



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

RNA:N, DNA:N JA PROTEIINIEN KOON,
PITOISUUDEN JA LAADUN MÄÄRITYKSEN
VALIDOINTI BIOANALYZER 2100 -LAITTEELLE

Maria Partanen

Opinnäytetyö
Joulukuu 2017
Energia-ja ympäristötekniikka
Laboriotekniikka



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikka

PARTANEN, MARIA:

RNA:n, DNA:n ja proteiinien koon, pitoisuuden ja laadun määrittämisen validointi
Bioanalyzer 2100 -laitteelle

Opinnäytetyö 52 sivua, joista liitteitä 9 sivua
Joulukuu 2017

Opinnäytetyö tehtiin FICAM:lle, joka on Tampereen yliopiston lääketieteen ja biotieteiden tiedekuntaan kuuluva tutkimuskeskus. FICAM on eläinkokeille vaihtoehtoisten menetelmien asiantuntijakeskus, joka kehittää ja validoi *in vitro* kudos- ja elinmalleja. Kudos- ja elinmallit perustuvat erilaistettuihin kantasoluihin, joista rakennetaan useiden solutyypin yhdistelmä soluviljelyssä. Malleista voidaan eristää mm. RNA:ta, josta tutkitaan esimerkiksi geeniekspressiota ja arvioidaan sytotoksisuutta. FICAM:iin oli hankittu bioanalyyttori RNA:n, DNA:n ja proteiinien koon ja määrän analysointiin, mutta laite ei ollut vielä GLP-käytössä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli todistaa bioanalyyttori hyväksyttäväksi GLP-käyttöön. Tarkoituksena oli validoida laite ja menetelmät RNA:n, DNA:n ja proteiinien pitoisuuden, koon ja laadun määrittämiseen. Menetelmiin valittiin sopivat kitit ja referenssiaineet laitteen käyttötarkoituksen perusteella. Tulosten perusteella arvioitiin järjestelmän toiminnan ja kytien toistettavuutta ja tarkkuutta. FICAM:in vaatimusten sekä Bioanalyzer 2100 -laitteen valmistajan, Agilent Technologies:in ilmoittamien arvojen perusteella validoinnille asetettiin hyväksymiskriteerit.

Bioanalyzer 2100 läpäisi validoinnin hyväksymiskriteerit RNA:n DNA:n ja proteiinien koon, pitoisuuden ja eheyden määrittämisessä. Laite sopii rutiinimenetelmiin sekä laadunvarmistukseen. Analyysiin tarvitaan hyvin vähän reagensseja, mikä on kustannustehokasta sekä vaarallisen jätteen määrä vähenee. Jatkotoimenpiteenä laitteelle voidaan tarvittaessa validoida useampi kitit sen mukaan, millaisia näytteitä halutaan analysoida.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Energy- and Environmental Engineering
Laboratory Engineering

PARTANEN, MARIA:

Validation of the Bioanalyzer 2100 System for the Determination of RNA, DNA, and Protein Size, Concentration and Quality

Bachelor's thesis 52 pages, appendices 9 pages
December 2017

This thesis was commissioned by FICAM, which is a GLP certified research facility in faculty of medicine and life sciences, University of Tampere. FICAM is specialized in developing and validating *in vitro* tissue and organ models to replace animal testing. From these models RNA, DNA and proteins can be isolated and analyzed to study gene and protein expression. Bioanalyzer 2100 (Agilent) was purchased for analyzing the RNA, DNA and protein samples and the system had to be validated before it could be used in GLP studies.

The aim of this thesis was to prove that the Bioanalyzer 2100 system fulfills the GLP requirements. The purpose was to validate this Bioanalyzer 2100 system and assays for the determination of RNA, DNA and protein concentration, size and quality. Suitable reference samples and analysis kits were selected based on the use of the system in FICAM. The samples were tested based on the instructions provided by Agilent Technologies. Results were analyzed for the repeatability, reproducibility and accuracy of the system and kits. The computerized system was tested for its authentication security and integrity of the data generated. Acceptance criteria for the validation were set based on the requirements of FICAM and values provided by the Agilent Technologies.

Bioanalyzer 2100 passed the validation in determining RNA and protein size and concentration, and DNA size. The system is suitable for routine assays and quality control. The results are quantitative and the assays require very small amounts of reagents which is cost effective and reduces the production of hazardous waste. As a follow-up several different kits could be validated for the system depending on the sample types.

Key words: validation, nucleic acids, proteins, concentration, quality

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	TEORIA	8
	2.1 RNA.....	8
	2.2 DNA.....	9
	2.3 Proteiinit.....	10
	2.4 Näytteidenkäsittely	12
	2.4.1 Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus	12
	2.4.2 Proteiinien eristys ja puhdistus.....	14
	2.5 Mikrofluidistiikka	16
	2.6 Hyvä laboratoriokäytäntö (GLP)	17
3	MITTAUS- JA MÄÄRITYSMENETELMÄT	20
	3.1 Kapillaarielektroforeesi	20
	3.2 Bioanalyzer 2100	22
	3.2.1 Käyttökohteet	24
4	VALIDOINTI.....	27
	4.1 Yleistä validoinnista	27
	4.2 Tarkkuus	27
	4.3 Toistettavuus	28
	4.4 Vertailumateriaalit	28
5	VALIDOINNIN SUORITUS.....	30
	5.1 Validointiprosessi	30
	5.2 RNA-analyysi	31
	5.3 DNA-analyysi	32
	5.4 Proteiinianalyysi	32
6	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	34
	6.1 RNA-analyysin tulokset.....	34
	6.2 DNA-analyysin tulokset	35
	6.3 Proteiinianalyysin tulokset.....	37
7	POHDINTA.....	39
	LÄHTEET	42
	LIITTEET	44
	Liite 1. RNA, ajo 1	44
	Liite 2. RNA, ajo 2	45
	Liite 3. RNA, ajo 3	46
	Liite 4. DNA, ajo 1	47
	Liite 5. DNA, ajo 2	48

Liite 6. DNA, ajo 3	49
Liite 7. Proteiini, ajo 1	50
Liite 8. Proteiini, ajo 2	51
Liite 9. Proteiini, ajo 3	52

LYHENTEET JA TERMIT

assay	(analyysi)menetelmä
apoptoosi	ohjelmoitu solukuolema
bp	emäspari
DNA	deoksiribonukleiinihappo
GLP	hyvä laboratoriokäytäntö (Good Laboratory Practice)
RNA	ribonukleiinihappo
PCR	polymeraasiketjureaktio
SOP	vakioitu toimintaohje (Standard Operating Procedure)
mikrofluidistiikka	tieteen ala, joka tutkii nesteen käyttäytymistä ja kontrollointia mikrotasoisissa rakenteissa
RIN	RNA:n eheysluku
geeniekspressio	geenien ilmentäminen
translaatio	proteiinin muodostuminen lähetti-RNA:n informaation perusteella
proteomiikka	tieteen ala, joka tutkii eliön tuottamien proteiinien kokonaisuutta
sekvenssi	järjestys
elektroforeesi	sähköisesti varautuneiden molekyylien liikkuminen sähkökentässä kohti vastakkaista varausta
aluke	lyhyt RNA - tai DNA -juoste
proteolyysi	proteiinien hajoaminen
amfipaattinen	molekyyli, jolla on sekä hydrofiilinen että hydrofobinen osa
miselli	lipidimolekyyilirakenne
tRNA	siirtäjä-RNA
mRNA	lähetti-RNA
rRNA	ribosomaalinen RNA
validointi	menetelmän sopivuuden osoittamienn
<i>in vitro</i>	solun ulkopuolella
kofaktori	entsyymiin liittynyt orgaaninen tai epäorgaaninen yhdiste
prosteettinen ryhmä	entsyymiin kovalenttisesti liittynyt metalli-ioni tai orgaaninen yhdiste
referenssiaine	vertailuaine

1 JOHDANTO

Tutkimustyössä näytteiden pitoisuuden ja laadun määrittäminen on välttämätöntä luotettavien tutkimustulosten saavuttamiseksi. Bioanalysointilaitteisto (Bioanalyzer 2100) on monipuolinen laite laadunvarmistukseen monissa töissä, esimerkiksi uuden sukupolven sekvensoinnissa, geeniekspressiossa ja proteomiikassa. Laitteella voidaan määrittää monesta eri lähteestä peräisin olevien RNA-, DNA- ja proteiininäytteiden eheyttä, pitoisuutta ja puhtautta nopeammin kuin esimerkiksi perinteisellä geielektroforeesilla. Lisäksi bioanalysointilaitteen tarkkuus näytteiden epäpuhtauksien havaitsemisessa on huomattavasti vanhempia menetelmiä parempi. Laitteella saadaan kvantitatiivisia tuloksia, kun taas Western blotting ja muut vanhemmat menetelmät ovat vain kvalitatiivisia tai semikvantitatiivisia.

Tämä opinnäytetyö tehtiin FICAMille, joka on Tampereen yliopistoon kuuluva GLP-sertifioitu tutkimuskeskus, jonka tavoitteena on korvata eläinkokeet *in vitro* kudokset ja elinmalleilla. Kudokset ja elinmallit ovat 3D-solurakenteita, jotka muodostuvat useista solutyypeistä ja kudokselle spesifisestä väliaineesta. Näillä rakenteilla mallinnetaan ihmisen kudoksen toimintoja mahdollisimman hyvin. GLP eli hyvä laboratoriokäytäntö on laatujärjestelmä, jolla varmistetaan tutkimustulosten luotettavuus ja toistettavuus.

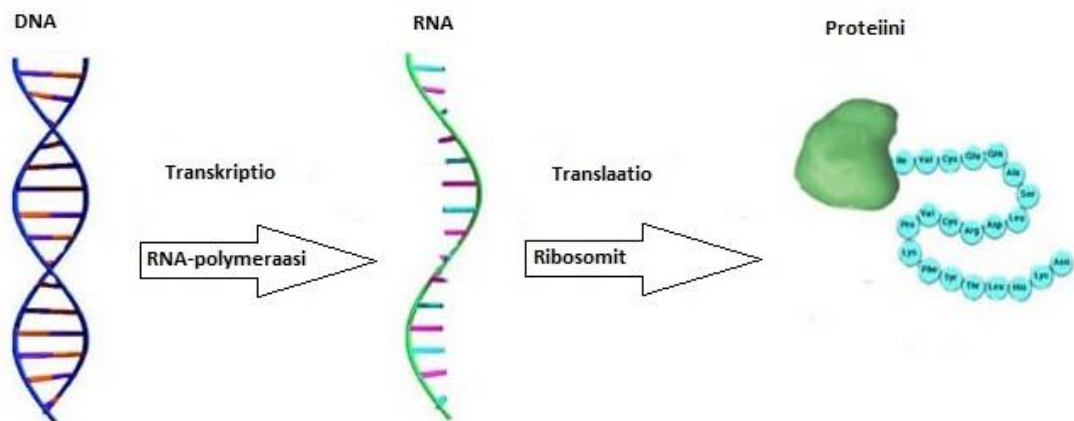
Opinnäytetyön tavoitteena oli saada bioanalysointilaitteisto hyväksyttävästi käyttöön GLP-töissä. Tarkoituksena oli validoida laite ja menetelmät RNA:n, DNA:n ja proteiinien pitoisuuden, koon ja laadun määrittämiseen. Menetelmiin valittiin näytteet, joiden koostumus tiedettiin, sekä sopivat kitit, jotka ovat FICAM:n tarpeiden mukaisia. Validoinnille asetettiin hyväksymiskriteerit FICAM:n tarpeiden ja valmistajan antamien arvojen mukaan. Koska FICAM on GLP-sertifioitu laboratorio, myös validointi suoritettiin OECD-ohjeistuksen mukaan. Sekä laitteesta että analyysimenetelmistä laadittiin kirjalliset työohjeet (SOP), jonka jälkeen kirjoitettiin validointisuunnitelma. Validoinnin suorituksen jälkeen työstä kirjoitettiin validointiraportti.

2 TEORIA

2.1 RNA

Ribonukleiinihappo eli RNA on lineaarinen molekyyli, joka koostuu neljästä eri ribonukleotidimäksestä: adeniinista (A), sytosiinista (C), guaniinista (G) ja urasiilista (U). Jokainen emäs koostuu riboosisokerista, fosfaattiryhmästä ja typpiästä. Vierekkäiset emäkset ovat liittyneet toisiinsa fosfodiesterisidoksilla. RNA on yleensä yksijuosteista, kun taas DNA on kaksijuosteista. Koska RNA:ssa on riboosisokeri deoksiriboosin sijaan, se on epästabiilimpi ja alttiimpi hajoamiselle kuin DNA. (Ribonucleic acid/RNA 2014)

RNA-polymeraasientsyymi muodostaa DNA:sta RNA:ta. Tätä prosessia kutsutaan proteiineja koodaavien geenien transkriptioksi, jolloin muodostuu lähetti-RNA:ta. Uudet RNA-sekvenssit ovat komplementaarisia DNA-templaatile. Translaatio tapahtuu ribosomilla, jossa RNA käännetään proteiineiksi. Translaatioon osallistuu kolme eri RNA-tyyppiä: lähetti-RNA (mRNA), siirtäjä-RNA (tRNA) ja ribosomaalinen RNA (rRNA). mRNA sisältää geneettisen informaation DNA:sta. tRNA kuljettaa sopivat aminohapot ribosomeihin proteiinisynteesiä varten. Ribosomeissa rRNA osallistuu RNA juosteen kääntämiseen aminohappoketjuksi. Translaatioon johtavaa tapahtumaketjua kutsutaan molekyylibiologian keskusdogmaksi (kuva 1). (Clancy 2008)



KUVA 1. Molekyylibiologian keskusdogma (Sharp 2012, muokattu).

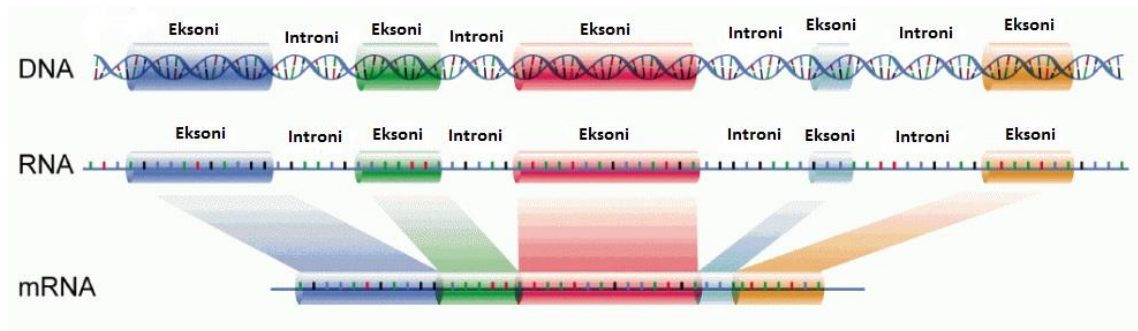
RNA osallistuu transkription ja translaation lisäksi muihin tapahtumiin soluissa. RNA osallistuu solujen toimintaan, säätelyyn ja toimii katalyyttinä solujen biokemiallisissa reaktioissa. RNA-molekyylit jotka eivät ole mRNA:ta, ovat ei-koodaavia. rRNA:n ja tRNA:n lisäksi eukaryoottisoluissa on ei-koodaavia, pieniä sääteleviä RNA:ta (sRNA): pieni nukleaarinen RNA (snRNA), mikroRNA (miRNA) ja pieni nukleolin RNA (snoRNA). snoRNA:t osallistuvat esi-RNA:n muokkaukseen tumajyväsessä. snRNA sijaitsee tumassa ja vaikuttaa geenisäätelyyn RNA-silmukoinnin kautta. miRNA inhiboi geeniekspressiota estämällä translaation ja on tutkimusten mukaan suuressa roolissa syövässä ja muissa taudeissa. Esimerkiksi Burkittin lymfoomasta eristetyistä B-soluista löytyy suuria määriä miRNA:ta, ja sen sekvenssi korreloi kromosomaalisen translokaation kanssa. (Clancy 2008)

2.2 DNA

DNA-molekyylit koostuu hydrofiilisestä deoksiriboosista eli sokerista, negatiivisesti varautuneesta fosfaattiryhmästä sekä erilaisista emäspareista. Emäsparit koostuvat adeniinista (A), guaniinista (G), sytosiinista (C) ja tymiinistä (T). Vetysidokset A- ja T- sekä C- ja G-emästen välillä saavat kaksi DNA-juostetta, joilla on komplementaariset juosteet sitoutumaan toisiinsa muodostaen kaksoisheliksirakenteen. Tässä rakenteessa vetysidokset ovat juosteiden sisäpuolella, ja fosfaattiryhmät ovat rakenteen ulkopuolella. (Kirby 2009)

DNA-juosteen vetysidokset voidaan rikkoa denaturoinnilla. Kun kaksijuosteinen DNA denaturoituu, juosteet irtoavat toisistaan. Yksijuosteinen DNA on huomattavasti epästabiliimpi kuin kaksijuosteinen DNA. Tämän takia juosteet voivat liittyä takaisin kaksijuosteiseksi DNA-rakenteeksi. Hybridisaatiossa kaksi eri lähteestä peräisin olevaa juostetta liittyvät toisiinsa. (Kirby 2009)

Proteiineja ja RNA:ta tuottavien koodaavien DNA-segmenttien lisäksi DNA-molekyyleissä on monia muitakin alueita, kuten säätelyyn osallistuvia alueita sekä ei-koodaavia alueita. Eukaryooteilla on huomattavasti suurempi määrä ei-koodaavaa DNA:ta kuin bakteereilla, esimerkiksi nisäkkäiden 300 Mbp DNA:sta 85 prosenttia on ei-koodaavaa DNA:ta. (Clark 2010, 79)



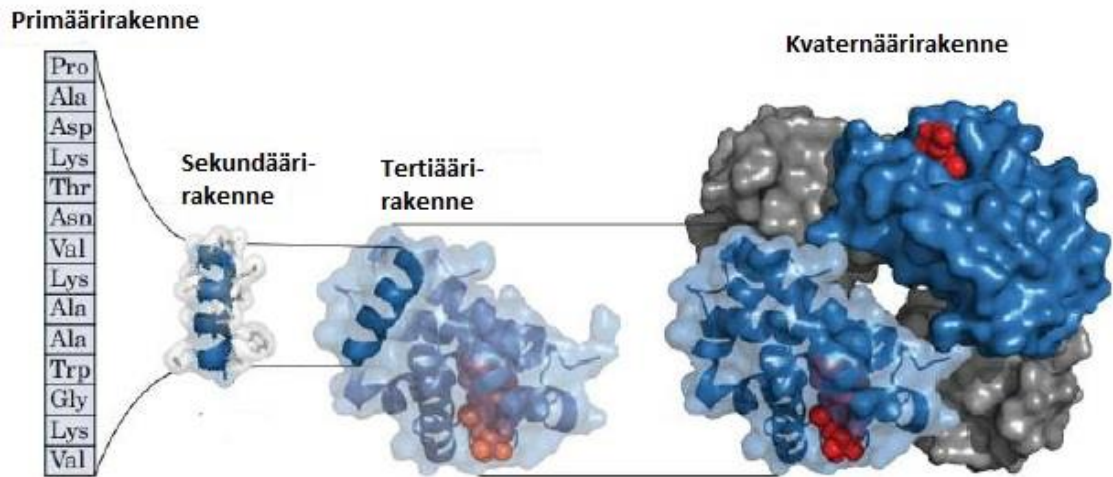
KUVA 2. Intronien ja eksonien järjestäytyminen geenissä (Feldenberg 2016, muokattu).

Geeni koostuu promoottorista, eksoneista (koodaava DNA) ja introneista (ei-koodaava DNA), jotka vuorottelevat (kuva 2). Jotta proteiinisynteesi voidaan suorittaa, intronit poistetaan transkription jälkeen. Kun geeniä ekspressoidaan, DNA transkriptoidaan pitkäksi RNA-juosteiksi (primääritranskripti), johon sisältyvät intronit. Primääritranskriptista poistetaan intronit, jolloin muodostuu mRNA:ta. (Clark 2010, 80)

2.3 Proteiinit

Proteiinit ovat biologisia polymeerejä, jotka suorittavat suurimman osan solujen toiminnoista. Ne voivat olla rakenteellisia eli ne tukevat solua tai saavat aikaan solun liikkumisen. Osa proteiineista siirtää ravintoaineita ja jätteitä, ja osa toimii entsymaattisesti biokemiallisissa reaktiossa esimerkiksi tuottaen energiaa. Proteiinit koostuvat yhdestä tai useammasta polypeptidiketjusta, jossa aminohapot ovat liittyneet toisiinsa peptidisidoksilla. Aminohapot koostuvat α -hiilestä, aminoryhmästä, karboksyyli ryhmästä, vetyatomista sekä sivuketjusta eli R-ryhmästä. Polypeptidiketjun ensimmäinen aminohappo säilyttää vapaan aminoryhmänsä, ja tätä päätä kutsutaan N-terminaaliksi. Ketjun viimeisessä aminohapossa on vapaa karboksyyli ryhmä, ja tätä päätä kutsutaan C-terminaaliksi. (Clark 2010, 70)

Lineaarisen polypeptidiketjun tulee laskostua 3D-rakenteeksi, jotta proteiini voi toimia. Monet proteiinit koostuvat useammasta ketjusta, ja niillä voi olla kofaktoreita tai prosteettisia ryhmiä. Kofaktorit ovat yleensä yksittäisiä metalliatomeja tai orgaanisia molekyyliä, jotka voivat liikkua proteiinista toiseen, ja prosteettiset ryhmät ovat proteiiniin liittyneitä orgaanisia molekyyliä (vitamiinit, sokerit, lipidit) tai epäorgaanisia metalleja. (Clark 2010, 71)



KUVA 3. Proteiinien rakenteet (Rashid, M.A., Khatib, F., Sattar, A. 2015, muokattu).

Proteiinin lopullinen muoto määräytyy aminohapposekvenssin mukaan. Proteiinirakenteet jaetaan neljään tasoon (kuva 3): Primääri-, sekundääri-, tertiääri- ja kvaternäärirakenteisiin. Primäärirakenne on proteiinin monomeerien järjestys eli proteiinin aminohapposekvenssi. Sekundäärirakenteessa polypeptidiketjut laskostuvat β -laskoksiksi tai kiertyvät α -heliksiksi, ja vetysidokset ovat ketjujen välissä. Tertiäärirakenne on 3D-rakenteeksi laskostunut β -laskos tai α -heliksi. Kvaternäärirakenne on monen erillisen polypeptidiketjun yhdistelmä (Clark 2010, 71).

Proteiinien liikkuvuuteen vaikuttavat useat tekijät. Kaikilla aminohapoilla on amiiniryhmä sekä karboksyylihapporyhmä, jonka lisäksi monilla aminohapoilla on ionisoituvia sivuryhmiä. Näiden ominaisuuksien ansiosta proteiinit ovat sähköisesti varautuneita. Sähköinen varaus antaa proteiineille myös mitattavan ominaisuuden. Proteiinit ovat natiivissa rakenteessaan melko pyöreitä ja taipumattomia molekyyliä, joiden halkaisija on yleensä 1-10 nm. Kun proteiinit denaturoituvat, niistä muodostuu pitkiä ketjuja. Denaturointiin käytetään yleensä natriumdodekyylisulfaattia (SDS). SDS-denaturoiduilla proteiineilla on negatiivinen sähkövaraus ja ne ovat lineaarisia, jolloin niiden liikkuvuus muistuttaa DNA:ta. (Kirby 2009)

2.4 Näytteidenkäsittely

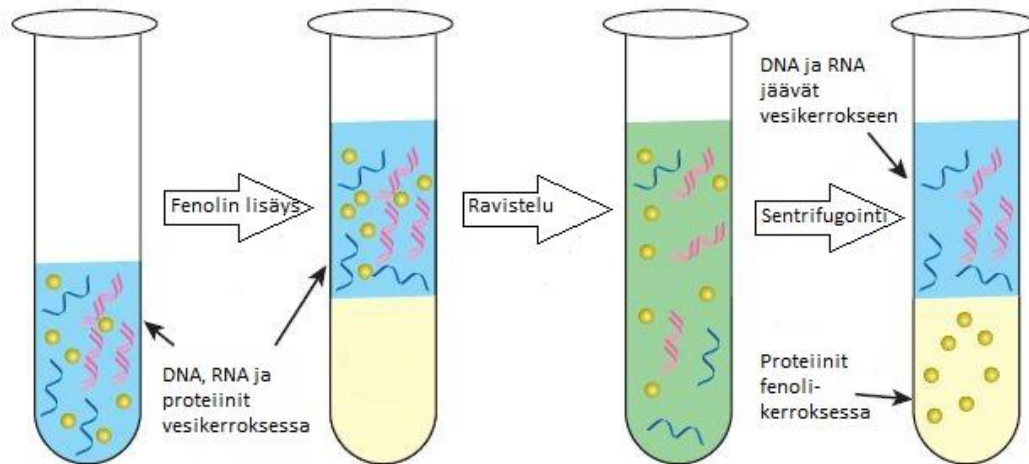
2.4.1 Nukleiinihappojen eristys ja puhdistus

Kun nukleiinihappoja eristetään soluista tai kudoksista, solut tulee ensin lyysata. Lyysauksessa solukalvot rikkoutuvat ja solun sisältö vapautuu liuokseen eli solulysaattiin. Näin tutkittavat nukleiinihapot voidaan erottaa muista solun komponenteista. Solujen lyysaus voidaan suorittaa joko mekaanisesti kuten jauhamalla ja sonikoimalla, tai lyysaus voidaan suorittaa kemiallisesti puskureiden avulla. Puskurit hajottavat soluseinän osmoosin avulla. Lyysauspuskurit sisältävät tyypillisesti detergenttejä, kuten Tritonia, joka liuottaa solukalvon lipidit. Puskuri voi sisältää myös kelatoivia aineita, kuten EDTA:ta inhiboimaan nukleasiaktiivisuutta. Solulysaatille voidaan suorittaa eristyksen jatkokäsittelyjä, esimerkiksi sentrifugointia, kemiallista erottelua tai pylvässuodatusta. (Bio-Rad, Nucleic Acid Extraction and Purification)

Ehjää RNA:ta on usein vaikea eristää. Ympäristössä on paljon Rnaaseja eli entsyymejä, jotka tuhoavat RNA-molekyylejä. Eristys vaatii näytteiden huolellista käsittelyä, hyvää aseptiikkaa sekä RNAasi-vapaita välineitä ja reagensseja. Eristykseen voidaan käyttää useita metodeja kuten esimerkiksi silikakalvoja, guanidiini-happo-fenoliuuttoa sekä magneettihelmiä. Kun RNA:ta eristetään orgaanisilla liuottimilla tai kaotrooppisilla aineilla, perusmenetelmä on sama. Ensin solut lyysataan joko puskureilla tai kaotrooppisilla aineilla kuten guanidiinikloridilla, fenolilla tai kloroformilla. Sen jälkeen näytteestä poistetaan DNA DNAasi-entsyymillä ja proteiinit digestoidaan proteinaasi K-entsyymillä tai vaihtoehtoisesti liuottamalla näyte guanidiinisuoloja sisältävään puskuriin, joka poistaa proteiinit. RNAasit poistetaan esimerkiksi fenolilla tai kloroformilla. Tämän jälkeen RNA erotetaan muista solukomponenteista lisäämällä kloroformia ja sentrifugoimalla. Näyteliuos jakautuu näin orgaaniseen faasiin ja vesifaasiin, jossa RNA toimenpiteen jälkeen sijaitsee. (Johnson 2012)

DNA voidaan puhdistaa joko sentrifugoinnilla tai kemiallisella uutolla. Solulysaattia sentrifugoimalla saadaan suuret ja painavammat molekyylit sedimentoitumaan pohjalle ja kevyemmät komponentit, kuten soluseinän kappaleet jäävät liuokseen. Sedimentoitunut DNA liuotetaan uudelleen sopivaan puskuriin, jonka jälkeen siitä poistetaan kemiallisesti proteiinit ja RNA, joita ei sentrifugoimalla voida erottaa

DNA:sta. DNA:n puhdistuksessa käytetään vaarallista ja syövyttävää fenolia, joka denaturoi proteiinit (kuva 4). Kun fenolia lisätään veteen, muodostuu kaksi erillistä faasia. Liuosta ravistellaan, jolloin kerrokset sekoittuvat ja proteiinit liukenevat fenoliin. Näytettä sentrifugoidaan lyhyesti ja vesikerros, jossa DNA ja RNA sijaitsevat, otetaan talteen. Puhdistusmenetelmänä voidaan käyttää myös geielektroforeesia, jos halutaan erotella esimerkiksi plasmideja. (Clark 2010, 568)



KUVA 4. Proteiinit poistetaan lisäämällä yhtä paljon fenolia ja vettä. Fenoli liuottaa proteiinit, mutta ei DNA:ta ja RNA:ta. Koska fenolilla ja vedellä on eri tiheydet, ne muodostavat erilliset kerrokset. Kun liuosta ravistetaan, proteiinit liukenevat fenoliin. Lyhyt sentrifugointi erottaa kerrokset, jolloin ylempi kerros voidaan eristää. (Clark 2010, muokattu)

Puhdistukseen on kehitetty uudempia menetelmiä, joilla fenolin käsittelyltä vältytään. Suurimmassa osassa DNA johdetaan hartsikolonniin läpi, joka sitoo pelkästään DNA:n. Yleisimpiä hartseja ovat silika ja anioninvaihtohartsi. Silika sitoo nukleiinihappoja nopeasti matalassa pH:ssa ja korkeassa suolakonsentraatiossa. Nukleiinihapot vapautetaan korkeassa pH:ssa ja matalassa suolakonsentraatiossa. Anioninvaihtohartsi on positiivisesti varautunut ja sitoo DNA:n negatiivisesti varautuneita fosfaattiryhmiä. Sitoutuminen tapahtuu matalassa suolakonsentraatiossa ja nukleiinihapot eluoituvat korkeassa suolakonsentraatiossa. (Clark 2010, 569)

DNA:sta poistetaan RNA-kontaminaatio ribonukleaasientsymillä, joka hajottaa RNA:n lyhyiksi oligonukleotideiksi jättäen DNA-makromolekyylin ehjäksi. DNA-RNA-seosta inkuboidaan ribonukleaasin entsyymiaktiiviteetin optimilämpötilassa. Tämän jälkeen

lisätään alkoholia, joka sakkauttaa DNA:n. Alkoholikäsittely ei ole spesifinen, jolloin se sakkauttaa DNA:n lisäksi myös suuria hiilihydraatteja ja proteiineja sekä ehjää RNA:ta. Nämä komponentit tulee poistaa liuoksesta ensin fenoliuutolla tai sentrifugoimalla. (Clark 2010, 569)

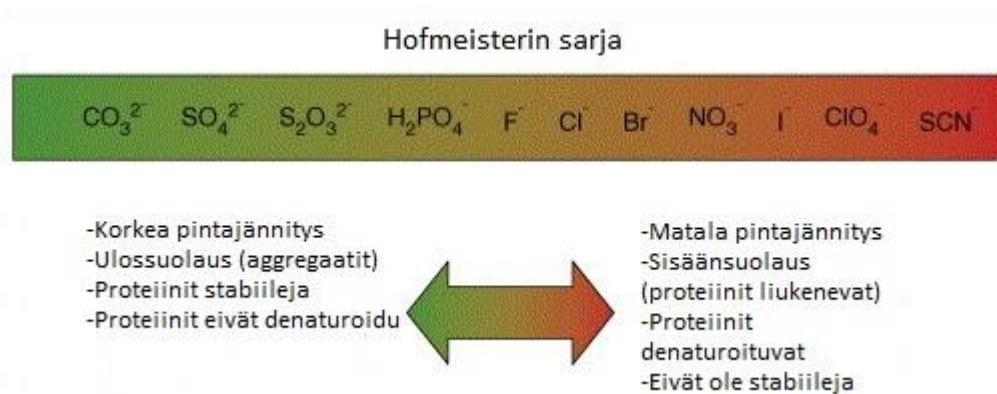
2.4.2 Proteiinien eristys ja puhdistus

Soluviljelyssä proteiineja voidaan eristää kasvatusliuoksesta johon solut ovat erittäneet proteiineja. Tällöin materiaali on melko puhdasta, koska mukana ei ole kontaminoivaa materiaalia. Yleensä kasvatusliuos konsentroidaan sentrifugoimalla ennen puhdistuksen aloittamista. Usein tutkittavat proteiinit sijaitsevat kudoksessa tai solumassassa, jolloin kontaminoivaa materiaalia vapautuu huomattavasti enemmän ja proteolyttinen aktiivisuus vaikeuttaa puhdistuksen suorittamista. Proteiinien uuttaminen kiinteästä näytteestä vaatii usein kompromissia saannon ja puhtauden välillä, ja uuttamisessa tulee pyrkiä halutun proteiinin vapautumiseen ja vaikeasti poistettavien kontaminanttien välttämiseen. Suurimmat ongelmat proteiinien puhdistuksessa ovat denaturoituminen, proteolyysi sekä pyrogeenien, nukleiinihappojen, bakteerien ja virusten aiheuttamat kontaminaatiot. Näitä ongelmia voidaan yleensä välttää pitämällä näyteenkäsittelyajat pieninä ja lämpötila matalana. Solun sisäisissä rekombinanttiproteiineissa ongelmana on niiden keräytyminen liukenemattomiksi ryhmittymiksi eli inkluusiokappaleiksi, jotka täytyy liuottaa ja uudelleenlaskostaa natiiviin rakenteeseen. (Janson 2011, 5)

Proteiinien uuttoliuosta valittaessa tulee ottaa huomioon olosuhteet, joissa eristettävä proteiini on vakaa ja vapautuu tehokkaasti soluista tai kudoksesta. Näitä olosuhteita ovat pH, puskurisuolat, detergentit tai kaatrooppiset aineet, pelkistävät aineet, kelatoivat aineet tai metalli-ionit sekä proteolyttiset inhibiittorit. pH valitaan sen mukaan, missä proteiinin aktiivisuus on korkein ja proteiini on vakaa. Puskurisuolat taas vaikuttavat proteiinin liukoisuuteen. Monesti proteiini on kiinnittynyt kalvoon tai partikkeliin, jolloin käytetään detergenttejä vähentämään hydrofobisia vuorovaikutuksia. Koska detergentit ovat amfipaattisia molekyyliä, ne muodostavat misellejä liian suurissa konsentraatioissa. Misellit vaikeuttavat puhdistusta, joten detergentin konsentraatio tulee pitää tarpeeksi matalana. Usein solunsisäisillä proteiineilla on suojaamattomia tioliryhmiä, jotka voivat hapettua puhdistuksen aikana. Pelkistävät aineet, kuten merkaptoetanoli ja ditiotreitoli (DTT), suojaavat tioliryhmiä. Kelatoivat aineet kuten EDTA poistavat häiritsevät

raskasmetallit, ja proteolyttiset inhibiittorit suojaavat proteiineja hajoamiselta. (Janson 2011, 6)

Proteiinien puhdistusmenetelmät voidaan jakaa presipitaatioon, elektroforeesiin, kromatografiaan, EBA-menetelmään (Expanded Bed Adsorption) ja kalvoadsorptioon. Presipitaatio suoritetaan lisäämällä näyteliuokseen suoloja, orgaanisia liuottimia tai polymeerejä, tai muuttamalla pH:ta tai lämpötilaa. Ionin vahvuus presipitaatiossa voidaan selvittää sen sijainnista Hofmeisterin sarjassa. (Janson 2011, 8)



KUVA 5. Hofmeisterin sarja (Zhang, Cremer 2006, muokattu).

Kuvassa 5 vasemmalla olevat antikaotrooppiset ionit ovat tehokkaimpia ulossuolauksessa, eli ne sitovat itseensä vettä tehostaen liuoksen hydrofobisuutta ja edistäen proteiinien ryhmittymistä. Kaotrooppiset suolat oikealla puolella taas alentavat hydrofobisia vuorovaikutuksia, eli ne saavat proteiinit pysymään liukoisessa muodossa. Polaariset orgaaniset liuottimet kuten etanoli saavat proteiinin sakkautumaan korvaamalla vesi liuoksessa. pH:n säätö on helppo ja edullinen tapa proteiinien presipitaatiossa, sillä proteiinien liukoisuus on matalin isoelektrisessä pisteessä. Presipitaation avulla puhdistetut proteiinit kerätään sentrifugoimalla. (Janson 2011, 8)

Kun halutaan eristää tiettyä proteiinia, voidaan menetelmänä käyttää immunopresipitaatiota. Menetelmää käytetään spesifiseen vasta-aineeseen sitoutuvan proteiinin erottamiseen muusta näytteestä. Vasta-ainetta ja solulyssaattia inkuboidaan, jolloin vasta-aineesta ja proteiinista muodostuu kompleksi. Tämä kompleksi voidaan eristää näytteestä esimerkiksi agarosihelmillä, joihin on liitetty proteiini A tai G. Vaihtoehtoisesti vasta-aineet voivat olla sidottuna valmiiksi helmiin. Vapaiden vasta-aineiden käyttäminen on hyödyllistä silloin, jos proteiinkonsentraatio on matala, vasta-

aineella on heikko affiniteetti tai sitoutuminen on hidasta. (Overview of the immunoprecipitation (IP) technique)

Proteiinien kromatografinen puhdistus riippuu proteiinin erottumisesta stationäärifaasin (adsorbentti) ja liikkuvan faasin (puskuriliuos) välillä. Stationäärifaasi on pakattuna pylvääseen, jonka läpi pumpataan puskuriliuosta. Pylväskromatografia on tehokas menetelmä, sillä adsorbentteja on kehitetty monien proteiinien ominaisuuksien mukaan: koko ja muoto (geelisuodatus/kokoeksklusio), nettovaraus ja varautuneet ryhmät (ioninvaihtokromatografia), kromatofokusointi, hydrofobisuus (käänteisfaasikromatografia), metallisidokset (metalliaffiniteetikromatografia), suojaamattomat tioliryhmät (kovalenttinen kromatografia) ja biologinen affiniteetti ligandeihin, inhibiittoreihin, reseptoreihin ja vasta-aineisiin (affiniteetikromatografia). Usein puhdistuksessa käytetään monia kromatografisia menetelmiä suuren puhtauden saavuttamiseksi. (Janson 2011, 9)

2.5 Mikrofluidistiikka

Mikrofluidistiikalla tarkoitetaan tiedettä, joka tutkii kuinka nesteen käyttäytyminen poikkeaa perinteisestä virtausteoriasta pienen mittakaavan systeemeissä. Mikrofluidistiikka on nestemekanikan alalaji, koska niiden fysikaaliset perusyhtälöt ovat identtisiä. Järjestelmä on mikrofluidistinen, jos jokin järjestelmän mittakaavoista, kuten pituus tai leveys, on alle mikrometrin. Näissä mittakaavoissa nesteiden ominaisuudet muuttuvat. Mikrofluidistiset virtaukset ovat yleensä laminaarisia ja esimerkiksi pintajännityksen merkitys voi olla suurempi kuin painovoiman. (Bastian 2016)

Yksi mikrofluidistiikan suurimmista sovelluksista ovat mikrofluidistiikkasirut (lab-on-a-chip). Siruja käytetään biologisten (DNA-sekvenssit), kemiallisten (lääkeaineet) ja biolääketieteellisten (toksiinit) aineiden analysointiin. Sirut ovat osa mekaanisia tai biolääketieteellisiä mikroelektromekaanisia järjestelmiä (MEMS), joissa yhdistyvät monet laboratorion toimenpiteet, esimerkiksi reagenssien sekoittaminen, entsyymireaktiot, erottelu sekä detektio. Analyysien suorittamisessa pienoiskoossa on monia etuja, kuten kustannustehokkuus, laitteiden pieni koko, nopeus, monitoimisuus ja herkkyys. Nesteen virtaus saadaan aikaan mekaanisilla pumpuilla tai elektrostaattisilla, magnetohydrodynaamisilla tai pintajännitysvoimilla. (Kleinstreuer & Abbott 2014. 189)

Menetelmissä käytetään hyvin pieniä nestetilavuuksia, jolloin kalliiden näytteiden ja reagenssien kulutus vähenee. Koska näytteet kulkeutuvat sirulla hyvin pieniä matkoja, analyysit ovat hyvin nopeita ja vasteaika pienenee (Kuznetsov 2010, 2).

Vaikka mikrofluidistiikkasiruja on käytetty laajasti lääketieteessä, terveydenhuollossa, ja ympäristövalvonnassa, teknologiassa on vielä parannettavaa. Yksi huomattava ongelma on soveltuvan teknologian puuttuminen sirujen valmistuksessa. Suljetut mikrofluidiikkarakenteet kuten kanavat ja kammiot ovat 3D-rakenteita, joten niitä ei voida suoraan muodostaa 2D-mikrorakenteista. Tämän takia sirut rakennetaan muodostamalla avoimia kanavia tai kammioita alustoilla, jotka pinotaan tai saumataan yhteen. Menetelmä tekee sirujen rakentamisesta monimutkaista ja kallista. (Kuznetsov 2010, 2) Näytteidenkäsittely asettaa rajoitteita menetelmien soveltamiselle ja käyttöönnotolle. Mikrofluidistiikkasirut ovat herkkiä virheille, jotka johtuvat pienistä näytetilavuuksista. Kapillaarivoimat, ilmakuplat, kanavien tukkeutuminen ja laminaarivirtausta häiritsevät reagenssit voivat aiheuttaa ongelmia analyyseissä (Jayamohan ym. 2016, 197).

2.6 Hyvä laboratoriokäytäntö (GLP)

Tutkimustyössä noudatetaan OECD:n ohjeistusta GLP-työskentelystä (Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring 2016). Laitevalidoinnissa noudatetaan OECD:n ohjeistusta (Application of GLP Principles to Computerized Systems 2016). Ohjeistuksissa kuvataan GLP:n perusvaatimukset testauslaitoksen henkilökunnalle ja organisaatiolle, laadunvarmistukselle, tiloille, laitteille ja reagensseille, testausjärjestelmille, riskinarvioinnille, testiaineille, toimintaohjeille ja raporteille. OECD:n mukaan GLP (Good Laboratory Practice) on laatujärjestelmä, jolla tarkkaillaan organisaation prosesseja ja olosuhteita, missä ei-kliinisiä ja ympäristön turvallisuuteen liittyviä tutkimuksia suunnitellaan, tehdään, tarkkaillaan, arkistoidaan ja raportoidaan. GLP-tutkimukset tehdään hyväksytyissä testauslaitoksissa, joiden toiminnan tulee vastata OECD:n asettamia vaatimuksia. GLP:ssä tärkeintä on jäljitettävyyys laboratorion toiminnalle, soluille, reagensseille ja laitteille. Suomessa Fimea tarkastaa testauslaitokset kahden vuoden välein ja myöntää GLP-sertifikaatin. (Puranen 2015)

Testauslaitoksen johdolla on vastuu GLP:n noudattamisesta. Testauslaitoksen johto varmistaa, että henkilökunnalla on riittävä koulutus työtehtävien suorittamiseen. Käytettävistä menetelmistä tulee olla voimassa oleva kirjallinen ohjeistus (Standard Operating Procedure, SOP). Tutkimuksen johtaja vastaa tutkimuksen GLP:n mukaisuudesta. Johtajan tulee myös varmistaa, että laadunvarmistuksesta vastaavilla henkilöillä on kopio tutkimussuunnitelmasta, ja tutkimuksen tekemiseen osallistuvilla henkilöillä SOP-ohjeistus. Vastuualueisiin kuuluu myös huolehtiminen siitä, että tutkimuksen kulku on suunnitelman mukainen, ja tutkimuksesta kerätty tieto dokumentoidaan. Johtaja arvioi mahdollisten poikkeamien vaikutuksen tutkimuksen laatuun. Tutkimukseen osallistuvien henkilöiden tulee olla koulutettuja GLP-työskentelyyn. (OECD 2016, 12)

Testauslaitoksessa tulee olla dokumentoitu laadunvarmistusohjelma. Henkilön, joka laadunvarmistuksen suunnittelee, ei pitäisi olla mukana tutkimuksen suorittamisessa. Laadunvarmistuksesta vastaavat henkilöt huolehtivat, että tutkimussuunnitelmassa on vaadittavat tiedot GLP:n mukaisuudesta ja suorittavat tarkastuksia joko tutkimukseen, laitokseen tai prosesseihin liittyen. (OECD 2016, 13)

Tutkimustyöhön osallistuvien henkilöiden tulee minimoida riskit oman terveytensä vaarantumiseen sekä tutkimustulosten epäluotettavuuteen. Laitteiden riskienhallinta käsittää laitteiden ja ohjelmistojen muutokset niin, että raakadatan luotettavuus ei kärsi. Tietojen katoaminen vältetään tekemällä säännöllisesti varmennuskopiot tuloksista. Riskien hallintaan sisältyy riskien tunnistaminen, arvioiminen ja lieventäminen. (OECD 2016, 11)

Testauslaitoksessa tulee olla riittävästi huoneita testausjärjestelmien ja projektien eristyksen varmistamiseksi ja kontaminaatioiden estämiseksi. Soluviljelyssä kontaminaatioita on kolmea tyyppiä: kemiallinen, mikrobiininen ja ristikontaminaatio. Kemiallisessa kontaminaatiossa solut altistuvat häiritseville kemikaaleille, esimerkiksi hormoneille, jotka voivat muuttaa solujen perimää. Mikrobisella kontaminaatiolla tarkoitetaan bakteereja ja hiivoja, jotka ovat usein työntekijästä peräisin. Ristikontaminaatiossa solut altistuvat toisille solulinjoille. Ristikontaminaatiot ovat erittäin haitallisia, sillä nopeakasvuisempi solutyyppi voi syrjäyttää alkuperäisen solulinjan, jolloin lopulta tutkimuksessa on käytetty aivan väärää solulinjaa, tai tutkimus täytyy aloittaa alusta. Reagenssien varastotilat tulee pitää erillään testausjärjestelmistä

puhtauden ja muuttumattomuuden takaamiseksi. Välineet ja laitteet, joita tutkimuksissa käytetään, tulee säännöllisesti tarkastaa, puhdistaa, huoltaa ja kalibroida. (OECD 2016, 13)

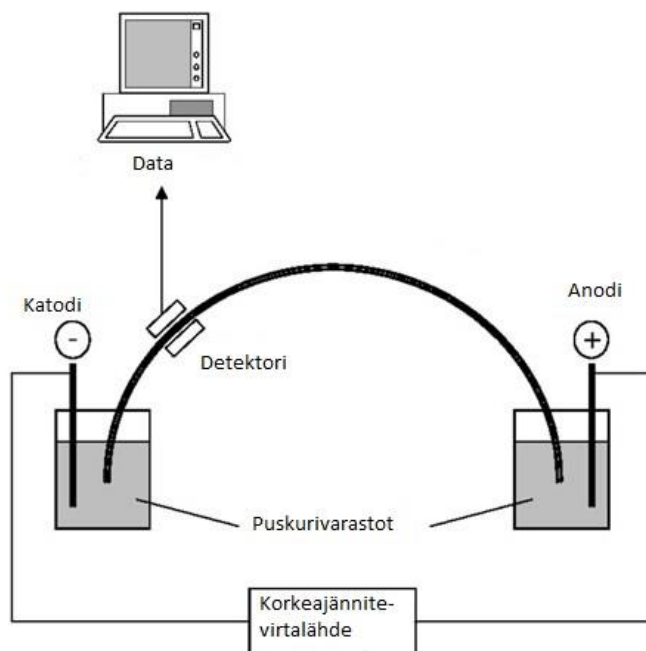
Testi- ja referenssiaineiden suhteen tulee dokumentoida niiden vastaanottopäivämäärä, eränumero, pitoisuus, viimeinen käyttöpäivämäärä, vastaanotettu määrä ja käyttö tutkimuksissa. Aineita tulee käsitellä niin, että aineiden homogeenisyys ja olomuoto säilyvät ja kontaminaatiot estetään. (OECD 2016, 13)

Testauslaitoksessa tulee olla kirjalliset SOP:it, jotka testauslaitoksen johto on hyväksynyt. SOP:it varmistavat testauslaitoksen tuottamien tulosten laadun ja jäljitettävyyden. Jokaisessa erillisessä testauslaitoksen yksikössä tai huoneessa tulee olla saatavilla viimeisin versio huoneessa käytettävien menetelmien SOP-ohjeistuksista. Jos ohjeistuksesta tehdään poikkeama, se tulee dokumentoida ja ilmoittaa tutkimuksen johtajalle. Jokaisesta tutkimuksesta kirjoitetaan loppuraportti, jonka tutkimuksen johtaja allekirjoittaa.

3 MITTAUS- JA MÄÄRITYSMENETELMÄT

3.1 Kapillaarielektroforeesi

Kaikki kapillaarielektroforeesitekniikat ovat toimintaperiaatteiltaan samankaltaisia. Niihin tarvitaan suurjännitelähde, anodi- ja katodipuskurivarastot ja elektrodit, erottelukammio, injektointijärjestelmä sekä detektori (kuva 6). Kapillaarielektroforeesi perustuu molekyylien liikkeeseen sähkökentässä, jossa molekyylit erottuvat luontaisen varauksensa mukaan. Perinteisestä elektroforeesista poiketen kapillaarielektroforeesi tapahtuu kapeassa putkessa. Se ei rajoitu vain suurien molekyylien erottumiseen koon ja varauksen perusteella, vaan myös matalan molekyylipainon tai neutraalin varauksen omaavia näytteitä voidaan analysoida. (Introduction to Capillary Electrophoresis 2017)



KUVA 6. Kapillaarielektroforeesin periaate (Introduction to Capillary Electrophoresis 2017 muokattu).

Kapillaarikenttäelektroforeesi (CZE) on yleisin kapillaarielektroforeesin muoto. Puskuri viedään paineen avulla kapillaariin, jonka jälkeen näyte injektoidaan. Polaarisuudesta riippuen elektro-osmoottinen virtaus (EOF) on joko tulo- tai poistoventtiiliä päin. Näytteet liikkuvat kapillaarissa, ja erottuminen perustuu pelkästään liikkuvuuteen. (Introduction to Capillary Electrophoresis 2017)

Kapillaarigeelielektroforeesissa (CGE) kapillaarissa on geelimatriisi. Tekniikalla voidaan erotella molekyylejä, joilla on sama liikkuvuus mutta eri molekyylikoko. Suuremmat molekyylit liikkuvat geelissä hitaammin, ja kulkeutuvat viimeisenä kapillaarin läpi. Kapillaarigeelielektroforeesia käytetään erityisesti proteiinien ja DNA:n erottelussa. (Introduction to Capillary Electrophoresis 2017)

Misellisessä sähkökineettisessä elektrokromatografiassa (MECC) puskuriin muodostuu misellejä. Miselleillä on polaariton sisus ja polaarinen pinta. Näytteen komponentit jakautuvat misellien ja puskuriliuoksen välille riippuen niiden affiniteetista miselleihin. Kun puskuriliuoksen ja misellien liikkuvuusnopeudet poikkeavat toisistaan, komponentit voidaan erotella affiniteetin perusteella. Tekniikalla on paljon yhteistä korkeapainenestekromatografian ja kaasukromatografian kanssa. (Introduction to Capillary Electrophoresis 2017)

Isoelektrisessä fokuoinnissa (IEF) kapillaarissa on pH-gradienti, jossa matalassa pH:ssa on positiivinen varaus ja korkeassa pH:ssa negatiivinen varaus. Komponentit liikkuvat siihen pH-arvoon, joka vastaa niiden isoelektristä pistettä. (Introduction to Capillary Electrophoresis 2017)

Mikrosiruelektroforeesi on muihin kapillaarielektroforeesitekniikoihin verrattuna melko uusi. Tekniikkana se on perinteisen geelielektroforeesin ja nestekromatografian hybridi. Geelielektroforeesiin verrattuna tekniikalla on monia etuja. Koska mikrosiruilla voidaan käyttää korkeampia sähkökenttiä niiden lämmönkestävyyden takia, erottelu-aika vähenee parista tunnista muutamisiin minuutteihin. Mikrosiruelektroforeesia on myös helpompi automatisoida, eikä siihen tarvita erillistä värjäystä tai skannausta. Kvantitointi on myös geelielektroforeesia tarkempaa. Nestekromatografiaan verrattuna näytteen komponentit erottuvat tehokkaammin ja nopeammin, näytemäärä on huomattavasti pienempi ja menetelmällä voidaan suorittaa monenlaisia erotteluita. Pienestä näytemäärästä on erityisesti hyötyä silloin, kun halutaan analysoida yksittäistä solua. Kapillaari- ja mikrosirulaitteistot ovat myös nestekromatografialaitteita helpommin siirrettäviä ja halvempia. (Breadmore 2011)

Vaikka kapillaarielektroforeesimenetelmät ovat korvanneet geelielektroforeesin monissa menetelmissä, perinteistä elektroforeesia käytetään vieläkin joissakin tapauksissa. Joskus fraktionkeräys voi olla välttämätöntä, ja on helpompaa kerätä tarvittava määrä

geelielektroforeesista kuin kapillaari- tai mikrosiruelektroforeesista. Geelejä voidaan myös käyttää monivaiheisissa menetelmissä, joihin sisältyy IEF, polyakryyliamidigeelielektroforeesi (PAGE) tai Western blotting. Rajoitteina kapillaari- ja mikrosiruelektroforeesissa on huono toistettavuus ja toteamisraja nestekromatografiaan verrattuna. (Breadmore 2011)

3.2 Bioanalyzer 2100

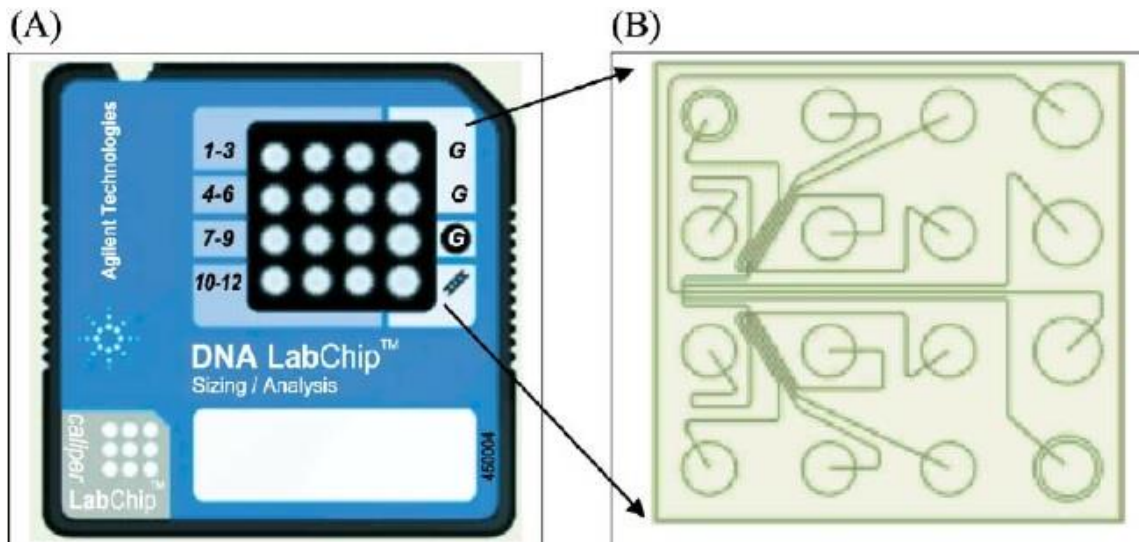
Kapillaarigeelielektroforeesia hyödyntävä bioanalysaattori on tarkoitettu puhdistettujen RNA-, DNA- ja proteiininäytteiden koon, laadun ja määrän analysoimiseen. Menetelmä perustuu mikrofluidistiikkasiruihin, joiden avulla perinteinen geelielektroforeesi on saatu korvattua automatisoidulla ja nopealla analyysimenetelmällä.



KUVA 7. Bioanalysaattori. (Maria Partanen, 2017)

Bioanalysaattorissa (kuva 7) molekyylien erottuminen tapahtuu kapillaari-elektrokromatografisesti. Laitteessa käytetään mikrokanavia sisältäviä siruja (kuva 8), jotka vähentävät erottumisaikaa sekä näytteiden ja reagenssien kulutusta. Sirulla on näytekaivoja, geelikaivoja sekä ulkoiselle kokostandardille (ladderille) kaivo. Mikrokanavat lasissa luovat verkoston kaivojen välille. Kun kaiivot ja mikrokanavat ovat

täynnä, sähkövirta kulkee sirun läpi. Värjätty näyte kulkeutuu sirun kanavien läpi laitteen fluoresenssidetektorille. Bioanalysaattorilla voidaan määrittää komponentteja jopa konsentraatiossa $\frac{pg}{\mu l}$. Tarvittava näytemäärä analyyseissä on 1-4 μl , jolloin arvokasta näytettä ei kulu määrittämiseen suuria määriä. Laitteeseen kuuluu myös valmistelualusta (Priming Station), jolla geeli saadaan paineen avulla syötettyä mikrokanaviin.



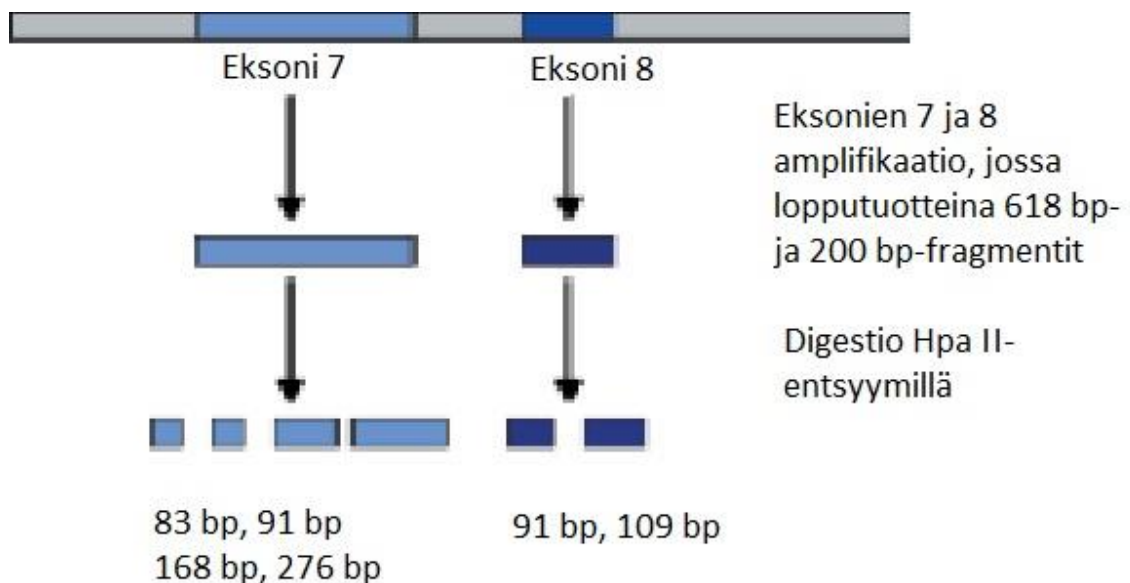
KUVA 8. Bioanalysaattorin siru. A) Sirulla on yhteensä 16 kaivoa, joista menetelmästä riippuen kolme on tarkoitettu geelille (G), yksi kokostandardille ja loput näytteille. B) Sirun rakenne koostuu mikrokanavista, joissa erottelu tapahtuu. Rakenteesta voidaan nähdä, että kaivot ovat yhteydessä toisiinsa (Lu, Tso & Yang 2002, muokattu).

DNA- ja proteiininimenetelmissä konsentraatio lasketaan tunnetusta ylämarkkerista. Laite vertaa markkerin pinta-alaa verrataan näytteen piikin pinta-alaan, jolloin konsentraatio voidaan määrittää. Suhteellisen kvantitoinnin lisäksi proteiineille voidaan suorittaa absoluuttinen kvantitointi ulkoisia standardeja käyttämällä. RNA-menetelmä kvantitoidaan kokostandardin pinta-alan avulla. Pinta-alaa verrataan näytepiikkien pinta-alan summaan. RIN (RNA integrity number) kertoo RNA-näytteiden eheyden arvion.

3.2.1 Käyttökohteet

Bioanalysaattoria voidaan käyttää neljässä biotieteiden eri osa-alueissa: genomiikassa, proteomiikassa, metabolian tutkimuksessa sekä bioinformatiikassa. Lisäksi laitteella voidaan tehdä virtaussytometrisiä määrytyksiä, joilla voidaan laskea soluja sekä analysoida esimerkiksi solujen proteiiniekspressiota, transfektiotehokkuutta, apoptoosia ja geenien hiljentämistä. (Applications for DNA, RNA, protein and cell analysis 2014)

Bioanalysaattorin DNA-analyysillä voidaan suorittaa restriktiodigestioanalyysi. Restriktioentsyymit pilkkovat DNA:ta pienemmiksi paloiksi, fragmenteiksi. Jos näytteessä on hyvin suuria tai pieniä fragmentteja, perinteisellä geelimenetelmällä ongelmana voi olla fragmenttien kulkeutuminen pois geelistä tai puutteellinen värjäys. Myös esimerkiksi DNA:n mutaatioita voidaan tutkia (kuva 9). (Applications for DNA, RNA, protein and cell analysis 2014)

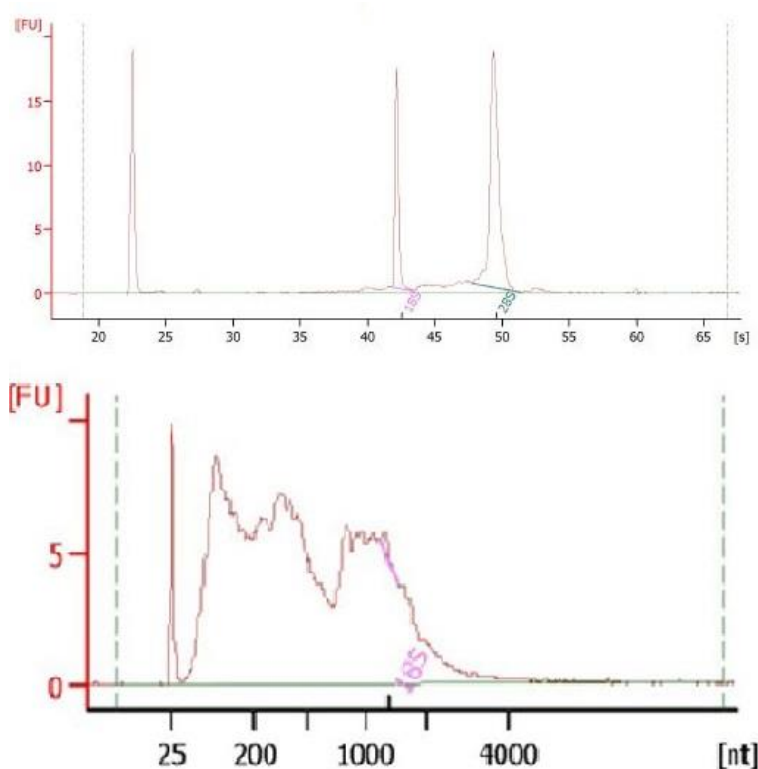


KUVA 9. Mutaatioiden tutkiminen restriktiodigestiolla. (Applications for DNA, RNA, protein and cell analysis 2014, muokattu.)

Kuvassa 9 p53-geenistä kahta eri DNA:n aluetta monistettiin spesifisillä alukkeilla ja digestoititiin Hpa II-entsyymillä, joka leikkaa DNA:ta alueilta joissa mutaatioita todennäköisesti esiintyy. Pistemutaation eli emäksien vaihtumisen tapauksessa Hpa II ei leikkaa DNA:ta, jolloin fragmentit jäävät suuremmiksi. Bioanalysaattorilla voidaan myös

tutkia PCR-tuotteiden puhtautta ja laatua tai optimoida qPCR-menetelmiä. (Applications for DNA, RNA, protein and cell analysis 2014)

Bioanalysaattorilla voidaan määrittää soluista kerätyn totaali-RNA:n eheyttä. Eheyden ja laadun varmistaminen näytteistä on hyödyllistä varsinkin, jos näytteitä käytetään kalliissa tutkimuksessa tai menetelmässä. Hajoamistuotteet nähdään helposti sekä geelikuvasta että elektroferogrammista (kuva 10).



KUVA 10. Totaali-RNA:n eheyden määrittäminen (McCormack 2014, muokattu).

Kuvassa 10 ylemmässä elektroferogrammista RNA-näyte on korkealaatuinen, ja 18S- sekä 28S- alueet ovat selkeitä piikkejä. Alemmassa elektroferogrammista RNA on selkeästi hajonnut. Monet hajoamistuotteet esiintyvät 18S- ja 28S-alueiden välillä. Kontaminaatiot, kuten genomisen DNA ja ribosomaalinen RNA voidaan myös havaita elektroforegrammeista ja geelikuvista.

Solulysaateista voidaan tutkia proteiiniexpressiota sekä vertailla proteiinien puhdistusmenetelmiä. Myös hyvin laimeista proteiininäytteistä, kuten kasvatusliuokseen erittyneistä proteiineista voidaan määrittää proteiinien määrä ja koko. Vasta-aineiden tunnistuksessa bioanalysaattori tuottaa samanlaisia tuloksia kuin SDS-PAGE sekä CGE,

mutta bioanalyssaattorin etuna on huomattavasti lyhyempi analyysi-aika. Esimerkiksi bispesifisiä vasta-aineita ei voida lainkaan analysoida SDS-PAGE:lla, mutta bioanalyssaattorin korkea resoluutio mahdollistaa näiden vasta-aineiden analysoinnin. (Applications for DNA, RNA, protein and cell analysis 2014) Yleiset proteiinien määritysmenetelmät kuten Western blotting ovat semikvantitatiivisia. Bioanalyssaattorilla saadaan kokonaan kvantitatiivisia tuloksia, ja yhdistettynä immunopresipitaatioon laitteella voidaan korvata Western blotting.

4 VALIDOINTI

4.1 Yleistä validoinnista

Mittausmenetelmän validointi on menettely, jolla osoitetaan analyttisen menetelmän sopivuus aiottuun käyttötarkoitukseen (Kemian metrologian opas 2005, 25). Validoinnilla arvioidaan analyysimenetelmässä saatujen tulosten luotettavuutta ja osoitetaan menetelmän olevan testattu ja tieteellisesti pätevä.

Validoinnissa tutkittavia parametrejä ovat selektiivisyys ja spesifisyys, lineaarisuus, mittausalue, toteamis- ja määrittäysrajat, poikkeama, saanto, häiriökestävyys, tarkkuus, toistettavuus, uusittavuus ja mittausepävarmuus. Validoinnin tulee olla mahdollisimman kattava, mutta aina ei ole validoinnin laajuudesta riippuen tarpeellista tai mahdollista tutkia menetelmästä kaikkia parametrejä. Validoinnin laajuuteen vaikuttavia tekijöitä ovat käyttötarkoitus, laitteisto ja olosuhteet. (Kemian metrologian opas 2005, 25)

Validoinnissa suoritetuista mittauksista laaditaan aina validointiraportti, josta käy ilmi tavoite, toteutus, laitteisto, välineet ja materiaalit. Raporttiin kirjataan validointisuunnitelman mukainen työn suoritus ja mittauksista saadut tulokset. Materiaaleista kirjataan ylös referenssiaineiden ja reagenssien tunnistetiedot. Raportissa tulee ilmaista tutkittavat parametrit, miten tuloksia on tarkasteltu sekä arvio mittausepävarmuudesta. Raportissa todetaan, voidaanko menetelmä ottaa käyttöön ja tarvitaanko lisätoimenpiteitä, esimerkiksi henkilökunnan koulutusta. Validoinnin dokumentit ja kaikki raakadata arkistoidaan (Kemian metrologian opas 2005, 38)

4.2 Tarkkuus

Mittauksen tarkkuudella tarkoitetaan analyysituloksen ja teoreettisen arvon vastaavuutta. Tarkkuus pyritään validoinnissa määrittämään arvioimalla systemaattisia ja satunnaisia virheitä, joita tarkastelemalla voidaan tutkia tulosten oikeellisuutta ja toistotarkkuutta. Oikeellisuus ilmaistaan yleensä poikkeamana, eli mittaustuloksia verrataan referenssiarvoon, joka on peräisin tunnetusta arvosta tai menetelmästä. Oikeellisuus

voidaan määrittää mittaustuloksista kaavan (1) mukaisesti. (Kemian metrologian opas 2005, 35)

$$\text{Oikeellisuus} = \frac{\text{keskiarvo}}{\text{vertailuarvo}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

Oikeellisuuden määrittämisessä analysoidaan useita rinnakkaisnäytteitä menetelmän mukaisesti ja määritetään konsentraatiot kustakin rinnakkaisnäytteestä. Rinnakkaisnäytteistä lasketaan konsentraatioiden keskiarvo, keskihajonta ja vaihtelukoefferentti, jonka jälkeen oikeellisuus voidaan laskea jakamalla keskiarvo vertailuarvolla ja kertomalla sadalla prosentuaalisen tuloksen saamiseksi. Keskihajonnalla kuvataan tulosten toistotarkkuutta eli satunnaisia virheitä, oikeellisuudella systemaattisten virheiden osuutta. (Kemian metrologian opas 2005, 36)

4.3 Toistettavuus

Toistettavuudella (CV, coefficient of variation) tarkoitetaan tulosten paikkansapitävyyttä, kun analyysi suoritetaan toistettavissa olosuhteissa lyhyellä aikavälillä. Toistettavuuteen vaikuttavia olosuhteita ovat esimerkiksi analyysin tekijä, laitteet, reagenssit, lämpötila ja pH. Toistettavuus määritetään suorittamalla rinnakkaismäärittäisiä näytteistä. (Kemian metrologian opas 2005, 37) Toistettavuus eli variaatiokerroin CV voidaan laskea kaavasta (2),

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \cdot 100 \% \quad (2)$$

missä σ on suhteellinen keskihajonta ja μ on keskiarvo. CV:tä käytetään kuvaamaan menetelmän tarkkuutta tai toistettavuutta.

4.4 Vertailumateriaalit

Vertailumateriaali on referenssiaine, joka on riittävän homogeeninen, jotta sitä voidaan käyttää joko kalibrointiin, menetelmän arviointiin tai materiaalien määrittämiseen, ja jonka koostumus ja pitoisuus tunnetaan. (SFS 3700, 1998). Vertailumateriaalit

luokitellaan ISO-standardiluokituksen mukaan varmennettuihin vertailumateriaaleihin sekä vertailumateriaaleihin. Varmennetut vertailumateriaalit ovat yleensä kaupallisia aineita, joiden sertifikaatissa kerrotaan jäljitettävyys, pitoisuus, puhtaus ja mittausepävarmuus. (Kemian metrologian opas 2005, 39)

Jos kaupallisia vertailumateriaaleja ei ole saatavilla, voidaan käyttää laboratorion sisäistä vertailumateriaalia. Niiden valmistuksessa tulee ottaa huomioon aineen homogeenisuuden ja vakauden varmistus, jäljitettävyyden osoittaminen ja epävarmuuden määrittäminen. (Kemian metrologian opas 2005, 43)

5 VALIDOINNIN SUORITUS

5.1 Validointiprosessi

Ennen validoinnin suoritusta menetelmästä kirjoitettiin GLP:n mukainen SOP-ohjeistus, sekä testattiin eri kittien toimivuutta. Testiajoissa havaittiin, että Agilent RNA 6000 Pico kitti ei soveltunut RNA:n pitoisuuden määrittämiseen, sillä näytteiden virheprosentti oli selkeästi yli tavoitellun rajan sekä tulokset poikkesivat huomattavasti monileimalukijalla saaduista tuloksista. Virhe ei ollut tekijästä tai näytteistä riippuvainen, sillä Agilentin edustaja varmisti, että kyseisen kitin virhe on RNA-näytteillä yli 30 %. Tästä johtuen RNA 6000 Pico Kit päätettiin vaihtaa RNA 6000 Nano Kittiin, joka sopii paremmin FICAM:n tarpeisiin, ja kitin vaihto ei muuttanut menetelmän suoritustapaa. DNA-analyysin Agilent DNA High Sensitivity kitti ja proteiinianalyysin Agilent Protein 230 kitti havaittiin toimiviksi ja tarpeisiin sopiviksi testiajojen perusteella.

Järjestelmän validoinnin tarkoituksena oli varmistaa, että Bioanalyzer 2100-järjestelmällä voidaan analysoida luotettavasti proteiinien ja nukleinihappojen määrää ja laatua. RNA-, DNA-, ja proteiininäytteet analysoitiin kuhunkin määrittämiseen sopivilla siruilla ja reagensseilla. Jokainen analyysi toistettiin kolme kertaa, ja jokaisesta näytteestä ja pitoisuudesta pipetoitiin sirulle kolme rinnakkaista näytettä toistettavuuden varmistamiseksi. Järjestelmän validoinnin yhteydessä suoritettiin myös Bioanalyzer 2100 Expert-ohjelmiston validointi, jolla varmistettiin tulosten jäljitettävyyden ja järjestelmän tietoturva.

Järjestelmän validointi suoritettiin OECD:n Application of GLP Principles to Computerized Systems -ohjeistuksen sekä FICAMin SOP-ohjeistuksen mukaisesti. Validoinnin suorituksesta laadittiin toiminnallinen kvalifointisuunnitelma (Performance qualification, PQ), jossa määriteltiin validoitava laite ja sen sisältämä ohjelmisto, sekä laitteen siihenastinen validointiprosessi mukaan lukien Käyttäjävaatimusten asettaminen (User requirement specification, URS), toiminnallinen kuvaus (Functional specification, FS), suunnitelman kvalifointi (Design qualification, DQ), asennuksen kvalifointi (Installation qualification, IQ) ja toiminnan kvalifointi (Operational qualification, OQ), jotka suoritti laitteen toimittaja. Suunnitelmaan sisältyi PQ:n tarkoitus, suorituspaikka, vastuuhenkilöt, laitteet ja reagenssit, suoritus, tulosten hyväksymiskriteerit ja raportointi.

Suunnitelman GLP-mukaisuus tarkastutettiin laadunvarmistusyksiköllä ja hyväksyttiin organisaation johdolla. Validoinnin käytännön osuuden jälkeen työn suorituksesta kirjoitettiin PQ-raportti, jossa kuvattiin suoritettut testit ja tarkastukset.

5.2 RNA-analyysi

RNA-analyysi suoritettiin SOP-ohjeistuksen mukaisesti Agilentin RNA 6000 Nano-kitillä. Pakkauksen mukana tullut kokostandardi denaturoitiin 70 °C:ssa 2 minuutin ajan CFX96 PCR-laitteella (Biorad), jäädytettiin jäällä ja jaettiin alieriin RNAasi-vapaisiin putkiin. Putkiin tehtiin etiketit, joihin sisältyi GLP:n mukaiset tiedot. Geelimatriisia pipetoitiin 550 µl kitin mukana tulleeseen suodatusputkeen, ja putkea sentrifugoitiin 10 minuuttia 4000 rpm. Geeli jaettiin 65 µl:n alieriin RNAasi-vapaisiin putkiin, jotka merkittiin GLP:n mukaisesti.

RNA-fragmenttien analyysi suoritettiin käyttämällä Thermo Scientific:in valmistamaa RiboRuler High Range RNA-kokostandardia referenssiaineena. Kokostandardin konsentraatio oli 480 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$, ja fragmenttien koot olivat 0.2 - 6.0 kb. Kokostandardia denaturoitiin 70 °C:ssa 10 minuutin ajan CFX96 PCR-laitteella ja jäädytettiin jäällä. 65 µl:n alierään geelimatriisia lisättiin 1 µl RNA 6000 Nano-värikonsentraattiin, jonka jälkeen geelimatriisia sekoitettiin ja sentrifugoitiin 10 minuuttia 14000 rpm.

Reagenssien valmistelun jälkeen RNA 6000 Nano-siru asetettiin bioanalysaattorin pohjustusvälineeseen, ja sirun geelikaivoon pipetoitiin 9 µl värjättyä geelimatriisia. Siru paineistettiin 30 sekunnin ajaksi ruiskun avulla, jonka jälkeen muihin geelikaivoihin pipetoitiin geelimatriisia. Kokostandardikaivoon ja näytekaivoihin pipetoitiin 5 µl RNA 6000 Nano Marker-liuosta, jonka jälkeen kokostandardikaivoon pipetoitiin 1 µl RNA 6000 Nano-kokostandardia ja näytekaivoihin 1 µl RiboRuler High Range RNA-kokostandardia. Sirua sekoitettiin 60 sekuntia 2400 rpm, jonka jälkeen siru ajettiin bioanalysaattorilla.

5.3 DNA-analyysi

DNA-analyysi suoritettiin SOP-ohjeistuksen mukaisesti Agilentin High Sensitivity DNA-kitillä. 200 µl:aan geelimatriisia pipetoitiin 15 µl High Sensitivity DNA-värikonsentraattia. Geelimatriisia sekoitettiin, jonka jälkeen geeli siirrettiin kitin mukana tulleeseen suodatusputkeen ja sentrifugoitiin 10 minuuttia 6000 rpm. Putkeen tehtiin etiketti, johon sisältyi GLP:n mukaiset tiedot reagenssista.

Referenssiaineena analyysissä käytettiin QX DNA Size Marker-kokostandardia, jonka valmistaja oli Qiagen. Kokostandardin konsentraatio oli $100 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$, ja fragmenttien koot 100 bp-2.5 kb. Kokostandardista tehtiin kolme laimennosta steriiliin veteen (0.5, 1 ja $10 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$).

Reagenssien valmistelun ja näytteiden laimentamisen jälkeen High Range DNA-siru asetettiin bioanalysaattorin pohjustusvälineeseen, ja sirun geelikaivoon pipetoitiin 9 µl värjättyä geelimatriisia. Siru paineistettiin 60 sekunnin ajaksi ruiskun avulla, jonka jälkeen muihin geelikaivoihin pipetoitiin geelimatriisia. Kokostandardikaivoon ja näytekaivoihin pipetoitiin 5 µl High Sensitivity DNA Marker-liuosta, jonka jälkeen kokostandardikaivoon pipetoitiin 1 µl RNA 6000 Nano-kokostandardia ja näytekaivoihin 1 µl näytelaimennoksia. Sirua sekoitettiin 60 sekuntia 2400 rpm, jonka jälkeen siru ajettiin bioanalysaattorilla.

5.4 Proteiininanalyysi

Proteiininanalyysi suoritettiin SOP-ohjeistuksen mukaisesti Agilentin Protein 230-kitillä. 650 µl:aan geelimatriisia pipetoitiin 25 µl värikonsentraattia, jonka jälkeen geelimatriisia vorteksoitiin. Geelimatriisi siirrettiin kitin mukana tulleeseen suodatusputkeen ja sentrifugoitiin 15 minuuttia 5200 rpm. Väriinpoistoliuos valmistettiin lisäämällä toiseen suodatusputkeen 650 µl geelimatriisia, joka myös sentrifugoitiin. Putkiin tehtiin etiketit, joihin sisältyi GLP:n mukaiset tiedot reagensseista.

RNA- ja DNA-analyyseistä poiketen proteiininanalyysissä käytettiin laboratorion sisäistä standardia, naudan seerumin albumiinia (BSA), jonka valmistaja oli Roche. Proteiinien koko vaihtelee sen mukaan, onko se pelkistetyssä vai pelkistymättömässä muodossa. Albumiinin koko on 55 kDa pelkistymättömänä. BSA:sta valmistettiin tarkat liuokset

steriiliin PBS:ään konsentraatioissa 50, 500 ja 2000 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$, ja liuokset suodatettiin steriilisuodattimen läpi. Näytteitä denaturoitiin 5 minuutin ajan 65 °C:ssa CFX96 PCR-laitteella. FICAM:n laboratoriossa käytetään β -merkapttoetanolia pelkistämiseen, jonka vuoksi siihen päädyttiin myös tässä menetelmässä. β -merkapttoetanolin pelkistämisteho ei kuitenkaan riittänyt, joten BSA:ta määritettiin pelkistymättömässä muodossa. Kitin ohjeen mukaan proteiininäytteitä olisi pitänyt denaturoida 95-100 °C:ssa, mutta tässä lämpötilassa BSA:n sekundäärirakenteessa olisi muodostunut aggregaatteja.

Reagenssien valmistelun jälkeen Protein 230-siru laitettiin bioanalysaattorin valmistelualustaan, ja sirun geelikaivoon pipetoitiin 12 μl värjättyä geelimatriisia. Sirua paineistettiin ruiskun avulla 60 sekuntia, jonka jälkeen kaivosta poistettiin jäljelle jäänyt geelimatriisi, ja pipetoitiin kaikkiin geelikaivoihin geelimatriisia. Väripoistoliuosta (Destaining solution) pipetoitiin 12 μl sille tarkoitettuun kaivoon, näytekaivoihin pipetoitiin 6 μl kutakin näytelaimennosta. Kokostandardikaivoon pipetoitiin 6 μl kokostandardia, jonka jälkeen siru ajettiin bioanalysaattorilla.

6 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

6.1 RNA-analyysin tulokset

Validointisuunnitelmassa RNA-analyysin hyväksymiskriteerit määriteltiin seuraavasti:

- RNA-vyöhykkeiden (band) tulee sijaita oikeilla kohdilla $\pm 15\%$ (kb): 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 (6.0 ei saata olla soveltuva, sillä markkeri voi olla päällekkäinen raidan kanssa)
- Rinnakkaisten RNA-näytteiden variaatiokerroin (CV) tulee vastata alkuperäistä konsentraatiota $480 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 25\%$
- Konsentraation oikeellisuus tulee olla yli 75%

Taulukkoihin 1 ja 2 on koottu tulokset validoinnin suorituksesta, sekä suunnitelmassa asetettujen hyväksymiskriteerien täyttymisestä. RNA-analyysistä saatujen tulosten perusteella menetelmä läpäisi validointikriteerit. Tulosten hajonta oli pienempi saman sirun rinnakkaisten välillä kuin eri sirujen välillä.

Taulukko 1. RNA-analyysin tulokset konsentraatiosta ja koosta, sekä hyväksymiskriteerien täytyminen.

Konsentraatio (ng/μl)	Keskiarvo (ng/μl)	CV (%)	Hyväksymiskriteeri <25% Hyväksytty/Ei hyväksytty
480	499.89	24.83	Hyväksytty
Koko (kb)	Keskiarvo (kb)	CV (%)	Hyväksymiskriteeri <10% Hyväksytty/Ei hyväksytty
0.2	0.20	0.00	Hyväksytty
0.5	0.50	0.00	Hyväksytty
1	1.00	0.00	Hyväksytty
1.5	1.50	0.00	Hyväksytty
2	2.00	0.00	Hyväksytty
3	3.00	0.00	Hyväksytty
4	4.00	0.00	Hyväksytty

Laitteen tulosteet RNA-analyyseista löytyvät liitteistä 1-3. Tulosten kokoraidoista sekä piikeistä voidaan havaita, että näytteissä ei ole tapahtunut hajoamista tai

kontaminaatiota. Piikit ovat selkeitä, ja raidat ovat näytteen valmistajan ilmoittamien kokoja vastaavia.

Taulukko 2. RNA-analyysin tulokset oikeellisuudesta, sekä hyväksymiskriteerin täyttymien.

c (ng/μl)	Oikeellisuus (%)	Hyväksymiskriteeri >75% Hyväksytty/Ei hyväksytty
480	96.02	Hyväksytty

6.2 DNA-analyysin tulokset

Validointisuunnitelmassa DNA-analyysin hyväksymiskriteerit määriteltiin seuraavasti:

- DNA-vyöhykkeiden tulee sijaita oikeilla kohdilla: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500 bp $\pm 10\%$.
- Rinnakkaisten DNA-näytteiden variaatiokerroin tulee vastata alkuperäisiä konsentraatioita 0.5, 1 ja 10 ng/μl $\pm 25\%$.
- Konsentraation oikeellisuuden tulee olla yli 75 %

Taulukkoihin 3 ja 4 on koottu DNA-analyysin tulokset sekä hyväksymiskriteerien täytyminen. Tulosten perusteella DNA:n konsentraation määrittämisessä vain pitoisuus 10 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ läpäisi kriteerit variaatiokertoimesta sekä oikeellisuudesta. DNA:n koon määrittämisessä kriteerit täyttyivät.

Taulukko 3. DNA-analyysin tulokset konsentraatiosta ja koosta, sekä hyväksymiskriteerien täyttyminen.

c (ng/μl)	Keskiarvo (ng/μl)	CV (%)	Hyväksymiskriteeri <25% Hyväksytty/Ei hyväksytty
0.5	0.91	19.49	Hyväksytty
1	1.77	25.86	Ei hyväksytty
10	11.98	10.35	Hyväksytty
Koko (bp)	Keskiarvo (bp)	CV (%)	Hyväksymiskriteeri <10% Hyväksytty/Ei hyväksytty
100	99.26	0.63	Hyväksytty
200	198.26	0.60	Hyväksytty
300	297.24	0.52	Hyväksytty
400	397.97	0.30	Hyväksytty
500	497.30	0.34	Hyväksytty
600	592.26	0.47	Hyväksytty
700	689.98	0.51	Hyväksytty
800	768.27	1.51	Hyväksytty
1000	963.82	0.86	Hyväksytty
1200	1238.40	1.51	Hyväksytty
1500	1621.34	0.57	Hyväksytty
2000	1971.87	0.64	Hyväksytty
2500	2415.33	1.53	Hyväksytty

Tulosteet DNA-analyyseistä löytyvät liitteistä 4-6. Vaikka pitoisuus $10 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ läpäisi validoinnin kriteerit, konsentraation määrittystä ei voida ottaa käyttöön DNA-analyysien osalta. Kvantitoinnin tulokset eivät olisi luotettavia, jos analyysi olisi suoritettavissa vain yhdellä pitoisuudella.

Taulukko 4. DNA-analyysin tulokset oikeellisuudesta, sekä hyväksymiskriteerin täyttymien.

C (ng/μl)	Oikeellisuus (%)	Hyväksymis- kriteeri >75% Hyväksytty/Ei hyväksytty
0.5	54.94	Ei hyväksytty
1	56.38	Ei hyväksytty
10	83.49	Hyväksytty

6.3 Proteiinianalyysin tulokset

Validointisuunnitelmassa proteiinianalyysin hyväksymiskriteerit määriteltiin seuraavasti:

- a) Proteiinvyöhykkeen tulee sijaita oikealla kohdalla 55 kDa \pm 10 %:
- b) Rinnakkaisten proteiiniäytteiden variaatiokerroin tulee vastata alkuperäisiä konsentraatioita 50, 500 ja 2000 ng/μl \pm 25%.
- c) Konsentraation oikeellisuuden tulee olla yli 75 %

Taulukkoihin 5 ja 6 on koottu proteiinianalyysin tulokset sekä hyväksymiskriteerien täytyminen. Tulosten perusteella konsentraatiot 50 ja 500 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ läpäisivät kaikki kriteerit, mutta pitoisuus 2000 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ ei läpäissyt oikeellisuuden kriteeriä. Proteiinin koon määrittämisessä kriteeri täyttyi.

Taulukko 5. Proteiinianalyysin tulokset konsentraatiosta ja koosta, sekä hyväksymiskriteerien täyttyminen.

c (ng/μl)	Keskiarvo (ng/μl)	CV (%)	Hyväksymiskriteeri <25% Hyväksytty/ Ei hyväksytty
50	39.46	14.34	Hyväksytty
500	472.70	15.54	Hyväksytty
2000	1262.03	7.62	Hyväksytty
Koko (kDa)	Keskiarvo (kDa)	CV (%)	Hyväksymiskriteeri <10% Hyväksytty/Ei hyväksytty
55	56.10	1.42	Hyväksytty

Tulosteet proteiinianalyseistä löytyvät liitteistä 7-9. Koska proteiinianalyysissä kaksi konsentraatiota läpäisi validoinnin kriteerit hyväksyttävästi, voidaan konsentraation määrittäminen ottaa käyttöön kun konsentraatio on 50-500 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$. Pitoisuus 2000 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ oli valmistajan mukaan kitin yläraja, ja soluviljelynäytteissä tällaisia pitoisuuksia ei todennäköisesti ole.

Taulukko 6. Proteiinianalyysin tulokset oikeellisuudesta, sekä hyväksymiskriteerin täyttymien.

c (ng/μl)	Oikeellisuus (%)	Hyväksymiskriteeri >75% Hyväksytty/Ei hyväksytty
50	78.92	Hyväksytty
500	94.54	Hyväksytty
2000	63.10	Ei hyväksytty

7 POHDINTA

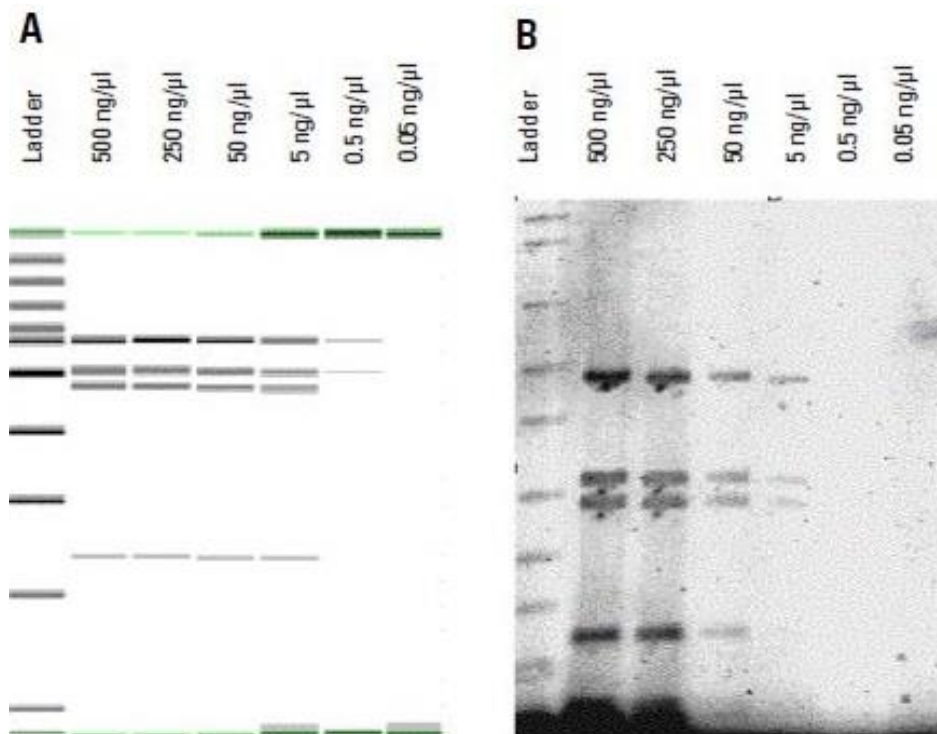
Opinnäytetyön tavoitteena oli saada bioanalysaattori käyttöön GLP-töissä. Tarkoituksena oli validoida laite ja menetelmät RNA:n, DNA:n ja proteiinien pitoisuuden, koon ja laadun määrittämiseen. Menetelmiin valittiin sopivat kitit, joiden toimivuutta testattiin kittien käyttöohjeiden perusteella ja tuloksia vertailemalla. Bioanalysaattorin sekä kittien valmistajan ilmoittamien arvojen perusteella validoinnille asetettiin hyväksymiskriteerit. Bioanalysaattorin validointi läpäisi hyväksymiskriteerit totaali-RNA:n ja proteiinien analyysin koolle, laadulle sekä konsentraatiolle, sekä DNA-analyysin koolle ja laadulle.

Menetelmän validoinnissa oli monia haasteita. Pienistä näytetilavuuksista johtuen pipetoinnin tuli olla hyvin tarkkaa, jotta rinnakkaisten näytteiden toistettavuus olisi ollut mahdollisimman hyvä. Mikrofluidistiikassa luotettavan toistettavuuden saavuttaminen on kuitenkin vieläkin haasteellista. Yksi validoinnissa käytetyistä referenssimateriaalista (RiboRuler High Range RNA Ladder) oli säilötty 1 mM EDTA-puskuriliuokseen, joka valmistajan mukaan tässä pitoisuudessa voi häiritä analyysiä. Kokostandardia olisi voinut yrittää puhdistaa ylimääräisistä suoloista ennen validoinnin suoritusta. Tämä ei kuitenkaan aiheuttanut validoinnin epäonnistumista, mutta on mahdollista, että referenssimateriaalin puhdistus olisi vähentänyt virhettä entisestään.

DNA-analyysissä bioanalysaattorin antamat tulokset ovat olleet lähes kaksinkertaisia todelliseen konsentraatioon verrattuna. On mahdollista, että DNA-analyysissä käytetyssä referenssiaineessa on RNA-analyysin tapaan ollut läsnä analyysiä häiritsevä aine, mutta referenssiaineen valmistaja ei ole ilmoittanut, millaiseen puskuriliuokseen referenssiaine on säilötty. PCR-tuotteiden konsentraation määrittämisessä ongelmana ovat liuoksissa olevat alukkeet ja fluoresoivat aineet, jotka emittoivat fluoresenssivaloa samalla aallonpituudella bioanalysaattorin fluoresoivien värien kanssa, jolloin kvantitointitulokset voivat olla liian suuria. Tulosten perusteella päädyttiin siihen, että koska bioanalysaattoria ei niinkään tarvittaisi DNA:n konsentraation määrittämisessä vaan laadun ja koon määrittämisessä, konsentraation määrittämiselle ei tarvitse suorittaa jatkovalidointia. Jos konsentraation määrittäminen haluttaisiin validoida, tulisi DNA High Sensitivity Kit todennäköisesti vaihtaa DNA 7500 kittiin, jolla kvantitointitulokset voisivat olla tarkkuudeltaan paremmat. Esimerkiksi RNA Pico- kittiä käytetään yleensä

kvalitatiiviseen analyysiin, joten on mahdollista että pienemmille pitoisuuksille tarkoitetut herkemmät kitit eivät niinkään sovellu kvantitatiivisille analyyseille.

Proteiinianalyyseissä ongelmana oli aggregaattien muodostuminen liian korkeissa denaturoitumislämpötiloissa (Borzova, 2016). Kitin valmistaja suositteli ensisijaisesti käyttämään DTT:tä pelkistämiseen β -merkaptetanolin sijaan. FICAM:n laboratorioissa käytetään β -merkaptetanolia pelkistämiseen, jonka vuoksi siihen päädyttiin myös tässä menetelmässä. β -merkaptetanolin pelkistämisteho ei kuitenkaan riittänyt, eikä se suojannut BSA:n tioliryhmiä tarpeeksi. Aggregaatit muodostuvat, kun proteiinien disulfididokset katkeavat, jolloin ne kiinnittyvät toisiinsa vetysidoksilla muodostaen liukenemattomia β -levyrakenteita. Tämä kuitenkin saatiin korjattua analysoimalla pelkistämätöntä proteiinia. DTT vahvempana pelkistäjänä voisi olla soveltuvampi jatkokäytössä. Pitoisuus $2000 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ ei läpäissyt validoinnin kriteerejä. Todennäköisesti konsentraatio on proteiinianalyysiin liian suuri, sillä suurissa pitoisuuksissa aggregaatteja muodostuu helpommin, jolloin mikrokanavat saattavat tukkeutua. Soluviljelyn näytteissä proteiinien konsentraatiot ovat kuitenkin yleensä melko matalia, joten analyysi voidaan ottaa käyttöön pienempien pitoisuuksien määrittämisessä ja näytteitä voidaan laimentaa tarvittaessa.



KUVA 11. Geelikuvavertailu bioanalysoinnista ja agarosigeelistä DNA-näytteille (Vitale, D. 2000, muokattu).

Esimerkiksi RNA-näytteiden eheyden määrittämisessä agarosigeelielektroforeesi voi viedä useita tunteja, kun taas bioanalysaattorilla voidaan sama määrittäminen suorittaa 30 minuutissa korkeammalla resoluutiolla. Kuvasta 11 voidaan havaita, että bioanalysaattorin antamasta geelikuvasta on myös huomattavasti helpompi lukea tulokset kuin agarosigeeliltä. Näytteiden eheyden määrittämisellä voidaan tutkia onko näytteessä jatkotoimenpiteitä häiritseviä komponentteja, jotka vaatisivat puhdistusvaiheen. Näin säästytään kallisarvoisten näytteiden haaskaamiselta, sekä saavutetaan luotettavimmat tutkimustulokset. Erityisesti ennen kalliita määrittämenetelmiä, kuten geeniarrayt, on hyvä varmistua näytteen laadusta.

Opinnäytetyö vastasi tarkoitustaan, sillä laite saatiin hyväksytyä GLP-käyttöön. Opinnäytetyön tavoitteessa onnistuttiin osittain, suurin osa analyysituloksista läpäisi validointisuunnitelmassa asetetut hyväksymiskriteerit. Analyyseissä saadut tulokset ovat luotettavia, sillä referenssimateriaalit olivat varmennettuja kaupallisia reagensseja, sekä sisäinen standardi oli määrittämen mukainen. Tulosten toistettavuus ja tarkkuus oli riittävä, jotta laite voidaan ottaa validoinnin jälkeen käyttöön tietyin rajoittein. Jatkotoimenpiteenä laitteelle voidaan tarvittaessa validoida useampi kitti sen mukaan, millaisia näytteitä tulevaisuudessa halutaan analysoida. Proteiini-analyysissä voidaan hankkia DTT:tä β -merkaptotetanolin sijaan, jos halutaan tutkia nimenomaan proteiineja pelkistyneessä muodossa.

Bioanalysaattorilla on monia etuja sekä tutkimuskäytössä että kaupallisissa menetelmissä. Laite soveltuu erityisesti näytteiden laadunvarmistukseen. Analyysiajat ovat erittäin lyhyitä: puolessa tunnissa voidaan analysoida jopa 12 näytettä. Menetelmät ovat helppokäyttöisiä, mikä parantaa tulosten tarkkuutta ja toistettavuutta työläämpiin menetelmiin verrattuna. Pienestä mittakaavasta johtuen se on kuitenkin herkkä virheille, esimerkiksi pipetointivirheille ja ilmakuplille sirun kanavissa. Tuloksia on helppo vertailla keskenään, ja esimerkiksi geelikuvien tulkinta on huomattavasti tarkempaa agarosigeeliin verrattuna. Näytteistä voidaan myös määrittää useampia ominaisuuksia yhdellä kerralla, kun taas perinteisillä menetelmillä määrittäykset vaatisivat useita eri vaiheita. Analyysieihin tarvitaan hyvin vähän reagensseja, mikä on kustannustehokasta ja vaarallisen jätteen määrä vähenee.

LÄHTEET

Agilent Technologies. 2014. Applications for DNA, RNA, protein and cell analysis. Luettu 15.7.2017.

http://hpst.cz/sites/default/files/attachments/agilent-2200-tapestation-system-application-compendium_1.pdf

Agilent Technologies. 2002. Agilent 2100 bioanalyzer Application compendium. Luettu 15.7.2017.

<http://www.gene-quantification.de/Bioanalyzer-2100.pdf>

Bastian, E. 2016. Microfluidics: Modeling, Mechanics and Mathematics. 1. painos. Alpha Books.

BioRad. n.d. Nucleic Acid Extraction and Purification. Luettu 3.10.2017.

<http://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/nucleic-acid-extraction-purification>

Borzova, V. A., Markossian, K. A., Chebotareva, N. A., Kleymenov, S. Y., Poliansky, N. B., Muranov, K. O., ... Kurganov, B. I. 2016. Kinetics of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine Serum Albumin. PLoS ONE.

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0153495>

Breadmore, M.C. 2011. Capillary and microchip electrophoresis: Challenging the common conceptions. Luettu 1.9.2017.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311014385?via%3Dihub>

Clancy, S. 2008. RNA functions. Nature Education. Luettu 1.9.2017.

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/rna-functions-352>

Clark, D. 2010. Molecular biology. Amsterdam: APCell.

Feldenberg, R. 2016. Intron Retention: a common cause for cancer. Luettu 3.10.2017.

<http://www.zmescience.com/medicine/genetic/intron-retention-cancer-25012016/>

H. Jayamohan, V. Romanov, H. Li, J. Son, R. Samuel, J. Nelson, B.K. Gale. 2016. Advances in Microfluidics and Lab-on-a-Chip Technologies. 3. painos. Elsevier Inc.

Introduction to Capillary Electrophoresis. Prince Technologies. n.d. Luettu 1.9.2017.

<http://www.princetechnologies.eu/products/ce-systems/ce-technologies/ce-introduction/>

Janson, J. 2011. Protein purification: Principles, high resolution methods, and applications. 3rd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons.

Johnson, M. 2012. RNA Extraction. Luettu 12.11.2017.

<https://www.labome.com/method/RNA-Extraction.html>

Kemian ja mikrobiologian jaosto. 2005. MIKES kemian metrologian opas. Helsinki.

<http://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>

Kirby, B. J. 2009. Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices. Cambridge University Press.

Kleinstreuer, C. & Abbott, A. 2014. Microfluidics and nanofluidics: Theory and selected applications. Hoboken, New Jersey. Wiley.

Kuznetsov, I. A. 2010. Microfluidics: Theory and applications. New York: Nova Science Publishers.

Lu, C., Tso, D., Yang, T. 2002. Detection of DNA mutations associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 bioanalyzer. Luettu 14.9.2017.

https://www.researchgate.net/figure/11482977_fig1_Fig-1-The-DNA-Labchip-used-in-the-Agilent-2100-bioanalyzer-The-chip-is-designed-to

McCormack, S. 2014. miRNA Expression Profiling. Dana-Farber Cancer Institute. Luettu 3.10.2017.

<http://moleculardiagnosticsscore.dana-farber.org/frequently-asked-questions.html>

Nature Education. n.d. Ribonucleic acid/RNA. Luettu 1.9.2017.

<http://www.nature.com/scitable/definition/ribonucleic-acid-rna-45>

OECD. 2016. Advisory Document of the Working Group on Good Laboratory Practice: Application of GLP Principles to Computerized Systems.

OECD. 1998. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. Paris.

Overview of the immunoprecipitation (IP) technique. ThermoFisher Scientific. n.d. Luettu 3.10.2017.

<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/immunoprecipitation-ip.html>

Puranen, P. 2015. Mitä on GLP? Fimea. Luettu 8.9.2017.

http://www.fimea.fi/documents/160140/1562893/GLP2015_MitaseonPPu/191db2fb-fc57-4ddf-b460-56ccbd36b3f2

Rashid, M.A., Khatib, F., Sattar, A. 2015. Protein preliminaries and structure prediction fundamentals for computer scientists. Luettu 14.9.2017.

https://www.researchgate.net/figure/282790336_fig2_Figure-3-Primary-secondary-tertiary-and-quaternary-protein-structures-3

Sharp, D. 2012. DNA, RNA and proteins. PBworks. Luettu 8.9.2017.

<http://aisbiology.pbworks.com/w/page/49012795/DNA,%20RNA,%20and%20Proteins>

Vitale, D. 2000. Comparing the Agilent 2100 Bioanalyzer performance to traditional DNA analysis techniques.

<http://www.chem-agilent.com/pdf/5980-0549EN.pdf>

Zhang Y., Cremer, P. 2006. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series.

LIITTEET

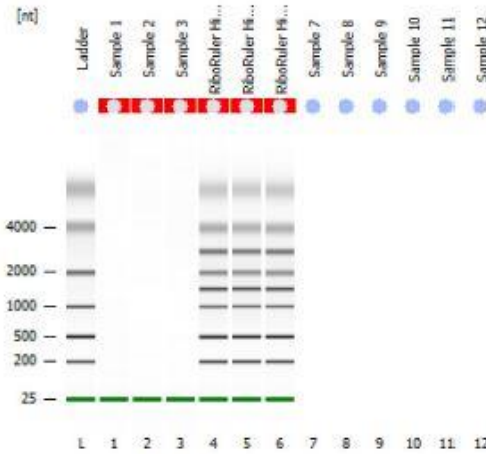
Liite 1. RNA, ajo 1

2100 expert_Eukaryote Total RNA Nano_DE13806688_2017-08-17_09-46-48.xad (V. 2)

Page 1 of 12

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE13806688_2017-08-17_09-46-48.xad
 Created: 8/17/2017 9:47:05 AM
 Modified: 8/22/2017 12:26:14 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

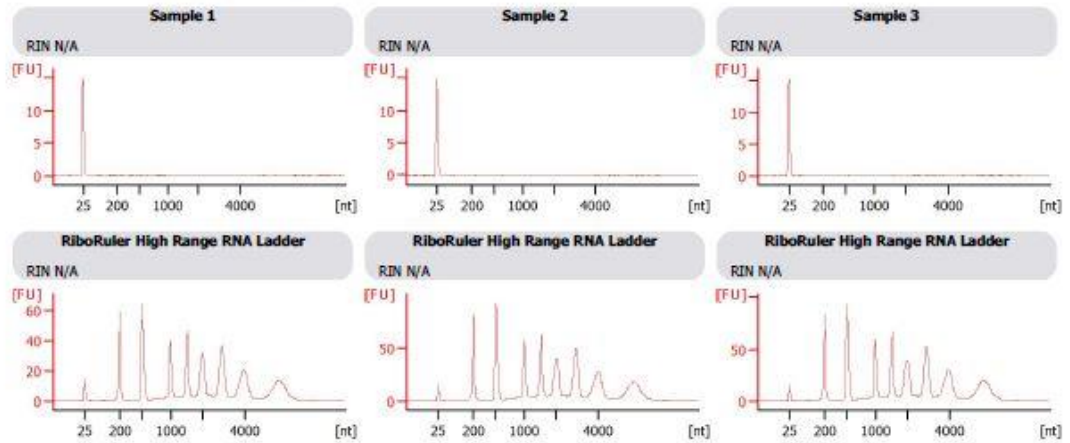
Instrument Name: DE13806688
 Serial#: DE13806688
 Firmware: C.01.069
 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\SecuredArea\Method\Templates\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xcv
 Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Version: 2.6
 Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Eukaryote)
 © Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #: VE10BK20
 Reagent Kit Lot #: 1716
 Chip Comments:



Liite 2. RNA, ajo 2

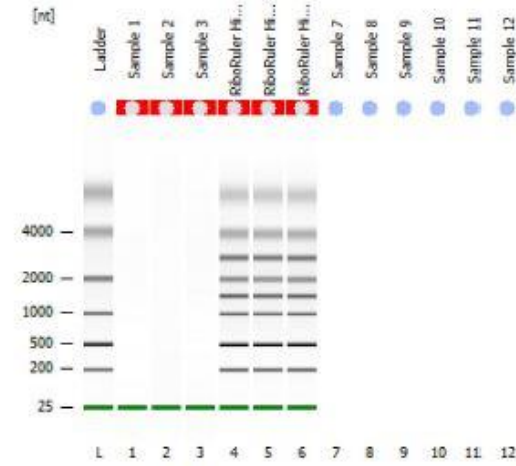
2100 expert_Eukaryote Total RNA Nano_DE13806688_2017-08-18_09-35-30.xad (V. 2)

Page 1 of 14

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE13806688_2017-08-18_09-35-30.xad

Created: 8/18/2017 9:35:47 AM
 Modified: 8/22/2017 12:07:00 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

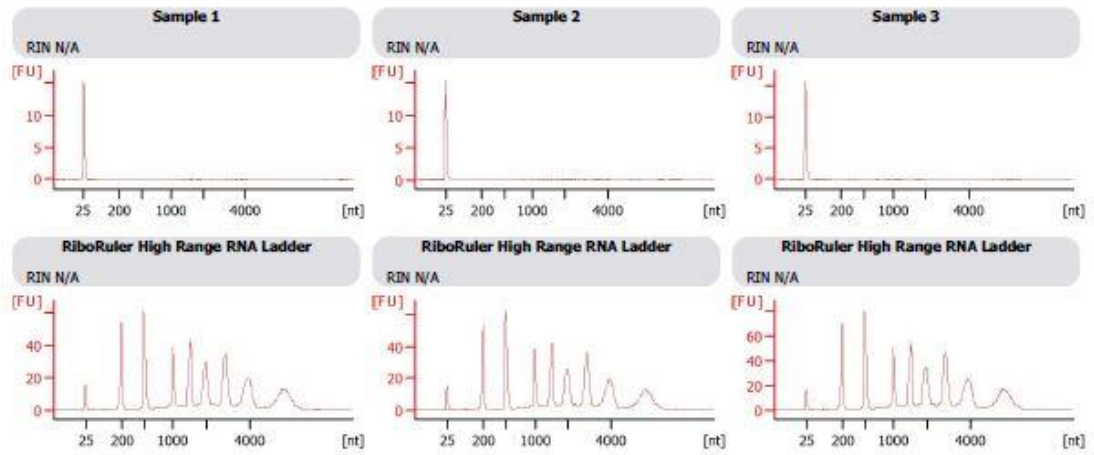
Instrument Name: DE13806688 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13806688 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\SecuredArea\Method\Templates\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series TT.vox
 Eukaryote Total RNA Nano
 Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Version: 2.6
 Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Eukaryote)
 © Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #: VE10BK20
 Reagent Kit Lot #: 1716
 Chip Comments:



Liite 3. RNA, ajo 3

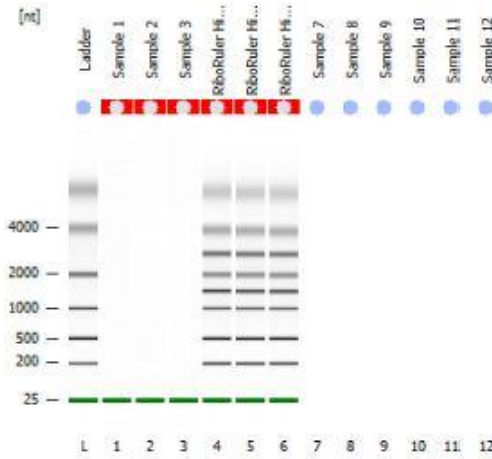
2100 expert_Eukaryote Total RNA Nano_DE13806688_2017-08-21_09-50-34.xad (V. 1)

Page 1 of 12

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE13806688_2017-08-21_09-50-34.xad

Created: 8/21/2017 9:50:54 AM
 Modified: 8/21/2017 10:06:31 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

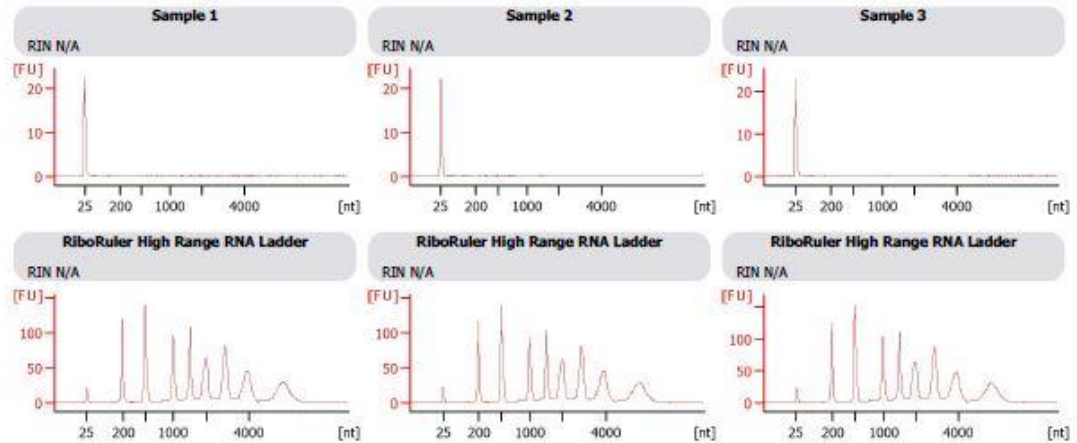
Instrument Name: DE13806688 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13806688 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\SecuredArea\Method\Templates\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series TT.xad
 Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Version: 2.6
 Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Eukaryote)
 © Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #: VE10BK20
 Reagent Kit Lot #: 1716
 Chip Comments:



Liite 4. DNA, ajo 1

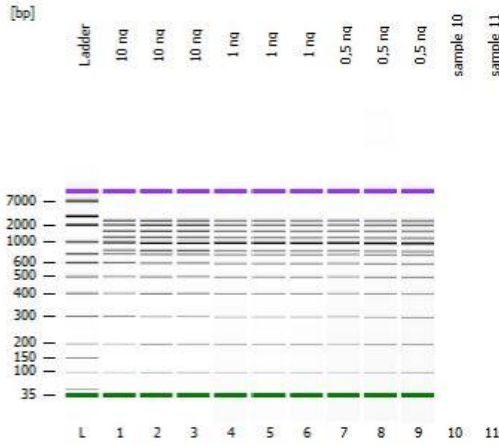
2100 expert_High Sensitivity DNA Assay_DE13806688_2017-08-09_13-49-19.xad (V. 1)

Page 1 of 18

Assay Class: High Sensitivity DNA Assay
 Data Path: C:\...gh Sensitivity DNA Assay_DE13806688_2017-08-09_13-49-19.xad

Created: 8/9/2017 1:49:40 PM
 Modified: 8/9/2017 2:25:15 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

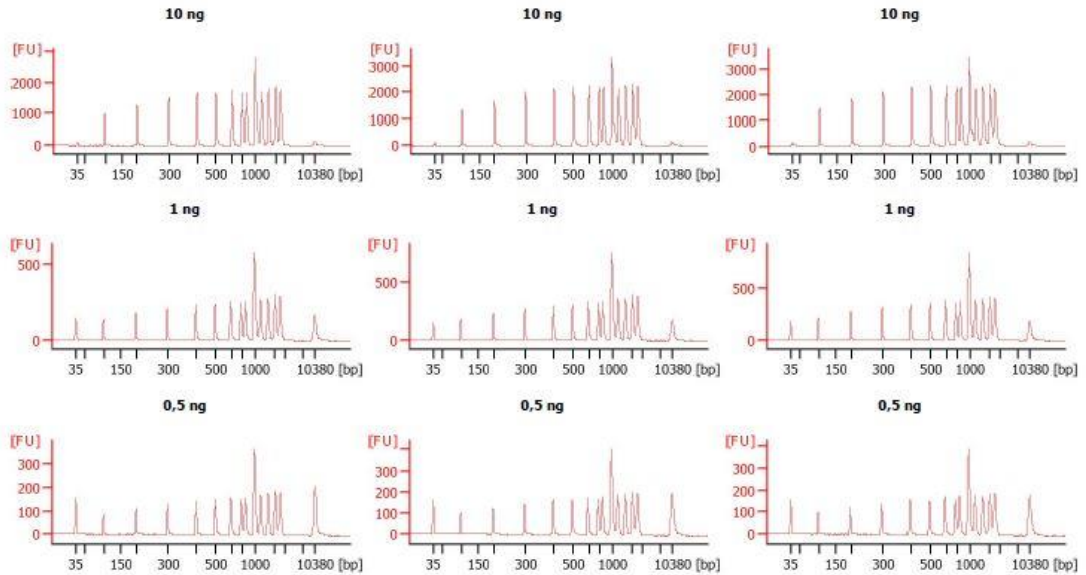
Instrument Name: DE13806688 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13806688 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\SecuredArea\Method\Templates\dsDNA\High Sensitivity DNA ver High Sensitivity DNA Assay
 Assay Class: High Sensitivity DNA Assay
 Version: 1.03
 Assay Comments: Copyright © 2003-2010 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #: VE02BK50
 Reagent Kit Lot #: 1710
 Chip Comments:

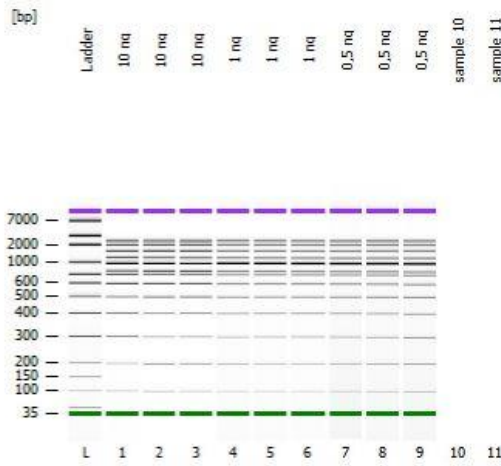


Liite 5. DNA, ajo 2

2100 expert_High Sensitivity DNA Assay_DE13806688_2017-08-10_10-40-03.xad (V. 1)

Assay Class: High Sensitivity DNA Assay Created: 8/10/2017 10:41:10 AM
 Data Path: C:\...gh Sensitivity DNA Assay_DE13806688_2017-08-10_10-40-03.xad Modified: 8/10/2017 11:16:46 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

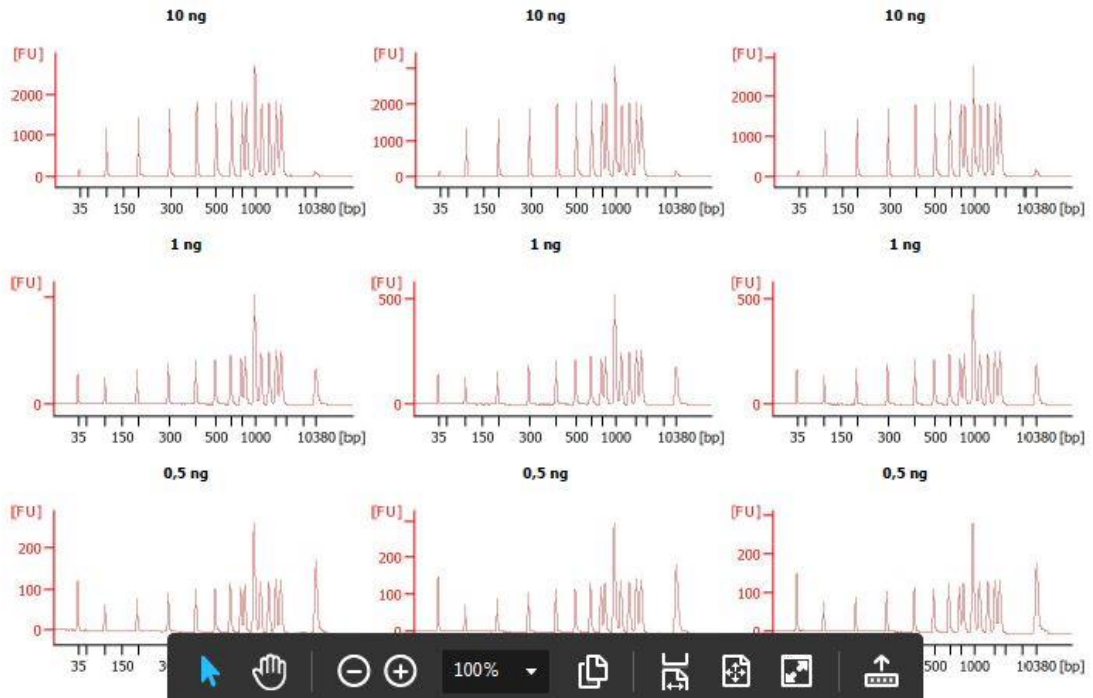
Instrument Name: DE13806688 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13806688 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\SecuredArea\Method\Templates\dsDNA\High Sensitivity DNA v01
 Assay Class: High Sensitivity DNA Assay
 Version: 1.03
 Assay Comments: Copyright © 2003-2010 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #:
 Reagent Kit Lot #:
 Chip Comments:



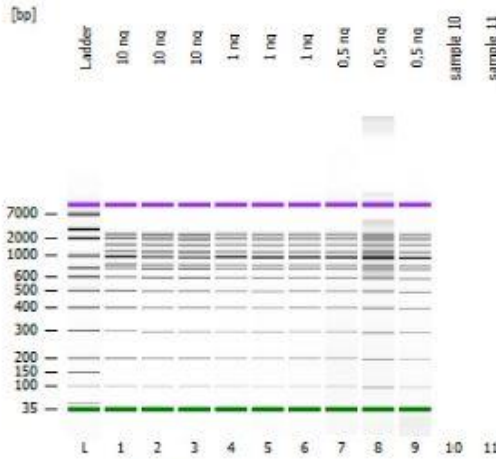
Liite 6. DNA, ajo 3

2100 expert_High Sensitivity DNA Assay_DE13806688_2017-08-11_09-57-48.xad (V. 3)

Page 1 of 20

Assay Class: High Sensitivity DNA Assay
 Data Path: C:\...gh Sensitivity DNA Assay_DE13806688_2017-08-11_09-57-48.xad
 Created: 8/11/2017 9:58:12 AM
 Modified: 8/11/2017 10:46:43 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

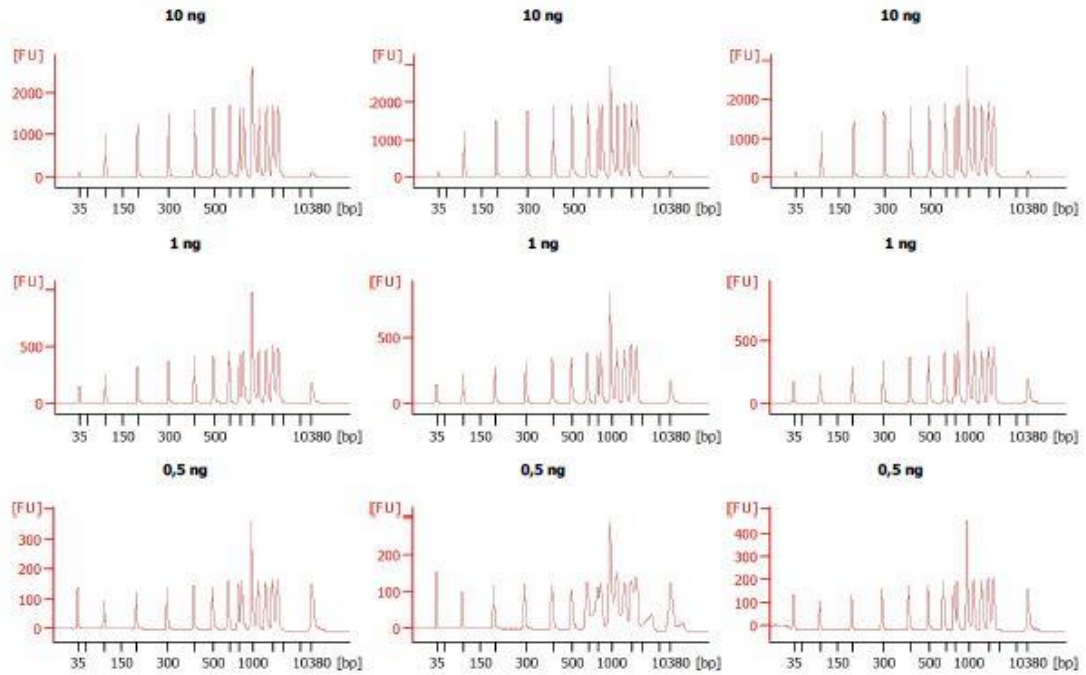
Instrument Name: DE13806688
 Serial#: DE13806688
 Firmware: C.01.069
 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\SecuredArea\Method\Templates\dsDNA\High Sensitivity DNA assay
 Assay Class: High Sensitivity DNA Assay
 Version: 1.03
 Assay Comments: Copyright © 2003-2010 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #: VE02BK50
 Reagent Kit Lot #: 1710
 Chip Comments:



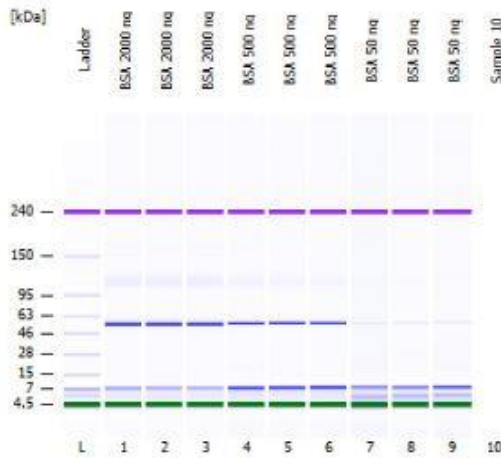
Liite 7. Proteiini, ajo 1

2100 expert_Protein 230_DE13806688_2017-08-14_10-48-23.xad (V. 2)

Page 1 of 19

Assay Class: Protein 230
 Data Path: C:\...\\2100 expert_Protein 230_DE13806688_2017-08-14_10-48-23.xad
 Created: 8/14/2017 10:48:43 AM
 Modified: 8/14/2017 11:26:32 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

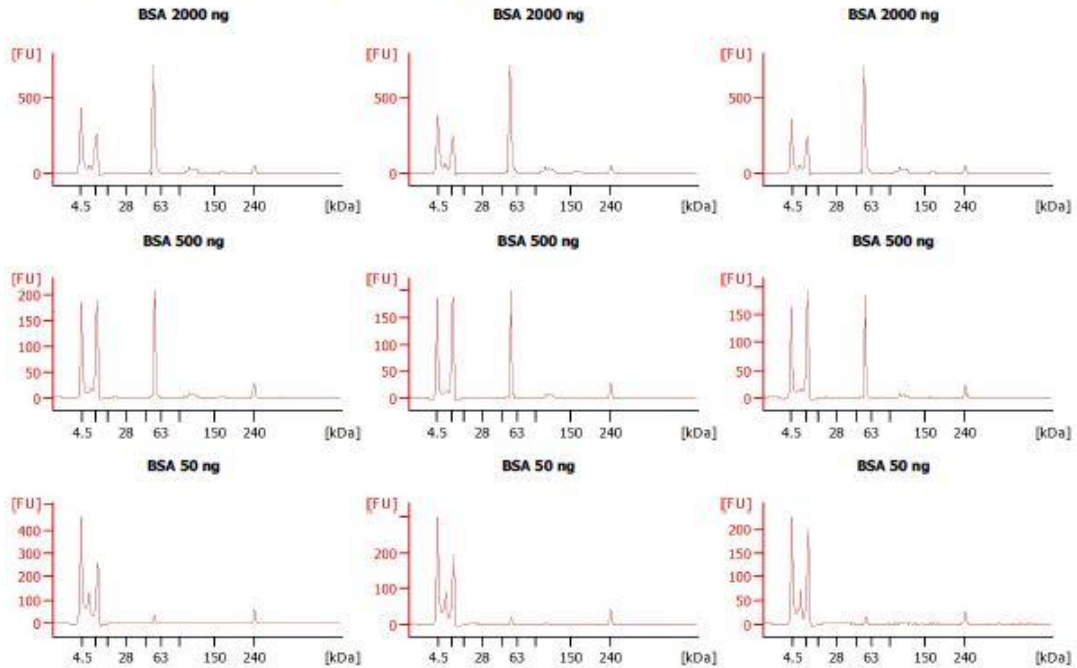
Instrument Name: DE13806688 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13806688 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\SecuredArea\Method\Templates\Protein\Protein 230 Series 11.yml
 Assay Class: Protein 230
 Version: 3.4
 Assay Comments: Protein Analysis 14 - 230 kDa
 © Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #: VD20BP10
 Reagent Kit Lot #: 1711
 Chip Comments:



Liite 8. Proteiini, ajo 2

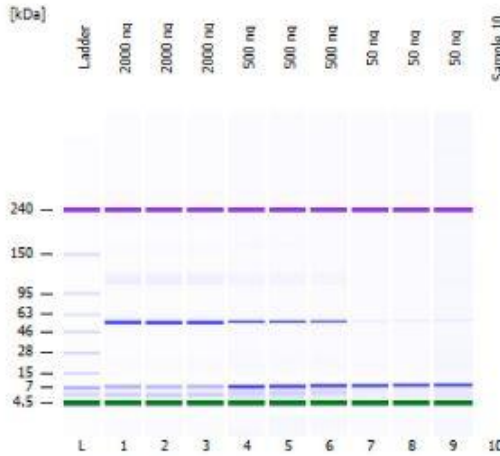
2100 expert_Protein 230_DE13806688_2017-08-15_10-06-33.xad (V. 2)

Page 1 of 19

Assay Class: Protein 230
 Data Path: C:\...\\2100 expert_Protein 230_DE13806688_2017-08-15_10-06-33.xad

Created: 8/15/2017 10:06:50 AM
 Modified: 8/15/2017 10:37:47 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

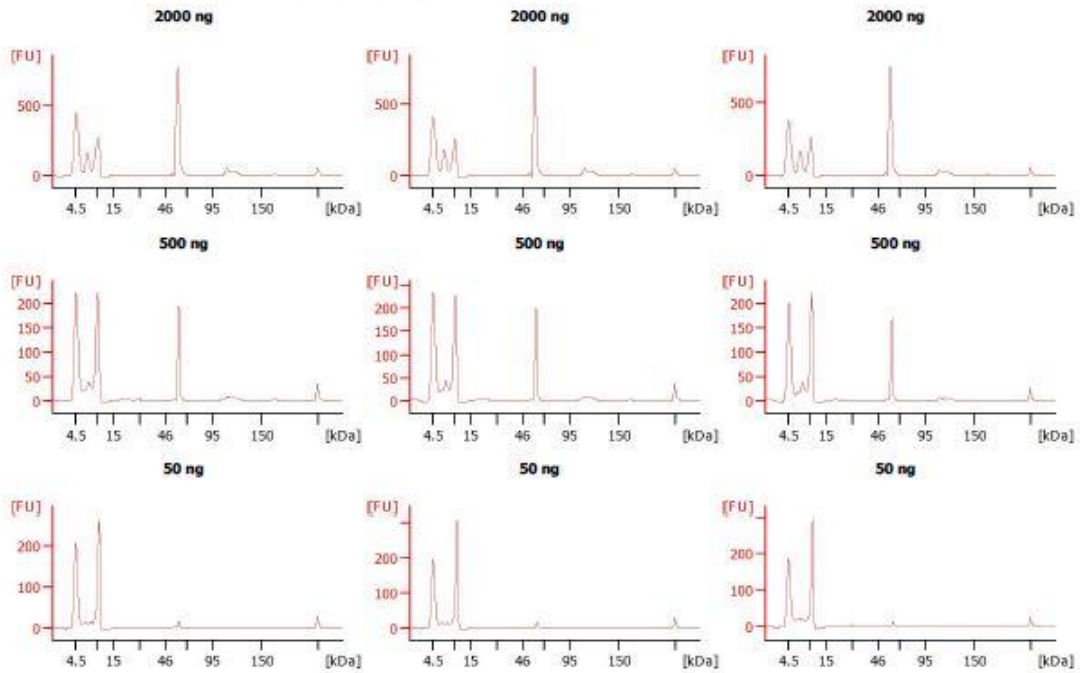
Instrument Name: DE13806688
 Serial#: DE13806688
 Firmware: C.01.069
 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\SecuredArea\Method\Templates\Protein\Protein 230
 Assay Class: Protein 230
 Version: 3.4
 Assay Comments: Protein Analysis 14 - 230 kDa
 © Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #: VD20BP10
 Reagent Kit Lot #: 1711
 Chip Comments:



Liite 9. Proteiini, ajo 3

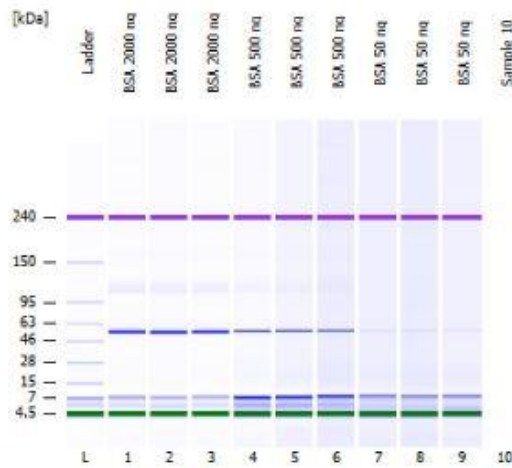
2100 expert_Protein 230_DE13806688_2017-08-16_10-13-51.xad (V. 2)

Page 1 of 19

Assay Class: Protein 230
 Data Path: C:\...\\2100 expert_Protein 230_DE13806688_2017-08-16_10-13-51.xad

Created: 8/16/2017 10:14:09 AM
 Modified: 8/16/2017 10:46:09 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

Instrument Name: DE13806688 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13806688 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\SecuredArea\Method\Templates\Protein\Protein 230 Series II.you
 Protein 230

Assay Class: Protein Analysis 14 - 230 kDa
 Version: 3.4
 Assay Comments: © Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #: VD20BP10
 Reagent Kit Lot #: 1711
 Chip Comments:

