



Bakteeri-DNA:n eristys lehmän maidosta

Menetelmän optimointi

Milma-Emilia Kumpulainen

OPINNÄYTETYÖ
Huhtikuu 2023

Laboratoriotekniikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan tutkinto-ohjelma

KUMPULAINEN, MILMA-EMILIA:
Bakteeri-DNA:n eristys lehmän maidosta
Menetelmän optimointi

Opinnäytetyö 54 sivua
Huhtikuu 2023

Tämä opinnäytetyö tehtiin osana kansainvälistä HoloRuminant-projektia. Projektissa tutkitaan märehtijöihin liittyviä mikrobiomeja ja niiden vaikutusta eläinten hyvinvointiin elinkaaren eri vaiheissa. Projektissa on 25 toimijaa 17:stä eri maasta. Yhteistyötoimijat ovat tutkimusorganisaatioita, voittoa tavoittelemattomia yhdistyksiä ja viljelijä- sekä rotujärjestöjä. Suomesta projektissa on mukana Luonnonvarakeskus. Optimoitua eristysmenetelmää tullaan käyttämään bakteeri-DNA:n eristykseen maidonäytteistä, jotka on kerätty poikineilta lehmillä, tasaisin väliajon. Eristetyn DNA:n avulla maidon bakteerit pyritään tunnistamaan ja niiden mahdollista muutosta maidossa seurataan testiajanjakson aikana.

Opinnäytetyö tehtiin yhdessä Luonnonvarakeskuksen kanssa, Jokioisten toimipisteessä, Genomiikka ja jalostus -ryhmässä. Työn tavoitteena on optimoida bakteeri-DNA:n eristysmenetelmä lehmän maidonäytteille. Työn tarkoituksena on havainnoida ja kokeellisesti osoittaa eristysmenetelmässä olevat työvaiheet, joiden tehostaminen tai muuttaminen voisi parantaa eristetyn DNA:n saantoa ja menetelmän toistettavuutta. Maidonäytteissä esiintyvien kaseiinien esikäsittelymenetelmien testaus oli oleellinen osa menetelmän optimointia. Lisäksi menetelmässä testattiin sentrifugoinnin ja homogenoinnin sekä automaation vaikutusta eristetyn DNA:n saantoon. Menetelmän toimivuutta varmistettiin maitohappobakteerin avulla ja eristetyt maitonäytteitä verrattiin utaretulehdusdiagnoosin saaneen lehmän maitoon.

Tehtyjen koe eristysten perusteella päädyttiin käyttämään EDTA:ta kaseiinien saostumisen estämiseksi. Eristystä häiritsevien kaseiinien onnistunut poistaminen mahdollisti suurempien DNA-pitoisuuksien mittaamisen maidonäytteistä. Näytteet soveltuivat myös automaattieristykseen Qiagenin Qiacube Connect -laitteella ja niistä onnistuttiin eristämään maitohappobakteerin DNA:ta onnistuneesti. Sentrifugin käyttö optimoitiin Luonnonvarakeskuksen tutkijoille valmiiksi menetelmää varten, mutta tehtyjen testien perusteella menetelmän muita työvaiheita ei muutettu optimoinnin tuloksena. Tulosten ja toistettavuuden varmistamiseksi tehdyt koe-eristykset tulisi toistaa useammin.

Asiasanat: HoloRuminant, bakteeri, patogeeni, DNA-eristys, mastiitti

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

KUMPULAINEN, MILMA-EMILIA:
Isolation of bacterial DNA from cow 's milk
Method optimization

Bachelor's thesis 54 pages
April 2023

This thesis was done as a part of the HoloRuminant project funded by European Union's Horizon 2020 research and innovation program (Grant Agreement No 101000213). Project examines ruminant-related microbiomes and their effect on the animal's well-being at different stages of the life cycle. The project has 25 actors from 17 different countries. Collaborators are research organizations, non-profit associations and farmer and breed organizations. From Finland, the Natural Resources Institute Finland is participating the project. The optimized isolation method will be used to isolate bacterial DNA from milk samples collected from calving cows at regular intervals. With the help of the isolated DNA, the aim is to identify the bacteria composition (i.e. microbiome) in the milk, and to monitor changes in microbiome during mastitis and/or different lactation phases.

The thesis was done in the Natural Resources Institute Finland, at Jokioinen, in the Genomics and breeding group. The aim of the work was to optimize the bacterial DNA isolation method for cow's milk samples. The purpose of the work was to observe and experimentally demonstrate the working steps in the isolation method, the enhancement or modification of which could improve the yield of the isolated DNA and the reproducibility of the method. The testing of pretreatment methods for caseins present in milk samples was the most important part of the optimization of the method. In addition, the method tested the effect of centrifugation and homogenization as well as automation on the yield of isolated DNA. The functionality of the method was verified with the help of lactic acid bacteria and the isolated milk samples were compared to the milk of a cow diagnosed with mastitis.

Based on the test isolations, it was decided to use EDTA to prevent precipitation of caseins. The successful removal of caseins interfering with the isolation made it possible to measure higher DNA concentrations in the milk samples. The samples were also suitable for automatic isolation with Qiagen's Qiacube Connect device, and the DNA of lactic acid bacteria was successfully isolated from them. The use of the centrifuge was optimized for the Natural Resources Institute's researchers. Based on the tests performed, the other working steps of the method were not changed because of the optimization. To ensure results and reproducibility, the test isolations made should be repeated more often.

Key words: HoloRuminant, bacteria, pathogen, DNA isolation, mastitis

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	5
2	LEHMÄNMAITO.....	6
	2.1 Maidon tuotanto Suomessa	6
	2.2 Lehmänmaidon koostumus	7
	2.2.1 Maidon rasvat.....	7
	2.2.2 Kivennäisaineet ja hiilihydraatit maidossa	9
	2.2.3 Proteiinit maidossa	9
	2.3 Utaretulehdus lehmillä.....	11
	2.4 Bakteerit lehmän maidossa	14
	2.5 HoloRuminant-projekti.....	17
3	DNA:n eristäminen maitonäytteistä.....	18
	3.1 DNA-eristyksen vaiheet.....	18
	3.2 Eristetyn DNA:n pitoisuuden mittaaminen	19
	3.3 Automatisoitu DNA-eristys Qiacube Connect- laitteella	20
	3.4 Inhibiittorit maitonäytteissä	21
	3.5 EDTA:n merkitys maidon bakteeri-DNA:n eristyksessä	21
4	MENETELMÄN OPTIMOINTI	22
	4.1 Lähtökohdat ennen optimointia	23
	4.2 Näytteiden esikäsittely	24
	4.3 PCR ja agarosigeelielektroforeesi esikäsitellyille näytteille	26
	4.4 Sentrifugointivaiheen optimointi	28
	4.5 Homogenointi FastPrep -homogenisaattorilla	29
	4.6 Maitohappobakteerin DNA:n eristys.....	30
	4.7 Automaattieristys Qiacube Connectilla.....	32
	4.8 Näytetilavuuden vaikutus eristetyn DNA:n pitoisuuteen	33
5	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	34
	5.1 Kaseiinien saostuksen ja saostuksen eston vaikutus eristetyn DNA:n pitoisuuteen	34
	5.2 Esikäsitellyn optimointi varmistettiin agarosigeelielektroforeesin avulla.....	37
	5.3 Sentrifugointivaiheen optimoinnin tulokset	39
	5.4 Optimoinnin muiden osa-alueiden tulokset	40
6	POHDINTA	45
	LÄHTEET.....	49

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Luonnonvarakeskuksen kanssa, osana kansainvälistä HoloRuminant-projektia. Luonnonvarakeskus on asiantuntija- ja tutkimusorganisaatio, joka maa- ja metsätalousministeriön alaisena tuottaa tutkimustietoon perustuvia ratkaisumalleja yhteiskunnalliseen päätöksentekoon Suomessa. (Luonnonvarakeskus n.d.) HoloRuminant on kansainvälinen 25 eri toimijan yhteinen projekti, jonka yhteistyötoimijoiden joukossa on mukana tutkimusorganisaatioita, viljelijä- ja rotujärjestöjä sekä voittoa tavoittelemattomia yhdistyksiä 17:sta eri maasta. Projektissa pyritään määrittämään märehitijöiden eri kehon osista peräisin olevien mikrobien yhteyttä toisiinsa, periytyvyyttä sekä niiden vaikutusta eläinten terveyteen. HoloRuminant-projektin avulla saadaan myös lisätietoa märehitijöiden elinolojen ja ravinnon vaikutuksesta eläinten elimistön mikrobiomeista. (HoloRuminant n.d.)

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida HoloRuminant-projektia varten kehitetty menetelmä toimivaksi lehmänmaidon bakteeri-DNA:n eristykseen. Menetelmän toimivuus maitonäytteille oli kyseenalaistettu epäonnistuneiden DNA-eristysten vuoksi. Tarkoituksena oli havainnoida olemassa olevaa eristysmenetelmää maitonäytteille ja kokeellisesti osoittaa eristysmenetelmässä olevat työvaiheet, joiden tehostaminen tai muuttaminen voisi parantaa eristetyin DNA:n saantoa ja menetelmän toistettavuutta. Maitonäytteiden tutkiminen luotettavalla tarkkuudella vaatii toimivan menetelmän.

HoloRuminant-projektissa on tärkeää pystyä tunnistamaan maidon sisältämät mikrobit ja niiden muodostamat mikrobiomit, koska niitä voitaisiin mahdollisesti käyttää indikaattoreina alkavalle utaretulehdukselle. Utaretulehdusten varhaisella tunnistamisella tai estämisellä on merkittäviä taloudellisia vaikutuksia tuottajille ja koko maidontuotantoketjulle. Lisäksi antibioottilääkinnän pienempi tarve vähentää riskiä antibiootiresistenssien mikrobien kehittymiselle, jolla on edistävää vaikutuksia koko eliökunnan elinmahdollisuuksiin.

2 LEHMÄNMAITO

2.1 Maidon tuotanto Suomessa

Läpi 2010-luvun maitoa on tuotettu suomalaisilta maitotiloilta meijereihin vuosittain yli 2000 miljoonaa litraa. Koko vuosikymmenen ajan maitotilojen määrä on laskenut tasaisesti. (Mattio 2020.) Vuonna 2021 maitotiloja oli Suomessa 4960, joista luomumaidon tuottajia 137. Luomumaitoa tuotettiin vuonna 2021 81 miljoonaa litraa. Lypsäviä lehmiä suomessa oli vuoden 2021 lopussa 248 500 yksilöä, joka on laskua edelliseen vuoteen kolme prosenttia. (Luonnonvarakeskus 2022.)

Maa- ja metsätalousministeriö määräsi vielä 1990-luvun alussa maidon hinnoittelussa käytetyt laatuluokat ja luokituksen perusteella maksettavat hyvitykset sekä vähennykset tuotetusta maidosta tuottajille. Tällä hetkellä maidon luokittelu ja hinnoittelu perustuu Suomessa meijerien omaan päätöksentekoon. Vaikka meijerin laatuluokitus onkin hyvin samankaltainen läpi maan, esiintyy silti hinnoittelussa alueellista vaihtelua. (Alasuutari ym. 2007, 132.) Maidontuottajille meijerit maksoivat vuoden 2021 lopussa keskimäärin 42,30 senttiä litralta. Tuottajahinta on ollut pienoisisessä nousussa 2020-luvun alusta alkaen. (Luonnonvarakeskus 2022.) Tuottajille maksettava tilityshinta maidosta määräytyy sovitun perusosan ja laadusta riippuvan osan mukaan. Laatuluokituksiin vaikuttaa tiloilta otettujen maitonäytteiden bakteeri- ja solumäärät. (Alasuutari ym. 2007, 133.) Lisäksi tuotetulle maidolle tehdään rasva- ja valkuaisainemääritys laboratorio-olosuhteissa vähintään kahdesti kuukaudessa. Näiden tekijöiden mukaan määräytyy tuottajahinnan laadusta riippuvainen osa. (Kuusamon osuusmeijeri n.d.) Maidon hinnoittelu voi poiketa hieman eri meijereillä ja jotkin meijerit maksavat tuottajilleen myös omia lisiä, kuten vastuullisuuslisää, jonka tarkoituksena on kannustaa tuottajia eläinten hyvinvointia tukeviin tekoihin. (Valio n.d.)

Maidon laatuun merkittävästi vaikuttava tekijä on lypsylehmien terveys. Eläinten terveys ETT ry on sekä valtakunnallisesti, että kansainvälisesti toimiva yhdistys, joka ylläpitävät nautatilojen terveydenhuollon seurantajärjestelmää, NASEVA:a. ETT perustettiin Suomen liittyessä Euroopan Unionin jäseneksi 1995. Yhdistystä ylläpitää suomalaiset meijerit, munapakkaamot ja eri liha-alan yritykset.

Yhdistyksen tärkeimpiä tehtäviä ovat mm. tuotantoeläinten terveydestä ja hyvinvoinnista huolehtiminen, tautiriskin hallinta ja tarttuvien tautien ehkäisy sekä rehuhygienian edistäminen. (Eläinten terveys ETT ry. 2021.) Lehmien hyvinvoinnin tarkkailulla ja sen edistämällä tuottajat välttyvät tuotantotappiolta ja voivat vaikuttaa tuotetun maidon laatuun (Hulsen 2007, 6.).

2.2 Lehmänmaidon koostumus

Lehmänmaidosta 87 prosenttia on vettä. Loput maidon koostumuksesta on kuiva-aineita, kuten laktoosia, proteiineja, kivennäisaineita ja rasvaa (Maitotieto n.d.). Lypsylehmien maidon koostumus on tärkeä mittari maidontuottajille arvioitaessa karjan ruokinnan onnistumista. Maidon urea-, proteiini- ja rasvapitoisuus kertovat lehmien saamien ravintoaineiden riittävydestä ja ruokinnan tasapainoisuudesta. (Kyntäjä, Nokka, Harmoinen 2010, 120.) Urea muodostuu lehmän maksassa pötsistä imeytyneestä ylimääräisestä ammoniakista, joka muodostuu rehun proteiinien hajotessa. Maidossa oleva urea on peräisin lehmän verenkierron ureasta. (Nousiainen 2016.) Tuotetun raakamaidon koostumusmittaukset tehdään vähintään kaksi kertaa kuukaudessa. Näissä mittauksissa saadaan selville maidon rasva-, proteiini- ja ureapitoisuudet. (Kuusamon osuusmeijeri n.d.) Koostumusmittauksia voidaan tehdä esimerkiksi meijerien laboratorioissa.

2.2.1 Maidon rasvat

Lehmänmaidon maitorasvasta on pystytty eristämään erilaisia rasvahappoja yli 400 ja erityistä maidon rasvan koostumuksessa on joidenkin rasvahappojen harvinaisuus. Osaa rasvahapoista löytyy vain maidosta. (Maitotieto n.d.) Erilaisia rasvahappoja on olemassa paljon, mutta yhteistä niille on, että ne kaikki koostuvat hiiliatomeista ja niihin sitoutuneista happi- ja vetyatomeista. Rasvahappoketjuja muodostuu hiiliatomien sitoutuessa toisiinsa. Sitoutuminen tapahtuu joko yksinkertaisin- tai kaksoissidoksin. Rasvahappoketjun pituus ja ketjussa olevien kaksoissidosten määrä muokkaa erilaisten rasvahappoketjujen ominaisuuksia. (Damodaran Parkin & Fennema 2007.) Ketjun pituus vaikuttaa rasvojen sulamisominaisuuksiin siten, että lyhyempiä rasvahappoketjuja sisältävät rasvat

sulavat alhaisemmissa lämpötiloissa (Saarela, Hyvönen, Määttä & Von Wright 2010).

Rasvat jaetaan tyydyttyneisiin, kertatyydyttymättömiin ja monityydyttymättömiin sen mukaan, kuinka paljon niiden hiiliatomien välillä on kaksoissidoksia. Tyydyttyneiden rasvojen rakenteessa ei ole lainkaan kaksoissidoksia. Kertatyydyttymättömissä rasvoissa kaksoissidoksia on yksi ja monityydyttämättömissä useampia. (Mattila, Piironen & Ollilainen 2001.) Suurin osa maidon rasvassa olevista rasvahapoista on lyhyitä tai keskipitkiä rasvahappoja, jotka voivat olla sekä tyydyttyneitä, että tyydyttymättömiä (Maitotieto n.d.). Lehmänmaidon rasvasta noin kaksi kolmasosaa on tyydyttynyttä (Colting 2012). Monityydyttämättömiä rasvahappoja maidossa on linolihappo ja alfa-linoleenihappo, jotka molemmat ovat ihmiselle välttämättömiä monityydyttämättömiä rasvahappoja, joita ihmisen elimistö ei pysty itse tuottamaan. (maitotieto n.d.) Tyydyttymättömien rasvahappojen kolmiulotteinen avaruusrakenne voi esiintyä, joko cis- tai trans-muodossa. Luonnonrasvat ovat pääsääntöisesti cis-muotoisia, mutta maitorasvan tyydyttymättömissä rasvahapoissa on myös hieman trans-muotoisia rakenteita, jotka muodostuvat lehmän pötsikäymisen seurauksena. (Saarela, Hyvönen, Määttä, Von Wright 2010.) Rasvojen kokonaismäärä maidossa on noin 4,5 prosenttia (Colting 2012).

Kuten koko lehmänmaidon koostumus, myös maidon rasvahappokoostumus on riippuvainen useasta eri tekijästä. Tärkein näistä tekijöistä on lehmien syömän ravinnon koostumus. Suomen vuodenaikavaihteluiden vuoksi myös vuodenajankohdalla on merkitystä maidon rasvahappokoostumukseen. (maitotieto n.d.) Lypsylehmän perusrehuannos sisältää vähän rasvaa. Yleisimmin käytettyjen rehujen rasvapitoisuus on noin 2,5–4 prosenttia. Rehuannoksen energiapitoisuutta voidaan kuitenkin nostaa erikseen annettavalla rasvalisällä, joka muuttaa myös lypsättävän maidon rasvan koostumusta. Lehmän pötsi sulattaa ravinnossa olevan rasvan kaksivaiheisesti. Pötsimikrobien erittämät lipaasit hydrolysoivat rasvan vapaiksi rasvahapoiksi ja tämän jälkeen ne biohydrogenoituvat. (Kyntäjä ym. 2010, 33.) Tämä tarkoittaa, että pötsin mikrobit pelkistävät tyydyttymättömät rasvahapot tyydyttyneiksi (Tuomisto 2008). Rasvahappojen pötsibiohydrogenaation vuoksi maidon rasva sisältää runsaasti tyydyttynyttä rasvaa. Väkipötsin osuutta kasvattamalla ruokinnassa voidaan lisätä maitorasvan tyydyttymättömien rasvahappojen määrää. Kasviöljylisä ja puna-apilasäilörehu sekä laadukas

laidunruokinta tähtää samaan tarkoitukseen. Näin ruokinnan avulla voidaan vaikuttaa maitorasvan koostumukseen. (Kyntäjä ym. 2010, 33.) Kun lehmän ravinto sisältää runsaasti monityydyttymättömiä rasvahappoja, siirtyy vaikutus lehmän tuottamaan maitoon. Lehmän pötsi kuitenkin sulattaa hyvin tehokkaasti monityydyttymättömiä rasvahappoja. Kasviöljyt rehuissa voidaan kuitenkin suojata pötsin vaikutukselta ja näin esimerkiksi rypsiä sisältävä rehuokinta voi nostaa jopa kolmanneksella maidon linoli- ja alfa-linoleenihappojen määrää. (Maitotieto n.d.)

2.2.2 Kivennäisaineet ja hiilihydraatit maidossa

Suurin osa maidossa olevista kivennäisaineista sijaitsee maidon vesiosassa. Lehmänmaidon kivennäisaineet ovat fosfori, jodi, kalsium, magnesium, natrium, seleeni ja sinkki. Monet kivennäisaineet päätyvät lehmänmaitoon lehmien syömästä rehusta. Käytetyt lannoitteet vaikuttavat rehun kivennäisainepitoisuuteen ja sitä kautta lehmiltä lypsettävään maitoon. (maitotieto n.d.) Kuten muukin maidon koostumus, myös kivennäisainepitoisuus vaihtelee. Pitoisuutta muokkaavat eläimen ravitsemustilan lisäksi, geenit ja elinympäristö. (Cashman 2006.)

Maidon hiilihydraatti on laktoosi eli maitosokeri. Laktoosi on disakkaridi, joka on muodostunut glukoosista ja galaktoosista (Wilt ym. 2010.) Laktoosi muodostuu lehmillä ja muilla nisäkkäillä maitorauhasissa. Laktoosin pitoisuudet eri nisäkkäslajien välillä kuitenkin vaihtelevat suuresti. Lehmän maidossa laktoosia on noin 4,9 prosenttia. (Vesa, Korpela, Sahi 1993.)

2.2.3 Proteiinit maidossa

Maidon proteiinit syntetisoidaan lehmän utareessa, maitorauhasen soluissa. Verenkierrosta peräisin olevista aminohapoista rakentuu peptidejä, joista koostuvat maidon proteiinit. (Huhtanen 1997, 213.) Lehmänmaidon proteiinisynteesissä käytetyt aminohapot ovat peräisin sekä mikrobi-proteiineista, että rehuproteiineista. Proteiinisynteesi vaatii onnistuakseen runsaasti energiaa. Tärkein energianlähde maidon proteiinien muodostuksen kannalta on etikkahappo, jota lehmillä

muodostuu pötsikäymisen tuotteena. Etikkahapon lisäksi pötsikäyminen tuottaa propionihappoa ja voi-happoa. (Aspila ym. 2001, 24.)

Proteiinipitoisuus maidossa on suurimmalta osalta lehmien perimän säätelemää. Kuitenkin myös lypsylehmien ruokinnalla voidaan vaikuttaa maidon proteiinipitoisuuteen. (Enroth ym. 2003, 57.) Esimerkiksi propionihappo tuottaa glukoosia lehmän maksassa ja mikäli propionihapon tuotto pötsikäymisessä on liian vähäistä vääränlaisen tai puutteellisen ruokinnan vuoksi, joutuu maksa käyttämään aminohappoja glukoosin synteesiin. Tällöin ruokinnan vaikutuksesta aminohappoja jää vähemmän käytettäväksi maidon proteiinien synteesiin ja tuotetun maidon proteiinipitoisuus jää vähäisemmäksi. Lehmien ruokinnassa voidaan kuitupitoisten väkirehujen avulla vaikuttaa propionihapon määrään pötsissä. (Aspila ym. 2001, 23–24, 95, 109.) Luontaisesti raakamaidossa on proteiineja 3,3 g /100 g (Kautiainen 2022). Maidon proteiineista noin 80 prosenttia on kaseiineja ja loput 20 prosenttia heraproteiineja (Huhtanen 1997, 213.).

Hera on maidon kirkas nesteosa, joka sisältää runsaasti proteiineja. Proteiinien lisäksi herassa on myös kivennäisaineita, joita proteiinit sitovat, sekä rasvaa, laktoosia ja vitamiineja. Heraproteiineja on useita ja ne ovat ominaisuuksiltaan erilaisia. Yhteinen tekijä kaikille heraproteiineille on, että ne sisältävät runsaasti ihmiselle välttämättömiä aminohappoja, kuten haaraketjuista leusiinia, jota esiintyy heraproteiineissa noin 26 prosenttia kaikista aminohapoista. Välttämättömiä aminohappoja on heraproteiineissa kaikista aminohapoista noin 56 prosenttia. (Kautiainen 2022.)

Kaseiinit ovat suurimolekyyllisiä ja fosforipitoisia proteiineja, jotka sisältävät myös kalsiumia ja rikkiä. Maidon proteiineista kaseiinit ovat tärkeimpiä ja niitä onkin maidossa määrällisesti eniten. Lehmän raakamaidossa on kaseiineja noin 26 grammaa litrassa. Maidon koostumuksen vaihdellessa voi kaseiinipitoisuuskin vaihdella. (Hämeen ammatti-instituutti 2013.) Heraproteiinien tavoin kaseiinit sisältävät runsaasti välttämättömiä aminohappoja. Kaseiinissa välttämättömien aminohappojen osuus on hieman pienempi kuin heraproteiinien, noin 49 prosenttia kaikista proteiinissa esiintyvistä aminohapoista. Haaraketjuisia aminohappoja kaseiineissa on 23 prosenttia aminohapoista. (Kautiainen 2022.) Kaseiinit ovat veteen liukenemattomia. Ne kuitenkin sitovat vettä tehokkaasti. Jokaista

proteiinigrammaa kohden kaseiinit kykenevät sitomaan jopa neljä grammaa vettä. (Broyard & Gaucheron 2015.) Veden sijaan kaseiinit liukenevat vahvoihin happoihin sekä emäksiin (Hämeen ammatti-instituutti 2013).

Maidossa esiintyy neljää eri kaseiinimolekyyliä, α s1, α s2, β ja κ - kaseiineja (Roy, Ye, Moughan & Singh 2020). Näiden kaseiinimolekyylien aminohappokoostumus ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet tunnetaan hyvin. Molekyylit ovat fosforyloituja, jonka vuoksi niillä on hyvä kyky sitoa kalsiumfosfaattia. (Broyard & Gaucheron 2015.) Yhteen kokoontuneita kaseiinimolekyyliä kutsutaan kaseiinimiselleiksi (Roy ym. 2020). Kaseiinimisellit muodostuvat kaseiinimolekyylien ja kalsiumfosfaatin yhdistelmästä (Broyard & Gaucheron 2015). Yksittäinen kaseiinimiselli on kooltaan $0,4 \cdot 10^{-6}$ m. Kaseiinit muodostavat maidossa suuria, verkko-maisia ryhmiä. (Hämeen ammatti-instituutti 2013.) Kaseiinimisellit sitoutuvat toisiinsa proteiinien välisen vuorovaikutuksen avulla. Ne sisältävät kaikkia neljää eri maidossa esiintyvää kaseiinimolekyyliä. Molekyylit α s1, α s2, β ja κ esiintyvät miselleissä suhteessa 40, 10, 35, 15 % (w/w). (Broyard & Gaucheron 2015.) Kaseiinimisellien muodostamat ryhmät sitovat sisäänsä maidon rasvaa ja antavat maidolle sen valkoisen värin. (Hämeen ammatti-instituutti 2013.)

Lehmänmaidon kaseiinimisellien ja maidon vesiosan välillä vallitsee dynaaminen tasapaino. Misellit voivat vaihtaa vesiosan kanssa yksittäisiä kaseiinimolekyyliä, epäorgaanista fosfaattia ja kalsiumia sekä vettä, riippuen fysikaaliskemiallisista olosuhteista. (Broyard & Gaucheron 2015.) Vallitsevat fysikaaliskemialliset olosuhteet voivat myös muokata proteiinien rakennetta (Foegeding & Davis 2011). Kaseiinimolekyyleillä ei ole tertiäärirakennetta ja tästä syystä ne ovat lämpöstabiileja. Kuitenkin lämpötilan muutoksella voi olla vaikutus proteiinien välisiin vuorovaikutuksiin. (Broyard & Gaucheron 2015.)

2.3 Utaretulehdus lehmillä

Lehmien utaretulehdus, eli mastiitti, on utareen maitoa tuottavan parenkymin eli peruskudoksen tulehdus (Radostits, Gay, Hinchcliff, & Constable 2007). Lypsy-lehmillä esiintyvistä infektio-taudeista utaretulehdus on yleisin (Halasa, Huijps, Østerås, & Hogeveen 2007.) Vuosittain Suomessa jopa kolmasosa lypsylehmistä

sairastuu utaretulehdukseen (Hiitiö ym. 2017). Tulehdus syntyy patogeenien päästyä lehmien utareen vedinkanavan kautta utareeseen. Utaretulehdus johtuu yleisimmin bakteeriperäisestä infektiosta, mutta myös levät, hiivat ja sienet aiheuttavat tulehdusta. (Ruegg 2012; Sandholm, Honkanen-Buzalski, Kaartinen & Pyörälä 1993, 45–89, 163–171.) Utaretulehdustapauksia pyritään estämään onnistuneiden torjuntaohjelmien avulla, jotka perustuvat riskitekijöiden tunnistamiseen ja oikeaan diagnostiikkaan (Ruegg 2012). Onnistunut riskienhallinta edistää lehmien hyvinvointia, säästää eläinlääkäri- ja lääkintäkustannuksia sekä takaa laadukkaan ja kannattavan liiketoiminnan harjoittamisen (Hulsen 2007).

Utaretulehdukset aiheuttavat infektiotaudeista eniten taloudellisia vahinkoja maidon tuottajille (Halasa ym. 2007). Utaretulehduksen kustannukset vaihtelevat lypsykauden ajankohdasta, taudin hoidosta ja mahdollisesta ennenaikaisesta lehmän poistosta riippuen reilusta sadasta eurosta aina tuhanteen euroon lehmää kohden (Heikkilä, Nousiainen & Pyörälä 2012). Tutkimusten mukaan tulehduksen ennaltaehkäisy on edullisempaa kuin taudin jälkihoito. Mikäli eläimellä kuitenkin todetaan utaretulehdus, on sen aiheuttaja tärkeää tunnistaa, jotta vältytään vääränlaiselta lääkehoidolta. Utaretulehdus hoidetaan aina bakteerikohtaisesti. Tarpeettomien hoitojen välttäminen säästää rahaa ja nopeuttaa eläimen paraneamista. (Heikkilä 2015.) Utaretulehduksen hoitoon käytetään antibiootteja, kuten penisilliiniä, aminopenisilliinejä tai tetrasykliinejä (ECDC, EFSA, EMA 2021). Lisäksi sairaan eläimen hoitoon käytetään tulehduskipulääkkeitä ja nesteytystä (Pyörälä & Tiihonen 2005).

Utaretulehdusta epäiltäessä otetaan lehmältä maidonäyte, joka tutkitaan laboratoriossa, jossa on toimiva laatu järjestelmä ja luotettava bakteriologinen diagnostiikka (Pyörälä & Tiihonen 2005). Viljely-, sekä PCR- menetelmien avulla voidaan havaita useita maidon sisältämiä bakteerilajeja (Taponen ym. 2019). Utareiden terveyttä voidaan tarkkailla myös mittaamalla maidon somaattisten solujen määrää. Terveen lehmänmaidonäytteessä somaattisten solujen määrä on alle 200 000 solua/ml. Soluluvun kolmen kuukauden geometrinen keskiarvo ei saa olla yli 400 000 solua millilitrassa. Suomalaisten tilojen soluluvut mitataan vähintään kahdesti kuukaudessa. (Maitohygienialiitto n.d.) Mikäli lehmällä on näytteenkeruu -vetimessä utaretulehdus, on maidonäytteen solujen määrä kohonnut. Solujen nousu ei silti yksin aina viittaa utaretulehdukseen, sillä kuumana

kesäkautena lehmien maidonäytteiden solumäärät voivat myös nousta lämmön seurauksena. (Alasuutari ym. 2007.) Utaretulehdus voidaan havaita myös silmä- määräisesti. Tämä tarkoittaa utareen ja vetimen koon ja muodon, sekä ulkoisten vaurioiden, sekä maidon ulkonäön ja hajun arvioimista. (Radostits 2007.)

Tulehdusta aiheuttavat bakteerit voivat olla ympäristöperäisiä tai lehmältä toiseen, esimerkiksi lypsykoneen kautta, tarttuvia patogeenejä. Ympäristöpatogeenit ovat taudinaiheuttajina usein lievempiä kuin tarttavat patogeenit. (Ruegg 2012.) Utaretulehdusdiagnoosin saaneiden lehmien maidosta on pystytty eristämään tavanomaisilla viljelymenetelmillä noin 140 eri bakteerilajia. Utarepatogeenit jaetaan kahteen ryhmään, vakaviin ja ei vakaviin taudinaiheuttajiin, patogeenin vaarallisuuden mukaan. Yleisempiä lehmien maidonäytteissä esiintyviä bakteereja ovat stafylokokit, enterobakteerit ja streptokokit. Nämä patogeenit ovat myös yleisempiä lehmien utaretulehduksen aiheuttajia. (Taponen 2019.) Kliinisen utaretulehduksen aiheuttajana *Staphylococcus aureus* on yleisin. Se on mahdollista tunnistaa maidonäytteissä selvästi jo kaksi viikkoa ennen utaretulehdusdiagnoosia. (Park ym. 2022.)

Utaretulehdukset luokitellaan kliinisiin ja subkliinisiin tulehduksiin (Ruegg 2012). Subkliinisellä utaretulehduksella tarkoitetaan piilevää utaretulehduksen muotoa. Tätä muotoa on vaikea havaita, sillä se ei aiheuta muutoksia maidon koostumuksessa, eikä eläimen yleisvoinnissa. Subkliininen utaretulehdus todetaan solulukujen nousuna. (Radostits ym. 2007.) Oireettomat tulehdukset leviävät helposti lehmältä toiselle, sillä niitä ei heti huomata ja siksi hoidon aloitus voi viivästyä. Utaretulehdus voi myös kroonistua, jos tulehduksen oireita ei saada hoidettua vaan ne jäävät eläimelle pysyviksi. (Blowey & Edmonson 2010.)

Kliininen utaretulehdus on selkeämmin havaittavissa yleisoireiden muutoksena, kuten kuumeen nousuna, syömättömyytenä ja juomattomuutena sekä pötsiliikkeiden pysähtymisenä. Tulehtunut utare voi olla kuuma ja turvonnut sekä tuotetun maidon koostumus, määrä ja väri voivat muuttua tulehdustilanteessa merkittävästi. Maidon ulkonäön muutokset riippuvat utaretulehduksen vakavuudesta ja aiheuttajasta. Esimerkiksi *Escherichia colin* aiheuttamassa utaretulehduksessa maito on kokkareista ja väriltään keltaista. *Trueperella pyogenes* saa maidon näyttämään ja haisemaan mädäntyneeltä. (Radostits 2007.) Utaretulehduksesta

kärsivän lehmän maidon koostumus voi muuttua myös veriseksi. Myös maidon proteiini- ja rasvakoostumus sekä kivennäis- ja hivenaineiden määrät voivat muuttua. Koostumuksen lisäksi maidon fysikaalisiin ominaisuuksiin voi tulla muutoksia. Tulehduksen myötä maitoon päässyt kudokseneste muuttaa maidon pH:ta ja sähkönjohtavuutta. Kudoksenesteen pääsy maitoon lisää maidossa olevien solujen määrää. (Sandholm 1993, 89–97.) Vaikea utaretulehdus aiheuttaa vakavampia oireita, jotka voivat pahimmassa tapauksessa tai hoitamattomana johtaa lehmän kuolemaan (Radostits ym. 2007).

2.4 Bakteerit lehmän maidossa

Lehmien kehossa kuten iholla, suolistossa ja limakalvoilla elää laaja valikoima erilaisia mikrobeja (Sender, Fuchs & Milo 2016). Lehmien, kuten muidenkin nisäkkäiden, maitorauhasissa on ainutlaatuinen mikrobisto (Addis ym. 2016). Maitorauhasia pidettiin pitkään steriileinä ja vieläköän ei ole täyttä varmuutta mitä kaikkia bakteereja ne pitävät sisällään, kuinka paljon ja mistä ne ovat peräisin (Rainard 2017). Lehmänmaitoon mikrobeja päätyy suoran tai epäsuoran kosketuksen kautta. Suora kosketus tarkoittaa lehmän vetimen tai lypsetyn maidon kosketusta lypsylaitteistoon, muuhun välineistöön tai henkilökuntaan. Epäsuoria kontaminaatiolähteitä ovat erilaiset ympäristötekijät, kuten pesuvedet, rehut, lanta ja kuivikkeet sekä eläinten elinympäristön ilmanlaatu (Montel ym. 2014.)

Suorien ja epäsuorien kontaminaatiolähteiden lisäksi maidossa esiintyy myös bakteereja, jotka ovat lähtöisin maitoa tuottavasta eläimestä. Joidenkin mikrobien on tutkittu kulkeutuvan maitorauhasiin esimerkiksi lehmän suoliston luumenista. (Addis ym. 2016, Young ym. 2015.) Maitorauhasen mikrobiomi, eli mikrobiyhteisön kollektiivinen geneettinen koostumus, ja lypsetyn maidon mikrobiomi ovat hyvin samankaltaiset. Tällöin voidaan päätellä, että maidon mikrobit ovat peräisin maitorauhasesta. Kuitenkin lypsetty maito ja avoimena oleva maitorauhanen ovat alttiita ympäristöstä peräisin oleville bakteereille. (Derakhshani ym. 2018.) Lehmänmaidon mikrobiomi vaihtelee suuresti eri karjojen maantieteellisten sijaintien mukaan (Espeche 2012). Koska ympäristö vaikuttaa maidon mikrobiomiin, voidaan maitoa tutkimalla myös tehdä havaintoja lehmien asuinympäristöstä ja siellä elävistä mikrobisuvuista. Ympäristön vaikutus maidon mikrobeihin on havaittu,

vaikka maitonäytteet olisi kerätty suoraan maitorauhasen säiliöstä. (Taponen ym. 2019.) Poikiminen ja lehmän rotu ovat myös tekijöitä, jotka vaikuttavat maidossa esiintyviin mikrobeihin (Cremonesi ym. 2018).

Utaremaidonäytteiden yleisimmät yksittäiset patogeenit ovat *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Streptococcus uberis* ja *Staphylococcus aureus*. (Taponen ym. 2019). On yleistä, että raakamaito koostuu yleensä monista erilaisista opportunistisista kommensalistisista mikrobisuvuista. Opportunistisella mikrobilla tarkoitetaan mikrobia, joka ei normaalisti aiheuta isäntäeliössä tautia, mutta muuttuu taudinaiheuttajaksi isännän puolustuskyvyn heikkenemisen vuoksi. (Terveyskirjasto 2016.) Kommensalismi tarkoittaa mikrobin ja isännän välistä suhdetta, josta toinen hyötyy ja toiselle suhde on merkityksetön (Tieteen termipankki). Tällaisia mikrobisukuja raakamaidosta on tunnistettu useita, kuten maitohappobakteerit, (esim. *Lactobacillus*) psykrotrofiset gramnegatiiviset ja -positiiviset bakteerit (esim. *Pseudomonas* ja *Bacillus*) ihoon liittyvät bakteerit (esim. *Staphylococcus* ja *Corynebacterium*) ja ympäristöstä tulleet bakteerit, jotka aiheuttavat utaretulehdusta (esim. *Mycoplasma* ja *klebsiella*) (Mtshali ym. 2022).

Tutkimusten mukaan on pystytty toteamaan, että terveiden lehmien maitonäytteiden mikrobistossa on enimmäkseen *Firmicutes*, *Bacteroidi*, *Proteobacteria* ja *Actinobakteerien* -pääjaksoon kuuluvia bakteereja (Mtshali ym. 2022). Tunnistettuja bakteereja ovat esimerkiksi *Faecalibacterium spp.*, *Lachnospiraceae*, *Propionibacterium spp.*, *Aeribacillus spp.*, *Nocardiodes* ja *Paenibacillus*. Useat bakteerit esiintyvät sekä terveiden lehmien, että utaretulehdusdiagnoosin saaneiden lehmien maitonäytteissä. Yksi esimerkki tällaisesta bakteerista on *Streptococcus uberis* ja tällaisten bakteerien on esitetty kuuluvan lehmänmaidon luonnolliseen mikrobiomiin. Luonnollinen mikrobiomi on kuitenkin vielä vailla runsaampaa tieteellistä näyttöä ja teoriaa voidaan pitää vain hypoteettisena. (Taponen ym. 2019.)

Enterobakteerit ovat yleisimpiä patogeeneja, joita esiintyy maitonäytteissä (Taponen ym. 2019). *Enterobacteriaceae* on gramnegatiivisten bakteerien heimo, jossa suurin osa bakteereista on terveyden kannalta vaarattomia. Enterobakteereihin kuuluu kuitenkin myös tauteja aiheuttavia bakteerilajeja, kuten *Escherichia coli* tai *Shigella*-, *Klebsiella*-, *Yersinia*- ja *salmonella* -sukujen bakteerit.

Escherichia coli on lämminverisillä eliöillä normaali suolistobakteeri. Nautaeläimillä ja muilla nisäkkäillä sitä esiintyy paksusuoleessa, jossa se muokkaa ravintoaineita ja valmistaa vitamiineja. Pääsääntöisesti *Escherichia coli* on hyödyllinen ja vaaraton, mutta patogeeniset *Escherichia coli* -kannat kykenevät heikentämään kohdesolujen puolustusta ja elimistön immuunijärjestelmää edistääkseen omaa selviytymistään. *Shigella* -suvun bakteerit elävät vain ihmisen elimistössä, kun taas *Yersinia* -suvun edustajia tavataan usein myös tuotantoeläimissä. *Listeria* -suvun bakteerit ovat sauvabakteereja, joita esiintyy maaperässä. *Listeria monocytogenes* on vaarallinen ihmisen terveydelle ja *Listeria ivanovii* märehitijöiden. (Vuento 2021, 139–152.)

Enterobakteerien tavoin maitonäytteissä esiintyy myös streptokokeja (Taponen ym. 2019). Streptococcus-sukuun kuuluu monia tautia aiheuttavia lajeja. Streptokokeille on tyypillistä, että eri bakteerit infektoi eri isäntälajeja. Streptokokit tuottavat toksineja, joilla ne infektoivat eläinsoluja ja tuhoavat kudoksia. Toksiinien tuoton tarkoitus on heikentää isäntäelion puolustusmekanismien toimintaa. (Vuento 2021. 174–175.)

Stafylokokit on kolmas yleinen maitonäytteiden patogeenisuku. (Taponen ym. 2019). Stafylokokit tuottavat erilaisia toksineja. *Staphylococcus aureus* kykenee erittämään toksinien lisäksi myös monenlaisia peptidejä ja sellaisia proteiineja, joiden avulla se pyrkii heikentämään isäntäeläimen immuunipuolustusta. (Vuento 2021, 161–164.) *Staphylococcus aureus* on yleisin tarttuva utaretulehduksen aiheuttaja lehmillä. Sitä esiintyy lehmillä sekä subkliinisessä, että kliinisessä utaretulehduksessa. (Park ym. 2022.)

Maitonäytteitä kerätessä on hyvin tärkeää noudattaa aseptisia työtapoja. Monet eri vaiheet näytteenotossa ovat alttiita näytteen kontaminoitumiselle. Tehdyt ja julkaistut tutkimukset lehmien maidon mikrobiomista ovat tuottaneet ristiriitaisia ja vaihtelevia lopputuloksia. Tutkimustulosten perusteella voidaan kuitenkin varmaksi todeta, että terveistä vetimistä kerätyt maitonäytteet voidaan erottaa utaretulehdusnäytteistä. (Taponen 2019.) Maidon mikrobien tutkimus on paljolti keskittynyt maidon laadulliseen tutkimukseen elintarvikkeiden näkökulmasta. On tutkittu miten mikrobit vaikuttavat maidon jalostusprosesseihin, tuotteiden kypsymiseen, makuun, koostumukseen ja säilyvyyteen. Lisäksi on tehty tutkimusta, miten

erilaiset lypsylehmien ruokavaliot vaikuttavat maidon mikrobiomeihin. (Mtshali ym. 2022.) Utaretulehduksen jälkeisistä mikrobiomeista sekä lääkityksen ja hoito-olosuhteiden vaikutuksista maidon mikrobeihin on myös olemassa tutkittua tietoa. Yleisin tapa tutkia lehmänmaidon mikrobiomia on 16S-rRNA-geenin sekvensointi. Tätä tapaa on sovellettu lehmien utaretulehduksen tutkimiseen ja diagnosointiin. (Taponen 2019.)

2.5 HoloRuminant-projekti

HoloRuminant-projekti pyrkii määrittelemään märehitijöiden eri kehon osista peräisin olevien mikrobien välistä yhteyttä ja sen vaikutusta eläinten suorituskykyindekseihin. Suorituskykyindeksit mittaavat tuotannon tehokkuutta ja sen jättämää hiilijalanjälkeä sekä syntyneitä metaanipäästöjä ja fenotyypistä sietokykyä muuttuvissa ympäristöolosuhteissa. Lisäksi eläimen kasvu ja terveys, erityisesti tehokkaan vastustuskyvyn muodostuminen tai sen puuttuminen ovat suorituskykyindekseihin mitattavia asioita. (HoloRuminant n.d.)

Projektin tavoitteiksi on kirjattu märehitijöihin liittyvien mikrobiomien muodostumisen määrittely, mikrobiomien karakterisointi ja niiden ylläpito. Löydettyjen mikrobiomien vaikutusta tutkitaan märehitijöiden terveyteen, hyvinvointiin ja tuotannon tehokkuuteen liittyen. Tulosten perusteella tehdään suosituksia, jotka esitetään siten, että tahot, joita tutkimus koskee ja jotka siitä hyötyvät, pystyvät mahdollisimman vaivattomasti ottamaan käyttöön ehdotetut muutosehdotukset. (HoloRuminant n.d.)

Euroopan unionin Horisontti 2020-tutkimus- ja innovaatio-ohjelma on myöntänyt rahoitusta HoloRuminant-projektille. (HoloRuminant n.d.) HoloRuminant-projekti on käynnissä syyskuuhun 2026 asti ja sitä koordinoi ranskalainen Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement. Suomesta projektiin osallistuu Luonnonvarakeskus. (European Commission 2022.)

3 DNA:n eristäminen maitonäytteistä

3.1 DNA-eristyksen vaiheet

Nykyaikaiset kaupalliset reagenssisarjat, eli kitit, ovat korvanneet perinteiset DNA:n eristykseen ja puhdistukseen käytettävät menetelmät. Valmiita reagenssisarjoja on erilaisia, riippuen siitä millaisille näytteille ne on tarkoitettu. (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2013, 105.) Sopivan eristysmenetelmän löytäminen tutkittaville näytteille on tärkeää näytteiden jatkokäsittelyn kuten kannalta (Promega n.d.). Riippumatta millaisesta tutkimuksesta on kyse, tai millainen menetelmä valitaan, kuuluu DNA:n eristykseen aina neljä vaihetta. Jotta DNA saadaan erotettua soluista, tulee DNA ensin vapauttaa. Vapautus tapahtuu solujen tehokkaalla hajottamisella, joka voi perustua kemiallisiin tai fysikaalisiin menetelmiin. Seuraavaksi nukleoproteiini-kompleksi denaturoidaan ja näytteestä erotetaan muita solun rakennusaineita, kuten hiilihydraatteja, lipidejä ja RNA:ta. Solun hajotuksen yhteydessä vapautuu myös molekyylejä, jotka hajottavat DNA:ta. Näitä molekyylejä ovat esimerkiksi DNA:aasit, jotka pyritään inaktivoimaan ennen neljättä vaihetta, joka on näytteen puhdistus. Näyte voidaan puhdistaa sentrifugoinnin jälkeen, joko uuttamalla tai pesuliuoksen avulla. (Tan & Yiap 2009.)

Valmiissa reagenssisarjoissa solujen rakenne rikotaan niitä hajottavien yhdisteiden avulla ja nukleiinihapot sidotaan silikamatriksiin. Silikamatriisiin perustuvassa eristysmenetelmässä keräysputkeen sijoitetussa pylväässä suoritetaan sentrifugointi, jolloin DNA tarttuu silikamatriksiin. Muu näyteliuos jää keräysputkeen. Tämän jälkeen valmiit pesuliuokset sentrifugoidaan silikakalvon läpi, jolloin eristetty DNA- puhdistuu. Lopuksi puhdistettu DNA eluoidaan silikakalvosta. (Suominen ym. 2013, 105–106.) Eristys voidaan tehdä käsin tai automatisoidusti laitteen avulla (Tan & Yiap 2009).

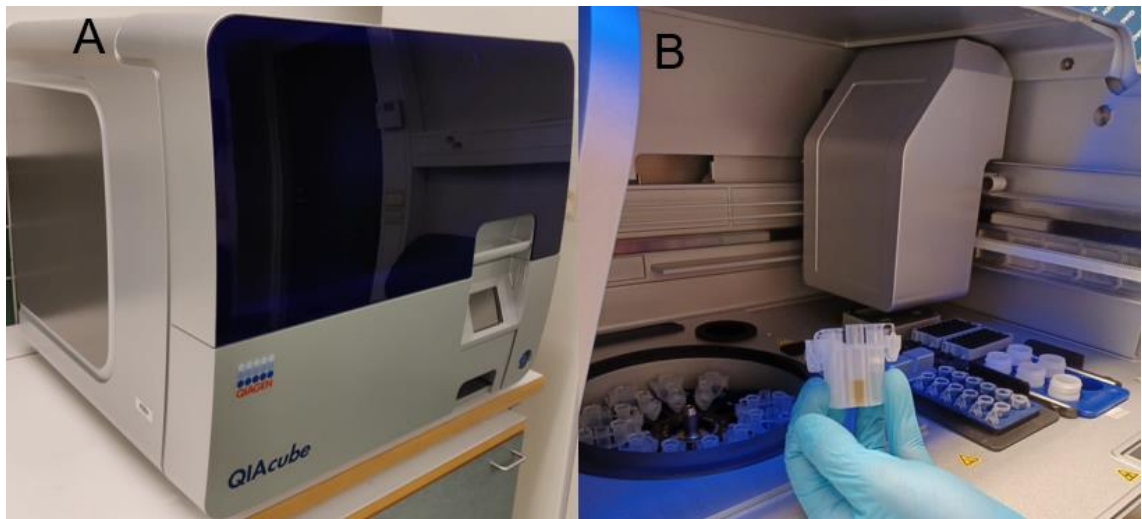
3.2 Eristetyn DNA:n pitoisuuden mittaaminen

Eristetyn DNA:n pitoisuus voidaan määrittää monin eri menetelmin. Mittausmenetelmät perustuvat joko näytteen absorbanssiin tai fluoresenssiin. Näytteen absorbanssin mittaaminen spektrofotometrisesti perustuu nukleotidien absorptiomaksimiin aallonpituudella 260 nm. Absorbanssiin perustuvia menetelmiä tarkempia ovat kuitenkin fluoresenssiin perustuvat mittausmenetelmät. Tarkkuus korostuu etenkin näytteissä, joiden DNA-pitoisuus on matala. Fluoresenssimenetelmät mittaavat näytteen pitoisuutta vertaamalla sitä standardinäytteisiin, joiden DNA-pitoisuus on tiedossa. (Suominen ym. 2013, 110–111.) Agarosigeelielektroforeesin avulla on myös mahdollista arvioida DNA:n pitoisuutta, mutta menetelmä on pitoisuuden mittaamiseksi epätarkka sekä hidas toteuttaa absorbanssiin tai uudempiin fluoresenssiin perustuviin menetelmiin verrattuna. Agarosigeelielektroforeesi menetelmässä näytteen laimennossarja ajetaan agarosigeelille. Näytteiden vyöhykkeiden fluoresenssien voimakkuutta verrataan standardivyöhykkeisiin. Agarosigeelielektroforeesissa DNA:han sitoutetaan etidiumbromidia ja DNA-etidium-kompleksia eksitoidaan UV-valoa käyttäen. Mitattu fluoresenssi on suoraan verrannollinen DNA:n massa. (Suominen & Ollikka 1999.)

Mikrovolyymispektrofotometri NanoDrop mittaa näytteiden DNA:n pitoisuutta absorbanssin avulla. Absorptioarvo 1 aallonpituudessa 260 nm vastaa näytteen pitoisuutta 50 µg/ml. DNA absorboi 260 nm aallonpituuden lisäksi myös hieman aallonpituudessa 280 nm. Näiden kahden aallonpituuden välinen suhde kuvaa mitatun DNA:n puhtautta. Puhtaan DNA:n absorbanssisuhde 260 nm/280 nm on 1,8. Alempi abrobanssisuhdeluku kertoo mahdollisista proteiini- tai fenolijäämistä, kun taas korkeampi suhdeluku voi johtua RNA:n tai hiilihydraattien läsnäolosta. (Suominen ym. 2013, 110–111.) NanoDrop One:nen käsikirja lupaa, että laite pystyy mittaamaan tarkasti näytteitä, joiden DNA-pitoisuus vaihtelee välillä 2–27500 ng/µl:ssa (Mannion, Loughrey & Matlock 2016).

3.3 Automatisoitu DNA-eristys Qiacube Connect- laitteella

Automatisoitujen DNA -eristyslaitteiden tarkoitus on tarjota vaihtoehto manuaalisille menetelmille. Teknologian kehityksen tarkoituksena on mahdollistaa korkea-laatuinen lopputulos. Tällä tarkoitetaan DNA:n maksimaalista saantoa näytteestä, puhtautta, toistettavuutta ja luotettavuutta, nopeutta ja tarkkuutta, sekä riskikontaminaation minimointia. (Tan & Yiap 2009.) Qiacube Connect on Qiagenin laite, jonka avulla voidaan suorittaa nukleiinihappojen sekä proteiinien eristys ja puhdistus näytteestä automatisoidusti (Qiagen 2021). QIAGEN Qiacube Connect kuvassa 2.



KUVA 2. Automaattieristyksessä käytetty QIAGEN Qiacube Connect. A: Laite ulkoa. B: Laite sisältä.

Qiacube Connectilla voidaan eristää kerralla 12 näytettä kolonnipohjaisella menetelmällä. Tällöin laite suorittaa automaattisesti solujen hajotuksen, tutkittavien nukleiinihappojen tai proteiinien sitomisen, pesun ja eluinnin. Laitteessa on sisäänrakennettuna sentrifugi, ravistin, automaattinen pipetointijärjestelmä ja esiasennettuja protokollia. (Qiagen n.d.)

3.4 Inhibiittorit maitonäytteissä

Maitonäytteitä käsiteltäessä näytteissä voi esiintyä erilaisia inhibiittoreita (Cremonesi ym. 2006). Inhibiittorien toiminta voi häiritä solun hajoamista eristysvaiheessa sekä PCR-reaktiossa estää polymeerasiaktiivisuutta DNA:ta monistettaessa. (Wilson 1997.) Maitonäytteissä esiintyvien inhibiittorien arvellaan tutkimusten perusteella vaikuttavan DNA-polymeerasiin tai alukkeiden sitoutumiseen PCR:ssä. Tästä syystä DNA:n eristykseen käytetyn menetelmän tulee olla tehtävälle tutkimukselle sopiva. Sopivan menetelmän tarkoituksena on varmistua näytteen riittävästä pitoisuudesta ja puhtaudesta. (Cremonesi ym. 2006.) Raakamaidon merkittävimmät inhibiittorit ovat maidon proteiineja. Myös rasvat, kalsium ja proteaasit, sekä urea ovat maidossa esiintyviä inhibiittoreita. (Wilson 1997.)

3.5 EDTA:n merkitys maidon bakteeri-DNA:n eristyksessä

Etyleenidiamiinitetraetikkahappo, eli EDTA on kalsiumia, raakamaidon merkittävää inhibiittoria, kelatoiva aine, jonka vaikutus johtaa kaseiinimisellien hajoamiseen. Raakamaitoon lisättynä kaseiinimisellien hajottaminen parantaa bakteeri-DNA:n saantoa ja PCR tehokkuutta. EDTA:n suora lisääminen raakamaitoon estää kaseiinimisellien hyytymisen proteiinipelletiksi sentrifugoinnin aikana. (Murphy, Sharifou, & Moran 2002.)

EDTA, on synteettinen aminohappo, jonka kemiallinen kaava on $C_{10}H_{16}N_2O_8$. EDTA:n molekyylimassa on 292,2 g/mol ja se hajoaa 220–245 °C:ssa muodostaen myrkyllistä kaasumaista typpioksiduulia. EDTA esiintyy valkoisena jauheena ja värittöminä kiteinä. Liukoisuus veteen on todella huono, mutta natriumhydroksidin avulla liukenemista voidaan edistää. (European comission 2021.)

4 MENETELMÄN OPTIMOINTI

Lehmänmaidon bakteeriperäisen DNA:n eristysmenetelmän optimoinnissa tarkasteltiin menetelmän toimivuutta kokonaisuutena, sekä pyrittiin helpottamaan, tehostamaan ja tarkentamaan yksittäisiä työvaiheita menetelmän eri osissa. Osa optimoinnin kohteeksi valikoituneista työvaiheista valikoitui työskentelyn aikana tarpeen mukaan. Hankalasti suoritettavat työvaiheet pyrittiin yksinkertaistamaan, jotta eristyksen suorittaminen olisi mahdollisimman yksinkertaista. Ylimääräisten työvaiheiden karsiminen vähentää mahdollisia kontaminaatioita näytteessä ja tehostaa työskentelyä. Kuviossa 1 on esitettyä optimoinnin eri osa-alueet.



KUVIO 1. Optimoinnin eri osa-alueet

Optimoinnin tärkein ja eniten huomiota saanut osuus oli näytteiden esikäsittely inhibiittorina toimivien kaseiinien poistamiseksi. Optimointi kohdistui lisäksi sentrifugointiasetusten optimointiin, FastPrep® homogenisaattorin (MP Biomedicals) käyttöön soluja hajottaessa ja automaattieristykseen Qiacube Connect -laitteella. Optimoitua menetelmää kokeiltiin myös eri näytteen lähtömäärillä, utaretulehdukseen sairastuneen lehmän maidolla ja lisäämällä maitohappobakteeria tutkittaviin näytteisiin. Kokeilujen perusteella luotiin työohje HoloRuminant-projektin käyttöön.

4.1 Lähtökohdat ennen optimointia

Osana HoloRuminant-projektia eristetään bakteeri-DNA:ta lehmien maidonäytteistä. Maidonäytteitä oli kerätty poikineilta lehmiltä, tasaisin väliajoin, ennalta sovitun ajanjakson ajan. Eristetyn DNA:n avulla maidon bakteerit pyritään tunnistamaan ja niiden mahdollista muutosta maidossa seurataan testiajanjakson aikana.

Ennen onnistunutta eristämistä eristysmenetelmä tulee optimoida mahdollisimman toimivaksi ja siinä olevat mahdolliset ongelmat tulee poistaa, jotta ne eivät vaikuta eristyksen tulokseen. Menetelmän tulee myös olla toistettava riittäväällä tarkkuudella. Ennen tehtyä optimointia saadut tulokset olivat olleet vaihtelevia. Pääsääntöisesti saanto oli ollut hyvin pieni tai DNA:n eristys oli epäonnistunut kokonaan.

Optimointia tehtiin testimaitonäytteillä, jotka oli kerätty Jokioisilla Luonnonvarakeskuksen Minkiön tutkimusnavetassa. Testimaidot ovat tankkimaitoja, eli koonnäytteitä Minkiön tutkimusnavetan lypsetyiltä lehmiltä. Tankkiin ajettu maito on kerätty terveiltä lehmiltä. Testimaitonäytteitä säilytettiin pakastimessa -20 asteessa. Testimaitonäytteiden loppuessa maitoa haettiin lisää tutkimusnavetalta ja sitä saatiin terveeltä lehmältä. Tällä näytteellä tutkittiin näytteiden alkutilavuuden vaikutusta eristetyn DNA:n pitoisuuteen. Lisäksi mastiitti- eli utaretulehdusmaitoa saatiin testejä varten lehmältä, jolla oli utaretulehdusdiagnoosi. Optimoinnin jälkeen menetelmää kokeiltiin myös HoloRuminant-projektiin kuuluvilla näytteillä, jotka oli säilytetty -80 asteessa.

Optimoitavassa menetelmässä eristys tehtiin käyttäen Qiagenin DNeasy® PowerSoil® Pro Kit:tiä. Lisäksi näytteet sentrifugoitiin maidon rasvan poistamiseksi kahdenkymmenen minuutin ajan neljän asteen lämpötilassa nopeudella 4500 g:tä. Sentrifugointilämpötilaan oli päädytty ennen optimointia, jotta maidon rasvan poistaminen olisi helpompaa. Kylmänä maidon rasva pysyy kiinteämpänä, jolloin sen poistaminen onnistuu pumpulipuikolla ilman, että rasvaa valuu supernatanttiin ja sitä kautta pelletin päälle. Sentrifugointilämpötilaa ei optimoitu uudelleen. Sentrifugoinnin ja rasvan poiston jälkeen näyte pestiin PBS-, eli fosfaattipuskuroidulla keittosuola -liuoksella kahdesti. Qiagenin DNeasy® PowerSoil® Pro Kit:tillä tehdyn eristyksen jälkeen DNA:n pitoisuutta mitattiin Thermo Scientific™

NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis -spektrofotometrillä. Optimoinnin kohteena olleet eristysvaiheet esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Eristysmenetelmän työvaiheet

Työvaihe		Toimenpiteet
Näytteen esikäsittely	Näytteiden sentrifugointi	20 min, +4 °C, 4500 g
	Rasvan poisto	Supernatantin poisto kaatamalla, rasvanpoisto vanupuikolla
	PBS- pesu	toistetaan kahdesti
DNA:n eristys	Qiagenin DNeasy PowerSoil Pro Kit	<ol style="list-style-type: none"> 1. valmistelu 2. solujen hajotus 3. inhibiittorien poisto 4. DNA:n sitominen 5. pesu 6. eluointi (50 µl)
Tulos	DNA:n pitoisuuden mittaaminen	NanoDrop One: pitoisuuden mittaaminen

Optimoitavan menetelmän työohje oli koottu DNeasy® PowerSoil® Pro Kit:n ohjeiden pohjalta.

4.2 Näytteiden esikäsittely

Näytteen esikäsittelyä kokeiltiin kolmella eri tavalla. Kukin tapa pyrki estämään inhibiittorina toimivien kaseiiniproteiinien vaikutusta eristykseen. Esikäsittelyllä yritettiin sekä poistaa kaseiineja saostamalla, että estää niiden saostuminen. Näytteinä käytettiin koontinäytteitä, jotka oli kerätty navetan tankista, terveiltä yksilöiltä lypsetystä maidosta.

Sentrifugoinnin avulla poistettiin maidon rasva näytteistä huolimatta maitonäytteiden esikäsittelytavasta. Näytteet sentrifugoitiin ennen eristystä nopeudella 4500 g:tä, kahdenkymmenen minuutin ajan lämpötilan ollessa +4 °C. Sentrifugoinnin aikana rasva kertyi näytteen pinnalle ja eristettävä materiaali pelletöityi

näyteputken pohjalle (kuva 3). Neljän asteen lämpötilan vuoksi rasvakerroksen koostumus on kiinteämpi kuin korkeammissa lämpötiloissa. Riippuen rasvakerroksen paksuudesta, voitiin rasvan alla oleva supernatantti joko kaataa putkesta rasvan painuessa putken reunaan tai rasvakerrokseen voitiin tehdä reikä esimerkiksi steriilillä pipetinkärjellä, josta supernatantti voitiin kaataa pois. Reiän tekeminen rasvakerrokseen oli hyvä vaihtoehto etenkin silloin, kun rasvakerros oli hyvin paksu. Ohut rasvakerros poistui usein supernatantin mukana kaadettaessa. Näyteputken reunoihin kiinni jäänyt rasva poistettiin steriilillä vanupuikolla. Matalan sentrifugointilämpötilan vuoksi rasvakerros pysyi kiinteämpänä ja yhtenäisempänä eikä valunut pelletin päälle näyteputkessa. Tästä syystä rasvanpoisto tuli tehdä heti sentrifugoinnin jälkeen, jottei näytteiden pinnalla oleva rasva pääsyt lämpenemään liikaa.



KUVA 3. Sentrifugoinnin aikana näytteen pinnalle kertynyt rasva.

Esikäsittelyvaihtoehdoista yksi oli inhibiittoreina toimivien kaseiinien poistaminen näytteistä saostamalla. Saostus tehtiin rasvanpoiston jälkeen. Saostusta kokeiltiin 80 prosenttisella etikkahapolla, joka laskee maidon pH:ta, jolloin kaseiinit saostuvat. Etikkahapon lisäksi saostusta kokeiltiin myös 6 M suolahapolla, jolla on maidon pH:hon ja kaseiineihin täysin sama vaikutus. Kaseiinien saostuessa painuivat kaseiinimisellit näyteputken pohjaan, jolloin pinnalle jäänyt neste kerättiin eristystä varten.

Kaseiinien saostusta verrattiin esikäsitteilytekniikkaan, jossa kaseiinien saostumista pyrittiin estämään EDTA:n avulla. EDTA (0,5 M, pH 8) lisättiin maitoon etikkahaposta ja suolahaposta poiketen jo ennen sentrifugointia, joka näytteille tehtiin rasvan poistamiseksi. Rasvanpoiston jälkeen eristys pystyttiin aloittamaan suoraan supernatantin poistolla, sillä EDTA:n vaikutuksesta saostumattomat kaseiinit jäivät supernatanttiin.

Vertailun vuoksi tehtiin myös näytteitä työohjeen alkuperäisen esikäsitteilytavan mukaan. Tällöin kaseiineja ei pyritti saostuksen tai saostuksen eston kautta poistamaan. Näytteistä suspensoitiin sentrifugoinnin ja rasvan poiston jälkeen putken pohjalle jääneet pelletit PBS liuokseen. Sentrifugoinnin jälkeen PBS-pesu toistettiin. Kaseiineja käsiteltäessä PBS-pesut jätettiin pois ja rasvanpoiston jälkeen voitiin siirtyä suoraan eristykseen DNeasy® PowerSoil® Pro Kit:llä. Tehtyjen koeeristysten jälkeen päädyttiin käyttämään kaseiinien saostuksen estoa EDTA:lla kaikissa optimoinnin muissa eristyksissä.

Kaseiinien saostusta ja saostuksen estoa kokeiltiin neljästi. Kaksi kerroista johti DNA:n eristykseen. Ensimmäisten tulosten pohjalta päädyttiin uusimaan eristys ilman HCl:llä tehtyä kaseiinien saostusta. Eristetyille näytteille tehtiin muista optimointikerroista poiketen PCR reaktiot ja DNA:n analysointiin agarosigeelielektroforeesilla.

4.3 PCR ja agarosigeelielektroforeesi esikäsitellyille näytteille

PCR-reaktiot ja DNA:n analysointi agarosigeelielektroforeesilla tehtiin vain näytteille, joilla tutkittiin kaseiinien saostusta ja kaseiinien saostuksen estoa. Ensimmäisen geelijaon perusteella testi suoritettiin valikoiduille näytteille uudelleen. Ensimmäiseen jatkokäsittelyyn eristyksen jälkeen valikoituivat näytteet, joissa oli tehty esikäsitteilyä niin etikkahapolla, suolahapolla, kuin EDTA:llakin. Lisäksi analysointiin otettiin mukaan PBS:llä pestyjä näytteitä, joiden kaseiineille ei ollut tehty minkäänlaista esikäsitteilyä. Näytteet, joille PCR ja agarosigeelielektroforeesiajo tehtiin, on listattu taulukkoon 3 sivulla 27.

TAULUKKO 3. Eri esikäsittelymenetelmillä käsitellyt näytteet, jotka ajettu agarosigeelielektroforeesissa.

nro	Esikäsittelytapa
1	PBS pesu
2	PBS pesu
3	kaseiinien saostus 80 % etikkahapolla
4	kaseiinien saostus 80 % etikkahapolla
5	Kaseiinien saostus 6 M suolahapolla
6	Kaseiinien saostus 6 M suolahapolla
7	EDTA
8	EDTA

Tulosten perusteella valittiin uudelleen eristettäviksi kaikki muut näytteet paitsi ne, joiden kaseiineja oli saostettu suolahapolla. Myös näille näytteille tehtiin eristyksen jälkeen PCR-reaktiot. Uusitut näytteet on listattu taulukkoon 4 sivulla 28.

TAULUKKO 4. Eri esikäsittelymenetelmillä käsitellyt näytteet, jotka valittu edellisen agarosigeelielektroforeesiajon perusteella uusintaajoon.

nro	Esikäsittelytapa
1	kaseiinien saostus 80 % suolahapolla
2	kaseiinien saostus 80 % suolahapolla
3	kaseiinien saostus 80 % suolahapolla
4	kaseiinien saostus 80 % suolahapolla
5	kaseiinien saostus 80 % suolahapolla
6	EDTA
7	EDTA
8	EDTA
9	EDTA
10	EDTA
11	PBS pesu
12	PBS pesu
13	PBS pesu
14	PBS pesu
15	PBS pesu

PCR-reaktioissa kontrollinäytteenä käytettiin Airam 16:sta, joka on Airam nimisen lehmän maidosta eristettyä DNA:ta.

Tässä yhteydessä tehtyjen geelijaajoilla haluttiin arvioida DNA:n määrää. Menetelmän optimoinnin kannalta oleellisinta oli, saatiinko vyöhykkeet näkymään geelissä. Geelin avulla varmistettiin eristysmenetelmän toimivuus ja eristyksen onnistuminen. Ajoliuoksena käytettiin TBE-liuosta. DNA:n havaitsemiseksi geeli värjättiin etidiumbromidilla (EtBr).

4.4 Sentrifugointivaiheen optimointi

Alkuperäisessä optimoitavassa menetelmässä näytteet sentrifugoitiin rasvan- ja supernatantin poistoa varten nopeudella 4500 g:tä, kahdenkymmenen minuutin ajan lämpötilan ollessa +4 °C. Sentrifugointia optimoitiin talon sisäisesti, jotta pysytettiin varmistamaan sentrifugin ja näyteputkien yhteensopivuus. Työssä

käytettävät näyteputket olivat Sarstedt Röhre 5 ml muoviputkia. Sentrifugoinnin aikana ongelmaksi muodostui näyteputkien korkkien kierteiden hajoaminen, jolloin kannet aukesivat sentrifugissa. Näyteputkien säilyminen ehjänä oli optimoinnin ensimmäinen tavoite. Kokeiluja tehtiin Sigman 4-16KS ja Eppendorfin 5810 sentrifugeja vertailemalla. Sigman sentrifugissa käytössä oli roottori 11150 ja eppendorfin sentrifugissa R A-4-44. Kun optimaalinen sentrifugi käytettäville näyteputkille oli löytynyt ja korkit pysyivät ehjänä sentrifugoinnin ajan, tarkasteltiin sentrifugointia siten, että menetelmään määritelty nopeus 4500 g:tä muutettiin 10 000 g:si. Tavoitteena oli tarkistaa nostaako muutos eristetyn DNA:n pitoisuutta.

4.5 Homogenointi FastPrep -homogenisaattorilla

Optimoitavassa menetelmässä oli määiteltynä näytteiden homogenointi FastPrep® homogenisaattorilla (MP Biomedicals). Alkuperäisessä protokollassa nopeus solujen hajotukselle oli 6,0 m/s ja ravistelu aika 60 sekuntia. Näytteiden ravistelu näillä asetuksilla toistettiin kolmesti. Kolmesti toistettujen ravistelun välissä oli aina viiden minuutin lepoaika, jottei näytteet tai käytettävä laite ylikuumentaisi. DNeasy® PowerSoil® Pro Kit:n käsikirja ohjeistaa, että näytteiden homogenointi suurilla nopeuksilla voi parantaa tulosta DNA:n pitoisuutta mitattaessa. Kuitenkin on mahdollista, että se johtaa DNA:n fragmentoitumiseen. (Qiagen. 2021) Näytteiden homogenointiaikaa kokeiltiin lyhentää työskentelyn tehostamiseksi sekä DNA saannon maksimoimiseksi. Lyhennettynä ravistelu suoritettiin kolmen toiston sijaan vain kerran. Lyhyemmällä ravisteluajalla haluttiin varmistaa, ettei kolmesti toistettu ravistelu aiheuttanut solujen fragmentoitumista ja pienennä näin mahdollista pitoisuutta tuloksia mitattaessa.

Homogenointiajan muutosta kokeiltiin näytteillä, jotka oli kerätty utaretulehdusdiagnoosin saaneelta lehmältä. Näytteisiin lisättiin EDTA:ta kaseiinien saostuksen estämiseksi. Utaretulehdusdiagnoosin saaneen lehmän maidolle tehdyn eristyksen tarkoituksena oli verrata DNA-pitoisuutta niiden näytteiden tuloksiin, jotka oli kerätty terveiltä yksilöiltä. Oletuksena oli, että utaretulehdusnäytteissä DNA:n pitoisuus on suurempi, kuin näytteissä, jotka on kerätty terveiltä yksilöiltä. Homogenointiajan muutoksen testaus päätettiin tehdä kyseisillä näytteillä, sillä

homogenointiin tehdyt muutokset ja niiden aiheuttamat mahdolliset pitoisuuserot näytteissä näkyisivät näin selvemmin. Homogenointi suoritettiin FastPrep® homogenisaattorilla Eristettyjä näytteitä oli neljä, joista kaksi homogenointiin FastPrepissä 1x 60 s, 60 m/s ja toiset kaksi 3x 60 s, 60 m/s. Näytteet esitettynä taulukossa 5.

TAULUKKO 5. Utaretulehdusmaitonäytteet ja niiden homogenointi

nro	Näyte	Näytetilavuus	Homogenointi
1	utaretulehdusdiagnoosin saaneen lehmän maito	5 ml	FastPrep 6,0 m/s 1x60 s.
2	Rinnakkainen näyte näytteelle 1	5 ml	FastPrep 6,0 m/s 1x60 s.
3	utaretulehdusdiagnoosin saaneen lehmän maito	5 ml	FastPrep 6,0 m/s 3x60 s.
4	Rinnakkainen näyte näytteelle 3	5 ml	FastPrep 6,0 m/s 3x60 s.

Näytteet 1 ja 2 kaksi olivat rinnakkaiset näytteet ja ne homogenointiin samoilla asetuksilla. Näiden näytteiden homogenointiaika poikkesi kaikista muista optimoinnin aikana homogenoiduista näytteistä siten, että niille tehtyjen ravistelujen määrä muutettiin kolmesta yhteen. Näytteet kolme ja neljä homogenointiin samalla tavalla kuin kaikki muutkin optimoinnissa homogenoidut näytteet.

Käytettäessä alkuperäisen menetelmän homogenointiaikaa ja toistoja (6,0 m/s, 3x 60 s) laitettiin näytteet jälle ravistelujen välissä olevan viiden minuutin lepoajan ajaksi. Järkevän ajankäytön vuoksi jälle nosto tapahtui irrottamalla koko näyteteline laitteesta. Jälle noston tarkoitus oli viilentää ravistelussa voimakkaasti kuumentuneita näytteitä. PowerBead -putkien korkit oli laitettava huolellisesti kiinni, jottei näytteet päässeet vuotamaan homogenoinnin aikana.

4.6 Maitohappobakteerin DNA:n eristys

Eristyksen toimivuuden tutkimiseksi kasvatettiin yön yli MD20 MRS -maitohappobakteeria, jota lisättiin lehmänmaitoon. MD20 -maitohappobakteeri on

luonnonvarakeskuksen sisäisestä kantakokoelmasta peräisin oleva maitohappobakteeri, jota oli kasvatettu yön yli MRS-kasvualustassa. Maitohappobakteerin avulla haluttiin toimivuuden lisäksi tutkia eristyksen tehokkuutta maitonäytteissä. Maitohappobakteerin DNA:ta eristettiin sekä käsin, että automaattisesti QIAGEN Qiacube Connect -laitteella. Koska optimoinnin aikana eristettyjen maitonäytteiden DNA-pitoisuudet olivat olleet hyvin pieniä, voitiin tunnettua bakteeria lisäämällä saada varmuutta eristysmenetelmän toimivuudesta. Tutkittavia näytteitä oli kolmenlaisia: Ensimmäinen näyte oli pelkkä bakteerinäyte, joka ei sisältänyt maitoa lainkaan. Tästä näytteestä DNA eristettiin käsin. Näyte toimi kontrollinäytteenä. Kontrollinäytteen avulla tiedettiin lisätyn maitohappobakteerin määrän muissa näytteissä. Seuravat näytteet olivat maitonäyte, joka eristettiin Qiacube Connectilla ja johon oli lisätty EDTA:ta sekä maitonäyte, josta DNA eristettiin käsin ja johon oli myös lisätty EDTA:ta. Näytteet ja niiden sisältämän DNA:n eristystapa on esitetty taulukossa 6.

TAULUKKO 6. Maitohappobakteerin DNA:n eristys maitonäytteistä käsin ja automaattisesti

nro	näyte	DNA:n eristys	Huom.
1	maitohappobakteerinäyte	Käsin	Ei maitoa
2	maito sis. maitohappobakteeria	Automaattinen	EDTA
3	maito sis. maitohappobakteeria	Käsin	EDTA

MRS-kasvualusta ja siinä kasvaneet maitohappobakteerit olivat nestemäisenä näyteputkessa. Näyteputkesta jaettiin näytettä kahteen kahden ml:n näyteputkeen. Elatusaine poistettiin putkista sentrifugoimalla putkia nopeudella 10 000 g:tä viiden minuutin ajan, jolloin bakteerit painuivat putken pohjalle ja elatusaine saatiin kaadettua pois. Bakteerit suspensointiin PBS-liuoksen avulla ja yhdistettiin yhteen putkeen, jonka jälkeen sentrifugointi uusittiin ja bakteerit suspensoitiin 600 µl:aan PBS-liuosta. Maitohappobakteeria sisältävästä PBS-liuoksesta jaettiin 1/3 kuhunkin testinäytteeseen. Yksi osa jaettiin kontrollinäytteeseen ja kaksi muuta osaa kahteen maitonäytteeseen. Maitohappobakteerin esikäsittely ennen on kuvattu vaiheittain kuviossa 2.



KUVIO 2. Maitohappobakteerin esikäsittely vaiheittain

Eristys suoritettiin DNeasy® PowerSoil® Pro Kit:illä sekä käsin eristyksessä, että Qiacube Connectilla. Näytteet sentrifugoitiin, rasva poistettiin ja näytteet homogenoitiin ennen eristyksiä. Molempiin maitonäytteisiin maitohappobakteeri lisättiin ennen rasvan poistamiseksi tehtävää sentrifugointia. Muista eristyskerroista poiketen käsin eristetystä näytteestä käytettiin eristyksen päätteeksi eluointitulavuutena 50 µl:n sijaan 100 µl:aa, jotta näytteet olisivat suoraan vertailukelpoisia Qiacube Connectilla tehtyjen eristysten kanssa. Qiacube Connectilla eluointitulavuudeksi oli määriteltä 100 µl.

4.7 Automaattieristys Qiacube Connectilla

Qiacube Connectilla eristettiin maitohappobakteeria sisältävän maitonäytteen lisäksi DNA:ta myös maitonäytteistä, joihin ei ollut lisätty maitohappobakteeria. Näille näytteille oli tehty esikäsittely 0,5 M EDTA:lla. Ennen automaattista eristystä muut esikäsittelytoimenpiteet olivat samanlaiset kuin maitohappobakteeria sisältävän näytteen (sentrifugointi, rasvan poisto ja homogenointi).

Tärkein testauksen tavoite oli tarkistaa, että kyseiset näytteet soveltuvat Qiacube Connectilla eristettäviksi ongelmitta ja tulokseksi saadaan käsin eristettyihin näytteisiin verrattuna samansuuruisia pitoisuuksia. Automaattisella eristyksellä

tahdottiin tarkastella ja verrata mahdollista työntekijän vaikutusta mitattuihin DNA-pitoisuuksiin. Automaattisessa eristyksessä olevien maitonäytteiden tuloksia verrattiin aiempiin, samoilla maitonäytteillä, käsin tehtyihin eristysihin. Eluoin-tilavuus Qiacube Connectilla on 100 µl.

4.8 Näytetilavuuden vaikutus eristetyn DNA:n pitoisuuteen

Optimoinnin aikana heräsi kysymys näytetilavuuden (5 ml) riittävydestä, sillä näytteiden DNA-pitoisuudet olivat olleet hyvin pieniä. Tilavuuden muutoksen vaikutusta eristetyn DNA:n pitoisuuteen kokeiltiin neljällä eri näytetilavuudella. Valitut tilavuudet olivat 5, 10, 15 ja 20 ml. DNA-eristys näytteille tehtiin käsin. Kullekin tilavuudelle tehtiin rinnakkainen näyte. Näytteisiin lisättiin EDTA:ta kaseiinien saostuksen estämiseksi. Näytemaito tässä optimoinnin osassa oli eri maitoa kuin aiemmin optimoinnin aikana. Käytetyn tankkimaidon loppumisen vuoksi näytetilavuuden tutkimiseen käytettiin yhdeltä terveeltä lehmältä kerättyä maitoa.

5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

5.1 Kaseiinien saostuksen ja saostuksen eston vaikutus eristetyn DNA:n pitoisuuteen

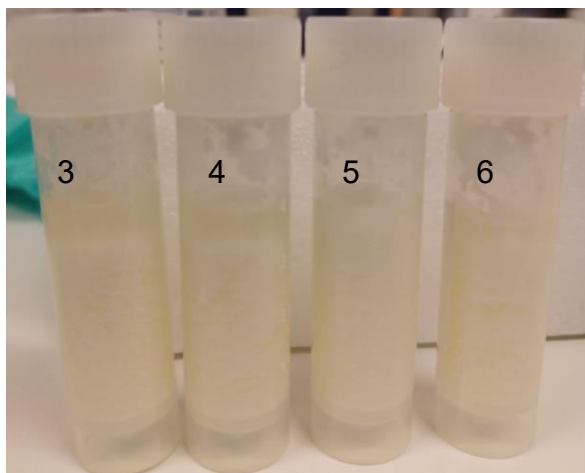
Taulukossa 7 on esitetty eri esikäsitteilymenetelmillä eristettyjen näytteiden DNA-pitoisuudet, jotka on mitattu NanoDrop One -laitteella. Pitoisuuksien lisäksi tuloksista voidaan tulkita eristetyn DNA:n puhtautta aallonpituuksien 260 ja 280 absorbanssien suhteesta. Näytteissä 1 ja 2 ei ole tehty kaseiinien saostusta tai saostuksen estoa, vaan näytteet on pesty PBS-liuoksella. Näytteille 3–6 on tehty kaseiinien saostus ja näytteissä 7 ja 8 kaseiinien saostus on pyritty estämään EDTA:n avulla.

TAULUKKO 7. Näytteiden esikäsitteily.

nro	esikäsitteilytapa	ng/ μ l	A260/A280	A260/A230
1	PBS pesu	0,4	-1,44	0,02
2	PBS pesu	2,0	53,58	0,00
3	kaseiinien saostus 80 % etikkahapolla	1,4	0,87	0,05
4	kaseiinien saostus 80 % etikkahapolla	0,6	-8,41	0,02
5	Kaseiinien saostus 6 M suolahapolla	0,6	-9,54	0,05
6	Kaseiinien saostus 6 M suolahapolla	2,5	4,84	0,01
7	kaseiinien saostumisen esto EDTA:lla	7,5	2,41	0,02
8	kaseiinien saostuksen esto EDTA:lla	6,0	2,53	0,02

Mitatut pitoisuudet olivat hyvin pieniä. Kaikkien mitattujen näytteiden pitoisuudet olivat alle 10 ng/ μ l. A260/A280 suhdeluku ei ole yhdelläkään näytteellä 1,8, joten eristetty DNA sisältää epäpuhtauksia. Miinusmerkkiset tulokset A260/A280 suhteessa voivat johtua mahdollisesta fenoli- tai proteiinikontaminaatiosta. Työn tarkoitus oli poistaa näytteestä proteiineja eri esikäsitteilytavoilla ja siksi proteiinikontaminaation aiheuttama epäpuhtaus on ilmeinen selitys A260/A280 suhdeluvun suurelle vaihtelulle näytteiden välillä. EDTA:lla käsitellyille näytteille suhdeluku on samansuuruinen rinnakkaisten näytteiden välillä. EDTA-näytteissä DNA-pitoisuus oli korkein, 6–7,5 ng/ μ l:ssa.

Kaseiinien saostus oli käytännössä vaikea toteuttaa sillä saostuneet kaseiinit eivät pelkästään painuneet näyteputken pohjalle, vaan olivat kaikkialla näyteputkissa, jolloin muun materiaalin kerääminen oli hyvin vaikeaa ja epätarkkaa. Kaseiinien saostuminen etikkahapolla ja suolahapolla on esitetty kuvassa 4.



KUVA 4. Kaseiinien saostuminen. Näytteissä 3 ja 4 kaseiinit saostettiin 80 % etikkahapolla ja näytteissä 5 ja 6 suolahapolla.

Näytteiden 3 ja 4 kaseiinit oli saostettu 80 prosenttisella etikkahapolla. Näissä näyteputkissa eristettävä materiaali erottuu pienenä tummempana faasina näytteen pinnalla. Saostuneet kaseiinit ovat painuneet eristettävän materiaalin alle. Kuvasta voidaan kuitenkin havaita, että kaikissa näyteputkissa kaseiinien saostuminen oli epätarkkaa ja saostunutta materiaalia oli paljon. Näytteissä 5 ja 6 käytettiin 6 M suolahappoa kaseiinien saostukseen. Näissä näytteissä eristettävän materiaalin faasia on lähes mahdoton havaita näytteen pinnalla.

Näytteistä eristetyille DNA:lle suoritettiin PCR-reaktiot ja ne ajettiin agarosigeelielektroforeesilla. Tulosten perusteella eristys uusittiin kaseiinien saostukselle 80 % etikkahapolla ja kaseiinien saostumisen estolle EDTA:lla. Lisäksi eristettiin näytteitä ilman kaseiineihin kohdistuvaa esikäsittelyä. Näille näytteille tehtiin pelkkä PBS-pesu. Kullekin esikäsittelytavalle eristettiin viisi näytettä. Näytteiden esikäsittelytutkimuksen toinen näytesarja on kuvattuna taulukossa 8 sivulla 36.

TAULUKKO 8. Kaseiinien esikäsittely näytteissä -toinen näytesarja.

nro	esikäsittelytapa	ng/ μ l	A260/A280	A260/A230
1	kaseiinien saostus 80 % etikkahapolla	3,0	13,83	0,00
2	kaseiinien saostus 80 % etikkahapolla	1,7	1,51	0,01
3	kaseiinien saostus 80 % etikkahapolla	1,6	2,17	0,01
4	kaseiinien saostus 80 % etikkahaolla	1,0	1,39	0,03
5	kaseiinien saostus 80 % etikkahapolla	0,9	1,15	0,01
6	kaseiinien saostumisen esto EDTA:lla	9,4	1,85	0,15
7	kaseiinien saostumisen esto EDTA:lla	7,2	1,86	0,05
8	kaseiinien saostumisen esto EDTA:lla	6,8	1,72	0,38
9	kaseiinien saostumisen esto EDTA:lla	3,2	1,73	0,05
10	kaseiinien saostumisen esto EDTA:lla	9,1	1,73	0,11
11	PBS pesu	1,8	1,89	0,01
12	PBS pesu	1,0	1,30	0,01
13	PBS pesu	0,7	0,93	0,06
14	PBS pesu	1,0	1,30	0,01
15	PBS pesu	0,9	0,65	0,03

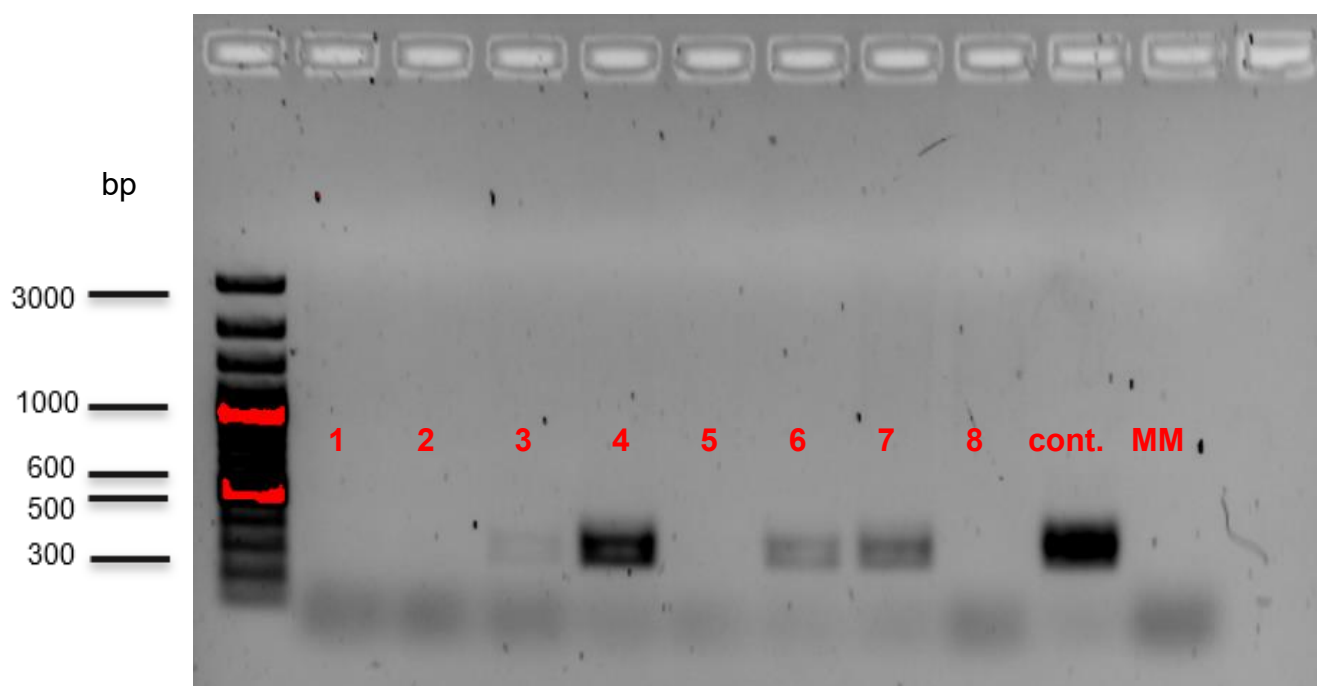
Tehdyt koe-eristykset (taulukot 7 ja 8) osoittavat kaseiinien saostuksen eston EDTA:lla tuottavan parhaan DNA-pitoisuuden. Tulos ylittää NanoDropin tarkkuuden vaatiman kaksi nanogrammaa mikrolitrassa. Suhdeluku A260/A280 oli uusitussa eristyksessä (taulukko 8) kaseiinien saostuksen eston saaneille näytteille hyvä. Tulokset osoittivat suhdeluvun olevan 1,72–1,86 välillä ja kertovat mitatun DNA:n puhtaudesta.

Kaseiinien saostus ja pelkkä PBS- pesu tuottavat molemmat hyvin samankaltaisia tuloksia. Saostusmenetelmässä pitoisuustulokseen vaikuttaa eristettävän materiaalin vaikea kerääminen saostuneiden kaseiinien joukosta. Näytteeseen jääneet kaseiinit häiritsevät eristystä ja tuottavat matalia pitoisuuksia DNA:lle näytteissä, joille oli tehty kaseiinien saostaminen tai kaseiineja ei ollut käsitelty lainkaan. Puhtaudesta kertova A260/A280 suhdeluku oli näille näytteille myös kauempana 1,8:aa kuin EDTA:lla käsitellyille näytteille. Myös vaihtelua suhdeluvussa oli rinnakkaisten näytteiden välillä enemmän kuin näytteillä, joissa kaseiinien saostumista oli estetty EDTA:n avulla.

Tulosten perusteella menetelmän optimoinnissa päädyttiin käyttämään näytteidensä esikäsittelyä kaseiinien saostumisen estoa EDTA:lla. PBS-pesu jätettiin olemassa olevasta protokollasta pois kokonaan. EDTA lisättiin maitonäytteisiin heti työskentelyn alussa, ennen rasvanpoistosentrifugointia. Muutokset merkittiin myös uuteen muokattuun työohjeeseen.

5.2 Esikäsittelyn optimointi varmistettiin agarosigeelielektroforeesin avulla

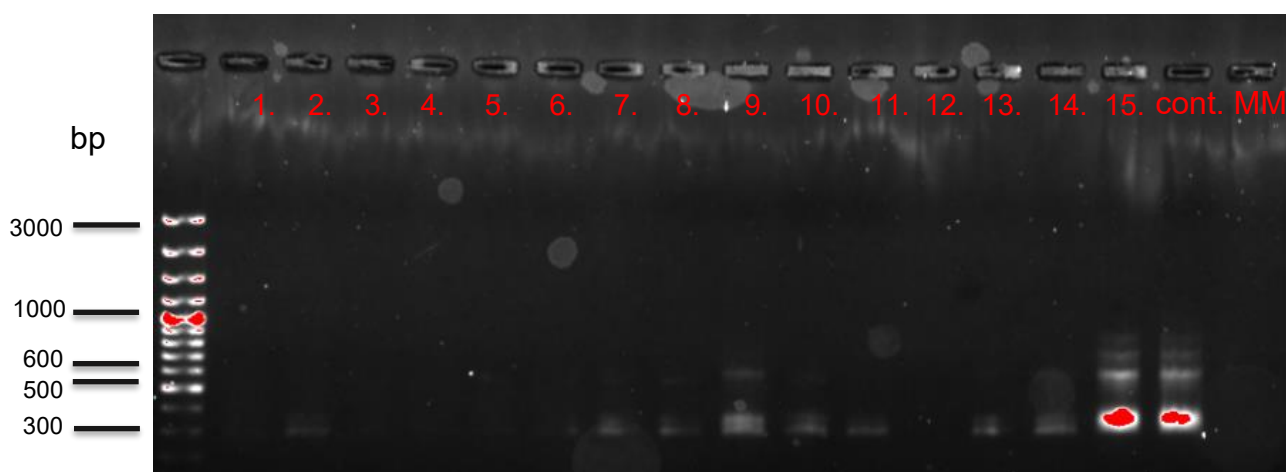
PCR reaktioiden jälkeen näytteet ajettiin TBE-ajoliuoksessa geelille. Geelit kuvattiin kuvantamislaitteella tulosten tarkistelemiseksi. Taulukossa 7 (sivu 34) esitettyjen näytteiden geelijaon tulokset esitettyinä kuvassa 5.



KUVA 5. Esikäsitellyt näytteet taulukosta 7. Näytteet 1 ja 2 ovat PBS-pestyä näytteitä. Näytteet 3 ja 4 oli käsitelty etikkahapolla kaseiinien saostamiseksi ja näytteiden 5 ja 6 kaseiinit oli saostettu suolahapolla. Näytteiden 7 ja 8 kaseiinien saostuminen oli estetty EDTA:lla. Kontrollinäyte oli Airam 16. Viimeisessä näytekäivossa oli lisättyä reaktioseos mastermix

Kontrollinäyte oli Airam lehmän DNA:ta, jonka pitoisuus oli 5 ng/μl. Viimeisessä näytekäivossa oli lisättyä mastermix reaktioseos, eli PCR reaktiossa käytetyt

reagenssit ilman DNA:ta. Näytteissä 1 ja 2 DNA-vyöhykettä ei ole näkyvissä lainkaan. Nämä näytteet on esikäsitelty siten, että näytteiden eristettävä materiaali on ainoastaan pesty PBS:llä. Näytteiden 3 ja 4 kaseiinit saostettiin etikkahapolla. Näiden näytteiden DNA-vyöhykkeet näkyvät geelillä. Näytteen 4 vyöhyke on erittäin selkeä. Näytteiden 5 ja 6 kaseiinit oli saostettu suolahapon avulla. Näyte 5 ei kuitenkaan erotu geelissä, joten se on epäonnistunut. Samanlainen tulos on näytteillä 7 ja 8, joiden kaseiinien saostuminen estettiin EDTA:lla. Toinen rinnakkaisista näytteistä onnistui hyvin ja DNA-vyöhyke voidaan erottaa hyvin. Toinen näyte on epäonnistunut. Tässä optimoinnin osassa tärkeintä oli selvittää näytteet, joiden DNA-vyöhykkeet näkyvät geelillä. DNA-eristys ja geelijaio uusittiin tulosten perusteella. Taulukossa 8 esitettyjen näytteiden geelijaion tulokset kuvassa 6.



KUVA 6. Esikäsitellyt näytteet taulukosta 4. Näytteet 1–5 ovat näytteitä, jotka oli käsitelty kaseiinien saostamiseksi etikkahapolla. Näytteet 6–10 ovat näytteitä, joiden kaseiinien saostuminen oli estetty EDTA:n avulla ja kaivoissa 11–15 on näytteet, joille oli suoritettu pelkkä PBS-pesu. Viimeistä edellisenä kontrollinäyte Airam 16 ja viimeisenä mastermix.

Näytteet 1–5 ovat näytteitä, joiden kaseiinit on saostettu etikkahapolla. Edellisessä geelissä (kuva 5) samalla tavalla esikäsiteltyjen näytteiden DNA-vyöhykkeet erottuivat selkeästi. Uusitus DNA-eristyksessä ja geelijaossa tulos on päinvastainen. Etikkahapolla käsiteltyjen näytteiden DNA-vyöhykkeet erottuvat todella huonosti tai ei lainkaan. Näytteiden 6–10 kaseiinien saostuminen estettiin EDTA:lla ja DNA-vyöhykkeet erottuvat geelissä kaikissa näytteissä. Näytteet 11–15 on pesty PBS:llä ja DNA-vyöhykkeiden erottuminen on vaihtelevaa. Osa

vyöhykkeistä näkyy hyvin, osa huonommin. Geeliajossa erottuvat vyöhykkeet tu-
kivat NanoDropilla mitattuja pitoisuustuloksia.

5.3 Sentrifugointivaiheen optimoinnin tulokset

Taulukossa 9 on esitetty sentrifugointitestin jälkeen eristettyjen näytteiden DNA-pitoisuudet, jotka on mitattu Nanodrop One laitteella. Näytteet 1 ja 2 oli sentrifugoitu nopeudella 4500 g:tä 20 minuutin ajan 4 °C lämpötilassa. Näytteet 3 ja 4 on sentrifugoitu nopeudella 10 432 g:tä 20 minuutin ajan 4 °C lämpötilassa.

TAULUKKO 9. Sentrifugointitehon muutos.

nro	asetukset	ng/μl	A260/A280	A260/A230
1	4500 g / 20 min / 4 °C	3,3	1,38	0,01
2	4500 g / 20 min / 4 °C	3,1	0,85	0,09
3	10 432 g (9000 rpm) / 20 min / 4 °C	3,2	1,51	0,04
4	10 432 g (9000 rpm) / 20 min / 4 °C	3,6	2,37	0,01

Eristetyn DNA:n pitoisuus oli samaa suuruusluokkaa riippumatta siitä, oliko sentrifugointi suoritettu 4500 g:llä vai 10 000 g:n nopeudella. Muutoksella ei ollut merkitystä kertyneen rasvan tai supernatantin määrään. Tämän testin mukaan 4500 g:n muuttaminen 10 000 g:hen ei parantanut DNA saantoa. Testi ei myöskään antanut viitteitä sentrifugoinnin vaikutuksesta DNA:n puhtauteen. Puhtauden suhteen tulokset ovat myös keskenään vaihtelevia.

Toimivin sentrifugi oli 5 ml:n Sarstedt Röhre -putkille Eppendorfin 5810 R sentrifugi ja A-4-44 roottori (kuva 7). Eppendorfin sentrifugissa näyteputkien korkit säilyivät ehjinä ja korkit pysyivät kiinni koko sentrifugoinnin ajan. Sigman 4-16KS sentrifugissa Sarstedt Röhre 5 ml näyteputket painuivat näytetelineen pohjaan korkkien kierteiden hajotessa. Näyteputket olivat näin avoimina osan aikaa sentrifugoinnista. Näyteputkien poistaminen näytetelineestä vaati työkalujen käyttöä. Tästä syystä ja avoimista korkeista johtuen näytteet olivat alltiita huomattavalle kontaminaatiolle. Suurin syy korkkien hajoamiseen oli näytetelineen muoto, jossa näyteputket roikkuvat korkeistaan ilman, että näyteputkien pohjat koskettivat

telineen pohjaa. Korkit hajosivat erityisesti niistä näyteputkista, jotka oli säilytetty $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa. Kyseiset näyteputket eivät sovellu pakastettaviksi. Pakastettujen putkien korkkien kierteet pettäivät sentrifugoinnin aikana, joka aiheuttaa korkkien hajoamisen.



KUVA 7. Eppendorf Sentrifugi, jossa Sarstedt Röhre 5 ml näyteputkien korkit pysyivät ehjinä.

DNA:n saanto oli testimaidoilla samansuuruinen riippumatta sentrifugin mallista ja merkistä. Tärkein optimoinnin kohde sentrifugia valitessa oli työskentelyn toimivuus ja tehokkuus.

5.4 Optimoinnin muiden osa-alueiden tulokset

Taulukossa 10, sivulla 41, on esitettyä DNA-pitoisuudet näytteille, joihin on lisätty maitohappobakteeria. Eristetty DNA-pitoisuus on mitattu Nanodrop One laitteella. Pitoisuuksien lisäksi tuloksista voitiin tulkita eristetyn DNA:n puhtautta aallonpituuksien 260 ja 280 absorbanssien suhteesta. Näyte 1 oli eristetty käsin ja se ei sisältänyt lainkaan maitoa. Tämä näyte toimi kontrollinäytteenä, johon maidosta eristettyä DNA:ta voitiin verrata. Näyte 2 oli maitonäyte, joka oli eristetty automaattisesti Qiacube Connectilla. Tämän näytteen kaseiinit oli esikäsitelty EDTA:lla. Näyte 3 oli näytteen 2 kaltainen, mutta siitä DNA-eristys oli tehty käsin.

TAULUKKO 10. Maitohappobakteerin lisäys ja DNA:n automaattieristys Qiacube Connectilla.

nro	näyte	ng/μl	A260/A280	A260/A230
1	maitohappobakteerinäyte → käsin eristys	134,2	1,84	0,77
2	testimaito sis. maitohappobakteeria ja EDTA:ta → Qiacube	257,2	1,85	2,17
3	testimaito sis. maitohappobakteeria ja EDTA:ta → käsin eristys	170,6	1,85	0,27

Maitohappobakteeria lisätessä testimaitonäytteisiin saatiin DNA:n saantoa lisättyä niihin näytteisiin verrattuna, joihin maitohappobakteeria ei ollut lisätty. Voidaan siis todeta, että menetelmällä onnistuttiin eristämään bakteeri-DNA:ta. Taulukon ensimmäinen näyte oli pelkkä bakteerinäyte, joka ei sisältänyt testimaitoa lainkaan. Maitonäytteet, joihin oli lisätty maitohappobakteeria, olivat samaa suurusluokkaa keskenään, mutta erosivat kuitenkin toisistaan. Tulosten perusteella suurin pitoisuus DNA:lle oli automatisoidussa eristyksessä Qiacube Connectilla. Myös käsin eristetyssä maitonäytteessä oli enemmän DNA:ta kuin kontrollina toimivassa maitohappobakteerissa. Koska maidossa on myös lisättyjen bakteerien lisäksi omaa DNA:ta, oli tulos täysin oikean suuntainen. Maitohappobakteerin ja maidon omien bakteerien välinen ero kuitenkin poikkesi suurusluokaltaan muista eristetyistä testimaitonäytteistä, jossa tulokset olivat olleet <10 ng/μl. On mahdollista, että maitohappobakteerit olivat onnistuneet kuljettamaan maidosta peräisin olevaa DNA:ta tehokkaasti mukanaan ja siksi saanto oli parempi näytteille, joissa oli lisättyä maitohappobakteeria kuin niille näytteille, joissa sitä ei ollut. Eristettyjä testinäytteitä oli vähän, eikä uusintoja testille tehty. Automaattisesti eristettyjen näytteiden pitoisuudet ovat esitetynä taulukossa 11 sivulla 42.

TAULUKKO 11. Qiacube Connect -automaattieristyksen tulokset.

näyte	ng/μl	A260/A280	A260/A230
pelkkä testimaito 1 → Qiacube	1,3	4,08	0,08
pelkkä testimaito 2 → Qiacube	1,8	3,61	0,07

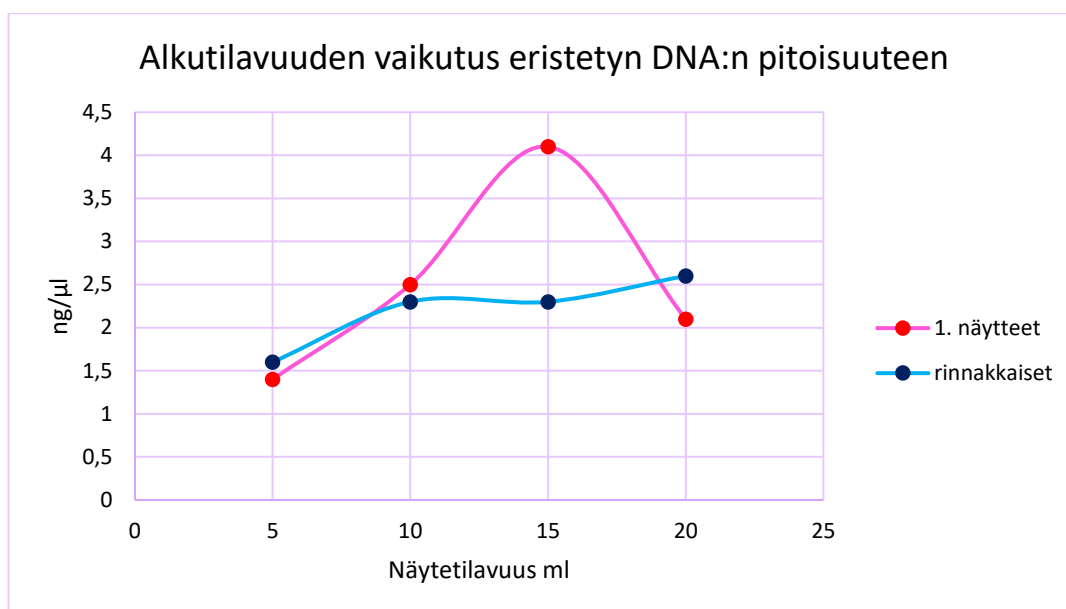
Qiacube Connectilla eristettiin automaattisesti rinnakkaiset testimaitonäytteet. Näytteiden pitoisuus kertoo, että eristystulos on samaa suuruusluokkaa kuin käsin eristettyjen testimaitonäytteiden pitoisuudet. Suhdeluku A260/A280 on korkeampi kuin puhtaalle DNA:lle määritelty 1,8. Korkea suhdeluku ei kuitenkaan kieli suoraan ongelmasta, sillä on mahdollista, että suhdeluku on epätarkka pitoisuuden ollessa hyvin pieni.

Lähtömäärän testauksen tulokset on mitattu edellisten tavoin. Näytteissä 1 ja 2 näytteen tilavuus oli 5 ml. Näytteissä 3 ja 4 tilavuus oli 10 ml ja näytteissä 5 ja 6 15 ml. Näytteiden 7 ja 8 näytetilavuus oli 20 ml. Eri tilavuuksilla olevien näytteiden DNA-pitoisuus on merkittynä taulukkoon 12.

TAULUKKO 12. Näytteen alkutilavuuden vaikutus DNA-pitoisuuteen.

nro	näytetilavuus (ml)	ng/μl	A260/280	A260/A230
1	5	1,4	1,46	0,01
2	5	1,6	1,64	0,01
3	10	2,5	2,00	0,05
4	10	2,3	1,60	0,02
5	15	4,1	3,11	0,00
6	15	2,3	4,50	0,01
7	20	2,1	2,40	0,07
8	20	2,6	1,38	0,05

Eri lähtömäärien tulokset on esitetty taulukossa siten, että jokaiselle tehdyille näytteelle on tehty myös rinnakkainen vertailunäyte. Näytteistä on muodostettu kuvio 3, joka havainnollistaa tuloksille ominaista pitoisuussuuruutta.



KUVIO 3. Alkutilavuuden vaikutus eristetyn DNA:n pitoisuuteen

Ensimmäisistä näytteistä 15 ml lähtömäärästä eristetty näyte antaa suurimman pitoisuuden 4,1 ng/µl. Muutoin pitoisuudet kaikilla näytteillä ovat 1,4 ng/µl ja 2,6 ng/µl välillä. Pitoisuuserot kaikilla näytteillä ovat hyvin pienet. Kaikki tulokset eivät ylitä 2 ng/µl:ssa pitoisuusrajaa. Tulosten varmistamiseksi testi tulisi uusida ja kokeilla myös suuremmilla näytetilavuuksilla.

Utaretulehdusdiagnoosin saaneen lehmän maidosta eristetyn DNA:n pitoisuudet on merkitty taulukkoon 13. Samassa taulukossa on myös esitettyä homogenoinnin vaikutus eristetyn DNA:n pitoisuuteen. Näytteissä 3 ja 4 homogenointiaika on sama kuin alkuperäisessä menetelmässä ja kaikissa optimoinnin aikana tehdyissä eristyksissä. Näytteissä 1 ja 2 ravistelua on FastPrep-laitteella muutettu kolmesta kerrasta yhteen.

TAULUKKO 13. Mastiittimaidolla tehty homogenointiajan testaus.

nro	homogenointiasetus	ng/µl	A260/A280	A260/A230
1	mastiitti FastPrep 6,0 m/s 1x60 s.	67,4	1,85	0,21
2	mastiitti FastPrep 6,0 m/s 1x60 s.	60,3	1,84	0,13
3	mastiitti FastPrep 6,0 m/s 3x60 s.	76,2	1,86	0,14
4	mastiitti FastPrep 6,0 m/s 3x60 s.	67,1	1,85	0,11

Utaretulehdusdiagnoosin saaneen lehmän maidosta voidaan mitattujen DNA konsentraatioiden perusteella huomata, että eristys on onnistunut puhtauden

osalta hyvin. Absorbanssisuhde A_{260}/A_{280} on jokaiselle näytteelle lähes 1,8. Tulokset ovat myös pitoisuudeltaan ylittäneet reilusti $2 \text{ ng}/\mu\text{l}$, jolloin pitoisuuttakin voidaan pitää suhteellisen tarkkana. Näytteet on kuitenkin eristetty samasta maidosta ja silti rinnakkaisten näytteiden välillä on havaittavissa pitoisuuksissa hienoista vaihtelua. Kolmesti toistettu ravistelu FastPrepillä ei sen sijaan ole tuonut merkittävää muutosta DNA-pitoisuuksiin, mutta kuitenkin voidaan todeta, että useampi ravistelutoisto tuottaa hieman paremman tuloksen.

6 POHDINTA

Optimoinnin tavoitteena oli muokata Luonnonvarakeskuksella käyttöön otettava menetelmä toimivaksi lehmänmaidon bakteerien DNA-eristykseen. Tarkoituksena oli päästä tavoitteeseen kokeellisesti osoittamalla eristysmenetelmässä olevat työvaiheet, joiden tehostaminen tai muuttaminen voisi parantaa eristetyn DNA:n mitattua pitoisuutta ja menetelmän toistettavuutta. Luonnonvarakeskus hyötyi optimoinnista erityisesti kaseiinien esikäsitteilyn, sentrifugin valinnan ja automaattieristyksen osalta. Optimoinnin tulokset eivät olleet vähäisten toistojen vuoksi kuitenkaan luotettavia vaan ainoastaan suuntaa antavia. Optimointi kuitenkin edisti HoloRuminant-projektiin kuuluvien maitonäytteiden eristystä ja toimi hyvänä pohjatietona projektia suorittaville tutkijoille.

Projektin suorittaminen ja maitonäytteiden onnistunut tutkiminen on tärkeää lehmien hyvinvoinnin edistämisen kannalta. Projektia edistävät toimet ovat eettisestä näkökulmasta tärkeitä, sillä niiden avulla Holoruminat-projektin tutkimus voidaan suorittaa mahdollisimman tarkasti. Maitonäytteiden keräämiseen ja maidontuotantoon liittyy paljon eettisiä kysymyksiä siitä, kenelle maito kuuluu ja onko tehostettu maidontuotanto eettisesti oikein maitoa tuottaville eläimille. Holoruminant-projektin avulla eläinten terveyttä voidaan kuitenkin pyrkiä parantamaan ja sitä kautta edistää lypsylehmien hyvinvointia.

Ennakkotietona tiedettiin, että tehdyt eristykset eivät olleet kerätyillä maitonäytteillä onnistuneet. Mahdollista syytä alettiin etsimään kirjallisuudesta ja esiin nousi kaseiiniproteiinien aiheuttamat ongelmat DNA-eristyksessä (Murphy ym. 2002). Tästä syystä optimointi keskittyi aluksi pääsääntöisesti kaseiinien saostamiseen tai niiden saostumisen estoon. EDTA:n suora lisääminen raakamaitoon estää kaseiinimisellien hyytymisen proteiinipelletiksi sentrifugoinnin aikana (Murphy ym. 2002). Tehtyjen koe eristysten perusteella päädyttiin käyttämään EDTA:ta kaseiinien saostumisen estämiseksi. Saatuja tuloksia oli vain vähän, mutta ne tukivat toisiaan. EDTA:n avulla tehty kaseiinien saostumisen esto oli toimivampi tapa esikäsitellä kaseiineja kuin niiden saostaminen suolahapolla tai etikkahapolla. Luonnonvarakeskuksen asiantuntijat ja tutkijat suosittelivat EDTA:n käyttöä maitonäytteiden kaseiinien poistamiseksi. Tehdyt testit ja niistä

saadut tulokset esiteltiin Holoruminat-projektin vetäjälle, joka tulosten ja muiden ennakkotietojen perusteella päätti, että EDTA:ta käytetään projektin kaikissa näytteissä estämään kaseiiniproteiinien saostuminen. Näin saostumattomat proteiinit saatiin poistettua näytteistä supernatantin mukana. Käytetyn EDTA:n määrä pysyi vakiona läpi optimoinnin. Toistettavuutta testattiin EDTA:n osalta vain vähän. Vastaavissa optimoinneissa testauskertoja tulisi olla vielä enemmän, jotta tuloksia voidaan pitää riittävän luotettavina ja toistettavina. Mikäli kaseiineja ei esikäsitellä millään tavalla on tulosten mukaan selvää, että näytteessä olevat kaseiinit vaikuttavat alentavasti näytteestä eristettävään DNA-pitoisuuteen.

Kaikissa optimoinnin osa-alueissa testejä tehtiin vähän. Osa testeistä suoritettiin vain kerran. Tuloksia voidaankin siis pitää lähinnä mielenkiintoisina havaintoina eikä luotettavina totuuksina. Työn suorittajalla tai ympäristöllä voi olla yksittäisissä eristyksissä vaikutusta lopputulokseen, sillä DNA-eristys on monien työvaiheiden ja pienten pitoisuuksien vuoksi hyvin altis kontaminaatioille. Siksi toistettavuuden varmistaminen useilla testauskerroilla olisi hyvin tärkeää. Koska testejä tehtiin rajallisten resurssien vuoksi vain vähän, ohjattiin optimointia aina siihen suuntaan, mikä näytti hieman edellistä vaihtoehtoa paremmalta. Optimoinnilla haluttiin myös tehtyjen testien lisäksi varmistaa työskentelyn sujuvuus kyseisillä näytteillä kyseisissä laboratoriotiloissa. Tarkoituksena oli optimoida kerättyjen maitonäytteiden eristys siten, että projektia suorittavien työntekijöiden olisi mahdollisimman helppo ryhtyä työhön. Työvälineet ja tarvittavat reagenssit oli valmistettu siten, että työskentely olisi mahdollisimman toimivaa ja tehokasta. Tällä pyrittiin mahdollistamaan projektissa työskentelevien työntekijöiden keskittyminen itse projektin suorittamiseen ja maitonäytteiden bakteeriperäisen DNA:n eristykseen.

Näytetilavuuden vaikutuksen tutkimista eristettävään DNA:han tulisi tehdä vielä laajemmin käyttäen suurempia tilavuuksia. Testaukseen olisi voinut ottaa vielä ainakin 50 ml ja 100 ml tilavuudet. Saadut tulokset tehdyillä tilavuuksilla eivät osoita, että alle 20 ml:n tilavuuksien näytemäärien DNA pitoisuuksilla olisi merkittäviä eroja. Kuitenkin 5 ml:n näytetilavuus antaa pienimmän pitoisuustuloksen. Huomioitavaa myös on, että käytetyt testimaidot, jotka oli kerätty tutkimusnavetan tankista, olivat loppuneet ja käyttöön otettiin yhden yksittäisen terveen lehmän maitoa. Tämäkin voi olla syy näytteiden välillä oleviin pieniin pitoisuuseroihin.

Kolmesti toistettu ravistelu (6,0 m/s, 3x 60 s) homogenisaattorilla kuumensi näytteitä voimakkaasti. Lisäksi jotkin PowerBead -putkien korkit vuosivat näytettä huolellisesta sulkemisesta huolimatta. Näyteputkien vuotaminen lisäsi kontaminaatoriskiä ja hukkasi näytettä. Korkkien vuotamiseen ei löytynyt selkeää syytä. Kolmesti toistettu ravistelu kuitenkin oli näyteputkille selvästi rajumpi käsittely, sillä niissä näkyi ulkoista kulumista. Ravistelun seurauksena joidenkin näyteputkien korkit myös löystyivät ja niitä tuli kiristää lepoajan aikana. Koska ravistelujen toistojen määrällä ei ollut merkittävää vaikutusta mitatun DNA:n pitoisuuteen, olisi työskentelyn tehostamiseksi, kontaminaatoriskin pienentämiseksi ja näytetilavuuden säilyttämiseksi suositeltavaa suorittaa homogenointi kyseisellä laitteella (FastPrep® MP Biomedicals) kolmen kerran sijaan vain yhden kerran, sillä tehdyn testin perusteella se ei muuta merkittävästi mitattua DNA:n pitoisuutta. Yhden testin perusteella ei kuitenkaan voi homogenointiaikaa muuttaa vaan se vaatisi vielä useampia toistoja tuloksen varmistamiseksi. Testi tulisi suorittaa myös monenlaisilla maitonäytteillä, kuten näytteillä, jotka on kerätty terveiltä yksilöiltä ja joiden maidossa on syytä olettaa olevan bakteeriperäistä DNA:ta vähemmän.

Koska eristettyjen näytteiden DNA-pitoisuudet olivat hyvin pieniä, ei Nanodropilla tehtyä mittausta voida pitää täysin luotettavana. Nanodropin lisäksi näytteitä voisi vastaavissa testeissä mitata myös muilla mittausmenetelmillä kuten fluoresenssiin perustuvalla mittauksella, sillä fluoresenssiin perustuva mittaus on asorbanssiin perustuvia menetelmiä tarkempi (Suominen ym. 2013). NanoDropilla mitattaessa laitteen käsikirja lupaa, että tulosta voidaan pitää tarkkana, kun DNA-pitoisuus on enemmän kuin 2 ng/μl (Mannion, Loughrey & Matlock 2016). Käyttökokemusten perusteella on havaittu, että mitä pienempi näytteen DNA-pitoisuus on, sitä suurempi on vaihtelu mittaustulosten välillä. Tästä syystä tuloksia voidaan pitää epätarkkoina matalien pitoisuuksien vuoksi. Epätarkka mittaus on ainoastaan suuntaa antava. Myös näytteiden puhtauksissa oli vaihtelua. Puhtaan DNA:n absorbanssisuhde 260 nm/280 nm on 1,8 ja alempi abrobanssisuhdeluku kertoo mahdollisista proteiini- tai fenolijäämistä. Korkeampi suhdeluku voi johtua RNA:n tai hiilihydraattien läsnäolosta. (Suominen ym. 2013, 110–111.) Maitonäytteet ovat kuitenkin läpi optimoinnin tuottaneet hyvin pieniä DNA-pitoisuuksia. Pois lukien näytteet, joihin oli lisätty maitohappobakteeria tai näytteet, jotka oli eristetty utaretulehdusdiagnoosin saaneen lehmän maidosta. Lisätutkimusten

avulla olisi mielenkiintoista tietää, miksi pitoisuudet ovat niin pieniä ja onko se tyypillistä terveeseen lehmän raakamaidolle.

Holoruminat-projekti tutkii märehäjäihin liittyviä mikrobiomeja. (HoloRuminant n.d.) Optimoitu menetelmä eristää lehmien maitonäytteiden DNA:ta alkuperäisiä työvaiheita noudattaen, kuitenkin siten, että työohjeeseen on tehty muutos kaseiinien esikäätelyn osalta. PBS-pesu on jätetty pois ja kaseiinien saostuksen esto EDTA:n avulla on otettu käyttöön. Kun projektia varten kerätyistä näytteistä on eristetty DNA:ta, ne sekvensoidaan ns. metabarcoding menetelmällä. Sekvenssejä verrataan tietokannoissa oleviin tunnettuihin sekvensseihin eri bakteereista. Tällä tavalla pystytään selvittämään mitä bakteereja näytteet sisältävät. Vaikka optimoinnin monia osia tuleekin tarkastella vain suuntaa antavina tietoina, on siitä merkittävää hyötyä kaseiinien esikäätelyn osalta. Muutokset työohjeeseen ja työskentelyn aloituksen valmistelu on mahdollistanut Holoruminat-projektin aloituksen Luonnonvarakeskuksella.

LÄHTEET

Addis, MF., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, RC. & Moroni, P. 2016. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. *Mol BioSyst.* 9.5.2016. Viitattu 7.1.2023. <https://pubs.rsc.org/en/content/article-landing/2016/MB/C6MB00217J>

Alasuutari, S., Manni, K. & Rautala, H. 2007. Lypsylehmän ruokinta ja hoito. 2.painos. Helsinki. Opetushallitus.

Aspila, P., Huhtanen, P., Kokkonen, T., Mälkiä, P., Mäntysaari, P., Rautala, H., Salmela, P. & Suvitie, M. 2001. Lypsylehmän ruokinta. 5. painos. Jyväskylä. Maaseutukeskusten Liitto.

Blowey, R. & Edmondson, P. 2010. Mastitis control in dairy herds. 2. painos. Oxfordshire. CAB International.

Broyard, C. & Gaucheron F. 2015. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. 27.3.2015. Viitattu 26.1.2023. <https://hal.science/hal-01294069/document>

Cashman, K. 2006. Milk minerals (including trace elements) and bone health. Department of Food and Nutritional Sciences, and Department of Medicine, University College, Cork, Ireland. 31.5.2006. Viitattu 5.1.2023. <https://www.science-direct.com/science/article/abs/pii/S0958694606001622>

Colting, F. 2012. Vallankumouksellinen maito. 1. painos. Helsinki. Atar Kustannus Oy.

Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., Morandi, S. & Luzzana M. 2006. Technical Note: Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. *American Dairy Science Association.* X.1.2006. Viitattu 1.2.2023. [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(06\)72080-X/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(06)72080-X/fulltext)

Cremonesi, P., Ceccarani, C., Curone, G., Severgnini, M., Pollera, C., Bronzo, V., Riva, F., Addis, MF., Filipe, J., Amadori, M., Trevisi, E., Vigo, D., Moroni, P. & Castiglioni, B. 2018. Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows. *PLOS ONE.* 24.10.2018. Viitattu 7.1.2023. <https://journals.plos.org/plosone/article/authors?id=10.1371/journal.pone.0205054>

Damodaran, S., Parkin, KL. & Fennema, OR. 2007. Fennema's Food Chemistry. 4.painos. Lontoo. New York.CRC Press

Derakhshani, H., Fehr, KB., Sepehri, S., Francoz, D., De Buck, J., Barkema, HW., Plaizier, JC. & Khafipour, E. 2018 Invited review: microbiota of the bovine udder: contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *J Dairy Sci.* X.12.2018. Viitattu 3.2.2023. [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(18\)30914-7/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(18)30914-7/fulltext)

Eläinten terveys ETT ry. 2021. Nautatilojen terveydenhuollon seurantajärjestelmä NASEVA-säännöt. Verkkosivu. Viitattu 22.1.2023. <https://www.naseva.fi/Public-Content/Rules>

Enroth, A., Jokipii, P., Korhonen, T., Koskivainio, H., Kyntäjä, J., Lampinen, K., Rautala, H. & Savela, P. 2003. Kannattava maidontuotanto. Maaseutukeskusten Liiton julkaisu nro 997. Helsinki: Pro Agria maaseutukeskusten liitto.

Espeche, C., Pellegrino, M., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C. & Nader-Macías F. 2012. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*. 28.11.2012. Viitattu 7.1.2023. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1075996412000054?via%3Dihub>

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA) and European Medicines Agency (EMA). 2021. Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA JIACRA III 2016-2018. European Commission. 30.6.2021. Viitattu 30.3.2023. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2021.6712>

European Commission. 2021. Ethylenediaminetetraacetic acid. European Commission, WHO & ILO. Verkkosivu. Viitattu 2.1.2023. https://www.ilo.org/dyn/icsc/show-card.display?p_lang=en&p_card_id=0886&p_version=2

European Commission. 2022. Understanding microbiomes of the ruminant holobiont. Verkkosivu. Viitattu 4.2.2023. <https://cordis.europa.eu/project/id/101000213>

Foegeding, A. & Davis, J. 2011. Food protein functionality: A comprehensive approach. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Market Quality and Handling Research Unit, Raleigh, USA. 12.5.2011. Viitattu 26.1.2023. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X11001640>

Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O. & Hogeveen, H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management. *Vet Q*. 29.3.2007. Viitattu 17.3.2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17471788/>

Heikkilä, A-M., Nousiainen, J.I. & Pyörälä, S. 2012. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *Journal of Dairy Science* 95.

Heikkilä, A-M. 2015. Eläinterveys euroina -esimerkkejä maidontuotannosta. Luento. ProAgria Maito-valmennus. 4.9.2015. Luonnonvarakeskus. Helsinki.

Hiitiö, H., Vakkamäki, J., Simojoki, H., Autio, T., Junnila, J., Pelkonen, S. & Pyörälä, S. 2017. Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. *Acta Veterinaria Scandinavica*. vol. 59. 22. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0288-x>

HoloRuminant. n.d. Project. EAAP. Verkkosivu. Viitattu 2.2.2023. <https://holoruminant.eu/>

Huhtanen, P. 1997. Märehtijän ravitsemusfysiologia. Kotieläintuotannon tutkimuslaitos. Luentomoniste osa II. Jokioinen: Maatalouden tutkimuskeskus.

Hulsen, J. 2007. Lehmähavaintoja. 2, painos. Porvoo. WS Bookwell Oy.

Hämeen ammatti-instituutti. 2013. Kaseiinit. Milk Works. Verkkosivu. Viitattu 5.1.2023. https://web.archive.org/web/20131016022510/http://portal.hamk.fi/portal/page/portal/HAMI/Milkworks/Oppimateriaali/mita_maito_on/maidon_kestävyyden_kaseiinit

Kautiainen, H. 2022. Proteiinien laaduissa on eroja. Valio Oy. 30.6.2022. Viitattu 25.1.2023. <https://www.valio.fi/hyvinvointi/proteiinien-laaduissa-on-eroja/>

Kuusamon osuusmeijeri. n.d. Maidon hinta. Verkkosivu. Viitattu 22.1.2023. <https://www.kuusamonosm.fi/maidon-hinta/>

Kyntäjä, J., Nokka, S. & Harmoinen, T. 2010. Lypsylehmän ruokinta. 1. painos. Hämeenlinna. Kariston Kirjapaino Oy.

Luonnonvarakeskus. n.d. Esittely. Verkkosivu. Viitattu 5.12.2022. <https://www.luke.fi/fi/tietoa-lukesta/esittely>

Luonnonvarakeskus. 2022. Maitoa tuotettiin vuonna 2021 edellisvuotta vähemmän, tuottajahinnassa oli hienoista nousua. Verkkosivu. Viitattu 2.1.2023. <https://www.luke.fi/fi/uutiset/maitoa-tuotettiin-vuonna-2021-edellisvuotta-vahemman-tuottajahinnassa-oli-hienoista-nousua>

Maitohygienialiitto. n.d. Somaattisten solujen määrä maidossa. Verkkosivu. Viitattu 30.3.2023. <http://www.maitohygienialiitto.fi/tilastot/somaattisten-solujen-maara-maidossa>

Maitotieto. n.d. Maidon koostumus. Verkkosivu. Viitattu 3.1.2023. <https://www.maitotieto.fi/tietoa-maidosta/mita-maito-on/maidon-koostumus.html>

Mattila, P. Piironen, V. & Ollilainen, V. 2001. Elintarvikekemian ja –analytiikka. Helsinki. Yliopistopaino.

Mattio, M. 2020. Maidontuotanto. Maa- ja metsätaloustuottajien keskusliitto MTK 9.6.2020. Viitattu 8.12.2022. <https://www.mtk.fi/-/maidontuotanto-1>

Montel, MC., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, DA., Desmases, N. & Berthier, F. 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. Int J Food Microbiol. 17.2.2014. Viitattu 7.1.2023 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160514001068?via%3Dihub>

Murphy, M., Sharifou, M. & Moran, C. 2002. High quality genomic DNA extraction from large milk samples. J Dairy Res. <https://doi.org/10.1017/s0022029902005848>

Mtshali, K., Khumalo, ZTH., Kwenda, S. Arshad, I. & Thekiso, OMM. 2022. Exploration and comparison of bacterial communities present in bovine faeces, milk and blood using 16S rRNA metagenomic sequencing. *Journals Plos.* 31.8.2022. Viitattu 31.2.2023. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0273799>

Nousiainen, J. 2016. Mikä on sopiva maidon ureapitoisuus?. Valio Oy. 23.2.2016. Viitattu 24.1.2023. <https://www.maitojame.fi/artikkelit/mika-on-sopiva-maidon-ureapitoisuus/>

Park, S., Jung, D., Altshuler, I., Kruban, D., Dufour, S. & Ronholm, J. 2022. A longitudinal census of the bacterial community in raw milk correlated with *Staphylococcus aureus* clinical mastitis infections in dairy cattle. *Animal Microbiome.* 24.11.2022. Viitattu 3.2.2023. <https://animalmicrobiome.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42523-022-00211-x>

Pyörälä, S. & Tiihonen, T. 2005. Nautojen sairaudet. Helsinki.fi. Viitattu 30.3.2023. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/1975/544/18_utaretulehdus_eli_mastiitti.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Qiagen. 2021. DNeasy PowerSoil Pro Kit Handbook. Verkkosivu. Viitattu 2.2.2023. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=9bb59b74-e493-4aeb-b6c1-f660852e8d97&lang=en>

Qiagen. n.d. QIAcube connect. Verkkosivu. Viitattu 2.2.2023. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-purification/instruments-equipment/qiacube-connect>

Radostits, OM., Gay, CC., Hinchcliff, KW. & Constable, PD. 2007. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* 10. painos. New York. Saunders Elsevier.

Rainard P. 2017. Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction? *Veterinary Research.* 17.4.2017. Viitattu 7.1.2023. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/MB/C6MB00217J>

Roy, D., Ye, A., Moughan, P. & Singh, H. 2020. Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk From Different Species—A Review. Riddet Institute, Massey University, Palmerston North, New Zealand. 6.8.2020. Viitattu 5.1.2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2020.577759/full>

Ruegg, P. 2012 *Mastitis in Dairy Cows, An issue of Veterinary clinics: Food Animal Practice.* 1. painos. Philadelphia, Pennsylvania. Saunders.

Saarela, AM., Hyvönen, P., Määttä, S. & Von Wright, A. 2010. *Elintarvikeprosessit.* Kuopio. Savonia-ammattikorkeakoulu.

Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L. & Pyörälä, S. 1993. *Utareen sairaudet.* 2. painos. Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu

Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. 2016. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. PLoS Biol. 14.9.2016. Viitattu 7.1.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4991899/>

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K & Pelkonen, J. 2013. Geenitekniikka. 2. korjattu painos. Turku: Turun Ammattikorkeakoulu.

Suominen, I. & Ollikka, P. 1999. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3. painos. Helsinki. Hakapaino Oy.

Tan, SC. & Yiap, BC. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraxtion: The Past and The Present. J Biomed Biotechnol. 30.11.2009. Viitattu 1.2.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2789530/>

Taponen, S., McGuinnes, D., Hiitiö, H., Simojoki, H., Zadoks, R. & Pyörälä, S. 2019. Bovine milk microbiome: a more complex issue than expected. Veterinary Research. 6.6.2019. Viitattu 2.3.2023. <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-019-0662-y>

Terveyskirjasto. 2016. Opportunistinen mikrobi. Duodecim Terveyskirjasto. Verkkosivu. Viitattu 1.3.2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt02424>

Mannion, J., Loughrey, S. & Matlock, B. 2016. NanoDrop One Performance Data: Nucleic Acid Measurements at 260 nm. Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA Thermo Fisher Scientific. Viitattu 30.3.2023. <https://tools.thermo-fisher.com/content/sfs/brochures/TN52810-E-0416M-Performance-Data.pdf>

Tieteen termipankki. 2023. Nimitys: kommensalismi. Tieteen termipankki. Verkkosivu. Viitattu 1.3.2023. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:kommensalismi>

Tuomisto, A. 2008. Rehun rasvahappojen biohydrogenaatio pötsinesteestä in vitro. Suomen maataloustieteellinen seura. 31.1.2008. Viitattu 25.1.2023. <https://journal.fi/smst/article/view/75851>

Valio. n.d. Maksamme vastuullisuuslisää tuottajille. Verkkosivu. Viitattu 22.1.2023. <https://www.valio.fi/vastuullisuus/elainten-hyvinvointi/maksamme-vastuullisuuslisaa-tuottajille/>

Vesa, T., Korpela, R. & Sahi, T. 1993. Laktoosi-intoleranssi ja sen hoito. 1. painos. Jyväskylä. Gummerus Kirjapaino Oy.

Vuento, M. 2021. Bakteerien planeetta. 2. painos. Helsinki. Gaudeamus Oy.

Wilson, I. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. American Society for Microbiology. X.10.1997. Viitattu 2.2.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168683/pdf/633741.pdf>

Wilt, T., Shaukat, A., Shamliyan, T., Taylor, B., MacDonald, R., Tacklind, J., Rutks, I., Schwarzenberg, SJ., Kane, R. & Levitt, M. 2010. Lactose intolerance

and health. Evid Rep Technol Assess (Full Rep). PubMed Central. Viitattu 21.3.2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4781456/>