

Antti-Jussi Kortevaara

# RNA-eristysmenetelmien vertailu formaliini- fiksoiduilla parafiiniin valetuilla näytteillä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

10.12.2012

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Antti-Jussi Korteveara RNA-eristysmenetelmien vertailu formaliini-fiksoiduilla parafiiniin valetuilla näytteillä 43 sivua + 3 liitettä 10.12.2012
Tutkinto	Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto, Bioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaajat	Lehtori Päivi Haapasalmi FM Harri Sihto
<p>Opinnäytteeni tarkoituksena oli vertailla kolme erilaista RNA:n eristysmenetelmää formaliini-fiksoiduilla parafiiniin valetuilla (FFPE) näytteillä. Näytteet olivat peräisin leiomyosarkoomasta (sileän lihaskudoksen pahanlaatuinen kasvain) ja gastrointestinaalinen stroomatumori taudista (GIST, maha-suolikanavan harvinainen kasvain). Opinnäytteeni liittyi akatemiaprofessori Heikki Joensuun johtamaan syöpätutkimusryhmän työhön ja toteutin työni Biomedicumissa Molekyyliionkologian laboratoriossa.</p> <p>Työssäni vertasin nykyisin käytössä olevaa RNA:n eristysmenetelmää (High Pure RNA Paraffin Kit, Roche) kahteen uuteen menetelmään. Ensimmäinen menetelmä oli modifikaatio nykyisin käytössä olevasta menetelmästä parafiinin poiston suhteen. Parafiinin poistoon käytin Depafaffinization Solution -liuosta (Qiagen). Toinen menetelmä oli täysin automatisoitu Tissue Preparation System -laite (Siemens) ja siinä käytettiin VERSANT® Tissue Preparation Reagent Kit -menetelmää. Eri menetelmillä saatua RNA:n pitoisuutta tutkin UV-VIS spektrofotometrisesti ja RNA:n laatua reaaliaikaisella käänteistranskriptio PCR:llä.</p> <p>Tuloksista kävi ilmi, että nykyisin käytössä oleva Rochen reagenssisarja on opinnäytteessä verratuista menetelmistä parhain. Qiagenin parafiininpoistoliuoksen käyttö ei tuonut huomattavaa lisähyötyä. Näiden kahden menetelmän välillä ei ollut merkitsevää eroavuutta (p-arvo 0,604) ja näytteiden välillä oli voimakas riippuvuus (korrelaatiokerroin 0,982). Siemensin automaatin tuottama RNA oli vertailun heikkolaatuisinta. Rochen ja Siemensin menetelmien eroavuus on melkein merkitsevä (p-arvo 0,023) ja niiden välillä oli kohtalainen riippuvuus (korrelaatiokerroin 0,556).</p> <p>Ottaen huomioon työni tulokset tutkimusryhmän kannattaa jatkaa Rochen menetelmän käyttöä. Suosittelen kuitenkin lämpimästi tutustumaan muihin tarjolla oleviin automaattisiin eristysmenetelmiin, sillä niistä saatava hyöty on ylivoimainen manuaalisiin menetelmiin nähden. Automaattisilla menetelmillä voidaan ajaa suurempia näytesarjoja kerralla, työn nopeus on ylivoimainen ja eristys ei sido työntekijää, vaan aikaa vapautuu muuhun työn tekemiseen.</p>	
Avainsanat	FFPE, RNA, eristys, RT-PCR, reaaliaikainen PCR

Author Title Number of Pages Date	Antti-Jussi Kortevaara Comparison of RNA Isolation Methods with Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples 43 pages + 3 appendices 10 December 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Päivi Haapasalmi, Senior Lecturer Harri Sihto, Master of Science
<p>In my study, I compared three different methods of isolating RNA using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples. The samples were from leiomyosarcoma (smooth muscle connective tissue tumor) and gastrointestinal stromal tumor. My study was connected to the work of the cancer research group lead by professor Heikki Joensuu. I performed the study at the molecular oncology laboratory in Biomedicum in Helsinki, Finland.</p> <p>I compared the currently used RNA isolation method (High Pure RNA Paraffin Kit, Roche) with two new methods. One of the new methods was a modification of the current method in regard to the removal of paraffin, in which I used Deparaffinization Solution (Qiagen). The other new method was a fully automated Tissue Preparation System device (Siemens), using VERSANT® Tissue Preparation Reagent Kit. For comparing the results of these three methods, I used UV-VIS spectrophotometer for the concentration and purity of RNA, and real-time reverse transcription PCR for the quality of RNA.</p> <p>The comparison showed that the High Pure RNA Paraffin Kit by Roche, which is currently in use, gave the best results. Using the Deparaffinization Solution by Qiagen did not yield significant improvements, although the results were very similar. What I found surprising was that the automated system by Siemens produced the lowest-quality RNA of the three methods.</p> <p>Therefore, I suggest that the cancer research group should continue using the kit by Roche for isolating RNA.</p>	
Keywords	FFPE, RNA, isolation, RT-PCR, Real-Time PCR

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Leiomyosarkooma ja gastrointestinaalinen stroomatumori (GIST)	2
2.1	Leiomyosarkooma	2
2.2	Gastrointestinaalinen stroomatumori eli GIST	3
3	Formaliini-fiksoidut parafiiniin valetut näytteet	4
3.1	Formaliini-fiksoidut parafiiniin valetut näytteet	5
3.2	Parafiinin poisto	6
4	RNA ja eristysmenetelmät	7
4.1	RNA:n käsittelyssä huomioon otettavaa	8
4.2	RNA:n eristys spin-kolonnimenetelmällä	8
4.3	RNA:n eristys magneettipartikkeilla	10
5	RNA:n analysointi	11
5.1	Spektrofotometrinen määrittäminen	12
5.2	Polymeraasiketjureaktio	12
5.2.1	Käänteistranskriptio PCR	14
5.2.2	Reaaliaikainen PCR	14
6	Aikaisemmat tutkimukset	17
7	Tutkimusasetelma ja -kysymykset	18
8	Toteutus	19
8.1	Näytemateriaali	20
8.2	RNA:n eristys	20
8.2.1	Eristys Roche'n High Pure RNA Paraffin Kit -menetelmällä	20
8.2.2	Eristys käyttäen apuna Qiagenin Deparaffinization Solution -liuosta	21
8.2.3	Eristys Siemensin automaatilla	22
8.3	RNA:n laadun tutkiminen	23
8.3.1	RNA:n pitoisuuden määrittäminen: NanoDrop	24
8.3.2	Käänteistranskriptio PCR	24
8.3.3	Reaaliaikainen PCR	25
9	Tulokset	26

9.1	RNA:n spektrofotometriset mittaukset	27
9.1.1	RNA:n pitoisuus	27
9.1.2	RNA:n puhtaus	28
9.2	RNA:n laatu	29
9.2.1	<i>ITGA4</i> -alukkeella saadut tulokset	29
9.2.2	<i>GAPDH</i> -alukkeella saadut tulokset	33
9.3	Tulosten yhteenveto	35
10	Luotettavuus	37
11	Pohdinta	38
	Lähteet	41
	Liitteet	
	Liite 1. Käytetyt reagenssit	
	Liite 2. Roche'n High Pure RNA Paraffin Kit -menetelmän ohje	
	Liite 3. Qiagenin Deparaffinization Solution -liuoksen käyttöohje	

## 1 Johdanto

Tein opinnäytteeni Molekyyliionkologian tutkimusryhmälle, jota johtaa akatemiaprofessori Heikki Joensuu. Hän sai Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin vuoden 2012 Matti Äyräpään palkinnon työstään syövän diagnostiikan ja hoidon parissa 25 vuoden ajalta. Merkittävintä tutkimusta Joensuu on tehnyt GIST-taudin (gastrointestinaalinen stroomatumori, maha-suolikanavan harvinainen pahanlaatuinen kasvain) ja rintasyövän osalla. Hän on tutkinut trastusumabi nimisen lääkeaineen käyttöä lääketoitona uudella tavalla potilaalle annettuna. Lisäksi Joensuu on ollut hoitamassa GIST-potilaita ensimmäisenä imatinibi-lääkkeellä. Helsingissä Syöpätautien klinikan johdossa hän on toiminut jo vuodesta 1994. (Biomedicum Helsinki - säätiö 2012.)

Työni on osa tällä hetkellä tapahtuvaa syöpätutkimusta, jossa selvitetään leiomyosarkoomassa (sileän lihaskudoksen pahanlaatuinen kasvain) ja GIST-kasvaimissa olevien tiettyjen geenien ilmentymää. Geenien ilmentymää tutkitaan eristämällä kudoksesta lähetti-RNA:ta. Immunohistokemian avulla geenien ilmentymää tutkitaan proteiinitasolla, jolloin kudokset osoitetaan tutkittavan proteiinin läsnäolo leimaamalla se spesifillä vasta-aineella. Normaalikudokseen tai muihin syöpiin nähden poikkeavia tasoja tutkitaan edelleen solulinjatutkimuksilla, jolloin voidaan saada selville voiko kyseisen proteiinin toimintaa estämällä vaikuttaa syöpäsolujen kasvuun. Lopullinen tavoite on löytää proteiini, jota voitaisiin käyttää täsmälääkkeen kohteena. Potilassarjoista esille nousevia poikkeavia proteiini tai RNA:n tasoja voidaan hyödyntää myös potilaskäytännöissä.

Leiomyosarkooma kuuluu pehmytkudossarkoomiin, joita todetaan Suomessa vuosittain hieman yli sata uutta tapausta (Syöpäjärjestöt 2012). Myös GIST kuuluu pehmytkudossarkoomiin ja kaikista ruuansulatuskanavan pahanlaatuisista kasvaimista GIST:in osuus on vain noin yksi prosentti. Suomessa GIST:ia diagnosoidaan vuosittain (vuoden 2007 arvio) noin 70 tapausta, joista 25 on selvästi pahanlaatuisia. (Joensuu – Roberts 2007a: 345–349).

Tässä työssä on tarkoitus verrata nykyisin käytössä olevaa RNA:n eristysmenetelmää formaliini-fiksoiduista parafiiniin valetusta (FFPE) kudoksenäytteestä kahteen uuteen menetelmään. Tavoitteena on selvittää menetelmä, jolla saadaan laadukkainta ja puhtainta RNA:ta. Ensimmäinen verrattava menetelmä on modifikaatio parafiinin poiston osal-

ta nykyisin käytössä olevavasta menetelmästä, jolloin päästäisiin eroon terveydelle haitallisen ksyleenin käsittelystä. Toinen verrattava menetelmä on täysin automatisoitu sisältäen parafiinin poiston ja RNA:n eristyksen, jolloin voitetaan ajankäytössä sekä vähennetään inhimillisten virheiden mahdollisuutta.

Eristetyn RNA:n pitoisuutta ja puhtautta selvitän spektrofotometrisesti ja laatua reaaliaikaisella käänteistranskriptio polymeraasiketjureaktiomenetelmällä. Työn tuloksia hyödynnetään tulevaisuudessa valittaessa RNA:n eristysmenetelmää tutkimusryhmän käyttöön. Toteutin opinnäytteeni Biomedicumissa Molekyyliionkologianlaboratoriossa tutkimusryhmän tiloissa.

## **2 Leiomyosarkooma ja gastrointestinaalinen stroomatumori (GIST)**

Tein työni tutkimusryhmään, jossa käsitellään leiomyosarkoomaa ja gastrointestinaalista stroomatumoritautia. Tässä kappaleessa käyn läpi kyseisiä tauteja; ominaisuuksia, yhtenäisyyksiä, eroja ja hoitoa.

### **2.1 Leiomyosarkooma**

Leiomyosarkooma kuuluu GIST:in ohella elimistön pahanlaatuisiin pehmytkudoksesta lähteviin kasvaimiin eli tukikudossyöpiin. Pehmytkudossarkoomista tavallisimpia ovat fibrosarkooma (lähtöpaikka sidekudos), liposarkooma (rasvakudos) ja leiomyosarkooma (sileä lihaskudos). Suomessa noin 350:stä vuosittain todettavasta sarkoomasta pehmytkudossarkoomia on hieman yli sata. Kaikista syöpätaudeista pehmytkudossarkoomien osuus on vain 1 %, joten ne ovat hyvin harvinaisia. (Syöpäjärjestöt 2012.)

Leiomyosarkooma voi esiintyä missä päin elimistöä tahansa, yleisimpinä paikkoina ovat raajat, kohtu, vatsa ja sisäelimet (Syöpäjärjestöt 2012). Leiomyosarkooma saa alkunsa pitkälle erilaistuneista sileistä lihassoluista. Soluissa on sikarin muotoinen tuma ja pitkälle erilaistunut sytoplasma, lisäksi kasvain on ulkonäöltään polyypimäinen. Leiomyosarkoomat ilmentävät lihaskasvaimille tyypillisiä merkkiaineita, kuten desmiiniä (lihassolun proteiini) ja sileälihasaktiinia. (Miettinen – Lasota 2001: 1–12.) Kasvain voi kasvaa suureksikin ennen sen havaitsemista ja tavallisin oire on päällepäin tuntuva kyhmy. Yleisoireilu, kuten kuumeilu tai painonpudotus on hyvin harvinaista (Duodecim 2011; Syöpäjärjestöt 2012).

Pehmytkudossarkoomien hoidon vaativuuden vuoksi hoito on keskitetty yliopistollisiin keskussairaaloihin. HUS:ssa kokoontuu kerran viikossa eri alojen edustajista (onkologit, kirurgian alat, patologi, radiologi) muodostuva pehmytkudossarkoomaryhmä suunnittelemaan uusien sarkoomapotilaiden hoitoa. Hoidot aloitetaan magneetti- sekä kaikukuvauksella, joiden ohjaamana otetaan ohut- sekä paksuneulanäyte. Primäärihoito sarkoomissa on leikkaus, joko yksinään tai yhdistettynä säde- ja/tai solunsalpaajahoidon. Sädehoitoon päädytään, jos kasvain on leikkauskelvoton, leikkausmarginaali on jäänyt liian pieneksi tai leikkausalue on kontaminoitunut. Sytostaattihoidot tulevat kyseeseen, kun kasvain on metastasoitunut tai kun leikkaus ja sädehoito eivät ole johtaneet toivottuun tulokseen. Kasvaimen uusiutumistaipumus on yleensä pieni, eikä potilas yleensä tarvitse lisää hoitoja. (Blomqvist – Tukiainen 2007: 526–531.)

## 2.2 Gastrointestinaalinen stroomatumori eli GIST

Gastrointestinaalinen stroomatumori (GIST) kuuluu pehmytkudossarkoomiin. Aikaisemmin se on luokiteltu leiomyosarkoomiin, mutta sittemmin on käynyt ilmi, että se muodostaa aivan oman ryhmänsä. GIST eroaa leiomyosarkoomasta taudin synnyn ja käyttäytymisen sekä hoidonkin suhteen. GIST-kasvaimet voidaan erottaa leiomyosarkoomasta immunohistokemialla parafiinileikkien värjäytyessä KIT-proteiinin (CD117-antigeeni) suhteen positiivisesti, mikä on keskeinen diagnostinen kriteeri. KIT-negatiiviset GIST:it ovat erittäin harvinaisia ja tällä hetkellä tutkimuksen kohde. Muuntunut KIT-tyrosiinikinaasi saa aikaan solun uudiskasvua ja siten kasvaimen synnyn. KIT-geenin mutaatio on löydettävissä noin 85 %:ssa GIST-kasvaimia. Ensimmäinen tehokas täsmähoitolääke imatinibi estää spesifisti KIT-reseptorin toiminnan ja se tehoaa hyvin myös pieniin vaikeasti havaittaviin kasvaimiin ja etäispesäkkeisiin. (Joensuu 2002: 2305–2312.)

Harvinainen GIST voi esiintyä missä tahansa ruansulatuskanavan osassa. Se saa alkunsa niin sanotuista Cajalin soluista, jotka säätelevät suolen hidasta supistelua ja sen yleisimpinä paikkoina ovat mahalaukku, ohutsuoli ja paksu- sekä peräsuoli. (Joensuu – Roberts 2007a: 345–346.) Ohutsuolen pahanlaatuisista kasvaimista taudin osuus on noin 20 % kaikista eri syöpämuodoista (Joensuu – Roberts 2007a: 431). Kaikista ruansulatuskanavan pahanlaatuisista kasvaimista GIST:in osuus on vain noin prosentti. Verenkierron välityksellä syntyvien metastaasien kohteena on tavallisesti maksa. GIST kasvaa usein suolen ulkopinnalta elinten väliin vatsaontelon sisään, jolloin sen havaitseminen tarpeeksi ajoissa voi olla hankalaa. Tämän seurauksena kas-



vaimet ovat usein kookkaita; keskimäärin 8 cm, mutta koko voi kasvaa jopa 40 cm:iin. Tautia sairastavien potilaiden keski-ikä on yleensä 60–70 vuotta ja sitä ilmenee yhtä paljon miehillä sekä naisilla. (Joensuu – Roberts 2007a: 345–349.)

GIST:lle altistavia tekijöitä (esimerkiksi alkoholi tai tupakka) ei tunneta, mutta maailmalla tunnetaan muutamia sukuja, joilta on löydetty GIST:lle altistava ituradan geenimutaatio. Pohjoismaista tätä mutaatiota ei ole löydetty. GIST voi löytyä sivulöydöksenä endoskopiassa (tähtystystutkimus), laparotomiassa (vatsan leikkaus) tai kuvaustutkimuksissa. (Joensuu – Roberts 2007b: 331.) Muita mahdollisuuksia löytää GIST on esimerkiksi ruokatorvesta keuhkojen röntgenkuvassa ja miehillä pienet peräsuolen GIST:it rutiinisessa hoitoon liittyvässä tunnustelussa eturauhasta tutkittaessa (Miettinen – Lasota 2001: 1–12). Suuret kasvaimet voivat löytyä sattumalta oireiden perusteella, sillä GIST:it vuotavat helposti verta. Vatsakivut, verenvuoto ja siihen liittyvä kehittyvä anemia, johtavat tarkempiin diagnostisiin tutkimuksiin ja siten taudin löytämiseen. Mahalaukun GIST:in oireita ovat epämääräiset ylävatsan kivut ja täyttymisen tunne. Suolistossa olevan taudin oireina voi tulla ahtaumia tai jopa suolen puhkeaminen. Suuren kasvaimen voi löytää myös jo pelkästään tunnustelemalla vatsaa. (Joensuu – Roberts 2007b: 331.)

Perushoitona GIST:lle on leikkaus. Leikkauksessa pyritään poistamaan kasvain ja sitä ympäröivä pseudokapseli. Imusolmukealueiden poistoa ei tavallisesti suoriteta, sillä GIST harvoin metastoi imusolmukkeisiin. Joissain tapauksissa on suositeltavaa, että ennen leikkausta kasvaimen kokoa pyrittäisiin pienentämään imatinibilääkehoidolla. Imatinibihoitoa on alettu käyttämään myös korvaamaan metastaasien leikkausoperaatioita. Solunsalpaajahoidot sekä sädehoito eivät ole olleet kovin tehokkaita GIST:n hoidossa. Sädehoito on lisäksi vahingollista annettaessa sitä suoliston alueelle. (Joensuu 2002: 2305–2312.)

### **3 Formaliini-fiksoidut parafiiniin valetut näytteet**

Tässä työssä käyttämäni näytteet olivat parafiinivalmisteita. Lyhenne FFPE tulee englannin kielen sanoista Formalin-Fixed Paraffin-Embedded eli formaliini-fiksoitu parafiiniin valettu. Kappaleessa käyn läpi tarkemmin näytemuotoa; sen hyötyjä ja haittoja sekä parafiinin poistoa. FFPE-näyte kuviossa 1.



Kuvio 1. FFPE-näyte. (Siemens Healthcare Diagnostics 2011).

### 3.1 Formaliini-fiksoidut parafiiniin valetut näytteet

Stantan mukaan Euroopassa otetaan vuosittain 25–30 miljoonaa kudospäytettä biopsiana tai leikkauksessa. Kudospäytteet fiksoidaan formaliinilla (yleisimmin puskuroitu 10 % formaliini; sis. 3,7 % formaldehydiä ja enintään 2 % metanolia) mahdollisimman pian, jotta estetään näytteen autolyysi ja mätäneminen. Tämän jälkeen näytteet valetaan parafiiniin, jolloin näytteen histologinen tutkimus on mahdollista. Kudospäytteitä löytyy valtavia määriä niin normaalista kuin sairaastakin kudoksesta, joten ne ovat siten erinomainen tutkimuskohde. (Stanta 2011: 3.)

FFPE-näytteet ovat osoittautuneet korvaamattoman arvokkaaksi materiaaliksi myös biomarkkereiden DNA:han, RNA:han ja mikro-RNA:han perustuvassa tutkimuksessa. Viimeaikoina syöpätutkimuksessa on keskitytty enenevässä määrin biomarkkereiden tunnistamiseen ja määrittämiseen. Tähän mennessä niitä on kuitenkin vasta löydetty vähäinen määrä histopatologisten näytteiden avulla. FFPE-näytteiden arvo on myös siinä, että vuosikymmeniä vanhoista näytteistä voidaan edelleen eristää nukleiinihappoja ja niihin liittyvät potilaiden seurantatiedot ovat helposti saatavilla. (Hennig ym. 2010: 1845.)

Vaikka FFPE-näytteen histologinen rakenne säilyy hyvänä, näytteen RNA:n eristäminen on haasteellista, sillä eristetty RNA on yleensä hyvin fragmentoitunutta. Puskuroimattoman (pH <1) fiksatiivin käyttö lisää RNA:n pilkkoutumista. (Gilbert ym. 2007: 1.) Tämän vuoksi fiksoiminen pitäisi tehdä neutraaliksi puskuroidulla formaliinilla + 4 °C:ssa. Ajan kuluessa RNA:n fragmentoituminen jatkuu edelleen parafiinivalmisteen hapettumisen vuoksi. Formaliini-käsittely aiheuttaa lisäksi ristisidoksia proteiinien ja nukleiinihappojen sekä nukleiinihappojen ja nukleiinihappojen välille. RNA:n emäksiin

liittyy myös metyyliryhmiä (-CH<sub>2</sub>OH), vaikeuttaen RNA:n eristystä ja käänteistranskriptaasin toimintaa käännettäessä RNA:ta cDNA:ksi. Esimerkiksi lähes 40 %:iin adeniini-emäksistä liittyy kyseinen ryhmä. (Farragher – Tanney – Kennedy – Harkin 2008: 435–445.)

FFPE-näytteen valmistuksessa formaliini fiksauksen jälkeen näytteen sisältämä vesi korvataan etanolilla. Seuraavissa vaiheissa etanoli korvautuu ksyleenillä ja lopuksi ksyleenin tilalle tulee parafiini. Lopuksi koko näyte valetaan parafiiniin. Mahdollinen näytteeseen jäävä vesi johtaa kudoksen proteiinien hajoamiseen. Optimaalisen tuloksen saamiseen tulisi käyttää matalassa lämpötilassa sulavaa parafiiniä, sillä näytteen käsittely korkeassa lämpötilassa voisi johtaa nukleiinihappojen ja proteiinien hajoamiseen. (Qiagen 2010: 8.)

### 3.2 Parafiinin poisto

Yleisin menetelmä parafiinin poistoon on ksyleenin (tai vastaavan liuottimen) käyttö ja sen jälkeiset pesut etanolilla. Muita vaihtoehtoja parafiinin poistoon on mikroaaltojen käyttö (vahan sulatus ja sen jälkeen jähmetys jäällä) tai suoraan kudoksen digestointi. Parafiinin poiston on uskottu olevan tärkeä vaihe RNA/DNA:n eristämiseen FFPE-näytteistä, mutta on olemassa myös tutkimuksia, ettei parafiinin poisto olisi välttämätöntä. (Gilbert ym. 2007: 1–2.)

Lehmannin ja Kreipen (2001) *Methods*-lehdessä julkaisemassa menetelmässä parafiinin poisto RNA:n eristyksessä FFPE-näytteestä on jätetty kokonaan pois. Tällä toimenpiteellä on säästetty aikaa, vähennetty RNA:n fragmentoitumisen ja ristikontaminaation riskiä sekä vähennetty vaarallisten aineiden käsittelyä. Parafiinin poistovaiheen jättäminen pois ei ollut vaikuttanut huomattavasti RNA:n saantiin. (Lehmann – Kreipe 2001: 413.)

Myös Bonin ja Stanta viittaavat siihen, että on mahdollista jättää parafiinin poistovaihe kokonaan pois. He neuvovat lisäämään lyysauspuskurin suoraan leikkeiden päälle. Tässä tapauksessa tulisi protokollaan lisätä 5 minuutin parafiinin sulatus + 65 °C:ssa, jolloin sula parafiini kerääntyisi lysaatin pinnalle. (Bonin – Stanta 2011: 59.)

Tässä opinnäytteessä on käytössä kaksi erilaista menetelmää parafiinin poistoon. Ensimmäisessä, nykyisin käytössä olevassa menetelmässä (High Pure RNA Paraffin Kit,

Roche) parafiinin poistetaan liuottamalla se ksyleeniin, minkä jälkeen ksyleeni pestään pois etanolilla. Verrattavassa menetelmässä (Deparaffinization Solution, Qiagen) parafiini sulatetaan näytteestä + 56 °C:ssa. Käytettävä liuos ja parafiini sekoittuvat keskenään ja muodostavat sentrifugoinnin jälkeen koeputken pinnalle erottuvan faasin. (Qiagen 2010: 11.) Ilmeisesti Qiagenin liuos on rasvaliukoinen, jolloin parafiini liukenee siihen. Sulaneen parafiinikerroksen alle jää vesifaasi, joka sisältää näytteen ja nukleinihapot. Mitään tarkempaa tietoa liuoksen sisällöstä ei ole saatavilla. Siemensin laitteella eristettäessä parafiini sulatetaan korkeassa lämpötilassa (+ 80 °C), jonka jälkeen näyte jäähdytetään, jolloin parafiini muodostaa näytteen pinnalle kovettuvan kerroksen. Tästäkään menetelmästä ei ole tiedossa täysin tarkkaa tietoa.

#### 4 RNA ja eristysmenetelmät

Lähdettäessä tutkimaan geenien ilmentymää, on usein parempi tutkia lähetti-RNA:ta (mRNA) kuin DNA:ta itseään. Tämä johtuu siitä, että mRNA-molekyylien avulla saadaan selville kudoksesta ne geenit, joiden ilmentymä on aktiivista juuri kyseisellä hetkellä. Kyseiset geenit voivat olla hyvinkin pieni osuus geenien kokonaismäärästä, mitä solussa on. (Brown 2000: 13.)

RNA:n eristykseen FFPE-näytteistä vaikuttaa hyvin moni asia; kudoksen fiksausta edeltäneet tekijät (esimerkiksi kudoksen tyyppi ja paksuus, autolyysin määrä), fiksaukseen liittyvät tekijät (esimerkiksi pH, lämpötila, fiksaukseen käytetty aika, fiksatiivin laatu, kudoksen paksuus) ja fiksauksen jälkeiset tekijät, kuten parafiinivalmisteen ikä ja säilytysolosuhteet. Eristyksen tekee haasteelliseksi se, ettei leikkeen fiksauksesta ole olemassa mitään yleistä standardia, vaan menetelmissä on paljon vaihtelua. (Gilbert ym. 2007: 1).

Erilaisia RNA:n eristysmenetelmiä on olemassa useita kymmeniä, täysin automatisoiduista manuaalisiin. Lisäksi on olemassa valmiita kaupallisia reagenssisarjoja jotka ovat suunniteltu erityisesti FFPE-näytteiden käyttöön. On kuitenkin osoitettu, että vaikka käyttäisi samaa kaupallista menetelmää, voi tulos olla hyvinkin poikkeava RNA:n saannon suhteen. Tekemällä pieniä säätöjä esimerkiksi proteinaasi K:n vaikutusaikaan, voidaan saada parannusta tulokseen. (Bonin – Stanta 2011: 57.) Tässä kappaleessa esittelen työssä käyttämäni kaksi erilaista RNA:n eristysmenetelmää. Lisäksi käyn läpi, mitä kaikkea on otettava huomioon RNA:n kanssa työskennellessä.

#### 4.1 RNA:n käsittelyssä huomioon otettavaa

RNA:n käsittelyssä pitää ottaa huomioon monia erilaisia varotoimia, koska RNA-molekyylit ovat hyvin epästabiileja. Suuren kontaminaation riskin aiheuttavat RNAasit eli ribonukleaasit, solun omat RNA:ta hajottavat entsyymit. RNAaseja esiintyy myös kaikkialla ympäristössä, esimerkiksi iholla ja ne ovat hyvin stabiileja entsyymejä, joten ne ovat vaikea inaktivoida. RNAasi ei tuhoudu autoklavoinnilla. (Wilkinson 2000: 57–59.)

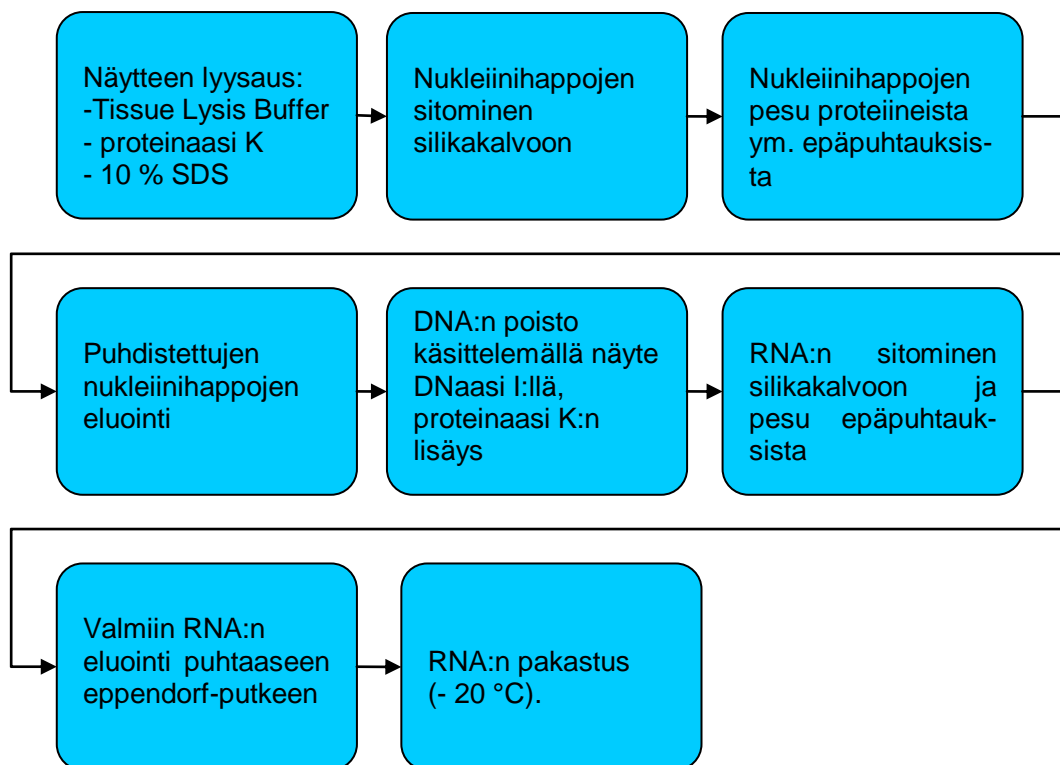
Kontaminaation välttämiseksi RNA:n kanssa työskennellessä, varsinkin PCR-vaiheessa (kappale 5.2 Polymeraasiketjureaktio, s. 12), on hyvä kiinnittää seuraaviin huomiota. Työskentelytila tulee puhdistaa esimerkiksi 100 % etanolilla, puhdistamiseen voi käyttää myös UV-valoa. Tässä työssä minulla oli käytössä kaupallinen RNase AWAY™ Reagent, jota käytin pintojen ja pipettien puhdistukseen. Työskennellessä on käytettävä koko ajan kertakäyttöisiä hansikkaita ja ne vaihdetaan aina likaantumisen jälkeen. Avonaisia näytteitä kohti puhumista tulee välttää. Näytteitä käsitellessä käytetään steriilejä kertakäyttöisiä materiaaleja; kuten pipetinkärjet ja näyteputket. RNA-työskentelyä varten olisi hyvä olla omat pipetit ym. tarvittavat välineet, joita ei käytetä mihinkään muuhun työskentelyyn. Kaikki käytettävät reagenssit tulisi valmistaa DEPC-käsitellyn (dietyylipyrokarbonaatti, inaktivoi tehokkaasti RNAasit) veteen. Käyttö-laimennoksia tehdessä laimennetaan kantaliuosta vain se määrä kerrallaan, mitä tullaan tarvitsemaan. RNA-näytteet pidetään jäällä niitä käsitellessä ja muulloin RNA säilytetään pakkasessa. (Wilkinson 2000: 57–59.)

#### 4.2 RNA:n eristys spin-kolonnimenetelmällä

Ennen kuin RNA:ta voidaan käsitellä, se pitää eristää ja puhdistaa häiritsevistä epäpuhtauksista. Yksi menetelmistä on käyttää spin-kolonnia. Eristysmenetelmässä solut ensin hajotetaan yön yli kestäväällä proteinaasi K -käsittelyllä (+ 55 °C) natriumlauryylisulfaatin (SDS) ja etyleenidiamiinitetraetikkahapon (EDTA) läsnä ollessa. EDTA kelatoi eli sitoo  $Mg^{2+}$ -ioneja heikentäen solukalvoja ja SDS toimii detergenttinä liuottaen solukalvoja, jolloin solut hajoavat. (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2010: 105–109; Roche 2011: 19.) Proteinaasi K poistaa myös formaliini käsittelystä seuraneita RNA:n emäksiin kiinnittyneitä metyyli-ryhmiä sekä RNA:n ja proteiinien välille syntyneitä ristsidoksia. (Farragher ym. 2008: 435–445; Qiagen 2010: 12.)

Spin-kolonne menetelmässä on käytössä putken pohjalla oleva silikakalvo, johon nukleiinihapot sitoutuvat korkeassa ionivahvuudessa guanidinium-tiosyanaatin läsnä ollessa. Näyteolosuhteet on suunniteltu siten, että varsinkin RNA sitoutuu vahvasti. Tämän jälkeen lysaatin epäpuhtaudet pestään pois sentrifugoimalla pesuliuosta kolme kertaa silikakalvon läpi. Lopuksi silikakalvossa kiinni olevat puhdistetut nukleiinihapot eluoidaan matalan ionivahvuuden omaavalla puskuriliuoksella puhtaaseen eppendorf-putkeen. (Suominen ym. 2010: 105–109; Roche 2011: 19.)

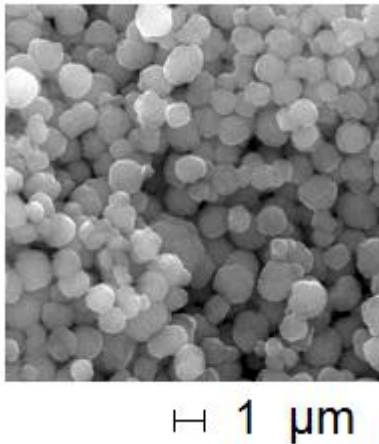
Puhdistetut nukleiinihapot käsitellään seuraavaksi DNAasi I:llä, jolloin näytteessä oleva DNA hajoaa. Näytteen DNAasi I käsittely lisää reaaliaikaisen PCR:n herkkyyttä, sillä teoriassa yksikin DNA:n fragmentti voi monistua reaktiossa ja siten tuottaa virheellisen tuloksen. Myös RNA:sta tuotetun cDNA:ta laatu paranee käsittelyn seurauksena. DNAasi I:n lisäksi näytteeseen lisätään vielä kerran proteinaasi K:ta, joka lisää RNA:n puhtautta. Käsittelyjen jälkeen RNA sidotaan uudelleen silikakalvoon ja epäpuhtaudet pestään pois toistamalla pesu kolmesti. Lopuksi puhdistettu RNA eluoidaan kalvolta matalan ionivahvuuden omaavalla eluaatilla puhtaaseen eppendorf-putkeen. (Dotti – Bonin 2011a: 87; Roche 2011: 19; Suominen ym. 2010: 105–109.) Kuviossa 2 on esitetty spin-kolonne eristyksen vaiheet pääpiirteittäin.



Kuvio 2. RNA-eristyksen vaiheet spin-kolonnimenetelmällä.

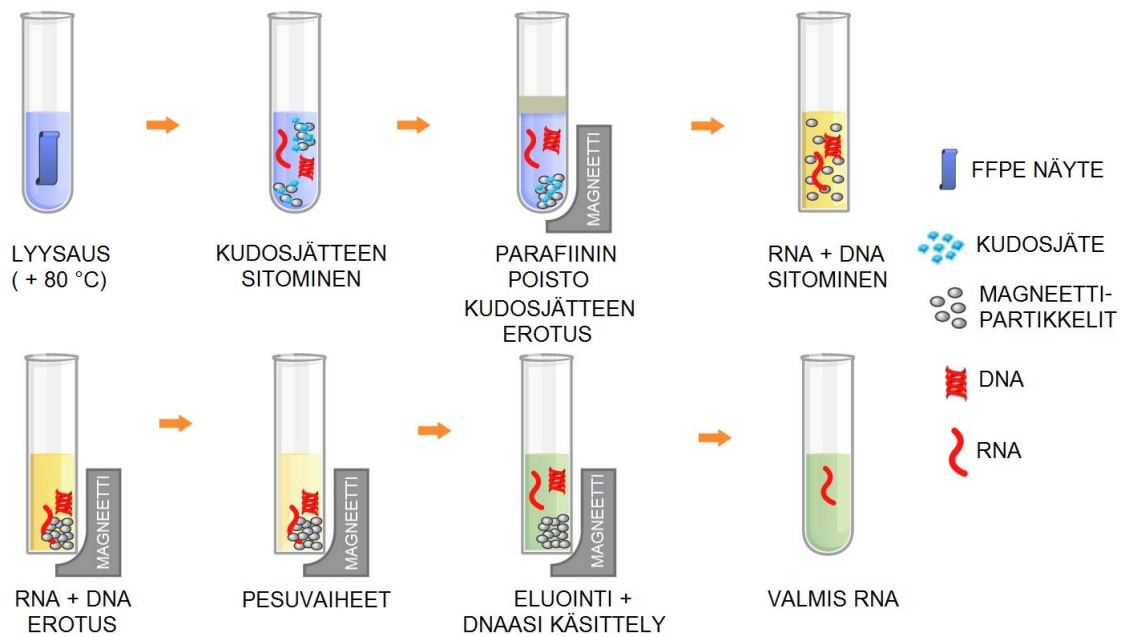
#### 4.3 RNA:n eristys magneettipartikkeilla

RNA:ta voidaan eristää myös paramagneettisilla partikkeilla. Siemensin kehittämässä menetelmässä magneettipartikkelien koko on halkaisijaltaan alle yhden mikrometrin ja niiden rautapitoisuus on yli 99 %. Partikkelien pinta on päällystetty nanopaksuisella silikakerroksella, joten nukleiinihappojen sitoutuminen niihin tapahtuu samoin kuin spin-kolonnimenetelmässä. Kuviossa 3 Siemensin valmistaman VERSANT® Tissue Preparation Reagent Kit -menetelmän magneettipartikkeleita. Partikkelien kyky sitoa materiaalia (nukleiinihappoja tai kudossjätettä) riippuu käytettävästä sidospuskurista. (Siemens Healthcare Diagnostics 2011).



Kuvio 3. Kuva VERSANT® Tissue Preparation Reagent Kit -menetelmän magneettipartikkeleista. (Siemens Healthcare Diagnostics 2011).

Aluksi parafiinileike lyysataan ravistuksessa + 80 °C:ssa puoli tuntia, seuraavaksi lämpötila lasketaan + 65 °C:seen puoleksi tunniksi ja näyte käsitellään proteinaasi K:lla. Tämän jälkeen kudossjäte sidotaan magneettipartikkeleihin ja näyte vietään kylmän magneetin läheisyyteen; kudossjäte sitoutuu magneettiin ja sula parafiini jähmettyy hydrofobisen reaktion seurauksena näyteputken reunoille. Parafiiniton lysaatti siirretään uuteen putkeen, lisätään kaotrooppinen puskuri ja uudet magneettipartikkelit. Kaotrooppinen puskuri mahdollistaa positiivisen ionin muodostaman sillan syntymisen negatiivisesti varautuneen silikan ja negatiivisen varauksen omaavan nukleiinihapon välille. Tämän jälkeen sitoutuneet nukleiinihapot pestään epäpuhtauksista kolme kertaa. Lopuksi näyte eluoidaan irti partikkeleista ja käsitellään DNAasi I:llä, jolloin tuloksena on puhdistettu RNA. Menetelmän vaiheet on kuvattu kuviossa 4. (Siemens Healthcare Diagnostics 2011; Suominen ym. 2010: 105–109).



Kuvio 4. RNA:n eristys silikapäällysteisillä magneettipartikkeilla (Mukaan Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2011).

Tässä työssä magneettipartikkeihin perustuvaa RNA:n eristystä käyttää Siemensin Tissue Preparation System -laite. Koska laite tekee kaiken automaattisesti alusta saakka, se suorittaa samalla myös parafiinin poiston. Kehittämällä RNA:n eristyslaitteen FFPE-näytteille, Siemens on vastannut kahteen suureen haasteeseen, jotka kohdataan kun kehitetään menetelmän automatisointia. Ensimmäinen on vaikeasti automatisoitava ja työläs parafiinin poisto. Toinen näytteen lyysaus. Digestoitumaton osa voi helposti tukkia laitteessa pipetin kärjen, jolloin näytteen käsittely keskeytyy. Digestioolosuhteet ovat näytteestä riippuvaisia; miten näytteen formaliini-fiksointi on suoritettu, kuinka suuri määrä näytettä on ja millaista näyte on morfologialtaan. Aiemmin digestoitumattoman näytteen välttämiseksi on käytetty joko pitempiä inkubointiaikoja tai kovempia digestioolosuhteita (korkeammat lämpötilat tai toistuva proteinaasi K:n lisäys). Vaihtoehtoisesti digestoitumaton osa on voitu sentrifugoida pois näytteestä. Sentrifugointi on kuitenkin hyvin vaikea toteuttaa automaattisesti. Tämän seurauksena Siemens on ottanut automaattiinsa käyttöön silikapäällysteiset magneettipartikkelit. (Bohmann ym. 2009: 1719–1727.)

## 5 RNA:n analysointi

Käytän tässä työssä RNA:n määrän, puhtauden ja laadun selvittämiseen kahta erilaista menetelmää. Ensimmäiseksi määritän RNA:n pitoisuuden ja puhtauden spektrofot-



metrillä. Seuraavaksi teen PCR-tekniikkaan perustuvia ajoja. Eristetystä RNA:sta tehdään komplementaarista DNA:ta (cDNA) käänteistranskriptaasi PCR:llä. Tuotettua cDNA:ta käytän templaattina reaaliaikaisessa PCR:ssä. Tämän PCR-ajon tuloksena saan tietoa, jonka avulla voin arvioida puhdistetun RNA:n laatua ja vertailla käyttämiäni eristysmenetelmiä.

### 5.1 Spektrofotometrinen määrittäminen

Nukleiinihappojen pitoisuuden määrittämiseen on olemassa monia erilaisia menetelmiä. Yksi yleisimmistä menetelmistä on spektrofotometrinen määrittäminen. Konsentraation määrittäminen perustuu näytteen absorbanssiin. Absorbanssi mitataan eri aallonpituuksilla, jolloin saadaan selville näytteen RNA:n konsentraatio ja tietoa näytteen epäpuhtauksista. (Dotti – Bonin 2011b: 75–76.)

Puhtaalle RNA:lle aallonpituuksien  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  suhde on 2,0. Proteiinit absorboivat aallonpituudella 280 nm, joten proteiinikontaminantit laskevat edellä mainittua suhdetta ( $< 1,8$ ). Jos eristykseen on jäänyt orgaanisia yhdisteitä (esim. etanoli), se näkyy aallonpituuksien  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  suhteessa. Puhdas RNA antaa suhdeluvuksi  $>1,8$ . (Dotti – Bonin 2011b: 75–76; Suominen ym. 2010: 110–111.)

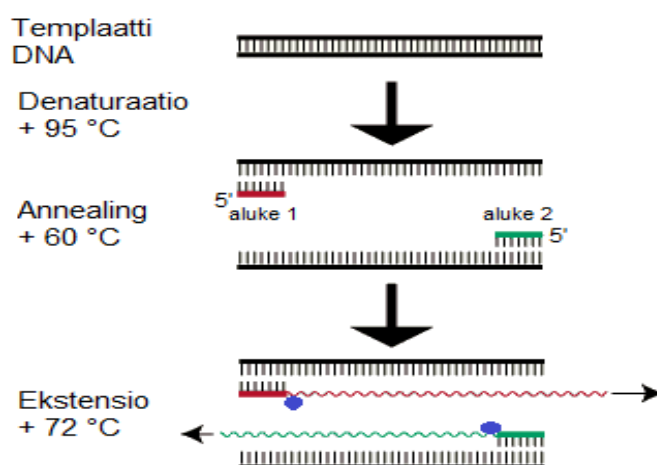
Perinteisen spektrofotometrin käyttö vaatii näytteen laimentamisen ennen määrittämistä ja suurempaa näytemäärää. Käytin tässä työssä konsentraation määrittämiseen NanoDrop-pienoisspektrofotometriä. Laitteen käytön hyötyjä on, että se tarvitsee pitoisuuden määrittämiseen hyvin pienen näytemäärän (1  $\mu\text{l}$ ) ja yhdellä mittauksella saa selvitettyä pitoisuuden ja tietoa näytteen puhtaudesta. (Dotti – Bonin 2011b: 75–76.)

### 5.2 Polymeerasiketjureaktio

Polymeerasiketjureaktio (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) on erittäin herkkä ja tehokas menetelmä monistaa emäsjärjestykseltään kahden tunnetun DNA-jakson välistä aluetta DNA-polymeerasin avulla. Monistukseen tarvitaan vain muutamia DNA-molekyylejä ja niistä voidaan monistaa muutamassa tunnissa jopa miljoonia kopioita. PCR:n teossa käytetään PCR-laitetta, jonka avulla voidaan säädellä tarkasti tapahtuvan reaktion lämpötilaa ja kestoja. (Suominen ym. 2010: 153.)

PCR:n teko lähtee monistettavasta kaksijuosteisesta DNA:sta. Halutun monistettavan alueen alku- ja loppupuolelta on tunnettava määrätyn mittainen alue sekvenssiä, jotta voidaan suunnitella alukkeet, jotka kiinnittyvät näille alueille. Alukkeita on kaksi kappaletta, yksi kummallekin juosteelle. Alukkeet ovat yleensä noin 15–40 nukleotidin mittaisia yksijuosteisia DNA-fragmentteja. PCR tarvitsee toimiakseen lisäksi myös nukleotideja (dNTP) uuden juosteen rakennusaineeksi, puskuriliuoksen ja tietyn magnesiumipitoisuuden luomaan optimaalisen olosuhteen reaktiolle. (Suominen ym. 2010: 154, 162.)

PCR-ajo koostuu kolmesta toistettavasta reaktiosta, mitä kutsutaan yhteisnimellä sykli (kuvio 5). Sykli alkaa denaturoinnilla. Denaturoinnissa nostetaan PCR:n lämpötila niin korkealle (+ 95 °C), että DNA-juosteen vastinosat irtoavat toisistaan. Syklin toisessa vaiheessa lasketaan lämpötilaa siten, että alukkeet löytävät DNA-juosteesta vastinkohansa ja kiinnittyvät niihin. Lämpötila lasketaan kuitenkin alas vain niin lyhyeksi aikaa, ettei itse DNA ehdi pariueta takaisin (renaturoitua). Syklin toista vaihetta kutsutaan nimellä annealing-reaktio. Kolmas vaihe alkaa lämpötilan nostolla, jolloin DNA-polymeraasi aloittaa DNA-juosteille vastinkappaleiden syntetisoinnin templaatin mallin mukaan. Syntyvä juoste tehdään reaktioseoksessa olevista vapaista nukleotideista 5' → 3' suunnassa alkaen alukkeen 3'-pästä. Tyypillinen kolmannen vaiheen, eli ekstension, lämpötila on noin + 72 °C. Syklin tultua loppuun se aloitetaan alusta uudelleen eli denaturaatiolla, jolloin vastasyntyneet kaksinauhaiset DNA:t erotetaan toisistaan. Kun sykliä (denaturaatio–annealing–ekstensio) toistetaan keskimäärin 15–40 kertaa, alukkeiden määrittämä väli monistuu eksponentiaalisesti. (Suominen ym. 2010: 154–156.)



Kuvio 5. Yksi PCR:n sykli. Kuvassa DNA-polymeraasi on sininen pallo.

### 5.2.1 Käänteistranskriptio PCR

Lähtömateriaalina PCR:lle voi olla myös yksijuosteinen RNA. Tätä RNA-lähtöistä PCR:ää kutsutaan käänteistranskriptio PCR:ksi (RT-PCR, engl. reverse transcription). RT-reaktiossa yksijuosteiselle RNA:lle syntetisoidaan vastinjuoste, jolloin siitä tulee cDNA-RNA-hybridi. Juosteet erotetaan toisistaan denaturoimalla ja syntynyt cDNA juoste toimii uutena templaatiina. Kun syklejä toistetaan, lopputuloksena cDNA-juoste monistuu eksponentiaalisesti. Lopputuotteeksi syntyy siten kaksinauhaista cDNA:ta. (Suomien ym. 2010: 170.)

RT-PCR:n tekemiseen on olemassa erilaisia menetelmiä riippuen lähtömateriaalista. FFPE-näytteistä saatava RNA on fragmentoituneempaa kuin fiksaamattomasta tuore-näytteestä saatava, joten käyttämäni lähdemateriaali rajoittaa menetelmän valintaa. (Dotti – Bonin – Nardon 2011a: 93.)

Käyttämäni menetelmä perustuu SuperScript III Reverse Transcriptase -nimisen käänteistranskriptaasin käyttöön ja satunnaisiin alukkeisiin (random primers). RT-PCR-reaktioseos koostuu viidestä komponentista: alukkeet, puskuriliuos, nukleotidit, RNA-templaatti ja käänteistranskriptaasientsyymi. Reaktioseoksessa on tärkeä olla mukana myös RNAasi-inhibiittori, koska eristetty RNA on hyvin herkkä RNAasien vaikutuksille. Käyttämäni entsyymi on mutatoitunut muoto Moloneyn hiirten leukemiaviruksen entsyymistä (MMLV-RT, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), jolloin sillä on parempi korkean lämpötilan sieto. Käyttämällä tätä entsyymiä ja alukkeita cDNA:n saanto on suurin, vaikka alukkeiden sitoutuminen on epäspesifiä. (Coleman – Tsongalis 2006: 54; Dotti ym. 2011a: 94–95.)

### 5.2.2 Reaaliaikainen PCR

Reaaliaikaisesta PCR:stä on tullut yleisesti käytetty menetelmä RNA:n ja DNA:n kvantitatiiviseen sekä kvalitatiiviseen määrittelykseen. RT-PCR:n yhdistäminen reaaliaikaisen PCR:n käyttöön on käypä menetelmä RNA:n tutkimiseen sekä tuore- että FFPE-näytteestä. Reaaliaikaisessa PCR:ssä syntyvän tuotteen määrää seurataan reaktion edistyessä. Menetelmän määrän seuraamisen perustuu fluoresoivan merkkiaineen käyttöön. Fluoresenssin määrä (signaali) kasvaa sitä mukaa, kun tuotteeksi syntyvän kaksinauhaisen DNA:n määrä lisääntyy. (Dotti – Nardon – Pracella – Bonin 2011b: 121; Suomien ym. 2010: 166–168.)

### 5.2.2.1 Signaalin mittaaminen

Reaaliaikaisessa PCR:ssä signaalin mittaamiseen on kolme erilaista menetelmää. Menetelmissä mitataan fluoresenssisignaalin määrän kasvua, joka on suoraan verrannollinen syntyvän tuotteen määrään. Menetelmä voi olla epäspesifi, jolloin kaikki syntyvä kaksinauhainen DNA tuottaa signaalin, tai spesifi, jolloin käytetään tarkkaan suunniteltuja alukkeita ja/tai koettimia. Spesifeillä menetelmillä päästään suurempaan tarkkuuteen ja luotettavuuteen lopputuloksen suhteen. (Houghton – Cockerill 2006: 1.) Seuraavaksi käyn läpi kaikki kolme erilaista menetelmää signaalin havaitsemiseen.

Ensimmäisenä menetelmänä on kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvat värit. Yleisin käytettävissä oleva menetelmä on SYBR Green, joka on myös ensimmäinen kaupallisesti saatava väri reaaliaikaisessa PCR:ssä. Sitouduttuaan DNA:han SYBR Green emittoi valoa, joka on 1000 kertaa voimakkaampi, kuin sitoutumattoman värin. SYBR Greenin hyviä puolia on se, että se voidaan lisätä suoraan jo valmiiksi optimoituun PCR:ään. Menetelmän huono puoli on kuitenkin se, että kaikki kaksijuosteinen DNA tuottaa signaalin. Tällöin esimerkiksi huonosti suunnitellut alukkeet voivat pariutua keskenään (niin sanottu primerdimer) ja tuottaa virheellisen tuloksen. SYBR Green on huono vaihtoehto myös siinä tapauksessa, jos näytteessä on vähän monistettavaa geeniä; silloin epäspesifi signaali vääristää tulosta. (Dotti ym. 2011b: 122; Houghton – Cockerill 2006: 2.)

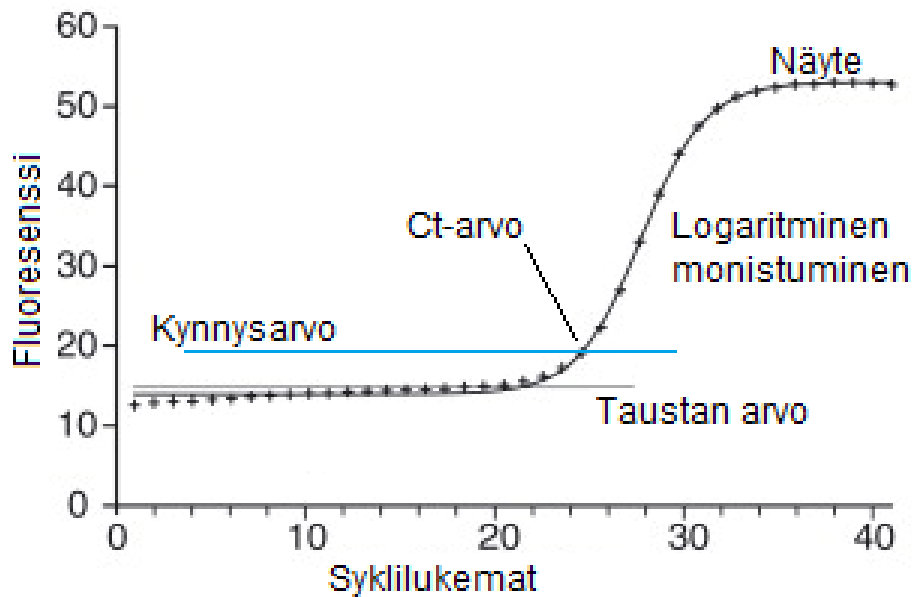
Alukkeisiin perustuva menetelmässä fluorofori on liitetty kohdespesifiin alukkeeseen, jolloin signaali syntyy kun aluke on liitetty syntyvään DNA-juosteeseen. Aluke on suunniteltu siten, että sen toisessa päässä on fluorofori ja toisessa päässä fluoroforin vaimentaja (engl. quencher). Vapaana reaktioseoksessa ollessaan aluke on pariutunut itsensä kanssa, muodostaen ns. hairpin-rakenteen. Tällöin fluoroforin lähellä oleva vaimentaja estää fluoroforin signaalin tuottamisen. Kun aluke liittyy DNA:han, vaimentajan vaikutus ei enää tavoita fluoroforia ja syntyy signaali. Toinen vaihtoehto on käyttää kahta fluoroforia, jotka ovat eri alukkeissa. Menetelmässä fluorofori viritetään sille ominaisella aallonpituudella. Tämän jälkeen fluorofori emittoi saamansa energian, joka siirtyy toisen alukkeen fluoroforille ja aiheuttaa mitattavan signaalin. Signaali syntyy vain, jos alukkeet liittyvät riittävän lähelle toisiaan syntyvään DNA-juosteeseen. Tämä lisää menetelmän tarkkuutta, sillä vain halutun alueen monistuminen aiheuttaa mitattavan signaalin synnyn. Edellä kuvattuja menetelmiä kutsutaan nimellä FRET (engl. fluo-

recence resonance energy transfer) (Houghton – Cockerill 2006: 3; Suominen ym. 2010: 168.)

Tässä työssä käyttämäni signaalin tuotto perustuu alukkeiden sekä fluoresoivan koettimen käyttöön. Menetelmässä alukkeet sitoutuvat annealing vaiheessa cDNA-juosteeseen, jonka jälkeen DNA-polymeraasi liittyy myös koettimen syntyvään cDNA:n vastinjuosteeseen. Koettimessa on 5'-päässä fluoresoiva reportteriosa ja 3'-päässä sen vaimentajaosa. Vapaana reaktioseoksessa ollessaan, vaimentaja estää reportterin signaalin synnyn. Tässäkin on kyse FRET-ilmiöstä; reportterin purkautuva tila ei näy fluoresenssina, vaan se siirtyy vaimentajalle. DNA-polymeraasin kootessa vastinjuostetta vaimentaja ja reportteri irtoavat syntyvästä juosteesta ja reportterin signaali pääsee syntymään. Aluke ja koetin on suunniteltu siten, että koetin sitoutuu kopioitavan alueen loppupuolelle, tällöin signaali syntyy aina, kun kopioitava alue on monistettu loppuun saakka. Koettimen avulla lisätään varmuutta siitä, että reaktiossa kopioidaan juuri haluttua aluetta. Jos aluke on suunniteltu heikosti, se voi sitoutua mahdollisesti väärään kohtaan, jolloin kopioituu väärä alue. Mutta jos koetin on suunniteltu oikein, ei väärän alueen kopioinnista synny tarkasteltavaa signaalia. (Houghton – Cockerill 2006: 2–3; Life Technologies 2012: 11–12.)

### **5.2.2.2 Tulosten analysointi**

Reaaliaikaisessa PCR:ssä signaalin suuruus mitataan jokaisella syklillä, näin saadaan kuvaaja, jossa x-akselilla on syklien lukema ja y-akselilla signaalin voimakkuus (kuvio 6). Näytteen sisältämän templaatin määrän arvioimiseen käytetään Ct-arvoa (threshold cycle) (tai kuten tässä työssä, laitteen tuottajasta riippuen CP-arvoa). Mitä aikaisemalla kierroksella logaritminen monistuminen alkaa, sitä pienemmän Ct-arvon näyte saa. Ct-arvo luetaan siltä sykliltä, milloin näytteen fluoresenssi ylittää kynnsarvon fluoresenssin. Kynnsarvo lasketaan automaattisesti koneen toimesta sen jälkeen, kun taustan arvo on määritetty sekä eksponentiaalinen kasvu näytteen fluoresenssissa alkaa. Mitä pienemmän Ct-arvon näyte saa, sitä enemmän näytteessä on ollut alun perin templaattia. PCR-ajossa olevien rinnakkaisten näytteiden Ct-arvot eivät saisi poiketa toisistaan enempää kuin 0,5 yksikköä. (Life Technologies 2012: 4, 7.)



Kuvio 6. Reaaliaikaisen PCR:n kuvaaja.

## 6 Aikaisemmat tutkimukset

Etsiessäni materiaalia opinnäytteeseen, löysin paljon tutkimuksia, joissa oli verrattu erilaisia menetelmiä RNA:n eristämiseen FFPE-näytteistä. Bohmannin ym. 2009 tehdyssä tutkimuksessa oli käytetty vastaavia eristysmenetelmiä kuin tässä työssä. Erona tutkimuksessa oli tähän työhön eristysmenetelmien ja näytteiden suurempi määrä. Tutkimuksessa verrattiin täysin automatisoitua magneettipartikkeleihin perustuvaa menetelmää (Siemens), manuaalista magneettipartikkeleihin perustuvaa menetelmää, semiautomoitua magneettipartikkeleihin perustuvaa menetelmää ja täysin manuaalista spin-kolonniin käyttöön perustuvaa menetelmää. Semiautomaattisessa menetelmässä parafiinin poisto suoritettiin manuaalisesti, muuten RNA:n eristys suoritettiin automaattisesti. Tutkimuksessa eristettiin kullakin menetelmällä 90 näytettä rintasyöpäkudoksesta. Parafiinileikkeet olivat peräisin FFPE-valmisteista, joiden ikä vaihteli kolmen ja 20 vuoden välillä. RNA:n laatu tutkittiin kvantitatiivisella käänteistranskriptio PCR:llä tutkimaan neljän eri geenin ekspressiota. (Bohmann ym. 2009: 1719–1727.)

Bohmannin ym. tuloksissa semiautomaattinen magneettipartikkeleihin perustuva menetelmä antoi parhaan tuloksen. Täysin automaattinen menetelmä tuli toiseksi hyvin pienellä erolla. Syyksi miksi semiautomaattinen menetelmä antoi paremman tuloksen kuin täysin automatisoitu, tutkimuksessa oletetaan näytteen pitempi lyysausaika. Menetelmässä määritettiin lyysauksen onnistuminen silmämääräisesti. Jos näytteessä oli lyy-

sautumatonta kudosta jäljellä, siihen lisättiin proteinaasi K:ta ja pidennettiin lyysauksen kestoja. Kokonaan automatisoidulla menetelmällä saatuun pienin rinnakkaisnäytteiden välinen vaihtelu, sekä pienin kokonaisajankäyttö sekä pienin näytteiden äärellä työskentelyä vaativa aika. Verrattaessa mitä tahansa magneettipartikkeleihin perustuvaa menetelmää spin-kolonneihin, kaikilla magneettipartikkeleilla eristetyillä näytteillä päästiin parempaan tulokseen niin RNA:n laadun kuin saannonkin suhteen. (Bohmann ym. 2009: 1719–1727.)

## 7 Tutkimusasetelma ja -kysymykset

Nykyisin käytössä oleva RNA:n eristys (High Pure RNA Paraffin Kit, Roche) tehdään kokonaan käsin, joten se vie paljon työaikaa ja sisältää vaiheita, jossa joutuu käsittelemään terveydelle vaarallisia aineita (esimerkiksi ksyleeni). Lisäksi inhimillisen virheen riskit työn edetessä kasvavat, koska työ sisältää paljon pipetointia ja eri käsittelyvaiheita. Eristykseen kuluu tällä menetelmällä noin puolitoista työpäivää.

Ensimmäisessä verrattavassa menetelmässä käytetään samaa reagenssisarjaa kuin nykyisessä RNA:n eristysmenetelmässä, mutta parafiinin poistoon käytetään uutta reagenssia (Deparaffinization Solution, Qiagen). Uudenlaisen parafiininpoiston hyöty olisi, että päästäisiin eroon ksyleenin käytöstä. Lisäksi toiveena on lopputulokseksi parempi-laatuinen RNA. Eristys toteutetaan muilta osin samoin kuin nykyinen menetelmä, eli kyseessä on nykyisen eristysmenetelmän modifiointi.

Toinen vertailussa mukana oleva menetelmä (Tissue Preparation System -laite ja VERSANT® Tissue Preparation Reagent Kit -menetelmä, Siemens) on täysin automatisoitu alusta loppuun. Laitteella saadaan tulos hieman yli neljässä tunnissa ja sillä voidaan käsitellä helposti suuria näytemääriä eikä työntekijä altistu terveydelle vaarallisille aineille. Täysin automatisoitu menetelmä vähentää myös inhimillisten virheiden mahdollisuuden minimiin. Automaatin hankintahinta (130000€) on kuitenkin suuri, joten on tärkeä selvittää laitteen tuottaman RNA:n laatua ennen sen mahdollista hankkimista.

Opinnäytetyössäni pyrin vastaamaan seuraaviin kysymyksiin:

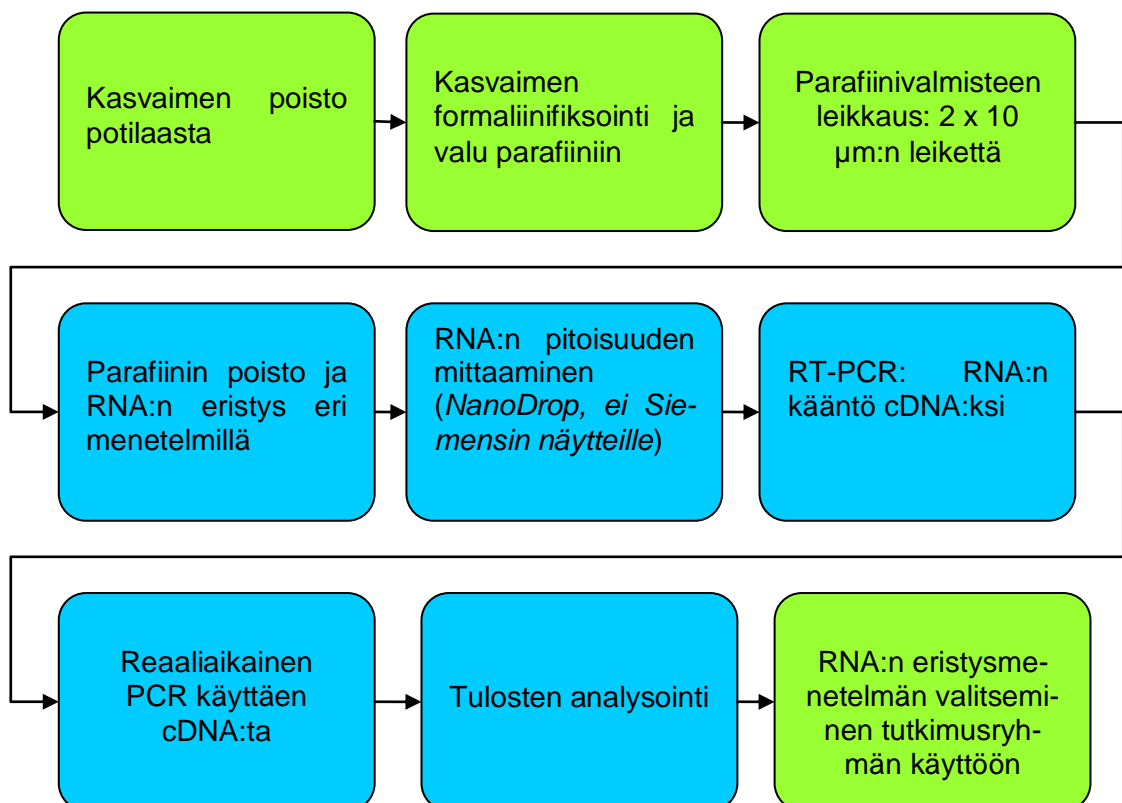
1. Miten Qiagenin Deparaffinization Solution -liuoksen käyttö parafiinin poistoon vaikuttaa RNA:n laatuun eristettäessä RNA:ta Rochen High Pure RNA Paraffin Kit -menetelmällä?

2. Kumpi menetelmä tuottaa parempaa RNA:ta: nykyinen Rochen High Pure RNA Paraffin Kit vai Siemensin Tissue Preparation System -laite käytettäessä VERSANT® Tissue Preparation Reagent Kit -menetelmää?
3. Mikä näistä kolmesta eri menetelmästä on paras RNA:n eristykseen?

Kysymyksiin pyrin saamaan vastauksen määrittämällä RNA:n pitoisuuden spektrofotometrisesti ja RNA:n laatua vertailemalla reaaliaikaisessa PCR-ajoissa saatavia sykliilukemia tilastollisin menetelmin. Mitä aiemmin PCR:ssä alkaa syntyä tuotetta, sitä laadukkaampaa RNA:ta näytteistä on saatu eristettyä.

## 8 Toteutus

Suoritin opinnäytteeni laboratorio-osuuden Molekyylionkologian laboratoriossa Biomedicumissa Helsingissä loppuvuodesta 2011. Kuviossa 7 ilmenee laboraatioiden kulku työvaiheesta toiseen. Kuvioon olen erottanut eri väreillä itse suorittamani työvaiheet (sininen) ja muut vaiheet (vihreä).



Kuvio 7. Työvaiheiden eteneminen. Vihreällä värillä ovat ennen ja jälkeen opinnäytteen suoritetut vaiheet, sinisellä itse toteuttamani vaiheet.



## 8.1 Näyttemateriaali

Näytteinä minulla oli seitsemän GIST- ja kahdeksan leiomyosarkoomaparafiinivalmistetta. Näytteet olivat peräisin suomalaisilta potilailta HUS:n patologianlaitoksen arkistosta ja ne ajoittuivat vuosille 1994–2006. Näytteet olivat nimetty parafiinivalmisteen mukaan, joten en missään vaiheessa saanut tietää tarkempia potilastietoja, joten potilaita ei voitu tunnistaa. Työn helpottamiseksi nimesin näytteet kuitenkin juoksevilla numeroinnilla 1–15.

Ennen RNA:n eristyksen aloitusta, jokaisesta parafiinivalmisteista oli leikattu valmiiksi mikrotomilla kaksi 10 µm:n paksuista leikettä eppendorf-putkeen. Jokaisesta näytteestä oli leikattu kolme rinnakkaista näytettä, yksi kutakin eristysmenetelmää varten.

## 8.2 RNA:n eristys

Seuraavissa kappaleissa kuvaan RNA:n eristyksen suorituksen kunkin vertailtavan menetelmän osalta. Ensimmäisenä on nykyisin käytössä oleva menetelmä, seuraavana on eristys modifioidulla parafiinin poistolla ja kolmantena täysin automatisoitu menetelmä. Liitteeseen 1 olen kerännyt tarkemmat tiedot kaikista työssä käyttämistäni reagensseista.

### 8.2.1 Eristys Rochen High Pure RNA Paraffin Kit -menetelmällä

Ennen eristyksen aloitusta varmistin, että minulla on tarvittavat reagenssit valmiina ja käyttökunnossa. Osa reagenssisarjan puskureista tuli laimentaa käyttöliuoksiksi ennen työn aloitusta. Osa liuoksista ei sisällynyt tuotepakettiin, vaan ne piti olla ”omasta takaa” kuten absoluuttinen etanoli, ksyleeni ja 10 % SDS.

Ennen kuin kudoksesta voidaan saada RNA:ta, siitä pitää poistaa parafiini. Toteutin parafiinin poiston High Pure RNA Paraffin Kit -menetelmän mukana tulleen ohjeen mukaan. Menetelmän parafiinin poisto perustui ksyleenin käyttöön. Mikrotomilla leikatut parafiinileikkeet laitettiin eppendorf-putkeen, jonka jälkeen näytteeseen lisätään ksyleeniä. Ksyleenin annetaan vaikuttaa tietty aika, jonka jälkeen se pestään pois etanolilla. Etanolin lisäyksen jälkeen näyte sentrifugoidaan, jonka jälkeen supernatantti imeetään pipetillä pois. Etanolipesu toistetaan kaksi kertaa. Ohjeen kohdassa 4 neuvotaan

kuivattamaan parafiinin poiston etanolijäänteet pitämällä + 56 °C:n lämpökaapissa 10 minuuttia, mutta pidin näytteitä lämpökaapissa reilun tunnin. Menetelmän ohje (parafiinin poisto sekä RNA:n eristys) on liitteessä 2. Menetelmän ohje kokonaisuudessaan on luettavissa PDF-muodossa osoitteessa

<[https://cssportal.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/03270289001\\_en\\_11.pdf](https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/03270289001_en_11.pdf)>.

RNA:n eristyksen suoritin ohjeen kohdasta yksi poiketen pitämällä näytteitä kaksi yötä lysis-puskurissa lämpöhauteessa (ohjeessa yksi yö), koska ajankohtaan sattui itsenäisyyspäivä. Kahden yön mittaisesta lyysauksesta huolimatta, kudosis ei ollut hajonnut kokonaan, vaan jouduin lisäämään 20 µl proteinaasi K:ta yhtä näytettä kohden ja laittamaan tunniksi lisää lämpöhauteeseen (+ 56 °C). Proteinaasi K:n lisääminen auttoi ja jatkoin eristyksen loppuun protokollan mukaan. (Roche 2011: 1–23.) Eristyksen kulku menee samoin kuin kuviossa 2 sivulla 9.

#### 8.2.2 Eristys käyttäen apuna Qiagenin Deparaffinization Solution -liuosta

Käytin eristyksessä parafiinin poistoon Qiagenin Deparaffinization Solution -liuosta. Liuoksen sisällöstä ei ole tarkempaa tietoa, mitä se sisältää, tai mihin tarkkaan ottaen parafiinin poisto perustuu tätä menetelmää käyttäessä. Parafiinin poistossa parafiinileikkeet laitetaan eppendorf-putkeen ja näytteisiin lisätään Deparaffinization-liuos. Näytettä sekoitetaan ja lämmitetään + 56 °C:ssa. Tämän jälkeen lisätään kudosta hajottavaa puskuria, jolloin koeputkeen muodostui kaksi eri faasia. Alempi faasi oli kirkas, sisältäen näytekudoksen ja ylempi faasi sininen, sisältäen sulaneen parafiinin. Tämän jälkeen seuraa kudoksen lyysaus proteinaasi K:n vaikutuksella, ensin tunti + 56 °C:ssa, jonka jälkeen tunti + 90 °C:ssa. Inkubointien jälkeen näyte sentrifugoidaan ja alempi kirkas faasi siirretään uuteen putkeen, mistä aloitetaan RNA:n eristys.

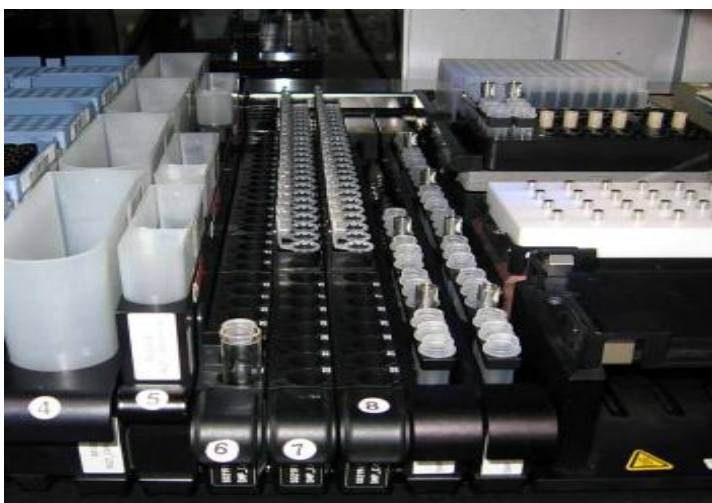
Suoritin parafiinin poiston Qiagenin ohjeen (Liite 3, ohje on luettavissa myös sähköisesti <<http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=201668>>) mukaan seuraavin poikkeuksin. Kohdassa 5 ATL-puskurin tilalla käytin Rochen Tissue Lysis Bufferin ja 10 % SDS:n seosta, suhteessa 140 µl Tissue Lysis Buffer ja 20 µl 10 % SDS yhtä näytettä kohden. Kohdassa 8 yhden tunnin inkuboinnin sijaan pidin näytteitä + 56 °C:ssa yön yli. Pidennetystä inkuboinnista huolimatta kudosis ei ollut lyysautunut, vaan lisäsin 20 µl proteinaasi K:ta ja laitoin lämpöhauteeseen noin viideksi tunniksi. Tämän jälkeen näytteet olivat jääkaapissa yön yli, jonka jälkeen suoritin parafiinin poiston loppuun ohjetta noudattaen. (Qiagen 2011: 1–3.) Parafiinin poiston jälkeen suoritin RNA:n eristyksen

käyttäen Rochen High Pure RNA Paraffin Kit -menetelmän ohjetta samoin kuin kohdassa 7.2.1. (lukuun ottamatta kahden yön inkubointia lysis-puskurissa). Yhden yön inkuboinnin jälkeen, kudus oli edelleen lyysautumatonta, joten tein proteinaasi K:n lisäykset kuten ensimmäisessäkin eristyksessä.

Deparaffinization Solution -liuosta käyttäessäni kohtasin käytännön ongelmia. Liuoksen lisäämisen jälkeen näytteet piti sekoittaa kunnolla ja sentrifugoida pisarat pohjalle. Parafiinileikkeet tarttuivat näyteputken reunoihin kiinni, jolloin koko näyte ei välttämättä päässyt kosketuksiin liuoksen kanssa. Kohdassa 7 proteinaasi K piti lisätä näyteputkessa erottuneeseen alempaan faasiin ja tämän jälkeen sekoittaa pipetoimalla nestettä ylös ja alas. Myös tämä vaihe osoittautui hankalaksi, sillä osin sulamaton parafiini ja kudus estivät kunnollisen sekoittamisen.

### 8.2.3 Eristys Siemensin automaatilla

Kävin suorittamassa RNA:n eristyksen Siemensin Tissue Preparation System -laitteella, jossa käytössä VERSANT® Tissue Preparation Reagent Kit -menetelmä Naistenklinikalla HUSLAB:in Genetiikan laboratoriossa. Näytteet laitettiin Sarstedin kierrekorkillisissa-putkissa telineissä laitteen sisään (kuvio 8), jonka jälkeen laite suoritti parafiinin poiston ja RNA:n eristyksen itsenäisesti. Ennen eristyksen aloitusta laitteesta tarkastettiin, että siinä on tarvittavat reagenssit ja välineet (mm. pipetinkärkiä ja näyteputkia).



Kuvio 8. Näkymä Tissue Preparation System -laitteen sisältä, keskellä näyteputkitelineet. (Siemens Healthcare Diagnostics 2011).

Parafiinin poisto ja eristys kestivät kokonaisuudessaan noin neljä tuntia, mikä on huomattava etu Rochen menetelmään verrattuna. Laitteen käynnistykseen ja näytteiden lataamiseen kuluva aika oli korkeintaan puoli tuntia. Parafiinin poiston laite teki tunnissa, minkä jälkeen tapahtui RNA:n eristys. Yhteen ajoin laitteeseen voi kerralla ladata 48 näytettä. Eristyksen jälkeen RNA:t säilytettiin pakastimessa (- 20 °C). Tissue Preparation System -laite kuviossa 9.



Kuvio 9. Tissue Preparation System, Siemens. (Siemens Healthcare Diagnostics 2011).

Koska tutkimusryhmä on suunnitellut mahdollisen Tissue Preparation System -laitteen hankkimista, sen tuottamaan RNA:han oli tärkeä tutustua etukäteen. Meille oli järjestetty tutustumispäivä laitteen toimintaan Naistenklinikalle ja samalla saimme mahdollisuuden eristää RNA:ta omista näytteistämme. Eristyspäivänä paikalla oli Saksasta Siemensin edustaja, Quido Hennig, PhD (Siemens Healthcare Diagnostics Products, Molecular Research, Saksa) esittelemässä laitteen ominaisuuksia. Samassa tilaisuudessa oli myös Oulun yliopistollisen keskussairaalan laboratorion väkeä tutustumassa laitteeseen.

### 8.3 RNA:n laadun tutkiminen

RNA:n tutkimiseen käytin kahta erilaista menetelmää. Konsentraation mittauksella sain RNA:n pitoisuudesta arvoja, mutta Siemensillä eristetyt näytteet eivät olleet vertailukelpoisia. Kiinnitin siten suuremman arvon laatua tukiessani reaaliaikaisen PCR:n tuloksiin, jonka perusteella tein myös tilastolliset analyysit eri menetelmien eroavuuksista.

### 8.3.1 RNA:n pitoisuuden määrittäminen: NanoDrop

RNA:n konsentraation mittaukset suoritettiin NanoDrop 2000 -laitteella (Thermo Scientific), käyttämäni ohjelma oli NanoDrop 2000/2000c (installation version 1.4.1). Laitteen nollaamiseen ja puhdistukseen käytin puhdistettua vettä (1,0 µl). Siemensin laitteella eristettyjä RNA:ita ei voinut mitata NanoDropilla, koska siinä käytetty eluaatti häiritsi mittauksia. Määritin muutaman Siemensin näytteen ja tulokset olivat selvästi virheellisiä. Siemens-näytteiden pitoisuudet selvitettiin ostopalveluna Biomedicum Functional Genomics Unit (FuGU) laboratorion kautta.

### 8.3.2 Käänteistranskriptio PCR

Käänteistranskriptio PCR:ssä (RT-PCR) käytin cDNA:n tekoon SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit -menetelmää (Invitrogen Corporation). Aluksi laimensin kaikki näytteet, siten että niiden pitoisuus oli 1,5 ng/µl. Tämä pitoisuus määräytyi kaikkein laimeimmasta Siemensin laitteella eristetystä näytteestä. Laimeimman näytteen pitoisuudeksi oletimme 5,00 ng/µl, vaikka näyte oli ollut alle laitteen mittausrajan. Valitsemalla näytteen pipetoitavaksi määräksi 14 µl, näytekuppaan tarvinnut lisätä enää erikseen vettä. Negatiivisena kontrollina käytin vettä. Laskin tarvittavan reaktioseoksen menetelmän ohjeen mukaan (ohje on luettavissa PDF-muodossa osoitteessa <[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/vlo\\_cdna\\_synthesis\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/vlo_cdna_synthesis_man.pdf)>). Yhtä reaktiota kohden tulevat määrät eri reagensseja taulukossa 1. Tein reaktioseoksen ja jaoin sen levyille, jonka jälkeen pipetoin laimennetun RNA:n. Suljin levyn kalvolla ja sentrifugoin pisarat pohjalle ennen koneeseen laittoa. Käänteistranskriptio PCR:ssä käyttämäni ohjelma taulukossa 2. Ajon jälkeen siirsin näytteet pakastimeen (- 20 °C).

Taulukko 1. Yhtä RT-PCR-reaktiota kohden tarvittavat reagenssit (Invitrogen Corporation 2008).

Reagenssi	Määrä, µl/reaktio
5X VILO™ Reaction Mix	4
10X SuperScript® Enzyme Mix	2
RNA (laimennettu)	14
DEPC-käsitelty vesi	-

Taulukko 2. RT-PCR:n ohjelma (Mukaihen Invitrogen Corporation 2008).

Vaihe	Lämpötila, °C	Aika, min
1.	25	10
2.	42	60
3.	85	5
4.	10	1 sekunti
5.	4	loppuaika

*PCR-laite: DNA Engine DYAD™ Peltier Thermal Cycler MJ Research. Kuoppalevy: ABgene® PCR Plates, Thermo-Fast® 96, Non-Skirted (Thermo Scientific). Kalvot: LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche).*

### 8.3.3 Reaaliaikainen PCR

Reaaliaikaiseen PCR:n suoritin kahdella eri alukkeella: *ITGA4* ja *GAPDH*. *GAPDH* poikkesi *ITGA4*:stä siinä, ettei sillä ollut erikseen R- ja F-suunnan alukkeita, vaan kummatkin olivat suoraan samassa liuoksessa. Tämän otin huomioon laskiessani reaktiutilavuuksia, jolloin ”puuttuvan” alukkeen tilavuuden korvasin vedellä. Toinen käyttämäni alukkeista *GAPDH* (glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi) on niin sanottu housekeeping-geeni (”taloudenpitogeeni”). Nämä geenit ilmenevät jokaisessa solussa vakiotasolla ja niiden tuotteita tarvitaan koko ajan. Tämän vuoksi *GAPDH* on yksi käytetyimmistä geeneistä vertailtaessa geenien ekspression tasoa. (Barber – Harmer – Coleman – Clark 2005: 389.) *ITGA4* (itegriini alfa 4) on tutkimusryhmän yksi kohdegeeneistä, jonka ekspressiota tutkitaan niin GIST:issä kuin leiomyosarkoomassakin. Ryhmän tarkoitus on saada selville, onko geenin ekspressio kuinka tavallisuudesta poikkeavaa näissä taudeissa.

Aloitin työn laskemalla tarvittavat reaktioseokset huomioiden, että jokainen näyte tulisi levyille triplikaattina ja lisäksi levyille tulisi negatiiviset kontrollit niin cDNA:n teosta (cDNA:n negatiivinen kontrolli) ja tästä PCR:stä (cDNA:n tilalla vesi). Laskuissa otin lisäksi huomioon pipetointivaran. Reaktioseokset kummallekin alukkeelle yhtä näytettä kohden ovat taulukossa 3. Valmistin reaktioseokset hanskat kädessä hyvin puhdistetussa laminaarikaapissa pitäen reagenssit työskentelyn ajan jäissä. Tämän jälkeen jaoin reaktioseoksen kuoppalevyille haravapipetillä, lisäsin cDNA:t ja suljin levyt kalvolla. Etukäteen olin suunnitellut näytteiden paikat siten, että samalle levyille tulisi näyte kummallakin alukkeella. Lopuksi sentrifugoin levyistä pisarat pohjalle, laitoin levyn koneeseen ja käynnistin ohjelman. PCR:n ohjelma taulukossa 4. Fluoresenssin määrän

muutos mitattiin jokaisen annealing-vaiheen lopuksi. Ajon jälkeen näytteet säilytettiin pakkasessa (- 20 °C). *Reaaliaikaisen RT-PCR:n laite: LightCycler® 480 (Roche). Kuoppalevyt: LightCycler® 480, Multiwell Plate 96 (Roche).*

Taulukko 3. Yhtä reaaliaikaista PCR-reaktiota kohden tarvittavat reagenssit. Vasen taulukko *ITGA4*-aluke, oikealla *GAPDH*-aluke.

Reagenssi	Määrä, µl/reaktio	Reagenssi	Määrä, µl/reaktio
Puskuri	10	Puskuri	10
F-aluke	0,4	Alukkeet (F ja R)	0,4
R-aluke	0,4	Koetin	0,2
Koetin	0,2	H <sub>2</sub> O	7,4
H <sub>2</sub> O	7	cDNA-templaatti	2
cDNA-templaatti	2		

Taulukko 4. Reaaliaikaisen PCR:n ohjelma

Vaihe	Lämpötila, °C	Aika
1. Pre-inkubaatio	95	10 min.
2. Denaturaatio	95	10 s.
3. Annealing	60	15 s.
4. Ekstensio	72	1 s.
Vaiheet 2–4, toisto 50x		
Ohjelman lopetus	40	30 s.

## 9 Tulokset

Käsittelen tuloksia kahdessa eri osassa. Ensimmäisessä käyn läpi eri menetelmillä saadun eristetyn RNA:n pitoisuutta (määrä). Toisessa osassa keskityn reaaliaikaisesta PCR:stä saatuihin tuloksiin (laatu). Lopuksi teen saamista tuloksistani yhteenvedon. Tulosten tulkinnassa annan suuremman painoarvon PCR-ajoista saaduille tuloksille, sillä spektrofotometriset määrytykset tehtiin eri menetelmillä. Pidän spektrofotometriä määrytyksiä lähinnä suuntaa antavina.

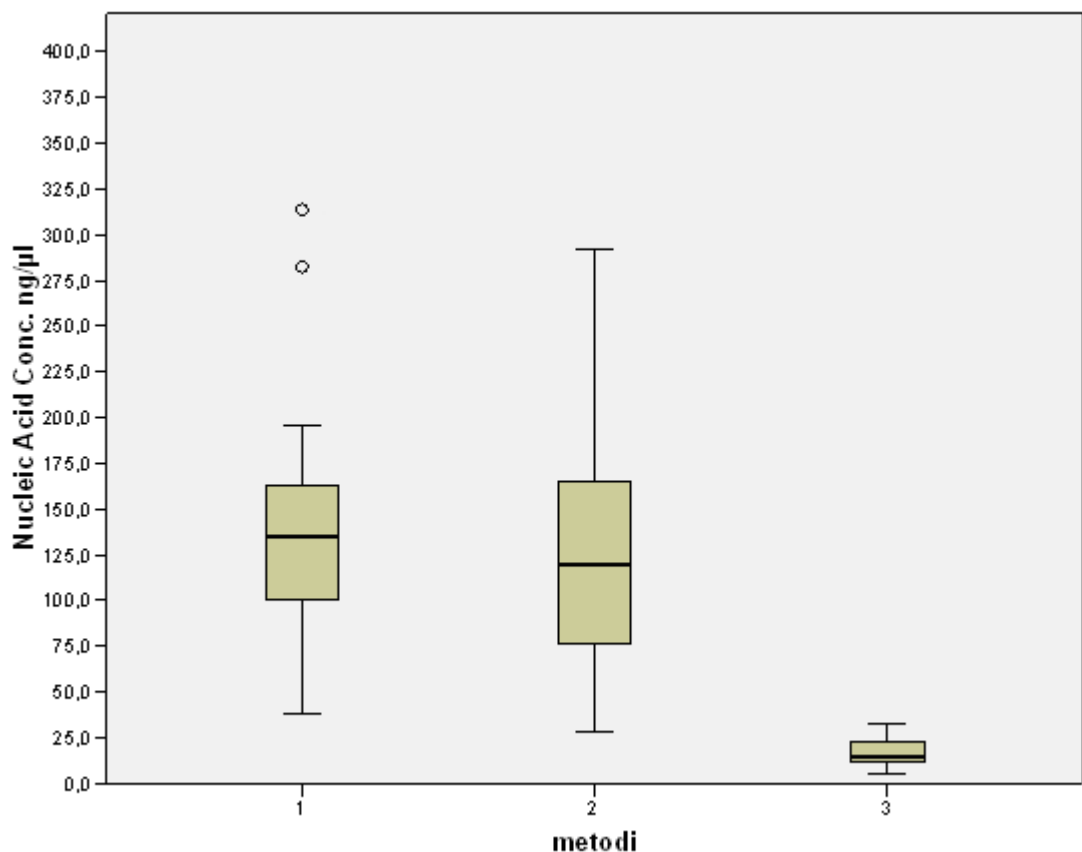
Olen käsitellyt tuloksia SPSS-tilasto-ohjelmalla ja Excel-tilukkolaskentaohjelmalla. Sain suoraan työelämän ohjaajalta tarkat tiedot, mitä he halusivat nähdä tuloksissani ja olen pyrkinyt noudattamaan niitä mahdollisimman tarkasti.

## 9.1 RNA:n spektrofotometriset mittaukset

Mittasin eristämäni RNA:n pitoisuudet NanoDrop-laitteella. Laitteella sai RNA:n pitoisuuden (ng/μl) ja aallonpituuksien 260/280 (RNA:n puhtaus) suhteen.

### 9.1.1 RNA:n pitoisuus

Tuloksissa ovat mukana Siemensin laitteella eristetyt näytteet, vaikka ne eivät ole mitattu samalla menetelmällä (NanoDrop) kuten muut eristykset. Siemensin näytteistä on laskettuna vain pitoisuudet ja hankimme ne laboratorion ulkopuolelta ostopalveluna. Eri menetelmillä saadut pitoisuudet ovat kuviossa 10. Kuvion ruskean laatikon alueelle osuu 50 % mittaustuloksista, laatikon keskellä oleva paksu poikkiviiva on mediaani, ylös- ja alaspäin olevat janat kuvaavat mittausten minimin ja maksimin. Minimi- ja maksimijanat ulottuvat enintään 1,5 kertaa laatikon mitan etäisyydelle, tätä suuremman arvon saaneet näytteet on merkitty pallolla.



Kuvio 10. RNA:n pitoisuudet (ng/μl) eri menetelmillä. 1) High Pure RNA Paraffin Kit, Roche, 2) High Pure RNA Paraffin Kit modifioituna Deparaffinization Solution -liuoksella, 3) Siemens



Kuviosta käy ilmi, miten Siemensin laitteella eristetyn RNA:n pitoisuus oli kaikista pienin. Tuloksia voinee kuitenkin hieman kyseenalaistaa, sillä Siemensin näytteiden pitoisuudet mitattiin eri laitteella ja menetelmällä, mutta pitäisin tuloksia kuitenkin suuntaa antavina. Nykyisellä RNA:n eristysmenetelmällä ja sen modifioinnilla päästiin paljon suurempiin pitoisuuksiin. Nykyisin käytössä olevalla menetelmällä (metodi 1) päästiin keskiarvoon 145 ng/μl, parafiinin poiston modifiointi (metodi 2) tuotti keskiarvon 129 ng/μl. Siemensin laitteella (metodi 3) saadun RNA:n pitoisuuden keskiarvo oli vain 17 ng/μl. Tarkemmat luvut ovat esillä taulukossa 5

Taulukko 5. RNA:n pitoisuudet (ng/μl); mediaani, maksimi, minimi, keskiarvo ja keskihajonta. 1) High Pure RNA Paraffin Kit, Roche, 2) High Pure RNA Paraffin Kit modifioituna Deparaffinization Solution –liuoksella, 3) Siemens.

Metodi	Mediaani	Maksimi	Minimi	Keskiarvo	Keskihajonta
1	134,5	313,6	38,3	145,0	76,2
2	119,3	292,4	28,4	128,7	74,0
3	14,4	32,6	5,5	16,5	7,6

### 9.1.2 RNA:n puhtaus

RNA:n puhtaudesta kertova aallonpituuksien  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  suhde (taulukossa 6). Siemensin näytteistä ei ollut käytettävissä eri aallonpituuksien välistä suhdelukua. Nykyisin käytössä olevalla menetelmällä sai lähemmäksi puhtaan RNA:n suhdelukua 2 olevan tuloksen, mutta menetelmissä ei ollut kuitenkaan kovin suurta eroa.

Taulukko 6. Aallonpituuksien  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  suhde mitattuna NanoDropilla. Metodit: 1) High Pure RNA Paraffin Kit, Roche, 2) High Pure RNA Paraffin Kit modifioituna Deparaffinization Solution –liuoksella.

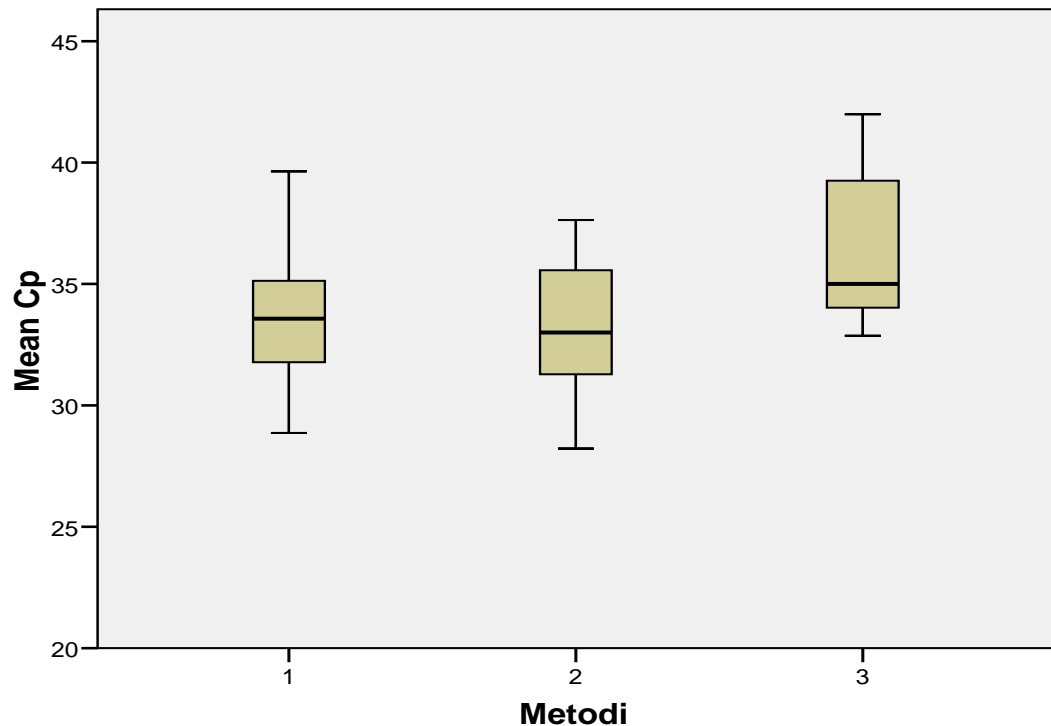
Metodi	Keskiarvo	Mediaani	Minimi	Maksimi
1	1,88	1,91	1,70	1,99
2	1,81	1,84	1,63	1,98

## 9.2 RNA:n laatu

RNA:n laatua tutkin vertailemalla sen toimimista reaaliaikaisessa PCR:ssä. Mitä aikaisemmalla syklillä ajossa on saatu signaali, sitä parempilaatuista RNA on. Käsittelen ajot alukekohtaisesti, ensin *ITGA4*-aluke sitten *GAPDH*. Aluksi vertailen eri menetelmien ajojen näytteiden keskiarvoja Kruskal-Wallis -testillä. Tällä saan selville onko menetelmien välillä merkitsevää eroa. Tämän jälkeen teen Mann-Whitney -testit verraten nykyistä ja modifioitua menetelmää sekä nykyistä ja Siemensin menetelmää, jolloin saan tarkemmin selville millä menetelmillä on eroavuutta. Tämän jälkeen esitän kaavioina ajojen statistiikkaa. Tarkastelen myös triplikaattina olleen yksittäisen näytteen keskihajontaa, tällä saan tietoa rinnakkaisnäytteiden tasosta. Lopuksi esitän korrelaatiot eri menetelmien välillä.

### 9.2.1 *ITGA4*-alukkeella saadut tulokset

Verrattaessa kolmen menetelmän ajojen keskiarvoja Kruskal-Wallis testillä, p-arvoksi tuli 0,019; joten eri menetelmien välillä oli melkein merkitsevä eroavuus. Mann-Whitneyn testillä vertasin Rochen menetelmää modifioituun parafiinin poistoon Qiagenin liuoksella (p-arvo 0,604), joten näiden kahden menetelmän välillä ei ollut merkitsevää eroa. Verrattaessa Rochen menetelmää Siemensiin, p-arvoksi tuli 0,023, joten näiden menetelmien ero on tilastollisesti melkein merkitsevä. Kyseisten p-arvojen erot ilmenevät selvästi kuviossa 11. Metodien 1 ja 2 välillä ei ole silminnähden kovinkaan paljoa eroa, mutta metodi 3 saa selvästi suurempia arvoja. Tarkemmat tiedot ajosta (mediaani, maksimi, minimi, keskiarvo ja keskihajonta) ovat taulukossa 7.



Kuvio 11. Reaaliaikaisen PCR:n tulokset *ITGA4*-alukkeella eri menetelmillä. 1) High Pure RNA Paraffin Kit, Roche, 2) High Pure RNA Paraffin Kit modifioituna Deparaffinization Solution -liuoksella, 3) Siemens

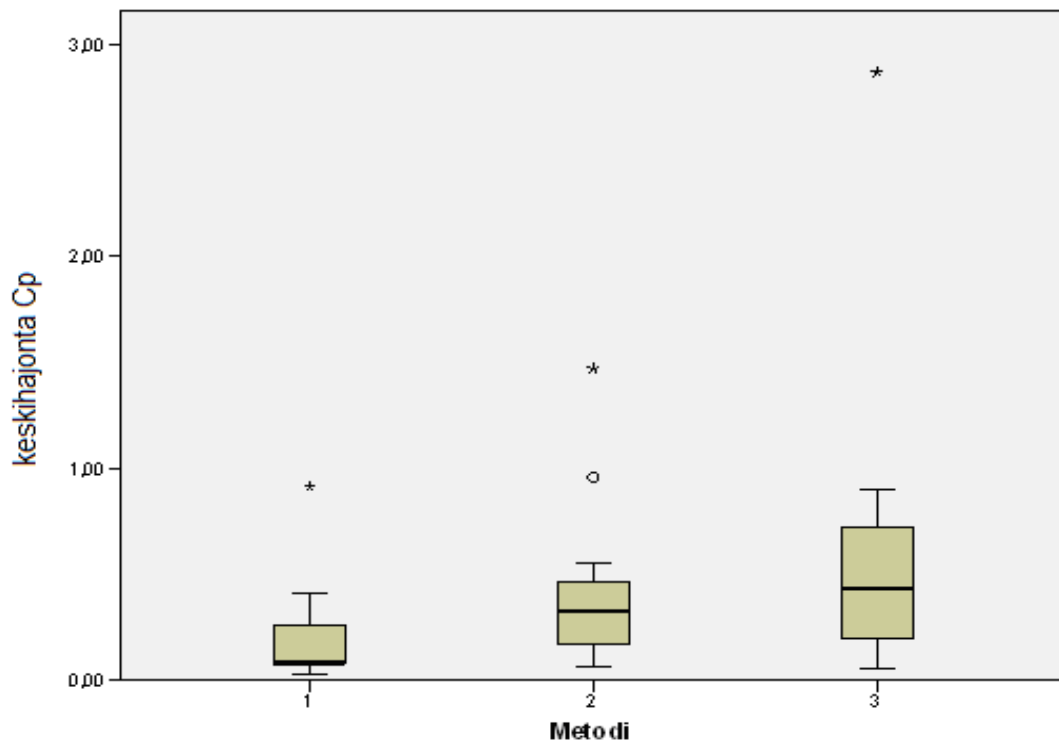
Taulukko 7. *ITGA4*-alukkeella tehtyjen ajojen tarkemmat tiedot. 1) High Pure RNA Paraffin Kit, Roche, 2) High Pure RNA Paraffin Kit modifioituna Deparaffinization Solution -liuoksella, 3) Siemens.

Metodi	Mediaani	Maksimi	Minimi	Keskiarvo	Keskihajonta
1	33,6	39,6	28,9	33,5	3,0
2	33,0	37,6	28,2	33,1	2,8
3	35,0	42,0	32,9	36,3	2,9

Taulukossa 8 on tietoa yksittäisen näytteen keskihajonnasta. Luvuista käy ilmi miten nykyisellä menetelmällä on yhden näytteen rinnakkaisten arvojen heittely ollut pienintä. Modifiointi on tuonut lisää heittelyä ja Siemensin näytteillä rinnakkaisten näytteiden arvot heittelevät kaikista eniten. Kuviossa 12 on sama tieto esitettyinä graafisesti.

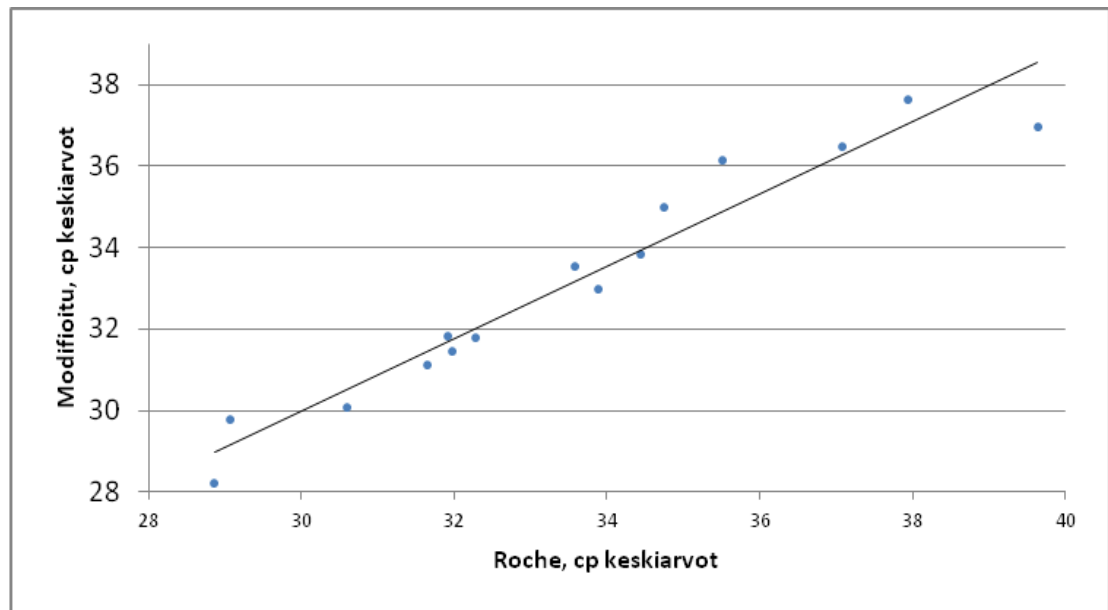
Taulukko 8. Triplikaattina olleen näytteen keskihajonnan tilastoa.

Metodi	Mediaani	Maksimi	Minimi	Keskiarvo	Keskihajonta
1	0,09	0,92	0,03	0,23	0,24
2	0,33	1,47	0,06	0,40	0,36
3	0,43	2,87	0,06	0,61	0,68



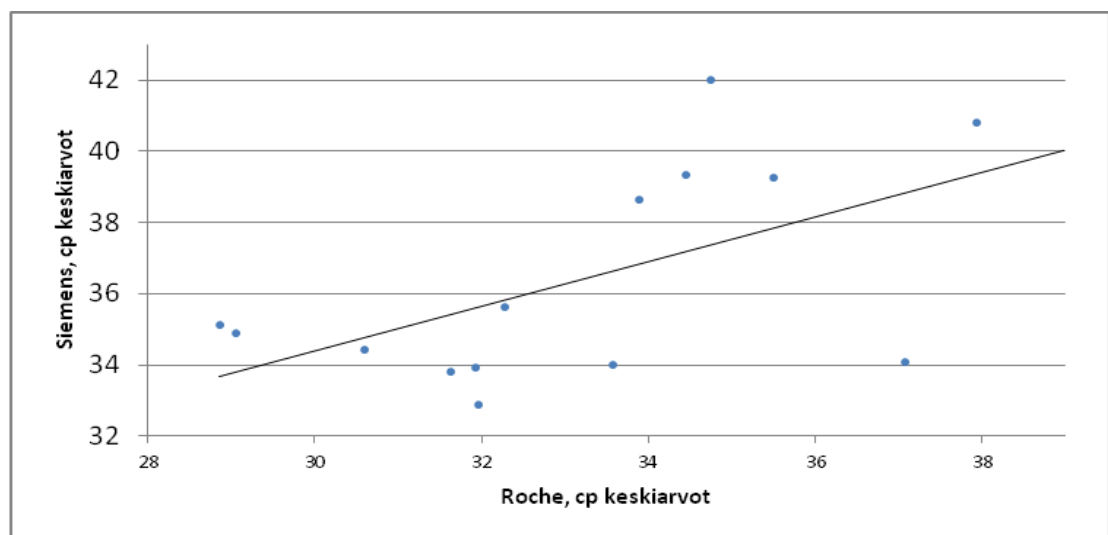
Kuvio 12. Triplikaattinäytteen keskihajontaa.

High Pure RNA Paraffin Kit ja sen modifioitu menetelmä tuottivat yllä olevan perusteella parempi laatuista RNA:ta kuin Siemens. Päätin vielä tutkia, kuinka hyvin eri menetelmien tulokset korreloivat keskenään. Verrattaessa Rochen menetelmää modifioituun menetelmään sain korrelaatiokertoimeksi 0,982 (p-arvo alle 0,001), menetelmien välillä on siis voimakas riippuvuus. Korrelaatiokuvaaja on kuviossa 13.



Kuvio 13. Korrelaatiokuvaaja; Roche verrattuna modifioituun eristykseen *ITGA4*-alukkeella. Korrelaatiokerroin 0,982.

Nykyistä eristysmenetelmää verrattaessa Siemensin menetelmään korrelaatiokertoimeksi tuli 0,556 (p-arvo 0,039). Menetelmien välillä on kohtalainen riippuvuus. Korrelaatiokuvaaja on kuviossa 11.



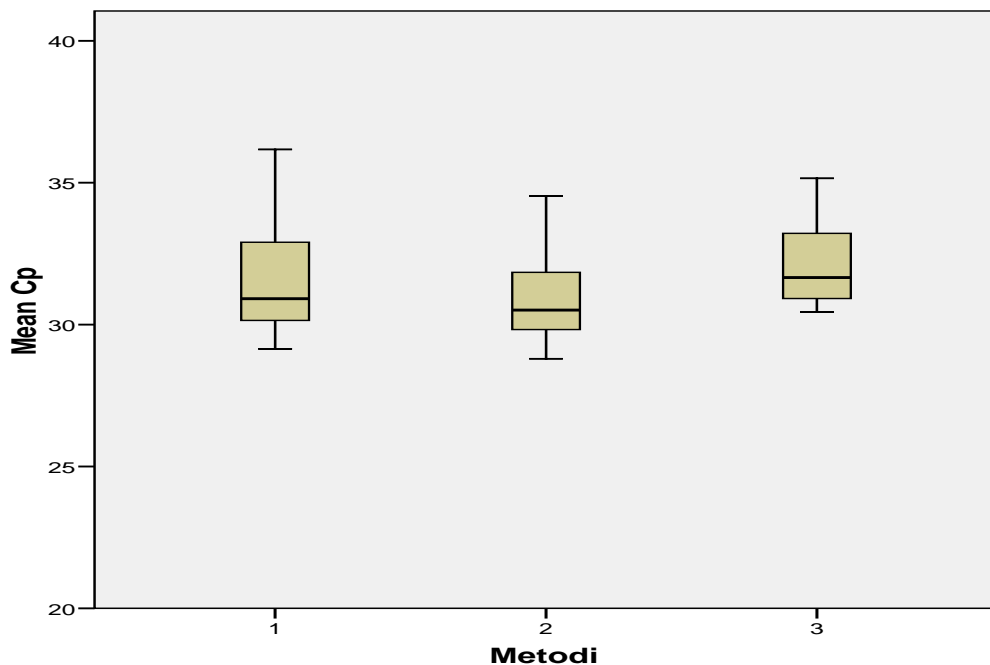
Kuvio 14. Korrelaatiokuvaaja; Roche verrattuna Siemensin eristykseen *ITGA4*-alukkeella. Korrelaatiokerroin 0,556.

Kuten kuvioista 13 ja 14 käy ilmi, nykyinen Rochen menetelmällä tuotettu RNA vastaa hyvin modifioitua menetelmää. Sen sijaan Siemensin laitteella eristetyt RNA:t poikkeavat selvästi Rochen näytteistä.

### 9.2.2 *GAPDH*-alukkeella saadut tulokset

Kolmen menetelmän välinen Kruskal-Wallis testin antoi p-arvoksi *GAPDH*-alukkeelle 0,171 (verrattuna *ITGA4*-alukkeella 0,019), joten tällä alukkeella tehtynä menetelmien välillä ei ollut tilastollista eroavuutta. Tämä voidaan selittää sillä, että *GAPDH*-alukkeen kopiauma geeni on ns. housekeeping geeni; sen ekspression tasaista kaikissa kudoksissa ja se on kokonaisuudessaan paljon tutkitumpi. Sen sijaan *ITGA4*:n ekspressio voi vaihdella paljon kudoksesta toiseen ja sen alukkeet ovat vähemmän tunnettuja ja optimoituja.

Mann-Whitneyn testillä tutkittaessa Roche vs. modifioitu menetelmä ja Roche vs. Siemens p-arvoiksi tuli 0,419 ja 0,310; joten *GAPDH*-alukkeella ei ajoin välille saatu RNA:n laadussa merkitseviä eroavuuksia. P-arvojen perusteella saatu tieto ilmenee hyvin kuviosta 15; eri menetelmien välillä ei ole paljoakaan eroavuutta, vaan eri menetelmät ovat saaneet hyvin samaa tasoa olevia lukemia. Menetelmän sisällä näytteiden keskihajonta on pienempää kuin *ITGA4*-alukkeella; *GAPDH*:lla menetelmien keskihajonnat olivat 1,5–2,0 kun *ITGA4*-alukkeella ne olivat 2,8–3,0. Tarkemmat tiedot ajoista ovat taulukossa 9.



Kuvio 15. Reaaliaikaisen PCR:n tulokset *GAPDH*-alukkeella eri menetelmillä. 1) High Pure RNA Paraffin Kit, Roche, 2) High Pure RNA Paraffin Kit modifioituna Deparaffinization Solution -liuoksella, 3) Siemens

Taulukko 9. *GAPDH*-alukkeella tehtyjen ajojen tarkemmat tiedot. 1) High Pure RNA Paraffin Kit, Roche, 2) High Pure RNA Paraffin Kit modifioituna Deparaffinization Solution -liuksella, 3) Siemens

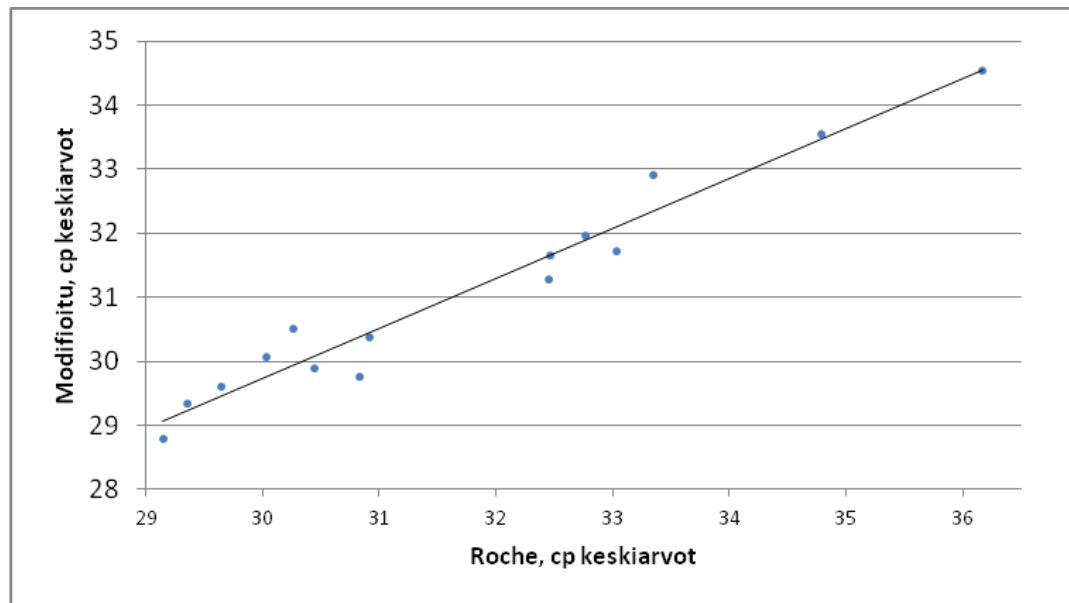
Metodi	Mediaani	Maksimi	Minimi	Keskiarvo	Keskihajonta
1	30,9	36,2	29,1	31,7	2,0
2	30,5	34,5	28,8	31,1	1,6
3	31,7	35,2	30,4	32,1	1,5

Tutkittaessa yksittäisen näytteen keskihajontaa rinnakkaisilla näytteillä tällä alukkeella on selvästi pienempää vaihtelua. Taulukossa 10 on kerätty tietoa triplikaattien toiminnasta.

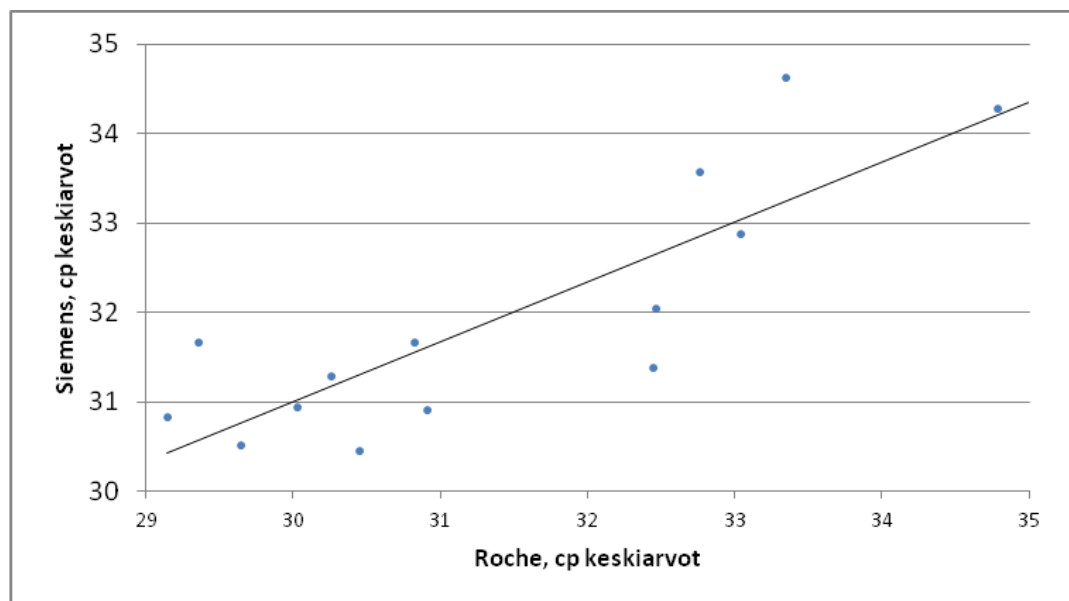
Taulukko 10. Triplikaattina olleen näytteen keskihajonnan tilastoa.

Metodi	Mediaani	Maksimi	Minimi	Keskiarvo	Keskihajonta
1	0,20	0,37	0,03	0,19	0,10
2	0,15	0,51	0,09	0,21	0,11
3	0,19	0,77	0,04	0,23	0,21

*GAPDH*-alukkeella tehtyjen ajojen korrelaatiot näkyvät kuvioissa 16 ja 17. Korrelaatiot ovat hyvin samansuuntaisia kummallakin alukkeella. Rochea ja modifioitua menetelmää verrattaessa korrelaatiokertoimeksi tuli 0,954, Roche verrattaessa Siemensiin arvoksi tuli 0,811 (kummassakin korrelaatioissa p-arvot alle 0,001). Vastaavat luvut *ITGA4*-alukkeella olivat 0,982 ja 0,556; joten korrelaatioidenkin perusteella *GAPDH*-aluke toimi ajossa paremmin.



Kuvio 16. Korrelaatiokuvaaja; Roche verrattuna modifioituun eristykseen *GAPDH*-alukkeella. Korrelaatiokerroin 0,954.



Kuvio 17. Korrelaatiokuvaaja; Roche verrattuna Siemensin eristykseen *GAPDH*-alukkeella. Korrelaatiokerroin 0,811.

### 9.3 Tulosten yhteenveto

Eri menetelmillä saatujen tulosten perusteella nykyisin käytössä oleva menetelmä ja siitä modifioitu menetelmä antavat hyvin pitkälle samanlaatuista RNA:ta. Siemensin eristyslaitteella saatava RNA on monilla mittareilla selvästi heikompaa niin pitoisuudel-



taan kuin laadultaankin. Puhtaasti saatujen tulosten perusteella hylkäisin Siemensin eristyslaitteen pois harkinnasta.

Tutkimuskysymyksiin vastaan seuraavasti:

1. Miten Qiagenin Deparaffinization Solution -liuoksen käyttö parafiinin poistoon vaikuttaa RNA:n laatuun eristettäessä RNA:ta Rochen High Pure RNA Paraffin Kit -menetelmällä?

Parafiinin poistoon käytettävän Qiagenin Deparaffinization Solution -liuoksen käyttäminen ei mielestäni tuo riittävän suurta lisähyötyä RNA:n pitoisuuteen tai laatuun. Tilastollisilla menetelmillä näiden kahden menetelmän välille ei saatu aikaan merkitsevää eroavuutta (p-arvo 0,604) ja näytteiden välillä oli voimakas riippuvuus (korrelaatiokerroin 0,982). Käytettäessä housekeeping-geeniä, menetelmien ero oli vielä pienempi. Vaikka käyttämällä kyseistä liuosta päästäisiin myrkyllisen ksyleenin käytöstä, aiheuttaisi sen käyttö lisäkuluja. Lisäksi parafiinin poistosta tulisi työvaiheena monimutkaisempi toteuttaa.

2. Kumpi menetelmä tuottaa parempaa RNA:ta: nykyinen Rochen High Pure RNA Paraffin Kit vai Siemensin Tissue Preparation System -laite käytettäessä VERSANT® Tissue Preparation Reagent Kit -reagenssisarjaa?

Tilastollisten menetelmien perusteella Rochen menetelmä tuottaa huomattavasti parempaa RNA:ta kuin Siemensin laite ja menetelmien eroavuus on melkein merkitsevä (p-arvo 0,023). Verrattaessa Rochen ja Siemensin menetelmällä eristettyjä näytteitä niiden välillä oli kohtalainen riippuvuus (korrelaatiokerroin 0,556). Vaikka Siemensin laitteella on paljon positiivisia etuja Rochen menetelmään verrattuna (huomattavasti nopeampi, helpompi käsitellä suuria näytemääriä, minimaalinen inhimillisen virheen riski, pienempi kontaminaation vaara, eristyksen tasalaatuisuus) sen tuottama RNA on kuitenkin selvästi heikkolaatuisempaa.

3. Mikä näistä kolmesta eri menetelmästä on paras RNA:n eristykseen?

Mielestäni paras menetelmä RNA:n eristykseen on Rochen High Pure RNA Paraffin Kit, koska sen valitseminen ei tuota tutkimusryhmälle uusia kustannuksia ja lisäksi sen käyttö on jo tuttua. Qiagenin Deparaffinization Solution -liuoksella modifioitu parafiinin

poisto ei tuo niin suurta lisähyötyä RNA:n laatuun, että sen hankkimiseen kannattaisi panostaa. Lisäksi liuksen käyttö oli hankalampaa, kuin nykyinen parafiinin poistoon käytetty menetelmä. Siemensin laitteella eristetyt näytteet poikkesivat niin paljon nykyisen menetelmän laadusta, että en voi suositella laitteen hankkimista.

## 10 Luotettavuus

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa luotettavuuden arviointiin on käytettävissä kaksi käsitettä: reliabiliteetti ja validiteetti. Reliabiliteetillä tarkastellaan tutkimuksen toistettavuutta. Jos tutkimus tehtäisiin uudestaan, saataisiinko silti samat tulokset (Kananen 2010:128–129.) Mielestäni työni reliabiliteetti on vahva. Samoista näytteistä voitaisiin leikata uudet leikkeet ja tehdä eristykset uudelleen. Siemensin näytteiden osalta reliabiliteetti olisi kaikista vahvin, sillä koneella tehden inhimillisen virheen mahdollisuus on vähäisin. Lisäksi olen dokumentoinut työni toteutuksen tarkasti kohta kohdalta, mukaan lukien perustellusti alkuperäisistä työohjeista tehdyt poikkeukset, joten työn voisi opinäytteeni perusteella toteuttaa uudelleen. Työstä löytyvät myös luettuna käytetyt reagenssit ja laitteistot.

Työn validiteetti eli luotettavuus kertoo, onko työssä tutkittu oikeita asioita. Ulkoinen validiteetti vastaa työn tuloksen yleistettävyydestä. (Kananen 2010: 128–129.) Näytemääräni oli työssä 15 kpl, mikä on melko pieni. Työtä tehdessä tutustuin artikkeleihin, joissa oli vertailtu erilaisia RNA:n eristysmenetelmiä. Artikkeleissa näytemäärät olivat satoja, lähes tuhansia, joten tutkimukseni yleistettävyys ei välttämättä ole kovin hyvä.

Sisältövaliditeetilla mitataan, onko käytetty oikeita mittareita (Kananen 2010: 130). Tutkimani aineiston perusteella RNA:n pitoisuuden ja puhtauden mittaamiseen käyttämäni menetelmät ovat olleet yleisesti käytettyjä ja luotettavia. Jokaisessa lukemassani artikkelissa, missä oli tutkittu geenien ekspressiota FFPE-materiaalista, geenin määrän tutkimiseen oli käytetty reaaliaikaista PCR:ää. Lisäksi spektrofotometrinen määrittäminen kuvaa tarkasti RNA:n pitoisuutta ja sen puhtautta.

Työn rakennevaliditeetti mittaa sitä, kuinka hyvin työn käsitteet on johdettu teoriasta (Kananen 2010: 131). Olen käynyt työssä läpi käyttämiäni käsitteitä: FFPE, eri eristysmenetelmät ja RNA:n laadun tutkimiseen liittyvät käsitteet. Käyttämäni materiaali mihin teoriani olen pohjannut, on ollut uutta 2000-luvulla julkaistua ja pääosin ulkomaalaista.

Kriteerivaliditeetti mittaa miten suoritettu tutkimus vertautuu aikaisempiin tutkimuksiin (Kananen 2010: 131). Aikaisempien tutkimusten perusteella Siemensin laiteella eristettyjen näytteiden olisi pitänyt antaa huomattavasti parempaa tulosta. Oma tutkimukseni poikkesi tästä tuloksesta kuitenkin huomattavasti. Aikaisemmat tutkimukset eivät siis tue saamaani tulosta.

Työskennellessäni pyrin jatkuvasti mahdollisimman steriiliin työskentelyyn välttämällä kontaminanttien joutumista näytteisiin. Kiinnitin huomiota RNA:n oikeanlaiseen käsittelyyn ja työmenetelmiin. Pidin PCR-työskentelyssä jatkuvasti puhtaat suojakäsineet ja kaikki reagenssit jäällä. Käyttäessäni eri reagensseja suljin korkit heti käytön jälkeen. Kaikki työssä olleet negatiiviset kontrollinäytteet pysyivät negatiivisina, joten työskentelyssä ei tapahtunut kontaminaatioita. Aikaisemmasta työkokemuksestani DNA-laboratoriossa on varmasti ollut hyötyä opinnäytteeni teossa.

Luotettavuuden lisäämiseksi tein Rochen menetelmällä tehdyt eristykset kahteen kertaan. Ensimmäisessä eristyksessä tapahtui virhe ohjeen ymmärtämisessä eristyksen alkupuolella, joten en pitänyt kyseistä eristystä luotettavana. Toisella kerralla tehdessäni eristystä osasin ennakoida tietyn kohdan mahdollisen ongelman etukäteen ja varautua siihen. Näin eristyksestä tuli luotettavampi.

## 11 Pohdinta

Opinnäytteeni tulos oli yllättävä. Työtä aloittaessa olin varma, että uusi markkinoille tullut eristysautomaatti tuottaisi luonnostaan parhaita RNA:ta. Myös aiemmat aiheeseen liittyvät tutkimukset antoivat olettaa, että RNA:n laatu olisi selvästi parempaa kuin spin-kolonne menetelmällä eristetty. Näinkin suuri eroavuus aikaisempaan tutkimukseen aiheuttaa ihmetystä. Olen koettanut pohtia työni preanalyttistä, analyttistä ja postanalyttistä puolta, mistä eroavaisuus voisi johtua. Preanalyttistä puolta käsittelen seuraavassa kappaleessa.

Koska syöpäkudos ei ole solukoltaan homogeenista voisi pohtia, missä järjestyksessä näyteleikkeet olivat leikattu eri menetelmiin. Onko voinut tapahtua niin, että ensin leikattuihin näytteisiin olisi tullut enemmän tutkittavan geenin sisältävää solukkoa ja lopupuolen näytteisiin vähemmän? Työtä aloittaessa, en kuitenkaan tiennyt missä järjestyksessä näytteet olivat leikattu, joten tällä luulisin olevan pieni merkitys työn tuloksen

kannalta. Voi tietenkin pohtia, että jos näytemääräni olisi ollut suurempi, olisivatko tulokset olleet edelleen samansuuntaisia.

Analyttistä vaihetta tarkasteltaessa työni luotettavuutta pitäisin hyvänä. Kaikki PCR-ajoissa mukana olleet kontrollinäytteet säilyivät puhtaana, joten työskentelyssäni ei tapahtunut kontaminaatioita. Noudatin työskentelyssä steriilejä työskentelytapoja ja säilytin käyttämäni näytteet ja reagenssit ohjeiden mukaisesti. Siemensin laitteella eristettyihin näytteisiin en pystynyt vaikuttamaan muuten kuin PCR-ajojen osalta. Itse eristyksen hän teki automaatti. Jos PCR-työskentelyssä olisi tapahtunut jokin huomattava virhe, sen olisi pitänyt näkyä muissakin näytteissä, sillä Siemensin laitteella eristetyt näytteet olivat ajoissa samoilla kuoppalevyillä kuin muillakin menetelmillä eristetyt näytteet. Ainut vaihe missä en itse vaikuttanut analysointiin, oli Siemensin laitteella eristettyjen näytteiden ostettu konsentraation mittaaminen. Ja juuri tämän mittauksen tuloksia käytettiin myöhemmin laskettaessa templaatin määrää RT-PCR:ään. Jos mittauksessa on tapahtunut jokin virhe, se on vaikuttanut siihen että RT-PCR:ssä on ollut vähemmän templaattia. Ja edelleen reaaliaikaisessa PCR:ssä on ollut vähemmän templaattia, joten tuotettakin on syntynyt myöhemmillä sykleillä. Voisiko tässä olla työni mahdollinen tulokseen vaikuttava virheen paikka?

Postanalytiikkaan lukisin ajojen jälkeisen tulosten käsittelyn tietokoneella. Tässäkään vaiheessa Siemensin laitteella eristetyt näytteet eivät eronneet mitenkään työskentelyni kannalta. Kaiken yllä olevan seurauksena, pidän saamaani tulosta luotettavana ja oikeana. Ennakko-oletuksesta huolimatta, automaattilla eristetyt näytteet olivat huomattavasti heikkolaatuisempia kuin manuaalisesti tehdyt.

Opinnäytteeni toteuttamisesta on ollut hyötyä tutkimusryhmälle. Oli tärkeää tutustua mahdollisesti harkittavan eristysautomaatin tuottamaan RNA:han. Työni perusteella tutkimusryhmä on jo päätenyt tulokseen, että eivät valitse RNA:n eristykseen vertailemiani menetelmiä. Tämän seurauksena ryhmässä on päädytty kartoittamaan muita markkinoilla olevia eristysautomaatteja.

Tulevaisuudessa näytemäärät tulevat kasvamaan ja tuloksia halutaan nopeammin ja luotettavammin. Lisäksi on tehokkaampaa sitoa työntekijä johonkin muuhun kuin eristämiseen, joka voidaan hoitaa automaattilla. Nykyinen menetelmä on kieltämättä hidas, se sitoo työntekijän puoleksitoista työpäiväksi tekemään vain RNA:n eristystä. Esimerkiksi verrattaessa parafiininpoisto- ja lyysausvaihetta manuaalisesti tehdessä, työvai-

heeseen kuului yön yli kestävä inkubointi, kun automaatilla parafiinin poisto ja lyysaus toteutui tunnissa. Manuaalisesti tehdessä samalla kertaa saa eristettyä vain pienen määrän näytteitä. Mukana olleen automaatin kapasiteetti oli 48 näytettä neljässä tunnissa. Lisäksi olisi ollut mahdollista eristää samalla kertaa näytteestä myös DNA, joten automaatin käyttö on huomattavasti nopeampaa ja monipuolisempaa. Siksi suosittelen ehdottomasti kartoittamaan lisää eri automaattivaihtoehtoja.

## Lähteet

Barber, Robert D. – Harmer, Dan W. – Coleman, Robert A. – Clark, Brian J. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics* 21. 389–395.

Biomedicum Helsinki -säätiö 2012. Vuoden 2012 Matti Äyräpään palkinto Heikki Joensuulle. Biomedicum Helsinki – säätiö. Verkkodokumentti. <<http://www.biomedicum.fi/index.php?page=1609>>. Luettu 2.11.2012.

Blomqvist, Carl – Tukiainen, Erkki 2007. Pehmytkudossarkoomat. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen, Mikko (toim.): *Syöpätaudit*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 526–531.

Bohmann, Kerstin – Hennig, Guido – Rogel, Uwe – Poremba, Christopher – Mueller, Maria Berit – Fritz, Peter – Stoerker, Sephan – Schaefer, Karl-L. 2009. RNA Extraction from Archival Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue: A Comparison of Manual, Semiautomated, and Fully Automated Purification Methods. *Clinical Chemistry* 55 (6). 1719–1727.

Bonin, Serena – Stanta, Giorgio 2011. RNA Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues. . Teoksessa Stanta, Giorgio (toim.): *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*. Berlin Heidelberg: Springer. 57.

Brown T. A. 2000. Getting started in molecular biology. Teoksessa Brown, T.A. (toim.): *Essential Molecular Biology*. Oxford University Press. 13.

Coleman, William B. – Tsongalis, Gregory J. 2006. The Polymerase Chain Reaction. Teoksessa Coleman, William B. – Tsongalis, Gregory J. (toim.): *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. New Jersey, USA. Humana Press Inc. 54.

Dotti, Isabella – Bonin, Serena 2011a. DNase Treatment of RNA. Teoksessa Stanta, Giorgio (toim.): *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*. Berlin Heidelberg: Springer. 87–90.

Dotti, Isabella – Bonin, Serena 2011b. Quantification of Nucleic Acids. Teoksessa Stanta, Giorgio (toim.): *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*. Berlin Heidelberg: Springer. 75–79.

Dotti, Isabella – Bonin, Serena – Nardon, Ermanno 2011a. Reverse Transcription. Teoksessa Stanta, Giorgio (toim.): *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*. Berlin Heidelberg: Springer. 93–97.

Dotti, Isabella – Nardon, Ermanno – Pracella, Danae – Bonin, Serena 2011b. Quantitative Real-Time RT-PCR. Teoksessa Stanta, Giorgio (toim.): *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*. Berlin Heidelberg: Springer. 121–132.

Duodecim 2011. Terveyskirjasto. Pehmytkudossarkooma. Verkkodokumentti. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk01076](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01076)>. Luettu 16.11.2012.

Farragher, Susan M. – Tanney, Austin – Kennedy, Richard D. – Harkin, Paul 2008. RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues. *Histochemistry Cell Biology* 130. 435-445.

Gilbert M. Thomas P. – Haselkorn, Tamara – Bunce, Michael – Sanchez, Juan – Lucas, Sebastian B. – Jewell, Laurence D. – Van Marck, Eric – Worobey, Michael 2007. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin- Embedded Tissues–Which Methods Are Useful When? *PLoS ONE* 2 (6). 1.

Hennig, Guido – Gehrman, Mathias – Stropp, Udo – Brauch, Hiltrud – Fritz, Peter – Eichelbaum, Michel – Schwab, Matthias – Schroth, Werner 2010: Automated Extraction of DNA and RNA from a Single Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Section for Analysis of Both Single-Nucleotide Polymorphisms and mRNA Expression. *Clinical Chemistry* 56 (12). 1845–1853.

Houghton, Scott G. – Cockerill, Franklin R. 2006. Real-time PCR: Overview and applications. *Surgery* 139 (1). 1–5.

Invitrogen Corporation 2008. SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit -menetelmän käyttöohje. Saatavilla myös sähköisesti <[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/vlo\\_cdna\\_synthesis\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/vlo_cdna_synthesis_man.pdf)>.

Joensuu, Heikki 2002. Tyrosiinikinaasin estäjä GIST-kasvainten täsmähoitona. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 118 (22). 2305–2312. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo93266.pdf>>. Luettu 16.11.2012.

Joensuu, Heikki – Roberts Peter J. 2007a. Gastrointestinaalinen stroomatumori GIST. Teoksessa Höckerstedt, Krister – Färkkilä, Martti – Kivilaakso, Eero – Pikkarainen, Pekka (toim.): *Gastroenterologia ja hepatologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 345–349.

Joensuu, Heikki – Roberts Peter J. 2007b. Gastrointestinaalinen stroomatumori eli GIST. Teoksessa Joensuu, Heikki – Roberts, Peter J. – Teppo, Lyly – Tenhunen, Mikko (toim.): *Syöpätaudit*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 331.

Kananen, Jorma 2010. Opinnäytetyön kirjoittamisen käytännön opas. Jyväskylän ammattikorkeakoulu. 128–129.

Lehmann, Ulrich – Kreipe, Hans 2001. Real-Time PCR Analysis of DNA and RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Biopsies. *Methods* 25. 409–418.

Life Technologies 2012: Real-time PCR handbook. Saatavilla myös sähköisesti <<http://find.lifetechnologies.com/qpcr/qpcrhandbook/blog/qpcr-handbook-1992GB-3964VI.html>>. Luettu 9.12.2012.

Miettinen, Markku – Lasota, Jerzy 2001. Gastrointestinal stromal tumors – definition, clinical, histological, immunohistochemical and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 438. 1–12.

Qiagen 2010. Unlocking your FFPE archive - Critical factors for molecular analysis of FFPE samples. FFPE-esite. Saatavilla myös sähköisesti <<http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=200780>>. Luettu 6.12.2012.

Qiagen 2011. Supplementary Protocol. Purification of genomic DNA from FFPE tissue using the QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit and Deparaffinization Solution. 1–3. Saatavilla myös sähköisesti  
<<http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=201668>>.

Roche 2011. High Pure RNA Paraffin Kit. Version 11. For the isolation of total RNA from fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Reagenssarjan ohjelehti. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Saksa. 1–23. Saatavilla myös sähköisesti  
<[https://cssportal.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/03270289001\\_en\\_11.pdf](https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/03270289001_en_11.pdf)>.

Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2011. The Siemens Tissue Preparation Solution A New and Innovative Technology. PowerPoint-esitys.

Stanta, Giorgio 2011. Archive Tissues. Teoksessa Stanta, Giorgio (toim.): Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues. Berlin Heidelberg: Springer. 3.

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2010. Geeniteknikka. Turun ammattikorkeakoulu. Turku.

Syöpäjärjestöt 2012. Sarkoomat. Verkkodokumentti.  
<<http://www.cancer.fi/tietoasvasta/syopataudit/sarkoomat/>>. Luettu 16.11.2012.

Wilkinson, Miles 2000. Purification of RNA. Teoksessa Brown, T. A. (toim.): Essential Molecular Biology. Oxford University Press. 69–88.



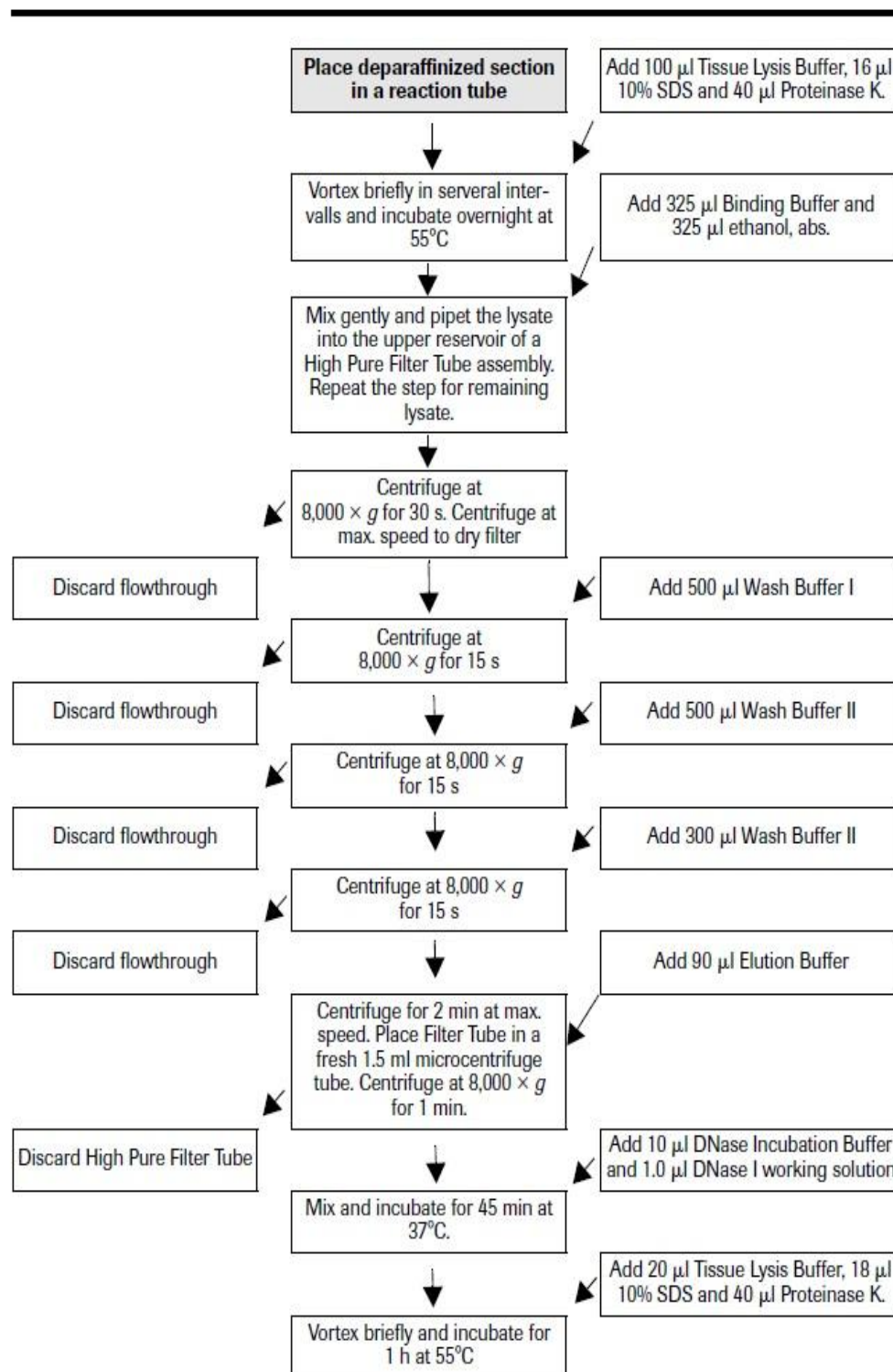
## Käytetyt reagenssit

- High Pure RNA Paraffin Kit, Roche Diagnostics
  - o REF 03270289 001, LOT 13064100, Version 11
  
- Absoloiitu etanoli, Etax, Aa, Altia
  
- Ksyleeni: C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>, Xylene mixture on isomers. Puriss. p.a. Sigma-Aldrich
  
- 10 % SDS: Sodium dodecyl sulfate, electrophoresis purity. 10 g / 100 ml aqua. Bio-Rad Laboratories
  
- Deparaffinization Solution, Qiagen
  - o Cat. no. 19093, LOT 139293537
  
- SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit, Invitrogen
  - o Sisältää:
    - 10X SuperScript® Enzyme Mix, sisältäen seuraavat:
      - SuperScript® III Reverse Transcriptase
      - RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor
      - Propietary helper protein
    - 5X VILO™ Reaction Mix, sisältäen seuraavat:
      - Random primers
      - MgCl<sub>2</sub>
      - dNTPs
  
- RNA:n laimennukseen käytetty vesi: Water, sequence grade, Amreco Inc.
  
- Reaaliaikaisen PRC:n reagenssit:
  - o Puskuri ja vesi:
    - LightCycler®480 Probes Master, Roche Diagnostics GmbH
    - REF 04 707 494 001, Version 09, 2x Conc.
    - H<sub>2</sub>O, PCR Grade

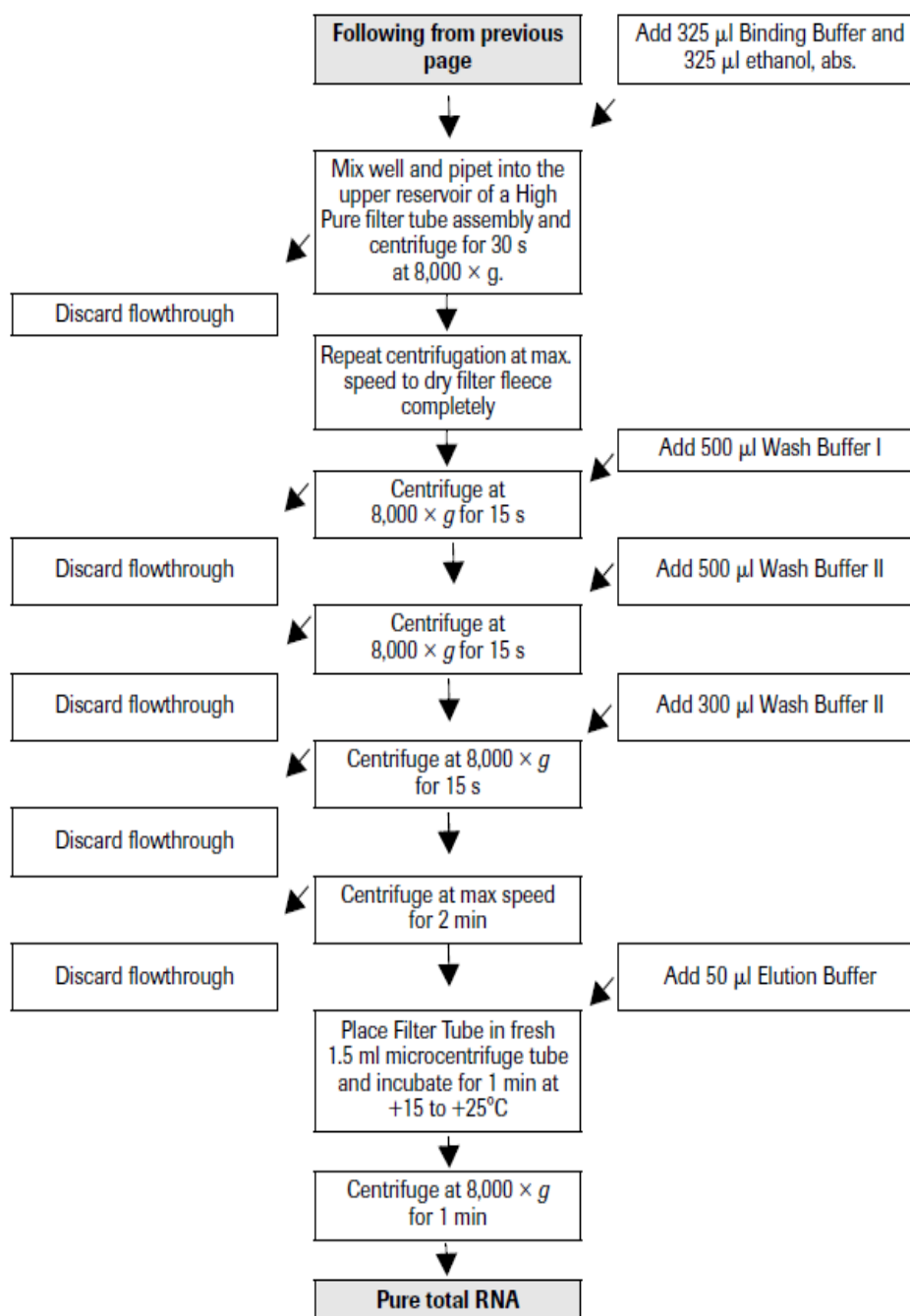
- ITGA413F-aluke, Oligomer
  - 7,9 nmol, 100,0 pmol/μl
  - MW: 7088, T<sub>m</sub> 58.9
  - 5' - CAA GGA AGT TCC AGG TTA CAT TG -3'
- ITGA413R-aluke, Oligomer
  - 21,7 nmol, 100,0 pmol/μl
  - MW: 8435, T<sub>m</sub> 58,9
  - 5' - TTA GAA GAG AAA TAG AAT CTT GGT GGA -3'
- *ITGA4*-koetin, Roche Diagnostics
  - Universal ProbeLibrary, Probe #13
  - Tuotenumero 04 685 121 001
- *GAPDH*-alukkeet ja koetin, Roche Diagnostics
  - Universal ProbeLibrary Human
  - GAPDH Gene Assay
  - Tuotenumero 05 190 541 001

## High Pure RNA Paraffin Kit -menetelmän ohje

### 2.2 Experimental Overview



2.2 Experimental Overview, continued



### 2.3 Protocol for the Isolation of RNA from Formalin-fixed, Paraffin-Embedded Tissue

**Deparaffinization** The following table describes the deparaffinization procedure for 1  $\mu\text{m} \times 5\text{--}10 \mu\text{m}$  section of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in a 1.5 ml reaction tube.

- ① To one 5 – 10  $\mu\text{m}$  section in a 1.5 ml reaction tube add 800  $\mu\text{l}$  Hemo-De (or Xylene), incubate 5 min and mix overhead during incubation several times.
- ② Add 400  $\mu\text{l}$  ethanol abs. and mix.  
Centrifuge for 2 min at maximum speed (12,000 – 14,000  $\times g$ ) and discard supernatant.
- ③ Add 1 ml ethanol abs. and mix by overhead shaking.  
Centrifuge for 2 min at maximum speed and discard supernatant.
- ④ Blot the tube briefly onto a paper towel to get rid of ethanol residues.  
Dry the tissue pellet for 10 min at 55°C.  
Proceed with step 1 of the RNA isolation protocol (2.3).

#### Alternative Procedure

The following table describes the deparaffinization procedure for 1  $\mu\text{m} \times 5\text{--}10 \mu\text{m}$  section of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue on a microscope slide.

- ① Place the slide in a Hemo-De (or Xylene) bath and incubate for 10 min.
- ② Tap off excess liquid and place the slide into ethanol abs. for 10 min.
- ③ Change bath and incubate the slide for additional 10 min in ethanol abs.
- ④ Scratch the deparaffinized section from the slide by using a sterile single-use scalpel and place it into a 1.5 ml reaction tube.  
 ⚠ To avoid scattering of the tissue scratch the section from the microscope slide before it has dried.
- ⑤ • Dry the tissue for 10 min at 55°C.  
• Proceed with step 1 of the RNA isolation protocol (2.3).

#### RNA Isolation Protocol

The following protocol describes the RNA isolation from a 1  $\mu\text{m} \times 5\text{--}10 \mu\text{m}$  section of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.

- ④ If necessary 3 preparations can be pooled after step 4.
- ① • To one tissue pellet (deparaffinized as described above) add 100  $\mu\text{l}$  Tissue Lysis Buffer (bottle 1, white cap), 16  $\mu\text{l}$  10% SDS and 40  $\mu\text{l}$  Proteinase K working solution.  
• Vortex briefly in several intervals and incubate overnight at 55°C.
- ② • Add 325  $\mu\text{l}$  Binding Buffer (bottle 3, green cap) and 325  $\mu\text{l}$  ethanol abs.  
• Mix gently by pipetting up and down.

## 2.3 Protocol for the Isolation of RNA from Formalin-fixed, Paraffin-Embedded Tissue, continued

- 3 Combine the High Pure filter tube and the collection tube and pipet the lysate into the upper reservoir.

---

- 4 Centrifuge for 30 s at  $8,000 \times g$  in a microcentrifuge and discard the flowthrough.
  - Q Step 3 – 4 can be repeated, in case RNA needs to be pooled, with 2 more tissue pellet preparations.

---

- 5 Repeat the centrifugation at maximum speed in order to dry the filter fleece completely.

---

- 6 • Add 500  $\mu$ l Wash Buffer I working solution (bottle 4, black cap) to the upper reservoir.  
• Centrifuge for 15 s at  $8,000 \times g$ , discard the flowthrough.

---

- 7 • Add 500  $\mu$ l Wash Buffer II working solution (bottle 5, blue cap).  
• Centrifuge for 15 s at  $8,000 \times g$ , discard the flowthrough.

---

- 8 Add 300  $\mu$ l Wash Buffer II working solution (bottle 5, blue cap), centrifuge for 15 s at  $8,000 \times g$ , discard the flowthrough.

---

- 9 Centrifuge the High Pure filter for 2 min at maximum speed.

---

- 10 • Place the High Pure filter tube into a fresh 1.5 ml reaction tube, add 90  $\mu$ l Elution Buffer (bottle 8, colorless cap).  
• Centrifuge for 1 min at  $8,000 \times g$ .

---

- 11 • Add 10  $\mu$ l DNase Incubation Buffer, 10 $\times$  (bottle 7, colorless cap) and 1.0  $\mu$ l DNase I working solution to the eluate and mix.  
• Incubate for 45 min at 37°C.

---

- 12 • Add 20  $\mu$ l Tissue Lysis Buffer (bottle 1, white cap), 18  $\mu$ l 10% SDS and 40  $\mu$ l Proteinase K working solution.  
• Vortex briefly.  
• Incubate for 1h at 55°C.

---

- 13 • Add 325  $\mu$ l Binding Buffer (bottle 3, green cap) and 325  $\mu$ l ethanol abs.  
• Mix and pipet into a fresh High Pure filter tube with collection tube.

---

- 14 Centrifuge for 30 s at  $8,000 \times g$  in a microcentrifuge and discard the flowthrough.

---

- 15 Repeat the centrifugation at maximum speed in order to dry the filter fleece completely.

---

- 16 • Add 500  $\mu$ l Wash Buffer I working solution (bottle 4, black cap) to the upper reservoir.  
• Centrifuge for 15 s at  $8,000 \times g$ , discard the flowthrough.

---

- 17 • Add 500  $\mu$ l Wash Buffer II working solution (bottle 5, blue cap).  
• Centrifuge for 15 s at  $8,000 \times g$ , discard the flowthrough.

---

- 18 • Add 300  $\mu$ l Wash Buffer II working solution (bottle 5, blue cap).  
• Centrifuge for 15 s at  $8,000 \times g$ , discard the flowthrough.

---

- 19 • Centrifuge the High Pure filter for 2 min at maximum speed.

**2.3 Protocol for the Isolation of RNA from Formalin-fixed, Paraffin-Embedded Tissue, continued**

- 
- 20 • Place the High Pure filter tube into a fresh 1.5 ml reaction tube.  
• Add 50  $\mu$ l Elution Buffer (bottle 8, colorless cap), incubate for 1 min at room temperature.  
• Centrifuge for 1 min at  $8,000 \times g$  to collect the eluted RNA.
- 
- 21 The microcentrifuge tube now contains the eluted RNA. Either use 10  $\mu$ l of the eluted RNA directly in RT-PCR or store the eluted RNA at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later analysis.
- $\triangle$  Before photometrical determination of RNA concentration, centrifuge the eluate for 2 min at maximum speed and transfer supernatant to a fresh 1.5 ml reaction tube without disturbing glass fibers at the bottom of the original tube.
-

## Qiagenin Deparaffinization Solution -liuoksen käyttöohje

### QIAGEN Supplementary Protocol

---

#### Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Equilibrate all buffers to room temperature; equilibrate Deparaffinization Solution to 20–25°C.
- In the procedure below, ■ indicates the volumes to use if processing 1–2 sections per sample, while ▲ indicates the volumes to use if processing >2 sections per sample.

#### Things to do before starting

- Preheat a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in steps 4 and 8. If a thermomixer or heated orbital incubator is not available, a heating block or water bath can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contain precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffer AW1 and Buffer AW2 have been prepared according to the instructions on page 13 of the *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook*.

#### Procedure

1. Using a scalpel, trim excess paraffin off the sample block. Cut into sections 5–10 µm thick.  
Note: If the sample surface has been exposed to air, discard the first 2–3 sections.
2. Immediately place the sections in a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not supplied).
3. Add ■ 160 µl or ▲ 320 µl Deparaffinization Solution and vortex vigorously for 10 s. Centrifuge briefly to collect the sample in the bottom of the tube.  
Note: Deparaffinization Solution is not supplied with the QIAamp FFPE Kit and should be ordered separately.
4. Incubate at 56°C for 3 min, and then allow to cool at room temperature (15–25°C).
5. Add 180 µl Buffer ATL, and mix by vortexing.
6. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g (10,000 rpm).
7. Add 20 µl proteinase K to the lower, clear phase. Mix gently by pipetting up and down.





## QIAGEN Supplementary Protocol

---

8. Incubate at 56°C for 1 h (or until the sample has completely lysed).
9. Incubate at 90°C for 1 h.  

The incubation at 90°C in Buffer ATL partially reverses formaldehyde modification of nucleic acids. Longer incubation times or higher incubation temperatures may result in more fragmented DNA.

Note: If using only one heating block, leave the sample at room temperature (15–25°C) after the 56°C incubation in step 8, until the heating block has reached 90°C for step 9.
10. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from inside the lid.
11. Transfer the lower, clear phase into a new 2 ml microcentrifuge tube.  

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 2 µl RNase A (100 mg/ml) and incubate for 2 min at room temperature before continuing with step 14 of the *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook*.
12. Continue with step 14 of the *QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook*.

QIAGEN handbooks can be requested from QIAGEN Technical Service or your local QIAGEN distributor. Selected handbooks can be downloaded from [www.qiagen.com/literature](http://www.qiagen.com/literature). Material safety data sheets (MSDS) for any QIAGEN product can be downloaded from [www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx).

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp® (QIAGEN Group). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

QA50 June-11 © 2011 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)  
Australia = 1-800-243-800  
Austria = 0800/281010  
Belgium = 0800-79612  
Canada = 800-372-9613  
China = 021-51345678  
Denmark = 80-883945  
Finland = 0800-914416

France = 01-60-920-930  
Germany = 02103-29-12000  
Hong Kong = 800 933 965  
Ireland = 1800 555 049  
Italy = 800 787980  
Japan = 03-5547-0811  
Korea (South) = 1544 7145  
Luxembourg = 8002 2076

The Netherlands = 0800 0229392  
Norway = 800-18859  
Singapore = 65-67773366  
Spain = 91-630-7030  
Sweden = 020-790282  
Switzerland = 055-254-22-11  
UK = 01293-422-911  
USA = 800-426-8137



---

Sample & Assay Technologies