

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan ko.

Laboratoriotekniikka

2016

Susanna Haavisto

ÄKTA OLIGOPILOT PLUS DNA- SYNTETISAATTORIN KVALIFIOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Laboratoriotekniikka

Syyskuu 2016 | 52 sivua

Ohjaajat: Jani Pelkonen, lehtori ja Anu Kiviniemi, prosessituen kemisti

Susanna Haavisto

ÄKTA OLIGOPILOT DNA-SYNTETISAATTORIN KVALIFIOINTI

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tehdä käyttöönottoqualifiointi uudelle ÄKTA oligopilot plus DNA-syntetisaattorille. Kvalifiointi, joka perustui Wallac Oy:n laadunhallintajärjestelmään, sisälsi synteetilaitteiston asennuksen kvalifioinnin (IQ) ja toiminnan kvalifioinnin (OQ).

Toimeksiantajalla oli ennestään käytössä tuotannossa Applied Biosystems 3400 DNA-syntetisaattori, joka haluttiin vaihtaa uudempaan toimintavarmuuden takaamiseksi. Syntetisoituja DNA-oligonukleotideja käytetään koettimina vastasyntyneiden seulontatuotteessa, jolla seulotaan SCID-oireyhtymää (Severe Combined Immunodeficiency Disorder).

Osana toiminnan kvalifiointia testattiin DNA-synteessimenetelmiä. Testien avulla selvitettiin millaisilla parametreilla synteessimenetelmistä saataisiin mahdollisimman tehokkaita. Samalla testattiin toimeksiantajan aiemmin käyttämän kantajamateriaalin soveltuvuus uudelle synteetilaitteistolle. Synteetilaitteistolle suunnitellulla kantajalla testattiin sille sopivat synteesiparametrit. Synteessimenetelmien testauksen yhteydessä haluttiin myös osoittaa, että toimeksiantajan oman modifioidun fosforamidiitin on oltava kuivattua ennen oligonukleotidisynteesiä. Synteessin jälkeisessä käsittelyssä testattiin kahta eri menetelmää irrottaa oligonukleotidi kantajasta ja poistaa oligonukleotidissa olevat suojarahmat.

Synteessimenetelmien testauksesta saatujen tulosten perusteella voitiin todeta molempien kantajamateriaalien toimivan uudella synteetilaitteistolla, mutta synteessimenetelmät eroavat toisistaan. Sekä toimeksiantajan oma että yleisesti käytössä oleva synteessin jälkeinen käsittelymenetelmä osoittautuivat toimiviksi molemmilla kantajamateriaaleilla. Lopullinen oligonukleotidin sekvenssin oikeellisuus ja puhtaus määritettiin analyyttisellä UPLC-MS ajolla. Tuloksena saatiin yksi selkeä tuotepiikki, jossa ei näkynyt sivutuotteita. Sekvenssin oikeellisuus selvitetiin antamalla käytetty sekvenssi Mongo Oligo -ohjelmaan, ja saatua ionisaatiosarjaa verrattiin oman oligonukleotidispektrin ionisaatiosarjaan.

ASIASANAT:

Kvalifiointi, oligonukleotidisynteesi, kantaja

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

September 2016 | 52 pages

Instructors: Jani Pelkonen, Senior Lecturer; Anu Kiviniemi Process Specialist

Susanna Haavisto

QUALIFICATION OF ÄKTA OLIGOPILOT PLUS DNA SYNTHESIZER

The aim of this study was to qualify a new ÄKTA oligopilot plus DNA synthesizer. Based on the quality management system of Wallac Oy, the qualification included the installation qualification (IQ) and the operational qualification (OQ) of the synthesis equipment.

The commissioner was already using an Applied Biosystems 3400 DNA synthesizer in production and wanted to replace it with a new instrument in order to improve performance reliability. Synthesized DNA oligonucleotides are used as probes in a neonatal screening product for the screening of SCID syndrome (Severe Combined Immunodeficiency Disorder).

As part of the operational qualification, DNA synthesis methods were tested in order to determine the parameters for the most efficient synthesis methods. At the same time, the suitability of the previously used solid support material for the new synthesizer was tested as were the synthesis parameters for the new support designed for the Äkta Oligopilot Plus synthesizer. Along with the synthesis method testing it was shown, that commissioner's own modified phosphoramidite has to be dried before the oligonucleotide synthesis. Two different methods for post-synthetic processing were tested to cleave the oligonucleotide from the solid support and for deprotection.

In summary, according to the results from the synthesis method testing, both solid supports were proven to work in the new synthesizer, but the synthesis methods differ from each other. Both the commissioner's own and the commonly used post-synthetic processing method were proven to work on both solid supports. The final accuracy and purity of the oligonucleotide sequence were determined with a UPLC-MS run. As a result, one clear product peak was obtained and no by-products were shown. The ionization series for the synthesized sequence was determined using the Mongo Oligo-program and it was compared with the received MS spectra of the oligonucleotide.

KEYWORDS:

qualification, oligonucleotide synthesis, solid support

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	7
2 LAITEKVALIFIOINTI	9
2.1 Kvalifioinnin teoriaa	9
2.2 Asennuksen kvalifiointi	11
2.3 Toiminnan kvalifiointi	15
2.4 Suorituskyvyn kvalifiointi	18
3 DNA-OLIGONUKLEOTIDIN SYNTEESI	19
3.1 Kemiallisen synteesin historiaa	19
3.2 Synteesin vaiheet	20
3.2.1 Suojaryhmän poisto	23
3.2.2 Kytkenä	24
3.2.3 5'-OH-ryhmän blokkauk	25
3.2.4 Hapetus	26
3.3 SCID-oireyhtymä	27
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	30
4.1 Nukleosidifosforamidiitit	30
4.2 Kantaja	32
4.2.1 CPG	33
4.2.2 Polystyreeni	33
4.3 Synteesimenetelmien testaus	34
4.4 Oligonukleotidin irrotus kantajasta ja suojaryhmien poisto	35
4.4.1 NaOH + AMA-käsittely	36
4.4.2 Ammoniakkikäsittely	36
4.5 UPLC-MS-analyysi	37
5 TULOSTEN KÄSITTELY	40
6 YHTEENVETO	49
LÄHTEET	51

LIITTEET

Liite 1. Synteesin ON1 UPLC-MS-spektri.

Liite 2. Synteesin ON7 UPLC-MS-spektri

KUVAT

Kuva 1. 4Q-mallin kvalifiointivaiheet. ¹	9
Kuva 2. Laitteiston tiedonsiirtokaavio UniNet. ³	12
Kuva 3. Sekundaarinen yhteysverkko UniNet2. ³	13
Kuva 4. DNA:n ja RNA:n emäkset. ⁹	21
Kuva 5. Nukleotidimonomeerin 5'-hiilen määräytyminen. ⁹	22
Kuva 6. 4,4'-dimetoksitrietyylisuojarahmian poisto. ¹²	23
Kuva 7. Fosforamidiittimonomeerin aktivointi ja kytkentä. ¹²	24
Kuva 8. Reagoimattomien 5'-OH-ryhmien blokkaukset. ¹²	26
Kuva 9. Fosfiittitriesterisidoksen hapetus. ¹²	27
Kuva 10. EnLite Neonatal TREC analyysi. ¹³	29
Kuva 11. Oligonukleotidin irrotus kantajasta ja suojarahmien poisto.	37

KUVIOT

Kuvio 1. Kytkentäajan testaus eri kantajamateriaaleilla	41
Kuvio 2. Kuivatun ja kuivaamattoman amidiitti X:n testaus eri kantajamateriaaleilla	43
Kuvio 3. Amidiittimäärän testaaminen PS-kantajalla	44
Kuvio 4. Synteesiskaalan 15 µmol testaus	45
Kuvio 5. Synteesiskaalan 17 µmol testaus	46

TAULUKOT

Taulukko 1. Oligonukleotidinäytteen UPLC-MS ajoparametrit	39
Taulukko 2. Synteesiparametrit kytkentäajan testaukseen	41
Taulukko 3. Synteesiparametrit kuivatun ja kuivaamattoman amidiitti X:n testaamiseen	42
Taulukko 4. Synteesiparametrit amidiittimäärän testaamiseen	44
Taulukko 5. Oligonukleotidin ON1 teoreettinen ionisaatiosarja	47
Taulukko 6. Ionien todelliset molekyyli­massat	47

KÄYTETYT LYHENTEET

CPG	Huokoinen lasi (Controlled pore glass)
DMT	4,4'-dimetoksitriityylisuojarahmä
ESI	Sähkösumutus-ionisaatio (Electrospray ionization)
IQ	Asennuksen kvalifointi (Installation Qualification)
OQ	Toiminnan kvalifointi (Operational Qualification)
PQ	Suorituskyvyn kvalifointi (performance Qualification)
SAP	Toiminnanohjausjärjestelmä (Systems, Applications and Products in data processing)
SCID	Immunologinen sairaus (Severe combined immunodeficiency disorder)
TOF	Lentoaika-analysaattori (Time-of-flight)
TREC	T-solun kehityksen sivutuote (T-cell receptor excision circle)
UPLC	Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (Ultra Performance Liquid Chromatography)
URS	Käyttäjävaaatimukset (User Requirement Specification)
UV	Ultravioletti

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehtiin PerkinElmer Wallac Oy:n toimeksiannosta. Työn tavoitteena oli tehdä käyttöönottovalifiointi uudelle ÄKTA oligopilot plus DNA-syntetisaattorille. Kvalifiointi perustui Wallac Oy:n laadunhallintajärjestelmään. Kvalifioinnin tuli dokumentoidusti osoittaa laitteen toimivan sille määritetyillä parametreilla hyväksyttävästi. Toimeksiantajalla oli omassa tuotannossaan käytössä Applied Biosystems 3400 DNA-syntetisaattori, joka haluttiin vaihtaa uudempaan toimintavarmuuden takaamiseksi. Uudelle DNA-syntetisaattorille sovittiin tehtäväksi asennuksen ja toiminnan kvalifioinnit sekä käyttö- ja huolto-ohjeet. Ennen kuin kvalifiointi voitiin aloittaa tuli perehtyä kvalifioinnin suoritukseen ja raportointiin. Työ vaati myös laitteen toimintaan ja sen käyttämään kemiaan perehtymistä, jotta pystyttiin osoittamaan laitteiston oikea toiminta sekä testisynteeseiden toimivuus ja syntetisoitavan oligonukleotidin sekvenssin oikeellisuus. Toimeksiantaja käyttää syntetisoimiaan DNA-oligonukleotideja koettimina vastasyntyneiden EnLite™ Neonatal TREC seulontatuotteessa, jolla seulotaan SCID-oireyhtymää (Severe combined immunodeficiency disorder).

Synteasilaitteistolla tehtiin synteesisimenetelmien testausta, jonka avulla oli tarkoitus selvittää millaisilla parametreilla synteesisimenetelmistä saataisiin mahdollisimman tehokkaita. Samalla testattiin soveltuuko toimeksiantajan synteeseissään aiemmin käyttämä kantajamateriaali huokoinen lasi uudelle synteasilaitteistolle, joka on suunniteltu polystyreenipohjaiselle kantajamateriaalille. Synteesisimenetelmien testauksen yhteydessä haluttiin myös osoittaa miksi toimeksiantajan oman modifioidun fosforamidiitin tulisi ehdottomasti olla kuivattua ennen oligonukleotidin synteesiä. Tähän asti synteeseissä on ollut käytössä kuivaamatonta fosforamidiittia, jolloin riskinä on ollut synteessin tehokkuuden ja saannon heikkeneminen. Synteessin jälkeisessä käsittelyssä testattiin kahta eri menetelmää irrottaa oligonukleotidi kantajasta ja poistaa oligonukleotidissa olevat suojarahmat.

Turkulainen Wallac Oy on osa suurempaa kansainvälistä PerkinElmer-konsernia, jonka toimipisteitä on yli 150 maassa. Wallac Oy kehittää ja tuottaa reagensseja, mittalaitteita sekä niihin kuuluvia ohjelmistoja farmaseuttiseen kehitykseen ja tutkimukseen sekä kliniseen diagnostiikkaan ja raskaudenaikaiseen sekä vastasyntyneiden joukkoseulontaan. Wallac oy perustettiin 1950-luvulla ja tänä päivänä yritys työllistää noin 530 henkilöä.

2 LAITEKVALIFIOINTI

Tässä luvussa käydään läpi laitekvalifioinnin teoriaa ja miten kvalifiointi toteutettiin tässä työssä.

2.1 Kvalifioinnin teoriaa

Laitteen kvalifiointi on osoitus siitä, että laitteen tai laitteiston toiminta on toivotun laista. Tietokoneohjattujen laitteistojen kvalifiointi kattaa koko systeemin elinkaaren. Prosessi aloitetaan arvioimalla tarve tietyille laitteille ja loppuu, kun laite poistetaan käytöstä. Kvalifioinnissa käytetään kuvan 1 mukaista 4Q-mallia kun kyseessä on kaupallisesti saatavilla olevat laitteistot. Tämä malli on jaettu neljään vaiheeseen, suunnittelun kvalifiointiin, asennuksen kvalifiointiin, toiminnan kvalifiointiin ja suorituskyvyn kvalifiointiin. Kaikki kvalifiointiin kuuluvat toiminnot määritellään kvalifiointisuunnitelmassa ja tulokset dokumentoidaan kvalifiointiraporttiin.¹ Tässä työssä ei käydä läpi suunnittelun kvalifiointia.



Kuva 1. 4Q-mallin kvalifiointivaiheet.¹

Wallac Oy:n kvalifiointimenettely jakaa kvalifioitavat laitteet kolmeen luokkaan, A, B ja C. Kvalifiointiluokkaan A kuuluvat laitteet, jotka käyttötarkoituksensa perusteella kuuluvat kvalifioitaviin laitteisiin, mutta ovat tyypiltään kertaluontoisia hankintoja. Luokan A kvalifioinnit ovat yleensä kokonaisia linjoja kuten valmistuslinjat, jotka koostuvat erilaisista moduuleista ja tehdään räätälöidysti asiakkaan tarpeisiin. Kvalifiointiluokkaan B kuuluvat ns. standardilaitteet kuten määrityslaitteet. Kvalifiointiluokan C laitteet ovat toiminnaltaan yksinkertaisia ja toiminta osoitetaan usein kalibroimalla. Laiteryhmien jaottelussa eri luokkiin otetaan huomioon laitteen käyttötarkoitus, laitetyyppi, laitteen tekninen toiminta ja laitteen vaikutus toiminnon tai tuotteen laatuun. Näiden kriteerien perusteella kriittisimmät laitteet kuuluvat luokkaan A tai B ja ei-kriittiseksi määritellyt laitteet luokkaan C. Tässä työssä kvalifioitu DNA-syntetisaattori kuuluu kvalifiointiluokkaan B. Kvalifioinnille tarvitaan aina vastuuhenkilö, joka huolehtii kvalifiointisuunnitelman laatimisesta. Suunnitelmassa on myös mahdollista hyödyntää laitevalmistajan tekemiä kvalifiointitoimenpiteitä. Ennen kuin kvalifiointitoimenpiteitä voidaan aloittaa, suunnitelma on hyväksyttävä kvalifioinnin ohjausryhmällä. Kvalifiointisuunnitelma pitää sisällään vähintään asennuksen ja toiminnan kvalifioinnin. Kvalifioinnin yhteydessä laitteelle laaditaan huoltosuunnitelma sekä käyttö- ja huolto-ohjeet. Kvalifioinnin tuloksena laaditaan raportti tehdyistä toimenpiteistä liitteineen, joka osoittaa laitteen toimintakyvyn.²

Laitekvalifioinnin yhteydessä laitteelle luodaan laitenumero SAP-toiminnanohjausjärjestelmässä. Lyhenne SAP tulee sanoista Systems, Applications and Products in data processing. SAP järjestelmään kirjataan laitteen tiedot, kuten merkki, malli, sarjanumero ja laitetunnus. Samalla laitteelle laaditaan määräaikaishuolto-ohjelma, jossa on määritettynä huoltoväli. Uudelle laitteelle määritetään ajankohta, josta huoltoväli lasketaan alkavaksi ja SAP-järjestelmä antaa ilmoituksen lähestyvistä huolloista. Huollon viivästyminen tai laiminlyönti johtaa laitteen käyttökieltoon ja poikkeamaan tuotannossa. Käyttökielto voidaan purkaa vasta sen jälkeen, kun asianmukaiset huoltotoimenpiteet on hyväksytysti tehty. Jäljitettävyyden kannalta tämän

kaltaisten poikkeamien syy on mahdollista selvittää SAP-järjestelmästä laitteen tiedoista.²

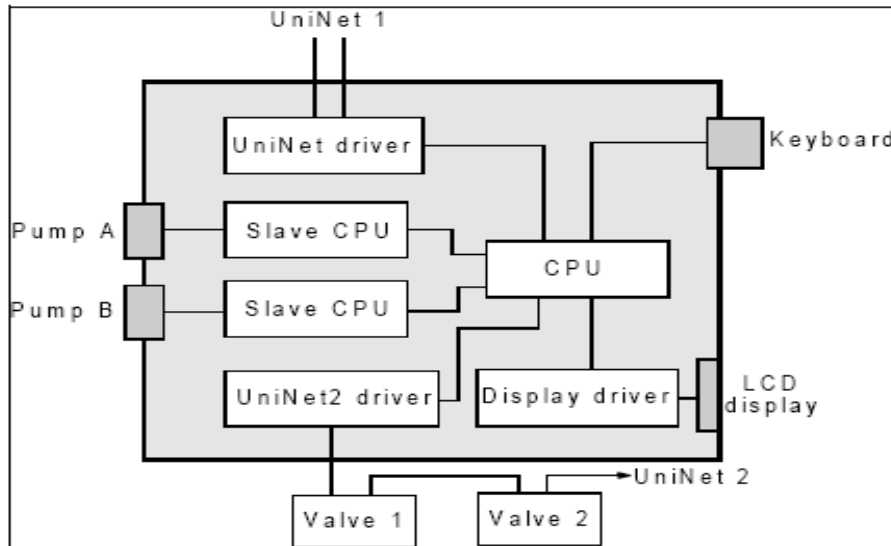
Tässä työssä kuvatut asennuksen ja toiminnan kvalifioinnit on suoritettu laitevalmistajan laatiman kvalifiointiprotokollan mukaisesti. Laitteiston asennuksesta vastasi laitevalmistajan valtuuttama huoltohenkilö. Laitevalmistajan asennusprotokolla oli jaettu neljään osioon ja jokainen osio tuli olla hyväksytetty kvalifiointivastaavalla, tuotantotekniikan edustajalla ja validointiasiantuntijalla ennen kyseisen osion toimenpiteiden aloitusta.

2.2 Asennuksen kvalifiointi

Asennuksen kvalifioinnilla tarkoitetaan objektiiviseen näyttöön perustuvaa dokumentoitua osoitusta, että tekninen järjestelmä ja sen osat on asennettu oikein niille määrätyille paikoille toimittajan ohjeiden ja vaatimusten mukaisesti.²

Kvalifiointiprotokollan asennuksen kvalifiointi varmentaa tietokoneen, lisälaitteiden, UNICORN-ohjelmiston, synteesiyksikön sekä laitteiston osien oikean asennuksen. Synteesilaitteistoa ohjataan UNICORN-ohjelmistolla, jota varten tarvitaan tietokone. UNICORN on ohjelmisto oligonukleotidisynteesilaitteiston ohjaamiseen ja hallintaan. Se koostuu ohjausohjelmistosta ja ohjaukortista tai yksiköstä, jotka toimivat liittymänä ohjaavan tietokoneen ja synteesilaitteiston välillä. UNICORN-ohjelmisto koostuu neljästä moduulista. UNICORN Managerissa tapahtuu tiedostojen käsittely ja hallinta kuten käyttäjäprofiilit. Method Editorissa luodaan tai muokataan valmiiksi ohjelmoituja menetelmiä. System Control suorittaa ja valvoo synteesiajoa. Evaluation mahdollistaa synteesitulosten graafisen tarkastelun. Asennuksen kvalifioinnin ensimmäisessä osiossa tietokoneesta tarkastettiin laitevalmistajan antamat laitteistovaatimukset kuten käyttöjärjestelmä ja järjestelmälaaji. UNICORN-ohjelmiston asennuksen yhteydessä tarkastettiin ohjelmiston versionumero sekä asennetut ohjelmistokansiot ja toimintasuunnitelmahakemistot.³

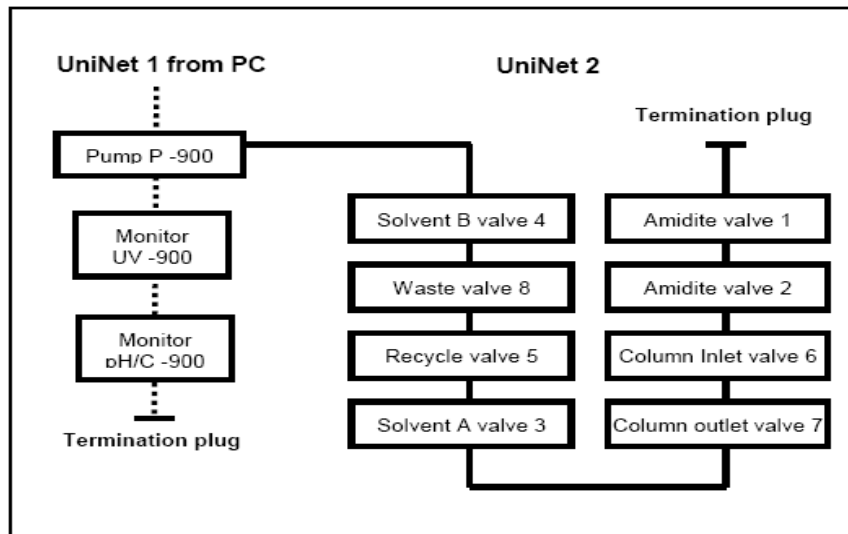
Asennuksen kvalifioinnin toisessa osiossa tarkastettiin kaikki laitteistossa olevat tai siihen asennettavat komponentit. Kuvassa 2 olevan laitteiston tiedonsiirtokaavion mukaan kaikki komponentit ovat yhteydessä toisiinsa monipisteyhteysväylän, UniNet kautta.³



Kuva 2. Laitteiston tiedonsiirtokaavio UniNet.³

Pääkomponentit, kuten pumppu ja monitorit sekä tietokone ja UNICORN-ohjelmisto ovat liitettyinä UniNet 1:een.³

Kuvassa 3 oleva sekundaarinen yhteysverkko, UniNet 2 liittää pienemmät komponentit, kuten venttiilit ilman erillistä virtalähdettä. Virta välittyy pääpumppusta, joka toimii myös väylänä UniNet 1 ja UniNet 2 välillä.³



Kuva 3. Sekundaarinen yhteysverkko UniNet2.³

Yleinen laitteiston tarkastus koostui valmistajan nimike- ja sarjanumeroiden tarkastuksesta. Laitteiston komponenttien nimike- ja sarjanumeroiden oli täsmäyttävä laitesertifikaatissa annettujen numeroiden kanssa. Laitesertifikaatista tarkastettiin, että kaikki systeemitestit oli suoritettu ja tulokset olivat valmistajan antamissa hyväksymisrajoissa. Laitteisto ja komponentit tarkastettiin visuaalisesti, että ne olivat vahingoittumattomia ja asennettu oikein valmistajan ohjeiden mukaisesti. UNICORN-ohjelmistoon kuuluu ulkoinen ohjausyksikkö CU-950, joka on yhteydessä ohjelmistoon USB-liitännän kautta. Ohjausyksiköstä tarkastettiin kaikki liitännät laitteistoon. Laitteistoon asennettiin päävirtajohto ja tarkastettiin UniNet 2 liitännät listattuihin komponentteihin. Putkituksen tarkastuksessa varmistettiin asennuksen oikeellisuus ja kaikkien liitäntöjen pitävyys. Venttiileihin sekä virtauksenrajoittimeen liitetyt putket eivät saaneet olla taittuneita tai muuten vahingoittuneita. Virtauksenrajoitinta käytetään vakaan vastapaineen turvaamiseksi koko laitteistossa.³

Laitteiston pääpumppu koostuu kahdesta yksiköstä A ja B. Kumpikin yksikkö sisältää kaksi mäntää. Jokaista mäntää ohjaa yksinkertainen vankka epäkeskonokka, jota ohjaa porrastussäädin. Säätimen nopeus vaihtelee lineaarisen liikkeen ja kokoonpuristuvuuden tasaamisen saavuttamiseksi. Systemi takaa tarkan matalan paineenvaihtelun virtauksen koko

virtausnopeusalueella riippumatta vastapaineesta. Virtausnopeuden kasvaessa, säätimen nopeus kiihtyy asteittain antaen pehmeän alun ja virtausnopeus kasvaa halutulle tasolle. Virtausnopeuden laskiessa säätimen nopeus alenee nopeasti matalammalle virtausnopeudelle. Pumpusta tarkastettiin asennuksen ja liitännöiden oikeellisuus.³

Pumpun männäntiivisteissä on huuhtelusysteemi, joka täytettiin asetonitriilillä ennen käyttöä. Huuhtelusysteemi ehkäisee liuottimista aiheutuvien saostumien kerääntymisen männäntiivisteiden paineettomalle puolelle. Huuhtelusysteemistä tarkastettiin asennuksen oikeellisuus sekä sähköinen liitos pumpusta laitteiston virtalähteeseen ja UniNet 1 yhteys pumppuun. Pumpun putkituksen tarkastuksessa varmistettiin asennuksen oikeellisuus ja kaikkien liitännöiden pitävyys. Putkituksen on noudatettava virtauskaaviota eivätkä putket saaneet olla taittuneita tai muuten vahingoittuneita.³

Seuraavaksi läpikäydyissä UV- ja johtokykymonitoreissa oli hyvin samanlaiset tarkastuksen kohteet. UV-monitorissa flash-lampun tuottama valo kulkeutuu monokromaattoriin, josta se ohjataan valokuidulle. Askelmoottori kääntää monokromaattorin hilan aallonpituuden valintaan. Valokuidut ohjaavat ja kohdistavat monokromaattisen eli yksivärisen valon virtaustielle. Ennen kuin valonsäde saapuu virtaustielle, se jaetaan ja osa valosta kulkee näyttekuidun ja osa vertailukuidun kautta. Kaksoisvalodiodi monitoroi mittaus- ja vertailusäteiden intensiteettiä. Detektori pystyy havaitsemaan kolme aallonpituutta samanaikaisesti välillä 190–700 nm. Johtokykyvetissä on kaksi lieriömäistä titaanielektrodia virtaustielle asetettuna. Elektrodiin johdetaan vaihtojännite ja saatu sähkövirta mitataan liuoksen johtokyvyn laskemiseksi. Toisessa elektrodeista on pieni lämpötilasensori, joka mittaa läpivirtauskyvetissä olevan liuoksen lämpötilaa.³

Molemmista monitoreista tarkastettiin asennuksen ja liitännöiden oikeellisuus sekä sähköinen liitos monitoreista laitteiston virtalähteeseen ja UniNet 1 yhteys molempiin monitoreihin. Monitorien putkituksen tarkastuksessa varmistettiin asennuksen oikeellisuus ja kaikkien liitännöiden pitävyys. Putkituksen on noudatettava virtauskaaviota eivätkä putket saaneet olla taittuneita tai muuten

vahingoittuneita. UV- ja johtokykymonitorit sisältävät läpivirtauskyvetin, jonka tuli olla oikein asennettu ja liitännät olivat pitäviä. UV-monitorin kyvetistä varmennettiin valotien pituus ja kyvetissä olevien valokuitujen asennus. Ohjelmistoasetuksista UV-monitorissa tarkastettiin nollauskohtien aallonpituus ja absorbanssi sekä lampun intensiteetti. Johtokykymonitorista tarkastettiin lämpötilakompensointi ja vertailulämpötila sekä johtokyvyn ja kennovakion sovitus ja johtokykyasteikon asetus.³

Laitteistoon on liitetty kaasulinja, koska kaikkien reagenssien tulee olla suojaakaasuympäristössä. Suojaavana kaasuna käytetään argonia, jonka tulee olla korkealaatuista ja erittäin kuivaa. Argon on ilmaa raskaampi kaasu, joten se muodostaa suojaavan kerroksen estäen ilmankosteuden pääsyn reagensseihin.⁴ Laitteiston ulkopuolella olevista liitännöistä tarkastettiin, että kaasun tuloliitin laitteistosta on liitetty päähanaan ja laitteiston sivusta tulevat reagenssiletkut on liitettynä oikeisiin reagenssipulloihin. Laitteiston sisällä olevien kaasuliitosten asennuksen tuli vastata valmistajan antamaa asennuskaaviota. Laitteiston sivusta tulevien kaasuletkujen tuli olla liitettynä oikeisiin reagenssipulloihin.³

2.3 Toiminnan kvalifiointi

Toiminnan kvalifioinnilla tarkoitetaan objektiiviseen näyttöön perustuvaa dokumentoitua osoitusta, että tekninen järjestelmä ja sen osat toimivat suunnitellulla tavalla koko sille asetetulla toiminta-alueella spesifikaation mukaan.²

Kvalifiointiprotokollan toiminnan kvalifiointi varmentaa UNICORN-ohjaussysteemin oikean toiminnan ÄKTA-laitteiston kanssa sekä laitteiston ja sen komponenttien oikean toiminnan. Toiminnan kvalifioinnin ensimmäisessä osiossa määriteltiin testit, joita käytettiin ohjaussysteemin oikean toiminnan varmentamiseen ennalta määritetyissä olosuhteissa. Testien suorittamiseksi UNICORN-ohjelmisto oli manuaalitulossa.³

Tietokoneen toiminnan testauksessa varmennettiin atk-laitteiston ja käyttöjärjestelmän toimivuus sekä tehtiin kovalevytesti. Hälytykset testattiin manuaalililassa asettamalla tietty arvo, joka tuottaa hälytyksen. Ennen kuin laitteiston reaktio hälytyksiin varmennettiin, testit suoritettiin samoilla arvoilla niin, että hälytykset olivat poissa käytöstä. Testattavia hälytyksiä olivat liian korkeat tai matalat paineet, johtokyvyn tai UV-signaalit.³

Turvallisuus- ja tapahtumatesteissä varmennettiin laitteiston reagointi simuloituihin katastrofitilanteisiin kuten virran häviäminen tietokoneesta tai synteesilaitteistosta ja yhteyden menetykset. Tietokoneen virran sammuaessa, ulkoisen ohjausyksikkö CU-950:n tulisi jatkaa laitteistolla käynnissä olevaa menetelmää sekä laitteiston ohjaamista tai vaihtoehtoisesti laitteisto menee pause-tilaan. Kun tietokone käynnistetään uudelleen, tietojen tulisi olla saatavissa varmuustiedostoista. Mikäli UNICORN-ohjelmiston ja ulkoisen ohjausyksikön välinen yhteys joudutaan luomaan uudelleen, siihen asti saadut tiedot menetetään. Laitteiston virran sammuaessa, UNICORN-ohjelmisto havaitsee yhteyden menetyksen. Mikäli UNICORN-ohjelmiston ja ulkoisen ohjausyksikön välinen yhteys joudutaan luomaan uudelleen, tietoja ei voida palauttaa virran menetyksen vuoksi ja UNICORN lopettaa menetelmän suorittamisen. Vaihtoehtoisesti tiedot voidaan palauttaa siihen asti kunnes virta menetettiin. Laitteisto menettäessä yhteyden tietokoneeseen, UNICORN-ohjelmisto havaitsee yhteyden menetyksen ja ulkoisen ohjausyksikön tulisi jatkaa laitteistolla käynnissä olevaa menetelmää sekä laitteiston ohjaamista tai vaihtoehtoisesti laitteisto menee pause-tilaan. Kun yhteys palautetaan, tiedot tulisi olla saatavissa ulkoiselta ohjausyksiköltä.³

Toiminnan kvalifioinnin toisessa osiossa varmennettiin laitteiston ja sen komponenttien oikea toiminta, joka suoritettiin joko manuaalisilla tai valmiiksi ohjelmoituilla menetelmillä. UV-monitorille tehtiin lineaarisuustesti käyttäen kaupallisia rautasulfaattivertailuluoksia. Testistä saaduista mittaustuloksista ja vertailuluosten pitoisuuksista laskettiin lineaarisuus ja poikkeamat sekä tarkastettiin, että lineaarisuuskäyrän selitysaste sekä lineaarisuuden poikkeama täyttävät annetut hyväksymisrajat. Monitorista testattiin myös taustan nollaus.

Johtokykymonitori testattiin myös kaupallisilla natriumkloridistandardeilla. Mittaustuloksista laskettiin poikkeama vertailuarvosta ja tarkastettiin, että saadut arvot täyttävät hyväksymisrajat.³

Asennustestillä varmennettiin laitteiston kyky syöttää gradienttia määritetyissä rajoissa. Testiä varten valmistettiin erilliset tolueeni-asetonitriili- ja asetoni-asetonitriililiuokset. Virtauksenrajoitin testattiin riittävän vastapaineen saavuttamiseksi sekä matalalla että korkealla virtausnopeudella ja tarkastettiin, että saadut painelukemat täyttävät annetut hyväksymisrajat.³ Virtauksenrajoitin estää ilmakuplien muodostumisen kolonnin jälkeisissä läpivirtauskyveteissä ja ylläpitää reagenssien tasaista leviämistä kolonnissa⁴. Kaasusysteemin testauksessa varmennettiin, että kaasu kulkee kaasunjakoputkiston kautta jokaiseen reagenssipulloon. Kaasusysteemille tehtiin myös vuototesti jolla varmistettiin, että kaasunpaine ei laske alle annetun lukeman testauksen aikana. Painemittarin testillä varmennettiin, että mittari on toimintakunnossa ja näyttää oikeaa kaasun painetta. Testauksessa käytettiin irrallista kalibroituja painemittaria, johon laitteiston mittarilukemaa verrattiin. Laitteiston ja kalibroidun painemittarin lukemista laskettiin hajonta, jota verrattiin annettuihin hyväksymisrajoihin.³

Laitteiston pääpumpulle tehtiin useita toiminnan testauksia. Painenäytön testauksessa varmennettiin, että pumppumonitorin näytöllä oleva painelukema on sama kuin UNICORN-ohjelmiston ohjausikkunoissa. Pienimmän ja suurimman painelukeman ero ei saanut ylittää annettua hyväksymisrajaa. A ja B pumpuista testattiin liuoksen syötön tarkkuus matalalla ja korkealla virtausnopeudella. Pumpun tarkkuus varmennettiin mittaamalla pumpun todellisuudessa pumppaamalla tilavuudella. Molempien pumppujen samanaikainen toiminta testattiin maksimi virtausnopeudella annetulla aikavälillä.³

2.4 Suorituskyvyn kvalifiointi

Suorituskyvyn kvalifioinnilla tarkoitetaan objektiiviseen näyttöön perustuvaa osoitusta, että laite toimii sille määritetyssä käyttötarkoituksessa ja on toistettavissa. Suorituskyvyn kvalifiointi perustuu käyttäjävaatimuksiin eli URS:iin.²

Suorituskyvyn kvalifiointi on usein osana laitekvalifiointia. Se ei kuitenkaan ota enää kantaa laitteen toiminnan oikeellisuuteen vaan liittyy lähinnä laitteelle luotavan menetelmän, kuten esimerkiksi tuotannon tai laadunvalvonnan toimivuuteen. Laitteen käyttäjä määrittelee kvalifioitavat asiat ja niiden hyväksymiskriteerit. Suorituskyvyn kvalifiointi voidaan tehdä erillisenä yksittäiselle laitteelle vasta, kun asennuksen ja toiminnan kvalifioinnit ovat hyväksytyt.^{5,6}

Suorituskyvyn kvalifioinnilla osoitetaan, että kvalifioitu laite tuottaa tasaisesti hyväksyttävää tuotetta normaaleissa käyttö- ja tuotanto-olosuhteissa. Laitteen toiminnan on oltava toistettavaa myös pitkällä aikavälillä. Suorituskyvyn kvalifioinnissa käytetään hyväksytyjä tuotanto- tai vastaavia materiaaleja. Kvalifiointi suoritetaan tuotanto- tai määritysolosuhteissa, jotka vastaavat normaalia toimintaa ja testien tulee kattaa koko aiottu toiminta-alue.^{5,6}

3 DNA-OLIGONUKLEOTIDIN SYNTEESI

Tässä luvussa käydään läpi oligonukleotidisynteesin kehittäminen, synteisiin kuuluvat vaiheet yleisesti käytetyillä menetelmillä ja reagensseilla sekä mihin syntetisoituja oligonukleotideja käytetään toimeksiantajan tuotannossa.

3.1 Kemiällisen synteessin historiaa

1950-luvun loppupuolella Chicagon yliopiston tutkija H. Gobind Khorana kiinnostui oligonukleotidien syntetisoimisesta. Hän esitteli kaksi periaatetta, jotka mahdollistivat enemmän kuin muutaman emäksen mittaisen oligonukleotidin synteessin. Ensimmäinen oli on-off-suojaussysteemi ja toinen stabiilien fosforyloitujen nukleosidien käyttö. Viimeksi mainitun periaatteen mukaan nukleosidi kytketään aktivoituna haluttuun toiseen nukleosidiin. Nukleotidisynteesi fosfodiesterimenetelmällä on sama kuin nykyään, mutta siihen on lisätty vielä hapetusvaihe. Khoranan suurin panostus liittyi kuitenkin nukleosidien suojaryhmiin. Avainasemassa tehokkaan ja syklisen asteittaisen synteessin kehittämisessä oli hyvä suojaryhmäsysteemi, joka sallii tiettyjen suojaryhmien poistamisen halutulla hetkellä. Khoranan ratkaisu tähän oli 5'-hydroksyylliryhmän suojaus dimetoksitriityylillä. Hän esitti myös suojaryhmät nukleosidien eksosyklisille aminoryhmille, jotka ovat puriini ja pyrimidiini emästen rengasrakenteen ulkopuolella olevia aminoryhmiä. Guaniinin suojaryhmänä hän käytti isobutyryyliryhmää ja adnosiinin sekä sytosiinin suojaryhmänä bentsoyyliä.⁷ Tymiini (DNA emäs) ja urasiili (RNA emäs) eivät tarvitse suojaryhmää, koska niissä ei ole eksosyklisiä aminoryhmiä. Suojaryhmä estää aminoryhmää reagoimasta aktivoituneen fosforamidiitin kanssa kytkentäreaktiossa.⁸

1960-luvun alussa Northwestern yliopiston professori Robert Letsinger kehitti peptidisynteesiä käyttäen kiinteänfaasin menetelmää. Hän käytti hyväkseen läpivirtausteknologiaa syklisessä systeemissä, jossa kukin yksikkö lisättiin toisen perään. Letsinger myötävaikuttanut kolmessa synteisiin liittyvässä asiassa.

Ensimmäisenä hän esitteli kiinteänfaasin menetelmän ja toisena synteessin fosfotriesterimenetelmällä, joka oli tärkeä parannus Khoranan fosfodiesterimenetelmään. Viimeisenä Letsinger esitteli fosfiittitriesterimenetelmän, joka oli pohjana hänen entisen oppilaansa Marvin Caruthersin myöhemmin kehittämässä fosforamidiittimenetelmässä. Ensimmäinen Letsingerin käyttämä kiinteä kantaja oli styreenidivinylibentseeni-polymeeri. Valitettavasti tämä kantaja reagoi joihinkin liuottimiin turpoamalla. 1970-luvun puolessa välissä Letsinger julkaisi artikkelin fosfiittitriesterimenetelmästä, joka perustui reaktiivisen fosforin käyttöön kolmenarvoisena viidenarvoisen sijasta. Synteesiin tarvittiin hapetusvaihe viisiarvoisen fosfaattirakenteen saavuttamiseksi. Fosfiittitriesteri välimuodon hapetus vakautti oligonukleotidin rakennetta.⁷

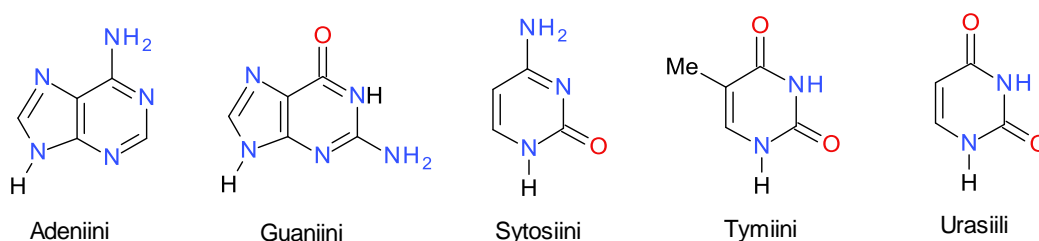
1973 tutkija Marvin Caruthers teki omaa tutkimustansa oligonukleotidien synteesistä. Seuraavan vuosikymmenen ajan hän etsi ratkaisua kahteen ongelmaan: orgaanisen polymeerikantajan turpoamiseen ja fosfityloidun nukleosidivälimuodon pysymättömyyteen. 1981 Caruthers julkaisi artikkelin epäorgaanisten kantajamateriaalien käytöstä. Tutkimuksessa käytettiin alun perin kromatografialaatuista silikaa, joka korvautui myöhemmin huokoisella lasikantajalla (CPG). Tämä ratkaisi turpoamisesta aiheutuvan haitan. Caruthers muokkasi Letsingerin fosfiittitriesterimenetelmää vaihtamalla yhden aktivaatiovaiheessa poistuvan ryhmän toiseen. Tämä mahdollisti pysyvän fosfityloidun nukleosidivälimuodon saavuttamisen.⁷

Oligonukleotidien kyky pariutua vastinemästensä kanssa mahdollistaa niiden käytön molekyyli diagnostiikassa. Oligonukleotidit toimivat niin alukkeina polymeerasiketjureaktioissa kuin koettimina hybridisaatioissa vastinjuosteidensa kanssa.⁸

3.2 Synteessin vaiheet

Oligonukleotidi on yksijuosteinen ketju, joka koostuu lukuisista nukleosidiyksiköistä, jotka ovat liittyneinä toisiinsa fosfodiesterisilloilla.

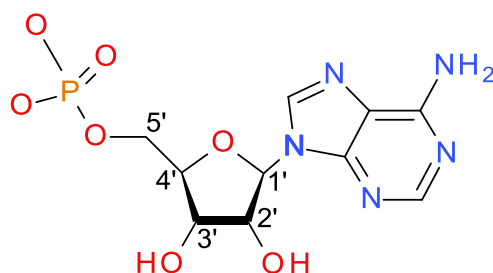
Nukleotidit ovat nukleosidien fosfaattiestereitä, jotka ovat sekä ribonukleiinihapon (RNA) että deoksiribonukleiinihapon (DNA) rakenneosia. Nukleotidit ovat siis nukleiinihappojen monomeereja. Kaikki nukleotidit rakentuvat kolmesta osasta: heterosyklisestä emäksestä, pentoosisokerista ja fosfaattiryhmästä. Nukleotidissa olevan pentoosisokerin 1'-hiili liittyy emäksen typpiin β -glykosyylamiinisidoksella. Emäkset ovat joko monosyklisiä pyrimidiinejä tai disyklisiä puriineja. DNA:n emäksiä ovat kuvassa 4 esitetyt adeniini (A), tymiini (T), sytosiini (C) ja guaniini (G). RNA:ssa tymiini korvataan urasiililla (U).^{9,10}



Kuva 4. DNA:n ja RNA:n emäkset.⁹

DNA:n sokeriosassa, deoksiriboosissa, 2'-hiilessä on vety, kun taas RNA:n sokeriosassa, riboosissa, 2'-hiilessä on hydroksidi. Emäksistä sytosiini, tymiini ja urasiili ovat pyrimidiinejä ja adeniini ja guaniini puriineja. Nukleotidin nimi määräytyy siihen kiinnittyneen emäksen mukaan. Deoksiribonukleotideja ovat deoksiadenosiini, deoksitymidiini, deoksisytidiini ja deoksiguanosiini.^{9,10}

Tavallisesti oligonukleotidisynteesissä fosfodiesterit muodostuvat 5'-hiilen fosfaattiryhmän ja sitä seuraavan nukleotidin pentoosisokerin 3'-hydroksyyliiryhmän väliin.^{9,10} Kuvassa 5 on esitetty nukleotidimonomeerin 5'-hiilen määrättyminen siten, että nukleiinihapon monomeerissa fosfaattiosa kiinnittyy sokeriosan siihen hiileen, joka on kauimpana emäsoosan kiinnittymiskohdasta¹¹.



Adenosiini 5'-monofosfaatti

Kuva 5. Nukleotidimonomeerin 5'-hiilen määräytyminen.⁹

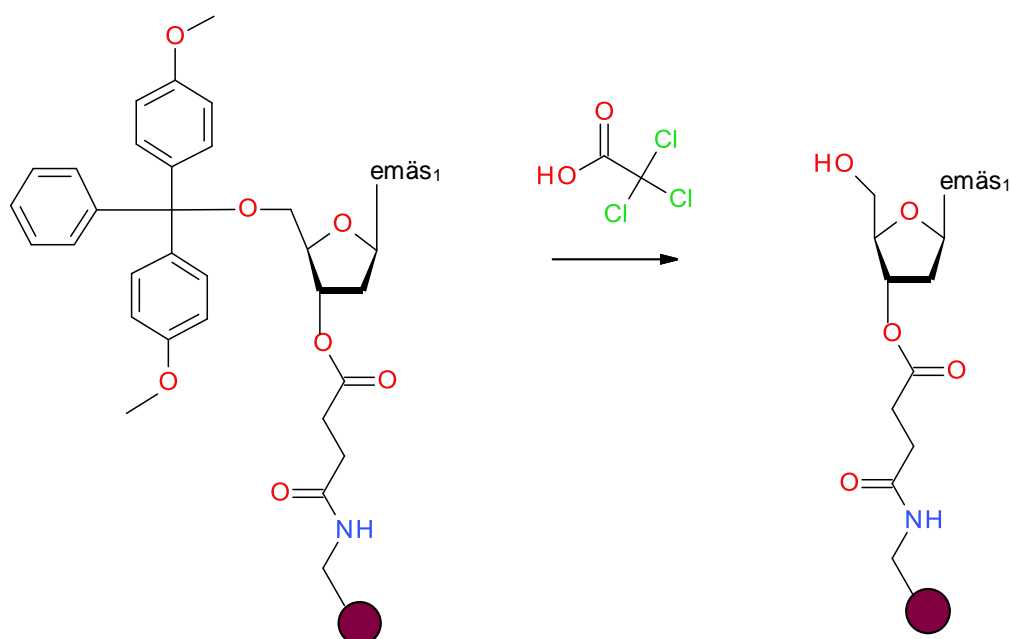
5'-hiilessä olevan fosfaatin esteröityessä toisen nukleotidin 3'-OH-ryhmän kanssa, muodostuu nukleotidien välille fosfodiesterisidos.¹¹ Puhuttaessa nukleiinihapoista etuliite ”oligo” tarkoittaa usein muutaman nukleosidin pituista ketjua, kun taas etuliite ”poly” tarkoittaa monta. On kuitenkin yleinen käytäntö puhua oligonukleotidistä, kun tarkoitetaan kemiallisesti syntetisoitua nukleiinihappoa vaikka se koostuisi jopa sadasta nukleosidistä.⁹

Oligonukleotidin synteesi fosforamidiittimenetelmällä suoritetaan kiinteällä kantajalla kuten huokoinen lasi (CPG) tai polystyreeni, joiden hyötynä on helppokäyttöisyys ja lopputuotteen yksinkertainen irrotus. Kiinteää kantajaa on saatavissa valmiiksi pakattuina kolonneina, jolloin synteessin mittakaava on valmiiksi määritelty. Kolonni on myös mahdollista pakata itse, mikäli synteesi halutaan tehdä jollain tietyllä mittakaavalla. Synteessin mittakaavalla eli skaalalla tarkoitetaan kantajaan kiinnitetyn ensimmäisen nukleosidin määrää (esim. yksikössä $\mu\text{mol/g}$). Kiinteän faasin synteessimenetelmässä oligonukleotidisekvenssi rakennetaan vaiheittain 3'-5'-suuntaan. Menetelmän vaiheista käytetään nimitystä synteesisykli ja yhden syklin aikana lisätään yksi deoksinukleotidi kerrallaan kasvavaan oligonukleotidiketjuun. Jokainen sykli koostuu neljästä kemiallisesta reaktiosta joita ovat suojarahmânpoisto (detritylation), kytchentä (coupling), 5'-OH-ryhmän blokkauk (capping) ja hapetus (oxidation).⁸

Seuraavaksi esitetyissä synteesin vaiheissa käytetyt menetelmät ja reagenssit ovat yleisesti käytettyjä DNA-synteesissä fosforamidiittimenetelmällä, kun kantajana on käytetty huokoista lasia. Tässä työssä ÄKTA oligopilotilla käytetyt reagenssit poikkeavat esimerkkeinä käytetyistä.

3.2.1 Suojaryhmän poisto

Oligonukleotidisynteesin alussa ensimmäinen nukleosidi on valmiiksi kiinnittynään kantajamateriaaliin. Kantajaan sidotussa nukleosidissa on 5'-päässä OH-ryhmän suojaryhmänä 4,4'-dimetoksitriityli (DMT), joka pitää poistaa ennen kuin oligonukleotidisynteesi voi edetä. Kuvassa 6 on esitetty suojaryhmän poisto, joka tehdään lisäämällä trikloorietikkahappo-dikloorimetääniliuosta synteesikolonnin läpi.¹²



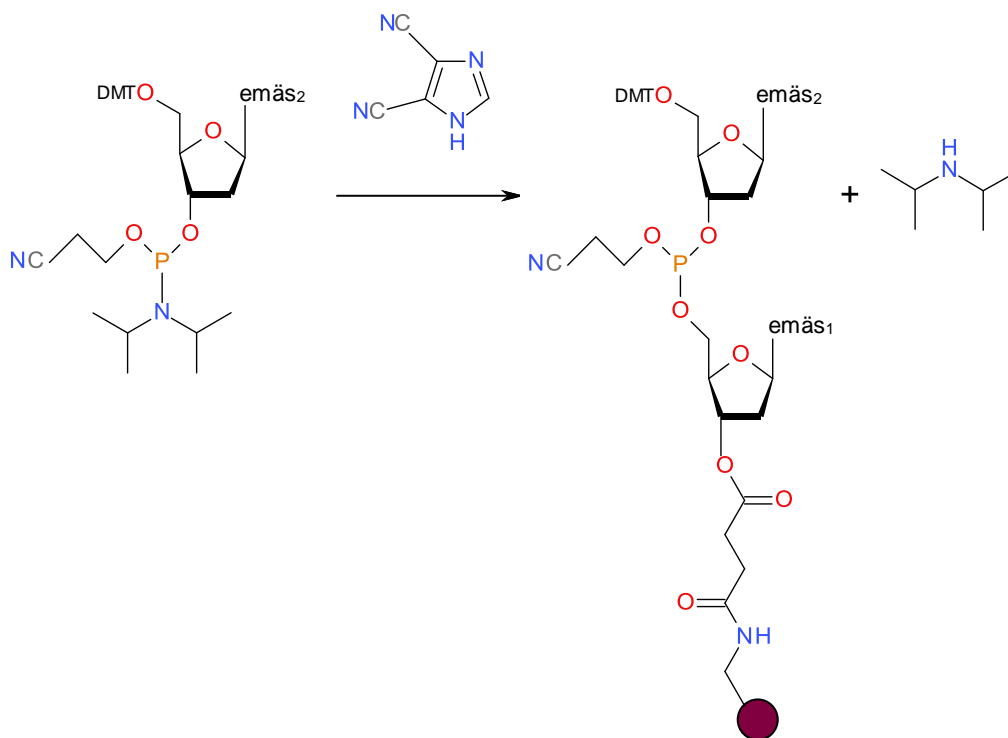
Kuva 6. 4,4'-dimetoksitriitylisuojaryhmän poisto.¹²

DMT-ryhmä on väritön ollessaan kiinnittynään nukleosidiin, mutta ryhmän irrottua se muuttaa väriään oranssiksi. Vapautuneen DMT-kationin oranssin värin intensiteettiä mitataan spektrofotometrisesti aallonpituudella 495 nm ja

intensiteetti on suoraan verrannollinen DMT-molekyylien määrään. Intensiteettiä voidaan hyödyntää kytkentätehokkuuden laskemiseen sekä synteessin etenemisen seurantaan.⁹ Tässä työssä suojaryhmän poistoon käytettiin dikloorietikkahappoa toluenissa.

3.2.2 Kytkeä

Suojaryhmän poiston jälkeen kantajassa kiinni olevan nukleosidin 5'-päässä oleva OH-ryhmä on valmis reagoimaan seuraavan lisättävän emäksen kanssa, joka lisätään kolonniin nukleosidifosforamidiittina. Lisättävää fosforamidiittimonomeeriä sekoitetaan ylimäärin katalyyttinä toimivan 4,5-disyanoimidatsolia sisältävän asetonitrililiuoksen kanssa. Kuvassa 7 olevan fosforamidiittimonomeerin sisältämä di-isopropyliamino ryhmä protonoituu katalyytin ansiosta ja korvautuu kantajassa kiinni olevan nukleosidin 5'-OH-ryhmän kanssa.^{8,12}

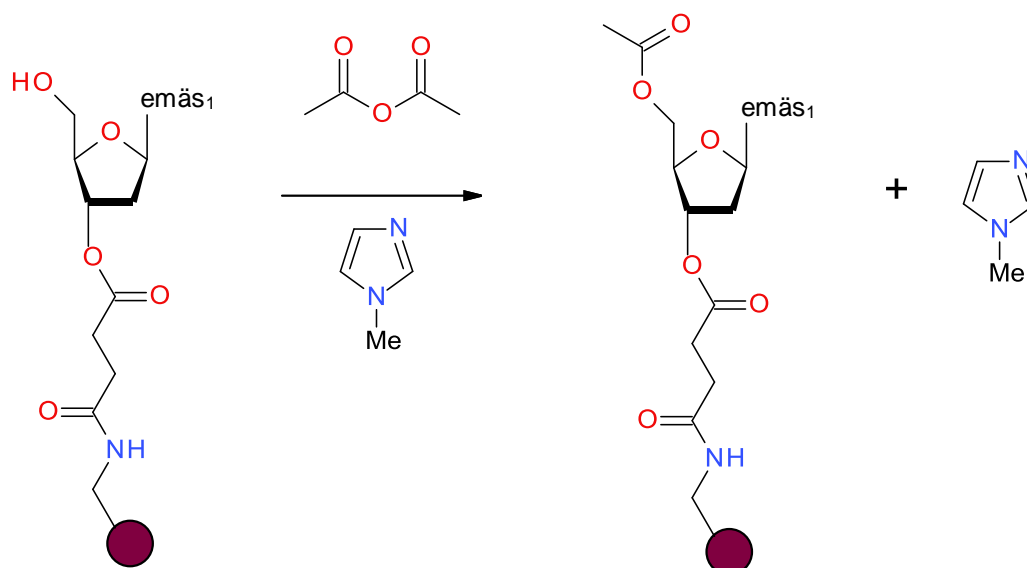


Kuva 7. Fosforamidiittimonomeerin aktivointi ja kytkentä.¹²

Nukleosidien välille muodostuu fosfiittitriesterisidos ja yksi fosfaattiryhmässä olevista happiatomeista on suojattu 2-syanoetyyliryhmällä.^{8,12} Tässä työssä käytettiin kytkennässä 5-bentsyyliotetratsolia asetonitrilissa.

3.2.3 5'-OH-ryhmän blokkaus

Nukleosidien toisiinsa kytkemisessä ei ole mahdollista saavuttaa 100 %:sta saantoa vaikka menetelmät olisivat tehokkaita ja käytetyt reagenssit puhtaita. Tämä tarkoittaa sitä, että pieni osa reagoimattomia 5'-OH-ryhmiä jää aktiivisiksi kytkennän jälkeen, jolloin niihin olisi mahdollista liittää seuraava nukleosidi. Tästä seuraisi, että muodostuvasta oligonukleotidista puuttuisi yksi emäs, jolloin se tarkoittaisi deleetiota halutussa sekvenssissä. Sekvenssiin jäänyt tarkistamaton deleetio kumuloituisi jokaisessa seuraavista synteesisykleistä ja lopputuote sisältäisi virheellisen geneettisen informaation. Tämän estämiseksi reagoimattomat 5'-OH-ryhmät blokataan lisäämällä kolonniin kahta eri liuosta, etikkahappoanhydridia ja *N*-metyyliimidatsolia tetrahydrofuraanissa. Kuvassa 8 elektrofiilinen seos asetyloi alkoholiryhmät ja etikkahappoanhydridiliuoksessa oleva pyridiini pitää pH:n emäksisenä, jolloin nukleosidin fosfororamidiittiryhmä ei detrityloidu.^{8,12}

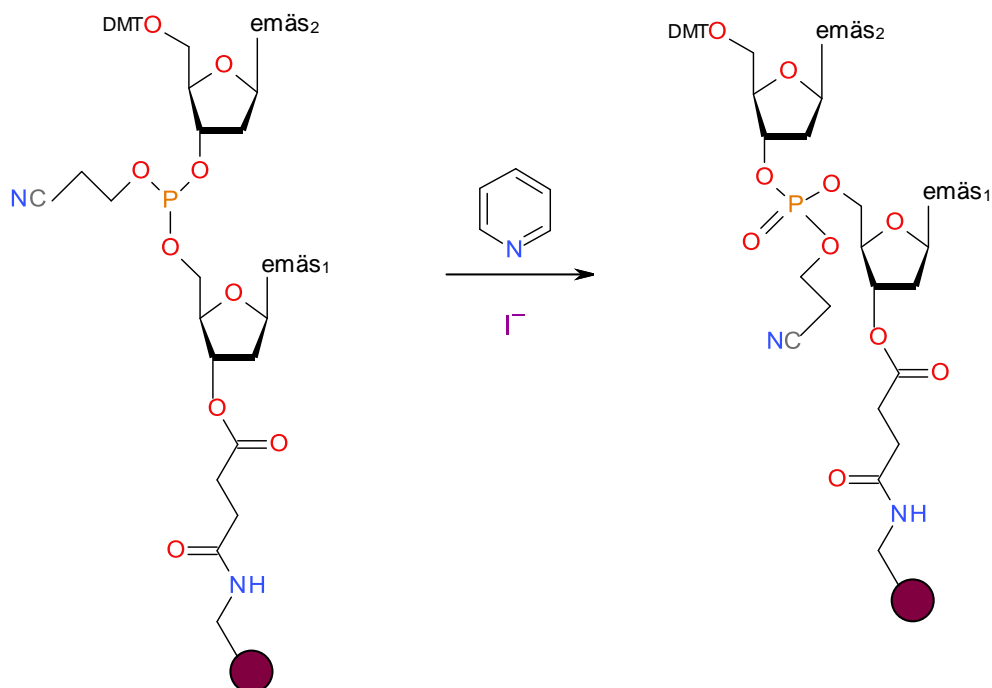


Kuva 8. Reagoimattomien 5'-OH-ryhmien blokkaukseen.¹²

5'-OH-ryhmän asetylointi tekee hydroksyyli-ryhmästä reagoimattoman seuraavissa synteesin vaiheissa.^{8,12} Tässä työssä 5'-OH-ryhmät blokkaukseen käytettiin etikkahappoanhydridiä ja *N*-metyyli-imidatsolia asetonitrilissä.

3.2.4 Hapetus

Kytkevävaiheessa muodostunut kolmenarvoinen fosfiittitriesterisidos on pysymätön ja näin ollen se on hapetettava viidenarvoiseksi fosfaattitriesterisidokseksi ennen seuraavan nukleotidin kytkentää. Kolonniin lisätään seosta, joka sisältää jodia, tetrahydrofuraania ja 2,6-dimetyylipyridiiniä vesiliuoksessa. Kuvan 9 mukaisesti kolmenarvoinen fosfori hapetetaan fosfaatiksi.^{8,12}



Kuva 9. Fosfiittitriesterisidoksen hapetus.¹²

Hapetuksessa kasvavan oligonukleotidin rakenne stabiloituu. Fosfaattiryhmässä kiinnittyneenä oleva 2-syanoetyyliryhmä toimii suojaryhmänä estäen ei-toivotut reaktiot seuraavissa synteessin vaiheissa.^{8,12} Tässä työssä hapetuksessa käytettiin seosta joka sisälsi jodia ja pyridiinia vesiliuoksessa.

Edellä kuvattuja synteesisivaiheita toistetaan oligonukleotidin rakentamiseksi niin kauan kunnes haluttu sekvenssi on saavutettu. Seuraavan synteesisyklin alussa 5'-päässä oleva DMT-ryhmä on poistettava, jotta seuraava lisättävä nukleosidifosforamidiitti voi reagoida 5'-OH-ryhmän kanssa.⁹

3.3 SCID-oireyhtymä

EnLite™ Neonatal TREC analyysi on tarkoitettu kvantitatiiviseen TREC (T-cell receptor excision circle) DNA:n määrittämiseen verinäytteestä, joka on kuivattuna erityiselle suodatinpaperille. Analyysillä seulotaan vastasyntyneistä SCID-oireyhtymää (Severe combined immunodeficiency disorder)

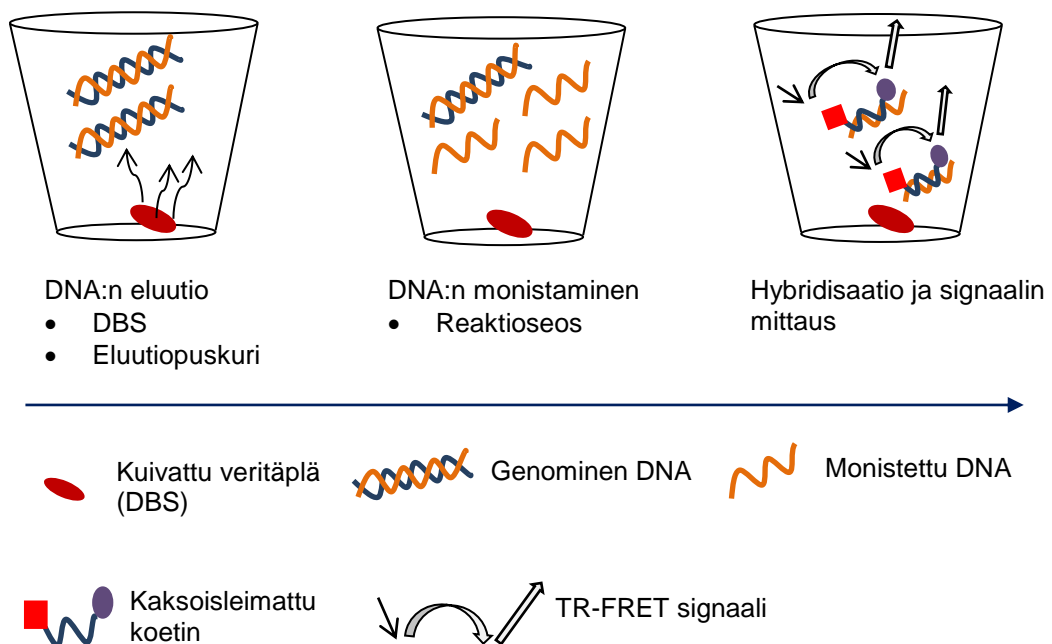
polymeraasiketjureaktioon (PCR) perustuvalla menetelmällä VICTOR™ EnLite instrumentilla.¹³

SCID on mahdollisesti hengenvaarallinen, periytyvä immunologinen sairaus, jossa T-lymfosyyttien kehittyminen epäonnistuu ja B-lymfosyytteja ei joko ole tai ne eivät toimi. Hoitamaton SCID altistaa potilaan hengenvaarallisille infektioille bakteeri-, virus- ja sienitartuntojen vuoksi.¹⁴ Useimmat vauvat, joilla on SCID, näyttävät fyysisesti normaaleilta syntyessään kunnes infektoita alkaa ilmaantua. Tällöin ollaan tilanteessa, jossa lapsen paino ja kasvu eivät saavuta ikäkauden normaaliarvoja.¹⁵

T-solureseptorien ”excision circles” (TRECs) ovat normaalin T-solun kehityksen sivutuotteita. TREC seulontamääritys tunnistaa tyypillisen SCID:n sekä mataliin T-solu arvoihin liittyvät olotilat. Tyypillisesti lapset, joilla on SCID menehtyvät infektiin ensimmäisen elinvuotensa aikana. Tunnusomainen merkki SCID:ssa on aina T-solujen tuotannon ja toiminnan vaikea puutteellisuus.¹⁴ Vakiintuneisiin SCID:n hoitomenetelmiin kuuluu puutteellisen immuunisysteemin korjaaminen hematopoeettisella kantasolujen siirrolla, jossa verestä tai luuytimestä eroteltuja kantasoluja siirretään infuusiona laskimoon. Hoitona voidaan käyttää myös entsyymikorvaushoitoa tai geenihoidokokeilua.¹⁶

TREC:t ovat stabiileja rengasmaisia DNA-osasia, jotka muodostuvat T-solureseptorien uudelleenjärjestäytymisen aikana, joka on osa T-solujen kypsymistä kateenkorvassa. TREC:t eivät kahdennu mitoosin aikana, vaan TREC siirtyy ainoastaan toiseen mitoosissa syntyneeseen tytärsoluun jokaisessa solunjakautumisessa.¹⁷ Terveillä vastasyntyneillä TREC:ja muodostuu runsaasti. Vastasyntyneillä, joilla on SCID, TREC:t ovat tuskin havaittavissa. Määritys voidaan tehdä vastasyntyneen kantapääverinäytteestä. DNA:ta monistamalla TREC:n kopiolukua veressä voidaan käyttää erottamaan terveet vastasyntyneet niistä vastasyntyneistä, joilla on lymfopenia eli veressä on niukasti imusoluja. Matala TREC kopioluku voi kuitenkin myös olla tulos muusta immuunipuutossairaudesta, kuten DiGeorge oireyhtymä tai immunosuppressiolääkkeen käytöstä.¹³

EnLite Neonatal TREC kitti on yhdistelmä polymeraasiketjureaktioon perustuvaa nukleiinihappojen monistamista ja aikaerotteiseen energiansiirtotekniikkaan (TR-FRET) perustuvaa havainnointia. Analyysi havaitsee kaksi kohdetta: TREC:n, joka on SCID-markkeri ja beta-aktiinin, jota käytetään kontrollina näytteen monistamisessa. TREC:n ja beta-aktiinin määrittäminen tapahtuu samanaikaisesti jokaiselle näytteelle. Määrittystuloksen tulkinta perustuu kahteen erilliseen kalibrintisuoraan ja laadunvalvonta kolmen kontrollin tulosten tulkintaan.¹⁴



Kuva 10. EnLite Neonatal TREC analyysi.¹³

Analyysi sisältää kohdesekvenssispesifisen koettimen, jossa pitkäaikaiset fluoresoivat lantanidifluoroforit ovat kytkettyinä yksijuosteisen koetinmolekyylin vastakkaisiin päihin. Koettimen hybridisointi mahdollistaa sen suoran havainnoinnin perustuen pitkittyneen puoliintumisajan energiansiirtoon. Tämänkaltaisen koettimen valinta mahdollistaa monianalyyttianalyysin, koska signaalin aallonpituus ja puoliintumisaika on soviteltavissa. Pitkäaikaisen fluoresenssin omaavien lantanidien käyttö vaimentaa tehokkaasti analyysimatriisin ja valonsironnan aiheuttamaa taustaa ja näin ollen lisää analyysin herkkyyttä.¹³

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Seuraava luku käsittelee laitteen toiminnan testaukseen käytettyjä materiaaleja sekä minkä tyyppisillä testiparametreilla laitteen toimintaa testattiin. Lisäksi käsitellään oligonukleotidien synteessin jälkeinen käsittely sekä oikeellisuuden varmistaminen massaspektrometrisesti.

4.1 Nukleosidifosforamidiitit

Serge Beaucage ja Marvin Caruthers esittelivät vuonna 1981 nukleosidifosforamidiitit DNA:n rakenneosina. Fosforamidiitit ovat suhteellisen pysyviä miedosti emäksisissä ja neutraaleissa olosuhteissa, mutta ovat hyvin herkkiä jopa heikoille hapoille. Nukleosidifosforamidiittien tärkein ominaisuus on kyky reagoida nopeasti nukleofiilisten ryhmien kanssa heikkojen happojen välityksellä. Jotta sivureaktioita ei tapahdu, kaikki nukleosidien muut funktionaaliset ryhmät on suojattava sopivilla ryhmillä, jotka ovat helposti poistettavissa oligonukleotidisynteessin jälkeen. Suojattavia ryhmiä ovat nukleotidiemästen eksosykliset aminoryhmät, 5'-asemassa oleva hydroksyyli-ryhmä ja fosfiittiryhmä.⁸

Perinteinen nukleosidifosforamidiittimonomeerin synteesi alkaa eksosyklisen aminoryhmien suojaamisella. Eksosykliset aminoryhmät on suojattava, jotta ne eivät trityloidu 5'-hydroksyyli-ryhmän suojauksen yhteydessä. Aminoryhmät eivät myöskään saa reagoida aktivoitujen fosforamidiittien kanssa kytkevävaiheessa. Emäksistä tyymiini ei sisällä eksosyklistä aminoryhmää, joten sitä ei ole tarvetta suojata. Sen sijaan adeniini, guaniini ja sytosiini suojataan yleensä emäslabiileilla suojaryhmillä kuten bentsoyyli- (Bz) tai isobutyryyli- (Ib) ryhmillä, jotka voidaan poistaa ammonolyysillä oligonukleotidisynteessin jälkeen. Bentsoyyllillä suojataan adeniini sekä sytosiini ja isobutyryyllillä guaniini. Reaktiossa adeniini ja sytosiini asyloidaan ylimäärällä bentsoyylikloridia, jolloin eksosykliset aminoryhmät ja kaikki sokeriosan vapaat hydroksyyli-ryhmät suojautuvat bentsoyyllillä. Tämän jälkeen sokeriosan hydroksyyli-ryhmien

suojaus puretaan vahvalla emäksellä kuten natriumhydroksidilla. Guaniinin suojaus tapahtuu samalla menetelmällä, mutta isobutyryylisuojaus tehdään isobutanoyyli anhydridillä. Asylointireaktion jälkeen sokeriosan hydroksyyliyhmiin suojaus ja toinen aminoasyyliryhmistä poistetaan emäskäsittelyllä. Eksosyklisen aminoryhmien suojaus voidaan poistaa valmiista oligonukleotidista esimerkiksi väkevällä ammoniakilla 55 °C:ssä, yön oli kestäväällä käsittelyllä.^{4,8,9}

Yleisin suojaryhmä fosforamidiitin 5'-asemassa olevalle hydroksyyliyhmiin on 4,4'-dimetoksitriyyliyhmiin (DMT). Tritylointireaktiossa 4,4'-dimetoksitriyylikloridi reagoi 5'-hydroksyyliyhmiin kanssa emäksen, kuten pyridiini tai 4-dimetyyliaminopyridiini läsnä ollessa. Reaktio tapahtuu ensisijaisesti 5'-hydroksyyliin, ei 3'-hydroksyyliin, johtuen steerisestä esteestä. Mitä voimakkaampi elektronin luovuttaja tietty tritylieetterisidos on, sitä herkempi trityyliyhmiin on niille happamille olosuhteille joissa ryhmä poistetaan. Dimetoksitriyyliyhmiin poistetaan synteesisyklin alussa trikloorietikkahapolla vedettömissä olosuhteissa, jolloin vältetään sivureaktioita kuten depurinaatio.^{8,9}

Viimeisenä vaiheena 5'-DMT nukleosidin 3'-hydroksyyliyhmiin fosfityloidaan esimerkiksi 2-syanoetyyliidi-isopropyyliaminofosfokloridiin ja katalyyttina käytetään ei-nukleofiilista emästä kuten *N,N*-di-isopropyylietyyliamiini tai trietyyliamiini. 2-syanoetyyliyhmiin on helposti poistettavissa käsittelemällä valmista oligonukleotidia väkevällä ammoniakilla.^{8,9}

Tässä työssä oligonukleotidien synteisiin käytettiin kaupallisia fosforamidiitteja sekä yhtä toimeksiantajan itse valmistamaa modifioitua fosforamidiittiä, jotka olivat liuotettuina kuivaan (vedettömään) asetonitriiliin. Kaikkien synteessissä käytettyjen reagenssien ja liuottimien tuli ehdottomasti olla vedettömiä. Reagensseissa ja liuotimissa tai laitteiston linjastoissa oleva kosteus vaikuttaa alentavasti synteesisäntoon ja tehokkuuteen. Tämän takia mitään reagenssi- ja liuotinpulloja ei saanut pitää avoimena enempää kuin pullon vaihdon ajan. Lisäksi fosforamidiitti-, aktivaattori- ja asetonitriilipulloissa käytettiin molekyyliuseuloja mahdollisen kosteuden poistamiseksi. Kaikki reagenssi- ja liuotinpullot olivat liitettynä argon-linjaan, jolloin argon muodostaa ilmaa

raskaampana suojaavan kerroksen liuottimen pinnalle. Argonin itsessään tuli myös olla kuivaa.⁴

4.2 Kantaja

Kiinteät kantajat ovat liukenemattomia partikkeleita. Kantajan halkaisija on tyypillisesti 50–200 µm. Monen tyyppisiä kiinteitä kantajamateriaaleja on olemassa, mutta käyttökelpoisimmiksi oligonukleotidisynteesille ovat osoittautuneet huokoinen lasi CPG (engl. controlled pore glass) ja polystyreeni.¹²

Kiinteän kantajan ensisijainen tehtävä on toimia inerttinä alustana syntetisoitavalle oligonukleotidille. Ihanteellinen kantajamateriaali on kemiallisesti, termisesti ja mekaanisesti stabiili, helposti turpoava ja hinnaltaan edullinen. Oligonukleotidisynteesin tapauksessa kantajan turpoamista halutaan välttää esimerkiksi ristosilloittamalla polymeeria. Kantajan valinnassa on otettava huomioon sen kuormauskapasiteetti (eng. loading) eli paljonko nukleosidia on kiinnitettynä kantajaan. Tässä kohtaa nukleosidi toimii funktionaalisena ryhmänä kantajassa. Periaate on, että suurempi nukleosidin määrä kantajassa mahdollistaa suuremman tuotemäärän eristämisen yhdestä kantajapartikkelista. Kantajapartikkelin koko puolestaan vaikuttaa reaktionopeuteen. Kantajamateriaalin valintaan vaikuttaa myös linkkeri eli ryhmä, joka liittää molekyylin kovalenttisesti kantajaan.¹⁸ Oligonukleotidien kohdalla kyseinen linkkerimolekyyli on sukkinyyli-ryhmä. Sukkinyyli liittää ensimmäisen nukleosidin 3'-päästä kantajaan. Linkkerimolekyylin on oltava stabiili kaikille synteesissä käytettäville reagensseille.¹²

Kantaja funktionalisoidaan käsittelemällä 5'-DMT nukleosidia butaanidihappoanhydridillä pyridiinin läsnä ollessa. Pyridiini soveltuu hyvin asyylaatioreaktioihin ja se estää dimetoksitriitylieetterin irtoamisen happaman nukleosidisukkinaatin muodostuessa. Ylimäärä nukleosidisukkinaattia lisätään kantajaerään. Jokainen kantajapartikkeli sisältää aminoryhmän kiinnittyneenä kantajan pintaan. Nukleosidisukkinaatti ja kantaja reagoivat di-imidi

kytkentäreagenssin ja happaman alkoholin, kuten 4-nitrofenolin kanssa. Viimeisenä tapahtuu blokkaukset, jotka suojaavat kaikki kantajan reagoimattomat aminoryhmät.¹²

Tässä työssä käytettiin Applied Biosystems:n CPG-kantajaa 1 µmol/g skaalassa. Kantaja oli funktionalisoitu tyymiinillä. Toisena kantajana käytettiin GE HealthCaren polystyreeni kantajaa PS 200. Synteeseissä käytettiin sekä adeniinilla että tyymiinillä funktionalisoituja kantajia skaaloissa 1, 15 ja 17 µmol/g.

4.2.1 CPG

CPG eli huokoinen lasikantaja on kova ja laajenematon partikkeli. Lasikantajat, joiden huokoskoko on 500 Å eli 50 nm ovat mekaanisesti vankkoja.¹² CPG:n hyötyihin kuuluu, että funktionaalistenryhmien reagoimiskyky ei riipu kantajan laajenemisesta tai orgaanisen liuottimen valinnasta. Kokoon puristumaton kova rakenne mahdollistaa reagenssien korkean virtausnopeuden.¹⁹ Synteesisaannot voivat kuitenkin huonontua merkittävästi mikäli yli 40 emäksen oligonukleotideja syntetisoidaan 500 Å huokoskoolla. Tämä johtuu siitä, että kasvava oligonukleotidiketju tukkii huokokset ja alentaa reagenssien diffuusiota kantajamatriisin läpi. Suuremman huokoskoon kantajat ovat kuitenkin hauraampia.¹²

4.2.2 Polystyreeni

Polystyreenipohjaiset kantajat ovat laajalti käytettyjä kantajia kiinteän faasin synteeseissä kemiallisen kestävyytensä vuoksi. Kantaja valmistetaan polymerisoimalla styreeniä divinyylibentseenin (DVB) läsnä ollessa. Divinyylibentseeni toimii ristisilloittajana parantaen polymeerin kovuutta ja kuumuudenkestävyyttä. Kantajan laajeneminen sopivan liuottimen vaikutuksesta mahdollistaa reagenssien tasaisen leviämisen kantajassa. Ristisilloituksen määrä muuttaa polymeerimatriisin solvataatio- ja laajenemisominaisuuksia.^{18,20,21}

4.3 Synteesimenetelmien testaus

Oligonukleotidien testisynteesiä tehtiin yhteensä 12, joissa käytettiin satunnaisia sekvenssejä. Osassa sekvensseistä oli mukana myös toimeksiantajan oma modifioitu fosforamidiitti. Ensimmäiset seitsemän synteesiajoa suoritettiin laitevalmistajan valtuuttaman kouluttajan kanssa. Synteesilaitteistoa ei voinut käyttää itse ennen kuin asianmukainen käyttökoulutus oli annettu. Eri synteesiparametreilla ja jälkikäsitteilyllä testattiin eri muuttujien vaikutusta lopputuotteeseen, kuten oligonukleotidin puhtaus ja tavoitellun sekvenssin oikeellisuus. Muuttujia synteesiajojen välillä olivat synteesin skaala, kytkentäaika, suojaryhmän (DMT) poistamiseen tarvittavan dikloorietikkahapon määrä, fosforamidiitin määrä ekvivalentteina ja synteesin jälkeinen käsittely. Synteesiseissä testattiin myös miten modifioidun nukleotidin käyttö kuivattuna ja kuivaamattomana vaikuttaa nukleotidien kytkentäreaktioon. Synteesiajot on nimetty ON ja synteesin numero.

Synteesin skaala eli mittakaava tarkoittaa ensimmäisen kantajaan sidotun nukleosidin nimellistä määrää μmol :na grammassa. Skaala voidaan laskea kertomalla kantajan massa kantajassa olevalla nukleotidin kuormituksella.⁴

Kytchentäaikana amidiitin ja aktivaattorireagenssin sekoitusta pumpataan kolonnin läpi. Laitteiston venttiilit on asetettu niin, että samaa amidiitin ja aktivaattorin määrää kierrätetään suljetussa linjastossa kolonnin läpi tietty aika, kunnes venttiilit avataan ja seos johdetaan jätteeseen. Samalla kun amidiittia ja aktivaattoria kierrätetään kolonnin läpi, seos kulkee myös johtokykykyvetin läpi.^{3,4} Kytkennän aikana mitattavan johtokyvyn tulisi pienentyä koko ajan, koska amidiittia tarttuu kantajaan. Jos kytkentäaika on asetettu liian lyhyeksi, seuraavaa lisättävää nukleotidia ei ehdi reagoimaan tarpeeksi. Seuraavan synteesisyklin kohdalla tämä näkyy niin, että poistettavia trityyliryhmiä on vähemmän johtuen lisätyn nukleotidin määrän vähyydestä ja lopputuotteen saanto pienenee.⁴

Kytkenän tehokkuutta jokaisen amidiitin kohdalla voidaan seurata synteesin edetessä. DMT-suojaryhmän poistuessa aina edellisestä nukleotidista

happokäsittelyvaiheessa eli nukleotidi detrityloituu, DMT muodostaa oranssin karbokationin, jonka intensiteettiä mitataan liuksen kulkiessa UV-monitorin kyvetin läpi. Tuloksena saadaan detritylointipiikin pinta-ala eli tritylointivaste. Saatu intensiteetti on suoraan verrannollinen irronneiden DMT-molekyylien määrään. Synteesin edetessä saatua detritylointipiikin pinta-alaa verrataan aina edelliseen saman nukleotidin DMT-piikin pinta-alaan.^{4,9} Piikin pinta-alan kynnyksarvoksi on asetettu 75 %. Mikäli pinta-ala menee alle tämän arvon, synteesi pysähtyy liian heikon kytkennän vuoksi. DMT-suojaryhmän poistamiseen tarvittavan dikloorietikkahapon määrä riippuu synteesin skaalasta ja käytetystä kantajasta. CPG:stä DMT-molekyylien poistuminen kestää pidempään kuin polystyreenistä, joten dikloorietikkahappoa tarvitaan enemmän. Pienessä 1 µmol skaalassa määrä asetettiin itse, mutta isommissa 15 ja 17 µmol skaalassa synteesilaitteisto monitoroi itse tarvittavan määrän. DMT-suojaryhmän poistumista monitoroidaan UV-mittauksella ja DMT-kationin oranssin värin absorboituminen voidaan havaita aallonpituudella 495 nm. Pienemmässä skaalassa aallonpituus asetettiin 500 nm:n. Isommissa skaaloissa, aallonpituudeksi asetettiin 400 nm. Aallonpituus oli vähän syrjässä oikeasta, koska DMT-molekyyliä oli enemmän. Käytettäessä polystyreenikantajaa dikloorietikkahapon määrä oli oletusarvon mukainen eli 5 millilitraa, mutta käytettäessä CPG-kantajaa määrä nostettiin 7 millilitraan.

Fosforamidiitin määrä ekvivalentteina tarkoittaa paljonko amidiittia käytetään ylimäärin kytkennässä. Kantajaan tuotava amidiitti reagoi kantajassa valmiina olevan nukleosidin kanssa 1:1 eli yhden ekvivalentin verran. Tällöin esimerkiksi 12 ekvivalenttia tarkoittaa 12 kertaa sitä amidiitin määrää kuin mitä todellisuudessa reagoi. Kytkentäreaktio saadaan etenemään nopeasti ja tehokkaasti, kun amidiittia käytetään ylimäärin.

4.4 Oligonukleotidin irrotus kantajasta ja suojaryhmien poisto

Oligonukleotidi on 3'-päästensä kiinnittyneenä kantajaan linkkerimolekyylin välityksellä. Linkkerimolekyylin on oltava stabiili synteesissä käytetyille

reagensseille, mutta helposti lohkaistavissa synteesin jälkeen. Sen jälkeen kun oligonukleotidi on irrotettu kantajasta, poistetaan viimeiset suojaryhmät. Poistettaviin suojaryhmiin kuuluvat eksosyklisen aminoryhmien suojaryhmät (bentsoyyli ja isobutyryyli) sekä fosfaattiryhmän 2-syanoetyyliryhmä. Oligonukleotidin 5'-päässä oleva viimeisessä kytkennässä jäänyt DMT-suojaryhmä on myös poistettava, jotta 5'-päähän jää pelkkä hydroksyyliiryhmä. DMT-suojaryhmä poistettiin synteesilaitteistolla. Näin ollen viimeisen nukleotidin lisäyksen jälkeen synteesilaitteisto teki vielä yhden DMT-suojaryhmän poistovaiheen.^{9,12,22}

4.4.1 NaOH + AMA-käsittely

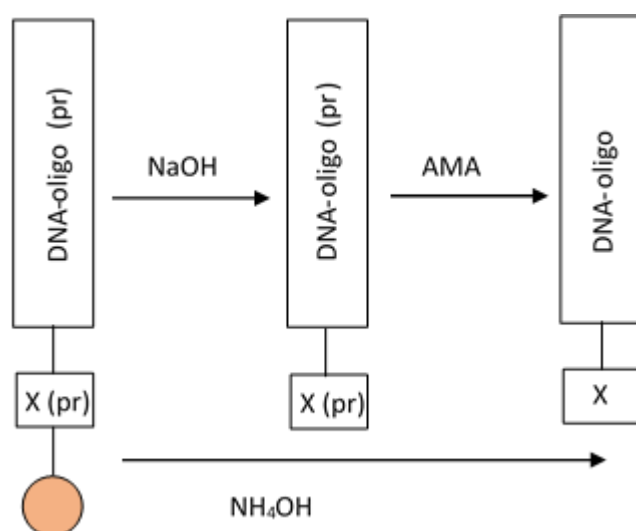
Tässä työssä käytettiin yhtenä kantajasta irrotus ja suojaryhmien poisto menetelmänä natriumhydroksidi sekä ammoniakki/metyyliamiini (AMA) käsittelyä. Synteesin jälkeen kantajassa vielä kiinni olevaa oligonukleotidia käsiteltiin natriumhydroksidilla. Natriumhydroksidi irrottaa oligonukleotidin kantajasta, mutta DNA:n amidityyppiset suojaryhmät säilyvät. Kantajamateriaali siirrettiin erilliseen Eppendorf-putkeen, mikäli kolonni oli itse pakattu ja lisättiin natriumhydroksidiliuos. Valmiiksi pakatun kolonnin molempiin päihin liitettiin ruiskut ja natriumhydroksidia ruiskutettiin kolonnin läpi edestakaisin. Sen jälkeen kun oligonukleotidi oli irrotettu kantajasta, tehtiin suojaryhmien poisto ammoniakki/metyyliamiiniliuoksella 55 °C:ssä.²³

4.4.2 Ammoniakkikäsittely

Tässä työssä käytettiin myös ammoniakkikäsittelyä oligonukleotidin irrottamiseksi kantajasta ja suojaryhmien poistomenetelmänä. Kantaja siirrettiin erilliseen putkiloon, johon lisättiin väkevää ammoniakia (28,0-30,0 % NH₃ (aq)). Oligonukleotidi irtoaa kantajasta väkevässä ammoniakissa huoneenlämmössä noin tunnissa. Eksosyklisen aminoryhmien suojaryhmien poistamiseksi oligonukleotidin sisältävä ammoniakki oli kuitenkin kuumennettava 55 °C:een ja käsittelyä jatkettiin yön yli. Bentsoyyliiryhmä

poistuu nopeasti, mutta isobutyryylin ammonolyysi vaatii pidemmän käsittelyajan. Fosfaattiryhmän 2-syanoetyyliryhmä poistuu nopeasti johtuen elektroneja puoleensa vetävän syanoryhmän viereisen hiiliatomin vetyjen erittäin happamasta luonteesta. Tätä mekanismia kutsutaan β -eliminaatioreaktioksi, jossa β -sidos nukleofiiliseen elektronipariin katkeaa. Nukleofiilinen elektronipari johtaa uuteen π -sidokseen, kun lähtevä ryhmä poistuu.^{9,12}

Kuvassa 11 on vielä havainnollistettuna kahden edellä mainitun menetelmän erot. Lyhenne pr kuvaa suojaryhmiä ja X modifioitua nukleotidia.



Kuva 11. Oligonukleotidin irrotus kantajasta ja suojaryhmien poisto.

4.5 UPLC-MS-analyysi

Nukleiinihappojen molekyyli­massan määrittäminen massaspektrometrialla on yksi tarkimmista menetelmistä analysoida oligonukleotidejä. Keskeisiä tekniikoita ovat ns. pehmeän ionisaation menetelmät, kuten MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) ja ESI (electrospray ionization) massaspektrometria. Oligonukleotideista saatavat massaspektrit ovat selkeitä ja spektrejä voidaan käyttää apuna syntetisoitujen oligonukleotidien rekenteen tai halutun modifioinnin onnistumisen tarkistamiseen.^{9,24}

MALDI-TOF massaspektrometriassa nukleiinihaponäyte kiteytetään sopivan matriisiliuoksen (esim. 3-hydroksipikoliinihappoliuos) avustuksella metallilevyn pintaan. Matriisikiteitä eksitoidaan esimerkiksi ultraviolettisäteen impulssilla korkeassa vakuuissa. Tämän seurauksena näytteen vahingoittumattomat molekyylit desorptoituvat kaasufaasiin ja ionisoituvat UV-säteilystä, joka tuottaa pääasiassa yksivaraussisia ioneja. Ionit analysoidaan TOF-massaspektrometrilla, joka erottelee ionit massan perusteella. Tyypillinen massan mittaaminen, jossa on mukana tunnistus ja spektrin tulkinta vie alle 10 sekuntia. Tämän menetelmän käyttö on mahdollista myös oligonukleotideille, joiden massa voi olla peräti 15000 Da eli oligonukleotidissa on noin 50 monomeeria.⁹

ESI massaspektrometriassa näytteet ionisoidaan liuoksen pienistä pisaroista korkean jännitteen avulla. ESI ionisaatio pystyy tuottamaan nukleiinihappoista monivaraussellisia ioneja, koska oligonukleotidien fosfaattiryhmistä voi irrota useampia protoneja. Tämä mahdollistaa korkean massaisten nukleiinihappomolekyylien havaitsemisen suhteellisen matalilla massan ja varauksen suhteilla. Verrattuna muihin biofysikaalisiin tutkimusmenetelmiin kuten NMR, spektroskopia ja kromatografia, ESI-MS:n etuna on menetelmän herkkyys sekä määrityksen nopeus. Oligonukleotidien tutkimisessa käytetään useasti negatiivista ionisaatiota johtuen siitä, että sokerifosfaattirakenne on herkkä deprotonoitumaan. ESI-kapillaarin jännitteen ollessa negatiivinen, muodostuvat pisarat sisältävät ylimäärin negatiivisia varauksia. Oligonukleotidien moolimassojen ja moninkertaisesti varautuneiden ionien massan ja varauksen suhteen laskemiseen on saatavilla ohjelma internetistä.^{9,25}

Tässä työssä oligonukleotidinäytteet ajettiin UPLS-MS-laitteistolla, jossa massa-analysointina oli TOF ja ionisaatio tehtiin sähkösumutus-ionisaatiolla eli ESI:lla. Ajoparametrit ovat esitettyinä taulukossa 1.

Taulukko 1. Oligonukleotidinäytteen UPLC-MS ajoparametrit

Laitteisto	UPLC-pumppu ja ohjausyksikkö UV (200–500 nm) ja MS-laitteisto
Kolonne	Waters Acquity UPLC OST C18 1.7 μ m, 2.1*100 mm
Eluentti	Ajoliuos A: 8.6 mM TEA/200 mM HFIP Ajoliuos B: MeOH Vahva pesuliuos: 10 % MeOH vedessä Heikko pesuliuos: 1-lk vesi
Virtausnopeus ja kolonnin lämpötila	0.2 ml/min, 60 °C
Näytteensyöttö	5 μ l, partial loop
Detektio	260 nm, MS negatiivinen moodi

TEA: trietyyliamiini, HFIP: heksafluoroisopropanoli, MeOH: metanoli

Ennen varsinaisia oligonukleotidinäytteitä ajettiin kaksi tyhjää gradienttia, joissa näytteenä käytettiin pelkkää vettä kolonnin tasapainottamiseksi. Ajo oltaisiin voitu tehdä myös ilman mitään näytettä eli kolonnin läpi olisi ajettu pelkkää eluenttia. Veden käyttäminen näytteenä puhdisti kuitenkin samalla injektorin edellisen käyttäjän mahdollisista näytejäämistä. Saaduista massaspektreistä tarkistettiin ionisaatiosarja antamalla oikea sekvenssi Mongo Oligo Mass Calculator-ohjelmaan, joka laski teoreettisen ionisaatiosarjan.

5 TULOSTEN KÄSITTELY

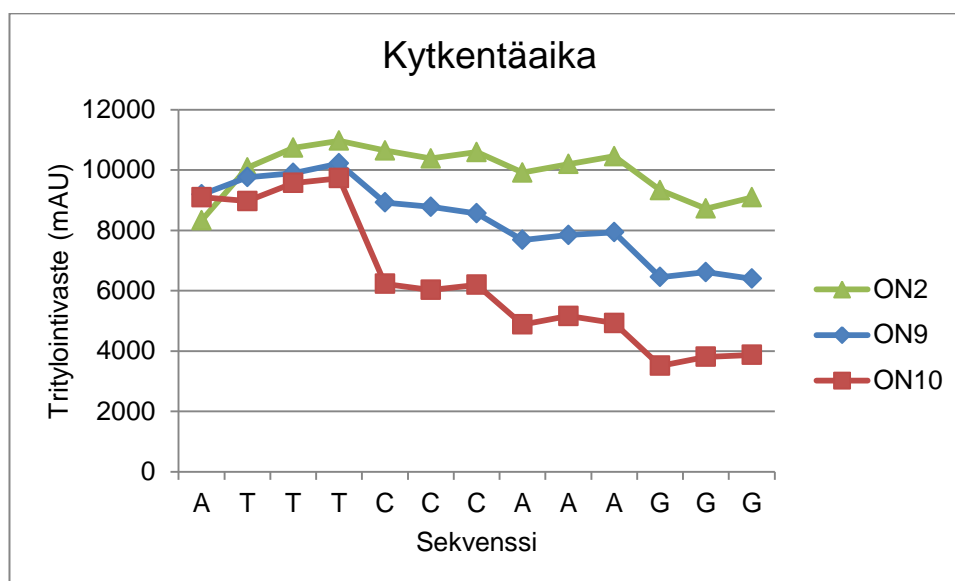
Laitekvalifioinnin testisynteeseiden tarkoituksena oli todentaa oligonukleotidisynteisiin luotujen synteessimenetelmien toimivuus kahdella eri kantajamateriaalilla, huokoinen lasi (CPG) ja polystyreeni (PS), ja eri synteesiskaaloilla (1-17 μmol). Synteessimenetelmien testauksessa syntetisoitiin DNA-oligonukleotideja, joissa oli käytössä kaikki luonnolliset DNA-emäkset. Testauksessa todennettiin myös synteasilaitteiston kyky lisätä modifioituja fosforamidiitteja DNA-oligonukleotidiketjuun. Tätä varten käytettiin toimeksiantajan omaa modifioitua amidiittia. Synteessimenetelmien testaus tehtiin mukailen toimeksiantajan TREC-koettimen tuotannon eräohjetta.

Laitteisto mittaa synteessin tehokkuutta trityylivasteen eli DMT-suojaryhmän poistumisen avulla jokaisen kytkennän jälkeen. Tritylaintivastetta käytettiin sekä testisynteeseissä hyväksymiskriteerinä että osoittamaan synteasilaitteiston suorituskykyä. Tritylaintivasteen mukaan kytkentätehokkuus jokaisen yksittäisen emäskytkennän jälkeen on oltava $\geq 90\%$. Laitekvalifioinnissa testattiin kaksi eri kantajaa. Laitevalmistajalla oli laitteistossa valmiita menetelmiä oligonukleotidien syntetisoimiseksi PS-kantajaa käyttäen. Testauksen yhteydessä luotiin menetelmät myös CPG-kantajalle sekä testattiin menetelmien toimivuus.

Laitteen toimivuus osoitettiin syntetisoimalla laitevalmistajan valtuuttamien kouluttajien testinä käyttämään DNA-oligonukleotidisekvenssiä 5'-GGGAAACCCTTA-3' ja synteeseit tehtiin minimi- ja maksimiskaaloilla sekä PS-että CPG-kantajilla. PS-kantajalla käytetty skaala oli välillä 1-17 μmol ja CPG-kantajalla 1 μmol . Taulukossa 2 on esitetty synteesisparametrit eri kytkentäaikojen testaamiseksi eri kantajilla ja kuviossa 1 on synteeseistä saatujen tritylaintivasteiden kuvaaja.

Taulukko 2. Synteesiparametrit kytkentäajan testaukseen

Oligo	Skaala (μmol)	Kytkeä DNA (min)	Kantajamateriaali
ON2	1	0,5	PS
ON9	1	2	CPG
ON10	1	0,5	CPG



Kuvio 1. Kytkeäajan testaus eri kantajamateriaaleilla

Kytkeäaika kuvaajasta (kuvio 1) voitiin todeta, että käytettäessä PS-kantajaa kytkeäaika voitiin pitää lyhyempänä, mutta kytkeä oli silti tehokas. CPG-kantajaa käytettäessä kytkeäajan oli oltava vähintään kaksi minuuttia, jotta lisättävä amidiitti ehti reagoida tarpeeksi. Synteesin ON10 kuvaaja havainnollistaa poistuvien trityyliryhmien määrän olevan pienempi kuin synteseillä ON2 ja ON9. Tämä vaikuttaa suoraan synteesin saantoon alentavasti. Kuvaajan perusteella voidaan kuitenkin todeta CPG-kantajan soveltuvan uudelle synteesilaitteistolle, jos kytkeäaika on 2 minuuttia ja DMT-suojaryhmän poistamiseen tarvittavan dikloorietikkahapon määrää lisättiin synteesissä.

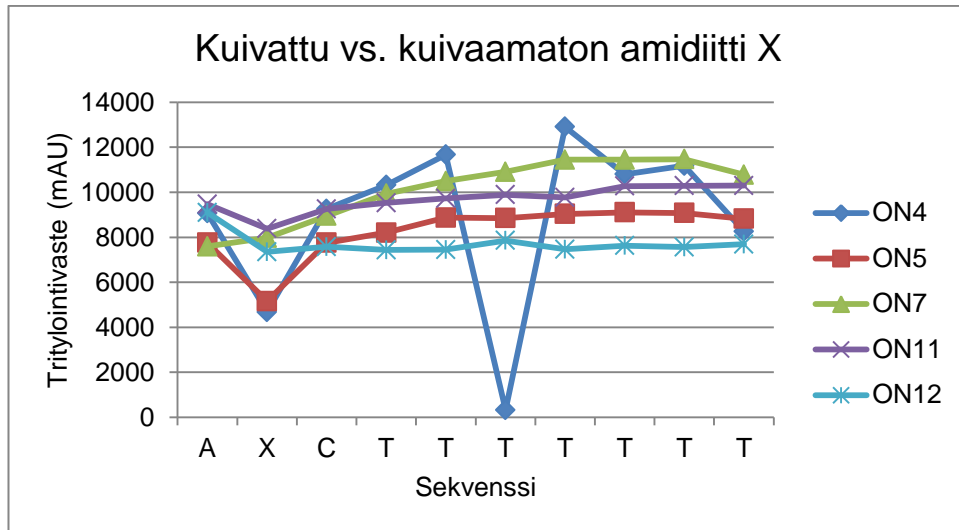
DNA-synteesin onnistuminen osoitettiin käyttämällä laitteistossa myös toimeksiantajan omaa modifioitua amidiittia oligonukleotidisekvensseissä 5'-TTTTTTCXA-3' ja 5'-TTTTTTCXT-3', joissa X kuvaa modifioitua amidiittia. Hyväksymiskriteerinä käytettiin tritylointivastetta. Tritylointivasteen käyrän muoto on sekvenssiriippuvainen, mutta jokaisella kerralla samanlainen.

Taulukossa 3 on esitetty synteesiparametrit kuivatun ja kuivaamattoman amidiitti X:n testaamiseksi eri kantajilla.

Taulukko 3. Synteesiparametrit kuivatun ja kuivaamattoman amidiitti X:n testaamiseen

Oligo	Skaala (μmol)	Detritylointi-reagenssin V (ml)	Detrityloinnin havaitsemisen λ (nm)	Amidiitin kuivaus	Kantajamateriaali
ON4	1	5	500	kuivaamaton	PS
ON5	1	5	500	kuivaamaton	PS
ON7	1	5	500	kuivattu	PS
ON11	1	7	500	kuivattu	CPG
ON12	1	7	500	kuivattu	CPG

Synteeseistä saaduista tritylointivasteista ja sekvenssistä saatiin kuvion 2 kuvaaja.



Kuvio 2. Kuivatun ja kuivaamattoman amidiitti X:n testaus eri kantajamateriaaleilla

Kuivatun ja kuivaamattoman amidiitin vertailussa voitiin kuvaajan (kuvio 2) perusteella todeta, että amidiitti X:n kuivaaminen ennen synteesiä paransi kytkennän tehokkuutta. Synteesein ON7, ON11 ja ON12 erona oli, että ON7 on syntetisoitu PS-kantajalla, jolloin kytkentäaika ja DMT-suojaryhmän poistamiseen tarvittavan dikloorietikkahapon määrä voitiin pitää pienempänä. Vastaavasti synteeseissä ON11 ja ON12 molempia oli nostettava, koska kantajana käytettiin CPG:ta.

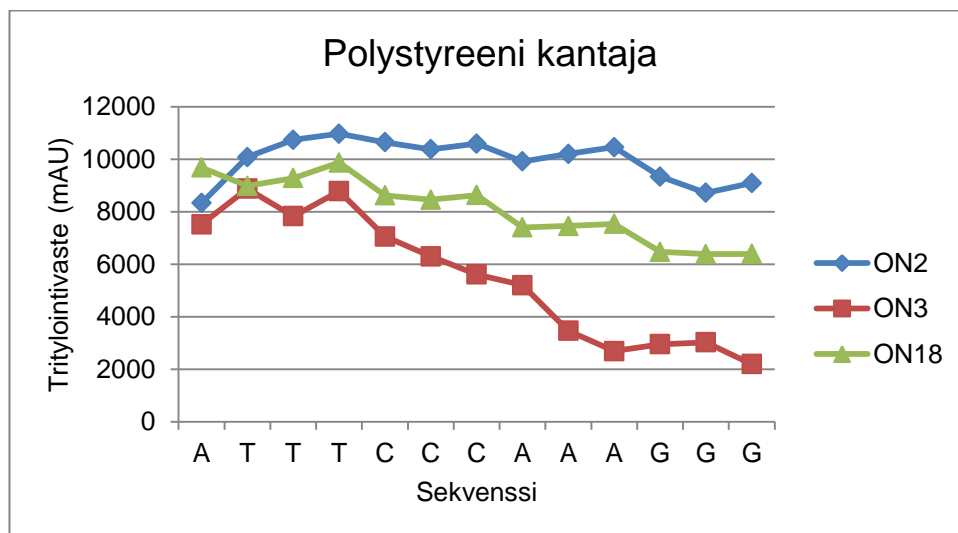
Kuvaajaan on myös otettu mukaan synteesi ON4, joka epäonnistui letkutaitteen vuoksi. Tällä haluttiin osoittaa se, että mikäli synteesin aikana jokin letku esimerkiksi taittuu laitteiston sisällä, vika on heti huomattavissa tritylointivasteen romahtamisena. Taittuneen letkun tilalle vaihdettiin uusi ehjä letku ja synteesiä jatkettiin siitä mihin se oli pysähtynyt.

Taulukossa 4 on esitetty synteesiparametrit amidiittimäärän (ekvivalentteina) testaamiseksi PS-kantajalla.

Taulukko 4. Synteesiparametrit amidiittimäärän testaamiseen

Oligo	Skaala (μmol)	Amidiitin määrä (ekvivalentteina/DNA-oligo)
ON2	1	12
ON3	1	6
ON18	1	12

Synteseistä saaduista tritylointivasteista saatiin kuvion 3 kuvaaja.



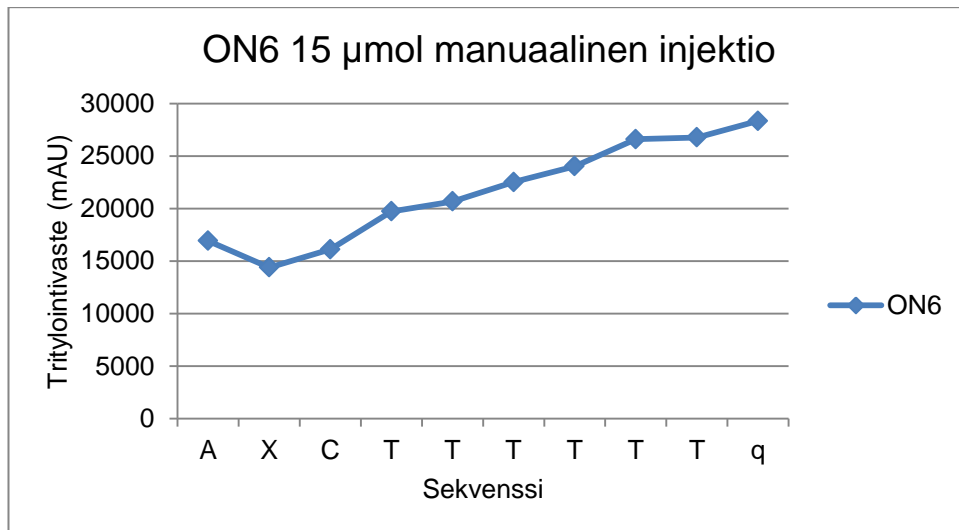
Kuvio 3. Amidiittimäärän testaaminen PS-kantajalla

Reagoivan amidiitin 12-kertainen ylimäärä nopeutti synteesin etenemistä verrattuna 6-kertaiseen määrään. Kuviossa 3 esitettyjä synteesejä ON2, ON3 ja ON18 vertaamalla voitiin todeta, että 12-kertainen amidiittiyylimäärä paransi kytkennän tehokkuutta merkittävästi.

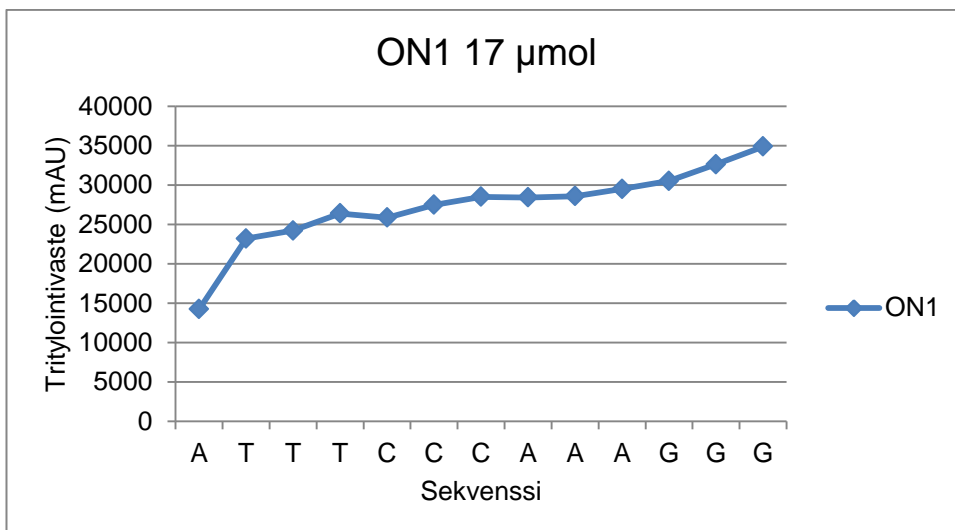
Lisäksi PS-kantajalla testattiin synteesiskaalat 15 μmol (ON6) ja 17 μmol (ON1). Synteesissä ON6 tehtiin viimeisen T-amidiitin lisäys manuaalisena injektiona suoraan kolonniin käyttäen oligonukleotidisekvenssiä 5'-qTTTTTTCXA-3'. Sekvenssissä oleva q kuvaa emästä, joka on injektoitu itse manuaalisesti kolonniin. Manuaalisen injektion tarkoituksena on säästää amidiittireagenssien

kulutuksessa, jolloin reagenssia ei kulu turhaan letkustoihin ja niiden huuhteluun. Mikäli käytettävissä on vain pieni määrä amidiittia tai se on kallista, on tärkeää minimoida sen kulutus mahdollisimman pieneksi. Muut emäkset ovat laitteiston lisäämiä. Sekvenssiin laitettiin itse injektoitava emäs jollakin muulla kirjaintunnuksella, jotta laitteisto pystyy erottamaan sen normaalisti lisättävistä. Synteessissä käytetty amidiitti X oli kuivattua. Synteessissä ON1 käytettiin edellä mainittua kouluttajien testisekvenssiä.

Synteeseistä saaduista tritylointivasteista ja sekvenssistä saatiin seuraavat kuvaajat, kuvio 4 ja kuvio 5.



Kuvio 4. Synteesiskaalan 15 µmol testaus



Kuvio 5. Synteesiskaalan 17 μmol testaus

Kuvioiden 4 ja 5 kuvaajien perusteella voitiin todeta, että trityylivasteet ovat samaa luokkaa koko synteesin ajan. Tämän perusteella synteesit suuremmilla kuin 1 μmol skaalalla voitiin todeta onnistuneiksi.

Oligonukleotidin irrotusta kantajasta ja suojaryhmien poistoa testattiin kahdella eri menetelmällä. Toisena käytettiin tapaa, jossa oligonukleotidi irrotettiin kantajasta natriumhydroksidilla ja suojaryhmät poistettiin tämän jälkeen ammoniakki/metyyliamiini käsittelyllä. Toisessa menetelmässä kantajassa kiinni olevaa oligonukleotidia käsiteltiin väkevällä ammoniakilla, jolloin kantaja ja suojaryhmät poistettiin yhtä aikaa.

Lopuksi syntetisoidun oligonukleotidin oikeellisuus varmistettiin massaspektrometrisesti. Synteesin ON1 oligonukleotidista, jonka irrotus kantajasta tehtiin väkevällä ammoniakilla, ajettiin UPLC-MS-ajo. Ajosta saatu grammi on liitteenä 1. Mongo Oligo Mass Calculator-ohjelmaan annettiin synteesissä ON1 käytetty sekvenssi ja laskettiin teoreettinen ionisaatiosarja negatiivisessa moodissa. Taulukossa 5 on esitettyä Mongo Oligo Mass Calculator-ohjelmasta saatu teoreettinen ionisaatiosarja.

Taulukko 5. Oligonukleotidin ON1 teoreettinen ionisaatiosarja

Sekvenssi 5'- GGGAAACCCTTTA -3'	
Ionisaatiosarja	
varaus	m/z
- 2	1978,31
- 3	1318,54
- 4	988,65

Oligonukleotidin ON1 massaspektristä havaittiin seuraavat molekyyli­massat, MS(ESI): m/z 1977,87 [M-2H]²⁻, 1318,24 [M-3H]³⁻ ja 988,43 [M-4H]⁴⁻. Ohjelmalla laskettiin myös oligonukleotidin ON1 teoreettinen molekyyli­massa ja tulokseksi saatiin M = 3958,65. Todellinen molekyyli­massa laskettiin käyttämällä verrantoa

$$m(\text{ioni}) = \frac{M - n(\text{lohkeavien vetyjen lkm})H}{\text{ionin varaus}}$$

jossa

M = laskettava molekyyli­massa

m(ioni) = spektristä havaitun ionin massa

H = vedyn moolimassa

Taulukossa 6 on laskettuna jokaisesta ionista todellinen molekyyli­massa

Taulukko 6. Ionien todelliset molekyyli­massat

m/z	Todellinen molekyyli­massa
1977,87	3957,75
1318,24	3957,74
988,43	3957,75

Massaspektristä havaittuja ja Mongo Oligo Mass Calculator-ohjelmalla laskettuja molekyyli-massoja vertaamalla voitiin todeta, että syntetisoidun oligonukleotidin rakenne oli oikea verrattuna teoreettiseen. Ajosta saatu UPLC-grammi osoitti yhden selkeän tuotepiikin aallonpituudella 260 nm noin 1,5 minuutin kohdalla.

Toisena esimerkkinä synteessin ON7 oligonukleotidi, josta ajettiin myös UPLC-MS-ajo. Ajosta saatu grammi on liitteenä 2. Oligonukleotidin irrottamiseen kantajasta ja suojaryhmien poistoon käytettiin natriumhydroksidia ja ammoniakki/metyyliamiini käsittelyä toimeksiantajan aiemmin käytössä olevan metodin mukaisesti. Menetelmän toimivuus uuden laitteiston syntetisoimilla oligonukleotideilla haluttiin todentaa myöhempää oligonukleotidien tuotantoa varten. Ajosta saadussa UPLC-grammissa oli havaittavissa tuotepiikki noin 2 minuutin kohdalla. Lisäksi grammissa näkyi sivutuotepiikit johtuen amidiitti X:stä. Liitteessä 2 olevan grammin perusteella voitiin todeta toimeksiantajan ohjeistaman menetelmän toimivan uudella laitteistolla tuotetuilla oligonukleotideilla.

6 YHTEENVETO

Työn tavoitteena oli tehdä käyttöönottokvalifiointi uudelle DNA-syntetisaattorille. Opinnäytetyöhön sisältyi ainoastaan asennuksen ja toiminnan kvalifiointi. Kvalifioinnin aikana kirjoitettiin kvalifiointisuunnitelma laitteen toimintojen hyväksymiskriteerien määrittämiseksi. Suunnitelman Kvalifioinnin ohjausryhmällä hyväksyttämisen jälkeen tehtiin suunnitelmassa määritellyt toimenpiteet. Kvalifioinnista saadut tulokset dokumentoitiin kvalifiointiraporttiin, joka hyväksyttiin myös Kvalifioinnin ohjausryhmällä. Kvalifiointi voitiin hyväksyä, kun kaikki määritellyt hyväksymiskriteerit täyttyivät.

Kvalifiointiraportin valmistuttua synteasilaitteisto oli toimintavalmis. Laitteistoa ei kuitenkaan otettu vielä tuotannolliseen käyttöön vaan sillä tehtiin vielä lisätestauksia sekä päivitettiin käyttö- ja huolto-ohjeet. Laitteistolla tehtyjen testisynteeseiden avulla todennettiin luotujen oligonukleotidisynteesimenetelmien toimivuus huokoisella lasi (CPG) ja polystyreeni (PS) -kantajilla. Synteasilaitteisto on suunniteltu niin, että sillä käytetään kantajana polystyreeniä. Testisynteeseissä testattiin ensimmäistä kertaa CPG-kantajan soveltuvuutta laitteistolla. Huokoisen lasikantajan todettiin soveltuvan käytettäväksi laitteistolla, kun synteesimenetelmän kytkentäaika pidennettiin ja DMT-suojaryhmän poistoon tarkoitettun dikloorietikkahapon määrää lisättiin verrattuna polystyreenin kanssa käytettävään metodiin. Synteeseissä käytetyn amidiittylimäärän todettiin parantavan kytkennän tehokkuutta samoin kuin kuivatun amidiitti X:n käyttö kuivaamattoman sijaan. Testisynteeseissä testattiin suurempien kuin 1 μmol synteesiskaalojen toimivuus. Testisynteeseit tehtiin skaaloissa 15 μmol ja 17 μmol . Synteeseistä saatujen tritylointivasteiden perusteella voitiin todeta vasteiden olevan kussakin synteeseissä samaa luokkaa, joten synteesi oli onnistunut. Syntetisoitujen oligonukleotidien oikeellisuus varmennettiin massaspektrometrisesti ajamalla oligonukleotideista UPLC-MS-spektri. Oligonukleotidin spektristä havaittuja molekyyli-massoja verrattiin Mongo Oligo Mass Calculator-ohjelmalla laskettuihin teoreettisiin molekyyli-massoihin. Todelliset molekyyli-massat vastasivat teoreettisia, joten

oligonukleotidin rakenne voitiin todeta oikeaksi. Kummankin oligonukleotidin irrottamiseksi kantajasta ja suojaryhmien poistoon käytetyn menetelmän todettiin toimivan uudella synteesilaitteistolla tuotetuilla oligonukleotideilla. Massaspektrometrisessä ajossa voitiin havaita tuotepiikit samalla aikavälillä molemmissa menetelmissä.

Kvalifioinnin tuloksien perusteella voitiin todeta laitteen toimivan sille määritetyillä toimintaparametreilla hyväksyttävästi. Laitteen käyttämän kemian voitiin todeta toimivan ja laitteella pystyttiin tuottamaan haluttua oligonukleotidisekvenssiä. DNA-syntetisaattori ei kuitenkaan ollut vielä valmis tuotantoonsiirtoon, koska laitteella ei oltu tehty minkäänlaisia karakterisointitestejä liittyen toimeksiantajan valmistaman oligonukleotidin syntetisoimiseksi. Tuotteeseen liittyvät karakterisointitestit ja muut synteesimenetelmien luomiseen liittyvät toimet sekä myöhemmin tuleva tuotantoonsiirto eivät enää kuuluneet osaksi tätä työtä vaan jatkuivat toisen henkilön toimesta.

LÄHTEET

- ¹ Analytical Instrument Qualification and System Validation. 2009. Agilent Technologies. Viitattu 19.03.2016. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-3288EN.pdf>.
- ² PerkinElmer Wallac Oy, menettelyohje 13905773: Kvalifiointimenettely.
- ³ ÄKTA oligopilot plus 10 Installation Qualification & Operational Qualification Protocol. 2015. GE Healthcare.
- ⁴ ÄKTA oligopilot plus User Manual. 2010. GE Healthcare.
- ⁵ The Global Harmonization Task Force: Quality Management Systems – Process Validation Guidance N99-10:2004. Edition 2.
- ⁶ EudraLex: Volume 4 Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines. Annex 15 Qualification and Validation. 06.02.2014.
- ⁷ Hogrefe, R. A Short History of Oligonucleotide Synthesis. TriLink Biotechnologies. Viitattu 24.02.2016 . http://www.trilinkbiotech.com/tech/oligo_history.asp.
- ⁸ Wei, Xia. 2013. Coupling activators for the oligonucleotide synthesis via phosphoramidite approach. *Tetrahedron*. Vol. 69(18).
- ⁹ Blackburn, G.M.; Gait, M.J.; Loakes, D. & Williams, D.M.2006. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. 3rd edition. The Royal Society of Chemistry.
- ¹⁰ Hiltunen, E. *et al.* 2010. Galenos: Johdanto lääketieteen opintoihin. 1.-2. PAINOS. Helsinki: WSOYpro Oy.
- ¹¹ Heino, J. & Vuento, M. 2007. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. Helsinki: WSOY.
- ¹² Brown, Tom & Brown, Tom Jr. 2014. *Nucleic Acids Book. Solid-phase oligonucleotide synthesis*. ATDBio. Viitattu 26.01.2016. <http://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis>
- ¹³ PerkinElmer Wallac Oy, EnLite™ Neonatal TREC kit insertti. Luettu 28.09.2015
- ¹⁴ Haavisto, S. 2015. MDx koulutusmateriaali. Projektityö. Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma. Turun ammattikorkeakoulu.
- ¹⁵ Buckley, R.H. 2012. The long quest for neonatal screening for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Vol. 129(3).
- ¹⁶ Kwan, A. & Puck, J.M. 2015. History and current status of newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Seminars in Perinatology*. Vol.39(3).
- ¹⁷ Al-Harhi, L. *et al.* 2000. Detection of T cell receptor circles (TRECs) as biomarkers for *de novo* T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). *Journal of Immunological Methods*. Vol.237(1-2).
- ¹⁸ Díaz-García, M.E.; Pina-Luis, G.; Rivero, I.A. 2006. Combinatorial solid-phase organic synthesis for developing materials with molecular recognition properties. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 25(2).
- ¹⁹ Albericio, F. 2000. *Solid-phase synthesis: A Practical Guide*. CRC Press.

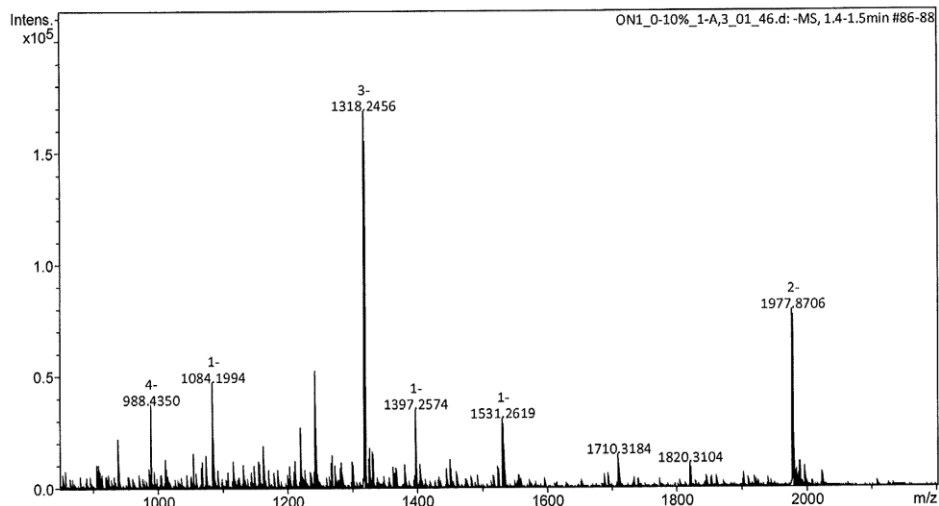
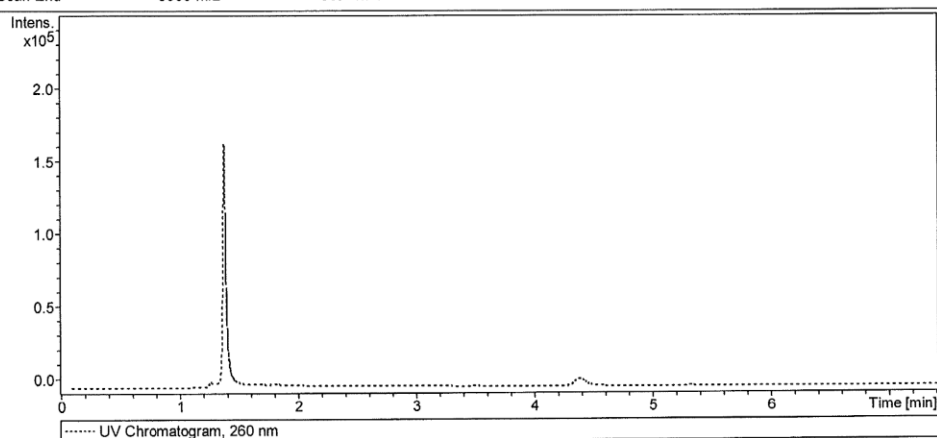
- ²⁰ Labadie, J.W. 1998. Polymeric supports for solid phase synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*. Vol.2(3).
- ²¹ Albericio, F. & Martin, F.G. 2008. Solid supports for the synthesis of peptides. *Chemistry Today*. Vol. 26(4)
- ²² Caruthers, M.H. 1985. Gene Synthesis Machines: DNA Chemistry and Its Uses. *Science*. Vol.230(4723).
- ²³ Deprotection-Volume 4- Alternatives to ammonium hydroxide. Glen Research. Viitattu 14.09.2016. <http://www.glenresearch.com/GlenReports/GR22-18.html>
- ²⁴ Gong, L. & McCullagh, J.S.O. 2011. Analysis of oligonucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to negative ion electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Vol.1218(32).
- ²⁵ Suomen massaspektrometrian seura ry. Ketola, R.; Kostianen, R.; Kotiaho, T. & Vainiotalo, P. 2010. *Massaspektrometrian perusteet*. Helsinki: Hakapaino.

Synteesin ON1 UPLC-MS-spektri

Display Report

Analysis Info
Analysis Name D:\Data\Teija\ON1_0-10%_1-A,3_01_46.d Acquisition Date 12/11/2015 10:49:03 AM
Method tutkimus_oligo.m Operator orgaaninen kemia
Sample Name ON1_0-10% Instrument micrOTOF 213750.10319
Comment training oligonucleotide
17 umol

Acquisition Parameter
Source Type ESI Ion Polarity Negative Set Nebulizer 2.0 Bar
Focus Not active Set Dry Heater 190 °C
Scan Begin 50 m/z Set Capillary 4000 V Set Dry Gas 9.0 l/min
Scan End 3000 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Divert Valve Waste



Synteesin ON7 UPLC-MS-spektri

Display Report

Analysis Info

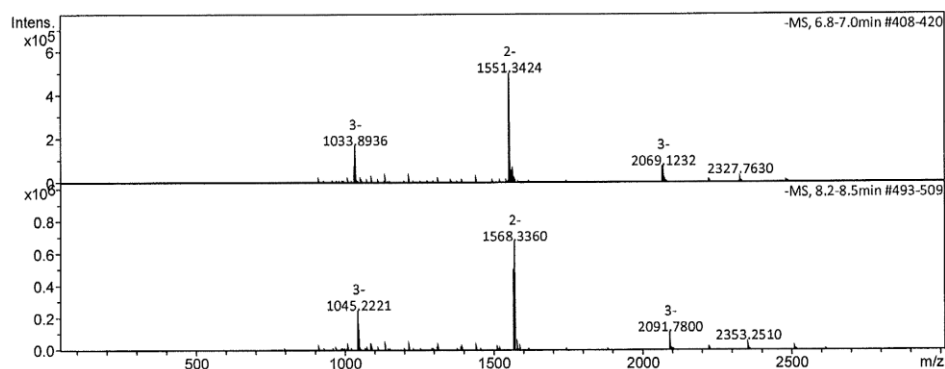
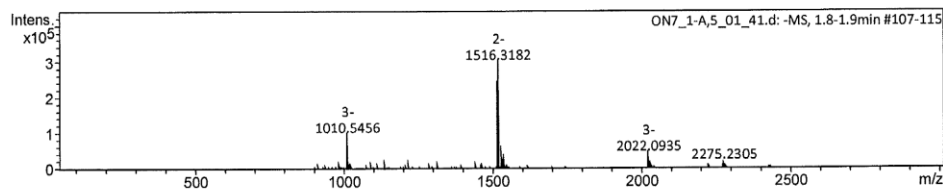
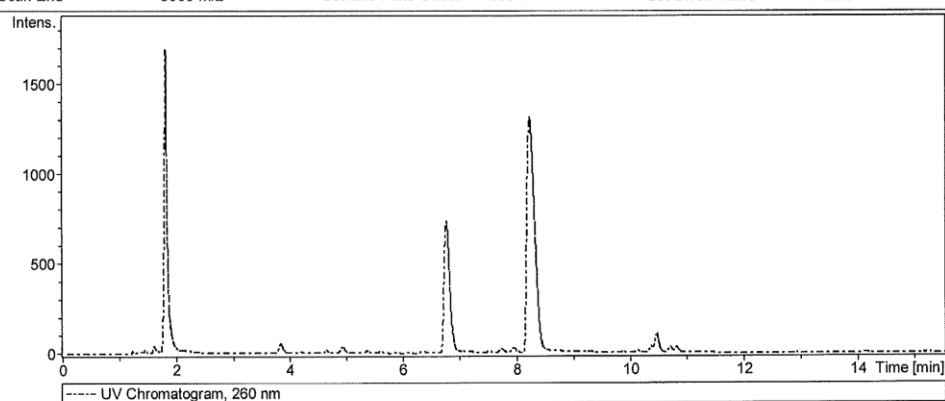
Analysis Name D:\Data\Teija\ON7_1-A_5_01_41.d
Method scid_oligosetti_kalibroinnilla.m
Sample Name ON7
Comment oligo kuivatulla [REDACTED]
1 umol
PS-kantaja

Acquisition Date 12/10/2015 6:15:49 PM

Operator orgaaninen kemia
Instrument micrOTOF 213750.10319

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	2.0 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	190 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4000 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Bruker Compass DataAnalysis 4.2

printed: 6/16/2016 12:27:43 PM

by: orgaaninen kemia

1 of 1