

Opinnäytetyö (AMK)  
Bioanalytiikan ko  
Kliininen mikrobiologia  
2013

Heidi Kunnasranta ja Meri Lehto

# DNA-ERISTYSMENETELMÄN OPTIMOINTI VAUVOJEN ULOSTENÄYTTEILLE



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikan ko | Kliininen mikrobiologia

Marraskuu 2013 | Sivumäärä 45+15

Ohjaajat: Seija Kirkko-Jaakkola ja Eveliina Munukka

Heidi Kunnasranta ja Meri Lehto

# DNA-ERISTYSMENETELMÄN OPTIMOINTI VAUVOJEN ULOSTENÄYTTEILLE

Ihmisen normaalimikrobisto vaikuttaa monella tavalla terveyteen ja hyvinvointiin. Valtaosa normaalimikrobistosta sijaitsee suolistossa. Normaalimikrobiston kehitys alkaa heti lapsen synnyttyä. Normaalimikrobiston tutkimuksessa käytetään nykyään yleisesti moleekyylibiologisia analyysimenetelmiä, joita edeltää bakteeri-DNA:n eristys. Eristysmenetelmiä on monenlaisia ja aikaisempien tutkimuksien perusteella eri menetelmät antavat ristiriitaisia tuloksia, jolloin jotkin bakteerilajit ylikorostuvat ja toiset jäävät huomaamatta.

Tämä opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian laitoksella suolistomikrobiston terveysvaikutuksia tutkivassa projektissa. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida bakteeri-DNA-eristysmenetelmä 2,5 kuukauden ikäisten vauvojen ulostenäytteille. Tavoitteena oli edistää lasten kehitystä tutkivaa FinnBrain-projektia ja kehittää Turun yliopiston suolistomikrobistoon liittyvää tutkimusta. DNA-eristysmenetelmän optimoinnilla taattiin näytteiden kelpoisuus jatkotutkimuksia varten.

Työssä testattiin kolmea kaupallista kittiä yhdistettynä erilaisiin esikäsitelyihin. Kitit olivat Qiagen, GenoXtract (automaatilla) ja MoBio. Bead beating eli näytteen homogenointi helmillä testattiin kolmilla eri helmillä ja eri homogenointiohjelmilla. Korkeimmat DNA-pitoisuudet tuotti GenoXtract-automaattilaitteen kitti ja lasihelmikäsitely homogenointiasetuksilla 1000rpm/3min. Eristystuotteet olivat myös riittävän puhtaita. Jatkotutkimuskelpoisuus tarkistettiin geelielektroforeesilla ja PCR-menetelmällä. Tulosten perusteella GenoXtract yhdistettynä lasihelmikäsitelyyn valikoitui parhaaksi menetelmäksi.

## ASIASANAT:

DNA-eristys, DNA-eristysmenetelmä, bakteeri-DNA, suolistomikrobisto, suolistomikrobiston kehitys

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical laboratory scientist | Clinical microbiology

November 2013 | 45+15

Seija Kirkko-Jaakkola and Eveliina Munukka

Heidi Kunnasranta and Meri Lehto

## OPTIMIZATION OF DNA EXTRACTION METHOD FOR BABY FECAL SAMPLES

The normal bacterial microbiota of humans affects the health and well-being of an individual many ways. The majority of the normal microbiota is in the intestines and begins to develop when a baby is born. The bacterial DNA extraction is commonly used in the research of the bacterial flora. There are numerous methods of extracting the DNA. According to previous research use of some methods return contradicting results, in which some species of bacteria are accentuated and some are completely unobserved.

The research section of this thesis was performed in the Department of Clinical Microbiology and Immunology in the University of Turku. This research is part of the doctoral thesis and the project called FinnBrain. The purpose of this project was to optimize the bacterial DNA extraction method of fecal samples of 2,5 month old babies. The aim of the research was to advance a study, FinnBrain, examining development of children and to further develop the intestinal microbiota research of the University of Turku.

During the research three commercial extraction kits were tested in combination with various pre-treatments. The manual extraction kits used were manufactured by Qiagen and MoBio and the automatic device tested was manufactured by GenoXtract. The bead beating, also known as homogenization, was tested with three different bead types and different homogenization methods.

The automatic device GenoXtract produced the highest concentration of DNA. The best pre-treatment was homogenization with glass beads with settings 1000rpm / 3min. The extraction products were also pure enough. The products were also tested with agarose gel electrophoresis and polymerase chain reaction –methods. Based on the results, GenoXtract automatic device and bead beating with glass beads were the best method for DNA extraction.

### KEYWORDS:

DNA-extraction, extraction-method, gut microbiota, establishment of gut microbiota

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 TEOREETTINEN TAUSTA</b>	<b>7</b>
2.1 Suoliston normaalimikrobisto	8
2.2 Normaalimikrobiston kehitys	8
2.3 Normaalimikrobiston vaikutukset terveyteen	9
2.4 Bakteeri-DNA:n eristys	12
2.5 Vauvan ulostenäyte	14
2.6 DNA-eristyksistä tehtävät jatkotutkimukset	14
2.6.1 Agaroosigeelielektroforeesi	14
2.6.2 Polymeraasiketjureaktio	15
2.6.3 Kvantitatiivinen PCR	16
2.6.4 Kokogenomisekvensointi	17
2.7 Aikaisemmat tutkimukset	17
<b>3 TYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMA</b>	<b>20</b>
<b>4 TYÖN TOTEUTUS</b>	<b>21</b>
4.1 Aineiston keruu ja toteutus	21
4.2 Metodologiset lähtökohdat	24
4.3 Käytettyjen kittien menetelmät	25
4.4 Eettiset lähtökohdat	26
<b>5 TULOKSET</b>	<b>28</b>
<b>6 POHDINTA</b>	<b>38</b>
6.1 Luotettavuus	40
6.2 Eettisyyden arviointi	41
6.3 Jatkotutkimusaiheet	41
<b>LÄHTEET</b>	<b>43</b>

## LIITTEET

- Liite 1. MoBio-kitin ohjeet
- Liite 2. FinnBrain-näytteiden käsittely
- Liite 3. Qiagen-kitin ohjeet
- Liite 4. NanoDropin käyttöohje
- Liite 5. PCR-ohje
- Liite 6. Toimeksiantosopimus

## KUVAT

Kuva 1. Ensimmäinen geeliajo	30
Kuva 2. Toinen geeliajo	32
Kuva 3. PCR-tuotteet	33

## KUVIOT

Kuvio 1. Pitoisuuksien keskiarvot	37
-----------------------------------	----

## TAULUKOT

Taulukko 1. DNA-eristys 1	28
Taulukko 2. DNA-eristys 2	29
Taulukko 3. DNA-eristys 3	30
Taulukko 4. DNA-eristys 4	31
Taulukko 5. DNA-eristys 5	32
Taulukko 6. DNA-eristys 6	33
Taulukko 7. Tunnusluvut eri helmillä	34
Taulukko 8. DNA-eristys 7	35
Taulukko 9. DNA-eristys 8	35
Taulukko 10. Pitoisuuden tunnusluvut	36
Taulukko 11. Puhtauden tunnusluvut	36

## KÄYTETYT LYHENTEET

AGE	Agaroosigeelielektroforeesi
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
PCR	Polymeraasiketjureaktio
qPCR	Kvantitatiivien PCR
rpm	Rounds per minute

# 1 JOHDANTO

Ihmisen normaalimikrobistolla on merkittävä yhteys yksilön terveyteen ja hyvinvointiin. Suurin osa ihmisen normaalimikrobistosta on suolistossa. Syntyvällä lapsella ei ole juurikaan normaalimikrobistoa, koska sikiö elää kohdussa käytännössä steriileissä olosuhteissa. Ensimmäiset mikrobit, joita lapsi kohtaa, ovat perinteisesti äidin vaginan bakteerit tai iholta tulevat bakteerit. Vasta noin vuoden iässä lapsen bakteeristo alkaa vakiintua. (Huovinen 2013.)

Tämä opinnäytetyö on osa väitöskirjaprojekteja sekä lasten kehitystä tutkivaa projektia FinnBrain. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on kehittää vauvojen ulostenäytteiden DNA-eristysmenetelmän esikäsittelyjä ja eristysmenetelmää siten, että ulostenäytteistä on mahdollista eristää koko mikrobiomin DNA. Kahden ja puolen kuukauden ikäisten vauvojen näytteet ovat ensimmäiset ulostenäytteet, jotka tämän opinnäytetyön tutkimukseen osallistuvilta lapsilta tutkitaan, ja ne kertovat näin suolistoflooran ”lähtötilanteen”. Vauvojen ravintona on tässä iässä pääsääntöisesti äidinmaito tai sen korvike. Haasteena on vauvojen ulostenäytteiden koostumus, koska se on hyvin erilainen kuin aikuisella tai kiinteää ruokaa syövällä lapsella. Nykyinen esikäsittely, jota ulosteelle tehdään, on liian raju vauvan ulostenäytteelle. Aiemmin käytetyllä eristysmenetelmällä DNA-eristykset eivät ole onnistuneet.

Tutkimuksen tavoitteena on, että menetelmää voidaan käyttää jatkossa sekä tutkimus- että rutiininäytteiden käsittelyssä. FinnBrain- ja väitöskirjaprojektien käytössä on arvokasta tutkimusmateriaalia, joten on tärkeää, että menetelmät toimivat. Tutkimus edistää lasten normaalimikrobiston kehityksen tutkimista, mikä on tärkeää, koska normaalimikrobiston kehitys on yhteydessä lasten hyvinvointiin.

## 2 TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 Suoliston normaalimikrobisto

Ihmisen normaalimikrobistosta valtaosa sijaitsee suolistossa. Suoliston bakteerilajisto on erittäin monipuolinen, sillä lajeja voi olla jopa 800–1000 erilaista. (Sekirov ym. 2010.) Suurin osa ruuansulatuskanavan bakteereista on anaeroebeja, joista yleisimpiä ovat bakterioidekset, bifidobakteerit, klostridit, peptostreptokokit ja fusobakteerit. Heti syntymän jälkeen yksilön kehoon alkaa muodostua yksilöllinen valikoitunut mikrobisto. Uusia mikrobeja saadaan hengittämällä, koskettamalla, syömällä ja juomalla. Ympäristötekijöiden ohella myös omien solujen pintarakenteet määräävät millainen mikrobilajisto yksilölle kehittyy. Normaalimikrobisto suojaa tehokkaasti suolistoa patogeenisten bakteerien kolonisaatiolta ja osallistuu mm. K-vitamiinin tuottamiseen. Normaalimikrobiston tavallisin häiriötekijä on antibioottihoito, joka vähentää elintärkeiden bakteerien määrää vaikutuskirjonsa mukaisesti. (Hellsten 2005.)

### 2.2 Normaalimikrobiston kehitys

Syntyvällä lapsella ei ole normaalimikrobistoa, mutta mikrobisto alkaa muodostua välittömästi syntymän jälkeen. Noin vuoden iässä suolistomikrobisto saavuttaa saman tason kuin aikuisella. Mikrobiston muodostumiseen vaikuttaa merkittävästi ympäristötekijät. Myös geeniperimällä on vaikutusta normaalimikrobiston muodostumisessa, mutta vaikutus on vähäisempi ympäristötekijöiden rinnalla. Lapsen saamat ensimmäiset bakteerit tulevat synnytyskanavasta, joten synnytystavallakin on vaikutusta normaalimikrobiston muodostumisessa. Alateitse syntyvä lapsi saa mikrobeja äidin vaginasta ja keisarinleikkauksella syntyvä lapsi saa ensimmäiset mikrobinsa äidin iholta. Vaginan bakteeriston jälkiä on löydetty imeväisten suolistofloorasta, mutta synnytystien tärkeys lapsen suolistoflooran kehitykselle on epäselvä. (Palmer ym. 2007.)



Normaalimikrobiston bakteerien määrässä on suurta kausittaista vaihtelua alle vuoden ikäisellä lapsella, joten kehitys ei ole lineaarista vaan bakteerien määrä suolistossa heittelee ensimmäisten elinkuukausien aikana. Osa bakteereista häviää hetkeksi, mutta sitten ne taas palaavat suolistoon ja lopullinen normaalimikrobiston koostumus alkaa muodostua. Bifidobakteerit ja Laktobasillit ovat vallalla erityisesti ensimmäisten elinkuukausien aikana. (Palmer ym. 2007.) Laktobacilleja löydetään tavallisesti vaginan normaalimikrobistosta, joten alateitse syntyvä lapsi kohtaa kyseisiä bakteereja jo synnytyksessä (Jalava 2010.). Bifidobakteerien suuri määrä voi selittyä äidin maidonkorvikkeilla, jotka sisältävät yleensä bifidobakteereja (Kok ym. 1996.). Kyseisten bakteerien määrä kuitenkin tasaantuu lapsen ollessa noin vuoden ikäinen, jolloin normaalimikrobistoa alkaa muistuttaa aikuisen normaalimikrobistoa. Ravinnolla oletetaan olevan myös suuri vaikutus normaalimikrobistoon. Vauvalla ravinto koostuu lähinnä äidinmaidosta ja/tai äidinmaidon korvikkeesta. Noin neljän kuukauden ikäisenä lapselle aletaan antaa kiinteämpää ruokaa ja tuolloin lapsen uloste ja bakteeristo muuttuu erilaiseksi. (Palmer ym. 2007.)

### 2.3 Normaalimikrobiston vaikutukset terveyteen

Normaalimikrobiston monimuotoisuus on tunnettu jo vuosikymmeniä, mutta sen merkitys erilaisissa sairauksissa on alkanut avautua vasta viime vuosien aikana. Tutkimustyö on useiden tutkimuksien kohdalla vielä kesken. Normaalimikrobistolla on monenlaisia vaikutuksia yksilön terveyteen ja hyvinvointiin ja vaikutukset näyttävät olevan paljon suuremmat kuin aikaisemmin on ajateltu. (Huovinen 2012.)

Valtaosa normaalimikrobistosta on bakteereja. Ne suojaavat elimistöä ensisijaisesti patogeeneiltä (ns. kolonisaatioresistenssi) ja osallistuvat ruuansulatukseen (Hellsten 2005.). Näiden niin sanottujen perustoimintojen lisäksi bakteerit voivat esimerkiksi tuottaa syöpäsolujen kasvua hidastavia ja terveyttä edistäviä hormoneja suolistossa (Kilkkinen 2004.). Suolen solujen rakennusmateriaalina ja energian lähteenä toimivat rasvahapot ovat bakteerien tuottamia. Suoliston bak-

teereilla voi olla myös negatiivisia vaikutuksia. Tästä on esimerkkinä joidenkin lääkkeiden inaktivointi. Bakteerit säätelevät myös immunitettia, mikä on havaittu immuunivälitteisissä sairauksissa, joita ovat muun muassa allergiat, tyypin 1 diabetes, autoimmuuniartriitit ja kokeellinen autoimmuunienkefalomyeliitti. (Huovinen 2012.)

Suolistomikrobiston koostumuksella saattaa myös olla osuutta lihavuudessa, sillä lihaviin ihmisten suoliston bakteeriston diversiteetti on vähäisempi kuin normaalipainoisilla, mikä johtaa epäsuotuisiin muutoksiin rasva-aineenvaihdunnassa. Tutkimus bakteerien vaikutuksesta tyypin 2 diabetekseen on vielä kesken, mutta tiedetään jo, että bakteeristolla on yhteys insuliiniherkkyyteen. Mikrobien tuottaman rapamysiinin on todettu pidentävän elinikää koe-eläimillä, mutta ihmisellä se aiheuttaa haittavaikutuksena immuunipuutosta. Rapamysiinin vaikutus on samankaltainen kuin niukka energisellä dieetillä, jossa elimistö menee niin sanotulle säästöliekille. Runsaan energian saannin aikana tällaiset toiminnot sammuvat ja ylipainon kehitys lisääntyy. (Huovinen 2012.)

Amerikkalaisessa tyypin 1 diabeteksen tutkimuksessa on saatu viitteitä siitä, että suolistoon lisätyillä bakteereilla voisi olla haiman saarekesolujen tuhoutumista hidastava tai estävä vaikutus. Haiman tulehduksen aiheuttavat valkosolut kypsyvät osittain suoliston alueella ja jos alueen bakteeristo on vääränlainen, valkosolujen muuttunut toiminta voi johtaa haimaa tuhoavaan reaktioon. MS-taudin synnyssä vaikutus on päinvastainen. Tutkimuksessa bakteerien tuominen hiiren elimistöön sairastutti lähes kaikki sairausalttiuden omaavat hiiret, kun taas mikrobittomissa olosuhteissa eläneille hiirille sairautta ei kehittynyt. Crohnin taudissa vaikutus vaihtelee olosuhteiden mukaan ja bakteeriston muutoksilla pystytään selittämään vaihteleva taudinkuva. (Huovinen 2012.)

On todettu, että jopa yksittäisellä bakteerilla voi olla mittavat vaikutukset elimistön toimintaan. Muutama vuosi sitten tutkijat löysivät bakteerin nimeltä *Faecalibacterium prausnitzii*. Kyseinen bakteeri on yleinen suolistobakteeri ja sen vaikutus aineenvaihdunnalle voidaan mitata muun muassa virtsan aineenvaihdunnan tuotteista. Bakteerin ajatellaan toimivan immunosuppressiivisena ja anti-inflammatorisena bakteerina, joka estää elimistön immuuniteetin ylilyöntejä. On

mahdollista, että suoliston runsaan tuhannen bakteerilajin joukossa on enemmänkin samankaltaisia bakteereja. (Huovinen 2012.)

Suolistobakteereilla on havaittu olevan vaikutusta myös aivojen välittäjäaineiden toimintaan. Niin sanotuilla mikrobivapailla hiirillä (engl. germ free, GF) on lisääntynyt välittäjäaineiden tuotanto, mikä aiheutti levottomuutta ja motorisen aivoalueen lisääntyntä aktiivisuutta. Kun GF-hiirille muodostettiin normaalimikrobisto, niiden levottomuus väheni. Lisäksi bakteeristolla uskotaan olevan vaikutusta älylliseen kehitykseen sekä autismiin. (Huovinen 2012.) Tällä hetkellä Varsinais-Suomessa käynnissä oleva tutkimus FinnBrain tutkii lasten kognitiivista kehitystä ja hyvinvointia, johon osaprojektina kuuluu tekeillä oleva väitöskirja lasten suolistoflooran kehitykseen liittyen (FinnBrain 2013.). FinnBrain-tutkimus selvittää muun muassa suolistomikrobiston ja varhaislapsuudessa koetun stressin välistä yhteyttä (Karlsson 2012.).

Bakteerit näyttäisivät säätelevän myös lisääntymiskäyttäytymistä hyönteisillä tehdyssä tutkimuksessa. Havaittiin, että samaa ravintoa saaneet hyönteiset parittelivat keskenään, mutta antibiootihoidon jälkeen parittelukumppanilla ei ollut enää väliä, josta pääteltiin, että bakteerit vaikuttavat feromonien toimintaan. Toisessa tutkimuksessa steriilit urokset eivät houkutelleet naaraita, koska näiden gammasäteilytettyjen urosten suoliston bakteerit olivat kuolleet. (Huovinen 2012.)

Säteilyn lisäksi bakteerit voivat kuolla antibiootteihin, jotka muuttavat mittavalla tavalla bakteeriston luonnollista koostumusta jopa vuosien ajaksi. Antibioottialistuksessa on havaittu huomattava allergiavasteen kasvu ympäristön homesienille. (Noverr ym. 2005.) Antibiootihoidosta on hyötyä suolistotulehdusten estämisessä ja haittaa Crohnin taudin synnyn estämisessä. Ristiriita johtuu todennäköisesti bakteeriston koostumuksen eroista eri tilanteista, siksi voidaan olettaa, että tulevaisuudessa yksilöllinen bakteeristo huomioidaan yksilöllisen hoidon suunnittelussa, jota jo nykyisin korostetaan hyvän hoidon kriteereissä. (Huovinen 2012.)

## 2.4 Bakteeri-DNA:n eristys

DNA:n eristys tarkoittaa nukleinihappojen irrottamista soluista, joissa se normaalisti sijaitsee (Rice 2013.). Genomista DNA:n eristystä käytetään esimerkiksi DNA-kirjastojen valmistusta varten. Niitä varten eliön genominen DNA pitää eristää mahdollisimman ehjänä, ja puhdistaa. Kromosomien DNA on pitkä ja ohutta rihmaa, joten se on herkkää pilkkoutumaan. (Suominen ym. 2010.)

Bakteerit kuuluvat prokaryooteihin eli tumattomiin eliöihin. Niissä DNA sijaitsee vapaana solulimassa eli sytoplasmassa (Suominen & Ollikka. 2004.). Bakteerien perimä eli genomi koostuu yhdestä tai eräillä ryhmillä kahdesta tai useammastakin pitkästä, useimmiten rengasmaisesta DNA-molekyylistä, kromosomista. Useiden mikrobien genomien sekvenssi tunnetaan kokonaan. Bakteerigenomin yksinkertainen rakenne rajoittaa genomien kokoa, mikä taas rajoittaa solun kehittymismahdollisuuksia. (Hedman ym. 2010.) Kromosomin lisäksi bakteereilla on itsenäisesti muodostuvia plasmideja. Plasmidit ovat kromosomiin verrattuna pieniä, rengasmaisia DNA-molekyylejä. (Suominen & Ollikka. 2004.)

DNA:n eristysmenetelmät perustuvat eristettävän molekyylin tai komponentin biologisiin, fysikaalisiin tai kemiallisiin ominaisuuksiin ja etenkin niiden erojen hyödyntämiseen. Usein eristämisessä käytetään teollisesti valmistettuja kittejä. (Pärssinen ym. 2012.) Kitti on kaupallinen reagenssi- ja/tai välinesarja, jolla saadaan tehtyä tietty laboratoriomenetelmä tai analyysi käyttämällä yhden valmistajan tuotteita (Suominen ym. 2010). Aikaisemmin eristykset on toteutettu itse valmistetuilla reagensseilla laboratoriokäsikirjojen ohjeilla. Suurien näytemäärien myötä ollaan siirtymässä automatisoituun eristämiseen. (Pärssinen ym. 2012.)

Bakteeri-DNA:n eristyksessä voidaan käyttää useita erilaisia protokollia riippuen näytemateriaalista ja etsitystä bakteerista. DNA:n saantoa voidaan parantaa erilaisilla kemiallisilla, entsyymaattisilla ja mekaanisilla esikäsittelyillä (Rice 2013.). Erilaisia esikäsittelyjä voidaan käyttää niin yksinään kuin yhdistelminä. Yleisin mekaaninen esikäsittely on homogeenointi, mutta myös korkeapaine- ja ultraäänikäsittelyjä käytetään. Homogeenoinnin etuina on sen tehokkuus, koska

käsittelyn jälkeen hajoitusliuos (lyysi) pystyy tunkeutumaan koko näytteeseen ulosteen koostumuksesta riippumatta. Mekaanisen käsittelyn huono puoli on DNA:n hajoaminen, mikä vaikeuttaa ehjien kromosomien saantia. Kemiaalliset ja entsyymaattiset käsittelyt ovat hellempää, mutta DNA:n saanto on yleensä huonompi. (Salonen ym. 2010.)

Homogenoinnin jälkeen solut käsitellään yleensä proteinaasi K-entsyymillä, jonka tarkoituksena on hajottaa eli lyysata solut. Tämän jälkeen suoritetaan DNA:n puhdistus. DNA:n puhdistukseen voidaan käyttää fenoliuuttoa, etanolisaostusta ja sentrifugointia, mutta nämä tekniikat ovat useimmiten nykyisissä menetelmissä korvattu silikakalvo-spin-kolonnei-puhdistusmenetelmillä. Puhdistukseen käytetään useimmiten kaupallisia, tarkoitusta varten suunniteltuja DNA:n puhdistuskiteitä. Silikamenetelmät perustuvat nukleiinihappojen sitoutumiseen silikaan korkeassa ionivahvuudessa kaotroopin läsnäollessa. Kaotrooppi on biomolekyyliä denaturoiva yhdiste, joka rikkoo molekyyliä ympäröivän vesivaipan. Silika on useimmiten sidottu pieneen pylvääseen eli spin-kolonneiin. Puhdistus tehdään yleensä mikrosentrifuugia apuna käyttäen. Tällöin DNA-liuos sentrifugoidaan pylvään pohjalla olevan silikakalvon läpi etanolilla korkeassa ionivahvuudessa, jolloin DNA sitoutuu silikaan, ja muut aineet menevät silikan läpi. Myös seuraavan vaiheen pesulioukset sentrifugoidaan silikakalvon läpi, jolloin viimeisetkin häiritsevät aineet saadaan pestyä pois. Tämän jälkeen DNA eluoidaan pieneen määrään laimeaa puskuria. Puskuri sentrifugoidaan kalvon läpi puhtaaseen steriiliin putkeen. (Suominen ym. 2010.)

Silikakalvo-spin-kolonnei-puhdistusmenetelmän vaihtoehtona voidaan käyttää magneettipartikkeliteoriaan perustuvia menetelmiä. Näissä menetelmissä DNA sidotaan silikakalvon sijasta silikapäälystettyihin paramagneettisiin partikkeleihin. Muut vaiheet, eli DNA:n sitoutuminen, pesu ja irrotus tapahtuvat samalla periaatteella kuin silikakalvo-spin-kolonnei-menetelmässäkin. Magneettipartikkelimenetelmässä partikkelit voidaan siirtää putkesta tai kuopasta toiseen seuraavaa vaihetta varten käyttämällä manuaalista tai automatisoitua magneettista keräilykärkeä. Toinen vaihtoehto on sitoa magneettipartikkelit putken tai kuopan pohjalle ja asettaa ulkopuolelle riittävän voimakas magneetti. Tällöin putkessa

oleva liuos voidaan imeä pois ja putkeen voidaan lisätä uusi liuos. Partikkelit saadaan vapautumaan loitontamalla ulkopuolella olevaa magneettia riittävän kauas. Magneettipartikkelitekniikoiden hyvänä puolena on se, että ne ovat suhteellisen helposti automatisoitavissa, jolloin ne mahdollistavat suurten näytemäärien käsittelyn samanaikaisesti. (Suominen ym. 2010.)

## 2.5 Vauvan ulostenäyte

Vauvat ulostavat normaalisti vaippaan, joten näytettä kerätään vaipasta ulostepurkkiin. Näytteenoton suorittaa tutkimukseen osallistuvan lapsen vanhempi. (Finnbrain 2013.). Ulosteseen ei saa sekoittua virtsaa. Ulostetta siirretään vaipasta tehdaspuhtaaseen näyteastiaan näyteastian korkissa olevalla lusikalla noin puoli purkillista (Oyslab ohjekirja 2010.). Ulostenäytteet säilytetään jääkaapissa ja toimitetaan laboratorioon jäähdytettynä tai huoneenlämmössä (Tykslab ohjekirja 2010.). Terveen vauvan ulosteen koostumus voi vaihdella löysästä kiinteään. Myös väri voi vaihdella runsaasti, yleensä sinapin keltaisesta vihreään. Rakenteeltaan uloste voi olla hieman ryynimäistä, limaista tai venyvää. (Salovaara 2008.)

## 2.6 DNA-eristyksistä tehtävät jatkotutkimukset

### 2.6.1 Agaroosigeelielektroforeesi

Agaroosigeelielektroforeesia (AGE) käytetään nukleiinihappojen analysointiin. Agaroosi on polysakkaridi, joka liukenee veteen kiehautettaessa. Jäähdyessään seos muodostaa hyytelömäisen geelin. Nukleiinihappojen kulkeutuminen geelillä perustuu siihen, että ne ovat happamia ja negatiivisesti varautuneita. DNA-palasia ajetaan sähkökentässä ja ne kulkeutuvat negatiivisesti varautuneena positiivista napaa kohti. Geelin verkkorakenne hidastaa DNA:n kulkeutumista sitä enemmän, mitä suurempia palat ovat, eli pidemmät DNA-molekyylit kulkeutuvat hitaammin kuin lyhyemmät. Erikokoiset DNA-jaksot jakautuvat geelijaon

aikana omiksi vyöhykkeikseen ja kulkeutuvat tietyllä nopeudella. Lopputuloksena geelillä on kullekin jaksolle oma vyöhyke, jota kutsutaan myös nimellä ”bändi”. Nukleiinihapot eivät näyt sellaisenaan geelissä, vaan DNA:han sekoitetaan ennen ajoa esimerkiksi etidiumbromidia, joka tunkeutuu nukleiinihappojen emästen väliin. Ajon jälkeen geeliä säteilytetään ultravioletivalolla, jolloin emäkset absorboivat UV-säteitä ja luovuttavat saamansa energian etidiumille, joka fluoresoi oranssinpunaisena. (Suominen ym. 2010.)

### 2.6.2 Polymeraasiketjureaktio

Polymeraasiketjureaktiota eli PCR:ää käytetään eripituisten DNA-jaksojen monistamiseen. Monistettava pätkä voi olla esimerkiksi yksittäinen geeni. Monistettavat DNA-jaksot sijaitsevat kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. Yleensä myös monistettavan jakson emäsjärjestys tunnetaan joko kokonaan tai ainakin osittain. PCR:ää käytetään moniin eri tarkoituksiin. Sillä voidaan muun muassa etsiä perinnöllisiä sairauksia tai kloonata haluttua geeniä. (Suominen & Ollikka. 2004.)

PCR:n perusajatuksena on käyttää lämpöä kestävää eli termostabiilia DNA-polymeraasia, joka ei inaktivoidu korkeissa lämpötiloissa. Käytettävät polymeeraasit on eristetty muun muassa kuumissa lähteissä elävistä bakteereista. Eniten käytetty polymeeraasi on *Thermus aquanticus* – bakteerista eristetty Taq-polymeraasi. Toinen perusajatus on kahden erilaisen, tarkalleen tunnetun alukkeen käyttäminen. Polymeraasiketjureaktiossa käytetään kahta aluketta, jotka sitoutuvat kaksinauhaisen DNA:n eri juosteisiin, monistettavan DNA-alueen vastakkaisiin päihin. Alukkeiden väliin jäävä DNA-pätkä on se, jota monistetaan. (Suominen & Ollikka. 2004.)

Templaatti-DNA on monistuksen kohde (Suominen & Ollikka. 2004.). DNA:n ei välttämättä täydy olla täysin puhdasta, jotta sitä voitaisiin käyttää PCR:ssä, mutta DNA:ta eristettäessä pyritään poistamaan PCR:ää häiritseviä ja inhiboivia tekijöitä (Suominen ym. 2010.). Templaattina toimii kaksijuosteinen DNA. Templaatti pitää denaturoida kuumennuskäsittelyllä, jotta alukkeet voisivat sitoutua

siihen. Kuumennuksen jälkeen lämpötilaa lasketaan hetkellisesti, jolloin alukkeet kiinnittyvät templaattiin. Tätä kutsutaan annealing-reaktioksi. Kun alukkeet ovat saaneet kiinnittyä, lämpötilaa nostetaan taas, jolloin DNA-polymeraasi alkaa liittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja alukkeen 3'-päästä lähtien templaatin mallin mukaisesti. Tätä tapahtumaa kutsutaan templaatin pidennysreaktioksi. Tällöin templaatin kummallekin nauhalle syntyy vastinnauha. Nauhan synteesi on valmis muutaman minuutin kuluttua, jonka jälkeen lämpötilaa taas nostetaan ja nauhat irrotetaan toisistaan. (Suominen & Ollikka. 2004.)

Sarjaa denaturointi-annealing-pidennys kutsutaan sykliksi. Yhdessä sykliissä syntyy kahdesta DNA-nauhasta neljä nauhaa, seuraavassa sykliissä taas neljästä nauhasta kahdeksan nauhaa ja niin edelleen. Syklejä toistettassa saadaan pienestä määrästä templaatti-DNA:ta monistettua suuri määrä tarkalleen määrätyn pituisia haluttuja DNA-jaksoja. (Suominen & Ollikka. 2004.)

### 2.6.3 Kvantitatiivinen PCR

Perinteisen PCR:n ongelmana on se, että hyvin pienet muutokset näytteessä, käsittelyssä tai PCR-oloissa voivat muuttaa tulosta huomattavasti, jolloin se ei ole kovinkaan hyvä menetelmä kvantitatiiviseen työskentelyyn. Tästä syystä tutkimuksissa käytetään apuna kvantitativista PCR-menetelmää eli qPCR:ää. QPCR on reaaliaikaisen PCR:n sovellus. Näytteiden käsittely sekä alukkeiden ja koettimien suunnittelu ovat tärkeässä osassa qPCR:n onnistumiselle. Kvantitatiivista PCR:ää käytettäessä kontrollireaktioita tulee tehdä perinteistä PCR-metodia useammin. (Suominen ym. 2010)

Reaaliaikaista PCR-menetelmää käytettäessä PCR-prosessi nopeutuu ja DNA-riskikontamionaatoriski pienenee. Reaaliaikainen PCR eroaa perinteisestä PCR-menetelmästä. Perinteisessä menetelmässä PCR-tuote analysoidaan esimerkiksi AGE:llä. (Suominen ym. 2010.) Reaaliaikainen PCR perustuu fluoresoivan merkkiaineen käyttöön, jolloin reaktiossa syntyvän tuotteen määrää voidaan seurata reaktion edetessä. (Ritz & Spiess 2008.) Fluoresoiva aine voi olla joko väri tai koetin. Fluoresoiva väri sitoutuu kaksinauhaiseen DNA:han, jolloin



väri muuttuu voimakkaammin fluoresoivaksi. Signaalin määrä korreloi DNA:n määrää. Koetin on pieni DNA-pätkä, joka on leimattu. Koetin sitoutuu kohteeseensa, jolloin sen antama signaali voimistuu. (Suominen ym. 2010.)

#### 2.6.4 Kokogenomisekvensointi

Sekvensoinnilla tarkoitetaan DNA:n sekvenssin eli DNA:n nukleotidijärjestyksen, määrittämistä. Kokogenomisekvensointi on menetelmä, jossa selvitetään yksilön koko perimän emäsjärjestys. Koko genomien sekvensointiin on kaksi eri periaatetta: koko genomien satunnaissekvensointi ja vaiheittainen aluke- tai kromosomikävely. Nykyiset genomisekvensointiprojektit käyttävät satunnaissekvensointia, jota voidaan täydentää esimerkiksi alukekävelyllä. (Suominen ym. 2010.)

Shotgun-sekvensointia on satunnaissekvensointi, jota käytetään pitkien DNA-pätkien sekvensointiin. Siinä suuri joukko satunnaisesti valmistettuja DNA-fragmentteja sekvensoidaan molemmista päistään. Satunnaissekvensoinnissa tuotetaan suuri määrä lukuja eli "readejä", jotka voivat olla päällekkäisiä. Readit ovat siis yhdestä sekvensointireaktiosta saatava DNA-sekvenssin määrä. Kun read-toistoja tehdään riittävästi, lähes koko genomi saadaan sekvensoitua. Satunnaissekvensointi on nopeampaa kuin perinteisemmällä alukekävelyllä sekvensointi. Menetelmällä saadaan myös tuotettua enemmän dataa. Suurten genomien sekvensoinnissa käytetään apuna valmiita geenikirjastoja. (Suominen ym. 2010.)

#### 2.7 Aikaisemmat tutkimukset

Edwardsin ja Parretin (2002) artikkeli on tehty tieteellisestä tutkimuksesta, jossa on tutkittu vauvan suolistoflooran kehitystä ensimmäisten elinkuukausien aikana ja vertailtu äidinmaidon ja korvikkeen vaikutuksia mikrobiston kehitykseen. Tutkimus osoitti, että äidinmaidon korviketta saaneiden vauvojen normaalimikrobisto kehittyy nopeammin kuin rintaruokittujen vauvojen ja vauvan ravinnolla on

suurempi vaikutus mikrobistoon kuin aikuisella. Adlerberthin ja Woldin (2009) katsausartikkelissa esitellään imeväisikäisten suolistoflooran muodostumista ja kerrotaan lapsilla tyypillisesti esiintyvistä bakteerilajeista. Tutkimus antaa tietoa siitä, mitä bakteereja vauvoilta todennäköisimmin löytyy. Lisäksi artikkelissa todetaan, että imeväisikäisten suolistokolonisaatioon ja sen terveysvaikutuksiin liittyen tarvitaan vielä lisää tutkimusta.

Salosen ym. (2010) artikkelissa kerrotaan tutkimuksesta, jossa tutkittiin aikuisten ulostenäytteistä eri menetelmillä eristettyä DNA:ta. Tutkimus osoittaa, että muun muassa erilaisilla mekaanisilla käsittelyillä DNA:n saantoa saadaan parannettua huomattavasti. Tutkimus osoitti myös, että eri eristysmenetelmillä voi olla jopa 35-kertainen ero kvantitatiivisessa saannossa sekä suuria eroja eri bakteerisukujen saannossa. Myös Maukosen ym. (2012) tutkimuksessa havaittiin, että eri DNA-eristys menetelmät antavat erilaisia tuloksia ulosteen bakteeripopulaatioista.

Anniina Rintalan (2013) pro gradu – tutkimuksessa tutkittiin suolistobakteeri *Faecalibacterium prausnitzii* klinistä merkistystä ja diagnostiikkaa. Työssä pystytettiin kvantitatiivinen tutkimusmenetelmä *F. prausnitzii* diagnosointiin. Tutkimuksessa käytettiin kahta samaa DNA-eristyskittiä kuin tässä opinnäytetyössä ja paras eristys saatiin aikaan GenoXtract-automaattilaitteella ja siihen kuuluvalla kitillä. Dna-eristykset eivät vaatineet erillistä puhdistusta ja eristykset toimivat PCR:ssa.

Furetin ym. (2009) tutkimuksessa vertailtiin ihmisten ja eläinten ulosteen mikrobistoa reaaliaikaisen PCR:n (RT-PCR) avulla. Tutkimuksessa selvisi, että tietyt bakteeriryhmät ovat yleisempiä ihmisellä ja jotkin ryhmät monimuotisempia eläimillä. Tutkimuksessa todettiin, että mikrobiston vertailu voi olla hyödyllistä biomarkkereiden identifioinnissa ulostekontaminaatiossa. DNA eristettiin tässäkin tutkimuksessa kaupallisella kitillä ja esikäsittelyssä soluja hajotettiin helmillä. Näytteet säilytettiin -80 asteessa ja eristyt DNA:t -20 asteessa jatkotutkimuksia varten. Kyseiset käsittelytavat tukevat opinnäytetyössä käytettäviä näytteiden käsittelytapoja.

Ulostenäytteiden säilytykseen liittyvä Roeschin ym. (2009) tutkimus osoittaa, että ulostenäytteen bakteeriston monimuotoisuus laskee merkittävästi, jos näytettä ei pakasteta (-80°C) 12 tunnin sisällä. Merkittävimmät muutokset tapahtuivat 12 ja 24 tunnin välillä (8,61 %). Pientä muutosta bakteeristossa tapahtuu jo kahdentoista tunnin kohdalla, mutta saannon lasku hidastuu 72 tunnin jälkeen (~10 %). Säilytyksen vaikutukset otetaan huomioon opinnäytetyössä.

### 3 TYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMA

Tutkimuksen tarkoituksena on kehittää menetelmää vauvojen ulostenäytteiden esikäsitteilyyn ja bakteeri-DNA:n eristykseen. Tarkoituksena on saada validoitua kliinisistä näytteistä sekä kvantitatiivisesti että kvalitatiivisesti mahdollisimman hyvä DNA-eristysmenetelmä. Eristyksen jälkeen näytteissä pitäisi olla riittävä määrä DNA:ta ja sen tulisi olla riittävän puhdasta jatkoanalysointia varten (esim. qPCR, kokogenomisekvensointi).

Opinnäytetyön tutkimusongelma:

- Millä esikäsitteilyllä ja eristysmenetelmällä (kitti/automaattilaite) saadaan määrällisesti parhaat ja puhtaimmat DNA:n saannit?

Tutkimuksen lopullisena tavoitteena on, että menetelmää voidaan käyttää tulevaisuudessa Turun yliopiston lääketieteellisen mikrobiologian laitoksella sekä tutkimus- että rutiininäytteiden käsittelyssä. Tutkimus mahdollistaa luotettavan mikrobiomin DNA:n määrityksen, mikä edistää lasten normaalimikrobiston kehityksen tutkimista. Opinnäytetyön tulokset edistävät suolistomikrobiston tutkimusta erilaisissa Turun yliopiston väitöskirjaprojekteissa.

## 4 TYÖN TOTEUTUS

### 4.1 Aineiston keruu ja toteutus

FinnBrain-kohorttitutkimuksessa tullaan keräämään erilaisia näytteitä usean vuoden ajan ja vähintään viideltä tuhannelta vauvalta Varsinais-Suomessa ja Ahvenanmaalla. Keväällä 2013 kohortissa ryhdyttiin keräämään suuremmissa mittakaavassa myös vauvojen ulostenäytteitä, ja varsinainen tutkimustyö Lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian laitoksella aloitettiin. Menetelmän optimoinnin tuli sen vuoksi olla valmiina kesän 2013 loppuun mennessä.

Opinnäytetyön käytännön osuus suoritettiin toukokuussa 2013 Turun yliopiston lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian laitoksen tiloissa. Bakteeri-DNA:n eristystä parannettiin esikäsittelyä ja menetelmää optimoimalla. Tarkoituksena oli testata erilaisia esikäsittelyjä (bead beating ja homogenointi) ja useaa kaupallista kittiä (Qiagen Stool Mini Kit, MoBio Stool Kit, Chelex) sekä automaattilaitetta (Hain Lifescience GenoXtract). Näytteen koostumuksessa yksi haasteellisimmista ominaisuuksista oli viskositeetti. Näytteiden viskositeettia pyrittiin vähentämään proteinaasi-K entsyymillä, joka kuuluu joidenkin kaupallisten kittien protokollaan.

Eristetyn DNA:n määrä ja puhtaus testattiin spektrofotometrillä (NanoDrop ND-1000) ja sisältö geelielektroforeesin avulla. Riittäväällä määrällä tarkoitetaan bakteeri-DNA-pitoisuutta, joka on vähintään 50ng/μl. Puhtauden kannalta merkittävien arvojen aallonpituuksien 260 ja 280 nm suhde ja ihanteellista olisi, jos arvo olisi välillä 1,8-1,9. Puhtaus on kuitenkin riittävä, kun se on noin 2. Huomiota pitää kiinnittää myös pitoisuuskäyrän muotoon.

Kun menetelmä oli saatu optimoitua näytteille sopivaksi, tehtiin menetelmän sisäisen vaihtelun testaus kolmelle eri ulostenäytteelle. Tulosten analysoinnissa käytettiin apuna tilastollisia menetelmiä. Tulokset raportoitiin syksyllä 2013.

Testattavaksi valittiin neljä erilaista kaupallista kittiä: Qiagen, Chelex, MoBio sekä Hain Lifesciencen valmistaman GenoXtract-automaattilaitteen kitti Stool

kit. Näistä karsittiin kuitenkin heti alkuun Chelex-menetelmä, joka ei sovellu normaalimikrobiston tutkimiseen, koska kitti oli tarkoitettu ainoastaan tiettyjen patogeenien etsimiseen ja eristykset kyseisellä kitillä eivät ole olleet puhtauden kannalta tarpeeksi laadukkaita jatkoanalysointeja varten. Erilaisten kittien ohella testattiin myös helmikäsittelyä eli niin sanottua bead beatingia. Helmikäsittelyyn kuuluu homogenisointi eli voimakas ravistelu, jolloin ulostenäytteestä tehdään tasainen massa ja samalla soluja hajoaa. Näytteet voidaan myös vaihtoehtoisesti homogenisoida ennen näytteen annostelua mikroputkeen ja tuolloin näytteeseen saadaan mukaan tasaisesti koko näytteessä oleva mikrobisto ja toistettavuus saattaa parantua. Tässä tutkimuksessa alkuperäiset näytteet haluttiin säilyttää käsittelemättömänä myöhempää käyttöä varten, joten koko näytettä ei homogenisoitu, vaan näytteitä sekoitettiin silmukalla ennen punnitusta tai näytteenannostelua mikroputkeen. Näytteet homogenisoitiin vasta mikroputkissa ja jäljelle jäänyt näyte pakastettiin sellaisenaan.

Helmien ja voimakkaan ravistelun oikeanlaisella yhdistelmällä eli homogenisoinnilla solut saadaan rikottua ja DNA vapautettua. Liian pitkä tai voimakas ravistelu saattaa kuitenkin vahingoittaa DNA:ta ja lisätä epäpuhtauksia. Helmien testauksessa käytettiin kolmea erilaista helmimateriaalia: keraamisia, lasisia ja garnet helmiä. Keraamiset helmet ovat käytössä aikuisten ulosteen bakteeri-DNA:n eristyksessä. Keraamiset helmet ovat valkoisia ja testatuista helmistä isoimpia halkaisijaltaan (keraamiset 1,4 mm, Garnet 0,7 mm, lasiset 0,5 mm). Lasiset helmet ovat kirkkaita ja kooltaan paljon pienempiä kuin keraamiset helmet. (MoBio 2013a) Garnet-helmet on tehty silica-ryhmän mineraaleista. Garnet on erittäin kova materiaali, jota on käytetty muun muassa hioma- ja hankausaineena. (Lowe 2013.) Garnet-helmet eivät ole pyöreitä pallohelmiä kuten muut testatut helmet, vaan ne ovat teräväkulmaisia ja vaihtelevan muotoisia. (MoBio 2013a.)

Ensimmäisenä testattiin rinnakkain Qiagen-kittiä ja GenoXtract-automaattilaitteen kittiä Stool kit. Ennen esikäsittelyä näytettä punnittiin 1,5ml:n eppendorf-putkiin noin 200mg. Jatkossa näytettä jaettiin putkiin silmämääräisesti 10 $\mu$ l silmukalla. Automaattilaitteelle on kehitetty useampi kitti, ja testaa-

mamme kitti oli tarkoitettu erityisesti ulostenäytteille. Sitä käytetään tällä hetkellä aikuisten näytteiden eristyksissä. Automaattilaitteella käytettiin samaa eristysohjelmaa kuin aikuisten näytteissä. Samalla kerralla kokeiltiin myös helmikäsittelyn vaikutusta eli osa näytteistä helmikäsiteltiin ja osa ei. Testatut helmet olivat keraamisia. Testauksessa oli kontrollina muutama jo tutkittu aikuisten näyte. Eristetty DNA laitettiin pakastimeen -20 asteen lämpötilaan säilytykseen aina mittauksen jälkeen.

Toinen eristys tehtiin GenoXtractilla käyttäen kolmea eri vauvanäytettä. Osalle näytteistä tehtiin helmikäsittely ja osaa käytettiin sellaisenaan. Käytössä olleet helmet olivat keraamisia kuten edeltävässäkin testauksessa. Osa näytteistä oli säilytetty +4 asteessa ja osa pakastettuna -70 asteessa.

Kolmantena testattiin helmikäsittelyä erilaisilla homogeenointiajoilla ja voimakkuuksilla: 1000rpm/3min, 2000rpm/1,5min, 1000rpm/1,5min. Kahden viimeisen GenoXtract-eristyskertojen DNA-tuotteet ajettiin agarosigeelille (Kuva 1.), josta havaittiin suurimmat DNA-pitoisuudet kirkkaimpina bändeinä.

Uusia vauvanäytteitä ei saatu kovinkaan usein, ja testauksessa pystyttiin käyttämään enimmäkseen runsaimpia näytteitä, koska jokaista näytettä oli jäätävä varsinaista väitöskirjatutkimusta varten. Tästä syystä neljänteen eristykseen oli käytettävissä vain yhtä näytettä. Neljännessä eristyksessä vertailtiin erilaisia helmiä: keraamisia, lasisia ja garnet-helmiä. Samalla kokeiltiin myös eri homogeenointiaikojen vaikutusta, koska eri helmet saattaisivat vaatia eri homogeenointiajan.

Viidennessä testauksessa haluttiin toistaa kaksi parasta helmikäsittelyä eli näytteet homogenoitiin lasi- ja garnethelmillä. Tässä vaiheessa saatiin käyttöön vielä lisäksi MoBion kitti. Kitin toiminta testattiin yhdessä helmikäsittelyjen kanssa sekä myös rinnakkain GenoXtract-automaattilaitteen Stool-kitin kanssa. Helmikäsittely tehtiin lasi- ja garnethelmillä. Näytteet esikäsiteltiin lasihelmillä homogenisointiasetuksilla 1000rpm/1,5min ja garnet-helmillä asetuksilla 1000rpm/3min. Kahden viimeisen eristyskerran näytteet ajettiin taas geelille

(Kuva 2.). Tarkoituksena oli varmistaa, että eristystuotteissa on mitattavaa DNA:ta.

DNA-eristysten kelpoisuus jatkotutkimuksia varten testattiin PCR:n avulla (Kuva 3.). PCR:ää varten valittiin monistettavaksi *Lactobacillus*-bakteeri, jota valtaosalta imeväisikäisiltä löytyy suolistosta. Oikean esikäsittelyn ja eristysmenetelmän löydyttyä kuudennessa eristyksessä vertailtiin kahta parasta helmikäsitelyä. Myös toistettavuutta seurattiin. Seitsemännellä eristyskerralla tutkittiin -70 asteen pakastuksen vaikutusta näytteisiin. Näytteinä käytettiin kaksi päivää aiemmin käytettyä näytettä tuoreena ja pakastettuna. Viimeisellä eristyskerralla testattiin menetelmän toimivuutta suuremmalla näytesarjalla (12 näytettä), jotka olivat olleet pakastimessa kahdesta viikosta muutamaan kuukauteen. Näytesarjan kaikille näytteille tehtiin sama esikäsittely eli näytteet homogenoitiin lasihelmillä kierrosnopeudella 1000 rpm ja ajalla 3 minuuttia.

#### 4.2 Metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa korostetaan syy-seuraussuhteita ja hyödynnetään johtopäätöksiä ja teorioita aikaisemmista tutkimuksista. Tutkimuksen havaintoaineisto soveltuu määrälliseen eli numeeriseen mittaamiseen. Kvantitatiivisen tutkimuksen tavoitteena on tutkia muuttujia säätelemällä ympäristöstä väliin tulevia muuttujia. Ilmiöille pyritään aina löytämään selitys. Kvantitatiiviselle tutkimukselle voidaan asettaa hypoteeseja, tutkimusongelmia tai tutkimustehtäviä. (Hirsjärvi ym. 2004.) Tutkimuksen näkökulmaa valitessa tulisi tarkastella tutkimustehtävää, joka määrittää tutkimuksen luonteen. Tutkimuksessa voidaan myös yhdistellä erilaisia lähestymistapoja. (Mcvilly ym. 2008.) Tuloksia voidaan havainnollistaa tilastollisin menetelmin. Kvantitatiivisissa tutkimuksissa ilmiöt selitetään keräämällä tietoa, joka analysoidaan matemaattisilla menetelmillä. (Hirsjärvi ym. 2004.)

Tämä opinnäytetyö on kvantitatiivinen tutkimus, koska siinä hyödynnetään aikaisempia tutkimuksia ja teorioita. Tämän tutkimuksen tulokset ovat määrällisiä ja ne on mahdollista muuttaa tilastollisesti käsiteltävään muotoon. Tämä opinnäytetyö sisältää tutkimusongelman, johon määrällisellä tutkimuksella haettiin



vastausta. Tutkimuksen tuloksista on tehty johtopäätöksiä. Opinnäytetyöhön kuului empiiristä tutkimusta, jonka aikana numeeriset tutkimustulokset kerättiin. Tutkimustulosten esittämisessä ja havainnollistamisessa käytettiin tilastollisia menetelmiä, joita ovat tulosten taulukointi, graafinen esitys ja tunnuslukujen laskeminen.

#### 4.3 Käytettyjen kittien menetelmät

Opinnäytetyössä käytetyt DNA-eristyskitit ovat MoBion PowerFecal™ DNA Isolation Kit, Qiagenin QIAamp DNA Stool Mini Kit ja GenoXtract-laitteen kitti GXT Stool Extraction Kit Ver 2.0.

Ennen kuin MoBion kittiä voidaan käyttää, näytteet täytyvät alkuvalmistella: näytettä mitataan noin 0,2 grammaa ja homogenisoidaan helmikäsittelyllä tasaiseksi. Helmikäsittelyllä halutaan rikkoa solut, jotta hajotusliuos pääsee sitoutumaan soluihin paremmin. Tämän jälkeen näytteen solut lyysataan eli hajotetaan, jolloin haluttu DNA vapautuu solujen, tässä tapauksessa bakteerisolujen sisältä. Seuraavaksi näytteestä poistetaan ylimääräiset aineet, jotka häiritsevät usein DNA-eristyksen jälkeen tehtävää PCR:ää. Ylimääräisten aineiden poistamisen jälkeen DNA sidotaan silikaan (ks. s. 13), pestään ja eluoidaan, jolloin saadaan valmis DNA-tuote. (MoBio 2013b.)

Myös Qiagenin kittiä käytettäessä näytettä mitataan noin 0,2 grammaa. Uloste-näyte voi olla joko tuoretta tai pakastettua. Tämän jälkeen näyte lyysataan proteinaasi K:lla. Lyysattuun näytteeseen lisätään InhibitEX-tabletti, jonka tarkoituksena on imeä itseensä eli inhiboida ylimääräiset PCR:ää häiritsevät aineet. Tämän jälkeen näytettä sentrifugoimalla tabletti saadaan poistettua näytteestä. Seuraavaksi DNA-sidotaan silikakalvoon ja pestään (ks. s. 13) kahteen kertaan, jotta ylimääräiset aineet poistuvat näytteestä varmasti. Tämän jälkeen DNA eluoidaan ja saadaan valmis DNA-tuote. (Qiagen 2013.)

GenoXtract-automaattilaitteen kitin toiminta perustuu innovatiiviseen magneettihelmikäsittelyyn. (ks. s. 13) Eristys tehdään neljässä vaiheessa. Ensimmäiseksi solut lyysataan, jonka jälkeen irronnut DNA sidotaan magneettisiin helmiin. Tä-

män jälkeen DNA-magneettihelmi-yhdistelmä pestään ja DNA eluoidaan. Lopputuloksena on puhdas DNA. (Hain Lifescience 2011a.) GenoXtract-automaattilaitteessa on 12-kanavainen pipetointijärjestelmä, joka mahdollistaa 12 näytteen samanaikaisen DNA-eristyksen. Laite on semi-automatisoitu eli kitin pipetit ja reagenssikaivot laitetaan koneeseen käsin ja kone suorittaa protokollan. (Hain Lifescience 2011b.)

#### 4.4 Eettiset lähtökohdat

Hyvien tieteellisten menettelytapojen noudattaminen on lähtökohta tutkimuksen luotettavuudelle ja uskottavuudelle. Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu rehellisyys, huolellisuus ja tarkkuus koko tutkimuksen ajan. Lisäksi hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu käytäntöjen soveltaminen, muiden tutkijoiden saavutusten huomioinen ja yksityiskohtaisuus tutkimuksen suunnittelussa, toteutuksessa ja raportoinnissa. (Kuula 2006.) Tutkimuksen eettisen ennakoarvion tekeminen on Suomessa lakiin perustuva velvoite ihmiseen kohdistuvan lääketieteellisen tutkimuksen kohdalla. Huolellisesti tehty tutkimus on usein eettisesti kestävä tutkimus, jossa tutkimuskohteen moraalinen asema ja oikeudet otetaan asianmukaisesti huomioon. (Launis 2007.)

Tutkimusaiheen valinta on eettinen valinta. Tutkijan tulee pohtia tutkimuksen yhteiskunnallista merkittävyyttä. Tutkimuksessa tulee välttää epärehellisyyttä, tutkimuksessa ei saa plagioida toisen tekstiä, tutkimustuloksia ei saa keksiä tai kaunistella. Tutkimukseen osallistuvia henkilöitä tulee tiedottaa, mitä tutkimuksessa tulee tapahtumaan. Henkilöiden tulee myös ymmärtää kaikki tutkimukseen liittyvät asiat ja heidän tulee osallistua tutkimukseen vapaaehtoisesti. (Hirsjärvi ym. 2004.)

Tähän tutkimukseen osallistuvat koehenkilöt ovat osallistuneet tutkimukseen vapaaehtoisesti ja heitä on tiedotettu näytteiden käytöstä. Tutkimukset eivät aiheuta fyysistä haittaa tutkittaville vauvoille tai heidän vanhemmilleen. Tutkittavat eivät saa tutkimuksesta terveydellistä hyötyä. Tutkittavilla on oikeus vetäytyä tutkimuksesta missä vaiheessa tahansa ja heillä on oikeus kuulla tutkimus-

tuloksista. (FinnBrain 2013.) Tässä opinnäytetyössä näytteisiin liittyvät tutkimuseettiset näkökulmat oli huomioitu FinnBrain-projektin taholla. Opinnäytetyön alkaessa FinnBrain-projektilla oli jo tarvittavat tutkimusluvut. Toimeksianto tälle opinnäytetyölle saatiin opinnäytetyön ohjaajalta ja Turun yliopiston lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian laitoksen palvelutoiminnanjohtajalta toukokuun alussa 2013.

## 5 TULOKSET

Ensimmäisen eristyskokeilun (Taulukko 1.) jälkeen huomattiin, että Qiagenin kitti vapauttaa vauvojen näytteistä erittäin vähän DNA:ta, alle 9ng/μl. Kontrollina olleista aikuisten näytteistä saatiin Qiagenilla korkeampia DNA-pitoisuuksia. GenoXtract-automaatilla helmikäsittelylle vauvanäytteelle saatiin korkea DNA-pitoisuus. Helmikäsittely nosti DNA-pitoisuuksia huomattavast, sillä ilman helmikäsittelyä molemmat kitit antoivat matalia DNA-pitoisuuksia. Helmikäsittely ei kuitenkaan vaikuttanut negatiivisesti näytteiden puhtauteen, vaikka DNA-pitoisuus olikin korkeampi. Käytetyt helmet olivat keraamisia.

Taulukko 1. DNA-eristys 1

<b>DNA-eristys1 8.5.2013</b>				
<b>Näytteen nimi/tunniste</b>	<b>Pitoisuus 1. mittaus</b>	<b>Pitoisuus 2. mittaus</b>	<b>Puhtaus 1. mittaus</b>	<b>Puhtaus 2. mittaus</b>
GenoXtract:				
Vauva, ceramic, (näyte mustaa) 2500rpm, 3min	164,4		1,49	
Vauva, ilman helmiä, 2500rpm, 3min	10,4	13,6	2,25	1,87
Aikuinen, ceramic, 2500rpm, 3min	165,7		1,97	
Aikuinen, ilman helmiä, 2500rpm, 3min	74,8		1,96	
Qiagen:				
Vauva, ceramic, 2500rpm, 3min	4,7	6,3	2,9	1,7
Vauva, ilman helmiä, 2500rpm, 3min	4,2	2,9	2,97	2,77
Vauva, ceramic, 2500rpm, 3min	8,3	8,7	1,71	1,82
Vauva, ilman helmiä, 2500rpm, 3min	4,8	5,3	1,97	1,94
Aikuinen, ceramic, 2500rpm, 3min	101,5		2,08	
Aikuinen, ilman helmiä, 2500rpm, 3min	58,4		2,15	
Aikuinen, ceramic, 2500rpm, 3min	57		2,01	
Aikuinen, ilman helmiä, 2500rpm, 3min	71,8		2,08	

Toisessa eristyksen testauksessa (Taulukko 2.) haluttiin varmistaa helmikäsittelyn tarpeellisuus. Helmikäsittelystä näytteistä saatiin korkeita DNA-pitoisuuksia kuten aikaisemminkin. Ilman helmiä käsitellyistä näytteistä saatiin matalia DNA-pitoisuuksia. Helmikäsiteltujen ja ilman helmiä käsiteltujen näytteiden ero DNA-

pitoisuuksissa on tässä mittauksessa parhaimmillaan jopa 5-kertainen. Lämpötilan vaikutus säilytyksessä oli vielä epäselvä, koska sitä testattiin vain yhdelle näytteelle rinnakkain. Yksittäisen näytteen perusteella DNA:n määrä näytteessä vähenisi lähes puolella pitkäaikaisen pakastussäilytyksen aikana.

Taulukko 2. DNA-eristys 2

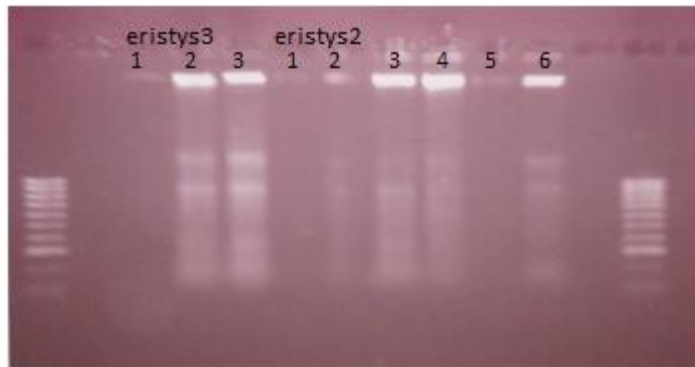
<b>DNA-eristys2 10.5.2013</b>				
<b>Näytteen nimi/tunniste</b>	<b>Pitoisuus 1. mittaus</b>	<b>Pitoisuus 2. mittaus</b>	<b>Puhtaus 1. mittaus</b>	<b>Puhtaus 2. mittaus</b>
FB018043, 4°C, ei helmiä	16,5	16,9	1,76	1,76
FB018103, 4°C, ei helmiä	31,7	31,8	1,85	1,82
FB018103, 4°C, ceramic	68,1	68,4	1,86	1,84
FB018043, 4°C, ceramic	103,4	102,9	1,81	1,83
FB018043, -70°C, ceramic	52,3	51	1,72	1,81
FB017083, -70°C, ceramic	58,7	59,1	1,78	1,8
Blankki, steriili vesi	0,2	-0,2	0,44	

Eri homogointiaikojen testauksessa (Taulukko 3.) selvisi, että kolmen minuutin käsittely näillä helmillä tuotti erittäin matalan pitoisuuden ja melko heikon puhtausarvon. Puolitoista minuuttia homogoiduissa näytteissä oli moninkertainen määrä DNA:ta. Homogoinnin kierrosnopeuksilla ei ollut suurta merkitystä, koska 1000 kierrosta minuutissa antoi vain vähän pienemmän DNA-pitoisuuden kuin 2000 kierrosta minuutissa, ja puhtausarvo oli lähes sama. Opinnäytetyön ohjaaja päätti, että 1000 kierrosta minuutissa on riittävä.

Taulukko 3. DNA-eristys 3

DNA-eristys3 13.5.2013				
Näytteen nimi/tunniste	Pitoisuus 1. mittaus	Pitoisuus 2. mittaus	Puhtaus 1. mittaus	Puhtaus 2. mittaus
FB018103, +4°C, ceramic, 1000 rpm, 3 min	8,2	7,7	2,2	2,42
FB018103, +4°C, ceramic, 2000 rpm, 1,5 min	126,9	126,3	1,96	1,97
FB018103, +4°C, ceramic, 1000 rpm, 1,5 min	111,9	111,7	1,94	1,96
Blankki, steriili vesi	0	0	0	0

Kahden viimeisen GenoXtract-eristyskertojen DNA-tuotteet ajettiin agarosigeelille (Kuva 1.), josta havaittiin suurimmat DNA-pitoisuudet kirkkaimpina bändeinä. Kuvassa on sivuilla ladderit ja keskellä eristystuotteet siten, että ensin on kolme näytettä kolmannelta taulukosta ja kuusi näytettä toisesta taulukosta. Kirkkaat bändit saatiin näytteistä, joissa oli DNA:ta 58–125 ng/μl. Näytteet, joista saatiin eristettyä DNA:ta alle 30ng/μl, näkyivät geelillä hyvin haaleasti. Geeliltä nähdään, että yli 50ng/μl DNA:ta sisältävät näytteet todella sisältävät näkyvästi mitattavaa DNA:ta.



Kuva 1. Ensimmäinen geelijaio

Erilaisten helmien testauksessa (Taulukko 4.) kävi ilmi, että aiemmin käytetyt keraamiset helmet tuottivat kaikkein matalimmat pitoisuudet. Keraamisilla saatiin riittävä pitoisuus 1,5 minuutin homogoinnilla ja erittäin matala pitoisuus 3 minuutin käsittelyllä. Lasisilla helmillä saatiin korkeimmat DNA-pitoisuudet pie-

nellä erolla garnet-helmiin verrattuna. Suurimmat pitoisuudet lasihelmillä saatiin homogeenoinnilla, jossa käytettiin kierrosnopeutta 1000rpm ajalla 3 minuuttia. Garnet-helmet toimivat parhaiten kierrosnopeudella 1000 rpm ajalla 1,5 minuuttia.

Taulukko 4. DNA-eristys 4

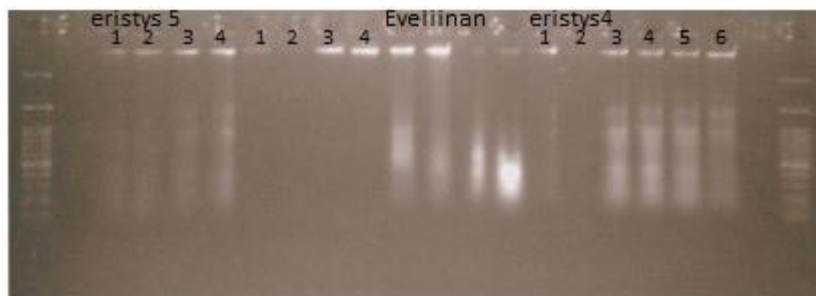
<b>DNA-eristys4 23.5.2013</b>				
<b>Näytteen nimi/tunniste</b>	<b>Pitoisuus 1. mittaus</b>	<b>Pitoisuus 2. mittaus</b>	<b>Puhtaus 1. mittaus</b>	<b>Puhtaus 2. mittaus</b>
FB018103, ceramic, 1000 rpm, 1,5 min	112,9	105,9	2,01	2,01
FB018103, ceramic, 1000 rpm, 3 min	6	6,7	1,91	1,62
FB018103, lasi, 1000 rpm, 1,5 min	150	146,8	1,99	1,99
FB018103, lasi, 1000 rpm, 3 min	185,1	187,3	2	2
FB018103, garnet, 1000 rpm, 1,5 min	168,6	167,1	2,01	2,02
FB018103, garnet, 1000 rpm, 3 min	93,4	91,9	1,97	1,96
Blankki, steriili vesi	0	0	0	0

Kiteistä viimeisimpänä testattu (Taulukko 5.) MoBion kitti tuotti matalia DNA-pitoisuuksia. MoBion antamat DNA-pitoisuudet, kaikki alle 17ng/μl, olivat siis lähes yhtä matalia kuin Qiagenin kitillä saadut pitoisuudet (Taulukko 1.). Samalla eristyskerralla (Taulukko 5.) testattiin taas esikäsittelyä ja kolmen minuutin lasihelmikäsittely tuotti helmikäsittelyistä jälleen korkeimman pitoisuuden, vaikka ero garnet-helmiin tässä mittauksessa oli vielä pienempi kuin edellisessä.

Taulukko 5. DNA-eristys 5

DNA-eristys5 24.5.2013				
Näytteen nimi/tunniste	Pitoisuus 1. mittaus	Pitoisuus 2. mittaus	Puhtaus 1. mittaus	Puhtaus 2. mittaus
GenoXtract:				
FB017723, garnet, 1000 rpm, 1,5 min	114,2	113,5	1,93	1,92
FB017723, garnet, 1000 rpm, 3 min	82	80,9	1,94	1,93
FB017723, lasi, 1000 rpm, 1,5 min	76,9	74,4	1,9	1,92
FB017723, lasi, 1000 rpm, 3 min	117,2	116,3	1,93	1,96
MoBio:				
FB017723, garnet, 1000 rpm, 1,5 min	7,3	7,2	1,39	1,59
FB017723, garnet, 1000 rpm, 3 min	4,6	3,6	1,35	1,43
FB017723, lasi, 1000 rpm, 1,5 min	12,2	13,7	1,81	1,72
FB017723, lasi, 1000 rpm, 3 min	15,9	16,3	1,91	1,69
Blankki, steriili vesi	0	0	0	0

Kahden viimeisen eristyskerran näytteet ajettiin taas geelille (Kuva 2.). Näin varmistettiin, että eristystuotteissa on mitattavaa DNA:ta. UV-kameralla kuvatulta geeliltä nähdään DNA:ta sisältävät näytteet. Pienen pitoisuuden eristykset näkyvät hyvin haaleasti geelillä. Valtaosa näytteistä liikkuu osittain geelillä pidemmälle eli eristystuotteissa on vähän epäpuhtautta ja hajonnutta DNA:ta (Kuva 2.).

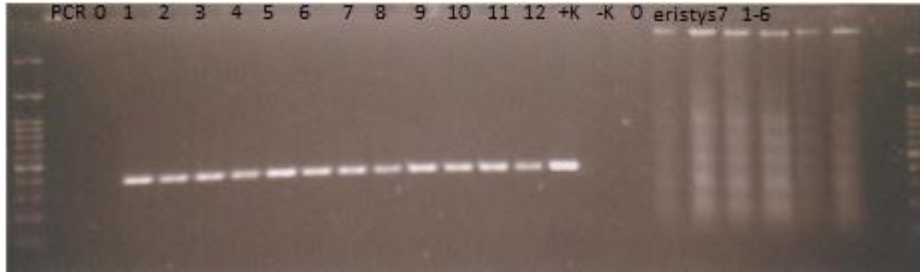


Kuva 2. Toinen geeliajo

DNA-eristysten kelpoisuus jatkotutkimuksia varten testattiin PCR:n (Kuva 3.) avulla. PCR:ää varten valittiin monistettavaksi *Lactobacillus*-bakteeri, jota aikaisempien tutkimusten mukaan valtaosalta imeväisikäisiltä löytyy suolistosta. (Adlerberthin & Woldin 2009.) Kuvassa 3. on kuusi näytettä vierekkäin laimennok-



sen kanssa eli yhteensä kaksitoista PCR-tuotetta. Positiivisesta kontrollista (*Lactobacillus*) saatiin positiivinen tulos ja negatiivisesta kontrollista (*E. coli*) saatiin negatiivinen tulos. Testi osoitti, että kaikista monistetuista näytteistä löytyi *Lactobacillus* ja bändit näkyivät selkeästi ja kirkkaasti geeliajossa (Kuva 3.).



Kuva 3. PCR-tuotteet

Kuudennessa eristyksessä (Taulukko 6.) vertailtiin kahta parasta helmikäsittelyä. Myös näytteen sisäistä vaihtelua ja toistettavuutta tutkittiin.

Taulukko 6. DNA-eristys 6

DNA-eristys6 27.5.2013				
Näytteen nimi/tunniste	Pitoisuus 1. mittaus	Pitoisuus 2. mittaus	Puhtaus 1. mittaus	Puhtaus 2. mittaus
FB17723, lasi, 1000 rpm, 3 min	161,3	157,8	2	2,01
FB17723, lasi, 1000 rpm, 3 min	115,6	115,6	1,98	1,99
FB17723, lasi, 1000 rpm, 3 min	106,6	108,3	1,98	2,01
FB17723, garnet, 1000 rpm, 1,5 min	122,1	120,2	1,99	2,01
FB17723, garnet, 1000 rpm, 1,5 min	119,4	118,4	2,01	1,99
FB17723, garnet, 1000 rpm, 1,5 min	90,6	92,3	2	2,03
Blankki, steriili vesi	0	0	0	0

Toistettavuus oli kohtalainen lasihelmillä, koska variaatiokerroin oli suhteellisen korkea, 23 % (Taulukko 7.). Garnet-helmet olivat hieman paremmin toistettavia, koska variaatiokerroin on matalampi (16%), mutta lasihelmet tuottivat korkeamman pitoisuuden.

Taulukko 7. Tunnusluvut eri helmillä

<i>Tunnusluvut</i>	<i>Lasihelmillä</i>	<i>Garnet-helmillä</i>
<b>Keskiarvo</b>	127,8	110,7
<b>Mediaani</b>	115,6	119,4
<b>Keskihajonta</b>	29,3	17,5
<b>Varianssi</b>	860,3	304,8
<b>Variaatiokerroin</b>	23 %	16 %
<b>Vaihteluväli</b>	54,7	31,5
<b>Minimi</b>	106,6	90,6
<b>Maksimi</b>	161,3	122,1
<b>Summa</b>	383,5	332,1
<b>Lukumäärä</b>	3	3

Seitsemännellä eristyskerralla (Taulukko 8.) tutkittiin -70 asteen pakastuksen vaikutusta näytteisiin. Näytteenä käytettiin kaksi päivää aiemmin käytettyä ja pakastettua näytettä eli siis samaa näytettä kuin eristyskerralla 6. (Taulukko 6.). Lyhyt aikainen pakastus vaikutti nostavasti näytteiden DNA-pitoisuuteen kaikissa näytteissä. Eristysten puhtausarvot olivat pakastetuissa näytteissä hieman yli 2 yksikköä. Tuoreissa näytteissä puhtausarvot olivat 2 tai hieman alle 2.

Taulukko 8. DNA-eristys 7

<b>DNA-eristys 7 29.5.2013</b>				
<b>Näytteen nimi/tunniste</b>	<b>Pitoisuus 1. mittaus</b>	<b>Pitoisuus 2. mittaus</b>	<b>Puhtaus 1. mittaus</b>	<b>Puhtaus 2. mittaus</b>
FB17723, lasi, 1000 rpm, 3 min	180,4	180,4	2,06	2,04
FB17723, lasi, 1000 rpm, 3 min	167,4	165,5	2,05	2,04
FB17723, lasi, 1000 rpm, 3 min	209,4	213,9	2,03	2,04
FB17723, garnet, 1000 rpm, 1,5 min	169,5	170,7	2,04	2,04
FB17723, garnet, 1000 rpm, 1,5 min	152,7	153,2	2,04	2,04
FB17723, garnet, 1000 rpm, 1,5 min	139,8	140,8	2,03	2,02
Blankki, steriili vesi	0	0	0	0

Viimeisellä eristyskerralla (Taulukko 9.) testattiin menetelmän toimivuutta suuremmalla näytesarjalla (12 näytettä), jotka olivat olleet pakastimessa kahdesta viikosta muutamaan kuukauteen. Näytesarjan kaikille näytteille tehtiin sama esikäsitely, eli näytteet homogenoitiin lasihelmillä kierrosnopeudella 1000 rpm ja ajalla 3 minuuttia. Pitoisuudet vaihtelivat välillä 10-147ng/μl. Yhdessä näytteessä puhtausarvo oli erittäin matala, noin 0,7.

Taulukko 9. DNA-eristys 8

<b>DNA-eristys8 30.5.2013</b>				
<b>Näytteen nimi/tunniste</b>	<b>Pitoisuus 1. mittaus</b>	<b>Pitoisuus 2. mittaus</b>	<b>Puhtaus 1. mittaus</b>	<b>Puhtaus 2. mittaus</b>
FB017013, lasi, 1000 rpm, 3 min	147,1	148,8	1,97	1,98
FB015863, lasi, 1000 rpm, 3 min	36,9	34,2	1,83	1,83
FB017273, lasi, 1000 rpm, 3 min	72,3	72,7	1,76	1,76
FB116893, lasi, 1000 rpm, 3 min	84,9	83,8	1,71	1,73
FB017223, lasi, 1000 rpm, 3 min	48,5	49,3	1,69	1,74
FB017433, lasi, 1000 rpm, 3 min	24,2	24	1,95	2,04
FB017973, lasi, 1000 rpm, 3 min	68,2	68,7	1,84	1,87
FB015963, lasi, 1000 rpm, 3 min	92,5	94	2,03	2,01
FB017333, lasi, 1000 rpm, 3 min	54,6	57,8	0,69	0,66
FB017183, lasi, 1000 rpm, 3 min	10,7	10,7	1,82	1,83
FB016883, lasi, 1000 rpm, 3 min	15,6	17,4	1,7	1,61
FB017773, lasi, 1000 rpm, 3 min	60,9	61,1	1,88	1,89
PCR, ei laimennettu, puhdistettu, nro. 5	17,8	17,7	1,77	1,96
PCR, ei laimennettu, puhdistettu, nro. 9	13,1	13,2	1,71	1,85
Blankki, steriili vesi	0	0	0	0

Optimoidulla menetelmällä saaduista tuloksista laskettiin tunnusluvut (Taulukko 10.). Näytteistä saatiin eristettyä DNA:ta keskimäärin 59 ng/μl. Pitoisuudessa on paljon hajontaa. Minimi-arvo on erittäin matala ja vaihteluväli laaja.

Taulukko 10. Pitoisuuden tunnusluvut

<i><b>Pitoisuus optimoidulla menetelmällä, tunnusluvut</b></i>	
<b>Keskiarvo</b>	59,7
<b>Mediaani</b>	57,8
<b>Keskihajonta</b>	38,0
<b>Varianssi</b>	1441,8
<b>Variaatiokerroin</b>	64%
<b>Vaihteluväli</b>	136,4
<b>Minimi</b>	10,7
<b>Maksimi</b>	147,1
<b>Summa</b>	716,4
<b>Lukumäärä</b>	12

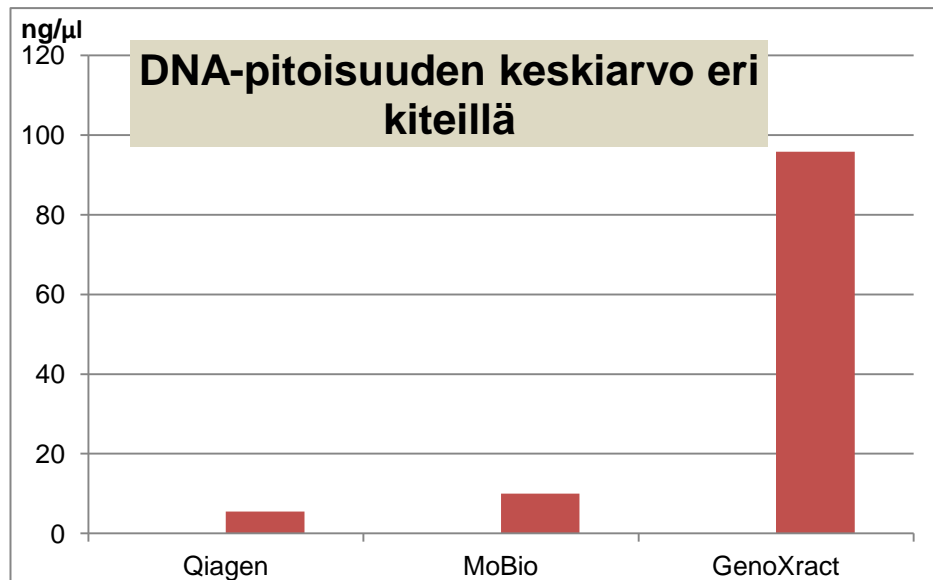
Myös optimoidulla menetelmällä tehdyn eristyksen puhtausarvojen tuloksista tehtiin yhteenvedona tunnusluvut (Taulukko 11.). Puhtaus pysyy keskimäärin <2 yksikössä. Mediaani on 1,83 eli se osuu optimaalisimpien arvojen välille (1,8–1,9). Hajonta on pientä.

Taulukko 11. Puhtauden tunnusluvut

<i><b>Puhtaus 260/280nm optimoidulla menetelmällä, tunnusluvut</b></i>	
<b>Keskiarvo</b>	1,74
<b>Mediaani</b>	1,83
<b>Keskihajonta</b>	0,35
<b>Varianssi</b>	0,12
<b>Variaatiokerroin</b>	20%
<b>Vaihteluväli</b>	1,34
<b>Minimi</b>	0,69
<b>Maksimi</b>	2,03
<b>Summa</b>	20,87
<b>Lukumäärä</b>	12

Kaikista eristysten pitoisuustuloksista laskettiin keskiarvot kiteittäin tulosten havainnollistamiseksi. Kuviosta 1. nähdään, että GenoXtract antaa ylivoimaisesti

korkeimmat DNA-pitoisuudet. Qiagenilla on saatu alhaisimmat pitoisuudet. GenoXtract:lla saadut DNA-pitoisuudet ovat moninkertaiset verrattuna Qiagenilla ja MoBio:lla saatuihin pitoisuuksiin.



Kuvio 1. Pitoisuuksien keskiarvot

## 6 POHDINTA

Opinnäytetyössä optimoitu DNA:n eristysmenetelmä otettiin käyttöön Turun yliopiston lääketieteellisen immunologian ja mikrobiologian laitoksella suolistomikrobeja tutkivassa työryhmässä. Opinnäytetyö tuotti siis käytännön hyötyä työelämän tarpeisiin. Lisäksi opinnäytetyön tulokset edistivät ja vauhdittivat suolistomikrobiston tutkimusta. Tutkimustulokset eivät ole ristiriidassa aikaisempien tutkimusten kanssa.

Mitattujen DNA-pitoisuuksien ja puhtausarvojen perusteella voidaan todeta, että paras DNA-eristysmenetelmä (Kuvio 1.) vauvojen ulostenäytteille on GenoXtract-automaattilaite ja laitteeseen kuuluva kitti Stool-kit ver.2 yhdistettynä esikäsittelyyn lasihelmillä ja ravisteluasetuksilla 1000rpm/1,5min.

Ensimmäisessä eristyksessä selvisi, että Qiagenin kitti antaa liian matalia DNA-pitoisuuksia (Taulukko 1.), joista ei voi tehdä jatkotutkimuksia normaalimikrobiston bakteeriston tutkimustyössä eikä siten sovellu eristysmenetelmäksi. Samalla kerralla testattu GenoXtract antoi hyvän DNA-pitoisuuden helmikäsittelystä vauvanäytteestä, mutta GenoXtractin toimivuus ei ollut kuitenkaan vielä selvää, koska eristystuote oli sameaa eli laadullisesti huonoa. Vauvanäytteen hyvä DNA-pitoisuus on tässä tapauksessa todennäköisesti virheellinen, koska samea näyte antaa virheellisen korkean absorbanssin. Helmikäsittely paransi pitoisuuksia huomattavasti. Qiagenin kitti ei toiminut edes helmikäsittelyn kanssa ja DNA-pitoisuudet olivat huonoja.

Seuraavissa testauksissa (Taulukot 2.-9.) GenoXtractin menetelmällä saatiin useimmissa tapauksissa riittävästi DNA:ta ja näytteet olivat tarpeeksi puhtaita. Eri homogointiaikojen ja voimakkuuksien testaus osoitti, että kolmen minuutin käsittely keraamisilla helmillä on liian pitkä (Taulukko 3.), koska pitoisuus oli todella matala ja puhtaus huono. Ravisteluvoimakkuus 2000 rpm tuotti vähän paremmat pitoisuudet kuin 1000rpm, mutta paremmaksi voimakkuudeksi valikoitui 1000rpm, koska se tuotti hieman puhtaammat eristykset ja riski DNA:n hajoamisesta olisi pienempi.

Erilaisten helmien testauksessa (Taulukko 4.) saadut tulokset osoittivat, että lasiset helmet toimivat parhaiten vauvanäytteiden kanssa, kun homogenointi tehdään asetuksilla 1000rpm/3min. Toiseksi parhaat olivat garnet-helmet 1000rpm/1,5min -homogenoinnilla. Garnet-helmillä käsitellyt näytteet tuottivat hieman puhtaampia ja toistettavampia tuloksia kuin lasihelmet, mutta paremman saannon vuoksi lasihelmet valikoituivat parhaiksi. Keraamiset helmet tuottivat kohtalaisia tuloksia pitoisuuden kannalta, mutta helmet olivat huonoimmat suhteessa muihin testattuihin helmiin.

Viimeisenä testattu MoBion kitti (Taulukko 5.) tuotti heikot DNA-pitoisuudet ja eristystuotteet olivat kelvottomia jatkotutkimusten kannalta. Tässä vaiheessa oli selvää, että kolmesta testatusta kitistä GenoXtract antaa parhaat tulokset ja on siten paras eristysmenetelmä tässä sovelluksessa. Optimoidulla menetelmällä eristettyjen näytteiden tunnusluvuista (Taulukko 10.) nähdään, että näytteistä on saatu eristettyä riittävästi DNA:ta, keskimäärin 59 ng/μl. Hajontaa on paljon ja se kertoo näytteiden suuresta monimuotoisuudesta, joka on todettu aikaisemmin useassa eri tutkimuksessa. Minimi-arvo kertoo, että kaikista näytteistä ei ole mahdollista saada kunnollista jatkotutkimusmateriaalia edes optimoidulla menetelmällä. Jos näytteet käsiteltäisiin yksilöllisesti niiden koostumuksen perusteella, saannot voisivat olla vielä paremmat. Koostumuksen arviointi ja yksilöllinen esikäsittely olisi toki hankalaa ja aikaa vievää. Puhtausarvojen tunnusluvuista (Taulukko 11.) nähdään, että puhtaus pysyy keskimäärin sallitun ylärajan alapuolella, eli <2 yksikössä, muttei kuitenkaan kaikista ihanteellisimmassa arvossa, eli 1,8–1,9. Toistettavuus on hyvä, koska hajontaa on vähän.

Menetelmä saatiin siis optimoitua näytteille sopivaksi. Tutkimusongelmaan saatiin vastaus, koska määrällisesti parhaan ja puhtaimman erityksen tuottava menetelmä ja esikäsittely saatiin selvitettyä. Onnistuneiden geelielektroforeesiajojen (Kuvat 1. ja 2.) ja PCR-tulosten (Kuva 3.) perusteella on selvää, että GenoXtractilla tehtyjä DNA-eristysnäytteitä voidaan käyttää luotettavasti jatkotutkimuksissa.

Näytteiden säilyvyydestä saatiin suuntaa antavaa tietoa, mutta tarkempaa paneutumista aiheeseen ei ehditty tekemään. Ensimmäisessä pakastukseen vai-

kutuksen testaamisessa (Taulukko 2.) näytti siltä, että pakastus heikentää tuloksia laskemalla DNA-pitoisuutta. Toisessa pakastuksen testauksessa (Taulukko 8.) pakastus paransi tuloksia nostamalla DNA-pitoisuutta. Erot johtuvat todennäköisesti siitä, että jälkimmäisessä testissä näytteet olivat pakastimessa vain muutaman päivän. Joten pakastusajalla näyttäisi olevan suuri merkitys DNA-pitoisuuteen. Lisäksi ensimmäisessä testauksessa oli mukana vain yksi näyte, joka oli ollut pidemmän aikaa pakastuksessa. Pakastus heikensi puhtautta, mutta vaikutus oli vähäinen. Pakastuksen vaikutus voi olla myös näytteen laadusta riippuvainen.

### 6.1 Luotettavuus

Näytteiden lukumäärä (12 kpl) oli melko pieni, mikä heikentää luotettavuutta. N-luku ( $n=53$ ) jäi melko pieneksi, koska aikaa ja näytteitä oli rajallinen määrä. Paras menetelmä testattiin kuitenkin useamman kerran ja tulokset olivat yhteneviä sekä menetelmä kohtuullisen toistettava. Ensimmäisen eristyksen kontrollina olleet aikuisten näytteet tuottivat odotetusti hyviä tuloksia, joten eristyksen tulokset eivät johtuneet tutkijoiden kokemattomuudesta ja eristyksen tuloksia voitiin pitää luotettavana. Myös PCR:n luotettavuutta kontrolloitiin positiivisen ja negatiivisen kontrollin avulla. Kontrollit toimivat moitteettomasti. DNA-eristysten pitoisuudet mitattiin ensimmäisen eristyskerran jälkeen aina kahdesti, jotta välttäisiin mahdollisten pipetointivirheiden aiheuttamilta vääriä tuloksilta.

Opinnäytetyössä testatut kitit olivat kaikki kaupallisia, mikä vähentää inhimillisten virheiden riskiä työn suorituksessa. Lisäksi kitit ovat valmiiksi kontrolloituja ja testattuja, mikä lisää luotettavuutta. Näytteiden massat arvioitiin ensimmäisen testauksen jälkeen silmämääräisesti ja tämä saattaa vaikuttaa näytteiden vertailukelpoisuuteen ja luotettavan tulkinnan tekemiseen. Optimoinnin jälkeen tilanne korjaantui ja näytteitä alettiin punnita rutiinisti. DNA-eristysten kannalta punnitus ei ole pakollista, mutta joidenkin jatkotutkimusten kannalta on ehdottoman tärkeää tietää näytteen tarkka massa.



Empiirisen vaiheen aikana pidettiin laboratoriopäiväkirjaa reaaliajassa ja poikkeustilanteet kirjattiin ylös. Tämä opinnäytetyö tehtiin parityönä, joten tutkimuksen suoritusta oli tarkkailemassa yhden sijasta kaksi tutkijaa, mikä vähentää virheiden määrää ja lisää luotettavuutta. Työskentely laboratoriossa oli huolellista ja aseptista. Teoreettisen taustan tutustumiseen, työohjeiden lukemiseen ja työvaiheiden opetteluun käytettiin aikaa. Työvaiheet suoritettiin työohjeiden ja ohjaajan antamien ohjeiden mukaan. Muiltakin osin tämä opinnäytetyö suoritettiin käytännön ohjaajan ja ohjaavan opettajan opastuksessa ja epäselviin tilanteisiin saatiin apua.

## 6.2 Eettisyyden arviointi

Hyvät tutkimuseettiset periaatteet toteutuivat tässä opinnäytetyössä, sillä tutkimus suoritettiin vaarantamatta henkilötietosuojaa, raportoinnissa oltiin rehellisiä, tuloksia ei vääristelty ja plagiointia ei tapahtunut. Tutkijat toimivat vastuullisesti, tarkasti ja avoimesti. Näytteet kulkivat koko laboratorioprosessin aikana juoksevilla numeroilla ja henkilötiedot pysyivät salassa. Myöskään näytteisiin liittyvät taustatiedot, esimerkiksi synnytys, imetys ja antibioottikuurit, eivät tulleet tässä vaiheessa tutkimusta ilmi. Tuloksista raportoitiin rehellisesti niitä vääristelemättä. Tuloksia arvioitiin kriittisesti ja kaikki muuttujat huomioitiin. Teoreettisen taustan kirjoittamisessa käytettiin oikeaoppimisia lähdemerkintöjä. Teoreettinen tausta pohjautuu laadukkaaseen tieteelliseen lähdemateriaaliin. Lähdemateriaalia ja aikaisempien tutkimusten tuloksia oli kuitenkin käytettävissä rajallinen määrä, koska tämän opinnäytetyön aihe on melko spesifi.

## 6.3 Jatkotutkimusaiheet

Menetelmän optimointi saatiin suoritettua loppuun asti, joten itsestään selvää jatkotutkimusaihetta ei ole. Toisaalta näytteen oikeanlainen säilytys on osa laadukasta esikäsittelyä, joten sitä voisi mahdollisissa jatkotutkimuksissa tutkia tarkemmin, koska tässä tutkimuksessa ei saatu selvää vastausta pakastuksen vaikutuksesta näytteen laatuun ja DNA:n saantoon. Myös koko näytteen homo-

genisoinnin vaikutus voisi olla jatkotutkimusaihe, jolla voitaisiin selvittää saadaanko tuloksista toistettavampia, kun koko alkuperäinen näyte homogenisoidaan ennen ulosteen annostelua mikroputkiin. DNA-eristysten toimivuutta kogenomisekvensoinnissa ei tässä opinnäytetyössä tutkittu, joten myös sitä voisi tutkia jatkotutkimuksissa.

## LÄHTEET

Adlerberth, I. & Wold, A.-E. 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. Wiley Online Library, *Acta Paediatrica*. Volume 98, Issue 2. Pages 229-238. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+on+11+May+from+10%3A00-12%3A00+BST+%2805%3A00-07%3A00+EDT%29+for+essential+maintenance&userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=>

Edwards, C. A. & Parret, A. M. 2002. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *British Journal of Nutrition*. Volume 88. Pages 11-18. Viitattu 9.5.2013 <http://journals.cambridge.org/action/displayFulltext?type=6&fid=909240&jid=BJN&volumeId=88&issueId=S1&aid=909236&bodyId=&membershipNumber=&societyETOCSession=&fulltextType=RA&fileId=S0007114502001757>

FinnBrain –study 2013. Viitattu 9.5.2013 <http://www.finnbrain.fi/>

Furet, J.-P.; Firmesse, O.; Gourmelon, M.; Bridonneau, C.; Tap, J.; Mondot, S.; Doré, J. & Corthier, G. 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS), Microbiol Ecol* 68. Pages 351-362.

Hain Lifescience 2011a. GXT Stool Extraction Kit.

Hain Lifescience 2011b. Viitattu 12.11.2013. <http://www.hain-lifescience.de/en/products/equipment/genoextract.html>

Hellsten, S. 2005. Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Kuntaliitto, 2. painos. Gummerus, Jyväskylä.

Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2004. Tutki ja kirjoita. Gummerus, Jyväskylä.

Huovinen, P. 2013. Bakteriston merkitys terveydelle avautuu vähitellen. *Suomen lääkirilehti*, 9/2013. Sivut 655-659.

Jalava, J. 2010. Ihmisen normaali mikrobisto ja sen merkitys. *Mikrobiologia*. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 1. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki.

Karlsson, H. 2012. Are there biomarkers for prenatal and early childhood stress? – The FinnBrain Neurodevelopment Study. *FinnBrain Neuro, Part B2*, University of Turku. Pages. 1-14.

Kilkinen, A. 2004. Edistääkö enterolaktoni terveyttä? *Suomen lääkirilehti* 5/2004, 59. Sivut 416-418.

Kok, R.; De Waal, A.; Schut, F.; Welling, G.; Weenk, G.; Hellingwerf, K. 1996. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *American Society for Microbiology, Applied and Environmental Microbiolgy*. Volume 62, Number 10. Pages 3668-3672.

Kuula, A. 2006. Tutkimusetiikka Aineistojen hankinta, käyttö ja säilytys. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä.

Launis, V. 2007. Tutkimuksen eettinen ennakoarviointi, mitä se on? *Tieteessä tapahtuu* 1/2007. Sivut 28-33.

- Lowe, D. 2013. Garnet. Viitattu 7.11.2013. <http://www.mindat.org/min-10272.html>
- Maukonen, J.; Simões, C. & Saarela, M. 2012. The currently used commercial DNA-extraction methods give different results of clodtridial and actinobacterial populations derived from human fecal samples. Wiley Online Library, FEMS Microbiology Ecology. Volume 79, Issue 3. Pages 697-708. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.2011.01257.x/full>
- Mcvilly, K.; Stancliffe, R.; Parmenter, T.; Burton-Smith, R. 2008. Remaining Open to Quantitative, Qualitative, and Mixed-Method Designs: An Unscientific Compromise, or Good Research Practice? Elsevier, Mental Retardation. Volume 35. Pages 151-203.
- MoBio 2013a. Bead Beating Tubes. Viitattu 7.11.2013. <http://www.mobio.com/bead-beating-tubes-homogenization/bead-beating-tubes-7.html>
- MoBio 2013b. PowerFecal DNA Isolation Kit. Viitattu 7.11.2013. <http://www.mobio.com/fecal-dna-isolation/powerfecal-dna-isolation-kit.html>
- Noverr, M.; Falkowski, N.; McDonald, R.; McKenzie, A. & Huffnagle, G. 2005. Development of allergic airway disease in mice following antibiotic therapy and fungal microbiota increase: role of the host genetics, antigen, and interleukin-13. Infection and immunity. American society for microbiology. Viitattu 15.11.2013. <http://iai.asm.org/content/73/1/30.abstract>
- Oyslab ohjekirja 2010. Viitattu 9.9.2013 [http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjeet/Ulostenaytteen\\_otto.pdf](http://oyslab.fi/cgi-bin/ohjeet/Ulostenaytteen_otto.pdf)
- Palmer, C.; Bik, E.; DiGiulio, D.; Relman, D. & Brown, P. 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. Plos Biology. Volume 5, Issue 7. Pages 1556-1573. <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0050177>
- Pärssinen, R.; Suominen, I. & Haajanen, K. 2012. Biogeeni, Ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa. Opetushallitus 2012.
- Qiagen 2013. QIAmp DNA Stool Mini Kit. Viitattu 7.11.2013. <http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-stool-mini-kit#productdetails>
- Rice, G. 2013. Dna extraction. Microbial life, Educational resources. Viitattu 9.5.2013 [http://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/genomics/dnaext.html](http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/dnaext.html)
- Rintala, A. 2013. Diagnostics and clinical significance of Faecalibacterium prausnitzii, Pro Gradu. Jyväskylän yliopisto.
- Ritz, C. & Spiess, A-N. 2008. QPCR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. Bioinformatics. Volume 24, Issue 13. Pages 1549-1551. Viitattu 12.11.2013. <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/24/13/1549.full.pdf+html>
- Roesch, L.; Casella, G.; Simell, O.; Krischer, J.; Wasserfall, C.; Schatz, D.; Atkinson, M.; Neu, J. ja Triplett, E. 2009. Influence of fecal sample storage on bacterial community diversity. The open microbiology journal, 3, 1874-2858. Pages 40-46.
- Salonen, A.; Nikkilä, J.; Jalanka-Tuovinen, J.; Immonen, O.; Rajilić-Stojanović, M.; Kekkonen, R.; Palva, A.; De Vos, W. 2010. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. ScienceDirect, Journal of Microbiological Methods. Volume 81, Issue 2. Pages 127-134. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701210000667>
- Salovaara, M. 2008. Vastasyntyneen hoito ja tarkkailu kotona. Viitattu 9.5.2013 <http://demo.seco.tkk.fi/tervesuomi/item/nn:145>


Sekirow, I.; Russell, S. L.; Antunes, L. C. & Finnlay, B. B. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev* 90. Pages 859-904.

Suominen, I. & Ollikka, P. 2004. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Opetushallitus, Helsinki.

Suominen, I.; Pärssinen, R.; Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. *Geenitekniikka*. Turun ammatti-korkeakoulu.

Tykslab ohjekirja 2010. Viitattu 9.5.2013. <http://ohjekirja.tykslab.fi/liitteet/MikrobiolNaytteet.pdf>

# Liite 1. MoBio-kitin ohjeet



## PowerFecal™ DNA Isolation Kit

**Prepare Sample**

**Cell Lysis**

**Inhibitor Removal Technology®**

**Bind DNA**

**Wash**

**Elute**

- Add sample to Dry Bead Tube
- Add Bead Solution
- Add Solution C1
- Heat Tubes at 65°C
- Attach to Vortex Adapter
- Vortex

*Centrifuge*

- Add Solution C2
- Incubate at 4°C

*Centrifuge*

- Add Solution C3
- Incubate at 4°C

*Centrifuge*

- Add Solution C4
- Load into Spin Filter

*Centrifuge*

- Wash with Solution C5

*Centrifuge*

- Elute with Solution C6

**Technical Information: Toll free 1-800-606-6246. or 1-760-929-9911 Email: [technical@mobio.com](mailto:technical@mobio.com) Website: [www.mobio.com](http://www.mobio.com)**



## Experienced User Protocol

Please wear gloves at all times

1. To the **Dry Bead Tube**, provided, add 0.25 grams of stool or biosolid.  
**Note:** For fecal samples that are especially high in lipids, polysaccharides and protein (for example: meconium or some bird feces) less material (0.10 grams) may improve the DNA yield and purity.
2. Add **750 µl of Bead Solution** to the **Dry Bead Tube**. Gently vortex to mix.
3. **Check Solution C1**. If **Solution C1** has precipitated, heat solution to 60°C until dissolved before use.
4. Add **60 µl of Solution C1** and invert several times or vortex briefly.
5. Heat the tubes at 65°C for 10 minutes.
6. Secure the bead tubes horizontally using the MO BIO Vortex Adapter tube holder for the vortex (MO BIO Catalog# 13000-V1) or secure tubes horizontally on a flat-bed vortex pad with tape. Vortex at maximum speed for 10 minutes. *Powerlyser 1000rpm 1,80min (22.5.0)*
7. Centrifuge the tubes at 13,000 x g for 1 minute.
8. Transfer the supernatant to a clean **2 ml Collection Tube** (provided). Expect between 400 to 500 µl of supernatant.
9. Add **250 µl of Solution C2** and vortex briefly to mix. Incubate at 4°C for 5 minutes.
10. Centrifuge the tubes at 13,000 x g for 1 minute.
11. Avoiding the pellet, transfer up to 600 µl of supernatant to a clean **2 ml Collection Tube** (provided).
12. Add **200 µl of Solution C3** and vortex briefly. Incubate at 4°C for 5 minutes.
13. Centrifuge the tubes at 13,000 x g for 1 minute.
14. Avoiding the pellet, transfer the supernatant to a clean **2 ml Collection Tube** (provided). Do not transfer more than 750 µl at this step.
15. Shake to mix Solution C4 before use. Add 1200 µl of **Solution C4** to the supernatant and vortex for 5 seconds.
16. Load 650 µl of supernatant onto a **Spin Filter** and centrifuge at 13,000 x g for 1 minute. Discard the flow through and repeat until all the supernatant has been loaded onto the Spin Filter.  
**Note:** A total of three loads for each sample processed are required.

**High Throughput Option:** Step 16 can become tedious when many samples need to be processed. For this reason, MO BIO has developed a vacuum protocol. It does require the purchase of our aluminum Spin Filter Adapters (MO BIO Catalog# 11992-10) which will allow you to fit our flat bottom

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: [technical@mobio.com](mailto:technical@mobio.com) Website: [www.mobio.com](http://www.mobio.com)





spin filters on to any vacuum manifold with Luer lock fittings. Please read **Vacuum Protocol using the PowerVac™ Manifold on page 11.**

17. Add 500 µl of **Solution C5** and centrifuge for 1 minute at 13,000 x g.
18. Discard the flow through.
19. Centrifuge again for 1 minute at 13,000 x g.
20. Carefully place the Spin Filter in a clean **2 ml Collection Tube** (provided). Avoid splashing any of **Solution C5** onto the **Spin Filter**.
21. Add 100 µl of **Solution C6** to the center of the white filter membrane. Alternatively, sterile DNA-Free PCR Grade Water or TE buffer may be used for elution from the silica Spin Filter membrane at this step (MO BIO Catalog# 17000-10).  
 Note: Eluting with 100 µl of Solution C6 will maximize DNA yield. For more concentrated DNA, a minimum of 50 µl of Solution C6 can be used. Do not use less than 50 µl of Solution C6.
 

*— str. aqua*
22. Centrifuge at 13,000 x g for 1 minute and discard the Spin Filter basket.

The DNA in the tube is now ready for any downstream application. No further steps are required.

We recommend storing DNA frozen (-20° to -80°C). **Solution C6** contains no EDTA. To concentrate the DNA see the Hints & Troubleshooting Guide.

**Thank you for choosing the PowerFecal™ DNA Isolation Kit.**

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: [technical@mobio.com](mailto:technical@mobio.com) Website: [www.mobio.com](http://www.mobio.com)



## Liite 2. FinnBrain-näytteiden käsittely

27.2.2013

### FinnBrain-näytteiden käsittely

FinnBrain-näytteet toimitetaan TYKS:stä keskiviikkoisin ja torstaisin. Saapuvat näytteet (5-6 kpl/päivä) tulee käsitellä mahdollisimman nopeasti; pakastus tehdään samana päivänä ja DNA-eristykset kerran viikossa.

- 1) Jokainen näyte jaetaan vetokaapissa (labra 333) kolmeen, kierrekorkilliseen 2ml Eppendorf-putkeen ja putket pakastetaan  $-70^{\circ}\text{C}$ . HUOM! Käytetään putkien koodaamiseen FinnBrain-tutkimuksen koodia, ja putkiin myös ylös pakastuspäivämäärä.  
*+ 1 putkeen 500µl EtOH-PBS-liuosta, jos näytettä tarpeeksi*
- 2) Saapuvasta näytteestä siirretään n. 100mg (sininen siirrostussilmukka) 2 ml helmiputkeen DNA-eristystä varten.

Mahdollinen ylimääräinen näyte pakastetaan sellaisenaan näytepurkissa. Jos DNA-eristystä ei suoriteta samana päivänä, laitetaan näyte odottamaan ( $+4^{\circ}\text{C}$ :een). Pyritään siihen, että näytteitä ei kuitenkaan säilytettäisi  $+4^{\circ}\text{C}$ :ssa vuorokautta kauempaa ennen DNA-eristystä.

Jos näyte on todella niukka, on DNA-eristys etusijalla ja pakastetaan kaikki mitä jää (jos jää).

#### FinnBrain-tutkijoiden yhteystiedot:

Tutkija Susanna Hakonen, susanna.hakonen at utu.fi

Tutkimushoitaja (rekrytointi) Johanna Wahlbäck, 02-333 7802

Professori Hasse Karlsson, hasse.karlsson at utu.fi , 02-333 7805

27.2.2013

**DNA-ERISTYS GENOEXTRACT-AUTOMAATILLA****Näytteiden käsittely (labra 333):**

- Siirrostetaan vetokaapissa n. 100 mg näytettä (hernettä pienempi nokare) 2 ml helmiputkeen.
  - Näytemäärä arvioidaan, 10 µl silmukka on ehkä paras väline näytteiden siirtämiseen.
- Lisätään helmiputkeen 1 ml Stool Stabilizer –liuosta, vorteksoidaan nopeasti
  - Stool Stabilizer löytyy GenoXtract-laitteen alla säilytettävästä GXT Stool –boksista.
- Homogenisoidaan näytteet MO BIO –homogenisaattorilla (Hännisen labra)
  - 2000 rpm, 5 min, ohjelma valmiina
  - Varmistetaan, että putkien korkit ovat kunnolla kiinni! Näytetunnukset pitää ehdottomasti merkitä putkien kylkeen, koska voivat homogenisoinnin aikana kulua korkeista pois.
  - Näytteet muuttuvat homogenisoinnin aikana tavallisesti vaaleanruskeaksi ”vaahdoksi”
- Sentrifugoidaan näytteet pikkufuugilla 5000 \*g, 4 min
- Pipetoidaan putkista 500µl supernatanttia 2 ml kierrekorkilliseen eppariin.
  - Pipetointi voi välillä olla hankalaa, koska näytteissä on runsaasti vaahtoa joka meinaa pursua ulos putkista.
  - Jos näytteen pintaan on jäänyt ohut ”mutakerros”, pipetoidaan kirkasta nestettä tämän kerroksen alta. Tarvittaessa sentrifugointi voidaan toistaa.

**GenoXtract-laitteen valmistelu (voidaan tehdä homogenisoinnin aikana):**

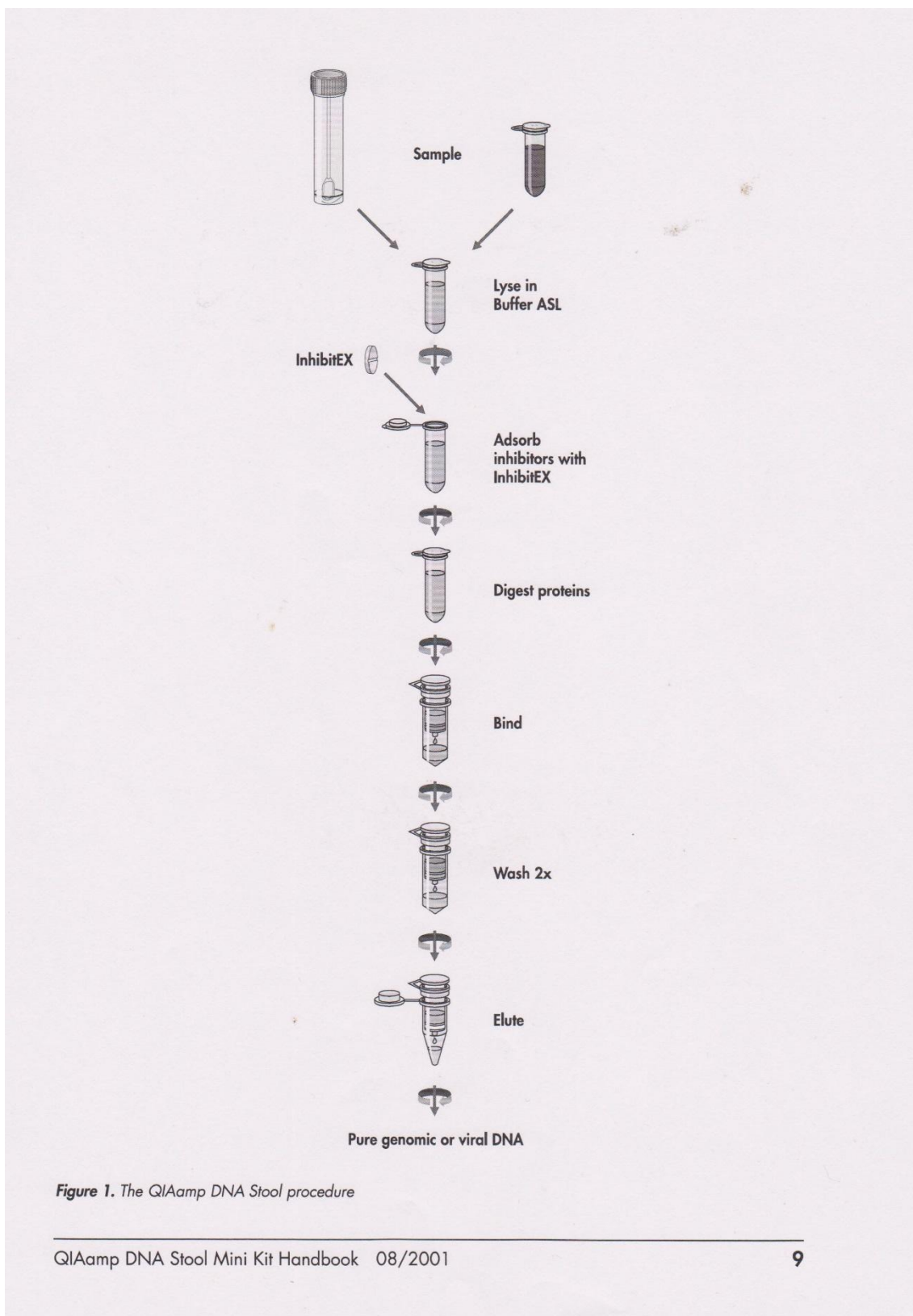
- Liitetään tarvittava määrä GXT Stool-kitistä löytyviä pumpetteja pipetinkärkiin, ja kiinnitetään pipettiyhdistelmät automaattiin
  - Tarkistetaan, että pipetit ovat hyvin kohdillaan. Pyörittäessä kärkiosaa myös pumpetin kuuluu pyöriä vapaasti ruttaantumatta
- Rei'itetään reagenssikasetit lävistäjällä, laitetaan kasetit paikoilleen
  - Lävistys on helpointa, kun kasetit ovat omassa laatikossaan. Jos joku kuoppa ei aukea kunnolla, voi muovikalvon rikkoa pipetinkärjellä.
  - Kasetit jäävät helposti vähän ylös alustasta koneeseen laitettaessa, on tärkeä painaa ne kunnolla paikoilleen
- Asetetaan hyllyltä löytyvät mustat muovirinkulat paikoilleen ja laitetaan 2 ml näyteputket (joissa 500 µl liuosta) näihin rinkuloihin

27.2.2013

- Asetetaan etummaisiiin koloihin 1,5 ml kierrekorkilliset epparit ilman korkkeja (säästetään korkit johonkin laitteen lähelle). Nämä putket ovat lopullisia tuotteita varten.
- Käynnistetään laite (ensin laitteen takaa, sitten edessä olevasta pyöreästä metallinapista), suoritetaan initialization ja painetaan sitten START PROTOCOL → GXT\_Stool\_DNA\_V2 → Elution volume 200  $\mu$ l → OK, OK, OK, OK → START  
Ajo kestää noin tunnin. (50 min)
- Kun ajo on lähtenyt käyntiin, huuhdellaan lävistäjä aqualla, kuivataan ja laitetaan takaisin pussiinsa.
- Kun ajo on valmis:
  - pakastetaan DNA:t -70°C. (-20°C) oma
  - Heitetään näyteputket, reagenssikasetit ja pipetit riskijätteeseen
  - Laitetaan muovirinkulat likoamaan 70% etanoliin (sininen purkki tiskipöydällä on tätä varten)
  - Irrotetaan laitteen metallitaso ja suihkutetaan se 70% etanolilla → kuivumaan esim. paperien päälle laitteen kylkeä vasten) kuivataan paperilla - takaisin paikoilleen
  - Kun viina on haihtunut metallitasosta, asetetaan taso takaisin paikoilleen ja suoritetaan UV dekontaminaatio -ohjelma (60 min).



## Liite 3. Qiagen-kitin ohjeet



## Protocol for Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection

Lysis conditions in this protocol are optimized to increase the ratio of non-human DNA to human DNA. Human DNA is not excluded by this procedure.

### Important notes before starting

- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on the labels.
- Mix all buffers before use.
- If a precipitate has formed in Buffer ASL or AL, dissolve by incubating at 70°C.
- Prepare a 70°C water bath for use in steps 3 and 12.
- For detection of cells that are difficult to lyse, such as those of some bacteria and parasites, the lysis temperature in step 3 can be increased to 95°C, if necessary.
- All centrifugation steps should be carried out at room temperature (15–25°C) at 20,000 x g (~14,000 rpm). Increase the centrifugation time proportionately if your centrifuge cannot provide 20,000 x g (e.g., instead of centrifuging for 5 min at 20,000 x g, centrifuge for 10 min at 10,000 x g).
- The 2 ml tubes used in step 5 should be wide enough to accommodate an InhibitEX tablet (e.g., Eppendorf Safe-Lock, cat. no. 0030120.094 or Sarstedt Safe-Seal, cat. no. 72.695).
- To increase robustness of downstream PCR assays of DNA eluates from stool samples, we strongly recommend adding BSA to PCR mixtures to a final concentration of 0.1 µg/µl (e.g., Serva cat. no. 11920 or New England Biolabs® BSA, cat. no. BSA-007). To increase PCR specificity, we recommend the use of QIAGEN HotStarTaq DNA Polymerase (see ordering information on page 39).

~0.2g

### 1. Weigh 180–220 mg stool in a 2 ml microcentrifuge tube (not provided) and place the tube on ice.

If the sample is liquid, pipet 200 µl into the microcentrifuge tube. Cut the end of the pipet tip to make pipetting easier.

If the sample is frozen, use a scalpel or spatula to scrape bits of stool into a 2 ml microcentrifuge tube on ice.

**Note:** When using frozen stool samples, take care that the samples do not thaw until Buffer ASL is added in step 2 to lyse the sample; otherwise the DNA in the sample may degrade. After addition of Buffer ASL, all following steps can be performed at room temperature.



Labran 377 pikkuhvosi max. no. 11200 rpm

Protocol

2. Add 1.4 ml Buffer ASL to each stool sample. Vortex continuously for 1 min or until the stool sample is thoroughly homogenized.

**Note:** It is important to vortex the samples thoroughly. This helps ensure maximum DNA concentration in the final eluate.

3. Heat the suspension for 5 min at 70°C. 95°C

This heating step increases total DNA yield 3- to 5-fold and helps to lyse bacteria and other parasites. The lysis temperature can be increased to 95°C for cells that are difficult to lyse (such as Gram-positive bacteria).

4. Vortex for 15 s and centrifuge sample at full speed for 1 min to pellet stool particles.
5. Pipet 1.2 ml of the supernatant into a new 2 ml microcentrifuge tube (not provided) and discard the pellet.

**Note:** The 2 ml tubes used should be wide enough to accommodate an InhibitEX tablet (e.g., Eppendorf Safe-Lock, cat. no. 0030120.094 or Sarstedt Safe-Seal, cat. no. 72.695).

Transfer of small quantities of pellet material will not affect the procedure.

6. Add 1 InhibitEX tablet to each sample and vortex immediately and continuously for 1 min or until the tablet is completely suspended. Incubate suspension for 1 min at room temperature to allow inhibitors to adsorb to the InhibitEX matrix.
7. Centrifuge sample at full speed for 3 min to pellet inhibitors bound to InhibitEX.
8. Pipet all the supernatant into a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and discard the pellet. Centrifuge the sample at full speed for 3 min.

Transfer of small quantities of pellet material from step 7 will not affect the procedure.

9. Pipet 15 µl Proteinase K into a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).
10. Pipet 200 µl supernatant from step 8 into the 1.5 ml microcentrifuge tube containing Proteinase K.
11. Add 200 µl Buffer AL and vortex for 15 s.

**Note:** Do not add Proteinase K directly to Buffer AL.

It is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to form a homogeneous solution.

12. Incubate at 70°C for 10 min.
  - (Optional: Centrifuge briefly to remove drops from the inside of the tube lid.)
13. Add 200 µl of ethanol (96–100%) to the lysate, and mix by vortexing.
  - (Optional: Centrifuge briefly to remove drops from the inside of the tube lid.)

14. Label the lid of a new QIAamp spin column placed in a 2 ml collection tube. Carefully apply the complete lysate from step 13 to the QIAamp spin column without moistening the rim. Close the cap and centrifuge at full speed for 1 min. Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate.

Close each spin column in order to avoid aerosol formation during centrifugation. If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation, centrifuge again until the QIAamp spin column is empty.

15. Carefully open the QIAamp spin column and add 500  $\mu$ l Buffer AW1. Centrifuge at full speed for 1 min. Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the filtrate.
16. Carefully open the QIAamp spin column and add 500  $\mu$ l Buffer AW2. Centrifuge at full speed for 3 min. Discard the collection tube containing the filtrate.

**Note:** Residual Buffer AW2 in the eluate may cause problems in downstream applications. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains Buffer AW2, contacting the QIAamp spin column. Removing the QIAamp spin column and collection tube from the rotor may also cause flow-through to come into contact with the QIAamp spin column. In these cases, the optional step below should be performed.

**Optional:** Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube (not provided). Centrifuge at full speed for 1 min. Discard the collection tube containing the filtrate.

17. Transfer the QIAamp spin column into a new, labeled 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and pipet 200  $\mu$ l Buffer AE directly onto the QIAamp membrane. Incubate for 1 min at room temperature, then centrifuge at full speed for 1 min to elute DNA.

**Note:** When using eluates in PCR, for maximum PCR robustness we highly recommend adding BSA to a final concentration of 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l to the PCR mixture. For maximum PCR specificity we recommend using QIAGEN HotStarTaq DNA Polymerase (see ordering information on page 38). For best results in downstream PCR, use the minimum amount of eluate possible in PCR; the volume of eluate used as template should not exceed 10% of the final volume of the PCR mixture. Also, note that high amounts of template DNA may inhibit the PCR.

DNA yield is typically 15–60  $\mu$ g but, depending on the individual stool sample and the way it was stored, may range from 5 to 100  $\mu$ g. DNA concentration is typically 75–300 ng/ $\mu$ l.

For more information about elution and how to determine DNA yield, purity, and length, see page 11.

For long-term storage, keeping the eluate at  $-20^{\circ}\text{C}$  is recommended.



## Liite 4. NanoDropin käyttöohje

### DNA-PITOISUUDEN MITTAAMINEN

DNA-pitoisuus mitataan puhdistetusta PCR-tuotteesta NanoDrop ND-1000-spektrofotometrillä huoneessa 4.25.

Käytä laitteen pesuun ja nollaamiseen mitattavassa näytteessä käytettyä eluointipuskuria.

Käytä spektrofotometrin (optisten) mittauspintojen pyyhkimiseen pehmopaperia (Kimtech Science).

- Laita tietokone päälle.
- Avaa tietokoneen työpöydältä pikakuvake **"NanoDrop"**.
- Valitse **"Nucleic Acid Measurement"**.
- Puhdista pehmopaperilla spektrometrin optiset mittauspinnat ja pipetoi 1,5 µl näytteeseen käytettyä eluointipuskuria mittauspisteeseen (~10 sek.).
- Käännä spektrometrin varsi alas ja valitse **"OK"** (to Initialize the Spectrometer).
- Nosta spektrometrin varsi ylös ja pyyhi mittauspinnat pehmopaperilla.
- Muuta aallonpituus 260 nm.
- Pipetoi 1,5 µl eluointipuskuria mittauspisteeseen ja laske varsi alas. Nollaa laite valitsemalla näytöltä **"Blank"** (~10 sek.).
- Nosta spektrometrin varsi ylös ja pyyhi mittauspinnat pehmopaperilla.
- Pipetoi 1,5 µl näytettä mittauspisteeseen, laske varsi alas ja valitse **"Measure"** (~10 sek.). Näytölle ilmestyy mitattavan näytteen DNA-pitoisuus, jonka yksikkö on ng/µl. Sample ID-kohtaan voi kirjoittaa näytteen tietoja ja tarvittaessa tämän näkymän voi tulostaa paperille valitsemalla **"Print Screen"**.
- Nosta fotometrinen varsi ylös ja pyyhi mittauspinnat pehmopaperilla.
- Mittaa seuraava näyte/näytteet kuten edellä ja viimeisen näytteen jälkeen pyyhi mittauspinnat pehmopaperilla. Aseta spektrometrin varsi alas ja aseta laitteen pehmuste sen mittauspintojen väliin.
- Sulje NanoDrop-ohjelma valitsemalla **"Exit"**.
- Sulje tietokone.

DNA-pitoisuuden mittaamisen jälkeen näyte on valmis sekvensointireaktiota ja –ajoa varten.



## Liite 5. PCR-ohje

33

### 3.2.1. Traditional PCR

Traditional PCR was performed using ~~Fprau~~ <sup>Lacto</sup> primers that had been previously designed and approved by Sokol and co-workers (2009; Table 3). Primers were ordered from ThermoFischer Scientific, and 10  $\mu$ M stock solutions of the primers were made.

**Table 3: ~~Fprau~~ primers used for both conventional PCR and qPCR. Mismatches are highlighted.**

Primer name	Sequence
Fprau 07	5'-CCA TGA ATT GCC TTC AAA ACT GTT-3'
Fprau 02	5'-GAG CCT CAG CGT CAG TTG GT-3'

For traditional PCR, AmpliTaq Gold™ DNA polymerase enzyme (Applied Biosystems, CA, USA) and 10x PCR buffer containing 15 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems®, CA, USA) were used. As deoxyribonucleotide triphosphates, a 1 mM stock solution made from the 10 mM dNTP mix (Promega Biotech AB) was used.

The recipe for one PCR reaction is represented in Table 4. The reaction mixture had a final concentration of 0.2  $\mu$ M of each primer, 100  $\mu$ M of dNTPs and 1.5 U of the polymerase enzyme. All the fecal DNA samples were diluted 1:10 before pipetting.

**Table 4: Reaction mixture for one PCR reaction**


Reagent	Volume ( $\mu$ l)
10x Buffer containing 15 mM MgCl <sub>2</sub>	5.0
<del>Fprau 07</del> primer (10 $\mu$ M) <sup>Lacto 07</sup>	1.0
<del>Fprau 02</del> primer (10 $\mu$ M) <sup>Lacto 05</sup>	1.0
dNTP mix (1 mM)	5.0
AmpliTaq Gold™ polymerase enzyme	0.3
Aqua	36.7
<b>Total</b>	<b>49</b>
DNA template	1.0

The PCR program with "Vertti" (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) consisted of pre-incubation at 95°C for 10 minutes, 40 cycles of 95°C for 30 seconds, 60°C for 1 min and 72°C for 30 seconds and then a final extension at 72°C for eight minutes. The expected PCR product size was 140 bp.

The PCR products were checked with Agarose Gel Electrophoresis (AGE) to confirm that a single, correct-size band was obtained. 1.5 % GellyPhor gels including 4  $\mu$ l Midori Green Advance DNA stain (Biotop Oy, Finland) per 120 ml gel were used. 8  $\mu$ l of PCR product was mixed with 2  $\mu$ l of Crystal 5x DNA loading buffer blue (Bioline), and from this

## Liite 6. Toimeksiantosopimus

Microsoft Word - Opinnäytetyön ohjaussopimus\_250107.doc - Opin... https://messi.turkuamk.fi/opiskelu/Dokumenttikirjasto/Opinnäytetyö\_...


**OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS**
1

**TURUN AMMATTIKORKEAKOULU**  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

---

**OPISKELIJAN TIEDOT** Opiskelija 1

Nimi Heidi Kunnasranta →

Osoite Keulakatu 2 B 9 20540 TURKU

Puhelin koti 040-8250762 Puhelin työ -

Sähköposti heidi.kunnasranta@students.turkuamk.fi

Koulutusohjelma bioanalytiikan ko

**OPINNÄYTETYÖ**

Aihe/ työnimi 

DNA-eristysmenetelmän kehittämisen vauvojen ulostensa Heille (seksuaalisen väkivallan tutkimus -raportti)

Aikataulu Toukokuu 2013 dokumentointi

**TOIMEKSIANTAJA**

Organisaatio Turun Yliopisto, Käsi- ja jalkaterveys, mieleno., Diabetestieteen laitos

Työn ohjaaja / yhteyshenkilö Eveliina Munukka, Erkki Eerola

Osoite Kiikasmyllynkat. 17, 20520 Turku

Puhelin 02-3337261 Sähköposti laevmu@utu.fi

**OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT**

Ohjaava opettaja Seija Kirkko-Jaakkola

Puhelin \_\_\_\_\_ Sähköposti seija.kirkko-jaakkola@turkuamk.fi

---

**Turun ammattikorkeakoulu**  
Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku  
puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791  
sposti etunimi.sukunimi@turkuamk.fi

1 / 2 2.4.2013 9:48

Opiskelija 2.

Nimi: Meri Lehto

Osoite: Tuureporinkatu 17 A 19 20100 Turku

Puhelin: 050 5377486

Sähköposti: meri.lehto@students.turkuamk.fi

Koulutusohjelma: bioanalytiikan ko





TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

## OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

2

### OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT\*

#### OHJAUS JA VASTUUT

Vastuu opinnäytetyön tekemisestä ja tuloksista on opiskelijalla. Turun ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjauksesta. Toimeksiantaja sitoutuu antamaan opiskelijan käyttöön kaikki opinnäytetyön tekemisessä tarvittavat tiedot ja aineistot sekä ohjaamaan opinnäytetyötä toimeksiantajaorganisaation näkökulmasta.

#### OIKEUDET

Opinnäytetyön tekijänoikeus kuuluu tekijälle eli opiskelijalle. Tekijänoikeuden lisäksi myös muiden immateriaalioikeuksien osalta noudatetaan kulloinkin voimassa olevaa kyseessä olevaa oikeutta koskevaa lainsäädäntöä.

#### TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

Mahdollisesta työsuhteesta, työstä maksettavasta palkki-osta ja työstä mahdollisesti aiheutuvien kustannusten korvaamisesta toimeksiantaja ja opinnäytetyön tekijä sopivat erikseen.

#### TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Kirjallinen raportti luovutetaan toimeksiantajalle ja asetetaan kirjaston kokoonlin tai julkaistaan elektronisessa muodossa verkkokirjastossa.

Julkaistava opinnäytetyöraportti on laadittava niin, ettei se sisällä liike- tai ammattisalaisuuksia tai muita julkisuuslaissa (laki viranomaisten toiminnan julkisuudesta) salassa pidettäväksi määrättyjä tietoja, vaan ne jätetään työn tausta-aineistoon. Opinnäytetyön arvioinnissa otetaan huomioon sekä julkaistava että salassa pidettävä osa.

Opinnäytetyön toimeksiantaja ja opiskelija sitoutuvat pitämään salassa kaikki opinnäytetyön tekemisessä ja sitä edeltävissä tai sen jälkeisissä neuvotteluissa esiin tulevat luottamukselliset tiedot ja asiakirjat.

Toimeksiantajan edustajalle varataan mahdollisuus tutustua opinnäytetyöraporttiin viimeistään neljätoista (14) päivää ennen alottua julkaisemista. Toimeksiantaja antaa työstä ennen edellä mainittua julkaisemisajankohtaa lausunnon, jossa voidaan määritellä opinnäytetyöraporttiin mahdollisesti sisältyvät liike- tai ammattisalaisuudet, joita ei julkaista.

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

### OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETTYLLÄ TAVALLA

8/4 20 13

Heidi Kunnasranta Meri Lehto  
Opiskelija

8/4 20 13

[Signature]  
Toimeksiantaja

### LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA\*

\* lähetetty sähköpostilla

\* Turun ammattikorkeakoulun toiminnan yhtiöittämistä vuoden 2014 alusta valmistellaan. Osakeyhtiön toiminnan alettua tämä sopimus siirtyy Turun AMK:n toiminnan vastaanottavalle yhtiölle.

Turun ammattikorkeakoulu  
Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku  
puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791  
posti etunimi.sukunimi@turkuamk.fi