

Matti Hölttä

# DNA-eristysmenetelmän kehitys papaijalle ja pellavansiemenelle, ja papaijan PCR- menetelmän validoinnin aloitus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

11.11.2015

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Matti Hölttä DNA-eristysmenetelmän kehitys papajalle ja pellavansiemenelle, ja papaijan PCR-menetelmän validoinnin aloitus 37 sivua + 1 liite
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Biotieteet
Ohjaaja(t)	FT Katri Juuti Jaostopäällikkö Anu Kallinen Laboratorioanalyttikko Heli Lappeteläinen Laborantti Anneli Forssen
<p>Tässä opinnäytetyössä tutkittiin eri DNA-eristysmenetelmien toimivuutta papajalle (<i>Carica papaya</i>) ja pellavansiemenelle (<i>Linum usitatissimum</i>). Menetelminä olivat Tullilaboratoriolla normaalissa käytössä olevat Biotecon Foodproof Preparation Kit III ja kaksi eri CTAB-menetelmää, joita muokattiin edelleen tarpeen mukaan. Näytteitä esikäsiteltiin monella tavalla, jotta selvisi, mikä tapa olisi tietyille matriisille paras. Kaikki eristetty DNA analysoitiin reaaliaikaisella PCR-laitteella (qPCR), jossa näytteen CT-arvoa verrattiin tarkkailunäytteisiin. Tämän lisäksi työssä aloitettiin papaijan PCR-menetelmän validointiprosessia selvittämällä sen spesifisyyttä ja herkkyyttä. Työ tehtiin Tullilaboratorion Elintarviketutkimukset II -jaostolle.</p> <p>Kaupallisella Biotecon-kitillä ei voitu eristää papajasta DNA:ta, joka ei sisältänyt ilmeisiä polymeerasireaktioita inhiboivia aineita. Edes hyvän puhtausarvon antaneet näytteet eivät monistuneet hyvin. Käyttäen muokattua versiota Adam Healeyn suunnittelemasta CTAB-menetelmästä siemenettömästä ruokapapajasta ja raakapapajasta saatiin eristettyä kohtalaisella saannolla hyvin puhdasta DNA:ta, joka monistui hyvin qPCR:ssä. Pellavansiemenistä ei onnistuttu millään menetelmällä eristämään monistuskelpoista DNA:ta. Saannot siitä olivat joka menetelmällä korkeita, mutta puhtausarvot olivat erittäin huonoja ja monistus huonoa. CTAB-menetelmät eivät eristäneet hyväksyttävän laatuista DNA:ta soijapaputarkkailunäytteistä, joten menetelmät vaativat vielä säätöä.</p> <p>Papaijan PCR-menetelmä todettiin spesifiseksi 18 muun kasvin ja kahden eläimen DNA:ta vastaan. Herkkyyttä kokeiltiin viidellä eri kymmenkertaisella kopiomäärätasolla kuudella toistolla. 10 000-, 1 000- ja 100- kopioiset kaivot monistuivat noin 3,33 syklin välillä toisistaan oletetusti. 10-kopioiset kaivot monistuivat 2,7 sykliä 100-kopioisten jälkeen. 1 kopioiset kaivot eivät monistuneet ollenkaan. Papaijan PCR-menetelmän toteamisrajaksi todettiin 10 kopiota.</p>	
Avainsanat	DNA:n eristys, Papaija, Pellavansiemen, reaaliaikainen PCR

Author(s) Title Number of Pages Date	Matti Hölttä Development of a DNA-extraction method for papaya and flaxseed and early work on papaya PCR method validation. 37 pages + 1 appendices 11 November 2015
Degree	Bachelor of Laboratory sciences
Degree Programme	Laboratory sciences
Specialisation option	Biosciences
Instructor(s)	Katri Juuti, PhD Anu Kallinen, Head of Section Laboratory analyst, Heli Lappeteläinen Laboratorician, Anneli Forssen
<p>In this thesis, the effect of different DNA-extraction methods was studied on the yield and purity of DNA from papaya (<i>Carica papaya</i>) and flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>). The methods used were a commercial Biotecon Foodproof preparation Kit III and two different CTAB-based methods on which modifications were made as necessary. The samples were pretreated in multiple ways to see if one might prove superior to the other. All extracted DNA was analyzed using real-time PCR (qPCR) and their crossing thresholds were compared to standardized samples used by the Finnish Customs Laboratory. Early work on the validation process of the PCR method for papaya was also conducted by measuring the specificity and sensitivity of the method. This thesis was done for the GMO department of the Finnish Customs laboratory.</p> <p>The Biotecon commercial kit proved unable to extract DNA from papaya that did not contain apparent PCR-inhibiting components. Even samples with a good A260/A280 ratio did not seem to properly multiply in PCR and had a poor CT-value. Seedless ripe papaya and unripe papayas yielded very pure DNA in moderate quantities that worked in qPCR using a modified version of the CTAB-method devised by Adam Healey in 2014. Flaxseed yielded extremely high amounts of DNA with all methods, but was generally impure and did not multiply very well in PCR. At no point did either CTAB-method yield acceptable results with a soybean-standard sample and require further adjustments.</p> <p>The PCR-method for papaya was tested against 18 different plant DNA-samples and two animal samples (human and tuna) and was found to be specific. Its sensitivity was tested using six replicates of five different levels of tenfold dilutions. From 10 000 copies to 100, a replication cycle difference of ~3,33 was observed between tenfold dilutions. Wells with 10 copies crossed the threshold of ~2,7 cycles earlier and wells with just 1 copy did not multiply at all; therefore the limit of detection for this method was determined to be 10 copies.</p>	
Keywords	DNA extraction, Papaya, Flaxseed, Real-time PCR

# Sisällys

## Lyhenteet

1Johdanto.....	1
2Teoria.....	2
2.1GMO-elintarvikkeet.....	2
2.1.1Papaija.....	3
2.1.2Pellava.....	4
2.2DNA:n eristys.....	5
2.2.1Esikäsittely.....	6
2.2.2Kaupalliset DNA-eristyskitit.....	7
2.2.3CTAB.....	7
2.3Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR.....	8
2.3.1Periaate.....	8
2.3.2Detektio ja kvantitointi.....	8
3Työn suoritus.....	11
3.1Näytteet ja niiden esikäsittely.....	11
3.1.1Tuorepapaija.....	12
3.1.2Hedelmäsekoitus sokeriliemessä.....	13
3.1.3Kuivattu papaija.....	13
3.1.4Hedelmäsekoitus mehussa.....	14
3.1.5Ruokapapaija.....	15
3.1.6Pellavansiemen.....	16
3.2DNA:n eristys.....	17
3.2.1Bioteccon.....	17
3.2.2CTAB-vertaus.....	17
3.2.3CTAB-eristykset.....	19
3.3PCR-ajot.....	19
3.4Papaijan tunnistusmenetelmän validointi.....	20
4Tulokset ja tulosten tarkastelu.....	20
4.1Bioteccon papaijasta ja pellavasta.....	21
4.1.1Papaija.....	21

4.1.2Pellava.....	23
4.2CTAB-vertaus.....	25
4.2.1CTAB-CEN.....	25
4.2.2CTAB-NGS.....	28
4.3CTAB-NGS papajasta ja pellavasta.....	29
4.3.1Papaijat.....	29
4.3.2Pellavansiemenet.....	31
4.4Papaijan tunnistusmenetelmän validointi.....	33
4.4.1Spesifisyys.....	33
4.4.2Herkkyyys.....	34
5Johtopäätökset.....	34

Liite 1. NanoDrop-mittausten raakadata

## Lyhenteet

PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymeraasiketjureaktio. DNA:n analysointimenetelmä.
CTAB	Heksadekyylitrimetyyliammoniumbromidi, triviaalinimeltään setrimoniumbromidi. Yleinen aine DNA:n eristysmenetelmissä.
GMO	Geneettisesti Muokattu Organismi. Eliö, jonka perimä on muokattu geenitekniikalla.

## 1 Johdanto

Tullilaboratorion elintarviketutkimukset II -jaosto tutkii maahantulleista elintarvikkeista geneettisesti muunneltua DNA:ta. Monista näytteistä etenkin riisiä, maissia ja soijaa sisältävistä näytteistä tarkastetaan mahdolliset muunnokset. Euroopan unionissa joitakin kasveja saa muunnella tietyillä tavoilla, ja esimerkiksi jotain geneettisesti muokattuja maissilajikkeita saa viljellä tietyissä EU:n maissa. Jos jokin elintarvike sisältää yli 0,9 % muokattua lajiketta, sen pitää olla merkattu GMO-tuotteena (Geneettisesti Muokattu Organismi). Lainsäädännön mukaan elintarvikkeissa saa olla EU:n hyväksymiä GM-lajikkeita, ja ne tulee merkitä pakkaukseen. Näitä voi olla myös tahattomina kontaminaatioina (<0,9 %), jolloin pakkausmerkintää ei tarvita. EU:ssa hyväksymättömiä GM-lajikkeita ei sallita, joten niitä sisältävät elintarvikkeet vedetään pois markkinoilta.

Tullilaboratorion GMO-analytiikassa on normaalissa rutiinikäytössä tällä hetkellä yksi kaupallinen DNA:n eristysmenetelmä, joka on tyypillisesti toimiva miltei kaikille analysoiduille näytematriiseille. Jotkin tuotteet, kuten pellavansiemen ja papaija eivät ole toimineet ihanteellisesti tällä menetelmällä, joten Tullilaboratoriota kiinnostaa kokeilla erilaisia keinoja, joilla matriiseista eristyisi analyysikelpoista DNA:ta. Polymeraasiketjureaktioissa käytössä oleva papaijan PCR-menetelmä ei ole validoitu.

Tässä työssä tutkittiin eri muodoissa olevan papaijan ja pellavan eri esikäsittelytapojen ja DNA-eristys-menetelmän vaikutusta eristetyn DNA:n saantoon ja puhtauteen sekä eristysten monistuvuutta qPCR-laitteella. Menetelminä on rutiinikäytössä oleva Biotecon kaupallinen kitti ja kaksi eri CTAB-menetelmää. Tarkoituksena olisi löytää CTAB-menetelmä, joka olisi turvallinen, tehokas ja nopea. Työn aikana aloitetaan myös papaijan PCR-menetelmän validointiprosessi selvittämällä sen spesifisyyttä muita kasveja ja eliöitä vastaan, ja herkkyyttä seuraamalla eri pitoisuuksien monistumista reaaliaikaisella PCR-laitteella. Validoinnin loput vaiheet, kuten spesifisyyden ja herkkyyden toistot jäävät opinnäytetyön laajuuden ulkopuolelle.

## 2 Teoria

### 2.1 GMO-elintarvikkeet

GMO:t ovat organismeja, joiden perimäainesta on muutettu geenitekniikalla laboratoriossa. Ne voivat olla mitä tahansa eliöitä tai kasveja, joiden perimää pystytään käsittelemään. Geenimuuntelutapoja ja -kohteita on monenlaisia. Kohde-eliöstä riippuen yleensä bakteerissa (kuten yleisesti käytetty *Escherichia coli*) monistettu geeni siirretään eliöön tavalla tai toisella. Monet eliöt vaativat muokatun geenin sisältävän plasmidin injektioimista suoraan solun tumaan, ja sen liittämistä kromosomistoon entsyymeillä. Jotkin bakteerit taas omaavat kyvyn siirtää DNA:ta suoraan toisille eliöille, etenkin kasveille [1].

Geenimuunneltuja organismeja tehdessä kasvinjalostuksessa alkuperäiseen eliöön yritetään tyypillisesti liittää jokin geeni, joka parantaa sen kasvuolosuhteita. Nämä kehitetyt piirteet voivat vaihdella joko home- tai tuhoeläinresistenssistä kylmänsietokykyyn tai vain nopeampaan ja tuottoisampaan satoon. Geenimuunnoksia tehdään myös silloin, kun kohde-eliön ravintoarvoja pyritään parantamaan. Toisinaan jostain eliöstä halutaan poistaa jokin tietty piirre, jolloin piirteen aiheuttava geeni tai geenit joko poistetaan tai vaimennetaan. Tällaisia eliöitä kutsutaan tyypillisesti KO-organismeiksi (Knockout Organism).

Vaikka ihmiset ovat muokanneet monia eliöitä jo vuosituhansien ajan perinteisillä jalostusmenetelmillä, geenimuunneltuja eliöitä tarkkaillaan ja säännellään erikseen juuri muokkausmenetelmien ja ulkopuolisen eliön DNA:n kohteeseen liittämisen takia. Tyypillinen aihepiiri GMO-tutkimuksissa on mahdollisten sivuvaikutusten seuraus. Tieteellisiä piirejä kiinnostaa tyypillisesti varsinkin estää tapaukset, joissa muokattu organismi aiheuttaa allergisen reaktion joillain ihmisillä esimerkiksi uuden proteiinin tuoton takia. Muokattuja organismeja ei myös tyypillisesti haluta päästää kasvamaan villinä luontoon. Näistä syistä monet maat ja yhdistykset ovat asettaneet muokatuille eliöille erittäin tiukat säännökset, ja niiden esiintymistä seurataan eri maissa.



### 2.1.1 Papaija

Papaija, *Carica papaya*, on Etelä-Amerikasta peräisin oleva lyhytikäinen kukkiva hedelmäpuu, jota nykyään kasvatetaan ympäri maailmaa trooppisilla ja subtrooppisilla alueilla. Se on laajasti jalostettu kasvi, ja siitä on olemassa lukuisia lajikkeita. Sen hedelmät ovat lajikkeesta riippuen tyypillisesti ulkomuodoltaan hieman päärynää muistuttavia ja kelta- tai vihreäkuorisia (kuva 1) ja sisältävät runsaasti A- ja C-vitamiineja. Ruokakäyttöön kasvatetut papaijat ovat melkein aina kaksineuvoisia, mikä tekee sadosta hyvin yhdenmukaista. Kypsynyt papaija sisältää useita pieniä mustia siemeniä, joita ympäröi keltainen tai oranssi melonimainen hedelmäliha. Papaijahedelmän siemeniä käytetään harvoin ruoanlaitossa. Papaijaa käytetään myös kypsymättömänä vihanneksena esimerkiksi salaateissa. Näitä papaijoita kutsutaan yleensä vihreiksi papaijoiksi. Kypsymättömien papaijoiden maitiaisnesteestä voidaan myös eristää papaiinia eli papaijaproteiinaasi I:tä, jota myydään lihan mureuttajana. [2.]



Kuva 1. Kypsynyt papaijahedelmä. Kuori on pehmeä ja väriltään epätasaisen keltavihreä.

Papaijasatoja on pitkään tuhonnut Papaija Ringspot Virus P (PRV-p), jota on todettu Afrikkaa lukuun ottamatta kaikissa maissa, joissa papaijaa kasvatetaan. Virus aiheuttaa

hedelmän kuoressa kehämäistä, mosaiikkimaista kuviota, ja puun nuutumista. Puun heikentyminen johtaa huonoon satoon ja lopulta sen tuhoutumiseen. Joidenkin virusisolaattien on todettu aiheuttavan puissa myös nekroosia eli solukuolemaa. PRV-p on RNA-peräinen potyvirusiin kuuluva, noin 800 nm pitkä sauvamainen virus, joka leviää pääosin hedelmäkirvojen välityksellä puusta toiseen. Se ei ole pelkästään papaijaspesifinen, vaan voi tartuttaa myös monia kurkkukasveja. Virustartunnan estämisen pääkeinot ovat satojen tarkkailu ja huonolaatuisten kasvien nopea poisto (eng. Roguing). [3, 4.]

Havaijissa kehitettiin 1990-luvulla kaksi transgeenistä papaijalajiketta, joihin liitettiin viruksen kapsidia koodaava geeni. Ne ilmestyivät markkinoille vuonna 1998, ja ovat olleet tehokkaita estämään tartunnan ainakin Havaiji-peräisiltä PRV-p-kannoilta. Ne eivät kumminkaan ole yhtä resistenttejä muista maista tulleita virus-kantoja vastaan. Toinen näistä lajikkeista, SunUp, oli ensimmäinen transgeeninen ruokakasvi, jonka genomi sekvensoitiin [5]. Transgeenisten papaijalajikkeiden tuonti ja kasvatusta on kielletty Euroopan Unionissa [6].

### 2.1.2 Pellava

Pellava, *Linum usitatissimum*, on yksi vanhimmista tunnetuista viljellyistä kasveista. Sen tiedetään olleen ihmisten käytössä jo 8 000 vuotta ennen ajanlaskun alkua, ja sen luullaan polveutuvan talvipellavasta (*Linum bienne*). Elintarvikkeena pellavasta hyödynnetään sen siemenet, joita on tuhansia vuosia käytetty pellavaöljyn valmistuksessa. Pellavaöljyä käytetään sen helpon kuivuvuuden takia ruoanlaiton lisäksi myös monissa pinnankäsittelyissä, kuten maalien sideaineena. Pellavansiemeniä käytetään myös leivonnassa ja lisätään joihinkin ruokiin jauhettuna. Muista kasvin osista on mahdollista valmistaa pellavakuitua, mutta puuvilla on päämääräisesti korvannut sen tekstiiliteollisuudessa [7, 8]. Pellavan siemeniä esiintyy lajikkeesta riippuen joko ruskeina (kuva 2) tai keltaisina.



Kuva 2. Ruskea pellavansiemen. Siemenet ovat litteitä, mutta muuten jyvänmuotoisia ja kovia.

Geneettisesti muokattua pellavaa on valmistettu monissa muodoissa. Siitä on tehty muunnoksia, joilla pyritään nopeampaan ja suurempaan kasvuun, tuhoeläinresistenssiin, lämpötilaresistenssiin ja korkeampiin ravintoainesuhteisiin. Yhdysvalloissa geneettisesti muokattua pellavansiementä on markkinoilla, mutta suurin osa muusta maailmasta ei ole hyväksynyt niitä markkinoille. Kanadasta Eurooppaan maahantuodusta pellavansiemenestä havaittiin vuonna 2009 FP967-kontaminaatiota pienissä määrissä. FP967-muunnos ei ole ollut laillinen Kanadassa vuodesta 2001 lähtien, ja kontaminaatio johti suuriin toimenpiteisiin sen poistamiseksi pellavasadoista. Sen tarkoitus on tuoda pellavasatoon homeresistenssiä [9, 10].

## 2.2 DNA:n eristys

Miltei kaikkien DNA-eristysmenetelmien periaate on sama. Näytesolut lyysataan eli hajotetaan tavalla tai toisella, joko mekaanisesti tai kemiallisesti. Mekaanisessa lyysauksessa solumassaa vorteksoidaan puskurissa, johon on lisätty pieniä, noin 0,1-0,15 mm helmiä, jotka tuhoavat soluseinän sysäyksillä, ja samalla jättävät soluorganelit ja itse DNA:n vapaaksi puskuriliuokseen. Kemiallisessa lyysauksessa soluseinä tuhoetaan itse puskuriliuoksella, ja kiinteä massa sentrifugoidaan näyteputken pohjalle, jotta DNA:ta sisältävä supernatantti voidaan ottaa käsittelyyn itsestään.

Lyysaava komponentti voi olla jokin entsyymi, kuten lysotsyymi tai muu yhdiste, joka tavalla tai toisella liuottaa soluseiniä. Vaihetta kutsutaan joissain menetelmissä uuttovaiheeksi. Tästä eteenpäin menetelmästä riippuen käytetään erilaisia tapoja DNA:n puhdistamiseen, saostamiseen ja eluoimiseen, jonka jälkeen eristetystä DNA-näytteestä tehdään tyypillisesti pitoisuuden määrittys.

Nukleiinihapot absorboivat UV-valoa aallonpituudella 260 nm, joten eristetyn näytteen DNA-pitoisuuden mittaamiseen käytetään usein UV-spektrofotometriä, kuten NanoDrop-laitetta. Eristetystä DNA:sta seurataan myös puhtautta, joka selvitetään vertaamalla sen absorbanssia 280 nanometrin aallonpituudella absorbanssiin 260 nanometrin aallonpituudella. Proteiinit absorboivat UV-valoa 280 nanometrin aallonpituudella ja voivat inhiboida PCR-reaktioita. Absorbanssien suhdetta, eli A260/A280-arvoa kutsutaan DNA:n puhtaudeksi. Suhteille ei ole olemassa tieteellisesti varmistettua lukua, joka takaisi puhtauden, mutta tyypillisesti A260/A280 -suhdetta 1,8 pidetään ”puhtaana” DNA:na [11]. Näytteistä seurataan usein myös A230-arvoa, jossa monet polymeerasireaktioita inhiboivat aineet kuten etanoli ja fenoliset aineet absorboivat. Useat menetelmät sisältävät RNAasi A -käsittelyn, koska RNA eristyy näytteestä samalla kuin muutkin nukleiinihapot.

### 2.2.1 Esikäsitteily

DNA-eristyksen onnistumisen kannalta on tärkeää, että näytematriisin partikkelikoko saadaan mahdollisimman pieneksi. Pieni partikkelikoko suurentaa näytteen pinta-alaa ja helpottaa uuttopuskurin imeytymistä näytematriisiin. Esikäsitteilytapa on näytematriisista riippuvainen. Esimerkiksi miltei kaikki papu- kuten soijapapunäytteet jauhaantuvat ongelmitta myllyillä, kuten Retsch Grindomix tai Waring Blender. Monet hedelmät ja muut tahmeat tuotteet vaativat vesilisäystä homogenisoinnissa, jota ilman niistä jää suuria osia homogenisointikannun seinille. Tapausmukaisesti näytettä voi myös homogenisoida esimerkiksi huumareella. Esikäsitteilyssä pyritään myös poistamaan materiaali, joka ei ole peräisin itse tutkittavasta aineesta. Ne voivat olla esimerkiksi joissain tuotteissa käytettyjä mausteita, sokeria tai suolaa. Niiden poisto tehdään yleensä yksinkertaisesti valuttamalla näytematriisia juoksevan veden olla tai liuottamalla niitä vedessä jonkin aikaa. Tarkoitus on päämääräisesti poistaa matriisista mahdollisimman tehokkaasti ylimääräiset, mahdollisesti eristystä haittaavat aineet.

### 2.2.2 Kaupalliset DNA-eristyskitit

DNA-analyysin jatkuva yleistyminen on tuonut markkinoille monenmoisia DNA-eristyskittejä. Niiden tavoitteena on tyypillisesti kehittää menetelmä, jolla asiakas voi nopeasti ja tehokkaasti eristää jostain tietyistä näytematriisista korkeasaantoista ja puhdasta DNA:ta. Kittejä on monia, ja niiden sopivuus eri matriiseille vaihtelee suuresti. Kittien toimintaperiaate vaihtelee myös. Esimerkiksi jotkin kitit ovat periaatteeltaan hyvin samanlaisia kuin normaali CTAB-eristys, ja toiset taas perustuvat DNA:n kromatografisiin ominaisuuksiin ja pesevät sitä silika-kalvoilla.

### 2.2.3 CTAB

Heksadekyylitrimetyyliammoniumbromidi-puskuriin (CTAB) perustuva DNA:n eristysmetodi kehitettiin alun perin moninaisten kasvien lehtien DNA:n eristykseen [12] ja on nykyään laajasti käytettynä monissa muokatuissa muodoissa kasvien DNA:n eristykseen [13, 14]. Sen toiminta perustuu molekyylin kompleksoitumiseen nukleiinihappojen kanssa korkeissa suolapitoisuuksissa. Tämä kompleksi on veteen liukeneva [15] ja liuottaa solujen ja soluorganellien kalvoja lyysaten näytekudoksen. CTAB-puskureissa on myös usein mukana EDTA-lisäys, joka kompleksoituu monien nukleaasientsyymien tarvitseman kofaktorin magnesiumin kanssa [16]. Joissain menetelmissä lisätään näytematriisiin uuttovaiheessa vielä  $\beta$ -merkaptotetanolia, joka inaktivoi entsyymejä hajottamalla niiden osien välisiä disulfididoksia, tuhoten niiden rakenteen [17].

CTAB-menetelmät vaativat supernatantin uuttua kloroformilla. Kloroformi imee CTAB-puskuriin kompleksoituneet denaturoituneet proteiinit ja polysakkaridit valkoiseen välifaasiin DNA:ta sisältävän CTAB-puskurifaasin ja raskaamman kloroformifaasin välille. Tämä uuttovaihe toistetaan monissa menetelmissä, jonka jälkeen ylempi faasi eristetään ja sen DNA saostetaan joko isopropanolilla tai suolaliuoksella ja 95 % etanolilla. Saostus sentrifugoidaan ja pelletti pestään vielä 70 % etanolilla ja kuivataan ennen sen liuotusta eluenttiin. Joissain menetelmissä hyödynnetään uuttovaiheessa vielä CTAB-puskuriin lisättyä polyvinyylipyrrolidonia (PVP), jonka tarkoitus on puhdistaa näytteestä pois fenolisia yhdisteitä. Fenoliset yhdisteet ovat yleisiä kasveissa ja inhiboivat PCR-reaktioita estämällä DNA-polymeraasin toiminnan samoin kuin pesussa käytetty etanoli [18, 19]. Etanoli ja fenoliset yhdisteet aiheuttavat absorbanssikäyrässä piikin 210-240 nm:n alueella [20, 21].

## 2.3 Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR

Reaaliaikainen PCR (kutsutaan myös qPCR, eli kvantitatiivinen PCR) on muunnos tyypillisestä polymeerasiketjureaktiosta (engl. Polymerase Chain Reaction). Sen avulla on mahdollista seurata DNA:n monistumista, kun se tapahtuu. Tekniikkaa kuvasivat alun perin W. Rychlik, W. J. Spencer, ja R. E. Rhoads vuonna 1990 [22]. Tämän jälkeen tekniikka on yleistynyt ja on käytössä esimerkiksi Tullilaboratoriossa GMO-elintarvikkeiden detektoimisessa. Ensimmäiset qPCR-menetelmille tarkoitetut PCR-laitteet tulivat markkinoille 1990-luvun puolivälissä.

### 2.3.1 Periaate

Kuten tyypillinen PCR, qPCR:n toiminta perustuu analysoitavan DNA:n monistamiseen eri vaiheisiin jaetuilla lämpötilanvaihdosreaktioilla. Aluksi DNA denaturoidaan korkeassa lämpötilassa, yleensä noin 95 °C:ssä. Lämpötilaa lasketaan 45–72 °C alueelle, jossa mastermixin primerit eli alukkeet tarttuvat spesifisesti monistusalueen 5'-päihin. Tätä vaihetta kutsutaan kiinnittymisvaiheeksi (engl. annealing). DNA-polymeraasi aktivoidaan ekstensio- eli pidentymisvaiheessa nostamalla lämpötilaa. Aktiivinen polymeerasientsyymi aloittaa denaturoidun templaatin vastinjuosteen rakentamisen käyttäen mastermixin vapaita emäksiä. Joissain PCR-ajo-ohjelmissa kiinnittymis- ja ekstensiovaiheet on yhdistetty. Eroavaisuus normaaliin PCR:ään tulee esille joka syklin lopussa. Jokaisessa qPCR-laitteessa on eksitaatiolähde; joko LED-valo, laaseri tai esimerkiksi fluoresoiva lamppu. Sen lisäksi niissä on myös fluoresenssia mittaava detektori. Nämä kaksi erikoisuutta mahdollistavat DNA:n reaaliaikaisen analyysin.

### 2.3.2 Detektio ja kvantitointi

DNA:n määrän detektio qPCR-menetelmissä perustuu niiden fluoresointiin. Vaikka DNA fluoresoi luonnollisesti UV-valon vaikutuksesta [23], fluoresenssi ei ole tarpeeksi vahvaa qPCR-tekniikkaan. Tämän takia reaktion mastermix, joka normaalisti sisältää alukkeet ja DNA-polymeraasin tarvitsee myös aineen, joka fluoresoi mitattavasti reaktioiden aikana. Näitä aineita on monia, mutta yleisimmät ovat SYBR Green -leimausaine ja erilaiset koettimet.

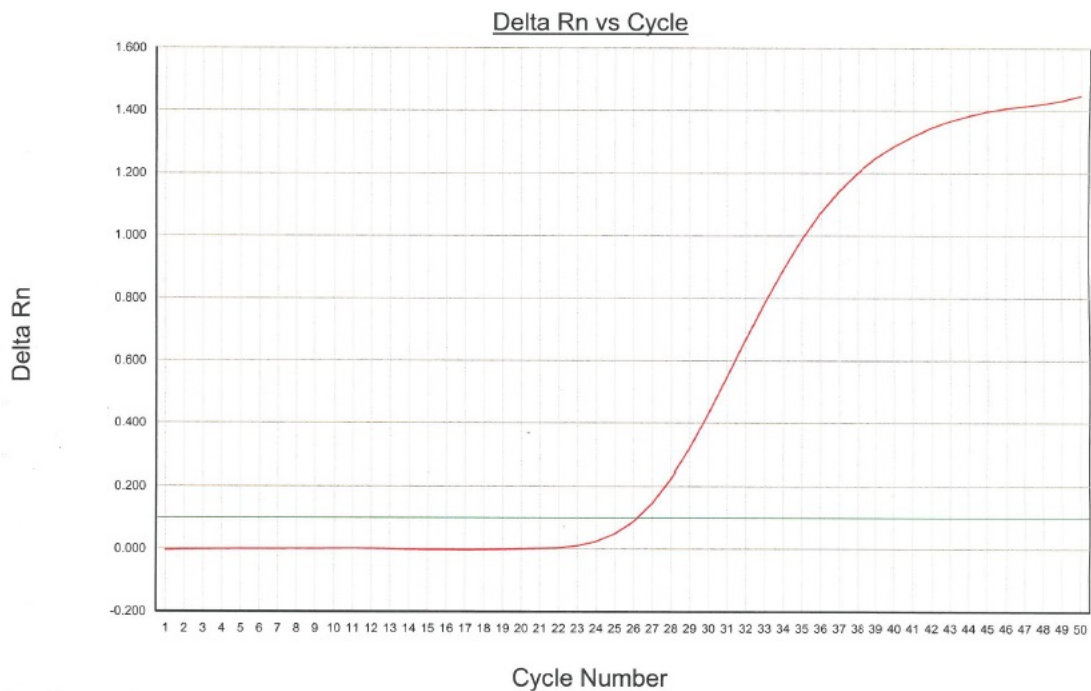
SYBR Green on 1990-luvun alkupuolella markkinoille tullut väriaine joka yleistyi nopeasti monissa nukleiinihappoja koskevissa analyyseissa, kuten qPCR:ssä. Se valmistettiin alun perin korvaamaan polymeraasireaktioiden analyysissa käytetyn myrkyllisen etidiumbromidin. Se on epäsymmetrinen syaniinimolekyylä, joka tarttuu vapaaseen kaksijuosteiseen DNA:han. Muodostunut DNA-SYBR Green kompleksi absorboi valoa sinisen alueella (497 nm) ja fluoresoi sitä vihreällä (520 nm). SYBR Green alkaa fluoresoida valoa heti DNA:han liittyttyään, ja syklin fluoresenssi mitataan ekstensiovaiheen päätyttyä. Tämän värileiman käytössä on epäspesifisyyden riski, koska se tarttuu templaatti-DNA:n lisäksi myös kaikkiin reaktioissa oleviin ei-tutkittuihin DNA-juosteisiin, alukedimeereihin ja muihin mahdollisiin sekundäärisiin tuotteisiin. SYBR Greenin lisäksi on olemassa myös monia muita yksittäisiä värileimamolekyylejä, kuten EvaGreen ja BOXTO, joiden toimimisperiaate on pääosin sama.

Toinen tapa mitata monistuneen DNA:n fluoresenssia on käyttää hybridisaatiokoettimia. Ne ovat alukkeiden tapaan spesifisiä templaatti-DNA:lle, ja ovat tyypillisesti 9-10 bp pitkiä oligonukleotideja. Jokaisessa reaktiossa on kaksi koetinta. Ensimmäiseen on liitetty 3'-päähän fluoreseiinimolekyylä, ja toiseen 5'-päähän jokin värileima, kuten LC Red 640. Oligonukleotidit asettuvat kiinnittymisvaiheessa toistensa lähetyville, enintään 5 bp:n päähän toisistaan. PCR-laitteen valolähde virittää fluoreseiinimolekyylin, joka alkaa emittoida vihreätä valoa. Vihreä valo puolestaan virittää värileiman hyödyntäen niin sanottua FRET-ilmiötä (Fluorescence Resonance Energy Transfer), jossa ensimmäisen virittyneen molekyylin energia siirtyy toiselle fluoresenssin välityksellä. Värileiman pitemmän aallonpituuden fluoresenssia käytetään fluoresenssin mittauksessa.

Myös hydrolyysikoettimet ovat yleisessä käytössä qPCR-menetelmissä. Ne ovat lyhyitä (yleensä 10–20 bp) geenispesifisiä DNA-juosteita eli oligonukleotideja, joihin on liitetty fluoresoiva "reportteri"-leima (esimerkiksi FAM, tetraklorofluoreseiini) ja fluoresenssia vaimentava aine. Reportterileima on tyypillisesti koettimen 5'-päässä ja vaimentaja taas 3'-päässä. Koetin tarttuu templaatti-DNA:han alukkeiden tapaan kiinnittymisvaiheessa. Kun Taq-polymeraasientsyymi monistaa templaattia, sen eksonukleaasinen toiminta purkaa koettimen ja täten erottaa reportterin ja vaimentajan toisistaan. Kaikki polymeraasientsyymit eivät välttämättä kykene tuhoamaan koettimia kunnolla, joten hydrolyysientsyymimenetelmissä on tyypillisesti käytössä jokin tietty akkreditoitu entsyymi, kuten Taq. Vapaa reportteri fluoresoi mitattavasti, aiheuttaen DNA-kopioiden määrään perustuvan fluoresenssin kasvun. Hydrolyysikoettimet ovat erittäin spesifisiä,

koska koetin voi tarttua vain templaatti-DNA:han ja sen fluoresenssin ilmentyminen riippuu alukkeiden toimivuudesta. Tässä työssä käytetään TaqMan-koettimia, jotka ovat yleisiä hydrolyysikoettimia. Reportteraineena on FAM ja vaimentajana on TAMRA (tetrametyylirodamiini). FAM/TAMRA -yhdistelmä on yleinen qPCR:ssä. FAM virittyy aallonpituudella 494 nm ja emittoi valoa aallonpituudella 518 nm. TAMRA-vaimentaja on myös fluoresoiva aine, mutta FAMin kanssa FRET-ilmiön takia reportterin fluoresenssi ei ilmene ennen koettimen purkamista.

Jokaisen syklin aikana monistetun DNA:n määrä kaksinkertaistuu. DNA:n kvantitoimiseen käytetään tämän takia niin sanottua Cycle threshold -arvoa (Ct-arvo). Tämä on kohta, jossa näytteen fluoresenssi ylittää mittauksen pohjalinjan ja merkkää fluoresenssin eksponentiaalisen nousun vaihetta (kuva 3).



Kuva 3. Esimerkki Ct-arvosta. Tämä käyrä lähtee monistumaan eksponentiaalisesti syklin 26 kohdalla, joten sen Ct-arvo on 26.



### 3 Työn suoritus

Näytematriisit esikäsiteltiin eri tavoin. Niistä tehtiin eristykset Biotecon-menetelmällä ja CTAB-menetelmällä. CTAB-menetelmiä arvioitiin soijatarkkailunäytteillä. Papaijan PCR-menetelmän validointiprosessi aloitettiin.

#### 3.1 Näytteet ja niiden esikäsittely

Tavoite kaikissa esikäsittelyissä oli ensisijaisesti saada näytteiden partikkelikoko mahdollisimman pieneksi. Tämä nostaa tehtyjen homogenaattien pinta-alaa ja täten parantaa uuttopuskurin vaikutusta. Jokaisesta näytteestä kokeiltiin myös erilaisia esikäsittelykeinoja, joilla pyrittiin vähentämään esimerkiksi sokerin määrää homogenaateissa.

Näytteinä työssä oli viisi erilaista papaijaa sisältävää matriisia ja yksi pellavansiemeninäyte. Jokaisesta tavasta tehtiin 2 punnitusta, jotka nimettiin aakkosjärjestyksessä. Tällä systeemillä A- ja B-näyte ovat samalla tavalla tehtyjä esikäsittelyjä, ja C- ja D- ovat toisella. Näytteet tulivat seuraavissa muodoissa:

- tuorepapaija, eli täysin kypsä oranssilihainen hedelmä lajiketta Sunrise Solo
- papaijaa sisältävä sokerilieminen hedelmäsekoitus, jossa myös ananasta, guavaa ja mangoa
- pussi kuivattuja ja sokeroituja kelta- ja punalihaisia papaijanpaloja
- papaijaa sisältävä ananasmehussa oleva hedelmäsekoitus, jossa myös ananasta ja guavaa
- ruokapapaija, eli raakana poimittu vihreä vihannesmainen papaija
- pussi ruskeita pellavansiemeniä
- soijapaputarkkailunäytettä, josta käytettiin tunnuksia Soija-TA ja STA

### 3.1.1 Tuorepapaija

Papaija kuorittiin ja viipaloitiin. Hedelmää homogenisoitiin Waring Blender -kannussa pienen vesilisäyksen kanssa sekä siemenien kanssa että ilman. Näistä homogenaateista otettiin eristystä varten kaksi punnitusta kumpaakin menetelmää varten. Siemenet itse eivät ole GMO-seulonnan kohde, koska niitä ei tyypillisesti syödä ja ne saattavat ristipölytyksen takia sisältää muokattua DNA:ta ja antaa virhepositiivisen tuloksen [24]. Siemeniä sisältävät homogenaatit tehtiin pääosin saantovertausta varten. Homogenaatit olivat koostumukseltaan hyvin vetistä tahnaa. Siemenellinen näyte oli väriltään vihertävä ja siemenetön oranssi.

Homogenaateista kokeiltiin myös poistaa nestettä sentrifugoimalla niistä vettä pois. Supernatantit, joiden pinnalle oli muodostunut pitkulainen kerros massaa (kuva 4) poistettiin ja jäljelle jääneet massat punnittiin eristystä varten. Supernatantin ja massan välissä oli lievästi läpikuultava geelimäinen kerros, jota ei poistettu.



Kuva 4. Sentrifugoitu siemenellinen tuorepapaijanäyte. Sentrifugaatin pinnalla on ohut kerros kellertävää massaa, jota pidettiin todennäköisesti hedelmälihan jäänteinä. Sitä ei otettu mukaan lopulliseen homogenaattiin

### 3.1.2 Hedelmäsekoitus sokeriliemessä

Näytteestä siivilöitiin sokeriliemi pois ja hedelmät eroteltiin steriileillä pinseteillä. Puolet erotellusta papaijasta liotettiin milli-Q-vedessä kaksi tuntia, jotta loput sokeriliemestä poistuisi hedelmistä. Kummatkin erät homogenisoitiin Waring Blenderillä. Papaijanpalojen katsottiin olevan niin vetisiä, että vesilisäystä ei tehty. Näyte homogenisoitui pääosin hyvin muutamaa isompaa palaa lukuun ottamatta, joten homogenaatteja käsiteltiin vielä jonkin aikaa huhmareella. Homogenaatit punnittiin putkiin eristystä varten. Nämä näytteet myös sentrifugoitiin samoin kuin tuorepapaijassa. Näihin ei muodostunut samanlaista kelluvaa massaa tai geelimäistä pintaa kuten siinä, vaan kiinteä massa oli läpikuultaan tasainen.

### 3.1.3 Kuivattu papaija

Näytteitä liotettiin runsaassa milli-Q -vedessä 24 tuntia, jotta sokerit liukenisivat pois paloista. Vesi oli yön aikana muuttunut kellertäväksi (kuva 5), ja se siivilöitiin pois. Liotetuista paloista tehtiin Waring Blenderillä homogenaatit suoraan ja vesilisäyksen kanssa. Suoraan homogenisoitu osuus jäi suuripartikkeliseksi ja vaati lisäkäsittelyä huhmareella. Vesilisäyksellä tehty suspensio oli koostumukseltaan hyvin samannäköinen kuin tuorepapaijasta tehty vesisuspensio.



Kuva 5. Vuorokauden liotettu kuivattu papaija ja suora homogenaatti. Palat olivat turvonneet ja sokeri oli nähtävästi liennut pois niiden pinnalta. Homogenisointi ilman vesilisäystä tuotti epämääräisen

eikä erityisen pienipartikkelisen mössön, jota vielä käsiteltiin huumareella.

Kuten tuorepapaijasta ja sokeriliemisestä hedelmäsekoituksesta, näistä homogenaateista tehtiin myös sentrifugointi. Sentrifugoitu suora homogenaatti sisälsi vähän supernatanttia, mutta ei muuten mitään erityisiä piirteitä. Vesihomogenaatista tehty sentrifugointi taas lähti helposti sekoittumaan takaisin supernatanttiin.

#### 3.1.4 Hedelmäsekoitus mehussa

Neste siivilöitiin pois ja hedelmät eroteltiin steriileillä pinseteillä. Erotellut papaijanpalat ositettiin kahteen, ja niistä tehtiin homogenaatit suoraan ja vesisuspensiona. Mehua otettiin talteen erikseen pH-mittausta varten, koska sekoituksen ainesosalistalla oli sitruunahappo. Alhaiset pH-arvot nostavat DNA:n depurinaation vauhtia [25] ja voi täten tehdä monistettavan DNA:n eristyksistä vaikeata tai jopa mahdotonta. Kummatkin homogenaateista olivat miltei nestemäisiä. Vesisuspensiona tehty näyte (kuva 6) oli hyvin pirtelömainen ulkomuodoltaan, kun taas suora homogenaatti oli vetistä mössöä.

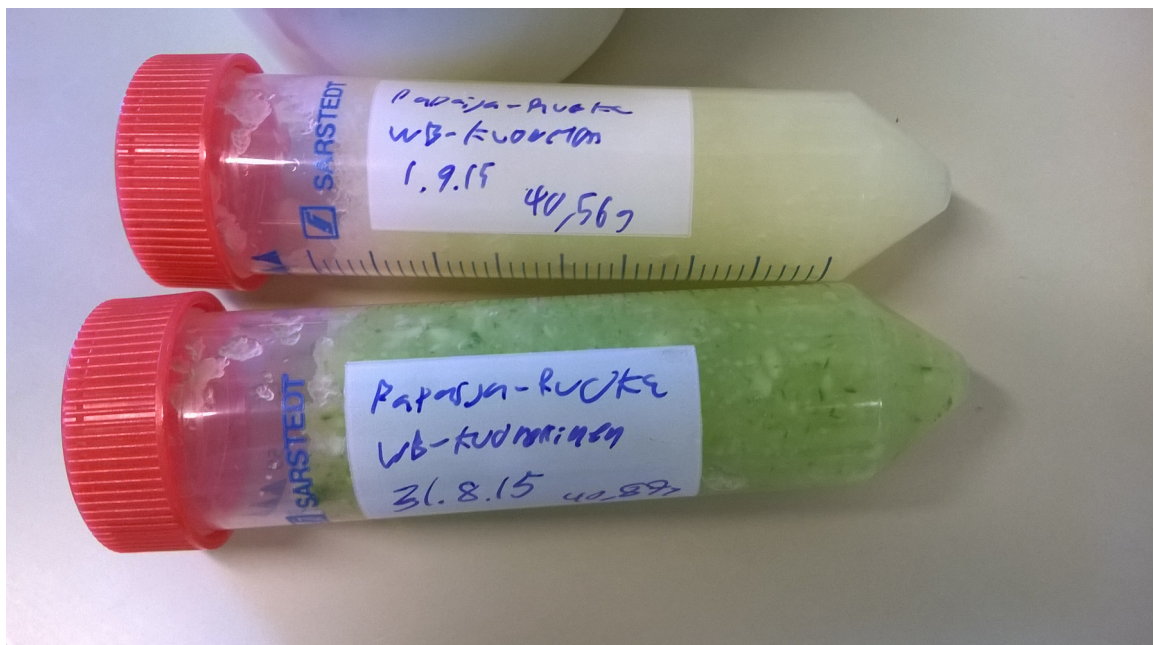


Kuva 6. Homogenaatit mehussa olleesta hedelmäsekoituksesta. Vesisuspensio on vasemmalla ja suora homogenaatti oikealla. Suora homogenaatti oli jäänyt vesisuspensionäytettä oranssimmaksi. Sitä on vähemmän, koska siitä oli tässä vaiheessa jo punnittu osuus sentrifugointia varten.

Näytteiden punnitusten jälkeen ne sentrifugoitiin. Näytteiden visuaaliset erot katosivat käsittelyssä, jossa ne olivat muuttuneet tasaiseksi tahmaiseksi tahnaksi, josta supernatantti poistettiin vaivattomasti.

### 3.1.5 Ruokapapaija

Tämä raakana poimittu papaija on eri lajiketta kuin tuorepapaija, ja on tarkoitettu pääosin salaatin ainesosaksi. Toisin kuin kypsyneessä papaijassa, tässä ei ilmentynyt ollenkaan mustia siemeniä. Papaija jaettiin osiin ja siemenet poistettiin. Osa papaijasta kuorittiin, ja siitä tehtiin Warring Blenderillä homogenaatit veden kanssa sekä kuorineen että ilman. Kuorineen homogenisoitu papaija jäi partikkelikooltaan selvästi kuoretonta suuremmaksi. Punnitusten jälkeen homogenaatteja otettiin sentrifugoitavaksi (kuva 7).



Kuva 7. Ruokapapaijahomogenaatteja valmiina sentrifugointiin. Kuorellisen homogenaatin isompi partikkelikoko ja satunnaiset kuorenkappalet ovat helposti nähtävissä.

Sentrifugoidusta kuoretomasta näytteestä oli helppo poistaa supernatantti, kun taas kuorellinen imi nestettä takaisin itseensä nopeasti. Vielä ylimääräisen sentrifugoinnin jälkeen nesteenpoisto vaati nesteen puristamista pois spaattelilla.

Ruokapapaijasta tehtiin myös näyte-eriä käyttäen normaalisti kuivatuotteille, kuten pähkinöille tarkoitettua Grindomix-kannua. Erinä oli kuoreton ja kuorellinen ruokapapaija sekä tuoreena että esipakastettuna. Grindomix lämmittää jauhattavaa

tuotetta helposti, ja pakastamisella yritettiin hidastaa matriisin muuttumista nestemäiseksi. Näytteet menivät pakastettuna ja suoraan nähtävästi yhtä pieneksi. Homogenaatit olivat pienipartikkelisia ja helposti punnittavia (kuva 8). Kuorellisiin näytteisiin jäi kummassakin tapauksessa vielä pienehköjä kuorenpalasia.



Kuva 8. Grindomix-kannulla homogenisoidut ruokapapajjat. Oikealla on suoraan homogenisoitu kuorellinen näyte ja vasemmalla pakastettu kuoreton näyte. Kuorelliseen jäi myös tässä esikäsitellyssä isompia erillisiä kuorenpalasia.

### 3.1.6 Pellavansiemen

Pellavansiementä jauhatettiin aluksi WB-kannulla. Jauhatustulos oli epätasainen koostumukseltaan. Joukossa oli silloin tällöin miltei vielä kokonaisia siemeniä. Jauhatus oli ilmavaa, ja sen tilavuus oli paljon kannuun laitettua siemenmäärää suurempi. Pellavansiemenestä tehtiin vielä toinen näyte-erä käyttämällä Grindomix-kannua, jolla näytteestä tuli selvästi hienopartikkelisempi. Tässäkin oli huomattavissa isompia siemenenpaloja, mutta paljon vähemmän kuin WB-kannulla tehdyssä erässä. Jauhatukset olivat väriltään vaaleanruskeita ja koostumukseltaan leivänmurumaista.

## 3.2 DNA:n eristys

Kaikki näytteet eristettiin ensimmäiseksi käyttäen Tullilaboratoriolla rutiinikäytössä olevaa kaupallista Bioteccon Foodproof® Sample Preparation Kit III:a. Eristykset ajettiin qPCR-laitteella, jonka jälkeen CTAB-menetelmän muunnoksien arviointi aloitettiin Soija-Tarkkailulla ennen papaija- ja pellavanäytteiden eristystä sillä. Kaikista eristyksistä mitattiin DNA:n pitoisuus käyttäen NanoDrop-laitetta.

### 3.2.1 Bioteccon

Kaikki näytteet eristettiin aluksi Bioteccon-kaupallisen kitin mukaan. Näytteet uutettiin sellaiseen uuttopuskuritulavuuteen, jossa niiden olomuoto oli enemmän vetinen kuin kiinteä. Uuttovaiheessa näytteisiin lisättiin myös sadasosa uuttopuskurin tilavuudesta RNAasi A:ta ja  $\alpha$ -amylaasia. Tätä lukuun ottamatta kitin alkuperäisohjeita noudatettiin täysin. Pellavansiemennäytteissä uuttopuskureihin lisättiin myös 2,5 ml heksaania, jolla yritettiin vähentää näytematriisin korkean rasvapitoisuuden vaikutusta tuloksiin. Heksaani ja syntynyt rasvakerros poistettiin ennen uuttovaiheen inkubointia.

### 3.2.2 CTAB-vertaus

Ennen papaijoiden DNA-eristystä CTAB-menetelmillä sen toimivuutta kokeiltiin aluksi soijatarkkailunäytteillä. Menetelmä itse on muokattu sellerin DNA-eristystä varten tehdystä ohjeesta ja sitä kutsuttiin nimellä CTAB-CEN. Kaksi grammaa soija-tarkkailunäytettä uutettiin sentrifugiputkessa kymmenellä millilitralla CTAB-uuttopuskuria ja ravisteltiin 65 °C lämpöhauteessa puoli tuntia. Putkiin lisättiin vielä 60  $\mu$ l RNAasi A:ta ja  $\alpha$ -amylaasi, ja uuttota jatkettiin vielä tunnin ajan. Putket sentrifugoitiin 30 minuuttia ja supernatantti eroteltiin.

700  $\mu$ l supernatanttia pipetoitiin putkeen, joissa oli valmiiksi 500  $\mu$ l kloroformia. Putket vorteksoitiin ja sentrifugoitiin 15 minuuttia. DNA:n saostus tehtiin 1,5 ml eppendorf-putkessa, jossa oli 100  $\mu$ l 3 M natriumasettaattia ja 500  $\mu$ l isopropanolia. Kloroformiuuton ylempää faasia otettiin siihen saostumaan 500  $\mu$ l välifaasia varoen. Kevyen sekoittamisen jälkeen putken annettiin inkuboitua 5 °C:ssa jääkaapissa puoli tuntia. Putki sentrifugoitiin 15 minuuttia, ja supernatantti poistettiin. Pelletti pestiin 70 % etanolilla ja sentrifugoitiin uudestaan. Supernatantti poistettiin, ja pelletti kuivattiin

vakuumikuivaajassa noin 45 minuutin ajan. Kuivattu pelletti liuotettiin 100 µl:aan Tris-HCl (pH 8.0). Pelletin annettiin liueta eluointiliuokseen yön yli. Menetelmää kokeiltiin toistamiseen käyttäen CTAB-puskuria, jossa oli 2 %:n PVP-lisäys. Tämän lisäksi kloroformiuutto toistettiin. Osasta tällä menetelmällä tehtyjä eristysnäytteitä kokeiltiin vielä lisäpuhdistus Biotecon-kitin silikafilttereillä. Kumpaankin sarjaan otettiin neljä näytettä. Toisessa sarjassa kaksi niistä tehtiin PVP-lisäyspuskurilla. Bioteconin lisäyspuhdistukseen otettiin kummastakin sarjasta kaksi näytettä. Toinen puhdistettu toisen sarjan näyte oli PVP-lisäysnäyte ja toinen normaalisti tehty.

Soijatarkkailunäytteitä kokeiltiin myös toisella CTAB-menetelmällä [26]. Tämä menetelmä on tarkoitettu eristämään korkealaatuista DNA:ta Next Generation Sekvensointia varten vaikeista matriiseista, kuten kahvipuun lehdistä nopeasti ja on optimoitu sitä kehittäneessä laboratoriossa eristämään hyvällä saannolla puhdasta DNA:ta, jossa genomien kokonaisrakenne on vielä mahdollisimman ehjä. Menetelmää kutsuttiin nimellä CTAB-NGS. Menetelmä vaatii β-merkaptopetanolia, joka on erittäin myrkyllistä. Sitä kokeiltiin aluksi aivan alkuperäisten ohjeiden mukaan, jonka jälkeen sitä lähdettiin muokkaamaan Tullilaboratorion käyttöön sopivaksi. Ensimmäinen muokkaus oli β-merkaptopetanolin korvaus samalla tilavuudella proteinaasi K:ta. Proteinaasi K:n lisäysvaihetta muutettiin myöhemmin RNAasi-käsittelyn jälkeiseksi inkubaatioksi ja käytettyä tilavuutta säädettiin.

Soijatarkkailunäytteeseen lisättiin kymmenen millilitraa esilämmitettyä (65 °C) CTAB-uuttopuskuria ja 30 µl β-merkaptopetanolia. Putken annettiin olla 65 °C:ssa lämpöravistelussa 30 minuuttia. Näytettä sentrifugoitiin 30 minuuttia, ja supernatantti siirrettiin uuteen putkeen. Supernatanttiin lisättiin yksi tilavuus kloroformia ja sitä vorteksoitiin 30 sekuntia. Putkea sentrifugoitiin 10 minuuttia ja ylempi supernatantti siirrettiin taas uuteen putkeen väli-faasia varoen. Siihen lisättiin 5 µl RNAasi A:ta ja inkuboitiin 15 minuuttia 37 °C:ssa välillä sekoitellen. Kloroformiuutto toistettiin, ja ylempi faasi otettiin jälleen uuteen putkeen. Putkeen lisättiin aluksi puoli tilavuutta 5 M NaCl-liuosta ja sekoitettiin. Nesteet pyöritettiin putken pohjalle, ja siihen lisättiin vielä 3 tilavuutta kylmää 95-prosenttista etanolia. Sekoitus tehtiin uudestaan ja putkea inkuboitiin -20 °C puoli tuntia. Inkuboitunut putki sentrifugoitiin 10 minuuttia, supernatantti poistettiin ja muodostunut pelletti pestiin kahteen kertaan 70 % etanolilla, sentrifugoiden sitä pesujen välissä 5 minuutin ajan. Etanoli poistettiin varovasti ja pelletti annettiin kuivua ilman vaikutuksesta 15 minuuttia. Kuivattu pelletti eluotettiin 100 µl Tris-HCl:ään. Pelletti annettiin liueta yön yli.



$\beta$ -merkptoetanololi jätettiin seuraavissa eristyksissä pois. Se korvattiin RNAasi A-käsittelyn jälkeisellä puolen tunnin inkubaatiolla 65 °C:ssa, jossa näyte oli proteinaasi K:n (5  $\mu$ l) vaikutuksen alaisena. Proteinaasi K:n määrää nostettiin sarjojen edetessä ja oli lopulta 80  $\mu$ l; sama määrä kuin Bioteccon-menetelmässä.

### 3.2.3 CTAB-eristykset

Proteinaasi K käsittelyn sisältävä muokkaus CTAB-NGS-menetelmästä otettiin käyttöön näytteiden eristämistä varten. Sillä eristettiin DNA:ta kummastakin ruokapapaijanäyte-erästä, tuorepapaijasta, kuivapapaijasta ja pellavansiemenestä. Hedelmäsekoitusnäytteitä ei eristetty tällä menetelmällä. Eristyksissä keskityttiin näytteisiin, joista pitäisi eristyä DNA:ta normaalisti, kuten prosessoimaton hedelmä ja ongelmallisin Bioteccon-näyte eli kuivattu papaija. Kuten Bioteccon-eristyksissä, pellavansiemeninäytteiden uuttopuskureihin lisättiin 2,5 ml heksaania. Heksaani ja rasvakerros poistettiin ennen uuttovaiheen inkubointia.

### 3.3 PCR-ajot

Kaikki eristetyt näytteet, joiden saannoksi tuli 20 ng/ $\mu$ l tai enemmän, analysoitiin ABI7300/7500 qPCR -laitteella. Jos näytteen DNA-pitoisuus ylitti raja-arvon, se laimennettiin ultrapuhtaalla vedellä 20 ng/ $\mu$ l tasolle. Näytteet mitattiin lajispesifisellä koettimella (PAP papaijalle, SAD pellavalle ja LEKT soijalle) ja yleisellä kasvi-DNA-koettimella, ACT. Tällä monitoroitiin virhemittauksia. Ajot tehtiin monissa sarjoissa 96-kaivoisella PCR-levyllä. Ajotilavuus oli 25  $\mu$ l, josta 5  $\mu$ l oli laimennettua näytettä ja 20  $\mu$ l mastermixia, jonka komponentit ja sekvenssit otettiin toisesta työstä (27). Joka eristyksestä tehtiin yksi toisto. Kaikissa ajoissa käytetty ajo-ohjelma esitetään taulukossa 1.

Taulukko 1. PCR-ajo-ohjelma. DNA denaturoidaan 95 °C:ssä nopeasti. Kiinnitys- ja ekstensiovaiheet on yhdistetty yhdeksi minuutin 60 °C vaiheeksi. Syklejä on 50.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Kesto (min)	Toistot
Alkulämmitys	50	2:00	1
Alkudenaturaatio	95	10:00	1
Denaturaatio	95	0:15	50
Kiinnittymis- ja ekstensiovaihe	60	1:00	

### 3.4 Papaijan tunnistusmenetelmän validointi

Papaijan tunnistukseen käytetty PCR-menetelmä ei ole akkreditoitu, joten sen validointiprosessi aloitettiin työn osana. Siitä tehtiin spesifisyyden ja herkkyuden mittaukset qPCR:llä. Opinnäytetyön ulkopuolelle jäi ajojen toisto toisen henkilön tekemänä ja positiivikontrollin CT-arvon lopullinen määrittäminen.

Spesifisyystestissä kahden eristetyn papaijanäytteen (siemenetön tuorepapaija ja Grindomix-jauhattu ruokapapaija) monistumista papaijalle spesifisillä koettimilla (PAP) verrattiin kahteenkymmeneen ”non-target” -näytteeseen. Vain papaijat saivat antaa fluorensessisignaalin PAP-koettimella. Kaikista tehtiin myös ajo kasvin DNA:lle spesifisillä koettimilla (ACT), jotta reaktioiden toimivuudesta voidaan olla varmoja.

Herkkyydestä papaijasta tehtiin kuusi sarjaa, joista kaikista oli yhteensä kuusi toistoa. Ensimmäinen sarja on vain 20 ng/μl pitoisuudelle laimennettu papaijanäyte. Sen jälkeen sarjat ovat kymmenenkertaisia laimennoksia, joissa on papaijan DNA:n kopioita 10 000, 1 000, 100, 10 ja 1 kappaletta. Pienin monistunut pitoisuus on koettimen toteamisraja, ja suurempien pitoisuuksien välillä odotetaan olevan noin 3,32 sykliä, jonka aikana DNA:n pitoisuuden pitäisi kymmenenkertaistua.

## 4 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Eristysten onnistumista tarkkailtiin NanoDrop-laitteella mitaten sen saantoa ja puhtautta. Monistumisen onnistumista seurattiin vertaamalla saatuja Ct-arvoja aiemmin määritettyihin raja-arvoihin. Selite PCR:llä analysoiduista papaija- ja pellavanäytteiden nimistä on taulukossa 2. Muita eristyskokeita ei analysoitu qPCR-laitteella syystä tai toisesta.

Taulukko 2. Näytteiden nimet

Näyte	Selite
Tuorepapaija A, B	Siemeniä sisältävä vesisuspensio
Tuorepapaija C, D	Siemenetön vesisuspensio
Tuorepapaija E, F	Vedenpoisto sentrifuugilla näytteistä A ja B
Tuorepapaija G, H	Vedenpoisto sentrifuugilla näytteistä C ja D
Sokeriliemi C, D	Suora homogenaatti vedessä liotetuista näytteistä
Sokeriliemi E, F	Vedenpoisto sentrifuugilla suoraan homogenisoiduista näytteistä

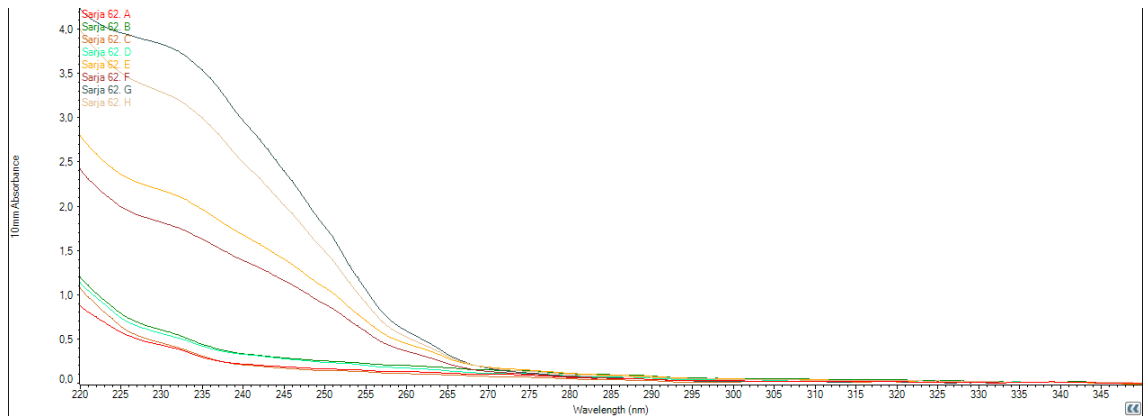
<b>Sokeriliemi G, H</b>	Vedenpoisto sentrifuugilla näytteistä C ja D
<b>Mehu E, F</b>	Vedenpoisto sentrifuugilla suoraan homogenisoiduista näytteistä
<b>Mehu G, H</b>	Vedenpoisto sentrifuugilla vesisuspensionäytteistä
<b>Ruokapapajia-WB A, B</b>	Kuorelliset Waring blender vesisuspensiot
<b>Ruokapapajia-WB C, D</b>	Kuorettomat Waring blender vesisuspensiot
<b>Ruokapapajia-WB E, F</b>	Vedenpoisto sentrifuugilla kuorellisista näytteistä, Waring blender
<b>Ruokapapajia-WB G, H</b>	Vedenpoisto sentrifuugilla kuorettomista näytteistä, Waring blender
<b>Ruokapapajia-Grindo A, B</b>	Kuorellinen homogenaatti, Grindomix
<b>Ruokapapajia-Grindo C, D</b>	Kuoreton homogenaatti, Grindomix
<b>Ruokapapajia-Grindo E, F</b>	Kuorellinen esipakastettu homogenaatti, Grindomix
<b>Ruokapapajia-Grindo G, H</b>	Kuoreton esipakastettu homogenaatti, Grindomix
<b>Pellava-WB</b>	Waring Blender jauhatus
<b>Pellava-WB heksaani</b>	Rasvanpoisto heksaanilla WB jauhatuksesta
<b>Pellava-Grindo</b>	Grindomix Jauhatus
<b>Pellava-Grindo heksaani</b>	Rasvanpoisto heksaanilla Grindomix jauhatuksesta

#### 4.1 Biotecon papajasta ja pellavasta

Yksikään eristetyistä näytteistä ei tuottanut kaupallisella kitillä DNA:ta, joka monistuisi hyvin PCR:ssä. Absorbanssikäyrät olivat sekavia ja puhtaudet omituisia. Monen näytteen saanto oli liian vähäinen PCR:ää varten. Raakadata näytteistä mitatuista DNA-pitoisuuksista ja niiden puhtauksista on esitetty liitteessä 1.

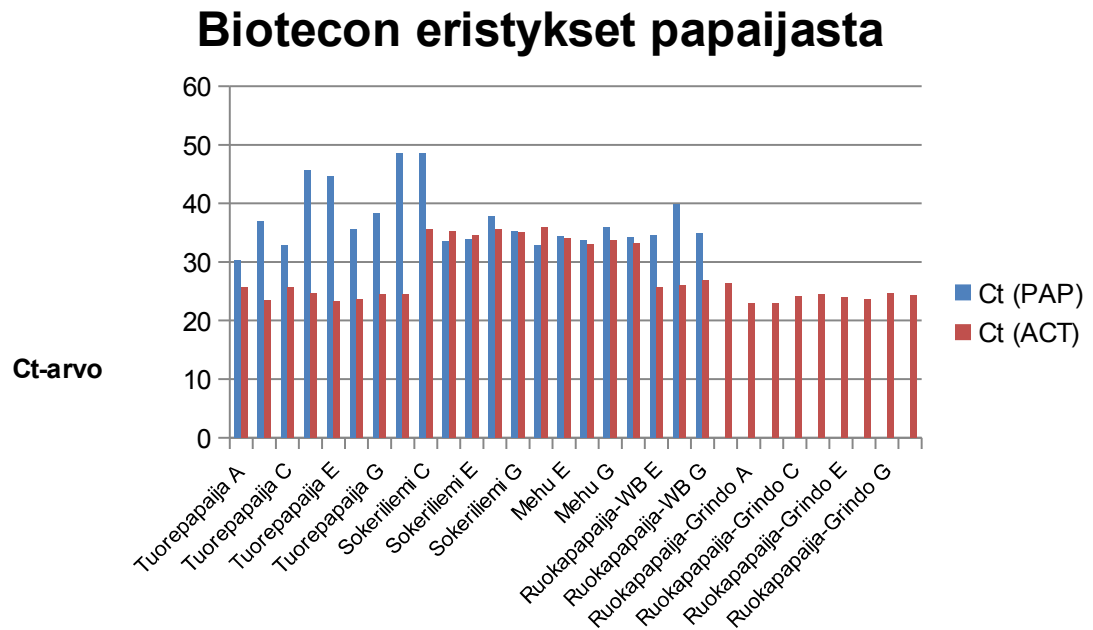
##### 4.1.1 Papajia

Bioteconilla eristetyt papajianäytteet antoivat päämääräisesti kohtalaisia tai huonoja saantoja. Niiden puhtaus vaihteli paljon, mutta jotkin näytteet, kuten mehussa ja sokeriliemessä olleet papajiat antoivat kummallisen korkeita puhtausarvoja. Kaikissa absorbanssikäyrissä oli yhtenäinen trendi, jossa käyrä tyypillisesti absorboi kovasti 220 nm:n aallonpituudella ja laskee hiljalleen hyvin alhaiselle tasolle. Esimerkkinä tästä on mehussa ollut papajia (kuva 9). Joistain näytesarjoista löytyi tiettyjä yhtäläisyyksiä. Siemenelliset tuorepapajianäytteet antoivat paljon paremman puhtausarvon kuin siemenettömät. Ruokapapajioissa taas kuorelliset näytteet antoivat aina alhaisemman, mutta silti korkean, puhtauden kuin kuorettomat. Niiden saanto oli toisaalta hieman korkeampi.



Kuva 9. Mehussa olleen papaijan eristyksen absorbanssikäyrä.

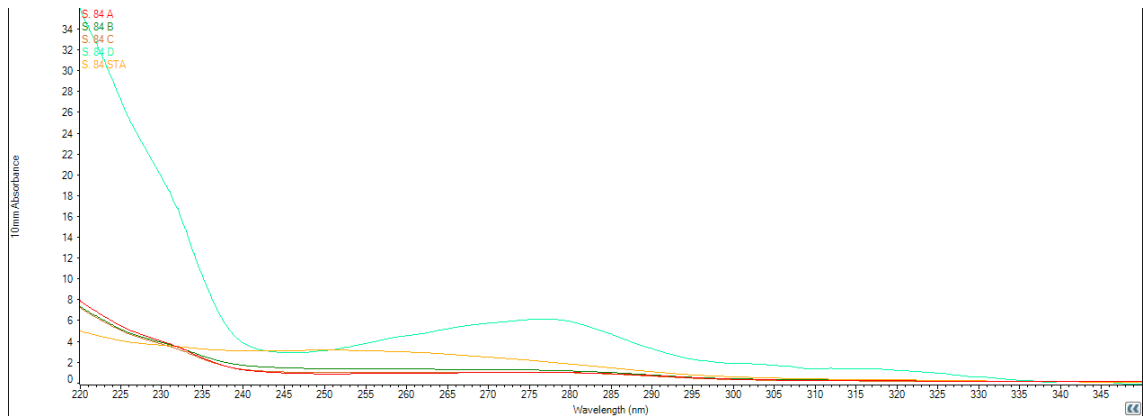
Suurin osa näistä eristyksistä ei tuottanut tarpeeksi DNA:ta PCR-ajoon. Poikkeuksellisesti ajoon otettiin mukaan myös näytteitä, jotka eivät ylittäneet 20 ng/μl rajaa. Kuivattujen papaijoiden eristykset jätettiin pois ajosta, koska niistä ei eristynyt yhtään DNA:ta. Jokainen näyte monistui papaijalle spesifisessä reaktiossa (PAP) hyvin myöhään. Sokeriliemessä olleet papaijat eivät antaneet PCR:ssä signaalia ollenkaan. PCR-kontrollina käytetyn papaija-tarkkailun oletetaan normaalisti saavan Ct-arvon syklien 24,17 ja 28,52 välillä. Kaikki näytteet monistuivat kasvin DNA:lle spesifisessä reaktiossa (ACT), ja tyypillisesti monta sykliä aikaisemmin kuin papaijalle spesifisessä reaktiossa (PAP) (kuva 10). Tämä voi osoittaa, että papaijantunnistus-PCR-menetelmä on herkempi lialle DNA-näytteessä kuin kasvin DNA:n tunnistusmenetelmä. Mehu- ja sokerilieminäytteissä osasyynä voivat hyvinkin olla alkuperäistuotteessa olleet muut hedelmät.



Kuva 10. Bioteconilla eristettyjen papaijoiden Ct-arvot

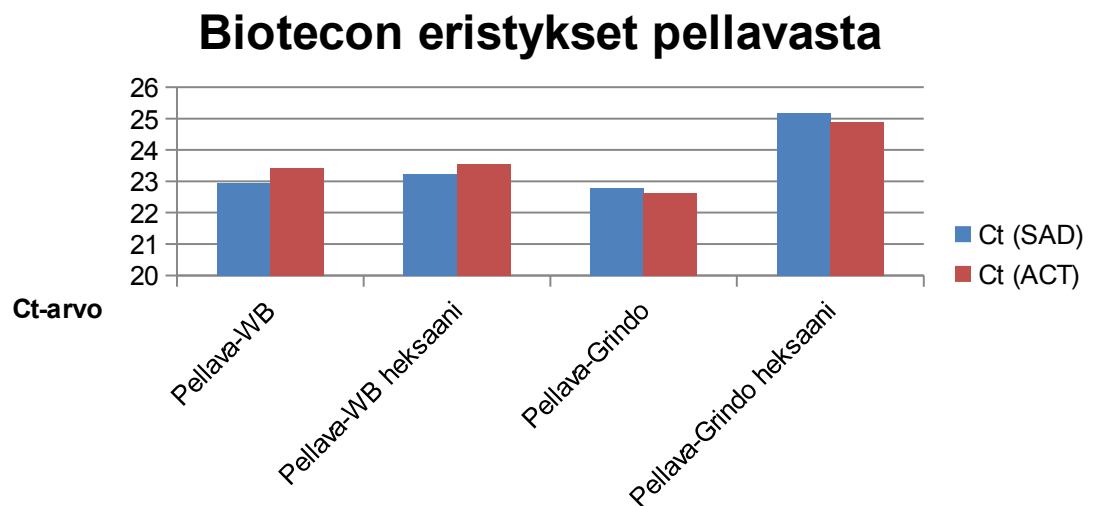
#### 4.1.2 Pellava

Pellavan käsittely menetelmällä osoittautui jo aluksi hankalaksi. Rasvanpoisto heksaanilla tuotti näyteputkeen selvän rasvakerroksen uuttopuskurin yläpuolelle, mutta se ei ollut helposti pipetoitavissa. Rasvakerroksen poisto vei mukanaan huomattavan osan uuttopuskuria. Käsittelystä huolimatta saostusputkien pohjalla oli jokaisessa näytteessä muodostunut paksu läpinäkyvä geelimäinen kerros. Heksaanikäsitellyn Grindomix-jauhatuksen silikafilterille meni pieni määrä tätä geeliä, ja sen vaikutus näkyy näytteen absorbanssikäyrässä. Tätä lukuunottamatta pellavanäytteiden saannot olivat alhaisia, eikä niiden absorbanssikäyrissä esiintynyt selvää eroa esikäsittelymenetelmien välillä (kuva 11). Näytteiden puhtaus A260/A280-suhteella mitattuna oli huono, parhaimmillaan 1,17. Papaijanäytteillä esiintynyt korkea absorbanssi matalilla aallonpituuksilla oli myös huomattavissa pellavansiemennäytteissä.



Kuva 11. Pellavansiemenen absorbanssikäyrät Biotecon-eristyksistä. A ja B olivat Waring Blender -jauhatuksia. C ja D olivat grindomix-jauhatuksia. B ja D oli käsitelty heksaanilla, ja D:n käsittelyssä silikafiltterille oli joutunut saostunutta geeliä.

Huonoista A260/A280 -arvoista huolimatta näytteet monistuivat kohtalaisen hyvin. Niiden Ct-arvo oli geelillä likaantunutta näytettä lukuun ottamatta keskimäärin 3 sykliä Pellava-kontrollia myöhemmin (kuva 12). Ne monistuivat luotettavammin kuin paremman puhtausarvon saaneet papaijanäytteet, joten voi olla, että papaijasta jääneet kontaminaatiot tuolla alueella ovat voimakkaampia polymeerasireaktion inhibiittoreita kuin pellavan vastaavat. Kummatkin koettimet antoivat suunnilleen samoilla sykleillä signaalin.



Kuva 12. PCR-tulokset bioteconilla eristetyistä pellavansiemenenäytteistä

## 4.2 CTAB-vertaus

Soija-TA osoittautui hankalaksi näytteeksi kummallakin CTAB-menetelmällä ja niiden muunnoksilla. Vaikka osalla menetelmistä saavutettiin hyvä A260/A280 -puhtausarvo, eristysten UV-käyrissä esiintyi muuta likaa. Raakadata näytteistä mitatuista DNA-määristä ja niiden puhtauksista on esitetty liitteessä 1. Yksikään soija-TA ei monistunut kasvispesifiselle ACT- tai soijaspesifiselle LEKT-koettimille asetettujen raja-arvojen sisällä.

### 4.2.1 CTAB-CEN

CTAB-CEN-menetelmän uutossa soijatarkkailunäytteiden supernatantti jäi sameaksi Bioteccon-uuttoihin verrattuna (kuva 13), mutta oli siitä huolimatta pipetoitavissa ilman suurempia ongelmia. Putken pohjalle sentrifugoitu kiinteä aines oli helposti irtautuvaa ja meinasi alituisesti ajautua pipetinkärkeen.



Kuva 13. Sentrifugoitu Soija-TA. Kiinteän aineen pintaa oli hankala nähdä supernatantin sameuden takia.

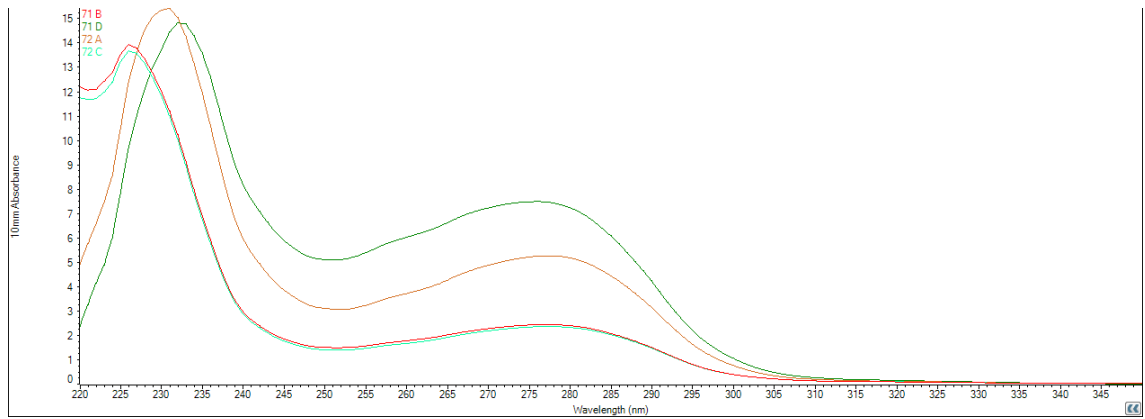
Kloroformiuutossa välifaasi oli erittäin selvä ja helposti irtautuva vaikeuttaen yläfaasin puhdasta eristystä. Saostusvaiheessa näyte muuttui välittömästi sameaksi. Tällä menetelmällä saostetut pelletit olivat erittäin suuria, repaleisia ja kellertäviä. Niiden pesu 70-prosenttisella etanolilla ei parantanut olosuhteita (kuva 14).



Kuva 14. Etanolipesussa oleva soijapavun DNA-pelletti. Tavattoman kokoinen pelletti oli nähtävästi likainen, eikä etanolilla tuntunut olevan siihen suurta vaikutusta.

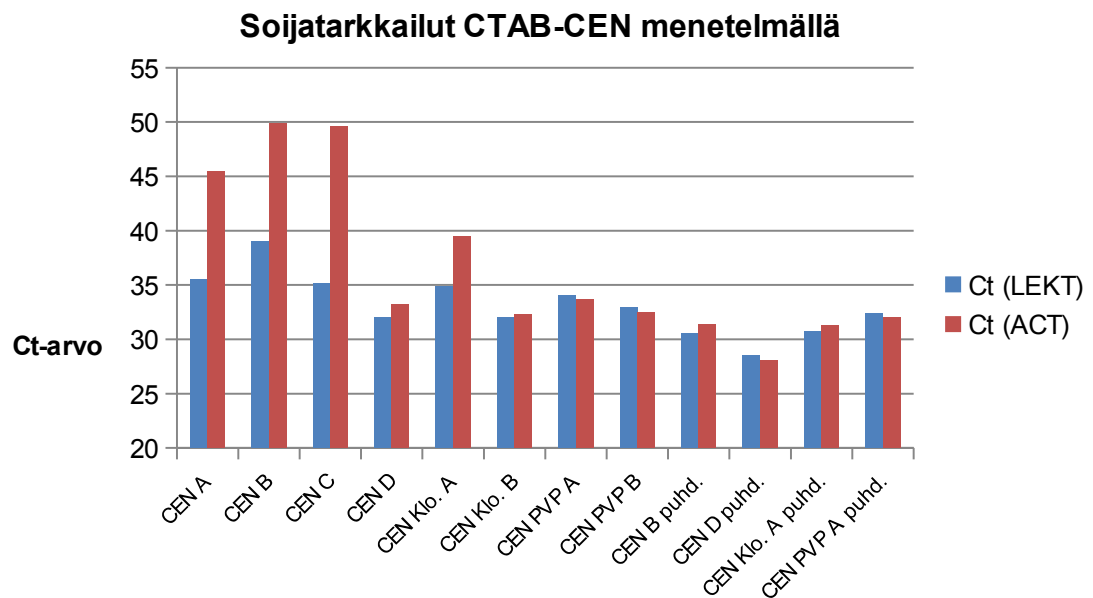
Pelletin kuivaus osoittautui sen koon takia ongelmalliseksi. Pitkänkin vakuumikuivauksen jälkeen siinä huomasi helposti kosteutta. Pelletti ei myöskään liuennut eluointiliuokseen. Eristysmenetelmän suoritus vei kokonaisen työpäivän. Sama ongelma toistui myös PVP-lisäyksessä ja toisessa kloroformipesussa. Kaikki näytteet antoivat erittäin huonot puhtausarvot (0,8-1,1), ja niissä oli alueella 220-240 nm suuri absorbanssiipiikki, joka osoittaa joko etanolin tai fenolisen yhdisteiden läsnäoloa eluentissa. PVP:llä ei näyttänyt olevan vaikutusta tähän. Näytteiden saannot olivat erittäin korkeita ja ylsivät parhaimmillaan jopa 2483 ng/μl tasolle. Bioteconilla tehdyt puhdistukset osasta näytteistä antoivat miltei identtisen absorbanssikäyrän (kuva 15).





Kuva 15. Bioteconilla puhdistetut CTAB-CEN näytteet. 71 B ja D ovat alkuperäisohjeen mukaisia näytteitä. 72 A oli normaali kaksi kertaa kloroformiuutettu näyte, ja 72 C oli uutettu PVP:n kanssa. Kaikissa on suuri piikki aallonpituudella 280, osoittaen suurta proteiinien määrää. Piikki käyrän pienemmillä aallonpituuksilla voi olla esimerkiksi etanolia tai fenolisia yhdisteitä.

Soijastandardille oletetaan Ct-arvoa syklien 21,76 ja 24,44 välillä käyttäen LEKT-reaktiota, ja syklien 19,83 ja 24,44 välillä ACT-reaktiolla. Mikään näytteistä ei yltänyt tähän rajaan, vaan Ct-arvot niistä olivat tyypillisesti 30 yläpuolella (kuva 16). Syystä tai toisesta ensimmäisen sarjan näytteet A-C monistuiivat paljon myöhemmin ACT-reaktiossa kuin LEKT:illä. Muuten Ct-arvot ovat päämääräisesti tasaisia reaktioiden välillä.

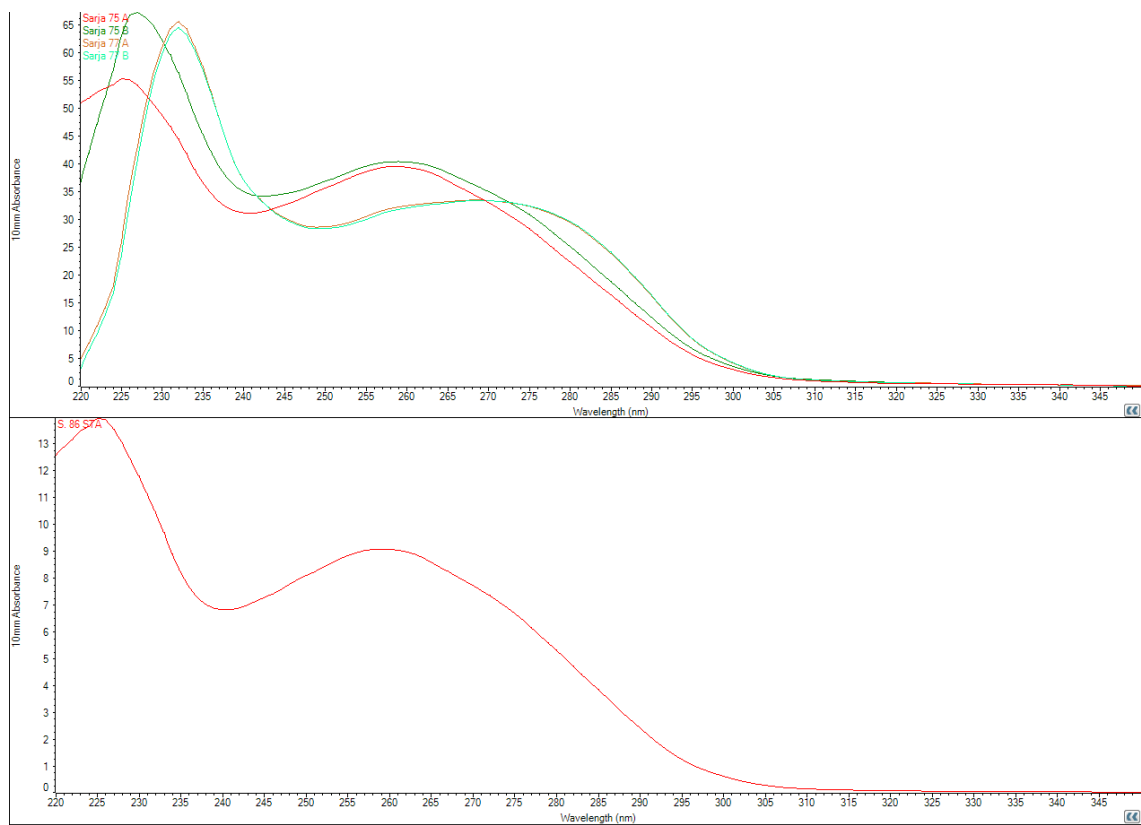


Kuva 16. PCR-tulokset CTAB-CEN-menetelmällä eristetyistä soijatarkkailunäytteistä

#### 4.2.2 CTAB-NGS

CTAB-NGS-menetelmällä eristys oli suhteellisen nopeaa CTAB-CEN:iin verrattuna. Proteinaasi K -versiot kestivät lisätyn inkubaatiovaiheen takia kauemmin. Menetelmällä tuotetut pelletit soijatarkkailunäytteistä olivat edelleen suurehkoja, mutta eivät repaleisia samalla tavalla kuin edellisessä menetelmässä. Ne olivat koostumukseltaan hyvin geelimäisiä ja kuivauksessa ne muuttuivat pääosin läpinäkyviksi, mutta ensimmäisissä kokeiluissa pelletin koon takia niiden keskiosa oli vielä kellertävä. Saostukseen otettavan supernatantin määrää muutettiin sarjojen edetessä pienemmäksi, eikä ongelmaa esiintynyt enää. Viimeisissä sarjoissa saostukseen otettiin 50 µl kloroformiuutettua näytettä, joka liuotettiin 100 µl:aan eluointipuskuria. Näissä ei enää esiintynyt samaa ongelmaa pelletin liukenemisen kanssa kuin ensimmäisissä kokeiluissa.

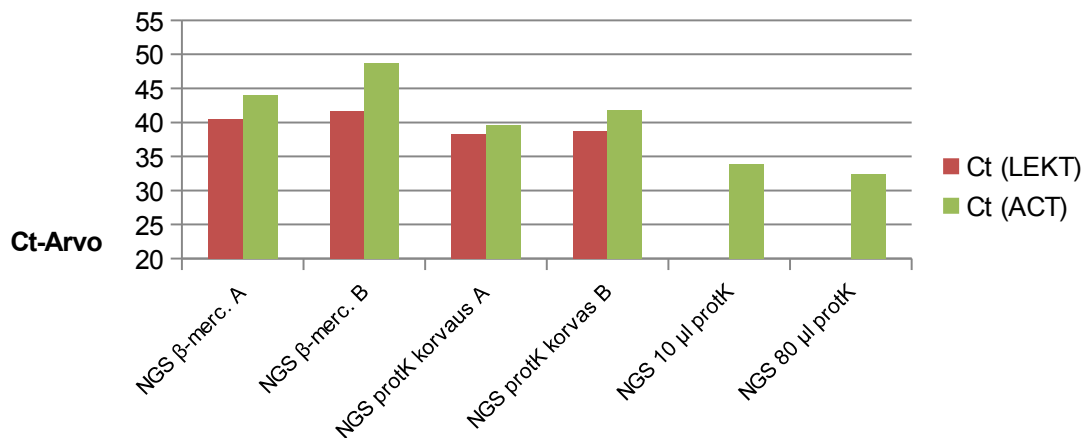
Absorbanssikäyrät eristyksistä olivat osittain lupaavat.  $\beta$ -merkaptotetanolisarjassa ei ilmennyt absorbanssiipikkiä aallonpituudella 280 nm:n. Alkuperäinen proteinaasi K kokeilu taas ei saanut proteiineja eliminoitua. 280 nm absorbanssi väheni proteinaasi K:n määrää lisätessä ja nostamalla se 80 µl:n tasolle saavutettiin puhtausarvo 1,71. 220–240 nm:n alueen piikkejä ei saatu eliminoitua missään vaiheessa (kuva 17).



Kuva 17. CTAB-NGS näytteiden absorbanssikäyrät. 75 A ja B olivat  $\beta$ -merkaptotoetanolilla käsitellyt näytteet. 77 A ja B olivat ensimmäiset proteinaasi K-kokeilut. 86 STA:ssa on taas sama määrä proteinaasi K:ta kuin Bioteccon kitissä (80  $\mu$ l) erillisessä inkubaatioissa.

Nämäkään näytteet eivät antaneet hyviä Ct-arvoja PCR-ajoissa. Aivan ensimmäisissä kokeiluissa Ct-arvo oli jopa 40:n syklin luokkaa. Arvo parantui myöhemmissä ajoissa kun proteinaasi K -käsittelyä oli muokattu, mutta tulokset eivät olleet edelleenkään hyväksyttävissä rajoissa (kuva 18). Vain ensimmäisistä kokeiluista tehtiin LEKT-reaktio. Myöhemmät soijatarkkailunäytteet toimivat ACT-reaktion kontrolleina papaijan ja pellavan CTAB-eristyksissä.

## Soijatarkkailut CTAB-NGS menetelmällä



Kuva 18. PCR-tulokset CTAB-NGS menetelmällä eristetyistä soijatarkkailunäytteistä

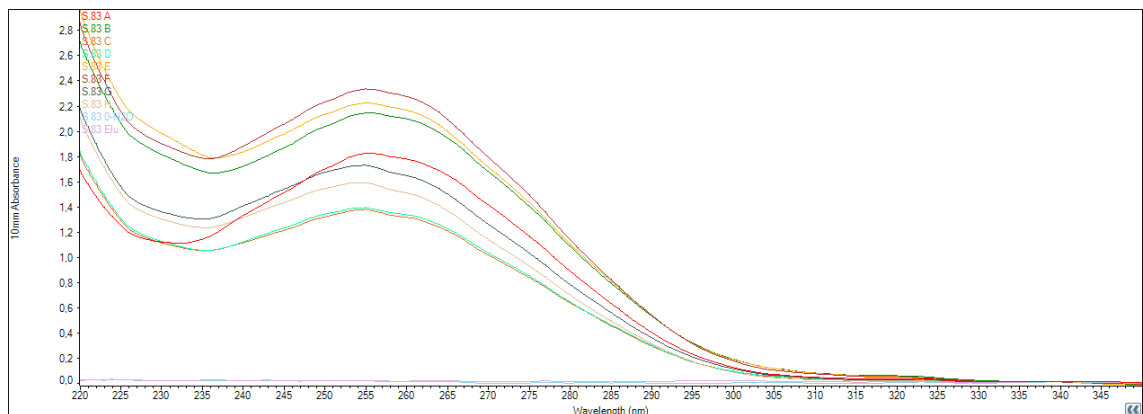
### 4.3 CTAB-NGS papaijasta ja pellavasta

CTAB-NGS-menetelmää käyttäessä monet papaijaeristyksistä antoivat kohtalaisella saannolla puhdasta DNA:ta, joka vielä monistui hyvin PCR:ssä. Pellava ei onnistunut menetelmällä. Raakadata näytteistä mitatuista DNA-määristä ja niiden puhtauksista on esitetty liitteessä 1.

#### 4.3.1 Papaijat

Osa papaijanäytteistä tuotti puhdasta ja tarpeeksi hyväsaantoista DNA:ta CTAB-NGS-menetelmällä. Eristys onnistui kaikista Grindomixilla jauhetuista ruokapapaijoista,

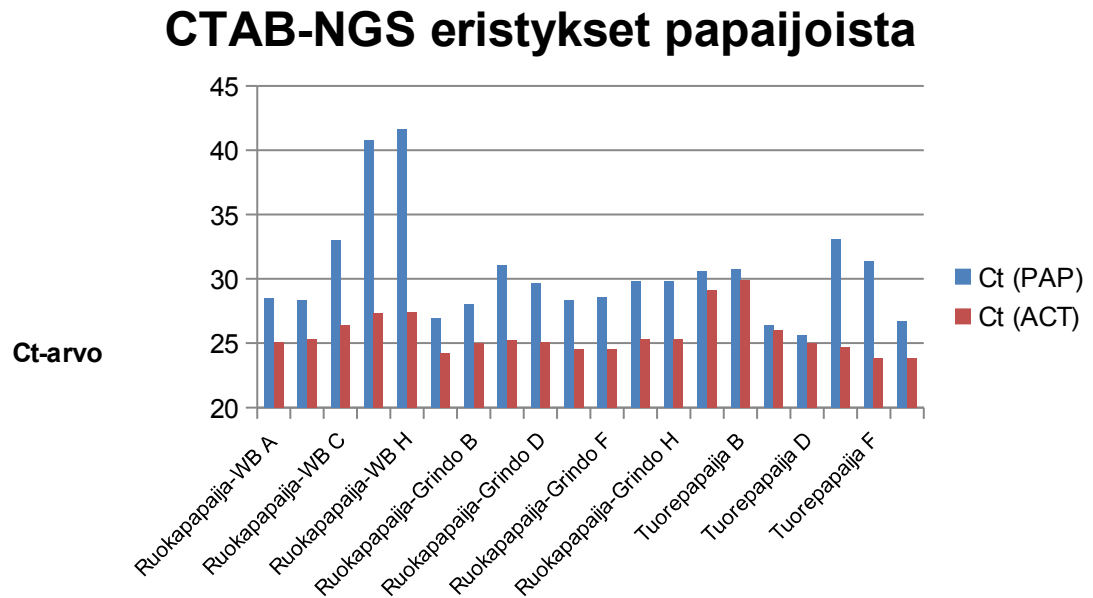
Waring Blenderillä tehdystä kuorellisesta vesisuspensiosta ja kaikista siemenettömistä tuorepapaijoista. Siemenelliset tuorepapaijat tuottivat jo uuttovaiheessa sentrifugoidun supernatantin pinnalle tiheän ja ruskean vaahdon, joka liukeni välittömästi takaisin supernatanttiin tehden siitä samean. Saostuksiin otettiin 300 µl kloroformiuutettua supernatanttia ja pelletit liuotettiin 50 µl:aan eluointipuskuria. Pienemmät saostustilavuudet eivät tuottaneet pellettiä. Pelletit itse olivat ennen kuivausta pieniä ja valkoisia hiutaleita saostusputkessa. Kuivauksessa kaikki pelletit muuttuivat täysin läpinäkyviksi. Näytteiden absorbanssikäyriässä ei esiintynyt korkeata absorbanssia 230 nm aallonpituudella niin kuin kaikissa Bioteccon-eristyksissä. Käyrien yleinen muoto on esillä kuvassa 19. Myös puhtaudet olivat korkeita: tyypillisesti 1,8–2,0 välillä. Kaikissa esiintyi noin 255 nm:n aallonpituudella pieni kumpu, jonka aiheuttajasta ei ole tietoa. Siemenellisistä tuorepapaijoista tuli paremmat saannot kuin muista näytteistä, mutta puhtausarvot olivat erittäin alhaiset. Kuivatusta papaijoista ei eristynyt periaatteessa yhtään mitään.



Kuva 19. Grindomix-jauhetun ruokapapaijan absorbanssikäyrä CTAB-NGS-eristyksestä. Tuloksissa ei näy selvää eroa kuorellisten ja kuorettomien erien välillä, tai esipakastettujen jauhatuksien ja tuoreesta papaijasta tehtyjen näytteiden välillä.

Kaikki edellä mainitut näytteet, joista tuli hyvä absorbanssikäyrä monistuivat kohtalaisen hyvin qPCR-laitteessa papaijaspesifisessä PAP-reaktiossa. Ct-arvo näissä näytteissä oli tyypillisesti 25–30 syklin alueella. Kasvispesifinen ACT-reaktio antoi edelleen signaalin selvästi PAP-reaktiota aikaisemmin, varsinkin esikäsitellyssä sentrifugoiduissa papaijoissa. Muuten ne seurasivat samaa Ct-arvojen trendiä. Ruokapapaijan kuorelliset näytteet monistuivat PAP-reaktiossa jokaisen näytteen kohdalla kuorettomia aikaisemmin, joten se saattaa olla lopulta parempi eristyskohde näytematriisilla. Siemenelliset tuorepapaijat taas monistuivat selvästi siemenettömiä tuorepapaijoita myöhemmin. Siemenistä saattaa siis uuttua jotain ainetta, joka ei

CTAB-menetelmällä puhdistu näytteestä ja inhiboi polymeraasireaktioita. Eristyksien PCR-ajojen tulokset ovat kuvassa 20.



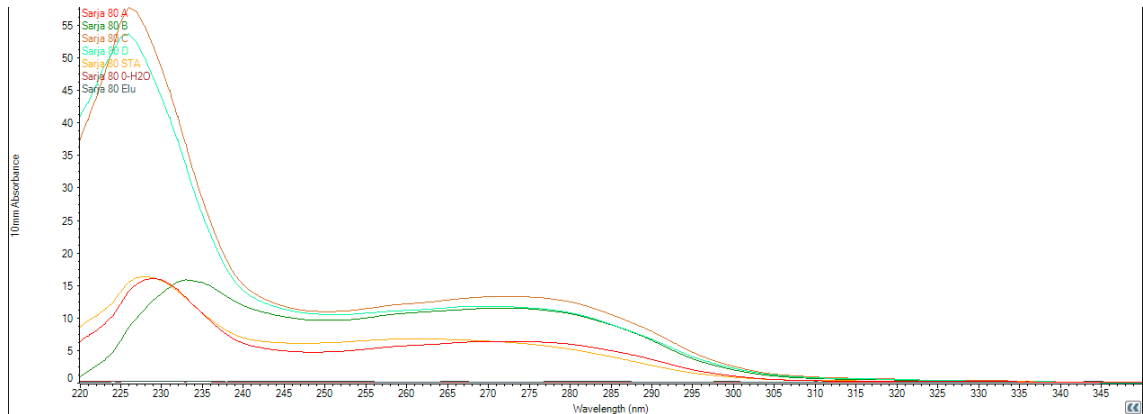
Kuva 20. PCR-tulokset papaijan CTAB-NGS-eristyksistä.

#### 4.3.2 Pellavansiemenet

Rasvanpoistoyritys heksaanilla johti samanlaisiin ongelmiin kuin Biotecconilla eristetyssä sarjassa. Rasvaa sisältävä heksaanikerros ei ollut helposti pipetoitavissa, ja vei mukanaan huomattavan osan uuttopuskuria. Tästä huolimatta uuttopuskuria oli tarpeeksi eristyksen jatkamiseen. Kaikki näytteet vaikuttivat hyvin öljymäisiltä, ja pipetointivaiheissa kärkiin jäi aina pieni määrä viskoosia nestettä, jota ei saatu pois. Saostusvaiheessa jokainen näyte muodosti saostusputkessa välittömästi erittäin tiheän ja samean vaalean massan, joka sentrifugoidessa muodosti suuria pellettejä. Pelletit olivat kellertäviä ja helposti putken pohjasta irtautuvia. Kuivattuina niissä oli geelimäisen läpinäkyvän pelletin keskellä vielä kellertävää massaa. Waring Blenderillä jauhetun heksaanittoman pellavansiemenen pelletti hajosi osittain etanolipesujen aikana.

Näytteiden absorbanssikäyrät olivat muodoltaan hyvin samanlaisia kuin soijatarkkailunäytteiden CTAB-NGS-eristyskäyrät. Niissä esiintyi muuta absorbanssia korkeampi piikki 230 nm:n aallonpituudella, ja puhtaus oli erittäin huono.

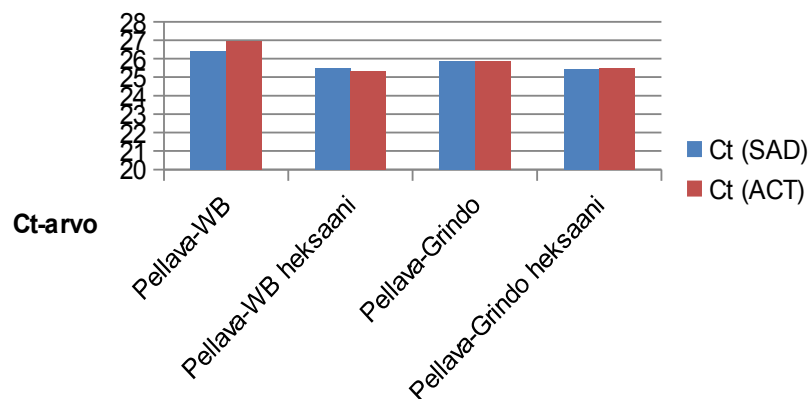
Saannot pellavansiemennäytteistä olivat hajonnutta pellettiä lukuun ottamatta yli 500 ng/ $\mu$ l. Hajonneesta pelletistä saanto oli 278 ng/ $\mu$ l. Näytteiden A260/A280-arvojen välillä ei ollut huomattavaa eroa. Grindomixillä jauhetuissa näytteissä oli selvästi korkeampi absorbanssi 230 nm:n aallonpituudella (kuva 21).



Kuva 21. Pellavansiementen absorbanssi CTAB-NGS eristyksistä. A ja B ovat Waring Blenderillä jauhettuja. C ja D ovat Grindomixillä jauhettuja. Heksaanikäsittely tehtiin näytteillä B ja D.

Näytteet eivät monistuneet qPCR-laitteella yhtä hyvin kuin Bioteconilla eristetty pellavansiemennäyte-erä. Huomattavissa oli kuitenkin pieni ero heksaanikäsiteltyjen ja normaalisti käsiteltyjen näytteiden välillä. Rasvanpoistoyritys on aikaistanut Ct-arvoa näillä näytteillä keskimäärin yhden syklin muihin näytteisiin verrattuna (kuva 22). Rasva voi hyvinkin olla suuri polymeraasiketjureaktion inhibitiota aiheuttava komponentti pellavansiemenessä, ja vaatii ilmeisesti paremman poistomenetelmän.

## CTAB-NGS eristykset pellavansiemenistä



Kuva 22. PCR-tulokset pellavansiemenistä CTAB-NGS-menetelmällä

#### 4.4 Papaijan tunnistusmenetelmän validointi

Validoitava FAM/TAMRA-kemiaan perustuva PCR-menetelmä osoittautui ajoissa luotettavaksi. Se oli spesifinen pelkästään papaijalle ja monistui herkkyystestissä vielä 10 kopiota sisältävillä toistoilla.

##### 4.4.1 Spesifisyys

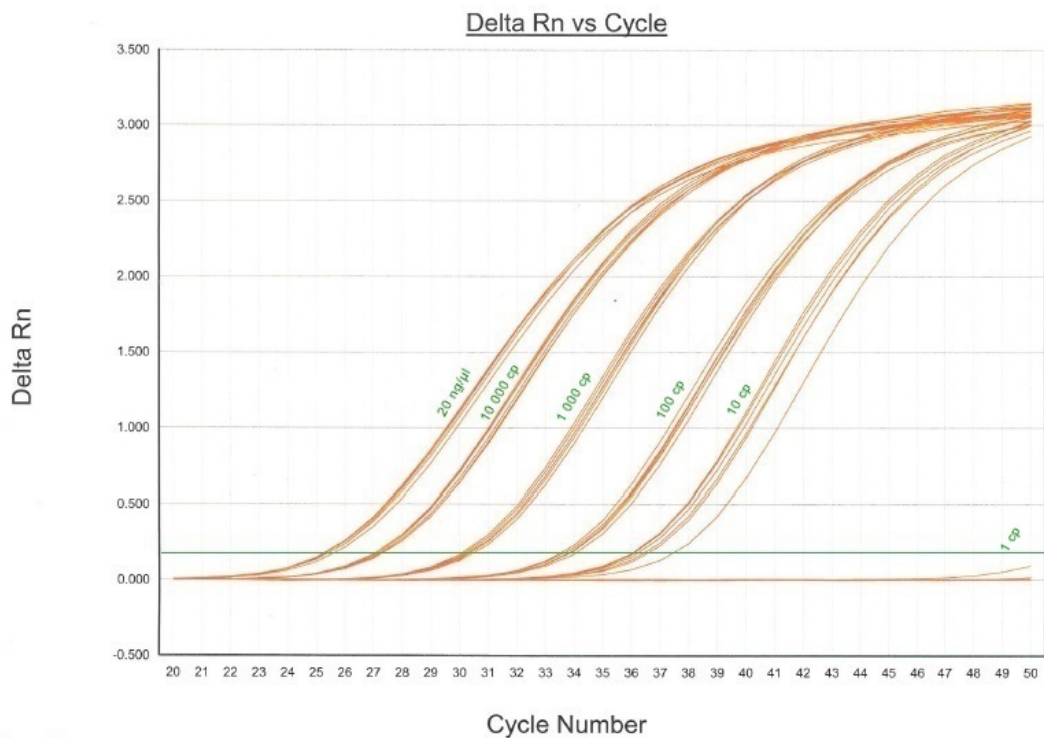
Spesifisyystestissä papaijanäytteiksi valittiin kaksi toimivaa CTAB-NGS-menetelmällä eristettyä näytettä, joiden todettiin monistuvan hyvin PCR:ssä. Ne olivat Grindomixillä jauhettu kuorellinen ruokapapaija ja vesisuspensionona homogenisoitu siemenetön tuorepapaija. PAP-koettimella pelkästään papaijanäytteet antoivat signaalin, joten se on todennäköisesti spesifinen pelkästään papaijalle tarkoituksen mukaisesti. Kaikkien näytteiden reaktion onnistuminen varmistettiin ajossa ACT-reaktioilla. Eläinperäiset DNA:t (ihminen ja tonnikala) eivät oletetusti antaneet niistä signaalia. Myös tuorepavun toisto jäi ilman signaalia todennäköisimmin pipetointivirheen takia. Taulukossa 3 listataan PAP-reaktiota vastaan testatut matriisit ja spesifisyystestin ajopohja.

Taulukko 3. Spesifisyystestin ajopohja

Ruokapapaija	Ruokapapaija	Tuorepapaija	Tuorepapaija	Vehnä	Vehnä	Pistaasi	Pistaasi	Seesami	Seesami	Riisi	Riisi	<b>PAP</b>
Kumina	Kumina	Anis	Anis	Persilja	Persilja	Tilli	Tilli	Fenkoli	Fenkoli	Yrttiselleri	Yrttiselleri	<b>PAP</b>
Pellava	Pellava	Ohra	Ohra	Porkkana	Porkkana	Tonnikala	Tonnikala	Ihminen	Ihminen	Punainen linssi	Punainen linssi	<b>PAP</b>
Tuoreherne	Tuoreherne	Kikherne	Kikherne	Mungpau	Mungpau	Tuorepau	Tuorepau	nolla kontrolli				<b>PAP</b>
Ruokapapaija	Ruokapapaija	Tuorepapaija	Tuorepapaija	Vehnä	Vehnä	Pistaasi	Pistaasi	Seesami	Seesami	Riisi	Riisi	<b>ACT</b>
Kumina	Kumina	Anis	Anis	Persilja	Persilja	Tilli	Tilli	Fenkoli	Fenkoli	Yrttiselleri	Yrttiselleri	<b>ACT</b>
Pellava	Pellava	Ohra	Ohra	Porkkana	Porkkana	Tonnikala	Tonnikala	Ihminen	Ihminen	Punainen linssi	Punainen linssi	<b>ACT</b>
Tuoreherne	Tuoreherne	Kikherne	Kikherne	Mungpau	Mungpau	Tuorepau	Tuorepau	nolla kontrolli				<b>ACT</b>

#### 4.4.2 Herkkyys

PAP-reaktio antoi herkkyystestissä hyvin tasaisia tuloksia näytesarjojen välillä. Satakopioiseen näytteeseen asti toistojen monistuskäyrät ovat toisissaan kohtalaisen tiheästi kiinni (kuva 23). Alemmissa kopiomäärissä esiintyi enemmän monistuskäyrien välistä hajontaa. Mikään yksikopioisista näytteistä ei tavoittanut Ct-rajaa, ja vain yksi lähti edes monistumaan reaktioiden aikana. Sykliä keskimääräinen väli 10 000 ja 1 000 kopiota sisältävien toistojen välillä oli 3,27. 1 000- ja 100-kopioisten toistojen syklien väli oli 3,49, ja 100- ja 10-kopioisten toistojen väli 2,68 sykliä. Vaikka alemmat DNA-määrät tuovat selvästi jo epätarkkuutta Ct-arvoihin, nekin monistuvat menetelmällä luotettavasti. Papaijan DNA:n toteamisrajaksi tällä koettimella osoittautuu täten kymmenen kopioksi.



Kuva 23. Herkkyystestin monistuskäyrät

## 5 Johtopäätökset

Kaupallinen Biatecon-kitti ei osoittanut näiden tuloksien mukaan sopivaksi papaijan käsittelyyn. Sillä eristetyt papaijanäytteet antoivat jokaisessa tapauksessa joko erittäin



huonon saannon, alhaisen tai kummallisen korkean puhtausarvon tai kummatkin. Nämä eristykset toimivat erittäin huonosti ja epätasaisesti qPCR-laitteessa. Syystä tai toisesta PAP-reaktio antoi joissain tapauksissa signaalin monta sykliä myöhemmin kuin ACT-reaktio, kun taas joissakin näytteissä niiden syklien välinen ero oli pieni. Tämä ilmiö esiintyi etenkin esikäsittelyssä tehtyjen vedenpoistojen kohdalla. CTAB-NGS-menetelmä tuntui toimivan osalle papaijamatriiseista. Prosessoimattomat hedelmät antoivat pääosin tarpeeksi DNA:ta qPCR-analyysia varten hyvillä puhtausarvoilla ja näytteet monistuivat loogisesti qPCR-analyysissa. Sama outo ero PAP- ja ACT-reaktioiden välillä esiintyi näytteissä joissa oli tehty vedenpoisto esikäsittelyn aikana. Prosessoidut tuotteet eivät välttämättä sisällä tarpeeksi ehjää DNA:ta, että ne sopeutuisivat menetelmälle ollenkaan.

Pellavasta saostui Biotecon menetelmällä erittäin paljon pipetointia vaikeuttavaa ja likaa sisältävää geeliä. Siitä ei muutenkaan eristynyt kuin kohtalainen määrä DNA:ta, joka antoi huonot puhtausarvot. Se kuitenkin monistui kohtalaisen hyvin qPCR-laitteella. CTAB-NGS-menetelmällä eristetyt näytteet antoivat muuten samankaltaisia tuloksia, mutta niiden saanto oli paljon korkeampi. Heksaanikäsittely tuntui helpottavan prosessia hieman, mutta tulevaisuudessa voidaan joutua etsimään muita tapoja poistaa näytteistä ylimääräinen rasva. Bioteconilla tehdyt eristykset monistuivat paremmin kuin CTAB-NGS-menetelmän näytteet.

CTAB-NGS-menetelmä osoittautui sopivaksi menetelmäksi eristämään hyvälaatuista DNA:ta prosessoimattomissa hedelmissä. Se ei missään vaiheessa ollut sopiva eristämään laatuvaatimusten mukaista DNA:ta soijatarkkailunäytteistä. Soijatarkkailunäytteistä saatiin viimeisillä kokeiluilla hyvä puhtausarvo ja saanto, mutta se ei edelleenkään monistunut tarpeeksi hyvin qPCR-laitteella. Menetelmä vaatii vielä muokkausta ja kokeilua, jos se halutaan ottaa käyttöön.

Papaijan tunnistusmenetelmä osoittautui validointiprosessin ensimmäisissä testeissä spesifiseksi ja tarpeeksi herkäksi. Sen validointiprosessi on vielä kesken, ja vaatii vielä ensimmäisten ajojen toistot toisen henkilön tekemänä ja positiivikontrollin Ct-arvon lopullisen määrittämisen. Näiden vaiheiden jälkeen menetelmä voidaan akkreditoida.

## Lähteet

- 1 Zupan, J.R & Zambryski P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology*. 1995;107(4). s. 1041-1047.
- 2 Papaya – General Crop Information. Verkkodokumentti.  
<[http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/crops/i\\_papa.htm](http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/crops/i_papa.htm)> Luettu 22.10.2015.
- 3 Gonsalves, D & Ishii, M. 1980. Purification and Serology of Papaya Ringspot Virus. Verkkodokumentti.  
<[https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n11\\_1028.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n11_1028.pdf)> 25.3.1980.
- 4 Tripahti, S., Suzuki, J. Y., Ferreira, S. A. & Gonsalves, D. 2008. Papaya Ringspot Virus- P. Characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular Plant pathology*, volume 9 issue 3. s. 269-280.
- 5 Ming, Ray et al. 2008 The Draft Genome of the Transgenic Tropical Fruit Tree papaya (*Carica Papaya Linnaeus*). *Nature*. 2008;452.7190. s. 991-996.
- 6 European Commission. 2014. Final report of an audit carried out in Thailand from 29 January to 07 February 2014 in order to evaluate the controls of genetically modified organisms in food of plant origin. Verkkodokumentti.  
<[http://ec.europa.eu/food/fvo/act\\_getPDF.cfm?PDF\\_ID=11081](http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=11081)> 10.6.2014.
- 7 Fu, Y-B., Diederichsen, A. & Allaby, R. G. 2012. Locus-specific view of flax domestication history. *Ecology and Evolution* 2.1. 2012. s. 139-152.
- 8 Helback, H. 1959. Domestication of Food Plants in the Old World. *Science Magazine*. 14.8.1959, volume 130, number 3372. s. 365-372.
- 9 Young, Lester et al. 2015. Genetics, Structure and prevalence of FP967 (CDC Triffid) T-DNA in flax. *SpringerPlus*. 2015;4;146.
- 10 McHughen, A., Rowland, G. G., Holm, F. A., Bhatti, R. S. & Kenaschuk E. O. 1996. Cultivar Description – CDC Triffid transgenic flax. Verkkodokumentti.  
<<http://pubs.aic.ca/doi/pdf/10.4141/P96-188>> 6.12.1996.
- 11 Thermo Scientific. 260/280 and 260/230 Ratios. T009-Technical Bulletin. Verkkodokumentti. <<http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>> 2008. s. 1-2.
- 12 Doyle, J. & Doyle, J. 1987. A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf Tissue. *Phytochem Bull*. 1987. s. 11-15.
- 13 Huang, Wang et al. 2013. An efficient DNA isolation method for tropical plants. *African Journal of Biotechnology*. 8.5.2013. s. 2727-2732.
- 14 Ovesna, J. & Hodek, J. 2009. Detection of Transgenic Papaya Lines: Extraction Protocol Optimisation and Verification of DNA Quality by PCR Assay. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009, volume 29 s.75-81.

- 15 Murray, M. G. & Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of High Molecular weight Plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 10.10.1980. s. 4321-4325.
- 16 Dominguez, K. & Ward, W. S. 2009. A Novel Nuclease Activity that is Activated by  $\text{Ca}^{2+}$  Chelated to EGTA. *Systems biology in reproductive Medicine*. 2009 dec. s. 193-199.
- 17 Shapira, E. & Arnon, R. 1969. Cleavage of one Specific Disulfide Bond in Papain. *The journal of Biological Chemistry*. 1969, volume 244, issue 4. s. 1026-1032.
- 18 Mackay, I. M. *Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. HorizonScientific Press, 2007. s. 81.
- 19 Bessetti, J. 2007. An introduction to PCR inhibitors. Verkkodokumentti. <<http://www.promega.com/~media/files/resources/profiles%20in%20dna/1001/an%20introduction%20to%20pcr%20inhibitors.pdf>> Promega Co. 3.2007.
- 20 Tuoteseloste – Etanoli. Verkkodokumentti. <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/34852>> Sigma-Aldrich Co.
- 21 Brescia, P. 2012. Micro-Volme Purity Assessment of Nucleic Acids using A260/A280 Ratio and Spectral Scanning. Verkkodokumentti. <<http://www.biotek.com/resources/articles/micro-volume-purity-assessment-nucleid-acids.html>> Biotek Inc. 5.6.2012.
- 22 Rychlik, W., Spencer, W. J. & Rhoads, R. E. 1990. Optimization of the annealing temperature of DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research* 11.11.1991, volume 18. s. 6409-6412.
- 23 Vaya, Gustavsson et al. 2010. Fluorescence of Natural DNA: From the Femtosecond to the Nanosecond Time Scales. *Journal of the American Chemical Society*. 10.8.2010. s. 11834-11835.
- 24 Mashardt, R. 2002. Is Organic Papaya Production in Hawaii Threatened by Cross-Pollination with Genetically Engineered varieties? Verkkodokumentti. <<http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/BIO-1.pdf>> 8.2002.
- 25 Suzuki, T., Ohsumi, S. & Makino, K. 1994. Mechanistic studies on depurination and apurinic site chain breakage in oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Research* 25.11.1994, volume 22. s. 4997-5003.
- 26 Healey, A., Furtado, A., Cooper, T. & Henry, R. J. 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 27.6.2014, volume 10.
- 27 Nakamura K. et al. 2011, Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain. *Biol. Pharm. Bull.* volume 34 (10) s. 1648-1651.

## NanoDrop-mittausten raakadata

## Biotecon

Näyte	DNA (ng/μl)	Puhtaus (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )
55 A	33	0,75
55 B	15	1,9
55 C	17	0,9
55 D	14	1,23
55 E	35	1,77
55 F	28	1,75
55 G	22	0,98
55 H	31	0,81
58 A	10	4,04
58 B	8	3,89
58 C	18	8,48
58 D	20	8,86
58 E	18	6,24
58 F	19	4,61
58 G	13	3,77
58 H	17	3,94
61 A	2	1,13
61 B	3	1,23
61 C	2	1,81
61 D	3	1,01
61 E	0	0,7
61 F	1	0,8
61 G	1	1,66
61 H	3	1,58
62 A	6	2,42
62 B	9	1,99
62 C	5	2,73
73 D	8	2,34
62 E	22	4,47
62 F	17	6,25
62 G	29	8,7
62 H	26	6,01
64 E	12	2,49
64 F	13	2,83
64 G	20	3,28
64 H	17	3,59
66 A	29	2,01

66 B	33	2,08
66 C	19	2,39
66 D	22	2,44
66 E	30	2,23
66 F	31	2,39
66 G	27	2,96
66 H	19	2,69
84 A	40	0,93
84 B	60	1,17
84 C	46	1,07
84 D	221	0,76

Sarjat

- 55 Tuorepapaija. ABEF siemenelliset. CDGH siemenettömät
- 58 Papaij-sokeriliemi. ABEF suorahom. CDGH vesisusp.
- 61 Kuivapapaija. ABEF suorahom. CDGH vesisusp.
- 62 Papaija-mehu. ABEF suorahom. CDGH vesisusp.
- 64 Ruokapapaija-WB. ABEF kuorellinen. CDGH kuoreton
- 66 Ruokapapaija-Grindo. ABEF kuorellinen, CDGH kuoreton
- 84 Pellavansiemen. AB Waring Blender, CD Grindo. BC Heksaani

## CTAB-vertaus

Näyte	DNA (ng/μl)	Puhtaus (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )
71 A	875	1,06
71 B	996	0,99
71 C	961	1,09
71 D	2483	0,9
72 A	2079	0,83
72 B	1204	0,96
72 C	724	1,09
72 D	1435	0,92
71 B-p	87	0,74
71 D-p	299	0,83
72 A-p	184	0,71
72 C-p	81	0,71
75 A	1964	1,77
75 B	2011	1,61
77 A	1616	1,1
77 B	1596	1,08
80 STA	330	1,31
86 STA	453	1,71

Sarjat

71	CTAB-CEN soijakokeilu
72	CTAB-CEN soijakokeilu 2x CHCl <sub>3</sub> . CD PVP-lisäys
"A-p."	Biotecon puhdistukset
75	CTAB-NGS B-merkaptto
77	CTAB-NGS protK. Korvaus
80	CTAB-NGS 10 ul ProtK
86	CTAB-NGS 80 ul ProtK

## CTAB eristykset

Näyte	DNA (ng/μl)	Puhtaus (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )
79-2 A	27	2,05
79-2 B	28	2,04
79-2 C	20	2,16
79-2 F	10	1,77
79-2 G	19	2,08
79-2 H	20	2,05
80 A	278	0,96
80 B	529	1,01
80 C	600	0,97
80 D	550	1,03
83 A	89	2
83 B	105	1,93
83 C	66	2,08
83 D	67	2,08
83 E	108	1,96
83 F	114	2
83 G	82	2,11
83 H	75	2,17
85 A	146	1,33
85 B	118	1,38
85 C	41	1,98
85 D	28	1,98
85 E	51	1,7
85 F	27	1,75
85 G	26	2,04
85 H	11	2,13

86 A	2	2,24
86 B	2	55,7
86 C	2	3,77
86 D	1	-1,59
86 E	1	-3,69
86 F	4	2,95
86 G	7	2,23

## Sarjat

- 79-2 Ruokapapajija-WB. ABEF kuorellinen. CDGH kuoreton
- 80 Pellavansiemen. AB Waring Blender, CD Grindo. BC Heksaani
- 83 Ruokapapajija-Grindo. ABEF kuorellinen, CDGH kuoreton
- 85 Tuorepapajija. ABEF siemenelliset. CDGH siemenettömät
- 86 Kuivapapajija. ABEF suorahom. CDGH vesisusp.