

Viktor Raimi

# DNA-näytteiden puhdistuksen automatisointi Biomek-robotilla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööriyö

22.5.2018

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Viktor Raimi DNA-näytteiden puhdistuksen automatisointi Biomek-robotilla 38 sivua + 4 liitettä 22.5.2018
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ammatillinen pääaine	Biolääketekniikka
Ohjaajat	laboratorioinsinööri Lars Paulin Tutkintovastaava Carola Fortelius
<p>Työssä käydään läpi polyetyleeniglykolipuhdistusprotokollan automatisointia Beckman Biomek NXp -pipetointirobotilla sekä pohditaan automatisoinnin vaiheita ja käyttäjäystävällisyyttä, että turvallisuusaspekteja.</p> <p>DNA-puhdistuksessa käytetty PEG-puhdistus on työläs ja hidas vaihe suorittaa käsin, minkä vuoksi protokolla pyritään automatisoimaan kyseisellä laitteelle. Työssä myös validoidaan eri valmistajien superparamagneettisia karboksyylihelmiä. Helmillä on keskeinen rooli PEG-puhdistuksessa DNA-fragmenttien sidonnassa</p> <p>Ohjelmoinnin ja helmien validoinnin jälkeen suoritettiin yhteensopivuusvalidointi. Tällä haluttiin varmentua helmien sopivuudesta automatisoituun järjestelmään. Työn aikana ilmeni DNA-näytteen selittämätön katoaminen, joka lopulta osoittautui olevan prosessin aikana jäänyttä reagenssia, mikä sai aikaan sen, että näyte näyttäisi katoavan.</p>	
Avainsanat	PEG, CA-helmi(et) ja DNA

Author Title Number of Pages Date	Viktor Raimi Automation of DNA-sample cleaning on Biomek pipetting robot 38 pages + 4 appendices 23 August 2017
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Professional Major	Bio medical technology
Instructors	Lars Paulin, laboratory engineer Carola Fortelius, degree correspondence
<p>This Bachelor's thesis studies the automation of the polyethylene glycol purification protocol with the Beckman Biomek NXp pipetting robot as well as discusses the steps of automation and the user-friendliness of the security aspects.</p> <p>The PEG purification used for DNA purification is a tedious and slow step by hand, which is why the protocol needs to be automated using a pipetting robot. The thesis project also validates the superparamagnetic carboxyl beads of different manufacturers. The beads play a central role in PEG purification by binding DNA fragments.</p> <p>After validation of the programming and bead validation, compatibility validation was performed. The aim was to verify the suitability of the beads for the automated system. During the thesis project, an unexplained disappearance of the DNA sample occurred, which eventually turned out to be a residual reagent from the process making it seem as if the sample was disappearing</p>	
Keywords	PEG, CA-beads and DNA

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto PEG-käsittelyyn	1
2	NGS next generation sequencing -DNA-kirjaston rakentaminen	1
2.1	Mikä on DNA-kirjasto ja miten se on luotu?	1
2.2	Kirjasto tyyppejä	3
2.2.1	Genominen kirjasto	3
2.2.2	cDNA-kirjasto	4
2.3	DNA-puhdistuksen perusta	5
2.4	DNA:n puhdistus	6
2.5	PEG-puhdistus ja kokoerottelu koneen silmin	6
2.6	Automatisoinnin hyödyt	7
2.7	Automatisoinnin haittoja	7
3	Projektin toteutus kokeellinen osa	8
3.1	Välineistö	8
3.2	Bekman NXp	8
3.3	Fragment Analyzer	8
3.4	Reagenssit	9
3.5	Menetelmät	9
4	Tulokset	10
4.1	Johdanto	10
4.2	Ohjelmointi	10
4.3	Käyttöjärjestelmän rakentaminen PEG-puhdistusohjelmalle	13
4.4	PEG-ohjelmiston optimointi	14
4.5	Lopullinen ohjelma ennen kokeiluja näytteellä	17
4.6	Turvallisuus	18
4.7	PEG-puhdistusprotokollan optimointi ennen näytteellä ajoa	20
4.8	Minimiestemäärän optimointia koneella	22
4.9	CA-Helmien testaus PEG-puhdistusprotokollassa	23
4.10	Optimointi hard semiskirted-levyille	25
4.10.1	Levyn yhteensopivuus ja optimointi	25
4.10.2	PEG-puhdistusprotokollaan optimointi	25
4.10.3	Johtopäätös	27

4.11	CA-Helmien testaus PEG- kokoerottelu	27
4.12	Protokollan suoritus koneella	28
4.13	IF THEN komento	30
4.14	Näytteen katoaminen prosessissa	31
4.15	Kokoerottelu 600-900bp koneellisesti	34
4.16	Koe oikealla näytteellä	35
5	Tulosten käsittely	35
5.1	Ohjelmoinnin onnistuneisuus	35
5.2	Viimeinen versio ohjelmasta	36
5.3	CA-helmien tulokset	36
5.4	Johtopäätökset	37
	Lähteet	38
	Liitteet	
	Liite 1. PEG-puhdistus 2.0	
	Liite 2. PEG-kokoerottelu 2.0	
	Liite 3. Virallinen komentopuu protokollasta	
	Liite 4.PEG-puhdistus protokollan ohje	

## Lyhenteet

bp Base pair

PEG Polyetyleeniglykoli.

Size selection Kokoerottelu

CA-helmet Karboksyylihappopäälyllistetyt superparamagneettiset helmet.

NX<sup>P</sup> Bekman-pipetointi-robotti, malli Biomek NX<sup>P</sup>.

DNA Deoksiriboosinukleaasi

NumPlates Levyjen lukumäärä

Array Alue

EB Eluutioliuos

PEGBEED PEG- ja CA-helmien seos

EBVol EB:n määrä jonka käyttäjä määrittää pipetoinnissa

ETOHVol EtOH:n määrä jonka käyttäjä määrittää pipetoinnissa

PEGBEEDVol PEGBEED-määrä, jonka käyttäjä määrittää pipetoinnissa

UI User interface / käyttöjärjestelmä

n kerroin

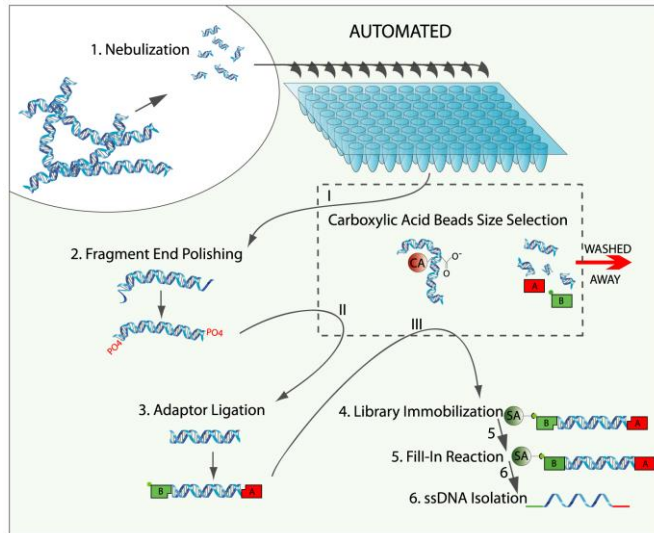
## 1 Johdanto PEG-käsittelyyn

Työn tarkoituksena on ohjelmoida DNA-polyethyleeniglykolipuhdistus (PEG) protokolla NX<sup>P</sup>-robotille. Työssä käydään läpi ohjelman kirjoittaminen sekä protokollaan liittyvää kemiaa. DNA-kirjastot ovat tärkeitä DNA-tutkimuksissa ja antavat tärkeää tietoa eliön genomiikasta sekä proteiineista. PEG-puhdistusprotokolla on hidas ja työläs prosessi tehdä manuaalisesti, tämän vuoksi protokollaa pyritään automatisoimaan Bekman Biomek NX<sup>P</sup>-robotille Viikin Biokeskuksen instituutille.

## 2 NGS next generation sequencing -DNA-kirjaston rakentaminen

### 2.1 Mikä on DNA-kirjasto ja miten se on luotu?

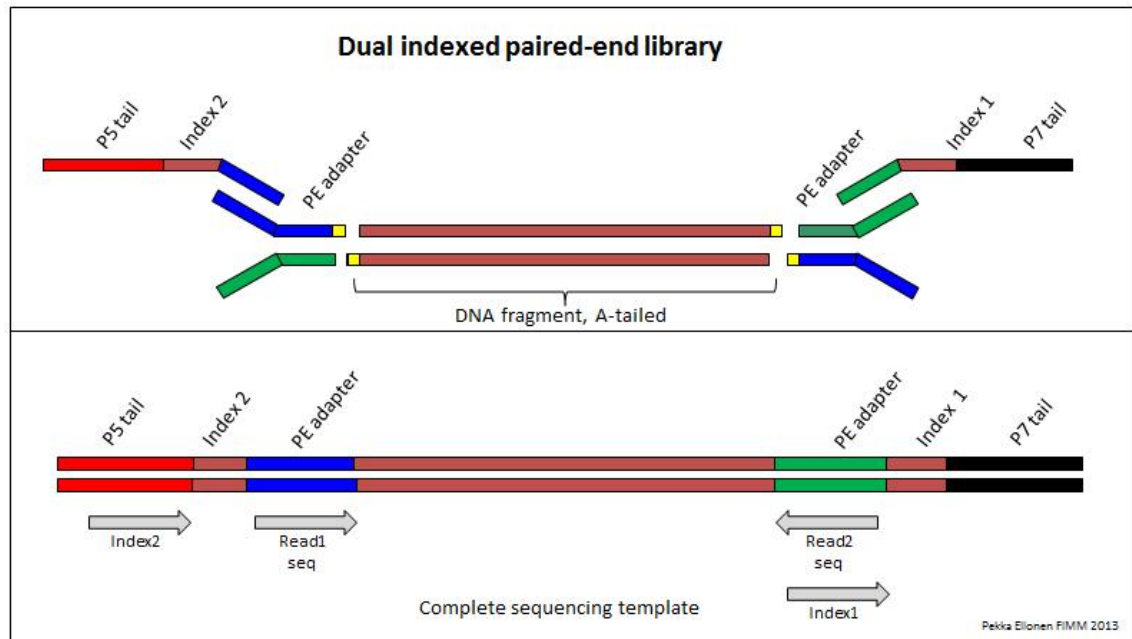
DNA-kirjasto on erikokoisista DNA-fragmenteista koostuva kokoelma, jossa tutkija voi esimerkiksi tunnistaa projektin kannalta tärkeitä fraktioita, spesifisen proteiinin valmistuksessa esiintyvän DNA-sekvenssin tai perinnöllisestä sairaudesta kertova DNA-sekvenssin. Näitä fraktioita pyritään eristämään jatkotutkimuksia varten. Erikokoisia DNA-fraktioita saadaan aikaan käyttämällä sonikaattoria. Sonikaattori on laite joka käyttää ultraääntä hajottaakseen DNA-ketjun eripituisiksi pätkiksi. Sonikointiajalla voidaan säädellä, kuinka paljon DNA hajoaa. Riippuen määrästä ja halutusta koosta voidaan sonikaattorilla tehdä neljä tai kuusi sonikointisykliä. Fragmentit ajetaan Fragment-Analyzer koneen läpi, jotta nähtäisiin, miten pieniin osiin DNA on pilkkoutunut. Fragmenteille suoritetaan kokoerottelu-protokolla (PEG-käsittely) jossa hankkiudutaan eroon väärän koluokan fragmenteista. [1; 2]



Kuva 1. Kuvassa DNA-kirjaston muodostaminen automaatiota hyödyntäen. Näyte ensin fragmentoidaan jonka jälkeen suoritetaan PEG-käsittely. PEG-käsittelyn jälkeen suoritetaan adapteri ligaatio (kuva 2) ja suoritetaan kirjasto immobilisaatio. Kaksijuosteisesta kirjastosta tehdään yksi juosteinen suorittamalla Single strand DNA isolation (ssDNA) eli yksijuosteisen DNA-ketjun isolaatio-protokolla[3].

Näytteet fosforyloidaan 5'päistä, jotta niistä tulee blunt end -tyyppisiä. Blunt end -fragmenteille suoritetaan end repair ja adapteri ligaatio jolloin fragmentista tulee kuvan 2 kaltainen juoste. Halutun kokoisille fragmenteille voidaan suorittaa PCR, jotta saataisiin riittävä määrä näytettä kirjaston rakentamiseen. Fragmentteihin tulee lopuksi lisätä indeksit PCR-menetelmällä. Lopuksi juosteet kiinnitetään ja suoritetaan ssDNA-isolaatio. Koko kirjasto prosessi etenee suoraviivaisesti kuvan 1 mukaisesti. [3;4;5]





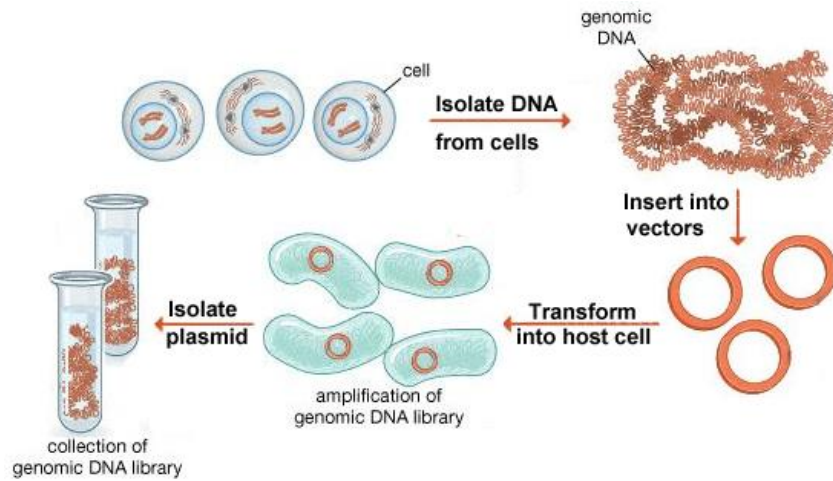
Kuva 2. Kuvassa DNA fragmenttiin lisätään 5' ja 3' päihin barkoodatut P5- ja P7-adapterit jotka antavat sille y:n kaltaiset päät. Päät suoristuvat indeksisäyksien jälkeen. [5]

## 2.2 Kirjasto tyyppejä

DNA-kirjastoja on muutamana laisina. Erottavina tekijöinä on mitä kukin kirjasto sisältää. Kirjasto voi sisältää genomista DNA:ta tai lähetti RNA:ta.

### 2.2.1 Genominen kirjasto

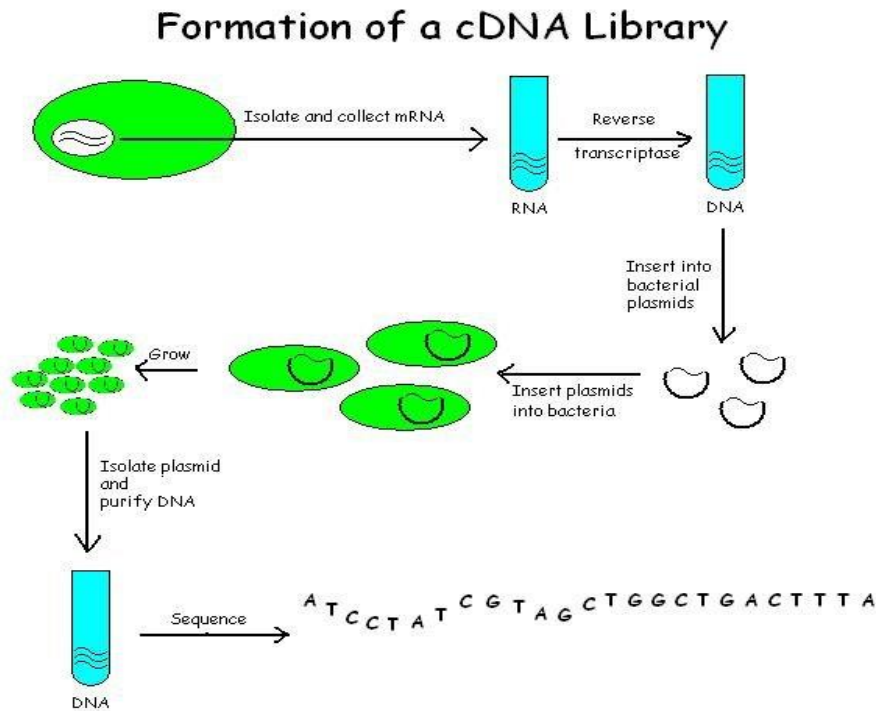
Genomisessa kirjastossa yksilön koko genomi on rakennettu fragmenteista. DNA-materiaali pilkkotaan erikokoisiksi fragmenteiksi, sillä yksilön DNA olisi aivan liian suuri käsiteltäväksi nykyisillä menetelmillä. DNA:sta saatava data on aivan liian suuri. Ideaali fragmentin koko on 300-600 emäsparia. DNA-fragmentit liitetään plasmidivektoreihin DNA-ligaatiolla. Plasmidit ajetaan bakteerin/ hiivasoluun. Bakteerit monistavat sisälle ajettua plasmidia-jolloin ne tuottavat kopioita tutkittavan yksilön genomista DNA:ta. Amplifikoinnin jälkeen DNA-fragmentit eristetään bakteerin plasmidista, jolloin saadaan kokoelma genomista fraktioitunutta DNA:ta. Periaatteessa tällä menetelmällä pitäisi saada koko yksilön genomi talteen pienempinä paloina. DNA-materiaalin lähteellä ei sinänsä ole väliä-sillä tiedetään, että jokaisessa solussa on koko yksilön genomi tosin poikkeuksena ovat mahdolliset mutaatiot. [6;7]



Kuva 3. Kuvassa selitetty genomisen DNA-kirjaston perusta yksinkertaistetusti. [8]

### 2.2.2 cDNA-kirjasto

cDNA-kirjaston rakentaminen ei paljon poikkea genomisen kirjaston rakentamisesta. Tärkeänä erona on se, että cDNA-kirjasto rakennetaan käyttäen yhtä solu- tai kudostyyppiä. Solun tai kudoksen lähetti-RNA:t eristetään ja näistä tehdään DNA kopiot käyttäen käänteistranskriptioentsyymejä. Tällä kirjasto menetelmällä voidaan kartoittaa lähetti-RNA:n populaatiota kudoksessa, sekä havaita erilaisten solujen kehitysvaiheet ja ekspressioprofiilit sekä helposti identifioida proteiineja. Genomisesta kirjastosta poiketen cDNA-kirjastossa on vain ja ainoastaan lähetti RNA:sta muodostettu DNA, tämän vuoksi cDNA-kirjastossa ei ole introneita. Introneiden puuttuminen saa kirjaston koon pieneksi, jolloin voidaan kopioida kirjasto täydessä koossa. Haittapuolena on se, että cDNA kopioita tarvitaan enemmän kuin genomisessa kirjastossa, kun halutaan tutkia proteiinin tuotantoa tai suorittaa solupohjaisia tutkimuksia. [1; 8; 9]



Kuva 4. kuvassa voi nähdä yksinkertaistetusti kuinka cDNA-kirjasto muodostetaan. [10]

### 2.3 DNA-puhdistuksen perusta

Kirjaston luonnissa käytetään polyetyleeniglykolipuhdistusprotokollaa (PEG), jossa erikokoiset fragmentit käsitellään polyetyleeniglykolilla. PEG- ja suolakonsentraatiota säätelemällä voidaan säädellä, minkä kokoiset fragmentit sitoutuvat CA-helmiin. Menetelmä tunnetaan myös SPRI (solid-phase reversible immobilization) -menetelmänä. Suurella PEG-konsentraatiolla pienkokoiset fragmentit sitoutuvat CA-helmiin ja laimeammalla konsentraatiolla taas isommat fragmentit. DNA kiinnittyy sähköisellä varauksella CA-helmeen, jonka vuoksi DNA-fragmentti ei huuhtoudu pois, kun nesteestä poistetaan väärinkokoisia fragmentteja. Tris tai vesi muuttaa CA-helmien varausta, jonka vuoksi DNA-fragmentit eluotuvat liuokseen. Tätä ominaisuutta hyödyntäen voidaan valita spesifisen kokoisia fragmentteja tutkittavaksi. [4; 10; 11; 12]

## 2.4 DNA:n puhdistus

Halutaan esim. saada kaikki yli 500 baseparia (bp) olevat fragmentit pois. Menetelmässä tulee käyttää 7,5-prosentista PEG-konsentraatiota. Suuremmalla konsentraatiolla jäisi pois kaikki yli 350 bp:n fragmentit ja pienemmällä taas 600 bp:n. Tutkittava näyte pipetoidaan nesteeseen, jossa on 5M NaCl:n ja 15 µl CA-helmiä. NaCl:n määrä vaihtelee riippuen PEG-prosenttisuudesta. Bindausvaihe kestää noin 10 minuuttia jonka jälkeen CA-helmet ajetaan eppendorfin pohjaan magneetilla, jolloin neste kirkastuu. CA-helmet kerääntyvät putkenpohjalle magneetin avulla. Bindauksessa kaikki 500 bp:tä pienemmät fragmentit kuten nukleotidit ja oligot eivät kiinnity CA-helmiin. Kirkastunut neste sisältää lyhyitä pätkiä, jotka voidaan ottaa talteen mahdollisiin jatkotutkimuksiin pipetoidamalla kirkas neste toiseen eppendorfiin. Tämän vaiheen jälkeen CA-helmet käsitellään 80-prosenttillä EtOH-liuoksella joka sisältää 8-prosenttia NaCl:tä. CA-helmet sekoitetaan liuoksessa hetken ja laitetaan takaisin magneetille. Kirkastunut neste pipetoidaan pois ja tilalle pipetoidaan eluutioliuos. Eluutioliuos voi olla TRIS-puskuria tai milliQ-vettä. Liuos sekoitetaan ja laitetaan magneeteille kirkastumaan. Kirkas neste pipetoidaan omaan eppendorfiin. Protokollasta saadaan kaksi tuotetta, lyhyitä fragmentteja jotka eivät sitoutuneet CA-helmiin ja pitkiä, jotka puolestaan sitoutuivat. Pitkät tuotteet käsitellään end repair mixillä, jolloin fragmenteista tulee blunt end -kaltaisia.

Protokollaa toistetaan uudelleen end repair-protokollan jälkeen, jolloin tehdään adapteriiligaatio. Adabteriligaatioprotokollan loppuksi ajetaan uudelleen PEG-puhdistus ja lisätään PCR-reaktioseos. Näytteet ajetaan PCR-laitteella monistaen haluttua fragmenttia.

## 2.5 PEG-puhdistus ja kokoerottelu koneen silmin

Prosessin pystyy kirjoittamana kolmivaiheisena ohjelmana.

Vaihe 1. PEG- ja CA-seoksen pipetointi näytealustaan/ näytteisiin ja sekoitus. Binding-aika pitää ottaa huomioon, jolloin inkubaatio voidaan suorittaa itse koneella tai levyllä vapauttaen kone toisiin käyttö tarkoituksiin inkubaation ajaksi.

Vaihe 2. Inkubaation jälkeen levy asetetaan magneeteille ja neste otetaan talteen toiselle levyllä. Levy poistetaan magneeteilta ja aloitetaan alkoholikäsitely. Levy asetetaan ta-

kaisin magneeteille ja alkoholikäsitelyssä käytetty alkoholi pipetoidaan jätteenä pois levyiltä. Kokoerottelussa taas kirkas neste pipetoidaan toiseen levyyn, jossa on puhtaat CA-helmet ja toistetaan ensimmäinen vaihe, jonka jälkeen aloitetaan alkoholi käsittely.

Vaihe 3. Levyt poistetaan magneeteilta, pipetoidaan eluutioneste näytteille ja sekoitetaan. Levyt asetetaan takaisin magneeteille ja otetaan neste talteen omalle levyille jossa jo valmiiksi pipetoitu haluttu jatkokäsittelyseos tai pipetoidaan jatkokäsittelyseoslevylle.

## 2.6 Automatisoinnin hyödyt

Käsintehtynä protokollalla voidaan tehdä 36 näytettä levyllä. Käsintehtynä protokolla syö valtavasti aikaa laboratorion henkilökunnalta, noin neljä tuntia per 36 näytteen levy. Päivän aikana pystytään suorittamaan noin 2-4 36 näytteen ajoa. Automatisoituna henkilökunnalta vaadittu aika koneen preparointiin ja säätöihin olisi noin 5 minuuttia teoriassa. Itse prosessi kokonaisuutena kestää noin 2 tuntia. Henkilökunta saisi runsaasti lisää aikaa toisiin projekteihin. Hidastavina tekijöinä on näytteen alkupreparointi, DNA:n fragmentointi sonikaattorissa ja ajo Fragment Analyzerissa. Fragment Analyzerillä halutaan varmistaa, että DNA on fragmentoitunut oikean kokoisiksi fragmenteiksi. Automatisoidussa versiossa on hyvin tärkeää, että PEG-määrää/ konsentraatiota voi säädellä sekä pipetoitavan eluutio liuoksen määrää, että seoksen määrää. PEG-konsentraation säätelyllä voidaan säätää, minkä kokoiset DNA-fragmentit kiinnittyvät CA-helmiin.

## 2.7 Automatisoinnin haittoja

Menetelmän automatisointi on kannattavaa, jos näytteitä on paljon. Liian vähäinen määrä näytteitä kasvattaa kuluja, sillä reagenssiä menee hukkaan. Hävikki johtuu menetelmästä, jolla kone kykenee ottamaan reagenssiä. Kone kykenee ottamaan reagenssiä vain esim. ylösalaisin olevasta kärkilaatikon kannesta.

### 3 Projektin toteutus kokeellinen osa

#### 3.1 Välineistö

Välineitä on lueteltu seuraavassa:

Tietokone (Windows XP OS), Bekman manuaali, Bekman Biomek NX<sup>P</sup> pipetointi robotti, testi 96 kuoppalevyjä (semi skirtted) 10 kpl, Fortitude 96 kuoppalevy semi skirted hard 10 kpl, 96 kuoppalevyille sopiva magneetti levy kaksi kappaletta, kaksi laatikkoa 200µl kärkiä, kaksi laatikkoa 100µl kärkiä, Oma tekoinen näyte alusta joka koostuu kahdesta erilaisesta pipetointi alustasta, Q-bit DNA mittaus laite, Fragment Analyzer kapilaarimittaus laite, Magnatrix pipetointi laite

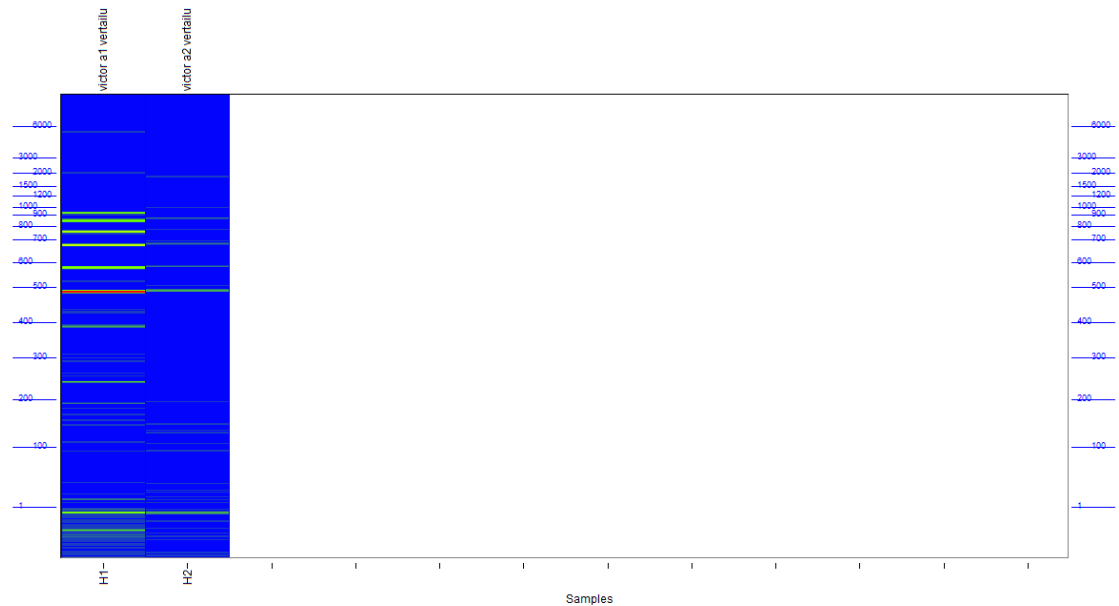
#### 3.2 Bekman NXp

Bekman NX<sup>P</sup> on pipetointirobotti, jolle voidaan kirjoittaa omia protokollia esimerkiksi PCR-levyjien esivalmisteluun tai DNA-puhdistukseen. NX<sup>P</sup> käyttää Windows XP:tä opeointi pohjana. Päivitetty NX<sup>P</sup>:n ohjelmisto on Windows 7 pohjainen, joka mahdollistaa enemmän yhteensopivuutta uusien koneiden kanssa. Projektissa käytetty NX<sup>P</sup> on Windows XP-pohjainen.

#### 3.3 Fragment Analyzer

Fragment Analyzer on elektrokapilaarimittauslaite, jolla voidaan tutkia esim. Kuinka hyvin PEG- kokoerotelu on onnistunut tai minkä kokoisia fragmentteja näytteessä on. Laite

suorittaa mittauksen ajamalla näytteet elektro kapilaarisesti geelin läpi. Laite antaa kuvan fragmenttien muodostamista viivoista sekä kertoo, kuinka suuria nämä viivat ovat.



Kuva 5. Esimerkki kuva Fragment Analyzer tuloksista. Kuvassa voi nähdä viivojen (fragmenttien) koko luokan.

### 3.4 Reagenssit

Projektissa käytettyjä reagenssejä:

Elintarvikevärejä kontaminaatiotesteihin (punainen, sininen, vihreä ja musta), Valio HYLA kevyt maitoa ja Juhlamokka kahvia kontaminaatio testeihin sekä pipetointi testeille, testi näyte, PEG:iä, TRIS puskuria, 5M NaCl, 1M NaCl, 80EtOH, CA-helmiä (MyOne), Testi CA-helmiä. (Promega Pronex, MyOne, Life science BioMag ja SeraMag), ThermoFisher GeneRuler 50bp DNA Ladder LOT00585624, ThermoFisher GeneRuler 1kb DNA ladder LOT 0024641462, Q-Bit kitti LOT 1905166, Fragment Analyzer kitti LOT 05AHY507, DNA ladder LOT 08DAYS13,

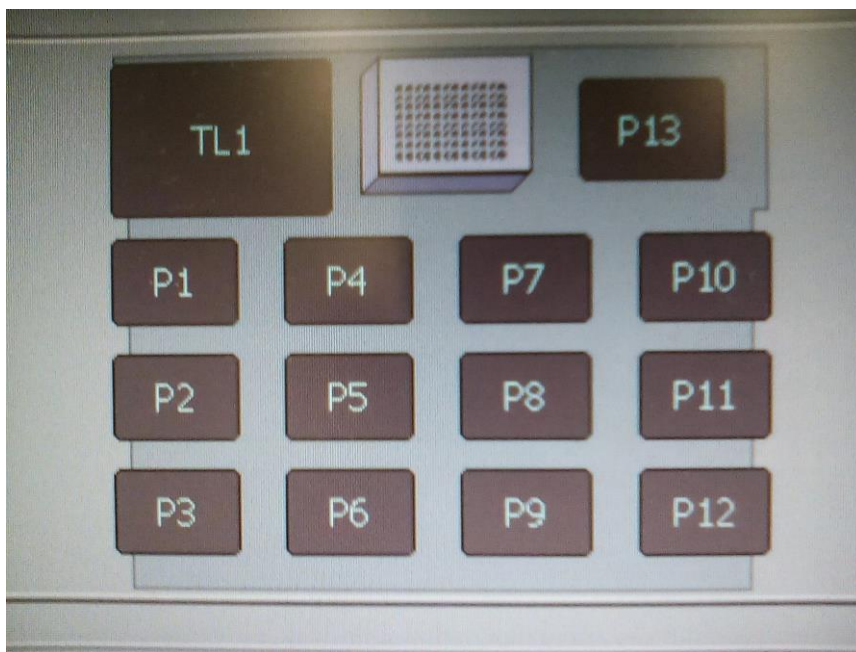
### 3.5 Menetelmät

PEG-Puhdistus menetelmä (liite1), PEG- kokoerottelu (liite2), Q-bitmittausohje ja Fragment Analyzer-näytteen esivalmistelu työohje.

## 4 Tulokset

### 4.1 Johdanto

Tässä luvussa esitellään alusta, jossa reagenssit, kärjet, yms. tavarat sijaitsevat. Tähän pohjaan tullaan viittaamaan useasti tulevassa tekstissä. Kuvissa esiintyvä "= (xy) & n" komento tarkoittaa, että suoritetaan n kertaa kyseinen funktio tai siirretään n määrä objekteja. N on reaalikokonaisluku esim. 1,2,3...n tai numeroitu objekti kuten levy1, levy2,...levy n.



Kuva 6. Alusta jossa reagenssit, kärjet, alustat sekä pesu astia sijaitsee. TL1 on kärkialusta jossa, robotti asettaa kärjet pipetointipäähän. TL1:en ja P13:sta välissä oleva asema on pesuasema.

### 4.2 Ohjelmointi

Bekman NX<sup>P</sup> robotin käyttöjärjestelmän ohjelmointimanuaali sisältää kattavat ohjeet esimerkiksi perus protokollien ohjelmointiin, levyltä levyille pipetointeja halutuilla parametreilla, jotka pitää erikseen kertoa koneelle tai tehdä oletusarvoiksi. Ensimmäiset kokeilut ohjelmat joita tuli suoritettua, pohjautuivat Magnatrix-robotin ohjelmaan, jota käytetään



PEG-puhdistuksessa. Tarkkojen havaintojen ja niiden kirjaamisen ansiosta pystyttiin luomaan Magnatrixin kaltaisen protokollan Bekman NX<sup>P</sup>-robotille käyttäen seuraavia komentoja.

Vaihe1 (luku 2.4). PEG- ja CA-helmi seoksen pipetointi näytteisiin ja inkubointi. Tässä vaiheessa pitkät DNA-fragmentit sitoutuvat CA-helmiin.

```
Start
Instrumentsetup
Transfare from PEGBEED 25µl to levy1
Mix levy1
Transfare from PEGBEED 25µl to levy2
Mix levy2
Transfare from PEGBEED 25µl to levy3
Mix levy3
Pause 600s
```

**Kuva 7.** Kuva komennoista jota käytetään toteuttamaan nestesiirto levyltä levyille. Levyt ja reagenssit voidaan asettaa mihin tahansa vapaaseen paikkaan esim. P1, P2 jne.

Välivaihe. Levyt siirretään magneettilevyille ja odotetaan, että CA-helmet kerääntyisi pohjaan. Supernatantti pipetoidaan omille näytelevyille (lyhyt tuote), jonka jälkeen vaihe 2 alkaa.

```
Move instrument levy1 to Mag1
Move instrument levy2 to Mag2
Move instrument levy3 to Mag3
Pause 30s
Aspirate from levy1
Despirate to Nayte1
Wash
Aspirate from levy2
Despirate to Nayte2
Wash Aspirate from levy3
Despirate to Nayte3
Wash
```

**Kuva 8.** Kuva komennoista jotka toteuttavat levysiirron paikasta A paikkaan B sekä komennoista jotka toteuttavat supernatantin siirron.

Vaihe 2 (luvussa 2.4) alkoholikäsitteily. Näyte levyille pipetoidaan 80-prosenttista alkoholia ja siirretään pois magneeteilta aloitusasemiin. Aloitusasemalla EtOH:a pipetoidaan näytekuppiin ja sekoitetaan. Sekoituksen jälkeen levyt siirretään takaisin magneeteille ja odotetaan 30 sekuntia, jotta CA-helmet kerääntyisivät magneettien vaikutuksesta näytekuppan reunoihin. EtOH pipetoidaan pois jätteenä. EtOH poiston jälkeen odotetaan hetki noin 30 sekuntia, jotta loputkin EtOH:t haihtuisi pois.

```

Transfare from ETHO 50µl to levy1
Transfare from ETHO 50µl to levy2
Transfare from ETHO 50µl to levy3
Move instrument levy1 to P4
Move instrument levy1 to P5
Move instrument levy1 to P6
Mix levy1
wash
Mix levy2
wash
Mix levy3
wash
Move instrument levy1 to Mag1
Move instrument levy1 to Mag2
Move instrument levy1 to Mag3
Pause 30s
Aspirate from levy1
Despirate to jate
Wash
Aspirate from levy2
Despirate to jate
Wash Aspirate from levy3
Despirate to jate
Wash
Pause 30s

```

**Kuva 9.** Kuva komennoista jotka toteuttavat PEG-puhdistuksenalkoholi käsittelyn. Levyjen paikat löytyvät kuvasta 6.

**Vaihe 3 EB-käsittely.** EB-käsittely irrottaa halutut DNA-fragmentit CA-helmistä. Levyt siirretään aloitus asemiin ja niihin pipetoidaan EB liuosta ja sekoitetaan. Levyt siirretään magneeteille ja odotetaan 30 sekuntia, jotta CA-helmet kerääntyisivät magneettien vaikutuksesta näytekuopan reunoihin, jonka jälkeen supernatantti pipetoidaan omille näytelevyille. Kirkkaan nesteen pitäisi sisältää halutun kokoiset fragmentit.

```

Move instrument levy1 to P4
Move instrument levy1 to P5
Move instrument levy1 to P6
Trasfare from EB to levy1
Trasfare from EB to levy2
Trasfare from EB to levy3
Mix levy1
wash
Mix levy2
wash
Mix levy3
wash
Move instrument levy1 to Mag1
Move instrument levy1 to Mag2
Move instrument levy1 to Mag3
Pause 30s
Aspirate from levy1
Despirate to nayte4
Wash

```

```

Aspirate from levy2
Despirate to nayte5
Wash
Aspirate from levy3
Despirate to Nayte6
Wash

```

Kuva 10. Kuva komennoista jotka toteuttavat PEG-puhdistuksen eluutio vaiheen missä CA-helmistä irtoaa halutut fragmentit. Levyjen paikat voidaan nähdä kuvasta 2.

Simulaatioajoissa prosessi vaikutti toimivalta ja täyttävän halutut toimenpiteet mutta konkreettisissa testeissä NX<sup>P</sup> ei kykene siirtämään levyjä. Protokollaa piti muuttaa huomioiden koneen rajoitteet.

### 4.3 Käyttöjärjestelmän rakentaminen PEG-puhdistusohjelmalle

Protokollaa varten täytyi luoda käyttöjärjestelmä, jotta ohjelmassa voitaisiin muuttaa erilaisia arvoja ilman että jouduttaisiin säätää protokollan oletusasetuksia. Tutkittiin koneella olevia tehdasvalmisteisiä protokollia ja niiden käyttöjärjestelmiä. Havainnointiin, että kaikkia vaiheita ei tarvitse erikseen kertoa koneelle vaan ne voidaan muuttaa toistuviksi komennoiksi reunaehdoilla eli Loop-komennolla. Loop-komento vaatii protokollalle käyttöjärjestelmän luontia. Käyttöjärjestelmän rakentaminen tehdään protokollan "start"-kohdasta. Tämän kaltaiset käyttöjärjestelmät sopivat hyvin vain ja ainoastaan, jos muuttujia on vähemmän kuin neljä. Käyttäjävastavuus häviää kokonaan käyttöjärjestelmästä, jos muuttujia on enemmän kuin neljä. Väärän arvon antaminen parametrille vaatii, että kaikki parametrit määritetään ennen kuin prosessi voidaan lopettaa ja antaa haluttu/halutut arvo(t). Parametrien määrittämiskunat ovat ponnahdusikkunoita, jotka tulevat yksi kerrallaan. Tärkeimmät komennot käyttöjärjestelmän luonnissa ovat "Prompt", "Variable ja Value", näille tulee antaa sopivat arvot ja liitteet esim. "Prompt NumPlates 3" = Kone kysyy kuinka, monta levyä on käytössä ponnahdusikkunalla. Maksimiarvoksi annettiin 3.

Overridable	Prompt	Variable	Value
	X	NumPlates	3
		Array	="", "levy_1", "levy_2", "levy_3", "levy_4", "levy_5", "levy_6",
		Array	="", "nayte_1", "nayte_2", "nayte_3",

			"nayte_4", "nayte_5", "nayte_6",
	X	EBVol	50
	X	ETHOVol	50
	X	PEGBEEDVol	50

Kuva 11. Start kohdan näkymä/ yksinkertaisen käyttöjärjestelmän (UI:n) luonti ikkunasta. Array on vaihteluväli jota levyt voivat saada. EBVol/ XVol käsky/ parametriehto määrittää kyseisen reagenssin määrän jota kone käyttää protokollassaan.

NX<sup>P</sup>-robotin valmistaja suostui antamaan erikoisen komennon, jolla pystytään luomaan käyttäjäystävällisen käyttöjärjestelmän. Tällä erikoisellakomennolla pystytään määrittämään X määrä parametreja, säätämään levyjen määriä ja käytettävää komentopuuta. Tällä komennolla pystytään rakentaa monimutkaisia komentopuita siten että robotti ei jumiudu käskyjen monimutkaisuudesta, sekä ohittamaan joitain koneen rajoitteita turvallisesti.

#### 4.4 PEG-ohjelmiston optimointi

Käyttöjärjestelmän luonnin jälkeen pystytään käyttämään Loop-komentoa. Loop-komento toimii seuraavan laisesti.

```
Start
Instrumentsetup
Group (PEGBEED pipetointi)
  Loop Transfare PEGBEED to levy =n
    Transfare from PEGBEED 25µl (mix and wash between destinations) to
    ="levy" & n
```

Kuva 12. Kuva kuinka "loop" komento saadaan aktivoitua. Komento ="(objekti)" & n selitetään luvussa 4.1.

Tällä tavalla voidaan kertoa koneelle, että suorittaisi nesteen siirron n kertaa jossa n vastaa pipetoitavien levyjen määrää. Tällöin ei tarvitse kirjoittaa erikseen käskyä pipetoida kaikkia levyjä. Käyttäjä voi itse määrittää, kuinka monta levyä hän aikoo pipetoida. Loop komentoa soveltaen voidaan koko prosessi suorittaa n määrälle levyille sekä Vol-komennolla voidaan optimoida esimerkiksi, kuinka paljon PEGBEED:ä laitetaan per levy. Uusi komentosarja näyttää seuraavanlaiselta:

```
Start
Instrumentsetup
Group (PEGBEED pipetointi)
  Loop n=1
```

```

        Transfare from =PEGBEEDVol µl (mix and wash between destina-
tions) to ="levy" & n
        End loop
    End group
Pause 600s (inkubaatio)
Loop move instrument ="levy" & n to ="mag" & n
Pause 30s (magneetit pohjaan)
Group (näytteen siirto)
    Loop n=1
        Aspirate from ="levy" & n
        Despirate to ="Nayte" & n
        Wash
    End loop
End group
Group (alkoholikäsitteily)
    Loop n=1
        Transfare from =ETHOVol µl to ="levy" & n
        Move instrument ="levy" & n to P4
    end loop

```

Kuva 13. Kuva hyvin yksinkertaistetusta PEG-puhdistusprotokollasta jolla pyritään havainnoidaan sekä seuraamaan koneen käytöstä kyseisissä vaiheissa. Katso liite 2 vaiheille.

Harmillisesti loop komentoa ei voi käyttää kun siirretään levyjä takaisin aloituspaikoille. Tämän vuoksi pitää käyttää vaihe vaiheelta komentoja. Harmillisesti robotti ei kykene siirtämään levyjä ylipäätään. Tämä yllättävä havainto vaati suunnitelmien muutosta. Ohjelmaa ei voida tehdä täysin automatisoiduksi. Tätä ongelmaa ei otettu huomioon simulaatioajoissa eikä myöskään kun ensimmäisiä variaatiota protokollasta tuli kirjoitettua. Ongelma ilmeni vasta konkreettisissa ajoissa.

```

Move instrument levyl to Mag1
Move instrument levyl to Mag2
Move instrument levyl to Mag3
    Loop n=1
        Mix ="levy" & n
        wash
        Move instrument ="levy" & n to ="Mag" & n
    end loop
Pause 30s
    Loop n=1
        Aspirate from ="levy" & n
        Despirate to jate
        Wash
    end loop
Pause 30s
Move instrument levyl to P4
Move instrument levyl to P5
Move instrument levyl to P6
end group
Group (EB käsittely)
    Loop n=1
        Trasfare from EB =EBVol µl mix and wash between destinations)
to ="levy" & n
    End loop
    loop n=1
        Move instrument ="levy" n & to ="Mag" & n
    Pause 30s

```

Kuva 14. Kuva levyjen siirtämisestä paikasta A paikkaan B ilman loop komentoa. Paikat voi nähdä kuvasta 6.

Koneelle ilmoitetaan, että maksimimäärä näytelevyjä on kolme, jolloin käyttäjän tulee itse lisätä kolme levyä niille paikoille, jotka näytettiin instrument set up -ikkunassa, jotta saataisiin pitkä tuote talteen ja vältettäisiin, että kone ylipipetoisi ja siirtelisi olemattomia levyjä, käytetään loop-komentoa. Loop-komento voidaan laittaa levypaikkakoordinaatioon, jolloin kone kysyy objektin nimeä ja määrää. Instrument set up:issa pitää nimetä levyt esim. Sample1, sample2...n jotta voidaan käyttää paikallista loop pipetointifunktiota. Funktiolla voidaan erikseen määrittää miten ja mitä pipetointi funktiota käytetään eri nimisille levyille. PEG -puhdistuksessa (liite1) supernatantia ei tarvitse ottaa talteen vaan se heitetään pois ja siirrytään suoraan alkoholikäsitelyyn. PEG-kokoerotuksessa (liite2) suoritetaan PEG-käsittely siten että supernatantti otetaan talteen ja tälle suoritetaan PEG-käisttely uudelleen käyttäen erilaista PEG-konsentraatiota eli toistetaan PEG-puhdistus kahdesti käyttäen erilaista PEG-konsentraatiota. Tämän vuoksi instrument set up pitää lisätä ennen kuin ohjelma aloittaa pitkien tuotteiden pipetoinnin, muutoin levyjä ei ole tarpeeksi.

```

Instrument set up
  Loop n=1
    Aspirate from ="levy" & n
    Despirate to ="näyte" & n
    Wash
  End loop
End group

```

Kuva 15. Kuva loop pipetointifunktiosta. Aspirate from ="levy" & n kertoo, että pipetoi levystä "levy" levyille "näyte" n kertaa jossa n on levyjen määrä.

Ohjelma oli alun perin suunniteltu 200  $\mu\text{l}$ :n kärjille ja ohjelma haluttiin 100  $\mu\text{l}$ :n kärjille. Ohjelmaa piti optimoida 100  $\mu\text{l}$ :n kärjille ja kalibroida pipetointikorkeus oikeaksi sekä, ottaa tarkat mitat kärjistä. Mausermittatyökälulla mitattiin ja kirjattiin 100  $\mu\text{l}$ :n kärkien mitaustulokset koneelle. Useita kuiva-ajoja piti tehdä tarkastaakseen, että kone ei vahingossa osu mihinkään liikkumisen aikana tai pipetoi huonosti. Kuivaajoissa koneen liikenopeudeksi asetettiin 20 prosenttia. Hienosäätöjä tehtiin useita tunteja, kunnes saavutettiin optimaaliset tulokset.



Kuva 16. Kuvassa näkyy metallinvärinen mausermittatyökälu, jolla mitattiin 100  $\mu\text{l}$ :n kärjen tarkat mitat kalibroinnin yhteydessä. Elintarvikevärejä joita käytettiin väritestissä kontaminaatio riskiä selvittäessä vasemmalta oikealle punainen, sininen ja vihreä. Valion kevyt HYLÄ maitoa käytettiin pipetointitesteissä pipetointinopeuden säätöä varten.

#### 4.5 Lopullinen ohjelma ennen kokeiluja näytteellä

```

Star
Instrument Setup
  Group Alkoholi kasittely
  Pause "magneetti vaikuttaa" 30s
  Loop for n=1 to =NumPlates
    Transfare=NatantVol  $\mu\text{l}$  from ="Alku" & n to ="sivu" & n
    (Change tips between destinations)
    Wash tips
  End Loop
  Wash with water
  Unload Tips
(turvallisuutta lisäävää kohta jotta koneella ei olisi kärkiä kun operaattori
siirtää manuaalisesti levyjä paikasta toiseen =96 pää menee koti asemaan)
  User pause (turva lisä, Käyttäjä itse reagoi tarvittavaan muutokseen)
  Instrument Setup (siirto magneeteitta pois)
  Loop for n=1 to =NumPlates
    Transfare =ETHOVol  $\mu\text{l}$  from="Alku" & n
    (Change tips between destinations)

```

```

        Wash tips
      End Loop
Wash with water
Unload tips
User pause
Instrument Setup "Siirto magneetille"
Pause "magneetti vaikuttaa" 30s
  Loop for n=1 to =NumPlates
    Transfare=ETHOVol µl from ="Alku" & n to jate
    (Change tips between destinations)
    Wash tips
  End Loop
Wash with water
Pause "alkoholi haihdutus" 30s
End group
Unload Tips
User Pause
Instrument Setup (mageeteilta pois)
Group (EB Kasittely)
  Loop n = 1 to =NumPlates
    Trasnsfare =EBVol µl from EB to ="Alku" & n
    (Change tips between destinations)
    Wash tips
  End Loop
  Unload Tips
  User pause
  Instrument Setup (magneeteille ja lisää Bnäyte levy)
  Pause"magneetti vaikuttaa" 30s
  Loop for n=1 to =NumPlates

    Transfare=EBVol µl from ="Alku" & n to ="sivuB" & n
    (Change tips between destinations)
    Wash tips

  End Loop
End Group
Group (mixin laitto (vaihto ehtoinen))
Finish

```

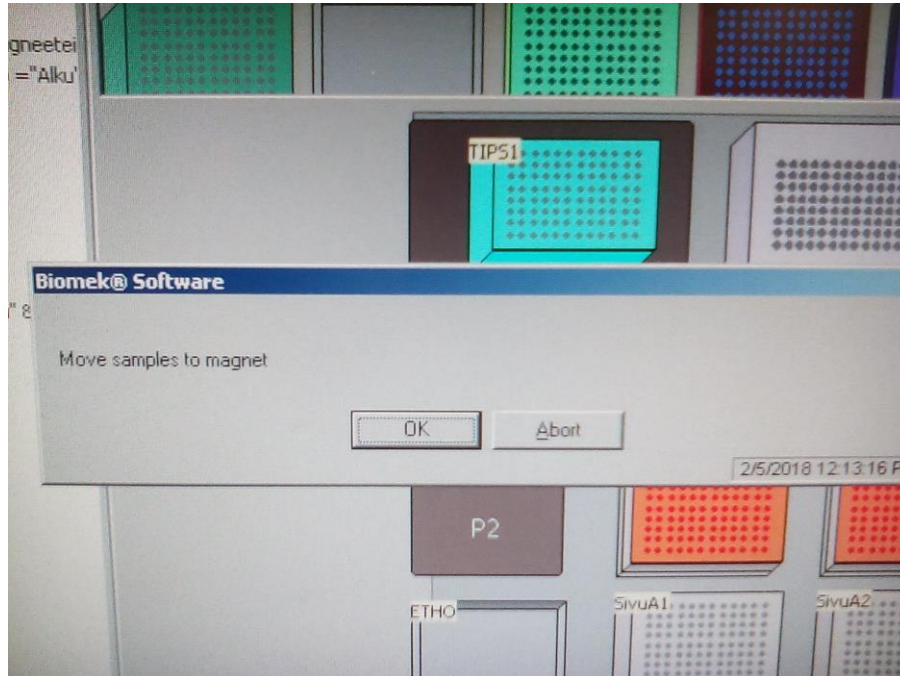
Kuva 17. Kuva raakaversiosta komennoista joiden pitäisi enemmän tai vähemmän toteuttaa protokolla sekä sisältää riittävästi turvastoppeja. Turvastopeilla pyritään lisäämään operaattorin turvallisuutta ja varmistamaan että kone ei liiku ennen kuin sille antaa luvan.

#### 4.6 Turvallisuus

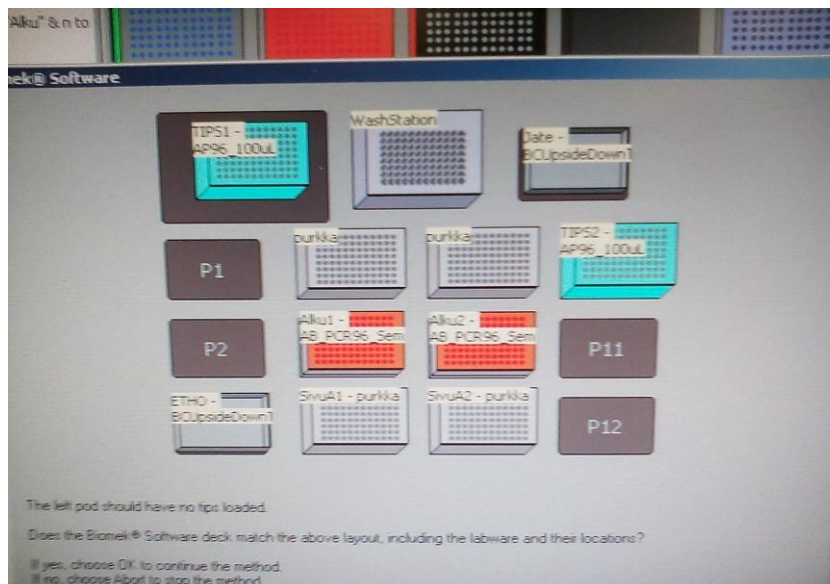
Komennoissa esiintyy useita pysähdyksiä ja tarkastus pisteitä, jossa robotti odottaa, että operaattori huomioi, mitä seuraavaksi pitää tehdä. Operaattori laittaa levyt niille paikoilleen, mihin kone näyttää ruudulla. Mikäli operaattori hyväksyy ja kertoo koneelle, että levyt ovat niille määritetyissä paikoilla, vaikka todellisuudessa eivät ole, on operaattori itse tehnyt virheen joko tahallisesti tai ollut liian kiireinen eikä huomionnut koneen ruudulla olevaa levykarttaa (kuva 19). Koneen pitää siirtää kaikki liikkuvat osat kotiasemaan turvallisesti. Kärjet menevät laatikkoon pesun kautta, ettei laatikkoon jäisi nesteitä tai muuta vastaavaa. Jokaiselle näyte sarjalle on oma kärkilaatikko mikä vähentää kontaminaatio-riskiä. Tällä pyritään myös välttämään pipetointipään tielletuloa, kun levyjä siirretään.



Käden osuessa päässä oleviin kärkiin on merkittävä kontaminaatoriski. Kotiasemallaan ollessaan päähän ei voi osua ja kone automaattisesti hakee kärjet uudelleen laatikosta. Käyttäjän ja näytteiden turvallisuus on otettu huomioon turvatoimilla ja ennakoivilla kommennoilla sekä operaattorin hyväksyntää kysyvillä kohdilla.



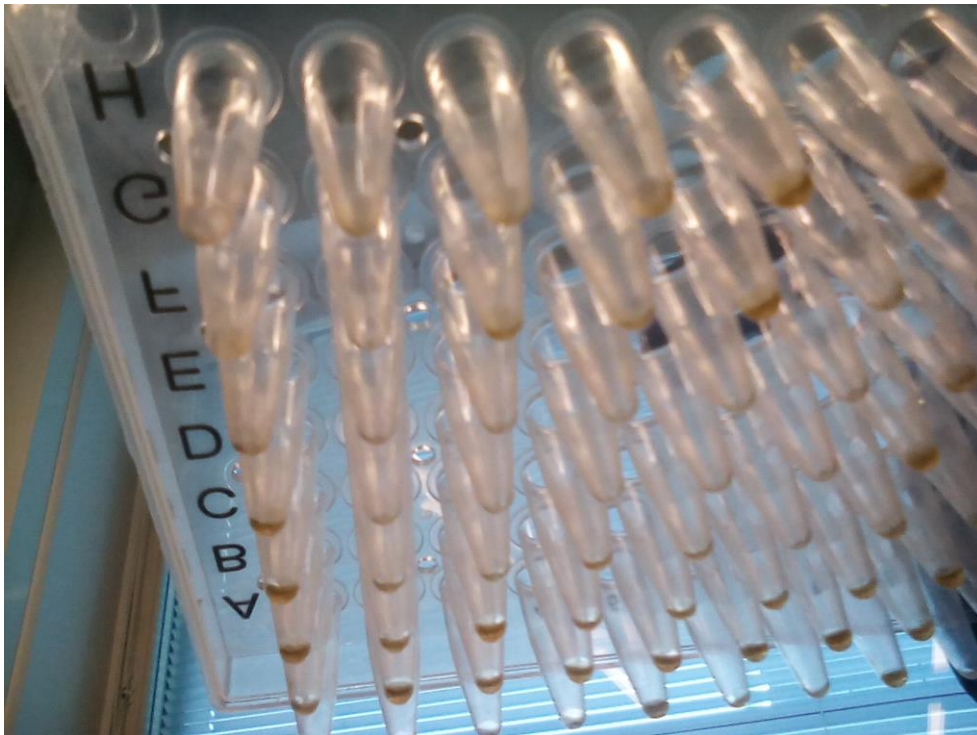
Kuva 18. Ohjelmaan lisätty stop-vaihe joka ilmoittaa käyttäjälle seuraavan vaiheen ja siirtämään näyte levyt magneeteille manuaalisesti ja klikkaamaan OK.



Kuva 19. Ohjelma näyttää visuaalisesti, mihin levyt tulee laittaa siltä varalta, jos käyttäjä ei muista tai ei ole käyttänyt protokollaa aikaisemmin. Laiton jälkeen käyttäjän tulee klikata hyväksykohtaa, kun levyt on paikoillaan. Jos tästä huolimatta tapahtuu virhe, käyttäjä on ollut huolimaton levyjen asettelussa.

#### 4.7 PEG-puhdistusprotokollan optimointi ennen näytteellä ajoa

Ohjelmiston valmistumisen jälkeen aloitettiin suorittamaan ensimmäisiä koeajoja. Koe-pipetoinneissa huomattiin, että NX<sup>P</sup> pipetoi epätasaisesti. Pipetin pipetointia kalibroitiin käyttämällä Valion kevytHYLA maitoa, sillä HYL A maito käyttäytyy seerumin tavoin ja on PEG:n tavoin viskoosia. Kalibroinnin jälkeen pipetoinnin laatu parani ja hävikki muuttui muutamaksi pisaraksi. Syy tähän ilmiöön johtui pipetinkärkeen muodostuneesta alipaineesta ja tai väärästä pipetointinopeudesta. Kärjen noustessa alipaine tasautuu imaisten nesteen mukanaan epätasaisesti jättäen suuria määriä nestettä pipetointikaivoihin. Väärän pipetointinopeuden tapauksessa haluttunestemäärä ei ehdi imeytyä kärkeen mikä johtaa epätasaiseen pipetointi tulokseen. Ajettua lisää testiajoja huomattiin, että 96 kuopalevyihin jäi kohtalaisen suuria määriä nestettä pohjaan ajon loppuvaiheessa, vaikka kärjen pipetointikorkeutta säädettiin 0,1 mm:in kaivon pohjasta. Säätämällä koneen pipetointi volyyminopeutta 100 µl/s:ssa 50 µl/s:ssa ja lievä ylipipetointi (kuopassa 50µl pipetoidaan pois 55µl) johti siihen, että lähes kaikki haluttu neste saatiin pipetoitua pois levyiltä. Joitain pieniä pisaroita jäi. Näistä on lähes mahdotonta päästä eroon ja tunnetaan myös dead volyymina.



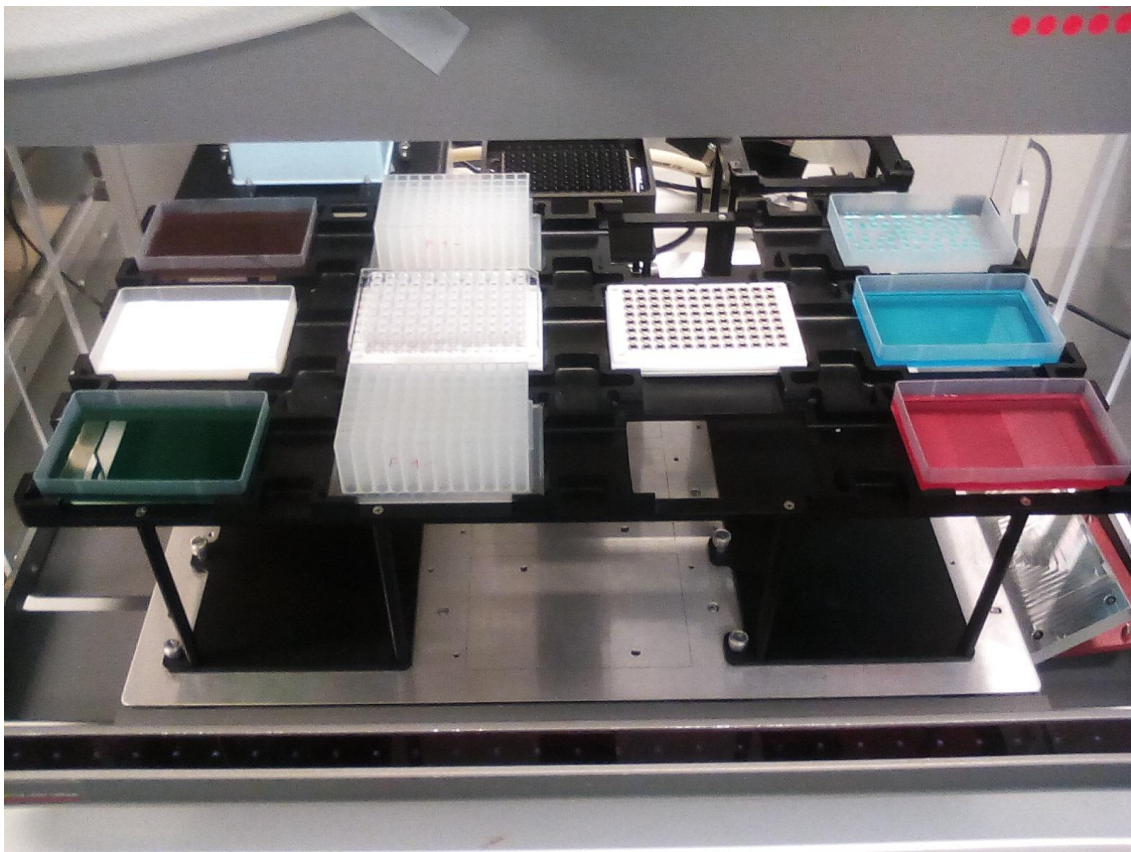
Kuva 20. Kuvassa voi nähdä epätasaista pipetointia. Jotkin kaivot tyhjenivät kokonaan niin kuin piti mutta valtaosaan jäi kohtuullisen suuria määriä nestettä. Kuva otettu ennen kalibrointia ja hienosäätöä.

Kalibrointien ja hienosäätöjen jälkeen suoritettiin väriajo. Väriajon aikana tarkkailtiin mahdollisia kontaminaatio riskejä ja nesteen käyttäytymistä pipetoinnin ja kuljetuksen aikana. Kontaminaatiosta ei ilmennyt viitteitä väritestin aikana. Robotti pipetoi jokaiselle levyille tasaisesti oikeita määriä nestettä ja pesi kärjet käymättä toisten näyte/tuote levyjen päältä, liike radat olivat oikeanlaiset. Pipetoinnin laatu heitteli kerta toisensa jälkeen. Syytä, heittelyihin ei löytynyt, vaikka käytettiin erilaisia säädöksiä pipetointikorkeudella ja nopeudella tai muulla vastaavalla. Vuosihuollon jälkeen pipetointilaatu parani merkittävästi. Koneen pipetointipää oli jossain vaiheessa osunut johonkin, minkä vuoksi pipetointipää oli hieman kallellaan aiheuttaen epätasaista pipetointia.



Kuva 21. Kuva otettu on kalibroinnin jälkeen. Pipetointijälki edelleen heittelee kuopasta toiseen mutta enemmistö kuopista tyhjentyi halutulla tavalla. Syy tähän ilmeni vuosihuollon yhteydessä. Pipetointipää oli osunut johonkin, minkä takia pää oli muutaman asteen kallellaan. Tämä johti epätasaiseen pipetointiin.

Väritestin jälkeen tuli ajettua "kahvimaitoajo." Tällä menetelmällä tarkastetaan, miten protokolla toimii erityyppisten nesteiden kanssa. Maito käyttäytyy seerumin tavoin ja kahvi lähes CA-helmien tavoin antaen realistisen kuvan protokollan ja säädösten toimivuudesta. Testissä käytettiin myös värjättyä vettä.



Kuva 22. Kuvassa kahvi, maito ja väritestin alkuasettelu. Kahvi, maito, väri testissä käytetyt värit ovat Meiran elintarvikevärejä punainen, sininen vihreä sekä Pauligtummapaahto kahvia ja Valion UHT-kevytmaitoa (kuva16). Testillä varmistetaan, että kontaminaatiota ei tapahdu sekä seuraten pipetointilaatua prosessin aikana. Pipetointilaatua pystyttiin parantamaan pienillä korkeussäädöillä sekä pipetoinnin virtausnopeutta säätämällä.

#### 4.8 Minimiestemäärän optimointia koneella

Seuraavassa kokeessa haluttiintutkia mikä on pienin mahdollinen määrä nestettä, jota voidaan käyttää siten että CA-helmet edelleen kerääntyisi kaivojen seinämiin magneettilevyn vaikutuksesta ja että protokolla toimisi edelleen. Testeissä käytettiin 50  $\mu$ l CA-helmi liuosta, 40  $\mu$ l, 30  $\mu$ l, 25  $\mu$ l, 20  $\mu$ l ja 15  $\mu$ l CA-helmi liuosta. Kaikkein optimaalisin liuosmäärä on 30  $\mu$ l, 25  $\mu$ l ja 20  $\mu$ l. 15  $\mu$ l antoi merkkejä epätasaisuudesta. Kaivon seinämiin ei muodostunut tyypillistä CA-helmikertymää. Protokollassa voidaan käyttää minimissään 20  $\mu$ l, tällä vielä savutetaan luotettavia tuloksia. 15 $\mu$ l voidaan käyttää kovissa Fortitude-levyissä mutta ei pehmeissä (luku 4.10).

#### 4.9 CA-Helmien testaus PEG-puhdistusprotokollassa

Ennen kuin protokollaa voidaan ottaa käyttöön koneella, halutaan kokeilla, voidaanko käyttää PEG-puhdistus menetelmää erivalmistajien CA-helmillä. Kokeilussa käytettiin SeraMag-, BioMag-, MyOne- ja Pronex CA -helmiä. Helmiä käytettiin liitteen 1 mukaisessa protokollassa. Haluttiin selvittää, miten helmet käyttäytyvät magneetilla, kuinka nopeasti helmet kerääntyvät magneetille (neste kirkastuminen) ja kuinka paljon näyttävää häviää protokollassa. SeraMag ja MyOne helmet pakkautuivat hyvin nopeasti magneetille kirkastaen nesteen noin 10-15 sekunnissa. BioMag-helmet pakkaantuivat hitaasti 1:stä 2 minuuttiin. Visuaalisesti voidaan havaita, että SeraMag helmiä olisi enemmän kuin MyOne tai BioMagissa.

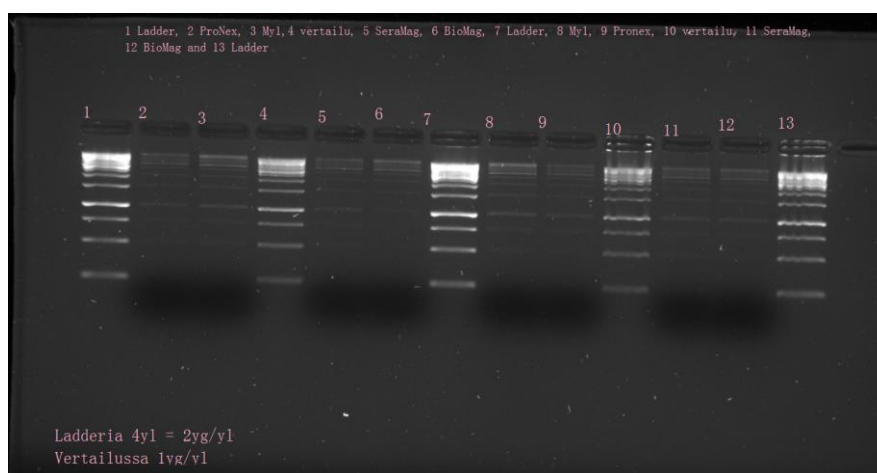
Helmillä suoritettiin PEG-puhdistus liitteen 1 mukaisesti käyttäen GeneRuler 10kb:n ladderia. PEG-käsittelyn jälkeen näytteet ajettiin 1,5 prosenttisessa agarosigeelillä 100 V 50 minuutin verran. Ajon jälkeen geelistä leikattiin kohta, jossa ajo oli suoritettu ja asetettiin BioRadin kuvauslaitteeseen, jolla otettiin kuva ajosta (kuva23). Kuvasta haluttiin katsoa, miten ajo onnistui sekä toimivatko CA-helmet halutulla tavalla.



Kuva 23. Kuvassa vasemmalta oikealle ladder 2µg/µl, SeraMag, MyOne, GeneRuler vertailunäyte, BioMag ja ladder. Näytteet ajettu agarosigeelissä 1.5 prosenttista 100 V 50 min. Kuvassa voi nähdä miten paljon eri CA-helmet sitovat DNA:ta ja onnistuivatko PEG kä-

sittelyt. Nähdään että kaikki alle 500dp:n fragmentit onnistuttiin pudottamaan pois. Vertailu näytettä ei PEG-käsitelty. Vertailunäytteellä haluttiin selvittää, miten paljon DNA:ta katoaa käsittelyn yhteydessä. Voidaan todeta, että testattavat CA-helmet toimivat halutulla tavalla. SeraMag antaa jostain syystä heikkoa tulosta.

Ensimmäisessä ajossa ei pystytty käyttämään Pronexin helmiä. Toistettiin PEG-puhdistus käyttäen kaikkia eri CA-helmiä seuraten niiden käytöstä toisiinsa ja MyOne verraten. Puhdistuksen aika mitään merkittävää havaintoa ei huomattu Pronexillä. Pronex käytetty MyOne:n ja SeraMagin tavoin. PEG-puhdistuksen jälkeen näytteet ajettiin 1.5 prosenttisessa agarosigeelillä 100 voltissa 50 minuutin verran. Ajon jälkeen geelistä leikattiin pala, jossa ajo suoritettiin ja kuvattiin edellä mainitulla laitteella. Kunkin CA-helmien toimivuutta tutkittiin ja verrattiin toisiinsa (kuva24).



Kuva 24. Kuvassa tutkittavat näytteet. Kaivot numeroitu 1-13:sta. Numerot näytteiden takana viittaa, missä kaivossa kyseinen näyte on. Ladder 2µg/µl kaivoissa 1, 7 ja 13, ProNex kaivoissa 2 ja 9, MyOne kaivoissa 3 ja 8, GeneRuler vertailu näyte kaivoissa 4 ja 10, SeraMag kaivoissa 5 ja 11, BioMag kaivoissa 6 ja 12 ja. Näytteet ajettu agarosigeelissä 1.5% 100V 50min. Kuvassa voi nähdä, miten paljon eri CA-helmet sitovat DNA:ta ja onnistuivatko PEG-käsittelyt. Nähdään, että kaikki alle 500dp:n fragmentit onnistuttiin pudottamaan pois. Vertailu näytettä ei PEG-käsitelty. Vertailu näytteellä haluttiin selvittää, miten paljon DNA:ta katoaa käsittelyn yhteydessä. Voidaan todeta, että testattavat CA-helmet toimivat halutulla tavalla. Edelliseen kuvaan nähden SeraMag antaa yhtä hyvän tuloksen kuin BioMag. Pronex antaa kohtalaisen hyvän tuloksen.

Huomattiin että ProNex helmet toimivat kutakuinkin BioMagin tavoin mutta helmien omanlaatuinen ominaisuus ei ole toivottava saatikka suotuisa. ProNex CA -helmiä tarvitaan eri määriä riippuen mitä fragmenttikokoa halutaan sitoa CA-Helmiin.

#### 4.10 Optimointi hard semiskirted-levyille

Ohjelmointi, optimointi ja kalibraatio oli suoritettu pehmeille ja taipuisille semiskirted-levyille, joita ei enää käytetä. Tätä kömmähdystä ei huomattu alkuvaiheessa mutta onneksi uudelleenoptimointi ei tuottanut hankaluuksia. Uudet levyt ovat samalta valmistajalta, jota käytettiin alussa. Uudelleenoptimointeja varten mitattiin uuden levyn mitat Mausermittatyökälulla (kuva 16). Levy poikkesi vanhasta x-akselilla noin 0,05 cm ja y-akselilla 0,08 cm. Levyn kuopat ovat enemmän suppilomaiset. Tarkkojen mittausten jälkeen piti varmentaa, että mitat ovat oikein suorittamalla pipetointikoe. Koe suoritettiin pipetoimalla halutulle levyille 50 µl värjättyä nestettä (kuva 22) erilaisissa kombinaatioissa esim. Magneettilevyn päällä ja itse rakennetun alustan päällä. Kärkien täytyi mennä kuopan keskelle, jottei magneettilevyn vaikutuksen takia olevat CA-helmet tulisi mukaan. Huomattiin, että levyn kuopat ovat enemmän oikealle noin 0,125 mm mikä johti uusiin pipetointioptimointeihin. Optimoinnit suoritettiin onnistuneesti.

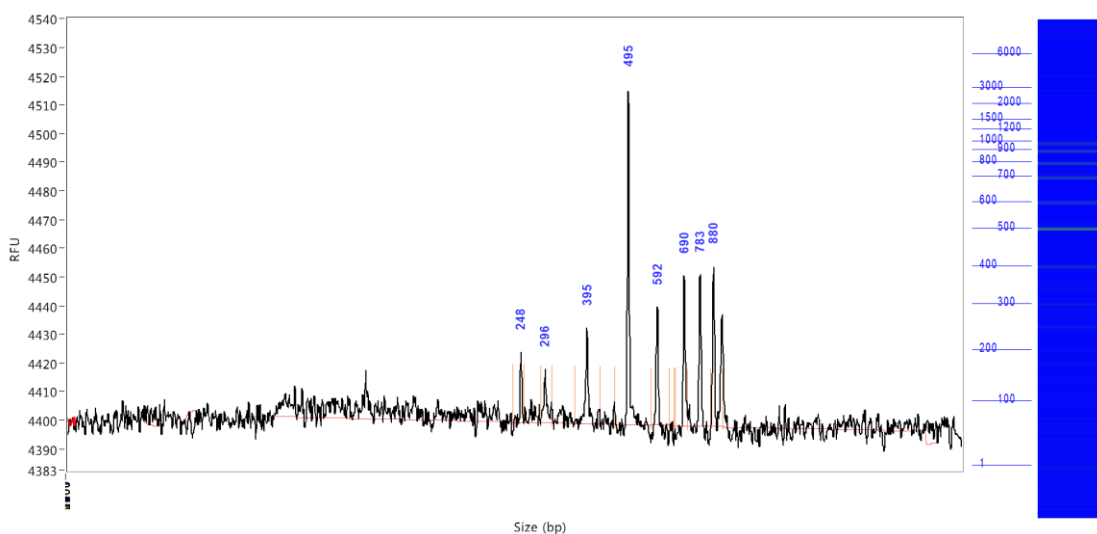
##### 4.10.1 Levyn yhteensopivuus ja optimointi

Huomattiin myös, että levy ei istunut magneettilevyn päällä samalla tavalla eikä ollut ohjelman mielestä edes yhteen sopiva magneettilevyille. Tämä ongelma ohittamiseksi tuli ohjelmaan luoda uusi levy, joka on yhteensopiva magneettilevyn kanssa. Tälle uudelle levyille annettiin samat mitat kuin tälle edelliselle levyille, joka ei ollut yhteensopiva mutta koska ohjelman levy on ns. tavallinen 96 kuoppalevy, ohjelma ei valittanut yhteensopimattomuutta. Uusi levy ei löytynyt magneettilevyn yhteensopivuuslistalta. Tämä johti siihen, että jouduttiin myös luomaan uusi magneettilevy. Tällä uudella magneettilevyllä haluttiin ennalta ehkäistä ongelmia, jotka voivat ilmentyä toisissa protokollissa yhteensopivuusohituksen takia. Uudelle levyille asetettiin yhteensopivuus uudelle magneettilevyille ja aloitettiin pipetointikoe. Koe suoritettiin ajamalla NX<sup>P</sup> 20 prosentin vauhdilla välttääkseen mahdollisia vaurioita. Levy istui 0,7 cm korkeammalla kuin edellinen levy. Arvo lisättiin uuden magneettilevyn Z-akselin offset valueen.

##### 4.10.2 PEG-puhdistusprotokollaan optimointi

Seuraavaksi ajettiin koepipetointi, jolla tarkastettiin, että kalibraatiot ovat onnistuneet halutulla tavalla. Onnistuneisuuden varmentumisen jälkeen suoritettiin väri-, kahvi- ja mai-

tokoeajo käyttäen PEG-puhdistusprotokollaa (kuva 18). Ajo suoritettiin onnistuneesti. Pipetointi ongelmia ei ilmentynyt eikä laatu heittelehtinyt toisin kuin pehmeillä levyillä (kuva 16). Ilmeisesti kovalla levyllä kuopat eivät ole epätasaisilla korkeuksilla, mikä oli havaittavissa lämpökäsitellyistä pehmeistä levyistä. Kokeiden jälkeen ajettiin PEG-puhdistus tutkien miten kalibraatiot toimivat oikeissa oloissa. Mitään silminnähtävää ja merkittävää ei ilmennyt pipetointien aikana. Uusilla levyillä suoritettiin myös PEG- kokoerottelu käyttäen PEG 7.5 prosentista ja 8.5 prosentista PEG:tä. Tällä pitäisi saada talteen kaikki fragmentit, joiden kokoluokka on 300-600 bp. Huomattiin, että CA-helmiä tuli mukaan lopputuotteeseen. Haluttiin, tutkia tuleeko CA-helmiä mukaan myös prosessin alussa ja ovatko ne vielä mukana loppuvaiheessa. Mikäli CA-helmet kulkevat koko prosessin läpi, PEG- kokoerottelu ei toimi halutulla tavalla mikä johtaa jatkotutkimuksiin syyn selvittämiseen. Epäilynä on liian kova pipetointinopeus tai että kärjet ovat liian lähellä reunaa. Varmentuakseen CA-helmien kulkevuudesta koe erä ajettiin Fragment Analyzerin läpi. Huomattiin että näytteen pitoisuus on heikkoa ja laatu suttuista mutta toteuttaa koko halutun erottelu prosessin. CA-helmet olivat peräisin toisen vaiheen levystä eluution mukana tulleita helmiä



Kuva 25. Kuva Fragment Analyzer ajosta. Kuvassa näkyvät piikit ovat oikeilla paikoillaan viitaten onnistuneeseen kokoerotteluun vaikka kuva onkin hyvin rosainen. CA-helmet ovat mitä ilmeisemmin olleet toisen vaiheen levystä peräisin ja tulleet vahingossa mukaan.

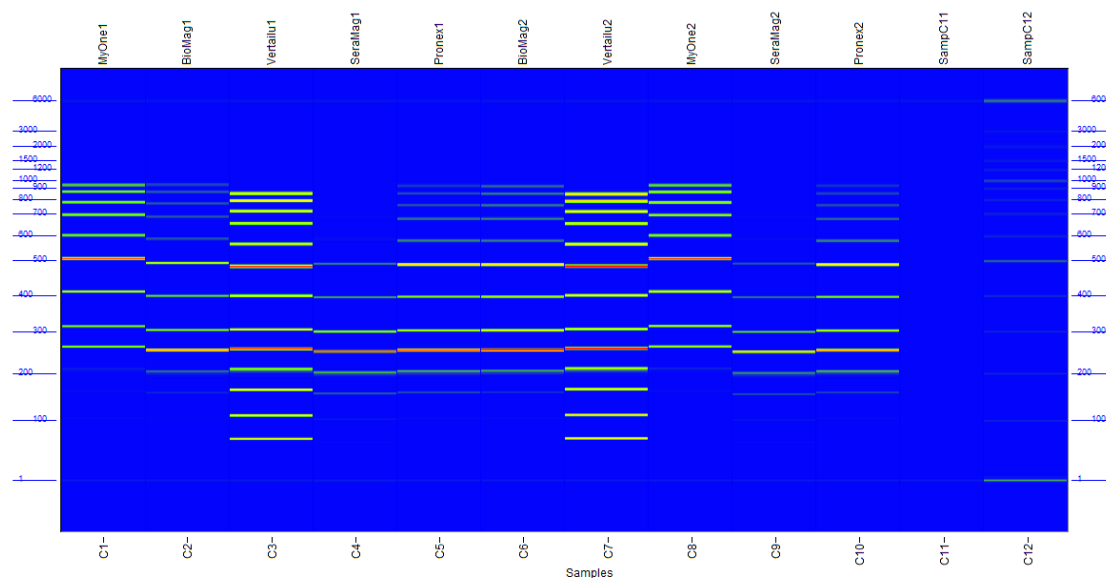


### 4.10.3 Johtopäätös

Levyoptimointi suoritettiin onnistuneesti. Levyjä pystytään käyttämään kyseisessä protokollassa ilman mitään ongelmia. Saanto on heikkoa, syy tähän ei johdu levyistä vaan riittämättömästä optimoinnista.

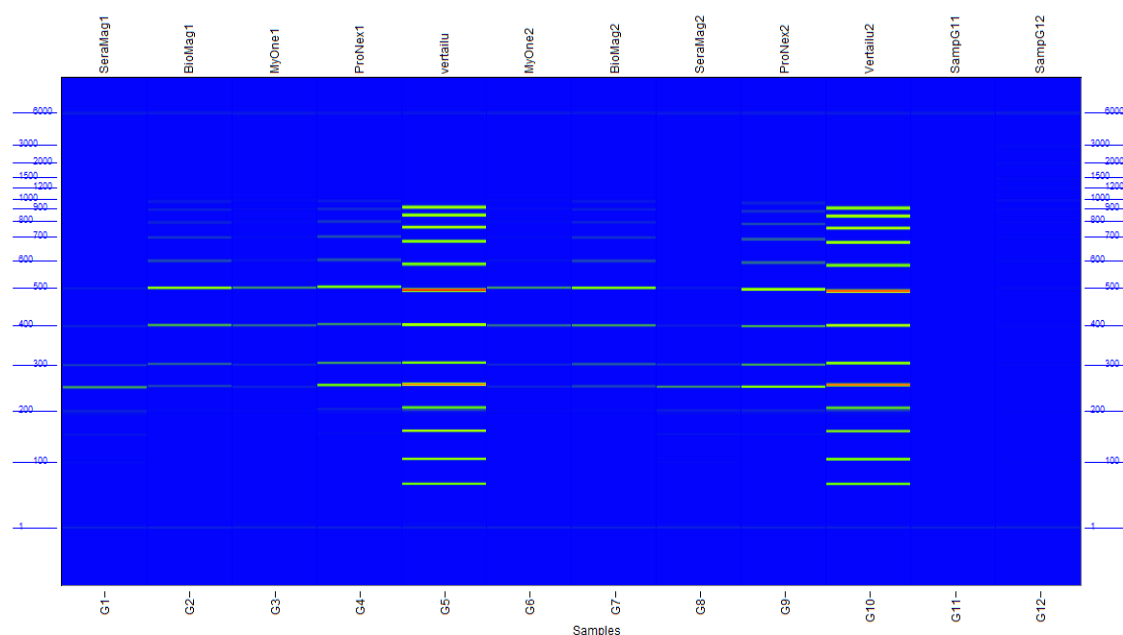
### 4.11 CA-Helmien testaus PEG- kokoerottelu

Helmillä suoritettiin PEG- kokoerottelu liitteen 2 mukaisesti käyttäen GeneRuler 1kb:n ladderia 50bp. Haluttiin saada talteen kaikki fragmentit välillä 300-500bp. Kokeilussa käytettiin PEG-konsentraatiota 7,5 % ja 8,5 %. PEG- kokoerottelu käsittelyn jälkeen näytteet ajettiin Fragment Analyzer:llä. Huomattiin, että testissä olleet CA-helmet jättivät 150bp:n fragmentteja. 150bp on vaara-alue, sillä se on sen verran pitkä, että se aiheuttaa lukuvirheitä dimeerisyyden takia. CA-helmet muutenkin antoivat mielenkiintoisia tuloksia. SeraMag vaikuttaa olevan kaikkein spesifisin. SeraMag CA -helmet eivät tuottaneet pitkistä fragmenteista johtuvia viivoja tosin kuin muut CA-helmet



Kuva 26. Kuvassa näkyy Fragment Analyzerin antama geelijaokuva. Näytteet vasemmalta oikealle: MyOne, BioMag, Vertailu, SeraMag, ProNex, BioMag, vertailu, MyOne, SeraMag, ProNex, ja ladderi ihan oikealla. Kaikki testattavat CA-helmet jättivät 150bp:n viivan, kun PEG-prosenttisuus oli 7.5-8.5-prosenttia. Kuvassa voi nähdä, että SeraMag CA -helmet eivät tuota ylimääräisiä viivoja alueilla jotka haluttiin pois.

Seuraavaksi sama kokeilu tehtiin uudelleen käyttäen PEG-prosenttisuus 7,5%-8%. Suurin osa testattavista näytteistä sisälsi 200 bp:stä 600+ bp:tä. PEG-prosenttisuuden muutos teki sen, mitä toivottiin. CA-helmien spesifisyys parani jonkin verran. Harmillisesti SeraMag CA -helmet kuitenkin jättivät 150 bp:n viivan mutta määrältään huomattavasti vähemmän kuin edellisessä kokeilussa. Kokeilu osoitti, että CA-helmet eivät käyttäydy samalla tavalla keskenään spesifisyydellään tai kyvyllä sitoa fragmenttejä. ProNex CA -helmet käyttäytyvät lähes samalla tavalla kuin MyOne-helmet mutta CA-helmien käyttö määrä on riippuvainen fragmentin koosta, mikä johtaa kustannusten nousuun per, näytteelle fragmentti ole kokoluokaltaan pieni.

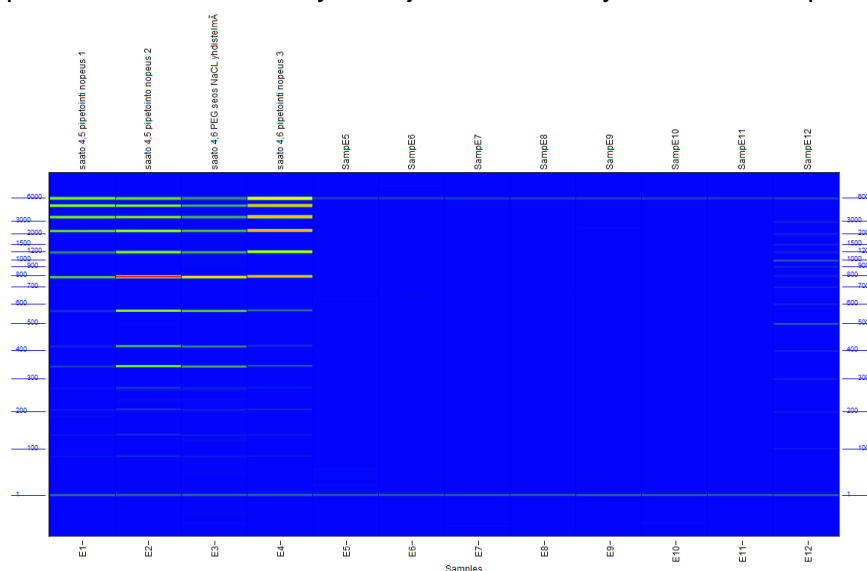


Kuva 27. Kuvassa kokeilu käyttäen 7,5-8% PEG-prosenttisuuksia. MyOne näytteet kaivoissa 3 ja 6, BioMag kaivoissa 2 ja 7, SeraMag kaivoissa 1 ja 8, ProNex kaivoissa 4 ja 9 sekä vertailunäyte kaivoissa 5 ja 10. Kuvassa voi huomata merkittäviä parannuksia spesifisyydessä edelliseen ajoon verrattuna.

#### 4.12 Protokollan suoritus koneella

CA-helmien testailua jatkettiin koneellisesti. Ensimmäinen koneella ajettu ajo antoi nol-latulosta, yhtään haluttua bp:tä ei jäänyt CA-helmiin. Havaittiin että CA-helmet kiinnittyivät ikävästi levyn reunoihin magneettikäsittelyn jälkeen erityisesti PEG lisäyksen jälkeen. On mahdollista, että PEG saa CA-helmet käyttäytymään eri tavalla mitä alun perin oli ajateltu ja kokeiltu. Ohjelmaa optimoitiin ja uudelleen tarkastettiin mahdollisten virheko-mentojen varalta. CA-helmiä kokeiltiin irrottaa lisäämällä sekoitustehoa siten, että neste

puhalletaan kärjistä kovemmalla paineella ulos seiniä pitkin. Paineen muutos paransi CA-helmien sekoittumista prosessin aikana sekä paransi fragmenttien sitoutumiskykyä CA-helmiin. Varmistaakseen että laatu parani, suoritettu koeajon lopputuote ajettiin Fragment Analyzerin läpi. Koeajojen aikana tuli havaittua ohjelmistossa virhe. Kone ei suorita haluttua paussia oikein mikä johtaa siihen, että CA-helmet eivät ehdi mennä magneeteille ajoissa ennen kuin kone aloittaa suorittamaan seuraavaa käskyä. Asiaa tutkittiin perinpohjaisesti. Käytetty käskypari toteuttaa paussin joissain halutuissa kohdissa muttei kaikissa. Mitä ilmeisemmin käskysarjassa on ristiriitakäsky tai kone ei ymmärrä, mitä paussilla tarkoitetaan. Voi olla, että levysiirtokäskyjen poisto on saanut käskypuun rakenteen muuttumaan halutusta lineaarisesta puusta modulaariseksi. Kone ilmoittaa aloittavansa paussin kesken pipetoinnin eikä suorita paussia halutussa kohdassa. Ongelmakohta löytyi ja korjattiin määrittämällä paussi uudelleen käyttäen PAUSE DEFINE POD1-käskyä. Tällä käskyllä pakotetaan paussi pipetointipäälle halutulla ajalla halutussa kohdassa. Pakotettu paussi ei vaikuttanut käskypuun rakenteeseen mutta saa käskyt käyttäytymään lineaarisesti. Ajo suoritettiin uudelleen käyttäen SeraMag CA -helmiä varmentuakseen että, ohjelma toimii. Toimivuuden määrityksen jälkeen koe toistettiin uudelleen käyttäen kaikkia tutkittavia CA-helmiä. Toisena haittaavana tekijänä huomattiin olevan PEG:n käytös liuoksena. PEG-liuos muuttuu erittäin viskoosiksi minkä vuoksi kaikkea näytettä ei saada talteen tai PEG:tä tulee pipetoitua epätasaisesti näytteeseen. Ongelma korjattiin-säätämällä pipetointinopeutta 1 µl:aan/s ja lisätään 50 ms pysähdys ennen full blowoutia (kärkien totaalinen tyhjennys). Tällä tavalla saadaan tasaisesti pipetoitua PEG-liuosta näytteille ja PEG-käsiteltyä liuosta eteenpäin.

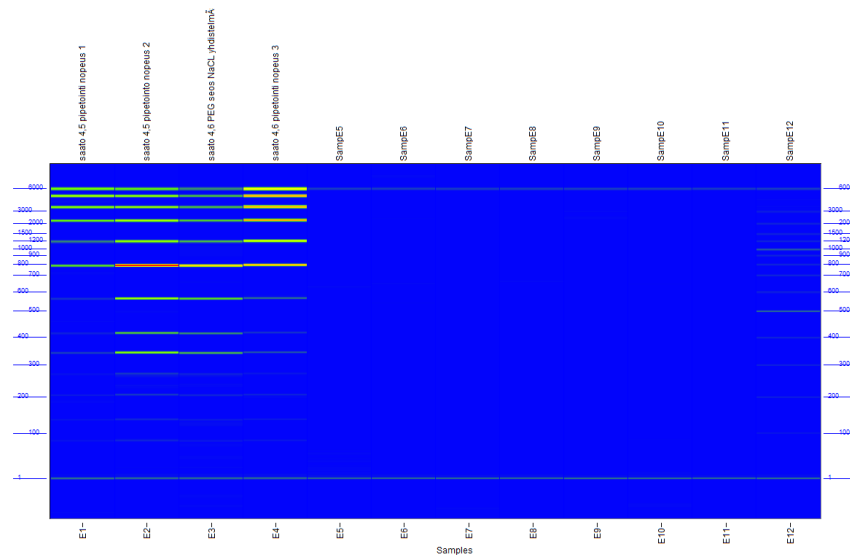


Kuva 28. Kuvassa Fragment Analyzer -geelijaio. Näytteissä käytetty erilaisia pipetointinopeuksia, parhaimman tuloksen sai toinen ja kolmas kokeilu vasemmasta katsottuna. CA-helmiin sitoutui 200bp ja yli 1000 bp:n fragmentit. Käytetyssä näytteessä kyseistä kokoa ei ole.

Yli 1000 bp:n fragmentit ovat kontaminaatioita joko ilmasta tai jostain muualta. Syytä tähän ei tiedetä.

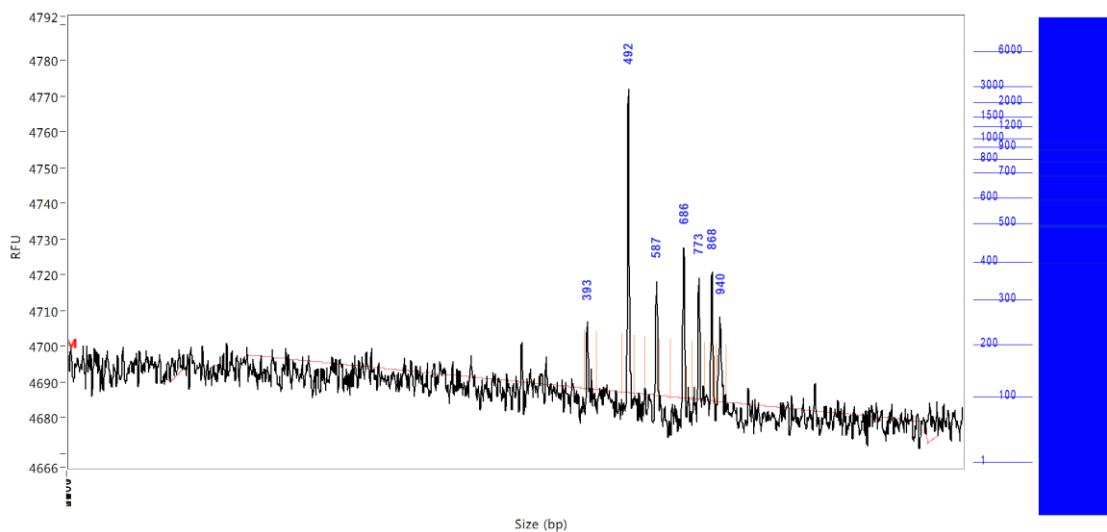
#### 4.13 IF THEN komento

Huomattiin myös, että lukuisten paussien ja levyjen manuaalinen siirtäminen sai koneen käyttäytymään oudolla tavalla, kun haluttiin ajaa vain yksi levy. Kone kuvitteli, että kärkilaatikoita oli kaksi yhden sijaan ja pyrki jatkuvasti vaihtamaan kärkijä. Ongelma pystyttiin korjaamaan IF-komentoa käyttämällä. IF numlpates=1 komennolla protokollaa ajetaan kopiolla, jossa käytetään vain ja ainoastaan yhtä kärkilaatikkoo ja yhtä näyte kolumnia. Kun näytelevyjä on enemmän kuin yksi, niin silloin tulee voimaan THEN-komento. THEN-komento ajaa protokollaa käyttäen kahden kärkilaatikon ohjelmaa ja näytekolumnia. Huomattiin myös, että tällä komentosarjalla NX<sup>P</sup> toteutti komentoja nopeammin. Voi olla, että protokolla oli liian monimutkainen koneelle ja IF THEN-komento selkeytti joitain komentoketjuja. Haittana tässä on se, että muutokset pitää kopioida IF ja THEN puiden alle muutoin jompikumpi komentopuu omaa muutoksen. Havainnointiin myös, että alkoholipuhdistuksen aikana CA-helmet jäävät hyvin korkealle, jolloin suurin osa näytettä omaavat CA-helmet ei eluoidu 25 µl:n tris-puskuriin. Ratkaisu kyseiseen ongelmaan on pipetointi nopeus. Pipetoimalla alkoholi käsitellyt CA-helmet magneetti levyille hitaammin mahdollistaa CA-helmien kerääntymisen paljon alemmaksi kaivon reunoille kuitenkin noudattaen luvun 4.8:n havaintoa.



Kuva 29. Kuvassa Fragment Analyzer -geelijaio. Näytteissä käytetty erilaisia pipetointinopeuksia, parhaimman tuloksen sai toinen vasemmalla oleva kokeilu. Saanto parani merkittävästi. Koe suoritettiin ennen PEG-pipetointioptimointia.

Pipetointi nopeutta säätämällä pitäisi parantaa saantoa. Menetelmää kokeiltiin käsin ja huomattiin merkittäviä eroja CA-helmien kerääntymisissä. Hitaammalla pipetointinopeudella CA-helmet kerääntyvät keskimäärin aina 25 µl:n kohdalle, kun taas eri nopeuksilla eri kohtiin. Nesteen määrällä ei ollut merkitystä hitaalla pipetoinnilla. Nopealla ”roiskaisulla” CA-helmet asettuivat epätasaisesti eri korkeuksiin. Menetelmää kokeiltiin koneellisesti todistaakseen idean toimivuutta konkreettisesti. Toivottiin, että tällä saadaan näyttesaanto parantumaan. Ajo ajettiin Fragment Analyzerin läpi varmentuakseen saannon ja laadun parantumisesta. Harmillisesti ajotulos oli edelleen hyvin heikkoa.



Kuva 30. Kuva Fragment Analyzer ajon jälkeen. Oikeanpuoleisessa geelissä yhtäkään viivaa ei ole nähtävissä mikä kertoo erittäin kehnosta saannosta. Jotain näytteestä jäi jäljelle mutta ei merkittävää määrää.

#### 4.14 Näytteen katoaminen prosessissa

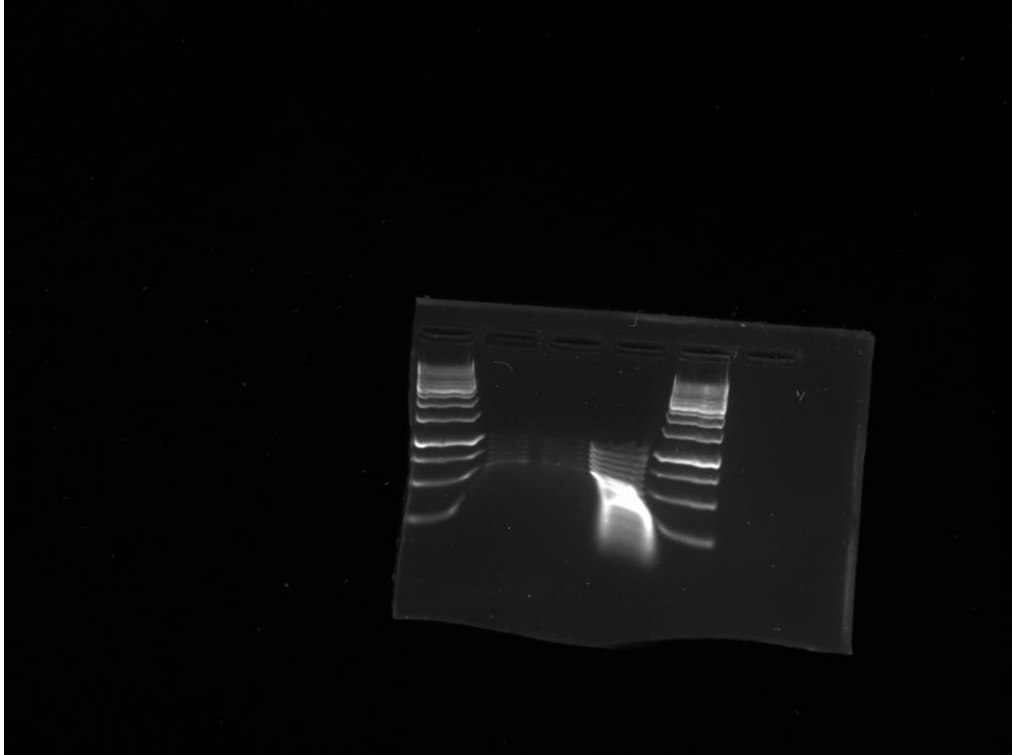
Suurta ihmetystä ohjelmassa aiheutti näytteen katoaminen prosessin aikana sekä erittäin kehnosta spesifisyydestä. Ohjelman hienosäätöjen ja pipetointikorkeuksien että, sekoituksen paineen optimointien jälkeenkin lopputuotetta on jäljellä 0,5 nanogrammaa per mikrolitra. Näytehävikkiä tulee paljon jostain syystä. Spesifisyyttä saatiin parannettua mekaanisella hienosäädöllä, muttei saantoa niinkään merkittävästi. Käsin tehtynä prosessista jää jäljelle keskimäärin noin 5,2 nanogrammaa per mikrolitra. Tutkimalla CA hel-

mien käytöstä ja hävikkiä prosessin aikana antoi mahdollisia vihjeitä näytteen katoamiseen. Jätteen joutuvia CA-helmiä otettiin talteen ja tutkittiin niissä olevaa DNA:n määrää ja fragmentti kokoa käyttämällä Qbit DNA-mittauslaitteistoa. Keskimääräisesti saatiin DNA:n määräksi 2,1 nanogrammaa per mikrolitra. Supernatantissa oli keskimäärin 7,5 nanogrammaa per mikrolitra. Koko käsittelyssä CA-helmiin jää 5,3 nanogrammaa DNA:ta ja supernatanttiin noin 5,2 nanogrammaa. Kunnollista vertailukohdetta havaintoon ei ollut. Epäiltiin että, alkoholilla olisi merkittävä vaikutus näytteen katoamiseen. Viitteitä tästä antoi, kun tutkittiin supernatantteja ennen ja jälkeen alkoholikäsitelyä. Huomattiin että ennen alkoholikäsitelyä supernatantissa oli keskimäärin 6,4 nanogrammaa DNA:ta ja käsittelyn jälkeen 0,5 nanogrammaa. Voi olla, että 80-prosenttinen alkoholi on liian vahvaa koneellisessa prosessissa mutta sopiva käsin tehtäessä. Vertailutuloksia tähän ei ole saatavilla. Prosessi toistettiin käyttämällä 70-prosenttista alkoholia. Saantoa saatiin parannettua säädöllä 3,7-2,8 nanogrammaan per mikrolitra. Tämä tulos ei poikkea huomattavasti käsin saadusta mutta on selkeästi heikompi.

Seuraavaksi kokeiltiin, oliko kyseessä sattuma, että laatu parani. Ajon aikana huomattiin pipetointilaadun yhtäkkinen merkittävä laadun huonontuminen. Pipetointialustan parametrejä oli jostain syystä muutettu siten, että kärkien tukeutumia ilmentyisi CA-helmien pipetointien yhteydessä. Parametrejä oli siirretty 0,25 cm X-akselilla ja 0,1 cm Y-akselilla. Uudelleen kalibrointi jouduttiin suorittamaan ja tähän kului harmillisesti päivä. Syy kyseiseen parametrimuutokseen ei koskaan selvinnyt. Koesarja jouduttiin ajamaa uudelleen. Spesifisyys näytti pysyvän kohtuullisen hyvin paikallaan saadusta mahdollisesta parannuksesta. Fragment Analyzerillä varmistettiin, että fragmenttikoot ovat halutun laisia. Harmillisesti näytteitä ei tullut esille Fragment Analyzer ajon jälkeen. Voi olla, että PEG:tä jää kärkiin minkä vuoksi näytteet eivät tule esille Fragment Analyzer-ajon jälkeen. Välttääkseen PEG:n kulkeutumista lopputuotteeseen kokeiltiin suorittaa ajo siten, että kärjet vaihdetaan puhtaisiin kärkiin ennen eluutiota Tris-puskuriin. Toinen vaihtoehto on tehostaa pesua, jos tällä saadaan PEG poistettua kärjistä ja tehostettua näytteiden saantia, niin ei ole tarvetta vaihtaa kärkiä. Harmillisesti kumpikaan vaihtoehto ei tuottanut haluttua lopputulosta, ei edes vaihtoehtojen yhdistelmä.

Tutkiessa ohjelman parametreja ja prompt parameters maksimi ja minimi pipetoinnin sallittuja heittoja huomattiin, että näihin arvoihin oli tehty muutoksia. Maksimi PEG-reagenssin pipetointiheitoksi oli laitettu 8 µl. Syytä tähän muutokseen ei myöskään koskaan selvinnyt. Prompt parameters ja levyasetusten arvojen yhtäkkinen muutos herätti kysymyksiä ja lisäsi tarkkaavaisuutta. Näytteen katoamisen syynä voi olla PEG, joka ei huuhtoudu

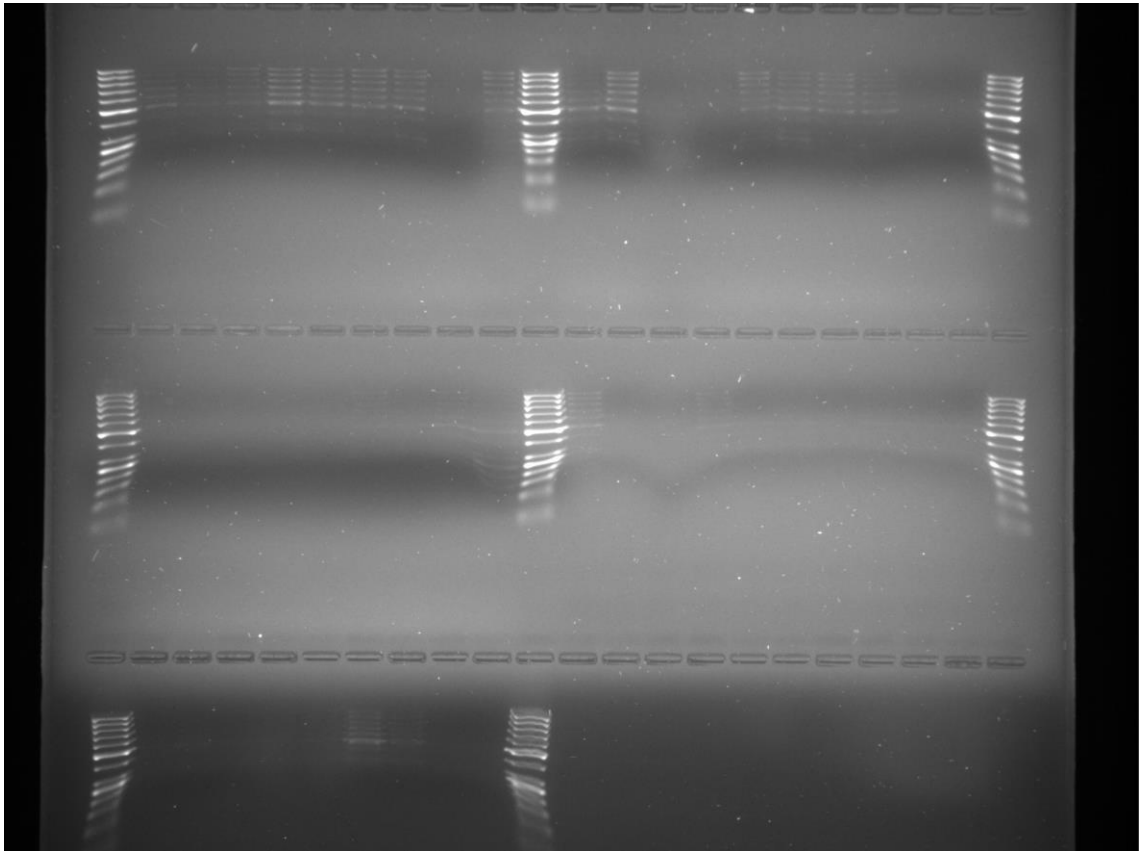
pois alkoholikäsitelyssä. PEG häiritsee Fragment Analyzerin mittauslaitteistoa tukkimalla kapillaareja. Näytteet ajettiin agarosii geelissä tarkistaakseen, että prosessi toimii ylipäätään. Ensimmäinen geelijaio antoi lupaavia tuloksia. Halutun kokoluokan bandejä tuli geelissä esiin, vaikka hyvin himmeinä.



Kuva 31. Kuva ensimmäisestä agarosii ajosta. Kokeessa käytettiin 2  $\mu$ l:n ajonäytettä ja 3  $\mu$ l:n Tris-puskuria ja 1  $\mu$ l 6x loading dye (Biorad). Bandien kokoluokka on noin 300:sta 1000 bp:hen. Tulos kertoo onnistuneesta size selectiosta. Harmillisesti jotkin viivat ovat menneet vinoon. Selitys tähän on laitteen heilahtaminen ajon aikana. Joku on vahingossa tönäissyt laitetta kesken ajon.

Samainen koe suoritettiin uudelleen ajaen kaikki +40 ajo näytettä geelissä, joita oli saatu aikaiseksi. Tavoitteena on nähdä, missä vaiheessa parannusta tapahtuisi vai tapahtuisiko ollenkaan. Syytä Fragment analyzerin huonoon toimivuuteen ei löydetty. On mahdollista, että koneellisen PEG- kokoerottelu näytteitä ei voi ajaa Fragment Analyzerissä.

ennen kuin näyte on poolattu. Varmentuakseen tästä vaihtoehdosta Magnatrixillä suoritetaan size selectio ja ajetaan Fragment Analyzerissä.



Kuva 32. Kuvassa agarosigeeli jossa ajettiin kaikki 48 ajonäytettä, jotka saatiin aikaiseksi. Kaikkia ajo näytteitä ei pystytty ajamaan, sillä jotkin näytteet kuluivat loppuun ennen kyseistä ajoa. Geeli on 2-prosenttista agarosigeeliä, ladderinä käytettiin thermofisher generuler 50bp ladderia 1  $\mu$ l. Näytteet ajettiin 110 minuuttia 100 V 400 mA:ssa

#### 4.15 Kokoerottelu 600-900bp koneellisesti

600-900bp:n kokoluokkaa käytetään MySeq-laitteistossa, jossa analysoidaan pitkiä fragmentteja esim. perinnöllisten tautien tutkimuksessa. Halutaan selvittää, kykeneekö kone kuinka tarkasti toteuttamaan haluttu ehto. PEG-prosenttisuus laskettiin ja asetettiin ehdoksi ajolle. Ajon jälkeen varmennettiin ajon onnistuneisuus käyttämällä ajo Fragment Analyzeri:ssä. Tutkimusta ei suoritettu ajan puutteen vuoksi.



#### 4.16 Koe oikealla näytteellä

Haluttiin kokeilla, miten ohjelma toimii oikealla näytteellä. Oikealla näytteellä fragmentti-profiili on huomattavasti erilainen. Fragmentti profiili muistuttaa normaali jakauman kumpua. Tällä voidaan testata paremmin PEG-konsentraation pysyvyyttä ja käytöstä. Tulokset verrataan käsin tehtyyn ajoon. Tavoitteena on saada parempaa saantoa, spesifisyyttä ja toistettavuutta. Näytä preparoitiin sonikaattorilla. Sonikaattori hajottaa DNA:n pieniksi erikokoisiksi fragmenteiksi käyttäen ultraääntä hyödykseen. Mitä pidempää DNA:ta käytetään Sonikaattorissa, sitä pienempää fragmenttia saadaan. Fragmentteista otetaan kokonaisprofiili ajamalla sonikoitunut DNA-näyte Fragment Analyzerissä, jonka jälkeen suoritetaan PEG- kokoerotus koneellisesti. Lopputuloksena pitäisi saada 300-600 bp:n kokoisia fragmentteja talteen. Varmentuakseen kokeen onnistumisesta lopputuote ajetaan Fragment Analyzeri:lla. Tutkimusta ei suoritettu ajanpuutteen vuoksi.

## 5 Tulosten käsittely

### 5.1 Ohjelmoinnin onnistuneisuus

Ohjelma toimii halutulla tavalla ja on hyvin muokattavissa. Ohjelma toteuttaa melkein kaikkia haluttuja vaatimuksia, joita laboratorio insinööri Lars Paulin oli asettanut. Ohjelma on suhteellisen helppokäyttöinen mutta sillä on joitain kompastuskiviä, ellei käyttäjä ole perehtynyt ohjelmistoon tai ole tarkkaavainen. Toisen vaiheen levy aiheuttaa suuren osa kömmähdyksistä, sillä reagenssit ovat samoilla paikoilla kuin ensimmäisen levyn kanssa ja samankaltaisilla nimillä PEG1, PEG2 ja NaCl1 NaCl2 1 viittaa ensimmäiseen levyyn ja 2 toiseen levyyn. Levyjen asettelu koneelle on suhteellisen helppoa ja käyttäjäystävällistä. Ohjelmaa voi vielä optimoida, jos päätetään käyttää toisen kaltaista levyä. Uudelleen optimointi on helppoa. Tarvitsee vain vaihtaa kuopan syvyyttä tai vastaavaa dimensiota valmiiseen pohjaan. Ohjelmassa olevat user pauset (Käyttäjäturvallisuutta lisäävä informoiva paussi) jotka kertovat seuraavasta vaiheesta sekä opastavat kuvat mahdollistavat, sen että perehtymätön henkilö pystyy käyttämään ohjelmaa ilman manuaalia. Tämä tosin edellyttää tarkkaavaisuutta, kuten edellä mainittiinkin. Ensimmäisen ja toisen levyn reagenssit ovat samoilla paikoilla ja käyttäjää pyydetään vaihtamaan ne. Jos tätä ei huomaa toisesta levystä tulee ensimmäisen levyn kaltainen. Tässä tapauksessa ohjelma kannattaa lopettaa ja aloittaa alusta toisen levyn valmistuskohdasta.

Kaiken kaikkiaan ohjelma on käyttövalmis ja onnistunut. Ohjelmaa voi edelleen optimoida ja hienosäätää mutta ajan puutteen vuoksi näin ei tehdä vaan keskitytään siihen, että ohjelma tuottaa tulosta.

## 5.2 Viimeinen versio ohjelmasta

Kokeellisten ajojen ja optimointien jälkeen tuli kirjoitettua lopullinen versio ohjelmasta (liite 3) ja protokollaan liittyvä ohje (liite 4). Ohjeessa käsitellään, miten protokollaa tulisi käyttää ja miten toimia ongelmatilanteessa.

## 5.3 CA-helmien tulokset

CA-helmistä BioMag ja SeraMag toimivat parhaiten. ProNex-helmet ovat liian tilanneriippuvaisia sekä myös kalliimpi vaihtoehto, sillä CA-helmien kulutus kasvaa fragmenttikoon ollessa enemmän kuin 600bp. Toiset CA-helmet toimivat samalla tavalla riippumatta siitä, mikä kokoinen fragmentin koko on. SeraMag on yhteen sopivampi Beckman NX<sup>P</sup>:n kanssa, sillä CA-helmet ajautuvat magneetille yhtä nopeasti kuin MyOne CA -helmet. BioMag CA -helmet ovat sopivimpia käsityöhön tai yksittäisen levyn ajoon. Toisen vaiheen levyä ei voi preparoida, jos BioMag CA -helmiä käytetään, sillä CA-helmien siirtyminen magneetille kestää liian kauan. Tämä vaihe pitäisi pystyä suorittamaan kuuden minuutin inkubaation aikana. Tiedetään, että se ei onnistu, ellei ohjelmaa optimoida uudelleen ja kokeilla sen toimivuutta.

SeraMag on kaikkein spesifisin verrattuna BioMagiin ja MyOneen ja ProNexiin. Ihan suoranaisesti PEG- kokoerottelu protokollaa ei voida käyttää uusilla CA-helmillä. SeraMag antaa 150 bp:n viivoja agaroosijossa. Muut CA-helmet eivät tee tätä. Tämä viittaa siihen, että PEG-prosenttisuus ei ole aivan optimi näille CA-helmille. Pienen PEG-prosenttisuuden muutoksella saatiin pudotettua 150 bp:n määrää lähes puolella. Rahallisesti ja laadultaan SeraMag on käyttäjäystävällisempi ja monikäyttöinen. BioMag ja ProNex ovat käyttökelpoisempia vain ja ainoastaan tarkoin määritettyihin käyttötarkoituksiin.

BioMag kykenee sitomaan suurempia määriä haluttua fragmenttia, minkä vuoksi fragmentti hävikki on pienempää. CA-helmien hidastuokkuuteen voi mukautua erilaisilla järjestelyillä. Spesifisyys on aika heikkoa mikä johtaa siihen että 300-500 bp:n asetuksilla tulee mukaan melkein kaikki 300-800 bp:n fragmentit.

ProNex CA -helmet toimivat melkein yhtä hyvin kuin SeraMag tai MyOne CA -Helmet. ProNex CA -helmien erityispiirre tekee niistä kehnot varsinkin, kun halutaan tutkia erikoisia fragmentteja, sillä CA-helmien määrää tulee lisätä tai vähentää riippuen kokoluokasta. Tämän kaltainen säätely lisää kustannuksia, sillä muut CA-helmet toimivat yhtä hyvin riippumatta fragmentin kokoluokasta.

#### 5.4 Johtopäätökset

SeraMag CA -helmet toimivat halutulla tavalla ja toimivat mahdollisimman optimaalisesti kaikkiin muihin verrattuna oleviin CA-helmiin. SeraMag CA -Helmet ovat hyvin spesifisiä, käyttäytyvät MyOne CA -helmien tavoin ja ovat halvempia kuin MyOne CA -helmet.

BioMag CA -helmiä ei oikein voi käyttää automaatiassa, sillä se kasvattaisi magneetti vaikutus pysähdyksien aikaa radikaalisesti johtaen joko lyhyeen tai pidempään inkubaatioaikaan, joka ohjeen mukaisesti on 6 minuuttia. Lyhyellä inkubaatiolla menetetään ilmeisesti haluttua tuotetta ja liian pitkällä inkubaatiolla mukaan tulee lyhyitä fragmentteja. Tätä ilmiötä ei ehditty tutkia kovinkaan perusteellisesti mutta tähän viittaavaa oli havaittavissa joissain optimointi ajojen tuloksissa. SeraMag CA -helmet sekä MyOne CA -helmet ovat yhteen sopivia PEG-puhdistusprotokollan kanssa.

PEG-puhdistusprotokolla antaa luotettavaa tulosta ja on käyttökelpoinen edelle hyväksytyillä CA -helmillä. Protokolla otettiin käyttöön ja jatketaan tutkimusta, miksi ajonäytteet eivät näy Fragment Analyzerillä mutta agarosigeelillä.

## Lähteet

- 1 W.C. Nierman, T.V. Feldblyum, in Encyclopedia of Genetics, 2001. Genomic Library. Verkko aineisto. Sciencedirect. <<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/genomic-library>>. Luettu 14.2.2018
- 2 Library (biology). Verkko aineisto. Wikipedia <[https://en.wikipedia.org/wiki/Library\\_\(biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Library_(biology))>. Luettu 26.1.2018 päivitetty 6.1.2018 kello 23:39
- 3 Increased Throughput by Parallelization of Library Preparation for Massive Sequencing. Verkko aineisto. PLOS|ONE <<http://journals.plos.org/plosone/article/figures?id=10.1371/journal.pone.0010029>>. Kuva on otettu/ luettu 20.1.2018
- 4 Large Scale Library Generation for High Throughput Sequencing. Verkko aineisto. PLOS|ONE <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0019119>>. Luettu 23.1.2018
- 5 DNA library preparation. Verkko aineisto. FIMM. [https://www.fimm.fi/sites/default/files/NGS\\_PE\\_dual\\_idx\\_library.jpg](https://www.fimm.fi/sites/default/files/NGS_PE_dual_idx_library.jpg)  
luettu 26.2.2018 päivitetty 25.04.2014 - 15:37
- 6 Increased Throughput by Parallelization of Library Preparation for Massive Sequencing. Verkko aineisto. PLOS|ONE <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010029>>. Luettu 23.1.2018
- 7 Genomic Library Construction Service. Verkko aineisto. Creative biogene Biotechnology. <<https://www.creative-biogene.com/Services/Genomic-Library-Construction-Service>>. luettu 28.2.2018
- 8 Difference between Genomic and cDNA Library. Verkko aineisto. Differencebtw <<https://www.differencebtw.com/difference-between-genomic-and-cdna-library/>> Luettu 28.4.2018
- 9 Genomic DNA and cDNA Libraries. Verkko aineisto. Thermofisher <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-applications/library-construction.html>>. Luettu 15.2.2018
- 10 Nadin Rohland and David Reich. Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. Verkko aineisto. Genome Research <<https://genome.cshlp.org/content/22/5/939.full#ref-8>>. Luettu 28.2.2018
- 11 laboratorio insinööri Lars Pauliin (keskustelut 15.1.–20.4.2018)

- 12 Genomic Library Construction Service. Verkko aineisto. Creative biogene Biotechnology <<https://www.creative-biogene.com/Services/Genomic-Library-Construction-Service>>. Luettu 10.3.2018
- 13 <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/biomolecules/dna-technology/v/dna-libraries-generating-cdna>

**PEG-puhdistus 2.0**

2.3.2012, Harri

Aloita selvittämällä tarvittava PEG % sitomisvaiheessa. Suurempi PEG konsentraatio mahdollistaa pienempien tuotteiden sitomisen. Karkeasti: 7 % PEG sitoo yli 1000 bp tuotteet. 9 % yli 300-400 pituiset. Luvut karkeita esimerkkejä. Tarkista ennen aloitusta.

P:\PEG\ -kansioista löytyy PEG-puhdistusreseptit -tiedosto. Syötä tarvitsemasi PEG % kenttään ja ota ylös lisättävän 5 M NaCl, MQ:n ja PEG-stokin määrät.

1. Ota puhtaaseen eppariin esim. 15 µl carboxy-beadeja. (15 µl sitoo 1 µg:n DNA:ta, älä käytä alle 10 µl ilman hyvää syytä)
2. Laita eppari magneetille ja **poista neste.**
3. Poista eppari magneetilta ja lisää **5 M NaCl ja MQ**
4. Suspensoi beadit kunnolla sekoittamalla pipetillä
5. Lisää näyte, sekoita
6. **Lisää PEG stock 1** (25 % PEG, 1,5 M NaCl). Pipetoi hitaasti, sillä PEG on paksua ja jää helposti pipetin kärkeen nopeasti pipetoimalla. Sekoita hyvin
7. Inkuboi **10 min**. Inkuboinnin aikana kannattaa sekoitella pipetillä, mutta ilmankin pärjää.
  
8. **Erottele** beadit magneetilla
9. **Poista suppi** (ota talteen jos aiot käyttää cutoffia lyhyemmät tuotteet! Tämä vaatii toisen capturen, PEG suppi ei toimi missään downstream käytössä)
  
10. Lisää 400 µl tuoretta **80 % EtOH**, sekoita niin että beadit suspensoituvat
11. **Poista EtOH** magneetin avulla
12. Toista pesu. Lisää EtOH ja poista magneetilla.
13. **Kuivaa** beadit 5min RT.
  
14. Eluointi: Lisää esim. 25 µl EB, 0,1x TE tai MQ. Suspensoi beadit hyvin ja inkuboi 3-5 minuuttia.
15. Erottele beadit magneetilla. Pipetoi neste uuteen eppariin.

**PEG-kokoerotelu 2.0**

29.6.2012, Harri

Aloita selvittämällä tarvittavat PEG-pitoisuudet sitomisvaiheessa. Suurempi PEG konsentraatio mahdollistaa lyhyempien fragmenttien sitomisen. Karkeasti: 7 % PEG sitoo yli 1000 bp tuotteet. 9 % yli 300-400 pituiset ja 11 % yli 150-200bp tuotteet. Luvut suuntaa antavia, tarkat arvot vaihtelevat erien välillä. Tarkista ennen aloitusta.

P:\PEG\ -kansioista löytyy kokoerotelureseptit.xlsx -tiedosto. Syötä tarvitsemasi PEG % kenttään ja ota ylös lisättävän 5 M NaCl, MQ:n ja PEG-stokin määrät.

1. Ota puhtaaseen eppariin esim. 15 µl carboxy-beadeja. (15 µl sitoo 1 µg:n DNA:ta, älä käytä alle 10 µl ilman hyvää syytä)
2. Laita eppari magneetille ja **poista neste.**
3. Poista eppari magneetilta ja lisää **5 M NaCl ja MQ.** Suspensoi beadit pipetillä sekoittaen.
4. Lisää näyte
5. **Lisää PEG stock 1** (25 % PEG, 1,5 M NaCl). Pipetoi hitaasti, sillä PEG on paksua ja jää helposti pipetin kärkeen nopeasti pipetoimalla. Sekoita hyvin
6. Inkuboi **6 min.** Älä ylitä tätä aikaa! Inkuboinnin aikana kannattaa sekoitella pipetillä, mutta ilmankin pärjää.

Valmistele sillä välin 2. vaiheen eppari:

- 1.1. Ota uuteen eppariin puhtaita beadeja ja poista puskuri magneetilla
- 1.2. Lisää 1 M NaCl ja suspensoi beadit siihen
- 1.3. Lisää stock2 (25 % PEG/1 M NaCl) tarvittava määrä ja sekoita
7. **Erottele beadit** vanhasta epparista magneetilla
8. **Siirrä suppi** 2. vaiheen uuteen eppariin ja sekoita pipetillä. Vanha eppari beadeineen roskeen. (näissä beadeissa on haluttua pidempi DNA. Jos haluat pitää pitkät tuotteet, tee putki 1:lle pesut step 11:sta alkaen )
9. Inkuboi **10 min**
10. Erottele beadit magneetilla ja heitä suppi pois
11. Lisää 400 µl tuoretta **80 % EtOH**, sekoita beadit
12. **Poista EtOH** magneetin avulla

13. **Kuivaa** beadit. 5min RT riittää.
14. **Eluointi**: Lisää esim. 25 µl **EB**, 0,1x TE tai MQ. Suspensoi beadit hyvin ja inkuboi 3-5 minuuttia.
15. Erottele beadit magneetilla. Pipetoi neste uuteen eppariin.



## Virallinen versio PEG puhdistus protokolla komentopuusta.

```

Star
Prompt for Global Variables
IF Number of families = 1 (levyjen määrä)
  Then
    Instrument Setup
    Alkupreparaatio
    Beadien ja näytteen laitto
    Loop n = 1
      Transfer =Bead yl from bead to sample
      Wash with water
      Pause (60s beadit reunoille)
    End Loop
    Loop n = 1
      Transfer = beadit yl from sample to waste
      Wash with water
    End Loop
    End Group
  Unload Tips
  User pause (tässä pyydetään käyttäjää siirtämään levyjä magneeteilta)
  Instrument Setup
  NaCl laitto
    Loop n = 1
      Transfer =NaCl yl from NaCl to sample
      Was with water
    End Loop
    End Group
  Add PEG1 to sample
    Loop n = 1
      Transfer =PEG yl from PEG1 to sample
      Wash in water
    End Loop
    End Group
  End Group
  Unload Tips
  User Pause (käyttäjää pyydetään laittamaan näytteet ensimmäisen levyn kaivoihin. Käyt-
  täjää pyydetään huomiomaan kuinka kauan toisen levyn valmistuksessa menee. Tällä halutaan
  välttää turhia venyneitä inkubaatioita.)
  Instrument Setup
  2nd stage plate preparation
  Setting bead on the plate
    Loop n = 1
      Transfer = beads yl from beads to 2nd stage plate
      Wash with water
      Pause (60s jotta CA helmet ehtisivät kaivojen reunoille)
    End loop
    Loop n = 1
      Transfer =bead yl from 2nd stage plate to waste
      Wash with water
    End Loop
    End Group
  Unload Tips
  User pause (tässä pyydetään käyttäjää siirtämään levy magneetilta)
  Instrument Setup
  Add NaCl to the plate
    Loop n = 1
      Transfer =NaCl2 yl from NaCl2 to 2nd stage plate
      Wash with water
    End Loop
    End Group
  Add PEG2 to the plate

```

```
        Loop n = 1
            Transfer =PEG2 yl from PEG2 to 2nd stage plate
            Wash with water
            End Loop
        End Group
    End Group
Unload tips
Notification pause
Instrument Setup
Alkoholi kasittely
    Loop n = 1
        Pause (60s)
        Transfer =Natant yl from sanple to 2nd stage plate
        Wash with water
        End loop
        Unload tips
        Incubation 10 min
        User pause (selitetään mitä seuraavaksi tapahtuu ja mitä pitää tehdä)
        Instrument Setup
        Loop n = 1
            Pause (60s)
            Transfer =Natant2 yl from sample to waste
            Wash with water
            End Loop
        Unload Tips
        User pause (pyydetään siirtämään levy pois magneetilta)
        Instrument Setup
        Loop n = 1
            Transfer =EtOH yl from EtOH to sample
            Wash with water
            End Loop
        Unload Tips
        User pause (pyydetään käyttäjää siirtämään levyt mageneeteille)
        Instrument Setup
        Pause (60s)
        Loop n = 1
            Transfer =EtOH yl from sample to waste
            Wash with water
            End Loop
        Pause (30s alkoholi haihdutus)
        End Group
    Unload Tips
    User Pause (pyydetään siirtämään levyt pois magneeteilta)
    Instrument Setup
    EB Kasittely
        Loop n = 1
            Transfer =EB yl from EB to Sample
            Wash with water
            End Loop
        Unload tips
        Pause (Incubation 3 min)
        User pause (pyydetään siirtämään levy magneetille)
        Instrument Setup
        Loop n = 1
            Pause (60s)
            Transfer =EB yl from Sample to Final plate
            Wash with water
            End Loop
        End Group
    End
Else (jos levyjä onkin enemmän kuin yksi)
    Instrument Setup
    Alkupreparaatio
        Beadien ja näytteen laitto
        Loop n = 1
            Transfer =Bead yl from bead to sample
```

```

        Wash with water
        Pause (60s beadit reunoille)
        End Loop
    Loop n = 1
        Transfer = beadit yl from sample to waste
        Wash with water
        End Loop
    End Group
Unload Tips
User pause (tässä pyydetään käyttäjää siirtämään levyjä magneeteilta)
Instrument Setup
NaCl laitto
    Loop n = 1
        Transfer =NaCl yl from NaCl to sample
        Was with water
        End Loop
    End Group
Add PEG1 to sample
    Loop n = 1
        Transfer =PEG yl from PEG1 to sample
        Wash in water
        End Loop
    End Group
End Group
Unload Tips
User Pause (käyttäjää pyydetään laittamaan näytteet ensimmäisen levyn kaivoihin. Käyt-
täjää pyydetään huomiomaan kuinka kauan toisen levyn valmistuksessa menee. Tällä halutaan
välttää turhia venyneitä inkubaatioita.)
Instrument Setup
2nd stage plate preparation
    Setting bead on the plate
        Loop n = 1
            Transfer = beads yl from beads to 2nd stage plate
            Wash with water
            Pause (60s jotta CA helmet ehtisivät kaivojen reunoille)
            End loop
        Loop n = 1
            Transfer =bead yl from 2nd stage plate to waste
            Wash with water
            End Loop
        End Group
    Unload Tips
    User pause (tässä pyydetään käyttäjää siirtämään levy magneetilta)
    Instrument Setup
    Add NaCl to the plate
        Loop n = 1
            Transfer =NaCl2 yl from NaCl2 to 2nd stage plate
            Wash with water
            End Loop
        End Group
    Add PEG2 to the plate
        Loop n = 1
            Transfer =PEG2 yl from PEG2 to 2nd stage plate
            Wash with water
            End Loop
        End Group
    End Group
Unload tips
Notification pause
Instrument Setup
Alkoholi kasittely
    Loop n = 1
        Pause (60s)
        Transfer =Natant yl from sanple to 2nd stage plate
        Wash with water
        End loop

```

```
Unload tips
Incubation 10 min
User pause (selitetään mitä seuraavaksi tapahtuu ja mitä pitää tehdä)
Instrument Setup
Loop n = 1
  Pause (60s)
  Transfer =Natant2 yl from sample to waste
  Wash with water
End Loop
Unload Tips
User pause (pyydetään siirtämään levy pois magneetilta)
Instrument Setup
Loop n = 1
  Transfer =EtOH yl from EtOH to sample
  Wash with water
End Loop
Unload Tips
User pause (pyydetään käyttäjää siirtämään levyt magneeteille)
Instrument Setup
Pause (60s)
Loop n = 1
  Transfer =EtOH yl from sample to waste
  Wash with water
  End Loop
  Pause (30s alkoholi haihdutus)
End Group
Unload Tips
User Pause (pyydetään siirtämään levyt pois magneeteilta)
Instrument Setup
EB Kasittely
  Loop n = 1
    Transfer =EB yl from EB to Sample
    Wash with water
  End Loop
Unload tips
Pause (Incubation 3 min)
User pause (pyydetään siirtämään levy magneetille)
Instrument Setup
Loop n = 1
  Pause (60s)
  Transfer =EB yl from Sample to Final plate
  Wash with water
  End Loop
End Group
End
  End
Finish
```

## PEG Työohje Biomek NX<sup>P</sup> PEG puhdistus protokolla.

### Tarvittavatvälineet

PEG stock 1, -stock 2, NaCl 5M, NaCl 1M, näytteet, EB, beadit ja 70 prosenttista EtOH, luettavaa sillä protokolla kestää noin 47 minuuttia eikä kykene siirtämään levyjä itse. Korvatulppia suositellaan käyttämään konehuoneen meluhaitan vuoksi.

#### 1 Levyjen asettelu ja poisto

Levyt ja reagenssialustat kannattaa laittaa siten että taaimmainen reagenssilevy laitetaan ensin ja sitten lähimmäinen. Levyjen tai reagenssialustojen poisto suoritetaan siten että aloitetaan lähimpänä olevista levyistä/ alustoista siirtyen taaimmaiseen. Tällä tavoin voidaan vähentää kontaminaation mahdollisuutta

**SUOSITELTAVAA OLISI KÄYTTÄÄ 90 µl EtOH ja 20 µl beadejä. EI SUOSITELLA KÄYTTÄMÄÄN ALLE 15 µl ELUUTIO LIUOSTA TAI BEEDEJÄ. KONE EI KYKENE ELUOIMAAN KUNNOLLA BEEDEJÄ REUNASTA TAI BEEDIT EIVÄT YLETY MAGNEETILLE, JOS NESTETTÄ ON LIIAN VÄHÄN.**

#### 2 Aloitus

Kone kysyy alussa miten paljon mitäkin reagenssia koneen pitää pipetoida. Jos tekee virheen tässä kohtaa ohjelman voi lopettaa, kun valitsee ABORT RUN, kun kone näyttää mihin mikäkin levy tulee instrument set up ikkunassa.

**KAHDEN LEVYN PIPETOINTI OHJELMA.** Aktivoidakseen kahden levyn pipetointi protokolla, käyttäjän kertoa koneelle, että käytössä on 2 levyä yhden sijaan. Kysymys esitetään reagenssi ikkunassa Number of plates. Jos Number of plates kohtaan on kirjoittanut 2 kone ajaa protokollan käyttäen kahden näyte levyn PEG-käsittelyprotokollaa. **HUOMIOI ETTÄ KAHDEN LEVYN PEG PROTOKOLLA VIE KAKSIN VERROIN REAGENSSEJÄ.**

Asettele levyt ja reagenssi alustat koneen kuvan mukaisella tavalla. Kaada reagenssit niille kuuluville alustoille. Alustoille kannattaa kirjoittaa mitä ne sisältävät ennen kuin kaataa reagenssit. Näyte levyihin kannattaa kirjoittaa esim. 1st ja 2nd jotta ei mene sekaisin, kun supernatantti otetaan talteen ohjelman puolivälissä.

Kone kertoo mitä, milloinkin pitää tehdä sanoin ja kuvin. Tarkkaavaisuutta ja huolellisuutta suositellaan ensimmäisen ja toisen levyn esivalmistelujenaikana. Tässä vaiheessa voi helposti tehdä kömmähdyksen. Mikäli kömmähdys tapahtuu lopeta ajo heti kun on mahdollista ja lisää käsin puuttuva reagenssi.

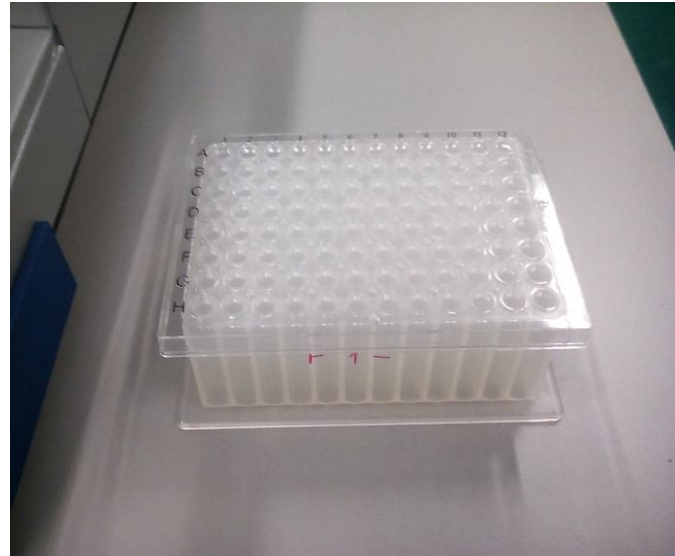
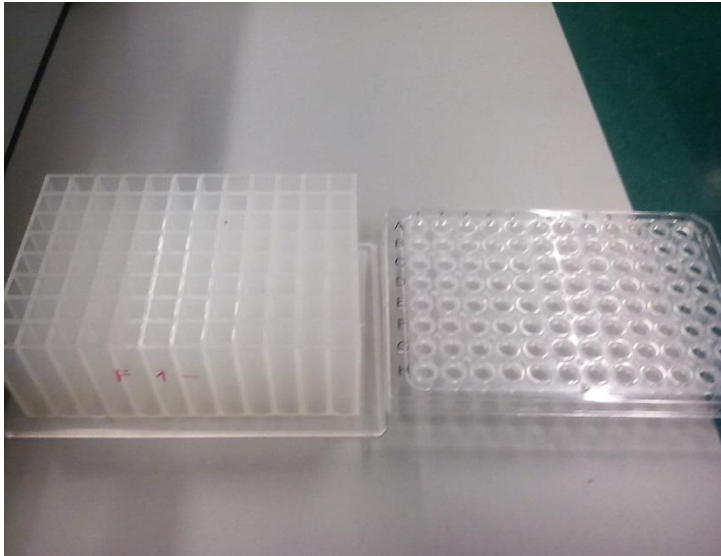
## HUOM

Protokollassa ei ole inkubaatio ajastinta näkyvillä. Käyttäjän tulee itse olla tarkkana aikojen suhteen.

### 3 Hyvä huomioida

## HUOM!!

Protokollassa käytetään purkkaviritettyä alustaa, jonka kasaamisessa tulee olla tarkkana. Viritelmä koostuu kahdesta osasta. Alimmaisessa osassa on merkattu F ja R. F tarkoittaa front ja R taas rear. Aseta pohja laatikko siten että F osoittaa ulos ja R taas koneen takakantta kohti. Katso kuva.



## HUOM!

Kahden levyn pipetointi ohjelmaa ei ole testattu tai hienosäädetty, jotkin ohjeistukset saattavat olla harhaanjohtavia. Syy tähän on ajanpuute, jonka vuoksi bug splatteria ei ehditty suorittaa. Ohjeistavat kuvat eivät ovat ajan tasalla. Käytä kahden levyn PEG käsittely ohjelmaa omalla vastuulla.

**HUOM!**

Ajotuloksia ei pysty näkemään Fragment Analyzerissä, syy tähän on eluutio vaiheessa mukana oleva PEG. Toistaiseksi ei ole keinoa saada PEG:tä pois mutta voidaan taata, että protokolla toteuttaa koerottelun moitteettomasti. Ajotuloksen pystyy varmistamaan ajamalla ajo näyte agarosi geelillä. Pipetointi laadun heittelyä esiintyy vain ja ainoastaan jos käytetään 30 µl beedejä. Liiallinen beedi määrää aiheuttaa kärkitukkeumia.

**HUOM!**

Jos beedejä jää liian korkealle kaivon eikä ole kunnolla liennut kunnolla nesteeseen. Napauttele levyä hellästi, jotta beedit tippuisivat nesteeseen. Muutama napautus riittää.

**ERITTÄIN TÄRKEÄ!**

Konehuoneessa on erittäin korkea melutaso, jonka vuoksi on suositeltavaa **KÄYTTÄÄ KORVATULPPIA**. Protokolla kestää keskimäärin 50 minuuttia ja käyttäjän läsnä oloa vaaditaan lähes koko ajan. 50 minuutin altistuminen kyseiseen melutasoon voi aiheuttaa pysyviä kuulo vaurioita. **Jo pelkästään kahdentunnin huoneessa olo aiheuttaa lievää korva kipua. MUISTA TÄYTTÄÄ KORVATULPPA LAATIKKO SÄÄNNÖLLISESTI!!!**