

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

2018

Simo Vainionpää

MIKRO-RNA:N MITATTAVUUS JA SÄILYVYYS KUIVAVERINÄYTTEESSÄ

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikkokoulutus

2018 | 23 sivua

Simo Vainionpää

MIKRO-RNA:N MITATTAVUUS JA SÄILYVYYS KUIVAVERINÄYTTEESSÄ

Mikro-RNA:t ovat noin 22 emäsparin pituisia RNA jaksoja, joita esiintyy kaikissa eukaryoottisissa eliöissä. Nämä jaksot vaikuttavat suuresti solujen elinkaaren toimintoihin ja eri geenien ekspressioon sitoutumalla mRNA juosteisiin. Mikro-RNA:n ekspressiota ollaan tutkittu laajasti syövän merkkiaineena, mutta neurologisten vaurioiden hoidossa ja diagnostiikassa ollaan vasta tutkimuksen alkuasteilla.

Turun yliopiston BAAC-tutkimusprojekti tutkii mikro-RNA:n mahdollisuutta toimia merkkiaineena urheilijoiden saamien aivotärähdyksen diagnostiikassa ja hoidossa. Tämä opinnäytetyön tarkoitus on osoittaa, onko kuivaverinäyte toimiva näytteidenkeruumenetelmä BAAC-projektin myöhempisiin vaiheisiin. Kuivaverinäyte olisi keräyksen helppouden ja näytteen käsittelyn vapaamuotoisuuden takia paras mahdollinen näytemuoto, mutta sen toimivuus tässä analytiikassa on tuntematon.

Tämän opinnäytetyön analyysivaiheessa havaittiin, että RNA:ta ei onnistuta erottamaan kuivaverinäytteestä tarvittavia määriä tarvittavissa puhtauksissa, ja siten se ei sovellu nykyisellään projektin käyttöön. Uusien erottelumenetelmien käyttöönotto saattaa mahdollistaa kuivaverinäytteen käytön.

ASIASANAT:

MikroRNA, molekyylibiologia, verinäytteen otto.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Laboratory Science

2018 | 23 pages

Simo Vainionpää

THE MEASUREMENT AND STORAGE OF MICRO RNA IN DRYED BLOOD SPOT SAMPLES

Micro-RNA are a family of small RNA molecules containing about 22 nucleotides. They can be found in all eukaryote cells. They affect the expression of the genome and cellular lifecycle immensely by binding with mRNA. Micro-RNA's expression has been studied broadly as a biomarker for cancer, but it functioning as a marker for the diagnosis and treatment of neurological damage is a new area of study.

The BAAC-project, running in the university of Turku, is studying microRNA's as a biomarker for the treatment and diagnostics of concussions in athletes. This bachelor thesis is meant to test, if a dried blood spot is a valid specimen collection method for later stages of the BAAC-project. A dried blood spot sample would be an optimal specimen because of its easy collection and storage, but it's functionality in this analysis is unknown.

In the analytics phase of this bachelor's thesis, it was found that sufficiently large or pure samples of RNA could not be extracted from the samples. As such the dried blood spot method can not be used in this project. The introduction of new extraction methods might allow for the use of these kind of samples.

KEYWORDS:

MicroRNA, molecular biology, blood specimen collection

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT	9
2.1 RNA	9
2.2 Ei-koodaavat RNA:t	10
2.3 Mikro-RNA	11
2.4 PCR ja qPCR	12
2.5 Kuivaverinäyte	12
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT	14
4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS	15
4.1 Toteutussuunnitelma	15
4.2 Näytteiden keruu	15
4.3 Näytteiden pakastus	16
4.4 Näytteiden käsittely ja analysointi	17
4.5 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	17
4.6 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	18
5 TULOKSET	19
6 POHDINTA	20
6.1 Tuloksien pohdinta	20
6.2 Mahdolliset ongelmat prosessissa	20
6.3 Mahdolliset jatkotutkimukset	21
LÄHTEET	22

KUVAT

Kuva 1. Nukleotidin perusrakenne	10
Kuva 2. Näytekortti josta on poistettu näyteruudut.	16

TAULUKOT

Taulukko 1. Eroteltujen RNA näytteiden spektrofotometrisen analyysin tulokset.	19
--	----

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

DNA	Deoksiribonukleiinihappo
RNA	Ribonukleiinihappo
PBS	Phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos
BSA	Bovine Serum Albumin, naudan seerumista eristetty albumini

1 JOHDANTO

Mikro-RNA:t, eli miRNA:t ovat lyhyitä, keskimäärin 22 emäksen pituisia ei-koodaavia RNA ketjuja. Ihmisessä on tunnistettu yli kaksi tuhatta erilaista miRNA:ta, joista suurin osa supressoi lähetti-RNA:n toimintaa. Solujen elämänkaaren eri vaiheet ovat vahvasti miRNA:n ohjaamia. (Guled & Knuutila 2013.)

Mikro-RNA:ta on tutkittu laajasti 2000-luvulla. Erityisesti mahdollisuudet biomarkkereina syövän diagnostiikkaan on ollut laajan tutkimuksen alasta. Lisäännytynyt kiinnostus miRNA-tutkimusta kohtaan on synnyttänyt laajan tietopohjan alasta ja vakiinnuttanut kvantitatiivisen PCR-menetelmän käytön miRNA:ta tutkittaessa (You-Jia ym. 2008). Mikro-RNA:n käyttö aivovaurioiden diagnostiikassa on aluillaan oleva tutkimuksen kohde. Vakavien aivotärähdysten on osoitettu aiheuttavan miRNA-pitoisuuksien vaihtelua selkäydinnesteessä sekä syljessä (Hicks ym. 2018).

Eri tutkimukset ovat saaneet eroavia tuloksia RNA:n säilyvyydestä kuivaverinäytteissä. Mitattaessa miRNA:ta on vertailtavia tuloksia saatu jopa kuuden kuukauden huoneenlämpöisen säilytyksen jälkeen (Ponnusamy ym. 2016). Toisaalta RNA-mittausten tulokset on osoitettu muuttuvan jopa kymmenkertaisesti neljän viikon säilytyksen jälkeen (Gruner ym. 2015). Tämän eroavaisuuden syyksi on ehdotettu entsyymien herkän taipumuksen pilkkoa RNA:ta heikentyvän huomattavasti lyhyempien RNA-jaksojen kohdalla (Reece ym. 2014). Mikro-RNA:ta on kyetty eristämään kuivaverinäytteestä vertailtavissa määrin, jopa vuosien jälkeen, kun näytteet on säilötty -80°C (Buroker ym. 2013).

Tämä opinnäytetyö suoritetaan osana Turun yliopiston biolääketieteen laitoksen BAAC-projektia. Projektissa selvitetään mikro-RNA:n soveltuvuutta diagnostiikkaa ja hoitoa helpottavana merkkiaineena aivotärähdyksissä. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on selvittää kuivaverinäytteen toimivuus näytteidenkeruumenetelmänä projektin myöhemmissä vaiheissa. Projektin luonteesta johtuen optimaalinen näytemuoto sallisi pitkänkin säilytyksen ilman jäädytystä ympäristöä. Näytteenkeruun tulisi myös olla riittävän yksinkertainen, jotta eri ammattikuntien henkilöstö kykenisi keräämään näytteen luotettavasti ja vaivattomasti. Kuivaverinäyte olisi ominaisuuksiltaan optimaalinen näytteen keruumuoto, sillä se vaatii laskimoverinäytettä huomattavasti vähemmän invasiivisen ja teknisesti selkeämmän näytteen keruun sormenpään ihopistona. Tässä opinnäytetyössä

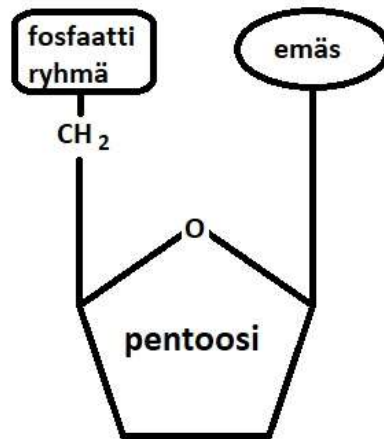
selvitetään mikro-RNA:n mittauskelpoisuus kuivaverinäytteessä, säilytysajan lisääntyessä. Näytteet säilöttiin huoneenlämmössä eroavia aikoja ja analysoitiin tulosten saamiseksi.

2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT

2.1 RNA

Elollisten solujen geneettisen informaation säilövä rakenne on DNA. Tämä pitkä molekyylietju siirtyy kopioituna solusta toiseen solunjakautumisen aikana. Soluissa DNA pitää sisällään ohjeet proteiinien tuotantoon, mutta nämä proteiinit eivät synny suoraan DNA:ssa sijaitsevien geenien ohjeista. Sen sijaan DNA:sta valmistuu näistä geeneistä RNA-molekyylietjä transkription avulla. Tällaisia proteiineja koodaavia RNA-molekyylietjä kutsutaan lähetti RNA:ksi (mRNA). Eukaryoottisissa soluissa DNA sijaitsee tumassa ja proteiinituotanto tapahtuu tumän ulkopuolella sytoplasmassa. RNA molekyyliet kulkeutuvat tumasta sytoplasmään, jossa ne koodaavat proteiinisynteesin. (Meister, G. 2011)

RNA eroaa DNA:sta rakenteellisesti vain hieman. Kumpikin koostuu fosfaattiryhmästä, pentoosi sokerista (viisihiilinen monosakkaridi) ja orgaanisesta emäksestä (Kuva 1). Yksi tällainen kolmen osan kokonaisuus on nimeltään nukleotidi. Fosfaattiryhmä on kummallakin samanlainen ja toimii eri sokerien välisenä liitoksena, kiinnittäen monosakkaridin 3' hiilen 5' hiileen. Pentoosisokeri aiheuttaa RNA:n ja DNA:n välisen eron; Kun monosakkaridin 2' hiileen on liittynyt happi, on kyseessä riboosi, eli RNA ja tämän hapen puuttuessa on kyseessä 2'-deoksiriboosi, eli DNA. Pentoosisokerin 1' hiileen liittynyt emäs voi olla joko puriini tai pyrimidiini. Puriineja ovat adeniini (merkitään A) ja guaniini (merkitään G), jotka esiintyvät sekä DNA:ssa, että RNA:ssa. Pyrimidiineistä vain sytosiini (merkitään C) esiintyy kummassakin nukleiinihapossa, tyymiini (merkitään T) vain DNA:ssa ja urasiili (merkitään U) vain RNA:ssa. Nukleotidien muodostaessa ketjuja voivat puriinit ja pyrimidiinit liittyä toisiinsa emäspariutumissäännön mukaisesti A-T, A-U ja C-G. Tästä muodostuu kaksinauhaisia kokonaisuuksia tai laskostuneita juosteita. (Suominen ym. 2013) Kolmen nukleotidin sarjaa RNA:ssa kutsutaan kodoniksi ja tämän muodostus määrää koodattavan proteiinin aminohapon (Meister, G. 2011).



Kuva 1. Nukleotidin perusrakenne

2.2 Ei-koodaavat RNA:t

Jo varhaisissa genomien sekvensointiprojekteissa havaittiin, että monimutkaiset genomit, kuten ihmisen genomi, koostuvat vain pieneltä osin proteiineja koodaavista alueista. On kuitenkin kyetty osoittamaan, että koko ihmisen genomi transkriptoidaan jatkuvasti ja siten suuri määrä ei-koodaavaa RNA:ta syntyy. Tällä ei-koodaavalla RNA:lla on lukuisia tunnistettuja tehtäviä ja ymmärrystä sen toiminnoista laajennetaan jatkuvasti. Monet näistä tehtävistä säätelevät geenien ekspressiota tai mahdollistavat tämän toiminnan. (Meister, G. 2011.)

Lukuisia ei-koodavia RNA ryhmiä ollaan nimetty ja näiden ryhmien sisälläkin vaihtelu on suurta. Yleisimpiä näistä ovat ihmiskehossa ribosomaalinen RNA (rRNA), joka on osa proteiineja valmistavaa ribosomia, ja siirtäjä RNA (tRNA), joka siirtää aminohappoja rakentuvaan proteiiniin. (Darnell 2011.) Mikro-RNA ja pieni häiritsevä RNA (siRNA) sitoutuvat komplementaarisiin mRNA-juosteisiin ja häiritsevät näiden toiminta RNA-interferenssiksi kutsutulla mekanismilla. Pitkillä ei-koodaavilla RNA juosteilla vaikuttaa olevan lukuisia tehtäviä kromosomien rakentumisessa ja muissa kromosomaalisissa tehtävissä. (Darnell 2011.)

2.3 Mikro-RNA

Mikro-RNA:ta eristettiin alun perin vuonna 1993, sukkulamadon genomia tutkittaessa (Reece ym. 2011, 411). Mikro-RNA:t ovat keskimäärin 22 emäksen pituisia yksijuosteisia RNA-pätkiä (Gule & Knuutila 2013). Mikro-RNA:n pääasiallinen tehtävä on säädellä lähetti-RNA:n, eli mRNA:n, toimintaa. Säättely on lähinnä supressoivaa ja yksi miRNA voi sitoutua useaan erilaiseen mRNA:aan. (Darnell 2011.)

Mikro-RNA transkriptoidaan solun tumassa, ei-koodaavista DNA-jaksoista, pri-miRNA:ksi. Tuman Drosha-mikroprocessorikompleksi pilkkoo pri-miRNA:n useiksi hiusneulasilmukkarakenteisiksi pre-miRNA:ksi. Pre-miRNA on yksi noin 70 nukleotidin mittainen RNA-juoste, joka on osittain emäspariutunut itsensä kanssa. Pre-miRNA:a kuljetetaan solun sytoplasmaan, jossa Dicer-entsyymi pilkkoo kompleksia, kunnes jäljelle jää yksijuosteinen miRNA. Mikro-RNA:n toinen juoste, jota käsitellään termillä miRNA*, irttoa sytoplasmaan ja hajoaa. (Suominen ym. 2013.) Kypsä miRNA sitoutuu AGO proteiinisuvun komplekseihin ja muodostaa kokonaisuuden miRNP. Harvinaisissa tapauksissa myös miRNA* sitoutuu samaan kompleksiin ja toimii siten aktiivisena miRNA:na. Edellä mainitun syntymekanismin lisäksi osa pre-miRNA-rakenteista syntyy laajempien RNA-transkriptioiden pientuotteena. (Gunter 2011.) Mikro-RNA vastaa toiminnaltaan ja kehitykseltään laajalti siRNA:ta, mutta yksi miRNA-jakso vaikuttaa suurempaan määrään eri mRNA:ta (Suominen ym. 2013).

Mikro-RNA juosteita esiintyy lähes kaikissa eukaryooteissa ja monissa viruksissa, joskin näiden ilmenemismuodot voivat olla hieman eroavia eri lajien välillä. Mikro-RNA:t voivat säädellä geeniekspressiota kolmella eri mekanismilla. Näiden mekanismien käyttö määräytyy miRNA:n ja kohteena olevan mRNA:n rakenteellisesta yhteensopivuudesta. Ensimmäinen mekanismi sitoo miRNP-kompleksin mRNA-juosteeseen ja pilkkoo sen. Tämä mekanismi toimii, kun miRNA-juoste on täydellinen vastakappale kohde-mRNA:lle, mutta esiintyy laajasti vain kasvikunnassa. Toisessa ja kolmannessa mekanismissa miRNA sitoutuu vain osittain mRNA:n ja joko estää tämän toimintaa tai johtavat sen hajoamiseen pidempien prosessien kautta. (Gunter 2011, 251-257.)

2.4 PCR ja qPCR

PCR:lla, eli polymeerasiketjureaktiolla monistetaan DNA-sarjoja, jotka sijaitsevat kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-sarjan välillä. Monistus perustuu lämpösykliin, joka vaikuttaa nukleinihappojen sitoutumisominaisuuksiin. Reaktion tuottamiseksi tarvitaan monistettava DNA, vapaita nukleotideja, DNA-polymeerasientsyymiä ja alukkeet, jotka sitoutuvat halutun DNA-jakson päihin. Korkeassa lämpötilassa (noin 95°C) emäsparien väliset vetysidokset purkautuvat ja kaksijuosteinen DNA denaturoituu yksijuosteiseksi. Kun lämpötila lasketaan (noin 55°C) kiinnittyvät alukkeet halutun DNA-sarjan päähän. Lämpötilaa taas hieman nostettaessa (noin 70°C) alkaa DNA-polymeerasi kokoamaan vapaita nukleotideja monistettavan alueen vastakappaleeksi. Kun tämä PCR-sykli toistetaan, on lähtökohtaisia DNA-sarjoja jo kaksinkertainen määrä, ja niiden määrä kasvaa tästä eksponentiaalisesti. (Suominen ym. 2013.)

qPCR tarkoittaa kvantitatiivista PCR menetelmää, jossa halutun nukleinihapposarjan eksperssio voidaan osoittaa numeerisesti (Suominen ym 2013). qPCR on erittäin herkkä kontaminaatioille ja vaatii huolellista työskentelyä, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia. Kun mitattava molekyyli on yksijuosteinen RNA, pitää se ensin kääntää DNA:ksi käänteistranskriptaasilla. qPCR:stä käytetään myös nimitystä RT-qPCR (Real-time quantitative-PCR). Nukleinihappojen monistusta seurataan prosessin aikana ja verrataan tunnettuun sisäiseen standardiin. (ThermoFisher 2018.) Kirjallisuudessa puhutaan käänteistranskriptaasiprosessista myös nimellä RT-PCR (reverse transcription PCR), mutta tässä tekstissä RT-alkuisella PCR-metodilla tarkoitetaan vain RT-qPCR-metodia.

2.5 Kuivaverinäyte

Kuivaverinäyte on imupaperille tiputettu kokoverinäyte, jonka annetaan kuivua myöhemmää analyysia varten. Suomessa yleisin käyttö tälle metodille on vastasyntyneiden aineenvaihduntasairauksien seulonta, jonka suorittaa Saske varsinais-suomen sairaanhoidopiirin alaisuudessa (Vsshp, Saske 2018).

Vuonna 1913 Ivar Christian Bang (1869-1918) määrittä glukoosia kuivatusta verinäytteestä ensimmäistä kertaa. Tämän jälkeen tutkimukset kuivaverinäytteistä lisääntyivät ja varsinkin vasta-ainemittausten määrä kasvoi. Testimetodin yleistymisen myötä myös näyttö tutkimuksen toiminnasta lisääntyi. Nukleinihappojen säilymisessä on esiintynyt

suurta vaihtelua. Hepatiitti B -viruksen kaksoisjuosteista DNA:ta pystyttiin mittaamaan luotettavasti kolmenkin viikon jälkeen, kun kuivaverinäytteitä säilytettiin huoneenlämmössä. RNA:n säilyvyydestä on syntynyt eroavaista tutkimusnäyttöä, yhdessä tutkimuksessa on osoitettu mittauskelpoisuuden säilyvän jopa vuoden huoneenlämmössä, kun taas toisissa on havaittu kymmenenkertainen muutos neljän viikon jälkeen. Yleistä yhteisymmärrystä RNA:n säilyvyydestä huoneenlämmössä säilytetyissä kuivaverinäytteissä ei siis ole muodostunut. Näytteiden eri eluointimenetelmillä on osoitettu olevan vain pientä eroavaisuutta, mutta laadukkaimmat tulokset on saavutettu PBS/BSA 0.05% (phosphate-buffered saline / bovine serum albumin) -seoksella. (Gruner, ym. 2015.)

Gruner ym. (2015) kokosivat kuivaverinäytteen keräystä ja käsittelyä standardoivan ohjeistuksen, jota ollaan käytetty suurilta osin tässä tutkimuksessa. Kuivaverinäytteen on osoitettu olevan toimiva alusta mikro-RNA analyysille, kun eluointi suoritetaan pakastamattomista näytteistä (Ponnusamy ym. 2016).

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoitus on määrittää, onko kuivaverinäyte toimiva näytteenkeruumenetelmä mikro-RNA:ta mitattaessa ja kuinka sen mitattavuus muuttuu kuivaverinäytteen säilytysajan pidentyessä.

Tämän opinnäytetyön tavoite on tuottaa informaatiota, joka auttaa yliopiston tutkimusryhmää määrittämään tulevat näytteenkeruun menetelmänsä. Yliopistolla toimiva BAAC-projekti pyrkii löytämään diagnoosia ja hoitoa helpottavia tuloksia, verinäytteistä eroteltujen mikro-RNA profiilien avulla. Tutkimuksen tulevien näytteiden keruu voidaan mahdollisesti suunnitella tämän opinnäytetyön tuloksia apuna käyttäen, mikäli kuivaverinäyte todetaan tähän toimintaan sopivaksi.

Tutkimuskysymykset ovat:

1. Kuinka luotettavasti miRNA pystytään mittaamaan kuivaverinäytteestä?
2. Miten pidentynyt kuivaverinäytteen säilytysaika huoneenlämmössä vaikuttaa miRNA:an mittauskelpoisuuteen?

4 OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUS

4.1 Toteutussuunnitelma

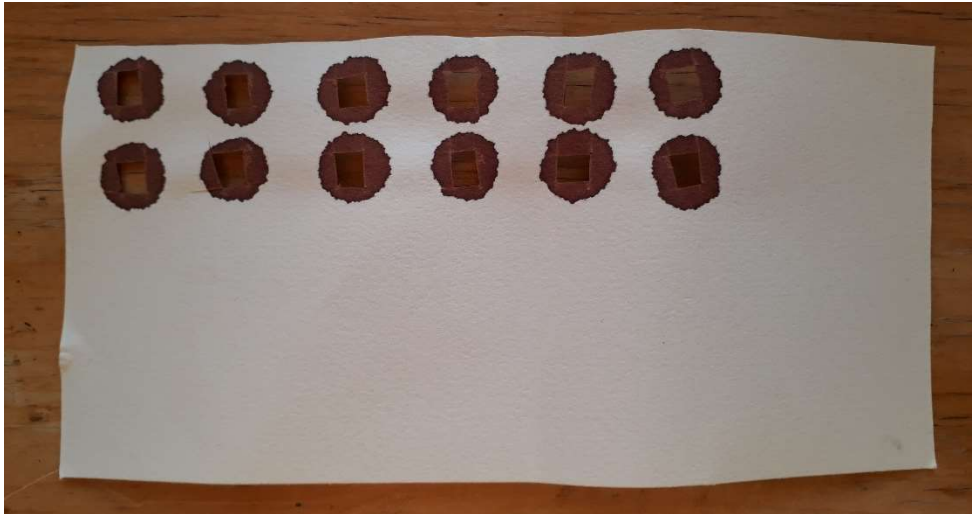
Tämän opinnäytetyön aihe saatiin yliopiston tutkijan aihe-ehdotuksesta. Ensimmäiset tapaamiset olivat Turun yliopiston biolääketieteen laitoksella solubiologian ja anatomian osastolla syksyllä 2017. Toteutuksen aikataulu ja toimintatavat sovittiin keväällä 2018. Työtä varten on tehty toimeksiantosopimus yliopiston kanssa.

Teoreettinen tausta koottiin aihealueen tieteellisistä julkaisuista ja oppikirjoista. Tämän opinnäytetyön eri aiheista löytyi useita tutkimuksia, mutta täysin vastaavaa tutkimusaihetta ei löytynyt. Mikro-RNA sekä kuivaverinäyteanalytiikka ovat hyvin tutkittuja aiheita, joista kummastakin löytyi useita ohjeistavia julkaisuja. Tässä opinnäytetyössä käytetyistä metodeista, kuten qPCR ja kuivaverinäytteen nukleiinihappoja säästävä eluointi, löytyy laajoja ohjeistavia oppikirjoja.

4.2 Näytteiden keruu

Näytteiden keruu suoritettiin elokuun 31. päivä 2018 Turun kupittaan palloiluhallissa ja ne kerättiin BAAC-tutkimukseen jo osallistuvilta nuorilta miehiltä. Näytteitä kerättiin yhteensä 21 kappaletta. Näytteenä otettiin laskimoverinäyte Vacuette-merkkisiin 3 ml EDTA-putkiin. Näytteet kuljetettiin yliopistolle 60 minuutin sisällä keräyksestä.

Näytteiden kuivaussäilytykseen käytettiin Whatman 903 -imupaperia. Suuremmista paperiarkeista valmistettiin 20cm x 11cm kokoisia kortteja (Kuva 1.), joihin merkittiin 10 - 12 15 mm kokoista keruualuetta. Näitä kortteja valmistettiin 20 kappaletta. Jokaisesta näytteestä siirrettiin kaksi pisaraa, eli noin 100µl, korttien merkitylle alueella. Jokainen näyte siirrettiin viiteen eri korttiin kahtena rinnakkaisena näytteenä. Rinnakkaisten näytteiden viereen merkittiin näytetunniste ja kortit numeroitiin siten, että saatiin viisi identtistä neljän kortin sarjaa. Yhden sarjan korteista kolme sisälsi viiden luovuttajan näytteet ja yksi kuuden.



Kuva 2. Näytekortti josta on poistettu näyteruudut.

Grüner ym. (2015) ohjeistavat kuivattamaan kuivaverinäytettä huoneenlämmössä, hyvässä ilmanvaihdossa ja yön yli. Tätä ohjetta mallintaen kortit asetettiin pahviseen telineeseen, jossa ne seisoivat yön yli vetokaapissa.

4.3 Näytteiden pakastus

Näytteiden kuivuttua yön yli aloitettiin näyteruutujen valmistus. Työalueena käytettiin BAAC-tutkimusryhmän työhuonetta. Työtaso pestiin, desinfioitiin ja päällystettiin muovipinnoitetulla työalustalla. Ensimmäinen korttisarja otettiin työtasolle ja jokaisesta näytepaikasta leikattiin noin 7,5mm x 7,5mm kokoinen ruutu. Näytteiden leikkaukseen käytettiin yksilöpakattua skalpellin kärkeä ja käsittelyyn laattapäisiä pinsettejä. Nämä työvälineet desinfioitiin näytteiden välillä 80% etanolilla. Jokainen näyteruutu kerättiin omaan kahden millilitran eppendorf-putkeensa ja putket nimikoitiin.

Kerätyt näyteruudut siirrettiin putkissaan -80°C pakkaseen. Mikro-RNA:n on osoitettu pysyvän kuivaverinäytekortissa analyysikelpoisena, kun se on pakastettu -80°C (Buroker ym. 2013). Näytteet sisältävä pakastin sijaitsee solubiologian ja anatomian osastolla ja on Turun yliopiston etäseurannan alla. Loput näytekortit siirrettiin jokainen omaan muovipussiinsa, joka suljettiin ilmatiiviiksi. Jokaiseen pussiin laitettiin pieni silica-geeliä sisältävä pussi kosteuden poistajaksi. Nämä muovipussit säilytettiin valolta suojattuna laboratorion hyllyssä.

Ensimmäisestä näyteruutujen valmistuksesta lähtien suoritettiin neljä vastaavaa näyteruutujen valmistusta tasan viikon välein. Jokainen suoritus toteutettiin samalla tavalla kuin ensimmäinen ja jokainen näyteruutu siirrettiin omaan 2ml eppendorf-putkeensa. Kaikki näytteet sijoitettiin samaan pakastimeen. Joka perjantai käsiteltiin uusi korttisarja, joten ruutujen valmistukset tapahtuivat 1.9.2018, 7.9.2018, 14.9.2018, 21.9.2018 ja 28.9.2018. Jokaisesta 21 potilasnäytteestä oli yhdessä sarjassa kaksi rinnakkaista ruutua, joten viidestä erottelusarjasta syntyi 210 näytettä.

4.4 Näytteiden käsittely ja analysointi

Ensimmäisiin testiajoihin valikoitui kuusi eri näytettä, jotka olivat kaikki pakastettu näytteenottoa seuraavana päivänä. Testinäytteet ajettiin kaksi kerrallaan kolmena eri päivänä. Näytteet eluoiitiin Grüner, ym. (2015) ohjaamalla tavalla. Näytteet otettiin pakasta suoraan eluoitavaksi, eikä niiden annettu sulaa ennen eluointinesteen lisäystä. Näytteiden eluoinnissa käytettiin kahden ensimmäisen sarjan kohdalla PSA/BSA 0,05% liuosta ja viimeisen sarjan kohdalla PSA/Tween20 0,05% liuosta. Eluointiliuosta pipetoiitiin näyteruutujen päälle 320µl. Näyteputket sekoitettiin nopeasti vortex laitteella ja asetettiin tasoheiluttajaan 4 tunniksi. Putket sentrifugoitiin 10000G 1min ja eluointiliuosta kerättiin 300µl.

Kerätylle näytteelle suoritettiin Trizol erottelu, sillä tätä erottelua oltiin käytetty tutkimuksen muissa vaiheissa. Laboratoriolla oli käytössä Biolinen Trisure valmiste ja erottelu suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti (Bioline 2018). Lopuksi näytteiden RNA pitoisuus ja puhtaus tarkistettiin Nanodrop merkkisellä spektrofotometrillä.

4.5 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivinen tutkimus, eli määrällinen tutkimus, on tutkimustapa, jossa tarkasteltavaa ilmiötä kuvataan numeerisesti. Numeerisen kuvauksen apuna käytetään kuvaajia, jotka asettavat numeeriset arvot vertailtavaan muotoon. Määrällisessä tutkimuksessa käytetty mittari ryhmittelee, järjestää ja luokittelee tutkittavan muuttujan. Määrälliselle tutkimukselle on tyypillistä, että mitattavien havaintoyksiköiden määrä on suuri. Yksi määrällisen tutkimuksen tavoitteista voi olla kartoittava tutkimus, jossa etsitään uusia näkökulmia ilmiöön. (Vilka 2007.) Korrelatiivinen tutkimus selvittää missä määrin yhden muuttujan vaihtelut vaikuttavat toisen muuttujan arvoihin. Tätä tutkimusmuotoa voidaan käyttää,

kun halutaan selvittää kahden eri muuttujan välisen yhteyden voimakkuus. (Anttila 2014.)

Tämä opinnäytetyö on metodologisilta lähtökohdiltaan kvantitatiivinen, sillä mitattavan yksikön ilmenemistä tutkitaan määrällisesti. Kaikki tulokset ovat numeerisia ja esitetään kuvaajien kautta vertailtavaan muotoon. Tässä opinnäytetyössä halutaan osoittaa yhden muuttujan, eli ajan, vaikutus toiseen muuttujaan, eli mikro-RNA:n ilmentymiseen. Tämä vertaileva kysymyksenasettelu tekee tutkimuksesta korrelatiivisen. Tämä opinnäytetyö on tavoitteiltaan osaksi myös kartoittava, sillä aiemmissa tutkimuksissa osoitettu mikro-RNA:n säilyvyys kuivaverinäytteissä haluttiin saada kartoitettua kausaalisuhteiden osalta.

4.6 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Tieteellinen tutkimus tulee olla suoritettu hyvän tieteellisen käytännön määrittämällä tavalla, jotta sen tulokset olisivat hyväksyttäviä, luetettavia ja uskottavia. Hyvä tieteellinen käytäntö on osa tutkimusorganisaatioiden laatujärjestelmää. Tutkimuseettisistä näkökulmista keskeisiä lähtökohtia tieteellisessä tutkimuksessa ovat rehellisyys, huolellisuus ja tarkkuus. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

Tämä opinnäytetyö on suoritettu hyvien tieteellisten käytäntöjen mukaisesti. Lähteet on merkitty huolella ja asianmukaisesti. Tutkimukset ja aineiston keruu suoritettiin Turun yliopiston tutkimusprojektin tutkimusluvan alaisuudessa.

5 TULOKSET

Kaikki kuusi näytettä analysoitiin kahdesti Thermo Scientificin Nanodrop One spektrofotometrillä, jotta saataisiin selville näytteiden lopullinen kokonais-RNA:n määrä ja puhtaus (taulukko 1). Sekä 260/280 ja 260/230 tulos tulisi olla mahdollisimman lähellä 2,0, jotta näyte olisi puhdas. (ThermoFisher 2018).

	ng/ μ l	260/280	260/230	260	280
Näyte 1	16,4	1,8	0,29	0,4	0,2
Näyte 2	14,5	1,86	0,72	0,36	0,3
Näyte 3	152	1,73	0,15	380	2,2
Näyte 4	13,1	1,66	0,09	0,33	0,2
Näyte 5	12,3	1,99	0,04	0,31	0,2
Näyte 6	57,9	1,99	0,41	1,45	0,7

Taulukko 1. Eroteltujen RNA näytteiden spektrofotometrisen analyysin tulokset.

Tulokset analysoitiin aina välittömästi erottelun jälkeen, kolmena eri päivänä, kaksi näytettä päivässä. Spektrofotometrisessä mittauksessa lasketaan kokonais-RNA:n määrä veressä eikä se siis paljasta miRNA-pitoisuuksia itsessään. Osaston tutkijat ohjeistivat, että kokonais-RNA tulee olla vähintään 10 ng/ μ l sekä puhdasta, jotta siitä kannattaa tehdä miRNA:n kvantitatiivisen määrittelyn. Kvantitatiivista PCR analyysia ei näiden tulosten johdosta ajettu.

6 POHDINTA

6.1 Tuloksien pohdinta

Näytteet ajettiin kaksi kerrallaan ja uudet eristykset aloitettiin vasta kun edellisen erän tulokset osoittivat näytelaadun olevan keinoa. Jokainen kuudesta näytteestä oli kokonais-RNA pitoisuudeltaan yli 10ng/μl, joten kaikki näytteet olisivat sopineet qPCR analyysiin. Näytteiden puhtaus voidaan tulkita arvoista 260/280 ja 260/230. Kummankin arvon tulisi olla noin 2.0. 260/280 arvo oli suuressa osassa tuloksia riittävän hyvä, mutta näyte 3 ja näyte 4 osoittivat lievää epäpuhtautta. 260/230 Oli jokaisen näytteen kohdalla selkeästi poikkeavan matala. Tämä epäpuhtaus voi selittyä trizol-reagenssin jäänteillä näytteessä tai muilla orgaanisilla tai epäorgaanisilla ainejäämillä.

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli määrittää; voidaanko kuivaverinäytteestä määrittää miRNA konsentraatio ja kuinka tuo konsentraatio muuttuu ajan myötä. Koska näytteistä ei onnistuttu mittaamaan riittävän korkeita kokonais-RNA arvoja, voidaan kuivaverinäytteen käyttöä näissä tutkimuksissa pitää epäsoveltuvana. Mikro-RNA tasojen mahdollista muutosta ajan kuluessa ei onnistuttu havainnoimaan. Aiemmat tutkimukset ovat erottelleet kuivaverinäytteestä onnistuneesti mikro-RNA:ta (Gruner ym. 2015; Ponnusamy ym. 2016). Näissä tutkimuksissa on kuitenkin käytetty spesifejä mikro-RNA erottelukittejä.

6.2 Mahdolliset ongelmat prosessissa

Koska jokaiselle näytekortille ollaan imeytetty 100 μl verta halkaisijaltaan 15 mm kokoiseen ympyrään ja tästä alasta kerätään talteen noin 7,5 mm x 7,5 mm kokoinen ruutu, on lopullinen verimäärä näyteruudussa vain noin 30 μl kokoverta. Eluointivaiheessa voidaan yhä olettaa, että osa soluista jää imupaperiin. Tämä lopullinen pieni näytemäärä vaatii tarkkaa työskentelyä ja saattaa helposti johtaa epäonnistuneeseen erotteluun.

Trizol-reagenssin ollaan osoitettu sitovan lyhyitä RNA-jaksoja eri suhteissa ja näin vaikuttavan lopulliseen saantoon (Young-Kook, Kim ym. 2012). Käytetyn reagenssin valmistajan ohjeistuksessa neuvotaan käyttämään 75% etanolia RNA:n puhdistukseen (Bioline 2018). 80% etanoli olisi kuitenkin saattanut puhdistaa näytteitä paremmin.

6.3 Mahdolliset jatkotutkimukset

Tähän opinnäytetyöhön kerätystä aineistosta voidaan jatkaa tutkimusta. Tässä opinnäytetyössä osoitettiin, että trizol-eristys ei ole toimiva eristysmetodi näin pienelle näytemäärälle, mutta muissa tutkimuksissa ollaan kuivaverinäytteistä eristetty miRNA:ta eristyskitteillä (Gruner ym. 2015; Ponnusamy ym. 2016). Eristyskitteillä on kaupallisesti myytävä paketti, joka sisältää kaikki reagenssit tiettyä toimenpidettä, kuten miRNA:n erottelua, varten. Jatkotutkimus tähän työhön olisi pyrkiä eristämään miRNA:ta jo kerätystä näytesarjasta käyttäen markkinoilla olevia eristyskittejä.

Mikäli kuivaverinäyte halutaan ottaa projektissa käyttöön, olisi tärkeää selvittää eri ympäristömuutosten vaikutus näytteisiin. Tällainen tutkimus vaatisi samanlaisen näytesarjan keräämistä, kuin tähän opinnäytetyöhön. Näytteitä säilytettäisiin eri lämpötiloissa ja vaihtelevassa ympäristössä. Tällainen lämpötilavaihtelu vastaisi näytteiden postittamisesta aiheutuvaa vaihtelua. Kuivaverinäytteen tulisi olla aina pakattuna ilmatiiviiseen tilaan, jossa olisi mukana kosteutta sitova esine ja koko näyte valolta suojattuna.

LÄHTEET

- Anttila, P. 2014. Tutkimisen taito ja tiedon hankinta. Metodix.fi www-sivut. Viitattu 17.10.2018 <https://metodix.fi/2014/05/17/anttila-pirkko-tutkimisen-taito-ja-tiedonhankinta/#6.4.1%20Laadullinen%20kuvaus>
- Bartlett, J. & Stirling, D. 2003. PCR Protocols. Toinen painos. Humana Press Inc. New Jersey, USA.
- Beitzinger, M. & Meister, G. 2014. Experimental identification of MicroRNA targets. Handbook of RNA Biochemistry vol 2, 49, 1087-1096
- Bioline. TRIsure protocol manual. Bioline www-sivujen alta löytyvä PDF tiedosto. Sisällöstä vastaa Bioline. Viitattu 18.11.2018. https://www.bioline.com/de/downloads/dl/file/id/953/trisure_product_manual.pdf
- Bustin, A. Benes, V. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, J. Kubista, M. Mueller, R. Nolan, T. Pfaffl, M. Shipley, G. Vandesompele, J. Wittwer, C. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55:4, 611-622.
- Buroker, N. Xue-Han, N. Zhao-Nian, Z. Kui, L. Wei-Jun, C. Xiu-Feng, W. Wei-Zhong, Zhu. Scott, C. Shi-Han, C. 2013. *Journal of medical diagnostic methods*, 2013, 2:3.
- Darnell James. 2011. RNA life's indispensable molecule. Cold spring harbor laboratory press. New York, USA.
- Guled M. & Knuutila S. 2013. Mikro-RNA:t ja syöpä. *Duodecim*. 129, 1661-9.
- Grüner, N. Stambouli, O. Ross, R. 2015. Dried blood spots – preparing and processing for use in immunoassays and molecular techniques. *Journal of visualized experiments*. (97), e52619.
- Hicks S. Johnson J. Carney M. Bramley H. Olympia R. Loeffert A. Thomas N. 2018. Overlapping MicroRNA expression in saliva and cerebrospinal fluid accurately identifies pediatric traumatic brain injury. *Journal on neurotrauma*. 35:64.
- Hunt, S. & Livesey, F. 2000. Functional Genomics. Oxford university press Inc. New York, USA.
- Khan, N. Cheng, J. Pezacki, J. Berezovski, M. 2011. Quantitative analysis of MicroRNA in blood serum with protein-facilitated affinity capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*, 83, 6196-6201.
- Meister, Gunter. 2011. RNA biology an introduction. Wiley-VCH Verlag & Co. Weinheim, Germany.
- Ponnusamy, V. Kapellou, O. Yip, E. Evanson, J. Wong, L. Michael-Titus, A. Yip, P. Shah, D. 2016. A study of microRNAs from dried blood spots in newborns after perinatal asphyxia: a simple and feasible biosampling method. Advance online publication. Volume 79, number 5. Viitattu: 2.4.2018. <https://www.nature.com/articles/pr2015276.pdf>.
- Reece. Urry. Cain. Wasserman. Minorsky. Jackson. 2011. Campbell Biology. 9. painos. Pearson. USA.
- Suominen, I. Pärssinen, R. Haajanen, K. Pelkonen, J. 2013. *Geeniteknikka*. 2. painos. Turun ammattikorkeakoulu. Turku.
- ThermoFisher Scientific. Basic principles of RT-qPCR. Sisällöstä vastaa ThermoFisher Scientific. Viitattu 4.4.2018. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/brands/thermo-scientific/molecular->

biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/basic-principles-rt-qpcr.html

ThermoFisher Scientific. Assessment of nucleic acid purity. Sisällöstä vastaa ThermoFisher Scientific. Viitattu 19.11.2018. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen suomessa. Viitattu 21.11.2018. https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf

Vilkkä, H. 2007. Tutki ja mittaa: määrällisen tutkimuksen perusteet. Kustanneosakeyhtiö Tammi. Helsinki. Viitattu 31.3.2018. <http://hanna.vilkkä.fi/wp-content/uploads/2014/02/Tutki-ja-mittaa.pdf>

VSSHP, Saskan verkkosivut. Sisällöstä vastaa VSSHP. Viitattu 4.4.2018. <http://www.vsshp.fi/fi/saske/Sivut/default.aspx>

You-Jia, H. Kang, T. Zhong-Yi, T. Yi-Xue, L. Hua-Sheng, X. 2008. Comparison of normalization methods with microRNA microarray. *Genomics* 92. 122.

Young-Kook Kim, Jinah Yeo, Minju Ha, Boseon Kim, V. Narry Kim. 2012. Retraction notice to: Cell adhesion-dependant control of micro-RNA Decay. *Molecular Cell*, 1005-1014