

Vesa Aalto

Genomisen DNA:n eristäminen vanhoista plasma- ja seeruminäytteistä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

15.11.2014

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Vesa Aalto Genomisen DNA:n eristäminen vanhoista plasma- ja seeruminäytteistä</p> <p>29 sivua + 3 liitettä 15.11.2014</p>
<p>Tutkinto</p>	<p>Laboratorioanalyttikko (AMK)</p>
<p>Koulutusohjelma</p>	<p>Laboratorioala</p>
<p>Ohjaajat</p>	<p>Laboratoriopäällikkö Päivi Laiho Lehtori Tiina Soininen</p>
<p>Opinnäytetyö suoritettiin THL:n ja FIMM:n yhteisen Biopankin tiloissa Biomedicum tutkimuskeskuksessa keväällä 2014. Tarkoituksena oli selvittää, voiko vanhoista plasma- ja seeruminäytteistä eristää tutkimuskelpoista DNA:ta. Näytteitä oli käytössä 120 kpl, 60 seerumiputkea ja 60 plasmaputkea. Näytteet oli kerätty aikavälillä 3 - 9.10.1975.</p> <p>Plasma- ja seeruminäytteissä ei lähtökohtaisesti ole suuria määriä DNA:ta, sillä veren eri osien erotteluvaiheessa suurin osa valkosoluista painuu pohjalle ja erottuu siten plasmasta ja seerumista. Tämä opinnäytetyö perustuu oletukseen, että plasman ja seerumin sekaan on jäänyt valkosoluja, joista DNA:ta on mahdollista eristää riittävä määrä jatkotutkimuksia varten.</p> <p>DNA:n eristämistä varten valittiin kaksi eri kittiä; PerkinElmerin chemagic circulating NA 4k H12 VD130612 -kitti ja Zymo Researchin ZR Serum DNA Kit™ -kitti. ZR -kitti hyödyntää silikahelmiä DNA:n eristyksessä ja chemagic-kitti magneettipartikkeleita. Chemagic-eristyksen suorittaa tehtävään tarkoitettu robotti, ZR -protokolla tehdään käsin.</p> <p>DNA:n konsentraatio mitattiin NanoDrop-spektrofotometrillä. Kaksijuosteisen DNA:n konsentraatio varmennettiin vielä PicoGreen-protokollalla PHERAStar-luminometrillä. Kun mittaukset oli suoritettu, näytteille tehtiin ID-PCR 96-kuoppalevyllä G-storm -koneella.</p> <p>PCR:n jälkeen näytteet lähetettiin THL:n sekvensointilaboratorioon, missä niille tehtiin fragmenttianalyysi. Fragmenttianalyysissä näytteille tehtiin elektroforeesi ABI3730xl DNA Analyzerillä, minkä jälkeen tulokset analysoitiin GeneMapper® -ohjelmalla. Tuloksia tarkasteltiin lisäksi SEX-PCR -menetelmällä ja agarosigeelielektroforeesilla.</p> <p>Tulokset olivat negatiivisia: DNA:ta saatiin kyllä eristettyä, mutta niin pieniä määriä, että eristys ja jatkokäsittely ei ole koko aineistolle mielekäästä.</p>	
<p>Avainsanat</p>	<p>seerumi, DNA, valkosolut, veri</p>

Author Title	Vesa Aalto Extraction of genomic DNA from old plasma and serum samples
Number of Pages Date	29 pages + 3 appendices 15 November 2014
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Päivi Laiho, Head of Laboratory Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>This thesis was conducted at THL/FIMM Biobank facilities in the Biomedicum research centre in spring 2014. The aim of the study was to discover a valid method to extract DNA from old plasma and serum samples for further research use. There were 120 samples, 60 serum tubes and 60 plasma tubes. Samples had been collected in 3 - 9 October 1975.</p> <p>By default, plasma and serum do not contain significant amount of DNA due to the blood separation protocol. When separation of blood cells and plasma/serum occurs, white blood cells tend to sink to the bottom of the vial and become absent in liquid plasma/serum. This thesis is based on a hypothesis that there is enough white blood cells remaining in plasma and serum to extract a viable amount of DNA.</p> <p>Two different kits were chosen for extracting DNA: PerkinElmer's chemagic circulating NA 4k H12 CD130612 kit and Zymo Research's ZR Serum DNA Kit™. The ZR kit is based on binding DNA to silica beads and then eluting it manually. The Chemagic kit in turn binds DNA to magnetic particles in robot-assisted extraction.</p> <p>The concentration of DNA was measured with a NanoDrop spectrophotometer. The concentration of double-stranded DNA was confirmed with a PicoGreen protocol using a PHERAStar luminometer. After concentration measurements ID-PCR was carried out with 96 -well plates using G-storm thermocycler.</p> <p>After PCR, samples were sent to THL's sequencing laboratory unit for fragment analysis. In fragment analysis, electrophoresis was carried out with an ABI3730xl DNA Analyzer. Results were analyzed with the GeneMapper® computer program. In addition, results were analyzed with the SEX-PCR protocol and agarose gel electrophoresis.</p> <p>In conclusion, the results were mostly negative. There were small amounts of DNA, but the amounts were not high enough to make it feasible to extract and further analyse the rest of the samples.</p>	
Keywords	serum, DNA, white blood cells, blood

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Veri, plasma ja seerumi	2
2.2	DNA:n eristysmenetelmien vertailu	3
2.3	DNA:n laadun tutkiminen	5
2.3.1	Spektrofotometrinen mittaus	5
2.3.2	Luminometrinen mittaus	6
2.4	DNA:n monistaminen ja kvantitointi	7
2.4.1	ID-PCR ja fragmenttianalyysi	7
2.4.2	SEX-PCR ja AGE	8
3	Työn toteutus	9
3.1	DNA-eristykset	9
3.1.1	ZR -kitillä käsin suoritettu eristys	9
3.1.2	Chemagic-kitillä robotilla suoritettu eristys	10
3.2	Spektrofotometrinen ja luminometrinen mittaus	11
3.3	PCR-reaktiot	12
4	Tulokset ja niiden tulkinta	17
4.1	NanoDrop-mittausten tulokset	17
4.2	PheraStar-mittausten tulokset	21
4.3	PCR-analyysien tulokset	25
5	Yhteenveto	27
	Lähteet	28

Liitteet

Liite 1. Standardi, kontrolli ja seerumi. PheraStar-mittaus 10.4.2014

Liite 2. Plasma. Pherastar-mittaus 17.4.2014

Liite 3. Standardi, kontrolli ja seerumi. PheraStar-mittaus 17.4.2014

Lyhenteet

AGE	Agaroosigeelielektroforeesi
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
dsDNA	Kaksijuosteinen deoksiribonukleiinihappo
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo
FIMM	Suomen molekyyli lääketieteen instituutti
ID-PCR	Identifikaatiopolymeraasiketjureaktio
MIBI	Meilahti Integrated Biobank Infrastructure, Meilahden biopankki- infrastrukturi
MSM I	Magnetic Separation Module I
PCR	Polymeraasiketjureaktio
SEX-PCR	Sukupuolen määrittämiseen käytetty polymeraasiketjureaktio
ssDNA	Yksijuosteinen deoksiribonukleiinihappo
THL	Terveyden ja hyvinvoinnin laitos

1 Johdanto

Opinnäytetyö suoritettiin THL:n ja FIMM:n yhteisessä Biopankki-laboratoriossa, jossa muun muassa eristetään ja käsitellään jatkotutkimuksia varten DNA:ta eri tutkimuksissa kerätyistä biologisista näytteistä. Biopankin tehtävänä on muun muassa väestön terveyden edistäminen, tautimekanismeihin vaikuttavien tekijöiden tunnistaminen, sairauksien ehkäisy, väestön hyvinvointia ja terveyttä edistävien tuotteiden kehittäminen sekä sairaanhoidossa käytettävien tuotteiden ja hoitokäytäntöjen kehittäminen.^[1] Biopankki sijaitsee Biomedicum tutkimuskeskuksessa Helsingin Meilahdessa.

Plasmassa ja seerumissa ei pitäisi olla DNA:ta lainkaan, sillä veressä oleva DNA sijaitsee valkosoluissa, mitkä poistetaan plasmaa ja seerumia valmistettaessa. Näytteisiin on kuitenkin voinut jäädä vähäisiä määriä valkosoluja. Koska tässä työssä tutkittavat näytteet eivät enää ikänsä puolesta sovellu muuhun analytiikkaan, päätettiin yrittää DNA:n eristämistä. Näytteet ovat myös tutkimusmielessä arvokkaita, sillä ne on otettu lähes neljäkymmentä vuotta sitten ihmisiltä, jotka ovat sittemmin osallistuneet muihinkin tutkimuksiin, joissa heidän elintapojaan ja sairauksiaan on seurattu. Osallistujista on myös runsaasti tietoa erilaisissa viranomaisrekistereissä. DNA:sta voisi löytyä muutoksia, jotka selittävät alttiutta sairastua eri kansantauteihin. Näistä syistä oli tärkeää saada eristettyä muistakin vanhoista varastoiduista verinäytteistä DNA; niiden hyöty tutkimuksille voisi olla arvaamattoman suuri.

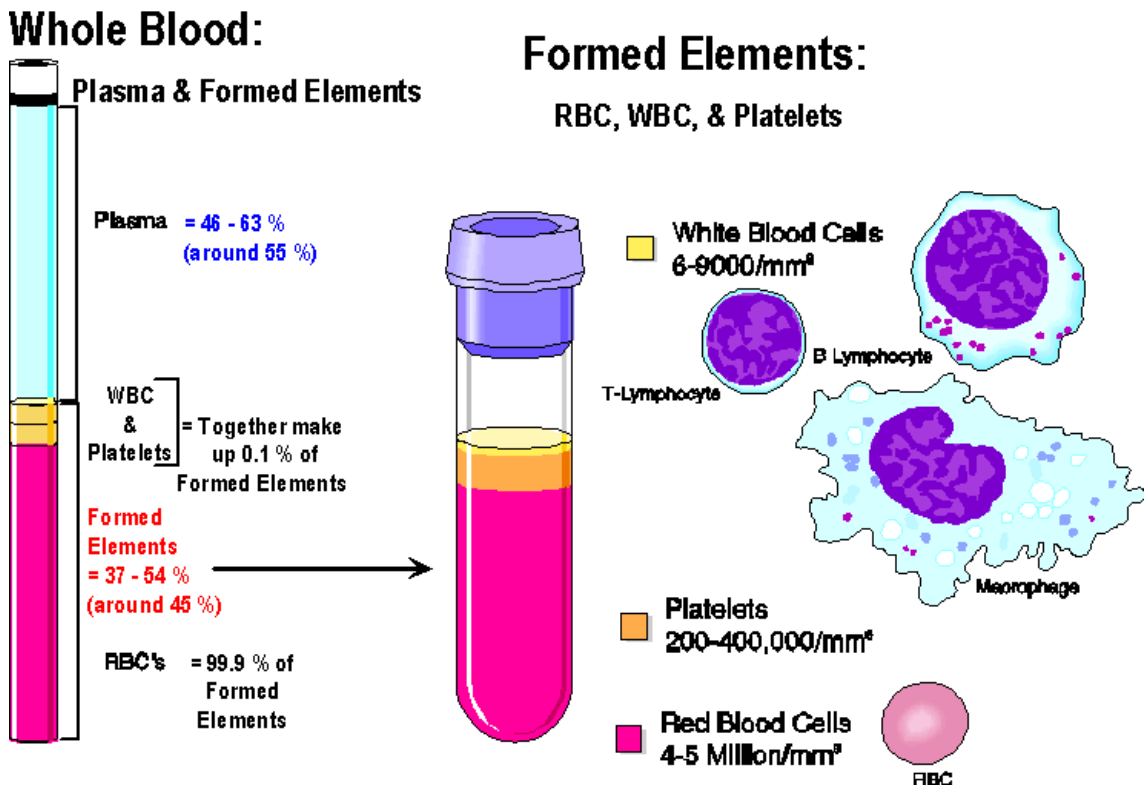
Eristyksen tulos selvitettiin useammalla eri mittausmenetelmällä, järjestyksessä spektrofotometrinen mittaus NanoDrop-spektrofotometrillä, luminesenssimittaus PHERAS-tar-luminometrillä, ID-PCR G-Stormilla, fragmenttianalyysi ABI3730xl DNA Analyzerilla ja agarosigeelielektroforeesilla. NanoDrop-mittaus tehtiin, jotta nähtiin onko DNA:ta tai mitään muutakaan eluoitunut, PHERAS-tarilla nähtiin spesifisemmin kaksijuosteisen DNA:n määrä ja ID-PCR valmisti näytteen fragmenttianalyysiä varten. Sillä selviää, onko PCR onnistunut ja voidaanko näytteitä käyttää jatkossa esimerkiksi genotyypaukseen. SEX-PCR –menetelmää käytettiin vahvistamaan tuloksia. Agarosigeelielektroforeesia käytettiin fragmenttianalyysin ja SEX-PCR:n tuloksia selventävänä analyysinä.

Opinnäytetyön tavoitteena on saada eristettyä vuonna 1975 kerätyistä plasma- ja seeruminäytteistä tutkimuskelpoista DNA:ta.

2 Teoria

2.1 Veri, plasma ja seerumi

Veri koostuu neljästä eri komponentista: punasoluista, verihiutaleista ja valkosoluista (noin 45 % kokonaistilavuudesta) ja plasmasta (noin 55 % kokonaistilavuudesta). Punasolujen eli erytrosyyttien tehtävä on kuljettaa happea keuhkoista muualle kehoon ja tuoda hiilidioksidia takaisin uloshengitettäväksi. Verihiutaleet eli trombosyytit ovat pieniä, värittömiä solunpalasia jotka osallistuvat yhdessä koagulanttiproteiinien kanssa veren hyydyttämiseen verenvuodossa. Valkosolut eli leukosyytit ovat osa immuunipuolustusjärjestelmää ja kulkevat veren mukana ympäri kehoa tuhoten viruksia ja bakteereita tai aktivoiden immuunijärjestelmän muita osia, joita näkyy kuvassa 1. [2]



Kuva 1. Veren eri osia. [3]

Plasma sisältää 92 % vettä. Lisäksi löytyy albumiinia (muodostaa pääosan proteiineista), fibrinogeeniä (osaltaan hyydyttää verta) ja globuliineja (esimerkiksi vasta-aineet). Plasmalla on useita tärkeitä tehtäviä kuten verenpaineen ylläpitäminen, vitamiinien ja hormonien kuljettaminen kehossa sekä sopivan pH:n säätelyminen. Plasma säilyy vuoden ajan pakastuksessa.^[4]

Plasma saadaan erotettua verestä sentrifugoimalla veri antikoagulantin (esim. EDTA) läsnä ollessa, jolloin solut painuvat pohjalle mutta plasma ja kaikki sen osat jäävät pinnalle, josta se on helppo kerätä talteen. Seerumi, joka on plasmaa ilman hyytymistekijöitä, voidaan erottaa antamalla veren hyytyä putkessa ja sentrifugoimalla putki sen jälkeen. Näin hyytymistekijät jäävät verisolujen joukkoon.

2.2 DNA:n eristysmenetelmien vertailu

Zymo Research ZR Serum DNA Kit™ perustuu ZymoBeads™ -silikahelmien käyttöön. Aluksi näytteessä olevat solut lyysataan, minkä jälkeen DNA adsorboituu silikahelmiin. Ne muodostavat kompleksin, joka voidaan erottaa muusta aineesta sentrifugoimalla (kuva 2). Siten DNA voidaan pestä ja myöhemmin eluoida kompleksista suoraan eluutiopuskuriin.



Kuva 2. ZR Kitin toimintaperiaate.^[5]

PerkinElmerin chemagic circulating NA 4k H12 VD130612 kitin ja muiden magneettivusteiseen eristykseen perustuvien protokollien periaatteena on eristää robotilla plasmasta ja seerumista sekä solunsisäistä että vapaana kulkevaa DNA:ta magneetin avustuksella. Aluksi solut lyysataan, jotta saadaan solunsisäinen DNA mukaan eristykseen. Tämän jälkeen DNA sitoutetaan magneettipartikkeleihin, jolloin kone pystyy liikuttelemaan sitä magneettisauvoilla pesuliuksien kautta eluutioliukseen. DNA erotetaan magneettipartikkeleista eluutioliukseen, minkä jälkeen se on valmis jatkokäsittelyä varten. ^[6]

Eristysrobotina Biopankissa toimii Chemagenin chemagic MSM I (kuva 3), automaattiseen nukleiinihappojen puhdistukseen kehitetty laite. Laitteen näytekapasiteettia voidaan muuttaa vaihtamalla magneettisauvapäitä. Vaihtoehdot ovat 12 sauvaa, 24 sauvaa ja 96 sauvaa. Biopankissa käytetään 12 sauvan päätä, kuten myös tässä opinnäytetyössä. Näytemäärät voivat olla 10 µl – 10 ml. ^[7]



Kuva 3. Chemagic MSM I –eristysrobotti. Näytekalkka ja reagenssit vasemmalla, valkoinen magneettisauvapää keskellä ja näyttöpäätte oikealla ^[8].

2.3 DNA:n laadun tutkiminen

2.3.1 Spektrofotometrinen mitta

DNA:n spektrofotometrinen mittaus suoritetaan, jotta nähdään onko eristys onnistunut ja voiko DNA:ta käyttää esimerkiksi PCR:ään. Spektrofotometrisessä mittauksessa seurataan kahta arvoa, DNA:n kokonaismäärää ja puhtautta (A260/A280 -suhdeluku). DNA absorboi UV-valoa hyvin tehokkaasti, ja sen tyypillisillä emäksillä absorptiomaksimi on 260 nm. ^[9]

Mittaus suoritettiin NanoDrop[®] ND-1000 UV/Vis-spektrofotometrillä. NanoDrop ND-1000 on täyden spektrin (220 – 750 nm) spektrofotometri, joka pystyy analysoimaan hyvin pieniä määriä näytteitä (tässä työssä 1,5 µl). Näyte pipetoidaan alustalle, jonka päälle lasketaan varsi. Valonlähteenä toimii sykäyksittäin xenon-lamppu, ja spektrofotometri analysoi valon sen kuljettua näytteen läpi. NanoDropiin on kytketty kannettava tietokone, jossa tulokset näkyvät suoraan. ^[10]



Kuva 4. NanoDrop[®] ND-1000 UV/Vis-spektrofotometri ^[11].

2.3.2 Luminometrinen mittaus

Spektrofotometri mittaa herkästi myös proteiineja, suoloja ja muita epäpuhtauksia. Luminometri puolestaan mittaa pääosin kaksijuosteista DNA:ta yhdistettynä fluoresoivaan, kaksijuosteiselle DNA:lle spesifiseen leimaan. Leimaukselle on useita vaihtoehtoja, mutta tässä työssä käytettiin Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent -leimaa. Vaikka PicoGreen ei ole täysin spesifinen dsDNA:lle, se kuitenkin fluoresoi yli 1000-kertaisella voimakkuudella kaksijuosteisessa DNA:ssa yksijuosteiseen DNA:han tai RNA:han verrattuna. PicoGreen voi kvantitoida 25 pg/ml dsDNA-pitoisuuksia fluorometrillä tai 250 pg/ml mikrolevyjen fluoresenssilukijalla. ^[12]

Mittauslaitteena käytettiin PHERAstar FS-luminometria (kuva 5), joka lukee näytteitä mikrolevyiltä. Laite mittaa näytteen fluoresenssin intensiteetin ja antaa datan suoraan tietokoneelle.



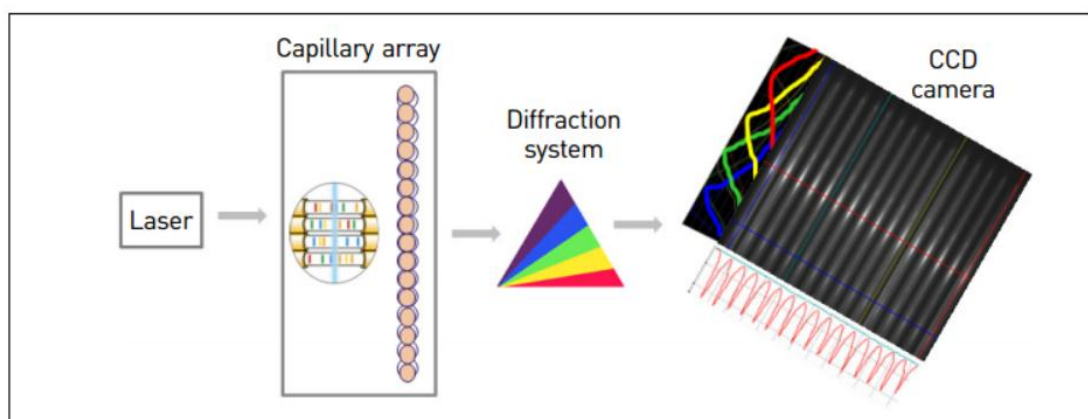
Kuva 5. PHERAstar FS-luminometri ^[13].

2.4 DNA:n monistaminen ja kvantitointi

2.4.1 ID-PCR ja fragmenttianalyysi

ID-PCR on menetelmä, jolla yleensä määritetään DNA-näytteestä henkilön DNA-sormenjälki. Se soveltuu myös hyvin henkilön sukupuolen määrittämiseen, mahdollisen kontaminaation toteamiseen sekä DNA-näytteiden PCR-kelpoisuuden testaamiseen. ID-PCR on 6-plex PCR-reaktio, eli siinä käytetään 6 fluoresoivaa primerparia. Tuotteet analysoidaan kapillaarielektroforeesilla. Menetelmä perustuu 6 mikrosatelliittimarkkerin tutkimiseen, joista 3 on autosomaalisia ja 3 sijaitsee sukupuolikromosomeissa; 2 X-kromosomissa ja 1 Y-kromosomissa. X- ja Y -kromosomeissa olevien markkereiden perusteella saadaan selville näytteenantajan sukupuoli, kun taas esimerkiksi sukulaissuhteita voidaan arvioida mikrosatelliittimarkkereilla. ^[14] Paneelin avulla voidaan myös kohtalaisen luotettavasti tunnistaa yksilö ja arvioida sukulaissuhteita.

Fragmenttianalyysi on kapillaarielektroforeesiin perustuva tekniikka, joka erottelee ionisoituneet fragmentit niiden koon perusteella. DNA-fragmentit injektoidaan kapillaariin elektrokinettisellä injektioilla PCR-tuotteesta tehdystä liuoksesta. Elektrokinettisessä injektiossa näytteelle annettu vahva sähkövirta muuttaa fragmentit negatiivisesti varautuneiksi ja pakottaa ne kapillaariin kulkemaan positiivista elektrodia kohti. Matkalla elektrodia kohti kokonsa perusteella erotetut fragmentit kulkevat lasersäteiden läpi, joka saa fragmentteihin kiinnitetyn leiman fluoresoimaan. Leiman signaalit erotellaan diffraktiolla ja kamera detektoi fluoresenssin, joka muutetaan digitaaliseksi dataksi jatkoanalysointia varten. Tekniikka on kuvassa 6.



Kuva 6. Kapillaarielektroforeesin toimintaperiaate. ^[15]

2.4.2 SEX-PCR ja AGE

SEX-PCR on Biopankin laadunvalvontaan käyttämä PCR-tekniikka, joka paljastaa näytteen antajan sukupuolen. PCR-menetelmä monistaa sukupuolikromosomeissa olevia sekvenssejä, jolloin geelillä näkyy joko 1 tuote (nainen) tai 2 tuotetta (mies), jos PCR on onnistunut. Tässä opinnäytetyössä SEX-PCR:ää käytettiin toteamaan PCR:n onnistuminen. PCR-tulokset analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla, jolloin voitiin todeta, ovatko näytteet jatkokäsittelykelppoisia vai eivät.

3 Työn toteutus

3.1 DNA-eristykset

Päätettiin, että 60:sta seeruminäytteestä tehdään 36 kpl robotilla ja 24 kpl käsin. Samoin tehtiin plasmanäytteiden kohdalla.

3.1.1 ZR -kitillä käsin suoritettu eristys

Tehtiin siis 24 kpl seerumeita ja 24 kpl plasmanäytteitä ZR -kitillä ^[5]. Seeruminäytteen määrä on 3 ml, joten lisätään lyysispuskuria suhteessa 4:1 → 12 ml. Plasmanäytteen määrä taas on 1,5 ml, joten lyysispuskuria tulee 6 ml. Jokaiseen näytteeseen lisätään 10 µl hyvin vorteksoituja ZymoBeads™ -silikahelmiä. Kitin ohjeissa mainitaan myös mahdollisuus lisätä tässä vaiheessa isopropanolia 0,3 -kertainen määrä näytemäärää kohti, jotta kaikki solujen ulkopuolinen DNA saadaan saostumaan. Tässä opinnäytetyössä ollaan kuitenkin kiinnostuneempia mahdollisesta solunsisäisestä DNA:sta, joten isopropanolia ei lisätty. Näytteitä inkuboitiin 2 h huoneenlämmössä välillä sekoittaen.

Inkuboinnin lakattua putkia sentrifugoitiin 1 min 2500 x g:n nopeudella. Supernatantti kaadettiin pois ja putkeen lisättiin 500 µl DNA:n pesuliuosta. Pelletti resuspensoitiin ja siirrettiin eppendorf-putkeen. Sentrifugoitiin putkea 1 min 2500 x g ja kaadettiin supernatantti pois. Lisättiin uudestaan 500 µl pesuliuosta ja sentrifugoitiin kuten edellä. Poistettiin supernatantti huolellisesti ja ilmakeivattiin pellettiä 15 min. Lisättiin 20 µl eluutiopuskuria ja resuspensoitiin pelletti. Sentrifugoitiin 10 000 x g 1 min ja kerättiin supernatantti talteen.

3.1.2 Chemagic-kitillä robotilla suoritettu eristys

Eristettiin 36 kpl seerumeita ja 36 kpl plasmoja. Kittiin kuuluvia esivalmisteluja oli Proteinaasi K:n liuottaminen laboratorioveteen ja Poly(A) RNA:n liuottaminen Poly(A) RNA -puskuriin. Eristys aloitettiin asettamalla robottiin muovikärjet (12 kpl), pesuliuokset 3 (12 kpl putkia á 3 ml liuosta) ja 4 (12 x 2 kpl á 3 ml) sekä eluutiopuskuri (12 kpl á 60 µl) 50 ml:n falconputkiin, jotka asetettiin metallikehikkoihin.

12 kpl näytteitä laitettiin 50 ml:n falconputkiin ja niihin lisättiin 3 ml lyysispuskuria, 50 µl proteinaasi K:ta ja 10 µl PolyA RNA -puskuria. Näytteet vorteksoitiin ja niitä inkuboitiin 30 min 60 °C:ssa lämpökaapissa. Näytteisiin lisättiin 100 µl magneettipartikkeleita ja 10 ml sitoutuspuskuria. Asetettiin kaikki metallikehikot robotin näytekehikkoon seuraavassa järjestyksessä:

1. Muovikärjet
2. Näytteet
3. Pesupuskuri 3
4. Pesupuskuri 4
5. Pesupuskuri 4
6. Eluutiopuskuri

Käynnistettiin eristysohjelma, odoteltiin noin 2 h ja kerättiin näytteet eppendorf-putkiin sen jälkeen, kun niistä oli erotettu mahdolliset magneettipartikkelijäämät.

3.2 Spektrofotometrinen ja luminometrinen mittaus

Näytteiden annettiin tasaantua ja liueta jääkaapissa yön yli, minkä jälkeen aloitettiin DNA:n konsentraation mittaus NanoDropilla ja PheraStarilla. NanoDrop-mittauksessa spektrofotometriin pipetoitiin 1,5 µl juuri sekoitettua näytettä kerrallaan ja blankkina käytettiin eluutiopuskuria.

PheraStar-mittaus tehtiin PicoGreen-protokollalla (Life Technologies Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent, Lot # 1394804) 96-kuoppalevyllä. Standardisuora (taulukko 1) oli valmiina, joten aloitettiin pipetoimalla levyllä 98 µl TE-puskuria per kuoppa. Kuoppiin lisättiin tämän jälkeen 2 µl DNA:ta. Pipetoitiin standardisuora (100 µl per kuoppa) ja lisättiin kaivoihin 100 µl juuri valmistettua PicoGreen-liuosta. Sekoitettiin ja fuugattiin levy. Mitattiin levy PheraStarilla ja syötettiin tulokset Exceliin ja laskettiin ne Plate_conc -makrolla.

Taulukko 1. PicoGreen-standardisuoran valmistus ja pitoisuudet

1 x TE	Lambda DNA (2 ng/µl)	Konsentraatio putkessa (ng/µl)	Konsentraatio mittauksessa le- vyllä (ng/µl)
1000 µl	0 µl	0	0
995 µl	5 µl	0,01	0,005
975 µl	25 µl	0,05	0,025
950 µl	50 µl	0,1	0,05
875 µl	125 µl	0,25	0,125
750 µl	250 µl	0,5	0,25
500 µl	500 µl	1	0,5
0 µl	1000 µl	2	1

3.3 PCR-reaktiot

ID-PCR reaktiota varten valittiin aluksi 10 seeruminäytettä, joissa oli suurin määrä DNA:ta. Tehtiin niille PCR ja fragmenttianalyysiin valmistavat toimenpiteet ohjeiden mukaisesti ^[14] ja lähetettiin PCR-levy fragmenttianalyysiin. ID-PCR tehtiin lisäksi kymmenelle plasmanäytteelle, ja samaan analyysiin laitettiin myös edellisessä reaktiossa epäonnistuneet seeruminäytteet. PCR-koneena toimi kaikissa reaktioissa G-Storm neljällä levy paikalla.

ID-PCR:ssä käytetyt reagenssit:

- Qiagen MgCl₂ 25 mM, Lot # 131057734
- 10x PCR Buffer, Applied Biosystems, Lot # M13037
- AmpliTaq Gold™ 1000 U 5 U/ml, Applied Biosystems, Lot # M14718
- Valmiit dNTP mix ja Primer mix (sisältää primerit SRY-F, SRY-R, GDB371492-F, GDB371492-R, HTR2C-SNP1-F, HTR2C-SNP1-R, DXS1220-F, DXS1220-R, D20S448-F, D20S448-R (T7-hännällä), AC00818_1-F, AC00818_1-R)

Fragmenttianalyysin valmistelussa käytettyjä reagensseja:

- AB Applied Biosystems GeneScan™ - 500 Liz™ Size Standard, Lot # 0702066
- AB Hi-Di™ Formamide, Lot # 0907854

Kun reaktion mastermix oli saatu pipetoitua taulukon 2 mukaisesti, pipetoitiin se 8-kanavaisella pipetillä 96-kuoppalevyllä. Tämän jälkeen pipetoitiin jokaiseen kaivoon 2 µl DNA:ta. Suoritettiin näytteille ID-PCR taulukon 3 ohjelman mukaisesti ja valmisteltiin näytteet fragmenttianalyysiin.

Taulukko 2. ID-PCR -reaktion pipetointitaulukko

Reagenssi	Kantaliuos	1x –seos (µl)	100x –seos (µl)	Lopullinen konsentraatio
10x puskuri	10x	1	100	1,00x
dNTP	2,00 mM	0,5	50	100,00 µM
MgCl ₂	25,00 mM	0,3	30	0,75 mM
dH ₂ O	-	4,98	498,00	-
A-TaqGold	5,00 U/µl	0,05	5,00	0,25 U
PrimerMix	-	1,17	117	
DNA	5,00 ng/µl	2	-	10,00 ng

Taulukko 3. ID-PCR -ohjelma

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1	95	12 min
2	95	30 s
3	63	30 s
	- 1.0 C per kierro	
4	Mene vaiheeseen 2	4 kertaa
5	95	30 s
6	58	30 s
	- 0.5 C per kierro	
7	72	30 s
8	Mene vaiheeseen 5	14 kertaa
9	95	30 s
10	50	30 s
11	70	30 s
12	Mene vaiheeseen 9	13 kertaa
13	72	6 min
14	10	∞

Kun negatiiviset tulokset fragmenttianalysistä saapuivat, todettiin että tehdään varmistava SEX-PCR reaktion onnistumisen varmistamiseksi. SEX-PCR:ään valittiin 20 näyttettä; kaikkein eniten DNA:ta sisältävät 10 plasmaa ja 10 seerumia.

SEX-PCR:ssä käytettiin samoja reagensseja kuin ID-PCR:ssä, mutta primereitä on vain 2 paria: SRY-F, SRY-R, HTR2C-F ja HTR2C-R.

Taulukossa 4 kuvataan SEX-PCR -reaktioon pipetoituja reagenssimääriä. DNA:n konsentraatio on tässä vaiheessa tuplattu ID-PCR -reaktiosta, jotta saataisiin edes jotain näkyviin geelillä. Taulukossa 5 on kuvattu SEX-PCR -ohjelma.

Taulukko 4. SEX-PCR -reaktion pipetointitaulukko

Reagenssi	Kantaliuos	1x –seos (µl)	40x –seos (µl)	Lopullinen konsentraatio
10x puskuri	10x	1,5	60,00	1,00x
dNTP	2,00 mM	0,5	60,00	200,00 µM
MgCl ₂	25,00 mM	0,9	36,00	1,5 mM
dH ₂ O	-	8,34	333,60	-
A-TaqGold	5,00 U/µl	0,16	6,40	0,80 U
PrimerMix	-	0,60	24	
DNA	2,50 ng/µl	2	-	20,00 ng

Taulukko 5. SEX-PCR -ohjelma

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1	95	11 min
2	95	30 s
3	65	1 min
	- 1.0 C per kierto	
4	Mene vaiheeseen 2	4 kertaa
5	95	30 s
6	60	30 s
	- 0.5 C per kierto	
7	72	30 s
8	Mene vaiheeseen 5	14 kertaa
9	95	30 s
10	53	30 s
11	70	30 s
12	Mene vaiheeseen 9	13 kertaa
13	72	6 min
14	10	∞

Tulokset analysoitiin 2% AGE:lla (100 V, 45 min).

4 Tulokset ja niiden tulkinta

4.1 NanoDrop-mittausten tulokset

Taulukoissa 6 ja 7 on kuvattu kaikkien näytteiden NanoDrop-mittaustulokset. ZR Kitillä eluointitilavuus on 20 µl ja Chemagicilla suoritettulla 60 µl.

Taulukko 6. Seerumista eristetyn DNA:n tietoja

<i>Näyte</i>	<i>ng/µl</i>	<i>A260/A280</i>	<i>Eristystekniikka</i>
30087	51,32	0,84	ZR Kit
30099	102,52	0,84	ZR Kit
30113	117,49	0,91	ZR Kit
30162	37,82	0,90	ZR Kit
30164	147,05	0,70	ZR Kit
30088	177,90	0,96	ZR Kit
30089	144,25	1,00	ZR Kit
30090	341,67	0,86	ZR Kit
30091	176,50	0,78	ZR Kit
30092	132,05	1,03	ZR Kit
30093	241,06	1,04	ZR Kit
30094	275,64	0,79	ZR Kit
30095	200,69	0,96	ZR Kit
30096	162,87	0,87	ZR Kit
30097	193,34	0,97	ZR Kit
30098	120,21	0,97	ZR Kit
30100	265,49	0,89	ZR Kit
30101	268,17	0,94	ZR Kit
30102	127,29	1,97	Chemagen
30103	138,13	1,81	Chemagen
30104	131,57	1,97	Chemagen
30105	178,98	1,87	Chemagen
30106	124,74	1,97	Chemagen
30108	135,76	2,01	Chemagen
30109	129,79	1,99	Chemagen
30111	136,58	2,06	Chemagen
30112	143,82	1,93	Chemagen
30114	110,77	2,12	Chemagen
30115	189,91	1,87	Chemagen
30187(s)	215,72	1,86	Chemagen
30188(s)	128,78	1,94	Chemagen
30189(s)	129,13	2,07	Chemagen
30156(1)	187,32	1,89	Chemagen
30157	139,04	1,95	Chemagen
30158	137,34	1,92	Chemagen
30159	131,21	1,95	Chemagen

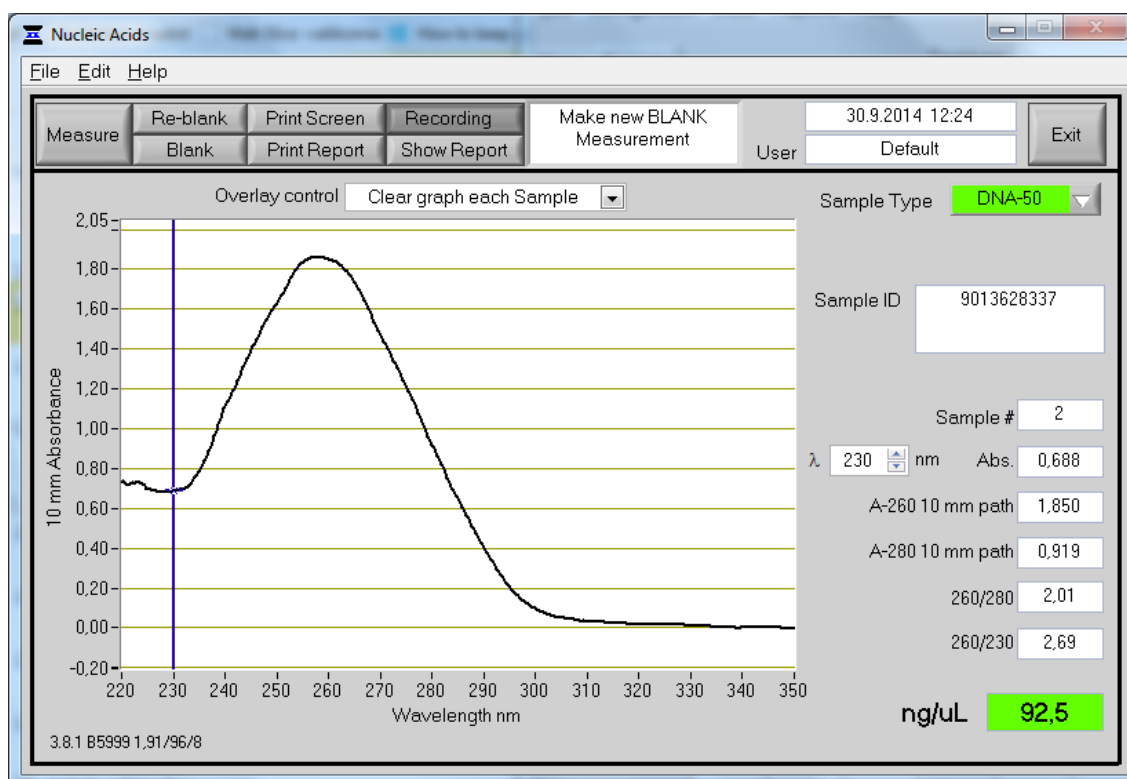
30160	153,62	2,01	Chemagen
30161	182,83	1,84	Chemagen
30163	142,55	1,83	Chemagen
30164	215,99	1,79	Chemagen
30165	139,66	2,03	Chemagen
30156(2)	204,83	1,90	Chemagen
30157(2)	142,66	2,18	Chemagen
30158(2)	167,60	1,77	Chemagen
30159(2)	126,82	1,85	Chemagen
30160(2)	89,90	1,98	Chemagen
30161(2)	317,26	1,54	Chemagen
30162(2)	295,01	1,74	Chemagen
30163(2)	412,26	1,46	Chemagen
30165(2)	358,21	1,56	Chemagen
30156(3)	103,81	1,90	Chemagen
30157(3)	131,81	1,98	Chemagen
30158(3)	218,58	1,75	Chemagen
30159(3)	250,14	1,73	Chemagen
30160(3)	62,44	0,80	ZR Kit
30161(3)	82,67	0,78	ZR Kit
30162(3)	101,49	0,88	ZR Kit
30163(3)	98,14	0,74	ZR Kit
30164(3)	123,04	0,91	ZR Kit
30165(3)	107,26	0,73	ZR Kit

Taulukko 7. Plasmasta eristetyn DNA:n tietoja

<i>Näyte</i>	<i>ng/μl</i>	<i>A260/A280</i>	<i>Eristystekniikka</i>
30087	93,90	0,78	ZR Kit
30088	139,23	0,85	ZR Kit
30089	145,03	0,81	ZR Kit
30090	207,40	1,03	ZR Kit
30091	149,91	0,93	ZR Kit
30092	139,61	0,89	ZR Kit
30093	162,50	0,99	ZR Kit
30094	81,25	0,83	ZR Kit
30095	135,31	0,94	ZR Kit
30096	73,46	0,76	ZR Kit
30097	138,48	0,89	ZR Kit
30098	203,11	0,80	ZR Kit
30099	174,31	0,82	ZR Kit
30100	157,20	0,90	ZR Kit
30101	201,53	0,94	ZR Kit
30102	172,76	0,89	ZR Kit
30103	240,08	0,94	ZR Kit
30104	109,33	0,95	ZR Kit
30105	101,59	1,19	Chemagen
30106	160,85	1,31	Chemagen
30108	95,71	1,16	Chemagen

30109	341,19	1,37	Chemagen
30111	162,97	1,41	Chemagen
30112	151,27	1,21	Chemagen
30113	204,81	1,23	Chemagen
30114	498,45	1,37	Chemagen
30115	268,98	0,96	Chemagen
30187(p)	186,64	1,40	Chemagen
30188(p)	240,81	1,28	Chemagen
30189(p)	102,72	1,13	Chemagen
30156	54,18	0,96	Chemagen
30157	72,00	1,03	Chemagen
30158	67,46	0,99	Chemagen
30159	75,65	0,99	Chemagen
30160	71,76	1,06	Chemagen
30161	161,06	1,23	Chemagen
30162	282,20	1,33	Chemagen
30163	88,11	1,08	Chemagen
30164	418,44	1,31	Chemagen
30165	146,45	1,44	Chemagen
30166	208,64	3,44	Chemagen
30167	313,60	1,13	Chemagen
30168	74,04	1,13	Chemagen
30169	90,95	1,25	Chemagen
30170	201,67	1,27	Chemagen
30171	400,52	1,44	Chemagen
30172	204,44	1,44	Chemagen
30173	107,66	1,27	Chemagen
30174	204,72	1,37	Chemagen
30175	304,17	1,38	Chemagen
30176	253,14	1,43	Chemagen
30177	180,29	1,34	Chemagen
30178	116,31	1,22	Chemagen
30179	293,21	1,42	Chemagen
30180	187,17	0,72	ZR Kit
30181	175,79	0,72	ZR Kit
30182	140,87	0,71	ZR Kit
30183	141,61	0,70	ZR Kit
30184	220,82	0,72	ZR Kit
30185	98,90	0,80	ZR Kit

NanoDropin tulokset näyttävät konsentraatioltaan hyvältä sekä käsin että koneella eristetystä materiaalista. Kuitenkin käsin eristettyjen näytteiden puhtautta kuvaava A260/A280-suhde on todella huono: kun tavoite on 1,8, nämä näytteet ovat sekä seerumissa että plasmassa suurimmalta osin alle 1. Robotilla eristettyjen näytteiden suhde on hieman parempi; se on seeruminäytteissä melkein ihanteellinen (1,7 - 2,0) (Kuva 7). Plasmanäytteissä suhde on tässäkin huono (1,0 - 1,4).



Kuva 7. Kuvakaappaus NanoDrop-spektrofotometrin yhden näytteen mittaustuloksesta

Todennäköinen syy korkeahkole konsentraatiolle mutta huonolle puhtausasteelle löytyy epäpuhtauksista. Näitä ovat esim. proteiinisakat tai eristyksissä apuna olleet silika- ja magneettihelmet, jotka eivät olleet lähteneet pois fuugauksessa/magneettitelineessä. Käsikitillä eristettyjen näytteiden heikko puhtausaste voisi johtua juuri mahdollisen DNA:n sekaan jääneistä silikahelmistä. Luminometrisessä mittauksessa nähdäänkin, kuinka paljon näytteissä oikeasti on jatkoanalyysikelpoista kaksijuosteista DNA:ta.

4.2 PheraStar-mittausten tulokset

Kuvassa 8 on esimerkki Excelin plate conc- makrolla käsitellyistä PheraStarin tuloksista. Muut mittaukset löytyvät kokonaisuudessaan liitteistä 1 - 3, edelle on otettu muiden mittausten laimennuskertoimella korjatut tulokset ja näytekartat. Näytekartoista on lihavoitu näytteet, jotka valittiin PCR-protokoliin.

PicoGreen REPORT

10.4.2014

pico_plasma_100414

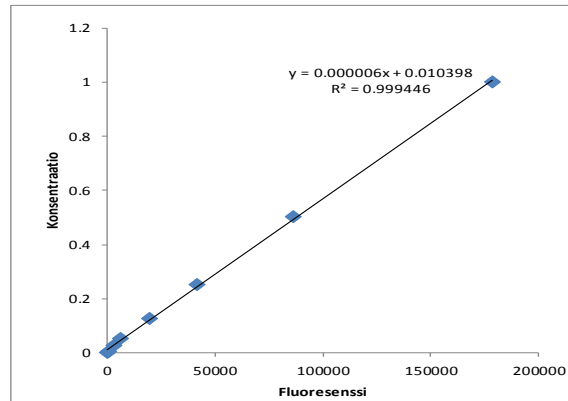
Standardisoora
Fluores. Konsentr.

132	0
620	0.005
2960	0.025
6170	0.05
19304	0.125
41572	0.25
86144	0.5
178681	1

Kulmak.	6E-06
Y-leikk.	0.0104
Korrel.	0.9994
Laim.	200

Victor mittaustulos

1289	622	650	2717	43	42	42	42	43	42	43	42
458	923	468	1241	43	43	43	43	42	43	42	43
571	666	2458	1439	40	41	41	40	41	40	42	42
1087	363	806	1021	42	41	41	42	41	42	41	41
634	663	917	1974	41	40	41	41	40	42	41	42
593	616	1077	1279	41	41	42	42	42	42	42	42
365	734	1103	110	43	41	41	41	42	41	43	42
422	677	3317	111	42	41	42	42	42	42	42	42



Histogrammi

ng/ul	Lkm
<0	0
<20	96
<40	0
<60	0
<80	0
<100	0
<120	0
<140	0
<160	0
<180	0
<200	0
>=200	96

Konsentraatiot mittauslevyllä

0.02	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

Laimennuskertoimella korjatut konsentraatiot

4	3	3	5	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	5	4	2	2	2	2	2	2	2	2
3	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	4	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	4	2	2	2	2	2	2	2	2
2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	6	2	2	2	2	2	2	2	2	2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	30087	30095	30103	30113								
B	30088	30096	30104	30114								
C	30089	30097	30105	30115								
D	30090	30098	30106	30187(s)								
E	30091	30099	30108	30188(s)								
F	30092	30100	30109	30189(s)								
G	30093	30101	30111									
H	30094	30102	30112									

Kuva 8. Ensimmäinen neljästä PheraStar-mittauksesta (tyhjät kaivot on merkitty harmaalla) ja sen näytekartta

Laimennuskertoimella korjatut konsentraatiot

2	103	2	3	3	5	2	2	2	2	2	2
3	23	3	3	3	5	2	2	2	2	2	2
5	79	5	3	3	9	2	2	2	2	2	2
9	111	3	3	4	6	2	2	2	2	2	2
24	70	2	3	4	5	2	2	2	2	2	2
48	44	4	3	4	5	2	2	2	2	2	2
98	102	4	3	4	4	2	2	2	2	2	2
201	79	4	3	5	2	2	2	2	2	2	2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	s	c	30087	30090	30098	30108						
B	t	o	30099	30091	30100	30109						
C	a	n	30113	30093	30101	30111						
D	n	t	30162	30092	30102	30112						
E	d	r	30164	30094	30103	30114						
F	a	o	30088	30095	30104	30115						
G	r	l	30089	30096	30105	30187(s)						
H	d		30090	30097	30106							

Kuva 9. 10.4.2014 mitatut plasmanäytteet, standardi ja kontrolli sekä näytekartta

Kuvista 10 ja 11 nähdään, että kaksijuosteista DNA:ta on useimmissa näytteissä joko ei ollenkaan tai erittäin vähän (1 - 5 ng/μl). Muutamissa yksittäisissä näytteissä DNA:ta on hieman enemmän, esimerkiksi plasmanäytteissä 30170 ja 30179 (21 ja 22 ng/μl). Valittiin näiden mittausten perusteella näytteet ID- ja SEX-PCR -reaktioita varten.

Laimennuskertoimella korjatut konsentraatiot

2	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	5	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	6	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	21	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	8	22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	30156	30164	30172	30180								
B	30157	30165	30173	30181								
C	30158	30166	30174	30182								
D	30159	30167	30175	30183								
E	30160	30168	30176	30184								
F	30161	30169	30177	30185								
G	30162	30170	30178									
H	30163	30171	30179									

Kuva 10. 17.4.2014 mitatut plasmanäytteet ja näytekartta

Laimennuskertoimella korjatut konsentraatiot

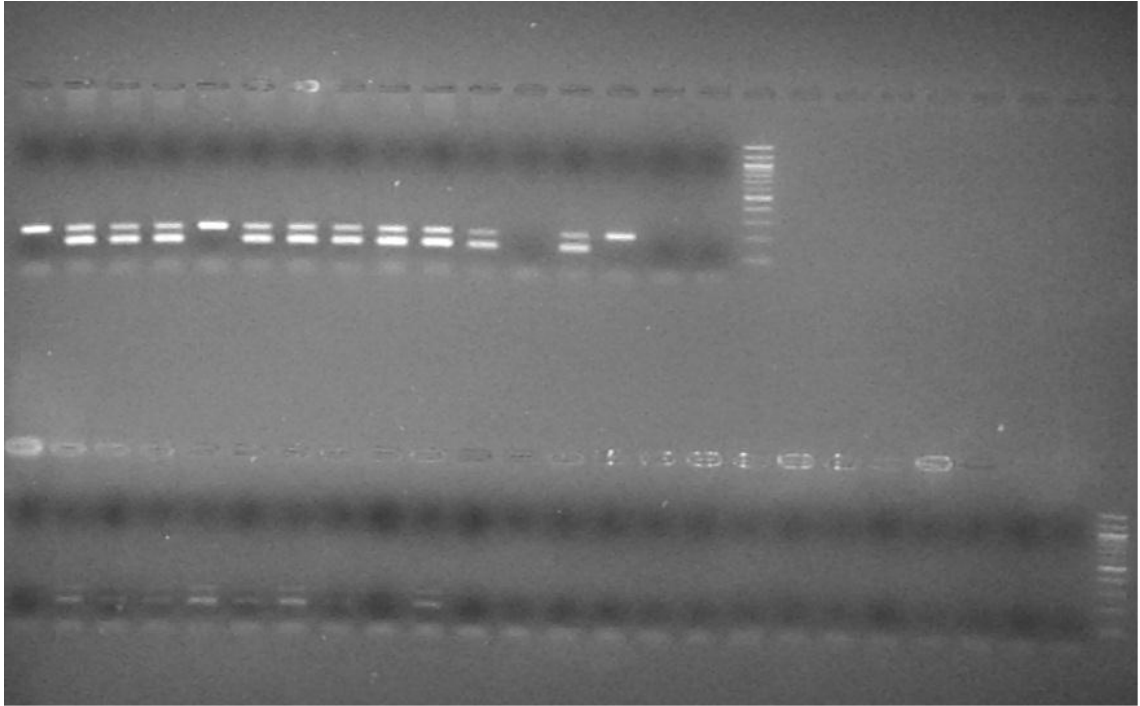
1	105	2	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1
2	21	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1
5	67	3	3	5	1	1	1	1	1	1	1	1
9	83	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1
23	68	3	4	3	1	1	1	1	1	1	1	1
50	44	4	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1
102	96	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1
199	78	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	s	c	30188(s)	30163	30161(2)	30160(3)						
B	t	o	30189(s)	30164	30162(2)	30161(3)						
C	a	n	30156	30165	30163(2)	30162(3)						
D	n	t	30157	30156(2)	30165(2)	30163(3)						
E	d	r	30158	30157(2)	30156(3)	30164(3)						
F	a	o	30159	30158(2)	30157(3)	30165(3)						
G	r	l	30160	30159(2)	30158(3)							
H	d		30161	30160(2)	30159(3)							

Kuva 11. 17.4.2014 mitatut seeruminäytteet, standardi ja kontrolli sekä näytekartta

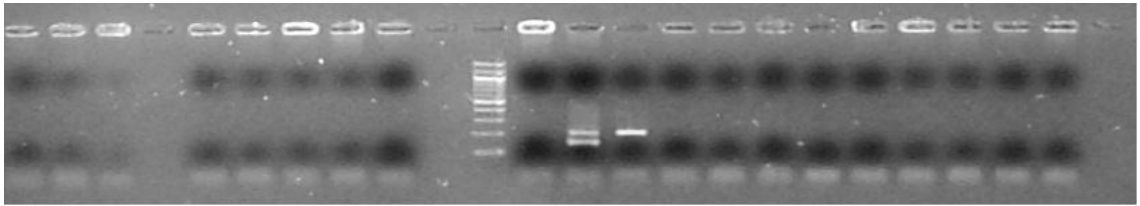
4.3 PCR-analyysien tulokset

ID-PCR:n tulokset tulivat sähköpostissa laboratorikoordinaattori Minttu Sauramolle, jolla oli koneellaan GeneMapper® -ohjelma tulosten analysointiin. Ilmeni, että minkäänlaista monistumista ei ollut tapahtunut kontrolleissa eikä näytteissä. Päätettiin tehdä helpompi ja halvempi SEX-PCR varmistamaan tuloksia (kuva 12).



Kuva 12. SEX-PCR:n AGE-analyysi. Kuvasta nähdään, että ladder (oikea reuna) näkyy heikosti ja muutama satunnainen näyte näkyy erittäin haaleasti. Ylärivissä olevat näytteet ovat muita näytteitä, jotka toimivat samalla kontrolleina.

Koska kuvassa näkyy muutama näyte haaleilla viivoilla, tehtiin vielä yksi PCR samoilla näytteillä (kuva 13).



Kuva 13. SEX-PCR:n AGE-analyysi.

Kuvassa näkyy tällä kertaa kirkkaampi ladder ja kirkaat mies- ja naiskontrollit. Kaksi heikompa viivaa ilmentää miestä (XY-kromosomit) ja yksi vahva viiva naista (XX-kromosomit). Näytteet eivät ole monistuneet, ja aiemmat heikot positiiviset eivät toistuneet uusinta- PCR-reaktiossa.

5 Yhteenveto

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, voisiko vanhoja plasma- ja seeruminäytteitä käyttää hyväksi nykytutkimuksissa eristämällä niistä DNA. Erinäiset tutkimusryhmät hyötyisivät tästä datasta monin tavoin, ja Biopankin tavoitteena onkin käydä tulevaisuudessa läpi vanhoja aineistoja ja pyrkiä saamaan niistä käyttökelpoista informaatiota.

Spektrofotometrinen mittaus antoi aluksi aihetta olettaa, että näytteissä voisi olla jatkokäsittelykelpoista DNA:ta. Puhtausaste ja konsentraatio olivat joissain näytteissä lähes ihanteelliset. Tuloksista voidaan myös todeta, että robotilla suoritettu magneettivusteinen eristys on tehokkaampi ja tuottaa paremman puhtausasteen kuin ZR Kitillä suoritettu käsineristys. Todennäköinen syy tähän on ZR Kitin silikahelmien aiheuttama häiriö spektrofotometrisessä mittauksessa; ilmeisesti ne eivät kunnolla poistuneet sentrifugoinnissa. Luminometrinen mittaus puolestaan paljasti, että kaksijuosteista DNA:ta ei useimmissa näytteissä ollut lainkaan ja muutamassa erittäin vähän.

ID-PCR:n tuloksista ei valitettavasti ole kuvakaappausta, mutta kuten yllä todettiin, tulokset olivat kauttaaltaan negatiivisia. On siis todennäköistä, että itse reaktiossa jokin meni vikaan. Levystä näki, että osa näytteistä oli haihtunut muovikelmun irrottua laitteessa, mutta muiden osalta oli vaikea sanoa mikä oli ongelma. Mahdollisesti pipetoinnissa tai protokollassa jotain epäonnistui tai jokin PCR:n reagensseista oli vanhentunut.

SEX-PCR -reaktiossa selvisi lopullisesti, että näytteitä ei ole mielekästä lähteä jatkoanalysoimaan, sillä DNA:ta on todella vähän. Vaikkakin yhdessä reaktioista saatiin näkyville muutama heikko viiva joistakin näytteistä, ei tämä ole tarpeeksi, jotta koko aineiston eristäminen kannattaisi. Kuten tämän opinnäytetyön alussa todettiin, plasmasta ja seerumista DNA:n löytyminen on epätodennäköistä ja näytteet ovat iäkkäitä, joten tulokset eivät tulleet yllätyksenä.

Lähteet

- 1 Biopankin toimintaperiaate ja tehtävät.
http://www.thl.fi/fi_FI/web/fi/aiheet/tietopaketti/biopankki. Verkkodokumentti. Viitattu 24.4.2014.
- 2 Veren koostumus. <http://www.redcrossblood.org/learn-about-blood/blood-components>. Verkkodokumentti. Viitattu 25.4.2014.
- 3 Kuva veren koostumuksesta. http://shs2.westport.k12.ct.us/forensics/08-blood/blood_components.htm. Verkkodokumentti. Viitattu 25.4.2014.
- 4 Plasman koostumus. <http://www.redcrossblood.org/learn-about-blood/blood-components/plasma>. Verkkodokumentti. Viitattu 25.4.2014.
- 5 ZR Serum DNA KIT™:n toimintaperiaate ja käyttöohje.
<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/20/d3013i.pdf>. Verkkodokumentti. Viitattu 25.4.2014.
- 6 Chemagic circulating NA 4k H12 VD130612 –kitin toimintaperiaate.
<http://www.chemagen.com/cfdna-general-information.html>. Verkkodokumentti. Viitattu 29.4.2014.
- 7 Chemagen chemagic MSM I:n eristysrobotin toimintaperiaate.
<http://www.abbis.de/en/products-for-distributors/products-chemagic-msm-i/>. Verkkodokumentti. Viitattu 29.4.2014.
- 8 Chemagic MSM I –kuva. http://www.abbis.de/images/f_chemagic-msm1-530.jpg. Verkkodokumentti. Viitattu 29.4.2014.
- 9 DNA:n spektrofotometrinen analyysi.
http://people.hofstra.edu/beverly_clendening/adv_molecular_biology/protocols/uv_spec_analysis_rna&dna.htm. Verkkodokumentti. Viitattu 29.4.2014.
- 10 NanoDrop® ND-1000 –spektrofotometrin toimintaperiaate.
<https://sites.google.com/a/alaska.edu/iab-corelab/equipment/spectrophotometers/nanodrop-nd-1000-spectrophotometer>. Verkkodokumentti. Viitattu 29.4.2014.
- 11 NanoDrop® ND-1000 –spektrofotometri.
https://sites.google.com/a/alaska.edu/iab-corelab/_/rsrc/1381258805663/config/pagetemplates/nanodrop-nd-1000-spectrophotometer/a-use-600pxNanoDrop-close.jpg. Verkkodokumentti. Viitattu 29.4.2014.

- 12 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent –leiman toimintaperiaate.
<http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/nucleic-acid-detection-and-genomics-technology/nucleic-acid-detection-and-quantitation-in-solution.html>. Verkkodokumentti. Viitattu 29.4.2014.
- 13 PHERAstar FS –luminometri.
<http://media.europeanpharmaceuticalreview.com/wp-content/uploads/PHERAstarFS-product-image.jpg>. Verkkodokumentti. Viitattu 29.4.2014.
- 14 ID-PCR:n toimintaperiaate ja työohje, sivu 2. Biopankki.
- 15 Fragmenttianalyysin toimintaperiaate ja kuva.
http://leme.recherche.usherbrooke.ca/2011/Labmeeting/DNA%20Fragment%20Analysis%20by%20Capillary%20Electrophoresis_LifeTechnologies.pdf. Sivun 18. Verkkodokumentti. Viitattu 30.4.2014.

STD_CTRL_FINT2D_060 PicoGreen REPORT

10.4.2014

STD_CTRL_seerumi_100414

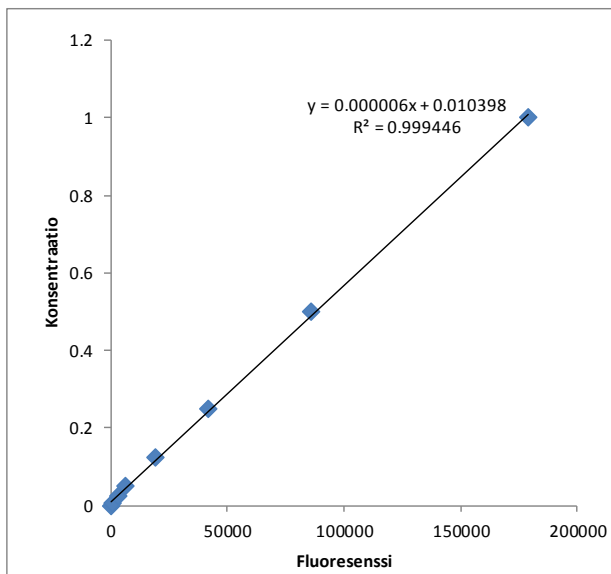
Standardisuora
Fluores. Konsentr.

132	0
620	0.005
2960	0.025
6170	0.05
19304	0.125
41572	0.25
86144	0.5
178681	1

Kulmak.	6E-06
Y-leikk.	0.0104
Korrel.	0.9994
Laim.	200

Victor mittausulos

132	90683	335	810	1158	2476	43	41	42	41	42	42
620	18378	497	1014	826	2465	43	42	43	42	42	42
2960	68862	2265	1264	1227	6019	40	40	40	40	41	40
6170	97679	611	712	1966	3108	41	42	41	42	41	42
19304	60687	345	738	1599	2646	39	40	41	41	41	42
41572	37195	1800	645	1876	2410	42	42	42	42	41	42
86144	89671	1833	667	1824	1934	42	43	43	42	42	41
178681	68833	1339	446	2421	123	43	41	42	43	43	42

Histogrammi
ng/ul Lkm

<0	0
<20	84
<40	2
<60	2
<80	3
<100	1
<120	3
<140	0
<160	0
<180	0
<200	0
>=200	95

Konsentraatiot mittauslevyllä

0.01	0.52	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.01	0.11	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.03	0.39	0.02	0.02	0.02	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.04	0.56	0.01	0.01	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.12	0.35	0.01	0.01	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.24	0.22	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.49	0.51	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
1.01	0.39	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

Laimennuskertoimella korjatut konsentraatiot

2	103	2	3	3	5	2	2	2	2	2	2
3	23	3	3	3	5	2	2	2	2	2	2
5	79	5	3	3	9	2	2	2	2	2	2
9	111	3	3	4	6	2	2	2	2	2	2
24	70	2	3	4	5	2	2	2	2	2	2
48	44	4	3	4	5	2	2	2	2	2	2
98	102	4	3	4	4	2	2	2	2	2	2
201	79	4	3	5	2	2	2	2	2	2	2

PicoGreen REPORT

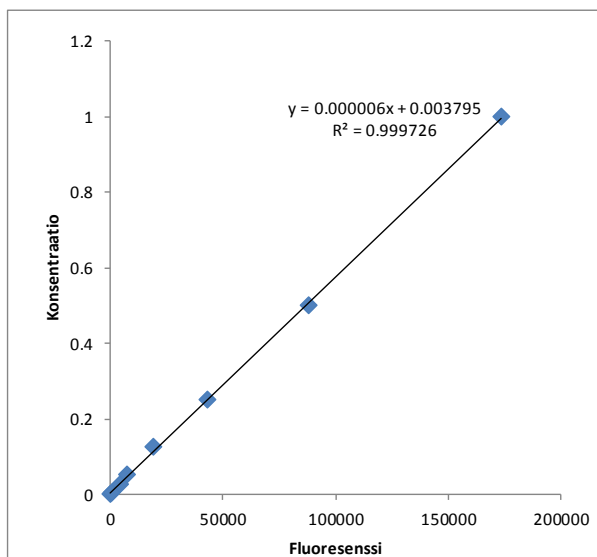
17.4.2014

std_ctrl_seerumi_170414

Standardisuora
Fluores. Konsentr.

203	0
665	0.005
4040	0.025
7356	0.05
19337	0.125
43163	0.25
88179	0.5
173854	1

Kulmak.	6E-06
Y-leikk.	0.0038
Korrel.	0.9997
Laim.	200

Histogrammi
ng/ul Lkm

<0	0
<20	84
<40	2
<60	2
<80	3
<100	2
<120	2
<140	0
<160	0
<180	0
<200	1
>=200	96

Victor mittausulos

203	90931	1267	2418	936	456	42	42	41	42	41	43
665	17653	1888	2299	1520	285	43	42	43	42	43	41
4040	57718	2175	2237	3496	562	41	39	39	42	42	41
7356	72018	1566	2230	1516	226	42	41	41	41	43	42
19337	58563	1822	2597	1564	342	40	41	40	41	41	42
43163	37432	2568	1375	2194	118	43	41	42	42	43	42
88179	83648	2152	2122	1639	112	41	43	42	42	43	42
173854	67900	2081	1895	2078	325	42	42	42	43	42	43

Konsentraatiot mittauslevyllä

0.00	0.52	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.01	0.10	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.03	0.33	0.02	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.05	0.42	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.11	0.34	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	0.22	0.02	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.51	0.48	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.00	0.39	0.02	0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Laimennuskertoimella korjatut konsentraatiot

1	105	2	4	2	1	1	1	1	1	1	1
2	21	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1
5	67	3	3	5	1	1	1	1	1	1	1
9	83	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1
23	68	3	4	3	1	1	1	1	1	1	1
50	44	4	2	3	1	1	1	1	1	1	1
102	96	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1
199	78	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1