



Ella Kuusisto ja Roosa Ukonaho

Syöpäkudosten DNA-eristys Maxwell CSC-eristysautomaatilla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

15.11.2024

Tiivistelmä

Tekijä(t):	Ella Kuusisto ja Roosa Ukonaho
Otsikko:	Syöpäkudosten DNA-eristys Maxwell CSC-eristysautomaatilla
Sivumäärä:	33 sivua + 3 liitettä
Aika:	15.11.2024
Tutkinto:	Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto
Tutkinto-ohjelma:	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaaja(t):	Lehtori Kaisa Rajakylä Lehtori Suska Veltheim

Osa Suomessa esiintyvistä sairauksista on harvinaisia jopa monessa suvussa periytyviä sairauksia. Näiden sairauksien diagnosoimiseksi geenitestausta on tärkeää ja geenitestauksen avulla sairauden diagnoosi voidaan varmistaa. Geenitutkimuksessa eristystä DNA:sta etsitään tiettyä mutaatiota tai harvinaista sairautta aiheuttavaa geeniä. Lähes aina myös syöpä saa alkunsa geenimutaatiosta. Näiden syöpäkudoksissa tapahtuneiden muutosten tutkimiseen käytetään geenitestausta.

Opinnäytetyön tutkimuksellinen osuus toteutettiin Meilahden Genetiikan laboratorion tiloissa. Genetiikan laboratorio on Suomen suurin ja siellä tehdään vuosittain yli 50 000 perinnöllisyyteen liittyvää tutkimusta. Meilahden Genetiikan laboratoriossa on tällä hetkellä käytössä DNA:n eristämiseksi tuumorinäytteistä fenolikloroformimenetelmä, joka muiden vanhojen eristysmenetelmien tapaan on työläs ja DNA:n eristäminen on ollut hyvin hidasta. Tästä syystä Meilahden Genetiikan laboratorio haluaa korvata tämänhetkisen tuumorinäytteiden eristysmenetelmän automatisoidulla magneettipartikkeleihin perustuvalla nukleiinihappojen eristysmenetelmällä. Tarkoituksena oli löytää optimaalisin lähtömateriaalin määrä ja inkubaatioaika, jolla saanto on mahdollisimman korkea ja DNA tarpeeksi laadukasta, jotta sitä voidaan hyödyntää jatkomenetelmissä.

Varsinaisiin testauksiin päätyi 12 eri näytettä, jotka olivat joko munasarja- tai rintakudosta, joista oli löydetty syöpäsoluja ja joille oli jo aikaisemmin tehty potilaalle tilatut tutkimukset. Kudokset valikoitiin ennakkoon määritetystä noin 30 kudoksenäytteen joukosta käytettävissä olevan näytemäärän, HRD-tuloksen ja mahdollisten mutaatioiden perusteella. Useiden testauskierrosten jälkeen voitiin todeta, että kahden tunnin inkubaatioajalla ja pienellä noin yhden nuppineulan pään kokoisella kudospalalla saatiin kaikista suurin määrä ehjää DNA:ta, joka kelpaisi parhaiten jatkomenetelmiin. Jatkossa Genetiikan laboratorio ottaa käyttöön testatun automatisoidun eristysmenetelmän, mikäli uuden menetelmän testauksen jälkeen saatavat tulokset ovat yhteneväisiä vanhan menetelmän tulosten kanssa.

Avainsanat: DNA, DNA:n eristysmenetelmät, DNA:n laatutekijät, mittausarvot

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author(s): Ella Kuusisto & Roosa Ukonaho
Title: Dna isolation from cancer tissues using the Maxwell CSC isolation machine
Number of Pages: 33 pages + 3 appendices
Date: 15 November 2024

Degree: Bachelor of health care
Degree Programme: Biomedical laboratory science
Instructor(s): Kaisa Rajakylä, Lecturer
Suska Veltheim, Lecturer

Some of the diseases occurring in Finland are rare, even hereditary diseases. Genetic testing is crucial for diagnosing these diseases, and it can help confirm a diagnosis. In genetic testing, specific mutations or genes causing rare diseases are sought from DNA isolated from the patient's sample. Almost always, cancer also originates from gene mutations. Genetic testing is used to study the changes that occur in cancer tissues.

The research component of the thesis was conducted in the facilities of the Meilahti Laboratory of Genetics. Laboratory of Genetics is the largest in Finland and conducts over 50,000 hereditary research studies annually. Currently, the Meilahti Genetics Laboratory uses the phenol-chloroform method for DNA isolation from tumor samples, which, like other old isolation methods, is laborious and has made DNA extraction very slow. For this reason, the Meilahti Genetics Laboratory aims to replace the current tumor sample isolation method with an automated paramagnetic nucleic acid isolation method. The goal was to find the optimal starting material size and incubation time to achieve the highest yield and ensure that the DNA is of sufficient quality for further methods.

A total of 12 different samples were ultimately tested, which were either ovarian or breast tissue that had cancer cells found and for which previous tests had already been ordered for the patient. The tissues were selected from a pre-defined set of about 30 tissue samples based on the available sample amount, HRD results, and possible mutations. After several testing rounds, it was determined that with a two-hour incubation time and a small tissue piece about the size of a pinhead, the highest amount of intact DNA was obtained, which would be best suited for further methods. In the future, the genetics laboratory will implement the paramagnetic isolation method tested, provided that the results obtained after testing the new method are consistent with the results of the old method.

Keywords: DNA, DNA isolation methods, DNA quality factors, measurement values

The originality of this thesis has been checked using Turnitin Originality Check service.

1	Johdanto	1
2	DNA osana tuumorinäytteiden tutkimusta	2
2.1	DNA	2
2.2	Syöpä	2
2.2.1	Rintasyöpä	3
2.2.2	Munasarjasyöpä	3
2.2.3	BRCA1 ja BRCA2	3
2.3	Menetelmäperiaatteet DNA:n eristämiseksi	4
2.3.1	Solujen hajotus eli lyysaus	4
2.3.2	Fenolikloroformi eristysmenetelmä	5
2.3.3	Paramagneettinen nukleiinihappojen eristysmenetelmä	5
2.4	Menetelmäperiaatteet DNA:n laadun selvittämiseksi	6
2.4.1	Spektrometria	6
2.4.2	Fluoresenssimittaus	6
2.4.3	Kapillaarielektroforeesi	7
3	Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	8
4	Toteutus	8
4.1	Kudosnäytteiden valinta ja kudoslýsaattien valmistus	8
4.2	DNA:n eristäminen	10
4.3	Eristetyn DNA:n konsentraation ja puhtauden mittaus	11
4.3.1	Nanodrop 1000	11
4.3.2	Qubit 3.0	12
4.4	DNA:n pilkkoutuneisuuden selvittäminen	12
5	Tulokset	13
5.1	Arvoluokat	13
5.2	Mittaustulokset	15
5.3	Lähtötuoteluokkien vertailu	19
6	Pohdinta	24
6.1	Tuloksiin vaikuttavat tekijät	25
6.1.1	Olosuhteiden vaikutus saantoon	25
6.1.2	Olosuhteiden vaikutus konsentraation	Virhe. Kirjanmerkkiä ei ole määritetty.
6.1.3	Olosuhteiden vaikutus pilkkoutuneisuuteen	26
6.2	Luotettavuus	27

6.3	Eettisyys	28
6.4	Ammatillinen kasvu	28
6.5	Kehittämisehdotukset	29
	Lähteet	31

Liitteet

Liite 1. Kudoslysaattien valmistaminen kudoksista

Liite 2. Fragment Analyzer – kuoppalevyjen valmistelu

Liite 3. Yksittäisten näytteiden mittaustulokset

1 Johdanto

Osa Suomessa esiintyvistä sairauksista on harvinaisia periytyviä sairauksia. Näiden sairauksien diagnosoinnissa geenitestausta on tärkeää ja geenitestauksen avulla sairauden diagnoosi voidaan varmistaa. Geenidiagnostiikassa eristetystä DNA:sta etsitään tiettyä mutaatiota tai harvinaista sairautta aiheuttavaa geeniä. Myös syöpäkudoksissa tapahtuneiden muutosten tutkimiseen käytetään geenitestausta. Syöpäkasvainten kohdalla geneettinen testaaminen on merkittävässä osassa esimerkiksi hoitomuotojen valinnassa sekä syöpäkasvaimen kehittymisen seurannassa. (Kääriäinen 2022.)

Opinnäytetyön tutkimuksellinen osuus toteutetaan Meilahden Genetiikan laboratorion tiloissa. Genetiikan laboratorio on Suomen suurin ja siellä tehdään vuosittain yli 50 000 perinnöllisyyteen liittyvää tutkimusta. Laboratoriossa tehtäviin tutkimuksiin kuuluu esimerkiksi erilaisia kromosomi-, array- ja DNA-sekvensointitutkimuksia. Tutkimusvalikoiden avulla selvitetään erilaisten oireyhtymien perinnöllisen alttiuden taustoja sekä mahdollistetaan syöpädiagnostiikkaa. (HUS 2024.)

Tähän asti kudoksenäytteiden eristykseen Genetiikan laboratoriossa on käytetty fenolikloroformimenetelmää, jossa lähes kaikki työ on tehty käsin. Nyt tilalle halutaan automatisoitu menetelmä eristyksen nopeuttamiseksi. Mikäli eristyksessä saatavan DNA:n laatu soveltuu jatkoanalyysiin ja menetelmä saadaan laboratorion käyttöön, voisi käytettävää kittiä laajentaa ja soveltaa koskemaan myös parafiinileikkeitä.

Opinnäytetyön tarkoituksena on optimoida uutta DNA-eristysmenetelmää ja selvittää optimaaliset olosuhteet erilaisille tuumorinäytteille. Optimaaliset olosuhteet tarkoittavat tässä työssä lähtömateriaalien määrää ja käytettävää inkubaatioaikaa. Tarkoituksena on selvittää, kuinka paljon ja kuinka puhdasta DNA:ta saadaan eristettyä erilaisista kudoksista. Toivottavaa on, että opinnäytetyön valmistuttua työntilallaajalla on käytössään menetelmä, jota voidaan käyttää jatkossa ainakin tuumorinäytteiden DNA:n eristämiseen. Optimointi ja testaus toteutetaan Maxwell CSC-eristysautomaatilla käyttäen Maxwell CSC Genomic DNA -kittiä.

2 DNA osana tuumorinäytteiden tutkimusta

2.1 DNA

Geenit eli ihmisen perinnölliset informaatiotekijät ovat koottuna pitkiin DNA-ketjuihin. DNA-ketju eli deoksiribonukleiinihappoketju koostuu kahdesta kierteisestä ketjusta, jossa nukleotidit ovat asettuneet vierekkäin. Ketjut ovat vastakkaisia ja niitä kutsutaan rihmoiksi. Vastakkaiset rihmat ovat kiinnittyneet toisiinsa emästen eli nukleotidien avulla. Jokaisella nukleotidilla on oma vastin nukleotidinsa. Adeniini A ja Tymiini T sekä Sytosiini C ja Guaniini G muodostavat keskenään parit. (Frilander & Heino 2015.) Nukleotidilla tarkoitetaan DNA:n tai RNA:n rakenneosaa, joka koostuu emäksestä ja fosfaatti- sekä sokeriosasta. Opinnäytetyössä tarkastellaan erityisesti genomista DNA:ta. Genominen DNA on kromosomista eristetty tai kloonattu DNA-jakso, jossa on sekä koodaavia että ei-koodaavia jaksoja. (Aittomäki & Moilanen & Perola 2016.)

Kromosomeissa sijaitsevat geenit eli perintötekijät ohjaavat monenlaisia toimintoja kuten esimerkiksi solun jakautumista ja solun kasvua. Näihin jakautumista ja kasvua ohjaaviin geeneihin voi tulla muutoksia eli mutaatioita, jolloin solun normaali jakautuminen ja kasvu häiriintyy. Syöpä saa yleensä aina alkunsa geenivirheestä. (Syöpäjärjestöt 2024.)

2.2 Syöpä

Yksi geenivirhe ei itsessään vielä aiheuta syöpää, mutta mutaatioiden tapahtuessa useissa tärkeissä geneeissä on syövän syntyä todennäköistä. Syöpägenejä on kahta erilaista tyyppiä. Onkogeneit ovat solujen kasvua kiihdyttäviä geenejä, joissa voi tapahtua geenien toimintaa aktivoivia muutoksia, jolloin solukko alkaa jakautua hallitsemattomasti. Kasvunrajoitegeenit taas hillitsevät solujen kasvua ja niissä tapahtuvat muutokset estävät geenin normaalin toiminnan ja voivat aiheuttaa syöpää. (Syöpäjärjestöt 2024.)

Monille syöville on tyypillistä niiden kyky muodostaa tuumoreita eli kasvaimia. Tuumori voi olla kyhmy tai patti, jolla on kyky tunkeutua kudokseen ja levittää etäpesäkkeitä. Usein tuumori myös erottuu ympäröivästä kudoksesta ja on muuta kudosta kiinteämpää. Etäpesäkkeiden lähettäminen on pahanlaatuisen syövän tunnusmerkki. (Ivaska & Ristimäki & Mustjoki 2023.)

2.2.1 Rintasyöpä

Rintasyöpä on yleisin syöpätyyppi naisilla. Vuosittain yli 5000 naista ja 20–30 miestä saa rintasyöpädiagnoosin. Rintasyöpään sairastuneista noin puolet ovat yli 60-vuotiaita, mutta syöpä yleistyy merkittävästi jo 40 ikävuoden jälkeen. Alle 30-vuotiailla rintasyöpä on hyvin harvinainen ja usein sairastumisen taustalta löytyykin geneettistä alttiutta. Sukupuoli ja ikä ovat merkittävimpiä riskitekijöitä rintasyövän taustalla. Lisäksi joidenkin ehkäisyvalmisteiden käyttö, alkoholin käyttö, postmenopausaalinen ylipaino, vähäinen aktiivisuus ja erilaiset säteilynlähteet ovat rintasyövän riskitekijöitä. BRCA1-, BRCA2- ja PALB2-geenivirheen tyypistä riippuen rintasyöpään sairastumisen riski on noin 30–80 %. (Mattson & Karihtala 2023; Vehmanen 2024.)

2.2.2 Munasarjasyöpä

Munasarjasyöpä on gynekologisista syöivistä toiseksi yleisin. Uusia munasarjasyöpiä diagnosoidaan vuosittain noin 550. Tautia voi ilmentua kaikilla ikäryhmillä, mutta alle 30-vuotiailla se on harvinainen. Munasarjakasvaimista 15 % on pahanlaatuisia. Munasarjoissa esiintyvät kasvaimet luokitellaan kolmen eri kudostyyppin perusteella pinnan epiteelin, itusolujen tai strooman kasvaimiin. Epiteelin kasvaimien ryhmään kuuluu sekä hyvänlaatuisia että pahanlaatuisia kasvaimia, mutta myös semimaligneja kasvaimia eli kasvaimissa on sekä hyvä- että pahanlaatuisen kasvaimen piirteitä. Kaikista epiteelin syöivistä tutkitaan BRCA1- ja BRCA2-geenien mutaatiot. Näille tehdään myös HRD-tutkimus, jolla etsitään homologisen rekombinaation puutosta. Mikäli potilaalla ilmenee kyseinen puutos, aiheutuu genomiin kopiolumuutoksia ja uudelleenjärjestäytymistä. (Mäenpää & Puistola & Färkkilä & Staff 2024.)

2.2.3 BRCA1 ja BRCA2

Munasarja- ja rintasyöpäalttiutta aiheuttavista geeneistä tärkeimmät ovat BRCA1 ja BRCA2. BRCA1 ja BRCA2 geenit ovat kasvua rajoittavia geenejä. Näitä geenejä löytyy jokaiselta ihmiseltä, mutta mutatoituessaan näihin geeneihin liittyy suuri syöpään sairastumisen riski. Mutatoituessaan geenit häiritsevät myös DNA:n virheiden korjausta sekä DNA-synteesiä. BRCA 1 sijaitsee kromosomissa 17q21 ja BRCA 2 kromosomissa 13q12. Mutaatiot eksoneissa 13 (BRCA 1) ja 11 (BRCA 2) aiheuttavat munasarjasyöpää. (Varol ym.2018: 2–4.)

BRCA 1- ja BRCA 2 -mutaatioita tavataan 2–3 %:ssa kaikista rintasyöpätapauksista. Usein perheissä, joissa tavataan BRCA-mutaatioita, on myös varhaisen rinta- ja munasarjasyöpään sairastuneita. Miespuolisilla BRCA1-kantajilla on kohonnut riski sairastua eturauhas- ja paksusuolisyöpään. BRCA2 lisää miesten riskiä sairastua rinta-, haimatai eturauhassyöpään. (Varol ym.2018: 2–4.)

2.3 Menetelmäperiaatteet DNA:n eristämiseksi

DNA:n eristämiseen on olemassa useita erilaisia menetelmiä. Aikaisemmat nukleiinihappojen eristysmenetelmät ovat perustuneet moniin uutto- ja sentrifugointivaiheisiin ja saanto on ollut vähäistä. Pieni saanto yhdessä alhaisen puhtausasteen kanssa ei ole aikaisemmin mahdollistanut menetelmien automatisointia. (Berensmeier 2006.) DNA:n eristys kyseisillä menetelmillä on vaatinut paljon käsin työskentelyä ja täten ollut työläs. Meilahden Genetiikan laboratorioissa on tällä hetkellä käytössä DNA:n eristämiseksi tuumorinäytteistä fenolikloroformimenetelmä, joka muiden vanhojen eristysmenetelmien tapaan on työläs.

Laboratorioiden tutkimuksia keskitetään tehtäväksi erikoistuneissa laboratorioissa, jollainen myös Genetiikan laboratorio on. Keskittämisen seurauksena näytemäärät ovat lisääntyneet ja suuret näytemäärät yhdistettynä työlääseen eristysmenetelmään tekevät kudosten DNA:n eristämistä hidasta. Tästä syystä Meilahden Genetiikan laboratorio haluaa korvata tämänhetkisen tuumorinäytteiden eristysmenetelmän automatisoidulla paramagneettisella nukleiinihappojen eristysmenetelmällä. Automatisoidussa eristysmenetelmässä eristysautomaatti suorittaa DNA:n eristämisen, ja työntekijälle jää manuaalisesti suoritettavaksi ainoastaan tuumorinäytteiden solujen hajotus eli lyysaus.

2.3.1 Solujen hajotus eli lyysaus

Ennen kuin itse perimää pääsee tutkimaan, täytyy solujen sisällä oleva materiaali vapauttaa. Kudosten solujen hajotusta kutsutaan myös lyysaukseksi. Lyysauksessa solujen solukalvot hajotetaan ja solun sisältö vapautuu lyysausliuokseen. Yleensä lyysauksessa käytetään useampaa erilaista menetelmää kuten esimerkiksi mekaanista jauhausta tai kemiallista hajotusta puskureiden avulla. DNA:n eristämiseksi eristettävä kudos homogenisoidaan ja käsitellään proteinaasi K-entsyymillä jo lyysausvaiheessa. Proteinaasi K-entsyymi pilkkoo hydrolysoimalla DNA:n aminohappojen välisiä peptidisidok-

sia. (Promega 2022.) Solukalvot hajoavat joko osmoosin tai detergenttien avulla kemiallisessa hajotuksessa. Lyysauspuskureiden detergentit liuottavat solukalvojen lipidit. (Biorad.)

2.3.2 Fenolikloroformi eristysmenetelmä

Fenolikloroformimenetelmässä lyysausliuos, jossa solut ovat hajonneena, uutetaan fenolikloroformiseokseen. Sentrifugoinnin seurauksena muodostuu kaksi nestefaasia, jossa nesteet eivät ole sekoittuneet keskenään. Lyysausliuoksessa olevat proteiinit denaturoituvat eli menettävät biokemiallisen rakenteensa ja toimintakykynsä. Denaturoidut proteiinit saostuvat fenolikloroformin ja lyysausliuoksen rajapinnalle. DNA jää vesipohjaiseen lyysausliuokseen. Tämän jälkeen lyysausliuos erotetaan fenolikloroformista, jolloin lopputuloksena on puhdistettua DNA:ta vesiliuoksessa. (Suominen ym. 2013: 104–106; Solunetti 2006.)

2.3.3 Paramagneettinen nukleiinihappojen eristysmenetelmä

Paramagneettinen eristysmenetelmä hyödyntää mikrometrin kokoisia paramagneettisia hiukkasia nukleiinihappojen eristämiseen erilaisista liuoksista. Paramagneettisuudella tarkoitetaan sitä, että hiukkaset käyttävät magneettisia ominaisuuksiaan ainoastaan ulkoisen magneetikentän läsnä ollessa. (Chen & Alberts & Rodriguez & Toner 2010.) Näytteiden sekaan lisätään paramagneettisia helmiä. Helmet pidetään paikoillaan vahvan magneetin avulla sen aikaa, kun kaikki ei-toivottu materiaali poistetaan puhdistuksen aikana. Pesun jälkeen genomisen DNA eluoidaan helmistä vedellä tai puskuriliuoksella. Jäljelle jää ainoastaan jatkokäsittelyyn soveltuvaa genomista DNA:ta. (Thermo-fisher.)

Nykyaikaiset magneettiset eristysmenetelmät säästävät aikaa ja vähentävät käytettävää työmäärää, sillä eristys voidaan tehdä suoraan halutusta näytemateriaalista, kuten verestä, homogenisoiduista kudoksista tai suoraan viljelyalustalta. Magneettinen erotelu onnistuu myös hyvin viskooseista näytteistä ja uudet automatisoidut menetelmät mahdollistavat suurienkin näytemäärien käsittelyn samanaikaisesti. Menetelmät altistavat kohdemolekyylit hyvin vähäiselle mekaaniselle rasitukselle, minkä vuoksi ne ovat erityisen hyviä nukleiinihappojen tai proteiinien ja muiden biomolekyylien eristykseen. (Berensmeier 2006.)

2.4 Menetelmäperiaatteet DNA:n laadun selvittämiseksi

DNA:n laatua tarkastellessa huomioidaan eristetyn DNA:n pitoisuus eli konsentraatio, puhtaus sekä pilkkoutuneisuus. Eristetyn DNA:n täytyy olla puhdasta, tarpeeksi pitkäketjuista sekä sitä tulee olla riittävästi, jotta eristetty DNA soveltuu erilaisten genetiikan tutkimuksien näyttemateriaaliksi. Opinnäytetyössä nämä laatutekijät määritetään erilaisilla analysointilaitteilla, jotka hyödyntävät seuraavia menetelmäperiaatteita: spektrometria, fluoresenssimittaus ja kapillaarielektroforeesi.

2.4.1 Spektrometria

Spektrometrialla voidaan tunnistaa erilaisia aineita ja määrittää niiden pitoisuuksia hyödyntämällä sähkömagneettista säteilyä ja sen vuorovaikutusta aineen välillä. Spektrofotometrian toiminta perustuu Lambert-Beerin lakiin eli aineen kykyyn absorboida valoa. Kun säteily läpäisee näytteen, sen voimakkuus pienenee. Spektrofotometri mittaa säteilyn määrää sen kulkiessa näytteen läpi, ja määrittää näytteelle absorbanssin, joka kuvastaa, miten paljon näyte on absorboinut eli imenyt itseensä valoa. Mitä suurempi absorbanssi on, sitä vähemmän säteilyä pääsee kulkemaan näytteen läpi. Jokaisella aineella on sille ominainen absorbanssi tietyllä aallonpituudella. Aallonpituuden lisäksi absorbanssiin vaikuttaa näytteen paksuus ja pitoisuus. (Jaarinen & Niirainen 2008: 46–53.)

Eristetyn DNA:n konsentraatio ja puhtaus voidaan selvittää spektrofotometrillä. Lambert-Beerin lakia ja kaavaa käyttäen absorbanssin mittauksella saadaan selville näytteen DNA:n konsentraatio. Tiedetään, että suurin mitattava absorbanssi puhtaasta DNA:sta saadaan aallonpituudella 260 nm. Proteiinit puolestaan absorboivat aallonpituudella 280 nm. DNA:n puhtautta voidaan tarkastella selvittämällä näiden kahden eri aallonpituuden absorbanssin suhdeluku A_{260}/A_{280} , jonka perusteella voidaan arvioida, kuinka onnistuneesti eristyksessä on saatu poistettua solulyysaatin muu materiaali. Puhtaassa DNA:ssa suhteutettu absorbanssiluku A_{260}/A_{280} on 1,8. (Lee & Jain 2017.)

2.4.2 Fluoresenssimittaus

Fluoresenssimittaus perustuu näytteen molekyylien virittämiseen ylemmälle elektroniselle tasolle, jonka purkautuessa muodostuu valoa, jonka fluorometri havaitsee ja esittää aallonpituuden funktiona (Jaarinen & Niirainen 2008: 66). Fluorometrillä voidaan mitata DNA:n konsentraatio.

Fluorometrissä käytetään voimakasvaloisia ksenonlamppuja, jonka aallonpituus voidaan määrittää halutulle tasolle. Aallonpituus on kuitenkin yleensä 200–800 nm, eli UV-Vis-säteilyä. Säteily ohjataan näytteeseen, milloin sen molekyylit virittyvät ylemmälle elektronitasolle. Virittynyt tila ei ole pysyvä, vaan molekyylit emittoituvat eli purkautuvat takaisin alempaan elektronitasoon vapauttaen energiaa, joka havaitaan valona. Monet aineet heikentävät fluoresenssin, eli valon vapauttamisen tehoa ja siihen vaikuttaa myös muun muassa aineiden lämpötila sekä pH, mistä syystä näytteet tulee mitata välittömästi. Fluoresenssin mittaaminen on määrittämenetelmänä erityisen herkkä, eli se havaitsee pienetkin pitoisuudet fluoresoivasta yhdisteestä. (Jaarinen & Niirainen 2018: 66–68.)

Fluoresenssimittaus edellyttää, että tutkittava yhdiste fluoresoi tai vaihtoehtoisesti yhdisteestä voidaan valmistaa fluoresoiva seos (Jaarinen & Niirainen 2018: 68). DNA itessään ei ole fluoresoivaa materiaalia, vaan fluoresenssimittauksia varten hyödynnetään DNA-juosteisiin kiinnittyvää fluoresoivaa merkkiainetta. Merkkiaine on spesifi eli se sitoutuu yksinomaan DNA:han.

2.4.3 Kapillaarielektroforeesi

Eristetyn DNA:n pilkkoutumisaste voidaan selvittää kapillaarielektroforeesilla. Pilkkoutumisasteella tarkoitetaan sitä, minkä kokoisia DNA fragmentteja eristämällä on saatu. Eristetty DNA ei saa olla liian pilkkoutunutta, sillä liian lyhyet DNA fragmentit eivät sovellu jatkoanalysoitaviksi.

Kapillaarielektroforeesi perustuu menetelmänä DNA:n negatiiviseen varaukseen. DNA:n varaus johtuu nukleotidien fosfaattiryhmästä ja joutuessaan sähkökenttään DNA pyrkii hakeutumaan kohti anodia eli sähkökentän positiivista napaa. (Suominen & Pärssinen & Haajanen & Pelkonen 2013: 122–123.) Kapillaarielektroforeesissa on silikakapillaari, jonka päiden välillä on korkea jännite ja joka sisältää elektrolyyttiliuosta. Kapillaarin sisäpinnalle on kiinnittyneenä negatiivisesti varautuneita silanoli-ryhmiä, mikä saa aikaan elektrolyyttiliuoksen kulkeutumisen kohti katodia eli negatiivisesti varautunutta päätä. Muodostunutta virtausta kutsutaan elektro-osmoottiseksi virtaukseksi (EOF). (Jaarinen & Niirainen 2008: 178–179.)

Tutkittavan liuoksen molekyylit kulkevat elektro-osmoottisen virtauksen mukana. Neutraalit molekyylit kulkevat yhtä nopeasti kuin elektrolyyttiliuos, mutta mitä positiivisempi molekyylillä on varaukseltaan, sitä nopeammin se kulkee kohti katodia. Virtauksessa kul-

kemisinopeuteen vaikuttaa myös viskositeetti eli virtausvastus, minkä seurauksena pienemmät molekyylit kulkevat virtauksessa nopeammin. Kapillaarin päässä on detektor, joka mittaa aineiden molekyylin absorbanssia niiden kulkiessa sen ohi. (Jaarinen & Niirainen 2008: 180–182.) Kapillaarielektroforeesilla voidaan selvittää DNA:n pilkkoutumisaste, sillä negatiivisesti varautunut DNA kulkee hitaammin kuin EOF eli elektro-osmoottinen virtaus. Mitä suurempi DNA-ketju on kyseessä, sitä hitaammin se kulkee virtauksessa ja havaitaan detektorissa.

3 Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, soveltuuko uusi Genomic DNA kit kudospalojen DNA:n eristämiseen Maxwell CSC-eristysautomaatilla ja mikä olisi eristettävälle kudokselle optimaalisin lyysauksen inkubaatioaika ja minkä kokoisella kudospalalla saadaan mahdollisimman hyvälaatuista ja puhdasta DNA:ta.

Opinnäytetyön tavoitteena on, että toiminnallisen testauksen jälkeen opinnäytetyöntilajalla on tiedossa menetelmä ja optimaaliset lähtötuotteet, joita he voivat hyödyntää jatkomenetelmien käytössä. Tavoitteena on, että jatkossa ainakin tuumorinäytteet voisi eristää kyseisellä menetelmällä.

Opinnäytetyötä ohjaavat seuraavat tutkimuskysymykset:

1. Mitkä ovat optimaalisimmat olosuhteet kullekin testattavalle kudostyypille?
2. Kuinka laadukasta eristetty DNA oli? Miten saatu DNA toimii jatkomenetelmissä?

4 Toteutus

4.1 Kudosnäytteiden valinta ja kudosllysaattien valmistus

Varsinaiisiin testauksiin päätyi 12 eri näytettä, jotka olivat joko munasarja- tai rintakudosta, joista oli löydetty syöpäsoluja ja joille oli jo aikaisemmin tehty potilaalle tilatut tutkimukset. Kudokset valikoitiin ennakkoon määritetystä noin 30 kudosnäytteen joukosta käytettävissä olevan näytemäärän, HRD-tuloksen ja mahdollisten mutaatioiden perusteella. Testauksia varten kudokset haettiin syväjäähäpakastimesta, johon käsitellyt kudokset aina arkistoidaan varsinaisen testauksen jälkeen. Kudosten valmistelua varten

näytteet sulatettiin jääkaapissa tai huoneenlämmössä. Testauksiin valikoituneille näytteille luotiin opinnäytetyötä varten tunnistamiseen Qpati-numerot. Qpati-numeroinnin ansiosta potilaat ja varsinaiset näyttenumerot säilyivät anonyymeinä.

Lähtötuotteina käytettiin kahden kokoisia kudospaloja. Tällä tarkasteltiin, onko kudoksen koolla väliä lyysauksen onnistumisen kannalta. Lyysauksen aikana kudospalan tulisi liueta kokonaan ja muodostaa mahdollisimman homogeeninen seos. Opinnäytetyössä lähtötuote A kuvasi kooltaan yhtä nuppineulan päätä, kun taas lähtötuote B oli kooltaan kaksinkertainen lähtötuotteeseen A verrattuna.

Kudospalojen koon vertailun lisäksi opinnäytetyössä haluttiin verrata inkubaatioajan vaikutusta DNA:n eristämisen kannalta. Inkubaatioajalla tarkoitetaan opinnäytetyössä sitä aikaa, jolloin näytettä seisotetaan ja jonka aikana lyysaus tapahtuu. Vertailua varten inkubaatio toteutettiin kahdella eri tavalla, joista toinen oli pidempi ja toinen lyhyempi. Pidemmässä inkubaatioajassa näytteitä seisotettiin yön yli 16 tuntia 56°C lämpölokissa ja lyhyemmässä inkubaatiossa näytteitä pidettiin kaksi tuntia 56°C lämpölokissa, jossa oli valittuna 1500 rpm ravisteluohjelma.

Taulukko 1. Lähtötuotteiden luokittelu koon ja inkubaatioajan mukaan.

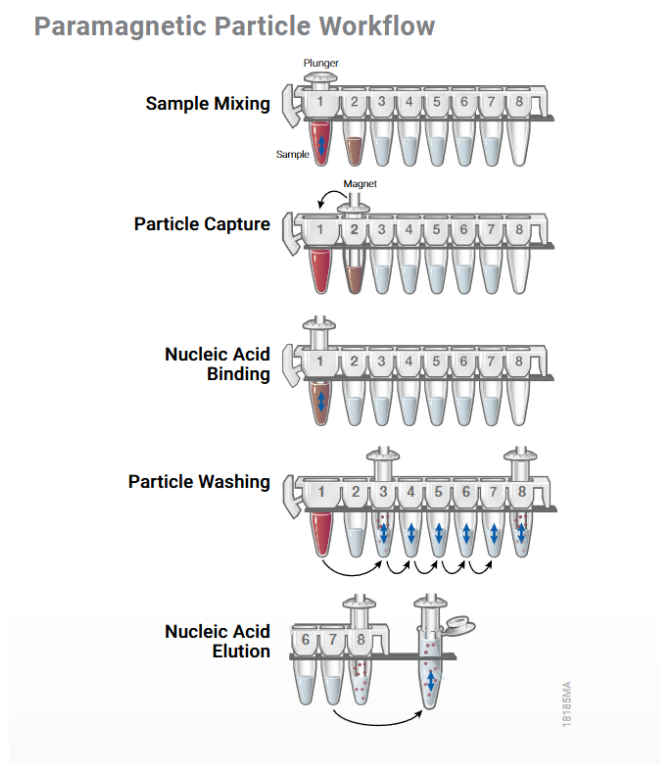
Lähtötuoteluokka	Selite
A2	Pieni kudospala, jonka lyysaus toteutettiin kahden tunnin inkubaatioajalla.
A16	Pieni kudospala, jonka lyysaus toteutettiin yli 16 tunnin inkubaatioajalla.
B2	Suuri kudospala, jonka lyysaus toteutettiin kahden tunnin inkubaatioajalla.
B16	Suuri kudospala, jonka lyysaus toteutettiin yli 16 tunnin inkubaatioajalla.

Valmistettavat kudosllysaatit luokiteltiin neljään eri luokkaan kudospalan koon ja inkubaatioajan mukaan (Taulukko 1). Kudosllysaatilla tarkoitetaan näytteseosta, jossa kudospalan solut ovat hajotettu ja niiden sisältö on vapaana lyysausliuoksessa. Kudosllysaattien valmistus on kuvattu opinnäytetyön liitteessä 1.

4.2 DNA:n eristäminen

Opinnäytetyössä DNA:n eristämiseen käytetään Promega-merkkistä Maxwell CSC-eristysautomaattia. Työn kulku on esitetty opinnäytetyön kuvassa 1. Maxwell CSC nukleiinihappoeristysautomaattien toiminta perustuu paramagneettiseen nukleiinihappojeneristysmenetelmään. Maxwell CSC -eristysautomaatin näytekasettien toisessa kaivossa on valmiina paramagneettisia hiukkasia, jotka kiinnittyvät analysaattorin määntän ympärille. Magnetisoituvat hiukkaset mahdollistavat kiinteän faasin liikuttelun eri näytekuoppien ja liuosten välillä. Kasetin ensimmäisessä näytesyvennyksessä nukleiinihapot sitoutuvat näihin paramagneettisiin hiukkasiin. Hiukkasten varautumisen vuoksi sitoutunut DNA pysyy paikoillaan myös ei-toivotun materiaalin puhdistuksen ajan. (Promega 2022:2.) Erilaisten pesujen ja puskureiden lisäysten jälkeen magneettipartikkelit ovat sitoutuneet putken pohjalle. Irronnut DNA kerätään talteen puhtauden ja konsentraation määrittämiseksi. (Suominen & Pärssinen & Haajanen & Pelkonen 2013: 105–107; Biorad.)

Opinnäytetyössä käytetty TE-puskuri sisältää 10 millimolaarista trishydroksimetyyliaminometaania, joka tunnetaan lyhyemmin myös nimellä Tris sekä 1 millimolaarista EDTA:ta eli etyleenidiamiinitetraetikkahappoa.



Kuva 1, DNA-eristys Maxwell eristysautomaatilla (Promega 2021).

4.3 Eristetyn DNA:n konsentraation ja puhtauden mittaus

Eristetyn DNA:n konsentraatio mitattiin kahdella eri analysaattorilla, joiden toiminnat perustuvat eri menetelmiin. Eristetyn DNA:n konsentraatio mitattiin ensin NanoDrop 1000 spektrofotometrillä, ja mittauksessa eristetyn DNA:n pitoisuutta laimennettiin niin, että konsentraatio oli alle 800 ng/μl. Tämän jälkeen eristetyn DNA:n konsentraatio mitattiin vielä Qubit 3.0 fluorometrillä.

4.3.1 Nanodrop 1000

NanoDrop 1000 on Thermo Scientificin spektrofotometri, jolla pystytään mittaamaan suurella tarkkuudella 1 mikrolitran (μl) näytteitä. Sen toiminta perustuu spektrofotometriaan, ja analysaattorilla pystytään mittaamaan absorbanssia 220-750 nm aallonpituuksilla. NanoDrop 1000 spektrofotometri soveltuu nukleiinihappojen konsentraation sekä puhtauden mittaukseen. NanoDrop 1000 pystyy mittaamaan luotettavasti näytteitä, joiden pitoisuus eli konsentraatio on peräti 3700 ng/μl. (Thermo Scientific 2010.)

Mikäli näytteen pitoisuus ylittää raja-arvon, on näytettä laimennettava. Käytettäessä NanoDrop 1000 näyte ei tarvitse erillistä kyvettä konsentraation mittaamiseksi, vaan nestemäisen näytteen oma pintajännite riittää pitämään näytteen paikallaan mittauksen suorittamiseksi. 1 μl näytettä pipetoidaan suoraan analysaattorissa olevaan näytejalustaan, jossa sijaitsee optisen kuitukaapelin pää. Tämän jälkeen analysaattorin toinen optinen kuitukaapeli tuodaan nestemäiseen näytteeseen, jolloin näyte jää kahden kuitukaapelin väliin. Kaapelia pitkin näytteen läpi kulkee valo, jonka määrän NanoDrop 1000 mittaa ja jonka mukaan sen järjestelmä laskee näytteelle konsentraation sekä absorbanssin. (Thermo Scientific 2010.)

Ennen DNA:n mittausta spektrofotometri kalibroitiin vedellä ja sille suoritettiin blank- eli nollamittaus samalla TE-puskurilla, jota on eristetyn DNA:n eluaattina eli liuoksena. Tämän jälkeen eluointiliuokset, joissa eristetty DNA on, mitattiin. Mikäli näytteen konsentraatio oli yli 800 ng/μl, sitä laimennettiin lisäämällä TE-puskuria. Kun DNA:n konsentraatio oli tarpeeksi alhainen, kirjattiin ylös näytteen lopullinen tilavuus, konsentraatio sekä sen suhteutetut absorbanssit 260/280 ja 260/230.

4.3.2 Qubit 3.0

NanoDrop 1000 spektrofotometrin mittausten jälkeen eristetyn DNA:n konsentraatio mitattiin Qubit 3.0 fluorometrillä. Qubit 3.0 on pienikokoinen analysaattori, joka ei tarvitse erillistä tietokonetta toimiakseen. Konsentraation mittaamiseksi eristettyyn DNA:han sidotaan spesifistä merkkiainetta, joka fluoresoi valoa ja jonka fluorometri havaitsee ja jonka perusteella se laskee näytteen konsentraation. Koska merkkiaine sitoutuu pelkästään kaksijuosteiseen DNA:han, minimoi mittaus kontaminanttien, kuten proteiinien ja RNA:n vaikutuksen tuloksiin tehden mittauksesta hyvin tarkan. (Thermo Scientific 2014.)

Qubit 3.0 mittauksen suorittamiseksi täytyi tehdä erillinen työliuos ja näytteet täytyi valmistella Qubitin omiin näyteputkiin. Työliuoksen valmistamiseen käytettiin Qubit dsDNA BR Assay Kittiä. Työliuos valmistettiin 1:200 laimennoksena, joka sisälsi 199 µl Qubit dsDNA BR bufferia ja 1 µl Qubit dsDNA BR Reagenttia eli värireagenssia. Valmistettua työliuosta pipetoitiin näyteputkeen 197 µl, minkä jälkeen näyteputkeen lisättiin 3 µl näytettä. Pipetoimisen jälkeen näyteputket vortexoitiin ja käytettiin sentrifugissa. (Thermo Scientific 2022.) Vortexoinnilla tarkoitetaan näytteen sekoittamista Vortex nimisellä automatisoidulla ravistelijalla. Sentrifugi on laite, joka pyörittää näyteputkia suurilla voimakkuuksilla niin, että painovoima pakottaa niiden sisällön painumaan täysin putken pohjaan.

Ennen mittausta näyteputkia inkuboitiin kaksi minuuttia, jonka aikana merkkiaine sitoutui kaksijuosteiseen DNA:han. Inkubaation jälkeen näytteet mitattiin. Näyteputket aseteltiin yksitellen Qubit 3.0 fluorometrin näytesyvennykseen, minkä jälkeen fluorometri mittasi ja antoi näytteen konsentraation muutamassa sekunnissa. Konsentraatio kirjattiin ylös, minkä jälkeen näyteputki poistettiin syvennyksestä.

4.4 DNA:n pilkkoutuneisuuden selvittäminen

Konsentraation ja puhtauden lisäksi eristetystä DNA:sta haluttiin selvittää sen pilkkoutuneisuus, koska sillä on merkitystä DNA:n soveltumiseen jatkoanalyysiin. Meilahden Genetiikan laboratoriossa DNA-juosteiden pituutta mitataan Fragment analyzer 5200 analysaattorilla.

Fragment analyzer 5200 on Agilentin valmistama analysaattori DNA- ja RNA-juosteiden erotteluun. Analysaattorin toiminta perustuu kapillaarielektroforeesiin. Analysaattorissa on joukko silikapäällysteisiä kapillaareja, joiden sisällä on useita sähköä johtavia

geelimattoja, jotka ovat suunniteltu seulomaan tietyn kokoisia DNA-molekyylejä. Kun kapillaareihin kohdistetaan voimakasjännitteinen sähkökenttä, tutkittava DNA siirtyy geelimattoa pitkin DNA-juosteen koon ja pituuden mukaan. Kapillaarin päässä oleva detektori havaitsee eri pituiset DNA-juosteet fluoresenssin avulla. DNA-juosteisiin sitoutuu geelimatosta merkkiainetta, joka fluoresoi valoa. (Agilent 2020.)

Ennen näytteiden asettamista Fragment Analyzeriin näytteet tuli valmistella kuoppalevyille. Näytteiden valmistelu on kuvattu liitteessä 2. Valmistelun jälkeen näytteet asetettiin analysaattoriin ja analysaattorista valittiin kaksijuosteiselle DNA:lle tarkoitettu ohjelma. Ajo käynnistettiin ja sen valmistuttua tulokset siirtyivät automaattisesti tietokoneelle. Analysaattorin antamista tuloksista kirjattiin ylös GQN-arvo eli Genomic Quality Number.

5 Tulokset

5.1 Arvoluokat

Eristetyn DNA:n laatutekijöitä eli pitoisuutta, puhtautta ja pilkkoutuneisuutta mitattiin kolmella eri analysaattorilla ja tuloksiin poimittiin mukaan mittaustulokset viidestä eri luokasta. Seuraavassa taulukossa (Taulukko 2) on esitettyä arvoluokat ja selitettynä niiden merkitys opinnäytetyössä:

Taulukko 2. Tuloksissa käytetyt mittausravot. Taulukossa on esitetty arvoluokka, analysaattori, jolla mittaus tapahtuu, DNA:n laatutekijä, jota mitataan sekä arvoluokan määrittely. *Analysaattori ei mittaa saantoa, vaan saanto lasketaan analysaattorin mitaaman konsentraation avulla.

Arvo- luokka	Analysaattori	DNA:n laatutekijä, jota mitataan	Selite
c (ng/μl)	NanoDrop 1000 Qubit 3.0	Pitoisuus	Konsentraatio eli pitoisuus Kertoo, kuinka monta nanogrammaa (ng) eristettyä DNA:ta on yhdessä mikrolitrassa (μl) TE-liuosta.
Saanto	NanoDrop 1000 * Qubit 3.0) *	Massa	Eristetyn DNA:n määrä. Kertoo, kuinka monta nanogrammaa (ng) eristettyä DNA:ta on.
A260/A280	NanoDrop 1000	Puhtaus	Aallonpituuksien 260 nm ja 280 nm suhteutettu absorbanssi, joka on ensisijainen arvo DNA:n puhtauden määrittämiseksi.

A260/A230	Nanodrop 1000	Puhtaus	Aallonpituuksien 260 nm ja 230 nm suhteutettu absorbanssi, joka on toissijainen arvo DNA:n puhtauden määrittämiseksi.
GQN	Fragment Analyzer	DNA-juosteen pituus, fragmenttikoko	DNA:n pilkkoutuneisuutta kuvaava arvo. Kertoo, kuinka monta prosenttia eristetystä DNA:sta ylittää tietyn fragmenttikoon. Arvot sijoittuvat välille 1–10, jossa 10 tarkoittaa 100 %

Taulukossa 2 esitetyt arvoluokat ovat valittu mukaan tuloksiin niiden merkityksellisyyden perusteella opinnäytetyön tavoitteiden kannalta. Konsentraatio (c) ja saanto kertovat siitä, onko eristys Maxwell CSC analysaattorilla ollut toimiva, eli onko sillä onnistuttu eristämään DNA:ta kudosnäytteistä. Konsentraatio on mitattu sekä NanoDrop 100 spektrofotometrillä, että Qubit 3.0 fluorometrillä. Kumpikaan analysaattori ei muodosta näytteelle saantoa, vaan se on laskettu kertomalla näytteen konsentraatio sen eluutiolavuudella. Tuloksiin on laskettu saanto sekä Nanodropin, että Qubitin konsentraatioiden perusteella.

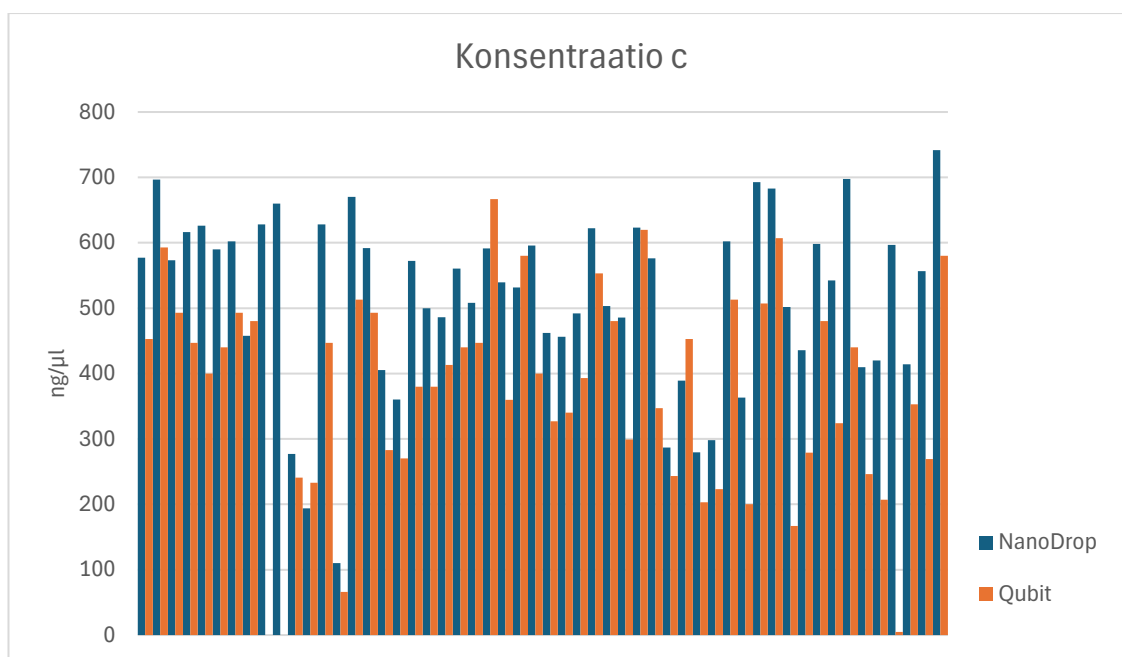
Aallonpituuksien 260/280 ja 260/230 suhteutetut absorbanssit kertovat DNA:n puhtaudesta. 260/280 nm suhteutettua absorbanssia pidetään ensisijaisena arvona DNA:n puhtautta arvioitaessa. Sen arvo madaltuu, mikäli näytteessä on suuria pitoisuuksia proteiineja tai muita kontaminantteja, jotka absorboivat valoa aallonpituudella 280 nm. 260/280 nm absorbanssiluvun tulisi olla puhtaassa DNA:ssa vähintään 1,8. Suhteutettu absorbanssi 260/230 nm on toissijainen arvo puhtautta arvioitaessa. Sen arvo madaltuu, mikäli näytteessä on suuria pitoisuuksia aallonpituutta 230 nm absorboivia kontaminantteja, kuten hiilihydraatteja. 260/230 nm suhdeluvun tulisi olla vähintään 2,0. (Butler & Matsumoto & Rutherford & Lima 2022.) Suhteutetut absorbanssiluvut on mitattu NanoDrop 1000 spektrofotometrillä.

Tuloksiin ei ole kirjattuna eristetyn DNA-juosteiden kokoa, vaan DNA:n pilkkoutuneisuutta tarkastellaan GQN-arvolla, joka saadaan Fragment Analyzerista. GQN- arvo eli Genomic Quality Number kuvastaa, kuinka monta prosenttia tutkitun näytteen DNA-juosteista on pidempiä kuin asetettu fragmenttikoko. (Agilent 2023.) Meilahden Genetiikan laboratoriossa fragmenttikooksi on asetettu 10 000 bp (base pair eli emäspari).

5.2 Mittaustulokset

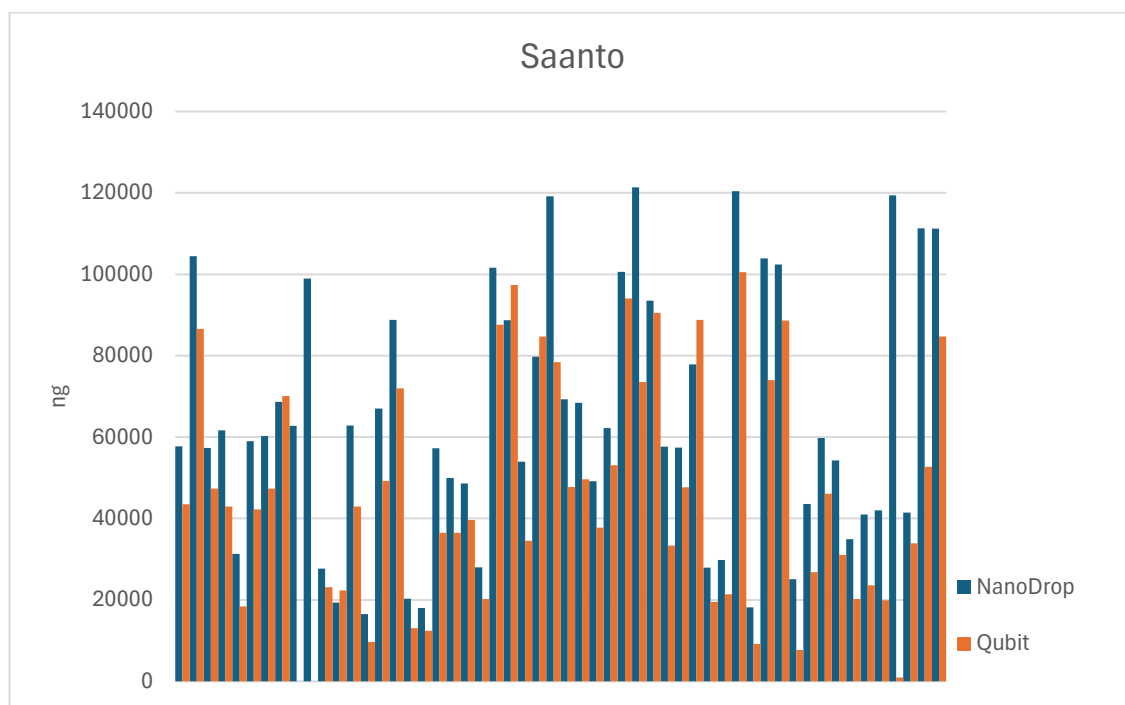
12 näytteestä tehtiin yhteensä 54 eristystä. Yksittäisistä näytteistä tehtiin useita eristys-
siä sekä samoilla että eri olosuhteilla (Taulukko 1.) sarjojen sisäisen ja välisen toistetta-
vuuden tarkastelemiseksi. Jokaisesta eristyksestä kirjattiin ylös mittaustulokset taulu-
kossa 2 esitetyistä arvoluokista. Yksittäisten näytteiden tulokset ovat taulukoituna liit-
teessä 3.

Kuviossa 1 on esitettyinä kaikkien eristysten konsentraatio sekä NanoDropilla että
Qubitilla mitattuna. Osasta näytteistä Qubitin antamaa arvoa ei ole esitetty ja arvon
puuttuminen näkyy kuviossa tyhjänä välinä pylväiden välissä. Näissä näytteissä fluoro-
metri antoi tulokseksi ”Too High” eli konsentraatio ylitti mittausalueen ylärajan. Kuvio-
sta on havaittavissa, että NanoDropin mittaustulokset ovat korkeampia, kuin Qubitin. Kuvi-
osta näkee, että jokaisesta eristyksestä on saatu mitattua konsentraatio eli jokainen
eristys on ollut onnistunut ja näytteestä on saatu eristettyä DNA:ta Maxwell CSC-eris-
tysautomaatilla.



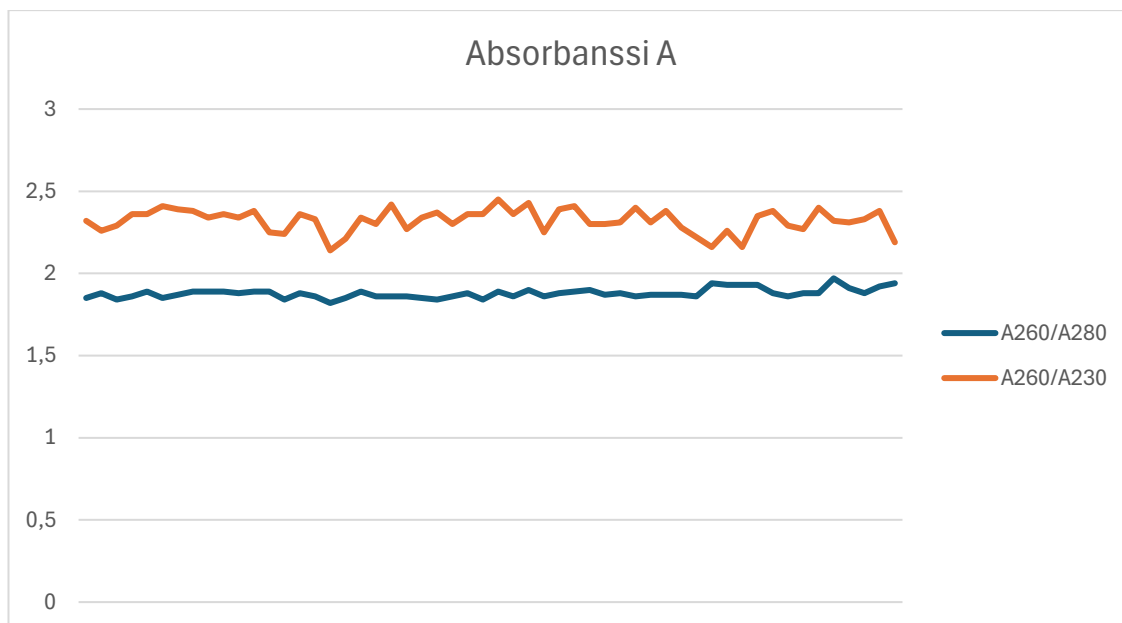
Kuvio 1. 54 DNA-eristuksen konsentraatiot (ng/μl). Siniset pylväät kertovat NanoDrop spektrofotometrin mittaamat konsentraatiot ja oranssit pylväät Qubit fluorometrin mittaamat konsentraatiot.

Kuvio 2 esittää pylväsdigrammia kaikkien eristysten laskennallisesta saannosta. Pylväsdigrammissa on esitettyä saannot Nanodropin sekä Qubitin antamien konsentraatioiden perusteella. Niistä näytteistä, joiden konsentraation Qubit fluorometri ilmoitti liian korkeaksi, ei ole laskettuna saantoa Qubit konsentraation perusteella. Tämä ilmenee kuviossa tyhjinä väleinä pylväiden välissä. Koska Qubitin konsentraatiot olivat NanoDropin konsentraatioita matalampia, näin ollen myös saannot ovat matalampia.



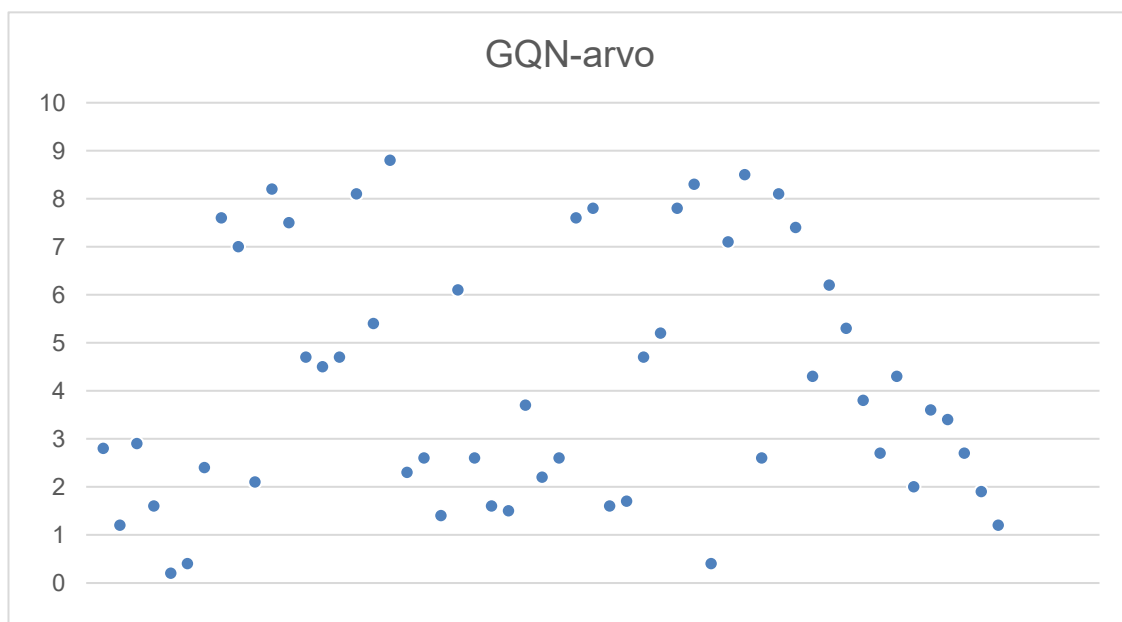
Kuvio 2. 54 DNA-eristyksen lasketut saannot (ng). Siniset pylväät kuvaavat NanoDrop spektrofotometrin konsentraatioiden perusteella laskettuja saantoja ja oranssit pylväät Qubit fluorometrin konsentraatioiden perusteella laskettuja saantoja.

Kaikkien eristysten suhteutetut absorbanssit aallonpituuksilla 260/280 ja 260/230 on havainnollistettu viivakaaviolla (Kuvio 3.) Viivakaaviossa tehtyjen eristysten suhteutettujen absorbanssien muutos havaitaan viivan epätasaisuutena. Ensisijaisesti DNA:n puhtauden arviointiin käytettävä suhteutettu absorbanssiluku 260/280 kulkee käyrällä huomattavasti tasaisemmin kuin toissijaisesti käytettävä suhteutettu absorbanssiluku 260/230. Mittauksissa A_{260}/A_{280} pysyy välillä 1,8–2,0 ja A_{260}/A_{230} välillä 2,1–2,45. Tulosten perusteella Maxwell CSC-eristysautomaatilla on saatu eristettyä puhdasta DNA:ta.



Kuvio 3. 54 DNA-eristyksen suhteutetut absorbanssit. Sininen viiva kuvaa suhteutettuja absorbansseja aallonpituuksilla 260/280 ja oranssi viiva aallonpituuksilla 260/230.

GQN-arvot ovat esitettyinä pistediagrammina kuviossa 4. Jokainen piste kaaviossa esittää eristystä ja sen GQN-arvoa, jonka vaihteluväli on 0–10. Kuviossa ne sijoittuvat arvovälille 0,2–8,8. Alimmassa tuloksessa eristetyn DNA:n juosteista vain 2 % on ylittänyt asetetun fragmenttikoon (10 000 bp), kun taas korkeimmassa arvossa 88 % juosteista on ollut yli asetetun fragmenttikoon. Tavoitearvoa GQN—arvolle ei ole määritelty, vaan siinä tavoitellaan mahdollisimman korkeaa tulosta.



Kuvio 4. 54 DNA-eristyksen GQN-arvot. Jokainen piste kuvastaa yhden eristetyn DNA:n tulosta.

Mittaustulosten analysoimiseksi niistä laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat. Keskiarvo (ka) kertoo, mihin kohtaan tutkitun aineiston arvojen keskikohta sijoittuu. Keskihajonta (sd) puolestaan kertoo, miten havaintoarvot sijoittuvat keskiarvon ympärille (Tilastokeskus.) Toistettavuuden arvioinnissa tärkeässä roolissa on määritettävä variaatiokerroin CV%, joka ilmaisee samasta näytteestä saatujen tulosten välisen hajonnan (Hägg 2016: 44). Koska variaatiokerroin on prosentuaalinen luku, on sen avulla helpompaa arvioida mittaustulosten hajontaa eli variaatiota. Variaatiokertoimen saa jakamalla keskihajonnan keskiarvolla ja sitten kertomalla saatu luku sadalla (sd/ka x100). Kaikkien 54 eristysten keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet ovat esitettyinä taulukossa 3.

Taulukko 3. Kaikista näytteistä lasketut keskiarvot (ka) ja keskihajonnat (sd) sekä niiden avulla laskettu variaatiokerroin (CV%)

	Na-nodrop c (ng/μl)	Saanto Nanodrop (ng)	Qubit c (ng/μl)	Saanto Qubit (ng)	A260/A280	A260/A230	GQN
Ka	516,26	63957,98	385,96	46837,92	1,88	2,32	4,20
Sd	135,19	30814,42	142,98	27751,08	0,03	0,07	2,57
CV%	26 %	48 %	37 %	59 %	2 %	3 %	61 %

Taulukon 3 perusteella voidaan todeta, että Maxwell CSC-eristysautomaatilla ja Genomic DNA Kitillä saa eristettyä DNA:ta. Nanodropin mittaaman konsentraation c keskiarvo oli 516,26 ng/μl ja Qubitin mittaamien konsentraatioiden keskiarvo 385,96 ng/μl. Eristetty DNA on myös puhdasta. Ensisijaisesti käytettävän A260/A280 keskiarvo oli 1,88, joka ylittää arvon 1,8 ja toissijaisesti käytettävän A260/A230 keskiarvo oli 2,32, joka puolestaan ylittää 2,0 rajan. Keskimääräinen GQN-arvo on 4,2 eli keskimäärin 42 % eristetystä DNA:sta ylitti fragmenttikooltaan 10 000 emäsparin.

Mittaustulosten variaatiossa on huomattavia eroja eri arvoluokissa. Kun tarkastelee taulukon 3 esittämiä variaatiokertoimia voidaan todeta, että mittaustuloksissa eniten hajontaa on GQN-arvossa, jossa variaatiokerroin oli 61 %. Myös saannossa variaatiokerroin on korkea. NanoDropin konsentraatioiden perusteella lasketun saannon variaatiokerroin oli 48 % ja Qubitin konsentraatioiden perusteella lasketun saannon 59 %. DNA:n puhtaudessa hajontaa ei juurikaan ole. Variaatiokerroin suhteutetulla absorbanssiluvulla A260/A280 se on vain kaksi prosenttia ja suhteutetulla absorbanssiluvulla A260/A230 kolme prosenttia.

5.3 Lähtötuoteluokkien vertailu

12 näytteestä tehtiin yhteensä 54 eristystä. Eristyksiä tehtiin neljällä erilaisella olosuhteella, joiden perusteella näytteet luokiteltiin erilaisiin lähtöaineluokkiin (Taulukko 1). Pienillä kudospaloilla tehtiin yhteensä 30 eristystä, joista 13 toteutettiin kahden tunnin (A2) ja 17 yli 16 tunnin (A16) inkubaatioajalla. Loput 24 eristystä tehtiin käyttäen suurta kudospalaa. Näistä kymmenen lyysaus toteutettiin kahden tunnin inkubaatioajalla (B2) ja lopuissa 13 eristyksessä lyysaus toteutettiin yli 16 tunnin inkubaatioajalla.

Jotta kudospalan koon ja inkubaatioajan vaikutusta eristyksen onnistumisen laatuun voitiin vertailla keskenään, laskettiin jokaisen lähtötuoteluokan (Taulukko 1.) näytteiden mittaustuloksille omat keskiarvot (ka), keskihajonnat (sd) sekä variaatiokertoimet (CV%), jotka ovat esitettynä taulukossa 4.

Taulukko 4. Luokkien keskiarvot (ka), keskihajonnat (sd) ja niiden perusteella lasketut variaatiokertoimet (CV%). A2: pieni kudospala kahden tunnin inkubaatioajalla, A16: pieni kudospala yli 16 tunnin inkubaatioajalla, B2: suuri kudospala kahden tunnin inkubaatioajalla, B16: suuri kudospala yli 16 tunnin inkubaatioajalla.

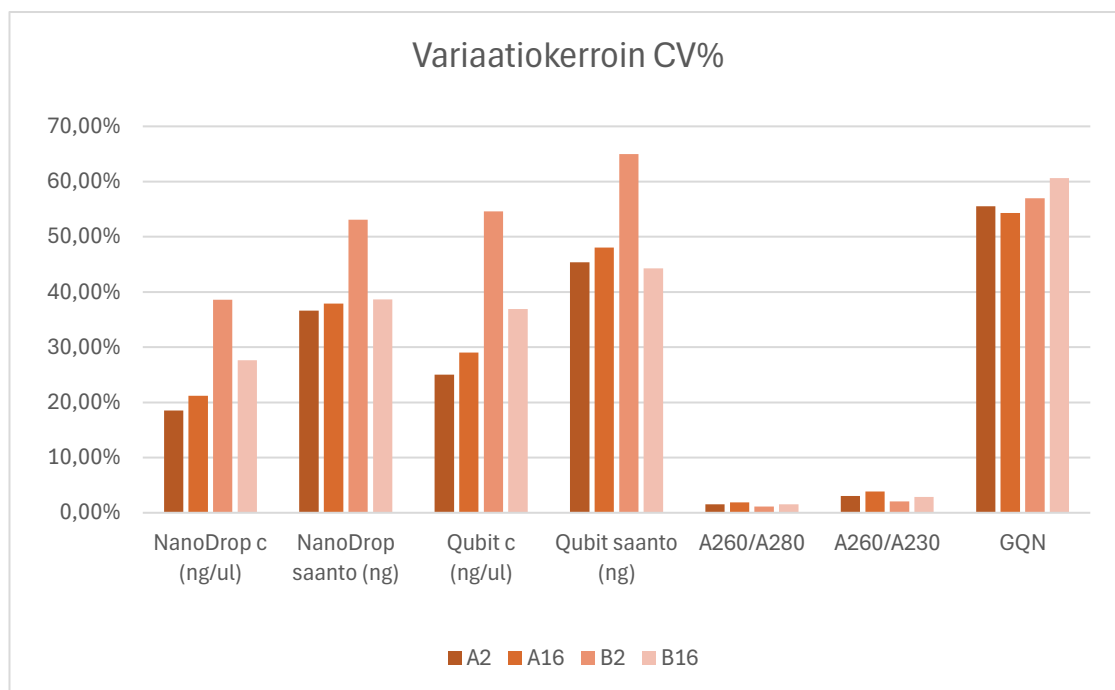
Lähtötuote		NanoDrop c (ng/μl)	NanoDrop Saanto (ng)	Qubit c (ng/μl)	Qubit Saanto (ng)	A260/A280	A260/A230	GQN
A2	Ka	566,55	72163,77	433,08	56546,83	1,88	2,32	5,00
	Sd	104,95	26432,05	108,47	25659,26	0,03	0,07	2,78
	CV%	18,5 %	36,6 %	25,0 %	45,4 %	1,5 %	3,0 %	55,5 %
A16	Ka	486,31	42063,88	336,53	28386,24	1,88	2,32	4,56
	Sd	103,22	15935,06	97,71	13638,90	0,04	0,09	2,48
	CV%	21,2 %	37,9 %	29,0 %	48,0 %	1,9 %	3,9 %	54,3 %
B2	Ka	464,36	63655,20	320,54	38492,51	1,88	2,32	4,98
	Sd	179,14	33794,49	174,98	25009,39	0,02	0,05	2,84
	CV%	38,6 %	53,1 %	54,6 %	65,0 %	1,1 %	2,1 %	57,0 %
B16	Ka	543,01	83140,29	447,66	66286,51	1,88	2,33	2,46
	Sd	149,91	32133,17	165,37	29368,31	0,03	0,07	1,49
	CV%	27,6 %	38,6 %	36,9 %	44,3 %	1,5 %	2,9 %	60,6 %

Taulukon 4 perusteella voidaan arvioida, mikä lähtötuoteluokka eli mitkä olosuhteet ovat paras vaihtoehto kudoksen DNA:n eristykseen Maxwell CSC -eristysautomaatilla. Konsentraation ja saannon mittaustuloksissa parhaita tuloksia on saatu suurella kudospalalla yli 16 tunnin inkubaatioajalla (B16) sekä pienellä kudospalalla kahden tunnin inkubaatioajalla (A2). Konsentraation ja erityisesti saannon mittauksissa tavoitellaan mahdollisimman korkeaa arvoa. Eristetyn DNA:n puhtauden arvioinnissa käytettävissä suhteutetuissa absorbanssiluvuissa A260/A280 ja A260/A230 ei puolestaan ollut juuri-kaan eroja lähtötuoteluokkien välillä. Eristetyn DNA:n juosteiden koosta kertovassa GQN-arvossa parhaiten menestyivät sekä suuri että pieni kudospala kahden tunnin inkubaatioajalla. Tässä merkittävästi alhaisemman tuloksen sai suuri kudospala yli 16 tunnin inkubaatioajalla. Ottamalla jokaisen arvoluokan keskiarvon huomioon voidaan taulukon 4 perusteella todeta, että paras lähtötuote DNA:n eristykseen on pieni kudospala kahden tunnin inkubaatioajalla. Keskiarvoja on vertailtu tarkemmin kuvioissa 6–9.

Tarkastelemalla taulukossa 4 esitettyjä variaatiokertoimia voidaan todeta, että vähiten hajontaa konsentraation mittauksissa on lähtötuoteluokassa A2 eli pienessä kudospalassa kahden tunnin inkubaatioajalla, jonka NanoDropin konsentraatioiden mittausten variaatiokerroin on 18,5 % ja Qubitin 25 %. Myös saannon hajonta on kyseisessä lähtötuotteessa alhaisin. Eniten hajontaa tapahtuu suurella kudospalalla kahden tunnin inkubaatioajalla, jonka NanoDropin konsentraatioiden mittausten variaatiokerroin on 38,6 % ja Qubitin peräti 54,6 %. Kaikissa lähtötuoteluokissa hajonta suhteutetuissa absorbanssiluvuissa A260/A280 ja A260/A230 on erittäin vähäistä, ja variaatiokertoimet sijoittuvat aallonpituuksilla 260/280 välille 1,1–1,9 % ja aallonpituuksilla 260/230 välille 2,1–3,9 %. GQN-arvossa oli puolestaan suurta hajontaa jokaisessa lähtötuoteluokassa, ja variaatiokertoimet sijoittuivat välille 54,3–60,6 %. Vähiten variaatiota GQN-arvossa tapahtui pienellä kudospalalla yli 16 tunnin inkubaatioajalla (54,3 %).

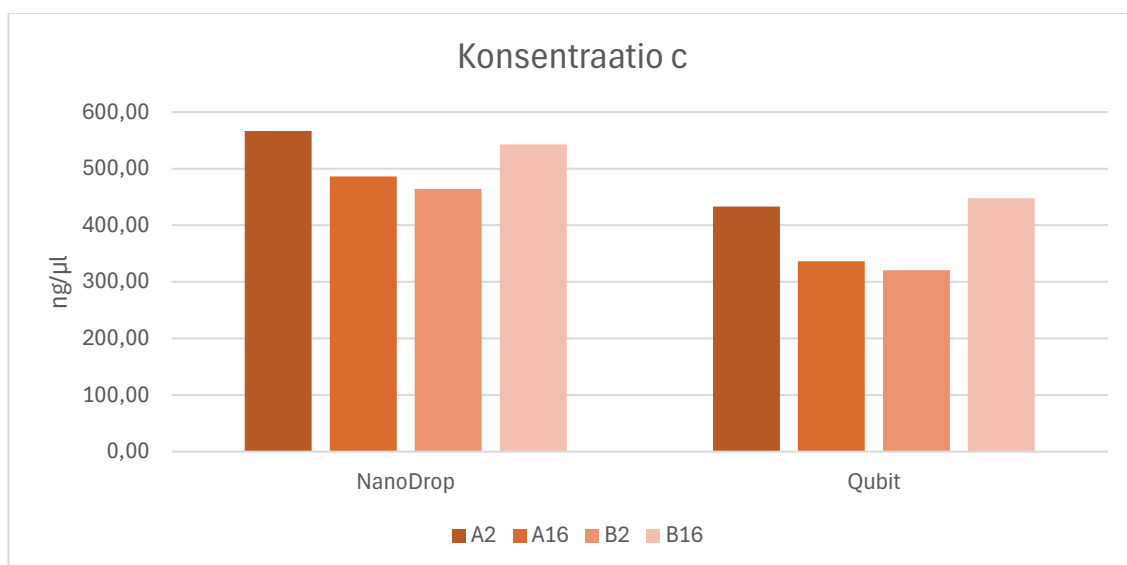
Kuviossa 5 on havainnollistettu eri lähtötuoteluokkien variaatiokertoimia (CV%) mitatuissa arvoluokissa. Kuviosta on havaittavissa, että merkittävästi korkeampaa hajontaa konsentraatioissa ja saannoissa on ollut lähtötuotteella B2 eli suurella kudospalalla kahden tunnin inkubaatioajalla. Vähiten hajontaa näissä arvoluokissa on tapahtunut puolestaan pienellä kudospalalla kahden tunnin inkubaatioajalla (A2). Poikkeuksena tästä on Qubitin konsentraatioiden perusteella laskettu saanto, jossa vähiten vaihtelua on suurella kudospalalla yli 16 tunnin inkubaatioajalla (B16). Kuviosta 5 on myös ha-

vaittavissa, kuinka kaikissa lähtötuoteluokissa hajonta on ollut pientä suhteutetuilla absorbanssiluvuilla A260/A280 ja A260/A230, ja kuinka korkea se on puolestaan ollut GQN-arvossa.



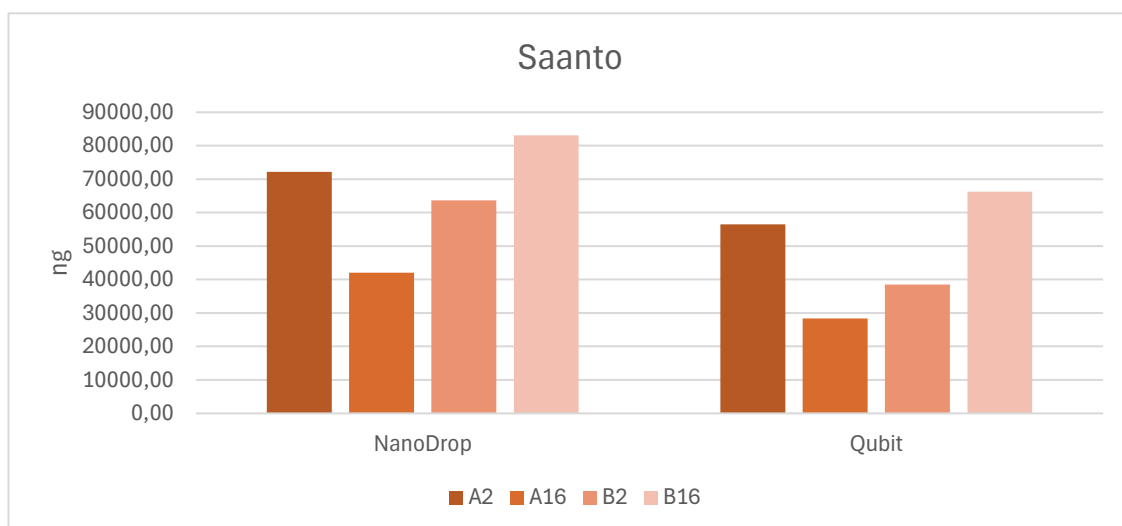
Kuvio 5. Lähtötuoteluokkien variaatiokertoimet (CV%) eri arvoluokissa. Jokaisessa arvoluokassa on asetettu lähtötuoteluokat (A2, A16, B2 & B16) vierekkäin vertailun helpottamiseksi.

Kuvio 6 esittää pylväsdiagrammia lähtötuoteluokkien konsentraatioiden keskiarvoista. NanoDropin (vasemmalla) ja Qubitin (oikealla) konsentraatiot ovat esitettynä erillään. Kuvioista on havaittavissa, että pitoisuudeltaan eniten DNA:ta on saatu eristettyä pienestä kudospalasta, jonka lyysaukseen on käytetty kahden tunnin inkubaatioaikaa (A2) sekä suurella kudospalalla, jonka lyysaukseen on käytetty yli 16 tunnin inkubaatioaikaa (B16). Lähtötuotteen A2 konsentraatioiden keskiarvo oli NanoDropin konsentraatioilla 566,55 ng/μl ja Qubitin 433,08 ng/μl. Lähtötuotteella B16 konsentraatioiden keskiarvo oli NanoDropilla mitattuna 543,01 ng/μl ja Qubitilla mitattuna 447,66 ng/μl. Kuvioista on havaittavissa, että NanoDropin mittausten keskiarvot olivat korkeampia kuin Qubitin.



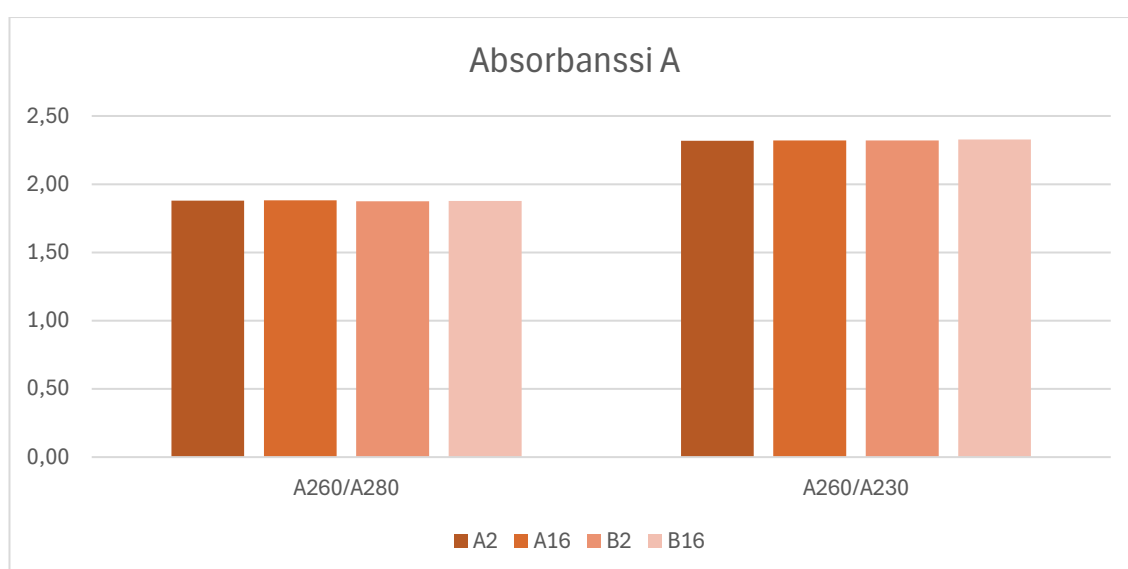
Kuvio 6. Pylväskaavio lähtötuoteluokkien konsentraatioiden (ng/μl) keskiarvoista. Vasemmanpuoleiset pylväät kuvaavat NanoDropilla mitattuja konsentraatioita ja oikeanpuoleiset Qubitilla mitattuja konsentraatioita.

Kuviossa 7 havainnollistetaan sekä NanoDropin (vasemmalla) että Qubitin (oikealla) konsentraatioiden perusteella laskettujen saantojen keskiarvoja eri lähtötuoteluokissa. Jokaisen luokan keskiarvo on eriteltyä omaksi pylvääksi. Pylväskaaviossa on nähtävissä, että keskimäärin paras saanto on saatu suurella kudospalalla yli 16 tunnin inkubaatioajalla (B16). Kyseisestä lähtötuotteesta on siis saatu eristettyä määrällisesti eniten DNA:ta.



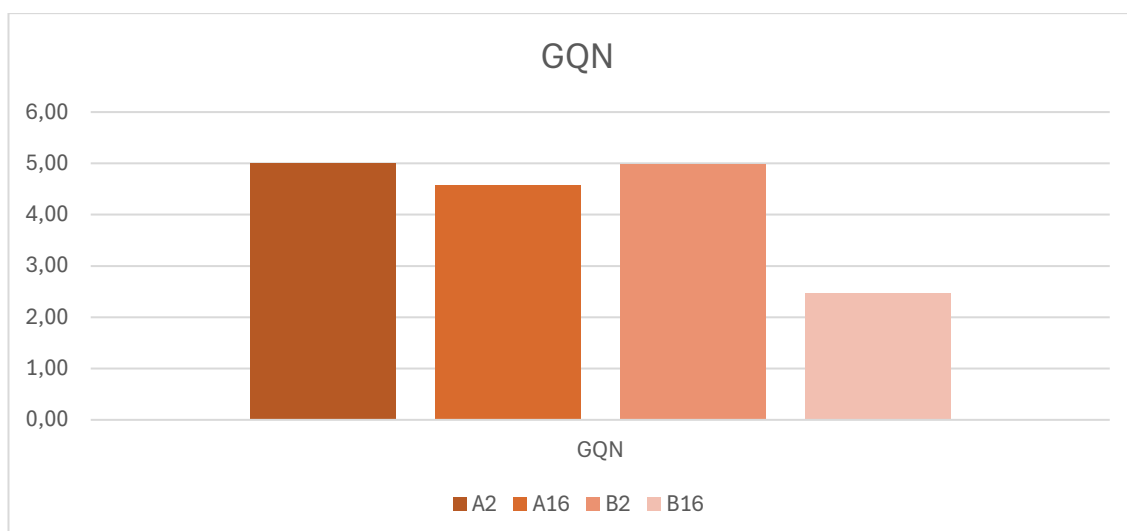
Kuvio 7. Pylväskaavio luokkien laskennallisten saantojen (ng) keskiarvoista. Vasemmalla puolella olevat pylväät kuvaavat NanoDropin konsentraation avulla laskettuja saantoja ja oikealla puolella olevat pylväät Qubitin konsentraation avulla laskettuja saantoja.

Luokkien suhteellisten absorbanssien keskiarvot aallonpituuksilla 260/280 ja 260/230 ovat esitettyinä yhteisessä pylväsdiagrammissa (Kuvio 8). Diagrammista on nähtävissä, ettei lähtötuotteella ollut merkitystä suhteellisiin absorbanssilukuihin. Kaikissa lähtöaineluokissa ensisijaisesti käytettävä suhteellinen absorbanssi A260/A280 on 1,88. Toisijainen absorbanssi A260/A230 oli puolestaan 2,32 kaikilla muilla lähtöaineluokilla paitsi suurella kudospalalla yli 16 tunnin inkubaatioajalla (B16), jolla kyseinen arvo oli 2,33. Kuvion 8 perusteella voidaan todeta, ettei kudospalan koolla eikä valitulla inkubaatioajalla ollut merkitystä näytteen puhtauteen.



Kuvio 8. Pylväskaavio suhteutettujen absorbanssilukujen keskiarvoista. Vasemmalla puolella olevat pylväät kuvaavat absorbansseja aallonpituuksilla 260/280 ja oikealla puolella olevat aallonpituuksilla 260/230.

Kuvio 9 esittää pylväsdiagrammia Fragment Analyzerin antamien GQN-arvojen keskiarvoja eri lähtöaineluokissa. GQN-arvon arvoväli on 0–10, mutta koska mikään lähtötuoteluokka ei keskiarvoltaan ollut yli 5, on diagrammissa arvovälinä 0-6. Fragmenttikooltaan yli 10 000 bp pituista DNA-juostetta on onnistuttu saamaan eniten kahden tunnin inkubaatioajalla sekä pienestä että suuresta kudospalasta (A2 & B2), joissa noin puolet eristetyn DNA:n juosteista ylitti fragmenttikooltaan asetetun 10 000 emäsparin (bp). Merkittävästi muista alhaisempi GQN-arvo on saatu suuresta kudospalasta yli 16 tunnin inkubaatioajalla (B16), jossa vain 24,6 % DNA-juosteista on pituudeltaan ollut yli asetetun fragmenttikoon.



Kuvio 9. Pylväskaavio GQN-arvon keskiarvoista eri lähtöaineluokille.

6 Pohdinta

Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, soveltuuko uusi Genomic DNA kit kudospalojen DNA:n eristämiseen Maxwell CSC-eristysautomaatilla. Lisäksi tarkoituksena oli tutkia, minkä kokoisella kudospalalla ja millä inkubaatioajalla saa eristettyä mahdollisimman laadukasta DNA:ta. Saaduista mittaustuloksista voidaan todeta, että DNA:ta saadaan eristettyä kudosnäytteistä Maxwell CSC –eristysautomaatilla ja eristetty DNA oli laadukasta. Uusi Genomic DNA kit siis soveltuu DNA:n eristämiseen kudospaloista.

Uudella menetelmällä DNA:n eristys tapahtui huomattavasti nopeammin, sillä vanhalla fenolikloroformiuuttomenetelmällä eristetyn DNA:n konsentraatiota ja laatua päästiin tarkastelemaan aikaisintaan seuraavana päivänä eristyksen aloittamisesta. Uudella menetelmällä laadullisia tarkasteluita pääsee tekemään jo muutaman tunnin kuluessa eristysprosessin aloituksesta. Uuden menetelmän avulla eristäminen on vähemmän työlästä myös laboratorion työntekijöille, kun käsin tehtäviä työvaiheita on vähemmän eikä sentrifugointeihin tarvitse käyttää aikaa.

Opinnäytetyön merkitys tilaajalle ja potilaille on merkittävä, sillä potilaat saavat uuden menetelmän ansiosta tutkimustulokset aikaisempaa nopeammin, kun uuttovaiheessa ei tarvitse odottaa seuraavaan päivään ennen seuraaviin työvaiheisiin siirtymistä. Maxwell CSC –eristysautomaatti mahdollistaa myös sen, että DNA:ta voidaan jatkossa eristää useamman potilaan kudosnäytteistä samanaikaisesti, jolloin yhä useampi potilas saa mahdollisen diagnoosinsa nopeammin. Automatisoitu menetelmä vapauttaa myös työntekijöiden resursseja, mikä lisää tehokkuutta Genetiikan laboratoriossa.

6.1 Tuloksiin vaikuttavat tekijät

Kun tarkastelee saatuja tuloksia tutkimuskysymysten näkökulmasta, paras kokonaisuus laadun ja pilkkoutuneisuuden suhteen saadaan pienellä kudospalalla kahden tunnin inkubaatioajalla. Näissä olosuhteissa käsitelty näyte on vähiten pilkkoutunutta ja saanto pysyy hyvänä, minkä perusteella näissä olosuhteissa käsitellyt näytteet soveltuvat parhaiten jatkoanalyysiin.

6.1.1 Olosuhteiden vaikutus saantoon

Taulukon 4 perusteella paras saanto saadaan suurella kudospalalla yli 16 tunnin inkubaation aikana. Paras saanto lähtötuotteella B selittyy mahdollisesti sillä, että suuren kokonsa ansiosta kudospalassa myös todennäköisesti on eniten DNA:ta. Huonoin saanto kyseisellä lähtötuotteella B ja kahden tunnin inkubaatiolla selittyy mahdollisesti nimenomaan lyhyellä lyysausajalla. Kahden tunnin lyysauksen aikana ison kudospalan solut eivät kerkeä hajoamaan yhtä tehokkaasti kuin pidemmän lyysauksen aikana.

Huonoin saanto saatiin 16 tunnin inkubaatioajalla ja pienellä kudospalalla. Yli 16 tunnin inkubaatio saattaa olla liian tehokas ja pitkä pienelle kudospalalle, jolloin saanto jää myös vähäiseksi. Pienellä kudospalalla ja kahden tunnin inkubaatiolla saanto oli toiseksi paras, sillä inkubaatioaika oli optimaalisin pienelle kudospalalle. Solujen solukalvot saatiin hajotettua tehokkaasti ja niiden sisältö vapautettua lyysausliuokseen kuitenkään solun sisältöä vaurioittamatta.

Lasketuissa saannoissa hajonta on ollut suurta jokaisessa lähtötuoteluokassa. Tämä johtuu mahdollisesti siitä, ettei menetelmän testauksessa käytetty mitään vaakaa näytemäärän mittaamiseksi, vaan näytemäärä otettiin kudospalasta silmämääräisesti. Toisaalta saannon hajontaa voi selittää myös eluutiolavuus. Maxwell CSC -eristysautomaatti eluoi eristetyn DNA:n 50 µl TE-liuokseen, josta eluutioliuos pipetoitiin eristyksen valmistettua. Kuitenkin joissain näytteissä eluutioliuoksen sekaan oli jäänyt magneettipartikkeleita ja liuosta ei saatu pipetoitua täysin 50 µl verran. Kuitenkin saantoa laskeissa on jokaisen näytteen eluutiolavuudeksi asetettu 50 µl ennen laimennoksia. Laskettu saanto voi siis olla joissakin näytteissä virheellisesti korkea.

6.1.2 Konsentraatio

Konsentraatioiden ja niistä laskettujen saantojen tuloksissa toistui se, että NanoDropin tulokset olivat korkeammat kuin Qubitin. Tämä selittyy menetelmien tarkkuudella. NanoDropilla nukleiinihappojen konsentraation mittaaminen perustuu niiden kykyyn absorboida valoa aallonpituudella 260 nm. DNA:n lisäksi myös RNA on nukleiinihappo ja täten myös se absorboi valoa kyseisellä aallonpituudella. Qubitin fluoresenssimittaus perustuu fluoresoivaan merkkiaineeseen, joka sitoutuu spesifisesti nimenomaan kaksijuosteiseen DNA:han. Fluoresenssimittaus on tästä syystä luotettavampi tapa DNA:n konsentraation mittaamiseksi. Mittauksien ero voidaan selittää sillä, että eristetyn DNA:n joukossa on ollut RNA:ta, joka on virheellisesti nostanut NanoDropin mittaaman DNA:n konsentraation arvoa.

6.1.3 Pilkkoutuneisuus

Tarkasteltaessa GQN-arvoa eli DNA:n pilkkoutuneisuutta parhaimmat arvot saatiin kahden tunnin inkubaatioajalla. Tämän voisi mahdollisesti selittää verrattain lyhyt, mutta tehokas näytteiden ravistelu. Pitkäaikainen näytteiden seisotus korkeassa lämpötilassa voi aiheuttaa nukleiinihappojen denaturoitumista eli nukleiinihappojen rakenteen rikkoutumista (Solunetti 2006). Rikkoutunut nukleiinihappojen rakenne vaikeuttaa geenien tunnistamista, sillä geenejä koodaavien proteiinien aminohappojärjestystä ei tällöin voida selvittää (Alberts, Johnson & Lewis 2002). Tällöin kyseinen DNA ei soveltuisi myöskään jatkomenetelmiin, sillä mutaatiota aiheuttavaa geeniä ei voida luotettavasti tunnistaa.

Jokaisessa lähtötuoteluokassa GQN-arvossa oli paljon hajontaa. Saatujen tulosten pohjalta (Liite 3) huomattiin, että ne näytteet, joiden DNA:n eristyksen ja Fragment Analyzerin ajon välillä ei ollut montaa päivää, antoivat lähes poikkeuksetta parempia GQN-arvoja eli niiden DNA-juosteiden fragmenttikoko oli suurempaa. Aikaisemmissa ajoissa jo eristettyjä näytteitä seisotettiin useampi päivä jääkaappilämpötilassa ennen niiden valmistelemista Fragment Analyzeriin. Eristetyn DNA:n säilytysajalla on siis ollut merkitystä tulosten kannalta. Säilytysaikana eristetty DNA on jonkin verran hajonnut. Säilytysajan lisäksi voisi ajatella, onko alhaisella lämpötilalla ollut jokin merkitys DNA:n pilkkoutuneisuuteen, sillä näytteet, jotka eivät olleet kylmäsäilytyksessä, antoivat parhaita tuloksia pilkkoutumisen suhteen.

Kudospalan koolla ei ollut merkittävää vaikutusta pilkkoutuneisuuteen (GQN 5,0 ja GQN 4,98), kun inkubaatioaika on ollut kaksi tuntia. Sen sijaan yli 16 tunnin inkubaatiossa suuri kudospala on ollut hyvin pilkkoutunutta (GQN 2,46) ja näin ollen huonolaa-tuisinta. Pienen kudospalan pilkkoutuneisuus yli 16 tunnin inkubaatioajalla oli puoles-taan melko lähellä kahden tunnin inkubaation GQN-arvoja (GQN 4,56).

6.2 Luotettavuus

Genetiikan laboratoriossa työskentely vaatii erityistä huolellisuutta ja tarkkuutta. Jokai-sen analyysiprosessin tulee olla varmistettu, jotta saatuja tuloksia voidaan pitää luotet-tavina. Oppinäytetyössä testattiin ja optimoitiin uutta Genomic DNA Kittä, mutta muu-ten oppinäytetyön toteutuksessa on käytetty Genetiikan laboratoriossa jo todennettuja menetelmiä.

Oppinäytetyössä eristetyn DNA:n laatutekijöiden mittaamiseksi on käytetty kolmea ana-lysaattoria, jotka ovat NanoDrop 1000, Qubit 3.0 ja Fragment Analyzer 5200. Nämä analysaattorit ovat Genetiikan laboratoriossa verifioituja eli niiden toimivuus on varmis-tettu eristetyn DNA:n analysointiin. Verifioinnin takia voidaan olettaa, että analysaattori antaa todenmukaisia tuloksia ja niitä voidaan pitää luotettavana. Jotta tuloksista olisi saatu vielä luotettavimmat, olisi niiden todenmukaisuus voitu varmistaa suorittamalla rinnakkaismittaukset eli mittaamalla sama näyte toistamiseen. Aikataulullisesti tämä ei kuitenkaan ollut oppinäytetyön toteutuksessa mahdollista.

Genetiikan laboratorion toimintaa ei voitu supistaa oppinäytetyön toteutusvaiheen ajaksi, mikä tarkoitti sitä, että työntekijöiden resurssit olivat suurimmaksi osaksi suun-nattu oikeiden potilasnäytteiden tutkimuksiin ja diagnostiikkaan. Tästä syystä oppinäy-tetyön toteutuksessa korostui itsenäinen työskentely. Työskentelyssä on noudatettu tarkasti laadittuja menetelmäohjeita sekä käytetty erityistä tarkkuutta etenkin käsin teh-tävissä työvaiheissa kuten pipetoinnissa, joissa virheitä voi sattua herkästi.

Työskentelyssä on pidetty huolta siitä, että käytettävät analysaattorit ovat olleet kalib-roituja ja niille on tehty päivittäiset huoltotoimenpiteet. Käytettävät reagenssit säilytettiin oikeaoppisesti ja niistä varmistettiin niiden voimassaolo. Oppinäytetyön toteutuksessa eristykset ja mittaukset tehtiin suurimmaksi osaksi eri päivinä ja toteutusvaiheessa huo-lehdittiin siitä, että eristettyjä DNA-näytteitä säilytettiin jääkaapissa aina, kun niistä ei suoritettu mittauksia. Työskentelyn vaiheissa pidettiin huolta myös siitä, että jokainen näyteputki oli tarkasti merkitty tunnisteella.

Opinnäytetyön luotettavuutta on varmistettu kattavalla tiedonhauilla. Teoriataustan tueksi on käytetty tieteellisiä vertaisarvioituja artikkeleita, oppikirjoja sekä tunnetusti luotettavien järjestöjen sivustoja. Opinnäytetyössä tiedonhaussa merkittävässä roolissa on ollut käytettävien analysaattorien laiteohjeet, jotka on laatinut laitevalmistaja. Opinnäytetyössä käytetyt tiedot ovat otettu vain luotettavista lähteistä ja ne on merkitty Metropolian lähdeviitteiden mukaisesti. Opinnäytetyössä on pidetty huolta siitä, ettei lähteistä ole suoraan kopioitu tietoa ja opinnäytetyö on tarkistettu plagioinnin varalta.

6.3 Eettisyys

Opinnäytetyössä on noudatettu hyviä tieteellisen menettelytavan peruseriaatteita. Ennen opinnäytetyön toteutusta opinnäytetyölle luotiin suunnitelma ja varsinaiselle toteutukselle haettiin tutkimuslupaa, eettistä ennakoarviointia työssä ei tarvittu. Tutkimuseettinen neuvottelukunta määrittelee, että ennen toteutusta on sovittava myös käytettävissä olevista aineistoista, aineiston käsittelystä ja aineiston julkistamisesta. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023). Koko opinnäytetyön ajan kaikkea toimintaa dokumentoitiin ja raportoitiin tarkasti.

Opinnäytetyön toteutusvaiheessa käsiteltiin potilasmateriaalia ja biologisia näytteitä. Tutkimuksellisen työn aikana käytetyt kudokset olivat peräisin oikeista jo diagnoosin saaneista potilaista. Potilaat pyrittiin pitämään mahdollisimman anonyymeinä koko opinnäytetyöprosessin ajan. Tämä varmistettiin luomalla jokaiselle potilaalle uusi näytenumero, jonka perusteella ei ollut enää mahdollisuutta selvittää esimerkiksi potilaan nimeä, henkilötunnusta tai diagnoosia. Opinnäytetyön aikana meille ei myöskään selvinnyt, oliko käsittelemämme kudokset peräisin potilaan munasarjoista vai rinnasta.

6.4 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyön toteutus tapahtui täysin uudessa ympäristössä uusien välineiden ja menetelmien avulla. Menetelmäperiaatteisiin tutustuminen vei paljon aikaa eikä ongelmatilanteita välttytty. Hyvä perehtyminen menetelmien periaatteisiin auttoi kuitenkin ymmärtämään, miten eteen tulleesta laiteongelmasta selvitään ja mikä mittauksessa on mennyt pieleen. Uusiin menetelmiin tutustuminen helpottaa myös varmasti jatkossa työelämään siirtymistä, sillä kaikki yleisimmät käytössä olevat menetelmät eivät olekaan täysin vieraita.

Opinnäytetyön toteutuksessa itsenäisen ja huolellisen työskentelyn merkitys korostui. Toteutuksessa seurattiin tarkasti annettuja suullisia ja kirjallisia ohjeita. Itsenäinen työskentely vaatii myös läpinäkyvyyttä ja rehellisyyttä, ja ongelmatilanteissa täytyi kyetä pyytämään neuvoa tilanteen korjaamiseksi. Työskentely Genetiikan laboratoriossa oli uutta, ja erityisesti aluksi täytyi kiinnittää erityistä huomiota aseptiikkaan. Genetiikan laboratoriossa aseptiikasta huolehtiminen on erityisen tärkeää, ettei näytteet kontaminoitu toisella nukleiinihapolla.

Prosessin aikana tiedonhaku ja lähdekriittisyys kehittyivät myös valtavasti. Lähdemateriaalia oli joihinkin teoriaosuuksiin valtavasti, joten kaiken materiaalin seasta oli osattava valita tärkeimmät ja juuri ne lähteet, jotka ovat opinnäytetyön kannalta olennaisia. Myös työelämässä on osattava etsiä luotettavaa tietoa mahdollisten ongelmatilanteiden ratkaisemiseksi.

Työelämää ajatellen ehkä tärkeimpänä ominaisuutena kehittyivät ryhmätyöskentelyn taidot ja aikatauluttaminen. Työskentely tapahtui lähes joka päivä eri ihmisten kanssa ja tilat olivat hyvin rajalliset, joten kaikkien kanssa piti kommunikoida avoimesti ja suunnitella, missä järjestyksessä ja milloin kukin hoitaa omat työvaiheensa, jotta vältyttäisiin näytteiden pilaantumiselta ja esimerkiksi liian pitkiltä näytteiden seisotuksilta.

6.5 Kehittämisehdotukset

Opinnäytetyössä eristettävät näytekudokset olivat erilaisia rinta- ja munasarjakudoksia, ja mittaustulosten perusteella niiden DNA:ta saa eristettyä Maxwell CSC -eristysautomaatilla käyttäen uutta Genomic DNA kittiä. Opinnäytetyössä eristetystä DNA:sta ei tehty jatkotutkimuksia eettisistä ja aikataulullisista syistä. Opinnäytetyön tilaaja eli Meilahden Genetiikan laboratorio voisikin tehdä eristetystä DNA:sta jatkotutkimukset ja verrata, yhtenevätkö ne vanhalla fenolikloroformi eristysmenetelmällä saatuihin tuloksiin.

Opinnäytetyön julkaisemisen yhteydessä ilmeni, että Genomic DNA kitin varsinaisissa työohjeissa näytteisiin olisi kuulunut jossain työvaiheessa lisätä RNA-polymeraasia. Opinnäytetyön toteutuksessa tätä työvaihetta ei tiedetty ja sen seurauksena työvaihetta ei tehty. Tästä huolimatta opinnäytetyössä DNA:n eristys onnistui. Genetiikan laboratoriossa voitaisiin testata DNA:n eristämistä kudospaloista myös ylimääräisellä työvaiheella ja verrata eristetyn DNA:n laatua siihen, kun sitä ei ole noudatettu.

Opinnäytetyön tulosten perusteella menetelmä voitaisiin validoida ja ottaa käyttöön korvaamaan nykyinen fenolikloroformi eristysmenetelmä rinta- ja munasarjakudoksille. Validoimiseksi Genetiikan laboratorion tulee testata vielä menetelmän toistettavuutta. Opinnäytetyössä testattiin eristykseen optimaaliset olosuhteet, ja Genetiikan laboratorio voi hyödyntää tätä kirjoittaessaan menetelmälle työohjetta. Mikäli menetelmä saadaan käyttöön, voisi sen tulevaisuudessa testata koskemaan myös muita tuumori- ja kudospäytteitä.

Lähteet

Agilent 2023. DNA Quality Metrics for the Agilent Automated Electrophoresis Systems. <<https://www.agilent.com/cs/library/datasheets/public/datasheet-genomc-dna-sample-quality-metrics-5994-5766en-agilent.pdf>>. Viitattu 1.11.2024

Agilent 2020. 5200, 5300, and 5400 Fragment Analyzer System Manual. <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/Fragment_Analyzer_system_manual_D0002110.pdf>. Viitattu 1.11.2024

Aittomäki, Kristiina & Moilanen Jukka & Perola Markus 2016. Lääketieteellinen genetiikka. Genominen DNA. Duodecim Oppiportti. <https://www.oppoportti.fi/op/ltg03100/do?p_haku=genominen%20dna#q=genominen%20dna> Viitattu 26.2.2024

Alberts, Bruce & Johnson, Alexander & Lewis, Johnson 2002. Molecular biology of the cell. 4th edition. National library of medicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>> Viitattu 9.11.2024

Berensmeier Sonja 2006. Magentic particles for the separation and purification of nucleic acids. National library of medicine. <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7080036/>> Viitattu 8.10.2024

Biorad, Introduction to Nucleic acid analysis. Nucleic acid extraction and purification. <<https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/nucleic-acid-extraction-purification?ID=LUSNQLDN>> Viitattu 22.03.2024

Butler, Cassidy & Matsumoto, Amy & Rutherford, Casey & Lima, Hope K 2022. Comparison of the Effectiveness of Four Commercial DNA Extraction Kits on Fresh and Frozen Human Milk Samples. Department of Human Nutrition. Winthrop University. Julkaistuu 19.7.2022. <<https://www.mdpi.com/2409-9279/5/4/63>>. Viitattu 1.11.2024

Chen, Grace Dongqing & Alberts, Catharina Johanna & Rodriguez, William & Toner, Mehmet 2010. Concentration and purification of HIV-1 virions by microfluidic separation of superparamagnetic nanoparticles. National library of medicine. <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2818585/>> Viitattu 2.10.2024

Frilander Mikko & Heino Tapio 2015. Kehitysbiologia. DNA ja geenisäätelyn periaatteet. Perintätekijöiden organisaatio. Duodecim Oppiportti. E-kirja. <<https://www.oppoportti.fi/op/kbi00008/do>> Viitattu 12.03.2024

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri 2024. Genetiikka. Kohdennetut geneettiset tutkimukset. Tutkimusohjekirja. <https://huslab.fi/ohjekirja/genetiikka_kohdennetut_geneettiset_tutkimukset_hakemisto.html> Viitattu 14.03.2024

Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri 2024. Genetiikka. Genomin laajuiset tutkimukset. Tutkimusohjekirja. <https://huslab.fi/ohjekirja/genetiikka_kohdennetut_geneettiset_tutkimukset_hakemisto.html> Viitattu 14.03.2024

Hiltunen, Erkki & Linko, Linnea & Hemminki, Sari & Hägg, Margareta & Järvenpää, Ella & Saarinen, Pertti & Simonen, Seppo & Kärhä, Petri 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. Menetelmien ominaisuuksiin liittyviä määritelmiä. Mittatekniikan keskus MIKES. Espoo: Metrologian neuvottelukunta. 19-20. <<https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>>. Viitattu 27.2.2024

Hägg, Margareta 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Bioanalytiikka. Teknologian tutkimuskeskus VTT. Espoo: Metrologian neuvottelukunta. 44-45 <<https://publications.vtt.fi/pdf/technology/2016/T276.pdf>>. Viitattu 27.2.2024

Ivaska, Johanna & Ristimäki, Ari & Mustjoki, Satu 2023. Syöpäsairaudet. Syövän synty, kasvu, leviäminen ja syyt. Ydinasiat. <<https://www.oppiportti.fi/oppikirjat/syt00001>> Viitattu 24.4.2024

Jaarinen, Soili & Niirainen, Jukka 2008. Laboratorion analyysitekniikka. Spektrometria. Valon ja materiaalin välinen vuorovaikutus. E-kirja. Helsinki: Edita. Viitattu 30.10.2024

Kääriäinen Helena 2022. Perinnölliset sairaudet. Geenitestaus. Terveyskirjasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01176>> Viitattu 13.03.2024

Lee, A. & Jain, A. 2017. DNA Concentration measurement at 260 nm using Photopette Bio. Tip Biosystems. <<https://tipbiosystems.com/wp-content/uploads/2020/05/AN-LS-001-DNA-Measurement.pdf>>. Viitattu 27.2.2024

Mattson, Johanna & Karihtala Peeter 2023. Syöpäsairaudet. Rintasyöpä. Rintasyövän yleisyys, vaaratekijät ja ehkäisy. Duodecim Oppiportti. E-kirja. <<https://www.oppiportti.fi/oppikirjat/syt00180>> Viitattu 7.10.2024

Mäenpää, Johanna & Puistola, Ulla & Färkkilä Anniina & Synnöve Staff 2024. Munasarjasyövän diagnostiikka. Gynekologiset syövät. Syöpäsairaudet. Duodecim Oppiportti. E-kirja. <<https://www.oppiportti.fi/oppikirjat/syt00204>> Viitattu 26.8.2024

Promega 2022. Maxwell CSC genomic DNA kit tekninen ohjekirja.2-3 <<https://fi.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/maxwell-csc-genomic-dna-kit-protocol-tm677.pdf?rev=a41579742b7c4d4cb8deb77ce43de3cc&la=fi-fi>> Viitattu 7.10.2024

Promega 2021. Maxwell®CSC Instruments. Nucleic Acid Extraction for diagnostic and clinical research applications. <<https://promega.widen.net/s/xbhczdvcz/maxwell-csc-instruments-brochure-br326>> Viitattu 7.10.2024

Solunetti 2006. Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus. <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_eristys_ja_puhdistus/2/> Viitattu 10.4.2024

Suominen, Ilari & Pärssinen, Jarmo & Haajanen, Jarmo & Pelkonen, Jani 2013. Geenitekniikka. Nukleiinihappojen analysointi agarosigeelielektroforeesilla. Turun ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 52. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu. 122–123. Viitattu 28.2.2024

ThermoFisher. Genomic DNA extraction and Genomic DNA isolation. Magnetic beads. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/genomic-dna-extraction.html>> Viitattu 25.10.2024

Thermo Fisher Scientific 2022. User Guide. Qubit dsDNA BR Assay Kit. Catalog numbers Q32850, Q32853. Käyttöohjeet. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf> Viitattu 30.10.2024

Thermo Fisher Scientific 2017. Qubit 3 Fluorometer. Catalog number Q33216. Käyttöohjeet <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/BID/manuals/MAN0010866_Qubit_3_Fluorometer_UG.pdf> Viitattu 30.10.2024

Thermo Fisher Scientific 2010. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual. Käyttöohjeet. <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%20x11.pdf>> Viitattu 30.10.2024

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2023. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan HTK_ohje 2023. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. <https://tenk.fi/sites/default/files/2023-03/HTK-ohje_2023.pdf> Viitattu 11.10.2024

Solunetti 2006. Proteiinit. Proteiinien rakenne. Tertiäärirakenne. <<https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/tertiaarirakenne/2/>> Viitattu 9.11.2024

Syöpäjärjestöt 2024. Kaikki syövästä. Tietoa syövästä. Mikä on syöpä. <<https://kaikki-syovasta.fi/tietoa-syovasta/mika-on-syopa/>> Viitattu 14.4.2024

Tilastokeskus 2024. Tietoa tilastoista. Käsitteet. <<https://stat.fi/meta/kas/index.html?K>>. Viitattu 30.10.2024

Varol, Umut & Kucukzeybek, Yuksel, & Alacacioglu, Ahmet & Somali, Isil & Altun, Zekiye & Safiye Aktas & Oktay Tarhan, Mustafa 2018. Journal of the Balkan Union of Oncology. BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. <<https://www.jbuon.com/archive/23-4-862.pdf>> Viitattu 5.10.2024

Vehmanen Leena 2024. Sairaudet. Syöpä. Rintasyövän riskitekijät, toteaminen ja alatyypit. Terveyskirjasto lääkärikirja Duodecim. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00618>> Viitattu 4.10.2024

Kudoslysaattien valmistaminen kudoksista

Kudosnäytteiden koko valitaan 5–50 mg:n väliltä. Opinnäytetyötä tehdessä ei ollut käytettävissä vaakaa, joten näytekooksi valikoitua kahdenkokoisia näytteitä. Näyte A: nuppineulan pään kokoinen pala. Näyte B: Noin kaksinkertainen näytteen A kokoon nähden. Kitin mukaan voidaan käyttää eluutiotilavuutena 50–200 µl. Opinnäytetyössä eluutiotilavuutena 50 µl. Kudosnäytteet säilytetty pakastettuina ja sulatettu ennen kudoslysaattien valmistamista.

TYÖOHJE:

1. Asetetaan lämpöblokin lämpötila 56 °C:een ja merkitään näyteputket
2. Siirretään leikatut kudokset niille merkittyihin putkiin ja leikataan kudospalat pienempiin paloihin lyysausajan lyhentämiseksi. Sentrifugoidaan näyteputkia 15 sekunnin ajan, jotta näytepalat laskeutuvat putken pohjalle.
3. Lisätään 300 µl aquaa näyteputkeen.
4. Lisätään jokaiseen näyteputkeen 30 µl proteinaasi K-liuosta.
5. Suljetaan putket ja sentrifugoidaan täydellä nopeudella 10 sekunnin ajan.
6. Jokaiseen putkeen lisätään 300 µl lyysausliuosta
7. Suljetaan jokainen putki ja sentrifugoidaan maksiminopeudella 10 sekuntia
8. Jätetään putket inkuboitumaan 56 C:een jollakin seuraavista ohjelmista:
 - lämpöblokkiin 1500 rpm ja enintään 2 tunnin seisotus
 - vähintään 16 tunnin seisotus ilman ravistelua
9. Vorteksoidaan näytteitä 10 sekunnin ajan maksimivoimakkuudella
10. Sentrifugoidaan näytteitä 5 minuutin ajan maksiminopeudella. Kaikki mahdollisesti sulamaton näytemassa sakkautuu putken pohjalle.
11. Siirretään supernatantti inkubointiputkesta uuteen putkeen niin, että mahdollinen saostuma jää inkubointiputken pohjalle.
12. Lisätään jokaiseen putkeen 300 µl lyysausbufferia
13. Suljetaan korkit, vorteksoidaan ja sentrifugoidaan maksiminopeudella 10 sekunnin ajan.

14. Valmistetaan Maxwellin näyttekasetit

15. Siirretään kudospnäyte kasetin 1. syvennykseen ja sekoitetaan kudospnäyte kasetin sidosliuokseen. Näytettä sekoitetaan liuokseen vähintään 10 kertaa, jotta syvennykseen muodostuu homogeeninen seos.

Fragment Analyzer 5200 – kuoppalevyn valmistelu

Ennen kuoppalevyjen valmistelua laimenna näytteet 1:1 suhteella TE-liuokseen. Pipetoi ensin 3 µl TE-liuosta, jonka jälkeen pipetoi 3 µl näytettä. Vortexoi laimennos ja käytä nopeasti fuugissa. Laimennokset voidaan tehdä erilliselle kuoppalevyille.

Kuoppalevyn valmistus Fragment Analyzeriin, Genomic 50 kb kit:

1. Pipetoi 199 ul Diluent Markeria 96-kuoppalevyn kuoppiin
2. Lisää 1 µl näytettä jokaiseen näytekuppaan ja 1 µl ladderia kuoppalevyn jokaisen käytössä olevan rivin viimeiseen kuppaan
3. Lisää vajaan rivin tyhjiin kuoppiin 24 µl Blank Solutionia
4. Aseta muovikalvo kuoppalevyn päälle, vortexoi kevyesti ja käytä kuoppalevy sentrifugissa
5. Irroita muovikalvo ja aseta kuoppalevy Fragment Analyzeriin

Yksittäisten näytteiden mittaustulokset

Taulukko 1. Mittaustulokset A2 näytteille (pieni kudospala kahden tunnin inkubaatioajalla)

Qpati nu- mero	Eris- tys	Lai- men- nos V (μ l)	Na- noDro p c (ng/ μ l)	Na- noDro p Saant o (ng)	Qubit c (ng/ μ l)	Qubit Saant o (ng)	A260/A28 0	A260/A23 0	GQ N
GK22 -1199	3.syys	100	602,16	60216	493	47328	1,87	2,39	2,4
GK22 -1199	19.syy s	150	457,69	68653, 5	480	70080	1,89	2,38	7,6
GK22 -1199	19.syy s	100	627,98	62798	Too high	-	1,89	2,34	7
GK24 -1139	3.syys	100	670,33	67033	513	49248	1,88	2,36	4,7
GK24 -1139	19.syy s	150	592,06	88809	493	71978	1,86	2,33	8,1
GK24 -1140	3.syys	100	572,4	57240	380	36480	1,89	2,34	2,3
GK24 -1141	30.elo	200	595,88	11917 6	400	78400	1,84	2,36	2,2
GK24 -1142	3.syys	100	576,34	57634	347	33312	1,87	2,3	7,8
GK24 -1143	30.elo	200	389,15	77830	453	88788	1,86	2,4	0,4
GK24 -1144	30.elo	50	363,13	18156, 5	200	9200	1,86	2,22	8,1
GK24 -1144	19.syy s	150	692,86	10392 9	507	74022	1,94	2,16	7,4
GK24 -1144	19.syy s	150	682,72	10240 8	607	88622	1,93	2,26	4,3
GK24 -1168	3.syys	100	542,46	54246	324	31104	1,86	2,29	2,7

Taulukko 2. Mittaustulokset A16 näytteille (pieni kudospala yli 16 tunnin inkubaatioajalla)

Qpati numero	Eris-tys	Lai-men nos V (µl)	Na-noDro p c (ng/µl)	Na-noDro p Saant o (ng)	Qubit c (ng/µl)	Qubit Saant o (ng)	A260/A280	A260/A230	GQ N
GK22-1194	30.elo	100	577,29	57729	453	43488	1,85	2,32	2,8
GK22-1198	30.elo	50	625,97	31298,5	400	18400	1,89	2,36	0,2
GK24-1139	3.syys	50	405,09	20254,5	283	13018	1,82	2,14	5,4
GK24-1139	19.syys	50	360,23	18011,5	270	12420	1,85	2,21	8,8
GK24-1140	3.syys	100	499,62	49962	380	36480	1,86	2,3	2,6
GK24-1140	9.syys	100	486,13	48613	413	39648	1,86	2,42	1,4
GK24-1140	19.syys	50	560,33	28016,5	440	20240	1,86	2,27	6,1
GK24-1141	30.elo	150	461,98	69297	327	47742	1,89	2,45	2,6
GK24-1141	9.syys	150	456,17	68425,5	340	49640	1,86	2,36	7,6
GK24-1141	19.syys	100	491,83	49183	393	37728	1,9	2,43	7,8
GK24-1143	30.elo	100	279,5	27950	203	19488	1,87	2,31	7,1
GK24-1144	30.elo	50	501,55	25077,5	167	7682	1,93	2,16	6,2
GK24-1144	19.syys	100	435,78	43578	279	26784	1,93	2,35	5,3
GK24-1144	19.syys	100	598,08	59808	480	46080	1,88	2,38	3,8
GK24-1168	3.syys	50	697,8	34890	440	20240	1,88	2,27	4,3
GK24-1168	9.syys	100	409,93	40993	246	23616	1,88	2,4	2
GK24-1168	19.syys	100	419,99	41999	207	19872	1,97	2,32	3,6

Taulukko 3. Mittaustulokset B2 näytteille (suuri kudospala kahden tunnin inkubaatioajalla)

Qpati numero	Eris-tys	Lai-men nos V (µl)	Na-noDro p c (ng/µl)	Na-noDro p Saant o (ng)	Qubit c (ng/µl)	Qubit Saant o (ng)	A260/A280	A260/A230	GQ N
GK22-1195	3.syys	100	573,02	57302	493	47328	1,84	2,29	2,9
GK22-1199	3.syys	150	659,84	98976	Too high	-	1,89	2,36	2,1
GK22-1199	19.syys	100	277	27700	241	23136	1,88	2,34	8,2
GK22-1199	19.syys	100	193,56	19356	233	22368	1,89	2,38	7,5
GK24-1138	30.elo	100	628,11	62811	447	42912	1,89	2,25	4,7
GK24-1140	3.syys	200	508,19	101638	447	87612	1,85	2,34	2,6
GK24-1141	30.elo	100	622,16	62216	553	53088	1,86	2,25	1,6
GK24-1142	3.syys	200	286,98	57396	243	47628	1,88	2,31	8,3
GK24-1143	30.elo	100	297,89	29789	223	21408	1,87	2,38	8,5
GK24-1168	3.syys	200	596,84	119368	4,86	952,56	1,91	2,31	3,4

Taulukko 4. Mittaustulokset B16 näytteille (suuri kudospala yli 16 tunnin inkubaatioajalla)

Qpati numero	Eris-tys	Lai-men nos V (µl)	Na-noDro p c (ng/µl)	Na-noDrop Saanto (ng)	Qubit c (ng/µl)	Qubit Saant o (ng)	A260/A280	A260/A230	GQ N
GK22-1194	30.elo	150	696,53	104479,5	593	86578	1,88	2,26	1,2
GK22-1195	3.syys	100	616,54	61654	447	42912	1,86	2,36	1,6
GK22-1198	30.elo	100	589,84	58984	440	42240	1,85	2,41	0,4

Liite 3

4 (4)

GK24-1138	30.elo	150	110,14	16521	66,2	9665,2	1,84	2,24	4,5
GK24-1140	3.syys	150	591,52	88728	667	97382	1,84	2,37	1,6
GK24-1140	9.syys	100	539,54	53954	360	34560	1,86	2,3	1,5
GK24-1140	19.syys	150	531,64	79746	580	84680	1,88	2,36	3,7
GK24-1141	30.elo	200	503,05	100610	480	94080	1,88	2,39	1,7
GK24-1141	9.syys	250	485,48	121370	299	73554	1,89	2,41	4,7
GK24-1141	19.syys	150	623,36	93504	620	90520	1,9	2,3	5,2
GK24-1143	30.elo	200	602,18	120436	513	100548	1,87	2,28	2,6
GK24-1168	3.syys	100	414,16	41416	353	33888	1,88	2,33	2,7
GK24-1168	9.syys	200	556,57	111314	269	52724	1,92	2,38	1,9
GK24-1168	19.syys	150	741,65	111247,5	580	84680	1,94	2,19	1,2