

TEKNIIKAN JA LIIKENTEEN TOIMIALA

Laboratorioala

Tutkimuspainotteinen suuntautumisvaihtoehto

OPINNÄYTETYÖ

**DNA:N ERISTYSMENETELMIEN VERTAILU ELINTARVIKENÄYTTEILLE
ERILAISILLA NÄYTEMATRIISEILLA**

**Työn tekijä: Aino Palva
Työn valvoja: Tiina Soininen
Työn ohjaaja: Anna-Riitta Savolainen**

Työ hyväksytty: __. __. 2007

**Tiina Soininen
lehtori**



ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tullilaboratorion Biokemian jaoston GMO-ryhmälle. Haluan kiittää työn ohjaajaa tullikemisti Anna-Riitta Savolaista käytännön ja kirjallisen työn ohjauksesta, laborantteja Anneli Forsénia ja Pia Haapaa käytännön työhön opastamisesta sekä koko Biokemian jaoston henkilökuntaa, joka teki työharjoitteluaikani erittäin mukavaksi.

Lisäksi haluan kiittää luokkatovereitani Helsingin ammattikorkeakoulu Stadian TB04-vuosikurssilta ja erityisesti Noora Kanervaa, joka toimi työn opponijana, lehtori Tiina Soinista, joka toimi työtä valvovana opettajana sekä tutoropettajaani Mirja-Liisa Mattssonina kaikesta tuesta koulutyön varrella.

Kiitän myös perhettäni ja ystäviäni, joilta olen saanut tukea opiskelujeni ja tämän työn tekemisen ajan.

Helsingissä 31.10.2007

Aino Palva

OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

Tekijä: Aino Palva	
Työn nimi: DNA:n eristysmenetelmien vertailu elintarvikenäytteille erilaisilla näytematriiseilla	
Päivämäärä: 31.10.2007	Sivumäärä: 41 s.
Koulutusohjelma: Laboratorioala	Suuntautumisvaihtoehto: Tutkimuspainotteinen
Työn valvoja: Lehtori Tiina Soininen	
Työn ohjaaja: Tullikemisti Anna-Riitta Savolainen	
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Tullilaboratorion Biokemian jaoston GMO-työryhmälle, joka valvoo elintarvikenäytteissä esiintyviä geneettisiä muunnoksia. Työn tarkoituksena oli vertailla DNA:n eristysmenetelmiä erilaisilla näytematriiseilla. Kaikki näytteet olivat Tullilaboratorion valvontaan kuuluvia elintarvikenäytteitä, joista osa oli pitkälle prosessoituja elintarvikkeita ja osa sisälsi suuria määriä rasvaa ja proteiinia. Jokaiselle näytetyypille pyrittiin löytämään sopivin menetelmä, jolla saadaan hyvälaatuisia ja monistuskelpoista DNA:ta. Eristetyn DNA:n pitoisuus, menetelmän kustannukset, työturvallisuus, analyysin käytetty aika ja kontaminaatoriskit olivat myös valintakriteerejä. Kolmea erilaista menetelmää verrattiin laboratoriossa rutiinikäytössä olevaan eristysmenetelmään.</p> <p>Näytteet käsiteltiin kolmessa sarjassa: ensimmäinen sisälsi riisinäytteitä, toinen maissinäytteitä ja kolmas soijaa sisältäviä elintarvikkeita. Jokaisesta näytteestä tehtiin rinnakkaispunnitus tulosten luotettavuuden varmistamiseksi. Kaikki näytesarjat eristettiin valituilla kolmella menetelmällä. Eristetyt DNA-näytteet analysoitiin kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR:llä, jotta voitiin varmistua, että näytteestä saatiin eristettyä halutun organismin DNA.</p> <p>Jokaiselle näytetyypille löydettiin parhaiten soveltuva menetelmä. Kahdella valituista menetelmistä saatiin parhaat tulokset jokaisen näytematriisin kohdalla. Myös näytteistä, joista ei saatu eristettyä referenssi-DNA:ta rutiinikäytössä olevalla menetelmällä, onnistuttiin eristämään haluttua DNA:ta yhdellä menetelmistä. Kokeilu onnistui hyvin ja tuloksia voidaan hyödyntää valittaessa valvontanäytteille sopivia eristysmenetelmiä.</p>	
Avainsanat: DNA:n eristys, prosessoitu elintarvike, kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR	

ABSTRACT

Name: Aino Palva	
Title: Comparison of Methods in Isolation of DNA from Foodstuffs Using Different Matrixes	
Date: 31.10.2007	Number of pages: 41
Department: Laboratory Sciences	Study Programme: Research
Instructor: Tiina Soininen, Lecturer	
Supervisor: Anna-Riitta Savolainen, Customs Chemist, ScM	
<p>The graduate study was made for the GMO group of the Biochemical department of the Finnish Customs Laboratory that monitors genetically modified foodstuffs. Three different DNA isolation methods were compared with the method currently used in routine work at the laboratory. The goal was to find the best method for each group of samples. All the samples had a poor yield or quality of DNA; most of the samples met both criteria. The criteria for determining the best method were the quality and amplification properties and also the yield of the isolated DNA. Also the cost, analysis time, safety and risk of contamination were taken into consideration in determining the most effective method for each sample type.</p> <p>The samples were normal samples that had been analysed in the laboratory and included highly processed foodstuffs and foodstuffs containing large amounts of fat and protein. The samples were analysed in three series, one containing rice, the other containing corn and the third containing soy. All the samples were analysed in duplicates to ensure the accuracy of the results. The isolated DNA samples were analysed using quantitative real time PCR to make sure the isolated DNA was from the desired organism.</p> <p>An effective method was found for each type of samples. Two of the used methods seemed to give the best results for every sample type analysed. Reference DNA had not been successfully isolated from two of the samples with the current routine method. This problem was overcome with one of the methods. The project was very successful and the results can be used in later problems with finding the most effective method for a certain difficult sample.</p>	
Keywords: DNA isolation, GMO, processed foodstuffs, quantitative real time PCR	

SISÄLLYS

ALKULAUSE

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	TYÖN TEORIA	2
2.1	Kasvisolun rakenne	2
2.2	Solujen hajotus nukleiinihappojen eristystä varten	4
2.2.1	<i>Hajotuspuskuri</i>	5
2.2.2	<i>Jauhatuksen tärkeys</i>	7
2.3	Kontaminanttien poisto	7
2.3.1	<i>Tärkkelystä hajottavat entsyymit</i>	7
2.3.2	<i>RNA:n poisto näytteestä</i>	9
2.3.3	<i>Proteiinien poisto</i>	9
2.3.4	<i>Muut kontaminantit</i>	9
2.4	DNA:n eristys kasvimateriaalista	10
2.4.1	<i>Guanidiinihydrokloridi ja silikamembraani</i>	10
2.4.2	<i>CTAB-saostus</i>	11
2.4.3	<i>Ioninvaihtokromatografia</i>	11
2.5	DNA:n eristys prosessoiduista elintarvikkeista	12
2.6	Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (<i>Real Time qPCR</i>)	13
2.6.1	<i>qPCR:n periaate</i>	13
2.6.2	<i>Laitteisto</i>	13
2.6.3	<i>Detektoinnin kemiaa</i>	13
2.6.4	<i>Tulosten analysointi</i>	17
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	18
3.1	Näytteet	18
3.2	DNA:n eristysmenetelmät	20
3.3	Reaaliaikainen PCR	21

4	TYÖN SUORITUS	21
4.1	Näytteiden esikäsittely	21
4.2	Uuttopuskurikokeilu	22
4.3	DNA:n eristys	22
4.3.1	<i>DNA:n eristys menetelmällä 2</i>	22
4.3.2	<i>DNA:n eristys menetelmällä 3</i>	23
4.3.3	<i>DNA:n eristys menetelmällä 4</i>	23
4.4	Reaaliaikainen PCR	23
5	TULOKSET	24
5.1	Uuttopuskurikokeilu	24
5.2	Rnaasi A:n lisäys menetelmään 2	24
5.3	α -Amylaasin käyttö maissi- ja riisinäytteissä	25
5.4	DNA:n eristys menetelmällä 2	27
5.5	DNA:n eristys menetelmällä 3	29
5.6	DNA:n eristys menetelmällä 4	29
5.7	PCR-tulokset	29
5.7.1	<i>Riisisarja</i>	30
5.7.2	<i>Maissisarja</i>	31
5.7.3	<i>Soijasarja</i>	33
6	PÄÄTELMÄT	35
6.1	Menetelmien vertailu	35
6.1.1	<i>Riisinäytteet</i>	35
6.1.2	<i>Maissinäytteet</i>	35
6.1.3	<i>Soijanäytteet</i>	36
6.2	Muut huomioonotettavat tekijät	37
6.2.1	<i>Kustannukset</i>	37
6.2.2	<i>Menetelmän helppous, käytetty aika, kontaminaatiot ja työturvallisuus</i>	38
6.2.3	<i>DNA:n saanto, puhtaus ja monistuvuus</i>	38
6.3	Prosessoiduille elintarvikkeille sopivin menetelmä	39
6.4	Yhteenveto	39
	VIITELUETTELO	40

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tullilaboratorion GMO-työryhmälle. Tullilaboratorio tutkii maahan tuotavia elintarvikkeita ja Biokemian jaostoon kuuluva GMO-työryhmä valvoo elintarvikkeiden geneettistä muuntelua. Geneettisesti muunneltuja organismeja (GMO) sisältävien elintarvikkeiden tutkimus ja valvonta on hyvin tärkeää niihin liittyvän lainsäädännön vuoksi. Tutkituimmat geenimuunnellut elintarvikkeet sisältävät soijan, maissin tai riisin DNA:ta. Geneettinen muuntelu elintarvikkeissa on sallittu tietyissä rajoissa. Kasveille on määritelty laillisia ja laittomia muunnoksia ja laillisenkin muunnoksen raja-arvo on 1 % tuotteen sisältämästä DNA:sta. Näytteiden laaja kirjo asettaa haasteita valvonnalle. Näytematriisit vaihtelevat raaka-aineista pitkälle prosessoituihin tuotteisiin.

Laboratoriossa on rutiinikäytössä yksi, kaupalliseen sovellukseen perustuva menetelmä DNA:n eristykseen. Menetelmä ei kuitenkaan sovellu kaikille näytematriiseille. Tämän työn tavoitteena oli vertailla erilaisille elintarvikenäytteille soveltuvia DNA:n eristysmenetelmiä ja löytää kullekin näyteryhmälle soveltuvin menetelmä. Painopiste oli erityisen hankalissa näytteissä, joista osasta ei käytössä olevalla menetelmällä ollut onnistuttu eristämään kohdeorganismien DNA:ta. DNA:n eristys elintarvikkeista on hankalaa monien eri tekijöiden vuoksi. Osa raaka-aineista, kuten riisi, on jo itsestään hankala näytematriisi. Jotkin elintarvikkeet sisältävät DNA:n eristystä tai PCR-analyysia haittaavia tekijöitä kuten suuria määriä suolaa, mausteita, rasvaa tai proteiineja. Vaikeimman näytematriisin muodostavat prosessoidut elintarvikkeet, joiden valmistuksessa on käytetty DNA:ta pilkkovia tekijöitä kuten lämpö-, happo- tai emäskäsittelyä. Usein prosessoidut elintarvikkeet sisältävät lisäksi edellä mainittuja analyysia vaikeuttavia tekijöitä.

Tavoitteena oli tarkastella kullekin näytetyypille soveltuvaa menetelmää DNA:n saannon, puhtauden ja monistuskelpoisuuden perusteella ja arvioida myös muita menetelmän käyttöön liittyviä tekijöitä, joista tärkeimpiä olivat kustannukset, menetelmän helppous ja nopeus sekä kontaminaatio- ja työturvallisuusriskien minimointi. Tarkoituksena oli tarkastella kolmea erilaista DNA:n eristysmenetelmää eristämällä samasta näytteestä DNA jokaisella menetelmällä, mittaamalla DNA-pitoisuudet ja vertaamalla tuloksia eri menetelmien kesken.

Työsuunnitelmaan sisältyi myös eristettyjen DNA-näytteiden analysointi reaaliaikaisella PCR:llä. PCR-analyysin avulla voitiin saada selville, oliko menetelmällä saatu eristettyä halutun organismin DNA. PCR-tulosten avulla voitiin myös arvioida eristetyn DNA:n monistuskelpoisuutta. Tutkimuksen kohteena olivat erityisen hankalat näytetyypit kuten suuria määriä rasvaa, proteiinia tai hiilihydraattia sisältävät tuotteet, pitkälle prosessoidut elintarvikkeet sekä erilaiset riisilajit ja -valmisteet.

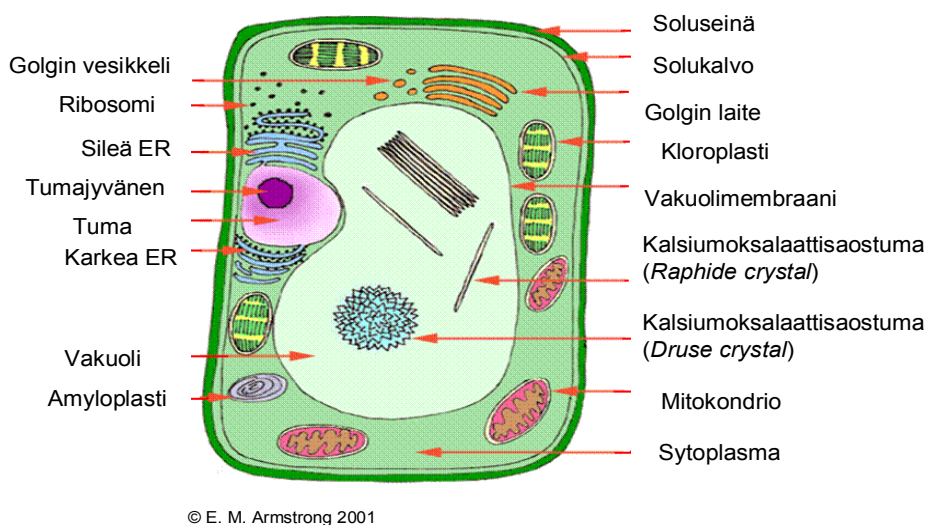
2 TYÖN TEORIA

Tässä osiossa on kerrottu kasvisolun rakenteesta ja solujen hajotuksesta, DNA:n eristysmenetelmistä sekä eristetyn DNA:n analysoinnista qPCR:llä.

DNA:n eristyksen ensimmäinen vaihe on solujen hajotus. Eri solut ovat rakenteeltaan erilaisia, mikä tulee ottaa huomioon hajotusmenetelmää valittaessa.

2.1 Kasvisolun rakenne

Kasvisolu on eläin- ja bakteerisolua huomattavasti suurempi. Kasvisolun läpimitta on noin 100 µm, kun eläinsolut ovat halkaisijaltaan noin 10 µm ja bakteerisolut 1 - 4 µm. Toinen suuri ero soluissa on kasvisolun sisältämä kova soluseinä. Plasmamembraania ympäröivä soluseinä koostuu hiilihydraattikomplekseista ja ligniinistä tai vahasta. Kasvisolu sisältää myös joitakin rakenteita, joita ei ole muissa soluissa. Näitä ovat kloroplastit ja vakuoli, amyloplasti ja kalsiumoksaalattisaostumat. Amyloplasti eli tärkkelysjyvänen on tärkkelyksen varastointipaikka. Kalsiumoksaalatti muodostaa joihinkin kasvisoluihin saostumia, jotka voivat olla piikkimäisiä tai rakeisia. Ne vastaavat koostumukseltaan ihmisen elimistössä muodostuvia munuaiskiviä, mutta ovat kuitenkin kasvisolulle tarpeellisia mahdollisesti suojaen solua tuholaisilta. Kasvisolun rakenne on esitetty kuvassa 1. [1, s. 362 - 363; 2.]



Kuva 1. Kasvisolun rakenne [3]

Soluseinä

Nopeasti jakautuvia soluja ympäröi ohut primaarinen soluseinä, joka erottaa solut toisistaan. Kasvun lakattua sekundaarinen soluseinä muodostuu primaarisen soluseinän ja plasmamembraanin väliin. [4, s. 6.]

Selluloosa on primaarisen soluseinän pääkomponentti. Se ei ole vesiliukoinen ja on stabiili matalassa pH:ssa. Selluloosamolekyylit ovat litteitä ja nauhamaisia, ja nämä nauhat ovat kiinnittyneinä toisiinsa vetysidoksin muodostaen kiteisiä mikrofibrillejä. Kiteisen selluloosarakenteen lisäksi soluseinässä on hemiselluloosan ja pektiinin muodostamaa amorfista ainetta. Pektinit ovat soluseinän komponenteista helpoimmin veteen liukenevia. Ne voidaan eristää soluseinästä kuuman veden, ammoniumoksalaatin, EDTA:n tai muiden soluseinässä olevia Ca^{2+} -ioneja kelatoivien aineiden avulla. Primaarisen soluseinän tärkein proteiini on ekstensiini, joka on paljon hiilihydraattia sisältävä glykoproteiini. Muita tärkeitä soluseinän proteiineja ovat entsyymit kuten erilaiset hydrolaasit, transferaasit ja peroksidaasit. [4, s. 6 - 9; 5, s. 432 - 443.]

Sekundaarinen soluseinä eroaa primaarisesta monella tapaa. Se on kovempi ja kestävämpi ja näin suojaa solun sisäisiä soluorganelleja mekaanisilta ja kemiallisilta haitoilta. Sekundaarinen soluseinä antaa kasvisolulle sen lopullisen muodon. Se koostuu selluloosasta, hemiselluloosasta, pektiinistä, proteiineista sekä pienestä määrästä fenolisia yhdisteitä ja entsyymejä. Selluloosan muodostamat mikrofibrillit yhdistettynä ligniiniin tekevät soluseinästä kestävä. Ligniinit ovat polymeeriyhdisteitä, jotka eivät liukene edes useimpiin liuottimiin. [4, s. 6 - 9; 5, s.432 - 443.]

2.2 Solujen hajotus nukleiinihappojen eristystä varten

DNA:n eristyksen ja puhdistuksen ensimmäinen vaihe on solujen hajotus. Soluja voidaan hajottaa useilla eri menetelmillä. Kasvi- ja eläinkudoksia hajotetaan usein mekaanisesti ensin leikkaamalla kudosta pieniksi paloiksi ja jauhamalla esimerkiksi huumareissa tai kaupallisilla, usein kotikäyttöön tarkoitetuilla myllyillä tai soseuttajilla. Kudokset voidaan jauhaa kuivana tai siitä voidaan tehdä suspensio veden tai puskuriliuoksen kanssa. Veden lisäys näytteeseen homogenointivaiheessa voi kiihdyttää DNA:ta pilkkovien entsyymien toimintaa. Homogenointi etanoliliuoksessa pelkän veden sijaan estää DNA:n toimintaa. Kuivajauhatusta on paras tapa välttää DNA:n hajoamista, mutta käytännön syistä joihinkin näytteisiin on lisättävä nestettä homogenoinnin onnistumiseksi tai kontaminanttien poistamiseksi. Esimerkiksi suolaa sisältävistä elintarvikkeista voidaan pestä näkyvää suolaa lämpimällä vedellä pois. Bakteerisoluille kova mekaaninen hajotus ei ole tarpeen eikä myöskään soveltu, sillä ne ovat paljon hauraampia. Bakteerisoluja voidaan hajottaa mekaanisesti pienten lasihelmien avulla. Pelkkä mekaaninen hajotus ei kuitenkaan usein riitä kasvisoluille, joilla on kova soluseinä. [1, s. 362 - 365; 6, s. 88 - 93.]

Soluja voidaan hajottaa myös entsyymaattisesti ja erilaisten puskuriliuosten avulla. Bakteerisoluille riittää käsittely lysotsyymillä. Lysotsyymi on entsyymi, joka hajottaa bakteerien soluseinässä esiintyvää peptidoglykaania. Gram-positiivisille bakteereille riittää lysotsyymikäsittely sopivan puskurin läsnä ollessa, mutta Gram-negatiivisten bakteerien hajotukseen tarvitaan myös käsittely EDTA:lla, joka kelaatoi ulomman lipopolysakkaridikalvon kalsiumioneja. Lisäksi liuoksen tulisi sisältää ionitonta detergenttiä liuottamaan solumembraania. Kasvisoluihin lysotsyymikäsittely ei tehoa. Niiden hajotukseen käytetään usein mekaanisen hajotuksen lisäksi

puskuriliuosta, joka sisältää detergentejä, EDTA:ta ja usein myös tietyille kasville spesifisiä entsyymejä, kuten α -amylaasia riisille ja maissille. Soluja voidaan hajottaa myös muilla tavoilla kuten ultraäänikäsittelyllä. [1, s. 363 - 365; 6, s. 88 - 93.]

Kasvisolun hajottaminen on haasteellista soluseinän kovuuden lisäksi myös sen sisältämien aineenvaihduntatuotteiden vuoksi. Näyte on jauhattava tarpeeksi perusteellisesti, jotta soluseinä saadaan hajoamaan. Voimaa ei saa kuitenkaan käyttää liikaa, jotteivät soluorganellit hajoa ja vapauta haitallisia yhdisteitä eristysliuokseen. Aineenvaihduntatuotteet hankaloittavat DNA:n puhdistusta ja voivat myös inhiboida PCR-reaktioita tai jopa hajottaa DNA-molekyylejä. Solujen hajotuksessa käytetään usein jotakin mekaanista menetelmää, jonka jälkeen solumassaa inkuboidaan sopivassa puskuriliuoksessa useiden tuntien ajan. [1, s.192 - 194; 7.]

Kasvimateriaali voidaan jäädäyttää homogeenointia varten nestemäisellä tyypellä. Tällöin näyte murskataan useimmiten huumareissa tai koeputkessa survomalla. Herkät materiaalit, kuten kasvien lehdet, käsitellään usein tällä tavalla. Homogeenointi voidaan tehdä myös huoneenlämmössä, jolloin usein käytetään kaupallisia myllyjä tai muita laitteita. Kovempi hajotus on usein tarpeen koville materiaaleille kuten siemenille tai jyville. [6, s. 88 - 93.]

Soluseinän hajotus voidaan tehdä myös kemiallisesti selluloosaa liuottavilla yhdisteillä kuten etyyliksantogenaatin natrium- ja kaliumsuoloilla, joita käytetään tekstiiliteollisuudessa. Kudosten hajotus onnistuu myös yhdistelemällä kuumalla ja kylmällä käsittelyä sykleissä. Kuuma-kylmäkäsittelyn lisäksi hajotuksessa voidaan käyttää alkalisia yhdisteitä. [6, s. 88 - 93.]

2.2.1 Hajotuspuskuri

Solujen hajotuspuskuri sisältää usein jotakin detergenttiä, joka alentaa solun pintajännitystä ja irrottaa soluseinässä olevia proteiineja. Liuos sisältää useimmiten myös suuria konsentraatioita NaCl:a sekä pelkistäviä ja kelatoivia aineita. Lisäksi liuoksen pH pidetään vakaana puskurisysteemin avulla. [6, s. 90 - 91.]

Detergentit

Detergenttejä käytetään uuttopuskurissa tuhoamaan solumembraaneja ja denaturoimaan proteiineja. Detergentit hajottavat solun solukalvon irrottamalla kalvon proteiineja. Useimmin käytetty detergentti on kationinen setyyli(trimetyyli)ammoniumbromidi eli CTAB. Anionisista detergenteistä käytetyimpiä ovat sarkosyyli ja natriumdodekyylisulfaatti eli SDS. Detergenttien pitoisuus puskuriliuoksessa voi vaihdella, mutta yleisin pitoisuus CTAB:lle on 2 % ja SDS:lle 1 %. [6, s. 90 - 91.]

Puskurisysteemi

Puskuriliuoksen puskurointiominaisuus perustuu usein Tris-HCl:n käyttöön. Puskurisysteemin tehtävänä on pitää liuoksen pH alueella, jolla DNA:ta hajottavat entsyymit eivät toimi optimaalisesti. pH säädetään yleensä alueelle 8 - 9, joka ei ole lähellä DNA:ta hajottavien entsyymien optimi-pH:ta. [6, s. 90 - 91.]

Korkea suolapitoisuus

Puskuriliuoksen NaCl-pitoisuus on usein yli 1 M. Korkea suolapitoisuus irrottaa nukleaariset proteiinit kuten histonit DNA:sta, pitää polysakkaridit liuoksessa, jos DNA saostetaan etanolilla, ja ulossuolaa mahdollisia PCR-reaktioita inhiboivia tekijöitä. [6, s. 90 - 91.]

Pelkistävät aineet

Puskuriliuoksessa käytetään usein pelkistäviä aineita estämään hapettumisreaktioita, jotka vahingoittavat suoraan tai epäsuorasti DNA:ta. Usein käytettyjä pelkistäjiä ovat β -merkaptoetanol, ditioneittoli ja askorbiinihappo. [6, s. 90 - 91.]

Kelatoivat aineet

Solun sisältä liuokseen vapautuvat DNA:ta tarvitsevat magnesiumioneja toimiakseen, joten DNA:n hajoamisen estämiseksi puskuriliuokseen lisätään usein magnesiumia kelatoivia yhdisteitä. Usein käytettyjä kelatoivia yhdisteitä ovat EDTA, EGTA, o-fenantroleeni ja Chelex. [6, s. 90 - 91.]

2.2.2 Jauhatuksen tärkeys

Tutkimuksissa saannot kasvavat suoraan suhteessa näytteen partikkelikoon pienenemiseen [7; 8]. Näytteen tulisi olla siis jauhettu mahdollisimman pieniksi osiksi, jotta mitattu DNA-pitoisuuden arvo näytteessä olisi luotettava. Tämä korostuu etenkin GMO-tutkimuksessa. Joskus näytteen partikkeleista, kuten jyvistä tai siemenistä, vain osa on geneettisesti muunneltuja. Näyte on siis sekoitettava ja jauhettava perusteellisesti oikean tuloksen saavuttamiseksi. Sekoitus on tärkeää myös valmiiksi homogeenisten näytteiden kohdalla.

2.3 Kontaminanttien poisto

Puskuriliuoksen lisäksi jo solujen hajotusvaiheessa näytteeseen lisätään usein entsyymejä, jotka hajottavat liuoksessa olevia haitallisia aineita. DNA:n eristystä haittaavia tekijöitä ovat RNA, tärkkelys, proteiinit ja monet kasvin tuottamat orgaaniset yhdisteet. Menetelmästä riippuen osa kontaminanteista poistetaan jo uuttovaiheessa, osa eristyksen edetessä.

2.3.1 Tärkkelystä hajottavat entsyymit

Amylaasit ovat entsyymejä, jotka katalysoivat glykosidisten sidosten hydrolyysiä. Näitä sidoksia on glukoosia sisältävissä yhdisteissä kuten tärkkelyksessä. Amylaasit voidaan jakaa α - ja β -amylaaseihin. Ne vaikuttavat yhdisteiden hydrolyysiin eri tavoilla, mikä täytyy ottaa huomioon entsyymien valinnassa. Tärkkelys sisältää amyloosia, joka on suoraketjuinen glukoosin polymeeri, sekä amylopektiiniä, joka on haaroittunut polysakkaridi. Haarautunut rakenne on suoraketjuista liukoisempi ja myös lisää tärkkelysliuoksen viskositeettia. α -Amylaasi katkoo glukoosiketjua sattumanvaraisesti α -1,4-glykosidisten sidosten kohdalta. Näin se pienentää liuoksen viskositeettia. β -Amylaasi katkoo α -1,4-sidoksia vain polymeerin ei-pelkistävästä päästä ja lineaarisen ketjun hydrolyysin tuotteena on aina maltoosia. [9, s. 163 - 165.]

Tärkkelyksen hajottaminen entsyymaattisesti ei kuitenkaan ole yksinkertaista prosessoituja elintarvikkeita käsiteltäessä. Tärkkelyksen pilkkoutumiseen vaikuttavat sen fyysinen muoto, tärkkelysjyvän luonne ja elintarvikkeen käsittely sitä valmistettaessa. Tärkkelys on tärkein kasvien varastoima polysakkaridi. Amylopektiinin osuus tärkkelyksestä on 70 - 80 % ja amyloosia on 20 - 30 %. Kasveissa tärkkelys on varastoituneena osaksi kiteisinä jyväsinä, jotka sisältävät sekä tiheästi haaroittuneita että lyhyempiä

kaksoiskierteitä muodostavia ketjumaisia osia. Nämä erilaiset rakenteet antavat tärkkelysjyväselle osin sekä kiteisen että amorfisen luonteen. [10.]

Tärkkelys ei liukene kylmään veteen, mutta kuumennettaessa se turpoaa ja lopulta molekyylin järjestys hajoaa ja se menettää kiteisen rakenteensa. Tärkkelysjyvänen on hajotessaan altis entsyymien vaikutukselle. Jäähtyessään tärkkelys kiteytyy uudelleen ja tämä uudelleenkiteytynyt tärkkelys pystyy vastustamaan entsyymien hydrolysoivaa vaikutusta. Elintarvikkeiden prosessoinnissa kuumennusta ja jäähdytystä voi tapahtua useita kertoja ennen kuin tuote on valmis. Tämän vuoksi α -amylaasilla ei välttämättä ole vaikutusta joidenkin lämpökäsiteltyjen elintarvikkeiden hajotukseen DNA:ta eristettäessä. [10.]

Kasvien soluseinä sisältää myös muita polysakkarideja, kuten selluloosaa, pektiiniä ja hemiselluloosaa, jotka eivät ole tärkkelystä. Näitä polysakkarideja ei saada pilkkoutumaan α -amylaasin avulla, sillä ne eivät ole α -glukaaneja eli ne eivät sisällä α -1,4-glykosidisia sidoksia. Usein soluseinän hajotukseen onkin käytettävä mekaanisia menetelmiä. [10.]

Tutkimukset ovat osoittaneet, että tärkkelystä hajottavat entsyymit toimivat paremmin kohteen partikkelikoon pienentyessä. Kokonaisissa tai vain osaksi hajotetuissa soluissa kova soluseinä estää tärkkelyksen turpoamista ja näin myös sen hajoamista. Myös tietyissä prosessoiduissa elintarvikkeissa kuten spagetissa tärkkelys on pakkautunut hyvin tiheästi, jolloin tärkkelyksen turpoaminen ja näin ollen myös hajoaminen on pienempää. Näytteen perusteellinen mekaaninen hajotus ja sekoitus ovat siis erittäin tärkeitä seikkoja, paitsi edustavan homogeenisen näytteen saamiseksi, myös solujen hajoamisen ja DNA:n eristyksen onnistumisen kannalta. [10.]

Maissin tärkkelys ei inhiboi PCR-reaktioita, toisin kuin happamat polysakkaridit, mutta häiritsee muuten DNA:n eristystä. Siksi tärkkelyksen hajottaminen on tärkeä eristyksen vaihe varsinkin maissinäytteiden kohdalla. Happamia polysakkarideja syntyy näyteliuokseen soluseinän hajotessa. [7.]

2.3.2 RNA:n poisto näytteestä

RNA voidaan usein eristää samalla menetelmällä kuin DNA, joten se on poistettava näyteliuksesta jollakin tavalla. RNA poistetaan useimmiten käsittelemällä näyteliuos RNAasilla. RNA voidaan myös saostaa lisäämällä liuokseen suuri pitoisuus litiumkloridia. RNA:n poisto voidaan tehdä heti DNA:n eristyksen alussa tai loppuvaiheessa. Usein RNAasi-käsittely tehdään uuttopuskurin lisäyksen yhteydessä. [11, s. 28 - 29.]

Näytteessä oleva RNA haittaa DNA-pitoisuuden määrittystä, sillä se absorboi DNA:n tavoin aallonpituudella 260 nm. Näin ollen RNA-kontaminoitunut näyte voi antaa liian suuren lukeman DNA:n pitoisuudelle. RNA-kontaminaatio voidaan havaita puhtausasteen lukemasta, joka on näytteen absorbanssi mitattuna aallonpituudella 260 nm jaettuna näytteen absorbanssilukemalla mitattuna aallonpituudella 280 nm. [11, s. 28 - 29.]

$$\text{DNA:n puhtaus} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Kun suhdeluku on noin 1,8, näytteessä ei oleteta olevan häiritseviä proteiineja. Proteiinit absorboivat vahvasti aallonpituudella 280 nm, joten proteiineja sisältävän näytteen absorbanssien suhde on pienempi kuin 1,8. Jos suhdeluku ≥ 2 , näytteessä voi olettaa olevan RNA-molekyylejä. [11, s. 28 - 29.]

2.3.3 Proteiinien poisto

Proteiinit poistetaan usein näyteliuksesta orgaanisella uutolla. Monissa menetelmissä käytetään myös proteiineja hajottavia entsyymejä proteiinien poistamiseksi näytteestä.

2.3.4 Muut kontaminantit

Muita nukleiinihappojen eristystä haittaavia aineita ovat kasvisolussa esiintyvät polyfenoliset yhdisteet, terpeenit, alkaloidit ja flavonoidit. Näiden yhdisteiden poistamiseksi uuttopuskuriin voidaan lisätä aineita inhiboivia yhdisteitä. Merkaptotetanoli on usein käytetty pelkistävä aine, joka inhiboi polyfenolien aiheuttamaa hapettumista. [6, s. 88 - 93.]

2.4 DNA:n eristys kasvimateriaalista

Kasvisolu sisältää nukleiinihappojen ja proteiinien lisäksi paljon muita biokemiallisia yhdisteitä, kuten hiilihydraatteja ja lipidejä. RNA ja proteiinit voidaan hajottaa entsyymaattisesti. Proteiinit voidaan hajottaa proteinaasi K:lla tai proteaasilla. Hajotuksen jälkeen ne voidaan saostaa näyteliuksesta esimerkiksi isopropanolilla. Lipidit saadaan uutettua kloroformin avulla eri faasiin nukleiinihappojen kanssa, mutta liotinuutto ei poista hiilihydraatteja, joita useissa kasveissa ja elintarvikkeissa esiintyy suuria määriä. Tämän vuoksi puhtaan DNA:n saamiseksi näytteestä tarvitaan jokin spesifisempi menetelmä. Menetelmiä on useita erilaisia ja ne perustuvat DNA:n eri ominaisuuksiin. [12, s. 35 - 36.] Tähän työhön valitut menetelmät olivat kaikki luonteeltaan erilaisia ja niiden periaatteet on esitelty omissa kappaleissaan.

Käytettyjä menetelmiä oli kolme:

- Guanidiinihydrokloridi ja silikamembraani (menetelmä 2)
- Ioninvaihtokromatografinen erotus ja DNA:n saostus isopropanolilla (menetelmä 3)
- Orgaaninen uutto kloroformilla ja DNA:n saostus CTAB:lla (menetelmä 4)

2.4.1 Guanidiinihydrokloridi ja silikamembraani

Guanidiinihydrokloridi denaturoi ja liuottaa kaikkia biokemiallisia yhdisteitä paitsi nukleiinihappoja. Tämän vuoksi sitä voidaan käyttää erottamaan nukleiinihappoja erilaisista kudoksista ja kasvimateriaaleista. Lisäksi liuoksen sisältäessä guanidiinihydrokloridia DNA sitoutuu tiukasti silikapartikkeleihin. Näin denaturoituneiden biokemikaalien seoksesta saadaan eristettyä puhdasta DNA:ta. Silikamateriaali yhdistetään usein kromatografiakolonnein, jolloin läpi virtaavasta nesteestä DNA tarttuu kolonnein ja muu materiaali virtaa kolonnin läpi. DNA saadaan irti kolonnista vesipitoisen eluointiliuoksen avulla. Vesi purkaa DNA:n ja silikapartikkelien väliset vuorovaikutukset. Tämä sovellus on useiden kaupallisten kittien periaate. Guanidiinihydrokloridin sijasta menetelmissä voidaan käyttää myös guanidiinitiosyanaattia. [12, s. 35 - 36.]

2.4.2 CTAB-saostus

Setyylitrimetyyliammoniumbromidi eli CTAB on detergentti, joka muodostaa liukenemattoman kompleksin nukleiinihappojen kanssa. CTAB-nukleiinihapposaostuma saadaan takaisin liukoiseen muotoon 1 M NaCl:n avulla. Nukleiinihapot voidaan tämän jälkeen saostaa etanolilla, saostuma liuottaa sopivaan puskuriliuokseen ja jatkaa liuoksesta analyysia. Ennen CTAB-saostusta kontaminantit poistetaan usein käyttämällä orgaanista liuotinta kuten kloroformia tai kloroformin ja fenolin seosta. [12, s. 35 - 36.]

2.4.3 Ioninvaihtokromatografia

Ioninvaihtokromatografia perustuu vastakkaisesti varautuneiden partikkelien vuorovaikutukseen. Varautuneet näytemolekyylit sitoutuvat vastakkaisesti varautuneeseen ioninvaihtajaan. Ioninvaihtajan ionisoituneet ryhmät vetävät liikkuvan faasin vastaioneja puoleensa. Vastaionit voidaan vaihtaa toisiin samalla tavalla varautuneisiin ioneihin, kun niitä on liikkuvassa faasissa. Tässä työssä käytetyssä menetelmässä kolonni ensin tasapainotetaan sopivalla puskurilla, jolloin matriisiin sitoutuu negatiivisesti varautuneita ryhmiä. Kun näyteliuos pipetoidaan kolonniin, nämä ryhmät korvautuvat negatiivisesti varautuneilla DNA-molekyyleillä. DNA eluoidaan kolonnista purkamalla ioninvaihtajan vuorovaikutukset eluointiliuoksen avulla. Ioninvaihtokromatografia on tehokas menetelmä, jolla voidaan puhdistaa kaikkia yhdisteitä, joissa on varautuneita osia. Sitä käytetään monien biologisten yhdisteiden, kuten proteiinien, peptidien ja nukleiinihappojen puhdistukseen. Ioninvaihtajat jaetaan kationinvaihtajiin ja anioninvaihtajiin. Kationinvaihtajat sisältävät negatiivisesti varautuneita ryhmiä ja sitovat positiivisesti varautuneita kationeja. Päinvastoin anioninvaihtajat sisältävät positiivisesti varautuneita ryhmiä, jotka sitovat negatiivisesti varautuneita anioneja. [1, s.521 - 527; 13, s. 24 - 29.]

2.5 DNA:n eristys prosessoituista elintarvikkeista

Pitkät DNA-jaksot hajoavat lyhyitä jaksoja herkemmin lämmön, pH:n muutoksen tai muiden tekijöiden vaikutuksesta. Pitkät, yli 300 bp:n pituiset DNA-jaksot ovat siis huonompia tunnistusjaksoiksi kuin lyhyemmät. Esimerkiksi GMO-analyysissä pitkän tunnistusgeenin käyttö ja sen mahdollinen hajoaminen elintarvikkeen prosessoinnin aikana voi johtaa väärin negatiivisiin tuloksiin. [8.]

Elintarvikkeiden prosessoinnissa käytetään usein vahvasti emäksisiä aineita ja toisaalta myös lämpökäsittely kiihdyttää hapon katalysoimia reaktioita tietyissä elintarvikkeissa kuten happoa sisältävissä hedelmissä ja vihanneksissa. DNA on herkkä happamille sekä emäksisille olosuhteille, joten nämä käsittelyt hajottavat usein kasvimateriaalin DNA:ta. [14; 15.]

Rasvat, suolat, hapot ja muut lisäaineet ovat myös mahdollisia PCR-reaktioita inhiboivia tekijöitä. CTAB-menetelmä puhdistaa tutkimuksen mukaan näytteitä, joilla on korkea hiilihydraattipitoisuus. Verinäytteille suunniteltujen kittien arveltiin puhdistavan proteiini- ja rasvapitoisia elintarvikenäytteitä, sillä veri sisältää paljon yhdisteitä, jotka voivat haitata PCR-reaktioita. [15; 16.]

Näytteen määrän lisääminen ei aina lisää eristetyn DNA:n määrää. Kolonneihin perustuvissa menetelmissä tämä korostuu, sillä kolonni voi sitoa vain tietyn määrän DNA:ta kerrallaan. Myös hajotuspuskurien kapasiteetti hajottaa näytettä on rajattu. [14.]

Esimerkkejä erityisen vaikeista näytetyypeistä ovat maissilastut, jotka ovat vaikeita näytteitä niiden sisältämien öljyjen ja rasvahappojen vuoksi [17], sekä kaakaota sisältävät tuotteet, sillä ne sisältävät paljon PCR:ää mahdollisesti inhiboivia kasvin sekundaarisia metaboliatuotteita [14]. Useimmat prosessoidut elintarvikkeet ovat hankalia näytteitä sekä näytteenkäsittelyn että analyysin kannalta.

2.6 Reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (*Real Time qPCR*)

PCR eli polymeerasiketjureaktio (engl. *polymerase chain reaction*) on yleinen molekyylibiologiassa käytetty menetelmä, jolla voidaan analysoida DNA:ta monistamalla genomin jaksoja DNA-polymeerasin avulla. PCR:stä on useita erilaisia sovelluksia. Tässä työssä keskitytään reaaliaikaiseen PCR:ään.

2.6.1 *qPCR:n periaate*

Reaaliaikaisessa PCR:ssä tuotteiden detektointi tapahtuu niiden syntyessä. Detektoinnissa käytetään apuna fluoresenssileimattuja yhdisteitä, joiden toimintaperiaatteet on selvitetty kappaleessa 2.6.3. PCR-laitteisto on kytketty tietokoneeseen, joka tallentaa tiedot reaaliaikaisesti. [18, s.182 - 183.]

2.6.2 *Laitteisto*

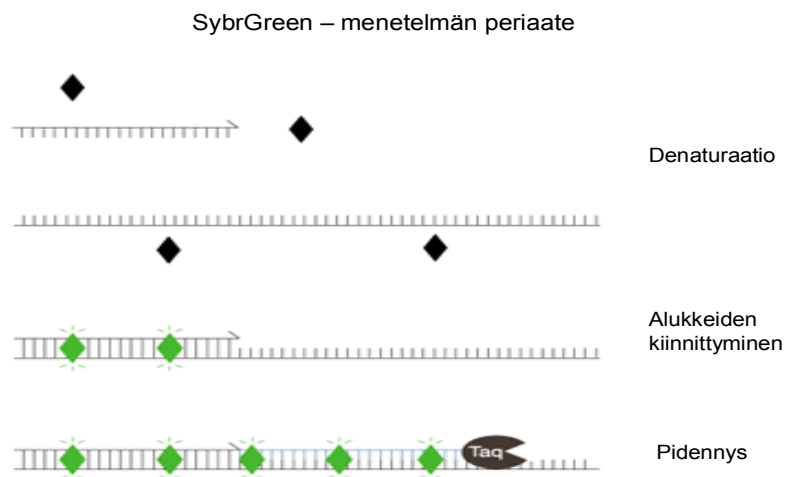
qPCR:n laitteisto koostuu valolähteestä, detektorista ja lämpömekanismista (engl. *thermocycler*). Yleisimmin käytettyjä valonlähteitä ovat argon-ionilaser, LED (*light emitting diode*) -laser, kvartsihalogeeni-tungstenlamppu ja ksenonlamppu. Detektorina käytetään PMT:tä (*photomultiplier tube*), fotodiodeja tai CCD-kameraa (*charged coupled device*). [19, s. 3 - 16.]

2.6.3 *Detektoinnin kemiaa*

DNA:n ja RNA:n detektointiin on kolme eri tapaa, jotka kaikki perustuvat fluoresoiviin väriaineisiin. Menetelmien yleinen periaate on reaktioseoksessa oleva väriaine, jota on ensin pieni määrä. Väriaine antaa fluoresoivan signaalin ja onnistuneiden PCR-sykliden lisääntyessä ja DNA:n monistuessa myös signaali kasvaa. [19, s. 16 - 25.]

DNA:han sitoutuvat väriaineet (DNA Binding Dyes)

Yksinkertainen tapa on yhdistää vapaa väriaine syntyneeseen kaksijuosteiseen DNA-tuotteeseen. Tässä menetelmässä käytetyin reagenssi on SYBR Green[®]. Yksijuosteiset nukleinihapot tai SYBR Green[®] eivät fluoresoi merkittävästi ollessaan sitoutumattomana liuoksessa, mutta sitoutuessaan kaksijuosteiseen DNA-tuotteeseen DNA-väriainekompleksi fluoresoi voimakkaasti (kuva 2). Menetelmä ei ole kovin spesifinen, sillä myös ei-toivotut PCR-tuotteet antavat signaalin. Menetelmää käytettäessä alukkeet on siis valittava huolellisesti ja laaduntarkkailu on tärkeää analyysien kehittämissä. [19, s.16 - 25.]



Kuva 2. SYBR Green[®]-sovelluksen periaate [20]

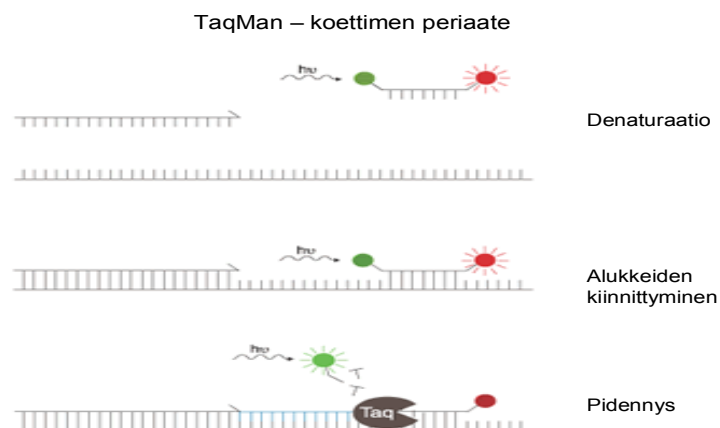
Väriaine-aluke-sovellukset (Dye-primer based assays)

Toinen tapa mitata nukleinihappojen määrää reaktioseoksessa on liittää alukkeeseen väriaine. Näillä menetelmillä on mahdollista suorittaa multiplex-reaktioita toisin kuin DNA:ta sitoviin väriaineisiin perustuvilla menetelmillä. Esimerkkejä näistä sovelluksista ovat LUX- ja Plexor-menetelmät. [19, s. 16 - 25.]

Fluoresenssileimatut oligonukleotidit

Kahdessa aiemmin esitellyssä menetelmässä käytetään alukeparia, kun taas koetinmenetelmissä spesifisyyttä kasvatetaan lisäämällä reaktioon kolmas tai neljäs oligo, jota kutsutaan koettimeksi. Näissä sovelluksissa koettimessa on fluoresoiva leima. Menetelmä on kahta aiempaa spesifisempi, sillä siinä ei detektoida häiritseviä epäspesifisiä PCR-tuotteita. Reaktiossa syntyy tuotteita vain, kun sekä alukkeet että koetin sitoutuvat samanaikaisesti. Menetelmällä on viisi erilaista sovellusta: hydrolyysikoettimet, Molecular Beacon-koettimet, minor groove binding (MGB) -koettimet, Locked nucleic acid (LAD) -koettimet ja hybridisaatiokoettimet. Jokaisessa tapauksessa useita reportteriväriaineita ja sammuttajia voidaan käyttää samanaikaisesti. [19, s.16 - 25.] Tässä työssä kaksi ensimmäistä, hydrolyysi- ja Molecular Beacon- koettimet ovat tarkemmin esiteltyinä.

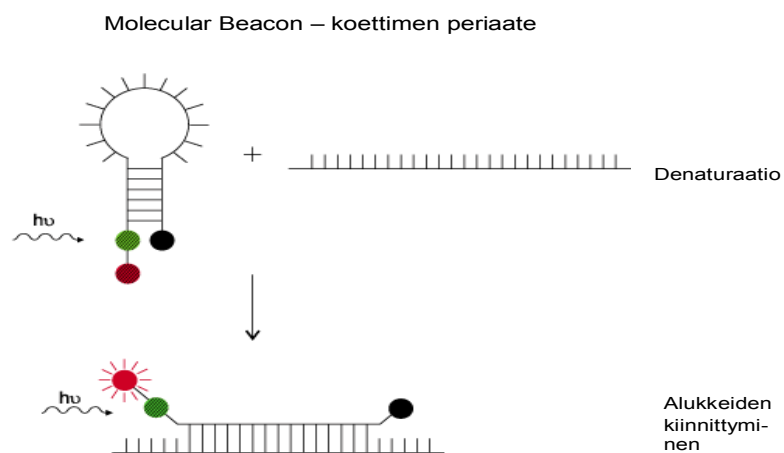
Hydrolyysikoettimet, joista tunnetuin sovellus on TaqMan-koetin, ovat lineaarisia oligonukleotidejä, joilla on usein reportterileima 5' -päässä ja sammuttaja 3' -päässä. Järjestystä voidaan kuitenkin vaihtaa. Kun reportteri ja sammuttaja ovat lähekkäin liuoksessa, reportterin signaali vaimenee. Kun koetin liittyy malli-DNA:han, väriaineet ovat niin kaukana toisistaan kuin on mahdollista. Tällöin sammuttaja ei pysty vaimentamaan reportteria, joka lähettää mitattavan signaalin (kuva 3).



Kuva 3. TaqMan-sovelluksen periaate[20]

Käytettävät koettimet ovat yleensä alle 30 bp:n pituisia, jotta signaalin esto saadaan onnistumaan. On tärkeää, että koetin sitoutuu malli-DNA:han ennen alukkeita, jotta jokaisen syklin aikana saadaan aikaan signaali. Hydrolyysikoettimien sulamislämpötila T_m on 9 - 10 °C korkeampi kuin niiden kanssa käytettyjen alukkeiden, sillä Taq-polymeraasi sitoutuu malli-DNA:han ja alkaa syntetisoida uutta juostetta hyvin nopeasti alukkeiden kiinnittymisen jälkeen. Koettimien toiminta perustuu Taq-polymeraasin 5' - nukleaasiaktiivisuuteen eli sen kykyyn katkaista koetin niin, että väriaine vapautuu DNA-juosteesta liuokseen. Kaikki DNA-polymeraasit eivät pysty hajottamaan koetinta, ja näin niitä ei voi käyttää hydrolyysikoettimien kanssa. [19, s.16 - 25.]

Molecular Beacon -koettimet ovat TaqMan-koettimien tapaan leimattuja: reportteri on toisessa päässä ja sammuttaja toisessa. Myös näiden koettimien sulamislämpötila T_m on korkeampi kuin reaktiossa käytettyjen alukkeiden. Koettimella on kummassakin päässä 4 - 6 emäksen pituiset sekvenssit, jotka ovat toisilleen komplementaarisia, ja näin koetin muodostaa liuoksessa silmukkamaisen rakenteen. Reportterin signaali on estetty tehokkaasti, kun se on hyvin lähellä sammuttajaa. Alukkeiden kiinnittymisvaiheessa koettimen muoto purkautuu lineaariseksi sen liittyessä malli-DNA:han, jolloin väriaineet erkanevat toisistaan ja reportterin signaali voidaan havaita (kuva 4). [19, s. 16 - 25.]



Kuva 4. Molecular Beacon-sovelluksen periaate [21]

2.6.4 Tulosten analysointi

qPCR-laite tallentaa kaiken tiedon ajon ajalta ja siihen liitetty tietokone piirtää tiedoista kuvaajan syklin numero signaalin funktiona.

Ct on se sykli, jonka aikana näytteen fluoresenssi ylittää valitun kynnyksarvon. Kynnyksarvo on suurempi kuin taustan fluoresenssi. Ct-arvo voidaan havaita kuvaajasta kohtana, jossa signaali alkaa nousta eksponentiaalisesti. [19, s. 39 - 41.]

DNA:n kvantitointi

Reaaliaikaisen PCR:n tuloksia käsitellään useimmiten kahdella eri tavalla: Ct-arvojen vertailulla tai standardisuoran avulla. Ct-arvojen vertailu tehdään käyttämällä esimerkiksi sertifioituja referenssimateriaaleja (CRM), joiden Ct-arvoihin näytteiden Ct-arvoja verrataan. Standardisuoramenetelmässä käytetään laimennossarjaa jostakin valitusta referenssimateriaalista. Näytteiden signaalia verrataan standardisuoraan. Standardisuoran pisteillä on tietyt pitoisuudet, jotka syötetään tietokoneohjelmaan manuaalisesti. Tämän perusteella näytteille voidaan laskea pitoisuudet. GMO-kvantitoinnissa referenssimateriaalin GMO-prosenttiosuus materiaalista on tiedossa. Kuitenkin PCR:n tehokkuuden oletetaan olevan samansuuruisen näytteelle ja referenssille, joten tehokkuuden vaihtelut voivat johtaa GMO-osuuden yli- tai aliarviointiin. [19, s. 39 - 41; 22.]

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Näytteistä eristettiin DNA kolmella eri menetelmällä. Vain yhden menetelmän toimintaperiaate oli samankaltainen kuin käytössä olevan menetelmän, johon tästä eteenpäin viitataan menetelmänä 1. Muut käytetyt menetelmät erosivat toimintaperiaatteeltaan täysin menetelmästä 1. Kaikkien menetelmien eristystuloksia verrattiin menetelmään 1. Eristetty DNA analysoitiin kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR:llä lopullisten päätelmien tekemiseksi.

3.1 Näytteet

Näytteitä oli kolme erillistä sarjaa: riisi-, maissi- ja soijasarja. Näytteet olivat vanhoja valvontanäytteitä, joista oli eristetty DNA menetelmällä 1. Näytteet valittiin menetelmällä 1 saatujen tulosten perusteella: valintaperusteina näytteille oli saanto $\leq 100 \mu\text{g/ml}$ tai puhtaus $\leq 1,40$. Osassa näytteistä molemmat kriteerit toteutuivat samanaikaisesti. Tarkoituksena oli myös valita mahdollisimman erilaisia näytteitä, jotta suurinta osaa vaikeiden näytteiden tyypillisistä ongelmista voitiin tutkia. Näytteet on esitetty sarjoittain taulukoissa 1 - 3.

Taulukko 1. Riisisarjan näytteet

Näyte	Raaka-aine/prosessoitu tuote	Ongelma	Tavoite
Riisivermicelli	Prosessoitu tuote: valmistettu riisijauhosta	Useat prosessointivaiheet ovat voineet aiheuttaa DNA:n hajoamista	Saannon ja puhtauden parantaminen
Riisinäkkileipä	Prosessoitu tuote: valmistettu riisijauhosta	Useat prosessointivaiheet ovat voineet aiheuttaa DNA:n hajoamista	Saannon ja puhtauden parantaminen
Riisi	Raaka-aine	Riisinäytteistä on saatu käytössä olevalla menetelmällä huonoja tuloksia*	Saannon ja puhtauden parantaminen
Riisiseos	Raaka-aine	Riisinäytteistä on saatu käytössä olevalla menetelmällä huonoja tuloksia**	Saannon ja puhtauden parantaminen
Lastenruoka	Prosessoitu tuote	Useiden prosessointivaiheiden lisäksi sisältää häiritseviä väri- ja makuaineita	Saannon ja puhtauden parantaminen

**Riisinäytteiden ongelmat voivat johtua riisin soluseinien kovuudesta.*

*** Riisi-villiriisiseos valittiin näytteeksi, jotta voitiin verrata tavallisen valkoisen riisin ja muiden riisilajien käyttäytymistä analyysissa.*

Taulukko 2. Maissisarjan näytteet

Näyte	Raaka-aine/prosessoitu tuote	Ongelma	Tavoite
Maissilastu	Prosessoitu tuote	Useiden prosessointivaiheiden lisäksi sisältää paljon rasvaa, suolaa ja mausteita*	Saannon ja puhtauden parantaminen
Maissimuro	Prosessoitu tuote	Useiden prosessointivaiheiden lisäksi sisältää rasvaa ja mausteita	Saannon ja puhtauden parantaminen
Jauhoseos	Prosessoitu tuote	Monet prosessointivaiheet ovat voineet aiheuttaa DNA:n hajoamista	Saannon ja puhtauden parantaminen
Tonnikalasalaatti	Prosessoitu tuote	Sisältää hiilihydraatteja ja rasvaa, jotka häiritsevät analyysia**	Saannon ja puhtauden parantaminen
Pikkuleipä	Prosessoitu tuote	Useiden prosessointivaiheiden lisäksi sisältää PCR-reaktioita inhiboivaa suklaata ***	Saannon ja puhtauden parantaminen

**Maissilastut sisältävät paljon suolaa, rasvaa ja mausteita, joita pestiin ennen homogenointia pois. Silti osa niistä jää aina näytteeseen ja vaikuttaa reaktioihin inhiboivasti. Maissilastujen valmistuksessa käytetään mekaanista hajotusta ja korkeita lämpötiloja, jotka voivat pilkkoa tuotteessa olevaa maissin DNA:ta.*

***Tonnikalasalaatti ja tarkemmin sen sisältämät maissinjyvät olivat esimerkki tuotteesta, jossa kasvin soluja ei ole hajotettu lainkaan elintarvikkeen prosessointia varten. Jyvät on kuitenkin kypsennetty valmista tuotetta varten.*

****Suklaan PCR:ää inhiboivien tekijöiden lisäksi sen sisältämä rasva aiheuttaa usein ongelmia analyysin eri vaiheissa.*

Taulukko 3. Soijasarjan näytteet

Näyte	Raaka-aine/prosessoitu tuote	Ongelma	Tavoite
Wok-kastike	Prosessoitu tuote	Soijan DNA:ta ei saatu eristettyä käytössä olevalla menetelmällä *	Soijan DNA:n eristäminen onnistuneesti
Proteiinipatukka	Prosessoitu tuote	Sisältää suuria määriä rasvaa ja proteiineja, jotka haittaavat analyysia **	Saannon ja puhtauden parantaminen
Soijarouhe	Prosessoitu tuote	Normaalisti vastaavista näytteistä on saatu hyviä tuloksia	Puhtauden parantaminen
Vehnäleipä	Prosessoitu tuote	Useat prosessointivaiheet ovat voineet aiheuttaa DNA:n hajoamista	Saannon ja puhtauden parantaminen
Soijakerma	Prosessoitu tuote	Soijan DNA:ta ei saatu eristettyä käytössä olevalla menetelmällä ***	Soijan DNA:n eristäminen onnistuneesti

**Wok-kastike oli soijakastikepohjainen maustekastike, joka sisälsi suuria määriä suolaa ja muita mausteita. Soijakastike on fermentoimalla valmistettu tuote, jonka valmistusprosessin aikana DNA on saattanut pilkkoutua analyysikelvottomaksi.*

*** Proteiinipatukat sisältävät soijaproteiinia, mutta usein myös suklaata ja muita PCR-reaktioita inhiboivia yhdisteitä. Lisäksi suuri proteiinipitoisuus hankaloittaa usein DNA:n eristystä.*

**** Soijakerma oli esimerkki erittäin hankalasta näytteestä sen sisältämän rasvan vuoksi. Aiemmassa analyysissa soijan DNA:ta ei saatu eristettyä soijakermanäytteestä.*

3.2 DNA:n eristysmenetelmät

Menetelmä 1 oli laboratoriossa käytössä oleva menetelmä, joka perustui DNA:n sitomiseen lasikuitumateriaaliin, kun liuoksessa oli guanidiinihydrokloridia. Menetelmässä käytettiin kaupallista kittiä, joka sisälsi pieniä, lasikuitumateriaalin sisältäviä kolonneja. Menetelmän 1 tulokset olivat aiemmin tehdyistä eristyksistä saatuja.

Menetelmä 2 perustui DNA:n sitomiseen silikamateriaaliin (2.4.1). Menetelmässä käytettiin kaupallista kittiä, joka oli tarkoitettu erityisesti kasvimateriaalille.

Menetelmä 3 perustui DNA:n erottamiseen näyteliuksesta ionikromatografisesti (2.4.2). Erotuksen jälkeen DNA saostettiin isopropanolilla, pestiin etanolilla ja liuotettiin lopuksi PCR-puskuriin. Menetelmässä käytettiin kaupallista kittiä, joka oli suunniteltu kudosis- ja verinäytteille. Tutkimusten mukaan veri- ja kudosisnäytteille tarkoitetut kitit ovat tehokkaita DNA:n eristykseen prosessoiduista ja erityisesti paljon rasvaa ja proteiinia sisältävistä näytteistä. Veri ja kudosisnäytteet sisältävät paljon PCR-reaktioita inhiboivia tekijöitä, joten näille näytteille suunnitellun kitin oletettiin puhdistavan DNA:ta haittaavista tekijöistä erittäin tehokkaasti [14;15].

Menetelmä 4 perustui DNA:n selektiiviseen saostukseen CTAB:illa (2.4.3). Menetelmä oli niin sanottu irtoreagenssimenetelmä eli kaikki reagenssit valmistettiin itse laboratoriossa. Menetelmässä näytteestä poistettiin häiritseviä tekijöitä kloroformiuutolla ja DNA saostettiin isopropanolilla, pestiin etanolilla ja liuotettiin PCR-puskuriin.

DNA:n pitoisuus oli määritettävä ennen PCR-analyysia. Pitoisuus mitattiin spektrofotometrillä, joka mittaa näytteen absorbanssia kahdella eri aallonpituudella. Tuloksesta ilmeni liuoksen koko nukleiinihappopitoisuus, joten DNA:n lisäksi näyte voi sisältää RNA:ta, jos DNA:n puhdistus ei ole ollut riittävää. Pitoisuudesta ei voida myöskään suoraan päätellä mitään eristysmenetelmän tehokkuudesta, sillä eristetty DNA voi olla jostakin muusta kuin kohdeorganismista. DNA:n monistuvuus tulisi siis aina tarkistaa PCR:n avulla.

3.3 Reaaliaikainen PCR

Näytteet monistettiin ABI:n qPCR-laitteistolla. Jokainen näytesarja analysoitiin qPCR:llä käyttäen riisille, maissille ja soijalle kullekin spesifisiä alukkeita. Detektoinnissa käytettiin TaqMan-menetelmää.

Näytteiden lisäksi jokaisen näytesarjan yhteydessä tehtiin kontrollinäytteistä laimennossarja, josta muodostettiin standardisuora. Riisisarjan standardisuora laimennettiin aiemmin analysoidusta riisinäytteestä, maissisarjan maissitarkkailunäytteestä ja soijasarjan soijatarkkailunäytteestä. DNA:n kvantitointi tehdään usein vertaamalla näytteiden signaalia standardisuoraan. Tässä tapauksessa kuitenkin menetelmien tehokkuutta arvioitiin vertailemalla saman näytteen Ct-arvoja eri menetelmillä eristettynä. Näytteiden Ct-arvoja ei voitu vertailla keskenään niiden sisältämän DNA:n eroavaisuuksien vuoksi, sillä eri tuotteissa DNA voi olla eri tavalla pilkkoutunut. Standardisuoran Ct-arvoihin vertaamalla voitiin arvioida, oliko näytteen DNA monistuskelpoista vai heikosti monistuvaa.

4 TYÖN SUORITUS

Näytteistä eristettiin DNA kolmella eri menetelmällä. Kokeiltiin myös, miten hajotuspuskuri vaikuttaa menetelmän 1 saantoon ja puhtauteen. Valmiskittien ohjeita sovellettiin elintarvikenäytteille sopiviksi.

4.1 Näytteiden esikäsittely

Riisinäytteet, maissimurot, pikkuleivät ja soijarouhe jauhettiin kuivana Waring-Blender-laitteella lasikannua käyttäen. Lastenruoka, wok-kastike ja soijakerma olivat valmiiksi homogeenisia, vesipitoisia seoksia. Jauhoseos oli valmiiksi homogeeninen seos. Maissilastut murskattiin, suolaa pestiin pois vedellä ja homogenoitiin kosteana huhmareessa. Tonnikalasalaatista poimittiin maissit pinseteillä analysoitavaksi ja homogenoitiin huhmareessa. Proteiinipatukka leikattiin pieniksi paloiksi ja punnittiin. Vehnäleipä homogenoitiin huhmareessa. Homogeenisia näytteitä punnittiin 1 - 4 grammaa näytteen vesipitoisuudesta riippuen.

4.2 Uuttopuskurikokeilu

Maissihiutalenäytteellä tutkittiin uuttopuskurin vaikutusta menetelmällä 1 tehtävään DNA:n eristykseen. Vertailtavina oli neljä erilaista uuttopuskuria, joista yksi oli reagensseista punnittu, laboratoriossa tehty puskuriliuos ja kolme muuta olivat kaupallisten kittien hajotuspuskureita. Kokeilu tehtiin myös soijatarkkailunäytteillä.

Näytettä punnittiin jokaista uuttopuskuria varten 1 gramma. Tulosten luotettavuuden vuoksi kaikille näytteille punnittiin myös rinnakkaisnäytteet. Jokaiseen näytteeseen lisättiin uuttopuskurin lisäksi RNAasi A:ta. Näytteet sekoitettiin koeputkisekoittajassa ja inkuboitin +65 °C:n lämpötilassa yön yli. Näytteitä sentrifugoitiin 11000 rpm:n nopeudella 35 minuutin ajan ja DNA eristettiin menetelmän 1 mukaisesti.

4.3 DNA:n eristys

Näytteistä eristettiin genominen DNA kolmella eri menetelmällä. Eristys tehtiin yksi näytesarja kerrallaan. Jokaisesta näytteestä tehtiin rinnakkaispunnitukset ja lisäksi sarjassa oli aina näytekohmainen tarkkailunäyte ja nollanäyte. Rinnakkaisnäytteiden tarkoituksena oli varmistaa tulosten luotettavuus. Tarkkailunäytteen avulla kontrolloitiin menetelmien toimivuutta. Nollanäytteenä kaikissa sarjoissa oli steriloitu vesi. Näytteiden DNA-pitoisuudet määritettiin spektrofotometrisesti.

4.3.1 DNA:n eristys menetelmällä 2

DNA:n eristys tehtiin kaupallisen kitin ohjeen mukaisesti soveltuvien osien. Menetelmään lisättiin näytteiden inkubointi uuttopuskurin lisäyksen jälkeen sekä entsyymikäsittelyt RNAasi A:lla ja α -amylaasilla uuttopuskurin lisäyksen yhteydessä. Lopullinen näyteliuoksen tilavuus oli 100 μ l.

4.3.2 DNA:n eristys menetelmällä 3

DNA:n eristys tehtiin toisen kaupallisen kitin ohjeen mukaisesti soveltuvin osin. Näytteen määrää, käsittelytapaa ja inkubointilämpötiloja sovellettiin elintarvikenäytteille sopivaksi. Riisi- ja maissinäytteille lisättiin α -amylaasikäsittely soluhajotuksen yhteydessä, sillä se vaikutti eristetyn DNA:n puhtauteen. Näytteet eristettiin ensin ilman amylaasikäsittelyä ja sen jälkeen tehtiin näytesarja, joka sisälsi entsyymien lisäyksen. Lopullinen näyteliuoksen tilavuus oli 100 μ l.

4.3.3 DNA:n eristys menetelmällä 4

DNA eristettiin CTAB-menetelmän mukaisesti soveltuvin osin. Lopullinen näyteliuoksen tilavuus oli 50 μ l.

4.4 Reaaliaikainen PCR

Jokaisesta eristyksestä tehtiin sopiva laimennos niin, että liuoksen DNA-pitoisuus oli 20 ng/ μ l. Näytteitä, joiden DNA-pitoisuus oli mittauksen perusteella alle 20 ng/ μ l, käytettiin suoraan PCR-reaktioihin laimentamatta. Lisäksi maissi- ja soijatarakkailunäytteistä tehtiin laimennossarjat, joista piirrettiin standardisuorat.

96-kuoppaiselle näytelevylle pipetoitiin 20 μ l mastermixiä, joka sisälsi alukkeet ja koettimen, sekä 5 μ l DNA-näytettä. Näytteet sekoitettiin sentrifugoimalla ja monistettiin qPCR:llä käyttäen kullekin näytesarjalle soveltuvaa ohjelmaa.

5 TULOKSET

Tuloksia tarkasteltiin ensin DNA:n eristyksen perusteella. PCR-ajosta saatujen Ct-arvojen avulla arvioitiin, oliko eristetty DNA halutusta organismista sekä kuinka monistuskelpoista se oli.

5.1 Uuttopuskurikokeilu

Sentrifugoinnin jälkeen näytteiden A, B, C, D, E ja F pinnalla oli rasvamainen kerros, mutta muuten supernatantti oli kirkas ja vaalean keltainen. Näytteiden G ja H supernatantti oli sameahko ja vahvemmin keltainen kuin muut näytteet. Näytteistä A ja B oli helppoa pipetoida supernatanttia eristykseen. Muiden näytteiden pipetointi oli hankalampaa, sillä supernatantin joukossa kellui saostumia, joita ei saatu sentrifugoitua pohjaan.

Puskureilla 1, 2 ja 4 saatiin samansuuruisia tuloksia sekä DNA-pitoisuudelle että puhtausasteelle (taulukko 4). Puskuria 3 käyttämällä saatiin parannettua hieman saantoa, mutta samalla puhtausaste kärsi huomattavasti suhteutettuna saannon parantumiseen. Näin ollen voidaan todeta, että uuttopuskurin valinnalla ei ole huomattavaa merkitystä DNA:n eristyksessä kyseessä olevalla kitillä. Puskurilla 1 uutetut näytteet tosin olivat helpoimpia käsitellä. Havaintojen perusteella siis kyseisellä kitillä eristämiseen sopivin on puskuri 1.

Taulukko 4. Uuttopuskurien vertailun tulokset

Näyte	DNA-pitoisuus (ng/ μ l)	Puhtaus (A260/A280)
A/Puskuri 1	49	1,68
B/Puskuri 1	44	1,63
C/Puskuri 2	43	1,67
D/Puskuri 2	48	1,64
E/Puskuri 3	62	1,54
F/Puskuri 3	76	1,36
G/Puskuri 4	47	1,62
H/Puskuri 4	53	1,60

5.2 Rnaasi A:n lisäys menetelmään 2

Soijatarkkailunäytteiden perusteella arvioitiin menetelmän tarvitsevan käsittelyvaiheen, joka poistaa näytteestä RNA:n. Uusintaeristys riisi- ja maissinäytteistä osoitti, että RNAasi-käsittely on tarpeen, sillä tulokset olivat huomattavasti pienempiä (taulukko 5).

Ensimmäisen eristyksen tulokset olivat siis harhaanjohtavia, sillä PCR-reaktioita varten DNA:n pitoisuus olisi yliarvioitu.

Taulukko 5. RNAasi A:n lisäys menetelmään 2, kokeilu riisisarjalla

Näyte	Menetelmä 2		Menetelmä 2 + RNAasi A	
	Saanto (ng/μl)	Puhtaus (A260/A280)	Saanto (ng/μl)	Puhtaus (A260/A280)
Riisivermicelli	18	2,17	7	1,08
	13	2,40	2	0,60
Riisinäkkileipä	10	1,25	4	0,95
	9	1,54	3	0,64
Riisi	104	1,95	6	1,06
	122	1,81	4	0,93
Riiseos	11	1,36	6	0,97
	3	n/n *	1	0,93
Lastenruoka	22	1,61	14	1,05
	23	1,31	18	1,12

*ei tulosta

Lisäksi uuden eristyksen tulokset osoittivat, ettei menetelmä sovellu riisinäytteiden DNA:n eristykseen. Ainoastaan lastenruoan saanto parani verrattuna menetelmään 1. Näiden näytteiden puhtaus kuitenkin oli alhaisempi kuin menetelmällä 1 eristettyjen näytteiden (taulukko 8).

5.3 α-Amylaasin käyttö maissi- ja riisinäytteissä

α-Amylaasin vaikutusta maissi- ja riisinäytteiden eristykseen kokeiltiin eristämällä näytesarjat ensin ilman α-amylaasikäsittelyä ja sen jälkeen lisäämällä näytteisiin α-amylaasia uuttopuskurin ja RNAasi A:n lisäyksen yhteydessä. Tämän jälkeen eristystä jatkettiin normaalin menetelmän mukaisesti. Riisinäytteiden kohdalla α-amylaasin lisäys vaikutti vain tavallisen riisin ja lastenruokanäytteen kohdalla (taulukko 6). α-Amylaasin lisäys näytti vaikuttavan saantoa enemmän eristetyn DNA:n puhtauteen. Lastenruokanäytteen kohdalla puhtaus kuitenkin jäi yhtä alhaiselle tasolle kuin menetelmässä 1. Tavallisen riisinäytteen saantoon entsyymilisäys ei vaikuttanut ja saanto jäi edelleen huomattavasti pienemmäksi kuin menetelmällä 1 eristettynä. Riisinäytteen puhtaus parani amylaasin lisäyksen seurauksena, mutta ei ollut kuitenkaan kovin paljon korkeampi kuin menetelmällä 1.

Taulukko 6. α -Amylaasin lisäys riisisarjan näytteisiin

Näyte	Menetelmä 2		Menetelmä 2 + RNAasi A		Menetelmä 2 + RNAasi A + α -amylaasi	
	Saanto (ng/ μ l)	Puhtaus (A260/A280)	Saanto (ng/ μ l)	Puhtaus (A260/A280)	Saanto (ng/ μ l)	Puhtaus (A260/A280)
Riisivermicelli	18	2,17	7	1,08	0	1,00
	13	2,40	2	0,60	5	1,69
Riisinäkkileipä	10	1,25	4	0,95	4	n/n *
	9	1,54	3	0,64	2	n/n *
Riisi	104	1,95	6	1,06	4 // 5	1,57 // n/n *
	122	1,81	4	0,93	6	3,07
Riisiseos	11	1,36	6	0,97	5	n/n *
	3	n/n *	1	0,93	5	2,70
Lastenruoka	22	1,61	14	1,05	20	1,28
	23	1,31	18	1,12	12	1,25

*ei tulosta

Maissinäytteiden puhtauteen α -amylaasin lisäys vaikutti huomattavasti (taulukko 7). Näytteiden DNA-pitoisuus ei noussut entsyymilisäyksen seurauksena. Tonnikalasalaatin DNA-pitoisuus näytti laskeneen entsyymilisäyksen jälkeen.

Taulukko 7. α -Amylaasin lisäys maissisarjan näytteisiin

Näyte	Menetelmä 2 + RNAasi A		Menetelmä 2 + RNAasi A + α -amylaasi	
	Saanto (ng/ μ l)	Puhtaus (A260/A280)	Saanto (ng/ μ l)	Puhtaus (A260/A280)
Maissilastu	4	n/n *	8	1,35
	8	2,53	11	1,24
Maissimuro	4	n/n *	8	2,08
	6	1,34	6	1,26
Jauhoseos	28	1,88	26	1,69
	21	2,00	30	1,66
Tonnikalasalaatti	86	1,34	10	1,28
	56	1,34	9	1,38
Pikkuleipä	9	n/n *	11	1,46
	7	3,49	9	1,32

*ei tulosta

Kuitenkin kaikkien menetelmällä 2 eristettyjen näytteiden DNA-pitoisuus jäi hyvin alhaiselle tasolle, joten amylaasin lisäys päätettiin lisätä menetelmään riisi- ja lastenruokanäytteiden tulosten perusteella.

5.4 DNA:n eristys menetelmällä 2

Eristyksien tulokset on esitetty taulukossa 8. Menetelmään 1 verrattuna huomattavasti paremmat DNA:n saannot on esitetty lihavoidulla ja vihreällä tekstillä. Menetelmään 1 verrattuna parantuneet DNA:n puhtausasteet on esitetty taulukossa kursivoidulla ja sinisellä tekstillä. Kaikkia tuloksia verrattiin menetelmän 1 tuloksiin. Riisivermicellistä, riisinäkkileivästä, riisistä, riisiseoksesta, maissilastuista, maissimuroista, tonnikalasalaaatista, proteiinipatukasta, vehnäleivästä ja soijakermasta saadut tulokset olivat alhaisempia sekä DNA:n saannon että puhtauden suhteen. Lastenruokanäytteiden saannot paranivat hieman, mutta olivat silti alle 100 µg/ml. Puhtaudet pysyivät samoina. Pikkuleipänäytteiden saannot pysyivät samansuuruisina. Puhtaus oli parempi menetelmällä 2, mutta ei kuitenkaan kovin hyvä. Wok-kastikkeen kohdalla sekä saanto että puhtaus kasvoivat. Menetelmällä 1 eristettynä kastikkeesta ei PCR-analyysin perusteella saatu eristettyä soijan DNA:ta. Tulos täytyi siis varmistaa PCR:llä. Soijarouhenäytteestä eristetty DNA oli menetelmällä 2 huomattavasti puhtaampaa. Saanto jäi kuitenkin hyvin merkittävästi alhaisemmaksi. Jauhoseoksen kohdalla saannot ja puhtaudet olivat samat kummallakin menetelmällä. Puhtaus oli suhteellisen hyvä, mutta saantoa voisi parantaa 50 µg/ml arvoista. Menetelmä ei ehkä ole kovin luotettava, sillä rinnakkaisnäytteet antoivat hyvin erilaisia arvoja varsinkin puhtauden suhteen. Saannot olivat menetelmällä hyvin pieniä. Riisinäytteelle tehtiin uusintaeristys edellisestä uuttopuskurista. Eristys ei onnistunut mahdollisesti sen vuoksi, että saanto oli alun perinkin hyvin pieni. Menetelmän toistettavuus ei siis ole välttämättä kovin hyvä prosessoiduille ja riisinäytteille. Menetelmä ei toiminut ollenkaan ilman Rnaasi A:n lisäystä ja toimi paremmin α-amylaasilisäyksellä.

Taulukko 8. Eristyksien tulokset. Saanto-sarakkeessa olevat luvut kuvaavat DNA:n pitoisuutta. Mitä suurempi luku on, sitä tehokkaampi kyseinen eristysmenetelmä on. Absorbanssien osamäärä kuvaa DNA:n puhtautta. Mitä lähempänä arvo on 1,8:aa, sitä puhtaampaa eristetty DNA on.

Näyte	Menetelmä 1		Menetelmä 2		Menetelmä 3		Menetelmä 4	
	eluoitu 50 µl:lla	A260/A280	eluoitu 100 µl:lla	A260/A280	liuotettu 100 µl:aan	A260/A280	liuotettu 50 µl:aan	A260/A280
Risivermicelli	56	1,55	0	1,00	190	<i>1,54</i>	10	1,19
	56	1,22	5	1,69	140	<i>1,89</i>	22	1,11
Riisinäkkileipä	16	1,41	4	n/n	45	<i>1,68</i>	7	1,38
	22	1,35	2	n/n	83	<i>1,72</i>	6	1,63
Riisi	52	1,48	4	1,57	124	<i>1,38</i>	14	1,55
	47	1,48	6	3,07	141	<i>1,61</i>	28	1,74
Riiseos	49	1,41	5	n/n	263	<i>1,85</i>	20	1,65
	55	1,45	5	2,70	305	<i>1,85</i>	33	1,80
Lastenruoka	5	1,20	20	1,28	48	2,03	5	1,32
	5	1,23	12	1,25	75	1,93	1	n/n
Maissilastu	64	1,48	8	1,35	257	<i>1,69</i>	23	1,79
	57	1,50	11	1,24	434	<i>1,72</i>	56	1,78
Maissimuro	13	1,07	8	2,08	38	<i>1,47</i>	0	n/n
	10	1,13	6	1,26	33	<i>1,54</i>	0	n/n
Jauhoseos	47	1,53	26	<i>1,69</i>	906	<i>1,69</i>	141	<i>1,71</i>
	58	1,61	30	<i>1,66</i>	387	<i>1,72</i>	605	<i>1,75</i>
Tonnikalasalaatti	24	1,55	10	1,28	149	<i>1,60</i>	201	<i>1,73</i>
	27	1,48	9	1,38	118	<i>1,65</i>	188	<i>1,72</i>
Pikkuleipä	26	1,07	11	1,46	97	<i>1,65</i>	23	1,66
	36	1,08	9	1,32	169	<i>1,68</i>	0	n/n
Wok-kastike	15	1,16	18	1,32	86	<i>1,61</i>	16	1,25
	19	1,17	17	1,27	31	<i>1,59</i>	36	1,23
Proteiinipatukka	32	1,33	6	2,90	344	<i>1,57</i>	36	<i>1,85</i>
	39	1,26	13	1,23	157	<i>1,57</i>	35	<i>1,88</i>
Soijarouhe	377	1,20	26	<i>1,75</i>	650	<i>1,75</i>	403	<i>1,47</i>
	380	1,41	24	<i>1,63</i>	803	<i>1,48</i>	204	<i>1,51</i>
Vehnäleipä	62	1,37	5	1,38	715	<i>1,72</i>	123	<i>1,71</i>
	71	1,38	5	4,97	681	<i>1,72</i>	85	<i>1,75</i>
Soijakerma	13	1,29	5	3,22	8	<i>1,51</i>	1	0,88
	22	1,20	5	1,70	11	<i>1,36</i>	5	1,76

* ei tulosta

5.5 DNA:n eristys menetelmällä 3

Eristyksien tulokset on esitetty taulukossa 8. Wok-kastikkeen saanto ja puhtaus paranivat. Puhtaus parani huomattavan paljon. Oli varmistettava kuitenkin PCR:llä, oliko eristetty DNA peräisin soijasta. Proteiinipatukan saanto ja puhtaus paranivat huomattavan paljon. Soijarouheen saanto oli alun perinkin hyvä, tarkoituksena oli parantaa puhtautta. Puhtaus parani toisen näytteen osalta merkittävästi. Vehnäleivän saanto ja puhtaus paranivat kumpikin merkittävästi. Soijakerman saanto ei ollut parempi, mutta puhtaus parani hieman.

5.6 DNA:n eristys menetelmällä 4

Eristyksien tulokset on esitetty taulukossa 8. Vermicellin saanto ja puhtaus olivat alhaisempia. Riisinäkkileivän saanto ei parantunut, puhtaus parani hieman. Riisin saanto oli alhaisempi, mutta puhtaus oli huomattavasti parempi. Riisiseoksen saanto ei parantunut vaan oli hieman alempi, mutta puhtaus parani huomattavasti. Lastenruoan saanto ja puhtaus olivat huonompia. Maissilastujen saanto oli hieman alhaisempi, puhtaus taas huomattavasti parempi. Maissimuroista saatujen mittaustulosten perusteella DNA:ta ei saatu eristettyä ollenkaan. Jauhoseoksen saanto ja puhtaus paranivat huomattavasti. Tonnikalasalaatin saanto ja puhtaus paranivat huomattavasti, menetelmä 4 oli tälle näytteelle paras. Wok-kastikkeen saanto oli samaa luokkaa, puhtaus vähän parempi. Proteiinipatukan saanto sama ja puhtaus oli paljon parempi. Soijarouheen saanto sama, mutta puhtaus parani. Vehnäleivän saanto ja puhtaus paranivat. Soijakerman saanto ja puhtaus olivat alhaisempia.

5.7 PCR-tulokset

PCR:n tuloksia arvioitiin Ct-arvojen perusteella. Mitä pienempi Ct-arvo oli, sitä aikaisemmassa vaiheessa DNA:ta alkaa monistua ja näin ollen DNA on hyvin monistuskelpoista. Suurista Ct-arvoista voidaan päätellä kohde-DNA:ta olevan näytteessä hyvin vähän tai se saattaa olla heikkolaatuista. Jos Ct-arvo on pienempi kuin taustan signaali, ei halutun organismin DNA:ta ole reaktioliuoksessa tai se on hajonnut monistuskelvottomiin osasiin. Kaikkien näytesarjojen kuvaajat ja standardisuorat ovat esitettyinä kuvissa 5 - 7. Monistuminen tapahtui normaalisti muutamaa poikkeusta lukuun

ottamatta. Poikkeava monistuminen voitiin huomata useimmissa tapauksissa epätavallisen pieninä Ct-arvoina.

5.7.1 Riisisarja

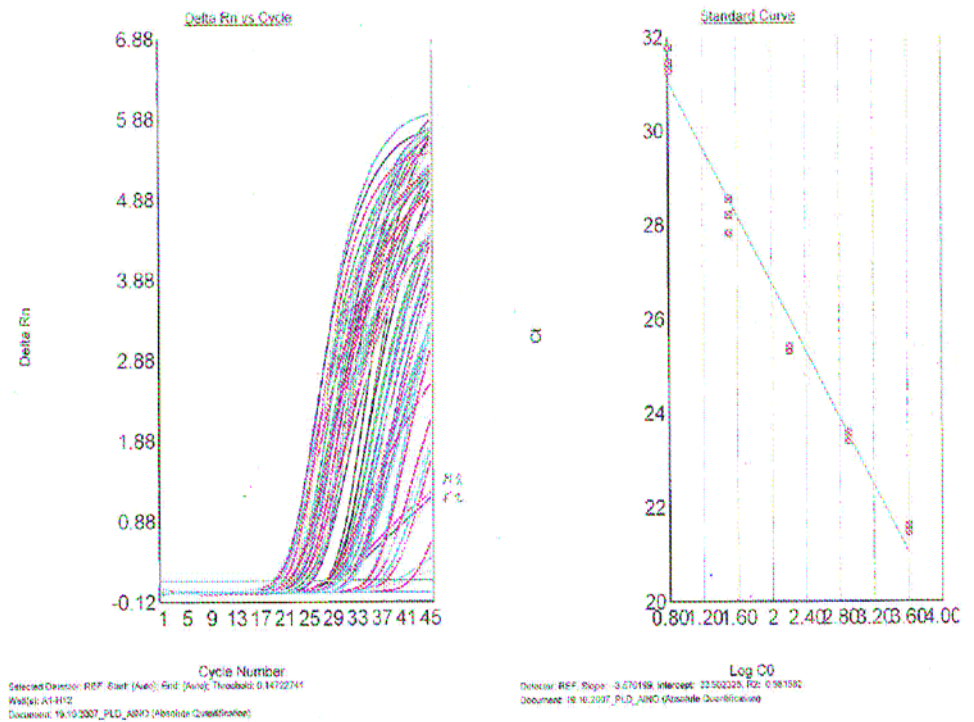
PCR-analyysin perusteella saatuja näytteiden Ct-arvoja vertailtiin keskenään (taulukko 9). Mitä pienempi arvo on, sitä aiemman syklin aikana näytteessä oleva DNA alkaa monistua. Toisin sanoen näissä näytteissä on enemmän monistuskelpoista DNA:ta. Jokaiselle näytteelle parhaat Ct-arvot voidaan erottaa tummenetusta tekstistä. Lastenruokanäytteistä saatiin eristettyä riisin DNA:ta vain menetelmällä 3. Riisivermicellinäytteiden kohdalla menetelmällä 3 eristetyt DNA-näytteet monistuivat selkeästi parhaiten. Menetelmällä 2 eristetyistä DNA-näytteistä toinen ei monistunut ollenkaan. Riisinäkkileipänäytteistä eristetty DNA monistui parhaiten menetelmän 4 DNA-näytteistä. Ct-arvot olivat keskenään hyvin tasaiset, kun taas menetelmällä 3 eristettyjen DNA-näytteiden Ct-arvojen välillä oli suuria eroja. Menetelmällä 2 eristetyistä DNA-näytteistä toinen ei monistunut ollenkaan. Riisinäytteistä ja riisiseosnäytteistä eristetty DNA monistui kaikkien menetelmien näytteistä. Menetelmällä 3 eristettyjen näytteiden DNA monistui parhaiten.

Taulukko 9. Riisinäytteiden Ct-arvot

Näyte	Ct-arvo /Menetelmä 2	Ct-arvo /Menetelmä 3	Ct-arvo /Menetelmä 4
Riisivermicelli	ei ref. DNA:ta *	22,23	28,84
	ei ref. DNA:ta *	23,92	28,63
	29,53	22,88	27,57
	24,25	22,94	29,46
Riisinäkkileipä	29,46	35,69	24,71
	29,53	37,73	24,82
	ei ref. DNA:ta *	23,67	23,67
	ei ref. DNA:ta *	25,11	23,71
Riisi	29,58	18,91	19,74
	30,09	19,25	19,81
	39,41	19,36	18,76
	31,19	19,15	20,46
Riisiseos	30,02	20,86	21,56
	29,05	21,17	21,58
	41,07	20,06	21,51
	29,56	19,66	22,12
Lastenruoka	35,32	41,60	31,03
	36,99	35,09	31,90
	ei ref. DNA:ta *	34,39	ei ref. DNA:ta *
	36,72	34,54	ei ref. DNA:ta *

* monistumista ei ole tapahtunut

Riisinäytteiden PCR-kuvaajat ja standardisuora ovat esitettyinä kuvassa 5.



Kuva 5. Riisinäytteiden reaaliaikaisen PCR:n kuvaaja ja standardisuora

5.7.2 Maissisarja

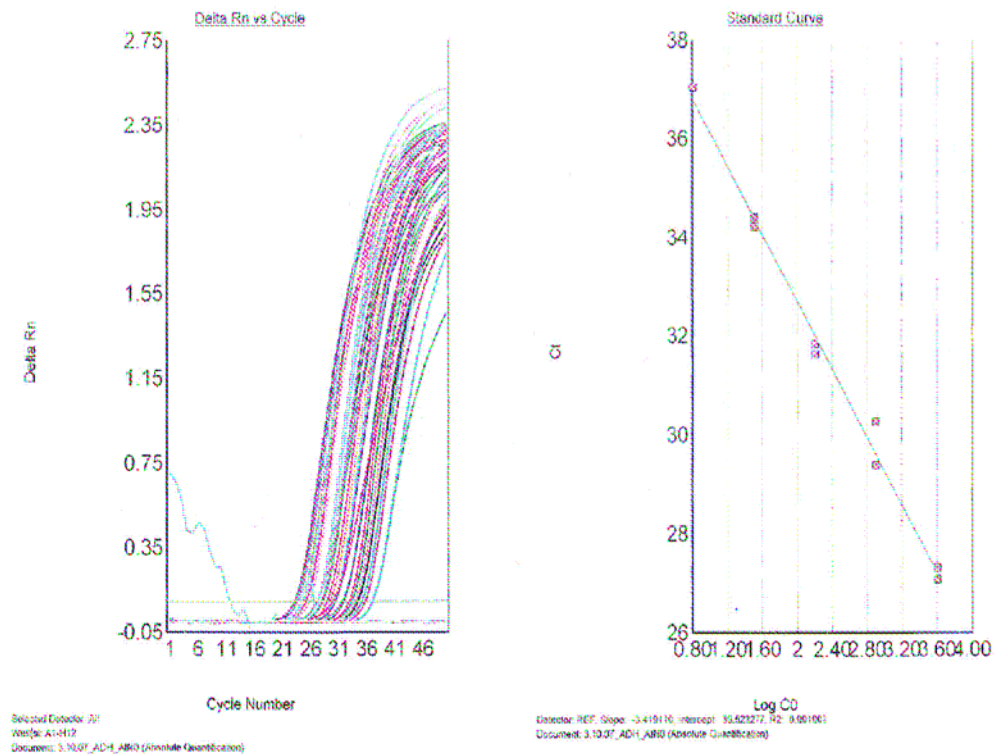
PCR-ajon perusteella saatuja näytteiden Ct-arvoja vertailtiin keskenään (taulukko 10). Maissimuronäytteiden kohdalla maissin DNA:ta ei monistunut minkään menetelmän näytteistä. Näytteessä oleva maissin DNA oli siis luultavimmin pilkkoutunut monistuskelvottomaksi. Menetelmällä 4 eristetyistä pikkuleipänäytteistä toisen näytteen mitattu DNA-pitoisuus oli 0, joten myöskään maissin DNA:ta ei monistunut PCR-reaktioiden seurauksena.

Taulukko 10. Maissinäytteiden Ct-arvot

Näyte	Ct-arvo /Menetelmä 2	Ct-arvo /Menetelmä 3	Ct-arvo /Menetelmä 4
Maissilastu	28,82	23,11	24,36
	28,14	23,22	24,38
	27,16	23,66	24,60
	27,38	23,31	24,95
Maissimuro	ei ref. DNA:ta *	ei ref. DNA:ta *	ei ref. DNA:ta *
	ei ref. DNA:ta *	ei ref. DNA:ta *	ei ref. DNA:ta *
	ei ref. DNA:ta *	ei ref. DNA:ta *	ei ref. DNA:ta *
	ei ref. DNA:ta *	ei ref. DNA:ta *	ei ref. DNA:ta *
Jauhoseos	27,27	25,05	24,15
	27,27	24,66	25,59
	27,85	27,14	27,19
	27,90	27,06	27,13
Tonnikalasalaaatti	37,00	29,42	33,25
	35,57	29,57	33,28
	35,04	30,13	32,76
	35,11	30,29	33,83
Pikkuleipä	27,22	24,06	24,66
	27,16	24,03	24,65
	27,40	24,35	ei ref. DNA:ta *
	27,27	29,80	ei ref. DNA:ta *

* monistumista ei ole tapahtunut

Maissinäytteiden PCR-kuvaajat ja standardisuora ovat esitettyinä kuvassa 6.



Kuva 6. Maissinäytteiden reaaliaikaisen PCR:n kuvaaja ja standardisuora

5.7.3 Soijasarja

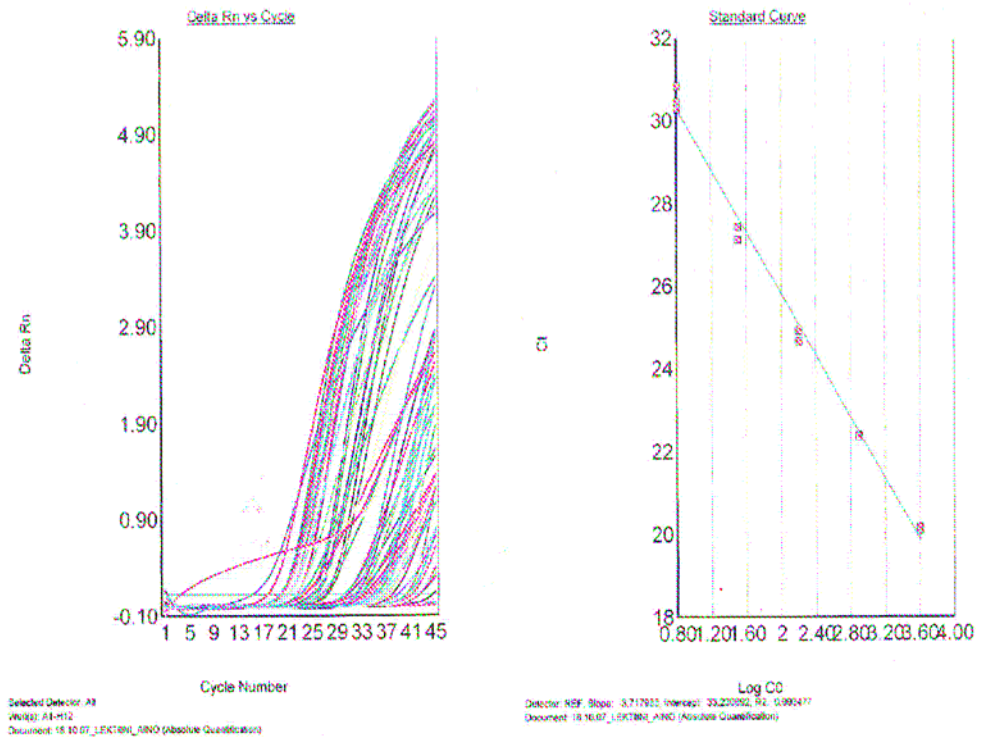
PCR-reaktioiden tulokset on esitetty taulukossa 11. Menetelmällä 3 eristetystä sojakermanäytteestä ei monistunut ollenkaan soijan DNA:ta. Parhaiten monistuva DNA saatiin menetelmällä 4. Vain menetelmällä 4 jokaisesta Wok-kastikenäytteestä saatiin eristettyä soijan DNA:ta. Soijarouhenäytteissä soijan DNA monistui kaikilla menetelmillä. Pienimmät Ct-arvot saatiin menetelmällä 3 eristetyistä näytteistä. Menetelmällä 3 saatiin siis monistuskelpoisinta DNA:ta. Vehnäleipänäytteiden kohdalla soijan DNA monistui kaikilla menetelmillä. Menetelmillä 3 ja 4 Ct-arvot olivat pienimmät eli DNA oli monistuskelpoisinta. Proteiinipatukanäytteistä soijan DNA monistui menetelmillä 2 ja 4. Menetelmällä 3 toisen rinnakkaisnäytteen kohdalla soijan DNA:ta ei monistunut ja toisen kohdalla Ct-arvo oli huomattavasti suurempi kuin menetelmillä 2 ja 4. Pienimmät Ct-arvot saavutettiin menetelmällä 4.

Taulukko 11. Soijanäytteiden Ct-arvot

Näyte	Ct-arvo /Menetelmä 2	Ct-arvo /Menetelmä 3	Ct-arvo /Menetelmä 4
Wok-kastike	42,46	44,63	35,62
	ei ref. DNA:ta *	40,27	37,39
	ei ref. DNA:ta *	ei ref. DNA:ta *	42,26
	44,63	ei ref. DNA:ta *	41,18
Proteiinipatukka	25,67	31,92	22,26
	25,38	33,95	23,10
	26,44	ei ref. DNA:ta *	23,65
	25,6	ei ref. DNA:ta *	24,36
Soijarouhe	20,13	19,91	21,02
	20,16	19,83	21,09
	19,69	15,24	21,25
	19,92	17,73	21,14
Vehnäleipä	36,28	3,49	32,59
	39,01	4,05	32,91
	36,65	32,02	33,46
	34,92	32,27	34,27
Soijakerma	39,25	ei ref. DNA:ta *	37,56
	ei ref. DNA:ta *	ei ref. DNA:ta *	36,18
	41,91	ei ref. DNA:ta *	38,04
	40,60	ei ref. DNA:ta *	42,12

* monistumista ei ole tapahtunut

Soijanäytteiden PCR-kuvaajat ja standardisuora ovat esitettyinä kuvassa 7.



Kuva 7. Soijanäytteiden reaaliaikaisen PCR:n kuvaaja ja standardisuora

6 PÄÄTELMÄT

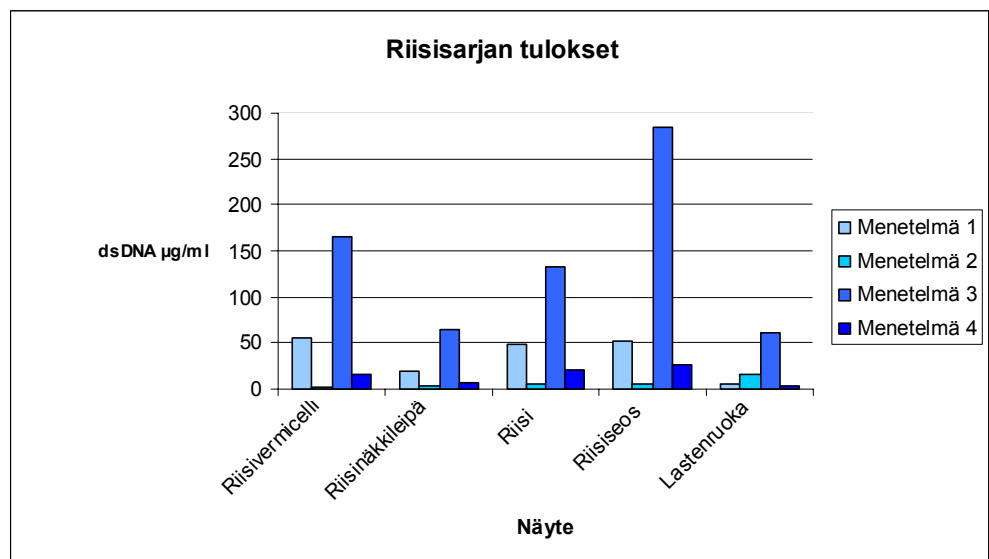
Jokaiselle näytteelle sopivinta DNA:n eristysmenetelmää arvioitiin sekä DNA:n saannon ja puhtauden että sen monistuvuuden perusteella. Myös menetelmien kustannuksia ja työturvallisuutta arvioitiin.

6.1 Menetelmien vertailu

Näytteille sopivia menetelmiä arvioitiin luokiteltuina analyysien mukaisiin näytesarjoihin.

6.1.1 Riisinäytteet

Menetelmällä 3 saatiin jokaisesta riisinäytteestä suurin saanto (kuva 8). PCR-tulokset osoittivat myös, että menetelmällä 3 saatiin monistuskelpoisinta DNA:ta kaikista näytteistä riisinnäkkileipää lukuun ottamatta (taulukko 8). Tuloksista voidaan siis päätellä, että menetelmä 3 on tehokkain menetelmä DNA:n eristykseen riisiä sisältäville näytteille.

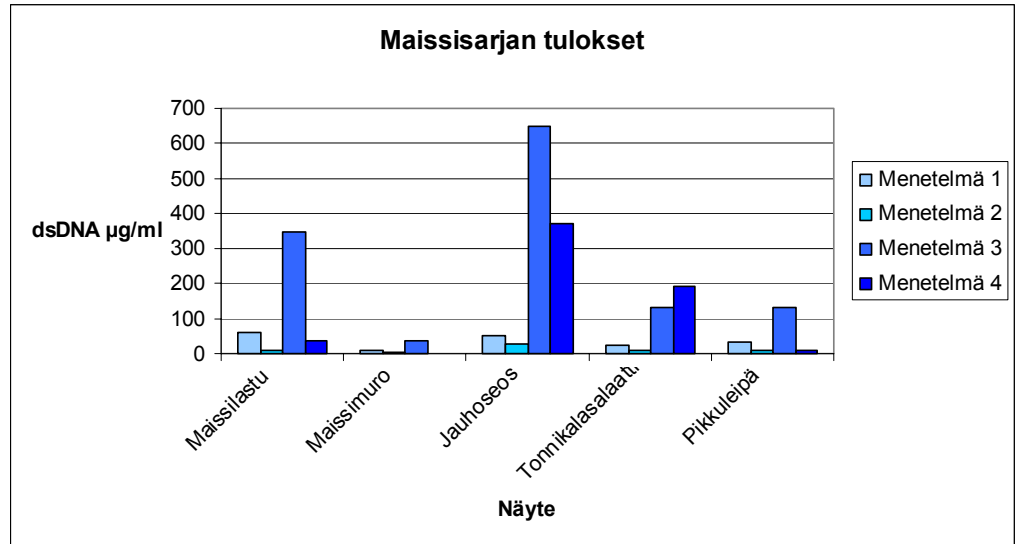


Kuva 8. Riisisarjan eristysten tulokset

6.1.2 Maissinäytteet

Maissilastu-, jauhoseos- ja pikkuleipänäytteiden saannot olivat menetelmällä 3 suurimmat (kuva 9). Myös tonnikalasalaaattinäytteen saanto oli hyvä, vaikka menetelmällä 4 se oli suurempi. Kyseisten näytteiden PCR-tulokset osoittivat myös menetelmällä 3 eristetyn DNA:n monistuneen parhaiten. Tonnikalasalaaatin saanto oli menetelmällä 4 parempi kuin menetelmällä 3, mutta DNA oli monistuskelpoisempaa menetelmällä 3 eristettynä.

Maissimurojen kohdalla maissin DNA:ta ei monistunut yhdestäkään näytteestä. Mittauksessa saadut DNA:n pitoisuuden arvot johtuivat näytteissä olevasta DNA:sta, joka oli peräisin jostakin muusta organismista kuin maissista tai maissin DNA:sta, joka oli pilkkoutunut niin pieniin osiin, ettei referenssigeeniä onnistuttu monistamaan.



Kuva 9. Maissisarjan eristyksien tulokset

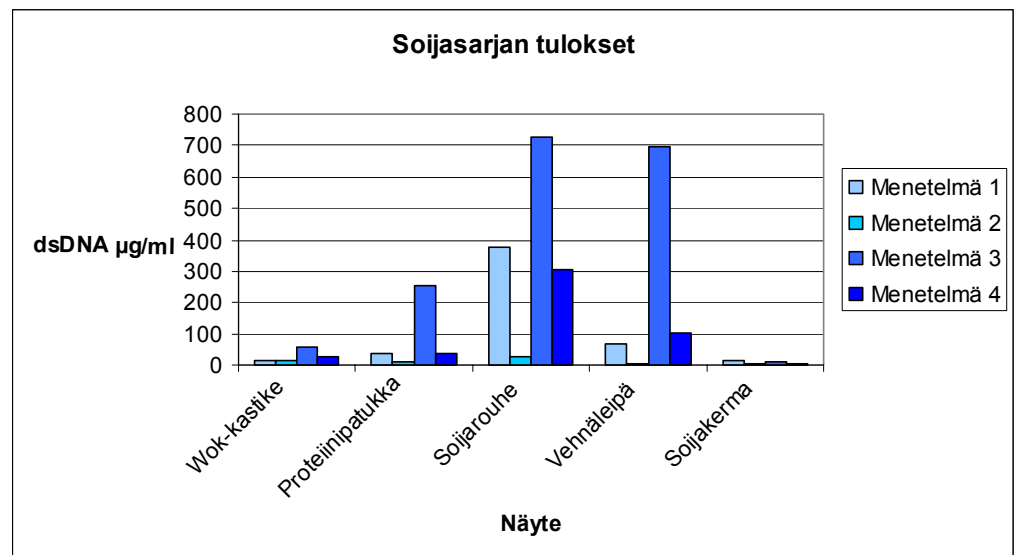
6.1.3 Soijanäytteet

Wok-kastikenäytteen ja proteiinipatukkanäytteen saannot olivat suurimmat menetelmällä 3 (kuva 10), mutta osasta näytteitä ei kuitenkaan monistunut ollenkaan soijan DNA:ta. Menetelmä ei ollut siis täysin luotettava kyseisille näytteille, sillä myös monistuneen DNA:n Ct-arvot olivat hyvin suuret eli DNA oli monistunut hyvin heikosti. Menetelmällä 4 saatiin toiseksi suurin saanto wok-kastikkeesta. PCR-tulokset osoittivat, että vain menetelmällä 4 eristetyistä näytteistä soijan DNA monistui luotettavasti. Menetelmä 4 oli siis soveltuvin wok-kastike- ja proteiinipatukkanäytteille.

Soijarouheesta saatiin hyvät saannot kaikilla menetelmillä menetelmää 2 lukuun ottamatta. Kaikkien näytteiden DNA oli myös helposti monistuvaa. Myös menetelmällä 2 eristettyjen näytteiden DNA monistui hyvin. Sekä DNA:n pitoisuus että monistuvuus olivat kuitenkin selkeästi parhaat menetelmällä 3.

Vehnäleipänäytteestä saanto oli korkein menetelmällä 3. PCR-tuloksista toisen näytteen kohdalla kuitenkin Ct-arvot ovat hyvin pienet ja kuvaajan muoto oli epätavallinen. Monistumisvaiheessa on siis tapahtunut jotakin epänormaalia. Näin ollen menetelmä ei ollut täysin luotettava. Menetelmällä 4 saanto oli myös hyvä ja Ct-arvot tasaiset. Menetelmän 4 Ct-arvot olivat samaa suuruusluokkaa kuin menetelmän 3 normaalisti monistuneen näytteen ja huomattavasti paremmat kuin menetelmällä 2. Menetelmä 4 oli siis luotettavin menetelmä DNA:n eristykseen vehnäleipänäytteestä.

Soijakermanäytteestä eristetyn DNA:n pitoisuudet olivat kaikilla menetelmillä hyvin matalat. PCR-tulokset paljastivat, että vain menetelmällä 4 saatiin eristettyä soijan DNA:ta näytteestä. Menetelmä 4 oli siis soveltuvin soijakermanäytteelle.



Kuva 10. Soijasarjan eristysten tulokset

6.2 Muut huomioonotettavat tekijät

Näytteille soveltuvia menetelmiä arvioitaessa oli mittaustulosten lisäksi otettava huomioon muita seikkoja kuten kustannukset, työhön käytetty aika sekä kontaminaatio- ja työturvallisuusriskit.

6.2.1 Kustannukset

Menetelmässä 4 käytettiin laboratoriossa itse tehtyjä reagensseja ja se oli käytetyistä menetelmistä edullisin. Menetelmät 1 ja 2 olivat periaatteeltaan samanlaisia ja kustannuksiltaan myös samaa tasoa. Menetelmässä 3 kaikkia

reagensseja, entsyymit mukaan lukien, käytettiin suurempia määriä kuin muissa menetelmissä. Kustannukset olivat siis suuremmat kuin muissa menetelmissä. Samasta menetelmästä on markkinoilla vähemmän reagensseja ja materiaaleja tarvitseva sovellus, jonka toimivuutta voisi olla järkevää kokeilla ennen menetelmän käyttöönottoa rutiinityöskentelyssä.

6.2.2 *Menetelmän helppous, käytetty aika, kontaminaatiot ja työturvallisuus*

Menetelmä 1 oli helppokäyttöinen ja nopea. Menetelmä 2 sisälsi useita näytteen siirtoja putkesta toiseen, mikä hankaloittaa työntekoa sekä lisää materiaalikustannuksia ja kontaminaatoriskiä. Menetelmä 3 oli helppokäyttöinen ja suhteellisen nopea. Suuremmat pipetointimäärät tosin hankaloittivat työn sujumista. Menetelmän rutiinikäytössä olisi parasta käyttää moottoroitua pipettiä käden väsymisen välttämiseksi. Menetelmässä 4 kului kaksinkertainen aika muihin menetelmiin verrattuna. Menetelmä 4 sisälsi myös useita putkenvaihtoja, jotka lisäävät aina kontaminaatoriskiä. Lisäksi menetelmässä käytetyt orgaaniset liuottimet saattavat aiheuttaa työturvallisuusriskin, mikä on otettava huomioon työtilojen suunnittelussa. Menetelmän käyttö asianmukaisissa tiloissa, työohjeen mukaan ja asianmukaisilla välineillä ei kuitenkaan aseta työntekijää vaaratilanteeseen. Menetelmissä 1 ja 2 käytettiin guanidiinihydrokloridia, joka on haitallinen aine. Menetelmässä 3 käytettiin isopropanolia. Menetelmässä 4 käytettiin kloroformia ja isopropanolia. Kaikkien menetelmien haitalliset liuokset kerättiin omiin jäteastioihin ja hävitettiin asianmukaisesti.

6.2.3 *DNA:n saanto, puhtaus ja monistuvuus*

Menetelmällä 3 saatiin suurimmat saannot suurimmasta osasta näytteitä. Menetelmä 4 oli saantojen suhteen toiseksi paras. Menetelmän 2 saannot olivat kaikista alhaisimpia. Saannot menetelmällä 2 olivat suurimmaksi osaksi pienempiä kuin menetelmällä 1. Eristetty DNA oli puhtainta menetelmillä 3 ja 4. Menetelmällä 2 eristetty DNA oli keskimäärin epäpuhtaampaa kuin menetelmällä 1. Eristetty DNA oli monistuskelpoisinta menetelmillä 3 ja 4.

6.3 Prosessoiduille elintarvikkeille sopivin menetelmä

Elintarvikkeiden prosessointi saattaa hajottaa DNA:n analyysikelvottomaksi. Näin on luultavimmin käynyt maissimuronäytteen kohdalla. Yhdellä menetelmistä mitattu DNA-pitoisuus oli nolla ja muilla menetelmillä pitoisuudet olivat hyvin pieniä. PCR-analyysissa maissin DNA:ta ei monistunut yhdestäkään maissimuronäytteestä. Riisivalmisteille, maissilastuille, jauhoseokselle ja pikkuleiville menetelmä 3 oli sopivin. Vehnäleivälle ja wok-kastikkeelle soveltuvin oli menetelmä 4.

Kaikista elintarvikkeista rasvaa ja muita kontaminantteja ei saada poistettua kuumalla vedellä huuhtomalla kuten maissilastuista. Näistä tuotteista hyviä esimerkkejä ovat proteiinipatukka ja soijakerma. Rasvaa sisältävistä tuotteista saatiin puhdistettua parhaiten DNA:ta menetelmällä 4. Orgaaninen uutto puhdisti näytettä tehokkaasti proteiineista ja lipideistä. Menetelmällä 3 rasvaa sisältävien näytteiden käsittely oli helpompaa ja saannot olivat huomattavasti suurempia kuin muilla menetelmillä, mutta eristetty DNA ei suurimmaksi osaksi ollut yhtä monistuskelpoista kuin menetelmällä 4.

6.4 Yhteenveto

Jokaiselle näytteelle löydettiin menetelmä, jonka tulokset olivat parempia kuin menetelmällä 1. Menetelmillä 3 ja 4 saatiin parhaat tulokset kaikista näytteistä. Menetelmällä 2 saadut tulokset olivat keskimäärin huonompia kuin menetelmällä 1. Menetelmä 2 soveltui vain yksinkertaisille, prosessoimattomille näytteille. Riisinäytteille menetelmä 3 oli selkeästi paras. Rasva- ja proteiinipitoisille näytteille soveltui parhaiten menetelmä 4. Menetelmät 3 ja 4 osoittautuivat tehokkaimmiksi DNA:n eristykseen prosessoiduista elintarvikkeista. Kummallakin menetelmällä on hyvät ja huonot puolensa, jotka on syytä ottaa huomioon menetelmän käyttöönotossa rutiinityöhön. Kaikkien näytteiden puhtautta tai saantoa, monissa tapauksissa molempia, saatiin parannettua huomattavasti. Myös molemmista näytteistä, joista ei saatu eristettyä soijan DNA:ta menetelmällä 1, onnistuttiin eristämään soijan DNA menetelmällä 4. Kokeilu oli siis onnistunut. Tulosten lopullista luotettavuutta pitäisi tosin tarvittaessa arvioida analysoimalla samat näytteet useaan kertaan samoilla menetelmillä. Tämän työn tuloksiin tulee siis suhtautua enemmän suuntaa antavina kuin suorina yleistyksinä.

VIITELUETTELO

- [1] Wilson, Keith - Walker, John, *Principles and techniques of Biochemistry and molecular biology*. Sixth edition. New York: Cambridge university press. 2005 (1975).
- [2] Grace, Stephen, University of Arkansas at Little Rock. *Biology 2402 - Introduction to Botany, Cell Vocabulary* [verkkodokumentti]. 2007 [viitattu 5.9.2007]. Saatavilla: <http://www.ualr.edu/botany/cellvocab.html>
- [3] Grace, Stephen, University of Arkansas at Little Rock. *Biology 2402 - Introduction to Botany, Image Gallery* [verkkodokumentti]. 2007 [viitattu 5.9.2007]. Saatavilla: <http://www.ualr.edu/botany/plant3.gif>
- [4] Dey, P.M. - Harborne, J.B. *Plant biochemistry*. San Diego, California: Academic Press. 1997.
- [5] Hall, J.L. ym. *Plant cell structure and metabolism*. Second edition. New York: Longman Group ltd. 1982 (1974).
- [6] Weising, Kurt ym. *DNA fingerprinting in Plants -Principles, Methods and Applications*. Second edition. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis group. 2005 (2005).
- [7] Holden, Marcia J. ym, Evaluation of Extraction Methodologies for Corn Kernel (*Zea Mays*) DNA for Detection of Trace Amounts of Biotechnology-Derived DNA *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51. (2003), s. 2468 - 2474.
- [8] Moreano, Francisco ym, Distortion of Genetically Modified Organism Quantification in Processed Foods: Influence of Particle Size Compositions and Heat-induced DNA Degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005), s. 9971 - 9979.
- [9] Bailey, James E. -Ollis, David F, *Biochemical engineering fundamentals*, second edition. Singapore: McGraw-Hill international editions, Chemical engineering series. 1986 (1977).
- [10] Cummings, John J. ym. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *The American Journal of Clinical Nutrition* 61 (1995), s.938 - 945.
- [11] Walker, J.M. -Rapley, R, *Molecular Biology and Biotechnology*. Fourth edition. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 2002 (2000).
- [12] Brown T.A, *Gene Cloning and DNA analysis*. Fourth edition. Great Britain: Blackwell Science Ltd. 2001 (1986).
- [13] Vijayalakshmi, M.A, *Biochromatography-theory and practice*. New York: Taylor & Francis Group. 2002.
- [14] DiBernando, G. ym. Comparative Evaluation of Different DNA Extraction Procedures from Food Samples. *Biotechnology Progress* 23 (2007), s. 297 - 301.

- [15] Smith, Donna S. ym. Comparison of Several Methods for the Extraction of DNA from Potatoes and Potato-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005), s. 9848 - 9859.
- [16] DiPinto, Angela ym. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control* 18 (2007), s. 76 - 80.
- [17] Peano, Clelia ym. Qualitative and Quantitative Evaluation of the Genomic DNA Extracted from GMO and Non-GMO Foodstuffs with Four Different Extraction Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004). s. 6962 - 6968.
- [18] Bartlett, John M.S. -Stirling, David, *PCR protocols*. Second edition. New Jersey: Humana Press Inc. 2003.
- [19] Dorak, M.Tefvik, *Real time PCR*. New York: Taylor & Francis Group. 2006.
- [20] Baylor College of Medicine. *Quantitative PCR Chemistries* [verkkodokumentti]. Päivitetty 29.10.2007 [viitattu 30.10.2007]. Saatavilla: <http://www.bcm.edu/mcfweb/?PMID=3151>
- [21] Invitrogen. *Molecular Probes: Handbook* [verkkodokumentti]. Päivitetty 5.4.2005 [viitattu 5.9.2007]. Saatavilla: <http://probes.invitrogen.com/handbook/figures/0709.html>
- [22] Cankar, Katarina ym. Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* 6:37 (2006).

