



Laura Hagelin & Miia Kokkola

# **HEMOKROMATOOSI-GEENIMUTAATION KLOONAAMINEN PCR-MENETELMÄLLÄ**

# **HEMOKROMATOOSI-GEENIMUTAATION KLOONAAMINEN PCR-MENETELMÄLLÄ**

Laura Hagelin & Miia Kokkola  
Opinnäytetyö  
Syksy 2013  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan koulutusohjelma

---

Tekijä(t): Laura Hagelin & Miia Kokkola  
Opinnäytetyön nimi: Hemokromatoosi-geenimutaation kloonaminen PCR-  
menetelmällä  
Työn ohjaaja(t): Irja Parkkinen, Paula Reponen  
Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2013  
Sivumäärä: 37 + 11 liitettä

---

Hemokromatoosi on sairaus, jossa raudan imeytymisen säätely häiriintyy. Se aiheutuu yleisimmin HFE-geenissä tapahtuvista C282Y- ja H63D-mutaatioista. Taudissa rautaa kertyy elimistöön ylimäärin, koska sitä imeytyy jopa 3–4 kertaa enemmän kuin terveellä ihmisellä. Kun rautaa on elimistössä liikaa, se voi aiheuttaa kudonvaurioita ja hoitamattomana vahingoittaa tärkeitä elimiä, kuten maksa, haimaa ja sydäntä.

Oulun seudun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelma sisältää Molekyylibiologian, geenitekniikan ja perinnöllisyyden harjoituskurssin, jossa tehdään hemokromatoosi-geenimutaation määrittäminen. Tässä harjoitustyössä käytetään positiivisena kontrollina genomista DNA:ta, jossa on hemokromatoosin aiheuttava geenimutaatio. Opinnäytetyömme tavoitteena oli kloonata hemokromatoosin HD-geenimutaatio plasmidivektoriin DNA:n monistamista varten, ja näin tuottaa lisää genomista DNA:ta harjoituskurssille. Aihe tuli Oulun seudun ammattikorkeakoululta.

Opinnäytetyössä käytettiin erilaisia geenitekniikan menetelmiä, kuten PCR, agarosigeelielektroforeesi, ligaatio, transformaatio, DNA:n eristys ja DNA:n sekvensointi. Kaikki käytännön työt tehtiin Oulun seudun ammattikorkeakoulun tiloissa.

Hemokromatoosigeenin H63D-mutaatio onnistuttiin kloonamaan ja monistamaan. Neljästä jatkoon valitusta plasmidi-DNA-näytteestä kahdessa oli hemokromatoosi-geenimutaation sisältävää DNA:ta. Jatkossa näitä kahta näytettä voidaan käyttää harjoitustyössä positiivisena kontrollina.

---

Asiasanat: hemokromatoosi, DNA, polymeraasiketjureaktio, geenimutaatio

## ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences  
Degree programme in Biomedical Laboratory Science

---

Author(s): Laura Hagelin and Miia Kokkola  
Title of thesis: Cloning of the hereditary hemochromatosis gene by PCR  
Supervisor(s): Irja Parkkinen, Paula Reponen  
Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2013  
Pages: 37 + 11 appendices

---

Hemochromatosis is a disease in which iron metabolism is disturbed. It is most commonly caused by two mutations in the HFE-gene, namely C282Y and H63D. In hemochromatosis the body accumulates too much iron. The amount absorbed into the body can be 3–4 times more than normally. When there is too much iron in the body, it can damage tissues and without treatment, it harms vital organs like liver, pancreas and heart.

This thesis was made for Oulu University of Applied Sciences. The aim of the thesis was to clone genomic DNA, which contains hemochromatosis genetic mutation into a plasmid and then multiply it. University can use this DNA in practical training of Molecular Biology, Gene Technology and Genetics course. In the practical work students determine hemochromatosis mutation and the DNA containing the mutation is used as a positive control.

In this thesis we used gene technology methods like PCR, agarose gel electrophoresis, ligation, transformation, extracting of DNA and DNA sequencing. All the practical work was done in the premises of Oulu University of Applied Sciences. Also starting material, reagents and other components were given by the university.

Through many phases, genomic DNA was successfully cloned and multiplied. From the four of the chosen plasmid-DNA-samples, two contained the hemochromatosis mutation. In the future the university can use these DNA samples as a positive control.

---

Keywords: hemochromatosis, DNA, polymerase chain reaction, genetic mutation

# SISÄLLYS

1 JOHDANTO	6
2 OPINNÄYTETYÖN SUUNNITTELU JA TAVOITTEET	7
3 HEMOKROMATOOSI	9
3.1 Diagnosointi	9
3.2 Hoito	10
3.3 HFE-geeni	10
3.4 HFE-proteiini	11
3.5 Mutaatioiden vaikutus HFE-proteiinin toimintaan	12
3.6 Geenimutaatioiden analysointi	14
4 TYÖN SUORITUS	15
4.1 PCR	15
4.2 Agarosigeelielektroforeesi	17
4.3 PCR-tuotteen puhdistus geeliltä	18
4.4 Kompetentit solut ja ligaatio	19
4.5 Transformaatio	20
4.6 Genomisen DNA:n eristys	20
4.7 Pesäke-PCR	21
4.8 Plasmidin puhdistus	22
4.9 Spektrofotometria	22
4.10 Genomisen DNA:n digestio	23
4.11 DNA:n sekvensointi	24
5 PROJEKTIN TAVOITTEIDEN SAAVUTTAMINEN	26
5.1 Genomisen-DNA:n monistaminen	26
5.2 Ligaatio ja transformaatio	27
5.3 Pesäke-PCR	29
5.4 Plasmidin puhdistus	31
5.5 Spektrofotometria	31
5.6 Digestio	32
5.7 DNA:n sekvensointi	34
5.8 Lopputulokset	35
6 POHDINTA	36
LÄHTEET	38
LIITTEET	41

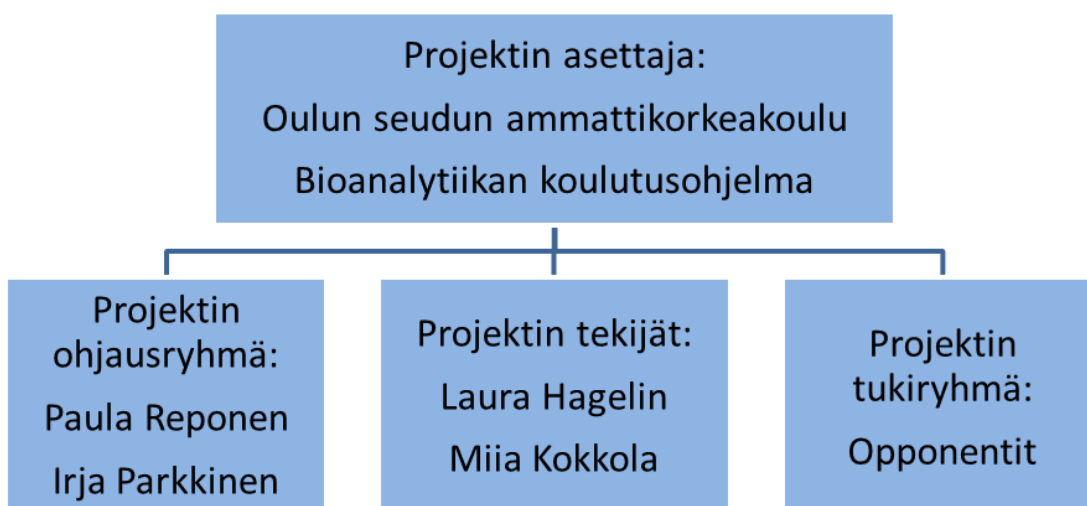
# 1 JOHDANTO

Hemokromatoosi on perinnöllinen sairaus, jossa elimistöön alkaa kertyä rautaa. Raudan liiallinen kertyminen voi johtaa kudonsvaurioihin ja myöhemmin jopa elinvaurioihin etenkin haimassa, maksassa ja sydänlihaksessa. (Färkkilä, M., Hannuksela, J. & Parkkila, S. 2008, 1019–1021.) Perinnöllinen hemokromatoosi aiheutuu HFE-geenissä esiintyvistä pistemutaatioista. Yleisimmät sairautta aiheuttavat mutaatiot ovat C282Y ja H63D. (Mustajoki, P. 2009, hakupäivä 25.12.2012.) Nämä geenimutaatiot vaikuttavat HFE-geenin koodaaman HFE-proteiinin toimintaan, jolloin rautatasapainon säätelyjärjestelmä ei enää toimi normaalisti ja rautaa otetaan elimistöön liikaa. (Parkkila, S. 2000, 829.) Hemokromatoosin aiheuttamien geenimutaatioiden osoittaminen tapahtuu HFE-geenin genotyypityksellä PCR-menetelmällä. (Alexander, J. & Kowdley, K. 2005, 244).

Oulun seudun ammattikorkeakoululla bioanalytiikan koulutusohjelmaan kuuluu molekyylibiologian ja geenitekniikan perusteet -kurssi, jolla tehdään hemokromatoosiin liittyvä harjoitustyö. Työn suorittamiseen tarvitaan positiiviseksi kontrolliksi genomista DNA:ta, jossa on hemokromatoosi-geenimutaatio. Meidän opinnäytetyöprojektinamme oli kloonata hemokromatoosin HD-mutaatio tätä harjoitustyötä varten. Toteutimme opinnäytetyömme käyttämällä geenitekniikan menetelmiä. Ensin monistimme DNA:ta PCR-laitteella, sitten kloonasimme PCR-tuotteen plasmidivektorin avulla bakteerisolussa. Kloonattu DNA analysoitiin agarosigeelielektroforeesin ja DNA:n sekvensoinnin avulla.

## 2 OPINNÄYTETYÖN SUUNNITTELU JA TAVOITTEET

Tavallisesti organisaatio muodostuu vähintään kahdesta yksilöstä, jotka työnjan avulla pyrkivät saavuttamaan organisaation haluamat tavoitteet (Karlsson, Å & Marttala, A. 2001, 76). Osansa meidän projektiorganisaatioomme antavat opinnäytetyömme asettaja, ohjausryhmä sekä opponentit. Projektimme asettaja on Oulun seudun ammattikorkeakoulu. Ohjausryhmäämme kuuluvat lehtori Paula Reponen ja lehtori Irja Parkkinen. Opponentteina toimivat bioanalytikkopiskelijat Saira Mikkonen ja Minna Välimaa. Projektiorganisaatiomme on esitetty kuviossa 1.



*KUVIO 1. Projektiorganisaatio*

Tavoitteenamme tässä opinnäytetyöprojektissä on onnistuneesti kloonata hemokromatoosin HD-geenimutaatio pJET1.2/blunt-plasmidivektoriin DNA:n monistamista varten. Tätä DNA:ta käytetään positiivisena kontrollina harjoitustyössä. Kontrolli on vähissä, ja projektimme tavoitteena on saada sitä lisää, jotta koulun ei tarvitse hankkia erikseen geenimutaation sisältäviä potilasnäytteitä.

Jotta saisimme kloonattua onnistuneesti haluamaamme DNA:ta, meidän täytyy työskennellä laboratoriossa huolellisesti. Näytteiden, reagenssien ja käyttämiemme tavaroiden kontaminoitumista täytyy välttää, esim. PCR on hyvin

herkkä kontaminaatiolle. Pintojen puhdistus ja kertakäyttökäsineiden vaihtaminen on tärkeää. Pipetoimme pieniä määriä, ja sen asian kanssa on myös oltava tarkkana. Kaikki tämä on osa opinnäytetyömme laatutavoitetta.

Toiminnallisena tavoitteena tällä projektilla on mahdollistaa harjoitustyön tekeminen myös tulevaisuudessa. Kun positiivisen kontrollin määrää koululla kasvatetaan, ei sitä lähitulevaisuudessa tarvitse erikseen hankkia potilasnäytteiden muodossa esimerkiksi Oulun Yliopistollisesta sairaalasta. Tämä helpottaa koulun toimintaa. Lisäksi laadimme koululla käytössä olevalle PCR-laitteelle suomenkieliset käyttöohjeet (liite 11), jotta opiskelijoiden ja muiden laitteen käyttäjien olisi helpompi työskennellä.

Oppimistavoitteenamme on se, että pystymme syventämään ammattitaitoamme hyödyntäen molekyylibiologian menetelmiä. Meillä molemmilla on opintosuunnitelmassamme molekyylibiologiasta vain molekyylibiologian ja geenitekniikan perusteet -kurssi, joten opinnäytetyömme avulla laajennamme omaa tietämystämme tällä saralla. Työmme edellyttää tarkkuutta, koska käsittelemme hyvin pieniä määriä DNA:ta ja reagensseja. Pyrimme tekemään työmme huolellisesti tuhlaamatta vähäistä lähtömateriaalia.



### 3 HEMOKROMATOOSI

Hemokromatoosi on sairaus, jossa raudan imeytymisen säätely häiriintyy. Rautaa imeytyy ohutsuolen alkuosassa jopa 3–4 kertaa enemmän kuin normaalisti ja sen seurauksena rautaa kertyy elimistöön ylimäärin. Raudan liian suuri määrä voi ajan kuluessa aiheuttaa elimistössä kudosten vaurioitumista ja myöhemmin johtaa elinvarioihin etenkin maksassa, haimassa ja sydänlihaksessa. Usein oireina ovat nivelkivut, väsymys, heikotus ja ihon värimuutokset. Jos hemokromatoosia ei hoideta, raudan kertyminen voi ilmetä maksassa maksakirroosina, haimassa diabeteksena ja sydämessä sydänlihassairauksina. (Färkkilä ym. 2008, 1019–1021.)

#### 3.1 Diagnosointi

Hemokromatoosin diagnosoinnissa määritetään ensin verestä seerumin ferriitinipitoisuus sekä seerumin tai plasman transferrinin rautakyllästeisyys. Ferriitinimäärityksellä saadaan selville elimistön rautavarastojen määrä, joka on yleensä koholla jo taudin alkuvaiheessa. Transferrinin rautakyllästeisyys on suoraan verrannollinen ohutsuolen solujen sisältämään rautamäärään ja ilmaisee elimistöön varastoituneen raudan määrää. Rautamääritysten ollessa viitealueen yläpuolella tehdään verestä DNA-analyysi, jonka avulla saadaan varmuus siitä, onko henkilöllä hemokromatoosi. (Färkkilä ym. 2008, 1025–1026; Parkkila, S. 2000, 834.) DNA-analyysi käsittää HFE-geenin genotyypityksen, jossa geenin rakenne selvitetään. Magneettikuvauksella voidaan tutkia suoraan maksassa olevia rautakertymiä (Aguilar-Martinez, P., Grandchamp, B., Cunat, S., Cadet, E., Blanc, F., Nourrit, M., Lassoued, K., Schved, J-F & Rochette, J. 2011, hakupäivä 25.12.2012). Maksasta otetaan koepala, kun varmuutta ei saada HFE-mutaatioiden genotyypityksellä, eikä raudan kertymiseen löydetä muuta syytä. Taudin diagnoosia ei voida tehdä ainoastaan geenimutaation perusteella, mutta mutaation löydyttyä pystytään arvioimaan henkilön riskiä sairastua hemokromatoosiin ja terveydentilaa osataan tarkkailla jatkossa. (Alexander, J. & Kowdley, K. 2005, 243-244; Parkkila, S. 2000, 834.)

### 3.2 Hoito

Hemokromatoosin hoito on usein venesektio eli veren poistamista elimistöstä, jolloin raudan määrää saadaan pienennettyä. Venesektio on turvallinen ja tehokas hoitomuoto ja tutkimukset ovat osoittaneet, että elinajan ennuste on normaali, kun hoito on aloitettu ennen vakavien elinvaurioiden ilmaantumista. (Färkkilä ym. 2008, 1019.) Aluksi venesektioita tehdään viikoittain. Kerralla otetaan suurin piirtein puoli litraa verta, jonka mukana elimistöstä lähtee pois n. 0,25 g rautaa. Näin jatketaan kunnes seerumin ferritiinipitoisuus on alle 50 µg/l ja seerumin tai plasman transferrinin rautakylläisyysaste alle 30 %. Jatkossa venesektioita tehdään vain tarpeen mukaan, tavallisesti muutaman kerran vuodessa. Hoito toteutetaan kuitenkin aina tapauskohtaisesti. (Alexander ym. 2005, 245; Färkkilä ym. 2008, 1026.)

### 3.3 HFE-geeni

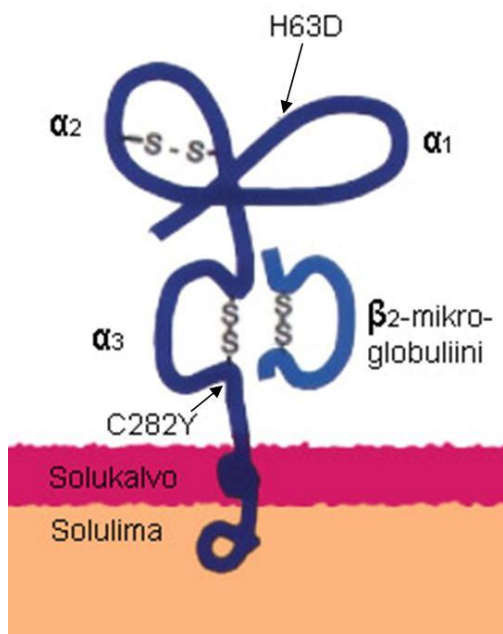
HFE-geeniä kutsutaan virallisesti hemokromatoosi-geeniksi, sillä siinä tapahtuvat geenimutaatiot ovat yleisimpänä syynä perinnöllisen hemokromatoosin ilmenemiseen. Lyhenne HFE viittaa korkeaan rautamäärään, "high Fe". (HGNC HUGO Gene Nomenclature Committee 2013, hakupäivä 12.1.2013). HFE-geeni sisältää tiedon siitä, miten valmistetaan HFE-proteiinia, jota on erityisesti maksan ja suoliston solujen pinnalla. (Parkkila, S. 2000, 833).

HFE-geeni sijaitsee ihmisellä kromosomissa 6, joka on autosomaalinen kromosomi. Toinen pareista on peritty isältä ja toinen äidiltä ja tämän takia geenejä on kaksi. (Solunetti 2006a, hakupäivä 12.1.2013). Perinnöllinen hemokromatoosi on lähtöisin HFE-geenin muutoksista. Geenimutaatio voi ilmentyä vain toisessa HFE-geenissä, jolloin puhutaan heterotsygootista geeniparista. Mutaatio voi olla myös homotsygootinen, jolloin se esiintyy molemmissa HFE-geeneissä. Jos kyseessä on heterotsygotia, on hyvin epätodennäköistä, että henkilö sairastuu hemokromatoosiin. Sen sijaan, jos geenimuutos on molemmissa HFE-geeneissä, raudan imeytyminen lisääntyy huomattavasti ja voi aiheuttaa raudan liiallisen kertymisen elimistöön. (Mustajoki, P. 2009, hakupäivä 25.12.2012.)

Hemokromatoosin aiheuttaa yleisimmin mutaatio C282Y. Tämä mutaatio tarkoittaa sitä, että aminohappoketjussa paikalla 282 tyrosiini vaihtuu kysteiiniksi. (Parkkila, S. 2000, 832). Nukleotidisekvenssissä mutaation sijainti on 845 ja siinä G muuttuu A:ksi. (NCBI National Center for Biotechnology Information 2013, hakupäivä 6.9.2013). Toinen HFE-geenin mutaatio on H63D. Tässä mutaatiossa histidiini vaihtuu asparagiinihapoksi aminohappoketjun paikassa 63. (U.S. National Library of Medicine 2009, hakupäivä 9.1.2012.) Nukleotidisekvenssissä mutaatio löytyy paikalta 187, jossa C muuttuu G:ksi. (NCBI National Center for Biotechnology Information. 2013, hakupäivä 6.9.2013). Perinnöllinen hemokromatoosi on enimmäkseen lähtöisin HFE-geenin C282Y -mutaatioista molemmissa HFE-geenin alleeleissa, jolloin sitä sanotaan homotsygotiksi. Tutkimusten mukaan on arvioitu, että jopa 90 % hemokromatoosipotilaista on homotsygotteja (C282Y/C282Y). Toiseksi eniten HFE-geenimutaatioista esiintyy kaksoisheterotsygotiaa, jolloin ilmenee kaksi eri mutaatiota yhdessä (C282Y/H63D). (Färkkilä ym. 2008, 1021.)

### **3.4 HFE-proteiini**

HFE-proteiini koostuu 343 aminohaposta ja sitä muodostuu tavallisesti ruoansulatuskanavan pintaepiteelissä, erityisesti ohutsuolen alkuosassa. HFE-proteiinin tarkkaa toimintatapaa ei täysin tunneta, mutta sen oletetaan säätelevän raudan ottamista soluihin ohutsuolen sekä maksan soluissa. (Parkkila, S. 2000, 833; U.S. Department of Energy (DOE) 2003, hakupäivä 12.1.2013.)



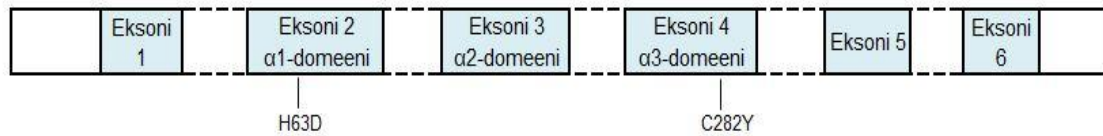
KUVIO 2. HFE-proteiinin rakenne. Alfa-domeenit,  $\beta_2$ -mikroglobuliini, rikkisidokset (S-S) sekä C282Y- ja H63D-mutaatioiden sijainnit. (Mukaillen Parkkila, S. 2000).

HFE-proteiinissa on solukalvolla  $\alpha_1$ - ja  $\alpha_2$ -alaysiköt, jotka ovat kiinnittyneet  $\alpha_3$ -alaysikköön. Näistä alaysiköistä  $\alpha_3$ -domeeni sitoutuu  $\beta_2$ -mikroglobuliiniin ja  $\alpha_1$ - ja  $\alpha_2$ -alaysiköt vaikuttavat transferrinireseptorien toimintaan. (U.S. Department of Energy (DOE) 2003, hakupäivä 12.1.2013.) Kuviossa 2 on esitetty HFE-proteiinin alfa-domeenit,  $\beta_2$ -mikroglobuliini sekä CY- ja HD-mutaatioiden sijainnit. HFE-proteiinin toimiessa oikein se liittyy  $\beta_2$ -mikroglobuliiniin ja kykenee siirtymään solukalvolle, jossa se sitoutuu transferrinireseptoriin. (Färkkilä ym. 2008, 1020). Kun kaikki nämä tekijät ovat yhdessä solukalvolla, ne sitovat transferriniä ja muodostavat yhtenäisen proteiinikompleksin. Tämä proteiinikompleksi siirtyy solun sisälle endosytoosin avulla ja rauta pääsee vapautumaan transferrinista ja päätyy solun solulimaan. Tämän jälkeen raudaton proteiinikompleksi palaa takaisin solukalvolle voidakseen sitoa jälleen rautaa. (Parkkila, S. 2000, 831, 833.)

### 3.5 Mutaatioiden vaikutus HFE-proteiinin toimintaan

HFE-geenin yleisimmät pistemutaatiot C282Y ja H63D sijaitsevat HFE-geenin eksoneissa. Kuviossa 3 on havainnollistettuna HFE-geenin rakenne ja mutaatioiden H63D ja C282Y sijainnit geenin eksoneissa ja HFE-proteiinin domeeneis-

sa. Mutaatiot ovat merkittävässä asemassa, sillä ne vaikuttavat HFE-proteiinin rakenteeseen ja sitä kautta sen toimintaan.



*KUVIO 3. Geenimutaatioiden esiintymisalueet HFE-geenin eksoneissa ja HFE-proteiinin alayksiköissä. (Mukaiillen Aguilar-Martinez ym. 2011).*

Raudan imeytymisen säätelyyn osallistuvat ohutsuolessa villuksissa olevat epä-kypsät epiteelisolut, jotka aistivat elimistön rautamäärää. HFE-proteiini on tärkeässä asemassa näiden solujen pinnalla ja se tarvitsee  $\beta$ <sub>2</sub>-mikroglobuliinin tasapainottajakseen toimiakseen normaalisti. C282Y-mutaatiossa tyrosiinin vaihtuminen kysteiiniksi aiheuttaa aminohappoketjussa  $\alpha$ <sub>3</sub>-domeenin disulfididoksen puuttumisen. Tämä rikkisidos on esitetty myös kuvion 2  $\alpha$ <sub>3</sub>-domeenissa. Kun sidosta ei ole, HFE-proteiinin  $\alpha$ <sub>3</sub>-domeenin ja  $\beta$ <sub>2</sub>-mikroglobuliinin yhteenliittyminen estyy, jolloin HFE-proteiini hajoaa, ennen kuin se ehtii kulkeutua solukalvolle. HFE-proteiinin ja transferriniireseptorin yhteenliittyminen on oleellista, jotta oikea määrä rautaa imeytyy elimistöön. Kun HFE-proteiini ei pääse solukalvolle, se ei sitoudu transferriniireseptoriin, minkä seurauksena raudan säätelyjärjestelmä häiriintyy ja rautaa otetaan soluihin enemmän kuin sitä tarvitaan. C282Y -mutaatio estää transferriniireseptorien kuljettamisen takaisin solukalvolle ja reseptorien määrä solujen pinnalla jää normaalia vähäisemmäksi. Tämän vuoksi ohutsuolen villusten epiteelisolut tulkitsevat raudan määrän elimistössä liian alhaiseksi ja korjaavat tilanteen ottamalla rautaa runsaammin ravinnosta verenkiertoon. (Parkkila, S. 2000, 831-833.) H63D-mutaatiossa tapahtuva histidiinin vaihtuminen asparagiinihapoksi muuttaa HFE-proteiinin solunsisäistä suolasiltaa ja sitä kautta vaikuttaa proteiinin ja transferriniireseptorin keskinäiseen toimintaan. (NCBI National Center for Biotechnology Information. 2013, hakupäivä 6.9.2013).

### 3.6 Geenimutaatioiden analysointi

Geenimutaatioiden osoittamiseen on useita menetelmiä, mutta eniten käytetään PCR-sovelluksia. Geenimutaatiota varten tarvitaan DNA:ta, joka saadaan harjoitustyössä kokoverestä. Verinäytteestä eristetään genominen DNA, jolle valitaan reaktioseos PCR-menetelmää varten. H63D-mutaatiota varten reaktioseoksessa ovat spesifiset alukkeet. DNA-polymeraasi tarttuu alukkeisiin, jotka ovat sitoutuneet denaturoituneisiin DNA-juosteisiin ja alkaa lisätä seoksessa olevia vapaita nukleotideja (dNTP) DNA-juosteelle komplementaarisesti. Tällä tavoin saadaan kloonattua haluttua DNA-pätkää. Alukkeet määräävät, mihin kohtaan DNA:ta ne sitoutuvat. Työssä on tarkoitus saada monistettua HFE-geenin eksoni 2, jolla HD-mutaatio sijaitsee. PCR-tuote digestoidaan restriktioentsyymillä BclI, jolloin siitä saadaan täsmällisemmin pilkottua haluttua DNA-pätkää. Digestoinnin jälkeen näytteille tehdään agarosigeelielektroforeesi. Tulokset analysoidaan agarosigeelielektroforeesi-ajon jälkeen geeliltä UV-valon avulla. Mutaation sisältävä DNA ja terve DNA erottuvat agarosigeelillä erikokoisina DNA-vyöhykkeinä. HD-mutaation sisältävä DNA ei digestoidu, kun taas terve DNA digestoituu.

## 4 TYÖN SUORITUS

Suoritimme opinnäytetyömme laboratorio-osuuden Oulun seudun ammattikorkeakoulun laboratoriotiloissa keväällä 2013. Työmme ohjaajana toimi lehtori Paula Reponen. Saimme kaikki tarvitsemamme välineet ja materiaalit käyttöömmme ammattikorkeakoululta. Käyttämämme välineet olivat steriilejä, ja käytimme lisäksi koko ajan kertakäyttökäsineitä välttääksemme proteiinikontaminaatiota. Työn suorittamista varten tehtyjen liuosten ohjeet ovat liitteessä 1. Kaikki työvaiheet on esitetty kuviossa 4.



KUVIO 4. Opinnäytetyön työvaiheet kaaviona.

### 4.1 PCR

Geenitekniikassa PCR on menetelmä, jolla monistetaan DNA-jaksoja. Reaktiot tapahtuvat yleensä kuoppalevyllä tai pienissä mikrosentrifuugiputkissa. Niiden lämpötilaa säädelään tarkoin PCR-laitteella. (Suominen, Pärssinen, Haajanen, Pelkonen 2010, 153.)

PCR perustuu DNA-polymeraasin kykyyn syntetisoida mallin mukaan uusia DNA-jaksoja alukkeiden avulla (NCBI, hakupäivä 23.12.2012). DNA-polymeraasin on oltava korkeaa lämpötilaa kestävä. Niitä on eristetty mm. kuumissa lähteissä eläviltä bakteereilta. Taq-polymeraasi esim. on löydetty *Thermus aquaticus*elta. PCR:ssä monistetaan kaksinauhaista-DNA:ta ja alukkeet kiinnittyvät DNA:n eri juosteiden vastakkaisiin päihin. Tämä alukkeiden väliin jäävä pätkä monistuu PCR-reaktiossa. (Suominen ym. 2010, 153-154.)

PCR tarvitsee toimiakseen templaatin eli malli-DNA:n, joka sisältää monistettavan DNA-jakson. Reaktion alussa DNA-molekyylit altistetaan korkealle lämpötilalle, jolloin se denaturoituu ja juosteet irtoavat toisistaan. (NCBI, hakupäivä 23.12.2012.) Tämän jälkeen lämpötilaa lasketaan hetkellisesti, niin että alukkeet kiinnittyvät templaattiin. Tätä sanotaan annealing-reaktioksi. Lämpötila ei saa kuitenkaan laskea liikaa, jotta DNA ei renaturoituisi takaisin kaksinauhaiseksi. Alukkeiden kiinnittymisen jälkeen nostetaan lämpötilaa n.72 °C:een, jolloin DNA-polymeraasi alkaa toimia. Seuraava vaihe on ekstension eli templaatin pidennysreaktio. Siinä DNA-polymeraasi liittyy reaktioseoksessa olevia vapaita nukleotideja alukseen päästä alkaen suuntaan 5'→3'templaatin mallin mukaan. DNA-jakson molemmista juosteista syntyy kopio. Juoste on nopeasti valmis, 1–2 minuutin kuluttua. Tällöin nostetaan taas lämpötilaa n. 95 °C:een ja juosteet irtoavat toisistaan. Denaturointi, annealing ja ekstension muodostavat yhdessä syklin, jota toistetaan niin kauan, että saadaan haluttu määrä DNA:ta. (Suominen ym. 2010, 154.)

Aloitimme laboratorio-osuutemme tekemällä PCR-reaktion HFE-geenin H63D-mutaatiolle. Käytimme ohjeena molekyylibiologian ja geenitekniikan kurssilla käytettyjä työohjeita (liite 2), sillä tarkoituksenamme oli monistaa lisää harjoitustyössä käytettävää positiivista kontrollia, joka sisältää H63D-mutaation (HD-mutaation). Positiivista kontrollia ei ollut enää kovin paljon jäljellä, joten teimme ensimmäistä PCR-reaktiota varten reagensscocktailin HD-mutaatiolle kolmelle näytteelle sekä negatiiviselle kontrollille. Näytteenä meillä oli jäljellä oleva positiivinen kontrolli 114 sekä kaksi näytettä, joissa oli kumpikin hemokromatoosin geenimutaatio. Näytettä kutsuttiin tuplaheteroksi. Tekemämme reakticocktail oli vain HD-mutaatiota varten, joten PCR ei monistaisi CY-mutaatiota. Positiivi-



sen kontrollin vähäisen määrän vuoksi otimme sitä selkeästi vähemmän, kuin alkuperäisessä ohjeessa oli. Kun näytteet oli pipetoitu reaktioseokseen, ne vortexoitiin kevyesti ja sentrifugoitiin muutaman sekunnin ajan, jotta näyte saatiin eppendorf-putken pohjalle. Tämän jälkeen näytteet asetettiin PCR-laitteeseen (TC-4000), jossa oli ohjelma hemokromatoosi-geenitestiä varten. Ohjelman vaiheet on esitetty taulukossa 1.

*TAULUKKO 1: PCR-ohjelma hemokromatoosia varten.*

Prosessi		Lämpötila	Aika
1. vaihe: alkudenaturaatio		96°C	5 min
2. vaihe: 35 sykliä	denaturaatio	96°C	30 s
	annealing	56°C	60 s
	ekstension	72°C	60 s
3. vaihe: loppuekstension		72°C	5 min
4. vaihe: säilytys		4°C	

## 4.2 Agarosigeelielektroforeesi

Elektroforeesin suorittamiseen tarvitaan periaatteessa vain virtalähde ja elektroforeesiyksikkö. Elektroforeesissa partikkeleita erotellaan sähkövirran avulla. Nukleiinihappojen elektroforeesissa käytetään yleensä 1 %:n agarosigeeliä, joka sisältää riittävän suuret huokokset DNA:n kulkeutumiseen. Agarosigeelin erottelukyky perustuu siihen, että geeliaines aiheuttaa vastusta näytteen liikkumiseen, jolloin molekyylien koko vaikuttaa siihen, miten ne erottuvat geelillä elektroforeesissa. Mitä pienempi molekyyli on, sitä esteettömämmin se kulkeutuu geelillä. (Walker, J. 2010, 399, 404, 422.)

Elektroforeesi DNA-näytteille suoritetaan siten, että geeli on kokonaan puskuriliuoksen alla. Agarosigeeli valetaan lasi- tai muovikelkalle ja geeliin tehdään näytteitä varten kaivot tarkoitukseen soveltuvalla muovikammalla. Geeli asetetaan ajokammioon kelmassa ja se peitetään kokonaisuudessaan puskurilla, jonka jälkeen näytteet voidaan pipetoida suoraan näytekaivoihin. (Walker, J. 2010, 423.)

Geeliä voidaan tarkastella UV-valossa (aallonpituus 300nm). Geeliin on mahdollista lisätä etidiumbromidia, joka sitoutuu DNA:n emäsparien väliin ja fluoresoi UV-valossa oranssinpunaisena. DNA:n tarkastelussa on kuitenkin otettava huomioon, että UV-valo voi vaurioittaa DNA:ta, minkä vuoksi tarkastelu-aika on pidettävä lyhyenä. (Walker, J. 2010, 168, 423.)

Työssä käytimme 1,2 %:n ja 1,5 %:n agarosigeelejä. 1,2 % geeli on harjoitus-työohjeen mukainen ja 1,5 %:n geeliä käytimme siksi, että halusimme vertailla DNA-vyöhykkeiden selkeyttä kahden eri vahvuisen geelin välillä. Agarosigeelien valmistusohjeet löytyvät liitteestä 3. Agarosigeelielektroforeesi suoritettiin joka kerta yön yli ajona, jolloin virtaa pidettiin 20 V:ssa.

### **4.3 PCR-tuotteen puhdistus geeliltä**

Puhdistimme saamamme PCR-tuotteen agarosigeeliltä Macherey-Nagelin valmistamalla Nucleospin© Gel and PCR Clean-up-kitillä (liite 4). Kitin toiminnan perustana on, että agarosigeelin sulatuksen jälkeen näyteliuos pipetoidaan kitin mukana tulleeseen silikapylvääseen, johon DNA kaotrooppisen suolan läsnä ollessa sitoutuu. Näyte puhdistetaan, kuivataan ja lopuksi eluoidaan DNA irti pylväästä.

Leikkasimme DNA:ta sisältävät palat geeliltä UV-valossa ja siirsimme ne steriileihin eppendorf-putkiin. Eppendorf-putket punnittiin ennen ja jälkeen agarosigeelipalojen laittamista niihin. Putkiin lisättiin 100 µl GeneClean turbosalt-reagenssia 0,1 g näytettä kohti. DNA-näytteitä inkuboitiin, jotta geeli sulaisi. Tämän jälkeen pipetoimme putkiin 200 µl Buffer NTI reagenssia 0,1 g näytettä kohti. DNA-näytteitä inkuboitiin jälleen vesihauteessa välillä sentrifugoiden. Sentrifugointi auttoi geelin hajoamiseen. Lopullinen liuos siirrettiin pieneen kromatografiapylvääseen ja sentrifugoitiin 30 sekuntia 11,000 x g. DNA tarttui pylvääseen, joten jäljelle jäänyt liuos kaadettiin pois ja näytteelle suoritettiin pesu käyttäen kitissä ollutta pesuliuosta. Lopuksi DNA irrotettiin pylväästä steriiliin eppendorf-putkeen.

#### 4.4 Kompetentit solut ja ligaatio

Bakteerit, kuten *Escherichia coli*, eivät tavallisesti ota sisäänsä vierasta DNA:ta. Kuitenkin kun bakteerin soluseinämää heikennetään esimerkiksi kalsiumkloridilla ja lämpöshokilla, DNA pääsee soluun sisälle. Tällaisia soluja sanotaan kompetenteiksi soluiksi. (Rapley, R. 2010a, 209.)

Ligaatiossa ligaasientsyymi liittää yhteen DNA-kappaleet muodostaen niiden välille kovalenttisen sidoksen. Yleisimmin käytössä oleva DNA-ligaasi on eristetty T4-bakteerifaagilta. Eniten ligaatiota käytetään DNA-jakson ja vektorin, esimerkiksi plasmidin, liittämiseksi yhteen. (Solunetti 2006b, hakupäivä 5.9.2013.)

Kasvatimme JM101-kannan *Escherichia coli*-soluja ravistelijassa +37 °C:ssa yön yli, jotta pystyimme tekemään niistä kompetentteja soluja. Yön yli kasva-neista bakteerisolusta otimme kasvustoa 2 ml ja lisäsimme siihen 200 ml LB-lientä ja laitoimme ne uudelleen ravistelijaan kasvamaan +37 °C:een kahdeksi tunniksi. Otimme bakteerikasvustoa neljään 50 ml falcon-putkeen ja sentrifugoimme niitä 3000 RPM nopeudella 5 minuuttia, jonka jälkeen kaadoimme supernatantin pois. Putkien pohjaan jäi solunappi. Solunapit suspensoitiin varovasti jääkylmään kalsiumkloridiin (CaCl<sub>2</sub>). Suspension jälkeen yhdistimme näytteet kahteen putkeen ja annoimme niiden seistä 20 minuuttia jäissä. Jäissä seisoittaminen pysäyttää solujen jakautumisen. Tämän jälkeen sentrifugoimme näytteet jälleen ja kaadoimme liuoksen pois.

Suoritimme ligaation CloneJET PCR Cloning-kitin ohjeilla (liite 5). PCR-reaktiossa polymeraasientsyymi jätti PCR-tuotteeseemme kohessiiviset päät, joten teimme DNA-fragmenteista tasapäiset kitin avulla. Käytössämme oli kolme näytettä ja kontrollinäyte. Käyttämässämme ohjeissa puhdistettua PCR-tuotetta otettiin ligaatiota varten 1 µl, mutta me otimme sitä kolmeen eri putkeen 5 µl, 10 µl, ja 15 µl. Kun ensimmäisen vaiheen pipetoinnit oli tehty, näytteet vortexoitiin nopeasti ja sentrifugoitiin 5 sekunnin ajan. Tämän jälkeen ligaatioseoksia inkuboitiin 70 °C:ssa vesihauteessa 5 minuuttia, jonka jälkeen ne jäähdytettiin jäällä. Näytteiden jäähdyttyä hetken suoritettiin ligaation toinen vaihe, jossa näytteisiin lisättiin 1 µl pJET1.2/blunt Cloning Vectoria ja 1 µl T4 DNA Ligaasia. Näytteet vortexoitiin nopeasti ja sentrifugoitiin 5 sekuntia. Ligaatioseoksia inkuboitiin

huoneenlämmössä 5 minuuttia, jonka jälkeen ne voitiin käyttää transformaatioon.

#### **4.5 Transformaatio**

Transformaatiossa DNA siirtyy solusta toiseen. Vastaanottavan solun on oltava kompetentti. Nämä kompetentit solut sitovat DNA-palasia, jotka ovat pilkkoutuneet irti toisen bakteerisolun genomista. DNA-fragmentit sitoutuvat kompetenttien solujen pinnalla oleviin proteiineihin. Tavallisesti yksi solu sitoo vain yhden DNA-fragmentin. Plasmidivektorit, joita transformaatiossa käytetään, sisältävät yleensä jonkin selektiogeenin, jotta voidaan tunnistaa solut, jotka ovat ottaneet DNA:ta sisäänsä. (Solunetti 2006f, hakupäivä 5.9.2013.)

Suoritimme transformaation erillisohjeen mukaan (liite 6). Transformaatiossa lisättiin ligaatioseosta kompetentteihin soluihin ja niitä seisotettiin jäissä 30 min. Tämän jälkeen vuorossa oli lämpöshokki, näytteet laitettiin tasan kahdeksi minuutiksi +42 °C:een lämpöhauteeseen ja heti jäihin sen jälkeen. Näytteisiin lisättiin esilämmitettyä LB-lientä ja niitä kasvatettiin 35 minuuttia +37 °C:ssa lämpöhauteessa.

Transformaation jälkeen laitoimme näytteet LB-maljoille kasvamaan. Maljoille tuli n. 250 µl näytettä. Meillä oli 12 näytemaljaa ja lisäksi kontrolli. Maljat laitettiin kasvamaan yön yli lämpökaappiin +37 °C:een.

#### **4.6 Genomisen DNA:n eristys**

Tässä vaiheessa eristimme genomista DNA:ta Macherey-Nagelin valmistamalla Genomic DNA from Blood: NucleoSpin© Blood-kitillä. NucleoSpin© Blood-kitin toiminta perustuu siihen, että sillä saadaan nopeasti eristettyä erittäin puhdasta genomista DNA:ta kokoverestä, seerumista, plasmasta tai muista elimistön eritteistä. Kitissä käytetään genomisen DNA:n eristämiseen lysimenetelmää, jossa kokoverta inkuboidaan liuoksessa, joka sisältää runsaasti kaatrooppisia ioneja sekä proteinaasi K:ta. Tämän jälkeen DNA:n sitoutumisolosuhteita säädetään etanolin avulla, jotta DNA sitoutuu NucleoSpin© Blood-kitin pylvään silikamembraaniin. Eri pesuvaiheilla saadaan poistettua tehokkaasti epäpuhtauksia ja lo-

puksi genomisen DNA eluoidaan pylväästä eluointipuskuriliuoksella steriiliin eppendorf-putkeen.

Otimme aluksi toisiltamme verinäytteet EDTA-putkeen. Käytimme omaa vertamme negatiivisena kontrollina, sitä vertailtiin HD-mutaatioon agarosigeelillä. Puhdistimme genomisen DNA:n noudattamalla NucleoSpin® Blood-kitin ohjeita (liite 7).

#### **4.7 Pesäke-PCR**

Pesäke-PCR on melko nopea menetelmä, kun halutaan tietää, onko transformaatiopesäkkeessä haluttu rekombinanttiplasmidi. Pesäke-PCR suoritetaan halutun DNA:n mukaisilla PCR-reaktioseoksilla. Pesäke-PCR:ssä käytetään yleisesti ristimaljausta, jolloin valittu pesäke viljellään uudelle elatusmaljalle ennen PCR-reaktiota. Ristimaljan pohjaan piirretään ruudukko, johon numeroidaan käytettävät pesäkkeet. Menetelmässä käytetyt pesäkkeet on järkevää merkitä myös transformaatiomaljan taakse, jotta tiedetään, mistä pesäke on otettu. Ristimaljan etuina on se, että nähdään kasvaako valittu pesäke uudella maljalla. Lisäksi ristimaljalla saadaan talteen haluttua plasmidia, sillä se saadaan kokonaan uudelle kasvualustalle ja siten sitä on käytettävissä, jos jokin menee pieleen myöhemmissä työvaiheissa. Ristimalja toimii siis laadunvarmistuksena, sillä pesäke-PCR:ään käytetään aina kokonaan yksittäinen bakteeripesäke.

Pesäke-PCR:n tekemistä varten kahden LB-maljan pohjaan piirrettiin ruudukot, jotka numeroitiin. Toisella maljalla oli numeroituina ruudut 1–16 ja toisella ruudut 17–20. Numeroimme 1–20 eppendorf-putket ja laitoimme niihin PCR-reaktioon tarvittavat aineet. Valitsimme 5 µl:n, 10 µl:n ja 15 µl:n elatusmaljoilta 20 yksittäistä pesäkettä. Kaikilla maljoilla kasvoi samanlaisia bakteeripesäkkeitä, joten niiden valintaan ei vaikuttanut ulkonäkö. Otimme maljalta pesäkkeen steriilin pipetinkärjen avulla, teimme kärjellä ristimaljalle piirretyn ruudukon sisälle rastin varoen elatusaineen hajoamista. Tämän jälkeen pipetinkärki laitettiin hetkeksi ruudukon numeroa vastaavaan eppendorf-putkeen. Pipetinkärki poistettiin pipetin avulla, jotta kärkeen mennyt neste ja loputkin bakteerisolut saatiin reaktioseokseen. Ristimaljat laitettiin yön yli kasvamaan lämpökaappiin +37

°C:een ja ne tarkastettiin seuraavana aamuna. Pesäke-PCR suoritettiin hemo-kromatoosi-geenitestin ohjelmalla. Tämän jälkeen tehtiin agarosigeelielektroforeesi, jolloin saatiin varmuus siitä, oliko bakteerisoluisa haluamaamme DNA:ta.

#### **4.8 Plasmidin puhdistus**

Eristämämme plasmidi oli transformoitu *Escherichia coli*-soluihin. Plasmidin puhdistukseen käytimme Macherey-Nagelin valmistamaa NucleoBond® Xtra Midi Plasmid Purification-kittiä ja sen ohjeita (liite 8). Kitin toiminta perustuu sen sisältämien puskuriliuosten tapaan hajottaa bakteerisolut samalla periaatteella kuin NaOH- ja SDS-menetelmällä. Bakteerisolujen hajottamisen jälkeen pylväs (NucleoBond® Xtra Column) ja siihen sopiva suodatin (NucleoBond® Xtra Column Filter) tasapainotetaan puskurin avulla, jonka jälkeen puskureilla käsitelty liuos kaadetaan suodattimeen. Liuos suodattuu omalla painollaan filterin läpi. Suodatuksen jälkeen plasmidi-DNA sitoutuu silikahartsisiin (NucleoBond® Xtra Silica Resin). Tehokkaan pesun jälkeen plasmidi-DNA eluoidaan, saostetaan ja helposti liuotetaan sopivaan puskuriin jatkokäyttöä varten.

Plasmidipuhdistuksen alussa otimme yön yli kasvustosta kutakin plasmidia kahteen steriiliin falcon-putkeen 50 ml. Olimme valinneet maljoilta pesäkkeet 3, 6, 11 ja 19. Tarkoitus oli, että jokaisen plasmidin kaksi putkea yhdistettäisiin alun pipetointien ja sentrifugausten jälkeen yhdeksi. Me olimme ymmärtäneet ohjeet hieman väärin ja yhdistimme plasmidit 3 ja 6 sekä 11 ja 19. Tämä aiheutti jatkossa pieniä ongelmia, mutta ei onneksi pilannut työtämme. Tämä vaihe uusittiin käyttäen vain plasmideja 6, 11 ja 19.

#### **4.9 Spektrofotometria**

Spektrofotometrin toiminta perustuu siihen, että mittakyvetissä olevaan näyte-liuokseen ohjataan tietyn aallonpituista valoa ja mitataan kuinka suuri osa valosta imeytyy liuokseen. Kaikilla aineilla on oma aallonpituus, jolla ne absorboivat eli imevät valoa eniten. Mitä enemmän näytteessä on mitattavaa ainetta, sitä paremmin se absorboi valoa ja sitä korkeampi on sen absorbanssiarvo. (Solunetti 2006d, hakupäivä 5.9.2013.) Spektrofotometriaa hyödynnetään aineiden tunnistamisessa sekä puhtauden ja pitoisuuden määrittämisessä. Monet biolo-

giset yhdisteet absorboivat valoa ultravioletti-valon alueella ja siksi spektrofotometrialla määritetään proteiinien ja nukleiinihappojen pitoisuutta. (Solunetti 2006e, hakupäivä 5.9.2013.) DNA:n pitoisuus voidaan määrittää UV-spektrofotometrillä, jolloin yksi absorbanssiyksikkö vastaa 50 µg DNA:ta millilitrassa eli  $A_{260} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$ . (Rapley, R. 2010a, 164).

Näytteen sisältämiä kontaminaatioita voidaan mitata aallonpituuksien 200–300 nm välillä. Proteiini absorboi voimakkaasti aallonpituudella 280 nm, mikä on sen absorbanssimaksimi. Nukleiinihapoilla absorbanssimaksimi on 260 nm. Puhtautta mitataan näiden aallonpituuksien (260 nm ja 280 nm) avulla ja lasketaan absorbanssisuhde. Proteiineista koostuvan näytteen suhdeluku jää alle 1.8. Suhdeluvun  $A_{260}/A_{280}$  ollessa noin 1.8 DNA-näytteessä ei ole proteiinikontaminaatiota. (Rapley, R. 2010a, 165.) Alhainen suhdeluku voi selittyä epäpuhtaudesta, joka absorboi 280 nm tai sitä matalammalla aallonpituudella. DNA:n uuttamismenetelmässä näytteeseen voi jäädä jäämiä fenolista tai muusta reagenssista, mikä aiheuttaa matalan  $A_{260}/A_{280}$  -suhdeluvun. Myös erittäin pieni DNA-konsentraatio aiheuttaa suhdeluvun pienenemisen. Jos suhdeluku on yli 2, on liuksessa RNA:ta, mikä absorboi 260 nm:ssa. (Thermo Fisher Scientific. 2013, hakupäivä 21.9.2013.) DNA:n ajatellaan olevan puhdasta, kun absorbanssiarvojen suhde on välillä 1.8–2.0. (Hofmann, A. 2010, 491).

Mittasimme näytteidemme DNA-pitoisuuden plasmidin puhdistuksen jälkeen. Mittasimme absorbanssit aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm. Saaduista tuloksista laskimme näytteidemme DNA-konsentraatiot ja puhtaudet.

#### **4.10 Genomisen DNA:n digestio**

Genomisen DNA:n eristämisen ja puhdistamisen jälkeen sitä voidaan fragmentoida eli pilkkoa täsmällisesti restriktioentsyymeillä. Nämä entsyymit ovat avainasemassa molekyylien kloonauksessa, koska niillä on spesifisyys tiettyjä DNA-jaksoja kohtaan. Tietyn eliön DNA-molekyyleistä saadaan samanlaisia palasia, kun niitä digestoidaan tietyillä entsyymeillä. Kokonaisen genomisen DNA:n digestoimisella voidaan genomi jakaa useisiin pieniin paloihin, joista jokainen sisältää suurin piirtein yhden geenin. Jotkut entsyymit katkaisevat DNA:n suorasti antaen sille tylpän pään. Toiset restriktioentsyymit puolestaan katkaisevat

DNA:n siten, että siihen muodostuu ns. porras, jolloin toinen DNA-juosteista jää pidemmäksi kuin toinen. Näin katkaistuja DNA-juosteita sanotaan kohessiivisiksi ja niiden ominaisuuksiin kuuluu se, että ne ovat keskenään identtisiä. Lisäksi DNA-juosteiden päät ovat komplementaarisia, joten ne voivat takertua toisiinsa kiinni. (Rapley, R. 2010b, 196.)

Digestio tehtiin genomisen DNA:n näytteille sekä puhdistetuille plasmideille PCR-reaktion jälkeen (liite 9).

#### **4.11 DNA:n sekvensointi**

DNA:n sekvensoinnilla tarkoitetaan sen nukleotidiketjussa olevien emästen järjestyksen selvittämistä. (Solunetti 2006c, hakupäivä 8.9.2013).

DNA:n sekvensointiin on useita eri menetelmiä, joista yksi on automaattinen Sangerin sekvensointi. Siihen kuuluu DNA:n monistus PCR-menetelmällä, PCR-tuotteen puhdistus, sekvensointi, tunnistus kapillaarielektroforeesilla ja saadun informaation käsittely.

Sangerin menetelmässä sekvensoitavaa DNA-juostetta käytetään mallina DNA:n synteessissä. Sekvensoitavalle alueelle kiinnitetään spesifinen aluke, josta lähtien DNA-polymeraasi alkaa liittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja sekä leimattuja nukleotideja (ddNTP) muodostaen DNA:lle vastinjuosteen. Automatisoidussa menetelmässä käytetään väriterminaatioteknologiaa, jossa jokainen dideoksinukleotidi (ddNTP) sisältää merkkiaineen, joka emittoi eriväristä fluoresenssivaloa. Dideoksinukleotidit emittoivat valoa eri aallonpituuksilla, mikä mahdollistaa sen, että sekvensointireaktiot voidaan tehdä yhdessä eppendorfputkessa. PCR-reaktiossa näytteeseen lisätään spesifiset alukkeet, värientsyymiä ja -puskuria, vettä sekä leimattuja ja leimaamattomia nukleotideja. PCR:n aikana sekvensoitavasta DNA:sta syntyy erimittaisia fragmentteja, joiden synteesi loppuu leimattuun dideoksinukleotidiin. (Rapley, R. 2010a, 191; Suominen ym. 2010, 178; Timmer, J. 2009, Hakupäivä 14.11.2013.)

PCR-tuotteista on puhdistettava tarpeettomat aineet ennen kuin ne detektoidaan. Puhdistuksella näytteistä poistetaan niihin jääneet sitoutumattomat deoksi- ja dideoksinukleotidit. Sekvensointireaktiossa syntyneet leimatut DNA-jaksot



erotellaan ja analysoidaan kapillaarielektroforeesilla. PCR-tuotteet ajetaan yhtenä näytteenä polyakryyliamidigeeliä sisältävässä lasikapillaarissa, jonka alareunassa on laservalo. Laservalo havaitsee dideoksinukleotidin fluoresoivasta leimasta ja tästä syntynyt valosignaali tallentuu analysaattorin detektorille. Detektori havaitsee leimatut DNA-jaksot niiden koon mukaan, sillä lyhyet fragmentit kulkeutuvat kapillaarin päähän ennen pitkiä fragmentteja. Näin laite antaa suoraan DNA:n sekvenssin eli emäsjärjestyksen. (Rapley, R. 2010a. 191–192; Suominen ym. 2010, 180; Timmer, J. 2009, Hakupäivä 14.11.2013.)

Sekvensoinnin pipetoinnit ja työvaiheet löytyvät liitteestä 10. Sekvensoinnissa käytimme alkuperäisiä plasmideja eli niitä, jotka olimme yhdistäneet väärin. Ensin laskimme plasmidien pitoisuuden. Teimme laimennokset, joissa oli plasmidia 300 ng/μl. Tämän jälkeen pipetoimme PCR-reaktiot. Meillä oli kaksi näytettä P1 ja P2. P1 sisälsi plasmidit 3 ja 6 ja P2 plasmidit 11 ja 19. PCR-reaktioita tuli yhteensä 8, kun P1 ja P2 näytteistä tuli molemmista yhteensä 4 reaktioputkea. Erona näissä oli alukkeet. Käytimme neljää erilaista aluketta, aluke 3, aluke 4 ja forward ja reverse. Kun PCR oli valmis, lisättiin näytteisiin EDTA:ta ja pyöräytettiin nopeasti mikrosentrifuugissa. Tämän jälkeen lisättiin etanolia ja vortexoitiin. Näytteitä seisotettiin huoneenlämmössä 10 minuuttia, jonka jälkeen niitä sentrifugoitiin 30 minuuttia 13,400 RPM. Putkien pohjalle muodostui sakka ja supernatantti poistettiin. Sakka pestiin 70 % etanolilla ja näytteitä sentrifugoitiin 15 minuuttia. Etanoli poistettiin ja näytteet vakuumikuivattiin, minkä jälkeen ne kerättiin lähetettäväksi Biocenterille.

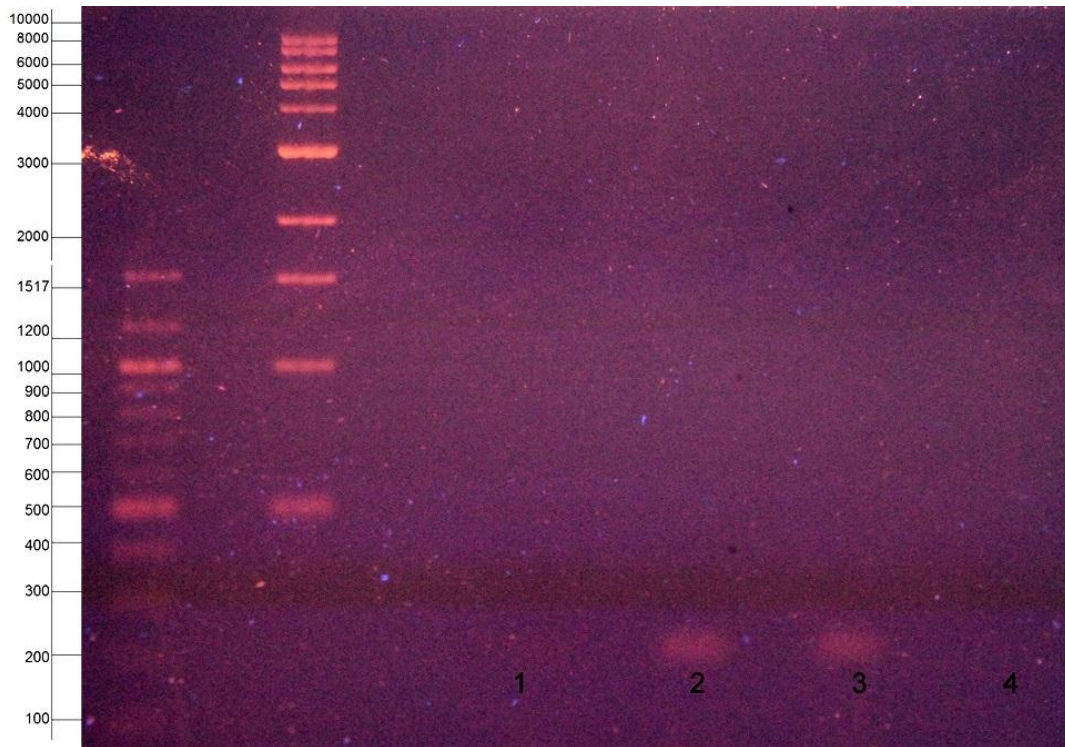
## 5 PROJEKTIN TAVOITTEIDEN SAAVUTTAMINEN

Tavoitteenamme oli kloonata hemokromatoosin HD-geenimutaatio plasmidivektoriin DNA:n monistamista varten ja samalla tuottaa lisää genomista DNA:ta, jotta positiivista kontrollia olisi jatkossa molekyylibiologian harjoitustyötä varten.

### 5.1 Genomisen-DNA:n monistaminen

Työmme alkoi jäljellä olevan positiivisen kontrollin monistamisella PCR-menetelmällä ja näytteiden ajamisella elektroforeesilla. Käytimme näytteinä koululla olevaa genomista DNA:ta, joka sisälsi vain hemokromatoosin HD-geenimutaation (näyte 114) sekä DNA:ta, joka sisälsi molemmat mutaatiot. Meillä oli neljä reaktioputkea, joissa oli yhdessä HD-geenimutaation sisältävää näytettä 1 µl ja lopuissa tuplahetero-näytettä 1 µl, 3 µl ja 5 µl. Käyttämämme ohje oli tehty 5 µl:lle DNA:ta. Me korvasimme puuttuvan määrän autoklavoidulla vedellä. Reaktioputkiin tuli genomisen DNA:n lisäksi myös reakticocktail. Näytteiden lopputilavuus oli 50 µl.

PCR-reaktion jälkeen pipetoimme näytteet 1,2 %:n agarosigeelille, ja ne jäivät ajoon yön yli. Seuraavana päivänä tarkastelimme geeliä UV-valolla ja leikkasimme PCR-tuotteet geeliltä ja puhdistimme ne. Geelin kuvasta (kuvio 5) näkyy, että onnistuimme monistamaan tuplahetero 1 µl:n ja 3 µl:n näytteistä DNA:ta ja saamaan sen geelille. HD-mutaatio- ja 5 µl:n tuplaheteronäytteestä emme saaneet DNA:ta. Syytä tähän emme osaa sanoa.

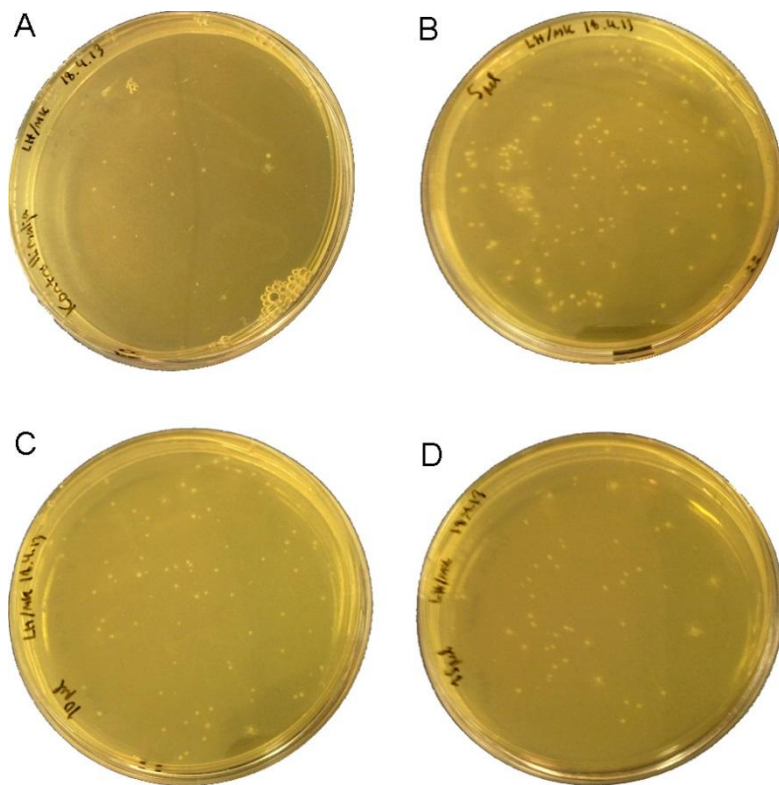


KUVIO 5. Agarosielektroforeesi. Paikka 1 = näyte 114 (HD-mutaatio). Paikka 2 = tuplahetero 1  $\mu$ l. Paikka 3 = tuplahetero 3  $\mu$ l. Paikka 4 = tuplahetero 5  $\mu$ l.

## 5.2 Ligaatio ja transformaatio

Toisena päivä laitoimme myös transformaatioissa tarvittavat kompetentit solut kasvamaan. Käytimme transformaatioissa *E.coli* JM101-kantaa. Ne jäivät ravistelijaan yön yli.

Ligaatio suoritettiin jäissä. Meillä oli kolme DNA-näytettä, joihin pipetoitiin 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l ja 15  $\mu$ l PCR-tuotetta. Kaikkiin lisättiin 1  $\mu$ l pJET1.2/blunt Cloning Vectoria ja 1  $\mu$ l T4 DNA Ligaasia. Steriilin veden avulla näytteiden lopputilavuudeksi tuli 20  $\mu$ l. Näytteet pyöräytettiin nopeasti sentrifuugissa, jotta myös putkien reunoilla olevat tipat saataisiin putken pohjalle. 5 minuutin seisotuksen jälkeen suoritimme transformaation ja maljauksen.



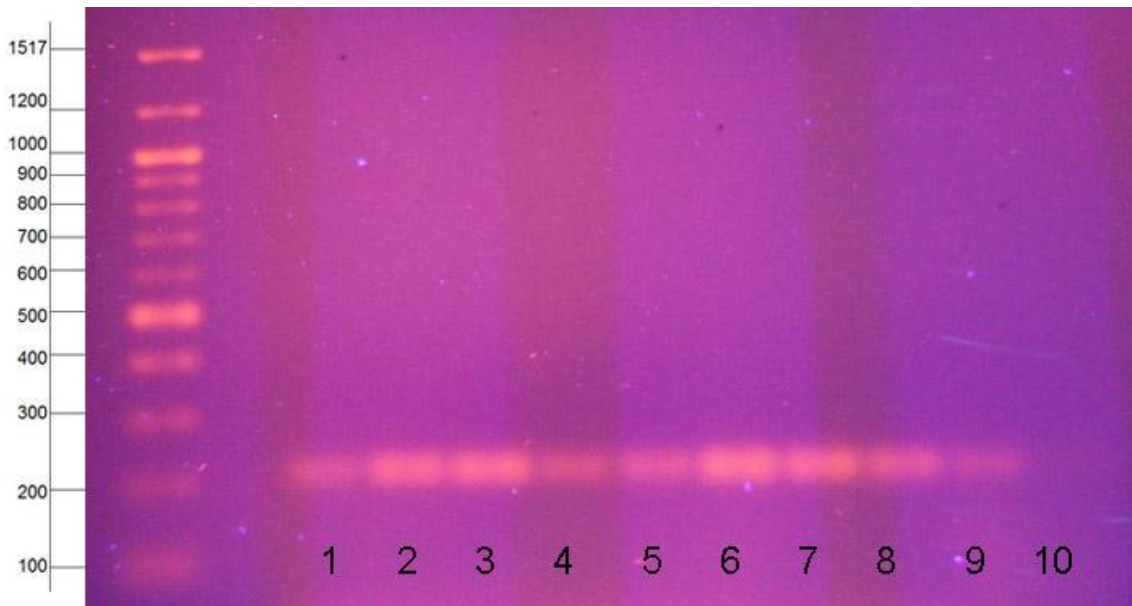
*KUVIO 6. Kuvassa transformaatiomaljat pesäkkeineen inkubaation jälkeen. Malja A = Kontrolli, Malja B = 5 µl, Malja C = 10 µl ja Malja D = 15 µl.*

Maljat olivat +37 °C:ssa lämpökaapissa, ja seuraavana päivänä kun tarkastelimme niitä, kaikilla kasvoi pesäkkeitä. Kuviossa 6 on kuvattu kontrollimalja sekä yksi 5 µl, 10 µl ja 15 µl:n näytemaljoista. Käyttämämme kitin positiivinen selektio varmisti, että elatusmaljoilla kasvoi bakteerisoluja, joilla oli haluttu plasmidi sisässään. Kloonausvektori takasi, että 99 % klooneista oli oikeita. Käyttämämme kloonausvektori pJET1.2/blunt sisälsi kuolettavan restriktioentsyymigeenin, joka lakkasi toimimasta, kun DNA yhdistyi plasmidiin. Toisin sanoen vain ne bakteerisolut, joilla oli uutta DNA:ta, pystyivät kasvamaan ja muodostamaan pesäkkeitä. Tällä tavalla pystyttiin valitsemaan ja poistamaan solut, joissa plasmidi ei sisältänyt uutta DNA:ta, näin oli sen vuoksi, että plasmidi oli yhdistynyt uudestaan itsensä kanssa tai plasmidiin ei ollut siirtynyt DNA:ta. Yhdistelmä-plasmidin puuttuessa bakteerisolut eivät pystyneet kasvamaan transformaation jälkeen, sillä restriktioentsyymigeeni aiheutti niiden

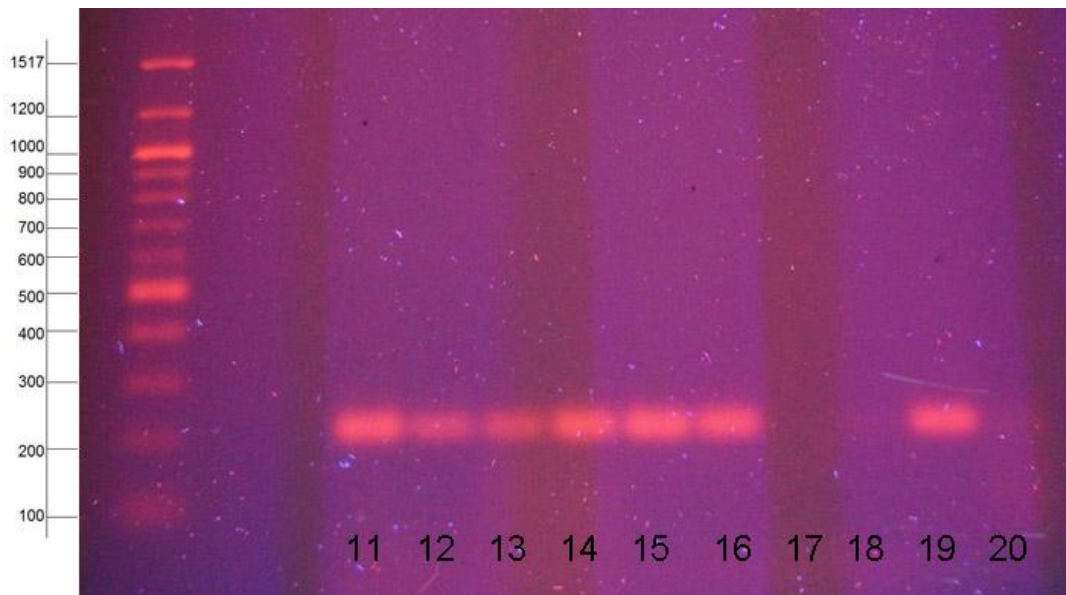
DNA:n pilkkoutumisen. Koska kaikilla maljoilla kasvoi pesäkkeitä, olimme onnistuneet ligaatiossa ja transformaatioissa.

### 5.3 Pesäke-PCR

Pesäke-PCR oli jo periaatteessa varmistus, että olemme onnistuneet monistamaan haluttua DNA:ta. Kuviosta 7 ja 8 nähdään, että kaikilla muilla pesäkkeillä oli haluttua genomista DNA:ta, paitsi pesäkkeessä 10, 17, 18 ja 20. Tämän näkee siitä, ettei geelillä näiden näytteiden kohdalla ole havaittavaa vyöhykettä. Valitsimme jatkoon pesäkkeet 3, 6, 11 ja 19. Nämä pesäkkeet valittiin sen perusteella, miltä ne näyttivät geelillä. Niiden vyöhykkeet olivat tummat ja selkeät.



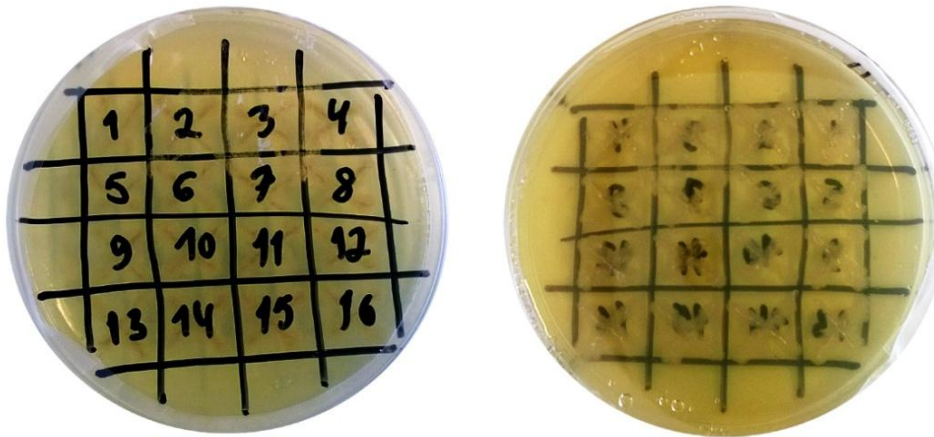
*KUVIO 7. Pesäke-PCR. Pesäkkeet 1–10.*



*KUVIO 8. Pesäke-PCR. Pesäkkeet 11–20.*

Pesäke-PCR:n yhteydessä tehdyillä ristimaljoilla oli kaikissa ruudukoissa kasvua. Kuviossa 9 on toisen ristimaljan ruudukot ja pesäkkeet. Tämän perusteella onnistuimme valitsemaan bakteeripesäkkeet, joissa on yhdistelmä-DNA. Pesäke-PCR kuitenkin tuotti toisenlaisen tuloksen, kun agarosielektroforeesilla ei saatu kaikista pesäkkeistä haluttua DNA:ta. Yhtenä syynä pesäke-PCR:n ja ristimaljan ristiriitaisiin tuloksiin voi olla se, että pipetinkärkeen ei ole jäänyt pesäkettä, kun sillä on tehty rasti ristimaljalle. Toinen vaihtoehto on se, että pesäkettä on saatu PCR-reaktioon asti, mutta DNA ei olekaan sisältänyt haluaamme mutaatiota. Tämä selittyy sillä, että kloonausvektori pJET1.2/blunt takasi lähes 100-prosenttisen kloonien saannin. On mahdollista, että onnistuimme valitsemaan myös sellaisia pesäkkeitä, joissa ei ollut DNA:ta.





KUVIO 9. Ristimalja ja näytteet 1–16. Vasen kuva maljan takaa, oikea kuva rasteissa kasvavista pesäkkeistä.

#### 5.4 Plasmidin puhdistus

Tämä vaihe ei onnistunut ihan niin kuin oli tarkoitus. Yhdistimme plasmidit väärin, joten ne eivät olleet täysin puhtaita, koska sekoittuivat keskenään. Ne olivat kuitenkin käyttökelpoisia, koska aikaisempien tulosten perusteella kaikissa pitäisi olla sama mutaatio. Plasmidien kuuluisi olla identtisiä klooneja toisistaan. Silti plasmidi numero 3 jäi työstämme pois, teimme plasmidien puhdistuksen varmistuksena uudestaan näytteille 6, 11 ja 19. Nämä näytteet ovat pakkasessa tallessa, joten niitä voidaan hyödyntää tarvittaessa myöhemmin.

#### 5.5 DNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen spektrofotometrillä

Pipetoimme 4 µl puhdistettua plasmidia 396 µl:aan vettä ja mittasimme näytteet spektrofotometrillä aallonpituuksilla 260 nm ja 280 nm. Mitattavan näytemäärän pienuuden vuoksi käytimme mikrokyvettiä. Saaduista tuloksista laskimme näytteidemme DNA-konsentraatiot ja puhtaudet, jotka näkyvät taulukossa 2. Mitä lähempänä DNA:n puhtausaste on 1.8, sitä puhtaampaa se on. Kuten taulukosta 2 näkee, näytteet 6 ja 19 ovat hyvin puhdasta DNA:ta, kun taas näytteessä 11 on todennäköisesti pientä proteiinikontaminaatiota. Se ei silti tarkoita, etteikö näyte toimisi positiivisena kontrollina harjoitustyössä. DNA-konsentraatioissa on eroja ja näytteessä 11 on eniten DNA:ta µl:aa kohti. Näyte 6 puolestaan sisältää näistä näytteistä vähiten DNA:ta. Eroina DNA-konsentraatioihin voi olla eri työ-

vaiheissa tapahtuneet käsittelyt. On vaikeaa jäljittää mitään yksittäistä työvaihetta, jossa virhe olisi käynyt.

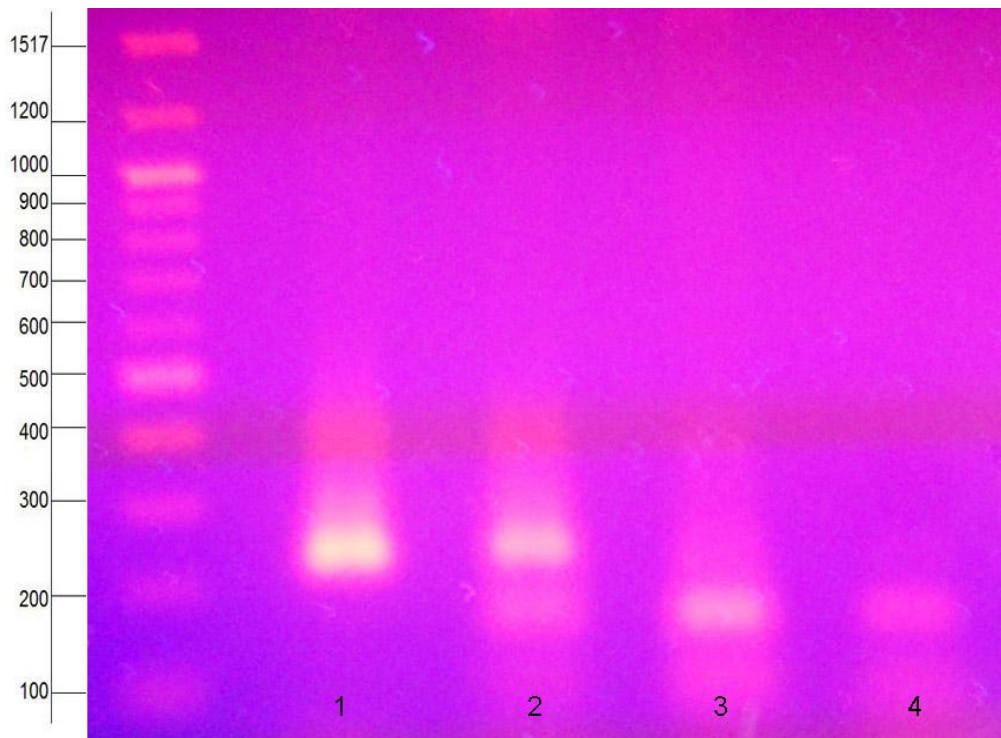
*TAULUKKO 2. DNA-näytteiden puhtaus.*

Näyte	ABS		DNA-konsentraatio	DNA:n puhtausaste $A_{260}/A_{280}$
	260nm	280nm		
H <sub>2</sub> O	0,0010	0,0002		
6	1,5789	0,8530	2,4785 µg/µl	1,85
19	0,8971	0,5040	4,4855 µg/µl	1,779
11	0,4957	0,3409	7,8945 µg/µl	1,45

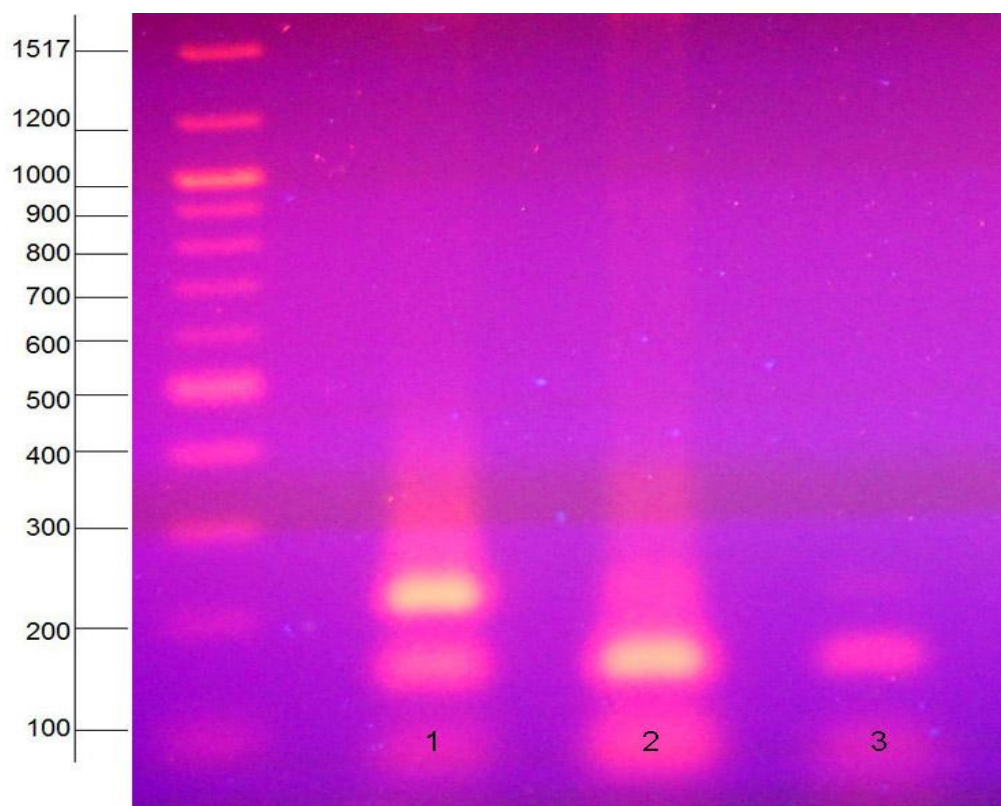
## 5.6 Digestio

Digestion jälkeen teimme PCR ajon, jossa oli mukana meistä itsestämme eristettyä genomista DNA:ta. Se toimi negatiivisena kontrollina. Näytteen 19 vyöhyke on samassa kohdassa kuin kontrolli, mikä viittaisi siihen, ettei siinä ole HD-mutaatiota. Tämä tulos on ristiriidassa aiempiin, näyte kasvoi transformatiomaljoilla ja pesäke-PCR antoi myös positiivisen tuloksen. Jossain vaiheessa on saattanut tapahtunut pipetointivirhe eikä näyte ehkä ole mennyt putkeen. Mitään muuta järkevää syytä emme osaa ajatella. Kuitenkin näytteissä 6 ja 11 olemme onnistuneet monistamaan hemokromatoosi-geenimutaation.





*KUVIO 10. 1,2% agarosigeeli. Reunassa 100bp standardi. Paikka 1 = näyte 6. Paikka 2 = näyte 11. Paikka 3 = näyte 19. Paikka 4 = Negatiivinen kontrolli.*



*KUVIO 11. 1,5% agarosigeeli. Reunassa 100bp standardi. Paikka 1 = näyte 11. Paikka 2 = näyte 19. Paikka 3 = Negatiivinen kontrolli.*

## 5.7 DNA:n sekvensointi

Kaikki näytteemme sekvensoitiin Biocenterissä. Tuloksia analysoidessamme geenimutaatio löytyi nukleotidisekvenssistä. Erona normaaliin geeniin on histidiinin (CAT) vaihtuminen asparagiinihapoksi (GAT). Kuviossa 12 näkyy yläpuolella mutaatiosekvenssi ja sen alla normaali sekvenssi. Mutaatiokohta, jossa histidiini on vaihtunut asparagiinihapoksi, on merkitty punaisella renkaalla. Kuviossa 12 ja 13 esiintyvä sekvenssi on näytteestä 6. Myös näytteestä 11 löytyi sama hemokromatoosi-mutaatio.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
370 bits(200)	1e-99	205/207(99%)	1/207(0%)	Plus/Plus
Query 231		ACATGGTTAAGGCCTGTTGCTCTGTCTCCAGGTTACACTCTCTGCACTACCTCTTCATG		290
Sbjct 26093292		ACATGGTTAAGGCCTGTTGCTCTGTCTCCAGGTTACACTCTCTGCACTACCTCTTCATG		26093351
Query 291		GGTGCCTCAGAGCAGGACCTTGGTCTTTCCTTGTTTGAAGCTTTGGGCTACGTGGATGAC		350
Sbjct 26093352		GGTGCCTCAGAGCAGGACCTTGGTCTTTCCTTGTTTGAAGCTTTGGGCTACGTGGATGAC		26093411
Query 351		CAGCTGTTTCGTGTTCTATGATGATGAGAGTCGCCGTGTGGAGCCCCGAACCTCCATGGGTT		410
Sbjct 26093412		CAGCTGTTTCGTGTTCTATGATGATGAGAGTCGCCGTGTGGAGCCCCGAACCTCCATGGGTT		26093471
Query 411		TCCAGTAGAATTTCAAGCCAGTATGTG	437	
Sbjct 26093472		TCCAGTAGAATTTCAAGCCAG-ATGTG	26093497	

*KUVIO 12. HFE-geenin H63D-mutaatio ja normaali emäsjärjestys. Mutaatiokohta on merkitty punaisella renkaalla.*

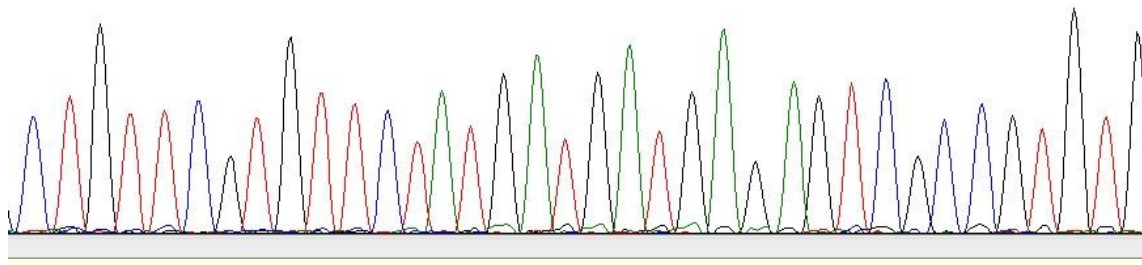
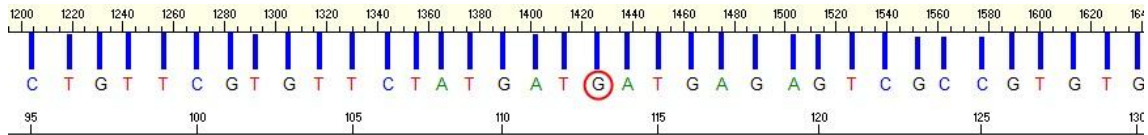
```

AAATGCAGAATAAAGTTGGTCAAGAGGAACATATTGAATATTTAGCTCGTA
GTTTTTCATGAGAGTCGATTGCCAAGAAAACCCACGCCACCTACAACGGTTC
CAGATGAGGTGGTTAGCATAGTTCTTAATATAAGTTTTAATATACAGCCTGA
AAATTTGAGAGAATAAAGAAGAACATCGATTTTCCATGGCAGCTGAGAAT
ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATACATGGTTAAGGCCTGTTGCTCTGTC
TCCAGGTTACACTCTCTGCACTACCTCTTCATGGGTGCCTCAGAGCAGG
ACCTTGGTCTTTCCTTGTTTGAAGCTTTGGGCTACGTGGATGACCAGCTGT
TCGTGTTCTATGATGATGAGAGTCGCCGTGTGGAGCCCCGAACCTCCATGG
GTTTCCAGTAGAATTTCAAGCCAGTATGTGTGCATCTTGCGAAAAACCGAG
CCACGGAAGTACTGG

```

*KUVIO 13. Sekvenssi, jossa tummennettuna mutaatio GAT eli asparagiinihapo.*

Saimme kuviossa 13 esitetyn sekvenssin Biocenteriltä. Sekvenssi tehtiin pJET1.2 reverse-alkukkeella, mikä tarkoittaa sitä, että sekvensointia tehtiin vastakkaiseen suuntaan. Tätä sekvenssiä vertasimme NCBI:n tietokannan BLAST-työkalun avulla terveen ihmisen DNA:han.



*KUVIO 14. Sekvensoinnissa saatu kromatogrammi, jossa mutaatiokohta on ympyröity.*

## 5.8 Lopputulokset

Lopputuloksena voimme todeta, että onnistuimme monistamaan ja kloonamaan hemokromatoosin HD-mutaation. Näytteet 6 ja 11 ovat identtisiä keskenään, kuten kloonien kuuluukin olla. Kumpaakin näistä näytteistä voidaan käyttää geenitestin positiivisena kontrollina. Näytteistä 3 ja 19 voisi tutkia onko niissä hemokromatoosin HD-mutaatio.

## 6 POHDINTA

Opinnäytetyömme aihe oli mielenkiintoinen ja työlle oli käytännön tarve. Saimme toteuttaa käytännönläheisen projektityön, jonka tarkoituksena oli monistaa genomista DNA:ta hemokromatoosi-harjoitustyötä varten. Projektityöskentelyssä opimme toimimaan suunnitelmallisesti ja jakamaan työtehtäviä keskenämme. Näiden taitojen myötä meillä on paremmat valmiudet toimia bioanalytikoina. Molekyylibiologia ja geenitekniikka ovat mielenkiintoisia osa-alueita bioanalytikon työssä. Ne eroavat suuresti tavallisesta näytteiden analysoinnista ja erikoisosaamista tarvitaan. Hemokromatoosi oli meille tautina aika tuntematon, ja etsimme paljon teoretietoa niin taudista kuin käyttämistämme geenitekniikan ja molekyylibiologian menetelmistä. Tavoitteenamme olikin syventää omaa osaamistamme tällä alalla. Opinnäytetyömme vaati syventymistä myös hemokromatoosi-geenimutaatioihin sekä niistä aiheutuviin muutoksiin elimistössä. Oli tärkeää tietää, miten HFE-proteiini toimii raudansäätelyjärjestelmässä normaalisti, jotta pystyimme ymmärtämään, millä tavoin geenimutaatiot muuttavat proteiinin toimintaa.

Työmme tavoitteena oli kloonata ja monistaa HD-mutaation sisältävää genomista DNA:ta. Onnistuimme tavoitteessamme ja saimme kloonattua kahteen plasmidiin hemokromatoosin HD-mutaation ja monistamaan sen. Mielestämme onnistuimme työssämme hyvin, vaikka plasmidi 3 jäi tekemämme virheen takia pois. Meille ei koskaan selvinnyt, miksi näyte 19 kasvoi ristimaljalla ja pesäke-PCR tulos oli positiivinen, vaikka viimeisellä agarosigeelillä näytteestä tuli negatiivinen. Näyte 19 sisälsi plasmidin, mutta jostain syystä emme saaneet sitä viimeiseen agarosielektroforeesiajoon.

Toiminnallisena tavoitteena opinnäytetyöprojektillemme oli mahdollistaa harjoitustyön tekeminen myös tulevaisuudessa. Onnistuimme kloonamaan ja monistamaan haluttua DNA:ta. Tavoitteenamme oli myös mahdollistaa harjoitustyön sujuva toteuttaminen PCR-laitteella laatimiemme käyttöohjeiden avulla. Toivomme, että työmme tuloksista on hyötyä myös tuleville bioanalytiko-opiskelijoille. Tekemämme työn ansiosta positiivista kontrollia on nyt käytettävissä.

vissä hemokromatoosi-geenitestiä varten. Kehittämistehtävänä työssämme olisi, että joku suorittaisi sekvensoinnin toisella kerralla puhdistetuille plasmideille. Jatkossa myös tekemäämme käyttöohjetta olisi hyvä päivittää ja muokata tarvittaessa.

Eettisyys tuli esiin opinnäytetyössämme lähinnä siinä kohdassa, kun käytimme omia näytteitämme negatiivisina kontrolleina. Tämä voisi monen mielestä olla eettisesti väärin. Pystymme kuitenkin perustelemaan omien näytteidemme käytön sillä, että kummallakaan meistä ei ole koskaan ollut korkeita rauta-arvoja ja siten olisi hyvin epätodennäköistä, että meillä olisi hemokromatoosia. Jos näytteissämme olisi ilmennyt geenimutaatio, olisi se toki varmennettu terveydenhuollossa. Geenimutaation löytyminen ilman korkeita veren rauta-arvoja ei johda hemokromatoosi-diagnoosiin, mutta silloin tilannetta osattaisiin seuralla ja pystyttäisiin ennaltaehkäisemään mahdollisia elinsairauksia.

## LÄHTEET

Aguilar-Martinez, P., Grandchamp, B., Cunat, S., Cadet, E., Blanc, F., Nourrit, M., Lassoued, K., Schved, J-F & Rochette, J. 2011. Ferrata Storti Foundation. Haematologica: The Hematology Journal. Iron overload in HFE C282Y heterozygotes at first genetic testing: a strategy for identifying rare HFE variants. Julkaistu 12.1.2011. Hakupäivä 25.12.2012.

<http://www.haematologica.org/cgi/content/full/96/4/507#F10960507>.

Alexander, J & Kowdley, K. 2005. Hereditary Hemochromatosis: Genetics, Pathogenesis, and Clinical Management. *Annals Of Hepatology* 4 (4), 240-247.

Färkkilä, M., Hannuksela, J. & Parkkila, S. 2008. Lääketieteellinen Aikauskirja Duodecim. Perinnöllinen hemokromatoosi. 2008. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

HGNC HUGO Gene Nomenclature Committee. 2013. Gene Symbol Report: HFE. Hakupäivä 12.1.2013.

[http://www.genenames.org/data/hgnc\\_data.php?hgnc\\_id=4886](http://www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=4886)

Hofmann, A. 2010. Spectroscopic techniques: I Spectrophotometric techniques. Teoksessa K. Wilson & J. Walker (toim.) *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Seitsemäs painos. New York: Cambridge University Press.

Karlsson, Å & Marttala, A. 2001. Projektikirja: onnistuneen projektin toteuttaminen. Tampere: Tammer-paino.

Mustajoki, P. 2009. Hemokromatoosi (Raudankertymäsairus). Lääkärikirja Duodecim. Hakupäivä 25.12.2012.

[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00758&p\\_teos=dlk&p\\_osio=&p\\_selaus=](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00758&p_teos=dlk&p_osio=&p_selaus=)

NCBI National Center for Biotechnology Information. 2013. Hereditary hemochromatosis – Molecular Genetics. Hakupäivä 6.9.2013.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1440/#hemochromatosis.Molecular\\_Genetics](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1440/#hemochromatosis.Molecular_Genetics)

NCBI National Center for Biotechnology Information. 2012. Probe. PCR. Hakupäivä 23.12.2012.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>

Parkkila, S. 2000. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Perinnöllinen hemokromatoosi. 2000; 116: 829-836.

Rapley, R. 2010a. Molecular biology, bioinformatics and basic techniques. Teoksessa K. Wilson & J. Walker (toim.) Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Seitsemäs painos. New York: Cambridge University Press.

Rapley, R. 2010b. Recombinant DNA and genetic analysis. Teoksessa K. Wilson & J. Walker (toim.) Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Seitsemäs painos. New York: Cambridge University Press.

Solunetti. 2006a. Ihmisen kromosomit. Hakupäivä 12.1.2013.

[http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/ihmisen\\_kromosomit/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/ihmisen_kromosomit/2/)

Solunetti 2006b. Ligaatio. Hakupäivä 5.9.2013.

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/ligaatio/2/>

Solunetti 2006c. Sekvensointi. Hakupäivä 8.9.2013.

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sekvensointi/2/>

Solunetti. 2006d. Spektrofotometri. Hakupäivä 5.9.2013.

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/spektrofotometri/>

Solunetti. 2006e. Spektrofotometria. Hakupäivä 5.9.2013.

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/spektrofotometria/>

Solunetti 2006f. Transformaatio. Hakupäivä 5.9.2013.

<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/transformaatio/2/>

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K., Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Thermo Fisher Scientific. 2013. NanoDrop Spectrophotometers - Nucleic Acid Purity Ratios. Hakupäivä 21.9.2013.

<http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>

Timmer, J. 2009. Ars Technica. Scientific Method – A brief guide to DNA sequencing. Hakupäivä 14.11.2013.

<http://arstechnica.com/science/2009/09/a-brief-guide-to-dna-sequencing/>

U.S. Department of Energy (DOE). Human Genome Project Information. The Hemochromatosis Gene. 2003. Hakupäivä 12.1.2013

[http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/posters/chromosome/hfe.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/posters/chromosome/hfe.shtml)

U.S. National Library of Medicine. 2009. Genes: HFE. Julkaistu 7.1.2013. Hakupäivä 9.1.2013.

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/HFE>

Walker, J. 2010. Electrophoretic Techniques. Teoksessa K. Wilson & J. Walker (toim.) Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Seitsemäs painos. New York: Cambridge University Press.



## **LIITTEET**

Liite 1 Liuosten valmistus

Liite 2 Genomisen DNA:n monistus (PCR)

Liite 3 Agaroosigeelin valmistus

Liite 4 PCR-tuotteen puhdistus geeliltä

Liite 5 Ligaatio

Liite 6 Transformaatio

Liite 7 Genomisen-DNA:n eristys

Liite 8 Plasmidin puhdistus

Liite 9 Digestio

Liite 10 Sekvensointi

Liite 11 TC 4000 käyttöohje

10xTBE-puskuri (1000 ml)

1. Punnitse 108 g Tris:ia, 55 g boorihappoa ja 9.3 g Na<sub>2</sub>EDTA:ta.
2. Punnitse kaikki aineet litraan vettä.

1xTBE-puskuri (100 0ml)

1. Punnitse 10.8g Tris, 5.5g boorihappoa ja 0.93 g Na<sub>2</sub>EDTA:ta.
2. Punnitse kaikki aineet litraan vettä.

LB-agar (500 ml, noin 25 maljaa)

1. Punnitse yhden litran Erlenmeyeriin 5 g NaCl:ia, 5 g tryptonia, 2.5 g hii-vauutetta ja 7.5 g agaroosia.
2. Lisää tislattua vettä 500 ml:aan asti.
3. Laita magneetti Erlenmeyerin pohjalle ja sekoita liuos magneettisekoitta-jan avulla. Poista magneetti sekoituksen jälkeen.
4. Peitä suuaukko foliolla ja laita indikaattoriteippi pulloon.
5. Autoklavoi liuos nesteille tarkoitetulla ohjelmalla
6. Anna liuoksen jäähtyä 55 °C:ksi.
7. Lisää ampisilliinia 50 ml.

Jaa liuos maljoille siten, että kaadat sitä jokaiselle maljalle n. 20 ml.

1. Tee HD-mutaatiolle cocktail steriiliin eppendorf-putkeen. Huomioi, että ohjeet ovat yhdelle PCR-reaktiolle. Cocktaileja tehdään aina ylimäärin eli PCR-reaktio + 1.

5 µl	10xpuskuri
2 µl 1:10-laim	aluke 3
2 µl 1:10-laim	aluke 4
1 µl	dNTP
0,5 µl	DNA-polymeraasi
34,5 µl	steriiliä vettä

Cocktailin lopputilavuudeksi tulee 45 µl.

2. Pipetoi steriiliin PCR-putkeen 5 µl genomista DNA:ta ja 45 µl HD-mutaatio cocktailia. Pipetoi samalla tavalla negatiivista kontrollia (H<sub>2</sub>O) toiseen PCR-putkeen.
3. Vortexoi näytteitä kevyesti ja sentrifugoi niitä hetki, jotta liuos saadaan putken pohjaan.
4. Siirrä näyteputket PCR-laitteeseen. Ohjelmoi laitteeseen seuraava ohjelma:

1. 96 °C 5 minuuttia
2. 96 °C 30 sekuntia
- 56 °C 60 sekuntia
- 72 °C 60 sekuntia
- 35 sykliä
3. 4 °C säilytys

Ohjelma kestää 2 tuntia 15 minuuttia.

1. Punnitse 2 g agaroosia erlenmeyeriin.
2. Lisää 1xTBE-puskuria 200 ml.
3. Liuota agaroosi kuumentamalla seosta mikroaaltouunissa.
4. Sekoita välillä kuumennuksen aikana, jotta agaroosi liukenee puskuriiin.
5. Liuosta kuumennetaan niin kauan, kunnes se muuttuu täysin kirkkaaksi nesteeksi. Älä anna seoksen kiehua.
6. Anna geelin jäähtyä n. 60 °C:een.
7. Lisää vetokaapissa 20 µl etidiumbromidia, sillä se on karsinogeeni. Sekoita liuosta varoen ilmakehien muodostumista.
8. Vala geeli päistään teipattuun ajokelkkaan ja aseta näytekampa paikoilleen. Jos geelissä näkyy suuria ilmakehien muodostumia, puhkaise ne esim. steriilillä neulalla.
9. Anna geelin jähmettyä 30 minuuttia.
10. Poista näytekampa geelistä ja teipit ajokelkan päistä.
11. Aseta kelkka ajoaltaaseen.
12. Lisää 1xTBE-puskuria niin, että geeli ja näytekaivot ovat varmasti sen peitossa.
13. Geeli on valmis näytteiden lisäämiseen.

Käytettäessä 1,2 % ja 1,5 % geelejä agaroosia punnitaan 2,4 g ja 3 g.

1. Punnitse tyhjä eppendorf-putki.
2. Leikkaa steriilillä veitsellä geeliltä haluamasi DNA palanen ja laita se punnitsemaasi eppendorf-putkeen.
3. Punnitse putki uudelleen. Saat näytteen painon vähentämällä tyhjän putken painon täyden putken painosta.
4. Lisää 200 µl Buffer NT1 reagenssia jokaista 100 mg näytettä kohti.
5. Inkuboi näytettä 10 minuutti 50 °C:ssa lämpöhauteessa. Sentrifugoi näytettä 2–3 minuutin välein, jotta geeli hajoaisi täysin.
6. Laita kitin mukana tuleva pylväs tyhjään ja steriiliin eppendorf-putkeen. Pipetoi näyte pylvääseen.
7. Sentrifugoi 30 sekuntia 11,000 x g. Kaada liuos pois.
8. Lisää 700 µl Buffer NT3 reagenssia pylvääseen. Sentrifugoi kuten edellä. Kaada liuos pois. Toista pesu.
9. Sentrifugoi näyte vielä 30 sekuntia 11,000 x g, jotta kaikki Buffer NT3 reagenssi on varmasti poistunut näytteestä. Varo ettei pylväs koske liuokseen kun kaadat sen pois.
10. Laita pylväs uuteen puhtaaseen eppendorf-putkeen. Lisää 15 µl Buffer NE reagenssia ja inkuboi huoneenlämmössä 1 minuutti.
11. Sentrifugoi 1 minuutti 11,000 x g.
12. DNA on nyt eppendorf-putkessa. Heitä pylväs pois.

Ligaatio suoritetaan jäissä

1. Pipetoi steriiliin eppendorf-putkeen 10  $\mu$ l 2xReaction Buffer reagenssia.
2. Lisää 1  $\mu$ l puhdistettua PCR-tuotetta.
3. Lisää nukleasivapaata vettä 6  $\mu$ l.
4. Pipetoi putkeen 1  $\mu$ l DNA Blunting Enzyme reagenssia.
5. Vortexoi näyte nopeasti 3–5 sekuntia.
6. Inkuboi näytettä 70 °C:ssa 5 minuuttia. Tämän jälkeen laita näyte taas jäihin.
7. Lisää sekä pJET1.2/blunt Cloning Vectoria, että T4 DNA Ligaasia 1  $\mu$ l.
8. Vortexoi 3–5 sekuntia.
9. Inkuboi näytettä huoneenlämmössä 5 minuuttia.
10. Käytä heti transformaatioon tai säilytä näyte pakasteessa transformaatioon saakka.

1. Ota ligaatioseosta 20 µl ja lisää 250 µl kompetentteja soluja. Seisota jäissä 30 minuuttia.
2. Pidä seosta tarkalleen 2 minuuttia + 42 °C asteisessa vesihauteessa (lämpöshokki)
3. Lisää 750 µl esilämmitettyä (+37 °C) LB-lientä ja inkuboi soluja 35 minuuttia +37 °C:ssa.
4. Maljaa näytteet esilämmitetyille LB-maljoille. 250 µl per malja. Levitä levityskolmiolla.
5. Laita maljat kasvamaan +37 °C:een lämpökaappiin yön yli.

1. Ota Verinäyte EDTA-putkeen
2. Laita vesihaude lämpenemään +70 °C:een. Elution Buffer BE täytyy esilämmittää
3. Pipetoi 25 µl proteinaasi K:ta ja 200 µl verta eppendorf-putkeen
4. Lisää 200 µl Buffer B3 reagenssia ja vortexoi 3 sekuntia
5. Inkuboi näytteet +70 °C:ssa 10 min
6. Lisää 210 µl 99% etanolia ja vortexoi näyte
7. Ota pakkauksesta pylväs ja tyhjä keräysputki. Pipetoi näyte pylvääseen ja sentrifugoi 1 minuutti 11,000 x g. Heitä keräysputki nesteineen pois.
8. Ota uusi keräysputki. Lisää 500 µl Buffer BW reagenssia. Sentrifugoi 1 minuutti 11,000 x g. Heitä keräysputki nesteineen pois.
9. Ota uusi keräysputki. Lisää 600 µl Buffer B5 reagenssia. Sentrifugoi kuten edellä. Kaada neste pois, mutta säilytä keräysputki.
10. Laita pylväs takaisin putkeen ja sentrifugoi vielä kerran 1 minuutti 11,000xG. Heitä keräysputki pois.
11. Laita pylväs steriiliin eppendorf-putkeen ja lisää 100 µl esilämmitettyä Buffer BE reagenssia. Pipetoi reagenssi suoraan silikamembraanin päälle. Inkuboi huoneenlämmössä 1 minuutti. Sentrifugoi 1 minuutti 11,000 x g.
12. Genominen DNA on nyt eppendorf-putkessa, joten heitä pylväs pois.



1. Ota kahteen 50 ml falcon-putkeen samaa yön yli kasvustoa n. 45 ml.
2. Sentrifugoi 3,000 RPM 3 minuuttia. Kaada liuos pois.
3. Lisää RES-reagenssia 4 ml/putki. Lisää ensin 1 ml ja purskuttele varovasti pipetillä, tarkoituksena saada aikaan lieju. Lisää sitten loput 3 ml.
4. Yhdistä putket.
5. Lisää 8 ml Lysis Buffer reagenssia. Lisää ensin 1 ml ja sekoita. Lisää loput 7 ml ja sekoita putkea viisi kertaa.
6. Inkuboi näytteitä huoneenlämmössä 5 minuuttia.
7. Ota esiin kitin mukana tullut filtteri ja pylväs. Aseta suodatin pylvääseen ja laita putki roikkumaan kitin mukana tulevaan telineeseen. Aseta pylvään alle tyhjä dekanterilasi.
8. Kostuta suodatin 12 ml EQU-buffer reagenssia. Pipetoi reagenssi suodattimen reunoja pitkin.
9. Sillä välin kuin suodatin kostuu, lisää näyteputkeen 8 ml NEU-buffer reagenssia ja sekoita heti 10–15 kertaa. Näyteliuoksen tulisi olla homogeeninen.
10. Sekoita näyte vielä kerran ennen suodattimeen kaatamista. Anna suodatua ainakin 10 minuuttia.
11. Lisää suodattimeen EQU-buffer reagenssia 5 ml. Pipetoi reagenssi jälleen suodattimen reunaa pitkin ja anna suodatua. Lopuksi heitä suodatin pois.
12. Pese pylväs 8 ml Buffer Wash reagenssia.
13. Vaihda pylvään alle 10 ml falcon-putki. Lisää Elution Buffer reagenssia 5 ml. Plasmidi-DNA on nyt falcon-putkessa.
14. Lisää näyteputkeen huoneenlämpöistä isopropanolia 3,5 ml. Sentrifugoi näytettä 45 minuuttia 5000 RPM. Poista isopropanoli.
15. Lisää 2 ml huoneenlämpöistä 70% etanolia. Sentrifugoi 10 minuuttia 5000 RPM. Poista etanoli varovasti pipetillä.
16. Kuivaa näyteputki vakuumilla (Speed Vac)

1. Digesticocktail HD-mutaatiolle. Huomio, että ohje on yhdelle DNA-näytteelle.

2 µl	10xpuskuri n:o 3
0,8 µl	BclI entsyymi
0,2 µl	100xBSA

2. Pipetoi PCR-tuotetta 17 µl ja 3 µl digesticocktailia steriiliin eppendorf-putkeen.
3. Vortexoi näyteputkea kevyesti ja sentrifugoi sitten hetki.
4. Siirrä näyte 50 °C:een vesihauteeseen 75 minuutiksi.
5. Lisää näytteeseen 4 µl 5xlatauspuskuria.
6. Digestoitu näyte säilytetään pakastimessa, jos ei sitä käytetä heti.

1. Laske plasmidin pitoisuus kaavalla  $1/50=260 \text{ abs}/X$ . Eli  $X=260 \text{ abs} \cdot 50$ .  
Vastaus on muodossa  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .
2. Tee laimennos, jossa on plasmidia  $300 \text{ ng}/\mu\text{l}$ .
3. Pipetoi PCR-reaktiot.
4. Valitse PCR-laitteelta sekvensointi ohjelma.
5. Valmista tarvittava määrä EDTA-NaAc-seosta 1:1
6. Kun näytteet ovat valmiita PCR:stä, lisää  $2 \mu\text{l}$  EDTA-seosta. Sentrifugoi nopeasti.
7. Lisää  $30 \mu\text{l}$   $100 \%$  etanolia ja vortexoi.
8. Seisota näytteitä huoneenlämmössä  $15$  minuuttia.
9. Sentrifugoi  $13,400 \text{ RPM}$   $30$  minuuttia. Putken pohjalle muodostuu sakka.
10. Poista supernatantti. Pese sakka  $40 \mu\text{l}$   $70 \%$  etanolilla.
11. Sentrifugoi näytteet  $13,400 \text{ RPM}$   $15$  minuuttia ja poista supernatantti.
12. Kuivaa näytteet vakuumilla (Speed Vac)
13. Lähetetään näytteen Biocenterille.

TC-4000

Käyttöohje

## NÄPPÄIMET



Lopetus. Käytetään ohjelmien muokkaamisen lopettamiseen tai ohjelmasta poistumiseen.



Liikutaan näytön riveillä ylöspäin. Muuttaa arvoja ylöspäin muokkauksessa.



Liikutaan näytön riveillä alaspäin. Muuttaa arvoja alaspäin muokkauksessa.



Desimaalierotin. Käytetään vaiheiden lisäämisessä ja ajan muokkaamisessa.



Delete. Käytetään jaksujen ja vaiheiden poistamiseen.



Pause. Ohjelman ollessa käynnissä sen pysäytys/tauottaminen.





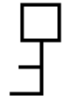








Enter. Valitaan toiminto tai muokkaus sekä hyväksytään kentän tai ohjelman muutokset.



Numero- ja kirjainnäppäimet. Käytetään ohjelmoinnissa. Numerokenttään saa suoraan käyttöön numerot ja tekstikenttään kirjaimet. Usean kirjaimen näppäintä painelemalla saa esiin sen sisältämät kirjaimet. Välilyönnin saa 0-näppäimestä. Muussa kuin numerokentässä numerot toimivat pitämällä näppäintä pohjassa hetken aikaa.

---

Näppäinten kuvat näytöllä ja niitä vastaavat näppäimet laitteen näppäimistöllä.

	Lopetus-näppäin.	
	Ilmoittaa, että ohjelma on lukittu: ohjelmaa voi muokata kun se on ensin kopioitu.	
	Nuolinäppäin ylös.	
	Nuolinäppäin alas.	
	Enter-näppäin.	
	Pause-näppäin.	

## LAITTEEN KÄYNNISTÄMINEN

- Laitte käynnistetään takaosassa olevasta virtakytkimestä.
- Näytölle ilmestyy päävalikko, jossa on kolme vaihtoehtoa

1. Programs (ohjelmat)
2. Information (laitteen tiedot)
3. Configuration (asetukset)

Voit tehdä ohjelmoinnin näytteidesi säilyttämisestä riippuen joko ennen tai jälkeen näytteen asettamista koneeseen. Huomioi, etteivät putket mene pohjaan asti. Kun kansi on auki, pyöritä kannessa olevaa oranssia rengasta ensin myötäpäivään niin paljon kuin se menee. Tämä nostaa laitteen kannen sisäpuolella olevaa pienempää lämpökantta. Kun lämpökansi on aivan ylhäällä laita kansi kiinni. Pyöritä rengasta nyt vastapäivään niin kauan kunnes tunnet vastustusta.

## OHJELMOINTI

### 1. KUN KÄYTÄT LAITTEESSA VALMIINA OLEVAA OHJELMAA

- Valitse **programs**, paina **enter**.
- Laitteessa on valmiina kaksi DNA:n monistamiseen tarkoitettua ohjelmaa, toinen on kaksivaiheinen (**2 step template**) ja toinen kolmivaiheinen (**3 step template**). Näitä voidaan kopioida ja muokata tarpeen mukaan.
- Valitse nuolinäppäimillä haluamasi ohjelma, paina **enter**.
- Voit nuolinäppäimiä käyttäen joko käynnistää ohjelman valitsemalla **run program**, tarkastella sitä valitsemalla **view program** tai kopioida ja muokata sitä valitsemalla **copy program**. Hyväksy valinta **enterillä**.
- **Copy program** valinnan jälkeen voit nimetä ohjelman. Paina **enter** ja kursori ilmestyy näytön vasempaan yläreunaan. Nimi kirjoitetaan kirjainnäppäimillä. Paina **enter** kun valmista.
- Paina **lopetus**-näppäintä ja näytön alareunaan tulee SAVE? ja vaihtoehdot YES ja NO. Paina **enter** valitaksesi **YES**. Ohjelma tallentuu laitteelle ja sille annetaan oma pikavalintanumero. Jos et halua tallentaa ohjelmaa, paina **lopetus**-näppäintä valitaksesi **NO**.
- Jos haluat käynnistää ohjelman, valitse nuolinäppäimillä **run program** ja **enter**. Laite kysyy haluatko varmasti käynnistää ohjelman, valitse **YES enterillä** ja **NO lopetus**-näppäimellä.
- Jos haluat muokata ohjelmaa, valitse **edit program** ja paina **enter**.
- Mene nuolinäppäimillä kohtaan, jonka haluat muokata ja paina **enter**.
- Jos haluat muokata lämpötilaa ja aikaa, valitse toiminto painamalla **enter**, syötä uusi lämpötila numeronäppäimillä ja hyväksy **enterillä**. Tämän jälkeen kursori siirtyy suoraan ajan kohdalle.

- Jos haluat ajaksi vain minuutteja, syötä aika numeronäppäimillä ja paina **enter**. Voit vaihtaa valintaa tuntien ja minuuttien välillä **desimaali**-näppäimellä. Jos haluamasi aika on alle minuutin, paina ensin **desimaali**-näppäintä, jonka jälkeen näytöllä näkyy **m** ja syötä sen jälkeen sekunnit. Aika hyväksytään **enterillä**.
- Jos haluat muokata toimintoa, jossa on **ON/OFF** -vaihtoehdot, voit valita näiden välillä **↑ ↓** näppäimillä. Vahvista valinta painamalla **enter**.
- Kun olet muokannut ohjelmaa haluamallasi tavalla, paina **lopetus**-näppäintä ja sitten **enteriä** tallentaaksesi muutokset. Jos et halua tallentaa, paina uudestaan **lopetus**-näppäintä.
- Nyt voi käynnistää muokkaamasi ohjelman valitsemalla **run program** ja **enter**. Laitte kysyy haluatko varmasti käynnistää ohjelman, valitse **YES enterillä** ja **NO lopetus**-näppäimellä.

## 2. KUN TEET UUDEN OHJELMAN

- Valitse **programs**, paina **enter**.
- Valitse **new program**, paina **enter**.
- Nimeä ohjelma painamalla **enter** ja kursori ilmestyy näytön vasempaan yläreunaan. Nimi kirjoitetaan kirjainnäppäimillä. Paina **enter** kun valmista.
- Valitse nuolinäppäimellä näytöltä rivi, jolla on katkoviivaa. Painamalla **enter** pääset lisäämään jakson (stage). Uuteen jaksoon voi syöttää syklien (cycles) määrän ja yhden vaiheen (step).
- Syklien (cycles) määrä syötetään numeronäppäimillä ja hyväksytään **enterillä**. Nuolinäppäimellä alaspäin pääset siirtymään vaiheeseen (step) ja painamalla **enteriä** voit muokata vaihetta ja hyväksyä muutokset **enterillä**.
- Uuden vaiheen voit lisätä **desimaali**-näppäimellä.



Oulun seudun ammattikorkeakoulu  
Sosiaali- ja terveysalan yksikkö  
TC-4000 –PCR

LIITE 11 6/6

Versio 2.0

2.9.2013

Laatijat: Hagelin Laura, Kokkola Miia  
Hyväksyjä:

---

- Valitun vaiheen voi poistaa **delete**-näppäimellä. Laite kysyy haluatko varmasti poistaa vaiheen "DEL STEP?". **Enterillä** hyväksyt poiston ja **lopetus**-näppäimellä palaat vaiheen muokkaukseen.
- Jakson (stage) lisääminen ennen jo olemassa olevaa jaksoa tapahtuu valitsemalla nuolinäppäimillä jakson numero ja painamalla **enter**. Jaksojen numerointi jatkuu normaalisti lisätyn jakson jälkeen.
- Jakson (stage) voi lisätä ohjelman loppuun menemällä nuolinäppäimillä katkoviivalle, joka on viimeisen jakson alapuolella. Hyväksy **enterillä**.
- Jakson (stage) voi poistaa valitsemalla haluttu jakso nuolinäppäimillä ja painamalla **delete**. Laite varmistaa jakson poistamisen "DEL STAGE?", hyväksy poistaminen **enterillä** ja palaa takaisin **lopetus**-näppäimellä.

## **OHJELMAN POISTAMINEN**

- Valitse **programs**, paina **enter**.
- Valitse ohjelma jonka haluat poistaa, paina **enter**.
- Etsi nuolinäppäimillä ohjelman valikosta **delete program**, paina **enter**. Laite kysyy haluatko varmasti poistaa ohjelman, valitse **YES enterillä** ja **NO lopetus**-näppäimellä.