

Aki Aittola

Optimaalisen mittauslaitteen määrittäminen Quant-iT dsDNA, High Sensitivity -kitille

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Aki Aittola Optimaalisen mittauslaitteen määrittäminen Quant-iT dsDNA, High Sensitivity -kitille 44 sivua 4.2.2017
Tutkinto	Laboratorioanalyytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Tutkija Eva Tas Lehtori Mia Ruismäki
<p>Opinnäytetyö suoritettiin Thermo Fisher Scientificille, ja sen tarkoituksena oli selvittää Quant-It dsDNA High Sensitivity -kitille optimaalinen laite, kun analysoidaan pieniä DNA-pitoisuuksia. Valittua laitetta on jatkossa tarkoitus suositella kyseisen kitin käyttöön. Optimaalinen laite valittiin määrittämällä eri laitteille DNA:n toteamis- ja määritysrajat käyttämällä kitin reagensseja. Testatut laitteet olivat Varioskan LUX, Fluoroskan ja Qubit™ 3.0 Fluorometri.</p> <p>Mittauksissa käytetty kitti perustuu DNA-molekyyliin sitoutumiseen fluoresoivaan fluorokromiin. Kaikki laitteet mittaavat fluoresenssisignaalia, joita verrattiin kitin mukana tulleiden kalibroitiliuosten tunnettuihin DNA-konsentraatioihin. Kalibroitisuorat olivat kaikki melko lineaarisia, mutta jokaisella laitteella suurimman kalibroitipisteen rinnakkaismääritysten hajonta oli melko suurta.</p> <p>Toteamis- ja määritysrajat määritettiin analysoimalla "blank"-näytteitä kitin mukana tulleiden kalibroitiliuosten avulla. "Blank"-näytteinä käytettiin sekä kitin puskuriliuosta, että kitin ensimmäistä kalibroitiliuosta, jonka konsentraatioksi ilmoitettiin 0 ng/μl. Kaikkia liuoksia pipetoitiin mustalle ja valkoiselle, 96- ja 384-kaivoiselle mikrokuoppalevyille, jotta voitiin määrittää myös paras mikrokuoppalevy kitin käyttöä varten. Qubit-laitteella näytteet analysoitiin sitä varten tarkoitetuissa Qubit-putkissa.</p> <p>Lisäksi tehtiin saantokoenäytteitä pienillä pitoisuuksilla. Niillä pyrittiin varmistamaan määritettyjä toteamis- ja määritysrajoja, etenkin koska ne olivat hyvin pieniä verrattuna kitin standardinäytteiden pitoisuuksiin.</p> <p>Tulosten perusteella paras laite kitin käyttöön on Varioskan LUX, jonka kanssa käytetään mustaa 96-kaivoista mikrokuoppalevyä. Tällä yhdistelmällä saatiin paras toteamis- ja määritysraja, sekä parhaat saantoprosentit.</p>	
Avainsanat	Fluoresenssi, DNA, Quant-it dsDNA High Sensitivity, Varioskan LUX, Fluoroskan, Qubit, toteamisraja, määritysraja

Author(s) Title	Aki Aittola Finding the Most Optimal Instrument for the Quant-it dsDNA High Sensitivity Assay Kit
Number of Pages Date	44 pages 4 February 2017
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	
Instructor(s)	Eva Tas, Application Scientist Mia Ruismäki, Senior Lecturer
<p>The study was done for Thermo Fisher Scientific. The purpose was to evaluate the optimal instrument for Quant-it dsDNA High Sensitivity assay kit when low concentrations are analyzed. The chosen instrument will be recommended for using this kit. The optimal instrument was chosen by evaluating limits of detection and quantification for different instruments. Tested instruments were Varioskan LUX, Fluoroskan and Qubit 3.0 Fluorometer.</p> <p>Quant-it dsDNA High Sensitivity assay kit is based on fluorochrome that is fluorescent as it bonds with DNA molecule. Therefore, every instrument measures fluorescence. Fluorescence signal was plotted against concentrations of the standard samples which were delivered with the kit. Every calibration curve was linear but the strongest standard samples had very high standard deviation.</p> <p>Limits of detection and qualification were evaluated by measuring blank samples using calibration samples delivered with the kit. Buffer solution and first calibration solution were used as a blank sample. Every solution was pipetted to black and white, 96- and 384-well plates in order to evaluate the best well plate for use of the assay kit. Measurements with the Qubit fluorometer were done in special Qubit-tubes.</p> <p>In addition, recovery samples were made and analyzed with low concentrations. This was because LOD and LOQ values were so low compared to the lowest calibration solution delivered with the assay kit.</p> <p>According to results the best instrument for the kit is Varioskan LUX with black 96-well plate. LOD and LOQ values were the lowest and recoveries accurate and precise.</p>	
Keywords	Fluorescence, Quant-it dsDNA High Sensitivity Assay Kit, Varioskan LUX, Fluoroskan, Qubit, limit of detection, limit of qualification

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työn teoria	1
2.1	Fluoresenssispektrofotometria	1
2.1.1	Fluoresenssin synty	2
2.1.2	Fluoresenssin mittaaminen	3
2.1.3	Spektrien mittaaminen	5
2.1.4	Signaalin detektointi	5
2.1.5	Toteamis- ja määrittäysrajat	8
2.2	Laboratoriolaitteet	9
2.2.1	Fluoroskan ja Fluoroskan FL	9
2.2.2	Varioskan™ LUX	10
2.2.3	Qubit® 3.0 Fluorometri	13
2.3	Quant-iT™ dsDNA High sensitivity -kitti	14
3	Työssä käytetyt välineet ja reagenssit	15
3.1	Reagenssit	15
3.2	Pipetit	15
3.3	Mikrokuoppalevyt ja laitteet	16
4	Työn suoritus	17
4.1	Näytteiden mittaus	17
4.2	Spektrien mittaus	21
5	Tulokset ja niiden käsittely	22
5.1	Spektrit	22
5.2	Grubbsin testi poikkeavuuksille	23
5.3	”Blank”-näytteiden tarkastelu	25
5.4	Kalibrointisuorien tarkastelu	26
5.5	Toteamis- ja määrittäysrajat	29
5.6	Saantokokeet	33
6	Yhteenveto	36
	Lähteet	38

Lyhenteet

DMSO	<i>Dimetyylisulfoksidi</i> , liuottimena käytetty orgaaninen yhdiste
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
ds	<i>double stranded</i> , kaksijuosteinen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , bakteerilaji
HS	<i>High sensitivity</i> , korkea herkkyys
LAT	<i>Luminescence, AlphaScreen, Time-resolved fluorescence</i> ,
LED	<i>light-emitting diode</i> , laitteen valoa emittoiva komponentti
LSG	Life Sciences Solutions Group
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i> , suhteellinen fluoresenssiyksikkö
RNA	Ribonukleiinihappo
SN	Sarjanumero
TRF	<i>Time-resolved fluorescence</i> , aikaerotteinen fluoresenssi

1 Johdanto

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää sopivin laite ja mikrokuoppalevy DNA-konentraation määrittämiseen tarkoitettulle Quant-iT™ dsDNA high sensitivity -kitille. Työ suoritetaan Thermo Fisher Scientificille yhteistyössä Life Sciences Solutions Group-ryhmän (LSG) kanssa, jotta kitin käyttöön voidaan suositella siihen sopivaa laitetta. Quant-iT-kitit perustuvat erilaisiin DNA- tai RNA-molekyyleihin sitoutuviin fluoresoiviin reagensseihin, joten mittaus tapahtuu fluoresenssispektrometriaa käyttäen.

Thermo Fisher Scientific on vuonna 2006 Thermo Electronin ja Fisher Scientificin yhdistymisestä perustunut yhdysvaltalainen laboratorio- ja biotekniikan laitteita ja välineitä tuottava yhtiö. Se työllistää maailmanlaajuisesti yli 50 tuhatta henkeä ja yhtiön päätuotemerkkejä ovat Thermo Scientific, Applied Biosystems, Invitrogen, Fisher Scientific ja Unity Lab Services. Opinnäytetyössä käytetyt mikrokuoppalevyjen analysointiin tarkoitettut laitteet ja mikrokuoppalevyt kuuluvat Thermo Scientificin tuotteisiin ja kitit sekä Qubit fluorometri Invitrogenin tuotteisiin. [6.]

Thermo Fisher Scientific toimii noin 50:ssä maassa, mutta päätoimisto sijaitsee Walthamissa, Yhdysvalloissa. Suomessa toimipisteitä on Vantaalla ja Joensuussa, joista Vantaan toimipisteellä tapahtuu tuotteiden markkinointi, myynti sekä mikrokuoppalevykijoiden tuotanto ja huolto ja Joensuussa taas pipettien ja osan kuoppalevyjen huolto ja tuotanto.

Mittauksissa käytettiin SkanIt-ohjelmaa, jota käytetään useiden laitteiden ohjaamiseen. Fluoroskanien ja Varioskan LUXin lisäksi ohjelmaa voidaan käyttää esimerkiksi Thermo Scientific Multiskan GO ja FC -fotometrien kanssa.

2 Työn teoria

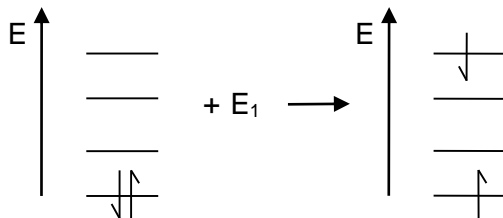
2.1 Fluoresenssispektrofotometria

Fluorimetria on sähkömagneettiseen säteilyyn perustuva analyysitekniikka, jossa fluoresoivaa näytettä eksitoidaan tietyn aallonpituuden valolla. Eksitaation johdosta analyysi emittoi eli lähettää lyhyen ajan kuluttua matalaenergisempää ja aallonpituudeltaan

suurempaa valoa, jota mitataan laitteen detektorilla, joka on yleensä valomonistinputki. Edellytyksenä fluorometrialle on, että tutkittava yhdiste tai siitä valmistettava johdos absorboi riittävästi viritysvaioa ja, että se fluoresoi. Tämä tekee fluorometriasta erittäin herkän ja spesifisen mittausmenetelmän. [1. s. 66–68, 2. s. 406–413.]

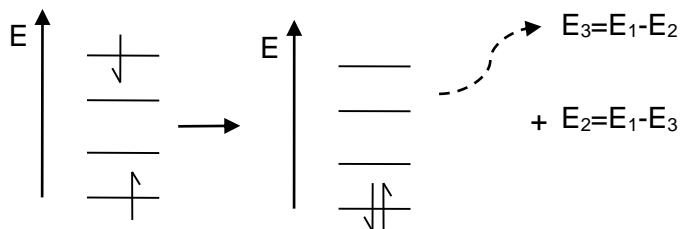
2.1.1 Fluoresenssin synty

Eksitoinnissa näytemolekyylit viritetään voimakkaalla tietyn aallonpituuden valolla. Yleensä eksitoinnissa käytetään kvartsi-halogeni- tai ksenonlampua, jolla saadaan voimakas valointensiteetti. Tarkoituksena on saada näytemolekyylit virittymään, eli absorboimaan itseensä valofotonin (kuva 1). [1. s. 66–67.]



Kuva 1. Molekyylin uloin elektroni siirtyy ylemmälle energiatilalle, eli molekyyli virittyy. Virittymiseen vaadittava energia (E_1) tulee laitteen lampusta. [1. s.66.]

Lyhyen ajan kuluttua eksitoinnista virittynyt molekyyli palautuu takaisin perustilaan, jolloin matala energisempää valoa vapautuu, eli emittoituu kaikkiin suuntiin (kuva 2). Loppu energia kuluu näyteliuksen lämpenemiseen. Koska emittoituvalla valolla matalampi energiataso, sen aallonpituus on suurempi kuin virittymiseen vaaditulla valolla. [1. s. 67-68; 2. s. 412–413.]

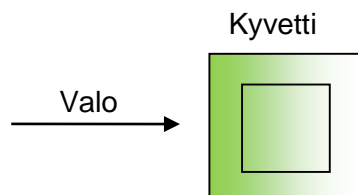


Kuva 2. Molekyylin viritystilän purkautuessa vapautuu valoa (E_2) ja lämpöenergiaa (E_3). Syntyvää valoa kutsutaan fluoresenssiksi ja sitä voidaan mitata fluoresenssispektrometrillä.

Virittymisen aikana elektronin spintila voi myös kääntyä. Tällöin puhutaan fosforisenssistä. Fosforisenssi eroaa fluoresenssista elektronin spintilan lisäksi siten, että se on fluoresenssia hitaampaa ja se tapahtuu suuremmalla aallonpituudella. Mittausten kannalta on kuitenkin samantekevää, onko kyse fluoresenssista vai fosforesenssista, kunhan tiedetään millä aallonpituudella näytteen emittoituminen tapahtuu. [1. s.66; 2. s. 406; 3. s. 91; 7. s 1-3.]

2.1.2 Fluoresenssin mittaaminen

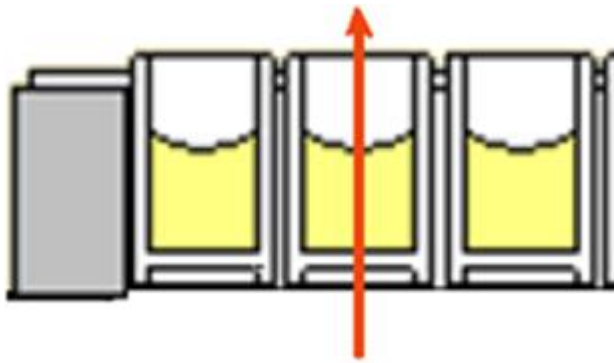
Sekä eksitaatio- että emissiovalon aallonpituus voidaan valita laitteesta riippuen joko eksitaatio- tai emissiomonokromaattorilla tai eksitaatio- tai emissiofilttereillä. Eksitaatiovalon aallonpituuden tulee olla valittu siten, että analyytti absorboi valoa sopivan paljon. Liian pieni absorptio aiheuttaa vain pientä emissiota, eikä sitä voida havaita. Liika absorbointi taas aiheuttaa valointensiteetin epätasaisuutta mittausalueella eikä koko kyvetin matkalla synny yhtä paljon virittyneitä molekyyliä ja näin pienentää emissiota (kuva 3). Myös emissiosignaali voi absorboitua, jolloin detektorin havaitsema signaali laskee. Kun maksimiemissio on saavutettu, alkaa se laskea näytteen konsentraatiota nostettaessa. Ilmiötä kutsutaan itseabsorptioksi ja sitä voidaan välttää pitämällä näyte tarpeeksi laimeana. [1. s.66–67; 2. s. 412; 3. s. 95.]



Kuva 3. Liian suuri absorbanssi aiheuttaa virittyneiden molekyylien epätasaisuutta. Väri kyvetin sisällä kuvaa valon absorbanssia ja sitä kautta emissiota. Absorbanssin ollessa liian suurta, valo ei pysty läpäisemään kyvetiä, jolloin kyvetin keski- tai takaosassa olevat molekyylit eivät saa tarpeeksi energiaa virittyäkseen. Mittaus tapahtuu kyvetin keskiosasta.

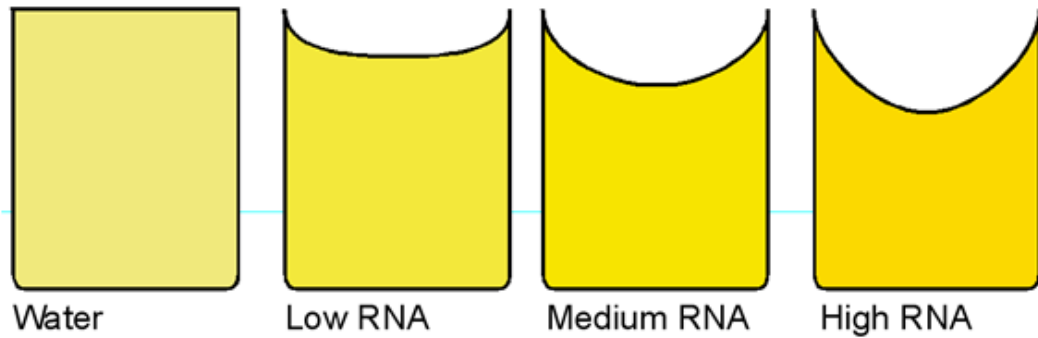
Perinteisessä fluoresenssispektrometriassa näyte on erikoiskvartsista valmistetussa kyvetissä, jonka kaikki sivut ovat optisia. Tällöin emissio mitataan kohtisuoraan eksitaatiovalosta, jolla minimoidaan hajavalon synnyttämää häiriösignaalia. Jos on tarvetta nostaa menetelmän herkkyyttä, voidaan eksitaatiovaloa ja detektoria vastakkaiset kyvetin sivut muuttaa peileiksi. Näin joka suuntaan säteilevä emissio ei pääse ulos kuin eksitaatiovalon sisääntulosivusta ja detektorisivusta. Tämä voi nostaa signaalia yli kolminkertaiseksi. [1. s. 68; 2. s. 412.]

Mikrokuoppalevyiltä mitatut analyysit suoritetaan yleensä mustalta levyltä, joka absorboi kaikkea valoa. Tällä pyritään välttämään valon takaisin heijastumista levyn seinämieltä tai pohjasta ja näin pienentämään taustasignaalin suuruutta. Koska fotometrisissä analyyseissä mitataan valon absorbanssia näytteen läpi, levyiltä pystysuunnassa mitaamisen myötä tulee huomioida oleellisena osana analyysiä näytteen meniskusefetti. Meniskuksen suunnasta riippuen se joko pienentää tai kasvattaa näytteen valotietä ja näin vaikuttaa mitattuihin tuloksiin (kuva 4). Fluorometriassa meniskus vaikuttaa kuitenkin vain näytteen pinnan muotoon, jolloin takaisin heijastuvan valon kulma voi vaihdella. Meniskuksen kokoon ja suuntaan vaikuttaa näytteen ja levyn välinen vuorovaikutus, joten levyn valmistusmateriaalilla on merkittäviä vaikutuksia tuloksiin. [14, 15.]



Kuva 4. Meniskusefetti vaikuttaa mikrokuoppalevyllä merkittävästi valotien pituuteen. Vastavasti poikkisuuntaan mitattavalla kyvetillä valotien pituus on aina hyvin tiedossa. [15.]

Monet aineet sammuttavat fluoresenssia, joten näytematriisi tulee valita tarkoin. Lisäksi lämpötila ja pH vaikuttavat fluoresenssitehokkuuteen merkittävästi. DNA:ta ja RNA:ta analysoitaessa myös näytemolekyylin pitoisuus vaikuttaa fluorsenssitehokkuuteen epäsuorasti meniskusefektin myötä. Suurilla DNA- tai RNA-pitoisuuksilla meniskusefetti on suurempi kuin pienillä pitoisuuksilla ja etenkin pienissä tilavuuksissa valotien pituus vaihtelee merkittävästi. Tämän takia analyysi ei välttämättä pysy lineaarisena suurilla pitoisuuksilla. (Kuva 5) [1, 14, 15.]



Kuva 5. DNA- tai RNA-konsentraatiolla on suuri vaikutus valotien pituuteen meniskus-efektin kautta. [14.]

2.1.3 Spektrien mittaaminen

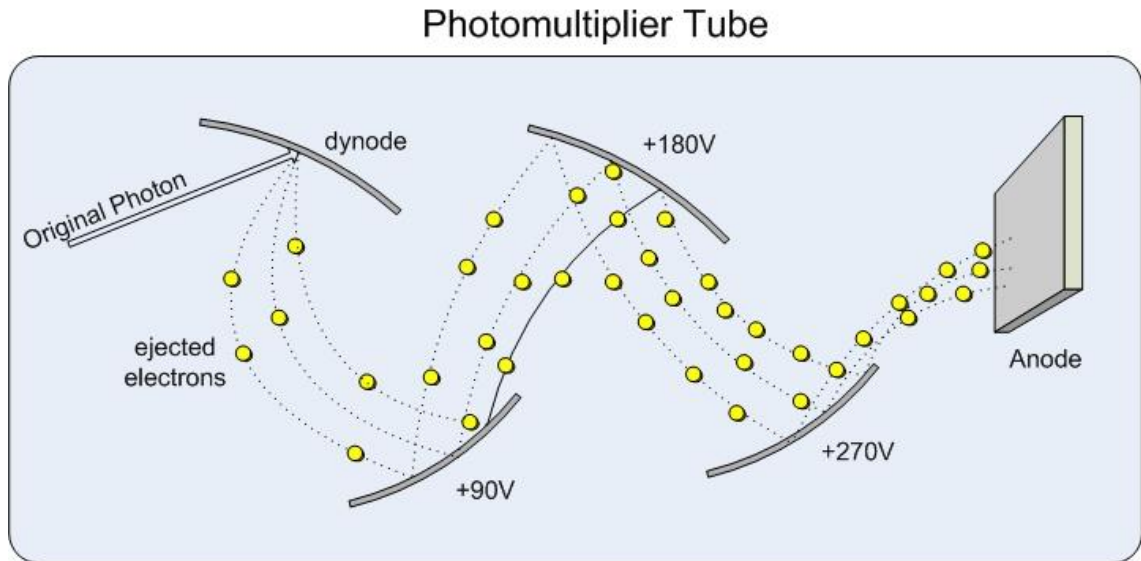
Eksitaatiospektrin voi mitata laitteella, jossa on eksitaatiomonokromaattori, jolla voi muuttaa eksitaatiovalon aallonpituutta. Spektri on yleensä samankaltainen absorptiospektrin kanssa. Mittaus tapahtuu pitämällä emissioaallonpituus vakiona ja käymällä läpi eri eksitaatioaallonpituudet. Emissiospektrin mittaamisessa taas pidetään eksitaatioaallonpituus vakiona, ja emissiomonokromaattorin avulla käydään läpi emissioaallonpituudet. Emissiospektri on yleensä eksitaatio- ja absorptiospektrin peilikuva. [1. s. 68; 2. s. 408, 410; 7. s. 34-36.]

2.1.4 Signaalin detektointi

Signaalin detektointi tapahtuu erilaisten detektorien avulla. Työssä käytetyillä mikrokuoppalevylukijoilla detektorina toimii usein fluorometreissä käytetty, erittäin herkkä valomonistinputki. Sen toiminta perustuu kahteen erilaiseen pintaan, katodiin ja useaan dynodiin.

Putkeen ohjattava valo kulkeutuu ensimmäiselle ohuelle metalliselle pinnalle, joka on valoa emittoiva katodi. Valon osuttua tähän pintaan, emittoituu siitä elektroneja, jotka ohjataan kiihdyttämällä seuraavalle, varautuneelle pinnalle, dynodille. Kiihdytyksen takia elektroneilla on suurempi kineettinen energia, kuin niillä alun perin oli ja jokainen kiihdytetty elektroni irrottaa dynodiin törmättyään useamman kuin yhden elektronin. Ensimmäiseltä dynodilta irronneet elektronit ohjataan seuraavalle, yhä varautuneemmalle, dynodille ja yhä enemmän elektroneja irtoaa. Tätä toistetaan useaan kertaan, jolloin

elektronien määrä kasvaa jokaisen dynodin kohdalla. Lopuksi elektronit luetaan sähköisenä signaalina anodilla. (Kuva 6) [2, s. 455-456; 7, s. 44-46.]

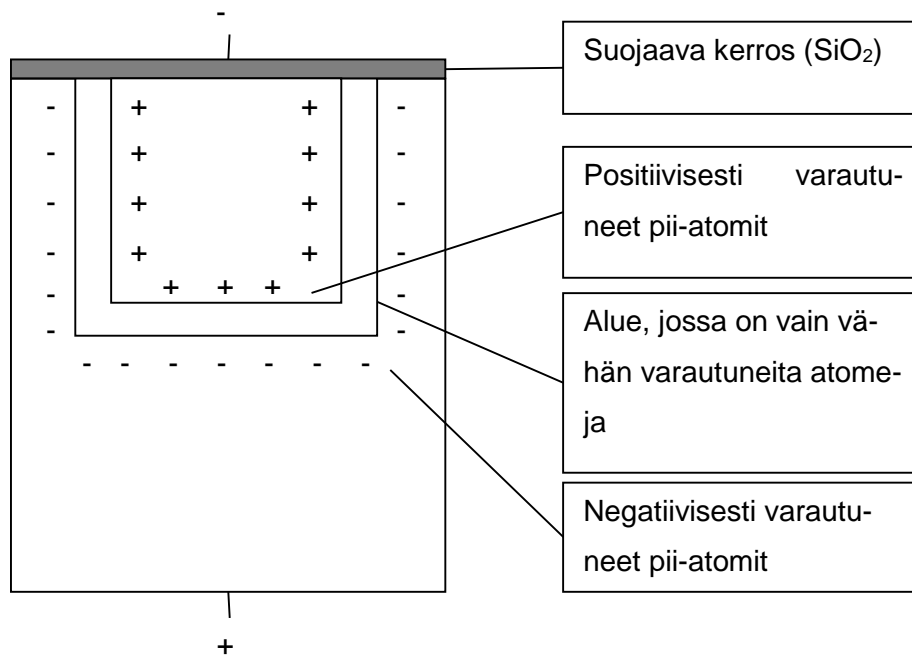


Kuva 6. Valomonistinputken toiminta kaavakuvana [10.]

Näytteestä tulevan signaalin voimakkuutta voidaan säätää vaihtamalla valomonistinputkeen kulkevan jännitteen voimakkuutta. Korkeammalla jännitteellä saadaan suurempi määrä elektroneja, jolloin signaalikin on voimakkaampi. Jännite kuitenkin pitää säätää suhteutettuna valon intensiteettiin. Liika jännite johtaa helposti lineaarisuuden heikkenemiseen. [7, s. 44.]

Toinen työssä käytetty detektori oli Qubit-laitteessa olleet valodiodit. Valodiodeissa on positiivisesti ja negatiivisesti varautuneita pii-atomeja. Positiivisesti varautuneiden atomien seassa on elektronivaje, jolloin niiden väliin jää aukkoja. Negatiivisesti varautuneiden atomien väliin jää taas ylimääräisiä elektroneja. [2, s. 457.]

Erilaisilla varautuneet atomit pidetään erillään vastakkaisella varauksella. Negatiivisesti varautuneet atomit vedetään pois päin positiivisesti varautuneista positiivisesti varautuneella jännitteellä, ja positiiviset atomit vastaavasti negatiivisella jännitteellä. Näin eri varauksisten atomien väliin jää alue, jossa on vain vähän ylimääräisiä elektroneja tai aukkoja. Näin varaukset varastoituvat kummallekin puolelle tätä aluetta, joka toimii kondensaattorina ja varastoi sähköistä varausta. Mittauksen alussa kondensaattoriin on täysin varautunut. (Kuva 7). [2, s.457.]



Kuva 7. Valodiodin kaavakuva [2, sivu 457.]

Valosäteilyn tullessa diodille, syntyy vapaita elektroneja ja aukkoja, jotka jakautuvat vastakkaisille varausalueille ja osa varastoituneesta varauksesta purkautuu. Mitä enemmän säteilyä diodille tulee, sitä enemmän varausta purkautuu ja mittauksen loputtua lasketaan, paljonko varausta vaaditaan, jotta kondensaattori saadaan taas täyteen varattua.

Valodiodeja voidaan myös asettaa riviin, jolloin puhutaan diodirividetektorista. Sen avulla voidaan määrittää valospektri nopeasti, koska sillä voidaan mitata useaa aallonpituutta samanaikaisesti. Tällöin laitteeseen vaaditaan myös polykromaattori, jolla valo hajotetaan eri aallonpituuksille. Resoluutio riippuu siis kuinka lähekkäin diodit ovat asetettu detektorilla ja kuinka hyvä on polykromaattorin erotuskyky. [2, s.457.]

Detektoreilla mitattu sähkövirta muunnetaan RFU-yksiköiksi, joka on fluoresenssisignaalin ilmoittamiseen käytetty yksikkö. Se on suhteellinen yksikkö, eikä siis kerro tarkkaan minkä signaalin laite on saanut, vaan se on voitu muuttaa esimerkiksi skaalamalla tiettyyn suuruuteen. Eri laitteilla mitatut RFU-arvot eivät siis välttämättä ole suoraan vertailukelpoiset.

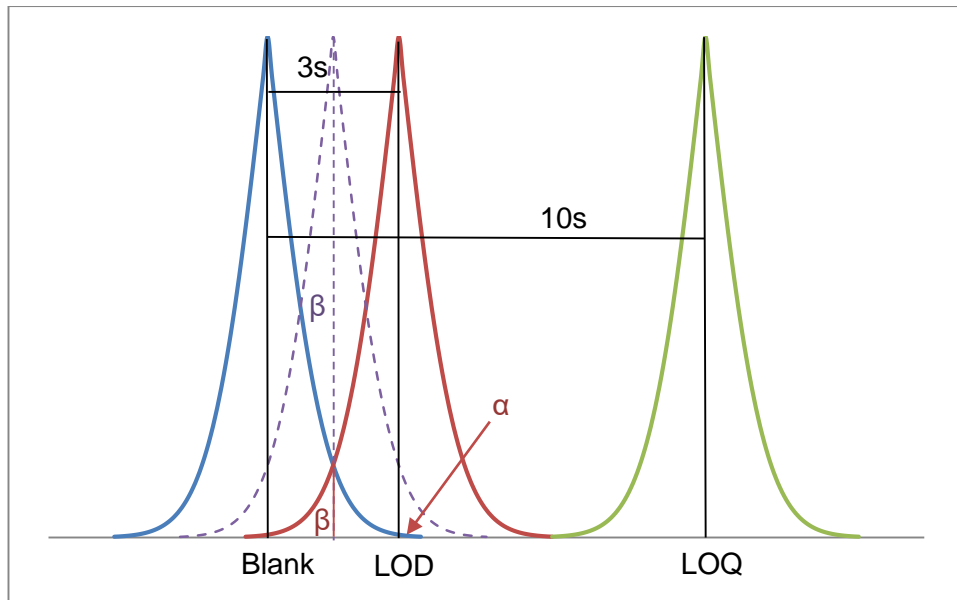
2.1.5 Toteamis- ja määritysrajat

Toteamisraja, eli LOD, on konsentraatoraja, jossa voidaan luotettavasti todeta, että näyte sisältää tutkittavaa analyyyttiä. Määritysraja, eli LOQ, taas kertoo sen, jolloin voidaan todeta määritettävän analyysin pitoisuus luotettavasti. Rajat määritellään analysoimalla joko "blank"-näytettä tai näytettä missä tutkittavaa analyyyttiä on vain vähän. Kumpaa näytettä käytetään, riippuu mittausteknologiasta. Esimerkiksi foto- ja fluorometriassa rajat määritellään "blank"-näytteiden avulla, mutta esimerkiksi kromatografiassa ne määritellään näytteillä, jotka sisältävät analyyyttiä, koska näissä tulee havaita kromatogrammin piikki pohjatasosta. [9, s. 21.]

LOD ja LOQ voidaan määrittää laitteelle tai analyysimenetelmälle. Erona näillä on se, että laitteelle määritettyyn toteamisrajaan ei välttämättä tarvitse suorittaa näytteenkäsittelyä mitattaville näytteille, kun taas menetelmän toteamisrajaa varten mitattavat "blank"-näytteet tulisi käydä läpi koko analyysiprosessi. Esimerkiksi DNA:ta mitattaessa laitteen toteamisraja voidaan määrittää mittaamalla puskuria "blank"-näytteenä, mutta analyysin toteamisrajaa määrittäessä tulee puskurin käydä esimerkiksi DNA:n eristysvaihe läpi, mikäli myös normaalisti mitattaville näytteille tämä tehtäisiin. Opinnäytetyössä määritettiin laitteiden toteamisrajoja. [9, s. 20-21.]

Toteamis- ja määritysrajojen laskeminen perustuu tilastomatematiikkaan. Toteamisraja lasketaan kertomalla useiden "blank"-näytteiden konsentraatioiden keskihajonta kolmella, jolloin toteamisraja saadaan laskettua 95 % luottamusasteella. Kerroin kolme tulee t-jakaumasta, kun näytteet todetaan virheellisesti positiiviseksi todennäköisyydellä $\alpha = 0,05$. Tällöin positiiviseksi todettujen näytteiden kriittinen arvo olisi $1,65s$, jossa s on "blank"-näytteiden keskihajonta ja $1,65$ kerroin t-jakaumasta, kun otoksia on runsaasti. Kaikki tämän arvon ylittävät todettaisiin positiiviksi. [9, Liite B.]

Tällä perusteella kuitenkin virheellisesti negatiiviseksi näytteiksi todettujen määrä olisi todella suuri (50 %, jos näytteen konsentraatio olisi täsmälleen $1,65s$), joten arvoon on otettava huomioon myös nämä arvot. Virheellisesti negatiiviseksi todettujen näytteiden todennäköisyydeksi asetetaan sama kuin positiivisten, $\alpha = \beta = 0,05$, ja näin sen kriittiseksi arvoksi tulee sama $1,65s$. Kokonaiskertoimeksi tulee siis $1,65 + 1,65 = 3,30$ ja tämä pyöristyy toteamisrajan kertoimeksi 3 (Kuva 8). [9, Liite B.]



Kuva 8. Kuvaaja, jossa sininen käyrä kuvaa "blank"-näytteiden tulosten jakautumista, punainen käyrä näytteiden tulosten jakautumista, kun konsentraatio on toteamisrajan tasolla ja vihreä näytteiden tulosten jakautumista, kun konsentraatio on määrittäysrajan tasolla. Violetilla katkoviivalla on merkitty hahmotelma toteamisrajasta, jos käytettäisiin kerrointa 1,65. α kuvaa virheellisten positiivisten tulosten todennäköisyyttä ja β virheellisten negatiivisten tulosten todennäköisyyttä. Mikäli pienempää kerrointa käytettäisiin, olisi β jopa 50 %.

Määrittäysrajan kertoimena on yleensä 10, mutta myös 5 ja 6 on usein käytetty. Mitä suurempi kerroin on, sitä suurempi todennäköisyys on, että tuloksista saadaan virheellisiä negatiivisia tuloksia.

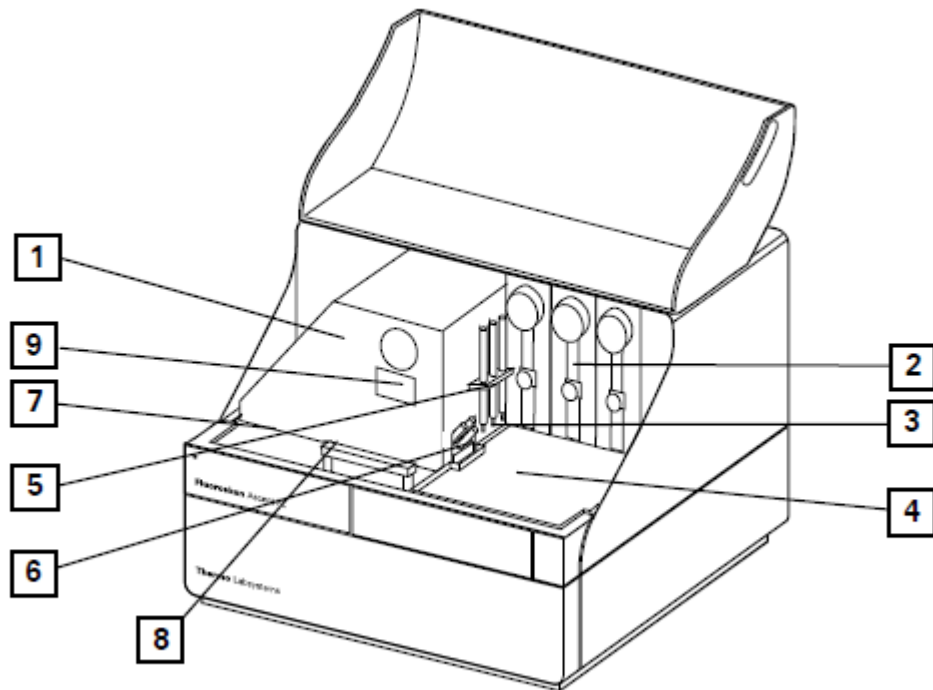
2.2 Laboratoriolaitteet

2.2.1 Fluoroskan ja Fluoroskan FL

Fluoroskan on fluorometri, jolla voidaan mitata fluoresenssia 1–384-kaivoisilta mikrokuoppalevyiltä (kuva 9). Fluoroskan FL-laitteella voidaan mitata fluoresenssin lisäksi myös luminesenssia. Laitteesta on myös versio, Luminoskan, jolla voidaan mitata vain luminesenssia.

Laitteen valonlähteenä toimii kvartsi-halogeeni-lamppu ja säteen halkaisijaa voidaan säätää joko 3 mm tai 1,5 mm paksuiseksi. Fluoroskan FL ei sisällä monokromaattoria, vaan valojen aallonpituuden säätely tapahtuu eksitaatio- ja emissiofilttereillä, jotka asetaaan omille filterikiekoille. Osa säteestä ohjataan puoliläpäisevän peilin avulla referenssidetektorille ja loput valosta menee valosuojan läpi näytteelle. Näytteen molekyylit

virittyvät ja lähettävät emissiosignaalia, joka ohjataan aiemmin mainitun peilin avulla emissiofilterin läpi detektorina toimivaan valomonistinputkeen. [4. s. 16.]



Kuva 9. Fluoroskanin etunäkymä, kun kansi on auki. Numeroidut kohdat ovat seuraavat: 1. laitteen optiikan valosuoja, 2. annostelupumppu, 3. annostelijapää, 4. roiskesuoja, 5. annostelijapäiden pidike, 6. tulppa annosteluaukoille, kun annostelijat eivät ole annostelu asennossa, 7. laitteen hallintapainikkeet, 8. sensori, joka havaitsee, onko kansi auki, 9. eksitaatiovähteen koon valitsin. [4, s. 15.]

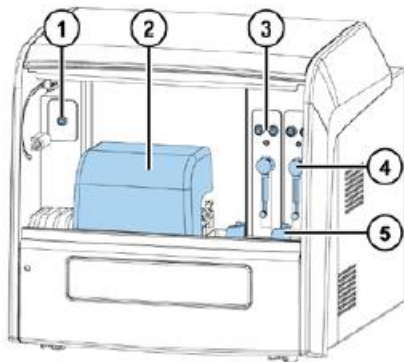
Yleensä laitteella mitataan näytettä mikrokuoppalevyn kaivojen päältä, mutta laitteen optiikan voi myös siirtää levyn alle. Tällöin näytteet voidaan mitata kaivojen pohjan kautta, jolloin kaivoissa tulee olla optisesti läpinäkyvät pohjat. Ala-optiikka soveltuu hyvin esimerkiksi solujen mittaamiseen, koska solut valuvat helposti kaivon pohjalle. Näin voidaan vähentää mahdollisia näytematriisin aiheuttamia häiriöitä. Laitteeseen on myös mahdollista asentaa maksimissaan kolme eri annostelijaa, joilla voidaan annostella tarkkoja määriä liuoksia näytteisiin laitteen sisällä. [4. s. 11 ja 17.]

2.2.2 Varioskan™ LUX

Varioskan™ LUX on mikrokuoppalevyille valmistettujen näytteiden analysointiin tarkoitettu laite, jossa on useita erilaisia mittaustekniikoita. Jokaisella laitteella on mahdollista

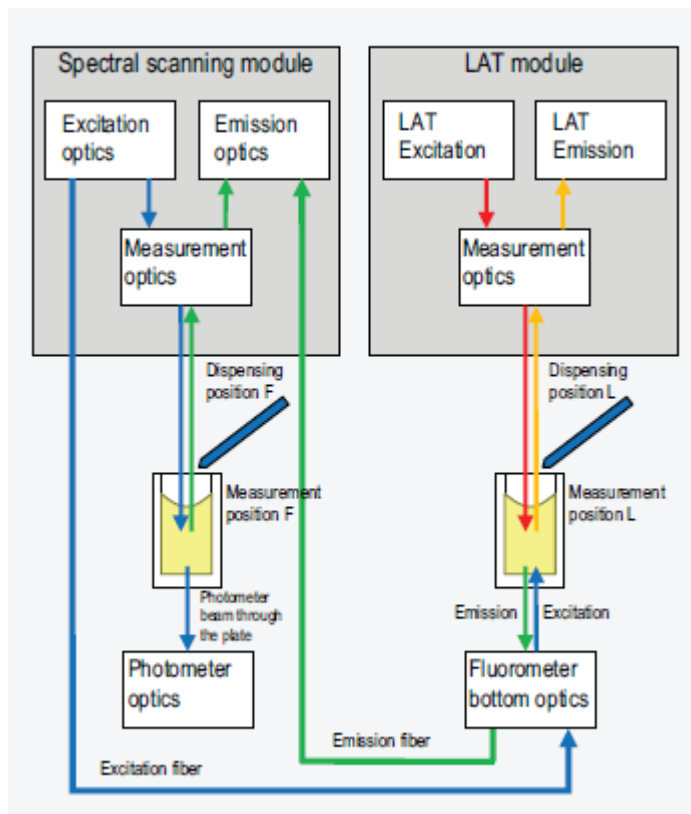
mitata absorbanssia ja fluoresenssia ja, riippuen laitteen lisäosista myös luminesenssia, aikaerotteista fluoresenssia (TRF) ja AlphaScreen-mittauksia.

LUX:iin on mahdollista asentaa maksimissaan kaksi annostelijaa (kuva 10), joilla voidaan annostella tarkkoja nestemääriä näytteeseen laitteen sisälle. Tämä mahdollistaa esimerkiksi luminesenssireaktion aloittamisen laitteen sisällä, jolloin reaktion kehittymistä voidaan seurata jo sen aloittamisen aikana.



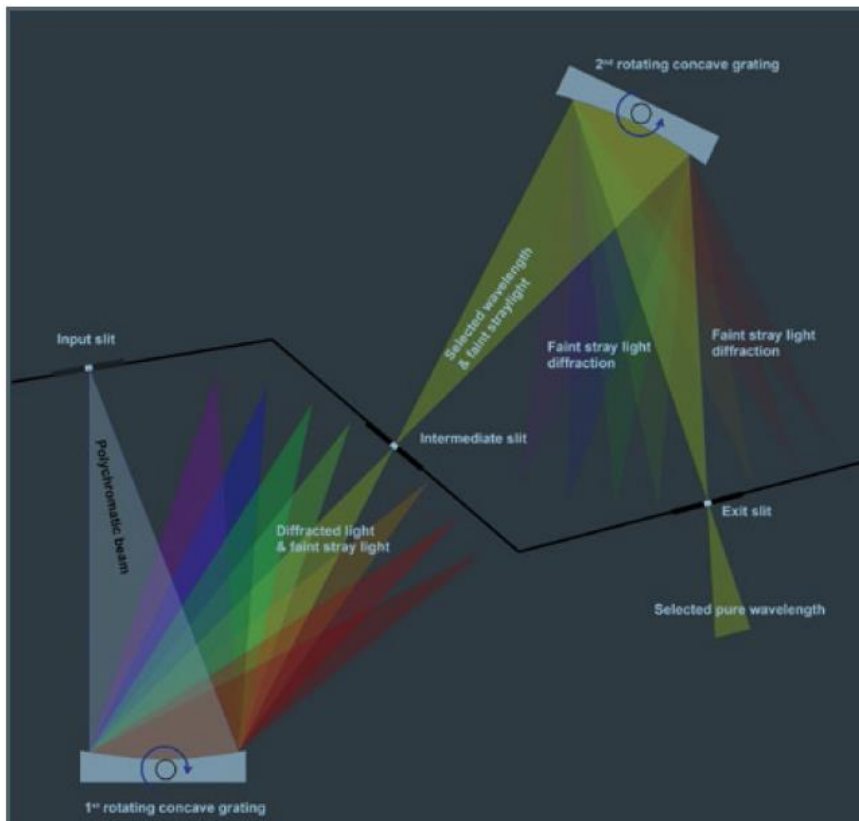
Kuva 10. Varioskan™ LUX-laitteen etunäkymä, kun liukuovi on auki. Kuvan laite on varustettu kahdella annostelijalla ja LAT-moduulilla. Numeroidut kohdat ovat seuraavat: 1. levyn kontrollointi painike, 2. LAT-moduuli, 3. annostelijoiden kontrollointipainikkeet, 4. annostelijat, 5. reagenssipullojen pidikkeet [5. s. 15.]

Laitteen optiikka jakautuu kahteen osioon. Toinen on jokaisessa laitteessa oleva sisäinen monokromaattoreilla toimiva osio, jolla mitataan fluorometrisia ja fotometrisia analyysejä. Toinen osio on LAT-moduuli, joka asennetaan tarvittaessa laitteeseen liukuoven taakse, annostelupumppujen viereen (kuva 4). LAT-moduulissa ei ole monokromaattoreita, vaan sen valon aallonpituuden säätely tapahtuu filtereillä, kuten Fluoroskan-laitteilla. Moduuli mahdollistaa luminesenssin, AlphaScreen-mittausten sekä TRF-mittauksen laitteella (Kuva 11). [5. s. 16.]



Kuva 11. Varioskan™ LUX-laitteen optiikan kaavakuva, kun LAT-moduuli on asennettu. [5. s. 16.]

Monokromaattoreita on sarjakytketty kaksi niin eksitaatio- kuin emissiopuolelle. Yhteensä monokromaattoreita on siis neljä, joilla pyritään puhdistamaan valosäde mahdollisimman selväksi. Voimakas valo ohjataan sisääntuloraon läpi ensimmäiselle monokromaattorille, jossa valo hajautuu eri aallonpituuksille. Kääntämällä ensimmäistä monokromaattoria, halutun aallonpituuden valo ohjataan väliraon läpi seuraavalle monokromaattorille, jolta se ohjataan samalla tavalla ulostuloraon läpi näytteelle. Ulostuloraon leveydellä voidaan myös säätää kaistan leveys joko 5 nm tai 12 nm paksuiseksi. Näin saadaan poistettua ei-toivottujen aallonpituuksien valo eli hajavallo mahdollisimman hyvin eksitaatio- tai emissiosäteestä. (Kuva 12) [5. s. 18, 19.]



Kuva 12. Kahden monokromaattorin sarjakytkennällä saadaan aikaan puhtas valosäde. Monokromaattorit on kytketty samalla tavalla niin eksitaatio- kuin emissiopuolellekin. [5. s. 18.]

Kuten Fluoroskan-laitteissa, myös LUX:issa detektorina toimii valomonistinputki. Valonlähteenä taas monokromaattori-puolella toimii ksenon purkaus lamppu ja LAT-moduulissa AlphaScreeniä varten LED-lamppu ja TRF-mittauksia varten ksenon purkaus lamppu. [5. s. 18, 21.]

2.2.3 Qubit® 3.0 Fluorometri

Qubit® 3.0 Fluorometri on pienikokoinen ja nopea yksittäisten näytteiden DNA-, RNA- ja proteiini-konsentraatioiden mittaukseen tarkoitettu laite. Yhden näytteen mittaaminen kestää alle 5 sekuntia. Se on suunniteltu käytettäväksi kittien kanssa ja vaatii fluoresoivan väriaineen lisäämisen näytteeseen. Siihen on ladattu esimerkiksi käytetyn kitin mittausohjelma valmiiksi ja käytettäessä oikeaa mittausohjelmaa, laite laskee näytteiden pitoisuudet laitteen sisään koodatun laskenta-algoritmin avulla. [8.]

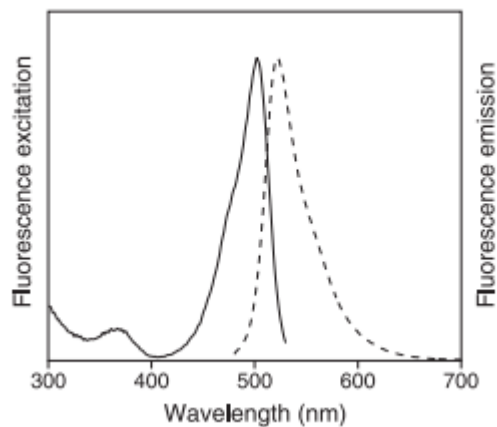
Valonlähteenä laitteessa toimii punainen ja sininen LED-lamppu, joiden maksimaallonpituudet ovat 470 nm ja 635 nm. Näytteeseen menevän valon aallonpituuden kontrollointiin käytetään filttäreitä, joita on laitteeseen asennettu kaksi paria. Eksitaatiofiltterei-

nä on sininen 430-495 nm ja punainen 600-645 nm filtit, ja emissiofilttereinä vihreä 510-580 nm ja punainen 665-720 nm filtit. Detektoreina toimii valodiodeja, joiden mitta-alue on 300-1000 nm. [8.]

2.3 Quant-iT™ dsDNA High sensitivity -kitti

Opinnäytetyössä käytetty Quant-iT™ dsDNA High Sensitivity -kitti on DNA-konsentraation määrittämiseen tarkoitettu analyysikitti, joka sisältää puskuriliuoksen, standardiliuokset sekä fluoresoivan värireagenssiliuoksen, johon kitin toiminta perustuu.

Värireagenssi on fluorokromi, joka fluoresoi tietyn aallonpituista valoa sitoutuessaan kaksijuosteiseen DNA-molekyylin. Eksitaatio- ja emissiomaksimit ovat 502 nm ja 523 nm (kuva 13). Kitti on tarkoitettu matalalle konsentraatioalueelle, sillä sen käyttöalueeksi ilmoitetaan 0,2-100 ng DNA:ta, eivätkä näytteessä olevat vapaat nukleotidit, RNA tai proteiinit häiritse mittausta. [11.]



Kuva 13. Kitin värireagenssin eksitaatio- ja emissiospektrit. Emissiospektri on merkitty katkoviivalla. [12.]

Koska kitti perustuu fluoresoivaan fluorokromiin, on se paljon herkempi ja spesifisempi kuin perinteiset fotometriset menetelmät, joilla usein analysoidaan DNA:ta. Yleisesti fluorometriset menetelmät ovat noin 1000 kertaa herkempiä kuin fotometriset menetelmät, mutta ne ovat myös herkempiä erilaisille analyysiä häiritseville tekijöille. [13.]

3 Työssä käytetyt välineet ja reagenssit

3.1 Reagenssit

Kaikki työhön tarvittavat reagenssit olivat Quant-iT dsDNA, high sensitivity -kittiin sisältyneet 250 ml puskuriliuos, 1,0 ml värireagenssiliuos sekä 0,5 ml jokaista standardiliuosta. Työssä käytetty kitti oli:

- Quant-iT™ dsDNA Assay Kit, High Sensitivity, 1000 assays, 0,2–100 ng, REF: Q33120, Lot: 1782381 ja 1802045
 - Kalibrintiliuokset: λ dsDNA 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 ja 10 ng/ μ l

3.2 Pipetit

Opinnäytetyössä käytettiin eri tilavuuksiin eri pipettejä. Pipetointiin pyrittiin valitsemaan aina optimaalisin pipetti siten, että pipetoitava tilavuus olisi pipetin pipetointialueen välissä. Työssä käytetyt pipetit olivat:

- Finnpiipette Novus 5-50 μ l, 8-kanavainen, SN: CH98194
- E1-ClipTip 0.5-12.5 μ l, yksikanavainen, SN: LH15100
- Finnpiipette F2 0.5-5 ml, yksikanavainen, SN: FJ12078
- Finnpiipette F2 20-200 μ l, yksikanavainen, SN: HH77837
- Finnpiipette Novus 100-1200 μ l, 8-kanavainen, SN: NA06445
- E1-ClipTip 2-125 μ l, yksikanavainen, SN: LH42041
- Finnpiipette F2 0.5-5 μ l, yksikanavainen, SN: GH27324
- Finnpiipette Novus 30-300 μ l, 8-kanavainen, SN: GH25432

3.3 Mikrokuoppalevyt ja laitteet

Optimaalinen mikrokuoppalevy kitille valittiin testaamalla mustia ja valkoisia 96-kaivoisia ja 384-kaivoisia levyjä. Qubit-laitteeseen käytettiin siihen sopivia Qubit-putkia. Työssä käytettiin seuraavia mikrokuoppalevyjä ja putkia:

- Nunc™ F96 MicroWell™ Black Polystyrene Plate, Cat: 237108, Lot: 067142
- Nunc™ 384-Well Polystyrene Black Microplate, Cat: 262260, Lot: 130204
- Nunc™ F96 MicroWell™ White Polystyrene Plate, Cat: 236180, Lot: 063554
- Nunc™ 384-Well Polystyrene White Microplate, Cat: 262360, Lot: 1105407
- Qubit® Assay Tubes, Cat: Q32856, Lot: 1784092

Työn suorittamiseen pyrittiin valitsemaan tutkittavia laitteita mahdollisimman monta, jotta pyrittiin varmistamaan tulosten luotettavuus. Varioskan LUX -laitteita oli mahdollista valita kolme, Fluoroskan ja Fluoroskan FL -laitteita aluksi kaksi ja myöhemmin kolme ja Qubit-fluorometrejä vain yksi. Varioskan LUX:eja ja Fluoroskaneja ohjattiin SkanIt -ohjelmalla. Mittauslaitteet olivat:

- Varioskan LUX
 - SN: LUX3020-Z033
 - SN: LUX3020-Z032
 - SN: LUX3020-Z023
- Fluoroskan ja Fluoroskan FL
 - Fluoroskan, SN: 374-90716
 - Fluoroskan FL, SN: 374-91232C

- Fluoroskan FL, SN: 374-91171C
- Qubit® 3.0 Fluorometer, SN: 2321603775

Lisäksi Fluoroskan ja Fluoroskan FL -laitteissa tarvittiin valon aallonpituuksien säätelyyn filtterikiekkkoja. Jokaisessa laitteessa käytettiin samanlaisia kiekkoja, joiden tiedot ovat seuraavat:

- Eksitaatiofilteri: Ex&Em 485 -14 nm, Standard wavelength, Default in Fluoroskan, cas: 1424852
- Emissiofilteri: Em 538 -25 nm for 4852/4302, Standard wavelength, Default in Fluoroskan, Cas: 1425382

4 Työn suoritus

4.1 Näytteiden mittaus

Työ aloitettiin valmistamalla kitin mukana tulleista värireagenssista ja puskurista 1:200 laimennos kitin käyttöohjeen mukaan. Huoneenlämpöistä puskuria pipetoitiin 35 ml ja reagenssia 175 µl muoviseen 50 ml sentrifugiputkeen. Tätä työliuosta pipetoitiin 20 µl käytettyihin kaivoihin mustalle ja valkoiselle 384-kaivoiselle mikrokuoppalevyille. Näihin kaivoihin pipetoitiin lisäksi 1 µl standardiliuoksia kuvan 14 mukaisesti. ”Blank”-näytteenä käytettiin työliuosta ja kaikista tehtiin kuusi rinnakkaista näytettä. Levyä sentrifugoitiin minuutin ajan 1500 rpm nopeudella ja aloitettiin mittaukset LUX laitteilla.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank1 Group 1	Blank2 Group 2	Std0002 0.5 ng/ μ Group 2	Std0003 1 ng/ μ Group 2	Std0004 2 ng/ μ Group 2	Std0005 4 ng/ μ Group 2	Std0006 6 ng/ μ Group 2	Std0007 8 ng/ μ Group 2	Std0008 10 ng/ μ Group 2			
B												
C	Blank1 Group 1	Blank2 Group 2	Std0002 0.5 ng/ μ Group 2	Std0003 1 ng/ μ Group 2	Std0004 2 ng/ μ Group 2	Std0005 4 ng/ μ Group 2	Std0006 6 ng/ μ Group 2	Std0007 8 ng/ μ Group 2	Std0008 10 ng/ μ Group 2			
D												
E	Blank1 Group 1	Blank2 Group 2	Std0002 0.5 ng/ μ Group 2	Std0003 1 ng/ μ Group 2	Std0004 2 ng/ μ Group 2	Std0005 4 ng/ μ Group 2	Std0006 6 ng/ μ Group 2	Std0007 8 ng/ μ Group 2	Std0008 10 ng/ μ Group 2			
F												
G	Blank1 Group 1	Blank2 Group 2	Std0002 0.5 ng/ μ Group 2	Std0003 1 ng/ μ Group 2	Std0004 2 ng/ μ Group 2	Std0005 4 ng/ μ Group 2	Std0006 6 ng/ μ Group 2	Std0007 8 ng/ μ Group 2	Std0008 10 ng/ μ Group 2			
H												
I	Blank1 Group 1	Blank2 Group 2	Std0002 0.5 ng/ μ Group 2	Std0003 1 ng/ μ Group 2	Std0004 2 ng/ μ Group 2	Std0005 4 ng/ μ Group 2	Std0006 6 ng/ μ Group 2	Std0007 8 ng/ μ Group 2	Std0008 10 ng/ μ Group 2			
J												
K	Blank1 Group 1	Blank2 Group 2	Std0002 0.5 ng/ μ Group 2	Std0003 1 ng/ μ Group 2	Std0004 2 ng/ μ Group 2	Std0005 4 ng/ μ Group 2	Std0006 6 ng/ μ Group 2	Std0007 8 ng/ μ Group 2	Std0008 10 ng/ μ Group 2			
L												

Kuva 14. Näytteiden asettelu 384-kaivoiselle levyille. Kuvasta pois jäävät kaivot ovat tyhjiä.

96-kaivoisille levyille työliuosta pipetoitiin 200 μ l ja standardiliuoksia 10 μ l kuvan 15 mukaisesti. Myös nämä tehtiin valkoiselle ja mustalle levyille.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank1 Group 1	Std1 0 ng/ml Group 1	Std2 0.5 ng/ml Group 1	Std3 1 ng/ml Group 1	Std4 2 ng/ml Group 1	Std5 4 ng/ml Group 1	Std6 6 ng/ml Group 1	Std7 8 ng/ml Group 1	Std8 10 ng/ml Group 1			
B	Blank1 Group 1	Std1 0 ng/ml Group 1	Std2 0.5 ng/ml Group 1	Std3 1 ng/ml Group 1	Std4 2 ng/ml Group 1	Std5 4 ng/ml Group 1	Std6 6 ng/ml Group 1	Std7 8 ng/ml Group 1	Std8 10 ng/ml Group 1			
C	Blank1 Group 1	Std1 0 ng/ml Group 1	Std2 0.5 ng/ml Group 1	Std3 1 ng/ml Group 1	Std4 2 ng/ml Group 1	Std5 4 ng/ml Group 1	Std6 6 ng/ml Group 1	Std7 8 ng/ml Group 1	Std8 10 ng/ml Group 1			
D	Blank1 Group 1	Std1 0 ng/ml Group 1	Std2 0.5 ng/ml Group 1	Std3 1 ng/ml Group 1	Std4 2 ng/ml Group 1	Std5 4 ng/ml Group 1	Std6 6 ng/ml Group 1	Std7 8 ng/ml Group 1	Std8 10 ng/ml Group 1			
E	Blank1 Group 1	Std1 0 ng/ml Group 1	Std2 0.5 ng/ml Group 1	Std3 1 ng/ml Group 1	Std4 2 ng/ml Group 1	Std5 4 ng/ml Group 1	Std6 6 ng/ml Group 1	Std7 8 ng/ml Group 1	Std8 10 ng/ml Group 1			
F	Blank1 Group 1	Std1 0 ng/ml Group 1	Std2 0.5 ng/ml Group 1	Std3 1 ng/ml Group 1	Std4 2 ng/ml Group 1	Std5 4 ng/ml Group 1	Std6 6 ng/ml Group 1	Std7 8 ng/ml Group 1	Std8 10 ng/ml Group 1			
G												
H												

Kuva 15. Näytteiden asettelu 96-kaivoiselle levyille.

Kaikki levyt mitattiin kaikilla LUX- ja Fluoroskan-laitteilla peräkkäin mahdollisimman nopeasti. Kun levyt odottivat laitteen vapautumista, ne suojattiin valolta foliolla. Ajo-ohjelmassa levy vietiin ensin laitteen sisään, jossa se sitä inkuboitiin pimeässä kaksi minuuttia. Inkuboinnin jälkeen jokaisesta kaivosta mitattiin yksitellen fluoresenssisignaali. LUX-laitteella emissio- ja eksitaatioaallonpituudet säädettiin monokromaattorilla 485 nm ja 530 nm ja Fluoroskan-laitteilla käytettiin eksitaatiofiltherinä 485 nm filtheriä ja emissiofiltherinä 538 nm filtheriä. Yhden näytteen mittausaikana oli 100 ms.

Qubit-laitteelle näytteet valmistettiin samasta työliuksesta ja standardiliuksista. Jokaisesta näytteestä tehtiin neljä rinnakkaista pipetoimalla Qubit-putkeen 200 µl työliusta ja 10 µl standardiliusta. Näytteitä vorteksoitiin ennen mittauksia kaksi-kolme sekuntia. Laite sisältää valmiin mittausohjelman, jossa se kalibroitiin pienimmällä (0 ng/µl) ja suurimmalla (10 ng/µl) standardilla. Koska ohjelmaan ei voida lisätä kalibroitipisteitä tai rinnakkaisnäytteitä, mitattiin kaikki standardinäytteet normaaleina näytteinä ja näiden signaaleista piirrettiin kalibroitisuora Excel-ohjelmalla jälkikäteen.

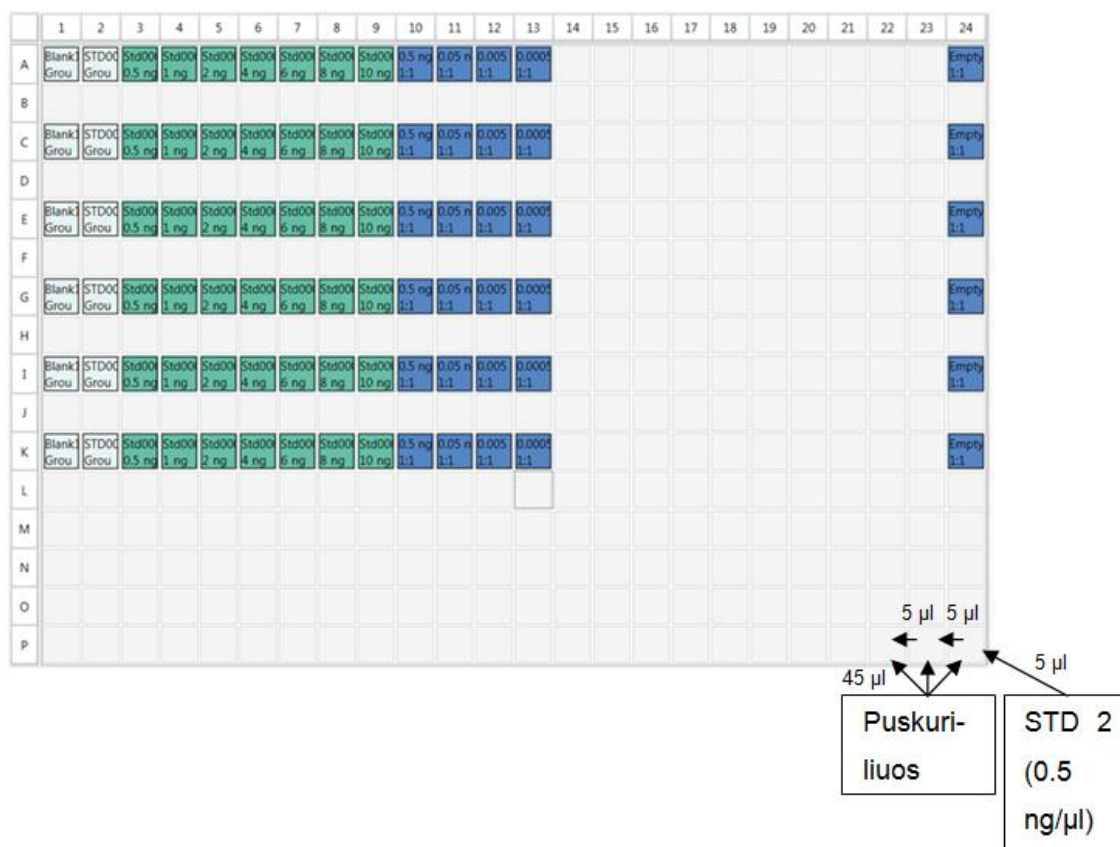
Koska etenkin mustan levyn toteamis- ja määritysrajat olivat erittäin pieniä, päätettiin niiden paikkansa pitävyys testata saantokokeilla. Lisäksi Fluoroskan-laitteita saatiin kolmas kappale, jolla voitiin parantaa tulosten luotettavuutta. Saantokokeiden näytteet tehtiin laimentamalla pienintä standardiliusta, joka sisälsi DNA:ta (0,5 ng/µl).

96-kaivoisille mustalle ja valkoiselle levyille pipetoitiin 200 µl työliusta jokaiseen mittauksissa käytettyyn kaivoon. Standardiliuksia ja näyteliuksia pipetoitiin kaivoihin 10 µl ja jokaisesta näytteestä tehtiin jälleen kuusi rinnakkaisnäytettä. Saantokoe näytteet laimennettiin puskuriliuksella. (Kuva 16)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank1 Group 1	Std0001 Group 2	Std0002 5 ng Group 1, Group 2	Std0003 10 ng Group 1, Group 2	Std0004 20 ng Group 1, Group 2	Std0005 40 ng Group 1, Group 2	Std0006 80 ng Group 1, Group 2	Std0007 80 ng Group 1, Group 2	Std0008 100 ng Group 1, Group 2	Sample 5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.05 ng 1:1 Group 1, Group 2
B	Blank1 Group 1	Std0001 Group 2	Std0002 5 ng Group 1, Group 2	Std0003 10 ng Group 1, Group 2	Std0004 20 ng Group 1, Group 2	Std0005 40 ng Group 1, Group 2	Std0006 80 ng Group 1, Group 2	Std0007 80 ng Group 1, Group 2	Std0008 100 ng Group 1, Group 2	Sample 5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.05 ng 1:1 Group 1, Group 2
C	Blank1 Group 1	Std0001 Group 2	Std0002 5 ng Group 1, Group 2	Std0003 10 ng Group 1, Group 2	Std0004 20 ng Group 1, Group 2	Std0005 40 ng Group 1, Group 2	Std0006 80 ng Group 1, Group 2	Std0007 80 ng Group 1, Group 2	Std0008 100 ng Group 1, Group 2	Sample 5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.05 ng 1:1 Group 1, Group 2
D	Blank1 Group 1	Std0001 Group 2	Std0002 5 ng Group 1, Group 2	Std0003 10 ng Group 1, Group 2	Std0004 20 ng Group 1, Group 2	Std0005 40 ng Group 1, Group 2	Std0006 80 ng Group 1, Group 2	Std0007 80 ng Group 1, Group 2	Std0008 100 ng Group 1, Group 2	Sample 5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.05 ng 1:1 Group 1, Group 2
E	Blank1 Group 1	Std0001 Group 2	Std0002 5 ng Group 1, Group 2	Std0003 10 ng Group 1, Group 2	Std0004 20 ng Group 1, Group 2	Std0005 40 ng Group 1, Group 2	Std0006 80 ng Group 1, Group 2	Std0007 80 ng Group 1, Group 2	Std0008 100 ng Group 1, Group 2	Sample 5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.05 ng 1:1 Group 1, Group 2
F	Blank1 Group 1	Std0001 Group 2	Std0002 5 ng Group 1, Group 2	Std0003 10 ng Group 1, Group 2	Std0004 20 ng Group 1, Group 2	Std0005 40 ng Group 1, Group 2	Std0006 80 ng Group 1, Group 2	Std0007 80 ng Group 1, Group 2	Std0008 100 ng Group 1, Group 2	Sample 5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.5 ng 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.05 ng 1:1 Group 1, Group 2
G							Empty Well 1:1 Group 1, Group 2	Empty Well 1:1 Group 1, Group 2	Empty Well 1:1 Group 1, Group 2	Empty Well 1:1 Group 1, Group 2	Empty Well 1:1 Group 1, Group 2	Empty Well 1:1 Group 1, Group 2
H	Sample 0.005 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.005 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.005 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.005 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.005 1:1 Group 1, Group 2	Sample 0.005 1:1 Group 1, Group 2						

Kuva 16. Saantokoenäytteiden laimentaminen ja näytteiden asettelu 96-kaivoisille mikrokuop-palevyille.

384-kaivoisille levyille työliuosta pipetoitiin 20 µl mustalle ja valkoiselle levyille jokaiseen mittauksissa käytettyyn kaivoon. Standardi- ja saantokoenäytteiden pipetointitilavuus oli 1 µl. Kaikista näytteistä tehtiin 6 rinnakkaisnäytettä ja saantokoenäytteet laimennettiin puskuriliuokseen levyllä kuvan 17 mukaisesti. Mittaukset suoritettiin vuoron perään heti levyn sentrifugoinnin jälkeen samanlaisilla ohjelmilla kuin aiemmin.



Kuva 17. Saantokoenäytteiden laimentaminen ja näytteiden asettelu 384-kaivoisille mikrokuopalevyille.

Qubit-laitteelle tehtiin myös saantokoenäytteet, joita varten myös standardiliuokset tehtiin uudestaan. Rinnakkaisia näytteitä tehtiin tällä kertaa vain kaksi ja ne mitattiin samalla tavalla kuin aiemmat näytteet. LOD- ja LOQ-arvot laskettiin ensimmäisistä standardinäytteistä, koska silloin käytettiin enemmän toistoja.

4.2 Spektrien mittaus

Jokaisesta levystä mitattiin eksitaatio- ja emissiospektrit, joilla voitiin arvioida, onko mittauksissa käytetyt eksitaatio- ja emissioaallonpituudet oikein valittu ja onko tarvittaessa mahdollista nostaa signaalin tasoa vaihtamalla aallonpituutta. Spektrit mitattiin kaikille levyille mittausohjelmalla, jossa levyä inkuboitiin laitteen sisällä pimeässä kaksi minuuttia.

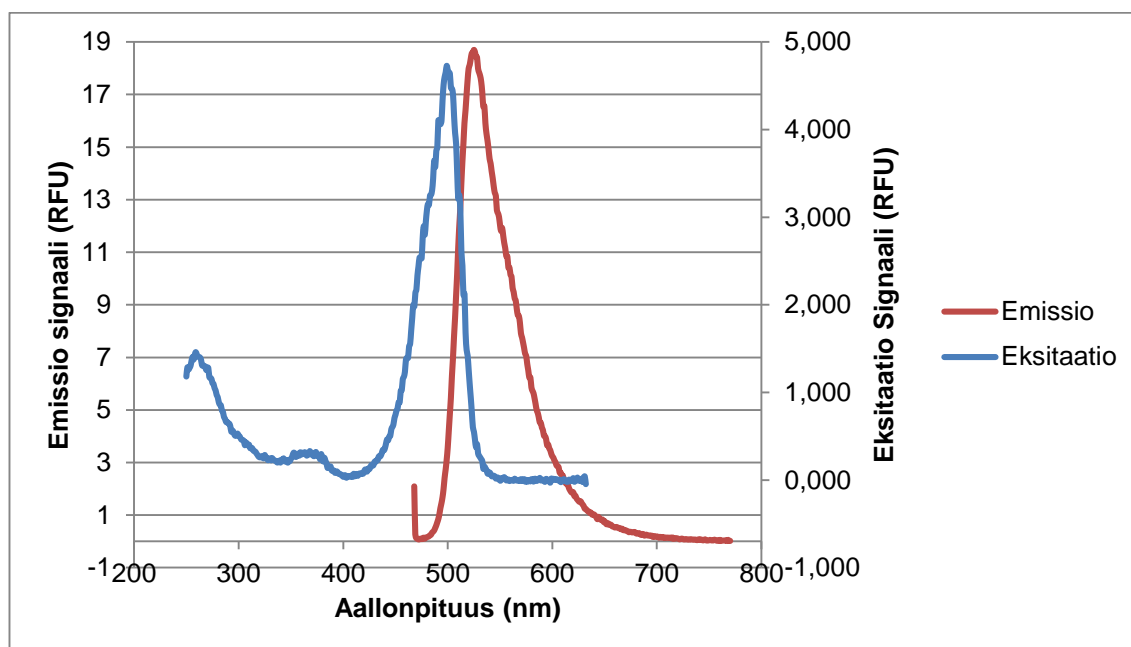
Eksitaatiospektri mitattiin LUX-laitteella pitämällä emissioaallonpituus vakiona 530 nm. Eksitaation aallonpituutta vaihdettiin 1 nm välein aloittaen 250 nm:stä ja päätyen 632 nm:iin. Emissiospektrin mittaamisessa taas eksitaatioaallonpituus pidettiin vakiona 485

nm ja emissioaallonpituutta vaihdettiin 1 nm välein aloittaen 505 nm:stä ja päättyen 700 nm:iin.

5 Tulokset ja niiden käsittely

5.1 Spektrit

Kaikilta neljältä erilaiselta levyiltä mitattiin eksitaatio- ja emissiospektrit. Spektrit olivat kaikilla levyillä samankaltaiset, mutta valkoisilla levyillä signaalien intensiteetti oli suurempaa, kuten muissakin tuloksissa. Maksimieksitaatio saavutetaan 501 nm kohdalla ja maksimiemissio 526 nm kohdalla. (Kuva 18)



Kuva 18. Eksitaatio- ja emissiospektrit mitattuna vahvimman standardiliuksen rinnakkaisnäytteiden keskiarvoista. Kuvan spektrit on mitattu mustalta 94-kaivoiselta levyiltä.

Mitattu eksitaatiomaksimi on hyvin lähellä kitissä ilmoitettua maksimia (502 nm). Emissiomaksimi on hieman ilmoitettua arvoa (523 nm) korkeampi mitatuissa arvoissa. Varioskan LUX:n aallonpituuden tarkkuudeksi ilmoitetaan eksitaatiossa ± 2 nm ja emissiossa ± 3 nm, ja mitatut arvot menevät näiden rajojen sisään. Mittausaallonpituuksina ei kuitenkaan käytetty eksitaatio- ja emissiomaksimeja, koska ne ovat niin lähekkäin, että vaarana on mitata laitteen näytteeseen lähettämää eksitaatiovaloa. Mittausaallonpituuksiksi valittiin siksi kitissä ilmoitetut, kauempana toisistaan olevat aallonpituudet.

5.2 Grubbsin testi poikkeavuuksille

Tulosten laskenta aloitettiin ottamalla poikkeavat tulokset pois laskuista ja pyrittiin poistamaan käyttäjästä riippuvat virheet. Etenkin pipetoinnissa oli riskinä, että virheitä tapahtui, koska pipetointimäärät olivat pieniä ja nestemäisen DNA-näytteen ominaisuudet vaikeuttavat pipetointia.

Jokaisen levyn näytteille suoritettiin Grubbsin testit, jolla voitiin todeta poikkeavat tulokset 95 % luottamustasolla. Testissä lasketaan epäilylle poikkeavalle tulokselle arvo (G_{laskettu}), jota verrataan kriittiseen taulukko arvoon, ($G_{\text{kriittinen}}$) (kaava 1). Mikäli laskettu arvo ylittää kriittisen arvon, on tulos 95 % luottamusvälillä poikkeava. Testit suoritettiin kahden eri laitteen tuloksille ja ne tulokset, jotka olivat kummallakin laitteella poikkeavia, jätettiin pois laskuista. Muiden poikkeamien osalta tarkasteltiin yksitellen tuloksia ne jättää huomiotta. Laitteita olivat LUX 3020-Z032 ja Fluoroskan FL 374-91232C ja G-testit laskettiin Minitab-ohjelmalla.

$$G_{\text{laskettu}} = \frac{|\text{epäilty poikkeama} - \bar{x}|}{s} \quad (1)$$

Mustasta 384-kaivoisesta levystä havaittiin kolme yhteistä poikkeavaa tulosta, joista kaikki olivat saantokoenäytteistä (taulukko 1). Yhteisten poikkeamien lisäksi jätettiin toisen saantokoenäytteen viides toisto huomiotta, koska sen signaali oli jokaisella mitauksella alle "blank"-näytteiden signaalin. On siis syytä epäillä, että pipetointi on joko jäänyt välistä, tai tehty väärään kaivoon. Muita poikkeamia ei havaittu, vaikka esimerkiksi seitsemännen standardin ensimmäinen toisto onkin huomattavan paljon muiden signaalia alempana. Tämän arvon G_{laskettu} ei kuitenkaan ylittänyt $G_{\text{kriittistä}}$ millään laitteella. Virheelliset tulokset voivat johtua siitä, että 384-kaivoiseen levyyn standardia tai näytettä pipetoitiin vain 1 μl ja oli vaikea mustalta levyiltä havaita, menikö tippa kaivoon vai jäikö se kaivon reunalle.

Taulukko 1. Mustasta 384-kaivoisesta levystä G-testillä havaitut poikkeavat arvot LUX- ja Fluoroskan FL-laitteilla.

Poikkeamat (LUX)			Poikkeamat (Fluoroskan)			Yhteiset		Muut	
Näyte	Toisto	Signaali	Näyte	Toisto	Signaali	Näyte	Toisto	Näyte	Toisto
Blank	5	0,0688	STD1	6	0,0581	Saanto 1	1	Saanto 2	5
STD1	2	0,0281	Saanto 1	1	0,765	Saanto 3	5		
STD2	6	0,901	Saanto 3	5	0,0823	Saanto 4	1		
Saanto 1	1	3,727	Saanto 4	1	0,0560				
Saanto 3	5	0,171							
Saanto 4	1	0,0681							

Jo pipetoinnin aikana huomattiin, että pipetoitaessa valkoiseen 384-kaivoisen levyyn 7. standardiliuosta, pipetoitiin kaksi ensimmäistä rinnakkaista laimeampien standardien joukkoon. Nämä kaksi laimeaa kaivoa voitiin ottaa laskuista pois ilman testejä. Näiden lisäksi todettiin kaksi yhteistä poikkeamaa ja kolme muuta arvoa (taulukko 2), jotka todettiin poikkeavaksi. Näiden näytteiden G_{laskettu} ylitti $G_{\text{kriittisen}}$ suurimmilla osilla laitteista.

Taulukko 2. Valkoisesta 384-kaivoisesta levystä havaitut poikkeamat

Poikkeamat (LUX)			Poikkeamat (Fluoroskan)			Yhteiset		Muut	
Näyte	Toisto	Signaali	Näyte	Toisto	Signaali	Näyte	Toisto	Näyte	Toisto
Blank	1	54,04	Blank	1	50,98	Blank	1	STD7	1
STD2	3	73,08	STD2	3	64,38	STD2	3	STD5	6
STD6	6	492,20	Saanto 2	6	51,61			STD6	1 ja 2
STD8	1	575,30	Saanto 4	5	54,34			STD8	1

Mustassa 96-kaivoisessa levyssä ei G-testien perusteella ollut yhtään yhtenäistä poikkeamaa (taulukko 3), eikä muitakaan merkittäviä poikkeamia havaittu. Jo pipetoitaessa huomattiin, että 96-kaivoisiin levyihin pipetointi oli helpompaa suurempien kaivojen ja suurempien tilavuuksien takia. Myös tulokset tukevat tätä.

Taulukko 3. Mustasta 96-kaivoisesta levystä ei havaittu G-testin perusteella laitteiden välillä yhteisiä poikkeavia tuloksia.

Poikkeamat (LUX)			Poikkeamat (Fluoroskan)			Yhteiset		Muut	
Näyte	Toisto	Signaali	Näyte	Toisto	Signaali	Näyte	Toisto	Näyte	Toisto
STD1	1	0,10	STD1	2	0,07245	-	-	-	-
			STD3	1	2,348				

Myös valkoisessa 96-kaivoisessa levyssä oli vain vähän poikkeamia (taulukko 4) verrattuna 384-kaivoisiin levyihin. Yhteisen poikkeaman lisäksi ei havaittu muita poikkeavia arvoja.

Taulukko 4. Valkoisen 96-kaivoisen levyn poikkeamat, joista yksi oli yhteinen.

Poikkeamat (LUX)			Poikkeamat (Fluoroskan)			Yhteiset		Muut	
Näyte	Toisto	Signaali	Näyte	Toisto	Signaali	Näyte	Toisto	Näyte	Toisto
STD1	4	20,32	STD1	4	16,13	STD1	4	-	-
Saanto 3	5	11,04							

Vaikka ensimmäisen Qubit-mittausten tuloksissa olikin melko suurta hajontaa, ei G-testin perusteella yksikään tulos ollut poikkeava. Yhtään tulosta ei siis jätetty huomiotta, kun LOD- ja LOQ-arvoja laskettiin Qubit-laitteelle. Koska saantokoemittauksissa käytettiin vain kahta rinnakkaista näytettä, ei G-testiä näille tuloksille voitu tehdä.

5.3 "Blank"-näytteiden tarkastelu

Tuloksista huomattiin, että "blank"-näytteen ja ensimmäisen standardiliuoksen mittaus-tulokset olivat lähes samalla tasolla. T-testin valintaa varten, tuloksista tehtiin F-testi, jotta havaitaan poikkeavatko niiden varianssit toisistaan (Taulukko 5).

Taulukko 5. Fluoroskan FL-laitteella mitatuista käsittelemättömistä tuloksista laskettiin F-testillä ovatko tulosten varianssit yhtä suuret. Tämän tuloksen perusteella valittiin t-testi.

Näyte	Blank 1	STD 1
1	0.03818	0.03800
2	0.03811	0.03720
3	0.03836	0.03726
4	0.03774	0.03780
5	0.03724	0.03768
6	0.03671	0.03794

F-Test Two-Sample for Variances

	Variable 1	Variable 2
Mean	0.037723333	0.037647
Variance	4.04827E-07	1.17E-07
Observations	6	6
df	5	5
F	3.462819343	
P(F<=f) one-tail	0.099512052	
F Critical one-tail	5.050329058	

Koska $F=2.08 < F \text{ Critical}=5.05$, varianssit ovat yhtä suuret 95 % luottamustasolla

Kun varianssit oli todettu yhtä suuriksi, suoritettiin näytteiden välillä kaksisuuntainen t-testi olettaen varianssit yhtä suuriksi (taulukko 6). Testin avulla saatiin selville, voidaanko myös näytteiden keskiarvojen olettaa olevan yhtä suuret.

Taulukko 6. T-testi, jolla voitiin todeta, että tilastollista eroa "blank"-näytteen ja kitin nollanäytteen välillä ei ole.

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	0.037723333	0.037647
Variance	4.04827E-07	1.17E-07
Observations	6	6
Pooled Variance	2.60867E-07	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	10	
t Stat	0.25999076	
P(T<=t) one-tail	0.400072765	
t Critical one-tail	1.812461102	
P(T<=t) two-tail	0.80014553	
t Critical two-tail	2.228138842	

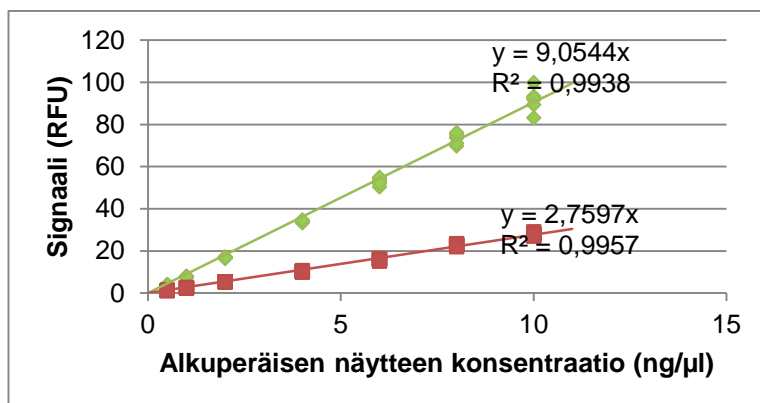
Koska $t \text{ Stat} = 0.26 < t \text{ Critical two-tail} = 2.23$, tuloksilla ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa luottamustasolla 95 %.

Tuloksista huomattiin, että "blank"-näytteenä käytetyn reagenssin ja ensimmäisen standardiliuksen (0 ng/μl) keskiarvojen tai varianssien välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa. Molempia näytteitä voitiin siis käyttää "blank"-näytteinä laskuissa ja näin saatiin useampi toisto, joka lisäsi tulosten luotettavuutta.

5.4 Kalibroitaisuurien tarkastelu

Kalibroitaisuurat pakotettiin kulkemaan origon kautta, koska tämä tarkensi etenkin laimeiden saantokoenäytteiden tuloksia merkittävästi (kuvat 19 ja 20). Koska kaikista näytteistä tehtiin taustan vähennys, eli vähennettiin "blank"-näytteiden keskiarvo, voitiin olettaa että, kun konsentraatio oli 0, oli myös signaali 0. Suoran pakottaminen origon kautta oli myös kitin käyttöohjeessa neuvottu tekemään, mikäli pieniä pitoisuuksia käsiteltäisiin. Esimerkiksi mustalla 96-kaivoisella levyllä ja Fluoroskanilla mitattuna 0,050 ng/μl saantokoenäytteiden tulos oli origon kautta kulkevan suoran avulla laskettuna 0,047 ng/μl. Jos suoraa ei olisi pakotettu kulkemaan origon kautta, olisi tulos ollut 0,167 ng/μl.

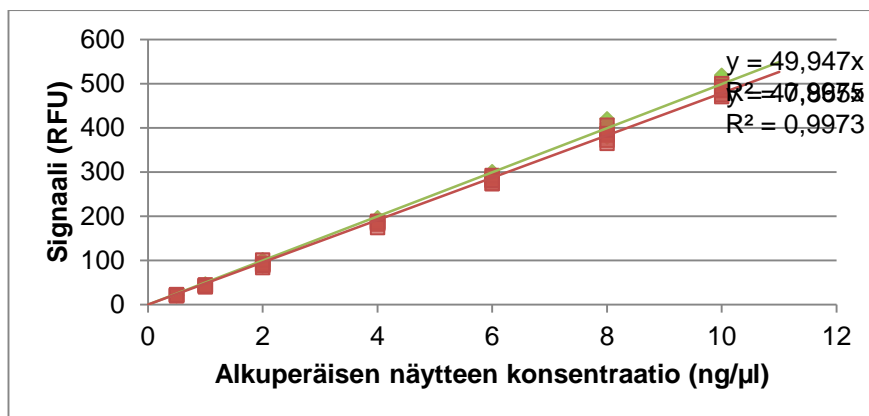
Mustilla levyillä mitattujen suorien kulmakertoimet olivat pieniä, joten pieni muutos näytteen konsentraatiossa vaikuttaa vain vähän signaalin intensiteettiin. Signaalien perustaso oli myös mustilla levyillä paljon pienempää. Rinnakkaisten standardinäytteiden suhteellinen keskihajonta ei muuttunut merkittävästi levyn väristä riippuen vaan enemmän merkitystä näytti olevan laitteella. Esimerkiksi LUX 3020-Z032 -laitteella mustan 96-kaivoisen levyn standardinäytteiden suhteelliset keskihajonnat näyttävät olevan valkoisen levyn vastaavia isompia, kun taas Fluoroskan FL – 232C -laitteella mitattuna ne ovat toisinpäin.



Kuva 19. Mustan 96-kaivoisen levyn standardisuora mitattuna Varioskan LUX -laitteella (vihreä suora) ja Fluoroskan FL (punainen suora) -laitteella.

Varioskan LUX:lla mitatun kalibrointisuoran kulmakerroin on huomattavan paljon Fluoroskanilla mitattua suurempi. Tämä ei kuitenkaan toistu valkoisilla levyillä. Täysin suoraan näitä arvoja ei kuitenkaan voi verrata, koska eri laitteita ei voida suhteellisten signaaliarvojen takia verrata.

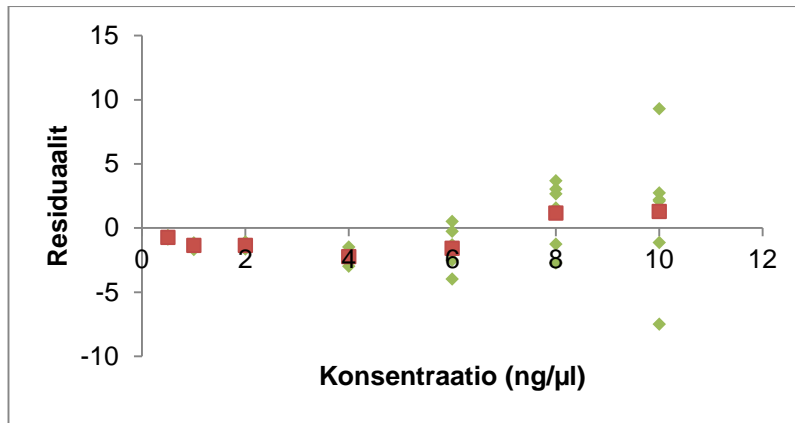
Kun valkoisella levyllä mitattua (kuva 20) ja mustalla levyllä mitattua (kuva 19) kalibrointisuoraa vertaa keskenään huomaa selvästi, kuinka signaalitaso on valkoisella levyllä reilusti suurempaa. Etenkin mustan levyn vahvimman standardin pisteistä voidaan havaita kuinka eri laitteilla mitattuna voi keskihajonta rinnakkaisnäytteiden välillä vaihdella laitteesta riippuen paljon.



Kuva 20. Valkoisen 96-kaivoisen levyn standardisuora mitattuna Varioskan LUX -laitteella (vihreä suora) ja Fluoroskan FL -laitteella (punainen suora).

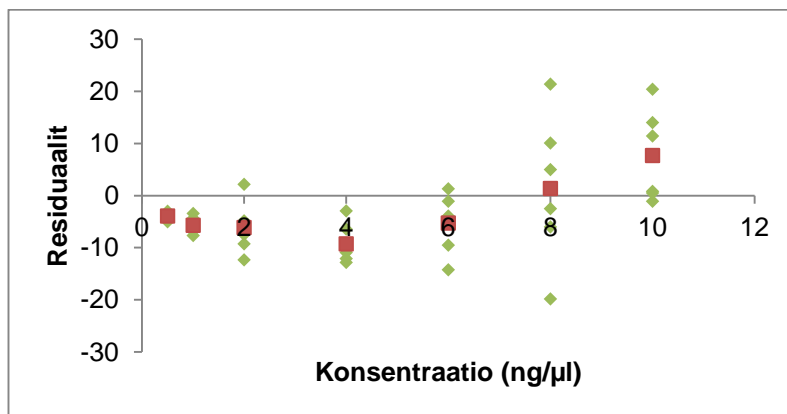
Suorien lineaarisuutta tutkittiin regressioanalyysillä, jonka avulla kalibrintisuoran pisteistä laskettiin residuaalit ja tarkasteltiin niiden jakautumista. Linearisessa suorassa suoran pisteiden residuaalien tulisi sijoittua tasaisesti nollan molemmin puolin ilman kaavamaisista jakaumaa. Kummankin värisellä levyllä mitatuille näytteille tehtiin regressioanalyysi yhdestä kalibrintisuorasta. Suorina käytettiin kuvissa 19 ja 20 näkyviä vihreitä, Varioskan LUX -laitteella mitattuja suoria.

Mustalla levyllä kalibrintisuoran pisteiden residuaalit ovat aluksi hieman nollan alapuolella, mutta lopulta nousevat nollan yläpuolelle (kuva 21). Tämä on seurausta siitä, että suora pakotettiin kulkemaan origon kautta. Ilman pakottamista suora olisi kulkenut hieman origon alapuolelta, joten nyt leikkauspisteen paikkaa on nostettu. Tällöin etenkin origoa lähellä olevat pisteet jäävät suoran alapuolelle. Tämän lisäksi pisteissä on havaittavissa pientä kaartavuutta, mikä viittaa epälinearisuuteen.



Kuva 21. Mustalla 96-kaivoisella levyllä mitattujen näytteiden residuaalit. Kuvaajaan on merkitty vihreillä pisteillä yksittäisten näytteiden sijoittuminen kalibrointisuoraan nähden ja punaisella näiden näytteiden keskiarvo.

Valkoisen levyn residuaaleissa (kuva 22) on havaittavissa samoja piirteitä, kun mustalakin levyllä. Lisäksi pisteet ovat valkoisella levyllä hajaantuneet reilusti mustaa levyä kauemmas suorasta, mutta suhteelliset keskihajonnat pisteillä on kuitenkin samaa tasoa.



Kuva 22. Valkoisella 96-kaivoisella levyllä mitattujen näytteiden residuaalit. Kuvaajaan on merkitty vihreillä pisteillä yksittäisten näytteiden sijoittuminen kalibrointisuoraan nähden ja punaisella näiden näytteiden keskiarvo.

5.5 Toteamis- ja määrittäysrajat

Ensimmäisten testien tulosten perusteella joidenkin levy- ja laiteyhdistelmien toteamis- ja määrittäysrajat olivat erittäin pieniä (taulukko 7). Lisäksi hajonta eri laitteiden välillä oli erittäin suurta. Näiden tulosten jälkeen päätettiin, että lisätään levyille myös saantoko-

keet ja otetaan mittauksiin mukaan kolmas Fluoroskan-laite, jotta voitiin varmistaa tulosten oikeellisuus.

Taulukko 7. Esimerkki ensimmäisten mittausten toteamis- ja määrittämissuojan laskemisesta. Mittauslevynä oli musta 96-kaivoinen levy. Toteamis- ja määrittämissuoja olivat todella pieniä, ja hajonta eri laitteiden välillä oli suurta. Vaikka kyseessä onkin kaksi erilaista laitetta, on melkein 10-kertainen ero LOD-arvossa huomattava.

Fluoroskan 374-90716				Fluoroskan FL 374-91232C			
$y = 0.2617x - 0.00267$ $R^2: 0.999$ RFU				$y = 0.1577x - 0.01781$ $R^2: 0.999$ RFU			
Konsentraatio (ng)		Konsentraatio (ng)		Konsentraatio (ng)		Konsentraatio (ng)	
Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
0.0005	0.0004	0.0120	0.0115	-0.0007	-0.0002	0.1088	0.1118
0.0004	0.0004	0.0117	0.0085	-0.0007	0.0008	0.1087	0.1183
0.0006	0.0004	0.0126	0.0087	0.0003	-0.0003	0.1151	0.1108
0.0000	0.0002	0.0103	0.0108	0.0008	0.0001	0.1181	0.1136
-0.0005	0.0000	0.0083	0.0103	-0.0003	-0.0002	0.1108	0.1115
-0.0010	0.0003	0.0063	0.0113	0.0005	-0.0002	0.1162	0.1115
		Keskiarvo	0.0102			Keskiarvo	0.1129
		Keskihajonta	0.0019			Keskihajonta	0.0033
		LOD (ng)	0.016			LOD (ng)	0.123
		LOQ (ng)	0.029			LOQ (ng)	0.146

Kaikista näytteistä poistettiin reagenssin aiheuttama taustasignaali laskemalla "Blank"-näytteiden signaalista keskiarvo, joka vähennettiin kaikkien näytteiden signaaleista. Lisäksi kaikki tuloksissa mainitut konsentraatiot ovat alkuperäisen laimentamattoman näytteen konsentraatioita. Koska kaikki näytteet laimenevat samassa suhteessa, ei ole tarvetta laskea kaivon sisäistä DNA-konsentraatiota.

Mittausten "blank"-näytteiden avulla laskettiin jokaiselle mittaukselle LOD- ja LOQ-arvot (taulukko 8). LOD- ja LOQ-arvoista laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat laitteittain ja verrattiin toisiinsa. Qubit-laitteita oli vain yksi käytössä, joten laitteiden välistä keskihajontaa ei voitu laskea sen tuloksista.

Taulukko 8. Esimerkkinä toteamis- ja määritysrajojen laskemisesta LUX 3020-Z023-laitteella ja mustalla 96-kaivoisella levyllä mitatut tulokset. Konsentraatiot on laskettu kalibrointisuoran yhtälön avulla.

LUX 3020-Z023					
y = 8.46455x			k= 8.46455		
Signaalit (RFU)			Konsentraatiot (ng/μl)		
Toisto	Blank	Blank	Toisto	Blank	Blank
1	-0.0024	0.0176	1	-0.0003	0.0021
2	-0.0054	-0.0029	2	-0.0006	-0.0003
3	0.0030	-0.0064	3	0.0004	-0.0008
4	-0.0021	-0.0066	4	-0.0002	-0.0008
5	0.0014	0.0002	5	0.0002	0.0000
6	0.0054	-0.0019	6	0.0006	-0.0002
				Average	0.0000
				SD	0.000785
				LOD (ng/μl)	0.0024
				LOQ (ng/μl)	0.0079

96-kaivoisella levyllä mitattuna pienimmät toteamis- ja määritysrajat olivat mittausten perusteella LUX-laitteella käyttäen mustaa levyä. Qubit-laitteella rajat olivat taas todella suuret mikrokuoppalevyihin verrattuna. Luotettavamman tuloksen saisi, jos laitteita olisi useampi ja voisi vertailla laitteiden välistä hajontaa. Keskihajonnat olivat jokaisella mikrokuoppalevykijalla ja levyllä suunnilleen samoja, joten kun keskiarvo on pienempi, on suhteellinen keskihajonta suurempi (Taulukko 9).

Taulukko 9. Toteamis- ja määrittäysrajat laitteittain erivärisille 96-kaivoisille levyille sekä Qubit-laitteelle. Qubit-laitteita oli vain yksi, joten keskihajontaa ei tälle voitu laskea. Fluoroskan- ja LUX-laitteet on numeroitu yhdestä kolmeen.

Toteamisraja					
Laite	LUX (Musta levy)	Fluoroskan (Musta levy)	LUX (Valkoinen levy)	Fluoroskan (Valkoinen levy)	Qubit
1	0,004	0,009	0,013	0,012	0,243
2	0,002	0,004	0,011	0,010	-
3	0,004	0,004	0,016	0,011	-
Keskiarvo LOD (ng/μl)	0,003	0,006	0,013	0,011	0,243
Keskihajonta LOD (ng/μl)	0,001	0,003	0,002	0,001	-
Määrittäysraja					
1	0,013	0,030	0,043	0,040	0,312
2	0,008	0,014	0,036	0,034	-
3	0,012	0,014	0,052	0,035	-
Keskiarvo LOQ (ng/μl)	0,011	0,019	0,043	0,036	0,312
Keskihajonta LOQ (ng/μl)	0,003	0,009	0,008	0,004	-

384-levyllä niin keskiarvot kuin keskihajonnatkin olivat 96-kaivoista levyä suurempia. LUX:lla mitatussa mustassa levyssä keskiarvo ja keskihajonta ovat melkein samat. Huomioitavaa kuitenkin on, että kaksi kolmesta mittauksesta antoi tulokseksi yhtä suurat rajat, toteamisrajan ollessa 0,004 ng/μl. Kolmas laite taas antoi tulokseksi 0,016 ng/μl, joka nosti keskihajontaa merkittävästi. Pienin keskiarvo mitattiin jälleen LUX:lla ja mustalla levyllä. 96-kaivoisella levyllä rajat olivat kuitenkin pienempiä. (Taulukko 10)

Taulukko 10. Toteamis- ja määritysrajat laitteittain erivärisille 384-kaivoisille levyille.

Toteamisrajat				
Laite	LUX (Musta levy)	Fluoroskan (Musta levy)	LUX (Valkoinen levy)	Fluoroskan (Valkoinen levy)
1	0,004	0,020	0,021	0,041
2	0,004	0,010	0,023	0,043
3	0,016	0,015	0,019	0,032
Keskiarvo LOD (ng/μl)	0,008	0,015	0,021	0,038
Keskihajonta LOD (ng/μl)	0,007	0,005	0,002	0,006
Määritysrajat				
1	0,012	0,067	0,071	0,135
2	0,012	0,034	0,077	0,142
3	0,053	0,050	0,064	0,105
Keskiarvo LOQ (ng/μl)	0,026	0,050	0,071	0,127
Keskihajonta LOQ (ng/μl)	0,024	0,017	0,007	0,019

5.6 Saantokokeet

Tulosten tueksi tehtiin jokaisella laitteella ja levyllä saantokokeita laimentamalla 0,5 ng/μl standardiliuosta. Saantokoenäytteiden tuloksista laskettiin saantoprosentti (kaava 2, taulukko 11) ja saantoprosenteista laskettiin keskiarvo ja keskihajonta samanlaisilla laitteilla ja levyillä mitatuiden tulosten välillä.

$$Saanto\% = \frac{c_{mitattu}}{c_{teoreettinen}} \times 100\% \quad (2)$$

Taulukko 11. Esimerkki saantoprosenttien laskemisesta mustalta 96-kaivoiselta levyltä mitattuna LUX:illa.

Kalibroitaisuoran avulla laskettu konsentraatio (ng/μl)				
Toisto	0,5 ng/μl	0,05 ng/μl	0,005 ng/μl	0,0005 ng/μl
1	0,4256	0,0435	0,0041	< Min
2	0,4568	0,0439	0,0036	< Min
3	0,4339	0,0409	0,0042	< Min
4	0,4575	0,0420	0,0039	< Min
5	0,4629	0,0445	0,0049	< Min
6	0,4480	0,0455	0,0045	< Min
Saanto%				
Toisto	0,5 ng/μl	0,05 ng/μl	0,005 ng/μl	0,0005 ng/μl
1	85,1	87,0	81,3	0,0
2	91,4	87,8	72,8	0,0
3	86,8	81,8	84,8	0,0
4	91,5	83,9	78,8	0,0
5	92,6	89,0	97,5	0,0
6	89,6	90,9	90,0	0,0
Keskiarvo	89,5	86,7	84,2	0,0
Keskihajonta	3,0	3,4	8,7	0,0
RSD-%	3,35 %	3,92 %	10,33 %	-

Mitatuista tuloksista huomataan että, kun mitattiin 0,5 ng/μl saantokoenäytettä 96-kaivoisilla levyillä, ei levyn tai laitteen mallilla ollut merkittävää eroa, vaan saantoprosentit olivat melko saman suuruisia. Qubit-laitteella mitattuna tämä pitoisuus oli todella tarkka, mutta pienemmissä pitoisuuksissa saantoprosentit nousivat merkittävästi. Mustilla levyillä mitattuna jopa 0,005 ng/μl näyte havaittiin melko varmasti, kuten olikin odotettua aiemmin laskettuihin toteamisrajoihin perustuen. Valkoisten levyjen kanssa mitattuina niin keskiarvot kuin keskihajonnatkin nousivat jo tällä näytteellä todella paljon aiemmista. Laimeinta näytettä ei voitu havaita millään laitteella tai levyllä (Taulukko 12).

Taulukko 12. 96-kaivoisten levyillä ja Qubit-laitteella mitattuiden näytteiden saantoprosentit ja saantoprosenttien keskihajonta eri laitteiden välillä.

	LUX (Musta levy)	Fluoroskan (Musta levy)	LUX (Valkoinen levy)	Fluoroskan (Valkoinen levy)	Qubit
KA Saanto % (0,5 ng/μl)	89,3	90,4	87,2	92,8	100,1
SD Saanto % (0,5 ng/μl)	4,9	3,9	1,7	3,7	-
RSD-%	5,5 %	4,3 %	2,0 %	3,9 %	-
KA Saanto % (0,05 ng/μl)	82,8	91,3	89,6	103,9	137,5
SD Saanto % (0,05 ng/μl)	3,2	9,7	6,4	12,8	-
RSD-%	3,9 %	10,6 %	7,2 %	12,3 %	-
KA Saanto % (0,005 ng/μl)	77,4	71,6	145,2	313,6	442,9
SD Saanto % (0,005 ng/μl)	7,9	5,8	112,5	107,0	-
RSD-%	10,2 %	8,1 %	77,5 %	34,1 %	-
KA Saanto % (0,0005 ng/μl)	0	0	493,7	480,65	3712,7
SD Saanto % (0,0005 ng/μl)	0	0	676,2	610,3	-
RSD-%	-	-	137,0 %	127,0 %	-

Huomattavin ero 384- ja 96-kaivoisten levyjen välillä on, että kaikkien laimennettujen näytteiden keskihajonnat ovat todella suuria. Mustilla levyillä 0,05 ng/μl näytteen keskiarvot ovat kuitenkin melko lähellä sataa, mutta niitä ei voida pitää kovinkaan luotettavina keskihajontojen takia (taulukko 13). Tulokset ovat hieman ristiriidassa toteamis- ja määritysrajojen kanssa, sillä niiden mukaan tämä näyte olisi 384-kaivoisella levyllä määritysrajan (0,026 ng/μl) sisällä LUX-laitteella mitattuna. Tämä viittaisi siihen, että rajojen keskihajontaa nostattava tulos olisi lähempänä laitteen oikeaa arvoa kuin kaksi muuta (taulukko 10).

Taulukko 13. 384-kaivoisilla levyillä mitattuiden saantokoenäytteiden saantoprosentit ja saantoprosenttien keskihajonta.

	LUX (Musta levy)	Fluoroskan (Musta levy)	LUX (Valkoinen levy)	Fluoroskan (Valkoinen levy)
KA Saanto % (0.5 ng/μl)	119,5	105,7	104,4	103,2
SD Saanto % (0.5 ng/μl)	6,7	2,7	14,9	17,3
RSD-%	5,6 %	2,5 %	14,3 %	16,8 %
KA Saanto % (0.05 ng/μl)	90,6	102,8	57,0	54,0
SD Saanto % (0.05 ng/μl)	20,2	60,6	33,3	39,4
RSD-%	22,3 %	58,9 %	58,5 %	73,0 %
KA Saanto % (0.005 ng/μl)	49,9	21,8	3,6	15,6
SD Saanto % (0.005 ng/μl)	54,3	37,1	8,7	38,3
RSD-%	108,9 %	169,9 %	245,0 %	245,0 %
KA Saanto % (0.0005 ng/μl)	62,7	292,5	1139,5	3816,1
SD Saanto % (0.0005 ng/μl)	73,2	604,5	2275,0	6574,5
RSD-%	116,7 %	206,7 %	199,7 %	172,3 %

Fluoroskanilla mitattuna mustan 384-kaivoisen levyn 0,05 ng/μl näytteen neljännen toiston tulos heittelee erittäin paljon. Sen saantoprosentit olivat 216,4 %, 115,52 % ja 283,2 %, joten tämä nostaa keskihajontaa kyseiselle näytteelle todella paljon. Huomattavaa on, että LUX:lla mitattuna saman näytteen pitoisuus heittelee 90 % ja 101 % välillä. Valkoisella levyllä ei onnistunut laimennettuiden näytteiden määrittäminen kovinkaan luotettavasti, sillä saantoprosentit olivat pieniä ja keskihajonnat suuria. Pitoisuus onkin vain toteamisrajan sisällä, eikä kvantitatiivinen määrittäminen näin ollen ole rajojen mukaan mahdollistakaan.

6 Yhteenveto

Paras laite kitin käyttöön oli tulosten perusteella Varioskan LUX, käyttäen mustaa 96-kaivoista mikrokuoppalevyä. Tällä yhdistelmällä saatiin paras toteamis- ja määrittämisraja ja samalla saantokoe näytteet olivat tarkkoja ja toistettavia.

Mittauksia olisi voinut parantaa tekemällä standardiliuoksista ensin suuremman tilavuuden laimennokset, josta olisi pipetoitu kaikki rinnakkaiset standardinäytteet. Tämä olisi vähentänyt pipetoinnista syntynyttä virhettä, joka oli nähtävissä etenkin regressioanalyysissä. Tällöin olisi tullut myös esiin enemmän laitteiden itse aiheuttamaa hajontaa.

Useampien laitteiden käyttö olisi antanut vielä paremman kuvan eri laitteiden kyvykkydestä. Etenkin Qubit-lukijoita olisi ollut hyvä olla enemmän. Vain yhden laitteen otos melko epäluotettavaa. Valitettavasti useampaa laitetta ei ollut saatavilla. Lisäksi muiden valmistajien laitteita olisi voinut käyttää referenssilaitteina. Tähän myös pyrittiin, mutta laitteen detektori rikkoontui juuri ennen mittausten aloittamista.

Thermo Fisher Scientificin laboratoriossa testataan tällä hetkellä muita Quant-it DNA ja RNA -kittejä. Myös näille on tarkoitus etsiä optimaalinen laite ja tarkastella onko paras laite kaikille kiteille sama.

Lähteet

- 1 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka, 2008, Laboratorion analyysitekniikka, 5. – 6. painos, Helsinki: Edita Publishing Oy,
- 2 Harris, Daniel C, 2010, Quantitative Chemical Analysis, Eighth Edition, International Edition, New York: W, H, Freeman and Company
- 3 Albani, Jihad René, 2007, Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy, Oxford: Blackwell Science
- 4 Fluoroskan Ascent® FL & Fluoroskan Ascent®, User Manual, 2008, Thermo Fisher Scientific, Inc,
- 5 Varioskan LUX, Technical Manual, 2015, Thermo Fisher Scientific, Inc,
- 6 Thermo Fisher Scientific: About us [Verkkosivusto.] <http://corporate.thermofisher.com/en/about-us.html> 28.9.2016
- 7 Lakowicz, Joseph R., 2006, Principles of Fluorescence spectroscopy, Third edition, Baltimore: University of Maryland School of Medicine,
- 8 Life Technologies, 2014, Product Manual: Qubit® 3.0 Fluorometer
- 9 B. Magnusson and U. Ornemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2. painos 2014) ISBN 978-91-87461-59-0. Saatavilla www.eurachem.org
- 10 Libretexts [Verkkosivusto.] http://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy%3A_Application, 6.1.2017
- 11 Invitrogen, 2006, Quant-iT™ Assay Kits for microplate-based assays of DNA, RNA, and protein
- 12 Thermo Fisher Scientific, 2015 User guide: Quant-iT™ dsDNA High sensitivity assay kit
- 13 Biocompare: Choosing the Best Detection Method Absorbance vs Fluorescence [Verkkosivusto.] <http://www.biocompare.com/Bench-Tips/173963-Choosing-the-Best-Detection-Method-Absorbance-vs-Fluorescence/> 7.1.2017

- 14 Jorma Lampinen, Marika Raitio, Arto Perälä, Heikki Oranen & Reija-Riitta Harinen, 2012, Microplate Based Pathlength Correction Method for Photometric DNA Quantification Assay, Application Laboratory, Sample Preparation and Analysis, Thermo Fisher Scientific, Vantaa

- 15 Lampinen, Jorma, 2010 Principles of Microplate Photometry, Thermo Fisher Scientific, Vantaa