

Jenni Lahtinen

Suhteellisen telomeeripituuden määrittäminen qPCR-tekniikalla

ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopistolla, molekyylineurologian tutkimusohjelmassa. Haluan kiittää dosentti liris Hovattaa, joka toimi opinnäytetyöni ohjaajana ja jonka tutkimusryhmässä sain mahdollisuuden tehdä opinnäytetyöni. Haluan myös kiittää Laura Kanasta, joka opasti minut alkuun opinnäytetyöni tekemisessä, ja koko muuta tutkimusryhmää sekä kaikkia muita auttaneita, kiitos avustanne ja tuestanne.

Haluan kiittää myös koulun puolesta opinnäytetyöni ohjaajana toiminutta lehtori Tiina Soinista ohjauksesta ja kannustuksesta.

Kiitän myös perhettäni ja ystäviäni, joilta olen aina saanut tukea ja kannustusta.

Helsingissä 28.09.2011

Jenni Lahtinen

Tekijä(t)	Jenni Lahtinen
Otsikko	Suhteellisen telomeeripituuden määrittäminen qPCR-tekniikalla
Sivumäärä	37 + 1 liitettä
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Lehtori Tiina Soininen Dosentti, akatemiaturkija Iiris Hovatta
<p>Tämän työn tavoitteena oli määrittää DILGOM-aineistosta näytteiden suhteellinen telomeeripituus qPCR:n (kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktion) avulla. Työssä käytetty DILGOM-aineisto (N = 4 300) on osa Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) FINRISKI-tutkimusta. Telomeerit ovat kromosomien päässä olevia DNA-pätkiä, jotka koostuvat toistuvista DNA-jaksoista (5´-(TTAGGG)_n-3´) ja proteiineista. Telomeerit ovat elintärkeitä solun normaalille toiminnalle, ne esimerkiksi estävät kromosomien fuusioitumisen toisiinsa ja suojaavat toiminnallista DNA:ta. Joka kerta solun jakautuessa telomeeri kuluu hieman. Tämän ilmiön on ajateltu olevan tärkeä tekijä vanhenemisessä. Tässä työssä suhteellinen telomeeripituus määritetään verestä eristetyistä genomisesta DNA:sta. Telomeeripituus saadaan määritettyä qPCR-pohjaisella menetelmällä laskemalla T/S-suhde määritettyjen telomeeri- ja yhden kopion geenin (<i>hemoglobiinin beta-proteiinia koodaava geeni, HBB</i>) arvoista. Kaikki qPCR-reagenssit testattiin ennen näyteajojen aloittamista. Näytteet kuivatettiin optisille 384-qPCR-levyille, samaten kuin standardit ja kontrollit. Näytteet ajettiin qPCR:llä ja tulokset analysoitiin CFX Manager 2.0- ja PASW Statistics 18 -ohjelmilla. Analysoinnissa katsottiin muun muassa iän, sukupuolen ja DNA:n eristysmenetelmän vaikutusta ja merkitsevyyttä suhteelliseen telomeeripituuteen. Iällä todettiin olevan merkitsevä vaikutus telomeeripituuteen ($p = 8,22 \cdot 10^{-33}$). Sukupuoli oli myös merkitsevä tekijä ($p = 0,045$), vaikka merkitsevyys ei ollut yhtä voimakas kuin iän merkittävyys. DNA:n eristysmenetelmän todettiin olevan erittäin merkitsevä ($p = 3,16 \cdot 10^{-81}$).</p>	
Avainsanat	Telomeerit, qPCR, DILGOM-aineisto

Author(s)	Jenni Lahtinen
Title	Measuring relative telomere length by using qPCR-technique
Number of Pages	37 pages + 1 appendices
Degree	Laboratory technologist
Degree Programme	Bachelor of Laboratory Services
Specialisation option	
Instructor(s)	Tiina Soininen, Lecturer Iiris Hovatta, Docent, academy research fellow
<p>The goal of this thesis was to determine relative telomere length from DILGOM-sample using qPCR. DILGOM-sample is part of the national FINRISK study performed by the Finnish National Institute for Health and Welfare.</p> <p>Telomeres are found in the ends of chromosomes and are made of replicated DNA sequences (5´-(TTAGGG)_n-3´) and proteins. Telomeres are vital to cell's everyday functions for example protecting the functional DNA and preventing the fusion of two chromosomes. Every time a cell divides telomeres get a bit shorter. This phenomenon is probably an important mechanism in ageing.</p> <p>In this thesis relative telomere length was measured from genomic DNA isolated from blood. Telomere length can be measured by qPCR by calculating a T/S ratio from telomere and single copy genes (<i>hemoglobin's beta-protein coding gene, HBB</i>) signal values.</p> <p>All of the qPCR reagents were tested before the test runs. Samples, standards and controls were dried onto optical 384-well qPCR-plates. qPCR reactions were run and results were analysed with CFX Manager 2.0 and PASW Statistics software. In the analysis, relative telomere length was compared to the age, sex and DNA extraction method. Age has a strong effect on telomere length ($p = 8,22 \cdot 10^{-33}$). Sex shows also some evidence for affecting telomere length ($p = 0,045$). DNA's extraction method has a very strong effect on telomere length ($p = 3,16 \cdot 10^{-81}$).</p>	
Keywords	Telomeres, qPCR, DILGOM

Alkulause	
Tiivistelmä	
Abstract	
Sisällys	
1 Johdanto	1
2 Teoria	2
2.1 Telomeerit	2
2.2 DILGOM-aineisto	4
2.3 qPCR	6
2.3.1 Detektointi	7
2.3.2 Tulosten analysointi	8
3 Työn toteutus	12
3.1 Näytelevyjen satunnaistaminen	15
3.2 Hgb- ja Tel-alukkeet	16
3.3 Standardit ja kontrollit	17
3.4 Standardien, kontrollien ja näytteiden kuivaus optisille 384-qPCR-levyille	18
3.5 Reagenssitestit	19
3.6 β -hemoglobiini- ja telomeeri-näyteajot	21
3.7 Uusinta-ajot	21
4 Tulokset	22
4.1 Alukkeiden konsentraatiot sekä puhtausasteet	22
4.2 Reagenssitestien tulokset	23
4.3 Tulosten tilastollinen analyysi	24
4.3.1 Näytteiden kalibrointi	25
4.3.2 Ajojen laatukontrolli	27
4.3.3 CV-%	28
4.3.4 Näytteiden analysointi PASW-tilasto-ohjelmalla	28
5 Yhteenveto	36
Lähteet	38
Liitteet	

Liite 1. Telomeerireaktiomiksin osan 1 pipetointiohje

1 Johdanto

Tämä opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopistolla, molekyylineurologian tutkimusohjelmassa, Iiris Hovatan tutkimusryhmässä, joka tutkii pääasiallisesti ahdistuneisuushäiriöiden genetiikkaa. Ryhmän tavoite on tunnistaa ja karakterisoida geenejä, jotka säätelevät normaalia ja patologista ahdistusta sekä geenejä jotka altistavat autismitautin sairauksille. Ryhmä tutkii myös telomeerejä, kromosomien päissä olevia DNA-jaksoja, ja on erityisesti kiinnostunut telomeerien pituutta säätelevistä tekijöistä.

Tämän työn tavoitteena on määrittää DILGOM-aineistosta suhteellinen telomeeripituus qPCR-laitteiston avulla. Tuloksista analysoidaan fenotyyppien vaikutukset telomeeripituuteen sekä lyhentyneisiin telomeereihin. DILGOM-aineisto on osa Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen joka viides vuosi toteuttamaa FINRISKI-tutkimusta, jossa tutkitaan ravitsemuksen, elämäntapojen ja perintötekijöiden yhteyttä lihavuuteen ja metaboliiseen oireyhtymään.

Telomeeripituutta on tutkittu ihmisen leukosyyteistä eristetystä DNA:sta useissa epidemiologisissa aineistoissa. Lyhentynyt leukosyyttien telomeeripituus on yhdistetty useisiin monitekijäisiin sairauksiin, kuten sydän- ja verisuonitauteihin sekä diabetekseen. Koska DILGOM-aineisto on väestöpohjainen aineisto, se mahdollistaa näiden yhteyksien tutkimisen sekä mahdollisen vaikutuksen määrittämisen väestötasolla. Näin pystytään sanomaan, onko lyhentyneellä telomeeripituudella yhteyttä monitekijäisiin sairauksiin Suomessa ja onko sillä merkitystä väestön hyvinvoinnille. Telomeeripituutta koskevissa tutkimuksissa pyritään tunnistamaan fenotyypit, jotka liittyvät kiihtyneeseen telomeerien lyhenemiseen. Fenotyypit vaihtelevat psykiatrisista sairauksista sydän- ja verisuonisairauksiin sekä diabetekseen. Hovatan tutkimusryhmä on aiemmissa tutkimuksissa pystynyt todistamaan lapsuusiän vaikeuksien, esimerkiksi vakavan fyysisen sairauden tai vanhemman alkoholismin, korreloivan negatiivisesti leukosyyttien telomeeripituuteen aikuisiällä. Lapsuusiän vaikeuksien tiedetään olevan yksi suurimmista riskitekijöistä psykiatrisiin sairauksiin. [1.]

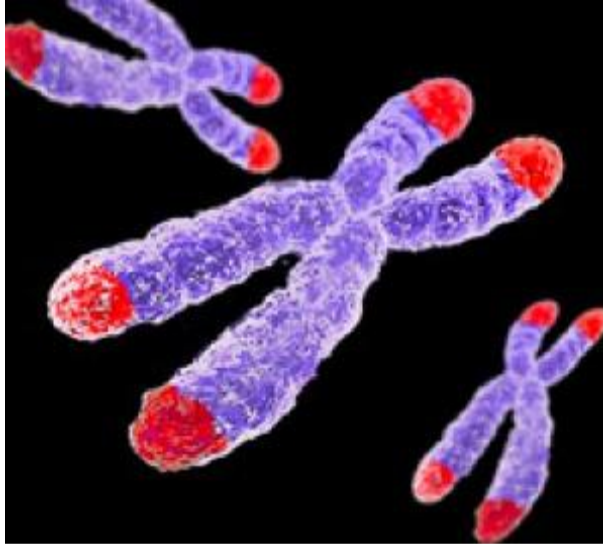
2 Teoria

2.1 Telomeerit

Telomeerit ovat kromosomien päässä olevia DNA-pätkiä, jotka koostuvat toistuvista DNA-jaksoista ($5'-(TTAGGG)_n-3'$) ja proteiineista. Telomeerit ovat tärkeässä roolissa genomisen eheyden ja tasapainon säilyttämisessä. Aiemmin telomeerien luultiin vain mahdollistavan kromosomien täydellisen replikaation, mutta nykyään niiden tiedetään olevan elintärkeitä solun normaalille toiminnalle. Ne esimerkiksi estävät kromosomien fuusioitumisen toisiinsa ja suojaavat toiminnallista DNA:ta. Kaikista tähän mennessä tutkituista ihmisen soluista keskimääräinen telomeeripituus on ollut syntymähetkellä noin 5–20 kb. [2; 3; 4.]

Joka kerta solun jakautuessa telomeerin äärimmäisessä päässä pieni pätkä telomeeria ei monistu, koska DNA-polymeraasi ei kykene monistamaan DNA-juostetta 3'-päästä, minkä seurauksena syntyy alukkeeseen mittainen vajaus telomeereihin. Kromosomi näin ollen kuluu telomeereistään. Tämän ilmiön on ajateltu olevan tärkeä tekijä vanhenemisessä. Kun telomeerin pituus on kriittisen lyhyt, solun toiminnot huonontuvat tai solu ei enää kykene jakautumaan. Lopulta se käy läpi ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin. On myös olemassa solulinjoja (tietyt syöpä- ja kantasolulinjat), joilla telomeerit eivät lyhene, vaan jopa pitenevät solun jakautuessa. Nämä solulinjat tuottavat käänteistranskriptaasi-entsyymiä, telomeraasia, joka pystyy pidentämään telomeerejä lisäämällä TTAGGG-toistojaksoja kromosomien 3'-päähen. [2; 3; 4; 5.]

Normaalisti solut ikääntyvät, ennen kuin niistä tulee vahingollisia keholle, jolloin niiden kasvu pysähtyy, koska solut eivät pysty jakautumaan liian lyhyiden telomeerien vuoksi. Jos telomeraasi onkin aktivoitunut, jotkin solut voivat välttyä kasvun pysähtymiseltä. Tämän uskotaan olevan oleellinen tapahtuma solujen vahingollisiksi muuttumiselle jopa 85 %:ssa syövästä. Seuraavalla sivulla olevassa kuvassa 1 on esitelty kromosomi ja kromosomien päissä olevat telomeerit. [2; 3; 4; 5.]



Kuva 1. Kuvassa kromosomeja, joissa telomeerit on kuvattu punaisella värillä. [6.]

Telomeereihin liittyy läheisesti proteiineja, jotka suojaavat telomeerien päässä olevaa päätesilmukkaa eli T-luuppia. Proteiinit myös välittävät telomeerien ja geenien välisiä signaaleja. Tärkeimmät telomeereihin sitoutuvista proteiineista ovat TRF1- ja TRF2-kompleksit. Näihin komplekseihin kuuluu suuri joukko proteiineja, kuten TANK, POT1, RAP1, TIN2, ERCC1, PARP2, BLM ja ATM. Ne ovat osa telomeerien toiminnan säätelyä ja DNA-vaurioiden korjaamista. Edellä mainittujen proteiinien mutaatioihin tai ekspression muutoksiin liittyy erilaisia häiriöitä, kuten kasvaimet ja ennenaikainen ikääntyminen. [4.]

Telomeerien rakenne on periaatteessa säilynyt evoluution aikana ennallaan. Telomeerien pituus, samoin kuin niiden lyhenemisnopeus, vaihtelevat eri eliölajeilla lajityypillisen eliniän mukaan. Esimerkiksi ihmisen leukosyyttien telomeerien pituus on noin 10 500 emäsparia ja ne lyhenevät keskimäärin 33 emäsparia vuodessa. Telomeerit ovat lyhyemmät miehillä kuin naisilla, mutta koska vastasyntyneillä pojilla ja tytöillä telomeerit ovat samanpituiset, voidaan olettaa, että sukupuolten välinen ero syntyy myöhemmin, mahdollisesti estrogeenin vaikutuksesta. [4.]

Telomeerien lyhenemiseen vaikuttavia tekijöitä ovat esimerkiksi jotkin monogeeniset ja ikääntymiseen liittyvät polygeeniset taudit, hapetusstressi (eli reaktiivisten happiradiikaalien haitalliset vaikutukset, jotka kasvavat iän myötä), miessukupuoli, tupakointi ja ylipaino sekä psyykinen stressi. Toisaalta antioksidantit ja estrogeeni, jonka on todet-

tu lisäävän telomeraasin aktiivisuutta soluviljelmissä, hidastavat telomeerien lyhenemistä. On vielä tutkimatta, liittyykö telomeerien nopeutunut lyheneminen esimerkiksi suolan, tyydyttyneiden rasvojen tai alkoholin käyttöön ja voidaanko telomeerien lyhenemistä hidastaa noudattamalla terveellisiä elintapoja. Tiedetään kuitenkin, että telomeerien lyheneminen liittyy vanhenemiseen, mutta vielä ei tiedetä, onko kyseessä syy vai seuraus. Näyttää kuitenkin mahdolliselta, että telomeerien lyhenemistä on mahdollista hidastaa elämällä terveellisesti. [4.]

Telomeerien pituus vaikuttaa hyvältä biologisen iän markerilta. Tutkijoita askarruttava kysymys on, pitäisikö telomeerejä lyhentää vai pidentää. Gerontologian tutkijoiden mielestä telomeerejä pitäisi pidentää. Heitä kiinnostaa ikääntymisen hidastaminen esimerkiksi suojaamalla telomeerejä lyhenemiseltä. Syöpätutkijoiden mielestä niitä pitäisi taas lyhentää. He etsivät keinoja nopeuttaa telomeerien lyhenemistä ja syöpäsolujen apoptoosia kehittämällä telomeraasin estäjiä syöpälääkkeiksi. Kliiniseen vaiheeseen jo ehtinyt telomeraasin RNA-templaatin antagonisti GRN163L, joka on kehitetty kroonisen lymfaattisen leukemian hoitoon, herättää toiveita toimivista syöpälääkkeistä. Toisaalta kun otetaan huomioon telomeraasin keskeinen rooli telomeerien ja solusyklin säätelyssä, niin näiltä lääkkeiltä voidaan odottaa ikäviä haittavaikutuksia. [4.]

2.2 DILGOM-aineisto

Työssä käytetty DILGOM-aineisto on osa Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen keräämää, joka viides vuosi toteutettavaa FINRISKI-tutkimusta. Tutkimuksessa selvitetään sydän- ja verisuonisairauksien sekä tiettyjen kroonisten kansantautien riskitekijöiden kehitystä väestössä. Tutkittavat ovat 25–74 -vuotiaita. Keväällä 1997 toteutettuun FINRISKI-tutkimukseen osallistuivat Pohjois-Karjalan, Oulun ja Kuopion läänit, Turku-Loimaan seutu, Helsinki sekä Vantaa. Yhteensä tutkimukseen osallistui 8 600 suomalaista. Vuonna 2007 toteutettuun tutkimukseen osallistui 6 000 suomalaista viideltä alueelta eri puolelta Suomea. DILGOM-aineisto on osa vuoden 2007 FINRISKI-aineistoa. Taulukossa 1 on esitetty muutamia perusmuuttujia työssä käytetystä aineistosta. [7; 8.]

Taulukko 1. DILGOM-aineiston perusmuuttujat. kh=keskihajonta.

N	4 331
Miehiä	1 999 (46,2 %)
Naisia	2 332 (53,8 %)
Iän keskiarvo (kh)	52,70 vuotta (\pm 13,5 vuotta)
Miesten iän keskiarvo (kh)	53,46 vuotta (\pm 13,3 vuotta)
Naisten iän keskiarvo (kh)	52,23 vuotta (\pm 13,6 vuotta)

Tutkittavien terveyskäyttäytymistä selvitetään lomakkeella, jossa kysytään muun muassa tupakoinnista, alkoholin käytöstä, liikunnasta, ravintotottumuksista, terveystalve-lujen käytöstä sekä sairauksista, niiden oireista ja sairaushistoriasta. Tutkimuksessa mitataan paino, pituus, vyötärön ja lantion ympäryys, verenpaine ja pulssi. Tutkittavilta otetaan verinäytteitä, joista analysoidaan muun muassa veren rasva-arvoja, kuten kokonaiskolesteroli, HDL-kolesteroli ja triglyseridit. Lisäksi tutkitaan muun muassa tulehdusarvoja sekä tehdään maksan toimintakokeita. Ravitsemustietoa saadaan tutkimuk-sen yhteydessä toteutettavasta FINRAVINTO-tutkimuksesta sekä veri- ja virtsanäytteis-tä. Tutkimukseen kuuluu useita eri alaotoksia, joissa selvitetään muun muassa ympä-ristön tupakansavuallistusta, naisten terveyttä, kylmäältistusta sekä liikuntaa ja fyysistä kuntoa. [8.]

DILGOM-tutkimuksen tarkoituksena on tuottaa uutta ja merkittävää tieteellistä tietoa ravinnon, liikunnan ja perimän osallisuudesta lihavuuteen ja sokeriaineenvaihduntaan, sekä niiden yhteisvaikutuksista. Tarkoituksena on myös kartoittaa niihin liittyviä biologi-sia mekanismeja sekä psykososiaalisia taustatekijöitä. Tutkimusaineiston valinta ja tar-kasti mitatut fenotyyppi-tiedot ovat erityisen tärkeitä tämän luonteisessa tutkimukses-sa. Tuoreen kansainvälisen arvion mukaan suomalainen väestö soveltuu erityisen hy-vin, ehkä jopa parhaiten maailmassa, elintapa- ja perintötekijöiden vaikutusten arvioin-tiin kroonisten monisyisten kansantautien synnyssä. [8.]

DILGOM-aineisto on ravitsemuksen, elämäntapojen ja perintötekijöiden yhteyttä liha-vuuteen ja metaboliseen oireyhtymään tutkiva aineisto. Tyypin 2 diabeteksen ja sydän- ja verisuonitautien riskitekijöistä lihavuus, ja erityisesti keskivartalolihavuus, ovat tär-keimpiä tautiriskejä. Lihavuuden esiintyvyys lisääntyy iän myötä. Metabolinen oireyh-tymä (MBO) on sydän- ja verisuonitautien riskitekijöiden kasauma, joihin kuuluu esi-

merkiksi vyötärölihavuus, kohonnut verenpaine, glukoosi- ja rasva-aineenvaihdunnan häiriö sekä insuliiniresistenssi. Perusteellisesta tutkimuksesta huolimatta on yhä epäselvää, onko metabolisen oireyhtymän taustalla yhteinen biologinen tekijä. Lihavuus, MBO, diabetes sekä sydän- ja verisuonisairaudet syntyvät perinnöllisen alttiuden ja elintapojen, erityisesti ravinnon ja liikunnan, yhteisvaikutuksesta. Ravinnon ja liikunnan vaikutus painoon ja glukoosiaineenvaihduntaan vaihtelevat henkilöstä riippuen ja perintötekijät vaikuttavat niihin liittyviin fysiologisiin vasteisiin. [8.]

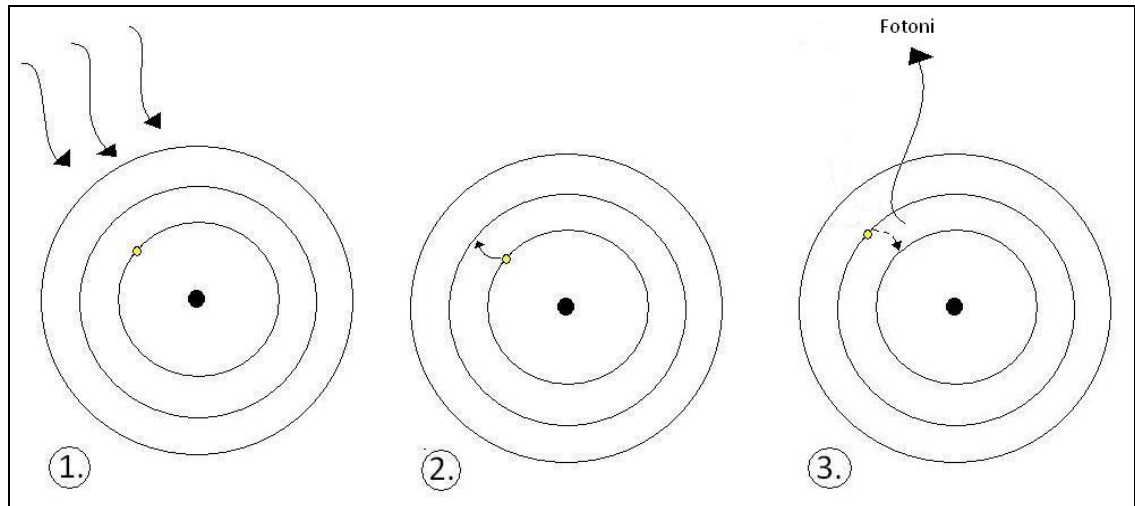
DILGOM-tutkimus koostuu viidestä pääosasta, jotka on lueteltu alla.

1. FINRISKI 2007 -tutkimuksen yhteydessä 2 000:lta 25 - 74 -vuotiaalta mieheltä ja naiselta kartoitettiin ravinto- ja liikuntatottumukset, psykososiaaliset taustatekijät, lihavuus, glukoosiaineenvaihdunta ja muut MBO:n osatekijät
2. Tutkittavilta kartoitettiin psykososiaalisten tekijöiden yhteys ravinto- ja liikuntatottumuksiin sekä lihavuuden ja MBO:n kehittymiseen
3. Tutkittavilta kartoitettiin myös ravinnon vaikutus lihavuuteen liittyviin hormoneihin, sytokiineihin ja muihin biologisiin välittäjäaineisiin sekä niiden yhteisvaikutus lihavuuden ja MBO:n synnyssä
4. Koko genomin kartoituksen perusteella analysoidaan vartalolihavuuden ja MBO:n geneettistä riskiprofiilia sekä testataan löydettyjen geenien yhteyttä lihavuuteen ja MBO:n kehittymiseen seuranta-aineostossa
5. Tutkittavien viiden vuoden seurantatutkimus suoritetaan vuonna 2012 [8.]

2.3 qPCR

Polymeraasiketjureaktion eli PCR:n (engl. *polymerase chain reaction*) sovelluksista tässä työssä keskitytään kvantitatiiviseen PCR:ään eli qPCR:ään. Normaalista PCR:stä poiketen kvantitatiivisessa PCR:ssä PCR-tuotteen määrää pystytään mittaamaan reaaliajassa fluoresenssin avulla.

Fluoresenssi on ilmiö, jossa molekyyli absorboi energiaa ja emittoi fotonin. Kun atomi absorboi energiaa, sen elektroni siirtyy korkeammalle energiatasolle eli atomi virittyy. Virityksen purkautuessa syntyy emissio ja fotonit vapautuu, kuten kuvassa 2 on esitetty. [9; 10.]



Kuva 2. Fluoresenssin toimintaperiaate: ensimmäisessä kuvassa energiaa absorboituu atomiin, toisessa kuvassa atomin elektroni hyppää seuraavalle energiatasolle, eli atomi virittyy ja kolmannessa kuvassa elektroni putoaa takaisin normaalille energiatasolleen, jolloin atomi emittoi fotonin.

2.3.1 Detektointi

Reaaliaikaisessa PCR:ssä käytetään detektointiin apuna DNA:han sitoutuvia fluoroforeja, joiden emissio voidaan detektoida eri aallonpituuksilla. Erityyppiset fluorofori-kemiat voidaan pääpiirteittäin jakaa kahteen ryhmään: spesifisiin ja epäspesifisiin kemioihin. Tässä työssä detektointi kemiana käytettiin SYBR® Green I:stä, joka on yleisin epäspesifisistä kemioista. [11; 12, s. 221.]

SYBR® Green I on helppokäyttöinen ja edullinen kemia. Se sitoutuu suoraan kaksijuosteiseen DNA:han, jolloin sen fluoresenssi kasvaa moninkertaiseksi. PCR-reaktion spesifisyys voidaan varmistaa sulamiskäyrän avulla. SYBR® Green I:n ei-spesifisestä sitoutumisesta johtuen jokaisen reaktion alukkeet on suunniteltava ja PCR-olosuhteet optimoitava huolella. Väri tarttuu kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han, joten epäspesifiset tuotteet ja niin sanotut alukedimeeri-tuotteet aiheuttavat fluoresenssia. Alukkeiden sitoutuminen toisiinsa voidaan kuitenkin yleensä erottaa spesifisistä tuotteista analysoimalla niiden sulamiskäyrät, jotka esitellään myöhemmin tässä kappaleessa, luvussa 2.3.2. [2; 11; 13, s.17.]

Käytännössä laite mittaa fluoresenssin jokaisen syklin lopussa joko ekstensio- tai annealing-vaiheen jälkeen, riippuen käytetystä detektointikemiasta. Fluoresenssin detek-

tointi tapahtuu laitteella, joka muuttaa valon elektroniseksi signaaliksi. qPCR-laitteissa käytetään yleensä detektoreina niin sanottua PMT- eli valomonistinputkea (engl. *Photomultiplier Tube*) tai valoherkällä kennolla eli CCD-kennolla (engl. *Charge-Coupled Device*) varustettua kameraa. [12, s. 338; 13, s. 3–16.]

Spesifiset kemiat perustuvat kohdespesifisten ja fluoresoivien koettimien käyttöön, kuten esimerkiksi TaqMan-koettimeen. Joissakin kemioissa koettimia on useampia ja jotkut taas ovat rakenteeltaan huomattavasti monimutkaisempia. Koettimien kustannuksissa ja toimivuuksissa on myös eroja. Yhteistä lähes kaikille spesifisille koettimille on niiden suunnittelun monimutkaisuus ja korkeampi hinta. [11; 14; 15.]

2.3.2 Tulosten analysointi

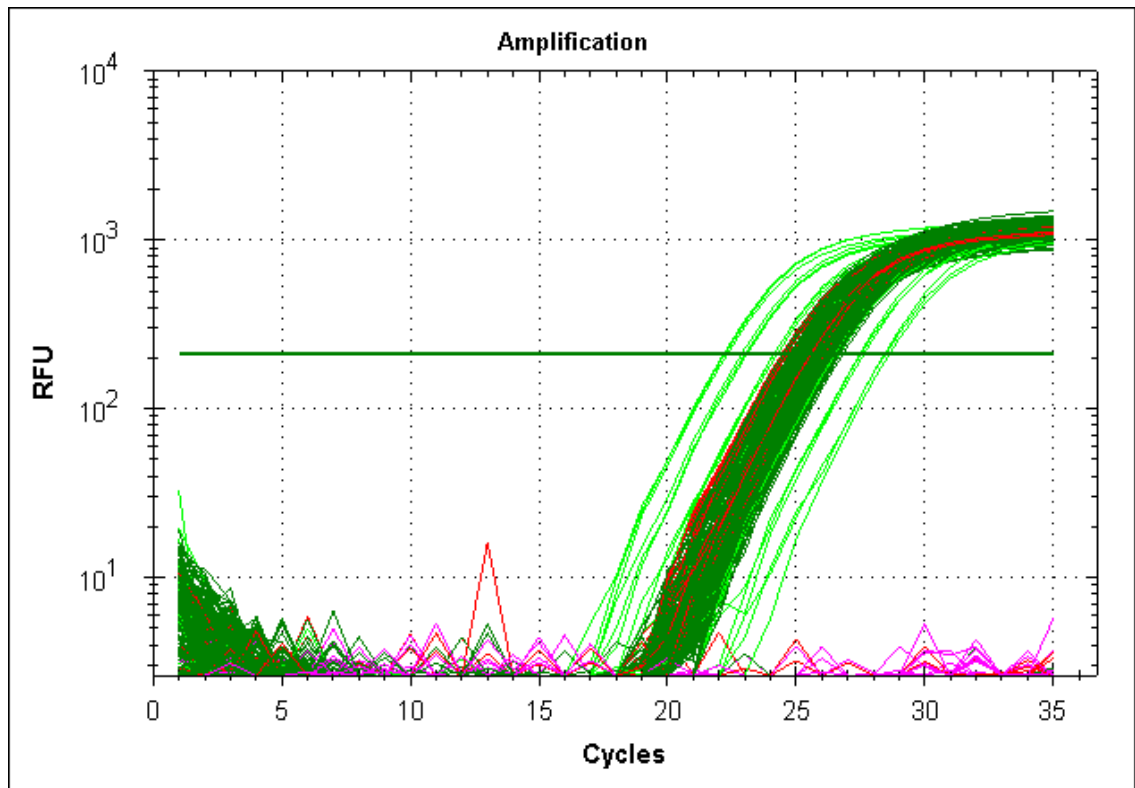
Reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR:n tuloksia ei tarvitse analysoida agarosigeelielektroforeesilla, vaan päätelmät voidaan tehdä qPCR-ohjelman mittaamien parametrien perusteella [13.].

Kynnystaso (engl. *Threshold line*) on se fluoresenssin taso, jossa qPCR-tuotteen fluoresenssi kohoaa taustafluoresenssin yläpuolelle ja on detektoitavissa. Kynnystaso voidaan määrittää qPCR-ohjelman avulla, ja se tulisi yleensä asettaa monistuskäyrän eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen pohjaviivan yläpuolella. [16.]

Yksi tärkeimmistä parametreista useimmissa qPCR-analyseissa on kynnysyklarvo. Kynnysykli (C_q) on sykli, jolla monistuskäyrä saavuttaa kynnystason. Kynnysyklin eli C_q-arvon suuruus on kääntäen verrannollinen näytteen alkuperäiseen templaattikoncentraatioon; mitä suurempi määrä templaattia reaktion alussa, sitä pienempi C_q-arvo eli sitä aiemmin tuote monistuu [2]. Eri qPCR-ajojen välisiä C_q-arvoja ei tulisi verrata toisiinsa sellaisenaan, koska C_q-arvo riippuu asetetusta kynnystasosta, joka taas saattaa vaihdella eri ajojen välillä [13; 16; 17].

qPCR:ssa fluoresenssimittauspisteiden perusteella saadaan reaaliaikainen monistuskäyrä, jossa x-akselilla ilmoitetaan sykli ja y-akselilla fluoresenssin suuruus. Monistuskäyrä voidaan piirtää myös logaritmisena y-akselin suhteen, jolloin PCR-reaktion lineaar-

rinen vaihe on helpompi erottaa, ja kynnystason asettaminen helpottuu. Alla olevassa kuvassa 3 on esitetty esimerkkinä qPCR-monistuskäyrä β -hemoglobiiniajosta. [2; 16.]

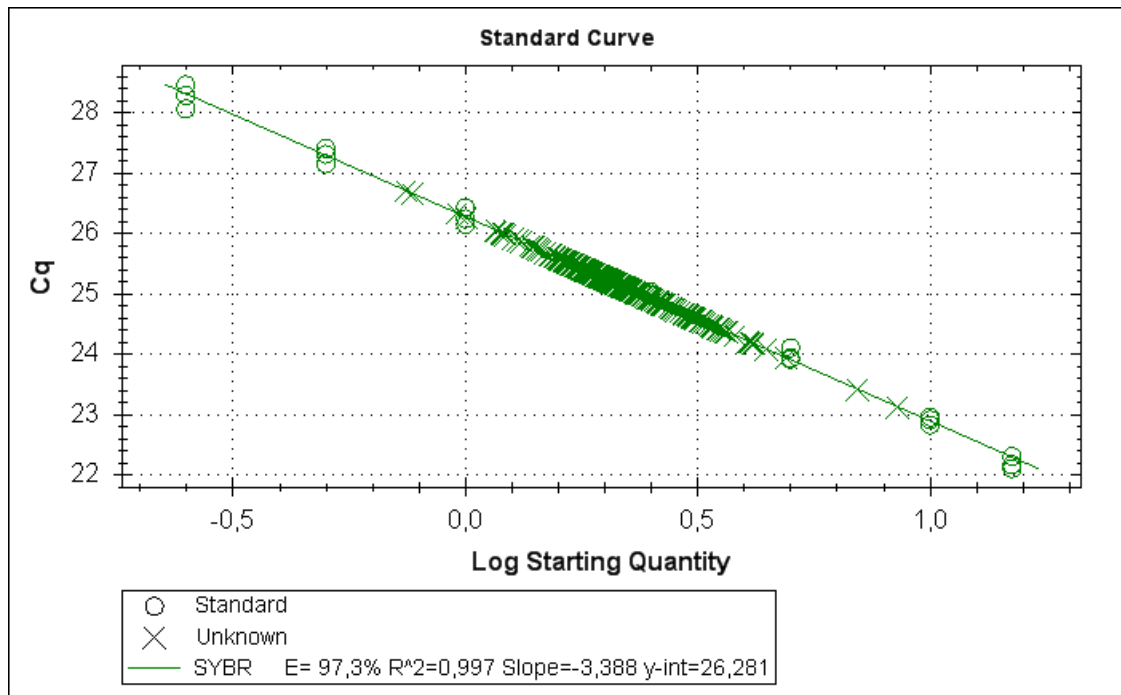


Kuva 3. Esimerkki qPCR-monistuskäyrien kuvaajasta. Standardit on merkitty vaaleanvihreällä, kontrollit punaisella, näytteet vihreällä ja negatiiviset kontrollit vaaleanpunaisella.

Tuntemattoman näytteen DNA-määrä voidaan selvittää käyttämällä apuna samasta kohde-DNA:sta tehtyä standardisuoraa. Standardisuora piirretään logaritmiselle asteikolle käyttäen standardipisteiden konsentraatioita ja niiden saamia C_q-arvoja. Standardisuoran onnistumiseen vaikuttavat pipetoinnin tarkkuuden lisäksi myös qPCR-laitteen asetukset sekä suorituskyky. [2; 16.]

Standardisuoran avulla voidaan määrittää myös reaktion tehokkuus. Reaktion tehokkuuteen vaikuttavat monistettavan amplikonin pituus, mahdolliset inhibiittorit sekä alukkeiden suunnittelu. Tehokkuuden tulisi olla välillä 90–110 %, mikä vastaa standardisuoran kulmakerrointa välillä $(-3,6)$ – $(-3,1)$. Jotta tulokset olisivat luotettavia, tulee tehokkuuksien olla samaa luokkaa standardien ja tuntemattomien näytteiden välillä. Tehokkuus voidaan määrittää myös jokaiselle reaktiolle erikseen käyttämällä esimerkiksi monistuskäyrän lineaarisen vaiheen kulmakerrointa. Monet qPCR-ohjelmistot ilmoittavat tehokkuudet jokaiselle reaktiolle erikseen automaattisesti. Laskemistavat vaihte-

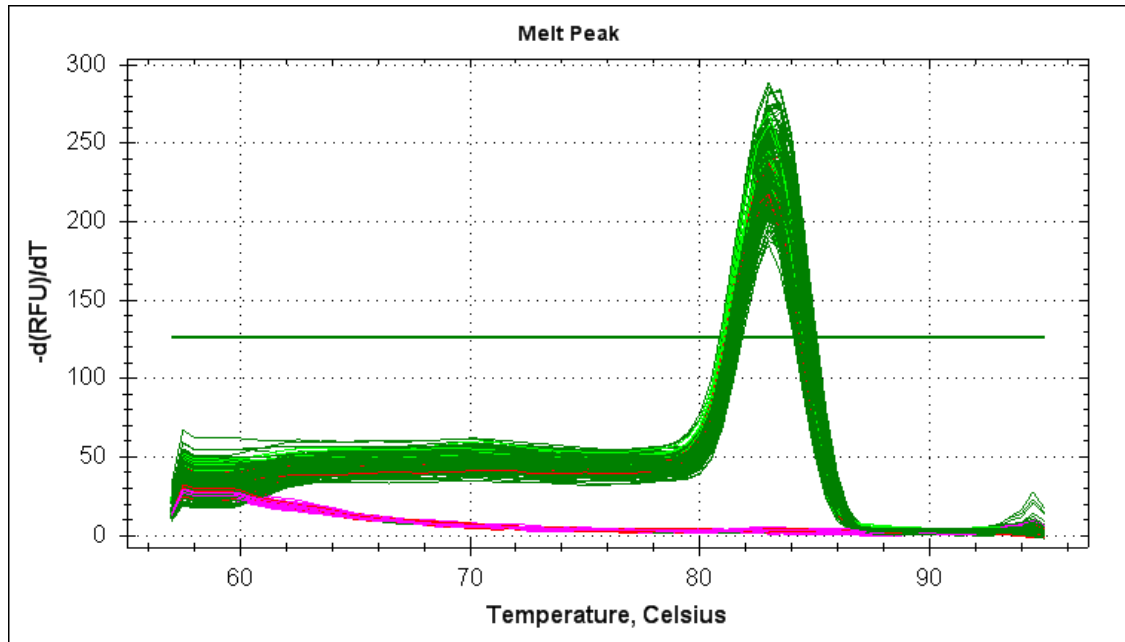
levat hieman ohjelmasta riippuen. Alla olevassa kuvassa 4 on esimerkki standardisuorasta. [12, s.102; 16; 18, s. 69–71]



Kuva 4. Kuvassa on esimerkki standardisuorasta, jossa standardit on kuvattu palloina ja näytteet rasteina. Standardisuorasta saadaan selville näytteiden pitoisuus, PCR-tehokkuus (E) sekä korrelaatiokerroin (R^2).

Sulamiskäyräanalyysi (engl. *Melting curve analysis*) suoritetaan varsinaisen qPCR-reaktion jälkeen ja sitä käytetään PCR-tuotteiden identifiointiin erityisesti käytettäessä ei-spesifisiä detektointikemioita. Jokaisella kaksijuosteisella DNA:lla on ominainen sulamislämpötila (T_m), jossa 50 % DNA:sta on denaturoituneena eli yksijuosteisena. [18, s.146.]

Sulamislämpötila riippuu muun muassa DNA-jakson pituudesta ja GC-pitoisuudesta. Myös DNA-juosteen sekundääri- ja tertiäärirakenne vaikuttavat sulamislämpötilaan. PCR-syklityksen jälkeen PCR-tuotetta lämmitetään noin 50 °C:sta 95 °C:seen seuraten samalla fluoresenssia, joka laskee sitä mukaa kun DNA denaturoituu, ja siitä irronnut fluorofori ei enää fluoresoi. Sulamiskäyrä piirretään yleensä derivaattamuodossa $-dF/dT$ eli fluoresenssin negatiivinen ensimmäinen derivaatta lämpötilan funktiona. Alla olevassa kuvassa 5 on esimerkki PCR-tuotteen sulamiskäyrästä, jossa sulamislämpötila eli $T_m = 83$ °C. [18, s.146.]



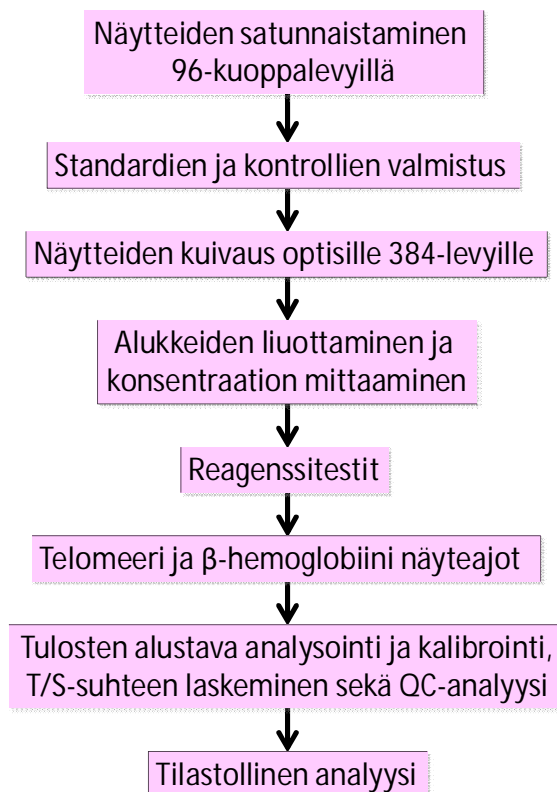
Kuva 5. Sulamiskäyrässä näytteet näkyvät piikkinä (vihreä) ja negatiiviset näytteet ovat pohjaviivan tasolla (vaaleanpunainen).

qPCR-ajojen tulosten laatua tarkastellaan qPCR-laitteiston omalla ohjelmistolla. Triplikaatit, joiden C_q -arvojen keskihajonta kynnysrajalla on yli 0,5, poistetaan analyysistä. Näytteiden tulokset kalibroidaan levyillä olevien kontrollien keskiarvolla, jotta saadaan poistettua levyefekti. Kalibroiduista tuloksista lasketaan T/S-suhte. Analysointi tehdään tilasto-ohjelma PASW Statistics versio 18:lla. Näytteiden kalibroiduista T/S-suhteista määritetään normaalijakautuneisuus graafisesti histogrammin avulla, merkittävyydet fenotyyppihin Levenen testillä (t-testi), regressiomalleja - esimerkiksi iän, sukupuolen ja eristysmenetelmän suhteen - sekä piirretään erilaisia aineistoa havainnollistavia kuvia. [19.]

3 Työn toteutus

Työssä määritettiin suhteellinen telomeeripituus telomeerien ja yhden kopion geenin suhteen (T/S-suhde) avulla. Työ tehtiin ajamalla telomeeri- ja β -hemoglobiinireaktiot qPCR-laitteistolla. Tässä työssä qPCR-laitteistona käytettiin Bio-Radin CFX384 -laitetta ja detektio perustui SYBR Green I -kemialle. Kontrolleina ja standardina käytettiin nuorten, terveiden ihmisten DNA-näytteitä (A2, B3, C6, D8 ja E10 sekä F12). Näytteitä oli yhteensä noin 4 300 kappaletta ja ne saapuivat valmiina käyttöläimennöksinä (5 ng/ μ l) 96-kuoppalevyillä.

qPCR-tulokset kalibroitiin kontrollien avulla levyefektin poistamiseksi. Kalibroituista arvoista laskettiin T/S-suhde. Kontrolleille laskettiin CV-%, jolla varmistettiin kontrollien tasaisuus ja laatu. Ajoista tehtiin laatukontrolli (QC-analyysi) pitämällä kirjaa ajojen PCR-tehokkuuksista sekä standardisuorien korrelaatiokertoimista. T/S-suhteen (eli suhteellisen telomeeripituuden) ja eri fenotyyppien, esimerkiksi iän ja sukupuolen, vaikutukset ja merkittävyydet toistensa kanssa analysoitiin PASW Statistics -tilasto-ohjelmalla. Alla olevassa vuokaaviossa (kuva 6) on esitelty työn eri vaiheet.



Kuva 6. Vuokaavio työn vaiheista.

Tässä työssä suhteellinen telomeeripituus määritettiin verestä eristetystä genomisesta DNA:sta. Telomeerien keskimääräinen pituus kromosomien päissä saatiin määritettyä qPCR-pohjaisella menetelmällä laskemalla T/S-suhde määritettyjen telomeerien ja yhden kopion geenin (*hemoglobiinin beta-proteiinia koodaava geeni*, HBB) arvoista. Yksikopioinen geeni korjaa näytteiden DNA-määrien eroavaisuuksia. Mitä pidemmät telomeerit näytteessä on, sitä enemmän saadaan PCR-tuotetta monistettua. Telomeeri- ja β -hemoglobiinireaktiot tehdään erikseen omilla optisilla 384-levyillä. Monistuneet PCR-tuotteet määritetään standardisuoran avulla. Jokaisesta näytteestä tehdään optisille 384-levyille kolme teknistä (rinnakkaista) näytettä, eli triplikaatit, laadun takaamiseksi. Jokaisen näytteen sijainti kahdella rinnakkaisella qPCR-levyllä on identtinen. [1; 3; 18.]

Telomeerireaktion reaktioseos on esitetty alla olevassa taulukossa 2 ja β -hemoglobiinin reaktioseos on esitelty taulukossa 3.

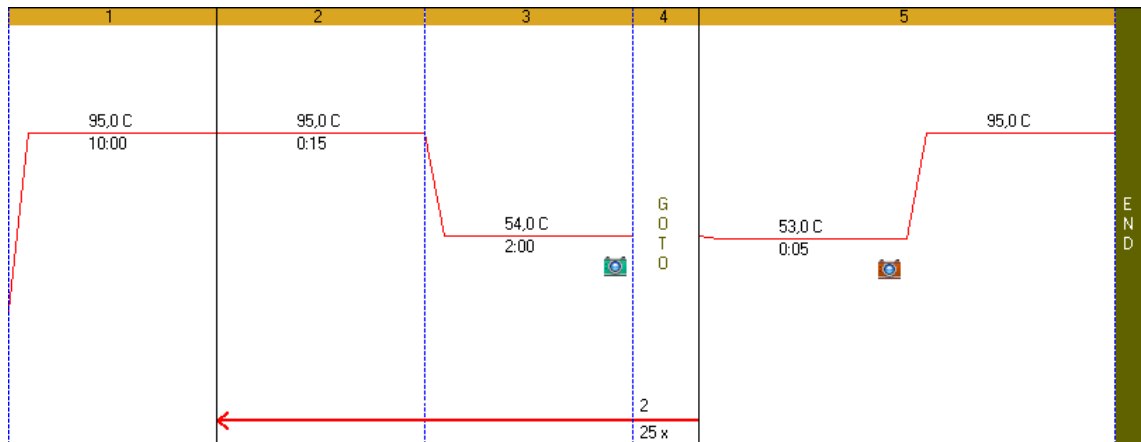
Taulukko 2. Telomeerireaktion eri komponenttien osuudet 15 μ l:n lopputilavuudessa [1].

Telomeerireaktion reaktioseos	
Reagenssi	Loppupitoisuus
Tel1b-alue (5´-CGGTTT(GTTTGG) ₅ GTT-3´) (Sigma-Aldrich)	270 nM
Tel2b-alue (5´-GGCTTG(CCTTAC) ₅ CCT-3´) (Sigma-Aldrich)	900 nM
SYBR Green I (Invitrogen)	0,26x
DTT (Sigma-Aldrich)	5 mM
DMSO (Sigma-Aldrich)	1 %
dNTP (Fermentas)	0,2 mM
AmpliTaq Gold® DNA-polymeraasi (5 U/ μ l) (Applied Biosystems)	1,25 U
AmpliTaq Gold Buffer II (Applied Biosystems)	1x

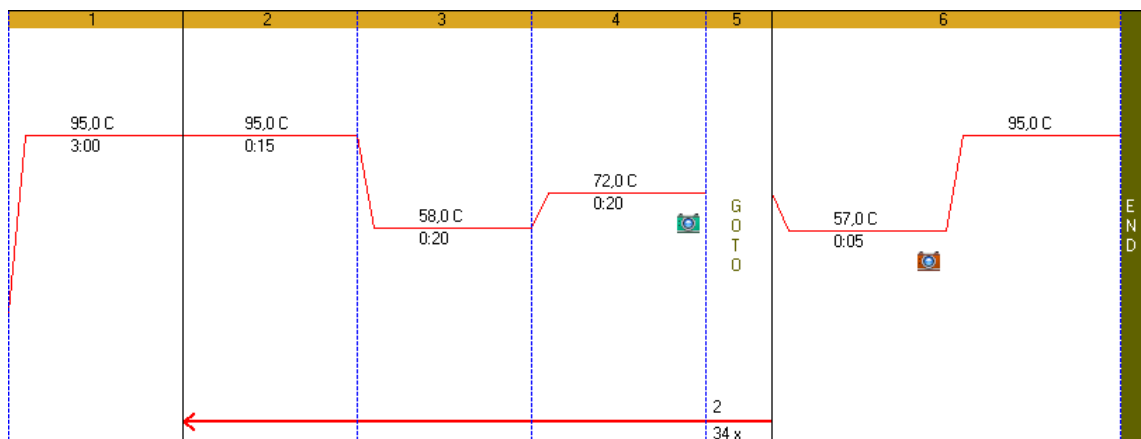
Taulukko 3. β -hemoglobiinireaktion eri komponenttien osuudet 15 μ l:n lopputilavuudessa [1].

β -hemoglobiinireaktion reaktioseos	
Reagenssi	Loppupitoisuus
Hgb1-alue (5´-GCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC-3´) (Sigma-Aldrich)	300 nM
Hgb2-alue (5´-CACCAACTTCATCCACGTTCAACC-3´) (Sigma-Aldrich)	300 nM
iQ™ SYBR® Green Superseos (Bio-Rad)	1x

Kuvissa 7 ja 8 on esitetty graafisesti qPCR-ajo-ohjelmat telomeeri- ja β -hemoglobiinireaktioille [1].



Kuva 7. Telomeerireaktion qPCR-ajo-ohjelma graafisesti esitettynä. Ensimmäinen vaihe on alkudenaturaatio, toinen vaihe on denaturaatio, kolmannessa vaiheessa ovat annealing- ja ekstensiovaiheet. Ohjelmassa on syklejä 25 kappaletta ja lopussa on sulamiskäyräanalyysi, joka tehtiin vain jokaisen päivän viimeiseen ajoon.

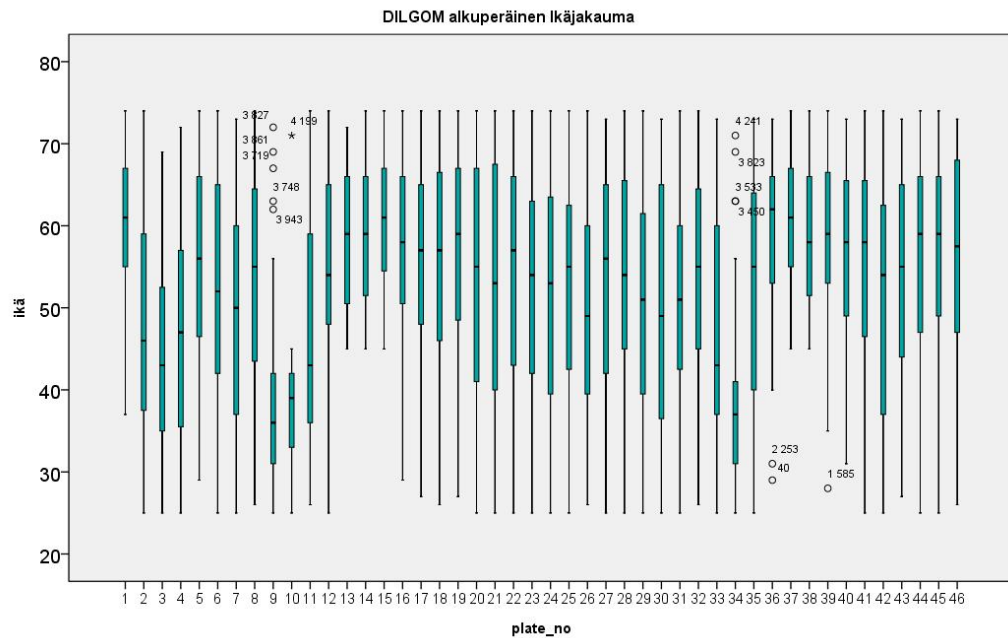


Kuva 8. β -hemoglobiinireaktion qPCR-ajo-ohjelma graafisesti esitettynä. Ensimmäinen vaihe on alkudenaturaatio, toinen vaihe on denaturaatio, kolmannessa vaiheessa on annealingvaihe ja neljännessä vaiheessa ekstensiovaihe. Ohjelmassa on syklejä 34 kappaletta ja lopussa on sulamiskäyräanalyysi, joka tehtiin vain jokaisen päivän viimeiseen ajoon.

qPCR-ajo-ohjelmat koostuvat alkudenaturaatio-, denaturaatio-, annealing- ja ekstensiovaiheista. Ajoihin tehdään myös sulamiskäyräanalyysit.

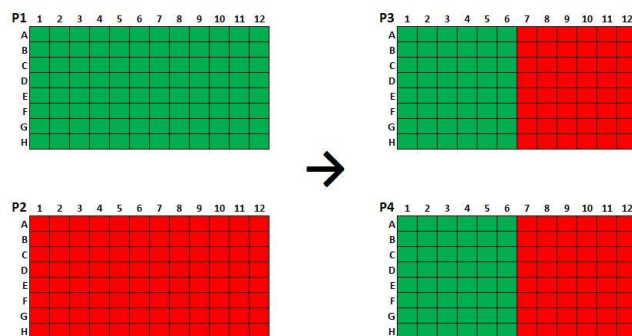
3.1 Näytelevyjen satunnaistaminen

Työ aloitettiin näytelevyjen satunnaistamisella. Kuvassa 9 on ikäjakauma levyittäin ennen satunnaistamisen aloittamista.



Kuva 9. DILGOM aineiston alkuperäinen ikäjakauma 96-kuoppalevyillä. Kuvasta näkee ikäjakauman olevan epätasainen levyillä.

Näytteet satunnaistettiin, jotta saatiin tasaiset ikä- ja sukupuolijakaumat kaikille levyille. Näytelevyt sulatettiin kylmähuoneessa + 4 °C:ssa. Levyt sentrifugoitiin 2 000 rpm:n kierrosnopeudella (550 g) 1 minuutin ajan. Levyjä sekoitettiin tasoravistelijassa noin 60 minuutin ajan, jonka jälkeen levyt sentrifugoitiin uudelleen ennen pipetointia. Levyiltä pipetoitiin 40 µl näytettä uusille 96-kuoppalevyille. Kahden tai kolmen levyn näytteiden paikkoja vaihdettiin keskenään. Kuvassa 10 on havainnollistettu levyjen pipetointi.



Kuva 10. Esimerkki levyjen satunnaistamisesta.

3.3 Standardit ja kontrollit

Standardeina ja kontrolleina käytettiin terveiden nuorten ihmisten genomista DNA:ta, joka oli eristetty verestä. DNA:t oli nimetty seuraavasti: A2, B3, C6, D8, E10 ja F12. Standardina käytettiin F12:ta. Standardeista tehtiin laatukontrolli eli QC-analyysi, jossa seurattiin ajojen PCR-tehokkuuksia sekä korrelaatiokertoimia. Alla olevassa taulukossa 5 ovat F12-standardisuoran standardien pitoisuudet.

Taulukko 5. F12-Standardisuora.

Standardi	c (ng/μl)
1	15,0
2	10,0
3	5,0
4	2,5
5	1,0
6	0,5
7	0,25

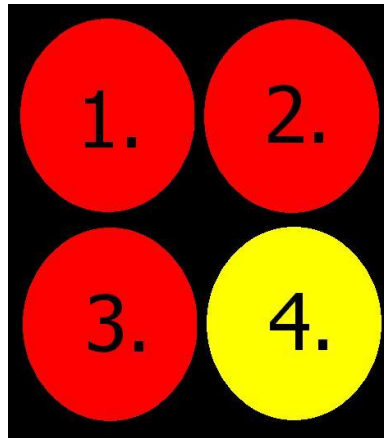
Kontrolleina käytettiin seuraavia DNA:ta: A2, B3, C6, D8 ja E10. Kontrolleista laskettiin keskiarvo, jonka avulla kalibroitiin näytteiden tulokset. Samalla poistettiin levyefekti sekä pystyttiin tarkkailemaan ajojen laatua. Alla olevassa taulukossa 6 ovat kontrollit ja niiden konsentraatiot.

Taulukko 6. Käytetyt kontrollit ja niiden konsentraatiot.

Kontr.	c (ng/μl)
A2	342
B3	133
C6	198
D8	180
E10	240

3.4 Standardien, kontrollien ja näytteiden kuivaus optisille 384-qPCR-levyille

Kuivaukset tehtiin DNA Hydra96 -robotilla. Näytteiden kuivaus optisille 384-qPCR-levyille saatiin ostopalveluna Suomen molekyyli lääketieteen instituutin (FIMM) teknologiakeskukselta. Standardit ja kontrollit kuivattiin kaikille levyille itse. DNA:ta haluttiin kuoppiin 10 ng. Näytteet ja kontrollit olivat 96-levyillä 5 ng/ul käyttölaimennoksina, joten levyille pipetoitiin robotilla 2 µl DNA-laimennosta. Näytteitä, kontrolleja sekä standardeja kuivattiin 384-levyille kolme rinnakkaista kuoppaa. Kuvassa 12 on esitetty malli, jonka mukaisesti positiot levyillä menivät. Yhden näytteen triplikaatit olivat positioissa 1–3 ja positiossa 4 oli standardi tai kontrolli.



Kuva 12. Näytteiden ja standardien positiot optisilla 384-levyillä. Positioissa 1–3 olivat näytteen triplikaatit ja positiossa 4 oli standardi tai kontrolli.

Levy täytettiin loppuun samalla tavalla. Näin yhdelle 384-levylle mahtui yhden 96-levyn näytteet triplikaatteina, negatiiviset näytteet sekä standardit ja kontrollit triplikaatteina. Kuvassa 13 on esitetty lopullinen kuivattujen levyjen levykartta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41	49	49	57	57	65	65	73	73	81	81	89	89
B	1	STD1	9	STD1	17	STD1	25	A2	33	A2	41	A2	49	NTC	57	NTC	65	NTC	73	NTC	81	NTC	89	NTC
C	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34	42	42	50	50	58	58	66	66	74	74	82	82	90	90
D	2	STD2	10	STD2	18	STD2	26	B3	34	B3	42	B3	50	NTC	58	NTC	66	NTC	74	NTC	82	NTC	90	NTC
E	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35	43	43	51	51	59	59	67	67	75	75	83	83	91	91
F	3	STD3	11	STD3	19	STD3	27	C6	35	C6	43	C6	51	NTC	59	NTC	67	NTC	75	NTC	83	NTC	91	NTC
G	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36	44	44	52	52	60	60	68	68	76	76	84	84	92	92
H	4	STD4	12	STD4	20	STD4	28	D8	36	D8	44	D8	52	NTC	60	NTC	68	NTC	76	NTC	84	NTC	92	NTC
I	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37	45	45	53	53	61	61	69	69	77	77	85	85	93	93
J	5	STD5	13	STD5	21	STD5	29	E10	37	E10	45	E10	53	NTC	61	NTC	69	NTC	77	NTC	85	NTC	93	NTC
K	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38	46	46	54	54	62	62	70	70	78	78	86	86	94	94
L	6	STD6	14	STD6	22	STD6	30	NTC	38	NTC	46	NTC	54	NTC	62	NTC	70	NTC	78	NTC	86	NTC	94	NTC
M	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39	47	47	55	55	63	63	71	71	79	79	87	87	95	95
N	7	STD7	15	STD7	23	STD7	31	NTC	39	NTC	47	NTC	55	NTC	63	NTC	71	NTC	79	NTC	87	NTC	95	NTC
O	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40	48	48	56	56	64	64	72	72	80	80	88	88	96	96
P	8	NTC	16	NTC	24	NTC	32	NTC	40	NTC	48	NTC	56	NTC	64	NTC	72	NTC	80	NTC	88	NTC	96	NTC

Kuva 13. Kuivatun 384-levyn levykartta telomeeri- sekä β -hemoglobiini-ajoihin. Standardit on merkitty vihreällä, kontrollit punaisella, negatiiviset näytteet ovat sinisellä ja varsinaiset näytteet vaaleanpunaisella.

Levyjä kuivattiin +37 °C:ssa yön yli. Levyjen päälle laitettiin kansi ja ne käärittiin nukkaamattomaan liinaan. Levyjä säilytettiin huoneenlämmössä valolta suojattuina.

3.5 Reagenssitestit

Reagenssitestit tehtiin ennen varsinaisten näyteajojen aloittamista. Testeissä optimoitiin alukkeiden monistuskyky, alukedimeerien muodostuminen sekä reaktioissa tarvittavat reagenssit telomeeri- ja β -hemoglobiiniajoja varten. Testeissä kiinnitettiin erityistä huomiota alukkeiden toimivuuteen ja puhtauteen edellisissä samantyyppisissä testeissä ilmenneiden ongelmien vuoksi. Testiajoissa käytettiin näytteinä vain standardeja ja kontrolleja.

Telomeerireaktioseokset valmistettiin taulukon 2 ohjeen mukaan ja β -hemoglobiini-reaktioseokset taulukon 3 mukaisesti. Telomeeri qPCR-ajot tehtiin kuvan 8 ajo-ohjelman mukaisesti ja β -hemoglobiini ajot kuvan 9 mukaan.

Ensimmäisissä testeissä testattiin telomeeri- sekä β -hemoglobiiniajoissa tarvittavien reagenssien toimivuus. β -hemoglobiiniajoissa käytettiin valmista reaktioseosta, jonka lisäksi seokseen lisättiin vain steriiliä vettä sekä Hgb1- ja Hgb2-alukkeet. Telomeeriajoissa reaktioseos jouduttiin valmistamaan monesta eri reagenssista, kuten puskuris-

ta, MgCl₂-liuksesta, Tel1b- ja Tel2b-alukkeista sekä entsyymistä. Molempien reaktioiden seokset on esitelty sivulla 14 olevissa taulukoissa 2 ja 3.

Edellisissä telomeerijajoissa tulleiden alukedimeerien vuoksi Tel-alukkeiden toimivuus testattiin alukeparitestillä. Reaktioseos valmistettiin taulukon 2 ohjeen mukaisesti ja seos yhdistettiin eri alukeparien kanssa. Testeissä havaittiin, että Tel-alukkeet eivät toimi. Uudet alukkeet tilattiin ja testattiin. Kaikki alukepari-testissä käytetyt eri alukekombinaatiot on esitelty kuvassa 14.

Mix 1	Tel1b_1	+	Tel 2b_1
Mix 2	Tel1b_1	+	Tel 2b_2
Mix 3	Tel1b_1	+	Tel 2b_b_1
Mix 4	Tel1b_1	+	Tel 2b_b_2
Mix 5	Tel1b_1	+	Tel 2b_c_1
Mix 6	Tel1b_1	+	Tel 2b_c_2
Mix 7	Tel1b_2	+	Tel 2b_1
Mix 8	Tel1b_2	+	Tel 2b_2
Mix 9	Tel1b_2	+	Tel 2b_b_1
Mix 10	Tel1b_2	+	Tel 2b_b_2
Mix 11	Tel1b_2	+	Tel 2b_c_1
Mix 12	Tel1b_2	+	Tel 2b_c_2

Kuva 14. Alukkeiden kombinaatiot.

Kuivatut näytelevyt testattiin jotta nähtiin toimivatko kuivatut näytteet, standardit sekä kontrollit. Yhdelle kuivatuista testi-levyistä tehtiin β -hemoglobiinireaktio. Seos valmistettiin taulukon 3 ohjeen mukaan ja qPCR ajettiin kuvan 9 mukaan.

Telomeerijajoja varten valmistettiin reaktioseoksen ensimmäinen osa reaktioseoksen pipetoinnin monimutkaisuuden takia. Valmistamalla osa 1 etukäteen vähennettiin pipetoinnista johtuvaa virhettä ja säästettiin aikaa ajo-päivinä. Jokaista ajopäivää varten valmistettiin oma seos Falcon-putkiin. Myös kolme ylimääräistä seosta valmistettiin mahdollisia uusintoja varten. Seoksen osan 1 pipetointiohje on liitteenä (liite 1). Reaktioseoksen toimivuus testattiin. Reaktioseos valmistettiin taulukon 2 ja qPCR ajettiin kuvan 8 ohjeiden mukaan. Seoksen osaa 1 säilytettiin -20 °C:ssa.

3.6 β -hemoglobiini- ja telomeeri-näyteajot

Tehtiin varsinaiset näyteajot β -hemoglobiini- ja telomeerireaktioille kuivatuilla näytelevyillä. Joka päivän alussa ajoille valmistettiin reaktioseos. Seosta pipetoitiin kaikkiin levyjen kuoppiin 15 μ l. Kaikki yhden päivän levyt pipetoitiin kerralla, minkä jälkeen niitä sentrifugoitiin 10 minuutin ajan 1 000 rpm:n kierrosnopeudella. Ajot aloitettiin 1. levystä ja loput levyt laitettiin jääkaappiin odottamaan. Sulamiskäyräanalyysi tehtiin vain päivän viimeisiin ajoihin.

Näyteajot tehtiin ensin β -hemoglobiini-reaktiolle. Reaktioseos valmistettiin taulukon 3 mukaisesti. β -hemoglobiiniajojen ajo-ohjelma on esitelty kuvassa 9. Kaikkien β -hemoglobiiniajojen valmistuttua tehtiin telomeerijot. Telomeerireaktioseoksen osaan 1 pipetoitiin DTT:tä, SYBR Green I:stä, vettä sekä entsyymiä. Seos sekoitettiin hyvin ennen levyille pipetoimista. Telomeerireaktioseoksen ohje on taulukossa 2 ja reaktion ajo-ohjelma on esitelty kuvassa 8.

Molempien reaktioiden ajoista tehtiin laatukontrolli eli QC-analyysi. Ajojen PCR-tehokkuudet ja korrelaatiokertoimet kirjattiin ylös joka ajosta. Kontrolleista laskettiin CV-%, josta nähtiin ajojen laatu, tasaisuus ja toistettavuus.

3.7 Uusinta-ajot

Uusittiin levyn 22 molemmat reaktiot, koska edellisissä ajoissa standardit olivat epäluotettavia. Kuivattiin levyn 22 näytteet uudelleen Hydra96:lla ylimääräisille testilevyille, joilla oli valmiiksi kuivattuina standardit ja kontrollit. β -hemoglobiini- ja telomeerireaktioseokset valmistettiin ohjeiden mukaan. Seokset pipetoitiin levyille ja levyt ajettiin ajo-ohjelmien mukaan. Levyn 22 alkuperäisten ajojen β -hemoglobiini-tulokset sekä uusittujen ajojen telomeeri-tulokset otettiin mukaan tilastolliseen analyysiin.

4 Tulokset

4.1 Alukkeiden konsentraatiot sekä puhtausasteet

Taulukossa 7 ovat telomeeri- sekä β -hemoglobiini-alukkeiden konsentraatiot ja puhtausasteet (A_{260}/A_{280}). DNA-näytteessä ei oleteta olevan häiritseviä proteiineja, kun puhtausaste on noin 1,8.

Taulukko 7. Alukkeiden konsentraatiot ja puhtaudet NanoDropilla mitattuina. Sarakkeessa c (ng/ μ l) ovat alukkeiden mitatut konsentraatiot, sarakkeessa A_{260}/A_{280} ovat alukkeiden puhtausasteet ja sarakkeessa Laskettu c (ng/ μ l) ovat ohjeen mukaiset konsentraatiot liuotuksen jälkeen.

Alukkeen nimi	c (ng/ μ l)	A_{260}/A_{280}	Laskettu c (ng/ μ l)
Hgb1a	703,19	1,67	821,32
Hgb1b	722,73	1,66	821,32
Hgb1c	783,16	1,67	821,32
Hgb2a	653,76	1,55	685,05
Hgb2b	671,97	1,56	685,05
Hgb2c	651,95	1,55	685,05
Tel1b_a	1 160,56	1,63	1 223,96
Tel1b_b	988,29	1,63	1 223,96
Tel2b_a	996,55	1,33	1 165,52
Tel2b_b	1 001,14	1,32	1 165,52
Tel2b_b_a	811,46	1,31	1 165,52
Tel2b_b_b	1 123,39	1,32	1 165,52
Tel2b_c_a	1 511,67	1,34	1 165,51
Tel2b_c_b	354,74	1,28	1 165,51

Seuraavalla sivulla olevassa taulukossa 8 ovat toimimattomien Tel-alukkeiden tilalle tilattujen uusien Tel-alukkeiden konsentraatiot ja puhtausasteet (A_{260}/A_{280}).

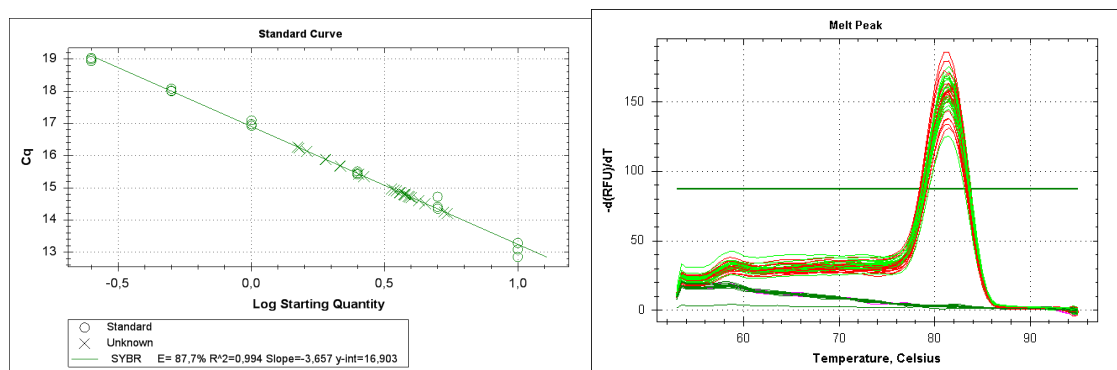
Taulukko 8. Uusien Tel-alukkeiden konsentraatiot ja puhtaudet NanoDropilla mitattuina. Sarakkeessa c (ng/μl) ovat alukkeiden mitatut konsentraatiot, sarakkeessa A₂₆₀/A₂₈₀ alukkeiden puhtausasteet ja sarakkeessa Laskettu c (ng/μl) ohjeen mukaiset konsentraatiot liuotuksen jälkeen..

Alukkeen nimi	c (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Laskettu c (ng/μl)
Tel1b	914,68	1,62	1 224,43
Tel2b_a	977,79	1,35	1 165,59
Tel2b_b	1 011,41	1,35	1 165,91
Tel2b_c	885,64	1,35	1 165,60

4.2 Reagenssitestien tulokset

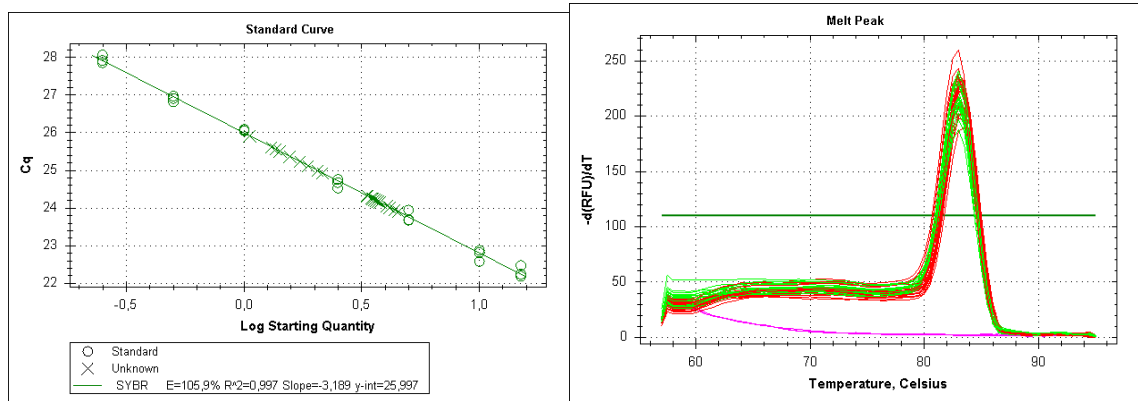
Testien tulokset analysoitiin CFX Manager 2.0 ja Microsoft Excel-ohjelmilla. Näytteet, joiden triplikaattien keskihajonta oli yli 0,5, poistettiin.

Kuvassa 15 ovat telomeerireaktion uusien alukkeiden testin standardisuora ja sulamiskäyrä, jossa ei näy negatiivisten näytteiden monistumista lainkaan. Myös standardisuora näytti hyvältä ja kontrollit olivat hyvin suoran alueella. Uusia alukkeita voidaan käyttää näyteajoihin.



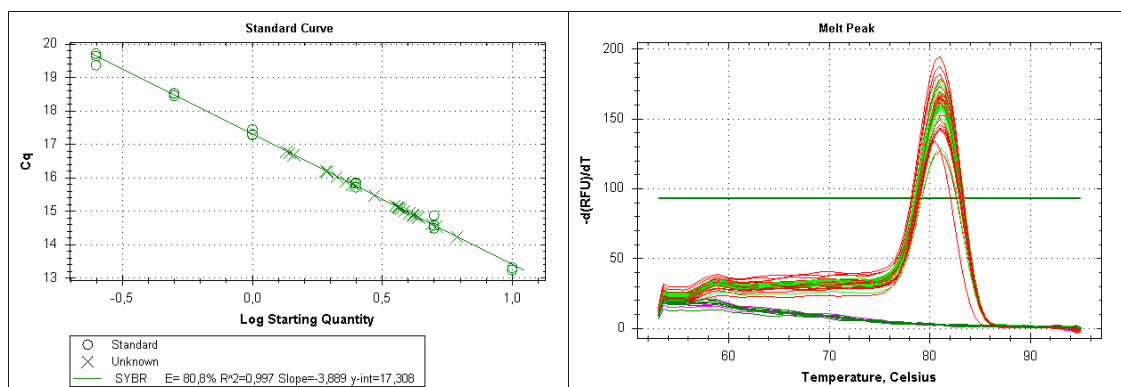
Kuva 15. Uusien Tel-alukkeiden testin standardisuora ja sulamiskäyrä. Standardit on vihreällä ja kontrollit punaisella.

Kuivattujen levyjen toimivuutta testattiin β -hemoglobiinireaktiolla. Kuvasta 16 näkee, että standardisuora on hyvä ja että kontrollit ovat hyvin suoran keskellä. Myös sulamiskäyrä näyttää hyvälle, negatiiviset näytteet ovat pohjalinjan tasossa ja kontrollit sekä standardit ovat siistinä piikkinä.



Kuva 16. Kuivattujen levyjen testin standardisuora ja sulamiskäyrä. Standardit on vihreällä ja kontrollit punaisella.

Telomeeriseoksen osa 1:n toimivuus testattiin. Kuvasta 17 voi päätellä, että seos toimii hyvin. Standardisuora on hyvä ja kontrollit ovat suoran keskellä. Oikealla olevassa sulamiskäyrässä ei ole näkyvissä negatiivisten näytteiden monistumista ja kontrollit ja standardit ovat siistinä piikkinä.



Kuva 17. Telomeerimiksi osa 1:n testiajon amplifikaatiokäyrä, standardisuora ja sulamiskäyrä. Standardit ovat merkattu vihreällä ja kontrollit punaisella.

β -hemoglobiini- ja telomeeriajosten osalta voitiin aloittaa näyteajot kaikkien testien onnistuttua.

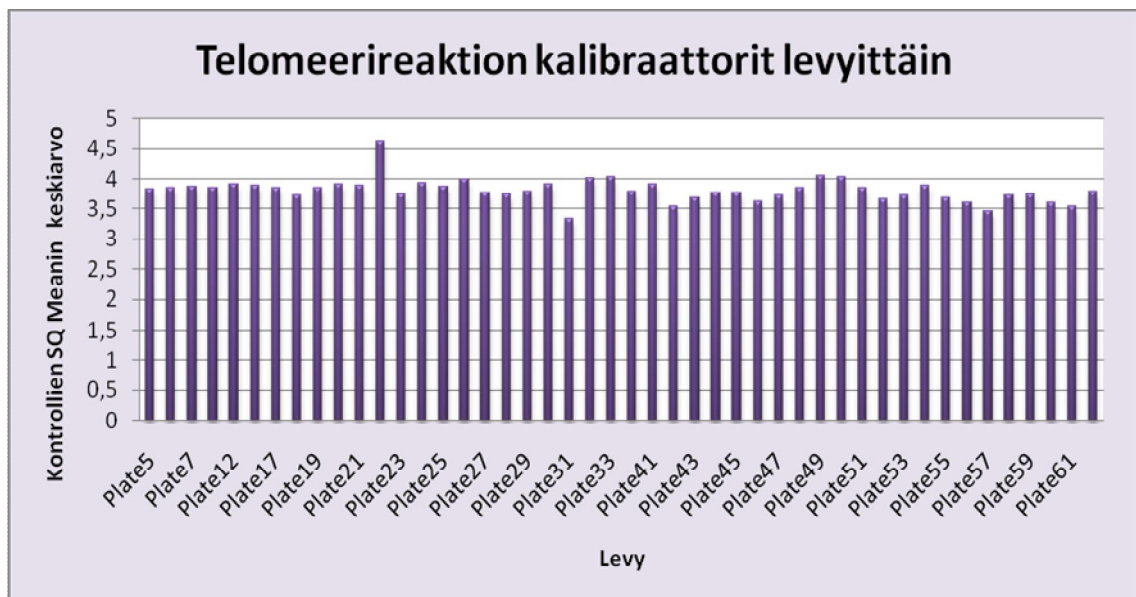
4.3 Tulosten tilastollinen analyysi

Tulosten analysoinnissa käytettiin qPCR-ohjelma CFX Manager 2.0:aa ja PASW Statistics 18:ta. Ajojen tarkastelu aloitettiin CFX Managerilla, jossa ajoihin lisättiin näytteiden nimet. Näytteet, jotka olivat standardisuoran ulkopuolella, poistettiin. Ajoista tarkastet-

tiin PCR-tehokkuus ja R^2 -arvo (eli korrelaatiokerroin) ja ne kirjattiin ajojen laatukontrolliin eli QC-analyysiin, josta kerrotaan tarkemmin luvussa 4.3.2. Kaikki standardit, kontrollit ja näytteet käytiin läpi yksitellen ja mahdolliset huonot triplikaatit poistettiin. Näytteet, joiden triplikaattien keskihajonta oli yli 0,5, poistettiin. Kontrolleista laskettiin CV-%, josta on kerrotaan luvussa 4.3.3.

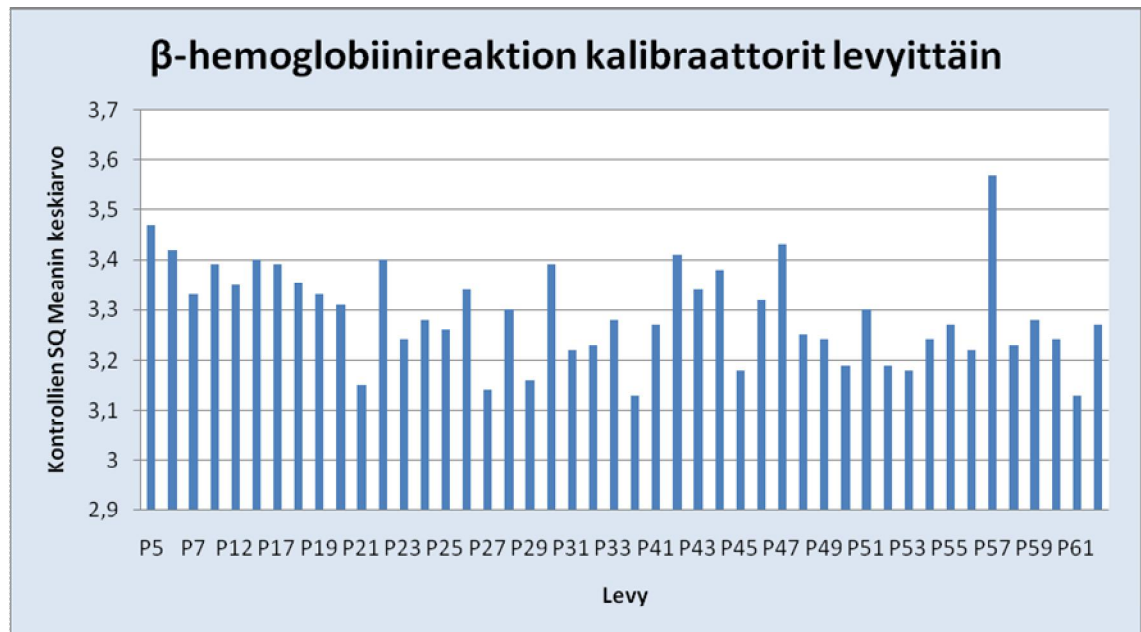
4.3.1 Näytteiden kalibrointi

Kontrolleista laskettiin näytteille levykohtaiset kalibraattorit (viiden kontrollin keskiarvo), joilla saatiin poistettua levyefekti. Telomeerireaktion kalibraattoriarvot olivat tasaisia. Keskihajonta-arvot olivat niin pieniä, ettei niitä näy kuvassa. Kalibraattoriarvot telomeerireaktiolle ovat alla olevassa kuvassa 18.



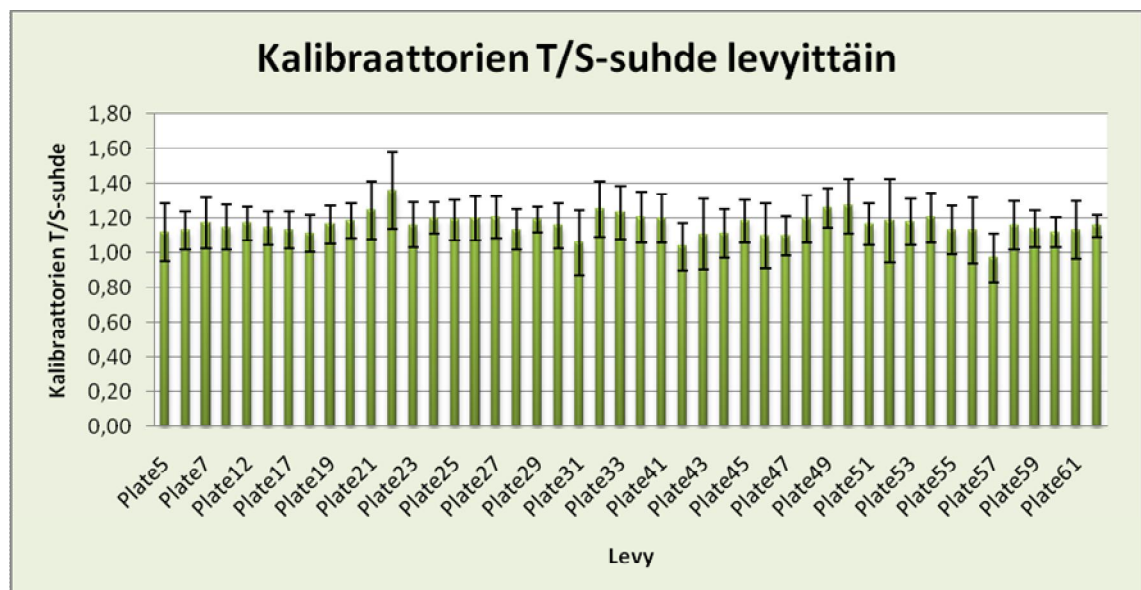
Kuva 18. Telomeerireaktion kalibraattorit levyittäin. Kalibraattorit saatiin viiden kontrollin keskiarvosta. Pylväät kuvaavat näytteiden keskiarvoa ja keskihajontaa.

β -hemoglobiinireaktion kalibraattoriarvot olivat myös tasaisia. Keskihajonta-arvot olivat niin pieniä, ettei niitä näy kuvassa. Kuvassa 19 ovat β -hemoglobiinireaktion kalibraattorit levyittäin.



Kuva 19. β-hemoglobiinireaktion kalibraattorit levyittäin. Kalibraattorit saatiin viiden kontrollin keskiarvosta. Pylväät kuvaavat näytteiden keskiarvoa ja keskihajontaa.

Alla olevassa kuvassa 20 ovat kalibraattorien T/S-suhteet levyittäin.



Kuva 20. Kalibraattorien T/S-suhteet levyittäin. Pylväät kuvaavat näytteiden keskiarvoa ja keskihajontaa.

Tarkastettiin, että uusitun levyn 22 tulokset eivät eroa muiden tulosten tasosta liikaa, jotta niitä voitiin käyttää analyyseissä. Levyn 22 telomeeri-tulosten keskiarvo erosi kaikkien levyjen tulosten keskiarvosta eniten, mutta ero ei ollut liian suuri. Levyn tulok-

sia voitiin käyttää analyyseissä. Analyyseissä käytettiin levyn 22 vanhan β -hemoglobiiniajon tuloksia ja uusitun telomeerijon tuloksia.

4.3.2 Ajojen laatukontrolli

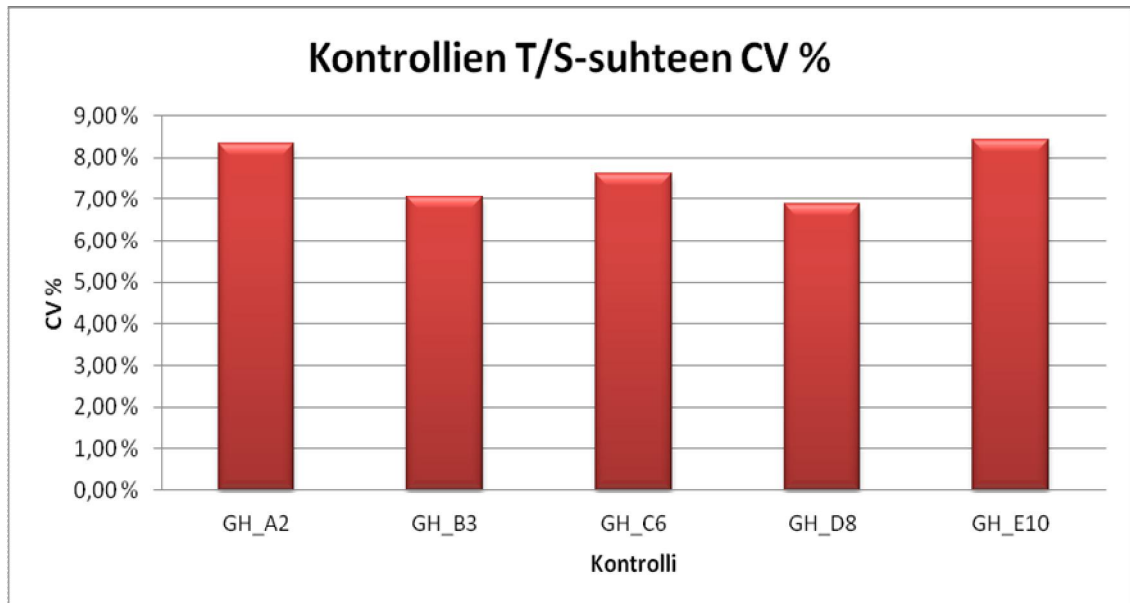
Ajoista tehtiin laatukontrolli eli QC-analyysi, johon merkittiin jokaisen levyn PCR-tehokkuus, korrelaatiokerroin (R^2) ja levyiltä poistetut näytteet sekä poistamisen syy. β -hemoglobiiniireaktion PCR-tehokkuus vaihteli välillä 86,5–100,1 %, ja keskiarvo oli 94,3 %. β -hemoglobiiniireaktion korrelaatiokerroin vaihteli välillä 0,988–0,998, ja keskiarvo oli 0,996. Tel-reaktion PCR-tehokkuus vaihteli välillä 74,8–87,6 %, ja keskiarvo oli 82,0 %. Tel-reaktion korrelaatiokerroin vaihteli välillä 0,981–0,999, ja keskiarvo oli 0,996. PCR-tehokkuudet olivat hyviä ja korrelaatiokertoimien keskiarvo oli molemmissa reaktioissa 0,996, mikä on erittäin hyvä. Taulukossa 9 on yhteenveto QC-analyysin tuloksista.

Taulukko 9. Yhteenveto QC-analyysistä. Näytteiden poistoon syynä voivat olla triplikaattien liian suuri keskihajonta ($> 0,5$), DNA:n puuttuminen, näytteet eivät standardisuoralla tai vain yhdestä triplikaatista saatiin amplifikaatiota.

		HGB	Tel	
N		4 332	4 332	
Näytteitä poistettiin		151 (3,5 %)	115 (2,7 %)	
Näytteitä jäljellä		4 181	4 217	
Kaikki levyt	E %	Keskiarvo	94,3	82,0
		Min	86,5	74,8
		Max	100,1	87,6
		Keskihajonta	2,9	3,29
	R ²	Keskiarvo	0,996	0,996
		Min	0,988	0,981
		Max	0,998	0,999
		Keskihajonta	0,002	0,003

4.3.3 CV-%

Kalibraattoreista laskettiin CV-arvot (engl. *correlation of variation*). CV-arvo kuvaa kontrollien laatua ja samankaltaisuutta. Se kertoo kuinka suurta sattumanvaraista vaihtelua tuloksissa voidaan olettaa esiintyvän levyefektin vuoksi. Laskettiin CV-% telomeeri- ja β -hemoglobiinikontrolleille erikseen sekä T/S-suhteelle. Kuvassa 21 ovat T/S-suhteen CV-%:t.

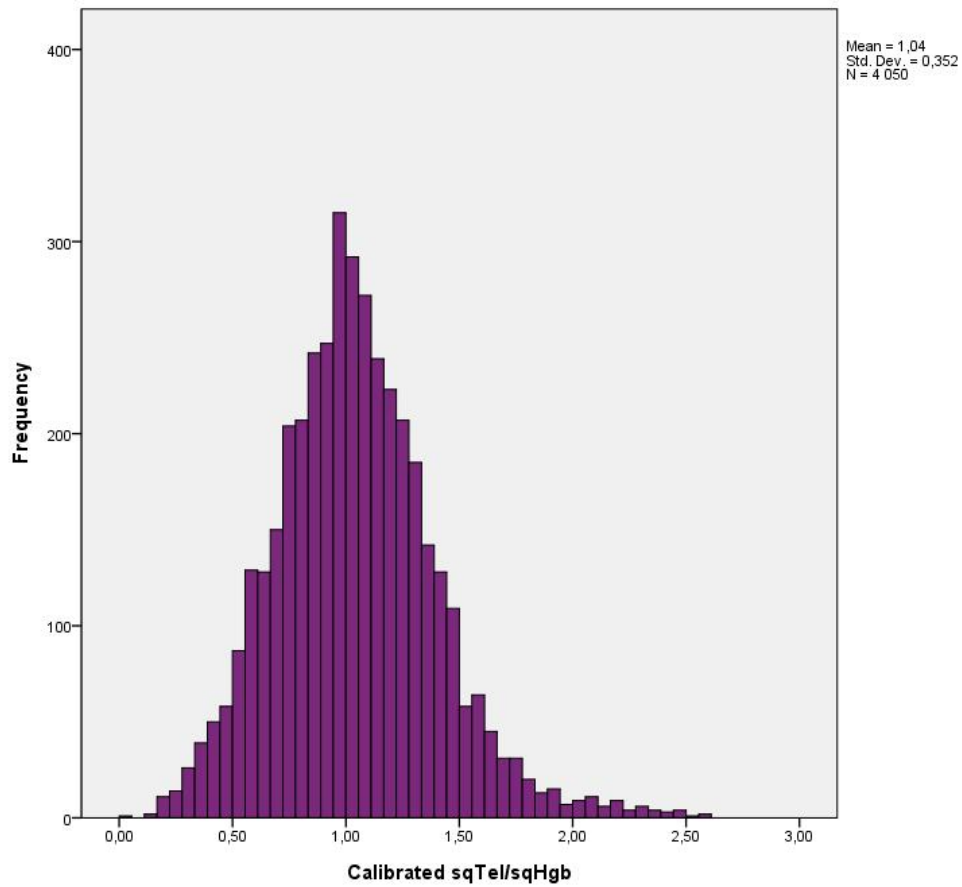


Kuva 21. Kontrollien CV%. Kaikkien kontrollien CV-% oli noin 8. Tavoitearvo on < 10 %.

Kaikkien kontrollien CV-% olivat noin 8, joka on hieman alle 10 % tavoitearvon.

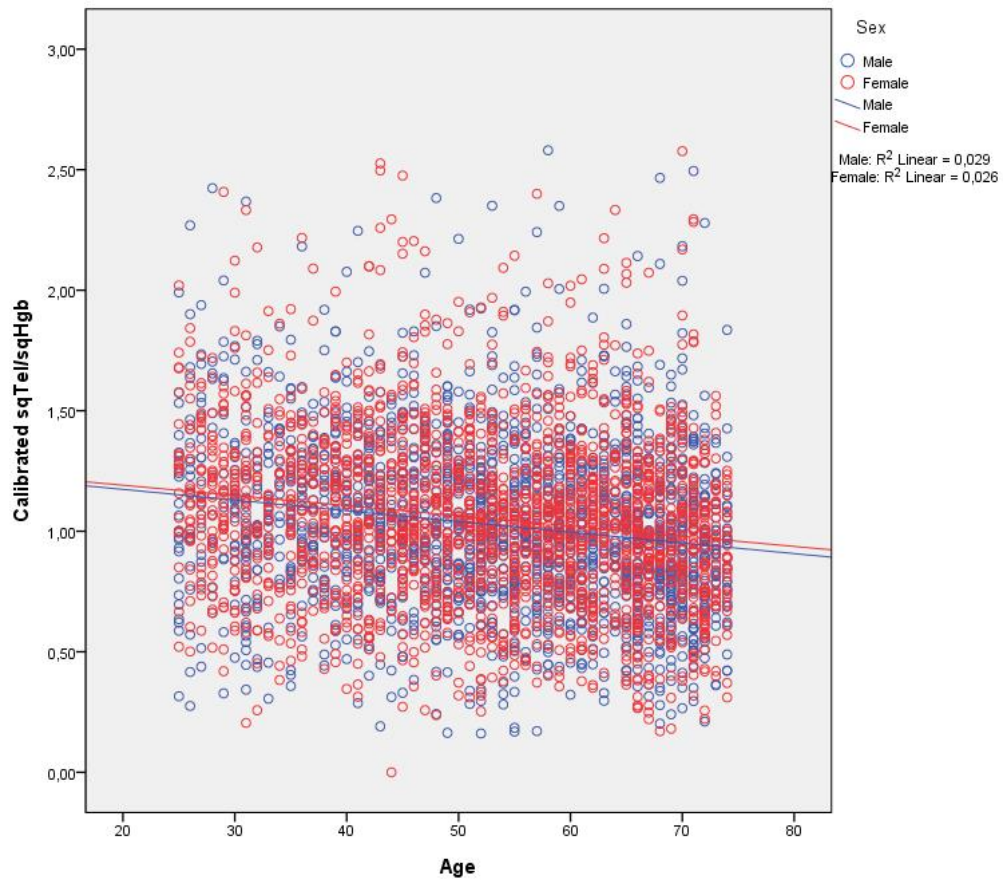
4.3.4 Näytteiden analysointi PASW-tilasto-ohjelmalla

Näytedata analysoitiin PASW Statistics -ohjelmalla, jolla yhdistettiin telomeeri- ja β -hemoglobiinitulokset samaan tiedostoon. Näytteille laskettiin T/S-suhde. Aineistosta poistettiin muista suuresti poikkeavat näytteet (engl. *outlier*). Näytteiden normaalijakautuneisuus on tarkastettu kuvassa 22.



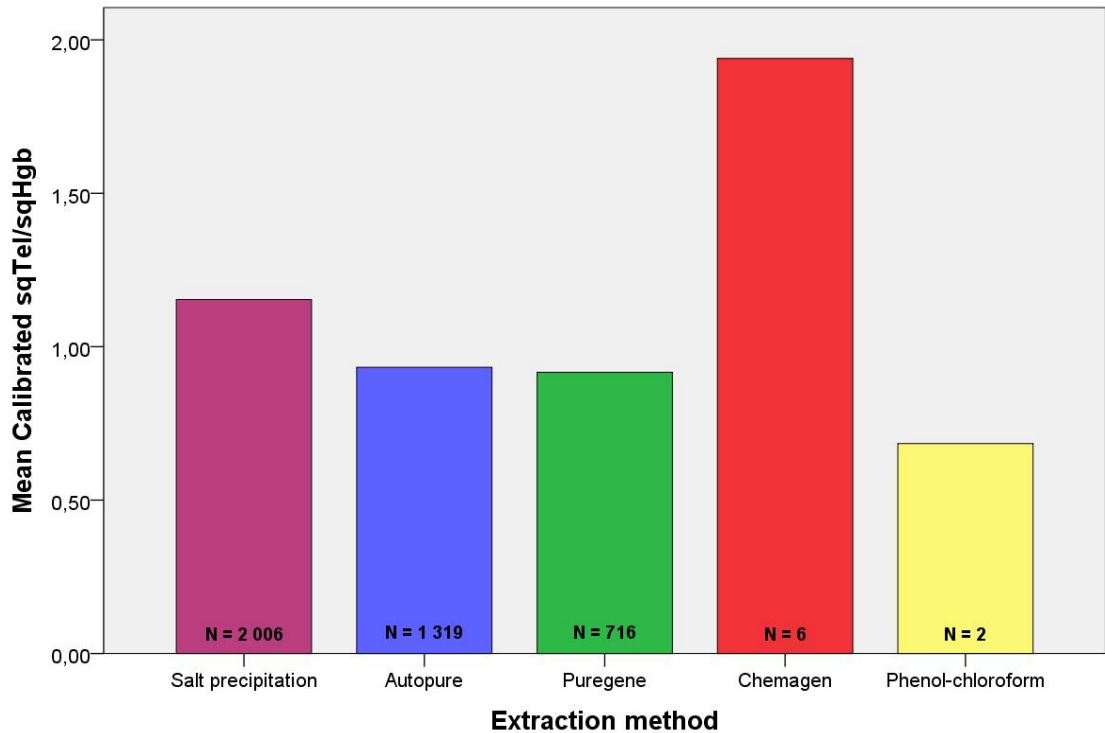
Kuva 22. Tulosten normaalijakautuneisuus. Kuvassa y-akselilla on tulosten määrä ja x-akselilla on tulosten T/S-suhde. Kuvaaja häntii hieman oikealle, mikä on normaalia biologisille aineistoille.

Sukupuolen ja iän vaikutus telomeeripituuteen on esitetty kuvassa 23. Kuvassa on huomattavissa selkeä iän negatiivinen vaikutus telomeeripituuteen; iän noustessa telomeerit ovat selkeästi keskiarvoltaan lyhyempiä verrattuna nuorempien henkilöiden telomeerien pituuteen.



Kuva 23. Tarkasteltiin iän ja sukupuolen vaikutusta telomeeripituuteen. Kuvasta voidaan päätellä iän vaikuttavan telomeerien pituuteen negatiivisesti. Sukupuolella näkyy myös olevan vaikutusta telomeeripituuteen. Punaiset pallot kuvaavat naisia ja siniset pallot miehiä. Kuvassa olevat viivat kertovat telomeeripituuden keskiarvon miehillä (sininen viiva) ja naisilla (punainen viiva).

DNA:n eristysmenetelmän suhde telomeeripituuteen on esitetty kuvassa 24. Kuvasta nähdään eristysmenetelmällä olevan huomattava merkitys telomeeripituuteen. Chemagen-menetelmällä on saatu muita menetelmiä huomattavasti pidemmät telomeeritulokset, vaikkakin Chemagen-menetelmän N-luku on pieni ($N = 6$).



Kuva 24. Eristysmenetelmän vaikutus telomeeripituuteen. Chemagen menetelmällä on saatu selvästi pidemmät telomeeri-tulokset kuin muilla menetelmillä. x-akselilla on eristys menetelmä ja y-akselilla on telomeeripituuden keskiarvo.

Alla olevassa taulukossa 10 on esitetty iän, sukupuolen ja DNA:n eristysmenetelmän merkittävyydet suhteelliseen telomeeripituuteen.

Taulukko 10. Katsottiin iän, sukupuolen ja eristysmenetelmän merkittävyydet telomeeripituuteen.

Malli	Standardoimattomat muuttujat		Standardoidut muuttujat	t	Merkitsevyys
	B	Keskivirhe	Beta		
1 (Vakio)	1,480	0,030		49,559	0
Ikä	-0,005	0,000	-0,179	-12,037	8,218E-33
Sukupuoli	0,021	0,010	0,030	2,007	0,045
Eristysmenetelmä	-0,133	0,007	-0,290	-19,528	3,156E-81

Taulukosta 10 nähdään iän vaikuttavan selvästi telomeerien pituuteen ($p = 8,22 \cdot 10^{-33}$) negatiivisesti, eli siten, että telomeeripituus lyhenee ikääntyessä. Sukupuoli vaikuttaa myös, mutta ei yhtä merkitsevästi kuin ikä (merkitsevyys $p = 0,045$). Miehillä oli lyhyempi telomeeripituus kuin naisilla. Sukupuolen merkitsevyys on vain $p = 0,045$, joka on juuri tilastollisen merkitsevyysrajan $p = 0,05$ alapuolella. DNA:n eristysmenetelmä vaikuttaa erittäin merkitsevästi telomeeripituuteen $p = 3,16 \cdot 10^{-81}$.

FINRISKI-tutkimuksen yhteydessä tutkittavilta henkilöiltä kerättiin fenotyyppisiä kyselykaavakkeen avulla. Kerätyistä fenotyyppitiedoista tässä työssä analysoitiin vapaa-ajan liikunnan rasittavuutta, BMI-arvoja ja tupakointitietoja. BMI-arvo eli painoindeksi (engl. *body mass index*) on mitta-arvo, jonka avulla voidaan arvioida ihmisen pituuden ja painon suhdetta. Painoindeksi lasketaan jakamalla paino pituuden neliöllä. Tässä työssä BMI-arvot on jaettu seuraaviin luokkiin: sairaalloisesti alipainoisten BMI on pienempi kuin 16; Alipainoisten BMI on 16,00–18,49; normaalipainoisten BMI on 18,50–24,99; ylipainoisten BMI on 25,00–39,99 ja sairaalloisesti ylipainoisten BMI on suurempi kuin 40.

Taulukossa 11 ovat vapaa-ajan liikunnan rasittavuuden, BMI-arvojen ja tupakoinnin merkittävyydet suhteelliseen telomeeripituuteen. Vapaa-ajan liikunnan rasittavuus ($p = 0,040$) sekä BMI-arvo ($p = 0,003$) vaikuttavat merkitsevästi suhteelliseen telomeeripituuteen. Tupakoinnilla ei havaittu merkitsevää yhteyttä telomeeripituuteen ($p = 0,501$).

Taulukko 11. Vapaa-ajan liikunnan rasittavuuden, BMI:n ja tupakoinnin merkittävyydet suhteelliseen telomeeripituuteen.

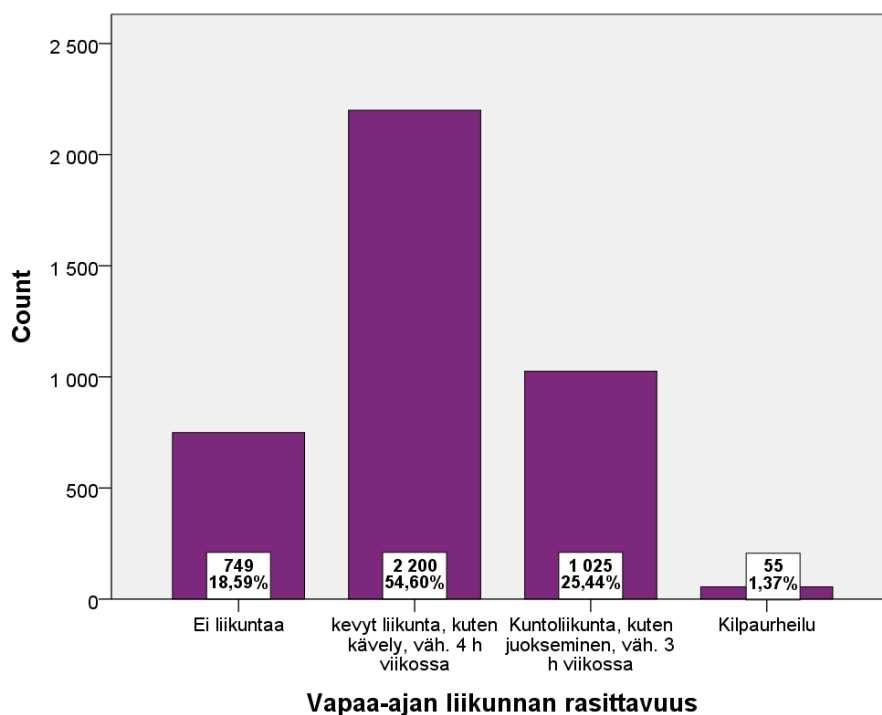
Malli	Standardoimattomat muuttujat		Standardoidut muuttujat	t	Merkitsevyys
	B	Keskivirhe	Beta		
1 (Vakio)	1,109	0,042		26,319	0
Vapaa-ajan liikunnan rasittavuus	0,017	0,008	0,034	2,051	0,040
BMI	-0,004	0,001	-0,049	-3,018	0,003
Tupakointi	-0,003	0,005	-0,011	-0,673	0,501

Taulukossa 12 on vapaa-ajan liikunnan rasittavuuden, BMI-arvojen ja tupakoinnin merkittävyydet suhteelliseen telomeeripituuteen sukupuolittain jaoteltuina. Miehillä vain vapaa-ajan liikunnan rasittavuus on merkitsevä ($p = 0,035$) telomeeripituuden kannalta kun taas naisilla vain BMI-arvo on merkitsevä ($p = 0,014$).

Taulukko 12. Vapaa-ajan liikunnan rasittavuuden, BMI:n ja tupakoinnin merkittävyydet suhteelliseen telomeeripituuteen sukupuolittain.

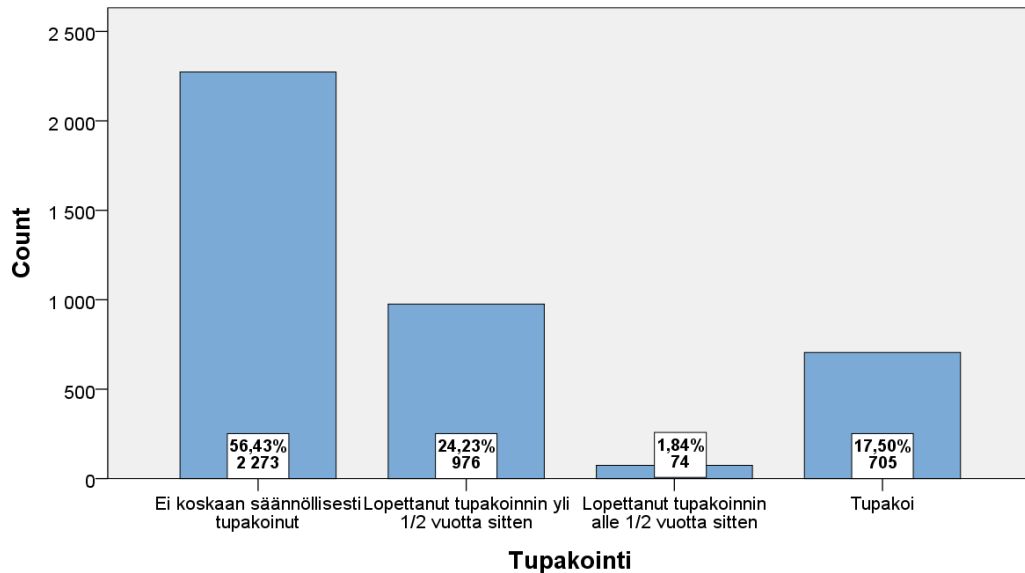
Sukupuoli	Malli	Standardoimattomat muuttujat		Standardoidut muuttujat	t	Merkitsevyys
		B	Keskivirhe	Beta		
Mies	1 (Vakio)	1,059	0,068		15,685	0
	Vapaa-ajan liikunnan rasittavuus	0,024	0,012	0,051	2,107	0,035
	BMI	-0,003	0,002	-0,037	-1,550	0,121
	Tupakointi	0,000	0,007	-0,001	-0,052	0,958
Nainen	1 (Vakio)	1,131	0,055		20,482	0
	Vapaa-ajan liikunnan rasittavuus	0,012	0,012	0,023	1,029	0,304
	BMI	-0,004	0,001	-0,055	-2,454	0,014
	Tupakointi	-0,002	0,007	-0,006	-0,254	0,799

Alla olevassa kuvassa 25 ovat vapaa-ajan liikunnan rasittavuuden eri kategorioiden määrät sekä prosenttiosuudet koko aineistosta.



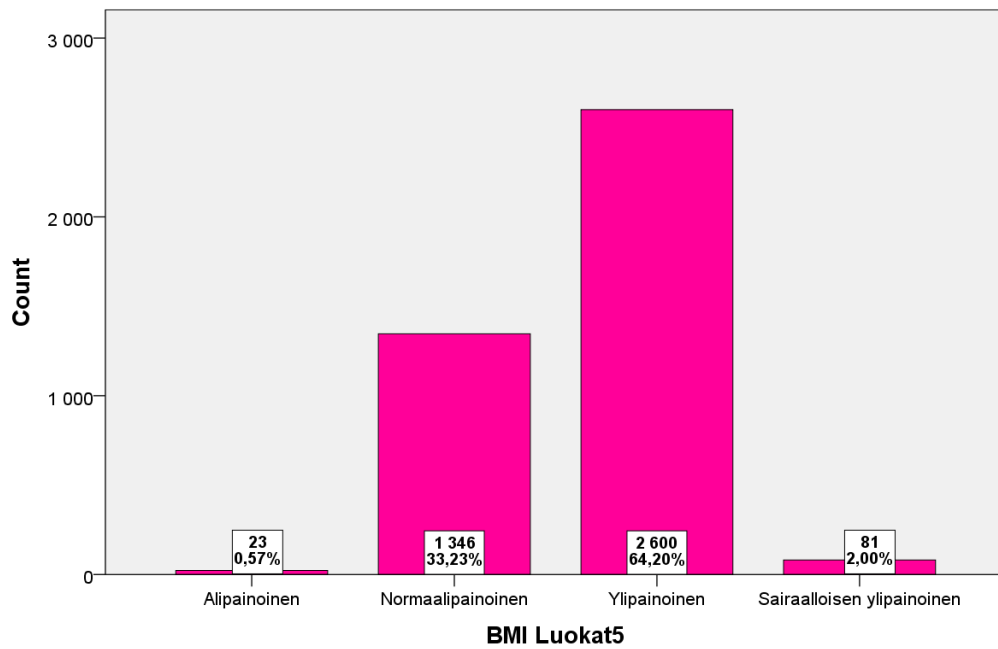
Kuva 25. Vapaa-ajan liikunnan rasittavuuden eri kategorioiden (ei liikuntaa, kevyt liikunta, kuntoliikunta ja kilpaurheilu) määrät ja prosenttiosuudet koko aineistosta. Y-akselilla on kuhunkin kategoriaan kuuluvien henkilöiden lukumäärä.

Kuvassa 26 on tupakointi-tietojen eri kategorioiden määrät sekä prosenttiosuudet koko aineistosta. Suurin osa aineiston tutkittavista henkilöistä harrastaa vapaa-ajallaan kevyttä liikuntaa, eikä tupakoi.



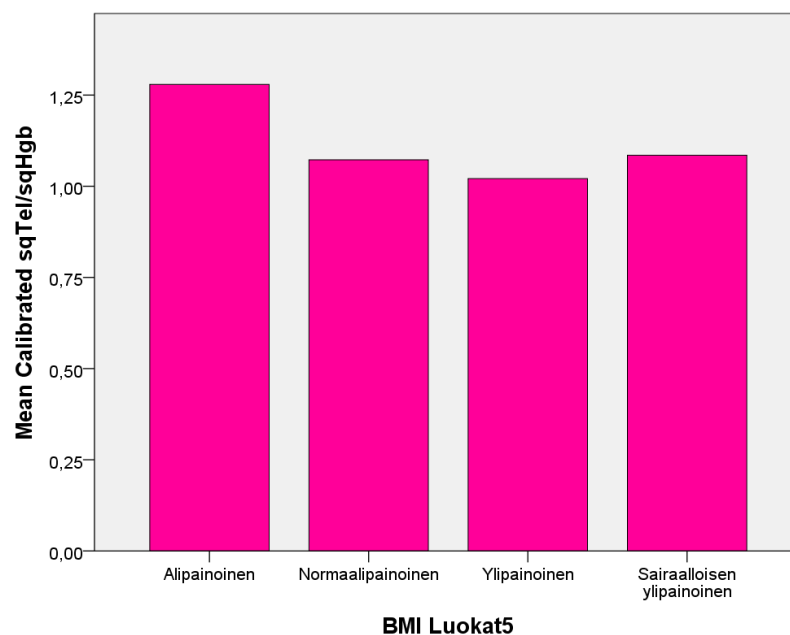
Kuva 26. Tupakoimattomien, tupakoinnin lopettaneiden ja tupakoivien määrät ja prosenttiosuudet koko aineistosta. Y-akselilla on kuhunkin kategoriaan kuuluvien henkilöiden lukumäärä.

Seuraavalla sivulla olevassa kuvassa 27 on BMI-luokkien eri kategorioiden määrät sekä prosenttiosuudet koko aineistosta. Suurin osa (64,20 %) aineiston tutkittavista on ylipainoisia, joiden BMI-arvo on 25,00 – 39,99. BMI-arvo tosin ei kerro todellista tilaa henkilön fyysisestä kunnosta tai rasvakudoksen määrästä. Tässä aineistossa ei ole yhtään sairaalloisesti alipainoista ja ylipainoisten osuus on suuri.



Kuva 27. BMI-arvojen eri kategorioiden (Sairaalloisesti alipainoinen BMI: < 16; Alipainoinen BMI: 16,00 - 18,49; normaalipainoinen BMI: 18,50 - 24,99; ylipainoinen BMI: 25,00 - 39,99 ja sairaalloisesti ylipainoinen BMI: > 40) määrät ja prosenttiosuudet koko aineistosta. Y-akselilla on kuhunkin kategoriaan kuuluvien henkilöiden lukumäärä.

Kuvassa 28 ovat BMI-luokat suhteessa telomeeripituuteen. Vapaa-ajan liikunnan rasittavuuden ja tupakoinnin suhteen eri kategoriat olivat tasaisia, mutta BMI-arvojen eri kategorioista alipainoisilla näyttäisi olevan pidemmät telomeerit kuin muilla.



Kuva 28. BMI-luokkien eri kategorioiden suhteet telomeeripituuteen. Y-akselilla on suhteellinen telomeeripituus ja x-akselilla on BMI-luokat 2 -5. Luokan 1 BMI-arvoja (BMI < 16) ei ollut aineistossa. Kuvan perusteella alipainoisilla on pisimmät telomeerit.

5 Yhteenveto

Tässä työssä määritettiin suhteellista telomeeripituutta DILGOM-aineiston DNA-näytteistä, jotka oli eristetty verestä. DNA-näytteet kuivattiin optisille 384-levyille. Telomeeri- ja β -hemoglobiinireaktioiden reagenssit optimoitiin. Näytteiden telomeeri- ja β -hemoglobiini-qPCR-ajojen jälkeen näytteet analysoitiin qPCR-ohjelmalla (CFX Manager 2.0) ja kalibroitiin kontrollien avulla levyefektin poistamiseksi. Kalibraattorit saatiin viiden kontrollin keskiarvosta. Kalibroiduista arvoista laskettiin näytteille T/S-suhde eli suhteellinen telomeeripituus.

Tilastollisissa analyyseissä todettiin iän ja sukupuolen vaikuttavan merkitsevästi suhteelliseen telomeeripituuteen. Tämän työn perusteella iän merkittävyys telomeeripituuteen ($p = 8,22 * 10^{-33}$) on suurempi kuin sukupuolen ($p = 0,045$). Iällä ja sukupuolella tiedetään olevan merkitystä suhteelliseen telomeeripituuteen aiempien tutkimusten perusteella [18.]. Iän tiedetään vaikuttavan telomeeripituuteen negatiivisesti eli lyhentävästi, joka todettiin myös tässä työssä. Joissakin seurantatutkimuksissa on tosin havaittu sellaisilla henkilöillä, joilla telomeerit ovat olleet keskimääräistä lyhyemmät, telomeerien pidentymistä. Myös se tiedetään että miehillä on lyhyemmät telomeerit kuin naisilla, mikä todettiin tässäkin työssä.

DNA:n eristysmenetelmällä on todella vahva vaikutus telomeeripituuteen ($p = 3,16 * 10^{-81}$). Miehillä DNA:n eristysmenetelmän merkitsevyys telomeeripituuteen oli $p = 8,10 * 10^{-37}$ ja naisilla $p = 3,36 * 10^{-46}$. Naisilla DNA:n eristysmenetelmä oli siis merkittävämpi kuin miehillä. Työssä käytettiin viittä eri menetelmää DNA:n eristämiseksi ja niistä yhdellä, Chemagen-menetelmällä, saatiin huomattavasti suuremmat tulokset kuin muilla menetelmillä, vaikkakin niiden henkilöiden lukumäärä, joiden DNA eristettiin Chemagen-menetelmällä oli pieni ($N = 6$). Myöhemmissä telomeeri-määrityksissä olisi-kin viisasta käyttää kaikille näytteille samaa DNA:n eristysmenetelmää.

Tupakoinnin merkitsevyyttä telomeeripituuteen ei tässä työssä pystytty todistamaan ($p = 0,501$), vaikka tupakoinnin on aiemmin havaittu vaikuttavan telomeeripituuteen muissa tutkimuksissa. Vapaa-ajan liikunnan rasittavuuden ($p = 0,040$) sekä BMI-arvon merkitsevyys ($p = 0,003$) telomeeripituuteen todettiin. Naisilla vapaa-ajan liikunnan rasittavuus ei ollut merkitsevä ($p = 0,304$), mutta miehillä oli ($p = 0,035$). BMI-arvon

merkitsevyys telomeeripituuteen naisilla oli merkitsevä ($p = 0,014$) kun taas miehillä ei ($p = 0,121$). Tämän työn perusteella liikunta ($p = 0,040$) sekä BMI-arvot ($p = 0,003$) olivat merkittäviä muuttujia telomeeripituuden kannalta. Elintapojen ja liikuntatottumusten uskotaan vaikuttavan telomeeripituuteen, ja tässä työssä saadut tulokset tukevat tätä väitettä. Väitettä tukee BMI-arvon ja vapaa-ajan liikunnan rasittavuuden merkittävyys, mutta toisaalta tupakoinnin ei todettu olevan merkitsevä tekijä telomeeripituuteen.

Työssä käytetty qPCR-menetelmä suhteellisen telomeeripituuden määrittämiseksi on hyvä ja käytännöllinen menetelmä. Se soveltuu suurien aineistojen määrittäisiin hyvin, mutta siinä on pieniä ongelmia, jotka pitäisi ratkaista. Esimerkiksi levyefektin poistamistapaa voisi parantaa. β -hemoglobiinireaktio toimii todennäköisesti joka kerta hyvin, mutta telomeerireaktion toteutusta voisi vielä kehittää. Telomeerireaktio on hyvin herkkä toimimaan ja juuri siinä ongelmat useimmiten tulevat. β -hemoglobiinireaktion reaktioseos on kaupallinen seos, johon tarvitsee lisätä vain alukkeet ja vesi, kun taas telomeerireaktion reaktioseokseen pipetoidaan montaa eri reagenssia. Vaihtelut telomeerireaktiossa saattavat johtua esimerkiksi pipetoinnista johtuvasta hajonnasta.

THL jatkaa DILGOM-projektia analysoimalla FINRISKI-tutkimuksen yhteydessä kerättyjä fenotyypitietoja ja tässä työssä määritettyjä suhteellisia telomeripituuksia. DILGOM-projektin tuloksia voidaan myös verrata tutkimusryhmän edellisiin samalla metodilla tehtyihin telomeeripituuden määrittäisiin ja yrittää parantaa levyefektin poistotapaa.

Lähteet

- [1] Laura Kananen ym. 2010. Childhood Adversities Are Associated with Shorter Telomere Length at Adult Age both in Individuals with an Anxiety Disorder and Controls. *PLoS ONE*, Volume 5, Issue 5, s. 1-7.
- [2] Uusivirta, Sanna. 2008. Väriaineet pipetoinnin apuna qPCR tekniikassa. Opinnäytetyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Järvenpää 2008.
- [3] Huzen, J. ym. 2010. Telomere length and psychological well-being in patients with chronic heart failure. *Age and Ageing* 2010, s. 1–5.
- [4] Fyhrquist, Frej & Saijonmaa, Outi. 2007. Telomeerit ja vanheneminen. *Duodecim*, Volume 123, s. 1961-1971.
- [5] Gil, Marcel & Coetzer, Thérèse L. 2004. Real-Time Quantitative PCR of Telomere Length. *Molecular Biotechnology*, Volume 27, s. 169-172.
- [6] Targeting telomeres and cancer for dummies. 2011. *The science creative quarterly*. Verkkodokumentti. Saatavilla: <http://www.scq.ubc.ca/targeting-telomeres-and-cancer-for-dummi%D3%99s/>. Viitattu: 25.7.2011.
- [7] FINRISKI 2007 -tutkimus: Suomi syö aiempaa terveellisemmin, mutta liikaa. 2007. *Kansanterveys*. Verkkodokumentti. Saatavissa: http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet_2007/nro_10_2007/finriski_2007_tutkimus__suomi_syo_aiempaa_terveellisemmin__mutta_liikaa/. Viitattu: 29.6.2011.
- [8] Kevään FINRISKI-tutkimuksella tuoretta tietoa riskitekijätasoista. 2002. *Kansanterveys*. Verkkodokumentti. Saatavissa: http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet_2002/2_2002/kevaan_finriski-tutkimuksella_tuoretta_tietoa_riskitekijatasoista/. Viitattu: 29.6.2011.
- [9] Behlke M. A. ym. 2005. Fluorescence and Fluorescence Applications. Verkkodokumentti. Saatavissa: http://eu.idtdna.com/Support/Technical/TechnicalBulletinPDF/Fluorescence_and_Fluorescence_Applications.pdf. Viitattu 16.6.2011.
- [10] Nobelprize.org. 2011. The Fluorescence Microscope. Verkkodokumentti. Saatavilla: <http://nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/index.html>. Viitattu 25.7.2011
- [11] Gene LinkTM. Ei päiväystä. Fluorescence Moleculer Probes. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://www.genelink.com/Literature/ps/PG-MB-Ver3.2.pdf>. Viitattu 16.6.2011.

- [12] Bustin, S. A. 2004. *A - Z f Quantitative PCR*. California: International University Line.
- [13] Dorak, M. T. 2009. Real-Time PCR. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>. Viitattu: 24.6.2011.
- [14] PREMIER Biosoft International. 2008. Molecular Beacons. Verkkodokumentti. Saatavissa: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/molecular_beacons.html. Viitattu 16.6.2011.
- [15] Applied Biosystems. Ei päiväystä. TaqMan® and SYBR® Green Chemistries. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>. Viitattu: 17.6.2011.
- [16] Kubista, M. ym. 2006. The Real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 27, No. 2-3. Verkkolehti. Saatavissa: <http://www.gene-quantification.de/kubista-qpcr-review-mam-2006.pdf>. Viitattu 16.6.2011.
- [17] Suomen akatemia. 2007. DILGOM. Verkkodokumentti. Saatavissa: <http://193.167.96.163/fi/A/Tiedeyhteiskunnassa/Tutkimusohjelmat/kaynnissa/ELVIRA/Hankkeet/DILGOM/>. Viitattu: 30.6.2011.
- [18] Bartlett, John M.S. & Stirling, David. 2003. *PCR protocols*, second edition. New Jersey: Humana Press Inc.
- [19] Humphreys, Janice ym. 2011. Telomere Shortening in Formerly Abused and Never Abused Women. *Biological Research For Nursing*. published online 8 March 2011. Saatavilla: <http://brn.sagepub.com/content/early/2011/03/07/1099800411398479>. Viitattu: 5.7.2011.

Telomeerireaktiomiksin osan 1 pipetointiohje

Telomeeriseoksen osan 1 valmistusohje

Seos:	1x	Yhden päivän seos (x ajoja / päivä)	Iso osa 1 seos	Pipetoi yhteeseen Falcon-putkeen
10x AmpliTaqGold Buffer II	1.500	3 456,0	44 928	3 168,0
MgCl ₂ (25 mM)	0,900	2 073,6	26 957	1 900,8
dNTPs (25 mM)	0,120	276,5	3 594	253,4
Tel1b alue (100 µM)	0,041	94,5	1 228	86,6
Tel2b alue (100 µM)	0,135	311,0	4 044	285,1
DMSO (100%, Sigma, RT)	0,150	345,6	4 493	316,8
H ₂ O (Fluka) osa 1	1,910	4 400,6	57 208	4 033,9
Osa 1 YHTEENSA			142 452	10 045
DTT (1 M, Sigma)	0,075			158
SYBR Green I (luote 11000 Järvenkoski H ₂ O:ssa, RT)	0,300			634
AmpliTaqGold 5 U / µl entsyymi	0,075			158
H ₂ O (Fluka) osa 2	9,795			20 687
DNA (5 ng/µl)	Kuivattu			Kuivattu
YHTEENSA	15,001			31 682
qPCR-ajo-ohjelma				Osa 1 ilman vettä
95 C, 10 min				6 010,8
95 C 15 s				
54 C 2 min	25x			
+ fluoresenssin luku				
Sulamiskäyräanalyysi (Vain päivän viimeiseen ajoon)				
Aika ~ 1 h 40 min / 2 h 5 min				

qPCR Tel-ajo
päiviä yhteensä: 13

qPCR Tel-ajojia
päivässä: 5

Osa 1 jaetaan 2 osaan, jolta saadaan DMSO ja Buffer lisättyä ja sekoitettua hyvin.

Yht.

I MgCl₂, dNTPS ja alukkeet 35 822,6 µl, jaetaan: 17 911,3 µl / Falcon-putki

II + Buffer 44 928,0 µl lisätään: 22 464,0 µl / Falcon-putki

III + DMSO 4 492,8 µl lisätään: 2 246,4 µl / Falcon-putki

1. Pipetoi osan 1 vedet (4 034 µl) Falcon-putkiin.

2. Pipetoi MgCl₂, dNTP:t ja alukkeet yhteen, sekoita hyvin.

3. Jaa seos kahteen Falcon-putkeen ja lisää DMSO ja puskuri.

4. Sekoita hyvin ja pipetoi seosta 6 011 µl Falcon-putkiin, joissa vesi jo vaimina.

5. Pakasta.

Huomi Sällytä osaa 1 pakkasessa -20°C!

Lisää osan 2 reagenssit päivittäin osaan 1 ennen reaktioseoksen pipetointia levyille.