



Kaupallisen RNA-eristyskitin optimointi Bravo-pipetointirobotille

Eemil Jaarinen

OPINNÄYTETYÖ
Joulukuu 2024

Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

JAARINEN, EEMIL:
Kaupallisen RNA-eristyskitin optimointi Bravo-pipetointirobotille

Opinnäytetyö 41 sivua, joista liitteitä 4 sivua
Joulukuu 2024

RNA, eli ribonukleiinihappo, on biomolekyyli, jota esiintyy kaikissa organismeissa sekä viruksissa. RNA:n yleisimpiä synteesejä ovat transkriptio, eli RNA-synteesi, jossa RNA syntetisoidaan DNA:n ohjeen mukaan sekä translaatio, eli proteiinisynteesi, jossa proteiineja muodostetaan RNA:n ohjeen mukaan. RNA:ta hyödynnetään paljon biolääketieteellisissä tutkimuksissa, koska sen sekvenssi on yksinkertainen ja se tunnetaan jo suhteellisen hyvin. Ei-koodaava RNA toimii eukaryooteilla myös apuna geenien ilmentymisessä sekä auttaa muokkaamaan muuta RNA:ta.

Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida kaupallinen RNA-eristyskiti Bravo-pipetointirobotille. Tarkoituksena oli eristää solulysaatista riittävästi laadukasta RNA:ta pipetointirobotilla sekä analysoida eristettyjen näytteiden konsentraatiota, näytepuhtautta ja laatua NanoDrop 2000- ja 2100 Bioanalyzer-laitteilla. Opinnäytetyö suoritettiin Tampereen yliopiston FHAIVE-tutkimusryhmässä.

RNA:ta eristettiin HUVEC-solujen lysaatista käyttämällä magneettisiin partikkeleihin perustuvaa RNA-eristyskittiä. HUVEC-soluja kasvatettiin kuoppalevyn kuopissa sekä inserttien basaalipuolilla. Automatisoidulla nesteenkäsittelijällä suoritettiin neljä testiajoa näytteillä, joiden perusteella laitteelle tehtyä ohjelmaa muokattiin toimivammaksi eristyskitille. Lopuksi suoritettiin yksi optimoitu ajo pipetointirobotilla. Automatisoidun eristyksen tuloksia verrattiin eristyskitillä käsin tehtyihin eristyksiin.

RNA:n automatisoitua eristystä saatiin optimoitua merkittävästi. Eristettyjen näytteiden konsentraatiota ja puhtautta saatiin parannettua. Myös automaattisen nesteenkäsittelijän pipetinkärkien ja kuoppalevyjen kulutusta saatiin vähennettyä.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

JAARINEN, EEMIL:

Optimisation of Commercial RNA Extraction Kit Using Bravo Pipetting Robot

Bachelor's thesis 41 pages, appendices 4 pages
December 2024

RNA or ribonucleic acid is a biomolecule that can be found in every living organism or virus. Its most common and best-known synthesis are transcription, where RNA is formed from DNA's instructions, and translation, where proteins are made according to RNA's instructions. In biomedicine, RNA is one of the most exploited molecules, as its sequence is simple and it's relatively well known. A non-coding RNA in eucaryotic cells also has a role in gene expression and helps edit other RNAs.

The purpose of this Bachelor's thesis was to optimise a commercial RNA extraction kit for the Bravo pipetting robot. Furthermore, the objective was to extract sufficient amount of high-quality RNA from cell lysate using a pipetting robot and to analyse sample concentrations, purity and quality with NanoDrop 2000 and 2100 Bioanalyzer. This Thesis was completed in the FHAIVE research group at Tampere University.

RNA was extracted from HUVEC cell lysate, using a magnetic bead-based extraction kit. HUVEC cells were cultured on the bottom of 12-well plates and on the basolateral side of inserts. Four test runs were completed with samples using Bravo. Based on these test runs, the protocol was edited to be more functional for the extraction kit used. After the test runs, one optimised sample run was conducted. The results of automated runs were compared to manually extracted samples, which were used as a reference.

The automatic extraction of RNA was optimised significantly. The concentrations and purities of samples were improved. The usage of well plates and pipetting tips were also reduced.

Key words: RNA extraction, automatic liquid handler, optimization, Agilent Bravo

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	RNA:N RAKENNE JA TEHTÄVÄT	7
3	RNA:N ERISTÄMINEN	9
4	PIPETOINTIROBOTIT	11
4.1	RNA:n laadun ja määrän arviointi.....	15
5	RNA:N ERISTYS HUVEC-SOLUISTA	20
6	TULOKSET	27
7	POHDINTA	31
	LÄHTEET	35
	LIITTEET	38
	Liite 1. Mitatut tulokset	38
	Liite 2. Mitatut tulokset	39
	Liite 3. Zymo Quick-RNA MagBead -eristyskitin ohje.....	40
	Liite 4. Zymo Quick-RNA MagBead -eristyskitin ohje.....	41

ERITYISSANASTO

FBS	Fetal Bovine Serum (naudan sikiön seerumi)
FHAIVE	Finnish Hub for Development and Validation of Integrated Approaches
FIMEA	Finnish Medicines Agency
GLP	Good Laboratory Practice (hyvä laboratoriokäytäntö)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (ihmisen napanuoralaskimon endoteelisolut)
IATA	Integrated Approaches to Testing and Assessment
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfaattipuskuroitu suolaliuos)
RIN	RNA Integrity Number

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunnan FHAIVE:n (Finnish Hub for Development and Validation of Integrated Approaches) tutkimusryhmässä, jonka tavoitteena on luoda vaihtoehtomenetelmiä eläinkokeille kehittämällä ja validoimalla uusia IATA-menetelmiä (Integrated Approaches to Testing and Assessment), käyttäen *in vitro* -malleja, toksikogenomiikkaa ja tekoälyä hyödyntävää datamallinnusta. FHAIVE:lla on FIMEA:n (Finnish Medicines Agency) GLP-laboratoriosertifikaatti (Good Laboratory Practice).

Tämän työn tavoitteena on optimoida kaupallinen RNA-eristyskitti Bravo-pipetointirobotille. Tarkoituksena on eristää solulysaatista riittävästi laadukasta RNA:ta pipetointirobotilla sekä analysoida saadut konsentraatiot ja näytepuhtaudet NanoDrop 2000- ja 2100 Bioanalyzer-laitteilla. Tutkimusryhmässä tehdään paljon RNA-eristyksiä, joita automatisoidun eristyksen käyttö tutkimuksissa voisi nopeuttaa ja tarkentaa. Tuloksia verrataan automatisoiduissa eristyksissä käytetyn eristyskitin käsin tehtävien eristyksien tuloksiin.

2 RNA:N RAKENNE JA TEHTÄVÄT

RNA, eli ribonukleiinihappo on biomolekyyli, jota esiintyy kaikissa elävissä organismeissa sekä viruksissa. RNA:n rakenne muodostuu nukleotideista, eli riboosi-sokerin ja typpiemäksen muodostamista yksiköistä. RNA:ssa esiintyvät typpiemäket ovat adeniini (A), guaniini (G), urasiili (U) ja sytosiini (C). RNA esiintyy lähtökohtaisesti yksijuosteisena rakenteena, mutta jotkut virustyytit voivat sisältää myös kaksijuosteista RNA:ta. (Farhana & Wang 2023) RNA:n sekvenssi on yksinkertainen ja helposti tutkittavissa, jonka takia sitä on helppo hyödyntää biolääketieteellisissä tutkimuksissa ja geenien muokkaamisessa (Rogoyski 2021).

Kolme keskeisintä RNA-tyyppiä ovat lähetti-RNA (mRNA), siirtäjä-RNA (tRNA) sekä ribosomaalinen RNA (rRNA). RNA:n yleisimpiä synteesejä ovat transkriptio, eli RNA-synteesi, jossa RNA syntetisoidaan DNA:n ohjeen mukaan, sekä translaatio, eli proteiinisynteesi, jossa proteiineja muodostetaan RNA:n ohjeen mukaan. mRNA, tRNA ja rRNA esiintyvät kaikki proteiinisynteesissä. RNA-synteesit ovat erilaisia eukaryootti- ja prokaryoottisolujen välillä. (Wang & Farhana 2023)

Transkriptiossa DNA:n geneettistä koodia kopioidaan RNA:n sekvenssiin. RNA:n ja DNA:n sekvenssissä erona ovat nukleotidien rakenne. DNA:n nukleotideissa typpiemäs on kiinnittynyt deoksiribonukleotidiin, eikä riboosi-sokeriin, kuten RNA:ssa. Deoksiribo- ja ribonukleotidin rakenne eroaa siten, että ribonukleotidissa on yksi OH-ryhmä enemmän. DNA:n ja RNA:n sekvensseissä on osana neljää erilaista typpiemästä, joista kolme ovat niiden välillä samoja ja yksi eroaa: DNA:ssa urasiiliin (U) tilalla on tymiini (T). (Alberts, Johnson & Lewis 2002)

Kaikki solujen sisältämä RNA on valmistettu DNA:n transkriptiossa. Transkription alussa RNA-polymeraasientsyymi kiinnittyy DNA:n osaan, joka kopioidaan. RNA-polymeraasi avaa pienen alueen DNA:n kaksoisjuosteesta, joka sisältää kopioitavan geenin. Juosteen avautuessa niiden emäkset irtoavat toisistaan. RNA kopioidaan toisesta DNA:n juosteesta, jota kutsutaan templaattijuosteeksi. RNA-polymeraasin avulla ribonukleotidit liittyvät toisiinsa templaattijuosteen mukaisessa järjestyksessä, jolloin muodostuneen RNA:n emäsjärjestys on yhdenmukainen

koodaavan juosteen kanssa, sillä erolla että tyymiinin tilalla RNA:ssa on urasiili. Tässä vaiheessa muodostunut RNA-ketju on mRNA:ta. (Alberts, Johnson & Lewis 2002)

mRNA toimii ikään kuin siltana DNA:n ja proteiinien välillä (Chan, Cho, & Wong 2020). mRNA on DNA:sta transkriptiossa syntynyttä RNA:ta, joka sisältää geneettisen koodin, jonka avulla translaatiossa voidaan muodostaa tarvittavia proteiineja. Prokaryoottien mRNA voi toimia proteiinisynteesissä ilman erillistä prosessointia, mutta eukaryoottisolujen mRNA ei ole muodostuessaan valmis toimimaan proteiinien muodostamisessa, vaan sitä kutsutaan pre-mRNA:ksi. Tämä johtuu siitä, että se sisältää proteiineja koodaavien osien, eli eksonien lisäksi myös ei-koodaavia osia, eli introneita. Eukaryoottien pre-mRNA:n prosessoinnissa ei-koodaavat osat poistetaan ja jäljelle jää vain koodaavat osat proteiinisynteesiä varten. (Wang & Farhana 2023)

tRNA toimii proteiinisynteesissä aminohappojen siirtämisessä mRNA:n koodin mukaisesti. tRNA kuljettaa aminohappoa sen 3'-päässä. Kun aminohappo on kiinnittyneenä tRNA:n 3' päähän, sitä kutsutaan aminoasyyli-tRNA:ksi. Aminoasyyli-tRNA:n apuna toimivat aminoasyyli-tRNA-syntetaasit. Ne ovat entsyymejä, jotka liittävät aminohapon tRNA:han. Ribosomaalinen RNA muodostaa ribosomeja yhdessä proteiinien kanssa. tRNA tunnistaa antikodonillaan mRNA:sta sen antikodonia vastaavan komplementaarisen osan, joka määrää liitettävän aminohapon. tRNA-molekyylien tuomat aminohapot liitetään ribosomilla yhteen polypeptidiketjuksi. (Farhana & Wang 2023) mRNA, tRNA ja rRNA eivät kuitenkaan ole ainoita RNA-tyyppejä, vaan erilaisia luokkia on tunnistettu yli sata kappaletta (Roundtree, Evans, Pan & He 2017).

RNA:lla on todettu olevan myös muita merkittäviä tehtäviä. Esimerkiksi eukaryooteilla ei-koodaava RNA säätelee proteiineja koodaavien geenien toimintaa esimerkiksi hajottamalla tiettyjä mRNA-molekyyliä tai voimistamalla niiden translaatiota. (Li 2023)

3 RNA:N ERISTÄMINEN

RNA:n eristäminen on edellytys monille molekyylibiologisille töille, kuten kään-teistranskriptiolle, jossa muodostetaan cDNA:ta, tai RNA:n sekvensoinnille. Eris-tystavan valinta riippuu monista tekijöistä, kuten näytteen tyypistä, halutun RNA:n pituudesta ja eristuksen mittakaavasta. (New England Biolabs n.d.) RNA:n eris-tämisen onnistumisen kannalta on tärkeää, että käytetty RNA on laadukasta. RNA:n eristäminen voidaan suorittaa useilla erilaisilla tavoilla, kuten orgaanisilla menetelmillä, spin-kolonneilla tai magneettisilla partikkeleilla. (Thermo Fisher Scientific n.d.a.)

Orgaanisissa eristysmenetelmissä näyte homogenisoidaan fenolia sisältävällä liuoksella ja sentrifugoidaan. Sentrifugoinnin aikana näyte jakautuu kolmeen eri faasiin. Alimmassa faasissa on orgaanista materiaalia, keskimmäinen faasi sisältää denaturoituneita proteiineja ja DNA:ta, ja ylin faasi sisältää RNA:ta, joka voi-daan ottaa talteen ja jatkokäsitellä. (Thermo Fisher Scientific n.d.a.)

Spin-kolonneilla tapahtuvassa eristyksessä käytetään kolonneja, joissa on esi-merkiksi lasikuidusta valmistettu suodatinkalvo, eli membraani. Solunäyte hajo-tetaan puskuriliuoksella, joka sisältää muun muassa RNAasi-inhibiittoreita. Sentrifugoinnin aikana muu näyte kulkeutuu membraanin läpi, mutta nukleiiniha-pot jäävät membraaniin. Eristyksen aikana membraania pestään eri liuoksilla. Pe-suliuosten jälkeen RNA irroitetaan membraanista eluutioliuokseen ja se voidaan kerätä talteen. Spin-kolonniputkien heikkona puolena on se, että näytteeseen saattaa jäädä myös DNA:ta. (Thermo Fisher Scientific n.d.a.)

Magneettiset partikkelit ovat noin 20–30 nm kokoisia rautaoksidipartikkeleita, jotka ovat päällystetty käyttötarkoituksen mukaan sitomaan yhdisteitä, kuten RNA:ta (MAGBIO n.d.). Aluksi näyte hajotetaan sopivaan eristyspuskuriin. Kun magneettiset partikkelit lisätään näytteen joukkoon, näytteen RNA sitoutuu pääl-lystettyihin partikkeleihin. Tämän jälkeen näyte, joka on sitoutunut magneettisiin partikkeleihin, asetetaan magneetin päälle, joka vetää partikkeleita puoleensa, ja liuokset voidaan aspiroida pois, mutta RNA ja magneettiset partikkelit jäävät as-tiaan (Thermo Fisher Scientific n.d. a.)

Näytettä pestään eristyksen aikana erilaisilla suojoja ja liuottimia poistavilla liuoksilla, vuorotellen vapauttaen ja sitoen partikkeleita magneettialustaan. Useiden resuspensointi- ja pesukierrosten jälkeen näytteeseen lisätään eluutioliuos, joka saa RNA:n irtautumaan partikkeleista. Partikkelit vedetään magneetin luokse ja eluutioliuoksessa oleva RNA otetaan talteen. Magneettisien partikkelien käyttöön liittyy riski, että eluutioliuokseen voi RNA:n lisäksi päätyä myös magneettisia partikkeleita. (Thermo Fisher Scientific n.d. a.)

RNA/DNA-eristystä tehtäessä automaattisilla nesteidenkäsittelijöillä, käytetään yleensä magneettisia partikkeleita. Käsillä eristettäessä puolestaan käytetään yleensä joko orgaanisiin liuottimiin tai spin-kolonneihin pohjautuvaa menetelmää. Näiden tulokset voivat erota toisistaan. (Jeffries, Kiss, Smith & Oris 2014)

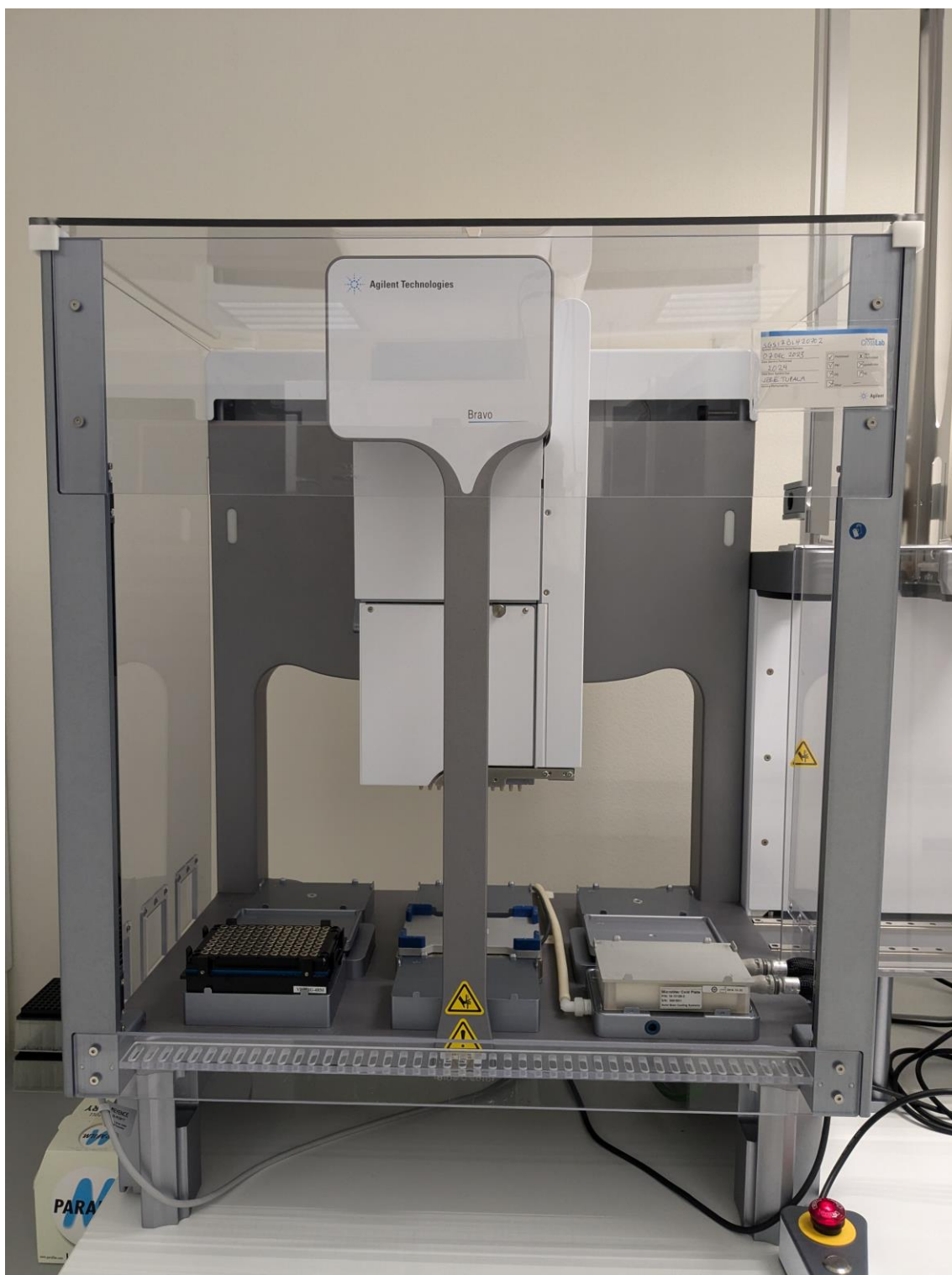
RNA:n eristystä varten soluja kasvatetaan esimerkiksi soluviljelypulloissa, kuoppalevyillä tai inserteillä. Soluinsertit tarjoavat soluviljelypulloa tai kuoppalevyä luonnollisemman ympäristön esimerkiksi epiteeli- tai endoteelisolujen kasvattamiseen. Inserteissä on pohjalla ohut huokoinen kalvo, jonka pinnalle solut kiinnittyvät. Inserttien käytön etuna on myös eri solutyypin kasvattaminen kalvon molemmilla puolilla. (Corning n.d.)

4 PIPETOINTIROBOTIT

Automaattisia nesteenkäsittelijöitä, eli pipetointirobotteja on saatavilla yksinkertaisista malleista aina hyvin monimutkaisiin laitteisiin. Ne kaikki voidaan kuitenkin luokitella roboteiksi, sillä ne pystyvät tekemään niille annettuja tehtäviä ennalta ohjelmoidun ohjelman mukaan. Pipetointirobottien automaation tasoissa on kuitenkin suuria eroja, jotka tulevat esiin niiden tehtävien suoritusmäärässä ja niiden kyvyssä joustaa tarpeen tullen ennalta syötetystä ohjelmasta. (Torres-Acosta, Lye & Dikicioglu 2022)

Automaattiset nesteidenkäsittelijät voidaan jakaa kolmeen kategoriaan niiden automaation tason mukaan. Ylimpään kategoriaan kuuluvat laitteet, jotka voivat suorittaa useita tehtäviä ilman laitteen muokkaamista. Keskikategoriaan kuuluvat laitteet, jotka suorittavat tiettyä tehtävää, mutta niihin voidaan lisäksi liittää muita yksittäisiä tehtäviä suorittavia laitteita. Alimpaan kategoriaan kuuluvat laitteet, jotka ovat keskittyneet nesteiden siirtämiseen, mutta voivat sisältää pieniä varusteita, kuten kuuma- tai kylmälevyn. Bravo Liquid Handling Platform (Agilent) on esimerkki keskimmäisen kategorian laitteesta. (Torres-Acosta, Lye & Dikicioglu 2022)

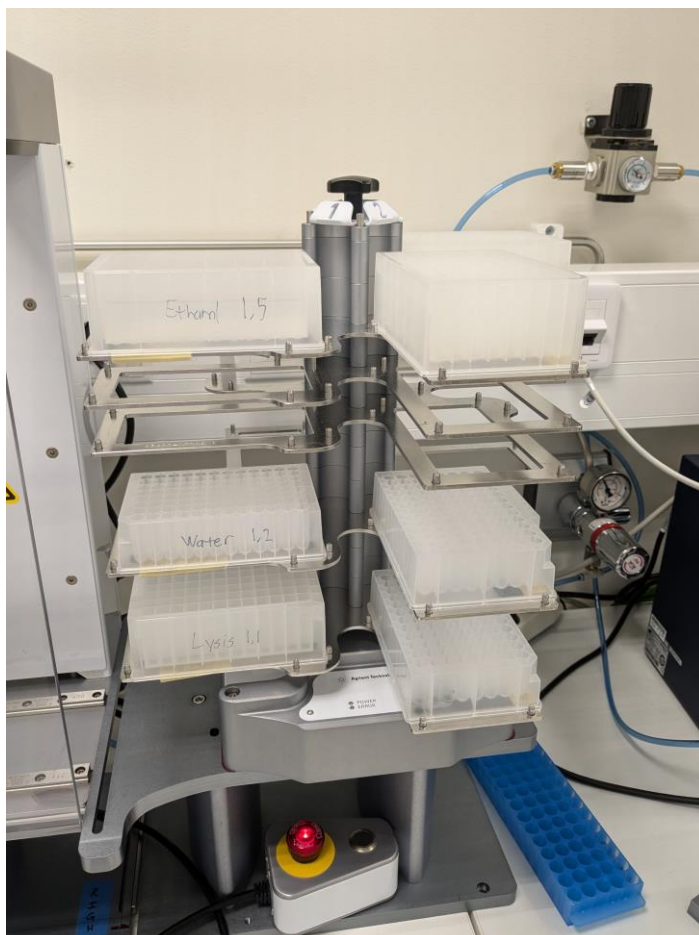
Agilent Bravo Liquid Handling Platform on laajasti muokattavissa työn edellytysten mukaan. Laitteeseen on saatavilla lukuisia lisävarusteita monenlaisiin analyysiin, kuten ravistelija, pipetointipäitä 96- ja 384-kuoppalevyille, lämpö- ja kylmälevy, käsittelijä kuoppalevyille ja pipetin kärjille, sekä kuoppalevyasema. Bravossa on yhdeksän pipetointialustaa, joissa se kykenee pipetoimaan nesteitä ja siirtämään muun muassa pipetinkärkiä ja reagenssiastioita alustojen välillä. Lisäksi Bravoon on mahdollista yhdistää esimerkiksi BenchCel- (Agilent) sekä MiniHub-laitteet (Agilent), jotka mahdollistavat tarvittavien reagenssien ja tarvikkeiden säilytyksen ja siirtelyn Bravon pipetointialustoille ja sieltä pois. Bravo-robotille on mahdollista ostaa myös valmiita ohjelmia, mutta niitä voi tehdä myös itse VWorks-ohjelmalla. (Agilent n.d.a, Agilent n.d.b)



KUVA 1. Agilent Bravo automaattinen nesteenkäsittelijä.



KUVA 2. Agilent BenchCel kuoppalevykäsittelijä, jossa ylhäällä pipetinkärkitelineet



KUVA 3. Agilent Minihub kuoppalevyasema

Agilent Bravo on robotiksi melko pieni, koska se itsessään pitää sisällään ainoastaan pipetointialustat sekä pipetointipään. Robotin toiminta-aluetta on mahdollista laajentaa erilaisilla lisäosilla. Jos halutaan robotin toimivan omatoimisemmin, kykenevän liikuttelemaan useita kuoppalevyjä sekä pipetointikärkiä, se on mahdollista hankkia kuoppalevykäsittelijällä ja kuoppalevytelineellä. Kuoppalevyn käsittelijä pystyy liikuttelemaan tarvittavat levyt Agilent Bravon käytettäväksi. Lisäksi robottilinjaston ulkopuolelle on saatavilla esimerkiksi kuoppalevyn sinetöijä ja viivakoodinlukija. Ratkaisu erotella laitteet mahdollistaa Bravon käyttämisen huomattavasti pienemmässä tilassa, jos ei kuoppalevykäsittelijää tarvita. (Torres-Acosta, Lye & Dikicioglu 2022)

Pipetointirobotit mahdollistavat monen työn automatisoinnin, mutta niiden ongelmana akateemisessa tutkimuksessa on hinta, tilan tarve sekä tarvittavat asiantuntijat. Automaattisten nesteidenkäsittelijöiden ohjelmointi uusiin tehtäviin on monimutkaista, hidasta ja vaatii usein myös asiasta tietävän ammattilaisen, joka vaikeuttaa niiden käyttöönottamista ympäristössä, jossa on jatkuvasti vaihtuvia,

pienempiä projekteja. Vaikka pipetointirobotit ovat tärkeitä biologisissa tutkimuksissa, ongelmana on niiden rajoittuneisuus toistamaan vain tiettyä tehtävää. (Dettinger, Kull, Arekatla, Ahmed, Zhang, Schneiter, Wehling, Schirmacher, Kawamura, Loeffler & Schroeder 2022)

Pipetointirobottien hyödyt riippuvat siis paljon siitä, millaista työtä sillä on suunniteltu tekemään. Akateemisessa ympäristössä tehdään paljon suppeita kokeita, joissa työ saatetaan tehdä vain kerran, eikä sitä toisteta enää uudelleen. Tällaiseen työhön robotista ei välttämättä ole juurikaan hyötyä, sillä sen ohjelman luominen vie aikaa. Lisäksi pipetointirobotteja täytyy huoltaa ja kalibroida säännöllisesti niiden toiminnan sekä tarkkuuden ylläpitämiseksi. Tämän takia robotit ovat erityisen hyödyllisiä töissä, jotka ovat toistuvia ja usein tehtäviä. (Torres-Acosta, Lye & Dikicioglu 2022)

Pipetointirobotit tarvitsevat usein erityisesti niille suunniteltuja välineitä, kuten pipetinkärkiä toimiakseen kunnolla. Myös robottien koko täytyy ottaa huomioon, sillä ne ovat yleensä suuria ja vievät paljon pöytätilaa, joka on pois muusta työskentelytilasta. Koska pipetointirobottien hinta on korkea ja hyöty riippuu paljon käytöstä, vaihtoehtojen kartoitus ja laboratorioon sopivimman laitteen valinta kannattaa tehdä huolella. (Torres-Acosta, Lye & Dikicioglu 2022)

Automaattisten nesteidenkäsittelijöiden suurimpana ongelmana on kontaminaatiot, joita voi syntyä esimerkiksi pipetinkärkiin jääneistä reagenssijäämistä tai nesteiden kulkeutumisesta robotin mukana eri vaiheiden välillä. Automaattiset nesteidenkäsittelijät saattavat joskus myös aspiroida tai dispensoida väärä neste-määriä esimerkiksi osien kulumisen tai ympäristön vaikutusten takia. Kontaminaatoriskiä voidaan pienentää esimerkiksi huolehtimalla laitteen huolloista ja käyttämällä kertakäyttöisiä pipetinkärkiä. (Rawat 2024)

4.1 RNA:n laadun ja määrän arviointi

Eristyksissä saadun RNA:n laatua ja määrää voidaan analysoida näytteen UV/VIS-absorption mittaamisella spektrofotometrisesti, esimerkiksi NanoDrop-

laitteella (Thermo Fisher Scientific). NanoDrop-laitteella näytettä pipetoidaan ja-lustalle, josta laite mittaa näytteen absorbanssin. Tuloksista saadaan selville RNA:n konsentraatio ja näytteen puhtautta voidaan arvioida ensisijaisesti A260/280- ja lisäksi A230/260-suhdearvon perusteella. Nukleiinihappojen absorptiomaksimi on 260 nm alueella, kun taas proteiinit absorboivat 280 nm aallonpituudella ja fenoli noin 270 nm aallonpituudella. Eristysliuosten epäpuhtaudet, kuten suolat tai näytteen hiilihydraatit, absorboivat valoa erityisesti 230nm alueella. Puhtaalla RNA:lla A260/A280-arvon pitäisi olla noin 2,0 ja A260/230-arvon noin 2.0–2.2. NanoDropilla tehtävät analyysit ovat nopeita ja helppoja, eikä vähäisen näyttemäärän takia RNA:ta kulu kuin 1–2 µl laadun ja määrän arvioimisen takia, verrattuna yleisiin 1 cm:n kyveteillä tehtäviin spektrofotometriin mittauksiin, sillä näytettä tarvitaan NanoDrop-laitteella mittaukseen vain 1–2 µl. (Erk 2022)



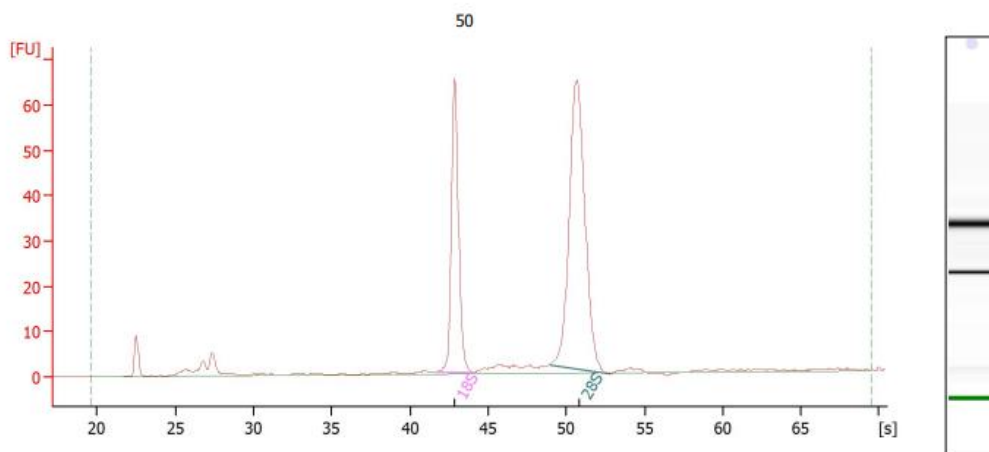
KUVA 4. NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Elektroforeesi on analyysitekniikka, jota käytetään nukleiinihappofragmenttien tunnistamiseen, määrän arviointiin, puhdistamiseen sekä laadun arviointiin. Geelielektroforeesissa RNA-molekyylit, jotka ovat varaukseltaan negatiivisia, kulkevat geelillä anodia kohti sähkövirran avulla. Geelielektroforeesijossa pidemmät RNA-fragmentit kulkevat yleisesti lyhyitä fragmentteja hitaammin kohti anodia, johtuen geelihuokosten pienestä koosta. RNA:n kulkemasta matkasta voidaan täten päätellä fragmentin kokoa. (Thermo Fisher Scientific, n.d. b.)

Geelielektroforeesin sijaan RNA-elektroforeesiajo voidaan tehdä myös mikrosirun avulla, jossa näyte liikkuu mikrosirun sisällä pienissä kammioissa kapillaari-

ilmiön avulla (Wu, Qin & Lin 2007). Mikrofluidistisiin siruihin perustuvaa elektroforeesia hyödyntää esimerkiksi Agilent 2100 Bioanalyzer-laite. Bioanalyzerilla voidaan analysoida näytteen RNA:n sekä DNA:n kokoa ja laatua. RNA:n laatu ilmoitetaan RIN-numeron (RNA integrity number) avulla, joka kertoo RNA:n eheydestä. RIN-arvo ilmaistaan asteikolla 0–10, jossa 10 tarkoittaa hyvin laadukasta RNA:ta. Laite laskee RIN-arvon vertaamalla 5S ja 18S sekä 18S ja 28S ketjujen välisiä signaaleja toisiinsa. Laadukkaalla RNA:lla 28S/18S välisen suhteen pitäisi olla noin 2,0, mutta myös alle 2,0 tulokset voivat olla laadukkaita. (Oregon State University n.d.)

Electropherogram Summary



Overall Results for sample 1 : **50**

RNA Area:	282.4	RNA Integrity Number (RIN):	10 (B.02.08)
RNA Concentration:	101 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.8	Result Flagging Label:	RIN:10

KUVA 5. Esimerkki Bioanalyzer-laitteen käyrästä

Bioanalyzerille on saatavilla useita erilaisia siruja erilaisiin analyyseihin, riippuen halutaanko laitetta käyttää esimerkiksi ribosomaalisen kontaminaation, näytteen koon tai näytteen määrän analysointiin. (Oregon State University n.d.) Tavalliseen, suuremman mittaluokan geelillä tehtävään elektroforeesiin verrattuna Bioanalyzerilla on monia etuja, kuten nopeampi erottelu, pienempi näytetilavuus (1 μl) sekä käyttäjän parempi työturvallisuus. (Davies, Denyer & Hadfield 2018)



KUVA 6. Agilent 2100 Bioanalyzer.

5 RNA:N ERISTYS HUVEC-SOLUISTA

Alla olevassa taulukossa 1 on esitetty työssä käytetyt reagenssit ja liuokset.

TAULUKKO 1. Työssä käytetyt reagenssit ja liuokset

Reagenssi/Liuos	Valmistaja
Endothelial cell growth medium 2	Promocell
FBS, ei-inaktivoitu	Gibco
Fibronectin 1 mg/ml	Corning
Trypan Blue	Gibco
TrypLE Express	Gibco
PBS	Euroclone
Quick-RNA Magbead-eristyskitti	Zymo Research

Työssä käytetyt välineet ja laitteet on esitetty alla olevassa taulukossa 2. Näiden lisäksi käytettiin automaattipipettejä, soluviljelypulloja, inkubaattoreita sekä lami-naarivirtauskaappia.

TAULUKKO 2. Työssä käytetyt laitteet ja välineet.

Laite/väline	Valmistaja
12-kuoppalevyt	Cellstar
Insertit 1,0 µm	Millicell
Bravo Liquid Handler + BenchCel + MiniHub + pipetinkärjet ja kuoppalevyt robotille	Agilent
Mikroskooppi (Primovert)	Zeiss
Solulaskuri (Cellometer T4)	Nexcelom
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
2100 Bioanalyzer	Agilent

Työ suoritettiin HUVEC-soluilla (human umbilical vein endothelial cells). HUVEC-soluja käytetään paljon biolääketieteellisessä tutkimuksessa, sillä niiden eristämisprosessi on melko yksinkertainen ja lähtömateriaalia, eli napalaskimoa, on

helposti ja eettisesti saatavilla, sillä lapsen syntymän jälkeen siitä tulee yleensä biologista jätettä. Endoteelikerros, eli verisuonen sisäseinämän ohut solukerros on helppo irrottaa entsyymaattisesti. Vaikka HUVEC-soluja käytetään laajasti eri tutkimuksissa, on hyvä muistaa, että ne eivät edusta kaikkien elimistön endoteelisolujen toimintaa täydellisesti. (Kocherova, Bryja, Mozdziak, Volponi, Dyszkiewicz-Konwińska, Piotrowska-Kempisty, Antosik, Bukowska, Bruska, Izycki, Zabel, Nowicki & Kempisty 2019)

RNA:n eristys solunäytteistä suoritettiin Quick-RNA MagBead-eristyskitillä (Zymo Research), joka on magneettisiin partikkeleihin perustuva RNA-eristyskiti, jolla voidaan eristää kokonais-RNA:ta kaikista näytetyypeistä, kuten soluista, kudoksista, verestä tai kasveista. Kitillä eristetyt näytteet ovat valmiita analyysisoveluksiin, kuten qPCR tai sekvensointiin. (Zymo Research n.d.) Kittiä käytettiin sen ohjeen mukaisesti, mutta inkubointiaikoja ja sekoitusten voimakkuuksia muokattiin työhön ja käytetylle näytteelle sopivimmiksi.

Työ aloitettiin päällystämällä HUVEC-soluille insertit. Inserttien basaalipuoli päällystettiin ensin ei-inaktivoitulla FBS:llä (naudan sikiön seerumi) ja inkuboitiin 37 °C lämpötilassa tunti. Tämän jälkeen FBS imettiin pois ja tilalle laitettiin 200 µl 50 µg/ml fibronektiiniä liuotettuna fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS) ja inkuboitiin 37 °C lämpötilassa yön yli. Seuraavana päivänä insertit siirrettiin jääkaappiin. 50 µg/ml fibronektiiniliuos tehtiin liuottamalla 1 mg fibronektiiniä 1 ml PBS:ään. Saatua liuosta laimennettiin edelleen sekoittamalla 50 µl tilavuus 950 µl PBS:ään, jolloin saatiin 50 µg/ml liuos. Ennen solujen lisäämistä pulloihin laitettiin 14 ml kasvatusmediumia ja asetettiin ne inkubaattoriin

Tämän jälkeen sulatettiin 1 ml soluampulli, jossa soluja on 500 000. Solususpensio lisättiin 2 ml:aan mediumia (Promocell). Tämän jälkeen soluliuosta pipetoitiin 1 ml kolmeen soluviljelypulloon, joissa oli esilämmitettyä mediumia. Pulloihin vaihdettiin mediumit noin vuorokauden inkuboinnin jälkeen 37 °C lämpötilassa.

Mediumin vaihdon jälkeen soluviljelypulloja inkuboitiin vielä noin kaksi vuorokautta 37 °C lämpötilassa, jonka jälkeen pulloista imettiin medium pois. Solut irroitettiin pullojen pohjasta TrypLE Express-liuoksella, pipetoimalla ensin 2 ml liuosta solujen päälle sekä pipetoimalla se nopeasti pois, ennen kuin solut alkavat

irtoamaan. Tämän vaiheen tarkoituksena oli huuhdella mediumin jäämät ja trypsiinin toimintaa inhiboivat molekyylit pois. Tämän jälkeen lisättiin 3 ml TrypLE Express-liuosta ja annettiin sen vaikuttaa 5 minuuttia inkubaattorissa, jotta solut irtoavat. Vaikutusajan jälkeen pulloihin lisättiin 8 ml mediumia ja soluliuosta sentrifugoitettiin 5 minuuttia 130 G:ssä.

Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin, solupelletin päälle lisättiin 1 ml mediumia ja sekoitettiin solut mediumiin pipetoimalla edestakaisin. Solut laskettiin sekoittamalla solususpensiota 20 µl 180 µl:aan Trypan Blue-liuosta, joka värjää kuolleet solut. Liuosta pipetoitiin 20 µl Nexcelom-laskentalevyn molempiin kammioihin ja laskettiin Cellometer-solulaskurilla.

Soluista tehtiin noin $3,0 \cdot 10^6$ solua/ml konsentraatioinen soluliuos. Soluliuosta pipetoitiin neljän 12-kuoppalevyn kuoppien pohjalle 200 µl ja soluliuoksen päälle 1300 µl mediumia, jonka jälkeen 12-kuoppalevyt laitettiin inkubaattoriin. Inserttien kalvon päällä oleva fibronectiini-liuos imettiin varovasti pois, niin ettei kalvo repeä ja pipetoitiin 200 µl soluliuosta inserttien basaalipuolen pinnalle. Yhteen kuoppaan tai insertille tuli noin 60 600 solua. Inserttejä inkuboitettiin 35 minuuttia 37 °C lämpötilassa, jonka jälkeen insertit käännettiin varovasti ympäri, jolloin ne jäivät roikkumaan oikein päin kuoppalevyn kaivoihin. Kuoppiin, joissa oli insertit, lisättiin 1300 µl mediumia pipetoimalla se insertin alle, jotta insertin ja kuopan pohjan väliin ei jäisi ilmaa. Inserttien apikaali-, eli päällispuolelle lisättiin mediumia 500 µl, jonka jälkeen insertit laitettiin inkuboitumaan 37 °C lämpötilaan.



KUVA 7. Insertit 12-kuoppalevyllä.

Seuraavana päivänä tarkistettiin mikroskoopilla, että solut ovat kiinnittyneet kuoppiin ja inserttien kalvolle. Kahden vuorokauden kuluttua solujen istutuksesta vaihdettiin mediumit. Kuoppalevyiltä imettiin medium varovasti pois ja soluille lisättiin 1,5 ml uutta mediumia. Inserttien soluilta poistettiin myös mediumit ja korvattiin se lisäämällä tuoretta mediumia 0,5 ml apikaalipuolelle ja 1,5 ml basaalipuolelle. Tämän jälkeen solut laitettiin taas inkubaattoriin.

Kahden vuorokauden kuluttua mediumin vaihdosta solut kerättiin RNA:n eristystä varten. Kuopista poistettiin medium ja ne pestiin 500 μ l PBS:llä. PBS imettiin pois hetken kuluttua ja tilalle pipetoitiin 200 μ l DNA/RNA shield-hajotusliuosta, joka oli laimennettu Zymo Quick-RNA Magbead -ohjeen mukaan (liite 3). Hajotusliuosta pipetoitiin edestakaisin solujen päällä solujen irrottamiseksi kasvatusalustasta. Myös solujen rapsuttelua hyödynnettiin mahdollisimman suuren saannon varmistamiseksi. Tämän jälkeen hajonneet solut, jotka olivat nyt DNA/RNA Shield-liuoksessa pipetoitiin 1,5 ml mikroputkiin ja pakastettiin -80°C .

Bravolla käytetyt eristyskitin liuokset laimennettiin liitteen 3 mukaisesti. Pipetointirobotille tehtiin ensimmäinen ohjelma valmiiksi eristystä varten. Ajo-ohjelma tehtiin aluksi Zymo Quick-RNA Magbead -eristyskitin ohjeen (liite 4) mukaisesti. Kun ajo-ohjelma oli saatu valmiiksi, se testattiin ajamalla ensin vesinäytteillä, jonka jälkeen tehtiin pieniä muokkauksia, kuten lisättiin pipettien kosketuksia reunoihin pisaroiden välttämiseksi, säädettiin pipetointikorkeuksia sekä kalibroitiin magneettialustan korkeus. Muokkauksien jälkeen ajettiin ohjelma uudestaan vesinäytteillä, jossa havaittiin vielä pieniä muutoskohteita, kuten pipetointien korkeuksien pieniä säätöjä ja kalibroitiin näytealustojen tarkat sijainnit robotille.

Seuraavaksi ohjelma ajettiin vielä vesinäytteillä, eikä muokattavia vaiheita havaittu. Tämän jälkeen ohjelma ajettiin työssä käytettävillä reagensseilla ja tehtiin pieniä muutoksia, kuten säädettiin yhtä kärkien reunaan kosketusta korkeammalle. Ajossa huomattiin, ettei edestakaisin pipetointi riitä sekoittamaan magneettisia partikkeleita kunnolla liuoksessa, jonka takia ohjelmaan muutettiin partikkelien sekoitus tehtäväksi ravistelijalla, eikä edestakaisin pipetoiden. Muokkauksen jälkeen ohjelma ajettiin uudestaan vesinäytteillä ja pienennettiin hiukan ravistuksen kierrosnopeutta.

Automatisoidut sekä käsin eristetyt näytteet valittiin satunnaisessa järjestyksessä, eikä näytumeron mukaan siten, että inserteillä olevia näytteitä tulisi suhteessa suurin piirtein saman verran muihin näytteisiin verraten jokaiseen ajoon. Seuraavaksi eristettiin eristyskitillä sen ohjeen mukaisesti kahdeksan näytettä käsin pipetoiden. Työohjeesta poiketen sekoituksessa käytettiin 900 rpm eikä 1200 rpm, jotta näytteet eivät roiskuisi kaivojen reunojen yli. Eristetyt näytteet analysoitiin NanoDropilla ja pakastettiin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Bravolla suoritettiin ensimmäinen näyteajo neljällä näytteellä aikaisemmin tehdyllä ajo-ohjelmalla. Ajossa huomattiin, että magneetin vaikutuksesta partikkelit jämähivät kuoppien pohjille tiiviiksi pelletiksi, eikä sekoitus riittänyt rikkomaan pellettejä. Ajon jälkeen lisättiin edestakaisia pipetointeja ennen ravistelijalla sekoitusta, jotta pellettejä saataisiin hajotettua pohjalta. Myös ravistuksen kierroksia lisättiin ja muutamien pipetointien korkeuksiin tehtiin pieniä muutoksia. Ajossa

eristetyt näytteet mitattiin NanoDropilla sekä Bioanalyzerilla. Eristetyt näytteet pakastettiin -80 °C. Bioanalyzerilla mitattiin samalla sirulla myös aikaisemmat käsin eristetyt näytteet.

Ensimmäisen Bravolla suoritetun näyteajon jälkeisten muokkauksien takia ohjelma piti testata ajamalla vesinäytteillä, jonka jälkeen se testattiin eristämällä yksi näyte. Ajon jälkeen eristetty näyte analysoitiin NanoDropilla. Ajon aikana ei huomattu ongelmia ohjelmassa, eikä muokkauksia tehty. Varmistettiin ajo-ohjelman toimivuus muokkauksissa syntyneiden virheiden varalta, muokattavaa ei löytynyt.

Kolmanteen Bravon näyteajoon laitettiin vuorotellen kuusi vesikontrolli- ja solunäytettä. Ajo-ohjelmassa ei ollut selkeitä muokattavia kohteita ajon tarkkailun ja tuloksien perusteella. Edestakaisin pipetointeja säädettiin kuitenkin niin, että laite aspiroi nesteet lähellä pohjaa ja dispensoi lähempänä pintaa, jotta näytettä saadaan sekoitettua paremmin liuoksiin. Vesinäytteet analysoitiin solunäytteiden tapaan Bioanalyzerilla ja NanoDropilla ristikontaminaatioiden havaitsemiseksi. Ajon jälkeen tehtyjä muokkauksia testattiin ajamalla vesillä, jotta nähtiin, tarvitaanko edestakaisin pipetoiden tehtäviin sekoitusten korkeuksiin vielä muutoksia. Dispensioita muokattiin tässä kohtaa vielä 2 mm ylemmäs, jotta se tapahtuisi lähempänä nesteen pintaa.

Ajoissa kului odotettua enemmän 1 ml kuoppalevyjä, joita täytyi säästellä optimoitua ajoa varten. Tämän takia ohjelmaan täytyi vaihtaa 1 ml kuoppalevyt 2 ml kuoppalevyiksi. Jotta kuoppalevyjä ja kärkiä kuluisi vähemmän, tehtiin ohjelma 24 näytteelle, jolloin reagensseja, pipetinkärkiä sekä kuoppalevyjä kului huomattavasti vähemmän. Ohjelma testattiin vesinäytteillä ja muokattiin yksi pipetointi, jossa robotti pipetoi kuoppalevyn väärältä riviltä.

Käytetyn eristyskitin ohjeen mukaiset DNAasi-vaiheet lisättiin ajo-ohjelmaan ja luotiin samalla toinen ajo-ohjelma 12 näytteelle, jossa käytetään DNAasia, joka hajottaisi eristyksessä mahdollisesti mukana olevan DNA:n, jotta se ei häiritse jatkoanalyysijä. Testattiin ajo-ohjelman toimivuus ja muokattiin yksi vaihe, jossa robotti pipetoi väärältä riviltä. 12 näytteen DNAasi-käsittelyn sisältävällä ohjelmalla ajettiin kuusi näytettä, joiden väleissä oli yhteensä kuusi vesikontrollia. Tu-

lokset analysoitiin Bioanalyzerilla sekä NanoDropilla. Ajo-ohjelmaa muokattiin ravistelujen keston osalta 10 s pidemmiksi, jotta näytteet ja partikkelit sekoittuisivat keskenään paremmin.

Seuraavaksi eristettiin käsin vielä kuusi näytettä eristyskitin ohjeen mukaisesti. Eristetyt näytteet analysoitiin heti ajon jälkeen NanoDropilla ja seuraavana päivänä Bioanalyzerilla. Tämän jälkeen ajettiin Bravolla optimoitu ajo 29 näytteellä, ja seitsemällä vesikontrollilla, ilman DNAasi-käsittelyä. Eristetyt näytteet mitattiin heti NanoDropilla ja seuraavana päivänä Bioanalyzerilla. Bioanalyzerilla analysoiduista näytteistä seitsemän mitattiin uudelleen, johtuen niiden poikkeavista tuloksista. Optimoidun ajon jälkeen luotiin ajo-ohjelma vielä 48 näytteelle.

6 TULOKSET

Bravolla suoritettiin yhteensä neljä testiajoa, joiden aikana eristyskittiä optimoitiin laitteelle sopivammaksi. Vain neljännessä testiajossa käytettiin DNAasi-käsittelyä. Neljän testiajon lisäksi suoritettiin käsin pipetoiden referenssieristys sekä varsinainen optimoitu näyteajo suuremmalla näytemäärällä. Taulukon 3 tulokset on ilmoitettu kunkin analyysin keskiarvoina (ka) ja -hajontoina (s), sillä jokaiseen kuoppaan pipetoitiin sama määrä soluja, jolloin näytteet ovat teoriassa samanlaisia.

TAULUKKO 3. Tuloksien keskiarvot ja -hajonnat.

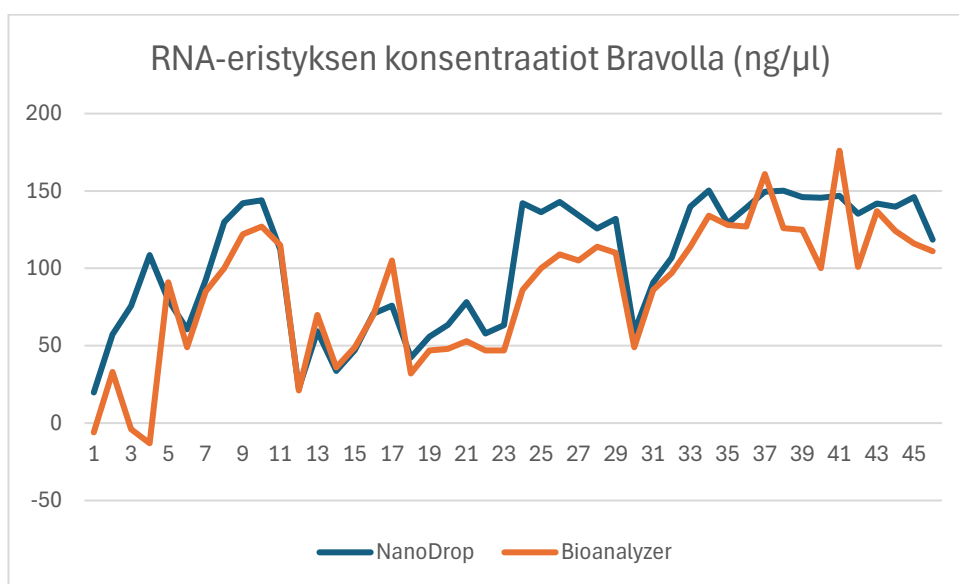
Ajo	Näytemäärä	NanoDrop c (ng/μl) ka (s)	NanoDrop (A260/280) ka (s)	Bioanalyzer c (ng/μl) ka (s)	Bioanalyzer RIN ka (s)
Testiajo 1	4	65,3 (37,0)	1,23 (0,50)	2,5 (20,7)	1,78 (3,55)
Testiajo 2	1	79,6	1,99	91,0	9,60
Testiajo 3	6	113,5 (32,5)	1,85 (0,11)	99,7 (29,2)	9,72 (0,21)
Testiajo 4 (DNAasi)	6	51,6 (21,0)	1,95 (0,06)	58,5 (29,8)	9,82 (0,18)
Käsin eristys	14	82,4 (38,6)	1,98 (0,03)	91,1 (54,1)	7,01 (3,2)
Optimoitu ajo	29	117,6 (35,8)	1,95 (0,03)	100,3 (36,5)	9,97 (0,06)

Alla olevassa taulukossa 4 on esitetty miten inserttien basaali puolella kasvatettujen solujen tulokset eroavat kuoppalevyn pohjalla kasvatetuista soluista.

TAULUKKO 4. Insertit verrattuna kuoppien pohjilla viljeltyihin soluihin.

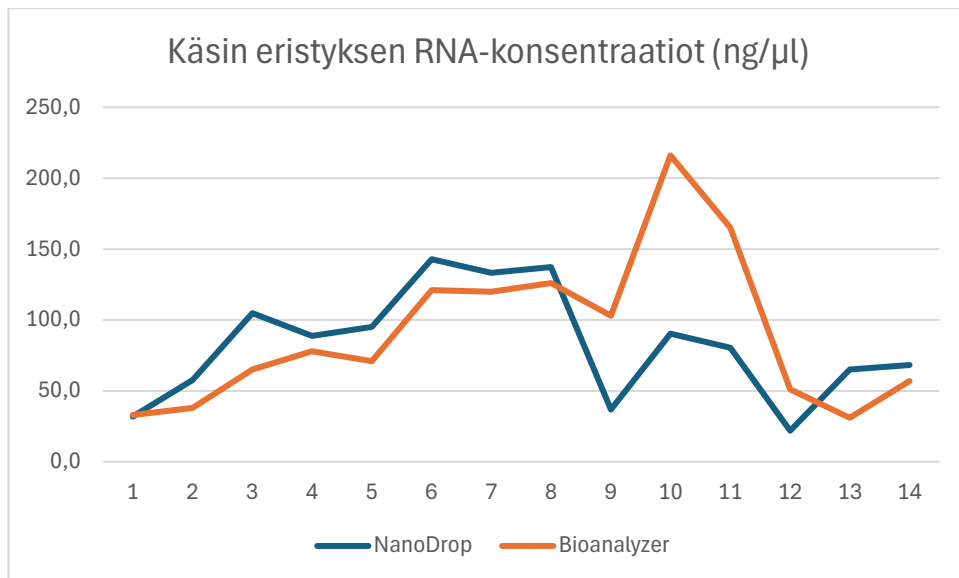
Näytetyyppi	Näytemäärä	NanoDrop c (ng/μl)	NanoDrop (A260/280)	Bio-analyzer c (ng/μl)	Bioanalyzer RIN
Insertit	12	49,2	1,88	42,7	7,70
Kuoppalevy	48	110,5	1,90	98,4	8,93

Alla olevassa kuvioissa 1 on esitelty kaikki automatisoitujen ajojen konsentraatiot viivakaavioina. Kuviossa on nähtävillä NanoDrop- sekä Bioanalyzer-laitteella mitatut konsentraatiot. Tulokset eivät ole näytenuumeron mukaisessa järjestyksessä, vaan järjestetty ensimmäisestä eristyksestä viimeisimpään. Näytteillä 12–17 on käytetty DNAasi-käsittelyä, joiden jälkeen ovat optimoidun ajon näytteet.



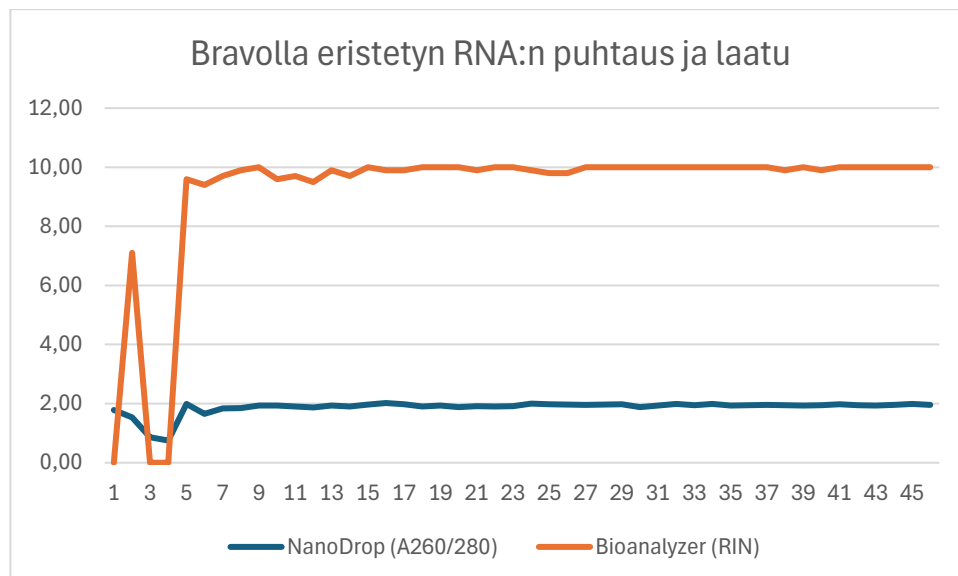
KUVIO 1. Bravolla eristettyjen näytteiden RNA-konsentraatiot.

Kuviossa 2 on käsin eristettyjen näytteiden konsentraatiot, mitattuna NanoDrop- ja Bioanalyzer-laitteella. Tulokset eivät ole näytenuumerojen mukaisessa järjestyksessä.



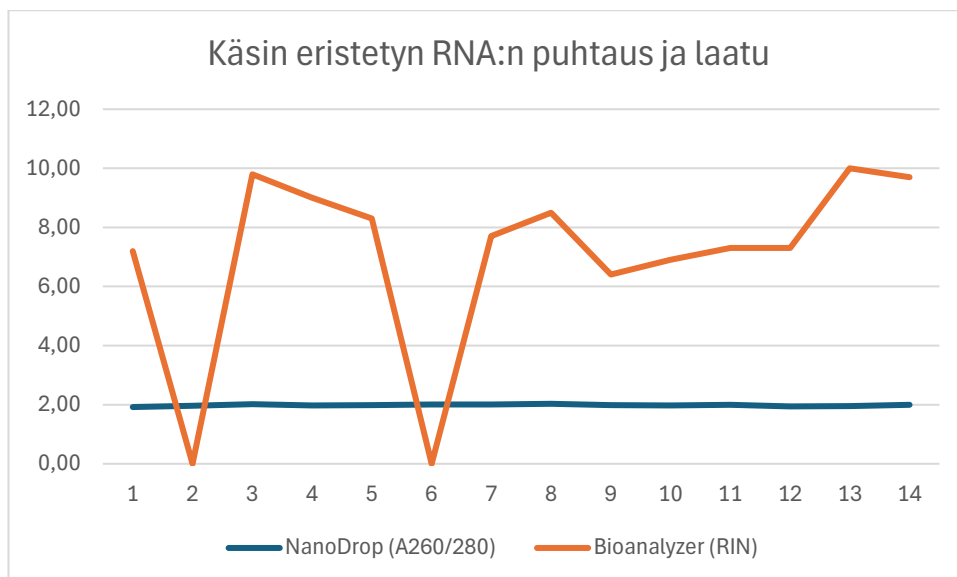
KUVIO 2. Käsin eristettyjen näytteiden RNA-konsentraatiot.

Kuviossa 3 on esitelty kaikki automatisoitujen ajojen puhtaus- ja laatuarvot Bioanalyzer- ja NanoDrop-laitteella. Tulokset on järjestetty ensimmäisestä eristyksestä uusimpaan.



KUVIO 3. Bravolla eristettyjen RNA-näytteiden puhtaus- ja laatuarvot.

Kuviossa 4 on esitelty kuvion 3 tavoin kaikkien käsin eristettyjen näytteiden puhtaus- ja laatuarvot, mitattuina Bioanalyzer- ja NanoDrop-laitteella.



KUVIO 4. Käsin eristettyjen RNA-näytteiden puhtaus- ja laatuarvot.

7 POHDINTA

Saatujen tulosten perusteella Zymo Quick-RNA MagBead -eristyskittiä voidaan käyttää Bravolla tehtävissä eristyksissä. Viimeisessä ajossa saatujen tulosten perusteella eristetty RNA oli puhdasta, laadukasta ja sitä oli riittävästi, eikä DNAasi-käsittelyä, tai lisäpuhdistuksia automatisoidun ajon jälkeen tarvita. Lisäksi DNAasilla käsiteltyjen näytteiden konsentraatio tippui ilman DNAasia käsiteltyihin näytteisiin verratessa, joka on merkinä siitä, että DNAasi-käsittely saattaa hajottaa DNA:n lisäksi myös saatua RNA:ta. DNAasilla käsiteltyjen näytteiden puhtauudessa ei myöskään ollut eroa ja käsittely pidentää ajoaikaa noin tunnilla, jolloin sen hyödyt näyttävät olevan haittoja pienemmät, eikä DNAasi-käsittelylle tässä kohtaa nähdä tarvetta. Automatisoidussa ajossa saadut tulokset olivat puhtaampia kuin eristyskitillä käsin eristetyt näytteet.

Saaduista tuloksista nähdään, että näytteiden konsentraatioita saatiin parannettua huomattavasti testiajojen avulla. DNAasia käytettäessä konsentraatiot laskivat huomattavasti, muuten muokkauksilla saatiin parannettua konsentraatiota progressiivisesti. Vertaamalla Bravolla saadun optimoidun ajon konsentraatioita käsin eristettyihin näytteisiin, huomataan konsentraatioiden olevan tasaisempia ja korkeampia. Keskihajontoja tarkasteltaessa huomataan puhtauksien ja laadun hajonnan pienentyneen testiajojen myötä. Konsentraatioit vaihtelevat keskenään paljon, mihin yhtenä syynä voi olla solujen kasvatuksessa tehty virhe. Kun näytteet oli pipetoitu kuoppiin, medium pipetoitiin liian voimakkaasti solujen päälle, jonka seurauksena solut levisivät kuoppien reunoille, eivätkä kasvaneet tasaisesti. Tämä havaittiin tarkastelemalla kasvaneita soluja mikroskoopilla, jolloin huomattiin joidenkin kuoppien keskustojen olevan tyhjiä, mutta reunoilla soluja kasvoi runsaasti.

Näytteiden Bioanalyzerilla ja NanoDropilla mitatut puhtaudet myös kasvoivat optimoinnin aikana. NanoDropilla saadut puhtaudet olivat hyviä jo toisessa testiajossa. Bioanalyzer-laitteen mukaan näytteiden laadut ei aluksi olleet kovinkaan tasaisia, mutta optimoidussa ajossa ne olivat jo lähes täydellisiä RIN-arvon pe-

rusteella, joka oli useammalla näytteellä 10. Käsien eristettyihin näytteisiin verrattessa puhtaudet olivat Bravolla eristettynä myös tasaisempia ja korkeampia, erityisesti Bioanalyzerin suhteen.

NanoDropilla saadut testiajojen puhtaudet olivat siis parempia, kuin testiajojen Bioanalyzerilla saadut tulokset, tämä voi johtua esimerkiksi siitä, että näytteisiin jääneet epäpuhtaudet eivät absorboineet valoa 260 nm tai 280 nm aallonpituuksilla, jolloin epäpuhtaudet eivät tulleet NanoDropilla mitattaessa esille, mutta Näkyivät Bioanalyzerin elektroforeesissa. RIN-arvo kertoo myös RNA:n eheydestä. Heikko eheys voi siis myös olla osasyynä mataliin RIN-arvoihin, ei pelkästään näytteen puhtaus. Tutkimalla A260/230-arvoja voitaisiin saada lisää tietoa näytteiden mahdollisista epäpuhtauksista NanoDrop-laitteella.

Automatisoidulla ajolla myös inhimillisten virheiden määrä on huomattavasti pienempi ja tulokset ovat tasalaatuisempia. Käsien tehtyjen eristysten puhtauteen voi vaikuttaa eristysten tekeminen pöytätasolla, eikä laminaarivirtauskaapissa. Eristykset tehtiin pöydällä, sillä pipetointirobottikaan ei ole laminaarivirtauskaapissa, jolloin tulokset ovat vertailukelpoisempia. RNA-eristystä käsin tehtäessä ilman laminaarivirtauskaappia on suurempi riski, että näytteisiin päätyy epäpuhtauksia, jotka vaikuttavat näytteen puhtauteen. Robotin ympärillä on muoviset seinät, jolloin pipetointitilaan päätyy pienemmällä todennäköisyydellä epäpuhtauksia, kuin käsien eristettäessä pöytätasolla, jossa eristyksen tekijästä voi tulla helpommin kontaminaatioita.

Automatisoidussa ajossa suurimmat riskit ovat magneettisten partikkelien pipetoinnissa, joka näyttää välillä melko epätasaiselta, johtuen siitä, että magneettiset partikkelit kasaantuvat sekoituksesta huolimatta ja tukkivat pienet 180 µl pipetinkärjet. Ongelmaa on vaikea korjata, koska robottiin ei ole saatavilla suurempia pipetinkärkiä. Vaikka magneettisten partikkelien pipetointi näyttää epätasaiselta, saatuihin tuloksiin sillä ei havaittu olevan vaikutusta.

Toinen esiin tullut ongelma koskee pipetinkärkiin välillä jääviä pieniä pisaroita, jotka aiheuttavat kontaminaatoriskin. Jos kärjessä roikkuva pisara tipahtaa robotin liikkeessa toiseen kuoppaan tai liukokseen, voi syntyä ristikontaminaatio. Koska robotin tulisi toimia luotettavasti ilman jatkuvaa valvontaa, täytyisi olla

varma, ettei tällaista tapahtuisi. Yhdessä testiajossa vesinäytteissä oli havaittavissa mahdollisesti hieman hajonnutta RNA:ta, joka ilmeni Bioanalyzerin antaman käyrän aaltomaisena muotona alueella, jossa RNA esiintyy. NanoDrop-laitteella vesinäytteissä ei kuitenkaan ollut havaittavissa RNA:ta. Lopullisessa ajossa vesinäytteet pysyivät kuitenkin puhtaina. Agilent Bravon ajo-ohjelmia voi muokata laajasti, jolla kontaminaatioiden riskejä saatiin pienennettyä havaittujen riskien osalta.

Ongelmaa pipetinkärkien pisaroiden osalta voi olla vaikea korjata, sillä kärkien kosketusta reunoihin ei voi asettaa voimakkaammaksi, koska jo käytetyllä voimakkuudella kuoppalevyihin syntyy painetta, jota kasvattaessa kuoppalevy voi kaatua tai heilahtaa pois pipetointialustalta. Myöskään pipetoinnin jälkeisen "blowout"-tyhjennyksen lisäämisestä ei ollut ongelmaan apua.

Tulosten perusteella inserteillä kasvatettujen näytteiden pitoisuus oli huomattavasti pienempi, joka voi johtua inserttien pienemmästä kasvupinta-alasta, verrattuna kuoppalevyn pohjan pinta-alaan, vaikka soluja laitettiin yhtä paljon myös inserteille. Myös solujen hajottamisessa insertin pintaa voi olla vaikea huuhtoa täysin puhtaaksi, jolloin soluja jää inserttien pinnalle, joka pienentää entisestään kerätyn solulysaatin konsentraatiota.

Bioanalyzerilla ja NanoDropilla saadut tulokset ovat konsentraation osalta samansuuntaiset. Bioanalyzerin tulokset ilmaisevat kuitenkin näytteen kontaminaatioista ja puhtaudesta huomattavasti enemmän, mutta analyysi vie myös enemmän aikaa. NanoDropin A260/280-arvoa käytettäessä puhtauden analysointiin on riskinä, että näytteisiin jää liuoksia, jotka eivät absorboi A260/280 aallonpituuksilla, kuten suoloja, jonka takia NanoDropilla RNA:n puhtautta analysoidessa kannattaa kiinnittää huomiota myös A260/230-arvoon, jonka pitäisi puhtaalla RNA:lla olla noin 2,0-2,2. Robotilla analysoitujen ensimmäisten näytteiden ajoissa A260/230-arvot olivat joidenkin näytteiden osalta alle 0,5, jonka perusteella näytteisiin saattoi olla jäänyt suoloja, vaikka A260/280-arvo olikin lähes 2,0.

Magneettisiin partikkeleihin perustuvan eristyskitin toimivuus RNA:n sekvensoinnissa olisi myös tärkeää tietää tulevaisuuden kannalta. Jos partikkelien jäämiä

jää lopputuotteeseen, onko niistä haittaa sekvensoinnin tuloksille. Tätä voisi miettiä mahdollisena jatkotutkimusaiheena.

Laminaarittomuus lisää kontaminaatoriskiä, josta voisi johtua vesinäytteiden piikit. Selvää kontaminaatoriskiä ei Bravon optimoidun ajon pipetoinneissa tai kontaminaatioita tuloksissa kuitenkaan näkynyt. Ongelmaan ratkaisuna voisi toimia esimerkiksi robotin mitoille tehty kotelo, johon saisi asennettua kohdepoiston.

LÄHTEET

Agilent. n.d. a. Bravo Automated Liquid Handling Platform. [Automated liquid handling, compact and flexible liquid handler | Agilent](#)

Agilent. n.d. b. BenchCel Microplate Handler. [Microplate storage and handling, BenchCel Microplate Handler | Agilent](#)

Alberts, B., Johnson, A. & Lewis, J. 2002. From DNA to RNA. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/>

Chan, L., Cho, W. & Wong, C. 6. May. 2020. Editorial: Role of RNA in Molecular Diagnostics of Cancer. Frontiers. [Frontiers | Editorial: Role of RNA in Molecular Diagnostics of Cancer \(frontiersin.org\)](#)

Clancy, S. 2008. RNA Functions. Nature Education. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/rna-functions-352/>

Corning, n.d. Permeable Supports Product Selection Guide. [Permeable Supports Product Selection Guide \(corning.com\)](#)

Davies, J., Denyer, T. & Hadfield, J. 16. Mar. 2018. Bioanalyzer chips can be used interchangeably for many analyses of DNA or RNA. Future Science. [Bioanalyzer chips can be used interchangeably for many analyses of DNA or RNA | BioTechniques \(future-science.com\)](#)

Dettinger, P., Kull, T., Arekatla, G., Ahmed, N., Zhang, Y., Schneider, F., Wehling, A., Schirmacher, D., Kawamura, S., Loeffler, D., & Schroeder, T. 2022. Open-source personal pipetting robots with live-cell incubation and microscopy compatibility. Nature. <https://www.nature.com/articles/s41467-022-30643-7>

Erk, J. 16. Feb. 2022. Strengths and Limitations of the Amazing NanoDrop™ Spectrophotometer. BiteSize Bio. [The Nanodrop Spectrophotometer: Quantification Made Easy \(bitesizebio.com\)](#)

Jeffries, M., Kiss, A., Smith, A. & Oris, J. 2014. A comparison of commercially-available automated and manual extraction kits for isolation of total RNA from small tissue samples. BMC. [A comparison of commercially-available automated](#)

[and manual extraction kits for the isolation of total RNA from small tissue samples | BMC Biotechnology | Full Text \(biomedcentral.com\)](#)

Kocherova, I., Bryja, A., Mozdziak, P., Volponi A. Dyszkiewicz-Konwińska, M., Piotrowska-Kempisty, H., Antosik, P., Bukowska, D., Bruska, M., Iżycki, D., Zabel, M., Nowicki, M. & Kempisty, B. 3. Oct. 2019. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. National Library of Medicine. [Human Umbilical Vein Endothelial Cells \(HUVECs\) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts - PMC \(nih.gov\)](#)

Li, Y. 13. Nov. 2023. Non-Coding RNA Performs Its Biological Function by Interacting with Macromolecules. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10671565/>

MAGBIO. n.d. What are Magnetic Beads and How Do They Work for Isolation of Biomolecules. [What are Magnetic Beads and How Do They Work for Isolation of Biomolecules? | MagBio Genomics](#)

New England Biolabs. n.d. RNA extraction and purification. <https://www.neb.com/en/products/rna-synthesis-and-modification/rna-extraction-purification/rna-extraction-purification>

Oregon State University. n.d. Agilent Bioanalyzer 2100. <https://cqls.oregon-state.edu/core/agilent-bioanalyzer-2100>

Rawat, S. 11. Jul. 2024. Successfully Maintaining Automated Liquid Handlers. Lab Manager. <https://www.labmanager.com/successfully-maintaining-automated-liquid-handlers-32504>

Rogoyski, O. 9. Apr. 2021. Three ways RNA is being used in the next generation of medical treatment. The Conversation. [Three ways RNA is being used in the next generation of medical treatment \(theconversation.com\)](#)

Roundtree, I., Evans, M., Pan, T. & He, C. 15. Jun. 2017. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. National Library of Medicine. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28622506/>

Thermo Fisher Scientific. n.d. a. The Basics: RNA Isolation. <https://www.thermo-fisher.com/ie/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html>

Thermo Fisher Scientific. n.d. b. RNA Electrophoresis. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/rna-electrophoresis.html>

Torres-Acosta, M., Lye, G., Dikicioglu, D. 15. Dec. 2022. Automated liquid-handling operations for robust, resilient, and efficient bio-based laboratory practices. Biochemical Engineering Journal. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X22003825>

Wang, T. & Farhana, A. 29. Jul. 2023. Biochemistry, RNA Structure. National Library of Medicine. [Biochemistry, RNA Structure - StatPearls - NCBI Bookshelf \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37111111/)

Wu, D., Qin, J. & Lin, B. 23. Dec. 2007. Electrophoretic separations on microfluidic chips. National Library of Medicine. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7094303/>

Zymo Research. n.d. Quick-RNA MagBead. https://zymoresearch.eu/products/quick-rna-magbead?srsId=AfmBOoojNQFdKCKZdQec0BuASaLL-RGZmskQzW-6M8wPyl_YOtjPB3Dbt

Zymo Research. n.d. Quick-RNA MagBead RNA from any sample. https://files.zymoresearch.com/protocols/r2132_r2133_quick-rna_magbead.pdf

LIITTEET

Liite 1. Mitatut tulokset

Ajo	Näyte- nu- mero	Konsentraatio, NanoDrop (ng/μl)	Puhtaus, NanoDrop (A260/280)	Konsentraatio, Bioanalyzer (ng/μl)	Puhtaus, Bioanalyzer (RIN)
Testiajo 1	1	19,8	1,78	-6	0,0
Testiajo 1	18	57,2	1,53	33	7,1
Testiajo 1	30	75,6	0,86	-4	0,0
Testiajo 1	54	108,6	0,75	-13	0,0
Testiajo 2	35	79,6	1,99	91	9,6
Testiajo 3	10	60,5	1,65	49	9,4
Testiajo 3	16	92,5	1,84	85	9,7
Testiajo 3	38	129,8	1,85	100	9,9
Testiajo 3	42	142,1	1,94	122	10,0
Testiajo 3	49	144,0	1,93	127	9,6
Testiajo 3	55	112,2	1,90	115	9,7
Testiajo 4	8	22,5	1,87	21	9,5
Testiajo 4	22	59,4	1,93	70	9,9
Testiajo 4	31	33,8	1,90	36	9,7
Testiajo 4	34	47,2	1,97	49	10,0
Testiajo 4	48	70,8	2,02	70	9,9
Testiajo 4	57	75,8	1,98	105	9,9
Käsin eristetty	4	31,8	1,92	33	7,2
Käsin eristetty	9	57,6	1,96	38	0,0
Käsin eristetty	13	104,7	2,02	65	9,8
Käsin eristetty	27	88,8	1,97	78	9,0
Käsin eristetty	33	95,1	1,99	71	8,3
Käsin eristetty	45	142,8	2,01	121	0,0
Käsin eristetty	52	133,2	2,01	120	7,7
Käsin eristetty	59	137,2	2,03	126	8,5
Käsin eristetty	6	36,9	1,98	103	6,4
Käsin eristetty	20	90,3	1,97	216	6,9
Käsin eristetty	24	80,5	2,00	165	7,3
Käsin eristetty	25	21,9	1,94	51	7,3
Käsin eristetty	44	65,0	1,95	31	10,0
Käsin eristetty	58	68,2	2,00	57	9,7

Liite 2. Mitatut tulokset

Ajo	Näyte- nu- mero	Konsentraatio, NanoDrop (ng/μl)	Puhtaus, NanoDrop (A260/280)	Konsentraatio, Bioanalyzer (ng/μl)	Puhtaus, Bioanalyzer (RIN)
Optimoitu	2	42,3	1,90	32	10,0
Optimoitu	3	55,9	1,94	47	10,0
Optimoitu	5	63,4	1,88	48	10,0
Optimoitu	7	78,2	1,91	53	9,9
Optimoitu	11	57,9	1,90	47	10,0
Optimoitu	12	63,3	1,91	47	10,0
Optimoitu	14	142,0	2,00	86	9,9
Optimoitu	15	136,3	1,98	100	9,8
Optimoitu	17	143,0	1,97	109	9,8
Optimoitu	19	134,3	1,96	105	10,0
Optimoitu	21	125,7	1,97	114	10,0
Optimoitu	23	132,0	1,98	110	10,0
Optimoitu	26	58,9	1,88	49	10,0
Optimoitu	28	90,8	1,94	86	10,0
Optimoitu	29	106,9	1,99	97	10,0
Optimoitu	32	139,9	1,95	114	10,0
Optimoitu	39	150,3	1,99	134	10,0
Optimoitu	36	129,0	1,93	128	10,0
Optimoitu	37	139,2	1,95	127	10,0
Optimoitu	40	149,6	1,96	161	10,0
Optimoitu	41	150,1	1,95	126	9,9
Optimoitu	43	146,0	1,93	125	10,0
Optimoitu	46	145,6	1,95	100	9,9
Optimoitu	47	146,8	1,98	176	10,0
Optimoitu	50	135,3	1,95	101	10,0
Optimoitu	51	141,9	1,93	137	10,0
Optimoitu	53	139,9	1,96	124	10,0
Optimoitu	56	146,1	1,99	116	10,0
Optimoitu	60	118,5	1,96	111	10,0

Liite 3. Zymo Quick-RNA MagBead -eristyskitin ohje

Protocol

The protocol consists of: (I) Buffer Preparation, (II) Sample Preparation, and (III) Total RNA Purification

(I) Buffer Preparation

- ✓ Add 20 ml (R2132) or 80 ml (R2133) isopropanol to the **MagBead DNA/RNA Wash 1** concentrate.
- ✓ Add 30 ml (R2132) or 120 ml (R2133) isopropanol to the **MagBead DNA/RNA Wash 2** concentrate.
- ✓ To prepare 1X solution of **DNA/RNA Shield™**, mix equal amounts of the supplied 2X concentrate with nuclease-free water (not provided) and mix well.
- ✓ Reconstitute lyophilized **Proteinase K** at 20 mg/ml with **Proteinase K Storage Buffer** and mix by vortexing. Use immediately or store frozen aliquots:
#D3001-2-20 (20 mg), add 1.04 ml **buffer**
- ✓ Reconstitute each vial of lyophilized **DNase I** with **DNase/RNase-Free Water** in a conical tube (not provided). Mix by gentle inversion and store frozen aliquots.
#E1011-A (1500 U), add 13.5 ml **water**
#E1009-A (250 U), add 2.25 ml **water**

For each sample to be treated, prepare **DNase I Reaction Mix** (scale up proportionally): Add 45 µl **DNase I** (reconstituted) and 5 µl **DNA Digestion Buffer** in a nuclease-free tube (not provided), mix by gentle inversion and place on ice until ready to use.

Liite 4. Zymo Quick-RNA MagBead -eristyskitin ohje

(III) Total RNA Purification

1. Add 200 μ l (1 volume) **RNA Lysis Buffer** to 200 μ l sample and mix well¹.
2. Add 400 μ l ethanol (95-100%) to the sample and mix well¹.
3. Add 30 μ l **MagBinding Beads** and mix well¹ for 20 minutes.
Important: **MagBinding Beads** settle quickly, ensure that beads are kept in suspension while dispensing.
4. Transfer the plate/tube to the magnetic stand² until beads have pelleted, then aspirate³ and discard the cleared supernatant.
5. Add 500 μ l **MagBead DNA/RNA Wash 1** and mix well¹. Pellet the beads^{2,3} and discard the supernatant.
6. Add 500 μ l **MagBead DNA/RNA Wash 2** and mix well¹. Pellet the beads^{2,3} and discard the supernatant.
7. Add 500 μ l ethanol (95-100%) and mix well¹. Pellet the beads^{2,3} and discard the supernatant.
8. Repeat step 7.
9. **DNase I** treatment (optional)
 - (D1) Add 50 μ l **DNase I Reaction Mix** and mix gently for 10 minutes.
 - (D2) Add 500 μ l **RNA Prep Buffer** and mix well¹ for 10 minutes. Pellet the beads^{2,3} and discard the supernatant.
 - (D3) Repeat steps 7-8.
10. Dry the beads for 10 minutes or until dry⁴.
11. To elute RNA from the beads, add \geq 50 μ l **DNase/RNase-Free Water** and mix well¹ for 5 minutes.
12. Transfer the plate/tube to the magnetic stand² until beads have pelleted, then aspirate³ and dispense the eluted RNA to a new plate/tube.

The eluted RNA can be used immediately or stored frozen.

1 For all buffer additions and incubation steps, **mix well** by pipetting the beads up and down several times and/or by shaking (vortexing) at \sim 1,300 rpm. Optimization may be required.

2 Use a strong-field magnetic stand or separator (e.g., ZR-96 MagStand, P1005; sold separately) until beads have pelleted.

3 Some beads will adhere to the sides of the well. When removing the supernatant, aspirate slowly to allow these beads to be pulled to the magnet as the liquid level is lowered.

4 Beads will change in appearance from glossy black when still wet to a dull brown when fully dry. Alternatively, a heat block can be used (25-55°C).