

Lotta Männikkö

Näyteseekaannusten detektointi THL Biopankin DNA-näyteprosessoinnista

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

21.11.2017

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Lotta Männikkö Näytesekaannusten detektointi THL Biopankin DNA-näyteprosessoinnista 29 sivua + 1 liitettä 21.11.2017
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Laboratoriopäällikkö Päivi Laiho Lehtori Tiina Soininen
<p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää Terveiden ja Hyvinvoinninlaitoksen Biopankin DNA-näyteprosessoinnissa tapahtuvien näytesekaannuksien määrää, eli kuinka iso osuus näytteistä sekoittuu verinäytteiden vastaanoton, DNA-eristyksen ja DNA-laimennoksen välillä. Biopankissa käsiteltyjen näytteiden tulisi täyttää korkeat laatuksiteerit ja olisi hyvin tärkeää ettei näytesekaannuksia pääsisi tapahtumaan. Yksi opinnäytetyön tavoite oli myös pystyttää menetelmä, jossa jo suoraan verinäytteelle voitiin tehdä PCR, ilman erillistä DNA-eristystä, jolloin sisääntullut verinäyte saadaan analyysiin mukaan. Opinnäytetyö suoritettiin THL Biopankin näytechallinnan laboratoriotiloissa Biomedicum tutkimuskeskuksessa keväällä 2017.</p> <p>Tutkittavina näytteinä toimivat sisääntulleesta verinäytteestä kerätty veriliuskanäyte, verinäytteestä eristetty DNA-liuos, sekä DNA-liuoksesta tehty laimennos. Näytteet ajettiin Minisatelliitti PCR-protokollan mukaisesti monistaen näyteenantajalle yksilöllistä D1S80-minisatelliittilokusta. Työssä pipetoitiin rinnakkain agarosigeelille (AGE) saman yksilön DNA-liuoksista saadut PCR-tuotteet ja kolmea näytevyöhykettä tarkasteltiin ajon jälkeen geeliltä. Saman yksilön kolmen näytevyöhykkeen tuli olla identtiset, näytesekaannusta olisi tapahtunut mikäli vyöhykkeiden välillä olisi havaittu poikkeamia.</p> <p>Tulkittavia tuloksia saatiin yhteensä 235 näytteestä, joista 24 oli hepariinia sisältäviä verinäytteitä. Myös verinäytteille onnistuttiin tekemään suoraan PCR, ilman erillistä DNA-eristystä. Tutkittujen näytteiden joukosta ei havaittu näytesekaannuksia. Menetelmää päästiin myös testaamaan asiakkaan reklamoimille näytteille, joiden joukosta tunnistettiin näytesekaannustapaus.</p> <p>D1S80- minisatelliittilokuksen monistamiseen perustuva yksilöntunnistusmenetelmä osoittautui hyväksi alustavaksi analyysiksi näytesekaannustapauksia tutkittaessa, mutta menetelmä vaatisi aina esimerkiksi ID-PCR (6-plex) varmistusanalyysin tulosten luotettavuuden takaamiseksi.</p>	
Avainsanat	DNA, PCR, Minisatelliitti, D1S80- lokus

Author(s) Title Number of Pages Date	Lotta Männikkö Screening of Sample Confusion Occurrence in THL Biobank' s DNA Sample Processing 29 pages + 1 appendices 21 November 2017
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Päivi Laiho , Head of Laboratory Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>The purpose of this study was to find out the number of sample confusion occurrence from the National Institute of Health and Welfare Biobank DNA sample processing. The study examined how much of the samples were mixed between blood sample reception, DNA isolation and DNA dilution. The samples processed at THL Biobank should meet high quality criteria so it is very important that sample confusion will not happen. One goal was also to set up a method where PCR- analysis could be made directly to the blood sample without the need of a separate DNA isolation. The study was carried out at THL Biobank's sample management laboratory facilities at the Biomedicum Research Center in spring 2017.</p> <p>The examined samples were the blood strips collected from the incoming blood samples, the DNA solution isolated from the blood sample and dilution from the DNA solution. The samples were run in accordance with the Minisatellite PCR protocol, amplifying the D1S80 minisatellite locus. Three PCR products of the same individual were pipetted in parallel to agarose gel (AGE) and three sample zones were examined on gel. The same individual sample zones should have drifted into identical positions on the gel and the deviations between the sample bands meant a possible sample confusion case.</p> <p>Outcomes from 235 samples were obtained, of which 24 were samples of heparin containing blood. No sample mix up were found among the studied samples. The method was also tested on a case where samples were returned from customer who suspected that there has been sample confusion among the samples. One clear sample confusion incident was found among the samples.</p> <p>The amplifying of the individual D1S80 minisatellite locus was proven to be a good initial analysis when examining sample mix up cases, which the customer has complaint about. The method however always requires for example an ID-PCR (6-plex) backup analysis to ensure the reliability of the results.</p>	
Keywords	DNA, PCR, Minisatellite, D1S80- locus

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työn teoria	2
2.1	DNA-näyteprosessointi THL Biopankissa	2
2.2	DNA-eristykseen käytettävät menetelmät	3
2.2.1	DNA-näytteiden jatkokäsittely	5
2.3	DNA-toistoalueiden profilointi	7
2.4	Minisatelliitit (Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs)	8
2.5	D1S80-lokus	9
2.6	Suoraan verinäytteestä tehtävän PCR:n haasteet	11
3	Työn toteutus	12
3.1	Kontrollien valmistus	12
3.2	Veriliuskanäytteiden esikäsittely ennen PCR-ajoa	12
3.3	DNA-liuosten esikäsittely	13
3.4	Hepariiniverinäytteiden esikäsittely	14
3.5	Minisatelliitti-PCR	15
3.6	Agarosegeelielektroforeesi	17
3.7	Menetelmän testaus GeneRisk-projektin sekaantuneilla näytteillä	18
4	Tulokset	18
4.1	Kontrollinäytteiden pitoisuudet	18
4.2	Agarosegeelielektroforeesi	19
4.3	Hepariinia sisältävien verinäytteiden tulokset	21
4.4	Generisk-projektin näytesekaannus	22
5	Tulosten tulkinta ja päätelmät	24
	Lähteet	27
	Liitteet	
	Liite 1. Agarosegeelielektroforeesi- ajojen kootut kuvat	

Lyhenteet

AGE	Agaroosigeelielektroforeesi
Alleeli	Vastingeeni, saman geenin vaihtoehtoinen muoto
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
D1S80	Yksilöntunnistukseen käytetty minisatelliittilokus
L1	Stokkinäytteille tehtävä ensimmäinen laimennos, käyttölaimennos
L2	L1-näytteille tehtävä toinen laimennos
PCR	Polymeraasiketjureaktio
STR	Short tandem repeat, mikrosatelliitti
THL	Terveyden ja hyvinvoinninlaitos
VNTR	Variable number of tandem repeats, minisatelliitti

1 Johdanto

Tämän opinnäytetyön aiheena oli tutkia ja selvittää Terveyden ja hyvinvoinninlaitoksen Biopankin DNA-näyteprosessoinnissa tapahtuvien näytesekaannuksien määrää. Opinnäytetyön tavoitteena oli myös pystyttää sisäistä laadunvalvontaa varten menetelmä, jonka avulla verinäytteestä voidaan tehdä suoraan PCR (Polymeraasiketjureaktio), ilman erillistä DNA-eristystä. Näin analyysiin saadaan mukaan myös Biopankkiin sisään tullut verinäyte. Alustava protokolla verinäytteiden käsittelylle oli olemassa, mutta sitä ei oltu vielä testattu minisatelliitti-PCR-menetelmällä. THL Biopankki käsittelee ja säilyttää ainutlaatuisia ja arvokkaita laajoja tutkimuskokoelmia ja edistää kyseisten aineistojen tutkimuskäyttöä terveyttä ja hyvinvointia edistäviin tutkimuksiin, sekä uusien hoitomenetelmien kehittämiseen. Työ toteutettiin keväällä 2017 THL Biopankin näytehallinnan laboratoriotiloissa Biomedicum tutkimuskeskuksessa.

Näytesekaannuksia voi tapahtua DNA-näyteprosessoinnissa useammassa eri vaiheessa, eikä tilastoja näytesekaannuksien määrästä ole THL Biopankissa vielä tähän mennessä tehty. DNA-näyteprosessoinnissa tapahtuvien näytesekaannusten määrän detektoinnilla saataisiin kuva prosessin sisällä tapahtuvien näytesekaannustapausten yleisyydestä. Työssä oli tavoitteena tutkia GeneRisk- ja NFID-projektien osalta yksilön antaman verinäytteen DNA-profiilin vastaavuutta samasta näytteestä eristetyn DNA-liuoksen ja liuoksesta valmistetun käyttölaimennoksen (Laimennos 1, L1) välillä agarosielektroforeesigeeliltä (AGE). Näytteille oli tarkoitus tehdä PCR-ajo minisatelliitti-PCR -protokollan mukaisesti, monistaen yksilölle spesifistä D1S80-minisatelliittilokusta, jolloin kolmea saman henkilön rinnakkaista näytevyöhykettä pystyisi tarkastella agarosigeeliltä mahdollisten poikkeamien detektoimiseksi. Näytevyöhykkeiden tulisi olla identtiset, mahdolliset näytesekaannukset havaittaisiin poikkeamina kolmen rinnakkaisen näytevyöhykkeen joukosta.

Työssä oli tarkoitus selvittää läpi kulkevien näytteiden virheprosentti, eli kuinka suuri osuus näytteistä sekoittuu verinäytteiden vastaanoton, DNA-eristyksen ja DNA-laimennoksen välillä. Tarkoituksena oli löytää DNA-näyteprosessoinnin mahdolliset ongelmakohdat ja puuttua niihin, jotta näytesekaannuksilta voitaisiin jatkossa välttyä. THL Biopankissa voitaisiin hyödyntää minisatelliitti-PCR -menetelmää muunmuassa

tarkasteltaessa potentiaalisia näytesekaannustapauksia, joista asiakas on reklamoinut. Näyteprosessoinnissa tapahtuvien näytesekaannusten määrän tutkimisesta olisi paljon hyötyä laadunvalvonnallisesta näkökulmasta, sillä asiakkaalle menevien näytteiden jatkotutkimukset ovat usein erittäin kalliita ja näytteiden tulisi täyttää korkeat laatukriteerit. Sekaantuneet näytteet voivat aiheuttaa turhia väärinkäsityksiä näytteiden jatkotutkimuksissa ja tapausten selvittäminen vie aina oman aikansa.

2 Työn teoria

2.1 DNA-näyteprosessointi THL Biopankissa

THL Biopankin DNA-eristyslaboratoriossa eristetään DNA:ta sisääntulevista verinäytteistä kymmeniä tai jopa satoja päivässä, riippuen eristykseen käytetystä laitteistosta sekä sen hetkistä henkilöstöresursseista.

Näytteet saapuvat Biopankkiin 4 tai 10 ml:an EDTA:ta sisältävissä veriputkissa, jolloin ne vastaanotetaan Samwise-tietojärjestelmään ja eristäjä tulostaa kaikille putkille uudet näytteenantajan omaa henkilökohtaista näytekoodia vastaavat tarrat. Jokaisella näytteellä on oma uniikki viivakoodinsa, sekä näytekoodi (subjekti), joka on yksilölle, eli näytteenantajalle ominainen koodi. Tietojärjestelmästä voidaan nähdä näytteen senhetkinen tila ja paikantaa näytteen sijainti Biopankissa. Näytteistä eristetään genomisen DNA eristysrobotiikkaa käyttäen tai käsin tehtävän protokollan mukaisesti. Eristyksen lopussa eluutioliuoksessa oleva DNA pipetoidaan käsin 1,5 ml:an koodattuihin näyteputkiin, jolloin näyte jää Biopankkiin niin sanotuksi stokki- eli varastoliuokseksi. Näytteistä mitataan DNA-pitoisuus ja puhtaus eristyksen jälkeen NanoDrop- tai Trinean DropSense-spektrofotometreillä.

Stokkiliuoksista laimennetaan käyttöläimennoksia (Laimennos 1, L1), sekä asiakkaalle meneviä laimennoksia (Laimennos 2, L2) 96-kuoppalevyille nesteenkäsittelyrobotiikkaa käyttäen. Käyttöläimennoksien kaksijuosteisen DNA:n pitoisuus mitataan PicoGreen-menetelmällä ennen asiakkaalle menevien laimennosten valmistusta.

Jokaisessa eristysprotokollassa näyte siirretään useamman kerran alkuperäisistä sisääntulevista veriputkista uusiin koodattuihin ja tarrotettuihin putkiin. Myös DNA-laimennoksia asiakkaille tehtäessä näyte siirtyy stokkiputkesta kertaalleen L1-levylle,

sekä L1-levyltä ainakin kerran lopulliselle, asiakkaalle menevälle L2-levylle. Jokainen näytesiirto ja käsittelykerta lisäävät riskiä mahdollisten näytesekaannusten syntymiselle.

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin kolme näytepistettä DNA-näyteprosessoinnista, jolloin tutkittavaksi saatiin yksilön verinäyte ennen DNA-eristystä (veriliuskanäyte), DNA-eristyksen läpikäynyt DNA-liuos (stokkiliuos) sekä stokkiliuoksesta laimennettu välilaimennos (L1-liuos). Näytteille tehtävän D1S80-lokuksen monistukseen perustuvan Minisatelliitti-PCR:n avulla pystytään havainnoimaan onko näytesekaannusta tapahtunut DNA-näyteprosessoinnissa ja jos on, niin missä kohtaa prosessia sekaannus on tapahtunut.

2.2 DNA-eristykseen käytettävät menetelmät

Verinäytteiden DNA-eristykseen on THL Biopankissa käytettävissä kolme eri Perkin Elmerin eristysrobotia, Chemagic MSM 1- ja Chemagic TM 360 – robotit sekä Janus® Chemagic Pro-robotti. Näytteistä voidaan eristää DNA myös käsin Qiagenin Puregene kitin protokollan mukaisesti. Perkin Elmerin Chemagic roboteilla on mahdollista eristää ja puhdistaa DNA:ta lukuisista eri näytteistä, kuten verestä, syljestä, kudoksesta, bakteereista ja plasmasta, käyttäen eri näytematriiseille tarkoitettuja eristyskittejä. THL Biopankissa on käytössä veri- ja sylkinäytteiden DNA-eristykseen tarkoitetut eristyskitit (chemagic DNA Blood Kit special Cat: CMG-704 / CMG-1074 ja chemagic DNA Saliva kit special Cat: CMG-1035), jotka sisältävät tarvittavat liuokset ja puskurit genomisen DNA:n eristämiseen.

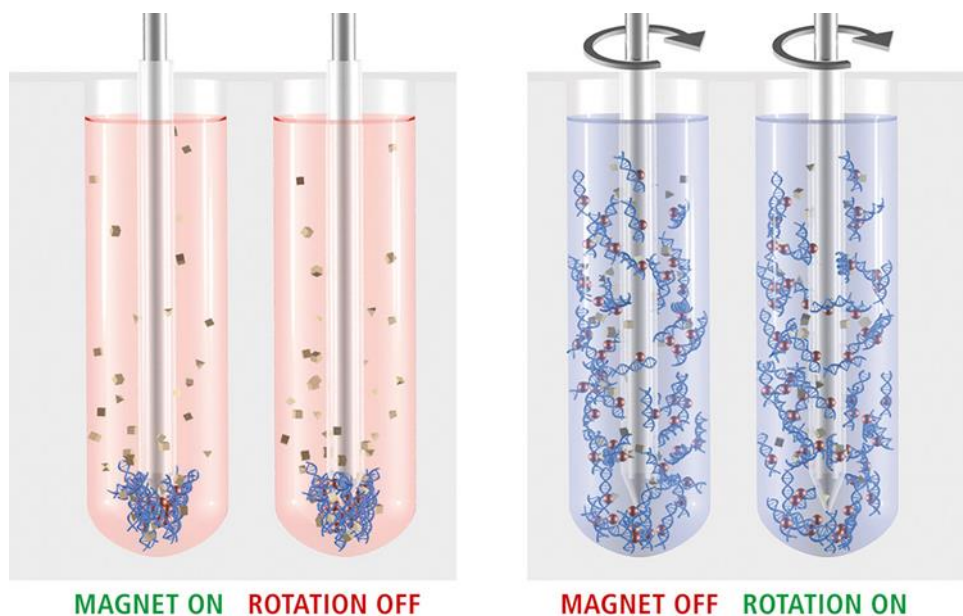
Näyte siirtyy jokaisessa DNA-eristysprotokollassa ainakin kaksi kertaa uusiin koodattuihin putkiin. Eristysrobotiikkaa käytettäessä verinäytteet kaadetaan aluksi näytteenantajan näytekoodilla varustettuihin näyteputkiin joiden järjestyksen säilymisestä, koodien tarroitukselta ja näytteiden siirrosta oikeisiin putkiin vastaa eristäjä. Eristysrobotti säilyttää saman näytejärjestyksen ajon loppuun asti, pipetoiden lopullisen DNA-liuoksen eristäjän koodittamiin putkiin, joiden kooditus tulee olla identtisessä järjestyksessä eristykseen alkupäässä olevien näytettä sisältävien putkien kanssa. Näytteet siirretään lopuksi vielä pienempiin 1,5 ml:an näyteputkiin (stokkiputket), kuten on kuvattu aiemmassa kappaleessa 2.1. Inhimilliset erehdykset ja

mahdolliset näytesekaannukset ovat tässä kohtaa mahdollisia. Tämä oli lukeutui myös opinnäytetyössä tutkitun kolmen prosessista otettavan näytepisteen joukkoon.

THL Biopankissa pyritään ensisijaisesti käyttämään verinäytteiden genomisen DNA:n eristykseen siihen tarkoitettua robottiikkaa, mutta eristyslaboratoriossa tehdään eristystä myös käsin tehtävällä protokollalla. Menetelmässä näytteiden siirto ja uusien putkien tarroitus tehdään kolme kertaa, eli yhtä monta kertaa kuin robotiikkaa käyttäessä.

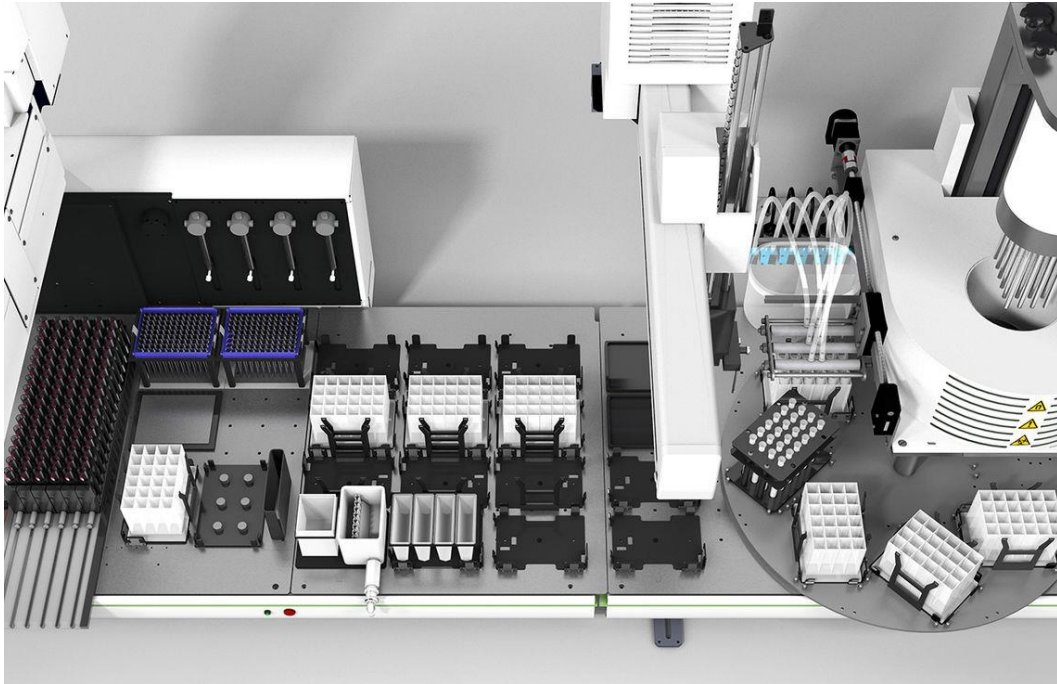
Roboteilla tehtävä eristys perustuu M-PVA- magneettihelmiin, jotka tarttuvat laitteessa oleviin pyöriviin metallisauvoihin sähkömagneetin avulla (ks. Kuva 1). Ensimmäisessä vaiheessa solut hajotetaan, jonka jälkeen DNA sitoutuu näytteestä magneettihelmiin ja kulkeutuu sauvojen mukana DNA- eristysprosessin läpi, järjestyksessä 1. Lysis buffer → 2. Binding buffer → 3. – 5. Wash buffer → 6. Wash buffer. Puhdas DNA on prosessin jälkeen eluutioliuoksessa (6. Wash buffer), jolloin se on valmiina jatkokäsiteltäväksi.

Chemagic MSM 1- ja Chemagic™ 360 -robottien osalta THL Biopankissa on käytössä 12 metallisauvan pää, jolla voidaan käsitellä 12 kpl verinäytteitä 50 ml:an putkissa, näytetilavuuden ollessa 4 - 10 ml.



Kuva 1 Vasen kuva: Magneetti on kytketty päälle, helmet ja DNA- pelletit tarttuvat sauvojen päihin. Oikea kuva: Magneetti on kytketty pois ja sauvat pyörivät, jotta näyte eluoituu puskuriiin. [1]

Janus® Chemagic Pro –eristysrobotilla (ks. Kuva 2.) on mahdollista eristää suurempia, maksimissaan 48 näytteen määriä, näytetilavuuden ollessa 10 µl – 10 ml:aa [2]. Laboratoriossa on käytössä 24 metallisauvan sekoitusvarsi.



Kuva 2 Janus® Chemagic Pro –eristysrobotin kansi kuvattuna ylhäältä. Vasemmalla 4 ml viivakoodatut näyteputket telineissä, keskellä 24 paikkaiset sekoituskaivot ja oikealla 24 metallisauvan varsi. [3]

2.2.1 DNA-näytteiden jatkokäsittely

DNA-eristetyille (stokki) näytteille tehdään THL Biopankissa käyttölaimennos (L1) Tegan Genesis tai Tecan Freedom EVO-nesteenkäsittelyrobotiikkaa käyttäen. Stokkiliuokset, jotka ovat 1,5 ml:an näyteputkissa, asetetaan 96-paikkaiselle telineelle ja laimennosrobotti laimentaa liuokset halutulle 96-malliselle kuoppalevyille. Käyttölaimennos oli tässä opinnäytetyössä tutkitun kolmen prosessista otettavan näytepisteen joukossa.

Laimentaja vastaa näytejärjestyksen tarkistamisesta laimennostyölistasta, jotta näytteet päätyvät oikeisiin kaivoihin kuoppalevyille. Laimennostyölista kertoo näytekoodilla ja näytteen viivakoodilla mihin näyte kuuluu 96-telineellä. Suuri riski näytesekaannusten syntymiseen on, mikäli laimentaja asettelee stokkiliuosputket väärään järjestykseen 96-telineelle ja nesteenkäsittelyrobotti laimentaa DNA-liuoksen väärään kaivoon tai mikäli kuoppalevy on asetettu väärinpäin robotin kannelle ennen laimennuksen aloitusta.

Robotit käyttävät nesteiden siirtoon sisäänrakennettua nesteannosteluvartta (LiHA), jossa on kahdeksan itsenäistä nesteannostelukanaavaa (ks. Kuva 3). Laitteet annostelevat liuoksia tilavuudeltaan 3 – 1000 µl, käyttäen 200 µl tai 1000 µl pipetinkärkiä. Jokaiselle kanavalle pystytään säätämään leveys ja ne ovat ohjelmoitavissa erikseen, mikä mahdollistaa eri nestetilavuuksien annostelun samanaikaisesti. Laitteen kannen leveys on 150 cm ja se voidaan konfiguroida käyttämään useita erilaisia kuoppalevyjä, altaita ja pipetinkärkiä [4]. Instrumenttien kontrollointiin käytetään Gemini Software- ohjelmistoa.



Kuva 3 Tecan Genesis RSP 150 –nesteenkäsittelyrobotti kahdeksan paikallisella LiHA-nesteannostelu varrella. Kuvasta voidaan nähdä stokkiliuosputket aseteltuna 96-paikkaiselle levylle ja läpinäkyvä 96-kuoppalevy, johon liuokset laimennetaan

2.3 DNA-toistoalueiden profilointi

Alunperin DNA-sormenjälkiprofiloinnin kehitti Sir Alec Jeffreys vuonna 1984 tutkiessaan DNA:n katkoskirjo (RFLP, Restriction length polymorphism) -menetelmän avulla ihmisen genomien eri toistoalueita (lokuksia), käyttäen apuna MLP-koettimia (multi locus probe). Tekniikassa MLP-koettimet pystyvät havaitsemaan useamman minisatelliitti (VNTR, Variable number of tandem repeats) -lokuksen samanaikaisesti ja tuottamaan yksilöllisen ja monivyohtyöhykkeisen DNA-profiilin eri henkilöiden välille [5]. Eri yksilöiden näytevyöhykkeitä pystyi tarkastella ja vertailla toisiinsa agarosigeeli-, sekä Southern blotting-ajojen jälkeen membraanilta, joka altistettiin röntgensäteilylle [6]. Käytettäessä ainoastaan yhtä MLP-koetinta nimeltään 33.15, DNA-profiilin vastaavuuden todennäköisyys yksilöiden välillä arvioitiin olevan $< 3 \times 10^{-11}$ ja käytettäessä kahta MLP:tä (koettimet 33.15 ja 33.6) vastavuus arvioitiin olevan $< 5 \times 10^{-19}$. Poikkeuksena on identtiset kaksoset, jotka voivat omata toisiaan vastaavat DNA-sormenjäljet [5].

MLP-koettimia käytettäessä DNA:n tulee olla mahdollisimman vähän hajonnutta ja sitä tulee olla riittävästi, jonka johdosta esimerkiksi rikospaikalta saatuja DNA-näytteitä analysoitiin SLP (Single locus probe)-koettimien avulla. SLP-menetelmä tuottaa yksinkertaisen, mutta hyvin polymorfisen yhden tai kahden vyöhykkeen DNA-profiilin, joita voi tarkastella suoraan agarosigeeliltä (AGE). SLP-analyysi on myös paljon herkempi kuin MLP ja tarvitsi pienempiä määriä DNA:ta (noin 10 ng) analyysin tekoon. [7 s. 3.]

Minisatelliittialueiden analysointia käytettiin yleisesti rikospaikkänäytteiden DNA-profiloinnissa vielä 1990-luvun alussa, ennen niiden korvautumista PCR-pohjaisilla mikrosatelliittialueiden (STR, short tandem repeats) analysointimenetelmillä. D1S80 oli laajasti käytetty minisatelliittilokus, jonka fragmentteja monistettiin tuottamaan alleeleita, jotka olivat merkittävästi pienempiä kuin fragmentit, joita oli aiemmin käytetty DNA-sormenjälkiprofiloinneissa. Verrattuna RFLP-menetelmään, D1S80-alleelit jakaantuvat erillisiin kokoluokkiin ja täten niitä pystyy vertaamaan suoraan geelillä standardiin, joka koostuu eri alleelien yhdistelmästä (allelic ladder). Tätä menetelmää

käytettiin hyväksi myöhemmässä vaiheessa myös lyhyempien mikrosatelliittialueiden analysoinnissa. [8 s.74.]

PCR-tekniikkaan (Polymeraasiketjureaktio) perustuvat analyysit on yleisesti käytetty menetelmä nykypäivän DNA-profiloinnissa, jossa todistusaineistoksi käytettävä näyte voi sisältää hyvin pienen määrän (0,3 - 0,5 ng) DNA:ta tai mikäli tuote on päässyt osittain hajoamaan. Näin pystytään monistamaan eksponentiaalisesti DNA:ta ja tuottamaan yksilöllinen DNA-profiili analysoimalla tietynlaisia VNTR, STR tai SNP (Single nucleotide polymorphism) -alueita [9 s. 17]. Monet rikostekniset laboratoriot käyttävät parhaillaan PCR- ja kapillaarielektroforeesipohjaisia menetelmiä polymorfisten STR-alueiden analysointiin [10].

2.4 Minisatelliitit (Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs)

Ihmisen genomi sisältää runsaasti introneita, jotka ovat proteiineja koodaamattomia alueita genomissa, proteiineja koodaavien eksoni-alueiden lisäksi. Koodaamattomien alueiden funktiota ei täysin vielä tiedetä, mutta alueilla sijaitsee tuhansia niin sanottuja DNA-toistojaksoja, joissa tietyn pituinen sekvenssi toistuu eri määrän henkilöiden välillä. Näiden toistojen vaihtelu voi aiheuttaa muutosta geenien toimintaan tai ilmentymiseen, mikä voi mahdollistaa organismien nopean sopeutumisen uusiin ympäristöihin. Ihmisen genomi sisältää keskimäärin 50 % erinäisiä toistojaksoja. [11.]

Tandemtoistoalueet on luokiteltu satelliiteiksi, minisatelliiteiksi (VNTR) tai mikrosatelliiteiksi (STR) riippuen toistetun yksikön pituudesta, sekä toistetun alueen määrästä [14]. Tandemtoistoalueista on ollut paljon hyötyä tutkittaessa rikoksia, perhekytköksiä, sekä geneettistä monimuotoisuutta. Kyseisten alueiden Tandem-nimitys viittaa alueiden toistettavien sekvenssien olevan peräkkäin, ilman minkäänlaista keskeytystä sekvenssien välillä [13].

Minisatelliittialueet ovat noin 6 - 100 emäsparin mittaisia emästoistojaksoja, joiden pituudessa ja toistojen määrässä on vaihtelevuutta yksiköiden välillä, joka tekee niistä hyödyllisen työkalun yksilön DNA-profiloinnissa. Minisatelliittialueiden toistojen pituudet voi vaihdella 10 – 1000 emäsparin välillä ja alueita voi useimmiten löytää kromosomin rekombinaation taitavilta subtelomeerisiltä alueilta [12]. Jotkin minisatelliittialueet (lokukset) osoittavat suurta vaihtelevuutta alleelien pituuksissa ja minisatelliitit

karakterisoidaan niiden hypervaihtelevuuden (hybervariaabeli) ja polymorfisuuden mukaan. Minisatelliittialueiden alleelien tiedetään olevan eriperintäisiä eli heterotsygootteja noin 85 - 99% tapauksista. [15, s.56.] On hyvin epätodennäköistä, että kahdella sukulaiskytköksiä omaamattomalla yksilöllä olisi identtinen toistoalueiden pituus, sekä toistojen määrä tutkittavien lokusten osalta, jonka johdosta eri henkilöiden välille syntyy yksilöllinen DNA-profiili [12].

Suurin osa genomien minisatelliiteista sisältää runsaasti kolmen vetysidoksen omaavia GC-emäspareja (sytosiini ja guaniini), jolloin kaksoiskierre on painavampi [12]. Tässä tapauksessa DNA-templaatti tarvitsee korkeamman lämpötilan auetakseen kuin runsaammin AT-emäspareja sisältävä DNA-templaatti, jolloin PCR-reaktion alussa tarvitaan korkean lämpötilan (95 °C) omaava Hotstart-vaihe kaksoiskierrteen aukeamisen takaamiseksi. Kyseinen vaihe oli käytössä myös tässä opinnäytetyössä näytteille tehdyssä PCR-ajossa.

2.5 D1S80-locus

D1S80 (MCT118) minisatelliittilokuksessa toistuu 16 emäsparin mittainen sekvenssi ja alueen toistojen määrä vaihtelee 14 ja 42 toiston välillä [16, s.35]. D1S80-locus sijaitsee genomissa paikalla 1p35 – p36, eli kromosomi yhden subtelomeerisellä alueella. Kyseinen locus on myös hyvin polymorfinen ja siitä on löydetty tähän mennessä 29 erikokoista alleelia, eli 29 erilaista D1S80-locuksen sekvenssin toistomäärää. D1S80-locuksen analysointiin käytetään SLP-koettimia (Single locus probe), jotka pystyvät tunnistamaan tietyn lokuksen genomien minisatelliiteista. [17.]

Tutkittaessa D1S80-lokusta alleelit karakterisoidaan toistojen määrällä, eli henkilö joka omaa esimerkiksi alleelit 18 ja 22 (Ks. kuva 4.) kuvataan olevan D1S80 18,22, eli 16 emäsparin mittainen sekvenssi toistuu yksilöllä 18 sekä 22 kertaa [16, s.35]. Tässä työssä D1S80-locuksen alleeleita ei erikseen karakterisoitu, sillä agarosigeelin erotuskyky (resoluutio) ei ole siihen riittävä, vaan näytevyöhykkeet eroteltiin geelikuvista silmämääräisesti.

16 emäsparia

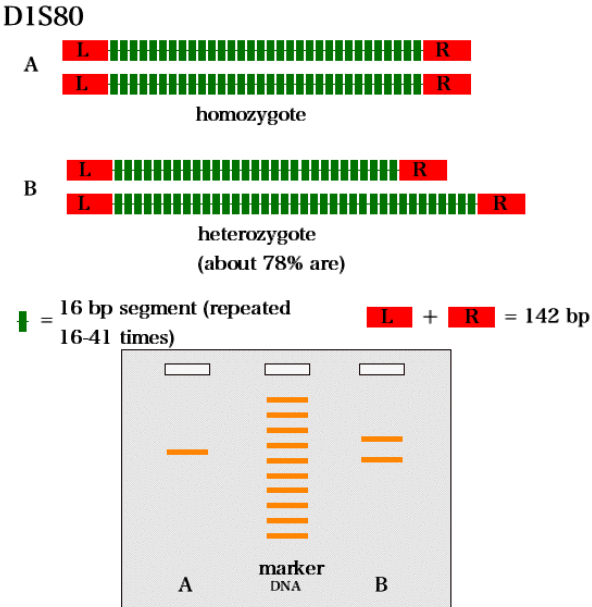
```

GAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCA
AGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCG
GCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCA
CCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGA
CCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAG
GACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAG = alleeli 22

GAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCA
AGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCG
GCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCA
CCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGA
CCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAGGAGGACCACCGGCAAG = alleeli 18
    
```

Kuva 4 D1S80-locuksen 16 emäsparin mittainen sekvenssi, joka toistuu yksilöllä 22 sekä 18 kertaa. Kuvan tekemiseen otettu mallia sivuston <https://www.coursehero.com/file/p74h846/D1S80-GAGGACCACCGGCAAG-GAGGACCACCGGCAAG-GAGGACCACCGGCAAG-GAGGACCACCGGCAAG/> kuvasta D1S80.

Yksilö, joka on homotsygoottinen D1S80-locuksen osalta, on nähtävissä vain yksittäinen PCR-tuote agarosigeelielektroforeesiajossa. Tämä johtuu siitä, että yksilö on samanperintäinen kyseisen locuksen osalta, eli vanhemmilta perityt vastingeenit vastaavat toisiaan ja ovat näin ollen myös samankokoisia. Yleisimmin henkilö on heterotsygootti, jolloin yksilöllä on vaihtelevuutta D1S80-locuksen toistojen määrissä, jonka johdosta geelillä on nähtävissä kaksi eri kokoista PCR-tuotetta. [18.] (Ks. Kuva 5)



Kuva 5 D1S80- locuksen homotsygoottisuus ja heterotsygoottisuus. [19]

Kyseisen lokuksen toistomäärien, sekä pituuden vaihtelu yksilöiden välillä teki siitä oivan välineen tutkittaessa esimerkiksi rikospaikalta taltioidun DNA-näytteen D1S80- lokuksen vastaavuutta epäillyn henkilön kyseiseen lokukseen. Hyvin pienestä määrästä (0,1 ng) näytettä pystyi PCR:n avulla monistamaan kyseistä lokusta riittävästi. FBI (Federal Bureau of Investigation) sisällytti D1S80- lokuksen analysoinnin rikostutkimukseensa vuonna 1995, mutta totesivat RFLP-menetelmien omaavan paremman erottelukyvyn ja luotettavuuden, kuin D1S80- lokuksen profilointi ja muut AMPFLP (Amplified fragment length polymorphisms) -tekniikkaan perustuvat analyysit. [20.] 1990-luvun alkupuolella rikostutkinnassa RFLP, sekä D1S80- lokuksen kaltaisten pidempien minisatelliittialueiden analysointi korvautui lyhyemmän toistoalueen omaavien mikrosatelliittialueiden analysoinnilla (STR) [21].

2.6 Suoraan verinäytteestä tehtävän PCR:n haasteet

Veri sisältää monia PCR-reaktiota inhiboivia tekijöitä, kuten immunoglobuliini G:tä (IgG), hemoglobiinia (Hb) ja laktoferriniä (rautaa sitova glykoproteiini), sekä vereen mahdollisesti lisättyjä koaguloitumisen- eli hyytymisenestoaineita. Yleisesti käytettyjä veren hyytymisenestoaineita ovat etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA), hepariini ja sitraatti. [22; 23.] Nämä inhiboivat tekijät voivat vähentää tai jopa kokonaan estää PCR-reaktiossa tapahtuvan monistumisen ja esimerkiksi yleisesti PCR-reaktiossa käytettävä *Taq*-polymeraasientsyymin toiminta voi kokonaan estyä jopa hyvin pienistä määristä (0,004%) ihmisen verta sisältävästä PCR-seoksesta. [24, s.139.]

PCR-reaktiota inhiboivien tekijöiden vaikutukset voidaan jaotella kolmeen ryhmään, joista (1) inaktivoi termostabiilin DNA-polymeraasin, (2) voi hajottaa tai sitoo itseensä nukleiinihapot ja (3) häiritsee solukalvon hajoitus (lyysaus) -vaihetta. Rautaa sitovat hemoglobiini ja laktoferrini-proteiinit saattavat inhiboida PCR-reaktiota vapauttamalla rautaioneita PCR-seokseen, jonka on huomattu häiritsevän DNA-synteesiä. [24 s. 135.] Tässäkin työssä PCR-reaktioon lisätty betaiini on glyserolin kanssa yleisesti käytetty PCR-reaktion onnistumista edesauttava lisäaine. Betaiinin tiedetään parantavan reaktion GC-rikkaiden alueiden monistusta, sillä se pystyy estämään sekundäärirakenteen muodostumisen, joka saattaa estää polymeraasientsyymin toiminnan. [25.]

3 Työn toteutus

3.1 Kontrollien valmistus

PCR-ajoa varten valmistettiin yhteensä kahdeksan kontrollia FT17 Pilot-projektin verinäytteistä, joille tehtiin DNA-eristys Biopankin Puregene -kitin ohjeiden mukaisesti. Reagensseja lisättiin puolet ohjeessa mainituista määristä, sillä ohjeesta poiketen verinäytteiden tilavuus oli 4 ml:aa 10 ml:n sijasta.

Eristyksen jälkeen mitattiin näytteiden DNA-konsentraatio NanoDrop-spektrofotometrillä. Laimennettiin kontrollinäytteet (Kontrollit 1 ja 2) pitoisuuteen 10 ng/µl. Tämä pitoisuus oli aiemmin osoittautunut sopivaksi minisatelliitti-PCR menetelmässä.

3.2 Veriliuskanäytteiden esikäsittely ennen PCR-ajoa

Sisääntulevista Generisk- ja NFID-projektien verinäytteistä oli jo valmiiksi kerätty opinnäytetyötä varten noin 1000 veriliuskanäytettä, jotka oli merkitty näytteenantajan näytekoodin mukaisesti. Liuskoina käytettiin Merck Milliporen Mquant™ Blank Stripsejä, jotka eivät sisällä lyysauspuskuria tai muita reagensseja. Liuskassa oleva tyynyosa oli kastettu verinäytteeseen, joka oli kuivumisen jälkeen asetettu 15 ml:an näytteenantajan koodilla koodattuun näyteputkeen.

Veriliuskanäytteiden esikäsittely suoritettiin erillisessä prePCR-huoneessa. Liuskojen sisältämän veren valkosolujen hajotukseen käytettiin TE-puskuriin pohjautuvaa DNA-uuttomenetelmää. Veriliuskanäytteeseen pipetoitavaa TE-puskurin määrää optimoitiin aluksi muutaman veriliuskanäytteen avulla (10 näytettä), sekä näytteitä inkuboitiin (+ 70 °C) kunnes saatiin näkyviä näytevyöhykkeitä geelille minisatelliitti-PCR -ajon jälkeen. Veriliuskanäytteisiin testatut liuosmäärät olivat tilavuudeltaan välillä 50 – 150 µl.

Eri henkilöiden näyteputkissa (tilavuudeltaan 15 ml) olevia liuskanäytteitä otettiin kerralla käsittelyyn 60 kpl, jotta käsiteltävä näytemäärä pysyi sopivana. Näyteputket numeroitiin aluksi 1 – 60 ja näytteet pidettiin excelillä tehdyn näytekartan mukaisessa järjestyksessä (ks. Kuva 6) läpi koko työn, käyttämällä 96-paikkaisia putkitelineitä, sekä

PCR-levyjä. Asetettiin 96 paikkaiselle telineelle 60 kappaletta 1,5 ml:an steriilipakattuja näyteputkia, jotka myös numeroitiin 1 – 60. Kuivatun liuskanäytteen tyynyosa leikattiin vastaavalla näytekoodilla merkittyyn putkeen saksilla, välttämättä koskemista kuivaan vereen. Sakset, sekä liuskanäytteiden käsittelyssä käytetyt pinsetit puhdistettiin jokaisen näytteen välillä 70 % etanolilla. Liuskojen tyynyosaan pipetoitiin 80 µl steriiliä 1xTE-puskuria (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8, erä: 106098). Näytettä suspensoitiin pipetillä edestakaisin n. 10 kertaa kunnes puskurin väri oli muuttunut punertavaksi, eli verta oli liennut riittävästi puskuriin. Näytteitä inkuboitiin 20 – 24 tuntia + 70 °C:ssa lämpökaapissa jonka jälkeen DNA oli eluoitunut liukseen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000	1008	1016	1024	1032	1040	1048	1056				
B	1001	1009	1017	1025	1033	1041	1049	1057				
C	1002	1010	1018	1026	1034	1042	1050	1058				
D	1003	1011	1019	1027	1035	1043	1051	1059				
E	1004	1012	1020	1028	1036	1044	1052					
F	1005	1013	1021	1029	1037	1045	1053	K1				
G	1006	1014	1022	1030	1038	1046	1054	K2				
H	1007	1015	1023	1031	1039	1047	1055	nolla				

Kuva 6 Esimerkki 96-paikkaisen levyn näytekartasta. Levyllä 60 näytettä, sekä kontrollit ja nollanäyte.

Inkuboinnin jälkeen putket vorteksoitiin lyhyesti (noin 2 s) ja sentrifugoitiin 3 minuuttia 4000 rpm:n nopeudella. Saatu supernatantti (noin 50 µl) pipetoitiin näytekartan mukaisessa järjestyksessä Falconin® Flexible plate 96-kuoppaiselle levylle. Levy suljettiin Thermo Scientific:in Bar Seal™ -kertakäyttökansilla ja niitä säilytettiin + 4 °C:ssa PCR-ajon tekoon asti. Näytteistä ei mitattu erikseen DNA-pitoisuutta, sillä tulokset eivät hyvin todennäköisesti olisi luotettavia veren sisältämien epäpuhtauksien johdosta.

3.3 DNA-liuosten esikäsittely

Liuskanäytteiden näytekoodeja vastaavat näytteet etsittiin Samwise-näytetietokannasta ja näytteistä koottiin excelin avulla poimintalista, josta nähtiin DNA-eristettyjen varasto-, eli stokkiliuosten, sekä laimennettujen, eli L1-näytteiden sijainti Biopankissa.

Stokkinäytteet päätettiin laimentaa 3:20 ja L1-näytteet 1:10, sillä minisatelliitti-PCR:n tekoa varten DNA-liuosten pitoisuus olisi optimaalinen välillä 2 – 20 ng/µl. Stokkinäytteiden alkuperäinen konsentraatio oli välillä 50 – 300 ng/µl ja L1- näytteiden

noin 100 ng/ μ l. Eristettyjen sekä laimennettujen DNA-näytteiden käsittelyssä käytettiin samaa näytekarttaa (ks. Kuva 6) kuin liuskanäytteissä, jotta sama näytejärjestys säilyisi koko prosessin läpi.

Stokkinäytteiden laimennos suoritettiin Tecan Genesis-nesteenkäsittelyrobotilla. Stokkiputkissa olevat näytteet sentrifugoitiin (2000 rpm, 1 min) ja kerättiin 96-paikkaiselle Tecan Genesis-robotin käyttämälle telineelle. Laite laimensi näytteet 20 μ l tilavuuteen, ottaen 17 μ l:aa steriiliä vettä, sekä 3 μ l näytettä Falconin® Flexible plate 96-kuoppaiselle levylle. Laitteen annostelevä vähimmäisnestemäärä oli 3 μ l.

L1-näytteet laimennettiin käsin 1:10 samanlaiselle 96-kuoppaiselle levylle, pipetoimalla monikanavapipetillä 9 μ l steriiliä vettä, sekä 1 μ l näytettä L1-levyltä. Stokki-, sekä L1-näytelevyjen sulkemiseen käytettiin Thermo Scientific BarSeal™ kertakäyttökansia.

3.4 Hepariniverinäytteiden esikäsittely

NFID-projektin 24:stä hepariinia sisältävistä verinäytteestä (näytteistä eristetään THL Biopankissa mononukleaariset valkosolut Ficoll-eristystekniikalla) tutkittiin verinäytteen ja siitä eristetyn DNA:n, eli storkiliuoksen DNA-profiilin yhdenmukaisuutta D1S80-locuksen osalta. Soluverinäytteet sisälsivät veren hyytymistä estävää hepariinia, joka inhiboi *Taq*-polymeraasientsyymien toimintaa PCR-reaktiossa, joten päädyttiin käyttämään solujen hajotukseen Nordic Bio Siten DirectPCR- lysis (Cell) -liuosta (Cat: 250-302-C) [26]. Soluverinäytteistä ei oltu kerätty verta liuskoille, joten veri pipetoitiin suoraan verinäytteestä soluhajotuspuskurin joukkoon.

Aluksi valmistettiin riittävästi solujen hajotukseen tarkoitettu liuosta, joka sisälsi 48 μ l:aa DirectPCR-lysis reagenssia, sekä 2 μ l Proteinaasi K-liuosta (1 mg/ml) näytettä kohden. Proteinaasi K:n pitoisuus tilavuudeltaan 100 μ l:an näyteliuoksessa oli tällöin 0,02 mg/ml. Liuosta pipetoitiin monikanavapipetillä 50 μ l per kaivo Thermo Scientific AB-0990, Ultra Rigid Semi skirted-96 kuoppalevylle, joka on leikattava kuoppalevy, eli levystä voi halutessaan käyttää vain tietyn osion kerrallaan. Liuoksen joukkoon pipetoitiin 50 μ l hepariniverinäytettä ja levy suljettiin Domed Cap (AB-0265)- liuskoilla.

Näytteitä vorteksoitiin lyhyesti (noin 2 s) ja inkuboitiin BioRadin PCR-laitteessa +55 °C:ssa 1 tunnin ajan. Tämän jälkeen levy vorteksoitiin uudestaan (5 s) ja sentrifugoitiin

1100 rpm 1 minuutin ajan. Inkuboitiin näytteitä +86 °C:ssa 50 minuutin ajan, jolla varmistetaan Proteinaasi K:n inaktivointi. Tämän jälkeen näyte oli valmis PCR-analyysiin.

3.5 Minisatelliitti-PCR

PCR:n tekoon käytettiin THL Biopankin Minisatelliitti-PCR -ohjetta, jota ei tähän mennessä oltu testattu veriliuskanäytteillä. PCR-reaktiossa entsyyminä käytettiin Promegan GoTaq® Green Master Mix-liuosta, joka sisälsi reaktioon tarvittavan puskurin (pH 8), nukleotidit (400 µM dATP, dGTP, dCTP ja dTTP) ja 3 mM magnesiumkloridin (MgCl₂).

Minisatelliitti-PCR:ssä käytetyt reagenssit:

- GoTaq® G2 Green Master Mix (Promega M782A Lot: 0000201990)
- 5 M Betaine solution (Sigma-Aldrich, B0300-1VL)
- 25 mM MgCl₂ (Roche Lot: P13852)
- dH₂O steriili vesi (Fisher Scientific Code: W/0106/15 Lot:1524344)
- 20 µM D1S80Rev aluke (Sigma-Aldrich HA10012361 – 001)
 - Sekvenssi: '5 – GTCTTGTTGGAGATGCACGTGCCCCCTTGC - 3'
- 20 µM D1S80Fw aluke (Sigma-Aldrich Ha10012360 – 001)
 - Sekvenssi: '5 – GAACTGGCCTCCAAACACTGCCCCGCCG – 3'

PCR-reseptit näytteille on esitetty taulukossa 1. ja 2. Stokki- ja L1-näytteiden osalta reseptiä optimoitiin lisäämällä magnesiumkloridia reaktioon, sekä nostettiin betaiinin määrää, jotta geelillä aika-ajoin näkyvät epäspesifit näytesyöhykkeet, eli niin sanotut ”haamu yöhykkeet” saatiin minimoitua.

Taulukko 1. PCR- resepti veriliuska- sekä hepariiniverinäytteille (1x).

	Stokin pitoisuus	1x PCR MIX (µl)	Pitoisuus 1x liuoksessa
GoTaq Green Master Mix	2X	7,5	1,00 X
Betaiini	5M	0,4	0,13 M
dH ₂ O		6,2	
D1S80Fw	20,00 µM	0,2	266 nM
D1S80Rev	20,00 µM	0,2	266 nM
DNA	2 – 20 ng/µl	1	
	Kokonaistilavuus:	15	

Taulukko 2. PCR- resepti DNA-liuoksille (1x).

	Stokin pitoisuus	1x PCR MIX (µl)	Pitoisuus 1x liuoksessa
GoTaq Green Master Mix	2X	7,5	1,00 X
Betaiini	5M	0,6	0,2 M
MgCl ₂	25 mM	0,2	0,33 mM
dH ₂ O		5,8	
D1S80Fw	20,00 µM	0,2	266 nM
D1S80Rev	20,00 µM	0,2	266 nM
DNA	2 – 20 ng/µl	0,5	
	Kokonaistilavuus:	15	

Valmistettiin aluksi riittävästi PCR Master Mix-seosta, joka sisälsi kaikki reaktioon tarvittavat reagenssit, pois lukien DNA-näyte. Liuosta pipetoitiin PCR-levylle (Thermo Scientific AB-0990, 0,2 ml Ultra Rigid Semi - skirted 96 –well PCR plate) monikanavapipetillä 14 -14,5 µl per kaivo, jonka jälkeen lisättiin liuokseen näytettä 0,5 – 1 µl. Kontrolleina käytettiin kahta FT17 Pilot-projektin (10 ng/µl) DNA-näytettä, jotka oli eristetty THL Biopankin käsin tehtävän protokollan mukaisesti. Nollanäytteenä käytettiin samaa steriiliä vettä, jota oli käytetty näytteiden laimennokseen. Levyt suljettiin tiiviisti pienempien näytemäärien osalta liuskoilla (Thermo Fisher Scientific AbGene Domed Cap Strips, AB-0265) tai suurempia näytemääriä käsiteltäessä

(maksimissaan 60 näytettä) levyjen sulkemiseen käytettiin tarttuvaa PCR-kalvoa (Thermo Fisher Scientific AbGene Adhesive PCR Film AB-0558). Levyjä sentrifugoitii 1100 rpm, 1 minuutin ajan ennen PCR-ajoa. Ajo suoritettiin BioRad:in T100™ Thermal Cycler PCR-laitteella. Minisatelliitti-PCR:ssä käytetyt ajo-olosuhteet on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Minisatelliitti PCR:n ajo-olosuhteet

Vaihe	Tapahtuma	Lämpötila (°C)	Aika (min.)
1.	Hot start	95	3
2.	Denaturaatio	94	1
3.	Alukkeiden sitoutuminen	65	0,5
4.	DNA-synteesi	72	0,5
5.	Mene vaiheeseen 2. 30 X	-	-
6.	Pidennysreaktio	72	7
7.	Säilytys	12	Määrittelemätön

3.6 Agarosigeelielektroforeesi

AGE-ajoa varten valmistettiin 2,5 % geeli lisäämällä 300 ml 1xTBE-puskurin joukkoon 7,5 g agarosia (BioNordika – standard Agarose – Type LE, Lot: LF45120017). Geelin värjäykseen käytettiin väriaineena SYBR® Safe Invitrogen (Lot: 1771635) geelinvärjäys reagenssia, jota pipetoitiin 300 ml:n geelin joukkoon 10 µl, jolloin reagenssin suhde liuoksessa oli 1:30 000.

Ennen geelille pipetoimista työtasolle koottiin veriliuska, stokki sekä L1-näytteistä valmistetut PCR-levyt, sekä näytekartta, josta pystyi tarkastella näytejärjestystä levyillä. Geelille pipetoitiin rinnakkain kolmeen vierekkäiseen kaivoon saman näytteenantajan veriliuska-, stokki-, ja L1-näytteet, jolloin näytevyöhykkeitä pystyi geelin kuvaamisen jälkeen vertaamaan toisiinsa. Näytteiden joukkoon ei tarvinnut lisätä erikseen geelin latausväriä, sillä GoTaq® Green-entsyymi sisälsi sinisen sekä keltaisen värin. Näytettä pipetoitiin kaivoon 15 µl ja 100 emäsparin kokoista kokostandardia (BioLabs Quick – Load Ladder 50 µg/ml, Lot:0431302) pipetoitiin reunimmaisiiin kaivoihin 5 µl per kaivo. Näytteitä ajettiin 1 tunti, 120 V jännitteellä BioRadin Sub-Cell® Model 192-

geelinajolaitteella kunnes näytevyöhykkeet olivat riittävästi erottuneet. Geeli kuvattiin ajon jälkeen Bio Radin geelinkuvantamislaitteella (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+), jossa oli käytössä Image Lab™ –ohjelmisto

3.7 Menetelmän testaus GeneRisk-projektin sekaantuneilla näytteillä

Minisatelliitti-PCR:n toimivuutta näytesekaannustapauksissa testattiin myös 14 GeneRisk-projektin näytteellä, joille asiakas oli tietävästi saanut genotyypauksessa saman tuloksen eri henkilöiden DNA-näytteiden välille.

Stokki-, sekä L1-näytteille tehtiin laimennokset kappaleessa 3.3 kuvatun protokollan mukaisesti. Mittauksessa ei ollut mukana veriliuskanäytteitä, sillä niitä ei oltu kyseisten näytteiden osalta kerätty. Tutkimus suoritettiin käyttäen samoja ajo-olosuhteita ja työskentelytekniikoita kuin kappaleissa 3.5 ja 3.6.

4 Tulokset

4.1 Kontrollinäytteiden pitoisuudet

Taulukossa 4 nähdään FT17-pilot projektin verinäytteistä eristettyjen kontrolliliuosten DNA-pitoisuudet.

Taulukko 4. Kontrollien pitoisuudet ja puhtaudet

Kontrolli	ng/μl	Abs. 260/280
1	218,4	1,87
2	205,4	1,84
3	8,4	1,56
4	211,4	1,86
5	179,0	1,86
6	210,4	1,85
7	206,0	1,87
8	401,0	1,87

Kontrolleina toimivat läpi koko työn Kontrollit 1 ja 2, jotka oli laimennettu pitoisuuteen 10 ng/μl.

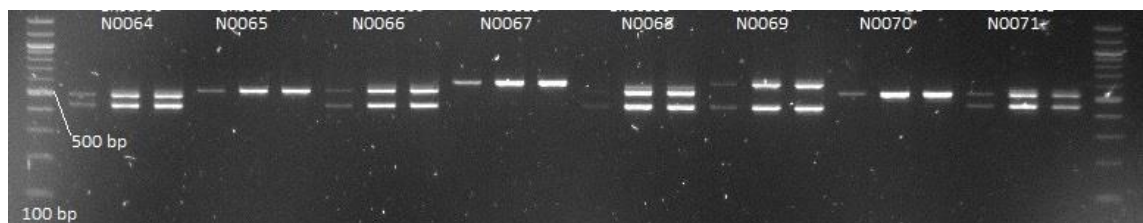
4.2 Agaroosigeelielektroforeesi

Geelille saatiin TE-puskurin määrän optimoinnin jälkeen näkyviä näytevyöhykkeitä, jossa oli nähtävissä joko yksi (homotsygootti) tai kaksi (heterotsygootti) yksilön D1S80- lokuksen näytevyöhykettä. Kuvassa 8, 9 ja 10 on esimerkit kahdeksan ja viiden näytteen geelijaosta, jossa jokaisella näytteellä on havaittavissa kolme peräkkäin olevaa, helposti tulkittavaa näytevyöhykettä. Kolmeen rinnakkaiseen kaivoon pipetoitiin geelille saman näytteen PCR-tuotteet järjestyksessä veriliuska-, stokki-, ja L1-näyte. Näytteitä on ajettu 120 V jännitteellä 1 tunti 2,5 % agaroosigeelillä. Kokostandardina reunimmisissa kaivoissa Bio Labs:in Quick-Load® 100 bp DNA ladder (50 µg/ml).

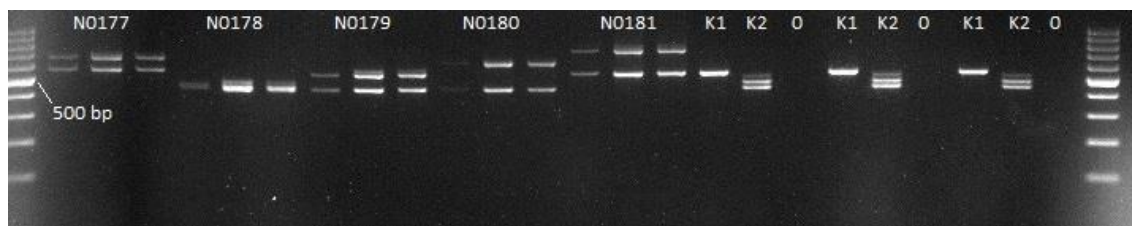
Kootut kuvat lopuista geelijaosta liitteessä 1. Kuvissa nähtävissä olevat näytekoodit eivät vastaa alkuperäisiä näytteenantajan näytekoodia, vaan ne ovat tätä opinnäytetyötä varten numeroitu uudelleen.



Kuva 7 Kahdeksan näytteen 3 rinnakkaista PCR-tuotetta, järjestyksessä veriliuska-, stokki- ja L1-näyte. Ajettu 1 tunti 2,5% geelillä, 120 V jännitteellä.

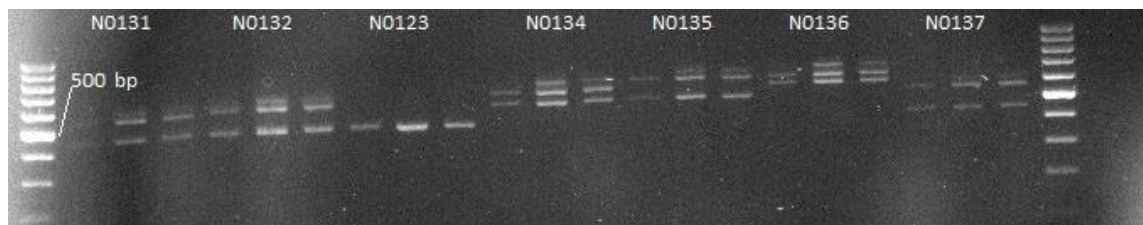


Kuva 8 Kahdeksan näytettä, kolme rinnakkaista PCR-tuotetta. 2,5 % geeli, ajettu 1 tunti 120 V jännitteellä.



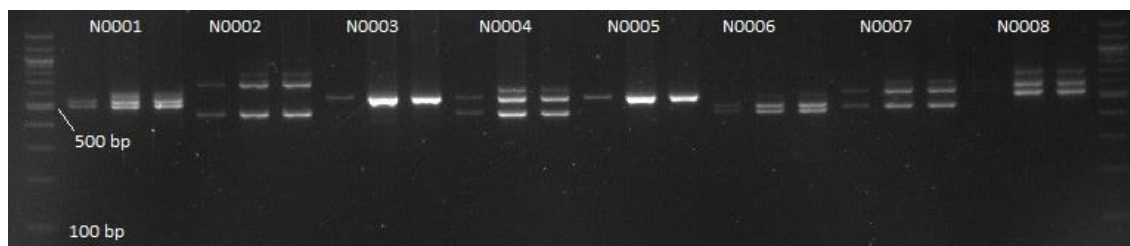
Kuva 9 Viiden eri yksilön näytteen geelijaio, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä. Veriliuska-, stokki- ja L1- PCR-levyjen kontrolli-, ja nollanäytteet (K1 ja K2 pitoisuudet 10 ng/μl). Geeliä (2,5%) ajettu 1 tunti 120 V jännitteellä.

Kuvassa 11 on kuvattu hieman haastavammin tulkittavissa oleva geelikuva, jossa geeliin on sen valmistusvaiheessa todennäköisesti päässyt paakkuja, eli agarooosi ei ole ollut täysin sekoittunut tai agarooosi on päässyt jäähtymään. Tästä johtuen näytteet ajautuvat geelillä vinoon. Tämän kaltaisilta geeleiltä on pystytty näytevyöhykkeiden vinoudesta huolimatta tulkitsemaan kolme saman näytteen vyöhykettä identtisiksi.



Kuva 10 Seitsemän eri yksilön kolme rinnakkaista PCR-tuotetta (veriliuska-, stokki-, sekä L1-näyte). Ajettu 2,5 % agarooosigeelillä 1 tunti 120 V jännitteellä.

Osassa, etenkin ensimmäisten ajojen geelikuvista on havaittavissa epäspesifiä näytevyöhykkeitä, jotka näkyvät toisina tai kolmansina niin sanoittuna ”haamu vyöhykkeinä” stokki-, sekä L1-näytteiden osalta (Kuvat 11 ja 12). Oletettavasti nämä näytteet sisälsivät kaksijuosteista DNA:ta runsaammin kuin veriliuskanäyte ja liian korkea määrä voi aiheuttaa PCR-reaktiossa epäspesifisten DNA-tuotteiden monistumista. Asia saatiin korjattua nostamalla $MgCl_2$ ja betaiinin määrää minisateelliitti-PCR -reaktiossa stokki-, sekä L1-näytteiden osalta (resepti kuvattu kappaleessa 3.5 Minisatelliitti PCR).



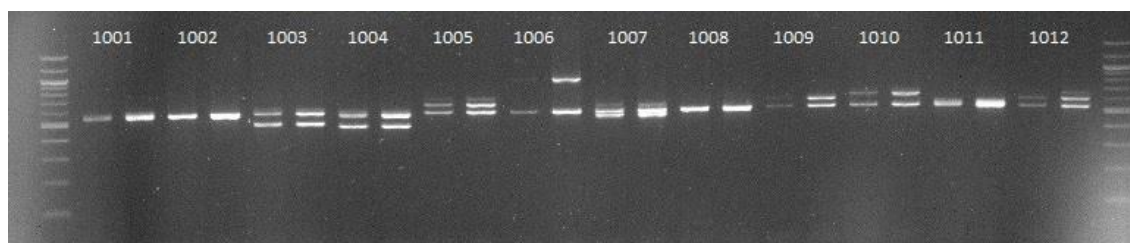
Kuva 11 Kahdeksan eri yksilön näytteen geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä. Stokki- sekä L1- näytteiden osalta nähtävissä epäspesifisiä kolmansia näytevyöhykkeitä. Ajettu 2,5% geelillä 1 tunti, 120 V jännitteellä.

Veriliuskanäytteiden osalta PCR-tuote saattoi olla satunnaisesti niin himmeä, ettei vyöhykettä pystytty tulkitsemaan ja näin ollen myös kyseisen näytteen stokki- sekä L1-vyöhykkeet on jätetty 211 lasketun näytteen ulkopuolelle. Kaikista 211 näytteestä oli luettavissa kolme rinnakkaista näytevyöhykettä. Tutkittujen näytteiden joukosta ei havaittu näytesekaannustapauksia.

4.3 Hepariniä sisältävien verinäytteiden tulokset

Kuvista 13, 14 ja 15 voidaan nähdä NFID-projektin veri- ja stokkinäytteiden geeliajojen tulokset. Tutkitun 24 näytteen joukosta ei havaittu poikkeamia, jotka viittaisivat näytesekaannukseen DNA-näyteprosessoinnissa. Kuvassa 12 on nähtävissä, että yksilön 1006 verinäytteen ylempi vyöhyke on hyvin himmeä, mutta kuitenkin tulkittavissa.

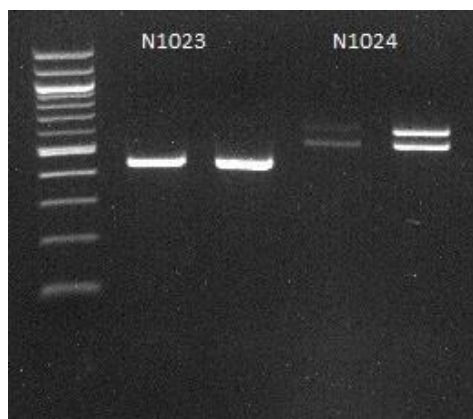
Saman yksilön kaksi rinnakkaista PCR-tuotetta pipetoitiin kaivoihin järjestyksessä veri- ja stokkinäyte. Kuvissa näytteenantajan näytekoodi lukee vyöhykkeiden yläpuolella. Kokostandardina 100 bp Bio Labs Quick - Load® DNA ladder.



Kuva 12 NFID- projektin kahdentoista näytteen kaksi rinnakkaista näytevyöhykettä, järjestyksessä veri- ja stokkinäyte. Ajoaika 1 tunti 120 V jännitteellä, 2,5% geelillä.



Kuva 13 Kymmenen NFID- soluverinäytteen kaksi rinnakkaista näytevyöhykettä, järjestyksessä soluveri- ja stokkinäyte. Kontrollit K1, K2 (10 ng/μl) sekä nolla näyte kuvassa oikealla



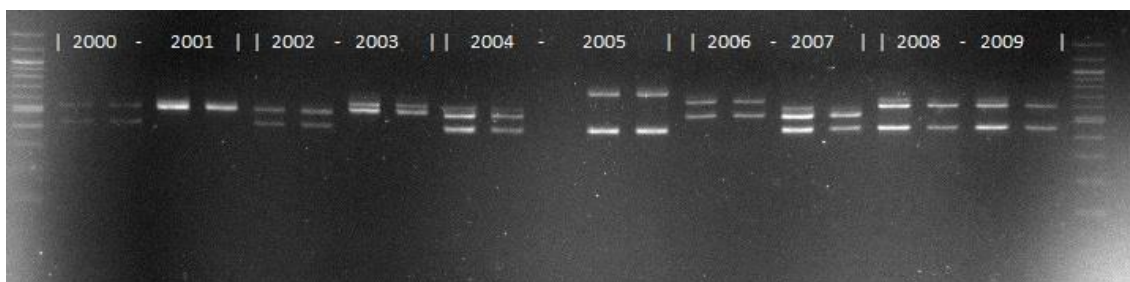
Kuva 14 Kahden eri yksilön kaksi rinnakkaista vyöhykettä (veri- ja stokkinäyte). Geeliä (2,5%) ajettu 1 tunti, 120 V jännitteellä.

4.4 Generisk-projektin näytesekaannus

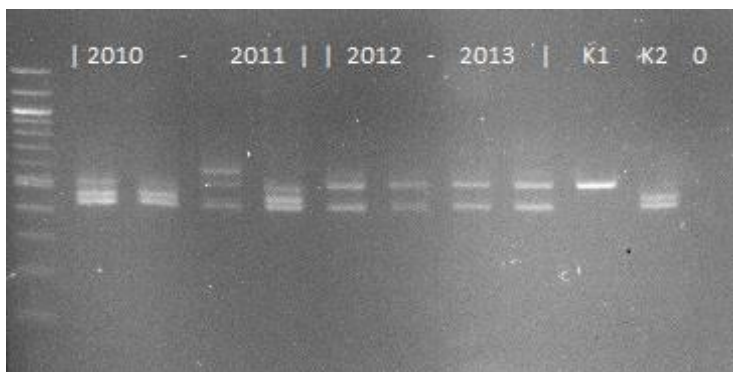
Geelikuvissa (ks. Kuva 16 ja 17) nähdään näytteenantajan näytekoodi näytevyöhykkeiden yläpuolella. Kuvissa pystyviivat erottavat kaksi potentiaalista näytesekaannustapausta toisistaan. Kyseisistä näytteistä oli tehty asiakkaalle lähtevät laimennokset ja asiakas oli saanut eri näytekoodin omaaville näytteille saman tuloksen genotyypauksessa.

Kuvista voitiin todeta, että suurimmassa osassa tapauksissa eri koodin omaavat näytteet antoivat erilaiset profiilit näytevyöhykkeille, joka indikoi ettei kyseiset näytteet ole päässeet sekaantumaan. Yksilöiden näytevyöhykkeet koodien 2008 - 2009 sekä 2012 – 2013 osalta ajautuivat samoille kohdille geelillä. Tämän tyyppisissä tapauksissa olisi suotavaa tehdä näytteille ID-PCR-ajo ja lähettää näytteet FIMM:in (Suomen molekyyli lääketieteen instituutti) laboratorioon fragmenttianalyysiin, joka perustuu

yksilön mikrosatelliittialueen analysointiin, antaen täten tarkemman tuloksen näytteenantajan yksilöllisestä DNA-profiilista.



Kuva 15 Kymmenen eri näytteenantajan kaksi rinnakkaista näytevyöhykettä, järjestyksessä stokki-, sekä L1-näyte. Yksilölle ominainen näytekoodi kulkee kuvan yläosassa.

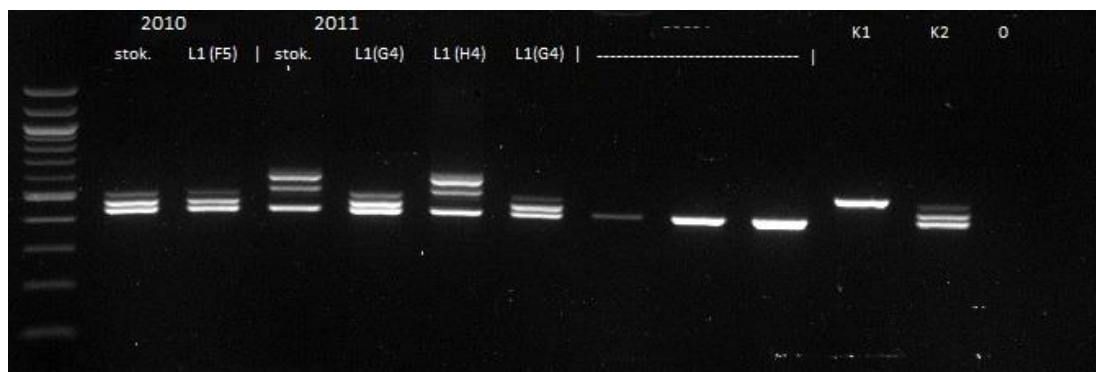


Kuva 16 Neljän eri näytteenantajan kaksi rinnakkaista näytevyöhykettä, järjestyksessä stokki-, sekä L1- näyte. Oikealla kontrollit K1, K2 (10 ng/μl) ja nollanäyte

Kuvaa 17 tarkasteltaessa huomattiin selkeä eroavaisuus yksilön 2011 stokki, sekä L1-näytevyöhykkeiden välillä. Myös yksilön 2010 kummatkin näytevyöhykkeet näyttivät vastaavan yksilön 2011 L1-näytteestä muodostunutta vyöhykettä. Tämän takia otettiin kyseisten yksilöiden näytteet tarkempaan tarkasteluun ja tehtiin vielä uusi minisatelliitti-PCR-ajo tulosten varmistamiseksi. Otettiin PCR- ja geelijaon mukaan myös samalta laimennoslevyltä (L1) kaivosta H4, yksilön 2010 oletusarvoista näytettä, sillä tähän kaivon epäiltiin olevan virheellisesti pipetoitu yksilön 2011 DNA-liuos.

Uuden ajon tuloksista (kuva 18) voitiin varmistua, että yksilön 2010 stokki-, sekä L1-näytteiden osalta ei ollut tapahtunut näytesekaannusta. Uusinta ajossa varmistuttiin myös siitä, että yksilön 2011 stokki-, sekä L1-näytteiden osalta oli tapahtunut näytesekaannus. Näytekoodin 2011 L1-levyn kaivon oli erehdyksissä laimennettu

yksilön 2010 näytettä. Kaivosta H4 otettu näyteliuos osoittautui olevan näyte koodilla 2011 kuten epäiltiin.



Kuva 17 Kahden eri yksilön näytesekaannustapaus (näytekoodit 2010 ja 2011). Kuvasta nähdään että yksilön 2011 L1- näytekaivoon (G4) on laimennettu erehdyksissä yksilön 2010 stokkinäyte ja näytekaivoon H4 oli päätynyt 2011 näytteen DNA- liuos.

5 Tulosten tulkinta ja päätelmät

Opinnäytetyötä varten tutkittiin yhteensä 227 GeneRisk-projektin näytettä, joiden joukosta 211 näytteen osalta geelillä oli nähtävissä veriliuska-, stokki-, sekä L1-näytteiden PCR-tuotteet. Kaikkiaan 227 tutkitun näytteen joukosta 93 % näytteistä oli sellaisia, joissa oli tulkittavissa geeliltä näytteenantajasta saadut kaikki kolme PCR-tuotetta. Näytteet ajautuivat agarosigeelillä kokostandardin mukaan noin 500 emäsparin kohdalle, joka on ominainen koko D1S80-lokuksen alleeleille. Näytteiden joukosta ei havaittu näytesekaannustapauksia. Tuloksiin otettiin mukaan näytteet (211 kappaletta), joissa oli geeliltä kaikki kolme näytevyöhykettä luettavissa.

Lisäksi hepariinia sisältäviä verinäytteitä saatiin tutkittua NFID-projektin osalta 24 kappaletta, joissa tutkittiin DNA-profiilin vastaavuutta saman yksilön DNA-eristetyn stokkinäytteen kanssa. Näytteiden osalta ei havaittu tapahtuneen sekaannuksia DNA-eristysprosessissa.

Suurempien näytemäärien analysointi olisi antanut vielä laajemman kuvan DNA-näyteprosessoinnista ja siellä mahdollisesti tapahtuvista näytesekaannustapauksista, mutta tulosta voi pitää kaiken kaikkiaan hyvänä, sillä sekaannuksia ei yhteensä 235 tutkitun näytteen joukosta ollut havaittavissa. Kaikkien tutkittujen 235 näytteen

heterotsygoottien osuus oli 72,77%, joka on hieman matalampi kuin D1S80-locuksen yleinen heterotsygoottisuus (noin 85 – 99 %). [5].

Työssä minisatelliitti-PCR saatiin toimimaan myös suoraan veri- ja veriliuskanäytteille ilman erillistä DNA-eristystä. Optimaalinen määrä 1xTE-puskuria, johon veriliuskanäytteestä liuotettiin, todettiin olevan noin 80 µl:aa. Suuremmalla, noin 150 µl:an tilavuudella vyöhykkeet eivät erottuneet geeliltä ja pienemmissä pitoisuuksissa (noin 50 µl) neste sakeutui inkuboinnin aikana liikaa, joka teki näytteen pipetoinnista haastavampaa. Veriliuskanäytteiden osalta vyöhykkeet näkyivät geelillä poikkeuksetta himmeämpinä, kuin stokki-, tai L1-näytteiden PCR-tuotteet, sekä pienessä osassa tapauksista näytevyöhyke ei ollut luettavissa veriliuskanäytteen osalta. Tämä johtuu todennäköisesti verinäytteen sisältämistä PCR:ää inhiboivista tekijöistä. DNA-eristyksen läpikäyneille näytteille kyseinen PCR-tekniikka sopi erinomaisesti ja näytevyöhykkeet oli poikkeuksetta selkeästi näkyvissä.

D1S80-locukseen perustuvaa minisatelliitti-PCR -menetelmää pystyisi hyvin hyödyntämään tilanteessa, jossa tutkitaan esimerkiksi asiakkaan puolelta ilmoitettuja mahdollisia näytesekaannustapauksia, jolloin asiakas on saanut eri näytekoodin omaaville näytteille saman tuloksen genotyypauksessa. Näin pystytään todentamaan, onko sekaannus tapahtunut THL Biopankin DNA-näyteprosessoinnissa vai prosessin ulkopuolella. Kaiken kaikkiaan kolme saman henkilön eri DNA-näytettä pystyi vaivattomasti tulkitsemaan omaavan identtisen D1S80-locuksen, joten Minisatelliitti-PCR voidaan todeta olevan varteenotettava alustava yksilöntunnistusmenetelmä tutkittaessa näytesekaannustapauksia THL Biopankissa.

D1S80-locuksen lisäksi minisatelliitti-PCR:ssä voisi monistaa myös muita minisatelliittilokuksia (esim. 3' APOB), jolloin geelille saataisiin näkymään useampi näytteenantajalle ominainen vyöhyke ja yksilöntunnistus olisi spesifimpää. Osissa geelikuvista esimerkiksi kahdella peräkkäisellä yksilöllä, ajautui geelillä D1S80-locuksen PCR-tuotteiden näytevyöhykkeet miltei identtisiin kohtiin, ja toisen minisatelliitti locuksen käytöllä, saataisiin kyseisille tapauksille spesifimmät DNA-profiilit ja yksilöntunnistus olisi luotettavampaa. Eri yksilöiden PCR-tuotteiden ajautuminen identtisiin kohtiin agarosigeelillä on D1S80-locusta tutkittaessa mahdollista. Agarosigeelelektroforeesin resoluutio, eli erottelukyky on heikompaa, kuin käytettäessä esimerkiksi korkean erottelukyvyn omaavaa SDS-PAGE- tekniikkaa (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis), jota pystyy käyttämään

myös pienempien DNA-fragmenttien koon määrittäisiin. Mahdollisten näytesekaannustapausten tutkimiseen tarkoitettu menetelmä THL Biopankissa tulisi kuitenkin olla edullinen ja mielellään vähän aikaa vievä, joten näytteiden analysointi esimerkiksi SDS-PAGE- menetelmällä ei olisi mielekäästä.

Asiakkaan reklamoimia näytesekaannustapauksia tutkittaessa voitaisiin tulosten varmistuksessa käyttää ID-PCR-menetelmää, mikäli Minisatelliitti-PCR -analyysissä näytevyöhykkeet olisivat ajautuneet identtisiin kohtiin geelillä, eikä luotettavaa tulosta menetelmällä olisi saavutettu. THL Biopankki käyttää FIMM:in laboratorion (SeqLab) tarjoamaa fragmenttianalyysi-palvelua satunnaisesti näytteiden DNA:n laaduntarkistukseen, jossa näytteille on aluksi tehty ID-PCR -ajo. Mikrosatelliittialueisiin perustuvassa menetelmässä analysoitavia primerpareja on 6 kappaletta (6-plex). Analyysi on hintava, joten analysoimalla näytteet aluksi minisatelliitti-PCR protokollalla, pystyttäisiin erottamaan selkeästi erottuvat näytevyöhykkeet toisistaan ja mikäli tuloksissa on tulkinnan varaa niin kyseiset näytteet voisi ajaa ID-PCR -protokollalla ja lähettää näytteet fragmenttianalyysiin.

Tekniikka on suuria näytemääriä käsiteltäessä hitaanpuoleinen, verinäytteiden inkubointiin ja esikäsitelyyn menee oma aikansa. DirectPCR-lyysistä, jota käytettiin hepariinia sisältävien verinäytteiden käsittelyssä, voisi hyödyntää myös veriliuskanäytteissä, jolloin inkubointiaika lyhenisi merkittävästi. L1-näytteiden käsittelyssä tulee olla erittäin tarkka, jotta näytteet saa pipetoitua oikeista kaivoista uudelle 96-kuoppalevyille. Pienempiä näytemääriä tai esimerkiksi verrattaessa vain stokki- ja L1-näytteitä toisiinsa minisatelliitti-PCR-menetelmää voi pitää melko nopeana, ja selkeänä alustavana DNA-profilointimenetelmänä tutkittaessa näytesekaannuksia THL Biopankissa. Luotettavuuden takaamiseksi epäselville tapauksille tulisi tehdä ID-PCR, jonka jälkeen näytteet lähetettäisiin fragmenttianalyysiin.

Lähteet

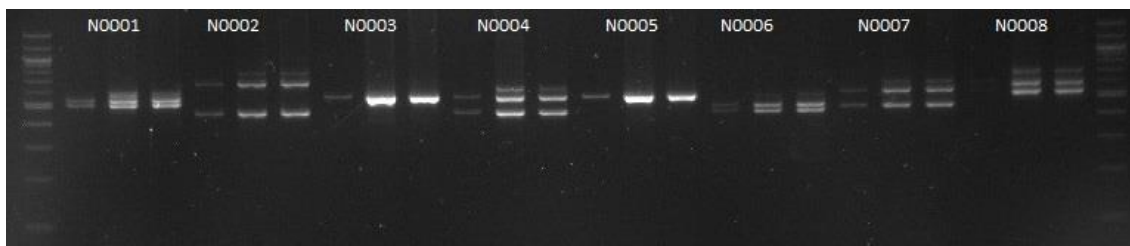
- 1 Kuva Magneettisauvojen toiminnasta
<http://www.chemagen.com/fileadmin/user_upload/Products/Images/Magnet-Rotation.jpg> Viitattu 31.5.2017
- 2 Janus® chemagic 360 pro- eristysrobotin toiminta
<<http://www.chemagen.com/januschemagic360.html>> Verkkosivu. Viitattu 4.5.2017
- 3 Kuva Janus® chemagic 360 pro eristysrobotista
<<http://www.chemagen.com/januschemagic360.html>> Viitattu 4.5.2017
- 4 Tecan Genesis nesteannostelurobotin toiminta
<<http://www.rpcifloTw.org/instruments/genesis150.html>> Verkkosivu. Viitattu 4.5.2017
- 5 A.J.Jeffreys, V.Wilson & S.L. Thein. 1985. Individual specific "fingerprints" of human DNA.
<https://www.mun.ca/biology/scarr/Jeffreys_et_al_1985_Nature_316,76.pdf>. Artikkel. Viitattu 5.5.2017
- 6 J.Thomas McClintock. 2014. Forensic Analysis of Biological Evidence: A Laboratory Guide for Serological and DNA Typing. s.1. DNA Diagnostics, INC Lynchburg, Virginia
- 7 A.J.Jeffreys & K.Tamaki. 2005. Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939656>> Artikkel. Viitattu 15.8.2017
- 8 D. Whitehouse & R.Rapley. 2007. Molecular Forensics. s.74. John Wiley & Sons Ltd. Viitattu 15.8.2017
- 9 K. Inman & N. Rudin. 2002. An Introduction to Forensic DNA Analysis 2nd ed. s.17. CRC Press LLC . Viitattu 12.9.2017
- 10 Human identification with STRs and SNPs. <<https://www.illumina.com/areas-of-interest/forensic-genomics/forensic-analysis-methods/snp-str-analysis.html>> Verkkosivu. Viitattu 31.5.2017
- 11 J.Duitama, A.Zablotskaya, R. Gemayel, A.Jansen, S.Belet, J.R.Vermeesch, K.J.Verstepen & G.Froyen. 2014. Large-scale analysis of tandem repeat variability in the human genome.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4027155/>> Artikkel. Viitattu 20.9.2017

- 12 A.J.Jeffreys & K.Tamaki. 2005. Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing.
<http://www.sjsu.edu/people/steven.lee/courses/c3/s4/tandem_repeats_review_article_jeffreys.pdf> Artikkel. Viitattu 31.5.2017
- 13 David P. Clark. 2010. Molecular Biology. s .84 Academic Cell.
- 14 F.Denoëud, G.Vergnaud & G.Benson. 2003. Predicting human minisatellite polymorphism. <<http://genome.cshlp.org/content/13/5/856.full>> Artikkel. Viitattu 12.9.2017
- 15 A.Khrunin, D.Verbenko & S.Limbroska. Minisatellite DNA Markers in Population Studies. Institute of Molecular Genetics
<<http://cdn.intechopen.com/pdfs/38424.pdf>> Artikkel. Viitattu 10.9.2017
- 16 D.Primorac & M.Schanfield. 2014. Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective. s.35. SRC Press LLC . Viitattu 12.9.2017
- 17 K.Balamurugan, M.L.Tracey, U.Heine, G.C.Maha & G.T.Duncan. 2012. Mutation at the Human D1S80 Minisatellite Locus .
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356730/>> . Artikkel. Viitattu 20.5.2017
- 18 EDVO-Kit 334. VNTR Human DNA Typing using PCR.
<<http://www.edvotek.com/site/pdf/334.pdf>> Verkkodokumentti. Viitattu 20.5.2017
- 19 Kuva D1S80- lokuksen PCR-tuotteista. Samford University, Department of Biological and Environmental Sciences
<<http://www2.samford.edu/~djohnso2/44962w/334/labfingerp.html>>
- 20 W.J.Tilstone, K.A.Savage & L.A.Clark. 2006. Forensic Science: An Encyclopedia of History, Methods and Techniques. s. 49. ABC-CLIO
- 21 K.N.Ballantyne, R.J.Mitchell & R.A. van Oorschot. 2010. Forensic trace DNA: a review <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3012025/>> Artikkel. Viitattu 12.9.2017
- 22 J.K.Actor, S.A.Hwang & M.L.Kruzel. 2009. Lactoferrin as a Natural Immune Modulator. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2915836/>> Artikkel. Viitattu 20.9.2017
- 23 Vaasan keskussairaala, Kliininen laboratorio. Ohjekirja 2013. Verinäytteenotto <<http://www.vshp.fi/medserv/klkemi/fi/ok/prov/verinaytteet.htm>> Verkkosivu. Viitattu 20.9.2017
- 24 P.Rådström, R.Knutsson, P.Wolffs, M.Lövenklev & C.Löfström. 2004. Pre-PCR Processing. Strategies to Generate PCR-Compatible Samples.

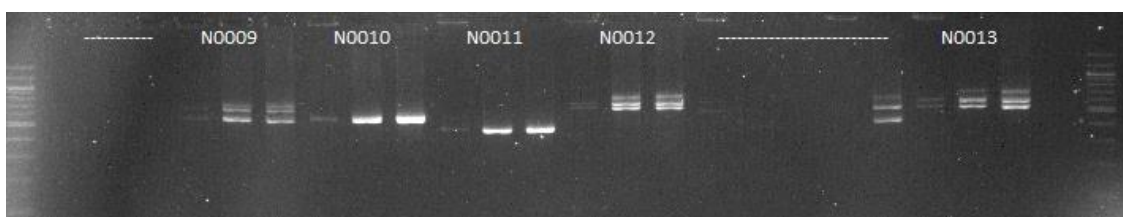
- <<http://www.gene-quantification.de/radstrom-pre-pcr-2004.pdf>> Artikkel. Viitattu 20.9.2017
- 25 BiteSizeBio.com. By Suzanne Kennedy. <<http://bitesizebio.com/2592/better-than-betaine-pcr-additives-that-actually-work/>> Verkkosivu. Viitattu 20.9.2017
- 26 Nordic BioSite. DirectPCR Lysis Reagent (Cell). Käyttöohje <http://admin.nordicbiosite.com/pdf/ProductPdfFiles/02474_250-301-C_250-302-C.pdf> Tulostettu. 20.4.2017

Agaroosigeelielektroforeesi-ajojen kootut kuvat

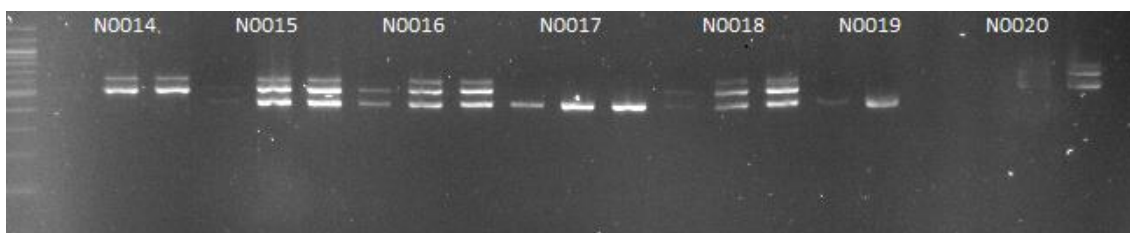
Opinnäytetyön loput geelikuvat koottuna. Kuvissa näkyy saman yksilön kolme rinnakkaista PCR-tuotetta, järjestyksessä veriliuska- stokki- ja L1-näyte.. Näytteenantajan koodi merkitty PCR-tuotteiden yläpuolelle.



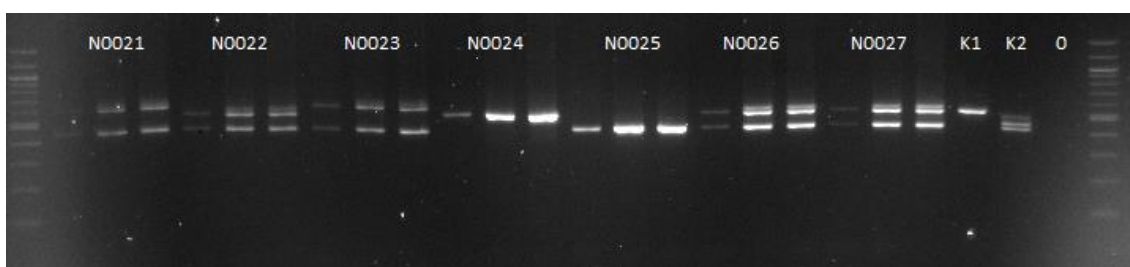
1. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä.



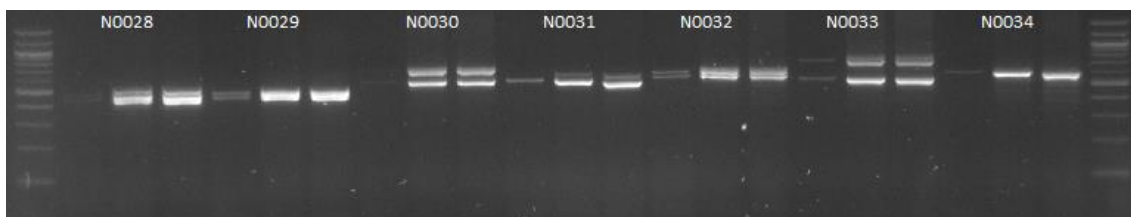
2. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, jossa tulkittavissa viiden yksilön kolme näytevyöhykettä.



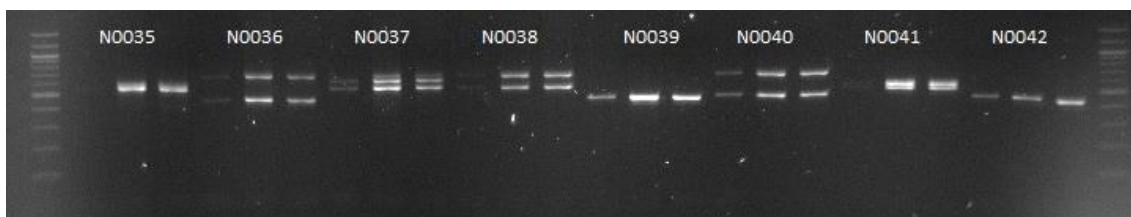
3. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, jossa tulkittavissa viiden yksilön kolme rinnakkaista näytevyöhykettä.



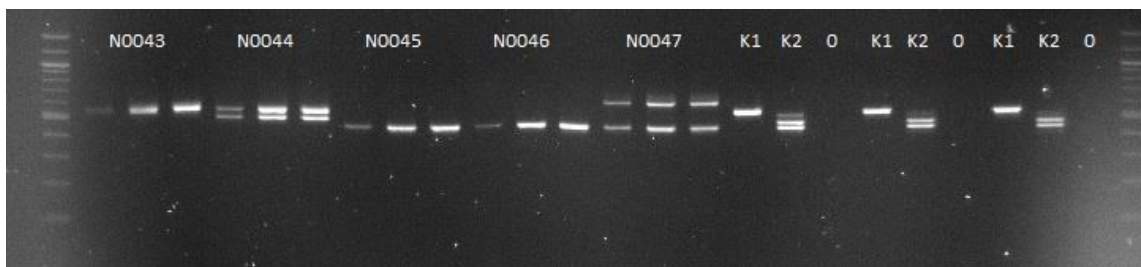
4. Seitsemän eri yksilön näytteiden geeliajo, sekä PCR-ajon kontrollit K1, K2 (10 ng/μl) sekä nollanäyte.



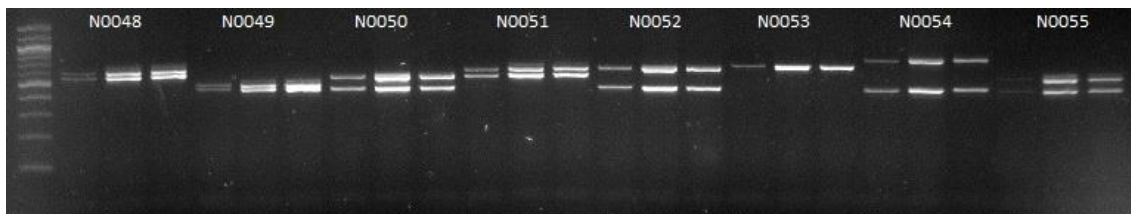
5. Seitsemän eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaisita näytevyöhykettä



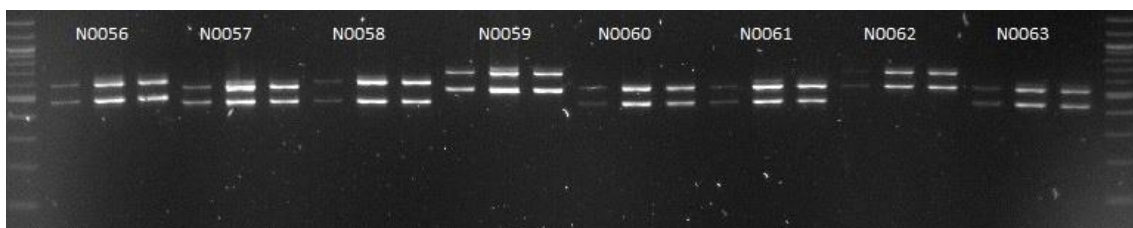
6. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



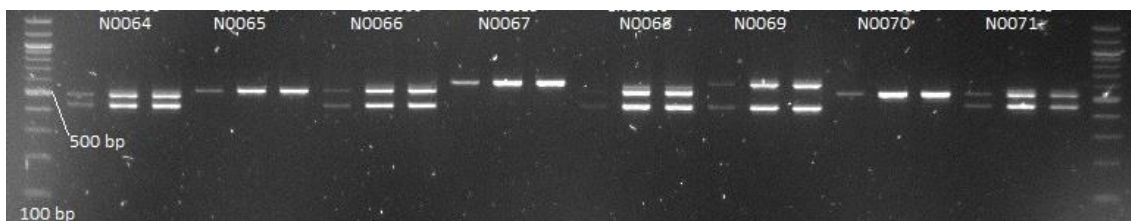
7. Viiden eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä. Kolmen PCR-levyn (veriliuska-, stokki-, sekä L1-näytteiden) kontrolli-, sekä nollanäytteet (K1, K2 ja 0). Kontrollinäytteiden pitoisuus 10 ng/μl.



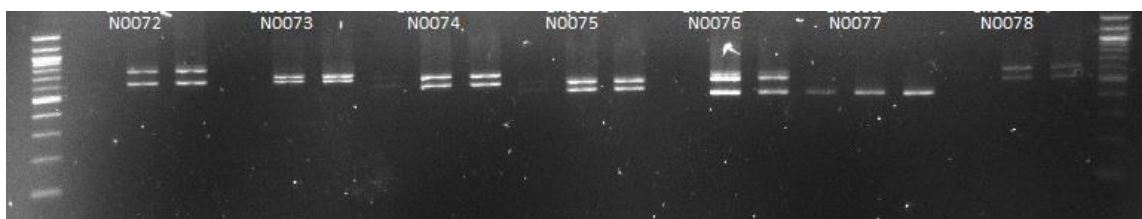
8. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



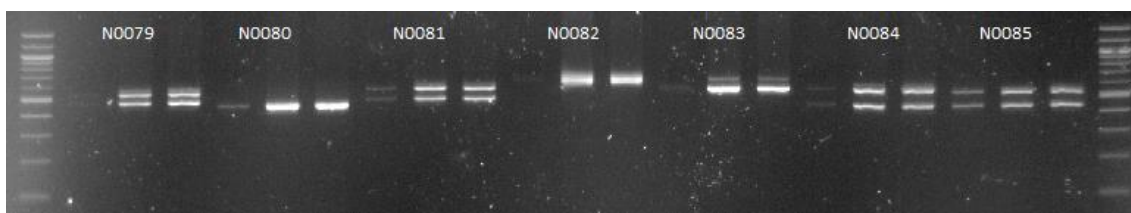
9. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



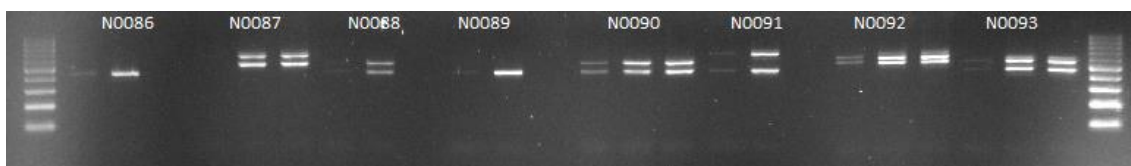
10. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



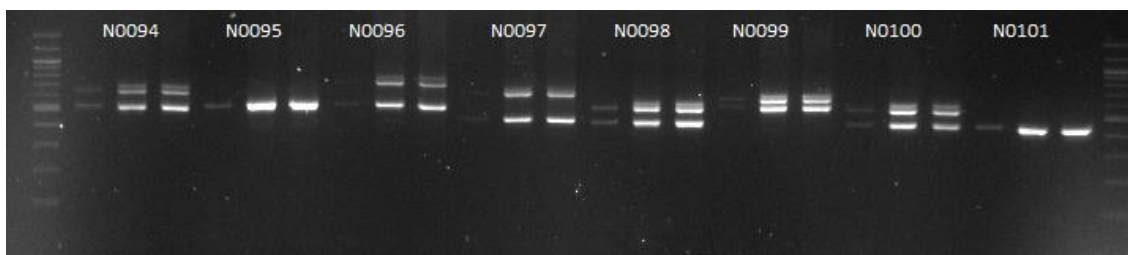
11. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, jossa tulkittavissa viiden yksilön kolme rinnakkasita näytevyöhykettä.



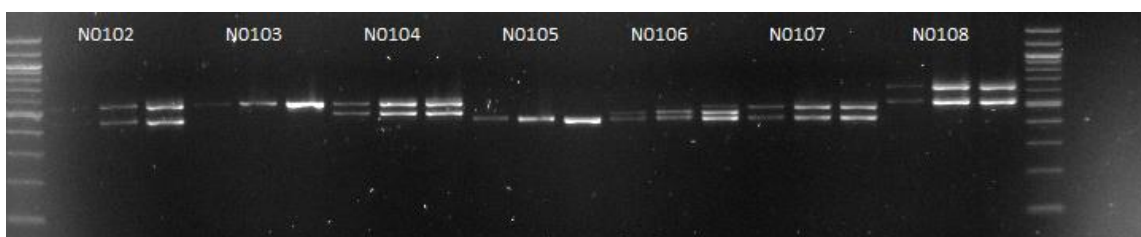
12. Seitsemän eri yksilön kolme rinnakkaista näytevyöhykettä.



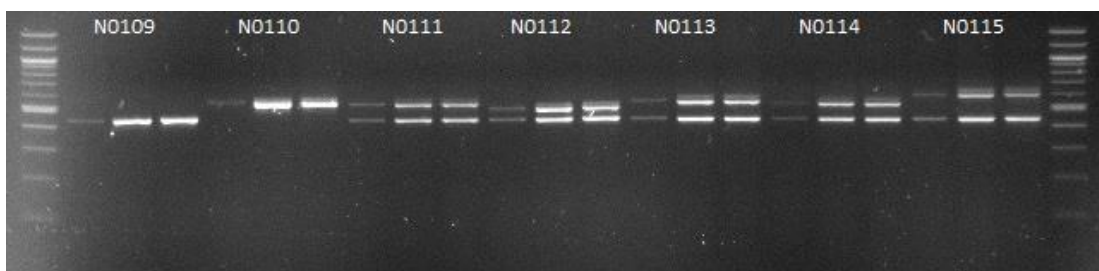
13. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, jossa tulkittavissa kolmen yksilön kolme rinnakkaista näytevyöhykettä.



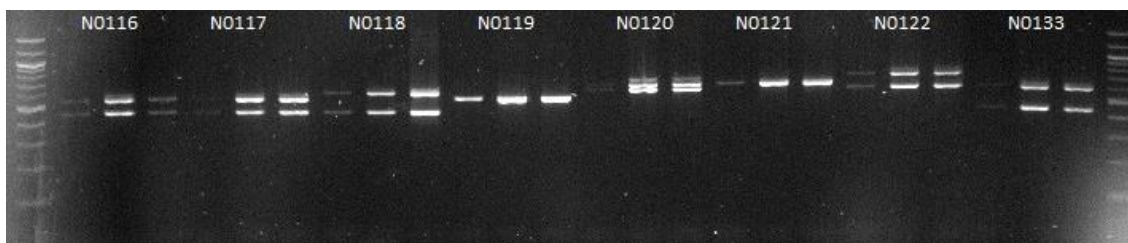
14. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä.



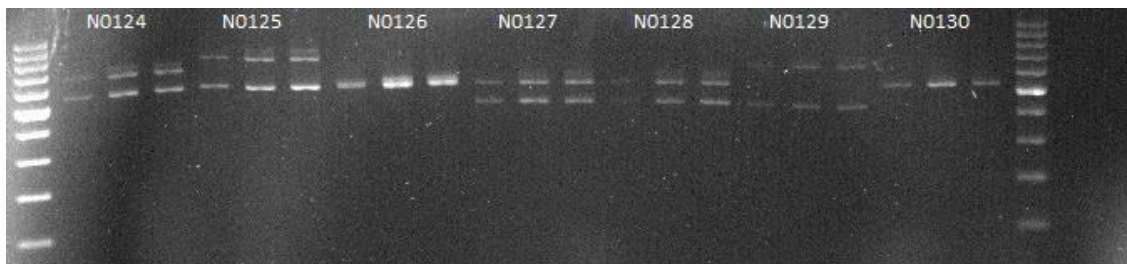
15. Seitsemän eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä.



16. Seitsemän eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä.



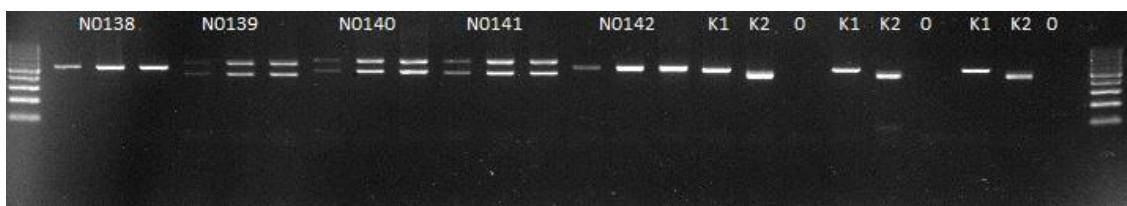
17. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



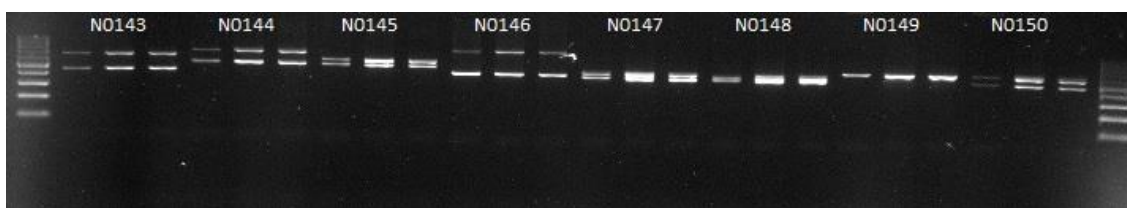
18. Seitsemän eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



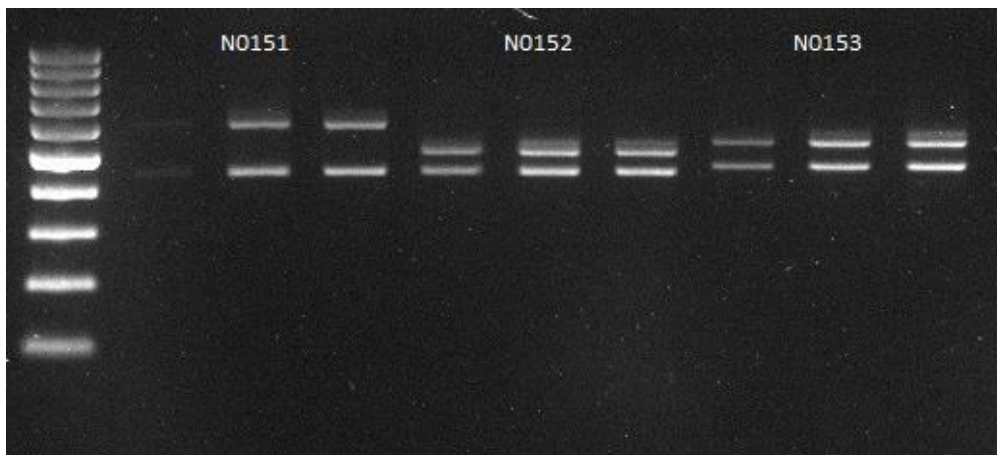
19. Seitsemän eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



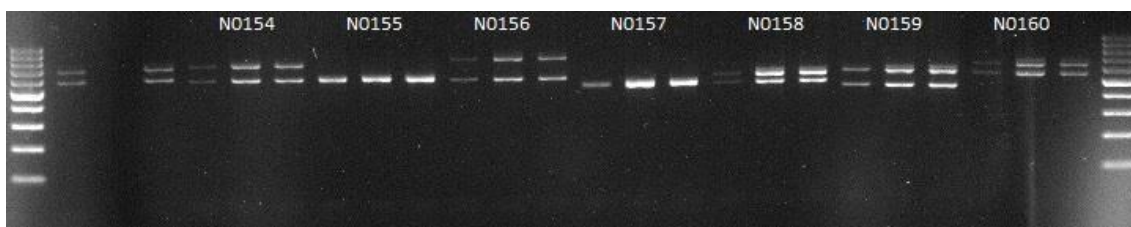
20. Viiden eri yksilön geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä. Kolmen PCR-levyn (veriliuska-, stokki-, sekä L1-näytteiden) kontrolli-, sekä nollanäytteet (K1, K2 ja O). Kontrollinäytteiden pitoisuus 10 ng/μl.



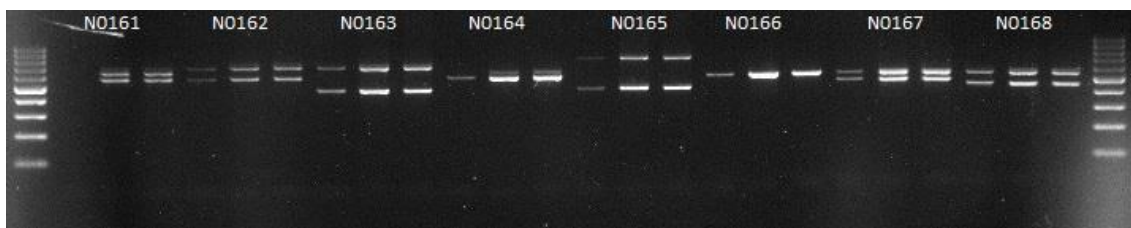
21. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geeliajo, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



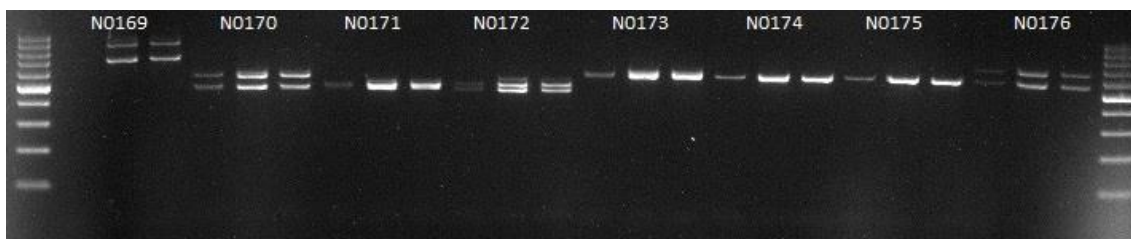
22. Kolmen eri yksilön näytteiden geelijaio, jossa kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



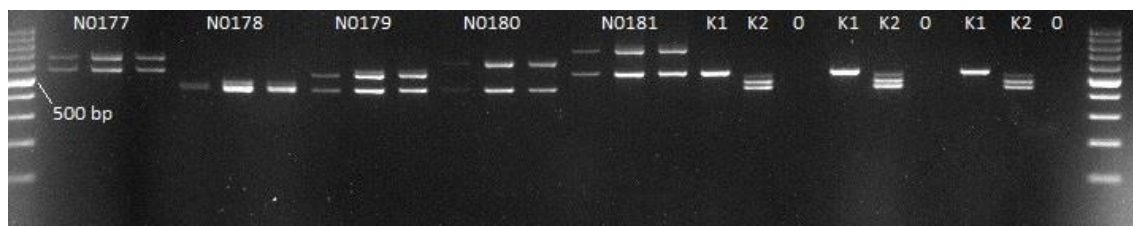
23. Seitsemän eri yksilön näytteiden geelijaio, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



24. Seitsemän eri yksilön näytteiden geelijaio, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



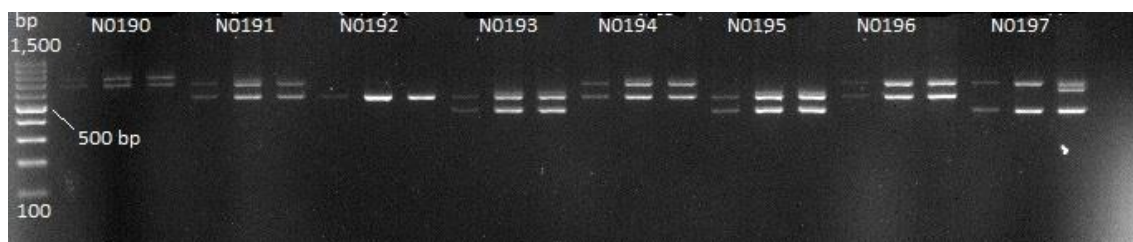
25. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geelijaio, seitsemän yksilön kolme rinnakkaista näytevyöhykettä tulkittavissa



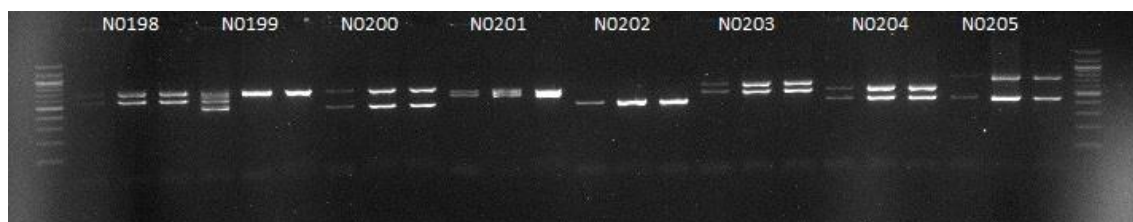
26. Viiden eri yksilön näytteiden geelijaio, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä. Kolmen PCR-levyn (veriliuska-, stokki-, sekä L1-näytteiden) kontrolli-, sekä nollanäytteet (K1, K2 ja 0). Kontrollinäytteiden pitoisuus 10 ng/μl.



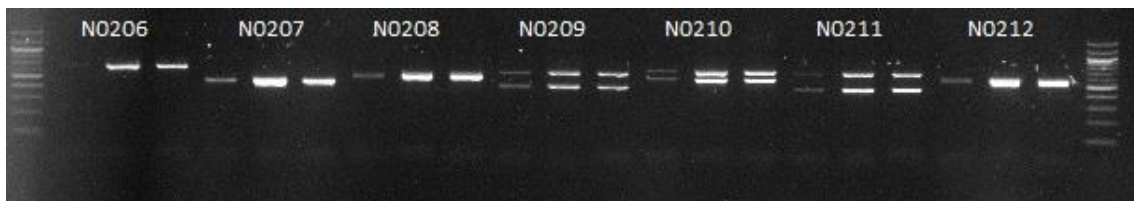
27. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geelijaio, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



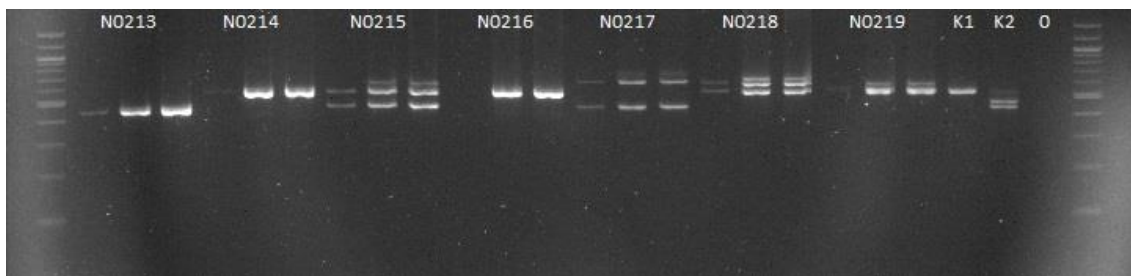
28. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geelijaio, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä



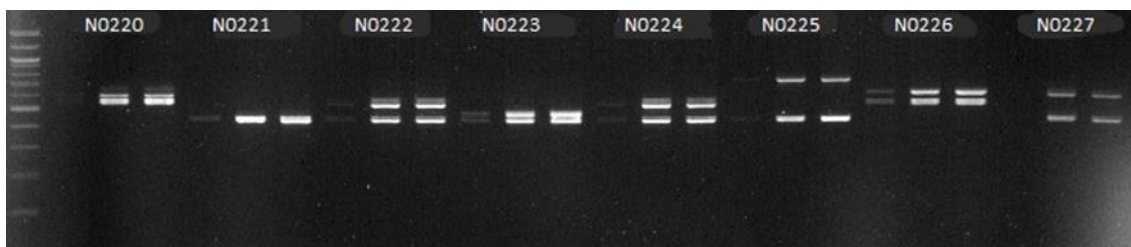
29. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geelijaio, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä. Koodilla N0199 ensimmäisessä näytevyöhykkeessä nähtävissä kontaminaatio. Kyseinen näyte oli päässyt haihtumaan PCR- ajossa jonka johdosta näytteen joukkoon pipetoitiin erehdyksissä hieman laboratoriovettä steriilin veden sijasta.



30. Seitsemän eri yksilön näytteiden geelijaio, kolme rinnakkaista näytevyöhykettä.



31. Seitsemän eri yksilön näytteiden geelijaio, kolme rinnakkaista näytettä, kuuden yksilön kolme rinnakkaista näytevyöhykettä tulkittavissa.



32. Kahdeksan eri yksilön näytteiden geelijaio. Seitsemän yksilön kolme rinnakkaista näytevyöhykettä tulkittavissa.

