



PIRKANMAAN  
AMMATTIKORKEAKOULU

**PERIFEERISEN VEREN MONONUKLEAARISTEN  
VALKOSOLUJEN JA RLT PLUS -LYYSAUSPUSKURIN MÄÄRÄN  
OPTIMOINTI QIAGEN RNeasy® Plus Mini Kit RNA-  
ERISTYSMENETELMÄLLE**

Tiina Sarkaranta  
Riikka Savijärvi

Opinnäytetyö  
Lokakuu 2009  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Pirkanmaan ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan koulutusohjelma, K06MBIOAN

SARKARANTA, TIINA & SAVIJÄRVI, RIIKKA:  
Perifeerisen veren mononukleaaristen valkosolujen ja RLT Plus -  
lyysauspuskurin määrän optimointi Qiagen RNeasy® Plus Mini Kit RNA-  
eristysmenetelmälle

Opinnäytetyö 63 s., liitteet 6 s.  
Lokakuu 2009

---

Opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida perifeerisen veren mononukleaaristen valkosolujen ja RLT Plus -lyysauspuskurin määrä Qiagen RNeasy® Plus Mini Kit RNA-eristysmenetelmälle. Tehtävänä oli erotella mononukleaariset valkosolut Becton Dickinson Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Citrate -putkia (CPT™-putkia) käyttäen, laskea solut Bürkerin laskukammiossa, eristää ribonukleinihappo (RNA) RNeasy® Plus Mini Kitillä sekä mitata RNA-saanto ja -puhtaus The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 -spektrofotometrillä. Tavoitteena oli pienentää tutkimuksessa tarvittavan perifeerisen veren määrää ja vähentää CPT™-putkista aiheutuvia kustannuksia. Opinnäytetyön aihe saatiin Tampereen yliopiston Lääketieteenlaitoksen Neuroimmunologian tutkimusryhmältä, jota johtaa professori Irina Elovaara. Tutkija Sanna Rinta ja bioanalytikko Raija Paalavuo ehdottivat aihetta Pirkanmaan ammattikorkeakoululle.

Opinnäytetyö perustui empiiriseen kokeelliseen tutkimusmenetelmään. Kokeellisen osuuden tulokset esitettiin pylväsdiagrammeina. Teoreettisessa osuudessa käsiteltiin multipeliskleroosia, mononukleaaristen valkosolujen erottelua, ribonukleasikontaminaation ehkäisyä, RNA:n tehtäviä ja rakennetta, RNA-eristystä sekä RNA:n pitoisuus- ja puhtausmittausta.

Kokeellisen osuuden tulokset osoittavat, että suurin RNA-saanto ja -puhtaus RNeasy® Plus Mini Kitillä saadaan, kun 10 miljoonaa solua hajotetaan 600 mikrolitralla (µl) RLT Plus -lyysauspuskuria. Tulokset osoittavat myös, että kaksi miljoonaa solua on liian pieni ja 12 miljoonaa solua liian suuri solumäärä eristää RNA:ta RNeasy® Plus Mini Kitillä. Jos soluja on 7,5 miljoonaa tai vähemmän, tulee RLT Plus -lyysauspuskurin määrä kuitenkin olla 350 µl.

Optimoinnin tulokset tukivat tutkimusryhmän päätöstä vähentää RNA-eristyksessä käytettävien mononukleaaristen valkosolujen määrää. Tuloksia voitiin käyttää hyväksi myös solususpension jakamisessa ennen RNA-eristystä. Jatkotutkimuksena voisi tehdä laajemman kokeilun eri solumäärillä ja suuremmalla otoskoolalla. Lisäksi polyakryyliamidigeelielektroforeesin (PAGE), agarosigeelielektroforeesin (AGE) tai Bioanalyzer-kapillaarielektroforeesilaitteen avulla voisi tarkistaa, onko RNA pysynyt ehjänä eristyksen aikana.

---

Asiasanat: Multipeliskleroosi, soluerottelu, Bürkerin laskukammio, RNA-eristys, pitoisuus- ja puhtausmittaus

## ABSTRACT

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu  
Pirkanmaa University of Applied Sciences  
Degree Programme in Biomedical Laboratory Technology

SARKARANTA, TIINA & SAVIJÄRVI, RIIKKA:

Optimizing the amount of mononuclear white cells in peripheral blood and RLT Plus -lysis buffer for Qiagen RNeasy® Plus Mini Kit RNA isolation method

Bachelor's thesis 63 pages, appendices 6 pages.  
October 2009

---

The purpose of this bachelor's thesis was to optimize the amount of mononuclear white cells in peripheral blood and RLT Plus -lysis buffer for Qiagen RNeasy® Plus Mini Kit RNA isolation method. The task was to separate mononuclear cells using Becton Dickinson Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Citrate blood collecting tubes, to count cells in Bürker counting chamber, to isolate ribonucleic acid using RNeasy® Plus Mini Kit and measure quantity and purity of RNA prepareate using The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 spectrophotometer. The aim was to decrease the amount of sample and expenses caused by CPT™ tubes. The subject for the bachelor's thesis was received from University of Tampere Medical School Neuroimmunology research group led by Professor Irina Elovaara. Researcher Sanna Rinta and medical laboratory technician Raija Paalavuo suggested the subject for Pirkanmaa University of Applied Sciences.

The bachelor's thesis was based on empirical and experimental research method. The theoretical part concerns with multiple sclerosis, cell separation, ribonuclease contamination, RNA functions, structure, isolation and quantity and purity measurement. The results of the experimental part are presented as bar charts to make the results more illustrative.

The highest quantity and purity of RNA is received when 10 million cells are degraded by 600 µl of RLT Plus -lysis buffer and RNA is isolated from the lysate using RNeasy Mini Spin -column. Doing so also the purity of the isolated RNA is highest. The results also show that two million cells is too small and 12 million cells too large cell count for isolating RNA with RNeasy® Plus Mini Kit. If the cell count is 7,5 million or less the amount of RLT Plus -lysis buffer should be 350 µl.

The results of the optimization support the research group's decision to decrease the cell count used in RNA isolation. The results were also utilized in dividing cell suspension. A wider experiment using larger amount of samples could be made as a further study. The condition of isolated RNA could be examined with polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), agarose gel electrophoresis (AGE) or Bioanalyzer capillary electrophoresis.

---

Keywords: Multiple Sclerosis, cell separation, Bürker's counting chamber, RNA isolation, quantity and purity measurement

## SISÄLLYS

1 JOHDANTO .....	5
2 MULTIPPELISKLEROOSI .....	7
2.1 Epidemiologia ja patogeneesi.....	7
2.2 Taudinkuva ja diagnostiikka .....	8
2.3 Hoito ja ennuste .....	10
3 SOLUJEN EROTTELU JA LASKEMINEN BÜRKERIN LASKUKAMMIOSSA .	11
3.1 Solujen erottelu BD Vacutainer® CPT™ -putkia käyttäen.....	13
3.2 Bürkerin laskukammio ja solujen laskeminen .....	14
4 RIBONUKLEIINIHAPON TEHTÄVÄT JA RAKENNE .....	17
4.1 Lähetä-RNA:n, ribosomaalisen RNA:n ja siirtäjä-RNA:n tehtävät.....	17
4.2 Ribonukleiinihapon primaarirakenne .....	18
4.3 Ribonukleiinihapon sekundaarirakenne.....	20
5 RIBONUKLEIINIHAPON ERISTÄMINEN JA SAANNON MITTAAMINEN .....	22
5.1 Ribonukleasikontaminaation ehkäiseminen.....	22
5.2 Ribonukleiinihapon eristäminen Qiagen RNeasy® Plus Mini Kittä käyttäen.....	23
5.2.1 RNeasy® Plus Mini Kitin periaate ja käyttö.....	24
5.2.2 Solumäärän määrittäminen RNA-eristuksen alussa.....	25
5.3 Puhtauden ja saannon mittaaminen .....	26
6 OPINNÄYTETYÖN TEHTÄVÄ, TARKOITUS JA TAVOITE .....	29
7 OPINNÄYTETYÖ KOKEELLISENA TYÖNÄ.....	31
8 KOKEELLISEN OSUUDEN KULKU .....	33
8.1 Eri työvaiheissa käytetyt välineet, laitteet ja reagenssit .....	33
8.2 Mononukleaaristen solujen erottelu ja laskeminen Bürkerin laskukammiossa.....	34
8.3 Ribonukleiinihapon eristäminen.....	43
8.4 Ribonukleiinihapon saannon ja puhtauden mittaus .....	44
9 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET .....	46
10 POHDINTA .....	50
LÄHTEET .....	54
LIITTEET.....	58

## 1 JOHDANTO

Multippeliskleroosi (MS-tauti) on yleisin invalidisoiva keskushermoston sairaus, jossa hermosolujen aksoneja ympäröivä myeliinituppi vahingoittuu tai tuhoutuu todennäköisesti immuunisolujen kohdistaman toiminnan seurauksena. Tampereen yliopiston Lääketieteenlaitoksella toimiva Neuroimmunologian tutkimusryhmä, jota johtaa professori Irina Elovaara, tutkii MS-potilaiden verinäytteistä immunologisten tekijöiden ilmentymistä sekä proteiini- että ribonukleiinihappotasolla (RNA). Tutkimusryhmän hankkeet ovat keskittyneet MS-tautiin liittyviin biologisiin merkkiaineisiin. Tutkimusryhmän tarkoituksena on löytää MS-taudin diagnostiikkaan, taudin aktiivisuuden määrittelyyn ja lääkehoitojen tehon arviointiin entistä spesifisempiä biologisia merkkiaineita. Spesifisempien biologisten merkkiaineiden löytäminen mahdollistaisi taudin varhaisemman diagnostiikan. Aikaisemmin tutkimusryhmä on analysoinut solukuolemaan liittyviä biologisia merkkiaineita kuten TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand), Fas ligandi, Fas reseptori ja MIF (macrophage migration inhibitory factor).

Opinnäytetyön aiheen antoivat tutkimusryhmän tutkija Sanna Rinta ja bioanalyttikko Raija Paalavuo. Tutkimusryhmän työntekijät olettavat, että pienentämällä mononukleaaristen valkosolujen määrää eristetty RNA olisi puhtaampaa sekä laadukkampaa. Myös RLT Plus -lyysauspuskurin sisältämä guanidiniumisotiasynaatti saattaa aiheuttaa epäpuhtautta RNA-preparaatteihin. Opinnäytetyömme tarkoituksena on perifeerisen veren mononukleaaristen valkosolujen (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) ja RLT Plus -lyysauspuskurin määrän optimointi Qiagen RNeasy® Plus Mini Kit RNA-eristysmenetelmälle. Tarkoituksenamme on löytää oikea solumäärä sekä sopiva solujen ja RLT Plus -lyysauspuskurin välinen suhde. Optimoinnin päämääränä on mahdollisimman suuri RNA-saanto ja mahdollisimman puhdas RNA-preparaatti.

Perifeerisen veren mononukleaariset valkosolut (lymfosyytit ja monosyytit) ovat transkriptioaktiivisempia kuin muut verisolut. Tämän vuoksi niitä käytetään monen eri alan tutkimuksissa kuten immunologisissa tutkimuksissa, biologisten merkkiaineiden tutkimuksissa, syöpätutkimuksissa sekä sydän- ja verisuonisairauksien tutkimuksissa. Neuroimmunologian tutkimusryhmä käyttää mononuk-

leaaristen valkosolujen erotteluun Becton Dickinson Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Citrate -putkia (CPT™-putkia). Mononukleaaristen valkosolujen laskemiseen tutkimusryhmä käyttää Bürkerin laskukammiota. Tutkimusryhmällä on käytössä RNA-eristystä varten Qiagen RNeasy® Plus Mini Kit ja RNA-saannon ja puhtauden mittaamiseen The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 -spektrofotometri. Opinnäytetyömme kokeellisessa osuudessa käytämme samoja erottelu- ja eristysmenetelmiä ja välineitä kuin tutkimusryhmä. Näytemateriaalina tulee olemaan terveiden henkilöiden kokoveri, josta erottelemme mononukleaariset valkosolut RNA-eristystä varten.

Työn teoriataustaa käsittelevässä osuudessa tarkastelemme multippelisklerootsin taudinkuvaa ja sen etiologiaa sekä diagnostiikkaa, solujen erottelua ja niiden laskemista laskukammiossa, ribonukleasikontaminaation ehkäisemistä sekä RNA:n tehtäviä, rakennetta, eristystä ja saannon mittaamista. Solujen erottelun olemme rajanneet käsittelemään mononukleaaristen valkosolujen erottelua perifeerisestä verestä. Solujen laskeminen on mahdollista erilaisissa laskukammioissa. Tässä työssä käsittelemme solujen laskemista Bürkerin laskukammiossa. Ribonukleiinihapon eristyksen teoriatausta koskee pylväsmenetelmää. Lopuksi käsittelemme RNA:n pitoisuus- ja puhtausmittausta spektrofotometrillä.

## 2 MULTIPPELISKLEROOSI

Multippeliskleroosi (MS-tauti) on krooninen, tulehduksellinen autoimmuunisairaus, jossa syntyy pesäkemäisiä vaurioita keskushermoston valkeaan aineeseen (Soinila, Somer & Kaste 2007, 378). Valkea aine koostuu hermosolujen aksonista ja gliasoluista. Gliasolut muodostavat suojaavan lipidikalvon (myeliinituppi) aksonin ympärille. (Haug, Sand, Sjaastad & Toverud 1999, 104.) Multippeliskleroosissa aivoihin ja selkäyttimeen kertyy tulehdussoluja, jotka aiheuttavat kudosaivurioita kuten myeliiniä muodostavien oligodendrosyyttien kuolemaa ja aksonien tuhoa (Elovaara & Soilu-Hänninen 2006, 2240). Toisinaan MS-taudissa myeliinitupen lisäksi vaurioituvat myös itse aksonit. Elimistö kykenee jossain määrin korjaamaan myeliinitupen vaurioita, mutta aksonivauriot eivät korjaudu. (Soinila ym. 2007, 379.)

### 2.1 Epidemiologia ja patogeneesi

Keskushermoston immuunivälitteisistä sairauksista multippeliskleroosi on yleisin. Taudin jakautuminen maailmanlaajuisesti on epätasaista. Sekä geneettisten että ympäristötekijöiden on todettu vaikuttavan sen syntyyn. (Elovaara, Färkkilä, Hietaharju & Pirttilä 2006, 98–99.) Ympäristötekijöistä erityisesti virusinfektioiden epäillään toimivan voimakkaasti MS-tautia laukaisevana tekijänä (Martin & Sospedra 2005, 683). Taudin esiintyminen on runsainta pohjoiseurooppalaisperäisellä väestöllä ja harvinaisinta Itä- ja Kaakkois-Aasiassa ja Afrikassa. Kaiken kaikkiaan multippeliskleroosia sairastavia arvioidaan Suomessa olevan yli 7000. Taudin esiintyvyys on paikalliseen väestöön verrattuna erityisen korkeaa Suomessa Etelä-Pohjanmaalla, Skotlannissa Shetlannin ja Orkneyn saarilla sekä Sardinian luoteisrannikolla ja Sisiliassa. Naiset sairastuvat MS-tautiin kaksi kertaa useammin kuin miehet. (Elovaara ym. 2006, 98–99.) Tauti puhkeaa usein jo nuorella iällä, yleisimmin 20–40 ikävuoden välillä (Martin & Sospedra 2005, 683).

Multippeliskleroosi on yleisyydestään huolimatta syntymekanismeiltaan huonosti tunnettu sairaus (Soinila ym. 2007, 378). Sen synty liittyy olennaisesti T-lymfosyyttien toimintaan. Multippeliskleroosin arvellaan käynnistyvän CD4<sup>+</sup>-auttaja-T-solujen tunnistettua tiettyjä hermoston ulkopuolella esiintyviä antigeenejä, esimerkiksi virusinfektion jälkeen. Auttaja-T-solut päätyvät imukudokseen, jossa tapahtuu sekä T-solujen että B-solujen antigeenivälitteinen aktivatio. Tämän jälkeen T- ja B-solut alkavat lisääntyä ja ne siirtyvät verenkierron välityksellä veri-aivoesteen läpi keskushermostoon. Immuunisolujen pääsy keskushermostoon aloittaa hermosolujen demyelinisaation (myeliinitupen vaurioituminen). (Elovaara ym. 2006, 103–104.)

## 2.2 Taudinkuva ja diagnostiikka

Usein MS-taudin ensimmäisiä oireita ovat näköhäiriöt, erilaiset kivut ja tuntoelämykset. Tuntoelämykset voivat olla pistelyä, nipistelyä, palelua tai kuumotusta ja ne paikallistuvat useimmiten alaraajoihin. (Elovaara ym. 2006, 110–112.) Taudin edetessä yleisiä oireita ovat uupuminen (fatiikki), lihasheikkous ja spastisuus (lihasjäykkyys), koordinaatiohäiriöt, tuntoelämykset, näköhäiriöt sekä silmäkipu, virtsarakon ja suoliston toimintahäiriöt, seksuaalisten toimintojen häiriöt, kognitiivisten toimintojen häiriöt sekä mielialaoireet (Soinila ym. 2007, 387–391).

Taudinkuvalle on tyypillistä pahenemisvaiheiden (relapsi) ilmaantuminen. Relapsilla tarkoitetaan joko sellaista tilannetta, jossa MS-potilaalle ilmaantuu uusia hermoston vaurioitumisesta johtuvia oireita tai jo aikaisemmin havaitut oireet pahenevat merkittävästi. (Elovaara ym. 2006, 116–117.) Toipuminen pahenemisvaiheiden välillä selittyy myeliinitupen korjaantumisella (Soinila ym. 2007, 379). Jos vaurio ehtii levitä aksoniin, myös oireet ovat pysyviä (Lassmann, Brück & Lucchinetti 2001, 115).

Diagnoosi perustuu kliiniseen tutkimukseen, likvortutkimuksen tuloksiin sekä aivojen ja selkäytimen magneettikuvaan. Mitään spesifistä MS-tauti-tutkimusta ei ole olemassa, vaan sairauden todennäköisyyttä arvioidaan MS-taudille tyypillisten laboratoriolöydösten ja kliinisen kuvan perusteella. Jotta MS-taudin diag-



noosia voidaan pitää riittävän varmana, edellyttää se vähintään kahden oirejakson esiintymistä potilaalla. (Elovaara ym. 2006, 118–119.) Multippeliskleroosia sairastavan potilaan toimintakykyä voidaan arvioida EDSS-pisteiden (Expanded Disability Status Scale) avulla. Asteikko on 20-portainen ja pisteitä voidaan antaa potilaalle nollasta kymmeneen toimintakyvyn heikentymisen mukaan. Nolla EDSS-pistettä tarkoittaa, ettei MS-tautiin liittyviä löydöksiä lääkärintarkastuksessa havaita ja kymmenen pistettä MS-tautiin liittyvää kuolemaa. (Elovaara ym. 2006, 124–125.)

Useimmiten MS-potilaan tietokonetomografiakuva on normaali (Elovaara ym. 2006, 119). Sen sijaan magneettikuvissa on monesti havaittavissa vaaleita alueita (plakki) merkinä aivokudoksen muutoksista (Soinila ym. 2007, 385). Likvortutkimukset ovat välttämättömiä MS-taudin diagnostiikassa, erityisesti erotusdiagnostisena toimenpiteenä. Tietyt muutokset likvorin koostumuksessa puhuvat MS-taudin puolesta. Multippeliskleroosia tutkittaessa määritetään yleensä immunoglobuliini G -indeksi (IgG-indeksi) ja IgG:n oligoklonaaliset alajaokkeet. (Elovaara ym. 2006, 119–120.) Immunoglobuliini G -indeksi mittaa likvorin ja veren IgG-pitoisuuksien suhdetta. Multippeliskleroosissa likvorin IgG-pitoisuus on kohonnut veren IgG-pitoisuuteen nähden. (Mustila ym. 2004, 166.) Herätevastetutkimusten merkitys MS-taudin diagnostiikassa on vähäinen. Niitä voidaan kuitenkin käyttää subkliinisten vaurioiden osoittamiseen magneettikuvan ollessa normaali. (Elovaara ym. 2006, 120.)

Elovaaran tutkimusryhmä on tutkinut apoptoosiin (solukuolema) liittyviä biologisia merkkiaineita. Lymfosyyttien apoptoosin estyminen voi johtaa haitallisiin immunoreaktiivisiin muutoksiin MS-taudissa. Muutoksiin liittyvien biologisten merkkiaineiden pitoisuuksia tutkimalla voidaan ehkä saada käsitystä taudin aktiivisuudesta ja lääkehoidon tehosta. (Rinta ym. 2008, 135.) Biologisia merkkiaineita tutkitaan diagnostiikan, taudinkulun, ennusteen, taudin aktiivisuuden ja lääkehoidon tehon arvioinnin näkökulmasta (Lutterotti, Berger & Reindl 2007, 1956).

### 2.3 Hoito ja ennuste

Multippeliskleroosi on krooninen sairaus, johon ei ole parantavaa hoitoa. Lääkityksellä pyritään vaikuttamaan pahenemisvaiheiden oireisiin ja varsinaisen taudin etenemiseen. Fysioterapialla on myös keskeinen merkitys MS-potilaiden hoidossa ja kuntoutuksessa. Yleisimmin taudinkulkua hidastavana lääkkeenä käytetään beetainterferonia, joka ennaltaehkäisee pahenemisvaiheiden ilmaantumista ja vähentää magneettikuvauksissa todettavien plakkien määrää. (Soinila ym. 2007, 387–393.) Toinen MS-taudin kulkua hidastava lääke on glatirameeriasetaatti, jonka vaikutusmekanismi poikkeaa beetainterferonista, mutta sen vaikutus on samankaltainen (Elovaara ym. 2006, 152–157). Akuutista pahenemisvaiheesta toipumista voidaan nopeuttaa metyyliprednisonihoidolla (Soinila, ym. 2007, 391). Kortikosteroidi hillitsee tulehdusta (Rudik ym. 1997, 1606–1607). Metyyliprednisonia annetaan suonensisäisesti kolmena peräkkäisenä päivänä. Hoito ei vaikuta sinänsä taudin etenemiseen, vaan lievittää pahenemisvaiheen aiheuttamia oireita. Pahenemisvaiheilla on taipumus lievitä spontaanisti ja siksi onkin syytä miettiä, milloin steroidihoitoa on tarpeellista käyttää. (Soinila, ym. 2007, 391.)

Tarkkaa ennustetta MS-taudille on hankala asettaa. Useimmiten taudin alussa pahenemisvaiheita on 1-2 vuodessa ja tämän jälkeen vähemmän. On todella harvinaista, että potilas kuolisi varsinaiseen MS-tautiin. Puolella MS-potilaista kuolinsyynä on tulehdus esimerkiksi keuhkokuume. Potilaiden elinajanennusteesta on monia tutkimuksia, joista voidaan päätellä taudin lyhentävän elinikää alle 10 vuodella. Työkykyä MS-tauti sen sijaan heikentää ja vie lopulta liikuntakyvyn sekä mahdollisuuden itsenäiseen elämään. (Elovaara ym. 2006, 124–128.)

### 3 SOLUJEN EROTTELU JA LASKEMINEN BÜRKERIN LASKUKAMMIOSSA

Perifeerisellä verellä on merkittävä rooli ihmisen immuunivasteen ja aineenvaihdunnan toiminnassa ja sen vuoksi sitä käytetään paljon tutkimusmateriaalina biolääketieteellisissä ja kliinisissä tutkimuksissa. Perifeeristä verta käytetään mm. biologisten merkkiaineiden etsimisessä, tutkimisessa ja diagnostiikan kehittämässä. (Affymetrix 2003, 1.) Se on hyvä tutkimusmateriaali geeniekspression erojen ja muutosten arvioinnissa eri sairauksissa ja lääkehoidossa (Debey ym. 2004, 193).

Soluja voidaan erotella monilla eri tekniikoilla käyttäen hyväksi solujen eri ominaisuuksia. Yleisin solujen erottelu- ja puhdistusmenetelmä on solujen sedimentaatio, joka tehdään sentrifugoimalla solut. Solut voidaan erotella joko koon perusteella differentiaalisentrifugoinnin avulla tai tiheyden perusteella käyttäen gradienttisentrifugointia. (Patel, Ford & Rickwood 1998, 43; Patel 2000, 49.)

Differentiaalisentrifugoinnilla tarkoitetaan tutkittavan materiaalin sentrifugointia askeleittain yhä suuremmalla teholla (G-arvo) ja pidempiä sentrifugointiaikoja käyttäen. Differentiaalisentrifugoinnilla halutut materiaalit sedimentoituvat putken pohjalle ja muut partikkelit jäävät supernatanttiin. (Patel ym. 1998, 58–59; Solunetti 2006a.) Gradienttisentrifugoinnissa putkessa on tiheysgradientti, joka on rakennettu esimerkiksi sakkaroosista, glyserolista tai raskasmetallisuoloista. Gradientin tiheys tulee valita siten, että sen tiheys on tiettyssä kohtaa yhtä suuri kuin erotettavan aineen tiheys on. Erotettava suspensio pipetoidaan gradientin päälle. Sentrifugoinnin aikana suspension eri partikkelit liikkuvat gradientissa, kunnes ne löytävät kohdan, jossa gradientin tiheys on yhtä suuri kuin partikkelien oma tiheys. Erotettava materiaali pysähtyy ja jää siihen kohtaan gradienttia. Putkeen muodostuu sarja eri tiheyden omaavia vyöhykkeitä. (Solunetti 2006b.) Solujen erottelumenetelmä valitaan solutyypin perusteella sekä sen perusteella, miten solut halutaan erotella (Patel ym. 1998, 43; Patel 2000, 49).

Tässä yhteydessä tarkastelemme mononukleaaristen valkosolujen erottelua muista soluista. Mononukleaaristen valkosolujen transkriptioaktiivisuus on suuri

verrattuna perifeerisen veren muihin soluihin. Tämän vuoksi perifeerisen veren mononukleaarisia valkosoluja käytetään monen eri alan tutkimuksissa kuten immunologisissa tutkimuksissa, biologisten merkkiaineiden tutkimisessa, syöpä-tutkimuksissa sekä sydän- ja verisuonisairauksien tutkimisessa. (Affymetrix 2003, 2.)

Solujen erottelu niiden tiheyden perusteella on tehokas ja edullinen tapa erottaa eri solupopulaatioita toisistaan. Tiheysgradientti voi olla joko portaittain tai tasaisesti muuttuva. (Patel 2000, 60–61.) Eri solutyypeillä on erilainen tiheys ja tätä ominaisuutta hyödynnetään solujen erottelussa yksivaiheisessa tiheysgradienttimenetelmässä (Esser 1998, 3). Mononukleaaristen valkosolujen ominaistiheys on huomattavasti pienempi iso-osmoottisissa olosuhteissa kuin muiden perifeerisen veren solujen tiheys (Patel 2000, 62).

Vuonna 1968 Arne Boyum julkaisi menetelmän, jolla mononukleaariset valkosolut pystyttiin erottelemaan muista perifeerisen veren soluista. Boymin keksimässä menetelmässä soluja erottelevana liuksena on natrium metrizoate ja Ficoll, jotka erottelevat mononukleaariset valkosolut erytrosyyteistä ja polymorfonukleaarista soluista. Boymin keksinnön jälkeen on keksitty monia uusia menetelmiä perifeerisen veren solujen erotteluun. (Patel 2000, 62.)

Yleisimmin solujen erottelussa käytetään ionitonta jodioitua Ficollia tai Percollia. Niistä valmistetaan gradientti, jolla on sopivan matala viskositeetti, tiheys ja osmolaliteetti. (Esser 1998, 3.) Ficoll on synteettinen, korkean molekyylipainon omaava polymeeri, joka on tehty polymerisaatiolla sakkaroosista ja epiklorohydriinistä. Ficoll ei ole toksinen soluille eikä se häiritse useimpia biologisia analyysejä. Ficoll-liuosten korkea viskositeetti ja osmoottisuus voi rajoittaa niiden käyttöä solujen erottelussa. Kun Ficoll yhdistetään metrizoaten tai diatrizoaten kanssa, se on erittäin hyödyllinen lymfosyyttien erottelussa kokoverestä. (Patel 2000, 57.)

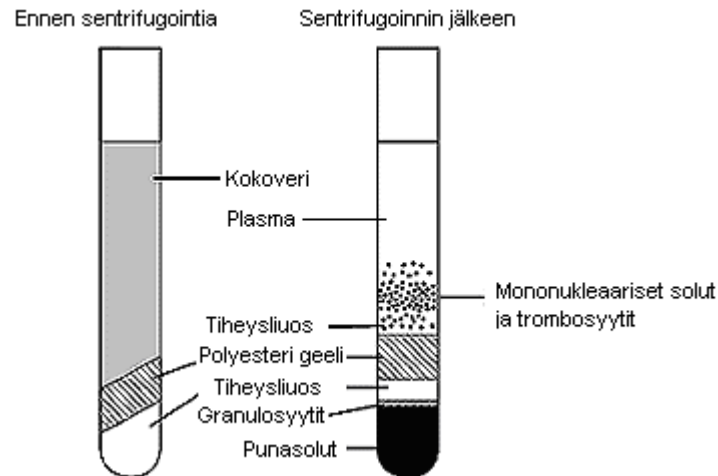
Ficollin kaksi tärkeintä käyttöaluetta ovat mononukleaaristen valkosolujen erottelu erytrosyyteistä ja granulotsyyteistä sekä elävien solujen erottaminen kuolleista soluista. (Esser 1998, 3.) Solujen yksivaiheisessa gradienttierotuksessa laimennettu veri laitetaan kerrokseksi sopivan tiheyden omaavan Ficollin päälle.

Sentrifugoinnin jälkeen mononukleaariset valkosolut sekä trombosyytit ovat asettuneet gradientin yläpuolelle. Erytrosyytit ja granulosyytit ovat menneet Ficollin läpi putken pohjalle. (Esser 1998, 4.)

### 3.1 Solujen erottelu BD Vacutainer® CPT™ -putkia käyttäen

Becton Dickinson Vacutainer® Cell Preparation Tube™ with Sodium Citrate -putket (CPT™-putket) ovat tarkoitettu kokoveren keräämiseen ja mononukleaaristen valkosolujen erotteluun kokoverestä. Solujen erottelussa hyödynnetään mononukleaaristen valkosolujen suhteellisen matalaa tiheyttä. Solujen erotteluun käytetään polyesterigeeliä ja tiheysgradienttiliuosta. Solut erotellaan yhdellä sentrifugoinnilla. (Becton Dickinson 2009.)

Mononukleaaristen valkosolujen erottelu kokoverestä on ensimmäinen vaihe monissa in vitro -analyysissä. FICOLL™ HYPAQUE™ -tekniikassa mononukleaaristen valkosolujen erotteluun käytetään nestemäistä FICOLL™ -tiheysgradienttiliuosta, natrium metrizoate -liuosta sekä natrium diatrizoate -liuosta. Mononukleaariset valkosolut asettuvat tiheysgradientin yläpuolelle sentrifugoinnin aikana. Sentrifugoinnin jälkeen solut kerätään varovasti pipetoimalla ne nesteen rajapinnasta. Mononukleaaristen valkosolujen erottelussa käytettävät CPT™-putket ovat antikoaguloitu natrium sitraatilla. Niihin on yhdistetty FICOLL™ HYPAQUE™ -tiheysliuos ja polyesterigeeli. Geeliosa erottaa mononukleaariset valkosolut ja plasman tiheämmistä veren komponenteista (kuvio 1, s. 14). (Becton Dickinson 2009.)



KUVIO 1. Mononukleaaristen valkosolujen erottuminen Becton Dickinson Vacutainer® Cell Preparation Tube™ with Sodium Citrate -putkessa (mukaillen Becton Dickinson 2009)

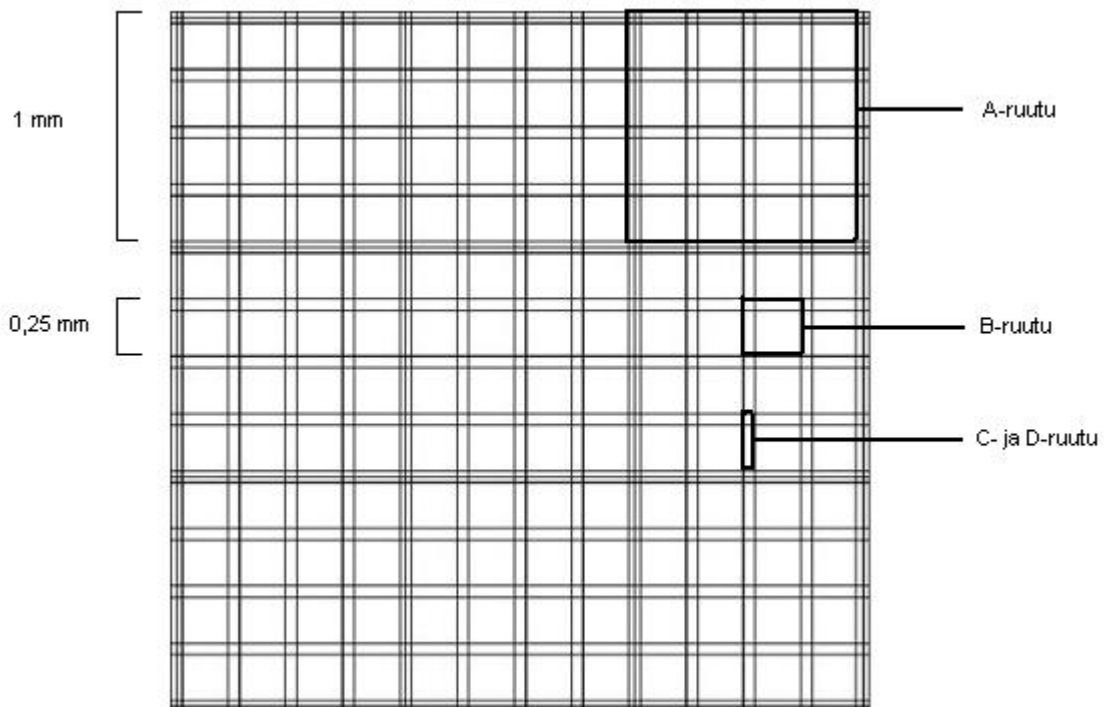
### 3.2 Bürkerin laskukammio ja solujen laskeminen

Solujen laskeminen voidaan tehdä manuaalisesti siihen tarkoitukseen kehitetyssä laskukammiossa (sytometri). Laskukammiota voidaan käyttää erilaisten solujen laskemiseen. Laskukammioita on erilaisia ja tässä yhteydessä käsittelemme tarkemmin Bürkerin laskukammiota (kuvio 2). Kaikille laskukammioille on tyypillistä tarkka nestekerroksen paksuus, joka on tavallisesti joko 0,05 millimetriä (mm) tai 0,1 mm. Bürkerin laskukammion syvyys on 0,1 mm. (Vilpo 2003, 65.)



KUVIO 2. Bürkerin laskukammio (Sarkaranta & Savijärvi 2009)

Laskukammion pohjaan on merkitty pinta-alaruudukko, jonka avulla tarkka tilavuus (V) määrytyy (kuvio 3). Laskukammion päälle asetetaan peitinlasi, jonka tulee peittää molemmat pinta-alaruudut. Peitinlasi rajaa nesteen alueen ja säättää nesteen syvyyden laskukammiossa. (Walters, Estridge & Reynolds 1990, 110; Vilpo 2003, 65.) Laskukammio täytetään peitinlasin reunasta ja täyttämisen jälkeen solujen annetaan laskeutua laskukammion pohjalle. Solut laskeetaan laskukammioista tietyltä alueelta, jonka tilavuus voidaan laskea. Tämän perusteella voidaan laskea solujen pitoisuus alkuperäisestä näytteestä. (Vilpo 2003, 65.) Näyte voidaan myös laimentaa ja tarvittaessa värjätä solujen laskeamisen helpottamiseksi. Tryban Blue värjäyksen avulla voidaan erottaa elävät ja kuolleet solut toisistaan. (Vilpo 2003, 65; Freshney 2005, 340.) Kokeellisessa osuudessa käytämme näytteen laimentamiseen ja värjäämiseen Tryban Blue -liuosta. Tryban Bluen reaktiokyky perustuu siihen, että sen kromofori on negatiivisesti varautunut eikä se värjää solua ellei sen solukalvo ole vahingoittunut. Väri sitoutuu kuolleisiin soluihin ja elävät solut jäävät värjäytymättä. (Biocompare 2009.)



KUVIO 3. Bürkerin laskukammion laskentaruudukko (mukaillen Labor Optik 2009; Mattila-Oksanen 2009)

Laskukammiossa on kaksi tarkkaan määritettyä ruudukkoa, joista solut voidaan laskea. Ruudukkojen pituus on 3 mm, leveys 3 mm ja syvyys 0,1 mm eli yhden ruudun pinta-ala on 9 mm<sup>2</sup> ja tilavuus on 0,9 mm<sup>3</sup>. Laskukammion molempien ruudukoiden yhteenlaskettu tilavuus on 1,8 mm<sup>3</sup>. (Labor Optik 2009; Turgeon 2007, 271.) Bürkerin laskukammioiden ruudut koostuvat yhdeksästä isosta neliönmuotoisesta ruudusta, joita kutsutaan A-ruuduiksi (kuvio 3, s. 15). A-ruudun sivun pituus on 1 mm, jolloin A-ruudun pinta-ala on 1 mm<sup>2</sup>. Laskukammion syvyys on 0,1 mm eli A-ruudun tilavuus on 0,1 mm<sup>3</sup>. Yksi A-ruutu on jaettu kuuteentoista pienempään B-ruutuun. B-ruudun sivun pituus on 0,25 mm. B-ruudun pinta-ala on 0,0625 mm<sup>2</sup> ja tilavuus on 0,00625 mm<sup>3</sup>. B-ruutu jakautuu vielä kahteen pienempään C- ja D-ruutuun. (Labor Optik 2009; Mattila-Oksanen 2009.) Solujen määrä tiettyä tilavuutta (V) kohden voidaan laskea seuraavaa kaavaa soveltaen (kuvio 4).

$$\text{Solumäärä} = \frac{N \text{ kpl} \times \text{laimennoskerroin}}{V}$$

KUVIO 4. Kaava solujen laskemiseen laskukammiossa (mukaillen Mattila-Oksanen 2009)



## 4 RIBONUKLEIINIHAAPON TEHTÄVÄT JA RAKENNE

Nukleiinihapot ovat makromolekyyliä, jotka osallistuvat informaation varastointiin ja siirtoon. Ribonukleiinihappojen tehtävänä on välittää deoksiribonukleiinihappojen (DNA) sisältämä tieto proteiinien rakenteesta eteenpäin. Ribonukleiinihappoja on olemassa useita eri muotoja kuten heteronukleaarinen RNA (engl. heterogeneous nuclear RNA, hnRNA), lähetti-RNA (engl. messenger RNA, mRNA), ribosomaalinen RNA (engl. ribosomal RNA, rRNA), siirtäjä-RNA (engl. transfer RNA, tRNA), pieni tumassa esiintyvä RNA (engl. small nuclear RNA, snRNA), pienikokoinen RNA-molekyyli (engl. small nucleolar RNA, snoRNA), mikroRNA (engl. microRNA, miRNA) ja pieni interferoiva RNA (engl. small interfering, siRNA). Heteronukleaarinen RNA on lähetti-RNA:n esimuoto. (Lodish ym. 2001, 411; Solunetti 2006c; Heino & Vuento 2007, 20, 42–44.)

### 4.1 Lähetti-RNA:n, ribosomaalisen RNA:n ja siirtäjä-RNA:n tehtävät

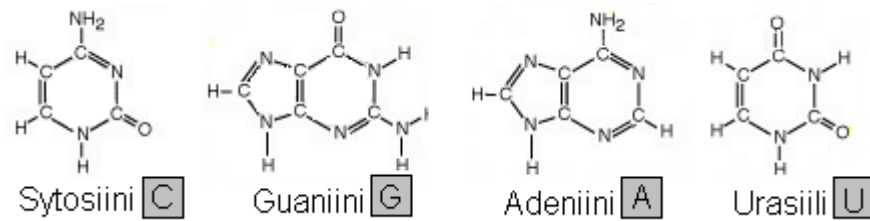
Tehtävällisesti tärkeimmät RNA:n muodot ovat lähetti-RNA, ribosomaalinen RNA ja siirtäjä-RNA. Niillä on suuri rooli proteiinisynteesissä (translaatio). Proteiinisynteesi tapahtuu lähetti-RNA:n ohjaamana ribosomeilla solulimassa. (Bolsover ym. 2004, 105; Heino & Vuento 2007, 46; Campbell & Farrell 2008, 253.) Lähetti-RNA-molekyyli syntyy tumassa kopioitumalla DNA-molekyylin proteiinigeeneistä. Ribosomaalinen RNA sekä siirtäjä-RNA valmistuvat geenituotteina niiden omista geeneistä ennen proteiinisynteesiä. (Lodish ym. 2001, 411; Turpeenoja 2005, 134; Heino & Vuento 2007, 44–45.) Kokonais-RNA:sta noin 1–5 % on lähetti-RNA:ta, 15–20 % siirtäjä-RNA:ta ja 80–85 % ribosomaalista RNA:ta (Qiagen 2001, 45).

Lähetti-RNA:n tehtävänä on siirtää informaatiota DNA:lta ribosomeille. Lähetti-RNA:n emäsjärjestys määrää tuotettavan proteiinin aminohappojärjestyksen (Bolsover ym. 2004, 473; Heino & Vuento 2007, 42–43; Campbell & Farrell 2008, 252.) Ribosomaalisen RNA:n tehtävänä on toimia ribosomien rakennosana. Se osallistuu valmistettavan proteiinin aminohappojen liittämiseen toisiin-

sa peptidisidoksilla. (Solunetti 2006d; Heino & Vuento 2007, 42–43; Campbell & Farrell 2008, 252.) Siirtäjä-RNA:n tehtävänä on puolestaan siirtää aminohappoja sytoplasmasta ribosomeille. Siirtäjä-RNA:ssa on kolmen nukleotidin ryhmä (antikodoni) ja aminohapon sitoutumispaikka. Antikodoni tunnistaa lähetti-RNA:sta sitä vastaavat vastakkaisemäket, jotka määräävät seuraavaksi liitettävän aminohapon. Siirtäjä-RNA kuljettaa aina seuraavaa kolmen emäksen jaksoa vastaavan aminohapon proteiinia valmistavalle ribosomille. Jokaista kolmen emäksen jaksoa vastaa oma siirtäjä-RNA lukuun ottamatta kolmea lopetuskoodia. Useimpia aminohappoja vastaa useampi siirtäjä-RNA. (Solunetti 2006e; Heino & Vuento 2007, 42–43, 46.)

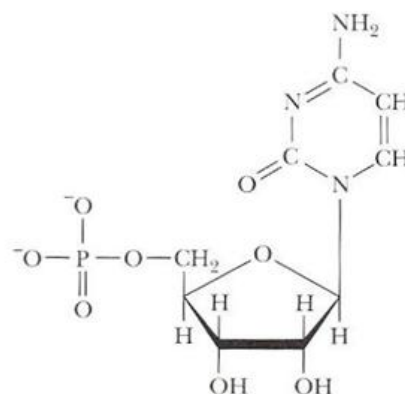
#### 4.2 Ribonukleiinihapon primaarirakenne

Ribonukleiinihapon primaarirakenteella tarkoitetaan nukleotidijärjestystä. Ribonukleiinihappomolekyyli koostuu kolmesta pääosasta: riboosista, fosfaattiryhmästä ja emäksestä. Riboosissa on 2'-kohdassa hydroksyyli-ryhmä (OH-ryhmä). Fosfaattiryhmän negatiivisen varauksen vuoksi nukleiinihapot ovat luonteeltaan happamia ja omaavat voimakkaan negatiivisen sähkövarauksen. Fosfaattiryhmä kiinnittyy riboosisokeriin, jonka 1'-hiiliatomiin liittyy yksi neljästä RNA:n emäksestä. Nämä neljä emästä ovat adeniini, guaniini, sytosiini ja urasiili (kuvio 5, s. 19). (Elliot & Elliot 2002, 343; Heino & Vuento 2002, 18, 50; Suominen & Ollikka 2003, 16–17; Turpeenoja 2005, 134.) Siirtäjä-RNA:lla voi olla myös muita harvinaisia emäksiä (Campbell & Farrell 2008, 236). Ribonukleiinihappomolekyylin muodostavat emäket ovat joko puriineja tai pyrimidiinejä. Sytosiini (C) ja urasiili (U) ovat pyrimidiinejä. Guaniini (G) ja adeniini (A) ovat puriineja. (Kuo-pion yliopisto 2002; Campbell, Smith & Peters 2005, 19; Campbell & Farrell 2008, 236.)



KUVIO 5. Emästen rakenteet (mukaillen National Center for Biotechnology Information 1999a)

Emäs, johon on sitoutunut riboosi, on nukleosidi. Emäs kiinnittyy riboosin 1'-kohtaan. Kun tähän nukleosidiin liittyy fosfaattiryhmä, molekyyliä kutsutaan nukleotidiksi. Fosfaattiryhmä kiinnittyy riboosin 5'-kohtaan. Jokaisessa nukleotidissa emäs on kiinnittynyt riboosin 1'-kohtaan joko 9'-kohdan tai 1'-kohdan typen välityksellä. Puriinit (adeniini ja guaniini) kiinnittyvät riboosiin 9'-kohdan typen välityksellä ja pyrimidiinit (sytyosiini ja urasiili) puolestaan 1'-kohdan typen välityksellä. (Kuopion yliopisto 2002; Suominen & Ollikka 2003, 17–18; Campbell & Farrell 2008, 236.) Nukleotideista käytetään usein nimityksiä AMP (adenosiini-monofosfaatti), CMP (sytyidiini-monofosfaatti), UMP (uridiini-monofosfaatti) ja GMP (guanosiini-monofosfaatti) (kuvio 6) (Kuopion yliopisto 2002; Campbell ym. 2005, 19).



KUVIO 6. Esimerkki ribonukleotidin rakenteesta, CMP (mukaillen Campbell & Farrell 2008, 218)

Puriinit ja pyrimidiinit voivat muodostaa toistensa välille vetysidoksia. Adeniinin ja urasiilin välille muodostuu kaksi vetysidosta ( $A=U$ ). Guaniinin ja sytosiinin välille muodostuu puolestaan kolme vetysidosta ( $G\equiv C$ ). Jälkimmäinen näistä sidoksista on kemiallisesti vahvempi sidos. (Kuopion yliopisto 2002.)

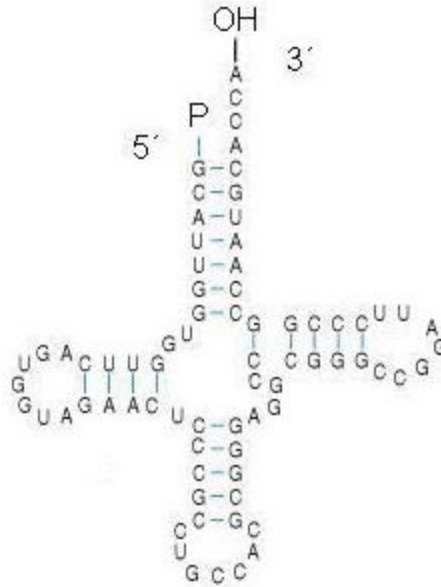
Nukleiinihappoketjun muodostavat nukleotidit liittyvät toisiinsa riboosiosista fosfaattiryhmän avulla. Fosfaattiryhmä muodostaa 3'-5'-fosfodiesterisidoksen kahden nukleotidin välille. Fosfaattiryhmä on aina sitoutunut edellisen sokerin 3'-kohtaan ja seuraavan sokerin 5'-kohtaan. Tämän takia nukleiinihappojuosteilla on tietty suunta (polariteetti). Juosteen toisessa päässä on vapaa 5'-fosfaatti ja toisessa päässä on puolestaan vapaa 3'-OH-ryhmä. Nukleiinihappojen emäsjärjestys kirjoitetaan aina siten, että aloitetaan 5'-päästä ja lopetetaan 3'-päähän. (Elliot & Elliot 2002, 343; Suominen & Ollikka 2003, 18–19.)

#### 4.3 Ribonukleiinihapon sekundaarirakenne

Ribonukleiinihappo on perusrakenteeltaan yksinauhaista, mutta se voi muodostaa erilaisia laskoksia nauhan eri osien liittyessä yhteen. Lisäksi eräillä RNA-viruksilla on tavattu kaksiketjuheliksiä. (Suominen & Ollikka 2003, 19, 21; Goudsmit 2004, 7; Heino & Vuento 2007, 43, 50.) Laskostuminen tapahtuu emäspariutumissääntöjen mukaisesti. Tällaisia rakenteita kutsutaan sekundaarirakenteiksi. (Heino & Vuento 2002, 50; Suominen & Ollikka 2003, 21.) Ribonukleiinihappomolekyylin sekundaarirakenne vaihtelee sen mukaan, mistä RNA-tyypistä on kyse (Turpeenoja 2005, 134).

Lähetä-RNA on sekundaarirakenteeltaan suora polymeeri, suoraketjuinen kopio DNA:sta. Tämän rakenteen ansiosta lähetä-RNA:n sisältämä viesti on helpompi lukea proteiinisynteesin aikana. Siirtäjä-RNA on kooltaan suhteellisen pieni molekyyli. Siirtäjä-RNA-molekyylin ja ribosomaalisen RNA-molekyylin rakenteessa on lenkkejä ja silmukoita sisäisten vetysidosten johdosta, jotka ovat syntyneet komplementaarisen emäspariutumisen tuloksena yksijuosteiseen ribonukleotidiketjuun. (Heino & Vuento 2002, 40–41; Turpeenoja 2005, 134–135.)

Erityisesti siirtäjä-RNA-molekyylit muodostavat tällaisia rakenteita. Siirtäjä-RNA-molekyyli muodostaa ns. hiusneularakenteita. (Suominen & Ollikka 2003, 21.) Kuviossa 7 nähdään siirtäjä-RNA:n apilanlehtimalli, jossa näkyy myös kolme hiusneularakennetta.



KUVIO 7. Esimerkki sekundaarirakenteesta (mukaillen National Center for Biotechnology Information 1999b)

## 5 RIBONUKLEIINIHAPON ERISTÄMINEN JA SAANNON MITTAAMINEN

Korkealaatuisen ja vahingoittumattoman RNA:n eristäminen on ensimmäinen ja usein myös kriittisin vaihe molekyylibiologisissa menetelmissä kuten Northern analyysissa, RT-PCR:ssa, RNA-kartoituksessa, in vitro -translaatiossa ja cDNA-kirjastojen valmistuksessa (Applied Biosystems 2009a). Eristetyn RNA:n tulisi edustaa näytteen in vivo -geeniekspressiota, jotta voidaan luottaa geeniekspressioanalyysin tuloksiin. Tämä on monimutkaista, sillä RNA:ssa saattaa tapahtua muutoksia näytteen käsittelyn tai RNA-eristuksen aikana. (Qiagen 2001, 48.) Ribonukleiinihapon eristämiseen voidaan käyttää monia eri menetelmiä kuten fenoli-kloroformiuuttoa, etanolisaostusta ja silikapuhdistusta (Suominen & Ollikka 1996).

Automaatio ja erilaiset kitit (valmisreagenssipakkaus) ovat lisääntyneet molekyylibiologian tutkimuksissa. Saatavilla on useita erilaisia kaupallisia kittejä nukleiinihappojen eristykseen. Ribonukleiinihapon eristyksessä kaupallisten kittien käyttäminen on vähentänyt monia RNA-eristykseen liittyviä ongelmia kuten ribonukleaasikontaminaatioiden syntymistä. (Wilson & Walker 2005, 195–196.)

### 5.1 Ribonukleaasikontaminaation ehkäiseminen

Nukleaasit ovat nukleiinihappoja pilkkovia entsyymejä. Deoksiribonukleaasit pilkkovat DNA:ta ja ribonukleaasit RNA:ta. (Turpeenoja 2005, 171.) Ribonukleiinihapon eristuksen onnistumisen kannalta on oleellista päästä eroon ribonukleaasientsyymeistä. Ribonukleaasit sietävät hyvin kuumennusta, eivätkä ne tarvitse kofaktoreita toimiakseen. (Chomczynski 1992, 3791.) Ribonukleiinihappomolekyyli on deoksiribonukleiinihappomolekyyliä lyhyempi ja siksi se kestää luonnostaan kovempaa käsittelyä. Sen rakenteessa olevat riboosin 2'-OH-ryhmät tekevät siitä kuitenkin erityisen alttiin ribonukleaasientsyymien toiminnalle, siksi RNA-eristys vaatii erityistoimenpiteitä ribonukleaasikontaminaation välttämiseksi. (Boyer 2006, 303.)

Ribonukleaaseja on joka puolella ympäristössä ja iholla (Suominen & Ollikka 2003, 65). Endogeenisiä ribonukleaasientsyymejä on solujen sisällä ja eksogeenisia ribonukleaasientsyymejä on mm. käsissä (Wilson & Walker 2005, 193). Kädet, pölypartikkelien mahdollisesti sisältämät bakteerit ja homeet ovat potentiaalisia ribonukleaasien lähteitä. Myös laboratoriovälineistä kuten pipetinkärjistä, koeputkista ja reagensseista voi aiheutua kontaminaatio näytemateriaaliin. (Qiagen 2001, 46.) Aseptiikan noudattamisella RNA-työskentelyssä pyritään ribonukleaasikontaminaation estämiseen (Qiagen 2001, 46).

Tärkeintä ribonukleaasikontaminaation välttämiseksi on suojakäsineiden käyttäminen, sillä käsistä aiheutuu yleisimmin kontaminaatio näytemateriaaliin. Suojakäsineet tulee vaihtaa usein. Koeputket pidetään suljettuina pipetointien välillä. (Qiagen 2001, 46.) Kaikki käytettävät välineet tulee joko itse käsitellä ribonukleaasivapaiksi tai käyttää tuottajien valmiita ribonukleaasivapaita tuotteita (Applied Biosystems 2009b). Pipettien tulee olla sellaisia, joita käytetään ainoastaan RNA-työskentelyssä (Applied Biosystems 2009c). Välineiden ja reagenssien käsittelylle on monia vaihtoehtoja, mutta usein käytetään DEPC-käsittelyä (dietyylipyrokarbonaattikäsittely). Se estää tehokkaasti entsyymien toimintaa, mutta se on myrkyllinen aine. Kaupallisesti on saatavilla myös turvallisempia ribonukleaasi-inhibiittoreita. (Suominen & Ollikka 2003, 66.)

Muovisten välineiden käsittelyssä on mahdollista käyttää natriumhydroksidia, etyleenidiamiinitetraetikkahappoa tai kloroformia. Käsittelyn jälkeen välineet huuhdellaan ribonukleaasivapaalla vedellä. Lasiset välineet voidaan kuumentaa 240 °C:ssa ribonukleaasien tuhoamiseksi. Ennen kuumennuskäsittelyä välineet pestään huolellisesti. Kuumennuksen tulee kestää vähintään neljä tuntia. (Qiagen 2001, 46–47.)

## 5.2 Ribonukleiinihapon eristäminen Qiagen RNeasy® Plus Mini Kittä käyttäen

Ribonukleiinihapon eristys alkaa solujen hajotuksella (lyysaus) ja RNA:n vapauttamisella solujen sisältä. Ribonukleiinihapot ovat suhteellisen lyhyitä verrattuna deoksiribonukleiinihappoihin ja siksi RNA ei vahingoitu niin herkästi. Solut voidaan siis hajottaa RNA-eristyksessä voimakkaammin. (Wilson & Walker

2005, 193; Boyer 2006, 294–295.) Tehokas solujen hajotus ja homogenisointi on oleellinen osa kaikkia kokonais-RNA:n eristysmenetelmiä. Soluseinät, soluliman membraanit ja soluorganellit täytyy hajottaa täydellisesti, jotta kaikki RNA vapautuisi. Erityyppiset näytteet vaativat erilaisia toimintatapoja, jotta saavutetaan solujen täydellinen hajoaminen. Jos solut ovat hajonneet epätäydellisesti, tuloksena on huomattavasti pienempi RNA-saanto. Solujen hajotuksen jälkeen homogenisointi on välttämätöntä, sillä se vähentää solulysaatin viskositeettia. Homogenisointi rikkoo korkean molekyylipainon omaavan genomisen DNA:n ja muita korkean molekyylipainon omaavia solun komponentteja. Epätäydellinen homogenisointi näkyy RNA:n huonona sitoutumisena pylvään membraaniin ja näin ollen vähentyneenä saantona. (Qiagen 2001, 49.)

RNeasy® Plus Mini Kit on suunniteltu eristämään RNA:ta pienistä määristä eläinsoluja tai -kudosta. Genomisen DNA:n aiheuttama kontaminaatoriski poistetaan käyttämällä gDNA Eliminator -pylvästä. RNeasy® Plus Mini Kitillä eristetty ribonukleiinihappomateriaali on eristyksen jälkeen valmista käytettäväksi ja sopii hyvin myös sovelluksiin, jotka ovat herkkiä pienillekin DNA-kontaminaatioille kuten RT-PCR. Eristettyä RNA:ta voidaan käyttää RT-PCR:n lisäksi myös mm. cDNA synteesissä ja Northern-hybridisaatio menetelmässä. (Qiagen 2005, 7.)

### 5.2.1 RNeasy® Plus Mini Kitin periaate ja käyttö

Ribonukleiinihapon eristäminen aloitetaan lyysaamalla solujen rakenne RLT Plus -lyysauspuskurilla (kuvio 8, s. 25). Ennen RLT Plus -lyysauspuskurin käyttöä siihen lisätään  $\beta$ -merkaptotetanolia, joka estää useiden proteiinien toiminnan katkaisemalla niiden rikkisillat (Qiagen 2005, 7; Campbell & Farrell 2008, 105). Se sisältää myös guanidiniumia ja guanidiniumisotiosyanaattia, jotka denaturoivat proteiineja ja inhiboivat ribonukleaaseja tehokkaasti (Qiagen 2005, 7; Wilson & Walker 2005, 193). Lyysauksen jälkeen näyte homogenisoidaan QIAshredder-pylvään avulla. Tämän jälkeen hajotetut sekä homogenisoidut solut laiteetaan Qiagenin gDNA Eliminator -pylvääseen. Solulysaatti (hajotetut solut) pakotetaan sentrifugoinnin avulla gDNA Eliminator -pylvään läpi, jolloin genomisen



DNA sitoutuu pylvääseen korkean ionivahvuuden omaavan puskurin läsnäollessa. (Qiagen 2005, 7.)

Kun genominen DNA on saatu poistettua näytteestä, putkeen lisätään etanolia. Etanolin avulla RNA:lle luodaan sopivat sitoutumisolosuhteet. Etanolin lisäämisen jälkeen näyte siirretään RNeasy Mini Spin -pylvääseen, jolloin kokonais-RNA sitoutuu pylväässä olevaan membraaniin ja mahdolliset kontaminantit huuhtoutuvat membraanin läpi keräysputkeen. (Qiagen 2005, 7–8.) Pesupuskureina RNA-eristyksessä käytetään RPE-puskuria ja RW1-puskuria (Qiagen 2005, 22). Tämän jälkeen ribonukleiinihappomateriaali eluoidaan vähintään 30 mikrolitraan (µl) vettä. Kaikki RNA-molekyylit, jotka ovat kooltaan yli 200 nukleotidia, tulee eristetyksi tällä menetelmällä. (Qiagen 2005, 7–8.)



KUVIO 8. RNA:n eristäminen pylväsmenetelmällä (mukaillen Qiagen 2009)

### 5.2.2 Solumäärän määrittäminen RNA-eristuksen alussa

Käytettäessä RNeasy® Plus Mini Kittä täytyy huomioida oikea solumäärä, jotta saavutettaisiin optimaalinen RNA:n saanto ja puhtaus. Solumäärään vaikuttavat mm. näytteen tyyppi (solut vai kudokset), näytteen sisältämän DNA:n ja RNA:n määrä sekä RLT Plus -lyysauspuskurin määrä. Jotta saadaan aikaan solujen tehokas hajoaminen ja RNeasy Mini Spin -pylvääseen suurin mahdollinen määrä näytettä, RLT Plus -lyysauspuskuria tulee olla oikea määrä. Solujen enimmäismäärään vaikuttavat myös gDNA Eliminator -pylvään DNA:n poistokyky sekä RNeasy Mini Spin -pylvään RNA:n sitomiskyky. (Qiagen 2005, 12.)

Valmistaja suosittelee käyttämään pienempää solumäärää kuin RNeasy® Plus Mini Kitin puhdistuskyvylle on mahdollista, kun RNA:ta eristetään näytteistä, jot-

ka sisältävät suuria määriä DNA:ta tai RNA:ta. Valmistajan mukaan suurin solumäärä, jota eristyksessä voidaan käyttää, on  $10 \times 10^6$  solua. Suurinta suositeltua solumäärää voidaan käyttää, jos käsiteltävät näytteet sisältävät RNA:ta keskimääräisesti tai vähän. Suurinta suositeltua solumäärää ei saa ylittää, vaikka RNeasy Mini Spin -pylvään RNA:n sitomiskyky ei ylittyisi. Jos solujen maksimimäärä ylitetään, solujen hajoaminen voi olla epätäydellistä ja hajonneiden solujen jätteet saattavat häiritä RNA:n sitoutumista RNeasy Mini Spin -pylvään membraaniin. Tällöin tuloksena on matalampi RNA-saanto ja -puhtaus. Eristettävä RNA saattaa kontaminoitua DNA:lla, jos gDNA Eliminator -pylvään DNA:n sitomiskyky ylitetään. Tämän vuoksi valmistaja suosittelee käyttämään näytteitä, jotka sisältävät vähemmän kuin 20 mikrogrammaa ( $\mu\text{g}$ ) DNA:ta. (Qiagen 2005, 12.)

### 5.3 Puhtauden ja saannon mittaaminen

Niin RNA:n kuin DNA:nkin pitoisuutta ja puhtautta voidaan mitata eri tavoin. Yleisin tapa RNA:n pitoisuuden ja puhtauden mittaamiseen on spektrofotometria. Määritykset voidaan suorittaa myös värjäämällä näyte etidiumbromidilla ja suorittamalla elektroforeesiajo. Tällöin geelillä näkyvä RNA-fraktio detektoidaan fluorometrillä. Nukleiinihapon puhtauden ja pitoisuuden mittaamisessa suuntaa antavat arvot ovat usein riittävän tarkkoja. Käytännön kannalta hyviä määrittämenetelmiä ovat sellaiset, joilla mittaus voidaan suorittaa pienellä näytemäärällä. Mittauksessa käytetty näyte on useimmiten heitettävä pois. (Suominen & Ollikka 2003, 67.)

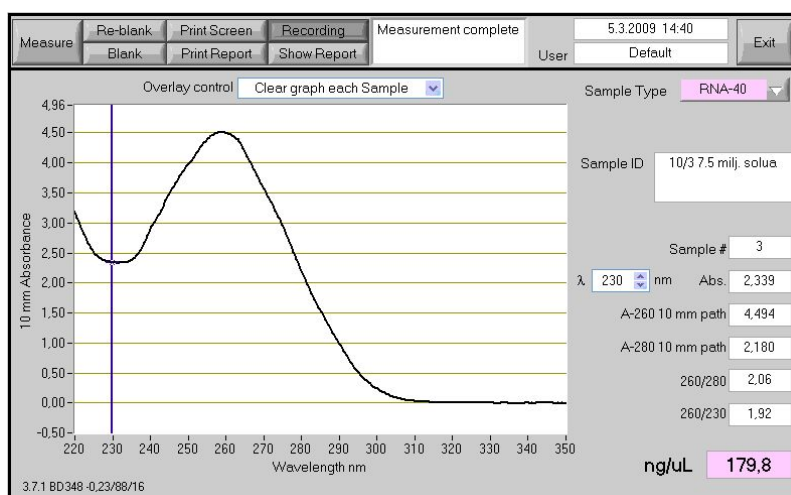
Spektrofotometria on instrumenttianalytiikan menetelmä, jossa pitoisuuden määrittäminen perustuu sähkömagneettisen säteilyn absorptioon tai emissioitumiseen näytemateriaaliin (Lehtonen & Sihvonen 2006, 211). Nukleiinihappojen pitoisuuden ja puhtauden mittaamiseen käytetään UV/VIS-spektrofotometria (Qiagen 2001, 55). Koska UV-säteet eivät läpäise lasia, UV-aallonpituusalueella tapahtuvissa mittauksissa käytetään kvartsikyvetiä (Suominen & Ollikka 2003, 67). Ribonukleiinihappopreparaatin pitoisuusmittaus tapahtuu aallonpituudella 260 nanometriä (nm). Puhtausmittausta varten pitoisuus mitataan myös 280

nm:n aallonpituudella. Absorpanssien välinen suhde ( $A_{260}/A_{280}$ ) ilmaisee RNA:n puhtautta. (Qiagen 2001, 55.) Sekundaarisena puhtausmittauksena voidaan käyttää  $A_{260}/A_{230}$ -suhdetta (Thermo Fisher Scientific Incorporated Company 2008, 5-2).

Kun RNA:n absorpanssi 260 nm:ssä on 1, on näytteen RNA-pitoisuus 40 µg/ml. Tätä tietoa apuna käyttäen voidaan laskea mitatun näytteen RNA-pitoisuus. (Suominen & Ollikka 2003, 67.) Puhtauden arviointi  $A_{260}/A_{280}$ -suhteen avulla perustuu siihen, että proteiinit, fenoli ja muut mahdolliset kontaminantit absorboivat voimakkaasti 280 nm:ssä, jolloin absorpanssisuhde pienenee. Vapaat nukleotidit ja oligonukleotidiketjut puolestaan nostavat suhdeluvun virheellisen korkeaksi. Ribonukleiinihappopreparaatin katsotaan olevan puhdas, kun  $A_{260}/A_{280}$ -suhde on 2,0. (Suominen & Ollikka 2003, 68; Thermo Fisher Scientific Incorporated Company 2008, 5-2 – 5-3.) Sekundaarisen puhtausmittauksen  $A_{260}/A_{230}$ -suhteen tulisi olla 1,8–2,2. Huomattavasti alhaisemmat arvot viittaavat epäpuhtauksiin RNA-preparaatissa. (Thermo Fisher Scientific Incorporated Company 2008, 5-3.)

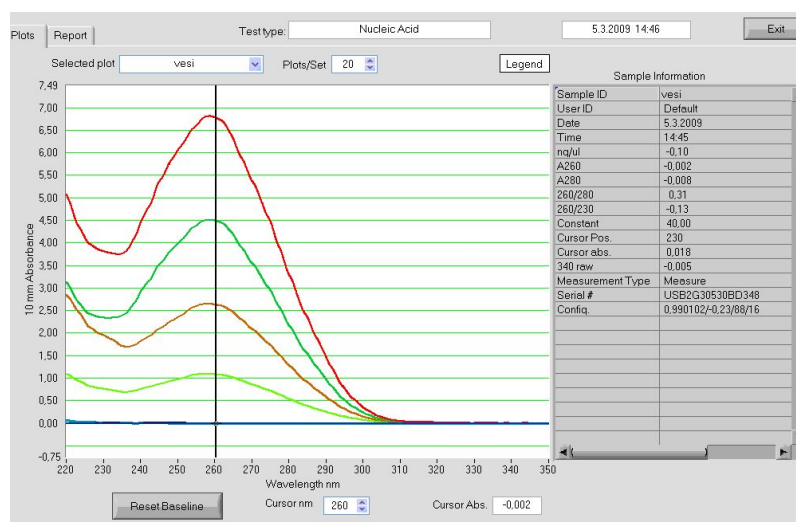
The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 -spektrofotometria voidaan käyttää DNA:n, RNA:n sekä proteiinien pitoisuuden ja puhtauden määrittämiseen sekä solumäärän arviointiin näytteestä. Mittaukset suoritetaan UV/VIS-aallonpituusalueella. Näyte pipetoidaan optiselle alustalle ja spektrofotometrin kansi suljetaan. Optisen alustan ja kannen väliin muodostuu nestepatsas, josta pitoisuus ja puhtaus mitataan. Laite mittaa absorpanssit väliltä 220–350 nm. Absorptiospektrin perusteella laite määrittää pitoisuuden ja puhtauden. Näytettä tarvitaan 1,5–2 µl. Laitetta ohjataan NanoDrop™ 1000 -tietokoneohjelman avulla. (Thermo Fisher Scientific Incorporated Company 2008, 1-1.)

NanoDrop™ 1000 -tietokoneohjelma piirtää näytteelle absorptiospektrin ja antaa mittaustulokset myös numeerisessa muodossa. Kuviosta näkee näytteen absorpanssin eri aallonpituuksilla. Ohjelma antaa  $A_{260}/A_{280}$ -suhteen ja  $A_{260}/A_{230}$ -suhteen arvon sekä RNA:n pitoisuuden nanogrammina mikrolitraa kohden (kuvio 9, s. 28).



KUVIO 9. Esimerkkikuva yksittäisen näytteen absorptiospektristä

Näytteiden absorptiospektrejä pystyy ohjelman avulla tarkastelemaan myös yhteenvetokuvaajasta. Yhteenvetokuvaajasta näkee, miten sarjan eri solumääristä saadut RNA:n absorpanssit eroavat toisistaan eri aallonpituuksilla. Yhteenvetokuvaajasta näkee myös nollanäytteen tuloksen. Esimerkkikuviossa nollanäytteenä on ribonukleaasivapaa vesi, jonka absorptiospektri näkyy kuvassa sinisenä (kuvio 10).



KUVIO 10. Esimerkkikuva yhteenvetokuvaajasta

## 6 OPINNÄYTETYÖN TEHTÄVÄ, TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyömme tarkoituksena on optimoida RNeasy® Plus Mini Kittä varten solumäärä ja RLT Plus -lyysauspuskurin määrä, joiden uskotaan vaikuttavan RNA-eristyksessä saatavan RNA:n määrään ja puhtauteen. Tarkoituksenamme on löytää oikea solumäärä sekä sopiva solujen ja RLT Plus -lyysauspuskurin välinen suhde.

Tehtävänämmä on erotella perifeerisen veren mononukleaarisia valkosoluja, laskea solumäärä Bürkerin laskukammiossa ja tämän jälkeen eristää RNA:ta Qiagen RNeasy® Plus Mini Kitillä. Eristyksen jälkeen mittaamme RNA-saannon ja -puhtauden The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 -spektrofotometrillä. Vertaamme, miten mononukleaaristen valkosolujen määrä vaikuttaa RNA-eristyksen saantoon ja puhtauteen. Kokeilemme myös, miten soluja hajottavan RLT Plus -lyysauspuskurin määrä (600 µl/350 µl) vaikuttaa eristyksen onnistumiseen. Tutkimusryhmän työntekijät olettavat, että RLT Plus -lyysauspuskurin sisältämä guanidiniumisotiosyanaatti saattaa aiheuttaa RNA-preparaatteihin epäpuhtautta. Vertailun teemme mononukleaaristen valkosolujen ja RLT Plus -lyysauspuskurin määrillä, jotka on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Kokeellisessa osuudessa käytettävien solujen määrä ja RLT Plus -lyysauspuskurin määrä

Solumäärä	RLT Plus -lyysauspuskurin määrä
$12 \times 10^6$	600 µl
$10 \times 10^6$	600 µl
$7,5 \times 10^6$	600 µl
$5 \times 10^6$	600 µl
$2 \times 10^6$	600 µl
$10 \times 10^6$	350 µl
$7,5 \times 10^6$	350 µl
$5 \times 10^6$	350 µl
$2 \times 10^6$	350 µl

Multippeliskleroosia sairastavista potilaista otetaan paljon verinäytteitä ja osa potilaista on huonokuntoisia. Tutkimusryhmä tarvitsee RNA-eristystä varten neljästä viiteen kahdeksan millilitran BD Vacutainer® CPT™ -putkea. Tavoitteenamme on pyrkiä pienentämään tutkimuksessa tarvittavaa näytemäärää. Näytteenotossa tarvittavat BD Vacutainer® CPT™ -putket ovat kalliita, joten myös näytteenotosta aiheutuvien kustannusten pienentäminen on tavoitteenamme. Henkilökohtaisia tavoitteitamme on syventyä paremmin molekyylibiologiaan ja RNA-eristykseen sekä perehtyä molekyylibiologian laboratoriossa työskentelyyn.

## 7 OPINNÄYTETYÖ KOKEELLISENA TYÖNÄ

Tutkimuksen tekeminen jaotellaan usein teoreettiseen tai empiiriseen tutkimukseen. Teoreettisessa tutkimuksessa tutkittavaa ilmiötä tarkastellaan käyttämällä hyväksi jo olemassa olevaa aineistoa. Se ei siis perustu kokemukseen eikä tiedon keräämiseen. Empiirisessä tutkimuksessa tutkittavaan ilmiöön perehdytään kokemusperäisesti. Empiirinen tutkimus voi olla kokeellinen tutkimus tai ei-kokeellinen tutkimus. Kokeellisessa tutkimuksessa kerätty aineisto on mitattavissa. (Teirilä & Jyväsjärvi 2001, 12.) Kokeellisessa tutkimuksessa mitataan yhden muuttujan vaikutusta toiseen muuttujaan. Tyypillisiä piirteitä kokeelliselle tutkimukselle ovat hypoteesin testaaminen, koejärjestelyjen vakiointi, yhden olosuhteen systemaattinen muuttaminen, muutosten numeerinen mittaaminen ja muiden muuttujien kontrollointi. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007, 130.)

Opinnäytetyömme perustuu empiiriseen tutkimustapaan ja se on kokeellinen vertaileva tutkimus. Opinnäytetyömme kokeellinen osuus on kaksiosainen. Ensimmäisessä osuudessa olemme vakioineet RLT Plus -lyysauspuskurin määrän 600 mikrolitraksi ja solumäärä on muuttujana. Myös toisessa osuudessa muuttujana on solumäärä ja RLT Plus -lyysauspuskurin määrän olemme vakioineet 350 mikrolitraksi. Vertailemme kokeellisessa osuudessa eri solumäärien ja RLT Plus -lyysauspuskurin määrän vaikutusta RNA-saantoon ja -puhtauteen. Olemme vakioineet muut koejärjestelyt. Mittaamme RNA-saannon ja -puhtauden muutokset spektrofotometrilla.

Empiirinen tutkimus voi olla myös joko kvalitatiivinen tai kvantitatiivinen (Teirilä & Jyväsjärvi 2001, 14). Opinnäytetyömme on kvantitatiivinen tutkimus. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa tulokset esitetään mahdollisuuksien mukaan numeerisessa muodossa, jolloin voidaan tutkia määrällisiä muutoksia ja merkitseviä eroavaisuuksia. Myös aineisto voidaan esittää numeerisessa muodossa. Kvantitatiiviselle tutkimukselle on tyypillistä se, että aineisto edustaa tilastollisesti perusjoukkoa, aineisto on tarkkaan rajattua ja tutkimus testaa teoriaa tai hypoteesia. Sillä on myös korkea reliabiliteetti ja validiteetti. (Teirilä & Jyväsjärvi 2001, 14.) Reliabiliteetilla tarkoitetaan mittauksen luotettavuutta ja toistettavuutta. Jos mittaus suoritettaisiin uudestaan, saataisiin siitä sama tulos. Validiteetilla tarkoi-

tetaan tutkimusmenetelmän kykyä mitata sitä, mitä tutkimuksessa on tarkoituskin mitata. (Koivula, Suihko & Tyrväinen 2002, 28–29.)

Opinnäytetyömme kuuluu empiirisen kvantitatiivisen tutkimuksen piiriin. Kokeellisen osuuden aineisto koostuu neljän eri ihmisen verinäytteistä, jotka jaoin yhdeksään sarjaan. Yksi sarja koostuu neljästä tai viidestä solumäärästä. Yhteensä tutkittavanamme on 43 havaintoyksikköä. Mitä suurempi otoskoko on, sitä luotettavampia tulokset ovat (Koivula ym. 2002, 26). Koivulan ym. (2002, 26) mukaan prosentteja ei kannata laskea, jos havaintoyksiköitä on alle 50. Otoksen ollessa pieni laskennallisia parametreja ei suositella käytettäväksi, sillä yksittäisten havaintoyksiköiden arvojen muutokset aiheuttavat suhteessa suuren virheen tuloksiin. (Koivula ym. 2002, 26.)

Esityönä empiirisessä tutkimuksessa tehdään usein tietojen tarkistus. Jos joukossa on selvästi virheellisiä tuloksia, ne hylätään. Aineisto järjestetään, jotta se voidaan tallentaa analysointia varten. (Hirsjärvi ym. 2007, 216–217.) Numeeriseen muotoon saatetuista tuloksista kannattaa laatia kuvaaja, jolloin tuloksia on havainnollisempaa tarkastella. (Teirilä & Jyväsjärvi 2001, 91.) Opinnäytetyösämme laadimme mittaustuloksista taulukoita ja havainnollistamme kokeellisen osuuden tuloksia pylväsdiagrammien avulla. Pylväsdiagrammeilla voidaan kätevästi tarkastella eri muuttujien kokoluokkia. Pylväsdiagrammien avulla pystytään arvioimaan X- ja Y-akseleilla olevien muuttujien välistä riippuvuutta. (Teirilä & Jyväsjärvi 2001, 91.)



## 8 KOKEELLISEN OSUUDEN KULKU

Saimme opinnäytetyömme aiheen syyskuussa 2008 Tampereen yliopiston Neuroimmunologian tutkimusryhmän tutkija Sanna Rinnalta ja bioanalyttikko Raija Paalavuolta. Aloitimme opinnäytetyöprosessin tekemällä opinnäytetyön suunnitelman, jonka saimme valmiiksi lokakuussa 2008. Saimme tutkimusluvan tutkija Sanna Rinnalta 10.11.2008 ja sopimuksen opinnäytetyöstä allekirjoitti professori Irina Elovaara marraskuussa 2008.

Kävimme harjoittelemassa perifeerisen veren mononukleaaristen valkosolujen erottelua, RNA-eristystä ja RNA:n pitoisuus- ja puhtausmittausta 25.–26.2.2009 Tampereen yliopiston Lääketieteenlaitoksen Neuroimmunologian tutkimusryhmän laboratoriotiloissa. Varsinaisen kokeellisen osuuden suoritimme 2.–5.3.2009.

### 8.1 Eri työvaiheissa käytetyt välineet, laitteet ja reagenssit

Verinäytteenotossa käytimme Terumon Venosafe™ Holder -neulanohjainta sekä Terumo Venoject™ Quick Fit -neuloja. Otimme verinäytteet BD Vacutainer® CPT™ -putkiin. Sentrifugoimme näytteet Eppendorf Centrifuge 5810 -sentrifugilla. Mononukleaaristen valkosolujen pipetoinnissa käytimme lasisia Pasteur-pipettejä.

Solujen pesuliuksena käytimme BioWhittakerin® fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS, phosphate buffered saline). Pesujen yhteydessä käytimme Sigma Laboratory Centrifuges 6K15 Sartorius -kylmäsentrifugia. Solujen laskemista varten valmistimme solususpensiosta ja Sigman 0,4 % Trypan Blue -väristä laimennoksen, jolloin kuolleet ja elävät solut erottuivat toisistaan. Solujen jakamisvaiheessa käytimme Biofuge Fresco Haraeus -sentrifugia. Mononukleaaristen valkosolujen lyysauksessa käytimme RLT Plus -lyysauspuskuria ja putkien sekoittamisessa Vortex Genie 2 -sekoittajaa. Ennen RLT Plus -lyysauspuskurin käyttöä, lisäsimme 14 ml:aan RLT Plus -lyysauspuskuria 140 µl β-

merkapttoetanolia. Solujen hajotuksen jälkeen pakastimme solulysaatit Sanyo UltraLow -pakastimessa -80 °C:ssa.

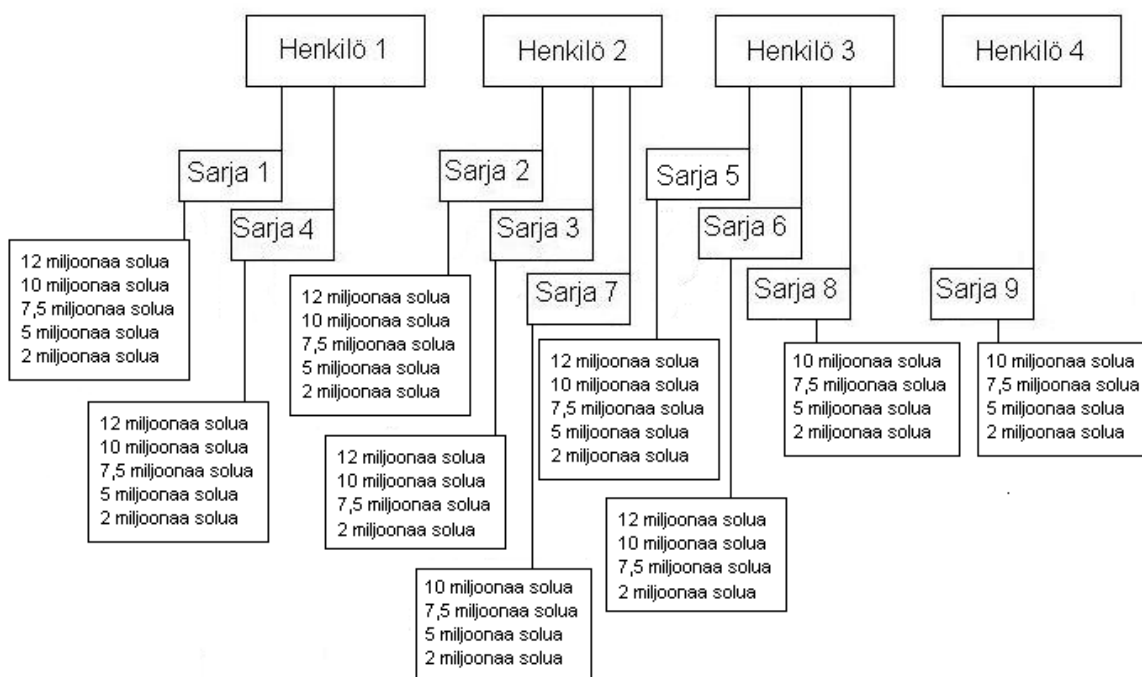
Ennen RNA-eristystä puhdistimme välineet MβP Molecular BioProducts RNase AWAY -liuoksella. Sulatimme solulysaatit Dual ThermoBath ALB 128 -lämpöhauteella +37 °C:ssa. Ribonukleiinihapon eristyksessä käytimme Qiagen RNeasy® Plus Mini Kitin mukana tulleita välineitä ja reagensseja. Kitti sisälsi gDNA Eliminator -pylväitä, RNeasy Mini Spin -pylväitä, 2 millilitran (ml) keräysputkia ja 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkia sekä tarvittavat reagenssit, joita olivat RW1-pesupuskuri, RPE-pesupuskuri, RLT Plus -lyysauspuskuri ja ribonukleasivapaa vesi. Lisäsimme RPE-pesupuskurin sekaan ennen käyttöä 14 ml absoluuttista etanolia pakkauksen ohjeen mukaan. Lisäksi tarvitsimme RNA-eristyksessä 70 % etanolia, jonka valmistimme lisäämällä 9,8 ml absoluuttista etanolia 4,2 ml:aan Qiagenin ribonukleasivapaata vettä. Lisäksi käytimme RNA-eristyksessä Qiagen QIAshredder-homogenisointipylväitä. Sentrifugointiin käytimme Eppendorf centrifuge 5415D -sentrifugia.

Pipetoinnissa käytimme tilavuudeltaan erikokoisia Finnpipette® Thermo Labsystems -ilmamäntäpipettejä ja TipOne Starlab -pipetinkärkiä. Käytimme myös Brand accu-jet -pumpettoria sekä Sarstedt serological pipette -muovipipettiä RLT Plus -lyysauspuskurin ja 70 % etanolin valmistuksessa.

## 8.2 Mononukleaaristen solujen erottelu ja laskeminen Bürkerin laskukammiossa

Aloitimme kokeellisen osuuden suorittamisen ottamalla verinäytteet kolmesta perusterveestä henkilöstä. Otimme näytteitä mononukleaaristen valkosolujen määrän optimointia varten yhteensä 32 kahdeksan millilitran BD Vacutainer® CPT™-putkea. Eri henkilöiden näyteputket identifioimme juoksevalla numerolla. Ensimmäinen osuus sisälsi yhteensä kuusi sarjaa. Yksi sarja koostui aina yhden henkilön näytteestä ja yhdessä sarjassa oli viisi tai neljä eri solumäärää (kuvio 11, s. 35). Yhtä sarjaa varten tarvitsimme kahdeksan 8 ml CPT™-putkea. Toista osuutta varten otimme vielä kolmesta eri henkilöstä yhteensä 12 kahdeksan millilitran CPT™-putkea kokoverta RLT Plus -lyysauspuskurin määrän vertailua varten. Otetuista verinäytteistä muodostui yhteensä kolme eri sarjaa ja

yksi sarja koostui yhden henkilön mononukleaarista valkosoluista, jotka ja-  
oimme neljään eri solumäärään (kuvio 11). Yhteen sarjaan tarvitsimme neljä  
kahdeksan millilitran CPT™-putkea. Sentrifugoimme näytteet heti näytteenoton  
jälkeen huoneenlämmössä Centrifuge 5810 eppendorf -sentrifugilla. Sentrifu-  
gointiteho oli 1720 g:tä ja sentrifugointiaika oli 30 minuuttia.



KUVIO 11. Eri henkilöiden verinäytteistä muodostuneet solusarjat

Sentrifugoinnin jälkeen pipetoimme solut steriileillä, lasisilla Pasteur-pipeteillä Sarstedin 15 ml:n kartioputkiin. Eri henkilöiden solut käsittelimme erikseen. Kun saimme kaikki solut pipetoitua CPT™-putkista Sarstedin 15 ml:n kartioputkiin, lisäsimme solujen päälle PBS:a ad. 15 ml. Fosfaattipuskuroidun suolaliuoksen lisäyksen jälkeen sekoitimme putkia varovasti noin viisi kertaa. Sentrifugoimme putket +4 °C:ssa 15 minuuttia 400 g:n teholla Sigma laboratory centrifuges 6K15 Sartorius -sentrifugilla. Sentrifugoinnin jälkeen kaadoimme supernatantin pois hajottamatta putken pohjassa olevaa solupellettiä. Tämän jälkeen kaa-  
doimme solupelletin päälle PBS:a ad. 10 ml. Hajotimme solupelletin PBS:n lisä-  
yksen yhteydessä varovasti lasisilla Pasteur-pipetillä suspensoiden. Tämän jäl-  
keen sentrifugoimme solususpension +4 °C:ssa 10 minuuttia 400 g:n teholla  
Sigma laboratory centrifuges 6K15 Sartorius -sentrifugilla. Sentrifugoinnin jäl-  
keen kaadoimme supernatantin pois. Solupelletin päälle lisäsimme 1 ml PBS:a

ja hajotimme solupelletin tarkasti lasisella Pasteur-pipetillä suspensoiden. Säilytimme solususpension jäähauteella solujen jakamiseen saakka.

Sarja 1:

Värjäsimme erotellut solut Tryban Blue -värillä. Pipetoimme 25 µl solususpensiota ja 100 µl Tryban Blue -väriä mikrosentrifugiputkiin, jolloin laimennoskerroin oli 5. Suspensoimme värin ja solususpension hyvin pipetillä. Pipetoimme värjättyä solususpensiota lasisilla Pasteur-pipeteillä Bürkerin laskukammioon. Laskimme B-ruuduista aina vähintään 100 solua. Ensimmäisessä sarjassa oli neljässä Sarstedin 15 ml putkessa 1 ml solususpensiota. Teimme jokaisesta solususpensioputkesta värjäyksen mikrosentrifugiputkeen.

Putki 1: 143 solua/12 B-ruutua = 11,9 solua/B-ruutu.

Putki 2: 165 solua/12 B-ruutua = 13,75 solua/B-ruutu.

Putki 3: 106 solua/10 B-ruutua = 10,6 solua/B-ruutu.

Putki 4: 115 solua/10 B-ruutua = 11,5 solua/B-ruutu.

Laskimme näiden tulosten perusteella, paljonko kussakin putkessa on soluja. Solumäärät on laskettu seuraavaa kaavaa käyttäen:

$$\frac{\text{laskettujen solujen määrä yhteensä}}{\text{laskettujen B-ruutujen määrä}} \times \text{laimennoskerroin} \times \text{tilavuus} \times 10^4$$

Laimennossuhde: 25 µl + 100 µl (1:5), laimennoskerroin on 5

Tilavuus: 16 B-ruutua (0,1 µl)

Putki 1:  $143/12 \times 5 \times 16 = 953 \times 10^4$  ( $9,53 \times 10^6$  solua/ml)

Putki 2:  $165/12 \times 5 \times 16 = 1100 \times 10^4$  ( $11 \times 10^6$  solua/ml)

Putki 3:  $106/10 \times 5 \times 16 = 848 \times 10^4$  ( $8,48 \times 10^6$  solua/ml)

Putki 4:  $115/10 \times 5 \times 16 = 920 \times 10^4$  ( $9,2 \times 10^6$  solua/ml)

Yhdistimme 1 ml solususpensiot yhteen Sarstedin 15 ml:n kartioputkeen, jonka jälkeen soluja oli yhteensä  $38,21 \times 10^6$  solua/4 ml. Keskimäärin soluja oli siis

$9,6 \times 10^6$  solua/ml. Laskimme tarvittavat solususpensiomäärät halutun solumäärän saavuttamiseksi (taulukko 2). Solusarjat ja -määrät merkitsimme juoksevilla numerolla. Merkintä 1/1 tarkoittaa ensimmäistä solusarjaa ja ensimmäistä solumäärää (12 miljoonaa solua). Merkintä 2/3 tarkoittaa puolestaan toista solusarjaa ja kolmatta solumäärää (7,5 miljoonaa solua).

TAULUKKO 2. Ensimmäisen sarjan solususpension määrä eri solumäärille

Solusarja	Haluttu solumäärä	Tarvittava solususpension määrä
1/1	$12 \times 10^6$	$12 \times 10^6 / 9,6 \times 10^6 = 1025 \mu\text{l}$
1/2	$10 \times 10^6$	$10 \times 10^6 / 9,6 \times 10^6 = 1000 \mu\text{l}$
1/3	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6 / 9,6 \times 10^6 = 780 \mu\text{l}$
1/4	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6 / 9,6 \times 10^6 = 550 \mu\text{l}$
1/4/2	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6 / 9,6 \times 10^6 = 550 \mu\text{l}$
1/5	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 / 9,6 \times 10^6 = 210 \mu\text{l}$

Pipetoimme solususpensiota mikrosentrifugiputkiin tarvittavat määrät ja sentrifugoimme mikrosentrifugiputket Biofuge Fresco Haraeus -sentrifugilla  $+4^\circ\text{C}$ :ssa 5 minuuttia 400 g:n teholla. Koska ensimmäisessä sarjassa solususpensiota jäi ylimääräistä, pipetoimme 1/4 solumäärälle rinnakkaisen näytteen, jolle annoimme näyttenumeroksi 1/4/2. Sentrifugoinnin jälkeen pipetoimme supernatantin varovasti pois steriloiduilla lasisilla Pasteur-pipeteillä. Tämän jälkeen pipetoimme solupelletin päälle 600  $\mu\text{l}$  RLT Plus -lyysauspuskuria. Hajotimme solupelletin pipetillä suspensoiden, jonka jälkeen vielä sekoitimme putket Vortex Genie 2 -sekoittajalla lyysayksen varmistamiseksi. Tämän jälkeen pakastimme solulysaatit  $-80^\circ\text{C}$  Sanyo Ultra low -pakastimessa. Jokaisen sarjan kohdalla käsittelimme solususpensiot edellä mainitulla tavalla.

Näytteen 1/3 kohdalla sattui pipetointivirhe, joten jouduimme poistamaan tämän näytteen sarjasta. Seuraavana päivänä otimme samalta henkilöltä verinäytteen ja korvasimme epäonnistuneen näytteen uudella. Otimme ensimmäiseen sarjaan myös 1/4 ja 1/5 solumäärille rinnakkaiset näytteet. Näiden kolmen solumäärän solususpensiomäärät esitämme taulukossa 3 sivulla 38.

TAULUKKO 3. Ensimmäisen sarjan uusitut solumäärät

Solusarja	Haluttu solumäärä	Tarvittava solususpension määrä
1/3	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6 / 18 \times 10^6 = 420 \mu\text{l}$
1/4	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6 / 18 \times 10^6 = 230 \mu\text{l}$
1/5	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 / 18 \times 10^6 = 110 \mu\text{l}$

## Sarja 2:

Toisessa sarjassa solususpensiota oli neljässä Sarstedin 15 ml:n kartioputkessa, joista jokaisessa oli 1 ml solususpensiota. Ennen solujen laskemista yhdistimme solut yhteen Sarstedin 15 ml:n putkeen, jolloin yhdessä putkessa oli 4 ml solususpensiota. Tällöin laskimme solut ainoastaan yhden kerran. Värjäsimme solut samalla tavalla kuin edellä kuvattiin. Solususpensiomäärät esitämme taulukossa 4.

## Putki 1:

$$101 \text{ solua}/4 \text{ B-ruutua} = 25,33 \text{ solua/B-ruutu}$$

$$25,33 \times 5 \times 16 = 2026,4 \times 10^4 \text{ (} 20 \times 10^6 \text{ solua/ml)}$$

$$20 \times 10^6 \text{ solua/ml} \times 4 = 80 \times 10^6 \text{ solua}/4 \text{ ml}$$

TAULUKKO 4. Toisen sarjan solususpension määrä eri solumääriille

Solusarja	Haluttu solumäärä	Tarvittava solususpension määrä
2/1	$12 \times 10^6$	$12 \times 10^6 / 20 \times 10^6 = 600 \mu\text{l}$
2/2	$10 \times 10^6$	$10 \times 10^6 / 20 \times 10^6 = 500 \mu\text{l}$
2/3	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6 / 20 \times 10^6 = 380 \mu\text{l}$
2/4	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6 / 20 \times 10^6 = 250 \mu\text{l}$
2/5	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 / 20 \times 10^6 = 100 \mu\text{l}$

## Sarja 3:

Kolmannen sarjan saimme samasta näytteestä toisen sarjan kanssa. Kolmannesta sarjasta puuttuu  $5 \times 10^6$  solumäärä (3/4), sillä solususpensiota ei riittänyt. Solususpension määrät ovat samat kuin toisessa sarjassa. Solususpensiomäärät esitämme taulukossa 5.

TAULUKKO 5. Kolmannen sarjan solususpension määrä eri solumäärille

Solusarja	Haluttu solumäärä	Tarvittava solususpension määrä
3/1	$12 \times 10^6$	$12 \times 10^6 / 20 \times 10^6 = 600 \mu\text{l}$
3/2	$10 \times 10^6$	$10 \times 10^6 / 20 \times 10^6 = 500 \mu\text{l}$
3/3	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6 / 20 \times 10^6 = 380 \mu\text{l}$
3/4	$5 \times 10^6$	Puuttuu (soluja ei riittänyt)
3/5	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 / 20 \times 10^6 = 100 \mu\text{l}$

## Sarja 4:

Neljännän sarjan alussa solususpensiota oli kolmessa Sarstedin 15 ml:n kartioputkessa, jossa jokaisessa solususpensiota oli 1 ml. Yhdistimme solususpension yhteen kartioputkeen, jolloin sitä oli yhteensä 3 ml. Neljännessä sarjassa värjäsimme solut jälleen Tryban Blue -värillä eli pipetoimme 25  $\mu\text{l}$  solususpensiota ja 100  $\mu\text{l}$  Tryban Blue -väriä mikrosentrifugiputkeen. Laskimme soluja yhteensä kymmenestä B-ruudusta.

Putki 1:  $226 \text{ solua}/10 \text{ B-ruutua} = 22,6 \text{ solua/B-ruutu}$

$22,6 \times 5 \times 16 = 1808 \times 10^4$  ( $18,08 \times 10^6 \text{ solua/ml}$ )

$18,08 \times 10^6 \text{ solua/ml} \times 3 = 54,2 \times 10^6 \text{ solua/ 3 ml}$

Solususpensiomäärät esitämme taulukossa 6 sivulla 40.

TAULUKKO 6. Neljännen sarjan solususpension määrä eri solumäärille

Solusarja	Haluttu solumäärä	Tarvittava solususpension määrä
4/1	$12 \times 10^6$	$12 \times 10^6 / 18 \times 10^6 = 670 \mu\text{l}$
4/2	$10 \times 10^6$	$10 \times 10^6 / 18 \times 10^6 = 560 \mu\text{l}$
4/3	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6 / 18 \times 10^6 = 420 \mu\text{l}$
4/4	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6 / 18 \times 10^6 = 230 \mu\text{l}$
4/5	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 / 18 \times 10^6 = 110 \mu\text{l}$

## Sarja 5:

Viidennen sarjan alussa solususpensiota oli kolmessa Sarstedin 15 ml:n kartioputkessa, jossa jokaisessa solususpensiota oli 1 ml. Yhdistimme solususpension yhteen kartioputkeen, jolloin sitä oli yhteensä 3 ml. Värjäsimme solut jälleen Tryban Blue -värillä kuten edellä. Laskimme soluja yhteensä kahdestatoista B-ruudusta.

Putki 1:  $347 \text{ solua}/12 \text{ B-ruutua} = 28,9 \text{ solua/B-ruutu}$

$28,9 \times 5 \times 16 = 2312 \times 10^4$  ( $23,12 \times 10^6 \text{ solua/ml}$ )

$23,12 \times 10^6 \text{ solua/ml} \times 3 = 69 \times 10^6 \text{ solua/ 3 ml}$

Solususpensiomäärät esitämme taulukossa 7.

TAULUKKO 7. Viidennen sarjan solususpension määrä eri solumäärille

Solusarja	Haluttu solumäärä	Tarvittava solususpension määrä
5/1	$12 \times 10^6$	$12 \times 10^6 / 23,12 \times 10^6 = 520 \mu\text{l}$
5/2	$10 \times 10^6$	$10 \times 10^6 / 23,12 \times 10^6 = 433 \mu\text{l}$
5/3	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6 / 23,12 \times 10^6 = 325 \mu\text{l}$
5/4	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6 / 23,12 \times 10^6 = 216 \mu\text{l}$
5/5	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 / 23,12 \times 10^6 = 87 \mu\text{l}$



## Sarja 6:

Kuudennen solusarjan saimme samasta näytteestä viidennen solusarjan kanssa. Kuudennessa sarjasta puuttuu  $5 \times 10^6$  (6/4) solun sarja, sillä solususpensiota ei riittänyt. Solususpension määrä on sama kuin viidennessä sarjassa. Solususpensionmäärät esitämme taulukossa 8.

TAULUKKO 8. Kuudennen sarjan solususpension määrä eri solumäärille

Solusarja	Haluttu solumäärä	Tarvittava solususpension määrä
6/1	$12 \times 10^6$	$12 \times 10^6 / 23,12 \times 10^6 = 520 \mu\text{l}$
6/2	$10 \times 10^6$	$10 \times 10^6 / 23,12 \times 10^6 = 433 \mu\text{l}$
6/3	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6 / 23,12 \times 10^6 = 325 \mu\text{l}$
6/4	$5 \times 10^6$	Puuttuu (soluja ei riittänyt)
6/5	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 / 23,12 \times 10^6 = 87 \mu\text{l}$

Otimme yhteensä kolmesta eri henkilöstä verta BD Vacutainer® CPT™-putkiin RLT Plus -lyysauspuskurin määrän vertailua varten. Otimme jokaisesta henkilöstä verta neljä kahdeksan millilitran CPT™-putkea. Yhteensä otimme näytteitä kaksitoista CPT™-putkea. Vertailussa oli siis kolme sarjaa, jossa jokaisessa oli neljä eri solumäärää.

Eroittelimme, värjäsimme ja laskimme mononukleaariset valkosolut näistä näytteistä samalla tavalla kuin edellisissä sarjoissa. Ainut muuttuja solujen käsittelyssä oli RLT Plus -lyysauspuskurin määrä. Nyt pipetoimme RLT Plus -lyysauspuskuria  $350 \mu\text{l}$ , kun aikaisemmin olimme pipetoineet RLT Plus -lyysauspuskuria  $600 \mu\text{l}$ .

## Sarja 7:

Seitsemännessä solusarjasta laskimme soluja kuudesta B-ruudusta.

Putki 1:  $226 \text{ solua}/6 \text{ B-ruutua} = 36,8 \text{ solua/B-ruutu}$

$36,8 \times 5 \times 16 = 2950 \times 10^4 \text{ solua}$  ( $29,5 \times 10^6 \text{ solua/ml}$ )

Tässä tapauksessa solususpensiota oli vain 1 ml. Solususpensiomäärät esitämme taulukossa 9.

TAULUKKO 9. Seitsemännen sarjan solususpension määrä eri solumäärille

Solusarja	Haluttu solumäärä	Tarvittava solususpension määrä
7/2	$10 \times 10^6$	$10 \times 10^6 / 29,5 \times 10^6 = 339 \mu\text{l}$
7/3	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6 / 29,5 \times 10^6 = 254 \mu\text{l}$
7/4	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6 / 29,5 \times 10^6 = 169 \mu\text{l}$
7/5	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 / 29,5 \times 10^6 = 68 \mu\text{l}$

Sarja 8:

Kahdeksannesta solusarjasta laskimme soluja neljästä B-ruudusta.

Putki 1: 202 solua/4 B-ruutua = 50,5 solua/B-ruutu

$50,5 \times 5 \times 16 = 4040 \times 10^4$  solua/ml ( $40,4 \times 10^6$  solua/ml)

Solususpensiomäärät esitämme taulukossa 10.

TAULUKKO 10. Kahdeksannen sarjan solususpension määrä eri solumäärille

Solusarja	Haluttu solumäärä	Tarvittava solususpension määrä
8/2	$10 \times 10^6$	$10 \times 10^6 / 40,4 \times 10^6 = 248 \mu\text{l}$
8/3	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6 / 40,4 \times 10^6 = 186 \mu\text{l}$
8/4	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6 / 40,4 \times 10^6 = 124 \mu\text{l}$
8/5	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 / 40,4 \times 10^6 = 50 \mu\text{l}$

Sarja 9:

Yhdeksännestä solusarjasta laskimme yhteensä kaksi B-ruutua.

Putki 1: 127 solua/2 B-ruutua = 63,5 solua/B-ruutu.

$63,5 \times 5 \times 16 = 5040 \times 10^4$  solua ( $50,4 \times 10^6$  solua/ml)

Solususpensiomäärät esitämme taulukossa 11 sivulla 43.

TAULUKKO 11. Yhdeksän sarjan solususpension määrä eri solumäärille

Solusarja	Haluttu solumäärä	Tarvittava solususpension määrä
9/2	$10 \times 10^6$	$10 \times 10^6 / 50,4 \times 10^6 = 198 \mu\text{l}$
9/3	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6 / 50,4 \times 10^6 = 149 \mu\text{l}$
9/4	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6 / 50,4 \times 10^6 = 99 \mu\text{l}$
9/5	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 / 50,4 \times 10^6 = 40 \mu\text{l}$

### 8.3 Ribonukleiinihapon eristäminen

Eristimme RNA:ta yhteensä 43 solulysaatista. Ribonukleiinihapon eristystä varten sulatimme lyysatut solut lämpöhauteella  $+37^\circ\text{C}$ :ssa 10–15 minuuttia, jonka jälkeen sekoitimme näytteen Vortex Genie 2 -sekoittajalla. Varsinaisessa RNA-eristyksessä käytimme Qiagen RNeasy® Plus Mini Kittia ja erikseen tilattuja Qiagen QIAshredder -homogenisointipylväitä. Lisäksi valmistimme eristystä varten 14 millilitraa 70 % etanolia ribonukleasivapaaseen veteen.

Kolmen näytteen kohdalla RNA-eristys epäonnistui viallisen gDNA Eliminator -pylvään vuoksi. Pylvään silikakalvo oli irronnut sentrifugoinnin aikana. Huomasimme silikakalvon irtoamisen etanolin lisäyksen yhteydessä, jolloin putken pohjalla näkyi valkoinen saostuma. Saostuma aiheutti epäpuhtautta näytteisiin. Näiden näytteiden mittaustulokset eivät ole mukana lopullisissa tuloksissa.

Ennen RNA-eristuksen suoritusta puhdistimme työtason ja tarvittavat välineet RNase AWAY -liuoksella. Lisäksi suojasimme työtason imupaperilla. Vaihdoin suojakäsineitä usein ribonukleasikontaminaation välttämiseksi. Eristyksen ensimmäisessä vaiheessa homogenisoimme näytteen: Pipetoimme  $600 \mu\text{l}$  solulysaattia  $2 \text{ ml}$ :n keräysputkessa olevaan violettiin QIAshredder-pylvääseen, jota sentrifugoimme 2 minuuttia  $16\,100 \text{ g}$ :n teholla Eppendorf centrifuge 5415 D -sentrifugilla. Tämän jälkeen hävitimme pylvään ja siirsimme homogenisoidun lyaatin keräysputkelliseen gDNA Eliminator -pylvääseen. Sentrifugoimme pylvästä 30 sekunnin ajan  $11\,200 \text{ g}$ :n teholla, jolloin näytteessä oleva

DNA sitoutui pylvään silikakalvolle. Hävitimme pylvään ja säilytimme sen läpi menneen nesteen.

Seuraavaksi pipetoimme solulysaattiin 600 µl 70 % etanolia. Sekoitimme etanolin ja lyaatin varovasti keskenään pipetillä suspensoiden. Etanolilisäyksen jälkeen siirsimme 700 µl näytettä vaaleanpunaiseen RNeasy Mini Spin -pylvääseen ja sentrifugoimme pylvästä 15 sekuntia 11 200 g:n teholla. Säästimme pylvään ja siirsimme sen uuteen keräysputkeen. Lisäsimme pylvääseen loput näytteestä ja toistimme sentrifugoinnin. Hävitimme läpi tulleen nesteen ja siirsimme pylvään uuteen keräysputkeen.

Käytimme näytteen pesemiseen kahta eri pesupuskuria. Ensin lisäsimme pylvääseen 700 µl RW1-pesupuskuria ja sentrifugoimme putkea 15 sekunnin ajan 11 200 g:n teholla. Seuraavat kaksi pesua suoritimme RPE-pesupuskurilla, jota lisäsimme 500 µl ja sentrifugoimme putken kuten edellä. Jälkimmäisessä pesussa sentrifugointiaika oli kaksi minuuttia. Hävitimme pylvään läpi tulleen nesteen ja siirsimme pylvään nukleasivapaaseen 1,5 ml mikrosentrifugiputkeen.

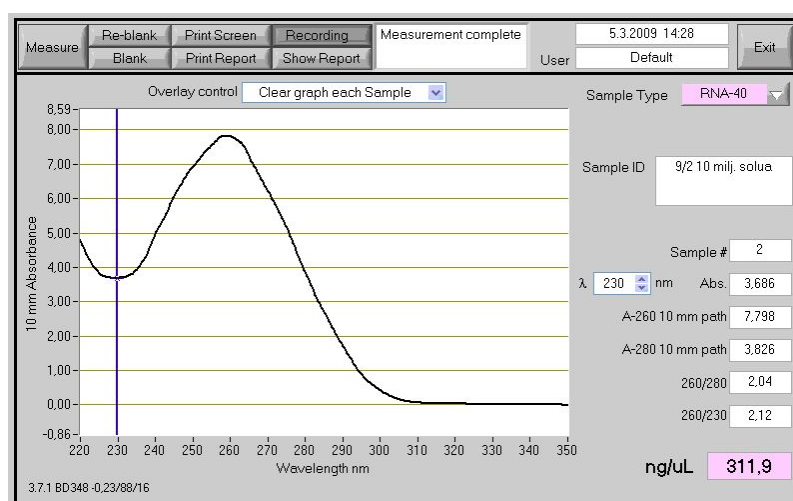
Kun olimme siirtäneet pylvään mikrosentrifugiputkeen, pipetoimme pylvääseen 30 µl ribonukleasivapaata vettä. Altistamalla RNA:n matalan elektrolyyttikoncentraation omaavalle liuokselle, saimme sen eluoitua pois pylvästä. Sentrifugoimme putkea minuutin ajan 11 200 g:n teholla, jonka aikana solulysaatista eristetty RNA eluoitui mikrosentrifugiputkeen. Eluoinnin jälkeen pakastimme näytteet -80 °C:ssa Sanyo Ultra low -pakastimessa.

#### 8.4 Ribonukleiinihapon saannon ja puhtauden mittaus

Mittasimme RNA:n saannon ja puhtauden The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 -spektrofotometrillä. Käytimme laitetta NanoDrop™ 1000 -tietokoneohjelman avulla. Laitoimme spektrofotometrin mittaussvalmiuteen pipetoimalla 3 µl ribonukleasivapaata vettä optiselle alustalle. Tämän jälkeen nollasimme laitteen ja teimme kontrollimittauksen 3 µl:lla ribonukleasivapaata vettä.

Mitattavia näytteitä oli yhteensä 43. Teimme mittaukset kahtena eri päivänä ja mittasimme aina yhden sarjan kerrallaan. Varsinaisissa pitoisuus- ja puhtausmittauksissa käytimme näytemääränä 2 µl:a. Pyyhimme optisen alustan nukkaamattomalla paperilla jokaisen näytteen mittaamisen jälkeen. Sarjojen välissä teimme kontrollimittauksen ribonukleasivapaalla vedellä varmistaaksemme, ettei optiselle alustalle jäänyt edellisen sarjan jäänteitä. Mittausta odottavat näytteet säilytimme jäähauteella.

Jokaisesta mittauksesta saimme tietokoneen näyttöpäätteelle kuvaajat ja numeeriset arvot saannon määrästä ja puhtaudesta (kuvio 12). Lisäksi saimme jokaisesta sarjasta yhteenvetokuvaajan, jossa oli jokaisen sarjaan kuuluvan näytteen absorptiospektri. Mittausten jälkeen puhdistimme optisen alustan ribonukleasivapaalla vedellä. Pipetoimme ribonukleasivapaata vettä optiselle alustalle 4 µl ja pyyhimme sen nukkaamattomalla paperilla. Lopuksi varmistimme nollanäytteellä, että alusta oli varmasti puhdas. Kaikki näytteistä saadut mittaus tulokset esitämme liitteessä 1 sivulla 58.

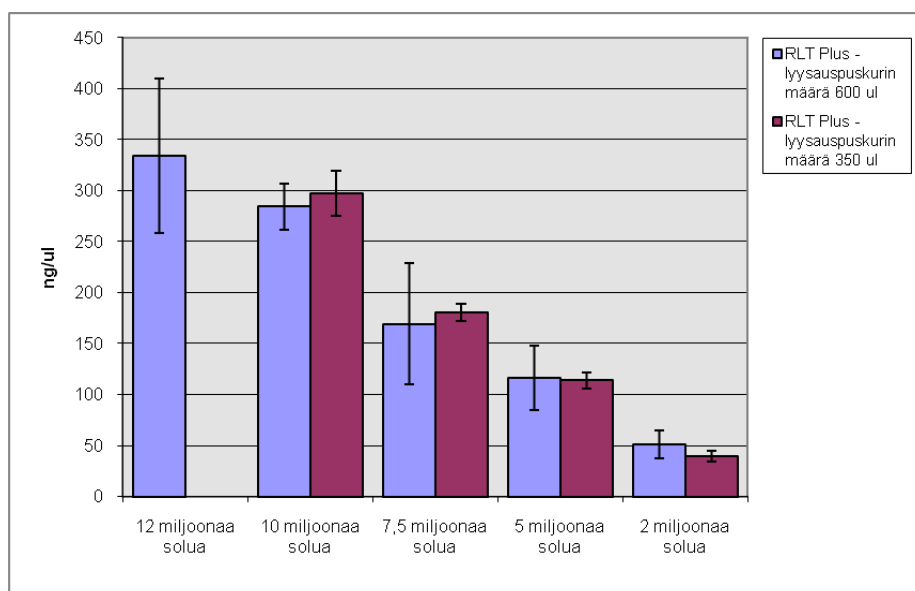


KUVIO 12. Yksittäisen näytteen absorptiospektri

Poistimme mittaustuloksisista yhteensä viisi eri näytettä. Kolme näytettä hylkäsimme viallisen gDNA Eliminator -pylvään vuoksi. Mittaustuloksia tarkasteltaessa poistimme myös kaksi muuta näytettä lopullisista tuloksista, sillä niiden saanto oli huomattavasti alempi muihin saman solumäärän näytteisiin verrattuna (liite 2). Luultavasti näiden näytteiden kohdalla joko solujen erottelu tai RNA-eristys oli epäonnistunut.

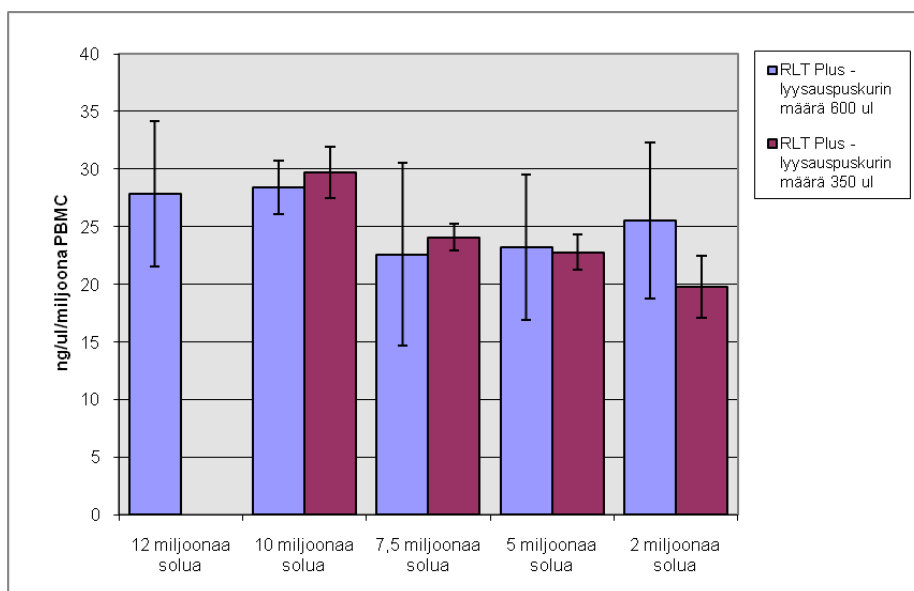
## 9 TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Havainnollistamme kokeellisen osuuden tuloksia pylväsdiagrammien avulla. Pylväsdiagrammeissa on myös keskihajontaa osoittavat janat. Kokeellisessa osuudessa vertailimme perifeerisen veren mononukleaaristen valkosolujen määrän ja RLT Plus -lyysauspuskurin määrän vaikutusta RNA-saantoon ja -puhtauteen. Solumäärinä käytimme viittä eri solumäärää: 12, 10, 7,5, 5 ja 2 miljoonaa solua. Käytimme RLT Plus -lyysauspuskurin määrinä 600 mikrolitraa ja 350 mikrolitraa. Keskimääräisen RNA-saannon eri solumäärillä esitämme kuviossa 13. Kokeellisen osuuden tulokset eivät ole yksiselitteisiä, koska havaintoyksiköiden määrä on vähäinen ja otimme verinäytteet eri ihmisiltä.



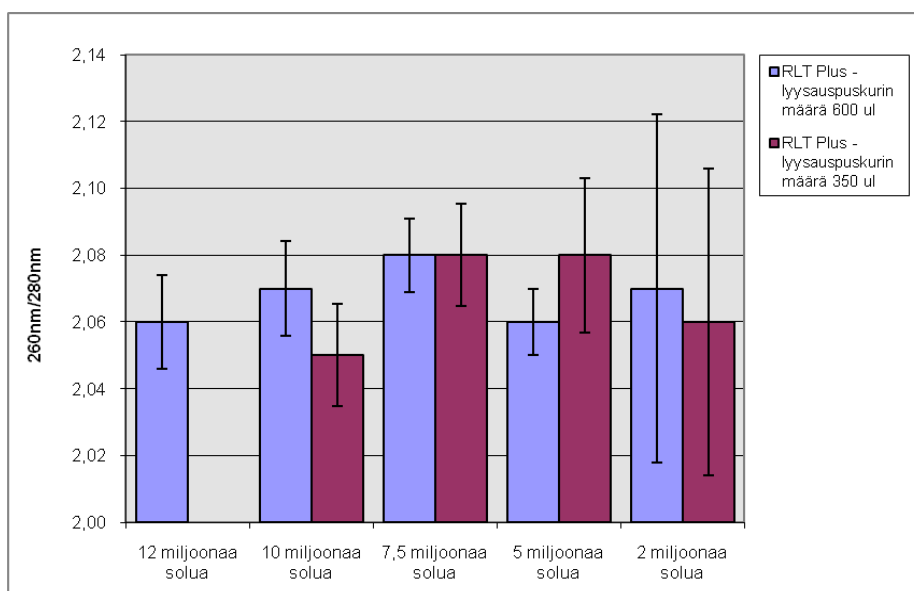
KUVIO 13. Keskimääräinen RNA-saanto eri solumäärillä

Laskimme keskiarvot RNA-saannoille miljoonaa solua kohden ja vertailimme saantojen määriä. Keskiarvoihin ja keskihajontoihin emme ole laskeneet mukaan hylättyjä näytteitä (liite 2 s.60–63). Eri solumäärien saannoissa ei ole suuria eroja. Näyttäisi kuitenkin siltä, että 10 miljoonasta solusta saadaan Qiagen RNeasy® Plus Mini Kitillä eristettyä eniten RNA:ta (kuvio 14, s. 47). Ribonukleiinihapon saannon ja puhtauden mittauksen ja tulosten tarkastelun perusteella tutkija Sanna Rinta päätti, ettei 12 miljoonan solun lyysausta kokeilla 350 µl:lla, koska 10 miljoonasta solusta saatiin eristettyä enemmän RNA:ta.



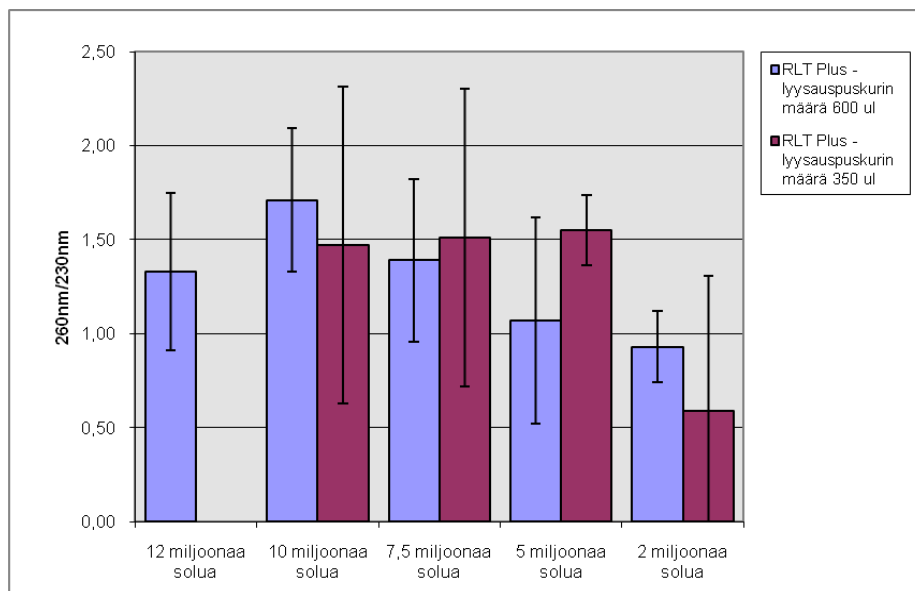
KUVIO 14. Keskimääräinen RNA-saanto miljoonaa solua kohden eri solumäärillä

Primaarisessa RNA:n puhtausmittauksessa  $A_{260}/A_{280}$  ei ole merkittäviä eroja eri solumäärien välillä. Arvon  $A_{260}/A_{280}$  tulee olla 2, jolloin RNA:n katsotaan olevan puhdasta. Kaikki kokeellisen osuuden havaintoyksiköt ylittävät tämän arvon, kun RLT Plus -lyysauspuskuria on 600 µl tai 350 µl (kuvio 15).



KUVIO 15. Keskimääräinen RNA-saannon puhtaus eri solumäärillä  $A_{260}/A_{280}$

Sekundaarisessa puhtausmittauksessa mitataan  $A_{260}/A_{230}$ -suhdetta. Arvon tulisi olla välillä 1,8–2,2. Havaintoyksiköiden välillä on vaihtelua sekundaarisessa puhtausmittauksessa. Osa tuloksista ylsi tähän tavoiteväliin ja osa tuloksista jäi paljon tavoitevälin alapuolelle (kuvio 16).



KUVIO 16. Keskimääräinen RNA-saannon puhtaus eri solumäärillä  $A_{260}/A_{230}$

Kokeellisen osuuden tuloksista voimme tehdä seuraavia johtopäätöksiä. Ribonukleiinihapon eristyksessä 12 miljoonaa solua on liian suuri määrä RNeasy® Plus Mini Kitin pylväiden puhdistuskyvyille. Päädyimme tähän johtopäätökseen, koska RNA:n puhtaus ja saanto ovat 12 miljoonalla solulla huonommat kuin 10 miljoonalla solulla. Myös RNeasy® Plus Mini Kitin käyttöohjeessa sanotaan, että pylväiden puhdistuskyky riittää korkeintaan 10 miljoonalle solulle. Toisaalta 2 miljoonaa solua on liian pieni määrä RNA-eristykseen Qiagen RNeasy® Plus Mini Kitillä. Solumäärän ollessa kaksi miljoonaa, puhtausmittausten tulosten välillä oli suurta hajontaa, eikä puhtaus ollut kaikkien näytteiden kohdalla toivotulla tasolla. Kahden miljoonan solun eristykseen tulisi käyttää sellaista kittiä, joka on tarkoitettu RNA-eristykseen vielä pienemmistä solumääristä.

Kokeellisen osuuden toisessa osiossa vertailimme RLT Plus -lyysauspuskurin määrän vaikutusta RNA:n saantoon ja puhtauteen. Tästä vertailusta saamiemme tulosten perusteella voimme päätellä, että 350 µl on liian pieni määrä RLT Plus -lyysauspuskuria 10 miljoonan solun hajottamiseen. Jos solumäärä on yli 7,5 miljoonaa, RLT Plus -lyysauspuskurin määrän tulisi olla 600 µl. Jos solu-



määrä on 7,5 miljoonaa solua tai vähemmän, tulee käyttää 350 µl RLT Plus -lyysauspuskuria (kuviot 14 ja 15, s. 47 ja kuvio 16, s. 48).

Mittaustuloksista tehdyt johtopäätökset tukivat tutkimusryhmän päätöstä käyttää enintään 10 miljoonaa solua RNA-eristykseen käytettäessä Qiagen RNeasy® Plus Mini Kittä ja ottaa MS-potilaista neljä BD Vacutainer® CPT™ -putkea viiden sijaan. Lisäksi mittaustulosten perusteella tutkimusryhmä käyttää mononukleaaristen valkosolujen hajotuksessa RLT Plus -lyysauspuskuria 600 µl, kun solumäärä on yli 7,5 miljoonaa. Jos solumäärä on 7,5 miljoonaa tai vähemmän, on sopiva RLT Plus -lyysauspuskurin määrä 350 µl.

## 10 POHDINTA

Opinnäytetyömme tehtävänä oli eristää perifeerisen veren mononukleaarisia valkosoluja, laskea solumäärä Bürkerin laskukammiossa ja tämän jälkeen eristää RNA:ta Qiagen RNeasy® Plus Mini Kitillä. Eristyksen jälkeen tehtävänäimme oli mitata RNA:n saanto ja puhtaus The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 -spektrofotometrillä. Vertasimme, miten mononukleaaristen valkosolujen määrä RNA-eristyksen alussa vaikuttaa saantoon. Tehtävänäimme oli myös kokeilla, miten soluja hajottavan RLT Plus -lyysauspuskurin määrä vaikuttaa eristyksen onnistumiseen.

Tarkoituksenamme oli optimoida RNeasy® Plus Mini Kittä varten solumäärä ja RLT Plus -lyysauspuskurin määrä. Opinnäytetyömme tarkoituksena oli löytää oikea solumäärä sekä sopiva solujen ja RLT Plus -lyysauspuskurin välinen suhde riittävän puhtauden ja saannon takaamiseksi. Kokeellisen osuuden tulosten perusteella voimme päätellä, että 12 miljoonaa solua on liian suuri määrä kyseisellä kitillä eristettäväksi ja 2 miljoonaa solua on liian pieni solumäärä. Eniten RNA:ta saimme eristettyä käyttämällä 10 miljoonaa solua. Saanto oli 10 miljoonalla solulla hyvä riippumatta RLT Plus -lyysauspuskurin määrästä. Saanto oli kuitenkin paljon puhtaampi, kun RLT Plus -lyysauspuskuria oli 600 µl 350 µl:n sijaan. Jos solumäärä on 7,5 miljoonaa solua tai vähemmän, tulee RLT Plus -lyysauspuskurin määrä olla 350 µl. Opinnäytetyömme tarkoitus täyttyi eli onnistuimme optimoimaan mononukleaaristen valkosolujen määrän sekä RLT Plus -lyysauspuskurin määrän Qiagen RNeasy® Plus Mini Kitille.

Opinnäytetyömme tavoitteena oli pyrkiä pienentämään tutkimuksessa tarvittavaa näytemäärää ja vähentää kustannusten määrää. Tutkimusryhmä käytti aikaisemmin 10–12 miljoonaa solua RNA-eristyksessä riippuen siitä, paljonko soluja saatiin potilaan verinäytteestä eroteltua. Kokeellisen osuuden tulosten perusteella tutkimusryhmä käyttää korkeintaan 10 miljoonaa solua. Jos potilaan verinäytteestä saadaan eroteltua esimerkiksi 12 miljoonaa solua, RNA-eristys tehdään kuuden miljoonan solun erissä. Tulosten perusteella tutkimusryhmä saa eristettyä enemmän ja puhtaampaa RNA:ta kuin aikaisemmin. Henkilökoh-

taiset tavoitteemme syventyä paremmin molekyylibiologiaan ja RNA-eristykseen ja perehtyä molekyylibiologian laboratoriossa työskentelyyn toteutuivat hyvin.

Kokeellinen osuus sisälsi monia tarkkuutta vaativia työvaiheita. Vaikka olimme käyneet harjoittelemassa solujen erottelua, laskemista ja RNA:n eristystä sekä spektrofotometrin käyttöä etukäteen, silti ensimmäisen sarjan käsittelyssä oli joitakin ongelmia. Kokeellisen osuuden järkevä suorittaminen oli ensimmäisen sarjan kohdalla vaikeaa. Virheiden kautta opimme yksinkertaisemman tavan suorittaa eri vaiheet. Ensimmäistä sarjaa pipetoitaessa tapahtui pipetointivirhe. Korvasimme epäonnistuneen näytteen myöhemmin otetulla verinäytteellä. Verinäyte oli peräisin samasta henkilöstä kuin alkuperäinenkin näyte. Kolmen näytteen kohdalla viallinen gDNA Eliminator -pylväs aiheutti sen, että jouduimme poistamaan näytteet sarjasta. Hylkäsimme näytteet, sillä emme pystyneet arvioimaan, miten vialliset pylväävät vaikuttivat RNA:n saantoon ja puhtauteen.

Kokeellisen osuuden kyky mitata sitä, mitä tutkimuksessa on tarkoituskin mitata (validiteetti), on mielestämme hyvä. Suoritimme kokeellisen osuuden työohjeita noudattaen ja samanlaisia työtapoja käyttäen. Reliabiliteetilla tarkoitetaan mittauksen luotettavuutta ja toistettavuutta. Jos suorittaisimme mittauksen uudestaan, saisimme siitä saman tuloksen. Olemme kuvanneet opinnäytetyömme kokeellisen osuuden niin tarkasti, että sen voisi suorittaa uudestaan samalla tavalla. Kokeellisen osuuden luotettavuutta heikentää havaintoyksiköiden vähäinen määrä. Esimerkiksi RLT Plus -lyysauspuskurin määrän optimoinnissa on vain kolme sarjaa ja kussakin sarjassa neljä havaintoyksikköä. Luotettavuutta lisäisi se, että otoskokoa kasvatettaisiin ja mukaan otettaisiin useamman eri henkilön verinäytteitä.

Jatkotutkimuksina voisimme tehdä laajemman vertailun eri solumäärillä, sillä kokeellisen osuuden otos oli melko suppea. Verinäytteitä voisi ottaa suuremmasta ihmisjoukosta, jolloin tutkimuksen luotettavuus paranisi. Osittain suuri hajonta opinnäytetyömme kokeellisen osuuden tuloksissa saattaa johtua siitä, että käytimme eri ihmisten verinäytteitä. Jatkotutkimuksena voisi myös tarkistaa, onko eristetty RNA pysynyt vahingoittumattomana. Tarkistuksen voisi tehdä polyakryyliamidigeelielektroforeesin (PAGE), agarosigeelielektroforeesin (AGE) tai Bioanalyzer-kapillaarielektroforeesilaitteen avulla.

Empiirinen kokeellinen tutkimusmenetelmä opinnäytetyömme menetelmäksi oli luonnollinen valinta. Opinnäytetyömme kytkeytyy tiukasti edellä mainittuun menetelmään, eikä kokeellista osuutta olisi voinut muita menetelmiä käyttäen tässä tapauksessa suorittaa.

Työskentely opinnäytetyömme parissa on ollut haastavaa ja mielenkiintoista. Pääsimme tutustumaan tutkimusryhmän laboratoriotiloihin, menetelmiin ja toimintaan. Ennen kokeellista osuutta perehdyimme tutkija Sanna Rinnan ja bioanalyttikko Raija Paalavuon antamaan taustamateriaaliin. Työn kulku oli vaikea ymmärtää pelkän teorian tiedon perusteella ja siksi kokeellisen osuuden suorittamiseen oli todella vaikea varautua ja valmistautua etukäteen. Työn eri vaiheet oppi ainoastaan itse tekemällä ja miettimällä. Opinnäytetyön kokeellisen osuuden myötä kädentaidot sekä tarkkuus kehittyivät. Saimme kokemusta solujen erottelusta, RNA-eristyksestä sekä RNA:n pitoisuus- ja puhtausmittauksesta ja aseptisestä työskentelystä.

Olemme pyrkineet käyttämään opinnäytetyössämme lähteitä monipuolisesti. Lähdemateriaalina olemme käyttäneet useita eri artikkeleita, alan oppikirjoja, ohjekirjoja, Internet-lähteitä sekä laitteiden käyttöoppaita. Suurin osa lähteistä on englanninkielisiä, joten kielitaitomme on parantunut opinnäytetyön etenemisen myötä. Alan erikoissanasto tuotti välillä hankaluuksia. Tiettyjä englanninkielisiä termejä oli mahdotonta kääntää suomen kielelle.

Artikkeleita hankkimme mm. National Center for Biotechnology Information sivuston PubMed -artikkelitietokannasta. Saimme runsaasti artikkeleita myös tutkija Sanna Rinnalta. Internet-lähteitä käytimme suhteellisen paljon, mutta olemme pyrkineet saamaan Internet-lähteen rinnalle myös kirjallisen lähteen. Olemme arvioineet Internet-lähteiden luottavuutta sivustojen tekijöiden ja ylläpitäjien perusteella. Internet-lähteiksi olemme valinneet ainoastaan sellaiset sivut, joita olemme pitäneet luotettavina. Esimerkiksi kokeellisessa osuudessa käytetyistä välineistä saa tietoa ainoastaan niiden valmistajilta ja tieto on useimmiten verkossa.

Lopuksi haluamme kiittää Neuroimmunologian tutkimusryhmää ja erityisesti tutkija Sanna Rintaa ja bioanalyttikko Raija Paalavuota. Yhteistyö työelämän oh-

jaajien kanssa on ollut mutkatonta. Olemme saaneet heiltä artikkeleita ja muuta taustamateriaalia opinnäytetyömme tueksi ja apua tulosten tulkitsemisessa. He ovat olleet aidosti kiinnostuneita työstämme ja sen etenemisestä sekä kokeellisen osuuden tuloksista.

## LÄHTEET

Affymetrix. 2003. Technical Note. An analysis of Blood Processing Methods to Prepare Samples for GeneChip® Expression Profiling. Luettu 22.4.2009. [http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/blood\\_technote.pdf](http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/blood_technote.pdf).

Applied Biosystems. 2009a. The Basics: RNA Isolation. Luettu 20.4.2009. <http://www.ambion.com/techlib/basics/rnaisol/index.html>.

Applied Biosystems. 2009b. Ten Sources of RNase Contamination. Luettu 20.4.2009. <http://www.ambion.com/techlib/tn/93/9316.html>.

Applied Biosystems. 2009c. The Basics: RNase Control. Luettu 22.4.2009. <http://www.ambion.com/techlib/basics/rnasecontrol/index.html>.

Becton Dickinson. 2009. Products. Molecular Diagnostics & Proteomics. BD Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Citrate. Luettu 22.4.2009. <http://www.bd.com/vacutainer/products/molecular/citrate/>.

Biocompare. 2009. Trypan Blue 0.4% solution from Sigma-Aldrich. Luettu 19.4.2009. <http://www.biocompare.com/ProductDetails/347618/Trypan-Blue-04-solution.html>.

Bolsover, S. R., Hyams, J. S., Shephard, E. A., White, H. A. & Wiedemann, C. G. 2004. Cell Biology: A Short Course. 2. painos. Hoboken, New Jersey: Wiley-Liss.

Boyer, R. 2006. Biochemistry Laboratory: Modern Theory And Techniques. San Fransisco: Benjamin Ciummings.

Campbell, M. K. & Farrell S. O. 2008. Biochemistry. 6. painos. Belmont (CA): Brooks/Cole, cop.

Campbell, P., Smith, A. & Peters, T. 2005. Biochemistry illustrated : biochemistry and molecular biology in the post-genomic era. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone New York.

Chomczynski, P. 1992. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. Nucleic Acids Research 20 (14), 3791-3792.

Debey, S., Schoenbeck, U., Hellmich, M., Gathof, B.S., Pillai, R., Zander, T. & Schultze, J.L. 2004. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. The Pharmacogenomics Journal 9 (4), 193-207.

Elliot, W. H. & Elliot, D. C. 2002. Biochemistry and Molecular Biology. 2. painos. Oxford: Oxford University Press.

- Elovaara, I., Färkkilä, M., Hietaharju, A. & Pirttilä, T. (Toim.). 2006. Kliininen neuroimmunologia. Helsinki: Yliopistopaino.
- Elovaara, I. & Soilu-Hänninen, M. 2006. Nykykäsitys multippeliskleroosin patogeneesista. *Duodecim* 122 (18), 2239-2247.
- Esser, C. 1998. Background. Teoksessa Recktenwald, D & Radbruch, A (toim.) *Cell Separation Methods and Applications*. USA: CRC Press.
- Freshney, R. I. 2005. *Culture of animal cells : a manual of basic technique*. 5. painos. New Jersey: Wiley-Liss.
- Goudsmit, J. 2004. *Viral fitness: the next SARS and West Nile in the making*. Oxford: Oxford University Press US.
- Haug, E., Sand, O., Sjaastad, Ø., Toverud, K. 1999. 1.-2. painos. *Ihmisen fysiologia*. Porvoo: WSOY.
- Heino, J. & Vuento, M. 2002. *Solubiologia*. Porvoo: WSOY
- Heino, J. & Vuento, M. 2007. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. 1. painos. porvoo: WSOY.
- Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2007. *Tutki ja kirjoita*. 13. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Koivula, U-M., Suihko, K. & Tyrväinen, J. 2002. *Mission: Possible: Opas opin-  
näytteen tekijälle*. 2. uudistettu painos. Pirkanmaan ammattikorkeakoulun julkai-  
susarja C. Oppimateriaalit. Nro 1.
- Kuopion yliopisto. 2002. Anatomian laitos. *Solubiologia*. Luettu 21.9.2008. Päivi-  
tetty 24.05.2002.  
<http://www.uku.fi/anatomia/sob/nuklhapot.htm#anchor1096883>.
- Labor Optik. 2009. Information about counting chamber (hemacytometer). Luet-  
tu 24.4.2009. <http://www.lo-laboroptik.de/englisch/info/info.html>.
- Lassmann, H., Brück, W. & Lucchinetti, C. 2001. Heterogeneity of multiple scle-  
rosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *TRENDS in Molecu-  
lar Medicine* 7 (3), 115 - 121.
- Lehtonen, P. O. & Sihvonen, M-L. 2006. *Laboratorioalan analyttinen kemia*. 1-  
1. painos. Helsinki: Opetushallitus.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. 2001. *Molecular Cell Biology*. 4. painos. New York: Freeman.
- Lutterotti, A., Berger, T. & Reindl, M. 2007. Biological Markers for Multiple Scle-  
rosis. *Current Medicinal Chemistry* 16 (14) 2007, 1956-65.
- Martin, R. & Sospedra, M. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annual Re-  
view of Immunology*. 23 (23), 683-747.

Mattila-Oksanen, L. 2009. Bürker-laskukammio. Työohje. Pirkanmaan ammattikorkeakoulu. Terveysala. Bioanalytiikan koulutusohjelma.

Mustila, A., Aine, R., Aittoniemi, J., Ala-Kivimäki, K., Collings, A., Mahlamäki, E., Mäntymaa, P. & Prusi, H. 2004, 166. Pirkanmaan sairaanhoitopiiri. Laboratoriokeskus-Ohjekirja 2004-2005. Tampere: Edita Prima Oy.

National Center for Biotechnology Information. 1999a. Genetics Review. RNA: Detailed View. Päivitetty 29.9.1999. Luettu 5.5.2009.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Original8Hour/Genetics/rna2.html>

National Center for Biotechnology Information. 1999b. Building blocks and chemical bonds in DNA, RNA and polypeptides. Luettu 15.9.2009.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=hmg&part=A29>.

Patel, D. 2000. Separating cells. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd.

Patel, D., Ford, C. & Rickwood, D. 1998. Fractionation of cells by sedimentation methods. Teoksessa Fisher, D., Francis, G.E. & Rickwood (toim.) Cell Separation: A Practical Approach. UK: Oxford University Press.

Qiagen. 2001. Bench Guide. Protocols, hints, and tips for molecular biology labs. Germany: Qiagen.

Qiagen. 2005. RNeasy® Plus Mini Handbook. For purification of total RNA from animal cells and easy-to-lyse animal tissues using gDNA Eliminator columns. Germany: Qiagen.

Qiagen. 2009. Sample and assay technologies. RNeasy® Plus Mini Kit. Luettu 30.3.2009. <http://www.qiagen.com/>.

Rinta, S., Kuusisto, H., Raunio, M., Paalavuo, R., Levula, M., Lehtimäki, T. & Elovaara, I. 2008. Apoptosis-related molecules in blood in multiple sclerosis. Journal of Neuroimmunology 205, 135-141.

Rudik, R. A., Cohen, J. A., Weinstock-Guttman, B., Kinkel, R.P. & Ransohoff, R. M. 1997. Management of Multiple Sclerosis. The New England Journal of Medicine. 337 (22), 1604-1611.

Sarkaranta, T. & Savijärvi, R. 2009. Bürkerin laskukammio. Pirkanmaan ammattikorkeakoulu.

Soinila, S., Somer, H., Kaste, M. 2007. 2.-3. painos. Neurologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Solunetti. 2006a. Solubiologia. Biokemiallisia menetelmiä. Differentiaalisentrifugointi. Luettu 24.4.2009.  
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/differentiaalisentrifugointi/2/>.



- Solunetti. 2006b. Solubiologia. Biokemiallisia menetelmiä. Gradienttisentrifugointi. Luettu 24.4.2009. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/gradienttisentrifugointi/2/>.
- Solunetti. 2006c. Solubiologia. Nukleiinihapot. RNA lajit. Luettu 13.5.2009. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/rna\\_lajit/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/rna_lajit/2/).
- Solunetti. 2006d. Solubiologia. Nukleiinihapot. RNA lajit. Ribosomaalinen RNA. Luettu 13.5.2009. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/rna/2/>.
- Solunetti. 2006e. Solubiologia. Nukleiinihapot. RNA lajit. Siirtäjä-RNA. Luettu 13.5.2009. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/trna/2/>.
- Suominen, I. & Ollikka, P. 1996. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 2. painos. Luettu 21.4.2009. <http://www.edu.fi/oph/abc/dna/perus.html>.
- Suominen, I. & Ollikka, P. 2003. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3-1. painos. Opetushallitus. Helsinki: Hakapaino Oy.
- Teirilä, M. & Jyväsjärvi, E. 2001. Tutkielman tekijän työkirja. Helsinki: Oy Finn Lectura Ab.
- Thermo Fisher Scientific Incorporated Company. 2008. Nanodrop™ 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. Wilmington: Thermo Fisher Scientific Inc.
- Turgeon, M.L. 2007. Linné & Ringsrud's Clinical Laboratory Science: The Basics and Routine Techniques. 5. painos. St. Louis: Elsevier Mosby.
- Turpeenoja, L. 2005. Biokemiaa : Virtsa-aineesta lääkemaitoon. 4.-2. painos. Helsinki: Opetus-hallitus.
- Vilpo, J. 2003. Solulaskenta. Teoksessa Vilpo, J. & Niemelä, O (toim.) Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia. 2. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.
- Walters, N. J., Estridge, B.H. & Reynolds, A.P. 1990. Basic Medical Laboratory Techniques. 2. painos. Albany: Delmar.
- Wilson, K & Walker, J. 2005. Principles And Techniques of Biochemistry And Molecular Biology. 6. painos. New York: Cambridge University Press.

## LIITTEET

## LIITE 1: 1 (2)

Ribonukleiinihapposaannon ja puhtauden mittaustulokset

Sarja 1	ng/μl	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	
1/1 12 miljoonaa solua	244,26	6,106	2,938	2,08	1,74	
1/2 10 miljoonaa solua	261,02	6,525	3,124	2,09	1,46	
1/3 7,5 miljoonaa solua	191,69	4,792	2,266	2,12	0,46	Hylätty
1/4 5 miljoonaa solua (uusi)	98,68	2,467	1,201	2,05	1,01	
1/4/1 5 miljoonaa solua	63,68	1,592	0,782	2,04	1,22	Hylätty
1/4/2 5 miljoonaa solua	157,77	3,944	1,901	2,08	0,34	Hylätty
1/5 2 miljoonaa solua (vanha)	45,57	1,139	0,562	2,03	1,02	
1/5 2 miljoonaa solua (uusi)	55,84	1,396	0,671	2,08	0,78	
Sarja 2	ng/μl	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	
2/1 12 miljoonaa solua	306,06	7,652	3,693	2,07	1,02	
2/2 10 miljoonaa solua	285,23	7,131	3,431	2,08	1,19	
2/3 7,5 miljoonaa solua	150,72	3,768	1,813	2,08	1,43	
2/4 5 miljoonaa solua	106,57	2,664	1,284	2,07	0,50	
2/5 2 miljoonaa solua	51,44	1,286	0,617	2,09	1,07	
Sarja 3	ng/μl	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	
3/1 12 miljoonaa solua	296,08	7,402	3,591	2,06	1,52	
3/2 10 miljoonaa solua	277,92	6,948	3,370	2,06	1,88	
3/3 7,5 miljoonaa solua	107,69	2,692	1,305	2,06	0,78	
3/5 2 miljoonaa solua	48,38	1,210	0,570	2,12	0,86	
Sarja 4	ng/μl	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	
4/1 12 miljoonaa solua	305,32	7,633	3,703	2,06	0,65	
4/2 10 miljoonaa solua	275,06	6,877	3,342	2,06	2,15	
4/3 7,5 miljoonaa solua	204,50	5,112	2,482	2,06	1,61	
4/4 5 miljoonaa solua	96,12	2,403	1,172	2,05	0,96	
4/5 2 miljoonaa solua	52,30	1,307	0,654	2,00	1,08	Hylätty
Sarja 5	ng/μl	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	
5/1 12 miljoonaa solua	443,29	11,082	5,415	2,05	1,41	
5/2 10 miljoonaa solua	322,12	8,053	3,900	2,06	1,88	
5/3 7,5 miljoonaa solua	254,25	6,356	3,061	2,08	1,21	
5/4 5 miljoonaa solua	163,14	4,079	1,985	2,05	1,82	
5/5 2 miljoonaa solua	73,36	1,834	0,872	2,10	0,68	

Jatkuu

## LIITE 1: 2 (2)

Sarja 6	ng/μl	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
6/1 12 miljoonaa solua	408,41	10,21	5,011	2,04	1,66
6/2 10 miljoonaa solua	118,18	2,955	1,391	2,12	0,33
6/3 7, 5 miljoonaa solua	129,49	3,237	1,560	2,08	1,93
6/5 2 miljoonaa solua	32,15	0,804	0,406	1,98	1,18
Sarja 7	ng/μl	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
7/2 10 miljoonaa solua	308,28	7,707	3,719	2,07	0,52
7/3 7,5 miljoonaa solua	189,60	4,740	2,271	2,09	0,60
7/4 5 miljoonaa solua	120,31	3,008	1,436	2,09	1,72
7/5 2 miljoonaa solua	33,47	0,837	0,404	2,07	0,17
Sarja 8	ng/μl	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
8/2 10 miljoonaa solua	311,92	7,798	3,826	2,04	2,12
8/3 7,5 miljoonaa solua	172,66	4,316	2,074	2,08	2,02
8/4 5 miljoonaa solua	116,35	2,909	1,390	2,09	1,58
8/5 2 miljoonaa solua	42,08	1,052	0,501	2,10	0,18
Sarja 9	ng/μl	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
9/2 10 miljoonaa solua	271,37	6,784	3,312	2,05	1,78
9/3 7,5 miljoonaa solua	179,77	4,494	2,180	2,06	1,92
9/4 5 miljoonaa solua	105,21	2,630	1,282	2,05	1,35
9/5 2 miljoonaa solua	43,24	1,081	0,537	2,01	1,42

Hylätty

## LIITE 2: 1 (4)

Mittaustuloksista lasketut keskiarvot ja keskihajonnat

RLT Plus -lyysauspuskuria 600 ul				
Näytenumero	Pvm	ng/μl	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
1/1 12 miljoonaa solua	4.3.2009	244,26	2,08	1,74
2/1 12 miljoonaa solua	4.3.2009	306,06	2,07	1,02
3/1 12 miljoonaa solua	5.3.2009	296,08	2,06	1,52
4/1 12 miljoonaa solua	5.3.2009	305,32	2,06	0,65
5/1 12 miljoonaa solua	5.3.2009	443,29	2,05	1,41
6/1 12 miljoonaa solua	5.3.2009	408,41	2,04	1,66
Keskiarvo (ng/μl)	333,90			
Keskihajonta (ng/μl)	75,60			
Keskimäärin 1 miljoonassa solua (ng/μl)	27,83			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	2,06			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	0,01			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	1,33			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	0,42			
Näytenumero	Pvm	ng/μl	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
1/2 10 miljoonaa solua	4.3.2009	261,02	2,09	1,46
2/2 10 miljoonaa solua	4.3.2009	285,23	2,08	1,19
3/2 10 miljoonaa solua	5.3.2009	277,92	2,06	1,88
4/2 10 miljoonaa solua	5.3.2009	275,06	2,06	2,15
5/2 10 miljoonaa solua	5.3.2009	322,12	2,06	1,88
6/2 10 miljoonaa solua	5.3.2009	118,18	2,12	0,33
Keskiarvo (ng/μl)	284,27	6/2 ei mukana		
Keskihajonta (ng/μl)	22,91			
Keskimäärin 1 miljoonassa solua (ng/μl)	28,43			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	2,07			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	0,01			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	1,71			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	0,38			

Jatkuu

## LIITE 2: 2 (4)

Näytenumero	Pvm	ng/μl	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
1/3 7,5 miljoonaa solua (uusi)	4.3.2009	191,69	2,12	0,46
2/3 7,5 miljoonaa solua	4.3.2009	150,72	2,08	1,43
3/3 7,5 miljoonaa solua	5.3.2009	107,69	2,06	0,78
4/3 7,5 miljoonaa solua	5.3.2009	204,50	2,06	1,61
5/3 7,5 miljoonaa solua	5.3.2009	254,25	2,08	1,21
6/3 7,5 miljoonaa solua	5.3.2009	129,49	2,08	1,93
Keskiarvo (ng/μl)	169,33	1/3 ei mukana		
Keskihajonta (ng/μl)	59,54			
Keskimäärin 1 miljoonassa solua (ng/μl)	22,58			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	2,08			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	0,01			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	1,39			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	0,43			
Näytenumero	Pvm	ng/μl	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
1/4/1 5 miljoonaa solua	4.3.2009	63,68	2,04	1,22
1/4/2 5 miljoonaa solua	4.3.2009	157,77	2,08	0,34
1/4 5 miljoonaa solua (uusi)	4.3.2009	98,68	2,05	1,01
2/4 5 miljoonaa solua	4.3.2009	106,57	2,07	0,50
3/4 puuttuu				
4/4 5 miljoonaa solua	5.3.2009	96,12	2,05	0,96
5/4 5 miljoonaa solua	5.3.2009	163,14	2,05	1,82
6/4 puuttuu				
Keskiarvo (ng/μl)	116,13	1/4/1 ja 1/4/2 ei mukana		
Keskihajonta (ng/μl)	31,66			
Keskimäärin 1 miljoonassa solua (ng/μl)	23,23			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	2,06			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	0,01			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	1,07			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	0,55			

Jatkuu

## LIITE 2: 3 (4)

Näytenumero	Pvm	ng/μl	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
1/5 2 miljoonaa solua (vanha)	4.3.2009	45,57	2,03	1,02
1/5 2 miljoonaa solua (uusi)	4.3.2009	55,84	2,08	0,78
2/5 2 miljoonaa solua	4.3.2009	51,44	2,09	1,07
3/5 2 miljoonaa solua	5.3.2009	48,38	2,12	0,86
4/5 2 miljoonaa solua	5.3.2009	52,30	2,00	1,08
5/5 2 miljoonaa solua	5.3.2009	73,36	2,10	0,68
6/5 2 miljoonaa solua	5.3.2009	32,15	1,98	1,18
Keskiarvo (ng/μl)	51,12	4/5 ei mukana		
Keskihajonta (ng/μl)	13,53			
Keskimäärin 1 miljoonassa solua (ng/μl)	25,56			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	2,07			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	0,05			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	0,93			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	0,19			
RLT Plus -lyysauspuskuria 350 ul				
Näytenumero	Pvm	ng/μl	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
8/2 10 miljoonaa solua	5.3.2009	308,28	2,07	0,52
9/2 10 miljoonaa solua	5.3.2009	311,92	2,04	2,12
10/2 10 miljoonaa solua	5.3.2009	271,37	2,05	1,78
Keskiarvo (ng/μl)	297,19			
Keskihajonta (ng/μl)	22,43			
Keskimäärin 1 miljoonassa solua (ng/μl)	29,72			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	2,05			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	0,02			
Keskiarvo (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	1,47			
Keskihajonta (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )	0,84			
Näytenumero	Pvm	ng/μl	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
8/3 7,5 miljoonaa solua	5.3.2009	189,60	2,09	0,60
9/3 7,5 miljoonaa solua	5.3.2009	172,66	2,08	2,02
10/3 7,5 miljoonaa solua	5.3.2009	179,77	2,06	1,92

Jatkuu

## LIITE 2: 4 (4)

Keskiarvo (ng/μl)	180,68			
Keskihajonta (ng/μl)	8,51			
Keskimäärin 1 miljoonassa solua (ng/μl)	24,09			
Keskiarvo ( $A_{260}/A_{280}$ )	2,08			
Keskihajonta ( $A_{260}/A_{280}$ )	0,02			
Keskiarvo ( $A_{260}/A_{230}$ )	1,51			
Keskihajonta ( $A_{260}/A_{230}$ )	0,79			
Näytenumero	Pvm	ng/μl	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
8/4 5 miljoonaa solua	5.3.2009	120,31	2,09	1,72
9/4 5 miljoonaa solua	5.3.2009	116,35	2,09	1,58
10/4 5 miljoonaa solua	5.3.2009	105,21	2,05	1,35
Keskiarvo (ng/μl)	113,96			
Keskihajonta (ng/μl)	7,83			
Keskimäärin 1 miljoonassa solua (ng/μl)	22,79			
Keskiarvo ( $A_{260}/A_{280}$ )	2,08			
Keskihajonta ( $A_{260}/A_{280}$ )	0,02			
Keskiarvo ( $A_{260}/A_{230}$ )	1,55			
Keskihajonta ( $A_{260}/A_{230}$ )	0,19			
Näytenumero	Pvm	ng/μl	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
8/5 2 miljoonaa solua	5.3.2009	33,47	2,07	0,17
9/5 2 miljoonaa solua	5.3.2009	42,08	2,10	0,18
10/5 2 miljoonaa solua	5.3.2009	43,24	2,01	1,42
Keskiarvo (ng/μl)	39,60			
Keskihajonta (ng/μl)	5,34			
Keskimäärin 1 miljoonassa solua (ng/μl)	19,80			
Keskiarvo ( $A_{260}/A_{280}$ )	2,06			
Keskihajonta ( $A_{260}/A_{280}$ )	0,05			
Keskiarvo ( $A_{260}/A_{230}$ )	0,59			
Keskihajonta ( $A_{260}/A_{230}$ )	0,72			