

Kia Bertula

Salaatti- ja tupakkanäytteiden  
homogenisointimenetelmien vertailu DNA-puhdistukseen  
magneettipartikkeliprosessorilla

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Kia Bertula Salaatti- ja tupakkanäytteiden homogenisointimenetelmien vertailu DNA-puhdistukseen magneettipartikkeliprosessorilla 78 sivua + 5 liitettä 4.6.2012
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaajat	Filosofian tohtori Marika Suomalainen Filosofian maisteri Sini Suomalainen Filosofian tohtori Annika Järviluoma
<p>Magneettipartikkelitekniikkaan perustuvat magneettipartikkeliprosessorit on kehitetty erilaisten molekyylien kuten nukleinihappojen puhdistuksen automatisointiin. Magneettipartikkeliprosessorit eristävät korkeasaantoista, puhdasta ja laadukasta DNA:ta ja RNA:ta erilaisista näytemateriaaleista.</p> <p>Työn tavoitteena oli vertailla erilaisia menetelmiä salaatti- ja tupakkanäytteiden homogenisointiin DNA:n eristämiseen magneettipartikkeliprosessorilla. Homogenisointimenetelmiksi valittiin mortteli ja survin, Talboys-kuulamyly, Pellet Pestle -mikrosentrifugiputkisekoittaja, Ulta-Turrax-koeputkisekoittaja ja Ribolyser-homogenisaattori. Lisäksi homogenisointimenetelmillä testattiin neljää erilaista homogenisointiolosuhdetta: näytteen homogenisointia sellaisenaan, homogenisointia lyysipuskurissa, homogenisointia nestetyypessä jäädytettynä ja kahden viimeiseksi mainitun yhdistelmätekniikkaa.</p> <p>Eristetyn DNA:n määrää, puhtautta ja laatua arvioitiin absorbanssimittauksilla, agaroselektroforeesilla ja PCR:llä.</p> <p>Tuloksien perusteella korkeasaantoisimmat, puhtaimmat, laadukkaimmat ja toistettavimmat lopputuotteet saatiin eristettyä morttelilla, Ribolyser-homogenisaattorilla ja Talboys-kuulamylyllä. Homogenisointiolosuhteista parhaimmaksi osoittautui tuloksien perusteella näytteen homogenisointi lyysipuskurissa. Talboys-kuulamylyn todettiin olevan työssä käytetyistä homogenisointimenetelmistä ainoa varteen otettava vaihtoehto, jos halutaan homogenisoida paljon näytteitä samanaikaisesti. Morttelin taas todettiin olevan erityisen hyvä vaihtoehto, jos näytteitä on lukumäärällisesti vähän tai ne voidaan homogenisoida yhdessä.</p> <p>Työssä saatiin laaja kuva erilaisten homogenisointimenetelmien ja -olosuhteiden ominaisuuksista ja käytettävyyksistä salaatti- ja tupakkanäytteille. Työn avulla pystytään suositteluun ja neuvomaan asiakkaita löytämään juuri heidän tarkoituksiinsa sopiva homogenisointimenetelmä kasvinäytteille, jota aikaisemmin ei ole pystytty tekemään.</p>	
Avainsanat	kasvi-DNA, DNA-puhdistus, homogenisointi, KingFisher, magneettipartikkeliprosessori, magneettipartikkelitekniikka

Author	Kia Bertula
Title	Comparison of lettuce and tobacco homogenization methods for DNA purification with a magnetic particle processor
Number of Pages	78 pages + 5 appendices
Date	4 June 2012
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructors	Marika Suomalainen, Doctor of Philosophy Sini Suomalainen, Master of Philosophy Annika Järviluoma, Doctor of Philosophy
<p>Magnetic bead based magnetic particle processors have been developed to automate to purify various molecules such as nucleic acid. Magnetic particle processors isolate high-yield, purity and high-quality DNA and RNA from various sample materials.</p> <p>The aim of this thesis project was to compare different methods of homogenizing lettuce and tobacco for DNA purification with a magnetic particle processor. The homogenization methods selected for this project were a mortar and pestle, a Talboys ball mill, a Pellet Pestle microcentrifuge tube mixer, an Ulta-Turrax test tube mixer and a Ribolyser homogenizer. In addition, four different types of circumstances of homogenization were tested: homogenization, homogenization with a lysis buffer, homogenization with liquid nitrogen and homogenization with a lysis buffer and liquid nitrogen.</p> <p>The amount, purity and quality of isolated DNA were evaluated by measurement of absorbance and by agarose gel electroforesis and PCR.</p> <p>The results of this project showed that the highest yield, the purest, highest quality and the most reproducible results were provided by the mortar and pestle, the Ribolyser homogenizer and the Talboys ball mill. According to the results, homogenization with a lysis buffer was an optimal circumstance for DNA isolating from lettuce and tobacco. The Talboys ball mill was found to be the only viable option to homogenize several samples simultaneously. Where as the mortar and pestle were found to be an extremely viable homogenization option for few samples or samples which can be homogenized together.</p> <p>Project provided a wide insight into the properties and usability of different homogenization methods and circumstances for lettuce and tobacco samples. On the basis of the results of the project, recommendations can be made and advice can be provided to help clients find the suitable homogenization method for their purpose, which previously has not been possible.</p>	
Keywords	plant DNA, DNA purification, DNA isolating, homogenization, KingFisher, magnetic particle processor , magnetic particle-based technique

# SISÄLLYS

Tiivistelmä

Abstract

<b>1 Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>KIRJALLISUUSOSA</b>	<b>3</b>
<b>2 Nukleiinihappojen eristys biologisesta näytemateriaalista</b>	<b>3</b>
2.1 Nukleiinihappojen eristämisen periaate	3
2.2 Nukleiinihappojen eristäminen kasvinäytteistä	5
2.3 Perinteiset nukleiinihappojen puhdistusmenetelmät	7
2.3.1 Fenoli-kloroformiuutto	7
2.3.2 Ioninvaihtokromatografia	8
<b>3 Magneettipartikkelitekniikka nukleiinihappojen puhdistamisessa</b>	<b>10</b>
3.1 Magneettipartikkelitekniikan periaate	10
3.2 Magneettipartikkeleiden rakenne ja niiden toiminta	12
3.3 Automatisoidut magneettipartikkeliprosessorit	14
<b>4 KingFisher-magneettipartikkeliprosessorit</b>	<b>14</b>
4.1 KingFisher-magneettipartikkeliprosessorit	14
4.2 KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorin esittely	16
4.2.1 KingFisher-magneettipartikkelit	16
4.2.2 Laitteen ominaisuudet ja toiminnan periaate	17
4.2.3 Prosessorin ohjaaminen	21
4.3 KingFisher-reagenssit	22

<b>KOKEELLINEN OSA</b>	<b>23</b>
<b>5 Työn tarkoitus</b>	<b>23</b>
5.1 Tausta	23
5.2 Tavoitteet	23
5.3 Työn kulku	24
<b>6 Materiaalit ja menetelmät</b>	<b>26</b>
6.1 Näytteet	26
6.2 Näytteiden homogenisointi ja lyysaus	26
6.2.1 Homogenisoinnin toteutus ja työvaiheet	26
6.2.2 Nestetyppi	28
6.2.3 Talboys High Throughput Homogenizer –kuulamyly	29
6.2.4 RiboLyser-homogenisaattori	31
6.2.5 Ultra-Turrax-koeputkisekoittaja	32
6.2.6 Pellet Pestle –mikrosentrifugiputkisekoittaja	34
6.2.7 Mortteli ja survin	35
<b>6.3 Nukleiinihappojen eristäminen KingFisher Duo - magneettipartikkeliprosessorilla</b>	<b>35</b>
6.4 Analyysimenetelmät	37
6.4.1 Absorbanssimittaus	37
6.4.2 Agaroosigeelielektroforeesi	39
6.4.3 PCR	40
6.4.4 Agilent Bioanalyzer -Lab-on-a-chip mikronestesiru	41
6.4.5 Tilastolliset laskut	43
<b>7 Tulokset ja tulosten tarkastelu</b>	<b>45</b>
7.1 Eri homogenisointimenetelmien ominaisuudet ja käytettävyys	45
7.2 DNA-saannot ja saantojen luottamusvälien tarkastelu	49
7.3 DNA:n puhtaus	56
7.3.1 A260/A280-arvot	56
7.3.2 DNA-spektrit	58

7.4	DNA:n laadun ja määrän tarkastelu agarosigeelielektroforeesilla	60
7.5	DNA:n laadun ja puhtauden tarkistus PCR:llä ja mikronestesirulla	63
7.6	Eri homogenisointiolosuhteiden vaikutus lopputuotteeseen	65
<b>8</b>	<b>Pohdinta</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>Yhteenveto</b>	<b>72</b>
	<b>Lähteet</b>	<b>75</b>
	<b>Liitteet</b>	
	Liite 1. TBE-puskurin koostumus	
	Liite 2. Salaatti- ja tupakkanäytteiden DNA-saannot	
	Liite 3. Salaatti- ja tupakkanäytteiden A260/A280-arvot	
	Liite 4. Salaattinäytteiden spektrit	
	Liite 5. Tupakkanäytteiden spektrit	

## Käsitteet

Estimaatti	Tilastollisin perustein määritetty tuntemattoman parametrin.
Homogenisointi	Aineen tai aineiden saattaminen homogeeniseen muotoon.
Homogeeninen	Homogeenisessa seoksessa ei ole nähtävissä seoksen eri komponentteja, vaan seos on tasalaatuinen.
Heterogeeninen	Heterogeenisessä seoksessa näkyy seoksen eri komponentteja, eikä seos ole tasalaatuinen.
Inaktivoida	Tehdä tehottomaksi tai vaikutuksettomaksi.
Inhibiittori	Aine, joka hidastaa kemiallisia reaktioita estämällä entsyymien toiminnan joko osittain tai kokonaan.
<i>In vitro</i>	Tutkimustekniikka, jossa koe suoritetaan elävän organismin tai solun ulkopuolella.
<i>In vivo</i>	Tutkimustekniikka, jossa koe suoritetaan elävän organismin tai solun sisällä.
Kaotrooppinen suola	Suola, joka denaturoi makromolekyylejä, kuten proteiineja.
Lyofilisoitu	Kylmäkuivattu.
Lysaatti	Muodostuu hajotettujen solukalvojen ja -seinien palasista sekä muista solun hajooneista komponenteista ja organelleista.
Lyysipuskuri	Puskuriliuos, joka on suunniteltu hajottamaan tai helpottamaan solujen hajotusta eli lyysausta.
Lyysaus	Solujen hajotus, jossa solujen solukalvot ja -seinät hajoavat
PCR	Polymerase Chain Reaction on menetelmä, jossa monistetaan haluttu geeni tai DNA-fragmentti.
Sekvensointi	Menetelmä, jossa selvitetään DNA:n nukleotidijärjestys.

## 1 Johdanto

Korkealaatuisen DNA:n eristäminen on tärkeä vaihe molekyylibiologiassa. Eristettyä DNA:ta käytetään useissa eri sovelluksissa kuten geenien sekvensoimisessa ja tunnistuksessa, jolla pystytään diagnosoimaan sairauksia ja tauteja, muuntogeenisten organismien jalostuksessa sekä lähtömateriaalina erilaisissa tutkimuksissa.

Magneettipartikkelitekniikkaan perustuvat magneettipartikkeliprosessorit on kehitetty erilaisten molekyylien kuten nukleiinihappojen puhdistuksen automatisoimiseksi, sillä perinteiset eristysmenetelmät ovat aikaa vieviä ja työläitä. Magneettipartikkeliprosessorien avulla voidaan eristää korkeasaantoista, puhdasta ja laadukasta DNA:ta ja RNA:ta erilaisista näytemateriaaleista. Magneettipartikkeliprosessorit mahdollistavat DNA:n eristyksen tietyistä näytemateriaaleista kuten verestä suoraan ilman näytteen esikäsittelyä. Haastavimmat näytemateriaalit kuten kasvinäytteet vaativat kuitenkin esikäsittelyn, ennen kuin DNA:n eristäminen näytteestä on magneettipartikkeliprosessoreilla mahdollista. Kasvinäytteet homogenisoidaan tasaiseksi massaksi, jossa ei ole erotettavissa erillisiä komponentteja. Tällöin näytteen solut ovat helpommin hajotettavissa, jolloin DNA saadaan ulos näytteen soluista ja pystytään puhdistamaan muista solukomponenteista. Lisäksi homogenisointi mahdollistaa tasaisemman lopputuloksen ja helpottaa näytteen käsittelemistä.

Insinöörityössä perehdyttiin kasvinäytteiden esikäsittelyyn ennen DNA:n eristystä KingFisher-magneettipartikkeliprosessorilla. Työ tehtiin Thermo Fisher Scientificin KingFisher-tuotekehitykselle. Työn tarkoituksena oli vertailla erilaisia homogenisointimenetelmiä salaatti- ja tupakkanäytteillä DNA:n eristämiseen KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorilla. Erilaisiksi homogenisointimenetelmiksi valittiin menetelmiä, jotka toimivat erilaisilla tekniikoilla kuten teräskuulat, keraamiset partikkelit, teräleikkuri ja survin. Lisäksi erilaisilla homogenisointimenetelmillä testattiin neljää erilaista homogenisointiolosuhdetta, näytteen homogenisointia: sellaisenaan, lyysispuskurissa, nestetyypessä jäädytettynä ja lyysispuskurin ja nestetyypen yhdistelmätekniikalla.



Tarkoituksena oli selvittää tutkittaville näytteille sopivat homogenisointimenetelmät ja niille optimaaliset olosuhteet, jotka mahdollistavat korkeasaantoiset, puhtaat ja laadukkaat DNA-tuotteet. KingFisher-tuotekehityksessä ei ole aikaisemmin testattu erilaisia homogenisointimenetelmiä, joten työ on tärkeä sekä tuotekehitykselle että markkinoinnille. Työn tavoitteena oli saada laaja käsitys erilaisista homogenisointimenetelmistä, jotta asiakkaille pystytään suosittelemaan ja auttamaan heitä löytämään juuri heidän tarkoituksiinsa sopiva homogenisointimenetelmä. Tästä syystä projektissa kiinnitettiin erityistä huomiota homogenisointimenetelmien käytännöllisyyteen, käytettävyyteen ja ominaisuuksiin.

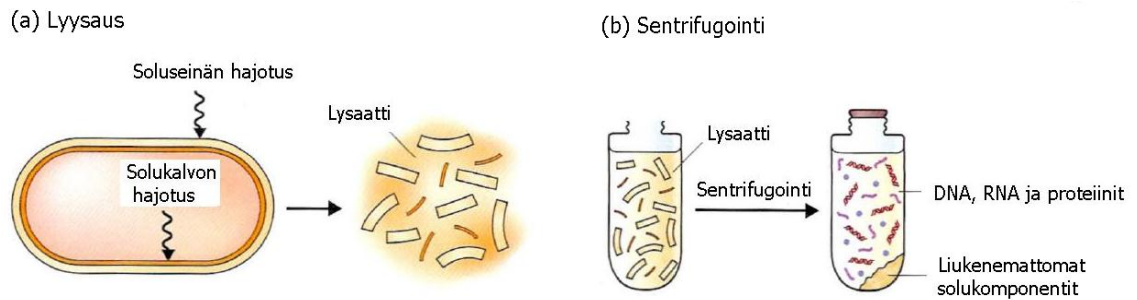
## KIRJALLISUUSOSA

### 2 Nukleiinihappojen eristys biologisesta näyttemateriaalista

#### 2.1 Nukleiinihappojen eristämisen periaate

Korkealaatuisten nukleiinihappojen eristäminen on tärkeä vaihe molekyylibiologiassa. Nukleiinihappojen eristäminen erilaisista soluista on välttämätöntä useille biokemiallisille ja diagnostisille prosesseille ja analyyseille (Berensmeier 2006: 496; Suominen & Ollikka 2003: 61). Puhtaita nukleiinihappoja tarvitaan moniin sovelluksiin kuten kloonaukseen, sekvensointiin ja geenien tunnistamiseen. Eristetystä DNA:sta on tullut tärkeä näyttemateriaali rikosteknisessä tutkimuksessa, genetiikassa ja molekyylibiologisessa diagnostiikassa. (Berensmeier 2006: 496) RNA:ta voidaan käyttää esimerkiksi geenien ilmentymisen tutkimiseen, jolla pyritään selvittämään geenien vaikutuksia sairauksiin (Dolter & Bramar 2001; Schadt 2005). Eristyksen puhtaudella ja laadulla on merkitystä, koska proteiinit, hiilihydraatit, vapaat nukleotidit ja muut epäpuhtaudet häiritsevät eristämisen jälkeisiä reaktioita ja analyysejä. (Berensmeier 2006: 496; Dale & von Schantz 2002: 36; Hawkins et al. 1994: 4543-4544.)

Vaikka erilaisia eristysmenetelmiä on useita erilaisia, niiden periaatteet ovat hyvin lähellä toisiaan. Nukleiinihappojen eristäminen edellyttää solujen hajottamista, jotta nukleiinihappojen puhdistaminen muista solukomponenteista on mahdollista. Lähtöateriaalin solut lyysataan eli hajotetaan, jolloin solukalvot ja bakteeri- ja kasvisolujen soluseinät rikkoutuvat ja halutut nukleiinihapot saadaan vapautettua ulos solusta solua ympäröivään liuokseen (kuva 1). Lysaatti muodostuu hajotettujen kalvojen ja seinien palasista sekä muista solun hajonneista komponenteista ja organelleista. Lysaatti sentrifugoidaan, jotta voidaan erotella liukenemattomat soluseinän ja solukalvon palaset liukenevista komponenteista. Liukenemattomat osat painautuvat pelletiksi putken pohjalla, kun taas nukleiinihapot ja proteiinit jäävät kirkkaaseen liuokseen pelletin yläpuolelle. Lysaus voidaan tehdä joko fysikaalisesti, jolloin solut hajotetaan mekaanisesti, tai kemiallisesti, jolloin solut altistetaan solukalvoa ja -seinää hajottaville aineille. Lysaus voidaan tehdä myös näitä kahta eri tekniikkaa yhdistelemällä. Menetelmän valinta riippuu käytettävän näyttemateriaalin solutyypistä sekä eristettävistä molekyyleistä. (Brown 2010: 28; Dale & von Schantz 2002: 31.)



Kuva 1. Lysaatin valmistaminen. (a) Solukalvo ja bakteri- ja kasvisolujen soluseinä hajotetaan lyysauksessa. Tuotteena on lysaatti, joka koostuu hajotettujen kalvojen ja seinien osista sekä muista solun komponenteista ja organelleista. (b) Lysaatti sentrifugoidaan hajonneiden solukomponenttien poistamiseksi. Liukenemattomat komponentit kuten solukalvojen ja –seinien palaset sentrifugoituvat putken pohjalle pelletiksi, kun taas liukoiset nukleiinihapot ja proteiinit jäävät kirkkaaksi liuokseksi pelletin yläpuolelle. (Brown 2010: 28, muokattu.)

Heterogeeniset näytteet, jotka eivät ole koostumukseltaan tasaisia kuten kudokset ja kasvit, homogenisoidaan ennen lyysausta, jotta yksittäisten solujen hajottaminen on mahdollista. Homogenisoinnilla näyte tehdään homogeeniseksi seokseksi eli tasaiseksi massaksi, jossa ei ole erotettavissa erillisiä komponentteja. Homogenisoinnilla varmistetaan myös tasainen näytemateriaali, joka on välttämätöntä näytteen pipetoinnissa ja käsittelyssä sekä tasaisten lopputulosten aikaansaamiseksi. Näytteestä riippuen näytemateriaali voidaan homogenisoida ennen lyysausta ja vasta tämän jälkeen tehdä itse soluhajotus tai homogenisointi ja lyysaus voidaan tehdä samanaikaisesti.

Lyysatusta näytteestä voidaan poistaa entsyymien avulla joko RNA tai DNA, jos lysaatti sisältää ylimääräisiä ei-toivottuja nukleiinihappoja. Vaikka suurimmat liukenemattomat komponentit on saatu erotettua nukleiinihapoista sentrifugoinnilla, sisältää liuos vielä proteiineja ja muita epäpuhtauksia. Nukleiinihappojen puhtauden laatuvaatimukset riippuvat käyttötarkoituksesta. Epäpuhtaudet kuitenkin häiritsevät joitakin menetelmiä ja reaktioita kuten sekvensointia ja PCR:ää. Myöskään liuoksen konsentraatiota ei saada määritettyä yhtä tarkasti kuin puhtaan nukleiinihapon. (Dale & von Schantz 2002: 31; Suominen & Ollikka 2003: 61) Jäljelle jääneiden epäpuhtauksien poistamiseksi sentrifugoidun lysaatin supernatantilla jatketaan nukleiinihappojen puhdistus- tai eristysmenetelmään. Tämä onkin yleensä vaihe, jossa eri eristysmenetelmät eroavat toisistaan. (Brown 2010:28-29; Dale & von Schantz 2002: 31.)

Sekä DNA:n että RNA:n eristämiseen ja puhdistamiseen on useita erilaisia menetelmiä. Menetelmiä voidaan soveltaa molemmille nukleiinihapoille, mutta reagenssit ja työvaiheet saattavat vaihdella sen mukaan, kumpaa nukleiinihappoa ollaan eristämässä. Kaupallisesti on saatavilla erilaisia kittejä, jotka sisältävät tarvittavat reagenssit ja ohjeet, mutta eristämiseen on myös yleisiä ohjeita, joiden reagenssit voidaan valmistaa itse. Kaupalliset valmisteet ovat yleensä varmoja, optimoituja ja laadukkaita ja saattavat nopeuttaa prosessia, mutta myös yleensä kalliimpia kuin itse tehdyt reagenssit. (Suominen & Ollikka 2003: 64.)

## 2.2 Nukleiinihappojen eristäminen kasvinäytteistä

Kasvisolut poikkeavat sekä rakenteellisesti että genomiltaan eläinsoluista. Tuman ja mitokondrionaalisen genomien lisäksi kasvisolut sisältävät kolmannen genomien: kloroplastisen genomien. Mitokondrioiden ja kloroplastien kromosomit ovat rakenteeltaan ympyrän muotoisia, toisin kuin tuman lineaariset kromosomit. Mitokondriot ja kloroplastit sisältävät useita genomien kopioita omissa organelleissaan. Tuman genomi sisältää kuitenkin suurimman osan geneettisestä tiedosta ja on yleisin geenimanipulaation kohde. (Slater et al 2008: 1.)

Nukleiinihappojen eristäminen kasvinäytteistä on monimutkaista kasvisolujen monimuotoisen rakenteen vuoksi. Toisin kuin eläinsoluilla, kasvisoluja ympäröi vahva soluseinä. Selluloosasta, hemiselluloosasta sekä pektiinistä koostuvan solukalvoa ympäröivän seinän yksi tehtävä on tukea solua, mikä vaikeuttaa sekä kasvinäytteen homogenisointia että lyysautumista.

Nukleiinihappojen eristämistä vaikeuttavat etenkin yhteyttämistuotteet ja yhteyttämiin liittyvät molekyylit. Kasvisolut sisältävät erityisen suuren määrän hiilihydraatteja verrattuna eläin- ja bakteerisoluihin. Erityisesti polysakkarideista ja polyfenoleista koostuva hiilihydraattimäärä vaikeuttaa nukleiinihappojen eristämistä niiden vaikean puhdistettavuutensa takia. Magneettipartikelitekniikassa hiilihydraatit saattavat kulkeutua magneettipartikkeleiden mukana, joka häiritsee nukleiinihappojen puhdistamista.

Biologiset näytteet ovat haasteellisia näytemateriaaleja, sillä ne täytyy käsitellä mahdollisimman pian tai säilöä esim. pakastamalla tai upottamalla kyseiseen tarkoitukseen sopivaan puskuriliuokseen. Säilömisellä pysäytetään biologiset reaktiot näytteessä, jolloin näytemateriaali säilyy muuttumattomana ja samanlaisena. Jos kaikki näyte käsitellään saman tien tai sitä ei säilötä oikein, sitä ei voida myöhemmin käyttää. Näin ei voida tehdä myöskään toistoja, jotka ovat kaikessa tutkimuksessa välttämättömiä, jotta voitaisiin varmistaa työn onnistumisen luotettavuus sekä testien toistettavuus. Toisaalta jos näyte säilötään ensimmäisten testien jälkeen, säilömisprosessi voi vaikuttaa sen ominaisuuksiin. Tällöin näyte ei myöskään ole enää tuore.

Järkevintä toistettavuuden kannalta olisi säilöä tuore näyte ja tehdä säilötystä näytteestä jokainen toistokerta, jolloin näyte olisi jokaisessa testissä samanlainen. Se ei kuitenkaan ole mahdollista silloin, kun halutaan tutkia tuoreita näytemateriaaleja. Tällöin ainoa vaihtoehto on tehdä testit eri näytemateriaalierästä, jolloin tuloksien tarkastelussa tulee ottaa huomioon biologisen materiaalista mahdollisesti johtuva vaihtelu.

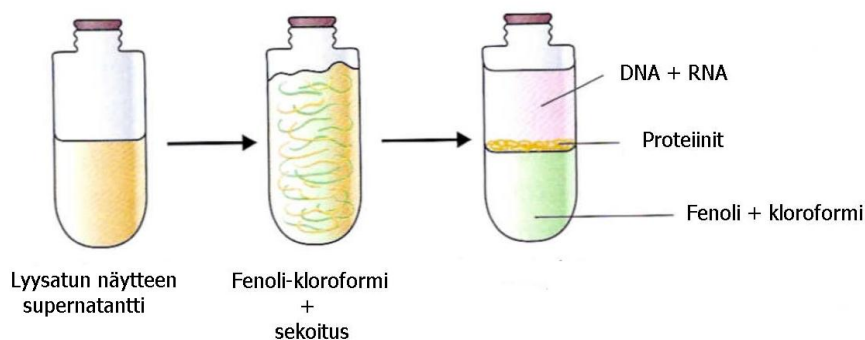
Nukleiinihappojen kohdalla on erityisen tärkeää tehdä testit mahdollisimman tuoreesta näytteestä, mikä tekee näytteiden käsittelystä haasteellista. Nukleiinihapot hajoavat herkästi jos niiden näytemateriaalia ei säilytä oikein tai säilötään väärin liian pitkiä aikoja (Micke et al. 2006: 202–211). RNA on epästabiliimpi molekyyli kuin DNA, johtuen molekyylin rakenteellisista eroista. RNA on lyhyempää kuin DNA, joten se hajoaa helpommin olosuhteiden kuten lämpötilan ja pH:n muutoksista. (Dale & von Schantz 2002: 10) Myös oikeanlainen säilytys tai säilytysolosuhteiden muuttuminen kuten pakastus-sulatusprosessi voi hajottaa nukleiinihappoja. Toisin kuin DNA, RNA hajoaa myös luonnollisesti solun sisällä RNAsien eli ribonukleaasien, solun omien RNA:ta hajottavien entsyymien toimesta. RNAseja on myös ympäristössä, ja näin ollen ne aiheuttavat suuren kontaminaatioriskin RNA-näytteille. RNAseja on mm. ihmisen iholla, ja ne ovat hyvin stabiileja entsyymejä, joita on vaikea inaktivoida. (Suominen ja Ollikainen 2003: 65.)

## 2.3 Perinteiset nukleiinihappojen puhdistusmenetelmät

### 2.3.1 Fenoli-kloroformiuutto

Solussa on lukuisia proteiineista koostuvia DNA:ta hajottavia entsyymejä sekä muita proteiineja, jotka häiritsevät jatkokäsittelyä mm. sitoutumalla DNA:han. (Dale & von Schantz 2002: 32) Fenoli-kloroformiuutossa lysatun näytteen supernatantista saostetaan proteiinit faasierottelun avulla. Siinä proteiinit saostuvat erilliseen faasiin, jolloin nukleiinihapot saadaan omaan faasiinsa, jolloin ne on helppo erottaa proteiineista. (Suominen & Ollikka 2003: 64.)

Fenoli-kloroformiuutossa lysatun näytteen supernatanttiin lisätään fenolia ja kloroformia suhteessa 1:1 tai vaihtoehtoisesti ainoastaan fenolia (kuva 2). Näiden orgaanisten liuottimien kanssa sekoituksessa kosketuksiin joutuneet proteiinit denaturoituvat, jolloin sentrifugoimalla saadaan muodostettua kaksi erillistä faasia ja proteiinit on helppo erottaa nukleiinihapoista. Sentrifugoinnin jälkeen valkoiseksi massaksi koaguloituneet proteiinit erottavat vesifaasin veteen liukenemattomasta faasista. Nukleiinihapot ovat liuenneena vesifaasissa saostuneiden proteiinien yläpuolella, kun taas fenoli ja kloroformi jäävät veteen liukenemattomina proteiinifaasin alapuolelle. Nukleiinihapot sisältävä vesifaasi siirretään pipetillä erilleen saostuneista komponenteista.



Kuva 2. Fenoli-kloroformiuutto. Lyysattuun ja sentrifugoituun näytteeseen lisätään fenoli ja kloroformi, jotka denaturoivat proteiinit, mutta eivät nukleiinihappoja. Sentrifugointi saa aikaan erilliset faasit, joissa ylimpänä ovat veteen liuenneet DNA ja RNA, keskimmäisenä koaguloituneet proteiinit ja alimpana orgaaninen veteen liukenematon fenoli-kloroformiliuos. (Brown 2010: 29, muokattu.)

Fenolin ja kloroformin jäämät häiritsevät nukleiinihappojen eristyksen jälkeisiä analyysijä kuten PCR:tä. Tästä syystä uuton jälkeen voidaan tehdä etanoli- tai isopropanolisaostus, jossa päästään fenolin ja kloroformin jäämistä eroon. Menetelmässä nukleiinihappoliuokseen lisätään sekä alkoholia että suolaliuosta, jolloin nukleiinihapot saostuvat suolana yhdenarvoisten kationien ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  tai  $\text{NH}_4^+$ ) ja alkoholin läsnä ollessa. Alkoholisaostusta käytetään myös konsentroimaan nukleiinihappoliuos vahvemiksi pitoisuudeksi, sillä putken pohjalle sentrifugoitaessa saostunut nukleiinihapposakka voidaan uudelleen liuottaa pienempään tilavuuteen. (Dale & von Schantz 2002: 33-34; Suominen & Ollikka 2003: 64.)

Fenoli-kloroformiuutto ei kuitenkaan sovellu kaikille näytetapauksille. Lähtömateriaalista häviää osa näytteestä uuton mukana, mikä vaikuttaa erityisesti pienen solumäärän näytteisiin (Dolter & Braman 2001: 1358–1361). Fenoli on myös erittäin myrkyllinen aine, joka edellyttää työskentelyltä erityisvaatimuksia kuten työskentelyä vetokaapissa (Dale & von Schantz 2002: 33). Tämä onkin yksi syy miksi fenoli-kloroformiuuton käyttö on nykyään vähentynyt. Menetelmä on myös työläs, jos näytteitä on paljon tai erilaisia näytemateriaaleja on useita samanaikaisesti.

### 2.3.2 Ioninvaihtokromatografia

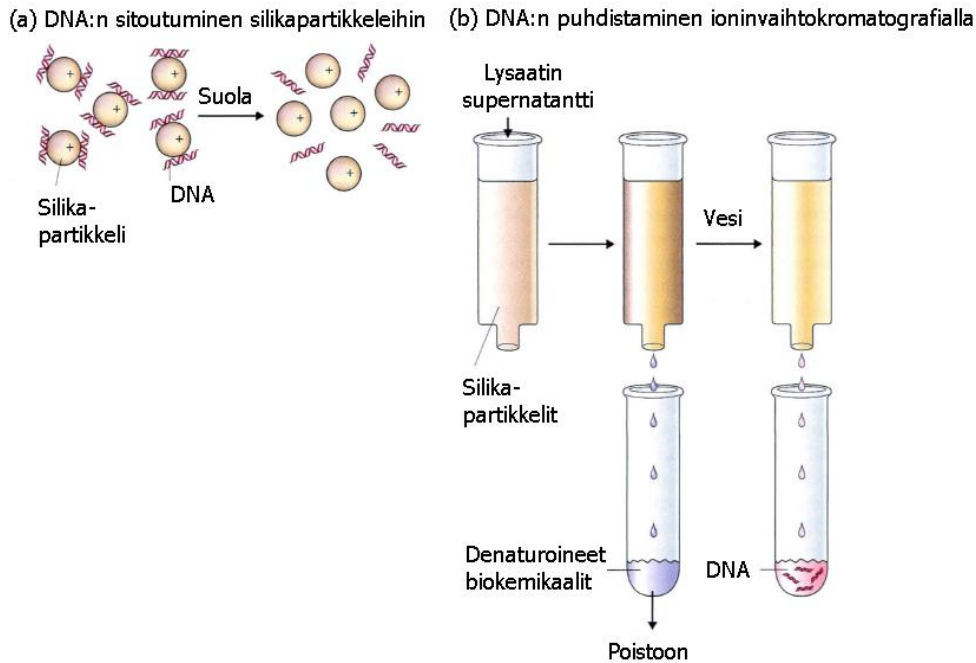
Kromatografinen menetelmä on kemiallinen erotusmenetelmä, joka perustuu aineiden erilaiseen jakautumiseen stationäärifaasin eli paikallaan pysyvän faasin ja liikkuvan faasin välillä. Liikkuvana faasina voi toimia joko neste tai kaasu ja stationäärifaasina liikkuvaan faasiin liukenematon kiinteä aine tai kiinteään aineeseen absorboitu neste. Kromatografisissa menetelmissä vaikuttavina ilmiöitä ovat sekä partitio että absorptio. Erotettavat aineet pyrkivät kiinnittymään kiinteään faasiin, mutta myös liukenemaan liikkuvaan faasiin. Aineet erottuvat toisistaan erilaisen jakaantumisen tuloksena. (Sheehan 2009: 11-12.)

Nukleiinihappojen eristämiseksi käytetään nestekromatografiaan perustuvia pylväitä, joiden erottelu perustuu yleensä affiniteettiin tai ioninvaihtoon. Ioninvaihtokromatografisissa menetelmissä aineet erotellaan stationäärifaasin ja eristettävän molekyylin erilaisten varauksien johdosta tapahtuvan sitoutumisen ja sen voimakkuuden mukaan. Neutraalissa pH:ssa negatiivisesti varautuneet nukleiinihapot ja tietyt proteiinit sitoutu-

vat alhaisessa suolakonsentraatiossa pylvään positiivisesti varautuneeseen kiinteään faasiin. Neutraalit ja positiivisesti varautuneet molekyylit kulkeutuvat pylvään läpi sitoutumatta positiiviseen stationäärifaasiin. Pylvään suolakonsentraatiota muuntelemalla saadaan eluotua pylvääseen kiinnittyneitä erilaisia molekyylejä ulos. Suolapitoisuutta nostamalla häiritään proteiinien ja RNA:n sitoutumista kiinteään faasiin, jolloin kyseisten molekyylien sidokset kiinteään faasiin katkeavat ja molekyylit eluoidaan ulos. DNA:n ja stationäärifaasin väliset sidokset saadaan katkaistua lisäämällä vielä korkeammalla suolapitoisuudella, joka poistaa nukleiinihapon ja kantajan välisen elektrostaattisen vuorovaikutuksen. (Brown 2010: 30; Dale & von Schantz 2002: 36.)

Ioninvaihtokromatografista silikapartikkeleihin perustuvaa pylväs menetelmää (kuva 3) sovelletaan sekä DNA:n että RNA:n puhdistamisessa. Nukleiinihapot sitoutuvat alhaisessa ionikonsentraatiossa pylvään kiinteän faasin positiivisesti varautuneisiin silikapartikkeleihin, muiden molekyylien mennessä ohi. Puhtaamman lopputuotteen varmistamiseksi voidaan käyttää guanidiniumtiosyanaattia, joka denaturoi ja liuottaa kaikki muut biomolekyylit paitsi nukleiinihapot. Epäpuhtauksien poistamisen lisäksi guanidiniumtiosyanaatti parantaa nukleiinihappojen sitoutumista silikaan. Nukleiinihappojen ollessa sitoutuneena silikaan voidaan kolonnia pestä erilaisten pesupuskurien ja sentrifugoinnin avulla. Puhdas DNA tai RNA eluoidaan lopuksi suolalla ja vedellä ulos kolonnista. Vesi häiritsee nukleiinihappojen ja silikan välisiä sidoksia ja lopputuloksena sidokset katkeavat. (Brown 2010: 33-34; Suominen & Ollikka 2003: 65.)





Kuva 3. DNA:n puhdistaminen ioninvaihtokromatografisella pylväällä silikan ja guanidinium tiosyanaatin avulla. (a) DNA sitoutuu silikapartikkeihin guanidinium tiosyanaatin läsnä ollessa. Reagenssien avulla saadaan suolakonsentraatiota nostettua, jolloin DNA:n sidokset silikaan aukeavat. (b) Lysaatin supernatantin DNA sitoutuu pylvään kiinteän faasin silikapartikkeleihin guanidinium tiosyanaatin avustamana. Samalla guanidinium tiosyanaatti denaturoi muut biokemikaalit, jotka eluoidaan ensimmäiseksi ulos. Erilaisten pesuvaiheiden jälkeen puhdas DNA eluoidaan vedellä ulos kolonnista, sillä vesi katkaisee DNA:n ja silikan väliset sidokset. (Brown 2010: 33-34, muokattu.)

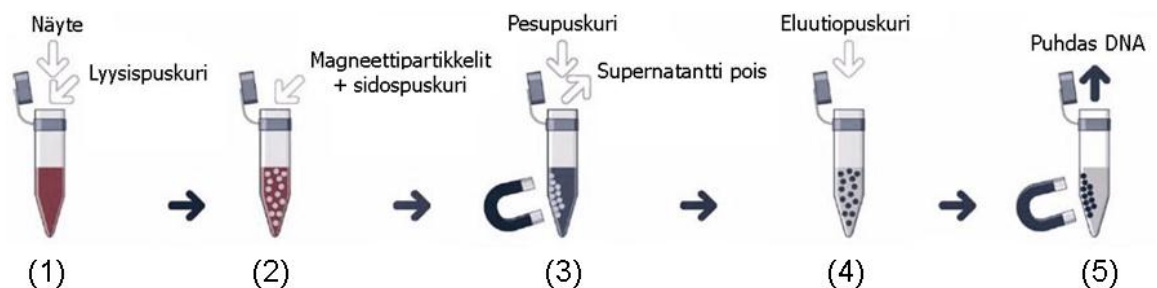
### 3 Magneettipartikkelitekniikka nukleiinihappojen puhdistamisessa

#### 3.1 Magneettipartikkelitekniikan periaate

Nukleiinihappojen eristäminen perinteisillä menetelmillä on suhteellisen hidasta ja työlästä, jos näytteitä on satoja päivässä. Työohjeet sisältävät yleensä useita uutto- ja sentrifugointivaiheita, ja lopputuotteet saattavat jäädä epäpuhtaaksi ja saannoiltaan pieniksi. Perinteiset menetelmät sitovat tekijän myös paikalleen koko prosessin ajaksi. Magneettipartikkelitekniikka on mahdollistanut nopeamman ja tehokkaamman nukleiinihappojen eristämisen, jolla voidaan saada korkeasaantoinen, laadukas ja puhdas lopputuote (Mäkinen et al. 2001: 136-137). Vaikka perinteisiä pylväsmenetelmiä on pystytty automatisoimaan aikaisemminkin, niin magnetismiin perustuvat tekniikat ovat tuoneet markkinoille uuden helposti automatisoitavan tekniikan nukleiinihappojen puhdistukseen (Saiyed, Telang & Ramchand 2003: 1). Nukleiinihappoja voidaan eristää magneettipartikkelitekniikan avulla suoraan näyttemateriaaleista kuten verestä ja viljel-

lyistä soluista ilman erityisiä esivalmisteluja tai -käsittelyitä. Magneettipartikkelit mahdollistavat myös DNA:n ja RNA:n eristämisen vaihtelevan kokoisista näytemääristä. Magneettipartikkelit ovat oikeastaan ainoa toteutettavissa oleva menetelmä keräämään hyvin pieniä partikkeleita (halkaisija noin 0,05-1 µm) saman kokoisten hajotettujen solujen osien joukosta. (Berensmeier 2006: 495.) Toisaalta magneettinen erottelumenetelmä on myös erityisen sopiva suuremman mittakaavan eristykseen (Obata et al. 2001: 500).

Magneettipartikkelitekniikka perustuu kemialliseen sitoutumiseen kohdemolekyylin ja magneettipartikkelin välillä. Kuvassa 4 on esitetty perinteisen, manuaalisen magneettipartikkelitekniikan periaate, jossa liikuttavana osana on neste magneettipartikkeleiden pysyessä samassa putkessa koko prosessin ajan. Menetelmässä lyysattuun ja sentrifugoituun näytteeseen lisätään magneettipartikkelit ja sidospuskuri, jonka avulla DNA sitoutuu partikkeleiden pintaan (1 ja 2). Pesupuskurin avulla puhdistetaan DNA:sta jäljelle jääneet epäpuhtaudet pois (3). Magneettipartikkeleihin sitoutunut DNA kerätään magneetin avulla putken seinämään, jolloin muu näyte saadaan poistettua supernatanttina pois (3). Viimeisessä vaiheessa DNA eluoidaan magneettipartikkeleista vapaaksi liuokseen eluutiopuskurin avulla (4). Jälleen magneettipartikkelit vedetään magneetin avulla putken seinämään, jolloin puhdas DNA-liuos saadaan kerättyä talteen (5). (Berensmeier 2006: 496-497.)



Kuva 4. DNA:n eristys perinteisen manuaalisen magneettipartikkelitekniikan avulla, missä liikkuvana osana on neste magneettipartikkeleiden pysyessä samassa putkessa. Ensimmäiseksi näyte lyysataan lyysipuskurissa (1). Lyysattuun näytteeseen lisätään magneettipartikkelit ja DNA:n sitoutumista magneettipartikkeleihin mahdollistava sidospuskuri (2). Partikkeleihin sitoutunut DNA kerätään putken reunaan magneetin avulla, jolloin jäljelle jäänyt näyte saadaan supernatantin poistolla pois (3). Epäpuhtaudet nukleiinihapoista saadaan puhdistettua lisäämällä partikkeleiden sekaan pesupuskuria (3). Eluutiopuskurilla eluoidaan magneettipartikkeleihin sitoutunut DNA vapaaksi liuokseen (4). Viimeiseksi magneettipartikkelit kerätään magneetin avulla putken reunaan ja puhdas DNA otetaan eluutiopuskurissa talteen (5). (Berensmeier 2006: 497, muokattu.)

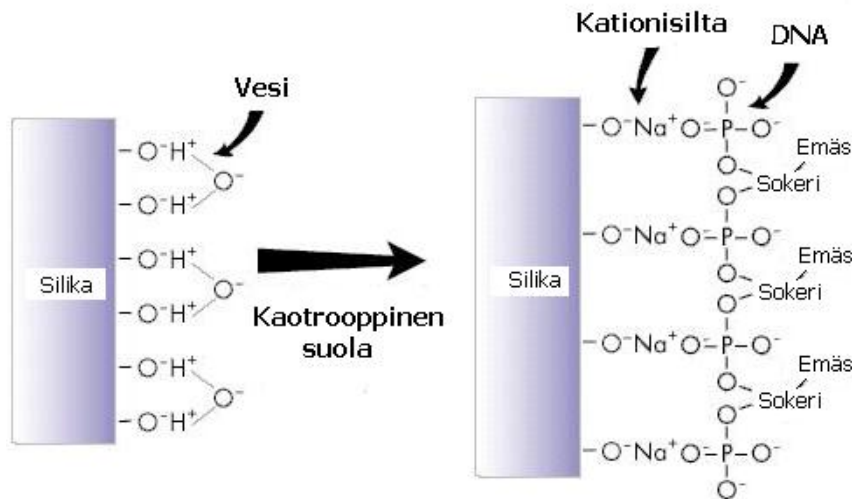
Idea magneettipartikkelitekniikan käyttämisestä molekyylibiologiassa on saanut alkunsa onnistuneista tuloksista kasvainsolujen erottamisesta luuytimeistä ja imusolujen erottamisesta ääreisverenkierrosta magneettitekniikalla (Obata et al. 2001: 500). Magneettipartikkelitekniikkaa hyödynnetään nukleiinihappojen puhdistukseen sekä biologisesti aktiivisten molekyylien kuten proteiinien, vasta-aineiden, erilaisten solujen ja niiden organellien sekä bakteerien erotteluun erilaisissa menetelmissä. Aluksi magneettipartikkeleita käytettiin vain in vitro-sovelluksissa kuten puhdistus- ja erotusmenetelmissä, mutta nykyään myös in vivo -menetelmissä. (Berthier & Silberzan 2005: 267.)

### 3.2 Magneettipartikkeleiden rakenne ja niiden toiminta

Magneettipartikkeleita on useita erilaisia ja erot niissä voivat olla sekä rakenteellisia että materiaalisia, riippuen käyttötarkoituksesta ja kohdemolekyyleistä. Magneettipartikkeleita käytetään suurimmaksi osaksi in vitro-tutkimustekniikoissa kuten diagnostiikassa, biologisten molekyylien tunnistamisessa ja puhdistus ja eristysmenetelmissä. Kaikki magneettipartikkelit sisältävät rautaa, mutta sen lisäksi ne sisältävät erilaisia synteettisiä polymeerejä, biopolymeerejä, huokoista lasia tai magneettisia partikkeleita. Magneettipartikkelit on päällystetty funktionaalisia ryhmiä sisältävällä affiniteettipinnalla. Funktionaaliset ryhmät sitoutuvat kemiallisesti tiettyyn kohdemolekyyliin, jolloin magneettipartikkeleihin tarttuneita molekyylejä voidaan siirtää tai pitää paikallaan magneetin avulla. (Berensmeier 2006: 497; Fang et al. 2007: 195.) Erilaisia affiniteettipintoja on useita erilaisia, riippuen siitä minkälainen on kohdemolekyyli. Pinnat voivat sisältää mm. primääri- ja sekundääri-vasta-aineita, A- ja G-proteiineja, erilaisesti varautuneita molekyylejä ja oligoja (Dynabeads® Types and Uses 2012). Biotiiniin sidotut nukleiinihapot voivat sitoutua magneettipartikkeleiden pinnalla olevan streptavidiniin tai silikan kemiallisiin ryhmiin. (Berthier & Silberzan 2005: 267-268; Dynabeads® MyOne™ SILANE 2008: 1.)

Silika on hyvin yleinen magneettipartikkeleiden päällystyksessä ja muissakin nukleiinihappojen puhdistusmenetelmissä. Nukleiinihapot sitoutuvat silikaan ja sen kaltaisiin molekyyleihin helposti olosuhteita muuttamalla. (Dynabeads® MyOne™ SILANE 2008: 1.) Nukleiinihapot sitoutuvat silikan pintaan kaotrooppisen suolan läsnäollessa (kuva 5). Kaotrooppinen suola denaturoi proteiinien ja nukleiinihappojen sekundääri-, tertiääri- ja kvartiäärirakenteita jättäen kuitenkin vähintään primaarirakenteen ehjäksi. Tästä syystä

kaatrooppinen suola toimii myös nukleaaseja inaktivoivana reagenssina (Boom et al. 1990: 495). DNA sitoutuu kaatrooppiseen suolaan, joka puolestaan on veden avustuksella sitoutunut silikaan. Vesi ja suola muodostavat keskenään kationisillan, joka toimii silikan ja DNA:n välikappaleena. (Boom et al. 1993: 3.)



Kuva 5. DNA:n sitoutuminen silikaan kaatrooppisen suolan ja veden läsnä ollessa. Silikaan sitoutunut vesi muodostaa kationisillan kaatrooppisen suolan kanssa, joka taas pystyy sitoutumaan DNA:n rakenteeseen. (Geneclean 2000, muokattu.)

Magneettipartikkeleiden halkaisijat voivat vaihdella noin 50 nm:stä 10 µm:iin kohdemolekyylistä ja pinnoitteesta riippuen. Nukleiinihappojen puhdistamisessa magneettipartikkelit ovat yleensä halkaisijaltaan 0,5-10 µm (KingFisher overview 2012). Partikkelin koon valintaan vaikuttavat kohdemolekyylin koko ja muoto. Lyhyiden nukleiinihappojen puhdistamiseen voidaan käyttää pienintä partikkelihalkaisijaa, kun taas pitkät ja konsentraatioiltaan suuret nukleiinihapot vaativat mahdollisimman suuri pinta-alaiset partikkelit, joiden sitoutumiskapasiteetti on mahdollisimman suuri. Vaihtoehtoisesti suurille kohdemolekyyleille voidaan käyttää pieniä magneettipartikkeleita, mutta partikkelien määrä tulee tällöin nostaa eli partikkeliliuoksen konsentraation täytyy olla suurempi kuin pienten kohdemolekyylien kanssa. (Berensmeier 2006: 497; Berthier & Silberzan 2005: 268.)

Bioteknologiassa käytetyt magneettipartikkelit ovat lähes aina paramagneettisia tai jopa superparamagneettisia, mutta myös ferro- ja ferrimagneettisia partikkeleita on jonkin verran käytössä (Berensmeier 2006: 495; Dynabeads® MyOne™ SILANE 2008; 1). Paramagneettisten partikkeleiden hyötynä on magneettisen voiman häviäminen ja

toisten paramagneettisten partikkeleiden hylkiminen ulkoisen magneettikentän poistussa. Toisin kuin ferromagneettiset partikkelit, paramagneettiset partikkelit eivät kasaannu keskenään magneettikentän puuttuessa. Ferrimagneettiset partikkelit ovat osittain magnetisoituvia, mikä mahdollistaa niiden käytön magneettipartikkeleissa. (Berthier & Silberzan 2005: 272-273.)

### 3.3 Automatisoidut magneettipartikkeliprosessorit

Automatisoituja magneettipartikkeliprosessoreita nukleiinihappojen eristämiseen ja puhdistamiseen löytyy nykyään usealta eri valmistajalla. Prosessoreiden koko, tekniikka, laatu ja hinta vaihtelevat valmistajittain.

Automatisoidut prosessorit voivat perustua kahteen erilaiseen tekniikkaan: automatisoituun nesteiden siirtämiseen tai automatisoituun magneettipartikkeleiden siirtämiseen. Aluksi kehitettiin varhaisempi tekniikka, jossa automatisoitiin nesteiden siirto. Tällöin magneettipartikkelit pidetään samassa astiassa, kuten aikaisemmin esitettiin kuvassa 4, ja laite suorittaa nesteiden vaihdon automaattisesti. Uudempi tekniikka mahdollistaa magneettipartikkeleiden siirron kaivosta tai putkesta toiseen nesteiden siirtämisen sijaan. Magneettipartikkeleiden siirtämisen etuna on erinomainen pesujen ja eluution tehokkuus sekä pienet kontaminaatoriskit. Molempia menetelmiä on käytössä ja molemmat ovat toimivia. (Fang et al. 2007: 195; KingFisher overview 2012; Mäkinen et al. 2001: 135.)

## 4 KingFisher-magneettipartikkeliprosessorit

### 4.1 KingFisher-magneettipartikkeliprosessorit

KingFisher on Thermo Fisher Scientificin tuoteperhe, joka on suunniteltu automaattiseen proteiinien, nukleiinihappojen ja solujen puhdistamiseen. KingFisher-tuoteperheen laitteet perustuvat kaikki magneettipartikkelitekniikkaan, jossa automatisointi on kohdistettu magneettipartikkeleiden siirtämiseen kuoppalevyjen kaivosta toiseen. Laitteet on suunniteltu puhdistamaan nukleiinihappoja yhdessä KingFisher-kittien kanssa erilaisista lähtömateriaaleista kuten verestä, soluista, eläin- ja kasvikudoksista, ulosteista, seerumista ja plasmasta. (KingFisher® Family 2008: 2; Lamberg 2012: 6.)

KingFisher-tuoteperhe sisältää tällä hetkellä neljä erilaista laitetta, joista uusin tulokas on KingFisher Duo (kuva 6). Vanhempia laitteita ovat KingFisher, KingFisher mL sekä KingFisher Flex. Jokaisella laitteella on omat ominaisuutensa kuten vähimmäis- ja enimmäisnäytemäärät ja näytetilavuudet. KingFisher-laitteen näytetilavuus on 20-200 µl sekä näytemäärä 24 kpl, KingFisher mL:n 50-1000 µl ja 15 kpl, KingFisher Flexin 20-5000 µl ja 24/96 kpl sekä KingFisher Duon 30-5000 µl ja 6/12/24 kpl. Laitteisiin sopivat niihin erityisesti suunnitellut muovit ja magneettipäät. Muovit ovat polypropyleenia, joka soveltuu erityisen hyvin käyttöön biomolekyylien kanssa. Polypropyleenilla on vähäinen sitoutumisaffiniteetti biomolekyyliin, mikä tekee siitä sopivan magneettipartikkeliprosessoreiden käyttöön. (KingFisher® Family 2008: 1-3; Pure Flexibility Unparalleled Performance 2012: 5.)

### KingFisher



### KingFisher mL



### KingFisher Flex



### KingFisher Duo



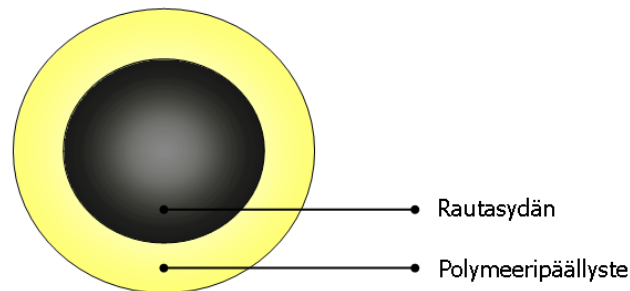
Kuva 6. KingFisher-tuoteperheen magneettipartikkeliprosessorit. Vasemmalta lähtien kuvattuna KingFisher, KingFisher mL, KingFisher Flex ja KingFisher Duo. (Lamberg 2012: 6, muokattu.)

KingFisher-magneettipartikkeliprosessoreita käytetään laajalti erilaisissa molekyylien erityissovelluksissa kuten genetiikassa ja proteomiikassa, biologisten kohteiden tunnistamisessa, oikeuslääketieteellisissä tutkimuksissa, biomarkkereiden tutkimuksissa, laadunvalvonnassa sekä eläintautimäärityksissä (KingFisher® Family 2008: 2).

## 4.2 KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorin esittely

### 4.2.1 KingFisher-magneettipartikkelit

KingFisher-kitit, jotka sisältävät nukleiinihappojen eristykseen tarvittavat reagenssit mukaan lukien KingFisher-magneettipartikkelit, on suunniteltu KingFisher-magneettipartikkeliprosessoreihin. KingFisher-laitteiden kanssa on kuitenkin mahdollista käyttää myös muita sopivia magneettipartikkelireagensseja. KingFisher-magneettipartikkelit ovat halkaisijaltaan 2-3  $\mu\text{m}$ , mutta myös 0,8-10  $\mu\text{m}$  kokoiset partikkelit ovat sopivia Duolle. Partikkeleiden sidoskyky vaihtelee kiteittäin välillä 0,4-1  $\mu\text{g}$  nukleiinihappoja / 1  $\mu\text{l}$  magneettipartikkeliliuosta. Nukleiinihappojen eristyksissä käytettävät KingFisher-magneettipartikkelit ovat rautasydämiä partikkeleita, jotka on päällystetty polymeeripäällysteellä (kuva 7). Erityisesti nukleiinihappojen puhdistamiseen suunniteltu polymeeri sitoutuu kaotrooppisen suolan läsnä ollessa spesifisesti nukleiinihappoihin. Vastaavasti nukleiinihapot irtoavat polymeerin pinnasta alhaisessa suolakonsentraatiossa. (KingFisher Cell and Tissue DNA Kit Instruction Manual 2010: 12-13; KingFisher Blood DNA Kit Instruction Manual 2010: 12-13; KingFisher Duo Use Manual 2011: 19; KingFisher Plant DNA Kit Instruction Manual 2010: 12-13; KingFisher Total RNA Kit Instruction Manual 2011: 12-13; Suomalainen 2012.)



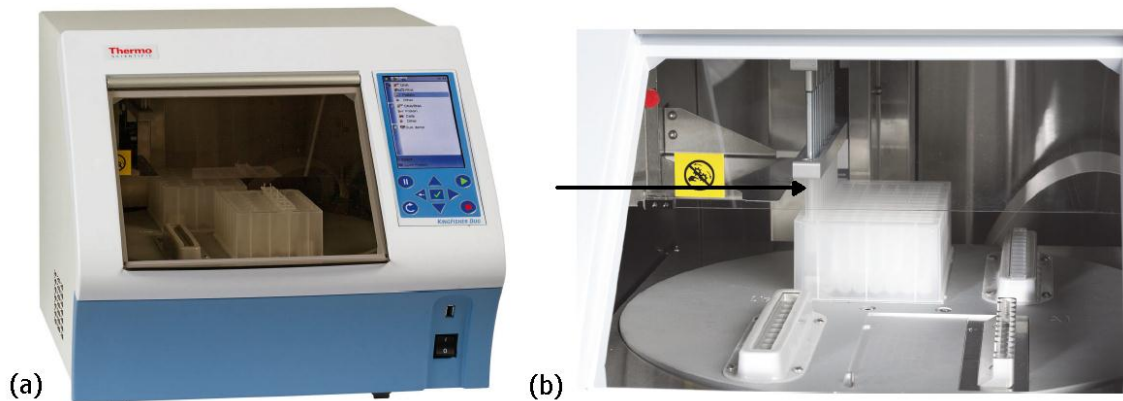
Kuva 7. Rautasydämissen magneettipartikkelin rakenne. Rautasydän on päällystetty affiniteetipinnan omaavalla päällysteellä, joka sitoutuu spesifisesti kohdemolekyylisiin. (KingFisher overview 2012: 3, muokattu; Suomalainen 2012).

Nukleiinihappojen puhdistuksessa käytetyt KingFisher-magneettipartikkelit ovat paramagneettisia tai superparamagneettisia partikkeleita (KingFisher Cell and Tissue DNA Kit Instruction Manual 2010: 13; KingFisher Total RNA Kit Instruction Manual 2011: 13). Partikkelit ovat näin ollen kykenemättömiä magnetisoitumaan ilman magneettikenttää, mutta ovat magnetisoituvan komponentin ansioista magneettikentän läsnä

ollessa magneettisia. Magneettipartikkelit magnetisoituvat siis magneetin läsnä ollessa magneettiin, mutta magneetin poistuessa partikkelit menettävät magneettisen ominaisuutensa. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että magneettikentän eli magneetin poistuessa partikkelit eivät kasaannu keskenään toisten magneettipartikkeleiden kanssa menetettyään magneettivoimansa. (Berthier & Silberzan 2005: 272.)

#### 4.2.2 Laitteen ominaisuudet ja toiminnan periaate

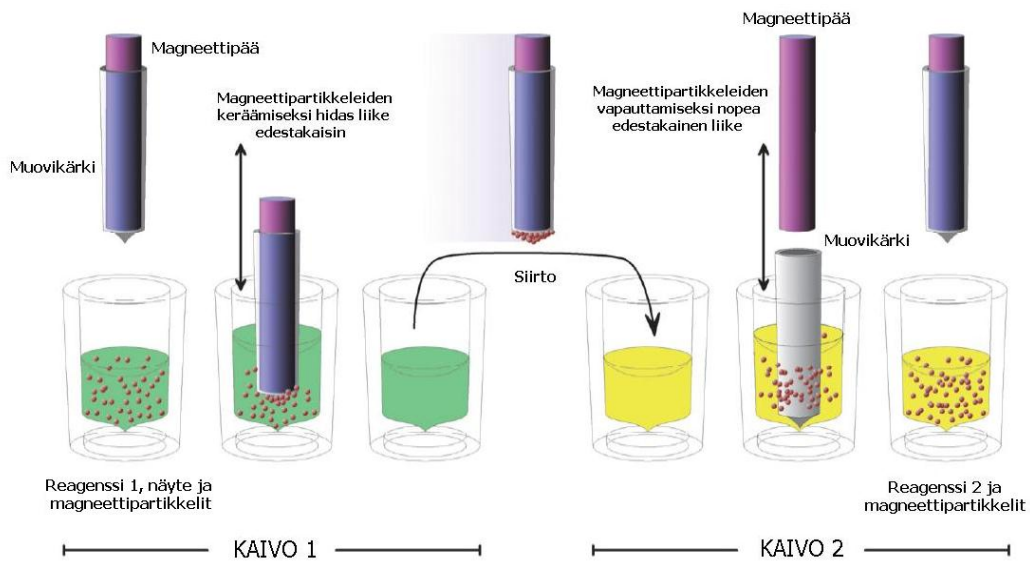
KingFisher Duo –magneettipartikkeliprosessorissa nukleiinihappojen eristäminen tapahtuu polypropyleenista valmistetuilla kuoppalevyillä automaattisesti liikkuvan magneettipään avustuksella (kuva 8.a) (KingFisher® Family 2008: 4). Kuoppalevyille pipetoidaan työohjeen mukaiset reagenssit riveittäin, niin että samaa reagenssia on aina yhdellä vaakarivillä, jolloin se on yhdenmukainen laitteen seinässä olevan magneettipään ja siihen kiinnitettynä olevan muovikärjen liikkeeseen (kuva 8.b). Muovikärki suojaa magneettipäätä, jolloin magneettipäätä voidaan käyttää yhä uudelleen vaihdettaessa kertakäyttöisiä muovikärkiä. Magneettipää muoveineen etenee automatisoidun protokollan mukaisesti riviltä toiselle, joissa jokaisessa on oma työvaiheensa. (KingFisher Duo Use Manual 2011: 57.)



Kuva 8. a) KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessori ulkoa kuvattuna. b) KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorin toiminta kuvattuna sisältä päin. Laitteen seinässä oleva magneettipää ja siinä kiinnitettynä oleva muovinen kärki (nuoli) liikkuvat automatisoituna muovisessa kuoppalevyssä kuoppariviltä toiselle. Jokainen rivi sisältää omat reagenssinsa ja näin ollen jokaisessa rivissä tapahtuu yksi työvaihe. (KingFisher Duo Use Manual 2011; 1,57, muokattu.)

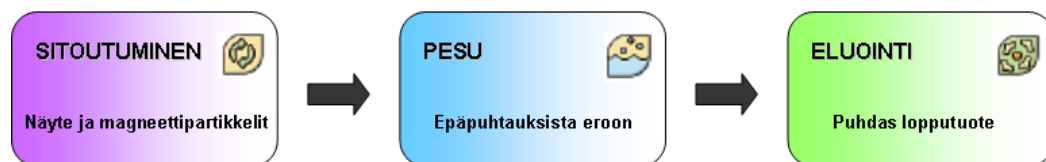


KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorin toiminta perustuu magneettipään ja magneettipartikkeleiden väliseen vuorovaikutukseen (kuva 9). Näytteen kanssa samaan kaivoon lisätään magneettipartikkelit sekä reagenssia, joka sisältää kaotrooppista suolaa. Kaotrooppisen suolan läsnä ollessa näytteen nukleiinihapot sitoutuvat spesifisesti magneettipartikkeleiden pintaan. Muovikärjen suojaama magneettipää ohjataan automaattisesti näytekaivoon, jossa se hitain edestakaisin liikkein keräilee magneettipartikkelit, jotka kiinnittyvät magneettikentän läsnä ollessa magneettipäähän. Magneettipartikkeleissa sitoutuneet nukleiinihapot voidaan nyt siirtää seuraavaan kaivoon, johon ne vapautetaan nostamalla magneettipää ylös muovikärjestä ja poistamalla magneettikentän vaikutus. Kaivon sisältöä voidaan myös sekoittaa muovikärjellä, kun magneettipää on nostettu ylös eikä se enää vaikuta magneettipartikkeleihin. (KingFisher Cell and Tissue DNA Kit Instruction Manual 2010: 12; KingFisher Duo Use Manual 2011: 15.)



Kuva 9. KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorin toiminnan periaate. Ensimmäisessä kaivossa (Kaivo 1) on reagenssi 1, näyte sekä magneettipartikkelit. Reagenssin 1 ansiosta näytteessä olevat nukleiinihapot sitoutuvat spesifisesti magneettipartikkeleiden pintaan. Muovikärjen suojaama magneettipää ohjautuu kaivoon, jossa se keräilee magneettipartikkelit liikkumalla hitaasta ylös ja alas. Magneettipartikkeleiden ollessa kiinnittyneenä magneettipäähän voidaan magneettipartikkelit ja niissä sitoutuneena olevat nukleiinihapot siirtää seuraavaan kaivoon (Kaivo 2), jossa on toinen reagenssi (Reagenssi 2). Magneettipään poistuessa muovikärjen sisältä häviää myös magneettikenttä, jolloin magneettipartikkelit irtoavat muovikärjen pinnasta. (KingFisher Cell and Tissue DNA Kit Instruction Manual 2010: 12; KingFisher Duo Use Manual 2011: 15, muokattu.)

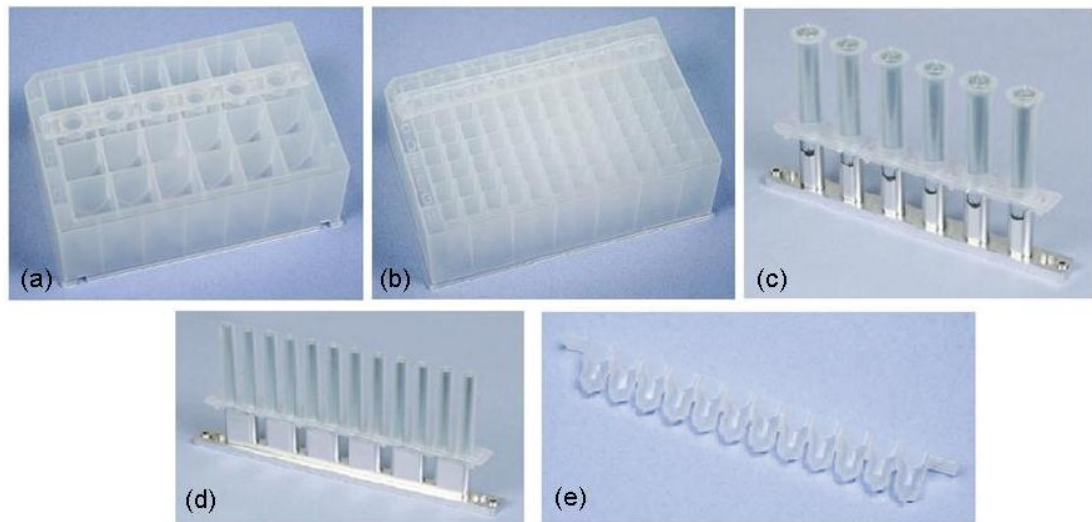
Protokollat vaihtelevat eri näytteiden ja niiden tilavuuksien mukaan. Erilaiset näytemateriaalit vaativat erilaisia työvaiheita, ja magneettipartikkeliprosessorin ohjaus tulee säätää käytettävälle tilavuudelle sopivaksi. Myös DNA:n ja RNA:n puhdistusprotokollat vaihtelevat toisistaan, ja ne sisältävät erilaisia työvaiheita. Kaikesta huolimatta jokaisessa KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorin nukleinihappojen puhdistusprosessissa on sama perustoiminta (kuva 10). Jokainen protokolla alkaa sitoutumisella, jossa näytteen nukleinihapot sitoutuvat magneettipartikkeleiden pintaan. Sitä seuraa pesusarja, joka yleensä tapahtuu useammassa peräkkäisessä kaivorivissä. Pesuilla poistetaan jäljelle jääneet epäpuhtaudet, millä mahdollistetaan puhdas lopputuote. Viimeisessä kaivorivissä puhtaat nukleinihapot vapautetaan magneettipartikkeleista eluoimalla. (KingFisher® Family 2008: 5.)



Kuva 10. KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorin puhdistusprosessikaavio. Protokollien ensimmäinen vaihe on sitoutuminen, jossa näytteen nukleinihapot sitoutuvat magneettipartikkeleiden pintaan. Seuraavana vaiheena on pesusarja, jonka avulla päästään jäljelle jääneistä epäpuhtauksista eroon. Viimeisenä vapautetaan puhdas lopputuote magneettipartikkeleista eluoimalla. (KingFisher® Family 2008: 5, muokattu.)

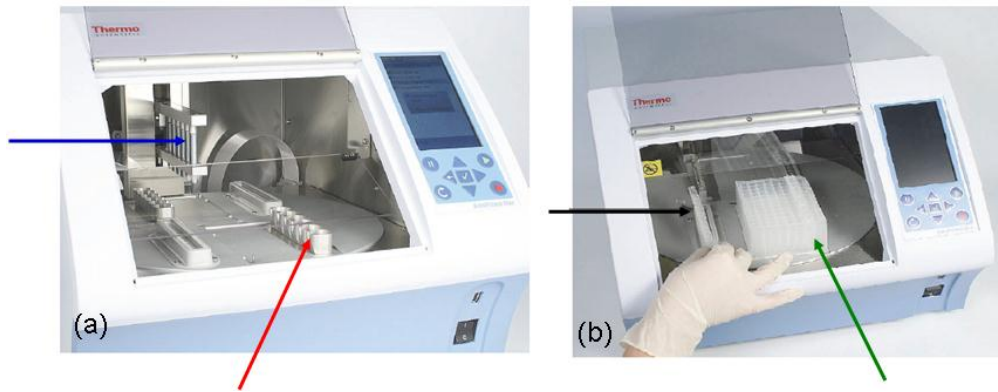
Duolle on kahden kokoisia kuoppalevyjä: 24-kaivoinen ja 96-kaivoinen (kuva 11.a ja b). 24-kuoppalevyllä pystytään eristämään nukleinihappoja samaan aikaan kuudesta eri näytteestä ja suuremman kaivomäärän omaavalla levyllä 12 eri näytteestä. Kaivokokoa määrää myös reagenssien tilavuudet, jotka ovat pienemmissä kaivoissa 50-1000 µl ja suuremmissa kaivoissa 200-5000 µl. Laitteeseen mahtuu kaksi kuoppalevyä samaan aikaan. 24 kaivon kuoppalevyillä työskennellessä molemmat paikat on aina täytetty, sillä levyllä on neljä riviä, joille reagenssit voidaan sijoittaa. Tässä tapauksessa protokollan reagenssit sijoitetaan kahdelle levyllä ja laite automatisoidaan siirtymään levyltä toiselle ohjelman puolivälissä. 96 kaivon tapauksessa tämä tarkoittaa taas sitä, että yksi protokolla pystytään suorittamaan yhdellä levyllä. Tällöin voidaan vastaavaa automatisointia käyttää hyväksi ja suorittaa puhdistusprosessi kahdelle levyllä peräkkäin ilman katkoja. Tällöin voidaan puhdistaa 24 näytettä ilman katkoja. 24- ja 96-

kuoppalevyjen eristykseen on suunniteltu omat magneettipäät ja niihin sopivat muovikärjet (kuva 11.c ja d). 96 kaivon levyä käytettäessä yleensä viimeinen työvaihe eli nukleiinihappojen eluointi suoritetaan erilliselle eluointiliuskalle (kuva 11.e), jossa puhdas lopputuote on helppo säilöä ja jatkokäsitellä. (KingFisher Duo Use Manual 2011: 26-28,51,50.)



Kuva 11. KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorin muovit ja magneettipäät. a) 24 kaivon kuoppalevy ja siihen suunniteltu 6 kärjen muovikärki. b) 96 kaivon kuoppalevy ja siihen suunniteltu 12 kärjen muovikärki. c) 6 näytteen magneettipää ja siihen sopiva muovikärki. d) 12 näytteen magneettipää ja siihen sopiva muovikärki. e) 96 kaivon eristykseen sopiva 12 näytteen eluointiliuska. (KingFisher Duo Use Manual 2011: 26,27,51,50, muokattu.)

Duon ominaisuuksiin kuuluvat myös vaihdettavat lämmityselementit, jotka samalla myös pitävät kuoppalevyn paikallaan prosessin aikana (kuva 12.a ja b). Lämmityselementtejä on kahden kokoisia: kuudelle näytteelle ja 12 näytteelle. Kuoppalevy asetetaan lämmityselementin päälle, niin että elementti on aina reunimmaisessa rivissä. Lämmitystä ei ole pakko käyttää, vaan sen pystyy halutessaan ja näytteen vaatiessa ohjelmoimaan protokollaan. Ylimääräinen suojattu lämpöhaude sijaitsee edellä mainitua vastapäätä ja se on tarkoitettu 12 näytteen eluointiliuskalle. Näin ollen on myös mahdollista ohjelmoida lämmitys viimeiseen eluointivaiheeseen.



Kuva 12. Magneettipartikkeliprosessori Duon osien esittely. a) Laitteen takaseinässä on kiinni magneettipää kuudelle näytteelle, joka on juuri laskeutumassa alaspäin (sininen nuoli) ja laitteen edessä lämpöhaude kuudelle näytteelle (punainen nuoli). b) Muoviset kuoppalevyt asetetaan lämpöhauteen päälle (vihreä nuoli) ja eluointiliuska siihen tarkoitettulle omalle lämpöhauteelle (musta nuoli). (KingFisher Duo Use Manual 2011: 32,57, muokattu.)

Laitteen sisäpuolella on keskellä pyöreä kiekkomainen alusta, joka mahdollistaa levyjen siirtämisen etupuolelta takapuolelle ja päinvastoin. Tämä on myös välttämätön ominaisuus yksittäisten levyjen kanssa työskennellessä, sillä magneettipään liikerata on ainoastaan laitteen takaosassa, joten prosessoitava levy käännetään aina laitteen takaosaan. KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessori on kooltaan suhteellisen pieni (40 x 46 x 35 cm ja 16 kg), sillä se on tarkoitettu laboratoriomittakaavaan. Se mahtuu hyvin esimerkiksi pöydälle ja on kevyt siirtää.

#### 4.2.3 Prosessorin ohjaaminen

Laitteen ohjaaminen voi tapahtua kahdella eri tavalla: laitteen sisältämien protokollien tai tietokoneohjelman ohjauksella. KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessi sisältää perusprotokollat nukleiinihappojen puhdistamiseen. Perusprotokollat on tehty KingFisher-kittien reagensseille sopiviksi ja soveltuvat hyvin perusnäytteille kuten esimerkiksi EDTA-verelle, HeLa-soluille, maksa- ja sydänkudoksille sekä tupakka- ja salaattinäytteille. Perusprotokollat soveltuvat myös useille muille näytemateriaaleille, mutta haastavimmat näytemateriaalit saattavat joskus vaatia muutoksia protokollaan, kuten pidennettyjä inkubaatioaikoja, tehokkaampia sekoituksia tai lisättyjä lämmitysvaiheita.

Toinen vaihtoehto on ohjata laitetta tietokoneen kautta BindIt-tietokoneohjelmalla.

BindIt:n hyötynä on, että ajotiedot tallentuvat koneelle ja ajon pysähtyessä pystytään tarkastamaan, missä vaiheessa prosessia ajo on pysähtynyt ja missä kohti virhe on

sattunut. Duon sisäisillä protokollilla ajot onnistuvat nopeasti, mutta muutoksia protokoliin ei ole mahdollista tässä vaihtoehdossa tehdä. BindIt:ssa pystytään tekemään muutoksia perusprotokoliin tai jopa luomaan alusta alkaen uusi protokolla. BindIt-tietokoneohjelman avulla pystytään laitetta soveltamaan hyvin monille erityyppisille näytemateriaaleille ja -määrille.

#### 4.3 KingFisher-reagenssit

KingFisher-kitit on suunniteltu KingFisher-magneettipartikkeliprosessoreiden käyttöön. Kittejä on tällä hetkellä viisi erilaista: Veri DNA, Totaali RNA, Solu ja kudosa DNA, Kasvi DNA sekä Virus NA, jolla voidaan eristää sekä DNA:ta että RNA:ta (kuva 13.a ja b). Kittien sisältämät reagenssit vaihtelevat kiteittäin riippuen siitä, minkälaiselle näytemateriaalille kitte on suunnattu. Myös samannimisten reagenssien koostumus saattaa vaihdella eri kiteissä, joten kittien reagensseja ei tule sekoittaa keskenään. Kaikki sisältävät ainakin lyysipuskurin, sidospuskurin, magneettipartikkelit, pesupuskureita sekä eluutiopuskurin. Osa kiteistä sisältää edellisten lisäksi myös rDNase- ja proteinaasi K -reagenssin.



Kuva 13. a) Viiden KingFisher-kitien kuvatunnukset: Veri DNA, Totaali RNA, Solu ja kudosa DNA, Virus NA ja Kasvi DNA. b) Veri DNA-kitin sisältö: lyysipuskuri, proteinaasi K –puskuri, lyofilisoitu proteinaasi K, KingFisher-magneettipartikkelit, sidospuskuri, 2x pesupuskuri 1, pesupuskuri 2 ja eluutiopuskuri. (Nucleic Acid Purification Workflow Optimized 2011: 1,2, muokattu.)

## KOKEELLINEN OSA

### 5 Työn tarkoitus

#### 5.1 Tausta

Thermo Fisher Scientific valmistaa magneettipartikkeliprosessoreita erilaisiin puhdistusprosesseihin kuten nukleiinihappojen puhdistamiseen. Magneettipartikkeliprosessorit kuuluvat Thermo Fisherin KingFisher-tuoteperheeseen, joka sisältää myös magneettipartikkeliprosessoreille suunnitellut reagenssit. Osa näytemateriaaleista kuten veri voidaan pipetoida suoraan magneettipartikkeliprosessoriin ilman esikäsittelyitä. Toiset näytemateriaalit ovat kuitenkin haastavampia ja tarvitsevat alustavia käsittelyjä, kuten homogenisoinnin, ennen kuin näytteestä on mahdollista puhdistaa nukleiinihapot KingFisher-magneettipartikkeliprosessoreilla. Tällaisia näytemateriaaleja ovat mm. kasvi-näytteet sekä eläinperäiset kudoksenäytteet.

#### 5.2 Tavoitteet

Työn tavoitteena oli vertailla erilaisia homogenisointimenetelmiä salaatti- ja tupakka-näytteille nukleiinihappojen puhdistamiseen KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorilla. Erilaisiksi homogenisointimenetelmiksi valittiin Ribolyser-homogenisaattori, Talboys-kuulamyly, Ultra-Turrax-koeputkisekoittaja, Pellet Pestle –mikrosentrifugiputkisekoittaja sekä perinteinen mortteli. Jokaiselle eri homogenisointimenetelmälle ja näytteelle pyrittiin myös optimoimaan paras mahdollinen lopputulos vaihtelemalla homogenisoinnin aikana olosuhteita (taulukko 1). Ensimmäisessä vaihtoehdossa näyte homogenisoitiin sellaisenaan ilman olosuhteiden muuttamista. Seuraavissa vaihtoehdoissa homogenisoinnin aikana näyte pidettiin lyysispuskurissa tai jäädytettiin nestetyössä. Neljännessä vaihtoehdossa testattiin lyysispuskurin ja nestetyöyden yhdistelmätekniikkaa, jossa näyte jäädytettiin ensin nestetyössä ja tämän jälkeen homogenisoitiin lyysispuskurissa. Tarkoituksena oli tutkia, onko näytteen nestemäisellä jäädyttämisellä merkitystä DNA:n saantoon, puhtauteen tai laatuun. Vastavasti haluttiin nähdä myös lyysispuskurin ja sen poisjättämisen vaikutus lopputuotteen. Homogenisoinnin jälkeen kaikista homogenisoiduista näytteistä eristettiin DNA KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorilla.

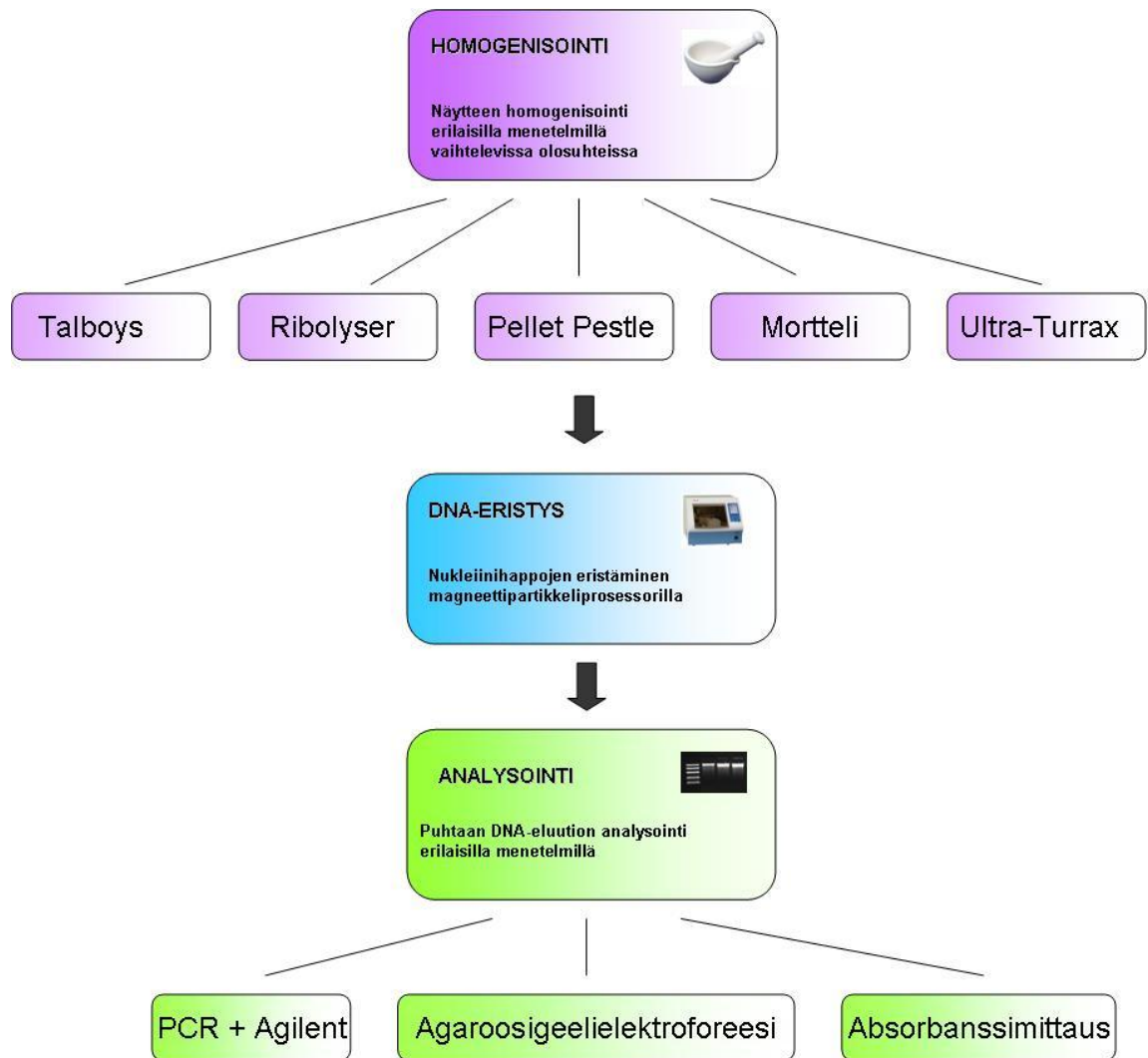
Taulukko 1. Olosuhdevaihtoehdot, joita vaihdeltiin homogenisointien aikana jokaisella eri homogenisointimenetelmällä.

Olosuhdevaihtoehto (nro)	Nimi	Lyhenne	Selitys
1	Pelkkä näyte	N	Näyte homogenisoitiin yksinään ilman olosuhteiden muuttamista
2	Lyysispuskuri	P	Näyte pidettiin homogenisoinnin ajan lyysispuskurissa
3	Nestetyppi	T	Näyte jäädytettiin nestetyypellä juuri ennen homogenisointia
4	Lyysispuskuri + nestetyppi	PT	Näyte jäädytettiin nestetyypellä ja tämän jälkeen pidettiin homogenisoinnin ajan lyysispuskurissa

Tavoitteena oli löytää kasvinäytteiden DNA:n puhdistamiseen KingFisher- magneetti-partikkeliprosessoreilla optimaaliset homogenisointimenetelmät, joita voidaan tulevaisuudessa suositella asiakkaille ja myös käyttää Thermo Fisher Scientificin aplikaatiolaboratoriossa. Tarkoituksena oli löytää homogenisointimenetelmät, jotka mahdollistavat puhtaan, korkeasaantoisen ja laadukkaan lopputuotteen, joka sopii erilaisiin jatko-analyysihin, kuten PCR:ään. Homogenisointimenetelmäksi haluttiin luotettava menetelmä, joka antaa toistettavuudellaan tasaiset tulokset. Haluttiin myös nähdä eri menetelmien toimivuus, jotta eri homogenisointimenetelmiä osataan suositella asiakkaiden erilaisiin käyttötarpeisiin. Työssä kiinnitettiin erityistä huomiota siihen, mikä menetelmä sopii pienten tai isojen näytemäärien käsittelyyn ja mikä olisi sopiva menetelmä, jos näytteet ovat erilaisia.

### 5.3 Työn kulku

Työ koostui kolmesta vaiheesta: näytteiden homogenisoinnista, nukleiinihappojen puhdistamisesta sekä loppuanalyyseista (kuva 14). Ensiksi näytteet homogenisoitiin erilaisilla homogenisointimenetelmillä. Jokaisella homogenisointimenetelmällä vaihdeltiin myös olosuhteita homogenisoinnin aikana. Homogenisoiduista kasvinäytteistä puhdistettiin DNA KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorilla. Puhdistettuja nukleiinihappoja analysoitiin erilaisilla analyysimenetelmillä kuten agarosigeelielektroforeesilla ja absorbanssimittauksella, jotta saatiin tietoa nukleiinihappojen laadusta, puhtaudesta ja saannosta.



Kuva 14. Työn kulku kaaviokuvana. Työ koostui kolmesta vaiheesta: näytteiden homogenisoinnista (violetti väri), DNA:n eristämisestä (sininen väri) ja puhdistetun lopputuotteen analysoimisesta (vihreä väri). Homogenisointiosiossa näytteet käsiteltiin erilaisilla homogenisointimenetelmillä, joissa vaihdeltiin myös olosuhteita. DNA:n eristäminen suoritettiin KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorilla. Viimeisessä vaiheessa puhtaat nukleiinihapot analysoitiin mittaamalla absorbanssit, agaroosigeelielektroforeesilla ja PCR:llä. (Ceramic Mortar & Pestle 2012; KingFisher Duo Use Manual 2011:1, muokattu.)



## 6 Materiaalit ja menetelmät

### 6.1 Näytteet

Työ toteutettiin kahdella erilaisella näytemateriaalilla: salaattinäytteillä ja tupakkanäytteillä (taulukko 2). Kaupasta ostettiin salaattiruukku, josta otettiin lehdet työn salaattinäytteisiin. Tupakan lehdet olivat sen sijaan istutuksesta, joka oli kasvatettu laboratoriossa. Näytteinä pyrittiin koko työn ajan käyttämään ulkonäöltään samannäköisiä lehtien osia. Molempien näytteiden kohdalla pyrittiin näytteeksi ottamaan lehtilapaa niin, että lehtiruotia tuli näytteeseen mukaan mahdollisimman vähän. Salaattinäytteissä näytteiksi valittiin myös väriltään samantyyppisiä palasia, niin etteivät toiset näytteet ollut kovin paljon vihreämpiä kuin toiset.

Taulukko 2. Työssä käytetyt näytteet. Näytteinä käytettiin jääsalaatin lehtiä, jotka olivat Vihreä Keiju -nimiseltä valmistajalta sekä tupakan lehtiä, jotka oli kasvatettu laboratoriossa.

<b>Kasvinäytteet</b>		
<b>Salaatin lehti</b>	Jäävuori salaatti	Vihreä Keiju
<b>Tupakan lehti</b>	Itse kasvatettu	-

### 6.2 Näytteiden homogenisointi ja lyysaus

#### 6.2.1 Homogenisoinnin toteutus ja työvaiheet

##### Reagenssit

- Nestetyppi (AGA)
- Lysis Buffer (KingFisher Plant DNA Kit)

##### Materiaalit, välineet ja laitteet

- Kuulamyly(Talboys High Throughput Homogenizer, Troemner)
- Kuoppalevy (Thermo 1,2ml 96-well storage plate, Thermo Scientific)
- Kuoppalevykorkit (Thermo storage plate cap strip, Thermo Scientific)

- Kuulia (Talboys S/S Grinding Balls for Deepwell Microplates, 4 mm)
  - Magneetti (Pick Pen Bio-Nobile)
  - Homogenisaattori (Ribolyser, Hybaid)
  - Partikkeliputket (Lysing Matrix D, MP Biomedicals)
  - Koeputkisekoittaja (Ultra Turrax Tube Drive, IKA)
  - Teräkoeputki (DT-20 Mischgefäß, IKA)
  - Mikrosentrifuugiputkisekoittaja (Pellet Pestle Motor Kontes, Sigma-Aldrich)
  - Mikrosentrifuugiputki (Eppendorf)
  - Pellettisurvin (Sigma-Aldrich)
  - Mortteli ja survin (Ø 11 cm)
- 
- Vaaka (Excellence Plus XP205 PeltaRange, Mettler Toledo)
  - Sentrifuugi (Thermo Centra CL3R, Thermo Scientific)
  - Sentrifuugi (Heraus Sepatech Megafuge, Heraus West-Germany)
  - Mikrosentrifuugi (Centrifuge 5415D, Eppendorf)
  - Lämpöhaude (UBD Grant)
  - Lämmittävä ravistelija (Thermomixer comfort, Eppendorf)

Näytteen homogenisointi ja solujen lyysaus tehtiin KingFisher Plant DNA Kitin reagensseilla ja työohjeiden mukaisesti (taulukko 3). Taulukossa on esitetty työvaiheet, kun näyte homogenisoidaan sellaisenaan ja vasta esikäsittelyn jälkeen lisätään lyysispuskuri. Tämän lisäksi työssä kokeiltiin myös yhdistelmätekniikoita, kuten näytteen homogenisointia lyysispuskurissa. Käytännössä tämän tarkoitti sitä, että näyte homogenisoi-  
ttiin lyysispuskurissa, ja tämän jälkeen jatkettiin kohdasta 3, jossa lisättiin RNase A -  
reagenssi. Taulukon työvaiheiden jälkeen homogenisoiduista näytteistä eristettiin DNA  
KingFisher-magneettipartikkeliprosessorilla.

Taulukko 3. Kasvinäytteiden esikäsitteily ennen DNA:n puhdistusta KingFisher Plant DNA -kitillä. Työohje on esitetty niin, että näyte homogenisoidaan sellaisenaan ja tämän jälkeen lisätään lyysispuskuri. Sekä salaatti että tupakkanäytteet käsiteltiin KingFisher Plant DNA Kitin ohjeistuksen mukaisesti. (KingFisher Plant DNA Kit Instruction Manual 2010: 20-21.)

---

### KingFisher Plant DNA Kit

---

1. Näytteen punnitseminen (työn näytteet 40 mg)
  2. Näytteen homogenisointi halutulla menetelmällä
  3. Lisää 500 µl lyysispuskuriä
  4. Lisää RNase A:ta (loppukonsentraatioksi 0,25 mg/ml)
  5. Sekoitus 30 s
  6. Sentrifugoi 1500 x g 30 s
  7. Inkuboi 56°C 30 min
  8. Sentrifugoi 6000 x g 20 min
  9. Pipetoi supernatantista 400 µl kuoppalevylle
- 

## 6.2.2 Nestetyppi

### Johdanto

Nestemäinen typpi on väritön ja hajuton neste, joka on -196 asteista. Typpi on myrkytöntä ja inerttiä, eli se ei reagoi kemiallisesti muiden aineiden kanssa. Nestetyppi säilytetään eristesäiliöissä tai painesäiliöissä, millä estetään höyrystyminen ja kaasuhäviöt. Suurina pitoisuuksina nestetyppi voi olla tukahduttava, sillä se alentaa ilmassa hapen pitoisuutta. Nestetyppiä käsiteltäessä tulee aina suojautua asianmukaisin varustein, kuten hansikkailla, suojalaseilla ja takilla, sillä se aiheuttaa nopeasti pysyviä vaurioita kylmyytensä vuoksi. (Karinen 2012: 1-3.)

Kylmäsäilytyksen tavoitteena on minimoida biologisille materiaaleille tapahtuvia vahinkoja jäädyttämällä ne. Tällaisia materiaaleja ovat kudokset, nisäkäsolut, bakteerit, kasvisolut ja virukset. (Brockbank et al. 2012.) Kryobiologian periaate on, että jäätymisvahinkojen laajuus riippuu vapaan veden määrästä järjestelmässä ja veden kyvystä kristallisoitua jäädytyksen aikana. Vesi on elävien solujen pääainesosa ja mahdollistaa kemiallisten reaktioiden tapahtumisen soluissa. Kun suurin osa solussa olevasta vedestä jäätyy, pysähtyy solun aineenvaihdunta. Useille eristetyille solutyypeille jäädyttäminen on helppo suorittaa. Monimutkaisemmat kudokset kuten sydänläpät ja herkät solut vaativat kuitenkin kylmäjäädätyksen asiantuntemusta ja ymmärrystä.

Kryobiologiaa on sovellettu myös homogenisoitiin, sillä silloin biologinen näyte säilyy hyvin homogenisoinnin aikana ja lisäksi saattaa helpottaa joidenkin näytemateriaalien soluseiniä hajottamista (Zeisler et al. 1983). Lisäksi nestetyppi inaktivoi solun haitallisia entsyymejä ja kemikaaleja (Plant Genomic DNA Extraction using CTAB 2012). Useat homogenisoitavat näytemateriaalit kuten kudokset ja kasvit menevät helposti liisterimäiseksi ja vaikeaksi käsitellä homogenisoidessa. Jäädymällä näytemateriaali hajoaa helposti jauhemaiseksi aineeksi, joka on helppo käsitellä homogenisoinnin jälkeen. Jäädymävaihtoehdoista nestetyppi on ehdottomasti suositeltava, sillä se jäädymää näytteen hetkessä ja tekee työvaiheesta nopean ja helpon.

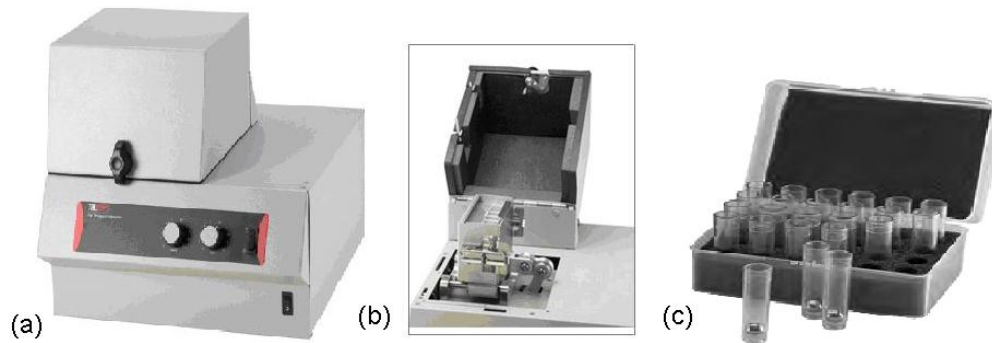
### Työn toteutus

Työssä käytettiin nestetyypeä kasvinäytteiden jäädymämiseen. Jokaisella homogenisointimenetelmällä testattiin nestetyypellä jäädymettyjen näytteiden homogenisointia. Lisäksi työssä tutkittiin lyysispuskurin ja jäädymyksen yhteisvaikutusta lopputulokseen. Tällöin valmiiksi punnitut näytteet jäädymettiin ja sen jälkeen homogenisoitiin jäädymyneenä lyysispuskurissa. Näytteiden jäädymttäminen tehtiin joko jäädymyksen kestävässä muoviputkissa, jolloin putki näyteineen jäädymettiin upottamalla nestetyypen, tai kastamalla näyte pinseteillä nestetyypessä.

#### 6.2.3 Talboys High Throughput Homogenizer –kuulamylly

##### Johdanto

Talboys Throughput Homogenizer -kuulamylly homogenisoi näytteitä kuulien avulla (kuva 15). Kuoppalevy tai rasia, joka sisältää putkia, asetetaan laitteen sisälle kahden levyn väliin, jolloin se pysyy tukevasti paikallaan prosessin ajan. Levyt kiinnitetään toisiinsa niissä olevien kiinnikkeiden avulla. Homogenisointi tapahtuu laitteen ravistellessa kuoppalevyä tai rasiaa, jolloin sen sisällä olevat kuulat murskaavat liikkuessaan näytteen. Laitteessa voidaan säätää sekä tehoa että aikaa.



Kuva 15. (a) Talboys Throughput Homogenizer –kuulamyly. (b) Laite aukaistuna. Sisälle sopii kuoppalevy tai rasia, joka asetetaan kahden levyn väliin. Näistä toinen on laitteessa kiinni ja toinen irrallinen osa. Levyt kiinnitetään tiukasti toisiinsa kiinni niissä olevien kiinnikkeiden avulla, jolloin kuoppalevy pysyy tiiviisti niiden välissä. (c) Valmistajan paketti, joka sisältää putket ja rasia, jossa voidaan homogenisoida näytteet kuulien avulla. (Talboys Throughput Homogenizer 2012, muokattu.)

Laitteeseen on mahdollista ostaa siihen kuuluvia paketteja, jotka sisältävät putket, joihin kuulat ja näyte asetetaan, ja putkille rasiat, joissa putket voidaan kiinnittää laitteeseen (kuva 15.c). Putkia on mahdollista saada erikokoisia ja vaihtelevista materiaaleista. Kuulat ovat ruostumattomasta teräksestä valmistettuja pieniä metallikuulia, joita voidaan tarvittaessa käyttää kaivoa kohden useampi. Talboys Throughput Homogenizerissa on myös mahdollista käyttää muita kuin itse valmistajan valmistamia paketteja. Myös kuoppalevyt sopivat ja tällöin voidaan homogenisoida useita näytteitä kerralla, jos näytemäärät ovat riittävän pieniä. (Talboys High Throughput Homogenizer Instruction manual 2009: 8.)

### Työn toteutus

Työssä käytettiin Thermo 1,2ml 96-well storage plate –kuoppalevyjä, joissa oli Thermo storage plate cap strip –korkit päällä homogenisoinnin ajan. Ennen varsinaisia testauksia näytteillä kuulamylyn käyttöä optimoitiin kokeellisesti sekä salaatti- että tupakka-näytteille. Kuulien optimaalista määrää tutkittiin yhdellä, kahdella ja kolmella kuulalla, joista päädyttiin käyttämään jatkossa kahta kuulaa yhdessä kaivossa. Lyysispuskurin määrää optimoitaessa (testatut määrät 50 µl, 100 µl, 250 µl, 350 µl ja 500 µl) päädyttiin käyttämään 100 µl lyysispuskuria. Tässä vaiheessa optimointi tehtiin visuaalisesti tarkastelemalla, kuinka hyvin näytteet homogenisoituivat.

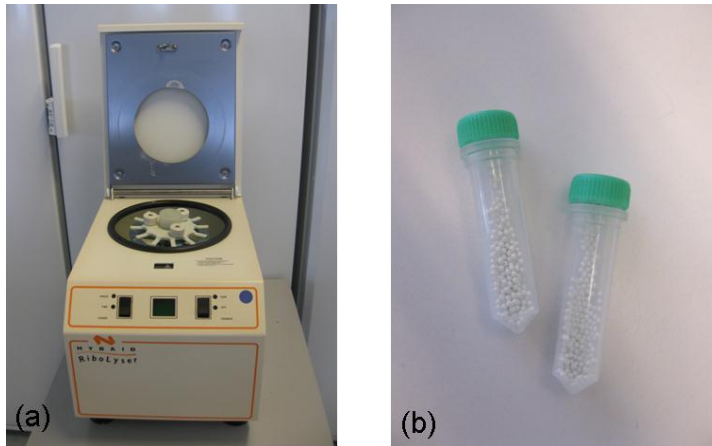
Eri homogenisointimenetelmien vertailussa näytteet punnittiin (noin 40 mg) ja siirrettiin kuoppalevyn kuoppiin. Jokaiseen kuoppaan lisättiin 2 kpl kuulia ja kuopat suljettiin niille tarkoitetuilla tiiviillä kansilla. Vaihtoehtoihin, joissa näytteet homogenisoitiin lyysispuskurissa, lisättiin 100 µl lyysispuskuria ennen homogenisointia. Näytteitä homogenisoitiin 3 minuuttia laitteen teholla 9. Homogenisoinnin jälkeen kuoppalevy sentrifugoitiin 2 minuuttia 2000 x g, jotta näytteet ja puskurit saatiin siirrettyä pohjalle korkeista. Kuoppiin lisättiin 200 µl lyysispuskuria, jolloin kuulat oli helpompi ottaa magneetin avulla pois kuopista. Liiallinen puskurin määrä on este kuulien poistamisen, sillä kuulia poistettaessa kuopasta magneetin avulla puskurin nousee helposti kaivon reunan yli, mutta liian vähäinen puskurin määrä taas aiheuttaa satunnaisesti näytteen tarttumisen kuuliin. Kuulien poiston jälkeen kaivoihin täytettiin lyysispuskurin määrä niin, että sen kokonaistilavuus oli 500 µl. Näytteiden kanssa jatkettiin KingFisher Plant DNA Kitin työhöjeen mukaisesti.

#### 6.2.4 RiboLyser-homogenisaattori

##### Johdanto

RiboLyser-homogenisaattori on laite, joka homogenisoi näytteet 2 ml:n putkissa pyörittämällä ja heiluttamalla putkia laitteen sisällä (kuva 16.a). Putket sisältävät partikkeleita tai pieniä palloja, jotka mekaanisesti hajottavat kudosta. Menetelmän periaate on samankaltainen kuin kuulamylyn, mutta kuulun sijasta putki sisältää paljon pieniä partikkeleita, jotka murskaavat näytteen. Ribolyser on vanhempi versio nykyisestä FastPrep-laitteesta.

Ribolyseriin on tarjolla useita erilaisia putkia, joissa partikkeleiden materiaali ja koko vaihtelevat. Yleensä partikkelit ovat zirkonia, lasia, keraamisia ja silikaa tai niiden sekoituksia. Erilaisille näytemateriaaleille on optimoitu erilaiset putken sisällöt eli eri näytemateriaalien kanssa käytetään erilaisia putkia. Tässä työssä käytettiin Lysing Matrix D – putkia, jotka sisältävät keraamisia 1.4 mm partikkeleita (kuva 16.b). Putket on suunniteltu erityisesti nukleinihappojen puhdistamiseen kasvi- ja eläinnäytteistä. Partikkelit ovat kemiallisesti inerttiä materiaalia, joten ne eivät sitoudu nukleinihappoihin. (Individual Lysing Matrix Tubes 2002; Lysing Matrix D 2012.)



Kuva 16. (a) Ribolyser-homogenisaattori. (b) Työssä käytetyt keraamisia partikkeleita sisältävä Lysing Matrix D –putki.

Näytteen lisäämisen jälkeen putket sijoitetaan laitteeseen niille tarkoitetuille paikoille. Näytteessä on 12 näytepaikkaa. Putkien päälle käännetään ruuvattava kansi, joka estää nesteiden pursuamisen kierrekorkkien välistä. Laitteessa voidaan säätää sekä aikaa että tehoa.

### Työn toteutus

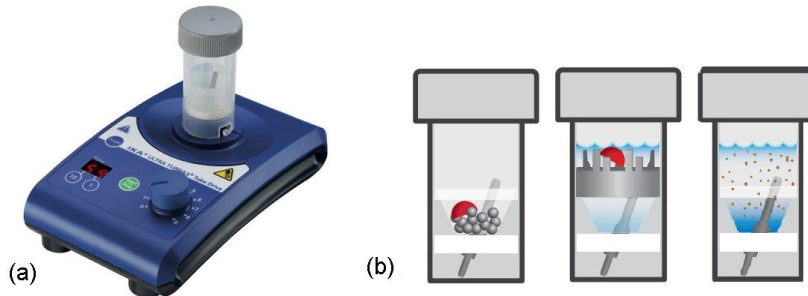
Työssä käytettiin Lysing Matrix D –putkia, joihin näytteet punnittiin (noin 40 mg). Vaihtoehtoihin, joissa näytteet homogenisoitiin lyysipuskurissa, lisättiin 500 µl lyysipuskuria ennen homogenisointia. Näytteitä homogenisoitiin 40 sekuntia laitteen teholla 6. Kasvinäytteet siirrettiin pipetillä putkista seuraavia työvaiheita varten omiin mikrosentrifugiputkiin ja työskentelyä jatkettiin KingFisher Plant DNA Kitin työohjeen mukaisesti.

### 6.2.5 Ultra-Turrax-koeputkisekoittaja

#### Johdanto

Ultra-Turrax-koeputkisekoittaja homogenisoi hajottamalla, sekoittamalla ja jauhamalla näytteitä siihen tarkoitetuissa koeputkissa (kuva 17.a). Ultra-Turrax pyörittää koeputkea, jolloin koeputken sisältämä rakenne homogenisoi näytteen. Erilaisia komponentteja sisältämiä putkia on kolmea vaihtoehtoa (kuva 17.b). Sekoitusputki sisältää vain

sekoitustikun, mutta kaksi muuta putkea sisältävät sekoitustikun lisäksi joko kuulia tai terän. Kuulia on mahdollista saada sekä lasista että ruostumattomasta teräksestä valmistettuja. Teräputken teräosa on muovinen kappale, joka pyöriessään ns. leikkaa näytteen pieniksi osiksi. Kaikkia putkia on mahdollista saada sekä 20 ml:n että 50 ml:n kokoisina. (Ultra-Turrax Tube Drive System 2012.)



Kuva 17. (a) Ultra-Turrax-koeputkisekoittaja. (b) Koeputkisekoittajan kolme erilaista putkea: kuulaputki, teräputki ja sekoitusputki. (IKA Ultra Turrax Tube Drive System 2012, muokattu.)

### Työn toteutus

Työssä käytettiin 20 ml:n putkia teräskuulilla tai terällä varustettuina. Aluksi optimoitiin kuulien ja lyysispuskurin määrää. Putkien toimivuutta testattiin myös ilman lyysispuskuria sekä nestetyypen kanssa. Kuulaputket hylättiin menetelmävaihtoehdoista, koska kuulien ja nesteen määrästä ja näytteen jäädyttämisestä huolimatta kuulat eivät homogenisoinneet näyttemateriaalia. Todettiin, että putkia ei voida jäädyttää nestetyypessä, sillä sekoitustikkua liikuttava mekanismi ei toimi jäätyessään. Vaihtoehtoisesti näyte voidaan jäädyttää ja sen jälkeen homogenisoida putkessa. Tämä olosuhdevaihtoehto jätettiin kuitenkin pois alkutestauksen jälkeen, sillä menetelmiä ja niiden olosuhdevaihtoehtoja oli pakko karsia työn laajuuden vuoksi. Jo alkutestauksissa huomattiin, että Ultra-Turrax-koeputkisekoittaja ei homogenisoi näytteitä täysin. Tästä syystä juuri Ultra-Turrax-koeputkisekoittajan olosuhdevaihtoehtoja karsittiin. Teräputkea käytettäessä lyysispuskuri oli välttämätön. Ilman nestettä terä siirsi näytteen reunoille ja korkkiin, minkä jälkeen näyte ei enää ole terän saavutettavissa eikä se homogenisoidu. Havaittiin myös liian vähäisen nesteen määrän heikentävän homogenisointia. Työssä päädyttiin käyttämään 4 ml:aa lyysispuskuria teräputkessa.



Erilaisia olosuhteita vertailtaessa Ultra-Turraxilla testattiin ainoastaan näytteen homogenisointumista lyysispuskurissa. Pelkän näytteen ja jäädytetyn näytteen homogenisointumisen luovuttiin, koska todettiin, että neste on välttämättömyys teräputkea käytettäessä. Koska putkien tilavuus oli niin suuri, ei putkissa voitu homogenisoida vain yhtä näytettä (40 mg). Kasvinäytteitä punnittiin noin 320 mg eli kahdeksan näytteen verran ( $8 \times 40 \text{ mg} = 320 \text{ mg}$ ), jolloin myös lyysispuskuria pipetoitiin kahdeksan näytteen verran eli yhteensä 4 ml ( $8 \times 500 \mu\text{l}$ ). Näytteitä homogenisoitiin Ultra-Turraxissa 59 sekuntia teholla 9. Kasvinäytteillä jatkettiin KingFisher Plant DNA Kitin ohjeen mukaisesti RNase A:n lisäsvaiheesta (taulukko 3).

#### 6.2.6 Pellet Pestle –mikrosentrifugiputkisekoittaja

##### Johdatus

Pellet Pestle –mikrosentrifugiputkisekoittaja on käsikäyttöinen, pattereilla toimiva sekoittaja ja homogenisaattori (kuva 18). Se sopii erityisesti solupellettien liuottamiseen ja sekoittamiseen sekä pehmeiden kudoksien hajottamiseen ja homogenisointiin. Pellet Pestle on suunniteltu erityisesti 0,5 ml ja 1,5 ml mikrosentrifugiputkille (Pellet Pestle Cordles Motor 2011.)



Kuva 18. Pellet Pestle –mikrosentrifugiputkisekoittaja. (Pellet Pestle Cordles Motor 2011.)

##### Työn toteutus

Pellet Pestlen testausten alussa selvisi, että näytteitä ei voida homogenisoida sellaisenaan eikä lyysispuskurissa. Pellet Pestleä käytettiin siis ainoastaan nestetyypessä jäädy-

tettyihin kasvinäytteisiin. Homogenisoinnin jälkeen kasvinäytteillä jatkettiin KingFisher Plant DNA Kitin työhöjään mukaisesti.

### 6.2.7 Mortteli ja survin

#### Työn toteutus

Näytteet homogenisoitiin morttelilla ja survimella nestetyypessä jäädytettynä (kuva 20). Nestetyppi kaadettiin suoraan morttelin, jossa se jäädytti punnitun näytteen. Nestetyppiä lisättiin välillä niin, että typpi ei päässyt haihtumaan kokonaan. Sekä salaatti- että tupakkanäytteet homogenisoitiin sekä yksittäin (noin 40 mg) että kahdentoista näytteen mukaisesti (480 mg). Ongelmana oli pienien näytemäärien kohdalla morttelin koko, joka oli tarkoitettu kooltaan huomattavasti suuremmille näytteille. Morttelin pinnoite oli myös hieman kärsinyt, jolloin pieniä näytemääriä homogenisoitaessa näytettä jäi morttelin reunoille ja osa näytteestä meni hukkaan. Tämä teki haasteelliseksi homogenisoinnin onnistumisen arvioimisen. Homogenisoinnin jälkeen kasvinäytteillä jatkettiin KingFisher Plant DNA Kitin työhöjään mukaisesti.



Kuva 19. Mortteli ja survin. (Mortal and Pestle 2012.)

### 6.3 Nukleiinihappojen eristäminen KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorilla

#### Reagenssit

- KingFisher Plant DNA Kit (Thermo Scientific)
- Etax Aa absoluutoitu etanoli 99,5 % (Altia)

### Materiaalit, välineet ja laitteet

- 96-kuoppalevy (Deep well 96 plate, Thermo Scientific)
- Eluutioliuska (KingFisher Duo Elution strips, Thermo Scientific)
- Muovikärki magneettipäälle (KingFisher Duo 12 Tip Comb for 96 DW Plate, Thermo Scientific)

Nukleiinihappojen puhdistus homogenisoiduista näytteistä tehtiin KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorilla. Homogenisoiduilla ja lyysatuilla kasvinäytteillä edettiin KingFisher Plant DNA Kitin työohjeen mukaisesti. 96-kuoppalevylle ja eluutioliuskalle pipetoitiin taulukon 4 mukaiset reagenssit. Muovikärki asetettiin kuoppalevyn riville B ja täytetyt levyt asetettiin laitteeseen. KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorilla suoritettiin puhdistusprotokolla, jonka lopputuloksena puhdas DNA oli eluoituna eluutioliuskalla. (KingFisher Plant DNA Kit Instruction Manual 2010: 23.)

Taulukko 4. KingFisher Plant DNA Kitin työohjeen mukaiset reagenssit kuoppalevyn täyttämiseen. Työohje ja reagenssit on suunniteltu kasvinäytteiden DNA:n eristämiseen KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorilla. (KingFisher Plant DNA Kit Instruction Manual 2010: 23.)

<b>Muovi</b>	<b>Rivi</b>	<b>Nimi</b>	<b>Reagenssi</b>	<b>Tilavuus/kaivo</b>
KingFisher 96 Deep Well	A	Näyte	Kasvilysaatti	400 µl
			Magneettipartikkelit	30 µl
			Sidospuskuri	400 µl
	B			
	C			
	D			
	E	Pesu 1	Pesupuskuri 1	600 µl
F	Pesu 2	Pesupuskuri 2	600 µl	
G	EtOH Pesu	80 % Etanoli	600 µl	
H	Pesu 3	Pesupuskuri 3	600 µl	
Eluutioliuska	-	Eluutio	Elutiopuskuri	100 µl

## 6.4 Analyysimenetelmät

### 6.4.1 Absorbanssimittaus

#### Reagenssit

- Eluutiopuskuri (KingFisher Plant DNA Kit)

#### Materiaalit, välineet ja laitteet

- UV-spektrofotometri (Multiskan GO, Thermo Fisher)

Kaikista näytteistä mitattiin absorbanssit A260, A280 ja A320 UV-spektrofotometrillä. DNA:n absorptiomaksimi on aallonpituudella 260, mutta DNA absorboi myös jonkin verran aallonpituudella 280. Nollaus suoritettiin KingFisher Plant DNA Kitin eluutiopuskurilla, johon DNA oli eluoitu. Nollausnäytteen avulla eliminoidaan eluutiopuskurin absorption aiheuttama virhe. Kun puhtaan DNA-liuoksen absorbanssi A260:ssä on 1.0, se vastaa DNA:n konsentraatiota 50 µg/ml. Taustasta, kuten magneettipartikkeleista, aiheutuva absorptio mitattiin aallonpituudella 320, jotta laskuissa pystyttiin ottamaan huomioon taustan korjaus. (KingFisher Plant DNA Kit Instruction Manual 2010: 24.) Mitatuista absorbansseista laskettiin DNA:n konsentraatio eli saanto kaavalla:

$$DNA - saanto = 50 \mu g / ml \cdot (A_{260} - A_{320}) \cdot laimennus \cdot kerroin$$

$A_{260}$  on DNA:n absorptio aallonpituudella 260

$A_{320}$  on taustan aiheuttama absorptio aallonpituudella 320

Eristetyn DNA:n puhtautta pystytään arvioimaan  $A_{260}/A_{280}$ -arvolla. DNA:lle optimaalinen luku on 1.8-1.9, mutta 1.7-2.0 on vielä tyydyttävä. Proteiinit ja muut orgaaniset aineet laskevat arvoa, kun taas RNA-kontaminaatiot, alkoholi-, fenoli- ja suolijäämät nostavat arvoa. Kaikille näytteille laskettiin  $A_{260}/A_{280}$ -arvo kaavalla:

$$A_{260}/A_{280} = \frac{(A_{260} - A_{320})}{(A_{280} - A_{320})}$$

$A_{260}$  = DNA:n absorptio aallonpituudella 260

$A_{280}$  = taustan aiheuttama absorptio aallonpituudella 320

$A_{320}$  = proteiineista ja DNA:sta johtuvat absorptio aallonpituudella 280

Lisäksi DNA:n puhtautta arvioitiin vielä DNA-spektrin  $A_{230}$ - $A_{340}$  avulla. Vertailuna käytetään puhtaan DNA-liuoksen spektriä. Mitatuista  $A_{230}$ - $A_{340}$ -absorbanssiarvoista vähennetään taustasta aiheutuva  $A_{320}$ -arvo. Taustakorjauksen jälkeen näytteen ja puhtaan DNA:n absorbanssit suhteutetaan toisiinsa kertomalla spektrin arvot niin, että  $A_{260} = 1$ . Jokaisesta näytteestä mitattiin absorbanssit välillä  $A_{230}$ - $A_{340}$  ja laskettiin spektrin arvot kaavalla:

$$A_i = \frac{1}{A_{260}} \cdot (a_i - A_{320})$$

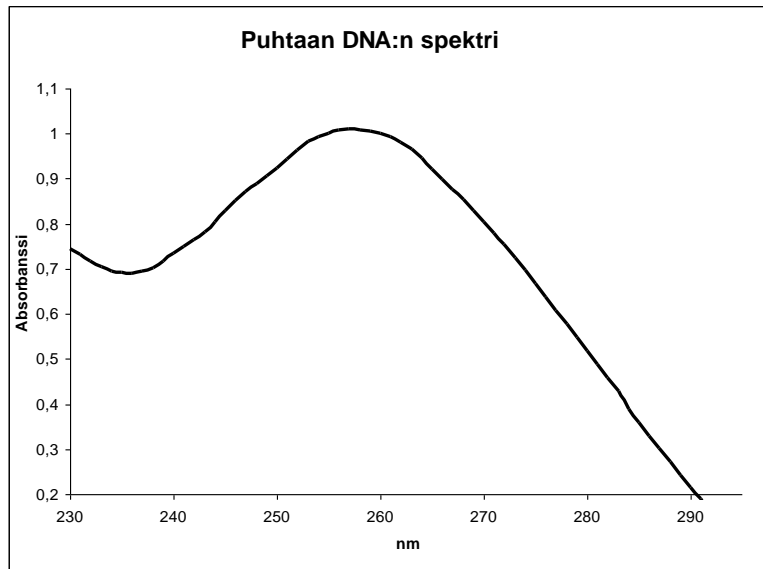
$A_i$  = laskettu absorbanssiarvo aallonpituudella  $i$ ,  $i = 230, 231, 232, \dots, 340$

$A_{260}$  = DNA:n absorptio aallonpituudella 260

$a_i$  = absorptio aallonpituudella  $i$

$A_{320}$  = proteiineista ja DNA:sta johtuvat absorptio aallonpituudella 280

Lasketuista arvoista piirrettiin kuvaaja, jonka spektrin muoto kertoo DNA:n puhtaudesta. Standardina käytettiin kaupallista vasikan kateenkorvasta eristettyä puhdasta DNA-liuosta, jonka spektri esitetty kuvassa 20.



Kuva 20. Vasikan kateenkorvasta eristetyn puhtaan DNA:n spektri. Absorbanssit on mitattu aallonpituuksilla 230-340 nm. Näiden avulla on laskettu uudet pisteet, joista spektri on piirretty.

#### 6.4.2 Agarosigeelielektroforeesi

##### Reagenssit

- Agarose LE Analytical Grade (Promega)
- 1x TBE-puskuri
- 6x Loading Dye Solution (Fermentas)
- FastRuler™ DNA Ladder (Fermentas)
- Etidiumbromidi 10 mg/ml (BIORAD)

##### Materiaalit, välineet ja laitteet

- Ajokammio ja virtalähde (Bio-Rad Power Pac 200)
- Geelin kuvantamislaitte (Alphamager)

Agarosigeelielektroforeesissa ajettiin jokaisella menetelmällä ja olosuhteella puhdistettu DNA-näyte. Valmistettiin 0,8 % agarosigeeli: punnittiin 0,8 g Agarose LE Analytical Grade –geelijauhetta, joka liuotettiin 100 ml:aan 1X TBE-puskuria (liite 1). Liuos kiehausutettiin mikrossa, jolloin jauhe liukeni tasaisesti puskuriiin. Liuoksen annettiin jäähtyä noin 60 °C:ksi, minkä jälkeen siihen lisättiin 2 µl etidiumbromidia. UV-valossa fluoresoi-

va etidiumbromidi sitoutuu kaksijuosteiseen DNA-molekyyliin, jolloin DNA voidaan havaita UV-valon avulla geelillä. Geeli valettiin ja sen annettiin jähmettyä noin puoli tuntia. Jokaisesta näytteestä valmistettiin 12,5 µl:n näyteseos, joka sisälsi 10 µl DNA:ta ja 2,5 µl 6X Loading Dye -puskuria. Geelille pipetoitiin 12 µl näyteoksia ja 10 µl FastRuler DNA Ladder -standardia. Geeliä ajettiin ensin pari minuuttia 80 V:ssa noin 1 h, kunnes näytteet olivat ajautuneet noin 5 cm geelin yläreunasta.

### 6.4.3 PCR

#### Reagenssit

- Steriili vesi
- Hot Star Taq™ entsyymi 5 U/µl (Qiagen)
- 10X PCR-puskuri (Qiagen)
- dNTP-seos 10 mM (Finnzymes)
- Aluke 100 pmol (Tobacco chloroplast trnL fwd, Thermo Hybaid)
- Aluke 100 pmol (Tobacco chloroplast trnL rev, Thermo Hybaid)

#### Materiaalit, välineet ja laitteet

- 96-PCR-kuoppalevy (ABgene SuperPlate Skirted PCR Plate, Thermo Scientific)
- Kuoppalevykorkit (Domed Cap Strip, Thermo Scientific)
- PCR-laite (Hybaid PCR Express)

PCR:n avulla monistettiin sekä salaatista että tupakasta eristetyistä DNA-näytteistä kloroplastin trnL-geenialue universaaleilla alukkeilla. Tarkoituksena oli selvittää DNA-näytteiden kelvollisuus PCR-reaktioon ja saada näin arvio DNA:n laadusta.

Alukkeet laimennettiin 1:10 steriiliin veteen. PCR:ää varten valmistettiin reaktioseos, johon pipetoitiin taulukon 5 mukaiset reagenssit. Reaktioseosta tehtiin 30-kertaisesti, josta pipetoitiin 24 µl reaktioseosta/kuoppa. Kuoppiin lisättiin 1 µl näytettä. Lisäksi ajossa oli mukana 2 negatiivista kontrollia, joihin lisättiin näytteen sijasta 1 µl vettä. Negatiivisessa näytteessä ei pitäisi tapahtua minkäänlaista monistumista, sillä siinä ei ole DNA:ta, joka voisi monistua. Jos negatiivinen näyte on puhdas ajon jälkeen, tiede-

tään, ettei reaktioseokseen ole päässyt kontaminaatiota aiheuttavaa DNA:ta ja ajon muiden kaivojen tulokset ovat näin ollen luotettavia.

Taulukko 5. PCR-reaktioseoksen reagenssit ja niiden tilavuudet yksinkertaisessa ja 30-kertaisessa reaktioseoksessa.

<b>Reagenssi</b>	<b>1X reaktio/<math>\mu</math>l</b>	<b>30X reaktio/<math>\mu</math>l</b>
Steriili vesi	19,75	592,5
10x PCR puskuri	2,5	75
Aluke I tupakka SYNG 10 pmol/ $\mu$ l	0,5	15
Aluke II tupakka SYNG 10 pmol/ $\mu$ l	0,5	15
dNTP-seos	0,5	15
HotStar Taq entsyymi 5U / $\mu$ l	0,25	7,5
yht.	24	720

Näytteet ajettiin Hybaid PCR Express –laitteella taulukon 6 mukaisella ohjelmalla. PCR-reaktion ohjelma.

Taulukko 6. PCR-reaktion ohjelma.

<b>Vaihe</b>	<b>Lämpötila</b>	<b>Aika</b>	<b>Syklit</b>
Alkudenaturaatio	95 °C	15 min	1
Denaturaatio	95 °C	15 s	45
Alukkeiden liittyminen	61 °C	45 s	
Pidentymisvaihe	72 °C	1 min	
Loppupidentyminen	72 °C	10 min	1
Lopetus	+4 °C		

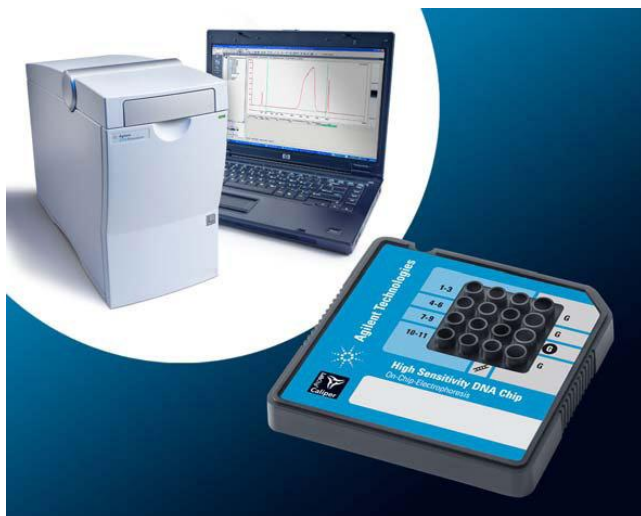
#### 6.4.4 Agilent Bioanalyzer -Lab-on-a-chip mikronestesiru

##### Johdanto

Agilent 2100 Bioanalyzer on mikronestesiruun perustuva laite, joka määrittää soluista, proteiineista, RNA:sta ja DNA:sta niiden koon, määrän ja laadun (kuva 21). Mikrosiruja hyödynnetään Lab-on-a-chip-tekniikassa, jossa yhdelle mikrosirulle on rakennettu "laboratorio" pienoiskoossa. Siruille tehdään usea eri analyysimenetelmä, jotka siru pystyy toteuttamaan ja analysoimaan automaattisesti. Mikronestesirut sisältävät ohuita kanavia, joissa neste kulkeutuu kapillaari-ilmion vaikutuksesta. Kanavat muodostavat piirin, jossa prosessit kuten sekoitus, aineiden erottelu, elektroforeesi ja PCR tapahtu-



vat halutussa järjestyksessä. (Agilent 2100 Bioanalyzer 2012a; Soininen Tiina 2012: 2-5.)



Kuva 21. Agilent 2100 Bioanalyzer, DNA Chip –mikronestesiru ja tietokoneessa 2100 Expert – tietokoneohjelma. (Agilent 2100 Bioanalyzer 2012b.)

Työssä käytetyssä mikronestesirussa näytteet pipetoidaan muiden reagenssien kanssa sirun kuoppiin, joista ne ajautuvat elektroforeettisesti vastaavasti kuin agarosigeelelelektroforeesissa. Elektroforegrammit ja geelijaon kaltainen kuva tallentuvat Agilent 2100 Expert –ohjelmaan tietokoneelle. (Agilent 2100 Bioanalyzer 2012a.)

### Työn toteutus

#### Reagenssit

- Agilent DNA 7500 Kit (Agilent)

#### Materiaalit, välineet ja laitteet

- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)
- Mikronestesiru (DNA Chips, Agilent)

Agilent Bioanalyzer -mikronestesirussa ajettiin sekä salaatti- että tupakkanäytteistä tehdyn PCR:n lopputuotteet. Mikronestesirun tietokoneelle muodostavasta gelikuvan

kaltaisesta kuvasta nähdään suoraan PCR:n onnistuminen kuvaan muodostuvien fragmenttien avulla.

Reagenssien annettiin tasaantua huoneenlämmössä 30 min. Mikrosirulle ladattava geeli valmistettiin pipetoimalla 25 µl DNA Dye Concentrate -reagenssia geelimatriisia sisältävään mikrosentrifugiputkeen. Liuos vorteksoitiin hyvin ja siirrettiin mikrosentrifugiputkeen, joka sisälsi suodattimen. Putkea sentrifugoitiin 15 min 1500 x g, jonka jälkeen geeliä pidettiin valolta suojattuna.

Geeliä pipetoitiin 9 µl mikronestesirun kaivoon ja painettiin geeli sirun kanaviin siihen tarkoitetun paineruiskun avulla. Geeliä lisättiin vielä 9 µl kahteen muuhun mikronestesirun kaivoon. Kaikkiin jäljelle jääneisiin vapaisiin kaivoihin pipetoitiin 5 µl Marker-reagenssia. Yhteen mikronestesirun kaivoon lisättiin 1 µl DNA Ladder -reagenssia ja muihin 1 µl näytettä. Mikronestesirua vorteksoitiin MS2 Minishaker -sekoittajalla 1 minuutin ajan, jonka jälkeen siru siirrettiin välittömästi laitteeseen ajoa varten.

#### 6.4.5 Tilastolliset laskut

##### Variaatiokerroin (CV)

Keskiarvoista laskettiin variaatiokertoimet (coefficient of variance) eli CV. Se ilmoitetaan tavallisesti prosentteina kertomaan mittausten suhteellisen hajonnan. Kahden eri otoksen keskihajontojen keskinäinen vertailu on välillä haasteellista, sillä keskihajonta vaihtelee aineiston keskiarvon myötä. Variaatiokerroin (CV %) määrittää, kuinka monta prosenttia keskihajonta on tulosten keskiarvosta eli suhteuttaa keskihajonnan keskiarvoon. Variaatiokerrointa voidaan näin ollen pitää toistettavuuden mittana, sillä se kertoo kuinka, paljon mittauksissa on hajontaa. Se kertoo poikkeavat mittaustulokset toisistaan eli sen, antaako menetelmä jokaisella kerralla samanlaisen tuloksen. Variaatiokerrointa käytetään pelkän keskihajonnan absoluuttisen virheen sijaan kuvastamaan suhteellista virhettä. Variaatiokerrointa laskettaessa tulosten tulee olla vähintään välimatka-asteikko, eli niistä tulee pystyä laskemaan erotus. Toisin sanoen tuloksien tulee olla numeerisia. (Holopainen ja Pulkkinen 2002: 83-88; Taavitsainen 2010: 63; Variaatiokerroin 2012; Variaatiokerroin 2003.) Eri menetelmien saannoista laskettiin niiden keskiarvo sekä keskihajonta seuraavalla kaavalla:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_i} (x_i - \bar{X})^2}{n-1}},$$

missä  $S_x$  = keskihajonta,  $x_i$  = yksittäinen mittaus,  $\bar{X}$  = mittausten keskiarvo,  $n$  = mittausten lukumäärä,  $i = 1,2,3,\dots,n$ .

Variaatiokerroin laskettiin kaavalla:

$$CV = \frac{S_x}{\bar{X}} \cdot 100\%$$

missä  $CV$  = variaatiokerroin,  $S_x$  = mittausten keskihajonta ja  $\bar{X}$  = mittausten keskiarvo.

### Luottamusväli

Oikeiden johtopäätösten tekemiseksi vaaditaan tieto mittaustarkkuudesta. Luottamusvälit määrittävät satunnaisotoksesta laskettuihin lukuihin sisältyvän virhemarginaalin. Luottamusväli kertoo välin, jolla oikea arvo on tietyllä todennäköisyydellä. Luottamusvälin todennäköisyydet ovat yleensä 95 % tai 99 %, riippuen todennäköisyydestä  $\alpha$ . Jos  $\alpha = 0,05$ , niin luottamusvälin todennäköisyys on 95 %. Työssä laskettiin keskiarvon luottamusväli, jossa lasketaan keskiarvon molemmille puolille 95 % virhemarginaalit. On siis 95 % varmuus, että tulos on laskettujen virhemarginaalien välissä. Toisin sanoen laskettu luottamusväli määrittelee ne rajat, joiden väliin 95 % keskiarvoista asettuu, mikäli tutkimus toistetaan. (Laininen 2001: 217; Luottamusväli 2012; Taavitsainen 2010: 69.)

Työn tulokset perustuvat pieneen mittaussarjaan, jossa on suhteellisen vähän mittauksia. Tästä syystä keskihajontaa pidetään "tuntemattomana", koska sen määrittäminen perustuu pieneen otoskokoon. Keskihajonnalle voidaan kuitenkin laskea estimaatti eli arvo normaalilla keskihajonnan laskukaavalla kuten aikaisemmin laskettiin. (Taavitsai-

nen 2010: 70.) Oletuksena on silti, että keskihajonta ei ole tiedossa ja näin ollen luottamusvälien ylä- ja alarajat laskettiin kaavalla:

$$\bar{X} \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-1} \frac{S_x}{\sqrt{n}},$$

missä  $\bar{X}$  = mittausten keskiarvo,  $t$  = Studendin t-jakauman arvo, jossa  $\alpha$  = riskitaso eli todennäköisyys ja  $n$  = vapausaste,  $S_x$  = mittausten keskihajonta ja  $n$  = mittausten lukumäärä eli vapausaste.

## 7 Tulokset ja tulosten tarkastelu

### 7.1 Eri homogenisointimenetelmien ominaisuudet ja käytettävyys

#### Talboys-kuulamylly

Talboys-kuulamylly oli työssä käytetyistä homogenisointimenetelmistä kaikista työläin. Itse homogenisointi ei vienyt kuin pari minuuttia, mutta kuulien poistaminen näytteiden seasta aiheutti lisätyövaiheita. Kuoppalevyn korkkien hygieeninen avaaminen vaati korkeissa olevien roiskeiden saattamisen sentrifugoimalla alas. Kuulat nostettiin yksitellen kynää muistuttavalla magneetilla ylös, jossa jouduttiin varomaan näytteen tarttumista poistettavaan kuulaan. Koska näytteet oli sentrifugoitu, täytyi ne vielä sekoittaa pipetillä tasaiseksi liuokseksi, jotta näyte saatiin taas homogeeniseen muotoon. Työläytensä lisäksi Talboys –kuulamyllyssä on suuri ristikontaminaation riski, sillä näytteitä käsitellään samalla levyllä vierekkäisissä kuopissa.

Toisaalta Talboys oli käytetyistä homogenisointimenetelmistä ainoa varteenotettava vaihtoehto, jos erillisiä näytteitä on paljon. KingFisher tuoteperheeseen kuuluva KingFisher Flex pystyy eristämään nukleiinihappoja 96 näytteestä samanaikaisesti. Työtä tehdessä pohdittiin samalla myös Flexille sopivia homogenisointimenetelmiä, vaikka itse työn eristykset tehtiinkin Duolla. Jos tavoitteena on eristää nukleiinihappoja 96 näytteestä, on tässä työssä käytetyistä menetelmistä ainoa varteenotettava homogenisointimenetelmä Talboys-kuulamylly. Kuulamylly oli homogenisointimenetelmistä ainoa,

jossa näytteiden KingFisher Plant DNA Kitin ohjeen mukaiset esikäsitteilyt kuten lämmitäminen ja sentrifugoiminen toteutettiin samalla levyllä. Pellet Pestlen - mikrosentrifugiputkisekoittajan, Ribolyser-homogenisaattorin ja morttelin yksittäisiä näytteitä käsiteltiin mikrosentrifugiputkissa, joka on usean näytteen kanssa hyvin työlästä, aikaa vievää ja epäkäytännöllistä.

Nestetyypen käyttö onnistui Talboys-kuulamyllyllä loistavasti. Koko 96-kuoppalevy näytteen pystyttiin jäädyttämään nestetyypessä, jolloin sekä levy että näytteet olivat jäässä. Levyn jäätyminen edesauttoi näytteiden jäätyksen kestoa. Jäätynneen levyn ansiosta näytteet olivat jäistä jauhoa vielä homogenisoinnin jälkeenkin. Levyn jäädyttäminen ei tietenkään toiminut silloin, kun näytteiden seassa oli lyysispuskuri, sillä puskuri jäättyi nestetyypen läsnä ollessa. Näytteiden yksittäinen jäädyttäminen ja jäätyneenä siirto lyysispuskuriin sekaan olikin työlästä ja hidasta.

Tulevaisuudessa näytteiden homogenisoitiin Talboys-kuulamyllylle tulisi kehittää sopiva menetelmä, jolla kuulat saataisiin poistettua useammasta näytteestä samanaikaisesti, jotta työvaihe ei veisi niin paljon aikaa ja olisi niin työläs. Lisäksi olisi hyvä testata, tarvitseeko kuulia poistaa lämmityksen ja inkuboinnin ajaksi vai vaikuttaako kuulien läsnäolo lopputuotteen saantoon ja epäpuhtauteen. Testauksessa näytteen siirto levyllä kuulien seasta onnistuu pipetillä suhteellisen hyvin eli kuulien poistaminen ei näytteen siirron kannalta ole välttämätöntä. Inkuboinnin jälkeen näyte voitaisiin siirtää homogenisointilevyllä suoraan reagenssilevyllä, jossa DNA:n eristäminen tapahtuu.

#### Ribolyser-homogenisaattori

Ribolyser-homogenisaattori näytti visuaalisesti tarkasteltaessa homogenisoivan täysin sekä salaatin että tupakan. Ribolyser-putket olivat kuitenkin hieman työläitä käyttää, sillä näyte piti siirtää partikkeleiden seasta lämmitystä ja inkubointia varten mikrosentrifugiputkiin. Usean näytteen kanssa työskennellessä siirteleminen vei paljon aikaa ja työläyttä lisäsivät Ribolyser-putkissa olevat kierrekorkit, jotka tekivät työskentelystä hyvin hidasta ja vaivalloista. Nestettä jäi myös jonkin verran hukkaan partikkeleiden sekaan, mikä näkyi näytettä siirtäessä.

Nestetyypen käyttö onnistui myös hyvin Ribolyser-homogenisaattorin kanssa, jolloin putket jäädytettiin näytteineen nestetyypessä. Putkien jäätyminen edesauttoi näytteen jäätyneen kestoja, ja näytteet olivat jäätyneitä vielä homogenisoinnin jälkeenkin. Näytteen jäädyttäminen ja jäätyneenä lisääminen lyysispuskuriin oli taas erityisen työlästä yksittäisten putkien ja niiden kierrekorkkien kanssa.

Myös Ribolyser-homogenisaattorilla olisi hyvä jatkossa testata, voiko näytteen lämmitellä ja inkuboida partikkeleiden kanssa, jolloin säästyttäisiin näytteiden siirtämiseltä. Tässä tapauksessa inkubointi suoritettaisiin Ribolyser-putkissa ja tämän jälkeen näyte siirrettäisiin putkesta partikkeleiden seasta suoraan kuoppalevyille DNA:n eristystä varten.

#### Ultra-Turrax-koeputkisekoittaja

Ultra-Turrax-koeputkisekoittaja oli hyvin nopea ja helppo homogenisointimenetelmä, sillä menetelmä vaati ainoastaan näytteen punnitsemisen homogenisointiputkeen ja 59 sekunnin homogenisoinnin. KingFisher Plant DNA Kitin ohjeen mukaiset esikäsittelyt kuten lämmitykset ja sentrifugoinnit pystyttiin suorittamaan Ultra-Turrax-koeputkisekoittajan koeputkessa eikä menetelmä vaatinut näytteen siirtämistä toiseen putkeen tai homogenisointikomponenttien kuten terän poistamista.

Menetelmää käytettäessä huomattiin kuitenkin jo paljaalla silmällä, että menetelmä ei homogenisoinut kasvinäytteitä täysin. Sekä salaattia että tupakkaa homogenisoitaessa putkessa oli havaittavissa suuriakin lehden palasia, jotka eivät olleet hajonneet. Lisäksi menetelmä sopi vain kooltaan suurille näytemäärille, sillä pienet 40 mg näytteet eivät homogenisoituneet putkessa.

Ultra-Turrax-koeputkisekoittajan testausvaiheessa havaittiin, että putkia ei voida jäädyttää nestetyypessä, sillä sekoitustikkua liikuttava mekanismi ei toimi jäätyessään. Todettiin myös, että neste on välttämättömyys homogenisoinnin mahdollistamiseksi. Lisäksi havaittiin, että kuulilla varustetut putket eivät homogenisoi salaatti- ja tupakka-näytteitä missään olosuhdevaihtoehdoissa kuten lyysispuskurissa tai nestetyypessä jäädytettynä.

### Pellet Pestle -mikrosentrifugiputkisekoittaja

Pellet Pestle –mikrosentrifugiputkisekoittaja hylättiin melkein kokonaan suositeltavana vaihtoehtona homogenisoida kasvinäytteitä, sillä menetelmä oli hyvin epäkäytännöllinen toteuttaa. Lisäksi se oli menetelmänä hyvin epäluotettava. Pellet Pestle –mikrosentrifugiputkisekoittaja hajotti hyvin heikosti salaatti- ja tupakkanäytteet, ja menetelmä oli myös hyvin haastava ja hidaskäyttöinen toteuttaa. Jäädetyt näytteet pirstoutuivat homogenisoitaessa palasiksi ja niitä roiskui mikrosentrifugiputkesta, vaikka homogenisointi toteutettiin hyvin varoen. Tästä johtuen näytettä meni homogenisoinnissa aina hukkaan, mikä ei ole toivottua, kun halutaan maksimoida DNA:n saantoa. Näytteiden roiskuminen ympäriinsä lisää myös ristikontaminaatoriskiä, jos lähellä on muita näytteitä. Menetelmä vaatii paljon kärsivällisyyttä eikä ollut toistettava eikä luotettava.

### Mortteli ja survin

Mortteli toimi homogenisointimenetelmänä yhdessä nestetyypin kanssa erityisen hyvin. Mortteli näytti visuaalisen tarkastelun perusteella saavan aikaan kaikista tasaisinta homogenisointia muihin homogenisointimenetelmiin verrattuna. Morttelilla homogenisoidut näytteet muodostivat lisätyn lyysipuskurin kanssa niin tasaisen liuoksen, että silmillä ei ollut nähtävissä kasvin palasia. Edellytyksenä morttelin käyttöä on kuitenkin näytteiden vähäinen lukumäärä. Jos erillään homogenisoitavia näytteitä on paljon erilaisia, on menetelmä kovin työläs ja hidaskäyttöinen. Mortteli sopii erityisen hyvin homogenisoitimiin, jossa näyttemateriaali on kooltaan suuri ja sen voi homogenisoida kerralla.

Työssä käytetyn morttelin halkaisija oli 11 cm, joka oli työn näytemäärille (40 mg) aivan liian suuri. Pienten näytemäärien homogenisointia olisi ollut parempi tutkia pienemmällä morttelilla. Morttelin pinta oli myös hyvin kulunut, mikä mahdollisti näytteen tarttumisen morttelin pintaan. Tämä aiheutti pieniin näytemääriin suhteellisen suurta hävikkiä osan näytteestä jäädessä morttelin reunoille, kun näytettä siirrettiin morttelista jatkokäsittelyä varten putkiin. Jatkossa pienillä näytemäärillä pitäisi testata homogenisointia pienemmässä ja uudemmassa morttelissa, jossa pinta ei olisi niin kulunut.

## Yhteenveto homogenisointimenetelmien ominaisuuksista

Työssä käytetyt homogenisointimenetelmät olivat hyvin erilaisia ja poikkesivat toisistaan sekä toimintaperiaatteiltaan että ominaisuuksiltaan (taulukko 7). Työssä käytetyistä homogenisointimenetelmien paremmuutta menetelmän sopivuuteen ei voida sanoa, sillä se riippuu hyvin monesta vaikuttavasta tekijästä. Eri menetelmät sopivat erilaiselle näytekoolle ja -määrälle. Erityisen suuresti menetelmän valintaan vaikuttaa puhdistetun DNA:n käyttötarkoitus, sillä homogenisointimenetelmä vaikuttaa DNA:n laatuun ja määrään. Osa DNA:n käyttötarkoituksista vaatii toisia enemmän, puhtaamman ja eheämmän lopputuotteen, kun taas joskus on tarve vain saada pienikin määrä ei niin hyvälaatuista lopputuotetta, jolloin myöskään homogenisointimenetelmän ei tarvitse maksimoida mahdollista saantoa ja laatua. Muita vaikuttavia asioita ovat yleensä käytössä olevat resurssit kuten aika ja raha.

Taulukko 7. Yhteenveto eri homogenisointimenetelmien ominaisuuksista.

	<b>Ribolyser</b>	<b>Pellet Pestle</b>	<b>Mortteli</b>	<b>Talboys</b>	<b>Ultra-Turrax</b>
<b>Näytteen koko (massa)</b>	Pieni	Pieni	Suuri	Pieni	Suuri
<b>Näytteiden määrä (kpl)</b>	Vähän	Vähän	Vähän	Vähän/Paljon	Vähän
<b>Homogenisointiprosessin kesto (aika)</b>	Lyhyehkö	Aikaa vievä	Aikaa vievä	Lyhyehkö	Lyhyt
<b>Automatisoitu / käsityötä</b>	Automatisoitu/käsityötä	Käsityötä	Käsityötä	Automatisoitu/käsityötä	Automatisoitu
<b>Näytteen homogeenisuus</b>	Täysin	Osittain	Täysin	Vaihteleva	Osittain

### 7.2 DNA-saannot ja saantojen luottamusvälien tarkastelu

Jokaisesta eristetystä DNA-näytteestä mitattiin absorbanssit (A260 ja A320) ja laskettiin niiden perusteella eluution DNA-konsentraatio. Sekä salaatti- että tupakkanäytteiden eristysten yksittäisten näytteiden saannot ( $\mu\text{g/ml}$ ) on esitetty liitteessä 2. Saannon lisäksi liitteessä on esitetty homogenisointimenetelmälle ja sen olosuhteelle saannon CV-arvo. Osa tuloksista hylättiin, koska ne poikkesivat huomattavasti muista saman eristuksen tuloksista. Nämä luvut on merkitty ylitse vedetyllä viivalla. Saannon haluttiin siis olevan mahdollisimman suuri, mutta CV-arvon mahdollisimman pieni, jolloin saantojen välinen hajonta olisi vähäistä.



Luottamusvälit määrittävät satunnaisotoksesta laskettuihin lukuihin sisältyvän virhemarginaalin. Työssä laskettiin saantojen keskiarvon luottamusväli, jossa lasketaan keskiarvon molemmille puolille 95 % virhemarginaalit. Laskettu luottamusväli määrittelee ne rajat, joiden väliin 95 % saantojen keskiarvoista asettuu, mikäli tutkimus toistetaan.

### Salaattinäytteiden saannot ja niiden luottamusvälit

Salaattinäytteiden DNA-saannoissa eri homogenisointimenetelmien välillä ei ollut kovin suuria eroja. Tästä syystä oli hyvin vaikea tehdä suuria johtopäätöksiä eri menetelmien välillä saantojen suhteen. Sen sijaan saantojen variaatiokertoimet (CV) eli suhteelliset hajonnat poikkesivat toisistaan enemmän eri menetelmien välillä.

Taulukossa 8 on esitetty salaattinäytteiden saantokeskiarvot ja CV-arvot eri homogenisointimenetelmillä ja olosuhteilla (N = pelkkä näyte, P = lyysispuskurissa, P+T = lyysispuskurin ja nestetyypen yhdistelmä ja T = nestetyypellä jäädytetty). Korkeimmat saannot (> 13 µg/ml) saatiin, kun näytteet homogenisoitiin Ribolyser-homogenisaattorilla nestetyypen ja lyysispuskurin yhdistelmätekniikalla (P+T), Talboyskuulamylyllä nestetyypessä jäädytettynä (T) ja Ultra-Turrax-koeputkisekoittajalla lyysispuskurissa (P). Ultra-Turraxissa oli kuitenkin 50 mg salaattia lähtömateriaalina, kun muissa menetelmissä oli 40 mg. Tästä syystä Ultra-Turraxin saantokeskiarvo ei ole muihin menetelmiin verrattuna niin suuri kuin taulukko väittää eikä myöskään vertailukelpoinen muiden menetelmien kanssa.

Taulukko 8. Yhteenveto salaattinäytteiden DNA-saannoista (µg/ml) ja CV-%:sta eri homogenisointimenetelmillä ja olosuhteilla (N = pelkkä näyte, P = lyysispuskurissa, P+T = lyysispuskurin ja nestetyypen yhdistelmä ja T = nestetyypellä jäädytetty).

	Ribolyser				Pellet Pestle	Mortteli		Talboys				Ultra Turrax
	N	P	P+T	T	T	Erikseen T	Yhdessä T	N	P	P+T	T	P
Keskiarvo (µg/ml)	10,0	10,4	13,1	8,7	12,0	6,1	11,0	9,8	9,7	9,0	13,5	13,5
CV %	45,2	20,4	23,9	22,4	41,4	26,3	2,1	52,1	8,8	25,0	17,7	3,1

Selkeästi muita menetelmiä heikompi saantokeskiarvo saatiin, kun morttelissa, homogenisoitiin näytteet erikseen eli yksitellen. Tämän epäiltiin kuitenkin johtuvan näytteen tartumisesta morttelin seinämiin, jolloin pienessä näytemäärässä pienikin näytehävikki

vaikuttaa suuresti saantoon. Tästä syystä kokeiltiin morttelissa homogenisointia suuremmalla näytemäärällä, joista itse eristykseen otettiin kuitenkin normaali näytemäärä (40 mg). Tällä haluttiin sulkea pois näytehävikistä johtuva saannon aleneminen. Näin pyrittiin näkemään itse menetelmän mahdollistava DNA-saanto, eikä kyseisen morttelilyksilön. Ero oli huomattava näiden kahden eri homogenisointitavan välillä, sillä yhdessä homogenisoitujen näytteiden saanto (11 µg/ml) oli noin puolet suurempi kuin yksittäin homogenisoitujen näytteiden (6,1 µg/ml).

Kaikista pienimmät ja muista menetelmistä huomattavasti poikkeavat variaatiokertoimet (CV) olivat morttelin yhdessä homogenisoiduilla näytteillä (2,1 %) ja Ultra-Turraxin (P) lyysispuskurissa homogenisoiduilla näytteillä (3,1 %). Nämä kaksi menetelmää eivät kuitenkaan ole vertailukelpoisia muihin menetelmiin, sillä näissä yksittäiset näytteet homogenisoitiin yhdessä, kun muissa menetelmissä yksittäiset näytteet homogenisoitiin toisistaan erikseen. Morttelin yhdessä homogenisoiduissa näytteiden ja Ultra-Turraxin näytteiden saantojen suhteellinen keskihajonta on homogenisointitavasta ja sen toteutuksesta riippuen muita menetelmiä pienempi, ei itse menetelmästä riippuen.

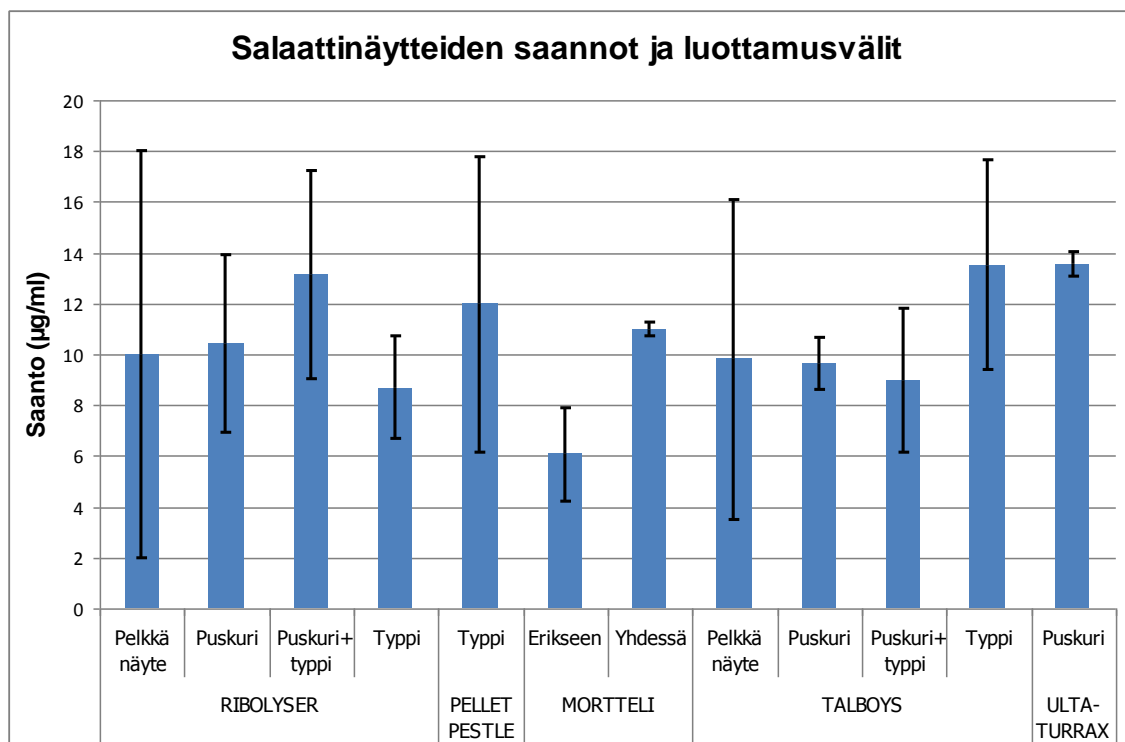
Keskenään vertailukelpoisista homogenisointimenetelmistä ja olosuhteista homogenisointi Talboys-kuulamylyllä lyysispuskurissa (P) antoi varsin pienen CV-arvon (8,8 %). Sen sijaan keskimääräistä suuremmat CV-arvot havaittiin kun näyte homogenisoitiin yksin (P) Ribolyser-homogenisaattorilla (45,2 %) ja Talboys-kuulamylyllä (52,1 %) sekä nestetyypen kanssa (T) Pellet Pestle -mikrosentrifugiputkisekoittajalla (41,4 %). Sekä variaatiokertoimien ja saantojen perusteella näyttää, että salaattinäytteen homogenisointi sellaisenaan ilman jäädytystä tai lyysispuskuria (pelkkä näyte) ei olisi yhtä tehokasta ja toistettavaa kuin muissa olosuhteissa homogenisoiduissa. Saantojen ja variaatiokertoimien perusteella ei kuitenkaan voida sanoa, mitkä menetelmät olisivat selkeästi muita parempia.

Salaattinäytteiden saantojen keskiarvot ja luottamusvälit on esitetty kuvassa 22.

Kuvan mukaan mortteli (erikseen homogenisoidut näytteet) eroaa tilastollisesti merkittävästi Ribolyser (puskuri+typpi), Talboys (puskuri) ja Talbos (typpi) – homogenisointimenetelmistä, koska morttelin luottamusvälin yläraja ei ole edellä mainittujen menetelmien luottamusvälien rajojen sisäpuolella. Muiden eri homogenisointimenetelmien saantojen luottamusvälien välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa,

sillä luottamusvälien ylä- tai alarajat ovat toisten menetelmien luottamusvälien rajojen sisäpuolella. Virhepalkit ovat siis limittäin tilanteissa, joissa ne eivät eroa tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Kun ero on tilastollisesti merkitsevää, toisen virhepalkin alaraja on suurempi kuin toisen virhepalkin yläraja, eivätkä virhepalkit näin "kosketa" toisiaan.

Kuvan mukaan ehdottomasti suurin luottamusväli saatiin, kun näytteet homogenisoitiin yksinään (pelkkä näyte) Ribolyser-homogenisaattorissa ja pienin luottamusväli, kun näytteet homogenisoitiin lyysipuskurissa (puskuri) Talboys-kuulamylyssä. Talboys-kuulamylyssä lyysipuskurin avustuksella homogenisoiduilla näytteillä on siis pienin virhemarginaali verrattuna muihin homogenisointimenetelmiin. Jos kokeet toistettaisiin, osuisivat menetelmän saannot 95 % varmuudella kyseisen virhemarginaalin väliin. Kuvan mukaan työssä käytetyistä homogenisointimenetelmistä toistettavin menetelmä oli Talboys-kuulamyly, kun näytteet olivat homogenisoitu lyysipuskurissa.



Kuva 22. Keskiarvot salaattinäytteiden DNA-saannoista pylväskaaviona sekä luottamusvälit (virhepalkit) eri homogenisointimenetelmille ja olosuhteille.

### Tupakkanäytteiden saannot ja niiden luottamusvälit

Erot tupakkanäytteiden DNA-saannoissa eri homogenisointimenetelmien välillä olivat suuria (vaihtelivat välillä 12,4-107,6 µg/ml). Sen sijaan CV-arvojen välinen vaihtelu ei ollut niin suurta kuin saantojen välinen vaihtelu.

Taulukossa 9 on esitetty tupakkanäytteiden saantokeskiarvot ja CV-arvot eri homogenisointimenetelmillä ja olosuhteilla (N = pelkkä näyte, P = lyysispuskurissa, P+T = lyysispuskurin ja nestetyypen yhdistelmä ja T = nestetyypellä jäädytetty). Selkeästi korkeimmat saannot saatiin taulukon mukaan Ribolyser-homogenisaattorilla eri olosuhteissa (65,9-107,6 µg/ml). Ribolyser-menetelmän olosuhteista korkein saantokeskiarvo saatiin lyysispuskurissa (P) homogenisoiduilla näytteillä (107,6 µg/ml). Ribolyser-homogenisaattorin lisäksi Talboys-kuulamyllyn lyysispuskurissa homogenisoitujen näytteiden saantokeskiarvo oli myös suhteellisen korkea (66,7 µg/ml). Kaikista matalimmat saannot saatiin Pellet Pestle –mikrosentrifugiputkisekoittajalla (12,4 µg/ml).

Taulukko 9. Yhteenveto tupakkanäytteiden DNA-saannoista (µg/ml) ja CV-%:sta eri homogenisointimenetelmillä ja olosuhteilla (N = pelkkä näyte, P = lyysispuskurissa, P+T = lyysispuskurin ja nestetyypen yhdistelmä ja T = nestetyypellä jäädytetty).

	Ribolyser				Pellet Pestle	Mortteli		Talboys				Ultra-Turrax
	N	P	P+T	T	T	Erikseen T	Yhdessä T	N	P	P+T	T	P
Keskiarvo (µg/ml)	70,5	107,6	78,0	65,9	12,4	18,7	45,4	20,4	66,7	49,6	50,8	33,3
CV (%)	13,0	11,3	28,8	9,2	26,3	13,4	0,7	19,4	13,2	12,9	47,7	1,5

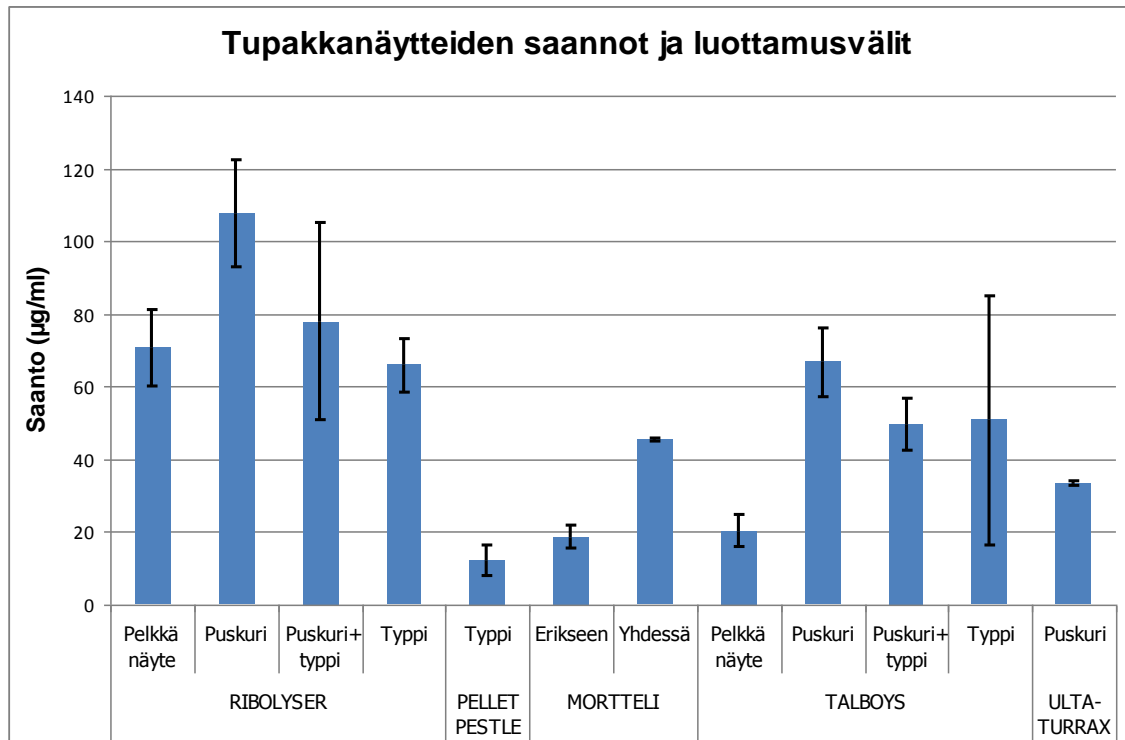
Tupakkanäytteiden saantojen variaatiokertoimien (CV) välillä ei ollut yhtä suurta vaihtelevuutta kuin itse saantojen välillä. Selkeästi pienimmät arvot olivat morttelissa yhdessä homogenisoiduissa näytteissä ja Ultra-Turraxilla homogenisoiduissa näytteissä. Kuten aikaisemmin salaattinäytteiden saantoja käsiteltäessä todettiin, eivät nämä kaksi homogenisointimenetelmää ole vertailukelpoisia muiden homogenisointimenetelmien kanssa. Poikkeavasti muita suuremmat CV-arvot saatiin, kun näyte homogenisoitiin nestetyypessä jäädytettynä (T) Talboys-kuulamyllyssä (47,7 %) ja nestetyypen ja lyysispuskurin yhdistelmätekniikalla (P+T) Ribolyser-homogenisaattorissa (28,8 %).

Saantojen ja CV-arvojen perusteella työssä käytetyistä homogenisointimenetelmistä paras menetelmä tupakkanäytteille oli Ribolyser-homogenisaattori niin, että näyte

homogenisoitiin lyysispuskurissa. Toisaalta tuloksien perusteella tupakkanäytteille oli myös paljon muita vartenotettavia homogenisointimenetelmiä.

Tupakkanäytteiden saantojen keskiarvot ja luottamusvälit on esitetty kuvassa 23. Kuvan mukaan eri homogenisointimenetelmät eroavat tilastollisesti merkittävästi toisistaan enemmän tupakkanäytteillä kuin salaattinäytteillä. Pellet Pestle (typpi), mortteli (erikseen) ja Talboys (pelkkä näyte) -homogenisointimenetelmät eroavat tilastollisesti merkitsevästi kaikista muista homogenisointimenetelmistä paitsi Talboys-menetelmästä (typpi). Kyseisten kolmen homogenisointimenetelmien luottamusvälit ovat hyvin pienet, mutta vastaavasti myös saannot jäivät hyvin alhaiseksi. On siis todennäköistä, että kokeita toistettaessa saannot osuisivat pienemmälle välille kuin muissa homogenisointimenetelmissä, mutta saannot olisivat myös alhaiset muihin homogenisointimenetelmiin verrattuna.

Suurin luottamusväli on Talboys (typpi) –menetelmällä. Tällä homogenisointimenetelmällä virhemarginaali on siis hyvin suuri saantojen suhteen. Ribolyser (puskuri) –menetelmässä saannot olivat korkeimmat ja luottamusväli suhteellisen tyydyttävä. Kuvan mukaan tupakkanäytteistä Ribolyser (puskuri) –menetelmä mahdollistaa saannoiltaan ja sen virhemarginaaleiltaan parhaimman lopputuloksen muihin homogenisointimenetelmiin verrattuna.



Kuva 23. Keskiarvot tupakkanäytteiden DNA-saannoista pylväskaaviona sekä luottamusvälit (virhepalkit) eri homogenisointimenetelmille ja olosuhteille.

### Yhteenveto saannosta

Salaattinäytteiden DNA-saannoissa vaihtelu eri homogenisointimenetelmien välillä oli huomattavasti vähäisempää kuin tupakkanäytteiden DNA-saannoissa. Näytemateriaali vaikutti siis vahvasti siihen, mikä homogenisointimenetelmä toimi ja missä olosuhteissa. Näytemateriaaleja olisi hyvä testata useampia kuin kaksi, jotta saataisiin laajempi käsitys eri homogenisointimenetelmien toimivuudesta DNA:n eristämiseen magneettipartikkeliprosessorilla. Tuloksien perusteella voidaan todeta, että eri näytemateriaalit käyttäytyvät eri homogenisointimenetelmissä eri tavalla.

Tuloksien mukaan korkeat saannot, pienen variaatiokertoimen (CV) ja pienen luottamusvälin mahdollistavia homogenisointimenetelmiä olivat erityisesti Ribolyser-homogenisaattori ja Talboys-kuulamyly, kun näyte oli homogenisoitu lysispuskurissa.

## 7.3 DNA:n puhtaus

### 7.3.1 A260/A280-arvot

Eristetyn DNA:n puhtautta pystytään arvioimaan mitatuista absorbansseista lasketulla A260/A280-arvolla. DNA:lle optimaalinen luku on 1.8-1.9, mutta 1.7-2.0 on vielä tyydyttävä. Proteiinit ja muut orgaaniset aineet laskevat arvoa, kun taas RNA-kontaminaatiot, alkoholi-, fenoli- ja suolijäämät nostavat arvoa. Kaikille näytteille laskettiin A260/A280-arvo mitatuista absorbansseista. Sekä salaatin että tupakan lehti- en DNA-eristysien yksittäisten näytteiden A260/A280-arvot on esitetty liitteessä 3. A260/A280-arvojen lisäksi liitteessä on esitetty homogenisointimenetelmälle ja sen olosuhteelle A260/A280-arvojen variaatiokerroin (CV).

Variaatiokertoimet (CV) ovat yleensä A260/A280-arvoilla huomattavasti pienemmät kuin DNA-saannoilla. DNA:n eristämässä saantoihin tulee helpommin vaihtelevuutta kuin puhtauteen. Tämä voi johtua yksinkertaisista virheistä työvaiheiden tekemisessä kuten pipetoimisesta, jolloin saannot voivat vaihdella suuresti eri näytteiden välillä, mutta puhtaus saattaa olla sama. Harvemmin puhtaus myöskään on KingFisher Duo - magneettipartikkeliprosessorilla pienempi kuin 1,6 tai suurempi kuin 2,1. Normaalisti KingFisher Duolla eristetyn DNA:n puhtaus on hyvä, johtuen itse puhdistusmenetelmästä.

#### Salaattista eristettyjen DNA-näytteiden A260/280-arvot

Salaattinäytteiden A260/280-puhtausarvojen keskiarvot sekä niiden variaatiokertoimet (CV) on esitetty taulukossa 10. Salaatin lehdistä eristetyissä DNA-näytteissä puhtaus oli hyvin tasaista eri homogenisointimenetelmien välillä (1,7-1,9). A260/A280-arvot olivat myös homogenisointimenetelmillä tasaisia, mistä seurasi pienet variaatiokertoimet.

Salaattista eristettyjen DNA-näytteiden puhtaus absorbansseista laskettuna A260/A280-arvona sekä A260/A280-arvojen variaatiokerroin (CV) eri homogenisointimenetelmillä ja olosuhteilla (N = pelkkä näyte, P = lyysispuskurissa, P+T = lyysispuskurin ja neste-tyypen yhdistelmä ja T = nestetyypellä jäädytetty).

Taulukko 10. Sekä Pellet Pestlellä että morttelilla erikseen homogenisoidut näytteet saivat arvoksi 1,7, joka on muihin menetelmiin verrattuna keskimäärästä pienempi eikä myöskään ole DNA:lle optimaalinen (< 1,8-1,9). Muiden menetelmien arvot olivat välillä 1,8-1,9, mikä kertoo DNA-tuotteen olevan puhdasta.

	Ribolyser				Pellet Pestle	Mortteli		Talboys				Ultra Turrax	
	N	P	P+T	T	T	erikseen T	yhdessä T	N	P	P+T	T	P	
<b>Keskiarvo</b>	1,8	1,8	1,8	1,8	1,7	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,9
<b>CV (%)</b>	5,1	3,3	1,5	1,7	5,6	3,5	0,5	3,7	2,0	2,1	2,0	0,8	

Kuten saantojen tarkastelussa todettiin, Ultra-Turrax-koepuotkisekoittajassa (P) ja morttelissa yhdessä homogenisoidut näytteet (T) eivät ole muihin homogenisointimenetelmiin vertailukelpoisia. Hieman muita homogenisointimenetelmiä korkeammat variaatiokertoimet saatiin kun näytteet homogenisoitiin yksinään Ribolyser-homogenisaattorissa (5,1 %) ja nestetyössä jäädytettynä Pellet Pestle – mikrosentrifugipuotkisekoittajassa (4,6 %). Muiden homogenisointimenetelmien variaatiokertoimet olivat välillä 1,5-3,7 % ja keskinäiset erot ovat hyvin pieniä.

Johtopäätöksenä salaattinäytteiden A260/A280-arvoista ja niiden variaatiokertoimista todettiin, että salaatista DNA:ta eristettäessä ei eri homogenisointimenetelmillä ole juurikaan merkitystä lopputuotteen puhtauteen. Toiset homogenisointimenetelmät näyttäisivät olevan puhtauden suhteen hieman toistettavampia kuin toiset menetelmät, mutta erot eri menetelmien välillä ovat hyvin pienet.

#### Tupakasta eristettyjen DNA-näytteiden A260/280-arvot

Tupakkanäytteiden A260/280-puhtausarvojen keskiarvot sekä niiden variaatiokertoimet (CV) on esitetty taulukossa 11. Tupakan lehdistä eristetyissä DNA-näytteissä puhtaus vaihteli eri homogenisointimenetelmien välillä (1,6-2,1). A260/A280-arvojen variaatiokertoimet eri homogenisointimenetelmien välillä taas vaihtelivat hyvin suuresti välillä 1,2-25,8 %, kun Ultra-Turrax-koepuotkisekoittajassa homogenisoituja ja morttelin yhdessä homogenisoituja näytteitä ei otettu huomioon.



Taulukko 11. Tupakasta eristettyjen DNA-näytteiden puhtaus absorbansseista laskettuna A260/A280-arvona sekä A260/A280-arvoista laskettu variaatiokerroin (CV) eri homogenisointimenetelmillä ja olosuhteilla (N = pelkkä näyte, P = lyysispuskurissa, P+T = lyysispuskurin ja nestetyypen yhdistelmä ja T = nestetyypellä jäädytetty)

	Ribolyser				Pellet Pestle	Mortteli		Talboys				Ultra Turrax
	N	P	P+T	T	T	erikseen T	yhdessä T	N	P	P+T	T	P
<b>Keskiarvo</b>	1,7	1,7	1,6	1,6	2,1	1,8	1,8	1,8	1,9	1,9	1,8	1,9
<b>CV (%)</b>	4,1	3,3	3,7	2,9	25,8	1,8	0,4	2,2	1,2	1,2	4,3	0,7

Kun näytteet homogenisoitiin lyysispuskurin ja nestetyypen yhdistelmätekniikalla (P+T) sekä nestetyypessä jäädytettynä (T) Ribolyser-homogenisaattorissa saatiin A260/A280-arvoiksi 1,6, joka on alle optimin (1,8-1,9). Tämä kertoo DNA:han jääneen proteiineja tai muita orgaanisia aineita, jotka tekevät eluutiosta epäpuhtaan. Vastaavasti Pellet Pestlen (T) arvo oli 2,1, joka kertoo eluution sisältävän RNA:ta tai alkoholi-, fenoli- tai suolojäämiä, jotka nostavat puhtausarvon optimin yläpuolelle ja kertoo näin epäpuhtaasta eluutiosta. Muiden homogenisointimenetelmien A260/A280-arvot olivat DNA:lle optimaalisia ja välillä 1,8-1,9, joka kertoo DNA:n olevan puhdasta.

Korkean A260/A280-arvon lisäksi Pellet Pestle (T) -mikrosentrifugiputkisekoittajan variaatiokerroin (25,8 %) on todella suuri. Menetelmä ei siis mahdollista puhdasta ja puhtaudeltaan toistettavaa lopputulosta. Keskimäärin Talboys-kuulamylyn variaatiokerroimet ovat Ribolyser-homogenisaattorin variaatiokertoimia pienemmät. Myös morttelin erikseen homogenisoiduilla näytteillä saatiin suhteellisen pieni variaatiokerroin (1,8 %).

Johtopäätöksenä tupakkanäytteiden tuloksista todettiin, että A260/A280-arvojen ja niiden variaatiokertoimien perusteella puhtaimmat ja puhtaudeltaan toistettavimmat DNA-elutiot muihin homogenisointimenetelmiin verrattuna saatiin Talboys-kuulamylyllä.

### 7.3.2 DNA-spektrit

DNA:n puhtautta arvioitiin myös DNA-spektrien (A230-A340) avulla. Standardina käytettiin puhtaan DNA-liuoksen (vasikan kanteenkorvasta eristettyä) spektriä. Puhtaan DNA-eluution spektrin pitäisi olla samanlainen muodoltaan kuin standardikäyrän. Näytteiden käyrien suuri poikkeavuus standardin muodosta kertoo DNA-eluution sisältävän epä-

puhtauksia. Jokaisesta näytteestä mitattiin absorbanssit A230-A340, joista laskettiin uusi absorbanssiarvo spektrin piirtämistä varten.

#### Salaattinäytteiden spektrit

Salaattinäytteiden DNA-spektrien kuvaaja on esitetty liitteessä 4. Kuvasta nähdään, että jokaisen menetelmän ja olosuhteen käyrä poikkeaa standardikäyrästä hyvinkin paljon. Morttelissa yksittäin homogenisoitujen näytteiden käyrä on siksakin muotoisena keskellä kuvaajaa. Luultavasti näytteen absorbanssien mittaaminen on ollut virheellinen. Muiden homogenisointimenetelmien DNA-käyrät ovat hyvin lähekkäin toisiaan. Näytteiden käyrien absorbanssit ovat x-akselilla aallonpituuksien alkupäässä (A230) hyvin paljon korkeammat kuin puhtaan DNA-standardin. Ne ovat siis hyvin kaukana puhtaan DNA:n käyrästä. Aallonpituuksien puolivälissä (A260) näytteiden käyrät kohtaavat standardikäyrän ja kulkevat jokseenkin lähekkäin toisiaan, kunnes loppupään aallonpituuksilla (A280) käyrät taas erkanevat. Tällöin näytteiden absorbanssit ovat jälleen korkeammat kuin puhtaan DNA:n. Kuvaajasta on vaikea arvioida, mitkä homogenisointimenetelmät antaisivat puhtaimman lopputuotteen, sillä käyrät, jotka ovat toisilla aallonpituuksilla lähimpänä standardikäyrää, ovat taas toisilla aallonpituuksilla kauimpana.

Salaattinäytteiden DNA-spektrien mukaan jokaisella homogenisointimenetelmällä ja olosuhteella saatiin lopputuotteeksi suhteellisen epäpuhdasta DNA:ta, mikä on hyvin ristiriidassa A260/A280-arvojen kanssa, jotka puolsivat suhteellisen puhtaita näytteitä. On hyvin vaikea lähteä pohtimaan, onko toisessa analyysimenetelmässä tapahtunut mittausrvirhe tai jotakin, mikä voisi aiheuttaa mittaukseen virhettä. Ainakin osa salaattija tupakkanäytteiden homogenisoinneista ja DNA-eristyksestä olisi hyvä toistaa, jolloin voitaisiin vertailla DNA-spektrien ja A260/A280-arvojen tuloksia keskenään.

#### Tupakkanäytteiden spektrit

Tupakkanäytteiden DNA-spektrien kuvaaja on esitetty liitteessä 5. Tupakkanäytteet olivat selkeästi puhtaampia kuin salaattinäytteet. Tupakkanäytteiden käyrien muodot ovat samankaltaisempia DNA-standardin kanssa kuin salaattinäytteiden käyrien muodot. Tupakkanäytteiden DNA-spektrit ovat myös hyvin paljon lähempänä standardi-

käyrää kuin salaattinäytteiden spektrit. Tietyt homogenisointimenetelmät näyttäisivät DNA-spektrien mukaan mahdollistavan suhteellisen puhtaan lopputuotteen.

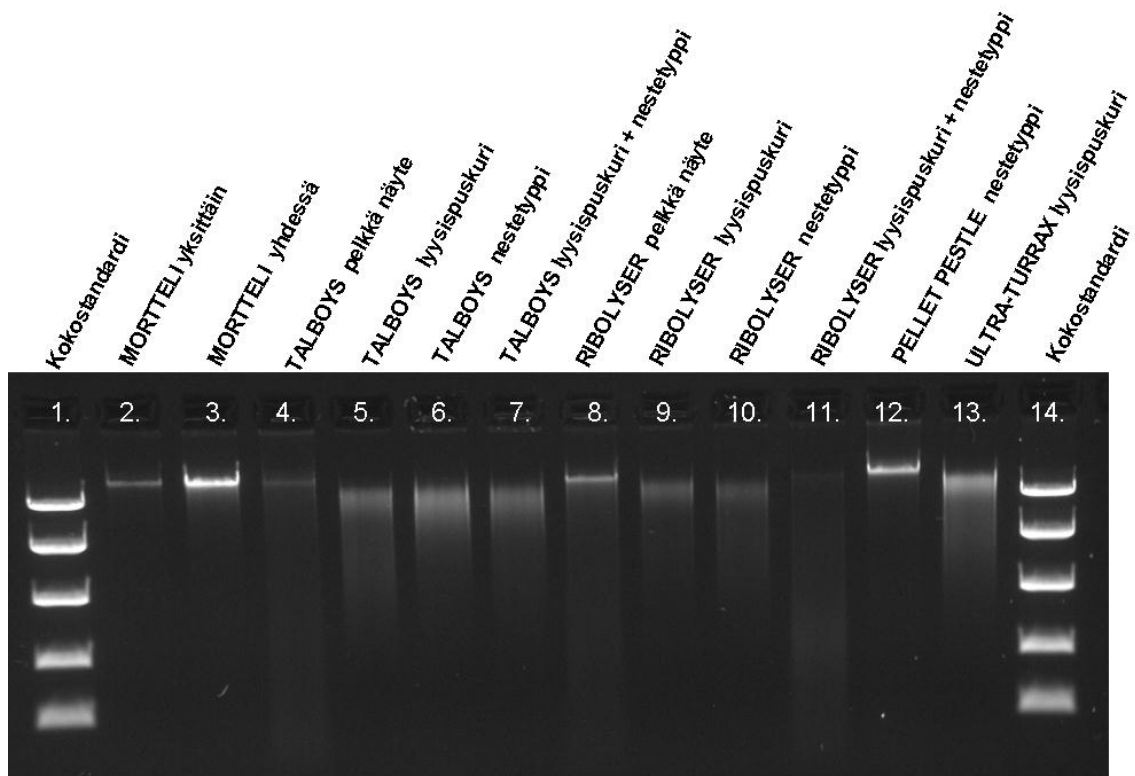
Spektrien mukaan kaikista puhtainta DNA:ta saatiin, kun näyte homogenisoitiin lyysispuskurissa tai lyysispuskurin ja nestetyypen yhdistelmätekniikalla Talboys-kuulamylyssä. Yleisesti Talboys-kuulamylyllä saatiin eristettyä puhtaimmat näytteet ja toiseksi puhtaimmat Ultra-Turrax-koeputkisekoittajalla. Selkeästi standardista kauimpana ja näin ollen epäpuhtaimpana oli Pellet Pestle –mikrosentrifugiputkisekoittajalla homogenisoitu näyte. Ribolyser-homogenisaattorissa ja morttelissa käsitellyt näytteet olivat näiden kahden ääripään välillä.

#### 7.4 DNA:n laadun ja määrän tarkastelu agarosigeelielektroforeesilla

Sekä salaatti- että tupakkanäytteistä ajettiin jokaisessa homogenisointimenetelmässä ja olosuhteessa homogenisoitu näyte agarosigeelielektroforeesilla. Agarosigeelielektroforeesin avulla saadaan arvio puhtaan DNA:n laadusta ja eheydestä. Lisäksi geelikuvasta pystytään kvalitatiivisesti arvioimaan ja vertailemaan DNA-määrää eluutioissa.

##### Salaattinäytteiden agarosigeelielektroforeesi

Salaatista eristetyt DNA-näytteet ajettiin agarosigeelielektroforeesissa, joka on esitetty kuvassa 24. Geelikuvan mukaan sekä näytteiden DNA-määrät että niiden laatu vaihtelivat eri homogenisointimenetelmien välillä. Suurimmat ja kirkkaimmat fragmentit havaittiin morttelissa (näytteet homogenisoitiin yhdessä) (3.) ja Pellet Pestlellä homogenisoituissa näytteissä (12.). Näistä kahdesta morttelin DNA-fragmentti oli geelikuvassa aavistuksen kirkkaampi, mikä kertoo, että siinä on enemmän DNA:ta. Geelikuvan mukaan DNA oli eluutioissa ehjää, kun näyte homogenisoitiin mortteleissa (2. ja 3.), Pellet Pestlessä (12.) ja yksinään homogenisoituna Ribolyser-homogenisaattorissa (pelkkä näyte) (8.), sillä fragmentit geelillä ovat selkeitä ja tarkkoja. Muiden homogenisointimenetelmien avulla eristetty DNA oli hajonnutta, sillä fragmentit jättivät sotkuisen vanan eivätkä ne ole tarkkareunaisia. Hajonneiden DNA-näytteiden pienemmät DNA-palat liikkuvat geelissä isoa kokonais-DNA:ta nopeammin koonsa vuoksi, jolloin lopputulos näyttää sotkuiselta vanalta.



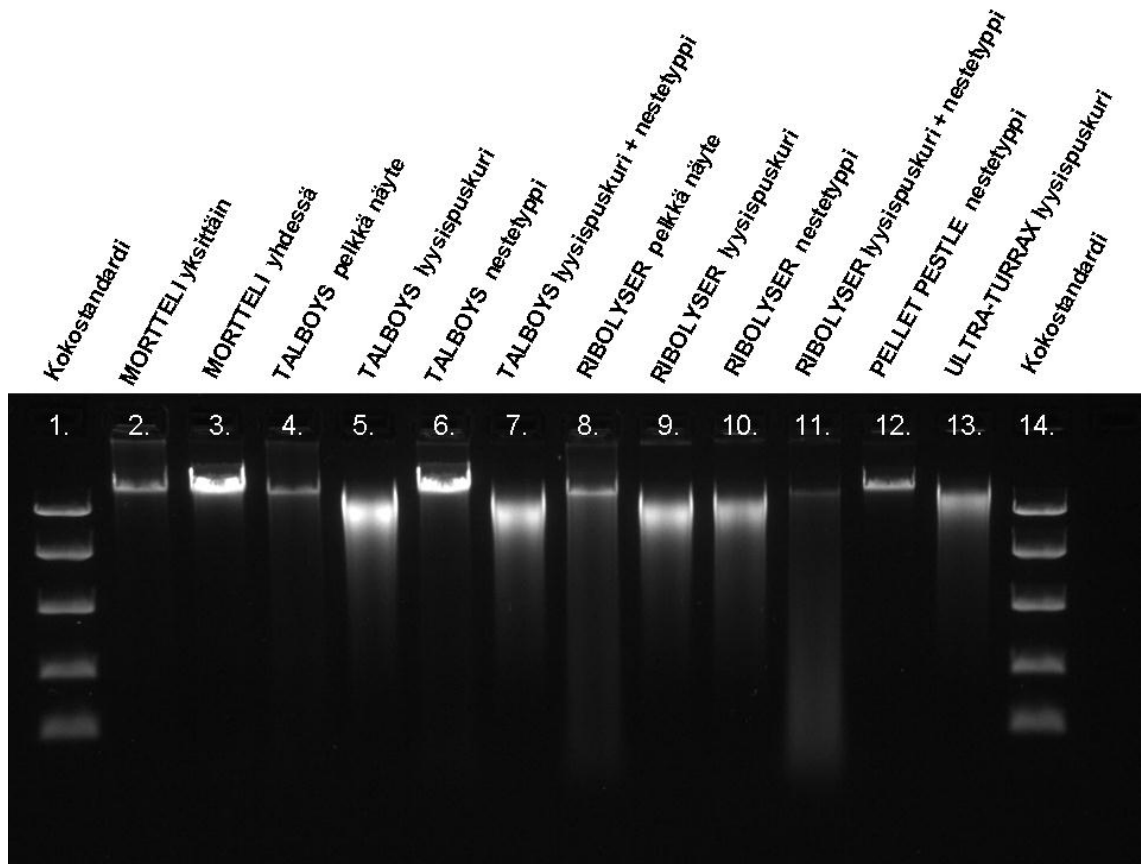
Kuva 24. Agarosigeelielektrofooresikuva salaatin lehdistä eristetyistä DNA-näytteistä eri homogenisointimenetelmillä ja olosuhteilla.

### Tupakkanäytteiden agarosigeelielektroforeesi

Tupakasta eristetyt DNA-näytteiden agarosigeelielektrofooresikuva on esitetty kuvassa 25. Kuten jo aikaisemmin kvantitatiivisesti DNA-saantoja tarkastellen todettiin, myös geelikuvan mukaan tupakkanäytteiden DNA:n määrissä eri homogenisointimenetelmien välillä oli enemmän vaihtelevuutta kuin salaattinäytteillä. Myös tupakkanäytteiden DNA:n laadussa oli eroa eri homogenointimenetelmien ja olosuhteiden välillä.

Geelikuvan mukaan eniten DNA:ta saatiin, kun näytteet homogenisoitiin morttelissa (näytteet homogenisoitu yhdessä) (3.) ja nestetyössä jäädytettynä Talboys – kuulamylyssä (6.). DNA:t ovat kuvan mukaan myös ehjiä, sillä fragmentit ovat hyvin selkeitä ja tarkkoja. Lisäksi myös Talboys-kuulamylyssä yksinään (pelkkä näyte) (4.) homogenisoitu ja Pellet Pestle -mikrosentrifugiputkisekoittajalla homogenisoitu näyte (12.) näyttäisi geelin mukaan mahdollistavan jokseenkin ehjän lopputuotteen, mutta vastaavasti DNA:n määrä on vähäinen. Paljon DNA:ta näyttää olevan myös näytteillä,

jotka oli homogenisoitu Talboys-kuulamyllyssä ja Ribolyser-homogenisaattorissa lyysispuskuria (5. ja 9.) tai lyysispuskurin ja nestetyypen yhdistelmätekniikkaa (7. ja 11.) apuna käyttäen, mutta määrää on vaikea arvioida lopputuotteiden hajonneisuuden takia.



Kuva 25. Agarosigeelielektrofooresikuva tupakan lehdistä eristetyistä DNA-näytteistä eri homogenisointimenetelmillä ja olosuhteilla.

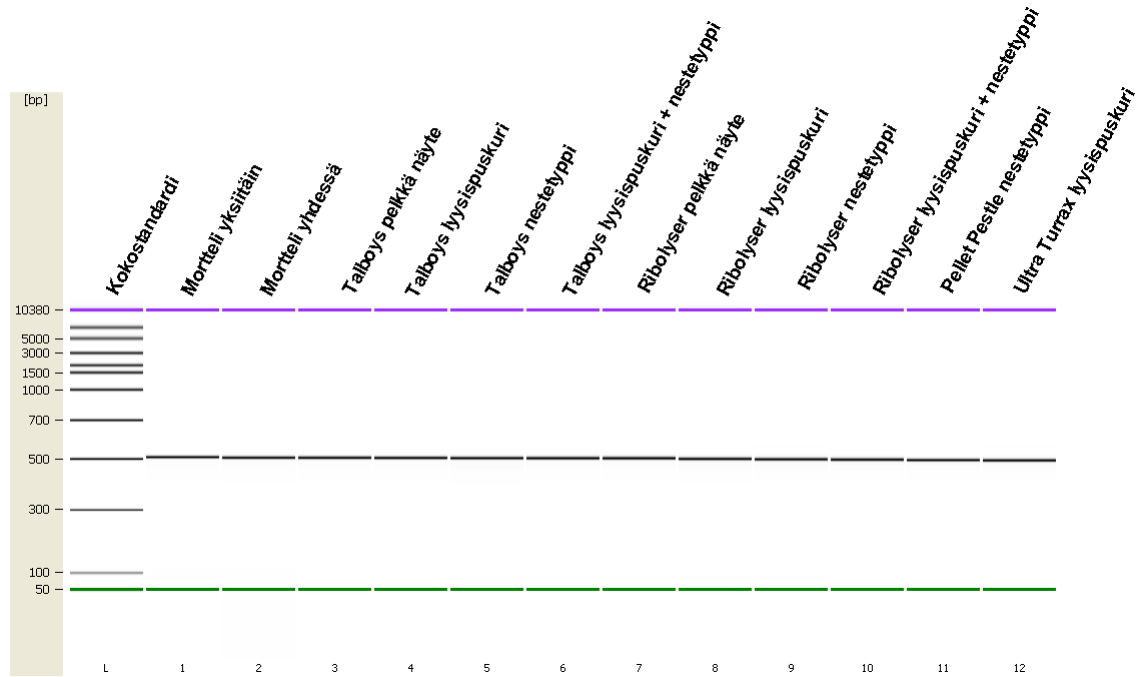
### Yhteenveto agarosigeelielektroforeeseista

Geelikuvien mukaan sekä salaatti- että tupakkanäytteiden DNA:n määrä ja laatu vaihtelevat eri homogenisointimenetelmillä. Tupakkanäytteillä DNA-määrä vaihteli suuremmin eri menetelmien välillä kuin salaattinäytteillä. Johtopäätöksenä kummastakin agarosigeelielektrofooresikuvasta todettiin, että selkeästi määrällisesti eniten ja ehjin lopputuote muihin homogenisointimenetelmiin verrattuna saatiin, kun näytteet homogenisoitiin morttelissa.

## 7.5 DNA:n laadun ja puhtauden tarkistus PCR:llä ja mikronestesirulla

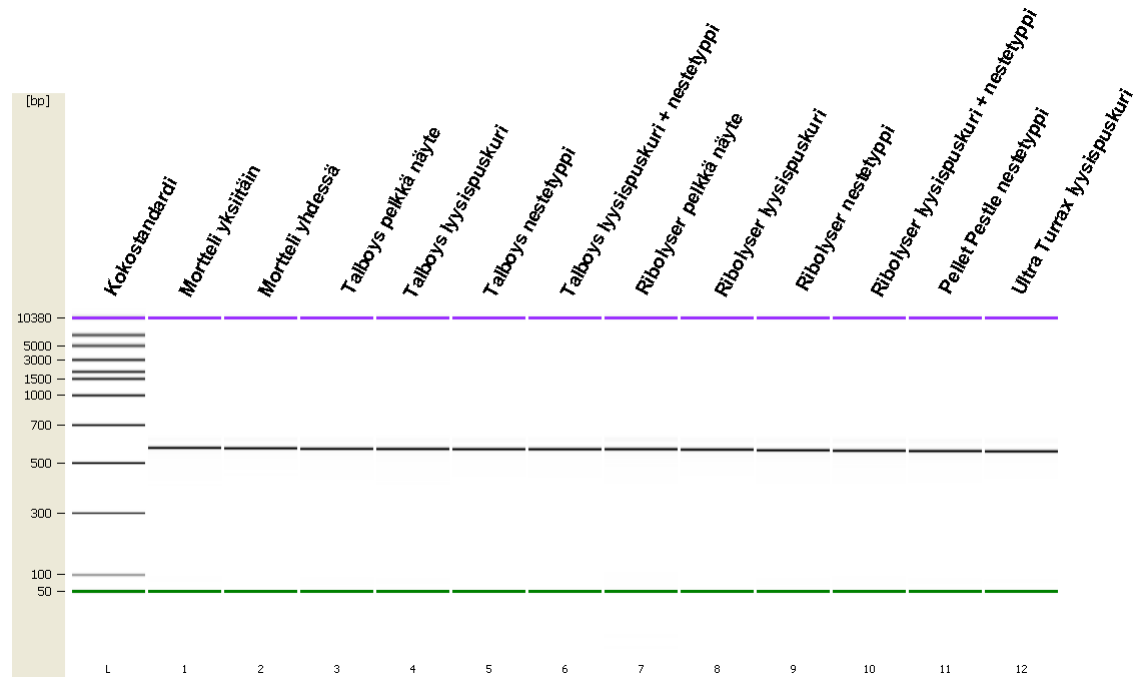
Saanto ja puhtaus eivät kerro DNA:n laadusta ja siitä, kuinka käyttökelpoista lopputuote on. Tästä syystä sekä salaattista että tupakasta eristetyistä DNA-näytteistä tehtiin PCR, jonka lopputuotteet ajettiin Agilent Bioanalyzeri -mikronestesirulla. Mikronestesirulla PCR-tuotteet ajautuivat elektroforeettisesti, josta tietokoneohjelma mahdollisti geelijaon kaltaisen kuvan. Kuvasta nähdään suoraan, onko PCR onnistunut. Jos ajoon muodostuu fragmentti, on lopputuotetta monistunut. Tyhjä kohta geelikuvassa kertoo PCR:n epäonnistumisesta, jolloin DNA ei ole monistunut PCR-reaktion aikana. PCR-reaktioon pipetoitu DNA:n määrä on yksinään niin pieni, että se ei näy Agilent Bioanalyzer -ajon muodostamassa kuvassa. PCR-reaktion onnistuminen ei kerro täysin ehjistä DNA:sta, sillä PCR-reaktio monistaa usein lyhyitäkin DNA-fragmentteja. Kuitenkaan DNA:n ollessa liian hajonnutta tai sen sisältämien inhibiittoreiden ja epäpuhtauksien johdosta PCR ei välttämättä aina onnistu.

Salaattinäytteistä eristetyn ja PCR:ssä monistetun DNA:n Agilent Bioanalyzeri-elektroforeesiajo on esitetty kuvassa 26. Kuvasta nähdään, että PCR-reaktiot onnistuivat kaikilla näytteillä, sillä geelijaossa näkyvät DNA-fragmentit jokaisen kaivon kohdalla. Eri homogenisointimenetelmien DNA-fragmentit ovat kaikki samankokoisia (hieman yli 500 emäsparia (bp)), koska PCR:n alukkeet olivat samat jokaisessa reaktiossa. Näytteissä on siis monistunut samankokoinen fragmentti. Todistettiin, että kaikilla eri homogenisointimenetelmillä ja olosuhteilla saatiin PCR-kelpoista DNA:ta menetelmän saannoista ja puhtaudesta huolimatta.



Kuva 26. Salaatista eristettyjen DNA-näytteiden PCR:llä monistettujen lopputuotteiden elektroforeesiajo Agilent Bioanalyzerissa.

Tupakkanäytteistä eristetyn ja PCR:ssä monistetun DNA:n Agilent Bioanalyzer-elektroforeesiajo on esitetty kuvassa 27. Myös tästä kuvasta nähdään, että PCR-reaktiot onnistuivat kaikilla eri homogenisointimenetelmien näytteillä, koska jokaisesta näytteestä on muodostunut fragmentti elektroforeesiajoon. Tupakkanäytteiden fragmentit ovat kooltaan hieman salaattinäytteiden fragmentteja suuremmat, sillä ne ovat kuvassa korkeammalla. Tupakkanäytteiden DNA-fragmentit ovat noin 500 emäsparin (bp) ja 700 emäsparin (bp) puolella välissä, jolloin voidaan arvioida niiden olevan noin 600 emäsparin pituisia. On täysin normaalia, että tupakalla ja salaatilla fragmentit ovat erikokoiset, vaikka alukkeet olivat PCR:ssä samat. Työssä käytetyt alukkeet monistavat universaalisti kloroplastin trnL -geenialueen, jonka DNA-sekvenssit eri kasveilla saattavat vaihdella. Eripituisista DNA-sekvensseistä johtuen myös PCR:ssä monistuvat fragmentit voivat olla erikokoisia, sillä reaktio monistaa koko alukkeiden välissä olevan sekvenssin. Todistettiin, että kaikki eri homogenisointimenetelmät ja olosuhteet mahdollistivat PCR-kelvollisen DNA:n eristyksen myös tupakkanäytteistä.



Kuva 27. Tupakasta eristettyjen DNA-näytteiden PCR:llä monistettujen lopputuotteiden elektroforesiajo Agilent Bioanalyzerissa

## 7.6 Eri homogenisointiolosuhteiden vaikutus lopputuotteeseen

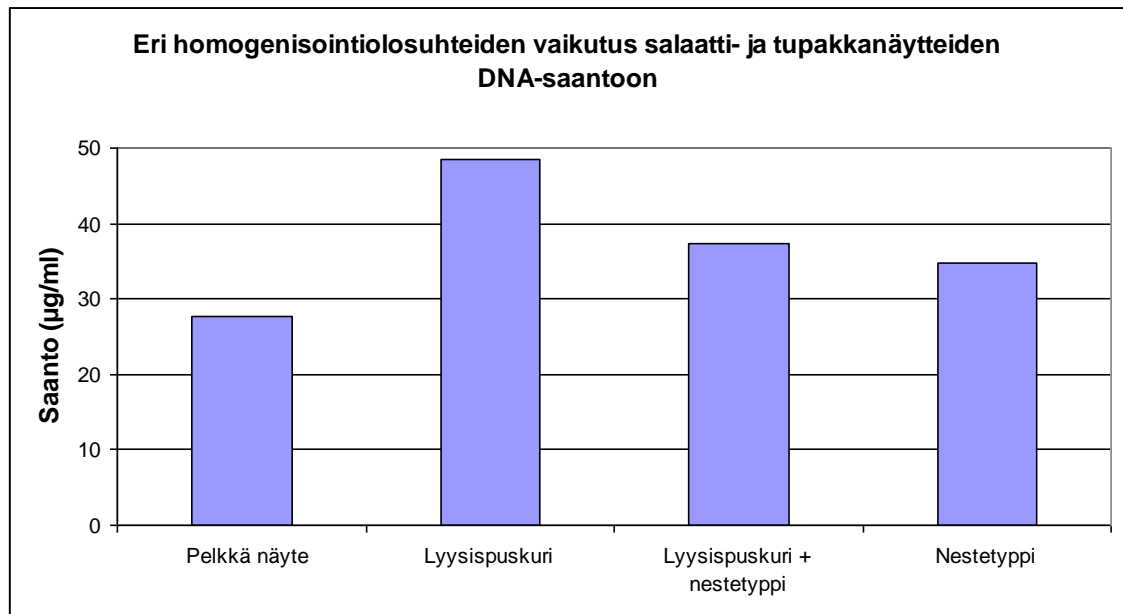
Kahdella eri homogenisointimenetelmällä testattiin kaikkia neljää eri homogenisointiolosuhdetta. Sekä Ribolyser-homogenisaattorilla että Talboys-kuulamylyllä homogenisoitiin näytteet sellaisenaan (pelkkä näyte), lysispuskurissa, nestetyössä jäädytettynä ja kahden viimeiseksi mainitun yhdistelmätekniikalla. Olosuhteita vertailtaessa toisiinsa otettiin huomioon vain nämä kaksi homogenisointimenetelmää. Muiden homogenisointimenetelmien kohdalla ei voida tietää, johtuuko lopputulos itse menetelmästä vai olosuhteista, kun näytettä ei ole homogenisoitu kaikissa olosuhteissa.

### Olosuhteiden vaikutus saantoon

Salaatti- ja tupakkanäytteiden saantokeskiarvot eri homogenisointiolosuhteilla sekä Ribolyser-homogenisaattorilla että Talboys-kuulamylyllä ovat esitetty kuvassa 28. Pylväässä on keskiarvo sekä salaatti- että tupakkanäytteiden saannoista Ribolyser ja Talboys-homogenisointimenetelmillä. Kuvan mukaan korkeimmat saannot saatiin lysispuskurissa homogenisoiduilla näytteillä. Matalimmat DNA-saannot olivat pelkän



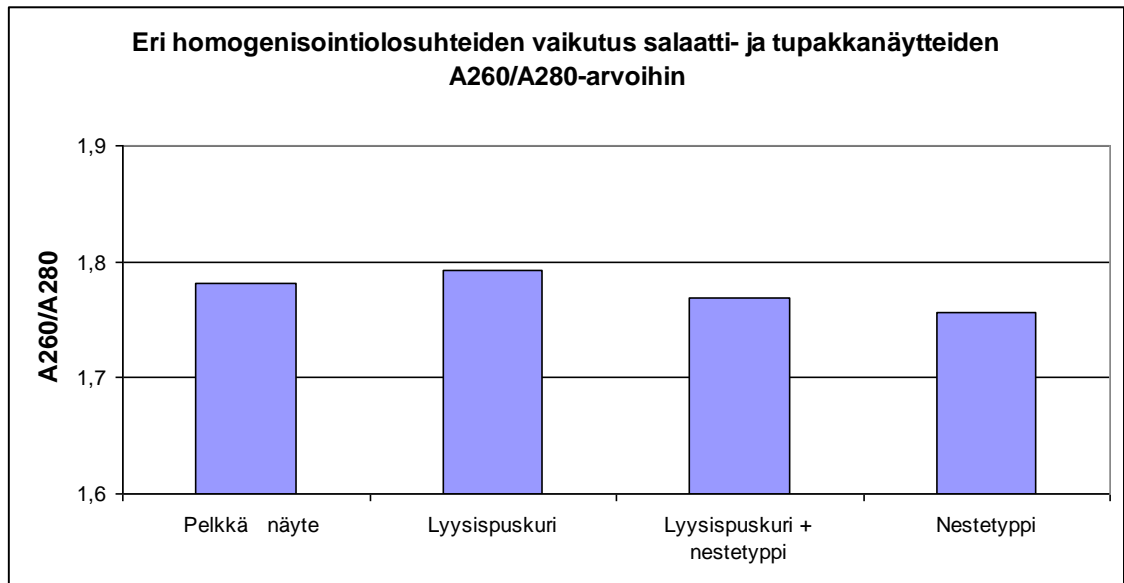
näytteen homogenisoidulla olosuhdevaihtoehdolla. Näiden kahden saantokeskiarvon ero on suhteellisen suuri (28 µg/ml ja 49 µg/ml). Lyysispuskurissa homogenisoiduilla näytteillä saatiin siis selkeästi parempi saantokeskiarvo muihin homogenisointiolosuhteisiin verrattuna.



Kuva 28. Eri homogenisointiolosuhteiden vaikutus salaatti- ja tupakkanäytteiden DNA-saantoon. Pylväässä on sekä salaatti- että tupakkanäytteiden saantokeskiarvo kahdella eri homogenisointimenetelmällä (Ribolyser ja Talboys).

#### Homogenisointiolosuhteiden vaikutus DNA:n puhtauteen

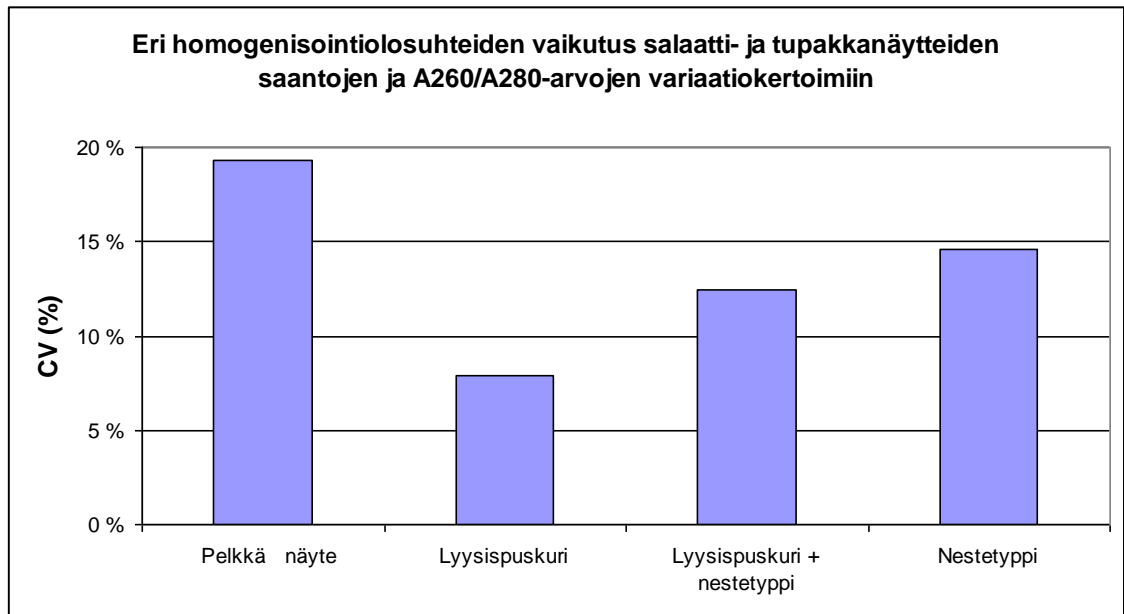
Salaatti- ja tupakkanäytteiden A260/A280-keskiarvot eri homogenisointiolosuhteilla sekä Ribolyser-homogenisaattorilla että Taboys-kuulamylyllä ovat esitetty kuvassa 29. Pylväässä on keskiarvo sekä salaatti- että tupakkanäytteiden A260/A280-arvoista Ribolyser- ja Talboys-homogenisointimenetelmillä. Kuvan mukaan A260/A280-puhtausarvoissa ei eri homogenisointiolosuhteiden välillä ole juurikaan eroa. Mikään olosuhde ei mahdollistanut DNA:lle optimaalista puhtausarvoa (1,8-1,9). Lyysispuskurissa homogenisoidut näytteet ovat muita olosuhteita lähempänä optimaalista A260/A280-arvoa (1,8). Se mahdollistaa siis hieman muita olosuhteita puhtaamman DNA-tuotteen.



Kuva 29. Eri homogenisointiolosuhteiden vaikutus salaatti- ja tupakkanäytteiden A260/A280-arvoihin. Pylväässä on sekä salaatti- että tupakkanäytteiden A260/A280-keskiarvot kahdella eri homogenisointimenetelmällä (Ribolyser ja Talboys).

#### Homogenisointiolosuhteiden vaikutus toistettavuuteen

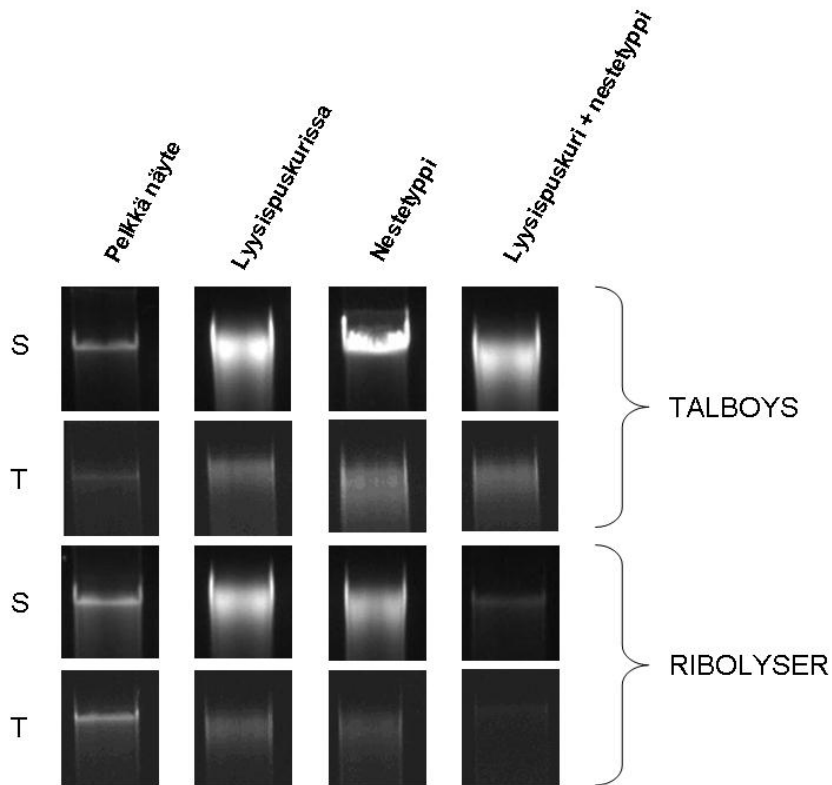
Salaatti- ja tupakkanäytteiden saantojen ja A260/A280-arvojen variaatiokertoimien (CV) keskiarvot eri homogenisointiolosuhteilla sekä Ribolyser-homogenisaattorilla että Talboys-kuulamyllyllä on esitetty kuvassa 30. Pylväässä on keskiarvo sekä salaatti- että tupakkanäytteiden variaatiokertoimista Ribolyser- ja Talboys-homogenisointimenetelmillä. Pienin variaatiokertoimien keskiarvo oli lyysispuskurissa homogenisoiduilla näytteillä. Korkein variaatiokerroin keskiarvo oli pelkän näytteen homogenisointiolosuhteessa. Lyysispuskurissa homogenisoidut näytteet mahdollistivat siis pienimmän suhteellisen keskihajonnan ja oli näin olosuhdevaihtoehdoista kaikista toistettavin.



Kuva 30. Eri homogenisointiolosuhteiden vaikutus salaatti- ja tupakkanäytteiden saantojen ja A260/A280-arvojen variaatiokertoimiin (CV). Pylväässä on sekä salaatti- että tupakkanäytteiden CV-keskiarvot kahdella eri homogenisointimenetelmällä (Ribolyser ja Talboys).

#### Homogenisointiolosuhteiden vaikutus DNA:n laatuun

Salaatti- ja tupakkanäytteiden agarosigeelielektroforeesikuvat eri homogenisointiolosuhteilla sekä Ribolyser-homogenisaattorilla että Talboys-kuulamyllyllä on esitetty kuvassa 31. Kuvasta on vaikea nähdä selkeitä eroja eri homogenisointiolosuhteiden välillä, sillä suurin osa DNA-fragmenteista on hajonnutta ja jättää geelillä ajautuessaan sotkuisen vanan. Kaikista selkein ja tarkkareunaisin fragmentti saatiin, kun salaattinäyte (S) homogenisoitiin nestetyössä jäädytettynä Talboys-kuulamyllyssä, mutta muut nestetyössä homogenisoidut näytteet ovat kuitenkin hajonnutta. DNA näyttäisi myös olevan suhteellisen ehjää, kun näyte homogenisoitiin yksinään (pelkkä näyte), mutta määrä jää selvästi muita olosuhteita vähäisemmäksi.



Kuva 31. Salaatti- (S) ja tupakkanäytteiden (T) agarosigeelielektroforeesikuvat eri homogenisointiolosuhteissa Ribolyser-homogenisaattorissa ja Talboys-kuulamyllyssä homogenisoituna.

DNA-tuotteen laadun arviointi perustui vain kahteen agarosigeelielektroforeesiajoon. Nestetyypen vaikutusta DNA:n laatuun ja eheyteen kannattaisi tarkastella vielä toisella analyysimenetelmällä tai ainakin ajaa muutama lisäajo agarosigeelielektroforeesissa. Agarosigeelielektroforeesi perustuu kvalitatiiviseen tulosten tulkintaan eikä ole menetelmänä luotettavin ja tarkin, sillä ajoissa on nähtävissä usein ajokohtaisia eroja

## 8 Pohdinta

Työssä saatiin laaja käsitys erilaisista homogenisointimenetelmistä ja niiden ominaisuuksista. Projektin aikana tutustuttiin eri menetelmien sekä hyviin että huonoihin puoliin ja saatiin kokemus eri menetelmien käytännöllisyydestä. Toisaalta työn kannalta oli erittäin hyvä, että homogenisointimenetelmiä oli useampi, jolloin myös vertailukohteita oli enemmän. Työn jälkeen asiakkaita on helpompi neuvoa ja auttaa valitsemaan juuri heidän tarkoituksiinsa sopiva homogenisointimenetelmä.

Projekti oli kuitenkin hyvin laaja, sillä se sisälsi useita eri homogenisointimenetelmiä ja näille useita eri olosuhdevaihtoehtoja kahdella eri näytteellä. Työ oli ehkä aavistuksen liian laaja, mikä vaikeutti töiden suunnittelua ja toteutusta. Tulosten tulkinta olisi myös ollut selkeämpää ja yksiselitteisempää, jos työn aihetta olisi hieman enemmän rajattu.

Jos työn homogenisointimenetelmiä tai niiden olosuhdevaihtoehtoja olisi projektin alussa karsittu, olisi pystytty tekemään työn alussa sopiva koesuunnitelma. Koesuunnitelma olisi mahdollistanut tulosten analysoimisen tilastollisten analyysien avulla, joiden mukaan olisi voitu todeta luotettavammin kuin luottamusvälien perusteella poikkeavatko homogenisointimenetelmät toisistaan tilastollisesti merkittävästi. Työn suunnittelussa todettiin, että toteutuskelpoisen koesuunnitelman tekeminen ei ole mahdollista, sillä kokeiden määrä nousisi niin valtavaksi, että projektia ei olisi mahdollista suorittaa halutussa ajassa. Kaikki työn näytteet, homogenisointimenetelmät ja olosuhdevaihtoehdot kuitenkin haluttiin projektiin mukaan, jolloin koesuunnitelman tekemisestä luovuttiin. Tämä pois sulki tulosten tulkinnan tilastollisten analyysien avulla. Koesuunnitelma olisi todennäköisesti parantanut eri homogenisointimenetelmien vertailukelpoisuutta, sillä kokeiden toteutus olisi luultavasti suunniteltu tarkemmin ja kiinnitetty erityistä huomiota toteutuksen yhdenmukaisuuteen. Työn tavoitteena ei kuitenkaan ollut katsoa menetelmien eroja tilastollisella tasolla. Asiakkaat harvemmin ovat kiinnostuneita eri menetelmien tilastollisista eroista. Kiinnostuksen kohteena ovat yleensä käytännöllisyys ja menetelmän ominaisuudet, joihin projektin tulokset vastaavat erityisen hyvin.

Kaikkien tulosten etenkin variaatiokertoimien (CV) tarkastelussa tulee ottaa huomioon niiden luotettavuus ja toistettavuus. Työ toteutettiin tekijän avulla, jolla ei ollut aikaisempaa kokemusta työn homogenisointimenetelmistä. Työn tekijä oli jo itsessään

mahdollinen virhelähde. Tämä saattoi vaikuttaa etenkin salaattinäytteiden tuloksiin, jotka suoritettiin ennen tupakkanäytteitä. Koska työn tarkoituksena oli optimoida samalla eri menetelmiä niin paljon kuin mahdollista, työskentelytapoja myös paranneltiin ja korjattiin projektin aikana. Eri menetelmiä vertailtaessa tulisi yleensä muiden virhelähteiden olla mahdollisimman pieniä, jotta nähdään itse menetelmien väliset erot. Homogenisointimenetelmien toistettavuus ei luultavastikaan ollut projektissa kaikista paras mahdollinen. Tämä tulee ottaa huomioon tuloksen tarkastelussa, jolloin tuloksien eri homogenisointimenetelmien eroihin ei voida sokeasti luottaa.

Projektin eri homogenisointimenetelmien väliset erot eivät siis ole täysin luotettavia ja ovat enemmänkin suuntaan antavia. Tämä kuitenkin oli projektiin tavoite, sillä ei oltu kiinnostuneita pienistä ja tarkoista menetelmien välisistä eroista. Tarkoituksena oli saada käsitys eri homogenisointimenetelmien käytännöllisyydestä ja toimivuudesta. Tarkoituksena oli nähdä suuremmat erot menetelmien välillä, jolloin asiakkaille pystytään kertomaan usean menetelmän perustiedot sekä niiden hyvät ja huonot puolet. Projektin tavoitteissa onnistuttiin erityisen hyvin ja työllä saatiin asetettuihin tavoitteisiin vastauksia.

Koska projekti oli laaja ja siihen käytetty aika rajallinen, jouduttiin karsimaan tutkittavia asioita kuten näytteiden lukumääriä. Tulevaisuudessa projektia voitaisiin jatkaa ehkä pienemmissä osissa ja keskittyä usean homogenisointimenetelmän sijasta yhteen tai muutamaankin jo hyväksi todettuun menetelmään, jotka ovat yleisiä asiakkaiden käytössä. Projektin ansiosta on helppo lähteä suunnittelemaan jatkotutkimuksia, sillä työssä saatiin erittäin paljon tietoa useasta eri homogenisointimenetelmästä. Tulevaisuudessa työn tuloksia voidaan soveltaa ja käyttää pohjatietona myös muiden näytemateriaalien homogenisoimisessa.

## 9 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli vertailla erilaisia homogenisointimenetelmiä salaatti- ja tupakka-näytteille DNA:n puhdistamiseen KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorille. Homogenisointiolosuhteita muuttelemalla pyrittiin löytämään myös jokaiselle menetelmälle optimaalinen homogenointitapa. Tarkoituksena oli löytää homogenisointimenetelmät, jotka mahdollistavat puhtaan, korkeasaantoisen ja laadukkaan lopputuotteen. Edellä mainittujen lopputuotteen ominaisuuksien lisäksi haluttiin myös nähdä eri homogenisointimenetelmien käytännöllisyys ja homogenisointiominaisuudet. Näytemateriaalien homogenisoinnin jälkeen näytteistä eristettiin DNA KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorilla. Lopuksi puhdistettu DNA analysoitiin erilaisilla menetelmillä kuten absorbanssimittauksella, agarosigeelielektroforeesilla ja PCR:llä.

Ultra-Turrax-koeputkisekoittimella suoritettiin mittauksia ainoastaan terällä varustetulla putkella ja niin, että näyte homogenisoitiin putkessa lyysispuskurin kanssa. Menetelmä oli nopea ja helppokäyttöinen, mutta se ei homogenisoinut näytteitä täysin. Lisäksi Ultra-Turrax-koeputkisekoittaja sopi vain kooltaan suurille näytemäärille. Huomattiin myös, että teräputkea käytettäessä neste on välttämättömyys homogenisoinnin onnistumiseksi ja että kuulilla varustetut putket eivät homogenisoi salaatti- ja tupakkanäytteitä. Talboys-kuulamyllyllä testattiin kaikkia neljää eri homogenisointiolosuhdetta: näytteen homogenisointia sellaisenaan, näytteen homogenisointia lyysispuskurissa, näytteen homogenisointia nestetyypellä jäädytettynä ja kahden viimeisen yhdistelmätekniikkaa. Tuloksien perusteella paras vaihtoehto oli lyysispuskurissa homogenisointi. Talboys-kuulamylly oli työssä käytetyistä homogenisointimenetelmistä kaikista työläin, mutta toisaalta ainoa vartenotettava vaihtoehto työssä käytetyistä homogenisointimenetelmistä, jos halutaan homogenisoida paljon näytteitä samanaikaisesti.

Morttelilla homogenisoitiin näytteitä ainoastaan nestetyypen kanssa yhdessä. Visuaalisen tarkastelun perusteella morttelilla näytti saavan kaikista homogenisointimenetelmistä tasaisinta homogenisointia. Mortteli sopii erityisen hyvin, jos näytemateriaali on kooltaan suuri ja sen voi homogenisoida yhdessä. Sen sijaan jos erillään homogenisoitavia näytteitä on paljon, menetelmä on hidas ja työläs. Myös Pellet Pestle – mikrosentrifugiputkisekoittimella homogenisoitiin ainoastaan nestetyypellä jäädytetyjä näytteitä. Menetelmä hylättiin melkein kokonaan suositeltavana vaihtoehtona homogenisoida kasvinäytteitä, sillä se hajotti näytteitä hyvin heikosti. Pellet Pestle -

mikrosentrifugiputkisekoitin vaati paljon käsityötä eikä ollut menetelmänä toistettava ja luotettava. Ribolyser-homogenisaattorilla homogenisoitiin näytteitä kaikissa neljässä eri homogenisointiolosuhteissa. Näistä lyysipuskurissa homogenisoidut näytteet osoittautuivat tuloksien perusteella parhaimmaksi. Ribolyser-homogenisaattori näytti visuaalisesti tarkasteltaessa homogenisoivan täysin sekä salaatin että tupakan. Menetelmä oli kuitenkin hieman työläs.

Korkeat saannot, pienen variaatiokertoimen (CV) ja pienen luottamusvälin mahdollistavia homogenisointimenetelmiä olivat erityisesti Ribolyser-homogenisaattori ja Talboys-kuulamylly, jolloin näyte oli homogenisoitu lyysipuskurissa. Puhtaimmat ja puhtaudeltaan toistettavimmat tulokset A260/A280-arvojen, näiden variaatiokertoimien (CV) ja DNA-spektrien perusteella saatiin Talboys-kuulamyllyssä, jossa näyte oli homogenisoitu lyysipuskurissa tai lyysipuskurin ja nestetyypen yhdistelmätekniikalla.

Eristettyjen DNA-tuotteiden eheyden, määrän ja laadun tarkastelussa todettiin agarosigeelielektrofooresikuvien perusteella morttelin mahdollistavan selkeästi eniten ja ehjimmän DNA:n muihin homogenisointimenetelmiin verrattuna. Sen sijaan PCR-reaktion ja sen tuotteiden elektrofooresiajolla todistettiin eristetyn DNA:n olevan PCR-kelvollinen kaikilla eri homogenisointimenetelmillä ja olosuhteilla sekä salaatti- että tupakkanäytteistä. Kun tarkasteltiin eri homogenisointiolosuhteiden vaikutusta salaatti- ja tupakkanäytteiden homogenisoinnin lopputulokseen, todettiin tuloksien perusteella lyysipuskurissa homogenisoinnin mahdollistavan korkeasaantoisimman, puhtaimman ja toistettavimman lopputuloksen. Nestetyypellä ei siis todettu olevan salaatti- ja tupakkanäytteiden homogenisoinnissa lopputuotteen kannalta edullisia vaikutuksia.

Projektissa opittiin erityisesti projektityöskentelyä ja siihen vaadittavia ja tarvittavia taitoa, kuten suunnitelmallisuutta, ajankäytön hallintaa, uusiin asioihin perehtymistä ja oppimista sekä tiedon hankintaa. Lisäksi insinööriyön toteutuksessa oltiin yhteyksissä asiantuntijoihin, joilta selviteltiin projektiin vaadittavia tietoja ja näin saatiin kokemusta englanninkielisestä kommunikoinnista ja asioiden hoitamisesta. Työn aikana opittiin myös huolehtimaan ja hankkimaan tarvittavat materiaalit ja ymmärrettiin niiden hankinnan suunnitelmallisuuden ja organisoinnin tärkeys laajassa projektissa. Projektissa suunniteltiin ja toteutettiin myös nestetyypen käyttöönotto laboratorioon ja selvitettiin tarvittavat turvallisuusjärjestelyt ja vaadittavat suojavarusteet.



Työstä oli suuri hyöty sekä KingFisher-tuotekehitykselle että –markkinoinnille, sillä yrityksessä ei aikaisemmin ollut perehdytty näytteiden homogenisointimenetelmiin KingFisher-magneettipartikkeliprosessoreille. Projektissa saatiin laaja käsitys erilaisista homogenisointimenetelmistä salaatti- ja tupakkanäytteille DNA:n eristämiseen KingFisher Duo -magneettipartikkeliprosessorilla. Työn tuloksia voidaan myös jatkossa soveltaa tai käyttää pohjatietona muiden näyttemateriaalien homogenisoimiseksi. Projektin ansioista asiakkaille voidaan suositella ja auttaa heitä löytämään juuri heidän tarkoituksiinsa sopiva homogenisointimenetelmä. Tuloksia käytetään myös tuotekehityslaboratoriossa hyödyksi ja apuna näytteiden homogenisoimiseen tarvittavissa tutkimuksissa.

## Lähteet

**Agilent 2100 Bioanalyser 2012a** = Agilent 2100 Bioanalyser. Agilent Technologies. (WWW-dokumentti).

<http://www.genomics.agilent.com/CollectionOverview.aspx?PageType=Application&SubPageType=ApplicationOverview&PageID=275> . Luettu 6.5.2012.

**Agilent 2100 Bioanalyser 2012b** = Agilent 2100 Bioanalyser. Agilent Technologies. (WWW-dokumentti) <http://www.agilent.com/about/vpk/28apr2009wad/index.html>.

Luettu 10.5.2012.

**Berensmeier, Sonja.** 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73. no. 3, s. 495-504.

**Berthier, Jean & Silberzan, Pascal.** 2006. *Microfluidics for biotechnology*. Artech House, s. 267-273.

**BindIt Software 3.2 for KingFisher Instruments User Manual.** 2011. Thermo Scientific. Rev 3.0.

**Boom, R, C J Sol, M M Salimans, C L Jansen, P M Wertheim-van Dillen & J van der Noordaa.** 1990 .Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28, no. 3, s. 495–503.

**Boom, Willem R., Henriette M. A. Adriaanse, Tim Kievits & Peter F. Lens.** 1993. Process for isolating nucleic acid. United States Patent. nro 5, s. 1-9.

**Boyer, R.** 2006. *Biochemistry Laboratory: Modern Theory And Techniques*. San Fransisco: Benjamin Ciummings, s. 294-295.

**Brown, T.A.** 2010. *Gene Cloning & DNA Analysis. An Introduction*. 6th ed. Wiley-Blackwell. John Wiley and Sons, s. 28-34.

**Ceramic Mortar & Pestle.** 2012. CompareStorePrices. Advanced System Technologies Ltd. (WWW-dokumentti). <http://www.comparestoreprices.co.uk/other-products/unbranded-ceramic-mortar-&-pestle.asp> . Luettu 20.4.2012.

**Brockbank et al.** 2012 = Brockbank, Kevin G.M & Covault James C. & Taylor, Michael J. *Cryopreservation Guide*. Thermo Scientific.

**Dale, Jeremy & von Schantz, Malcolm.** 2002 *From genes to genomes. Concepts and applications of DNA technology*. Wiley, s. 10, 31-36.

**Dolter, K.E. & Braman, J.C.** 2001. Small-sample total RNA purification: laser capture microdissection and cultured cell applications. *Biotechniques* 30, no. 6, s. 1358–1361.

**Dynabeads® MyOne™ SILANE.** 2008. Invitrogen Dynal AS. Invitrogen beads separations. Ohjekirja, s. 1-2.

**Dynabeads® Types and Uses.** 2012. Dynabeads® Magnetic Beads. Life TechnologiesTM.(WWW-dokumentti).  
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Product-Brand/Dynal/Dynabeads-Types-and-Uses.html> . Luettu 14.4.2012.

**Fang, X., R. C Willis, A. Burrell, K. Evans, Q. Hoang, W. Xu, and M. Bounpheng.** 2007 Automation of nucleic acid isolation on kingfisher magnetic particle processors. Journal of the Association for Laboratory Automation 12, no. 4, s. 195–201.

**GeneClean®.** 2000. How GENE CLEAN® works . Department of Biology. Davidson college.(WWW-dokumentti)  
<http://www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring99/lauren/geneclean.html> . Luettu 15.4.2012.

**Hawkins, Trevor L. & O'Connor-Morin, Tara & Roy, Aparna & Santillan, Cynthia.** 1994. DNA purification and isolation using a solid-phase. Nucleic Acids Research 22. no. 21, s. 4543 -4544.

**Holopainen, Martti & Pulkkinen, Pekka.** 2002. Tilastolliset menetelmät. WSOY, s. 83-88.

**Individual Lysing Matrix Tubes.** 2002. Products. Q-BIO Gene. (WWW-dokumentti).  
[http://www.qbiogene.com/fastprep/lysing\\_tubes.shtml](http://www.qbiogene.com/fastprep/lysing_tubes.shtml). Luettu 26.4.2012.

**Karinen Kimmo 2012** = Karinen Kimmo. Nestemäisen typen turvallinen käsittely. Teknillinen korkeakoulu. Orgaanisen kemian laboratorio, s. 1-3.

**KingFisher Blood DNA Kit Instruction Manual.** 2010. Thermo Scientific. Rev 1.0. Ohjekirja, s. 12-13.

**KingFisher Cell and Tissue DNA Kit Instruction Manual.** 2010. Thermo Scientific. Rev 1.0. Ohjekirja, s. 12-13.

**KingFisher Duo User Manual.** 2011. Thermo Scientific. rev 1.0. Ohjekirja, s. 1-57.

**KingFisher® Family.** 2008. Thermo Fisher Scientific Inc. Esite, s. 1-6.

**KingFisher overview 2012** = KingFisher overview. Power Point –esitys, s. 3.

**KingFisher Plant DNA Kit Instruction Manual.** 2010. Thermo Scientific. Rev 1.0, s. 12-24.

**KingFisher Total RNA Kit Instruction Manual.** 2011. Thermo Scientific. Rev 1.1, s. 12-13.

**Laininen Pertti.** 2001. Todennäköisyys ja sen tilastollinen soveltaminen. Otatieto, s. 217.

**Lamberg 2012** = Lamberg, Arja. KingFisher introduction. Thermo Fisher Scientific. Power Point –esitys, s. 6.

**Luottamusväli 2012** = Luottamusväli. Tilastokeskus. Tietoa tilastoista. Käsitteet ja määritelmät. (WWW-dokumentti) <http://www.stat.fi/meta/kas/luottamusvali.html>. Luettu 10.5.2012.

**Lysing Matrix D.** 2012. MP Biomedicals. (WWW-dokumentti). [http://www.mpbio.com/product\\_info.php?family\\_key=116913100](http://www.mpbio.com/product_info.php?family_key=116913100). Luettu 26.4.2012.

**Micke, P et al.** 2006. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Laboratory investigation* 86. no. 2, s. 202–211.

Minuth, Will W & Strehl, Raimund & Schumacher, Karl. 2005. *Tissue Engineering: Essentials for Daily Laboratory Work*. Wiley-VCH, s. 10.

**Mortal and Peste 2012** = Mortal and Peste. Lesson 04: Logical Mind Map. (WWW-dokumentti) <http://xxluvlemonadexx.blogspot.com/> . Luettu 26.4.2012.

**Mäkinen Johanna, Marttila Harri & Viljanen Matti K.** 2001. Automated purification of *Borrelia burgdorferi* s.l. PCR products with KingFisher™ magnetic particle processor prior to genome sequencing. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225, no. 1–2, s. 134-137.

**Nucleic Acid Purification Workflow Optimized.** 2011. KingFisher Kits. Thermo Scientific.

**Obata, K et al.** 2001. Development of a novel method for operating magnetic particles, Magtration Technology, and its use for automating nucleic acid purification. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91. no. 5, s. 500-503.

**Pellet Pestles Cordles Motor.** 2011. Sigma-Aldrich (WWW-dokumentti) <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z359971?lang=fi&region=FI>. Luettu 26.4.2012.

**Plant Genomic DNA Extraction using CTAB 2012** = Plant Genomic DNA Extraction using CTAB. (WWW-dokumentti). [http://www.cilr.uq.edu.au/UserImages/File/Plant%20Genomic%20DNA%20Extraction%20by%20CTAB%20\\_2\\_\\_Fiona.pdf](http://www.cilr.uq.edu.au/UserImages/File/Plant%20Genomic%20DNA%20Extraction%20by%20CTAB%20_2__Fiona.pdf) . Luettu 9.5.2012.

**Pure Flexibility Unparalleled Performance.** 2012. Thermo Scientific KingFisher Family Nucleic Acid Purification System, s. 1-6.

**Saiyed, ZM, Telang, SD & Ramchand, CN.** 2003. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. *Biomagnetic Research and Technology* 1. no. 1, s. 1-8.

**Schadt, Eric E. et al.** 2005. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nat Genet* 37, no. 7, s. 710-717.

**Sheehan, David.** 2009. *Physical biochemistry: principles and applications*. John Wiley and Sons, s. 11-12.

**Slater, Adrian & Scott, Nigel W. & Fowler, Mark R.** 2008. *Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants*. Oxford University Press, s. 1.

**Soininen Tiina 2012** = Soininen Tiina. Mikronestesirut, proteomiikka ja nanobiotekniikka diagnostiikassa. Power Point –esitys, s. 2-5.

**Suomalainen Marika.** 2012. Aplikaatitutkija. Thermo Fisher Scientific. Keskustelu 16.4.2012.

**Suominen, Ilari & Ollikka, Jari.** 2003. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3-1. painos Helsinki: Hakapaino Oy, s. 61-66.

**Taavitsainen Veli-Matti.** 2010. Tilastomatematiikan peruskurssi, s. 63-70.

**Talboys Throughput Homogenizer 2012** = Talboys Throughput Homogenizer. Laboratory Equipment. Troemner. (WWW-dokumentti ).  
[http://www.troemner.com/equip\\_talboys\\_high\\_throughput\\_homogenizers.php](http://www.troemner.com/equip_talboys_high_throughput_homogenizers.php). Luettu 25.4.2012.

**Talboys High Throughput Homogenizer Instruction manual.** 2009. Talboys. Rev 2. Ohjekirja, s. 8.

**Thermo Scientific KingFisher Duo Magnetic Particle Processor.** 2011. Product Specifications. Thermo Scientific. (WWW-dokumentti)  
<http://fscimage.thermoscientific.com/images/D02518~.pdf>. Luettu 28.1.2011.

**Ultra-Turrax Tube Drive System 2012** = Ultra-Turrax Tube Drive System . IKA. Esite.

**Variaatiokerroin.** 2003. KvantiMOTV. Menetelmätietovaranto. (WWW-dokumentti).  
<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/hajontaluvut/hajontaluvut.html> . Luettu 10.5.2012

**Variaatiokerroin 2012** = Variaatiokerroin. Tilastokeskus. Johdatus tilastolliseen ajatteluun. Tieto tiivistyy tunnuslukuihin. (WWW-dokumentti).  
<http://www.stat.fi/tup/verkkokoulu/data/tt/02/11/index.html> . Luettu 10.5.2012

**Zeisler Rolf & Langland John K. & Harrison Sally H.** 1983. Cryogenic Homogenization of Biological Tissues. Analytical Chemistry 55, no. 14, s. 2431–2434.

**TBE-puskurin koostumus**

5X TBE-puskurin koostumus:

Trizma base	270,0 g
Boorihappo	137,55 g
0.5 M EDTA ph 8.0	100 ml

Lisätään puhdistettu vettä niin, että kokonaistilavuudeksi tulee 5000 ml.

## Salaatti- ja tupakkanäytteiden DNA-saannot

	Ribolyser				Pellet Pestle	Mortteli		Talboys				Ultra Turrax
	Pelkkä näyte	Puskurissa	Puskuri+Typpi	Typpi	Typpi	näytteet erikseen homogenisoitu	näytteet yhdessä homogenisoitu	Pelkkä näyte	Puskurissa	Puskuri+Typpi	Typpi	Puskuri
	40 mg				40 mg	40 mg		40 mg				50 mg
<b>SALAATTI</b>												
<b>1 kerta</b>												
Näyte 1	3,5	6,4	11,3	6,0	13,9	8,1	10,8	7,8	9,8	14,0	23,6	14,3
Näyte 2	4,8	6,2	13,7	5,5	15,6	5,9	11,3	15,5	10,8	8,0	26,4	14,1
Näyte 3	5,1	7,3	8,9	9,3	13,9	6,7	10,9	14,6	9,4	8,1	17,0	14,2
Näyte 4	5,8	6,6	12,4	5,2	7,9	5,8	11,0	3,8	10,6	7,4	17,1	14,1
<b>2 kerta</b>												
Näyte 1	28,0	19,2	20,4	11,3	19,6	7,5	-	5,2	9,8	7,5	5,6	13,6
Näyte 2	15,2	15,5	15,7	12,5	6,3	5,2	-	7,1	10,1	8,6	5,8	12,9
Näyte 3	10,2	9,8	11,1	9,3	9,0	6,1	-	15,8	7,9	10,1	5,7	13,0
Näyte 4	7,1	12,6	11,7	10,5	9,6	3,1	-	8,6	8,9	8,1	7,0	12,2
<b>Keskiarvo (µg/ml)</b>	<b>10,0</b>	<b>10,4</b>	<b>13,1</b>	<b>8,7</b>	<b>12,0</b>	<b>6,1</b>	<b>11,0</b>	<b>9,8</b>	<b>9,7</b>	<b>9,0</b>	<b>13,5</b>	<b>13,5</b>
<b>CV (%)</b>	<b>45,2</b>	<b>20,4</b>	<b>23,9</b>	<b>22,4</b>	<b>41,4</b>	<b>26,3</b>	<b>2,1</b>	<b>52,1</b>	<b>8,8</b>	<b>25,0</b>	<b>17,7</b>	<b>3,1</b>
<b>TUPAKKA</b>												
<b>1 kerta</b>												
Näyte 1	86,1	117,1	78,6	73,7	9,5	15,3	45,4	28,7	86,5	63,8	38,5	35,2
Näyte 2	74,6	123,0	70,9	68,7	-250,4	23,4	45,8	19,6	75,2	58,8	118,2	35,8
Näyte 3	77,1	106,9	87,8	60,4	10,0	19,6	45,2	23,9	78,4	65,2	42,1	35,3
Näyte 4	91,1	99,6	77,9	65,2	14,8	18,5	45,1	25,2	74,0	52,6	36,7	35,4
<b>2 kerta</b>												
Näyte 1	71,1	110,1	55,9	58,0	17,7	17,6	-	16,6	43,7	44,7	45,0	31,9
Näyte 2	51,9	119,2	94,7	73,1	13,5	16,5	-	21,5	53,4	43,8	41,4	31,5
Näyte 3	61,0	95,0	46,9	62,3	11,6	19,0	-	14,6	66,7	33,3	43,4	30,9
Näyte 4	51,4	90,1	111,2	66,1	9,4	19,7	-	12,9	55,7	34,4	40,9	30,5
<b>Keskiarvo (µg/ml)</b>	<b>70,5</b>	<b>107,6</b>	<b>78,0</b>	<b>65,9</b>	<b>12,4</b>	<b>18,7</b>	<b>45,4</b>	<b>20,4</b>	<b>66,7</b>	<b>49,6</b>	<b>41,2</b>	<b>33,3</b>
<b>CV (%)</b>	<b>13,0</b>	<b>11,3</b>	<b>28,8</b>	<b>9,2</b>	<b>26,3</b>	<b>13,4</b>	<b>0,7</b>	<b>19,4</b>	<b>13,2</b>	<b>12,9</b>	<b>47,7</b>	<b>1,5</b>

## Salaatti- ja tupakkanäytteiden absorbanssien A260/A280 suhteet

	Ribolyser				Pellet Pestle	Mortteli		Talboys				Ultra Turrax
	Pelkkä näyte	Puskurissa	Puskuri+Typpi	Typpi	Typpi	näytteet erikseen homogenisoitu	näytteet yhdessä homogenisoitu	Pelkkä näyte	Puskurissa	Puskuri+Typpi	Typpi	Puskuri
	40 mg				40 mg	40 mg		40 mg				50 mg
<b>SALAATTI</b>												
<b>1 kerta</b>												
Näyte 1	1,7	1,7	1,8	1,8	1,6	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Näyte 2	1,7	1,8	1,9	1,8	1,6	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,7
Näyte 3	1,7	1,8	1,8	1,8	1,6	1,6	1,8	1,8	1,9	1,8	1,8	1,7
Näyte 4	1,8	1,8	1,8	1,8	1,6	1,7	1,8	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8
<b>2 kerta</b>												
Näyte 1	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	-	1,8	1,8	1,8	1,7	1,7
Näyte 2	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7	1,8	-	1,8	1,9	1,7	1,7	1,8
Näyte 3	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	-	1,9	1,7	1,7	1,8	1,8
Näyte 4	1,8	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	-	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8
<b>Keskiarvo (µg/ml)</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>
<b>CV (%)</b>	<b>5,1</b>	<b>3,3</b>	<b>1,5</b>	<b>1,7</b>	<b>5,6</b>	<b>3,5</b>	<b>0,5</b>	<b>3,7</b>	<b>2,0</b>	<b>2,1</b>	<b>2,0</b>	<b>0,8</b>
<b>TUPAKKA</b>												
<b>1 kerta</b>												
Näyte 1	1,7	1,6	1,7	1,7	3,2	1,9	1,8	1,9	1,8	1,9	1,8	1,8
Näyte 2	1,6	1,6	1,6	1,7	1,0	1,9	1,8	1,9	1,9	1,9	1,9	1,6
Näyte 3	1,6	1,6	1,7	1,6	2,4	1,9	1,8	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8
Näyte 4	1,6	1,7	1,7	1,7	2,1	1,9	1,8	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8
<b>2 kerta</b>												
Näyte 1	1,8	1,7	1,6	1,6	1,8	1,8	-	1,8	1,9	1,8	1,8	1,8
Näyte 2	1,8	1,7	1,7	1,6	1,8	1,8	-	1,8	1,9	1,8	1,8	1,8
Näyte 3	1,7	1,8	1,6	1,7	1,8	1,8	-	1,8	1,8	1,9	1,9	1,9
Näyte 4	1,8	1,7	1,6	1,6	1,8	1,8	-	1,8	1,8	1,9	1,9	1,9
<b>Keskiarvo (µg/ml)</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>	<b>2,1</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,9</b>	<b>1,9</b>	<b>1,8</b>	<b>1,9</b>
<b>CV (%)</b>	<b>4,1</b>	<b>3,3</b>	<b>3,7</b>	<b>2,9</b>	<b>25,8</b>	<b>1,8</b>	<b>0,4</b>	<b>2,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>4,3</b>	<b>0,7</b>



## Salaattinäytteiden spektrit

