvon 4,7. Opiskelijoiden arvio omasta kyvystään työskennellä itsenäisesti ohjeen avulla sai keskiarvoksi 4,3. Jo näiden vastausten perusteella voitiin todeta, että työohje on hyvän työohjeen kriteerien mukainen myös arviointiryhmän mielestä. Avointen vastausten perusteella työohjeessa on selkeät ja tarpeeksi tarkat ohjeet, jotka ovat hyvin jäsenneilty. Myös alun johdantoa keuhuttiin, sillä se kertoi hyvin työn tarkoituksen. Kehitysideoina työohjeelle annettiin tulosodotusten kuvaajien selityksiä, tärkeiden lauseiden lihavoitua sekä muita ohjeen muotoiluun liittyviä ehdotuksia, jotka päätettiin toteuttaa valmiiseen työohjeeseen. Toiveet esimerkiksi putkien kokojen lisäämisestä päätettiin olla toteuttamatta, sillä kokotietojen poisjättämisen katsottiin lisäävän opiskelijan aktiivista ajattelua, joka on Opetushallituksen (n.d.) mukaan hyvän opetusmateriaalin keskeinen piirre. Kokonaisuutena kyselyn tulokset antoivat kuvan, että vastaajat pitivät työohjetta erittäin hyvänä opiskelijoiden harjoitustyölle. Vastaajien mielestä työohjeen avulla työskentely onnistuisi sujuvasti, joka on Kankaanpään ja Piehlin (2011, 295) mukaan hyvän työohjeen tarkoitus. Kyselyn kysymykset ja vastaukset ovat nähtävillä kokonaisuudessaan liitteessä Työohjekysely ja sen tulokset (liite 3).

Kehittämistyön tuotoksena syntyi työohje RT-PCR:n ja sulamiskäyräanalyysin tekemiseen (liite 4). Työohje otetaan käyttöön keuhällä 2026 järjestettävällä molekyylibiologian syventävällä kurssilla, ja sen myötä opetukseen saadaan uusi, nykyaikainen ja paljon kliinisissä laboratorioissa käytössä oleva menetelmä. Työohjeen odotetaan helpottavan opettajan työtä sekä toimivan selkeänä ohjausvälineenä, joka tukee opiskelijoiden itsenäistä työskentelyä laboratorioharjoituksissa. Myös tulevat opiskelijat hyötyvät työohjeen käyttöönotosta ja näiden tärkeiden menetelmien oppimisesta, sillä ne ovat olennainen osa nykyaikaista laboratoriotyöskentelyä. Työn varsinainen käyttöönotto ja implementointi jää tilaajan vastuulle. Tämä mahdollistetaan luovuttamalla tuotos tilaajalle ja esittelemällä se keuhään 2026 molekyylibiologian syventävän kurssin oppitunnilla.

7 POHDINTA

7.1 Kehittämistyön toteutuksen ja tulosten pohdinta

Kehittämistyön tuotosta voidaan tarkastella tavoitteiden toteutumisen näkökulmasta huomioiden syntyneet muutokset. Arvioinnissa voidaan hyödyntää asetettua tarkoitusta ja tavoitteita sekä käytettyjä menetelmiä. (Turunen, Pekonen, Korhonen & Tohmola 2025, 34.) Kehittämistyö eteni pääosin lineaarisen mallin mukaan, mikä toi selkeyttä ja jäseneltävyyttä prosessin vaiheistukseen. Työn edessä kuitenkin havaitsimme, että konstruktiiivinen malli olisi voinut soveltua paremmin tämänkaltaiseen kehittämisprosessiin. Konstruktiiivinen malli mukautuu helpommin muutoksiin ja vaikeammin hallittavissa oleviin kokonaisuuksiin, jolloin työskentelyssä korostuu reflektiivisyys, vuorovaikutus ja arviointi sekä niistä oppiminen (Salonen ym. 2017, 52). Toteutusvaiheessa jouduimme tekemään runsaasti reflektiota testiajojen jälkeen sekä suunnittelemaan seuraavia ajoja edellisten onnistumisen tai epäonnistumisen perusteella. Konstruktiiivisen mallin soveltuvuutta puoltaa myös se, ettemme ennen testiajojen aloittamista tienneet, kuinka monta ajoa joutuisimme tekemään, jotta tulosten luotettavuus ja toistettavuus saataisiin varmistettua ennen työohjeen laatimisen aloittamista.

Lineaarinen malli on selkeärakenteinen ja etenee vaiheittain (Salonen ym. 2017, 52). Vertailemalla lineaarista ja konstruktiiivista mallia tulimme kuitenkin lopuksi siihen tulokseen, että lineaarinen malli sopi työhömmä paremmin, sillä se helpotti testiajojen suunnittelua ja dokumentointia. Työ toteutettiin lineaarisen mallin mukaisesti asteittain tehden siihen kuuluvaa jatkuvaa arviointia ja reflektiota jokaisen vaiheen sisällä, mikä puolsi menetelmän käyttöä. Työn tutkimuksellinen osuus tuottaa uutta tietoa, jota voidaan hyödyntää kehittämistyössä (Salonen 2013, 41). Tässä työssä tutkimuksellista osuutta olivat testiajot, joiden perusteella kehittämistyön tuotoksena laadittiin työohje. Tämän vuoksi tutkimuksellinen kehittäminen soveltui tämän opinnäytetyön menetelmäksi hyvin.

Kehittämistyön tarkoituksena oli tuottaa työohje sulamiskäyräanalyysiin RT-PCR-laitteella bioanalyttikko-opiskelijoille. Onnistuneen ohjelmoinnin, suoritettujen ajojen ja saatujen tulosten sekä oman kokemuksemme pohjalta työohjeen laatiminen onnistui melko nopeasti hankittua teoretietoa ja kitin manuaalia hyödyntäen. Suunnitteluvaiheessa otimme huomioon tilaajan toiveet sekä kehittämistyön tuotokselle asetetut tavoitteet. Lisäksi käytimme tuotosta arvioitavana työn tilaajalla saadaksemme kehittämis ehdotuksia, minkä jälkeen muokkasimme työohjetta saamamme palautteen perusteella. Halusimme varmistaa ohjeen ymmärrettävyyden, kielen ja selkeyden myös opiskelijoiden näkökulmasta, joten keräsimme palautetta oman vuosikurssimme opiskelijoilta ja otimme heidän näkemyksensä ja mielipiteensä huomioon ohjeen viimeistelyssä. Tämän jälkeen saavutimme työn tarkoituksen ja lopputuloksena syntyi selkeä ja toimiva työohje opiskelijoiden käyttöön. Sen laatiminen opetti meitä jäsentämään työvaiheet pedagogisesti ja tuottamaan oppimista tukevaa materiaalia, mikä on hyödyllistä myös työelämässä. Työohje on tilaajan käytettävissä sellaisenaan, eikä sitä tarvitse muokata lainkaan ennen käyttöönottoa.

Kehittämistyömme yhtenä tavoitteena oli pidentää nykyisen laitekannan käyttöikä. Vaikka aluksi emme olleet varmoja ajojen onnistumisesta, oli meillä laitteen valmistajalta saatu puoltava selvitys kitin toimivuudesta, joten lähdimme toteuttamaan ajoja luottavaisin mielin. Iloksemme testaamiseen käytetty RT-PCR-kitti tuotti valmistajan lupaamat tulokset koulun Roche LightCycler® 96 -laitteella. Laitteelle ohjelmoitu ajo toimi muutamien virheiden ja toistokertojen jälkeen, ja saatujen tulosten perusteella niitä voitiin pitää luotettavina. Dokumentoimme ajojen suorittamisen avoimesti ja rehellisesti koko työskentelyn ajan. Toteutettujen testausten avulla olemme mahdollistaneet nykyisen laitekannan käyttöiän pidentämisen.

Toisena tavoitteenamme oli nykyaikaistaa koulun laboratorioharjoitusten sisältöä eli mahdollistaa tuleville bioanalytikko-opiskelijoille harjoitustyö sulamiskäyräanalyysistä RT-PCR-laitteella. Koululla voidaan edelleen suorittaa myös perinteistä PCR-ajoa, joko erikseen tai rinnakkain RT-PCR:n kanssa. Uuden työohjeen myötä opiskelijoille kuitenkin mahdollistuu kliinisissä laboratorioissa käytössä olevan RT-PCR-menetelmän oppiminen sekä sulamiskäyräanalyysin tekeminen ja tulosten ymmärtäminen. RT-PCR on laajalti käytetty menetelmä eri kliinisissä laboratorioissa ja yleisin kaikista PCR-sovelluksista (Ciotti ym. 2024), minkä vuoksi on tärkeää, että valmistuvat bioanalytikit hallitsevat menetelmän periaatteen ja käytännön soveltamisen. RT-PCR:n osaaminen tukee työelämään siirtymistä ja yhtenäistää laboratorioiden osaamista valtakunnallisesti.

Bioanalytikko vastaa luotettavien laboratoriotutkimustulosten tuottamisesta asiakkaan terveydentilan arviointia ja terveyden edistämistä varten. Hän tekee tiivistä yhteistyötä eri terveydenhuollon ammattilaisten kanssa, jotta potilaan hoitoa ja sen kehittämistä tukevat laboratoriotutkimukset voidaan toteuttaa laadukkaasti ja tarkoituksenmukaisesti. Bioanalytikko hallitsee laboratoriotutkimusprosessin kokonaisuudessaan ja ymmärtää syvällisesti sen eri vaiheet, mikä varmistaa tulosten laadun ja luotettavuuden. (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.e.) Bioanalytikon eettiset ohjeet painottavat ammatillista vastuuta, joka edellyttää bioanalytikolta oman työnsä kautta ammatin arvostuksen ylläpitämistä ja siihen kohdistuvan luottamuksen vahvistamista. Lisäksi bioanalytikon odotetaan osallistuvan aktiivisesti alan ja koulutuksen jatkuvaan kehittämiseen. (Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017, 3.) Opinnäytetyöprosessin aikana olemme syventäneet ymmärrystämme siitä, kuinka keskeisessä roolissa bioanalytikon ammattitaito ja vastuullinen toiminta ovat laadukkaiden laboratoriopalvelujen tuottamisessa. Tulosten oikea tulkinta sekä mahdollisten virhelähteiden tunnistaminen edistävät potilasturvallisuutta ja vahvistavat diagnostiikan laatua ja luotettavuutta.

Opintokokonaisuudet mahdollistavat opetuksen ja työelämälähtöisen tutkimus- ja kehittämistoiminnan yhdistämisen (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.e.), ja nykyaikaisten menetelmien käyttöönotto koulutuksessa vahvistaa bioanalytikko-opiskelijoiden valmiuksia työelämäyhteistyöhön. Lisäksi se lisää alan kykyä vastata teknologian nopeaan kehitykseen. Menetelmän oppeja voidaan myös soveltaa monilla eri tieteenaloilla, sillä PCR:ää hyödynnetään muun muassa biolääketieteessä, biotekniikassa ja oikeuslääketieteessä (Bustin ym. 2019, 19). Kliinisissä laboratorioissa PCR-menetelmää ja sen erilaisia sovelluksia käytetään erityisesti mikrobiologian ja genetiikan erikoisaloilla (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 3). Tämän vuoksi eri PCR-sovellusten hallinta tarjoaakin bioanalytikoille monipuoliset mahdollisuudet työskennellä erilaisissa laboratorioympäristöissä sekä osallistua diagnostiikan, tutkimusten ja menetelmien kehittämiseen.

Koulutuksessa ja opinnoissa korostetaan vastuullisuutta ja kestävää kehitystä kaikessa toiminnassa (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.e). Opinnäytetyön tavoitteiden täyttymistä voidaan peilata myös Savonia-ammattikorkeakoulun (2024) strategiaan, jonka mukaan kestävä kehityksen edistäminen, resurssiviisaus eli luonnonvarojen harkittu ja kestävä käyttö sekä työelämän tarpeisiin vastaaminen ovat myös työssämme toteutuneita arvoja. Bioanalyttikoiden osaamisen tulisi vastata työelämän tarpeisiin mahdollisimman hyvin (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.e). Opinnäytetyön myötä olemme voineet kehittää omaa kestävää ja vastuullista toimintatapaamme sekä syventää osaamistamme, mikä on vahvistanut valmiuksiamme jatkuvaan oppimiseen.

Opinnäytetyöprosessin aloitusvaiheessa meillä ei ollut vielä tietoa, että työmme tulisi sisältämään konkreettisen tuotoksen laatimisen, vaan lähdimme toteuttamaan koko opinnäytetyötä kehittämistyön periaatteiden mukaisesti lineaarista mallia hyödyntäen. Ajojen onnistumisen myötä tuli tilaajan kanssa kuitenkin puhetta, että opiskelijoiden harjoitustyön ohjeelle olisi tarvetta. Tilaajan toiveesta aloimme valmistella tuotosta bioanalyttikko-opiskelijoille harjoitustyön konkreettiseen suorittamiseen. Tuotoksen suunnittelussa teoreettista tietopohjaa pidetään lähtökohtana (Turunen ym. 2025, 32). Meillä oli onneksi jo valmiiksi kirjoitettuna vahva teoriapohja sekä mahdollisuus hyödyntää testiajoihin laadittua työohjetta opiskelijoiden työohjeen mallina. Työn teoreettinen osuus oli vaativa ja se edellytti meiltä laajaa perehtymistä aihealueen keskeisiin käsitteisiin ja menetelmiin. Haasteenamme oli esittää teoria niin, että se olisi helposti ymmärrettävissä myös ulkopuoliselle lukijalle, joten pyrimme parantamaan opinnäytetyömme tekstin selkeyttä ja luettavuutta esimerkiksi avaamalla ammatillisia termejä.

Arviointivaiheessa tarkastelimme tuotoksen onnistumista peilaten sitä Kankaanpään ja Piehlin (2011, 296–299) laatimiin laadukkaan työohjeen kriteereihin, kuten ohjeen selkeyteen, asioiden kertomiseen aikajärjestyksessä ja ohjeen etenemiseen loogisesti. Kävimme läpi, mitä olimme saaneet aikaan ja millaisia vaikutuksia työllä oli tilaajalle. Harjoitustyön suorittaminen onnistuneesti valitulla kitillä varmistui, ja laatimamme työohje on siten hyödynnettävissä molekyylibiologian syventävällä kurssilla. Tilaaja sai toivomansa valmiiksi ohjelmoidun ajoprotokollan sulamiskäyräanalyysiin RT-PCR-menetelmällä suorittamista varten sekä opiskelijoille käytettävän työohjeen. Opinnäytetyön laatimisen lähtökohtana oli oma kiinnostuksemme molekyylibiologiaan ja olimme kokeneet perinteisellä PCR-menetelmällä suoritettujen työn mielekkääksi. Lisäksi meille oli jo kehittynyt ymmärrystä RT-PCR:n merkityksestä ja sen hallintaan liittyvästä osaamistarpeesta.

Jälkikäteen pohdimme, mitä olisimme voineet tehdä toisin ja tulimme siihen tulokseen, että aikataulu olisi ollut hyvä siirtää aiemmaksi. Työn toteutus olisi kannattanut aloittaa jo keväällä, jolloin olisimme voineet käyttää ajoihin enemmän aikaa. Lisäksi työohjeeseen tekemämme muutosten jälkeen tuotoksen testaaminen vielä kokonaisuudessaan uudelleen olisi antanut lisäarvoa analysointiin ja varmuutta työohjeen toimivuudesta. Myös suunnittelu työn tilaajan kanssa olisi voinut olla jäsennellympää ja sisällön määrittely tarkempaa, mikä olisi selkeyttänyt työn etenemistä ja aikataulutusta.

7.2 Kehittämistyön eettisyys ja luotettavuus

Eettisyyden noudattaminen opinnäytetyössä tarkoittaa vastuullista, eettiset periaatteet huomioonottavaa toimintaa koko tutkimus- tai kehittämisprosessin ajan. Se edellyttää eettisten näkökulmien huomioimista niin aiheen valinnassa ja suunnitteluvaiheessa kuin myös tuotoksen raportoinnissa ja julkaisemisessa. (Elo, Kinnunen, Rasa, Saarnio & Tapio 2025, 15.) Keskeisinä lähtökohtina prosessissa toimivat eurooppalaisen tutkimuseettisen ohjeistuksessa määritellyt hyvän tieteellisen käytännön periaatteet, joihin kuuluvat luotettavuus, rehellisyys, arvostus ja vastuunkanto (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023, 11). Myös bioanalyytikon eettiset ohjeet korostavat ammatillista vastuuta, jonka mukaan bioanalyytikon tulee omalla toiminnallaan edistää ammatin arvostusta ja säilyttää siihen kohdistuva luottamus sekä osallistua alan ja koulutuksen kehittämiseen (Suomen Bioanalyttikoliitto ry 2017, 3).

Opinnäytetyön aiheen valinnassa tulee jo alusta alkaen huomioida tutkimuseettiset periaatteet ja tietosuoja. Lisäksi tulee arvioida, ovatko aihe ja siihen liittyvät teemat lähestyttävissä opinnäytetyön puitteissa siten, että työ voidaan toteuttaa eettisesti kestäväällä ja turvallisella tavalla. (Elo ym. 2025, 15.) Opinnäytetyömme aihe ei kohdistu yksittäisiin henkilöihin tai henkilöryhmiin, vaan keskittyy uuden menetelmän toimivuuden testaamiseen koulun laboratoriotiloissa sekä työhjeen laatimiseen saatujen tulosten pohjalta. Testaukset eivät edellyttäneet näytteiden keräämistä kohderyhmältä, sillä tarvittavat DNA-näytteet sisältyivät opetuskäyttöön tarkoitettuun testikittiin. Näin ollen aihe oli opinnäytetyön puitteissa helposti lähestyttävä ja eettisesti turvallinen. Työhön ei myöskään sisältynyt henkilötietojen käsittelyä, joten se ei edellyttänyt erityisiä salassapito- tai tietosuojajärjestelyjä.

Opinnäytetyöprosessin alussa laaditaan sopimus opiskelijan, toimeksiantajan ja ammattikorkeakoulun kesken, jossa sovitaan työn toteutuksen kannalta olennaisista asioista, kuten aiheesta, aikataulusta, ohjauksesta, tavoitteista sekä tulosten omistus- ja käyttöoikeuksista. Opinnäytetyön teos laaditaan oman ammattikorkeakoulun ohjeistusta noudattaen ja sen tekijänoikeudet syntyvät opinnäytetyön tekijöille. Opinnäytetyön tekijöiden tulee myös ymmärtää eettisen ennakoarvioinnin merkitys sekä varmistaa sen tarpeellisuus. (Arene ry 2024, 13–14.) Opinnäytetyösopimus allekirjoitettiin kaikkien osapuolten, eli työn tekijöiden, ohjaajan sekä Savonia-ammattikorkeakoulun koulutuspäällikön toimesta. Työlle ei ollut tarpeen hakea erillistä tutkimuslupaa eikä suorittaa eettistä ennakoarviointia, sillä tutkimus ei kohdistunut ihmisiin eikä sisältänyt aineiston keruuta. Lisäksi tuotos ei sisältänyt luottamuksellista tai salassa pidettävää tietoa, joten sen julkaisemiselle ei ollut tarvetta asettaa rajoituksia.

Tutkimustulosten ja -aineistojen dokumentoinnin tulee tapahtua hyvän tieteellisen käytännön periaatteiden mukaisesti, eikä saatuja tuloksia tule muunnella tai esittää harhaanjohtavassa muodossa. Tulosten vääristely on toimintaa, jossa tutkimustuloksia muutetaan tai valikoidaan ilman tieteellisesti hyväksyttävää perustetta. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023, 17–18.) Työhjeen laatiminen perustui suorittamiimme testiajoihin, joiden tulokset raportoimme luotettavasti ja rehellisesti. Säilyttääksemme prosessin kulun ja tulosten tulkinnan avoimina ja jäljitettävinä, dokumentoimme kaikki ajojen aikana tapahtuneet virheet ja poikkeamat.

Arvioimme ajoja yhdessä tilaajan kanssa ja vertasimme niistä saatuja tuloksia odotettuihin tuloksiin varmistaaksemme niiden paikkansapitävyyden. Odotetut tulokset olivat tarkistettavissa testattavan kitin manuaalista (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022, 15–16). Lisäksi varmistimme ajojen oikeellisuuden luotettavaksi todetulla referenssimenetelmällä. Laadimme suoritetuista testauksista johdonmukaisen raportin, johon lisäsimme kuvia tehdyistä ajoista parantaaksemme tutkimuksen luotettavuutta ja avoimuutta sekä havainnollistaaksemme prosessin kulkua ja tuloksia. Tiedostimme, että tulosten oikeellisuus vaikuttaa suoraan laitteen ja kitin hyödyntämiseen opetuskäytössä, ja siksi pyrimme varmistamaan, että kaikki raportoidut havainnot ovat tarkkoja ja perustuvat todelliseen testausdataan. Lisäksi huolehdimme laboratoriotyöskentelyssä työturvallisuuden toteutumisesta esimerkiksi noudattamalla PCR-menetelmän vaatimaa aseptiikkaa sekä laitteiden käyttöön ja työskentelyyn liittyvien ohjeistusten noudattamisesta, mitkä olivat lähtökohtana testiajojen onnistumiselle.

Eettiset näkökulmat kohdistuvat kehittämistoiminnan aikana opinnäytetyöntekijöiden toimintatapoihin, päätöksentekoon ja yhteistyöhön työelämäkumppanien, ohjaajien sekä muiden prosessiin osallistuvien henkilöiden kanssa. Menetelmiin liittyvät eettiset näkökulmat korostuvat muun muassa kohderyhmien osallistamisessa, heidän anonymiteettinsa turvaamisessa sekä osallistumisen vapaaehtoisuuden varmistamisessa. Lisäksi keskeisessä roolissa ovat henkilöiden kohtelu ja huomioiminen kehittämistoiminnan aikana sekä osallistavien menetelmien asianmukainen käyttö. (Turunen ym. 2025, 35.) Toteutimme kohderyhmän osallistamisen tuotoksen testaamiseen ja arvioimiseen anonyymin Webropol-kyselyn avulla, johon vastaaminen oli täysin vapaaehtoista. Anonymiteetti ja vapaaehtoisuus loivat osallistujille luottamuksellisen ilmapiirin, mikä mahdollisti mielipiteiden avoimen ilmaisun myös negatiivisen palautteen muodossa. Se, että kohderyhmä saattoi vastata kyselyyn ilman ulkopuolelta tulevia odotuksia, lisäsi arvioinnin luotettavuutta ja tarjosi meille arvokasta sekä realistista tietoa työohjeen kehittämistarpeista.

Opinnäytetyön luotettavuuden, laadun ja tulosten hyödynnettävyyden varmistamiseksi on tärkeää käyttää lähdekritiikkiä tarkastellessa lähteitä ja aineistoja. Lähdekriittisessä arvioinnissa otetaan huomioon työn julkaisuajankohta, tiedon ajantasaisuus, kuka tekstin on tuottanut ja mihin tarkoitukseen. Laadukas sisältö on usein tunnistettavissa siitä, että se on vertaisarvioitu eli teksti on arvioitu vähintään kahden ulkopuolisen erityisasiantuntijan toimesta. (Vilka 2021.) Tiedonhankinta opinnäytetyöprosessin aikana perustui alan kirjallisuuteen, ajantasaisiin verkkojulkaisuihin sekä tieteellisiin, vertaisarvioituihin artikkeleihin. Haimme lähteitä luotettavista tietokannoista, kuten PubMedistä ja Science Directistä, joissa on saatavilla kansallisesti ja kansainvälisesti tunnustettua tutkimustietoa. Käyttämällä luotettavia, tieteellisiä lähteitä pystyimme vahvistamaan työn uskottavuutta ja laadukkuutta sekä varmistamaan, että johtopäätöksemme perustuvat tutkittuun tietoon. Lähteiden valinnassa painotimme julkaisuajankohtaa ja -paikkaa, kirjoittajien asiantuntijuutta sekä lähteen tieteellistä taustaa ja asiasisältöä. Pyrimme pääsääntöisesti käyttämään mahdollisimman tuoreita lähteitä, jotta työn teoreettinen tausta perustuisi ajantasaiseen tutkimusnäyttöön. Joissakin tapauksissa hyödynsimme myös vanhempia, yli viisitoista vuotta vanhoja lähteitä, kun arvioimme niiden sisältämän tiedon olevan edelleen ajankohtaista ja paikkansapitävää. Esimerkiksi PCR:n periaate on lähtöisin jo vuodelta 1971 (Rolando ym. 2024), jonka aikana sen peruseriaate ei ole muuttunut ja näin myös vanhempi tieto on ajantasaista.

Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu arvostuksen osoittaminen muiden tekemiä töitä ja saavutuksia kohtaan, mikä tarkoittaa niihin viittaamista asianmukaisella tavalla. Plagiointi on toisen tuottaman tekstin, ajatusten tai tutkimustulosten esittämistä omanaan ilman lupaa tai ilman asianmukaista viittoa alkuperäiseen lähteeseen. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023, 14–17.) Käytimme kehittämistyömme raportin tarkistamiseen Turnitin-plagioinnintunnistusohjelmaa, joka arvioi tekstimme samankaltaisuutta alkuperäisiin lähteisiin sekä muuhun internetistä löytyvään materiaaliin nähden. Teimme tarkistuksia säännöllisesti raportin kirjoittamisen aikana sekä ennen työn lähettämistä lopparviointiin. Pyrimme ilmaisemaan asiat raportissa hyödyntämällä useita eri lähteitä samaan aiheeseen liittyen tiedon luotettavuuden varmistamiseksi ja muodostamalla niistä oman synteesin osoittaaksemme aiheeseen perehtyneisyyttä ja käsitellyn aineiston sisäistämistä. Hyödynsimme työssämme monipuolisesti useita eri lähteitä sekä kuvia avoimen sisällön mediakirjastosta Wikimedia Commonsista. Tarkistimme kuvien lisenssit huolellisesti varmistaaksemme, että niiden muokkaaminen oli sallittua, sillä kuvien tekstit tuli voida kääntää suomeksi teorian ymmärtämisen ja havainnollistamisen tukemiseksi. Merkitsimme kaikki käyttämämme lähteet lähdeluetteloon ja laadimme tekstiin lähdeviitteet Savonia-ammattikorkeakoulun vuoden 2024 raportointiohjeen mukaisesti.

Hyödynsimme työssämme OpenAI:n ChatGPT-tekoälyä kitin manuaalin tietosisältöön perustuvien kuvien luomisessa, sillä selkeitä ja havainnollistavia kuvia RT-PCR:stä ja sulamiskäyräanalyysistä ei ollut ilmaisissa kuvapankeissa saatavilla. Havainnollistavilla kuvilla pystyimme parantamaan raportin ymmärrettävyyttä myös lukijan näkökulmasta. Lisäksi käytimme tekoälyä kriittisesti vähäisissä määrin kieliasun tarkistamiseen, mutta työn sisällöllinen ajattelu ja johtopäätökset ovat tekijöiden omia.

7.3 Ammatillinen kasvu

Bioanalytikkokoulutuksen osaamistavoitteisiin kuuluvat oman alan keskeisten teorioiden, menetelmien ja periaatteiden hallinta sekä niiden soveltaminen kliinisessä laboratoriotyössä osana moniammatillista yhteistyötä. Tärkeässä roolissa ovat tiedon kriittinen arviointi, ongelmanratkaisukyky ja vastuullinen toiminta erilaisissa asiantuntijatehtävissä. Valmistuva bioanalytikko tunnistaa omat vahvuutensa ja kehittämiskohteensa, toimii eettisesti ja yhteisöllisesti sekä omaa valmiudet jatkuvaan oppimiseen ja alan kehittämiseen tutkimus- ja kehittämismenetelmiä hyödyntäen. (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.d.) Opinnäytetyön eli työelämäläheisesti toteutettavan oppimisprosessin keskeisiin tavoitteisiin kuuluvat työelämän kehittäminen sekä opiskelijan oman asiantuntijuuden syventäminen valitussa aiheessa. Prosessiin osallistuvien asiantuntijoiden tehtävänä on toimia opiskelijan tukena sekä myös ohjata ja arvioida toimintaa. (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.c.)

Bioanalytikon osaamisprofiilin muodostavat sekä yleiset että tutkinto-ohjelmakohtaiset kompetenssit. Yleisiin kompetensseihin kuuluvat oppimaan oppiminen, työelämässä toimiminen, eettisyys, kestävä kehitys, kansainvälisyys ja monikulttuurisuus sekä ennakoiva kehittäminen. Tutkinto-ohjelmakohtaisiin kompetensseihin puolestaan sisältyvät luonnontieteellinen ja lääketieteellinen osaaminen, laboratoriotutkimusprosessin preanalyttiseen-, analyttiseen- ja postanalyttiseen liittyvä osaaminen, asiakaspalvelu- ja ohjausosaaminen, laatu-, turvallisuus- ja riskien hallintaosaaminen, laboratoriotyön ammattieettinen osaaminen ja ammatillisuus sekä tutkimus-, kehittämis- ja johtamisosaaminen. (Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.d.)

Tulevaisuuden työelämässä kehittämistyöhön liittyvä osaaminen muodostuu yhtä tärkeämmäksi osaksi ammatillista asiantuntijuutta (Salonen ym. 2017, 71). Opinnäytetyöprosessi RT-PCR:n ja sulamiskäyräanalyysin parissa tarjosi meille mahdollisuuden soveltaa ja syventää bioanalytiikon osaamistamme käytännössä. Työn aikana pääsimme kehittämään menetelmäosaamistamme testiajojen suunnittelussa, optimoinnissa ja tulosten tulkinnassa. Aiheen parissa työskentely myös vahvisti ammatillista ajatteluaamme ja laboratoriotyöskentelytaitojamme. Lisäksi se kehitti ongelmanratkaisukykyämme ja antoi meille valmiuksia toimia tutkimuksellisesti. Prosessin aikana kehityimme oman työomme kriittisessä arvioinnissa sekä opimme toimimaan yhteistyössä yhteisten päämäärien saavuttamiseksi. Ammatillisen osaamisen jatkuva ylläpitäminen ja kehittäminen ovat jokaisen bioanalytiikon velvollisuuksia ja samalla keskeinen osa asiantuntijuuden vahvistamista (Suomen Bioanalytiikkoliitto ry. 2017, 2–3).

Sopivan aiheen löytäminen kehittämistyöllemme oli aluksi haastavaa, sillä yhteisesti sovittuina kriitteereinä olivat aiheen liittyminen molekyylibiologiaan, kaikkien tekijöiden mielenkiinto sekä työn toteuttaminen tutkimuksellisella otteella. Halusimme työssä päästä soveltamaan teoreettista osaamistamme käytännön laboratoriotyöskentelyssä. Prosessin alkuvaiheessa löysimme kiinnostavan aiheen valmiiden aihe-ehdotusten joukosta, mutta lopullinen aiheemme tarkentui vasta tilaajan kanssa käydyn keskustelun myötä. CSI-laajennuskitin yhteensopivuuden testaaminen koulun RT-PCR-laitteelle tarjosi meille mahdollisuuden harjoitella menetelmiä, joita olimme aiemmin käsitelleet vain teoriassa. Aihe-ehdotuksen laatiminen työlle sujui ongelmitta työn tilaajan kanssa käydyn keskustelun sekä laitteen ja kitin manuaalien pohjalta. Aiemmasta pohjatiedostamme RT-PCR:stä ja sulamiskäyräanalyysistä oli hyötyä, sillä se auttoi meitä tutkimuskysymysten suunnittelussa ja rajaamisessa.

Työsuunnitelman laatiminen eteni pääosin sujuvasti, mutta kohtasimme sen aikana myös jonkin verran haasteita. Yhdeksi keskeisimmäksi ongelmaksi osoittautui luotettavan ja sisällöllisesti laadukkaan tiedon löytäminen sulamiskäyräanalyysistä, josta ei ollut saatavilla lainkaan suomenkielisiä, opinnäytetyöhön soveltuvia lähteitä. Aiheeseen perehtyminen kitin manuaalin avulla kuitenkin auttoi meitä ymmärtämään menetelmän periaatteen sekä tulosten tulkintamisen, ja sitä kautta opimme käyttämään oikeita hakusanoja tietoa etsiessämme.

RT-PCR:stä ja erityisesti perinteisestä PCR:stä tietoa oli sen sijaan huomattavasti laajemmin saatavilla. Tiedonhaku kehitti merkittävästi hakustrategiaamme ja lähdekriittisyyttämme, sillä jouduimme arvioimaan lähteiden tieteellistä luotettavuutta ja soveltuvuutta työhömmä. Suunnitteluvaiheessa työhön sisältyi vielä useita epävarmuustekijöitä, jotka liittyivät laitteen ohjelmoinnin onnistumiseen sekä tarvittavien testiajojen määrään. Näiden seikkojen vuoksi työskentelyyn kuluva aika oli haastavaa arvioida etukäteen. Työsuunnitelman laatiminen auttoi meitä kuitenkin jäsentämään kokonaisuutta ja hahmottamaan työn eri vaiheet sekä laatimaan työlle alustavan aikataulun käytettävissä olevan ajan puitteissa.

Työn toteutuksen aikana kohtasimme useita haasteita, jotka edellyttivät ongelmanratkaisukykyä ja menetelmäosaamisen soveltamista käytännössä. Ensimmäiset haasteet ilmenivät jo ennen testiajojen aloittamista, kun ajoprotokollan ohjelmointi laitteelle ei sulamiskäyräanalyysin osalta onnistunut kitin mukaisilla asetuksilla. Ratkaisuna päädyimme käyttämään analyysissä laitteen oletusasetuksia, joiden totesimme myöhemmin soveltuvan työhön erinomaisesti. Merkittävin haaste kuitenkin ilmeni

ensimmäisen testiajon aikana, kun RT-PCR-ajon amplifikaatiokäyriä ei muodostunut lainkaan. Ongelman selvittäminen edellytti perusteellista perehtymistä sekä kitin että laitteen manuaaleihin, ja sen seurauksena havaitsimme, että mittauspisteet puuttuivat kaksivaiheisesta PCR:stä kokonaan.

Uudelleenohjelmoinnin jälkeen käyrät muodostuivat seuraavissa ajoissa normaalisti. Samalla kohtasimme kuitenkin uuden ongelman, sillä sulamiskäyräanalyysi ei edennyt toisessa testiajossa loppuun asti. Vasta kolmannen ajon jälkeen tuloksia ja omaa työskentelyä tarkastellessamme havaitsimme, että mahdollinen virhe johtui PCR-striippien puutteellisesta painamisesta laitteen näytelevyyn. Lisäksi analysointiohjelman käytössä esiintyi haasteita, sillä sulamispisteiden näkyviin saaminen vaati jälleen tarkempaa perehtymistä laitteen manuaaliin. Haasteita aiheutti myös se, että alun epäonnistuneet ajot saivat meidät epäilemään, ettei analysointiohjelmalla ole mahdollista muokata kuvien esitystapaa siten, että amplifikaatiokäyrät saataisiin vastaamaan paremmin kitin manuaalissa esitettyjä tuloksia. Lopulta kuitenkin löysimme ohjelmasta oikean esitystavan, jolla saimme onnistuneista ajoista kitin manuaalia vastaavia kuvia.

Testiajojen suorittaminen ja niiden yhteydessä ilmenneet haasteet kehittivät kykyämme työskennellä vastuullisesti ja itsenäisesti sekä arvioida ja korjata toimintatapojamme ohjeiden mukaisesti.

Opimme soveltamaan kitin manuaalin ohjeita käytännössä ja noudattamaan yhä paremmin tarkkuutta ja huolellisuutta laboratoriotyöskentelyssä. Kaikki testauksissa esiintyneet ongelmat ratkaisimme itsenäisesti, mutta ajatteluprosessin aikana saimme työn tilaajalta tukea ja varmistusta siitä, että etenimme päätelmiemme kanssa oikeaan suuntaan tehden perusteltuja johtopäätöksiä. Tämä vahvisti ammatillista päätöksenteko- ja ratkaisukykyämme sekä menetelmäosaamistamme.

Raportin teoriaosuuden laatiminen loi vahvan pohjan ymmärtää sulamiskäyräanalyysin suorittamista RT-PCR-laitteella ja sen avulla hahmotimme niiden toimintaperiaatteet ennen käytännön toteutusta. Teoriaosassa käsitelimme työn toteutuksen kannalta tärkeitä aiheita, jotka tukivat menetelmän ymmärtämistä, testiajojen suunnittelua, suorittamista sekä tulosten analysointia. Raportin menetelmäosa näin ollen pohjautui vahvasti teoriaosuuteen, mikä mahdollisti työvaiheiden ja tulosten raportoinnin johdonmukaisesti ja perustellusti. Kehittämistyön tuotoksena syntyneessä työohjeessa teoria ja käytäntö yhdistyivät, sillä käytännön työskentely perustui sekä kitin manuaaliin että omakohtaiseen testaukseen. Näin teoria- ja menetelmäosa tukevat toisiaan ja varmistavat, että työn toteutus oli sekä perusteltua että systemaattista.

Opinnäytetyön toteuttaminen ryhmätöinä sujui kokonaisuudessaan erinomaisesti. Ryhmän kaikilla jäsenillä on ollut koko työskentelyn ajan korkea tahtotila laadukkaan materiaalin tuottamiseen. Selkeä suunnitelmallisuus ja avoin kommunikaatio edesauttoivat työn sujuvuutta, ja vastuiden jakamisessa hyödynsimme jokaisen ryhmän jäsenen vahvuuksia ja kiinnostusta eri aiheisiin. Kaikki ryhmän jäsenet osallistuivat työhön aktiivisesti, ja koko prosessin ajan vallitseva keskinäinen arvostus loi ilmapiirin, jossa uusien ideoiden ja näkökulmien jakaminen oli luontevaa. Yhteisen tavoitteen merkitys korostui erityisesti siinä, että pysyimme suunnitellussa aikataulussa koko prosessin ajan.

Raporttiosuuden kirjoittamisen aikana tiivistimme aikataulua, jotta viimeistelyyn jäisi riittävästi aikaa. Pidimme säännöllisesti kokouksia Teamisissa varmistaaksemme, että kaikki ryhmän jäsenet suorittavat omista vastuualueistaan ja pyysimme toisiltamme apua matalalla kynnyksellä. Loppuraportin laatiminen osoittautui erityisen haastavaksi toteutusosion osalta, sillä opinnäytetyöstämme oli alku-

peräisestä suunnitelmasta poiketen muodostunut tutkimuksellinen kehittämistyö. Testiajojen etene-
misen sekä työohjeen laatimisen vaiheiden kuvaaminen ja yhdistäminen samaan osioon vaati tark-
kaa jäsentelyä ja huolellista pohdintaa. Työohjeen laatiminen ei sisällynyt alkuperäiseen suunnitel-
maamme, mikä toi lisähaastetta sekä edellytti meiltä joustavuutta ja kykyä sopeutua muutoksiin. Ko-
konaisuudessaan prosessi vahvisti kykyämme sovittaa yhteen tutkimuksellinen ote ja käytännön tuo-
toksen laatiminen sekä vaiheiden dokumentointi, mikä kehitti ongelmanratkaisukykyämme kirjoitta-
misen aikana. Samalla tiimityöskentely osoittautui erittäin antoisaksi ja vahvisti kokemustamme siitä,
kuinka yhteistyö, selkeä vastuunjako ja toisten työpanoksen arvostaminen tukevat laadukkaan ja
onnistuneen lopputuloksen saavuttamisessa. Prosessin aikana pyysimme opinnäytetyön ohjaajalta
säännöllisesti palautetta loppuraportistamme, mikä tuki työn sujuvaa etenemistä, mahdollisti sen
jatkuvan arvioinnin ja varmisti asetettujen tavoitteiden saavuttamisen.

Opinnäytetyön toteuttaminen on ennen kaikkea opiskelijan oma oppimisprosessi, jonka tarkoituk-
sena on ammatillisen osaamisen syventäminen, asiantuntijuuden kehittäminen sekä työelämätaito-
jen vahvistaminen (Arene ry 2024, 17). Opinnäytetyöprosessi tarjosi meille monipuolisia valmiuksia
kliinisessä laboratoriossa työskentelyyn. Työ perehdytti meidät RT-PCR:ään ja sulamiskäyräanalyy-
siin, joita hyödynnetään laajasti eri erikoisaloilla, ja samalla se loi vankan pohjan myös muiden PCR-
sovellusten käyttöön. Prosessi kehitti taitojamme analysoida ja tulkita tuloksia kriittisesti sekä esittää
havaintomme selkeästi ja perustellen. Työohjeen laatiminen opetti meitä jäsentämään työvaiheet
pedagogisesti ja tuottamaan oppimista tukevaa materiaalia, mikä on hyödyllistä myös työelämässä.
Englanninkielisen kirjallisuuden ja kitin manuaalin käyttö vahvisti valmiuksiamme toimia kansainväli-
sessä työympäristössä. Lisäksi opinnäytetyön tekeminen paransi tiimityöskentelytaitojamme, mikä
lisäsi työelämävalmiuksiamme. Kokonaisuudessaan opinnäytetyöprosessi kehitti sekä menetelmä-
osaamistamme että kriittistä ajatteluamme valmistuen meitä itsenäiseen ja analyttiseen työskente-
lyyn laboratoriotutkimusten parissa.

7.4 Kehittämistyön hyödynnettävyys ja kehittämisideat

Kehittämistyön tavoitteena oli pidentää nykyisen laitekannan käyttöikä, ja tähän kehittämistyön tu-
loksella päästiin. Tilaajan laite alkaa kuitenkin olla jo aika vanha, joten uuden laitteen hankinta on
jossain vaiheessa välttämätöntä. Kitin suorittamiseen on kuitenkin testattu työohjeessa olevaa ajo-
protokollaa, joka sellaisenaan tai pienillä muutoksilla mahdollisesti toimii myös uudella laitteella lu-
tettavasti. Näin työtä voi kehittää myös tulevaisuudessa opiskelijoiden käyttöön, vaikka laite tarvitsisi
vaihtaa uuteen. Mikäli testatun testikitin vaihto toiseen tulee aiheelliseksi tai sitä päivitetään, voi työ-
ohjetta muokata tarpeen mukaan sopivammaksi. Työohje on rakennettu niin, että se etenee loogi-
sessa työskentelyjärjestyksessä ja sisältää kaikki tarvittavat työvaiheet tehtävälle työlle. Tästä syystä
työohje on hyvin muokattavissa myös tulevaisuudessa erilaisille RT-PCR:n sovelluksille.

Sulamiskäyräanalyysin toimivuus tilaajan laitteessa saatiin varmistettua tämän kehittämistyön
myötä. Sulamiskäyräanalyysi on erittäin käytetty menetelmä monella osa-alueella mikrobiologiassa
(Tong & Giffard 2012), joten tulevaisuudessa sen harjoittelu voisi olla tarpeellista myös mikrobiolo-
gian taitopajoissa jollakin mikrobiologisella sovelluksella. Tämä yhdistäisi eri erikoisalojen tietoa ja
taitoja opiskelun aikana sekä lisäisi valmiuksia työelämään. Esimerkiksi eri bakteerilajien erottami-
nen toisistaan sulamiskäyräanalyysiä hyödyntäen voisi toimia luontevana jatkona mikrobiologian
syventävällä kurssilla tehtävälle veriviljelyprosessille. Harjoitustyö voisi sisältää sulamiskäyräanalyy-

sin lisäksi reaaliaikaisen multiplex-PCR-menetelmän, jossa samaan reaktioon on lisätty eri bakteereille spesifisiä alukkeita. Tämä sovellus toimisi siis monin tavoin samoin kuin teoriaosassa esitelty mikrobiologian laboratoriossa käytössä oleva FilmArray®.

Kehittämistyön tuotos on sellaisenaan hyödynnettävissä molekyylibiologian taitopajoissa harjoitus-työnä. Työtä voisi kuitenkin jatkokehittää digitaaliseen muotoon, esimerkiksi interaktiiviseksi opetusmateriaaliksi, joka tukisi RT-PCR:n ja sulamiskäyräanalyysin opiskelua jo ennen käytännön harjoittelua. Tällainen materiaali voisi auttaa opiskelijoita ymmärtämään menetelmien periaatteita syvällisemmin. Opetusmateriaalissa voisi havainnollistaa RT-PCR:n ja sulamiskäyräanalyysin eri vaiheet kuvien tai animaatioiden avulla sekä kuvata yksityiskohtaisesti reaktioiden sisällöt verraten niitä ajossa syntyviin amplifikaatiokäyriin. Opetusmateriaaliin olisi helppo sisällyttää myös eri DNA-pitoisuuksien vaikutus Ct-arvoihin sekä selitys aluke-dimeerien vaikutuksesta negatiiviseen kontrolliin.

Työohjeen pohjalta voisi kehittää myös taitopajoihin valmistavan opetusvideon. Video tukisi oppimista laboratorioharjoituksissa, sillä sen avulla opiskelijat voisivat tutustua työvaiheisiin ja laitteistoon etukäteen, jolloin oppimiskapasiteettia jäisi enemmän itse reaktioiden ymmärtämiseen. Videolla voisi esittää työvälitteet ja työn suorittamiseen käytettävät vaiheet yksitellen, ja opiskelija voisi hyödyntää videota sekä ennakoivaltumistautumisessa että työn suorittamisen tukena taitopajatunneilla. Videoon voitaisiin liittää myös opettajalle laatimamme opetusvideo ajon tulosten analysoinnista, jonka päätimme jättää pois opiskelijoiden työohjeesta. Näin video esittäisi koko prosessin alusta tulosten valmistamiseen asti, vaikka opiskelijat eivät itse analysointivaihetta suorittaisikaan.

LÄHTEET

Työssä on käytetty seuraavasti tekoälyä:

ChatGPT 2025. OpenAI. GPT-5. Käytetty kuvien luomiseen ja kielenmuotoiluun, lokakuu 2025.
<https://chatgpt.com/>

Addgene n.d. How to Design a Primer. Verkkajulkaisu. <https://www.addgene.org/protocols/primer-design/>. Viitattu 11.11.2025.

Akram, F., Shah, F., Ibrar, R., Fatima, T., Haq, I., Naseem, W., Gul, M., Tehreem, L. & Haider, G. 2023. Bacterial thermophilic DNA polymerases: A focus on prominent biotechnological applications. *Analytical Biochemistry* 671, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115150>. Viitattu 10.11.2025.

Alberts, B., Heald, R., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2022. *Molecular Biology of the Cell*. 7. painos. New York: W. W. Norton & Company.

Aoki, A., Adachi, H., Mori, Y., Ito, M., Sato, K., Okuda, K., Sakakibara, T., Okamoto, Y. & Jinno, H. 2022. Discrimination of SARS-CoV-2 Omicron Sublineages BA.1 and BA.2 Using a High-Resolution Melting-Based Assay: a Pilot Study. *Microbiology Spectrum* 10 (4).
<https://doi.org/10.1128/spectrum.01367-22>. Viitattu 14.10.2025.

Arene ry 2024. Ammattikorkeakoulujen opinnäytetöiden eettiset suositukset. Pdf-tiedosto. Päivitetty 18.2.2025. https://arene.fi/wp-content/uploads/Raportit/2025/AMMATTIKORKEAKOULUJEN%20OPINN%20YTET%20C3%96I%20DEN%20EETTISET%20SUOSITUKSET%202025.pdf?_t=1739803988. Viitattu 18.10.2025.

Artika, I.M., Dewi, Y.P., Nainggolan, I.M., Siregar, J.E. & Antonjaya, U. 2022. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes* 13 (12). <https://doi.org/10.3390/genes13122387>. Viitattu 27.9.2025.

Bates, S. A. n.d. Deoxyribonucleic acid (DNA). Verkkajulkaisu. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Deoxyribonucleic-Acid-DNA>. Viitattu 27.9.2025.

Bermingham, N. & Luettich, K. 2003. Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology* 9 (3), 159–164. [https://doi.org/10.1016/S0968-6053\(02\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0968-6053(02)00102-3). Viitattu 2.9.2025.

Bhagavan, N. V. 2002. *Medical Biochemistry*. San Diego, California: Harcourt / Academy Press.

Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006. Real-Time PCR Applications Guide. Pdf-tiedosto. Julkaistu 6.8.2006. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf. Viitattu 14.11.2025.

Bio-Rad Laboratories, Inc. 2022. Bio-Rad Explorer Crime Scene Investigator PCR Basics Kit: A Real-Time PCR Extension. Pakkausinsertti. Julkaistu 24.6.2022.

Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.a. Biotechnology Explorer. Crime Scene Investigator PCR Basics Kit. Pakkausinsertti.

Bio-Rad Laboratories, Inc. n.d.b. What is High Resolution Melting (HRM)? Verkkajulkaisu. <https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/what-high-resolution-melting-hrm?ID=LUSOIH97Q>. Viitattu 26.9.2025.

Brisson, M., Tan, L., Park, R. & Hamby, K. n.d. Identification of Nonspecific Products Using Melt-Curve Analysis on the iCycler iQ Detection System. Pdf-tiedosto. Bio-Rad Laboratories, Inc. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2684.pdf. Viitattu 13.10.2025.

Brody, L. n.d. DNA replication. Verkkajulkaisu. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/DNA-Replication>. Viitattu 27.9.2025.

- Budhbaware, T., Rathored, J. & Shende, S. 2024. Molecular methods in cancer diagnostics: a short review. *Annals of Medicine* 56 (1). <https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2353893>. Viitattu 14.10.2025.
- Bustin, S. A., Zaccara, S. & Nolan, T. 2019. Principles of the Real-time Polymerase Chain Reaction. Teoksessa Behlke, M. A., Berghof-Jäger, K. & Brown, T. (toim.) *Polymerase Chain Reaction: Theory and Technology*. E-kirja. 19–41. Norfolk, UK: Caister Academic Press. Viitattu 22.05.2025.
- Campbell, M. K. & Farrell, S. O. 2009. *Biochemistry*. E-kirja. 6. painos. Belmont, CA: Thomson Higher Education. <https://alraziuni.edu.ye/uploads/pdf/Biochemistry-Campbell-Sixth-Edition.pdf>. Viitattu 5.5.2025.
- Caulton, S. 2013. Solusykli. Kuva mukailten: Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell_cycle_simple.png. Viitattu 7.10.2025.
- Chen, D., Wang, Y-Y., Chuai, Z-R., Huang, J-F., Wang, Y-X., Liu, K., Zhang, L-Q., Yang, Z., Shi, D-C., Liu, Q., Huang, Q. & Fu, W-L. 2014. High-Resolution Melting Analysis for accurate detection of BRAF mutations: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* 4. <https://doi.org/10.1038/srep04168>. Viitattu 14.10.2025.
- Ciotti, M., Nicolai, E. & Pieri, M. 2024. Development and optimization of diagnostic assays for infectious diseases. *LabMed Discovery* 1 (2). <https://doi.org/10.1016/j.lmd.2024.100032>. Viitattu 6.10.2025.
- Davenport, L., Devesse, L., Court, D. S. & Ballard, D. 2023. Forensic identity SNPs: Characterisation of flanking region variation using massively parallel sequencing. *Forensic Science International: Genetics* 64. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102847>. Viitattu 19.10.2025.
- Do, H., Krypuy, M., Mitchell, P. L., Fox, S. B. & Dobrovic, A. 2008. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* 8 (142). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-142>. Viitattu 14.10.2025.
- Elo, S., Kinnunen, S., Rasa, M., Saarnio, R. & Tapio, T. 2025. Eettisiä lähtökohtia ja näkökulmia opinnäytetyön prosessiin ja ohjaukseen. Teoksessa Turunen, E., Pekonen, E & Elo, S. (toim.) *Opinnäytetyön menestystarina. Opinnäytetyöopas sosiaali- ja terveysalan opiskelijoille ja ohjaajille. Savonia-ammattikorkeakoulun julkaisusarja 1/2025*. Kuopio: Savonia-ammattikorkeakoulu. 15–23. <https://urn.fi/URN:NBN:fi-fe2025021311820>. Viitattu 15.10.2025.
- Enzoklop 2014. Polymeraasiketjureaktio. Kuva mukailten: Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg. Viitattu 27.9.2025.
- Eurachem 2025. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 3. painos. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_3rd_ed_V1_EN.pdf. Viitattu 13.10.2025.
- Feng, L. & Lou, J. 2018. DNA Methylation Analysis. Verkkojulkaisu. Julkaistu 14.12.2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8916-4_12. Viitattu 27.10.2025.
- Garritano, S., Gemignani, F., Voegelé, C., Nguyen-Dumont, T., Calvez-Kelm, F. L., Silva, D. D., Lesueur, F., Landi, S. & Tavtigian, S. V. 2009. Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. *BMC Genetics* 10 (5). <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-5>. Viitattu 26.9.2025.
- Ghorbani, J., Hashemi, F. B., Jabalameli, F., Emaneini, M. & Beigverdi, R. 2022. Multiplex detection of five common respiratory pathogens from bronchoalveolar lavages using high resolution melting curve analysis. *BMC Microbiology* 22 (141). <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02558-2>. Viitattu 14.10.2025.

- Jensen, C. B., Schneider, U. V., Madsen, T. V., Nielsen, X. C., Ma, C. M. G., Severinsen, J. K., Hoegh, A. M., Botnen, A. B., Trebbien, R. & Lisby, J. G. 2024. Evaluation of the analytical and clinical performance of two RT-PCR based point-of-care tests; Cepheid Xpert® Xpress CoV-2/Flu/RSV plus and SD BioSensor STANDARD™ M10 Flu/RSV/SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Virology* 172. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2024.105674>. Viitattu 6.10.2025.
- Kankaanpää, S. & Piehl, A. 2011. *Tekstintekijän käsikirja – Opas työssä kirjoittaville*. E-kirja. Helsinki: Suomen Yrityskirjat Oy.
- Kyrö, P. 2003. *Tutkimusprosessi valintojen polkuna. Yrittäjyyskasvatuksen julkaisusarja*. Hämeenlinna: Tampereen yliopisto, ammattikasvatuksen tutkimus- ja koulutuskeskus.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C-Y. & Kim, Y. H. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* 20 (62). <https://dx.doi.org/10.3791/3923>. Viitattu 27.10.2025.
- Leja, D. 2022. DNA:n emäsparit. Kuva mukaillen: Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_base-pair_diagram.jpg. Viitattu 27.9.2025.
- McDonald, C., Taylor, D. & Linacre, A. 2024. PCR in Forensic Science: A Critical Review. *Genes* 15 (4). <https://doi.org/10.3390/genes15040438>. Viitattu 6.10.2025.
- Mehta, B., Daniel, R. & McNevin, D. 2013. High resolution melting (HRM) of forensically informative SNPs. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 4 (1), 376–377. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.191>. Viitattu 19.10.2025.
- Nicklas, J. A. & Buel, E. 2003. Development of an Alu-based, real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. *Journal of Forensic Sciences* 48 (5). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14535658/>. Viitattu 15.5.2025.
- Nuutinen, S. 2025. Agaroosigeelielektroforeesi-ajon tulokset. Valokuva. 6.9.2025. Siilinjärvi: S. Nuutisen kokoelmat.
- Opetushallitus n.d. E-oppimateriaalin laatukriteerit. Verkojulkaisu. <https://www.oph.fi/fi/julkaisut/e-oppimateriaalin-laatukriteerit>. Viitattu 25.9.2025.
- Orpana, A. & Kiiski, K. 2025. Laboratoriodiagnostiset menetelmät. Teoksessa Aittomäki, K., Moilanen, J., Perola, M. & Pöyhönen, M. (toim.) *Lääketieteellinen genetiikka*. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 26.9.2025.
- Ortutay, C. & Ortutay, Z. 2017. *Molecular Data Analysis Using R*. E-kirja. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Viitattu 7.10.2025.
- Paavola, S., Iломäki, L. & Lakkala, M. 2012. Tiedon esittäminen verkko-oppimateriaalissa. Teoksessa Iломäki, L. (toim.) *Laatua E-oppimateriaaleihin*. E-oppimateriaalit opetuksessa ja oppimisessa. Helsinki: Opetushallitus. 144 https://www.oph.fi/sites/default/files/documents/144415_laatua_e-oppimateriaaleihin_2.pdf 415_laatua_e-oppimateriaaleihin_2.pdf. Viitattu 11.11.2025.
- Pryor, R. J. & Wittwer, C. T. 2006. *Real-Time Polymerase Chain Reaction and Melting Curve Analysis*. Teoksessa Lo, Y. M. D., Chiu, R. W. K. & Chan, K. C. A. (toim.) *Clinical Applications of PCR*. E-kirja. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. Viitattu 26.9.2025.
- Qiagen n.d. HRM versus Classical Melt Curve Analysis. Verkojulkaisu. HRM vs Classical melt curve a <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/technology-and-research/hrm-technology/hrm-vs-classical-melt-curve-analysis> nalysis. Viitattu 26.9.2025.
- Rodríguez-Lázaro, D. & Hernández, M. 2019. *Introduction to the Real-time Polymerase Chain Reaction*. Teoksessa Behlke, M. A., Berghof-Jäger, K. & Brown, T. (toim.) *Polymerase Chain Reaction: Theory and Technology*. E-kirja. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 1–18. Viitattu 22.05.2025.

- Rolando, J. C., Melkonian, A. V. & Walt, D. R. 2024. The Present and Future Landscapes of Molecular Diagnostics. *Annual Review of Analytical Chemistry* 17, 459–474. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061622-015112>. Viitattu 16.10.2025.
- Ruiz, M. 2007. DNA:n replikaatio. Kuva mukailen: Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_replication_en.svg#filelinks. Viitattu 27.9.2025.
- Salonen, K. 2013. Näkökulmia tutkimukselliseen ja toiminnalliseen opinnäytetyöhön. Opas opiskelijoille, opettajille ja TKI-henkilöstölle. Turun ammattikorkeakoulun puheenvuoroja 72. <https://urn.fi/URN:ISBN:978-952-216-373-8>. Turku: Turun ammattikorkeakoulu. Viitattu 4.10.2025.
- Salonen, K., Eloranta, S., Hautala, T. & Kinos, S. 2017. Kehittämistoiminta ja kehittämisen menetelmiä ammatillisessa korkeakoulutuksessa. Turun ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 108. Turku: Turun ammattikorkeakoulu. <https://urn.fi/URN:ISBN:978-952-216-649-4>. Viitattu 4.10.2025.
- Sanastokeskus ry 1994. Työohje. Verkkojulkaisu. TEPA-termipankki. Erikoisalojen sanastojen ja sanakirjojen kokoelma. <https://termipankki.fi/tepa/fi/haku/ty%C3%B6ohje>. Viitattu 20.9.2025.
- Savonia-ammattikorkeakoulu 2024. Savonian strategia 2025-2028. Vastuullisesti vaikuttavin Savonia. Pdf-tiedosto. Hyväksytty 13.2.2024. <https://www.savonia.fi/app/uploads/2024/08/Savonia-Strategia-2025-2028-FINAL.pdf>. Viitattu 4.11.2025.
- Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.a. TB23SP Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma. Molekyylibiologia (perusteet). Verkkojulkaisu. <https://opinto-opas.peppi.savonia.fi/10889/fi/10887/16755/928/0/60487>. Viitattu 5.10.2025.
- Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.b. TB23SP Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma. Molekyylibiologia (syventävä). Verkkojulkaisu. <https://opinto-opas.peppi.savonia.fi/10889/fi/10887/16755/928/0/60492>. Viitattu 5.10.2025.
- Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.c. TB23SP Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma. Opintojen rakenne. Pdf-tiedosto. <https://opinto-opas.peppi.savonia.fi/attachment/60300/2328>. Viitattu 17.10.2025.
- Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.d. TB23SP Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma. Osaamistavoitteet. Pdf-tiedosto. <https://opinto-opas.peppi.savonia.fi/attachment/60300/2771>. Viitattu 17.10.2025.
- Savonia-ammattikorkeakoulu n.d.e. TB23SP Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma. TB23SP opetus suunnitelma. Verkkojulkaisu. <https://opinto-opas.peppi.savonia.fi/10889/fi/10887/16755/928>. Viitattu 4.11.2025.
- Sen, S. K. n.d. Ribonucleic acid (RNA). National Human Genome Research Institute. Verkkojulkaisu. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Ribonucleic-Acid-RNA>. Viitattu 27.9.2025.
- Solunetti n.d. Solusykli. Verkkojulkaisu. https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/solusykli_1/. Viitattu 5.10.2025.
- Suomen Bioanalytikkoliitto ry 2017. Bioanalyytikon, laboratoriohitoajan eettiset ohjeet. Pdf-tiedosto. Julkaistu 26.8.2017. https://www.bioanalytikot.fi/app/uploads/2023/09/Eettiset-periaatteet_FI_print_2017.pdf. Viitattu 2.11.2025.
- Suomen Bioanalytikot ry 2024. Kliinisen laboratorion erikoisalut. Verkkojulkaisu. Päivitetty 14.3.2024. <https://www.bioanalytikot.fi/keita-olemme/opiskele-bioanalytikoksi/erikoisalut/>. Viitattu 24.9.2025.
- Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, P. 2010. Geenitekniikka. Turun ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 52. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2025. RSV. Verkkojulkaisu. Päivitetty 23.9.2025. <https://thl.fi/aiheet/infektioaudit-ja-rokotukset/audit-ja-torjunta/audit-ja-taudinaiheuttajat-a-o/rsv>. Viitattu 6.10.2025.

- Terveyskylä 2022. Genetiikan sanasto. Verkkojulkaisu. Tarkistettu 2.3.2022. <https://www.terveyskyla.fi/genetiikkajaharvinaiset/tietoa/harvinaissairauksista-ja-genetiikasta/genetiikan-sanasto>. Viitattu 3.11.2025.
- Thermo Fisher Scientific n.d.a. Amplification of the No Template Control (NTC). Verkkojulkaisu. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/amplification-no-template-control.html>. Viitattu 6.10.2025.
- Thermo Fisher Scientific n.d.b. Mutation Scanning. Verkkojulkaisu. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-applications/genetic-variation-analysis-using-real-time/high-resolution-melting-hrm/mutation-scanning.html>. Viitattu 27.10.2025.
- Thermo Fisher Scientific n.d.c. What is Genotyping? Verkkojulkaisu. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/genotyping-analysis-real-time-pcr-information/what-is-genotyping.html?>. Viitattu 27.10.2025.
- Tieteen termipankki 2025. DNA/deoksiribonukleiinihappo. Verkkojulkaisu. Päivitetty 2.12.2016. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Biotekniikka:DNA>. Viitattu 4.10.2025.
- Tong, S. Y. C. & Giffard, P. M. 2012. Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (11), 3418–3421. <https://doi.org/10.1128/JCM.01709-12>. Viitattu 25.9.2025.
- Turunen, E., Lamminpää, R., Sirviö, K. & Elo, S. 2025. Onnistunut opinnäytetyöprosessi. Teoksessa Turunen, E., Pekonen, E. & Elo, S. (toim.) *Opinnäytetyön menestystarina. Opinnäytetyöopas sosiaali- ja terveysalan opiskelijoille ja ohjaajille. Savonia-ammattikorkeakoulun julkaisusarja 1/2025*. Kuopio: Savonia-ammattikorkeakoulu. 7–14. <https://urn.fi/URN:NBN:fi-fe2025021311820>. Viitattu 15.10.2025.
- Turunen, E., Pekonen, E., Korhonen, U. & Tohmola, A. 2025. Kehittämistyö opinnäytetyönä. Teoksessa Turunen, E., Pekonen, E. & Elo, S. (toim.) *Opinnäytetyön menestystarina. Opinnäytetyöopas sosiaali- ja terveysalan opiskelijoille ja ohjaajille. Savonia-ammattikorkeakoulun julkaisusarja 1/2025*. Kuopio: Savonia-ammattikorkeakoulu. 29–36. <https://urn.fi/URN:NBN:fi-fe2025021311820>. Viitattu 15.10.2025.
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Pdf-tiedosto. Julkaistu 15.3.2023. https://tenk.fi/sites/default/files/2023-03/HTK-ohje_2023.pdf. Viitattu 4.5.2025.
- Vilkka, H. 2021. Näin onnistut opinnäytetyössä. Ratkaisut tutkimuksen umpikujiin. E-kirja. Jyväskylä: PS-kustannus. Viitattu 4.5.2025.
- Zhang, X., Yu, H., Yang, Q., Wang, Z., Xia, R., Chen, C., Qu, Y., Tan, R., Shi, Y., Xiang, P., Zhang, S. & Li, C. 2021. A Forensic Detection Method for Hallucinogenic Mushrooms via High-Resolution Melting (HRM) Analysis. *Genes* 12 (2). <https://doi.org/10.3390/genes12020199>. Viitattu 19.10.2025.

LIITE 1: TYÖOHJE OHJELMOINTIIN JA TESTIAJOIHIN

Protokollan ohjelmointi

Ohjelmoi lämpösykli (thermal cycler) seuraavalla nopealla PCR-protokollalla.

Reaktiivilavuus on **25 µl**.

Kannen lämpötilan tulisi olla **95–100 °C**.

- **Sykli 1:** 94 °C 2 minuuttia
DNA:n alustava denaturointi
- **Sykli 2:**
 - 94 °C 10 sekuntia (*Denaturointi*)
 - 52 °C 30 sekuntia (*Kiinnittyminen ja pidentäminen – kerää data*)

Toista **sykli 2 yhteensä 40 kertaa**.

Sykli 3: Sulamiskäyräanalyysi (Melt-curve analysis)

Ohjelmoi laite lämmittämään näytteet **55 °C:sta 95 °C:seen 0,5 °C:n välein** ja laita laite keräämään dataa (tai lukemaan näytteet) **10 sekunnin kuluttua kunkin lämpötilan nousuvaiheen jälkeen**. Vaihtoehtoisesti voit käyttää laitteen oletusasetuksia sulamiskäyräanalyysiin.

Tallenna protokolla laitteen kirjastoon.

Huomautus: Tämä on nopea PCR-protokolla, joka saattaa suosia pienemmän epäillyn kohde-DNA:n amplifioitumista tai aiheuttaa heikompaa amplifikaatiota verrattuna Laboratorio 1:een. Voit kuitenkin silti havaita kaikkien pienempien kaistojen (bands) amplifikaation tällä nopeammalla protokollalla. Halutessasi voit käyttää Laboratorio 1:n (sivu 10) protokollaa saadaksesi voimakkaamman amplifikaation kaikista alleeleista.

Työn suorittaminen

Putkien sulatus

1. Sulata DNA-näytteet ja alukkeet Crime Scene Investigator -kitistä sekä SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix jään päällä.

DNA:n laimennussarjojen valmistelu

2. Rikospaikan ja epäiltyjen DNA laimennetaan 100-, 10 000- ja 1 000 000-kertaisesti. Kukin opiskelijaryhmä valmistaa neljä 1,5 ml mikrosentrifugiputkea, jotka on merkitty DNA-templaatin nimellä (joko A, B, C, D tai CS) ja laimennusmerkinnällä.

Esimerkki DNA-näytteestä Epäilty A:

- Epäilty A #1: 1/100 laimennus
 - Epäilty A #2: 1/10 000 laimennus
 - Epäilty A #3: 1/1 000 000 laimennus
 - Epäilty A #4: ei templaattia (negatiivinen kontrolli)
3. Lisää 990 µl steriiliä tislattua vettä kuhunkin yllä mainituista putkista. Lisää 10 µl väkevää templaatti-DNA:ta putkeen, joka on merkitty #1. Sekoita putkea perusteellisesti vortexissa vähintään 10 sekuntia tai napauttamalla sitä vähintään 20 kertaa. Siirrä 10 µl laimennettua DNA:ta putkesta #1 putkeen #2. Sekoita perusteellisesti. Siirrä 10 µl laimennettua DNA:ta putkesta #2 putkeen #3. Sekoita perusteellisesti. Putkeen #4 ei lisätä templaatti-DNA:ta.

PCR-putkien valmistelu

4. Hanki kahdeksankuoppainen PCR-putkistriippi. Valmistat PCR-reaktiot duplikaatteina. Merkitse jokainen putkipari templaattinimellä ja laimennusmerkinnällä, ja varmista, että kirjoitat **vain putkien sivuihin**.

Esimerkiksi kahdeksanputkinen striippi ryhmälle, joka analysoi Epäilty A:n, merkittäisiin seuraavasti: A1; A1; A2; A2; A3; A3; A4; A4.

Varmista, että reaktiot valmistellaan täsmälleen sillä tavalla kuin ne on ohjelmoitu reaaliaikaiseen PCR-laitteeseen.

5. Lisää 12,5 µl templaatti-DNA:ta kustakin laimennusputkesta vastaaviin PCR-putkipareihin.

PCR-masterseoksen valmistelu

6. Merkitse uusi 1,5 ml mikrosentrifugiputki nimellä "MM".
7. Pipetoi 110 µl SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermixiä MM-putkeen.

8. Pipetoi 2,2 µl Crime Scene Investigator Kitin alukkeita (sininen) MM-putkeen. Sekoita perusteellisesti vortexissa 10 sekuntia tai napauttamalla putkea 20 kertaa. Spinnaa putken sisältö alas.

Lisää Master Mix PCR-putkiin

9. Lisää 12,5 µl master mixiä jokaiseen kahdeksaan PCR-reaktioputkeen käyttäen joka kerta puhdasta pipettikärkeä. Sekoita reaktio varovasti pipetoimalla hitaasti ylös ja alas useita kertoja ilman, että vedät pipettikärkeä pois putkesta. Muista, että tämä PCR havaitaan optisesti, joten **vältä kuplien muodostamista** reaktioseokseen.
10. Sulje putket optisilla tasakansilla. Napauta putkia varovasti pöytää vasten tai käytä mikrosentrifugia, jossa on sovitin, varmistaaksesi, että seos on putken pohjalla.

Suorita PCR-reaktiot

11. Suorita PCR-reaktiot reaaliaikaisella PCR-laitteella.
12. Tarkastele PCR-reaktioita reaaliajassa niiden edetessä sykliensä aikana.
13. Yhdistä reaaliaikainen PCR-laite ja tietokone projektoriin, jotta opiskelijat näkevät tulokset helpommin.
14. (Valinnainen) Kun reaktiot ovat valmiit, lisää 6 µl Orange G -näytteenajoväriä näytteisiin ja aja PCR-tuotteet 3 % agarosigeelillä Crime Scene Investigator Kit -oppaan ohjeiden mukaisesti.
Huomaa, että käyttämällä nopeaa kahden vaiheen sykliä vahvistuvat vain 200 ja 300 bp alleelit, eikä tämän vuoksi rikospaikan DNA:ta voida yhdistää epäiltyyn.
15. Analysoi tulokset.

Odotetut tulokset

Reaaliaikaiset PCR-reaktiot näkyvät käyrinä, jotka muistuttavat seuraavissa kaavioissa esitettyjä. 1/100 laimennettu DNA, joka on väkevintä, saa käyrän ilmestymään aikaisemmin, esimerkiksi noin syklillä 10. 1/10 000-kertaisesti laimennetut näytteet ilmestyvät myöhemmin, ehkä noin syklillä 20. Lopuksi 1/1 000 000-kertaisesti laimennetut näytteet ilmestyvät viimeisenä, syklin 25 jälkeen. Ilman mallia oleva kontrollinäyte sisältää PCR-alue-dimeerejä ja alkaa monistua noin syklillä 30 (tai ei mahdollisesti ollenkaan).

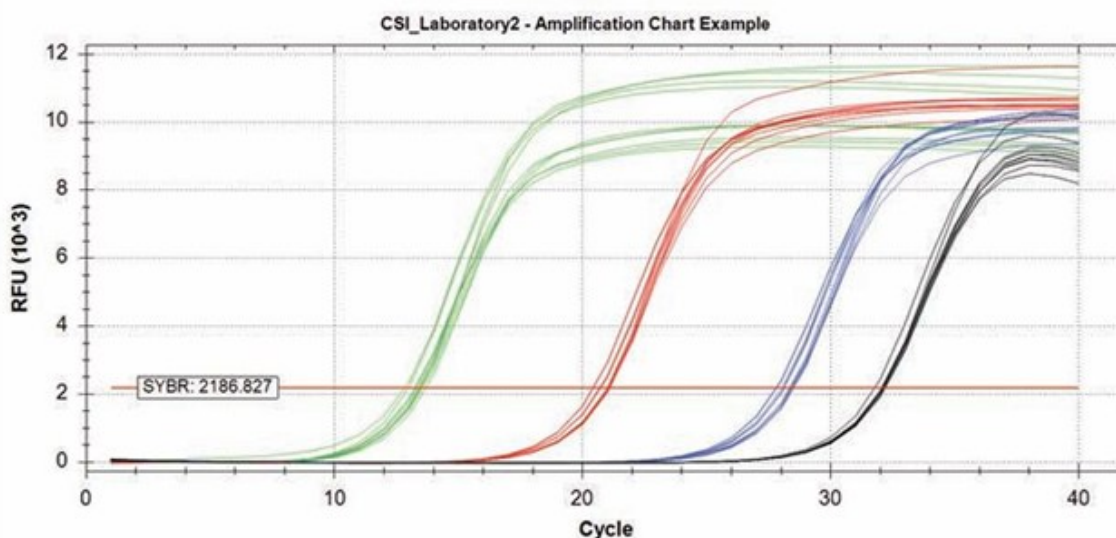


Figure 9. PCR Amplification plot. Color key: Green=100X, Red=10,000X, Blue=1,000,000X, Black=NTC. RFU=relative fluorescence units.

Yllä oleva kvantifiointikäyrä havainnollistaa selvästi reaaliaikaisen PCR:n kvantitatiivisen luonteen. Näytteet, jotka sisältävät suurempia pitoisuuksia lähtö-DNA:ta, tuottavat käyriä, jotka nousevat aikaisemmin. Kohta, jossa nämä käyrät ylittävät kvantifiointisyklin (jota kutsutaan yleisesti C_q-arvoksi), liittyy suoraan templaatin lähtömäärään. Näitä C_q-arvoja voidaan myöhemmin käyttää DNA-pitoisuuksien tarkkaan kvantifointiin. Koska PCR:ssä DNA:n määrä kaksinkertaistuu jokaisella syklillä, käyrät, joiden C_q-arvot eroavat kolmella syklillä, edustavat $2^3 = 8$ -kertaista eroa mallin lähtöpitoisuudessa.

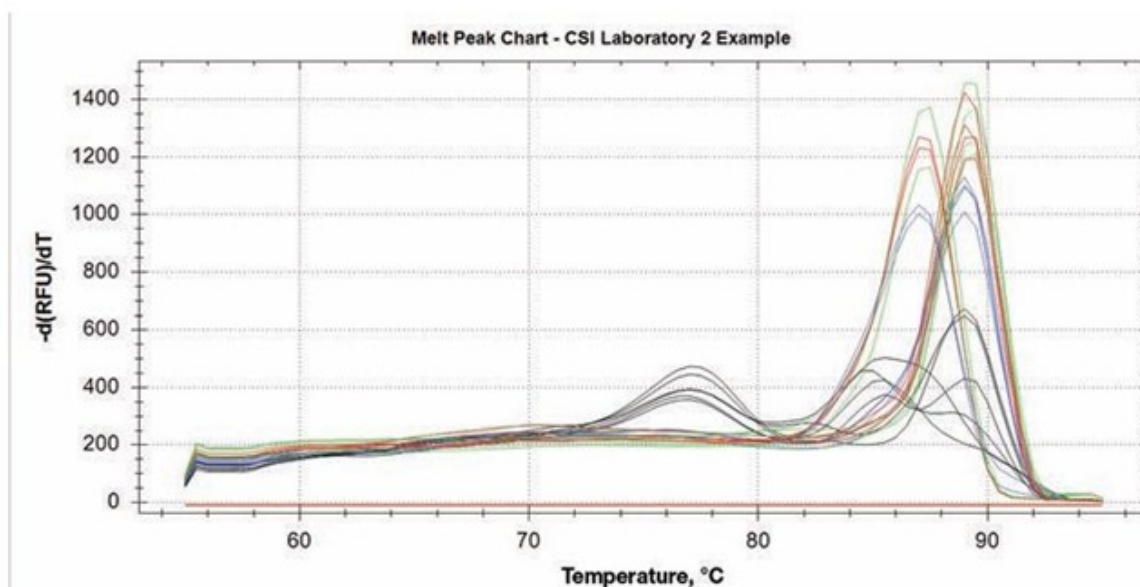


Figure 10. Melt-curve plot. Color key: Green=100X, Red=10,000X, Blue=1,000,000X, Black=NTC.

Sulamiskäyräanalyysi Crime Scene Investigator -paketille, joka on ajettu nopealla reaaliaikaisella protokollalla, paljastaa tyypillisesti kolme erillistä huippua. Kuitenkin kukin reaktio tuottaa yleensä yhden tai kaksi huippua: yhden, joka vastaa monistettuja pääasiallisia DNA-fragmentteja, ja toisen pienemmän, joka edustaa aluke-dimeerejä. Eri PCR-tuotteilla on usein erilaiset sulamislämpötilat (lämpötila, jossa DNA-juosteet erkanevat eli sulavat). Tässä tapauksessa noin 75 °C:n lähellä oleva huippu edustaa aluke-dimeerejä, ja kaksi yli 85 °C:n huippua edustavat suurempia amplikoneja, jotka ovat peräisin eri epäiltyjen DNA-näytteistä Crime Scene Investigator -paketissa.

LIITE 2: NÄYTTEIDEN AJOKOHTAISET CT-ARVOT JA SULAMISPISTEET

Laimennos 1: 1/1 000, 2: 1/10 000, 3: 1/1 000 000

Näyte	Ajo 1.	Ajo 2.	Ajo 3.	Ajo 4.
	Ct-arvo Sulamispiste °C	Ct-arvo Sulamispiste °C	Ct-arvo Sulamispiste °C	Ct-arvo Sulamispiste °C
A1	-	16,36	15,25	15,46
	90,18	-	90,33	90,28
A2	-	21,31	20,01	20,41
	90,06	-	90,20	90,22
A3	-	30,28	-	-
	90,20	-		
B1	-	-	14,25	14,06
			88,29	88,33
B2	-	-	20,59	20,20
			86,34	88,17
C1	-	19,60	15,28	16,32
	90,14	-	90,25	90,27
C2	-	21,86	20,30	20,26
	90,07	94,73	90,18	90,14
C3	-	28,17	-	-
	90,16	94,71		
D1	-	-	15,45	15,52
			86,39	86,41
D2	-	-	21,57	21,45
			86,33	86,29
S1	-	17,05	15,79	16,10
	90,09	-	90,33	90,28
S2	-	21,86	20,36	20,62
	90,06	-	90,28	90,17
S3	-	28,17	-	-
	90,16	-		
N1	-	35,71	34,54	35,07
	90,25	84,53	78,27	78,76
N2	-	33,59	-	-
	90,24	83,57		

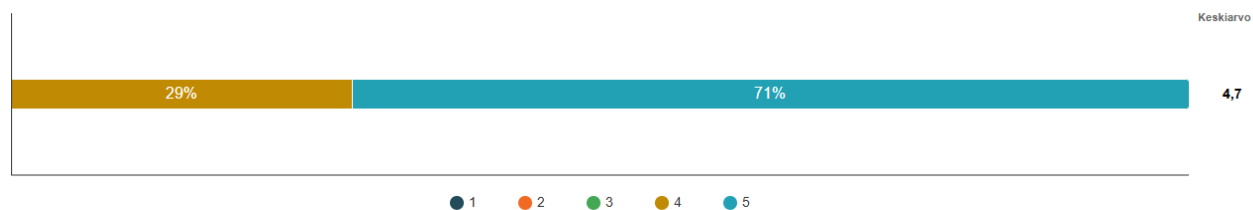
LIITE 3: TYÖOHJEKYSELY JA SEN TULOKSET

**Työohjeen arviointi:
RT-PCR ja sulamispisteanalyysi**

Vastaajien kokonaismäärä: 7

**Onko työohjeen jäsentely looginen?
(1. ei ollenkaan looginen, 5. erittäin looginen)**

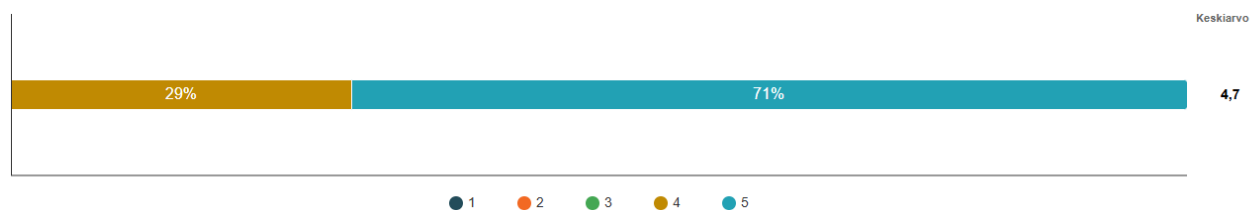
Vastaajien määrä: 7



	1	2	3	4	5	Keskiarvo	Mediaani
	0,0%	0,0%	0,0%	28,6%	71,4%	4,7	5,0

**Onko kieli selkeää ja ymmärrettävää?
(1. ei ollenkaan selkeää ja ymmärrettävää, 5. erittäin selkeää ja ymmärrettävää)**

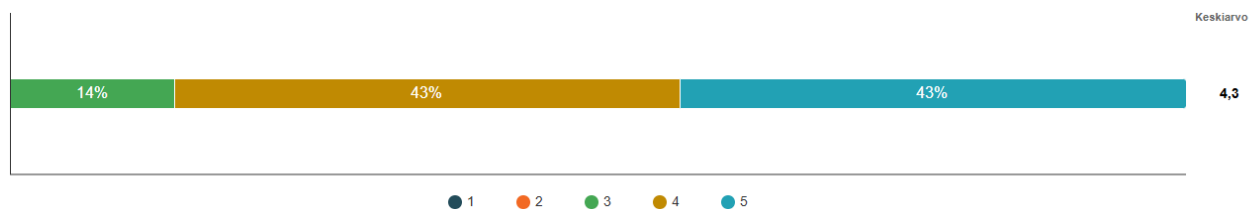
Vastaajien määrä: 7



	1	2	3	4	5	Keskiarvo	Mediaani
	0,0%	0,0%	0,0%	28,6%	71,4%	4,7	5,0

**Kuinka itsenäisesti pystyisit työskentelemään ohjeen mukaan?
(1. en lainkaan itsenäisesti, 5. erittäin itsenäisesti)**

Vastaajien määrä: 7



	1	2	3	4	5	Keskiarvo	Mediaani
	0,0%	0,0%	14,3%	42,8%	42,9%	4,3	4,0

Mikä toimi hyvin ohjeessa?

Vastaajien määrä: 4

Vie kaikki tekstivastaukset [Word](#) tai [PDF](#) muotoon

Vastaukset
<p>Seikeät ja tarpeeksi tarkat ohjeet. Hyvin jäsennetty.</p>
<p>Alussa hyvä tiivis teksti, mitä tehdään ja mitä työllä saadaan selville. Ohjeet ovat selkeät ja niitä on helppo seurata. Työvaiheet merkitty ns väliotsikolla, joka selkeyttää ja tavallaan hajaannuttaa ohjetta vielä enemmän eli silmät pysyy paremmin oikealla rivillä. Valmis taulukko tuloksien merkkaukseen hyvä idea!</p>
<p>Kaikki tarvittavat välineet kerrottu yksityiskohtaisesti, menetelmän tarkoitus ilmaistu selvästi, vaiheet on jäsennetty tarkasti</p>
<p>Ohje on selkeä ja siinä on jokainen vaihe avattu selkeästi auki. Ohje etenee loogisesti ja ohjeessa on valmiiksi tehty taulukko ja esimerkkikuvat RT-PCR-ajon ja sulamispisteanalyysin kuvaajista.</p>

Miten parantaisit ohjetta?

Vastaajien määrä: 4

Vie kaikki tekstivastaukset [Word](#) tai [PDF](#) muotoon

Vastaukset
<p>Ohje on jo tosi hyvä ja toimii varmasti sellaisenaan, mutta keksimällä keksin muutamia kehitysideoita. :) Voisiko tarvittavat tarvikkeet olla yhdellä sivulla, niin ne saisi katsottua ns. yhdellä silmäyksellä. Ja voisiko tarvikkeen edessä olla pikkuinen laatikko, johon voi laittaa ruksin, kun tarvike on kerätty. Ehkä sellainen laatikko voisi olla myös ohjeen numeroiden kohdalla, niin pysyisi paremmin kartalla, missä kohdin on menossa, kun laittaa ruksin sitä mukaa kun työssä etenee.</p>
<p>Putket laimennoksille Putken Master Mixille: mikä/minkä kokoinen putki? Reagenssit tulee pitää jäällä koko työskentelyn ajan! tämä voisi olla esim lihavoituna, niin erottuu selkeämmin.</p>
<p>Tästä ei paremmaksi pääse</p>
<p>En tiedä, enkö osannut vain lukea, mutta jouduin lukemaan laimennussarjan ohjeen kohdan 3. useamman kerran. Siinä voisi vielä avata, että "putkessa 1 on tällöin 1/100-laimennos ja putkessa 2 on 1/10 000-laimennos". Toivoisin, että lopussa oleviin kuvaajiin voisi avata, mitä niissä näkyy. Taulukkoon voisi vielä liittää, millä yksiköllä arvot tai tulokset laitetaan (tai tosiaan kirjoittaa esimerkit auki kuvaajien yhteyteen).</p>

Jäikö jotain vielä sanomatta? Kerro se tässä!

Vastaajien määrä: 2

Vie kaikki tekstivastaukset [Word](#) tai [PDF](#) muotoon

Vastaukset
<p>"Pipetit, joilla voi pipetoida 3 µl, 10 µl 12,5 µl, 147 µl ja 990 µl sekä niille sopivat filitterikärjet" puuttuu pilkku 10 ja 12,5 välistä :)</p>
<p>Olisipa meidän taitopajojen aikaan ollut yhtä aloittelija-ystävällinen ohje. Silloin oli ihan pyörällä päästään ohjeita lukiessa. Onneksi seuraavat sukupolvet pääsevät helpommalla. Todella hyvää työtä!</p>

LIITE 4: KEHITTÄMISTYÖN TUOTOS ELI TYÖOHJE

RT-PCR ja sulamiskäyräanalyysi

Työn tarkoituksena on tutustua reaaliaikaisen PCR:n periaatteisiin sekä sen nopeaan ja kvantitatiiviseen luonteeseen. RT-PCR-ajon jatkona tehdään sulamiskäyräanalyysi, jolla saadaan tietoa reaktiossa olevista monistustuotteista. Siitä saatujen tulosten perusteella on tarkoitus selvittää, kuka epäillyistä henkilöistä (B, C vai D) on rikoksen tekijä.

Jokaisesta DNA-näytteestä tehdään kaksi laimennosta eli jokainen opiskelija pipetoi kymmenen PCR-reaktiota: epäiltyjen DNA:t B, C ja D, rikospaikka-DNA:n S sekä negatiivisen kontrollin N. DNA:t ovat valmiiksi eristetty.

RT-PCR-protokollan ohjelmointi

Ennen pipetoinnin aloittamista tarkistetaan laitteelle ohjelmoitu protokolla.

Reaktiutilavuus on **25 µl**.

- **Sykli 1:** 94 °C 2 minuuttia
DNA:n alustava denaturointi
- **Sykli 2:**
94 °C 10 sekuntia (*denaturaatio*)
52 °C 30 sekuntia (*annealing ja ekstensio – kerää datan*)

Toista **sykli 2 yhteensä 40 kertaa**.

- **Sykli 3: Sulamiskäyräanalyysi**
95 °C 60 sekuntia
40 °C 60 sekuntia
65 °C 1 sekunti
98 °C 1 sekunti

Jokainen opiskelija tarvitsee

- | | |
|--|---|
| •Pipetit, joilla voi pipetoida 3 µl, 10 µl, 12,5 µl, 147 µl ja 990 µl sekä niille sopivat filtterikärjet | •Putken Master Mixille |
| •Jäitä | •Kynän putkien merkitsemiseen |
| •Steriiliä vettä | •Rikospaikka-DNA S: Crime Scene DNA |
| •PCR-stripit ja niiden kannet | •Epäiltyjen DNA:t: B, C ja D |
| •Putket laimennoksille | •SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix |
| | •Crime Scene Investigator Primers |

Reagenssit tulee pitää jäällä koko työskentelyn ajan!

Työn suorittaminen

Sulatus

1. Sulata DNA-näytteet, alukkeet sekä SYBR® Green Supermix jään päällä.

Laimennussarjojen valmistelu

2. Laimenna rikospaikka-DNA ja epäiltyjen DNA:t 100- ja 10 000-kertaisiksi sarjalaimennoksina. Merkitse putkiin DNA-templaatin nimi ja laimennusmerkintä. Tarvitset tätä varten 10 putkea (8 laimennoksille ja 2 negatiivista kontrollia varten).

Esimerkki DNA-näytteestä B:

- B1: 1/100 laimennos
- B2: 1/10 000 laimennos

3. Lisää 990 µl steriiliä vettä kuhunkin putkeen. Lisää 10 µl templaatti-DNA:ta putkeen, joka on merkitty numerolla 1. Sekoita putkea perusteellisesti vortexilla vähintään 10 sekuntia. Siirrä 10 µl laimennettua DNA:ta putkesta 1 putkeen 2. Vortexoi 10 sekuntia. Putkessa 1 on tällöin 1/100-laimennos ja putkessa 2 on 1/10 000-laimennos. Negatiivisiin kontrolleihin ei pipetoida DNA:ta.

Master Mixin valmistus

4. Merkitse putki nimellä "MM".
5. Pipetoi 147 µl SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermixiä MM-putkeen.
6. Pipetoi 3 µl Crime Scene Investigator Kitin alukkeita MM-putkeen. Sekoita perusteellisesti vortexilla 10 sekuntia.

PCR-putkistriippien valmistelu ja Master Mixin lisääminen

7. Merkitse kahdeksankuoppaiseen PCR-putkistriippiin DNA-templaatin nimi ja laimennos. **Kirjoita vain putkien sivuihin, älä kansiin!**
8. Lisää 12,5 µl Master Mixiä jokaiseen PCR-reaktioputkeen.

Templaatti-DNA:n lisääminen PCR-putkiin

9. Lisää 12,5 µl templaatti-DNA:ta kustakin laimennosputkesta vastaaviin PCR-putkiin käyttäen joka kerta puhdasta pipetinkärkeä.
10. Sekoita reaktio varovasti pipetoimalla hitaasti ylös ja alas useita kertoja ilman, että vedät pipettikärkeä pois putkesta. **Vältä kuplien muodostamista reaktioseokseen.**
11. Sulje stripit kansilla ja spinnaa putkien sisältö alas mikrosentrifuugilla.

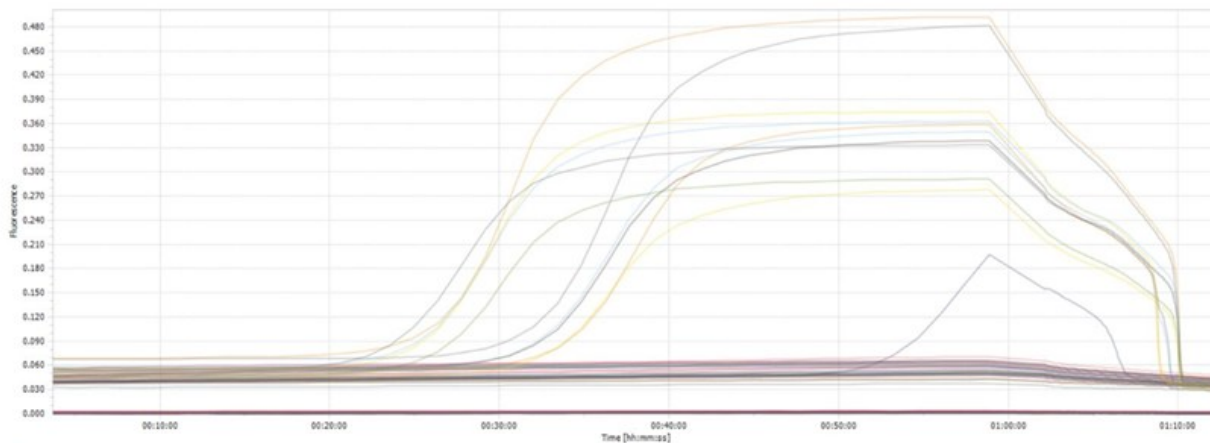
RT-PCR-ajon suoritus

12. Aja PCR-reaktiot reaaliaikaisella PCR-laitteella. Asettaessasi stripit laitteeseen, huolehdi, että painat ne kunnolla pohjaan asti!
13. Seuraa PCR-tuotteiden monistumista reaaliajassa syklien edetessä.
14. Ajon jälkeen analysoi tulokset ja vertaile eri näytteitä toisiinsa.

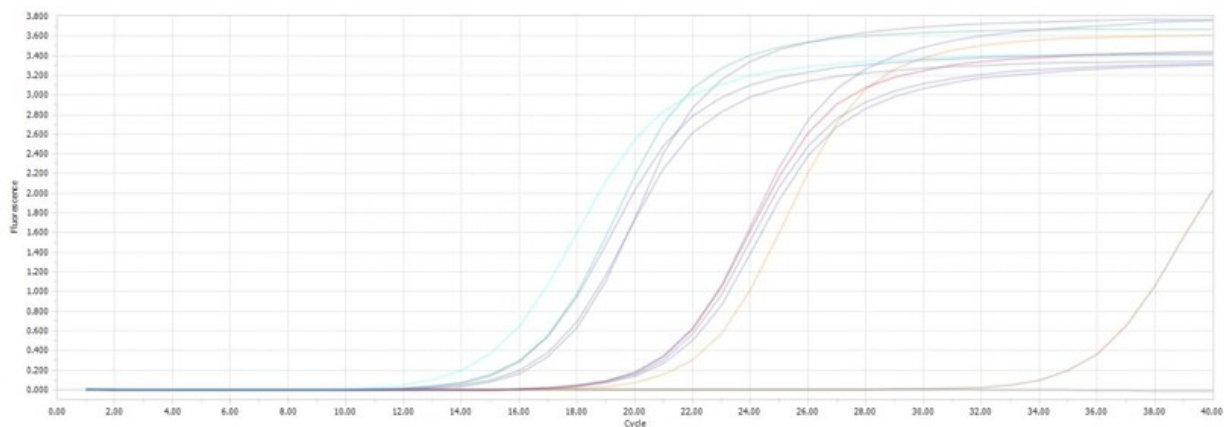
Kirjaa saamasi tulokset taulukkoon

Näyte	Ct-arvo	Sulamispiste °C
B1: 1/100		
B2: 1/10 000		
C1: 1/100		
C2: 1/10 000		
D1: 1/100		
D2: 1/10 000		
S1: 1/100		
S2: 1/10 000		
N1		
N2		

Esimerkkikuvat tuloksista

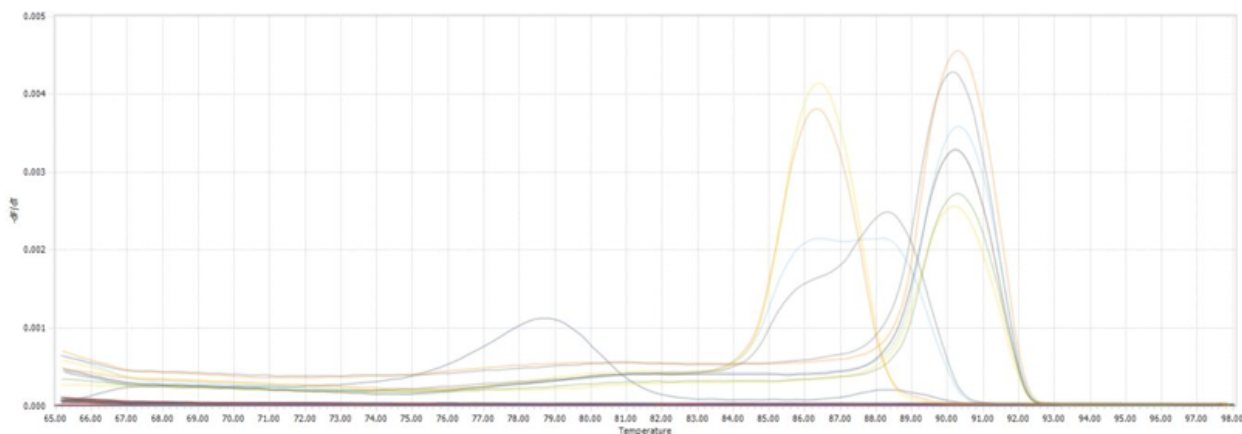


Kuva 1. Ajon raakadata fluoresenssikäyristä



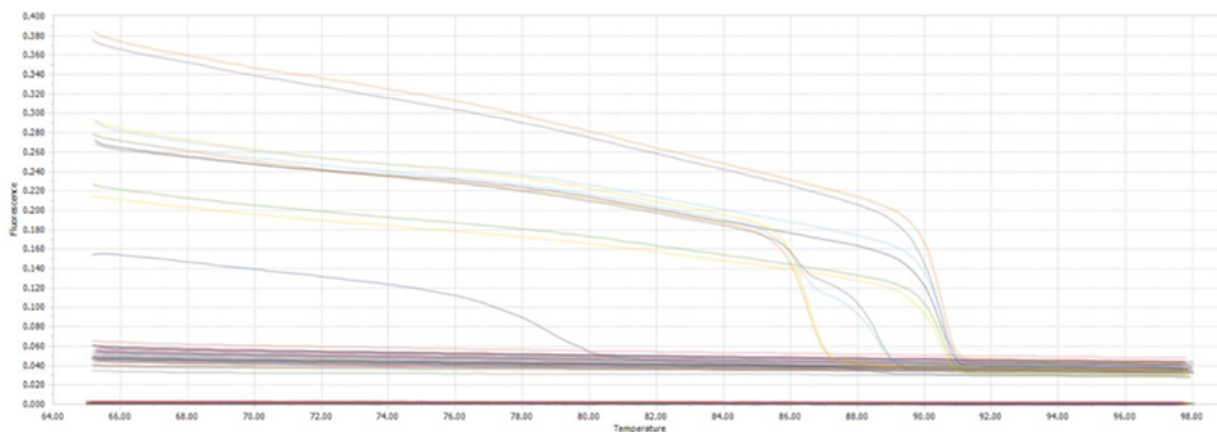
Kuva 2. Monistumiskäyrät

Kuvassa 2 on nähtävillä RT-PCR-ajon monistumiskäyrät. Eniten DNA:ta sisältävät näytteet ovat lähteneet monistumaan ensin eli varhaisemmilla sykleillä. Niiden Ct-arvo on siis pienempi verrattuna näytteisiin, jotka ovat sisältäneet lähtötilanteessa vähemmän DNA:ta. Kaikista viimeisimpänä on lähtenyt monistumaan negatiivinen kontrolli. Sen kohdalla kyse on epäspesifisestä monistumisesta, joka johtuu yleensä aluke-dimeereistä.



Kuva 3. Sulamispisteet

Kolmannessa kuvassa nähdään sulamiskäyräanalyysin tulokset, joissa näkyvät huiput kuvaavat monistuneiden DNA-tuotteiden sulamispisteitä. Aluke-dimeerit sulavat matalammassa lämpötilassa kuin varsinaiset PCR-tuotteet, minkä ansiosta spesifiset monistustuotteet voidaan erottaa epäspesifisistä tuotteista.



Kuva 4. Sulamiskäyräanalyysi

Kuvassa 4 nähdään, kuinka käyrät lähtevät laskemaan, kun sulamiskäyräanalyysissä lämpötilaa nostetaan asteittain ja muodostuneiden DNA-juosteiden denaturaation myötä fluoresenssin määrä vähenee.