



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Joel Tilhe

Olosuhteiden ja eristysmenetelmien vaikutus verinäytteistä eristettävään DNA:han

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

16.9.2020

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Joel Tilhe Olosuhteiden ja eristysmenetelmien vaikutus verinäytteistä eristettävään DNA:han 29 sivua 16.9.2020
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	laboratoriokoordinaattori Tuuli Sistonen lehtori Tiina Soininen
<p>Opinnäytetyö suoritettiin THL Genomiikka ja Biopankki -yksikön tiloissa Helsingin Meilahdessa keväällä 2020. Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, miten eri säilytysolosuhteet, esikäsitteilymenetelmät sekä eri pitoisuuden mittaamenetelmät vaikuttavat ihmisverestä eristettävän DNA:n pitoisuuteen ja laatuun. Näytteitä kerättiin kokonaisuudessaan 45 viideltä eri näytteenantajalta. Jokaiselta näytteenantajalta kerättiin yhdeksän 5 ml:n kokonaisverinäytettä.</p> <p>Verinäytteet jaettiin kolmeen eri ryhmään niiden säilytystavan perusteella. Ryhmä 1 valittiin vertailuryhmäksi, ja pakastettiin täysin laboratorion menetelmäohjeen mukaisesti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa välittömästi näytteenkeräyksen jälkeen. Ryhmä 2:n näytteet siirrettiin näytteenoton jälkeen $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilaan. Matkapakastimen kantta avattiin satunnaisin väliajoin 15 minuutiksi, ja näin simuloitiin matkapakastimen jatkuvasta availusta seuraavaa lämpötilan vaihtelua. Ryhmä 3:n näytteet pakastettiin ensin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa kuten ryhmä 1:n, mutta niiden annettiin sulaa kertaalleen huoneenlämpöiseksi ja pakastettiin uudelleen.</p> <p>Näytteet jaettiin vielä kahteen ryhmään niiden esikäsitteilymenetelmän mukaan: 30 näytettä eristettiin magneettibeadimenetelmään perustuvalla näytteenkäsittelyrobotilla, ja 15 näytettä eristettiin käsin suolasaostusmenetelmällä.</p> <p>Kaikkien näytteiden pitoisuus mitattiin kahdella eri menetelmällä, absorbanssiin perustuvalla mittaamenetelmällä, sekä merkkiaineen fluoresenssiin perustuvalla menetelmällä. Toisin kuin absorbanssimittaus, joka mittaa DNA:n kokonaispitoisuutta merkkiaineen fluoresenssiin perustuva mittaus tunnistaa pelkästään kaksijuosteisen DNA:n.</p> <p>Kaikista näytteistä saatiin onnistuneesti eristettyä DNA:ta. Tulosten perusteella voidaan sanoa eri lämpötiloilla olleen pitoisuutta madaltava vaikutus verinäytteestä eristettävän DNA:han, erityisesti dsDNA:n pitoisuuteen. Ainoastaan ryhmien 2 ja 3 välinen ero pitoisuudessa pystyttiin osoittamaan tilastollisesti merkitseväksi. Eristysmenetelmien välille pystyttiin osoittamaan tilastollisesti merkitsevä ero ryhmissä 2 ja 3, muttei vertailuryhmässä 1 absorbanssimittattuna. Fluoresenssimittattuna ero eristysmenetelmien välillä oli tilastollisesti merkitsevä kaikissa säilytyslämpötiloissa. Jotta voitaisiin varmistaa tulosten luotettavuus, tarvittaisiin huomattavasti nykyistä suurempi näytemäärä. Nykyisellä näytemäärällä biologisten näytteiden suuren vaihtelun takia tilastollisen analyysin selitysvoima jäi vähäiseksi.</p>	
Avainsanat	DNA-eristäminen, suolasaostus, magneettibeadit, verinäytteet.

Author Title Number of Pages Date	Joel Tilhe Effects of Extraction Methods and Different Storage Environments on DNA Extracted from Blood Samples 29 pages 16 September 2020
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Tuuli Sistonen, Laboratory coordinator Tiina Soininen, Senior lecturer
<p>The purpose of this thesis work was to determine how different storage conditions, preanalytical methods and different measurement methods affect the concentration and quality of DNA isolated from human blood samples. Total amount of 45 whole blood samples measuring 5 ml in volume were collected from five distinct subjects, nine samples per subject. The laboratory work was carried out at the Genomics and Biobank unit of the Finnish Institute for Health and Welfare in Meilahti, Helsinki during the spring of 2020.</p> <p>Blood samples were divided into three groups based on their method of storage. Group 1 was selected as a control group and completely frozen in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ freezer immediately after sampling, following the laboratory methodological instructions. Group 2 samples were moved after sampling to a mobile freezer with a temperature of $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The lid of the mobile freezer was opened at random intervals for 15 minutes, simulating the temperature variation following the continuous opening of the freezer. Group 3 was first frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ as Group 1, and then allowed to melt completely to room temperature before being re-frozen again at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.</p> <p>The samples were further divided into two groups according to their pre-treatment method: the DNA from 30 samples was isolated with a sample treatment robot based on the magnetic bead method, and 15 samples were hand-isolated by the salting out method. The concentrations of all samples were measured by two different methods, the absorbance-based measurement method, and the fluorescence-based method. Unlike with the absorbance method, which measures the total DNA concentration of the sample, the fluorescence-based method only detects double-stranded DNA.</p> <p>DNA was successfully recovered from all samples. Based on the results, it appears that the different storage temperatures had a decreasing effect on the amount of DNA recovered per blood sample, especially dsDNA. Only samples stored in temperatures 2 and 3 yielded a statistically significant difference in DNA yield, when measured with the absorbance method. Difference for temperature group 1 was not statistically significant. Samples measured using the fluorescence method yielded a statistically significant effect in all temperature groups. To achieve higher certainty in the results, a substantially larger sample size would be needed. The current sample size was too low to achieve a proper level of statistical power in the analysis because of the high variability of biological samples.</p>	
Keywords	DNA-extraction, salt precipitation, magnetic bead, blood.

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Verinäytteet	2
2.2	DNA-eristysmenetelmät	3
2.3	Magneettipartikkeleihin perustuva DNA-eristys	3
2.4	DNA:n eristäminen suolasaostamalla	4
2.5	DNA-pitoisuuden määrittäminen	6
2.6	Pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen fluorometrisesti	7
2.7	Säilytyslämpötila ja säilyvyys	9
3	Työn toteutus	9
3.1	Näytteenotto	10
3.2	Näytteenhallinta tietokannassa	11
3.3	DNA-eristys Chemagic 360 -eristysrobotilla	12
3.4	DNA-eristäminen suolasaostusmenetelmällä	14
3.4.1	Punasolujen hajotus/pesu	14
3.4.2	Valkosolujen hajotus	14
3.4.3	Proteiinien saostaminen	14
3.4.4	DNA:n saostaminen ja pesu	15
3.5	Pitoisuusmittaus DropSense 96 -laitteella	16
3.6	Kaksijuosteisen DNA:n pitoisuuden mittaus fluorometrisesti	17
3.7	Tulosten tilastollinen analyysi	18
4	Tulokset	19
4.1	Erot mittausmenetelmien välillä	19
4.2	Erot säilytysolosuhteiden välillä	20
4.3	Erot eristysmenetelmien välillä	22
5	Loppupäätelmä ja johtopäätökset	24
	Lähteet	27

Lyhenteet

ANOVA – Analysis of variance, varianssianalyysi

Cell Lysis – Valkosolujen hajotukseen käytetty reagenssi

DNA - Deoksiribonukleiinihappo

dsDNA – Double-stranded DNA, kaksijuosteinen deoksiribonukleiinihappo

EDTA - Etyleenidiamiinitetraetikkahappo

EtOH – Etyylialkoholi

Fe₃O₄ – Magnetiitti, ferromagneettinen rautamalmineraali

MBE – Magnetic Bead Extraction, magneettibeadieristys

RBC – Red Blood Cell, punasolu.

RBC Lysis – Punasolujen hajotukseen käytetty reagenssi

ssDNA – Yksijuosteinen deoksiribonukleiinihappo

TE-Buffer – TE-puskuri. Tris(hydroksimetyyli)aminometaanista ja etyleenidiamiinitetraetikkahaposta muodostettu DNA-säilytyksessä käytetty puskuriliuos

THL – Terveiden ja hyvinvoinnin laitos

1 Johdanto

Genomiikka on yksi nopeimmin kasvavia lääketieteen haaroja. Globaalin genomiikka-markkinoiden arvoksi on arvioitu vuonna 2019 jopa 18,9 miljardia dollaria, ja kasvua enustetaan jopa 13,5 % vuodessa, nousten 35,7 miljardiin dollariin vuoteen 2024 mennessä [1.] Genotyypauksen ja genomisekvensoinnin yleistyessä tarve luotettavaan DNA-eristykseen kasvaa sen mukana. Verinäytteitä saatetaan kuitenkin säilyttää vaihtelevissa olosuhteissa, jotka voivat johtaa epäonnistuneeseen DNA-eristykseen.

Työn tarkoituksena oli selvittää eri olosuhteiden vaikutus verinäytteistä eristettävän DNA:n määrään. Eri säilytyslämpötilalla on todettu olevan vaikutusta DNA-saantoon sekä kaksijuosteisen DNA:n määrään verinäytteistä eristetyissä DNA-näytteissä. [2.] Biopankkiin tulevien näytteiden välillä on usein merkittäviä eroja, esimerkiksi niiden iän ja säilytystavan perusteella. Muuttujat kuten näytteenotto, näytteen kuljetus, säilytysaika ja säilytysolosuhteet voivat vaihdella merkittävästi näytteiden välillä, ja vaikuttaa lopulliseen DNA-saantoon negatiivisesti.

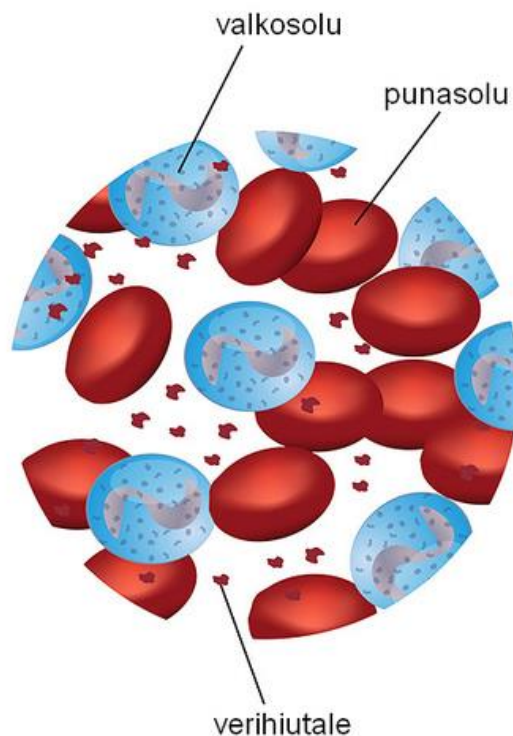
Työ suoritettiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen Genomiikka ja Biopankki -yksikössä Helsingin Meilahdessa. Genomiikka ja Biopankki -yksikkö on Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen alainen yksikkö, joka tutkii kansantautien geneettistä taustaa sekä vastaa väestötutkimuksen laboratorioanalytiikasta ja THL Biopankin toiminnasta. DNA:n lisäksi yksikkö tutkii näytteistä myös muuta genomiikkaa kuten transkriptiomiikkaa sekä proteomiikkaa. Yksikköön saapuvilla näytteillä on usein erittäin vaihteleva historia niiden säilytysolosuhteiden- ja ajan kannalta. Usein näytteet saattavat olla esimerkiksi näytteenantajalta, joka on menehtynyt, eikä uutta näytettä voida tämän myötä kerätä. Onkin siis tärkeää, että jokaisesta mahdollisesta näytteestä saadaan eristettyä onnistuneesti DNA:ta jatkoanalyysiin.

Eri lämpötilojen vaikutusta näytteisiin tutkittiin altistamalla kolme verrokkiryhmää verinäytteitä eri säilytyslämpötiloille, minkä jälkeen niistä eristettiin DNA käyttäen kahta eri eristysmenetelmää, suolasuostusmenetelmää sekä magneettibeadimenetelmää. Pitoisuus mitattiin sekä absorbanssimenetelmällä että fluorometrisesti, jotta saatiin selville, kuinka iso osa DNA:sta on säilynyt kaksijuosteisena.

2 Teoria

2.1 Verinäytteet

Veri on happea ja ravinteita kuljettavaa nestemäistä kudosta. Suurin osa veren tilavuudesta muodostuu veriplasmasta, joka on kirkasta nestettä, josta puuttuvat veren solut. Veren soluja ovat punasolut eli erytrosyytit, valkosolut eli leukosyytit sekä verihiutaleet eli trombosyytit. Punasolujen tehtävä on kuljettaa happea, valkosolujen torjua patogeenejä, kuten viruksia ja bakteereita, ja verihiutaleet osallistuvat veren hyytymiseen. Näistä ainoastaan valkosoluilla on tuma. Koska solun DNA sijaitsee sen tumassa, verinäytteestä DNA:ta saadaan pelkästään valkosoluista. Kuvassa 1. esitettynä veren eri solut, valkosoluihin kuvattuna tuma. [3; 4.]



Kuva 1. Veren eri solut, valkosolu, punasolu sekä verihiutale. [3.]

Koska iso osa kokonaisverestä muodostuu erinäisistä proteiineista kuten albumiineista, fibrinogeneineista sekä globuliineista, ne tulee puhdistaa näytteestä huolellisesti näytteen DNA:ta eristettäessä. [3.] Tämä tapahtuu useimmiten joko magneettipartikkeleihin perustuvalla menetelmällä, tai vaihtoehtoisesti proteiinien suolasaostuksella.

2.2 DNA-eristysmenetelmät

Ennen kuin näytteet voidaan lähettää jatkoanalysoitavaksi, DNA täytyy saada erilleen muusta lähtöaineesta, kuten verestä tai syljestä. Yleisimpiä eristysmenetelmiä ovat magneettibeadeihin perustuva eristys sekä erityistä huolta vaativille näytteille käsin suolasaostus.

2.3 Magneettipartikkeleihin perustuva DNA-eristys

DNA-eritys on nykyään pitkälti automatisoitua. Yleinen eristysmenetelmä alalla on niin kutsuttu magneettibeadieristys, joka soveltuu myös helposti automatisoitavaksi (Kuva 2.). Menetelmässä ferromagneettiset partikkelit, niin kutsutut beadit, erottelevat soluista vapautetun DNA:n. Magneettipartikkelit ovat noin 20–30 nm läpimitaltaan olevia pieniä helmiä, jotka tyypillisesti on valmistettu magneettisista rautaoksidipartikkeleista, esimerkiksi magnetiitista (Fe_3O_4).



Kuva 2. Perkin Elmer Chemagen Chemagic 360 -näytteenkäsittelyrobotti.

Magneettipartikkelierotus jakautuu kolmeen yksinkertaiseen osaan: hajotus/lyysi, liuoksen puhdistus proteiineista ja muista kontaminanteista, ja viimeisenä DNA:n keräys. Eristyksen vaiheet kuvattuna Kuvassa 3.



Kuva 3. Chemagic 360 -eristysprotokolla. [5.]

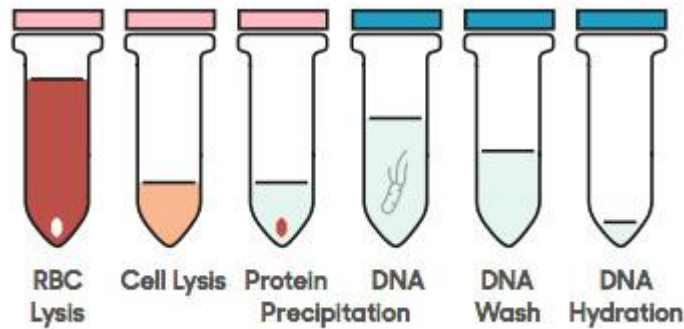
Chemagic 360 -eristysprotokollan ensimmäinen vaihe on lyysispuskurin lisäys näytteeseen. Lyysis-puskuri hajottaa solujen soluseinämän ja vapauttaa DNA:n solun tumasta. Seuraavassa vaiheessa sidospuskuri mahdollistaa vapautetun DNA:n kiinnittymisen magneettipartikkeleihin magneetikentän vaikutuksesta. Magneettisauva sekoittaa liuosta ja siirtää vapautuneen DNA:n putkesta toiseen. Vaihe toistetaan kolmesti, joka kerralla siirtyen puhtaaseen sidospuskuriin. Tämän jälkeen magneettipartikkeleihin sitoutunut DNA siirretään magneettisauvojen avulla sidospuskurista pesupuskuria sisältäviin Falcon-putkiin. Pesu suoritetaan kolmesti, joka kerralla siirtyen puhtaaseen putkeen, johon laite annostelee pesupuskuria. Pesussa näytteestä poistetaan epäpuhtauksia kuten proteiineja. Pesun jälkeen magneettisauvat siirtävät eristetyn DNA:n eluutiopuskuriin. [5.]

DNA pipetoidaan eluutiopuskuriin ja magneetikenttä poistetaan, mikä saa DNA:n irtoamaan magneettipartikkeleista. Tämän jälkeen DNA-näyte pipetoidaan magneettialustalla puhtaisiin Eppendorf-putkiin, etteivät magneettipartikkelit pääse aiheuttamaan ongelmia jatkoanalyseissä.

2.4 DNA:n eristäminen suolasaostamalla

Suolasaostusmenetelmä on yleinen tapa eristää DNA verinäytteistä. Menetelmä hyödynittää tiettyjen molekyylien madaltunutta liukoisuutta korkean ionivahvuuden liuoksessa.

Suolasaostuksella poistetaan näytteistä suuria biomolekyylejä, useimmiten proteiineja. Suolan tyypillä ja konsentraatiolla voidaan vaikuttaa siihen, mitkä proteiinit saostuvat selektiivisesti. Suolasaostus ei kuitenkaan ole tarpeeksi spesifi menetelmä, jotta sitä voisi hyödyntää tietyn proteiinin eristämiseen, vaan menetelmää käytetäänkin useimmiten lähinnä näytteen alkuvaiheen puhdistukseen suurista biomolekyyleistä kuten proteiineista. Eristyksen vaiheet esitettynä kuvassa 4. [6.]



Kuva 4. Suolasaostuksen vaiheet yksinkertaistettuna. Vaihe 1: Punasolujen lyysaus, vaihe 2: solulyysis, vaihe 3: proteiinien saostus, vaihe 4: DNA:n saostus, vaihe 5: pesu, vaihe 6: DNA-liuottaminen. [6.]

Hydrofiiliset ja hydrofobiset vuorovaikutukset solu ympäristön kanssa säätelevät suurten biomolekyylien kuten proteiinien konformaatiota eli atomien avaruudellista kolmiulotteista järjestäytymistä proteiinissa. Nämä vuorovaikutukset määräävät tyypillisesti proteiinin lopullisen konformaation suojaamalla suurinta osaa hydrofobisista funktionaalisista ryhmistä pooliselta solu ympäristöltä.

Suolasaostuksessa molekyyli laskostuu niin, että kaikki hydrofobiset osat ovat kiinnittyneenä toisiinsa, ja hydrofiiliset osat ovat vapaita vuorovaikuttamaan veden kanssa. Vaarautuneet ja pooliset aminohapot tarvitsevat vesimolekyylejä ympärilleen pysyäkseen liuenneena, ja korkean ionivahvuuden vesipohjaisessa liuoksessa vesimolekyylit ympäröivät ionien ja proteiinien varaukset. Tietyissä ionivahvuudessa vesimolekyylit eivät enää kykene ylläpitämään sekä ionien että proteiinien varausta, ja lopputuloksena heikoimmin liukenevat osat liuoksessa kuten proteiinit saostuvat, mikä mahdollistaa niiden erotuksen liuoksesta. [7.]

Proteiinien saostuttua näyte esimerkiksi sentrifugoidaan, mikä saa saostuneet proteiinit pakkautumaan pelletiksi näyteputken pohjalle, DNA:n jäädessä supernatanttiin joka kerätään talteen. Vaihe voidaan toistaa useaan kertaan, jotta mahdollisimman suuri osuus proteiineista saadaan erotettua näytteestä. Tämän jälkeen itse DNA saostetaan esimerkiksi isopropanolilla, jolloin muodostunut DNA-pelletti voidaan sentrifugoida näyteputken pohjalle. Tämän jälkeen DNA liuotetaan uudelleen, tällä kertaa säilytysliuokseen, esimerkiksi TE-puskuriin.

2.5 DNA-pitoisuuden määrittäminen

Yleisesti käytetty metodi DNA-näytteen pitoisuuden ja puhtauden määrittämiseen on UV/Vis -menetelmä. Työssä mittaus suoritettiin Trineanin valmistamalla DropSense 96 UV/Vis -spektrofotometrillä (Kuva 5.).

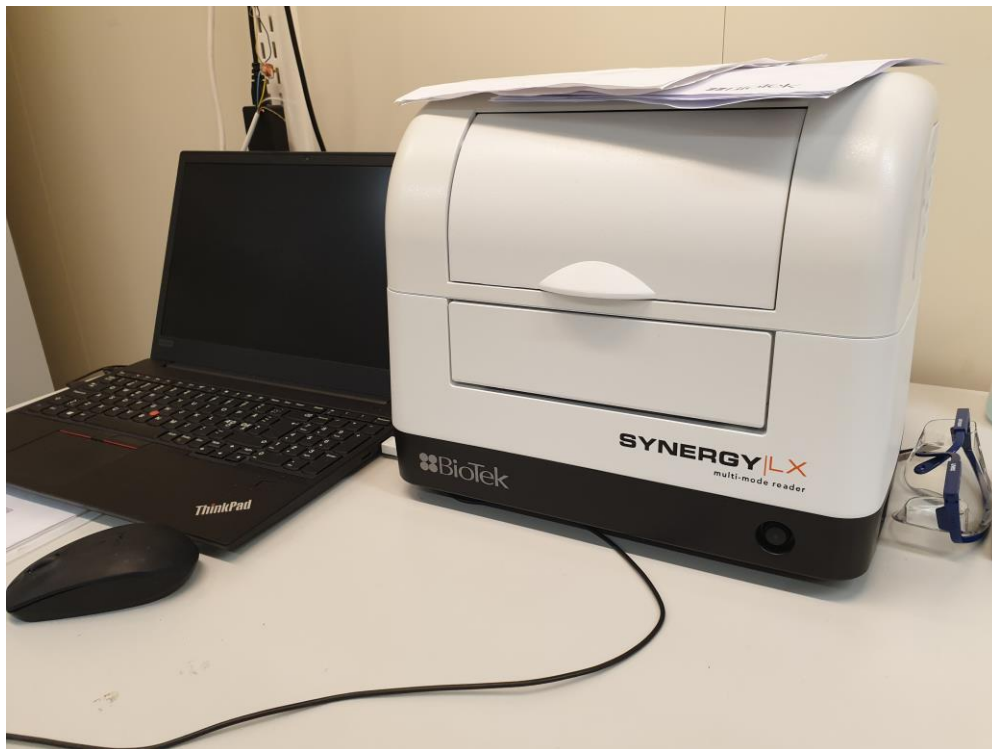


Kuva 5. DropSense 96 UV/Vis -spektrofotometri.

DNA-pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen UV/Vis -spektrofotometrillä perustuu näytteen absorbanssiin. Absorbanssilla tarkoitetaan valon määrää, joka imeytyy liuokseen. Absorbanssi mitataan 260 nanometrin alueelta, jossa DNA absorboi valoa voimakkaimmin. Menetelmässä DNA-pitoisuus määritetään mittaamalla absorbanssi 260 nanometrin alueelta ottaen huomioon näytteen epäpuhtauksien aiheuttama tausta. [8.]

2.6 Pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen fluorometrisesti

Toinen yleisesti käytettävistä DNA-pitoisuus- ja puhtausmittausmetodeista on PicoGreen-reagenssin fluoresenssiin perustuva mittaus BioTekin Synergy LX -monitoimilukijalla (Kuva 6.). Fluorometri on instrumentti, jota käytetään näkyvän valon fluoresenssin mittaamiseen. Fluoresenssiin perustuvaa menetelmää käytetään varsinkin silloin, kun tarkkuus on erityisen tärkeää. Menetelmän etuna on myös sen kyky määrittää kaksijuosteisen DNA:n pitoisuus kokonais-DNA:n pitoisuuden sijasta.



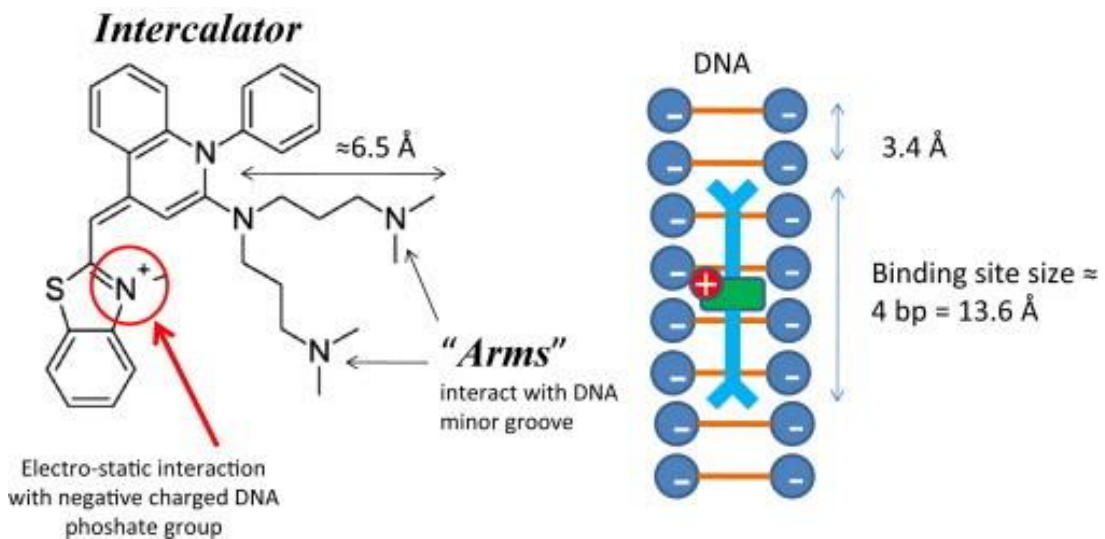
Kuva 6. BioTek SynergyLX -monitoimilukija.

Yleisempien DNA-pitoisuuden mittaustekniikoiden kuten 260 nm:n alueen absorbanssiin perustuvien tekniikoiden rajoittavana tekijänä on ylimääräisten molekyylien aiheuttama absorbanssi joka vääristää tulosta. Verrattuna fluoresenssimenetelmään, absorbanssimittauksen tarkkuutta heikentävät esimerkiksi nukleotidien verrattain iso vaikutus, yksijuosteisen DNA:n läsnäolo ja proteiinit, sekä yleisesti DNA-näytteissä tavattavat kontaminantit kuten EDTA ja fenoli. Absorbanssimenetelmä ei myöskään erota RNA:ta DNA:sta. Tämän takia useita fluoresenssiin perustuvia menetelmiä on kehitetty poistamaan ongelmia, jotka ovat absorbanssimittausmenetelmälle ominaisia.

Menetelmässä käytetty reagenssi PicoGreen on yleisesti käytetty ultra-sensiitivinen fluoresoiva nukleinihapon merkkiaine, jolla voidaan kvantitoida kaksijuosteista DNA:ta (dsDNA). Se mahdollistaa DNA-pitoisuusmittauksen jopa alle 1 ng/ml pitoisuuksissa. [9.]

PicoGreen-merkkiaine muodostaa erittäin paljon fluoresoivan kompleksin DNA:n kanssa verrattuna vapaaseen väriaineeseen liuoksessa. PicoGreenin ja DNA:n kaikkia vuorovaikutuksia ei tunneta täysin, mutta todennäköisesti PicoGreen kiinnittyy DNA:han sen kinoliiniryhmistä. PicoGreenin bentso-tiatsoli-kompleksi, jolla on yksi paikallinen positiivinen varaus, on todennäköisesti vastuussa elektrostaattisesta vuorovaikutuksesta DNA:n fosfaattiryhmän kanssa. Koska tiatsoli kiinnittyy kovalenttisesti kinoliiniryhmään ja elektrostaattisesti DNA:n fosfaattiin, voidaan olettaa sen myös istuvan tiiviisti DNA:han, johtaen koko bentso-tiatsoli/kinoliini-ryhmän stabilisoitumiseen toivotussa konformaatiotilassa.

Koska PicoGreenin ja DNA:n sitoutumisalue on pidempi kuin pelkkä interakalaatio antaa olettaa, on myös todennäköistä, että PicoGreen-merkkiaineen kaksi demityyliaminopropyyliiryhmää, niin kutsutut "kädet", kiinnittyvät DNA:n matalaan uurteeseen. Nämä vuorovaikutukset ovat yhdessä vastuussa noin $\sim 10\text{--}12$ kJ/mol lisästä Gibbsin energiaan, johtaen erittäin vahvaan sitoutumiseen. Kuvassa 7. esitettynä PicoGreen-merkkiaineen rakenteelliset osat, joihin sen eri vuorovaikutukset perustuvat. Punaisella ympyröitynä PicoGreen-molekyylin kinoliiniryhmä, mustat nuolet osoittavat dimetyyliaminopropyyliiryhmät eli "kädet". Vasemmalla oletettua pidempi sitoutumisalue DNA-rihmassa. [10.]



Kuva 7. PicoGreen-merkkiaineen rakenteelliset osat, joihin sen eri vuorovaikutukset DNA:n kanssa perustuvat. [10.]

2.7 Säilytyslämpötila ja säilyvyys

DNA on herkkä biomolekyylili, joka saattaa hajota suurissa lämpötilanvaihteluissa tai yleensä väärässä säilytyslämpötilassa. Aiemmissa tutkimuksissa säilytyslämpötilan vaihteluiden on todettu vaikuttavan merkittävästi eristettävän DNA:n määrään verinäytteissä. [1.] Korkeimmat pitoisuudet saatiin tutkimuksissa näytteistä, joiden DNA eristettiin välittömästi näytteenoton jälkeen ilman pakastamista. Huoneenlämmössä yli seitsemän päivää säilytettyjen näytteiden pitoisuus oli merkittävästi ($p > 0,05$) niitä näytteitä matalampi kuin niiden näytteiden, joita oli säilytetty 4 päivää 23 °C:n lämpötilassa tai 28 päivää -20 °C:n lämpötilassa. [11.]

3 Työn toteutus

Opinnäytetyö suoritettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen Genomiikka- ja Biopankki -yksikön tiloissa Biomedicum 1:n tutkimus- ja opetuskeskuksessa Helsingin Meilahdessa (Kuva 8.). Työn tilaajana toimi Genomiikka- ja Biopankki -yksikkö, ja työn aihe valittiin, jotta siitä on myös yksikölle hyötyä. Opinnäytetyötä valvoi yksikössä laboratoriokoordinaattori Tuuli Sistonen. Työssä käytettiin yksiköstä löytyviä välineitä, laitteistoja ja reagensseja.



Kuva 8. Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen Genomiikka- ja Biopankki -yksikön laboratoriotilaja, joissa työ suoritettiin.

3.1 Näytteenotto

Näytteenotto suoritettiin Becton Dickinsonin valmistamiin 5 ml:n tilavuuden veriputkiin (Kuva 9). Putkissa lisäaineena 7.2 mg K2EDTA-liuosta. Verinäytteet kerättiin viideltä vapaaehtoiselta yksiköstä siipineulalla FinTerveys 2017 näytteenoton menetelmäohjetta mukaillen. [12.] Näytteitä kerättiin yhdeksän per näytteenantaja.



Kuva 9. Näytteenkeräykseen käytetyt BD Vacutainer -veriputket.

Verinäytteenoton jälkeen verinäytteet siirrettiin välittömästi -20 °C:seen odottamaan DNA-eristystä. 30 näytettä pakastettiin tyypillisessä näytepakkasessa, ja 15 näytteistä pakastettiin WAECO CoolFreeze CFX95DZ2 -matkapakastimessa, jota käytettiin myös FinTerveys 2017 -projektissa. (Kuva 9.)



Kuva 10. Waeco CoolFreeze CFX95DZ2 -matkapakastin.

Verinäytteet jaettiin kolmeen eri ryhmään niiden säilytystavan perusteella. Ryhmä 1 valittiin vertailuryhmäksi, ja pakastettiin täysin laboratorion menetelmäohjeen mukaisesti –20 °C:een välittömästi näytteenkeräyksen jälkeen. Ryhmä 2:n näytteet siirrettiin näytteenoton jälkeen –20 °C:n lämpötilaan. Matkapakastimen kantta avattiin satunnaisin väliajoin 15 minuutiksi, näin simuloitiin matkapakastimen jatkuvasta availusta seuraavaa lämpötilan vaihtelua. Ryhmä 3:n näytteet pakastettiin ensin –20 °C:een kuten Ryhmä 1:n näytteet, mutta annettiin sulaa kertaalleen huoneenlämpöiseksi ja pakastettiin uudelleen.

Jokaisen näytteenottajan näytteistä kolme säilytettiin –20 °C:ssa, kolme näytettä –20 °C:ssa matkapakastimessa, sekä kolme näytettä annettiin sulaa huoneenlämpöön. Kuusi näytettä per näytteenantaja eristettiin magneettibeadimenetelmällä, ja kolme näytettä suolasaostusmenetelmällä. Näin jokaista näytteenantajaa kohden eristettiin kolme näytettä magneettibeadimenetelmällä sekä yksi näyte suolasaostamalla per säilytysolosuhde. Kaikki näytteet mitattiin molemmilla mittausmenetelmillä.

3.2 Näytteenhallinta tietokannassa

Näyteputkille luotiin paikkatieto sekä tarrat viivakoodilla käyttäen Terveyden ja Hyvinvoinnin laitoksen SamWise-tietokantaa. Tämä helpottaa näytteiden hallintaa sekä tulosten kirjaamista, kun näytteet ovat samassa tietokannassa, jossa niihin voidaan yhdistää pitoisuus- ja puhtausmittaustulokset näytteen viivakoodin mukaan (Kuva 11.).

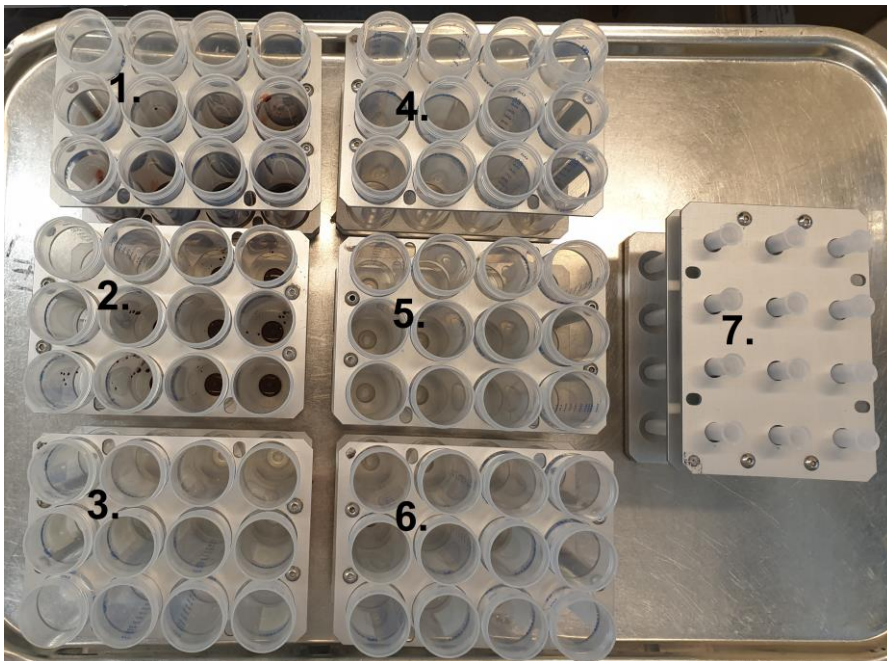
Cancel	Index	Project	Arrival Date	Sampling Date	Blood Volume	Barcode	Order Char	SampleType	ReceiveComment	Sample Remarks	Subject/barcode:
	0		26.3.202		10			Blood/Heparin			

Kuva 11. Näytteiden vastaanotto SamWise-tietokantaan.

3.3 DNA-eristys Chemagic 360 -eristysrobotilla

Kerätyistä 45 näytteestä 30 eristettiin Chemagic 360 -eristysrobotilla, jonka toiminta perustuu magneettipartikkelimenetelmään. Eristys aloitettiin näytteiden sulattamisella huoneenlämpöön. Verien sulettua ne siirrettiin 50 ml Falcon-putkiin, joihin oli printattu tarrat viivakoodilla ja subjektinumerolla. Tämän jälkeen putket aseteltiin robotin putkitelineisiin.

Seuraavaksi täytettiin viisi putkitelintä lisää 50 ml:n Falcon-putkilla. Ensimmäiseen putkeen lisättiin 500 µl eluutiopuskuria, menetelmässä Chemagenin omaa 10 mM TE-puskuria. Toisen putkitelineen putkiin lisättiin 500 µl Chemagenin magneettipartikkeli-reagenssia. Kolmen putkitelineen putket jätettiin tyhjäksi, joihin robotti annosteli automaattisesti ajon aikana käytettävät puskurit. (Kuva 12.)



Kuva 12. 1. Verinäytteet, 2. Magneettibeadit, 3. Eluutioputket, 4. 5. 6. tyhjät putket, 7. kärjet.

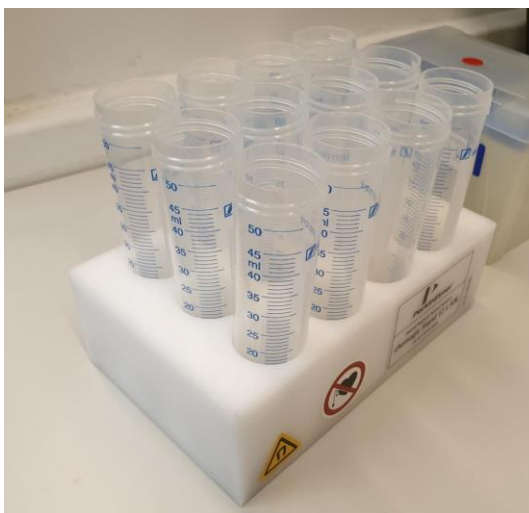
Putkitelineet aseteltiin oikeassa järjestyksessä Chemagic 360 -eristysrobotin pyörivälle alustalle, huomioiden oikean järjestyksen, jotta menetelmä onnistuu. Koska robotti ei itse tunnista eroja putkien välillä, aseteltiin ne seuraavaan järjestykseen laitteeseen: 1. Kärjet, 2. veri, 3. magneettibeadit, 4. 5. 6. tyhjät putket, 7. eluutioputket. (Kuva 12.)



Kuva 13. Putket Chemagic 360 kääntyvällä tasolla.

Eristysajo suoritettiin Chemagic 360:n 5 ml:n tilavuuden verinäytteille tarkoitetulla eristysohjelmalla. Laite eristää DNA:n verinäytteestä automaattisesti valitun ohjelman mukaisesti. Eristykseen kului aikaa noin 99 minuuttia per ajo. Robotti kykenee eristämään 12 näytettä per ajo.

Ajon päätyttyä valmis DNA, joka on eluoitu eluutiopuskuriin pipetoidaan Falcon-putkista 2.2 ml:n Eppendorf-putkiin. Näytteen sisältävät putket aseteltiin magneettiselle alustalle, joka erottaa mahdolliset magneettipartikkelijäämät näytteestä putken sivuille, jotta puhdas näyte saadaan pipetoitua ilman kontaminaatiota. (Kuva 14.)



Kuva 14. Eluutioputket magneettialustalla.

3.4 DNA-eristäminen suolasaostusmenetelmällä

Työssä toisena eristysmenetelmänä toimi käsin suolasaostus, johon magneettibeadimenetelmällä eristettyjä näytteitä voitiin verrata. Käsin eristäessä verinäytteet annettiin ensin sulaa huoneenlämpöiseksi, jonka jälkeen ne siirrettiin 50 ml:n Falcon-putkiin. Eristys suoritettiin käyttämällä Laboratoriotyön Tukipalveluiden (LATU) reagensseja.

3.4.1 Punasolujen hajotus/pesu

Suolasaostusmenetelmässä verinäytteet sulatettiin huoneenlämpöön ja siirrettiin 50 ml:n Falcon-putkiin. Näytteestä hajotettiin ensin punasolut lisäämällä RBC Lysis -puskuria (155mM ammoniumkloridi, 10mM natriumkarbonaatti, 1 mM EDTA, pH = 8) 20 ml:n merkkiin asti, eli noin 15 ml. Tämän jälkeen näyte sekoitettiin ja annettiin inkuboitua 10 minuuttia huoneenlämmössä. Inkubaatioajan kanssa tulee olla tarkka, ettei se ylitä 30 minuuttia, tai myös valkosolut alkavat hajota liuoksessa. Tämän jälkeen näytteitä sentrifugoitettiin 10 minuuttia 2000 g:n voimakkuudella.

Sentrifugoinnin jälkeen putkesta kaadettiin varovasti supernatantti. Tyypillisesti verinäytteitä ei saa kaataa yleiseen viemäriin, mutta lyysauksen jälkeen näyte on turvallista hävittää viemäriin. Putkeen sentrifugoinnissa muodostuneen pelletin päälle jätettiin noin 100 µl supernatanttia, ja putki vorteksoitiin, kunnes pelletti on hajonnut nesteeseen.

3.4.2 Valkosolujen hajotus

Seuraavaksi putkiin lisätään 5 ml Cell Lysis -liuosta (10 mM TRIS, 25mM EDTA, 1 % SDS, pH 7) ja vorteksoitiin homogeeniseksi. Cell Lysis -reagenssin tehtävänä on hajottaa valkosolut ja vapauttaa DNA niiden tumasta. Liuoksessa oleva SDS eli natriumlau-ryylisulfaatti hajottaa solujen seinämät ja vapauttaa DNA:n valkosolujen tumasta. Näytteet jätettiin Cell Lysis -vaiheeseen vähintään vuorokaudeksi huoneenlämpöön, mutta näytteet säilyvät tässä tilassa jopa vuoden.

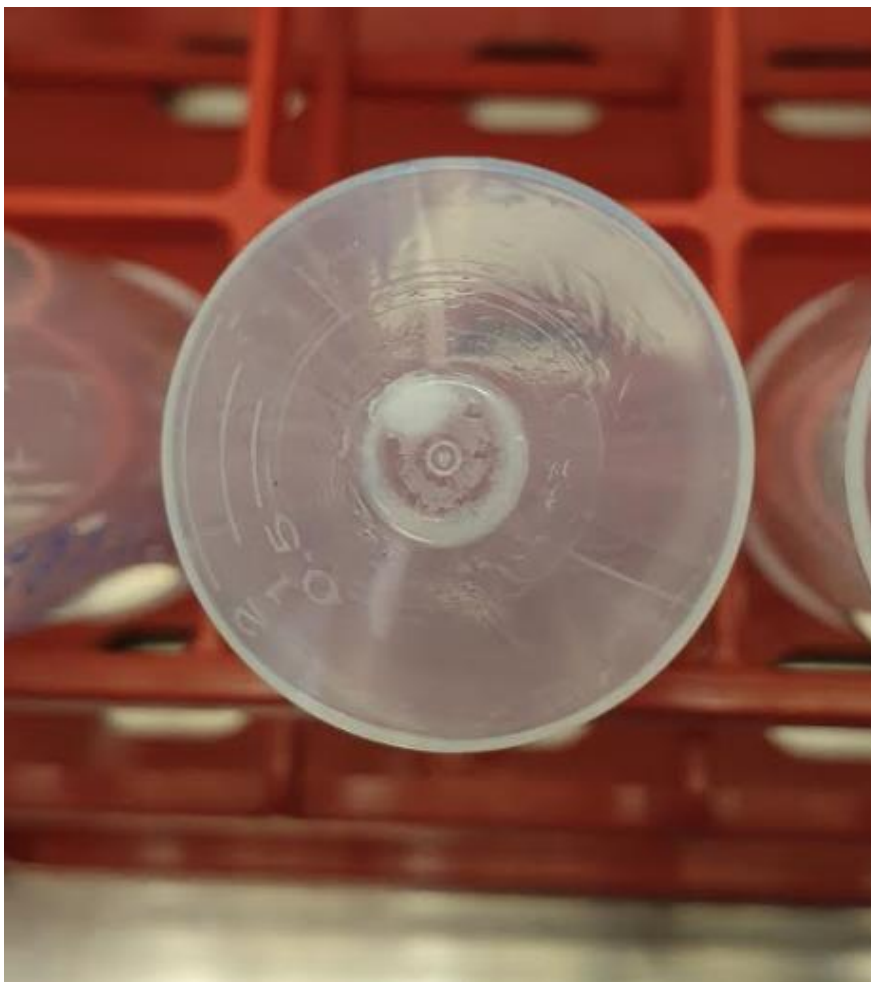
3.4.3 Proteiinien saostaminen

Seuraava suolasaostuksen vaihe on proteiinien saostaminen. Putkiin lisättiin 1650 µl PPS-reagenssia (10 M ammoniumasetaatti, pH = 8), vorteksoitiin vähintään 20 sekuntia,

kunnes näyte on homogeeninen ja annettiin inkuboitua 5 minuuttia huoneenlämmössä. Tämän jälkeen putket sentrifugoitiin 10 minuuttia 4000 g:n voimalla, joka painaa saostuneet proteiinit putken pohjalle.

3.4.4 DNA:n saostaminen ja pesu

Sentrifugoinnin jälkeen putkista kaadettiin supernatantti varovaisesti uusiin 50 ml Falcon-putkiin, joissa oli valmiina 5 ml isopropanolia. Putkia käännettiin noin 20 kertaa, kunnes DNA saostui. Saostumisen jälkeen näyteputkia sentrifugoitiin 5 minuuttia 3000 g:n voimalla. Sentrifugoinnin seurauksena eronnut supernatantti kaadettiin pois, varoen ettei pohjaan kertynyt DNA-rihma irtoa supernatantin mukaan. (Kuva 15.).



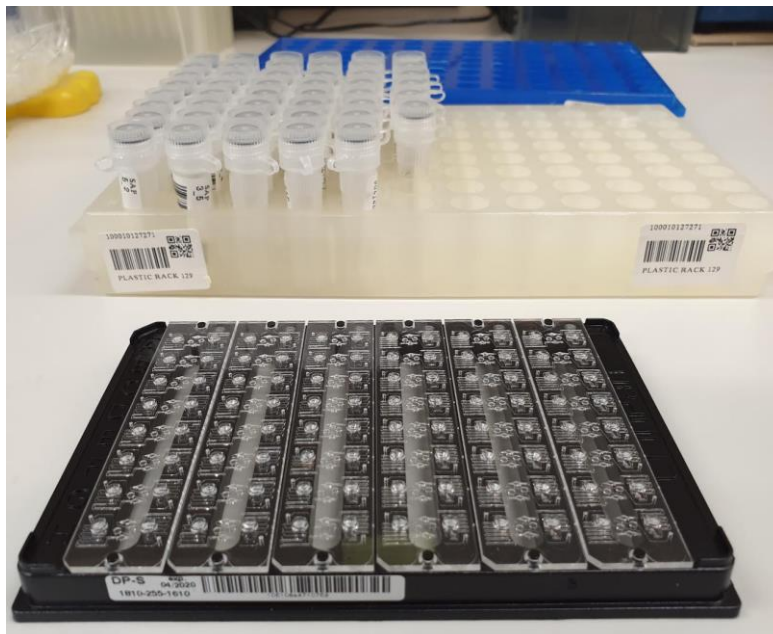
Kuva 15. DNA-rihma putken pohjalla.

Putkiin, joissa DNA-rihma pohjalla lisättiin 5 ml 70-prosenttista etanolia, ja putket sentrifugoitiin taas 5 minuuttia 3000 g:n voimalla. Tämän jälkeen supernatantit kaadettiin pois, ja putket aseteltiin ylösalaisin putkitelineeseen kuivumaan 5 minuutin ajaksi. Kuivattuaan näytteet liuotettiin 500 µl TE-puskuria. Näytteen annettiin liuota päivästä kahteen, ja tämän jälkeen DNA-liuos siirrettiin 2.2 ml Eppendorf-putkiin. TE-puskurin määrää voi säätää esimerkiksi visuaalisesti arvioimalla DNA-pelletin kokoa ja liuottaa pienempään tai isompaan tilavuuteen sopivan pitoisuuden saavuttamiseksi.

3.5 Pitoisuusmittaus DropSense 96 -laitteella

Eristetyille näytteille suoritettiin pitoisuusmittaus käyttäen Trianonin DropSense 96 -spektrofotometriä, joka mittaa DNA-pitoisuuden näytteessä spektrofotometrisesti UV/Vis -alueelta.

Pitoisuusmittaus suoritetaan pipetoimalla Trianonin 96 -kuoppalevyille jokaista näytettä 2 µl per kaivo. Kuoppalevyn kaivot imevät kapillaarisesti näytteen pieniin mittaускаivoihin, joiden kohdalta spektrofotometri lukee näytteen absorbanssin jonka mukaan näytteen pitoisuus määritetään. Pipetoinnissa tulee olla huolellinen, ettei näytekaivoon pääse esimerkiksi ilmakuplaa, joka haittaa mittausta. (Kuva 16.).



Kuva 16. Trianon 96 -kuoppalevy DropSense 96 -spektrofotometrille.

Kun näytteet on pipetoitu yksittäisiin kaivoihinsa, siirryttiin DropSense 96 -spektrofotometrille. Spektrofotometrin ohjausohjelmassa, DropQuant, valittiin mitattava näyte, tässä tapauksessa DNA, luettiin näytejärjestys ohjelmaan putkien viivakoodien mukaan, ja valittiin näytteiden eristykseen käytetty menetelmä.

3.6 Kaksijuosteisen DNA:n pitoisuuden mittaaminen fluorometrisesti

Eristetyille näytteille suoritettiin pitoisuusmittaus fluorometrisesti käyttäen fluoresoivana merkkiaineena PicoGreen-reagenssia.

Pitoisuusmittausta varten valmisteltiin ensin standardisuora käyttäen PicoGreen-reagenssin kitissä mukana tulevaa λ -DNA:ta. Standardisuoraa varten λ -DNA:sta tehtiin ensin 2 ng/ μ l eli suhteen 1:50 laimennos 1x TE-puskuriin. Tästä laimennettiin Taulukon 1 mukaisesti standardisuora pitoisuusmittaukseen.

Taulukko 1. PicoGreen-mittauksen standardisuora.

nro	1 x TE	Lambda DNA (2 ng/ μ l-laimennos)	DNA-konsentraatio putkessa (ng/ μ l)
0	1000 μ l	0 μ l	0
I	995 μ l	5 μ l	0,01
II	975 μ l	25 μ l	0,05
III	950 μ l	50 μ l	0,1
IV	875 μ l	125 μ l	0,25
V	750 μ l	250 μ l	0,5
VI	500 μ l	500 μ l	1
VII	0	1000 μ l	2

Standardinäytteitä pipetoitiin 100 μ l 96-kuoppalevyn ensimmäiseen sarakkeeseen siten, että 0-näyte tulee kaivoon A1 ja VII-näyte kaivoon H1. Järjestys on tärkeää automaattisen tulostenlaskennan takia.

Standardisuoran lisäksi standardilevyille pipetoitiin myös kahdeksan THL Biopankin sisäistä kontrollinäytettä, joiden pitoisuus on tunnettu. Kontrollinäytteiden pitoisuudet Taulukossa 2. Kontrollinäytteiden pitoisuus saa vaihdella $\pm 20\%$.

Taulukko 2. Kontrollinäytteiden pitoisuudet ja $\pm 20\%$:n virhemarginaali.

nro	Kontrollien pitoisuudet (ng/ μ l)	(-20 %)	(+20 %)
1	138	110	165
2	40	32	48
3	1,8	1,5	2,1
4	53	43	63
5	30	24	36
6	113	90	135
7	16	13	19
8	42	34	50

Kontrollinäytteet pipetoitiin samalle mittauslevylle kuin standardinäytteet, seuraavaan sarakkeeseen niin, että näyte 1 tulee kaivon A2 ja 8-näyte tulee kaivon H2. Myös tämä on tärkeää huomioida, jotta laitteen automaattinen tulostenlaskenta toimii oikein.

3.7 Tulosten tilastollinen analyysi

Työstä saatuja mittaustuloksia tarkasteltiin tilastollisten testien avulla, tarkoituksena löytää mahdollisia tilastollisesti merkitseviä vaikutuksia näytteiden pitoisuuteen. Testiksi valittiin parittainen t-testi, joka mahdollistaa kahden toisistaan riippumattoman otoksen vertailun keskenään. Otoksiin valittiin aina näytteitä niin, että pelkästään tutkittava faktori, esimerkiksi lämpötila tai eristysmenetelmä, vaihteli otosten välillä. Saman näytteenantajan näytteitä voitiin siis käsitellä toistoina.

4 Tulokset

Jokaisesta näytteestä saatiin onnistuneesti eristettyä DNA:ta. Pitoisuusmittauksien mukaan näytteiden pitoisuus sijoittui muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta noin 100–600 ng/μl alueelle. Korkeimmat pitoisuudet saatiin suolasaostamalla käsineristetyistä suoraan näytteenoton jälkeen pakastetuista ryhmä 1:n näytteistä. Matalimmat pitoisuudet saatiin magneettibeadimenetelmällä eristetyistä kokonaan sulaneista ja uudelleenpakastetuista ryhmä 3:n näytteistä. Matkapakastimessa säilytettyjen ryhmä 2:n näytteiden pitoisuudet osuivat näiden kahden välille.

4.1 Erot mittausmenetelmien välillä

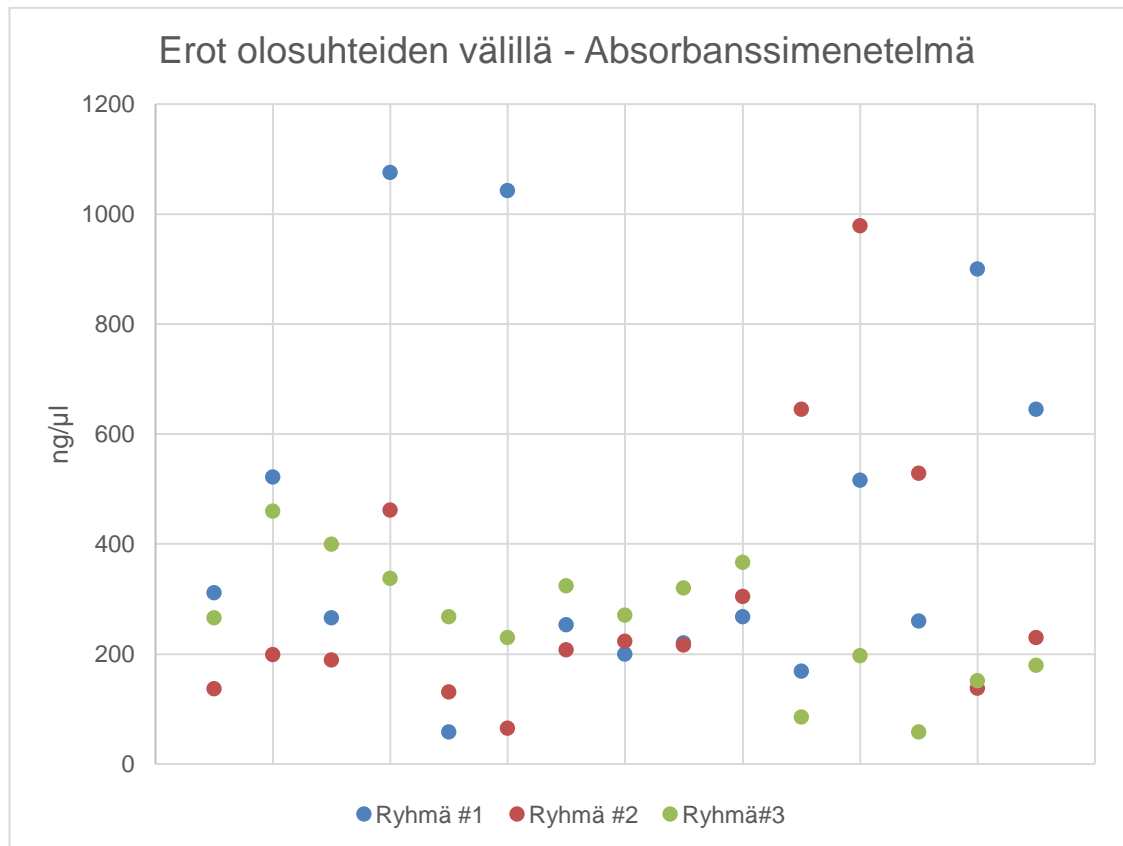
Näytteiden pitoisuus mitattiin kahdella eri menetelmällä, absorbanssiin- sekä fluoresenssiin perustuvilla mittausmenetelmällä. Absorbanssiin perustuva mittausmenetelmä tunnistaa näytteestä sen DNA:n kokonaispitoisuuden, kun taas fluoresenssipohjainen menetelmä tunnistaa pelkästään kaksijuosteisena säilyneen DNA:n näytteestä. Näytteiden pitoisuuksille suoritettiin parittainen t-testi, johon valittiin samalla eristysmenetelmällä eristetyt näytteet samoista säilytysolosuhteista.

Magneettibeadimenetelmällä eristettyjen näytteiden välille löydettiin tukea erosta pitoisuuksissa mittausmenetelmien välillä ryhmissä 1 ($p = 0,033$) sekä 3 ($p = 0,013$). Ryhmän 2 näytteiden välillä magneettibeadimenetelmällä eristetyissä näytteissä tilastollinen merkitsevyys jäi osoittamatta ($p = 0,051$).

Suolasaostuksella eristetyille näytteille suoritettiin sama tilastollinen käsittely, johon valittiin kaikki ne näytteet, joiden säilytysolosuhde sekä eristysmenetelmä pysyi samana. Ryhmässä 1 ($p = 0,736$) ja 2 ($p = 0,557$) tilastollista merkitsevyyttä ei pystytty osoittamaan toisin kuin ryhmässä 2 ($p = 0,00194$).

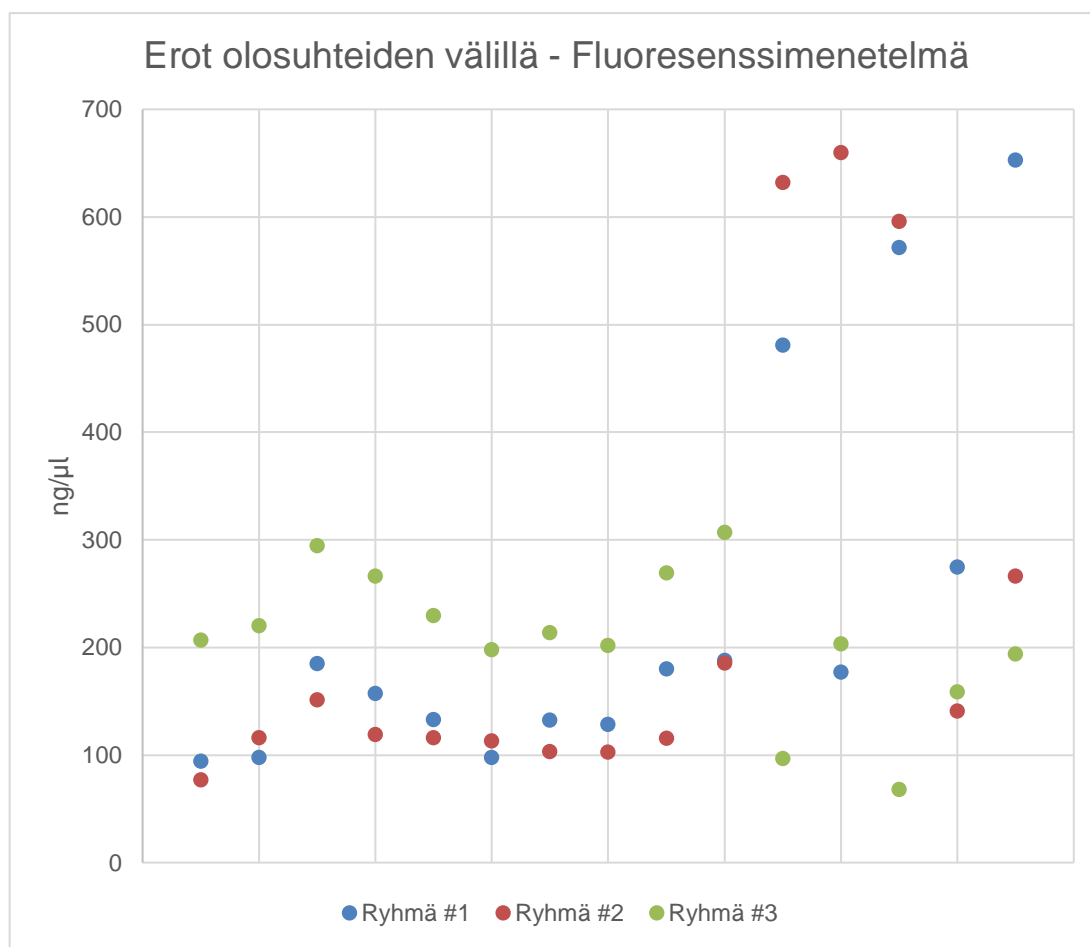
4.2 Erot säilytysolosuhteiden välillä

Eroja DNA-pitoisuudessa eri olosuhteissa säilytettyjen näytteiden välillä tutkittiin tilastollisten menetelmien avulla sekä visuaalisesti sijoittamalla pitoisuudet pistekuvaajaan. Absorbanssimenetelmällä mitattaessa näytteiden pitoisuudet sijoittuivat muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta noin 100–600 ng/μl alueelle. Korkeimmat pitoisuudet saatiin ryhmän 1:n näytteistä, jotka toimivat opinnäytetyössä vertailuryhmänä (Kuva 17.)



Kuva 17. Näytteiden absorbanssimenetelmällä mitatut pitoisuudet graafisesti esitettynä. Sininen = Ryhmä 1, punainen = Ryhmä 2, vihreä = Ryhmä 3.

Ryhmässä 1 näytteiden keskipitoisuudeksi absorbanssimenetelmällä saatiin 447 ng/μl. Matkapakastimessa säilytettyjen näytteiden pitoisuus oli lievästi ryhmää 1 matalampi. Ryhmä 2:n näytteiden keskiarvoksi absorbanssimittauksella saatiin 310 ng/μl. Tämä on vain 69 % vertailuryhmän 1 keskipitoisuudesta. Kokonaan huoneenlämpöön sulatettujen ryhmä 3:n näytteiden keskipitoisuus oli vain 209 ng/μl, yli puolet vertailuryhmää 1 matalampi (46 %).



Kuva 18. Näytteiden fluoresenssimenetelmällä mitatut pitoisuudet graafisesti esitettyinä. Sininen = Ryhmä 1, punainen = Ryhmä 2, vihreä = Ryhmä 3.

Fluoresenssimittauksella ryhmä 1:n näytteiden keskipitoisuudeksi saatiin 237 ng/μl, ryhmän 2 näytteiden keskipitoisuudeksi 233 ng/μl ja ryhmä 3:n näytteiden keskipitoisuudeksi 209 ng/μl. Eri olosuhteilla oli siis huomattavasti vähemmän vaikutusta kaksijuosteisen DNA:n pitoisuuteen eristetyissä näytteissä kuin niiden sisältämään DNA:n kokonaispitoisuuteen. Tämä näkyy myös visuaalisesti pistekaaviosta (Kuva 18.), jossa näytteiden pitoisuudet vastaavat hyvin paljon toisiaan muutamaa poikkeusta lukuunottamatta. Kuitenkaan yksikään näistä korkean pitoisuuden näytteistä ei kuulunut ryhmä 3:een.

Näytteiden pitoisuuksia analysoitiin tilastollisesti käyttämällä parittaista t-testiä niille näytteille, jotka olivat samalla eristysmenetelmällä eristettyjä sekä samalla mittaamenetelmällä mitattuja.

Magneettibeadimenetelmällä eristettyjen näytteiden absorbanssimenetelmällä mitattujen pitoisuuksien ero ryhmissä 1 ja 2 oli lähellä tilastollista merkitsevyyttä ($p = 0,086$) 0,05:n merkitsevyydellä. Samojen näytteiden fluoresenssimenetelmällä mitattujen pitoisuuksien erolle ryhmissä 1 ja 2 tilastollinen analyysi ei myöskään kyennyt osoittamaan tilastollista merkitsevyyttä, vaan p-arvo jäi jälleen hieman 0,05:n merkitsevyydellä korkeammaksi ($p = 0,072$).

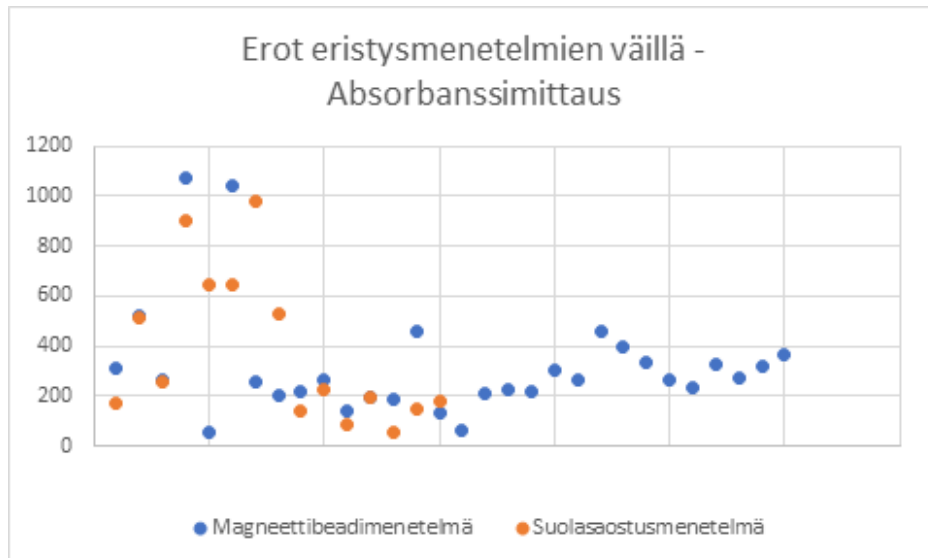
Suolasaostusmenetelmällä eristettyjen näytteiden pitoisuuksien välille ei myöskään löydetty tukea tilastollisesti merkitsevää erosta. Absorbanssimenetelmällä mitattujen näytteiden pitoisuuksien välinen ero ryhmissä 1 ja 2 jäi jälleen yli tilastollisen merkitsevyyden rajan ($p = 0,983$) 0,05 merkitsevyydellä eikä näin ollen eroa voida pitää tilastollisesti merkitsevänä. Samoin fluoresenssimenetelmällä mitattujen näytteiden välinen ero pitoisuudessa ryhmien 1 ja 2 välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää ($p = 0,859$) 0,05:n merkitsevyydellä.

Toisin kuin ryhmän 2 kanssa, ryhmien 3 ja 1 välinen ero näytteiden pitoisuudessa osoitettiin kaikilla menetelmillä tilastollisesti merkitseväksi. Magneettibeadimenetelmällä eristettyjen näytteiden absorbanssimenetelmällä mitattujen pitoisuuksien välinen ero osoitettiin tilastollisesti merkitseväksi ($p = 0,0326$) 0,05:n merkitsevyydellä. Samojen näytteiden fluoresenssimenetelmällä mitattujen näytteiden ero ryhmien 1 ja 3 välillä osoitettiin tilastollisesti erittäin merkitseväksi ($p = 0,000117$) 0,001:n merkitsevyydellä.

Suolasaostusmenetelmällä eristettyjen näytteiden välinen ero ryhmissä 1 ja 3 säilytettyjen absorbanssimenetelmällä mitattujen näytteiden pitoisuuksissa osoitettiin myös tilastollisesti merkitseväksi ($p = 0,017$) 0,05:n merkitsevyydellä. Samoin fluoresenssimenetelmällä mitattujen samojen näytteiden pitoisuuksien välinen ero lämpötiloissa 1 ja 3 osoitettiin tilastollisesti merkitsevästi ($p = 0,049$) 0,05:n merkitsevyydellä.

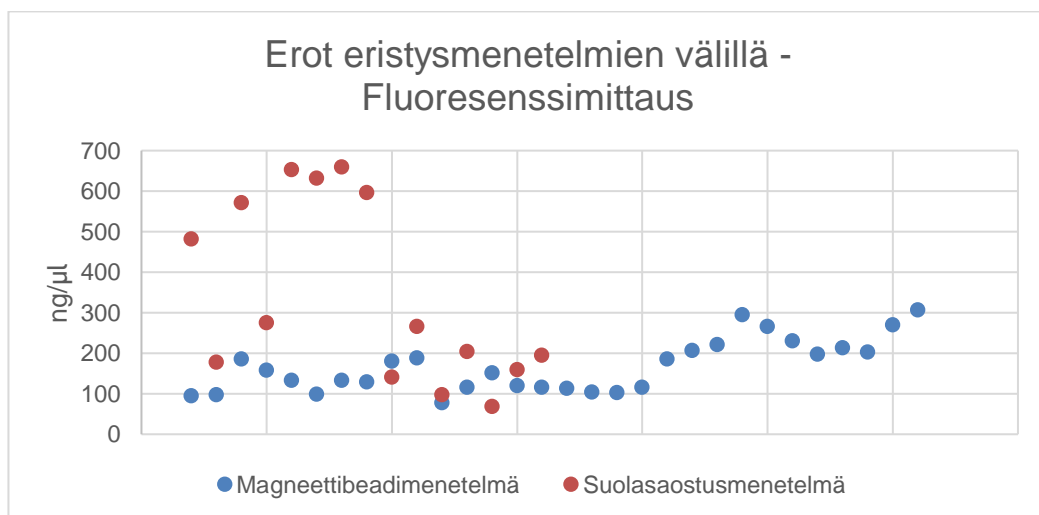
4.3 Erot eristysmenetelmien välillä

Visuaalisesti esitettynä (Kuva 19.) absorbanssimenetelmällä mitattujen näytteiden pitoisuuksista on mahdollista nähdä miten korkeimmat poikkeukset sijoittuvat useammin suolasaostettujen näytteiden kategoriaan, ja magneettibeadimenetelmällä eristettyjen näytteiden pitoisuus on huomattavasti tasaisempaa.



Kuva 19. Erot näytteiden absorbanssimenetelmällä mitatuissa pitoisuuksissa eristysmenetelmien välillä graafisesti esitettynä pistekaaviona.

Myös fluoresenssimenetelmällä mitattujen pitoisuuksien erot eri eristysmenetelmien välillä noudattavat samaa trendiä kuin absorbanssimittattuna, jossa suolasaostusmenetelmällä eristettyjen näytteiden pitoisuus on selvästi magneettibeadimenetelmää korkeampia (Kuva 20.).



Kuva 20. Erot näytteiden pitoisuuksissa eristysmenetelmien välillä fluoresenssimenetelmällä mitattuna.

Tuloksia tarkasteltiin suorittamalla useita parittaisia t-testejä eri näytekokoonpanolla. Tilastollisesti tarkasteltuna eristysmenetelmien välille ei löydetty tukea tilastollisesti

merkitsevää eroa ryhmässä 2 ($p = 0,117$) toisin kuin ryhmässä 3 ($p = 0,00117$) absorbanssimenetelmällä mitattuna. Vertailuryhmän 1 eroa pitoisuuksissa mittausten välillä ei pystytty osoittamaan tilastollisesti merkitseväksi ($p = 0,714$) 0,05:n merkitsevyystasolla.

Fluoresenssimittattujen näytteiden pitoisuuksien välinen ero eristysmenetelmien välillä osoittautui tilastollisesti merkitseväksi jokaisessa säilytyslämpötilassa, jopa vertailuryhmässä 1 toisin kuin absorbanssimitattuna. Erot pitoisuudessa eristysmenetelmien välillä ryhmässä 1 ($p = 0,034$), ryhmässä 2 ($p = 0,035$) sekä ryhmässä 3 ($p = 0,035$) osoittautuivat kaikki tilastollisesti merkitseviksi.

5 Loppupäätelmä ja johtopäätökset

Tulosten perusteella säilytysolosuhteilla oli merkittävä vaikutus verinäytteistä eristettävien näytteiden kokonaispitoisuuteen ja laatuun. Oikeaoppisesti menetelmäohjetta mukaillen suoraan näytteenoton jälkeen -20 °C :ssa säilytettyjen näytteiden pitoisuus oli keskimäärin korkeampi kuin kummankaan vertailuryhmän. Toiseksi parhaiten säilyivät matkapakastimessa säilytetyt näytteet. Selvästi heikoimmin säilyivät kokonaan sulaneet, uudelleenpakastetut verinäytteet. Silti jokaisesta näytteestä saatiin eristettyä tarpeeksi DNA:ta yleisimpien jatkoanalyysien tarpeisiin.

Tilastollisesti merkitsevä ero pystyttiin osoittamaan pelkästään ryhmässä 1 ja 3 säilytettyjen näytteiden välille. Tukea tilastollisesti merkitsevää eroa näytteiden pitoisuuksien välille ei löydetty ryhmien 1 ja 2 välille missään kategoriassa. Matkapakastimessa säilytettyjen ryhmä 2:n näytteiden pitoisuus oli myös keskimäärin vertailuryhmää matalampaa, mutta tilastollinen analyysi ei löytänyt tukea tilastollisesti merkitsevää eroa yhdessäkään kategoriassa.

Eristysmenetelmien välillä merkittävimmät erot löytyivät korkeimmissa pitoisuuksissa, erityisesti kaksijuosteista DNA:ta mittaavalla fluoresenssimenetelmällä mitattuna. Käsin suolasaostamalla eristettyjen näytteiden keskipitoisuus oli fluoresenssimittattuna huomattavasti magneettibeadimenetelmällä eristettyjä näytteitä korkeampi. Magneettibeadimenetelmällä eristettyjen näytteiden pitoisuudet olivat myös huomattavasti tasaisempia.

Koska kaikki korkeimmat pitoisuudet osuivat suolasaostusmenetelmän kategoriaan, on todennäköistä, että magneettibeadimenetelmällä eristettäessä esimerkiksi mekaaninen räsitus hajottaa eristettyä kaksijuosteista DNA:ta, johtaen matalampaan pitoisuuteen fluoresenssimitattuna verrattuna käsin suolasaostamalla eristettäviin näytteisiin.

Johtuen siitä, että absorbanssi- sekä fluoresenssimenetelmät mittaavat eri asiaa näytteestä, niiden vertailu sellaisenaan ei ole kannattavaa. Absorbanssimenetelmä mittaa näytteestä DNA:n kokonaispitoisuuden, fluoresenssimenetelmä taas kaksijuosteisen DNA:n pitoisuuden. Myös esimerkiksi nukleotidien läsnäolo heikentää absorbanssimenetelmän tarkkuutta.

Tulosten tilastollista analyysia vaikeutti suppea näytemäärä sekä biologisten näytteiden suuri sisäinen vaihtelu. Toisin kuin esimerkiksi kemiallisten näytteiden, biologisten näytteiden kanssa työskentely on huomattavasti ennalta-arvaamattomampaa. Kahden muuten identtisen, samasta näytteenantajasta kerätyn näytteen välinen ero eristyneessä DNA-pitoisuudessa saattaa olla yli kymmenenkertainen, laskien tilastollisen analyysin selitysvoimaa huomattavasti.

Jatkotutkimuksiin suositellaan huomattavasti suurempaa näytemäärää ja samaa näytemäärää kaikkiin vertailuryhmiin tulosten tilastollisen analyysin helpottamiseksi.

Tulosten perusteella verinäytteiden säilytystä suositellaan edelleen menetelmäohjeen mukaisesti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:een heti näytteenoton jälkeen. Tulosten perusteella kuitenkin sekä matkapakastimessa säilytetyistä että täysin sulaneista näytteistä on mahdollista saada onnistuneesti eristettyä riittävästi DNA:ta yleisimpiin jatkoanalyysiin.

Työssä tutkittiin pelkästään yhden kerran sulamisen vaikutusta verinäytteisiin. On todennäköistä, että suurempi määrä DNA:ta hajoaa pidemmällä sulamisajalla tai useammalla kuin yhdellä sulatussyklillä. Pitkä sulamisaika tai useampi sulamissykli saattaa laskea erityisesti ehjän kaksijuosteisen DNA:n pitoisuutta eristetyssä näytteessä.

Lähteet

- 1 Genomics Market by Product and Service. 2020. Verkkoaineisto. <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/genomics-market-613.html>> Luettu 9.9.2020
- 2 Effect of Storage Temperature on the Quality and Quantity of DNA Extracted from Blood. 2000. Verkkoaineisto <https://www.researchgate.net/publication/45724823_Effect_of_Storage_Temperature_on_the_Quality_and_Quantity_of_DNA_Extracted_from_Blood#read> Luettu 24.8.2020
- 3 Tietoa verestä. Veripalvelu. Verkkoaineisto. <<https://www.veripalvelu.fi/verenluovutus/veren-matka/tietoa-veresta>> Luettu 5.3.2020
- 4 Biologia: Veren solut. Valkeakosken kaupungin opetus- ja varhaiskasvatuspalvelut. Verkkoaineisto. <<https://peda.net/valkeakoski/opetuspalvelut/pk/tyry/oppiaineet/biologia/bi-toimela/ihminen/veri>> Luettu 23.3.2020
- 5 Perkin Elmer Chemagic 360 Instrument. Perkin Elmer. Verkkoaineisto. <<https://genomics.d-markbio.com/perkin-elmer-chemagic-360-instrument/>> Luettu 7.7.2020
- 6 Extraction and purification of nucleic acids. Verkkoaineisto. <<https://www.biot-ed.es/1-1-extraction-and-purification-of-nucleics-acids/>> Luettu 30.6.2020
- 7 Salting out. Chemistry LibreTexts. Verkkoaineisto. <[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Thermodynamics/Real_\(Non-Ideal\)_Systems/Salting_Out](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Thermodynamics/Real_(Non-Ideal)_Systems/Salting_Out)> Luettu 23.3.2020
- 8 How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample? Verkkoaineisto. <<https://fi.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/>> Luettu 25.3.2020
- 9 Fluorometric Quantitation of dsDNA using PicoGreen®. BioTek. Verkkoaineisto. <<https://www.biotek.com/resources/application-notes/fluorometric-quantitation-of-dsdna-using-picogreen/>> Luettu 26.3.2020
- 10 Turner Biosystems: DNA Quantitation Using PicoGreen®. Verkkoaineisto. <<https://www.promega.com/~media/files/products%20and%20services/instruments/detection/tbs%20technical%20support%20docs/s-0041.pdf>> Luettu 26.3.2020

- 11 Effects of blood storage time and temperature on DNA yield and quality. Verkkoaineisto. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8431281/>> Luettu 24.5.2020
- 12 FinTerveys 2017 menetelmäohje. Sivut 50–51. Verkkoaineisto. <http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/139084/URN_ISBN_978-952-343-449-3.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Luettu 12.5.2020

