

Tuula Nurttila

# QI Agility-pipetointirobottien verifiointi

Metropolia Ammattikorkeakoulu  
Laboratorioanalyttikko  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Opinnäytetyö  
11.11.2011

## ALKULAUSE

Opinnäytetyö tehtiin Keskusrikospoliisin Rikosteknisen laboratorion biologian linjalla Vantaan Jokiniemessä syksyllä 2011. Haluan kiittää projektipäällikköä rikoskemisti Laura Hirvasta kirjallisen- ja käytännön ohjauksesta sekä rikoskemisti Markus Pirttimaata avusta laitteiden kanssa.

Lisäksi kiitän tutoropettajaani ja opinnäytetyötäni ohjannutta lehtori Tiina Soinista tuesta ja ohjauksesta.

Kiitän myös perhettäni, ystäviäni ja muuta laboratorion henkilökuntaa ainaisesta tuesta ja kannustuksesta.

Vantaalla 11.11.2011

Tuula Nurttila

Tekijä	Tuula Nurttila
Otsikko	QIAgility-pipetointirobottien verifiointi
Sivumäärä	39 sivua + 1 liite
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (amk)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Ohjaajat	Rikoskemisti Laura Hirvas Lehtori Tiina Soininen
<p>Opinnäytetyö tehtiin syksyllä 2011 Keskusrikospoliisin rikosteknisen laboratorion biologian linjalla Vantaalla. Työn tavoitteena oli verifioida kaksi Qiagenin QIAgility-pipetointirobottia kvantitatiivisen PCR:n reaktioreagenssien annosteluvaiheen ja PCR:n laimennosvaiheen automatisoimiseksi.</p> <p>Työssä tarkastellut spesifikaatiot olivat toistettavuus, luotettavuus, herkkyys ja tulosten oikeellisuus. Ongelmat pipetointirobotin toiminnassa aiheuttivat sen, että useiden toimintatestien näytteiden qPCR-monistuksessa havaittiin satunnaista epäspesifistä monistumista. Ongelmaa yritettiin ratkaista erilaisilla toimenpiteillä, kuten QIAgility-pipetointirobotin uudelleenkalibroinnilla. Toimenpiteillä ei kuitenkaan ollut vaikutusta pipetointirobotin toimintaan. Myöhemmin QIAgilityista löydettiin muutamia valmistusvirheitä, jotka saatiin korjattua. Työssä ilmenneiden ongelmien vuoksi laitteiden valmistajille tullaan pitämään kertauskoulutusta laitteiden valmistuksessa ilmenneiden huolimattomuuksien vuoksi.</p> <p>Ajan puutteen vuoksi opinnäytetyön tavoitteisiin ei vielä päästy. Qiagenin QIAgility-pipetointirobottien sekä työn ohessa käytettyjen Qiagenin Rotor-Gene Q-qPCR -laitteiden verifiointia ja Qiagenin Investigator™ Quantiplex -kitin testausta jatketaan edelleen Keskusrikospoliisin rikosteknisessä laboratoriossa.</p>	
Avainsanat	QIAgility-pipetointirobotti, verifiointi

Author	Tuula Nurttila
Title	Verifying of QIAgility-pipetting robots
Number of Pages	39 pages + 1 appendix
Degree	Bachelor of Science
Degree Programme	Laboratory Services
Instructors	Laura Hirvas, Forensic DNA-expert Tiina Soininen, Lecturer
<p>The thesis was made at the National Bureau of Investigation´s laboratory in the line of biology in Vantaa in autumn 2011. The goal of the work was to verify Qiagen´s two QIAgility-pipetting robots to automate quantitative-PCR´s dose of reaction reagents and PCR-reactions dilution.</p> <p>The specifications which were examined were repeatability, reliability, sensitivity and accuracy of measurement. The problems with functioning of pipetting robots caused random non-specific amplification of the DNA in many tests. The samples of tests were amplified with qPCR. Resolving the problems was attempted with several actions, for example recalibrating the QIAgility-pipetting robots, but those actions didn´t affect the function of devices. Later, there were found couple of manufacturing errors, which were repaired. Because of the carelessness in manufacturing of the pipetting robots caused problems, which were found during the tests of devices function, the manufacturer will be re-educated.</p> <p>The goals of the thesis weren´t reached because of lack of time. Verifying of the Qiagens QIAgility-pipetting robots and the Rotor-Gene Q-qPCR –device and testing of Qiagens Investigator™ Quantiplex Kit needs to be continued in the National Bureau of Investigation´s laboratory.</p>	
Keywords	QIAgility-pipetting robot, verify

## Sisällys

1	Johdanto	2
2	Teoria	3
2.1	DNA-analytiikka	3
2.2	qPCR	5
2.2.1	Yleistä	5
2.2.2	qPCR-laitteisto	8
2.3	Verifiointi	14
3	QIAgility-pipetointirobotin toiminnan testaus	16
3.1	Näytteet	16
3.2	Investigator™ Quantiplex Kit	17
3.3	Esivalmistelut	18
3.4	Toimintatestit	19
3.4.1	QIAgility-pipetointirobotin käyttöönotto	20
3.4.2	Toimintatestit QIAgility-demo -laitteella	24
3.4.3	Toimintatestit QIAgilityilla A ja B	28
4	Tulokset	31
4.1	QIAgility-demo -laite	31
4.2	QIAgilityt A ja B	37
5	Johtopäätökset	39

## Liitteet

Liite 1. Toistettavuus- ja luotettavuustestin tulokset.

## 1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Keskusrikospoliisin Rikosteknisen laboratorion biologian osastolla. Rikostutkinnassa käytetään DNA-tutkimuksia yksilöntunnistusmenetelmänä. Tutkimukset ovat vertailututkimuksia, joissa verrataan rikospaikkänäytteistä saatuja DNA-tunnisteita DNA-rekisterissä olevien henkilöiden tai rikospaikkänäytteiden DNA-tunnisteisiin tai muuten tunnettujen henkilöiden (epäilty) DNA-tunnisteisiin. Periaatteessa tutkimus voidaan tehdä kaikesta materiaalista, joka sisältää ihmisen tumallisia soluja. Useimmiten kuitenkin tutkimus kohdistuu näytteisiin, jotka sisältävät verta, sylkeä, ihosoluja tai siemennestettä. DNA-tutkimuksissa määritetään näytteen DNA-pitoisuus, jota voidaan käyttää apuna polymeraasiketjureaktio- eli PCR-monistuksen tehokkuuden optimoinnissa. Koska rikoksiin liittyvien näytteiden määrät ja pitoisuudet ovat hyvin pieniä, reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR eli qPCR on erittäin tärkeä ja hyödyllinen menetelmä.

Työn tavoitteena oli verifioida Qiagenin QIAgility-pipetointirobotti, jotta voitaisiin automatisoida kvantitatiivisen PCR:n reaktioreagenssien annostelu, sekä nykyään manuaalisesti tehtävä näytteiden laimennus PCR-monistusta varten. Laitteen käyttöönotto nopeuttaisi työvaiheiden kulkua ja siten näytteiden kulkua laboratoriossa samalla vähentäen virheen mahdollisuutta, jota manuaalipipetoinnissa voidaan kohdata. Pipetointirobotin toimivuuden testauksen ohella käytettiin Qiagenin Rotor-Gene Q-qPCR -laitetta, sekä sen kanssa yhteensopivaa Qiagenin Investigator<sup>TM</sup> Quantiplex-kvantitaatiokittiä, joilla monistettiin robotin pipetoimien näytteiden DNA:ta.

## 2 Teoria

### 2.1 DNA-analytiikka

Rikospaikkanäytteiden tutkimisen ongelmalliseksi tekee se, että tahrinäytteet sisältävät paljon muutakin materiaalia kuin DNA:ta. Näytteissä oleva muu materiaali aiheuttaa helposti inhibitiota. Eristysmenetelmän tarkoituksena on erotella DNA-molekyyleistä niitä suojelevat ja pakkaavat proteiinit sekä muu solumateriaali.

DNA-tutkimus tehdään tahrinäytteille, jotka voivat olla peräisin esimerkiksi vaatteista, tavaroista ja ihmisen iholta tai limakalvoilta. Aluksi näytteille tehdään DNA:n eristys mahdollisimman puhtaan DNA:n saamiseksi. Tämän jälkeen näytteet kvantitoidaan, jolloin saadaan selville näytteiden pitoisuus qPCR-reaktioiden optimoimiseksi. Rikospaikkanäytteiden DNA-pitoisuudet ovat yleensä hyvin pieniä, joten kvantitoinnin jälkeen osaa näytteistä täytyy konsentroida. Konsentroidin jälkeen näytteille tehdään qPCR-ajo DNA:n monistamiseksi. Monistetut PCR-tuotteet erotellaan vielä kapillaarielektroforeesilla. Lopuksi verrataan mahdollisesti saatuja tunnisteita joko epäiltyjen DNA-tunnisteisiin tai DNA-rekisterin DNA-tunnisteisiin.

Tahrinäytteissä on usein jotakin, joka inhiboi, mikä vaikuttaa DNA:n monistukseen PCR:lla. Yleisimpiä inhibiittoreita ovat hemi ja humiinihappo. Kun veren hemi hapettuu, syntyy hematiinia, joka on jäljitetty inhiboivan polymeraasiaktiivisuutta. Humiinihappo on maa-aineksen yksi pääkomponenteista. Sitä on siis yleisimmin näytteissä, jotka on otettu maassa olevasta tahrasta. Käyttämällä Qiagenin Investigator™ Quantiplex-kittiä, kitin sisäinen kontrolli pystyy havaitsemaan hematiinin läsnäolon, kun näytteessä on maksimissaan 110 µM hematiinia, joka on loppukonsentraatio. Se vastaa DNA-näytteen konsentraatiota 1,375 mM, kun käytetään suositeltua 2 µl:n näytetilavuutta qPCR-reaktioissa. Vastaavasti kitillä saadaan määritettyä luotettavasti näytteen DNA-pitoisuus, kun humiinihappoa on näytteessä maksimissaan 20 ng/µl. Tämä vastaa DNA-näytteen konsentraatiota 250 ng/µl käytettäessä 2 µl:n näytetilavuutta. Muita inhiboivia tekijöitä tahrinäytteissä ovat muun muassa kankaiden indigo-väri, luiden ja hampaiden kalsium sekä nahan ja tietyn tyyppisten kasvimateriaalien tanniinihappo. [22.]

Rikospaikkanäytteiden yleisin DNA:n eristysmenetelmä on chelex-eristys. Chelex<sup>®</sup> 100:n (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) käyttö perustuu kelatiini-resiinin käyttöön. Ioninvaihto-resiini chelex koostuu styreenidivinyylibentseenikopolymeereista sisältäen imonoasetatti-ioneja, jotka toimivat kuin kelatiini-ryhmät sitoutuessaan polyvalentteihin metalli-ioneihin, kuten magnesiumiin. Kun reaktioista poistetaan magnesium, DNA:ta hajottavat nukleasientsyymit inaktivoituvat, ja siten DNA-molekyylit ovat turvassa. [1; 2, s. 39–45.]

Useimmissa ohjeissa näytteisiin, kuten veritahroiin, lisätään 5 prosenttista chelex-suspensiota (pH 9-11), jota sekoitetaan magneettisekoittajalla. Lisäksi näytteisiin lisätään proteinaasi-K-seriiniä, joka puhdistaa näytteet kontaminoivista proteiineista sekä inaktivoi muut entsyymaattiset tapahtumat ja nukleasit, jotka voivat heikentää DNA:ta tai RNA:ta puhdistuksen aikana. Eristettäessä DNA:ta spermasta näytteisiin lisätään myös DDT:tä ( $C_{14}H_9Cl_5$ ) siittiösolujen hajottamiseksi, koska pelkkä proteinaasi-K ei pysty hajottamaan vahvaa solukalvoa. Tämän jälkeen näytteitä keitetään useita minuutteja, jolloin proteinaasi-K:n ja DDT:n läsnä ollessa, solut hajoavat ja DNA vapautuu. Lähellä 100 °C lämpötilaa olevat lämpötilat denaturoivat DNA:n ja samalla solumembraanit hajoaa ja solujen proteiinit tuhoutuu. Pienellä sentrifugoinnilla saadaan chelex ja muu solujäte eroon supernatantista, jossa denaturoitu DNA on.

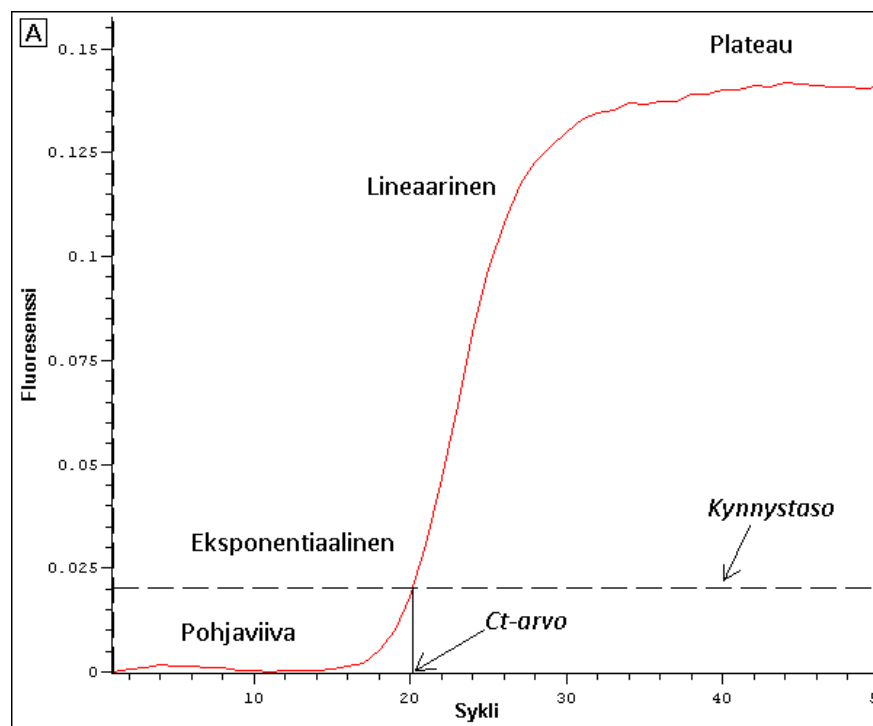
Koska chelex denaturoi kaksijuosteisen DNA:n tuottaen yksijuosteista DNA:ta, eristystuotteita voidaan käyttää vain PCR-pohjaisissa menetelmissä. Eristysmenetelmän etuna kuitenkin on, että eristykseen voidaan käyttää yhtä ainoaa putkea, jolloin kontaminaatiovaara pienenee huomattavasti. Chelexin käyttö lisäksi vähentää näytteissä mahdollisesti olevien inhiboivien komponenttien vaikutusta, joka jatkossa helpottaa näytteiden todellisen DNA-konsentraation selvittämistä. Vaikka yleensä toiveena on, että tahrinäyte on mahdollisimman vahva eli sisältää mahdollisimman paljon ihmisen tumallisia soluja, veritahrat tekevät poikkeuksen. Pienestäkin veritahrasta voidaan saada kelpo DNA-tunniste, jolloin vältetään veren hematiinin helposti aiheuttama määrityksiä haittaava inhibitio. [1; 2, s. 39–45; 3; 4.]



## 2.2 qPCR

### 2.2.1 Yleistä

Jotta loppujen lopuksi rikospaikkänäytteestä saadaan tunniste, on se ensin kvantitoitava PCR-menetelmää käyttämällä. Kun tiedetään näytteiden DNA-pitoisuus, voidaan optimoida DNA:n monistusreaktiot. DNA:n monistus tehdään käyttämällä qPCR:ta. Tuolloin DNA:n monistumista voidaan seurata reaaliaikaisesti sopivan detektorin ja PCR-laitteeseen liitetyn tietokoneen avulla. Tietokoneohjelma piirtää monistumisesta reaaliaikaista kuvaajaa, jossa x-akselilla on syklit ja y-akselilla fluoresenssin määrä, kuten kuvassa 1. [5; 6; 7; 8; 9.]

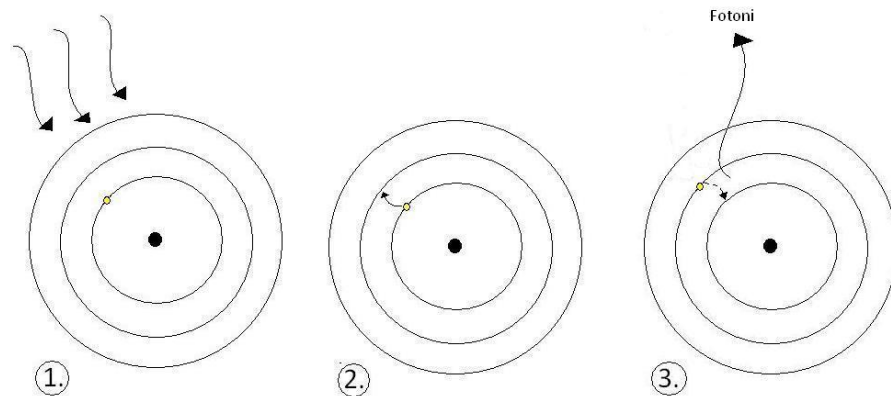


Kuva 1. qPCR-monistuskäyrä, jossa y-akseli on logaritminen [9].

Reaktioihin lisätään fluoresoiva koetin tai leima, joka fluoresoi sitoutuessaan monistuneeseen PCR-tuotteeseen. Se, kuinka monta PCR-sykliä tarvitaan, jotta fluoresenssi alkaa lisääntyä merkittävästi, on suhteessa näytteessä olevan alkuperäisen DNA:n määrään; mitä enemmän monistuvaa tuotetta reaktiossa on, sitä aiemmin muodostunut spesifi fluoresenssi havaitaan. [5; 6; 7; 8; 9.]

PCR-monistuksen jälkeen jokaiselle näytteelle määritetään kynnysyklarvo,  $C(t)$ -arvo, joka on kohta, jossa näytteen fluoresenssi leikkaa kynnysarvoviivan. Kynnysarvoviiva asetetaan pohjaviivan yläpuolelle kohtaan, jossa monistuskäyrä kasvaa eksponentiaalisesti (kuva 1). Tämä tarkoittaa fluoresenssin tasoa, jossa qPCR-tuotteen fluoresenssi on detektoitavissa eli kohta, jossa fluoresenssi kohoaa taustafluoresenssin yläpuolelle. Standardisuoran ja  $C(t)$ -arvon avulla saadaan laskettua tuntemattomassa näytteessä olevan DNA:n määrä. Reaktioiden tehokkuus voidaan myös määrittää standardisuoran avulla, jolloin kulmakerroin (slope) on  $-3,6$  ja  $-3,1$  välillä, mikä vastaa 90–110 %:n tehokkuutta. [5; 6; 7; 8; 9; 16.]

Fluoresenssi on ilmiö, jossa molekyyli absorboi valoa emittoiden eli vapauttaen siten fotonin. Fluoresenssin periaate on kuvattu kuvassa 2.

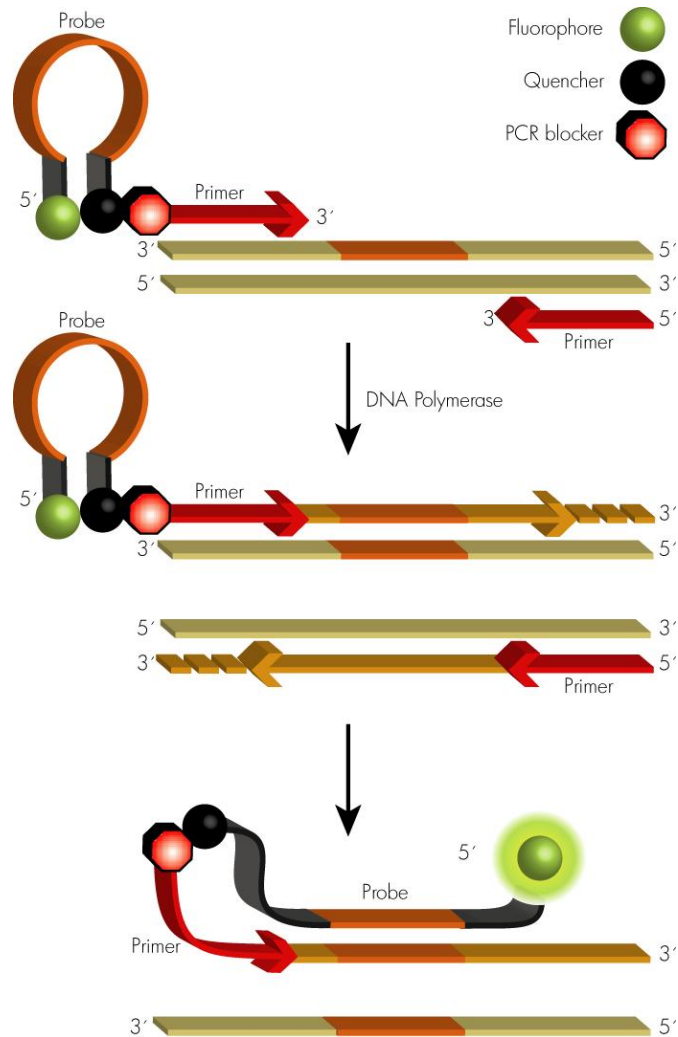


Kuva 2. Fluoresenssin periaate [10].

Valon absorptiolla eli imeytymisellä molekyyliin (kohta 1) saadaan aikaan viritystila, jossa atomin elektroni siirtyy korkeammalle energiatasolle, tapahtumaa kutsutaan eksitaatioksi (kohta 2). Viritystilan purkautuessa elektroni palaa korkeammalta energiata-solta takaisin alemmalle tasolle, jolloin syntyy emissio eli syntyy säteilyä, ja fotoni va-pautuu (kohta 3). [5; 10; 11; 12.]

qPCR:ssa detektoinnin apuna käytetään DNA:han sitoutuvia fluoroforeja, joiden emissio voidaan detektoida eri aallonpituuksilla. Pääpiirteittäin erilaiset fluorofori-kemiat voi-daan jakaa kahteen eri ryhmään, spesifisiin ja epäspesifisiin kemioihin. Yhteistä eri fluorofori-kemioilla on niissä käytettyjen fluoroforien lähettämän signaalin vahvuuden verrannollisuus syntyneen tuotteen määrään. [13; 14.]

Oiagenin Investigator™ Quantiplex-kitin toiminta perustuu Scorpion-alukkeiden eli primerien käyttöön, joiden toiminta muistuttaa fluoresoivalla väriaineella leimattua hydrolyysikoetin TaqMania. Scorpion-alukkeiden toimintaperiaate on esitetty kuvassa 3.



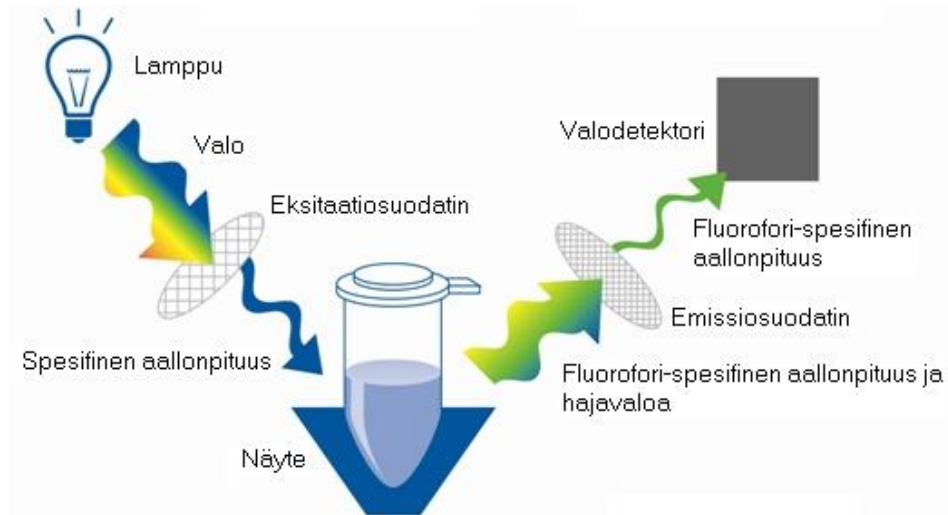
Kuva 3. Scorpion-alukkeiden toimintaperiaate [23].

Kitin alukeseoksen sisältämät Scorpion-alukkeet ovat monitoiminnallisia molekyyliä, jotka sisältävät PCR-alukkeet sitoutuneena kovalenttisesti koettimeen eli probeen. Alukkeet ovat erittäin tunnettuja, koska ne hybridisoituvat niin nopeasti kohdesekvenssiin intramolekulaarisen reaktion kautta. [22; 23.]

Aluke on linkittyneenä kohde-spesifiseen koettimeen PCR-estäjän (kuvassa 3 PCR blocker) kautta. Alukkeen 5'-päähen on sitoutuneena fluorofori ja 3'-päähen sammuttaja eli quencher. PCR-estäjä estää läpiluvun monistuksen aikana, joka johtaisi neularakenteen aukeamiseen ja siten fluoresenssin kohoamiseen, vaikka kohdesekvenssi puuttuisikin vielä. Alukkeen ympärillä olevat sekvenssit ovat komplementaarisia toisilleen, mikä johtaa neularakenteen muodostumiseen. Fluorofori ja sammuttaja ovat lähekkäin, mikä estää fluoroforia fluoresoimasta. Jotta signaalin esto onnistuu, koettimet ovat yleensä alle 30 bp:n pituisia. Monistuksessa kohdesekvenssin ekstensio alkaa koettimen Scorpion-alukkeen päästä. Denaturaation aikana neularakenne aukeaa, jolloin Scorpion-alukkeen sisältävä koetinsekvenssi sitoutuu monistuneeseen komplementaariin kohdesekvenssiin. Neularakennetta ei enää muodostu eli koettimen sitoutuessa PCR-monistustuotteeseen fluorofori ja sammuttaja ajautuvat erilleen. Fluorofori alkaa siten fluoresoida sille tunnusomaista fluoresenssia, jonka määrä lisääntyy entisestään monistuksen edetessä. [22; 23.]

### 2.2.2 qPCR-laitteisto

qPCR-laitteisto koostuu pääasiassa kolmesta eri osasta: lämpömekanismista, valonlähteestä ja detektorista. Koska laitteisto on suljettu, riski näytteiden kontaminoitumiseen on hyvin pieni. qPCR-laitteiston lämpöyksikkö on toiminnaltaan samanlainen kuin tavallisessa PCR-laitteessa. Rakenteeltaan se kuitenkin poikkeaa sen verran, että sillä tulee pystyä mittaamaan fluoresenssia. Riippuen käytetystä detektointikemiasta fluoresenssi mitataan jokaisen syklin lopussa joko annealing- tai ekstensio -vaiheen jälkeen. Kuvassa 4 on esitetty fluoresenssin detektoinnin periaate. [15; 7; 19; 6.]



Kuva 4. qPCR-laitteen toimintaperiaate [15].

Fluoroforit, joita käytetään qPCR:ssa, vaativat eksitoituakseen valonlähteen. Laitteissa käytettäviä valonlähteitä ovat LED:t, argon-ionilaser, ksenonlamppu sekä kvartsihalogeeni-tungstenlamppu. Eksitaatio-suodatinta, jolla voidaan valita haluttu eksitaatioaallonpituus, käytetään halogeenilamppujen, sekä yleensä myös LED-valojen kanssa. Laser-valo lähettää valoa tietyllä aallonpituudella, joten silloin eksitaatio-suodatinta ei tarvita. Valo heijastetaan näytteen läpi, jolloin syntyy käytetylle fluoroforille spesifinen emissioaallonpituus. Jotta se saadaan erotetuksi hajavalosta, tarvitaan emissio-suodatinta. Mitä useampi emissio-suodatin laitteessa on, sitä useampaa emissioaallonpituutta laitteella voidaan mitata. Laitteen suorituskykyyn vaikuttaa myös se, millainen suodattimien optinen laatu on. [15; 7; 19; 6.]

### 2.2.2.1 Rotor-Gene Q

QIAgility-pipetointirobotin ohella työssä käytettiin Rotor-Gene Q-qPCR -laitetta. Kuten kuvasta 5 nähdään, telineessä, johon Rotor-Disc laitetaan, on reikiä, jotka mahdollistavat ilmavirran vapaan liikkumisen näytetilassa. Näin saadaan aikaan tehokkaasti reaktiotilan lämmitys ja viilennys sekä varmistetaan, että kaikilla näytteillä on sama lämpötila.



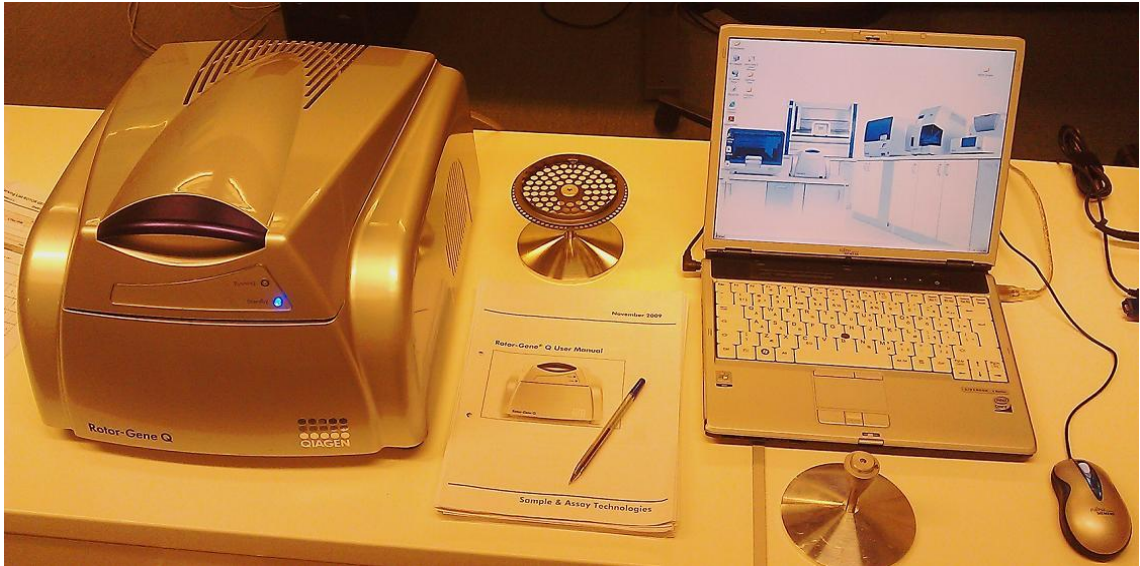
Kuva 5. Näytteet valmiina qPCR-ajoon.

qPCR-ajon ollessa käynnissä näytteet pyörivät laitteessa kuin käytettäessä sentrifugia. Näytteet ovat linjassa detektiooptiikan kanssa ja menevät 150 millisekunnin välein eksitaatio/detektio-optiikan ohi mahdollistaen erittäin nopean tiedonkeräyksen DNA:n monistumisesta. Lämpötilan ja detektioinnin yhdenmukaisuus näytteiden välillä sekä sentrifugiomaisuus eliminoivat näytekohtaisen vaihtelun ja reunaefektin. Näin ollen Rotor-Gene Q-qPCR -laite on markkinoiden tarkin ja monipuolisin tällä hetkellä. [21.]

Rotor-Gene Q-qPCR -laitteessa on kuusi erillistä LED-valonlähdettä, joita voidaan yhdistellä käytettäväksi kuuden erilaisen detektiofilterin ja erittäin herkän PMT-detektorin kanssa. Näin mahdollistuu laajan mittausalueen käyttö: eksitaatio aallonpituuksilla 365–680 nm ja detektio aallonpituuksilla 460–740 nm. Markkinoiden laajin mittausalue, UV-valosta infrapuna-aallonpituuksiin, mahdollistaa lähes minkä vain fluorofori-kemian käytön tulevaisuudessa, koska qPCR-laitteen ohjelmalla voidaan luoda uusia eksitaatio-detektioaallonpituus-yhdistelmiä. [21.]

### 2.2.2.2 Bio-Rad

Tarkoituksena on, että biologian osastolla nykyään käytössä oleva kokoonpano, Bio-Radin PTC-0200-perusrunko ja CHROMO4-detektori/lämpötilayksikkö, korvataan uudella Qiagenin Rotor-Gene Q-qPCR -laitteella, joka nähdään kuvassa 6.



Kuva 6. Rotor-Gene Q-qPCR -laite.

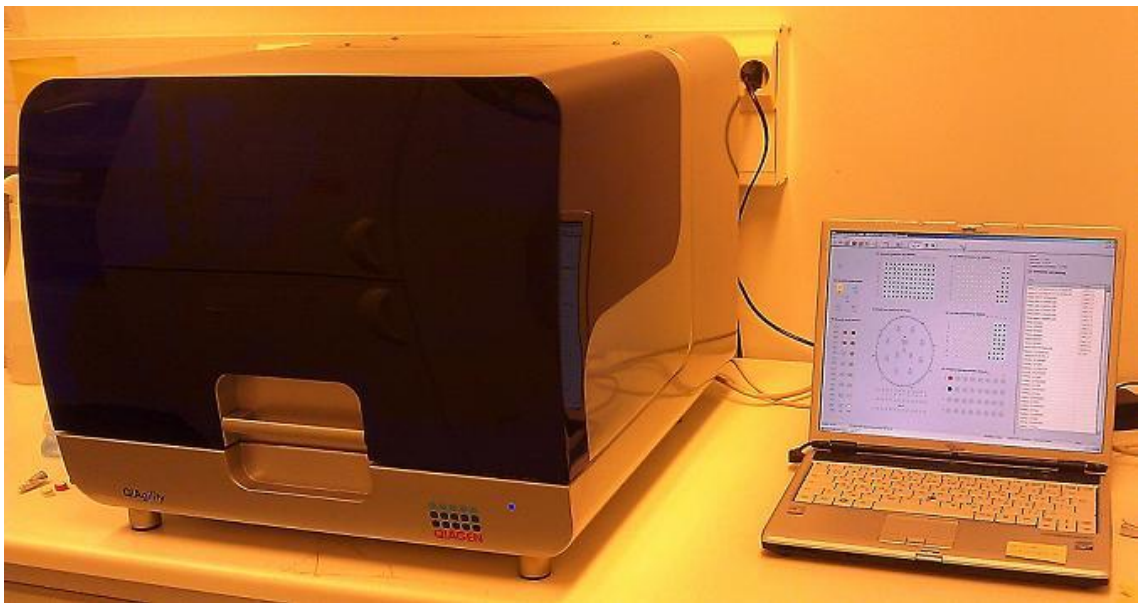
Bio-Radin PCR-laitteen huonona puolena ovat näytteiden kiinteät näytepaikat, joiden takia lämpötila näytteiden välillä saattaa vaihdella ja siten tulokset eivät ole suoraan täysin verrattavissa keskenään. Näytteitä lämmittävän kannen jäähdytys on hidasta, koska lämmin ilma ei pääse kiertämään suljetussa reaktiotilassa. Käytettäessä laitetta on myös tärkeää tarkastaa, ettei näytekuopissa ole kuplia, koska ne haittaavat mittaus- ta. Lisäksi mittauskapasiteetti on hieman suppeampi, kuin Qiagenin Rotor-Gene Q-qPCR -laitteen, koska siinä on vain neljä LED-valonlähdettä ja neljä fotodiodia, ja de- tektointi on mahdollista vain neljällä eri värillä samalla kertaa.



Käytettäessä Rotor-Gene Q-qPCR -laitetta yhdessä Qiagenin Investigator™ Quantiplex-kitin kanssa reaktioaika on huomattavasti lyhyempi, kuin nykyisin biologian osastolla käytössä olevalla Bio-Radin PCR-kokoonpanon, ja Applied Biosystems'in Quantifiler™ Human DNA Quantification-kitin yhdistelmällä. Lyhyt reaktioaika nopeuttaisi näytteiden kulkua laboratoriossa, mikä olisi erittäin tärkeää näytemäärien kasvaessa kaiken aikaa.

### 2.2.2.3 QIAgility

Rotor-Gene Q-qPCR -laitteen ohella voidaan käyttää QIAgility-pipetointirobottia (kuva 7).

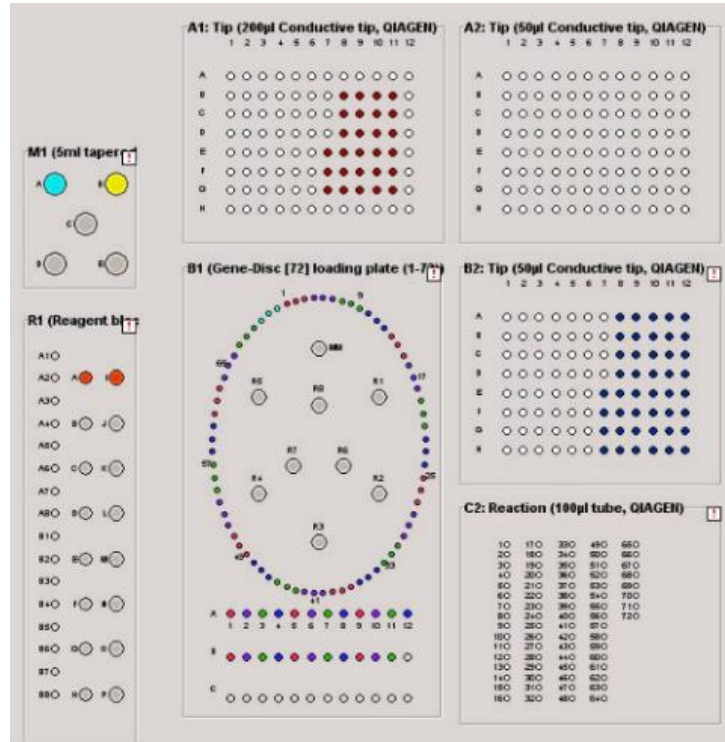


Kuva 7. QIAgility-pipetointirobotti.

QIAgility-pipetointirobotilla voidaan pipetoida 100 PCR-reaktiota noin puolessa tunnissa. Korkealaatuinen pipetointi saadaan aikaan käyttämällä nestepinnan tunnistusta ja filterikärkiä. Lisäksi laitteen asetuksista on mahdollista valita UV-valon käyttö, jolla voidaan poistaa työpöydältä mahdolliset kontaminaatiot. Samoin voidaan valita HEPA-filterin käyttö, joka pitää laitteen sisällä olevan ilman puhtaana PCR-reaktioiden pipetoinnin aikana. [20.]



Alla on kuva QIAgility-pipetointirobotin hallinnointiin käytettävästä QIAgility-ohjelmasta, jonka työpöytä koostuu seuraavista osista: reaktioseos (M1), reagenssit (R1), näytteet (B1) sekä levyt/putket (C2). Lisäksi kohdassa A1 on 200 µl:n kärkeä ja kohdissa A2 ja B2 on 50 µl:n kärkeä. [20.]



Kuva 8. QIAgility-ohjelman työpöytä [20].

QIAgility-pipetointirobotin hallinnointiin käytettävän QIAgility-ohjelman työpöytä vastaa pipetointirobotin työpöytä (kuva 9), joten erilaisten pipetointiohjelmien luominen on helppoa.



Kuva 9. QIAgility-pipetointirobotin työpöytä [20].

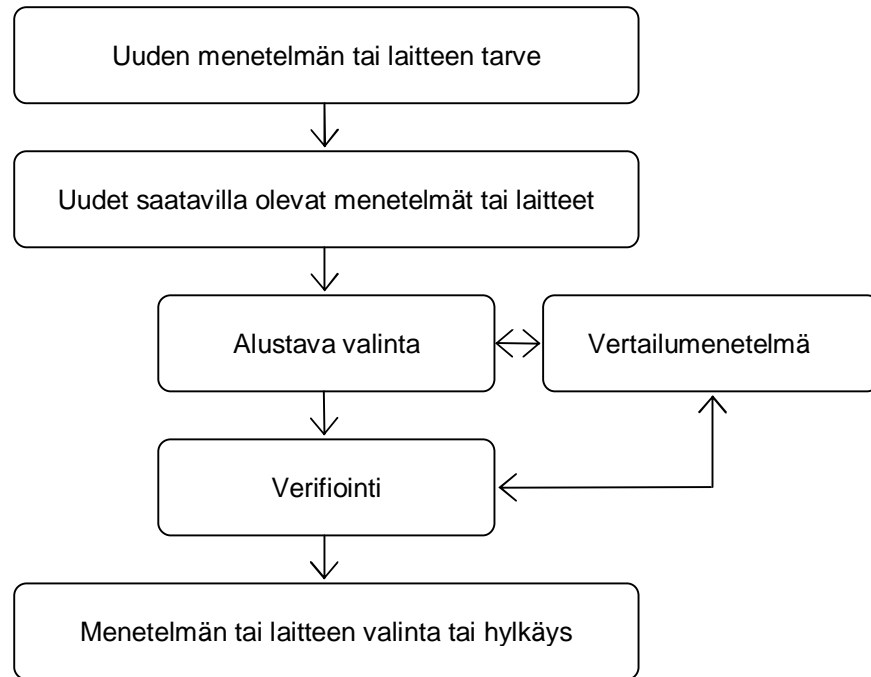
### 2.3 Verifiointi

Menetelmän kelpoistamisella eli validoinnilla tarkoitetaan mittausten sarjaa, joiden avulla osoitetaan analyysimenetelmän tuottavan oikeita tuloksia. Sen avulla tutkimalla ja puolueettomalla näytöllä varmistetaan, että menetelmä täyttää käyttötarkoituksen asettamat vaatimukset. Olemassa oleva taustatieto ja validoinnin tuloksena syntyvä tieto kerätään yhteen ja niiden perusteella todetaan onko menetelmä luotettava ja arvioidaan sen soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen. Validoinnin avulla saadaan tietää menetelmien kriittiset tekijät, ja saadun validointitiedon avulla saadaan määritettyä menetelmän toimintarajat. [17; 12.]

Mikäli menetelmiin on tehty oleellisia muutoksia, tehdään uudelleenvalidointi. Siinä määritettyjen spesifikaatioiden esimerkiksi toistettavuus ja luotettavuus todentamista kutsutaan verifiointiksi. Menetelmän verifiointilla laboratorio todentaa, että saatavien tulosten tarkkuus ja mittausalue täyttävät laboratorion ja asiakkaan asettamat tarpeet. Käytännössä verifoinilla tarkoitetaan validointia suppeampaa menetelmän testausta. Menetelmävastuuhenkilö päättää tapauskohtaisesti verifiointin laajuuden. [18; 17.]

Työssä tarkastellut spesifikaatiot olivat toistettavuus, luotettavuus, herkkyys ja tulosten oikeellisuus.

Seuraavalla sivulla olevassa kuvassa 10 on esitetty verifiointin vaiheet. Verifiointissa aluksi todetaan uuden menetelmän tai laitteen tarve. Seuraavaksi selvitetään minkälaisia laboratorion tarpeisiin sopivia menetelmiä tai laitteita on tarjolla ja tehdään alustava valinta. Samalla sovitaan vertailumenetelmä, jolla saatuja tuloksia vertaillaan uudella menetelmällä tai laitteella saatuihin tuloksiin. Päätetään myös mitä materiaalia testaukseen käytettävät näytteet ovat ja minkä verran niitä tarvitaan (rinnakkaismääritykset), jotta tuloksia voidaan pitää luotettavina. Verifiointissa saatujen tulosten ja niistä tehtyjen johtopäätösten perusteella valitaan voidaanko menetelmä tai laite ottaa käyttöön. [9.]



Kuva 10. Verifioinnin vaiheet.

Menetelmää testattaessa pitää käyttää aina tunnettuja näytteitä, joiden materiaali muistuttaa todellista näyttemateriaalia niin tarkasti kuin mahdollista. Näin voidaan ottaa huomioon esimerkiksi inhibiittorien vaikutus tuloksiin. Tarkoituksena ei myöskään ole tehdä validointia ideaaliolosuhteissa, vaan todellisessa käyttöympäristössä. Rinnakkaismittausten avulla selvitetään menetelmän toistettavuus. Pelkkä menetelmän validointi ja verifiointi eivät riitä, vaan jatkossa menetelmien toimivuutta tulee seurata sisäisten kontrollien ja ulkoisten laadunarviointinäytteiden avulla. [12; 17.]

### 3 QIAgility-pipetointirobotin toiminnan testaus

#### 3.1 Näytteet

Qiagenin QIAgility-pipetointirobotin toiminnan testaukseen käytettiin seuraavia näytteitä:

- humaaniveri (otettu 12.4.11, jaettu 6.7.11/HA)
  - chelex-eriste (eristys 29.8.11/TN, jaettu 30.8.11/TN)
  - CST-eriste (eristys 14.9.11/TH, jaettu 15.9.11/TN)
- humaanisperma (saatu 8.10.11, eristys 9.10.11/TN)
- 200 ng/μl kvantitointistandardi (Applied Biosystems, Quantifiler™ Human DNA Standard)
- 0,07 ng/μl kontrolli DNA 007 (Applied Biosystems, AmpFLSTR® DNA Control 007)
- punainen ja vihreä elintarvikeväri
- MQ-H<sub>2</sub>O.

Veri- ja spermaeristeitä oli tarkoitus käyttää testeissä oikeina näytteinä sen jälkeen, kun on todettu verifioitavien QIAgility-pipetointirobottien toimivan. Näytteitä käytettiin myös testiin, jonka avulla saataisiin tietää kuinka samankaltaisia tuloksia kombinaatiot vanha kitti ja vanha laite sekä uusi kitti ja uusi laite antaisivat. Vanhalla kitillä ja laitteella tarkoitetaan laboratorioissa nykyään käytössä olevaa Applied Biosystems Quantifiler™ Human DNA Quantification-kittiä ja Bio-Rad PTC-0200- ja CHROMO4 qPCR-laitteistokokoonpanoa. Uusi kitti on Qiagenin Investigator™ Quantiplex Kit ja uusi laite on Qiagenin Rotor-Gene Q-qPCR -laite. Kvantitointistandardia käytettiin ristikontaminaatiotesteihin. Kontrolli DNA 007:ää käytettiin testeissä Qiagenin Investigator™ Quantiplex-kitin oman kontrollin Z1 lisänä. Punaista ja vihreää elintarvikeväriä käytettiin kielten säästämiseksi, kun seurattiin, toimiko pipetointirobotti oikein. MQ-H<sub>2</sub>O:tä käytettiin elintarvikeväritesteissä master mixin asemasta, ja lisäksi se oli negatiivisena kontrollina muissa testeissä. Osa kontaminaatiotesteistä tehtiin myös niin, että standardien ja kontrollien lisäksi näytteinä kaikissa lopuissa kuopissa oli MQ-H<sub>2</sub>O.

### 3.2 Investigator™ Quantiplex Kit

Näytteiden analysointiin käytettiin Rotor-Gene Q-qPCR –laitteen kanssa yhteensopivaa Investigator™ Quantiplex-kittiä, joka on kehitetty ihmisen DNA:n kvantitoimiseen qPCR:lla. Kitti sisältää Reaction mix FQ:n, Primer mix IC FQ:n ja kontrolli-DNA Z1:n. Alla olevassa taulukossa 1 on kuvattu qPCR-monistusreaktioita varten valmistettavan master mixin pipetointiohje yhtä qPCR-reaktiota kohden. Yhteen reaktioon tulee 2 µl näytettä.

Taulukko 1. Master mixin pipetointiohje.

Reagenssi	Tilavuus / 25 µl:n reaktio	Loppukonsentraatio
Reaction Mix FQ (2,18x)	11,5 µl	1x
Primer Mix IC FQ	11,5 µl	1x
Lopputilavuus	23 µl	

Reaktioseos on entsyymien ja puskurin seos, joka tukee nopeaa Scorpion-alukkeiden reaktiota. Puskuri sisältää QBond-molekyylin, joka lisää DNA-polymeraasin affiniteettia lyhyeen yksijuosteiseen DNA:han. Tämän vuoksi annealing-aika lyhenee. Alukeseos sisältää alukkeen, Scorpion-alukkeen ja templaatin sisäistä kontrollia varten. Sisäänrakennettuna ominaisuutena on 200 bp:n kokoinen sisäinen kontrolli, jonka avulla nähdään onko PCR-monistuminen onnistunut ja kuinka paljon mahdollista inhibitiota on. Käyttämällä kitin kontrolli-DNA Z1:tä, luvataan herkkyden olevan 1 pg/µl DNA:ta ja standardisuoran olevan lineaarinen 5 pg/µl asti.

Työn kaikki qPCR-ajot tehtiin käyttämällä Investigator™ Quantiplex–qPCR –kittiä ja Rotor-Gene Q-qPCR –laitetta. Alla olevassa taulukossa 2 on esitetty testeissä käytetyn qPCR-ohjelman kulku.

Taulukko 2. qPCR–ohjelma.

Step	Lämpötila	Aika	Syklit	Muuta
PCR:n aktivaatio	95 °C	1 min		PCR vaatii esi-inkubaation DNA -polymeraasin aktivoimiseksi
2-step syklitys:				
denaturaatio	95 °C	1 s	40	
yhdistetty annealing / ekstensio	60 °C	10 s		Fluoresenssidatan keräys käyttäen green- (FAM) ja yellow-kanneleja (VIC)

FAM-leimaa käytetään monistettujen PCR-tuotteiden havaitsemiseen ja VIC-leiman avulla nähdään sisäisen kontrollin monistuminen. Kitin DNA-polymeraasilla voidaan monistaa spesifisesti ihmisen genomien 146 bp:n multikopio-alueita. Alue on valittu sen mukaan, että se antaa korkean herkkyuden ja luotettavuuden eri yksilöiden ja väestöjen välillä. Multikopiokohdealue, jota monistetaan, on 4NS1C. Se sijaitsee lukuisissa ihmisen genomien autosomeissa. 4NS1C alue edustaa noin 20 kopiota / haploidi genomi.

### 3.3 Esivalmistelut

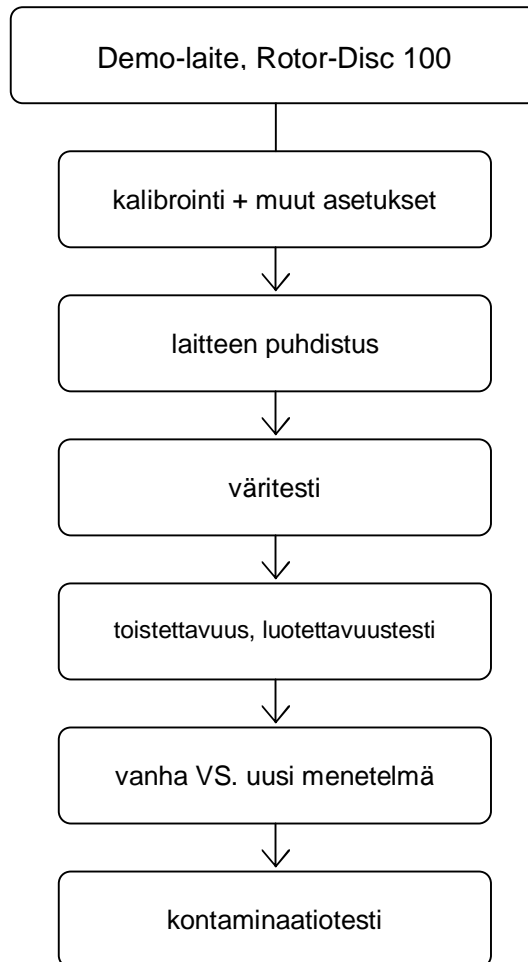
Ennen QIAgility-pipetointirobotin testauksen aloittamista valmistettiin näytteet, joita laitetta testattaessa oli tarkoitus käyttää. Valmistettavat näytteet olivat chelex- ja CST-eristeet humaanista verestä sekä DNA-eriste humaanista spermasta. Näytteet kvantitoitiin käyttämällä Bio-Radin PCR-kokoonpanoa ja Quantifiler™ Human DNA Quantification -kittiä.

DNA-näyte verestä eristettiin chelex-eristysmenetelmällä RLAB-DNA3 menetelmäohjeen mukaisesti. Määritettiin verinäytteen DNA-pitoisuus totaalkvantitoimalla se menetelmäohjeen RLAB-DNA13 mukaan, niin että sarjaan laitettiin laimentamaton veri ja veri laimennoksella 1:5, kolme rinnakkaista kummastakin. Laboratorion toisen ryhmän työntekijä teki CST-eristeen verestä menetelmäohjeen RLAB-DNA24 mukaisesti.

Spermalle tehtiin suoraspermaeristys menetelmäohjeen RLAB-DNA17 mukaan, poikkeuksena olivat muutokset proteinaasi-K:n ja DDT:n määrissä sekä inkubaatioajassa. 10 mg/ml proteinaasi-K:ta ja DDT:tä, jonka koostumus on 1 g DDT:a/ 6,5 ml DDT – puskurikantaliuosta, laitettiin menetelmäohjeesta poiketen tuplasti. Lisäksi inkubointiaikaa +56 °C:ssa pidennettiin puoleentoista tuntiin. Reagenssien määrää ja inkubaatioaikaa lisättiin, koska tavoitteena oli saada mahdollisimman korkean konsentraation omaavia spermaeristeitä. DNA:n eristyksen jälkeen näytteitä konsentroidiin Microcon YM-100 -menetelmällä menetelmäohjeen RLAB-DNA27 mukaisesti. Ohjeesta poiketen suodattimelle pipetoitiin vain 200 µl MQ-H<sub>2</sub>O:tä, koska näytettä oli normaalitilannetta enemmän. Spermanäytteet kvantitoitiin, kuten verinäytteet. Sarjaan laitettiin laimentamaton sperma sekä 1:100- ja 1:1000-laimennokset, kaikista kolme rinnakkaista.

### 3.4 Toimintatellit

Biologian linjalle tilattujen kahden QIagility-pipetointirobotin kanssa oli toimitusvaikeuksia, joten suurin osa toimintatesteistä tehtiin Qiagenilta lainassa olleella demolaitteella. Seuraavalla sivulla olevassa kuvassa 11 on vuokaavio työn vaiheista.



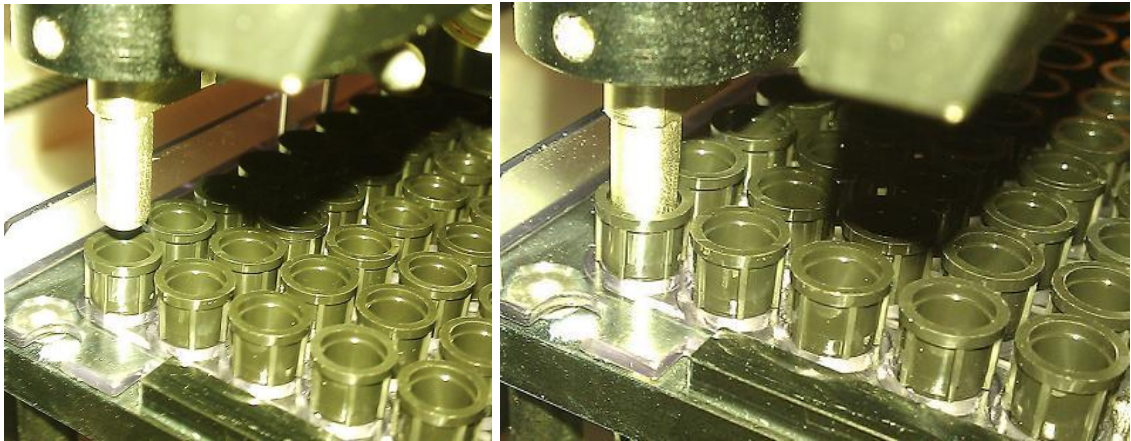
Kuva 11. Vuokaavio demo-laitteella tehdyistä toimintatesteistä.

#### 3.4.1 QIAgility-pipetointirobotin käyttöönotto

Ennen toimintatestien aloitusta laite kalibroitiin. Kalibrointia hallinnoitiin tietokoneen QIAgility-ohjelmalla ja se tehtiin QIAgility-pipetointirobotin kannen ollessa auki, koska kärjenottoa ja yksiköiden paikkojen kalibrointi tehtiin silmämääräisesti arvioiden.



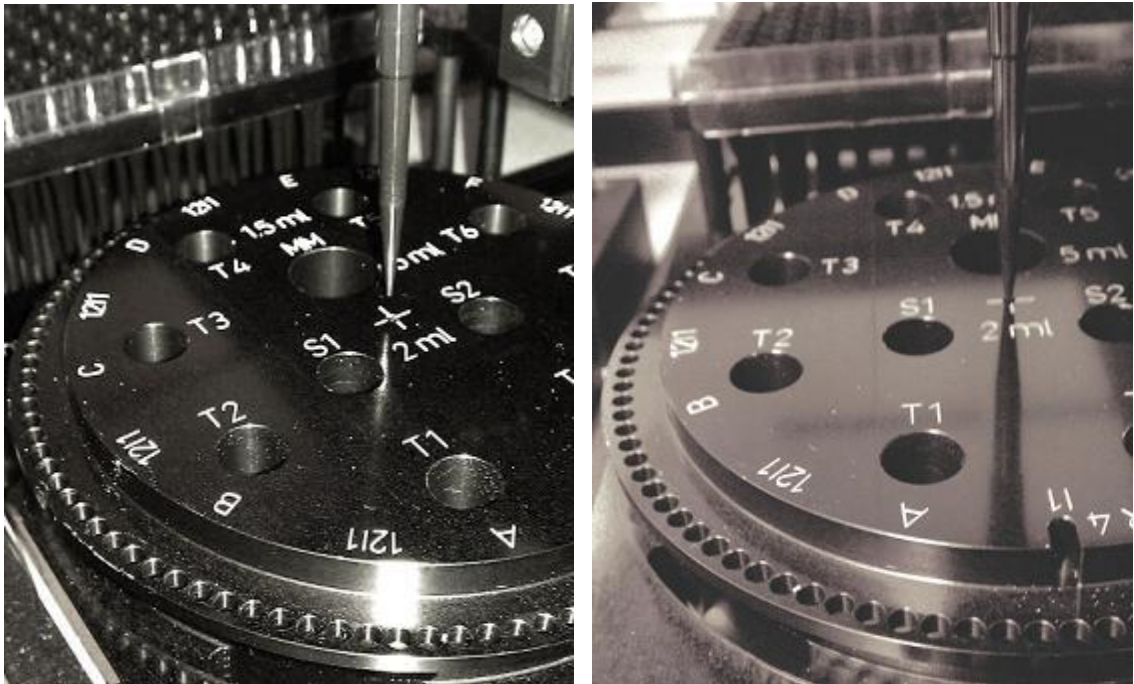
Aluksi kalibroitiin kärjenottokohta, eli kohta, johon pipetointirobotin käsi asettuu ottaakseen kärjen kärkitelineestä. Laitteella on kolmessa yksikössä kärkiä, kaikille yksiköille tehtiin erikseen kärjenottokohdan kalibrointi. Kalibrointi toteutettiin niin, että tietokoneohjelman avulla liikutettiin pipetointirobotin kättä sivu- ja korkeussuunnassa silmämääräisesti arvioiden kohtaan, jossa se asettuu mahdollisimman keskelle kärkeä, kuten kuvasta 12 nähdään.



Kuva 12. Kärjenottokohdan kalibrointi.

Kärjenottokohdan ollessa sopiva, voitiin aloittaa QIAgility-pipetointirobotin muiden yksiköiden paikkojen ja korkeuksien kalibrointi. Paikkojen kalibrointi tehtiin jokaiselle yksikölle (reaktioseos, reagenssit, näytteet, putket) erikseen samalla tavoin kuin kärjenottokohdan kalibrointi niin, että käyttämätön kärki ohjattiin mahdollisimman keskelle kuoppaa, johon reagenssiputki asetetaan.

Näyteyksikön paikan kalibrointi poikkesi muiden yksiköiden kalibroinnista siten, että kalibrointi tehtiin yksikön keskellä olevan pienen reiän keskelle, kuten kuvassa 13. Tärkeää oli, ettei kalibrointia tehdä reiän halkaisevan rastin mukaan, koska se painetaan vasta jälkikäteen yksikköä valmistettaessa eli se on vain suuntaa antava kuvio.



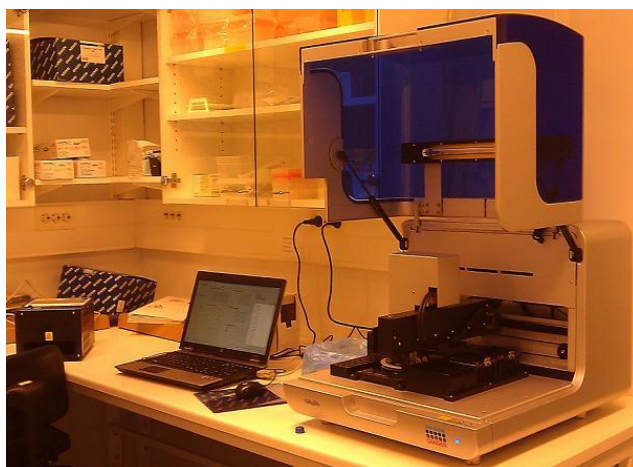
Kuva 13. Näyteyksikön paikan kalibrointi.

Yksiköiden paikkojen kalibroinnin jälkeen kalibroitiin yksikköjen korkeudet. Yksiköiden korkeuden kalibrointi tarkoittaa sitä kuinka syvälle putkeen kärki asettuu pipetointirobotin pipetoidessa. Korkeuden kalibrointi toteutettiin niin, että kuhunkin yksikköön laitettiin neljä niihin sopivaa tyhjää putkea laitteen osoittamiin kuoppiin. Poikkeuksena oli reaktioseos-yksikkö, jossa oli paikka vain yhdelle 5 ml:n putkelle, ja 100 näytteen näyte-yksikkö, jolle mittauksia tehtiin 12 kappaletta. QIAgility-tietokoneohjelman avulla laite mittasi putkien syvyyden automaattisesti asettamalla kärjen niin syväälle putken sisään, että kärki osui putken pohjaan. Tämän jälkeen laite laski mittaustuloksien keskiarvon ja vähensi siitä 20 pykälää, josta tuli korkeus, johon kärki asettuu pipetoidessa reagensseja kuoppiin.

Laitteen kalibroinnin jälkeen testattiin eri asetusten vaikutusta pipetointirobotin toimintaan. Qiagenin edustajan suositus oli, että kärkiä käytettäisiin kärkien säästämiseksi kahdeksan kertaa uudelleen, kun mahdollista, eli käytännössä pipetoitaessa reaktioseosta putkiin. Testattiin kestäisivätkö kärjet niin monta uusiokäyttökertaa, vai olisi-ko jokin muu uusiokäyttökertojen määrä parempi. Pipetointirobotti laitettiin pipetoi-maan vettä Rotor-Disc 100:lle, kun kärkien uusiokäyttökertojen määrä oli suositeltu kahdeksan kertaa. Laite vaihtoi kärkeä viisi kertaa pipetoinnin aikana, eli pipetoitiin yhteensä 40 kuoppaan vettä. Sama toteutettiin vielä asetuksilla neljä, kolme ja kaksi kärjen uusiokäyttökertaa. Pipetointia ja kärkien kuntoa käytön aikana ja sen jälkeen seurattiin kaikkien pipetointien ajan QIAgilityn kannen ollessa auki.

Seuraavaksi testattiin, kuinka perusasetus single-stage- tai 3-stage-asetukset vaikutta- vat kärjenottotapaan ja -nopeuteen kärkitelineestä. Single-stage- eroaa 3-stage- asetuksesta siten, että siinä pipetointirobotin käsi laskeutuu yhdellä sykäyksellä alas ottaakseen kärjen, kun 3-stage-asetuksella käsi laskeutuu ottamaan kärjen kolmivai- heisesti. QIAgility-ohjelmaa käyttäen asetettiin pipetointirobotti ottamaan useampi kär- ki eri asetusten ollessa käytössä.

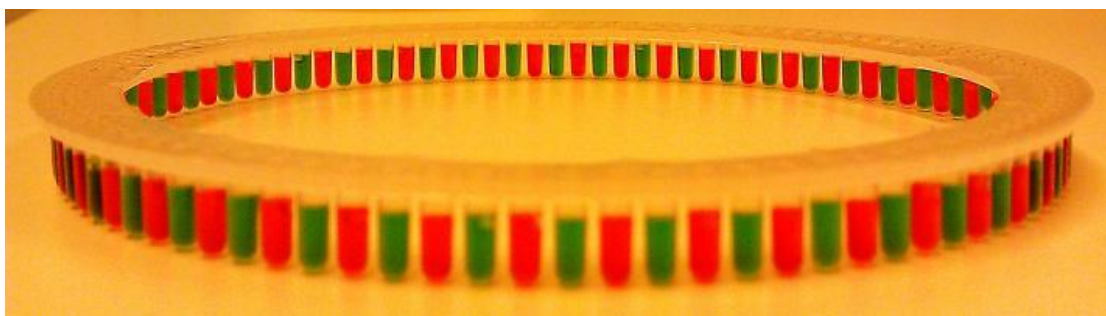
Koska laitteen kalibrointi ja asetusten testaus oli tehty laitteen kannen ollessa auki (ku- va 14), laite oli puhdistettava ennen toimintatestien aloittamista. Pipetointirobotin yksi- köt irrotettiin ja pestiin astianpesuaineella. Tyhjä laite pyyhittiin alkoholittomalla Hy- gisoft-liuoksella, minkä jälkeen sille tehtiin 20 minuutin UV-käsittely. Lisäksi kaikki kär- jet vaihdettiin uusiin.



Kuva 14. QIAgility-pipetointirobotti kannen ollessa auki.

### 3.4.2 Toimintatestit QIAgility-demo -laitteella

Kalibroinnin onnistuminen varmistettiin tekemällä väritesti, jossa seurattiin onnistuuko pipetointi, kuten on tarkoitettu ja pysyvätkö kärjet ehjinä. Väritestin pipetointi toteutettiin niin, että QIAgility-pipetointirobotilla pipetoitiin Rotor-Disc 100:lle ensiksi 23  $\mu\text{l}$  vettä ja sitten 2  $\mu\text{l}$  punaista ja vihreää elintarvikeväriä siten, että samaa väriä oli aina joka toisessa kuopassa, kuten kuvassa 15.



Kuva 15. Väritesti Rotor-Disc 100:lla [23].

Väritestin jälkeen siirryttiin testaamaan QIAgility-pipetointirobotin pipetoinnin toistettavuutta ja luotettavuutta. Testin avulla saatiin tietää kuinka tarkasti pipetointiroboti pipetoi sille pipetoitavaksi annetun nestemäärän. Ensimmäiseksi punnittiin 1 ml:n Eppendorf-putkia yhteensä 60 kappaletta, minkä painot kirjattiin ylös. Tämän jälkeen putkiin pipetoitiin 50  $\mu\text{l}$ :n kärjillä 2, 25 ja 50  $\mu\text{l}$  vettä, 10 putkea kullakin tilavuudella. Samoin tehtiin 200  $\mu\text{l}$ :n kärjillä, joilla putkiin pipetoitiin 51, 100 ja 200  $\mu\text{l}$  vettä. Veden lisäyksen jälkeen Eppendorf-putket punnittiin ja tuloksista laskettiin pipetointien keskiarvo, keskihajonta, virhearvio sekä suhteellinen virhe. Punnitukset tehtiin analyysivaa´alla Mettler-Toledo AE 200-S.

QIAgility-pipetointirobotin pipetoinnin luotettavuus- ja toistettavuustestissä oli saatu hyväksyttävät tulokset, joten suoritettiin testiajo, jonka avulla saataisiin tietää kuinka samankaltaisia tuloksia kombinaatiot vanha kitti ja vanha laite sekä uusi kitti ja uusi laite antavat. Näytteitä oli kolme erilaista: chelex-eristetty veri, CST-eristetty veri ja sperma, kaikista tehtiin rinnakkaiset. Määritettiin näytteiden pitoisuudet yhdistelmällä vanha kitti ja vanha laite (ks. luku 3.2). Analysointi tehtiin Opticon Monitor 3.1-ohjelmalla. Kombinaatiolla uusi kitti ja uusi laite käytettiin Rotor-Gene Q-qPCR -laitetta ja Investigator<sup>TM</sup> Quantiplex-kittiä, tulosten analysointiin käytettiin Rotor-Gene Q Series Softwarea.

Testiajon, josta saatiin tietoa vanhalla (Bio-Rad ja Applied Biosystems -yhdistelmä) ja uudella (Qiagen) menetelmällä saatavien tulosten vertailukelpoisuudesta, jälkeen aloitettiin ristikontaminaatiotestien teko. Myös jatkossa kaikissa testeissä käytettiin Rotor-Gene Q-qPCR -laitetta ja Investigator™ Quantiplex-kittiä. Analysointiin käytettiin Rotor-Gene Q Series Softwarea.

Kontaminaatiotestit tehtiin käyttäen 100-kuoppaista Rotor-Discia reaktiutilavuuden ollessa joko 20 tai 25 µl:a. Kumpaakin reaktiutilavuutta käytettäessä näytettä laitettiin 2 µl. Standardeista (pitoisuudet: 20; 5; 1,25; 0,312; 0,0781; 0,0195 ja 0,00488 ng/µl), vedestä ja kontrolli DNA 007:sta (30 ng/µl) tehtiin rinnakkaiset. Näytteet olivat vesi ja kvantitointistandardi (200 ng/µl), joita laitettiin vuoronperään joka toiseen kuoppaan. Alla olevassa taulukossa 3 on kuvattu kaikki tehdyt kontaminaatiotestit ja niiden asetukset.

Taulukko 3. Kontaminaatiotestien asetukset.

Kontaminaatiotesti	Reaktiutilavuus (µl)	Asetukset
1.	23 + 2	-
2.	23 + 2	-
3.	18 + 2	näytteiden lisäyksen jälkeinen sekoitus pois
4.	18 + 2	näytteiden lisäyksen jälkeinen sekoitus pois
5.	23 + 2	näytteiden lisäyksen jälkeinen sekoitus pois
6.	18 + 2	näytteiden lisäyksen jälkeinen sekoitus pois + 3-stage kärjenottotapa

Ristikontaminaatiotestien 3, 5 ja 6 jälkeen tehtiin erilaisia muutostoimenpiteitä. Näiden tarkoituksena oli välttää kontaminaatioiden synty seuraavissa testeissä.

Kolmannen ristikontaminaatiotestin jälkeen kalibroitiin näyte-yksikön paikka ja korkeus uudelleen. Koska kalibroinnin asetuksia muutettiin, kittien säästämiseksi kalibroinnin onnistuminen varmistettiin tekemällä jälleen väritesti, kuten edellä, mutta reaktiivilavuus oli nyt 2 µl elintarvikeväriä ja 18 µl vettä 23 µl:n sijaan.

Neljännessä ristikontaminaatiotestissä käytetyn 20 µl reaktiivilavuuden jälkeen kokeiltiin käyttää 25 µl:n reaktiivilavuutta. Viidennen kontaminaatiotestin jälkeen laite kalibroitiin uudelleen, ja muutettiin hieman pipetoinnin asetuksia. Näiden muutosten jälkeen tehtiin taas varmuuden vuoksi väritesti, mikäli kalibroinnissa olisikin jokin mennyt pieleen tai siinä olisi vielä jotain säädettävää. Tällä kertaa väritesti tehtiin sekä 20 µl:n että 25 µl:n tilavuuksilla.

Pipetointirobotille oli tehty erinäisiä toimenpiteitä, joiden jälkeen tutkittiin vielä mahdollisuutta, että Rotor-Discit eivät olisikaan puhtaita, eli kontaminaatiot olisivatkin jo valmiiksi kuopissa. Taltioitiin näyte taltiointitiloissa asianmukaista suojautumista ja työkentelytapoja noudattaen menetelmäohjeen RLAB-DNA21 mukaisesti. Näyte taltioitiin pyyhkimällä yhdellä kostutetulla pumpulipuikolla kaikki uuden käyttämättömän Rotor-Disc 72:n kuopat sisältä, minkä jälkeen pumpuli leikattiin steriiliin 1 ml:n Eppendorfputkeen. Taltiointi tehtiin käyttämällä Rotor-Disc 72:ta testeissä käytetyn Rotor-Disc 100:n sijaan, koska sen kuopat olivat sen verran isompia, että niihin mahtui pumpulipuikko. Tehtiin chelex-eristys menetelmäohjeen RLAB-DNA3 mukaan.

Rotor-Disc 100 olisi sopivampi biologian linjan käyttöön, mutta päätettiin silti siirtyä 72-kuoppaisen Rotor-Discin testaamiseen. Qiagen on validoinut pelkästään Rotor-Disc 72:n, joten vaihto valmistajan jo validoimaan menetelmään tuntui järkevältä. Sen kuopat ovat reilusti isompia ja syvempiä, sillä sen maksimireaktiivilavuus on 100 µl. Siten 25 µl reaktioiden käyttö ei pitäisi olla ongelmallista, kuten Rotor-Disc 100:lla se on testeissä saatujen tulosten perusteella vaikuttanut olevan. Rotor-Disc 100:n maksimireaktiivilavuus on 25 µl (käyttösuositus 15–25 µl), mikä tarkoittaa että samaisella reaktiivilavuudella ja 20 µl:n reaktiivilavuudella nestepinta on erittäin lähellä kuopan yläreunaa. Tämän vuoksi voisi periaatteessa olla mahdollista, että kuopasta toiseen voi helposti siirtyä DNA:ta parissakin eri kohtaa. Esimerkiksi poistettaessa Rotor-Discin yksikköä QIAgility-pipetointirobotista, jotta siihen voidaan liimata heat sealing film kuvan 16 Rotor-Disc Heat Sealer-kalvonliimauslaitteella, se pitää poistaa QIAgility-laitteesta hie-



man vinossa näyteyksikön lukitusmekanismin takia. Toisaalta kontaminaatiovaara voi olla asetettaessa käsin heat sealing filmiä Rotor-Discille liimausta varten (kuva 16), jolloin kalvo voi liikkua tahattomasti pyöreän Rotor-Discin ympärillä.



Kuva 16. Rotor-Disc Heat Sealer.

Rotor-Disc 72:n maksimireaktiutilavuus on 100  $\mu$ l, joten näytteiden nestepinta ei ole lähelläkään kuopan yläreunaa käytettäessä 20 tai 25  $\mu$ l:n reaktiutilavuuksia, mikä voisi mahdollistaa kontaminaatioiden synnyn edellä luetelluissa tilanteissa.

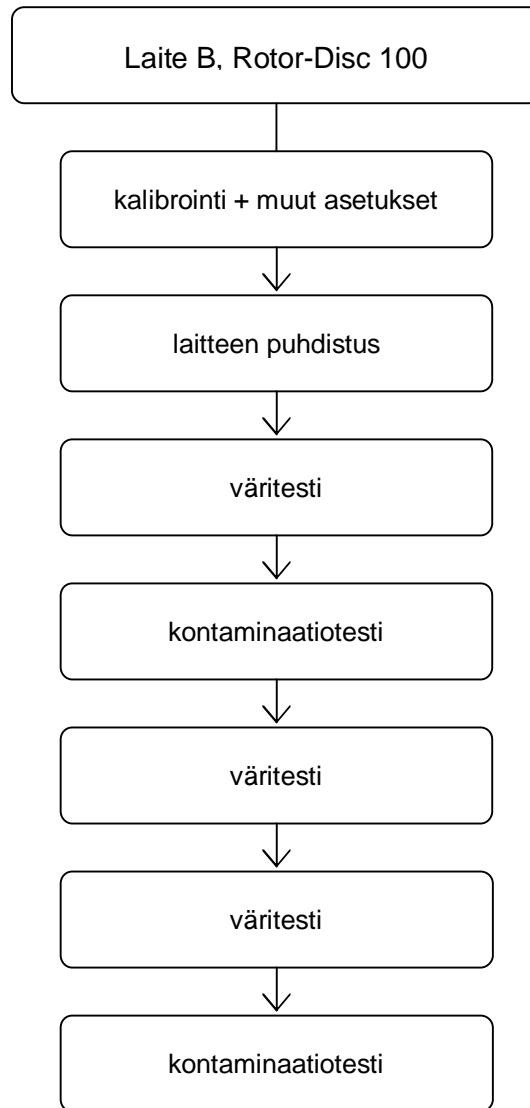
Kalibroitiin Rotor-Disc 72:n käyttöön sopiva näyte-yksikkö, jonka tehtiin jälleen väritesti 25  $\mu$ l:lla. Tämän jälkeen tehtiin ristikontaminaatiotesti kuten aiemmatkin kontaminaatiotestit. Reaktiutilavuutena oli 25  $\mu$ l, näytteiden jälkeinen sekoitusasetus oli pois päältä, ja kärjenottotavaksi asetettiin 3-stage-asetus.

Robotin käsi liikkuu sen verran nopeasti, että tarkkaan katsomallakin on vaikea olla varma meneekö se näytekuppien yli muulloin kuin pipetoidessa kyseiseen kuoppaan reaktioseosta tai näytettä. Suljettiin pois QIAgility-pipetointirobotin vaikutus tuloksiin pipetoimalla manuaalisesti Rotor-Disc 72:lle ensin 23 µl reaktioseosta ja sitten 2 µl näytettä. Kuten aiemmissa kontaminaatiotesteissä, alkuun pipetoitiin ensin Qiagenin kitin kontrolli Z1:stä seitsemää eri laimennosta (vahvin 20 ng/µl, laimennokset aina 1:4), kontrolli DNA 007:ää sekä vettä, kaikkia rinnakkaiset. Näytteitä pipetoitiin seuraavallisessa järjestyksessä: alkuun useampi vesi peräkkäin, seuraavaksi joka toisessa kuopassa vettä tai 200 ng/µl kvantitointistandardia (yhteensä 44 kuoppaa) ja loppuun vielä useampi vesi peräkkäin. Pipetointia seurasi toinen työntekijä, jotta voitaisiin huomata, mikäli pipetoija itse kontaminoi näytteitä työskentelytavoillaan.

### 3.4.3 Toimintatestit QIAgilityilla A ja B

Aloitettiin toimintatestien teko QIAgility-pipetointiroboteilla A ja B. Ensimmäiseksi otettiin käyttöön QIAgility B. Seuraavalla sivulla olevassa kuvassa 17 on vuokaavio työn vaiheista. QIAgilityn B testauksen jälkeen tehtiin toimintatestit myös käyttäen pipetointirobottia A.





Kuva 17. Vuokaavio laitteella B tehdyistä toimintatesteistä.

Ennen toimintatestien tekemistä QIagility-pipetointirobotit kalibroitiin ja asetukset laitettiin kohdilleen, kuten tehtiin, kun otettiin käyttöön Qiagenilta lainassa ollut demolaitetta. Kalibroinnin onnistuminen varmistettiin tekemällä väritesti.

Laitteella B tehtiin kontaminaatiotesti muuten samoin kuin edelliset kontaminaatiotestit, mutta tässä testissä näytteenä oli vain vesi. Kontaminaatiotestin jälkeen kalibroitiin uudelleen kärkienottoa. Tämän jälkeen tehtiin väritesti edellä kuvatulla tavalla (ks. luku 3.3.2). Uusittiin vielä väritesti, joka jouduttiin keskeyttämään pipetointirobotin alkaessa toimia sille kuulumattomalla tavalla. Kalibroitiin uudelleen vielä näyteyksikön paikka ja korkeus, kuten aiemmin on kuvattu (ks. luku 3.3.1). Varmistettiin kalibroinnin onnistuminen väritestillä. Tehtiin kontaminaatiotesti, kuten laitteen B käyttöönoton alussa kuvailtu kontaminaatiotesti tehtiin.

Laitteella B havaittujen ongelmien vuoksi aloitettiin toimintatestien teko QIAgility-pipetointirobotilla A. Testien teko eteni samalla tavalla kuin laitetta B käytettäessä, eli kalibroinnin jälkeen varmistettiin kalibroinnin onnistuminen väritestillä, minkä onnistuttua tehtiin kontaminaatiotesti.

## 4 Tulokset

### 4.1 QIAgility-demo -laite

QIAgility-pipetointirobotin kalibroinnin jälkeen testattiin eri asetusten vaikutusta laitteen toimintaan. Ensiksi testattiin, mikä olisi sopiva määrä kärkien uusiokäytölle. Kaikkien testien aikana ja sen jälkeen kärjet olivat hyvässä kunnossa, joten päädyttiin käyttämään asetusta kärjen kahdeksan uusiokäyttökertaa, kun mahdollista.

Seuraavaksi testattiin single-stage ja 3-stage asetuksia. Todettiin, että asetuksista 3-stage oli parempi kuin single-stage, koska silloin pipetointirobotti otti kärjen rauhallisemmin, jolloin kärki ei mennyt niin vinoon kuin karkeahkolla perusasetuksella. Lisäksi todettiin, että oli asetus kumpi tahansa, sillä ei ollut vaikutusta pipetointiaikaan. Tämä oli hyvä asia, kun tarkoituksena on nopeuttaa näytekulkua laboratoriossa.

Kun laite oli kalibroitu, asetukset olivat kunnossa ja laite oli puhdistettu, tehtiin väritesti, jonka tarkoituksena oli varmistaa oliko kalibrointi onnistunut. Testin aikana, ja sen jälkeen kaikki kärjet olivat ehjiä, eikä silmämääräisen arvion perusteella havaittu värejä sekoittuneena toisiinsa.

Väritestissä tehtyjen havaintojen perusteella todettiin, että toimintatestejä voidaan jatkaa. Testattiin kuinka luotettavia, ja toistettavia tuloksia saadaan käyttämällä QIAgility-pipetointirobottia. Toistettavuus- ja luotettavuustestin tulokset voidaan nähdä liitteestä 1 taulukoista 1-6. Eppendorf-putkien painojen keskiarvo oli 0,9867 g ja keskihajonta 0,0077. Alla olevasta taulukossa 4 on kooste toistettavuus- ja luotettavuustestin tuloksista.

Taulukko 4. Kooste toistettavuus- ja luotettavuustestin tuloksista.

	2 µl	25 µl	50 µl	51 µl	100 µl	200 µl
Keskiarvo	1,91	24,39	49,19	50,52	99,04	197,37
Virhearvio	0,031	0,018	0,031	0,029	0,067	0,054
Keskihajonta	0,0994	0,0568	0,0994	0,0919	0,2119	0,1703
Suhteellinen virhe (%)	1,6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03

Eniten virhettä tuli pipetoitaessa 2 µl vettä (suhteellinen virhe 1,6 %), joka todennäköisimmin johtui siitä, että erittäin pieni tilavuus pipetoitiin tyhjään Eppendorf-putkeen. Paremmat tulokset olisi siis varmaankin saatu, jos putkiin olisi jo etukäteen pipetoitu jokin tunnettu tilavuus vettä. Pienin virheprosentti saatiin pipetoitaessa 200 µl vettä, jolloin suhteellinen virhe oli vain 0,03 %:a. Pipetoitaessa 25, 50, 51 ja 100 µl vettä, suhteellisen virheen arvo oli kaikissa 0,1 %:a.

Luotettavuus- ja toistettavuustestissä oli saatu erinomaiset tulokset, joten seuraavaksi tutkittiin, kuinka keskenään vertailukelpoisia tuloksia saadaan kombinaatioilla vanha kitti ja vanha laite sekä uusi kitti ja uusi laite. Eri menetelmillä saadut keskiarvot näytteiden DNA-pitoisuuksista nähdään taulukosta 5.

Taulukko 5. Eri menetelmillä saadut keskiarvot näytteiden DNA-pitoisuuksista.

Näyte	Vanha kitti (ng/µl)	Uusi kitti (ng/µl)
Chelex-veri	0,6	2,6
CST-veri	0,2	0,1
sperma	12,9	0,8

Käytettäessä Qiagenin qPCR-laitetta ja kittiä näytteitä analysoidessa poistettiin pitoisuuden 20 ng/µl omaavien standardin tulokset, koska ne poikkesivat standardisuorasta. Kuten taulukosta 5 nähdään, vanhalla ja uudella menetelmällä saadut näytteiden DNA-pitoisuudet eivät ole kovinkaan samanlaiset. Standardisuoran ja kontrolli DNA 007:n mukaan testi oli onnistunut. Lisäksi 200 bp:n sisäisen kontrollin mukaan näytteiden monistus oli onnistunut. Jatkossa samaisilla näytteillä olisi tarkoitus tehdä samanlainen testi isommalla otannalla ja esimerkiksi useampaa laimennosta käyttäen, jotta testin tuloksia voitaisiin pitää muunakin kuin korkeintaan suuntaa antavina.

Menetelmien pikaisen vertailun jälkeen aloitettiin ristikontaminaatiotestien teko. Kontaminaatiotestejä tehtiin useampia eri asetuksin. Testien tulokset ovat taulukossa 6.

Taulukko 6. Kontaminaatiotestien tulokset ja huomiot.

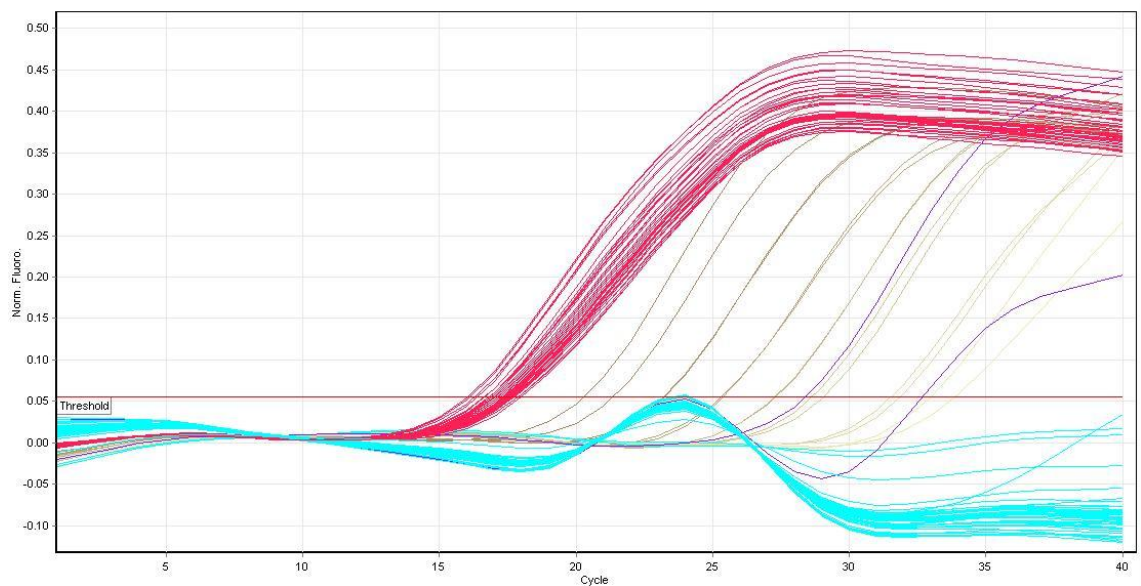
Kontaminaatio-testi	Kontaminaatiot (kpl)	Muuta
1.	1	-
2.	3	-
3.	3	kahdesta kuopasta ei saatu ollenkaan C(t)-arvoa, sisäisen kontrollin mukaan monistus onnistui
4.	0	-
5.	4	-
6.	2	toiselle kontaminaatioista ei saatu C(t)-arvoa ja yhdelle näytteelle, jolla oli C(t)-arvo, sisäinen kontrolli ei antanut ollenkaan arvoa

Vain yhdessä kuudesta kontaminaatiotestistä ei havaittu yhtään kontaminaatiota. Eri-laisia muutostoinenpiteitä tehtiin testien 3, 5 ja 6 jälkeen, minkä tarkoituksena oli välttää kontaminaatioiden synty.

Kontaminaatiotesteissä 1, 2 ja 3 havaittiin satunnaista epäspesifistä monistumista, joten tehtiin seuraavat toimenpiteet:

- 20 µl reaktiivilavuuden käyttö 25 µl:n sijasta
- näytteiden lisäyksen jälkeinen sekoitus -asetus pois käytöstä, koska pidettiin mahdollisena, että sen asetuksen ollessa päällä, näytteitä roiskuisi kuopasta toiseen
- näyte-yksikön paikan ja korkeuden kalibrointi, koska kärkiroskakorissa oli muutama vääntynyt kärki

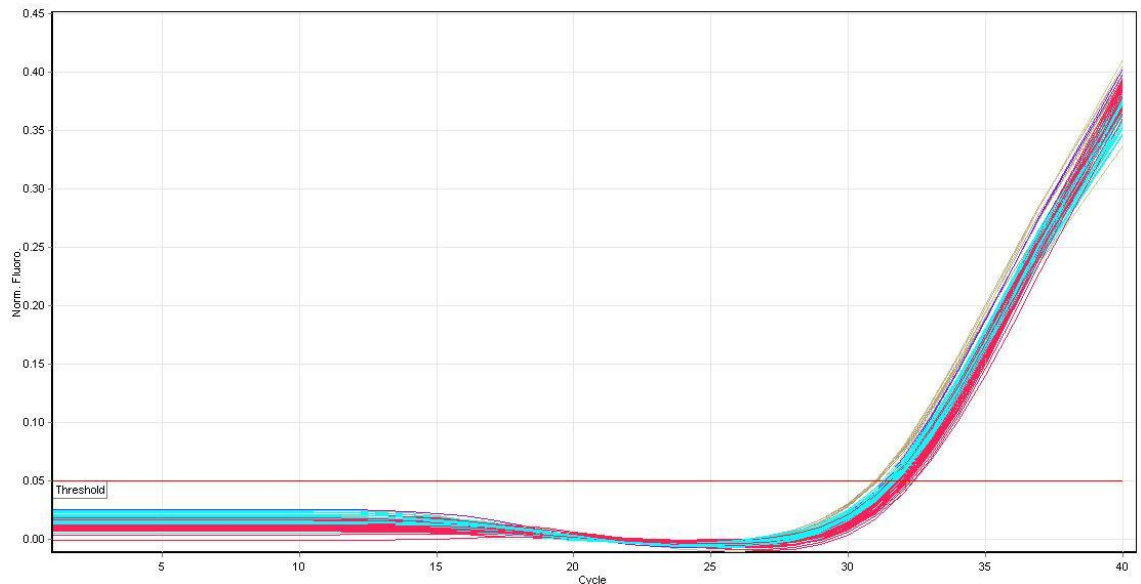
Kalibroinnin asetuksia muutettaessa kalibroinnin onnistuminen varmistettiin aina teke-  
mällä väritesti. Värejä ei sekoittunut, eikä kärkiä hajonnut, joten jatkettiin taas konta-  
minaatiotestien tekemistä. Alla olevassa kuvassa 18 on neljännen kontaminaatiotestin  
monistuskäyrät. Kuvassa punaisella on näytteenä olleen kvantitointistandardin monis-  
tuskäyrät ja sinisellä näytteenä olleen veden monistuskäyrät. Violeeteilla käyrillä puoles-  
taan kuvataan kontrolli DNA 007:n monistumista, ja vaaleat käyrät ovat standardien  
monistuskäyriä.



Kuva 18. Neljännen kontaminaatiotestin monistuskäyrät.

Kuten kuvasta 18 nähdään, neljännessä ristikontaminaatiotestissä ei ollut yhtään kon-  
taminaatiota, koska veden siniset käyrät pysyvät koko qPCR -ajon ajan kynnysarvovii-  
van (kuvassa threshold) alapuolella. Punaisella olevat kvantitointistandardin monistus-  
käyrät nousevat ensimmäisinä, koska monistuminen tapahtui tavallista aiemmin näyt-  
teiden ollessa erittäin vahvoja (200 ng/μl). Jälkimmäinen violeeteista kontrolli DNA  
007:n monistuskäyristä on hieman poikkeava, mikä ilmentää näytteen monistuneen  
tavallista myöhemmin, ja siten käyrä nousee melko laiskasti ylöspäin. Tästä päätellen  
osa kontrolli DNA 007:sta on jäänyt matkan varrelle, kuten kärkeen. Toinen mahdolli-  
suus on myös kontrolli DNA 007:n viskoosius, jonka takia QIAgility-pipetointirobotti ei  
ole ehkä alun perinkään onnistunut saamaan näytettä tarpeeksi kärkeen.

Huomioitiin myös sinisellä merkittyjen veden monistuskäyrien tavallisuudesta poikkeava mutka ylöspäin syklien 20–25 välillä. Kuitenkin, kuten kuvasta 19 nähdään, sisäisen kontrollin monistuskäyrät olivat siististi nipussa, eli DNA:n monistus oli onnistunut.



Kuva 19. Sisäisen kontrollin tulokset.

20 µl:n reaktiutilavuudella oli saatu puhtaat ristikontaminaatiotestin tulokset, joten testattiin millaiset tulokset saataisiin, kun reaktiot tehtäisiin kitin ohjeen mukaisesti, eli 23 µl reaktioseosta ja 2 µl näytettä. Kontaminaatiotestissä havaittiin neljä kontaminaatiota, mikä nähtiin sinisellä merkittyjen veden monistuskäyrien nousuna kynnyсарvovii-van yli syklin 35 jälkeen. Tämän vuoksi viidennen ristikontaminaatiotestin jälkeen kalibroitiin uudelleen kohta, johon pipetin kärki asettuu Rotor-Discin kuopassa, sekä otettiin käyttöön 3-stage-kärjenottoasetus.

Väritestit tehtiin kalibroinnin onnistumisen varmistamiseksi molemmilla käytetyillä reaktiutilavuuksilla (20 ja 25 µl). Kumpikin väritesti onnistui hyvin.

Väritestien onnistuttua tehtiin vielä uusi kontaminaatiotesti, jossa kuitenkin havaittiin satunnaista epäspesifistä DNA:n monistumista. Kaikki mahdolliset laitteen asetukset oli säädetty uudelleen, eikä ollut onnistuttu saamaan kuin yksi täysin puhdas ristikontaminaatiotesti kuudesta testistä. Siksi päätettiin varmistaa, voisiko Rotor-Discit olla kontaminaationlähteenä. Taltioidussa näytteessä ei kuitenkaan ollut DNA:ta, eli luotettiin Rotor-Discien olevan puhtaita, kuten kuuluu.

Rotor-Disc 100:a käyttämällä ei saatu hyviä tuloksia, joten siirryttiin käyttämään 72-kuoppaista Rotor-Disciä. Kuten edellä, aluksi sille sopiva yksikkö kalibroitiin, jonka jälkeen kalibroinnin onnistuminen varmistettiin tekemällä väritesti. Väritestissä kaikki kärjet olivat ehjiä käytön jälkeen, eikä värien sekoittumista havaittu. Tämän jälkeen tehtiin kontaminaatiotesti, jossa kuitenkin havaittiin satunnaista epäspesifistä DNA:n monistumista.

Vaikka oli siirrytty käyttämään isomman maksimireaktiivilavuuden omaavaa Rotor-Disciä, kontaminaatiotestissä havaittiin edelleen kontaminaatioita. Oli siis hyvä sulkea pois myös itse pipetointirobotin vaikutus testien tuloksiin. Manuaalipipetoinnin aikana seurattiin myös työntekijän työskentelytapoja, joissa ei huomattu moittimista. Kontaminaatioita oli kuitenkin kaksi kappaletta, mutta niiden DNA-pitoisuudet olivat niin pienet (0,001 ja 0,002 ng/μl), ettei niistä saisi edes määritettyä, mitä DNA:ta se on. Applied Biosystems<sup>TM</sup>in Quantifiler<sup>TM</sup> Human DNA Quantification-kitillä vastaavanlaisia arvoja ei saataisi edes määritettyä.

Useissa testeissä oli havaittu kontaminaatioita, joten pidettiin mahdollisena, jos DNA:ta olisi ilmassa aerosolina, varsinkin kun testeissä käytetty kvantitointistandardi oli niin vahva (200 ng/μl). Jatkossa voitaisiin tehdä testi, jossa käytetään niin sanottuna vahvana näytteenä Investigator<sup>TM</sup> Quantiplex-kitin omaa standardia Z1, jonka vahvuus on 20 ng/μl. Lisäksi se olisi parempi vaihtoehto ristikontaminaatiotesteissä käytettäväksi, koska Rotor-Gene Q-qPCR -laitteen luvataan antavan luotettavia tuloksia noin 50 ng/μl asti. Näyte pitoisuudella 200 ng/μl on siksi antanut läpi kaikkien testien hyvin vaihtelevia tuloksia. Tuloksia on pidetty lähinnä suuntaa antavina varsinkin, kun tarkoituksena on kuitenkin ollut selvittää, voiko vahva näyte kontaminoida viereisen kuopan laimean näytteen.



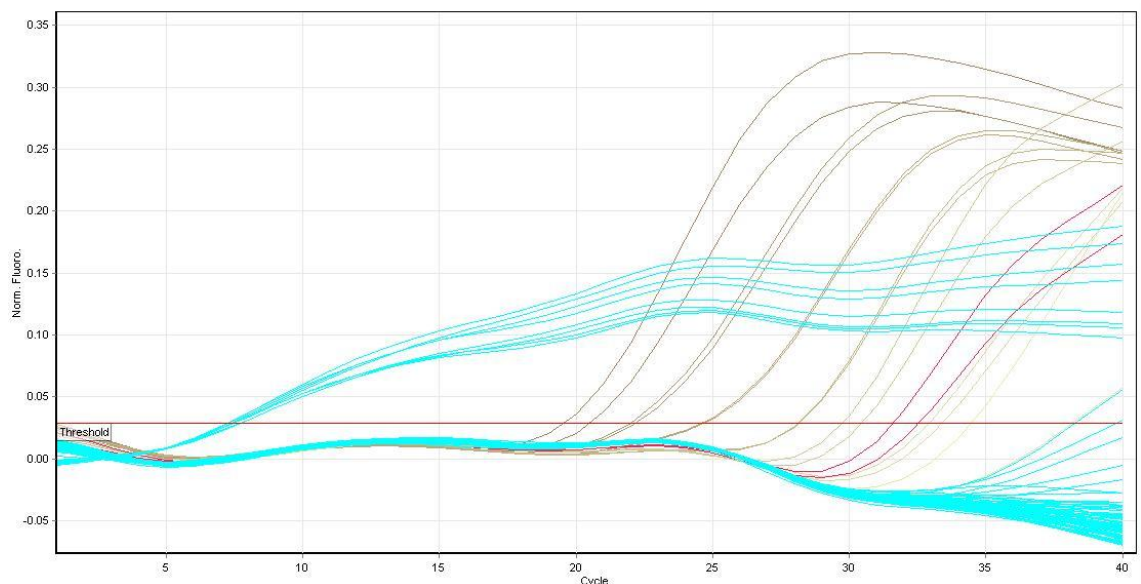
## 4.2 QIAgilityt A ja B

Toimintatestien teko aloitettiin käyttämällä laitetta B, jolla tehdyn väritestin perusteella sillä voitiin seuraavaksi tehdä kontaminaatiotesti. Testiä tehdessä huomattiin laitteen pudottelevan kärkiä laitteen sisälle, minkä vuoksi kalibroitiin uudelleen kärkienottokoh- ta, ja tehtiin väritesti. Väritestiä seurattaessa huomattiin kuitenkin, että osaan kuopista ei mennyt ollenkaan väriä, joten testin pipetointi keskeytettiin. Kalibroitiin uudelleen vielä näyteyksikön paikka ja korkeus. Tehtiin taas väritesti, koska laitteen kalibroin- tiasetuksia oli muutettu. Väritesti meni muuten hyvin, mutta huomattiin kärkien edel- leen asettuvan hieman enemmän toiseen reunaan, joten testin jälkeen tehtiin vielä pieni hienosäätäminen näyteyksikön paikan kalibroinnissa. Hienosäädön jälkeen tehtiin taas kontaminaatiotesti. Vaikka kontaminaatiotestiä ennen tehty väritesti oli onnistu- nut, QIAgility-pipetointiroboti B alkoi jälleen pudotella kärkiä laitteen sisälle kesken testin pipetoinnin. Päätettiin, ettei laitteella B tehtäisi enempää testejä tällä erää, en- nen kuin Qiagenilta on tullut joku tarkistamaan, onko laite oikeasti kunnossa.

Ennen kuin asiantuntija oli tarkastanut QIAgility-pipetointirobotin B toimintakunnon, tehtiin toimintatestit laitteella A, samalla tavoin kuin laitteella B. Laitteella A tehty kon- taminaatiotesti, jossa näytteinä oli pelkkää vettä, ei kuitenkaan onnistunut. Laite oli ohjelmoitu tekemään reaktioseos 100 näytteelle, ja lisänä pieni pipetointivara. Kesken reaktioseoksen pipetoinnin laite kuitenkin ilmoitti, ettei havaitse riittävää määrää reak- tioseosta 5 ml:n reaktioseosputkessa. Reaktioseos oli loppunut kokonaan, jolloin neljä kuoppaa olisi jäänyt ilman reaktioseosta. Robotti ollut missään vaiheessa ilmoittanut reaktio- ja alukeseoksien riittämättömyydestä reaktioseosta tehdessä, vaikka laitteeseen olikin laitettu asetus nestepinnan havaitsemiseksi. Lisättiin tarvittava määrä reak- tio- ja alukeseoksia manuaalisesti 5 ml:n reaktioseosputkeen, koska laite ei osaa tehdä lisää reaktioseosta, jos se loppuu kesken ohjelman. Kärjet sen sijaan olivat kunnossa käytön jälkeen.

QIAgility-pipetointirobotilla A tehdyssä kontaminaatiotestissä oli jopa 10 kontaminaatio- ta. Kuopat C10 ja G5 antoivat C(t)-arvot 39,73 ja 38,23; jotka ovat tavalliset lukemat, kun näytteessä on kontaminaatio. Tähän mennessä, jos testeissä oli ilmennyt kontami- naatioita, saatiin samanlaisia arvoja. Myös Qiagenin edustaja sanoi arvojen olleen mel- ko tavallisia. Kuoppien C10 ja G5 pitoisuudet olivat 0,0007 ja 0,0015 ng/μl. Nämä arvot ovat niin pienet, ettei niistä saada määritettyä mitä DNA:ta kuopissa on.

Kuoppien C10 ja G5 monistuskäyrät nähdään kuvassa 20 sinisinä käyrinä, jotka nousevat kynnyksarvoviivan yli syklin 35 jälkeen. Kuvassa vaalealla ja violetilla olevat käyrät ovat standardien ja kontrolli DNA 007:n monistuskäyrät.



Kuva 20. QIAgility-laitteella A pipetoidut kontaminaatiotestin monistuskäyrät.

Lopuille kahdeksalle näytteelle, jotka olivat kontaminoituneet, saatiin erikoiset  $C(t)$ -arvot; näiden näytteiden  $C(t)$ -arvot olivat seitsemän paikkeilla. Näytteiden sinisellä merkityt monistuskäyrät nousevat kynnyksarvoviivan yli aivan liian aikaisin, jo viidennen syklin paikkeilla. Normaalisti, jos kontaminaatioita on, käyrät nousevat kynnyksarvoviivan yli vasta viimeisten syklien (35–40) aikana. Kitin sisäisen kontrollin mukaan PCR-monistus oli kuitenkin onnistunut.

Testeissä saatujen erikoisten tulosten vuoksi testin tiedot ja tulokset lähetettiin Qiagenin asiantuntijoille, jotka epäilivät vian olevan joko qPCR-laitteessa tai kitissä.

## 5 Johtopäätökset

Keskusrikospoliisin rikosteknisen laboratorion biologian linjan laboratorioon oli tilattu kaksi Qiagenin QIAgility-pipetointirobottia. Opinnäytetyön tavoitteena oli verifioida nämä laitteet. Pipetointirobottien kanssa oli kuitenkin toimitusvaikeuksia, joten toimintatestit tehtiin suurimmaksi osaksi Qiagenilta lainassa olleella demo-laitteella.

QIAgility-pipetointirobotin käyttö oli helppoa, koska tietokoneohjelma, jolla pipetointiohjelmaa tehtiin, oli yksinkertainen ja selkeä. Ohjelmien käytön helpoksi teki se, että ohjelman ja pipetointirobotin työpöydät vastaavat toisiaan. Suurimpana ongelmana pipetointirobotin käytössä oli kärkien rikkoutuminen, vääntyminen ja tippuminen laitteen sisälle, minkä takia kuoppiin ei mennyt ollenkaan haluttuja reagensseja. Tämä aiheutti sen, että useissa toimintatesteissä näytteitä kontaminoitui. Ongelmia QIAgility-pipetointirobotille tuotti myös kärkien saanti kärkitelineestä, jolloin ohjelma pysähtyi. DNA-kontaminaatioiden poistamiseksi laitetta kalibroitiin useasti, testattiin eri asetusten vaikutusta pipetointiin ja kokeiltiin 20 ja 25 µl:n reaktiivilavuutta sekä 100- että 72-kuoppaisella Rotor-Discillä. Lisäksi varmistettiin Rotor-Discien puhtaus ja työntekijän työtavat sekä pipetoitiin manuaalisesti yksi kontaminaatiotesti Rotor-Disc 72:lle. Millään näistä toimenpiteistä ei kuitenkaan ollut vaikutusta QIAgility-pipetointirobotin toimintaan. Loppujen lopuksi molemmista QIAgility-pipetointiroboteista löytyi muutamia valmistusvirheitä, jotka saatiin korjattua. Qiagenin asiantuntijan mukaan samanlaisia ongelmia oli tavattu viimeksi vuosia sitten. Laitteisiin oli asennettu vanhanmalliset pipetointirobotin käden kärjenottokohdat, eikä asennusvaiheessa ollut noudatettu tarkkaavaisuutta.

Qiagenin QIAgility-pipetointirobottien sekä työn ohessa käytettyjen Qiagenin Rotor-Gene Q-qPCR –laitteiden verifiointia ja Qiagenin Investigator™ Quantiplex-kitin testausta jatketaan edelleen Keskusrikospoliisin rikosteknisessä laboratoriossa. Vaikka tavoitteisiin ei vielä päästy, saatiin erittäin hyödyllistä tietoa ja taitoa ongelmatilanteissa, joita voidaan kohdata käytettäessä QIAgility-pipetointirobottia. Työssä ilmenneet ongelmat johtivat siihen, että laitteiden valmistajille tullaan pitämään kertauskoulutusta laitteiden valmistuksessa ilmenneiden huolimattomuuksien vuoksi. Lisäksi Qiagen lupasi korvata käytetyt kitit (10 kpl) ja kärjet, jotta saisi hyvitettyä laboratoriolle aiheutuneita kuluja ja ongelmia.

## Lähteet

- [1] Bio-Rad Laboratories. 2000. Chelex® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual. Verkkodokumentti. Saatavissa: [http://www3.bio-rad.com/webmaster/pdfs/9184\\_Chelex.PDF](http://www3.bio-rad.com/webmaster/pdfs/9184_Chelex.PDF). Viitattu: 25.10.2011.
- [2] Butler, J. M. 2005. FORENSIC DNA TYPING: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, second edition. Elsevier.
- [3] Omscientia. Proteinase-K. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://www.omscientia.com/product/Proteinase-K>. Viitattu: 2.11.2011.
- [4] The Davistown Museum. DDT. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://www.davistownmuseum.org/cbm/chemicals/ddt.html>. Viitattu: 2.11.2011.
- [5] Behlke, M. A. ym. 2005. Fluorescence and Fluorescence Applications. Verkkodokumentti. Saatavissa: [http://cdn.idtdna.com/support/technical/TechnicalBulletinPDF/Fluorescence\\_and\\_Fluorescence\\_Applications.pdf](http://cdn.idtdna.com/support/technical/TechnicalBulletinPDF/Fluorescence_and_Fluorescence_Applications.pdf). Viitattu: 2.11.2011.
- [6] Dorak, M. T. 2009. Real-Time PCR. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>. Viitattu: 25.10.2011.
- [7] Bustin, S. A. 2004. A - Z of Quantitative PCR. California: International University Line.
- [8] Kubista, M. ym. 2006. The Real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine, 27/2006. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://www.gene-quantification.de/kubista-qpcr-review-mam-2006.pdf>. Viitattu: 25.10.2011.

- [9] Applied Biosystems. 2011. Real-Time PCR: Understanding Ct. Verkkodokumentti. Saatavissa: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_053906.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_053906.pdf). Viitattu: 26.10.2011.
- [10] Nobelprize.org. 2011. Microscopes: The Fluorescence Microscope. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/index.html>. Viitattu 2.11.2011.
- [11] Aalto-yliopiston kurssiportaali Noppa. Fotoni. Verkkodokumentti. Saatavissa: [http://www.google.fi/url?sa=t&rct=j&q=fotoni&source=web&cd=10&ved=0CF8QFjAJ&url=https%3A%2F%2Fnoppa.aalto.fi%2Fnoppa%2Fkurssi%2Ftfy-0.2061%2Fluennot%2FTfy-0\\_2061\\_fotoni.pdf&ei=hGCxTvWmO43P4QTfy-zcAQ&usq=AFQjCNGo3E5eT3YFIbdNxtVok5kIFcBatQ&cad=rja](http://www.google.fi/url?sa=t&rct=j&q=fotoni&source=web&cd=10&ved=0CF8QFjAJ&url=https%3A%2F%2Fnoppa.aalto.fi%2Fnoppa%2Fkurssi%2Ftfy-0.2061%2Fluennot%2FTfy-0_2061_fotoni.pdf&ei=hGCxTvWmO43P4QTfy-zcAQ&usq=AFQjCNGo3E5eT3YFIbdNxtVok5kIFcBatQ&cad=rja). Viitattu: 2.11.2011.
- [12] Jaarinen, S. – Niiranen, J. 1997. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Oy Edita Ab.
- [13] Applied Biosystems. Real-Time PCR Vs. Traditional PCR. Verkkodokumentti. Saatavissa: [http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtPCR\\_vs\\_tradPCR.pdf](http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtPCR_vs_tradPCR.pdf). Viitattu: 26.10.2011.
- [14] Gene Link™. Fluorescent Molecular Probes, PG-MB-Version 5.2. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://www.genelink.com/literature/ps/pg-mb-ver5.2.pdf>. Viitattu: 21.9.2011.
- [15] Uusivirta, S. 2008. Väriaineet pipetoinnin apuna qPCR-tekniikassa. Opin näytetyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Laboratorioala. Järvenpää 2008.

- [16] Lahtinen, J. 2011. Suhteellisen telomeeripituuden määrittäminen qPCR-tekniikalla. Opinnäytetyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Laboratorioala. Helsinki 2011.
- [17] Liimatainen, O. 2002. Menetelmien validointi ja verifiointi kliinisen mikrobiologian laboratoriossa: yleisiä periaatteita.
- [18] Ikäheimo, I. 2002. Käytännön esimerkkejä kliinisen mikrobiologian menetelmien validoinnista ja verifioinnista.
- [19] Palva, A. 2007. DNA:n eristysmenetelmien vertailu elintarvikenäytteille erilaisilla näytematriiseilla. Opinnäytetyö. Stadia Helsingin ammattikorkeakoulu. Laboratorioala. Helsinki 2007.
- [20] Qiagen. 2011. QIAgility. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://www.qiagen.com/Products/QIAgility.aspx>. Viitattu: 26.10.2011.
- [21] Qiagen. 2011. Rotor-Gene Q - Pure Detection - Brochure. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://www.qiagen.com/Products/RotorDisc100StarterKit.aspx#Tabs=t2>. Viitattu: 26.10.2011.
- [22] Qiagen. 2011. Investigator Quantiplex Kit. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://www.qiagen.com/products/investigatorquantiplexkit.aspx#Tabs=t>. Viitattu: 22.9.2011.
- [23] Qiagen. 2011. Investigator Quantiplex® Handbook, For quantification of human DNA in forensic samples. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://www.qiagen.com/products/investigatorquantiplexkit.aspx#Tabs=t2>. Viitattu: 2.9.2011.

## Toistettavuus- ja luotettavuustestin tulokset

Taulukko 1. Eppendorf-putket 1-10, 50 µl:n kärjillä pipetoitiin 2 µl:a vettä.

	tyhjä putki	putki + vesi		
Eppendorf	Massa (g)	Massa (g)	MQ-H <sub>2</sub> O (µg)	MQ-H <sub>2</sub> O (µl)
1	0,9894	0,9914	0,0020	2
2	0,9890	0,9909	0,0019	1,9
3	0,9927	0,9945	0,0018	1,8
4	0,9894	0,9914	0,0020	2
5	0,9909	0,9929	0,0020	2
6	0,9784	0,9803	0,0019	1,9
7	0,9706	0,9725	0,0019	1,9
8	0,9879	0,9896	0,0017	1,7
9	0,9958	0,9977	0,0019	1,9
10	0,9744	0,9764	0,0020	2

Keskiarvo ja virhearvio:  $1,91 \pm 0,031$

Keskihajonta: 0,0994

Suhteellinen virhe: 1,6 %

Taulukko 2. Eppendorf-putket 11–20, 50 µl:n kärjillä pipetoitiin 25 µl:a vettä.

	tyhjä putki	putki + vesi		
Eppendorf	Massa (g)	Massa (g)	MQ-H <sub>2</sub> O (µg)	MQ-H <sub>2</sub> O (µl)
11	0,9853	1,0098	0,0245	24,5
12	0,9864	1,0108	0,0244	24,4
13	0,9894	1,0138	0,0244	24,4
14	0,9910	1,0153	0,0243	24,3
15	0,9836	1,0079	0,0243	24,3
16	0,9928	1,0172	0,0244	24,4
17	0,9769	1,0013	0,0244	24,4
18	0,9770	1,0014	0,0244	24,4
19	0,9706	0,9950	0,0244	24,4
20	0,9958	1,0202	0,0244	24,4

Keskiarvo ja virhearvio:  $24,39 \pm 0,018$

Keskihajonta: 0,0568

Suhteellinen virhe: 0,1 %

Taulukko 3. Eppendorf-putket 21–30, 50 µl:n kärjillä pipetoitiin 50 µl:a vettä.

	tyhjä putki	putki + vesi		
Eppendorf	Massa (g)	Massa (g)	MQ-H <sub>2</sub> O (µg)	MQ-H <sub>2</sub> O (µl)
21	0,9862	1,0355	0,0493	49,3
22	0,9863	1,0355	0,0492	49,2
23	0,9929	1,0421	0,0492	49,2
24	0,9905	1,0398	0,0493	49,3
25	1,0001	1,0491	0,0490	49
26	0,9894	1,0386	0,0492	49,2
27	0,9705	1,0196	0,0491	49,1
28	0,9928	1,0420	0,0492	49,2
29	0,9796	1,0287	0,0491	49,1
30	0,9906	1,0399	0,0493	49,3

Keskiarvo ja virhearvio:  $49,19 \pm 0,031$

Suhteellinen virhe: 0,1 %

Keskihajonta: 0,0994

Taulukko 4. Eppendorf-putket 31–40, 50 µl:n kärjillä pipetoitiin 51 µl:a vettä.

	tyhjä putki	putki + vesi		
Eppendorf	Massa (g)	Massa (g)	MQ-H <sub>2</sub> O (µg)	MQ-H <sub>2</sub> O (µl)
31	0,9926	1,0431	0,0505	50,5
32	0,9879	1,0383	0,0504	50,4
33	0,9890	1,0396	0,0506	50,6
34	0,9836	1,0340	0,0504	50,4
35	0,9786	1,0291	0,0505	50,5
36	0,9744	1,0251	0,0507	50,7
37	0,9770	1,0275	0,0505	50,5
38	0,9863	1,0368	0,0505	50,5
39	0,9744	1,0249	0,0505	50,5
40	0,9945	1,0451	0,0506	50,6

Keskiarvo ja virhearvio:  $50,52 \pm 0,029$

Keskihajonta: 0,0919

Suhteellinen virhe: 0,1 %



Taulukko 5. Eppendorf-putket 41–50, 50 µl:n kärjillä pipetoitiin 100 µl:a vettä.

	tyhjä putki	putki + vesi		
Eppendorf	Massa (g)	Massa (g)	MQ-H <sub>2</sub> O (µg)	MQ-H <sub>2</sub> O (µl)
41	0,9810	1,0799	0,0989	98,9
42	0,9895	1,0883	0,0988	98,8
43	0,9909	1,0901	0,0992	99,2
44	0,9810	1,0802	0,0992	99,2
45	0,9867	1,0858	0,0991	99,1
46	0,9909	1,0899	0,0990	99
47	0,9945	1,0933	0,0988	98,8
48	0,9908	1,0896	0,0988	98,8
49	0,9944	1,0936	0,0992	99,2
50	0,9919	1,0913	0,0994	99,4

Keskiarvo ja virhearvio:  $99,04 \pm 0,067$

Keskihajonta: 0,2119

Suhteellinen virhe: 0,1 %

Taulukko 6. Eppendorf-putket 51–60, 50 µl:n kärjillä pipetoitiin 200 µl:a vettä.

	tyhjä putki	putki + vesi		
Eppendorf	Massa (g)	Massa (g)	MQ-H <sub>2</sub> O (µg)	MQ-H <sub>2</sub> O (µl)
51	0,9809	1,1785	0,1976	197,6
52	0,9926	1,1897	0,1971	197,1
53	0,9744	1,1717	0,1973	197,3
54	0,9893	1,1864	0,1971	197,1
55	0,9745	1,1720	0,1975	197,5
56	1,0000	1,1974	0,1974	197,4
57	0,9944	1,1919	0,1975	197,5
58	0,9999	1,1974	0,1975	197,5
59	0,9906	1,1880	0,1974	197,4
60	0,9889	1,1862	0,1973	197,3

Keskiarvo ja virhearvio:  $197,37 \pm 0,054$

Keskihajonta: 0,1703

Suhteellinen virhe: 0,03 %

