

Janita Sandberg

Sinisimpukan geeniaktiivisuuden määrittäminen qPCR-menetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

13.3.2019

Tekijä	Janita Sandberg
Otsikko	Sinisimpukan geeniaktiivisuuden määrittäminen qPCR-menetelmällä
Sivumäärä	27 sivua + 9 liitettä
Aika	13.3.2019
Tutkinto	Laboratorioanalytiikka (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Tutkija Raisa Turja Lehtori Tiina Soininen
<p>Itämerellä kuljetettavan raakaöljyn ja öljyalosteiden määrän on ennustettu kasvavan huomattavasti lähivuosina. On tärkeää tutkia öljyn vaikutuksia eliöihin, sillä Itämerellä mahdollisen öljyonnettomuuden riski on suuri. Itämeren ominaisuudet, kuten veden mataluus ja hidas vaihtuminen, murtovesi sekä kylmyys tekevät siitä herkän likaantumiselle ja sen aiheuttamille vaikutuksille.</p> <p>Tämä opinnäytetyö on tehty Suomen ympäristökeskuksessa. Työn tavoitteena oli ottaa käyttöön qPCR-menetelmä, jonka avulla tutkitaan geeniaktiivisuutta kudoksessa. Menetelmän tarkoituksena on selvittää, kuinka haitalliset aineet vaikuttavat tutkittavaan sinisimpukkaan (<i>Mytilus Trossulus</i>) oksidatiivisen stressin näkökulmasta. Simpukoita altistettiin öljylle, jonka komponentit synnyttävät eliöissä happiradikaaleja. Kun eliön happiradikaalien määrä kasvaa, myös antioksidanttien määrän on noustava. Eliön geenit tuottavat antioksidantteja neutraloimaan happiradikaaleja. Mikäli happiradikaaleja on antioksidantteihin nähden liikaa, puhutaan oksidatiivisesta stressistä. Tällöin happiradikaalit aiheuttavat solussa proteiinien, lipidien ja DNA:n vahingoittumisen ja pahimmassa tapauksessa solukuoleman.</p> <p>Näytteinä käytetyt simpukat oli haettu Itämerestä mahdollisimman puhtaalta alueelta. Simpukoille tehtiin yksi koeasetelma, jossa oli käytössä kolme erilaista käsittelyä: kontrollit, matala pitoisuus öljyä vedessä ja korkea pitoisuus öljyä vedessä. Osaa simpukoista altistettiin yhden päivän ajan ja toista koeryhmää seitsemän päivän ajan. Kolmas koeryhmä siirrettiin vielä seitsemän päivän altistuksen jälkeen puhtaaseen veteen viikoksi. qPCR-menetelmällä mitattiin oksidatiivisen stressin torjumiseen ja mahdollisiin muihin vaikutuksiin liittyvien geenien aktiivisuuksia.</p> <p>RNA-näytteiden laatu varmistettiin bioanalysaattorilla. Kuoppalevyjen välisiä eroja ja replikaattien varianssia tarkasteltiin laskemalla variaatiokertoimia, joiden tuli jäädä alle viiden prosentin. Kaikissa tavoite saavutettiin. Kontrollien tuloksia verrattiin ANOVAlla matalapitoisiin ja korkeapitoisiin käsittelyihin. Kontrollien ja matalien pitoisuuksien välillä p-arvot olivat yli 0,05. Näin ollen eroja niiden välillä ei ollut. Korkeiden pitoisuuksien ja kontrollien välillä joidenkin geenien p-arvo oli yli 0,05 päivänä 1 ja toisien geenien kohdalla päivänä 7.</p>	
Avainsanat	Itämeri, sinisimpukka, öljy, haitalliset aineet, qPCR, biomarkkeri, oksidatiivinen stressi, antioksidanttijärjestelmä

Author	Janita Sandberg
Title Number of Pages Date	Determination of Blue Mussel Gene Activity by qPCR Method 27 pages + 9 appendices 13 March 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Raisa Turja, Researcher Tiina Soininen, Senior lecturer
<p>The amount of crude oil and petroleum products transported in the Baltic Sea is expected to increase significantly in the coming years. It is important to study the effects of oil in organisms, as there is a high risk of a possible oil accident in the Baltic Sea. The features of the Baltic Sea, such as the shallow water and slow changeover, brackish water and cold temperature make it sensitive to contamination and its effects.</p> <p>The aim of this study was to introduce a qPCR method to investigate gene activity in tissue. The purpose of the method is to find out how hazardous substances affect the blue mussel (<i>Mytilus trossulus</i>) under study. Mussels were exposed to oil in the laboratory. Components of the oil produce oxygen radicals in the organisms. As the number of oxygen radicals in the organism increases, the number of antioxidants also needs to increase. The organism's genes produce antioxidants to neutralize oxygen radicals. The oxygen radicals in the cell cause damage to the proteins, lipids and DNA, and in the worst case, cell death.</p> <p>The mussels used as samples were collected from the Baltic Sea from an area, which was known to be as clean as possible. There were three different experimental designs for the mussels: controls, low concentration of oil in water and high concentration of oil in water. Some of the mussels were exposed for one day and another test group for seven days. The third experimental group was transferred to clean water for a week after seven days of exposure. qPCR method was used to measure the activity of genes involved in combating oxidative stress and other possible stress effects.</p> <p>The quality of the RNA samples was confirmed by a bioanalyzer. The differences between the well plates and the variance of the replicates were examined by calculating the coefficients of variation, which were to remain below 5 %. These goals were achieved. Control results were compared with ANOVA for low-grade and high-grade treatments. There was no difference between control and low concentration treatments. Between high concentrations and controls for some genes, the p-value was greater than 0.05 for day 1 and for other genes for day 7.</p>	
Keywords	Baltic sea, blue mussel, oil, hazardous substances, qPCR, biomarker, oxidative stress, antioxidant system

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Itämeri ja öljy	2
2.2	Simpukka ja indikaattorilajit	3
2.3	Biomarkkeri	4
2.4	Oksidatiivinen stressi	5
2.5	Antioksidanttijärjestelmä	6
3	Työn suoritus	8
3.1	RNA-eristys	9
3.2	cDNA-synteesi	10
3.3	RNA- ja cDNA-pitoisuuksien määrittäminen	11
3.4	qPCR	13
3.5	Tulosten tilastollinen käsittely	16
4	Tulokset ja niiden tarkastelu	18
4.1	Koejärjestelyiden mittaukset	18
4.2	RNA-eristyksen onnistuminen	18
4.3	Kuoppalevyjen väliset erot	20
4.4	Replikaattien väliset erot	21
4.5	Käsittelyiden väliset erot	24
5	Johtopäätökset	25
	Lähteet	27

Liitteet

Liite 1. Näytetiedot

Liite 2. Työssä käytetyt laitteet

Liite 3. Työssä käytetyt välineet, kitit ja reagenssit

Liite 4. Pipetointikartta

Liite 5. Katalaasin standardisuorat

Liite 6. Mitattujen näytteiden replikaattien keskiarvot, cDNA-pitoisuudet, näytteiden ja standardien cDNA-konsentraatioiden erotukset ja Ct-arvojen suhteelliset aktiivisuudet

Liite 7. Bioanalysaattorin RNA:n laadun analysointi

Liite 8. Bioanalysaattorin kuvaajat

Liite 9. Kuoppalevyjen väliset erot

Lyhenteet

CAT	Catalase gene. Katalaasigeeni.
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid. Komplementaarinen deoksiribonukleiinihappo.
DNA	Deoxyribonucleic acid. Deoksiribonukleiinihappo.
GST	Glutathione S-transferase. Glutationi S-transferaasi.
MVP	Major vault protein. Major vault -proteiini.
PAH	Polyaromatic hydrocarbon. Polyaromaattinen hiilivety.
PCR	Polymerase chain reaction. Polymeraasiketjureaktio.
PDRP	Pleiotropic drug resistance protein. Pleiotrooppinen lääkeresistenssiproteiini.
p53	Phosphoprotein. Fosfoproteiini.
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction. Kvantitatiivinen DNA:n monistamismenetelmä.
ROS	Reactive oxygen spesies. Reaktiivinen happiradikaali.
SOD	Superoxide dismutase. Superoksididismutaasi.
SYKE	Finnish Environment Institute. Suomen ympäristökeskus.
TAE	Tris-acetate-EDTA. Tris-asettaatti-EDTA.

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tehtiin Suomen ympäristökeskuksessa (SYKE) Merikeskuksen laboratoriossa. Työ liittyi osana Merien saastuminen -ryhmän tutkimuksiin, joissa keskitytään erilaisten haitallisten aineiden esiintymiseen ja vaikutuksiin Itämeressä.

Laaja valuma-alue, mataluus sekä vähäinen veden vaihtuvuus tekevät Itämerestä hyvin herkän likaantumiselle ja sen vaikutuksille, joten sen tilaa on tärkeä tutkia ja seurata. Itämeren ympäristö on haasteellinen useille eliöille muun muassa murtoveden sekä lämpötilan ja valon määrän vaihtelun vuoksi. Itämerellä kuljetetaan runsaasti öljyä vuosittain ja määrän ennustetaan kasvavan huomattavasti lähivuosina. Näin ollen öljyonnettomuuksien riski kasvaa entistä suuremmaksi. [1, s. 5, 12, 24, 36–39.]

Öljy aiheuttaa monenlaisia ongelmia Itämeren ekosysteemissä. Pieninä määrinä öljyn komponentit aiheuttavat eliön elimistössä stressivasteen, jota voidaan havaita tutkimalla tiettyjen geenien aktiivisuuksien muutoksia. Nämä muutokset saattavat viitata oksidatiiviseen stressiin, joka saa aikaan solujen vaurioita ja pahimmillaan eliön kuoleman.

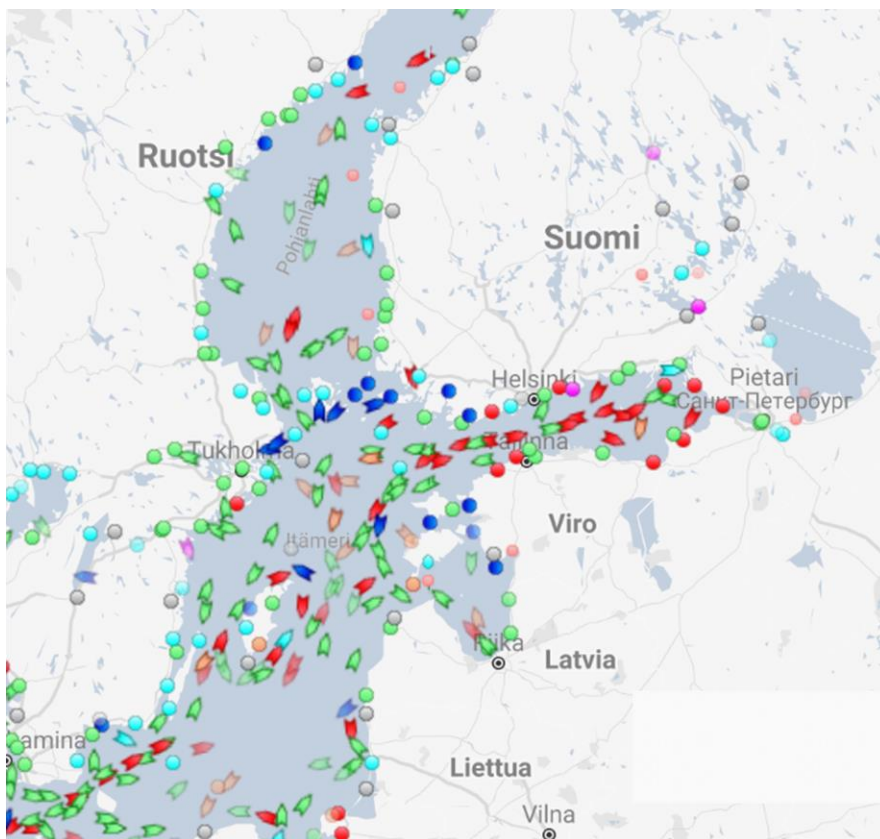
qPCR-menetelmää on sovellettu ympäristötieteissä, jossa haasteena on ollut genomisen tiedon puute tutkittavista lajeista. Haitallisten aineiden vaikutusta antioksidanttigeenien aktiivisuuteen on tutkittu jonkin verran eri simpukka- ja osterilajeissa, joissa on raportoitu sekä geenien aktivoitumista että inhiboitumista, riippuen tutkittavasta kemikaalista. Vielä vähemmän on tutkimuksia, joissa haitallisten aineiden vaikutusta on tutkittu sekä geeni- että entsyymiaktiivisuuksiin, jotka on määritetty samasta yksilöstä. Öljy-yhdisteillä on havaittu olevan vaikutuksia simpukoiden geenien aktiivisuuteen. [2.] Öljyn vaikutuksia geeniaktiivisuustasolla ei ole aiemmin tutkittu Itämeren sinisimpukassa.

Työn tarkoituksena oli ottaa käyttöön menetelmä, jonka avulla tutkitaan sinisimpukan geenien aktiivisuuksien muutoksia. Tämän avulla voidaan jatkossa seurata simpukan stressitasoja. Käytännön työ oli aloitettu keräämällä simpukat Itämerestä ja suorittamalla öljyaltistukset eri pitoisuuksilla ja aikapisteillä. Näin voitiin vertailla geenien aktiivisuuksia ottaen huomioon eri pitoisuudet ja altistumisen kesto. Työtä jatkettiin tämän opinnäytetyön käytännön osuudella eli eristämällä näytepaloista RNA-näytteet ja syntetisoimalla niistä cDNA-näytteet qPCR-analyysia varten.

2 Teoria

2.1 Itämeri ja öljy

Itämerellä kulkee runsaasti suuria aluksia joka hetki, kuten kuvassa 1 on esitelty. Itämeren olosuhteet ovat haasteelliset, mikä tuo omat riskinsä onnettomuuksille. On arvioitu, että Suomenlahdella kuljetetaan vuodessa noin 150 miljoonaa tonnia öljyä. Kuljetettavan öljyn määrän ennustetaan kasvavan lähivuosina 260 miljoonaan tonniin vuodessa. [3; 4, s. 9.]



Kuva 1. Itämeren laivaliikenne. Itämerellä kulkevien alusten määrä 8.1.2019. [5.]

Itämeren ekosysteemi on alttiimpi öljyn haitallisille vaikutuksille, kuin monien muiden merien ekosysteemit. Itämeren suolapitoisuus on matala verrattuna muihin meriin. Mitä matalampi suolapitoisuus on, sitä enemmän öljyä liukenee meriveteen. Matalassa lämpötilassa eliöiden öljyn komponenttien hajotuskyky ja haittavaikutuksista palautuminen on hitaampaa. Lisäksi kylmässä öljyn komponentit haihtuvat tavallista hitaammin. [4, s. 27.]

Kesällä sekä valo että lämpö edistävät haihtumista ja mikrobiologista muuntumista ja vaikuttavat täten myös öljyn käyttäytymiseen vedessä. Talvella mitatut kokonaisöljypitoisuudet ovat yleensä korkeampia kuin kesällä, sillä yhdisteiden hajotusta rajoittaa ravinteiden puute, kylmä vesi ja kyseisen öljynlaadun sisältämien yhdisteiden hajottamiseen sopeutuneiden mikrobien puute. Talviaikaan (loka-marraskuussa) vedestä suoritettut mittaukset ovat pienemmän virheensä vuoksi luotettavampia kuin kesäaikaan tehdyt mittaukset. Näistä syistä johtuen talviaikaisten havaintojen suhteellinen osuus öljypitoisuuksien seurannassa todennäköisesti kasvaa jatkossa. [4, s. 17.]

Raakaöljy ja siitä jalostetut öljytuotteet ovat useiden yhdisteiden seoksia. Erityisesti polyaromaattisten hiilivetyjen (PAH) on osoitettu olevan haitallisia vesieliöille. Öljyn myrkyllisyys liittyy yhdisteiden kemialliseen rakenteeseen ja se eroaa jokaisen yhdisteen kohdalla. Jokainen öljy on erilainen seos eri yhdisteitä. Öljyonnettomuuden ympäristövaikutusten arvioiminen on hankalaa, koska sen hetkiset ympäristötekijät vaikuttavat öljyn leviämiseen, haihtumiseen ja biosaatavuuteen. Lisäksi eri öljyjen sisältämien haitallisimpien yhdisteiden vaihteleva määrä vaikeuttaa vaikutusten arviointia. [4, s. 18–19.]

Koska Itämerellä olosuhteet vaihtelevat paljon, haitallisten aineiden vaikutusten indikaattoreina käytetään usein paljon tutkittuja pitkäikäisiä lajeja, joissa haitalliset aineet aiheuttavat mitattavissa olevia stressivasteita. Tällaisia lajeja ovat liejusimpukka ja sinisimpukka. [4, s. 28.]

2.2 Simpukka ja indikaattorilajit

Öljyindikaattorilajien tulisi olla laajalle levinneitä ja esiintyä riittävän runsaina Suomen vesialueilla. Seuranta-aineiston olemassaolo on myös vertailun kannalta eduksi. Toisaalta myös uhanalaisten lajien käyttö indikaattoreina on tärkeää, jos öljy saastuttaa niiden esiintymisalueen. Indikaattoreina käytettävien eliöiden öljyaltistuminen riippuu vuodenajan lisäksi myös öljyvahingon sijainnista. Rannalla eliöyhteisöt ovat monimuotoisempia verrattuna lajiköyhiin avomeren pohjaekosysteemeihin. [4, s. 32–36.]

Sinisimpukat ovat yleisimmin käytettyjä meressä eläviä bioindikaattoreita ympäristön haitallisia aineita ja niiden vaikutuksia tutkittaessa. Simpukat ovat tutkituimpia indikaattorilajeja. Näin ollen niitä käytettäessä voidaan ottaa huomioon miten eri tekijät, kuten esimerkiksi vuodenaikojen vaihtelut vaikuttavat niiden stressivasteisiin. Ne ovat herkkiä

ympäristön muutoksille, raskasmetalleille sekä muille haitallisille aineille. Simpukat ovat pitkäikäisiä, kerryttävät epäpuhtauksia, niitä esiintyy maailmanlaajuisesti ja ne kestävät hyvin ankaria olosuhteita silti reagoiden biologisesti stressiin. Lisäksi simpukan aineenvaihdunta hajottaa huonosti tiettyjä öljyn komponentteja, jolloin yhdisteet varastoituvat lajin kudoksiin. On arvioitu, että Itämeren simpukat suodattavat vuosittain koko Itämeren tilavuuden verran vettä. Tämän seurauksena simpukat keräävät tehokkaasti vedessä olevia haitallisia aineita kudoksiinsa. Näistä syistä simpukat ovat hyviä bioindikaattoreita. [4, s. 33–36; 6; 7, s. 19.]

Kun simpukka altistuu tarpeeksi haitalliselle aineelle, sen kudoksissa alkaa tapahtua mitattavissa olevia muutoksia. Nämä muutokset liittyvät eliön kykyyn puolustautua haitallisten aineiden aiheuttamia vaurioita vastaan. Muutoksia tapahtuu entsyymien toiminnassa, energian kulutuksessa sekä tiettyjen geenien aktiivisuuksissa. [7, s. 21.]

2.3 Biomarkkeri

Biomarkkerit voidaan määritellä karkeasti joko indikaattoreiksi tai merkeiksi muutoksista biologisessa systeemissä. Ne voivat viestiä muutoksista molekulaarisella, biokemiallisella tai solutasolla. Toksikologiassa biomarkkerit ovat luokiteltu altistumisen, vaikutuksen ja alttiuden merkeiksi. [8, s. 26–28.]

Ideaalin biomarkkerin tulisi olla helposti mitattavissa tutkittavasta kudoksesta tai muusta biologisesta tuotteesta. Biomarkkereita hyödynnetään ympäristön tilan seurannan mitauksissa, joita käytetään altistumisen, riskinarvioinnin ja sen hallinnan arviontiin ja tutkimiseen. [8, s. 26–28.]

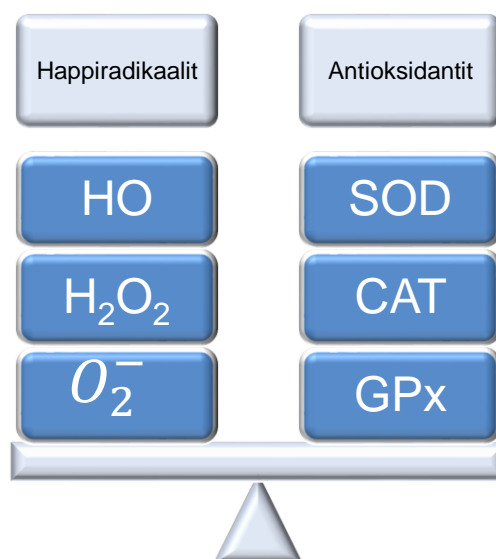
Öljyvahingon tapahduttua biomarkkereita voitaisiin mitata mahdollisimman pian paikanpäältä otetuista eliönäytteistä, jotta nähdään öljyaltistuksen välittömät vaikutukset, sekä voitaisiin seurata eliöiden palautumista tai mahdollisia pitkäaikaisvaikutuksia kuukausien tai vuosien jälkeen [4, s. 27–28].

Jotta öljyn vaikutuksia eliöihin voitaisiin mitata, on tärkeää, että määritetään myös erikseen referenssialue, missä öljyvahinko ei todennäköisesti vaikuta ja varsinainen vaikutustutkimusalue. Tai vaihtoehtoisesti verrataan ekosysteemin öljypitoisuuksia ja terveyttä öljyvahinkoa ennen ja sen jälkeen. [4, s. 28.]

Biomarkkerit ovat sellaisia biologisia toimintoja, jotka normaalitilassa huolehtivat solujen tasapainoisesta toiminnasta, eli niillä on aina jokin mitattava perustaso. Altistuminen haitallisille aineille, kuten öljy-yhdisteille, aiheuttaa biomarkkerien aktiivisuuden muutoksen. Muutoksia perustasaan voi aiheutua myös muista ympäristötekijöistä johtuen tai altistumisessa eri haitalliset aineet aiheuttavat vastakkaiset reaktiot: toinen inhiboi ja toinen aktivoi esimerkiksi jonkin geenin toimintaa. Tällöin tietyn biomarkkeri-vasteen löytäminen on vaikeaa. Ongelman välttämiseksi on suositeltavaa mitata yhden biomarkkerivasteen sijaan monia biomarkkereita, joilla on erilaisia käyttötarkoituksia ja jotka ilmenevät eri biologisilla tasoilla. [7, s. 19.] Mitä useampi biomarkkeri viittaa muutoksiin, sitä varmemmin mittaukset viittaavat elion olevan stressitilassa.

2.4 Oksidatiivinen stressi

Oksidatiivista stressiä syntyy, kun reaktiivisten happiradikaalien ja niitä neutralisoivien antioksidanttien tasapaino järkkyy. Tällöin reaktiivisia happiradikaaleja on enemmän kuin mitä antioksidantit kykenevät torjumaan. Tämä voi johtua joko happiradikaalien voimakkuudesta tai antioksidanttijärjestelmän vajavaisesta toiminnasta. Elimistön normaalitilassa happiradikaalit ja antioksidantit ovat tasapainossa. Tyypillisimpiä happiradikaaleja ovat hydroksyyli-radikaali ($\cdot\text{OH}$), vetyperoksidi (H_2O_2) ja superoksidiradikaali (O_2^-). Kuvassa 2 on esitetty tyypillisimpien happiradikaalien ja antioksidanttien välinen tasapaino. [2.] Antioksidanteista on kerrottu tarkemmin seuraavassa luvussa.



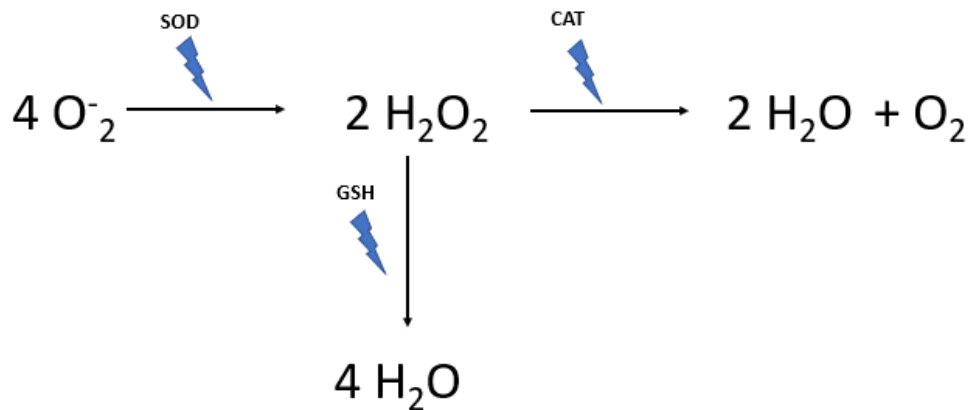
Kuva 2. Yleisimpien happiradikaalien ja antioksidanttien tasapaino. [2.]

Happiradikaaleja muodostuu muun muassa ionisoivan säteilyn, ilmansaasteiden, UV-valon ja erilaisten haitallisten aineiden, kuten öljyn vaikutuksesta. Lisäksi happiradikaaleja syntyy normaalisti elimistön soluhengityksessä. Happiradikaalien ja antioksidanttien epätasapaino johtaa proteiinien, lipidien ja DNA:n vahingoittumiseen. Liiallinen happiradikaalien aiheuttama kuormitus aiheuttaa lopulta solukuoleman. [2.] Elimistön antioksidanttijärjestelmä tuottaa antioksidantteja rajoittaen näin happiradikaalien määrää pitäen tasapainoa yllä ja eliön terveenä.

2.5 Antioksidanttijärjestelmä

Kun eliössä happiradikaalien määrä lisääntyy, antioksidanttigeenien aktiivisuus kasvaa ja näin ollen solut alkavat tuottamaan lisää erilaisia antioksidanttientsyymejä vaarallisia hapen sivuvaikutuksia vastaan. Antioksidanttientsyymit ovat keskeisessä roolissa homeostaattisen hapetus-pelkistystilan ylläpitämisessä. Antioksidanttien puute tai ylimentyminen voi aiheuttaa peruuttamattomia vaurioita kudoksissa. Antioksidanttientsyymien kolme päätekijää ovat superoksididismutaasi (SOD), katalaasi (CAT) ja glutationiperoksidaasi (GPx). Näistä kolmesta tässä työssä määritettiin katalaasin ja superoksididismutaasin geeniaktiivisuuksia. Katalaasi ja superoksididismutaasi ovat yleisiä entsyymejä, joita esiintyy lähes kaikissa hapelle altistuvissa elävissä organismeissa. Ne ovat erittäin tärkeitä entsyymejä solun suojaamisessa happiradikaaleja vastaan. Katalaasit ovat hyvin tehokkaita. Yksi katalaasimolekyylillä voi muuttaa miljoonia vetyperoksidimolekyylejä joka sekunti. [2, 9.]

Kuvasta 3 voidaan nähdä, kuinka aluksi superoksididismutaasi muuttaa superoksidiradikaalit (O_2^-) vetyperoksidiksi (H_2O_2). Tämän jälkeen joko katalaasi tai glutationiperoksidaasientsyymi pelkistävät vetyperoksidin vedeksi ja hapeksi.



Kuva 3. Superoksididismutaasi muuttaa superoksidiradikaalin vetyperoksidiksi, ja katalaasi muuttaa vetyperoksidin vedeksi ja happikaasuksi. Tai vaihtoehtoisesti glutationiperoksidaasientsyymi muuttaa vetyperoksidin vedeksi. [2.]

Tässä työssä on mitattu kvantitatiivisella PCR-menetelmällä antioksidantteja tuottavien geenien (CAT, SOD, GST) aktiivisuuden lisäksi myös muiden stressivasteeseen reagoivien geenien (p53, PDRP, MVP) aktiivisuutta.

Kvantitatiivinen PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) on menetelmä, jolla voidaan tunnistaa ja mitata spesifisesti halutun DNA:n tai RNA:n määrä näytteestä. Geenien aktiivisuutta mitattaessa menetelmä perustuu geenin tunnistamiseen ja monistamiseen suunniteltujen geenispesifisten alukkeiden avulla. Geenien toimiessa ne tuottavat RNA:ta, jonka määrä kertoo geenien aktiivisuudesta. qPCR-reaktiota varten näytteestä eristetty RNA muutetaan ensin komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA, yksijuosteinen) käänteiskopioijaentsyymien avulla. qPCR-reaktiossa muodostuu kaksijuosteista DNA:ta, kun spesifiset alukkeet tarttuvat haluttuun geenisekvenssiin. Tässä vaiheessa myös reaktiossa käytettävä fluoresoiva reporteriaine sitoutuu ja fluoresoi, minkä avulla on mahdollista mitata kaksijuosteisen DNA:n muodostumista reaaliajassa.

3 Työn suoritus

Tässä työssä näytteinä käytetyt sinisimpukat olivat peräisin puhtaalta alueelta Tvärminnen eläintieteellisen aseman lähistöltä. Koe suoritettiin lokakuussa 2017. Simpukoita altistettiin dieselöljylle, joka oli peräisin Nesteen jalostamolta Porvoosta. Kokeessa haluttiin altistaa simpukat vain dieselin veteen liukenevalle osalle. Tämä toteutettiin lisäämällä dieseliä tekomeriveteen (Instant Ocean) suhteessa 5 grammaa dieseliä 1 litraan tekomerivettä. Liuosta sekoitettiin +10 asteen lämpötilassa 48 tuntia, annettiin faasien erottua 3 tuntia ja otettiin talteen vain vesifaasi. Veden dieselpitoisuutta mitattiin reaaliaikaisesti Enviroflu-sensorilla (TRlos). Akvaarioista valittiin sattumanvaraisesti 20 simpukkaa, joiden pehmytkudoksista poolattiin yksi näyte, josta määritettiin PAH-pitoisuudet SYKEN laboratoriossa. Kokeessa oli kolme käsittelyä: ei-kontaminoitu tekomerivesi (kontrolli), matala ja korkea dieselpitoisuus. Kaikilla käsittelyillä oli kaksi replikaattiakvaariota. Samankokoisia simpukoita laskettiin sattumanvaraisesti sata kappaletta jokaiseen akvaarioon, joissa oli +10-asteista tekomerivettä 25 litraa 5,6 PSU:n (eng. practical salinity unit) suolapitoisuudessa promilleina. Akvaariot puhdistettiin ja vesi sekä käsittelyt uusittiin kahden päivän välein. Simpukoita ruokittiin päivittäin Instant Algae -leväseoksella. Näytteitä otettiin jokaisesta käsittelystä sattumanvaraisesti kuusi kappaletta yhden ja seitsemän päivän jälkeen sekä viikon jälkeen, kun simpukat oli siirretty seitsemän päivän altistuksen jälkeen puhtaaseen veteen (recovery). Kokeessa oli siis kolme aikapistettä, jotka olivat päivä 1, päivä 7 ja recovery. Tätä työtä varten simpukoista leikattiin ruuansulatusrauhanen. Näytteet jäädettiin heti nestetyypen ja säilöttiin -80 asteessa RNA-eristystä varten.

Tämän opinnäytetyön käytännön osuus alkoi eristämällä simpukoista preparoiduista ruuansulatusrauhasista RNA. Näytteitä eristettiin jokaisesta aikapisteestä ja käsittelystä kuusi kappaletta. Eli 54 eri simpukan ruuansulatuskudoksesta eristettiin RNA. Näytetiedot ovat liitteessä 1. Eristyksessä oli otettava huomioon käytössä olevan reagenssin, TRzoloin, vaarallisuus. Eristetyistä näytteistä mitattiin Qubit-laitteella RNA-pitoisuus. RNA-näytteistä syntetisoitiin kaupallisen kitin avulla cDNA-näytteet, joista mitattiin Qubit-laitteella yksijuosteisen DNA:n pitoisuus. cDNA-näytteet ajettiin qPCR-laitteella kuuden eri geenin alukkeilla. Käytetyt alukkeet olivat CAT (katalaasi), SOD (superoksididismutaasi), p53 (fosfoproteiini), PDRP (pleiotrooppinen lääkeresistenssi proteiini), GST (glutationi S-transferaasi) ja MVP (Major vault -proteiini). Työvaiheet on kuvattu tarkemmin kohdissa 3.1–3.4.

Työssä käytettiin välineitä, jotka oli varattuja ainoastaan RNA-analyysille. Käytetyt laitteet on kuvattu liitteessä 2. Reagenssit, kitit ja välineet on kuvattu liitteessä 3.

3.1 RNA-eristys

Korkillisiin putkiin lisättiin halkaisijaltaan 1,0 millimetrin kokoisia lasihelmiä (BioSpec Products, tuotenumero 11079110) noin puoli senttiä pohjasta ja 1 millilitra TRizolia (Ambion, tuotenumero AM12400). On otettava huomioon, että TRizolia käsiteltäessä tulee vaihtaa suojakäsineitä säännöllisesti ja kyseisen reagenssin kontaminoimat jätteet on hävitettävä huolellisesti ja asianmukaisesti. Käsiteltäviä näytteitä oli 6–24 kappaletta eristyskerta kohden. Jokaiseen putkeen lisättiin noin 50–100 milligramman kokoinen pala sinisimpukkanäytettä ja putki siirrettiin välittömästi jäihin. Näytteiden käsittelyssä käytetyt välineet puhdistettiin 70-prosenttisella etanolilla eri näytteiden ja käsittelyiden välillä.

Kun lasihelmet, TRizol ja näytteet oli lisätty putkiin, ne asetettiin homogenisaattoriin (FAST PREP FP120, sarjanumero FP120-1B060289-4D) kaksi kertaa 25 sekunniksi voimalla 5 metriä sekunnissa. Tämän työvaiheen päätteeksi näyteputket jätettiin huoneenlämpöön inkuboitumaan 5 minuutiksi.

Inkubointiajan täytyttyä näyteputkista siirrettiin nesteet eppendorf-putkiin ja kuhunkin lisättiin 200 mikrolitraa kloroformia (Sigma-Aldrich, tuotenumero 650471). Korkit suljettiin huolellisesti ja putkia käännettiin rauhallisesti ylösalaisin 15 kertaa, minkä jälkeen putket laitettiin jälle inkuboitumaan 2–3 minuutiksi. Näytteitä sentrifugoitiin 12 000 g:n voimalla 15 minuuttia +4 asteessa. Putkista otettiin talteen ylempi kirkas faasi (RNA). Alemmat faasit (proteiini ja DNA) vietiin -80 asteen säilytykseen mahdollisia myöhempiä analyyseja varten.

RNA-putkiin pipetoitiin 500 mikrolitraa isopropanolia (J.T. BAKER, tuotenumero 8175). Putkien korkit suljettiin huolellisesti ja putkia käännettiin ylösalaisin rauhallisesti 10 kertaa, jonka jälkeen näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia. Inkubointiajan täytyttyä näytteitä sentrifugoitiin 12 000 g:n voimalla 10 minuuttia +4 asteen lämpötilassa.

Sentrifugoinnin jälkeen varmistettiin, että pelletti on hyvin kiinni putken seinämässä. Putkista kaadettiin varovaisesti nesteet pois ja niitä koputeltiin imupaperia vasten ylimääräisten nesteiden poistamiseksi. Putkiin lisättiin 1 millilitra 75-prosenttiseksi laimennettua etanolia (Altia, tuotenumero 12110124). Tässä vaiheessa näytteet säilyvät +4 asteen lämpötilassa viikon tai -20 asteessa kokonaisen vuoden.

Näytteitä vorteksoitiin siten, että pelletti irtosi putken seinämästä ja sentrifugoitiin 7 500 g:n voimalla 5 minuuttia +4 asteessa. Putkesta pipetoitiin nesteet pois ja pellettejä ilma-kuivattiin 5–10 minuuttia. Pelletti ei saa kuivua liikaa, koska tämä vaikuttaa sen liukeneamiseen seuraavassa vaiheessa.

Jokaiseen putkeen lisättiin 100 mikrolitraa RNAasi-vapaata vettä (MP Biomedicals, tuotenumero 821739) ja vorteksoitiin, kunnes pelletti oli täysin liuennut veteen. Näytteitä inkuboitiin +55,5 asteessa noin 3 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen varmistettiin, että pelletti on liuennut veteen. Näytteitä säilytettiin -80 asteessa.

3.2 cDNA-synteesi

Tässä työvaiheessa cDNA:n syntetisoimiseksi käytettiin kaupallista SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR -kittiä. Aluksi piti laskea, paljonko näytettä tuli pipetoida cDNA-reaktion RNA-näytteen konsentraation avulla. Pitoisuuden tuli olla 3 mikrogrammaa per reaktio. Tämän jälkeen putkiin pipetoitiin käytetyn kitin reagenssit taulukon 1 mukaisesti RNA-näytettä, random hexamers -alukkeita, dNTP -seosta ja DEPC -käsiteltyä vettä siten, että jokaisessa putkessa oli kokonaistilavuudeltaan 10 mikrolitraa liuosta.

Taulukko 1. RNA-näytteen, alukkeiden, dNTP:n ja veden pipetointi. Reagenssit ovat käytetystä kaupallisesta kitistä. RNA-näytteen määrä riippui sen konsentraatiosta ja veden määrä riippui RNA-näytteen määrästä. Seoksen yhteistilavuus tuli olla 10 mikrolitraa.

Reagenssi	Määrä (µl)
RNA-näyte	n
Alukkeet: 50 ng/µl random hexamers	1
10 mM dNTP seos	1
DEPC-käsitelty vesi	10-n-2

Seokset siirrettiin inkuboitumaan PCR-laitteeseen +65 asteeseen 5 minuutiksi ja annettiin seistä 0 asteessa vähintään 1 minuutin ajan. Inkuboinnin aikana valmistettiin cDNA-synteesiseos pipetoimalla eppendorf-putkeen käytetystä kitistä reagenssit taulukon 2 mukaisesti.

Taulukko 2. cDNA-synteesin seos.

Reagenssi	Määrä (μ l)
10X RT Puskuri	2
25 mM MgCl ₂	4
0,1 M DTT	2
RnaseOUT (40 U/ μ l)	1
SuperScript III RT (200 U/ μ l)	1

Kun näytteet oli inkuboitu, niihin lisättiin cDNA-synteesiseosta 10 mikrolitraa putkea kohden. cDNA-synteesiseoksia sekoitettiin kevyesti ja sentrifugoitiin nopeasti. cDNA-synteesiseokset laitettiin inkuboitumaan taulukon 3 mukaisesti.

Taulukko 3. cDNA-synteesin inkubointiohjelma.

Asteet (°C)	Aika (min)
25	10
50	50
85	5
0	Jäähdytys

Inkuboinnin jälkeen jokaiseen putkeen lisättiin vielä 1 mikrolitra käytetyn kitin *Escherichia coli* RNAasi H:ta (2U/ μ l) ja seoksia inkuboitiin vielä 20 minuuttia +37 asteen lämpötilassa. Synteesituotteet varastoitettiin -20 asteeseen.

3.3 RNA- ja cDNA-pitoisuuksien määrittäminen

Qubit-mittauksissa käytettiin kaupallisia kittejä. Qubit-laitteella mitattiin RNA- ja ssDNA (cDNA) -pitoisuudet näytteistä. RNA-pitoisuuksien mittaamiseen käytettiin Qubit RNA

Assay -kittiä (Thermo Fisher Scientific, tuotenumero Q32855). cDNA-pitoisuudet mitattiin käyttämällä Qubit ssDNA Assay-kittiä (Thermo Fisher Scientific, tuotenumero Q10212). RNA-pitoisuus tuli mitata ennen cDNA-synteesiä ja cDNA-pitoisuus ennen qPCR-ajoa. Pääperiaatteena molemmissa mittauksissa oli, että ensin valmistettiin työliuos ja sitten valmistettiin ja mitattiin standardit ja lopuksi näytteet. Työliuos valmistettiin pipetoimalla reagenssit taulukon 4 mukaisesti.

Taulukko 4. Työliuos.

Työliuos	
Reagenssi	Määrä (μ l) /mitattava putki
Qubit RNA Reagenssi/ Qubit ssDNA Reagenssi	1
Qubit RNA puskuri / Qubit ssDNA puskuri	199

Liuos sekoitettiin huolellisesti ja säilytettiin valolta suojattuna. Työliuos tuli käyttää saman päivän aikana. Standardeja valmistettiin 2 kappaletta. Ne valmistettiin pipetoimalla Qubit-määritykseen tarkoitettuihin putkiin (Thermo Fisher Scientific, tuotenumero Q32856) reagenssit taulukon 5 mukaisesti.

Taulukko 5. Työliuosten, näytteiden ja standardien pipetointi.

Näytteet	
Reagenssi	Määrä (μ l) / näyte
RNA-näyte	1
Qubit RNA työliuos / Qubit ssDNA työ- liuos	199
Standardit	
Reagenssi	Määrä (μ l) / standardi
Standardi	10
Qubit RNA työliuos / Qubit ssDNA työ- liuos	190

RNA-mittauksissa toisen standardin pitoisuus oli 0 ng/μl ja toisen 10 ng/μl ja ssDNA-mittauksissa standardien pitoisuudet olivat 0 ng/μl ja 20 ng/μl. Liuoksia vorteksoitiin 2–3 sekuntia ja inkuboitiin huoneenlämmössä 2 minuuttia. Tämän jälkeen laitteesta valittiin sopiva mittausohjelma ja mitattiin standardit laitteen antamien ohjeiden mukaisesti.

RNA-näytteet laimennettiin aluksi RNAasi-vapaalla vedellä joko 1:10 tai 1:20. cDNA-näytteitä ei tarvinnut laimentaa. Näytteet valmistettiin pipetoimalla taulukon 5 mukaisesti reagenssit Qubit-putkiin.

Näytteitä vorteksoitiin 2–3 sekuntia ja inkuboitiin huoneenlämmössä 2 minuuttia. Mitattaessa laitteeseen syötettiin näytetilavuus, jonka perusteella laite laskee näytteen todellisen konsentraation. RNA-näytteistä laskettiin itse vielä laimennoskertoimen perusteella todellinen konsentraatio.

3.4 qPCR

qPCR-analyysissä käytettiin kaupallista Platinum® SYBR® Green -kittiä ja monia erilaisia alukkeita. Alukkeiden tiedot ja sekvenssit ovat taulukossa 6.

Taulukko 6. qPCR-analyysissä käytetyt alukkeet ja niiden tiedot.

Nimi	Lyhenne	Tehtävä	Sekvenssi
Katalaasi	CAT-F	Antioksidantti	5' -AACCGAGAACTCACCTGAAGGATCC-3'
Katalaasi	CAT-R	Antioksidantti	5' -ACCTTGGTCAGTCTTGAAGTGGAAAT-3'
Glutathioni S-transfe-raasi	GSTa-F	Antioksidantti	5' -ATCAGGAGGCTGCCAAAGTA-3'
Glutathioni S-transfe-raasi	GSTa-R	Antioksidantti	5' -CTACAGCCAACAGGCACTCA-3'
Major vault -proteiini	MVP-F	Lääkeresistenssi	5'-TGT TAT TGA GGA GAC TGT CAG G-3'
Major vault -proteiini	MVP-R	Lääkeresistenssi	5'-GGT CTT CTT CAC CAG CCA TTC C-3'
Pleiotrooppinen lääke-resistenssiproteiini	PDRP-F	DNA:n korjaus	5' -CTGCCAAAGAAAGCTACAAAGAAG-3'
Pleiotrooppinen lääke-resistenssiproteiini	PDRP-R	DNA:n korjaus	5' -CCTTTGACAATGGATTGAGGTT-3'
Fosfoproteiini	p53-F	Kasvurajoitegeeni	5' -CTAGGTAGACGGGCAGTAGAAGTT-3'
Fosfoproteiini	p53-R	Kasvurajoitegeeni	5' -GCCTCCTGGTGTACTGTAGTGAT-3'
Superoksididismutaasi	SOD-F	Antioksidantti	5'-AGG CGC AAT CCA TTT GTT AC-3'
Superoksididismutaasi	SOD-R	Antioksidantti	5'-CAT GCC TTG TGT GAG CAT CT-3'

Analyysin standardit valmistettiin pipetoimalla samaan putkeen 2 mikrolitraa kaikkia näytteitä ja niistä tehtiin kolme laimennosta (1:2, 1:5, 1:10). Eppendorf-putkeen valmistettiin kitin reagensseista SYBR Green -seos taulukon 7 kaltaisesti.

Taulukko 7. SYBR Green -seos.

Reagenssit	Määrä (μl) /kaivo
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix	5
ROX Reference Dye	0,2
Alukkeet 10 μM	0,4
RNaasi-vapaa vesi	3,4

SYBR Green -seosta pipetoitiin 96-kuoppalevyn jokaiseen käytettävään kuoppaan 9 mikrolitraa. Tämän jälkeen kuoppiin pipetoitiin kolmena replikaattina cDNA-näytteet, nollanäyte ja valmistetut standardit. Esimerkki pipetointikartasta liitteenä 4. Kun seos ja näytteet oli pipetoitu, levyä sentrifugoitiin, jotta nesteet saatiin kuopan pohjalle. Sentrifugoitu levy asetettiin qPCR-laitteeseen (7300 Real Time PCR System, AB Applied Biosystem, sarjanumero 273001443) ja käynnistettiin käytetylle alukkeelle soveltuva ohjelma. Käytetyt qPCR-ohjelmat löytyvät taulukosta 8.

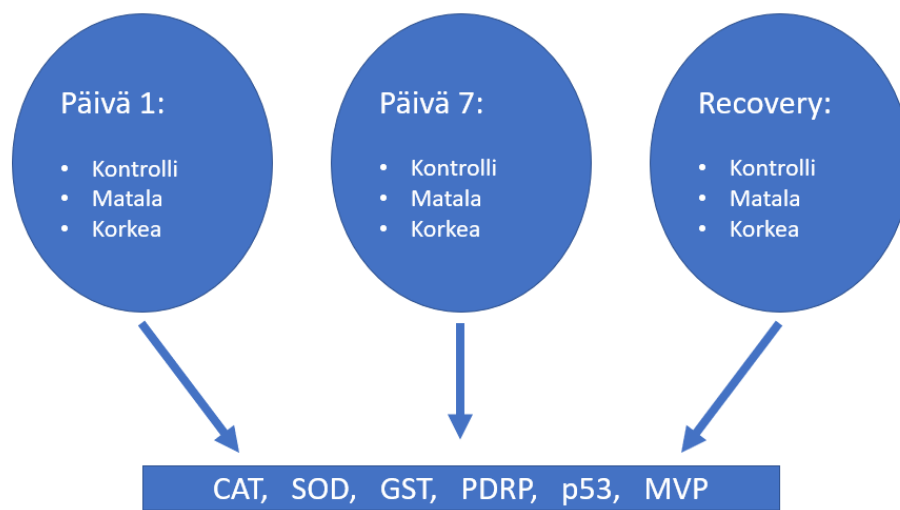
Taulukko 8. qPCR-ohjelmat eri alukkeille.

CAT, MVP	Toistot	Lämpötila °C	Aika
Vaihe 1	1	50	2 min
		95	10 min
Vaihe 2	40	95	15 s
		57	1 min
Vaihe 3 (sulamispiste)	1	95	15 s
		60	1 min
		95	15 s
SOD	Toistot	Lämpötila °C	Aika
Vaihe 1	1	50	2 min
		95	10 min
Vaihe 2	40	95	15 s
		60	1 min
Vaihe 3 (sulamispiste)	1	95	15 s
		60	30 s
		95	15 s
p53, PDRP	Toistot	Lämpötila °C	Aika
Vaihe 1	1	94	1 min
Vaihe 2	40	95	10 s
		60	45 s
Vaihe 3 (sulamispiste)	1	95	15 s
		55	30 s
		95	15 s
GST	Toistot	Lämpötila °C	Aika
Vaihe 1	1	50	2 min
		95	10 min
Vaihe 2	40	95	15 s
		57	1 min
Vaihe 3 (sulamispiste)	1	95	15 s
		60	30 s
		95	15 s

Ajon jälkeen levy siirrettiin +4 asteeseen säilytykseen ja tulokset otettiin talteen tietokoneelta.

3.5 Tulosten tilastollinen käsittely

Saatuja tuloksia tuli käsitellä, jotta voitiin muun muassa arvioida menetelmän toimivuutta ja mittausten luotettavuutta. Jokaisesta geenistä oli siis mitattu kaikkien käsittelyjen ja aikapisteiden näytteiden mittausta yhdellä levyllä kolmella replikaatilla geeniä kohden. Tämä on havainnollistettu kuvassa 4.



Kuva 4. Jokaisella aikapisteellä oli kontrolli, matala pitoisuus ja korkea pitoisuus. Näistä jokaisesta ajettiin tutkittujen geenien alukkeilla qPCR-ajot.

Ct-arvoista laskettiin geenien suhteellinen aktiivisuus (eng. relative quantification, RQ). Jotta suhteellinen aktiivisuus saatiin laskettua, tehtiin standardisuorat jokaiselle levyille erikseen (liite 5). Jos levyillä olisi ollut samat standardit, olisi voitu käyttää samaa standardisuoraa kaikkien levyjen kohdalla, mutta liitteessä 5 käytetyssä esimerkissä on käytetty eri standardeja eri levyillä, joten saman suoran käyttö ei ollut mahdollista.

Suorasta laskettiin kulmakerroin ja sen avulla laskettiin tehokkuus (eng. efficiency, E) kaavan 1 mukaisesti.

$$E = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{slope}}\right)} \right) - 1 \quad (1)$$

Tehokkuuden, cDNA-konsentraation ja näytteen ja kontrollien keskiarvon Ct-arvojen erotuksen (ΔCt) avulla laskettiin geenin suhteellinen aktiivisuus kaavan 2 mukaisesti. cDNA-konsentraatiot jaettiin tuhannella tulosten selkeyttämiseksi.

$$RQ = \left(\frac{\Delta Ct}{E}\right) / (\text{näytteen cDNA:n konsentraatio}) \quad (2)$$

Katalaasi-geenin mittaustuloksista lasketut arvot ovat esimerkkinä liitteessä 6.

Kuoppalevyjen välisiä eroja voitiin tarkastella vain geenien GST, p53 ja PDRP kohdalla, koska vain niissä oli käytetty levyjen välillä samaa standardia. Oli neljä eri pitoista standardia, joista mitattiin jokaisella levyllä kolme replikaattia. Jokaisen eripitoisen standardin kaikki arvot kerättiin yhteen ja niistä laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin. Variaatiokerroin laskettiin kaavan 3 mukaisesti.

$$CV\% = \left(\frac{\text{keskihajonta}}{\text{keskiarvo}}\right) * 100 \quad (3)$$

Replikaattien välisiä eroja vertailtiin laskemalla jokaisen näytteen replikaateista keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

Käsittelyjen välisiä eroja tutkittiin vertaamalla ANOVAlla jokaisen aikapisteen kontrollien RQ-arvoja matalan ja korkean pitoisuuden altistuksen RQ-arvoihin. ANOVAlla saatujen p-arvojen perusteella pääteltiin, oliko käsittelyiden välillä eroja vai ei. Jos p-arvo oli korkeampi kuin alfa (0,05), käsittelyiden väliset arvot eivät eronneet merkitsevästi. Sen sijaan, jos p-arvo oli matalampi kuin alfa, arvot erosivat toisistaan merkitsevästi eli käsittelyiden välillä oli eroa.

4 Tulokset ja niiden tarkastelu

4.1 Koejärjestelyiden mittaukset

Veden dieselpitoisuutta seurattiin reaaliaikaisesti fluorometrisella Enviroflu-sensorilla (TRlos). Taulukossa 9 on esitetty pitoisuudet alussa ja kahden vuorokauden jälkeen. Simpukat suodattavat vettä, ja tämän vuoksi kahden vuorokauden jälkeen veden dieselpitoisuudet olivat pudonneet matalan ja korkean pitoisuuden käsittelyissä.

Taulukko 9. Veden dieselpitoisuus.

Veden dieselpitoisuus (µg/l)		
Käsittely	Alussa	2 vrk:n jälkeen
Matala	12	9
Korkea	30	20

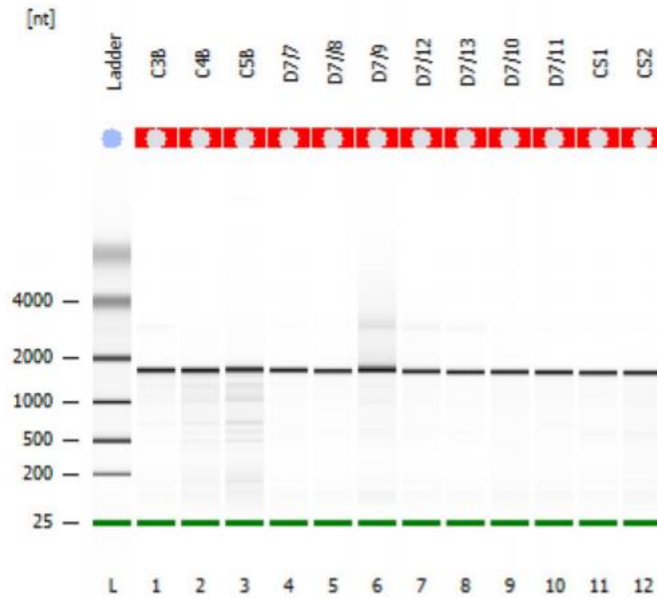
Akvaarioista valittiin sattumanvaraisesti simpukoita, joista poolattiin näyte, josta määritettiin PAH-pitoisuudet SYKE:n laboratoriossa. Taulukosta 10 voidaan havaita, kuinka simpukat ovat seitsemän päivän jälkeen keränneet PAH-yhdisteitä kudoksiinsa. Lisäksi huomataan, että simpukoiden ollessa altistuksen jälkeen viikon puhtaassa vedessä niiden kudoksien PAH-pitoisuudet olivat laskeneet.

Taulukko 10. Simpukoiden kudoksista mitatut dieselpitoisuudet.

Simpukoiden kudosten dieselpitoisuus (µg/kg)			
Käsittely	Päivä 1	Päivä 7	Recovery
Kontrolli	10	11	12
Matala	48	74	38
Korkea	92	105	62

4.2 RNA-eristyksen onnistuminen

RNA-näytteistä osa analysoitiin bioanalysaattorilla toisessa laboratoriossa. Laitteella varmistettiin, että käytetty RNA-eristysmenetelmä oli toiminut asianmukaisesti. Odotusten mukaisesti näytteistä saatiin esille kaksi eri kokoista vyöhykettä (kuva 4).



Kuva 5. RNA-näytteiden analysointi. Ylimmällä rivillä näytetunnukset, alimmalla näytteiden lukumäärä ja vasemmalla kokoasteikko (eng. ladder). Jokaisesta RNA-näytteestä on erottunut 2 vyöhykettä.

Liitteestä 7 nähdään erottuneiden vyöhykkeiden kuvaajat. Suuremman nukleotidivyöhykkeen piikki on korkea. Pienemmän nukleotidivyöhykkeen piikki puolestaan on hyvin pieni. Simpukoille on tyypillistä, että vain yksi piikki erottuu selkeästi. Joidenkin näytteiden kohdalla on jonkin verran taustakohinaa.

Liitteessä 8 olevista kuvaajista nähdään nukleotidien kokoasteikon ja näytteiden kuvaajat. Lisäksi kuvaajien alapuolella on bioanalysaattorin mittaamat konsentraatiot. Näytteet oli laimennettu suhteessa 1:10. Lopulliset bioanalysaattorilla mitatut konsentraatiot ja Qubit-laitteella mitatut konsentraatiot ovat taulukossa 11.

Taulukko 11.

Näyte	Bioanalysaattori (ng/ μ l)	Qubit (ng/ μ l)
C3B	4490	3000
C4B	2720	1464
C5B	1240	936
D7/7	2230	953,5
D7/8	3480	1450
D7/9	3470	1550
D7/10	4130	1300
D7/11	4060	1350
CS1	3180	1000
CS2	3760	1300

Bioanalysaattorilla mitatut konsentraatiot olivat huomattavasti korkeampia kuin Qubit-laitteella mitatut. Verrattaessa mittaustuloksia toisiinsa huomataan, että konsentraatiot kuitenkin kasvavat suhteessa toisiinsa. Tässä työssä oli kokoaikaisessa käytössä Qubit-laitte, joten sen antamia pitoisuuksia on käytetty käsiteltäessä tuloksia.

4.3 Kuoppalevyjen väliset erot

Taulukossa 12 on esitetty vertailtujen geenien lasketut variaatiokerroimet. Kunkin standardin Ct-arvoista laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin (liite 9). Jokaisen kohdalla variaatiokerroin jäi reilusti alle viiden prosentin, mikä kertoo siitä, että kuoppalevyjen väliset erot eivät ole suuret.

Taulukko 12. Mitattujen standardien väliset erot levyittäin.

Levyjen keskiarvojen erot					
GST	Cv	p53	Cv	PDRP	Cv
S 1	3,1	S 1	2,9	S 1	1,7
S 1:2	2,0	S 1:2	4,3	S 1:2	3,7
S 1:5	2,5	S 1:5	2,6	S 1:5	2,9
S 1:10	1,8	S 1:10	3,8	S 1:10	3,0

4.4 Replikaattien väliset erot

Eri geenien mitattujen Ct-arvojen replikaateista laskettiin keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet. Lasketut variaatiokertoimet löytyvät taulukoista 13-18.

Taulukko 13. Katalaasin variaatiokertoimet

CAT									alle 1
									yli 1
Päivä 1			Päivä 7			RE			
Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	
-	2,5	1,6	1,1	1,0	2,9	<1	1,3	<1	
<1	4,7	1,6	1,1	<1	1,7	<1	2,0	<1	
<1	<1	1,1	<1	1,2	<1	1,5	<1	1,6	
<1	<1	1,0	<1	2,2	<1	4,1	1,4	1,2	
<1	2,1	1,6	2,7	1,2	1,9	<1	2,9	<1	
<1	1,1	1,3	<1	1,2	1,3	<1	1,7	3,0	

Taulukko 14. Major Vault -proteiinin variaatiokertoimet

MVP									alle 1
									yli 1
Päivä 1			Päivä 7			RE			
Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	
1,0	1,3	<1	<1	<1	1,9	<1	1,9	<1	
<1	1,6	<1	<1	1,2	1,5	<1	<1	1,1	
2,1	1,2	2,3	<1	2,4	1,0	1,0	<1	<1	
2,1	<1	<1	<1	1,2	<1	<1	<1	<1	
<1	1,6	<1	<1	1,7	<1	<1	<1	2,9	
1,6	2,0	<1	<1	<1	1,0	1,1	<1	<1	

Taulukko 15. Superoksididismutaasin variaatiokertoimet

SOD									alle 1
									yli 1
Päivä 1			Päivä 7			RE			yli 3
Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	
<1	2,9	<1	<1	<1	3,3	<1	2,5	<1	
<1	1,0	<1	<1	<1	2,4	<1	2,3	2,1	
4,5	<1	2,3	3,1	2,2	<1	2,9	<1	4,8	
1,1	<1	1,4	1,0	2,3	<1	1,9	<1	2,0	
2,0	4,4	<1	<1	1,8	1,8	<1	1,6	<1	
<1	<1	1,1	<1	<1	1,4	<1	1,8	<1	

Taulukko 16. Glutationi S-transferaasin variaatiokertoimet

GST									alle 1
									yli 1
Päivä 1			Päivä 7			RE			yli 3
Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	
1,4	1,3	1,5	<1	2,5	<1	1,0	<1	2,0	
<1	1,2	1,3	1,4	2,0	2,0	<1	<1	1,7	
<1	<1	1,7	1,4	3,2	3,6	3,6	1,8	<1	
2,3	1,8	2,1	1,0	3,0	4,6	1,0	1,2	<1	
2,7	3,6	1,0	1,6	3,2	1,8	<1	2,5	<1	
3,8	2,0	<1	2,6	<1	<1	<1	1,1	2,5	

Taulukko 17. Fosfoproteiinin variaatiokertoimet

p53									alle 1
									yli 1
Päivä 1			Päivä 7			RE			yli 3
Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	
<1	1,1	<1	<1	<1	1,0	<1	1,7	<1	
1,0	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	
<1	<1	<1	<1	1,5	<1	<1	1,1	2,5	
<1	<1	<1	2,3	1,0	<1	1,8	2,7	<1	
<1	1,1	<1	<1	1,4	<1	<1	1,1	<1	
<1	1,0	<1	<1	2,2	<1	<1	1,0	<1	

Taulukko 18. Pleiotrooppisen lääkeresistenssiproteiinin variaatiokertoimet

PDRP									alle 1
									yli 1
Päivä 1			Päivä 7			RE			yli 3
Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	Kontrolli	Matala	Korkea	
<1	<1	<1	<1	<1	<1	1,0	<1	<1	
1,3	<1	1,0	<1	1,4	<1	<1	1,1	<1	
<1	<1	<1	2,9	<1	<1	<1	1,6	1,2	
1,2	2,9	<1	1,6	1,0	<1	<1	1,2	<1	
1,0	<1	<1	3,1	<1	<1	<1	1,3	<1	
<1	<1	2,7	1,9	1,6	2,1	<1	<1	1,1	

Jokaisen geenin kohdalla variaatiokertoimet olivat alle viiden prosentin. Geenien p53 ja PDRP kohdalla suurin osa variaatiokertoimista jäivät alle kahden prosentin. Muiden geenien kohdalla on hieman enemmän yli kahden prosentin variaatiokertoimia.

4.5 Käsittelyiden väliset erot

Taulukossa 19 on esitetty ANOVAlla saadut p-arvot. Niiden perusteella on tutkittu käsittelyiden välisiä eroja. Tässä on verrattu eri aikapisteiden kontrolleja matalan ja korkean pitoisuuden altistuksiin. Päivän 1 cDNA-konsentraatiot olivat suuria, mikä vaikutti kyseisen päivän lopullisiin tuloksiin. Geenien CAT ja p53 kohdalla päivän 1 tuloksissa on eroa verrattuna kontrolliin, mutta eroa ei ole päivän 7 kohdalla. Tämä viittaa siihen, että erot johtuvat cDNA-konsentraatiosta eikä geeniaktiivisuuden muutoksesta kudoksessa. Geenien PDRP ja SOD tuloksissa päivän 7 kohdalla on tapahtunut muutosta. Mutta verrattaessa kontrolliin näytteitä, jotka ovat seitsemän päivän altistuksen jälkeen olleet viikon puhtaassa merivedessä, ei muutosta ole verrattaessa. Tämä antaisi ymmärtää, että geeniaktiivisuus on palautunut kontrollin tasolle.

Taulukko 19. ANOVAlla saadut p-arvot verrattaessa kontrolleja ja matalan ja korkean pitoisuuden altistuksiin.

Käsittelyjen väliset erot			
CAT	Päivä 1	Päivä 7	Recovery
Kontrolli vs matala	0,09	0,79	0,31
Kontrolli vs korkea	0,02	0,28	0,13
MVP	Päivä 1	Päivä 7	Recovery
Kontrolli vs matala	0,47	1,00	
Kontrolli vs korkea	0,73	0,26	
p53	Päivä 1	Päivä 7	Recovery
Kontrolli vs matala	0,30	0,69	0,56
Kontrolli vs korkea	0,00	0,79	0,27
PDRP	Päivä 1	Päivä 7	Recovery
Kontrolli vs matala	0,53	0,14	0,53
Kontrolli vs korkea	0,42	0,00	0,11
SOD	Päivä 1	Päivä 7	Recovery
Kontrolli vs matala	0,44	0,18	0,30
Kontrolli vs korkea	0,53	0,01	0,98

5 Johtopäätökset

Bioanalysointitulosten ja qPCR-analyysin onnistuneiden tulosten perusteella voidaan päätellä, että RNA-eristys oli onnistunut. Myös sellaiset näytteet toimivat, jotka olivat väärässä kohtaa työn toteutusta pois jäiltä sekä olivat oudon värisiä. Jatkossa on otettava huomioon, että mitattaessa pitoisuuksia eri menetelmillä, saadaan eri tuloksia. Näin ollen saman tutkimuksen tuloksia käsiteltäessä olisi syytä olla koko ajan sama konsentraatioiden mittaussuunnitelma. Onnistuneiden qPCR-tulosten perusteella voidaan todeta myös cDNA-synteesin onnistuneen.

Simpukat ovat luonnosta kerättyjä ja jokainen on oma yksilönsä, joten niiden välillä on varmasti eroja geeniaktiivisuuksia mitattaessa. Tämän vuoksi menetelmän luotettavuutta analysoitaessa simpukoiden välisiä tuloksia ei voitu vertailla keskenään. Levyjen välillä ei ollut suurta eroa. Variaatiokertoimet pysyvät tavoitteessa eli alle viiden prosentin. Tätä voisi vielä tutkia lisää muillakin analysoiduilla geneilla ja suuremmalla levymäärällä. Tässä työssä käytettiin laitetta, johon soveltuu vain 96-kuoppalevyt. Levyjen erojen välttämiseksi voisi käyttää laitetta, johon soveltuu 384-kuoppalevy, mutta saatujen tulosten perusteella kyseisestä näkökulmasta katsottuna sille ei ole tarvetta. Tavoitteiden mukaisesti replikaattien väliset variaatiokertoimet jäivät myös alle viiden prosentin.

Käsittelyiden väliset erot ilmenivät odotetusti. Kontrollien ja matalapitoisten käsittelyiden välillä ei ollut eroja geeniaktiivisuuksissa, mutta kontrollien ja korkeapitoisten käsittelyiden geeniaktiivisuuksien välillä oli eroja. Tämän perusteella voidaan epäillä, että korkeammassa pitoisuudessa simpukoiden stressivasteet nousevat ja tutkitut geenit aktivoituvat.

Tässä työssä haluttiin määrittää geeniaktiivisuuden suhteellinen ero kontrollisimpukoissa ja öljyaltistetuissa simpukoissa, mikä laskettiin standardisuoran avulla, jossa standardinäyte sisälsi kokeen kaikki näytteet. Geeniaktiivisuus voidaan laskea myös muilla tavoilla, joista erillisen "housekeeping"-geenin (esimerkiksi 18S-geeni), jonka aktiivisuus ei todennäköisesti muutu altistuksesta huolimatta, määrittäminen ja tulosten suhteuttaminen siihen olisi myös soveltunut tähän työhön [10]. Tulokset viittaavat siihen, että dieselaltistus

aiheuttaa muutoksen simpukoiden geenien aktiivisuuteen. Tässä työssä jokaisessa käsittelyssä jokaisen aikapisteen kohdalla on käytetty kuutta simpukkaa. Merkitsevän eron esille saamiseksi voisi analysoida jokaisesta käsittelystä ja aikapisteestä kuusi simpukkaa lisää.

Tämä työ on luonut hyvän pohjan jatkaa tutkimuksia tämän aiheen parissa. Koska tuloksia saatiin, voidaan jatkaa tutkimalla työssä analysoituja genejä lisää ja analysoimalla muidenkin geenien aktiivisuuksia. Katalaasin ja superoksididismutaasin geenitason tutkimuksia tullaan vertaamaan myös simpukoista mitattuihin entsyymiaktiivisuustuloksiin. Näin voidaan tarkastella, tukevatko tulokset toisiaan.

Lähteet

- 1 Raateoja Mika; Myrberg Kai; Flinkman Juha & Vainio Jouni. 2008. KOTIMERI: Itämeri ympärillämme. Helsinki: Edita.
- 2 Regoli, Francesco; Giuliani Maria Elisa. Helmikuu 2014. Marine Environmental Research, Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. Verkkoaineisto. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113613001219>>. Luettu 18.2.2019.
- 3 Merenkulku Itämerellä. Verkkoaineisto. WWF. <<https://wwf.fi/alueet/itameri/merenkulku>>. Luettu 8.1.2019.
- 4 Rousi Heta & Kankaanpää Harri. 2012. Itämerellä tapahtuvien öljyvahinkojen ekologiset seuraukset. Toimintasuunnitelma. Helsinki: Edita.
- 5 Marine traffic. Verkkoaineisto. <<https://www.marinetraffic.com/en/ais/home/centerx:18.8/centery:58.7/zoom:5>>. Poimittu 8.1.2019.
- 6 HELCOM. State of the Baltic Sea- Second HELCOM holistic assessment 2011-2016. Verkkoaineisto. <<http://www.helcom.fi/Lists/Publications/BSEP155.pdf>>. Luettu 10.10.2018.
- 7 Turja Raisa. 2015. Biological Effects of Contaminants in Mussels (*Mytilus trossulus*) Transplanted in Northern Baltic Sea Coastal Areas. Väitöskirja.
- 8 Gupta Ramesh C. 2014. Biomarkers in toxicology. Oxford, Elsevier's Science & Technology Rights Department.
- 9 Catalase. Verkkodokumentti. <<http://pdb101.rcsb.org/motm/57>>. Luettu 14.10.2018.
- 10 Diaz De Cerio Arruabarrena Oihane. 2012. Transcriptomic tools and gene expression profiles of toxic chemical exposure in aquatic pollution sentinel organisms. Väitöskirja.

Näytetiedot

Dieselkokeen näytetiedot (aikapiste, käsittely, kudos, näytteen tunnus).

Päivä 1			Päivä 7			Recovery		
Käsittely	Kudos	Näyte	Käsittely	Kudos	Näyte	Käsittely	Kudos	Näyte
Kontrolli	DG 1	D1C1	Kontrolli	DG 1	C1B	Kontrolli	DG 1	RC1B
Kontrolli	DG 2	D1C2	Kontrolli	DG 2	C2B	Kontrolli	DG 2	RC2B
Kontrolli	DG 3	D1C3	Kontrolli	DG 3	C3B	Kontrolli	DG 3	RC3B
Kontrolli	DG 4	D1C4	Kontrolli	DG 4	C4B	Kontrolli	DG 4	RC4B
Kontrolli	DG 5	D1C5	Kontrolli	DG 5	C5B	Kontrolli	DG 5	RC5B
Kontrolli	LMS2	D1CLMS	Kontrolli	DG 6	C6B	Kontrolli	DG 6	RC6B
Matala	DG 1	D1L1	Matala	DG 1	L1B	Matala	DG 1	RL1B
Matala	DG 2	D1L2	Matala	DG 2	L2B	Matala	DG 2	RL2B
Matala	DG 3	D1L3	Matala	DG 3	L3B	Matala	DG 3	RL3B
Matala	DG 4	D1L4	Matala	DG 4	L4B	Matala	DG 4	RL4B
Matala	DG 5	D1L5	Matala	DG 5	L5B	Matala	DG 5	RL5B
Matala	LMS4	D1LLMS	Matala	DG 6	L6B	Matala	DG 6	RL6B
Korkea	DG 1	D1H1	Korkea	DG 1	H1B	Korkea	DG 1	RH1B
Korkea	DG 2	D1H2	Korkea	DG 2	H2B	Korkea	DG 2	RH2B
Korkea	DG 3	D1H3	Korkea	DG 3	H3B	Korkea	DG 3	RH3B
Korkea	DG 4	D1H4	Korkea	DG 4	H4B	Korkea	DG 4	RH4B
Korkea	DG 5	D1H5	Korkea	DG 5	H5B	Korkea	DG 5	RH5B
Korkea	LMS6	D1HLMS	Korkea	DG 6	H6B	Korkea	DG 6	RH6B

Työssä käytetyt laitteet

Taulukossa kuvattu työssä käytetyt laitteet (käyttötarkoitus, valmistaja ja sarjanumero).

LAITTEET			
RNA-eristys			
Laitteen nimi	Käyttö	Valmistaja	Sarjanumero
FAST PREP FP120	Näytteiden homogenisointi	Savant Instruments	FP120-1B060289-4D
MilliQ	Veden puhdistus	Merck Millipore	F3DA70467C
Block heater	Näytteiden lämmitys	Stuart Scientific	R000100279
Qubit			
Qubit fluorometer	RNA- ja DNA-pitoisuuksien mittaaminen	Turner Biosystems	45250-155
cDNA-synteesi			
PTC-200 Peltier Thermal Cyclers	Inkubointi	MJ Research	AL 058602
qPCR			
7300 Real Time PCR System	DNA:n reaaliaikainen monitorointi	AB Applied Biosystems	273 001 443

Työssä käytetyt välineet, kitit ja reagenssit

Taulukossa kuvattu työssä käytetyt välineet, kitit ja reagenssit (käyttötarkoitus, valmistaja ja tuotenumero).

RNA-eristys			
Tuotteen nimi	Käyttö	Valmistaja	Tuotenumero
Suorat, korkilliset putket	Lyysaus, RNA-eristys	SARSTEDT AG & CO	72.694.406
Rnase-Free 1.5 mL Microfuge Tubes	RNA-eristys	Ambion	AM12400
Disposable Scalpels	Näytepalan käsittely	Swann-Morton	5010
Lasihelmet, Glass beads (1,0 mm)	Lyysaus	BioSpec Products	11079110
TRizol Reagent	Lyysaus, RNA-eristys	Ambion	15596018
Kloroformi	RNA-eristys	Sigma-Aldrich	650471
Isopropanoli	RNA-eristys	J.T. BAKER	8175
RNAasi-vapaa vesi	RNA:n laimennus	MP Biomedicals	821739
ETAX Aa	RNA:n puhdistus	Altia	12110124
Qubit (RNA ja ssDNA)			
Qubit RNA Assay Kit	RNA:n pitoisuuden määrittäminen	Thermo Fisher Scientific	Q32855
Qubit ssDNA Assay Kit	yksijuosteisen DNA:n pitoisuuden määrittäminen	Thermo Fisher Scientific	Q10212
Qubit assay tubes	Qubit-mittaus	Thermo Fisher Scientific	Q32856
cDNA-synteesi			
SuperScript ® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	cDNA:n syntetisointi	Life technologies	18080-051
0,2 mL 8-Strip PCR Tube individually Attached Flat Caps	cDNA:n syntetisointi	Star LAB	A1402-3700
Rnase-Free 1.5 mL Microfuge Tubes	cDNA-synteesin Mix	Ambion	AM12400
qPCR			
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix	qPCR-ajo	Thermo Fisher Scientific	11733-046
Levyt	qPCR-ajo	4titude	ITOIOG
Kalvot	qPCR-ajo	Sigma-Aldrich	Z734438-100EA
Rnase-Free 1.5 mL Microfuge Tubes	qPCR Mix ja primer Mix	Ambion	AM12400

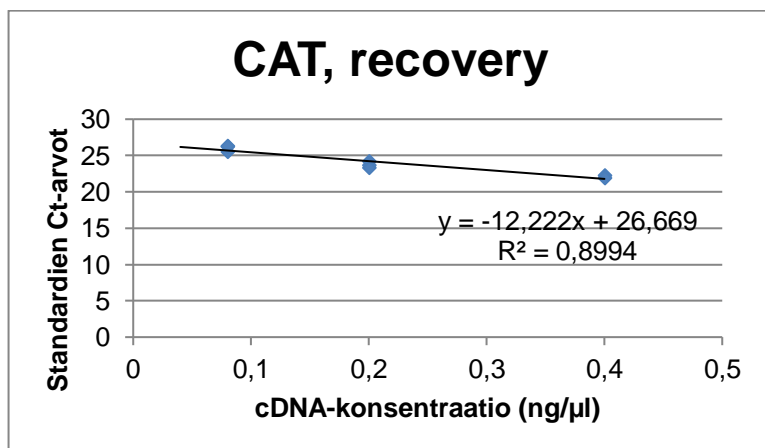
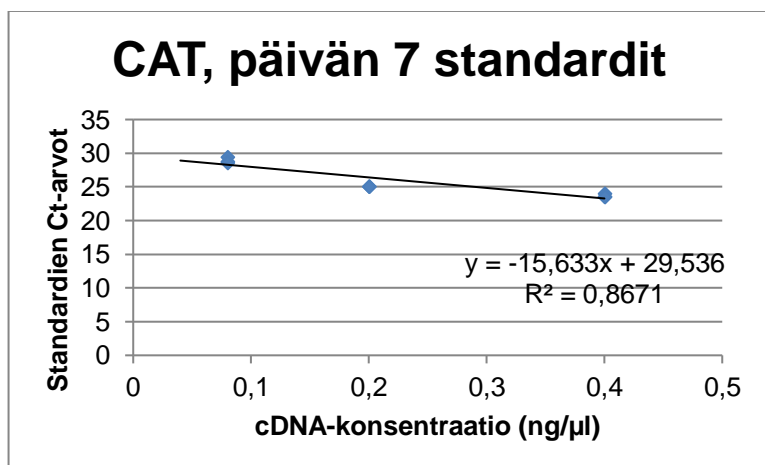
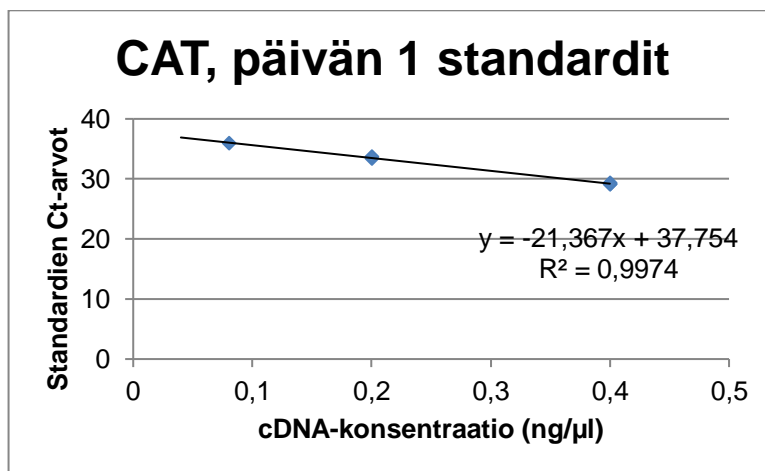
Pipetointikartta

Kolmeen ensimmäiseen kaivoon pipetoitiin nollanäytteet. H-riville pipetoitiin standardit. Loput kaivot voitiin käyttää näytteiden analysointiin. Kaikista tehtiin kolme replikaattia.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC	D1C1	D1C1	D1C1	D1C2	D1C2	D1C2	D1C3	D1C3	D1C3
B	D1C4	D1C4	D1C4	D1C5	D1C5	D1C5	D1CLMS	D1CLMS	D1CLMS	D1L1	D1L1	D1L1
C	D1L2	D1L2	D1L2	D1L3	D1L3	D1L3	D1L4	D1L4	D1L4	D1L5	D1L5	D1L5
D	D1LLMS	D1LLMS	D1LLMS	D1H1	D1H1	D1H1	D1H2	D1H2	D1H2	D1H3	D1H3	D1H3
E	D1H4	D1H4	D1H4	D1H5	D1H5	D1H5	D1HLMS	D1HLMS	D1HLMS			
F												
G												
H	S 1	S 1	S 1	S 1:2	S 1:2	S 1:2	S 1:5	S 1:5	S 1:5	S 1:10	S 1:10	S 1:10

Katalaasin standardisuorat

Standardeista tehdyt suorat. cDNA-konsentraatio on jaettu tuhannella selkeyttämään tuloksia.



Mitattujen näytteiden replikaattien keskiarvot, cDNA-pitoisuudet, näytteiden ja standardien cDNA-konsentraatioiden erotukset ja Ct-keskiarvojen suhteelliset aktiivisuudet

Näytteistä mitattiin cDNA-konsentraatiot ja kolmen replikaatin Ct-arvot. Ct-arvoista laskettiin replikaattien keskiarvot ja niistä laskettiin tehokkuus, näytteen ja standardin välinen erotus ja näytteen suhteellinen aktiivisuus. Tässä liitteessä esitetty vain katalaasista saadut arvot.

Päivä 1	Kontrolli		Kulmakerroin: 0,9974		
Näyte	Ct-keskiarvo	Tehokkuus, E	cDNA-pitoisuus (ng/μl)	ΔCt	Suhteellinen aktiivisuus, RQ
D1C1	37,3	0,1	303	10,7	0,5
D1C2	27,2	1,1	404	-0,9	2,7
D1C3	24,5	1,5	410	-2,0	3,6
D1C4	31,0	0,7	430	2,9	1,7
D1C5	25,3	1,4	331	-2,9	4,1
D1CLMS	29,1	0,9	390	0,9	2,3

Päivä 1	Matala pitoisuus		Kulmakerroin: 0,9974		
Näyte	Ct-keskiarvo	Tehokkuus, E	cDNA-pitoisuus (ng/μl)	ΔCt	Suhteellinen aktiivisuus, RQ
D1L1	31,2	0,7	241	3,1	3,0
D1L2	29,6	0,9	409	1,4	2,1
D1L3	29,1	0,9	400	0,9	2,3
D1L4	27,1	1,1	361	-1,1	3,1
D1L5	29,7	0,8	309	1,5	2,7
D1LLMS	24,5	0,8	345	1,2	2,4

Päivä 1	Korkea pitoisuus		Kulmakerroin: 0,9974		
Näyte	Ct-keskiarvo	Tehokkuus, E	cDNA-pitoisuus (ng/μl)	ΔCt	Suhteellinen aktiivisuus, RQ
D1H1	27,6	1,1	322	-0,6	3,3
D1H2	30,6	0,8	452	2,4	1,7
D1H3	29,1	0,9	346	0,9	2,6
D1H4	29,1	0,9	452	1,0	2,0
D1H5	33,3	0,6	300	5,1	1,9
D1HLMS	25,3	0,7	401	2,0	1,9

Päivä 7	Kontrolli		Kulmakerroin: 0,8671		
Näyte	Ct-keskiarvo	Tehokkuus, E	cDNA-pitoisuus (ng/μl)	ΔCt	Suhteellinen aktiivisuus, RQ
C1B	22,6	1,1	175	-0,7	6,3
C2B	23,0	1,0	184	-0,3	5,7
C3B	22,0	1,2	166	-1,3	7,3
C4B	24,2	0,9	279	0,9	3,2
C5B	24,8	0,8	175	1,5	4,6
C6B	23,2	1,0	163	-0,1	6,2

Päivä 7	Matala pitoisuus		Kulmakerroin: 0,8671		
Näyte	Ct-keskiarvo	Tehokkuus, E	cDNA-pitoisuus (ng/μl)	ΔCt	Suhteellinen aktiivisuus, RQ
L1B	22,0	1,2	132	-1,4	9,3
L2B	21,2	1,4	192	-2,2	7,2
L3B	23,6	1,0	177	0,2	5,5
L4B	22,9	1,1	178	-0,4	6,0
L5B	24,8	0,8	255	1,5	3,1
L6B	24,2	0,9	219	0,9	4,0

Päivä 7	Korkea pitoisuus		Kulmakerroin: 0,8671		
Näyte	Ct-keskiarvo	Tehokkuus, E	cDNA-pitoisuus (ng/μl)	ΔCt	Suhteellinen aktiivisuus, RQ
H1B	22,2	1,2	177	-1,1	6,6
H2B	22,5	1,1	285	-0,9	4,0
H3B	24,0	0,9	124	0,7	7,3
H4B	23,4	1,0	155	0,1	6,3
H5B	22,6	1,1	170	-0,7	6,5
H6B	21,5	1,3	160	-1,8	8,1

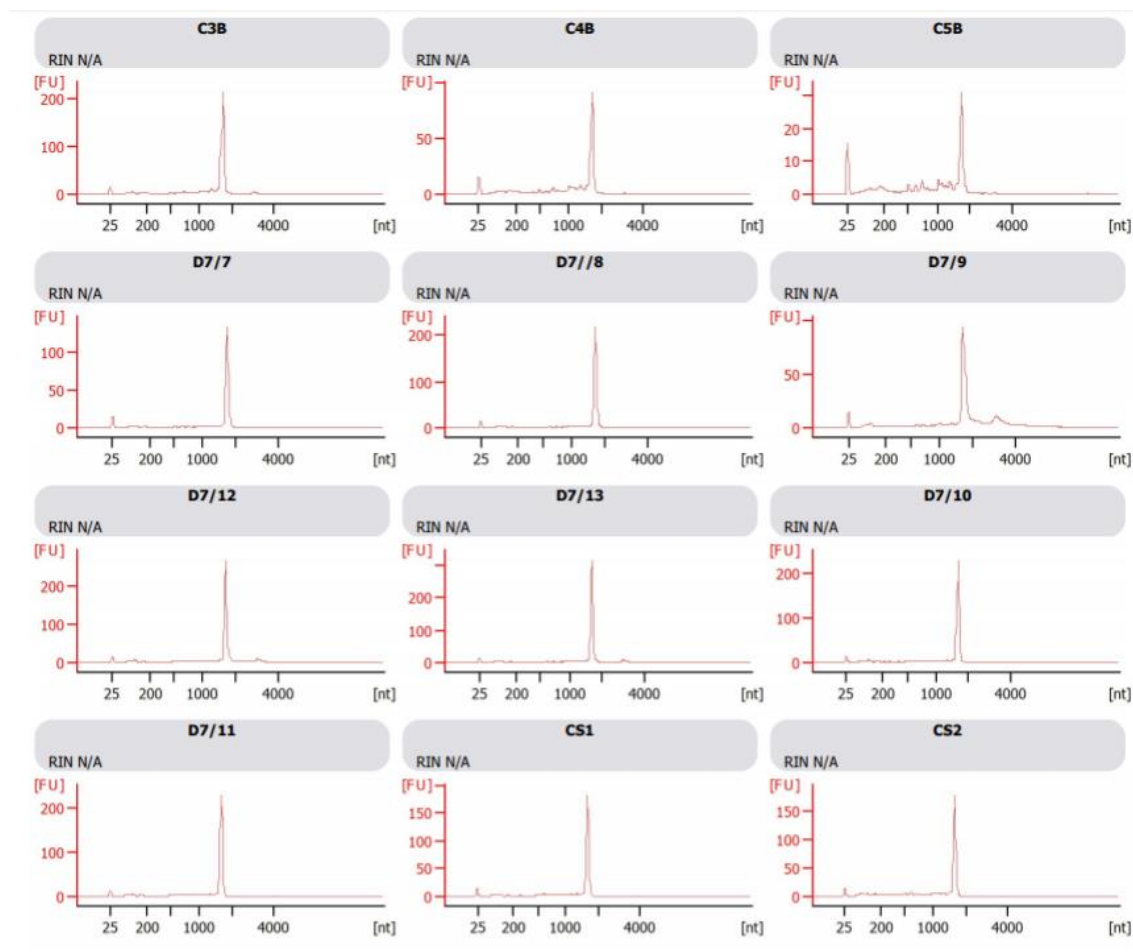
Recovery	Kontrolli		Kulmakerroin: 0,8994		
Näyte	Ct-keskiarvo	Tehokkuus, E	cDNA-pitoisuus (ng/μl)	ΔCt	Suhteellinen aktiivisuus, RQ
RC1B	22,1	1,2	294	-1,2	4,2
RC2B	23,4	1,0	285	0,1	3,4
RC3B	23,4	1,0	290	0,1	3,4
RC4B	22,9	1,1	300	-0,4	3,6
RC5B	25,3	0,7	215	2,0	3,2
RC6B	22,6	1,1	558	-0,7	2,0

Recovery	Matala pitoisuus		Kulmakerroin: 0,8994		
Näyte	Ct-keskiarvo	Tehokkuus, E	cDNA-pitoisuus (ng/μl)	ΔCt	Suhteellinen aktiivisuus, RQ
RL1B	21,9	1,3	223	-1,3	5,8
RL2B	22,6	1,1	245	-0,7	4,6
RL3B	24,1	0,9	248	0,8	3,4
RL4B	23,3	1,0	353	0,0	2,8
RL5B	23,4	1,0	224	0,2	4,3
RL6B	24,1	0,9	258	0,8	3,3

Recovery	Korkea pitoisuus		Kulmakerroin: 0,8994		
Näyte	Ct-keskiarvo	Tehokkuus, E	cDNA-pitoisuus (ng/μl)	ΔCt	Suhteellinen aktiivisuus, RQ
RH1B	22,0	1,3	292	-1,3	4,3
RH2B	23,2	1,0	289	-0,1	3,5
RH3B	23,2	1,0	311	-0,1	3,3
RH4B	23,2	1,0	242	0,0	4,2
RH5B	23,1	1,0	342	-0,1	3,0
RH6B	22,5	1,2	196	-0,8	5,9

Bioanalysaattorin RNA:n laadun analysointi

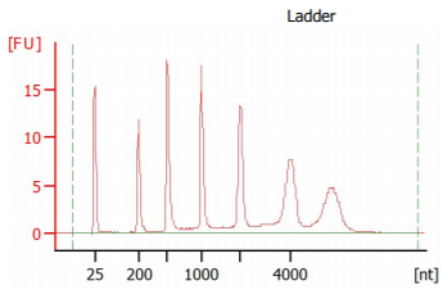
Kuvaajat bioanalysaattorin analysoimista RNA-näytteistä.



Bioanalyssaattorin kuvaajat

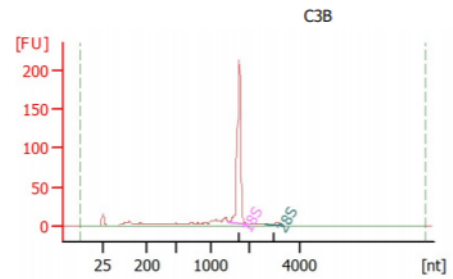
Kuvaajat bioanalyssaattorin analysoimista RNA-näytteistä.

Electropherogram Summary



Overall Results for Ladder

RNA Area: 165,8
 RNA Concentration: 150 ng/µl
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: All Other Samples

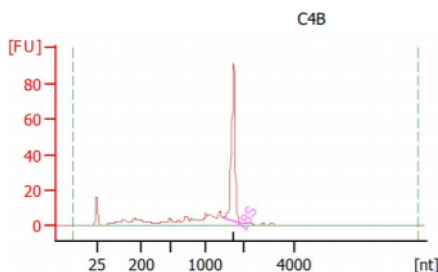


Overall Results for sample 1 : **C3B**

RNA Area: 495,8
 RNA Concentration: 449 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 1 : **C3B**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 477	1 983	289,2	58,3
28S	2 615	3 366	6,6	1,3

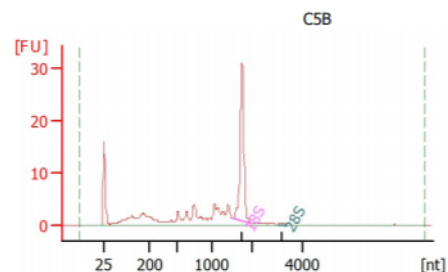


Overall Results for sample 2 : **C4B**

RNA Area: 300,9
 RNA Concentration: 272 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 2 : **C4B**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 482	1 950	127,1	42,2



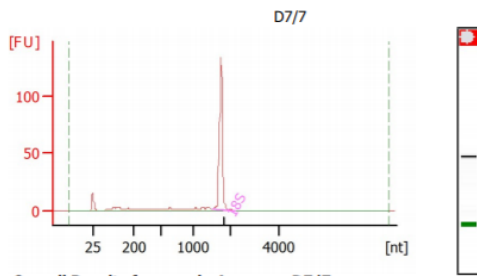
Overall Results for sample 3 : **C5B**

RNA Area: 137,2
 RNA Concentration: 124 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 3 : **C5B**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 503	2 021	45,1	32,9
28S	2 999	3 371	0,2	0,1



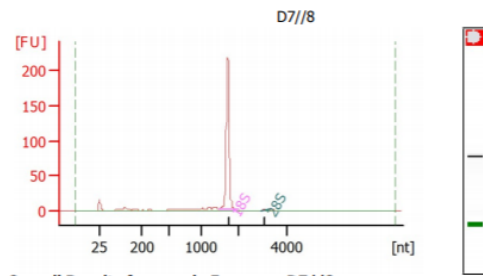


Overall Results for sample 4 : D7/7

RNA Area: 246,6
 RNA Concentration: 223 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 4 : D7/7

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 491	2 175	163,5	66,3

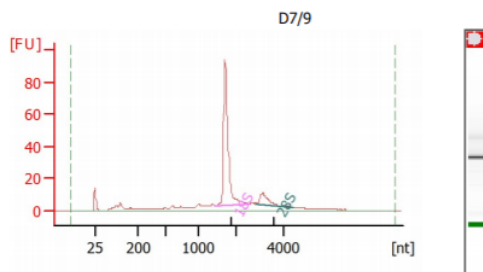


Overall Results for sample 5 : D7/8

RNA Area: 385,0
 RNA Concentration: 348 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 5 : D7/8

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 460	2 013	262,3	68,1
28S	2 967	3 280	0,8	0,2

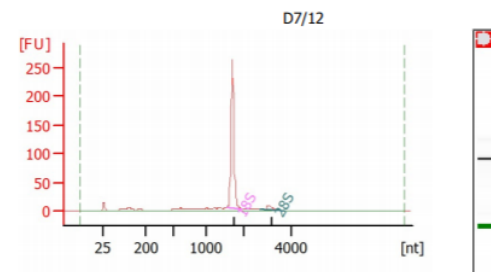


Overall Results for sample 6 : D7/9

RNA Area: 383,3
 RNA Concentration: 347 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,1
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 6 : D7/9

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 458	2 599	161,0	42,0
28S	2 845	4 402	18,4	4,8

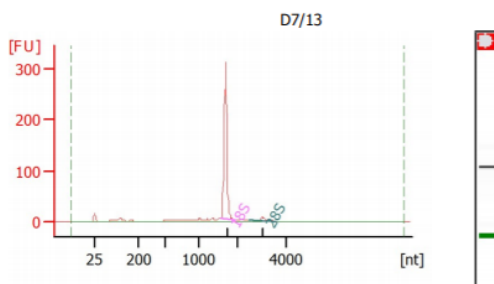


Overall Results for sample 7 : D7/12

RNA Area: 558,0
 RNA Concentration: 505 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,1
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 7 : D7/12

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 568	1 971	305,4	54,7
28S	2 668	3 683	16,3	2,9

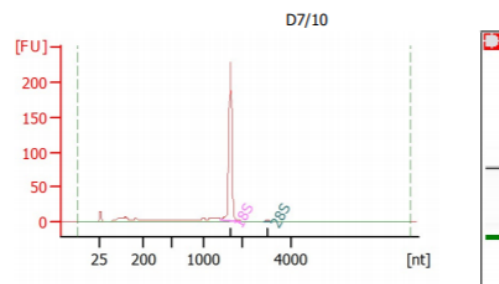


Overall Results for sample 8 : D7/13

RNA Area: 549,9
 RNA Concentration: 498 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 8 : D7/13

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 556	1 943	346,5	63,0
28S	2 476	3 550	14,3	2,6

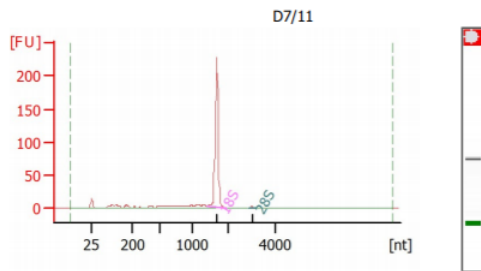


Overall Results for sample 9 : D7/10

RNA Area: 456,6
 RNA Concentration: 413 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 9 : D7/10

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 436	1 976	275,6	60,4
28S	2 905	3 210	1,2	0,3

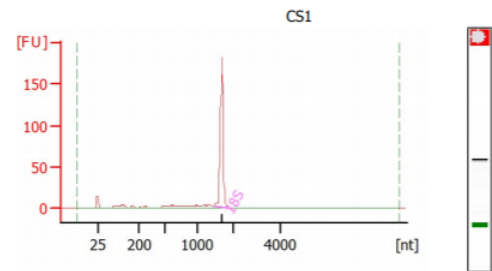


Overall Results for sample 10 : D7/11

RNA Area: 448,6
 RNA Concentration: 406 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 10 : D7/11

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 432	1 948	279,4	62,3
28S	2 865	3 199	1,3	0,3

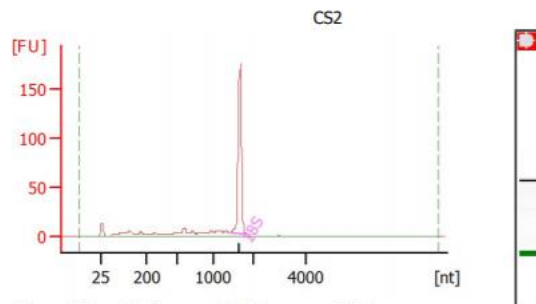


Overall Results for sample 11 : CS1

RNA Area: 351,6
 RNA Concentration: 318 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 11 : CS1

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 428	1 937	220,4	62,7



Overall Results for sample 12 : CS2

RNA Area: 415,4
 RNA Concentration: 376 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0,0
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 12 : CS2

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1 417	1 909	214,0	51,5

PDRP									
S 1	Ct-arvot	26,7	26,7	27,0	26,9	26,5	25,1	26,0	26,9
	Keskiarvo	26,5							
	Keskihajonta	0,7							
	Variaatiokerroin	2,5							

S 1:2	Ct-arvot	27,7	27,6	27,6	27,9	27,7	26,1	26,1	25,7
	Keskiarvo	27,0							
	Keskihajonta	0,9							
	Variaatiokerroin	3,4							

S 1:5	Ct-arvot	28,3	27,5	28,4	28,8	29,1	26,8	27,4	27,2
	Keskiarvo	27,9							
	Keskihajonta	0,8							
	Variaatiokerroin	2,9							

S 1:10	Ct-arvot	29,5	28,9	30,2	31,0	30,8	29,3	29,2	28,8
	Keskiarvo	29,7							
	Keskihajonta	0,9							
	Variaatiokerroin	2,9							

p53							
S 1	Ct-arvot	22,68	22,87	22,38	22,29	21,64	21,41
	Keskiarvo	22,2					
	Keskihajonta	0,6					
	Variaatiokerroin	2,6					

S 1:2	Ct-arvot	25,13	23,45	23,2	23,06	22,18	22,42
	Keskiarvo	23,2					
	Keskihajonta	1,0					
	Variaatiokerroin	4,5					

S 1:5	Ct-arvot	24,7	24,8	24,4	24,6	23,3	23,8
	Keskiarvo	24,3					
	Keskihajonta	0,6					
	Variaatiokerroin	2,4					

S 1:10	Ct-arvot	25,6	25,5	26,3	25,8	24,4	24,0
	Keskiarvo	25,3					
	Keskihajonta	0,9					
	Variaatiokerroin	3,5					

