

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja Elintarviketekniikka

Biotekniikka

2014

Krista Kiuru

PICHIA PASTORIS – HIIVAKANTOJEN SIIRTOGEEENIN KOPIOLUVUN MÄÄRITTÄMINEN KVANTITATIIVISELLA PCR- MENETELMÄLLÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Krista Kiuru

PICHIA PASTORIS –HIIVAKANTOJEN SIIRTOGEENIN KOPIOLUVUN MÄÄRITTÄMINEN KVANTITATIIVISELLA PCR-MENETELMÄLLÄ

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää kvantitatiiviseen polymeerasiketjureaktioon (qPCR) perustuva menetelmä kopioluvun määrittämiseksi *Pichia pastoris* –hiivakannoista. Hiivakantoihin oli siirretty Influenssa B-viruksen nukleoproteiinia (IBnP) koodaava geeni transformaatiomenetelmällä, jossa siirtyy useampi geenikopio kerrallaan ja geenikasetissa oli toisena merkkiproteiini hydrofobiini eri muodoissaan (HFB1_3, HFB1_4 ja Tag 6). Kantavektorina käytettiin pPICZ A -vektoria. Työssä käytettiin sisäisinä kontrolleina ns. single copy –hiivakantoja, joissa oli vain yksi siirtogeenikopio.

Käytettävät alukeparit testattiin käyttämällä *E. colista* eristettyä, IBnP-geenin sisältävää plasmidia qPCR-templaattina. Varsinaisia qPCR-ajoja varten kasvatetuista hiivasoluista eristettiin genominen DNA (gDNA), jota käytettiin qPCR-templaattina. Hiivakasvatuksista laskettiin myös hiivasolujen määrä FACS-solulaskurilla, jonka jälkeen solut käsiteltiin qPCR:ää varten.

Lopuksi single copy –näytteitä verrattiin multicopy –näytteisiin. Multicopy-näytteet ajettiin rinnakkain single copy – näytteiden kanssa, jolloin saatiin suhteutettu tulos, jota voitiin verrata single copy – näytteistä saatuihin tuloksiin. Tämän perusteella voitiin arvioida voidaanko gDNA eristää siten, että rinnakkaisista näytteistä saadaan suhteellisesti mitattuna oikea tulos, jota voidaan käyttää erilaisen kopioluvun omaavien näytteiden vertaamiseen toisiinsa. Kvantitointi tehtiin standardi-suoraa vastaan käyttäen 2nd derivative max –analyysia.

Optimoidulla menetelmällä saavutettiin parhaimmillaan 10 kopion herkkyys hajotetuilla soluilla. Hajottamattomilla soluilla herkkyys oli 100 kopiota. Tämän perusteella voidaan todeta, että PCR-syklaus ei hajota soluja tasaisesti, joten solunäytteet on hyvä esikäsitellä hajottamalla ne. Tämä parantaa huomattavasti menetelmän herkkyyttä.

ASIASANAT:

Pichia pastoris, kvantitatiivinen PCR, genominen DNA, kopioluku

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2014 | 41

Instructor: Petri Susi (Ph. D.), Kaj Sjöblom (M. Sc.)

Krista Kiuru

DETERMINATION OF COPY NUMBER OF THE TRANSFER GENE OF PICHIA PASTORIS YEAST STRAINS WITH QUANTITATIVE PCR METHOD

The purpose of the thesis was to develop a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method, which can be used to determine the target gene copy number from *Pichia pastoris* yeast strains. Single copy strains of *Pichia pastoris* were used as internal controls to which the multicopy strains were compared to during the study. The primary target gene was the gene encoding the nucleoprotein of Influenza B virus (IBnP). Hydrophobin was other target gene (HFB1_3, HFB1_4 and Tag 6). pPICZ A was used as a vector.

The primer pair was tested using purified plasmid containing IBnP gene as a template in the qPCR reaction. Genomic DNA was then isolated from the cultivated yeast cells for qPCR. Alternatively, the number of the yeast cells was counted by flow cytometry, and isolated DNA samples were analyzed by qPCR.

Finally, the single copy samples were compared to multicopy samples. The results allowed the estimates to be made about whether gDNA can be isolated with comparable results from parallel samples and whether single copy and multicopy samples can be compared to each other. Quantitation was made against the standard straight line using the 2nd Derivative Max analysis.

The optimized method reached sensitivity of 10 copies with broken cells. The sensitivity of the non-broken cells was 100 copies. According to the findings it is possible to conclude that the PCR cycling does not break cells evenly, and it is therefore essential to process the cell samples by breaking them before qPCR runs. Pre-treatment considerably improves the sensitivity of the method.

KEYWORDS:

Pichia pastoris, quantitative PCR, genomic DNA, copy number

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	7
2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	8
2.1 Pichia pastoris	8
2.2 Plasmidien käyttö qPCR:ssä	9
2.2.1 Plasmidien eristys	9
2.2.2 Kvantitointi ja kopioluvun laskeminen	10
2.3 gDNA:n eristys	11
2.4 gDNA:n konsentraation mittaaminen	13
2.5 qPCR	14
2.5.1 Detektointi	17
2.5.2 qPCR:ssä käytettävät laitteet	19
2.6 gDNA:n kvantitointi	21
2.7 Agarosigeelielektroforeesi	22
2.8 FACS	24
3 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET	26
3.1 Primerien testaus plasmidilla	27
3.2 Toistettavuus	29
3.3 Hiivasolujen kasvatus	29
3.4 gDNA:n eristys ja konsentraation mittaus	31
3.5 Solujen laskeminen ja qPCR	33
3.6 gDNA:n kvantitointi	37
4 TARKASTELU	38
LÄHTEET	40

LIITTEET

Liite 1. Näytteiden koodaus.
Liite 2. Alukkeiden tiedot.

KUVAT

Kuva 1. Työssä käytetyn vektorin rakenne (Invitrogen 2010).	9
Kuva 2. NucleoSpin® Tissue työvaiheet (Macharey-Nagel 2014).	12
Kuva 3. Yhden PCR-syklin kolme vaihetta (Biosistemika 2014).	15
Kuva 4. PCR-tuotteen kaksinkertaistuminen jokaisen syklin aikana (Purves, Sadava ym. 2004).	16
Kuva 5. Näytteen kolmen laimennoksen amplifikaatiokäyrät.	17
Kuva 6. SYBR® Green I periaate (Davidson College 2003).	18
Kuva 7. TaqMan® koettimen periaate (Davidson College 2003).	19
Kuva 8. Roche Diagnostic, LightCycler 480 qPCR-laite.	20
Kuva 9. Rotor-Gene poikkileikkaus (Qiagen 2014).	21
Kuva 10. Agarosii-molekyylit (USBiological 2014).	22
Kuva 11. Agarosigeelillä erottuvat vyöhykkeet.	23
Kuva 12. FACS-kaavio (School of Medicine 2014).	25

KUVIOT

Kuvio 1. Työn eteneminen.	26
Kuvio 2. Laimennossarja.	28
Kuvio 3. Esimerkki yhden näytteen laimennoksesta.	35

TAULUKOT

Taulukko 1. Alukkeiden sekvenssit.	27
Taulukko 2. qPCR-ajosta saadut Cp-arvot plasmidi-näytteestä.	28
Taulukko 3. Laimennosten väliset Cp-arvojen erot.	29
Taulukko 4. Spektrofotometrillä mitatut OD 600-arvot.	30
Taulukko 5. Solujen lukumäärä kammioittain.	30
Taulukko 6. Nanodropilla mitattujen näytteiden pitoisuus ng/μl.	32
Taulukko 7. Eri laitteiden antamat konsentraatiot ng/μl.	33
Taulukko 8. Lasketun näytteen sijainti kuoppalevyllä ja näytteen nimi. copy).	34
Taulukko 9. PCR-reaktio.	35
Taulukko 10. PCR-ajo-olosuhteet.	35
Taulukko 11. Rinnakkaisten näytteiden Cp-arvojen keskiarvot, keskihajonta ja hajonnan prosenttiosuus.	36
Taulukko 12. Näytteen laimennosten väliset erot Cp-arvoissa.	36

KÄYTETYT LYHENTEET

AGE	Agaroosigeelielektroforeesi
Aluke	Lyhyt DNA-jakso, joka sitoutuu komplementaariseen alueeseen DNA:ssa
Cp	Crossing point
Ct	Kynnyssykli (eng. threshold cycle)
FACS	Solujen lajitteluun ja analysointiin tarkoitettu virtausytometrialaitte (eng. fluorescence-activated cell sorting)
gDNA	Genominen DNA
HFBI	Hydrofobiini
IBnP	Influenssa B -viruksen nukleoproteiini
qPCR	Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio
RNAasi	RNA:ta pilkkova entsyymi
T _m	Sulamislämpö (eng. melting temperature)

1 JOHDANTO

Jokaisella yksilöllä on tietty määrä tietyn geenin kopioita genotyypissä. Tätä kopioiden määrää kutsutaan kopioluvuksi. Erot genomien DNA-sekvensseissä edistävät osaltaan yksilön ainutlaatuisuutta. Nämä eroavaisuudet vaikuttavat useimpiin ominaisuuksiin, kuten sairauksille altistumiseen (Gene-quantification-verkkosivusto 2014). Proteiinituottoon kehitetyt tuottokannat voivat sisältää yhden tai useamman geenikopion riippuen geenisiirtomenetelmästä. Periaatteessa siirtogeenien määrä määrittelee proteiinin tuottumisen, mutta asia ei välttämättä ole näin suoraviivainen. Geeni voi myös insertoitua sellaiseen kohtaan genomia, että geenin ekspressio ei toimi ja joissain tapauksissa useat geenikopiot voivat jopa johtaa geeniekspression estymiseen.

Kopioluvun määrittämiseen on olemassa useita erilaisia menetelmiä. Tällaisia kopiolumen menetelmiä ovat esimerkiksi korkeaan resoluutioon perustuvat array-menetelmät (Bejjani ym. 2006) sekä NGS-menetelmät (eng. Next-Generation DNA Sequencing Methods). Tässä opinnäytetyössä kopiolumen määrittämiseen on käytetty kvantitatiivista PCR-menetelmää, jossa tutkittavan geenin tuntematonta kopiolumua verrataan referenssigeenin tunnettuun kopiolumuun. Vertailun mahdollistamiseksi testattiin myös geenieristysmenetelmiä toisiinsa.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida menetelmä *Pichia pastoris* -hiivakantojen kopiolumen määrittämiseen Roche Diagnosticsin LightCycler 480 qPCR-laitteella. Tarkoituksena oli testata sopiiko kyseinen laite tarkkaan kopiolumen määrittämiseen. Opinnäytetyö tehtiin Turun ammattikorkeakoulun (TuAMK) HydroBody-projektissa, joka on TuAMK:n ja VTT:n yhteisprojekti ja jonka tarkoituksena on kehittää uusi tuotantokonsepti teollisesti arvokkaille proteiineille.

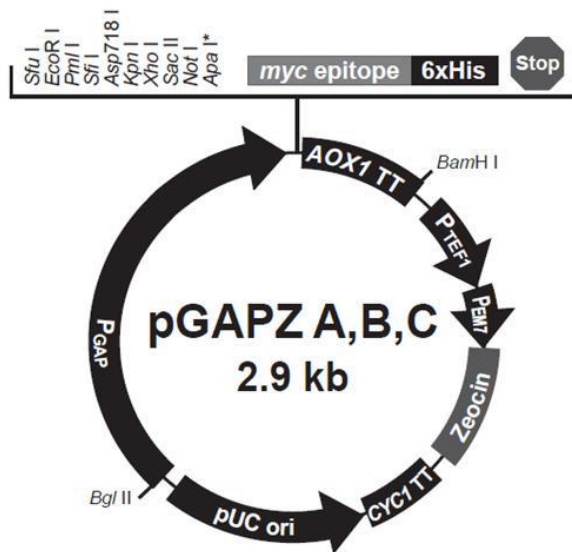
2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 *Pichia pastoris*

Pichia pastoris on metylotrofinen hiiva, joka kykenee metaboloimaan metanolia ainoana hiililähteenä (Invitrogen 2010, 1). *P. pastoris* on laajalti käytetty biolääkeaineiden perustutkimuksissa ja tuotannossa. Se on myös tärkeä malliorganismi peroksisomaalisen lisääntymisen sekä metanolin assimilaation tutkinnassa. Monet sen ominaisuudet kuten nopea kasvu ja korkea solutiheys, tiukasti kontrolloidut metanoli-indusoitavat promoottorit (AOX1 ja AOX2) ja tehokas eritysmekanismi tekee *P. pastoris* ideaalin ekspressiosysteemin. (Bioinformatics & Evolutionary Genomics 2014).

Pichia pastoris -hiivalla on useita etuja, jotka tekevät siitä erinomaisen heterologisen tuotto-organismin proteiinien tuottoon. Tällaisia ovat mm. proteiinien laskostuminen ja posttranslatorinen modifikaatio. Sitä on myös helppo muokata geneettisesti aivan kuten *E. coli* tai *Saccharomyces cerevisiae*. *P. pastoris* on nopeampi, helpompi ja halvempi käyttää kuin muita eukaryoottiekpressiosysteemeitä, kuten baculovirusta tai nisäkkäiden kudosisäilyelmiä. Sillä on lisäksi mahdollista saavuttaa usein korkeampi ekspressiotaso kuin eläinsoluilla. Näiden ominaisuuksien takia *Pichia pastoris* -hiivan käyttö proteiiniekpressiosysteemissä on erittäin hyödyllistä. (Invitrogen 2010,1).

Hiiva-DNA:n eristystä varten tehtiin kuusi (6) kappaletta hiivakasvatuksia valmiista kantaviljelmistä. Näistä kolme oli ns. single copy- ja kolme multicopy-kantoja. Jälkimmäisten kopioluku ei ollut tunnettu. Kukin tuottokanta tuottaa Influenssa B -viruksen nukleoproteiinia (IBnP) pPICZ A -vektorista (Kuva 1), mutta niissä on erilainen hydrofobiinia tuottava geenijärjestys (näitä kutsutaan lyhenteillä: HFBI_3, HFBI_4 ja Tag6).



Kuva 1. Työssä käytetyn vektorin rakenne (Invitrogen 2010).

2.2 Plasmidien käyttö qPCR:ssä

2.2.1 Plasmidien eristys

Plasmidin eristämiseen käytettiin NucleoSpin®Plasmid –kittiä (Macherey-Nagel), joka on suunniteltu plasmidi-DNA:n nopeaan ja pienen mittakaavan eristykseen. NucleoSpin®Plasmid –kitillä eristetty plasmidi-DNA sopii käytettäväksi mm. automaattisessa DNA-sekvensoinnissa ja PCR:ssä.

NucleoSpin®Plasmid –kitti perustuu silikakalvotekniikkaan. Menetelmässä pelletoitu kasvatus suspensoidaan puskuriin ja plasmidi-DNA vapautetaan *E. coli* –isäntäsolusta käyttämällä denaturoivaa puskuria. Neutraloivaa puskuria lisäämällä luodaan olosuhteet plasmidi-DNA:ta sitomiseksi NucleoSpin®Plasmid –pylvään silikakalvoon. Saostuneet proteiinit, genominen DNA ja solujätteet pelletoidaan sentrifugoimalla. Supernatantti siirretään NucleoSpin®Plasmid pylvääseen. Suolat, aineenvaihduntatuotteet sekä liukoiset makromolekyylaariset soluaineosat poistetaan pesemällä etanolilla.

Lopuksi puhdas plasmidi-DNA eluoidaan lievästi emäksisellä puskurilla alhaisessa ionivahvuudessa. (Macherey-Nagel 2010.)

2.2.2 Kvantitointi ja kopioluvun laskeminen

Plasmidin tarkka kopioluku voidaan laskea, kun tiedetään konsentraatio ja plasmidin koko. Internetistä löytyy useita kopioluvun laskemiseen tarkoitettuja laskureita. Tässä työssä kopioluvun laskemista varten plasmidin konsentraatio mitattiin NanoDrop® 1000 spektrofotometrillä (Thermo Scientific) ja vertailun vuoksi Qubit® 1.0 fluorometrillä (Invitrogen).

NanoDrop on pienspektrofotometri, jolla voidaan pienellä näytemäärällä mitata DNA- ja RNA-pitoisuuksia ja niiden puhtautta mittaamalla absorbanssi aallonpituuksilla 280 nm. Nanodropissa pieni määrä näytettä (0,5 µl-2,0 µl) pipetoidaan kuituoptyn kaapelin päähän, jolloin kannen laskemisen jälkeen muodostuu näytepilari. Laite mittaa näytteen läpi kulkevan valon määrän ja syöttää tiedot tietokoneelle. (Invitrogen 2007.)

Toisin kuin NanoDropissa, Qubit® 1.0 fluorometrissä tarvitaan näytteiden mittaamista varten menetelmään sopiva kitti. Työssä käytettiin Qubit® dsDNA HS Assay kittiä. Fluorometri perustuu fluoresenssipohjaisten väriaineiden käyttöön, jotka sitovat spesifisesti DNA:ta, RNA:ta tai proteiineja. Qubit on NanoDropia huomattavasti herkempi, jolloin sillä voidaan mitata alhaisempia pitoisuuksia omaavia näytteitä (vähintään 10 pg/µl pitoisuuksia). Qubitilla voidaan mitata sekä DNA:ta ja RNA:ta samasta näytteestä, kun taas Nanodropilla samassa näytteessä olevaa DNA:ta ja RNA:ta ei voida erottaa. (Invitrogen 2007.)

Kopiolukulaskurina käytettiin RIGSC:n (University of Rhode Island Genomics and Sequencing Center) tarjoamaa laskuria. Tässä kopiolukulaskurissa laskelma perustuu olettamukseen, että keskimääräisen emäsparin (bp) paino on 650 daltonia. Tämä tarkoittaa sitä, että yksi mooli emäsparia painaa 650 g,

jolloin minkä tahansa kaksijuosteisen DNA-templaatin molekyyliaino voidaan arvioida sen sekä templaatin pituuden (bp) perusteella. Laskin edellyttää, että käyttäjä määrittää kuinka paljon templaattia on läsnä (ng:na) ja mikä on templaatin pituus (bp), jolloin pystytään laskemaan kopioiden määrä templaattissa. (RIGSC 2014.) Tähän käytetään seuraavaa kaavaa:

$$\text{Kopioiden määrä} = (\text{määrä (ng)} * 6,022 \times 10^{23}) / (\text{pituus (bp)} * 1 \times 10^9 * 650)$$

Käytännön syistä pitoisuus ilmoitetaan usein tilavuusyksikköä kohti, esim. $1,1 \times 10^{11}$ molekyyliä / μl

2.3 gDNA:n eristys

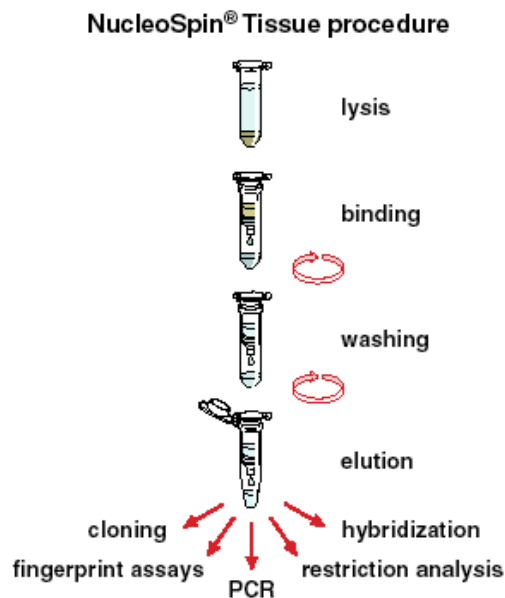
Genomisen DNA:n eristämiseen on käytettävissä useita eri menetelmiä ja tekniikoita. Eristysmenetelmät perustuvat eristettävän DNA:n erilaisiin ominaisuuksiin kuten fysikaalisiin tai kemiallisiin. Genominen DNA on ohutta ja pitkä rihmaa, joten se katkeaa herkästi DNA-liuosta sekoitettaessa tai pipetoitaessa. DNA:n osittainen katkeilu on kuitenkin sallittua joissain sovelluksissa kuten PCR:ssä. (Suominen ym. 2010, 105-108.)

Kun DNA:ta eristetään, käsitellään solut usein proteinaasi K -entsyymillä, joka hajottaa solut. Solujen hajottamisen jälkeen DNA puhdistetaan. Tähän voidaan käyttää fenoliuuttoa, etanolisaostusta ja sentrifugointia. Osa proteiineista saadaan poistettua DNA-liuoksesta uuttamalla varovasti fenoli-kloroformilla. DNA:n saostus tapahtuu etanolin avulla ja, jos katkeilua ei ole tarvetta varoa, voidaan DNA kerätä talteen sentrifugoimalla.

Fenoliuuton, etanolisaostuksen ja sentrifugoinnin ongelmana on niiden aiheuttama DNA:n katkeilu. Tämän takia edellä mainitut tekniikat on nykyisin korvattu silikakalvo-spin-kolonne puhdistusmenetelmillä. Genomisen DNA:n eristämiseen on käytettävissä kaupallisia kittejä, jotka perustuvat useimmiten silikakalvo-spin-kolonne puhdistusmenetelmään. (Suominen ym 2010, 105-108.) Kaupallisten reaktiosarjojen eli kittien etu on niiden nopeus ja tehokkuus, sekä tarkat työohjeet, joilla pitäisi saavuttaa haluttu lopputulos.

Tässä työssä genomisen DNA:n eristämiseen käytettiin NucleoSpin® Tissue kittiä (Macherey-Nagel). NucleoSpin® Tissue kitti on suunniteltu erittäin puhtaan genomisen DNA:n nopeaan puhdistukseen mm. kudospäyteistä, bakteereista, hiivoista ja kliinisistä näytteistä (uloste, virtsa). Eristettyä DNA:ta voidaan käyttää suoraan PCR-, Southern blottaus- tai erilaisissa entsyymaattisissa reaktioissa. (Macherey-Nagel 2010.)

NucleoSpin® Tissue kitin käyttö perustuu silikakalvotekniikkaan. Menetelmässä soluhajotus saadaan aikaan inkuboimalla 56 °C:ssa näytettä liuoksessa, joka sisältää SDS:ää ja proteinaasi K:ta. Jotta DNA:n sitoutumiselle NucleoSpin® Tissue -kolonnin silikakalvolle saadaan asianmukaiset olosuhteet, lyaattiin lisätään suuria määriä kaotrooppisia ioneja (sidospuskuri) ja etanolia. Sitoutumisprosessi on palautuva ja spesifinen nukleinihapoille. Epäpuhtaudet poistetaan tehokkaasti pesemällä membraania puskurilla. Puhdasta genomista DNA:ta eluoidaan lopuksi alhaisessa ionivahvuuden olosuhteissa lievästi emäksisellä eluutiopuskurilla. Tämän jälkeen tuote on valmis käytettäväksi halutuissa reaktioissa. (Suominen ym. 2010, 105-108.)



Kuva 2. NucleoSpin® Tissue työvaiheet (Macharey-Nagel 2014).

2.4 gDNA:n konsentraation mittaaminen

DNA:n pitoisuuden mittaamiseen on käytettävissä useita erilaisia menetelmiä, kuten absorbanssin mittaaminen, agarosigeelielektroforeesi tai fluoresoiviin väriaineisiin perustuvia mittauksia.

Absorbanssi menetelmät

Yleisin tekniikka DNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittämiseen on absorbanssin mittaus DNA:lle sopivaa aallonpituutta käyttäen. Absorbanssimittaus on yksinkertaista ja laitteisto on yleensä saatavilla laboratorioympäristössä. Menetelmään tarvitaan spektrofotometri, UV-lamppu, UV-valoa läpäiseviä kyvettejä ja liuosta, jossa puhdistettua DNA:ta. Menetelmä perustuu DNA:n nukleotidien absorptioon 260 nm:ssa, jossa DNA absorboi valoa voimakkaammin. DNA:n pitoisuus 50 µl/ml vastaa puhtaan DNA-liuoksessa absorptiota 1,0 aallonpituudessa 260 nm. (Suominen ym. 2010, 110-111.)

Spektrofotometrisen menetelmän avulla pystytään määrittämään DNA-näytteen puhtautta. Tällöin mitataan DNA-näytteen absorptiota 260 nm:n lisäksi aallonpituudella 280 nm. 280 nm on proteiinien absorptiomaksimi ja myös DNA absorboi vielä jonkin verran siinä. Absorbanssien suhdeluku $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ on puhtaalle DNA-näytteelle 1,8. (Promega 2014.) Jos DNA-näyte sisältää proteiineja eli näytteessä on todennäköisesti proteiinikontaminaatio, se näkyy absorbanssisuhteen pienenemisenä. Puhtaan RNA:n suhdeluku on 2,0. RNA:n suurempi suhdeluku kuin DNA:lla johtuu siitä, että RNA absorboi voimakkaammin 260 nm:ssa kuin DNA. Jos DNA-näytteen suhdeluku nousee yli 2,0, voidaan olettaa näytteen sisältävän RNA:ta. RNA saadaan poistettua DNA-näytteestä RNAasikäsittelyllä. (Suominen ym. 2010, 110-111.)

Fluoresoiviin väriaineisiin perustuvat mittaukset

DNA-pitoisuus voidaan määrittää myös käyttämällä fluoresenssimittareita sekä fluoresoivia väriaineita. Fluoresenssimenetelmät ovat herkempiä kuin absorbanssi, joten menetelmä sopii hyvin matalapitoisille näytteille. DNA:ta sitovien väriaineiden avulla saadaan DNA:ta mitattua tarkemmin kuin spektrofotometrisillä menetelmillä. Väriaineet, kuten PicoGreen® sitoutuvat selektiivisesti kaksijuosteiseen DNA:han. Fluorometrillä mitataan väriaineen fluoresenssi-intensiteettiä. Tällöin fluoresenssin voimakkuus pystytään muuttamaan DNA-pitoisuudeksi standardisuoran avulla.

Agaroosigeelielektroforeesin (AGE) käyttö DNA:n pitoisuuden määrittämisessä perustuu fluoresoivien väriaineiden käyttöön. DNA-pitoisuus pystytään arvioimaan geeliltä silmämääräisesti vertaamalla näytejuovien fluoresenssin määrää tunnettuihin DNA-standardeihin. Menetelmän hyötynä on, että proteiinit ja pienet RNA-pitoisuudet eivät häiritse määrittystä. Lisäksi geelielektroforeesin avulla voidaan määrittää myös DNA-molekyylien kokoa, jota ei spektrofotometrisellä mittauksella voida tehdä. AGE-menetelmä on kuitenkin hyvin epätarkka, koska se pohjautuu vain silmämääräiseen arviointiin, eikä se sovellu alhaisille DNA-pitoisuuksille (Suominen ym. 2010,110-111.) Agaroosigeelielektroforeesista on kerrottu lisää luvussa 3.6

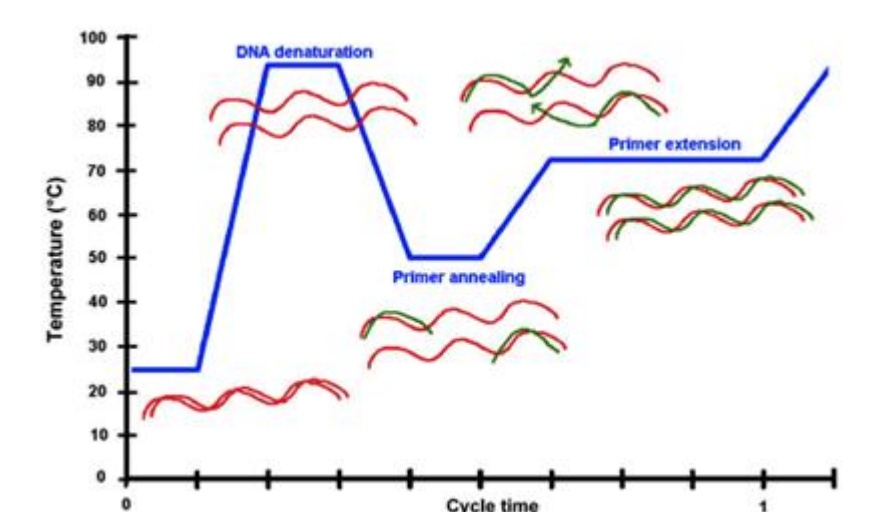
Tässä työssä DNA:n pitoisuus mitattiin käyttämällä niin spektrofotometriä mittauksia sekä fluoresoiviin merkkiaineisiin perustuvia mittauksia. DNA:n pitoisuus määritettiin käyttäen Nanodrop® spektrofotometriä, Qubit® fluorometriä sekä Hidex Sense monileimalaskinta.

2.5 qPCR

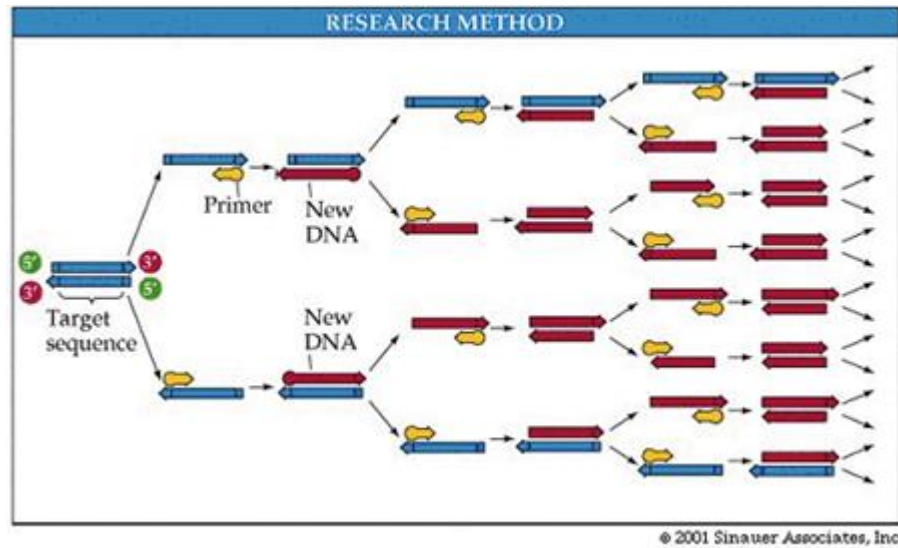
Kvantitatiivinen PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR, voidaan käyttää myös nimeä Real-Time quantitative PCR, RT-qPCR) on menetelmä, jolla voidaan spesifisesti mitata nukleiinihapon (DNA,RNA) määrää näytteestä

(Suominen ym. 2010). Kvantitatiivinen PCR antaa mahdollisuuden monistetun nukleinihapon tarkan pitoisuuden määrittämiseen näytteestä. Kvantitatiivisen PCR:n suurin ero verrattuna perinteiseen PCR:n on monistumistuotteiden määrän reaaliaikainen mittaaminen tietokoneen välityksellä. Tämän takia reaktion jälkeisiä työvaiheita, kuten agarosigeelielektroforeesia, ei tarvita paitsi silloin kun halutaan varmistaa, että tuote on oikeankokoinen. (Heid ym. 1996.)

PCR-menetelmässä käytetään lämmönkestävää DNA-polymeraasia, joka luo vastinjuosteen yksisäikeiselle DNA:lle. Lisäksi käytetään kahta tarkoin tunnettua aluketta, jotka rajaavat monistettavan alueen. PCR:ssä toistetaan kolme vaihetta: denaturaatiovaihetta, alukkeiden kiinnittymisvaihetta ja pidentymis- eli elongaatiovaihetta (kuva 3). Kun näitä vaiheita toistetaan, monistettavan alueen kopiomäärä kaksinkertaistuu jokaisen syklin aikana (kuva 4). Tärkeä osa qPCR:n onnistumisessa on näytteiden käsittely sekä alukkeiden ja koettimien suunnittelu. (Suominen ym. 2010, 169-170.)

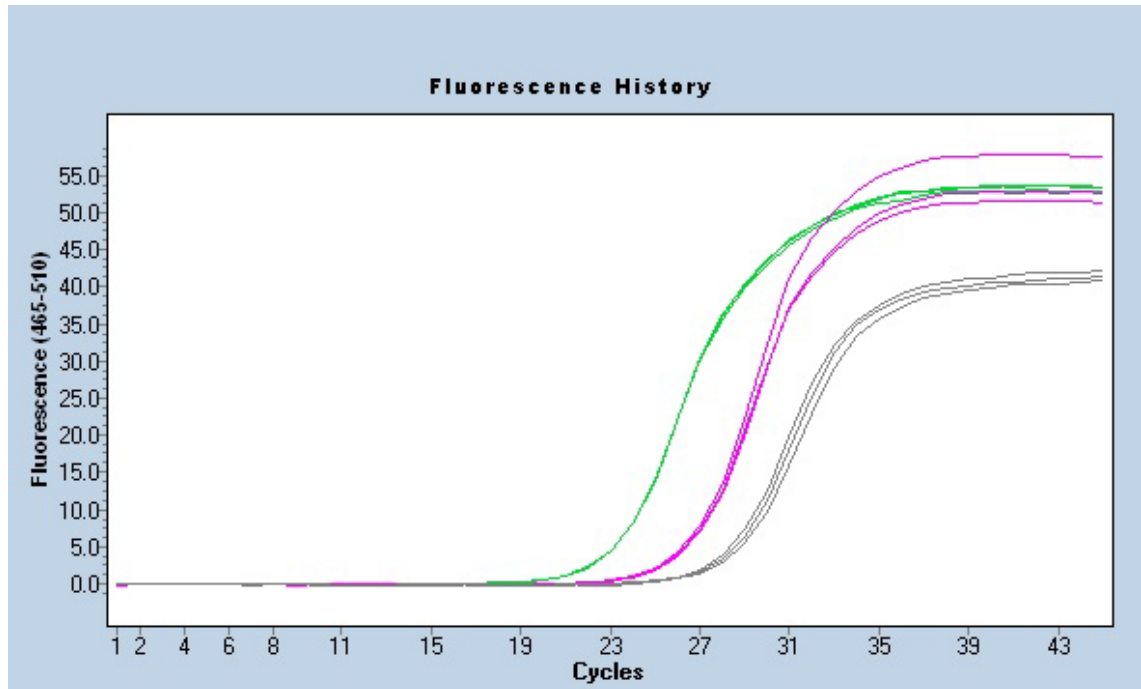


Kuva 3. Yhden PCR-syklin kolme vaihetta (Biosistemika 2014).



Kuva 4. PCR-tuotteen kaksinkertaistuminen jokaisen syklin aikana (Purves, Sadava ym. 2004).

Kvantitatiivisessa PCR-reaktiossa tuotteisiin sitoutuu fluoresoivat molekyylit, jotka emittoivat valoa. qPCR-laitteisto mittaa emittoivan valon voimakkuutta jokaisen syklin jälkeen. Kun fluoresoivien molekyylin emissiovalo ylittää taustan aiheuttaman signaalin eli kynnyksen, kutsutaan tätä kynnyssykliksi (engl. threshold cycle, Ct). Mitä pienempi Ct-arvo saadaan, sen enemmän lähtötilanteessa on ollut kopiota templaatti-DNA-alueesta. Kynnyssyklin arvo, Ct, kertoo myös milloin ensimmäistä kertaa havaitaan PCR-tuote. Esimerkiksi, jos Ct-arvo on 22, on fluoresenssi ollut ensimmäistä kertaa taustasäteilyä voimakkaampaa 22. syklin kohdalla. Kynnyssykli määräytyy eksponentiaalisen monistumisen aikana. Näytteen sisältämän templaatti-DNA:n pitoisuus voidaan määrittää qPCR:ssä joko suhteellisesti tai absoluuttisesti standardisuoran avulla. (Heid ym. 1996.) Ct-arvo ja kopioluku suhteutuvat toisiinsa siten, että 10-kertainen muutos herkkydessä vastaa n. 2,7-yksikön muutosta Ct-arvossa, mutta tämä muutos pitää määrittää laitekohtaisesti. Tuotteen oikeellisuus ja puhtaus voidaan todeta sulamislämpökäyrän avulla.



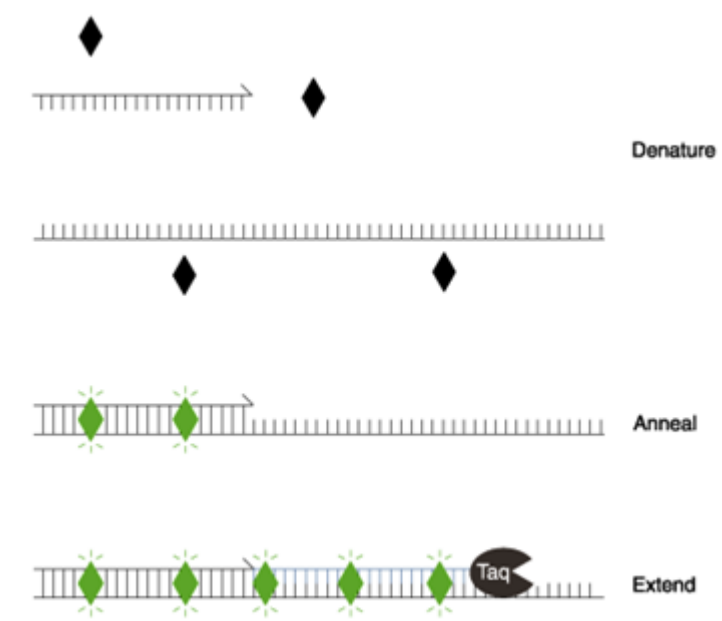
Kuva 5. Näytteen kolmen laimennoksen amplifikaatiokäyrät.

2.5.1 Detektointi

DNA:n ja RNA:n detektoimiseen reaaliaikaisella PCR:llä on kolme perinteistä menetelmää, jotka käyttävät fluoresoivia väriaineita. Väriaine antaa fluoresoivan signaalin, joka kasvaa DNA:n monistuessa ja PCR-syklien lisääntyessä. (Heid ym. 1996.)

DNA:han sitoutuvat väriaineet

Yksi menetelmä on kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvien väriaineiden (engl. DNA Binding Dyes) käyttö. Nykyään yksi käytetyimpiä väriaineita on SYBR® Green I (Life Technologies). Menetelmä perustuu kaksijuosteista DNA:ta värjäävän leiman käyttöön, joka sitoutuessaan kaksijuosteiseen DNA:han fluoresoi voimakkaasti (kuva 6).



Kuva 6. SYBR® Green I periaate (Davidson College 2003).

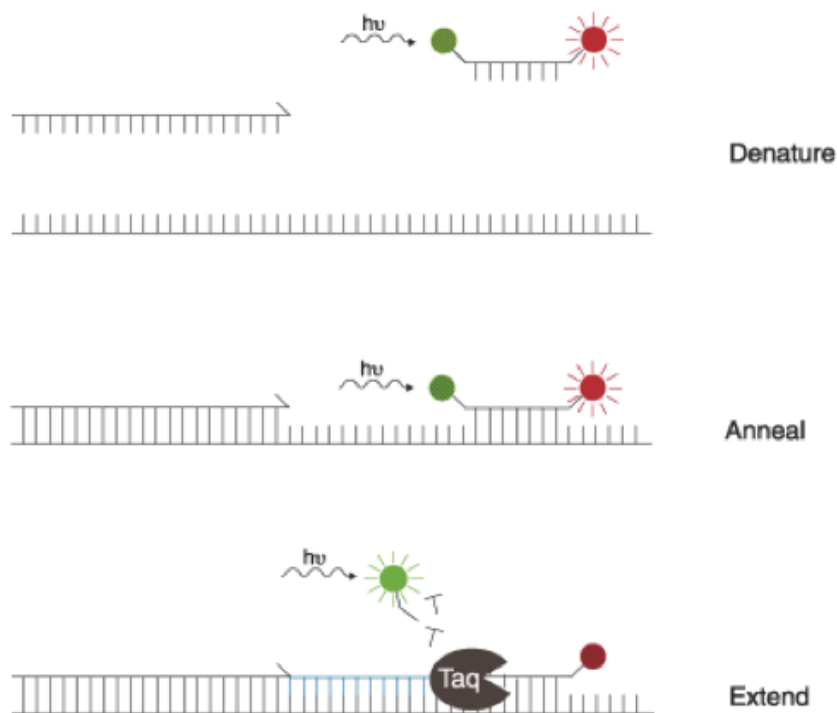
Väriaine-alue-sovellukset

Väriaine-alueisiin perustuvassa (engl. Dye-primer based assays) menetelmässä alueisiin liitetään väriaine. Tällainen sovellus on esimerkiksi LUX™-sovellus (Invitrogen). Näiden sovelluksien avulla voidaan tehdä multiplex-reaktioita, joita ei voida tehdä DNA:ta sitoviin väriaineisiin perustuvilla menetelmillä. (Dorak 2007.)

Fluoresenssileimatut oligonukleotidit

Toisin kuin kahdella edellä mainitulla menetelmällä, joissa käytetään alueparia, koetinmenetelmissä reaktioon lisätään kolmas tai neljäs oligo spesifisyyden lisäämiseksi. Tätä kutsutaan koettimeksi, jossa on fluoresoiva leima. Yksi käytetyin koetin on TaqMan®, joka on hydrolyysikoetin. Menetelmässä käytetään kahta koettinta, jotka sitoutuvat vierekkäin DNA:han. Koettimen 5' -päässä on yleensä fluoresenssin reporterileima ja sammuttajaleima 3' -päässä.

Sammuttajaleiman tehtävänä on tukahduttaa lähettäjäleima, jolloin se ei voi antaa fluoresenssisignaalia. Koetin hydrolysoituu eli pilkkoutuu polymeraasissa olevan nukleaasiominaisuuden johdosta, kun koetin sitoutuu kohdesekvenssiin ja polymeraasi alkaa rakentaa ketjua. Tästä seuraa, että sammuttaja- ja reportterileima ajautuvat erilleen ja muodostuu fluoresenssisignaali, jolloin fluoresenssisignaali voidaan mitata (kuva 7). Fluoresenssisignaali kasvaa, kun monistettavien ketjujen määrä lisääntyy.



Kuva 7. TaqMan® koettimen periaate (Davidson College 2003).

2.5.2 qPCR:ssä käytettävät laitteet

LightCycler® 480

LightCycler® 480 on Roche Diagnosticin valmistama, monikuoppalevyn käyttöön perustuva reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR-laite, jota käytetään

erittäin tarkkoihin laadullisiin ja määrällisiin nukleinihappojen havaitsemiseen ja genotyypitykseen (Kuva 8). Se tarjoaa parannellun suoritustehon, yhteensopivuuden atk-laitteiden kanssa sekä maksimaalista joustavuutta järjestelmien ja ohjelmistojen kanssa. Laitetta voidaan ajaa 24 tuntia vuorokaudessa, 7 päivää viikossa ilman valvontaa, mikä tekee laitteesta tehokkaan laboratoriorobotin. (Paa 2014).



Kuva 8. Roche Diagnostic, LightCycler 480 qPCR-laite.

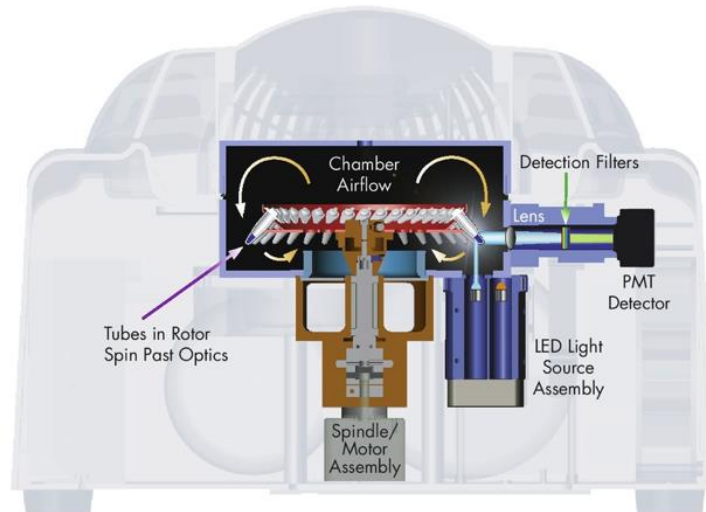
Bio-Rad Digital™ PCR

Bio-Rad:n valmistama Digital™ PCR-tekniikka tarjoaa absoluuttista nukleinihappojen kvantitointia monenlaisiin sovelluksiin kuten syövän mutaatioiden tutkimuksiin, HI-viruksen havaitsemiseen ja jopa ympäristön tilan seurantaan (Bio-Rad 2014). Digital PCR:ää voidaan käyttää myös kopioluvun määrittämiseen (Bio-Rad 2014, 37).

Qiagen Rotor-Gene

Rotor-Genen pyörivä muotoilu takaa erinomaisen suorituskyvyn. Qiagenin valmistamassa reaaliaikaisessa PCR-laitteessa on ainutlaatuinen roottorin rakenne, joka mahdollistaa tarkan ja monipuolisen reaaliaikaisen PCR:n nopeasti. Kuvassa 9 on esitetty Rotor-Genen poikkileikkaus. Jokainen

näyteputki pyörii kammiossa liikkuvan ilman avulla, joka pitää kaikki näytteet saman lämpöisinä nopeissakin lämpökäsittelyissä. Laite on suunniteltu nopeaan ja helppokäyttöiseen työskentelyyn, jolla voi tehdä mm. geeniekspressio-analyyskejä ja miRNA tutkimuksia. (Qiagen 2014)



Kuva 9. Rotor-Gene poikkileikkaus (Qiagen 2014).

Tässä opinnäytetyössä käytettiin ainoastaan Rochen LightCycler® 480 qPCR-laitetta. Edellä mainittujen lisäksi markkinoilla on myös useiden eri valmistajien kvantitatiiviseen PCR:ään soveltuvia laitteita.

2.6 gDNA:n kvantitointi

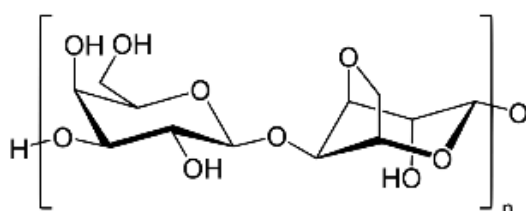
Kvantitatiivisesta PCR:stä saatuja tuloksia voidaan käsitellä joko standardisuoran avulla tai Ct-arvoja vertailemalla. Tuloksia käsiteltäessä standardisuoran avulla käytetään jostakin referenssimateriaalista valmistettua laimennossarjaa. Tällöin näytteiden signaalia verrataan standardisuoraan. Näytteille voidaan laskea pitoisuudet, kun tietokoneohjelmaan manuaalisesti syötetään standardisuoran pisteiden pitoisuudet. Kun tulosten käsittely tehdään

Ct-arvoja vertailemalla, voidaan käyttää ns. sisäistä kontrollia, jonka Ct-arvoja verrataan näytteen Ct-arvoihin. (Heid ym. 1996).

2.7 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesi (AGE) on elektroforeesiin perustuva menetelmä, jota käytetään nukleiinihappojen, DNA ja RNA, sekä proteiinien erotteluun. Agarosigeelielektroforeesia käytetään keskikoisten fragmenttien (menetelmän työskentelyalue n. 0,1-50 kb) analysoimiseen. (Suominen ym. 2014, 122-125).

Agaroosi on polysakkaridi, joka puhdistetaan punaleivistä tai merilevästä. Agaroosi on paremmin puhdistettu ja kalliimpi kuin agar. Agaroosi-molekyylit ovat pitkiä, toistuvan disakkaridi (1 3)- β -D-galaktopyranoosi-(1 4)-3,6-anhydro- α -L-galaktopyranoosi lineaarisia polymeerejä (kuva 10). Tyypillinen agaroosi-molekyyli sisältää yli sata monomeeria.



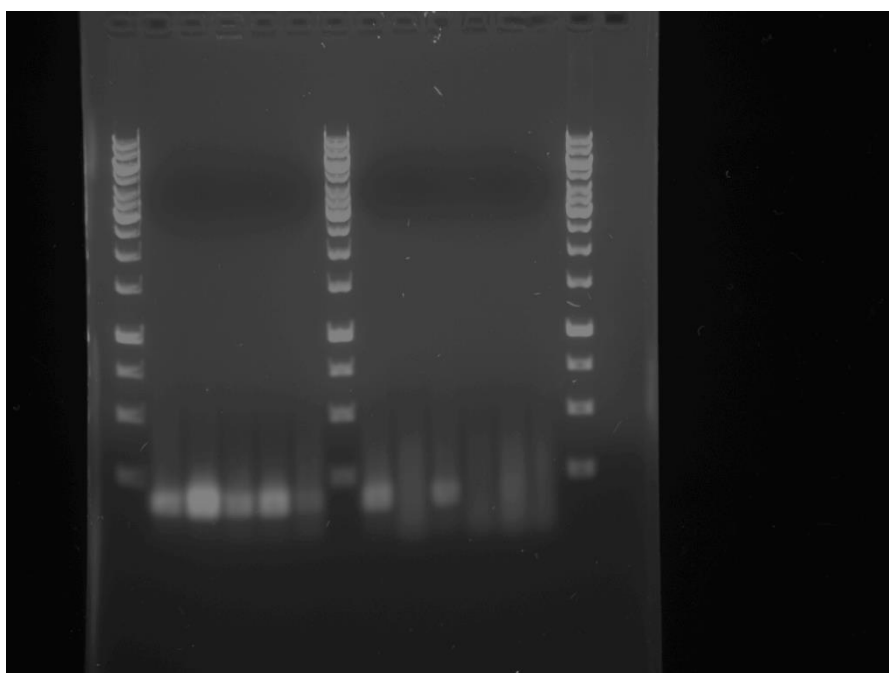
Kuva 10. Agaroosi-molekyyli (USBiological 2014).

Elektroforeesissa käytettävä agaroosi on hyvin puhdistettua. Puhdistusprosessissa poistetaan epäpuhtauksia, jotka saattavat häiritä molekyylikloonauksessa käytettäviä entsyymejä, kuten esimerkiksi restriktioendonukleaaseja. Puhdistuksen avulla saadaan luotua agaroosille myös halutut elektroforeettiset ominaisuudet sekä saadaan vähennettyä taustafluoresenssia, joka tärkeää DNA-molekyylien visualisoinnissa.

Agaroosi-molekyylit pystyvät muodostamaan geelejä, joilla on suhteellisesti määritetty huokoskoko. Agaroosi-molekyylit liuotetaan n. 90°C:ssa. Geeli muodostuu, kun lämpötila laskee n. 40°C:een. Geelin huokoskoko on tyypillisesti 50-200 nm agaroosipitoisuudesta riippuen. Kun agaroosin pitoisuus

kasvaa, huokoisten keskimääräinen halkaisijakoko pienenee. Tämä vaikuttaa DNA:n kulkeutumiseen geelillä. Mitä suurempi agarosipitoisuus, sitä hitaammin DNA:t liikkuvat. Nukleiinihappojen kulkeutuminen agarosigeelissä perustuu siihen, että ne ovat happamia ja negatiivisesti varautuneita fosfaattiryhmiensä ansiosta. Kun nukleiinihapot ajautuvat sähkökenttään, liikkuvat ne negatiivisesti varautuneina positiivista napaa kohti. Erikokoiset nukleiinihappojaksot erottuvat koosta riippuen omiksi vyöhykkeiksi eli "bändeiksi" (kuva 11.) ajon aikana. (Suominen ym. 2010).

Nukleiinihapot saadaan näkyviin agarosigeelissä etidumbromidin (EtBr) ja UV-valon avulla. Etidumbromidin etidium-ionit asettuvat emästen väliin nukleiinihappoissa ja fluoresoivat voimakkaasti UV-valossa. Etidumbromidin ongelmana on sen karsinogeenisuus, joten yhä enemmän on alettu käyttää väriaineena SYBR:a ja sen johdannaisia. (Suominen ym. 2014, 122-125).



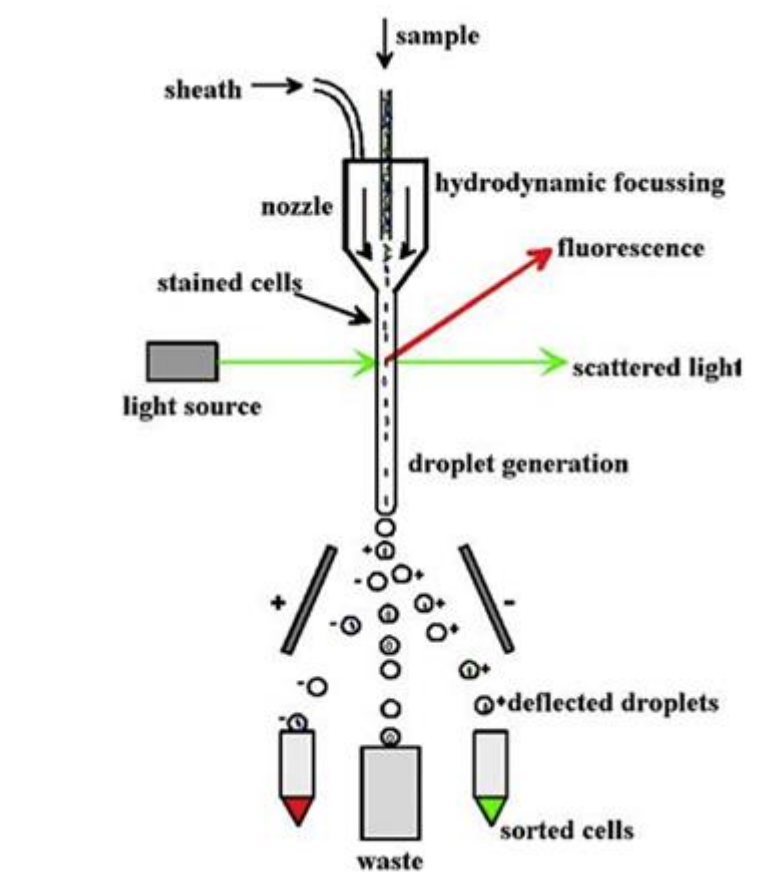
Kuva 11. Agarosigeelillä erottuvat vyöhykkeet.

2.8 FACS

FACS (Fluorescence-activated cell sorting) on solujen lajitteluun ja analysointiin tarkoitettu virtausytometrinen menetelmä, joka perustuu solujen fluoresoiviin ominaisuuksiin sekä valonsirontaan. Solut merkitään fluoresoivalla aineella, jolloin solujen lähettämän emission voimakkuutta voidaan mitata säteilyttämällä soluja lasersäteellä. Tämän avulla saadaan tietoa mm. solun rakenteesta ja koosta. (Mandal 2014.)

Tutkimuksessa käytettiin Turun biotekniikan keskuksen Becton-Dickinson FACSAria™ II virtausytometriä. BD FACSAria™ II virtausytometri on suurinopeuksinen solulajittelija. Virtausytometriä voidaan ajaa useassa eri paineessa ja sillä voidaan saavuttaa jopa 70 000 tapahtumaa sekunnissa. Sen kiinteän optiikan suunnittelun ja digitaalisten elektronien ansiosta BD FACSAria II virtausytometrillä voidaan tunnistaa jopa 13 fluoresenssimarkkeria sekä kaksi sidontaparametria kerrallaan. Soluja voidaan kerätä joko näyteputkiin (1 ml:n ja 5 ml:n putkiin tai 15 ml:n falcon -putkiin), kuoppalevyille (6, 24, 48, 96 tai 384-kuoppalevyille) tai suoraan mikroskoopin näytelaseille. Näytteiden lämpötilaa voidaan myös säädellä kesken analyysin välillä +4 °C ... + 42 °C.

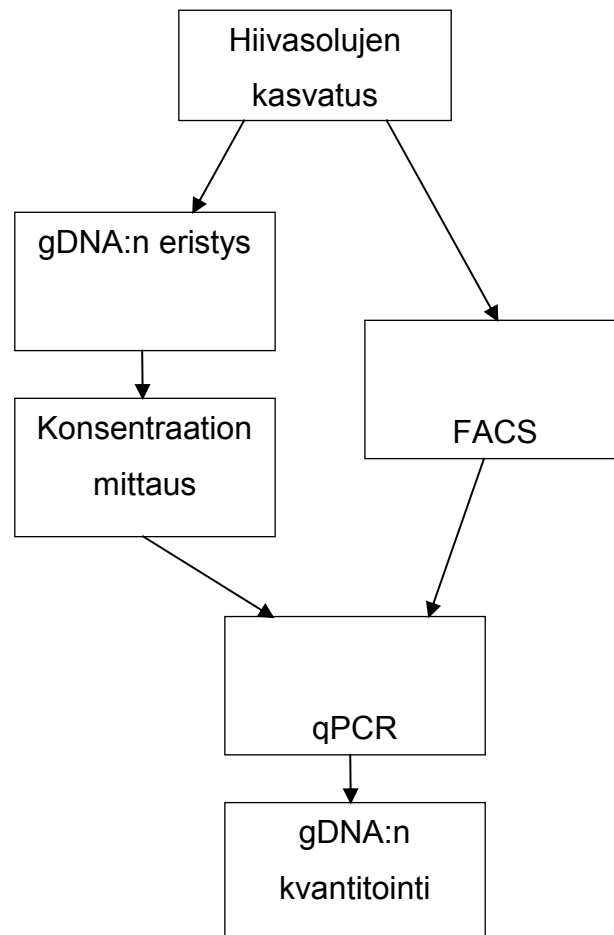
Virtausytometrissä solut ohjataan virtauksen mukana ohueeseen putkeen, jolloin ne voidaan detektoida yksitellen. Putkessa solut kohtaavat lasersäteen, jolloin solu muodostaa varjon estäessään lasersäteen suoran kulun detektorille. Varjon koko riippuu solun koosta. Solun koko voidaan päätellä detektorille saapuvan valon perusteella. Tietokone piirtää laitteelta saaduista tiedoista kuvaajan halutulla tavalla. (BD 2014.)



Kuva 12. FACS-kaavio (School of Medicine 2014).

3 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET

Kasvatettujen hiivasolu-näytteiden valmistaminen qPCR-ajoa varten suoritettiin kahdella eri tavalla. Ensimmäisessä tavassa hiivasta eristettiin genomista DNA:ta ja näytteiden konsentraatio mitattiin. Toisessa tavassa hiivasoluista laskettiin suoraan hiivasolujen määrä kasvatuksen jälkeen solulaskurilla. Laskettuja soluja ja gDNA:ta käytettiin templaattina qPCR:ssä. Lopuksi käytettiin tulosten analysointiin qPCR-laitteen analyysimenetelmiä. Työjärjestys on esitetty kuviossa 1.



Kuvio 1. Työn eteneminen.

3.1 Primerien testaus plasmidilla

Primerien testausta varten plasmidi tuotettiin *E. coli*-bakteerikannassa ja eristettiin käyttämällä NucleoSpin® Plasmid -kittiä (Macherey-Nagel). Koska plasmidi (InB-NP-HFB1_3-pICZA) sisältää sekä IBnP (influenssa B viruksen nukleoproteiini), että HFBI (hydrofobiini) geenit, testattavina primereina käytettiin primeripareja InB-NP-F ja -R sekä HFB1-F ja -R. Käytettyjen alukkeiden sekvenssit, koko ja sijainti ovat kuvattu taulukossa 1. Alukkeiden tekniset tiedot löytyvät liitteestä 2.

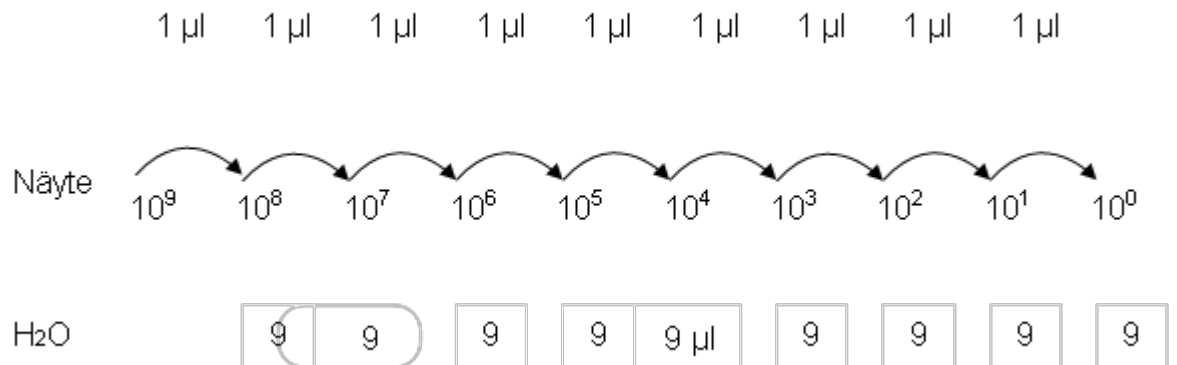
Taulukko 1. Alukkeiden sekvenssit.

Aluke	Sekvenssi
InB-NP-F	AGGCTGGTTTGAACGACGAT
InB-NP-R	CACCAGTCTTGTTGTGGTCG
Koko: 168 bp (sijainti: 569/736)	
HFB1-F	TGGTTCTGGTGGTGGTTCTT
HFB1-R	AGCAACTGGAGCAACACAAC
Koko: 207 bp (sijainti: 52/259)	

Plasmidi-näytteiden konsentraatio mitattiin NanoDrop® spektrofotometrillä ja kopioluvun määrä laskettiin RIGSC:n kopiolukulaskurilla.

Esimerkiksi plasmidi-näytteen InB-NP+Tag 6 in pICZ A koko on 5548 bp ja konsentraatio 102,84 ng/μl, jolloin kopiolukulaskurin mukaan näytteen kopioluku on $1,72 \times 10^{10}$. Näyte laimennettiin sekoittamalla 2,9 μl näytettä ja 47,1 μl puhdistettua vettä, jolloin kopioiden määräksi saatiin 1×10^9 . Tästä tehtiin laimennossarja (kuvio 2) niin, että seuraavan laimennoksen kopioluku on kymmenen kertaa pienempi aina yhden kopioluvun sisältämään näytteeseen asti. Näytteet ajettiin kolmena rinnakkaisena. Saaduista Cp-arvoista sekä sulamispisteistä laskettiin keskihajonta ja laimennosten väliset Cp-arvojen erot (taulukot 2 ja 3). Mukana ajossa oli myös kontrolli-näyte, joka ei sisällä templaattia eli tuotetta ei pitäisi tulla. Tämän avulla voitiin tarkistaa, miten

qPCR:n herkkyys ja kvantitointi kohtaavat. Jatkossa qPCR-ajoissa käytettiin etupäässä alukkeena InB-NP-F ja -R primerparia.



Kuvio 2. Laimennossarja.

Taulukko 2. qPCR-ajosta saadut Cp-arvot plasmidi-näytteestä.

Näytteen laimennokset	Keskiarvo (Cp)	Hajonta	Hajonta-%
10^6	15,33	0,32	2,08 %
10^5	17,62	0,11	0,60 %
10^4	20,33	0,11	0,56 %
10^3	23,03	0,26	1,13 %
10^2	24,92	0,03	0,13 %
10^1	25,65	0,03	0,10 %
10^0	25,65	0,03	0,12 %
kontrolli	25,88	0,06	0,24 %

Taulukko 3. Laimennosten väliset Cp-arvojen erot. Cp-arvojen väliset erot on laskettu rinnakkaisten näytteiden keskiarvoista.

Näytteen laimennokset	Laimennosten Cp-arvojen ero (Cp)
10^6-10^5	2,29
10^5-10^4	2,71
10^4-10^3	2,70
10^3-10^2	1,89
10^2-10^1	0,73
10^1-10^0	0,00
10^0 -kontrollinäyte	0,23

3.2 Toistettavuus

Plasmidi-näyte toimi templaattina kuudessa qPCR-ajossa. Toistojen avulla etsittiin mahdollisia Ct-arvojen muutoksia qPCR-ajojen tuloksissa, joita ei teoriassa pitäisi olla samanlaisissa ajoissa ja samoissa ajo-olosuhteissa. Näin testattiin qPCR-ajojen tulosten paikkansapitävyys.

qPCR-ajoissa ajettiin plasmidi-näytteistä valmistettu laimennossarja kolmena rinnakkaisena. Saaduista Cp-arvoista ja sulamispisteistä laskettiin rinnakkaisten näytteiden keskihajonta sekä laimennosten välinen vaihteluväli. Näin saatiin tekijän ja laitteen välinen tuottama vaihteluväli. Toistoja tehtiin jatkossa myös hiiva-DNA-näytteistä.

3.3 Hiivasolujen kasvatus

Hiiva-DNA:n eristystä varten kasvatettiin kuusi erilaista hiivakantaa valmiilta viljelymaljoilta, joista kolme oli single copy- ja kolme multicopy-kantoja. Kasvatukset tehtiin Falcon-putkiin, joissa oli 5 ml YPD-mediumia. Kasvatusaika oli 21 tuntia, lämpötila +30 °C ja sekoitusnopeus 250 rpm.

Valmistetaan kasvatuksista 1:10 -laimennos lisäämällä kyvetiin 900 µl YPD-mediumia ja 100 µl kasvatusta. Laimennoksista mitataan OD₆₀₀-arvo spektrofotometrillä aallonpituudella 600 nm. OD₆₀₀-arvot on esitetty taulukossa 4. Näytteiden purkukoodi on esitetty liitteessä 1. **Error! Reference source not found.**

1:10 -laimennoksista valmistettiin 1:5 -laimennokset lisäämällä 800 µl puhdistettua vettä ja 200 µl 1:10 -laimennosta Eppendorf-putkiin. 1:5 -laimennoksista laskettiin solut solukammioilla. Jokaiseen putkeen lisättiin 15 µl Löffler metyleeni sinistä ja pipetoitiin 10 µl näytettä solukammioon. Solujen lukumäärä laskettiin mikroskoopilla kolmesta ruudusta. Solujen lukumäärät kammioittain on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 4. Solujen lukumäärä kammioittain. Jokaisesta kammioista on laskettu kolme ruutua ja näistä ruuduista saatujen solumäärien keskiarvo.

Kammio ja näytteen nimi	Ruutu 1 (solujen lkm)	Ruutu 2 (solujen lkm)	Ruutu 3 (solujen lkm)	Keskiarvo
1. 64130	49	48	37	45
2. SC65140	33	41	46	40
3. SC63150	29	30	35	31
4. 65130	64	66	71	67
5. 63120	33	37	35	35
6. SC64140	40	54	59	51

Solupelletit otettiin talteen kasvatusputkista. Jokaista kasvatusta lisättiin 1,5 ml:aa Eppendorf-putkeen ja putkia sentrifugoitiin 1 minuutin ajan (16000xg, 22 °C). Supernatantit poistettiin imupullolla ja putkiin lisättiin 1,5 ml:a kasvatusta. Fuugaus toistettiin ja supernatantit poistettiin. Tämän jälkeen otettiin 6 uutta Eppendorf-putkea ja lisättiin jokaiseen 1 ml kasvatusta ja sentrifugattiin 1 minuutti. Supernatantit poistettiin ja 3 ml:n ja 1 ml:n näytteet siirrettiin pakkaseen.

3.4 gDNA:n eristys ja konsentraation mittaus

Hiiva-DNA:ta eristettiin kuudesta eri hiiva-näytteestä NucleoSpin® Tissue –kitillä (Macherey-Nagel) ohjeen mukaan. 3 ml näytettä ja 1 ml 10mM EDTA:a sentrifugoitiin 10 minuuttia. Näyteputkiin lisättiin 600 µl sorbitolipuskuria ja 10 µl lytikaasi-liuosta. 30 minuutin inkuboinnin jälkeen näytteitä sentrifugoitiin kymmenen minuuttia. Näytteistä poistettiin supernatantti ja lisättiin 180 µl T1-puskuria ja 25 µl proteinaasi K:ta. Näytteitä sekoitettiin ja inkuboitiin 1,5 tuntia 56 °C:ssa. Näytteitä sekoitettiin ja lisättiin 200 µl B3-puskuria ja sekoitettiin jälleen. Kymmenen minuutin inkuboinnin jälkeen näytteisiin lisättiin 210 µl absoluuttista etanolia ja sekoitettiin näyteputkia. Seos siirrettiin NucleoSpin® Tissue -kolonniin, jotka sijoitettiin keräilyputkiin. Sentrifugoinnin jälkeen ylimääräinen neste poistettiin keräilyputkista ja sentrifugointi ja nesteen poisto keräilyputkista toistettiin uudelleen. Näytteet pestiin 500 µl BW-puskurilla ja sentrifugoitiin yksi minuutti, jonka jälkeen ylimääräinen neste keräysputkista poistettiin. Pesu toistettiin käyttämällä 600 µl B5-puskuria. Pesujen jälkeen näyteputkia sentrifugoitiin vielä yksi minuutti. NucleoSpin® Tissue -kolonnit siirrettiin Eppendorf-putkiin ja lisättiin 100 µl 70 °C:sta BE-puskuria. Näytteitä inkubointiin huoneenlämmössä yksi minuutti. Näytteitä sentrifugoitiin yksi minuutti ja NucleoSpin® Tissue -kolonnit poistettiin. Jokainen näyte laitettiin puoliksi ja toiseen puoleen lisättiin 10 µl RNAasia. DNA-näytteitä säilytettiin pakkasessa.

Eristetyistä gDNA-näytteistä mitattiin konsentraatio NanoDrop® spektrofotometrillä, Qubit® fluorometrillä ja Hidex Sense monileimalaskimella. Eri näytteiden antamia konsentraatioita verrattiin keskenään (taulukko 7). NanoDrop® -laitteeseen asetettiin nollanäytteeksi 1 µl NucleoSpin® Tissue -kitin eluointipuskuria BE. Jokaista mitattavaa DNA-näytettä pipetoitiin 1 µl laitteen anturiin. Anturi pyyhittiin jokaisen konsentraatiomittauksen jälkeen. Spektrofotometrin antamat pitoisuudet on esitelty taulukossa 6.

Taulukko 5. Nanodropilla mitattujen näytteiden pitoisuus ng/µl.

Näyte	Pitoisuus ilman RNAasia (ng/μl)	Pitoisuus näytteen sisältäessä RNAasia (ng/μl)
SC63150	77,6	136,1
63120	72,5	131,4

Qubit® fluorometrin mittausalue on 0,2-100 ng, joten näytteet laimennettiin NanoDropin antamaan pitoisuuteen 50 ng/μl, taulukon 6 arvoista, puhdistetulla vedellä. Mitattavat näytteet käsiteltiin Qubit® dsDNA HS Assay -kittiä (Life Technologies™) käyttämällä. Valmistettiin käyttö liuos sekoittamalla 14 μl Quant-iT™ reagenssia ja 2786 μl Quant-iT™ puskuria. Laimennettiin standardit 1 ja 2 fluorometrin kalibrointia varten lisäämällä 190 μl käyttöliuosta kahteen Qubit® -putkeen, johon toiseen tuli 10 μl kitin standardiliuosta 1 ja toiseen 10 μl standardiliuosta 2. Mitattavat näytteet valmistettiin lisäämällä 198 μl käyttöliuosta ja 2 μl DNA-näytettä Qubit® -putkeen. Sekä standardit että näytteet sekoitettiin vorteksoimalla putkia 3 sekuntia. Näytteitä ja standardeja inkuboitettiin huoneenlämmössä kaksi minuuttia. Laite kalibroitiin standardeilla ja konsentraatio näytteistä mitattiin.

Konsentraation mittaamiseen Hidex Sense monileimalaskurilla käytettiin Quant-iT PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits -kittiä (Life Technologies). Mittaamista varten valmistettiin standardilaimennokset, joiden lopulliset pitoisuudet olivat 0, 1, 10, 50, 100, 250, 500 ja 1000 ng/μl, laimentamalla kitin Lambda DNA:ta 1xTE-puskuriin. Jokainen hiiva-näyte laimennettiin 1:100 1xTE-puskurilla. Standardeja ja näytteitä pipetoitiin 100μl 96-kuoppalevyille kolmena rinnakkaisena. Jokaiseen kuoppalevyn kuoppaan lisättiin 100 μl Quant-iT reagenssia, joka on laimennettu 200-kertaisesta 1-kertaiseksi lisäämällä 4975 μl 1xTE-puskuria 25 μl:aan 200xQuant-iT:tä. Kuoppalevyja sekoitettiin kuoppalevysekoittajassa ja inkuboitettiin levyjä 2 minuuttia. Mittausta varten tehtiin sopiva ohjelma monileimalaskimelle (Ex. 485 nm, emissio 520 nm). Mitattiin konsentraatiot näytteistä.

Taulukko 6. Eri laitteiden antamat konsentraatiot ng/ μ l. Näytteet on laimennettu konsentraatioon 50 ng/ μ l NanoDropin antamien laimentamattomien näytteiden pitoisuuksien mukaan.

Näyte	NanoDrop®	Qubit®	Hidex Sense*
SC63150	51,6	5,49	-
63120	51,6	6,43	-
SC63150+RNAasi	53,0	0,854	6,40
63120+RNAasi	53,7	0,557	0,87

* Hidex Sense'llä mitattu ainoastaan RNAasilla käsiteltyjä näytteitä.

3.5 Solujen laskeminen ja qPCR

Solujen laskemista varten valmistettiin 8 kappaletta hiivakasvatuksia, joista kaksi on single copy -kantoja ja kuusi multicopy -kantaa. Laitettiin jokaista solustokkia omalle maljalle 5 μ l ja levitettiin siirrostussilmukalla. Kasvatettiin maljoja n. 20 tuntia 30 °C:ssa. Lisättiin kahdeksaan kasvatusputkeen 5 ml YPD-mediumia ja siirrostettiin pesäke maljoilta putkiin. Putkia inkuboitiin n. 22 tuntia, 33 °C ja 250 rpm. Kasvatukset siirrettiin kasvatusputkesta Falcon-putkeen ja sentrifugoitiin 5 minuuttia/2000xg. Näytteistä poistettiin supernatantti niin, että jäljellä jäi vain pelletti. Lisättiin 5 ml 1xPBS:ää.

Hiivasolujen määrä laskettiin kasvatuksista FACS-solulaskurilla. Laskeminen tapahtui Turun Biotekniikan keskuksessa. Solut laskettiin 96-kuoppalevyille niin, että jokaista näytettä on 12 kuoppaa. Näytteet jaettiin kahdelle kuoppalevyille jolloin molemmilla kuoppalevyillä on yhteensä neljä eri näytettä (Taulukko 8). Jokaisessa kuoppalevyn kuopassa on 250 μ l näytettä joka sisältää 250 000 solua. Näytteiden säilyvyyden takaamiseksi kuoppalevyt säilytettiin kylmässä.

Taulukko 7. Lasketun näytteen sijainti kuoppalevyllä ja näytteen nimi (SC=single copy).

Kuoppalevy 1	Kuoppalevy 2
--------------	--------------

A1-A12	SC64110	A1-A12	SC63150
B1-B12	65231	B1-B12	63110
C1-C12	63130	C1-C12	64120
D1-D12	63120	D1-D12	64130

Lopullinen PCR-ajo suoritettiin FACS-solulaskurilla lasketuilla näytteillä, jotka hajotettiin lasihelmillä. Jokaisesta näytteestä tehtiin 10^{-1} - ja 10^{-2} -laimennokset. Tämän lisäksi ajossa oli mukana jokainen näyte laimentamattomana. Kaikista näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista.

Ajettavat näytteet valmistettiin lisäämällä Eppendorf-putkiin 250 μ l solunäytettä, 250 μ l puhdistettua vettä ja 500 μ l lasihelmiä. Soluja hajoitettiin helmimyllyssä 3 minuuttia 70 %:n teholla. Valmistettiin laimennokset 10^{-1} ja 10^{-2} (kuvio 3). Valmistettiin PCR-reaktioseos. Reaktioseoksessa käytettiin kaupallista 2 x KAPA SYBR fast mixia, joka sisältää DNA-polymeraasin, reaktiopuskurin, deoksinukleotidin (dNTP), SYBR Green I -väriaineen sekä $MgCl_2$:ta. Alukeparina käytettiin InB-NP-R ja InB-NP-F -primereita. Taulukossa 9 on kuvattu PCR-reaktion pipetointivaiheet. Lisätään kuoppalevyn kuoppiin 19 μ l PCR-reaktioseosta ja 1 μ l näytettä ja ajettiin näytteet qPCR-laitteella. PCR-ajolosuhteet on esitetty taulukossa 10.



Kuvio 3. Esimerkki yhden näytteen laimennoksesta. Jokaisesta näytteestä tehtiin rinnakkaiset eri kuoppalevyn kuopista otetuista soluista.

Taulukko 8. PCR-reaktio.

Reagenssit	μ l
ddH ₂ O	8.2
10 μ M 5'-aluke	0.4

10 μ M 3'-aluke	0.4
2 x KAPA SYBR Fast Mix	10
gDNA	1
Yhteensä	20

Taulukko 9. PCR-ajo-olosuhteet.

T (°C)	Aika	
95	3 min	
95	10 s	x 40
58-63	30 s	
72	20 s	
72	5 min	
4	∞	

Cp-arvot saatiin 2nd Derivative Max -analyysillä ja sulamispisteet Tm Calling -analyysillä. Cp-arvojen ja sulamispisteiden keskihajonnat sekä laimennosten välinen Cp-arvojen ero laskettiin. Liitteessä 3 on esitetty 2nd Derivative Max-analyysin raakadata, josta taulukon 11 keskiarvot ja hajonnat sekä taulukon 12 laimennosten väliset erot ovat laskettu.

Taulukko 10. Rinnakkaisten näytteiden Cp-arvojen keskiarvot, keskihajonta ja hajonnan prosenttiosuus.

Näytteen nimi	Keskiarvo (Cp)	Hajonta	Haj.-%
SC64110	24,38	0,06	0,26 %
SC64110_1	26,00	0,07	0,28 %
SC64110_2	26,33	0,12	0,44 %
65231	23,95	0,03	0,14 %
65231_1	25,60	0,25	0,98 %
65231_2	26,08	0,14	0,54 %
63130	24,50	0,05	0,21 %
63130_1	25,94	0,04	0,14 %
63130_2	26,08	0,04	0,15 %
63120	25,42	0,06	0,25 %
63120_1	27,88	0,04	0,13 %
63120_2	26,74	0,03	0,12 %
SC63150	23,82	0,02	0,06 %
SC63150_1	26,92	0,04	0,15 %
SC63150_2	28,70	0,17	0,58 %
63110	22,16	0,02	0,08 %
63110_1	25,63	0,04	0,16 %
63110_2	28,35	0,09	0,30 %
64120	22,87	0,04	0,19 %
64120_1	26,23	0,06	0,25 %
64120_2	28,02	0,24	0,86 %
64130	23,28	0,08	0,32 %
64130_1	26,90	0,10	0,36 %
64130_2	28,46	0,11	0,37 %

Taulukko 11. Näytteen laimennosten väliset erot Cp-arvoissa. (1= laimentamattoman ja 10^{-1} -laimennoksen välinen ero, 2= 10^{-1} -ja 10^{-2} -laimennoksen välinen ero).

Näytteen nimi	1	2
SC64110	1,62	0,33
65231	1,65	0,48
63130	1,43	0,15
63120	2,45	-1,14
SC63150	3,10	1,78
63110	3,47	2,73
64120	3,36	1,79
64130	3,63	1,55

3.6 gDNA:n kvantitointi

Työssä verrattiin single copy-näytteitä multicopy- näytteisiin. Single copy -kantoja käytettiin ns. sisäisenä kontrollina, joihin multicopy-kantoja verrattiin. Valmistettiin laimennossarja, jonka avulla haettiin tietoa kvantitatiivisen PCR:n herkkyydestä eli paljon DNA:ta tulisi olla, jotta saadaan PCR-tulos. Tämän perusteella valittiin qPCR-alue, jolla herkkyys oli riittävä. Ajettiin multicopy-näytteet rinnakkain single copy – näytteiden kanssa, jolloin saatiin suhteutettu tulos, jota voitiin verrata single copy –näytteistä saatuihin tuloksiin. Tämän perusteella voitiin arvioida voidaanko gDNA eristää siten, että rinnakkaisista näytteistä saadaan suhteellisesti mitattuna oikea tulos, jota voidaan käyttää erilaisen kopioluvun omaavien näytteiden vertaamiseen toisiinsa. Kvantitointi tehtiin standardi-suoraa vastaan käyttäen 2nd derivative max –analyysia. Käytännössä kyseessä oli suhteellinen kvantitointi, jossa tutkittavan geenin tuntematonta kopiolukua verrattiin referenssigeenin tunnettuun kopiolukuun. Luvun 3.5 taulukosta 11 nähdään, että single copy –ja multicopy –kantojen C_p-arvojen ero olivat n. ±1-2 yksikköä riippuen tarkasteltavasta näytteestä eli single copy –ja multicopy –kantojen ero kopioluvussa oli arviolta 3-8 kopiota.

4 TARKASTELU

Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida menetelmä *Pichia pastoris* -hiivakantojen kopioluvun määrittämiseen kvantitatiivisella PCR-menetelmällä ja testata qPCR:n soveltuvuus tarkkaan kopioluvun määrittämiseen. qPCR-ajoissa käytettiin laimennossarjoja, joiden avulla haettiin tietoa qPCR:n herkkyydestä, kun näytteenä käytettiin gDNA:ta eli tarkoituksena oli selvittää paljonko DNA:ta pitää olla, jotta saadaan PCR:stä tulos. Rinnakkaisilla näytteillä tarkasteltiin työn suorittajan ja laitteen tuottamaa vaihteluväliä.

Opinnäytetyön edetessä saatiin kehitettyä menetelmän herkkyyttä. Kuten tuloksista selvisi, herkkyys on parempi hajoitetuilla soluilla. Tämän perusteella voidaan todeta, että PCR-syklaus ei hajota tasaisesti soluja, joten solunäytteet on hyvä esikäsitellä hajottamalla ne ja mittaamalla gDNA-konsentraatio. Tämä parantaa huomattavasti menetelmän herkkyyttä. Lisäksi on hyvä suhtautua varauksella laitteiden luotettavuuteen, sillä tulokset saattavat poiketa verraten toiseen laitteeseen. Näin ollen on hyvä testata useampaa menetelmää ja laitetta ja verrata niiden antamia tuloksia keskenään.

Plasmidi-näytteillä tehdyistä qPCR-ajoista saaduista Ct-arvoista arvioitiin yhden kopioluvun vastaavan n. 0,27 syklin eroa Cp-arvossa. Menetelmä toimii parhaiten Cp-arvon ollessa alle 25, mutta Cp-arvon noustessa yli 28:aan mittaustulokset eivät enää ole luotettavia. Plasmidi-näytteillä päästiin parhaimmillaan yhden kopion herkkyyteen ja myös sulamispisteanalyysissä herkkyys oli 1 kopion luokkaa. Hiiva-näytteillä päästiin parhaimmillaan 10 kopion herkkyyteen. Kaksi eri single copy -näytettä antoivat hieman eri Cp-arvot, vaikka teoriassa niiden tulisi olla samat. Single copy -ja multicopy -näytteiden Cp-arvot olivat hyvin samanlaisia eli kopioiden määrä niin single copy -näytteissä, että multicopy -näytteissä on suunnilleen sama.

PCR-tuotteista tehdyn geelijaon perusteella, voidaan todeta PCR:n toimivan 1/100-laimennoksessa eli kun solumäärä on n. 10 solua PCR-reaktiossa ja kun

solut on esikäsitelty lasihelmillä. Hajottamattomilla soluilla PCR toimii 1/10 – laimennoksella eli solumäärän ollessa n. 100 solua/reaktio.

DNA:n konsentraation mittauksessa spektrofotometrin antama DNA:n määrä oli reilusti enemmän kuin olisi pitänyt. Fluorometrillä saatu DNA-määrä taas jäi paljon oletetun määrän alle. Monileimalaskin antoi samanlaisia tuloksia kuin fluorometri. Fluorometrin mittausalue saattaa olla myös ongelmallinen, sillä näytteen pitoisuus tulisi tarkistaa ennen mittausta jollain muulla konsentraation mittaamiseen tarkoitetulla laitteella, jotta näytteen pitoisuus saadaan suhteutettua Qubitin mittausalueelle. Kuten taulukosta 7 (luku 3.4) huomattiin DNA-konsentraation mittaukset antoivat suuret erot DNA-määrissä eri laitteiden väleillä. Tämän perusteella ei laitteiden antamia konsentraatioita voida pitää luotettavina. Myös näytteiden käsittely RNAasilla saattaa vaikuttaa näytteen pitoisuuden määrään. Tämä saattaa olla esimerkiksi merkki kontaminaatiosta. Näiden tulosten perusteella ei voida valita parasta vaihtoehtoa eri gDNA-mittausmenetelmien väliltä, vaan tulisi suorittaa lisäkokeita. Tämän takia päädyttiin laskemaan solujen määrä FACS-solulaskurilla, jota voidaan Turun biotekniikan keskuksen mukaan pitää luotettavana menetelmänä.

Opinnäytetyön alussa verrattiin kahta valmista primerparia InB-NP-F & -R ja HFB1-F & -R. Näiden kahden primeriparin välillä ei havaittu eroja. Jatkossa voisi primerien tilalla monistaa kahta aluetta samassa reaktiossa. Genomista monistetaan geenipätkä, jonka tiedetään esiintyvän yksittäisenä kopiona, jolloin se toimii sisäisenä kontrollina.

Varsinaisista näytteistä saatujen tulosten perusteella ei voida sanoa onko kopioluvun määrittäminen LC480 qPCR-laitteella tässä työssä esitetyllä tavalla varteenotettava vaihtoehto. qPCR-menetelmä on hyvin vaativa ja herkkä pipetointivirheille eli erityisesti pipetointitarkkuus on keskeinen asia työn onnistumisen kannalta.

LÄHTEET

BD. 2007. FACS Aria II User's Guide. Viitattu 26.4.2014 <http://www2.udel.edu/ctcr/sites/udel.edu/ctcr/files/BD%20FACS Aria%20II%20Users%20Guide.pdf>.

Bejjani, B. & Shaffer, L. 2006. Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization to Clinical Diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics*. Saatavilla verkossa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1876176/>

Bioinformatics & Evolutionary Genomics. 2014. *Pichia pastoris*. Viitattu 15.6.2014 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/genomes/view/Pichia-pastoris>.

Bio-Rad. 2014. Droplet Digital PCR Applications Guide. Viitattu 16.10.2014 https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf, sivu 37.

Bio-Rad. 2014. Viitattu 18.10.2014 <https://www.bio-rad.com/en-fi/category/amplification-pcr>.

Bioestimika. 2014. qPCR basics. Viitattu 20.10.2014 <http://www.biosistemika.com/workshops/qpcr-basics>

Davidson College. 2003. Real-Time PCR: the TaqMan®. Viitattu 26.4.2014 <http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/pierce/realtimpcr.htm>.

Dorak, M. 2007. Real-time PCR. School of Clinical Medical Sciences (Child Health) Newcastle University. UK. Viitattu 26.4.2014 http://download.bioon.com.cn/upload/201302_21044927_9712.pdf.

Gene-quantification. Viitattu 5.5.2014 <http://www.gene-quantification.de/cnv-faq.pdf>.

Heid, C.; Stevens, J. Livak, K. & Williams, P. 1996. Real time quantitative PCR. BioAnalytical Technology Department. California. Viitattu 14.3.2014 <http://genome.cshlp.org/content/6/10/986.long>.

Invitrogen. 2010. pPICZ A, B, and C *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of recombinant proteins User Manual. Catalog no. V190-20. Viitattu 15.6.2014 http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ppicz_man.pdf.

Invitrogen. 2010. *Pichia* Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris* User Manual. Catalog no. K1710-10.

Invitrogen. 2007. Qubit® Fluorometer Instruction Manual. Viitattu 5.4.2014 <http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/cell-tissue-analysis/qubit-all-file-types.par.27078.file.dat/qubit-usermanual.pdf>.

Macherey-Nagel. 2010. NucleoSpin® Plasmid DNA Purification User Manual.

Macherey-Nagel. 2014. Viitattu 12.3.2014 <http://www.mn-net.com/Products/DNAandRNAPurification/DNAfromtissueandcells/NucleoSpinTissue/tabid/1353/language/en-US/Default.aspx>.

Mandal, A. 2014. News Medical. Viitattu 26.4.2014 <http://www.news-medical.net/health/Fluorescence-Activated-Cell-Sorting.aspx>.

Paa. 2014. Roche LightCycler LC480. Viitattu 27.6.014 <http://www.paa-automation.com/labauto/services/case-studies/paa-installed/roche-lightcycler-lc-480.asp>.

Promega. 2014. How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample?. Viitattu 12.3.2014 [http://fi.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/?__utma=1.2047046494.1398669419.1398669419.1398669419.1&__utmb=1.1.10.1398669419&__utmc=1&__utmz=1.1398669419.1.1.utmcsr=\(direct\)|utmccn=\(direct\)|utmcmd=\(none\)&__utmv=-&__utm=254069256](http://fi.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/?__utma=1.2047046494.1398669419.1398669419.1398669419.1&__utmb=1.1.10.1398669419&__utmc=1&__utmz=1.1398669419.1.1.utmcsr=(direct)|utmccn=(direct)|utmcmd=(none)&__utmv=-&__utm=254069256).

Purves, W.; Sadava, D.; Orians, G. & Heller H. 2004. Life Wire. Viitattu 20.10.2014 http://www.odec.ca/projects/2005/anna5m0/public_html/methods.htm

Qiagen. 2014. Viitattu 16.10.2014 <http://www.qiagen.com/fi/products/catalog/automated-solutions/detection-and-analysis/rotor-gene-q/#productdetails>.

RIGSC, University of Rhode Island Genomics and Sequencing Center. 2004. dsDNA copy number calculator. Viitattu 2.3.2014 <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>.

School of Medicine. 2014. Viitattu 26.4.2014 <http://missinglink.ucsf.edu/lm/molecularmethods/flow.htm>.

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

USBiological. 2014. Viitattu 20.2.2014 <https://www.usbio.net/misc/newsletter120109>.

Näytteiden koodaus

HydroBody-projektissa on luotu koodausjärjestelmä näytteiden nimeämisessä. Koska *Pichia pastoris*-kantoja on useampia, eri tuotto proteiineille, tuottovektoreille sekä merkkiproteiineille on oma merkkinsä. Näytteen koodi koostuu 6-9 merkin sarjasta, missä jokainen merkki ilmoittaa tietyn tiedon näytteestä. Tässä opinnäytetyössä on käytetty kymmentä erilaista koodia, jotka purkautuvat seuraavasti:

Etumerkki: SC=single copy

1. merkki: 6=Influenssa B viruksen nukleoproteiini
2. merkki: 3=HFB1_3 4=HFB1_4 5=tag6
3. merkki: 1=pPICZ A 2=pGAPZ A
4. merkki: Lähtöpesäkkeen juokseva numero; 1,2,3,4,5...
5. merkki: 0=indusoimaton 1=indusoitu

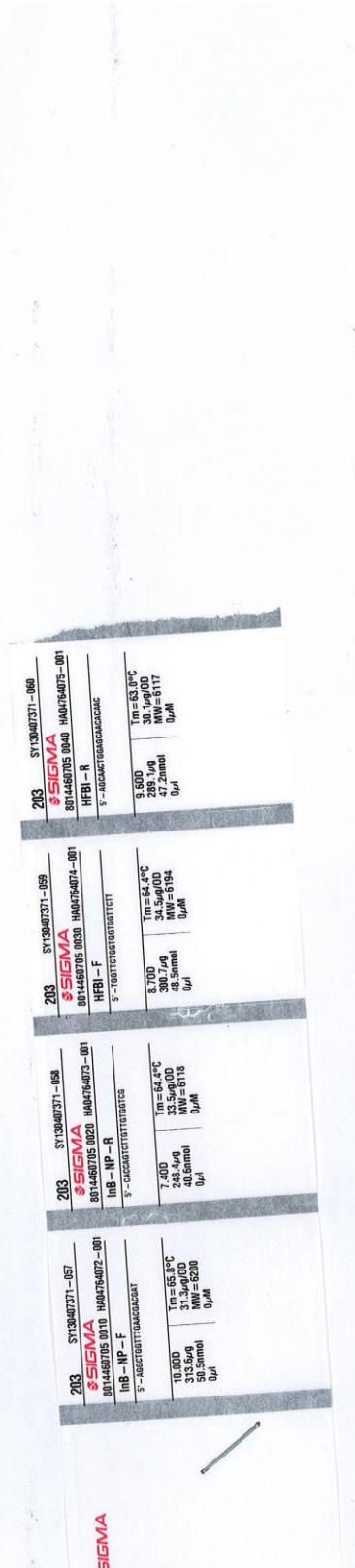
Alukkeiden tiedot

Technical Datasheet

INSTITUTE: TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
 RESEARCHER: PETRI SUSI
 PURCHASE ORDER NO: 38204/601129

SALES ORDER NO: 8014460705
 CUSTOMER NO: 0035074077
 SHIPMENT DATE: 05/04/2013

Batch #	Oligo Name	Oligo #	Ler Pur	Scale	MW	Tm°	µg/OD	OD	µg	nmol	Epsilori 1/(nm ² cm)	Dime ₂ ndry	GC %	µl for 100µM	Sequence(5'-3')
HA04764072	InB-NP-F	8014460705-000010	20	DST	6200	65.8	31.3	10.0	313.6	50.5	197.7	No	50	505	AGGCTGGTTGAACGACGAT
HA04764073	InB-NP-R	8014460705-000020	20	DST	6118	64.4	33.5	7.4	248.4	40.6	182.2	No	55	406	CACCAGTCTTGTGGTGG
HA04764074	HFBI-F	8014460705-000030	20	DST	6194	64.4	34.5	8.7	300.7	48.5	179.2	No	50	485	TGGTCTGGTGGTGGTCTT
HA04764075	HFBI-R	8014460705-000040	20	DST	6117	63.0	30.1	9.6	289.1	47.2	203.1	No	50	472	AGCAACTGGGACACACAAAC



2nd Derivative Max –analyysin raakadata

qPCR-ajon 2nd Derivative Max –analyysistä saadut Cp-arvot.

Pos	Name	Cp
A1	SC64110	24,45
A2	SC64110	24,33
A3	SC64110	24,36
A4	SC64110_1	25,98
A5	SC64110_1	25,94
A6	SC64110_1	26,08
A7	SC64110_2	26,24
A8	SC64110_2	26,29
A9	SC64110_2	26,46
A10	65231	23,97
A11	65231	23,91
A12	65231	23,97
B1	65231_1	25,44
B2	65231_1	25,47
B3	65231_1	24,89
B4	65231_2	25,95
B5	65231_2	26,23
B6	65231_2	26,05
B7	63130	24,56
B8	63130	24,46
B9	63130	24,49
B10	63130_1	25,94
B11	63130_1	25,9
B12	63130_1	25,97
C1	63130_2	26,11
C2	63130_2	26,1
C3	63130_2	26,04
C4	63120	25,46
C5	63120	25,46
C6	63120	25,35
C7	63120_1	27,84
C8	63120_1	27,88
C9	63120_1	27,91
C10	63120_2	26,76
C11	63120_2	26,7
C12	63120_2	26,75

D1	SC63150	23,84
D2	SC63150	23,82
D3	SC63150	23,81
D4	SC63150_1	26,88
D5	SC63150_1	26,96
D6	SC63150_1	26,92
D7	SC63150_2	28,89
D8	SC63150_2	28,59
D9	SC63150_2	28,61
D10	63110	22,17
D11	63110	22,14
D12	63110	22,17
E1	63110_1	25,65
E2	63110_1	25,65
E3	63110_1	25,58
E4	63110_2	28,45
E5	63110_2	28,32
E6	63110_2	28,29
E7	64120	22,89
E8	64120	22,9
E9	64120	22,82
E10	64120_1	26,28
E11	64120_1	26,16
E12	64120_1	26,26
F1	64120_2	28,26
F2	64120_2	28,03
F3	64120_2	27,78
F4	64130	23,32
F5	64130	23,19
F6	64130	23,32
F7	64130_1	26,8
F8	64130_1	26,92
F9	64130_1	26,99
F10	64130_2	28,56
F11	64130_2	28,35
F12	64130_2	28,46