

Opinnäytetyö AMK

Bioanalytikkokoulutus

2021

Jenni Ali-Penttilä, Piia Pokkinen

**QIASYMPHONY-
ERISTYSAUTOMAATIN
SOVELTUVUUS ERI
KUDOSMATERIAALIEN DNA-
ERISTYKSEEN**

Jenni Ali-Penttilä, Piia Pokkinen

QIASYMPHONY-ERISTYSAUTOMAATIN SOVELTUVUUS ERI KUDOSMATERIAALIEN DNA- ERISTYKSEEN

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli suorittaa QIASymphony-eristysautomaatilla validointityö, josta on hyötyä Tyks Lääketieteellisen genetiikan laboratoriolle. QIASymphony-automaatti perustuu magneettipartikkeliteknologiaan, jossa DNA sidotaan päällystettyihin magneettipartikkeleihin. Toimeksianto saatiin Tyks Lääketieteellisen genetiikan osastolta. Validointityössä käytetyistä DNA:n lähtömateriaaleista on hyötyä tilanteessa, jossa verinäyte ei edusta potilaan omaa genomia, kuten allogeenisen kantasolusiirron saaneilla potilailla tai jos verinäytettä ei saada. Automatisoidun DNA-eristyksen etuja laboratoriolle ovat sen nopeus ja helppous, vaarallisten kemikaalien käsittelyn ja käytön väheneminen, mikä edistää työturvallisuutta sekä alkoholisaostusvaiheen poisjääminen, joka voi aiheuttaa DNA:n katkeilua.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, miten erityyppiset kudospäätteet ovat sovellettavissa DNA:n lähtömateriaalina, kun käytetään QIASymphony-eristysautomaattia. Validointiprosessiin kerättiin yhteensä 100 kpl sylki-, posken limakalvon epiteelisolu-, hius-, ja kynsinäytteitä vapaaehtoisilta luovuttajilta. Ennen eristystä kirjoitettiin työohjeet, jotka jäivät laboratorion käyttöön. DNA-eristys suoritettiin käyttämällä kudospäätteille sopivaa protokollaa, lisäksi testattiin kahta eri protokollaa sylki- ja posken limakalvonäytteille ja arvioitiin, kumpi niistä on käyttökelpoisempi. DNA-eristyksen jälkeen mitattiin DNA:n konsentraatio ja puhtaus QIAxpert-spektrofotometrilla.

Tutkimuksessa arvioitiin DNA:n määrän ja laadun riittävyttä laboratoriosprosessin vaatimuksiin ja validointiraportissa todettiin QIASymphony-automaatille käyttökelpoisiksi DNA:n lähtömateriaaleiksi sylki- ja poskenlimakalvon epiteelisolunäytteet sekä kynsinäytteet. Virtsanäytteiden todettiin soveltuvan lähtömateriaaliksi mitokondrio-DNA:n tutkimuksissa, joihin tarvitaan pieni määrä nukleiinihappoja. Tuloksista kirjoitettiin validointiraportti Lääketieteellisen genetiikan laboratoriolle.

ASIASANAT:

DNA, eristysmenetelmä, magneettipartikkeli, magneettipartikkeliteknologia, validointi, QIASymphony

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree Programme in Biomedical Laboratory
Sciences

2021 | 57 pages, 11 pages in appendices

Jenni Ali-Penttilä, Piia Pokkinen

SUITABILITY OF QIASYMPHONY AUTOMATED NUCLEIC ACID EXTRACTION UNIT FOR EXTRACTION OF DIFFERENT TISSUE MATERIALS

The aim of this thesis was to perform a validation using a QIASymphony extraction unit, the study is useful to the laboratory of Tyks Medical Genetics. QIASymphony is based on magnetic particle technology where DNA binds to covered magnetic particles. The assignment of this thesis was given by Tyks Medical Genetics. Different starting materials used in the validation study are valuable in situations where blood sample does not represent patient's own genome, for example with patients who have received an allogeneic stem cell transplant or if blood sample cannot be taken. Advantages of automated DNA extraction for the laboratory are quick and easy usability, reduced use and handling of hazardous chemicals, which promotes occupational safety and the omission of alcohol precipitation step that can cause DNA breakage.

The purpose of this thesis was to find out the usability of different types of tissue samples as DNA starting material when using QIASymphony. A total of 100 saliva, buccal mucosal, hair and nail samples were collected from volunteer donors for the validation process. Before DNA extraction, work instructions were written, and they were left to the laboratory for use. The extraction of DNA was performed by using a protocol suitable for the material, and in addition, two different protocols were tested on saliva and buccal mucosal samples to evaluate which one is more usable. After DNA extraction, the concentration and purity of DNA were measured with QIAxpert spectrophotometer.

The study evaluated the adequacy of the quantity and quality of DNA for the requirements of the laboratory process and in the validation report it was identified that saliva and buccal mucosal samples as well as nail samples were usable as DNA starting materials for QIASymphony. Urine samples were identified usable as a starting material for mitochondrial DNA analysis that requires a small amount of DNA. A validation report including the results was written for Tyks Medical Genetics.

KEYWORDS:

DNA, extraction method, magnetic particle, magnetic particle technology, validation, QIASymphony

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	7
1 JOHDANTO	9
2 DNA:N ERISTYSMENETELMÄT	10
2.1 Fenoli-kloroformi eristys	10
2.2 Silikamenetelmä	10
2.3 Anioninvaihtokromatografia	11
2.4 Magneettipartikkeliteknologia	11
3 DNA:N KONSENTRAATIO JA PUHTAUS	14
3.1 Spektrofotometria	14
3.2 Eristetyn DNA:n konsentraation ja puhtauden mittaaminen spektrofotometrillä	15
4 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS	16
5 TYÖSSÄ KÄYTETYT NÄYTEMATERIAALIT	18
5.1 Sylki	18
5.2 Posken limakalvon epiteelisolut	18
5.3 Hiustupet	18
5.4 Kynsi	19
5.5 Virtsa	19
6 VALIDOINTIPROSESSI	20
6.1 Validointiprosessi QIASymphony-automaatilla	21
7 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	22
7.1 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	22
7.2 Näytemateriaalinen kerääminen	23
7.3 Näytteiden esikäsittely	23
7.4 QIASymphony DSP DNA Midi ja Virus/Pathogen Mini -kitit	25
7.5 Näytteiden DNA-eristys QIASymphony-automaatilla	25
7.6 Eristetyn DNA:n mittaaminen QIAxpert-spektrofotometrillä	26
7.7 Qiaxpert raportin kuvaajat	27
7.8 Näytteiden hävittäminen	29

8 TUTKIMUSTULOKSET	30
9 POHDINTA	37
9.1 Sylkinäytteiden ja posken limakalvon epiteelisolunäytteiden tulosten tarkastelu	37
9.2 Hius- ja kynsinäytteiden tulosten tarkastelu	38
9.3 Virtsanäytteiden tulosten tarkastelu	39
10 OPINNÄYTETYÖN LUOTETTAVUUS JA EETTISYYS	41
10.1 Luotettavuuden tarkastelu	41
10.2 Eettisyyden tarkastelu	42
LÄHTEET	43

LIITTEET

- Liite 1. Suostumuslomake.
- Liite 2. Tiedote tutkimuksesta.
- Liite 3. Työohjeet näytteiden eristämiseen QIASymphony-eristysautomaatilla.
- Liite 4. Validointiraportti.

KAAVAT

Kaava 1. Transmittanssin laskeminen.	14
Kaava 2. Absorbanssin laskeminen.	14
Kaava 3. Absorbanssin ja näytteen konsentraation yhteys.	14
Kaava 4. Kaksijuosteisen DNA:n prosenttiosuuden laskeminen.	26
Kaava 5. Nukleiinihappojen kokonaissaannon laskeminen.	26

KUVAT

Kuva 1. Suolasillan muodostuminen silikamenetelmässä.	11
Kuva 2. Magneettipartikkeliteknologia.	12
Kuva 3. Lyse&Spin-putken periaate.	24
Kuva 4. Näytteen Sylki_2a_sylkiprotokolla kuvaaja.	27
Kuva 5. Näytteen Sylki_1_sylkiprotokolla epäonnistunut mittaus.	28
Kuva 6. Näytteen Sylki_1_sylkiprotokolla uusintamittaus.	28
Kuva 7. Näytteen Poski_7_veriprotokolla kuvaaja.	29

KUVIOT

Kuvio 1. Nukleiinihappojen keskimääräisen kokonaissaannon tulokset näyttemateriaaleittain.	35
Kuvio 2. Nukleiinihappojen keskimääräisen konsentraation tulokset näyttemateriaaleittain.	35
Kuvio 3. Kaksijuosteisen DNA:n keskimääräisen konsentraation tulokset näyttemateriaaleittain.	36

TAULUKOT

Taulukko 1. Posken limakalvon epiteelisolunäytteiden tulokset sylkiprotokollalla.	30
Taulukko 2. Sylkinäytteiden tulokset sylkiprotokollalla.	31
Taulukko 3. Posken limakalvon epiteelisolunäytteiden tulokset veriprotokollalla.	31
Taulukko 4. Sylkinäytteiden tulokset veriprotokollalla.	31
Taulukko 5. Hiusnäytteiden tulokset.	33
Taulukko 6. Kynsinäytteiden tulokset.	33
Taulukko 7. Virtsanäytteiden tulokset.	34

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Absorptiospektri	Absorptiospektri osoittaa, kuinka paljon näyte absorboi valoa säteilyn eri aallonpituuksilla (Hanson ym. 2020)
Allogeeninen kantasolusiirto	Allogeenisessa kantasolusiirrossa kantasolut kerätään vieraalta, kudostyyppiltään sopivalta luovuttajalta (Anttila ym. 2015, 466)
Buffy coat	Valkosoluista ja verihiutaleista muodostuva kerros sentrifugoidussa, antikoagulanttia sisältävässä verinäytteessä plasman ja punasolujen välissä (LaboratoryInfo 2020)
Carrier-RNA	Käytetään pienten näytemäärien DNA-eristyksessä DNA:n saannon parantamiseen (Qiagen 2020)
DNA	Deoksiribonukleinihappo eli deoksiribonukleotideista muodostuva kaksijuosteinen ja kierteinen molekyyli, joka sisältää yksilön perimän (Lääketieteen termit 2021)
Eluointi	Uuttaminen, liuottimen avulla tapahtuva ainesosan poistaminen (Lääketieteen termit 2021)
Epiteeli	Verisuoneton kerros, joka päällystää ihoa ja limakalvoja (Lääketieteen termit 2021)
FFPE-kudosnäyte	FFPE on lyhenne sanoista Formalin-Fixed Paraffin-Embedded ja tarkoittaa parafiiniin valettua kudosnäytettä (Youssef 2020)
Genomi	Yksilön koko perimäaine (Lääketieteen termit 2021)
Geenimutaatio	Rakenteellinen muutos, joka voi tapahtua yhdessä tai useammassa geenissä (Lääketieteen termit 2021)
Guanidiinisuolo	Guanidiinisuolo on yleinen DNA:n eristysmenetelmissä käytetty kaotrooppi (Suominen ym. 2010, 106)
Hemoglobiini	Hemoglobiinin tärkein tehtävä on kuljettaa happea (O ₂) keuhkoista kudoksiin. Hemoglobiini on proteiini, joka koostuu kahdesta α -alaysiköstä ja kahdesta β -alaysiköstä (Ahmed ym. 2020)
Kaotrooppi	Biomolekyylijä hajottava yhdiste (Suominen ym. 2010, 106)
Kitti	Kaupallinen reagenssi- ja/tai välinesarja, joka sisältää yhden valmistajan menetelmää tai analyysia varten tarvittavat tuotteet (Suominen ym. 2010, 107)
Kontaminaatio	Kontaminaatiolla tarkoitetaan tartuntaa tai saastumista, jossa esimerkiksi mikrobeja pääsee ei-toivottuun paikkaan (Lääketieteen termit 2021)

Lyysaus	Lyysaus on menetelmä, jossa solukalvo hajotetaan tai tuhoetaan solujen DNA:n, RNA:n, proteiinien tai organelien vapauttamiseksi soluista (Shehadul Islam ym. 2017)
Mikrosiru	Koostuu kiinteälle alustalle kiinnitetyistä geenikoettimista, johon nukleiinihapot voivat kiinnittyä (Suominen ym. 2010, 206)
Nukleiinihappo	Deoksiribonukleotideista tai ribonukleotideista muodostuva pitkä ketjumainen molekyyli (Lääketieteen termit 2021)
Oligonukleotidi	Korkeintaan muutaman kymmenen nukleotidin muodostama polynukleotidi (Suominen ym. 2010)
Patogeeni	Tartuntataudin aiheuttaja. Patogeeneihin kuuluvat bakteerit, virukset, alkueläimet, madot tai prionit (Alberts ym. 2002)
Proteinaasi K	Proteinaasi K:ta käytetään DNA-eristyksessä solujen lyysaukseen ja proteiinien hajotukseen (Hansson ym. 2007)
Puskuri	Vesiliuoksessa vaikuttava happo-emäspari, joka pystyy vastustamaan ulkoisia pH-muutoksia (Turpeenoja 2005, 226).
RNA	Ribonukleiinihappo eli ribonukleotideista muodostuva molekyyli, joka on mukana mm. proteiinisynteesissä (Lääketieteen termit 2021)
Sekvensointi	Menetelmä, jolla saadaan selvitettyä DNA:n emäsjärjestys (Turpeenoja 2005, 226)
Spin-kolonne	Spin-kolonne sisältää pylvään, joka asetetaan vastaanottoputken sisälle. Näyte sentrifugoidaan pylvään pohjassa sijaitsevan silikakalvon läpi ja DNA kiinnittyy silikakalvoon. Pesuliuokset ja lopullinen eluointi tapahtuu sentrifugoimalla liuoksia kalvon läpi (Suominen ym. 2010, 106)
Substraatti	Substraatti on entsyymattisen reaktion lähtöaine eli aine, johon entsyymi vaikuttaa (Turpeenoja 2005, 226)
Tunnusluku	Tunnuslukujen avulla voidaan kuvata jakaumia niiden erilaisia ominaisuuksia perusteena käyttäen. Keskeisimpiä tunnuslukuja ovat keski- ja hajontaluvut (Tilastokeskus 2021)

1 JOHDANTO

Geneettinen tutkimus tarkastelee DNA:ta, kromosomeja sekä geenituotteita, kuten RNA:ta ja proteiineja toimien oleellisena osana lääketieteellistä tutkimusta ja geneettisten sairauksien diagnosointia (Suomen lääkäriliitto 2021). Sairaudet voidaan jakaa harvinaisiin perinnöllisiin sairauksiin, joiden diagnosoinnissa perimän selvittäminen on tärkeää, ja tavallisiin kansantauteihin, joiden syntyyn vaikuttaa geenien lisäksi monet muut ulkoiset tekijät. Geneettisen sairauden selvittämisen tai poissulkemisen lisäksi voidaan tutkia, onko yksilö geenivirheen oireeton kantaja. (Vilpo ym. 2010, 73) Tekniikan kehittyminen on mahdollistanut sen, että nykypäivänä tunnetaan jo tuhansien perinnöllisten sairauksien geenitausta. (Kääriäinen 2020.)

Ennen kuin perimää voidaan tutkia esimerkiksi sekvensoimalla, DNA täytyy eristää solusta (Suominen ym. 2010, 103). DNA:n eristäminen jakautuu seuraaviin vaiheisiin: solun hajottaminen eli lyysaus, solukalvojen osien sekä proteiinien poisto, puhdistus muista kontaminanteista ja puhdistetun DNA:n talteen kerääminen. DNA:ta voidaan eristää erilaisilla menetelmillä kuten fenoli-kloroformieristyksellä, silikamenetelmällä, anioninvaihtokromatografialla sekä magneettipartikkeliteknologialla. (Dhaliwal 2013.)

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli suorittaa QIASymphony-eristysautomaatilla validointityö, josta on hyötyä Tyks Lääketieteellisen genetiikan laboratoriolle. Validointiprosessissa todetaan, että menetelmän käyttöä tai soveltamista koskevat määrätyt vaatimukset täyttyvät (Lääketieteen termit 2021). Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, miten hyvin erityyppiset kudosnäytteet ovat sovellettavissa DNA:n lähtömaterialina, kun käytetään QIASymphony-eristysautomaattia. QIASymphony-automaatin eristysmenetelmä perustuu magneettipartikkeliteknologiaan.

Validointiprosessia varten kerättiin ensin erilaisia kudosnäytteitä vapaaehtoisilta luovuttajilta. Näytemateriaalille laadittiin tarvittavat työohjeet ennen DNA-eristystä, joita muokattiin työn edetessä ilmenneillä parannusehdotuksilla. Tarkoituksena oli, että ohjeet jäivät osastolle käyttöön. Kerätyistä näytteistä eristettiin DNA QIASymphony-automaatilla ja mitattiin eristetyn DNA:n konsentraatio QIAxpert-spektrofotometrillä sekä arvioitiin DNA:n puhtautta. Opinnäytetyöprosessin päätteeksi laadittiin validointiraportti saaduista tuloksista Lääketieteellisen genetiikan laboratoriolle.

2 DNA:N ERISTYSMENETELMÄT

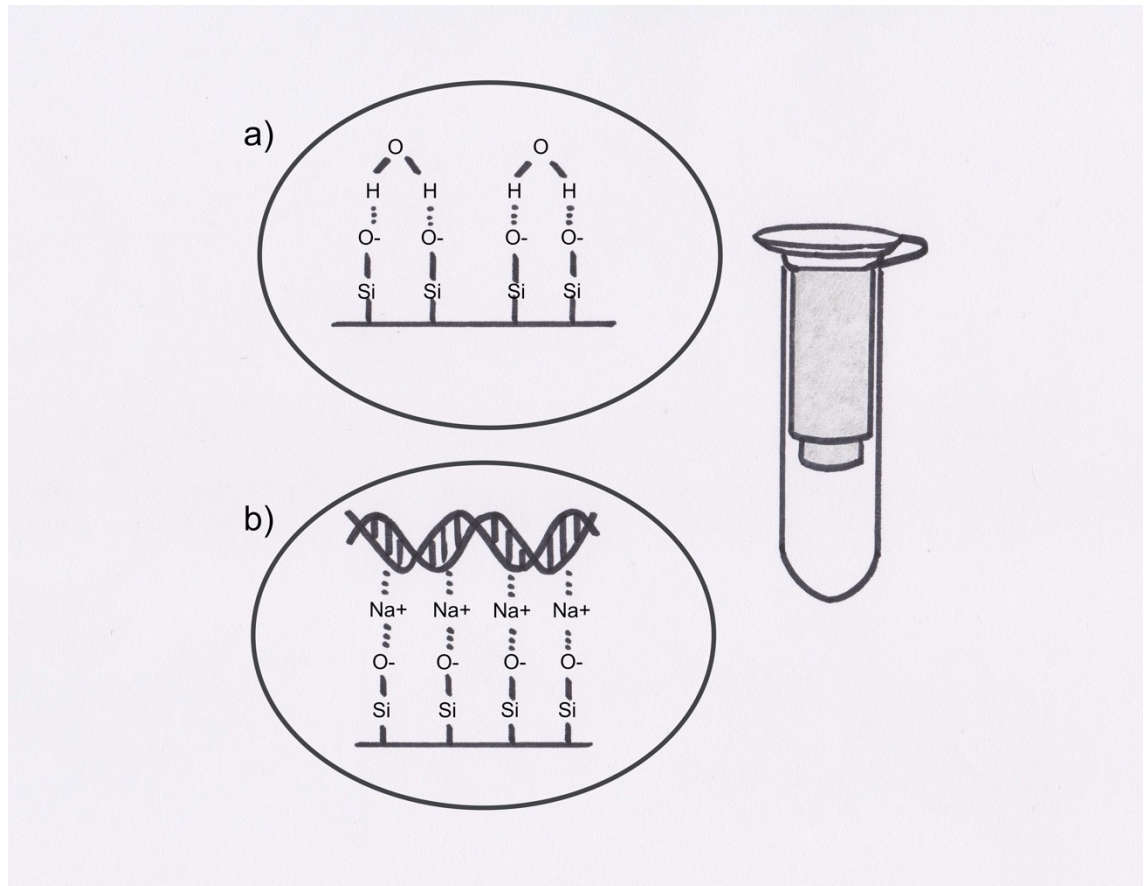
Eristysmenetelmät perustuvat siihen, että haluttu komponentti, kuten DNA, RNA tai proteiinit, pyritään erottamaan lähtömateriaalista. Lähtömateriaalina voi toimia esimerkiksi soluviljelmä tai kudoksenäyte. Menetelmissä hyödynnetään eristettävän molekyylin tai komponentin kemiallisia, biologisia tai fysikaalisia ominaisuuksia. (Pärssinen ym. 2012, 157.)

2.1 Fenoli-kloroformi eristys

Fenoli-kloroformi eristys on perinteinen eristysmenetelmä, jossa solut ensin lyysataan, minkä jälkeen hajonneet solun osat erotetaan jäljelle jääneestä DNA:sta ja proteiineista sentrifugoimalla. Proteiinit pilkotaan proteaasi-entsyymien avulla ja saostetaan fenolilla tai fenolin ja kloroformin 1:1 seoksella. Saostuneet proteiinit sentrifugoidaan, jolloin ne saadaan erotettua DNA:sta. Puhdistettu DNA saostetaan käyttämällä etanolia tai isopropanolia. RNA saadaan hajotettua näytteestä RNAasi-entsyymien avulla prosessin aikana. (Dhaliwal 2013.)

2.2 Silikamenetelmä

Silikamenetelmä perustuu DNA:n sitoutumiseen silikakalvoon tietyssä pH:ssa ionien ja kaotroopin läsnä ollessa. Kaotroopit pilkkovat vesimolekyylit negatiivisesti varautuneen silikan ja negatiivisesti varautuneen DNA:n väliltä, jolloin niiden välille syntyy korkeassa ionipitoisuudessa positiivisten ionien muodostama suolasilta (Kuva 1). Suolasilta mahdollistaa DNA:n kiinnittymisen silikaan. Ylimääräinen liuos saadaan sentrifugoimalla pois ja DNA:sta poistetaan kontaminantit pesemällä se 80 % etanolilla. Lopuksi puhdas DNA eluoidaan laimeaan puskuriliuokseen sentrifugoimalla puskuri silikakalvon läpi steriiliin vastaanottoputkeen. Menetelmässä voidaan käyttää spin-kolonneja tai mikrosiruja. (Dhaliwal 2013; Suominen ym. 2010, 106.)



Kuva 1. Suolasillan muodostuminen silikamenetelmässä (Mukaillen kuvaa: Suominen ym. 2010, 106). Kuviossa a) vesimolekyylit estävät silikaa kiinnittymästä DNA:han. Kuviossa b) kaatropit ovat pilkkoneet vesimolekyylit, jolloin positiivisesti varautuneet ionit muodostavat suolasillan negatiivisesti varautuneen silikan ja negatiivisesti varautuneen DNA:n välille.

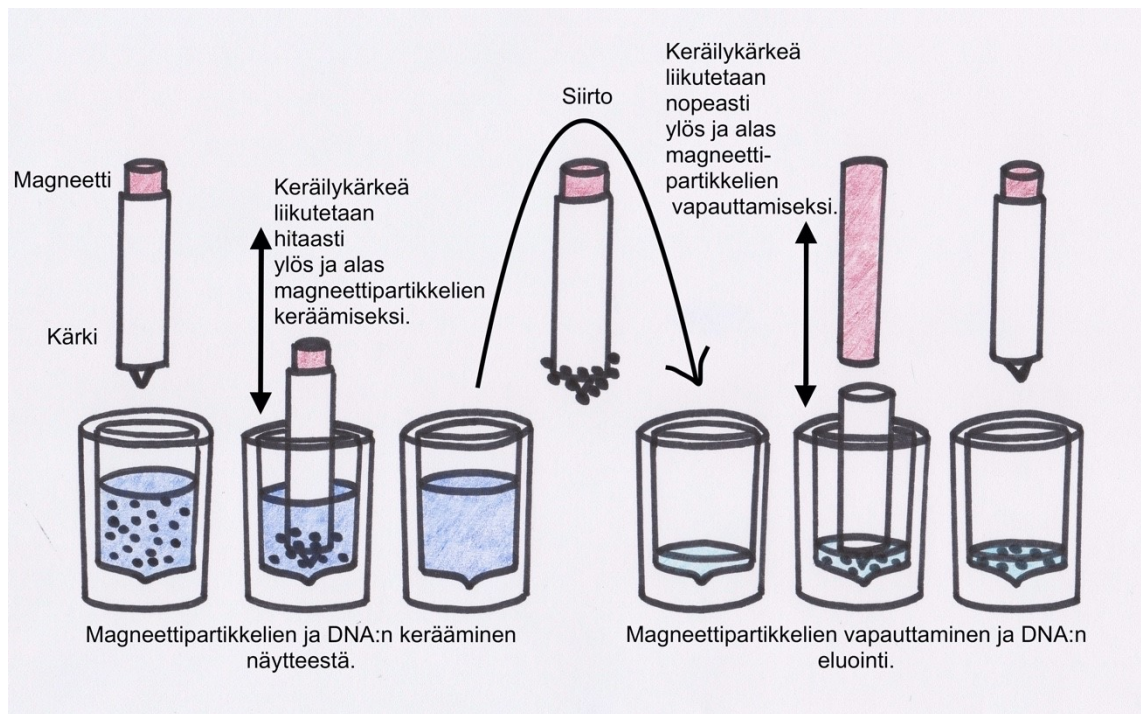
2.3 Anioninvaihtokromatografia

Anioninvaihtokromatografia perustuu vuorovaikutukseen negatiivisesti varautuneen DNA:n ja positiivisesti varautuneiden substraatin pintamolekyyliden välillä. Matalassa suolapitoisuudessa DNA kiinnittyy substraattiin, minkä jälkeen kontaminantit pestään pois. Puhdistettu DNA eluoidaan korkean suolapitoisuuden omaavalla puskurilla. (Dhaliwal 2013.)

2.4 Magneettipartikkeliteknologia

Magneettipartikkeliteknologiassa näytteen DNA sidotaan päällystettyihin magneettipartikkeleihin (Dhaliwal 2013). Ensimmäisessä vaiheessa magneettipartikkelit lisätään

näytesuspensioon ja inkubaatiovaiheen aikana partikkelit ja DNA sitoutuvat toisiinsa (Safarik & Safarikova 1999, 35). Magneettipartikkeleita voidaan liikutella liuksesta toiseen magneettisen keräilykärjen avulla (Suominen ym. 2010, 107). Kerätty DNA pestään epäpuhtauksista ja lopuksi puhdistettu DNA eluoidaan liuottimeen magneettipartikkeleista (Kuva 2) (Qiagen 2013; Safarik & Safarikova 1999, 35).



Kuva 2. Magneettipartikkelitekniologia (Mukaillen kuvaa: AB Applied Biosystems 2011, 17). Magneettisen keräilykärjen avulla kerätään magneettipartikkelit, joihin DNA on sitoutuneena. Magneettipartikkeleita ja niihin kiinnittynyttä DNA:ta kuljetetaan liuksesta toiseen, lopuksi magneettipartikkelit vapautetaan keräilykärjestä ja DNA eluoidaan.

Magneettipartikkelit

Magneettipartikkelitekniologiassa käytetyt magneettipartikkelit ovat usein paramagneettisia, eli ne tarvitsevat ulkoisen magneettikentän magnetisoitukseensa. Tämän ominaisuuden ansiosta magneettipartikkelit irtoavat toisistaan magneettikentän poistuessa helpottaen niiden vapauttamista liukseen. Partikkelien ollessa irrallaan toisistaan, DNA:lla on enemmän pinta-alaa sitoutua. Magneettipartikkelit voivat olla metallioksideja, puhtaita metalleja tai magneettisia metalliseoksia. Nukleiinihappoja käsiteltäessä käytetään magneettipartikkelien materiaalina usein rautaoksidaa Fe_3O_4 tai $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, joi-

den etuna on niiden biologinen yhteensopivuus, stabiilisuus ja nopea irrotettavuus ulkoisessa magneettikentässä. Rautaoksidit ovat usein silika-, amino- tai karboksyyli-päällystettyjä. (Chen ym. 2020.)

3 DNA:N KONSENTRAATIO JA PUHTAUS

3.1 Spektrofotometria

Spektrofotometriassa määritetään valon absorptiota eli imeytymistä kemialliseen yhdisteeseen mittaamalla väliaineen läpäisevän eli transmittoivan valon intensiteetti, joka tarkoittaa fotonien määrää. Fotoni on hiukkanen, joka välittää sähkömagneettista säteilyenergiaa kuten valoa (Kennedy 2020; Vilpo ym. 2010). Eri yhdisteet absorboivat, transmittoivat tai heijastavat valoa tietyllä aallonpituudella. Tätä voidaan hyödyntää, kun halutaan mitata näytteessä olevan tunnetun yhdisteen määrää. Spektrofotometriaa hyödynnetään erilaisissa kvantitatiivisissa analyyseissä ja sen sovelluksia löytyy muun muassa kemian, fysiikan ja biokemian eri aloilta. (Vo 2020.) Transmittanssi saadaan laskettua mitatun valon intensiteetin avulla:

$$\text{Transmittanssi } (T) = \frac{I_t}{I_0}$$

Kaava 1. Transmittanssin laskeminen.

I_t on valon intensiteetti näytteen läpäisyn jälkeen ja I_0 valon intensiteetti ennen näytteen läpäisyä (Kaava 1.). Määritettävän aineen pitoisuuden kasvaessa transmittanssi vähenee logaritmisessa suhteessa, jolloin transmittanssin ja aineen pitoisuuden välille saadaan kaartuva kuvaaja. Tästä syystä fotometrisissä määrittelyissä mitataan absorbanssia, joka saadaan transmittanssin avulla logaritmisestä yhtälöstä:

$$\text{Absorbanssi } (A) = -\log(T) = -\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right)$$

Kaava 2. Absorbanssin laskeminen.

Lambert-Beerin lain mukaan absorboituneen valon määrä tietyllä aallonpituudella on suoraan verrannollinen valon kulkutiellä olevan absorboivan aineen konsentraatioon:

$$A = abc$$

Kaava 3. Absorbanssin ja näytteen konsentraation yhteys.

A on absorbanssi, a on molaarinen absorptiokerroin, b valotien pituus mittakyvetyissä ja c määritettävän aineen konsentraatio (Kaava 3.). Molaarinen absorptiokerroin on kullekin molekyylielle ominainen vakio. (Vilpo ym. 2010, 55; Vo 2020.)

3.2 Eristetyn DNA:n konsentraation ja puhtauden mittaaminen spektrofotometrilla

Eristetyn DNA:n laatua voidaan arvioida mittaamalla näyte spektrofotometrilla. DNA:n nukleotidit absorboituvat aallonpituudessa 260 nm. Tällä aallonpituudella puhtaan DNA:n absorbanssi on yksi, joka vastaa DNA-konsentraatiota 50 $\mu\text{g/ml}$. DNA:n puhtautta voidaan arvioida absorbanssisuhteella, joka puhtaalle DNA:lle on 1,8. Suhde A_{260}/A_{280} lasketaan jakamalla DNA:n absorptioarvo aallonpituudessa 260 nm, absorptioarvolla aallonpituudessa 280 nm, joka on proteiinien absorptiomaksimi. Mitä alhaisempi suhde on, sitä todennäköisemmin eristetyssä DNA:ssa on proteiinikontaminaatio. Näytteessä oleva RNA, oligonukleotidit ja vapaat nukleotidit absorboivat voimakkaammin 260 nm:ssä kuin DNA, nostaen absorbanssisuhdetta. Puhtaalle RNA:lle absorbanssisuhde A_{260}/A_{280} on 2,0. (Suominen ym. 2010, 111.) Absorptioiden suhteella A_{260}/A_{230} mitataan kontaminantteja kuten kaotrooppisia suoloja tai fenolijäämiä, joiden absorptiomaksimi on 230 nm:ssä. Absorptiosuhteen ollessa yli 1,8, DNA on yleensä käyttökelpoista jatkotutkimuksiin. (Cantor & Koetsier 2019, 1.)

4 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli suorittaa QIASymphony-eristysautomaatilla validointityö, josta on hyötyä Tyks Lääketieteellisen genetiikan laboratoriolle. Siitä, että näyttemateriaalit ovat peräisin eri kudoksista on hyötyä tilanteissa, joissa verinäyte ei edusta potilaan omaa genomia, kuten allogeenisen kantasolusiirron saaneilla potilailla, tai jos verinäytettä ei saada. Työssä käytetyistä lähtömateriaaleista on saatu käsin tehtävin menetelmin eristettyä onnistuneesti DNA:ta Lääketieteellisen genetiikan laboratoriossa. Käsin tehtävät DNA-eristykset ovat korvautumassa QIASymphony-eristysautomaatilla, joka on otettu käyttöön osastolla loppuvuodesta 2020 verinäytteiden DNA-eristykseen. Automatisoitu DNA-eristys nopeuttaa ja helpottaa työskentelyä laboratoriossa, eikä siinä tarvita käsin tehtävin eristysmenetelmien alkoholisaostusvaihetta, joka voi aiheuttaa DNA:n katkeilua (Qiagen 2021c; Suominen ym. 2010, 105). Myös työn suorittajasta ja taitotasosta johtuva vaihtelu eristyksen onnistumiseen, muun muassa tarkkuutta vaativissa pipetointivaiheissa, vähenee. Käsin tehtävistä menetelmistä esimerkiksi fenoli-kloroformi eristyksessä käytetään terveydelle ja ympäristölle vaarallisia kemikaaleja. Automatisoitu DNA-eristys vähentää niiden käyttöä ja käsittelyä, mikä edistää työntekijöiden työturvallisuutta.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, miten hyvin erityyppiset kudoksenäytteet ovat sovellettavissa DNA:n lähtömateriaalina, kun käytetään QIASymphony-eristysautomaattia. Validointiprosessia varten kerättiin yhteensä 100 kappaletta sylki-, hius-, posken limakalvon epiteelisolu- sekä kynsinäytteitä vapaaehtoisilta luovuttajilta. Ennen näytteiden DNA-eristystä, laadittiin työohjeet näytteiden esikäsittelyä ja DNA:n eristystä varten QIASymphony-eristysautomaatilla. Työohjeita muokattiin työskennellessä huomattujen parannusehdotuksien perusteella. Ohjeiden oli tarkoituksena jäädä laboratoriolle käyttöön.

Kerätyistä näytteistä eristettiin DNA käyttäen kudospotilaalle sopivaa protokollaa. Lisäksi testattiin kahta eri protokollaa sylki- ja posken limakalvon epiteelisolunäytteiden DNA-eristykseen ja arvioitiin, kumpi niistä olisi käyttökelpoisempi. Eristyksen jälkeen mitattiin QIAxpert-spektrofotometrillä DNA:n konsentraatio sekä arvioitiin DNA:n puhtautta. Opinnäytetyössä pyrittiin selvittämään, onko jokin markkinoilla olevista kiteistä soveltuva laajasti erityyppisiin kudoksiin, ja onko lopputuotteena saadun DNA:n määrä

ja laatu laboratorioprosessin vaatimuksiin riittävä. Tutkimuksen päätteeksi saaduista tuloksista kirjoitettiin validointiraportti Lääketieteellisen genetiikan laboratoriolle.

5 TYÖSSÄ KÄYTETYT NÄYTEMATERIAALIT

5.1 Sylki

Pieniä sylkirauhasia löytyy runsaasti suuontelon seinämästä, mutta pääosa syljestä erittyy suurista sylkirauhasista, joita on kolme paria. Korvan edessä sijaitsevat korvasylkirauhaset, suun pohjassa leuanalussylkirauhaset ja kielenalussylkirauhaset. Vuorokaudessa sylkeä erittyy keskimäärin 0,5-1 litraa. Sylki koostuu pääosin vedestä, joka sisältää erilaisia epäorgaanisia suoloja kuten kalsiumia, fosfaattia, fluoria ja bikarboonaattia. Lisäksi syljessä on jonkin verran proteiineja ja lipidejä. (Honkala 2019; Karhumäki ym. 2006, 25.) Syljestä eristettävä DNA on peräisin posken epiteelisoluista ja syljessä olevista valkosoluista (Thiede ym. 2000). Noin 12 % DNA:sta on peräisin suun bakteereista (Birnboim ym. 2011).

5.2 Posken limakalvon epiteelisolut

Kudokset muodostuvat samanlaisista, lähekkäin sijaitsevista soluista ja niiden tuottamasta soluväliaineesta. Epiteeli- eli pintakudos on verisuonetonta, uusiutuvaa kudosta, jota on iholla, limakalvoilla, rauhasissa ja aistinelimissä. Epiteelikudoksessa on hyvin vähän soluväliainetta, minkä johdosta solut ovat tiiviisti kiinni toisissaan. Posken seinämää peittää kerrostuneen levyepiteelin muodostama limakalvo. (Nienstedt ym. 2003.) DNA eristetään posken limakalvon epiteelisoluista.

5.3 Hiustupet

Hiukset ovat ihon sarveisrakenteita (Karhumäki ym. 2006, 21). Ne ovat kuollutta kudosta, joka muodostuu runsaasti keratiinia sisältävistä soluista. Keratiinit ovat ryhmä veteen liukenemattomia, sulfaattipitoisia säikeisiä proteiineja. (Wang ym. 2016.) Vain hiuksen tyviosassa on eläviä soluja. Hius kasvaa karvasipulista, johon työntyvässä sidekudoksesta muodostuneessa hiusnystyssä on verisuonia, jotka ravitsevat jakautuvia soluja. Hiuksen juurta ympäröi ihon pinnalla olevan kerrostuneen epiteelin, orvaskeden, soluista muodostunut karvatuppi. Hius saa värinsä kasvualueella olevien melanosyyttisolujen tuottamasta melaniinista. (Karhumäki ym. 2006, 21.) Hiuksesta eristettävä DNA on peräisin hiuksen ja karvatupen soluista.

5.4 Kynsi

Kynnet ovat hiuksien tapaan keratiinipitoisia ihon sarveisrakenteita, jotka sidekudos liittää sormen tai varpaan päähän. Kynnen kasvualue on ihon sisällä. Kasvualueella ei ole verisuonia, vaan ravintoaineet saadaan orvaskeden alla olevasta verinahasta, joka taas sisältää runsaasti verisuonia. (Nienstedt ym. 2003, 26.) Kynnestä eristettävä DNA on peräisin kynnen keratiinipitoisista soluista.

5.5 Virtsa

Munuaiset tuottavat virtsaa, joka poistuu elimistöstä virtsateitä pitkin. Virtsateiden seinämää peittää välimuotoinen epiteeli (Lääketieteen termit 2021). Munuaiset säätelevät elimistön nestetasapainoa, happo-emästasapainoa ja kivennäisaineiden määrää virtsan erityksen avulla. Vuorokaudessa virtsaa erittyy normaalisti noin 0,5-2,5 litraa. Virtsa koostuu 95 % vedestä ja loput ovat siihen liuenneita aineita kuten typpipitoisia kuona-aineita, suoloja, orgaanisia aineenvaihdunnan tuotteita ja virtsan väriaineita. Eniten kuona-aineista virtsaan erittyy ureaa eli virtsa-ainetta, joka on proteiiniaineenvaihdunnan lopputuote. Eristettävä DNA on peräisin virtsateiden seinämästä irronneista epiteelisoluista ja virtsassa olevista valkosoluista. (Nienstedt ym. 2003, 82-84.) Virtsa on normaalisti steriiliä, joten valkosolujen suurentunut määrä viittaa yleensä tulehdukseen tai virheelliseen näytteenottotekniikkaan (Eskelinen 2016).

6 VALIDOINTIPROSESSI

Validoinnilla tarkoitetaan menetelmän testausta, jossa varmennetaan sen pätevyys suunnitelluissa käyttöolosuhteissa. Arvioinnin kohteena ovat menetelmän ja laitteen soveltuvuus ja suorituskyky tiettyyn käyttötarkoitukseen. Validoinnille asetettavat vaatimukset on määriteltävä tapauskohtaisesti, sillä vaatimukset vaihtelevat menetelmän ja sen käyttötarkoituksen mukaan. Laajuus riippuu validoitavasta analyysimenetelmästä ja sen käyttötarkoituksesta. Validointi tulee ulottaa näytteen tutkimista edeltävästä preanalyttisestä vaiheesta aina tutkimisen jälkeiseen postanalyttiseen vaiheeseen saakka. (Hägg 2016.) Preanalyttiseen vaiheeseen kuuluu muun muassa näytteen otto, säilytys ja kuljetus laboratorioon sekä näytteen valmistaminen analyysikelpoiseksi. Analyttiseen vaiheeseen kuuluu analyysi ja laadunvarmistus ja postanalyttiseen vaiheeseen tulosten arviointi ja hyväksyminen. (Tuokko ym. 2008, 7.)

Ennen validoinnin aloittamista prosessista laaditaan suunnitelma, joka dokumentoidaan ja hyväksytään. Muutokset suunnitelmassa ovat mahdollisia, mutta ne tulee kirjata ylös. Validointisuunnitelmaan kuuluvat tietyt asiat, jotka muodostavat suunnitelmalle rungon. Suunnitelmassa tulee kuvata validoinnin kohteena oleva menetelmä tai laite ja sen soveltamisala. Lisäksi tulee käydä ilmi validoinnin tavoite, näyteaineisto, vastuuhenkilöt, aikataulu, laitteet, tilat, laajuus ja määritettävät parametrit sekä vaatimukset validoinnin tuloksille. (Hägg 2016.)

Toteutusvaiheeseen ryhdytään validointisuunnitelman mukaisesti. Validoinnin edetessä suoritetaan tarvittaessa lisätestauksia ja muutokset dokumentoidaan. Tulokset lasketaan tilastollisin menetelmin ja niitä verrataan asetettuihin tavoitteisiin. (Hägg 2016.) Validoinnin päätteeksi laaditaan validointiraportti, josta käy ilmi työn tavoite, toteutus, mittauksiin käytetty laitteisto, välineistö ja materiaalit. Raporttiin kirjataan suunnitelman mukaiset toimenpiteet ja tulokset. Raportissa käsitellään kaikki suunnitellut validointiparametrit. Validointiparametrilla voidaan tarkoittaa esimerkiksi saantoa. Lisäksi arvioidaan mittausepävarmuutta ja mahdollisia häiriötekijöitä. Validointiraportin yhteenvedossa todetaan, onko menetelmä aiottuun käyttötarkoitukseen soveltuva ja täyttääkö se sille asetetut vaatimukset. (Hiltunen ym. 2011, 27.)

6.1 Validointiprosessi QIASymphony-automaatilla

Validointiprosessin suunnitelmana toimi opinnäytetyön suunnitelma. Ennen suunnitelman laatimista rajattiin lähtömateriaalit, joita validoinnissa tulnaisiin testaamaan sekä päätettiin, miten eristetyn DNA:n laatua tulnaisiin arvioimaan. Validointiprosessia varten kerättiin yhteensä 100 kappaletta sylki-, hius-, posken limakalvon epiteelisolu- sekä kynsinäytteitä vapaaehtoisilta luovuttajilta. DNA:n eristämiseen QIASymphony-automaatilla laadittiin työohjeet ennen työn aloittamista. Työn suorittamisen jälkeen laadittiin saaduista tuloksista Lääketieteellisen genetiikan osastolle validointiraportti, jonka hyväksyi osaston sairaalageneetikko. Validointiraportissa esitettiin kaikki saadut tulokset taulukoituna sekä arvioitiin lähtömateriaalien käyttökelpoisuutta automatisoituun DNA-eristykseen.

7 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Tämän opinnäytetyön aihe saatiin Tyks Lääketieteellisen genetiikan osastolta syksyllä 2020. Hankkeen hyväksyi osaston prosessinjohtaja. Opinnäytetyön suunnitteluprosessi aloitettiin loppuvuodesta 2020 ja opinnäytetyösopimus allekirjoitettiin keväällä 2021. Validointityössä käytettyjen näytteiden keräys sekä DNA:n eristys ja mittaus toteutettiin keväällä 2021. Valmis opinnäytetyö raportoitiin loppukevällä 2021. Opinnäytetyö on Työelämäyhteistyön ja opetusmenetelmien kehittäminen bioanalytikkokoulutuksessa (TurkuCRC T163/2017) -hankkeen osatutkimus.

7.1 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Toiminnallinen opinnäytetyö on ammattikorkeakouluissa käytettävä teoriaa ja käytäntöä yhdistävä opinnäytetyön toteutustapa, joka toimii vaihtoehtona tutkimukselliselle opinnäytetyölle (Airaksinen & Vilka 2003, 5-9). Oleellisena erona toiminnallisen ja tutkimuksellisen opinnäytetyön välillä on se, että toiminnallisessa työssä opiskelija tekee tuotoksen. Tuotos sisältää uuden tiedon lisäksi palvelun, tuotteen, oppaan, mallin, toimintatavan tai minkä tahansa innovaation, joka on aikaisempaa parempi tai kokonaan uusi. Toiminnallisessa opinnäytetyössä siis yhdistyvät käytännön toteutus ja sen raportointi (Airaksinen & Vilka 2003, 9). Yleensä toiminnallisessa opinnäytetyössä on mukana toimeksiantaja, jonka kanssa käydään keskustelua, arviointia, toiminnan uudelleen suuntaamista sekä palautteen vastaanottoa ja antoa. (Salonen 2013, 6-25.)

Tämä opinnäytetyö on toiminnallinen, sillä tuotoksena laadittiin toimeksiantajalle validointiraportti työn tuloksista. Lisäksi tehtiin työohjeet käytettyjen näytemateriaalien esikäsittelyyn ennen DNA-eristystä. Työohjeita päivitettiin työn edetessä ja lisättiin työtä tehdessä esille tulleet parannusehdotukset. Opinnäytetyön loppuun on liitettynä valmis validointiraportti (liite 4) ja viimeisin versio työohjeista (liite 3). Työssä ei muodostunut uutta tieteellistä tietoa, vaan selvitimme jo olemassa olevien tekniikoiden ja laitteiden soveltuvuutta Lääketieteellisen genetiikan laboratorion prosesseihin.

7.2 Näytemateriaalinen kerääminen

Sylkinäytteitä ja posken limakalvon epiteelisolunäytteitä kerättiin kumpaakin näytemateriaalia 20 kpl vapaaehtoisilta luovuttajilta. Sylkinäytteet kerättiin Oragene•DNA OG-500-keräysputkeen. Keräysputkeen syljetään noin 2 ml sylkeä, minkä jälkeen säilöntäaine vapautetaan putkeen sulkemalla korkki. Säilöntäaine stabilisoi DNA:n säilytystä varten ja ehkäisee bakteerikontaminaatiota (Smith 2010). Posken limakalvon epiteelisolut kerättiin ORAcollect•DNA OCR-100 -keräysputkella. Näyte otettiin pakkaukseen kuuluvalla Swab-näytteenottotikulla hankaamalla alempia ikeniä molemmin puolin. Näytekkaus sisältää liuoksen, joka estää bakteerien kasvua.

Kynsi- ja hiusnäytteitä kerättiin kumpaakin näytemateriaalia 20 kpl vapaaehtoisilta luovuttajilta. Hiustenäytteet kerättiin ottamalla noin 10-15 hiusta hiustuppeineen ja ne pilkottiin saksilla 1,5 ml Eppendorf-putkiin. Myös kynsinäytteet kerättiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin leikkaamalla niihin kynnen paloja.

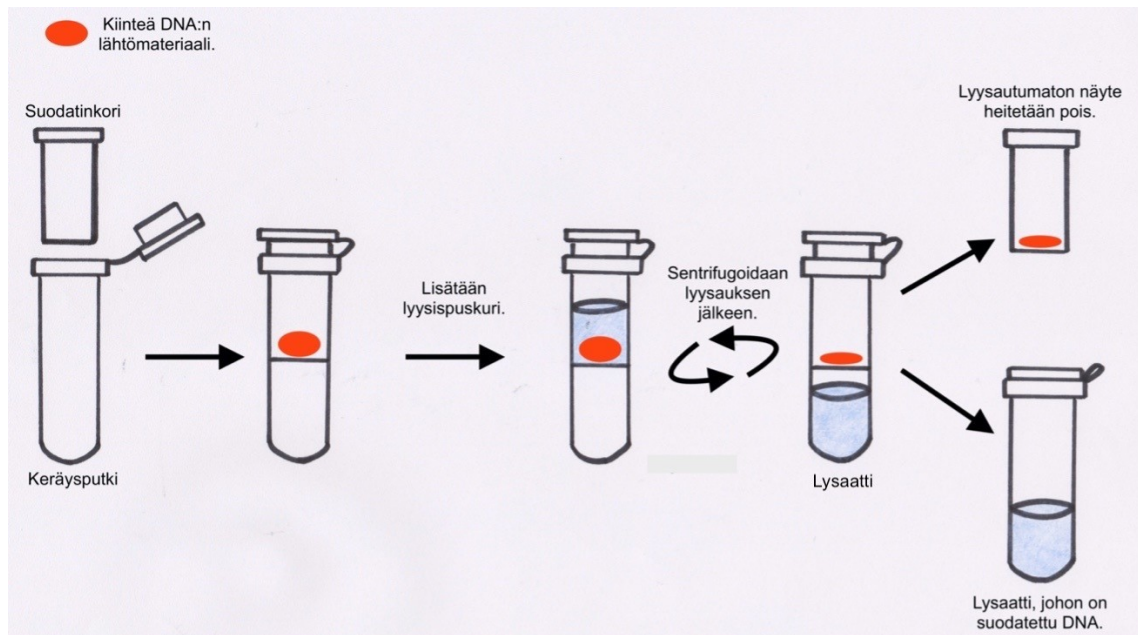
Virtsanäytteitä kerättiin 20 kpl vapaaehtoisilta luovuttajilta. Virtsanäytteet kerättiin puhtaasti laskettuna virtsana säilöntäaineellisiin BD Vacutainer -virtsanäyteputkiin. Yksi näyte jouduttiin keräämään säilöntäaineettomaan putkeen. Säilöntäaineellinen putki sisältää boorihappoa, natriumformiaattia ja natriumboraattia, jotka estävät bakteerien lisääntymisen näytteessä (Mediq 2013). Yhteen näytteeseen kerättiin solut kahdesta 10 ml putkesta. Näytteet sentrifugoitiin viimeistään kahden vuorokauden kuluttua näytteenotosta ja pakastettiin -20°C odottamaan DNA-eristystä.

7.3 Näytteiden esikäsittely

Sylkinäytteet ja posken limakalvon epiteelisolunäytteet eivät vaatineet erillistä esikäsittelyä. Sylkinäytteistä poistettiin Pasteur-pipetillä paakkuuntunut lima, jotta se ei häiritsisi DNA-eristystä. Posken solunäytteiden keräämiseen käytetystä Swab-näytteenottotikusta puristeltiin putken seinämään siihen imeytynyt näytemateriaali.

Kynsi- ja hiusnäytteet vaativat kiinteinä kudospaaleina esikäsittelyn. Esikäsittely tehtiin Investigator Lyse&Spin Basket -kittiä käyttäen. Kittin tarkoitus on rikosteknisten

kiinteiden materiaalien lyysaukseen ja suodatukseen. Kittiin kuuluu korimainen suodatinkori, jonka läpi lysaatti erotetaan kiinteästi materiaalista sentrifugoimalla se mukana tulevaan 2 ml keräysputkeen (Kuva 3). Ensin kynnen palat ja hiukset leikattiin 0,5-1 cm pituisiksi paloiksi ja jokainen näyte siirrettiin Lyse&Spin-putken suodatinkoriin. Näytteeseen lisättiin 220 µl ATL puskuria ja 20 µl proteinaasi K:ta. Proteinaasi K hajottaa eli lyysaa solut ja pilkkoo proteiinit (Hansson ym. 2007). Tämän jälkeen näytteet laitettiin lämpöravistelijaan ja inkuboitiin 900 rpm 56°C 3 h. Osa näytteistä sai lyysautua yön yli. Muutamaan näytteeseen ehdittiin lisäämään 4 µl RNase A:ta (100 mg/ml) ennen kuin se loppui kesken. Ribonukleaasi A:ta (lyh. RNase A), käytetään RNA:n pilkkomiseen DNA-näytteestä (Qiagen 2021e). Asiasta konsultoitiin osaston sairaalageneetikkoa ja päädyttiin siihen tulokseen, että loput näytteet esikäsitellään ilman RNase A:ta, sillä siitä on merkittävää hyötyä vain, jos näytemäärä on hyvin pieni.



Kuva 3. Lyse&Spin-putken periaate (Mukaiillen kuvaa: Tepnadze 2019). Suodatinkori yhdistetään keräysputkeen, jonne kiinteä DNA:n lähtömateriaali asetetaan. Koriin lisätään lyysispuskuri ja näytteen annetaan lyysautua. Näyte sentrifugoidaan, jolloin lyysispuskuri ja siihen liuennut DNA suodattuvat keräysputkeen. Lyysautumaton näyte heitetään pois ja DNA:n sisältävä lysaatti kerätään talteen.

Kaikissa kynsi- ja hiusrnäytteissä oli liukenematonta kudosta, joten näytteet sentrifugoitiin. Näytteitä sentrifugoitiin ensin minuutin ajan 3000 g, mutta niitä päädyttiin lopulta sentrifugoimaan useamman minuutin ajan 20 000 g, sillä lysaatti ei meinannut laskeutua suodatinkorin läpi keräysputkeen. Kolmesta hiusrnäytteestä lysaattia ei saatu erotet-

tua ollenkaan keräysputkeen, joten niistä ei voitu suorittaa DNA-eristystä. Lysaatti siirrettiin keräysputkista Eppendorf-putkiin. Huonon suodattavuuden takia kynsi- ja hiusnäytteisiin lisättiin vielä 240 µl ATL puskuria riittävän näytemäärän varmistamiseksi.

Virtsanäytteiden annettiin sulaa rauhassa huoneenlämmössä ennen esikäsitelyä. Solupelletit yhdistettiin yhteen putkeen ja näyte suspensoitiin lisäämällä 300 µl ATL puskuria. Näytettä siirrettiin 220 µl 2 ml Sarstedt-putkeen ajoa varten.

7.4 QIASymphony DSP DNA Midi ja Virus/Pathogen Mini -kitit

Qiagenin valmistamalla QIASymphony DSP DNA Midi -kitillä voidaan eristää DNA:ta kokoveri-, buffy coat-, kudos- ja FFPE-kudosnäytteistä. Kitti soveltuu myös virus-DNA:n eristämiseen kokoverestä. Joillekin näytemateriaaleille, kuten kudos- ja FFPE-kudosnäytteille tarvitaan manuaalinen esikäsitely ennen DNA-eristystä. QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini -kitillä voidaan eristää virus- ja bakteeri/patogeeni-DNA:ta useista eri näytemateriaaleista. Kiteillä voidaan eristää DNA:ta jopa 96 näytteestä samanaikaisesti QIASymphony-eristysautomaatilla. Kitit sisältävät reagenssikasetin, tarvittavat entsyymit ja eluutiopuskurin. Lisäksi Virus/Pathogen Mini -kitti sisältää carrier RNA:ta, jonka käyttö lisää eristetyn DNA:n saantoa. Eristysmenetelmää eli protokollaa ja eluutiotilavuutta voidaan muokata käyttötarkoituksen mukaan. (Qiagen 2021a; Qiagen 2021b.) Eluutiotilavuudella tarkoitetaan liuottimen tilavuutta, johon eristetty ja puhdistettu DNA eluoidaan.

7.5 Näytteiden DNA-eristys QIASymphony-automaatilla

Sylkinäytteet ja posken limakalvon epiteelisolunäytteet eristettiin QIASymphony-eristysautomaatilla QIASymphony DSP DNA Midi -kitillä. Puolet näytteistä eristettiin kustomoidulla sylkiprotokollalla ja puolet jo osastolla verinäytteiden eristykseen käytössä olevalla veriprotokollalla. Tarkoituksena oli selvittää, kumpi protokollista on käytökelpoisempi kyseisille lähtömateriaaleille. Sylkiprotokollassa automaatti pipetoi 1 ml näytettä DNA-eristykseen ja eristetyn DNA:n eluutiotilavuus on 145 µl. Posken solunäytteissä käytettiin FIX-labwarea vähäisen näytemäärän vuoksi, jolloin automaatti ei käytä nestepinnan tunnistusta, vaan pipetoi näytteen putken pohjasta. Tilanteessa,

jossa näytettä on alle 1 ml, automaatti pipetoi niin paljon näytettä kuin mahdollista. Sylkinäytteiden pipetoinnissa käytettiin nestepinnan tunnistusta. Eristys sylkiprotokollalla kesti noin kaksi tuntia. Veriprotokollassa automaatti pipetoi 400 µl näytettä DNA-eristykseen ja eluotiotilavuus on 100 µl. Myös veriprotokollassa käytettiin nestepinnan tunnistusta. Eristys veriprotokollalla kesti noin tunnin. Molemmat näytemateriaalit eluutiin viilentävälle näyteblokille, mikä parantaa DNA:n säilymistä näytteessä.

Hius- ja kynsinäytteet sekä virtsanäytteet eristettiin QIASymphony eristysautomaatilla QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini -kitillä Complex200_V6_DSP-protokollaa käyttäen. Automaatti pipetoi 200 µl näytettä DNA-eristykseen. Hius- ja kynsinäytteet pipetoitiin FIX-labwarea käyttäen. Virtsanäytteiden pipetoinnissa oli käytössä nestepinnan tunnistus. Eristetyn DNA:n eluotiotilavuus oli 110 µl. Kunkin näytemateriaalin ajo kesti reilusti yli tunnin. Hius- ja virtsanäytteet eluutiin viilentävälle blokille. Kynsinäytteet jouduttiin eluoimaan huoneenlämpöisille näyteblokeille, sillä kaikki viilentävät näyteblokit olivat käytössä.

7.6 Eristetyn DNA:n mittaaminen QIAxpert-spektrofotometrilla

Näytteet pipetoitiin QIAxpert-laitteelle suunniteltuihin näytekasetteihin ja yhtä näytettä pipetoitiin 2 µl näytekaivoon. QIAxpert- laite mittaa kaksijuosteisen DNA:n konsentraation eli dsDNA:n, nukleiinihappojen kokonaiskonsentraation, epäpuhtaudet (A260), taustan (A260), residue-arvon, nukleotidien absorbanssin arvon 260 nm:ssä ja absorbanssisuhteet A260/A280 sekä A260/A230. Lisäksi laskettiin kaksijuosteisen DNA:n prosenttiosuus eristetystä DNA:sta sekä nukleiinihappojen kokonaissaanto nanogrammina.

$$dsDNA - \% = \frac{dsDNA}{\text{Nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatio}} \cdot 100$$

Kaava 4. Kaksijuosteisen DNA:n prosenttiosuuden laskeminen.

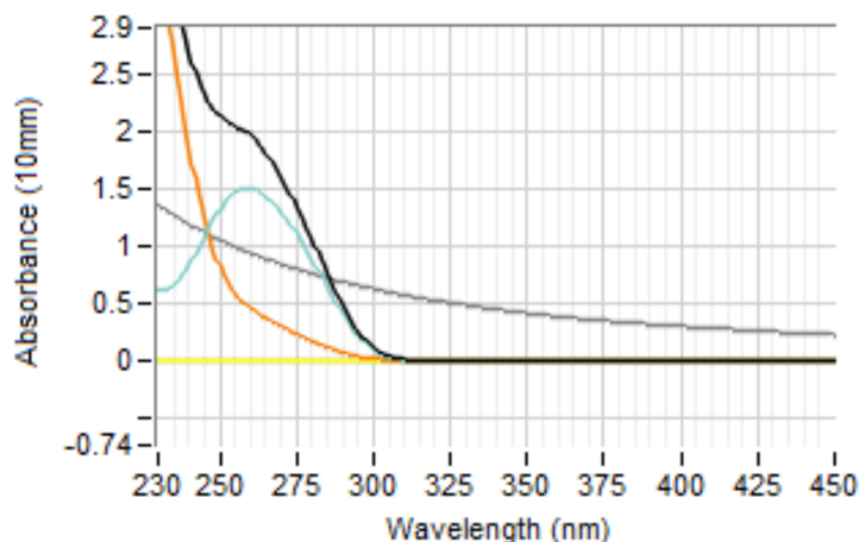
$$\text{Kokonaissaanto} = \text{Nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatio} \cdot \text{Eluotiotilavuus}$$

Kaava 5. Nukleiinihappojen kokonaissaannon laskeminen.

Epäpuhtaudet (A260) mittaavat näytteessä olevia tunnettuja epäpuhtauksia. Tavoitteena on eritellä eristyksestä jääneet epäpuhtaudet, kuten guanidiinisuoala, muista näytteessä olevista mahdollisista epäpuhtauksista. Yleensä tämä arvo ei ole niin korkea, että sillä olisi vaikutusta jatkotutkimuksiin. Residue-arvon avulla mitataan, että spektrinen sisältö on riittävä analyysin suorittamiseen. Jos residue-arvo on yli 2,5%, kaksijuosteisen DNA:n spektriä ei pystytä määrittämään. Tässä tapauksessa määritetään vain kokonaisnukleinihappokonsentraatiota kuvaava spektri. Taustan arvo nousee, jos näyte sisältää ylimääräisiä partikkeleita. Partikkelit voivat olla esimerkiksi DNA-eristyksestä jääneitä magneettipartikkeleita tai hemoglobiinin aiheuttamaa sameutta. Absorbanssisuhteen A260/A280 avulla mitataan mahdollista proteiinkontaminaatiota ja suhteen A260/A230 avulla muita kontaminantteja. (Qiagen 2021d.)

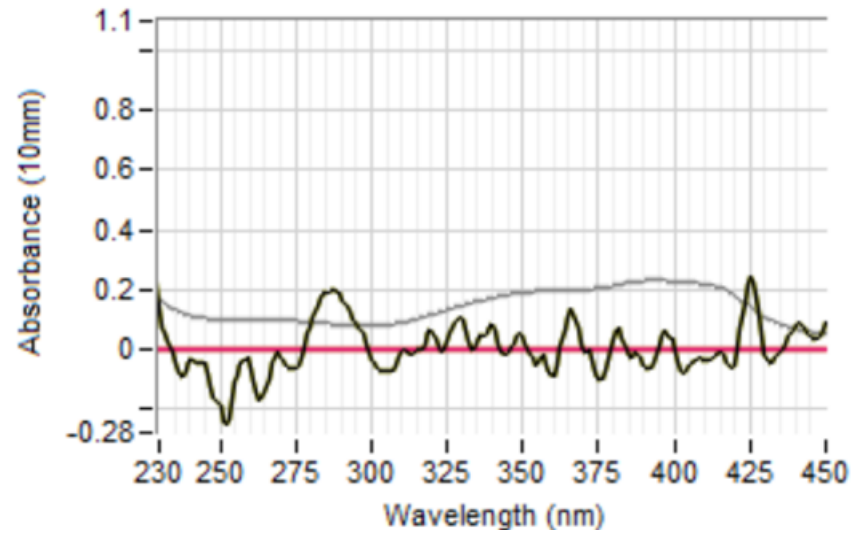
7.7 Qiaxpert raportin kuvaajat

QIAxpert tulosraporttiin sisältyy myös tuloksia havainnollistavat kuvaajat. Kuvaajassa turkoosi käyrä edustaa kaksijuosteista DNA:ta. Jos näytteestä ei saada määritettyä kaksijuosteista DNA:ta, näkyy kuvaajassa vain pinkki nukleinihappojen kokonaiskonsentraatiota kuvaava käyrä. Musta käyrä kuvaa näytteen mitattua ja taustakorjattua kokonaisspektriä, oranssi epäpuhtauksia, harmaa taustaa A260-arvolla ja keltainen käyrä kuvaa näytteen mittaamatonta osaa (Qiagen 2021d).

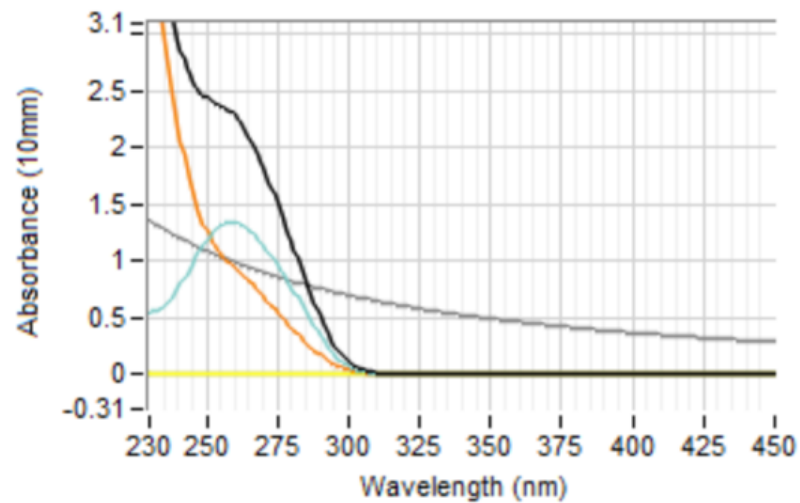


Kuva 4. Näytteen Sylki_2a_sylkiprotokolla kuvaaja.

Kuva 4 edustaa onnistunutta DNA:n eristystä. Kuvaajasta nähdään, että kaksijuosteista DNA:ta on löytynyt näytteestä reilusti, eikä näytteessä ole liikaa epäpuhtauksia.

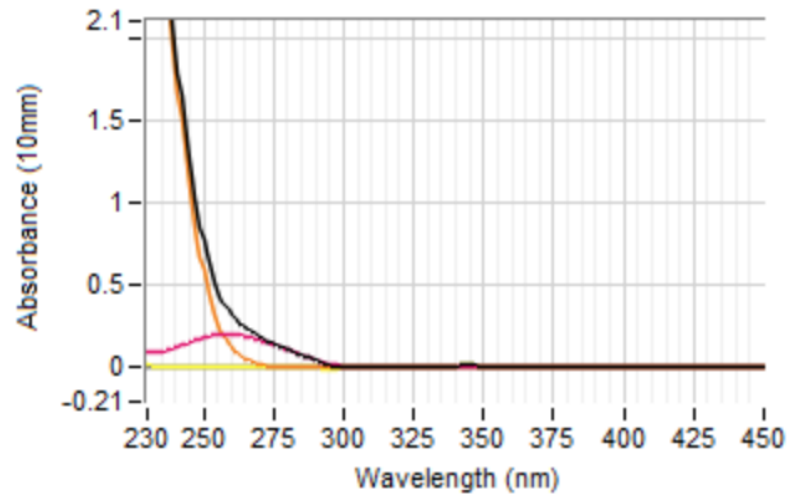


Kuva 5. Näytteen Sylki_1_sylkiprotokolla epäonnistunut mittaus.



Kuva 6. Näytteen Sylki_1_sylkiprotokolla uusintamittaus.

Kuvasta 5 huomataan, että mittaus on epäonnistunut, sillä siitä ei ole saatu siistiä absorbanssikuvaajaa. Näytteestä ei ole löytynyt lainkaan nukleiinihappoja. Kuvasta 6 nähdään, että saman näytteen uusintamittaus on onnistunut. Epäonnistunut mittaus on saattanut johtua esimerkiksi pipetoinnin yhteydessä tulleesta ilmakuplasta.



Kuva 7. Näytteen Poski_7_veriprotokolla kuvaaja.

Kuva 7 edustaa näytettä, jossa on hyvin vähän nukleiinihappoja. Näytteestä ei ole saatu määritettyä ollenkaan kaksijuosteista DNA:ta kuvaavaa spektriä, jolloin kuvajassa näkyy vain pinkki nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatiota edustava käyrä.

7.8 Näytteiden hävittäminen

Tutkimukseen kerätyt kudoksenäytteet ja niistä eristetty DNA hävitettiin tutkimuksen päätyttyä biologisena jätteenä laboratoriokäytänteiden mukaisesti. Vapaaehtoisten luovuttajien allekirjoittamat suostumuslomakkeet hävitettiin tietosuojajätteisiin tutkimuksen päätyttyä.

8 TUTKIMUSTULOKSET

Taulukoissa 1-7 on esitetty DNA-eristyksen tulokset kullekin näyttemateriaalille. Sylki-näytteiden ja posken limakalvon solunäytteiden tuloksissa on eritelty sylki- ja veriprotokollalla eristetyt näytteet omiin taulukoihinsa. Jos sama luovuttaja on luovuttanut useamman saman näyttemateriaalin näytteen, on tämä merkitty taulukkoon pienaakkosin näytteen numeron perään. Kaikista näytteistä ei saatu määritettyä kaksijuosteisen DNA:n konsentraatiota, mikä taulukossa on merkitty nolllalla, jotta nämä tulokset saatiin laskettua mukaan tunnuslukuihin. Jotta dsDNA voidaan mitata, tulee kokonaisnukleinihappopitoisuuden olla yli 25 ng/ μ l. Näytteessä saattaa siis olla kaksijuosteista DNA:ta, mutta sitä ei matalan kokonaisnukleinihappopitoisuuden takia saatu määritettyä. Näytteet, joista ei saatu mitattua kaksijuosteista DNA:ta, mitattiin kahteen kertaan tuloksen luotettavuuden varmistamiseksi.

Näyttenumero	dsDNA (ng/ μ l)	dsDNA:n osuus (%)	Nukleinihapot (ng/ μ l)	Kokonaissaanto (ng)	Epäpuhtaudet (A260)	Tausta (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
Poski_1_sylkiprotokolla	17,6	41,8	42,1	6105	0,61	0	0,3	0,97	2,3	0,22
Poski_2_sylkiprotokolla	43,2	95,8	45,1	6540	0,16	0,58	0,5	1,03	2,07	0,23
Poski_3a_sylkiprotokolla	0	0	22,2	3219	0,12	0	0,4	0,57	2,57	0,13
Poski_3b_sylkiprotokolla	0	0	18,2	2639	0,12	0	0,4	0,49	2,71	0,11
Poski_4a_sylkiprotokolla	17,9	56,3	31,8	4611	0,39	0	0,4	0,75	2,3	0,17
Poski_4b_sylkiprotokolla	0	0	16,5	2393	0,11	0	0,4	0,45	2,82	0,11
Poski_5_sylkiprotokolla	0	0	24,1	3495	0,12	0	0,4	0,6	2,39	0,14
Poski_6_sylkiprotokolla	26,6	58,3	45,6	6612	0,51	0	0,4	1,05	2,26	0,24
Poski_7_sylkiprotokolla	26,4	52,2	50,6	7337	0,6	0	0,4	1,13	2,19	0,27
Poski_8_sylkiprotokolla	24,9	66,4	37,5	5438	0,36	0	0,3	0,87	2,23	0,21
Keskiarvo	15,7	37,1	33,4	4839						
Keskihajonta	15,2	34,8	12,5	1812						
Minimi	0	0	16,5	2393						
Maksimi	43,2	95,8	50,6	7337						

Taulukko 1. Posken limakalvon epiteelisolunäytteiden tulokset sylkiprotokollalla.

Näyttenumero	dsDNA (ng/μl)	dsDNA:n osuus (%)	Nukleiinihapot (ng/μl)	Kokonaissaanto (ng)	Epäpuhtaudet (A260)	Tausta (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
Sylki_1_sylkiprotokolla	67,2	61,4	109,4	15863	0,94	0,99	0,2	2,29	1,95	0,53
Sylki_2a_sylkiprotokolla	75,4	80,8	93,3	13529	0,46	0,94	0,3	1,97	1,86	0,48
Sylki_2b_sylkiprotokolla	56,5	81,3	69,5	10078	0,38	0,43	0,3	1,51	1,98	0,38
Sylki_3a_sylkiprotokolla	47,9	80,5	59,5	8628	0,35	0,48	0,3	1,31	1,97	0,33
Sylki_3b_sylkiprotokolla	27,6	67,3	41	5945	0,38	0,97	0,5	0,94	1,91	0,26
Sylki_4a_sylkiprotokolla	45,6	80,7	56,5	8193	0,33	0,93	0,4	1,24	1,9	0,33
Sylki_4b_sylkiprotokolla	24,6	67,2	36,6	5307	0,36	1,01	0,5	0,85	1,89	0,24
Sylki_5_sylkiprotokolla	0	0	20,5	2973	0,12	0	0,5	0,53	2,65	0,14
Sylki_6_sylkiprotokolla	69,2	55,9	123,7	17937	1,2	0,39	0,2	2,59	2,03	0,59
Sylki_7_sylkiprotokolla	153,3	92,9	165,1	23940	0,34	1,03	0,3	3,42	1,85	0,74
Keskiarvo	56,7	66,8	77,5	11239						
Keskihajonta	41,2	26,0	44,9	6513						
Minimi	0	0	41	2973						
Maksimi	153,3	92,9	165,1	23940						

Taulukko 2. Sylkinäytteiden tulokset sylkiprotokollalla.

Näyttenumero	dsDNA (ng/μl)	dsDNA:n osuus (%)	Nukleiinihapot (ng/μl)	Kokonaissaanto (ng)	Epäpuhtaudet (A260)	Tausta (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
Poski_1_veriprotokolla	0	0	13,5	1350	0,11	0	0,5	0,39	2,75	0,11
Poski_2_veriprotokolla	0	0	11,7	1170	0,11	0	0,4	0,35	2,87	0,1
Poski_3_veriprotokolla	0	0	16	1600	0,12	0	0,6	0,44	2,52	0,12
Poski_4a_veriprotokolla	0	0	21,9	2190	0,11	0	0,4	0,55	2,52	0,15
Poski_4b_veriprotokolla	7,6	21,5	35,4	3540	0,67	0	0,4	0,83	2,41	0,23
Poski_5a_veriprotokolla	0	0	12	1200	0,11	0	0,5	0,35	3,03	0,1
Poski_5b_veriprotokolla	0	0	14,1	1410	0,11	0	0,5	0,39	2,65	0,11
Poski_6_veriprotokolla	0	0	18,7	1870	0,12	0	0,5	0,49	2,51	0,14
Poski_7_veriprotokolla	0	0	10,1	1010	0,12	0	0,6	0,32	2,98	0,09
Poski_8_veriprotokolla	0	0	11,1	1110	0,11	0	0,5	0,34	3,02	0,1
Keskiarvo	0,76	2,15	16,5	1645						
Keskihajonta	2,40	6,80	7,60	760						
Minimi	0	0	10,1	1010						
Maksimi	7,6	21,5	35,4	3540						

Taulukko 3. Posken limakalvon epiteelisolunäytteiden tulokset veriprotokollalla.

Näyttenumero	dsDNA (ng/μl)	dsDNA:n osuus (%)	Nukleiinihapot (ng/μl)	Kokonaissaanto (ng)	Epäpuhtaudet (A260)	Tausta (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
Sylki_1_veriprotokolla	48,7	90,0	54,1	5410	0,22	0,44	0,4	1,19	2,03	0,35
Sylki_2_veriprotokolla	41,9	100	41,9	4190	0,12	0	0,6	0,96	2,18	0,28
Sylki_3_veriprotokolla	4,8	14,6	32,8	3280	0,68	0	0,7	0,78	2,37	0,23
Sylki_4a_veriprotokolla	0	0	14,2	1420	0,12	0	0,8	0,41	2,88	0,13
Sylki_4b_veriprotokolla	0	0	8,7	870	0,12	0	0,8	0,3	3,99	0,1
Sylki_5_veriprotokolla	11,4	37,0	30,8	3080	0,5	0	0,5	0,73	2,33	0,22
Sylki_6_veriprotokolla	52,7	100	52,7	5270	0,11	0	0,5	1,17	2,09	0,34
Sylki_7_veriprotokolla	0	0	7	700	0,12	0,39	0,6	0,26	2,55	0,08
Sylki_8_veriprotokolla	0	0	24,8	2480	0,12	0,57	0,4	0,61	2,15	0,18
Keskiarvo	17,7	38,0	29,7	2967						
Keskihajonta	23,0	45,7	17,7	1769						
Minimi	0	0	7	700						
Maksimi	52,7	100	54,1	5410						

Taulukko 4. Sylkinäytteiden tulokset veriprotokollalla.

Sylkiprotokollalla eristettiin 10 posken solunäytettä ja 10 sylkinäytettä. Posken solunäytteistä kaksijuosteista DNA:ta saatiin keskimäärin 15,7 ng/ μ l eli 37,1 % nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatiosta, nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatio oli keskimäärin 33,4 ng/ μ l ja kokonaissaanto oli keskimäärin 4839 ng. Sylkinäytteistä saatiin keskimäärin kaksijuosteista DNA:ta 56,7 ng/ μ l eli 66,8 % nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatiosta, nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatio oli keskimäärin 77,5 ng/ μ l ja kokonaissaanto oli keskimäärin 11239 ng.

Veriprotokollalla eristettiin 10 posken solunäytettä ja 9 sylkinäytettä. Posken solunäytteistä kaksijuosteista DNA:ta saatiin keskimäärin 0,76 ng/ μ l eli 2,15 % nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatiosta, nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatio oli keskimäärin 16,5 ng/ μ l ja kokonaissaanto oli keskimäärin 1645 ng. Sylkinäytteistä saatiin keskimäärin kaksijuosteista DNA:ta 17,7 ng/ μ l eli 38,0 % nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatiosta, nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatio oli keskimäärin 29,7 ng/ μ l ja kokonaissaanto oli keskimäärin 2967 ng.

Nukleiinihappoja mitattaessa epäpuhtauksien (A260) tulisi olla alle 2,5 %. Sylki- ja posken limakalvon solunäytteiden epäpuhtauksien arvot sijoittuvat sylkiprotokollalla välille 0,11-1,2 ja veriprotokollalla välille 0,11-0,68, joten molemmilla protokollilla saavutettiin erinomainen puhtaus. Sylkiprotokollalla epäpuhtauksia oli havaittavissa keskimäärin hieman enemmän. Molemmilla protokollilla tausta oli korkeampi sylkinäytteissä. Molemmilla protokollilla sekä sylkinäytteiden että posken limakalvon epiteelisolunäytteiden

absorbanssisuhde A260/A280 oli yli 1,8, joten näytteissä ei todennäköisesti ollut proteiini-
kontaminaatiota. Absorbanssisuhde oli kuitenkin useissa näytteissä yli 2,0, joten
näytteissä saattoi olla RNA:ta.

Näyttenumero	dsDNA (ng/μl)	dsDNA:n osuus (%)	Nukleiinihapot (ng/μl)	Kokonaissaanto (ng)	Epäpuhtaudet (A260)	Tausta (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
Hius_1a	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-12,88	0,03
Hius_1b	0	0	0,1	11	0,12	0	0,6	0,13	-16,13	0,04
Hius_2	0	0	1,4	154	0,12	0	0,5	0,15	19,98	0,04
Hius_3a	0	0	0,6	66	0,12	0	0,5	0,13	39,94	0,04
Hius_3b	0	0	0,1	11	0,12	0	0,5	0,13	-56,71	0,04
Hius_4	0	0	0,6	66	0,12	0	0,6	0,13	35,84	0,04
Hius_5	0	0	25,2	2772	0,63	0	0,6	0,63	2,66	0,17
Hius_6	0	0	0	0	0,12	0	0,7	0,13	-16,01	0,04
Hius_7	0	0	0,2	22	0,12	0	0,5	0,13	-28,92	0,04
Hius_8	0	0	8,7	957	0,12	0	0,6	0,3	3,91	0,08
Hius_9	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-45,86	0,03
Hius_10	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-18,85	0,04
Hius_11	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-71,02	0,03
Hius_12	0	0	15,4	1694	0,12	0	0,6	0,43	3,06	0,12
Hius_13	0	0	4,3	473	0,12	0	0,6	0,21	5,05	0,06
Hius_14	0	0	0,1	11	0,12	0	0,8	0,13	-17,53	0,04
Hius_15	0	0	0,2	22	0,12	0	0,5	0,12	-101,47	0,04
Keskiarvo	0	0	3,35	1,12						
Keskihajonta	0	0	6,98	767						
Minimi	0	0	0	0						
Maksimi	0	0	25,2	2772						

Taulukko 5. Hiusnäytteiden tulokset.

Näyttenumero	dsDNA (ng/μl)	dsDNA:n osuus (%)	Nukleiinihapot (ng/μl)	Kokonaissaanto (ng)	Epäpuhtaudet (A260)	Tausta (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
Kynsi_1a	0	0	0,5	55	0,12	0	0,5	0,13	24,44	0,04
Kynsi_1b	0	0	0,1	11	0,12	0	0,5	0,13	-58,13	0,04
Kynsi_1c	0	0	0,7	77	0,12	0	0,6	0,14	46,11	0,04
Kynsi_2	0	0	6,6	726	0,12	0	0,6	0,26	4,74	0,07
Kynsi_3a	0	0	12,7	1397	0,12	0	0,5	0,37	3,02	0,1
Kynsi_3b	0	0	6,8	748	0,12	0	0,5	0,26	3,7	0,07
Kynsi_4	0	0	9,1	1001	0,12	0	0,6	0,3	3,55	0,08
Kynsi_5a	0	0	3,6	396	0,12	0	0,6	0,2	6,27	0,05
Kynsi_5b	0	0	3,8	418	0,12	0	0,6	0,2	6,18	0,06
Kynsi_6	0	0	4	440	0,12	0	0,4	0,2	5,22	0,06
Kynsi_7	0	0	6	660	0,12	0	0,5	0,25	3,73	0,06
Kynsi_8	0	0	0,8	88	0,12	0	0,5	0,14	25,31	0,04
Kynsi_9	0	0	0,4	44	0,12	0	0,5	0,13	28,4	0,04
Kynsi_10	0	0	0,1	11	0,12	0	0,5	0,12	38,92	0,03
Kynsi_11	0	0	0,2	22	0,12	0	0,6	0,13	-76,25	0,04
Kynsi_12	0	0	5	550	0,12	0	0,5	0,22	4,72	0,06
Kynsi_13	0	0	1,7	187	0,12	0	0,4	0,15	7,51	0,04
Kynsi_14	0	0	1,1	121	0,12	0	0,5	0,14	15,58	0,04
Kynsi_15	0	0	10,3	1133	0,11	0	0,5	0,32	3,05	0,08
Kynsi_16	0	0	0,9	99	0,12	0	0,6	0,14	23,45	0,04
Keskiarvo	0	0	3,72	409						
Keskihajonta	0	0	3,80	418						
Minimi	0	0	0,1	11						
Maksimi	0	0	12,7	1397						

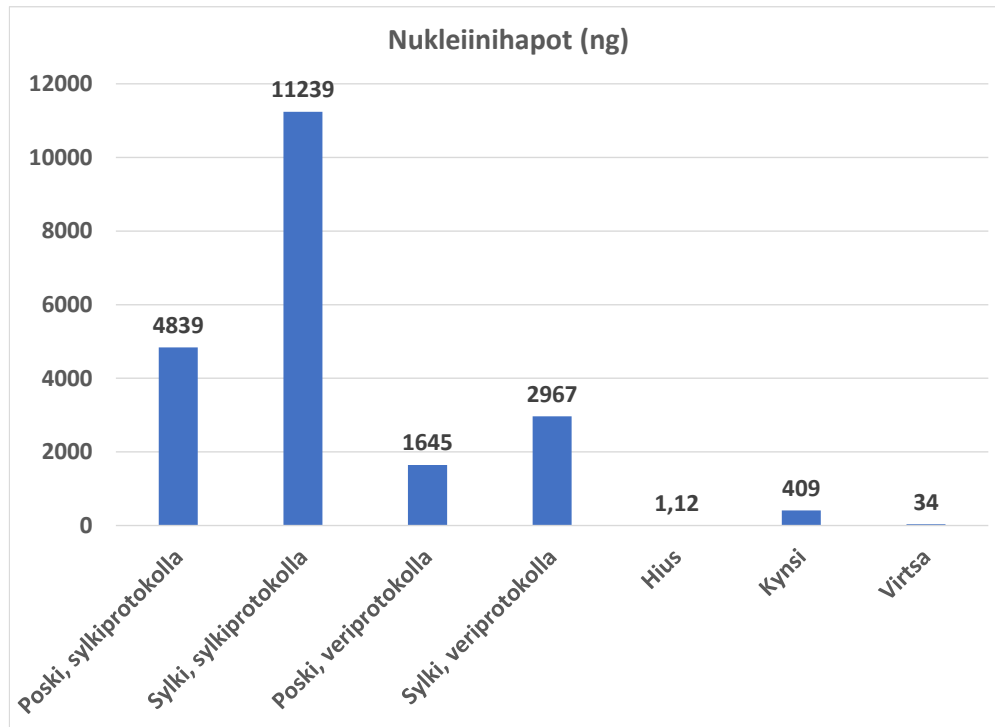
Taulukko 6. Kynsinäytteiden tulokset.

Näyttenumero	dsDNA (ng/ μ l)	dsDNA:n osuus (%)	Nukleiinihapot (ng/ μ l)	Kokonaissaanto (ng)	Epäpuhtaudet (A260)	Tausta (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
Virtsa_1a	0	0	0	0	0,12	0	0,5	0,12	39,58	0,04
Virtsa_1b	0	0	0,2	22	0,12	0	0,6	0,12	-52,7	0,04
Virtsa_1c*	0	0	2,2	242	0,12	0	0,5	0,16	9,24	0,05
Virtsa_2a	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-180,63	0,04
Virtsa_2b	0	0	0,3	33	0,12	0	0,5	0,13	58,98	0,04
Virtsa_3	0	0	1,2	132	0,12	0	0,5	0,15	15,92	0,04
Virtsa_4a	0	0	0,8	88	0,12	0	0,7	0,13	10,62	0,04
Virtsa_4b	0	0	0	0	0,12	0	0,7	0,13	-20,57	0,04
Virtsa_5a	0	0	0,2	22	0,12	0	0,6	0,12	-3611,19	0,04
Virtsa_5b	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-126,23	0,04
Virtsa_6a	0	0	0	0	0,12	0	0,5	0,12	294,9	0,03
Virtsa_6b	0	0	0,1	11	0,12	0	0,6	0,12	-339,92	0,04
Virtsa_7a	0	0	0,1	11	0,12	0	0,5	0,12	51,02	0,04
Virtsa_7b	0	0	0	0	0,12	0	0,5	0,12	-158,28	0,03
Virtsa_8	0	0	0,2	22	0,12	0	0,6	0,12	62,69	0,04
Virtsa_9a	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,13	-100,88	0,04
Virtsa_9b	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	87,04	0,04
Virtsa_10	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-33,11	0,04
Virtsa_11	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-22,62	0,04
Virtsa_12	0	0	0,8	88	0,12	0	0,6	0,13	28,37	0,04
Keskiarvo	0	0	0,3	34						
Keskihajonta	0	0	0,6	61						
Minimi	0	0	0	0						
Maksimi	0	0	2,2	242						

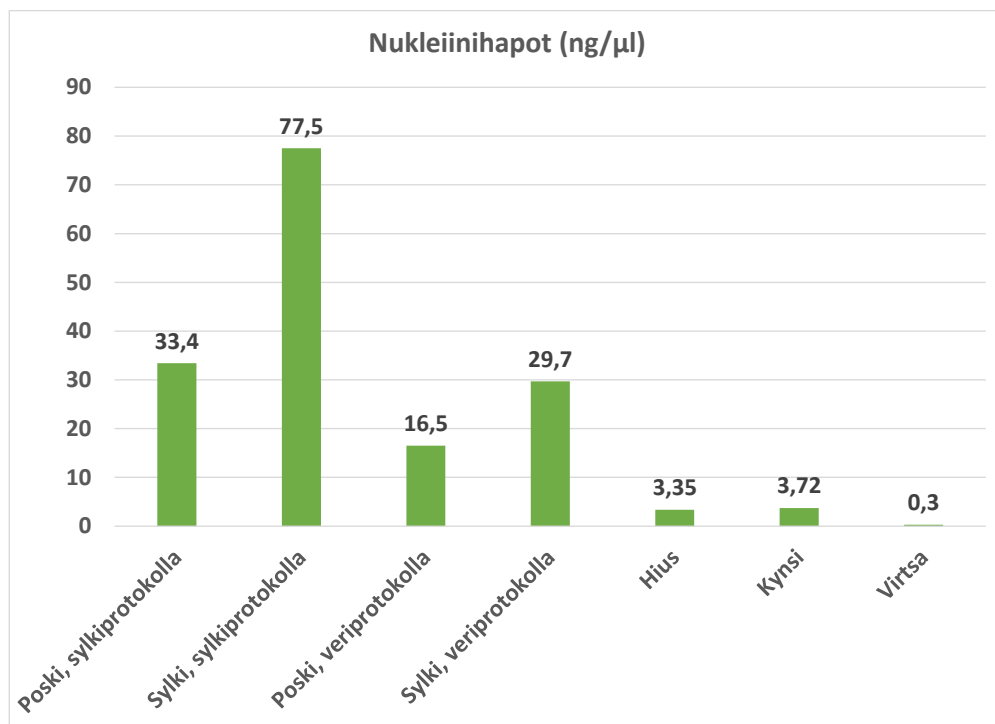
*Näyte otettu säilöntäaineettomaan putkeen

Taulukko 7. Virtsanäytteiden tulokset.

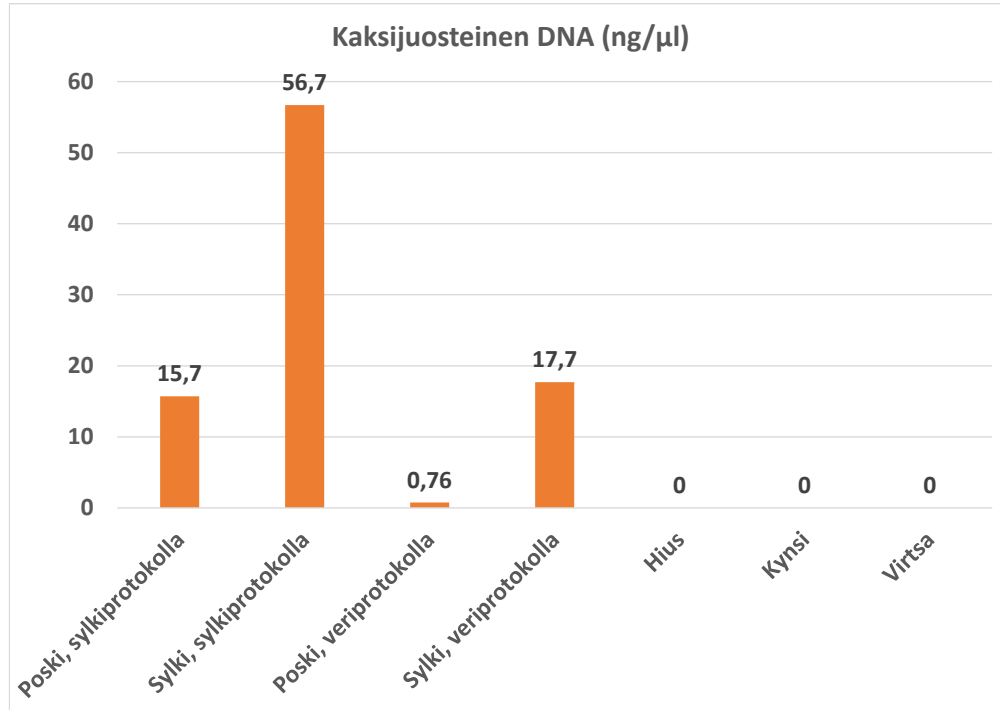
Työssä eristettiin DNA 17 hiusnäytteestä, 20 kynsinäytteestä ja 20 virtsanäytteestä. Hiustenäytteiden nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatio oli keskimäärin 3,35 ng/ μ l ja kokonaissaanto keskimäärin 1,12 ng. Kynsinäytteiden nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatio oli keskimäärin 3,72 ng/ μ l ja kokonaissaanto keskimäärin 409 ng. Virtsanäytteiden nukleiinihappojen kokonaiskonsentraatio oli keskimäärin 0,3 ng/ μ l ja kokonaissaanto keskimäärin 34 ng. Alhaisen kokonaiskonsentraation takia hius-, kynsi- tai virtsanäytteistä ei saatu määritettyä kaksijuosteista DNA:ta. Näyttemateriaalien puhtaus oli erinomainen, sillä epäpuhtauksien (A260) arvot sijoittuvat hiustenäytteissä 0,12-0,63 ja kynsinäytteissä 0,11-0,12 välille ja virtsanäytteissä arvo oli kaikkien näytteiden kohdalla 0,12. Minkään kudosmateriaalin kohdalla tausta ei ollut koholla. Alla olevissa kuvioissa 1-3 on esitetty nukleiinihappojen keskimääräisen kokonaissaannon, konsentraation ja kaksijuosteisen DNA:n konsentraation tulokset näyttemateriaaleittain.



Kuvio 1. Nukleinihappojen keskimääräisen kokonaissaannon tulokset näyttemateriaaleittain.



Kuvio 2. Nukleinihappojen keskimääräisen konsentraation tulokset näyttemateriaaleittain.



Kuvio 3. Kaksijuosteisen DNA:n keskimääräisen konsentraation tulokset näyttemateriaaleittain.

9 POHDINTA

9.1 Sylkinäytteiden ja posken limakalvon epiteelisolunäytteiden tulosten tarkastelu

Sylkinäytteiden kohdalla DNA:n eristys onnistui erinomaisesti. Sylkinäytteiden luovutus oli helppoa ja nopeaa, joten näyte voisi sopia myös kotona otettavaksi. Esikäsitteilyä näytemateriaali ei vaatinut ollenkaan, mikä nopeutti eristysprosessia. Sylkinäytteet ajettiin sekä sylkiprotokollalla että veriprotokollalla, joista sylkiprotokolla oli huomattavasti käyttökelpoisempi. Sylkiprotokollalla saatiin eristettyä kaikista sylkinäytteistä nukleiinihappoja ja yhtä näytettä lukuun ottamatta myös kaksijuosteisen DNA:n konsentraatio onnistuttiin määrittämään. DNA-eristyksessä pyritään saamaan mahdollisimman paljon kaksijuosteista DNA:ta jatkosovelluksiin, esimerkiksi NGS-tutkimukseen. NGS on lyhenne sanoista Next-generation sequencing ja sitä käytetään DNA:n sekvensointiin sekä geenimutaatioiden osoittamiseen (Qin 2019).

Posken limakalvon epiteelisolunäytteiden luovutuksessa näytteenottotekniikka vaikuttaa eristetyn DNA:n saantoon, joten voisi olla hyvä, että näyte otetaan ammattilaisen toimesta. Näytteenottotikkua on hangattava riittävän voimakkaasti posken limakalvoa vasten, jotta soluja saadaan kerättyä riittävästi DNA-eristystä varten. Näyte otetaan hankaamalla alempia ikeniä, joten on varottava osumasta hampaisiin mahdollisen mikrobikontaminaation takia. Posken limakalvon epiteelisolunäytteestä DNA-eristuksen lähtömateriaalina tekee haasteellisen se, että näytteenottotekniikalla saattaa olla vaikutusta tuloksiin. Näytemateriaalin DNA:n saannossa oli paljon hajontaa, jonka voisi arvella osittain johtuvan näytteenottotekniikasta. Kuten sylkinäytteissäkin, posken solunäytteissä DNA:n eristys onnistui paremmin sylkiprotokollalla kuin veriprotokollalla. On kuitenkin huomioitava, että molempien näytemateriaalien kohdalla veriprotokollassa alkuperäistä näytettä otetaan vähemmän DNA-eristykseen, jolloin saanto on luonnostaan pienempi kuin sylkiprotokollalla.

Niiden sylki- ja posken limakalvon epiteelisolunäytteiden, joista saatiin eristettyä DNA:ta, absorbanssisuhde A260/A280 oli yli 1,8. Tämä kertoo siitä, että eristetyissä DNA-näytteissä ei todennäköisesti ole proteiinikontaminaatiota. Näytteissä, joissa absorbanssisuhde oli runsaasti korkeampi kuin 1,8, saattaa olla läsnä RNA:ta, oligonuk-

leotideja tai vapaita nukleotideja. Sylkinäytteissä oli keskimäärin molemmilla protokollilla enemmän epäpuhtauksia kuin posken solunäytteissä. Epäpuhtauksien korkeampi määrä voi johtua siitä, että sylkinäytteissä on saattanut olla enemmän ylimääräisiä partikkeleita kuten ruuan palasia tai mikrobikontaminaatiota kuin posken limakalvon epiteelisolunäytteissä.

Sylki- ja posken limakalvon epiteelisolunäytteet sylkiprotokollalla eristettynä ovat käytökelpoisia potilasnäytteiden lähtömateriaaleina DNA-eristykseen QIASymphony-eristysautomaatilla. Myös veriprotokollan käyttöä voisi joissakin tapauksissa harkita. Molemmista näytemateriaaleista kummallakin protokollalla saatiin yli 200 ng, jota voitaisiin karkeasti pitää genetiikan tutkimuksien alarajana nukleiinihappojen kokonaissaannolle. Sylki- ja posken limakalvon solunäytteiden etuna oli helppo ja nopea näytteenotto, sekä näytteen hyvä säilyvyys myös huoneenlämmössä. Sylkinäyte säilyy eristyskelpoisena OG-500-näyteputkessa huoneenlämmössä jopa 5 vuotta (DNA Genotek Inc., 2011). Posken limakalvon epiteelisolunäyte säilyy eristyskelpoisena OCR-100-näyteputkessa huoneenlämmössä kaksi kuukautta (DNA Genotek Inc., 2017).

9.2 Hius- ja kynsinäytteiden tulosten tarkastelu

Hiusnäytteiden ottaminen ja esikäsittely oli työläs ja aikaa vievä prosessi, sillä hiuksia oli haastavaa ensin kerätä Eppendorf-putkiin ja sen jälkeen siirtää Lyse&Spin-putkiin. Työtä tehdessä tehtiin huomio, että hiusnäytteet olisi kannattanut kerätä suoraan Lyse&Spin-putkiin, sillä tämä olisi nopeuttanut esikäsittelyä huomattavasti. Hiusnäyte sisälsi 10-15 hiusta hiustuppineen, jotka oli pilkottu noin 0,5-1 cm pituisiksi paloiksi. Myöhemmin todettiin, että hiusnäytteiksi olisi saattanut soveltua paremmin pelkät hiustupet, jotka sisältävät runsaasti DNA:ta. Lyysispuskuri ei riittänyt peittämään hiusten paloja kokonaan, joten lyysaus ei onnistunut kunnolla. Lyysispuskuria oli siis liian vähän näytemäärään nähden. Tämän takia Lyse&Spin-putkien suodatinkorit tukkeutuivat, mikä aiheutti ongelmia sentrifugointivaiheessa, sillä lyaatti ei päässyt kunnolla suodatamaan keräysputkeen. Näytteitä jouduttiin sentrifugoimaan korkeilla kierroksilla useita kertoja, jolloin DNA:n laatu saattaa kärsiä. Kolmesta hiusnäytteestä ei saatu lyaattia ollenkaan erotettua. Myös runsaasti keratiinia sisältävä hius näytemateriaalina voi aiheuttaa ongelmia, jos proteinaasi K pilkkoo proteiinit niin tehokkaasti, että suodatinkori tukkeutuu. Kynsinäytteissä lyysispuskurin ja näytemateriaalin suhde oli sopivampi kuin hiusnäytteissä, sillä lyaatti saatiin sentrifugoitua keräysputkeen vaivattomammin. Sekä

hius- että kynsinäytteistä saatiin eristettyä hyvin vähän DNA:ta. Tähän saattoi vaikuttaa edellä mainittu lyysispuskurin liian pieni volyymi näytemäärään nähden.

Hius- ja kynsinäytteiden absorbanssisuhde A260/A280 vaihteli negatiivisesta positiiviseen arvoon, mikä viittaa siihen, että eristetyssä DNA:ssa on epäpuhtauksia, jotka ovat todennäköisesti peräisin näyttemateriaalista. Epäpuhtaudet eivät ole este useimmille jatkotutkimuksille, mutta jatkotutkimusten tuloksia tulkittaessa mahdolliset kontaminaatiot on otettava huomioon. Vaikka hius- ja kynsinäytteistä saatiin eristettyä hyvin vähän DNA:ta, voisi niitä harkita käytettävän tietyissä tapauksissa. Hiusnäytteistä saatiin keskimäärin reilusti alle 200 ng nukleiinihappoja ja kynsinäytteistä saatiin nukleiinihappoja keskimäärin hieman yli 200 ng. Näyttemateriaalien tuloksissa oli paljon hajontaa. Kynsi- ja hiusnäytteiden esikäsittely vei paljon aikaa, joten ne eivät ajankäytön kannalta sovellu usein käytettäviksi näyttemateriaaleiksi sairaalalaboratorioon.

9.3 Virtsanäytteiden tulosten tarkastelu

DNA:n säilymisestä virtsassa ei löytynyt yhtenäistä tietoa, joten virtsanäytteet päädyttiin sentrifugoimaan mahdollisimman pian, kuitenkin viimeistään kahden vuorokauden sisällä näytteenotosta, ja ne pakastettiin -20°C odottamaan DNA-eristystä. Virtsanäytteistä ei juurikaan saatu eristettyä DNA:ta. Tätä voi selittää se, että ihmisen virtsassa on normaalisti hyvin vähän tumallisia soluja, joista DNA:ta saataisiin eristettyä (Ng 2018). Myöhemmin todettiin, että esikäsittelyvaiheessa olisi kannattanut huuhtoa alkuperäisen virtsanäyteputken seinämät ATL puskurilla solupelletin pipetoimisen jälkeen, jotta kaikki solut olisi varmasti saatu talteen. Tämän opinnäytetyön tutkimuksen perusteella ei voida ottaa kantaa siihen, onko virtsaputkessa ollut säilöntäaine vaikuttanut DNA-eristyksen onnistumiseen, sillä tutkimuksessa oli vain yksi näyte, joka ei sisältänyt säilöntäainetta. Tutkimuksen perusteella ei voida myöskään ottaa kantaa siihen, vaikuttaako näytteen tuoreus tai säilytys DNA:n saantoon virtsanäytteestä. Virtsanäytteen säilöntäaineen, tuoreuden ja säilytyksen merkitys DNA-eristyksen onnistumiseen vaatisi siis lisätutkimuksia.

Virtsanäytteistä saatiin eristettyä keskimäärin 34 ng nukleiinihappoja. Tämän lisäksi myös solun energia-aineenvaihdunnasta huolehtivalla soluelimellä, mitokondrioilla on omaa DNA:ta (Heino & Vuento 2019, 97-98). Mitokondrio-DNA:n tutkimiseen tarvitaan noin 22 ng nukleiinihappoja, joten virtsanäyte lähtömateriaalina on käyttökelpoinen ky-

seisessä tutkimustarkoituksessa. Mitokondrio-DNA periytyy äidiltä jälkeläiselle. Mitokondriosairauksissa soluissa on geenivirhe, joka aiheuttaa soluissa energiansaannin heikkenemistä tai aineenvaihdunnallisia häiriöitä. (Heikkilä 2020.)

10 OPINNÄYTETYÖN LUOTETTAVUUS JA EETTISYYS

10.1 Luotettavuuden tarkastelu

Tutkimus toteutettiin hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti, rehellisesti, huolellisesti ja tarkasti. Hyvää tieteellistä käytäntöä noudatettiin kaikissa tutkimuksen vaiheissa, tutkimusta tehdessä, tutkimustulosten tallentamisessa ja esittämisessä sekä tutkimustulosten arvioinnissa. (TENK 2012.) Tieteelliset lähteet ovat avainasemassa opinnäytetyön tietoperustaa laadittaessa. Opinnäytetyötä tekevän on oltava tietoinen uusimmasta opinnäytetyön aiheeseen liittyvästä tutkimustiedosta. (Perttula 2018.) Opinnäytetyöhön pyrittiin etsimään mahdollisimman luotettavia ja tuoreita lähteitä, viittaamalla niihin asianmukaisesti. Eri tietokantoja ja hakusanoja käytettiin kattavasti. Opinnäytetyön lähteiksi valikoitiin sekä suomalaista että ulkomaista kirjallisuutta.

Tässä opinnäytetyössä suoritettujen validoinnin näyteaineisto sisälsi yhteensä 100 kappaletta kudosnäytteitä, noin 20 kappaletta kutakin kudospateriaalia. Tulosten luotettavuutta olisi voinut parantaa se, jos kaikki näytteet olisivat olleet peräisin eri luovuttajilta ja tutkimukseen olisi kerätty enemmän näytteitä. Tähän ei kuitenkaan opinnäytetyön toteuttamisaikataulun ja laajuuden puitteissa ollut resursseja. Työssä noudatettiin aseptisiä työskentelytapoja, jotta voitiin ehkäistä tuloksia häiritsevää kontaminaatiota. Aseptisessä työskentelyssä edetään puhtaimmasta kohteesta likaiseen, minkä avulla estetään kudosten tai välineiden kontaminaatio esimerkiksi mikrobeilta (Karhumäki ym. 2017).

Näytteiden eristämisessä oli mukana Lääketieteellisen genetiikan laboratoriohoitaja ja opinnäytetyön etenemistä ohjasi osaston sairaalageneetikko. QIASymphony-automaattin teknisestä valmistelusta, kuten protokollien asentamisesta, vastasi laitevalmistajan edustaja. Työhön laaditut näytemateriaalien työohjeet tarkasti ja hyväksyi osaston sairaalageneetikko ennen työn suoritusta.

10.2 Eettisyyden tarkastelu

Yksilöiden geneettistä informaatiota koskevaan tiedonkeruuseen liittyy monia eettisiä kysymyksiä. Useimpien eettisten kysymyksien taustalla on käsitys, jonka mukaan geneettinen informaatio, toisin kuin muu terveyteen liittyvä tieto, on moraaliselta kannalta erityistä ja vaatii tarkkaa suojelua. Geneettiseen tutkimukseen näyttemateriaalia kerätessä näytteen luovuttajalle on kerrottava tarkasti, mihin tarkoitukseen geneettistä informaatiota käytetään, kerrotaanko tuloksia näytteen luovuttajalle, kenen muun tietoon tulokset aiotaan saattaa sekä missä DNA-näytteitä tullaan säilyttämään. (Aromaa ym. 2002, 2-3.) Tähän opinnäytetyöhön kerätyistä näytteistä ei tutkittu mitään kliinistä tietoa, sillä työn tarkoituksena oli ainoastaan eristää näytteestä DNA ja arvioida eristykseen onnistumista. Tällöin ei ole huolta siitä, että tutkimuksessa selviäisi mitään arkaluonteista tietoa näytteen luovuttajan terveydentilasta.

Opinnäytetyölle hankittiin sen toteuttamiseen vaadittava tutkimuslupa ja toimeksiantajan kanssa tehtiin kirjallinen opinnäytetyösopimus ennen käytännön toteutuksen aloittamista. Vapaaehtoisille näytteiden luovuttajille annettiin kirjallinen tutkimustiedote (liite 2) ja allekirjoitettava suostumuslomake (liite 1). Tutkimukseen osallistuville kerrottiin tutkimuksesta ja tutkittavan oikeuksista myös suullisesti ja vastattiin mahdollisiin kysymyksiin. Näytteet käsiteltiin nimettöminä ilman mitään tunnistetietoja, joten niitä ei ollut mahdollista yhdistää luovuttajaan. Suostumuslomakkeiden henkilötietoja käsiteltiin luottamuksellisesti ja säilytettiin lukitussa paikassa Lääketieteellisen genetiikan laboratoriossa koko tutkimuksen keston ajan. Tutkimuksen päätyttyä suostumuslomakkeet hävitettiin tietosuojajätteenä. Tutkimukseen kerätyt kudospäätteenä ja niistä eristetty DNA hävitettiin tutkimuksen päätyttyä biologisena jätteenä laboratoriokäytänteiden mukaisesti.

LÄHTEET

- AB Applied Biosystems 2011. MagMAX™ Express 96 User Manual. Saatavilla osoitteessa: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_050582.pdf Luettu 6.5.2021
- Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., & Safo, M. K. (2020). Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. Sub-cellular biochemistry, 94, 345–382. Saatavilla osoitteessa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7370311/> Luettu 17.4.2021
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4. painos. New York: Garland Science. Introduction to Pathogens. Saatavilla osoitteessa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26917/> Luettu 15.4.2021
- Anttila, P., Porkka, K., Lassila, R., Remes, K., Savolainen, E. & Rusanen, S. 2015. Veritaudit. 4. uud. p. Helsinki: Duodecim.
- Aromaa, A., Launis, V. & Lötjönen S. 2002. DNA-näytteet epidemiologisissa tutkimuksissa. ETENE. Saatavilla osoitteessa: <https://etene.fi/julkaisut/2002%20> Luettu 5.2.2021
- Birnboim, H.C, Iwasio R.M & James, C. 2011. Human genomic DNA content of saliva samples collected with the Oragene® self-collection kit. Saatavilla osoitteessa: <https://www.dnagenotek.com/US/pdf/PD-WP-011.pdf%20> Luettu 12.3.2021
- Cantor, E. & Koetsier, G. 2019. Saatavilla osoitteessa: <https://www.bioke.com/support/appnotes/1345/a-practical-guide-to-analyzing-nucleic-acid-concentration-and-purity-with-microvolume-spectrophotometers.html> Luettu 17.3.2021
- Chen Y., Liu Y., Shi, Y., Ping, J., Wu, J & Chen, H. 2020. Magnetic particles for integrated nucleic acid purification, amplification and detection without pipetting. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115912> Luettu 15.3.2021
- Dhaliwal, A. 2013. DNA Extraction and Purification. Saatavilla osoitteessa: <https://www.la-bome.com/method/DNA-Extraction-and-Purification.html> Luettu 21.1.2021
- DNA Genotek Inc. 2017. Easy and reliable DNA collection with ORAcollect•DNA. Saatavilla osoitteessa: <https://www.dnagenotek.com/ROW/pdf/PD-BR-00056.pdf> Luettu 24.4.2021
- DNA Genotek Inc. 2011. Long-term storage of Oragene®/saliva samples. Saatavilla osoitteessa: <https://www.dnagenotek.com/ROW/pdf/PD-PR-012.pdf> Luettu 24.4.2021
- Eskelinen, S. 2016. Virtsan partikkelien koneellinen peruslaskenta (U-solut), virtsan sakan mikroskooppitutkimus (U-sakka). Duodecim terveyskirjasto. Saatavilla osoitteessa: <https://www.terveyskirjasto.fi/snk03152> Luettu 24.4.2021
- Hanson, D. M., Harvey, E., Sweeney, R., & Zielinski, T. J. 2020. Spectroscopy. Saatavilla osoitteessa: <https://chem.libretexts.org/@go/page/4468> Luettu 18.4.2021
- Hansson, O., Valgren, C. & Wester, S. 2007. Proteinase K challenged by a novel protease. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2007.10.207> Luettu 18.4.2021
- Heikkilä, M. 2020. Mitokondriotautiin voi löytyä yllättävä hoito – joskus ruokavalio vaikuttaa. Suomen Lääketieteen Säätiö. Saatavilla osoitteessa: <https://laaketieteensaatio.fi/mitokondriotautiin-voi-loytya-yllattava-hoito-joskus-ruokavalio-vaikuttaa/> Luettu 24.4.2021
- Heino, J. & Vuento, M. 2019. Biokemia ja solubiologia. 1. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Hiltunen, E., Linko, L., Hemminki, S., Hägg, M., Järvenpää, E., Saarinen, P., Simonen, S., & Kärhä, P. 2011. J4/2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. Espoo: Mikes. Saatavilla osoitteessa: <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2011-J4.pdf> Luettu 18.4.2021

Honkala S. 2019. Sylki ja sylkirauhaset. Duodecim terveyskirjasto. Saatavilla osoitteessa: https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=trv00009 Luettu 12.3.2021

Hägg, M. 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Espoo: Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. Saatavilla osoitteessa: <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf> Luettu 18.4.2021

Karhumäki, E., Lehtonen, M., Nieminen, K. & Syrjäkallio-Ylitälo, M. 2006. Päästä varpaisiin: Ihmisen anatomia ja fysiologia. Helsinki: Edita.

Karhumäki, T., Hirvonen, K. & Ylitupa, E. 2017. Välinehuolto. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Kennedy, M. 2020. Photons. Saatavilla osoitteessa: <https://chem.libretexts.org/@go/page/1690> Luettu 18.4.2021

Kääriäinen, H. Geenitestausta. Lääkärikirja Duodecim. Kustannus Oy Duodecim 2.12.2020. Saatavilla osoitteessa: https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01176 Luettu 28.1.2021

LaboratoryInfo 2020. Buffy Coat. Saatavilla osoitteessa: <https://laboratoryinfo.com/buffy-coat/> Luettu 18.3.2021

Lääketieteen termit. Hakusana: DNA. Terveyskirjasto, Duodecim 2021. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://www.terveyskirjasto.fi/sovellukset/sanakirjat/#/> Luettu 17.3.2021

Lääketieteen termit. Hakusana: eluointi. Terveyskirjasto, Duodecim 2021. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://www.terveyskirjasto.fi/sovellukset/sanakirjat/#/> Luettu 18.4.2021

Lääketieteen termit. Hakusana: geenimutaatio. Terveyskirjasto, Duodecim 2021. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://www.terveyskirjasto.fi/sovellukset/sanakirjat/#/> Luettu 18.4.2021

Lääketieteen termit. Hakusana: genomi. Terveyskirjasto, Duodecim 2021. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://www.terveyskirjasto.fi/sovellukset/sanakirjat/#/> Luettu 18.4.2021

Lääketieteen termit. Hakusana: kontaminaatio. Terveyskirjasto, Duodecim 2021. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://www.terveyskirjasto.fi/sovellukset/sanakirjat/#/> Luettu 18.4.2021

Lääketieteen termit. Hakusana: nukleiinihappo. Terveyskirjasto, Duodecim 2021. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://www.terveyskirjasto.fi/sovellukset/sanakirjat/#/> Luettu 17.3.2021

Lääketieteen termit. Hakusana: RNA. Terveyskirjasto, Duodecim 2021. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://www.terveyskirjasto.fi/sovellukset/sanakirjat/#/> Luettu 17.3.2021

Lääketieteen termit. Hakusana: validointi. Terveyskirjasto, Duodecim 2021. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://www.terveyskirjasto.fi/sovellukset/sanakirjat/#/> Luettu 11.2.2021

Lääketieteen termit. Hakusana: välimuotoinen epiteeli. Terveyskirjasto, Duodecim 2021. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://www.terveyskirjasto.fi/sovellukset/sanakirjat/#/> Luettu 17.3.2021

Mediq 2013. BD Vacutainer -virtsanäyteputki. Saatavilla osoitteessa: <https://tuoteluettelo.mediq.fi/n349591/bd-vacutainer--virtsanayteputki> Luettu 12.3.2021

Ng, H.H., Ang, H.C., Hoe, S.Y., Lim, M.-L., Tai, H.E., Soh, R.C.H. & Syn, C.K.-C. 2018. Simple DNA extraction of urine samples: Effects of storage temperature and storage time. *Forensic Science International*, Volume 287, June 2018. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.03.035> Luettu 23.4.2021

Nienstedt, W., Kallio, S., Raitanen, M. & Sinivuori, E. 2003. Luut ja ytimet: Ihmiselimistö lyhyesti. 7. uud. p. Helsinki: WSOY.

Perttula, S. 2018. Luotettavat lähteet – hyvä opinnäytetyön tietoperusta. *Kreodi*. Saatavilla osoitteessa: <https://www.kreodi.fi/arkisto/artikkelit/luotettavat-lahteet-hyva-opinnaytetyon-tietoperusta> Luettu 6.5.2021

Pärssinen, R., Suominen, I. & Haajanen, K. 2012. Biogeeni: Ammatillista biokemiaa ja geeniteknikkaa. Helsinki: Opetushallitus.

Qiagen 2021a. QIASymphony DSP DNA Kits. Saatavilla osoitteessa: <https://www.qiagen.com/nl/products/diagnostics-and-clinical-research/clinical-sample-processing/qiasymphony-dsp-dna-kits-row/#orderinginformation> Luettu 15.3.2021

Qiagen 2021b. QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit. Saatavilla osoitteessa: <https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/sample-processing/qiasymphony-dsp-viruspathogen-kits/?clear=true#orderinginformation> Luettu 15.3.2021

Qiagen 2021c. DNA. Saatavilla osoitteessa: <https://www.qiagen.com/us/service-and-support/learning-hub/molecular-biology-methods/dna/> Luettu 18.1.2021

Qiagen 2021d. QIAxpert System. Saatavilla osoitteessa: <https://www.qiagen.com/gb/products/instruments-and-automation/quality-control-fragment-analysis/qiexpert-system/#orderinginformation> Luettu 17.3.2021

Qiagen 2021e. RNase A. Saatavilla osoitteessa: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/lab-essentials/enzymes/rnase-a/> Luettu 6.5.2021

Qiagen 2020. Why is carrier RNA used during the isolation of gDNA from microdissected samples with the QIAamp DNA Micro Kit? Saatavilla osoitteessa: <https://www.qiagen.com/fi/resources/faq?id=74c4468f-e7bc-4a8c-a290-73b88587136e&lang=en> Luettu 18.4.2021

Qiagen 2016. See what's really in your sample. Saatavilla osoitteessa: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=f0f303f2-015e-4b86-8386-f4ab4a4740c5&lang=en> Luettu 10.1.2021

Qiagen 2013. QIASymphony® SP/AS User Manual – General Description. Version 3.1.

Qin D. 2019. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer biology & medicine*, 16(1), 4–10. Saatavilla osoitteessa: <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055> Luettu 23.8.2021

Safarik, I., Safarikova, M. 1999. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00338-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00338-7) Luettu 19.1.2021

Salonen, K. 2013. Näkökulma tutkimukselliseen ja toiminnalliseen opinnäytetyöhön. Saatavilla osoitteessa: <https://docplayer.fi/1986011-Nakokulmia-tutkimukselliseen-ja-toiminnalliseen-opinnaytetyohon.html> Luettu 5.2.2021

- Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. R. 2017. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines*, 8(3), 83. Saatavilla osoitteessa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6190294/> Luettu 18.4.2021
- Smith, B. 2010. Rinse, Swab or Spit – What’s the real source of DNA in saliva? Saatavilla osoitteessa: <https://blog.dnagenotek.com/blogdnagenotekcom/bid/35944/Rinse-Swab-or-Spit-What-s-the-Real-Source-of-DNA-in-Saliva> Luettu 12.3.2021
- Suomen lääkäriliitto 2021. Lääkärin etiikka > hoidon erityiskysymyksiä > geenitestit. Saatavilla osoitteessa: <https://www.laakariliitto.fi/laakarinetiikka/hoidon-erityiskysymyksia/geenitestit/> Luettu 28.1.2021
- Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. *Geenitekniikka*. 2. korj. p. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- Tepnadze, N. 2019. Investigator Lyse&Spin Basket Kit. Saatavilla osoitteessa: <https://prima-medi.com/ka/2019/12/20/investigator-lysespin-basket-kit/> Luettu 6.4.2021
- Thiede, C., Prange-Krex, G., Freiberg-Richter, J. Bornhäuser, M. & Ehninger, G. 2000. Buccal swabs but not mouthwash samples can be used to obtain pretransplant DNA fingerprints from recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 25, 575–577. Saatavilla osoitteessa: <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702170> Luettu 12.3.2021
- Tilastokeskus. 2021. Etusivu > Tietoa tilastoista > Käsitteet > T > Tunnusluku. Saatavilla osoitteessa: <https://www.stat.fi/meta/kas/tunnusluku.html> Luettu 18.4.2021
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta (TENK) 2021. Hyvä tieteellinen käytäntö (HTK). Saatavilla osoitteessa: <https://tenk.fi/fi/tiedevilppi/hyva-tieteellinen-kaytanto-htk> Luettu 18.1.2021
- Tuokko, S., Rautajoki, A., Lehto, L., Ripatti, T., Simolin, A. & Sinivuori, E. 2008. *Kliiniset laboratorionäytteet: Opas näytteiden ottoa varten*. Helsinki: Tammi.
- Turpeenoja, L. 2005. *Biokemiaa virtsa-aineista lääkemaitoon*. Vantaa: Dark Oy.
- Vilka, H. & Airaksinen, T. 2003. *Toiminnallinen opinnäytetyö*. Helsinki: Tammi.
- Vilpo, J., Niemelä, O. & Pulkki, K. 2010. *Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia*. 3. uud. p. Helsinki: Kandidaattikustannus.
- Vo, K. 2020. Spectrophotometry. Saatavilla osoitteessa: Spectrophotometry. (2020, August 16). Retrieved April 18, 2021. Saatavilla osoitteessa: <https://chem.libretexts.org/@go/page/1431> Luettu 18.4.2021
- Wang, B., Yang, W., McKittrick, J. & Meyers, A. M. 2016. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001> Luettu 15.3.2021
- Youssef, O. 2020. 2032P – Optimization of automated germline DNA extraction from non-tumoral formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues. Saatavilla osoitteessa [vaatii käyttöoikeuden]: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz269.049> Luettu 28.1.2021

Liite 1: Suostumuslomake

Suostumus osallistua opinnäytetyötutkimukseen

Olen saanut tiedot opinnäytetyönä tehtävän tutkimuksen tavoitteista ja käytännön toteutuksesta. Minulle on annettu mahdollisuus esittää lisäkysymyksiä tutkimuksesta. Olen saanut tiedot henkilötietojen käsittelystä tutkimuksessa. Minulle on luvattu, että henkilötietojani käsitellään huolellisesti ja tietoturvallisesti eikä niitä luovuteta ulkopuolisille. Tiedän, että osallistumiseni on vapaaehtoista. Voin keskeyttää tai peruuttaa osallistumiseni tutkimukseen milloin vain. Olen tietoinen siitä, että mikäli keskeytän tutkimuksen tai peruutan suostumuksen, minusta keskeyttämiseen ja suostumuksen peruuttamiseen mennessä kerättyjä tietoja voidaan käyttää osana tutkimusaineistoa.

Paikka ja päivämäärä

Osallistun tutkimukseen

Allekirjoitus

Nimenselvennys

Suostumuksen vastaanottaja

Tutkijan, opinnäytetyötekijän nimi

Alkuperäinen allekirjoitettu tutkittavan suostumus sekä kopio tutkimustiedotteesta jäävät tutkijan arkistoon tutkimuksen ajaksi. Tutkimustiedote ja kopio allekirjoitetusta suostumuksesta annetaan tutkittavalle.

Liite 2: Tiedote tutkimuksesta



Tiedote tutkimuksesta

16.02.2021

TIEDOTE TUTKIMUKSESTA**QIAsymphony-eristysautomaatin soveltuvuus eri kudost materiaalien DNA-eristykseen****1. Pyyntö osallistua tutkimukseen**

Teitä pyydetään mukaan tutkimukseen, jossa tutkitaan miten hyvin erityyppiset kudostnäytteet ovat sovellettavissa DNA:n lähtömateriaalina, kun käytetään QIAsymphony-eristysautomaattia. Tämä tiedote kuvaa tutkimusta ja teidän osuuttanne siinä.

2. Vapaaehtoisuus

Tutkimukseen osallistuminen on täysin vapaaehtoista. Voitte myös keskeyttää tutkimuksen koska tahansa syytä ilmoittamatta.

3. Tutkimuksen tarkoitus

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää, miten hyvin erityyppiset kudostnäytteet ovat sovellettavissa DNA:n lähtömateriaalina, kun käytetään QIAsymphony-eristysautomaattia. Pyritään selvittämään, onko jokin markkinoilla olevista kiteistä soveltuva laajasti erityyppisiin kudoksiin, ja onko lopputuotteena saadun DNA:n määrä ja laatu laboratorioprosessin vaatimuksiin riittävä.

4. Tutkimuksen toteuttajat

Tämä opinnäytetyö toteutetaan Tyks lääketieteellisen genetiikan osastolle. Opinnäytetyötä ohjaa kyseisen osaston sairaalageneetikko ja hankkeen on hyväksynyt osaston prosessinjohtaja. Opinnäytetyö on Työelämäyhteistyön ja opetusmenetelmien kehittäminen bioanalytikkokoulutuksessa (TurkuCRC T163/2017) -hankkeen osatutkimus.

5. Tutkimusmenetelmät ja toimenpiteet

Osallistut tutkimukseen luovuttamalla seuraavia ei-invasiivisia näytteitä:

- Posken limakalvon soluja
- Sylkeä
- Virtsa
- Hiuksia
- Kynsinäytteen

Voit luovuttaa yhtä tai useampaa eri näytemateriaalia. Ennen näytteen luovuttamista kerromme Sinulle, miten näytteenotto tapahtuu ja kuinka paljon näytettä tarvitaan. Luovuttamiasi näytteitä käytetään tutkimusmateriaalina opinnäytetyössämme. Näytteistä eristetään DNA ja määritetään sen pitoisuus ja laatu. Tutkimuksessa ei selviä mitään kliinistä tietoa, ainoastaan se, miten hyvin DNA:n eristys onnistui kyseisestä näytemateriaalista.

Näytteet anonymisoidaan ja koodataan, joten Sinua ei voida yhdistää näytteeseen tutkimuksen aikana. Näytteitä ja suostumuslomakkeita säilytetään Tyks lääketieteellisen genetiikan osastolla tutkimuksen ajan lukitussa paikassa. Tutkimuksen päätyttyä hävitämme Sinusta kerätyt näytteet ja näytteestäsi eristämämme DNA:n biologisena jätteenä

Tutkimuksen päätyttyä hävitämme Sinusta kerätyt näytteet ja näytteestäsi eristämämme DNA:n biologisena jätteenä laboratoriokäytäntöjen mukaisesti. Myös suostumuslomakkeet hävitetään tutkimuksen päätyttyä tietosuojajätteeseen.

6. Kustannukset ja niiden korvaaminen osallistujalle

Tutkimukseen osallistuminen ei maksa Sinulle mitään. Osallistumisesta ei myöskään makseta erillistä korvausta. Matkakustannuksia ei korvata.

7. Tutkimustuloksista tiedottaminen

Tutkimuksessa ei selviä Sinusta mitään kliinistä tietoa. Opinnäytetyö julkaistaan avoimesti Theseus-tietokannassa. Näytteet anonymisoidaan ja koodataan, joten Sinua ei voida tunnistaa tutkimuksesta.

8. Tutkimuksen päättymisen

Myös tutkimuksen suorittaja voi keskeyttää tutkimuksen. Tutkimukseen osallistuja ei saa erillistä tietoa tutkimuksen päättymisestä.

9. Lisätiedot

Pyydämme teitä tarvittaessa esittämään tutkimukseen liittyviä kysymyksiä opinnäytetyötä tekeväälle tutkijalle ja/tai opinnäytetyön ohjaajalle, joiden yhteystiedot ovat alla.

10. Tutkijoiden yhteystiedot

Tutkija, opinnäytetyötekijä

Nimi: Jenni Ali-Penttilä

Puh.

Sähköposti:

Tutkija, opinnäytetyötekijä

Nimi: Piia Pokkinen

Puh.

Sähköposti:

Opinnäytetyön ohjaaja

Titteli: KT-jatko-opiskelija, TtM, Bioanalytiikan päätoiminen tuntiopettaja

Nimi: Marko Björn

Sektorit: TERHY

Puh.

Sähköposti:

Liite 3: Työohjeet näytteiden eristämiseen QIASymphony-eristysautomaatilla

Laatinut: Jenni Ali-Penttilä, Piia Pokkinen
Pvm: 25.4.2021

Työohjeet näytteiden eristämiseen QIASymphony-eristysautomaatilla:**Sylki- ja posken limakalvon solunäytteet**

1. Tarkista, ettei sylkinäytteessä ole kasaantunutta limaa. Pipetoi se tarvittaessa pois. Puristele posken limakalvon solunäytteen Swab-näytteenottotikkuun imeytynyt neste putken seinämää vasten näytteeseen.
2. Aseta sylki- tai posken limakalvon solunäyte alkuperäisessä näyteastiassa (sylki Oragene•DNA OG-500, posken limakalvon solunäyte ORAcCollect•DNA OCR-100) putkialustalle.
3. Näytteestä eristetään DNA Oragene1000-protokollalla QIASymphony DSP DNA Midi -kitillä. Käytä posken limakalvon solunäytteille FIX-labwarea.

Virtsanäytteet

1. Sentrifugoi virtsanäytteet 3000 rpm 20 min alkuperäisissä näyteputkissaan (BD Vacutainer 10 ml).
2. Poista supernatantti pipetillä sentrifugoitujen virtsanäytteiden pellettien päältä. Jos otat valmiiksi erotellut virtsasedimentit pakkasesta, anna niiden sulaa rauhasa huoneenlämmössä.
3. Jos virtsaa on kahdessa putkessa, siirrä sedimentit samaan putkeen. Huuhto putken seinämään jääneet solut vielä pienellä määrällä ATL-puskuria, jotta kaikki solut saadaan talteen.
4. Suspensoi näyte lisäämällä vähintään 300 µl ATL-puskuri.
5. Siirrä 220 µl näytettä Sarstedt-putkeen.
6. Aseta näyte putkialustalle. Näytteestä eristetään DNA Complex200_V6_DSP-protokollalla QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini -kitillä. Käytä virtsanäytteille FIX-labwarea.

Kynsi- ja hiusnäytteet

1. Leikkaa kynnen palat tai hiukset 0,5-1 cm pituisiksi paloiksi ja siirrä Lyse&Spin-putkeen, jos niitä ei ole kerätty suoraan kyseiseen putkeen.
2. Lisää 440 µl ATL-puskuria ja 40 µl proteinaasi K:ta.
3. Laita putki lämpöavistelijaan, inkuboi sekoittamalla 900 rpm 56°C kunnes näyte on täysin lyysautunut.
Huom! Useimmille kudoksille riittävä aika on 3 h. Mikäli näyte ei ole lyysautunut 3 h jälkeen, aikaa voidaan pidentää tai hajoamaton näyte voidaan poistaa sentrifugoimalla kohdan 4 mukaisesti. Myös lyysaus yön yli on mahdollista.
4. Jos näytteessä on liukenematonta kudosta, sentrifugoi 20 000 x g 1 min. Toista, kunnes kaikki neste suodattunut keräysputkeen.
5. Siirrä 220 µl supernatanttia Eppendorf-putkeen. Näytteestä eristetään DNA Complex200_V6_DSP-protokollalla QIASymphony DSP Virus/Pathogen Mini -kitillä. Käytä hius- ja kynsinäytteille FIX-labwarea.

Liite 4: Validointiraportti

TYKS Genomiikka
Lääketieteellinen genetiikka
DNA-diagnostiikka

Lomake 19, Validointiraportti-

1 (7)

Jakelu: Osasto, laatupäällikkö	
Kirjoittaja: Jenni Ali-Penttilä, Piia Pokkinen	Pvm: 25.4.2021
Laatupäällikkö: Minna Toivonen	Pvm: 16/4/2021
Validoinnin suorittajat: Jenni Ali-Penttilä, Piia Pokkinen	
Hyväksyjä: Minna Toivonen	Pvm: 16/4/2021
Suositus menetelmän käyttöönotosta:	
Suositus menetelmän käyttöönottoajankohdasta	

QIASYMPHONY-ERISTYSAUTOMAATIN SOVELTUVUUDEN TESTAUS ERI KUDOSMATERIAALIEN DNA-ERISTYKSEEN, VALIDOINTIRAPORTTI

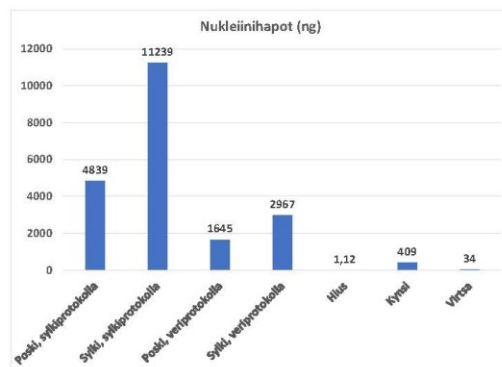
TUTKIMUKSEN TARKOITUS:

Validoinnin tarkoituksena oli testata, miten hyvin erityyppiset kudospäätteet ovat sovellettavissa DNA:n lähtömateriaalina, kun käytetään QIASymphony-eristysautomaattia. Pyrittiin selvittämään, onko markkinoilla olevista kiteistä jokin soveltuva laajasti erityyppisiin kudoksiin, ja onko lopputuotteena saadun DNA:n määrä ja laatu laboratorioprosessin vaatimuksiin riittävä. Aineistona käytettiin vapaaehtoisilta luovuttajilta kerättyjä sylki-, posken limakalvon epiteelisolu-, hius-, kynsi- ja virtsanäytteitä. Testi on validointiajankohtana RUO (Research use only).

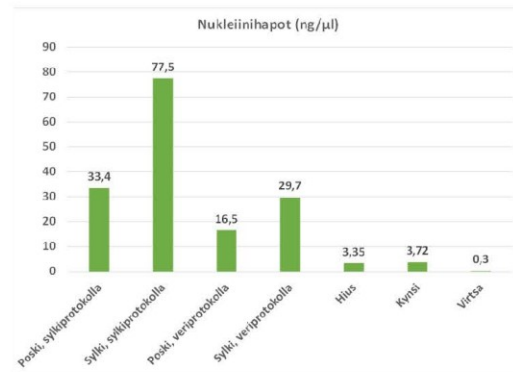
TUTKIMUSMENETELMÄN KUVAUS JA LAATUVAATIMUKSET:

QIASymphony-eristysautomaatin toiminta perustuu magneettipartikkeliteknologiaan. Magneettipartikkeliteknologiassa näytteen DNA sidotaan päällystettyihin magneettipartikkeleihin. Magneettipartikkelit lisätään näytesuspensioon ja inkubaatiovaiheen aikana partikkelit ja DNA sitoutuvat toisiinsa. Magneettipartikkeleita voidaan liikutella liuoksesta toiseen magneettisen keräilykärjen avulla. Kerätty DNA pestään epäpuhtauksista ja puhdistettu DNA eluoidaan liuottimeen magneettipartikkeleista. Eristetyn DNA:n konsentraatio ja puhtaus mitattiin QIAxpert-laitteella, jonka toiminta perustuu spektrofotometriaan.

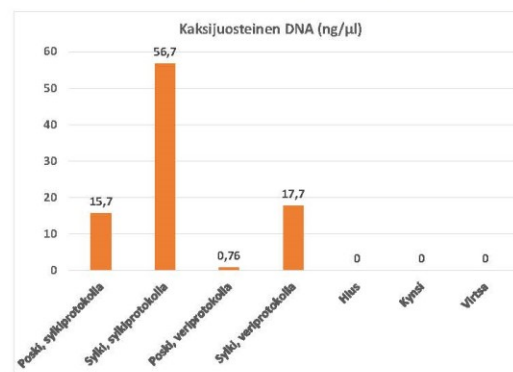
TULOS JA SEN TULKINTA:



Kuvio 1. Nukleiinihappojen keskimääräisen kokonaissaannon tulokset näyttemateriaaleittain.



Kuvio 2. DNA:n keskimääräisen konsentraation tulokset näyttemateriaaleittain.



Kuvio 3. Kaksijuosteisen DNA:n keskimääräisen konsentraation tulokset näyttemateriaaleittain.

Yllä olevissa kuvioissa 1-3 on esitetty yhteenveto nukleiinihappojen keskimääräisen kokonaissaannon, konsentraation ja kaksijuosteisen DNA:n konsentraation tuloksista näyttemateriaaleittain. Nukleiinihappojen kokonaissaannon alarajana, joka vähintään tarvitaan jatkotutkimuksiin, voidaan pitää 200 ng saantoa. Tämä tulos ylittyi molemmilla protokollilla sylki- ja posken limakalvon epiteelisolunäytteiden tapauksessa. Myös kynsinäytteistä saatiin keskimäärin yli 200 ng. Hius- ja virtsanäytteiden kokonaissaanto jäi reilusti alle alarajan. Virtsanäytteiden keskimääräinen kokonaissaanto riittäisi kuitenkin mitokondriaalisen DNA:n tutkimuksiin, joissa alarajana voidaan pitää 22 ng. DNA:n eristyksessä pyritään saamaan mahdollisimman paljon kaksijuosteista DNA:ta, jota tarvitaan esimerkiksi NGS-tutkimuksen suorittamiseen. Kuvioista 2-3 nähdään, että kaksijuosteista DNA:ta on saatu syljestä molemmilla protokollilla ja posken limakalvon epiteelisoluista sylki-protokollalla.

VALIDOINTITESTAUKSEN TULOS:

Sylki- ja posken limakalvon epiteelisolunäytteet sylki-protokollalla eristettynä ovat käyttökelpoisia potilasnäytteiden lähtömaterialina DNA-eristykseen QIASymphony-eristysautomaatilla. Myös veri-protokollan käyttöä voi joissakin tapauksissa harkita. Hiusnäytteiden DNA:n saanto jäi hyvin vähäiseksi. Kynsinäytteistä DNA:ta saatiin eristettyä hieman paremmin. Hius- ja kynsinäytteiden esikäsittelyvaiheessa todettiin, että lyysispuskuria oli liian vähän näyttemäärään nähden, jolloin näytteet eivät lyysautuneet kunnolla ja Lyse&Spin-putkien basketit tukkeutuivat, mikä aiheutti ongelmia sentrifugointivaiheessa. Näytteen epätäydellinen lyysautuminen saattoi vaikuttaa myös eristetyn DNA:n vähäiseen

saantoon. Kynsinäytteiden kokonaissaanto kuitenkin ylitti tutkimuksiin tarvittavan alarajan, joten näytemateriaalia voidaan käyttää tietyissä tapauksissa. Myös virtsanäytteiden kokonaissaanto jäi vähäiseksi, mutta näytemateriaalia voidaan käyttää esimerkiksi mitokondrio-DNA:n tutkimiseen, jossa nukleiinihappoja tarvitaan huomattavasti vähemmän.

Sylki- ja posken limakalvon epiteelisolunäytteitä oli helppo ja nopea ottaa. Posken limakalvon solunäytteessä on kuitenkin huomioitava näyteenottotekniikan vaikutus tuloksiin. Näyteenottotikkua on hangattava tarpeeksi voimakkaasti ikeniä vasten riittävän solumäärän keräämiseksi ja varottava osumasta hamapaisiin mahdollisen mikrobikontaminaation välttämiseksi. Näytemateriaalit säilyvät hyvin huoneenlämmössä alkuperäisissä näyteputkissaan. Hius- ja kynsinäytteitä oli työläästä siirtää alkuperäisestä Eppendorf-putkesta Lyse&Spin-putkeen, joten jatkossa näytteet kannattaisi kerätä suoraan Lyse&Spin-putkiin. DNA:n säilymisestä virtsassa ei löytynyt yhtenäistä tietoa, joten virtsanäytteet päädyttiin sentrifugoimaan mahdollisimman pian, kuitenkin viimeistään kahden vuorokauden sisällä näyteenotosta, ja ne pakastettiin -20°C. Virtsanäytteet kerättiin yhtä näytettä lukuun ottamatta säilöntäaineelliseen putkeen bakteerien lisääntymisen estämiseksi. Tämän validoinnin tuloksien perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä siitä, onko virtsanäytteen säilöntäaineella, tuoreudella tai säilytyksellä merkitystä DNA-eristyksen onnistumiseen.

Hius-, kynsi- ja virtsanäytteiden absorbanssisuhte A260/A280 vaihteli negatiivisesta positiiviseen arvoon, mikä kertoo siitä, että eristetyssä DNA:ssa oli epäpuhtauksia, jotka ovat todennäköisesti peräisin näytemateriaalista. Nämä epäpuhtaudet eivät ole este useimmille jatkotutkimuksille, mutta jatkotutkimusten tuloksia tulkittaessa mahdolliset kontaminantit on otettava huomioon. Muilta osin validointinäytteiden eristetyn DNA:n puhtaus oli hyvä. Alla olevissa taulukoissa 1-8 on esitetty validoinnin tulokset.

Sample name	dsDNA (ng/µl)	dsDNA:n osuus (%)	Nucleic acids (ng/µl)	Nucleic acids (ng)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
Poski_1_sylkiprotokolla	17,6	41,8	42,1	6105	0,61	0	0,3	0,97	2,3	0,22
Poski_2_sylkiprotokolla	43,2	95,8	45,1	6540	0,16	0,58	0,5	1,03	2,07	0,23
Poski_3a_sylkiprotokolla	0	0	22,2	3219	0,12	0	0,4	0,57	2,57	0,13
Poski_3b_sylkiprotokolla	0	0	18,2	2639	0,12	0	0,4	0,49	2,71	0,11
Poski_4a_sylkiprotokolla	17,9	56,3	31,8	4611	0,39	0	0,4	0,75	2,3	0,17
Poski_4b_sylkiprotokolla	0	0	16,5	2393	0,11	0	0,4	0,45	2,82	0,11
Poski_5_sylkiprotokolla	0	0	24,1	3495	0,12	0	0,4	0,6	2,39	0,14
Poski_6_sylkiprotokolla	26,6	58,3	45,6	6612	0,51	0	0,4	1,05	2,26	0,24
Poski_7_sylkiprotokolla	26,4	52,2	50,6	7337	0,6	0	0,4	1,13	2,19	0,27
Poski_8_sylkiprotokolla	24,9	66,4	37,5	5438	0,36	0	0,3	0,87	2,23	0,21
Keskiarvo	15,7	37,1	33,4	4839						
Keskihajonta	15,2	34,8	12,5	1812						
Minimi	0	0	16,5	2393						
Maksimi	43,2	95,8	50,6	7337						

Taulukko 1. Posken limakalvon epiteelisolunäytteiden tulokset sylkiprotokollalla.

Sample name	dsDNA (ng/ μ l)	dsDNA:n osuus (%)	Nucleic acids (ng/ μ l)	Nucleic acids (ng)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/ A280	A260/ A230
Sylki_1_sylkiprotokolla	67,2	61,4	109,4	15863	0,94	0,99	0,2	2,29	1,95	0,53
Sylki_2a_sylkiprotokolla	75,4	80,8	93,3	13529	0,46	0,94	0,3	1,97	1,86	0,48
Sylki_2b_sylkiprotokolla	56,5	81,3	69,5	10078	0,38	0,43	0,3	1,51	1,98	0,38
Sylki_3a_sylkiprotokolla	47,9	80,5	59,5	8628	0,35	0,48	0,3	1,31	1,97	0,33
Sylki_3b_sylkiprotokolla	27,6	67,3	41	5945	0,38	0,97	0,5	0,94	1,91	0,26
Sylki_4a_sylkiprotokolla	45,6	80,7	56,5	8193	0,33	0,93	0,4	1,24	1,9	0,33
Sylki_4b_sylkiprotokolla	24,6	67,2	36,6	5307	0,36	1,01	0,5	0,85	1,89	0,24
Sylki_5_sylkiprotokolla	0	0	20,5	2973	0,12	0	0,5	0,53	2,65	0,14
Sylki_6_sylkiprotokolla	69,2	55,9	123,7	17937	1,2	0,39	0,2	2,59	2,03	0,59
Sylki_7_sylkiprotokolla	153,3	92,9	165,1	23940	0,34	1,03	0,3	3,42	1,85	0,74
Keskiarvo	56,7	66,8	77,5	11239						
Keskihajonta	41,2	26,0	44,9	6513						
Minimi	0	0	41	2973						
Maksimi	153,3	92,9	165,1	23940						

Taulukko 2. Sylkinäytteiden tulokset sylkiprotokollalla.

Sample name	dsDNA (ng/ μ l)	dsDNA:n osuus (%)	Nucleic acids (ng/ μ l)	Nucleic acids (ng)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/ A280	A260/ A230
Poski_1_veriprotokolla	0	0	13,5	1350	0,11	0	0,5	0,39	2,75	0,11
Poski_2_veriprotokolla	0	0	11,7	1170	0,11	0	0,4	0,35	2,87	0,1
Poski_3_veriprotokolla	0	0	16	1600	0,12	0	0,6	0,44	2,52	0,12
Poski_4a_veriprotokolla	0	0	21,9	2190	0,11	0	0,4	0,55	2,52	0,15
Poski_4b_veriprotokolla	7,6	21,5	35,4	3540	0,67	0	0,4	0,83	2,41	0,23
Poski_5a_veriprotokolla	0	0	12	1200	0,11	0	0,5	0,35	3,03	0,1
Poski_5b_veriprotokolla	0	0	14,1	1410	0,11	0	0,5	0,39	2,65	0,11
Poski_6_veriprotokolla	0	0	18,7	1870	0,12	0	0,5	0,49	2,51	0,14
Poski_7_veriprotokolla	0	0	10,1	1010	0,12	0	0,6	0,32	2,98	0,09
Poski_8_veriprotokolla	0	0	11,1	1110	0,11	0	0,5	0,34	3,02	0,1
Keskiarvo	0,76	2,15	16,5	1645						
Keskihajonta	2,40	6,80	7,60	760						
Minimi	0	0	10,1	1010						
Maksimi	7,6	21,5	35,4	3540						

Sample name	dsDNA (ng/μl)	dsDNA:n osuus (%)	Nucleic acids (ng/μl)	Nucleic acids (ng)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
Sylki_1_veriprotokolla	48,7	90,0	54,1	5410	0,22	0,44	0,4	1,19	2,03	0,35
Sylki_2_veriprotokolla	41,9	100	41,9	4190	0,12	0	0,6	0,96	2,18	0,28
Sylki_3_veriprotokolla	4,8	14,6	32,8	3280	0,68	0	0,7	0,78	2,37	0,23
Sylki_4a_veriprotokolla	0	0	14,2	1420	0,12	0	0,8	0,41	2,88	0,13
Sylki_4b_veriprotokolla	0	0	8,7	870	0,12	0	0,8	0,3	3,99	0,1
Sylki_5_veriprotokolla	11,4	37,0	30,8	3080	0,5	0	0,5	0,73	2,33	0,22
Sylki_6_veriprotokolla	52,7	100	52,7	5270	0,11	0	0,5	1,17	2,09	0,34
Sylki_7_veriprotokolla	0	0	7	700	0,12	0,39	0,6	0,26	2,55	0,08
Sylki_8_veriprotokolla	0	0	24,8	2480	0,12	0,57	0,4	0,61	2,15	0,18
Keskiarvo	17,7	38,0	29,7	2967						
Keskihajonta	23,0	45,7	17,7	1769						
Minimi	0	0	7	700						
Maksimi	52,7	100	54,1	5410						

Taulukko 3. Sylinderinäytteiden tulokset veriprotokollalla.

Sample name	dsDNA (ng/μl)	dsDNA:n osuus (%)	Nucleic acids (ng/μl)	Nucleic acids (ng)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/A280	A260/A230
Hius_1a	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-12,88	0,03
Hius_1b	0	0	0,1	11	0,12	0	0,6	0,13	-16,13	0,04
Hius_2	0	0	1,4	154	0,12	0	0,5	0,15	19,98	0,04
Hius_3a	0	0	0,6	66	0,12	0	0,5	0,13	39,94	0,04
Hius_3b	0	0	0,1	11	0,12	0	0,5	0,13	-56,71	0,04
Hius_4	0	0	0,6	66	0,12	0	0,6	0,13	35,84	0,04
Hius_5	0	0	25,2	2772	0,63	0	0,6	0,63	2,66	0,17
Hius_6	0	0	0	0	0,12	0	0,7	0,13	-16,01	0,04
Hius_7	0	0	0,2	22	0,12	0	0,5	0,13	-28,92	0,04
Hius_8	0	0	8,7	957	0,12	0	0,6	0,3	3,91	0,08
Hius_9	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-45,86	0,03
Hius_10	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-18,85	0,04
Hius_11	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-71,02	0,03
Hius_12	0	0	15,4	1694	0,12	0	0,6	0,43	3,06	0,12
Hius_13	0	0	4,3	473	0,12	0	0,6	0,21	5,05	0,06
Hius_14	0	0	0,1	11	0,12	0	0,8	0,13	-17,53	0,04
Hius_15	0	0	0,2	22	0,12	0	0,5	0,12	-101,5	0,04
Keskiarvo	0	0	3,35	1,12						
Keskihajonta	0	0	6,98	767						
Minimi	0	0	0	0						
Maksimi	0	0	25,2	2772						

Taulukko 1. Hiusnäytteiden tulokset.

Sample name	dsDNA (ng/μl)	dsDNA:n osuus (%)	Nucleic acids (ng/μl)	Nucleic acids (ng)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/ A280	A260/ A230
Kynsi_1a	0	0	0,5	55	0,12	0	0,5	0,13	24,44	0,04
Kynsi_1b	0	0	0,1	11	0,12	0	0,5	0,13	-58,13	0,04
Kynsi_1c	0	0	0,7	77	0,12	0	0,6	0,14	46,11	0,04
Kynsi_2	0	0	6,6	726	0,12	0	0,6	0,26	4,74	0,07
Kynsi_3a	0	0	12,7	1397	0,12	0	0,5	0,37	3,02	0,1
Kynsi_3b	0	0	6,8	748	0,12	0	0,5	0,26	3,7	0,07
Kynsi_4	0	0	9,1	1001	0,12	0	0,6	0,3	3,55	0,08
Kynsi_5a	0	0	3,6	396	0,12	0	0,6	0,2	6,27	0,05
Kynsi_5b	0	0	3,8	418	0,12	0	0,6	0,2	6,18	0,06
Kynsi_6	0	0	4	440	0,12	0	0,4	0,2	5,22	0,06
Kynsi_7	0	0	6	660	0,12	0	0,5	0,25	3,73	0,06
Kynsi_8	0	0	0,8	88	0,12	0	0,5	0,14	25,31	0,04
Kynsi_9	0	0	0,4	44	0,12	0	0,5	0,13	28,4	0,04
Kynsi_10	0	0	0,1	11	0,12	0	0,5	0,12	38,92	0,03
Kynsi_11	0	0	0,2	22	0,12	0	0,6	0,13	-76,25	0,04
Kynsi_12	0	0	5	550	0,12	0	0,5	0,22	4,72	0,06
Kynsi_13	0	0	1,7	187	0,12	0	0,4	0,15	7,51	0,04
Kynsi_14	0	0	1,1	121	0,12	0	0,5	0,14	15,58	0,04
Kynsi_15	0	0	10,3	1133	0,11	0	0,5	0,32	3,05	0,08
Kynsi_16	0	0	0,9	99	0,12	0	0,6	0,14	23,45	0,04
Keskiarvo	0	0	3,72	409						
Keskihajonta	0	0	3,80	418						
Minimi	0	0	0,1	11						
Maksimi	0	0	12,7	1397						

Taulukko 2. Kynsinäytteiden tulokset.

Sample name	dsDNA (ng/μl)	dsDNA:n osuus (%)	Nucleic acids (ng/μl)	Nucleic acids (ng)	Impurities (A260)	Background (A260)	Residue (%)	A260	A260/ A280	A260/ A230
Virtsa_1a	0	0	0	0	0,12	0	0,5	0,12	39,58	0,04
Virtsa_1b	0	0	0,2	22	0,12	0	0,6	0,12	-52,7	0,04
Virtsa_1c*	0	0	2,2	242	0,12	0	0,5	0,16	9,24	0,05
Virtsa_2a	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-180,6	0,04
Virtsa_2b	0	0	0,3	33	0,12	0	0,5	0,13	58,98	0,04
Virtsa_3	0	0	1,2	132	0,12	0	0,5	0,15	15,92	0,04
Virtsa_4a	0	0	0,8	88	0,12	0	0,7	0,13	10,62	0,04
Virtsa_4b	0	0	0	0	0,12	0	0,7	0,13	-20,57	0,04
Virtsa_5a	0	0	0,2	22	0,12	0	0,6	0,12	-361,1	0,04
Virtsa_5b	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-126,2	0,04
Virtsa_6a	0	0	0	0	0,12	0	0,5	0,12	294,9	0,03
Virtsa_6b	0	0	0,1	11	0,12	0	0,6	0,12	-339,9	0,04
Virtsa_7a	0	0	0,1	11	0,12	0	0,5	0,12	51,02	0,04
Virtsa_7b	0	0	0	0	0,12	0	0,5	0,12	-158,3	0,03
Virtsa_8	0	0	0,2	22	0,12	0	0,6	0,12	62,69	0,04
Virtsa_9a	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,13	-100,9	0,04
Virtsa_9b	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	87,04	0,04
Virtsa_10	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-33,11	0,04
Virtsa_11	0	0	0	0	0,12	0	0,6	0,12	-22,62	0,04
Virtsa_12	0	0	0,8	88	0,12	0	0,6	0,13	28,37	0,04
Keskiarvo	0	0	0,3	34						
Keskihajonta	0	0	0,6	61						
Minimi	0	0	0	0						
Maksimi	0	0	2,2	242						

*Näyte otettu säilöntäaineettomaan putkeen

Taulukko 3. Virtsanäytteiden tulokset.