



SAVONIA

OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

LAADUKAS GENOMINEN DNA

DNA:n eristysmenetelmien vertailu rintasyöpänäytteistä

TEKIJÄT: Mii Koistinen
Ulla Lehtoaho

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t) Koistinen Miia, Lehtoaho Ulla	
Työn nimi Laadukas genominen DNA – DNA:n eristysmenetelmien vertailu rintasyöpänäyhteistä	
Päiväys	22.11.2016
Sivumäärä/Liitteet	58/12
Ohjaaja(t) Anssi Mähönen, Arto Mannermaa	
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Itä-Suomen yliopisto, Terveystieteiden tiedekunta, Lääketieteen laitos, Kliinisen lääketieteen yksikkö, Kliinisen patologian ja oikeuslääketieteen oppiaine	
Tiivistelmä	
<p>Genomitutkimuksen tavoitteena on ymmärtää sairauksien periytymistä, syntyä ja etenemistä, sekä myös parantaa ja yksilöidä sairauksien hoidon tehoa ja seurantaa. Uusissa syöpätutkimuksissa on pystytty selvittämään syöpäalttiuden molekyyligeneettistä taustaa ja sitä kautta on saatu lisätietoa sairastumisriskeistä. Ihmisen genomi sisältää nykytiedon mukaan yli 20 000 geeniä, jotka koodaavat elämälle välttämättömiä proteiineja. Geenin altistuessa mutaatiolle on mahdollista, että syntyy ylimääräisiä, virheellisesti toimivia tai kokonaan toimimattomia proteiineja, jolloin syövän syntymekanismit saattavat aktivoitua. Näitä mutataatioita pystytään tutkimaan muun muassa sekvensoimalla geenien emäsjärjestyksiä.</p> <p>Sekvensointimenetelmien kehittymisen myötä on mahdollistunut pitkien DNA-juosteiden sekvensointi. Kehitystyön ansiosta vuonna 2009 markkinoille tullut Single Molecule Real Time (SMRT) -sekvensointimenetelmä lupaa keskimäärin 21 000 juostetta yhdellä reaktiolla. SMRT-sekvensointiin soveltuvan DNA:n tulee olla riittävän suurikokoista ja puhdasta.</p> <p>Opinnäytetyö on vertaileva, määrällinen tutkimus, jonka tarkoituksena oli eristää genomista DNA:ta kolmella eri menetelmällä. Tutkimuksessa vertailtiin keskenään perinteistä fenoli-kloroformiuuttoa sekä kahta kaupallista reagenssarjaa (Agilent ja Qiagen) ja tavoitteena oli selvittää, mikä näistä menetelmistä soveltuisi parhaiten SMRT-sekvensointiin soveltuvan DNA:n eristämiseen.</p> <p>Eristetyn DNA:n laatua määritettiin spektrofotometrillä, fluorometrillä, PCR:llä sekä agarosigeelielektroforeesilla. Lisäksi työssä tarkasteltiin näytteiden säilytyksen keston vaikutusta eristetyn DNA:n laatuun, sekä eristysmenetelmien kustannusvaikuttavuutta. Työssä käytettävät lähtömateriaalit olivat rintasyöpätutkimukselle lahjoitettuja veri- ja kudospäätteitä. Lisäksi eristykset tehtiin myös rintasyöpäsolumiljelmän soluista.</p> <p>Opinnäytetyöstä saatujen tulosten perusteella voitiin todeta, että pisintä ja puhtainta DNA:ta saatiin eristettyä perinteisellä fenoli-kloroformiuutolla. Tulosten perusteella on aloitettu rintasyöpäkudosten SMRT-sekvensointiin johdatavat DNA:n eristykset.</p>	
Avainsanat genominen DNA, genomitutkimus, DNA:n eristys, SMRT, rintasyöpä	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Koistinen Miia, Lehtoaho Ulla			
Title of Thesis High-quality, genomic DNA – Comparing DNA isolation methods from breast cancer samples.			
Date	22.11.2016	Pages/Appendices	58/12
Supervisor(s) Anssi Mähönen, Arto Mannermaa			
Client Organisation /Partners University of Eastern Finland, Faculty of Health Sciences, School of Medicine, Institute of Clinical Medicine, Academic subject of Clinical Pathology and Forensic Medicine.			
<p>Abstract</p> <p>The objective of genome-based research is to understand heredity and the development of diseases, but it also develops and improves treatments and follow up for diseases. Cancer research has identified many molecular genetic alterations as a background for cancer and thereby information on risks of illnesses has grown. According to current knowledge human genome contains over 20 000 genes, that code for essential proteins. Genes can be exposed to different kind of mutations. These mutations can cause extra, defective or entirely inactive proteins. This may lead to activating cancer genetics. Mutations can be researched by using sequencing methods.</p> <p>The development of sequencing methods has enabled longer DNA-strand sequencing. The Single Molecule Real Time (SMRT) sequencing approach came on market on 2009. With SMRT long sequences, even 21 000 bases, can be sequenced in one reaction. Isolated DNA for SMRT sequencing must be pure and high-molecular weight.</p> <p>This study is a comparative and quantitative research and the purpose is to isolate genomic DNA using three different methods. The study compares traditional phenol-chloroform method with two different commercial isolation kits (Agilent and Qiagen). The objective of this study is to find out which of these three methods is suited best for isolating DNA when the main objective is SMRT sequencing.</p> <p>The quality of the isolated DNA will be ensured by using spectrophotometer, fluorometer, PCR and agarose gel electrophoresis. In addition, this study regards the influence of long term storage for the quality of isolated DNA and cost-effectiveness between different isolation methods. Starting materials used in this study were donated blood and tissue samples for breast cancer research. In addition, breast cancer cell line was used.</p> <p>The results of this study showed that traditional Phenol-chloroform method isolated the longest and the purest DNA. Based on these results the cancer research group has begun further research with isolating DNA from breast-cancer tissue.</p>			
<p>Keywords genomic DNA, genome research, DNA isolation, SMRT, breast cancer</p>			

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	7
2	RINTASYÖPÄ SAIRAUTENA	8
2.1	Rintasyövän kudostyypit.....	8
2.2	Diagnostiikka, nykyhoito ja ennuste	8
3	DNA	10
3.1	DNA:n rakenne	10
3.2	Geenit	11
3.3	Geneettisen informaation lukeminen	12
4	SYÖVÄN GENETIIKKA	13
4.1	Karsinogeneesin vaiheet	13
4.2	Mutaatiot.....	13
5	DNA:N SEKVENSOINTIMENETELMÄT	15
5.1	Ensimmäisen sukupolven sekvensointimenetelmät	15
5.2	Toisen sukupolven sekvensointimenetelmät.....	15
5.3	SMRT-sekvensointimenetelmä	16
5.4	Sekvensointimenetelmien hyödyntäminen syöpätutkimuksessa	17
6	DNA:N ERISTÄMINEN	18
6.1	Genomisen DNA:n eristys ja puhdistus	18
6.2	Näytteiden säilytys genomisen DNA:n eristystä varten.....	19
6.2.1	Verinäytteet.....	19
6.2.2	Kudosnäytteet.....	19
7	ERISTETYN DNA:N LAADUNVARMISTUS.....	21
7.1	NanoDrop.....	21
7.2	Qubit.....	22
7.3	Agaroosigeelielektroforeesi	22
7.4	PCR.....	23
8	OPINÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE	25
9	TYÖN ETENEMINEN.....	26
9.1	Eristysmenetelmien valinta	26
9.1.1	Fenoli-kloroformiuutto	27
9.1.2	Qiagen	28

9.1.3	Agilent.....	29
9.2	Näytteiden esivalmistelut.....	30
9.3	DNA:n eristykset.....	31
9.4	Eristetyn DNA:n puhtauden ja pitoisuuden mittaus.....	33
9.5	Toimivan ja ehjän genomisen DNA:n toteaminen	34
10	TULOKSET	35
11	EETTISYYS JA LUOTETTAVUUS	41
12	POHDINTA.....	42
12.1	Tulosten pohdinta	42
12.1.1	NanoDrop-tulokset	42
12.1.2	Qubit-tulokset.....	43
12.1.3	Geielektroforeesi-tulokset.....	44
12.1.4	Muita huomioita käytetyistä eristysmenetelmistä	45
12.2	Kustannusvaikuttavuuden arviointi	46
12.3	Verinäytteiden säilyvyyden merkitys.....	47
12.4	Opinnäytetyön tarkoituksen ja tavoitteen arviointi.....	48
12.5	Tulosten luotettavuus ja eettisyys	48
12.6	Ammatillinen kasvu	49
LÄHTEET		51
LIITE 1: GENOMISEN DNA:N ERISTÄMINEN FENOLI-KLOROFORMIUTOLLA		59
LIITE 2: GENOMISEN DNA:N ERISTÄMINEN QIAGEN:N MAGATTRACT HMW DNA REAGENSISARJALLA		62
LIITE 3: GENOMISEN DNA:N ERISTÄMINEN AGILENT:N RECOVEREASE DNA ISOLATION REAGENSISARJALLA		66
LIITE 4: TULOKSIA.....		68
LIITE 5: KUVALUETTELO.....		69

Sanasto

BRCA = Kasvunrajoitegeeni, joka osallistuu DNA vaurioiden korjaamiseen

DPBS = Fosfaatti-puskuroitu suolaliuos (Dulbecco's phosphate-buffered saline)

Dissekoida = Leikellä

DNA = Deoksiribonukleaasihappo

DNA-fragmentti = Lyhyt jakso DNA-juostetta

Eluoituminen = DNA:n jakautuminen tasaisesti liuokseen

Fluorofori = Kemiallinen yhdiste, joka emittoi valoa

Geeni = Perintötekijä eli DNA:n emäsjakso, joka sisältää ohjeen proteiinin valmistukseen

Genomi = Koko perintöaines, sisältää geenit ja proteiineja koodaamattomat DNA:n osat

Genominen DNA = Kromosomaalinen DNA; kromosomeiksi pakkautunut DNA

Karsinooma = Pahanlaatuinen kasvain

mtDNA = Mitokondriaalinen DNA; mitokondriossa sijaitseva DNA

Mutaatio = Vaurio DNA:ssa

Mutageeni = DNA:n vauriota aiheuttava tekijä

Oligonukleotidi = Muutaman nukleotidin mittainen nukleiinihappo

Paralleeli = Rinnakkainen

Sekvenssi = järjestys

Sekvensointi = emäsjärjestyksen selvittäminen

Substituutio = Korvautuminen

Templaatti = Malli-DNA, monistusreaktion kohde

TBE-puskuri = Tris-Boraatti-EDTA -puskuri

TE-puskuri = Tris-EDTA -puskuri

Transformaatio = Muuntuminen

1 JOHDANTO

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpätyyppi. Vuonna 2012 diagnosoitiin maailmanlaajuisesti lähes 1,7 miljoonaa uutta tapausta, joka käsittää yli 25 % kaikista syöpätapauksista. Suomessa rintasyöpä on ollut naisten yleisin syöpä vuodesta 1960 lähtien ja on jatkuvasti yleistynyt vuosikymmenten aikana. Vuonna 2013 diagnosoitiin 4831 uutta tapausta ja vuoteen 2020 mennessä uusien diagnoosien määrän arvioidaan nousevan lähes 6000 tapaukseen vuodessa. (Suomen syöpärekisteri 2010; Finnish Cancer Registry 2015; WCRF 2016.) Rintasyövän ennuste Suomessa kuuluu maailman parhaimpiin, jopa 89 % on elossa viiden vuoden kuluttua taudin toteamisesta. Tämän katsotaan johtuvan kattavan seulonnan, varhaisen toteamisen ja laadukkaan hoidon ansiosta. Vaikka syöpäsairauksien hoito on eräs nopeimmin kehittyvistä lääketieteen alueista, ei ole olemassa yhtä tehokasta hoitomuotoa joka toimisi kaikille. Viime vuosien lääkekehityksestä huolimatta kaikkia rintasyöpiä ei kyetä parantamaan. (Pfizer 2014a; Roche 2015a.)

Geneettisten tekijöiden on todettu sekä altistavan että suojaavan syövän kehittymistä. Tieto genomien variaatioista, genomien kattavien tutkimusten myötä, on antanut merkittävää tietoa muun muassa syövän sairastumisen riskeistä ja periytyvyydestä. Geenitutkimuksilla on pystytty selvittämään syöpäalttiuden molekyyligeneettistä taustaa ja saamaan näin lisätietoa sairastumisriskeistä. Tutkimusten toivotaan tulevaisuudessa johtavan sekä perinnöllisten että ei-perinnöllisten syöpien ennaltaehkäisyyn ja täsmähoitoon. (Aittomäki, Kääriäinen, Mecklin ja Palva 2013, 61.)

Syövän geneettisen luonteen vuoksi sen syntyä, diagnosointia sekä hoidon vaikuttavuutta voidaan selvittää tutkimalla muutoksia DNA:n emäsjärjestyksessä eli sekvenssissä. Ensimmäiset menetelmät DNA:n sekvensointiin ovat peräisin jo 1970-luvulta, jonka jälkeen kehitystyö on ollut jatkuvaa. Vuonna 2009 Pacific Bioscience toi markkinoille uuden Single Molecule Real-Time (SMRT) sekvensointimenetelmän, joka mahdollistaa, aiemmista menetelmistä poiketen, pitkien DNA-jaksojen sekvensoinnin. Menetelmällä voidaan keskimäärin sekvensoida 21 000 emäsparia yhdellä reaktiolla, joka taas mahdollistaa jopa kokonaisen geenin sekvensoinnin kerrallaan. Tällöin voidaan paremmin havaita sekvenssissä tapahtuvia laajoja muutoksia, kuten deleetiota, uudelleen järjestäytymistä tai liiallisia toistojaksoja. (Qiagen 2013 – 2015; Pacbio 2015a; LeBlanc ja Marra 2015.)

Aihe opinnäytetyölle saatiin Itä-Suomen yliopiston kliinisen patologian oppiaineelta. Tavoitteena oli selvittää, millä käytössä olleilla menetelmistä saadaan parhaiten eristettyä laadukasta genomista DNA:ta SMRT-sekvensointia varten. Tavoitteena oli tehdä laadukas pohjatyö mahdollisille tuleville jatkotutkimuksille.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli eristää ihmisen genomista DNA:ta viljellyistä soluista, sekä rintasyöpäpotilaiden verestä ja kudoksenäytteistä kolmea eri menetelmää käyttäen. Eristetyn DNA:n laatu määritettiin useilla eri laadunvarmistusmenetelmillä. Samalla tarkasteltiin mahdollisia näytteiden säilytysajan kestosta johtuvia vaikutuksia DNA:n laatuun, sekä eri menetelmien kustannusvaikuttavuutta.

2 RINTASYÖPÄ SAIRAUTENA

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä Suomessa, ja se on jatkuvasti yleistynyt viime vuosikymmenten aikana. Vuosittain siihen sairastuu noin 4800 henkilöä. Rintasyöpä alkaa tuntuvasti yleistyä 45 ikävuo- den jälkeen, mutta sitä esiintyy harvakseltaan myös alle 30-vuotiailla. Useimmiten potilaiden keski-ikä taudin toteamishetkellä on noin 60 vuotta. Vaikka rintasyöpään sairastuneiden määrä on kasvanut vuosien aikana huomattavasti, syöpäkuolleisuudessa on ollut vain vähäistä kasvua. Noin yhdeksän kymmenestä rintasyöpädiagnoosin saaneista on elossa viiden vuoden kuluttua taudin toteamisesta. (Suomen syöpärekisteri 2010; Joensuu ja Huovinen 2013, 595; Syöpäjärjestöt 2015a.)

Rintasyöpä on monisyinen sairaus, eikä sen synnylle ole yhtä yksittäistä tekijää. Hormonaalisten tekijöiden on kuitenkin katsottu lisäävän sairastumisriskiä. Myös perinnöllisyys, vaihdevuosi- iän jälkeinen ylipaino ja runsas alkoholin käyttö suurentavat riskiä. Periytyvä geenimuutos liittyy noin 5 %:iin suomalaisista rintasyöpätapauksista ja näistä noin 30 %:ssa muutos on BRCA1- tai BRCA2-geenissä. BRCA-geenien toiminta liittyy muun muassa DNA:n korjausmekanismeihin ja mutaation kantajilla on huomattavan suuri riski sairastua rintasyöpään. (Vehmanen 2012; Joensuu ym. 2013, 595; Syöpäjärjestöt 2015a.)

2.1 Rintasyövän kudostyyppit

Rintasyöpä luokitellaan kasvutapansa mukaan kahteen päätyyppiin: duktaaliseen ja lobulaariseen karsinoomaan ja näiden alatyyppeihin. Lisäksi tunnetaan useita harvinaisia rintasyöpätyyppejä. Duktaalinen eli tiehytperäinen karsinooma on yleisin rintasyöpätyyppi ja sitä esiintyy noin 70 % sairastuneista. Duktaalisisessa syöpämallissa syöpäsolut tunkeutuvat rintatiehyeen sisältä ympäröivään kudokseen. Jos syöpä ei ole vielä levinnyt kudokseen asti, käytetään siitä nimitystä duktaalinen karsinooma in situ (DCIS). Tämä luokitellaan rintasyövän esiasteeksi, eikä ole vielä varsinainen pahanlaatuinen kasvain. Toiseksi yleisin rintasyöpätyyppi on lobulaarinen eli rauhasperäinen karsinooma, jota esiintyy noin 10 - 20 prosentilla. Lobulaarisella rintasyövällä on suurempi taipumus esiintyä molemmissa rinoissa kuin duktaalisisella. Rintasyövän harvinaisempiin kudostyyppisiin kuuluvat papillaarinen, medullaarinen, musinoottinen ja tubulaarinen karsinooma. Harvinaisemmissa syöpätyypeissä ennuste on yleensä parempi kuin duktaalisisessa ja lobulaarisessa. (Joensuu ym. 2013, 601 – 602; Roche 2015a.)

2.2 Diagnostiikka, nykyhoito ja ennuste

Tyypillisin rintasyövän oire on kivuton kyhmy rinnassa. Rinnassa voi esiintyä myös erilaisia ihomuutoksia, epämääräistä pistelyä ja kipua, tai nännistä voi erittyä kirkasta tai veristä eritettä. Rintasyöpä voi olla myös täysin oireeton. Rintojen omatoiminen, säännöllinen tutkiminen on tärkeää, jotta syöpä havaittaisiin mahdollisimman varhaisessa vaiheessa. (Pfizer 2014a; Rintasyöpäyhdistys 2016.)

Mammografia eli rinnan röntgenkuvaus on kliinisen tutkimuksen ohella ensisijainen menetelmä rintasyövän diagnosoinnissa ja seurannassa. Kuvantamisen avulla voidaan todeta epänormaalit muutokset, kuten alkavat kasvaimet ja muut kudostyypit. Ultraäänitutkimuksella usein täydennetään muita

tutkimuksia, jos halutaan selvittää oireiden luonnetta tarkemmin. Radiologiset tutkimukset eivät yksin riitä diagnosoimaan sairautta, vaan syöpäepäily on vielä vahvistettava neulanäytteellä tai kirurgisella biopsialla. Kudoksenäytteen perusteella patologi pystyy määrittämään tarkemmin rintasyövän tyypin ja erilaistumisasteen. Patologi arvioi myös syövän mahdollisen leviämisen, kasvainsolukon hormoniherkkyyden sekä määrittää HER-2 -syöpägeenin mutaation. Kaikki nämä yhdessä antavat tietoa syövän luonteesta, sekä auttavat hoidon suunnittelussa. (Pfizer 2014a; Syöpäjärjestöt 2015a; Rintasyöpäyhdistys 2016.)

Leikkaus on tällä hetkellä rintasyövän ensisijainen ja yleisin hoitomenetelmä. Lisäksi tehdään vartijaimusolmuketutkimus, jossa selvitetään mahdollinen syöpäsolujen leviäminen kainalon imusolmukkeisiin. Leikkausmenetelmiä on useita ja niiden tavoitteena on saada poistettua syöpäsolut rinnan ja kainalon alueelta. Leikkauksessa voidaan käyttää tilanteen mukaan joko rinnan säästävää leikkausta tai koko rinnan poistoleikkausta, esimerkiksi kasvaimen suuren koon vuoksi. Leikkauksen jälkeen patologi tutkii poistetut syöpäkudokset, joista selvitetään rintasyövän tyyppi, levinneisyys, hormoniherkkyys ja HER2-status. Näiden tulosten perusteella potilaalle laaditaan yksilöllinen hoitosuunnitelma, jonka avulla pyritään tuhoamaan mahdolliset, jäljelle jääneet, syöpäsolut. Leikkauksen jälkeinen hoito voi jatkua sädehoidolla, solunsalpaajahoidolla (sytostaatti), hormonihoitolla, biologisilla hoidoilla tai näiden yhdistelmillä. Mikäli kyseessä on levinnyt rintasyöpä, potilasta hoidetaan mahdollisuuksien mukaan vain sytostaatilla, hormonihoidoilla tai biologisilla hoidoilla. (Pfizer 2014a; Roche 2016a; Roche 2016b.)

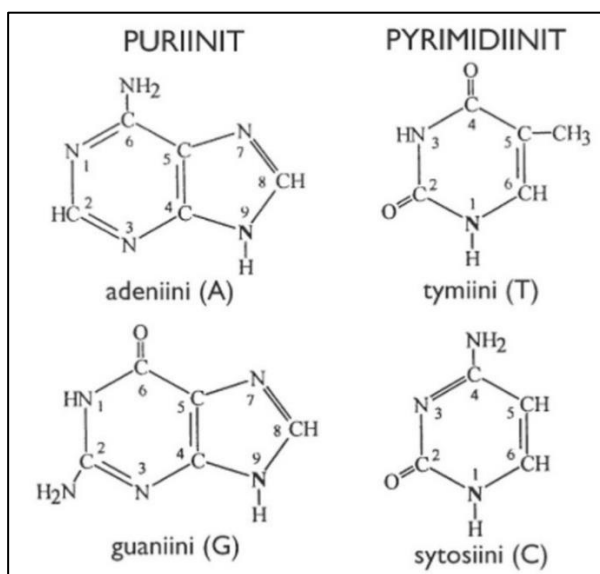
Rintasyövän ennuste paranee koko ajan varhaisemman diagnosoinnin, parempien hoitomenetelmien, sekä lääketieteellisen tutkimustyön ansiosta. Tällä hetkellä tärkein ennusteeseen vaikuttava tekijä on taudin löytyminen mahdollisimman varhain esimerkiksi seulontamammografiassa. Hoidon tehoa on kuitenkin vaikea arvioida, koska ennusteeseen vaikuttavat myös potilaan ikä, yleiskunto, syövän tyyppi ja levinneisyys. Viimeaikaiset tutkimukset ovat antaneet uutta tietoa syövän synnystä, kasvusta ja leviämisestä. Näitä tietoja on voitu hyödyntää uusien kohdennettujen lääkehoitojen eli niin sanottujen täsmälääkkeiden kehittämiseksi. (Pfizer 2014a; Pfizer 2014b; Rintasyöpäyhdistys 2016.)

3 DNA

DNA on perintöainesta, joka sisältää perintötekijät eli geenit. Jokainen ihmisen tumallinen solu sisältää genomia eli koko geeniperimän: 23 kromosomiparia, joissa on tiiviisti solun tumaan pakkautunutta DNA:ta. Tätä 3,3 miljardia emäsparia (ep) sisältävää DNA:ta kutsutaan genomiseksi tai kromosomaaliseksi DNA:ksi. Tämän lisäksi DNA:ta sisältävät solujen mitokondriot. Mitokondriaalinen DNA (mtDNA) koostuu 16 569 emäsparista. Molemmat DNA:t ovat kaksoisjuosteisia ja geenejä koodaavia, mutta muuten poikkeavat toisistaan rakenteeltaan, pakkautumiseltaan sekä proteiinisynteesiltään. Myös periytyvyydessä on eroa: kromosomiparit muodostuvat molemmilta vanhemmilta perityistä kromatideista, mutta mtDNA periytyy ainoastaan äidiltä. (Knuutila 2006, 31; Chial ja Graig 2008; Suominen, Pärssinen, Haajanen ja Pelkonen 2013, 13, 105.)

3.1 DNA:n rakenne

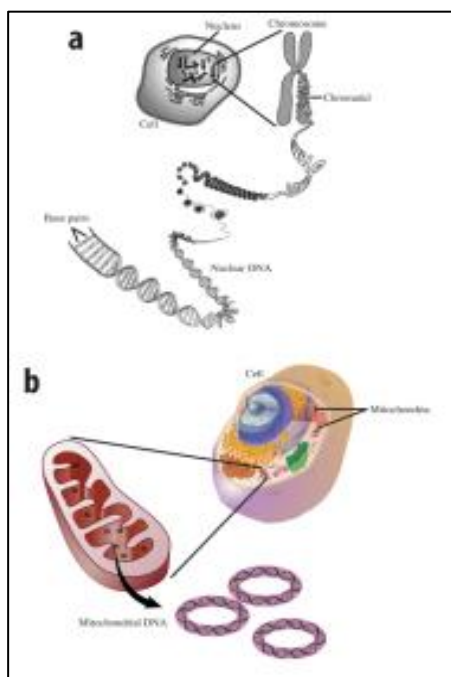
DNA koostuu nukleotidi-molekyyleistä, joiden rakenne muodostuu kolmesta osasta: viisihiilisestä monosakkaridista eli deoksiriboosista, fosfaattiryhmästä ja orgaanisesta emäksestä. Emäksiä on neljä erilaista: puriineihin kuuluvat adeniini (A) ja guaniini (G), sekä pyrimidiineihin kuuluvat tymiini (T) ja sytosiini (C) (kuva 1). (Suominen ym. 2013, 15 - 17.)



KUVA 1. DNA:n emäkset (Muokattu kuvasta: Suominen, Pärssinen, Haajanen ja Pelkonen 2010).

Nukleotidit sitoutuvat toisiinsa fosfaattiryhmästään ja muodostavat näin negatiivisen varauksen omaavan nukleinihappoketjun eli DNA-juosteen. Kaksoisjuosteisessa DNA-molekyylissä on kaksi tällaista juostetta kiinnittyneenä toisiinsa antiparalleelisesti eli vastakkaisuuntaisesti. Juosteet kiinnittyvät toisiinsa emästen välisillä vetysidoksilla emäspariutumissäännösten mukaisesti. Vetysidosten määrällä on merkitystä DNA-juosteiden sitoutumislujuuteen, esimerkiksi alukkeiden sitoutumisessa templaattiin eli malli-DNA:han PCR-reaktiossa. (Suominen ym. 2013, 16, 18 - 20.)

Kaksoisjuosteinen DNA-molekyyli kiertyy täyden kierroksen joka kymmenennen emäsparin kohdalla, jättäen emäkset kierteisen juosteen sisäpuolelle. Juoste jatkaa kiertymistä useiden eri proteiinien avulla nukleosomeiksi ja lopulta nukleosomit muodostavat kromatiinirihman. Kromatiinirihma pakkautuu edelleen tiiviisti muodostaen lopulta kromosomin. MtDNA ei pakkaudu kromosomeiksi, vaan kaksoiskierteinen DNA-juoste muodostaa rengasrakenteen, josta on kymmeniä kopioita vapaana mitokondrion matrixissa eli ydinosassa (Kuva 2). (Frilander 2006, 15; Knuutila 2006, 32; Solunetti 2006a; Chial ja Graig 2008.)



KUVA 2. Kaksoiskierteisen DNA:n muodot. a) Kromosomaalinen DNA. b) Mitokondriaalinen DNA. (The conceivable future 2016.)

3.2 Geenit

Lähes jokaisen solun tumassa on noin kahden metrin mittainen, tiivis, kromosomeiksi pakkautunut DNA-rihman, joka sisältää kaiken geneettisen informaation. Ihmisen DNA:n arvellaan sisältävän 20 000 - 25 000 toiminnallista yksikköä eli geeniä, joista 37:n tiedetään sijaitsevan mtDNA:ssa. Geenistä voidaan erottaa kaksi osaa: koodaava- ja säätelyalue. Koodaavan alueen intronit eli ei-koodaavat jaksot, jakavat proteiinisynteesiin tarvittavat eksonit eli koodaavat alueet, useampaan osaan. Yhden geenin eksonin pituus on keskimäärin 1500 ep, jonka intronit ovat tavallisesti jakaneet neljästä kymmeneen, 100 - 200 ep:n pituisiksi jaksoiksi. Intronien keskipituus yhdessä geenissä puolestaan on 3300 ep. Molemmissa on kuitenkin suurta koon vaihtelua geenien välillä. (Solunetti 2006b; Frilander 2006, 14 - 17; Chial ja Graig 2008.)

Geenin säätelyalueilla ei koodata geenituotteita, vaan niiden tarkoitus on ohjata geenien ilmentymistä eli ekspressiota. Ekspresion keskeisin säätelykohta on transkriptio, jossa DNA:n emäsjärjestys kopioidaan lähetti-RNA:n esiasteeksi. Säätelyalueet voidaan jakaa toimintojen perusteella kahteen pääalueeseen: promoottori- ja tehostaja-alueisiin. Molemmat alueet osallistuvat säätelyalueiden kahteen

päätehtävään: kromatiinirakenteen avaamiseen ja transkription aloitukseen tarvittavan aloituskompleksin muodostukseen. (Frilander 2006, 15, 17 - 22.)

3.3 Geneettisen informaation lukeminen

Säätelyalueisiin on kiinnittynyt useita erilaisia proteiineja, jotka osallistuvat yhdessä muiden säätelytekijöiden kanssa DNA:n pakkautumisen tiiviyteen. DNA:n tiiviydellä on suuri merkitys geenien aktivaatiossa. Liian tiiviiksi pakkautunutta DNA:ta ei transkription aloituskompleksiin kuuluva "lukijaentsyymi", RNA-polymeraasi, kykene lukemaan. Proteiinit aktivoivat geenin löysentämällä DNA:ta ja vastaavasti voivat hiljentää geenin tiivistämällä DNA:ta. Geenin aktivaatiossa, kromatiinirakenteen avaamisen jälkeen, säätelyalueen vapaalle promoottorialueelle muodostuu ekspressioon tarvittava transkriptiokoneisto, jonka tehostaja-alue sitoo paikoilleen. Varsinaisen transkription aloittamiseen tarvitaan vielä aktivaattoriproteiinin ja RNA-polymeraasin fyysinen proteiini-proteiinikontakti. (Frilander 2006, 18 - 22.)

Transkriptiossa kromosomaalisen DNA:n koodaavan alueen informaatio kopioituu transkriptiokoneiston avulla esiaste-RNA:ksi. Esiaste-RNA sisältää kaiken koodaavan alueen informaation: intronit ja eksonit. RNA:n päämäärässä, sytoplasmassa tapahtuvassa translaatiossa, ei kuitenkaan tarvita kuin tieto eksoneista, joten esiaste-RNA muokataan tumassa lähetti-RNA:ksi. Muokkauksen tavoitteena on saada virheetön lähetti-RNA translaatioon. (Frilander 2006, 18, 20, 22.)

Esiaste-RNA:n muokkaukseen lähetti RNA:ksi kuuluvat intronien poisto, cap-rakenteen liittäminen 5'-päähän ja poly-A-hännän synteysi 3'-päähän. Tärkein ja haastavin näistä on intronien poisto, jonka tekee spliseosomi. Spliseosomin tehtävä on tunnistaa ja poistaa tarkasti kaikki intronit, mutta tarvittaessa sen on myös pystyttävä muuttamaan intronien ja eksonien rajoja, solun sisältä ja ulkoa tulevien signaalien mukaisesti. Yksikin virheellinen intronin poisto voi johtaa virheellisesti tai kokonaan toimimattomaan proteiiniin. Spliseosomit tunnistavat poistettavat intronit niiden päissä olevien emäsryhmien perusteella. Joskus pistemutaation aiheuttama muutos intronien päiden emäsjärjestyksessä voi johtaa intronin poistoon väärästä kohdasta. (Sariola ja Vuorio 1996; Frilander 2006, 22 - 23.)

Translaatiossa DNA:n geneettinen informaatio muutetaan muokatun lähetti-RNA:n avulla aminohapposekvenssiksi. Aminohapposekvenssi syntyy, kun lähetti-RNA:ta luetaan kolmen nukleotidin jaksoina, kodoneina. Monet proteiinit eivät pysty toimimaan suoraan aminohapposekvenssinä, vaan lopullisen muotonsa proteiini saa vielä erillisten muokausvaiheiden jälkeen. (Frilander 2006, 25, 28 - 29.)

4 SYÖVÄN GENETIIKKA

Syövän synty eli karsinogeneesi on monivaiheinen tapahtuma, jossa solun DNA:n vaurioituminen muuttaa normaalin solun pahanlaatuiseksi. Tämä ei tapahdu hetkessä, vaan vauriot kertyvät solun kasvua säätelevään järjestelmään vähitellen. (Isola ja Kallioniemi 2013, 15; Syöpäjärjestöt 2015b.) Normaleissa kudoksissa solut jakautuvat hallitusti ja tarkoin säädellysti tietyin väliajoin. Syöpä saa alkunsa, kun solujen jakaantumisen säätely häiriintyy ja solut muuttuvat syöpäsoluiksi. Tämä voi joutua esimerkiksi altistuksesta karsinogeneeneille eli syöpää aiheuttaville aineille. Näitä voivat olla kemialliset aineet, virukset tai säteily. Joissakin tapauksissa altistava DNA-vaurio voi olla myös periytyvä. Kasvain eli tuumori kehittyy hiljalleen, kun syöpäsolut jakaantuvat hallitsemattomasti lukuisia kertoja muodostaen lopulta ison ryhmittymän. Tuumori muuttuu pahanlaatuiseksi muututtuaan invasiiviseksi, jolloin syöpäsolut kykenevät tunkeutumaan tyvikalvon läpi ympäristöön. Metastaasit eli etäispesäkkeet syntyvät syöpäsolujen kulkeutuessa veri- tai imusuonistossa ja tunkeutuessa sieltä uuteen kasvupaikkaan, jolloin uusi kasvain alkaa kehittyä. (Lehto ja Stenbäck 2012b, 294; Roche 2015b.)

4.1 Karsinogeneesin vaiheet

Syövän kehittymisen ensimmäistä vaihetta kutsutaan initiaatioksi. Initiaatiossa DNA:ssa tapahtuva vaurio herkistää solun myöhemmille muutoksille. Useimmiten tämä vaihe kohdistuu proto-onkogeneeneihin eli esisyöpägeeneihin, sekä kasvunrajoitegeneeneihin, joiden tehtävänä on estää solujakautumista ja kasvaimen kehittymistä. Promootiolla tarkoitetaan seuraavaa vaihetta eli syövän kehittymisvaihetta, jossa kohdesolukon solunjakautumisaktiivisuus suurenee ja syövän synnylle ratkaisevat vauriot syntyvät. Kolmas keskeinen syövän kehittymisen vaihe on progressio eli taudin etenemisvaihe, jossa pahanlaatuiseksi muuttunut solukko muuttuu edelleen yhä pahanlaatuisemmin käyttäytyväksi. Vaurioituneet solut alkavat lisääntymään kontrolloimattomasti saavuttaen lopulta kyvyn lähettää etäpesäkkeitä. (Isola ym. 2013, 13, 20.)

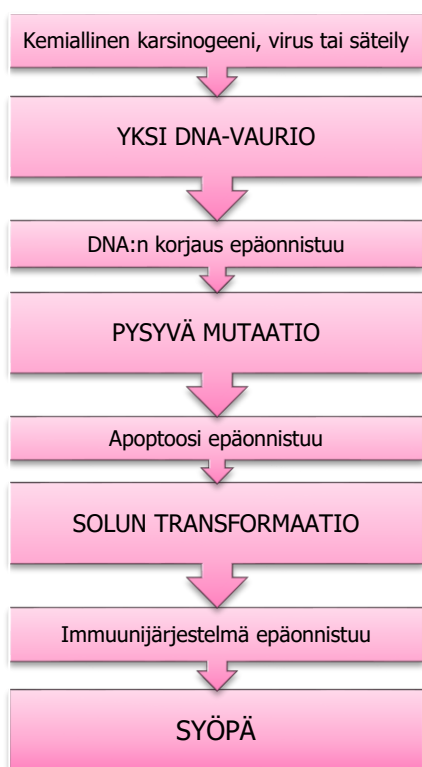
4.2 Mutaatiot

Keskeistä syövän synnyssä ovat erilaiset mutaatiot eli pysyvät DNA-vauriot, joita voi tapahtua sekä spontaanisti että mutaatiota aiheuttavien tekijöiden eli mutageenien vaikutuksesta. Yksinkertaisin mutaatiotyyppi on pistemutaatio, jonka aiheuttaa yhden tai muutaman emäsparin muutoksen DNA-sekvenssiin. Jo yksi muutos DNA-jaksossa voi johtaa virheellisen proteiinin syntyyn ja sitä kautta onkogeenin eli syöpägeenin aktivoitumiseen ja kasvunrajoitegeenin toiminnan lakkaamiseen. (Isola ym. 2013, 16, 19; Boren 2015; Hammack 2016.)

Pistemutaatiot jaetaan kahteen pääluokkaan: emäsparien substituutioihin tai lukukehysmutaatioihin. Substituutiot puolestaan jaetaan kolmeen eri vaihtoehtoon: missense, nonsense ja hiljaiseen mutaatioon. Missensemutaatio muuttaa aminohapon joksikin toiseksi aminohapoksi, jolloin geenin koodi muuttuu. Vaikutukset proteiiniin voivat olla arvaamattomia, esimerkiksi verisolujen muoto voi muuttua epänormaaliksi. Vaikutukset voivat olla yhtäläillä myös neutraaleja. Jos mutaation seurauksena koo-

dista tulee lopetuskoodi (stop codon), puhutaan Nonsense-mutaatiosta. Koska tämän kaltaiset mutaatiot luovat lopetuksen normaalisti toimivan geenin keskelle, tuloksena on lähes aina ei-toimiva geeni. Hiljaiseksi- tai nollamutaatioksi kutsutaan emäsparin muutosta, jolla ei ole muutosta geenin tuottamaan proteiiniin. Lukukehystä muuttavalla mutaatiolla puolestaan tarkoitetaan yhden tai kahden emäsparin häviämistä (deleetio) tai lisäystä (insertio) geenissä. Silloin lukukehys muuttuu niin, että syntyvän proteiinin aminohappojärjestys poikkeaa normaalista. Siksi tämän tyyppisillä mutaatioilla on tuhoisimmat vaikutukset kuin substituutiolla. Mutaatioita voi esiintyä myös kromosomitasolla, jolloin on kyse suuremmista muutoksista, kuten esimerkiksi translokaatiosta. Translokaatiossa perintöainesta siirtyy kahden tai kolmen kromosomin välillä, jonka seurauksena voi sairastua esimerkiksi leukemiaan. (Solunetti 2006e; Lehto ja Stenbäck 2012a, 81; Hammack 2016.)

Vaikka mutaatioita syntyy elimistössä kaiken aikaa, vain harva niistä johtaa varsinaisen syövän kehittymiseen. Syntynyt mutaatio voi tappaa solun, jolloin vauriolla ei ole pitkäaikaisia vaikutuksia tai vaurio voi osua DNA-jaksoon, jolla ei ole vaikutusta kyseisen solukon toimintoihin. Metastaaseja muodostavan syöpäkasvaimen kehittymiseen ei myöskään riitä yksi mutaatio, vaan sen syntyyn vaaditaan useita DNA-vaurioita. Elimistöllä on myös erilaisia DNA-vaurioiden korjaukseen tarkoitettuja mekanismeja, jotka havaitsevat virheelliset emäkset, leikkaavat ne pois ja palauttavat emäsjärjestyksen alkuperäiseen muotoonsa. Nykytiedon mukaan näiden korjausmekanismien pettäminen onkin keskeinen tekijä syövän synnyssä. (Isola ym. 2013, 17.) Syövän syntyyn vaikuttavat lisäksi syöpäsolukon kyky välttää apoptoosi (ohjattu solukuolema), solujen muuntuminen pahanlaatuisiksi, immuunijärjestelmän epäonnistuminen, solujen suurentunut jakautumisnopeus ja lopulta syöpäkasvaimen kehittyminen (Kuvio 1) (Vähäkangas ja Kosma 2012, 123).



KUVIO 1. Syövän synty. (Muokattu kuvasta: Vähäkangas ym. 2012, 118).

5 DNA:N SEKVENSOINTIMENETELMÄT

Sekvensoinnilla tarkoitetaan DNA-molekyylin nukleotidien emäsjärjestyksen selvittämistä. Ensimmäiset sekvensointimenetelmät kehiteltiin jo 1970-luvulla ja siitä lähtien menetelmien kehittyminen on vienyt genomitutkimusta eteenpäin. Vuosikymmenten aikana on opittu paremmin ymmärtämään geenien toimintaa, DNA:n ja proteiinien vuorovaikutusta sekä genomien vaikutusta tauteihin. Menetelmien kehittyminen on lyhentänyt menetelmien käyttöön tarvittavaa aikaa ja sitä kautta myös kustannusvaikeus on parantanut. Menetelmät voidaan luokitella ensimmäisen, toisen ja kolmannen sukupolven sekvensointimenetelmiin. (McCarthy 2010; Schadt, Turner ja Kasarskis 2010; Green 2016.) Vaikka sekvensointitekniikat ovat kehittyneet jatkuvasti, uudet menetelmät eivät ole syrjäyttäneet edeltäjiänsä, vaan jokaiselle menetelmälle on muokkautunut oma käyttöalueensa. Sekvensointimenetelmän valintaan vaikuttaa haluttu suoritusteho ja tarkkuus, sekä sekvensoitavan DNA-juosteen pituus. (Thermo Fisher Scientific 2015c.)

5.1 Ensimmäisen sukupolven sekvensointimenetelmät

Ensimmäisen sukupolven menetelmiä on kaksi, jotka molemmat kehitettiin 1970-luvun loppupuolella: Sangerin menetelmä sekä Maxamin ja Gilbertin menetelmä (Pareek, Smoczynski ja Tretyn 2011). Maxamin ja Gilbertin kehittämällä kemiallisella menetelmällä pystyttiin selvittämään noin 100 emäksen pituisen juosteen rakenne (Maxam ja Gilbert 1977). Sangerin menetelmän perusrunko on edelleen käytössä ja siinä käytetään templaattina yksijuosteista DNA:ta. Menetelmällä voidaan nykyään selvittää 800 - 1000 emäksen pituisen juosteen rakenne. Sangerin menetelmän etuna on sen tehokkuus lyhyiden DNA-juosteiden sekvensoinnissa. Menetelmä on tarkka ja nopea, jolloin analyysikohtainen hinta on myös edullinen. Sangerin menetelmää käytetäänkin usein varmentamaan tai täydentämään ensin toisella menetelmällä kohdennettua aluetta. (Schadt ym. 2010; Thermo Fisher Scientific 2015c.)

5.2 Toisen sukupolven sekvensointimenetelmät

2000-luvun alussa kehitettiin toisen sukupolven menetelmät, joilla pystytään sekvensoimaan suurempia määriä DNA-molekyylejä, suuremmalla suorituskvyyllä, paralleelista eli rinnakkaisesti. Menetelmillä pystytään selvittämään satoja miljoonia sekvenssejä nopeasti, sekvenssien jäädessä kuitenkin lyhyiksi, vain 35 - 600 emäksen mittaisiksi juosteiksi. Menetelmien heikkoudeksi muodostui sekvenssien lyhentymisen lisäksi tarkkuuden huonontuminen Sangerin menetelmään verrattuna. (Schatz, Delcher ja Salzberg 2010; Schadt ym. 2010; Russnes, Navin, Hicks ja Borresen-Dale 2011; LeBlanc ja Marra 2015.)

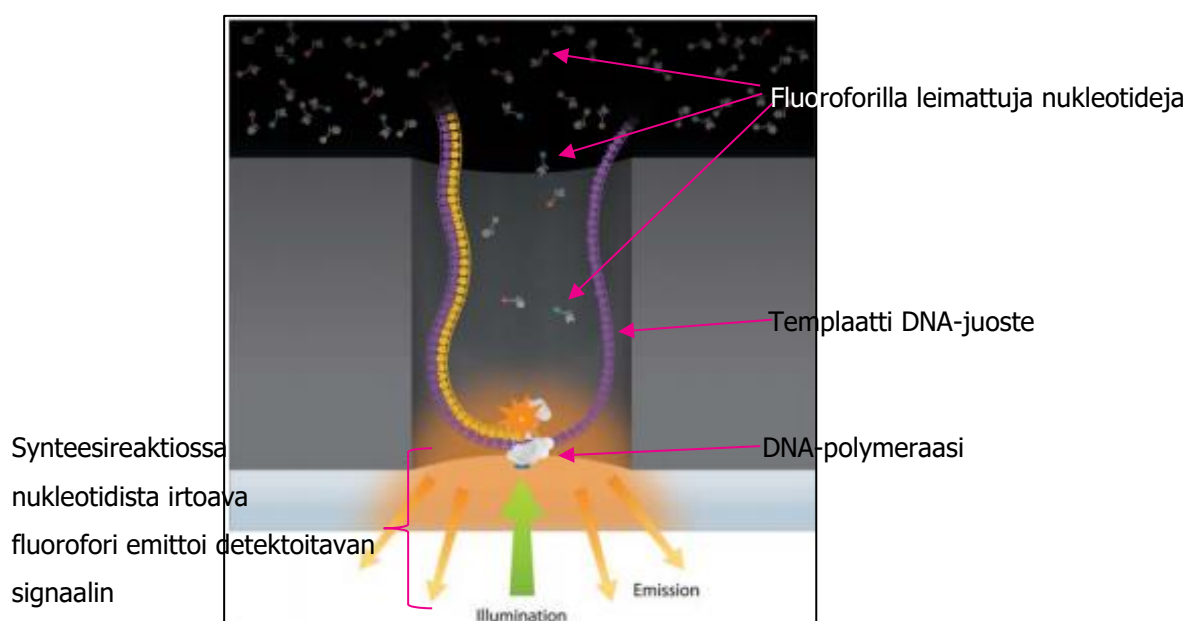
Toisen sukupolven menetelmistä käytetyin on syklinen ryhmäsekvensointi -menetelmä, jossa kymmeniä tuhansia, keskenään identtisiä DNA-fragmentteja kiinnittyy kopioitavaksi. Käsitteltävää dataa voi yhdessä analyysissä tulla jopa 300 gigaemäksen verran, jolloin tiedon käsittely ja kokoaminen muodostuvat haastavaksi. Kun halutaan tietoa useista geneista yhtä aikaa ja nopeasti, käytetään

toisen sukupolven menetelmiä. Näitä menetelmiä käytetään muun muassa eksonien sekvenssin tutkimiseen, josta saatua tietoa voidaan hyödyntää esimerkiksi taudinaiheuttajien tunnistamisessa. (Schadt ym. 2010; Thermo Fisher Scientific 2015c.)

5.3 SMRT-sekvensointimenetelmä

Ensimmäisen ja toisen sukupolven sekvensointimenetelmissä DNA pilkkotaan fragmenteiksi sekvensointia varten tai se fragmentoituu sekvensoinnin aikana, jolloin sekvensoidut jaksot jäävät lyhyiksi. Uutta menetelmää, jossa sekvensoidaan yhtä DNA-molekyyliä kerrallaan, ilman DNA:n pilkkomista tai pilkkoutumista, voidaan kutsua kolmannen sukupolven menetelmäksi. Kolmannen sukupolven menetelmä terminä ei ole kuitenkaan vielä täysin vakiintunut. Yksi uusista menetelmistä on Single Molecule, Real-Time -sekvensointitekniikka (SMRT), jonka Pacific Biosciences kehitti vuonna 2009. Menetelmä mahdollistaa keskimäärin 21 000 emäksen pituisen DNA-juosteen sekvensoinnin. (LeBlanc ja Marra 2015.)

SMRT-sekvensointimenetelmässä hyödynnetään ZMW (zero-mode waveguide) -kammioita ja fosfaattiosastaan leimattuja nukleotideja. Menetelmässä DNA-juoste ja DNA-polymeraasi muodostavat kompleksin, joka kiinnitetään kuopan pohjassa olevaan ZMW-kammioon biotiinin ja streptavidiinin avulla. Kuoppaan lisätään kaikkia neljää eri nukleotidia, joista jokainen on leimattu omalla fluoroforilla. Leimatut nukleotidit kulkeutuvat kammioon ja kiinnittyvät entsyymaattisesti, emäspariutumissäännön mukaisesti, templaatti-DNA-juosteeseen. ZMW-kammiossa on vain kymmeniä nanometrejä halkaisijaltaan oleva reikä, jonka kautta valo ohjautuu entsyymireaktioon. Nukleotidin kiinnittyessä millisekunnin aikana fluorofori vapautuu ja ohjatun valon osuessa fluoresoivaan väriin, emittoituu detektoitava signaali (kuva 3). ZMW-kammiot mahdollistavat näin yhden nukleotidin synteesi-reaktio-signaalin seuraamisen reaaliajassa. Yhdessä kuopassa on tuhansia ZMW-kammioita, joissa reaktiot tapahtuvat paralleelista. (Schadt ym. 2010; PacBio 2015 - 2016.)



KUVA 3. Kuvassa on kuvattu yksi tuhansista SMRT-kuopan pohjalla olevista ZMW-kammioista. (Muokattu Schadt ym. 2010).

SMRT-tekniikassa on yhdistettynä ja paranneltuna ensimmäisen ja toisen sukupolven parhaat puolet (taulukko 1). SMRT-tekniikka mahdollistaa pidemmät sekvensoidut juosteet nopeammin, tarkemmin ja pienemmillä kustannuksilla. Tiedon kokoaminen lyhyistä sekvensoiduista juosteista voi olla haastavaa, varsinkin, jos jokin alue on sekvensoitunut huonosti tai jäänyt kokonaan sekvensoitumatta. Tällöin on mahdollista, että jokin tieto jää saamatta, kokoaminen vie aikaa ja tarvittaessa sekvensointi täytyy uusida. Pitkät sekvensoidut juosteet mahdollistavat paremmin monimutkaisten rakenneaurioiden huomaamisen DNA:ssa. SMRT-sekvensointi-tarkkuus on myös todettu luotettavaksi, jopa 99,999 % luotettavuus. Kustannusvaikuttavuutta antaa menetelmän nopeus, jopa 1 - 3 nukleotidin sekvenssi sekunnissa. (McCarthy 2010; Roberts, Carneiro ja Schatz 2013.)

TAULUKKO 1. Sekvensointimenetelmien eroja. (Schadt ym. 2010)

	1. sukupolvi	2. sukupolvi	SMRT-tekniikka
Sekvensoitujen juosteiden pituus	800 – 1000 ep	300 ep	1000 – 21 000 ep
Sekvensointireaktiosta tulokseen kuluva aika	tunteja	päiviä	tunteja
Resoluutio eli erotuskyky	Useiden kopioitujen DNA-molekyyllisekvenssien keskiarvo	Useiden kopioitujen DNA-molekyyllisekvenssien keskiarvo	yhden DNA-molekyylin resoluutio
Kustannukset	korkea/emäs matala/analyysi	matala/emäs korkea/analyysi	matala-keskiarvo /emäs matala/analyysi

5.4 Sekvensointimenetelmien hyödyntäminen syöpätutkimuksessa

Toisen sukupolven menetelmiä voidaan hyödyntää erilaisten mutaatioiden selvittämisessä. Leary, Kinde, Diehl, Schmidt ja Clouser ym. (2010) selvittivät omassa tutkimuksessaan translokaatioita peräsuoli- ja rintatuumoreista. Shah, Morin, Khattra, Prentice ja Pugh ym. (2009) puolestaan tutkivat pistemutaatioita lobulaarisista rintasyövistä. Sekvensointimenetelmistä on myös hyötyä syövän hoidon seurannassa, esimerkiksi on tutkittu kemoterapian hyödyllisyyttä huonoennusteisten rintasyöpien hoidossa (Lips, Michaut, Hoogstraat, Mulder ja Besselink ym. 2014). Mantere, Winqvist, Kauppila, Grip ja Jukkola-Vuorinen ym. (2016) puolestaan hyödynsivät omassa tutkimuksessaan sekä ensimmäisen, että toisen sukupolven menetelmiä täydentämään ja varmistamaan saatuja tutkimustuloksia, tutkiesaan rintasyövän periytyvyyttä Suomen väestössä.

SMRT-tekniikkaa voidaan hyödyntää syövän tutkimisessa monin eri tavoin. Flusberg, Webster, Lee, Travers ja Olivares ym. (2010) hyödynsivät omassa tutkimuksessaan SMRT-menetelmää havaitsemaan kemiallisia DNA-metylaatioita. DNA-metylaatiolla tarkoitetaan metyyliryhmän kiinnittymistä DNA:n sytosiininukleotidiin, joka on aivan normaali tapahtuma läpi koko elämän. Syöpäsoluissa metylaatio kuitenkin vääristyy geenien eri alueilla, hypo- tai hypermetylaationa. (Tieva ja Peltomäki 2012.)

6 DNA:N ERISTÄMINEN

Jotta ihmisen tai muun organismin perimää voidaan tutkia, täytyy DNA saada erilleen solun muista rakenteista. Tätä menetelmää kutsutaan DNA:n eristämiseksi, joka on yksi geeniteknikan eli yhdistelmä-DNA-tekniikan keskeisimmistä menetelmistä. DNA:ta voidaan eristää useista eri lähtömateriaaleista, kuten kudoksista, viljellyistä soluista tai kokoverestä. Ennen DNA:n jatkokäsittelyä, se tulee puhdistaa huolellisesti kaikesta muusta materiaalista, kuten rasvasta tai proteiinista. Eristettyä DNA:ta voidaan hyödyntää monia eri tarkoituksia varten, kuten monistaa sitä polymeerasiketjureaktiolla eli PCR-laitteella, sekvensoida, tai muokata erilaisten entsyymien avulla ja liittää uuteen isäntäsoluun. (Pärssinen, Suominen ja Haajanen 2012, 156; Suominen ym. 2013, 103, 105.)

DNA:n eristykseen on olemassa useita eri vaihtoehtoja: perinteisestä fenoli-kloroformi -menetelmästä lukuisiin erilaisiin kaupallisiin reagenssisarjoihin. Reagenssisarjat valitaan eri lähtömateriaalien (esimerkiksi kudokset/bakteerit), eristettävän DNA-typin (kromosomaalinen DNA/plasmidi-DNA), sekä mahdollisesti myös halutun DNA-määrän ($\mu\text{g}/\text{mg}$) mukaisesti. Menetelmien tarkoituksena on saada pilkottua solun osat: kalvot, proteiinit ja muut DNA:ta suojaavat rakenteet niin, että DNA vapautuu kudoksesta. Tämän jälkeen liuksesta poistetaan kaikki muut tarpeettomat molekyylit. (Ulmanen, Tenhunen ja Yläne 2009, 34 – 35; Pärssinen ym. 2012, 157; Suominen ym. 2013, 105.)

6.1 Genomisen DNA:n eristys ja puhdistus

Genominen DNA muodostaa koko organismin geneettisen informaation. Genomi-DNA:n molekyylit ovat yleensä suurikokoisia, mutta molekyylin koko, kromosomien lukumäärä ja DNA:n luonne vaihtelevat paljon eri organismien välillä. Kaikilla organismeilla, viruksia lukuun ottamatta, genominen DNA on kaksijuosteista. Eukaryooteilla suurin osa genomisesta DNA:sta sijaitsee tumassa (nukleaarinen dna), mutta osa siitä sijaitsee myös mitokondrioissa. Genomista DNA:ta tarvitaan muun muassa sekvensoinnissa ja siirtogeenisten mutaatioiden määrittämisessä. Ehdoton perusedellytys kaikille genomisen DNA:n eristysmenetelmille on, että kaikki solujen ja soluelinten seinämät ja kalvot lyysautuvat eli hajoavat täydellisesti. Puutteellinen lyysaus heikentää saantoa merkittävästi. (Agilent Technologies 2016b; Qiagen 2016a.)

Sekvensointia varten eristetyn DNA:n tulee säilyä mahdollisimman ehjänä, jotta se olisi käyttökelpoista. Koska genomisen DNA:n rihma on pitkä, ohutta ja haurasta, katkeilee se helposti liian voimakkaan käsittelyn, kuten sekoituksen tai sentrifugoinnin vaikutuksesta. Useimmissa muissa geeniteknikan sovelluksissa, kuten PCR:ssä, DNA:n pilkkoutumisella taas ei ole niin suurta merkitystä. (Suominen ym. 2013, 105.)

Fenoli-kloroformiuutto korvataan nykyisin yhä useammin kaupallisilla DNA:n puhdistusmenetelmillä. Menetelmiä löytyy runsaasti erilaisia, eri käyttötarkoitukseen olevia ja lukuisilta eri valmistajilta. Menetelmät ovat nopeita, tehokkaita ja helppokäyttöisiä ja sisältävät kaiken tarvittavan materiaalin puhtaana ja suurikokoisemman DNA:n aikaansaamiseksi. Puhdistusmenetelmissä käytetään usein niin sanottua silikamenetelmää, joka perustuu nukleiinihappojen sitoutumiseen silikamatriksiin korkeassa

ionivahvuudessa ja kaotroopin eli biomolekyylejä hajottavan yhdisteen läsnä ollessa. Silikamatriksi on useimmiten sidottu mikroputken sisällä olevaan pieneen pylvääseen eli niin kutsuttuun spin-kolonneihin. Näin DNA saadaan helposti puhdistettua epäpuhtauksista sentrifugoimalla tai käyttämällä vakuumi-imulaitteita isompien näytemäärien kanssa. Puhdistettu DNA pystytään lopussa irrottamaan eluoimalla se puskuriliuoksella puhtaaseen vastaanottoputkeen. Silikamenetelmän etuna on käytettävyys erilaisille näytetyypeille, esimerkiksi totaali DNA:lle, PCR-tuotteelle tai agarosigeeliltä leikatulle ja liuotetulle DNA:lle. Puhdistuksen jälkeen DNA on heti käytettävissä kaikkiin sovelluksiin, mukaan lukien sekvensointi, mikrosiruanalyysit, ligaatio- ja transformaatio-, restriktio-, leimaus, mikroinjektio-, PCR- ja *In Vitro* -menetelmät. Kaupallisten reagenssisarjojen huonona puolena on korkeampi näytetekoitainen hinta verrattuna perinteisiin manuaalisiin tekniikkoihin. (Suominen ym. 2013, 106 – 107; Qiagen 2016b.)

Toinen yleinen fenoli-kloroformiuuton korvaava menetelmä on magneettipartikeliteknologiaan perustuva DNA:n puhdistus. Tässä menetelmässä nukleiinihapot sidotaan silikamatriksin sijasta silikapäällystettyihin paramagneettisiin partikkeleihin, pesu- ja irroitusvaiheen tapahtuessa samalla periaatteella kuin spin-kolonnimenetelmässä. (Suominen ym. 2013, 107.)

6.2 Näytteiden säilytys genomisen DNA:n eristystä varten

Lähtömateriaalin laatu vaikuttaa eristetyn DNA:n laatuun ja saantoon. Paras tulos saadaan, kun eristetään DNA tuoreista kudoksista tai soluista. Jos näytteitä ei voida käsitellä heti keräyksen jälkeen, tulee ne säilyttää sellaisissa olosuhteissa, että DNA säilyisi ehjänä ja käyttökelpoisena. Genomisen DNA:n saanto yleensä heikkenee, jos näytteitä, erityisesti eläinten näytteitä, säilytetään liian korkeassa lämpötilassa (+2 - 8 °C) tai liian kylmässä (-20 °C) ilman esikäsitelyä. Lisäksi näytteiden toistuvaa jäädytystä ja sulatusta tulisi välttää, sillä se johtaa DNA:n pilkkoutumiseen. (Qiagen 2016a.)

6.2.1 Verinäytteet

Verinäytteisiin tulee lisätä antikoagulantti ennen säilytystä. Esimerkiksi näytteet, joihin on lisätty hepariinia tai EDTA:aa, voidaan säilyttää +2 - 8 °C:ssa muutaman päivän ajan tai -20 °C:ssa tai -80 °C:ssa joitakin viikkoja. Vaihtoehtoisesti verinäytteet voidaan käsitellä ACD-liuoksella (0,48 % sitruunahappoa, 1,32 % natriumsitraattia, 1,47 % glukoosia: 1 ml 6 ml:aan verta) ja säilyttää vähintään viiden päivän ajan +2 - 8 °C:ssa tai kuukauden ajan -20 °C:ssa. Pidempiaikaiseen säilytykseen suositellaan solujen tumien pakastusta -20 °C:ssa (Qiagen 2016a.)

6.2.2 Kudosnäytteet

Formaliinilla fiksoiminen eli kiinnittäminen ja parafiinilla petaaminen ovat hyviä menetelmiä kliinisten kudosnäytteiden pitkäaikaiseen säilytykseen. Nopeus, jolla biomolekyylit hajoavat tai muuntuvat, voi vaihdella kudostyypeittäin. Siksi kudokset on hyvä irrottamisen jälkeen kiinnittää mahdollisimman nopeasti. Kudoksen fiksoiminen tapahtuu formaliiniliuoksella, joka voi vaihdella koostumukseltaan. Tyypillisesti käytetään 10 % formaliinia, joka sisältää 3,7 % formaldehydiä ja 1 – 1,5 % metanolia. Formaliini

aiheuttaa kemiallisen reaktion, jolloin biomolekyylit kiinnittyvät. Paras mahdollinen tulos saadaan, kun käytetään neutraalipuskuroitua formaliiniliuosta, puskuroimattoman tai happaman liuoksen sijasta. Neutraali puskuri hidastaa formaliinin hajoamista, jonka hajoamistuotteiden uskotaan osaltaan haittaavan nukleiinihappojen laatua. Fiksattujen näytteiden pitkäaikainen säilytys ei kuitenkaan ole suositeltavaa, sillä formaliini voi aiheuttaa DNA:n kemiallisia muutoksia. (Qiagen 2016a.)

Kiinnityksen jälkeen kudoksenäytteet valetaan parafiiniin prosessissa, joka koostuu useista työvaiheista. Työvaiheiden tarkoituksena on poistaa näytteistä vesi ja kyllästää ne sen jälkeen parafiinilla. On tärkeää varmistaa että kudokset on kuivattu hyvin ennen kyllästämistä, sillä jäljelle jäänyt vesi voi aiheuttaa näytteen hajoamisen. Optimaalisin vaihtoehto DNA:n säilymisen kannalta, olisi käyttää lisäaineetonta, matalassa lämpötilassa sulavaa parafiinia. (Qiagen 2016a.)

Tuore kudos voidaan välittömästi jäädyttää ja säilyttää $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa tai nestetyypessä. Lyyosatut kudokset voidaan säilyttää sopivassa lyysepuskurissa joitakin kuukausia huoneenlämmössä. (Qiagen 2016a.)

7 ERISTETYN DNA:N LAADUNVARMISTUS

Luotettava DNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen on tärkeää monissa molekyylibiologian sovelluksissa. DNA:n saantoa pystytään määrittämään useilla eri menetelmillä, kuten mittaamalla absorbanssia, agaroosigeelielektroforeesilla tai käyttämällä fluoresoivia DNA:han sitoutuvia väriaineita. Tavallisin ja helpoin menetelmä DNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittämiselle on absorbanssin mittaaminen. (Qiagen 2016a; Promega 2016a.)

Spektrofotometriaa ja fluorometriaa käytetään yleisesti mittamaan genomisen DNA:n pitoisuutta. Spektrofotometrillä pystytään mittaamaan puhdasta DNA:ta mikrogrammoissa, eli DNA:ta joka ei sisällä proteiinia, fenolia, agaroosia tai RNA:ta. Fluorometria on puolestaan herkempi menetelmä, jolla pystytään määrittämään DNA-määriä jopa nanogramman tarkkuudella. (Qiagen 2016a.)

SMRT-sekvensoinnissa eristetyn DNA:n laatu on suoraan verrannollinen sekvensointitulokseen. Sekvensointiin tulevan DNA:n tulisi olla kaksoisjuosteista ja puhdasta denaturoivista ja liuottavista reagensseista, sekä alkuperäisestä lähtömateriaalista. Eristettyä DNA:ta ei myöskään saa altistaa korkeille lämpötiloille, useille pakastus-sulatus-sykleille tai koville pH:n vaihteluille (pH alle 6 tai yli 9), jolloin se säilyttää eheydensä ja toiminnallisuutensa. Tämän vuoksi PacBio suosittelee varmistamaan sekvensoitavan DNA:n puhtauden, konsentraation ja eheyden eri menetelmiä käyttäen. Puhtautta voidaan mitata käyttämällä NanoDrop spektrofotometriä, jolla saadaan suhdeluvut aallonpituuksilta 260/280 nm ja 260/230 nm. Konsentraation määrittämiseen suositellaan NanoDrop:n sijasta Qubit fluorometria, jolla saadaan selville kaksoisjuosteisen DNA:n pitoisuus. Kaksoisjuosteisen DNA:n toimivuuden toteutukseen käytetään PCR:ää. Eheys ja pituus voidaan puolestaan tarkistaa analysoimalla DNA-näyte agaroosigeelielektroforeesilla. Parhaassa tapauksessa geelillä näkyy yksi vahva vyöhyke, joka kertoo ehjästä DNA-juosteesta. (PacBio 2013.)

7.1 NanoDrop

DNA:n puhtaus ja konsentraatio voidaan määrittää mittaamalla sen absorbanssi spektrofotometrillä, esimerkiksi NanoDropilla. NanoDrop on laajalti käytetty mittaukseen tarvittavan pienen näytemäärän (1 µl) ja menetelmän helppouden vuoksi. Mittausmenetelmä perustuu DNA:n ja RNA:n nukleotidien absorbtioon 260 nm:ssa (A260). Jotta saadut lukemat olisivat käyttökelpoisia, A260-lukeman tulee olla välillä 0,1 – 1,0. Puhtaan DNA-liuoksen absorptio 1, aallonpituudessa 260 nm vastaa 50 µg/ml genomista DNA:ta. Tämä suhde toteutuu vain jos mittaus on tehty neutraalissa pH:ssa, siksi näytteet tulisi laimentaa laimeaan, lievästi emäksiseen suolaliuokseen (pH ~7,5), esimerkiksi Tris HCl:iin. (Qiagen 2016a & c.)

DNA:n absorboidessa 260 nm:ssa ja proteiinin 280 nm:ssa, saadaan absorbanssisuhde 260 nm/280 nm (A260/A280), joka kertoo arvion DNA:n puhtaudesta. Puhtaan DNA:n absorbanssien suhde näissä aallonpituuksissa on A260/A280=1,8 (mittauksessa 1,7 – 1,9). Jos näytteessä on proteiinikontaminaatio, se havaitaan helposti absorbanssisuhteen pienenemisenä esimerkiksi 1,6:een. Liian alhainen pH

näytteessä alentaa herkkyyttä proteiinikontaminaation havaitsemisessa. Myös fenolijäämät aiheuttavat absorbanssisuhteen alenemista. Absorbanssia puolestaan nostavat RNA, oligonukleotidit ja vapaat nukleotidit, jotka absorboivat 260 nm:ssa kaksoisjuosteista DNA:ta voimakkaammin. (Suominen ym. 2013, 111; Qiagen 2016a)

Nukleiinihappojen puhtautta voidaan määrittää myös absorbanssisuhteella A260/A230. Suhdeluku puhtaalle DNA:lle on yleensä suurempi, kuin vastaava A260/A280-arvo, noin 2,0 – 2,2. Epänormaalit arvot voivat olla merkinä näytteen tai eristysmenetelmän ongelmista. Huomattavasti alhaisempi suhde voi osoittaa DNA:n sisältävän epäpuhtauksia, jotka absorboivat 230nm:ssa, kuten EDTA tai fenoli. Liian korkeisiin arvoihin puolestaan voi johtaa nollanäytteen pipetointi likaiselle näytealustalle tai väärän nollanäytteen käyttö. Nollanäytteessä tulee myös olla sama pH ja vastaava ionivahvuus kuin näyteliuksessa. (Thermo Fisher Scientific 2016 a & b.)

NanoDrop–menetelmää voidaan soveltaa luotettavasti vain DNA:n puhtauden määrittämisessä. Menetelmä ei ole luotettava kaksoisjuosteisen DNA:n konsentraation mittaauksessa, koska näytteen mahdolliset epäpuhtaudet häiritsevät mittausta ja näin mitatut pitoisuudet saattavat jäädä huomattavasti odotettua pienemmiksi. (Yan, Lail, Williams, Gutierrez ja Wei 2014; HudsonAlpha 2016.)

7.2 Qubit

DNA:n pitoisuuden ja saannon mittaamiseen voidaan käyttää myös fluoresenssiin perustuvia menetelmiä, kuten Qubit-fluorometriä. Fluorometriset menetelmät ovat herkempiä kuin absorptioon perustuvat menetelmät, koska niillä pystytään mittaamaan spesifisesti vain tiettyä molekyyliä. Fluoresoivat väriaineet sitoutuvat selektiivisesti kaksijuosteiseen DNA:han ja värit emittoivat vain jos ovat sitoutuneena kohdemolekyyliin. Tämän vuoksi menetelmä soveltuu erityisesti pienten DNA-pitoisuuksien mittaamiseen. Qubitista saatujen pitoisuusarvojen avulla voidaan määrittää, paljonko DNA:ta pipetoidaan jatkoreaktioihin, kuten geelielektroforeesiin. Mikäli DNA-liuoksen kokonaistilavuus on tiedossa, voidaan laskennallisesti selvittää DNA:n kokonaissaanto. (HudsonAlpha 2016; Promega 2016a.)

7.3 Agarosigeelielektroforeesi

Geelielektroforeesi on hyvä ja nopea, ja edelleen yksi käytetyimmistä menetelmistä eristetyn ja puhdistetun genomisen DNA:n määrän ja laadun arvioimiseen. Menetelmä ei ole kovin tarkka, mutta se antaa silti riittävästi tietoa DNA:n eheydestä, koosta ja puhtaudesta. Menetelmässä näytteet tai siitä tehdyt laimennokset sekä standardit ajetaan agarosigeelillä, jolloin erikokoiset DNA-fragmentit erottuvat toisistaan vyöhykkeiksi. Vyöhykkeiden fluoresenssien voimakkuutta verrataan lopuksi tunnettuihin standardeihin. Menetelmä soveltuu myös erityisen hyvin pienten DNA-fragmenttien, esimerkiksi PCR-tuotteen havaitsemiseen: jopa 20 ng DNA:ta voidaan havaita agarosigeelielektroforeesilla. (Ulmanen ym. 2004, 36; Pärssinen ym. 2013, 160; Suominen ym. 2013, 110; Qiagen 2016a & c.)

Elektroforeesi perustuu erikokoisten molekyylien liikkumiseen tiheässä väliaineessa sähkökentän vaikutuksesta. Koska DNA-molekyylit ovat negatiivisesti varautuneita, ne liikkuvat sähkökentässä kohti

positiivista napaa. Agarosigeelin huokoinen rakenne hidastaa molekyylien liikkumista, jolloin suuret nukleiinihappopalat liikkuvat pieniä hitaammin ja ne erottuvat näin koon mukaisesti. Valmistettavan geelin pitoisuudella eli tiheydellä voidaan vaikuttaa DNA-fragmenttien erottuvuuteen. Korkeampi agarosin pitoisuus parantaa pienempien fragmenttien erottuvuutta, ja päinvastoin pienempi pitoisuus antaa paremman tarkkuuden ja erottelun suurikokoisimmille fragmenteille. Jos käytetään väärää agarosipitoisuutta, fragmentteja voi olla vaikea visualisoida luotettavasti. (Ulmanen ym. 2004, 36 – 37; Pärssinen ym. 2013, 161; Promega 2016a.)

Elektroforeesilla eroteltujen nukleiinihappojen visualisointi edellyttää interkalatoivan väriaineen käyttöä. Yleisimmin käytetty on etidiumbromidi (EtBr), joka sitoutuu DNA:han asettumalla emäsparien väliin. Kun geeliä valaistaan ultraviolettivalolla (UV), etidiumbromidi fluoresoi punaoranssina. DNA:han tarttuva etidiumbromidi on mutageeni ja syöpää aiheuttava yhdiste, jonka käsittelyssä on noudatettava erityistä huolellisuutta ja varovaisuutta. (Ulmanen ym. 2004, 36 – 37; Pärssinen ym. 2013, 161; Thermo Fisher Scientific 2015b; Promega 2016a.) Nykyisin etidiumbromidi voidaan korvata myös vähemmän haitallisilla nukleiinihappoväreillä, kuten fluoresoivalla GelRed:illä. GelRed on erittäin herkkä ja vakaa, sekä ympäristön kannalta turvallinen nukleiinihappoväriaine, joka on suunniteltu korvaamaan EtBr muun muassa kaksijuosteisen DNA:n värjäyksessä agarosigeelillä. Väri on myös huomattavasti herkempi kuin EtBr ja sillä on käytännössä myös sama spektri kuvantamisjärjestelmässä kuin etidiumbromidilla. (Biotium 2016.)

7.4 PCR

Fragmentoitunut DNA voidaan helposti havaita geielektroforeesilla, mutta esimerkiksi näytteen käsittely formaldehydillä voi aiheuttaa laajoja biomolekyylien muutoksia. Muutokset eivät ole ilmeisiä, jos tarkastellaan pelkkää DNA:n kokoa, mutta ne vaikuttavat DNA:n kykyyn toimia templaattina. Muutokset voivat olla niin huomattavia, että vain murto-osa DNA:sta on enää toimivaa. DNA:n toimivuus tulisikin testata käyttämällä polymeeraasiin perustuvaa määrittystä, kuten PCR:ää. (Thermo Fisher Scientific 2015a.)

Polymeraasiketjureaktiolla eli PCR:llä voidaan monistaa suuria määriä tarkkaan määrättyä DNA-jaksoa. Reaktiot tehdään yleensä pienissä ohutseinäisissä mikroputkissa tai kuoppalevyillä, joiden lämpötilaa säädellään tarkasti PCR-laitteella. Menetelmän peruseriaatteena on käyttää korkeaa lämpöä kestävää, DNA:ta monistavaa DNA-polymeraasientsyymiä, sekä tunnettuja alukkeita (primer), joilla rajataan monistettava DNA-alue ja jakson pituus. Templaattina toimii eristetty kaksoisjuosteinen DNA. Varsinaisten monistusreaktioiden ohella tehdään myös kontrollireaktiot, joiden avulla voidaan selvittää reaktioiden toimivuus ja mahdolliset reagenssien tai näytteiden kontaminaatiot. (Suominen ym. 2013, 153 - 156; Pärssinen ym. 2012, 179.)

PCR-reaktiot voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen. Ensimmäisessä vaiheessa eli alkudenaturaatioissa (taulukko 4), DNA templaatin juosteet saadaan erkanemaan toisistaan korkean lämpötilan avulla. Toinen vaihe sisältää kolmivaiheisia syklejä, yleensä 20 – 35 kpl, joissa vuorottelevat denaturaatio, aluk-

keiden kiinnittyminen juosteisiin, sekä DNA-polymeraasi -synteesi. Viimeisessä, loppupidennysvaiheessa varmistetaan kaikkien DNA-juosteiden polymerisoituminen loppuun saakka. Tämän jälkeen laite jäädyttää itsensä lopputuotteelle sopivaan säilytyslämpötilaan (+4 °C). (Solunetti 2006d.)

8 OPINÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyön tarkoituksena on eristää rintasyöpäpotilaiden genomista DNA:ta kokoveri- ja kudoksenäytteistä, sekä laboratorio-olosuhteissa viljellyistä rintasyöpäsoluista, kolmea eri menetelmää käyttäen. Tarkoituksena on myös määrittää eristetyn DNA:n laatua ja tarkastella mahdollisia näytteiden säilytysajan kestosta johtuvia vaikutuksia DNA:n laatuun. Työssä tarkastellaan myös eristysmenetelmien kustannusvaikuttavuutta.

Opinnäytetyön tavoitteena on saada selville millä menetelmällä saadaan eristettyä mahdollisimman pitkää ja laadukasta, SMRT-sekvensointi -menetelmän kriteerit täyttävää DNA:ta. Tavoitteena on tehdä laadukas pohjatyö mahdollisille tuleville jatkotutkimuksille.

9 TYÖN ETENEMINEN

Opinnäytetyö on kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus, jonka kokeellinen osuus koostui DNA:n eristyksestä kolmella eri menetelmällä sekä eristetyn DNA:n laadun ja puhtauden määryksistä. Eristykset tehtiin yhdellä menetelmällä kerrallaan, ensin viljellyistä rintasyöpäsoluista ja sen jälkeen kaikista kokoverinäytteistä. Viljellyistä soluista ja kokoverinäytteistä eristetystä DNA:sta tehtiin laadunmäärykset fotometrisin ja fluorometrisin menetelmin, sekä monistamalla DNA:ta PCR:llä. Lisäksi eristetty DNA ja PCR-tuotteet analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla. Laadunmääryksestä saatujen tulosten perusteella eristysmenetelmistä valittiin kaksi parasta menetelmää, joilla toteutettiin ainutkertaisten rintasyöpäkudosnäytteiden eristykset.

9.1 Eristysmenetelmien valinta

Erilaisia DNA:n eristysmenetelmien vertailuja on tehty tutkimusmaailmassa laajalti, mutta täysin samanlaista menetelmävertailua ei tieteellisistä artikkeleista löytynyt. Vertailuihin valittujen eristysmenetelmien valintaan vaikuttivat useat tekijät, kuten DNA:n laatu, sekä lähtömateriaalien samankaltaisuus ja säilytysolosuhteet. Lisäksi valintoihin vaikuttivat olemassa olevat laitteistot, sekä kustannusvaikuttavuus. Valintaan vaikuttaneiden tekijöiden moninaisuuden vuoksi eristysmenetelmien vertailujen vertailu osoittautui haastavaksi.

Perinteisen Fenoli-kloroformi -menetelmän toimivuudesta on tehty useita erilaisia tutkimuksia. Mirmomeni, Sajjadi Majd, Sisakhtnezhad ja Doranegard (2010) vertasivat tutkimuksessaan Fenoli-kloroformi uuttoa, DNA:n ulos-suolaus -menetelmää ja kaupallista reagenssisarjaa Qiagenilta (DNA mini kit), eristettäessä DNA:ta parafiinin valetuista kudosnäytteistä. Tutkimuksessa käytetyt kudosnäytteet olivat peräisin vatsan adeno karsinoomasta ja maksasolukarsinoomasta. Kaikki menetelmät osoittautuivat toimiviksi, eikä menetelmien välillä voitu osoittaa merkittävää eroa. Artikkelin kuvasta 1 voidaan kuitenkin nähdä, että Fenoli-kloroformi -menetelmällä on saatu hieman parempi saanto verrattuna muihin menetelmiin.

Di Pietro, Ortenzi, Tilio, Concetti ja Napolioni (2010) käyttivät Fenoli-kloroformi -menetelmää tutkissaan kokoveren soveltuvuutta genotyypitutkimuksiin pitkän säilytysajan jälkeen. Tutkimuksessa kokoveri oli kerätty ja pakastettu (-20 °C) 1980 – 1995 lukujen välisenä aikana. Tutkimustulosten perusteella kokoverta voidaan pitää genotyypitutkimuksissa pitkänkin säilytysajan jälkeen luotettavana tutkimusmateriaalina.

Opinnäytetyössä käytetyt kaupalliset eristysmenetelmät valittiin vertailemalla valmistajien (Thermo Fisher Scientific, Qiagen, Agilent ja Promega) antamia spesifikaatioita. Valittujen eristysmenetelmien tuli soveltua mahdollisimman suurikokoisen ja puhtaan genomisen DNA:n eristämiseen ja eristetyn DNA:n tuli soveltua sekvensointiin. Valintaan vaikuttivat myös eristysprotokollan pituus, käytettävien menetelmien hellävaraisuus DNA:lle sekä reagenssien turvallisuus käyttäjää kohtaan. Menetelmien tuli lisäksi sopia kaikille kolmelle eristettävälle lähtömateriaalille (veri, kudosa ja viljellyt solut). Selvitystyön

päätteeksi kokeelliseen osuuteen valittiin perinteinen Fenoli-kloroformiuutto, sekä kaupalliset reagenssisarjat Qiagenilta (MagAttract® HMW DNA) ja Agilentilta (RecoverEase DNA).

9.1.1 Fenoli-kloroformiuutto

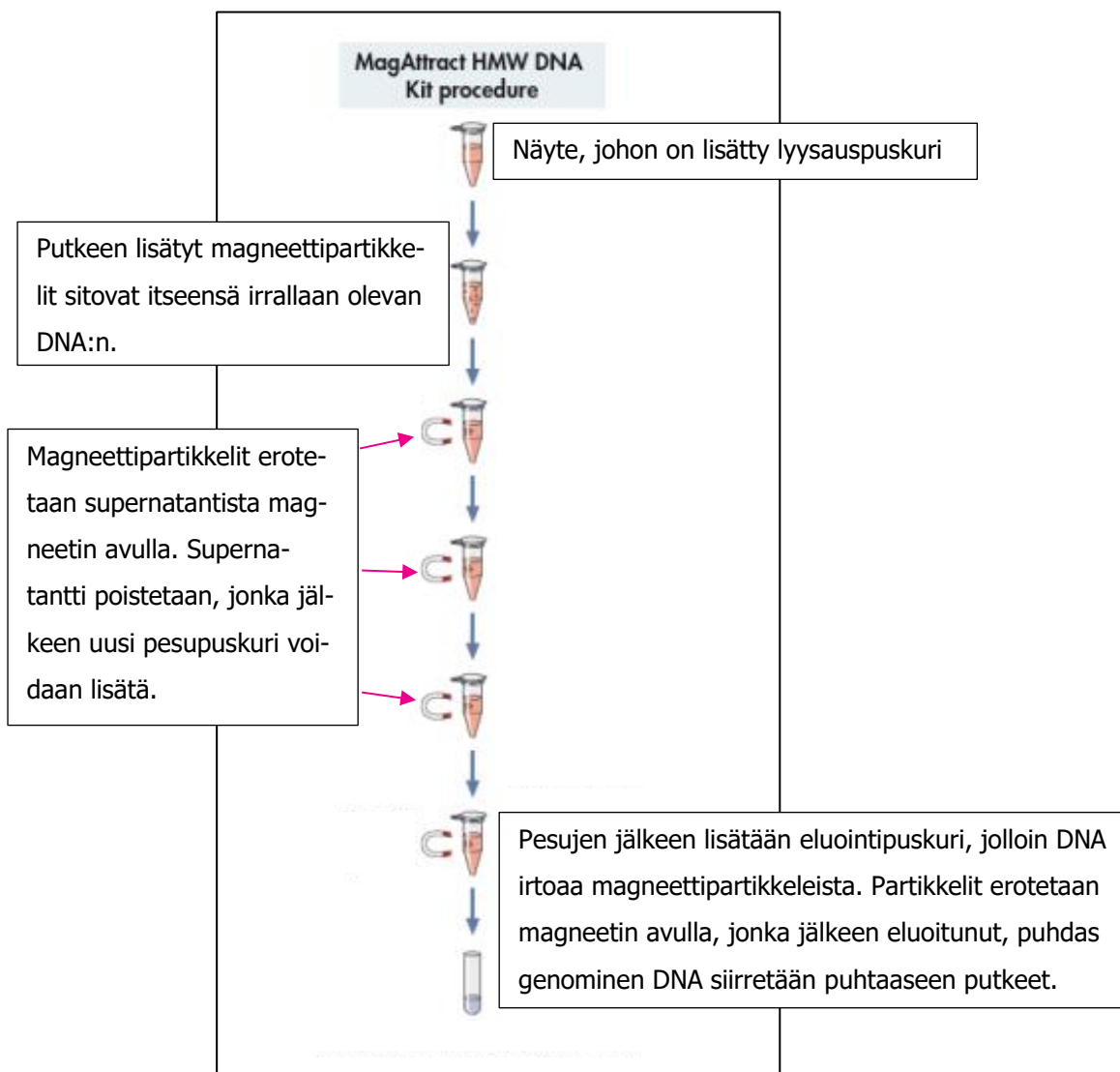
Fenoli-kloroformiuutossa genomisen DNA:n eristäminen aloitetaan yleensä homogenisoimalla kudospala tai keräämällä solut kokoverinäytteestä tai valmistetuista soluviljelmistä. Eristys aloitetaan hajottamalla ensin solut ja solun osat proteinaasi-K -entsyymillä EDTA:a ja SDS:a sisältävässä liuoksessa. EDTA:n eli etyleenidiamiinitetraetikkahapon tarkoituksena on estää DNAasi:a eli DNA:ta pilkkovaa entsyymiä toimimasta. SDS eli natriumlayryylisulfaatti on puolestaan detergentti, joka hajottaa soluseinää ja nukleiinihappojen proteiinikomplekseja sekä poistaa solukalvojen lipidejä. Tarvittaessa voidaan käyttää myös RNAasi-entsyymiä hajottamaan RNA:ta. (Suominen ym. 2013, 105; 108 – 109; Gaikwad 2016; Promega 2016b; Carleton College 2016.)

Solujen hajotuksen jälkeen DNA-liuos uutetaan varovasti fenoli-kloroformilla. Uuton tarkoituksena on puhdistaa DNA jäljellä olevista rasvoista ja proteiineista, jolloin nukleiinihapot jäävät vesiliuokseen ja epäpuhtaudet liukenevat fenoliin ja saostuvat. Tällä menetelmällä DNA kuitenkin väistämättä katkeilee jossain määrin. Uuton jälkeen vesifaasissa oleva DNA saostetaan etanolilla ja saostuneet DNA-rihmat kierretään varovasti steriiliin ja ohuen lasisauvan ympärille. Nukleiinihapot saostuvat vain suoloina, joten saostuksessa on oltava etanolin lisäksi läsnä myös jotakin kationia, esimerkiksi natrium-asetaatia. Tällä menetelmällä on mahdollista saada suurikokoista DNA:ta (100 - 200 kb). (Solunetti 2006c; Ulmanen ym. 2009, 35; Suominen ym. 2013, 105.)

Fenoli-kloroformi -menetelmää käytettäessä tulee kiinnittää erityistä huomiota työturvallisuuteen, koska menetelmässä tarvittavat fenoli ja kloroformi ovat molemmat myrkyllisiä ja molempien epäillään aiheuttavan perimävaurioita. Lisäksi kloroformin epäillään aiheuttavan syöpäsairauden vaaraa. (VWR 2014; VWR 2015.)

9.1.2 Qiagen

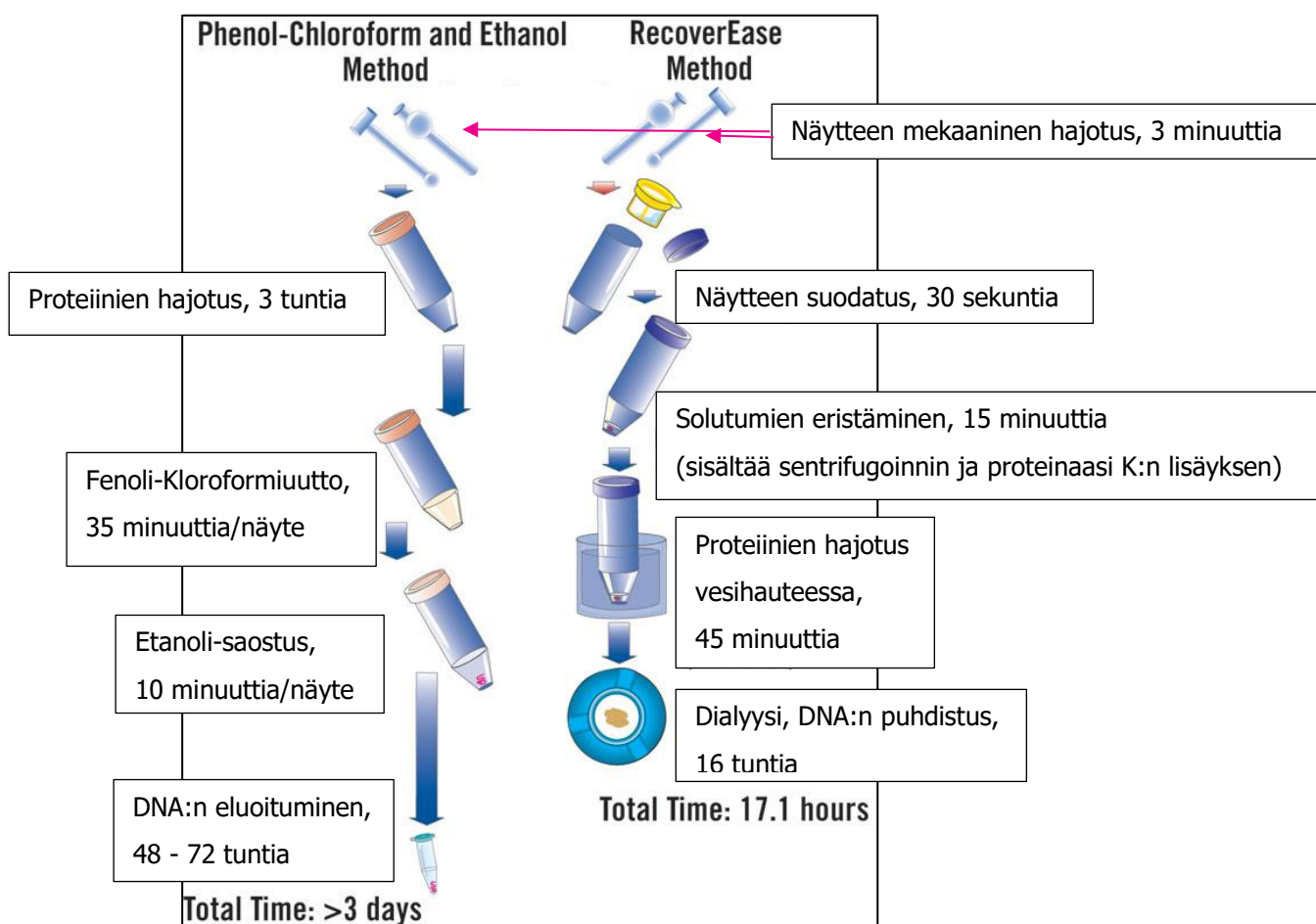
Qiagenin MagAttract® HMW DNA -reagenssisarja mahdollistaa suurikokoisen (100 – 200 kb) ja puhtaan genomisen DNA:n eristyksen käyttämällä yksinkertaista, magneettiin perustuvaa menetelmää (kuva 4). Menetelmässä on yhdistetty silikamenetelmän nopeus, tehokkuus ja magneettipartikkeleita hyödyntävä protokolla. Valmistajan mukaan magneetteihin perustuva tekniikka on hyvin selektiivinen ja minimoi DNA:n katkeilemisen, jolloin saadaan erittäin suurikokoista ja korkealaatuista DNA:ta. Qiagenin reagenssisarja soveltuu useille eri lähtömateriaaleille, kuten ihmisen tai eläimen kudokselle, kokoverelle tai bakteereille. Eristetty genomisen DNA sopii lukuisiin sovelluksiin, kuten genotyyppaus, DNA-kirjastot ja uuden sukupolven sekvensointi (NGS). (Qiagen 2014.)



KUVA 4. Qiagenin protokolla. Muokattu: Qiagen 2014. MagAttract® HMW DNA Kit Handbook.

9.1.3 Agilent

Agilentin RecoverEase DNA -eristys menetelmä perustuu lähtömateriaalin mekaaniseen hajotukseen, karkeaan suodatukseen, inkubointiin aktiivisen proteinaasin kanssa, sekä eristetyn DNA:n puhdistukseen yön yli kestäväällä dialyysillä. Valmistajan mukaan menetelmällä saadaan eristettyä suurikokoista (100 - 500 kb) genomista DNA:ta erilaisista eläinkudoksista tai kokoverestä (Rogers ja Dyciaico 2008; Agilent Technologies 2016a.) Menetelmän etuna on, ettei siinä tarvitse käyttää orgaanisia liuottimia tai tehdä etanolisaostusta, eikä käyttää liiallisia tai liian voimakkaita DNA:ta pilkkovia käsittelyitä. Lisäksi valmistajan mukaan menetelmä on nopeampi kuin perinteinen fenoli-kloroformiuutto (kuva 5). Dialyysin jälkeen genominen DNA on täysin eluoitunut, puhdas proteiineista ja suoraan käytettävissä eri sovelluksiin. (Agilent Technologies 2016a.)



KUVA 5. Agilentin eristysmenetelmä vs. Fenoli-kloroformi -uutto (Agilent Technologies 2016a).

9.2 Näytteiden esivalmistelut

Rintasyöpäpotilaiden kokoverinäyteputket, noin 10 ml/putki, (5 putkea 1990-luvulta ja 5 putkea 2014-luvulta) otettiin sulamaan huoneenlämpöön pitkäaikaisäilytyksestä (-80 °C). Sulaneet veret sekoitettiin varovasti kääntelemällä ja putkista otettiin erilleen näytteet eri eristysmenetelmiä varten. Yhdestä putkesta jaettiin 5 ml Fenoli-kloroformiuuttoa varten, 200 µl Qiagenin menetelmää varten ja 4 ml Agilentin menetelmää varten. Näytteet koodattiin niin, että samasta putkesta otetuilla näytteillä oli sama koodi eristysmenetelmästä riippumatta, esimerkiksi V1. Menetelmät erotettiin toisistaan liittämällä näytteen eteen menetelmän alkukirjain. Koodatut verinäytteet siirrettiin -20 °C:een odottamaan eristysvaihetta.

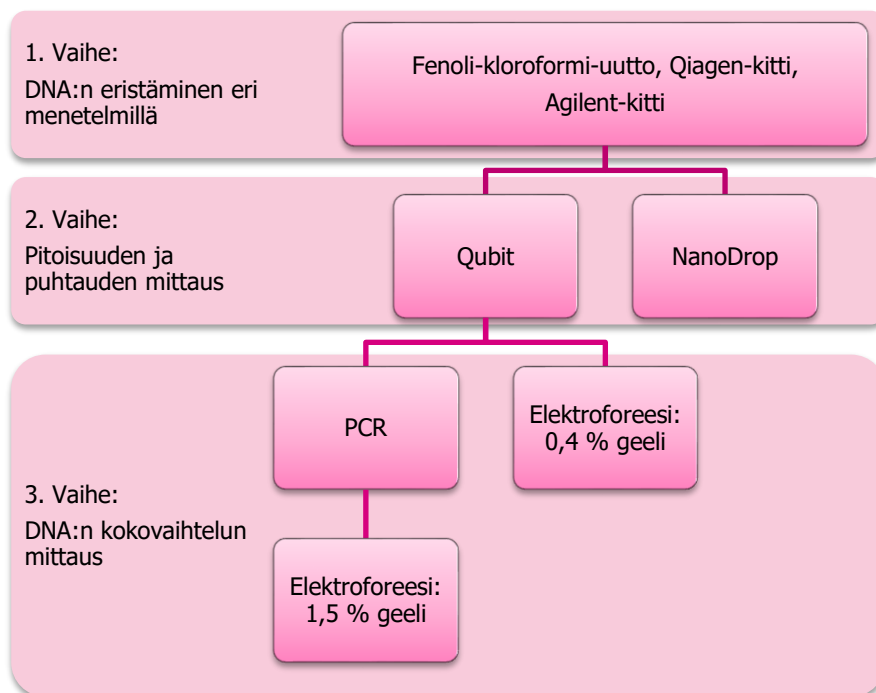
Laboratorio-olosuhteissa viljellyistä MCF-7 -rintasyöpäsoluista oli pakastettu valmiiksi solupelletit -80 °C:een. Solupellettien koko vaihteli 8 – 12 x 10⁶ solua/putki. Solupelletit koodattiin eristysvaiheeseen otettaessa koodilla "S1 - S12".

Rintasyöpäkudoksenäytteitä säilytettiin -80 °C:ssa. Kolmesta eri kudospalasta dissekoitiin kaksi rinnakkaista näytettä (~25 mg) eristystä varten. Kudospalojen sulamisen välttämiseksi dissekointi suoritettiin nestetyypellä jäädytetyn steriilin metalliastian päällä. Näytteet koodattiin ("K1 - K3") ja siirrettiin -20 °C:een odottamaan eristystä. Menetelmäkohtaiset näytemäärät ja näytteiden koodit on koottu taulukkoon 2.

TAULUKKO 2. Menetelmäkohtaiset näytemäärät (suluissa menetelmille ja näytteille annetut koodit)

	MCF- 7	1990-luvun veri	2014-luvun veri	Kudos
Fenoli-kloroformiuutto (F)	3 x 12 milj. solua (FS1 - FS3)	5 x 5 ml (FV1 - FV5)	5 x 5 ml (FV6 - FV10)	1. 26 mg (FK1) 2. 27 mg (FK2) 3. 31 mg (FK3)
	2 x 24 milj. solua (FS4 - FS5)			
	3 x 10 milj. solua (QS6 - QS8)	5 x 200 µl (QV1 - QV5)	5 x 200 µl (QV6 - QV10)	1. 22 mg (QK1) 2. 27 mg (QK2) 3. 27 mg (QK3)
Qiagen (Q)	(uusittu: 2 x 10 milj. solua QS9 - QS10)			
Agilent (A)	2 x 8 milj. solua (AS11 - AS12)	5 x 4 ml (AV1 - AV5)	5 x 4 ml (AV6 - AV10)	-

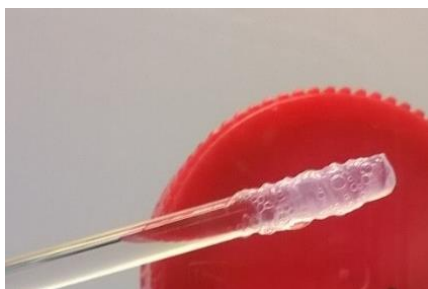
Qiagenin ja Agilentin menetelmien mukana tulleet englanninkieliset ohjeet käännettiin suomeksi ja muokattiin tarvittaessa tehdyn työn mukaisiksi (liitteet 2 ja 3). Esivalmisteluiden jälkeen työvaiheet etenivät kuvion 2 mukaisesti.



KUVIO 2. Työn eteneminen

9.3 DNA:n eristykset

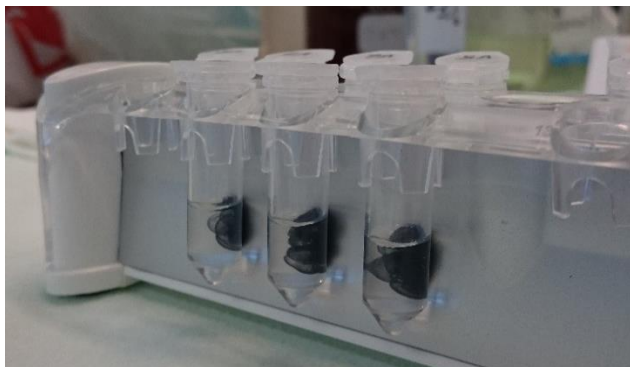
Fenoli-kloroformiuuton ohje: DNA:n eristys kokoverestä, muokattiin genomisen DNA:n eristykseen sopivaksi (liite 1). Alkuperäisestä ohjeesta korvattiin saostuneen DNA:n keräämiseen ja siirtoon tarkoitettu pipetitointivaihe lasisauvaan. Myös puhdistus tehtiin ilman sentrifugointia, huuhtelemalla DNA-rihmaa sen ollessa lasisauvassa kiinni. Näillä muutoksilla pyrittiin minimoimaan DNA:n käsittelyä ja ehkäisemään rihman katkeilua. Solunäytteistä eristyi runsaasti näkyvää DNA-rihmaa (kuva 6), muissa näytteissä (veri ja kudus) määrä oli vähäisempi. Eristetyn DNA:n annettiin tasoittua TE-puskuriin kaksi vuorokautta huoneenlämmössä, ennen vaiheita 2 ja 3 (kuvio 2).



KUVIA 6. Fenoli-kloroformi -uutolla eristetty DNA-rihma lasisauvassa (Koistinen ja Lehtoaho 2016).

Qiagenin protokollassa (Qiagen 2014) oli selkeät ohjeet DNA:n eristykseen kokoverestä ja kudoksesta. Kudoksenäytteen eristyksessä, ohjeesta poiketen, lisättiin kaksinkertainen määrä Proteinaasi K:ta, jolla pyrittiin varmistamaan kudospoteiinien pilkkoutuminen. DNA:n eristykseen viljellyistä soluista ei ollut suoraan omaa ohjetta, joten solujen kohdalla noudatettiin samaa ohjetta kokoveren kanssa. Solupelletit QS6 - QS8 suspensoitiin 600 µl:aan DPBS:a, joista otettiin 260 µl:n näyte varsinaiseen eristykseen.

DNA:ta eristyi kuitenkin ylimäärin, jolloin eluoituminen magneettipartikkeleista jäi vaillinaiseksi. Soluista uusittiin kaksi näytettä (QS9 - QS10) suspensoimalla solupelleteistä toinen 5 ml:aan ja toinen 10 ml:aan DPBS:a, jonka jälkeen molemmista otettiin 200 μ l suspensoitua näytettä eristykseen. Lähtö- materiaalista riippumatta eristetty DNA oli heti eristyksen jälkeen valmis jatkomittauksiin. Kuvassa 7 magneettikuuliin kiinnittynyt DNA on erotettuna putkien seinämään magneettitelineen avulla.



KUVA 7. Qiagenin menetelmä – DNA:n pesuvaihe (Koistinen ja Lehtoaho 2016).

Agilentin reagenssisarja sisälsi kaikki tarvittavat reagenssit itse eristykseen, mutta dialyysivaiheessa tarvittava TE-puskuri (1000 ml/näyte) tuli valmistaa ja autoklavoida (115 °C/15 min) ennen työn aloittamista. Ohjeessa vaadittu dialyysiallas korvattiin työvaiheessa tavallisella dekantterilasilla. Täytyi myös varmistaa, että riittävä määrä dekantterilaseja ja magneettisauvoja oli steriloitu ennen työn aloittamista, sekä tarvittava määrä magneettisekoittajia varattu dialyysiin (1/näyte). Työssä tarvittiin myös kudoshierrintä (kuva 8), joka puhdistettiin pesuaineella, DNAaway:lla ja milliQ-vedellä, sekä kuivattiin lämpökaapissa jokaisen näytteen käsittelyn välissä. Menetelmällä eristettiin ensin MCF-7 -solujen DNA:t ohjeen (Agilent Technologies 2016b) mukaisesti. Ohjeen kohtia 8 ja 9 ei voitu kuitenkaan tehdä, koska selkeää pellettä ei sentrifugoinnissa muodostunut. Kohdat korvattiin pipetoimalla neste mahdollisimman tarkasti pois. Muilta osin eristys eteni ohjeen mukaan. Suomennettu ohje muokattiin tehdyn työn mukaiseksi (liite 3).

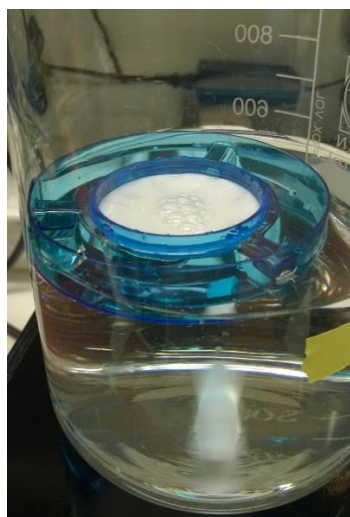


KUVA 8. Kudoshierrin (Koistinen ja Lehtoaho 2016).

Agilentin protokolla ei sisältänyt ohjetta solupelletin tekoon verinäytteistä. Ohje pelletin tekoon katsottiin Rogers ja Dyaicon 2008 kirjoittamasta artikkelista: New protocols for isolating high-molecular-weight genomic DNA. Artikkelin ohjeen mukaan valmistetun solupelletin voi tarvittaessa pakastaa -80 °C:een. Kolmea verinäytettä lukuun ottamatta solupelletit pakastettiin. Ohjeesta ei löytynyt mainintaa

sentrifugointiajoista, joten solupellettien valmistamisessa käytettiin Fenoli-kloroformi -protokollan aikaa ja nopeutta (2500 g/15 min). Verinäytteiden pelletoinnin jälkeen DNA:n eristys eteni viljeltyjen solujen eristysohjeen mukaisesti.

Ohjeessa dialyysin kestoksi oli laitettu 16 – 48 tuntia, jonka aikana TE-puskuri tuli vaihtaa 0 - 2 kertaa. Työssä käytetty dialyysiaika oli noin 18 tuntia ja puskuri vaihdettiin kerran dialyysin aikana. Dialyysimalja kellui puskurin päällä ja magneettisekoittajalla oli rauhallinen sekoitus koko dialyysin ajan (kuva 9). Dialyysin loputtua puhdistunut DNA pipetoitiin dialyysimaljan päältä steriiliin putkeen. DNA oli erittäin viskoosia, minkä vuoksi putkeen lisättiin TE-puskuria ja näytteen täytyi antaa eluoitua kaksi vuorokautta huoneenlämmössä. Kahden vuorokauden jälkeen oli kuitenkin selkeästi havaittavissa, ettei näyte ollut täysin eluoitunut, jolloin näytteitä pidettiin vielä noin 5 tuntia heilurisekoittajalla. Sekoituksen jälkeen näyte oli eluoitunut, pipetoitavissa ja puhtaus mitattavissa.



KUVA 9. Agilentin menetelmän dialyysivaihe, DNA maljan keskellä (Koistinen ja Lehtoaho 2016).

9.4 Eristetyn DNA:n puhtauden ja pitoisuuden mittaaminen

DNA:n eristyksen ja eluoitumisen jälkeen näytteet mitattiin Thermo Scientificin NanoDrop 1000 -spektrofotometrillä. Mittauksen aluksi näytelevylle pipetoitiin milliQ-vettä, sitten nollanäyte ja lopuksi varsinaiset näytteet laitteiston antamien ohjeiden mukaisesti. Nollanäytteenä käytettiin kyseisessä eristyksessä käytettyä eluointipuskuria. Näyttemäärä kaikissa mittauksissa oli 1,5 µl. NanoDropilla mittaamalla saatiin tietoa eristetyn DNA:n puhtaudesta (A260/280 ja A260/230) (liite 4, kuva 18).

Kaksoisjuosteisen DNA:n pitoisuuden mittaamiseen käytettiin Invitrogenin Qubit 2.0:aa. Pitoisuuden mittausta varten näytteistä tehtiin 1:200 laimennokset 0,5 ml putkeen erikseen valmistettuun reaktioseokseen. Lisäksi jokaiselle mittaukskerralle valmistettiin kaksi standardia laimennoksella 1:20. Valmistettuja laimennoksia vorteksoitiin 2 – 3 sekunnin ajan, jonka jälkeen laimennosta vielä inkuboitiin kaksi minuuttia huoneenlämmössä valolta suojattuna. Inkuboinnin jälkeen putki asetettiin laitteeseen mitattavaksi. Laite antoi suoraan pitoisuuden, jossa oli huomioitu käytetty laimennuskerroin. Näitä pitoisuuksia (liite 4, kuva 19) käytettiin vaiheessa 3 (kuvio 1), koska työssä oltiin kiinnostuneita ainoastaan kaksoisjuosteisesta DNA:sta.

9.5 Toimivan ja ehjän genomisen DNA:n toteaminen

Toimivan DNA:n toteamiseksi eristettyä DNA-näytettä monistettiin PCR:llä. Yksinkertaisen reaktioseoksen komponentit on lueteltu taulukossa 3. Onnistuneessa reaktiossa alukkeista 1F & 2R monistuu 1269 emäsparia pitkä juoste. Käytetty PCR-ohjelma (taulukko 4) oli optimoitu jo aiempiin tutkimuksiin. Näytteiden lisäksi PCR:ssä käytettiin positiivi- ja negatiivikontrolleja. Positiivikontrollina käytettiin aiemmin eristettyä DNA:ta, jonka jo tiedettiin toimivan PCR-reaktiossa. Negatiivikontrollina käytettiin näytteen sijasta steriiliä vettä. Näytemääräksi muodostui 60 ng/reaktio (60 ng/20 µl) Qubit:sta saadun laimeimman näytepitoisuuden perusteella. Loput näytteet laimennettiin samaan pitoisuuteen steriilillä vedellä.

TAULUKKO 3. 1 X Reaktioseos

Reagenssi	Määrä (µl)
10 x Dream Taq -puskuri	2
Nukleotidit	0,4
Alukkeet: 1F & 2R	3
Templaatti-DNA	10
Polymeraasi	0,1
Vesi	4,5
Yhteensä	20

TAULUKKO 4. Työssä käytetty PCR-ohjelma

Vaihe	Lämpötila °C	Aika
Alkudenaturaatio	95	3 min
Denaturaatio	95	30 s
Alukkeiden kiinnitys	63,5	30 s
Pidennys (synteesi)	72	1 min
Loppupidennys	72	5 min
Ohjelman lopetus	4	→

PCR-tuotteet analysoitiin elektroforeesilla: 1,5 %:lla agarosigeelillä, 1h 20min / 80 V. Geeli valmistettiin 1 X TBE-puskuriin ja samaa liuosta käytettiin myös ajopuskurina. DNA-fragmentit saatiin näky-mään lisäämällä geeliin fluoresoivaa Gel red-nukleiinihappoväriä (Biotium 2016). PCR-tuotetta otettiin 5 µl uuteen putkeen ja lisättiin 0,5 µl latauspuskuria, josta pipetoitiin 5 µl geelille. Kokostandardia (100 – 3000 ep) pipetoitiin 5 µl.

Ehjän ja pitkän DNA:n toteamiseksi eristetty DNA analysoitiin 0,4 %:lla agarosigeelillä, 20 h / 40 V. Näytteistä tehtiin tarvittaessa välilaimennokset, jotta näytteen pitoisuudeksi saatiin noin 150 ng / kaivo. Näytteiden pipetointi geelille tehtiin samoin kuin edellä. Kokostandardina käytettiin 100 – 10000 ep:n fragmentteja.

10 TULOKSET

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, millä menetelmällä saisi eristettyä pisintä ja laadukkainta genomista DNA:ta SMRT-sekvensointia varten. Jotta eristetty DNA olisi riittävän laadukasta sekvensoitavaksi, tuli sen olla puhdasta, ehjää ja toimivaa. Näiden kriteerien pohjalta menetelmät asetettiin paremmuusjärjestykseen (***= paras, **=toinen, *=kolmas) saatujen tulosten (liite 4 ja kuvat 10 - 17) perusteella (taulukko 5). Taulukkoon 5 kootuissa tuloksissa ei huomioitu erikseen eri lähtömaterialleja, vaan tulokset käsiteltiin menetelmäkohtaisesti.

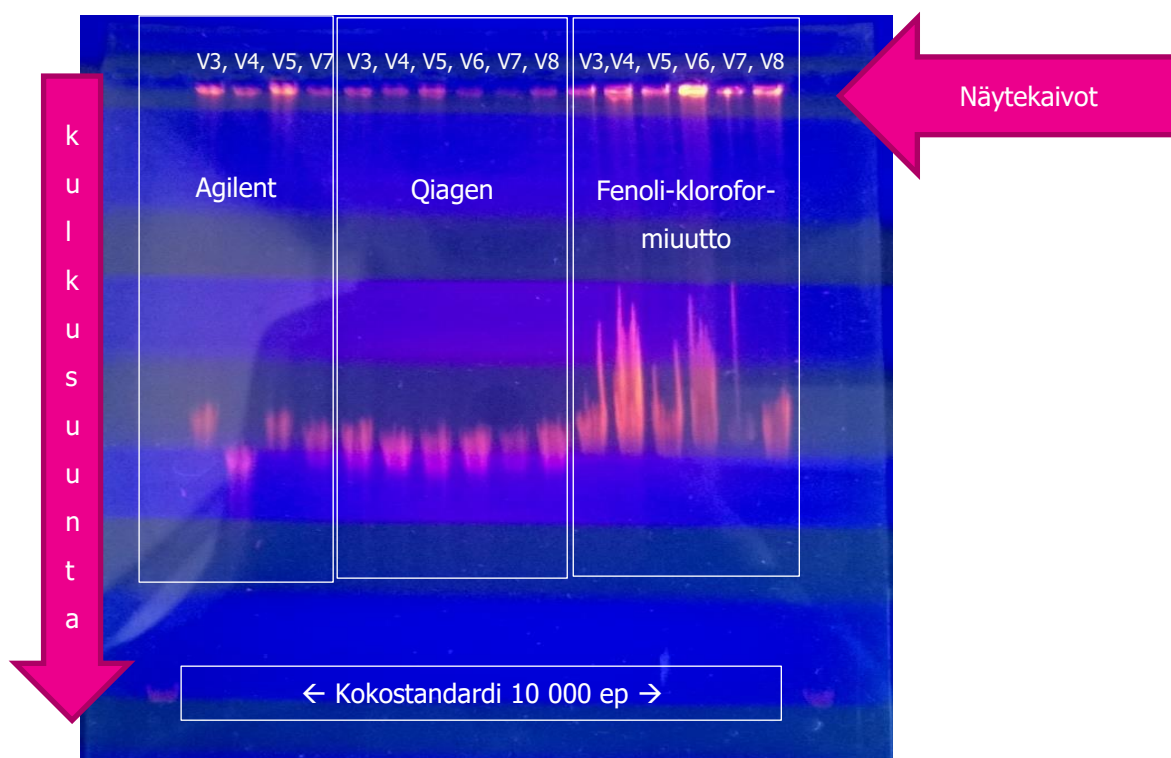
TAULUKKO 5. Eristetyn DNA:n laadun vertailu menetelmäkohtaisesti.

(***= paras, **=toinen, *=kolmas)

		Fenoli-kloroformi- uutto	Qiagen	Agilent
		n=18	n=15	n=8
Puhtaus (NanoDrop)	A260/A280	**	***	*
(liite 4, kuva 18)	A230/A260	***	**	*
Eheys & pituus (0,4 % geeli)		***	**	**
(Kuvat 10 ja 11)				
DNA:n toimivuus (PCR + 1,5 % geeli)		***	*	**
(Kuvat 12 - 14)				
Tähdet yhteensä		11	8	6

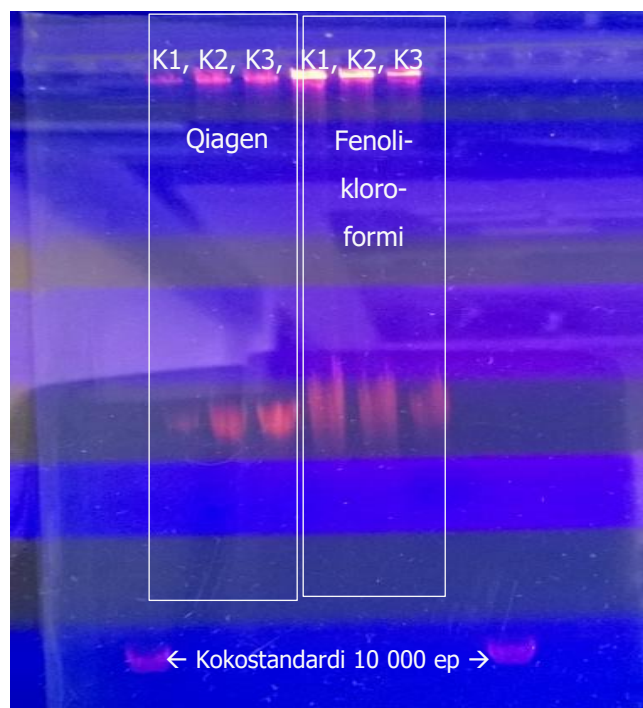
Eristetyn DNA:n puhtaus mitattiin NanoDropilla, josta saatiin puhtausarvot kahdelle eri absorbanssi-suhteelle. Saaduista tuloksista (Liite 4, Kuva 18) laskettiin menetelmäkohtaisesti, kuinka monta prosenttia näytteistä asetui määritettyjen puhtausarvojen viiteväleihin (A260/A280 = 1,7 – 1,9, A230/A260 = 2,0 – 2,2). Korkeimman prosenttiluvun saanut menetelmä sai kolme tähteä ja huonoin yhden.

Eristetyn DNA:n eheys ja pituus analysoitiin 0,4 %:lla agarosielektroforeesigeelillä (40V/20h), jossa eristettyä DNA:ta verrattiin kokostandardiin. Kokostandardin suurimman fragmentin koko oli 10 000 emäsparia (kuvat 10 ja 11). Kokoverinäytteiden analyysikuvasta 10 voidaan todeta visuaalisesti tarkastelemalla, että kaikilla kolmella menetelmällä saatiin eristettyä 10 000 emäsparia pidempää DNA:juostetta. Kuvasta voidaan nähdä myös, että Fenoli-kloroformiuutolla eristyi selkeästi pidempää DNA:ta muihin menetelmiin verrattuna. Kaupallisten eristysmenetelmien (Agilent ja Qiagen) välillä ei havaittu merkittävää eroa DNA:n koossa. Kaikkiin näytekaivoihin pipetoitiin 100 – 150 ng näytettä.



KUVA 10. 0,4 %:n agarosielektroforeesigeeli, 40V/20h. Verinäytteistä eristetty DNA kaikilla eristysmenetelmillä. Näytettä 100 - 150 ng/näytekaivo. (Koistinen ja Lehtoaho 2016.)

Kudosnäytteistä eristetty DNA (kuva 11) analysoitiin visuaalisesti kahden parhaan eristysmenetelmän vertailemiseksi. Myös tässä oli todettavissa eristetyn DNA:n olevan 10 000 emäsparia pidempää. Tuloksista voidaan nähdä myös, että Fenoli-kloroformiuutolla on eristynyt hieman pidempää DNA-juostetta kuin Qiagenin menetelmällä.

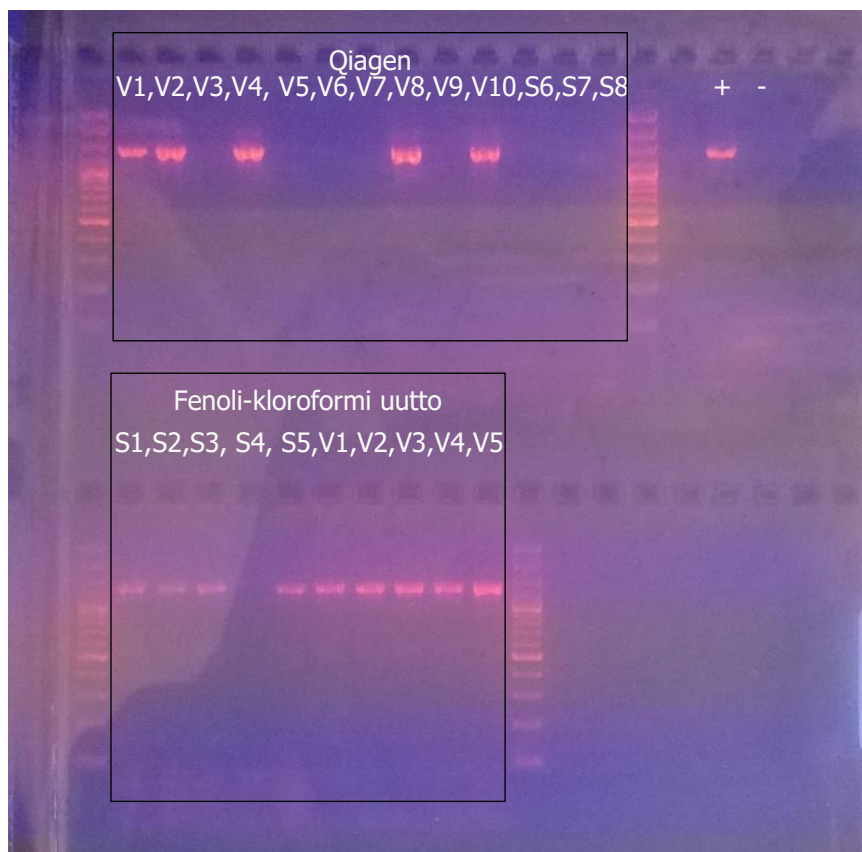


KUVA 11. 0,4 %:n agarosielektroforeesigeeli, 40V/20h. Rintasyöpäkudoksista eristetyt DNA:t; Qiagen ja Fenoli-kloroformiuutto. Näytettä QK1 54 ng, muita näytteitä 160 – 210 ng/näytekaivo. (Koistinen ja Lehtoaho 2016).

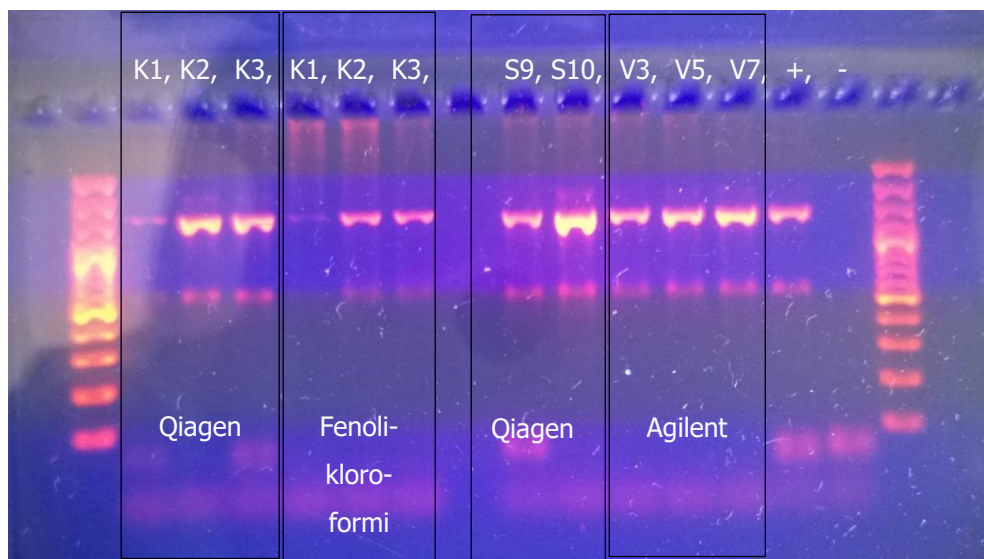
Eristetyn DNA:n toimivuutta analysoitiin visuaalisesti kuvista 12 – 14. DNA:n toimivuuden varmistamiseksi eristetyille DNA-näytteille tehtiin PCR, josta saatu tuote analysoitiin 1,5 %:lla agarosigeelillä (80V/1h20min). Kokostandardina käytettiin 100 - 3000 emäsparin pituisia fragmentteja (Kuva 12). PCR-alukkeilla kopioidun DNA-fragmentin tuli olla kooltaan 1269 emäsparia. PCR-reaktion voidaan todeta onnistuneen, koska geelillä on nähtävissä yksi DNA-vyöhyke fragmenttien 1500 ja 1200 välissä. Kuvista 12, 13 ja 14 laskettiin onnistuneet PCR-reaktiot ja ne suhteutettiin menetelmäkohtaiseen näytteen kokonaislukumäärään (n), jolloin menetelmät voitiin laittaa paremmuusjärjestykseen.



KUVA 12. 1,5 %:n Agarosielektroforeesigeeli, 80V/1h20min. Fenoli-kloroformi- ja Agilent-menetel- millä eristetystä DNA:sta tehty PCR-tuote. (Koistinen ja Lehtoaho 2016.) Käytetty kokostandardi, kuva muokattu: Thermo Scientific 2012.

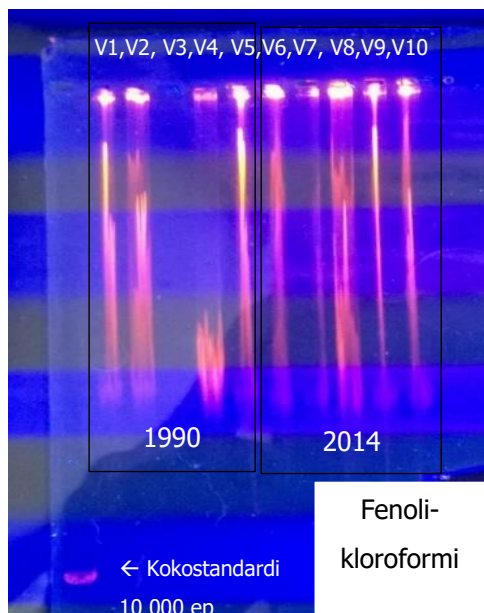


KUVA 13. 1,5 %:n Agarosielektroforeesigeeli, 80V/1h20min. PCR-tuote: Qiagen sekä fenoli-kloroformi (Koistinen ja Lehtoaho 2016).

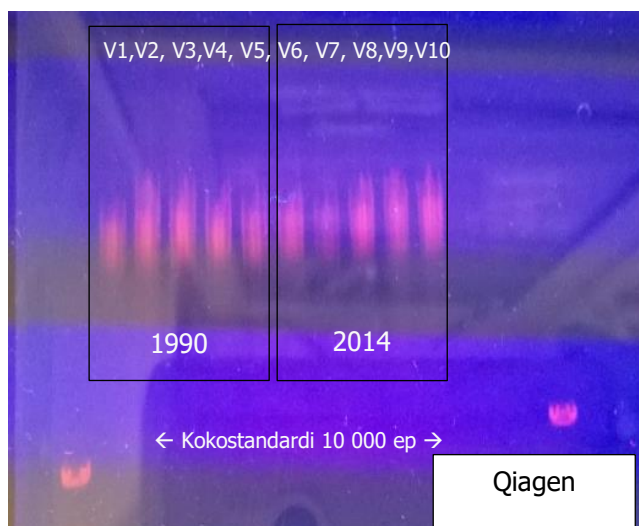


KUVA 14. 1,5 %:n Agarosielektroforeesigeeli, 80V/1h20min. PCR-tuote; Qiagen, Agilent sekä fenoli-kloroformi (Koistinen & Lehtoaho 2016).

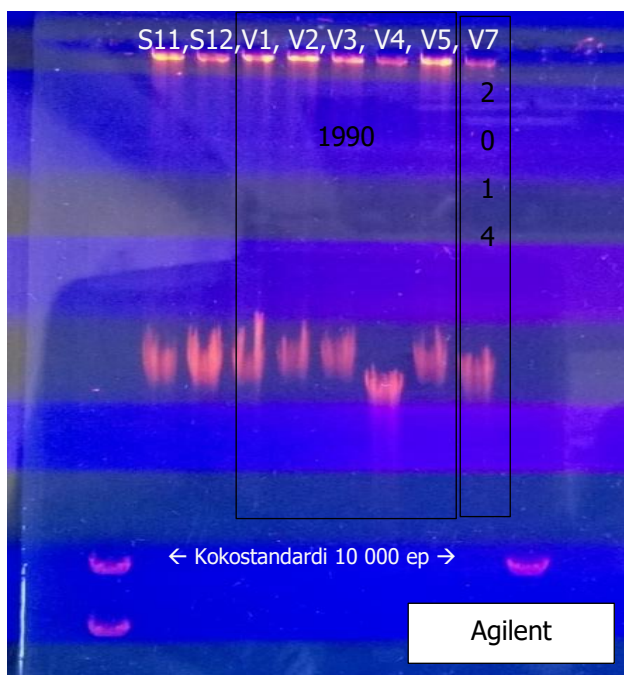
Osa verinäytteistä (V1 – V5) oli säilytetty $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa yli 20 vuoden ajan. Työssä haluttiin tarkastella, onko pitkällä säilytysajalla vaikutusta eristetyn DNA:n laatuun. Vertailtaessa DNA:n eheyttä ja pituutta, samalla menetelmällä eristetyt DNA:t analysoitiin kukin omalla 0,4 %:lla agarosielektroforeesigeelillä (40V/20h) kerrallaan (Kuvat 15 - 17). Kuvista 15 – 17 on nähtävissä, ettei säilytyksen kestolla ole ollut merkittävää vaikutusta DNA:n eheyteen. Myöskään muissa laatukriteereissä (puhtaus, liite 4 kuva 18 ja toimivuus, kuvat 12 - 14) ei ollut nähtävissä säilytyksen kestosta johtuvia eroja.



KUVA 15. Verinäytteiden säilyvyyden vaikutus DNA:n eristykseen. Eristys fenoli-kloroformiuutolla. 0,4 %:n agarosielektroforeesigeeli, 40V/20h (Koistinen ja Lehtoaho 2016).



KUVA 16. Verinäytteiden säilyvyyden vaikutus DNA:n eristykseen. Eristys Qiagen:n menetelmällä. 0,4 %:n agarosielektroforeesigeeli, 40V/20h (Koistinen ja Lehtoaho 2016).



KUVA 17. Verinäytteiden säilyvyyden vaikutus DNA:n eristykseen. Eristys Agilentin menetelmällä. 0,4 %:n agarosielektroforeesigeeli, 40V/20h. Geelillä myös Agilentin menetelmällä eristetyt solunäytteet (S11 ja S12). (Koistinen ja Lehtoaho 2016).

DNA:n laadullisten tekijöiden lisäksi työssä vertailtiin menetelmien kustannusvaikuttavuutta (taulukko 6), jossa huomioitiin menetelmien hankintahinta, sekä eri työvaiheisiin kulunut aika. Vertailussa kolme tähteä (=paras) sai menetelmä, joka tuli edullisimmaksi niin hankintahinnaltaan, kuin myös käytetyn ajan suhteen.

TAULUKKO 6. Eristysmenetelmien kustannusvaikuttavuus. (***=edullisin/ajallisesti nopein)

	Fenoli-klooroformi	Qiagen	Agilent
Hinta/näyte	***	**	*
Reagenssien/kaupallisen reagenssisarjan hinta (kertahankintana)	**	***	*
Esivalmisteluihin kulunut aika	**	***	**
Eristykseen kulunut aika	**	***	*
Eluoitumiseen kulunut aika	**	***	**
Tähdet yhteensä	11	14	7

11 EETTISYYS JA LUOTETTAVUUS

Tutkimuseettinen neuvottelukunta on antanut ohjeistuksen hyvästä tieteellisestä käytännöstä, loukausepäilyjen käsittelemisestä, sekä eettisestä ennakkoarvioinnista ihmistieteessä. Tieteellisen tutkimuksen luotettavuus ja tulosten uskottavuus edellyttävät hyvien tieteellisten käytäntöjen noudattamista ja vastuu kuuluu jokaiselle tutkimustoiminnassa mukana olevalle henkilölle. (Helsingin yliopisto 2016.) Hyvä tieteellinen käytäntö edellyttää tiedeyhteisöltä rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta tutkimuksen suunnittelussa ja toteutuksessa sekä tutkimustulosten tallentamisessa, raportoinnissa ja arvioinnissa. Tiedonhankinta-, tutkimus-, ja arviointimenetelmät sekä avoimuus tulosten julkaisussa ja rahoituslähteiden raportoimisessa tulee olla myös eettisesti kestäviä. Lisäksi tutkimusryhmän jäsenen asema, oikeudet, vastuut ja velvollisuudet tulee olla määritelty ennen tutkimuksen alkamista. (UEF 2016a.)

Tutkimustyö edellyttää aina tutkimuslupien hankkimista sekä tutkimuksen eettisen ennakkoarvioinnin tekemistä. Ennakkoarvioinnin suorittavat tutkimuseettiset toimikunnat ja sen tarkoituksena on suojella tutkittavia ja varmistaa tutkijan oikeusturvaa. Ihmistieteisiin luettavien, ei-lääketieteellisten, tutkimusten eettisyyttä arvioidaan yliopistojen omissa tutkimuseettisissä toimikunnissa. Jos taas kyse on lääketieteellisestä tutkijalähtöisestä tutkimuksesta, eettisyyttä arvioidaan sairaanhoitopiirien ja lääketieteellisten tiedekunnan eettisissä toimikunnissa. Uuden tutkimuksen aloittaminen edellyttää aina eettisen toimikunnan puoltavaa lausuntoa. (Helsingin yliopisto 2016.) Patologian yksiköllä on Itä-Suomen yliopiston sekä Pohjois-Savon sairaanhoitopiirin tutkimuseettisten toimikuntien puolto rintasyöpätutkimukseen. Opinnäytetyössä toimitaan näiden lupien alaisuudessa.

12 POHDINTA

12.1 Tulosten pohdinta

Opinnäytetyössä eristettiin genomista DNA:ta rintasyöpänäytteistä kolmea eri menetelmää käyttäen, joista ensimmäinen oli perinteinen fenoli-kloroformiuutto ja kaksi muuta kaupallisia reagenssisarjoja, kahdelta eri valmistajilta. Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, millä käytössä olleista menetelmistä saataisiin eristettyä pisintä ja laadukasta, SMRT-sekvensointiin soveltuvaa DNA:ta.

Toisin kuin Mirmomeni, ym. (2010) tekemässä vertailussa, opinnäytetyössä voitiin selkeästi osoittaa, että pisintä ja puhtainta DNA:ta saatiin eristettyä fenoli-kloroformiuutolla. Tarkastelussa pitkään säilytettyjen kokoverinäytteiden hyödynnettävyydestä tutkimustyössä, voidaan puolestaan olla yhtä mieltä Di Pietro, ym. (2010) kanssa: kokoveren säilytyksen kestolla ei ole merkittävää merkitystä eristetyn DNA:n laatuun. Tästä työstä saatujen tulosten perusteella on jo pystytty aloittamaan rintasyöpäkudoksen sekvensointiin johtavat DNA:n eristykset.

12.1.1 NanoDrop-tulokset

Ensimmäiseksi eristetyistä ja eluoituneista DNA-näytteistä mitattiin puhtaus NanoDropilla. Saaduista tuloksista (Liite 4, kuva 18) voidaan selkeästi huomata Fenoli-kloroformi -menetelmällä eristettyjen näytteiden absorbanssisuhteen A260/280 olevan lähempänä viitearvoja, kuin kaupallisilla menetelmillä eristettyjen. Veri- ja kudoksenäytteet olivat lähes kaikki viitearvojen sisällä, kun taas solunäytteiden arvot olivat hieman viitearvojen yläpuolella. Fenoli-kloroformilla eristettyjen solunäytteiden (S1 - S5) korkeiden arvojen arvellaan johtuvan solujen sisältämästä RNA:sta, koska NanoDrop mittaa kaikki näytteessä olevat nukleotidit. Veri- ja kudoksenäytteistä RNA oli puolestaan ennättänyt hajota pitkän säilytysajan vuoksi. Fenoli-kloroformiuuton protokollaan (Liite 1) RNA:n poistokäsittelyä ei kuulunut, toisin kuin reagenssipakkauksiin käsittely sisältyi. Jatkossa voitaisiin pohtia RNA-käsittelyn lisäämistä myös Fenoli-kloroformi -menetelmän protokollaan. Reagenssipakkauksilla, erityisesti Agilentin menetelmällä, eristettyjen näytteiden A260/280-arvot puolestaan jäivät selkeästi viitearvojen alapuolelle. Tämä taas viittaa proteiinijäämiin DNA-näytteissä. DNA:n puhtautta voisi yrittää parantaa Proteinaasi K:n määrän optimoinnilla ja pesuvaiheiden lisäämisellä (Qiagen) tai pidentämällä dialyysiaikaa ja lisäämällä puskurinvaihtoja (Agilent).

Suurin osa kaupallisilla reagenssisarjoilla eristettyjen näytteiden absorbanssisuhteen A260/A230 arvoista jäi selkeästi viitearvojen alapuolelle. Liian alhainen arvo voi viitata menetelmien reagensseista jääviin epäpuhtauksiin, jotka absorboivat aallonpituudella 230. Fenoli-kloroformilla puolet näytteistä puolestaan ylitti viitearvojen ylärajan. Korkea arvo voidaan saada, jos mitattaessa käytetään väärää nollanäytettä tai näytealusta on likainen. Epänormaalit arvot voivat kertoa myös näytteen tai eristysmenetelmän ongelmista. Mittatauksessa käytettiin nollanäytteenä näytteen eluointipuskuria (TE-puskuri) ja näytealusta puhdistettiin laitteen ohjeiden mukaisesti mittausten välissä. Tämän perusteella mittaustulokset viittaisivat enemmän menetelmäperäisiin ongelmiin.

Qiagenin menetelmällä eristettävien solunäytteiden (S6 - S8) eristysvaiheessa huomattiin magneettipartikkeleiden ympärillä runsaasti viskoosia DNA-rihmaa. NanoDropilla mitattaessa eristetyn DNA:n absorbanssisarvo jäi kuitenkin alhaiseksi. Näytteet uusittiin (S9 - S10) ja solut suspensoitiin suurempaan tilavuuteen, jolloin eristettävä solumäärä saatiin pienemmäksi (luku 9.3). Tällä tavoin DNA:n puhtautta saatiin parannettua. Alkuperäisten näytteiden epäpuhtauksiin on todennäköisesti syynä näytteiden suuri solumäärä, jolloin DNA:ta on eristynyt ylimäärin ja siten pesupuskureiden teho on jäänyt heikoksi. Pesuvaiheen tehoon on voinut vaikuttaa myös käytössä olleen tasosekoittajan nopeussäätö (rpm), jonka todellista sekoitusnopeutta ei pystytty varmistamaan. Lisäksi DNA:n puhtautteen on voinut vaikuttaa myös menetelmän pesuvaiheiden useat pipetointivaiheet. Työohjeessa korostettiin supernatantin tarkkaa pipetointia pois pesuvaiheiden välissä, mutta aina on mahdollista, että nestejäämiä on jäänyt näytteeseen. Qiagenin protokollaan voisi myös helposti lisätä ylimääräisiä pesuvaiheita, joka puolestaan voisi parantaa näytteen puhtautta. Toisaalta sekoitusvaiheita tulisi myös lisää ja se taas puolestaan lisäisi DNA:n katkeilun riskiä. Myös näytemäärän optimoinnilla voisi mahdollisesti parantaa DNA:n puhtautta.

Agilent-menetelmän protokollassa Proteinaasi K tuli aktivoida ennen käyttöä +50 °C/2 - 5 min (Agilent Technologies 2016b). Työssä käytettiin 4 minuutin aktivointiaikaa. Näyteputkien inkubointivaiheessa +50 °C/45 min, putkia sekoitettiin kevyesti heiluttamalla 15 minuutin välein. (Liite 3, kohta 12). Proteinaasi K:n inkubointiaikaa voisi kokeilla pidentää viiteen minuuttiin, jolla varmistettaisiin entsyymin aktivoituminen. Myös näyteputkien sekoitus pitkän inkubointivaiheen aikana on saattanut olla liian kevyttä tai vähäistä ja siksi proteinaasi K ei välttämättä ole sekoittunut riittävän hyvin näytteeseen. Dialyysin lopettamisen jälkeen, erityisesti solunäytteiden kohdalla, DNA oli hyvin viskoosia ja sitä oli vaikea pipetoida dialyysimaljalta pois. Näytteiden suuren viskositeetin vuoksi niiden pitoisuus ei ollut heti mitattavissa, vaan ne tuli ensin laimentaa ja olla sekoittajalla noin 5 tuntia ja antaa sen jälkeen eluoitua huoneenlämmössä useamman vuorokauden ajan.

Valmistajan mukaan DNA:n olisi pitänyt olla suoraan mitattavissa ja käytettävissä dialyysin päätyttyä. Valmistaja suositteli dialyysin kestoksi 16 - 48 tuntia, 0 - 2 puskurin vaihdolla. (Agilent Technologies 2016b.) Työssä käytetty dialyysi-aika oli 18 tuntia, yhdellä puskurin vaihdolla. Puskurin vaihdon tarkoituksena oli maksimoida eristetyn DNA:n puhtaus. Jatkossa voisi kokeilla, auttaisiko dialyysiajan pidentäminen puhtaamman DNA:n lisäksi myös näytteen parempaan eluoitumiseen.

12.1.2 Qubit-tulokset

Qubit-fluorometrillä mitattiin eristetyn, kaksoisjuosteisen DNA:n pitoisuus (Liite 4, Kuva 19). Mittauksesta saatuja pitoisuustuloksia hyödynnettiin jatkomenetelmissä (PCR/geelielektroforeesi). Qubit-tulosten perusteella DNA-näytteet laimennettiin samaan pitoisuuteen, jolloin ne olisivat keskenään vertailukelpoisia.

Qiagenin protokollan mukaan DNA:n saantoon vaikuttavat eristettävä lähtömateriaali, kudospalan koko ja ikä, sekä säilytysolosuhteet. Valmistajan mukaan 200 µl:sta verta saadaan DNA-pitoisuudeksi 20 - 40 ng/µl (Qiagen 2016b). Tästä tavoitteesta jäätin kuitenkin kaikkien paitsi yhden (QK2) näytteen

kohdalla, eikä säilytysajalla tuntunut olevan merkittävää vaikutusta tuloksiin. Pienempään DNA:n saantoon voi ohjeen mukaan vaikuttaa myös magneettipartikkeleiden määrä näytteessä, sekä DNA:n menetys viimeisessä pesuvaiheessa. Nämä tekijät huomioitiin työskentelyvaiheessa: magneettipartikkeleita vorteksoitiin ohjeen mukaisesti yli kolmen minuutin ajan ja viimeisen pesuvaiheen vesi pipetoitiin varovasti magneettien vastakkaisen seinämän puolelta.

Qiagenin protokollan mukaan (Qiagen 2016b) kudospala sai olla maksimissaan 25 mg painoinen, koska tätä suurempi koko saattaa johtaa näytteen huonompaan lyysautumiseen ja siten DNA:n huonompaan eristymiseen. Jotta kaikki kudospätkät olisivat keskenään vertailukelpoisia, ne pyrittiin leikkaamaan samankokoisiksi (~25 mg).

Agilentin protokollassa ei ollut mainintaa viljeltyjen solujen tai kokoveren tavoitepitoisuudesta (Agilent Technologies 2016b). Myöskään fenoli-kloroformiuutosta mahdollisesti saatavista DNA-pitoisuuksista ei löytynyt tietoa kirjallisuudesta.

12.1.3 Geelielektroforeesi-tulokset

Analysoitaessa eristetyn DNA:n pituutta agarosigeelielektroforeesilla tulee geelin pitoisuuden lisäksi huomioida sähkökentän voimakkuus (V) ja käytettävä analyysi-aika (h). Ensimmäisessä elektroforeesi-analyysissä eristetty DNA ajettiin 0,7 % agarosigeelillä (60V/5h), mutta geeli osoittautui liian tiheäksi eikä näytteet juurikaan edenneet geelillä. DNA:n suuren koon vuoksi geelin agarosipitoisuus laskettiin 0,4 %:iin ja laitteen asetukset muutettiin 40V/20h. Kaivoihin pipetoitavaa näytepitoisuutta ei muutettu. Edellä mainitut muutokset osoittautuivat toimiviksi, jolloin DNA-vyöhykkeet pääsivät kulkeutumaan geelillä.

Käytössä olevan kokostandardin suurin fragmentti oli 10 000 emäsparia. Eristetyn DNA:n pitkän analyysiajan vuoksi vain kokostandardin suurin fragmentti jäi geelille ja sitä pienemmät ajautuivat geeliltä ulos. Elektroforeesikuvista (kuvat 10 ja 11) voidaan kuitenkin todeta, että kaikilla eristysmenetelmillä saatiin eristettyä 10 000 emäsparia suurempaa genomista DNA:ta. DNA:n tarkemman koon määrittämiseksi olisi tarvittu käyttöön vielä suurempi kokostandardi. Elektroforeesikuvista voidaan nähdä myös, että Fenoli-kloroformiuutolla eristetyn DNA:n fragmenttista osa jää korkeammalle, mikä tarkoittaa, että osa DNA:sta on vieläkin pidempää ja kulkeutunut siksi hitaammin.

Eristetyn DNA:n tuli olla myös toimivaa. Tämän varmistamiseksi eristetyistä DNA:sta tehtiin PCR-reaktio, josta saatu tuote analysoitiin 1,5 %:lla agarosigeelielektroforeesilla (80V/1h20min). Reaktio toimivuutta voitiin tarkastella visuaalisesti kuvista 12 – 14.

Analyysi-aikaa olisi voinut hieman pidentää fragmenttien erottuvuuden parantamiseksi, mutta työn kannalta aika oli kuitenkin riittävä. Osassa näytteistä (Agilent: V1 - V2 ja Qiagen: V3, V5 - V7, V9, S6 - S8) PCR-reaktio epäonnistui ja geelillä ei ilmennyt lainkaan DNA-vyöhykettä. Näytteiden yhteiseksi tekijäksi muodostui huono puhtaus: alle 0,8 absorbanssisuhteella A260/230. Näytteeseen jääneet epäpuhtaudet ovat mahdollisesti vaikuttaneet templaatin toimintakykyyn PCR-reaktioiden aikana. Yhden

näytteen (S4) reaktio ei puolestaan onnistunut (kuva 13), vaikka puhtausarvot olivat hyvät. Tähän voi olla syynä esimerkiksi pipetointi- tai laskuvirhe, kuten liian vähäinen templaatti-DNA:n määrä. Kontrollinäytteistä (+/-) voidaan nähdä reaktion toimivuus ja se, ettei kontaminaatioita ilmennyt.

Kaikkien kudoksenäytteiden (kuva 14) PCR-reaktiot onnistuivat, vaikka Qiagenin menetelmällä eristettyjen kahden näytteen (K1, K3) puhtausarvo suhteella A260/A230 jäi alle 0,8. Jotta näytteet olisivat keskenään vertailukelpoisia, ne laimennettiin samaan pitoisuuteen (60 ng/reaktio) Qubitilla saatujen tulosten perusteella. QK1:n pitoisuus jäi kuitenkin hiukan tätä alhaisemmaksi, koska lähtöpitoisuus oli vain 5,34 ng/μl. Näytteen QK1 heikko fragmentti geelillä voisi johtua hiukan alhaisemmasta lähtöpitoisuudesta. Mutta koska myös FK - K1 fragmentti näkyy heikkona, voi syynä olla myös näyteperäinen ongelma.

12.1.4 Muita huomioita käytetyistä eristysmenetelmistä

Fenoli-kloroformiuuton protokolla oli alun perin tarkoitettu ainoastaan kokoverelle. Menetelmän heikkoutena oli suuren tarvittavan näytemäärän (5 ml) lisäksi, työntekijän merkitys työn laatuun, käytettävien reagenssien myrkyllisyys sekä pitkä DNA-näytteen eluointiaika. Myrkylliset reagenssit tulee hävittää virallisten määräysten mukaisesti, josta aiheutuu lisäkustannuksia. Hävityksestä aiheutuvia lisäkustannuksia ei ole huomioitu tämän työn kustannusvaikuttavuutta arvioitaessa. Fenoli-kloroformi -menetelmän käyttö vaatii myös työn huolellista suunnittelua, koska työssä tarvittavat liuokset tulee valmistaa ja autoklavoida ennen varsinaisen työn aloittamista. Eristetty DNA-rihma on puolestaan ohutta ja haurasta ja siksi eristysvaiheissa tulisi välttää liian voimakkaita käsittelyitä. Keräämällä saostettu DNA-rihma lasisauvan avulla, voitiin alkuperäisestä protokollasta vähentää sentrifugointi- ja pipetointivaiheita.

Qiagenin reagenssisarja sisälsi kaikki työssä tarvittavat reagenssit. Lisäksi protokollaan oli tarkkaan määritelty, millaiset magneettiteline ja tasoravistelijat työhön soveltuisivat. Menetelmässä käytettiin parhaita, vastaavanlaisia, saatavilla olevia laitteita.

Agilentin reagenssisarja sisälsi kaikki työssä tarvittavat reagenssit, puskurin valmistusta lukuun ottamatta. Puskuriliuokset tulee valmistaa ja autoklavoida ennen varsinaisen työn aloittamista. Tämän lisäksi menetelmää varten tarvitaan kudoshierrin, magneettisekoittajia, sekä steriilejä dialyysiasioita ja magneetteja. Magneettisekoittajia, dialyysiasioita ja magneetteja tarvitaan yksi per näyte. Työläin vaihe eristyksessä oli kudoshierimen käyttö. Käytössä oli vain yksi kudoshierrin ja se tuli puhdistaa ja kuivata huolellisesti jokaisen näytteen välissä ristikontaminaatioiden välttämiseksi. Protokollan loppuvaiheessa DNA pipetoidaan dialyysimaljalle ja sitä pidetään dialyysissä vähintään 16 h kevyellä sekoituksella. Sekoitus saa olla melko rauhallista, koska yksi näytemalja (V9) menetettiin sen upottua puskuriin.

Vaikka pisintä ja laadukkainta DNA:ta saatiin eristettyä Fenoli-kloroformiuutolla, kaupallisten menetelmien soveltuvuutta eristykseen ei voida täysin poissulkea. Mikäli aikaa ja resursseja olisi ollut enemmän, menetelmien optimointi olisi saattanut parantaa DNA:n puhtautta. Toisaalta eristetyn DNA:n

pituus oli sekvensoinnin kannalta tärkein valintaperuste, joten Fenoli-kloroformiuutto osoittautui sen puolesta kiistatta parhaaksi eristysmenetelmäksi.

Qiagenin menetelmän eduksi muodostuivat paras kustannusvaikuttavuus, sekä menetelmän helppokäyttöisyys ja käyttäjäystävällisyys. Protokolla oli selkeä, työvaiheet yksinkertaisia ja eristetty DNA oli heti valmis mittauksiin ja jatkokäsittelyihin. Menetelmä ei myöskään sisältänyt työntekijälle haitallisia reagensseja, kuten Fenoli-kloroformiuutto. Lisäksi menetelmällä saatiin eristettyä useita näytteitä samanaikaisesti yhden päivän aikana, toisin kuin kahdella muulla menetelmällä.

12.2 Kustannusvaikuttavuuden arviointi

Menetelmien kustannusvaikuttavuutta arvioitaessa tarkasteltiin reagenssien ja kaupallisten reagenssisarjojen hankintahinnan ohella myös menetelmien esivalmisteluihin ja eristysvaiheisiin kuluva aikaa. Kaupallisten menetelmien hankintahinnat vertailua varten, katsottiin toimittajien omilta verkkosivuilta. Fenoli-kloroformiuuttoa varten tarvittavien reagenssien listahinnat katsottiin suoraan tunnetun reagensseja toimittavan yrityksen verkkosivuilta. Vaikka Fenoli-kloroformiuutossa käytettävien reagenssien hankintakustannukset nousivat kaupallisten reagenssisarjojen hankintahintaa suuremmiksi, näytekohtainen hinta jäi kuitenkin pienimmäksi reagenssien riittoisuuden vuoksi.

Qiagenin menetelmän eduksi muodostui menetelmän helppokäyttöisyyden lisäksi lyhyt esivalmisteluihin kuluva aika, koska kitti sisälsi kaikki eristyksessä tarvittavat reagenssit. Fenoli-kloroformiuuttoa varten tuli valmistaa ja autoklavoida useita eri liuoksia. Agilentin menetelmä vaati myös runsaasti autoklavoitua puskuriliuosta ja lisäksi tuli huomioida työssä tarvittavat steriilit välineet.

Kaupallisten menetelmien eristysvaiheiden pituus vaihteli eristettävän lähtömateriaalin mukaan. Qiagenin protokollan mukaan kahdentoista näytteen eristämiseen kuluu aikaa noin 70 minuuttia. Eristettäessä DNA:ta viljellyistä soluista tai kokoverestä, arvioitu aika hieman ylittyi, muttei kuitenkaan merkittävästi. Pidempään eristysaikaan vaikutti toisaalta myös uuden menetelmän omaksumiseen kuluva aika. Kudosnäytteiden DNA:ta eristettäessä aikaa puolestaan pidensi yön yli kestävä, varsinaista eristysvaihetta edeltävä, lyysausinkubaatio. Taulukosta 6 (s. 40) voidaan nähdä Qiagenin menetelmän sijoittuvan kustannusvaikuttavuudeltaan parhaimmaksi menetelmäksi.

Agilentin protokollassa yhden näytteen eristysajaksi oli määritelty noin yksi tunti ja dialyysiajaksi 16 tuntia (kuva 5, s.29). Protokollan ohjeistus oli annettu ainoastaan kudoksille ja soluviljelmille. Ohjeistus solupelletin valmistukseen kokoverestä sekä valmistetun pelletin pakastamisesta katsottiin erillisestä artikkelista. Solupelletin valmistaminen pidensi jonkin verran protokollan mukaista näytteen käsittelyaikaa. Protokollassa (Agilent Technologies 2016b) arvioitu yhden näytteen käsittelyaika (noin 17 tuntia) oli käytännössä toteutettavissa, mikäli dialyysiaika pidettiin minimissään eli 16 tunnissa. Tunnin eristysaika ei kuitenkaan käytännössä toteutunut, koska näytteitä eristettiin useampi rinnakkain. Aikaa pidensivät kudoshierTIMEN puhdistaminen, kuivaaminen lämpökaapissa ja viilentäminen jäällä näytteiden käsittelyn välillä. Lisäksi näytteitä pystyttiin eristämään vain kolmesta näytteestä kerrallaan mag-

neettisekoittajien rajallisen saatavuuden vuoksi. Qiagenin menetelmään verrattuna 12 näytteen käsittely ei olisi ollut tällä menetelmällä mahdollista toteuttaa. Myös dialyysiaikaa voisi pidentää minimistä DNA:n puhtaustulosten parantamiseksi. Näiden havaintojen pohjalta Agilentin menetelmä sijoittui kustannusvaikuttavuudeltaan heikoimmaksi.

Fenoli-kloroformi -menetelmällä eristäminen kesti lähtömateriaalista riippumatta kaksi puolikasta työpäivää, joiden välissä oli yön yli kestävä inkubaatio. Näytteitä pystyttiin käsittelemään useampia rinnakkain, mutta kuitenkin vähemmän kuin Qiagenin menetelmällä. Suurimman osan eristysajasta näytteet olivat sentrifuugissa tai heilurisekoittajalla, jolloin työvaiheet kevenivät. Kustannusvaikuttavuudeltaan menetelmä sijoittui kaupallisten menetelmien väliin.

Qiagenin menetelmällä eristetty DNA oli protokollan (Qiagen 2016b) mukaisesti heti eristyksen jälkeen mitattavissa. Myös Agilentin menetelmällä eristetyt näytteet olisivat pitäneet protokollan (Agilent Technologies 2016b) mukaan olla mitattavissa heti dialyysin jälkeen, mutta tämä ei käytännössä toteutunut. Näytteet olivat erittäin viskoosia ja huonosti eluoituneita, eikä näytteistä voinut pipetoida pieniä määriä mittausta varten. Näytteiden eluoitumiseen meni lisäksi vielä kaksi vuorokautta.

Fenoli-kloroformi -menetelmällä eristettyjen näytteiden eluoitumiseen kului ohjeen (liite 1) mukaisesti kaksi vuorokautta huoneenlämmössä. Riittävä eluoitumisaika varmistettiin ensimmäisenä eristettyjen solunäytteiden avulla, jolloin NanoDrop-mittaukset suoritettiin päivinä 0 (eristyspäivä), 1 ja 2. Kahden vuorokauden eluoitumisajan jälkeen DNA:n pitoisuus ei enää muuttunut, jolloin näytteiden voitiin todeta eluoituneen riittävästi.

12.3 Verinäytteiden säilyvyyden merkitys

Työn tarkoituksena oli myös tarkastella mahdollisia säilytysajasta johtuvia eroja eristettävän DNA:n laatuun kokoverinäytteistä. Puhtautta (NanoDrop), pitoisuutta (Qubit) ja toimivuutta (PCR) määritettäessä, ei näytteiden säilytyksen kestolla havaittu oleva merkitystä DNA:n laatuun. Näiden määritysten lisäksi eristetty DNA analysoitiin 0,4 %:lla agarosigeelillä (40V/20h), jokainen eristysmenetelmä omalla geelillään (kuvat 15 - 17). Myöskään näissä ei havaittu säilytyksen kestolla olevan merkittävää vaikutusta DNA:n pituuteen. Fenoli-kloroformi -menetelmällä eristetyn näytteen V3 (184 ng) kohdalla (kuva 15), on todennäköisesti kyseessä pipetointi- tai muu virhe, koska kuvassa 10 sama näyte (129 ng) on kuitenkin onnistunut. Qiagenin menetelmällä eristetyn näytteen V7 vyöhyke (kuva 16) on myös havaittavissa muita vyöhykkeitä heikompana, mikä saattaa johtua näytteen alhaisemmasta lähtöpitoisuudesta (Qubit: 6,16 ng/μl). Geelillä on myös havaittavissa markkereiden epätasainen kulkeutuminen, johon voi olla syynä esimerkiksi geelin epätasainen laatu.

Agarosigeeleiltä voidaan todeta eri menetelmien tasalaatuisuus: kaikista näytteistä on saatu eristettyä samankokoista DNA-juostetta. Kuvan 17 näyte V4, on kulkeutunut hiukan alemmaksi kuin muut, joka voi viitata DNA:n hienoiseen pilkkoutumiseen eristysvaiheessa. V4 on eristetty yhtä aikaa näytteiden V1 ja V2 kanssa, eikä mitään toisistaan poikkeavaa eristyksen aikana ole kuitenkaan havaittu.

Kokoverinäytteiden solupellettien valmistusvaiheessa V4-näytteelle tehtiin kuitenkin ylimääräinen sentrifugointi selkeämmän pelletin aikaansaamiseksi. Tämä ylimääräinen vaihe on mahdollisesti vaikuttanut lopullisen DNA-juosteen pituuteen.

12.4 Opinnäytetyön tarkoituksen ja tavoitteen arviointi

Opinnäytetyön kokeellinen osuus toteutettiin seitsemän viikon aikana Itä-Suomen yliopiston kliinisen patologian laboratoriotiloissa. Työvaiheiden edetessä ja mahdollisissa ongelmatilanteissa työskentelytapoja ja menetelmiä kehitettiin selkeämmiksi, sekä DNA:n eristysohjeet muokattiin tehdyn työn mukaisiksi. Aikataulutus suunniteltiin ajankäytöllisesti tehokkaaksi, jolloin työvaiheet tehtiin limittäin, yksi eristysmenetelmä kerrallaan. Työskentelyaika koettiin riittäväksi ja kaikki työvaiheet saatiin tehtyä alkuperäisen suunnitelmien mukaisesti. Tähän työhön on raportoitu työn eteneminen, mahdolliset poikkeamat työvaiheissa, näytteen laadussa tai määrässä, sekä analyysitulokset ja menetelmäohjeet. Työn etenemistä havainnointiin kaaviolla, taulukoilla ja kuvilla. Varsinaiset analyysitulokset DNA:n laadusta esitettiin vertailevina koostetaulukoina mittaustuloksista, sekä kuvina geelielektroforeesituloksista. Kustannusvaikuttavuutta vertailtiin myös taulukkomallissa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli saada selville millä menetelmällä saataisiin eristettyä mahdollisimman laadukasta, SMRT-sekvensointi -menetelmän kriteerit täyttävää DNA:ta. Tavoitteena oli tehdä laadukas pohjatyö mahdollisille tuleville jatkotutkimuksille.

Opinnäytetyön tulosten perusteella saatiin selville paras menetelmä laadukkaan genomisen DNA:n eristämiseksi. Neljä viidestä laadunarviointi menetelmästä osoitti perinteisen Fenoli-kloroformiuuton olevan vertailun parhain eristysmenetelmä ja näin ollen menetelmä soveltuisi käytettäväksi SMRT-sekvensointiin tarkoitetun DNA:n eristämiseen. Kustannusvaikuttavuudeltaan menetelmä puolestaan sijoittui toiseksi parhaaksi vaihtoehdoksi. Analyysitulosten perusteella pääsimme tavoitteeseemme laadukkaasta pohjatyöstä tuleville tutkimuksille. Tutkimusryhmä on jo aloittanut sekvensointiin johtavat näytteiden eristykset työn pohjalta.

12.5 Tulosten luotettavuus ja eettisyys

Opinnäytetyössä toimittiin tutkimuseettisten ohjeiden mukaisesti (luku 11). Tietoa pyrittiin hakemaan ajantasaista ja luotettavista lähteistä, kuten alan kirjallisuudesta ja oppimateriaaleista, sekä verkkojulkaisuista ja tieteellisistä artikkeleista. Lähdeviitteitä on käytetty tekstissä asianmukaisesti. Kokeellisen osuuden työvaiheet suunniteltiin huolellisesti, huomioiden rajallinen näytemäärä, sekä reagenssien, materiaalien ja laitteiden saatavuus. Laboratoriotiloihin ja menetelmiin saatiin perehdytys ennen työvaiheiden aloittamista. Tutkimuksen työvaiheet pyrittiin dokumentoimaan niin, että menetelmät ovat ymmärrettävissä ja tarvittaessa toistettavissa sekä raportoitavissa opinnäytetyöhön. Dokumentointi antaa myös pohjan uusille jatkotutkimuksille. Laboratoriossa pyrittiin työskentelemään huolellisesti ja eettisesti vastuullisesti. Kaikki tulokset on esitetty raportissa rehellisesti niitä vääristelemättä.

Opinnäytetyön kokeellinen osuus oli pieni osa Yliopistolla tehtävää jatkuvaa rintasyöpätutkimusta. Opinnäytetyössä käytettiin rintasyöpäpotilaiden näytteitä, jotka oli kerätty Kliinisen lääketieteen patologian yksikön ja KYS:n yhteistyönä. Näytteet oli tarkoitettu käytettäväksi patologian yksikön rintasyöpätutkimuksessa. Suurin osa näytteistä oli säilytyksessä jo valmiiksi koodattuina, niin ettei henkilötietoja ollut näkyvissä. Ainoastaan 1980-luvulla otetuissa kokoveriputkissa henkilötiedot olivat nähtävissä. Opinnäytetyötä varten kaikki työssä käytetyt näytteet koodattiin numeroilla ja kirjaimilla potilaan henkilötietojen suojaamiseksi. Näytteiden alkuperäiset tiedot jäivät ainoastaan Yliopiston tietoon. DNA-näytteiden analysointiin käytettävissä menetelmissä laitteet kalibroitiin ennen käyttöä sekä kaikissa analyyseissa käytettiin asianmukaisia standardinäytteitä, jolloin pystyttiin varmistamaan saatujen tulosten luotettavuus.

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä Suomessa ja sairastuneiden määrä kasvaa koko ajan. Geneettisillä tekijöillä on todettu olevan vaikutusta syövän periytyvyyteen ja sairastumisriskiin. Syövän geneettisen luonteen vuoksi DNA:n sekvenssien muutoksien selvittäminen on tärkeä osa uutta syöpätutkimusta. Geenitutkimusten pohjalta voidaan tulevaisuudessa kehittää syövän ennaltaehkäisevää ja yksilöllistä, kohdennettua lääkehoitoa. Näillä perusteilla Patologian tutkimusryhmän rintasyöpätutkimus ja sillä ohella opinnäytetyömme ovat eettisesti perusteltuja.

12.6 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyö oli prosessina mielenkiintoinen ja mielekäs tehdä. Lisäksi aihe tuki opetussuunnitelman (Savonia-ammattikorkeakoulu 2016) mukaisia molekyylibiologian opintoja, kasvattaen siten omaa ammatillista kasvua. Tavoitteena oli löytää määrällinen tutkimus, joka antaisi mahdollisuuden tutustua syvemmin uuteen aiheeseen ja tutkimusmenetelmiin sekä kehittää aiempaa ammatillista osaamista laboratorioalalla. Lisäksi tavoitteena oli saada uusia näkökulmia omiin työskentelytapoihin ja eri työyhteisöjen toimintaperiaatteisiin. Toiveena oli myös, että työ olisi tieteellisesti merkityksellinen ja mahdollisesti antaisi uutta lisätietoa jatkotutkimuksiin.

Opinnäytetyön tekeminen aloitettiin tiedonhaualla alan kirjallisuudesta ja luotettaviksi arvioituista verkkolähteistä. Oikean, luotettavan ja ajantasaisen tiedon löytäminen, asiayhteyksien ymmärtäminen ja tiedon kokoaminen työn teoriapohjaksi osoittautui ajoittain haastavaksi. Suuri osa verkkomateriaaleista oli englanninkielisiä. Haastavinta oli opetella syövän syntymekanismit, ymmärtää eri sekvenssointimenetelmien erot ja niiden hyödyntäminen syövän tutkimisessa, sekä jäsenellä tieto yhdeksi tiedoksi. Palkitsevinta työtä tehdessä oli huomata, että kykeni sisäistämään runsaasti uutta tietoa, jota pystyi hyödyntämään teoriaosuutta tehdessä.

Opinnäytetyön kokeellinen osuus koostui työn suunnitteluvaiheesta, erilaisista valmistelutöistä, DNA:n eristyksistä, eristetyn DNA:n laaduntarkkailusta, sekä menetelmien ja tulosten dokumentoinnista. Suunnitteluvaiheessa ja tutkimuksen valmistelussa tuli huomioida ajankäyttö, näytteiden rajallinen määrä, materiaalien ja reagenssien riittävyys, sekä laitteiden rajallinen saatavuus. Myös reagenssien käyttöturvallisuustiedotteisiin perehdyttiin ennen työn aloittamista. Kokeellisen osuuden haasteiksi muodostuivat ajankäyttö, menetelmäkokonaisuuden hallinta ja työn aikataulutus. Eristysmenetelmät

ja työskentely-ympäristö olivat ennestään uusia, eristysprotokolla saattoi vaatia pitkiä esivalmisteluja tai protokolla oli muuten pitkäkestoinen. Lisäksi tuli huomioida muiden työntekijöiden työskentely, esimerkiksi laitteiden käyttövuorojen suhteen. Myös yhteisen työskentelyajan löytäminen toi omat haasteensa. Lisää haastetta toi eristysmenetelmien, näytemateriaalien ja laadunmääritysmenetelmien määrä ja se, että työvaiheet jouduttiin tekemään limittäin työn sujuvuuden parantamiseksi. Tässä riittävä ja laadukas dokumentointi ja näyteputkien merkkkaus nousi erityisen tärkeään asemaan. Varmuus laboratoriotyöskentelyssä, dokumentointitaidossa ja työohjeiden kirjoittamisessa, sekä työohjeiden nopea omaksuminen, työskentelyn sujuvuus ja osittain tutut laadunmääritysmenetelmät toivat puolestaan varmuutta omaan työskentelyyn.

Opinnäytetyöprosessi vastasi hyvin asetettuja toiveita ja näin sekä henkilökohtaiset että ammatilliset tavoitteet täyttyivät. Työn aikana perehdyttiin mielenkiintoisiin aiheisiin, kuten syöpään sairautena, eri sekvensointimenetelmiin ja niiden hyödyntämiseen syövän tutkimisessa. Prosessin aikana englanninkielisen tekstin sisäistäminen ja kääntäminen harjaantui sekä tieteellisen tekstin tuottaminen kehittyi. Näistä tiedoista tulee olemaan hyötyä tulevassa bioanalyttikon ammatissa.

LÄHTEET

AGILENT TECHNOLOGIES 2016a. RecoverEase DNA Isolation Kit - Details & Specifications. [Verkkójulkaisu.] [Viitattu 2016-05-29.] Saatavissa:

<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?crumbAction=push&pageId=900009>

AGILENT TECHNOLOGIES 2016b. RecoverEase DNA Isolation Kit. Instruction manual. [Verkkójulkaisu.] [Viitattu 2016-05-29.] Saatavissa: <http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/720202.pdf>

AITTOMÄKI, K., KÄÄRIÄINEN, H., MECKLIN, J-P. ja PALVA, T. 2013. Periytyvyyden piirteet, toteaminen ja molekyyli-genetiikka. Teoksessa JOENSUU, H., ROBERTS, P. J., KELLOKUMPU-LAHTINEN, P-L., JYRKKIÖ, S., KOURI, M. ja LYLTY, T. (toim.). Syöpätaudit. 5. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. s. 59 - 78.

BIOTIUM 2016. Gel red nucleic acid gel stain, 10000X in water. [Verkkójulkaisu.] [Viitattu 2016-06-02.] Saatavissa: <https://biotium.com/product/gelredtm-nucleic-acid-gel-stain-10000x-in-water/>

BOREN, E. 2015. Otavan opisto. Mutaatiot. [Verkkójulkaisu.] [Viitattu 2016-01-23.]

http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/bi/bi2/09_perinnollisyys/03_mutaatiot?C:D=hRyE.hQ2U&m:selres=hRyE.hQ2U

CARLETON COLLEGE 2016. DNA Extraction. [Verkkójulkaisu.] [Viitattu 2016-06-20.] Saatavissa: http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/dnaext.html

CHIAL, H. ja GRAIG, J. 2008. Nature education. mtDNA and mitochondrial diseases. [Verkkójulkaisu.] [Viitattu 2016-02-17.] Saatavissa: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/mtdna-and-mitochondrial-diseases-903#>

DI PIETRO, F., ORTENZI, F., TILIO, M., CONCETTI, F. ja NAPOLIONI, V. 2010. Genomic DNA extraction from whole blood stored from 15- to 30-years at -20 °C by rapid phenol-chloroform protocol: A useful tool for genetic epidemiology studies. [Verkkójulkaisu.] [Viitattu 2016-09-18.] Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850810000757>

FINNISH CANCER REGISTRY 2015. Mean annual numbers of new cancer cases in 1967-2013, by primary site and period, FEMALES. [Verkkójulkaisu.] [Viitattu 2016-02-23.] Saatavissa: <http://stats.cancerregistry.fi/stats/eng/veng0004i0.html>

FLUSBERG, B. A., WEBSTER, D., LEE, J., TRAVERS, K., OLIVARES, E., CLARK, T. A., KORLACH, J. ja TURNER, S. W. 2010. NCBI. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. [Verkkójulkaisu.] [Viitattu 2016-02-04.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2879396/?tool=pubmed>

FRILANDER, M. 2006. DNA ja geenisäätelyn periaatteet. Teoksessa AULA, P., KÄÄRIÄINEN, H. ja PALOTIE, A. (toim.). Perinnöllisyyslääketiede. 3., uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

GAIKWAD, A. B. 2016. DNA extraction: Comparison of methodologies. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-06-20.] Saatavissa: http://www.nbgr.ernet.in/Portals/6/DMX/GENOMIC_RESOURCES/DNA%20extraction-Comparison%20of%20methodologies.pdf

GREEN, E. D. 2016. National human genome research institute. DNA sequencing. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-01-28.] Saatavissa: <http://www.genome.gov/glossary/?id=51>

HAMMACK, S. 2016. 17.6: Point Mutations. [Verkkoluento.] [Viitattu 2016-02-22.] Saatavissa: <http://www.hammiverse.com/lectures/17/6.html>

HELSINGIN YLIOPISTO 2016. Tutkimusetiikka. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-29.] Saatavissa: <https://www.helsinki.fi/fi/tutkimus/tutkimusetiikka>

HUDSONALPHA 2016. Quality Control. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-11-21.] Saatavissa: <https://gsl.hudsonalpha.org/information/sample/qc>

ISOLA, J. ja KALLIONIEMI, A. 2013. Syövän synty, kasvu ja leviäminen. Teoksessa JOENSUU, H., ROBERTS, P. J., KELLOKUMPU-LAHTINEN, P-L., JYRKKIÖ, S., KOURI, M. ja LYLTY, T. (toim.). Syöpätaudit. 5. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. s. 9-28.

JOENSUU, H., HUOVINEN, R. ja LEIDENIUS, M. 2013. Rintasyövän yleisyys, ehkäisy ja diagnostiikka. Teoksessa JOENSUU, H., ROBERTS, P. J., KELLOKUMPU-LAHTINEN, P-L., JYRKKIÖ, S., KOURI, M. ja LYLTY, T. (toim.). Syöpätaudit. 5. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. s. 593-601.

KNUUTILA, S. 2006. DNA ja geenisäätelyn periaatteet. Teoksessa AULA, P., KÄÄRIÄINEN, H. ja PALOTIE, A. (toim.). Perinnöllisyyslääketiede. 3., uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

LEARY, R. J., KINDE, I., DIEHL, F., SCHMIDT, K., CLOUSER, C., DUNCAN, C., ANTIPOVA, A., LEE, C., MCKERNAN, K., DE LA VEGA, F. M., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B., DIAZ, L. A. Jr ja VELCULESCU, V. E. 2010. NCBI. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-01-30.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2858564/>

LEBLANC, V. G. ja MARRA, M. A. 2015. Cancers. Next-generation sequencing approaches in cancer: where have they brought us and where will they take us? [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-01.] Saatavissa: <http://www.mdpi.com/2072-6694/7/3/0869/htm>

LEHTO, V-P. ja STENBÄCK, F. 2012a. Mutaatiot. Teoksessa MÄKINEN, M., CARPÉN, O., KOSMA, V-M., LEHTO V-P, PAAVONEN, T. ja STENBÄCK, F. (toim.). Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. s. 81.

LEHTO, V-P. ja STENBÄCK, F. 2012b. Syöpäsolun invaasiomekanismit ja metastasointi. Teoksessa MÄKINEN, M., CARPÉN, O., KOSMA, V-M., LEHTO V-P., PAAVONEN, T. ja STENBÄCK, F. (toim.). Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. s. 294.

LIPS, E. H., MICHAUT, M., HOOGSTRAAT, M. L., MULDER, L., BESSELINK, N., KOUDIJS, M. J., VOEST, E. E., BERNARDS, R., NEDERLOF, P. M., WESSELING, J., RODENHUIS S. ja WESSELS, L. FA, 2014. Cancer research. Next generation sequencing to find predictors for chemotherapy response in triple negative breast cancer. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-01-30.] Saatavissa: http://cancerres.aacrjournals.org/content/75/9_Supplement/P3-06-21.short

MANTERE, T., WINQVIST, R., KAUPPILA, S., GRIP, M., JUUKOLA-VUORINEN, A., TERVASMÄKI, A., RAPA-KKO, K. ja PYLKÄS, K. 2016. PLOS Genetics. Targeted next-generation sequencing identifies a recurrent mutation in *MCPH1* associating with hereditary breast cancer susceptibility. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-02-01.] Saatavissa: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1005816#sec004>

MAXAM, A. M. ja GILBERT, W. 1977. A new method for sequencing DNA. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-01-29.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC392330/>

MCCARTHY, A. 2010. Science direct. Chemistry & Biology. Third generation DNA sequencing: Pacific biosciences' single molecule real time technology. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-01-28.] Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552110002474>

MIRMOMENI, M.H., SAJJADI MAJD,S., SISAKHTNEZHAD, S. ja DORANEGARD, F. Comparison of three methods for DNA extraction from paraffin embedded tissues. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-09-18.] Saatavissa: <http://scialert.net/fulltext/?doi=jbs.2010.261.266&org=11#f1>

PACBIO 2013. Guidelines for successful SMRTbell libraries. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-02-18.] Saatavissa: <http://dnatech.genomecenter.ucdavis.edu/wp-content/uploads/2014/07/Pacbio-Guidelines-SMRTbell-Libraries-v1.0.pdf>

PACBIO 2015. Bring the W back to whole genome sequencing. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-02-24.] Saatavissa: <http://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/Bring-the-W-Back-to-Whole-Genome-Sequencing.pdf>

- PACBIO 2015-2016. SMRT Sequencing. [Video.] [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-03.] Saatavissa: <http://www.pacb.com/smrt-science/smrt-sequencing/>
- PAREEK, C. S., SMO CZYNSKI, R. ja TRET YN, A. 2011. NCBI. Sequencing technologies and genome sequencing. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-01-29.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189340/#CR122>
- PFIZER 2014a. Rintasyöpä. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-21.] Saatavissa: <http://www.syopainfo.fi/eri-syopamuodot/rintasyopa.html>
- PFIZER 2014b. Lääkehoito. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-24.] Saatavissa: <http://www.syopainfo.fi/syovan-hoito/laakehoito.html>
- PROMEGA 2016a. How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample? [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-01-31.] Saatavissa: <https://fi.promega.com/resources/pubhub/notes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/>
- PROMEGA 2016b. Sodium Dodecyl Sulfate, Molecular Biology Grade (SDS). [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-06-20.] Saatavissa: https://fi.promega.com/products/biochemicals-and-labware/biochemical-buffers-and-reagents/sodium-dodecyl-sulfate_-molecular-biology-grade-_sds_/
- PÄRSSINEN, R., SUOMINEN, I. ja HAAJANEN, K., 2012. Biogeeni. Tampere: Juvenes Print - Suomen Yliopistopaino Oy.
- QIAGEN 2014. MagAttract® HMW DNA Kit Handbook. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-06-12.] Saatavissa: <https://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=3e331b6c-0742-483b-b74f-a7be2d4c1116&lang=en>
- QIAGEN 2013-2015. NGS cancer genotyping. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-24.] Saatavissa: <https://www.qiagen.com/fi/products/life-science-research/cancer-research/ngs-cancer-genotyping/>
- QIAGEN 2016a. Considerations for isolation and quantification of both genomic DNA and plasmid DNA. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-02.] Saatavissa: <https://www.qiagen.com/fi/resources/molecular-biology-methods/dna/#>
- QIAGEN 2016b. QIAquick PCR Purification Kit. Product details. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-04.] Saatavissa: <https://www.qiagen.com/fi/shop/sample-technologies/dna/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit#productdetails>
- QIAGEN 2016c. Next-Generation Sequencing (NGS). [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-06-14.] Saatavissa: <https://www.qiagen.com/fi/resources/molecular-biology-methods/ngs/>

RINTASYÖPÄYHDISTYS EUROPA DONNA FINLAND RY 2016. Tietoa rintasyövästä. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-01-24.] Saatavissa: <http://www.europadonna.fi/rintasyopa2/>

ROBERTS, R. J., CARNEIRO, M. O. ja SCHATZ, M. C. 2013. Genome Biology. The advantages of SMRT sequencing. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-02-04.] Saatavissa: <http://www.genomebiology.com/2013/14/7/405>

ROCHE 2015a. Rintasyövän eri tyypit [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-01-19.] Saatavissa: <http://www.rintasyopa.fi/yleista/rintasyovan-eri-tyypit/>

ROCHE 2015b. Rintasyövän synty ja ehkäisy. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-01-19.] Saatavissa: <http://www.rintasyopa.fi/yleista/rintasyovan-synty-ja-ehkaisy/>

ROCHE 2016a. Hoitoprosessi. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-10-06.] Saatavissa: <https://rintasyopa.fi/rintasyovan-hoito/hoitoprosessi/>

ROCHE 2016b. Rintasyöpäleikkaus. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-10-06.] Saatavissa: <https://rintasyopa.fi/rintasyovan-hoito/rintasyopaleikkaus/>

ROGERS, B. J. ja DYCAICO, M. J. 2008. New Protocols for Isolating High-Molecular-Weight Genomic DNA. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-06-16.] Saatavissa: <http://cp.literature.agilent.com/litweb/pdf/5989-8257EN.pdf>

RUSSNES, H. G., NAVIN, N., HICKS, J. ja BORRESEN-DALE, A-L. 2011. NCBI. Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-01-31.] Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3195464/#B1>

SARIOLA, H. ja VUORIO, E. 1996. Duodecim. RNA: juoksupoika vai työnjohtaja? [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-01-27.] Saatavissa: http://duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&viewType=viewArticle&tunnus=duo60079&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_auth=

SAVONIA-AMMATTIKORKEAKOULU 2016. Opetussuunnitelmat. [Viitattu 2016-11-21.] [Verkkojulkaisu.] Saatavissa: <http://portal.savonia.fi/amk/fi/opiskelijalle/opetussuunnitelmat?yks=KS&krtid=792&tab=6&krtid2=79299>

SCHADT, E. E., TURNER, S. ja KASARSKIS, A. 2010. Human molecular genetics. A window into third-generation sequencing. [Verkkojulkaisu.] [Viitattu 2016-01-28.] Saatavissa: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/19/R2/R227.full.pdf+html>

SCHATZ, M. C., DELCHER, A. L. ja SALZBERG, S. L. 2010. Genome research. Assembly of large genomes using second-generation sequencing. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-01-31.] Saatavissa: <http://genome.cshlp.org/content/20/9/1165.full>

SHAH, S. P., MORIN, R. D., KHATTRA, J., PRENTICE, L., PUGH, T., BURLEIGH, A., DELANEY, A., GELMON, K., GULIANY, R., SENZ, J., STEIDL, C., HOLT, R. A., JONES, S., SUN, M., LEUNG, G., MOORE, R., SEVERSON, T., TAYLOR, G. A., TESCHENDORFF, A. E., TSE, K., TURASHVILI, G., VARHOL, R., WARREN, R. L, WATSON, P., ZHAO, Y., CALDAS, C., HUNTSMAN, D., HIRTS, M., MARRA, M. A. ja APARICIO, S. 2009. Nature. Mutation evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-01-30.] Saatavissa: <http://www.nature.com/nature/journal/v461/n7265/full/nature08489.html>

SOLUNETTI 2006a. Mitokondrion rakenne. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-17.] Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/mitokondrion_rakenne/2/

SOLUNETTI 2006b. Mitokondrion perimä. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-17.] Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/mitokondrion_perima/2/

SOLUNETTI 2006c. Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-05-27.] Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_eristys_ja_puhdistus/2/

SOLUNETTI 2006d. Nukleiinihappojen monistaminen. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-09-20.] Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/nukleiinihappojen_monistaminen/2/

SOLUNETTI 2006e. Translokaatio. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-11-05.] Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/translokaatio_1/2/

SUOMEN SYÖPÄREKISTERI 2010. Rintasyövän seulonta. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-23.] Saatavissa: <http://www.cancer.fi/syoparekisteri/joukkotarkastusrekisteri/ammattilaisille/rintasyovan-seulonta/>

SUOMINEN, I., PÄRSSINEN, R., HAAJANEN, K. ja PELKONEN, J., 2013. Geenitekniikka. 2.korjattu painos. Saarijärvi: Saarijärven Offset Oy.

SYÖPÄJÄRJESTÖT 2015a. Rintasyöpä. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-01-18.] Saatavissa: <https://www.kaikkisyovasta.fi/tietoa-syovasta/syopataudit/rintasyopa/>

SYÖPÄJÄRJESTÖT 2015b. Mikä on syöpä? [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-01-23.] Saatavissa: <https://www.kaikkisyovasta.fi/tietoa-syovasta/mika-on-syopa/>

THERMO FISHER SCIENTIFIC 2015a. Quantify functional DNA. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-06-14.] Saatavissa: <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/dna-genotyping-from-human-ffpe-samples/quantify-functional-dna.html>

THERMO FISHER SCIENTIFIC 2015b. Agarose Gel Electrophoresis Tips & Tricks. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-07.] Saatavissa: <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/pcr/elevate-pcr-research/agarose-content-with-tips-and-tricks.html>

THERMO FISHER SCIENTIFIC 2015c. New to Sanger and Next-Generation sequencing technology. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-09-12.] Saatavissa: <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/sequencing/sequencing-education/sanger-next-generation-technology.html>

THERMO FISHER SCIENTIFIC 2016a. 260/280 and 260/230 Ratios. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-06-13.] Saatavissa: <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>

THERMO FISHER SCIENTIFIC 2016b. Assessment of Nucleic Acid Purity. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-06-13.] Saatavissa: <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>

THERMO SCIENTIFIC 2012. Product information. Generuler 100 bp PLUS DNA Ladder. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu: 2016-09-06.] Saatavissa: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013009_GeneRuler_100bp_Plus_DNALadder_250ug_UG.pdf

TIEVA, A. ja PELTOMÄKI, P. 2012. Duodecim. Epigeneettiset muutokset syövässä. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-04.] Saatavissa: http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&p_p_action=1&p_p_state=maximized&viewType=viewArticle&tunnus=duo10005

UEF 2016. Tutkimusetiikka. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-02-29.] Saatavissa: <https://www.uef.fi/tutkimusetiikka>

ULMANEN, I., TENHUNEN, J. ja YLÄNNE, J., 2009. Geeni ja biotekniikka. 6.-8. painos. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

VWR 2014. Käyttöturvallisuustiedote. Fenoli. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-09-13.] Saatavissa: https://fi.vwr.com/assetsvc/asset/fi_FI/id/8939148/contents

VWR 2015. Käyttöturvallisuustiedote. Kloroformi. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-09-13.] Saatavissa: https://fi.vwr.com/assetsvc/asset/fi_FI/id/7902276/contents

VÄHÄKANGAS, K., KOSMA, V-M. 2012. Solumetabolia ja soluvaurio. Teoksessa MÄKINEN, M., CARPÉN, O., KOSMA, V-M., LEHTO V-P., PAAVONEN, T. ja STENBÄCK, F. (toim.). Patologia. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. s. 117-123.

WCRF 2016. Breast cancer statistics. [Verkojulkaisu.] [Viitattu 2016-02-23.] Saatavissa:

<http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/breast-cancer-statistics>

YAN, J., LAIL, K., WILLIAMS, T., GUTIERREZ, A. ja WEI, C-L. 2014. Genomic DNA sample QC. [Verkojulkaisu.] [Viitattu 2016-11-21.] Saatavissa:

<http://1ofdmq2n8tc36m6i46scovo2e.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2013/11/Genomic-DNA-Sample-QC.pdf>

LIITE 1: GENOMISEN DNA:N ERISTÄMINEN FENOLI-KLOROFORMIUUTOLLA

Itä-Suomen Yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Kliinisen lääketieteen yksikkö

Kliininen patologia ja oikeuslääketiede

Muokattu ohjeesta: DNA:n eristys kokoverestä 16.6.2005 HT.

Ulla Lehtoaho, Miia Koistinen 16.6.2016

GENOMISEN DNA:N ERISTÄMINEN FENOLI-KLOROFORMIUUTOLLA

Työssä tarvittavat tarvikkeet:

- 50 ml Falcon-putkia
- Mikrosentrifuugiputkia 1,5 ml
- Sentrifuugi
- Heilurisekoittaja
- Vesihaude
- Steriilejä lasisauvoja

Työssä tarvittavat liuokset/reagenssit:

- 0,1 % Nonidet P-40
- Lyysispuskuri pH 8.0
- 20 % SDS
- Proteinase K, 10 mg/ml
- TE-puskuri pH 8.0
- 3M Natriumasettaatti pH 7.5
- Kloroformi-isoamyylialkoholi
- Tasapainotettu fenoli pH 6.8

- a) vain kokoverelle
- b) vain viljellyille soluille
- c) vain kudokselle

Ensimmäinen päivä: Solujen homogenisointi

1. a) Sulatettua ja tasaiseksi sekoitettua verta otetaan 5 ml 50 ml:n Falcon-putkeen. Lisätään steriiliä vettä ad. 50 ml. Putkia sekoitetaan kääntämällä niitä muutaman kerran ylösalaisin. Veden vaikutuksesta punasolut ja solukalvot rikkoontuvat ja veri "kirkastuu" hemolyysin johdosta.
2. a) Fuugataan 2500 g / 15 min (Rotina 380), jonka jälkeen supernatantti kaadetaan pois, varoen solunapin rikkoontumista.

3. a) Lisätään 24 ml 0,1 % NP-40-liuosta. Solunapit pestään suspensoimalla pasteuripipetillä edestakaisin. Fuugataan 2500 g / 15 min. Supernatantti kaadetaan pois.
4. a, b) **Solunapin** päälle lisätään 5 ml lyysipuskuria ja 250µl 20 % SDS:a sekä 100 µl proteinaasi K:ta. Suspensoidaan pasteuripipetillä suspensioksi. SDS rikkoo tumakelmut ja proteinaasi K hajottaa proteiinit.

c) **Kudospalan** (25 mg) päälle, eppariin, lisätään 500 µl lyysipuskuria ja 25 µl 20 % SDS:a sekä 20 µl proteinaasi K:ta. Suspensoidaan pasteuripipetillä suspensioksi. SDS rikkoo tumakelmut ja proteinaasi K hajottaa proteiinit.
5. a, b, c) Näytteitä inkuboidaan yön yli +40 °C:ssa kevyessä sekoituksessa.

Toinen päivä: Uutto

1. a, b) Putkiin lisätään 5 ml fenolia, sekoitetaan heilurissa 15 – 45 min, jonka jälkeen fuugataan 2500 g / 15 min.

c) Eppariputkiin lisätään 500 µl fenolia, sekoitetaan heilurissa 15 – 45 min, jonka jälkeen fuugataan 2500 g / 15 min.
2. a, b, c) Vesifaasi=yläfaasi, joka sisältää DNA:n pipetoidaan uuteen putkeen. Varotaan faasienväliin saostunutta proteiinia.

a, b) Lisää putkiin (johon yläfaasi kerätty) 2,5 ml fenolia ja 2,5 ml kloroformia. Sekoitetaan heilurissa 15 min, jonka jälkeen fuugataan 2500 g / 15 min.

c) Lisää putkiin (johon yläfaasi kerätty) 250 µl fenolia ja 250 µl kloroformia. Sekoitetaan heilurissa 15 min, jonka jälkeen fuugataan 2500 g / 15 min.
3. a, b, c) Vesifaasi=yläfaasi, joka sisältää DNA:n pipetoidaan uuteen putkeen. Varotaan faasienväliin saostunutta proteiinia.

a, b) Lisää putkiin (johon yläfaasi kerätty) 5 ml kloroformia. Sekoitetaan heilurissa 15 min, jonka jälkeen fuugataan 2500 g / 15 min.

c) Lisää putkiin (johon yläfaasi kerätty) 500 µl kloroformia. Sekoitetaan heilurissa 15 min, jonka jälkeen fuugataan 2500 g / 15 min.

4. a, b, c) Vesifaasi=yläfaasi, joka sisältää DNA:n pipetoidaan uuteen putkeen. **Älä ota** mukaan yhtään alafaasia.

DNA:n saostaminen

1. a, b) Vesifaasiin lisätään 700 µl 3 M Na-asetaattia ja 10 ml -20 °C ABS EtOH:a. DNA-rihmaa aletaan kierittämään steriilin lasisauvan ympärille.

c) Vesifaasiin lisätään 70 µl 3 M Na-asetaattia ja 1 ml -20 °C ABS EtOH:a. DNA-rihmaa aletaan kierittämään steriilin lasisauvan ympärille.
2. a, b) Lasisauvassa oleva DNA-rihma huuhdellaan pipetoimalla rihaman päälle 500 µl 70 % EtOH:a, jonka jälkeen etanolin annetaan haihtua ilmakehään pois.

c) Lasisauvassa oleva DNA-rihma huuhdellaan pipetoimalla rihaman päälle 200 µl 70 % EtOH:a, jonka jälkeen etanolin annetaan haihtua ilmakehään pois.
3. a, b, c) DNA-rihma eluoidaan sopivaan määrään (esim. 100 – 200µl) TE-puskuria. TE-puskuri pipetoidaan rihaman päälle, lasisauvan ollessa epparissa. Lasisauvaa pidetään puskurissa, kunnes kaikki rihma on irronnut lasisauvasta.
4. Näytteiden annetaan eluotua huoneenlämmössä vähintään kaksi vuorokautta, ennen jatkotoimenpiteitä.

LIITE 2: GENOMISEN DNA:N ERISTÄMINEN QIAGEN:N MAGATTRACT HMW DNA REAGENSSISARJALLA

Itä-Suomen Yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Kliinisen lääketieteen yksikkö

Kliininen patologia ja oikeuslääketiede

Ulla Lehtoaho, Miia Koistinen 16.6.2016

GENOMISEN DNA:N ERISTÄMINEN QIAGEN:n MagAttract HMW DNA reagenssarjalla

Välineet ja reagenssit

- Vesihaude (37 °C)
- EtOH (96–100%)
- Steriilejä mikroputkia 1.5 ja 2 ml
- Mikrosentrifuugi (2 ml:n putkille)
- Steriilit pipetinkärjet filttareilla
- Magneettiräkki
- Vortex
- Tasosekoittaja (1400 rpm)

Kudosnäytteille lisäksi:

- Kirurgin veitsi
- Nestetyyppi (pakastetulle näytteelle)
- Nestetyypen kestävät metalliastiat näytteiden leikkausta varten (pakastetulle näytteelle)
- Analyysivaaka
- Inkubaattori-sekoittaja (56 °C)

DNA:n eristys kokoverestä (tuore tai pakastettu näyte) (käytetty myös soluille)

Qiagen MagAttract HMW DNA kit (Kit handbook s. 15-17)

Huomioitava ennen eristyksen aloittamista:

- Kitti soveltuu EDTA-, sitraatti- ja hepariiniverelle.
- Varmistettava, ettei eristettävä DNA ole fragmentoitunut,
- Eristysvaiheessa vältettävä liian voimakasta käsittelyä tai turhia pipetointivaiheita.

Esivalmistelut

- Lämmitetään vesihaude +37 °C:een
- Sulatetaan kokoveri +37 °C:ssa kevyesti sekoittaen ja annetaan tasaantua huoneenlämmössä ennen työn aloitusta. Tuore veri sekoitetaan varovasti kääntelemällä ennen pipetointia.
- Jos AL tai MB buffer sisältää sakkua, inkuboidaan +37 °C:ssa välillä sekoittaen
- Valmistetaan buffer MW1 ja PE 96- 100 % EtOH:iin pullon ohjeen mukaisesti.
- Vortexoidaan MagAttract suspension G (magneettipartikkelit) 3 min ennen ensimmäistä käyttöä

Työohje

1. Pipetoidaan 20 µl Proteinase K mikroputken (2 ml) pohjalle
2. Lisätään putkeen 200 µl kokoverta
3. Lisätään 4 µl Rnase ja 150 µl Buffer AL. Vorteksoidaan varovasti.
Huom. Proteinase K:ta ei saa lisätä suoraan Buffer AL:n sekaan.
Huom. Varmistettava, että liuos on sekoitettu homogeeniseksi, jotta taataan tehokas lyysautuminen.
4. Inkuboidaan 30 min rt (Tai +65 °C 10 min). Lyysauksen aikana liuoksen väri muuttuu tummanruskeaksi tai mustaksi.
5. Spinnataan putket lyhyesti.
6. Lisätään 15 µl MagAttract Suspension G.
Huom. Varmistettava ennen pipetointia, että suspensio on tasainen!
7. Lisätään 280 µl Buffer MB.
8. Laitetaan putket sekoittajalle ja inkuboidaan 3 min rt, 1400 rpm.
9. Siirretään putket magneettiräkkiin ja annetaan seistä n. 1 min kunnes magneettikuulat erottuvat putken seinämään. Poistetaan supernatantti huolellisesti koskettamatta kuulia.
10. Poistetaan putket magneettiräkistä.
11. Lisätään 700 µl Buffer MW1 suoraan magneettipelletin päälle.
12. Laitetaan putket sekoittajalle ja inkuboidaan 1 min rt, 1400 rpm.
13. Toistetaan kohdat 9-12 ja uudelleen kohdat 9 ja 10.
14. Lisätään 700 µl Buffer PE suoraan magneettipelletin päälle.
15. Laitetaan putket sekoittajalle ja inkuboidaan 1 min rt, 1400 rpm.
16. Toistetaan kohdat 9 ja 10, ja uudelleen kohdat 14, 15 ja lopuksi **vain kohta 9**.
Huom. Supernatantti poistettava huolellisesti, jotta kaikki Buffer PE saadaan pois.
17. Huuhdotaan kuulat 700 µl Nuclease free water:lla putkien ollessa magneetissa kiinni.
Huom. Vettä ei saa pipetoida suoraan magneettien päälle. Pipetointi varovasti vastakkaisen seinämän puolelta.
18. Inkuboidaan 1 min rt ja poistetaan supernatantti.
19. Toistetaan kohdat 17 ja 18.
20. Putket poistetaan magneetista ja lisätään sopiva määrä (100-200 µl) Buffer AE.
21. Laitetaan putket sekoittajalle ja inkuboidaan 3 min rt, 1400 rpm.
22. Siirretään putket magneettiräkkiin ja annetaan seistä n. 1 min kunnes magneettikuulat erottuvat putken seinämään. Supernatantti (DNA) siirretään 1,5 ml:n mikroputkiin.

DNA:n eristys kudoksesta (tuore tai pakastettu näyte)

Qiagen MagAttract HMW DNA kit (Kit handbook s. 18-19)

Huomioitava ennen eristyksen aloittamista:

- Varmistettava, ettei eristettävä DNA ole fragmentoitunut,
- Eristysvaiheessa vältettävä liian voimakasta käsittelyä tai turhia pipetointivaiheita.

Esivalmistelut

- Lämmitetään inkubaattori-sekoittaja 56 C:een lyysausvaihetta varten
- Jos ATL buffer:iin on muodostunut sakkaa, inkuboidaan 37 °C:ssa välillä sekoittaen
- Valmistetaan buffer MW1 ja PE 96 – 100 % EtOH:iin pullon ohjeen mukaisesti.
- Vortexoidaan MagAttract suspension G (magneettipartikkelit) 3 min ennen ensimmäistä käyttöä

TyöohjePäivä 1 (kit handbook s 18)

1. Leikataan steriilillä veitsellä kudospala (max 25 mg) ja punnitaan se (esijäähdytetyssä) 2 ml:n mikroputkessa.
2. Näytteelle lisätään 220 µl Buffer ATL.
3. Lisätään 40 µl Proteinase K ja vortexoidaan.
4. Inkuboidaan 56 °C, 900 rpm yön yli (12 – 16 h), kunnes kudoksesta täysin lyysautunut.

Päivä 2 (kit handbook s. 19)

1. Spinnataan putket lyhyesti.
Huom. Jos putkessa liukenematonta materiaalia jäljellä, sentrifugoidaan 20,000 x g, 3 min ja siirretään supernatantti uuteen putkeen.
2. Pipetoidaan 200 µl lisaattia uuteen 2 ml:n putkeen.
3. Lisätään 4 µl Rnase A. Sekoitetaan pulssi-vortexoimalla ja inkuboidaan 2 min rt.
4. Lisätään 150 µl Buffer AL ja sekoitetaan pipetoimalla.
5. Lisätään 280 µl Buffer MB.
6. Lisätään 40 µl MagAttract Suspension G
Huom. Varmistettava ennen pipetointia, että suspensio on tasainen!
7. Laitetaan putket sekoittajalle ja inkuboidaan rt 3 min, 1400 rpm.
8. Siirretään putket magneettiräkkiin ja annetaan seistä n. 1 min kunnes magneettikuulat erottuvat putken seinämään. Poistetaan supernatantti huolellisesti koskettamatta kuulia.
9. Poistetaan putket magneettiräkestä.
10. Lisätään 700 µl Buffer MW1 suoraan magneettipelletin päälle
11. Laitetaan putket sekoittajalle ja inkuboidaan 2 min rt, 1400 rpm.
12. Toistetaan kohdat 8-11 ja uudelleen kohdat 8 ja 9.
13. Lisätään 700 µl Buffer PE suoraan magneettipelletin päälle
14. Laitetaan putket sekoittajalle ja inkuboidaan 2 min rt, 1400 rpm.
15. Toistetaan kohdat 8 ja 9, ja uudelleen kohdat 13, 14 ja lopuksi **vain kohta 8**.
Huom. Supernatantti poistettava huolellisesti, jotta kaikki Buffer PE saadaan pois.

16. Huuhdotaan kuulat 700 μ l Nuclease free water:lla putkien ollessa magneetissa kiinni.

Huom. Vettä ei saa pipetoida suoraan magneettien päälle. Pipetointi varovasti vastakkaisen seinämän puolelta.

17. Inkuboidaan 1 min rt ja poistetaan supernatantti.

18. Toistetaan kohdat 16 ja 17.

19. Putket poistetaan magneetista ja lisätään sopiva määrä (100 – 200 μ l) Buffer AE.

20. Laitetaan putket sekoittajalle ja inkuboidaan 3 min rt, 1400 rpm.

Siirretään putket magneettiräkkiin ja annetaan seistä n. 1 min kunnes magneettikuulat erottuvat putken seinämään. Supernatantti (DNA) siirretään 1,5 ml:n mikroputkiin

LIITE 3: GENOMISEN DNA:N ERISTÄMINEN AGILENT:N RECOVEREASE DNA ISOLATION REAGENSISARJALLA

Itä-Suomen Yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Kliinisen lääketieteen yksikkö

Kliininen patologia ja oikeuslääketiede

Ulla Lehtoaho, Miia Koistinen 16.6.2016

GENOMISEN DNA:N ERISTÄMINEN AGILENT:n RecoverEase DNA Isolation reagenssisarjalla

Solupellettien valmistus kokoverestä

Tarvittavat lisämateriaalit ja reagenssit

- Tris-buffered ammonium chloride (140 mM NH₄Cl; 17 mM Tris-HCl, pH 7.65) 5 x määrä näytteeseen nähden
- 0.85 % NaCl (20 ml/näyte)
- Vesihaude +37 °C
- 50 ml:n steriilit putket
- Steriilit pipetinkärjet filttereillä
- Sentrifuugi 50 ml putkille (3480 rcf)

Solupelletin valmistusohje

1. Pipetoidaan veri (n. 5 ml) 50 ml:n steriiliin putkeen.
2. Lisätään näytteelle 5 x määrä NH₄Cl/Tris-HCl; esim. 5 ml verta ja 25 ml NH₄Cl/Tris-HCl.
3. Sekoitetaan 5 krt kääntelemällä ja inkuboidaan +37 °C 5 min.
4. Sentrifugoidaan 3480 rcf 15 min ja pipetoidaan supernatantti pois.
5. Pestään solupelletti 0.85 % NaCl; lisätään 25 ml NaCl pelletin päälle ja sekoitetaan varovasti pipetillä.
6. Toistetaan kohta 4.
7. Solupellettien pakastus -80 °C.

Huom. Soluviljelmille tehtäessä solut irrotetaan solukaapimella tai trypsiinillä, pestään, pelletoidaan ja jäädytetään nestetyypellä ennen käyttöä.

RecoverEase DNA Isolation Kit –protokolla

Tarvittavat lisämateriaalit ja reagenssit

- Wheaton Dounce –kudoshierrin (7 ml)
- DNA Away ja milliQ H₂O hiertimen puhdistukseen
- Sakset pipetinkärkien leikkaamiseen
- TE-puskuri, autoklavoitu (reilu 1 l/näyte)
- 500 – 1000 ml steriilejä dekantterilaseja (1/näyte) =dialyysastia
- Steriilejä magneetteja (1/näyte)

Esivalmistelut

- Lämmitetään vesihaude +50 °C:een.
- Lämmitetään inkubaattori-sekoittaja ~+50°C:een kudoshierimen kuivausta varten
- Otetaan solupelletit sulamaan.
- Viilennetään puhdas Wheaton Dounce –kudoshierrin (7 ml) jäällä
- Otetaan jäälle Lysis buffer, Digestion buffer, Proteinase K (jaettu aiemmin 70 µl eriin) ja Rnase-It.

Protokolla soluviljelmille (sama protokolla myös kokoverelle)

1. Pipetoidaan 5 ml jääkylmää Lysis buffer:ia solupelletin päälle ja sekoitetaan varovasti pipetoimalla edestakaisin.
2. Siirretään näyte pipetillä kylmään kudoshierimeen ja hierretään ylös-alas survimella 5 krt (vaahtoa).
3. Kaadetaan homogenaatti steriilin strainerin läpi steriiliin 50 ml:n putkeen.
4. Huuhdotaan kudoshierrin 3 ml:lla Lysis buffer:ia ja kaadetaan strainerin läpi putkeen (tot. volyyymi 8 ml). Strainer heitetään pois ja suljetaan putken korkki.
5. Siirretään putki jäälle ja toistetaan edelliset vaiheet lopuille näytteille.
6. Sentrifugoidaan putket 1100 x g, 12 min + 4 °C.
7. Pipetoidaan kaikki supernatantti varovasti pois ja kuivataan jäljelle jäänyt kosteus putken seinämiltä vanupuikolla. Pelletti usein harsomaista ja nesteen seassa kelluvaa, jolloin pipetoidaan supernatantista vain se osa mitä pystyy.
8. Aktivoidaan Proteinase K (1 putki per näyte) vesihauteella +50 °C 2-5 min ennen käyttöä.
9. Valmistetaan Digestion solution; 20 µl Rnase-It / 1 ml Digestion buffer.
10. Lisätään 70 µl Digestion solution solupelletin päälle ja heilutetaan kevyesti. Jos pelletti kiinni putken pohjassa, tulee heiluttaa niin, että se irtoaa. Tarvittaessa irrotetaan pipetin kärjellä työntämällä.
11. Laitetaan putket vesihauteelle +50 °C ja lisätään näytteille 70 µl lämmitettyä Proteinase K-liuosta. Sekoitetaan kevyesti heiluttamalla.
12. Suljetaan putket ja inkuboidaan 45 min. Sekoitetaan kevyesti heiluttamalla 10 – 15 min välein.
13. Kaadetaan vähintään 500 ml steriiliä TE buffer:ia steriiliin dekanterilasiin, siirretään dekka magneettisekoittajalle ja asetetaan dialyysimalja puskurin pinnalle. Malja asetetaan niin päin, että sen sivussa olevat kaarevat lovet muodostavat pienen N-kirjaimen. Varmistetaan myös, että dialyysimaljan membraani on kauttaaltaan kosketuksissa puskuuriin, eikä membraanin alla ole isoja ilmakuplia. Jokaiselle näytteelle tulee oma dialyysiastia.
14. Siirretään varovasti viskoosi genominen DNA dialyysimaljan membraanin päälle. Pipetointi tehdään katkaistulla pipetinkärjellä.
15. Laitetaan magneettisekoittajaan kevyt sekoitus päälle ja dialysoidaan DNA:ta huoneenlämmössä 16 – 48 h. Uusi puskuuri vaihdetaan kerran (tai kaksi) dialyysin aikana, jolloin maksimoidaan eristetyn DNA:n puhtaus.
16. Dialyysin loputtua poistetaan dialyysimalja TE buffer:sta ja pipetoidaan DNA 15 ml:n steriiliin putkeen. Pipetointi tehdään katkaistulla 5 ml:n pipetinkärjellä. Pipetoidessa tulee huomioida, että DNA on todella viskoosia ja peittää tasaisesti koko membraanin.
17. Eristetty genominen DNA on suoraan käytettävissä muihin sovelluksiin. Säilytys 1 kk + 4 °C.

LIITE 4: TULOKSIA

NanoDrop								
Fenoli-kloroformi uutto			Qiagen			Agilent		
	A260/280 (1.7-1.9)	A260/230 (2.0-2.2)		A260/280 (1.7-1.9)	A260/230 (2.0-2.2)		A260/280 (1.7-1.9)	A260/230 (2.0-2.2)
S1	1,98	2,15	S6	1,88	0,13	S11	1,87	2,2
S2	2,01	2,2	S7	1,93	0,19	S12	1,81	2,11
S3	1,96	2,2	S8	1,96	0,16			
S4	1,97	2,15	S9	1,85	1,96			
S5	2,01	2,12	S10	1,67	1,37			
V1	1,83	2,27	V1	1,77	1,57	V1	1,55	0,56
V2	1,83	2,24	V2	1,7	1,42	V2	1,56	0,57
V3	1,84	2,32	V3	1,84	0,71	V3	1,7	1,06
V4	1,82	2,23	V4	1,71	1,5	V4	1,64	1
V5	1,8	2,17	V5	1,77	0,44	V5	1,71	0,84
V6	1,85	2,29	V6	1,67	0,6	V6	1,07	0,47
V7	1,85	2,32	V7	1,48	0,24	V7	1,56	1
V8	1,83	2,16	V8	1,73	1,29	V8	1,07	0,58
V9	1,86	2,28	V9	1,74	0,38	V9		
V10	1,85	2,26	V10	1,72	1,19	V10	1,08	0,4
K1	1,92	2,27	K1	1,55	0,43			
K2	1,83	2,13	K2	1,82	1,08			
K3	1,9	2,13	K3	1,81	0,53			
Rajojen sisällä (%)	67	50		73	0		36	18

KUVA 18. NanoDop 1000:lla mitatut puhtausarvot (absorbanssit). Punaisella arvot, jotka eivät osu viitevälihin. Qiagen:n S6,S7 ja S8 uusittu (S9 ja S10). Agilent:n V9:stä ei tulosta.

Qubit					
Fenoli-kloroformi uutto		Qiagen		Agilent	
V1	420	V1	14,8	V1	19,5
V2	179	V2	18,9	V2	25,4
V3	228	V3	19,1	V3	23,8
V4	92,6	V4	12,3	V4	10,3
V5	240	V5	14,4	V5	14,9
V6	222	V6	12,8	V6	
V7	208	V7	6,16	V7	11,3
V8	60,4	V8	13,1	V8	
V9	136	V9	12	V9	
V10	226	V10	12,7	V10	
K1	35,6	K1	5,34		
K2	42	K2	27,8		
K3	35,4	K3	17,9		
S1	118	S6		S11	28,8
S2	142	S7		S12	19,8
S3	188	S8			
S4	204	S9	36		
S5	175	S10	18,2		
KA (ng/μl)	164		16,1		19,225

KUVA 19. Qubit 2.0:lla mitatut pitoisuudet (ng/μl).

LIITE 5: KUVALUETTELO

KUVA 1, s.10. DNA:n emäkset. Muokattu kuvasta: SUOMINEN, Ilari, PÄRSSINEN, Raimo, HAAJANEN, Kari & PELKONEN, Jani, 2010. Turun ammattikorkeakoulu. Geenitekniikka. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-09-03.] Saatavissa: http://julkaisut.turkuamk.fi/geenitekniikka/kuvat_luku_1.html

KUVA 2, s.11. Kaksoiskierteisen DNA:n muodot. The conceivable future 2016. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-03-01.] Saatavissa: <https://theconceivablefuture.wordpress.com/tag/mitochondrial-dna/>

KUVA 3, s.16. SMRT-kuopan pohjalla oleva ZMW-kammio. Muokattu: SCHADT, Eric E, TURNER, Steve & KASARSKIS, Andrew 2010. Human molecular genetics. A window into third-generation sequencing. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-01-28.] Saatavissa: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/19/R2/R227.full.pdf+html>

KUVA 4, s. 28. Qiagenin protokolla. Muokattu: Qiagen 2014. MagAttract® HMW DNA Kit Handbook. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-06-12.] Saatavissa: <https://www.qiagen.com/fi/resources/resource-detail?id=3e331b6c-0742-483b-b74f-a7be2d4c1116&lang=en>

KUVA 5, s.29. Agilentin eristysmenetelmä vs. Fenoli-kloroformiuutto. Muokattu: Agilent Technologies 2016a. RecoverEase DNA Isolation Kit - Details & Specifications. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu 2016-05-29.] Saatavissa: <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?crumbAction=push&pageId=900009>

KUVA 6, s.31. Fenoli-kloroformi uutolla eristetty DNA-rihma lasisauvassa. KOISTINEN, Miia & LEHTO-AHO, Ulla 2016.

KUVA 7, s.32. Qiagenin menetelmä – DNA:n pesuvaihe. KOISTINEN, Miia & LEHTO-AHO, Ulla 2016.

KUVA 8, s.32. Kudoshierrin. KOISTINEN, Miia & LEHTO-AHO, Ulla 2016.

KUVA 9, s.33. Agilent menetelmän dialyysivaihe, eristetty DNA (kuplat) puhdistuu sinisen dialyysimaljan keskellä. KOISTINEN, Miia & LEHTO-AHO, Ulla 2016.

KUVA 10, s.36. 0,4 %:n agarosielektroforeesigeeli, 40V/20h. Verinäytteistä eristetty DNA kaikilla eristysmenetelmillä. KOISTINEN, Miia & LEHTO-AHO, Ulla 2016.

KUVA 11, s.36. 0,4 %:n agarosielektroforeesigeeli, 40V/20h. Rintasyöpäkudoksista eristetyt DNA:t; Qiagen ja Fenoli-kloroformi uutto. KOISTINEN, Miia & LEHTO-AHO, Ulla 2016.

KUVA 12, s.37. 1,5 %:n Agarosielektroforeesigeeli, 80V/1h20min. PCR-tuote; fenoli-kloroformi sekä Agilent. KOISTINEN, Miia & LEHTO-AHO, Ulla 2016. Käytetty kokostandardi, kuva muokattu: Thermo Scientific 2012. Product information. Generuler 100 bp PLUS DNA Ladder. [Verkkajulkaisu.] [Viitattu:

2016-09-06.] Saatavissa: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013009_GeneRuler_100bp_Plus_DNALadder_250ug_UG.pdf

KUVA 13, s.38. 1,5 %:n Agarosielektroforeesigeeli, 80V/1h20min. PCR-tuote; Qiagen sekä fenoli-kloroformi. KOISTINEN, Miia & LEHTOAHO, Ulla 2016.

KUVA 14, s.38. 1,5 %:n Agarosielektroforeesigeeli, 80V/1h20min. PCR-tuote; Qiagen, Agilent sekä fenoli-kloroformi. KOISTINEN, Miia & LEHTOAHO, Ulla 2016.

KUVA 15, s.39. Verinäytteiden säilyvyyden vaikutus DNA:n eristykseen. Eristys fenoli-kloroformiulla. 0,4 %:n agarosielektroforeesigeeli, 40V/20h. KOISTINEN, Miia & LEHTOAHO, Ulla 2016.

KUVA 16, s.39. Verinäytteiden säilyvyyden vaikutus DNA:n eristykseen. Eristys Qiagen:n kitillä. 0,4 %:n agarosielektroforeesigeeli, 40V/20h. KOISTINEN, Miia & LEHTOAHO, Ulla 2016.

KUVA 17, s.40. Verinäytteiden säilyvyyden vaikutus DNA:n eristykseen. Eristys Agilent:n kitillä. 0,4 %:n agarosielektroforeesigeeli, 40V/20h. KOISTINEN, Miia & LEHTOAHO, Ulla 2016.