

Opinnäytetyö AMK

Bioanalytikkokoulutus

2024

Annika Helling, Kaisa Korpela

# Mikrobinäytetestipakkauksen kehitysprosessi Bioname Oy:lle



Opinnäytetyö AMK | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bioanalytikkokoulutus

2024 | 34 sivua

Annika Helling, Kaisa Korpela

## Mikrobinäytetestipakkauksen kehitysprosessi Bioname Oy:lle

Opinnäytetyö tehtiin toimeksiantona Bioname Oy:lle. Tavoitteena oli löytää parhaiten ihon mikrobiston pyyhkäisynäytteenottoon soveltuva näytteenottotikku sekä menetelmä, jolla mitata DNA-konsentraatio.

Työ toteutettiin vertailemalla kahta erilaista näytteenottotikkua ja kahta eri mittausmenetelmää keskenään. Vertailtavina tikkuina olivat Isohelix DNA Buccal Swab -tikut ja Premium Topz -tikut. Tutkittavat näytteet otettiin toistettavasti kaikilla tikuilla. Näytteistä eristettiin DNA, jonka jälkeen konsentraatiot mitattiin käyttämällä Qubit-fluorometriä ja spektrofotometrisellä menetelmällä toimivaa NanoDropia. Tuloksia havainnollistamaan tehtiin vielä PCR ja elektroforeesiajo.

Mittausmenetelmien osalta tutkimuksen tulokset tukivat laitteiden valmistajan kertomaa niiden ominaisuuksista ja eroista. Qubit erottaa DNA:n mahdollisista kontaminanteista NanoDropia tehokkaammin, mutta NanoDrop mittasi suuremmat DNA-konsentraatiot. Näytteenottotikkujen osalta Qubitin tuloksia vertaillessa ero DNA-saannissa ei ollut merkittävä. NanoDropin tuloksissa Isohelix DNA Buccal Swab- tikkujen DNA-saanti oli selvästi Premium Topz -tikkuja suurempi.

Saatuja tuloksia häyttasi ennen PCR-vaihetta tapahtunut kontaminaatio, joka näkyi eristysvaiheen negatiivisen kontrollin tuloksissa. Kontaminaation todennäköisimmäksi syyksi osoittautui negatiivisena kontrollina toimineen Premium Topz -tikun puutteellinen sterilointi.

Asiasanat:

Näytteenotto, Laboratorio, Mikrobit, PCR, Tutkimus

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

2024 | 34 pages

Annika Helling, Kaisa Korpela

## Microbial sample kit development process for Bioname Ltd

This Bachelor's Thesis was conducted as an assignment for Bioname Ltd. The objective was to find the most suitable swab for collecting skin microbiota samples and a method to measure DNA concentration.

The assignment was carried out by comparing two different swabs and two different measurement methods. The swabs being compared were Isohelix DNA Buccal Swabs and Premium Topz sticks. The samples were taken repeatably with all swabs. DNA was extracted from the samples and DNA concentrations were measured with Qubit fluorometer and NanoDrop spectrophotometer. PCR and agarose gel electrophoresis were done to visualize the results.

The results supported the manufacturer's statements about the features and differences of the measurement methods. Qubit recognizes DNA from possible contaminants better than NanoDrop, but NanoDrop measured larger DNA concentrations. In Qubit results, the difference in DNA yields was not significant. In NanoDrop results, the DNA yield from Isohelix DNA Buccal Swabs was clearly higher than from Premium Topz sticks.

Contamination that occurred in the extraction negative control before the PCR stage affected the results. The contamination was most likely caused by incomplete sterilization of the Premium Topz stick used as an extraction negative control.

Keywords:

Sampling, Laboratory, Microbes, PCR, Research

# Sisältö

<b>Käytetyt lyhenteet tai sanasto</b>	<b>6</b>
<b>1 Johdanto</b>	<b>7</b>
<b>2 Mikrobinäytteen laboratorioprosessi</b>	<b>8</b>
2.1 Näytteenotto	8
2.2 DNA:n eristäminen ja puhdistaminen	8
2.3 NucleoMag® DNA Microbiome -kitti	9
2.4 Agaroosigeelielektroforeesi	9
2.5 Polymeraasiketjureaktio eli PCR	10
2.6 NanoDrop ja sen toimintaperiaate	11
2.7 Qubit ja sen toimintaperiaate	13
<b>3 Tutkimuksen tavoite ja tarkoitus</b>	<b>14</b>
<b>4 Tutkimuksen toteutus</b>	<b>15</b>
4.1 Metodologiset lähtökohdat	15
4.2 Eettiset lähtökohdat	15
4.3 Esivalmistelut ja näytteenotto	16
4.4 DNA:n eristys	16
4.5 DNA:n konsentraation mittaaminen	19
4.6 PCR ja elektroforeesi	20
<b>5 Tulokset</b>	<b>23</b>
5.1 Qubit-laitteen tulokset	24
5.2 NanoDrop-laitteen tulokset	24
5.3 Elektroforeesin tulokset	25
5.4 Eri puikkojen tulokset	26
<b>6 Pohdinta</b>	<b>27</b>
6.1 Tulokset ja luotettavuus	27

6.2 Opinnäytetyöprosessi	29
<b>Lähteet</b>	<b>31</b>

## **Kuvat**

Kuva 1. Tyypillinen nukleiinihapon spektri NanoDrop-laitteessa	13
Kuva 2. Kuoppalevy, ennen magneetille laittoa	17
Kuva 3. Kuoppalevy NucleoMag SEP-magneetilla	18
Kuva 4. Elektroforeesiajo	27
Kuva 5. DNA ladder	30

## **Taulukot**

Taulukko 1. PCR:n valmistelu	21
Taulukko 2. PCR:n vaiheet alukkeille Bakt_341F ja Bakt_805R	21
Taulukko 3. Qubit-laitteen tulokset	23
Taulukko 4. NanoDrop-laitteen tulokset	23
Taulukko 5. Tulokset muutettuna samaan yksikköön (ng/μl)	24
Taulukko 6. Tulosten keskiarvot muunnettuna samaan yksikköön (ng/μl)	26

## Käytetyt lyhenteet tai sanasto

DNA	Deoksiribonukleiinihappo. Polymeeri, joka muodostaa geneettisen materiaalin soluissa. (Tieteen termipankki, DNA, 2024)
Fluorometri	Laite, joka havaitsee näytteessä olevan värileimat, mitkä ovat takertuneet kohdemolekyyleihin. (Thermo Fisher, N.D.)
Geelielektroforeesi	Menetelmä, jonka avulla voidaan erotella proteiineja ja nukleiinihappoja geelin ja sähkövarauksen avulla. (Tieteen termipankki, Geelielektroforeesi, 2024)
Konsentraatio	Tietyn aineen määrän suhde seoksen koko määrään. (Tieteen termipankki, Konsentraatio, 2024)
Kontaminaatio	Epätoivotun mikrobin tai aineen esiintyminen. (Tieteen termipankki, Kontaminaatio, 2024)
PCR	Polymeraasiketjureaktio. Menetelmä, jonka avulla monistetaan DNA-jaksoja. (Suominen ym. 2013, 153)
RNA	Ribonukleiinihappo. Nukleotidien muodostama yksijuosteinen ketju. (Tieteen termipankki, RNA, 2024)
Spektrofotometri	Laite, jolla mitataan näytteen läpi pääsevän valon määrää. Tämän avulla saadaan tietoa näytteen pitoisuudesta sekä kemiallisesta koostumuksesta. (Measurlabs, n.d.)
Supernatantti	Esimerkiksi näytettä sentrifugoitaessa osa näytemateriaasta jää astian pohjalle samalla, kun supernatantti jää pinnalle. (Tieteen termipankki, Supernatant, 2024)

# 1 Johdanto

Jokaisella ihmisellä on iholla elävä mikrobisto, joka on yleensä vaaraton (Tieteen termipankki 2014). Ihon normaalin mikrobikasvuston koostumus vaihtelee ihoalueen fysiologian mukaan. Mikrobikasvusto suojaa ihoa infektioilta sekä tukee sen suojaavaa toimintaa. Tietyt bakteerilajit viihtyvät kosteassa ympäristössä ja toiset kuivassa. Tällöin kehon taivealueet ovat ideaaliset muun muassa *Staphylococcus*-lajeille. (Byrd, Belkaid & Segre 2018, 143–155.) Tämä opinnäytetyö tekee katsauksen ihon mikrobiston tutkimiseen.

Genetiikka on yksi kasvava tieteenlaji, jota hyödynnetään lääketieteessä. Sen kehitykset ja sovellukset mahdollistavat merkittäviä parannuksia sairauksien diagnosoinnissa, hoidossa sekä ehkäisyssä. Muun muassa genetiikan avulla voidaan räätälöidä hoitomenetelmät yksilöllisesti potilaan geneettisen profiilin perusteella sekä arvioida sairauden riskiä tunnistamalla riskitekijöitä esimerkiksi tutkimalla verestä vasta-aineita (Aittomäki, Moilanen & Perola, 2016).

Aihe valittiin yhdessä opinnäytetyön toimeksiantajan, Bioname Oy:n, kanssa. Yritys erikoistuu bioalan tutkimuksiin ja tarjoaa asiakkailleen kattavia DNA-eristys- ja lajintunnistuspalveluja. Aihe on toimeksiantajan kannalta ajankohtainen, koska kyseessä on kasvava yritys, joka voisi tästä opinnäytetyöstä saatavan datan avulla laajentaa palvelutarjontaansa.

Opinnäytetyön tavoitteena on mahdollistaa näytteenottopakkauksen kehittäminen. Tämän avulla voidaan optimoida ihon mikrobiston tutkimiseen tarvittavat prosessit, kuten näytteenotto, DNA:n eristys sekä analysointi. Tämä projekti yhdistää käytännön laboratoriotyöskentelyn ja tieteellisen raportoinnin, tarjoten kattavan kuvan siitä, kuinka tehokkaasti erilaiset näytteenottomenetelmät ja DNA-analyysit voivat palvella bioalan tutkimuksia ja sovelluksia.

## 2 Mikrobinäytteen laboratorioprosessi

Bioname Oy on bioalan tutkimuksiin erikoistunut yritys. Bioname Oy tarjoaa asiakkailleen palveluita, joissa asiakkaan lähettämästä näytteestä voidaan eristää DNA sekä bioinformatiikan avulla käsitellä sekvenssejä ja siten tunnistaa lajeja, kuten mikrobeja. Näyttemateriaalina voi olla esimerkiksi maaperä, eläimen jätös, sieni- tai sekanäyte. (Bioname Oy, n.d.) Laboratoriossa tapahtuu kliinisen laboratorion kanssa hyvin samanlainen prosessi, johon kuuluvat näytteen vastaanottaminen, oikeanlainen säilytys, esikäsittely, analyysi ja tulosten raportointi. Näytteen laboratorioprosessi alkaa aina preanalyttisestä vaiheesta. (Työterveyslaitos, nd.).

### 2.1 Näytteenotto

Isohelixin DNA-näytteenottotikut on tarkoitettu ensisijaisesti posken solujen keräämiseen, mutta ne toimivat hyvin myös iholla ja muilla pinoilla (Immunodiagnostic, n.d.). Topz-tikkuja ei ole tarkoitettu tällaiseen työskentelyyn, minkä takia niiden käyttöön ei ole omia ohjeita. Bakteerinäytteet otetaan yleensä erilaisista haavoista tai palovammoista, jolloin on erityisen tärkeää puhdistaa iho, jotta normaalifloora ei kontaminoi näytettä (Matikainen, ym. 2010. s. 163). Haava- ja ihonäytteet esimerkiksi bakteeriviljelyä varten otetaan hankaamalla näytteenottotikkua haavan pohjassa tai ihon infektiopesäkkeessä (Synlab, 2022). Näytteenotossa sovellettiin ihon bakteerinäytteenoton ja haavan pintanäytteenoton ohjeita.

### 2.2 DNA:n eristäminen ja puhdistaminen

DNA:ta voidaan eristää monista eri näyttemateriaaleista. DNA eristetään näytteestä, ennen kuin sitä voidaan käsitellä sekä analysoida. Lisäksi siitä on puhdistettava ainakin suunniteltuja reaktioita häiritsevät epäpuhtaudet. Näitä epäpuhtauksia ovat esimerkiksi proteiinit, jotka voivat sitoutua DNA:n komponentteihin ja estää monistumista, sekä RNA, joka kilpailee DNA:n kanssa

sitoutuen PCR:n komponentteihin. (Suominen ym. 2013, 103, 105.) DNA erotetaan solun muista rakenteista lyysaamalla eli hajottamalla solut, jolloin DNA vapautuu. Tämän jälkeen käytetään erotusmenetelmän mukaan kemiallista tai entsyymaattista menetelmää, jolla voidaan poistaa RNA, proteiinit, lipidit ja muut makromolekyylit. DNA on eristysmenetelmän mukaan joko sidottu esimerkiksi silikaan tai magneettisiin helmiin, tai se voidaan puhdistamisen jälkeen saostaa etanolilla. (Gupta, 2019.)

### 2.3 NucleoMag® DNA Microbiome -kitti

DNA voidaan eristää esimerkiksi valmiin kitin avulla. Työssä käytetään NucleoMagin DNA Microbiome -kittiä. Kitin toiminta perustuu nukleiinihappojen kiinnittymiseen paramagneettisiin helmiin. Lyysaus aloitetaan lisäämällä näytteeseen M1-lyysipuskuria, jonka jälkeen näytteitä sekoitetaan. Sekoituksen jälkeen näytteitä inkuboidaan, jonka aikana DNA vapautuu. Tämän jälkeen kontaminantit saostetaan Mlc-puskurin avulla. Saostuksen ansiosta nukleiinihapot kykenevät absorboitumaan paramagneettisiin helmiin, jotka lisätään lyaatin ja sitoutumista edistävän MI2-puskurin kanssa syväkuoppalevyille. DNA pestään erilaisilla pesupuskureilla sekä 70 % etanolilla. Pesujen jälkeen magneettihelmien annetaan kuivua, jonka jälkeen DNA eluoidaan MI5-puskuriin. Eluointipuskuri irrottaa DNA:n magneettihelmistä, ja supernatantti pipetoidaan uusiin putkiin. (NucleoMag®, 2020.)

### 2.4 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesi on menetelmä, jolla voidaan analysoida nukleiinihappoketjuja. Menetelmässä negatiivisesti varautuneet nukleiinihapot kulkeutuvat agarosigeelillä kohti positiivista napaa eli anodia, kun ajolaitteeseen kytketään sähkövirta. Tekniikka mahdollistaa laajan erotusalueen, jota voidaan hyödyntää erikokoisten DNA-jaksojen erottamiseen. (Suominen ym. 2013, 122.) Agarosigeelielektroforeesiin tarvitaan ajolaite, joka koostuu altaasta, altaan molemmissa päissä sijaitsevista elektrodeista, päälle laitettavasta kannesta ja

virtalähteestä. Ajoa varten valmistetaan agarosista geeli. Agarosin liukenee kiehuaessa veteen, ja jäähtyessään muuttuu hyytelön kaltaiseksi geeliksi. Kun geeli on vielä nestemäisessä muodossa, siihen painetaan kampa, joka tekee näytteitä varten kaivot geeliin. Kun geeli on täysin jähmettynyt, poistetaan kampa ja lisätään ajopuskuria niin, että geeli peittyi kokonaan. Agarosigeelielektroforeesiajo tapahtuu ajopuskurin pinnan alla. Jotta näytteet saadaan pipetoitua kaivoihin, on niiden oltava raskaampia kuin ajopuskuri. Näytteisiin voidaan lisätä tätä varten TBE-näytepuskuria. DNA ei näy agarosigeelillä sellaisenaan, joten geeliin lisätään myös väriainetta, joka mahdollistaa tulosten tarkastelun ajon jälkeen esimerkiksi UV-valon avulla. Kun virtalähde kytketään päälle, negatiivisesti varautunut DNA kulkeutuu kohti positiivista napaa eli anodia. Agarosigeelin verkkorakenne hidastaa nukleiinihappojen kulkeutumista sitä enemmän, mitä suurempia ne ovat. Näin ollen ajon aikana erikokoiset DNA-jaksot kulkeutuvat omiksi vyöhykkeikseen geelillä. (Suominen ym. 2013, 122–125.)

## 2.5 Polymeraasiketjureaktio eli PCR

PCR eli polymeraasiketjureaktio on tärkeä osa molekyyli-genetiikan laboratorioprosessia. PCR on hyvä menetelmä DNA-jaksojen monistamiseen. Sen perusperiaatteena on hyödyntää lämpötilaa kestävä DNA-polymeraasia. Lisäksi käytetään kahta erilaista aluketta, joiden tarkka emäsjärjestys tunnetaan. Alukkeet ovat synteettisiä, muutaman nukleotidin mittaisia DNA-pätkiä, jotka tunnistavat näytteen DNA:sta vastinalueensa. Näiden alukkeiden väliin jäävä DNA-jakso on se, mitä halutaan monistaa. (Ranki-Pesonen, 1994).

Templaattina eli mallina toimii yleensä kaksijuosteinen DNA- tai yksijuosteinen RNA-juoste. DNA täytyy eristää ennen käsittelyä, sillä näytteessä saattaa olla kopiointia häiritseviä tekijöitä, minkä vuoksi näytettä ei voida laittaa suoraan PCR-laitteeseen. DNA:n ei tarvitse olla täysin puhdasta, mutta eristämisen tavoitteena on häiritsevien tekijöiden minimointi sekä DNA:n vapautuminen. RNA:ta täytyy käsitellä cDNA:ksi käänteistranskriptaasilla, josta voidaan tehdä varsinaiset monistusreaktiot. (Suominen, ym. 2010. 153–154.)

Denaturaatiovaiheessa lämpötila kohotetaan korkeaksi, jolloin DNA:n kaksoisjuosteet denaturoituvat eli erkanevat yksijuosteisiksi DNA-ketjuiksi. DNA:n rakenne koostuu kahdesta pitkästä polynukleotidiketjusta. Ketjuja voidaan kutsua myös DNA-juosteiksi. Nukleotidien emäsosien eli adeniinin, sytosiinin, guaniinin tai tyymiinin välillä on heikkoja vetysidoksia, jotka pitävät ketjut kiinni toisissaan. (Alberts, ym. 2002.) Korkea lämpötila katkaisee vetysidokset emästen välillä, mikä johtaa juosteiden erkanemiseen. Denaturointi valmistelee DNA-juosteet liittymisvaihetta eli annealingia varten. Ensimmäisen vaiheen jälkeen alukkeet pystyvät kiinnittymään komplementaarisiin alueisiin, eli ne sekvenssin alueet, jotka ovat toistensa vastinpareja. (Suominen, ym. 2010. 154–161.)

Annealing eli liittymisvaihe tapahtuu matalassa lämpötilassa, minkä ansiosta alukkeet liittyvät DNA-juosteisiin. Lämpötila on vaiheeseen optimaalinen 47–60 asteen välillä, sillä se määräytyy käytettyjen alukkeiden GC-pitoisuuden eli guaniinin ja sytosiinin osuuden mukaan. Alukkeiden komplementaarinen pariutuminen DNA:n kanssa on välttämätöntä, jotta DNA-polymeraasi voi sitoutua ja aloittaa uuden juosteen rakentamisen. (Suominen, ym. 2010. 154–161.)

Viimeisenä vaiheena on pidennysvaihe, jota kutsutaan usein elongaatiovaiheeksi. Lämpötila nostetaan noin 72°C. Tämä on optimaalinen lämpötila suurimmalle osalle DNA-polymeraaseista. Nämä sitoutuvat alukkeisiin DNA-molekyyleissä ja aloittavat syntetisoimaan uutta DNA-juostetta. Polymeraasi lisää deoksiribonukleotideja yksi kerrallaan juosteeseen. Pidennysvaihe on keskeisin PCR:n vaihe, sillä siinä syntyy uutta DNA:ta. Tämän jälkeen PCR-reaktio alkaa alusta denaturointivaiheesta ja koko prosessi toistetaan useita kertoja peräkkäin. PCR:n ansiosta DNA-materiaalin määrä kasvaa eksponentiaalisesti ja tätä voidaan siten hyödyntää analyysiin tai sovelluksiin. (Saunders & Lee. 2013.)

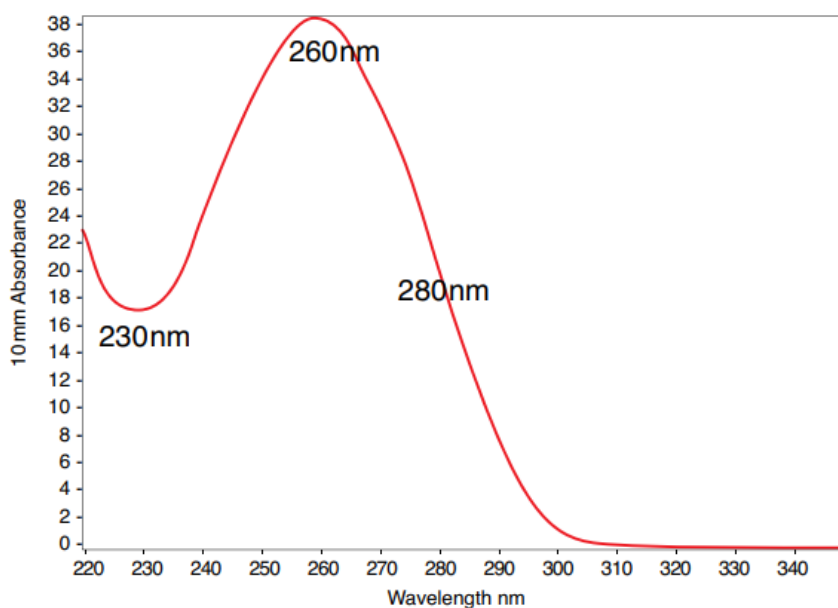
## 2.6 NanoDrop ja sen toimintaperiaate

NanoDrop on DNA:n, RNA:n ja proteiinien konsentraation määrittämiseen soveltuva laite, joka toimii hyvin pienillä, 1–2 µl, näytemäärillä. Laite mittaa

konsentraation spektrofotometrisellä menetelmällä ja sen avulla voidaan tutkia, onko DNA:n eristäminen onnistunut. (Thermo Fisher Scientific, n.d.)

Spektrofotometri toimii perustuen sähkömagneettisen säteilyn ja mitattavan aineen vuorovaikutukseen. Sähkömagneettinen säteily on valonnopeudella kulkevaa sähkömagneettista aaltoliikettä. Laite mittaa absorptiota tai emissiota ja laskee sen perusteella tutkittavalle aineelle transmittanssin, joka ilmoitetaan prosenttiosuuksina. Transmittanssi kertoo näytteen läpi kulkeneen säteilyn tehon suhteessa läpi menneen säteilyn tehoon. Laite voi mitata myös näytteen absorbanssia. (Heiskanen 2016, 9.)

NanoDrop ND-2000 hyödyntää ultraviolettisäteilyä, sillä DNA absorboi sitä tehokkaasti. Laite on täyden spektrin eli 220–750 nm aallonpituuksia tutkiva spektrofotometri. Xenon-lampun valo läpäisee näytteen ja laitteen sisäinen spektrofotometri havaitsee absorboimattoman valon määrän. Laite vertaa valon määrää valon lähtöintensiiteettiin, minkä avulla lasketaan absorbanssi. (Thermo Fisher Scientific, 2010.)



Kuva 1. Tyypillinen nukleiinihapon spektri NanoDrop-laitteessa (Thermo Fisher, 2010)

NanoDrop käyttää  $A_{260}/A_{280}$  -suhdelukua näytteen puhtauden ilmoittamiseen. Kuvaan 1 on merkattu spektrin rakenteen muodostavat kriittiset aallonpituudet, joista määräytyy suhdeluku. DNA:ta mitatessa noin 1,8 arvoa voidaan pitää

puhtaana. Kyseinen suhdeluku on myös verrannollinen nollanäytteenä käytetyn puskuriliuoksen pH ja ioniseen vahvuuteen. Tarkoituksena on käyttää nollanäytteenä samaa liuosta, jota käytetään myös näytteiden puskuriliuoksena. Alle 7 pH puskuriliuokset alentavat tuloksia samalla, kun neutraali pH nostaa tulosta. A260/A230 -suhdeluku on puhdasta nukleiinihappoa käsitellessä usein korkeampi kuin A260/A280-arvo. Jos arvo eroaa odotetusta, se saattaa johtua esimerkiksi magneettihelmien tai proteiinien läsnäolosta. Myös epäonnistunut DNA:n eristys vaikuttaa tulokseen huomattavasti. (Thermo Fisher Scientific, 2010.)

## 2.7 Qubit ja sen toimintaperiaate

Qubit on fluorometrisellä menetelmällä DNA:n, RNA:n ja proteiinien konsentraation määrittävä laite. Kyseinen menetelmä on suosittu myös DNA-näytteiden kvantifioinnissa PCR-tuotteiden, fragmenttien tai kirjaston valmistuksen yhteydessä. Fluorometria perustuu fluoresenssisignaalin mittaamiseen. Väriaine sitoutuu spesifisesti nukleiinihappoihin, kuten DNA:han tai RNA:han. Fluorometri lähettää tietyn aallonpituuden valoa näytteeseen, jolloin fluoresoivan molekyylin elektronit nousevat korkeammalle energiatasolle. Kun elektronit palaavat alemmalle energiatasolle se emittoi valoa, minkä fluorometri tunnistaa. Tällöin signaalin vahvuus on verrannollinen näytteen pitoisuuteen. (Thermo Fisher Scientific, n.d.)

Menetelmässä fluoresoiva väriaine lisätään näytteeseen, ja tämän jälkeen näyte analysoidaan. Fluorometri mittaa fluoresenssisignaalin intensiteetin, jota se vertaa väriaineen kalibrointikäyrään. Kalibrointikäyrä tehdään tunnettujen standardien avulla. (Thermo Fisher Scientific, n.d.) Verrattuna spektrofotometriaan ja sen menetelmiin, fluorometri tarjoaa suuremman herkkyuden ja tarkkuuden mittaamalla signaalin suoraan. Lisäksi epäpuhtaudet aiheuttavat vähemmän taustahäiriöitä kuin spektrofotometrisissä menetelmissä. (Paul, P., ym. 2021.)

### 3 Tutkimuksen tavoite ja tarkoitus

Opinnäytetyön tavoitteena on löytää ihon mikrobiston pyyhkäisynäytteenottoon parhaiten soveltuva näytteenottotikku sekä menetelmä, jolla mitata DNA:n konsentraatio. Täten opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla kahta erilaista tikkua pyyhkäisynäytteenotossa, eristää näytteistä DNA sekä mitata eristetyn DNA:n konsentraatiota eri menetelmillä. Näiden vaiheiden avulla selvitetään eri tikkujen soveltuvuutta pyyhkäisynäytteenottoon sekä vertaillaan eristetyn DNA:n mittausmenetelmiä, joiden pohjalta Bioname Oy voisi jatkaa tutkimuksia sekä lanseerata oman pyyhkäisynäytteenottoon tarkoitetun testipakkauksen.

Tutkimusta tehdessä jouduttiin pohtimaan myös tutkimuksen eettisyyttä. Näytteenotossa tärkeänä osana on varmistaa, että näytteen antaja on antanut suostumuksen näytteenottoon. Lisäksi henkilötietojen suojaaminen on ensiarvoisen tärkeää. Prosessin aikana on välttämätöntä olla rehellinen siitä, mihin näytettä käytetään sekä mahdolliset hyödyt ja haitat tutkimuksesta. (Bioanalytikkoliitto, 2017.)

## 4 Tutkimuksen toteutus

Syksyllä 2023 otettiin yhteyttä Bioname Oy:hyn. Bioalan yritys ehdotti erilaisia aiheita, joista valikoitui sopivin jatkokehitykseen. Syksyn aikana tutkimustyö suoritettiin Bioname Oy:n laboratoriossa Kupittaalla.

### 4.1 Metodologiset lähtökohdat

Ammattikorkeakoulussa yksi opinnäytetyön menetelmän vaihtoehtoista on toiminnallinen opinnäytetyö. Toiminnallisessa opinnäytetyössä syntyy tuotos, joka voi olla muun muassa konkreettinen tuotos, palvelu tai ohjeistus. Tuotoksen pitäisi tukea työelämää. Toiminnallisessa opinnäytetyössä yhdistyy ammatillinen osaaminen sekä raportointi. (Vilkkä & Airaksinen, 2003.) Tässä opinnäytetyössä saadaan konkreettista tietoa siitä, kummat testatuista näytteenottotikuista ovat parempia itsenäisesti suoritettavaa näytteenottoa varten, ja poikkeako eri menetelmillä mitatessa eristetyn DNA:n konsentraatio. Näytteenotto, DNA:n eristys ja DNA:n konsentraation mittaus toteutetaan käytännön työnä laboratoriossa. Saaduista tuloksista tehdään vertailu ja johtopäätökset, joista kirjoitetaan raportti. Näiden tietojen pohjalta Bioname Oy voi jatkaa uuden palvelun, näytteenottopakkauksen kehittämistä. Palvelu mahdollistaa asiakkaiden itseottamien sekä lähettämien näytteiden analysoinnin. Uusi palvelu mahdollistaa asiakaskunnan laajentamisen, josta on hyötyä yritykselle. Tässä opinnäytetyössä yhdistyi käytännön toteutus sekä sen raportointi. Käytännön toteutukseen kuuluu tutkimuksen tekeminen ja raportointiin kuuluu työpäiväkirjan ja opinnäytetyön kirjoittaminen.

### 4.2 Eettiset lähtökohdat

Raportin kirjoittaminen aloitettiin vasta tutkimustyön valmistumisen jälkeen, jolloin pystyttiin käsittelemään työtä paremmin kokonaisuutena. Tiedonhaussa käytettiin hakukoneina Finnaa, Google Scholaria sekä Pubmediä. Lähteitä kerättiin myös Turun ammattikorkeakoulun kirjastosta. Lähteinä toimi sekä suomenkieliset, että

englanninkieliset materiaalit. Lähteitä käytettäessä on otettu huomioon niiden eettiset periaatteet. Hyvää tieteellistä käytäntöä ylläpitäen kaikista tiedoista sekä kuvista on merkattuna niiden lähteet. Raportin kirjoittajan täytyy ajatella kriittisesti lähteiden luotettavuutta (TENK, 2023).

#### 4.3 Esivalmistelut ja näytteenotto

Ennen näytteenottoa näytteenottopuikot olivat 30 min ajan (15 min per puoli) Biowizardin Kojair-vetokaapissa ultraviolettivalon alla. Ultraviolettivalo steriloi puikon pintaa hajottamalla siinä olevia bakteereita ja viruksia UVC-säteilyn avulla. UVC-säteily toimii niin lyhyellä aallonpituudella, että se kykenee tuhoamaan patogeenien nukleiinihapot. (STUK, n.d.)

Näytteenotto tapahtui yhden henkilön kyynärtaipeesta. Käytössä oli neljä Premium Topz- puikkoa sekä kolme IsoHelixin swab-näytteenottotikkua. Yksi Premium Topz-puikoista toimi negatiivisena kontrollina, minkä avulla pystyttiin seuraamaan tutkimuksen onnistumista. Negatiivisena kontrollina toimiva puikko laitettiin suoraan vetokaapista NucleoSpinin putkeen. Näytteet otettiin hieromalla puikkoja yksitellen samassa sijainnissa eli kyynärtaipeessa. Näytteenotto tehtiin toistettavaksi vakioimalla sen kesto, mikä valikoitui 10 sekunniksi.

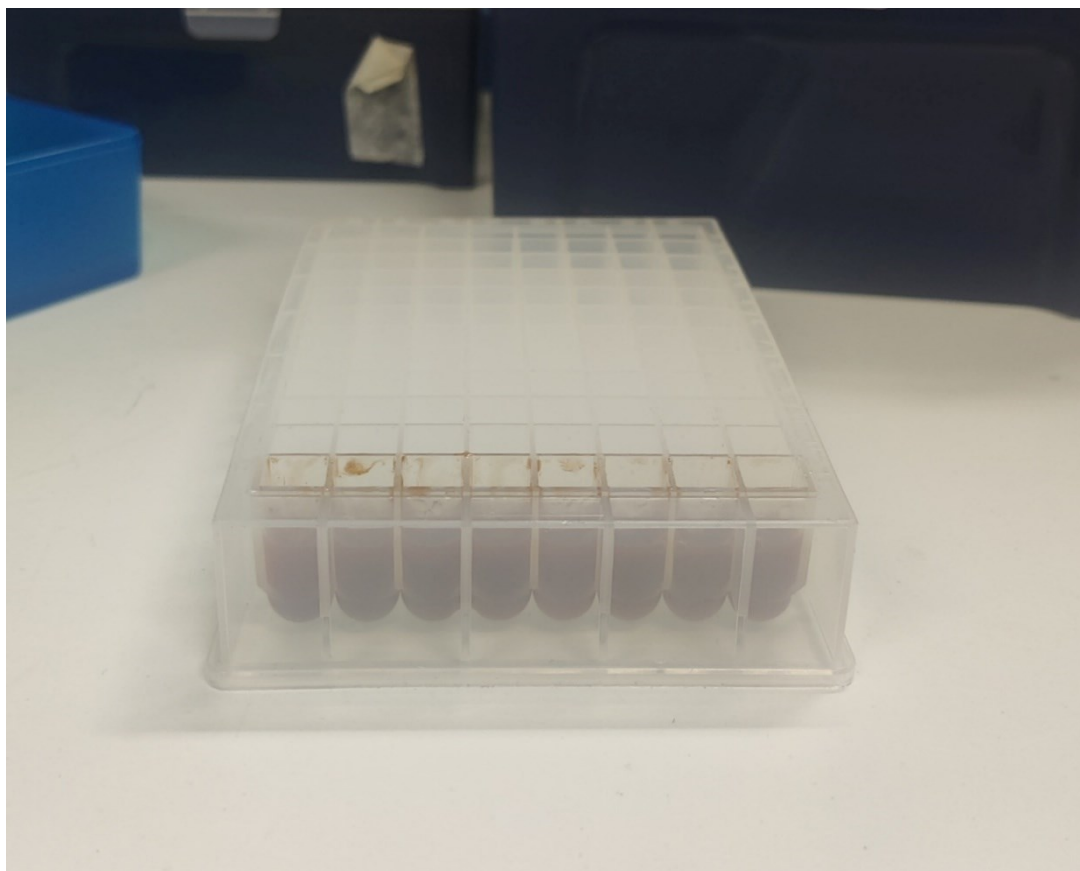
#### 4.4 DNA:n eristys

DNA eristettiin NucleoMagin DNA Microbiome kitillä (REF: 744330.4) Tikut laitettiin jokainen omaan putkeensa, joissa oli 700 µl M11-lyysipuskuria. Kun näytteet olivat omissa putkissaan, niistä alettiin eristämään DNA:ta. Ensin näytteet laitettiin Vortex-sekoittajaan 10 minuutin ajaksi, joka sekoitti näytemateriaalin puskuriliuokseen. Sekoituksen jälkeen näytteitä inkuboitiin 10 minuuttia huoneenlämmössä.

Näyte sentrifugoitiin 11 000 x g nopeudella 10 minuutin ajan, jotta sekoituksessa syntynyt vaahto sekä ei-toivotut aineet laskeutuisivat putken pohjalle. Supernatantti siirrettiin 2 ml:n kokoisiin koeputkiin. Putkiin lisättiin 150 µl Mlc-

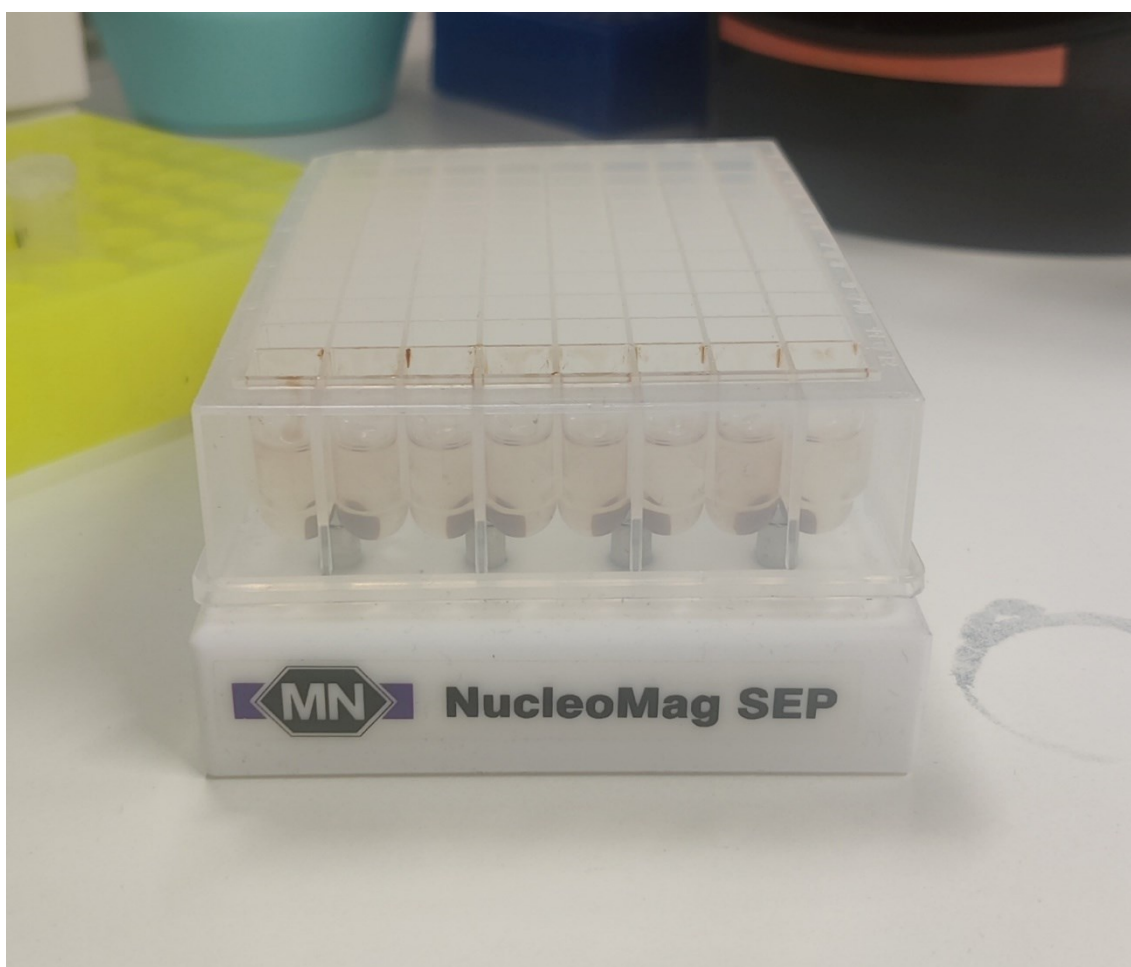
puskuria. Näytteitä sekoitettiin noin 5 sekunnin ajan Vortex-sekoittajalla, minkä jälkeen näytteitä inkuboitiin 10 minuutin ajan 2–8 asteessa jääkaapissa. Puskuri saosti epäpuhtaudet erilleen DNA:sta. Inkubaation jälkeen näytteitä sentrifugoitiin 5 minuutin ajan 11 000 x g nopeudella, jolloin epäpuhtaudet laskeutuivat koeputken pohjalle ja pinnalta saatiin pipetoitua DNA:n sisältävä supernatantti. Jokaista näytettä siirrettiin 500 µl kuoppalevylle omiin kuoppiinsa.

Jokaiseen näytekuoppaan lisättiin 25 µl NucleoMagin B-helmiä, jotka sitovat itseensä DNA:n. Sitoutumista avustamaan kuoppiin lisättiin MI2-puskuria pipetoimalla edestakaisin. Pipetointimenetelmän avulla sekoitettiin puskuri, helmet sekä näyte toisiinsa. 5 minuutin inkubaation jälkeen kuoppalevy siirrettiin kuvassa 2 olevan NucleoMag SEP-magneetin päälle. Magneettihelmet kulkeutuivat kohti magneettia, jolloin kaivon pohjalle muodostui pelletti. Tämän ansiosta helmiin sitoutunut DNA erottui puskuriliuoksesta. Erottumisen jälkeen supernatantti poistettiin kuopista pipetoimalla.



Kuva. 2 Kuoppalevy, ennen magneetille laittoa

Kuoppalevy poistettiin magneetilta 7 minuutin jälkeen, kun kuopan pohjalle oli muodostunut pelletti. Kuvasta 3 voidaan huomata magneetin siirtäneen pelletin mahdollisimman lähelle magneettia, jolloin supernatantti voidaan poistaa. DNA pestiin kahdesti 600  $\mu$ l MI3-puskurilla. Molemmilla kerroilla kuoppalevy siirrettiin magneetin päälle, jolloin helmiin sitoutunut DNA erottui pesuliuksesta. Supernatantin poistamisen jälkeen jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 600  $\mu$ l MI4-puskuria. Tämä toimii DNA:n puhdistamiseen, minkä jälkeen kuoppalevy siirrettiin magneetille ja supernatantti poistettiin kuopista pipetoimalla.



Kuva 3. Kuoppalevy NucleoMag SEP- magneetilla.

Seuraavaan vaiheeseen tarvittiin 70 % etanolia, jota tehtiin käyttämällä 99 % etanolia ja Milli-Q-vettä. Milli-Q-vesi on ultrapuhdasta vettä, joka suodatetaan UV-lampun, Quantum-kiillotuspatruunan sekä Q-POD-yksikön kautta. Eri suodattamisen vaiheet kohdistavat veden puhdistamisen erilaisiin kohteisiin. UV-

lamppu vaikuttaa orgaaniseen materiaan sekä bakteereihin. Quantum-kiillotuspatruuna poistaa niin ioniset kuin orgaanisetkin epäpuhtaudet. (Merck Millipore, 2013.) Jokaiseen kuoppaan lisättiin 600 µl etanolia, joka mahdollistaa DNA:n saostumisen. Saostumisen jälkeen helmet erotettiin etanolista magneetin avulla ja annettiin kuivua.

Viimeisenä vaiheena DNA:n eristämisessä oli DNA:n eluointi. DNA eluointiin eli erotettiin helmistä lisäämällä eluointipuskuri MI5:tä 80 µl kuoppiin. 10 minuutin inkubaation jälkeen kuoppalevy siirrettiin magneetille, jolloin DNA oli irtaantuneena helmistä supernatantissa. Supernatantti siirretään tilavuudeltaan 1,5 ml:n koeputkiin, joita säilytetään -20 asteen pakastimessa.

#### 4.5 DNA:n konsentraation mittaaminen

DNA:n konsentraation mittaaminen aloitettiin Qubit-laitteella. Kyseisellä laitteella pitoisuuden määrittäminen vaatii näytteen valmistelua. Tähän käytettiin Qubitin dsDNA Quantification Assay Kittia (REF: Q32854). Näytteistä siirrettiin 10 µl toiseen koeputkeen, joihin lisättiin Qubit Working Solutionia 190 µl. Tämä liuos mahdollistaa fluoresenssiin perustuvan menetelmän. Lisäksi tarvitaan kaksi standardia, joiden avulla laite voidaan kalibroida eli varmistetaan laitteen toimintakunto. Laite tietää standardien pitoisuudet, jolloin se vertaa nykyisiä tuloksia siihen mitä on muistissa. Ennen mittaamista koeputkia sekoitettiin käsin kääntelemällä. Näyteputki asetettiin laitteeseen ja toteutettiin yhteensä neljä mittausta jokaista näytettä kohden.

NanoDrop-laitteella konsentraatiota määritettäessä ei tarvitse eristetylle DNA:lle tehdä esivalmisteluja. Laitetta käytettäessä on hyvä huomioida, että mittauspää on suorassa kontaktissa näytteeseen. Tällöin ristikontaminaation riski on mahdollinen. Ristikontaminaatiossa edellinen näyte vaikuttaa seuraavan tulokseen, jolloin tulos ei ole luotettava. Täten on tärkeää puhdistaa laite aina ennen käyttöä sekä mittauksen välillä. Ennen mittauksia mittauspähän pipetoitiin laboratoriovettä, joka puhdistaa sen. Lisäksi mitattiin nollanäyte, jonka pitoisuus on 0 ng/µl. Nollanäytteen käyttö alustaa laitteen tasolle, jossa suurempi pitoisuus

kuin 0 ng/μl nousee esiin. Nollanäytteen mittaamisen jälkeen mitattiin näytteiden konsentraatiot pipetoimalla näytettä 1 μl mittauspäähän. Mittaamisen lopettamisen jälkeen on tärkeää puhdistaa mittauspää uudelleen seuraavia mittauksia varten.

#### 4.6 PCR ja elektroforeesi

PCR eli polymeerasiketjureaktio on molekyylibiologinen menetelmä, joka perustuu DNA:n monistamiseen laboratoriossa. Työssä käytettiin alukkeita Bakt\_341F (etualuke) ja Bakt\_805R (taka-aluke). Alukkeet ovat lyhyitä yksijuosteisia DNA-sekvenssejä, jotka toimivat lähtöpisteenä DNA-polymeerasin toiminnalle. Etualukkeen sijainti määrää sen, mistä kohtaa DNA:ta halutaan monistaa eli tässä tilanteessa DNA:n kohdealueen 304 emäsparista. Taka-alukkeen sijainti määrittää monistamisen päätepisteen. Tässä tilanteessa monistaminen päättyy DNA:n kohdealueen 805:teen emäspariin. Bakt\_341F vastaa täydellisesti yli 1 000 000 bakteerisekvenssiin sekä kattaa *Escherichia coli*n paikat 300–400. Bakt\_805R vastaa täydellisesti noin 900 000 bakteerisekvenssiin, minkä vuoksi juuri kyseiset alukkeet ovat valikoituneet käyttöön mikrobinäytteitä tutkittaessa PCR:n alukkeina. (Herlemann, ym. 2011.)

Ensin pipetoitiin alukeversiot 0 ja 2 samaan putkeen sekä 1 ja 3 toiseen, niin että molemmissa putkissa on niin etu- kuin taka-aluke. Sen jälkeen valmistettiin mastermix eli liuos, joka koostuu alukkeista, polymeerasientsyymistä sekä RNAaasi-vapaasta vedestä. Taulukkoa 1 käytettiin mallina ennen liuosten valmistamista, jotta saatiin parempi kuva, paljonko kyseisiä liuoksia tarvittiin. Liuosta valmistettiin 12 reaktioon molemmilla alukkeiden versioilla eli ylimäärin, sillä näytteiden kokonaismäärä oli 9. Näihin kuuluivat 8 näytettä sekä PCR:n negatiivinen kontrolli.

Taulukko 1. PCR:n valmistelu

Reagenssi	Konsentraatio (µM)	1 reaktio (µl)	12 reaktiota (µl)
RNAse-vapaa vesi	-	2,4	28,8
MyTag HS Mix	1x	5	60
Alukemix (0+2 tai 1+3)	0,6	0,6	7,2
DNA		2	-
Kokonaistilavuus		10	120

PCR tehdään kuoppalevyllä, jonka vuoksi kuoppalevylle pipetoitiin 0+2 mastermixiä sekä 1+3 mastermixiä molempia yhdeksään kuoppaan. Kuoppiin lisättiin näytteiden DNA:ta tai vesi, joka toimi PCR:n negatiivisena kontrollina. Negatiivisen kontrollin avulla pystytään varmistamaan menetelmän onnistuminen. Kontrollin tulos kuvaa reaktiossa käytettävien reagenssien puhtautta. Kuoppalevy peitettiin ennen kevyttä sentrifugointia, jotta neste siirtyi kuoppien pohjalle. Sentrifugoinnin jälkeen kuoppalevy asetettiin PCR-koneeseen ja käynnistettiin oikea PCR-ohjelma (taulukko 2). Seuraavassa taulukossa PCR:n vaiheet.

Taulukko 2. PCR:n vaiheet alukkeille Bakt\_341F ja Bakt\_805R

Kierrosten lukumäärä	Lämpötila (Celsius)	Kesto (min)	Vaiheen nimi
1	95	3.00	Alkudenaturaatio
30	95	0.30	Denaturaatio

	55	0.30	Liittymisvaihe
	72	0.30	Pidentymisvaihe
<b>1</b>	72	10.00	Loppupidentymisvaihe

PCR:n aikana DNA monistuu, jolloin näytemateriaan pitoisuus kasvaa ja siitä on mahdollista tehdä luotettavammin tutkimuksia. PCR:n onnistumisen varmistamiseksi ajetaan näytteet geelielektroforeesilla. DNA-molekyylit siirtyvät geelillä kohti positiivista sähkövarausta. Tällöin DNA:n nopeus ja sen etenemä matka on kääntäen verrallinen sen kokoon. Täten menetelmää voidaan käyttää molekyylin koon määrittämiseen.

Elektroforeesia varten valmistettiin 1,5 % geeli agarosista. Geelin valmistaminen aloitettiin punnitsemalla 1,5 grammaa agarosia erlenmeyeriin, johon kaadettiin 100 ml 0,5x TBE-puskuria ja sekoitettiin pyöritellen. TBE-puskuri (Tris-Boraatti-EDTA) toimii pienten DNA- ja RNA- fragmenttien erottelussa (Thermo Fisher, n.d.). Erlenmeyeriä lämmitettiin mikrossa, kunnes neste oli kirkasta. Geelialustalle laitettiin kammat, jotta geeli sai muotonsa. Erlenmeyeriä jäähdytettiin kylmän veden alla. Viilentymisen jälkeen pulloon lisättiin 2 µl Midori Extra -väriainetta ja sitä sekoitettiin pyörittelemällä. Geeli kaadettiin alustalle ja annettiin jähmettyä.

Geelin valmistuttua se siirrettiin elektroforeesilaitteelle ja kaadettiin sen päälle TBE-puskuria, kunnes se peittyi kokonaan. Kamman avulla geeliin on syntynyt kaivoja. Ensimmäiseen kaivoon pipetoitiin 1,5 µl 50bp ladderia. Tämän jälkeen jokaiseen kaivoon pipetoitiin 1 µl näytettä. Laitteeseen laitettiin kansi päälle ja näytteitä ajettiin 100 V 22 minuuttia.

## 5 Tulokset

DNA:n eristyksen jälkeen kaikista näytteistä mitattiin DNA-konsentraatiot Qubit- ja NanoDrop-laitteilla. Taulukoissa 3 ja 4 näytteet A1-A4 ovat Premium Topz-puikkojen tulokset, B1-B3 IsoHelixin swab-näytteenottotikkujen tulokset ja Neg eristysnegatiivisen kontrollin tulos.

Taulukko 3. Qubit-laitteen tulokset

	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	keskiarvo ng/ml
A1	0,61	0,59	1,46	1,15	0,95
A2	0,57	0,60	0,88	1,64	0,92
A3	2,13	1,28	1,42	1,42	1,56
A4	1,58	1,55	1,56	1,57	1,57
B1	1,01	1,01	0,85	1,03	0,98
B2	0,92	0,86	0,82	0,99	0,90
B3	1,02	0,95	0,94	0,93	0,96
Neg	0,5	Alle 0,5	Alle 0,5	Alle 0,5	Alle 0,5

Taulukko 4. NanoDrop-laitteen tulokset

	ng/μl	260/280	260/230
A1	1,9	1,84	0,61
A2	1,8	1,38	0,49
A3	2,1	1,57	0,59
A4	1,9	1,65	0,54
B1	2,3	1,43	0,78

B2	3,1	1,42	0,77
B3	3,9	1,4	0,64
Neg	1,7	1,33	0,66

### 5.1 Qubit-laitteen tulokset

Qubit-laitteella jokainen näyte mitattiin neljä kertaa. Kaikkien näytteiden tulokset ovat laitteen lukualueen sisällä. Negatiivinen kontrolli on myös ensimmäisessä ajossa antanut lukualueen sisällä olevan tuloksen.

### 5.2 NanoDrop-laitteen tulokset

NanoDrop-laitteen mittaustuloksista (taulukko 5) huomataan, että tulokset eivät viittaa aivan puhtaaseen nukleinihappoon. 260/280 tuloksien kuuluisi olla noin 1,8, jotta sitä voidaan pitää puhtaana, ja 260/230 tuloksien olla korkeampia kuin 260/280 (noin 1,8–2,2) (Thermo Fisher Scientific, 2010). Näytteistä kaikki paitsi A1 jäävät alle 1,8 rajan 260/280 tuloksissa. Näytteitä A1-A4 sekä B1-B3 verratessa A1-A4 ovat jonkin verran korkeampia 260/280 alueen tuloksissa, mutta B1-B3 tulokset ovat korkeampia 260/230 alueella. Lisäksi negatiivisessa kontrollissa havaittiin tuloksia, mitkä eivät vastaa odotuksia. Tulokset ovat lähellä varsinaisten näytteiden tuloksia.

Taulukko 5. Tulokset muutettuna samaan yksikköön (ng/μl)

	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	Neg
<b>Qubit</b>	0,0191	0,0189	0,0313	0,0313	0,0195	0,0180	0,0190	Alle 0,005

<b>Nano Drop</b>	1,9	1,8	2,1	1,9	2,3	3,1	3,9	1,7
------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

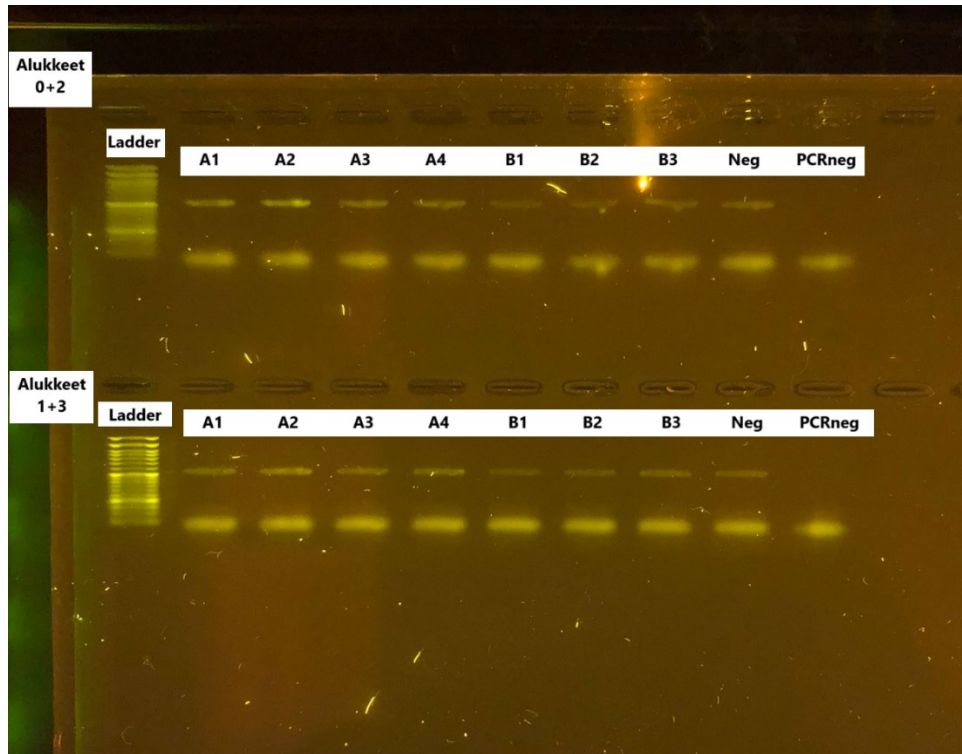
### 5.3 Elektroforeesin tulokset

PCR:n jälkeen tehtiin elektroforeesiajo havainnollistamaan ja varmistamaan sen onnistuminen. Geelistä otetussa kuvassa näkyy vasemmalla ensimmäiseen kaivoon pipetoitu 50 bp ladder, joka sisältää DNA-fragmentteja, joten näytteiden kulkeutumista geelillä voidaan verrata ladderiin.

Elektroforeesiajossa käytettiin New England Biolabsin 50 bp DNA Ladderia, jolla voidaan havainnollistaa 50-1350 emäsparin kokoisia DNA-jaksoja. Ladderin 200 bp ja 500 bp kohdissa on muita kirkkaampi ja selkeämpi värireaktio, jotta niitä voidaan käyttää referensseinä. (New England Biolabs, 2024.)

Elektroforeesiajon tuloksista (kuva 4) huomataan, että kaikissa näytteissä sekä negatiivisessa kontrollissa on DNA-vyöhykkeet 500 bp kohdalla. PCR:ssä käytetyt alukkeet monistavat aluetta, jonka koko on 535 bp PCR:n jälkeen. Näytteiden tuloksissa nähdään siis oikeanlainen tuote, mutta eristysvaiheen negatiivisen kontrollin pitäisi olla 500 bp kohdalta tyhjä. Kuten myös NanoDrop- ja Qubit-tulokset osoittavat, viittaa eristysnegatiivisen kontrollin tulos kontaminaatioon. PCR-negatiivisessa kontrollissa sen sijaan ei näy PCR-tuotetta, joten kontaminaatio on tapahtunut ennen PCR-vaihetta.

Sekä DNA-konsentraation mittauksen tuloksista, että kuvasta 4 huomataan, että negatiivinen kontrolli antaa tuloksia, vaikka sellaista ei odoteta tapahtuvan. Eristysnegatiivisena kontrollina toimi Premium Topz-puikko.



Kuva 4. Elektroforeesiajo

#### 5.4 Eri puikkojen tulokset

Taulukossa 6 Premium Topz –tikkujen (näytteet A1-A4) ja Isohelixin tikkujen (näytteet B1-B3) tulosten keskiarvot samassa yksikössä (ng/μl). Qubit-laitteen tulokset ovat hyvin samanlaiset, joten ne eivät osoita kummankaan tikun selkeää paremmuutta. NanoDrop-mittauksen perusteella Isohelixin DNA Buccal Swab -tikut tuottavat korkeamman DNA-saannon verrattuna Premium Topz -tikkuihin.

Taulukko 6. Tulosten keskiarvot muunnettuna samaan yksikköön (ng/μl)

	Premium Topz	Isohelix DNA Buccal Swab
<b>Qubit</b>	0,0252	0,0189
<b>NanoDrop</b>	1,9	3,1

## 6 Pohdinta

Pohdintaosiossa käsitellään tutkimustyön tuloksia, niiden syitä ja luotettavuutta eri näkökulmista. Tarkoituksena on reflektoida työskentelyn eri vaiheita ja virhelähteitä. Laittevalmistajien ohjeita hyödyntäen pohditaan, mitä käytännön työssä olisi voitu tehdä toisin. Viimeisessä kappaleessa käsitellään opinnäytetyöprosessin työn vaiheita, haasteita ja antia kirjoittajille, sekä mietitään jatkotutkimusaiheita.

### 6.1 Tulokset ja luotettavuus

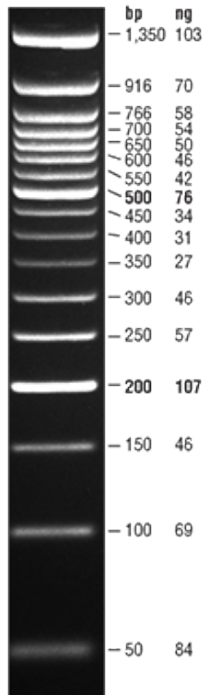
Eristyksessä negatiivinen kontrolli antoi positiivisia tuloksia DNA-konsentraatioita mitatessa. On monta vaihtoehtoa, mistä se voisi johtua. Negatiivisena kontrollina käytettiin Premium Topz-tikkua. Tulos johtuu todennäköisesti siitä, että puikkojen sterilointi UV-valolla ei ollut riittävä. Premium Topz-puikkojen pakkaus ei ollut steriili, minkä vuoksi jo pakkauksessa voi olla mikrobeja. Mikrobien läsnäolo häiritsee tulosta. UV-valolla sterilointi kesti 15 min per puoli. Tämä ei välttämättä ollut riittävä aika tikun sterilointiin. Kuitenkin laboratoriotyöskentelyssä ylläpidettiin aseptiikkaa käyttämällä puhdasta laboratoriotakkia sekä kertakäyttökäsineitä, minkä vuoksi on todennäköisempää, että kontrollin tulos johtuu joko pipetointivirheestä tai epäpuhtaasta näytteenottotikusta. Tutkimuksen aikana edettiin työohjetta seuraten mahdollisten virheiden minimoimiseksi. Aiemmin koulutuksen aikana on harjoiteltu pipetointimenetelmiä ja –tekniikkaa, jonka avulla on kartutettu kokemusta pipetoinnista. IsoHelixin swab-näytteenottotikut olivat vanhentuneita, mutta steriilisti pakattuja, joten niiden antamia tuloksia voidaan pitää Premium Topz-tikkujen tuloksia luotettavampina. Swab-näytteenottotikut eivät ole pääasiallisesti tarkoitettu kyseiselle näytematerialle, vaikka niitä voidaan hyödyntää myös mikrobinäytteenottoon. Lisäksi pipetoitaessa syntyy aina aerosoleja, joissa on pieniä määriä DNA:ta. DNA on voinut kulkeutua edellisistä näytteistä pipetin kautta takaisin koeputkeen.

Qubit on Thermo Fisher Scientificin nettisivujen mukaan NanoDropia tarkempi pienempiä pitoisuuksia käsiteltäessä ja se pystyy erottamaan paremmin DNA:n muista komponenteista, joita liuoksessa voi olla, kuten RNA tai kontaminantit. Kontaminanteja voi olla esimerkiksi magneettiset B-helmet, jotka ovat siirtyneet pipetoitaessa näytteen mukana. NanoDropin etuna on yksinkertaisempi menetelmä, joka on spektrofotometria. Menetelmä soveltuu paremmin laajemman valikoiman näytteiden mittaamiseen. (Paul, P., ym. 2021.) Mitattujen ja samaan yksikköön muunnettujen tulosten perusteella NanoDrop mittasi Qubitia huomattavasti suurempia määriä DNA:ta näytteistä. Qubitin tuloksissa negatiivisen kontrollin tulokset ovat kuitenkin merkittävästi näytteiden tuloksia alhaisemmat, joka vahvistaisi Qubitin kyvyn erottaa DNA:n kontaminantista. NanoDropin tuloksissa sen sijaan negatiivisen kontrollin tulos on lähes sama osan näytteiden kanssa. Matalat arvot 260/280 alueella indikoivat yleensä kontaminaatiota, joka voi olla peräisin eristysprosessissa käytetystä aineista. Myös hyvin matalissa nukleiinihappokonsentraatioissa, eli alle 10 ng/μl, tulokset voivat olla virheellisiä. (Thermo Fisher Scientific, 2012.)

DNA:n eristykseen käytetty NucleoMag® DNA Microbiome-kitti ei ole tarkoitettu suoraan käytetylle näytemateriaalille, vaan sitä käytetään enemmän maaperä- uloste- ja biofilminäytteiden käsittelyyn. Kuitenkin kitin tarkoitus on mikrobien DNA:n eristäminen, minkä vuoksi kitti soveltuu tähän tehtävään. Elektroforeesissa sekä analysointilaitteilta saatavien tulosten perusteella kytetään luottamaan DNA:n eristämisen onnistumiseen.

Kontaminaatio heikentää tutkimuksen tuloksien luotettavuutta. Qubit-laitteen tuloksia tarkasteltaessa voidaan kuitenkin huomata, että negatiivisen kontrollin tulokset ovat näytteiden tuloksia selkeästi alhaisempia. Tämä viittaa siihen, että näytteissä on DNA:ta. Sen sijaan NanoDropin tuloksissa negatiivisen kontrollin tulokset ovat osaa näytteiden tuloksista suurempia tai lähes saman tasoisia. Thermo Fisherin nettisivujen mukaan Qubit pystyy NanoDropia paremmin erottamaan DNA:n muista komponenteista, joka voi selittää tulosten tasojen erot eri laitteiden välillä. Samaa yksikköön muunnettuna NanoDropin tulokset ovat Qubitia selvästi suurempia, joten ilman kontaminaatiota NanoDrop toimii parempana DNA-konsentraation mittaamenetelmänä.

Elektroforeesiajon jälkeen ladder on valmistajan referenssikuvaa (kuva 5) tiheämpi. Tämä hankaloittaa tulosten tulkintaa. DNA-vyöhykkeet olisi saanut erotettua paremmin toisistaan käyttämällä 2-3 % agarosigeeliä, tai ajamalla suuremmalla jännitteellä (New England Biolabs, 2024). Elektroforeesiajota olisi voinut myös jatkaa pidemmän aikaa, jotta ladder ja näytteet olisivat kulkeutuneet geelillä pidemmälle.



Kuva 5. DNA ladder. (New England Biolabs)

## 6.2 Opinnäytetyöprosessi

Aluksi opinnäytetyön prosessi eteni erittäin nopeasti, sillä samanaikaisesti olevien työharjoittelujen aikataulut painoi niskaan. Into laboratoriotyöskentelyyn vei mukanaan ja tutkimustyö saatiin valmiiksi muutaman viikon sisällä. Aihe oli kiinnostava, mutta teoretiedon käsittely oli raskaampi prosessi. Raportin kirjoittamisen aloittaminen oli hieman haasteellista, sillä työharjoittelu vei paljon energiaa. Työn teki haastavaksi myös se, että vastaavia aikaisempia tutkimuksia ei ollut tehty.

Opinnäytetyön teko oli kokonaisuudessaan opettavaista. Tutkimuksen suunnittelu ja toteuttaminen, ilman aikaisempaa kokemusta, osoittautuivat yllättävän haastaviksi. Jälkikäteen mietittynä monenkin asian olisi voinut tehdä toisin. Käytännön työn aikana tehtiin muistiinpanoja, mutta niitä olisi pitänyt tehdä vielä tarkemmin ja enemmän, jotta kirjoittaminen olisi ollut helpompaa. Kirjoitusvaiheessa huomattiin, että esimerkiksi käytettyjen kittien REF-koodeja ei kirjoitettu ylös, ja joitain itsestään selviltä tuntuneita työvaiheita puuttui. Nämä kaikki saatiin selvitettyä vielä jälkeempään, mutta siihen kului ylimääräistä aikaa. Lisäksi käytännön työn aikataulu oli suunniteltu niin tiukaksi, että tutkimus pystyttiin toteuttamaan vain yhden kerran. Siitä johtuen kontaminaatiosta huolimatta tutkimusta ei toistettu.

Toisaalta käytännön osuus tarjosi paljon uusia oppimiskokemuksia sekä aiemmin harjoiteltuja taitoja päästiin käyttämään. Tutkimuksesta saatiin myös merkittäviä tuloksia, joka oli niin analysoinnin kuin koko opinnäytetyön sisällön kannalta tärkeää. Opinnäytetyön tavoitteen mukaisesti onnistuttiin keräämään tietoa eri näytteenottotikkujen soveltuvuudesta pyyhkäisynäytteenottoon ja DNA-konsentraation mittaussuunnitelmista. Ennen PCR-vaihetta tapahtunut kontaminaatio kuitenkin haittaa tuloksia. Saaduista tuloksista on hyötyä yritykselle, mutta ennen näytteenottopakkauskehittämistä tutkimus kannattaisi vielä uusia, jotta saataisiin tulokset, joihin voidaan luottaa täysin. Jatkotutkimusaiheena voisi olla tässä tutkimuksessa käytettyjen näytteenottotikkujen vertailu muidenkin näytemateriaalien näytteenotossa.

## Lähteet

Aittomäki, K., Moilanen, J., Perola, M. & Aarnisalo, A. 2016. Lääketieteellinen genetiikka. Duodecim.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Garland Science.

Bioanalytikkoliitto. 2017. Bioanalytikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet. Viitattu 23.4.2024.  
<https://satakunta.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/134433/Bioanalytikon,+laboratoriohoitajan+eettiset+ohjeet.pdf>

Bioname Oy, n.d. Palvelumme. Viitattu 20.9.2023. <https://bioname.fi>

Byrd, Belkaid & Segre 2018. The Human Skin Microbiome. Nature Reviews Microbiology. <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.157>

Gupta, N. 2019. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. Journal of Cytology. Viitattu 28.2.2024.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6425773/>

Heiskanen, N. 2016. Spektrofotometrin historiaa, toiminta ja sovelluksia esimerkkinä klorofyllin määrittäminen. Viitattu 10.9.2023.  
[http://www.kemia.ovh/ont/Heiskanen\\_N\\_2016\\_kandidaatintutkielma.pdf](http://www.kemia.ovh/ont/Heiskanen_N_2016_kandidaatintutkielma.pdf)

Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J. & Andersson, A.F. 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. The ISME Journal.

Immunodiagnostic. N.D. Näytteiden keräys ja säilytys. Viitattu 23.4.2024.  
[https://www.immunodiagnostic.fi/tutkimus/naytteiden-kerays-homogenisointi-ja-sailytys/?gad\\_source=1&qclid=Cj0KCQjwZixBhCoARIsAIC745CdAJ1si5ExO34HnvEX9b8lahhHohv9\\_pwc2\\_sGuNmOnzGBmE7tPeUaApKTEALw\\_wcB](https://www.immunodiagnostic.fi/tutkimus/naytteiden-kerays-homogenisointi-ja-sailytys/?gad_source=1&qclid=Cj0KCQjwZixBhCoARIsAIC745CdAJ1si5ExO34HnvEX9b8lahhHohv9_pwc2_sGuNmOnzGBmE7tPeUaApKTEALw_wcB)

Matikainen, A., Miettinen, M., Wasström, K. 2010. Näytteenottajan käsikirja. Edita.

Measurlabs. N.D. Spektrofotometria. Viitattu 2.4.2024  
<https://measurlabs.com/fi/menetelmat/spektrofotometria/>

Merck Millipore. 2013. Milli-W Advantage A10-esite.  
[https://www.merckmillipore.com/FI/en/product/Milli-Q-Advantage-A10-Water-Purification-System,MM\\_NF-Z00Q0V0WW#anchor\\_DS](https://www.merckmillipore.com/FI/en/product/Milli-Q-Advantage-A10-Water-Purification-System,MM_NF-Z00Q0V0WW#anchor_DS)

New England Biolabs. 2024. 50 bp DNA Ladder. Viitattu 20.8.2024.  
<https://www.neb.com/en/products/n3236-50-bp-dna-ladder>

NucleoMag® DNA Microbiome, 9/2020. User manual. Viitattu 19.9.2023  
[https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/NucleoMag\\_DNA\\_Microbiome\\_User\\_Manual\\_Rev\\_01.pdf](https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/NucleoMag_DNA_Microbiome_User_Manual_Rev_01.pdf)

Paul, P., Rajput, S., Joshi, P., Naithani, M., Chowdhury, N., Rao, S. & Pai, M. 13.11.2021. Comparison of Fluorometric and UV Spectrophotometric Findings for DNA Isolated From Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Blocks, Fine Needle Aspiration Cytology Smears, and Blood. Cureus.

Ranki-Pesonen, M. 1994. Onko polymeraasiketjureaktio käytännön mikrobidiagnostiikkaa? Viitattu 3.9.2024. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim.

Saunders, N. & Lee, M. 2013 Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications. Caister Academic Press.

STUK. N.d. UV-C-säteilyn käyttö desinfioinnissa. Viitattu 2.9.2024.  
<https://stuk.fi/sateily-kuluttajatuotteissa-ja-laitteissa>

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turku. Turun ammattikorkeakoulu.

Synlab. 2022. Bakteeri, viljely 2 (aerobiviljely, pintamärkä). Viitattu 1.10.2024.  
[https://www.yml.fi/tuotekuvaus\\_show.php?tuotenro=51](https://www.yml.fi/tuotekuvaus_show.php?tuotenro=51)

TENK, 2/2023. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettiseen neuvottelukunnan julkaisu.

Thermo Fisher Scientific. 2010. NanoDrop Nucleic Acid Handbook. Viitattu 21.2.2024.  
<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FCAD%2Fmanuals%2Fts-nanodrop-nucleicacid-olv-r2.pdf>

Thermo Fisher Scientific. 2012. Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. Viitattu 27.2.2024.  
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>

Thermo Fisher Scientific. N.d. NanoDrop Microvolume Spectrophotometers. Viitattu 9.9.2023.  
<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/instruments/nanodrop.html>

Thermo Fisher Scientific. N.d. Qubit Fluorometric Quantification. Viitattu 9.9.2023.  
<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html>

Thermo Fisher Scientific.	N.d.	TBE Buffer.	Viitattu	2.9.2024.
<a href="https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B52/tabs?defaultTab=0">https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B52/tabs?defaultTab=0</a>				
Tieteen termipankki.	2024.	DNA.	Viitattu	20.3.2024
<a href="https://tieteentermipankki.fi/wiki/Biologia:DNA">https://tieteentermipankki.fi/wiki/Biologia:DNA</a>				
Tieteen termipankki	2024.	Geelielektroforeesi.	Viitattu	2.4.2024
<a href="https://tieteentermipankki.fi/wiki/Biologia:geelielektroforeesi">https://tieteentermipankki.fi/wiki/Biologia:geelielektroforeesi</a>				
Tieteen termipankki.	2024.	Konsentraatio.	Viitattu	2.4.2024
<a href="https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:konsentraatio">https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:konsentraatio</a>				
Tieteen termipankki.	2024.	Kontaminaatio.	Viitattu	2.4.2024
<a href="https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:kontaminaatio">https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:kontaminaatio</a>				
Tieteen termipankki.	2024.	RNA.	Viitattu	20.3.2024.
<a href="https://tieteentermipankki.fi/wiki/Biotekniikka:RNA">https://tieteentermipankki.fi/wiki/Biotekniikka:RNA</a>				
Tieteen termipankki.	2024.	Spektrofotometri.	Viitattu	2.4.2024
<a href="https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:spektrofotometri">https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:spektrofotometri</a>				
Tieteen termipankki.	2024.	Supernatant.	Viitattu	2.4.2024
<a href="https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:supernatant">https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:supernatant</a>				
Työterveyslaitos.	N.d.	Laboratoriotyö.	Viitattu	20.3.2024.
<a href="https://www.ttl.fi/oppimateriaalit/ergonomian-tietopankki/laboratoriotyo">https://www.ttl.fi/oppimateriaalit/ergonomian-tietopankki/laboratoriotyo</a>				