



Tua Silmunen

# Fluoresoivan eksonukleaasimene- telmän kehittäminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

22.11.2023

# Tiivistelmä

Tekijä: Tua Silmunen  
Otsikko: Fluoresoivan eksonukleaasimenetelmän kehittäminen  
Sivumäärä: 34 sivua + 1 liite  
Aika: 22.11.2023

Tutkinto: Laboratorioanalytiikka (AMK)  
Tutkinto-ohjelma: Laboratorioanalytiikka  
Ohjaajat: Lehtori Tiina Soininen

---

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää toimeksiantajayrityksen käyttöön menetelmä, jonka avulla eksonukleaasipitoisuusmääritykset voidaan tehdä ilman radioaktiivisten aineiden käyttöä. Käytössä olevalla menetelmällä eksonukleaasipitoisuudet määritetään radioaktiivisesti leimattujen DNA-substraattien avulla nestetuikeilmaisimella. Työssä tutkittiin kehitetyn menetelmän toimivuutta sekä optimoitiin menetelmän parametrejä.

Aikaisempien tutkimusten perusteella tarkasteltiin fluoresoivan menetelmän soveltuvuutta eksonukleaasiaktiivisuuden osoittamiseksi. Eksonukleaasien tunnistamiseen käytettiin kaksoisleimattuja Molecular Beacon -koettimia ja positiivikontrolleina käytettiin kaupallisia eksonukleaaseja sekä Taq-DNA-polymeraasia. Näytteiden fluoresenssitason muutokset määritettiin qPCR-ajolla. Menetelmäkehityksessä tutkittuja parametrejä olivat kaupallisten eksonukleaasien entsyymimäärä, Molecular Beacon -koettimien pitoisuus, kuumasaumaajan käyttö kuoppalevyn sulkemisessa, reaktioiden lineaarinen alue sekä Calf thymus DNA:n lisäys reaktioihin. Lisäksi fluoresoivan menetelmän tuloksia verrattiin käytössä olevaan radioaktiiviseen menetelmään.

Fluoresoiva eksonukleaasimenetelmä antoi selkeät vaste-erot negatiivi- ja positiivikontrollien välille. Lisäksi yrityksen kahden eri tuotteen, jotka eivät tutkitusti omaa eksonukleaasiaktiivisuutta, vasteet jäivät negatiivikontrollien tasolle. Todettiin, että tuotteet eivät aiheuta väärää positiivista reaktiota fluoresoivalla eksonukleaasimenetelmällä. Molecular Beacon -koetinseoksen tausta häiritsi eksonukleaaseista syntyvän vasteen näkymistä, kun käytettävät koetinpitoisuudet olivat suuret. Kun reaktioissa käytettiin yksittäisiä koettimia, eri eksonukleaasipitoisuuksien väliset erot olivat selkeämmät. Tämän lisäksi rinnakkaisnäytteiden hajonta oli vähäisempää. Eri Taq-DNA-polymeraasipitoisuuksien fluoresenssitasoissa ei kuitenkaan havaittu merkittäviä eroja. Positiivikontrolleille ei näin ollen pystytty määrittämään selkeitä kriteerejä. Reaktioilla ei ollut selkeää lineaarista aluetta. Lisäksi kaupallisten eksonukleaasi-entsyymierien väleillä oli huomattavasti hajontaa sekä radioaktiivisella että fluoresoivalla menetelmällä.

Fluoresoivalle menetelmälle ei voitu asettaa samanlaisia kriteerejä kuin radioaktiivisella menetelmällä on ollut käytössä. Tämänlaisena fluoresoivasta menetelmästä ei saatu yritykselle korvaavaa menetelmää, mutta tulokset antavat hyvän pohjan jatkok tutkimuksille esimerkiksi täysin kvalitatiivisesta menetelmästä.

Avainsanat: eksonukleaasit, Molecular Beacon -koettimet, qPCR

## Abstract

Author: Tua Silmunen  
Title: Development of Exonuclease Activity Detection by a Fluorescent Method  
Number of Pages: 34 pages + 1 appendix  
Date: 22 November 2023

Degree: Bachelor of Laboratory Services  
Degree Programme: Laboratory Sciences  
Instructors: Tiina Soininen, Senior Lecturer

---

The purpose of this thesis work was to develop a method for a company for the determination of exonuclease activity without the use of radioactive substances. The current method uses a liquid scintillation detector and radiolabelled DNA substrates to determine the concentration of exonucleases. The functionality of the developed method was examined, and the parameters of the method were optimized.

The applicability of a fluorescent method to demonstrate exonuclease activity was examined. Dual-labelled Molecular Beacon probes were used to identify exonucleases. Commercial exonucleases and Taq-DNA polymerase were used as positive controls. Changes in fluorescence levels were determined by a qPCR run. The parameters examined included the amount of enzyme in the commercial exonucleases, the concentration of Molecular Beacon probes, the use of a heat sealer in the sealing of microplates, the linear region of the reactions, and the addition of Calf thymus DNA to the reactions. In addition, the results of the fluorescent method were compared with the radioactive method used.

The fluorescent exonuclease method provided clear differences in response between negative and positive controls. In addition, the responses of two products, that do not possess exonuclease activity, remained at the level of negative controls. It was verified that the products do not cause a false positive reaction with the fluorescent exonuclease method. The background of the Molecular Beacon probe mixture interfered with the response from exonucleases when the probe concentrations were high. When individual probes were used, the response differences between exonuclease levels were clearer. However, no significant differences were observed in the fluorescence levels of Taq DNA polymerases. Therefore, no clear criteria could be established for the positive controls. Reactions did not have a clear linear region. In addition, there was considerable dispersion between commercial exonuclease enzyme batches by both the radioactive and fluorescence method.

No certain criteria could be set for the fluorescent method. As such, the fluorescent method cannot be used as a replacement method in the company. However, the results provide a good basis for further research on, for example, a fully qualitative method.

Keywords: exonucleases, Molecular Beacon probes, qPCR

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Menetelmän kehitys	2
2.1	Eksonukleaasit	2
2.2	Menetelmän kehitys yleisesti sekä in-house-menetelmät	3
2.3	Eksonukleaasien määrittäminen tukeilmaisimella	6
2.4	Eksonukleaasien määrittäminen Molecular Beacon -koettimilla	9
3	Materiaalit ja menetelmät	11
3.1	Alustavat tutkimukset yrityksessä	11
3.2	Eksonukleaasien määrittäminen näytteistä nestetukeilmaisimella	14
3.3	Eksonukleaasien määrittäminen näytteistä Molecular Beacon -koettimilla qPCR-laitteella	15
4	Tulokset ja tulosten tarkastelu	17
4.1	Eksonukleaasien entsyymimäärän optimointi	17
4.2	Molecular Beacon -koettimien pitoisuudet sekä päätepisteiden fluoresenssitaset	19
4.3	Molecular Beacon -seoksen taustan häirintä sekä yksittäisten Molecular Beacon -koettimien käyttö	23
4.4	Lineaarisen alueen määrittäminen	26
4.5	Kaupallisten eksonukleaasi-entsyymierien väliset erot	28
5	Päätelmät	29
	Lähteet	32

Liite 1: Eksonukleaasien entsyymimäärän optimointi radioaktiivisella menetelmällä

## Lyhenteet

DNA:	Deoksiribonukleiinihappo.
FRET:	Fluorescence resonance energy transfer. Fluoresenssiresonanssin energian siirto.
GLP:	Good Laboratory Practice. Hyvä laboratoriokäytäntö.
GMP:	Good Manufacturing Practice. Hyvä tuotantotapa.
PCR:	Polymerase chain reaction. Polymeraasiketjureaktio.
qPCR:	Quantitative polymerase chain reaction. Kvantitatiivinen tai reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio.
RFU:	Relative fluorescence unit. Suhteellinen fluoresenssiyksikkö.
RNA:	Ribonukleiinihappo.
RT:	Reverse transcriptase enzyme. Käänteiskopioijaentsyymi.
SNP:	Single nucleotide polymorphism. Yksittäisen nukleotidin polymorfismi.
TE:	Tris-EDTA-liuos.
U:	Unit. Entsyymien katalyyttisen aktiivisuuden yksikkö.
Å:	Ångström. Pituuden mittayksikkö, joka on $10^{-10}$ m eli 0,1 nm.

## 1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin toimeksiantajayrityksen tuotannon yksikössä keväällä 2021. Yritys on molekyyli diagnostiikkayhtiö, joka kehittää ja valmistaa testejä infektio tautien ja antibioottiresistenssin diagnostiikkaan. Kehitetyt diagnostiikkatestit ja -laitteet pohjautuvat qPCR- ja geenisiruteknologioihin.

Yrityksellä on käytössä sisäisen laadun tarkkailussa menetelmä, jolla määritetään valmistettujen reagenssien eksonukleasipitoisuudet radioaktiivisesti leimattujen DNA-substraattien avulla. Määritykset tehdään nestetuikeilmaisimella. DNA-substraatin valmistus on hankalaa, ja työskentely radioaktiivisten aineiden kanssa vaatii erityistä varovaisuutta.

Työn tavoitteena oli kehittää yrityksen käyttöön vaihtoehtoinen menetelmä, jonka avulla eksonukleasien pitoisuusmäärityksissä vältetään radioaktiivisten aineiden käyttöä. Menetelmästä pyrittiin saamaan turvallisempi sekä nykyaikaisempi. Yrityksessä tehtyjen aiempien tutkimusten perusteella tutkittiin fluoresoivan menetelmän soveltuvuutta eksonukleasiaktiivisuuden osoittamiseksi.

## 2 Menetelmän kehitys

### 2.1 Eksonukleaasit

Nukleaasit ovat entsyymejä, jotka katkaisevat hydrolysointireaktiolla nukleiinihappojen (DNA ja RNA) fosfodiesterisidoksia. Eksonukleaasit katkaisevat nukleotidejä yksi kerrallaan yksi- tai kaksijuosteisen polynukleotidiketjun joko 3'- tai 5' -päästä. Laajin nykytieto eksonukleaaseista on saatu tunnistamalla *Escherichia coli* -bakteerista yli 20 eksonukleaasia. Suurin osa *E. coli* -bakteerista löydetystä DNA- ja RNA-eksonukleaaseista on nimetty joko mielivaltaisesti roomalaisilla numeroilla tai niiden substraattispesifisyyden mukaan. Tiettyjä eksonukleaaseja esiintyy myös laajasti muissa bakteeri-, arkeoni- ja eukaryoottisuvuissa. [1, s. 66.]

Eksonukleaasit toimivat monella eri tavalla, mikä riippuu niiden substraattispesifisyydestä sekä biokemiallisista ominaisuuksista [1, s. 66]. Suuri osa eksonukleaaseista pystyy hajottamaan DNA:ta nukleotidiketjussa olevista virheistä (nick), joissa kaksijuosteisen DNA-molekyylin toisesta juosteesta puuttuu fosfodiesterisidos kahden vierekkäisen nukleotidin väliltä. Yksi tapa, jolla eksonukleaasit hajottavat DNA:ta, on poistaa yksi nukleotidi nukleotidiketjusta kerrallaan. Tällaisia eksonukleaaseja ovat muun muassa eksonukleaasit I ja III sekä lambda-eksonukleaasi. Lambda-eksonukleaasi muuttaa kaksijuosteisen DNA-molekyylin yksijuosteiseksi hajottamalla vain toisen juosteen 5'-päästä alkaen. Toisaalta esimerkiksi T5-eksonukleaasi sekä eksonukleaasit V ja VII poistavat nukleotidiketjusta lyhyitä oligonukleotidejä. Eksonukleaasit eroavat lisäksi niiden aktiivisuussuunnan ja substraattispesifisyyden mukaan. Esimerkiksi eksonukleaasit V ja VII toimivat sekä 5'–3'- että 3'–5' -suuntaan, kun taas eksonukleaasit I, III ja T toimivat vain 3'–5'-suuntaan. Eksonukleaasit I ja T pystyvät hajottamaan vain yksijuosteista DNA:ta ja jättäen kaksijuosteisen DNA-molekyylin ehjäksi, mitä voi käyttää hyväksi PCR-alukkeiden poistamisessa. Sitä vastoin T7-eksonukleaasi pystyy melkein ainoana eksonukleaasina hajottamaan vain kaksijuosteista DNA:ta toisin kuin T5-eksonukleaasi ja eksonukleaasi III, jotka pystyvät hajottamaan sekä yksi- että kaksijuosteista DNA:ta. [2; 3.]

Eksonukleaasit ovat tärkeässä asemassa solumetaboliassa sekä solujen ylläpidossa. Ne ovat myös välttämättömiä pitämään genomin stabiiliisuutta yllä. Eksonukleaasit toimivat muun muassa oikolukijana DNA-polymerisaation aikana. [4, s. 1317.] Ne poistavat epätavallisia DNA-rakenteita, joita saattaa syntyä DNA:n kaksoiskierteen kahdentumisen aikana ja estävät tällä tavoin mutaatioiden syntymistä. Lisäksi eksonukleaasit voivat suoraan korjata vahingoittunutta DNA:ta sekä mahdollistavat geneettisen rekombinaation. [1, s. 66; 4, s.1317.] RNA-eksonukleaasit edistävät samalla tavoin stabiilin RNA-molekyylin syntymistä [1, s. 66].

Eksonukleaaseja voidaan käyttää laajasti erilaisissa bioteknologisissa sovelluskohteissa [2]. Esimerkiksi PCR-reaktioissa halutuista tuotteista voidaan poistaa eksonukleaasien avulla yksijuosteiset alukkeet, minkä jälkeen syntyneet tuotteet voidaan muun muassa sekvensoida tai niille voidaan tehdä esimerkiksi SNP (single nucleotide polymorphism) -analyysi. Tämän lisäksi kyseisistä näytteistä voidaan poistaa turhat yksijuosteiset DNA-molekyylit ja jättää jäljelle vain halutut kaksijuosteiset tuotteet. [5.] Eksonukleaaseja voidaan myös käyttää hyväksi kohdennetussa mutageneesissä tai rekombinantti-DNA-teknologiassa, jossa pyöreiden kloonauksvektoreiden joukosta voidaan poistaa lineaariset kaksijuosteiset DNA-molekyylit. [6; 7; 8, s. 47–48.]

## 2.2 Menetelmän kehitys yleisesti sekä in-house-menetelmät

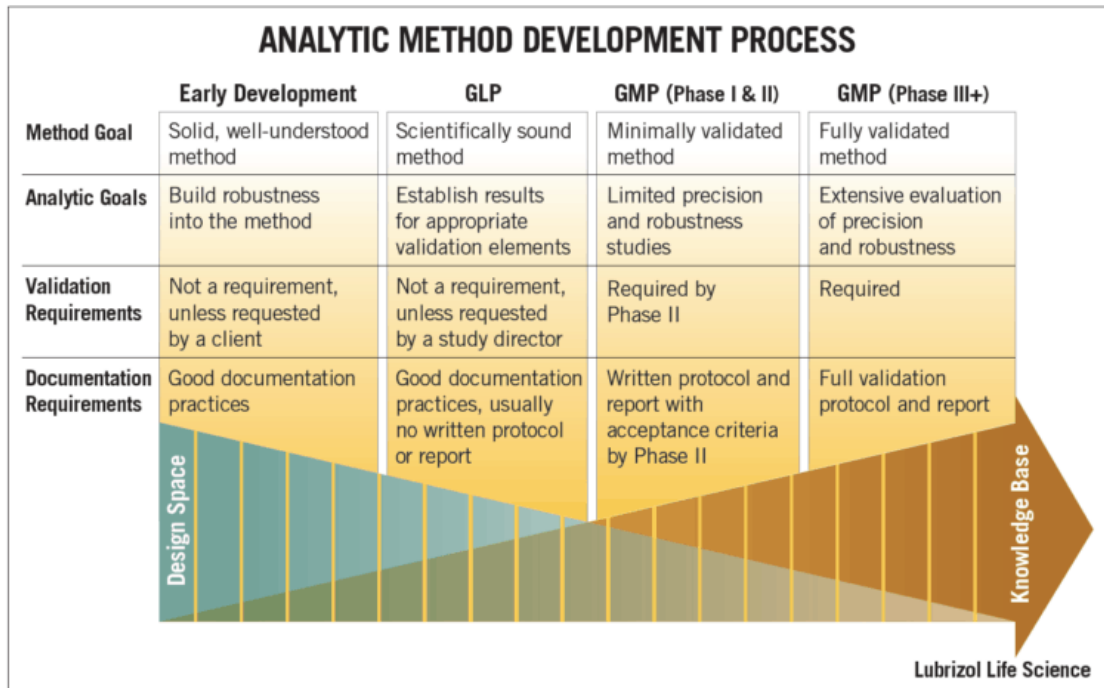
Menetelmän kehityksellä pyritään luomaan uudenlaisia analyttisiä menetelmiä, joilla testataan tutkittavasta aineesta tai tuotteesta tarkoin määrättyjä ominaisuuksia ja verrataan niitä vakiintuneisiin hyväksymiskriteereihin [9]. Menetelmän kehitys koostuu yleensä kolmesta päävaiheesta: toteutettavuudesta, kehittämisestä ja validoinnista [10].

Toteutettavuusvaiheessa tutkitaan, soveltuuko uusi metodi kyseisen näytteen analysointiin [10]. Menetelmän soveltuvuutta voidaan tarkemmin analysoida erilaisilla kriteereillä, kuten käytetyn tekniikan herkkyydellä, selektiivisyydellä sekä tarkkuudella [11, s. 8–9]. Lisäksi on tärkeätä kerätä kaikki olennaiset aineistot

tutkittavasta analyytistä ja metodista sekä määrittää menetelmän kehityksen tavoitteet, aikataulu ja kulut. Menetelmän kehittämisvaiheessa pyritään optimoimaan uusi analyttinen menetelmä. Optimoinnin tavoitteena on muun muassa vähentää menetelmän monimutkaisuutta, jotta se on toistettavissa eri laboratorioissa sekä eri työntekijöillä. [10.] Menetelmän optimoinnin aikana menetelmän parametrejä muutetaan yksi tai muutama kerrallaan, kunnes saadaan haluttu lopputulos. Lisäksi kunnollinen dokumentaatio optimoinnin aikana on tärkeää. [11, s. 9.] Analyyttimatriisin valitseminen sekä näytteen esikäsittely ovat myös muutamia keskeisimpiä osia menetelmän kehittämisessä [10]. Menetelmän validoinnilla osoitetaan, että uusi menetelmä on sopiva ja sen suorituskyky tarvittu tasolla aiottuun käyttötarkoitukseen. Validointi suoritetaan vertaamalla uutta optimoitua menetelmää johonkin tunnettuun mittausmenetelmään, jonka tulostason erot tunnetaan ja jonka toistotarkkuus sekä oikeellisuus ovat riittäviä vertailumenetelmäksi. [12.]

Kuvassa 1 on esitetty virtauskaavion omaisesti analyttisen menetelmän eri kehitysvaiheet vasemmalta oikealle: toteutettavuus (early development), kehittäminen (GLP, Good Laboratory Practice) sekä validointi (GMP, Good Manufacturing Practice). Lisäksi kuvassa on esitetty näiden eri vaiheiden tavoitteet ja vaatimukset koskien tutkittavaa metodia, analytiikkaa, validointia sekä dokumentaatiota.

Figure 2



Kuva 1. Virtauskaavio uuden analyttisen metodin kehitysprosessista [13].

Kaupallisesti myytävien tuotteiden testaukseen vaaditaan yleensä akkreditoituja menetelmiä. Jotta jokin menetelmä lasketaan akkreditoituksi, sen täytyy saavuttaa tietyt laatukriteerit, jotka perustuvat kansainvälisiin standardeihin. Kun menetelmä akkreditoidaan, vahvistettu akkreditoiva elin arvioi ja hyväksyy samalla metodin lisäksi myös kyseisen laboratorion. [14.] Monet laboratoriot käyttävät myös niin sanottuja in-house-menetelmiä. Näitä menetelmiä ei tarvitse hyväksyttää ulkopuolisilla tahoilla, mutta ne seuraavat kuitenkin tarkkoja kehityksia ja validointiohjeita, jotka on laadittu laboratorion sisällä. Näitä in-house-menetelmiä voidaan käyttää hyväksi laboratorion sisäisen laadun tarkistamiseen. [15.]

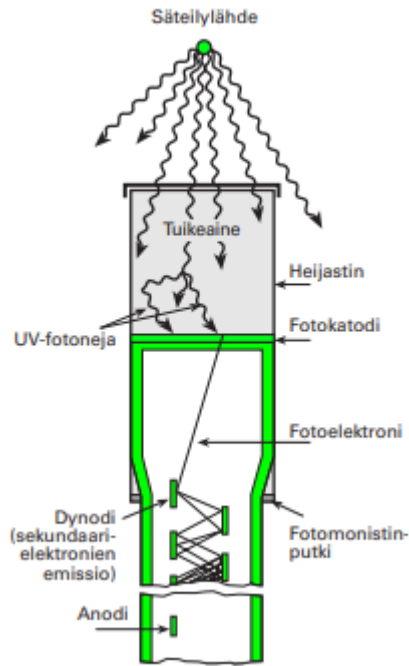
Tämänlaisia sisäisiä menetelmiä voivat olla muun muassa seuraavat analyttiset menetelmät: identifikaatiotesti, epäpuhtauksien hallinta sekä kvantitatiivinen analyysi. Identifikaatiotestillä tarkastellaan sisältääkö tutkittava näyte haluttua analyyttiä. Sillä ei kuitenkaan pystytä selvittämään analyytin määrää. Identifikaatiotesti suoritetaan yleensä vertaamalla näytteen jotakin ominaisuutta referenssistandardin samaan ominaisuuteen. Tulos voidaan antaa esimerkiksi muodossa kyllä/ei tai positiivinen/negatiivinen. Epäpuhtauksien testaaminen voi olla

joko kvantitatiivinentesti tai toteamisrajatesti. Kumpikin testi pyrkii osoittamaan näytteen puhtaustasoa, mutta ne vaativat kuitenkin erilaiset validointikriteerit. Kvantitatiivisella analyysillä mitataan valitun analyytin määrää tutkitussa näytteessä. Tulokseksi voidaan saada analyytin absoluuttinen määrä näytteessä, kun käytetään tarkkaan määriteltyjen referenssimateriaalien kalibrointikäyriä. Tulos voidaan myös ilmaista suhteellisesti, kun käytetään kalibrointikäyriä ja referenssimateriaaleja, jotka eivät täysin vastaa analyyyttiä. [15.]

### 2.3 Eksonukleaasien määrittäminen tuikeilmaisimella

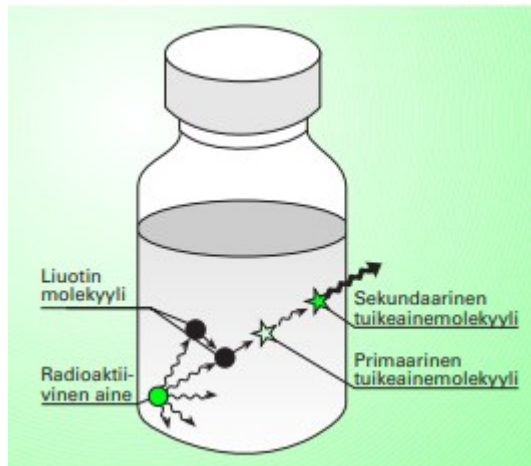
Nestetuikelaskennalla määritetään yleisimmin beeta- ja alfa-aktiivisten aineiden radioaktiivisuuden määrää. Sillä voidaan lisäksi havainnoida pienenenergisii gamma- sekä röntgensäteilijöitä. Nestetuikelaskentaa käytetään varsinkin biokemiassa ja sairaaloissa, mutta sillä voidaan myös analysoida alhaisaktiivisia ympäristönäytteitä. Yleisimpiä määritettäviä radionuklideja ovat  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{222}\text{Rn}$  ja  $^{241}\text{Pu}$ . [16, s. 165–166.]

Nestetuikelaskennassa voidaan käyttää radioaktiivisuuden mittaamiseen joko nestetuikeilmaisinta tai nestetuikespektrometriä. Pienet beetaenergiat, kuten  $^3\text{H}$  ja  $^{14}\text{C}$ , mitataan useimmin nestetuikeilmaisimella. Nestetuikeilmaisimen tärkeimmät osat ovat orgaaninen tuikeaine ja valomonistinputki. [17, s. 122–124.] Kuvassa 2 on esitetty tuikeilmaisimen tarkempi rakenne.



Kuva 2. Tuikeilmaisimen rakenne [17, s. 123].

Orgaaninen tuikeaine koostuu orgaanisesta aromaattisesta liuottimesta ja tuikeaineesta. Liuotin liuottaa näytteen ja tuikeaineet sekä siirtää energiaa alfa- tai beetahiukkaselta tuikeaineelle. Tuikeaineseokset koostuvat yleensä kahdesta eri tuikeaineesta, joista ensimmäinen vapauttaa säteilylähteeltä siirtyneen virityksen energian valona ja toinen muuttaa emittoituvan valon aallonpituuden optimaaliseksi, jotta se voidaan havaita valomonistinputkessa. [16, s. 166–167.] Emittoituneet valofotonit ohjataan valomonistinputken fotokatodille heijastavien pintojen avulla. Tämän seurauksena fotokatodista irtoaa elektroneja, jotka kiihdytetään ja monistetaan elektrodisarjalla (ns. dynodit). Elektronit kulkeutuvat dynodien kautta anodille, josta elektronien synnyttämä sähkösignaali voidaan mitata. [17, s. 125.] Kuvassa 3 on esitetty tarkemmin nestetuikeprosessin eri vaiheet.

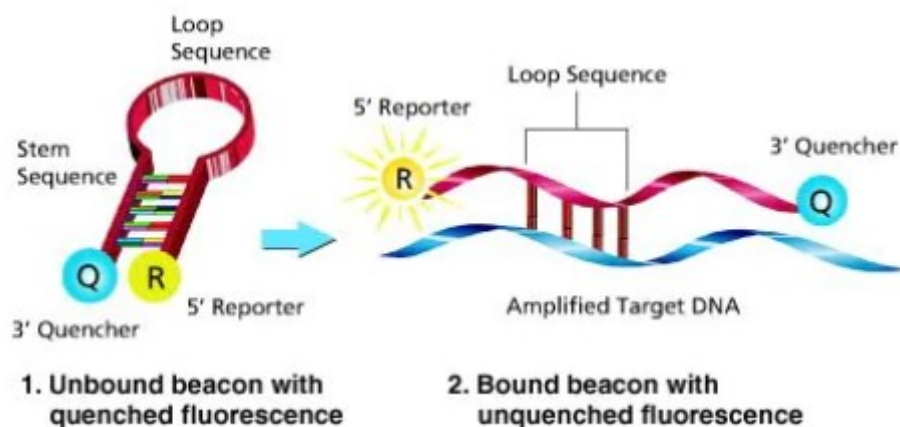


Kuva 3. Nestetuikeprosessin eri vaiheet. Nestetuikeprosessissa radioaktiivinen nuklidi virittää liuotinmolekyylin korkeammalle energiatilalle, minkä jälkeen energia siirtyy sisäisen siirtymän kautta tuikeinmolekyytille. Tuikeaine vapauttaa siirtyneen virityksen valofotoneina, jotka valomostinputki muuttaa sähköiseksi signaaliksi. [16, s. 167.]

Nestetuikeilmäisimellä voidaan mitata näytteiden eksonukleaasien entsyymimäärää semikvantitatiivisesti radioaktiivisesti leimattujen DNA-substraattien avulla. Käytetty DNA-substraatti sisältää radioaktiivista tritiumia ( $^3\text{H}$ ). Näytteitä inkuboidaan aluksi radioaktiivisesti leimatun yksijuosteisen DNA-substraatin sekä puskurin kanssa useita tunteja. Tämän aikana näytteen sisältämät mahdolliset eksonukleaasit pilkkovat substraatin lyhyemmiksi oligonukleotideiksi. Inkuboinnin jälkeen näytteiden sisältämät pitkät DNA-juosteet saostetaan trikloorietikkahapon (TCA) avulla. Saatua supernatantti sekoitetaan tuikeaineeseen ja analysoidaan tuikeilmäisimellä. Tuikeilmäisimellä havaitaan näytteistä  $^3\text{H}$ -aktiivisuutta, jos DNA-substraattia on pilkkoutunut riittävä määrä ja substraatissa käytettyä  $^3\text{H}$ -leimaa on jäänyt supernatanttiin. Näytteestä mitattua  $^3\text{H}$ -aktiivisuutta verrataan positiivikontrollina käytettävän Taq-DNA-polymeraasin vapauttamaan  $^3\text{H}$ -aktiivisuuteen. [18.] Taq-polymeraasia pystytään käyttämään positiivikontrollina, koska sillä on DNA-polymeraasiaktiivisuuden lisäksi 5'-3'-suuntaan toimiva eksonukleaasiaktiivisuus, joka sijaitsee Taq-polymeraasin aminopäässä eli N-terminaalissa [19].

## 2.4 Eksonukleaasien määrittäminen Molecular Beacon -koettimilla

Molecular Beacon -koettimet ovat kaksoisleimattuja fluoresoivia silmukkarakenteisia koettimia, joita käytetään hyväksi muun muassa reaaliaikaisessa ja päätepiste PCR-menetelmissä, SNP-analyysissä, patogeenien havaitsemisessa sekä geenin ilmentymisanalyysissä [20; 21]. Molecular Beacon -koettimien varrellinen silmukkarakenne muistuttaa hiuspinniä, jonka muodostavat 5'-pään fluoresoiva väriaine, fluorofori, 3'-pään sammuttaja sekä silmukan yksijuosteinen DNA-sekvenssi, joka on komplementaarinen kohde-DNA:lle. Koettimen varsirakenteet koostuvat noin 4–6 emäsparista ja ovat komplementaarisia toisilleen. Vastavasti koettimen silmukkarakenne koostuu noin 20–25 emäsparista. [21.] Kuvassa 4 on esitetty Molecular Beacon -koettimen rakenne sekä toimintatapa silmukkamuodossa sekä sitoutuneena kohde-DNA:han.



Kuva 4. Molecular Beacon -koettimen rakenne ja toimintatapa silmukkamuodossa sekä sitoutuneena kohde-DNA:han [21].

Kun Molecular Beacon -koetin on silmukkamuodossa, fluoroforin ja sammuttajan läheisyys estää fluoresenssin vapautumisen. Koettimen hiuspinnimuoto avautuu, kun silmukan DNA-sekvenssi sitoutuu kohde-DNA:han. Tämä toiminto erottaa fluoroforin ja sammuttajan toisistaan, jolloin fluoroforin luonnollinen fluoresenssiemissio voi tapahtua. Mitattu fluoresenssisignaali on suoraan verrannollinen kohde-DNA:n määrään. [21.] Molecular Beacon -koettimet ovat hyvin spesifisiä, sillä koettimen ja kohde-DNA:n hybridisaatio on termodynaamisesti suositumpaa kuin koettimen hiuspinnimuoto. Lisäksi koettimen

hiuspinnimuoto on termodynaamisesti suositavampaa kuin sen sitoutuminen epäspesifiseen DNA-sekvenssiin. [20.]

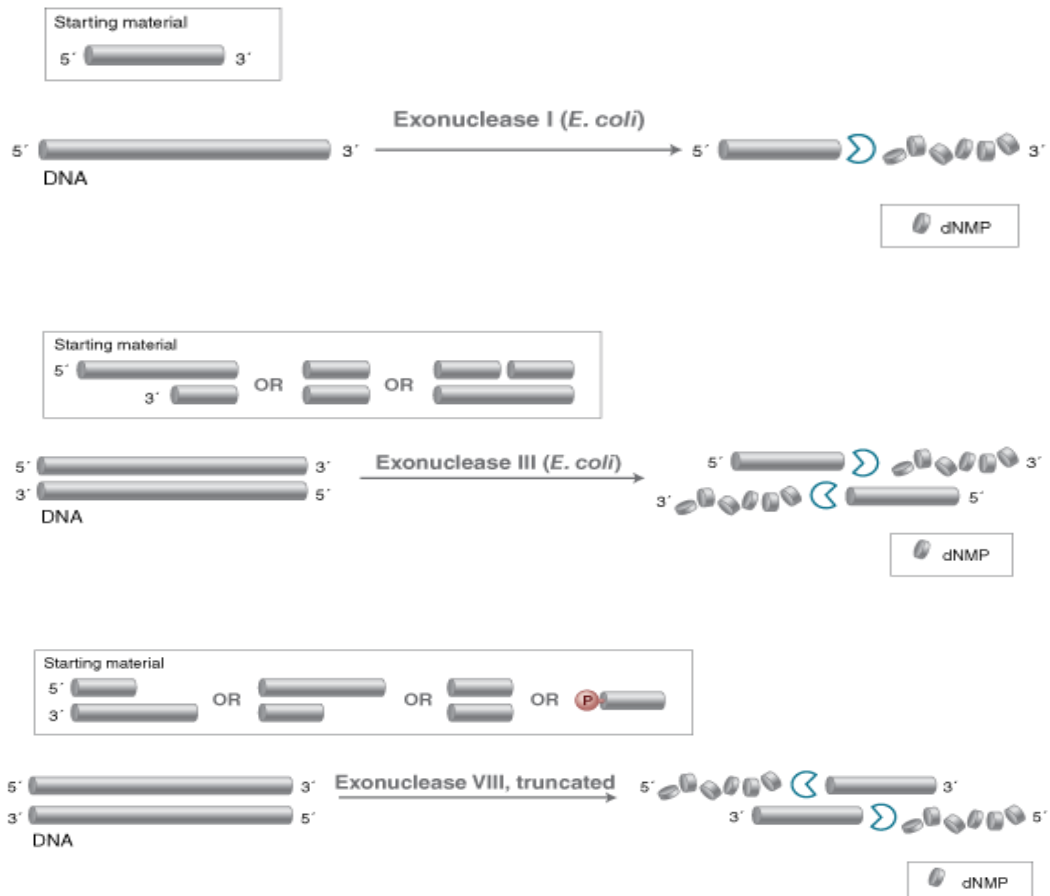
Molecular Beacon -koettimien toiminta pohjautuu fluoresenssiresonanssin energian siirtoon (FRET) [20]. FRET on etäisyysriippuvainen kahden virittyneen värimolekyylin välisestä vuorovaikutuksesta ja sillä tarkoitetaan säteilemätöntä energian siirtoa luovuttajamolekyyliltä, fluoroforilta, vastaanottajamolekyyliin, sammuttajaan [22; 23]. Tällaisen vuorovaikutuksen tapahtuessa molekyylien välillä ei tapahdu lämpöenergian muuntumista eikä molekulaarisia törmäyksiä [22]. Jotta energian siirto voi tapahtua, luovuttajamolekyylin ja vastaanottajamolekyylin on oltava lähellä toisiaan. Tyypillisesti tällainen etäisyys on 10–100 Å. Lisäksi vastaanottajamolekyylin absorptiospektrin ja luovuttajamolekyylin emissiospektrin on oltava päällekkäisiä. [23.]

Eksonukleaasien määrittäminen Molecular Beacon -koettimilla tapahtuu hieman eri tavalla kuin esimerkiksi PCR-reaktiossa. Fluoresoiva eksonukleaasimenetelmä perustuu eksonukleaasien kykyyn pilkkoa Molecular Beacon -koettimista fluoroforin ja sammuttajan erilleen, jolloin fluoresenssiresonanssin energian siirtoa ei tapahdu ja fluoresenssiemissio voidaan mitata. Fluoresenssin muutoksen mittaamiseen käytetään qPCR-laitteistoa, jonka reaktiolämpötila ja mittausväli pidetään samana koko mittauksen ajan. Määrittämisessä käytetään sopivaa puskuria sekä substraattina spesifisiä kaksoisleimattuja Molecular Beacon -koettimia ja fluoresenssin muutosta seurataan päätepisteiden fluoresenssitasoista tai reaktiokäyrien kulmakertoimista. Määrittämisessä käytetään positiivikontrolleina kaupallisia eksonukleaaseja, joiden pitoisuus tunnetaan. Menetelmä on kvalitatiivinen limit-testi, jolloin näytteistä mitattuja reaktiokäyriä verrataan tunnettujen standardien, positiivikontrollien sekä negatiivikontrollien, reaktiokäyriin. [24.]

### 3 Materiaalit ja menetelmät

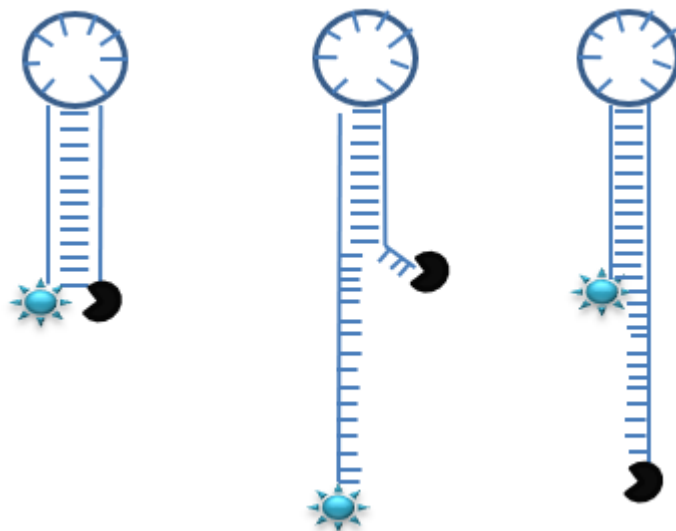
#### 3.1 Alustavat tutkimukset yrityksessä

Yrityksessä oli tehty alustavia tutkimuksia Molecular Beacon -koettimien soveltuvuudesta eksonukleaasiaktiivisuuden määrittämiseksi. Näiden tutkimusten perusteella tähän työhön valittiin kolme erilaista kaupallista eksonukleaasia: eksonukleaasi I, eksonukleaasi III ja katkaistu eksonukleaasi VIII. [25.] Eksonukleaasi I hajottaa lineaarista yksijuosteista DNA:ta 3'-päätä [5]. Eksonukleaasi III hajottaa lineaarista kaksijuosteista DNA:ta 3'-päätä, mutta se pystyy myös hajottamaan kaksijuosteista DNA:ta nukleotidiketjun keskeltä, jos siinä esiintyy nickejä [6]. Katkaistu eksonukleaasi VIII hajottaa lineaarista kaksijuosteista DNA:ta 5'-päätä [7]. Kuvassa 5 on esitetty näiden kolmen eksonukleaasin toiminta, aktiivisuussuunnat sekä mahdolliset DNA-substraatit.



Kuva 5. Eksonukleaasi I:n, III:n ja VIII:n toiminta, aktiivisuussuunnat ja substraatit [5;6;7].

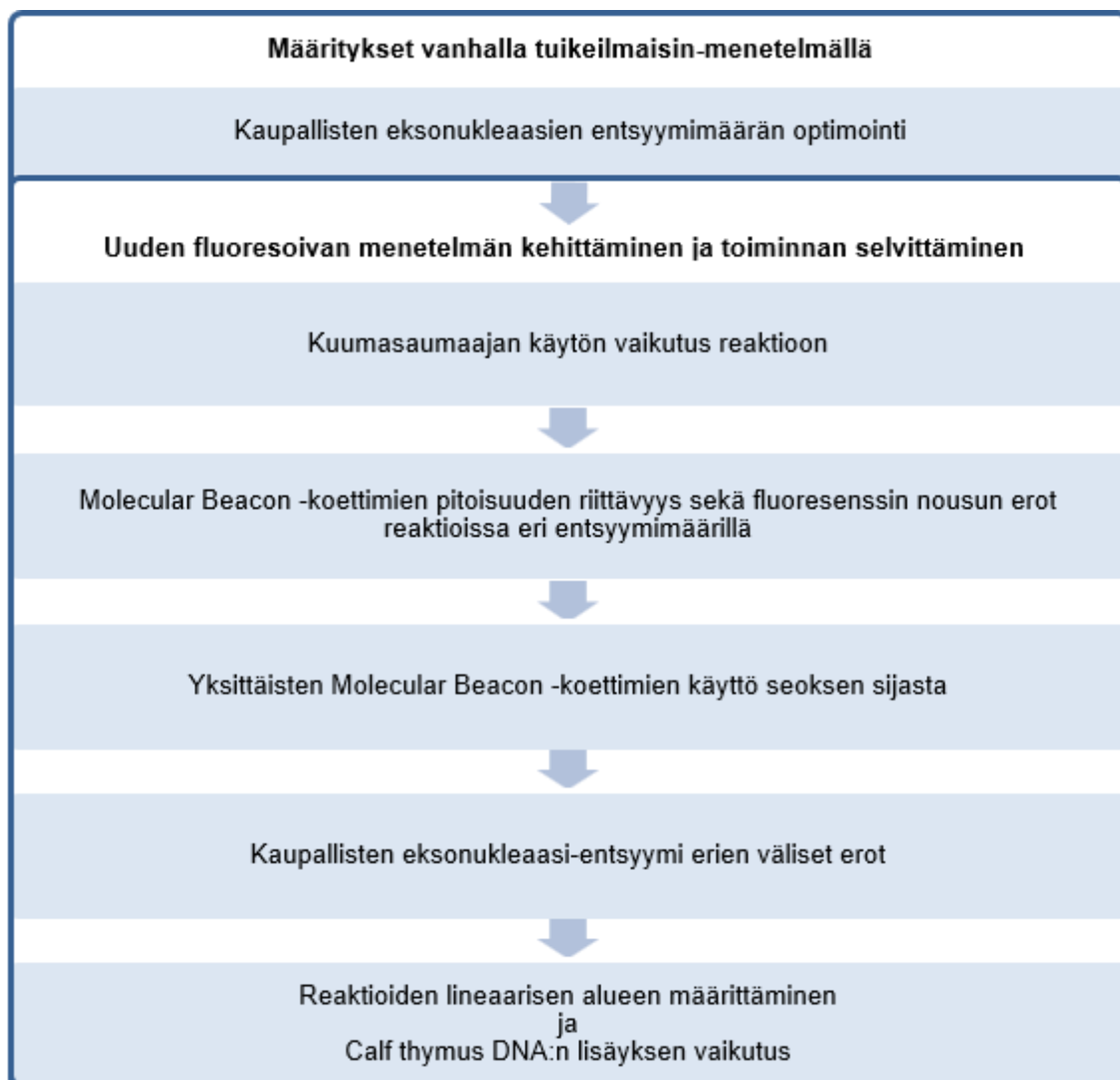
Molecular Beacon -koettimia valittiin eksonukleaasien tapaan myös kolme eri-laista: tylppäpäinen, 3'-häntäinen ja 5'-häntäinen koetin. Kaikkiin Molecular Beacon -koettimiin on liitetty 5'-pään fluoresoiva väriaine (FAM) ja 3'-pään sammuttaja (Iowa Black FQ). Molecular Beacon -koettimien silmukkaosa koostuu kuudesta nukleotidistä, komplementaariset varret 14 nukleotidistä ja hännät 12 nukleotidistä. Kuvassa 6 on havainnollistettu näiden koettimien rakenteita. [25.]



Kuva 6. Kuvassa on havainnollistettu vasemmalta oikealle tylppäpäisen, 5'-hän-  
täisen ja 3'-hän-  
täisen koettimen rakenne [25.]

Aikaisempien tutkimusten perusteella kaupallisten eksonukleaasien mukana tulleet puskurit korvattiin Taq-puskurilla ja tämän työn lähtökohtana reaktioissa käytettiin koetinseosta, jossa kaikkien kolmen koettimen pitoisuus oli  $0,17 \mu\text{M}$  [25].

Kuvassa 7 on esitetty virtauskaavio opinnäytetyön kulusta sekä tutkittavista muuttujista.



Kuva 7. Virtauskaavio opinnäytetyön kulusta sekä tutkittavista muuttujista.

### 3.2 Eksonukleaasien määrittäminen näytteistä nestetuikeilmaisimella

Eksonukleaasien määrittäminen suoritettiin yrityksen sisäisen työohjeen mukaisesti. Määrittämistä varten valmistettiin esiseos (reaktioseos ilman näytettä) taulukossa 1 esitetyn reaktioseoksen mukaisesti. Eksonukleaasi-näytteinä käytettiin kaupallisia New England BioLabs -yritykseltä tilattuja eksonukleaaseja: eksonukleaasi I (M0293S), eksonukleaasi III (M0206S) sekä eksonukleaasi VIII (M0545S). Nolanäytteenä sekä totaalireaktionäytteenä käytettiin Milli-Q-vettä ja Taq-polymeraasi-kontrollina käytettiin yrityksen omaa Taq-polymeraasi-laimennosta.

Taulukko 1. Eksonukleaasien määrittämiseen nestetuikeilmaisimella valmistetut reaktioseokset.

Komponentti	Tilavuus reaktiossa
ssDNA eksonukleaasi substraatti (Yrityksen oma substraatti)	4 µl
10 x Taq-puskuri (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM KCl)	5 µl
Milli-Q-vesi	36 µl
Näyte	5 µl

Esiseos pipetoitiin näytteiden kanssa näyteputkiin, joita inkuboitiin 37 °C:ssa 4 tuntia. Näytteisiin lisättiin 100 µl Herring sperm DNA:ta (Yrityksen reagenssi), minkä jälkeen näyteputkia vorteksoitiin. Totaalireaktionäytteisiin lisättiin 150 µl Milli-Q-vettä ja muihin näytteisiin lisättiin 150 µl 20-prosenttista TCA-liuosta (tuotenumero 0133, VWR Chemicals, LLC). Näytteitä pidettiin jäissä 5 minuutin ajan ja sentrifugoitiin 4 °C:ssa 13 300 rpm:n nopeudella 5 minuuttia. Nestetuikeputkiin lisättiin 3 ml nestetuikeseosta (tuotenumero 461-008, Hidex) ja 150 µl supernatanttia. Nestetuikeputkia vorteksoitiin 10 sekunnin ajan, minkä jälkeen näytteiden radioaktiivisuus mitattiin Hidex 300SL -nestetuikeilmaisimella. Määrittämissä käytettiin 1 minuutin laskentaohjelmaa <sup>3</sup>H-isotoopille sekä taustastandardia (tuotenumero 6008411, PerkinElmer) ja H<sup>3</sup>-standardia (tuotenumero 6008412, PerkinElmer). Tulokset analysoitiin yrityksen omalla Excel-laskentataulukolla.

### 3.3 Eksonukleaasien määrittäminen näytteistä Molecular Beacon -koettimeilla qPCR-laitteella

Käytetyt Molecular Beacon -koettimet tilattiin Integrated DNA Technologies (IDT) -yritykseltä. Määrittämissä oli mukana kolme erilaista koetinta, tylppäpäinen (ref. 226328204/228268199, IDT), 3'-häntäinen (ref. 226328206/228268201, IDT) ja 5'-häntäinen (ref. 226328205/228268200, IDT). Molecular Beacon -koettimet laimennettiin TE-puskuriin. Positiivikontrollinäytteinä

määrityksessä käytettiin samoja kaupallisia eksonukleaaseja kuin nestetuikemäärityksessä sekä Taq-polymeraasia. Tämän lisäksi kontrollinäytteinä käytettiin yrityksessä valmistettua RT-entsyymiä ja vasta-ainetta, jotka eivät omaa eksonukleaasiaktiivisuutta. Nämä näytteet on todettu riittävän puhtaksi eksonukleaaseista radioaktiivisella menetelmällä. Negatiivisena kontrollina käytettiin jokaisessa määrityksessä 1X Taq-puskuria. Näytelaimennokset valmistettiin taulukossa 1 esitettyyn Taq-puskuriin. Määritystä varten valmistettiin esiseos taulukossa 2 esitetyn reaktioseoksen mukaisesti. Työssä käytettyjen Molecular Beacon -koettimien ja näytteiden konsentraatiot reaktioissa on esitetty tulosten yhteydessä.

Taulukko 2. Eksonukleaasien määritykseen Molecular Beacon -koettimilla valmistetut reaktioseokset.

Komponentti	Tilavuus reaktiossa
10X Taq-puskuri	2 µl
Molecular Beacon -seos/ yksittäinen Molecular Beacon -koetin	1 µl
Milli-Q-vesi	12 µl
Näyte	5 µl

Esiseos ja näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevylle kylmäblokin päällä. Näytteitä, Molecular Beacon -koettimia ja esiseoksia pidettiin jäissä pipetoinnin ajan. Kuoppalevy suljettiin kuumasaumajalla ja sentrifugoitiin ennen qPCR-ajoa. qPCR-ajot suoritettiin CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System -laitteilla, joissa reaktiolämpötila oli 37 °C ja reaktioaika 4 tuntia. Fluoresenssitason muutosta reaktioissa mitattiin 1 minuutin välein. Tulokset analysoitiin Bio-Rad CFX Manager (3.1) -ohjelman avulla, jossa pohjaviiva asetuksena oli No Baseline subtraction.

## 4 Tulokset ja tulosten tarkastelu

### 4.1 Eksonukleaasien entsyymimäärän optimointi

Kaupallisten eksonukleaasien entsyymimäärä optimoitiin yrityksessä käytössä olevalla radioaktiivisella menetelmällä. Menetelmän yhtenä kriteerinä oli, että näytteistä ei saisi vapautua enempää kuin 1 % vedyn isotooppi  $^3\text{H}$  radioaktiivisuutta. Uudelle fluoresoivalle eksonukleaasimenetelmälle haluttiin samat kriteerit kuin radioaktiivisessa menetelmässä. Tästä syystä optimoinnilla haettiin eksonukleaasientsyymimäärää, joka vapauttaisi noin 1 %  $^3\text{H}$  radioaktiivisuutta. Taulukossa 3 on esitetty keskiarvot vapautuneesta radioaktiivisuudesta muutamalla eri entsyymimäärällä. Kaikki mittaustulokset, tulosten keskiarvot ja keskihajonnat on esitetty liitteessä 1. Määrittämiä tehtiin seitsemällä eri mittauskeralla, joissa osalle näytteistä tehtiin kaksi rinnakkaismäärittystä.

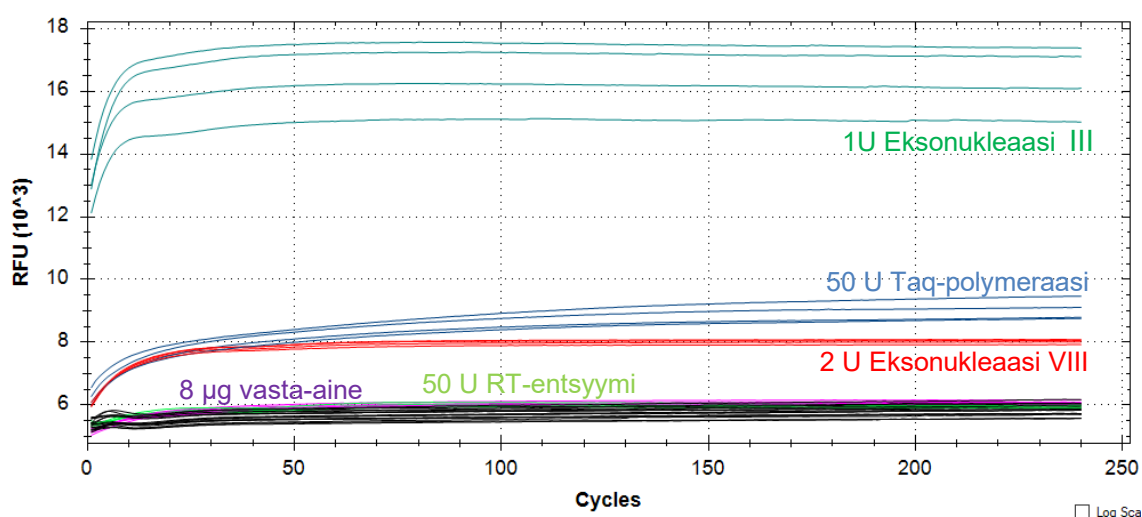
Taulukko 3. Kaupallisten eksonukleaasien ja Taq-polymeraasin vapauttaman radioaktiivisuuden keskiarvot ja keskihajonta eri entsyymimäärillä. Määrittäminen tehtiin nestetuikeilmaisimella.

<b>Eksonukleaasi I</b>					
Entsyymimäärä	5 U	7,5 U	9 U	10 U	15 U
<sup>3</sup> H aktiivisuus %	0,01	0,01	0,13	6,37	11,92
Keskihajonta	0,18	0,03	-	3,53	-
<b>Eksonukleaasi III</b>					
Entsyymimäärä	0,3 U	0,5 U	1 U	1,25 U	1,5 U
<sup>3</sup> H aktiivisuus %	0,00	0,33	0,97	2,22	2,57
Keskihajonta	-	0,29	1,07	-	-
<b>Eksonukleaasi VIII</b>					
Entsyymimäärä	1 U	1,5 U	2 U	3 U	5 U
<sup>3</sup> H aktiivisuus %	0,95	1,85	1,87	2,66	2,32
Keskihajonta	0,18	0,32	0,46	0,13	-
<b>Taq-polymeraasi</b>					
Entsyymimäärä	50 U	100 U			
<sup>3</sup> H aktiivisuus %	1,34	2,41			
Keskihajonta	0,31	0,36			

Tuloksista huomattiin, että eri mittauskertojen välillä oli hieman vaihtelua eksonukleaasien vapauttamassa radioaktiivisuudessa. Myös saatujen aktiivisuusarvojen keskihajonnat olivat aika suuret joidenkin entsyymimäärien kohdalla. Tämän lisäksi kaupallisten eksonukleaasierien väleillä aktiivisuuserot vaihtelivat paljon. Näiden tulosten sekä yrityksessä tehtyjen alustavien tutkimusten perusteella fluoresoivan menetelmän kehittämisessä käytettiin pääsääntöisesti seuraavia entsyymimääriä: 10 U eksonukleaasi I (radioaktiivisuutta vapautui 0,42–6,37 %), 1 U eksonukleaasi III (radioaktiivisuutta vapautui 0,97 %) ja 1–2 U eksonukleaasi VIII (radioaktiivisuutta vapautui 0,95–1,87 %).

## 4.2 Molecular Beacon -koettimien pitoisuudet sekä päätepisteiden fluoresenssitaset

Fluoresoivan eksonukleaasimenetelmän toimivuutta tutkittiin valituilla kaupallisilla eksonukleaasimäärillä, Taq-polymeraasilla sekä yrityksen kahdella eri tuotteella, vasta-aineella ja RT-entsyymillä (kuva 8). Käytetyllä vasta-aineella ja RT-entsyymillä ei ole tutkitusti eksonukleaasiaktiivisuutta (määrittäminen tehty radioaktiivisella menetelmällä). Yrityksen omat tuotteet otettiin määrittämiseen mukaan, jotta varmistettiin, etteivät tuotteet aiheuta väärää positiivista reaktiota fluoresoivalla eksonukleaasimenetelmällä. Reaktioissa käytettiin aikaisemman tutkimustiedon perusteella Molecular Beacon -koetinseosta, jossa yksittäisen koettimen pitoisuus oli  $0,17 \mu\text{M}$ . Jokaisesta reaktiosta tehtiin neljä rinnakkaismäärittystä ja negatiivisista kontroleista kahdeksan rinnakkaismäärittystä.

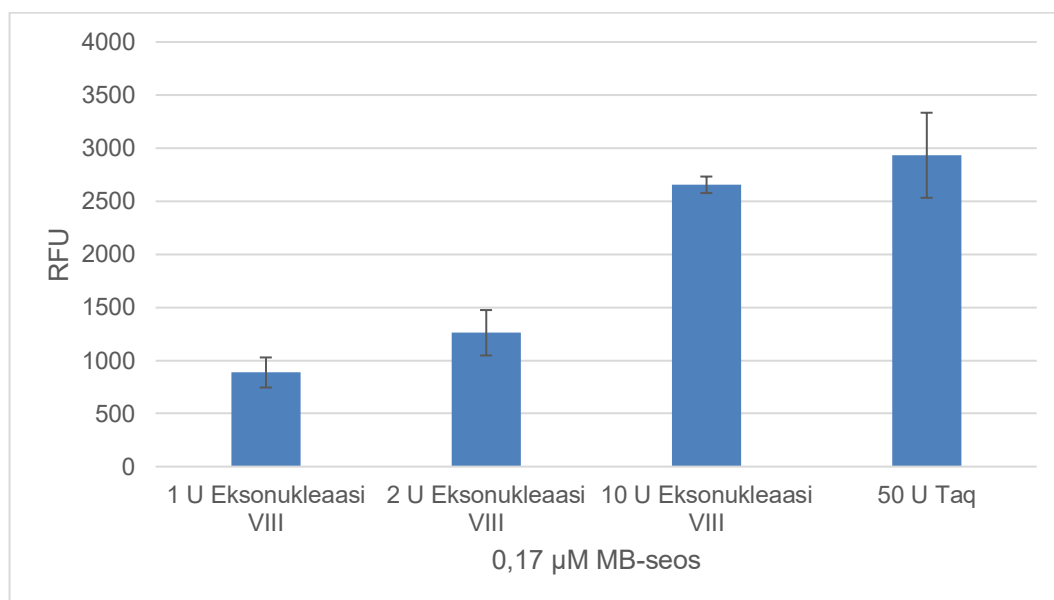


Kuva 8. qPCR-kuvaaja fluoresoivan menetelmän toimivuuden tutkimisesta. Reaktioissa käytettiin Molecular Beacon -koetinseosta, jossa yksittäisen koettimen pitoisuus oli  $0,17 \mu\text{M}$ . Kuvaajaan on merkitty tumman vihreällä 1 U eksonukleaasi III, sinisellä 50 U Taq-polymeraasi, punaisella 2 U eksonukleaasi VIII, liilalla 8  $\mu\text{g}$  vasta-aine, vaalean vihreällä 50 U RT-entsyymi ja mustalla negatiiviset kontrollit.

Kuvassa 8 on esitetty reaktioiden fluoresenssitason muutos syklien funktiona. Yksi sykli tarkoittaa tässä tapauksessa yhden minuutin mittausväliä. Kuvasta 8 nähdään, että vasta-aineen ja RT-entsyymin reaktiokäyrät jäävät myös fluoresoivalla menetelmällä selkeästi negatiivisten kontrollien tasolle. Tämän lisäksi

reaktiot, jotka sisälsivät 50 U Taq-polymeraasia ja 2 U eksonukleaasi VIII:ta antavat hyvin samankaltaisen vasteen päätepisteiden fluoresenssitasoissa, mikä vastaa radioaktiivisen menetelmän tuloksia. Näistä tuloksista huomataan kuitenkin, että eksonukleaasi III antaa huomattavasti suuremman vasteen fluoresenssitasoissa, kuin mikään muu tutkittu näyte. Eksonukleaasi III todennäköisesti hajottaa koettimet kokonaan keskeltä lähtien riippumatta koettimien eri päistä. Tästä syystä eksonukleaasi III päätettiin jättää pois opinnäytetyön jatkotutkimuksista.

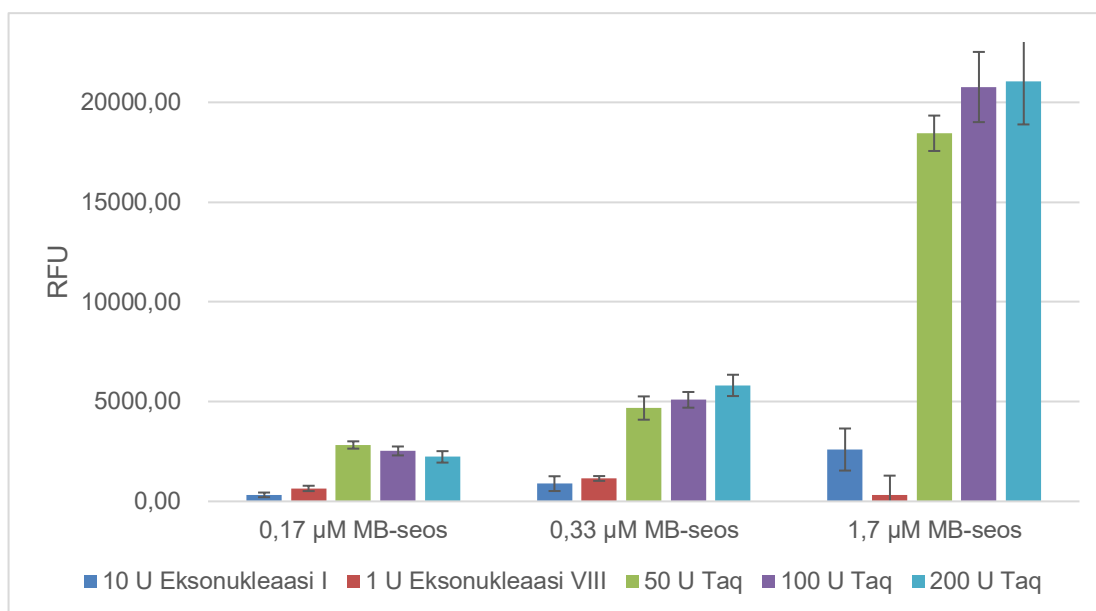
Reaktioiden päätepisteiden fluoresenssitasojen eroja tutkittiin kolmella eri eksonukleaasi VIII pitoisuudella. Jokaisesta pitoisuudesta tehtiin neljä rinnakkaismäärittystä ja negatiivisista kontroleista tehtiin kahdeksan rinnakkaismäärittystä. Reaktiot sisälsivät 1 U, 2 U ja 10 U eksonukleaasi VIII:ta sekä kontrollina 50 U Taq-polymeraasia. Reaktioissa käytettiin edellisen määrittelyn tapaan Molecular Beacon -koetinseosta, jossa yksittäisen koettimen pitoisuus oli  $0,17 \mu\text{M}$ . Kuvassa 9 on esitetty reaktioiden päätepisteiden fluoresenssitasot, joista on vähennetty negatiivisten kontrollien nollataso.



Kuva 9. Eksonukleaasi VIII ja Taq-polymeraasireaktioiden päätepisteiden fluoresenssitasojen erot, kun reaktioissa käytettiin Molecular Beacon -koetinseosta. Yksittäisen koettimen pitoisuus reaktiossa oli  $0,17 \mu\text{M}$ . Negatiivisten kontrollien nollataso on vähennetty reaktioiden RFU-tasoista. Pylväisiin on lisäksi merkitty keskihajontaväli.

Eksonukleaasi VIII:ta sisältävien reaktioiden päätepiste fluoresenssitaset kasvasivat odotetulla tavalla melko lineaarisesti, kun eksonukleaasipitoisuutta nostettiin. Kuitenkin edellisistä tuloksista poikkeavasti, 50 U Taq-polymeraasia sisältävän reaktion päätepiste fluoresenssitaso ei jää samalle tasolle kuin 1 U ja 2 U eksonukleaasi VIII:ta sisältävien reaktioiden fluoresenssitasot. Kyseinen fluoresenssitaso nousee jopa korkeammaksi kuin 10 U eksonukleaasi VIII:ta sisältävän reaktion fluoresenssitaso, mikä poikkeaa täysin radioaktiivisella menetelmällä saaduista tuloksista. 50 U Taq-polymeraasin ajateltiin mahdollisesti käytävän kaikki reaktion sisältämät Molecular Beacon -koettimet loppuun.

Edellisten tulosten perusteella tutkittiin reaktioiden päätepisteiden fluoresenssitasojen eroja eri Molecular Beacon -koetinkonsentraatioilla. Reaktiot sisälsivät 10 U eksonukleaasi I:tä, 2 U eksonukleaasi VIII:ta sekä 50 U, 100 U ja 200 U Taq-polymeraasia. Reaktioissa käytettiin Molecular Beacon -koetinseoksia, joissa yksittäisen koettimen pitoisuudet olivat 0,17  $\mu\text{M}$ , 0,33  $\mu\text{M}$  ja 1,7  $\mu\text{M}$ . Kuvassa 10 on esitetty reaktioiden päätepisteiden fluoresenssitasot, joista on vähennetty negatiivisten kontrollien nollataso. Jokaisesta eri reaktiosta tehtiin neljä rinnakkaismäärittystä, ja lisäksi negatiivisista kontrolleista tehtiin kahdeksan rinnakkaismäärittystä.

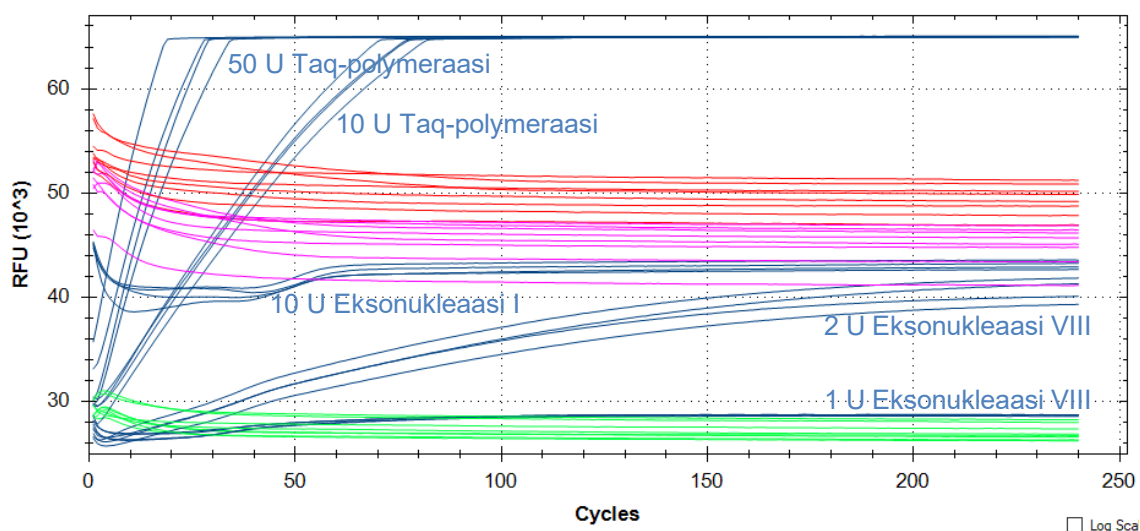


Kuva 10. Eksonukleaasi I, eksonukleaasi VIII ja Taq-polymeraasireaktioiden päätepisteiden fluoresenssitason erot, kun koettimien pitoisuuksia nostetaan. Reaktioissa käytettiin Molecular Beacon -koetinseoksia, joissa yksittäisen koettimen pitoisuudet olivat 0,17 μM, 0,33 μM ja 1,7 μM. Negatiivisten kontrollien nollataso on vähennetty reaktioiden RFU-tasoista. Pylväisiin on lisäksi merkitty keskihajontaväli.

Eksonukleaasi I:tä sisältävien reaktioiden päätepiste fluoresenssitaso nousee, kun reaktioiden Molecular Beacon -koettimien pitoisuutta nostettiin, mikä oli odotettu tulos. Eksonukleaasi VIII käyttäytyy kuitenkin täysin eri lailla ja sitä sisältävien reaktioiden fluoresenssitaso laskee selkeästi, kun käytetään suurinta koetinpitoisuutta. Tämän lisäksi ei nähdä selkeätä eroa eri Taq-polymeraasipitoisuuksia sisältävien reaktioiden päätepiste fluoresenssitasoissa. Tästä voitiin päätellä, että Taq-polymeraasi käyttää reaktiossa olevat Molecular Beacon -koettimet loppuun. Tulosten perusteella oletettiin myös, että koetinseoksen tausta häiritsi yksittäisiä koettimia substraattina käyttävien eksonukleasien fluoresenssin nousun näkymistä. Tämä näkyi selkeästi eksonukleaasi VIII:ta sisältävien reaktioiden kohdalla. Eksonukleaasi VIII hajottaa vain 5'-häntäistä koetinta.

### 4.3 Molecular Beacon -seoksen taustan häirintä sekä yksittäisten Molecular Beacon -koettimien käyttö

Reaktioiden sisältämien koettimien pitoisuudet nostettiin mahdollisimman korkeiksi, jotta nähtäisiin, saadaanko Taq-polymeraasia sisältävien reaktioiden päätepisteiden fluoresenssitasoille selkeä ero. Lisäksi reaktioissa käytettiin yksittäisiä Molecular Beacon -koettimia, jotta nähdään, paraneeko fluoresenssi-vaste tämän avulla. Eksonukleaasi I:tä sisältävissä reaktioissa käytettiin 5  $\mu$ M 3'-häntäistä koetinta ja eksonukleaasi VIII:ta sekä Taq-polymeraasia sisältävissä reaktioissa käytettiin 5  $\mu$ M 5'-häntäistä koetinta. Molecular Beacon -koetinseoksen taustan häiritsemistä tutkittiin negatiivisten kontrollien avulla. Negatiivisissa kontrolleissa käytettiin 5  $\mu$ M 3'-häntäistä koetinta, 5  $\mu$ M 5'-häntäistä koetinta sekä Molecular Beacon -koetinseosta, jossa yksittäisen koettimen pitoisuus oli 5  $\mu$ M. Jokaisesta eri reaktiosta tehtiin neljä rinnakkaismäärittystä lukuun ottamatta negatiivisia kontrolleja, joista tehtiin kahdeksan rinnakkaismäärittystä. Yllä olevien reaktioiden qPCR-kuvaaja on esitetty kuvassa 11.

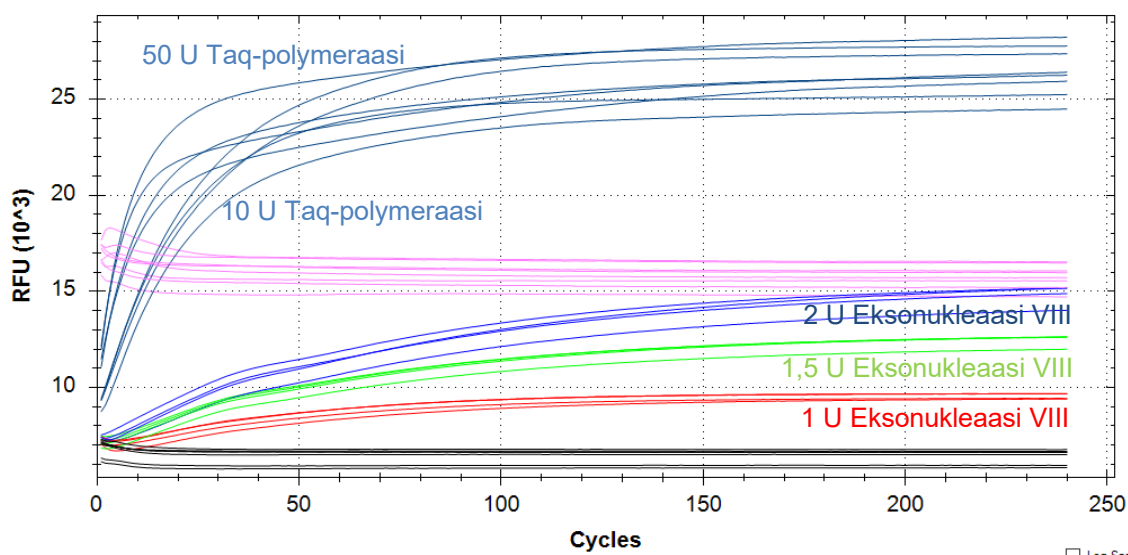


Kuva 11. qPCR-kuvaaja Molecular Beacon -seoksen taustan häirinnästä sekä yksittäisten Molecular Beacon -koettimien käytöstä. Kuvaajaan on merkitty eri näytteiden reaktiokäyrät sinisellä. 10 U Eksonukleaasi I sisältävissä reaktioissa käytettiin 5 µM 3'-häntäistä koetinta. 1 U ja 2 U eksonukleaasi VIII sekä 10 U ja 50 U Taq-polymeraasia sisältävissä reaktioissa käytettiin 5 µM 5'-häntäistä koetinta. Negatiiviset kontrollit on merkitty kuvaajaan punaisella (Molecular Beacon -koetinseos, jossa yksittäisen koettimen pitoisuus oli 5 µM), lilalla (5 µM 3'-häntäinen koetin) ja vihreällä (5 µM 5'-häntäinen koetin).

Vaikka Molecular Beacon -koettimen pitoisuus nostettiin niin suureksi, että laitteen vastekatto tuli täyteen, 10 U ja 50 U Taq-polymeraasia sisältäville reaktioille ei saatu selkeätä eroa päätepiste fluoresenssitasoissa. Reaktiokäyrien alun muodossa huomataan kuitenkin selkeä ero, minkä avulla voidaan määrittää Taq-polymeraasille mahdollinen lineaarinen alue. Kuvasta 11 huomataan myös, että Molecular Beacon -koetinseoksen tausta selkeästi häiritsee eksonukleaasi I:n ja VIII fluoresenssivasteen näkymistä. Tämä nähdään siitä, että vain Molecular Beacon -koetinseosta sisältävän reaktion vaste (punaiset käyrät) ylittää huomattavasti niiden reaktioiden, jotka sisältävät vain yksittäistä koetinta ja eksonukleaasia (siniset käyrät), vasteen. Tällöin, jos reaktio sisältää suuren pitoisuuden Molecular Beacon -koetinseosta, reaktiosta mitattu vaste johtuu suurimmaksi osaksi vain yksinään koetinseoksen aiheuttamasta fluoresenssitason noususta. Tämä ei ole haluttu tulos, eikä myöskään kerro mitään eksonukleaasien aiheuttamasta fluoresenssin noususta. Tämän perusteella reaktioissa tulisi käyttää huomattavasti pienempiä Molecular Beacon -

koetinseospitoisuuksia tai sellaista yksittäistä koetinta, joka on eksonukleasille ensisijainen substraatti.

Molecular Beacon -koettimien pitoisuus reaktioissa laskettiin  $1 \mu\text{M}$  ja näytteitä sisältävissä reaktioissa käytettiin vain 5'-hätäistä koetinta. Määrittämissä oli mukana 50 U ja 10 U Taq-polymeraasia sekä 1 U, 1,5 U ja 2 U eksonukleasi VIII:ta. Jokaiselle reaktiolle tehtiin neljä rinnakkaismäärittystä. Negatiivisten kontrollien reaktioissa käytettiin  $1 \mu\text{M}$  5'-hätäistä koetinta sekä Molecular Beacon -koetinseosta, jossa yksittäisen koettimen pitoisuus oli  $1 \mu\text{M}$ . Negatiivisille kontroleille tehtiin kahdeksan rinnakkaismäärittystä. Reaktioiden qPCR-kuvaaja on esitetty kuvassa 12.



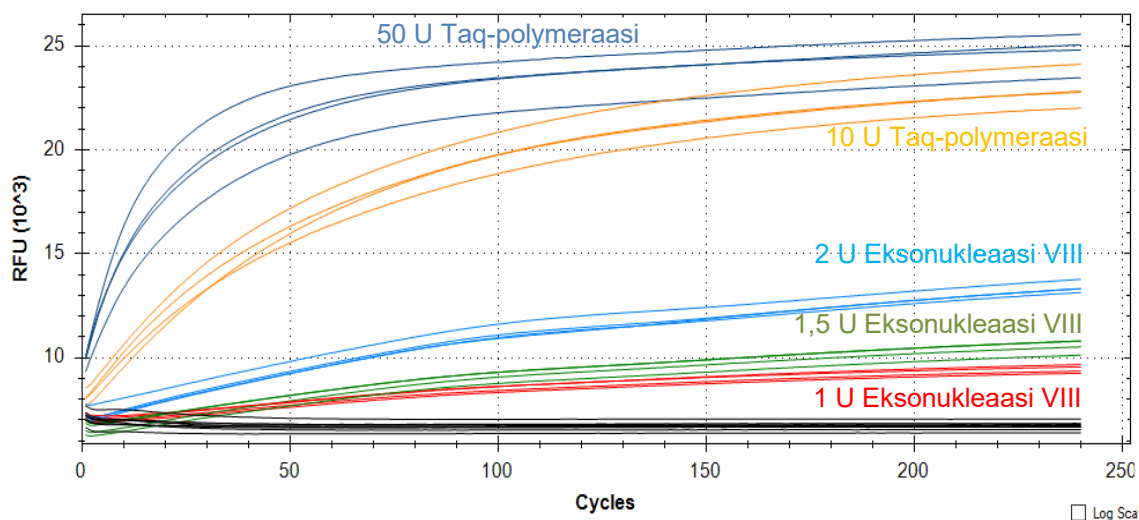
Kuva 12. qPCR-kuvaaja Molecular Beacon -seoksen taustan häirinnästä sekä yksittäisten Molecular Beacon -koettimien käytöstä, kun koetinpitoisuus reaktioissa laskettiin  $1 \mu\text{M}$ . Näytteitä sisältävissä reaktioissa käytettiin vain 5'-hätäistä koetinta. Kuvaajaan on merkitty harmaansinisellä 10 U ja 50 U Taq-polymeraasi, tumman sinisellä 2 U eksonukleasi VIII, vihreällä 1,5 U eksonukleasi VIII ja punaisella 1 U eksonukleasi VIII. Negatiiviset kontrollit on merkitty kuvaajaan lilalla (Molecular Beacon -koetinseos, jossa yksittäisen koettimen pitoisuus oli  $1 \mu\text{M}$ ), mustalla ( $1 \mu\text{M}$  5'-hätäinen koetin).

Eksonukleasi VIII:ta sisältävien reaktioiden fluoresenssivaste jää Molecular Beacon -koetinseoksen taustan alle myös alhaisemmalla koetinpitoisuudella. Lisäksi 10 U ja 50 U Taq-polymeraasia sisältävien reaktioiden erot reaktiokäyrien

alussa pienenivät, mutta eron käyrän alussa voi nähdä vielä 1  $\mu\text{M}$  koetinpitoisuudellakin.

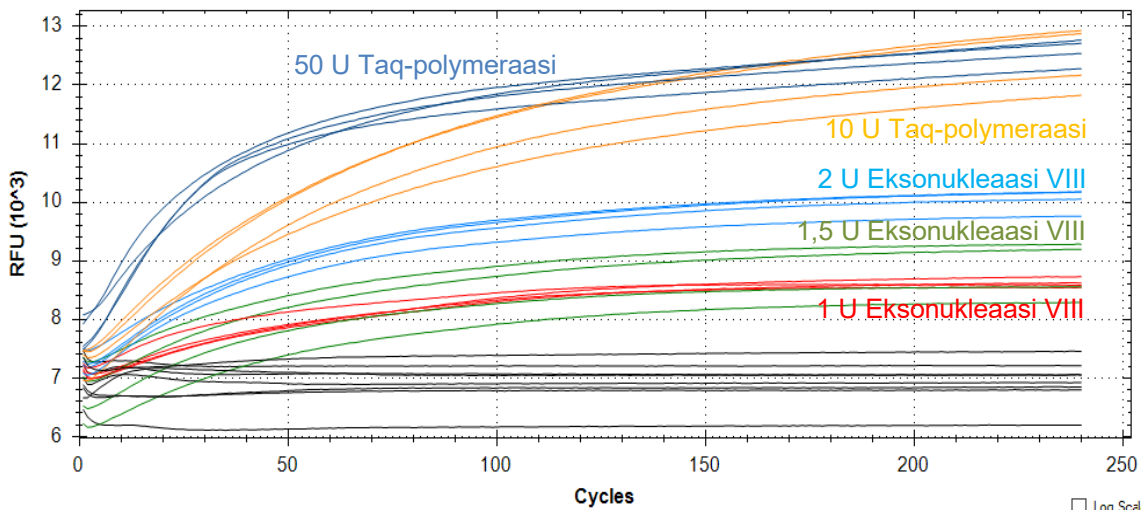
#### 4.4 Lineaarisen alueen määrittäminen

Lineaarisen alueen määrittämiseksi qPCR-laitteen reaktioaikaa lyhennettiin ja mittausväliä tihennettiin. Fluoresenssin kehitystä reaktioissa seurattiin yhden tunnin ajan ja mittausväli oli 15 sekuntia. Määrityksessä oli mukana 10 U ja 50 U Taq-polymeraasi sekä 1 U, 1,5 U ja 2 U eksonukleaasi VIII:ta. Reaktioissa käytettiin sekä 1  $\mu\text{M}$  5'-häntäistä koetinta että Molecular Beacon -koetinseosta, jossa yksittäisen koettimen pitoisuus oli 0,33  $\mu\text{M}$ . Kaikista reaktioista tehtiin neljä rinnakkaismääritystä lukuun ottamatta negatiivisia kontroleja, joista tehtiin kahdeksan rinnakkaismääritystä. Kuvassa 13 on esitetty qPCR-kuvaaja reaktioista, joissa käytettiin vain 1  $\mu\text{M}$  5'-häntäistä koetinta. Kuvaajassa yksi sykli tarkoittaa 15 sekunnin mittausväliä.



Kuva 13. qPCR-kuvaaja lineaarisen alueen määrittämisestä. Reaktiossa käytettiin 1  $\mu\text{M}$  5'-häntäistä Molecular Beacon -koetinta. Kuvaajaan on merkitty harmaalla sinisellä 50 U Taq-polymeraasi, oranssilla 10 U Taq-polymeraasi, kirkkaansinisellä 2 U eksonukleaasi VIII, vihreällä 1,5 U eksonukleaasi VIII ja punaisella 1 U eksonukleaasi VIII. Negatiiviset kontrollit on merkitty kuvaajaan mustalla.

Kuvassa 14 on esitetty qPCR-kuvaaja reaktioista, joissa käytettiin Molecular Beacon -koetinseosta, jossa yksittäisen koettimen pitoisuus oli  $0,33 \mu\text{M}$ . Kuvaajassa yksi sykli tarkoittaa 15 sekunnin mittausväliä.

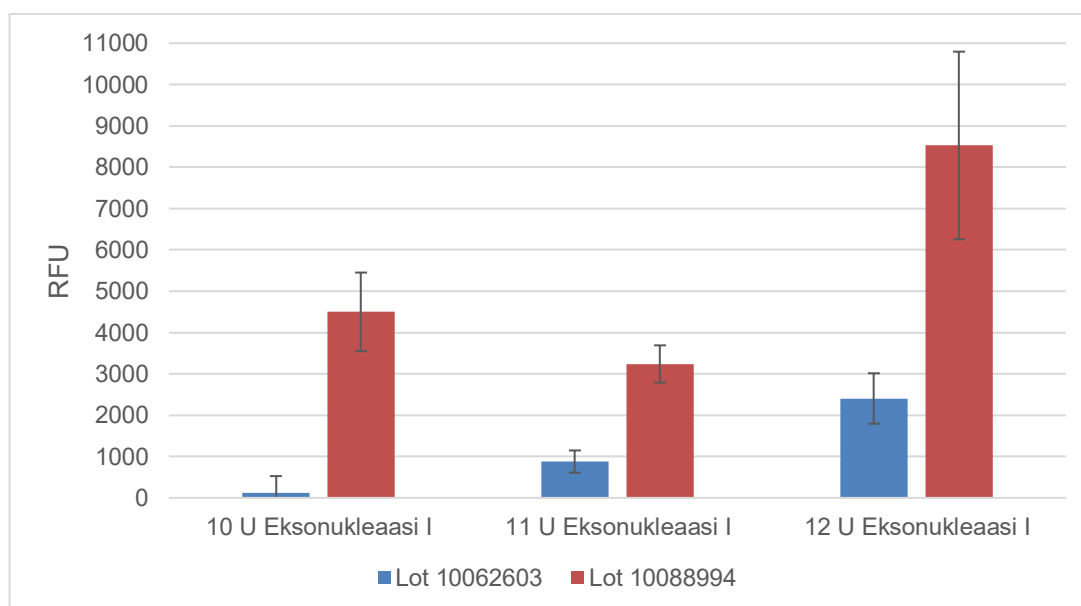


Kuva 14. qPCR-kuvaaja lineaarisen alueen määrittämiseksi. Reaktiossa käytettiin Molecular Beacon -koetinseosta, jossa yksittäisen koettimen pitoisuus oli  $0,33 \mu\text{M}$ . Kuvaajaan on merkitty harmaalla 50 U Taq-polymeraasi, oranssilla 10 U Taq-polymeraasi, kirkkaansinisellä 2 U eksonukleasi VIII, vihreällä 1,5 U eksonukleasi VIII ja punaisella 1 U eksonukleasi VIII. Negatiiviset kontrollit on merkitty kuvaajaan mustalla.

Yhden tunnin mittausajalla ei saada kunnollista eroa 10 U ja 50 U Taq-polymeraasin reaktiokäyrien kulmakertoimiin eivätkä reaktiokäyrät ole lineaarisia. Reaktioaikaa ei voida lyhentää yhdestä tunnista enempää, sillä aikaisemmista mittauksista on huomattu, että fluoresenssinvaste on huomattavasti epävakaampaa juuri mittauksen alussa. Yksittäisen Molecular Beacon -koettimen käyttö verrattuna Molecular Beacon -koetinseoksen käyttöön tässä määrityksessä kuitenkin tukee aikaisemman määrityksen tuloksia. Kun reaktioseoksessa on vain yhtä koetinta, eksonukleasi VIII:n reaktiokäyrät ovat lineaarisempia ja rinnakkaiden mittauksen erot ovat huomattavasti pienemmät. Lisäksi päätepisteiden fluoresenssitasoissa nähdään selkeä ero eri eksonukleasi VIII:n entsyymipitoisuuksilla.

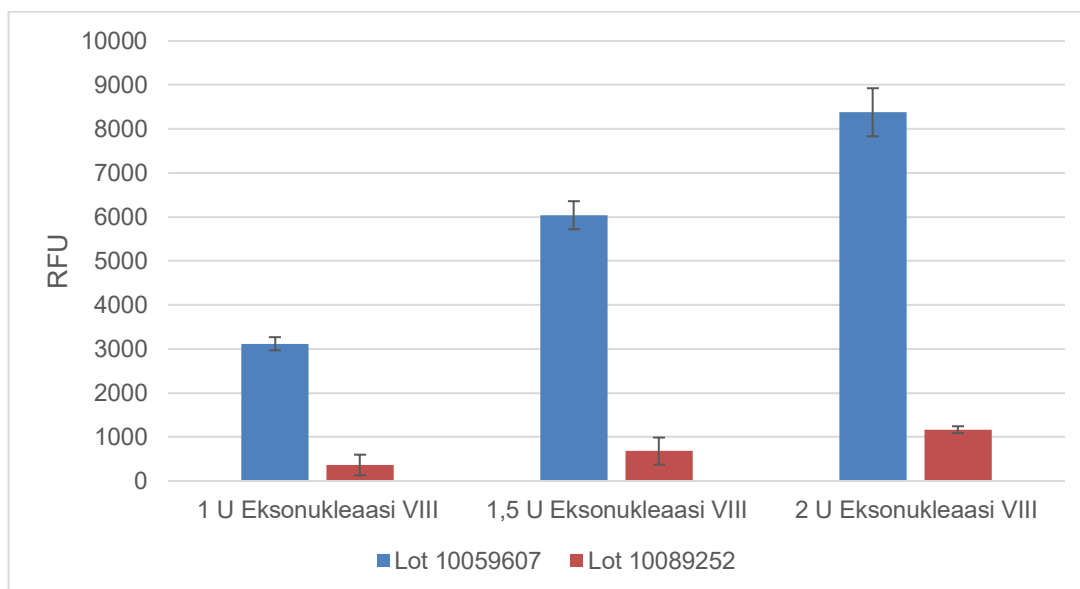
#### 4.5 Kaupallisten eksonukleaasi-entsyymierien väliset erot

Radioaktiivisella menetelmällä tehdyistä määrytyksistä huomattiin, että kaupallisten eksonukleaasi-entsyymierien väleillä oli suuria eroja. Erien välisiä eroja tutkittiin myös fluoresoivalla eksonukleaasimenetelmällä. Reaktioiden päätepisteiden fluoresenssitason eroja tarkasteltiin kahdella eri eränäytteellä. Määrytyksissä käytettiin yksittäisiä Molecular Beacon -koettimia. Eksonukleaasi I:n reaktioseoksessa käytettiin 1  $\mu\text{M}$  3'-hätäistä Molecular Beacon -koetinta ja eksonukleaasi VIII:n reaktioseoksessa käytettiin 1  $\mu\text{M}$  5'-hätäistä koetinta. Määrytyksissä käytettiin 10 U, 11 U ja 12 U eksonukleaasi I sekä 1 U, 1,5 U ja 2 U eksonukleaasi VIII entsyymipitoisuuksia. Jokaisesta eri reaktiosta tehtiin neljä rinnakkaismäärytystä, minkä lisäksi negatiivisista kontroleista tehtiin kahdeksan rinnakkaismäärytystä. Kuvassa 15 on esitetty eksonukleaasi I reaktioiden päätepisteiden fluoresenssitasot, joista on vähennetty negatiivisten kontrollien nollataso.



Kuva 15. Eksonukleaasi I reaktioiden päätepisteiden fluoresenssitason erot. Reaktioissa käytettiin 1  $\mu\text{M}$  3'-hätäistä Molecular Beacon -koetinta. Negatiivisten kontrollien nollataso on vähennetty reaktioiden RFU-tasoista. Pylväisiin on lisäksi merkitty keskihajontaväli.

Kuvassa 16 on esitetty eksonukleaasi VIII reaktioiden päätepisteiden fluoresenssitasot, joista on vähennetty negatiivisten kontrollien nollataso.



Kuva 16. Eksonukleaasi VIII reaktioiden päätepisteiden fluoresenssitasojen erot. Reaktioissa käytettiin 1  $\mu$ M 5'-häntäistä Molecular Beacon -koetinta. Negatiivisten kontrollien nollataso on vähennetty reaktioiden RFU-tasoista. Pylväisiin on lisäksi merkitty keskihajontaväli.

Kaupallisten eksonukleaasi-entsyymierien välillä on paljon hajontaa myös fluoresoivalla menetelmällä. Tästä syystä menetelmän kontroleille ei voida antaa yhtä tiettyä numeraalista kriteeriä päätepiste RFU-arvoista.

## 5 Päätelmät

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää toimeksiantajayritykselle uusi fluoresoiva eksonukleaasimenetelmä, jossa käytettäisiin eksonukleaasien tunnistamiseen Molecular Beacon -koettimia sekä positiivikontrolleina kaupallisia eksonukleaaseja. Yrityksessä käytössä olevassa menetelmässä käytetään radioaktiivista substraattia, jonka käyttö ja valmistus haluttaisiin lopettaa. Työn aloitusparametrit pohjautuivat yrityksessä aikaisemmin tehtyihin tutkimuksiin.

Tässä työssä tutkittiin menetelmän toimivuutta sekä pyrittiin optimoimaan menetelmän parametrejä. Opinnäytetyössä optimoitiin kaupallisten eksonukleaasien

entsyymimäärä radioaktiivisella menetelmällä sekä Molecular Beacon -koettimien pitoisuus reaktioissa fluoresoivalla menetelmällä. Lisäksi tässä työssä tutkittiin kuumasaumaajan käytön vaikutusta reaktioihin sekä yksittäisten koettimien käyttöä seoksen sijasta. Opinnäytetyössä selvitettiin myös, saadaanko menetelmällä selkeä ero päätepisteiden fluoresenssitasoihin eri entsyymimäärillä, löytyykö reaktiokäyristä kapea lineaarinen alue ja miten Calf thymus DNA:n lisäys vaikuttaa reaktioihin.

Kuumasaumaajan käytöllä ei huomattu olevan vaikutusta reaktioiden alkamiseen eikä reaktiokäyrien muotoon (tuloksia ei ole esitetty tässä työssä). Kuumasaumaajan käyttöä tutkittiin, koska menetelmän reaktiolämpötila on 37 °C ja kuumasaumaajan lämpötila nousee yli 80°C:seen. Haluttiin välttää tilannetta, jossa reaktiot alkavat ennen kuin kuoppalevy saadaan laitteelle, jolloin mittauksen tulokset eivät kata koko reaktiota. Lisäksi liian korkea lämpötila olisi voinut vaikuttaa reaktion etenemiseen. Fluoresoivalla menetelmällä saatiin selkeät erot päätepisteiden fluoresenssitasoihin negatiivisten kontrollien ja tutkittavien positiivikontrollien välille. Lisäksi tutkittavien näytteiden, vasta-aineen ja RT-entsyymin, reaktiokäyrät jäivät fluoresoivalla menetelmällä selkeästi negatiivisten kontrollien tasolle. Nämä näytteet oli todettu puhtaiksi radioaktiivisella menetelmällä. Tällä varmistettiin, etteivät tuotteet aiheuta väärää positiivista reaktiota uudella menetelmällä.

Positiivikontrolleina käytettäville kaupallisille eksonukleaasille ja Taq-polymeraasille ei pystytty määrittämään selkeitä kriteerejä, kun reaktioissa käytettiin Molecular Beacon -koetinseosta. Huomattiin, että Molecular Beacon -koetinseoksen tausta häiritsee eksonukleaaseista syntyvän vasteen näkymistä, kun käytettävät koetinpitoisuudet olivat suuret. Toisaalta, kun reaktioissa käytettiin yksittäisiä Molecular Beacon -koettimia, rinnakkaisissa näytteissä todettiin myös vähemmän hajontaa. Reaktioilla ei ollut selkeää lineaarista aluetta fluoresoivalla menetelmällä, lisäksi eri ajojen väliset tulokset erosivat toisistaan huomattavasti. Kaupallisten eksonukleaasi-entsyymierien väleillä oli myös huomattavasti hajontaa sekä radioaktiivisella että fluoresoivalla menetelmällä. Calf Thymus DNA:n lisäys pienensi hajontaa Taq-polymeraasin rinnakkaisnäytteissä sekä selkeytti

päätepisteiden fluoresenssitason eroja eri entsyymipitoisuuksilla (tuloksia ei ole esitetty tässä työssä). Reaktioihin lisätty Calf Thymus DNA -pitoisuus oli sama kuin radioaktiivisella menetelmällä. Lisäyksellä ei kuitenkaan ollut vaikutusta kaupallisiin eksonukleaaseihin. Näiden tulosten perusteella kontrollien kriteereiksi ei voitu esimerkiksi asettaa reaktiokäyrien kulmakertoimia tai tiettyä päätepiste fluoresenssiarvoa.

Tämän työn perusteella käytössä olevan radioaktiivisen ja uuden fluoresoivan menetelmän tulokset eivät ole yhtäläisiä. Fluoresoivalle menetelmälle ei voitu asettaa samanlaisia kriteerejä kuin radioaktiivisella menetelmällä on ollut käytössä. Näin ollen tämänlaisena fluoresoivasta menetelmästä ei saada yritykselle vastaavaa toimivaa menetelmää. Jatkotutkimuksia voisi tehdä mahdollisesta täysin kvalitatiivisesta menetelmästä, jossa tulos olisi joko negatiivinen tai positiivinen. Tällöin positiivisena kontrollina voitaisiin käyttää Taq-polymeraasia. Lisäksi Molecular Beacon -koetinseoksen sijaan tulisi todennäköisesti keskittyä enemmän yksittäisiin Molecular Beacon -koettimiin.

## Lähteet

- 1 Lovett, Susan. 2004. Exonucleases, Bacterial. Encyclopedia of Biological Chemistry. Vol. 1, s. 66–72.
- 2 What are exonucleases and their applications. Verkkoaineisto. New England BioLabs Inc. <<https://international.neb.com/tools-and-resources/video-library/what-are-exonucleases-and-their-applications>>. Luettu 27.10.2022.
- 3 Properties of Exonucleases and Non-specific Endonucleases. Verkkoaineisto. New England BioLabs Inc. <<https://international.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/properties-of-exonucleases-and-nonspecific-endonucleases>>. Luettu 27.10.2022.
- 4 Mason, Penelope & Cox, Lynne. 2012. The role of DNA exonucleases in protecting genome stability and their impact on ageing. Age (Dordrecht, Netherlands). Vol. 34, s. 1317–1340.
- 5 Exonuclease I (*E. coli*). Verkkoaineisto. New England BioLabs Inc. <<https://www.neb.com/products/m0293-exonuclease-i-e-coli#Product%20Information>>. Luettu 2.11.2022.
- 6 Exonuclease III (*E. coli*). Verkkoaineisto. New England BioLabs Inc. <<https://www.neb.com/products/m0206-exonuclease-iii-e-coli#Product%20Information>>. Luettu 2.11.2022.
- 7 Exonuclease VIII, truncated. Verkkoaineisto. New England BioLabs Inc. <<https://www.neb.com/products/m0545-exonuclease-vii-ituncated#Product%20Information>>. Luettu 2.11.2022.
- 8 Glick, Bernard; Pasternak, Jack & Patten, Cheryl. 2010. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. 4th ed. Washington, DC: ASM Press.
- 9 Method Development. Verkkoaineisto. EKG Labs. <<https://www.ekglabs.com/method-development/>>. Luettu 16.11.2022.
- 10 Thomas, Felicity. 2021. Outlining the Key Steps to Method Development. Verkkoaineisto. Pharma Tech. <<https://www.pharmtech.com/view/outlining-the-key-steps-to-method-development>>. 22.6.2021. Luettu 16.11.2022.
- 11 Sharma, Shivani; Goyal, Swapnil & Chauhan, Kalindi. 2018. A Review on Analytical Method Development and Validation. International Journal of Applied Pharmaceutics. Vol. 10, s. 8–15.

- 12 2.5 Validointi ja verifiointi. Verkkoaineisto. Labquality. <[https://www.labquality.fi/sote-ammattilaisille/laadukas\\_vieritutkimus/validointi\\_verifiointi/](https://www.labquality.fi/sote-ammattilaisille/laadukas_vieritutkimus/validointi_verifiointi/)>. Luettu 16.11.2022.
- 13 Analytical Method Development and Validation. 2019. Verkkoaineisto. Health CDMO Division. <<https://lubrizolcdmo.com/technical-briefs/analytical-method-development-and-validation/>>. Päivitetty 27.11.2019. Luettu 17.11.2022.
- 14 Skoglund, Henrik. 2016. Accredited Test Methods And Capabilities For Medical Devices. Verkkoaineisto. Elos Medtech. <<https://elos-medtech.com/accredited-test-methods-and-capabilities-for-medical-devices/>>. 9.2.2016. Luettu 17.11.2022.
- 15 Analytical Method Validation Guideline. 2017. Yrityksen sisäinen dokumentti.
- 16 Ikäheimonen, Tarja; Klemola, Seppo; Vesterbacka, Tia & Rahola, Tua. Aktiivisuuden määrittäminen. Verkkoaineisto. STUK. <[https://www.stuk.fi/documents/12547/494524/kirja1\\_5.pdf/f16c33c2-0fb5-40e8-8d41-8a96ecea746e](https://www.stuk.fi/documents/12547/494524/kirja1_5.pdf/f16c33c2-0fb5-40e8-8d41-8a96ecea746e)>. Luettu 30.11.2022.
- 17 Klemola, Seppo. Säteilyn ilmaisimet. Verkkoaineisto. STUK. <[https://www.stuk.fi/documents/12547/494524/kirja1\\_4.pdf/3f6c3115-afa3-4b1e-9fb6-8cba27fb2a1a](https://www.stuk.fi/documents/12547/494524/kirja1_4.pdf/3f6c3115-afa3-4b1e-9fb6-8cba27fb2a1a)>. Luettu 30.11.2022.
- 18 SOP-MDE-200 Working instruction for exonuclease assay V2-0. 2020. Yrityksen sisäinen dokumentti.
- 19 Taq facts. 2022. Verkkoaineisto. Biosearch Technologies. <<https://blog.biosearchtech.com/thebiosearchtechblog/bid/48174/taq-facts>>. Päivitetty 11.3.2022. Luettu 13.12.2022.
- 20 Molecular beacon probes. Verkkoaineisto. Integrated DNA Technologies. <<https://eu.idtdna.com/pages/products/qpcr-and-pcr/custom-probes/molecular-beacons>>. Luettu 13.12.2022.
- 21 Molecular Beacons. Verkkoaineisto. Sigma-Aldrich. <<https://www.sigmaaldrich.com/FI/en/technical-documents/technical-article/genomics/qpcr/molecular-beacons>>. Luettu 13.12.2022.
- 22 Held, Paul. 2005. An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Technology and its Application in Bioscience. Verkkoaineisto. Agilent. <<https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-fluorescence-resonance-energy-transfer-fret-technology-and-its-application-in-bioscience/>>. 20.6.2005. Luettu 14.12.2022.
- 23 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)—Note 1.2. Verkkoaineisto. Thermo Fisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/molecular-probes-the->

handbook/technical-notes-and-product-highlights/fluorescence-resonance-energy-transfer-fret.html>. Luettu 14.12.2022.

- 24 Vanhempi tutkija. 2021. Toimeksiantajayritys, Espoo. Keskustelu 8.–25.3.2021.
- 25 Molecular beacons for exonuclease activity testing. 2018. Yrityksen sisäinen dokumentti.

## Eksonukleaasien entsyymimäärän optimointi radioaktiivisella menetelmällä

Taulukko 1. Eksonukleaasi I mittaustulokset, tulosten keskiarvot ja keskihajonnat

Eksonukleaasi I (lot 10062603)									
<sup>3</sup> H Aktiivisuus %									
Entsyymimäärä	1	2	3	4	5	6	7	Keskiarvo	Keskihajonta
1 U	0,49							0,49	-
2,5 U	0,22		-0,25					-0,02	0,34
5 U	-0,13	0,10	-0,20				0,04	0,01	0,18
		0,26							
7,5 U		-0,02	-0,06					-0,03	0,03
		-0,01							
9 U					0,13			0,13	-
10 U				6,37	0,42		0,11	2,30	3,53
15 U				11,92				11,92	-
20 U				21,41				21,41	-
Eksonukleaasi I (lot 10088994)									
1 U							-0,02	-0,02	-
5 U							0,14	0,14	-
10 U							0,25	0,25	-

Taulukko 2. Eksonukleaasi III mittaustulokset, tulosten keskiarvot ja keskihajonnot

Eksonukleaasi III (lot 10063241)									
<sup>3</sup> H Aktiivisuus %									
Entsyymimäärä	1	2	3	4	5	6	7	Keskiarvo	Keskihajonta
0,1 U	0,13							0,13	-
0,2 U	-0,06							-0,06	-
0,3 U	-0,20							-0,20	-
0,5 U		0,54						0,33	0,29
		0,13							
1 U		0,28		2,20				0,97	1,07
		0,42							
1,25 U				2,22				2,22	-
1,5 U				2,57				2,57	-
1,75 U				3,70				3,70	-
2 U			3,41					3,79	0,54
			4,17						
3 U			5,23					5,08	0,22
			4,92						

Taulukko 3. Eksonukleaasi VIII mittaustulokset, tulosten keskiarvot ja keskihajonnat

Eksonukleaasi VIII (lot 10059607)									
<sup>3</sup> H Aktiivisuus %								Keskiarvo	Keskihajonta
Entsyymimäärä	1	2	3	4	5	6	7		
1 U						1,05	1,00	0,95	0,18
						0,85	0,92		
						1,15	0,88		
						1,15	0,62		
1,5 U					1,27	2,17		1,85	0,32
					1,87	1,99			
						1,75			
						2,06			
2 U	0,55	2,07	1,19	1,50	2,55			1,87	0,46
		1,78	1,24	2,10	2,13				
			1,51	1,87	2,51				
			1,41	1,93	2,44				
3 U		2,57						2,66	0,13
		2,75							
5 U	2,32							2,32	-
10 U	6,85							6,85	-
Eksonukleaasi VIII (lot 10089252)									
1 U							0,22	0,19	0,19
							0,28		
							-0,09		
							0,34		

Taulukko 4. Taq-polymeraasi mittaustulokset, tulosten keskiarvot ja keskihajonnat

Taq-polymeraasi									
<sup>3</sup> H Aktiivisuus %									
Entsyy- määrä	1	2	3	4	5	6	7	Keskiarvo	Keski- hajonta
50 U	0,98	1,05	1,22	1,16	1,64	1,58	1,75	1,34	0,31
100 U		2,76	1,79	2,73	2,19	2,50	2,49	2,41	0,36