



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU  
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Inka Kangastupa

---

## **Allergeenimäärittysten siirto Valion Seinäjoen aluelaboratorioon**

Opinnäytetyö

Kevät 2025

Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

## Opinnäytetyön tiivistelmä

Tutkinto-ohjelma: Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

Tekijä: Inka Kangastupa

Työn nimi alaotsikoineen: Allergeenimääritysten siirto Valion Seinäjoen aluelaboratorioon

Ohjaaja: Sarita Ventelä

Vuosi: 2025

Sivumäärä: 31

Liitteiden lukumäärä: 2

---

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli edesauttaa allergeenimääritysten käyttöönottamista Valion Seinäjoen aluelaboratorioon. Allergeenimääritykset siirtyivät talven 2024 ja kevään 2025 aikana Valion Tutkimus & Kehitys -yksiköstä Seinäjoen toimipisteeseen. Työn tavoitteena oli optimoida kaurajäämä-menetelmän näytematriisien happamuutta Oat Protein Residue (ESOAT-48) -testille ideaaliksi sekä määrittää näytteille sopiva NaOH-liuoksen lisäysmäärä. Lisäksi tavoitteena oli tutustua menetelmässä käytettävän ELISA-robotin käyttöön ja parantaa siihen liittyviä työohjeita.

pH-arvojen säätämisen osalta työn käytännönosuus toteutettiin loppuvuodesta 2024. Säädettäviä näytematriiseja oli yhteensä 27. Käytettäväksi liuokseksi valittiin NaOH eli natriumhydroksidi, kun aikaisemmin T&K:lla oli ollut käytössä KOH eli kaliumhydroksidi. KOH:ia käytettäessä eri lisäysmääriä oli ollut kuusi riippuen näytematriisista. Kokeiluilla määrä saatiin kuitenkin puolitettua ja NaOH-liuoksella niitä oli vain kolme, mikä helpottaa määrityksen parissa työskentelyä.

ELISA-robottiin liittyvä käytännönosuus toteutettiin keväällä 2025. Robotin kohdalla keskityttiin vanhojen työohjeiden paranteluun ajon aloitukseen liittyen sekä tehtiin työohjeet uuden ohjelman luomiseen robotille. Robottia käytetään toistaiseksi vain allergeenimäärityksiin, mutta tulevaisuudessa sillä voisi suorittaa muistakin määrityksistä ELISA-vaiheen. Sitä varten oli hyödyllistä saada työohjeet uuden ohjelman luomiseen sekä päivitettyt työohjeet ajon aloitukseen.

<sup>1</sup> Asiasanat: allergeenit, ELISA-menetelmä, käyttöönotto

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

## Thesis abstract

Degree programme: Bachelor of Engineering, Food Processing and Biotechnology

Author/s: Inka Kangastupa

Title of thesis: Transfer of allergen assays to Valio's Seinäjoki laboratory

Supervisor(s): Sarita Ventelä

Year: 2025

Number of pages: 31

Number of appendices: 2

---

The purpose of this thesis was to facilitate the introduction of allergen assays to Valio's Research & Development unit at the Seinäjoki laboratory during the winter of 2024 and the spring of 2025. The aim of the work was to optimize the acidity of the oat residue method's sample matrices for the Oat Protein Residue (ESOAT-48) test to be ideal, as well as to determine the appropriate amount of addition of NaOH solution to add to the samples. In addition, the aim was to familiarize oneself with the use of the ELISA robot used in the method and to improve the related work instructions.

In terms of adjusting pH values, the practical part of the work was carried out at the end of 2024. The total number of sample matrices to be adjusted was 27. NaOH was chosen as the solution to be used, whereas previously the Research & Development unit had used KOH. When using KOH, there had been six different increments depending on the sample matrix. However, the number of increments was halved and there were only three with the NaOH solution, which made it easier to work with the assay.

The practical part related to the ELISA robot was carried out in the spring of 2025. Focus was placed on improving the old work instructions related to the start of the drive, and work instructions were created for creating a new program for the robot. The robot is currently only used for allergen assays, but in the future, it could be used to perform the ELISA phase of other assays. To do so, it was useful to have work instructions for creating a new program, as well as updated work instructions for starting the run.

<sup>1</sup> Keywords: allergens, ELISA-method, introduction

## SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä .....	2
Thesis abstract .....	3
SISÄLTÖ .....	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo .....	5
Käytetyt termit ja lyhenteet.....	6
1 JOHDANTO .....	7
2 ALLERGEENIT.....	8
2.1 Allergeenien määritelmä.....	8
2.2 Allergeenimerkinnot.....	9
3 VALIDOINTI, VERIFIOINTI JA MITTAUSEPÄVARMUUS .....	13
3.1 Validointi ja verifiointi.....	13
3.2 Mittausepävarmuuden arviointi.....	14
4 ALLERGEENIMÄÄRITYS ELISA-MENETELMÄLLÄ JA ELISA-ROBOTTI .....	15
4.1 Kaurajäämä.....	16
4.2 Gluteenijäämä .....	17
4.3 Kaseiinijäämä .....	18
4.4 ELISA-robotti.....	19
5 KOKEELLINEN OSIO.....	21
5.1 pH-arvojen säätö eri näytematriiseille .....	21
5.2 Robotin työohjeiden parantelu.....	23
6 TULOKSET .....	24
7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA YHTEENVETO.....	27
LÄHTEET .....	29
LIITTEET .....	31

## Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Taulukko 1. Allergioita ja intoleransseja aiheuttavat aineet ja tuotteet.....	11
Kuva 1. Esimerkki elintarvikkeen ainesosaluettelosta.....	12
Kuva 2. Kaurajäämä-testin prosessikaavio.....	17
Kuva 3. Gluteenijäämä-testin prosessikaavio.....	18
Kuva 4. Kaseiinijäämä-testin prosessikaavio.....	19
Kuva 5. Happamuuden säätö prosessikaavio.....	22
Taulukko 2. pH-arvon säätö 10 % NaOH-liuoksella.....	24
Taulukko 3. pH-arvon säätö 1 M NaOH-liuoksella.....	25
Taulukko 4. Näytematriisit, joiden pH-arvoa ei täytynyt säätää NaOH-liuoksella.....	25

## Käytetyt termit ja lyhenteet

<b>Absorbanssi</b>	Optinen tiheys. Luku, joka vastaa aineeseen imeytyneen valon määrää.
<b>Antigeeni</b>	Hiilihydraatti tai proteiini, jonka seurauksena elimistössä muodostuu vasta-aineita.
<b>Aveniini</b>	Kaurassa esiintyvä varastoproteiini.
<b>Matriisi</b>	Tässä työssä tutkittava näyte. Näytteen sisältämät komponentit.
<b>pH</b>	Kertoo, kuinka hapan tai emäksinen neste on.
<b>Vorteksointi</b>	Näytteen sekoittamista pyörteisellä menetelmällä, käytetään homogenoimaan näyte.

# 1 JOHDANTO

Allergeenimääritykset ovat tärkeä osa elintarviketurvallisuutta. Niiden turvallisuus ja tarkkuus on ensiarvoisen tärkeää. Valio päätti siirtää allergeenimääritykset Tutkimus & Kehitys (T&K) -yksiköstä Valion Seinäjoen aluelaboratorioon syksyn 2024 ja alkuvuoden 2025 aikana. Siirto johtuu siitä, että Tutkimus & Kehitys -yksikkö keskittyy nimensä mukaisesti enemmän tutkimiseen ja kehittämiseen, kun taas allergeenimääritykset ovat nykyään rutiinimäärityksiä, jotka halutaan siirtää aluelaboratorioon. Seinäjoen tehdas on myös maantieteellisesti keskeinen paikka logistiikkaa ajatellen. Opinnäytetyö liittyy allergeenimääritysten käyttöönottoon.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on säätää kaurajäämä-analyysissä käytettävien näytematriisien happamuutta Oat Protein Residue (ESOAT-48) -testille ideaaliksi sekä parantaa ELISA-robotin käyttöön liittyviä työhajeita. Määrityksissä käytetään ELISA-menetelmää. Tarkoituksena on siirtyä suorittamaan ELISA-vaihe robotilla, jotta käsin suoritettava työ vähenee ja virheiden riski pienenee.

Työn teoriaosuudessa kartoitetaan taustaa liittyen allergeeneihin ja allergeenimäärityksiin ELISA-menetelmällä, jota Valio käyttää määrityksissä. Työn rakenteessa teoriaosuuteen kuuluvat allergeenit, validointi, verifiointi sekä mittausepävarmuus, allergeenimääritys ELISA-menetelmällä ja ELISA-robotti. Käytännöosuuteen kuuluu pH-arvojen säätö näytematriiseille ja työhajeiden parantelu. Lopuksi esitellään tulokset, joissa tarkastellaan aikaansaatuja tuloksia. Viimeisenä ovat johtopäätökset ja yhteenveto.

## 2 ALLERGEENIT

### 2.1 Allergeenien määritelmä

Allergia on immuunijärjestelmän häiriö, jonka aiheuttavat enimmäkseen vaarattomat erilaiset aineet, joita esiintyy ympäristössä, eläimissä, ruoissa tai lääkkeissä (Siragakis, 2014, s. 70). Niitä voi olla esimerkiksi eri elintarvikkeet tai eläinpöly. Allergiset sairaudet voivat vaikuttaa haitallisesti ihmisen elämänlaatuun. Ne vaikuttavat fyysiseen, psyykkiseen, sosiaaliseen ja taloudelliseen hyvinvointiin. Joillekin henkilöille allergia voi olla hengenvaarallinen riippuen henkilön allergiaherkkyydestä. Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen (2023) arvion mukaan aikuisista noin 3–5 %, peruskouluikäisistä lapsista noin 5–10 % ja imeväis- ja leikki-ikäisistä 10–15 % kärsii ruoka-allergioista. Pienillä lapsilla yleisimmin allergiaoireita aiheuttavat maito, viljat, kananmuna ja kala. Lapsilla on yleistä, että ruoka-allergia paranee kouluikään mennessä.

Allergeenit ovat allergia- tai yliherkkyyksireaktioita aiheuttavia ainesosia (Andersen, 2023, s. 66). Yliherkkyyksireaktioita kutsutaan intoleranssiksi silloin, kun ne eivät johdu allergiasta. Intoleranssissa on usein kyse entsyymien puutteesta, kuten laktoosi-intoleranssissa laktaasientsyymien puutteesta. Siragakis (2014, s. 70), mukaan ruoka-aineallergioista on tullut maailmanlaajuisesti tärkeä elintarviketurvallisuuskysymys, joka johtuu ruoka-aineallergioiden lisääntymisestä. Sen vuoksi allergeenien on oltava hallittavissa elintarviketuotannossa (Andersen, 2023, s. 66). Allergeenien hallinta ja elintarviketurvallisuus ovat yleensä keskeisiä ohjelmia, jotka tarvitaan turvallisen elintarviketuotannon varmistamiseen. Niiden avulla voidaan taata, että allergiset henkilöt voivat turvallisesti nauttia elintarvikkeita.

Elintarvikkeet voivat aiheuttaa monenlaisia immuuni- ja allergisia reaktioita (Andersen, 2023, s. 67). Kansanterveyden kannalta merkittävimmät ongelmat liittyvät erityisesti reaktioihin, joissa elimistö muodostaa IgE-vasta-aineita ruoan sisältämille valkuaisaineille. IgE tarkoittaa immunoglobuliinia, joka on synonyymi vasta-aineelle. Tyypillisimpiä IgE-välitteisen reaktion aiheuttamia oireita ovat nokkosihottuma ja siihen liittyvä turvotus, punoittava iho, oksentelu, vatsakivut, hengitysteiden ahtautuminen ja pahimmillaan anafylaksia, eli vaikea allerginen reaktio (Csonka, 2018). Vakavimmat allergiset reaktiot liittyvät yleensä maapähkinöihin, maitotuotteisiin ja kananmuniin (Andersen, 2023, s. 67). Tietoa ruoka-

aineallergioiden yleisyydestä ja vakavuudesta on kuitenkin rajallisesti saatavilla ja oireiden luokittelu voi olla haastavaa.

Soluvälitteiset vasteet, jotka voivat liittyä tai olla liittymättä IgE-välitteisiin mekanismeihin, voivat johtaa ruoka-allergiaan (Siragakis, 2014, s. 70–71). Ruoka-allergia johtuu yleensä IgE-välitteisestä reaktiosta. Silloin elimistöstä vapautuu välittäjäaineita, kuten histamiinia, joka aiheuttaa allergiaoireet. Allergiaoireet, jotka ovat IgE-välitteisiä, ilmaantuvat yleensä heti altistumisen jälkeen. Ei-IgE-välitteiset, hitaammin kehittyvät allergiaoireet, ilmaantuvat yleensä muutamien tuntien tai päivien kuluttua ja ovat oireilultaan lievempiä. Termiä ruokaintoleranssi (allergian ruokayliherkkyys) käytetään vain ei-immuunivälitteisissä reaktioissa, jotka kuvaavat epänormaalia fysiologista vastetta, yksilön entsyymaattista, farmakologista, idiosynkraattista tai määrittelemätöntä luonnetta. Ruoka-allergeeni on antigeeninen molekyyli (proteiini), joka saa aikaan immunologisen vasteen. Allergeeni voi esiintyä useissa muodoissa (isoallergeenit) yhdessä lajissa. Isoallergeenit jakavat korkean aminohapposekvenssin sisennyksen ja immunologisen ristireaktiivisuuden. Jos allergeenien välinen sekvenssi-identiteetti on yli 90 %, kutsutaan näitä saman allergeenin isoformeiksi tai varianteiksi. Allergeeninimikkeistön on määritellyt World Health Organization ja International Union of Immunological Societies (WHO-IUIS).

## 2.2 Allergeenimerkinnät

Elintarvikelain 297/2021 mukaan pakollisten elintarviketietojen ilmoittamisen ensisijaisena tavoitteena tulisi olla kuluttajien mahdollisuus tunnistaa tuote, käyttää sitä asianmukaisesti ja valita itselleen sopivia vaihtoehtoja ruokavalionsa mukaisesti. Tämän periaatteen mukaisesti elintarvikealan toimijoiden tulisi varmistaa, että nämä tiedot ovat saatavilla myös näkövammaisille.

Euroopan parlamentti ja neuvosto antoi vuonna 2011 Elintarviketietoasetuksen (EU n:ro 1169/2011), joka koskee elintarviketietojen antamista kuluttajalle. Joulukuussa 2014 tuli pakolliseksi luovuttaa pakolliset elintarviketiedot. Pakollisten ravintoarvomerkintöjen ilmoittaminen tuli voimaan joulukuussa 2016. Elintarviketietoasetuksen tavoitteena on suojella kuluttajien terveyttä ja etuja sekä varmistaa, että elintarvikkeista annettu tieto on luotettavaa (Elintarviketietoasetus 1169/2011/EU). Asetuksen avulla kuluttajille taataan

mahdollisuus tehdä turvallisia ja tietoon perustuvia valintoja elintarvikkeiden suhteen. Se turvaa kuluttajien oikeuden riittävään tiedonsaantiin asettamalla elintarvikemerkintöjä koskevat yleiset periaatteet, vaatimukset ja vastuut. Asetuksen tarkoituksena on varmistaa, että kuluttajat saavat tiedon elintarvikkeiden alkuperästä, niiden sisältämistä ainesosista, ravintoarvoista ja mahdollisista allergeeneistä. Ainesosaluettelossa on ilmoitettava myös valmistuksessa käytetyt lisäaineet, jotka voivat aiheuttaa allergisia reaktioita.

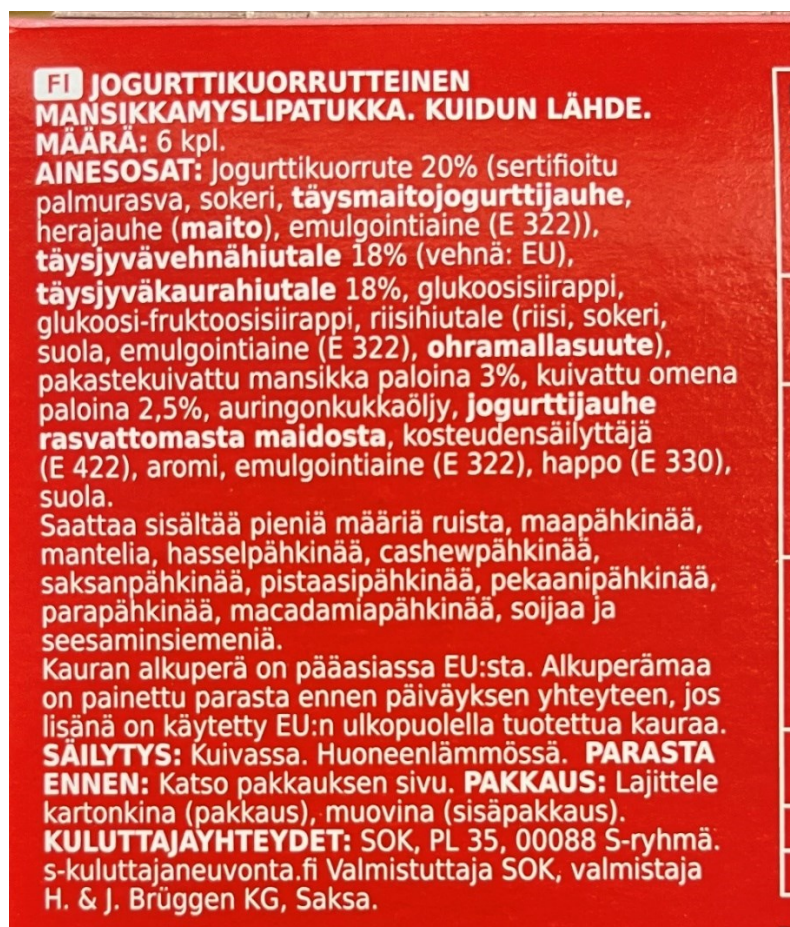
Allergeenit ovat ainesosia, jotka voivat aiheuttaa allergia- tai yliherkkyysoireita (Ruokavirasto, i.a.a.). Kuluttajan on havaittava pakkausmerkinnöistä helposti allergeenit ja intoleransseja aiheuttavat aineet (Ruokavirasto, i.a.b.). Ne tulee ilmoittaa selkeästi muusta ainesosaluettelosta erottuvalla tavalla esimerkiksi muuttamalla kirjasinlajia, kirjaintyyliä tai taustaväriä. Allergioita ja intoleransseja aiheuttavat aineet tulee ilmoittaa ainesosaluettelossa omilla nimillään. Alla olevassa taulukossa (Taulukko 1) on esitetty 14 allergioita ja intoleransseja aiheuttavat aineet ja tuotteet, jotka täytyy aina ilmoittaa elintarvikkeiden pakkausaineosaluettelossa.

Taulukko 1. Allergioita ja intoleransseja aiheuttavat aineet ja tuotteet (Ruokavirasto, i.a.a).

Elintarvikeryhmä	Laji
Gluteenia sisältävät viljat ja viljatuotteet	Vehnä, ruis, ohra, kaura
Äyriäiset ja äyriäistuotteet	
Munat ja munatuotteet	
Kalat ja kalatuotteet	
Maapähkinät ja maapähkinätuotteet	
Soijapavut ja soijapaputuotteet	
Maito ja maitotuotteet (ml. Laktoosi)	
Pähkinät ja pähkinätuotteet	Manteli, hassel-, saksan-, cashew-, pekaani-, para-, ja pistaasipähkinät sekä Macademia- ja Gueenslandpähkinät
Selleri ja sellerituotteet	
Sinappi ja sinappituotteet	
Seesaminsienet ja seesaminsientuotteet	
Rikkidioksidi ja sulfiitit, jos niiden pitoisuudet ovat yli 10 mg/kg tai 10 mg/l kokonaisrikkidioksidiksi laskettuna	
Lupiinit ja lupiinituotteet	
Nitviäiset ja nitviäistuotteet	

Useiden elintarvikkeiden ainesosaluettelossa on lause ”Saattaa sisältää pähkinää” (Csonka, 2018). Henkilöiden, joilla on ollut anafylaksia, on syytä välttää tällaisia tuotteita, sillä on mahdollista, että ne ovat valmistusvaiheessa kontaminoituneet. Kyseisiä tuotteita ei kuitenkaan tarvitse vältellä, jos pähkinät aiheuttavat lievempiä oireita.

Kuvassa 1 on havainnollistava esimerkki elintarvikkeen ainesosaluettelosta, josta voidaan nähdä, että vaaditut allergioita aiheuttavat ainesosat on lihavoitu, jotta ne erottuisivat tekstistä paremmin. Kuvan elintarvikepakkauksen ainesosaluettelossa on lihavoitu esimerkiksi täysmaitojogurttijauhe ja täysjyvävehnähiutale, jotka määritellään allergiaa aiheuttaviksi ainesosiksi. Lisäksi siinä on mainittu, että tuote saattaa sisältää pieniä määriä muun muassa ruista ja eri pähkinälajeja.



Kuva 1. Esimerkki elintarvikkeen ainesosaluettelosta.

## 3 VALIDOINTI, VERIFIOINTI JA MITTAUSEPÄVARMUUS

### 3.1 Validointi ja verifiointi

Validointi on prosessi, jolla arvioidaan menetelmän tai laitteen soveltuvuutta ja suorituskykyä tiettyyn käyttötarkoitukseen (Kemianseurat.fi, i.a.). Sen avulla määritetään vertailuarvot parametreille, jotka kuvaavat menetelmän luotettavuutta (Hägg, 2016, s. 7). Validoinnin vaatimukset vaihtelevat menetelmän ja sen käyttökohteen mukaan, ja ne on määriteltävä tapauskohtaisesti. Validoinnin laajuus riippuu analyysimenetelmän luonteesta ja käyttötarkoituksesta. Erityisesti silloin, kun laboratorio kehittää uuden menetelmän itse, se on validoitava kattavasti ja dokumentoitava huolellisesti. Validointiin kohdistuvat vaatimukset riippuvat sekä menetelmästä että sen käyttökohteesta (Kemianseurat.fi, i.a.). Sekä määrälliset (kvantitatiiviset) että laadulliset (kvalitatiiviset) analyysit voidaan validoida, mutta niiden validointimenettelyt eroavat toisistaan. Esimerkiksi mikrobiologisissa analyyseissä hyödynnetään sekä kvantitatiivisia että kvalitatiivisia menetelmiä.

Häggin (2016, s. 8) mukaan verifiointi on validointia suppeampi prosessi. Se suoritetaan, kun käyttöön otetaan mittausmenetelmä, joka on jo aiemmin validoitu esimerkiksi tuotteen valmistajan toimesta ja se on käytössä muualla. Verifiointi on tarpeen myös silloin, kun laboratoriossa aiemmin validoituun menetelmään tehdään muutoksia. Näitä voivat olla esimerkiksi muutokset laitteistossa, tietojärjestelmässä, näytematriisissa, analyysimenetelmässä tai näytteen käsittelyssä. Verifiointissa osoitetaan esimerkiksi varmennetun vertailumateriaalin avulla, että menetelmä toimii odotetusti (Kemianseurat.fi, i.a.). Tällainen tilanne voi olla esimerkiksi silloin, kun kyseessä on standardimenetelmä, joka on läpikäynyt kattavan kollaboratiivisen testauksen tai jolla on runsaasti käyttökokemusta.

### 3.2 Mittausepävarmuuden arviointi

Mittausepävarmuus on ei-negatiivinen parametri, joka kuvaa mittaussuureelle saatujen arvojen oletettua vaihtelua, perustuen käytettyihin tietoihin (Hägg, 2016, s. 23). Mittausepävarmuus on määritelty virherajojen avulla ja se kuvaa yleisluonteisten mittaustulosten vaihtelua. Mittausepävarmuus on olennainen osa jokaista menetelmää, sillä virheitä voi sattua esimerkiksi näytteenotossa, laitteissa, näytteiden säilytyksessä ja analyysin eri vaiheissa. Mittausepävarmuus on arvio niistä tulokseen liittyvistä rajoista, joiden välissä on niin sanotusti oikea arvo tietyllä todennäköisyydellä.

Mittausepävarmuuteen vaikuttavia tekijöitä voivat olla matriisi, työn suorittaja, työvälineet, reagenssit, systemaattiset sekä satunnaiset virheet (Hakkinen, 2019). Hiltusen ym. (2011, s. 41–42) mukaan käyttämällä digitaalisia mittalaitteita käyttäjän vaikutus mittaustulokseen vähenee. Näytteenotossa yksi virhelähde voi olla näytteenotto kohta, joka johtuu siitä, että näytteessä eri kohdat poikkeavat jotenkin toisistaan ja aiheuttaa keskenään poikkeavia tuloksia. Myös käytettävä mittalaite vaikuttaa mittausepävarmuuteen (Hiltunen ym., 2011 s. 39–40). Mittalaitteen epävarmuuteen vaikuttavia mahdollisia tekijöitä ovat kalibroinnista kulunut aika ja sen epävarmuus, mittalaitteen asento sekä mitattavan signaalin aaltomuoto.

Mittausepävarmuus koostuu systemaattisesta ja satunnaisesta virheestä, joka esiintyy mitauksessa (Hägg, 2016, s. 24). Systemaattinen virhe on toistuva ja ennustettava, ja aiheuttaa mittaustulosten järjestelmällisen poikkeaman todellisesta arvosta. Systemaattisen virheen syy voi olla esimerkiksi väärin kalibroitu vaaka, joka näyttää aina liian vähän. Satunnainen virhe johtuu mittauksen vaihtelusta ja sattumanvaraisista tekijöistä. Se voi aiheuttaa mittaustuloksiin pieniä eroja jokaisella mittauskerralla. Satunnaisen virheen syy voi olla esimerkiksi inhimillinen epätarkkuus. Satunnaisvirhettä kuvaa määrityksen sisäinen ja välitason toistotarkkuus ja systemaattista virhettä menetelmän oikeellisuus.

Mittausepävarmuuden tietoja tarvitaan, kun arvioidaan mittaustuloksen tarkkuutta tai vertaillaan eri laboratorioiden tuloksia keskenään (Hägg, 2016, s. 24). Mittausepävarmuuden määritelmässä esiintyvä parametri voi olla esimerkiksi keskihajonta.

## 4 ALLERGEENIMÄÄRITYS ELISA-MENETELMÄLLÄ JA ELISA-ROBOTTI

Yleisimmät allergeenimääritykset perustuvat joko ELISA- (enzyme-linked immunosorbent assay) tai PCR-menetelmiin (Eurofins, 2019). ELISA-menetelmällä näytteestä määritetään suoraan allergisoivaa proteiinia ja tulos ilmoitetaan kvantitatiivisesti (mg/kg). PCR-menetelmällä analysoidaan DNA:ta - ei proteiinia - ja tulos ilmoitetaan muodossa positiivinen/negatiivinen.

ELISA-menetelmä perustuu vasta-aineiden kykyyn sitoutua spesifisiin antigeeneihin (Crowther, 2009, s. 43). Näytteen analysointi perustuu reagenssien avulla aikaansaatuun signaaliin, jonka voimakkuus kertoo tutkittavan aineen pitoisuuden. Menetelmän perusperiaate on, että liuos, jossa on antigeeni tai vasta-aine, sidotaan kiinteälle pinnalle esimerkiksi mikrotiitterilevyn kaivoihin. Tämän jälkeen lisätään entsyymikonjugoitu vasta-aine tai antigeeni, joka sitoutuu kohteeseen, vasta-aineeseen tai antigeeniin, spesifisesti. Lopuksi lisätävä substraatti reagoi entsyymin kanssa muodostaen mitattavan värireaktion. Tulos saadaan spektrofotometrisesti. ELISA-menetelmä jaetaan kolmeen menetelmään: suoraan, epäsuoraan ja sandwich-menetelmään (Crowther, 2009, s. 11). Lisäksi sandwich ELISA voidaan jakaa suoraan ja epäsuoraan menetelmään.

ELISA-menetelmän yksinkertaisin menetelmä on suora menetelmä (Crowther, 2009, s. 12). Menetelmässä käytetään antigeeniä, joka on laimennettu puskuriin, jossa on korkea pH (Crowther, 2009, s. 13). Antigeeni voi sitoutua tehokkaasti mikrotiitterilevyn kaivojen pohjalle inkuboinnin aikana, koska puskuri ei sisällä muita proteiineja, jotka voisivat häiritä antigeenia. Sitoutumattomat aineet poistetaan pesemällä kaivot pesupuskurilla, minkä jälkeen niihin lisätään entsyymileimattu vasta-aine (Crowther, 2009, s. 14). Tämä vasta-aine on laimennettu pesupuskuriin, joka sisältää blokkusainetta. Seuraavan pesuvaiheen jälkeen kaivoihin lisätään substraatti, joka kiinnittyy vasta-aineessa olevaan entsyymiin. Inkuboinnin aikana entsyymi katalysoi värireaktion, joka pysäytetään joko lisäämällä inhiboiva reagenssi tai muuttamalla pH-arvoa. Syntynyt väriaine mitataan spektrofotometrisesti, mikä mahdollistaa analysoitavan pitoisuuden määrittämisen.

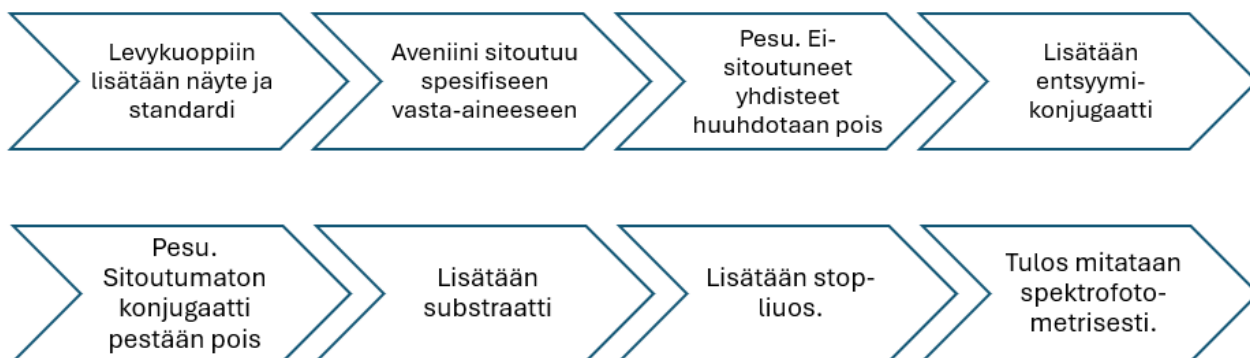
Epäsuora ELISA poikkeaa hieman suorasta ELISA:sta (Crowther, 2009, s. 14). Siinä kaivoihin kiinnitetyn antigeenin jälkeen lisätään leimaamaton primaarivasta-aine, joka sitoutuu antigeeniin inkuboinnin aikana. Tämän jälkeen sitoutumaton aine huuhdotaan pois pesuvaiheessa, ja kaivoihin lisätään entsyymillä merkitty sekundaarivasta-aine. Inkuboinnin aikana tämä vasta-aine kiinnittyy primaarivasta-aineeseen. Sitten suoritetaan levyn pesu uudelleen ja lisätään substraatti, jonka jälkeen määrittys jatkuu samoin kuin suorassa menetelmässä.

ELISA-menetelmän sandwich-menetelmä voi olla joko suora tai epäsuora (Crowther, 2009, s. 16–21). Suorassa sandwich-menetelmässä mikrotiiterilevyn kaivoihin lisätään primaarivasta-aine, joka kiinnittyy passiivisesti kaivon pohjalle inkuboinnin aikana. Tämän jälkeen levy pestään ja sen jälkeen voidaan käyttää blokkauspuskuriä, jotta saadaan poistettua epäspesifistä sitoutumista aiheuttavat kohdat. Levylle suoritetaan inkubointi ja pesu, joiden jälkeen kaivoihin lisätään näytteet, jotka on laimennettu blokkauspuskuriin. Inkuboinnin aikana tutkittavat antigeenit sitoutuvat primaarivasta-aineeseen. Sitoutumaton aine huuhdotaan pois pesuvaiheessa ja kaivoihin lisätään entsyymileimattu sekundaarivasta-aine, joka tunnistaa ja sitoutuu antigeeniin inkuboinnin aikana. Uuden pesuvaiheen jälkeen substraatti lisätään kaivoihin ja syntyvä värireaktio pysäytetään stop-liuoksella ennen spektrofotometristä mittausta. Epäsuorassa sandwich-menetelmässä sekundaarivasta-aine ei ole leimattu. Kaivoihin lisätään kolmas vasta-aine, joka ei reagoi primaarivasta-aineen kanssa, vaan sitoutuu sekundaarivasta-aineeseen mahdollistaen signaalin havaitsemisen. Määrittys jatkuu substraatin lisäämisellä ja päättyy stop-liuokseen.

#### 4.1 Kaurajäämä

Valion työohjeiden (sisäinen tiedonanto, 13.12.2024) mukaan Oat Protein Residue (ESOAT-48) -testi on immunologinen menetelmä kaurajäämien analysointiin. Testi mittaa kauran proteiineista aveniinia, jota kaurassa on noin 4–14 %. Aveniini on kaurassa esiintyvä prolamiini eli varastoproteiini. Testilevyn kuopat on päällystetty aveniinispesifisellä vasta-aineella. Testilevylle lisätään standardia niille osoitettuihin kuoppiin sekä näytettä omiin kuoppiinsa, jolloin aveniini sitoutuu spesifiseen vasta-aineeseen. Pesuvaiheessa ei sitoutuneet yhdisteet huuhdotaan pois ja kaivoihin lisätään entsyymikonjugaatti. Sitoutumaton konjugaatti pestään pois ja sen jälkeen lisätään substraatti. Testin lopuksi lisätään stop-liuos, joka muuttaa värin sinisestä keltaiseksi. Mittaus tapahtuu ELISA-laitteella

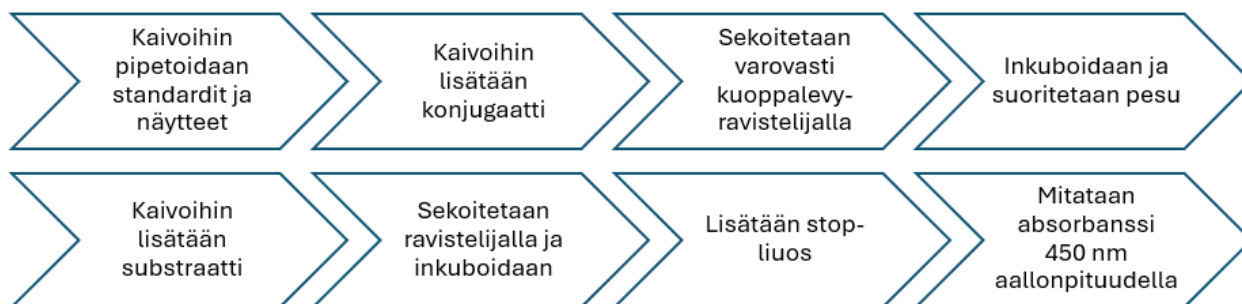
aallonpituudella 450 nm. Absorbanssi on verrannollinen aveniinikonsentraatioon näytteessä. Tulos ilmoitetaan muodossa mg/kg aveniinia. Kuvassa 2 on esitetty prosessikaavio kaurajäämä-testistä. Kaavio havainnollistaa analyysin kulun.



Kuva 2. Kaurajäämä-testin prosessikaavio.

## 4.2 Gluteenijäämä

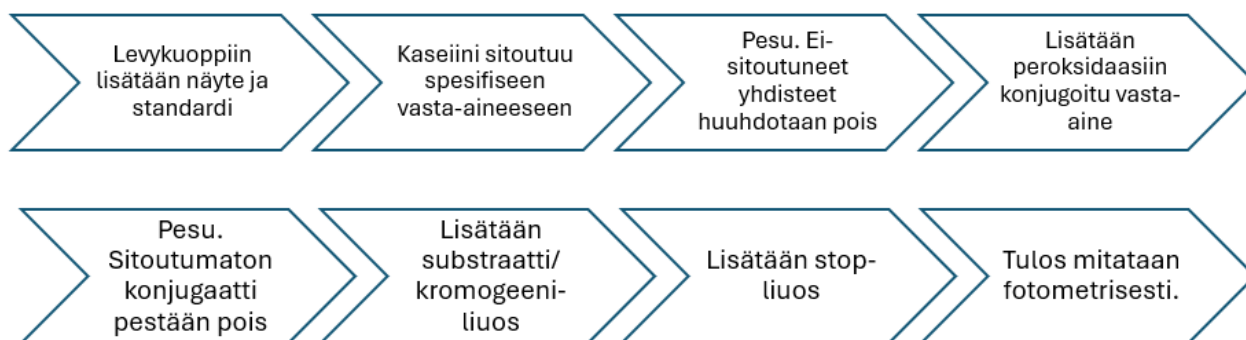
Valion työohjeiden (sisäinen tiedonanto, 13.12.2024) mukaan gluteenitesti Ridascreen® competitive soveltuu prosessoitujen näytteiden (fermentoidut, hydrolysoidut) gluteenijäämän analysointiin. Testissä käytetään spesifisiä vasta-aineita, jotka tunnistavat gliadiinin. Gliadiini on glutamiinipitoinen valkuaisaine, jota esiintyy vehnässä ja rukiissa ja se aiheuttaa keliakialle ominaisen suolitulehduksen. Analyysi voidaan työohjeiden mukaan jakaa kahteen osaan: näytteiden uuttoon ja testin tekemiseen, johon kuuluu työn valmistelu ja testin suorittaminen. Näytteiden uutossa näytepuskuri laimennetaan tislattuun veteen ja homogenoidaan edustava näytemäärä. Kiinteälle ja nestemäiselle elintarvikkeelle on oma ohjeensa. Homogenoitu näyte vorteksoidaan ja sentrifugoidaan huoneenlämmössä. Supernatantti, eli neste, joka erottuu sentrifugoinnin aikana kiinteän sakkaosan yläpuolelle, laimennetaan laimennettuun näytepuskuriin. Kuvassa 3 on havainnollistettu prosessikaavio itse gluteenijäämätestin suorittamisen eri vaiheet.



Kuva 3. Gluteenijäämä-testin prosessikaavio.

### 4.3 Kaseiinijäämä

Kaseiini on maidossa ja maitotuotteissa esiintyvä proteiini, joka tunnetaan sen hitaasta imeytyvyydestään. Valion työohjeiden (sisäinen tiedonanto, 13.12.2024) mukaan RIDASCREEN®FAST Casein on immunologinen menetelmä kaseiinin analysointiin elintarvikkeista, kuten jäätelö, viini, suklaa, virvokkeet, lastenruoka, leipomotuotteet, makkarat ja jauhoseokset. Mikrotiitteristriippien kuopat on päällystetty kaseiinispesifisellä vasta-aineella. Lisäämällä standardia ja näytettä kuoppiin kaseiini sitoutuu spesifiseen vasta-aineeseen. Pesuvaiheessa ei-sitoutuneet yhdisteet huuhdotaan pois ja sen jälkeen lisätään peroksidaasiin konjugoitu vasta-aine. Tämä vasta-ainekonjugaatti on sitoutunut Ab-Ag-kompleksiin. Vasta-aine-antigeeni- vasta-aine-kompleksi muodostuu. Sitoutumaton konjugaatti pestään pois ja kaseiinin havaitsemiseksi kuoppiin lisätään substraatti/kromogeeni-liuos, joka muuttaa kromogeenin siniseksi. Stop-liuoksen lisäys muuttaa värin sinisestä keltaiseksi. Mittaus tapahtuu ELISA-laitteella fotometrisesti aallonpituudella 450 nm. Absorbanssi on verrannollinen kaseinikonsentraatioon näytteessä. Tulos ilmoitetaan mg/kg kaseiinia. Kuvassa 4 on esitetty kaseinianalyysin prosessikaavio. Kaavio havainnollistaa analyysin vaiheet ja kulut.



Kuva 4. Kaseiinijäämä-testin prosessikaavio.

#### 4.4 ELISA-robotti

Allergeenimäärityksissä käytettävänä ELISA-robottina toimii Dynex DS2 automaatti, joka on tietokoneohjattu mikrolevyn käsittelyjärjestelmä (Dynex Technologies, s. 9). Laite suorittaa automatisoidusti ELISA-määrityksen vaiheet, joita ovat näytteiden pipetointi, reagenssilisäys, inkubointi, levyjen pesu, absorbanssin mittaus sekä tulosten laskenta. Automaatti on tarkoitettu käytettäväksi tutkimus- ja teollisuuslaboratorioissa.

Tutkittavat näytteet esikäsitellään käsin kuten aikaisemminkin. Esikäsitellyt näytteet asetetaan automaattiin, joka suorittaa näytteille ajon ja kerää tulokset (Dynex Technologies, s. 9). Laitteeseen lisätään käsiteltävät näytteet, mikrokuoppalevy, reagenssiliuokset ja standardit sekä pipetin kärjet laitteen pyytämässä järjestyksessä.

Laite on liitetty DS-Matrix-ohjelmistoon, jota käytetään Dynex DS2 automaatin ohjaamiseen. Ohjelmistossa käyttäjä voi muokata parametrit ja luoda monipuolisesti uusia ohjelmia eri määritysten suorittamiseen. Ohjelmistolla pääsee myös tarkastelemaan aikaisemmin suoritettujen ajojen tuloksia takautuvasti. Ohjelmistolla hallinnoidaan sitä, mikä analyysi Dynex DS2 automaatilla kulloinkin suoritetaan. Ohjelmistoon on luotu ja tallennettu laitteella yleisimmin ajettavat analyysit ja jokaiselle analyysille on määritetty omat parametrit, pesut, käytettävät standardi- ja reagenssiliuokset. Tallennettujen analyysien lisäksi

ohjelmistoon on tallennettu laitteen pesuohjelmat, jotka suoritetaan päivittäin ennen laitteen käyttöä ja eri analyysien välissä.

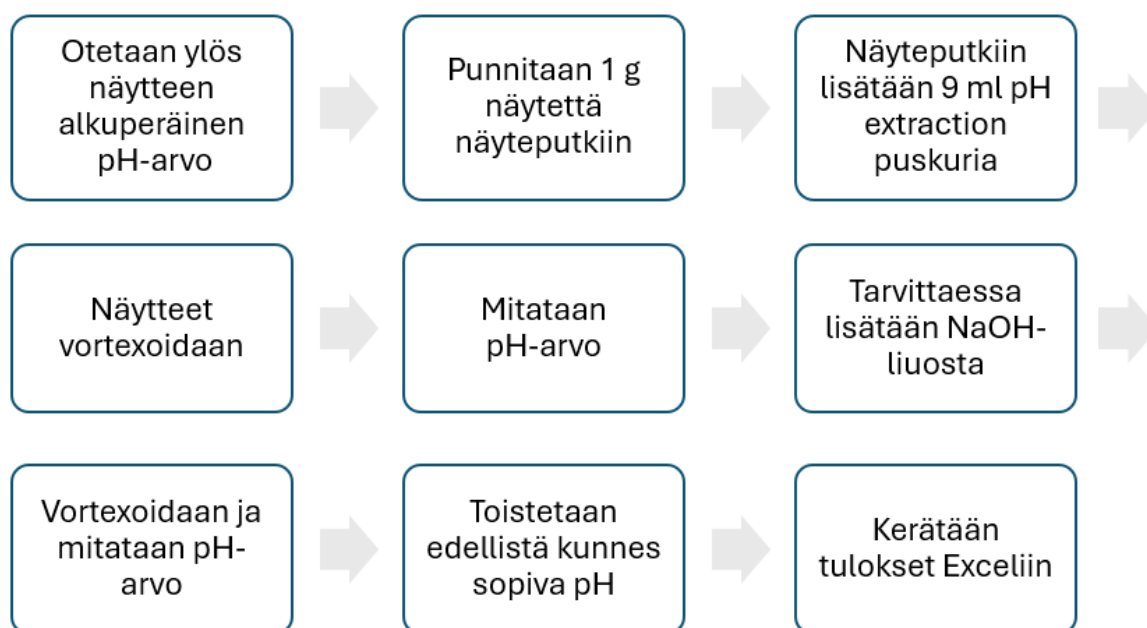
## 5 KOKEELLINEN OSIO

### 5.1 pH-arvojen säätö eri näytematriiseille

Opinnäytetyön käytännön osuus aloitettiin säätämällä kaurajäämä-määrittämissä tutkittavien tuotteiden pH-arvoja menetelmälle sopiviksi. Tuotteina oli esimerkiksi Valion jogurtteja sekä mehuja. Menetelmässä näytteiden pH-arvojen olisi hyvä olla välillä 6,5–7,5. Aikaisemmin määrittämissä oli käytetty KOH:ia eli kaliumhydroksidia säätämään happamuutta. Sitä ei kuitenkaan käytetä Seinäjoen aluelaboratoriossa muissa menetelmissä, joten se päädyttiin vaihtamaan NaOH:n eli natriumhydroksidiin. Sen tiedetään toimivan pH:n säätämiseen ja se on laboratoriossa käytössä muutoinkin. Kokeellisessa osuudessa haluttiin selvittää, kumpi sopisi käytettäväksi määrittämissä paremmin, 10 % NaOH-liuos vai 1 M NaOH-liuos. 1 molaarinen NaOH-liuos vastaa noin 4 %:sta NaOH-liuosta. Työssä tultiin siihen tulokseen, että voisi olla parempi käyttää 10 % NaOH-liuosta, sillä sitä tarvittiin määrällisesti noin puolet vähemmän säätämään tuotteen pH-arvo haluttuun arvoon kuin 1 M NaOH-liuosta.

Jokaisesta näytematriisista (27 kpl) tehtiin kahdet rinnakkaismäärittämissä. Jokaisesta näytematriisista kirjattiin tuotteen alkuperäinen pH-arvo ja tuotetta punnittiin 1 g kahteen näyteputkeen (rinnakkaismäärittämissä 1 ja 2). Ensimmäisessä rinnakkaismäärittämissä käytettiin 10 % NaOH-liuosta ja toisessa rinnakkaismäärittämissä 1 M NaOH-liuosta.

Jokaiseen näyteputkeen lisättiin 9 ml pH extraction-puskuria, joka nostaa näytteen pH-arvoa. Tämän jälkeen näytteet vorteksoitiin huolellisesti, jotta näyte olisi tasaisesti sekaisin, ja niistä mitattiin pH-arvot. Osalle näytteistä riitti pelkkä extraction-puskurin lisääminen saavuttamaan ideaalin pH-arvon. Lopuille näytteille lisättiin NaOH-liuosta ja lisäysmäärä sekä lopullinen pH-arvo kirjattiin ja niistä tehtiin Excel-taulukot. Kuvassa 5 on esitelty yksinkertainen prosessikaavio pH-arvojen säädöstä näytematriiseille havainnollistamaan työn kulkua. Käytännöntyön tulokset on kerätty taulukoihin, joita tarkastellaan työn tulokset -osiossa.



Kuva 5. Happamuuden säätö prosessikaavio.

Lisäksi yhtenä työn tavoitteena oli yksinkertaistaa menetelmää löytämällä yksi yhteinen tai muutama eri NaOH-lisäysmäärä, joka sopisi useille näytematriiseille. Sen myötä työskentely menetelmän parissa helpottuisi. Aikaisemmin T&K:lla jokaiselle näytematriisille oli lisätty oma määrä KOH:ia ja sen määrä oli vaihdellut 20–60 µl riippuen näytematriisista. Lisäysmäärien vähentäminen helpottaisi huomattavasti työskentelyä. Lisäysmäärät saatiin selville, kun pH-arvot oli säädetty ideaaliksi ja niistä koottiin taulukot lisäysmäärän mukaan. Näin hahmotettiin selkeästi, kuinka monelle näytteelle lisättiin mikäkin määrä NaOH-liuosta. Muutaman näytteen kohdalla tehtiin vielä uusintakokeilu, jotta nähtiin, toimisiko sille toinen lisäysmäärä paremmin ja saataisiin vähennettyä eri lisäysmääriä. Osan kohdalla kokeilu toimi ja ne saatiin siirrettyä toisen lisäysmäärän alle, mutta jäljelle jäi yksi näytematriisi, jolla on muista eroava oma lisäysmäärä. Lisäysmääriä tuli yhteensä kolme, kun aikaisemmin niitä oli ollut kuusi. Tuloksia tarkastellaan enemmän työn tulokset -osiossa.

## 5.2 Robotin työohjeiden parantelu

Toinen osa työtä oli tutustua ELISA-robottiin. Laitetta on käytetty aikaisemmin Tutkimus & Kehitys -yksikössä allergeenimäärityksissä, mutta se on melko uusi osa määritystä ja sen käyttö on ollut vähäistä. Robottiin tutustuminen tapahtui paikan päällä Seinäjoen laboratoriossa helmikuun ja huhtikuun välisenä aikana vuonna 2025.

Robottia voidaan ohjelmoida myös simulaatio-ohjelmassa. Tällöin uuden ohjelman testausta on helpompi tehdä. Simulaatio-ohjelmassa pystyi hakemaan ja nimeämään uuden analyysin ja näytesarjan. Sen lisäksi lisäämään laitteeseen tarvittavat kuvitteelliset näytteet, reagenssit ja muut tarvikkeet kuten pipetin kärjet. Simulaatio-ohjelman avulla robotilla pystyi harjoittelemaan ajon aloitusta ja siten muokattiin ja paranneltiin olemassa olevaa työohjetta koskien ajon aloitusta ja alkuvalmisteluita ennen sitä. Työohje on liitetty tämän opinnäytetyön liitteeksi 1.

Robottia ohjattiin tietokoneelle asennetusta DS Matrix -ohjelmasta. Ohjelmaan oli aikaisemmin luotu kaikki tällä hetkellä käytössä olevat allergeenimääritykset. Tavoitteena kuitenkin tulevaisuudessa on, että robotilla voisi suorittaa myös joidenkin muiden määritysten ELISA-vaiheita.

Robottiin ei ollut olemassa työohjeita uuden ohjelman luomiseen liittyen ja siksi haluttiin selvittää yksityiskohtaisesti mitä tietoja vaadittiin, jotta uusia ohjelmia pystyi luoda ja robotia voisi käyttää laboratoriossa muissakin analyyseissä. Robotin manuaali oli englanniksi, joten sitä suomennettiin ja tiivistettiin ja näin selvitettiin uuden ohjelman luomisen prosessia. Työohje on liitetty tämän opinnäytetyön liitteeksi 2.

## 6 TULOKSET

Tulokset näytematriisien happamuuden säätämisestä kerättiin kolmeen taulukkoon. Ensimmäisessä taulukossa (Taulukko 2) on näytematriisien tulokset 10 % NaOH-liuoksella säädettynä, toisessa (Taulukko 3) 1 M NaOH-liuoksella ja kolmannessa taulukossa (Taulukko 4) ne näytematriisit, joiden pH-arvoa ei tarvinnut säätää natriumhydroksidilla.

Taulukko 2. pH-arvon säätö 10 % NaOH-liuoksella.

tuote	pH	pH extraction- puskurin lisäyksen jälkeen	Lisätty	pH
			10% NaOH (µl)	
Näytematriisi 1	4,31	6,31	20	7,17
Näytematriisi 2	4,2	6,39	20	7,22
Näytematriisi 3	4,17	6,36	20	7,28
Näytematriisi 4	4,29	6,02	20	6,75
Näytematriisi 5	4,34	6,34	20	7,16
Näytematriisi 6	4,26	6,26	20	7,1
Näytematriisi 7	4,31	6,24	20	7,21
Näytematriisi 8	4,27	6,29	20	7,04
Näytematriisi 9	4,29	6,39	20	7,26
Näytematriisi 10	4,34	5,88	30	6,93
Näytematriisi 11	4,27	5,96	30	7,22
Näytematriisi 12	3,69	5,72	30	7,37
Näytematriisi 13	4,27	5,95	30	7,15
Näytematriisi 14	3,09	6,56	10	7,04

Taulukko 3. pH-arvon säätö 1 M NaOH-liuoksella.

tuote	pH	pH extraction-	lisätty	pH
		puskurin		
		lisäyksen Jälkeen	1M NaOH (µl)	
Näytetriisi 1	4,31	6,37	30	6,86
Näytetriisi 2	4,2	6,4	30	6,92
Näytetriisi 3	4,17	6,37	30	6,89
Näytetriisi 4	4,29	6	60	6,87
Näytetriisi 5	4,34	6,31	40	7,03
Näytetriisi 6	4,26	6,28	40	6,97
Näytetriisi 7	4,31	6,28	30	6,81
Näytetriisi 8	4,27	6,27	40	6,93
Näytetriisi 9	4,29	6,4	40	6,95
Näytetriisi 10	4,34	5,87	80	7,02
Näytetriisi 11	4,27	5,98	60	6,99
Näytetriisi 12	3,69	5,74	50	7
Näytetriisi 13	4,27	5,97	70	7,04
Näytetriisi 14	3,09	6,56	20	7

Taulukko 4. Näytetriisit, joiden pH-arvoa ei täytynyt säätää NaOH-liuoksella.

tuote	pH	pH extraction puskurin lisäyksen jälkeen	
		1. rinnakkaisnäytteet	2. rinnakkaisnäytteet
Näytetriisi 15	6,82	7,62	7,62
Näytetriisi 16	4,11	6,76	6,74
Näytetriisi 17	3,74	7,1	7,11
Näytetriisi 18	3,36	6,93	6,94
Näytetriisi 19	6,67	7,52	7,55
Näytetriisi 20	3,46	7,24	7,25
Näytetriisi 21	3,68	6,82	6,82
Näytetriisi 22	3,29	7,15	7,15
Näytetriisi 23	7,63	8,04	8,05
Näytetriisi 24	4,28	6,84	6,83
Näytetriisi 25	7,11	7,88	7,91
Näytetriisi 26	6,32	7,5	7,5
Näytetriisi 27	6,78	7,73	7,72

Taulukoissa 2–4 on kerätty yhteen kaurajäämä-menetelmässä tutkittavat näytetriisit

ja niiden pH-arvot. Tavoitteena oli saada näytematriisin happamuus välille 6,5–7,5. Ensimmäisessä pH-arvo-sarakkeessa on näytteen alkuperäinen pH, jota lähdettiin säätämään. Seuraavassa sarakkeessa oikealle on merkitty tuotteen pH-arvo, kun näytteen oli lisätty 9 ml pH extraction-puskuriliuosta, joka nosti tuotteen pH-arvoa. Taulukkoon 4 on kerätty ne näytematriisit, joilla puskurin lisäys riitti nostamaan pH-arvon haluttuun arvoon. Taulukkoon 4 on kerätty molempien rinnakkaisnäytteiden pH-arvot, kun niihin oli lisätty 9 ml extraction-puskuriliuosta.

Taulukkoon 2 on kerätty ensimmäisten rinnakkaisnäytteiden pH-arvot näytematriiseista 1–14, kun niihin lisättiin 10 % NaOH-liuosta. Taulukossa 3 on toiset rinnakkaisnäytteet näytematriiseista 1–14 ja niihin lisättiin 1 M NaOH-liuosta. Yhtenä työn tavoitteena oli selvittää kumpaa liuosta, 10 % NaOH- vai 1 M NaOH-liuosta, olisi järkevämpi käyttää menetelmässä. Taulukoista 2 ja 3 voidaan havaita, että 10 % NaOH-liuosta tarvittiin määrällisesti jopa puolet vähemmän saavuttamaan haluttu pH-arvo, kuin 1 M NaOH-liuosta. Siitä syystä voidaan todeta, että menetelmässä on kannattavampaa käyttää 10 % NaOH-liuosta säätämään näytteiden pH-arvoa.

Happamuuden säätämiseen liittyi myös toinen työn tavoite, joka oli löytää näytematriiseille yksi yhteinen tai pari eri NaOH-liuoksen lisäysmäärää. Aikaisemmin näytematriiseille oli lisätty kuutta eri määrää KOH:ia välillä 20–60 µl riippuen näytematriisista. Tämän työn kautta lisäysmäärät puolittuivat, ja löydettiin kolme yhteistä lisäysmäärää: 20, 30 ja 10 µl 10 % NaOH:ta. Näytematriiseille 1–9 lisätään 20 µl, näytematriiseille 10–13 30 µl ja näytematriisille 14 lisätään 10 µl liuosta. Myös näytematriisin 14 kohdalla kokeiltiin lisätä 20 µl NaOH:ta, jotta lisäysmääriä olisi ollut vain kaksi. Kokeilu kuitenkin nosti näytematriisin 14 pH-arvon yli sallitun raja-arvon ja siksi päädyttiin pitämään se 10 µl lisäysmäärällä. Näytematriiseille 15–27 riitti pH-extraction puskuriliuoksen lisäys saavuttamaan halutun happamuuden.

## 7 JOHTOPÄÄTÖKSET JA YHTEENVETO

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli edesauttaa allergeenimääritysten käyttöönottoa Valion Seinäjoen laboratoriossa, jonne ne siirtyivät Valion Tutkimus & Kehitys -yksiköstä. Työn yhtenä tavoitteena oli säätää kaurajäämä-testissä tutkittavien näytematriisien happamuus Oat Protein Residue (ESOAT-48) -testille sopivaksi, eli välille 6,5–7,5. pH-kokeiluilla pyrittiin myös selvittämään, kumpi sopisi lisäysliuokseksi paremmin, 10 % NaOH-liuos vai 1 M NaOH-liuos. Lisäksi työn tavoitteena oli tutustua määrittämissä käytettävään ELISA-robottiin, jonka tarkoituksena on tulevaisuudessa suorittaa allergeenimääritysten ELISA-vaihe. Tähän asti määrittäminen pipetoimisineen ja pesuineen on suoritettu käsin. Siihen liittyen oli tarve päivittää aikaisempia työohjeita koskien ajon aloittamista sekä tehtiin uudet työohjeet koskien uuden ohjelman luomista. Robotilla voisi tulevaisuudessa suorittaa myös muiden määrittäysten ELISA-vaiheita.

Kaurajäämä-testillä tutkittavien näytematriisien happamuutta täytyi säätää menetelmälle ideaaliksi, eli tavoitevälille 6,5–7,5. Näytematriiseja oli yhteensä 27. Tuotteina oli muun muassa erilaisia Valion jogurtteja ja mehuja. Kokeiluja suoritettiin vuoden 2024 marras- ja joulukuussa. Aikaisemmin menetelmässä oli käytetty KOH:ia eli kaliumhydroksidia, mutta sitä ei käytetä Seinäjoen aluelaboratoriossa muutoin, joten se korvattiin NaOH:lla eli natriumhydroksidilla, jota laboratoriossa käytetään. Sen tiedettiin vaikuttavan happamuuteen samalla tavalla. Tavoitteena oli myös löytää yksi yhteinen tai pari eri lisäysmäärää näytteille, jotta työskentely helpottuisi merkittävästi. Aikaisemmin eri lisäysmääriä kaliumhydroksidilla oli ollut kuusi, välillä 20–60 µl, riippuen näytematriisista. Määrä koettiin turhan suureksi ja hankaloittavan työskentelyä. Lopputuloksena saatiin kolme eri lisäysmäärää 10 %:lla NaOH:lla, 10, 20 ja 30 µl. 10 % NaOH valittiin siitä syystä, että sitä tarvittiin määrällisesti noin puolet vähemmän, kuin 1 M NaOH-liuosta. Muutamaa näytettä kokeiltiin säätää myöhemmin uudelleen, jotta saataisiin tarkempi tieto, kumpi kahdesta vaihtoehdosta lisäysmääränä toimii näytteelle paremmin. Osalle näytteitä ei tarvinnut lisätä kuin pH-extraction-puskuriliuos, jotta ne saavuttivat ideaalin happamuuden. Työn tavoitteessa onnistuttiin, kun lisäysmäärät saatiin puolitettua ja tämä helpotti käytännön työskentelyä määrittäysten parissa.

DS Matrix -ohjelmiston simulaatio-ohjelmassa pystyi harjoittelemaan ajon aloittamista

kuvitteellisilla näytteillä ja työvaiheita ennen sitä. Robottiin liittyen onnistuttiin päivittämään ajon aloittamisen aikaisempia työohjeita yksityiskohtaisemmiksi ja robotin hyödyntäminen tulee helpottumaan sen myötä. Lisäksi opinnäytetyössä tehtiin työohjeet koskien uuden ohjelman luomista, jotta robottia voidaan käyttää myös muihin määrityksiin. Tulevaisuudessa laitteen kanssa täytyy vielä suorittaa rinnakkaisajoja käsin tehtäville näytteille, jotta sen luotettavuus menetelmässä voidaan todentaa.

## LÄHTEET

Andersen, V. (2023). *Food safety management: A practical guide for the Food Industry*.

Academic Press. [https://www.google.fi/books/edition/Food\\_Safety\\_Management/3TpwEAAAQBAJ?hl=en&gbpv=1&dq=Food+Safety+management+chapter+5+stella&pg=PA64&printsec=frontcover](https://www.google.fi/books/edition/Food_Safety_Management/3TpwEAAAQBAJ?hl=en&gbpv=1&dq=Food+Safety+management+chapter+5+stella&pg=PA64&printsec=frontcover)

Crowther, J. (2009). *The ELISA Guidebook*. (2. Painos). Humana Press.

Csonka, P. (2018). *Aikuisten ruoka-allergia*. [https://www.allergia.fi/site/assets/files/28002/aikuisten\\_ruoka\\_allergia.pdf](https://www.allergia.fi/site/assets/files/28002/aikuisten_ruoka_allergia.pdf)

Dynex Technologies. (i.a.). *DS2 Automated ELISA System. Operator's Manual*.

Elintarvikelaki 297/2021. [https://www.finlex.fi/fi/lainsaadanto/2021/297#chp\\_3\\_sec\\_25\\_heading](https://www.finlex.fi/fi/lainsaadanto/2021/297#chp_3_sec_25_heading)

Elintarviketietoasetus 2011/1169/EU. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus elintarviketietojen antamisesta kuluttajille. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>

Eurofins. (2019). *Allergeenitestausta*. [https://cdnmedia.eurofins.com/european-east/media/2850271/eurofins- uutiskirje\\_toukokuu-2019.pdf](https://cdnmedia.eurofins.com/european-east/media/2850271/eurofins- uutiskirje_toukokuu-2019.pdf)

Hakkinen, M. (2019). *Mittausepävarmuuden laskeminen: ISO 19036 mukaisesti. Esi-merkki: Campylobacter*. [https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/koulutukset/labran-koulutukset/mittausepavarmuus\\_mhakkinen.pdf](https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/koulutukset/labran-koulutukset/mittausepavarmuus_mhakkinen.pdf)

Hiltunen, E., Linko, L., Hemminki, S., Hägg, M., Järvenpää, E., Saarinen P., Simonen S., & Kärhä, P. (2011). *Laadukkaan mittaamisen perusteet*. Luettu 20.5.2025. <https://sarjaweb.vtt.fi/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>

Hägg, M. (2016). *Validoinnin suunnittelun opas*. <https://kemianseurat.fi/finntesting/wp-content/uploads/2019/10/Validoinnin-suunnittelun-opas-2016.pdf>

Kemianseurat.fi. (i.a.). *Analyysimenetelmien validointi*. <https://kemianseurat.fi/finntesting/analyysimenetelmien-validointi/>

Ruokavirasto. (2023). *Allergioita ja intoleransseja aiheuttavat aineet*. <https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/elintarvikeala/ainesosat-ja-sisalto/allergeenit/>

Siragakis, G. (2014). Food allergens testing: molecular, immunochemical, and chromatographic techniques. Wiley.

THL (2023). *Ruoka-allergiat*. <https://thl.fi/aiheet/kansantaudit/astma-ja-allergiat/ruoka-allergiat>

## **LIITTEET**

**Liite 1. Työohje ajon aloitukseen ELISA-robotilla.**

**Liite 2. Työohje uuden ohjelman luomiseen ELISA-robotilla.**

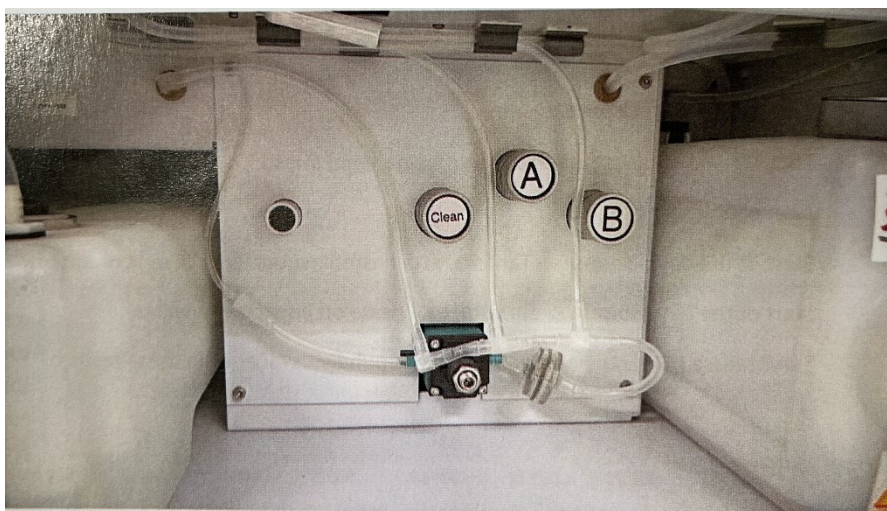
## Liite 1. Työohje ajon aloitukseen ELISA-robotilla.

### Dynex DS2 automaatin käyttö

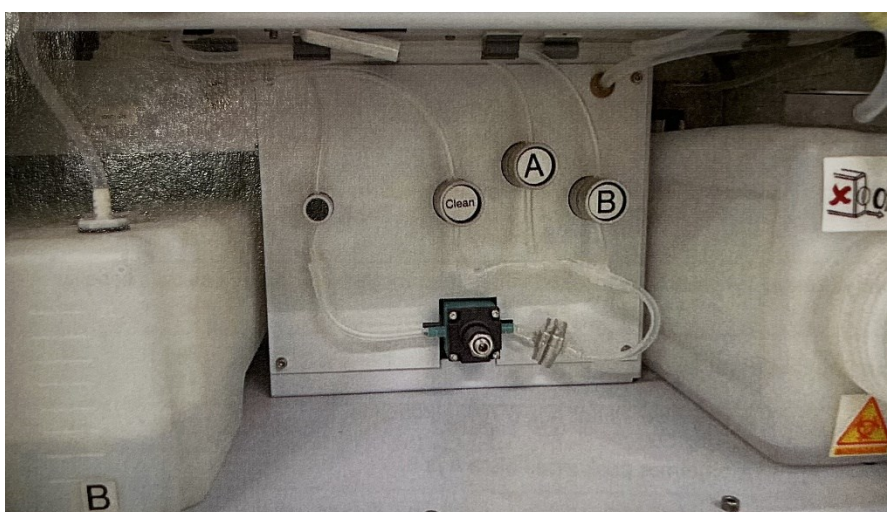
### Ajon käynnistäminen

#### Ennen ajoa:

- Käynnistä ensin DS2 laite, sitten tietokoneelta DS Matrix -ohjelma. Ohjelma täytyy toistaiseksi avata järjestelmävalvojana (hiiren oik.)
- Tarkista, että nesteletkut kiinnitetty. Jos irti, kiinnitä ne paikalleen. Kuvat 1 ja 2.



Kuva 6. Nesteletkut irti.



Kuva 7. Nesteletkut kiinni.

- Tarkista pesupään toiminta: ensin Start of the day dispense ja sen jälkeen Start of the day aspirate -ohjelmilla
  - o Avaa File/Worklist Editor, valitse New Sample batch
  - o Nimeä näytesarja ja näyte, näytemäärä 1
  - o Nimeä vas. ylänurkka vihreä pallura esim. 1 -> Done
  - o Valitse ohjelma ja käynnistä ajo
  - o Aseta tarvikkeet laitteeseen softan ohjeiden mukaisesti
    - aseta 1 sormiputki, jossa tislattua vettä
    - aseta testi pesulevy, kauralle oma
  - o Ajon päätyttyä:
    - Start of the day dispense -> tarkista, että nestetilavuudet levyllä ovat oikeat
    - Start of the aspirate -> tarkista, että neste on poistettu kaivoista
  - o Tarvittaessa puhdista pesupään suuttimet puhdistusvaijerilla ja toista testiajo.

### Ajon aloitus:

- Avaa File/Worklist Editor ja valitse New sample batch (uusi näytesarja).
- Nimeä näytesarja ja anna näytteiden lukumäärä. Valitse näytetietojen syöttö käsin tai viivakoodeista. -> klikkaa Assign hyväksyäksesi valinnat -> Next
- Valitse luettelosta mittausohjelma "kaurajäämä" näytteiden lukumäärän mukaan (Add Assay).
- Käynnistä painamalla Accept-kuvaketta. Viiveajan voi ohittaa Skip-painikkeella ja siirtyä heti reagenssien ja tarvikkeiden lisäämiseen.
- Aseta reagenssit ja tarvikkeet laitteeseen softan ohjeiden mukaisesti.
  - o ota DIL 25 ml putkeen
  - o stop liuos 15 ml putkeen, myös subst ja conj.
  - o Lisää standardit isommasta luvusta pienempään (20 ppm=5.S, 12=4.S jne)
  - o Standardi 1 (viimeinen) = pipetoi dilution bufferista pieneen standardiputkeen sama määrä kuin muissa standardeissa
- Varmista, ettei liuosten pinnalla ole nestekuplia tai vaahtoa
- lisää siniset kärjet (kansi ja pohja pois), (paina kärkilaatikko kunnolla paikalleen)
- lisää pitkiä kärkiä, määrä näkyy ohjelman ruudulla.

Ajo alkaa automaattisesti, kun viimeinen tarvike on lisätty.

### Tulokset:

- Report-painike avaa viimeisimmän ajon tulokset.
- View all reports -painikkeella pääsee katsomaan vanhempia mittaustuloksia. Tai kaksoisklikkaamalla mittauksen nimeä luettelossa.

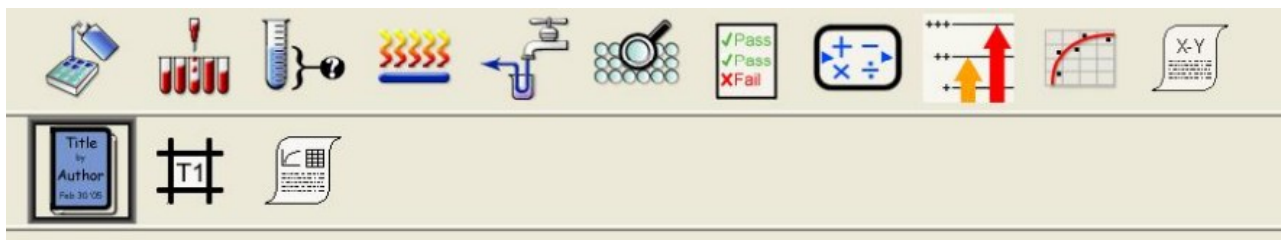
## Liite 2. Työohje uuden ohjelman luomiseen ELISA-robotilla.

### Uuden ohjelman luominen DS Matrix-ohjelmistolla:

#### File -> Assay Editor

Jokaisessa ohjelmassa täytyy olla valittuna ainakin Title by author, Template ja Report Layout -välilehdet.

Nimeä ohjelma **Title by author** -sivulla. Jos haluat, että ajo pyytää joka kerta kitin LOT-tietoja, valitse "Request kit lot data at run time".



Kuva 8. Assay Editor välilehdet.



#### Template -välilehdellä:

Clear all tyhjätäkseen kaikki -> valitse Replicates -kohdasta esim. standardi, ja klikkaile tai vedä sillä haluamasi kaivot. Muuttamalla Replicates number, saat vaihdettua esim. 2x S2 jne. Kun valmis -> validate



#### Dispense -välilehdellä:

Käytetään, kun yhtä liuosta, esim. substraattia lisätään samalla volyymilla kaikkiin levyn kaivoihin.

Valitse kaivot klikkailemalla, vetämällä tai select all buttons. Valittuihin kaivoihin tulee keltainen check merkki.

Valitse haluamasi liuos Fluid-vetovalikosta. Täällä voit myös lisätä uuden nesteen valikkoon. Määritä lisättävän liuoksen määrä (Volume).



#### Pipette -välilehdellä:

Klikkaa kaivoja, joihin laimennettu näyte, kontrolli tai standardi pipetoidaan.

Klikkaa kerran, kaivon ympärille ilmestyy punainen ympyrä, mikä osoittaa, että laimennus tapahtuu syväkaivonauhasta (deep-well-strips).

Jos napsautat kahdesti, ilmestyy vihreä ympyrä, joka osoittaa, että laimennus tapahtuu suoraan levyllä olevassa kaivossa.

Toista tämä jokaiselle lisättävälle kontrollille, standardille tai testinäytteelle, joka tulee laimentaa.

#### Napsauta "Definition"-välilehteä:

Valitse käytettävä laimennusaine avattavasta valikosta.

Syötä pipetoitava väkevän (laimentamattoman) kontrollin, standardin tai näytteen tilavuus syväkaivonauhaan tai levyn kaivoon.

Valitse laimennussuhde tai absoluuttinen tilavuus.

Syötä tavoitetilavuus, eli määrä laimennettua näytettä, joka lopulta pipetoidaan levyn kaivoon, kun laimennus tehdään syväkaivonauhassa.

Kaikki tilavuudet ilmoitetaan mikrolitroina ( $\mu\text{l}$ ).



#### Well Fill Verify -välilehdellä:

Käytetään seuraamaan OD:n avulla nesteiden tarkkaa pipetointia tiettyihin kaivoihin.

Valitse ja raahaa **well fill verify** -ikoni, joka on tilavuudellinen kysymysmerkillä merkitty koeputki, lisätäksesi sen testisekvenssiin.

Valitse kaivot **well fill verify** -toiminnolle klikkaamalla haluttuja kaivoja. Keltainen valintamerkki ilmestyy näkyviin.

Valitse testi- ja referenssiabsorptioaallonpituudet, joilla levy luetaan. Yleensä yksi aallonpituus riittää.

Valitse **Enable**-valintaruutu **OD test** -toiminnolle. Kunkin valitun kaivon absorbanssin odotetaan olevan määritellyllä OD-alueella.

Valitse **high**-valintanappi, syötä korkein hyväksyttävä OD jokaiselle kaivolle ja syötä alin OD-

raja. Tai jätä korkein arvo tyhjäksi ja syötä vain alin hyväksyttävä OD-arvo kaivoille.  
Valitse **Increment**, jos edellisen **well fill verification** -testin tulokset tulisi vähentää aktiivisesta sarjasta ennen testin suorittamista.

Tai valitse **median test**, jos haluat käyttää mediaanitestiä.

Jos **blanking on A1** on käytössä, kaivon A1 OD-arvo vähennetään kaikista muista testikaivoista ennen kuin tarkistus hyväksytään tai hylätään.

Lisää ravistus ennen tarkistusta tarvittaessa, jotta varmistetaan, etteivät kuplat häiritse raportoitua OD-arvoa.



#### **Incubate -välilehdellä:**

Valitaan lämpötila.

Aseta lyhyin ja pisin haudutukseen sallittu kesto.

Aseta lämpötila.

Aseta aika sekunneissa. Oletusasetus inkuboinnin aikaiselle ravistukselle on pois päältä.

Aseta nopeus, Low, medium tai High.



#### **Wash -välilehdellä:**

Aseta pesusyklien määrä. Voi olla välillä 1–9.

Valitse pesu by Strip tai koko Plate.

**by strip:** kaikki syklit ovat valmiit ennen kuin etenee seuraavaan.

**by plate:** jokainen sykli on valmis kaikissa stripeissä levyllä ennen kuin seuraava sykli alkaa. Pesuri aspiroi/dispensoi ensimmäisen stripin, siirtyy seuraavaan, sitten odottaa 5 sek ennen kuin aloittaa seuraavan syklin.

**Constant timing** voidaan asettaa, jos kaikkien liotusaikojen halutaan pysyvän samoina riippumatta siitä, kuinka monta riviä (näytettä) käsitellään tietyssä päivänä.

**Final aspirate** -toimintoa käytetään kaivojen tyhjentämiseen ennen seuraavan toimenpiteen suorittamista.

**Sweep mode** määritellään, jos halutaan suorittaa ylimääräinen aspiraatio kaivojen tyhjentämiseksi pesupuskurin pisaroista mahdollisimman täydellisesti ennen seuraavaa toimenpidettä.

Vaihtoehdot ovat:

**None** – normaali aspiraatio toteutuu.

**Sweep** – Normaali aspiraatio tapahtuu, sitten pesupäät liikkuvat kerran kaivon poikki oikealta vasemmalle liikkeessä poistaakseen pesupuskurin, joka on voinut jäädä kaivon reunoihin.

**Sweep on last cycle only** – Lakaisu tapahtuu vain viimeisellä ohjelmoidulla syklillä.

**Super sweep** – Normaali aspiraatio tapahtuu, sitten pesupäät liikkuvat kaivon poikki x-kuviollisessa aspiraatiassa.

**Super sweep on last cycle only** – Super sweep tapahtuu vain viimeisessä ohjelmoidussa syklissä.

Aseta puhdistus volyyymi ja käytettävä pesuliuos. Puhdistus ottaa pesuliuoksen joko A tai B astiasta ja täyttää pesupään. Puhdistus estää sitä, että ensimmäisiin kaivoihin annosteltaisiin vain ilmaa tai kuplia.

Aseta puhdistusnesteen tilavuus (clean volume). Käyttää vettä pienestä pesupullosta.

Aseta liotusaika (Soak time) sekunneissa lyhyeksi inkuboinniksi pesupuskuriin.

**"Synchronize soak delay from transfer timings"** -valintaruutu voidaan valita OD-arvon (optisen tiheyden) vaihtelun minimoimiseksi levyllä, mikä voi johtua epätäydellisestä inkuboinnista.

**DS2** synkronoi sarakkeiden liotusajat viivästetysti sen perusteella, kuinka kauan näytteiden siirto mikroitiitterilevyllä kestää.

Toisin sanoen, pipetointiin voi kulua 15 minuuttia, mutta levyn pesu voi viedä vain 3 minuuttia.

Testissä täytyy olla pipetointivaihe ennen pesutoimenpidettä.

**Synchronize** toimii vain nauhakohtaisessa pesutilassa.

Syötä annostelutilavuus nuolinäppäimillä (ylös ja alas).

Valitse **wash buffer**. Voit myös lisätä, poistaa tai kopioida.

Käytä **bottom wash** -toimintoa, jos lisäpesu on tarpeen.

Tarkista aspirate, jos kaivot tarvitsevat vain tyhjentää nesteestä, ei pestä.



### Read -välilehdellä:

Valitse lukusuodin (reading filter) ja referenssisuodin (jos käytössä on kaksiaallonpituustila). Aseta sekoitusaika, 0–99 sekuntia, joka tapahtuu välittömästi ennen mittauksia. Poistaa ilmakuplat ja tasoittaa nestepinnan.



### Quality control -välilehdellä:

Kaksoisklikkaa haluttua **Function**-kohtaa lisätäksesi sen yhtälöön. Funktiot ovat elementtejä, joita käytetään yhtälöiden muodostamiseen.

Kirjoita halutessasi virheilmoitus (**Fail message**). Tämä viesti näkyy raportissa osoittamassa, että yhtälön kriteerit eivät täyty. Kaikkien yhtälöiden täytyy joko hyväksyä tai hylätä näyte. Kun käytetään useita yhtälöitä, jotkut eivät voi olla hylkäyksiä ja jotkut hyväksyntöjä, niiden on oltava samoja.

Klikkaa **Add**-painiketta.

Klikkaa **Clear** nollataksesi **Equation**- ja **Fail**-kentät lisätäksesi uusia yhtälöitä.

Klikkaa **Change** tai **Remove** vaihtaaksesi tai poistaaksesi jo lisättyjä yhtälöitä.

Laatukontrolliraportin (QC Report) käsittelyvaihtoehtoihin kuuluu oletuksena kaikkien laadunvalvontahylkäysten raportointi; muut tulokset voidaan poistaa näkyvistä, mikä voi olla tärkeää, jos data viedään automaattisesti Matrixista muihin tiedostoihin.

Valitse asetukset positiivisille/negatiivisille tuloksille, käyrän sovitukselle, automaattiselle poikkeavien arvojen poistolle, jos ne eivät ole harmaana.



### Ratio -välilehdellä:

Kaksoisklikkaa **Functions**, joka lisää ne yhtälöön.

Syötä yksiköt, joissa tiedot raportoidaan, esimerkiksi "mg/dL".

Klikkaa **results flagging** -välilehteä määrittääksesi lauseen, joka joko korvaa numeerisen tuloksen tai näytetään tuloksen vieressä. Lause aktivoituu aina, kun numeerinen tulos täyttää ohjelmoitujen ehdot.

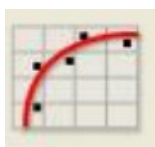
Ehto on tuloksen merkitsemiselle tarkoitettu lauseke. Jos numeerisen tuloksen sijaan halutaan raportoida lause, se voidaan kirjoittaa tuloskenttään.



### Threshold -välilehdellä:

Syötä absoluuttiset OD-arvot tai arvot, jotka on saatu esimerkiksi käyrän sovitus -laskennasta positiivisille ja negatiivisille rajatasoille. Kaksoisklikkaa toimintoa **functions**-listalaatikossa lisätäksesi tämän funktion. Voit käyttää aritmeettisiä operaattoreita.

Muuta **Label**-sarakeessa tunnisteet haluamaksesi sanoiksi tai muiksi tunnisteiksi, jotka halutaan raportoida.



### Curve fit -välilehdellä:

**Fit type** -välilehdellä valitaan käyrätyyppi.

**Graph** -välilehdellä Matrix käyttää Automaattista skaalausta, jos skaalausta ei säädä manuaalisesti. Jos haluaa säätää manuaalisesti, täytyy asettaa min ja max numerot.

**Minimum**-kenttään voi kirjoittaa pienimmän arvon joko konsentraatio- tai OD-akselille.

**Maximum**-kenttään voi syöttää suuremman OD- tai standardikonsentraation.

**Tick Marks** jakavat akselin tasaisesti minimija maksimiarvojen välille.



### Report -välilehdellä:

Raportin asettelu: Oletuksena kaikki vasemman sarakkeen tiedot sisältyvät lopulliseen raporttiin. Poistaaksesi ei-toivotut tiedot, korosta rivi ja klikkaa **remove function** -painiketta.

Raporttimuoto: Valitse formaattityyppi (raakadata, suhde, kynnysarvo tai käyrän sovitus).

Data raportoidaan valitun vaihtoehdon mukaisesti testissä ohjelmoidusti.

Valitse **Create Matrix** saadaksesi tulokset 8x12-taulukkomuodossa.

Valitse **Table options** (jos **Create Table** on myös valittu) määrittääksesi mukaan otettavat parametrit: näytteen tunniste, kaivon sijainti, toistojen arvot jne.

Valitse molemmat vaihtoehdot, jos haluat parametrien sisältyvän molempiin formaatteihin.

Klikkaa valintaruutu **numeric options** -kohdassa keskiarvon laskemiseksi toistoille tarvittaessa.

Valitse tulosten järjestys näytetyypeille, jotka on määritelty mikrotiitterilevyn mallissa, klikkaamalla parametria. Poistaaksesi parametrin, yliviivaa se ja klikkaa poista painiketta.

**Header footer:** Valitse tiedoston otsikko- ja alatunnistevaihtoehdot, jotka haluat lisätä kunkin raporttisivun ylä- ja/tai alareunaan.

**Output to file:** Jos haluat viedä raportin tietoihin muuhun ohjelmistoon, kuten ulkoisiin taulukkolaskentaohjelmiin, rastita **enable**-ruutu. Valitse tiedostomuoto, johon tiedot viedään. Data viedään automaattisesti CSV-tiedostona.