



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Noora Nenonen

Fluoresoivan kontrollin käsittelyn optimointi Novodiag-testin DNA-mikrosirulla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

2.12.2020

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Noora Nenonen Fluoresoivan kontrollin käsittelyn optimointi Novodiag-testin DNA-mikrosirulla 27 sivua 2.12.2020
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	tuotantoinsinööri Anna Wiklund lehtori Tiina Soininen
<p>Nopeaa, tehokasta ja helppokäyttöistä molekyyli diagnostiikkaa tarvitaan maailmassa koko ajan kasvavassa määrin. Vaihtoehtona hitaille soluviljelymenetelmille Mobidiag on kehittänyt Novodiag-tuoteperheen, jonka avulla terveydenhuollon ammattilaiset voivat antaa diagnoosin potilaalle vain murto-osassa siitä ajasta, joka kuuluu perinteisiin menetelmiin. Tuoteperheen testit kattavat erilaisia bakteeri-, lois- ja virustartuntojen, sekä antibioottiresistenttien mikrobien tunnistusta.</p> <p>Novodiag-testit perustuvat nukleiinihappoanalytiikkaan. Kaikissa testeissä hyödynnetään qPCR-menetelmää ja osassa tunnistus tapahtuu DNA-mikrosiruissa hybridisaatioreaktion kautta. Hybridisaatioreaktio perustuu DNA-mikrosirussa olevien kohdemolekyylien sekä PCR-reaktiossa monistuneiden koettimien väliseen vuorovaikutukseen, jossa komplementaariset DNA- tai RNA-juosteet yhdistyvät. Leimatut koettimet voidaan onnistuneen hybridisaatioreaktion jälkeen havaita detektorilla ja tehdä tunnistus näytteessä olevista mikrobeista.</p> <p>Tämän työn aiheena oli keskittyä DNA-mikrosiruissa olevien fluoresoivien kontrollien optimointiin. Novodiag-testien mikrosiruilla käytetään kahta kontrollia: hybridisaatiokontrollia ja GRID-kontrollia. Näistä jälkimmäinen on valmiiksi leimattu kontrolli, jonka avulla rajataan testisirun kaksi array-aluetta ja ohjataan Novodiag-laite löytämään kohdemolekyylien spotit sirun pinnalta. GRID-kontrollin haasteena on ollut sen epätasainen intensiteetti kahden array-alueen välillä. Kontrollin liian korkea tai matala intensiteetti-arvo tai liiallinen puoliero intensiteeteissä voi aiheuttaa sen, että laite ei löydä kohdemolekyyliä eikä anna sen vuoksi oikeaa tulosta.</p> <p>Ongelman syyksi oli rajattu GRID-kontrollin huono sekoittuminen puskuriin ja sen seurauksena epätasainen jakautuminen <i>source platelle</i>, josta spotit printataan lasisiruille. Laimennokset tehtiin Tecan Freedom EVO -pipetointirobotilla, jolle luotiin kaksi uutta pipetointiohjelmaa GRID-kontrollin laimennoksia varten. Näillä testiohjelmissa valmistetuista <i>source plateista</i> tehtiin 40 testisirua. Lisäksi valmistettiin 20 vertailusirua. Sirut printattiin Bacterial GE+ -testin pohjalle ja ne analysoitiin Novodiag-laitteella ja Mobidiagin sisäisellä ohjelmistolla. Tuloksena todettiin, että ensimmäisen testiohjelman siruissa oli vielä nähtävissä sama ongelma kuin alkutilanteessa, mutta toinen testiohjelma antoi positiivisia tuloksia, eikä puoliero havaittu yhtä paljon. Näiden tulosten perusteella voidaan optimointia vielä jatkaa eteenpäin.</p>	
Avainsanat	Novodiag, DNA-mikrosirutekniikka, hybridisaatio, GRID-kontrolli

Author Title	Noora Nenonen Optimization of Handling Fluorescent Control Target on a Novodiag DNA Microarray Chip
Number of Pages Date	27 pages 2 December 2020
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Tiina Soininen, Senior Lecturer Anna Wiklund, Production Engineer
<p>Fast, efficient and user-friendly molecular diagnostics are increasingly needed in the world. As an alternative for slow cell culturing methods, Mobidiag has developed Novodiag product family which can give patients the needed diagnosis in a fraction of a time compared to old methods. Novodiag tests cover variety of different bacteria, parasite and viral infections and even antibiotic resistant microbes. Novodiag tests are based on nucleic acid analytics. All tests use the qPCR technique and in some of the tests, final identification occurs by hybridization reaction on micro array chips. In hybridization reaction, the targets placed on a micro array chip react with DNA or RNA probes that are in the sample liquid. Probes amplify in PCR reaction and they pair with their complementary DNA or RNA strand that is attached to the micro array chip. Probes contain a fluorescent tag which can be detected after successful hybridization reaction. Positive reaction indicates that the sample contains DNA or RNA of a microbe that is on the test's target panel.</p> <p>This thesis deals with optimizing fluorescent control spots on DNA microarray chips. The goal is to find a method that gives equal fluorescent control spot signals on the microarray chips. In Novodiag DNA microarray chips there are two different controls: hybridization control and GRID control. GRID control's purpose on the chip is to delimit two microarray fields and to guide Novodiag instrument finding targets on the chip. GRID control is the only target that contains fluorescent tag when it is printed to the chip. The challenge with GRID has been that it gives uneven intensity values between the two microarray fields. The intensity of the GRID should not be too low or high, nor should the difference between the two fields be too large, because it may lead to incorrect detection of targets.</p> <p>The cause of the problem was identified as deficient mixing of the GRID control with the buffer. As a result, the control is unevenly distributed to the source plates, from which the targets are printed on microarray chips. Dilution into the buffer is performed by Tecan Freedom EVO pipetting robot, for which two new pipetting scripts were created. These test scripts were used to make source plates, from which 40 microarray chips were printed. The microarray chips were analyzed with Novodiag instrument and with Mobidiag house software. As a result, first test script showed the same problem as before but with the second test script intensity values of the GRID control were a lot better on both microarray fields. Based on these results, the optimization can be further continued.</p>	
Keywords	Novodiag, microarray, hybridization, GRID control

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	DNA-mikrosirutekniikka	2
	2.1.1 Erilaiset sirumateriaalit	4
	2.1.2 DNA-mikrosirujen printtaus	4
	2.1.3 DNA-mikrosirujen analysointi	6
	2.2 Hybridisaatio	7
3	DNA-mikrosirut Novodiag-testeissä	8
	3.1 Novodiag-testikasetin toiminta	9
	3.2 Bacterial GE+	10
	3.3 GRID-kontrolli	11
4	Työn toteutus	13
	4.1 Tecan FreedomEVO -laitteen ohjelmointi	14
	4.2 DNA-mikrosirujen printtaus ja ajo Novodiag-laitteella	17
5	Tulokset	17
6	Loppupäätelmät	24
	Lähteet	27

Lyhenteet

BGE+	Bacterial GE+. Yksi Novodiag-tuoteperheen testeistä.
eNAT™	Guanidiini-tiosyanaatti-pohjainen puskuri, jota hyödynnetään mikrobiologisten näytteiden säilytyksessä.
ETEC	Enterotoksinen <i>Escherichia coli</i> -bakteeri
MeNPOC	<i>Methylnitropiperonyloxycarbonyl</i> . Metyylnitropiperonyloxykarbonyyli.
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> . Reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio
TE	Tris-EDTA-puskuri

1 Johdanto

Yhä kiihtyvässä määrin maailmassa on tarvetta nopeille ja helposti saavutettaville molekyyli diagnostiikan menetelmille. COVID-19-pandemian seurauksena on markkinoille tullut monia uusia kliiniseen diagnostiikkaan keskittyviä laitteita, joilla pyritään helpottamaan terveydenhuoltoa antamalla ripeitä tuloksia mahdollisille tartunnan saaneille potilaille. Mobidiag Oy, joka on vuonna 2000 perustettu suomalainen molekyyli diagnostiikan yritys, on kehittänyt tuotteita juuri tähän tarkoitukseen.

Novodiag on nopeaan analytiikkaan keskittynyt yksi Mobidiagin tuoteperheistä, johon kuuluu analysointi-instrumentti, ohjelmisto ja erilaisia mikrobi-infektioihin keskittyneitä testejä. Novodiag-testeillä analysoidaan nukleiinihappoja kliinisistä näytteistä hyödyntämällä qPCR-tekniikkaa (reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio) sekä DNA-mikrosiruja. Perinteinen menetelmä analysoida mikrobi-infektioita potilasnäytteistä on valmistaa näytteistä soluviljelmiä, minkä vuoksi diagnoosin saamisessa voi kestää useita päiviä. Sen lisäksi, että nämä menetelmät ovat aikaa vieviä, ne vaativat ammattimaista henkilökuntaa ja oikeanlaisia laboratoriotiloja ja -välineitä. Novodiag-tuoteperheen etuna on, että analysointilaitte on pieni, helpokäyttöinen ja nopea.

Novodiag-testeillä voidaan analysoida ruoansulatuselimistön infektioita, antibioottiresistenssejä bakteereja, loiseläimiä sekä uusimpana testinä COVID-19-virusta. Bacterial GE+ on Novodiag-instrumentille suunniteltu potilaan ulostenäytteestä suoritettava testi, jolla voidaan yhdellä kerralla analysoida yli 10 eri bakteeria. Useat näistä bakteereista ovat yleisiä turistiripulin aiheuttajia, ja tarkalla taudinaiheuttajan tunnistuksella voidaan hoitaa potilasta oikeilla mikrobilääkkeillä.

Monissa Novodiag-testeistä, kuten Bacterial GE+ -testissä, patogeenin tunnistus tapahtuu DNA-mikrosirun hybridisaatioreaktiossa. Kaikkien sirulla olevien kohdemolekyylien spotteja analysoidaan niiden antaman intensiteetin perusteella. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on helpottaa työskentelyä Novodiag-testien DNA-mikrosirujen tuotannon parissa. Työssä yritettiin luoda toimiva pipetointirobotin ohjelma mikrosiruissa olevalle fluoresoivalle GRID-kontrollille, sen sijaan, että tämä työvaihe suoritetaan käsityönä. Haasteena pipetointiohjelmassa on ollut kontrollin epätasainen jakautuminen siruille ja siitä johtuvat erot sirujen kahden eri array-alueen intensiteettiarvoissa. GRID-kontrollin

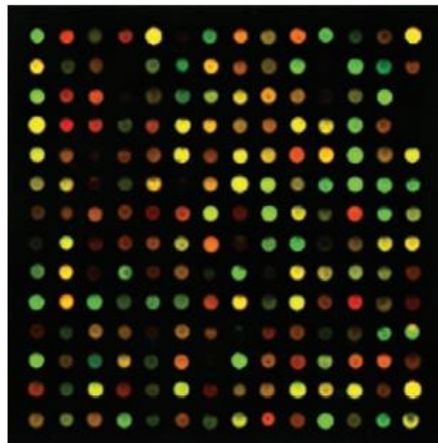
intensiteetillä on suuri merkitys, sillä sen avulla Novodiag-laite löytää kohdemolekyylit sirun pinnalta ja saattaa vaikuttaa spottien tunnistumiseen negatiiviseksi tai positiiviseksi. Tämän vuoksi on tärkeää, että GRID-kontrollin intensiteetti on optimaalisella tasolla kaikilla testikasettien DNA-mikrosiruilla.

2 DNA-mikrosirutekniikka

DNA-mikrosirutekniikka on geenien tutkimiseen kehitetty menetelmä, jonka avulla voidaan tunnistaa jopa koko ihmisen genomi yhdellä analyysikerralla. Tekniikka perustuu hybridisaatioreaktioon, jossa näytteessä olevat monistetut DNA- tai RNA-juosteet yhdistyvät sirun pinnalla olevien niille komplementaaristen juosteiden kanssa. Näytteessä oleva perimäainne on leimattu jollain fluoresoivalla aineella ja kun sirua kuvataan reaktion päätteeksi, hybridisoituneet juosteet sirun pinnalla loistavat kukin niille ominaisella intensiteetillä. DNA-mikrosirutekniikasta on monia sovelluksia biotieteiden alalla ja sitä voidaan hyödyntää tutkimustarkoituksessa niin ihmisten, kuin muidenkin organismien geenien kartoituksessa. Lääketieteessä on mikrosirutekniikasta myös paljon hyötyä, sillä yhdellä sirulla voidaan potilaan näytteestä tunnistaa useita eri bakteereita, viruksia tai loiseläimiä. Myös epäorgaanisia DNA-mikrosirutekniikan kaltaisia sovelluksia on kehitetty, mutta ne eivät täytä kaikkia samoja vaatimuksia, jotka on asetettu DNA-mikrosiruille. [1, s. 1–4.]

Geenien ekspressioon suunnatut DNA-mikrosirumenetelmät ovat kaikista yleisempiä tutkimusmaailmassa, mutta siruilla on myös monia muita käyttötarkoituksia. Esimerkkeinä genotyyppitys, kudosanalyysit ja proteiinien tutkimus. Lääketiede on jo varhaisessa vaiheessa ottanut DNA-mikrosirutekniikan käyttöön sairauksien kartoituksessa ja tekniikalla onkin paljon etuja verrattuna joihinkin muihin menetelmiin. Sairauksien syntyyn vaikuttavat aina monet tekijät yhdessä, kuten geeniperimä, ruokavalio ja ympäristö. Mikrosirutekniikan avulla pystytään löytämään kaikki sairaukselle altistavat tekijät samalla kertaa. Syöpäsairaudet ovat ylivoimaisesti eniten tutkittu aihe, mutta myös monien muiden sairauksien syntymekanismia on tutkittu DNA-mikrosirutekniikan avulla. Kun sairauden puhkeamiseen vaikuttavat tekijät tunnetaan paremmin molekyyllitasolla, voidaan valmistaa paremmin kohdennettuja ja toimivampia lääkkeitä. [1, 19–21.]

DNA-mikrosirutekniikassa yleensä lasisirun pinnalle printataan haluttua yksijuosteista DNA:ta tai RNA:ta. Lääketieteellisen diagnostiikan sovelluksissa kohdemolekyylit ovat usein lyhyitä, muutaman nukleotidin mittaisia DNA- tai RNA-pätkiä, eli oligonukleotidejä ja yleensä synteettisesti valmistettuja. Jotta DNA-mikrosiruja pystytään analysoimaan luotettavasti hybridisaatioreaktion jälkeen, kohdemolekyylit tulee printata sirun pinnalle kontrolloidusti ja suunnitelmallisesti. Printatut pisarat ovat mikroskooppisen pieniä, ja niiden järjestys ja paikka sirun pinnalla tulee määrittää tarkasti etukäteen. Analysointivaiheessa on tietenkin tärkeää tietää, missä yksittäinen kohdemolekyyli sijaitsee, ja siksi jokaiselle kohdemolekyyllille annetaan oma ”osoitteensa” sirulla. Kohdemolekyylit printataan sirun pinnalle suorissa riveissä ja riittävän etäällä toisistaan. Pisaroiden koko tulisi olla yhteneväinen koko sirun alueella, jotta analyysivaiheessa saadut signaalit ovat vertailukelpoisia. Array-järjestysten suunnitteluun on olemassa monenlaisia työkaluja ja ohjelmistoja, jotka saa yhdistettyä laitteisiin, joilla printataan spotit sirulle. [1, s. 4–5.] Kuvassa 1 on esimerkki DNA-mikrosirusta, jossa on fluoresoivilla väriaineilla leimattuja cDNA-koettimia (komplementaarinen DNA). Kuvasta erottaa hyvin, miten kohdemolekyylit ovat tasaisin välimatkoin asetettu sirulle ja ne ovat säännöllisen kokoisia.



Kuva 1. Kuva DNA-mikrosirusta, jossa on fluoresoivilla väriaineilla leimattuja cDNA-koettimia [2, s. 156].

Kohdemolekyylit liuotetaan aina jonkinlaiseen puskuriin ennen sirulle printtausta. Oikeanlaisen puskurin valintaan vaikuttaa DNA-mikrosirun pinta sekä kohdemolekyyliä toivotut ominaisuudet. Tärkeimmät asiat, joita puskurilla halutaan edistää, on parantaa printtauksen tuottavuutta, stabilisoida pisarat siten, että ne säilyttävät sirulla yhteneväisen muodon, denaturoida kohdemolekyylit ja edesauttaa pisaroiden näkyvyyttä sirulla

myös paljaalla silmällä katsottaessa. Puskurin ominaisuuksilla voidaan siis vaikuttaa paljon siihen, miten pisara saadaan optimaalisesti kiinnittymään DNA-mikrosirun pinnalle. [1, s. 135]

2.1.1 Erilaiset sirumateriaalit

Sirumateriaalin valinnalla on suuri merkitys, sillä kohdemolekyylien kiinnittyminen sirun pintaan oikealla tavalla vaatii sirulta monia ominaisuuksia. Ensimmäisissä DNA-mikrosirutekniikan kokeissa käytettiin tavallista mikroskoopin näytelasia, joka oli päällystetty synteettisellä polymeerillä. Nykyään lasi on edelleen paljon käytetty materiaali sirujen valmistuksessa, mutta sen tulee täyttää paljon tiukemmat kriteerit toimiakseen optimaalisesti kohdemolekyylien kiinnittymisalustana. Tärkeimpiä ominaisuuksia ovat tasainen ja sileä sirun pinta, tasalaatuisuus, inerttiys, kestävyys ja riittävä suorituskyky. Esimerkiksi epätasainen sirun pinta voi aiheuttaa pisaroiden välillä eroavaisuuksia koon ja muodon suhteen. [1, s. 95.]

Käsittlemättömän lasin päälle kohdemolekyylit eivät kiinnity, minkä vuoksi sirun pintaa muokataan kemiallisesti tai se päällystetään ohuella kalvolla. Kemiallisesta pinnan käsittelystä puhutaan silloin, kun sirun pinnan molekyylien välille ja kemiallisesti reaktiivisten yhdisteiden välille muodostuu kovalenttinen sidos. Organopiiyhdisteet ovat paljon käytetty tässä menetelmässä. Toinen tapa on päällystää sirun pinta ohuella kalvolla, jolloin sirun pinnan ja kalvon välille ei muodostu kovalenttista sidosta. Pinta voidaan päällystää esimerkiksi akryyliamidilla, polylysiinillä tai nitroselluloosalla. [1, s. 95–98.]

2.1.2 DNA-mikrosirujen printtaus

DNA-mikrosirujen printtaus on pääasiallisesti automatisoitua, ja niiden valmistukseen on olemassa monenlaisia robotiikkaa hyödyntäviä laitteita. DNA-mikrosirutekniikka on herkkä analyysimenetelmä, joten myös sen valmistavilta laitteilta vaaditaan riittävän hyvää tarkkuutta ja suorituskykyä. [1, s. 159.] On tärkeää, että kohdemolekyyli sirun pinnalla säilyttää oikean muotonsa ja paikkansa, minkä vuoksi tarvitaan sopivan sirumateriaalin lisäksi dispensereitä, jotka kykenevät käsittelemään tarpeeksi pieniä näytemääriä. Novodiag-mikrosiruilla olevat spotit ovat tilavuudeltaan alle 1000 pikolitraa, eli noin 1×10^{-6} mikrolittraa.

Mikrosirujen printtaukseen on kolme erilaista tapaa: kontaktiton (*noncontact*), kontaktillinen (*contact*) ja puolijohdeteknologia (*semiconductor technologies*). Kuten kahden ensimmäisen nimistä voi päätellä, toisessa menetelmässä dispensointipää on suorassa kontaktissa sirun pinnan kanssa ja toisessa pisara lentää sirulle ilman läpi. Puolijohdeteknologia on ottanut mallia tietokoneiden mikropiirien valmistuksesta ja toimii melko samoilla periaatteilla. [1, s.180–181, 185 & 188.]

Kontaktillisessa printtauksessa dispensointi tapahtuu kosketuksissa sirun pinnan kanssa ja on suosittu menetelmä varsinkin tutkimuskäytössä. Dispensointiin voidaan käyttää esimerkiksi mikrospottausneuloja (*microspotting pins*), joiden päässä on näyttekanava tiettylle tilavuudelle. Neuloja on saatavilla eri näytetilavuuksille, yleisimmät ovat 0,2 ja 0,6 µl. Printtauksen aikana neulan kärkeen muodostuu näytteestä pieni pisara, joka laskeaan sirun pinnalle siten, että itse neulan kärki ei kosketa sirua missään vaiheessa. Muita välineitä kontaktilliseen printtaukseen ovat pinsetit (*tweezers*), halkaistu neula (*split pin*) ja kapillaariputket (*capillary tubes*). [1, s. 180–183.]

Kontaktittomaksi printtaukseksi käsitetään kaikki ne menetelmät, joissa dispensointipää ja sirun pinta eivät ole suorassa kontaktissa. Kontaktittoman printtauksen menetelmät on todettu parhaaksi silloin, kun halutaan printata nopeasti mutta näyttemäärä ei ole suuri. Yksi tämän menetelmän sovelluksista on pietsosähköinen dispensointisysteemi (*piezoelectric dispensing system*), jossa sähköimpulssin avulla voidaan hallitusti suihkuttaa pisaroita dispensointikärjestä. Pietsosähköilmiö perustuu tiettyjen materiaalien, kuten kvartsin, kykyyn värähdellä, kun siihen johdetaan sähköä. Tällaista materiaalia voidaan kutsua pietsosähköanturiksi ja se voidaan asentaa osaksi mikrosirujen printtaukseen tarkoitettua dispensointipäätä. Kun anturi asetetaan näytteiden dispensointiin tarkoitetun kapillaarin ympärille, se aiheuttaa pieniä paineaaltoja kapillaarin sisällä ja työntää nestettä ulos pieninä pisaroina. Piezosähköisellä menetelmällä voidaan suihkuttaa nestettä kapillaarin päästä jopa 60 000 pisaraa/s. Samaa tekniikkaa hyödynnetään myös esimerkiksi mustesuihkutulostimissa. [1, s. 185, 186.]

Puolijohdeteknologia on mikropiirien tuotannossa käytetty menetelmä, jota voidaan myös pääpiirteittäin soveltaa DNA-mikrosirujen valmistukseen. Kaikki DNA-mikrosiruissa käytettävät puolijohdeteknologian sovellukset perustuvat kiinteäfaasisynteesiin, jonka avulla array-alue rakennetaan sirun pinnalle vaiheittain käyttäen kaikkia neljää DNA:n emästä. Optinen litografia (*photolithography*) on yksi puolijohdeteknologiaan

perustuva menetelmä, jossa ensin sirujen pinta käsitellään reagensseilla siten, että pinnalle saadaan ensin reaktiivisia aminoryhmiä ja vielä uudelleen, jolloin muodostuu kemiallinen ryhmä nimeltään metyylinitropiperonyloxykarbonyyli (MeNPOC). MeNPOC-yhdiste on stabiili, eikä reagoi herkästi, mutta se voidaan poistaa sirulta altistamalla se ultraviolettisäteilylle noin 30 sekunnin ajan. Paljastetut kohdat ovat alttiita reaktioille, jolloin ne pystyvät sitoutumaan DNA:n emästen kanssa. Kohdemolekyyl-DNA:n juosteen 3'-päässä sijaitsee fosforiamidiittiryhmä, joka reagoi sirun pinnan aminoryhmien kanssa. Yleensä sirun pinta paljastetaan kerrallaan vain osittain ultraviolettisäteilylle, joka saa aikaan sen, että kohdemolekyylit kiinnittyvät vain tiettyihin osiin sirua. Siru peitetään fotomaskilla, jonka sisältämällä kromilla voidaan estää UV-säteilyn pääsy sirun pinnalle. Reaktion voi toistaa niin monta kertaa kuin on tarvetta ja kiinnittää juosteita useille eri paikoille sirulla. [1, s. 188–190.]

2.1.3 DNA-mikrosirujen analysointi

DNA-mikrosirutekniikassa detektio on luonnollisesti yksi olennaisimmista vaiheista. Mikrosirun pinnalta halutaan löytää ne kohdemolekyylit, jotka ovat yhdistyneet näytteessä olevien koettimien kanssa ja antavat positiivisen signaalin. Kaikissa analysointitekniikoissa ensisijainen vaihe on sirun kuvaaminen, jossa kaikki spotit ovat nähtävissä. [1, s.197–198.]

Valtaosassa mikrosirutekniikoista hyödynnetään fluoresoivia merkkiaineita, joiden avulla kohdemolekyylien ja koettimien väliset reaktiot havaitaan. Fluoresenssi-ilmiö perustuu fluoroforimolekyyliin, joissa olevat elektronit virittyvät korkeammalle energiatasolle fotonien vaikutuksesta. Emissiovaiheessa fotonit vapautuvat elektroneista hieman pidemmällä aallonpituudella ja elektronit palautuvat takaisin normaalille energiatasolleen. Fluoresenssi on todettu turvalliseksi, nopeaksi, helpoksi ja riittävän herkäksi detektointitavaksi. Radioaktiivisia leimoja voidaan myös käyttää DNA-mikrosirutekniikassa, mutta niiden käyttöön sisältyy riskejä sekä on hitaampaa. Fluoresoivat leimat antavat myös tarkempia signaaleja verrattuna radioaktiivisiin leimoihin. Radioaktiivisten leimojen kanssa on vaarana, että yhden kohdemolekyylin signaali sekoittuu viereisten spottien signaalien kanssa, eikä näin anna tarkkaa lukemaa tietyn spotin signaalitasosta. [1, s. 208–210, 212–213.]

Sirujen kuvaamiseen käytetään skannereita, joissa laserin avulla johdetaan eksitaatio-suodattimen kautta mikrosirun pinnalle tiettyä valon aallonpituutta. Aallonpituus valitaan sirulla käytettävien fluoresenssileimojen eksitaatioarvojen perusteella. Fluoresenssileimojen emittoiva valo ohjataan objektiivilinssin kautta detektorilinssille ja siitä edelleen valomonistimelle ja tietokoneelle. Mikrosirun antamien emissiosignaalien perusteella muodostetaan tietokoneella kuva array-alueesta ja signaalitason perusteella voidaan värikoodata kohdemolekyylit. Värien perusteella voidaan tulkita positiivisia ja negatiivisia reaktioita kuvasta. [1, s. 220–222, 236–238.]

DNA-mikrosiruja voidaan myös kuvata käyttämällä valonlähteenä laserin sijasta tavallista valkoista valoa. Tämän menetelmän periaatteena on ottaa valokuva fluoresoivista spoteista sirun pinnalla, ja toisin kuin laserskannereissa, tässä tekniikassa pyritään kuvaamaan suurempaa aluetta sirusta kerralla. Laseria käyttävät skannerit liikuttavat joko sirua tai optiikkaa, jotta koko array-alue saadaan analysoituksi. Normaalissa valoa käyttävässä laitteessa valonsäteet johdetaan sen lähteestä eksitaatio-suodattimen läpi sirulle. Hybridisoituneet kohdemolekyyleissä olevat fluoresoivat leimat emittoivat valoa emissio-suodattimen läpi kameralle. Kamerassa oleva detektori muuttaa fotonit analogiseksi sähkövirraksi, joka voidaan tietokoneella muuttaa luettavaksi kuvaksi sirun pinnasta. [1, s. 240–241.]

2.2 Hybridisaatio

Hybridisaatio perustuu yksijuosteisten nukleiinihappojen pariutumiseen niille komplementaaristen juosteiden kanssa. Koska nukleiinihapot yhdistyvät ainoastaan sellaisen juosteen kanssa, joiden emäsparit vastaavat toisiaan, voidaan tämän tekniikan avulla tunnistaa luotettavasti näytteestä tietyt DNA- tai RNA-molekyylit. [3, s. 193]

Kaksijuosteinen DNA tai RNA saadaan denaturoitua, eli jaettua yksijuosteisiksi, altistamalla DNA tai RNA noin 100 asteen lämpötilalle tai erittäin emäksiselle ympäristölle. Denaturoinnissa nukleiinihappojen väliset vetysidokset katkeavat ja juosteet erkanevat toisistaan. Tämä reaktio on kuitenkin reversiibeli, eli juosteet voivat jälleen kiinnittyä toisiinsa, kun DNA- tai RNA-liuosta jäähdytetään hitaasti. [3.] Samaa reaktiota hyödynnetään myös PCR-tekniikassa (polymerase chain reaction), mutta sen tavoitteena on tuottaa suuri määrä kopioita halutusta DNA:sta. PCR-tekniikassa haluttua DNA:ta kuumentetaan, jotta juosteet irtoavat toisistaan. [4, s. 13.]

Hybridisaatiossa kohdemolekyyli-DNA:n tai -RNA:n vastinparina käytetään koettimia (engl. *probe*), joka voi olla DNA:ta tai RNA:ta ja yleensä lyhyt synteettinen oligonukleotidi. Hybridisaatioreaktion havaitsemiseksi koettimet leimataan jonkinlaisella merkkiaineella, joka voidaan myöhemmin havaita detektorilla. Merkkiaine voi olla esimerkiksi radioisotooppi, fluoresenssi- tai luminenssileima tai värireaktioon perustuva kromogeeninen leima. Radioaktiivinen isotooppileima on herkkä menetelmä, jolla voidaan havaita hyvin pieniä DNA- tai RNA-pitoisuuksia, mutta se on nykyisin enää harvemmin käytössä. Sen sijaan fluoresoivat ja valoreaktioihin perustuvat leimat ovat yleisesti käytössä olevia menetelmiä. [4, s. 13.]

3 DNA-mikrosirut Novodiag-testeissä

Novodiag on Mobidiagin yksi tuoteryhmä, johon sisältyy Novodiag-testilaitteisto, ohjelmisto sekä erilaisia mikrobi-infektioihin keskittyneitä testikasetteja. Laite on kehitetty *in vitro* -diagnostiikkainstrumentiksi, jolla voidaan kliinisistä näytteistä tunnistaa nukleiinihappoja. Novodiag-laitteen etuna on sen helppokäyttöisyys, nopeus ja näytteiden vähäinen käsittely ennen testiajoa. Laitteella voi analysoida ainoastaan sille valmistettuja Novodiag-testikasetteja ja tällä hetkellä Mobidiagin valikoimassa on viisi erilaista bakteeri-, virus- ja parasiitti-infektioihin keskittyntä testiä. [5.] Kuvassa 2 on Novodiag-analysointilaite ja siihen kuuluva ohjausnäyttö sekä viivakoodinlukija. Yhdellä Novodiag-yksiköllä voi analysoida neljä kasettia samanaikaisesti ja näitä yksiköitä voi yhdistää jopa neljä samaan ohjausnäyttöön.



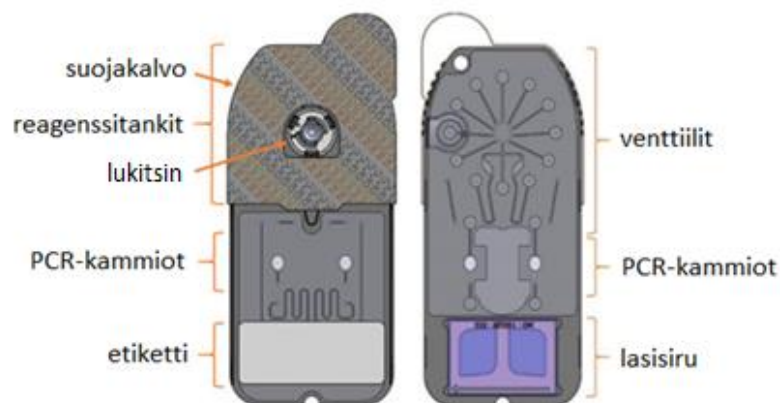
Kuva 2. Novodiag-analysointilaite, jossa on neljä paikkaa testikaseteille, laitteen ohjausnäyttö ja viivakoodinlukija [5].

Kaikissa Novodiag-testikaseteissa hyödynnetään qPCR-teknologiaa, ja osassa testeistä lopullinen mikrobien tunnistus tapahtuu DNA-mikrosirujen avulla. DNA-mikrosirujen toiminta perustuu hybridisaatioreaktioihin, joita hyödyntämällä voidaan yhdellä sirulla tunnistaa jopa useita kymmeniä taudinaiheuttajia. Tämä on suuri etu kliinisessä tutkimuksessa, sillä potilasta ei tarvitse altistaa useille eri testeille, kun yhdellä voidaan seuloa mahdollista taudinaiheuttajaa useista mikrobeista samalla kertaa. [5.]

3.1 Novodiag-testikasetin toiminta

Näytteen käsittely alkaa mikrobien kemiallisella lyysauksella, eli solurakenteiden hajottamisella, testille ominaisessa reagenssiputkessa. Kemiallisessa reaktiossa bakteerisolujen nukleiinihapot vapautuvat ympäröivään liuokseen. Nukleiinihappoja suojaa lyysausreagenssi, jonka vuoksi näytettä voidaan säilöä tarvittaessa putkessa pidempiäkin aikoja. [6.] Osassa testeistä lyysaus tapahtuu vasta kasetin sisällä olevien reagenssien avulla [5].

Solujen hajotuksen jälkeen näytettä pipetoidaan testikasettiin sopiva määrä ja kasetti suljetaan korkilla. Näytesäiliön päällä on suojakalvo, joka poistetaan ennen näytteen lisäämistä. Kaikkia kasetin reagensseja suojaa puoliläpäisevä membraani, joka estää nesteiden ulospääsyn kasetista, mutta läpäisee kaasuja. [5.] Kuvassa 3 on kaavakuva testikasetista ja eritelty sen tärkeimmät osat.



Kuva 3. Novodiag-testikasetin rakenne [5].

Kaikki testin eri vaiheet tapahtuvat kasetin sisällä olevissa reagenssitankeissa ja kammioidissa, sekä hybridisaatioreaktio lasisirun pinnalla. Näytteen käsittely alkaa DNA:n eristyksellä, jonka jälkeen voi PCR-reaktio alkaa PCR-kammioissa. Novodiag-laitteen sisällä on ruisku, jonka avulla nesteiden virtausta ohjataan testikasetin sisällä. PCR-kammioissa ovat valmiina reaktioon tarvittavat alukkeet ja koettimet. Reaktiota voidaan seurata fluoresenssileimattujen koettimien avulla, kummastakin PCR-kammioista erikseen. [5.]

Osa Novodiag-testeistä, kuten COVID-19-testi, perustuu pelkästään qPCR:n antamaan tulokseen, mutta osassa testeissä tunnistuksen apuna käytetään DNA-mikrosiruja. Esimerkiksi tässä työssä käytetyllä Bacterial GE+-testillä voidaan DNA-mikrosirulla olevien kohdemolekyylien avulla tunnistaa useita eri patogeenejä samalla testillä. [5.]

Novodiag-laite antaa käyttäjälle välittömästi ajon jälkeen tuloksen, mikäli näytteestä on tullut positiivinen tunnistus jollekin mikrobille tai mikäli tulos on negatiivinen. Käyttäjät eivät pääse laitteelta näkemään tarkemmin ajon tietoja, mutta Mobidiagilla on oma sisäinen tietokanta, jolla voidaan analysoida kaikkia ajon aikana tapahtuvia reaktioita. Tämä työkalu on erittäin tärkeä esimerkiksi laaduntarkkailun ja uusien tuotteiden kehityksessä. Tässä opinnäytetyössä saatuja Novodiag-ajojen tuloksia on myös analysoitu tämän ohjelman avulla.

3.2 Bacterial GE+

Bacterial GE+ (BGE+) on yksi Mobidiagin Novodiag-tuoteperheen *in vitro* -käyttöön suunnatuista testeistä. Testin avulla voi yhdestä ulostenäytteestä selvittää yli kymmenen erilaista mahdollista ruoansulatuskanavan tulehduksen aiheuttavaa bakteeria tai toksinia, muun muassa *Campylobacter coli*, enterotoksinen *Escherichia coli* (ETEC) ja *Salmonella* -sukuun kuuluvat bakteerit. Bacterial GE+ -testi on kehitetty yhä kasvavaan tarpeeseen hoitaa akuutteja ruoansulatuskanavan tulehduksia ja auttaa terveydenhuollon henkilökuntaa antamaan potilaille oikeanlaista hoitoa. [6.]

Kuten kaikissa Novodiag-testeissä, myös Bacterial GE+ -testissä hyödynnetään nukleinihappojen analysointiin perustuvia menetelmiä, tässä testissä qPCR:a ja DNA-mikrosirutekniikkaa. Näyte valmistellaan ennen testikasettiin laittamista eNAT-putkessa, joka suojaa näytteessä olevaa DNA:ta. [6.] eNAT on Copan-yhtiön valmistama guanidiini-

tiosyanaattipohjainen reagenssiputki, jonka tarkoituksena on stabilisoida näytteessä oleva perimäainne ja inaktivoida mahdolliset taudinaiheuttajat [7]. Testikasetin sisällä tehdään DNA:n eristys, PCR-reaktiot ja hybridisaatioreaktiot. qPCR-reaktiot tapahtuvat samanaikaisesti kahdessa PCR-kammiossa, joissa näytteen perimäainne sekä prosesikontrolli monistetaan. Reaktion etenemistä seurataan koettimilla, joihin on liitetty fluoresoivat leimat. [6.]

PCR-reaktioiden jälkeen monistettu näyte-DNA siirtyy kahteen hybridisaatiokammioon. DNA-mikrosirulla on kaksi kontrollia, hybridisaatiokontrolli ja GRID-kontrolli (tulee sanasta *gridding*). Mikäli näytteessä on monistunut DNA:ta, joka on komplementaarinen sirulla olevien kohdemolekyylien kanssa, juosteet yhdistyvät ja antavat positiivisen signaalin. Tunnistus tapahtuu näiden positiivisten hybridisaatioreaktioiden kautta. Onnistunut hybridisaatioreaktio antaa sirua kuvattaessa signaalin tietyllä intensiteettitasolla, joka voidaan tietokoneen avulla tulkita positiiviseksi. Novodiag-laitteen sisälle rakennettu ohjelmisto osaa tulkita sirulta saatuja intensiteetti-arvoja ja muodostaa niiden perusteella tuloksen, onko näyte positiivinen jollekin testin kohdepaneelissa olleelle bakteerille tai toksiinille. [6.]

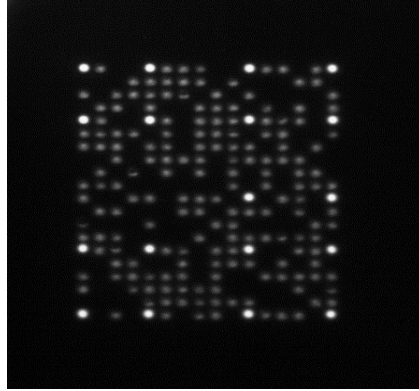
3.3 GRID-kontrolli

Novodiag-testien DNA-mikrosiruissa käytetään kahta erilaista kontrollia, joiden avulla varmistetaan testin hybridisaatio-osuuden onnistuminen. Toinen näistä on hybridisaatiokontrolli (lyhennetään HYB), jonka tarkoituksena on indikoida hybridisaatioreaktion onnistumista DNA-mikrosirulla. Onnistuneen hybridisaatioreaktion varmistamiseksi Novodiag-laitteen tulee tunnistaa tietty määrä hybridisaatiokontrolleja sirulta. [8.]

Tässä työssä keskityttiin optimoimaan GRID-kontrollia, jonka tehtävänä mikrosirulla on ohjata Novodiag-laite etsimään kohdemolekyyliä array-alueilta oikeista kohdista. GRID-kontrolli on ainoa jo valmiiksi leimattu näyte, ja se voidaan nähdä kuvista jo ennen hybridisaatioreaktion alkamista. GRID-kontrollin 3'-päästä on modifioitu siten, että sinne on lisätty fluoresoiva värileima. [8.]

GRID-kontrollissa on tärkeää, miten sen pisarat on aseteltu mikrosirulle. Ne toimivat eräänlaisena karttana laitteelle rajaamalla array-alueen sen kaikista ulkoreunoista ja

ohjaamalla laitteen etsimään kohdemolekyylejä oikeasta paikasta. Yhteensä GRID-kontrollispotteja on yhdellä array-alueella 18 kappaletta. [8.] Kuvassa 4 on Novodiag-laitteen ottama kuva BGE+-testin mikrosirusta ja siitä voi nähdä miten GRID-kontrollit loistavat kirkkaammin kuin muut spotit array-alueilla.



Kuva 4. Novodiag-laitteen ottama kuva BGE+-testin DNA-mikrosirun toisesta array-alueesta ennen hybridisaatioreaktion alkamista. Kuvasta erottaa selvästi GRID-kontrollit, jotka loistavat kirkkaampina muihin spotteihin verrattuna.

GRID-kontrollin, sekä kaikkien muidenkin sirulla olevien spottien antamaa signaalia mitataan intensiteetti-arvoilla. Jos sirulla oleva kohdemolekyyli on hybridisaatioreaktiossa yhdistynyt näytteessä sille komplementaarisen DNA:n kanssa, sen antaa tietyllä intensiteetti-arvolla signaalin laitteelle ja se voidaan tulkita positiiviseksi. Jokaista kohdemolekyyliä on useampi rinnakkainen spotti sirulla, ja määrä vaihtelee hieman näytteiden välillä. Novodiag-laitteen tulee löytää tietty määrä kohdemolekyylejä sirulta riittävällä intensiteettitasolla, jotta syntyy positiivinen tunnistus. GRID-kontrollin antamalla intensiteetti-arvolla on Novodiag-testeistä suuri merkitys siinä, miten laite tulkitsee muita spotteja sirulta. Kaikissa Novodiag kaseteissa on kaksi hybridisaatiokammioita ja molemmissa kammioissa oma array-alueensa. Näiden kahden array-alueen tulisi antaa samantyyppisiä intensiteetti-arvoja GRID-kontrollin, ja muidenkin kohdemolekyyliä osalta, jotta testin tulos on luotettava. [8.]

Tätä opinnäytetyötä aloitettaessa haasteena oli, että testeissä GRID-kontrollin intensiteettitasot olivat erilaiset kahden array-alueen välillä. Novodiag-testien DNA-mikrosiruissa oli esiintynyt GRID-kontrollin osalta puolieroja array-alueissa siten, että toisella array-alueella intensiteetti saattoi olla alle sallitun rajan ja toisella puolella se oli sen yli. Näin suuri puoliero johtaa siihen, että Novodiag-laite ei välttämättä löydä kaikkia

kohdemolekyylejä sirulta, eikä osaa sen vuoksi tehdä tunnistusta näytteestä. [8.] Tavoitteena oli löytää menetelmä, jonka avulla puoliero array-alueiden intensiteettieroissa saataisiin tasattua ja intensiteetit palaamaan optimaalisemmalle tasolle.

GRID-kontrollin laimennos Tecan-pipetointilaitteella

Kaikkien Novodiag-testien DNA-mikrosirujen valmistuksessa ensimmäinen vaihe on *source platen*, eli 384-kuoppalevyn, valmistus ja siihen tarkoitukseen hyödynnetään Tecan FreedomEVO -pipetointilaitetta. Laitteen avulla sirulla käytettävät kohdemolekyylit ja kontrollit laimennetaan puskuriin ja siirretään *source platelle* oikeille paikoille. Jokaisella kohdemolekyylillä on oltava oma paikkansa source platella, sillä printtauslaite on ohjelmoitu noutamaan tietystä *source platen* kuopasta näyte ja printtaamaan se sirulle array-kuvion mukaisesti. GRID-kontrolli tulee kahteen kuoppaan *source platella*, sillä yksi kuoppa edustaa yhtä array-aluetta sirulla. GRID-kontrolli sijaitsee molemmilla array-alueilla, ja sen vuoksi sillä on myös kaksi paikkaa *source platella*. [8.]

Tecan-pipetointilaitteen ohjelmointiin käytetään sen omaa ohjelmaa nimeltä Tecan FreedomEVOware. Laitteella pystyy todella monipuolisesti rakentamaan erilaisia pipetointiohjelmia ja laitetta voidaan muokata helposti käyttäjän tarpeisiin. Pipetointilaitteen etuna on tietysti vähentää manuaalista työskentelyä, mutta se myös poistaa käyttäjien mukana tuomat virheet ja erot pipetoinnissa. Laitetta ohjelmoitaessa on kuitenkin tärkeää tietää, millaisten yhdisteiden kanssa on tekemisissä ja miten ne käyttäytyvät pipe-toitaessa. Esimerkiksi kovin viskoosiset yhdisteet tarvitsevat erilaisen ohjelman ja osa yhdisteistä voi vaatia sekoituksen osalta voimakkaampaa käsittelyä. Tätä opinnäytetyötä aloittaessa, oli GRID-kontrollin intensiteettien puoliero array-alueiden välillä osattu yhdistää ongelmaan Tecan-laitteen pipetointiohjelmassa. Koska yhden array-alueen GRID-kontrollit valmistettiin yhteen kuoppaan *source platella*, tulisi uusi ohjelma luoda siten, että laimennos molemmissa kuopissa olisi samanlainen. [8.]

4 Työn toteutus

GRID-kontrollin optimointia lähdettiin toteuttamaan kolmessa eri vaiheessa. Vertailukontrolliksi valittiin manuaalisesti pipetoitu GRID-kontrolli *source platelle* ja Tecan-pipetointilaitteelle ohjelmoitiin kaksi uutta pipetointiohjelmaa GRID-kontrollille, joista

vähintään toisesta odotettiin saatavan hyväksyttäviä tuloksia. Tecan-pipetointilaitteen tekemien laimennosten jälkeen valmiit *source platet* säilytettiin viileässä ennen kuin ne vietiin printattavaksi.

DNA-mikrosirujen tuotannossa käytetty laite printtaa kohdemolekyylit lasisiruille siihen järjestetykseen, mikä on määritetty BGE+ -testille. Laitteessa käytetään lasikapillaaria, jolla pisarat dispensoidaan sirulle. Lasisirut, joita käytettiin, ovat Mobidiagilla itse tuotettuja siruja.



















Testikasetit ajettiin Mobidiagin tiloissa olevilla Novodiag-laitteilla ja tulosten analysoinnissa hyödynnettiin Mobidiagin omaa sisäistä ohjelmistoa. Näytteenä testeissä oli synteettisesti valmistettua Salmonella- ja ETEC-bakteerien DNA:ta laimennettuna ensin TE-puskuriin ja vielä sen jälkeen eNAT-puskuriin pitoisuudessa.

4.1 Tecan FreedomEVO -laitteen ohjelmointi

Tecan-pipetointilaitteen optimointia lähdettiin suorittamaan kolmessa eri vaiheessa. Testimenetelmäksi valittiin Bacterial GE+ sen lyhyen koettimien spottausajan vuoksi. Ennen varsinaista optimointia tehtiin vertailusiruiksi sellaisia, joissa GRID-kontrolli oli pipetoitu manuaalisesti alustalle (*source platelle*). Tämä menetelmä on jo aiemmin tuotantokäytössä todettu tasalaatuiseksi, mutta se vaatii työntekijältä ylimääräistä käsityötä. Näistä DNA-mikrosiruista liimattiin BGE+-testikasetteihin 20 kappaletta, jotka myöhemmin analysoitiin Novodiag-laitteella.

Ohjelmoinnin tarkoituksena oli selvittää jääkö GRID-kontrollin sekoituksen aikana mahdollisesti jäämiä sekoittavaan pipetin kärkeen, joka siirtää sen vuoksi enemmän kontrollia toiseen kaivoon. On myös mahdollista, että Tecan-laite ei kykene sekoittamaan kontrollia puskuriin tarpeeksi tehokkaasti, jotta seoksesta tulisi homogeeninen. Tällöin todennäköisesti suurempi pitoisuus kontrollia jää laimennosputken yläosaan ja konsentraatio laimenee kohti putken pohjaa. Testiohjelmia tehtäessä haluttiin osoittaa kumpi näistä teorioista saattaa olla syynä eroihin GRID-kontrollin intensiteeteissä array-alueiden välillä. Ensimmäisessä ohjelmassa ajateltiin, että ongelma voisi poistua kärkeä vaihtamalla ja toisessa siten, että laimennoksia tehdään kaksi, eli kummallekin array-alueelle omansa.

Ensimmäinen vaihe optimoinnissa oli luoda Tecan-laitteelle uusi pipetointiohjelma GRID-kontrollin osalta. Aiemmin laite on käyttänyt kahta pipetointikärkeä, joista toisella laite aspiroi GRIDin näyteputkesta ja dispensoi sen putkeen, jossa on laimennospuskuria. Sekoitus tapahtui myös tällä samalla kärjellä. Sekoituksen jälkeen sama kärki aspiroi GRID-kontrollin ja laimennospuskurin seosta ja dispensoi sen *source platen* kaivoihin. Uudessa ohjelmassa haluttiin GRIDin sekoitus puskuriiin tehdä erillisellä kärjellä. Kuvassa 5 on osa uudesta pipetointiohjelmasta, jossa laite noutaa yhden ylimääräisen kärjen ja siirtää GRIDin näyteputkesta laimennosputkeen (vaiheet 196—198). Tämän jälkeen aspirointi *source plateille* tapahtuu kahdella muulla kärjellä (vaiheet 199—203).

196	 Get DITis	 2,5,7	DITi 200ul Filter LiHa
197	 Aspirate	 3	60 µl Probe transfer from 2ml to 1.5 ml "GRID" (Col. 1, Row 1)
198	 Dispense	 3	60 µl Probe transfer from 2ml to 1.5 ml "4. 1.5ml dilution" (Col. 1, Row 12)
199	 Aspirate	 5	80 µl Probe dilution mixing "4. 1.5ml dilution" (Col. 1, Row 12)
200	 Aspirate	 7	80 µl Probe dilution mixing "4. 1.5ml dilution" (Col. 1, Row 12)
201	 Dispense	 5,7	20 µl Probe transfer to 384 "384-plate: Spare plate" (Col. 24, Rows 11,15)
202	 Dispense	 5,7	30 µl Probe transfer to 384 "384-plate: Plate A" (Col. 24, Rows 11,15)
203	 Dispense	 5,7	30 µl Probe transfer to 384 "384-plate: Plate B" (Col. 24, Rows 11,15)
204	 Drop DITis	 1-8	"DITiWaste"























Kuva 5. Osa Tecan-pipetointilaitteelle luodusta pipetointiohjelmasta, jossa GRID-kontrollin sekoitus laimennospuskuriin tapahtuu erillisellä kärjellä.

Mikäli sekoituksesta jäisi vielä pieni määrä GRID:iä pipetin kärkeen, se voisi aiheuttaa eron konsentraatioissa *source platen* kaivojen välillä. Myöhemmin tuloksia analysoidessa tästä ohjelmasta käytetään nimeä testiohjelma 1.

Toiseksi pipetointiohjelmaksi testattiin vaihtoehtoa, jossa molemmat kärjet tekevät omat GRID-kontrollin laimennokset omiin näyteputkiin. Jos näytettä jäisi sekoituksen aikana pipetin kärkeen, se siirtyisi molempien kärkien mukana *source plateille*. Vaihtoehtoisesti mikäli GRID-kontrolli ei sekoitu puskuriiin tasaisesti, tulisi tässä tapauksessa molempiin

kaivoihin todennäköisemmin sama konsentraatio kontrollia. Laitteeseen laitettiin GRID-kontrollia varten kaksi laimennosputkea, ja tämä muutos tuli myös ohjelmoida Tecan-laitteelle. Laite aloittaa pipetointiohjelmansa aina dispensoimalla laimennospuskuria jokaiseen laimennosputkeen. Tätä testikertaa varten laitteelle tuli ohjelmoida dispensointi yhteen ylimääräiseen putkeen.

Puskurin pipetoinnin jälkeen pipetointilaitte aspiroi GRID-kontrollia 30 µl kahdella kärjellä ja tekee laimennokset puskuriputkiin. Kuvassa 6 on osa Tecan-pipetointilaitteen ohjelmasta, jossa näkyy GRID-kontrollin aspirointi, dispensointi ja sekoitus kahdessa laimennosputkessa (vaiheet 197—202). Tästä ohjelmasta käytetään myöhemmin nimeä testiohjelma 2.

196	 Get DITis	 DITi 200ul Filter LiHa	
197	 Aspirate		30 µl Probe transfer from 2ml to 1.5 ml "GRID" (Col. 1, Row 1)
198	 Dispense		30 µl Probe transfer from 2ml to 1.5 ml "4. 1.5ml dilution" (Col. 1, Row 12)
199	 Aspirate		30 µl Probe transfer from 2ml to 1.5 ml "GRID" (Col. 1, Row 1)
200	 Dispense		30 µl Probe transfer from 2ml to 1.5 ml "4. 1.5ml dilution" (Col. 1, Row 13)
201	 Aspirate		80 µl Probe dilution mixing "4. 1.5ml dilution" (Col. 1, Row 12)
202	 Aspirate		80 µl Probe dilution mixing "4. 1.5ml dilution" (Col. 1, Row 13)
203	 Dispense		20 µl Probe transfer to 384 "384-plate: Spare plate" (Col. 24, Rows 11,15)
204	 Dispense		30 µl Probe transfer to 384 "384-plate: Plate A" (Col. 24, Rows 11,15)
205	 Dispense		30 µl Probe transfer to 384 "384-plate: Plate B" (Col. 24, Rows 11,15)
206	 Drop DITis		"DITiWaste"

Kuva 6. GRID-kontrollin pipetointi Tecan-pipetointilaitteella. Tässä testiohjelmassa laite pipetoi kontrollin kahteen eri puskurilaimennosputkeen, joista molemmista dispensoidaan omille kaivoille *source platella*.

Tällä ohjelmalla toivottiin poistuvan yhdellä kärjellä tehtävästä sekoituksesta johtuva puoliero. Riskinä oli kuitenkin, että puolieroa syntyy, mikäli kumpikin kärki ei sekoita GRID-kontrollia laimennospuskuriin täysin samalla tavalla. GRID-kontrollin kemiallisten ominaisuuksien takia, sen täydellinen sekoittuminen puskuriin on haastavaa.

4.2 DNA-mikrosirujen printtaus ja ajo Novodiag-laitteella

Source plateja valmistettiin yksi jokaista testiajoa kohden ja näiltä printattiin jokaiselta 20 mikrosirua. Kaikki sirut valmistettiin käyttämällä samaa printtaukseen tarkoitettua laitetta ja samoja dispensointipäitä. Siruina käytettiin Mobidiagin itse tuottamia lasisiruja. Yhteensä array-ajoja tehtiin siruille kolme kappaletta. Kohdemolekyylit sisältävät sirut kiinnitettiin BGE+ testikasetteihin ja näiden annettiin tämän jälkeen olla valolta suojattuna huoneenlämmössä useita päiviä ennen analysointia. Sirujen on hyvä kiinnityksen jälkeen olla vähintään vuorokauden ajan kuivumassa ennen ajoa Novodiag-laitteella.

Novodiag-ajot suoritettiin kuudessa eri osassa, sillä laitekapasiteettiä oli noin 12 kasetille kerrallaan. Ennen ajoja valmistettiin näyte testikaseteille. Näyte sisälsi Salmonella- ja ETEC-bakteerien synteettisesti valmistettua DNA:ta, joka oli laimennettu TE- ja eNAT-puskuriin. Näytettä pipetoitiin jokaisen kasetin näytetankkiin 600 µl. Näytetankit suljettiin korkeilla, minkä jälkeen ne voitiin laittaa laitteeseen ja aloittaa testiajo. Novodiag-laite on erittäin yksinkertainen käyttää ja testiajon aloittamiseksi, tulee valita ainoastaan haluttu testi Novodiag-testien joukosta, ja sen jälkeen syöttää näytetiedot. Laite lopettaa ajon automaattisesti, ja ajon tiedot lähetetään Mobidiagin sisäiselle analysointiohjelmistolle. Ohjelmistosta löytää kaikki testiajot näytetietojen perusteella.

5 Tulokset

Tässä luvussa esitellään Novodiag-laitteella tehtyjen ajojen jälkeen saatuja tuloksia, jotka on analysoitu Mobidiagin sisäisellä ohjelmistolla. Tulosten tarkastelussa keskitytään GRID-kontrollista saatuihin intensiteettilukemiin ja siihen, miten ne vaikuttavat muiden spottien analysointiin DNA-mikrosirulta. Novodiag-testeistä käytettiin Bacterial GE+-testiä, ja näytteenä oli salmonellabakteerin ja ETEC-bakteerin synteettistä DNA:ta.

DNA-mikrosirujen GRID-kontrollien intensiteettiluvut ovat Mobidiagin pyynnöstä jätetty pois liikesalaisuuteen vedoten. Tämän vuoksi tuloksissa ei kerrota tarkkoja GRID-kontrollien antamia intensiteettiarvoja tai niiden perusteella laskettuja array-alueiden intensiteettieroja. Tässä kappaleessa testiohjelmien, sekä vertailuohjelman mikrosirujen GRID-kontrollien intensiteettierot array-alueiden välillä, on havainnollistamisen vuoksi jaettu viiteen eri kategoriaan niiden antamien arvojen perusteella. Intensiteettierot, jotka ovat

hyväksytyllä tasolla, on taulukoissa esitetty kirjaimilla A, B ja C. Pienin intensiteettiero on kuvattu A-kirjaimella, ja näissä siruissa GRID-kontrollien intensiteettiarvot ovat molemmilla array-alueilla hyvin lähellä toisiaan. B-kirjaimella esitetty intensiteettiero ei ole merkittävän suuri ja C-kirjaimella ero jää vielä hyväksyttävän rajan alle, mutta on havaittavissa kuvissa. Mikrosirut, joissa intensiteettierot array-alueilla ovat yli sallitun arvon, on esitetty kirjaimilla D ja E. D-kirjain kuvaa intensiteettiero, joka on hyväksytyyn rajan yläpuolella ja E-kirjain sellaisia siruja, joissa ero on huomattava array-alueiden välillä. Merkittävä intensiteettiero kahden array-alueen välillä voi johtaa siihen, että kaikki kohdemolekyylit eivät ole enää havaittavissa DNA-mikrosirun pinnalta.

Ajojen tavoitteena oli löytää kolmesta testierästä sellainen, jossa GRID-kontrollin intensiteetit olisivat sopivalla tasolla sekä yhtä suuret molemmilla array-alueilla. Liian suuri ero array-alueiden välisissä intensiteeteissä on hylkäysperuste. Vertailukohdaksi kahdelle testimenetelmälle otettiin sirut, joihin GRID-kontrolli pipetoitiin käsin suoraan *source platelle*. Taulukossa 1 on kuvattu vertailumenetelmästä saatujen GRID-kontrollien intensiteettierot kahden array-alueen välillä.

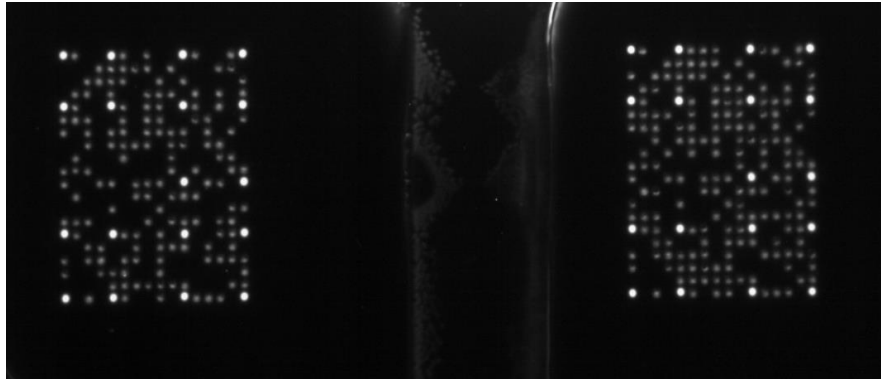
Taulukko 1. GRID-kontrollien erot array-alueiden välillä vertailumenetelmän mikrosiruilla. Kirjaimet A, B ja C kuvaavat sitä, että erot intensiteeteissä ovat hyväksytyllä tasolla.

Vertailumenetelmä	Ero array-alueiden intensiteeteissä	Vertailumenetelmä	Ero array-alueiden intensiteeteissä
Mikrosiru 1	A	Mikrosiru 11	B
Mikrosiru 2	C	Mikrosiru 12	A
Mikrosiru 3	A	Mikrosiru 13	A
Mikrosiru 4	A	Mikrosiru 14	B
Mikrosiru 5	B	Mikrosiru 15	A
Mikrosiru 6	B	Mikrosiru 16	A
Mikrosiru 7	A	Mikrosiru 17	A
Mikrosiru 8	B	Mikrosiru 18	A
Mikrosiru 9	B	Mikrosiru 19	B
Mikrosiru 10	B	Mikrosiru 20	A

A= ei merkittävää eroa, B= vähäinen ero, C= jonkun verran eroa, D= ero yli sallitun rajan, E= merkittävä ero

Vertailumenetelmän mikrosiruilla kaikki mitatut GRID-kontrollin intensiteettiarvot ovat lähes optimaalisella tasolla, ja erot array-alueiden intensiteeteissä ovat kaikilla siruilla hyväksyttävällä tasolla. Koska suurimmassa osassa siruista intensiteettiero on kuvattu A-kirjaimella, ovat puolierot hyvin pienet. Intensiteettieroille laskettu keskihajonta osoittaa myös, että vertailumenetelmän sirujen välillä on vain vähän vaihtelua.

Kuvassa 7 on Novodiag-laitteen ottama kuva molemmista array-alueista ennen hybridi-saatioreaktion alkamista. Kuvasta voi huomata hyvin, miten GRID-kontrollit erottuvat tarkasti ja yhtä voimakkaana molemmilla puolilla.



Kuva 7. Novodiag-laitteen kuva vertailumentelmän DNA-mikrosirusta. GRID-kontrollit erottuvat selvästi kirkkaampina pisteinä molemmilla array-alueilla.

Kohdemolekyylit erottuvat kuvassa tarkasti, kun GRID-kontrollin intensiteetti on menetelmään optimoidulla tasolla ja array-alueiden välinen intensiteetti on pieni. Novodiag-laitte etsii kohdemolekyylit kuvista GRID-kontrollien avulla ja testin onnistumisen kannalta on tärkeää, että kontrolli on printattu täsmälleen oikeaan paikkaan sirulle ja että sen intensiteetti on optimaalinen. Tässä mikrosirussa kohdemolekyylit erottuvat selkeästi taustaa vasten, ja GRID-kontrollit eivät loista kuvasta liian himmeänä tai kirkkaana.

Testiohjelma 1:n avulla toivottiin poistuvan array-alueiden välinen puoliero, mikäli syy on, että GRID-kontrollia siirtyy enemmän *source platelle* kärjessä, joka tekee sekoituksen puskuriin. Tulokset Mobidiagin sisäisellä ohjelmalla analysoidessa indikoivat kuitenkin sitä, että ongelmaa ei saatu korjattua tällä testiohjelmalla. GRID-kontrollin intensiteettiarvoissa on suurta vaihtelua, ja vaikka osa arvoista on vielä hyväksytyjen rajojen sisällä, on selviä puolieroja array-alueiden välillä havaittavissa. Taulukossa 2 on kuvattu array-alueiden väliset intensiteettierot GRID-kontrollin osalta.

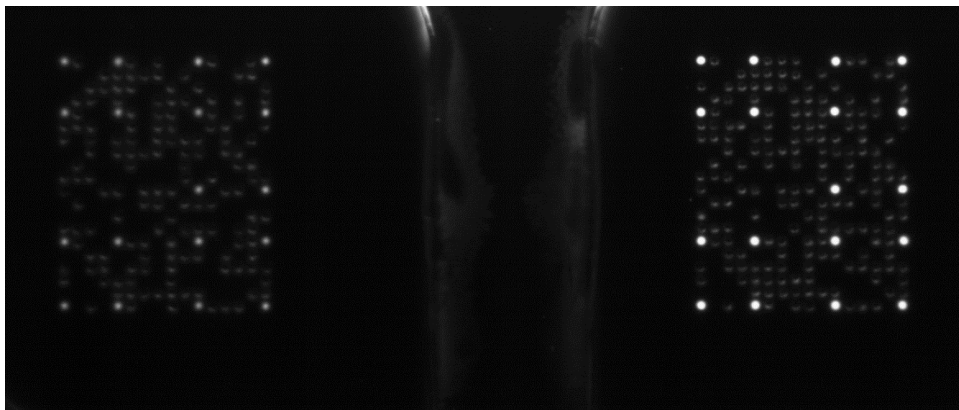
Taulukko 2. Testiohjelma 1:n GRID-kontrollien intensiteettiarvojen erot array-alueiden välillä BGE+ -testikaseteissa. C-kirjaimilla kuvatuissa mikrosiruissa intensiteettierot ovat vielä hyväksyttävän rajan alapuolella, D- ja E-kirjaimilla kuvatuissa siruissa ero on yli sallitun arvon.

Testiohjelma 1	Ero array-alueiden intensiteeteissä	Testiohjelma 1	Ero array-alueiden intensiteeteissä
Mikrosiru 1	E	Mikrosiru 11	D
Mikrosiru 2	C	Mikrosiru 12	E
Mikrosiru 3	E	Mikrosiru 13	D
Mikrosiru 4	E	Mikrosiru 14	D
Mikrosiru 5	D	Mikrosiru 15	D
Mikrosiru 6	D	Mikrosiru 16	D
Mikrosiru 7	D	Mikrosiru 17	C
Mikrosiru 8	D	Mikrosiru 18	D
Mikrosiru 9	E	Mikrosiru 19	C
Mikrosiru 10	E	Mikrosiru 20	D

A= ei merkittävää eroa, B= vähäinen ero, C= jonkun verran eroa, D= ero yli sallitun rajan, E= merkittävä ero

Taulukosta voi nähdä, että lähes kaikissa mikrosiruissa GRID-kontrollin intensiteettiarvot kahden array-alueen välillä erosivat toisistaan yli hyväksyttävän rajan. Ainoastaan siruissa 2, 17 ja 19 puoliero ei ole hylkäysperusteinen. Näillä kolmella sirulla todettiin kuitenkin toisen array-alueen intensiteettien olevan niin matalat, ettei niitä voitu hyväksyä. Testiohjelman sirujen molemmista array-alueista laskettiin keskiarvot ja niiden perusteella voidaan myös todeta merkittävä ero kahden puolen välillä. Keskihajonnan perusteella array-alueiden intensiteettieroissa on enemmän vaihtelua kuin vertailumenetelmän siruissa.

Puolierot voi nähdä selvästi myös Novodiag-laitteen ottamista kuvista, sillä kohdemolekyylien spotit ovat paljon heikompia toisella array alueella kuin toisella. Kuvassa 8 on testisiru 16:sta otettu kuva ennen hybridisaatioreaktion alkamista, eli ainoastaan GRID-kontrollien spotit tulisi erottua kirkkaimpana kuvista. Vasemmalla kuvassa on array-2, jonka GRIDin intensiteettiarvot ovat matalammat verrattuna oikealla puolella oleviin array-1:n GRIDin intensiteetteihin.



Kuva 8. Testiohjelma 1:n mikrosirusta numero 16 otettu kuva Novodiag-laitteella. Kuvassa on selvästi erotettavissa array-alueiden erot GRID-kontrollin intensiteettien suhteen ja miten se vaikuttaa myös muiden spottien havaitsemiseen.

Array-2-alueelta kaikki spotit eivät ole edes paljain silmin havaittavissa. Liian suuri puoliero intensiteeteissä voi johtaa siihen, että laite ei löydä kaikkia kohdemolekyylejä, mutta esimerkiksi tämän sirun kohdalla Novodiag-laite on pystynyt tekemään oikean tunnistuksen näytteessä olevien bakteerien perimän suhteen. Laitteen ohjelmisto kykenee melko heikosta intensiteettitasosta huolimatta erottamaan sirulta ne kohdemolekyylit, jotka ovat hybridisoituneet näytteessä olevien juosteiden kanssa.

Testiohjelma 2:n tavoitteena oli poistaa puolierot array-alueiden välillä tekemällä kaksi laimennosta GRID-kontrollista. Näin ollen molemmissa laimennosputkissa olisi sekoittuminen tapahtunut samalla tavalla ja molemmista putkista saataisiin pipetoitua samanlaiset näytteet. GRID-kontrollin kemiallisten ominaisuuksien vuoksi, aine muodostuu herkästi liukenemattomaksi faasiksi puskurin yläpuolelle, mikäli sekoitus ei ole ollut riittävä. Tulokset testiohjelma 2:sta osoittavat, että sirut, jotka valmistettiin tämän ohjelman mukaan, näyttävät tasalaatuisemmilta kuin testiohjelma 1:n mukaan valmistetut. Taulukossa 3 on kahden array-alueen intensiteettiarvojen erotus esitettyinä. A-kirjaimella kuvatuissa mikrosiruissa puolierot ovat vain vähäisiä. B-kirjaimella kuvatuissa siruissa ero on suurempi, mutta hyväksyttävä, ja C-kirjaimella kuvatuissa siruissa puoliero on vielä sallitun rajan alapuolella.

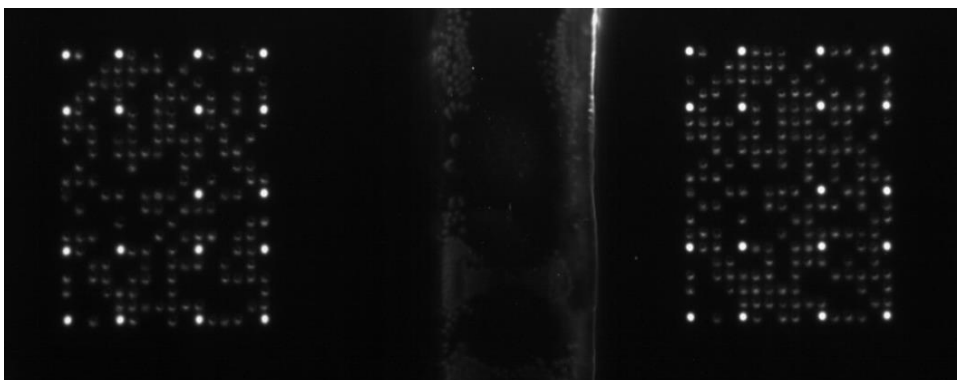
Taulukko 3. Testiohjelma 2:n GRID-kontrollien intensiteettien erot BGE+ -testikaseteissa. Kaikissa siruissa array-alueiden intensiteettierot ovat sallituissa rajoissa.

Testiohjelma 2	Ero array-alueiden intensiteeteissä	Testiohjelma 2	Ero array-alueiden intensiteeteissä
Mikrosiru 1	A	Mikrosiru 11	B
Mikrosiru 2	A	Mikrosiru 12	B
Mikrosiru 3	A	Mikrosiru 13	B
Mikrosiru 4	A	Mikrosiru 14	A
Mikrosiru 5	B	Mikrosiru 15	B
Mikrosiru 6	A	Mikrosiru 16	B
Mikrosiru 7	A	Mikrosiru 17	A
Mikrosiru 8	C	Mikrosiru 18	B
Mikrosiru 9	C	Mikrosiru 19	C
Mikrosiru 10	A	Mikrosiru 20	A

A= ei merkittävää eroa, B= vähäinen ero, C= jonkun verran eroa, D= ero yli sallitun rajan, E= merkittävä ero

Tällä ohjelmalla valmistetuista siruista GRID-kontrollien intensiteetit ovat paljon lähempänä optimaalista arvoa, eikä yksikään siruista ylitä tai alita sallittuja raja-arvoja. Molemmille array-alueille laskettiin keskiarvot ja ne eroavat melko vähän toisistaan. Myös keskihajonnan perusteella array-alueiden intensiteettieroissa on vain vähän vaihtelua. Array-alueiden välillä on nähtävissä kuitenkin enemmän eroa intensiteeteissä kuin vertailumenetelmän siruissa.

Novodiag-laitteen kuvista voi myös nähdä, että array-alueella on spotit paljon selkeämmin havaittavissa kuin testiohjelman 1 siruissa. Laite on myös löytänyt kaikki spotit siruilta, ja tunnistukset näytteen suhteen ovat menneet oikein. Kuvassa 9 on Novodiag-laitteen kuva sirusta.



Kuva 9. Testiohjelma 2:n mikrosirusta otettu kuva Novodiag-laitteella. Molemmilla array-alueilla GRID-kontrollin ja muiden kohdemolekyylien spotit erottuvat selkeästi, eikä selvää puolieroja alueiden välillä ole nähtävissä.

Kuvassa 10 näkee, että spotit ovat nähtävissä molemmilla array-alueilla ja GRID-kontrollin spotit eivät ole liian himmeitä tai kirkkaita kummallakaan puolella. Tulokset puoltavat sitä, että GRID-kontrollin sekoitus aiemmin käytetyssä pipetointiohjelmassa ei ole ollut riittävä, vaan suurempi konsentraatio kontrollia on jäänyt laimennosputken yläosaan ja vähemmän putken pohjalle.

Tulosten tilastollinen arviointi

Testiohjelmien intensiteettiarvoja vertailtaessa voidaan nähdä, että testiohjelma 2:n tulokset ovat parempia kuin testiohjelma 1:n. Tilastollisella testillä voidaan kuitenkin selvittää, eroavatko testiohjelmilla saadut intensiteettiarvot merkitsevästi vertailumenetelmän intensiteettiarvoista. Vertailumenetelmä on todettu toimivaksi ja sillä menetelmällä valmistetut DNA-mikrosirut ovat antaneet luotettavia tuloksia.

Testiksi valittiin t-testi, jolla verrataan testiohjelman ja vertailumenetelmän array-alueiden välisiä intensiteettieroja. Kiinnostuksen kohteena tässä työssä on, ovatko testiohjelmalla valmistetut sirut vähintään yhtä hyviä kuin vertailumenetelmällä tehdyt, ja kaksisuuntainen t-testi sopii tähän tarkoitukseen hyvin. T-testi asettaa aineistolle vaatimukseksi sen, että se noudattaa normaalijakaumaa, mikä toteutuu tämän aineiston kohdalla.

Testin nollahypoteesi on, että kummallakaan testiohjelmalla valmistettujen mikrosirujen intensiteettierot eivät eroa vertailumenetelmän sirujen intensiteettieroista. Tämä voidaan merkitä seuraavasti:

$$H_0 : \text{vertailumenetelmä} = \text{testiohjelma 1} = \text{testiohjelma 2}$$

Vastahypoteesi testissä on, että toinen, tai molemmat testiohjelmat eroavat vertailumenetelmästä. Luottamustasona testissä on 95 %, eli $\alpha = 0,05$.

Testiohjelma 1:n ja vertailumenetelmän array-alueiden intensiteettieroja vertailtaessa saadaan t-testin p-arvoksi $1,33 \cdot 10^{-14}$. Näin ollen p-arvo $< \alpha$, eli H_0 hylätään. Tämän perusteella voidaan todeta, että testiohjelma 1:n array-alueiden väliset intensiteettierot eroavat tilastollisesti merkitsevästi vertailumenetelmän arvoista 95 %:n luottamustasolla.

Testiohjelma 2:n ja vertailumenetelmän arvoja vertailtaessa, saadaan t-testin p-arvoksi 0,63. Tässä testissä on p-arvo $> \alpha$, eli H_0 ei hylätä. Testiohjelma 2:n array-alueiden väliset intensiteettierot eivät eroa tilastollisesti merkitsevästi 95 %:n luottamustasolla vertailumenetelmän intensiteettieroista. Näin ollen voidaan todeta, että testiohjelma 2:n DNA-mikrosirujen GRID-kontrollit ovat tilastollisesti hyväksyttävällä tasolla verrattuna vertailumenetelmään. Tässä työssä valmistettu otos on kuitenkin sen verran pieni, että siruja tulisi valmistaa vielä lisää, jotta lopullisen päätöksen menetelmän toimivuudesta tuotantokäyttöön voisi tehdä.

6 Loppupäätelmät

Työn tavoitteena oli löytää GRID-kontrollille optimaalinen pipetointiohjelma Tecan Freedom EVO -laitteella. Tätä varten luotiin Tecan-pipetointilaitteelle kaksi uutta ohjelmaa ja valmistettiin testisiruja yhteensä 60 kappaletta, molemmille testiohjelmille 20 kappaletta ja vertailumenetelmälle 20 kappaletta. Alkuperäinen haaste GRID-kontrollin suhteen on ollut sen eroavaisuudet intensiteettiarvoissa array-alueiden välillä ja ennen opinnäyte-työn aloitusta ongelmaksi rajattiin Tecan-pipetointilaitteen tekemä laimennos ja sen jako *source platen* kaivoihin.

Kahdella testiohjelmalla saatiin hyvin erilaisia tuloksia niistä valmistetuista testisiruista. Tulokset analysoitiin Mobidiagin sisäisellä ohjelmistolla, josta saadaan dataa kaikista testikasettien reaktioista, ja myös kuvia DNA-mikrosiruista. Vertailumenetelmän mikrosirujen intensiteettiarvot GRID-kontrollin suhteen olivat sitä, mitä niiden tuleekin olla. Arvot olivat optimaalisella tasolla, ja eroa array-alueiden välillä oli vain vähän. Näihin

arvoihin verrattuna, voitiin sanoa, että testiohjelma 1:n mikrosirut eivät tuottaneet haluttua tulosta. Intensiteettien välillä oli suurta hajontaa eri sirujen välillä ja useammassa sirussa intensiteettiarvot olivat liian pieniä tai suuria, mikä on hylkäysperuste. Array-alueiden välillä eroa intensiteeteissä oli lähes kaikissa yli sallitun rajan, mikä voi analysointivaiheessa aiheuttaa haasteita. Näiden tulosten perusteella voidaan päätellä, että laimennoksen valmistuksessa on mahdollista, että osa GRID-kontrollista siirtyy sekoittavan pipetointikärjen mukana, mutta suurempi ongelma on todennäköisesti riittämättömässä sekoituksessa puskuriin.

Testiohjelma 2:n sirujen tulokset ovat huomattavasti parempia verrattuna testiohjelma 1:n sirujen intensiteetteihin. Jälkimmäisen ohjelman intensiteettiarvot pysyivät kaikilla mikrosiruilla hyväksytyjen rajojen sisällä, sekä hajontaa eri sirujen välillä ei ollut niin paljon kuin ensimmäisessä testiohjelmassa. Array-alueiden välillä oli eroa intensiteeteissä jonkun verran, mutta tilastollisen testin perusteella, arvot eivät eroa merkitsevästi vertailumenetelmän arvoista.

Näin ollen voidaan päätellä ongelman olleen pääasiallisesti siinä, että GRID-kontrollin kemiallisten ominaisuuksien takia se sekoittuu huonosti puskurin kanssa ja Tecan-laitteen nykyinen sekoitus on osittain riittämätön. Ongelmaan auttoi osittain se, että laimennoksia tehtiin kaksi kappaletta, eli molemmille *source platen* kaivoille omansa. Yhdestä kaivosta printtauslaite siirtää GRID-kontrollin yhdelle array-alueelle, eli yksi laimennosputki vaikuttaa ainoastaan toiseen array-alueeseen. Näin ollen laimennoksen jälkeen molemmissa putkissa voidaan konsentraation olettaa olevan lähestulkoon samanlainen siinä kohtaa laimennosputkea, josta pipetointikärki käy noutamassa näytteen.

Tässä työssä käytetty testisirujen määrä yhdelle menetelmälle oli melko pieni. Jotta voidaan varmasti sanoa, millainen pipetointiohjelma GRID-kontrollille olisi optimaalinen, tulisi testisiruja valmistaa vielä lisää ja analysoida niiden intensiteettiarvoja. 20 sirulla saatiin hyvin suuntaa antavia tuloksia ja voidaan todeta, että testiohjelma 1 ei toimi GRID-kontrollin laimentamiseen. Testiohjelma 2 voisi mahdollisesti toimia sellaisenaan. Todennäköisesti GRID-kontrollin pitoisuutta laimennoksessa pitäisi hieman pienentää, jotta intensiteettiarvot saataisiin lähemmäs optimaalista arvoa. Koska GRID-kontrolli sekoittuu huonosti puskurin kanssa, johtuen todennäköisesti kontrollin kemiallisista ominaisuuksista, voisi pipetointiohjelmaan lisätä ylimääräisen ja voimakkaamman sekoituksen. Tämä voisi edesauttaa sitä, että kontrolli ja puskuri sekoittuisivat paremmin koko

laimennosputkeen. Voimakkaampaa sekoitusta voisi testata myös muiden näytteiden osalta, vaikka näissä samanlaista sekoittumisongelmaa ei ole havaittu. Muut näytteet siirretään *source platelle* vain yhdellä kärjellä, minkä vuoksi samanlaista haastetta ei synny kuin GRID-kontrollin kohdalla. Käsien laimennoksen valmistamisessa ongelmaa ei ole, sillä siinä laimennosputki vorteksoidaan sekä laitetaan lopuksi sentrifugiin, mikä saa aikaan tehokkaan sekoittumisen. Uuden pipetointiohjelman toimivuus tulisi varmistaa myös muiden Novodiag-testien osalta, ennen kuin se voidaan lopullisesti ottaa tuotantokäyttöön.

Lähteet

- 1 Schena, Mark. 2003. Microarray Analysis. 1st ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- 2 Glick, Bernard; Pasternak Jack & Patten Cheryl. 2010. Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA. 4th ed. Washington DC: ASM Press.
- 3 Haajanen, Kari; Pelkonen, Jani; Pärssinen, Raimo & Suominen, Ilari. 2013. Geenitekniikka. 2. korjattu painos. Saarijärvi.
- 4 Amaratunga, Dhammika & Cabrera, Javier. 2004. Exploration and Analysis of DNA Microarray and Protein Array Data. 1st ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- 5 Novodiag-järjestelmän käyttöopas. 2020. Versio 4-0.
- 6 Novodiag Bacterial GE+ Instructions for Use. 2020. Version 5-0.
- 7 eNAT™ Brochure. 2020. Verkkoaineisto. Copan. <<https://www.copanusa.com/sample-collection-transport-processing/enat/>>. Luettu 27.11.2020.
- 8 Wiklund, Anna. 2020. Tuotantoinsinööri, Mobidiag Oy. Keskustelu 14.9.2020