



TAMPEREEN  
AMMATTIKORKEAKOULU

# SOLUNÄYTTEIDEN LAADUNTARKKAILUN KEHITYSTYÖ

Olli Virtanen

Opinnäytetyö  
Lokakuu 2017  
Laboratorioalan koulutus



## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutus

VIRTANEN, OLLI:  
Solunäytteiden laaduntarkkailun kehitystyö

Opinnäytetyö 60 sivua, joista liitteitä 7 sivua  
Lokakuu 2017

---

Opinnäytetyö suoritettiin THL Biopankin DNA-näytehallintalaboratoriossa Helsingissä. Sinne varastoidaan eri puolilta Suomea biologisia näytteitä myöhempiä tutkimuksia varten. Usein yhdestä henkilöstä on useampia näytteitä puhtaana DNA:na tai soluina. Laboratorion sisäiseen laaduntarkkailuun kuuluu samasta henkilöstä lähtöisin olevien näytteiden tunnistaminen geenimerkkien ja PCR-menetelmien avulla.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää laboratorion sisäistä laaduntarkkailua. Tarkoituksena oli kehittää solunäytehallinnan käyttöön soveltuva laaduntarkkailumenetelmä. Sukupuolen määrittävää SEX-PCR-menetelmää on käytetty karkeaan laatukontrolliin, mutta sen antamat tulokset eivät ole olleet yhtenäisesti luotettavia. Menetelmän toimivuutta pyrittiin parantamaan työstämällä PCR-reaktiota ja vertailemalla erilaisia tapoja eristää DNA:ta. Tarkemmassa kontrollissa on käytetty kuuteen geenimerkkiin perustuvaa ID-PCR-menetelmää, mutta sen tulokset on analysoitu FIMM:n laboratoriossa. Menetelmän korvaamisen toivossa testattiin uutta PCR-menetelmää, jossa yksilötunnistukseen käytetään D1S80-minisatelliittia. Minisatelliittia käytettiin tunnistamaan sisäistä virhettä eli eristämisen aikana tapahtuvaa näytteiden sekaantumista. ID-PCR-menetelmää käytettiin testaamaan kahdesta eri näyteryhmästä ulkoista virhettä eli näytteiden kesken tapahtuvaa sekaantumista ennen biopankkiin saapumista. Kaikki DNA-näytteet eristettiin hepariinia sisältävistä veri- ja solunäytteistä. Koska hepariini inhiboi PCR-reaktioita, pyrittiin löytämään parhaiten inhibointia vähentävä eristysmenetelmä.

Vaihtamalla SEX-PCR-menetelmän ohjelma ja muuntelemalla komponentteja tai niiden pitoisuuksia menetelmästä tehtiin huomattavasti varmempi. D1S80-minisatelliitin monistamiskokeessa alle 40 %:lla näytteistä saatiin näkyviä tuloksia. Näytteiden erottavuus ei kuitenkaan riittänyt sisäisen virheen luotettavaan arviointiin. ID-PCR-tekniikkaa käyttämällä ei löytynyt ulkoista virhettä pienestä näyteryhmästä, joka testattiin. DNA:n eristäminen voitiin tehdä manuaalisesti tai kalliimmalla kaupallisella eristyskitillä, tosin jälkimmäisellä hepariini-inhiboinnin vähentyminen oli todennäköisempää.

Tavoite ja tarkoitus ovat toteutuneet SEX-PCR-menetelmän osalta. D1S80-minisatelliitti on yksinään osoittautunut riittämättömäksi sisäisen virheen tarkkailuun. Mikäli ID-PCR halutaan korvata, uuteen PCR-menetelmään on vähintään lisättävä toinen geenimerkki. Kaikkien tulosten perusteella hepariinin inhiboiva vaikutus riippuu näyteryhmästä ja vähenee todennäköisimmin kaupallista eristyskitiä käyttämällä. Mikäli halutaan käyttää halvempaa manuaalieristystä, menetelmää on vielä kehitettävä, että inhibointi vähentyisi ryhmästä riippumatta.

---

Asiasanat: biopankki, laaduntarkkailu, PCR, geenimerkki, hepariini

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Sciences

VIRTANEN, OLLI:  
Development Work for the Quality Control of Cell Samples

Bachelor's thesis 60 pages, appendices 7 pages  
October 2017

---

This thesis was conducted for the sample management laboratory of THL Biobank in Helsinki. Samples of pure DNA or cells from all over Finland are stored there for later studies. Identifying samples originating from the same donor through genetic markers and PCR methods is part of the internal quality control of the laboratory. The objective of this thesis was to further develop the internal quality control. The purpose was to build a quality control method for cell sample management.

The sex determining SEX-PCR method used in coarse quality control has not provided reliable results continuously. To improve its operability, the PCR reaction was worked on together with contrasting different DNA extraction methods. ID-PCR, a method based on six genetic markers, has been used in more fine-grained control, but so far its results have been analyzed by the laboratory of FIMM. In hopes of finding a replacement, a new PCR method utilizing a D1S80 minisatellite was tested to see whether it would offer a significant increase in the level of internal precision in DNA extraction. ID-PCR was used to test the external accuracy of inbound samples from two different sample groups. All DNA samples were extracted from blood and cell samples containing heparin. Since heparin inhibits PCR reactions, the aim was to find the best extraction method to reduce inhibition.

SEX-PCR became significantly more reliable through the replacement of the PCR program and modifications on the components or their concentrations. Less than 40 percent of the samples used in the minisatellite testing provided meaningful results, but they were unapplicable for testing the internal precision. In the ID-PCR test, no external inaccuracy was found amidst the tested samples. DNA extraction was possible either manually or by using a more expensive extraction kit. However, reduction in heparin inhibition was more likely with the latter.

The objectives set for SEX-PCR were achieved. The D1S80 minisatellite alone proved to be insufficient for determining precision. At least a second generic marker should be added to the new PCR method before ID-PCR can be replaced. Judging by all the results, inhibition of heparin appears to depend on the sample group and is most likely to reduce when an extraction kit is used. As far as the cheaper, manual extraction method is concerned, more development is required before group-independent reduction of inhibition can be reached.

---

Key words: biobank, quality control, PCR, genetic marker, heparin

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	VERI JA DNA.....	8
	2.1. Veri, hyytyminen ja hepariini .....	8
	2.2. DNA.....	9
	2.3. Kromosomit ja toistojaksot .....	12
	2.4. DNA-synteesi.....	13
3	PCR .....	15
	3.1. PCR-reaktio .....	15
	3.2. PCR-reaktioon vaikuttavia tekijöitä.....	17
	3.3. AGE-analyysi.....	19
	3.4. Erilaisia PCR-tyyppejä .....	20
4	DNA:N ERISTYS- JA PUHDISTUSMENETELMISTÄ .....	24
	4.1. DNA:n manuaalinen eristys verestä .....	24
	4.2. DNA:n puhdistaminen kaupallisella eristyskitillä .....	25
	4.3. Solujen eristäminen Ficoll-fraktiolla .....	26
	4.4. DNA:n puhtauden ja pitoisuuden määrittäminen .....	26
5	TOTEUTUSSUUNNITELMA .....	28
6	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	29
	6.1. DNA:n eristäminen veri- ja solunäytteistä.....	29
	6.2. Heparinaasi .....	29
	6.3. Näytteet.....	30
	6.3.1 Päänäytteet .....	30
	6.3.2 SEX-näytteet .....	31
	6.4. GoTaq® Green Master Mix.....	32
	6.5. PCR-menetelmät.....	32
	6.6. PCR-ohjelmat.....	34
	6.7. AGE ja laitteet .....	35
7	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU .....	37
	7.1. SEX-PCR-menetelmän toimivuus .....	37
	7.2. Sisäinen laatukontrolli .....	42
	7.2.1 Minisatelliitti-PCR .....	43
	7.2.2 ID-PCR.....	44
	7.3. Ulkoinen laatukontrolli .....	46
8	POHDINTA.....	49
	LÄHTEET.....	51
	LIITTEET .....	54

Liite 1. DNA:n eristys immortalisoidusta solulinjasta (CEPH) .....	54
Liite 2. Verisolujen eristys Ficoll-fraktiolla (Li-hepariiniveri 10 ml).....	56
Liite 3. NF-päänäytteiden tiedot.....	57
Liite 4. SU-päänäytteiden tiedot.....	58
Liite 5. SEX-näytteiden tiedot.....	59
Liite 6. GoTaq <sup>®</sup> Green Master Mix (M712) -tietolomake .....	60

## LYHENTEET JA TERMIT

AGE	agaroosigeelielektroforeesi
antikoagulantti	veren hyytymistä hidastava lääkeaine
bp	DNA:n pituuden mittayksikkö (base pair)
DHS	dehydrosikimihappo
DNA	deoksiribonukleiinihappo
dNTP	deoksinukleosiditriposfaatti (deoxynucleosidetriphosphate)
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
entsyymi	biologisia reaktioita nopeuttava proteiini
geeni	perintötekijä
geenimerkki	tunnistettava lyhyt DNA-jakso, jonka sijainti perimässä tunnetaan
hiilihydraatti	hiiltä, vetyä ja happea sisältävä orgaaninen molekyyli
inhiboida	hidastaa/estää reaktiota
interventio	toimenpide, jolla pyritään vaikuttamaan yksilön/ryhmän terveydentilaan/käyttäytymiseen
kb	DNA:n pituuden mittayksikkö (kilobase)
kofaktori	entsyymin toiminnan kannalta välttämätön tekijä
lyysaus	solukalvon hajotus
M	mol/l
manuaalinen	käsin suoritettava
PCR	polymeraasiketjureaktio (polymerase chain reaction)
polymeeri	useiden toisiinsa sitoutuneiden pienempien molekyylien eli monomeerien muodostama yhdiste
polysakkaridi	pitkäketjuinen hiilihydraatti
proteiini	aminohapoista koostuva molekyyli
SDS	natriumlauryylisulfaatti
synteettinen	keinotekoisesti tuotettu
termostabiili	lämpöä kestävä

## 1 JOHDANTO

THL Biopankki on asiantuntijayksikkö, joka on osa sosiaali- ja terveysministeriön alaisen Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen toimintaa. Se varastoi ja hallinnoi tutkimusaineistoja, joihin vapaaehtoisilta kansalaisilta on kerätty biologisia näytteitä ja tietoja. Kerättyä aineistoa hyödynnetään selvittäessä perimän, ympäristön ja elintapojen yhteisvaikutuksia kansantaudeissa, tutkittaessa tautimekanismeja sekä kehitettäessä interventiostrategioita.

Opinnäytetyö suoritettiin THL Biopankin DNA-näytehallintalaboratoriossa, joka sijaitsee Biomedicum tutkimuskeskuksessa Helsingissä. Laboratorio jakaa työtilat ja tekee tiivistä yhteistyötä Suomen molekyyli lääketieteen instituutin eli FIMM:n kanssa. Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää THL Biopankin sisäistä laaduntarkkailua.

THL Biopankissa vastaanotetaan verinäytteitä, joista eristetään muun muassa DNA:ta ja soluja, jotka säilötään jatkotutkimuksia varten. Samasta näytteenantajasta vastaanotetaan usein enemmän kuin yksi verinäyte. Sisäisen laaduntarkkailun kannalta on voitava todentaa luotettavasti, että saapunut näyte ja laboratoriossa käsitelty näyte eli lopputuote ovat peräisin samasta henkilöstä. Lisäksi on tärkeä varmistaa, että kaikki samalla tutkimustunnuksella laboratorioon tulleet näytteet ovat peräisin samasta henkilöstä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää laaduntarkkailumenetelmä solunäytehallinnan käyttöön. Työhön käytettiin PCR-tekniikkaa ja geenimerkkien analyysiä, joilla voidaan erottaa eri yksilöt toisistaan. Yksi työn haasteista oli se, että alkuperäinen solueristykseen käytettävä verinäyte sisältää hepariinia, jolla on taipumus inhiboida PCR-reaktioita. Menetelmän tulisi olla sellainen, että analysoitaessa voidaan todentaa näytteen ja lopputuotteen yhteensopivuus samaan yksilöön ilman hepariinin aiheuttamaa häiriötä.

## 2 VERI JA DNA

### 2.1. Veri, hyytyminen ja hepariini

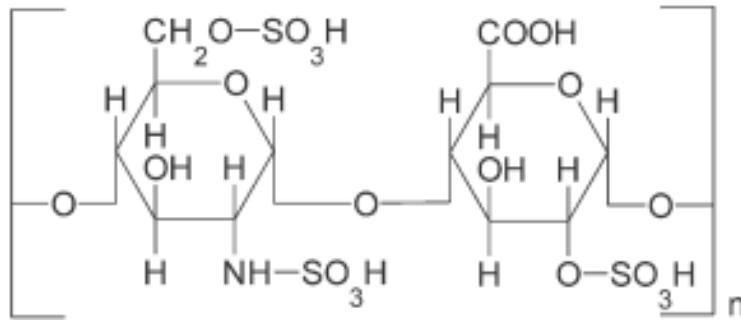
Veri on regeneraatio- eli uusiutumiskykyistä kudosta, joka kiertää kehossa suonia pitkin. Hieman yli puolet verestä koostuu plasmasta, joka muun muassa säätelee nestetasapainoa. Loput verestä koostuu kolmenlaisista verisoluista: tumattomista punasoluista ja verihiutaleista sekä tumallisista valkosoluista. Punasolut, jotka kattavat suurimman osan solujen osuudesta veressä, kuljettavat keuhkoista happea kudoksiin ja hiilidioksidia kudoksista keuhkoihin. Verihiutaleet auttavat elimistöä tyrehtyttämään verenvuotoja, kun taas valkosolut puolustavat sitä taudinaiheuttajilta. (Aivelo, Järvinen, Kaarisalo & Tarkiainen 2016; Veripalvelu 2017.)

Veren hyytyminen on verenvuodon tyrehtyttämiseen pyrkivä reaktiosarja. Kun verisuoni vaurioituu, verihiutaleita hakeutuu vaurioituneeseen kohtaan. Samalla veren hyytymisjärjestelmä tuottaa trombiinientsyymiä, joka pilkkoo fibrinogeeniksi kutsuttua veriplasman proteiinia. Fibrinogeenistä tulee säikeistä fibriniä, joka muodostaa verihiutaleiden kanssa hyytymän. (Kallio 2001, 595–598.)

Terveen kehon järjestelmä hajottaa fibrinin mukana hyytymän sitä mukaa kun vaurio-kohta paranee. Jos tarpeettomaksi käyneen hyytymän annetaan jäädä verenkiertoon, se voi tukkia verenkiertoa ja siten aiheuttaa jopa kuolemantapauksia. Esimerkiksi sydäninfarkti ja aivoverenkierron tukkeutuminen voivat olla hyytymän aiheuttamia. Siksi veressä on normaalitilanteissa hyytymistä estäviä tekijöitä, joita kutsutaan antikoagulanteiksi. Yksi tärkeimmistä antikoagulanteista on hepariini. (Kallio 2001, 595, 599.)

Hepariini on erittäin hapan polysakkaridi, joka rakentuu vähintään glukosamiini- ja glukuronihappomonomeereistä (kuvio 1). Elimistössä hepariinia esiintyy varastoituneena muun muassa maksassa. Sitä vapautuu verenkiertoon vain vähän kehon ollessa terve. Lääketieteellisesti hepariinia käytetään, kun halutaan saada aikaan nopea antikoagulanttinen vaikutus esimerkiksi keuhkoveritulpan hoidossa. (Kallio 2001, 600; Pelkonen & Ruskoaho 2003, 417, 419–420.)





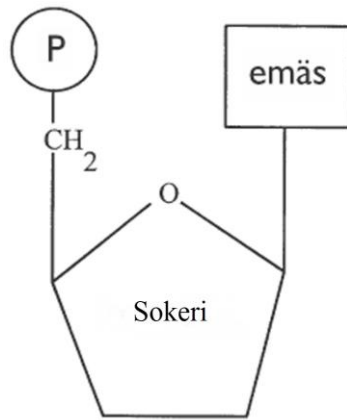
KUVIO 1. Glukosamiinin ja glukuronihapon muodostama hepariinin perusrakennekaava (Kallio 2001, 600)

Hepariinin antikoagulanttinen vaikutus perustuu sen kykyyn sitoutua entsyymien ja mahdollisesti muiden orgaanisten aineiden kanssa (Pasanen & Pirdil 2013, 6). Yksi näistä entsyymeistä on antitrombiini III, joka inaktivoi trombiinin kaltaisia hyytymistekijöitä. Normaalisti antitrombiini III:n sitoutuminen hyytymistekijöihin on hyvin hidasta, mutta nopeus lähes tuhatkertaistuu hepariinin sitoutuessa entsyymiin. (Kallio 2001, 599–601.)

## 2.2. DNA

Deoksiribonukleinihappo eli DNA on perintöainesta, johon on koodattu perintötekijät eli geenit. Geenien avulla eliö kykenee kehittymään, toimimaan ja siirtämään informaatiota jälkeläisilleen. (Suominen, Pärssinen, Haajanen & Pelkonen 2013, 13.) Tämä tapahtuu siten, että geenit ohjaavat proteiinien valmistusta soluissa ja sitä kautta eliön elintoimintoja (Mutanen & Rostila 2016).

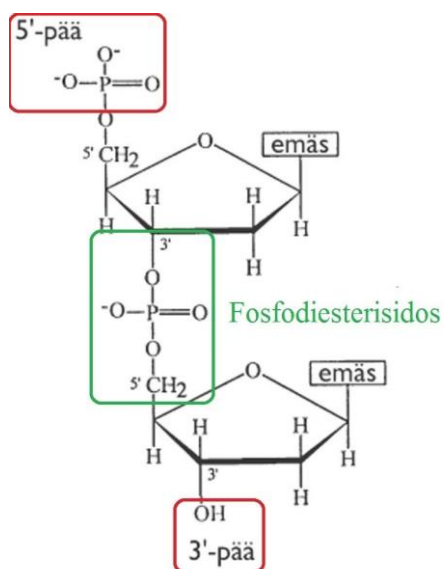
DNA on hyvin pitkä polymeeri, jonka muodostavia monomeerejä kutsutaan nukleotideiksi. DNA:n nukleotidit koostuvat kolmesta molekyylisestä: deoksiriboosi-sokerista, fosfaattiryhmästä ja orgaanisesta emäksestä (kuvio 2). Sokeri- ja fosfaattiosa ovat kaikissa DNA:n nukleotideissa samat, mutta emäs on vaihtoehtoisesti tymiini, adeniini, guaniini tai sytosiini. Kirjoitettaessa nukleotidien järjestystä DNA:ssa käytetään usein näiden emästen lyhenteitä, jotka ovat vastaavasti T, A, G ja C. (Suominen ym. 2013, 15–17.)



P = fosfaattiryhmä

KUVIO 2. Nukleotidin perusrakenne (Suominen ym. 2013, 15, muokattu)

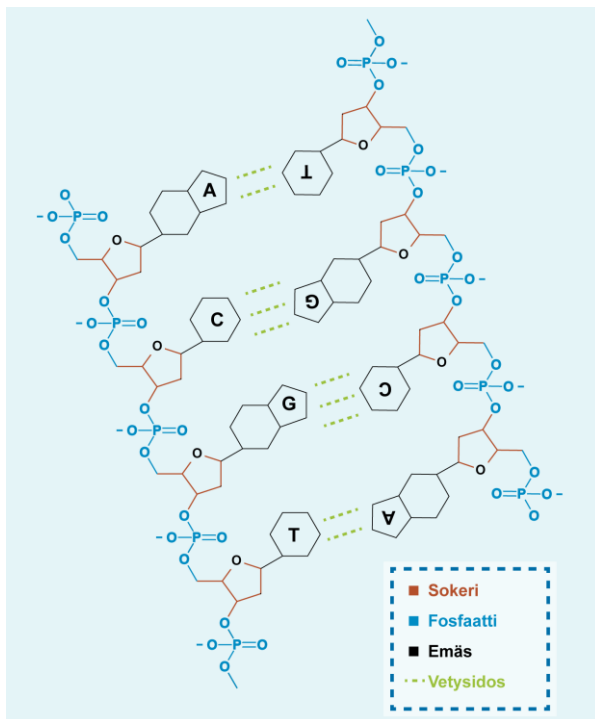
DNA-nauhassa eli -juosteessa vierekkäiset nukleotidit ovat ketjuuntuneet sokeriosistaan fosfaattiryhmän muodostaman 3'-5'-fosfodiesterisidoksen välityksellä. Kyseisessä sidoksessa edellisen nukleotidin sokeriosan kolmas hiili on sitoutunut esterisidoksella fosfaattiin, joka puolestaan on sitoutunut toisella esterisidoksella seuraavan nukleotidin viidenteen hiileen sokerissa (kuvio 3). Nukleiinihappujuosteen yhdessä päässä on sokerin viidenteen hiileen sitoutunut vapaa fosfaatti (5'-pää). Vastakkaisessa päässä on sokerin kolmanteen hiileen sitoutunut vapaa OH-ryhmä (3'-pää). Siksi nukleiinihappojen emäs-järjestys eli sekvenssi kirjoitetaan aina 5'-päätä alkaen eli 5'→3'-suunnassa, esimerkiksi 5'-GTTTACAAT-3'. (Suominen ym. 2013, 18; Mutanen & Rostila 2016.)



KUVIO 3. DNA-juosteen rakenne (Suominen ym. 2013, 19, muokattu)

DNA:n pituuden mittayksikkö on bp, joka on lyhenne englannin kielen sanoista base pair. Se tarkoittaa vierekkäisten nukleotidien/emästen määrää DNA-juosteessa. Toinen yleisessä käytössä oleva mittayksikkö on kilobase eli kb, joka vastaa 1000 bp:ia. (Kallio 2005, 58; EndMemo, 2017.)

DNA-molekyyli muodostuu kahdesta juosteesta, jotka kietoutuvat toistensa ympärille spiraalimaisena kaksoiskierteenä. Juosteiden nukleotidijärjestys on antiparalleelinen eli toisilleen vastakkainen. Juosteet sitoutuvat toisiinsa siten, että emäkset pariutuvat toistensa kanssa kuviossa 4 esitetyllä tavalla. Tymiini pariutuu aina adeniinin kanssa kahdella vetysidoksella. Guaniini puolestaan pariutuu sytosiinin kanssa kolmella vetysidoksella. (Suominen ym. 2013, 19; Mutanen & Rostila 2016.)

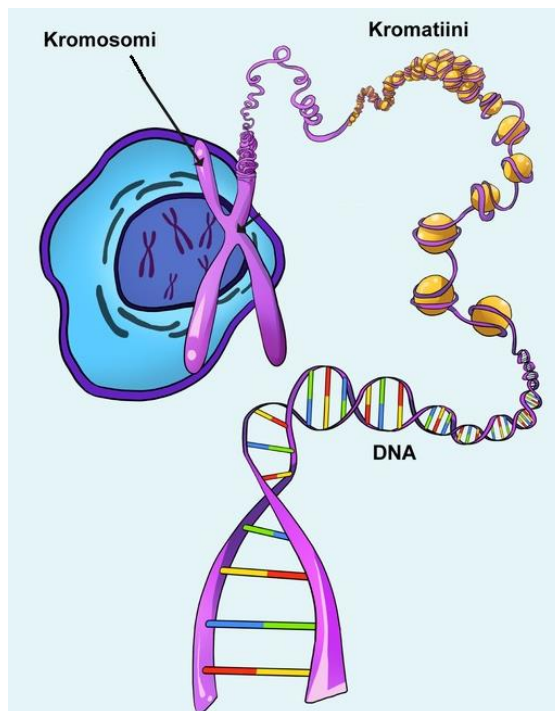


KUVIO 4. Kaksoisjuosteen rakenne (Mutanen & Rostila 2016, muokattu)

Kaksoiskierre on kestävä, mutta myös helposti muokattava. Tämä johtuu siitä, että juosteet voivat irrota toisistaan vetysidosten katketessa esimerkiksi riittävän korkean lämpötilan tai voimakkaan emäskäsittelyn kautta. Tätä kutsutaan DNA:n denaturoimiseksi. Kaksoiskierre voidaan myös palauttaa eli renaturoida poistamalla denaturoiva tekijä. Tämä tarkoittaa kuumennetun DNA:n hidasta jäädyttämistä tai emäksen neutraloimista. (Suominen ym. 2013, 21; Mutanen & Rostila 2016.)

### 2.3. Kromosomit ja toistojaksot

Ihmissolu kuuluu eukaryoottisoluihin. Kyseisillä soluilla on tuma, jonne DNA on pakautunut ja järjestäytynyt useiksi kromosomeiksi. Kukaan kromosomi koostuu kromatiinista. Kromatiini muodostuu yhdestä suuresta lineaarisesta DNA-rihmasta ja siihen liitetyistä proteiineista (kuvio 5). Ihmisen kromosomisto on diploidi eli jokaista kromosomia esiintyy kaksi kappaletta. Yksi on peritty isältä ja toinen äidiltä. Ihmisellä esiintyy normaalisti kaksikymmentäkolme kromosomiparia. (Turpeenoja 2005, 132–133; Hannula, Somerma, Fagerstedt & Haahtela 2006, 18; Suominen ym. 2013, 11.)



KUVIO 5. Kromosomin rakenne (Mutanen & Rostila 2016, muokattu)

Yksi ihmisen kromosomipareista määrittää yksilön sukupuolen. Tämän parin kromosomivariaatioita kutsutaan muotonsa vuoksi X- ja Y-kromosomeiksi. Naisella esiintyy kaksi X-kromosomia, kun taas miehellä esiintyy sekä X- että Y-kromosomi. Y-kromosomi on X-kromosomia pienempi ja sisältää vähemmän genejä. Muissa kromosomipareissa molemmilla kromosomeilla on sama muoto ja koko. (Ijäs-Virtanen & Partanen 2013, 9.)

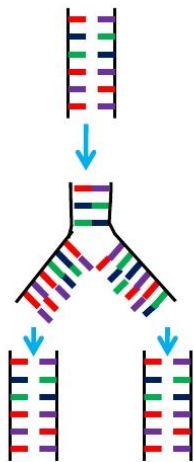
Ihmisperimä sisältää geenien lisäksi niin kutsuttuja toistojaksoja. Toistojaksot ovat DNA-jaksoja, joissa sama nukleotidijärjestys toistuu useita kertoja peräkkäin. Toistojen lukumäärä on yksilöllistä, mikä antaa perustan yksilötunnistukselle. Vastinkromosomeilla on

samat toistojaksot, muttei välttämättä samaa toistojen esiintyvyyttä. Esimerkiksi satunnaisella henkilöllä voi esiintyä toistojakso 5'-ATGCA-3' neljätoista kertaa kromosomissa X ja kaksikymmentäviisi kertaa vastinkromosomissa Y. Hänen lapsensa perii toisen kromosomeista ja vastaavan toistojaksojen määrään. Toiselta vanhemmalta peritty kromosomi ei välttämättä sisällä samaa toistojaksoa 14- tai 25-kertaisesti. (Chantler 2004; Klug & Cummings 2004, 265; Mutanen & Rostila 2016.)

## 2.4. DNA-synteesi

DNA:n kaksoiskiarteisuus on tärkeää solun monistumisen ja geneettisen tiedon säilyvyyden kannalta. Kaksoiskierre on yhtäaikaaisesti vaikea hajottaa ja helppo aukaista. Vaikea hajottaminen takaa perinnöllisen informaation säilyvyyden. Helppo avautuminen puolestaan tekee mahdolliseksi DNA:n tehokkaan kopioinnin. (Happonen, Holopainen, Sariola, Sotkas, Tenhunen, Tihtarinen-Ulmanen & Venäläinen 2006, 61.)

Kun DNA kahdentuu, DNA-juosteiden väliset vetysidokset katkaistaan. Juosteille valmistetaan DNA-synteesin kautta uudet komplementaariset juosteet. Syntyy kaksi uutta DNA-molekyyliä, jotka ovat täysin identtisiä alkuperäisen kaksijuosteisen DNA:n kanssa. (Turpeenoja 2005, 138–139.) Tämä osoitetaan kuviossa 6. DNA-synteesillä tarkoitetaan sekä DNA:n luonnossa tapahtuvaa monistumista että täysin synteettistä valmistamista (Ritala, Koivistoinen, Jäntti, Ahteensuu & Ruohonen-Lehto 2013, 9).



KUVIO 6. DNA:n kahdentuminen (KaiserScience 2017)

Yksi DNA-synteesin tärkeistä tekijöistä on DNA-polymeraasientsyymi. Kun DNA-juostetta kopioidaan, vapaita nukleotideja liitetään mallina toimivien juosteiden eli templaattien määräämässä emäsjärjestyksessä uudeksi komplementaariseksi juosteeksi. DNA-polymeraasi liittää uuden nukleotidin fosfaattiosan edellisen nukleotidin sokeriosan vapaaseen OH-ryhmään. Samalla kun uusi juoste valmistuu, emäkset pariutuvat toistensa kanssa. (Turpeenoja 2005, 139.)

### 3 PCR

Polymeraasiketjureaktio eli PCR on biokemiallinen menetelmä, jota käytetään monistamaan DNA-jaksoja (Suominen ym. 2013, 153). PCR-tekniikalla on merkittävä osuus geenitutkimuksessa, ja sille keksitään jatkuvasti uusia sovelluksia (Happonen ym. 2006, 89). PCR-reaktiota käytetään usein monistamaan vain tiettyjä DNA-jaksoja. Tällä tavoin sääsetään aikaa, jota kuluu kopioitaessa näytteen koko DNA:ta. (Nelson & Cox 2013, 327.)

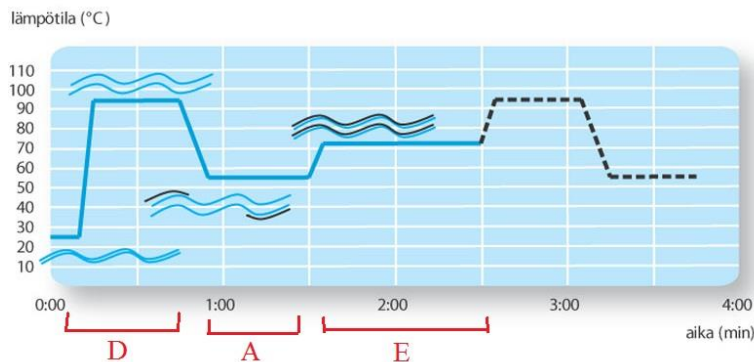
PCR-reaktiolla voidaan monistaa DNA:ta hyvin pienestä määrästä näytettä tai paloja yksittäisistä geeneistä. Materiaalia monistetaan, jotta saadaan havaittavia tuloksia tarkemmissa tutkimuksissa. Tällaisia tutkimuksia ovat muun muassa yksilötunnistus, sairauksien diagnosointi sekä tuhansia vuosia sitten kuolleiden eliöiden perimän selvittäminen. (Happonen ym. 2006, 89; Suominen & Ollikka 2006, 107.)

PCR-reaktiossa jäljitellään DNA-synteesiä. Perusajatuksena on avata näytteen DNA-juoste korkeassa lämpötilassa ja merkitä monistettava DNA-jakso alukkeilla. DNA-polymeraasientsyymi kokoaa reaktioon lisättyjen nukleotidien avulla kopion monistettavasta DNA-jaksosta, minkä jälkeen juosteet rakentuvat uudelleen. Tällä tavalla templaatti-DNA:n määrä kaksinkertaistuu. Tekemällä näin kymmeniä kertoja tuotetaan miljoonia kopioita monistettavasta alueesta suhteellisen lyhyessä ajassa. (Happonen ym. 2006, 90; Suominen & Ollikka 2006, 107; Suominen ym. 2013, 153.)

#### 3.1. PCR-reaktio

PCR-reaktio koostuu eri lämpötiloja vaativista vaiheista, joista käytetään yhteisnimitystä PCR-sykli. Sykli alkaa templaatin denaturoimisesta. Näytteen DNA-juosteet avataan kuumentamalla näyte lähes 100 °C:seen. Sen jälkeen lämpötilaa lasketaan hetkellisesti noin 55 °C:seen, jotta alukkeet pystyisivät kiinnittymään templaattiin. Englanninkielinen termi tälle vaiheelle on annealing. Tämä vaihe pidetään lyhyenä ja lämpötilan lasku sopivana, ettei templaatti ehtisi renaturoitua eli sitoutua uudelleen vastineensa kanssa. (Happonen ym. 2006, 90; Suominen ym. 2013, 154.)

Kun alukkeet ovat kiinnittyneet, lämpötila nostetaan noin 72 °C:seen. DNA-polymeraasi alkaa silloin liittää nukleotideja alukseen 3'-päästä templaatin mallin mukaan. Tätä kutsutaan pidennysreaktioksi eli ekstensioksi. Templaatin molemmille juosteille syntyy vastine alukkeista alkaen. Kun synteesi on valmis minuuteissa, lämpötila nostetaan noin 95 °C:seen. Tällöin kaikki juosteet irtoavat toisistaan ja sykli alkaa uudestaan. (Happonen ym. 2006, 90; Suominen ym. 2013, 154.) Kuviossa 7 esitetään malli PCR-syklin lämpötilaprofiilista.



KUVIO 7. Malli PCR-syklin lämpötilaprofiilista: denaturointi (D), annealing (A) ja ekstensio (E) (Suominen ym. 2013, 155, muokattu)

Ensimmäisen PCR-syklin lasketaan alkavan ensimmäisestä monistumisesta. Kahdesta uudesta DNA-molekyylistä tulee seuraavassa syklissä neljä uutta ja edelleen kolmannessa syklissä kahdeksan uutta. Kun syklejä toistetaan useasti peräkkäin, pienestä määrästä templaatti-DNA:ta monistetaan runsaasti määrätyn pituisia DNA-jaksoja. Yleensä syklejä tehdään 15–40 kertaa. Hyvin optimoituina PCR-reaktio ovat erittäin tehokas. Parhaimmillaan saadaan 30–35 syklillä monistettua yhdestä pikogrammasta ( $10^{-12}$  g) templaatti-DNA:ta yksi mikrogramma ( $10^{-6}$  g) kohde-DNA:ta. (Suominen & Ollikka 2006, 108; Suominen ym. 2013, 154–155.)

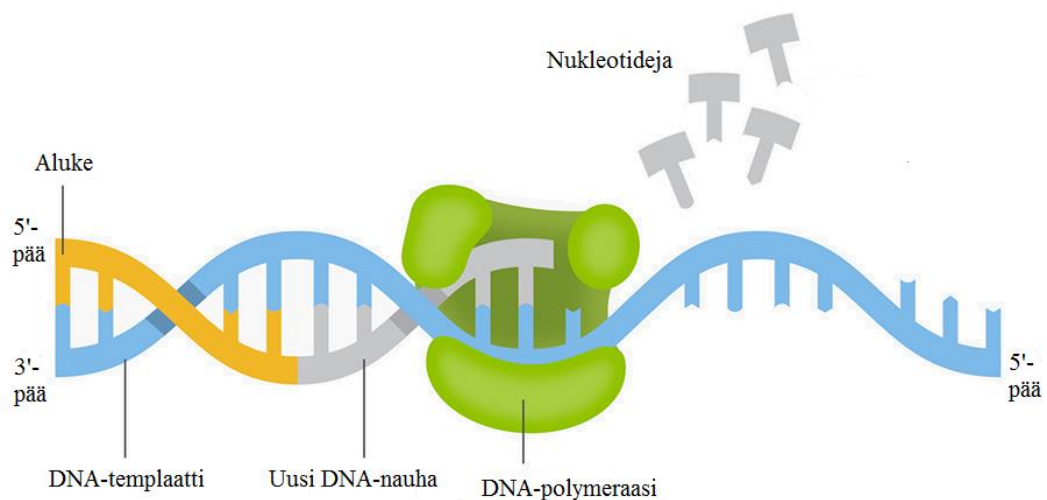
Yleensä PCR-reaktion suorittamiseen käytettävä astia on enintään puolen millilitran tilavuinen ja ohutseinäinen mikrosentrifuugiputki tai kuoppalevy (Suominen & Ollikka 2006, 107). Levyyn voi mahtua muutamia kymmeniä erillisiä näytteitä, ja niiden peittämiseen voidaan käyttää termostabiileja kalvoja tai kansia. On myös kehitetty automaattisia PCR-laitteita, jotka säätelevät näytteiden lämpötilaa ohjelmoidun PCR-syklin mukaisesti (Suominen & Ollikka 2006, 107).



### 3.2. PCR-reaktioon vaikuttavia tekijöitä

PCR-reaktio on nopea suorittaa, mutta myös herkkä virheille. Virheitä aiheutuu kontaminaatioista ja pienistä pipetointilavuuksista. Siksi PCR-työskentelyyn tarvitaan huolellisuutta ja kokeen tarkkaa etukäteissuunnittelua. Mahdollisimman eristetyn puhdistilan käyttö on vähintään suositeltavaa. (Happonen ym. 2006, 89; Suominen & Ollikka 2006, 112; Suominen ym. 2013, 156.)

Reaktion yksittäisten komponenttien kohdalla on huomioitava niiden suhteelliset pitoisuudet toisiinsa nähden. Lisäksi varsinaisten monistusreaktioiden ohella kannattaa tehdä kontrollireaktioita. Yksi esimerkki kontrollireaktioista on positiivinen kontrolli. Se on reaktio, joka on aikaisemman kokemuksen perusteella onnistunut. Koska reaktion (kuvio 8) ei haluta alkavan seoksen ollessa kontaminaatioaltis, on suositeltavaa lisätä entsyymi ja näyte viimeisinä. (Happonen ym. 2006, 89; Suominen & Ollikka 2006, 109–110; Suominen ym. 2013, 156, 162.)



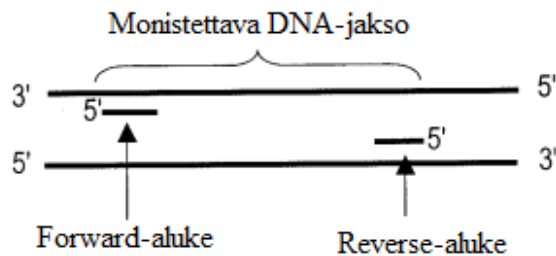
KUVIO 8. DNA-juosteen kopiointi (Thermo Fisher Scientific 2017, muokattu)

PCR-reaktiossa käytettävän DNA-polymeraasin on oltava niin termostabiili, että se pysyy toimimaan lähellä 100 °C:n lämpötiloja. Tällaisia polymeraaseja on eristetty muun muassa kuumien lähteiden bakteereista. Eniten käytetään *Thermus aquaticus* -bakteereista eristettyä *Taq*-polymeraasia. Muita polymeraaseja ovat muun muassa *Pfu*, *Vent*, *Tth* ja DynaZyme. (Suominen & Ollikka 2006, 107; Suominen ym. 2013, 153, 158.)

Kaikki DNA-polymeraasit tekevät vaihtelevissa määrin virheitä. Vain osa kykenee korjaamaan itse tekemiään virheitä synteesissä. Standardimenetelmät optimoidaan nykyään *Taq*-polymeraasille sen virheellisyydestä huolimatta. Esimerkiksi ekstensiovaiheessa yleisesti käytetty lämpötila 72 °C on optimi *Taq*-polymeraasin toiminnalle. *Taq*-polymeraasista on valmistettu vähemmän virheitä tekeviä versioita proteiininimuokkauksella. (Suominen ym. 2013, 153, 158.)

Eri entsyymien tehokkuuseroista johtuen sopiva entsyymin määrä riippuu entsyymistä itsestään. Myös erilaiset templaatit ja alukkeet vaativat erilaisia entsyymimääriä. Jos entsyymiä on liian vähän, haluttua tuotetta ei saada tarpeeksi. Liian suuri entsyymipitoisuus taas kasvattaa epätarkkojen tuotteiden saantomahdollisuutta. (Suominen ym. 2013, 162.)

Alukkeet ovat yksijuosteisia, synteettisiä ja lyhyitä DNA-fragmentteja, jotka koostuvat noin 15–40 nukleotidista. Niiden emäsjärjestys on komplementaarinen tietylle osalle templaattissa. Ne on suunniteltu kiinnittymään kaksinauhaisen DNA:n juosteisiin siten, että monistettava DNA-alue on niiden välissä (kuvio 9). Yleensä alueen pituus on alle 10 kb. Alukkeet voidaan erottaa toisistaan forward- ja reverse-lyhenteillä. (Happonen ym. 2006, 89; Suominen & Ollikka 2006, 107; Suominen ym. 2013, 154.)



KUVIO 9. Alukkeiden kiinnittyminen templaattiin (Kima & Rasche 2004, 116, muokattu)

PCR-reaktion tarkoitus määrää sen, millaisia alukkeita käytetään. Alukkeiden pitoisuus, pituus ja nukleotidikoostumus määräävät annealingvaiheen lämpötilan. Sitoutumisen voimakkuutta kuvaa sulamislämpötila  $T_m$ . Kyseisessä lämpötilassa puolet alukkeista ovat kiinnittyneinä templaatteihin ja puolet vapaina. Suositeltu annealingvaiheen lämpötila on noin 5 °C alempi kuin alukkeen  $T_m$ . (Suominen & Ollikka 2006, 110; Suominen ym. 2013, 158.)

Yleensä optimaalinen alukepitoisuus on 0,1–0,5  $\mu\text{M}$ . Jos alukkeita on liikaa, ne voivat kiinnittyä väärin kohtiin templaatissa ja siten lisätä epätarkkojen tuotteiden määrää. Myös templaatista riippumattomien tuotteiden syntymisen todennäköisyys kasvaa. (Suominen ym. 2013, 162.)

PCR-reaktiossa käytettäviä vapaita nukleotideja kutsutaan lyhenteellä dNTP (Huhtala, Ruotsalo & Vidgren 2015, 13). Jokaista neljää nukleotidivariaatiota tulisi olla reaktiossa yhtä paljon, yleensä 20–200  $\mu\text{M}$ . Jos dNTP:tä on liian paljon, alukkeita kiinnittyy enemmän väärin kohtiin, jolloin koko reaktion tarkkuus heikkenee. Myös todennäköisyys väärän nukleotidin kiinnittymisestä kasvaa. Siksi kannattaa optimoida pienin käyttökelpoinen dNTP-pitoisuus. (Suominen ym. 2013, 162.)

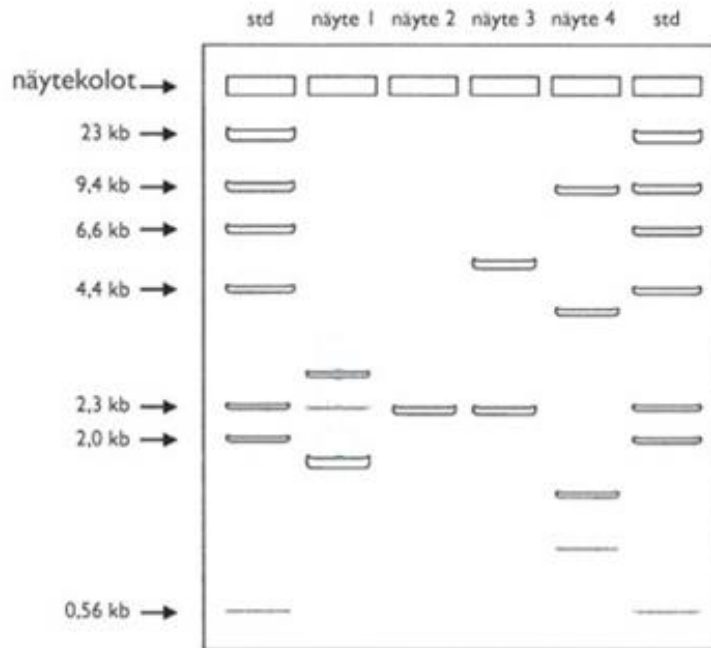
PCR-reaktiossa käytetään magnesiumioneja kofaktoreina. Magnesiumpitoisuus vaikuttaa moniin asioihin reaktiossa, kuten alukkeiden kiinnittymiseen, DNA-nauhojen denaturoimislämpötilaan, tuotteen spesifisyyteen sekä entsyymien aktiivisuuteen ja tarkkuuteen. Magnesiumionit lisätään reaktioon magnesiumkloridista, joka hajoaa reaktiossa vapaiksi magnesium- ja kloridi-ioneiksi. Magnesiumpitoisuuden suositeltu pitoisuus on 0,5–2,5 mM suurempi kuin dNTP:n kokonaispitoisuus. (Suominen & Ollikka 2006, 110; Suominen ym. 2013, 162; Huhtala ym. 2015, 17.)

PCR-reaktiolla tiedetään olevan monia näytteistä lähtöisin olevia inhiboivia tekijöitä, kuten urea ja hepariini. Heparinin inhiboivaa vaikutusmekanismia ei täysin ymmärretä, mutta sen uskotaan liittyvän kyseisen antikoagulantin kykyyn sitoutua entsyymeihin ja muihin orgaanisiin yhdisteisiin. Todennäköisesti se estää polymeraasin kiinnittymisen DNA-templaattiin sitoutumalla itse entsyymiin ja vähentää siten PCR-tuotteiden saantoa. Se voi myös sitoutua magnesiumioneihin ja estää niitä osallistumasta tehtäviinsä reaktiossa. (Lamble 2009, 1, 17–18, 47; Pasanen & Pirdil 2013, 6.)

### **3.3. AGE-analyysi**

Nukleiinihappojen analysoimiseen on useita elektroforeesiin perustuvia menetelmiä, jotka vaihtelevat analysoitavan nukleiinihappojakson koon mukaan. Keskikokoiset DNA-fragmentit ovat kooltaan 0,1–50 kb. Niiden analysoimiseen käytetään agarosigee-

lielektroforeesia eli AGE:a. Agarooosi on merilevästä eristettävä polysakkaridi, josta valmistetaan geeli. Negatiivisesti varautuneen fosfaattiryhmänsä vuoksi nukleiinihappo kulkeutuu geelin läpi kohti positiivista varausta. Mitä suurempi fragmentti on, sitä enemmän verkkorakenteinen geeli hidastaa sen liikettä. Tämä saa erikokoiset DNA-jaksot erottumaan omiksi vyöhykkeikseen, kuten kuviossa 10. (Moilanen 2011, 17; Suominen ym. 2013, 122–123.)



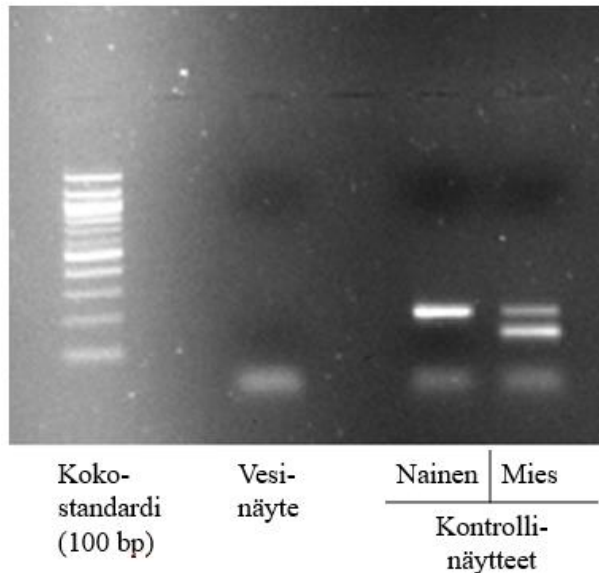
KUVIO 10. Kaavio agarosigeelistä AGE-ajon jälkeen (Suominen ym. 2013, 127, muokattu)

Koska DNA:n kulkeutumisenopeus on riippuvainen agarosipitoisuudesta, käytetään yleensä geelejä, joiden agarosikoostumus on 0,4–2,0 %. DNA ei näy sellaisenaan geelillä, minkä vuoksi geeliin lisätään UV-valossa fluoresoivaa väriainetta. Tällaista väriainetta on muun muassa SYBR. (Suominen ym. 2013, 123–126.)

### 3.4. Erilaisia PCR-tyyppejä

Kun PCR-reaktiossa monistetaan useampaa kuin yhtä DNA-jaksoa, puhutaan multiplex-PCR:stä. Siinä tarvitaan jokaista monistettavaa DNA-jaksoa kohden omat alukkeet. Yksi esimerkki multiplex-PCR:stä on sukupuolen määrittämiseen kehitetty SEX-PCR. Siinä monistetaan kahta jaksoa ihmisen sukupuolikromosomeista. Jaksojen erilaisesta koosta

johtuen PCR-tuotteet erottuvat AGE-ajossa kahtena eri fragmenttina, kuten kuvassa 1. Jos näyte on naisesta, saadaan vain X-kromosomin fragmenttia. Jos kyseessä on mies, saadaan myös Y-kromosomin fragmenttia. (Finch, Hope & van Daal 1996, 93–94; Patel, Thakur & Patel 2013, 1.)

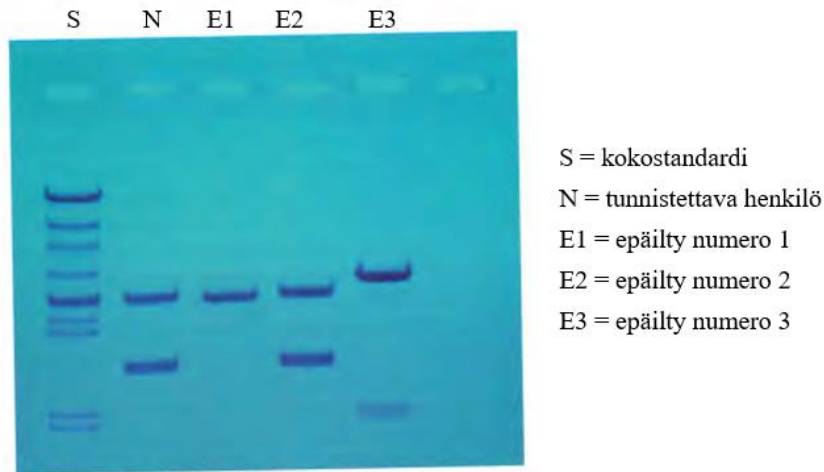


KUVA 1. Kuvantamiskameralla erottuvat nais- ja miespuoliset kontrollinäytteet (Kuva: Olli Virtanen 2016)

Y-kromosomista monistetaan sille ominaista SRY-geeniä. Nimi on lyhennetty englannin kielen termistä sex-determining region Y. X-kromosomista löytyy muutamia DNA-jaksoja, jotka sopivat SEX-PCR:n tarkoitukseen. Tällaisia ovat esimerkiksi 5-hydroksitryptamiini reseptori 2C eli HTR2C ja human leukocyte antigen eli HLA. Koska nämä molemmat jaksot ovat pidempiä kuin SRY, SRY-fragmentti kulkee niiden fragmentteja pidemmälle AGE-ajossa. (Finch, Hope & van Daal 1996, 93–94; Patel, Thakur & Patel 2013, 1.)

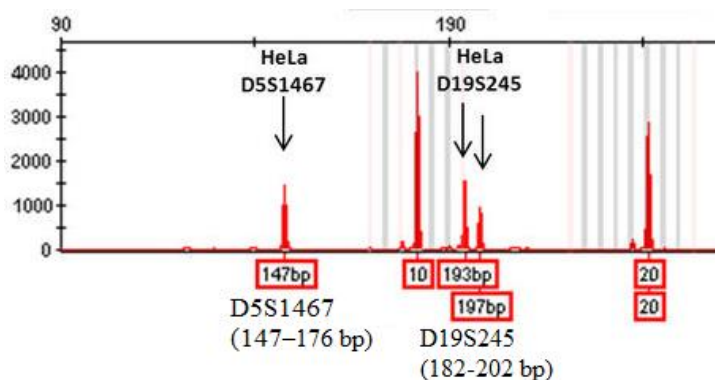
Kun monistetaan yhtä DNA-jaksoa yksilötunnistusta varten, hyödynnetään toistojaksoja kuten kuvassa 2. Vastinkromosomeista monistetaan samaa geenimerkkiä, jonka koko ei ole välttämättä sama molemmissa kromosomeissa. Mitä suurempi on toistojaksojen pituus, sitä lyhyemmän matkan fragmentit kulkevat elektroforeesissa. Fragmenttien välinen etäisyys on sitä pidempi, mitä suurempi ero on toistojaksojen lukumäärässä. Yksi toistojaksojen kanssa esiintyvistä geenimerkkien ryhmistä ovat minisatelliitit, joiden koko vaihtelee kymmenestä sataan emäsparia. Yksi esimerkki minisatelliiteista on D1S80, joka esiintyy ihmisen ensimmäisessä kromosomiparissa. D1S80:n pituus on kuusitoista bp, ja

sen toistojen lukumäärä vaihtelee neljästätoista neljäänkymmeneen. (Budowle, Daselaar & Kloosterman 1993, 257–258; Chantler 2004; Wong 2006, 1; Roslan, Azizan & Saat 2009, 143.)



KUVA 2. Toistojaksojen käyttöä rikostutkimuksessa (Klug & Cummings 2004, 452, muokattu)

ID-PCR eli identifikaatio-PCR on tarkempaan yksilötunnistukseen käytettävä multiplex-PCR, jossa alukkeet merkitään fluoresoivilla leimoilla. ID-PCR-tuotteiden analysointiin käytetään kapillaarielektroforeesiin perustuvaa menetelmää. Kapillaarissa erotetut DNA-fragmentit saavat varauksen ennen kuin ne johdetaan kulkemaan lasersäteän läpi. Laser aktivoi fluoresoidut leimat, ja kamera erottaa erikokoisten fragmenttien fluoresenssit toisistaan. Fluoresenssien antamat tiedot muutetaan digitaaliseksi dataksi, josta tehdään Genemapper® ID-X -ohjelmalla graafinen esitys, kuten kuviossa 11. (Jaarinen & Niiranen 2008, 178; Lahti 2013, 13; Aalto 2014, 7.)



KUVIO 11. Fluoresoitujen geenimerkkien graafinen esitys (Almeida, Hill & Cole 2011, 7, muokattu)

Genemapper® ID-X -ohjelma esittää fluoresoidun geenimerkin piikkinä. Merkin sijainti x-akselilla riippuu DNA-jakson koosta. DNA:n koko puolestaan on riippuvainen merkissä esiintyvien toistojaksojen määrästä. Näin voidaan erottaa toisistaan saman geenimerkin eri kromosomeista tulleet versiot. (Almeida, Hill & Cole 2011, 6.)

## 4 DNA:N ERISTYS- JA PUHDISTUSMENETELMISTÄ

DNA:n eristäminen verestä aloitetaan valkosolujen eristämisestä. Valkosolut hajotetaan, minkä jälkeen vapautunut DNA kerätään talteen. Joko eristämisen aikana tai jälkeenpäin DNA:sta puhdistetaan epäpuhtaudet. Kromosomien DNA eli genomisen DNA on erittäin pitkää ja ohutta. Siksi se helposti pilkkoutuu mekaanisista leikkausvoimista, joita syntyy pipetoitaessa, voimakkaassa sekoituksessa tai sentrifugoitaessa. Kuitenkin PCR:n kaltaisissa sovelluksissa DNA voi olla osittain katkeillutta. (Suominen ym. 2013, 103, 105.)

### 4.1. DNA:n manuaalinen eristys verestä

Suurikokoisen genomisen DNA:n manuaaliseen eristämiseen ihmisverestä on useampi kuin yksi tapa, mutta periaatteet ovat kaikissa samat. Eristämiseen kuuluu solujen lyysausta eli solukalvojen hajottamista, häiritsevien entsyymien inaktivoimista ja muiden kontaminanttien poistamista ennen DNA:n talteenottoa. Valkosolujen lyyssauksessa voidaan sopivat olosuhteet luoda sellaisilla yhdisteillä kuin SDS eli natriumlauryylisulfaatti ja EDTA eli etyleenidiamiinitetraetikkahappo. Proteiinien pilkkomiseen käytetään usein proteinaasi K -entsyymiä. (Ghatak, Muthukumaran & Nachimuthu 2013, 226; Suominen ym. 2013, 105; Chacon-Cortes & Griffiths 2014, 2.)

Mikäli DNA:n katkeilua ei tarvitse erityisesti välttää, sen keräämisessä voidaan hyödyntää sentrifugointia. Tällöin eristys aloitetaan sentrifugimalla valkosolut pelletiksi, josta voidaan erottaa suurin osa muusta verestä. Jos ei haluta pellettiin päätyvän punasoluja, ne voidaan hajottaa ennen valkosolujen sentrifugointia. Valkosolujen hajottamisen jälkeen DNA:sta poistetaan proteiineja esimerkiksi suurella suolapitoisuudella, minkä jälkeen etanolia tai isopropanolia voidaan käyttää DNA:n saostamiseen ja pesemiseen. (Suominen ym. 2013, 105; Chacon-Cortes & Griffiths 2014, 3.)

Joissain vanhanaikaisemmissa manuaalisissa eristysmenetelmissä DNA saostetaan etanolilla tai isopropanolilla suoraan näytteestä. Näyte lisätään seokseen, joka sisältää alkoholin lisäksi natriumasetaattia tai jotain muuta suolaa. Seos pienentää DNA:n vesiliukoisuutta, minkä seurauksena DNA saostuu. DNA erotetaan liuoksesta sentrifugimalla ja



pestään kylmällä alkoholilla. Toisella sentrifugoinnilla alkoholi poistetaan DNA:sta. DNA kuivatetaan ennen kuin se liuotetaan puhtaaseen liuokseen. (Oswald 2007.)

#### 4.2. DNA:n puhdistaminen kaupallisella eristyskitillä

Koska alkoholisaostus ja sentrifugointi aiheuttavat DNA:n katkeilua, ne on useimmiten korvattu silikakalvokolonniin perustuvilla puhdistusmenetelmillä. Silikamenetelmät perustuvat nukleiinihappojen sitoutumiseen silikaan korkeassa ionivahvuudessa kaotrooppin läsnä ollessa. Kaotrooppi on biomolekyyliä denaturoiva yhdiste, joka rikkoo molekyyliä ympäröivän vesivaipan. Tämä mahdollistaa positiivisen ionin muodostaman suolasillan syntymisen negatiivisesti varautuneiden silikan ja DNA:n välille. (Suominen ym. 2013, 105–106.)

Silikamatriksi sidotaan pieneen spin-kolonniksi kutsuttuun pylvääseen (kuvio 12). DNA:ta sisältävä liuos applikoidaan pylvääseen kaotrooppiliuoksessa, ja pylväs asetetaan vastaanottoputkeen. Liuos sentrifugoidaan läpi silikakalvosta, johon DNA tarttuu. Epäpuhtaudet pestään pois puskuroimalla 80-prosenttisella etanolilla. Pesuliuokset sentrifugoidaan silikakalvon läpi. DNA eluoidaan pieneen määrää laimeaa puskuria sentrifugoidamalla puskuri kalvon läpi steriiliin vastaanottoputkeen. (Suominen ym. 2013, 106.)



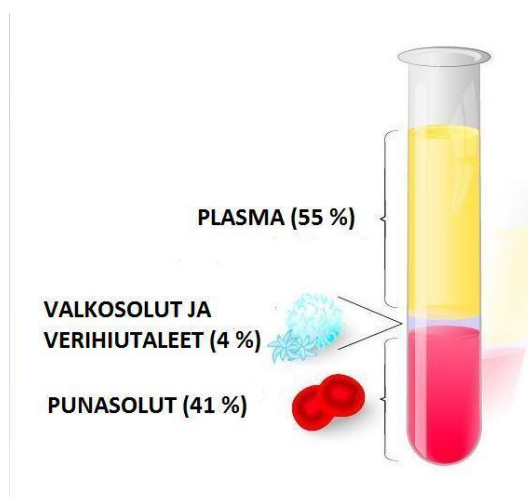
KUVIO 12. DNA:n puhdistus spin-kolonnilla (Suominen ym. 2013, 106, muokattu)

Kaupallisilla reagenssivalmistajilla on DNA:n puhdistukseen omat reagenssisarjansa eli "kittinsä", joista useimmat perustuvat silikamenetelmään. Niiden avulla DNA:n puhdistaminen on nopeaa ja tehokasta, mutta myös kalliimpaa kuin manuaalisilla menetelmillä. Yhden näytteen puhdistaminen maksaa tyypillisesti 0,5–1,0 €. (Suominen ym. 2013, 107.)

### 4.3. Solujen eristäminen Ficoll-fraktiolla

Kudoksista ei aina haluta eristää ainoastaan DNA:ta, vaan halutaan tutkia tai säilyttää eläviä soluja kokonaisina. Soluista voidaan myöhemmin tarvittaessa eristää DNA. Yksi tapaa eristää verestä valkosoluja on käyttää Ficoll-polysakkaridia (Järvinen 2016, 18).

Kun verinäytettä sentrifugoidaan, se jakautuu komponenttiensa tiheyksien perusteella kerroksiin (kuvio 13). Punasolut ovat tiheimpiä, minkä vuoksi ne kasautuvat alimmaisiksi, selvästi erottuvaksi punaiseksi kerrokseksi. Plasma, jolla on pienin tiheys, esiintyy kaikkein ylimpänä, keltaisena nesteinä. Valkosolut ja verihiutaleet jäävät näiden kerrosten väliin. Koska tämä keskimääräinen vaalea kerros on komponenttiensa vähäisen pitoisuuden vuoksi hyvin pieni tilavuudeltaan, sitä on vaikea eristää punasoluista manuaalisesti. (Järvinen 2016, 18.)



KUVIO 13. Sentrifugoitua verta (Aivelo ym. 2016)

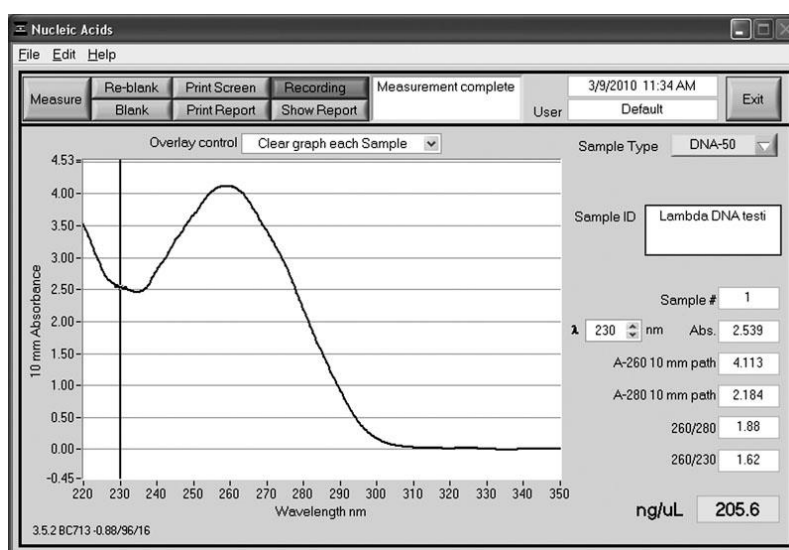
Kun Ficoll-fraktiota lisätään verinäytteeseen ja näytettä sentrifugoidaan, Ficoll kerrostuu punasolujen yläpuolelle. Ficollin yläpuolelle jää hötöinen, helposti erottuva kerros valkosoluja ja verihiutaleita. Kun tämä kerros on eristetty, valkosolut on helppo puhdistaa verihiutaleista, Ficollista ja plasmasta puskuriliuoksella. (Järvinen 2016, 18.)

### 4.4. DNA:n puhtauden ja pitoisuuden määrittäminen

Yleisin menetelmä DNA-pitoisuuden määrittämiseen perustuu DNA:n nukleotidien absorptioon 260 nm:n aallonpituudessa. Puhtaan DNA-liuoksen absorptio aallonpituudella

260 nm vastaa DNA-pitoisuutta 50 µg/ml. Proteiinien maksimiabsorptio on 280 nm, ja myös DNA absorboi jonkin verran kyseisellä aallonpituudella. Kun aallonpituuden 260 nm absorbanssi jaetaan aallonpituuden 280 nm absorbanssilla, puhtaan DNA-absorbanssin arvo on 1,8. (Suominen ym. 2013, 110–111.)

Koska proteiinit absorboivat voimakkaimmin 280 nm:ssä, niiden läsnäolo DNA-liuoksessa ilmenee absorbanssisuhteen pienenemisenä arvosta 1,8. Suurempi absorbanssiarvo johtuu usein vapaista nukleotideista, jotka absorboivat 260 nm:ssä DNA:ta voimakkaammin. Puhtaan DNA-näytteen absorptiospektrin muoto on esitetty kuviossa 14. (Suominen ym. 2013, 110–111.)



KUVIO 14. Esimerkki puhtaan DNA-näytteen absorptiospektristä (Suominen ym. 2013, 111)

Nukleiinihappoliuosten pitoisuuden mittaamiseen on saatavilla erityisiä pienoisspektrofotometrejä. Niillä voidaan mitata DNA-pitoisuus 1–50 µl:n näyte-eristä ja saada arvio näytteen puhtaudesta. Pienoisspektrofotometrit ovat erittäin käteviä nukleiinihappotöissä, mutta niitä käytettäessä on muistettava erilaisten puskuriliuosten ja tuote-epäpuhtauksien mahdollinen vaikutus lopputulokseen. Koska valotie on lyhyempi kuin isommissa laitteissa, pienikin häiriö voi vaikuttaa merkittävästi lopputulokseen. (Suominen ym. 2013, 111.)

## 5 TOTEUTUSSUUNNITELMA

Useissa tutkimusprojekteissa THL Biopankkiin saapuu verinäytteitä, joista eristetään sekä soluja että DNA:ta tutkimuskäyttöön. Kun näytteitä käsitellään, niillä on lähdehenkilön suhteen sekä ulkoisen että sisäisen virheen mahdollisuus. Ulkoinen virhe tarkoittaa näytteiden välistä mahdollista sekaantumista ennen niiden saapumista biopankkiin. Sisäisellä virheellä tarkoitetaan eristämisen aikana sattuvaa näytteiden sekaantumista.

THL Biopankissa on ollut käytössä luovuttajan sukupuolta määrittävä SEX-PCR-menetelmä näytteiden karkeaa laatukontrollia varten. Menetelmässä on ollut vikana se, että sen antamien tulosten luotettavuus ei ole ollut yhtenäistä. Opinnäytetyö aloitettiin työstämällä SEX-PCR-menetelmän toimivuutta hepariinia sisältävillä näytteillä, joista eristettiin DNA:ta erilaisilla menetelmillä. Pyrittiin kehittämään sellainen menetelmä, jolla jäännösverestä saataisiin riittävän puhdasta DNA:ta mahdollisimman kustannustehokkaasti ja helposti laaduntarkkailua varten.

THL Biopankissa on laaduntarkkailussa käytetty myös kuuteen geenimerkkiin perustuvaa ID-PCR-menetelmää tarkempaa yksilötunnistusta varten. Biomedicum tutkimuskeskuksessa ID-PCR-tuotteiden fragmenttianalyysiin tarvittavat välineet ovat FIMM:n työtiloissa. FIMM tekee biopankin ID-PCR-tuotteiden analyysit tilaustöinä. Opinnäytetyön aikana soluhallinnan ulkoista virhettä testattiin käyttämällä ID-PCR-menetelmää tunnistamaan samasta henkilöstä peräisin olevia näytteitä, jotka olivat tulleet automatisoituun DNA-eristysprosessiin ja solueristykseen. Sisäisen virheen testaamiseen käytettiin uutta D1S80-minisatelliittialuetta monistavaa PCR-menetelmää, jonka tuloksia vertailtiin ID-PCR-menetelmän tuloksiin.

## 6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 6.1. DNA:n eristäminen veri- ja solunäytteistä

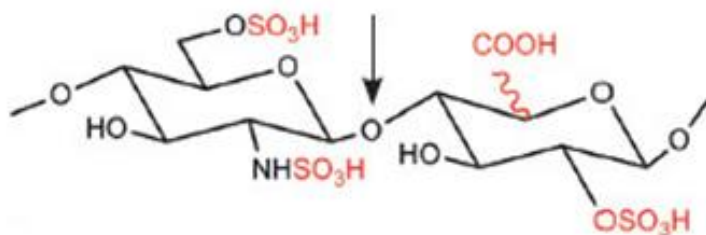
Joistain työssä käytetyistä verinäytteistä DNA eristettiin käyttämällä kaupallista DNeasy® Blood & Tissue Kit -kittiä, jonka valmistaja on Qiagen. Näytteet käsiteltiin verenä, jossa on sekä tumallisia että tumattomia soluja. DNA liuotettiin puskuriin, joka koostui EDTA-liuoksesta ja puskurista tris-Cl. (Qiagen 2006.)

Liitteessä 1 kuvattua manuaalista DNA-eristysmenetelmää sovellettiin työssä käytetyistä veri- ja solunäytteistä suurimpaan osaan. Solunäytteiden kohdalla lyysaus suoritettiin ohjeen mukaisesti ennen DNA:n saostamista ja pesemistä. Verinäytteiden kohdalla solut ensin sentrifugoitiin pelleteiksi. Suurin osa supernatantista kaadettiin pois, minkä jälkeen suoritettiin saostus ja pesu. Reagensseja käytettiin pienemmissä tilavuuksissa kuin liitteessä 1 neuvotaan. DNA liuotettiin dehydrosikimihappoon eli DHS-liuokseen.

Muutaman verinäytteen kohdalla DNA eristettiin vanhemmalla manuaalisella menetelmällä, joka perustuu etanolisaostukseen. Saostuksella yritettiin poistaa hepariinia ja lisätä DNA:n puhtausastetta ilman kaupallisen kitin käyttämistä. Verinäytteet lyysattiin hiilihappohauteella ja natriumasetaatilla ennen etanolikäsittelyä. Eristetty DNA liuotettiin veteen.

### 6.2. Heparinaasi

Heparinaasi on entsyymi, joka pystyy hajottamaan hepariiniketjuja selektiivisesti eliminaatio- eli lohkeamisreaktion kautta. Sitä käytetään yleisesti PCR-reaktiossa käytettävän DNA:n puhdistamiseen hepariinista. SEX-PCR-menetelmän toimivuuden parantamiseksi koetettiin heparinaasin käyttöä kaupallisella kitillä eristettyihin DNA-näytteisiin. Kyseinen versio, *Bacteroides* Heparinaasi I, on kloonattu *Bacteroides eggerthii* -bakteerista. Entsyymi hajottaa hepariiniketjun lohkaisemalla ketjun muodostavat glykosidisidokset (kuvio 15). (Lamble 2009, 17; New England Biolabs 2016.)



KUVIO 15. Lohkaistava glykosidisidos merkitty nuolella (New England Biolabs 2016, muokattu)

Työssä käytetty *Bacteroides* Heparinaasi I (New England Biolabs) oli pitoisuudeltaan 12 U/ $\mu$ l. Se hajottaa yhdessä minuutissa noin 1,0  $\mu$ mol hepariinia 30 °C:ssa ja pH-arvossa 7. Kun hepariinia sisältävää substraattia sekoitettiin reaktiopuskuriin, heparinaasin annettiin toimia 30 °C:ssa halutun aikaa. Heparinaasin toiminta pysäytettiin nostamalla liuoksen lämpötila yhden minuutin ajaksi 100 °C:seen. (New England Biolabs 2016.)

### 6.3. Näytteet

Työssä käytetyt näytteet, joista eristettiin DNA:ta, olivat joko alkuperäistä verinäytettä tai soluja, jotka oli eristetty alkuperäisestä verinäytteestä Ficoll-fraktiolla liitteessä 2 kuvatulla tavalla. Kaikki näytteet valittiin kahdesta näytteenluovuttajien ryhmästä, joita kutsutaan NF- ja SU-projekteiksi. Molempien ryhmien verinäytteissä esiintyy hepariinia. Osaa näytteistä käytettiin ainoastaan SEX-PCR-menetelmän toimivuuden testaamisessa, minkä vuoksi ne on merkitty SEX-lyhenteellä. Muita näytteitä, joita käytettiin myös sisäisen ja ulkoisen virheen testaamisessa, kutsutaan päänäytteiksi.

#### 6.3.1 Päänäytteet

Päänäytteet valittiin 32 henkilöstä. Jokaista henkilöä kohden oli veri- ja solunäyte, joista eristettiin DNA:ta. DNA-näytteitä oli siis yhteensä 64. Henkilöistä kaksikymmentä kuului SU-projektiin ja loput NF-projektiin. Kaikista näytteistä eristettiin DNA manuaalisesti lukuun ottamatta kymmentä NF-verinäytettä, joihin käytettiin Qiagenin kaupallista kittiä. Tietoja NF-näytteistä on taulukoitu liitteeseen 3 ja SU-näytteistä liitteeseen 4.

### 6.3.2 SEX-näytteet

SEX-näytteiden nimiin on merkitty sulkein numerot yhdestä viiteen sen perusteella, miten niistä yritettiin eristää hepariinia. Eristysmenetelmät on selitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. SEX-näytteiden eristysmenetelmät

SEX(1)	Kuutta sentrifugoitua NF-verinäytettä käsiteltiin PBS-liuoksella ennen kuin DNA eristettiin niistä Qiagenin kaupallisella kitillä. PBS on fosfaattilla puskuroitua suolaliuosta.
SEX(2)	Viidestä normaalisti Qiagenin kitillä eristetystä NF-näytteestä otettiin kahdesti DNA-näyte, johon kokeiltiin <i>Bacteroides</i> Heparinaasi I:stä kahdessa eri reaktioaktiivisuudessa: 12 U ja 24 U.
SEX(3)	Viidestä NF-verinäytteestä eristettiin DNA vanhemmalla, etanolisaostukseen perustuvalla manuaalisella menetelmällä. DNA liuotettiin veteen.
SEX(4)	Neljästä prosessissa syntyneistä, eri pitoisuudessa säilytyistä solunäytteistä (lopputuote) eristettiin DNA manuaalisesti (liite 1). Näytteistä kolmella oli liian suuri DNA-pitoisuus PCR-reaktioon, minkä vuoksi niitä oli laimennettava.
SEX(5)	Kolmesta NF-verinäytteestä eristettiin DNA manuaalisesti (liite 1). Kaksi niistä osoittautuivat olevan peräisin samasta henkilöstä, mutta ne olivat tulleet laboratorioon kahdella eri tutkimuskoodilla. Tästä syystä niiden nimiin on merkitty 2a ja 2b. Nämä näytteet oli eristetty samaan aikaan kuin päänäytteiden manuaalisesti eristetyt NF-verinäytteet. Niitä ei kuitenkaan käytetty muuhun kuin SEX-PCR-menetelmän testaamiseen vastaavien solunäytteiden puutteen vuoksi.

Liitteeseen 5 on merkitty tietoja SEX-näytteistä. Vain SEX(1)-näytteistä ei ole kerätty tietoja, koska niiden toimivuus osoittautui testien alkuvaiheessa heikoksi.

#### 6.4. GoTaq® Green Master Mix

Osa PCR-menetelmän reagensseista voidaan etukäteen yhdistellä valmiiksi seoksiksi. Toiminta helpottaa PCR-seoksen valmistamista vähentämällä tarvetta reagenssien erilliseen pipetoimiseen. Tällaista seosta käytettiin myös SEX-PCR-menetelmän kehittämisessä.

Kyseinen seos oli Promegan valmistama GoTaq® Green Master Mix. Se koostuu *Taq*-polymeraasista, nukleotideista, magnesiumkloridista sekä puskureista (merkitty taulukoihin lyhenteellä BFR), jotka on säädetty optimaalisiin konsentraatioihin. Tähän seokseen tarvitsee erikseen lisätä vain DNA-templaatti, alukkeet ja vesi. Nimensä seos on saanut kahdesta värjäysaineesta, sinisestä ja keltaisesta, jotka yhdessä värjäävät seoksen vihreäksi. Vihreä väri tekee seoksen helpommaksi havaita silmin. Tämän vuoksi PCR-tuotteisiin ei tarvitse erikseen lisätä väriainetta elektroforeesilla analysoitaessa. Myöskään latauspuskuria ei tarvita AGE-ajossa, koska seoksen omat puskurit tekevät siitä tarpeeksi tiheän. (Promega Corporation 2016.)

#### 6.5. PCR-menetelmät

Käytettäviä PCR-reaktioita oli kolmea eri tyyppiä: SEX-PCR, ID-PCR ja minisatelliitti-PCR. Niistä jokaisella oli omat reaktiossa käytettävät reagenssipitoisuutensa, joita työstettiin varsinkin SEX-PCR-menetelmän kohdalla. Monistettavaa DNA:ta käytettiin reaktioissa yleensä 40 ng. Mikäli haluttiin muunnella DNA:n tai jonkin muun reagenssin pitoisuutta käytänteistä, vähennetty reagenssi korvattiin vastaavalla tilavuudella vettä. Jokainen tässä työssä kirjattu PCR-seos kertoo reagenssien pitoisuudet yhtä näytettä kohden.

Alkuperäisessä SEX-PCR-menetelmässä, jonka toimivuuden työstämisestä aloitettiin, monistettiin SRY- ja HTR2C-alukkeita entsyymillä AmpliTaq Gold™. Siihen kuului myös kaksi kontrollinäytettä: yksi nais- ja yksi miespuolinen. Taulukkoon 2 on merkitty alkuperäisen seoksen reagenssien pitoisuudet.



TAULUKKO 2. Alkuperäisen SEX-PCR-reaktion reagenssien pitoisuudet

10XBFR	dNTP	MgCl <sub>2</sub>	AmpliTaq Gold™	SRY-forward	SRY-reverse	HTR2C-forward	HTR2C-reverse
1,00 X	200,00 μM	1,50 mM	0,80 U	200,00 nM	200,00 nM	200,00 nM	200,00 nM

Kun siirryttiin testaamaan GoTaq® Green Master Mix -seosta, sitä sovellettiin uuteen SEX-PCR-reaktioon tietolomakkeen (liite 6) ohjeiden mukaisesti. Uudessa reaktiossa AmpliTaq Gold™ poistettiin ja HTR2C-aluke korvattiin HLA-alukkeella. Seoksesta tehtiin kolme versiota, jotka on merkitty taulukkoon 3: GMM-1, GMM-2 ja GMM-3. Seoksessa GMM-2 käytettiin SRY-aluketta kaksi kertaa enemmän kuin seoksessa GMM-1. Seokseen GMM-3 lisättiin DyNAzymeII-entsyymiä toimimaan *Taq*-polymeraasin kanssa. Kun D1S80-minisatelliitin alukkeita testattiin, niitäkin pyrittiin monistamaan GoTaq® Green Master Mix -seoksella. Taulukossa 3 tämä seos on merkitty Minisatelliitiksi.

TAULUKKO 3. Green Master Mix -seoksella toteutetut PCR-reaktiot (harmaalla merkitty otettu käyttöön uudessa SEX-PCR-menetelmässä)

	GMM-1	GMM-2	GMM-3	Minisatelliitti
GoTaq® Green Master Mix	1,00 X	1,00 X	1,00 X	1,00 X
DyNAzymeII	-	-	0,4 U	-
SRY-forward	0,33 nM	0,67 nM	0,33 nM	-
SRY-reverse	0,33 nM	0,67 nM	0,33 nM	-
HLA-forward	0,33 nM	0,33 nM	0,33 nM	-
HLA-reverse	0,33 nM	0,33 nM	0,33 nM	-
D1S80-forward	-	-	-	0,33 μM
D1S80-reverse	-	-	-	0,33 μM

Biopankin ID-PCR-menetelmässä monistetaan kymmenen nanogramman DNA-näytteenstä kuutta fluoresoitua geenimerkkiä, jotka on merkitty taulukkoon 4. Kaksi näistä ovat sukupuolikromosomien jaksot HTR2C ja SRY.

TAULUKKO 4. ID-PCR-menetelmässä monistettavat geenimerkit

	AC00818-1	D20S448	DSX1220	GDB371492	HTR2C	SRY
Minimi- koko (bp)	170	222	185	134	175	111
Maksimi- koko (bp)	210	270	220	150	181	113

ID-PCR-reaktion alukkeet oli valmiiksi sekoitettu yhteen liuokseksi, joka tarvitsi vain lisätä ID-PCR-seokseen (taulukko 5). Alukkeiden lopputilavuudet seoksessa olivat seuraavat: 25,0 nM alukkeella AC00818-1, 160,0 nM alukkeella D20S448, ja 100,0 nM muilla alukkeilla.

TAULUKKO 5. ID-PCR-seos ilman alukkeita

Reagenssi	Pitoisuus seoksessa
10XBFR	1,00 X
dNTP	100,00 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub>	0,75 mM
AmpliTa <sub>q</sub> Gold™	0,25 U

Kun ID-PCR-reaktio suoritettiin, tuotteet valmistettiin kapillaarielektroforeesia varten liuottamalla reaktiotuotteisiin elektroforeesissa käytettävää DNA-kokostandardia (500 LIZ<sup>®</sup>) ja Hi-Di -formamidia, jota käytetään suspensoimaan kapillaariin injektaitavia näytteitä. FIMM:n laboratoriossa suoritettiin elektroforeesi, minkä jälkeen graafiset tulokset viestitettiin tekijälle. ID-PCR-tuotteille suoritettiin AGE-ajo vain sen varmistamiseksi, että reaktio oli tapahtunut.

## 6.6. PCR-ohjelmat

Taulukkoon 6 on merkitty kaikki opinnäytetyössä käytetyt PCR-ohjelmat, joita oli yhteensä kuusi. Alkuperäistä SEX-PCR-ohjelmaa käytettiin ennen Green Master Mix -seoksen käyttöönottoa. Sen jälkeen kehitettiin vertailtavaksi kaksi toisistaan hieman eroavaa uutta SEX-PCR-ohjelmaa. ID-PCR-menetelmällä oli oma ohjelma, ja D1S80-minisatelliittiin testaamiseen käytettiin kahta eri ohjelmaa: Minisatelliitti 1 ja Minisatelliitti 2.

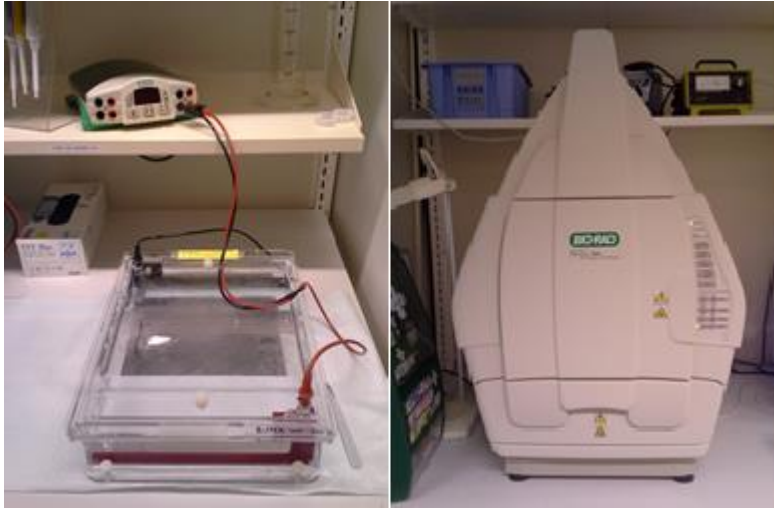
TAULUKKO 6. PCR-ohjelmat (harmaalla merkitty otettu käyttöön uudessa SEX-PCR-menetelmässä)

	PCR- sykli- luku- määrä	Esiläm- mitys	Denatu- raatio	Annealing	Eks- tensio	Loppu- ekstensio
Alkuperäinen SEX-PCR	14	95 °C 11 min	90 °C 0,5 min	50 °C 0,5 min	70 °C 0,5 min	72 °C 6 min
Uusi SEX- PCR-ohjelma 1	35	94 °C 3 min	94 °C 1,5 min	60 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 10 min
Uusi SEX- PCR-ohjelma 2	35	94 °C 3 min	94 °C 1 min	57 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 10 min
ID-PCR	14	95 °C 12 min	95 °C 0,5 min	50 °C 0,5 min	70 °C 0,5 min	72 °C 6 min
Mini- satelliitti 1	30	95 °C 4 min	95 °C 0,5 min	65 °C 0,5 min	72 °C 2 min	72 °C 7 min
Mini- satelliitti 2	36	95 °C 4 min	95 °C 1 min	65 °C 1 min	72 °C 2 min	72 °C 7 min

Monistuksen loputtua jokainen ohjelma asetti PCR-laitteen säilyttämään PCR-tuotteita lämpötilassa 10 °C ennen kuin tuotteet kerättiin talteen ja analysoitiin. Jokaisen ohjelman kohdalla PCR-reaktion suorittamiseen kului vähintään yksi tunti.

### 6.7. AGE ja laitteet

Opinnäytetyön aikana kaikki PCR-tuotteet analysoitiin AGE-ajolla. 2-prosenttinen geeli valmistettiin BioNordikan valmistamasta agarosista. Ajopuskurina käytettiin TBE-puskuria, joka koostuu tris(hydroksimetyyli)aminometaanista, boorihaposta ja EDTA-liuoksesta. Geeliin lisättiin Invitrogenin valmistamaa SYBR Safe -väriainetta. Ajoallas (Sub-Cell® Model 192) ja virtalähde (PowePac™ Basic Power Supply) olivat Bio-Radin valmistamia (kuva 3).



KUVA 3. Oikealla puolella *Gel Doc XR+ Imaging System* -laitteisto ja vasemmalla puolella ajoallas ja virtalähde (Kuva: Olli Virtanen 2016)

Jokaisessa ajossa käytettiin 100 bp:n molekyylikokostandardia. Näytteisiin lisätty latauspuskuri oli värjätty siniseksi. Sekä molekyylikokostandardi että latauspuskuri olivat Bio-Labsin valmistamia.

Jokaisen AGE-ajon jälkeen geelin kuvantamiseen käytettiin *Gel Doc XR+ Imaging System* -laitteistoa, joka oli myös Bio-Radin valmistama (kuva 3). Se on kaappiin asennettu valopöytä, jonka avulla UV-valoa voidaan käyttää turvallisesti kuvantamiseen. SYBR Safella värjätty geeli asetetaan kaappiin XcitaBlue-ruudun päälle. UV-valo suodattuu ruudun läpi ja fluoresoi DNA-fragmentit vahingoittamatta niitä. (Bio-Rad Laboratories 2017.)

Työssä käytetty PCR-laite oli G-Stormin valmistama GS4 Multi Block -malli. Kyseisessä mallissa on tilaa neljälle kuoppalevyille, joista jokaiselle säädetään erikseen PCR-ohjelma. DNA-näytteiden pitoisuuden ja puhtauden määrittämiseen käytettiin *Nd 1000* -pienoisspektrofotometriä, jonka valmistaja oli NanoDrop Technologies. DNA-näytteiden valmistamisessa apuna käytettiin sekoittamiseen kykenevää Eppendorfin inkubaattoria. Thermo Scientificin mikrosentrifuugi oli *Heraeus Fresco 21* -mallia, kun taas Eppendorfin iso versio oli 5810-mallinen.

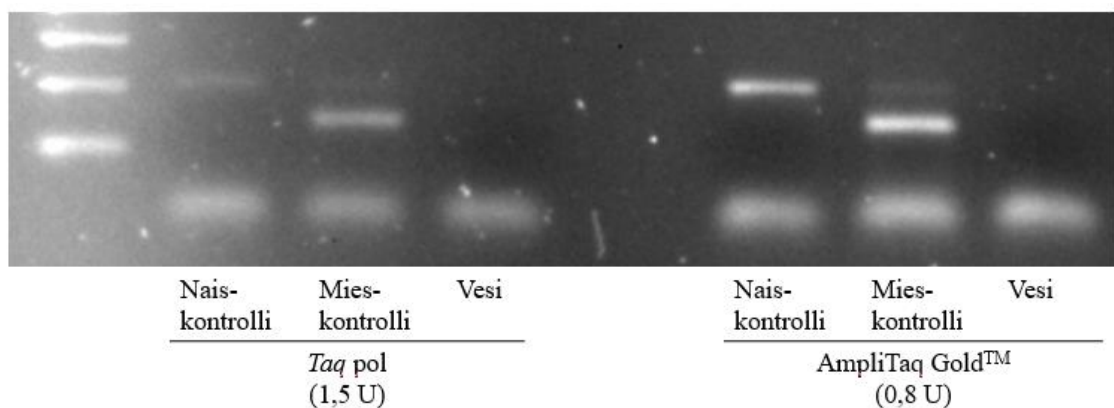
## 7 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

### 7.1. SEX-PCR-menetelmän toimivuus

SEX-PCR-menetelmän tehostamiseen käytettiin kolmeatoista PCR-ajoa, joiden kaikista tuloksista tehtiin AGE-ajo. Reaktioita testattiin sitä mukaa kun näytteitä valmistettiin ja materiaaleja hankittiin. Kahdeksassa ensimmäisessä PCR-ajossa noudatettiin alkupe-  
räistä SEX-PCR-menetelmää (taulukko 2) ja -ohjelmaa (taulukko 6). Nais- ja miespuoli-  
sia kontrollinäytteitä käytettiin kaikissa PCR-ajoissa.

Ensimmäinen SEX-PCR-testi suoritettiin alustuksena kymmenelle DNA-näytteelle, jotka oli normaaliin tapaan eristetty kaupallisella Qiagenin kitillä NF-projektin verinäytteistä. Näytteistä ja kontrolleista ei saatu geelillä havaittua näkyviä fragmentteja. Syyksi oletettiin hepariinin inhiboivaa vaikutusta, sillä kitillä eristetty DNA on melko puhdasta ja DNA-saanto oli riittävä.

Koska kontrollinäytteet eivät myöskään toimineet ensimmäisessä ajossa, entsyymien AmpliTaq Gold™ tehokkuutta epäiltiin. Entsyymiä vertailtiin *Taq pol* -polymeraasiin, jonka pitoisuudeksi säädettiin 1,5 U. Kontrolli-DNA:lla vertailtuna alkuperäinen ent-  
syymi osoittautui paremmaksi (kuva 4). Entsyymejä ei vaihdettu.

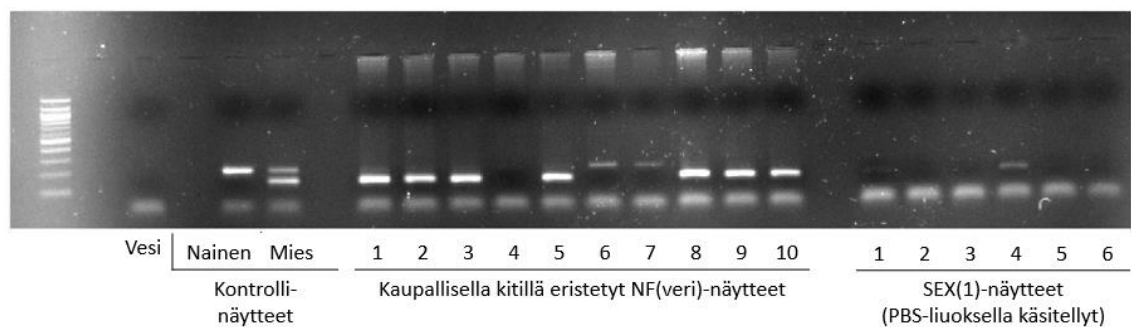


KUVA 4. Tulokset entsyymien toimivuuden vertailemisesta (Kuva: Olli Virtanen 2016)

Kolmas testi suoritettiin samalla tavalla ja samoille näytteille kuin ensimmäinen testi. Tässä uusinnassa ei saatu näkyviin muita fragmentteja kuin naiskontrollin yksi ainoa. Y-  
kromosomia tunnistava fragmentti jäi monistumatta, mikä kuvaa hyvin vanhan SEX-

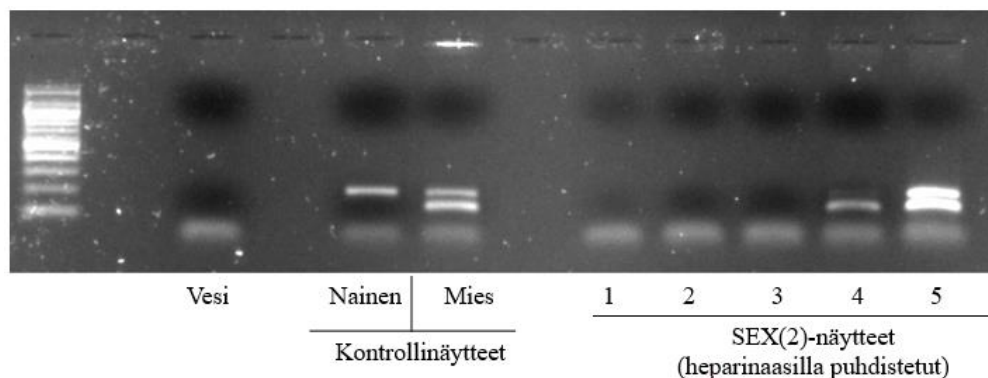
PCR-menetelmän epäluotettavaa toimivuutta. Neljännessä testissä koetettiin SEX(1)-näytteitä, jotka oli käsitelty PBS-liuoksella ennen DNA:n eristämistä kaupallisella kitillä. Niistäkään ei saatu näkyviä fragmentteja vaikka tällä kertaa kontrollit toimivat hyvin.

Viidennessä testissä monistettiin SEX(1)-näytteet ja kitillä eristetyt NF(veri)-näytteet huomattavasti suuremmasta DNA-pitoisuudesta. Näkyviä fragmentteja ilmestyi useimpien NF(veri)-näytteiden ja yhden SEX(1)-näytteen kohdalla (kuva 5). Tarvittiin siis toivottua enemmän DNA:ta näkyvien tulosten aikaansaamiseksi. Samalla huomattiin, että solujen käsitteleminen PBS-liuoksella ennen eristystä ei parantanut tuloksia.



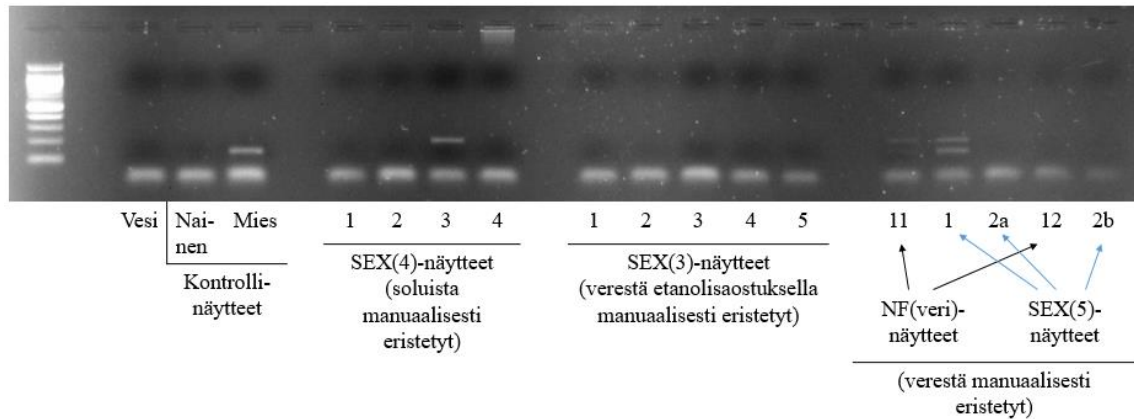
KUVA 5. Suuremmalla DNA-pitoisuudella tehty viides SEX-PCR (Kuva: Olli Virtanen 2016)

Kuudennessa testissä tutkittiin heparinaasilla käsiteltyjä NF(veri)-näytteitä eli SEX(2)-näytteitä. Vain näytteistä 4 ja 5 saatiin fragmentteja (kuva 6). Kyseisistä näytteistä oli kuitenkin ennen heparinaasikäsitelyä mitattu enemmän DNA:ta kuin muista, joten DNA:n määrän olisi pitänyt olla riittävä. Seitsemännessä testissä koetettiin loput SEX(2)-näytteistä. Niissä hepariinia oli käytetty kaksinkertaisesti poistamaan inhiboivaa vaikutusta. Fragmentteja ei kuitenkaan monistunut muista kuin kontrollinäytteistä.



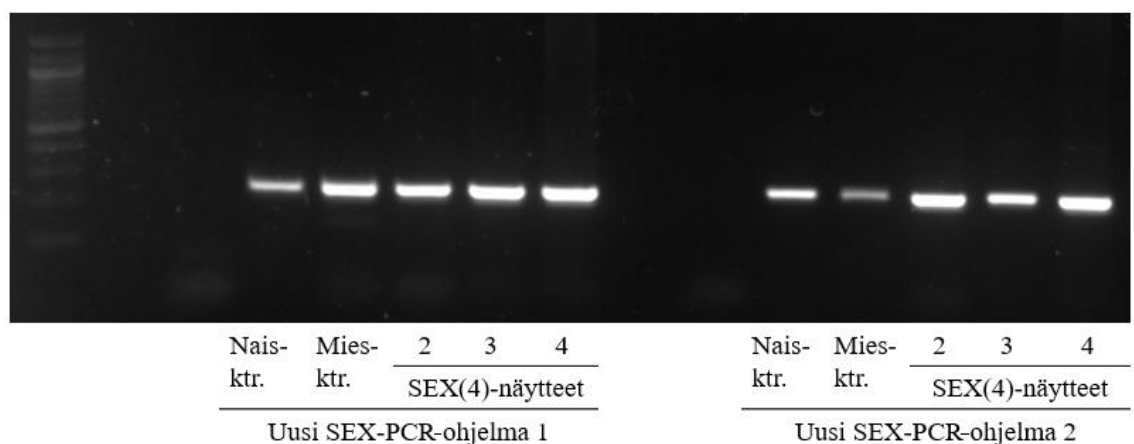
KUVA 6. Heparinaasilla puhdistetut näytteet (Kuva: Olli Virtanen 2016)

Kahdeksas testi käsitti etanolisaostuksella manuaalisesti eristetyt SEX(3)-näytteet, Ficoll-prosessin lopputuotteen soluista manuaalisesti eristetyt SEX(4)-näytteet sekä verestä manuaalisesti eristetyt NF(veri)- ja SEX(5)-näytteet. Näiden näytteiden DNA-pitoisuudet yritettiin saada mahdollisimman lähelle arvoa 40 ng. Muilta osin pyrittiin noudattamaan mahdollisimman tarkasti alkuperäistä PCR-seosta. Tulokset näkyvät kuvassa 7.



KUVA 7. Viimeinen SEX-PCR alkuperäisen ohjeen mukaan (Kuva: Olli Virtanen 2017)

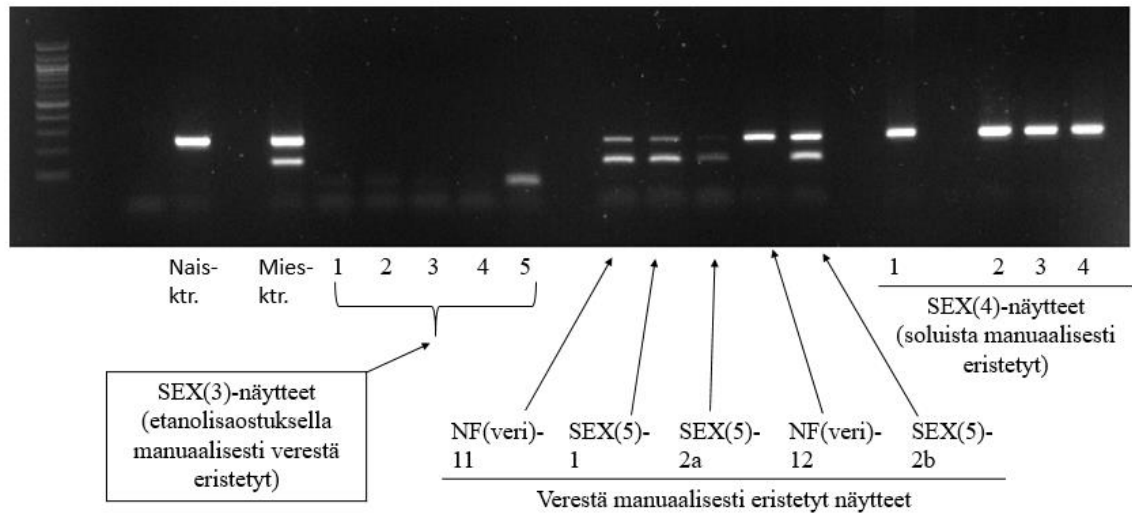
Mikään alkuperäisellä SEX-PCR-menetelmällä tehdyistä testeistä ei johtanut toivottuihin tuloksiin, ja myös kontrollit toimivat testeissä epäsäännöllisesti. Sen vuoksi GoTaq® Green Master Mix -seoksella kehitettiin uusi SEX-PCR-menetelmä GMM-1 (taulukko 3). Menetelmää varten tehtiin myös vertailtavaksi kaksi lämpötilaohjelmaa (taulukko 6). Ohjelmia vertailtiin yhdeksännessä PCR-testissä. Näytteiksi valittiin soluista manuaalisesti eristetyt SEX(4)-näytteet 2–4, joiden DNA-pitoisuudet laimennettiin lähelle arvoa 40 ng (kuva 8).



KUVA 8. Uusien SEX-PCR-ohjelmien vertailu (Kuva: Olli Virtanen 2017)

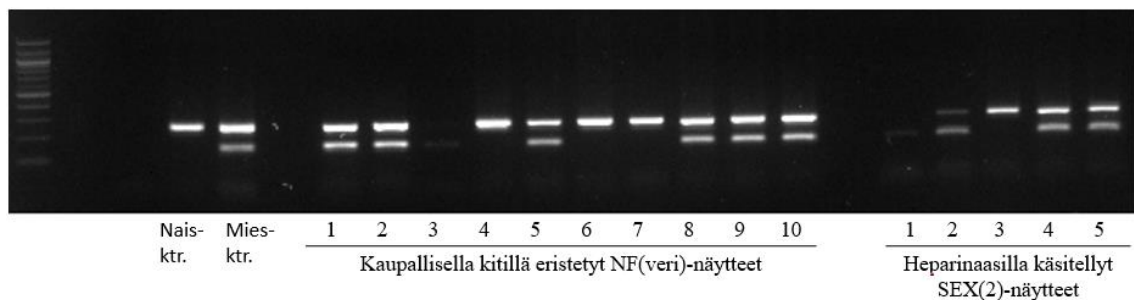






KUVA 10. Näytteiden vertailua uudella SEX-PCR-menetelmällä (Kuva: Olli Virtanen 2017)

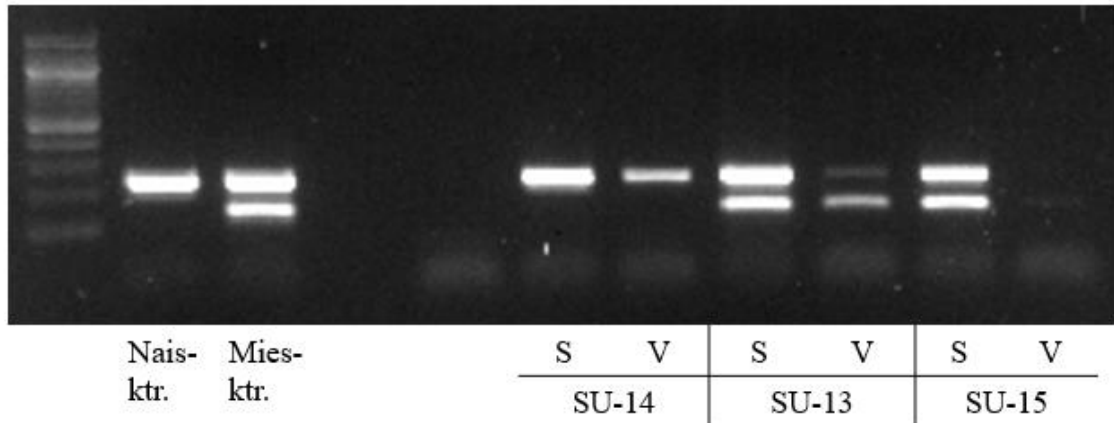
Kahdestoista ajo suoritettiin, kun haluttiin vielä kerran testata heparinaasin vaikutusta PCR-monistumiseen. Kaupallisella kitillä eristettyjä NF-verinäytteitä ja heparinaasilla käsiteltyjä SEX(2)-näytteitä vertailtiin uudella menetelmällä (kuva 11). Näytteen NF(veri)-3 vyöhykkeiden puute johtui hävikistä reaktioseoksessa. Muuten kaupallisella kitillä eristetyt näytteet erottuivat yhtä hyvin kuin manuaalisesti soluista eristetyt näytteet (kuva 10). Myös sukupuoli oli oikein, sillä ainoastaan näytteet 4, 6 ja 7 olivat naispuolisia. Heparinaasikäsitelyllä ei juurikaan ollut vaikutusta.



KUVA 11. Kaupallisella kitillä eristetyt ja heparinaasilla käsitellyt näytteet uudella SEX-PCR-menetelmällä (Kuva: Olli Virtanen 2017)

SEX-PCR-menetelmän toimivuuden työstäminen lopetettiin näihin tuloksiin. Kuitenkin uutta menetelmää testattiin yhden kerran muutamille manuaalisesti eristetyille SU-näytteille. Vertailtiin kolmesta henkilöstä peräisin olevia DNA-näytteitä, jotka oli eristetty soluista tai verestä. Tulokset on esitetty kuvassa 12. Verestä eristetty näyte 15 ei monis-

tanut fragmentteja, koska reaktioseosta saatiin geelille liian vähän hävikin vuoksi. Kaikilla muilla näytteillä fragmentit näkyivät. Koska soluista eristetyt näytteet olivat veristä eristettyjä näytteitä puhtaampia, niiden fragmentit erottuivat kirkkaampina.



S = soluista eristetty

V = verestä eristetty

KUVA 12. Uuden SEX-PCR-menetelmä testaus SU-näytteisiin (Kuva: Olli Virtanen 2017)

Uusi SEX-PCR-menetelmä toimii seoksella GMM-2 (taulukko 3) ja ohjelmalla 1 (taulukko 6). Sekä NF- että SU-projektin näytteistä saadaan erottuvia tuloksia. Parhaiten fragmentit näkyvät, kun näyte on eristetty kaupallisella kitillä tai manuaalisesti. Tulosten perusteella heparinaasin käyttö, PBS-käsittely tai manuaalinen eristys etanolisaostuksen kautta eivät ole tarpeellisia tai suositeltavia soveltaa.

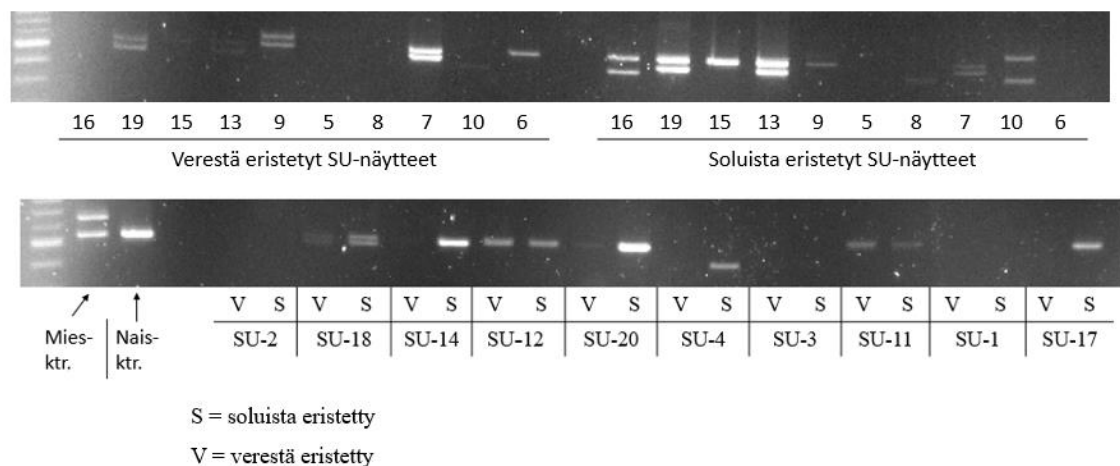
## 7.2. Sisäinen laatukontrolli

Solunäytteiden sisäisessä laadussa on kyse eri lailla käsiteltyjen, samasta henkilöstä lähtöisin olevien näytteiden yhteyden varmentamisesta. Sisäisellä virheellä tarkoitetaan eristämisen tai muun käsittelyprosessin aikana sattuvaa näytteiden sekaantumista. Tämän tarkkailemiseen sukupuolen määrittäminen SEX-PCR-menetelmällä on riittämätön. Biopankissa tähän on käytetty ID-PCR-menetelmää, joka perustuu kuuden geenimerkin tunnistamiseen. Haluttiin kokeilla, riittäisikö yhden geenimerkin, D1S80-minisatelliitin, monistaminen tähän. Samalla kun tätä vaihtoehtoa työstiin, ID-PCR-menetelmä suoritettiin vertailuaineistoksi.

Tässä opinnäytetyön osassa käytettiin kahdestakymmenestä henkilöstä peräisin olevia SU-projektin DNA-näytteitä (liite 4). Jokaista henkilöä kohden oli kaksi manuaalisesti eristettyä näytettä. Yksi näyte eristettiin soluista ja toinen alkuperäisestä verinäytejäämästä.

### 7.2.1 Minisatelliitti-PCR

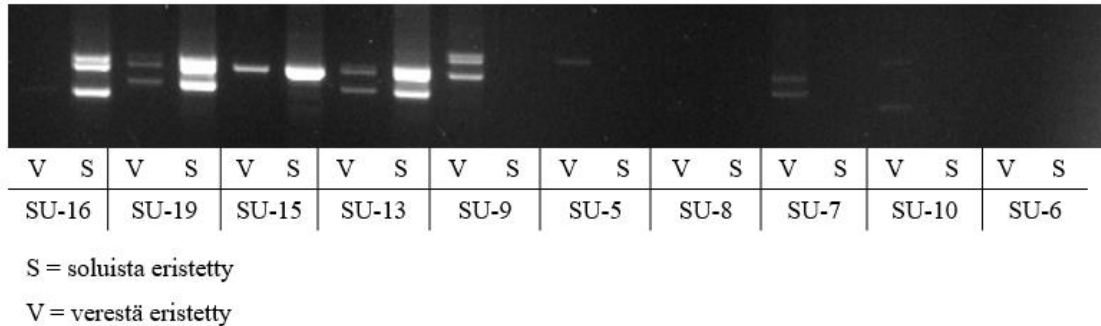
GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix -seosta käytettiin kehittämään D1S80-minisatelliittia varten PCR-seos (taulukko 3). Kehitettiin myös lämpötilaohjelma Minisatelliitti 1 (taulukko 6). PCR-seosta ja lämpötilaohjelmaa testattiin kaikkiin SU-projektin näytteisiin. Samalla testattiin SEX-PCR:n kontrollinäytteet. Näytteillä DNA:n puhtausaste vaihteli huomattavasti. Verestä eristettyjen DNA-näytteiden suhdeluku oli 0,5–1,8. Soluista eristettyjen DNA-näytteiden suhdeluku oli 1,3–3,0. PCR-testin tulokset on esitetty kuvassa 13.



KUVA 13. Minisatelliitti D1S08:n testaus ohjelmalla Minisatelliitti 1 (Kuva: Olli Virtanen 2017)

Soluista eristetyt näytteet tuottivat fragmentteja keskimäärin enemmän kuin verestä eristetyt. Tähän vaikutti osittain solunäytteiden parempi keskimääräinen puhtausarvo. SU-projektin henkilöistä noin 40 prosentilla fragmentit näkyivät molemmilla näytteillä. Luotettava tunnistus ei onnistunut tällä menetelmällä, koska fragmentit olivat liian samankokoisia eri henkilöiden kohdalla. Monissa tapauksissa myös saman henkilön eri näytteet monistui epäluotettavasti.

D1S80-minisatelliittia testattiin vielä kerran erilaisella lämpötilaohjelmalla Minisatelliitti 2 (taulukko 6). DNA:ta käytettiin kaksi kertaa enemmän kuin edellisessä testissä. Tämän työn puitteissa vain puolet SU-näytteistä ehdittiin testata tällä tavalla (kuva 14).



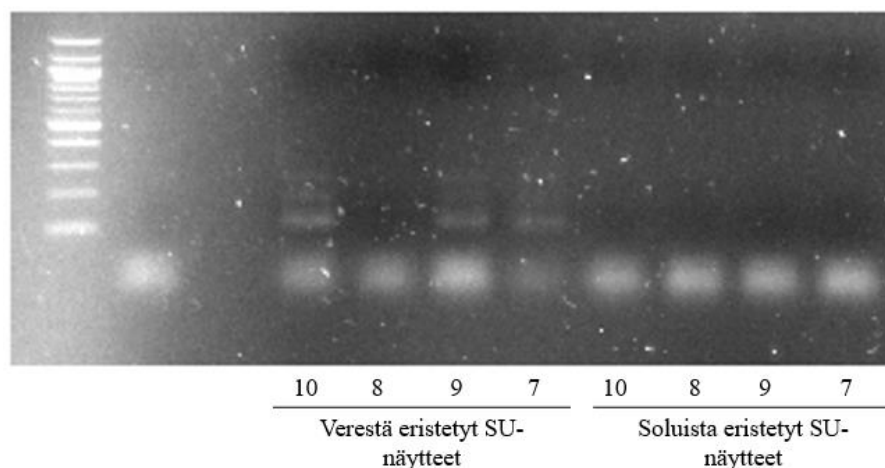
KUVA 14. Minisatelliitti D1S08:n testaus ohjelmalla 2 (Kuva: Olli Virtanen 2017)

Tulokset olivat käytännöllisesti katsoen samat kuin ensimmäisessä minisatelliitti-PCR-testissä (kuva 13). Fragmenttien näkyvyysaste ei muuttunut. Verestä ja soluista eristettyjen näytteiden samankaltaisuus näkyi vain näytteillä 19, 15 ja 13. Näytteiden 13 ja 7 verestä eristetyt versiot näyttivät keskenään liian samanlaisilta. Yksilötunnistuksen luotavuus ei parantunut. Kontrollinäytteet oli otettu mukaan, mutta niissä tapahtui haihtumista huonon suojakalvon takia. Siksi niitä ei ole lisätty kuvaan 14.

Tulosten perusteella D1S80-minisatelliitilla on potentiaalista käyttöä sisäisen laadun tarkkailuun. Kuitenkaan se ei yksinään riitä antamaan luotettavia tuloksia. Sisäisen virheen osalta laadun varmistus heikentyisi, jos käytettäisiin yksinään tähän vaiheeseen jätettyä menetelmää.

### 7.2.2 ID-PCR

SU-näytteille suoritettiin tavanomainen ID-PCR-reaktio (taulukko 5) taulukossa 6 esitetyllä lämpötilaohjelmalla. AGE-ajot suoritettiin sen varmistamiseksi, että reaktiot olivat tapahtuneet. Yleisellä tasolla fragmenttien näkyvyys oli hyvin vähäistä. Tämän oletettiin johtuvan riittämättömästä puhtaudesta, eikä kapillaarielektroforeesin odotettu antavan paljon tuloksia. Työn puitteissa analysoitiin vain DNA-näytteet 7–10, sekä verestä että soluista eristetyt (kuva 15). Verestä eristettyjen näytteiden puhtausaste oli 0,73–1,75. Soluista eristettyjen näytteiden puhtausaste oli 2,04–2,17.



KUVA 15. Kapillaarielektroforeesissa analysoitujen SU-näytteiden ID-PCR-tulokset (Kuva: Olli Virtanen 2017)

Kaikista kahdeksasta DNA-näytteestä löydettiin geenimerkkejä. Kuudesta geenimerkistä vain DSX1220:aa ei tunnistettu yhdestäkään. Analyysi antoi kuitenkin heikkoja tuloksia, jotka on kirjattu taulukkoon 7.

TAULUKKO 7. SU-näytteiden ID-PCR-tulokset

		Fragmenttien koot (bp)				
Näytenu- mero	Alku- perä	AC00818-1	D20S448	GDB371492	HTR2C	SRY
SU-7	veri	-	-	134/140	180	110
	solu	-	-	136/143	-	110
SU-8	veri	189/193	247/251	140/147	-	-
	solu	-	145/236	140/145	-	-
SU-9	veri	181/197	244/251	140/143	180	110
	solu	197	236/251	145	-	110
SU-10	veri	189	247	136/140	180	110
	solu	-	236	145	-	110

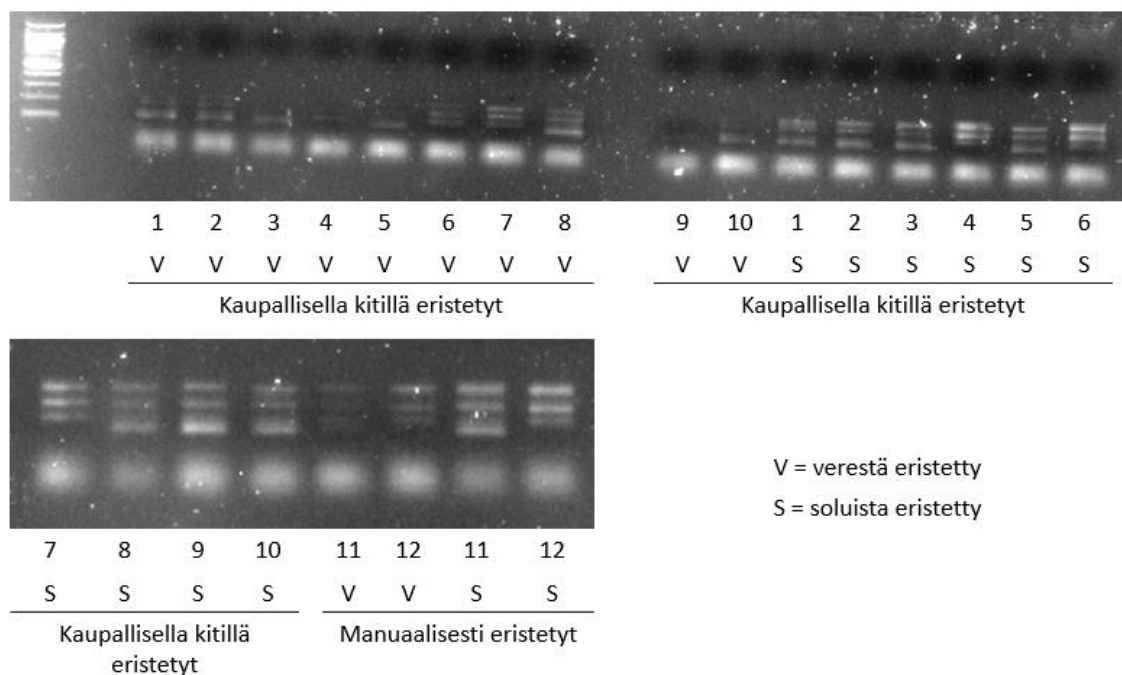
SU-näytteille ei voitu suorittaa kovin luotettavaa yksilötunnistusta. Geenimerkkejä puutui tai samasta yksilöstä tulleiden näytteiden kohdalla saman geenimerkin variaatiot olivat erilaisia. Esimerkiksi X-kromosomin geenimerkkiä HTR2C löydettiin vain verestä eristetyistä DNA-näytteistä. Y-kromosomin geenimerkkiä SRY kuvaava graafinen käyrä esiintyi soluista eristettyjen näytteiden kohdalla huomattavasti matalampana kuin verestä eristettyjen näytteiden kohdalla. Tulosten huonon laadun uskottiin johtuvan siitä, että

DNA ei ollut puhdistunut riittävästi manuaalisella eristysmenetelmällä. Sisäistä virhettä ei voitu arvioida.

### 7.3. Ulkoinen laatukontrolli

Solunäytteiden ulkoisessa kontrollissa tarkkaillaan näytteiden kesken tapahtuvaa mahdollista sekaantumista ennen niiden saapumista biopankkiin. Tätä ulkoista virhettä testattiin ID-PCR-menetelmällä samalla tavalla kuin sisäinen virheen arvioinnissa. Käytettiin kahdestatoista henkilöstä lähtöisin olevia NF-projektin päänäytteitä (liite 3). Puolet niistä olivat automatisoidusta DNA-prosessista, eli niiden kohdalla DNA eristettiin verestä kaupallisella kitillä tai manuaalisesti. Loput oli vastaanotettu soluprosessista.

Kaikille näytteille suoritettiin ID-PCR-reaktio (taulukko 5) tavanomaisella lämpötilaohjelmalla (taulukko 6). Tuotteiden monistumista tarkasteltiin AGE-ajolla (kuva 16).



KUVA 16. NF-päänäytteiden ID-PCR-tulokset (Kuva: Olli Virtanen 2017)

Näkyviä fragmentteja saatiin paljon enemmän kuin oli saatu sisäisen virheen tarkkailussa SU-projektin näytteistä samalla ID-PCR-menetelmällä (kuva 15). Soluista eristetyt näytteet, jotka oli käsitelty puhtaammassa ympäristössä, monistivat fragmentteja paremmin kuin verestä eristetyt. Soluista eristettyjen näytteiden puhtausastetta ei tunnettu, mutta verestä eristettyjen näytteiden kohdalla arvo vaihteli välillä 1,13–1,83. Kaikki näytteet

lähetettiin kapillaarielektroforeesiin analysoitaviksi, ja niistä saatiin taulukossa 8 esitetyt tulokset.

TAULUKKO 8. NF-näytteiden ID-PCR-tulokset

		Fragmenttien koot (bp)		
Näytenumero	Alkuperä	AC00818-1	D20S448	GDB371492
NF-1	veri	189/197	228/244	140
	solu	189/197	228/244	140
NF-2	veri	197	244/247	140
	solu	197	244/247	140
NF-3	veri	181/193	244/251	140
	solu	181/193	244/251	140
NF-4	veri	181/193	240	140/143
	solu	181/193	240	140/143
NF-5	veri	189	244	140/147
	solu	189	244	140/147
NF-6	veri	189/193	251/259	136/140
	solu	189/193	251/259	136/140
NF-7	veri	193	240/247	140/143
	solu	193	240/247	140/143
NF-8	veri	181/193	244/247	143/145
	solu	181/193	244/247	143/145
NF-9	veri	-	255	140/143
	solu	185/197	251/255	140/143
NF-10	veri	189/193	244/247	140
	solu	189/193	244/247	140
NF-11	veri	181/193	244/255	140/143
	solu	181/193	244/255	140/143
NF-12	veri	181/185	247/251	140/143
	solu	181/185	247/251	140/143

Kaikista NF-näytteistä löydettiin sukupuolikromosomien DNA-jaksojen HTR2C ja SRY fragmentit. Jokainen mies- ja naispuolinen näyte pystyttiin tunnistamaan sukupuolen

osalta. Myös muita tutkittuja geenimerkkejä löydettiin NF-näytteistä. Ainoastaan geenimerkistä DSX1220 ei saatu signaaleja. Muiden kolmen merkin variaatioita vertailemalla voitiin samasta yksilöstä lähtöisin olevien näytteiden yhdenmukaisuus todentaa. Myöskään eri henkilöillä ei ollut täysin samanlaisia merkkejä, mikä kertoo menetelmän hyvästä erottelukyvystä. Ulkoista virhettä ei löydetty tästä pienestä näytemäärästä.



## 8 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää THL Biopankin sisäistä laaduntarkkailua. Tarkoituksena puolestaan oli kehittää solunäytehallinnan käyttöön soveltuva laaduntarkkailumenetelmä. PCR-tekniikoiden työstämisen toivottiin johtavan siihen, että hepariinin aiheuttama häiriö vähenisi samasta henkilöstä lähtöisin olevien DNA-näytteiden ja lopputuotteiden yhdenmukaisuutta todentaessa. Samalla pyrittiin tekemään mahdollisimman pienistä näyte-eristä riittävän puhtaita kustannustehokkaalla tavalla.

SEX-PCR-menetelmän kehittäminen johti uuteen menetelmään, jolla saadaan suuremmalla todennäköisyydellä sukupuolifragmentit näkymään AGE-ajossa. GoTaq® Green Master Mix -seoksen käyttöönotto on tehostanut SEX-PCR-reaktion komponenttien käyttöä. Sukupuolikromosomien alukkeita tarvitaan pienemmässä tilavuudessa kuin aiemmin. Sekä pipetointiin tarvittava aika että erillisten pipetointivirheiden riski ovat vähentyneet. Myöskään latauspuskuria ei enää tarvita geelijaossa. DNA:ta pystytään monistamaan vähintään 20 ng:n eristä. Näytteitä ei ole tarpeen käsitellä heparinaasilla, pestä PBS-liuoksella tai saostaa etanolilla. DNA:n eristäminen manuaalisesti tai kaupallisella kitillä riittää. Toisaalta pelkän manuaalisen eristyksen käyttö olisi halvempaa, mutta tulokset eivät anna aihetta luopua kaupallisesta kitistä.

Laatukontrollin sisäisen virheen testaaminen D1S80-minisatelliitilla osoitti, ettei yhden geenimerkin monistaminen riitä luotettavaan yksilötunnistukseen. ID-PCR-menetelmästä ei siis voida luopua. Minisatelliitin käyttö GoTaq® Green Master Mix -seoksen kanssa antoi kuitenkin lupaavia tuloksia. Menetelmä tarvitsee vielä kehittämistä ennen kuin sitä voidaan käyttää. Erityisesti tarvitaan jokin toinen geenimerkki monistettavaksi D1S80-minisatelliitin kanssa. Esimerkiksi ihmisen seitsemännessätoista kromosomiparissa esiintyvä minisatelliitti D17S5 on pituudeltaan seitsemänkymmentä bp ja toistuu useimmissa tapauksissa 1-14 kertaa (Sullivan, Pope, Gill & Robertson 1992, 37; Katsuyama, Inoko, Imanishi, Mizuki, Gojobori & Ota 1998, 130). Kaksi minisatelliittia kannattaisi monistaa erillisissä PCR-seoksissa sen todentamiseksi, millä todennäköisyydellä eri minisatelliittien fragmentit kulkeutuvat AGE-ajossa yhtä pitkälle. Mikäli kyseinen todennäköisyys on pieni, voidaan minisatelliitteja yrittää soveltaa samassa PCR-seoksessa reagenssikulutuksen vähentämiseksi.

NF-projektin näytteistä ei löydetty ulkoista virhettä ID-PCR-menetelmällä. Tästä ei kuitenkaan voida sanoa varmuudella mitään, koska näytteet olivat peräisin vain muutamasta henkilöstä. Sisäisen ja ulkoisen virheen tuloksista päätellen DNA:n puhdistaminen näyttää toimineen eristyskitillä paremmin kuin manuaalisesti. SU-projektin näytteistä ei ole saatu fragmentteja yhtä hyvin kuin NF-projektin näytteistä. Uudessa SEX-PCR-menetelmässä koetetut kolmesta henkilöstä tulleet SU-näytteet ovat toimineet yhtä hyvin kuin NF-näytteet. Sen sijaan minisatelliitti- ja ID-PCR-menetelmissä fragmenttien saanto on ollut vaihtelevaa. Tämä epäjohtamukaisuus saattaa liittyä siihen, että kaikkien SU-näytteiden kohdalla DNA:n eristäminen suoritettiin manuaalisesti eikä kaupallisella kitillä.

Opinnäytetyön tavoitteen ja tarkoituksen kannalta on onnistuttu. Karkean laatukontrollin käyttöön on kehitetty uusi ja tehokkaampi SEX-PCR-menetelmä. Minisatelliitti D1S80:n koetus puolestaan on antanut alustaa uudelle menetelmälle, joka voi lisätestien kautta vielä korvata ID-PCR-menetelmän. Jos halutaan eristää DNA:ta näytteistä kustannustehokkaalla manuaalisella tavalla, menetelmää on edelleen työstettävä hepariini-inhiboinnin vähentämiseksi.

## LÄHTEET

- Aalto, V. 2014. Genomisen DNA:n eristäminen vanhoista plasma- ja seeruminäytteistä. Laboratorioalan koulutusohjelma. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.
- Aivelo, T., Järvinen, L., Kaarisalo, M. & Tarkiainen, K. 2016. Symbioosi 4: Ihmisen biologia. Turku: e-Oppi Oy.
- Almeida, J., Hill, C. & Cole, K. 2011. Authentication of African green monkey cell lines using human short tandem repeat markers. *BMC Biotechnology* 11 (102).
- Bio-Rad Laboratories, Inc. Gel Doc™ XR+ Imager. Effortless and Accurate Gel Imaging and Analysis. Luettu 6.9.2017. [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5838.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5838.pdf)
- Budowle, B., Daselaar, P. & Kloosterman, A. D. 1993. PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. *International Journal of Legal Medicine* 105 (5). Springer-Verlag, 257–264.
- Chacon-Cortes, D. & Griffiths, L. R. 2014. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* 4 (2), 1–9.
- Chantler, P. 2004. Recombinant DNA – Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTRs). Päivitetty 6.4.2004. Luettu 26.5.2017. [http://www.rvc.ac.uk/review/DNA\\_1/4\\_VNTRs.cfm](http://www.rvc.ac.uk/review/DNA_1/4_VNTRs.cfm)
- EndMemo. 2017. Basepair ↔ Kilobasepair Conversion. Viitattu 24.5.2017. <http://www.endmemo.com/sconvert/bpkb.php>
- Finch, J. L., Hope, R. M. & van Daal, A. 1996. Human sex determination using multiplex polymerase chain reaction (PCR). *Science & Justice* 36 (2). Elsevier Inc, 93–95.
- Ghatak, S., Muthukumaran, R. B. & Nachimuthu, S. K. 2013. A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis. *Journal of Biomolecular Techniques* 24 (4), 224–231.
- Hannula, P., Somerma, P., Fagerstedt, K. & Haahtela, K. 2006. *Biologia 5 – Bioteknologia*. 1. painos. Helsinki: Haahtela-kehitys Oy.
- Happonen, P., Holopainen, M., Sariola, H., Sotkas, P., Tenhunen, A., Tihtarinen-Ulmanen, M. & Venäläinen, J. 2006. *Bios 5, Bioteknologia*. 1. painos. Helsinki: WSOY Opimateriaalit Oy.
- Huhtala, E., Ruotsalo, S & Vidgren, S. 2015. Laktoosi-intoleranssin määrittäminen RT-PCR-menetelmällä. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Savonia-ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.
- Ijäs-Virtanen, L. & Partanen, S. 2013. Sikiötutkimuksista perinnöllisyysneuvontaan -

Sikiöindikaation tehtävän raskaudenkeskeytyksen hoitopolusta ammattilaisille. Hoitotyön koulutusohjelma. Kätilötyön suuntautumisvaihtoehto. Tampereen ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.–6. painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Järvinen, T. 2016. Adipogeneesimallin kehittäminen – Komponenttien pakastuksen ja viljelyn optimointi sekä monosyyttien vaikutus rasvan määrään. Laboratorioalan koulutusohjelma. Tampereen ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

KaiserScience. 2017. DNA replication. Luettu 25.5.2017. <https://kaiser-science.wordpress.com/biology-the-living-environment/genetics/dna-replication/>

Kallio, J. 2001. Veren hyytymiseen vaikuttavat lääkeaineet. Teoksessa Koulu, M. & Tuomisto, J. (toim.) Farmakologia ja toksikologia. 6. painos. Kuopio: Kustannus Oy Medicina, 595–618.

Kallio, M. 2005. Kuvatietokanta DNA-molekyylissä. Tietojenkäsittelytiede. Joensuun yliopisto. Pro gradu –tutkielma.

Katsuyama, Y., Inoko, H., Imanishi, T., Mizuki, N., Gojobori, T. & Ota, M. 1998. Genetic Relationships among Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakh, Greek, Saudi Arabian, and Italian Populations Based on Allelic Frequencies at Four VNTR (D1S80, D4S43, COL2A1, D17S5) and One STR (ACTBP2) Loci. *Human Heredity* 48 (3), 126–137.

Kima, P. E. & Rasche, M. E. 2004. Sex Determination Using PCR. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 32 (2), 115–119.

Klug, W. S. & Cummings, M. R. 2004. *Essentials of Genetics*. 5. painos. San Francisco: Benjamin Cummings.

Lahti, M. 2013. Uuden Y-STR-PCR-menetelmän validointi. Laboratorioalan koulutusohjelma. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Lamble, S. 2009. Directed Evolution of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase by Compartmentalised Self-Replication. University of Bath. Thesis.

Moilanen, V. 2011. Poistogeenisen *Escherichia coli* -kannan luominen P1-bakteriofagimenetelmällä. Laboratorioanalyytikon koulutusohjelma. Biotekniikan suuntautumisvaihtoehto. Oulun seudun ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Mutanen, J. & Rostila, A. 2016. *Symbioosi 3: Solu ja Perinnöllisyys*. Turku: e-Oppi Oy.

New England Biolabs. 2017. *Bacteroides* Heparinase I. Tulostettu 14.12.2016. <https://www.neb.com/products/P0735-Bacteroides-Heparinase-I>

Oswald, N. 2007. BitesizeBio. Ethanol Precipitation of DNA and RNA: How it works. Luettu 3.9.2017. <http://bitesizebio.com/253/the-basics-how-ethanol-precipitation-of-dna-and-rna-works/>

Pasanen, A. & Pirdil, Z. 2013. Säilyvätkö bakteerilajit antikoagulanttia sisältävissä putkissa? Bioanalytiikan koulutusohjelma. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Opinnäyte-työ.

Patelia, E. M., Thakur, R. & Patel, J. 2013. Sex Determination using Polymerase Chain Reaction. Open Access Scientific Reports 2 (4).

Pelkonen, O & Ruskoaho, H. 2003. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Promega Corporation. GoTaq® Green Master Mix (M712) Product Information. Muokattu 10/16. Ladattavissa osoitteessa <https://fi.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-m712-protocol/>

Qiagen. 2006. Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (DNeasy 96 Protocol). Teoksessa DNeasy Blood & Tissue Handbook, 31–34. Ladattavissa osoitteessa <https://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=en>

Ritala, A., Koivistoinen, O., Jäntti, J., Ahteensuu, M. & Ruohonen-Lehto, M. 2013. Synteettinen biologia. Biotekniikan neuvottelukunnan 6. julkaisu. Helsinki.

Roslan, H. A., Azizan, N. H. & Saat, R. 2009. DNA Polymorphism of D1S80 Locus in Modern Malay Sample Population of Sarawak. Sains Malaysiana 38 (2), 143–147.

Sullivan, K. M., Pope, S., Gill, P. & Robertson, J. M. 1992. Automated DNA Profiling by Fluorescent Labeling of PCR Products. Genome Research 2 (1), 34–40.

Suominen, I. & Ollikka, P. 2006. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3–2. painos. Helsinki: Opetushallitus.

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

Thermo Fisher Scientific. 2017. PCR Basics. Luettu 25.5.2017. <https://www.thermo-fisher.com/fi/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>

Turpeenoja, L. 2005. Biokemiaa: virtsa-aineesta lääkemaitoon. 4–2. painos. Helsinki: Opetushallitus.

Veripalvelu. 2017. Tietoa verestä. Päivitetty. 11.1.2017. Luettu 26.5.2017. <https://www.veripalvelu.fi/verenluovutus/veren-matka/tietoa-veresta>

Wong, E. M. 2006. Minisatellite analysis of human D1S80 VNTR locus. Luettu 8.3.2017. Ladattavissa osoitteessa <http://people.wcsu.edu/wong/bio535/info07.html>

## LIITTEET

### Liite 1. DNA:n eristys immortalisoidusta solulinjasta (CEPH)

1 (2)

#### DNA:n eristys immortalisoidusta solulinjasta (CEPH)

(Oletussaan to 10-20 milj. solua, yksi solu sisältää 5-6 pg DNA:ta)

#### KOHDESOLUJEN EROTUS KASVATUSLIUKSESTA

1. Kaada kasvatusliuos 50 ml Falcon putkeen.
2. Fuugaa kasvatusliuos (30-40 ml) **20 min 1500 rpm** mistral fuugilla. Kaada kasvatusliuos solunapin päältä pois.
3. Lisää **5 ml PBS liuosta** ja sekoita solunappi varovasti liuokseen.
4. Fuugaa PBS-liuos **20 min 1500 rpm** mistral fuugilla. Kaada supernatantti pois.

#### SOLUJEN HAJOTUS

1. Lisää **3 ml cell lysis**-liuosta ja vorteksoi solunappi liuokseen. Jos solut eivät liukene voit inkuboida 37 °C kunnes saostuma on liennut. (Näytteet säilyvät liuoksessa 18 kk.)  $\epsilon T$
2. Jäähdytä huoneenlämpöön. Siirrä näyte 15 ml Falconputkeen.
3. Lisää liuokseen **1 ml PPS** ja vorteksoi vähintään 20 sekuntia.
4. Sentrifugoi **10 minuuttia 3400 rpm** sorvall mistral fuugilla (yläkerrassa).

#### DNA:n SAOSTAMINEN JA PESU

1. Kaada supernatantti 15 ml Falcon putkeen jossa on 3 ml isopropanolia. Saosta DNA kääntelemällä putkia 50 kertaa. Sentrifugoi 3400 rpm 5 minuuttia sorvall mistral fuugilla (yläkerrassa).
2. Kaada supernatantti pois ja lisää **3 ml 70 % etanolia**.
3. Sentrifugoi **3400 rpm 5 minuuttia** sorvall mistral fuugilla (yläkerrassa).
4. Kaada supernatantti varovasti pois ja kuivaa näytettä (putki ylösalaisin) **5 min. ÄLÄ YLIKUIVAA!!**

5. Liuota näyte DHS:ään tai 1xTE-liuokseen. Muista testata TE-liuoksen pH kun avaat uuden TE-pullon laimennosta varten. Lue projektikansiosta tarkempi ohje näytteen liuotuksesta!
6. Siirrä DNA varovaisesti Falcon-putkesta 2ml kierrekorkilliseen eppendorf-putkeen.
7. Anna DNA:n liueta ja asettua 2 päivää huoneenlämmössä. Tämän jälkeen näytteet voi siirtää jääkaappiin odottamaan mittausta. HUOM! Älä vorteksoi DNA:ta, sillä rihma ei kestä ehjänä kovaa käsittelyä tässä vaiheessa eristystä.

## Liite 2. Verisolujen eristys Ficoll-fraktiolla (Li-hepariiniveri 10 ml)

### Verisolujen eristys Ficoll-fraktionilla (Li-hepariiniveri 10 ml)

Solutyöskentely tehdään laminaarissa. Suojaa itsesi ja näytteet noudattamalla hyvää aseptiikkaa, käyttämällä suojavarusteita, laboratoriotakkia ja sisäjalkineita

1. Kaada 10 ml veri 50 ml:an Falcon putkeen jossa 20 ml PBS (ilman Ca/Mg) (RT) ja sekoita kääntämällä putkea pari, kolme kertaa
2. Kerrosta varovasti laimennetun veren alle 10 ml Ficolia (Ficoll paque, Amersham, esim ruiskulla ja pitkällä neulalla). **Ei saa sekoittaa!!!**

**Älä työnnä neulaa takaisin holkkiin, ettet vahingossa pistä itseäsi verisellä neulalla, vaan kerää neulat suoraan viiltävään jätteastiaan tai muuhun väliaikaiseen astiaan josta ne siirretään työskentelyn lopuksi viiltävän jätteen roskikseen.**

**Älä tee yli 10 näytteen sarjoja, kokeneet työskentelijät voivat poiketa tästä muutamalla näytteellä.**

3. Fuugaa 2000 rpm 20 min, **ei jarrua** (jos et voi jatkaa työtä heti, pidennä fuugausaikaa).
4. Ime ylin kerros (plasma) pois pipetillä, varo valkoista, hötöistä solukerrosta Ficoll-kerroksen päällä. Ylimmän kerroksen voi myös poistaa pasteurilla.
5. Kerää lymfositit, eli valkoinen hötökerros talteen 15 ml Falconiin pasteuripipetillä. Mukaan saa tulla vähän plasmata. Punasolut voi tarvittaessa kerätä pohjan napista (eri näyte) ja pestä PBS:llä erillisessä putkessa.

**Pidä keräysputkista auki vain ko. näytteen putki sekaannusten ja kontaminaatioiden välttämiseksi ja sulje se heti kerättyäsi näytteen**

6. Lisää PBS:ää ad 12ml, sekoita kääntelemällä ja fuugaa 1200 rpm 10 min (jarru saa olla päällä)
7. Dekantoi suppi pois, varo solunappia
8. Naputtele pari kertaa solunappia, jotta se tulee irtonaisemmaksi. Lisää PBS:ää esim 2ml, sekoita ja ota näyte (10ul) solujen laskemista varten (tilavuus tunnettava), lisää PBS ad 10 ml.
9. Fuugaa 1200 rpm 10 min
9. Dekantoi suppi huolellisesti. Naputtele solunappi irtonaiseksi. Lisää 2ml pakastusliuosta (inaktivoitu. FCS + 10 % DMSO), sekoita ja jaa kahteen ampulliin (a 1 ml/ampulli). Avaa taas ainoastaan ampullit, joiden näytettä käsittelet.  
Pakasta isopropanolitankissa o/n  $-80^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$   $\text{N}_2$  /  $-150^{\circ}\text{C}$ .



## Liite 3. NF-päänäytteiden tiedot

TAULUKKO 9. NF-päänäytteiden tiedot

Eristysmenetelmä	Näyte	DNA-pitoisuus (ng/μl)	Absorbanssi (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	Sukupuoli
DNeasy® Blood & Tissue Kit	NF(veri)-1	17,18	1,82	Mies
	NF(veri)-2	16,87	1,83	Mies
	NF(veri)-3	15,56	1,77	Mies
	NF(veri)-4	17,45	1,66	Nainen
	NF(veri)-5	10,15	1,63	Mies
	NF(veri)-6	17,89	1,81	Nainen
	NF(veri)-7	8,05	1,76	Nainen
	NF(veri)-8	25,95	1,73	Mies
	NF(veri)-9	19,01	1,68	Mies
	NF(veri)-10	14,31	1,62	Mies
Manuaalinen eristys (liite 1)	NF(veri)-11	9,3	1,13	Mies
	NF(veri)-12	4,8	1,19	Nainen
	NF(solu)-1	Ei mitattu	Ei mitattu	Mies
	NF(solu)-2	Ei mitattu	Ei mitattu	Mies
	NF(solu)-3	Ei mitattu	Ei mitattu	Mies
	NF(solu)-4	Ei mitattu	Ei mitattu	Nainen
	NF(solu)-5	Ei mitattu	Ei mitattu	Mies
	NF(solu)-6	Ei mitattu	Ei mitattu	Nainen
	NF(solu)-7	Ei mitattu	Ei mitattu	Nainen
	NF(solu)-8	Ei mitattu	Ei mitattu	Mies
	NF(solu)-9	Ei mitattu	Ei mitattu	Mies
	NF(solu)-10	Ei mitattu	Ei mitattu	Mies
NF(solu)-11	Ei mitattu	Ei mitattu	Mies	
NF(solu)-12	Ei mitattu	Ei mitattu	Nainen	

## Liite 4. SU-päänäytteiden tiedot

TAULUKKO 10. SU-päänäytteiden tiedot

Eristysmenetelmä	Näyte	DNA-pitoisuus (ng/μl)		Absorbanssi (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	
		veri	solu	veri	solu
Manuaalien eristys (liite 1)	SU-1	10,04	20,56	0,78	1,99
	SU-2	6,70	18,00	0,72	1,91
	SU-3	5,07	21,59	0,72	2,09
	SU-4	4,01	20,68	0,50	2,29
	SU-5	10,29	22,05	1,10	1,94
	SU-6	101,62	21,93	1,76	1,94
	SU-7	30,20	18,55	1,50	2,17
	SU-8	8,82	17,86	0,73	2,10
	SU-9	11,98	20,99	1,25	2,04
	SU-10	36,03	16,51	1,75	2,04
	SU-11	33,31	0,52	1,25	3,01
	SU-12	102,83	1,10	1,11	1,34
	SU-13	65,40	25,32	1,36	1,89
	SU-14	10,89	5,66	0,69	1,62
	SU-15	128,00	3,32	1,37	1,33
	SU-16	40,14	2,98	1,13	2,82
	SU-17	35,71	2,61	1,04	2,16
	SU-18	18,38	2,06	0,97	1,07
	SU-19	38,63	10,62	0,99	1,94
	SU-20	15,68	4,37	0,78	1,68

## Liite 5. SEX-näytteiden tiedot

TAULUKKO 11. Heparinaasilla käsiteltyjen SEX-näytteiden tiedot

Näyte	Alkuperäisen NF(veri)-näytteen numero (liite 3)	Heparinaasiaktiivisuus (U)
SEX(2)-1	3	12
SEX(2)-2	5	12
SEX(2)-3	7	12
SEX(2)-4	8	12
SEX(2)-5	9	12
SEX(2)-6	3	24
SEX(2)-7	5	24
SEX(2)-8	7	24
SEX(2)-9	8	24
SEX(2)-10	9	24

TAULUKKO 12. Muiden SEX-näytteiden tiedot

Eristysmenetelmä	Alkuperä	Näyte	DNA-pitoisuus (ng/μl)	Absorbanssi (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	Sukupuoli
Manuaalinen eristys (liite 1)	Solu	SEX(4)-1	10,6	1,96	Nainen
		SEX(4)-2	182,6	1,82	Nainen
		SEX(4)-3	428,0	1,85	Nainen
		SEX(4)-4	753,5	1,88	Nainen
	Veri	SEX(5)-1	13,5	1,21	Mies
		SEX(5)-2a	6,8	1,33	Mies
		SEX(5)-2b	8,8	1,06	Mies
Etanoli- saostukseen perustuva manuaalinen eristys	Veri	SEX(3)-1	32,9	Ei mitattu	Ei tiedossa
		SEX(3)-2	29,0	Ei mitattu	Ei tiedossa
		SEX(3)-3	37,9	Ei mitattu	Ei tiedossa
		SEX(3)-4	31,0	Ei mitattu	Ei tiedossa
		SEX(3)-5	46,5	Ei mitattu	Ei tiedossa

## Liite 6. GoTaq® Green Master Mix (M712) -tietolomake



# Usage Information

## I. Standard Application

### Reagents to be Supplied by the User

template DNA downstream primer  
upstream primer mineral oil (optional)

1. Thaw the GoTaq® Green Master Mix at room temperature. Vortex the Master Mix, then spin it briefly in a microcentrifuge to collect the material at the bottom of the tube.

2. Prepare one of the following reaction mixes on ice:

#### For a 25µl reaction volume:

Component	Volume	Final Conc.
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5µl	1X
upstream primer, 10µM	0.25–2.5µl	0.1–1.0µM
downstream primer, 10µM	0.25–2.5µl	0.1–1.0µM
DNA template	1–5µl	<250ng
Nuclease-Free Water to	25µl	N.A.

#### For a 50µl reaction volume:

Component	Volume	Final Conc.
GoTaq® Green Master Mix, 2X	25µl	1X
upstream primer, 10µM	0.5–5.0µl	0.1–1.0µM
downstream primer, 10µM	0.5–5.0µl	0.1–1.0µM
DNA template	1–5µl	<250ng
Nuclease-Free Water to	50µl	N.A.

#### For a 100µl reaction volume:

Component	Volume	Final Conc.
GoTaq® Green Master Mix, 2X	50µl	1X
upstream primer, 10µM	1.0–10.0µl	0.1–1.0µM
downstream primer, 10µM	1.0–10.0µl	0.1–1.0µM
DNA template	1–5µl	<250ng
Nuclease-Free Water to	100µl	N.A.

3. If using a thermal cycler without a heated lid, overlay the reaction mix with 1–2 drops (approximately 50µl) of mineral oil to prevent evaporation during thermal cycling. Centrifuge the reactions in a microcentrifuge for 5 seconds.
4. Place the reactions in a thermal cycler that has been preheated to 95°C. Perform PCR using your standard parameters.

## II. General Guidelines for Amplification by PCR

### A. Denaturation

- Generally, a 2-minute initial denaturation step at 95°C is sufficient.
- Subsequent denaturation steps will be between 30 seconds and 1 minute.

### B. Annealing

- Optimize the annealing conditions by performing the reaction starting approximately 5°C below the calculated melting temperature of the primers and increasing the temperature in increments of 1°C to the annealing temperature.
- The annealing step is typically 30 seconds to 1 minute.

### C. Extension

- The extension reaction is typically performed at the optimal temperature for Taq DNA polymerase, which is 72–74°C.
- Allow approximately 1 minute for every 1kb of DNA to be amplified.
- A final extension of 5 minutes at 72–74°C is recommended.

### D. Refrigeration

- If the thermal cycler has a refrigeration or "soak" cycle, the cycling reaction can be programmed to end by holding the tubes at 4°C for several hours.
- This cycle can minimize any polymerase activity that might occur at higher temperatures, although this is not usually a problem.

### E. Cycle Number

- Generally, 25–30 cycles result in optimal amplification of desired products.
- Occasionally, up to 40 cycles may be performed, especially for detection of low-copy targets.

## III. General Considerations

### A. GoTaq® Green Master Mix Compatibility

GoTaq® Green Master Mix is compatible with common PCR additives such as DMSO and betaine. These additives neither change the color of GoTaq® Green Master Mix nor affect dye migration.

If both agarose gel analysis and further downstream applications involving absorbance or fluorescence will be used, the two dyes can be removed from reactions using standard PCR clean-up systems such as the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Cat.# A9201).

### B. Primer Design

PCR primers generally range in length from 15–30 bases and are designed to flank the region of interest. Primers should contain 40–60% (G + C), and care should be taken to avoid sequences that might produce internal secondary structure. The 3'-ends of the primers should not be complementary to avoid the production of primer-dimers. Primer-dimers unnecessarily deplete primers from the reaction and result in an unwanted polymerase reaction that competes with the desired reaction. Avoid three G or C nucleotides in a row near the 3'-end of the primer, as this may result in nonspecific primer annealing, increasing the synthesis of undesirable reaction products. Ideally, both primers should have nearly identical melting temperatures ( $T_m$ ). In this manner, the two primers should anneal roughly at the same temperature. The annealing temperature of the reaction is dependent upon the primer with the lowest  $T_m$ . For assistance with calculating the  $T_m$  of any primer, a  $T_m$  Calculator is provided on the BioMath page of the Promega web site at: [www.promega.com/biomath/](http://www.promega.com/biomath/)

### C. Amplification Troubleshooting

To overcome low yield or no yield in amplifications (e.g., mouse tail genotyping applications), we recommend the following suggestions:

- Adjust annealing temperature. The reaction buffer composition affects the melting properties of DNA. See BioMath Calculator to calculate the melting temperature for primers in the GoTaq® reaction ([www.promega.com/biomath/](http://www.promega.com/biomath/)).
- Minimize the effect of amplification inhibitors. Some DNA isolation procedures, particularly genomic DNA isolation, can result in the copurification of amplification inhibitors. Reduce the volume of template DNA in reaction or dilute template DNA prior to adding to reaction. Diluting samples even 1:10,000 has been shown to be effective in improving results, depending on initial DNA concentration.
- Increase template DNA purity. Include an ethanol precipitation and wash step prior to amplification to remove inhibitors that copurify with the DNA.
- Add PCR additives. Adding PCR-enhancing agents (e.g., DMSO or betaine) may improve yields. General stabilizing agents such as BSA (Sigma Cat.# A7030; final concentration 0.16mg/ml) also may help to overcome amplification failure.

### D. More Information on Amplification

More information on amplification is available online at the Promega web site: [www.promega.com/products/psr/](http://www.promega.com/products/psr/)

Part# 091M712  
Printed in USA. Revised 10/16.