

Lauri Snellman

Master mix -reagenssiseoksen testaus qPCR:ää varten

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja Elintarviketekniikka

Insinöörityö

13.11.2015

Tekijä(t) Otsikko	Lauri Snellman Master mix -reagenssiseoksen testaus qPCR:ää varten
Sivumäärä Aika	31 sivua + 1 liitettä 13.11.2015
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaaja(t)	Dosentti, Marja-Liisa Lokki FM, lehtori, Juha Eljas A. Knuutila
<p>HLA-laboratoriossa tehdyn työn tarkoituksena oli löytää uusi <i>master mix</i> -reagenssiseos vanhan <i>mixin</i> tilalle qPCR-ajoihin. qPCR-menetelmää käytettiin potilasnäytteillä tehtäviin tutkimuksiin, joissa selvitettiin tiettyjä HLA-alueen geenejä (HLA eli Human Leucocyte Antigen), jotka liittyvät erilaisiin tulehdus- ja autoimmuunisairauksiin kuten nivelreumaan ja sepelvaltimotautiin.</p> <p><i>Master mix</i> sisältää kaikki nukleotidit, puskuriliuoksen, entsyymien ja muita komponentteja, joita qPCR-reaktiot vaativat. Ainoastaan templaatti-DNA, sekä alukkeet puuttuvat. Testeihin valittiin 3 eri valmistajan kaupallista <i>master mixiä</i> (PerfeCTa, Brilliant III, FastStart). Potilasaineistosta valittiin joukko positiivisia ja negatiivisia näytteitä ajoja varten.</p> <p>Testaukset aloitettiin testaamalla <i>mixit</i> ensin yhden tutkimuksen suhteen (HLA-C4B -geeni) optimiolojen löytämiseksi. Johtuen <i>master mixien</i> erilaisista ominaisuuksista, FastStart testattiin erikseen. Optimin löytämisen jälkeen testattiin loput geeniajot <i>mixeillä</i> eri reaktioolosuhteissa. Näiden ensimmäisten testausten aikana FastStart pudotettiin pois, sillä PerfeCTa ja Brilliant III olivat nopeampia ja toimivat samoissa olosuhteissa. Testikierroksen jälkeen myös Brilliant III jätettiin pois ja lisätestaukset tehtiin pelkällä PerfeCTalla.</p> <p>Toinen testikierros tehtiin ensimmäisen testikierroksen perusteella valituissa ajoolosuhteissa. Ajoissa oli mukana sekä kontrolleja, että uusia potilasnäytteitä. Tulokset varmistettiin vielä vanhalla <i>mixillä</i>.</p> <p>Lopuksi voitiin todeta, että Perfecta toimii jopa paremmin kuin vanha <i>mix</i> ja antoi samat tulokset (positiivinen kahdella tai yhdellä geenikopiolla tai negatiivinen). Se myös toimii nopeammin kuin vanha <i>mix</i>, minkä vuoksi qPCR-ajo on 30 minuuttia lyhyempi.</p>	
Avainsanat	qPCR, master mix, HLA, DNA, geeni, alleeli

Author(s) Title	Lauri Snellman Master mix reagent testing for qPCR
Number of Pages Date	31 pages + 1 appendices 13th November 2015
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Biomedicine
Instructor(s)	Marja-Liisa Lokki, Docent Juha Eljas A. Knuutila, MSc, Senior lecturer
<p>The purpose of the thesis was to find a new master mix for quantitative PCR (qPCR) to replace an old discontinued master mix. qPCR was used for testing patient samples for various HLA genes related to some inflammatory and autoimmune diseases (reactive arthritis, rheumatism, coronary artery syndromes). The master mix contains all nucleotides, buffer, enzyme and other ingredients needed for reactions excluding DNA template and primers. 3 different kinds of commercial master mixes were selected for trials (PerfeCTa, Brilliant III, FastStart). Some previously tested patient samples were selected as positive and negative controls.</p> <p>The testing started with finding optimal qPCR conditions for one test (HLA-C4-B -gene test). Due to different kind of features between master mixes FastStart was tested separately. After optimization other gene tests were tested with all mixes in different reaction conditions (small changes in time and temperature). During the trials FastStart was dropped off and only PerfeCTa and Brilliant III stayed, which could be tested in the same conditions. When both mixes were tested at least once with every gene test, PerfeCTa was selected for extra tests.</p> <p>After the first trial, PerfeCTa was selected for second trial variation runs, with reaction conditions based on the first trials results. In variation runs, controls from first trial and unknown patient samples were tested with the old master mix and PerfeCTa and the results were compared with each other.</p> <p>In conclusion, PerfeCTa performs even better than the old master mix and gives the same results (positive, double positive, negative). It also performs faster than the old mix and, therefore, the qPCR run is 30 minutes shorter than with the old mix.</p>	
Keywords	qPCR, master mix, HLA, DNA, gene, allele

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Ihmisen immunologinen järjestelmä	2
2.1	Immuunipuolustuksen osat	2
2.2	Komplementti	4
2.3	C4	6
3	HLA-järjestelmä	7
3.1	HLA-alue	7
3.2	HLA-molekyylit ja antigeenien esittely	8
3.3	HLA-alue ja autoimmuunisairaudet	10
4	Laitteet ja metodit	11
4.1	PCR	11
4.2	qPCR	11
4.3	Rotor-Gene 3000 ja 6000	14
5	PCR-reaktiomix	14
5.1	qPCR master mix	14
5.1.1	Polymeraasientsyymi	15
5.1.2	Magnesium (Mg^{2+})	15
5.1.3	Muut komponentit	15
5.2	Alukkeet	16
5.3	Templaatti-DNA	16
6	Mixien testaus	17
6.1	Testattavat master mixit	17
6.2	Kontrollinäytteet	17
6.3	Sopivien ajo-olosuhteiden etsiminen C4B-geenitestiin	19
6.4	Mixien toimivuuden testaus eri geenitutkimuksissa	21
7	Ajojen optimointi	25
7.1	Perfectan lisättestaukset	25
7.2	Variaatioajot	27

7.3	Yhteenveto	27
8	Loppupäätelmät	28
	Lähteet	29
	Liitteet	
	Liite 1. Menetelmäohje qPCR	

Lyhenteet

PCR	Polymeraasiketjureaktio (Polymerase Chain Reaction). Menetelmä jolla monistetaan DNA:ta.
qPCR	Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (quantitative PCR). PCR:stä kehitetty sovellutus, jossa voidaan seurata monistettavan DNA:n määrän lisääntymistä ajon aikana.
HLA	Human Leucocyte Antigen. Geenialue, joka koodaa immuunipuolustuksen keskeisiä molekyylejä.

1 Johdanto

Kuluneen vuosikymmenen aikana lääketiede on kehittynyt geenitekniikan saralla huimasti. Sen jälkeen, kun ihmisen koko genomi saatiin sekvensoitua, geenitutkimus on kasvanut merkittävästi ja nykyään erilaisia geenitekniisiä sovellutuksia käytetään hyväksi tutkittaessa geenien vaikutuksia erilaisiin sairauksiin ja yliherkkyyksiin. Jotkin sairaudet ja yliherkkyydet esimerkiksi joillekin tietyille lääkeaineille liittyvät hyvin vahvasti tiettyihin geeneihin tai niiden puutoksiin. Yleensä kuitenkin tietty geeni tai geenikombinaatio ei yksin aiheuta sairautta, vaan siihen liittyy myös monia ympäristötekijöitä (esim. stressi, ruokavalio, infektiot, muut sairaudet).

Tämän työn tarkoituksena oli löytää uusi reagenssiseos (master mix) qPCR:llä (tai real-time PCR) tehtäviin geenitutkimuksiin. Aiemmin tutkimuksissa käytetyn master mixin valmistus oli lopetettu, joten uuden korvaavan mixin löytäminen tuli ajankohtaiseksi. Uudelta master mixiltä vaadittiin yhteensopivuutta käytössä olleen laitteen ja menetelmän kanssa, sekä vähintään yhtä hyvää intensiteettitasoa, kuin vanhalla master mixillä. Pyrittiin myös lisäämään kustannustehokkuutta siten, että eri geenitestejä voitaisiin tehdä samoissa ajo-olosuhteissa, jolloin laitteen kapasiteetti pystyttäisiin hyödyntämään mahdollisimman hyvin. Tavoitteeksi otettiin löytää ajo-olosuhteet, joissa kaikki geenitestit pystyvät erottelmaan positiiviset näytteet negatiivisista, sekä eri kopiokumäärät toisistaan. Koska geenitutkimuksia tehtiin sekä potilasnäytteille että tutkimusnäytteille, mixien testauksen jälkeen jokainen geenitutkimus tuli myös validoida uudelle mixille. Varsinainen validointi jätettiin myöhemmin tehtäväksi laboratorion muun henkilökunnan toimesta.

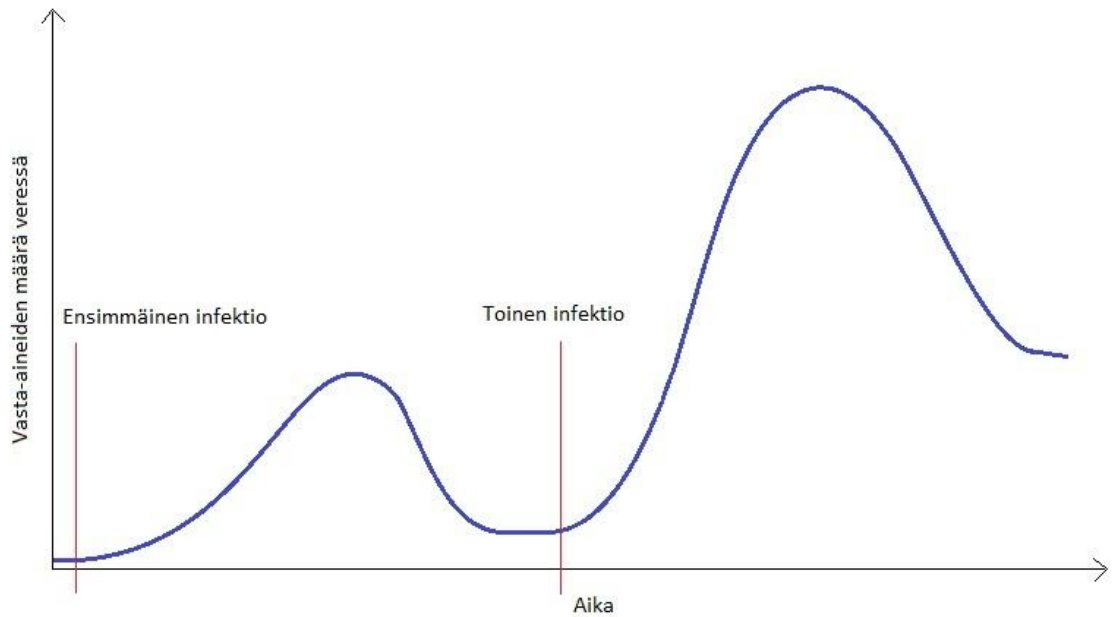
Testejä varten valittiin 3 eri kaupallista qPCR Master Mixiä: FastStart SYBR Green Master (Roche), PerfeCTa SYBR Green FastMix (Quanta Biosciences) ja Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies). Kaikissa testiin valituissa mixeissä fluoresoivana väriaineena toimi SYBR Green I, joka sitoutuu vain kaksijuosteiseen DNA:han. Sen avulla voidaan seurata kaksijuosteisen DNA:n määrän lisääntymistä reaktioputkessa, mittaamalla näytteen intensiteettiä jokaisen PCR-syklin jälkeen.

2 Ihmisen immunologinen järjestelmä

2.1 Immuunipuolustuksen osat

Ihmisen immuunipuolustus mikrobeja vastaan muodostuu synnynnäisestä ja hankitusta immuunijärjestelmästä. Synnynnäinen immunitetti koostuu epiteelisolujen muodostamasta fyysisestä esteestä, fagosyyttisoluista (neutrofiilit ja makrofaagit), dendriitti- ja NK-soluista (Natural Killer -solut), veren komplementtisysteemiin ja tulehdusreaktioon liittyvistä proteiineista, sekä sytokiiniproteiineista. Synnynnäinen immuunisysteemi on läsnä jo ennen infektiota, valmiina reagoimaan mikrobeihin ja vaurioituneiden solujen tuotteisiin nopeasti. Synnynnäisen immuunisysteemin mekanismit tunnistavat toistuvia mikrobien rakenneosasia, jotka ovat yleisiä useilla eri mikrobiryhmillä ja sen vuoksi systeemi pystyy toimimaan hyvinkin laajaa mikrobikirjoa vastaan. Koska kaikki immuunisysteemin osat ovat koko ajan läsnä ympäri kehoa valmiina odottamassa, systeemi alkaa toimimaan välittömästi infektion tapahduttua. [1.]

Synnynnäisen immunitetin ollessa ”universaali” puolustusmekanismi, eli samat tunnistusmolekyylit pystyvät tunnistamaan useita erilaisia mikrobilajeja, hankittu immuunisysteemi puolestaan kehittyy jatkuvasti jokaisen kohtaamansa mikrobin myötä ja luo jokaiselle mikrobilajille omat spesifiset tunnistusmolekyylinsä, jotka reagoivat vain kyseistä mikrobia vastaan. Tämän ansiosta hankittu immuunisysteemi pystyy puolustautumaan hyvin laajaa uhkakirjoa, kuten monenlaisia mikrobeita ja erilaisia haitallisia yhdisteitä vastaan. Lisäksi hankittu immuunisysteemi pystyy ”muistamaan” tietyn mikrobin aiheuttaman edellisen infektion, minkä vuoksi seuraavalla kerralla immuunivaste on huomattavasti nopeampi ja tehokkaampi (Kuva 1). [1.]



Kuva 1. Immuunivaste samalle mikrobille on toisella infektioikerralla huomattavasti nopeampi ja tehokkaampi verrattuna ensimmäiseen kertaan.

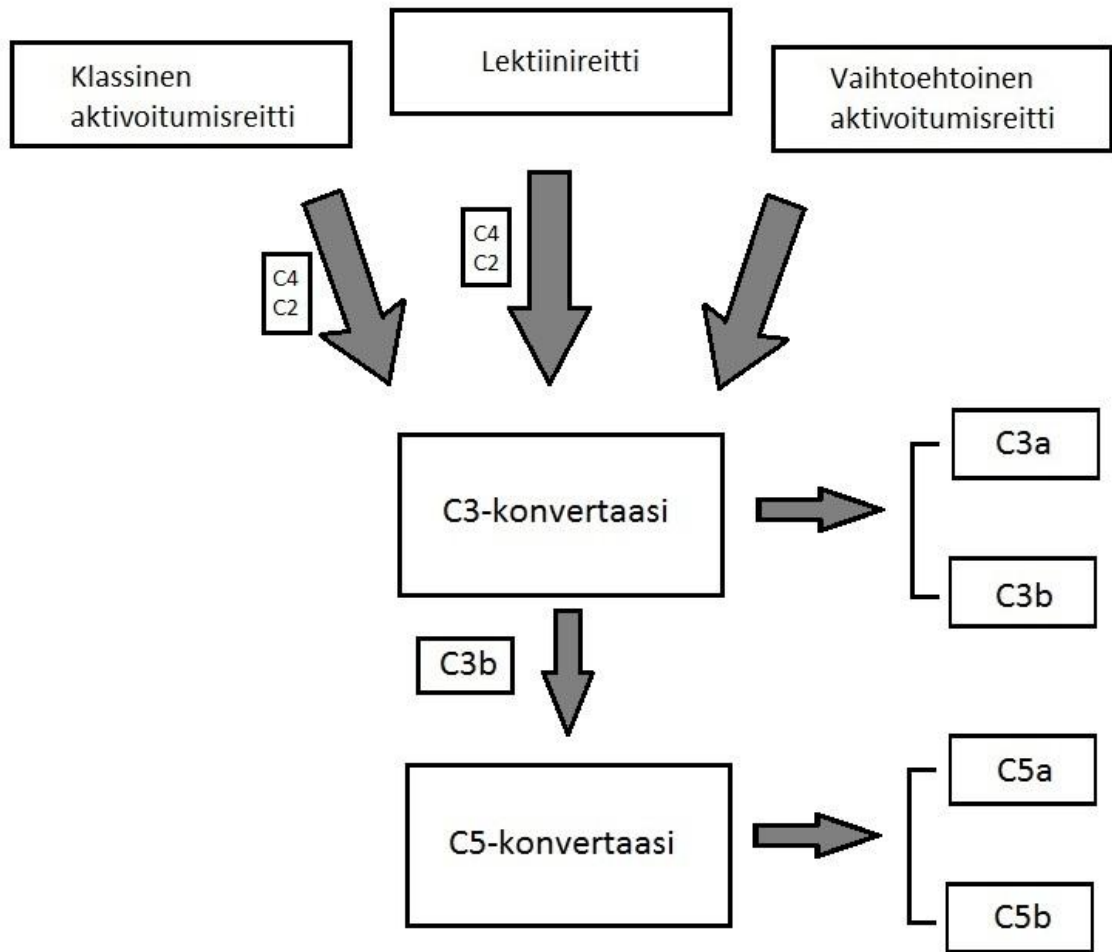
Hankittu immuniteetti voidaan jakaa kahteen eri osaan, humoraaliseen ja soluvälitteeseen immuniteettiin, sen perusteella, miten ja mitä kautta ne vaikuttavat immuunivasteeseen, mitkä immuunisysteemin komponentit niitä säätelevät ja minkä tyyppisiä mikrobeita vastaan ne ovat erikoituneet. Humoraali-immuniteetti muodostuu B-lymfosyyteistä (kutsutaan myös B-soluiksi), jotka tunnistavat pintarakenteidensa avulla mikrobien antigeenisia osia solujen pinnalta ja verestä, sekä B-solujen tuottamista vasta-aineista. Sitoutuessaan mikrobien antigeenisin kohtiin, vasta-aineet tekevät mikrobit vaarattomiksi merkkäämällä ne muiden immuunijärjestelmän osien tuhottavaksi. [1.]

Solvälitteinen immuniteetti puolestaan muodostuu T-lymfosyyteistä (T-solut), jotka tunnistavat solujen sisällä olevia mikrobeita, kuten viruksia ja bakteereita. T-solut voidaan jakaa alaryhmiin toimintansa perusteella: auttajasoluihin (Th), joilla on pinnallaan CD4 -molekyylejä ja tappajasoluihin (Tk), joilla on pinnallaan CD8 -molekyylejä. CD4- ja CD8-molekyylit osallistuvat antigeenien tunnistukseen yhdessä T-solureseptorin (TcR) kanssa, minkä vuoksi niillä on tärkeä merkitys T-solujen toiminnassa. CD4- ja CD8-molekyylit sitoutuvat antigeenejä T-solulle esitteleviin HLA -molekyyleihin ja auttavat lujittamaan TcR:n ja HLA -molekyylin välistä sidosta. [1; 2; 3.]

Auttajasolujen tehtävinä on nimensä mukaan avustaa infektion torjunnassa vaikuttamalla T- ja B-solujen aktivoitumiseen, kasvuun ja erikoistumiseen, sekä erittämällä sytokiineja. Lisäksi ne vaikuttavat myös B-solujen vasta-ainetuotantoon. Tappajasolut puolestaan tunnistavat ja tappavat infektoituneita soluja. Infektion aikana infektion aiheuttanutta mikrobia vastaan erikoistuneiden B- ja T-solujen määrä lisääntyy merkittävästi. Siten ne pystyvät toimimaan tehokkaasti kyseistä uhkaa vastaan. Infektion jälkeen suurin osa näistä soluista kuolee apoptoosin kautta, mutta jotkut soluista jäävät jäljelle muistisoluna. Muistisolujen ansiosta immuunisysteemi pystyy ”muistamaan” saman mikrobin ja toimimaan huomattavasti nopeammin seuraavalla infektiokerralla. [1.]

2.2 Komplementti

Komplementti on osa synnynnäistä immuunipuolustusta. Se muodostuu useiden kymmenien molekyylien joukosta (Taulukko 1) ja niiden muodostamista erilaisista komplekseista, jotka toimivat yhdessä mm. mikrobien tunnistuksessa ja torjunnassa (tuhoaminen ja opsonisaatio), tulehdusreaktion voimistamisessa, kehon puhdistamisessa kuolleista soluista, sekä komplementtisysteemin säätelyssä. Komplementtisysteemi aktivoituu kolmea eri reittiä pitkin, joista jokainen käynnistyy eri tavalla. Aktivoitumisreittejä ovat ns. klassinen reitti, lektiinireitti, sekä vaihtoehtoinen aktivoitumisreitti. Aktivoitumisreiteistä ensimmäisenä löydetty klassinen aktivoitumisreitti käynnistyy, kun komplementin proteiini (C1q) tunnistaa vasta-aineita, jotka ovat kiinnittyneet mikrobin tai jonkin muun rakenteen pintaan. Vaihtoehtoisesti myös jotkin tietyt molekyylit, kuten esimerkiksi C-reaktiivinen proteiini (CRP), voivat laukaista aktivoitumisreitit. Tunnistuksen jälkeen alkaa ketjureaktio, joka johtaa kaikille reiteille yhteiseen ”risteykseen”, eli C3-konvertaasin muodostumiseen (Kuva 2). [1; 4; 5; 6.]



Kuva 2. Komplementtisysteemin aktivoitumisreitit.

C3-konvertaasi muodostuu mikrobin tunnistuksesta liikkeelle lähtevän, useita vaiheita sisältävän ketjureaktion lopputuloksena, jossa C3-konvertaasin muodostumista edeltävässä välivaiheessa C4 molekyyli halkaistaan kahteen osaan C4a ja C4b -molekyyleiksi, joista C4b muodostaa C2:n kanssa kompleksin. Syntyneestä kompleksista lohkaistaan C2-molekyylistä pala pois (C2b), jolloin jäljelle jää C4b:n ja siinä kiinni olevan C2a:n muodostama kompleksi, jota kutsutaan C3-konvertaasiksi. C3-konvertaasi puolestaan halkaistaan kahteen osaan, jotka taas aktivoivat ja muodostavat uusia komplekseja. C3-reaktioketju johtaa C5-konvertaasin muodostumiseen ja lopulta mikrobin solukalvoa tuhoavan molekyylin (membrane attack complex; MAC) muodostumiseen. [1; 6.]

Taulukko 1. CNC:n (Complement Nomenclature Committee) laatima lista nimisuosituksista komplementtisysteemin eri osille. Vanhat nimitykset sulkujen sisällä. [7.]

Recommended Name	Comments	Recommended Name	Comments
Pathways		Proteins (cont.)	
CP	Classical pathway	MBL	Mannose binding lectin
AP	Alternative pathway	Ficolin-1	(M-Ficolin)
LP	Lectin pathway	Ficolin-2	(L-Ficolin)
TP	Terminal pathway	Ficolin-3	(H-Ficolin)
Proteins		MASP-1	MBL-associated serine protease 1
C1	Complex of C1q, 2C1r, 2C1s	MASP-2	MBL-associated serine protease 2
C1q		MASP-3	MBL-associated serine protease 3
C1r		FHL-1	Factor H-like protein 1
C1s		FHR-1	Factor H-related protein 1
C1-INH	C1 Inhibitor (C1 esterase inhibitor)	FHR-2	Factor H-related protein 2
C2		FHR-3	Factor H-related protein 3
C3		FHR-4	Factor H-related protein 4
C3(H ₂ O)	Thioester-hydrolyzed form of C3	FHR-5	Factor H-related protein 5
C3a	Anaphylatoxin from C3	CD59	(Protectin, Homologous restriction factor)
C3a-desArg	C3a without C-terminal Arginine	Cn	Clusterin (Apolipoprotein J, SP-40,40)
C3b		Protein complexes	
iC3b	Inactivated C3b	C5b6	Terminal pathway complex of C5b + C6
C3dg		C5b-7	Terminal pathway complex of C5b6 + C7
C3d		C5b-8	Terminal pathway complex of C5b-7 + C8
C4		C5b-9	Terminal pathway complete complex
C4a		sC5b-9	Soluble C5b-9 with Vn or Cn bound
C4a-desArg	C4a without C-terminal Arginine	C3bBb	AP C3 convertase
C4b		C3bBbP	AP C3 convertase with Properdin
C4d		C3bBbC3b	AP C3/C5 convertase
C4BP	C4b binding protein	C4BP-Protein S	C4BP bound to Protein S
C5		Receptors	
C5a	Anaphylatoxin from C5	CR1	CD35 (C3b/C4b Receptor)
C5a-desArg	C5a without C-terminal Arginine	CR2	CD21 (C3d Receptor)
C5b		CR3	CD11b/CD18 complex
C6		CR4	CD11c/CD18 complex
C7		C3aR	Requesting CD number
C8		C5aR1	CD88 (C5aR)
C9		C5aR2	(C5L2) Requesting CD number
Vn	Vitronectin (S protein, S40)	CRlg	Complement receptor of the Ig family
FB	Factor B	C1qR	C1q receptor
FD	Factor D	gC1qR	Recognizes globular C1q domains
FH	Factor H	cC1qR	Calreticulin, Recognizes collagen domain
FI	Factor I	LHR	Long homologous repeat [in CR1]

Aktivaatioketjureaktiossa komplementtisysteemin molekyylit siis toimivat reaktiopolussa seuraavien vaiheiden aktivaattoreina tai rakenneosasina komplekseissa. Reaktiopulun eri vaiheissa komplekseista halkaistaan osia pois, jolloin kompleksi muuttuu seuraavan vaiheen molekyyliksi ja halkaistu pienempi molekyylit toimii taas jossain muussa tehtävässä, kuten voimistamassa tulehdusreaktiota. [6.]

2.3 C4

Komplementin molekyyleistä lähes puolet toimivat systeemin säätelijöinä ja inhibito-reina. Systeemin säätelyn tarkoituksena on, ettei systeemi hyökkää omia soluja ja rakenteita vastaan, mutta pystyy silti toimimaan tehokkaasti omissa tehtävissään kehon puolustamiseksi ja puhtaana pitämiseksi. [8]

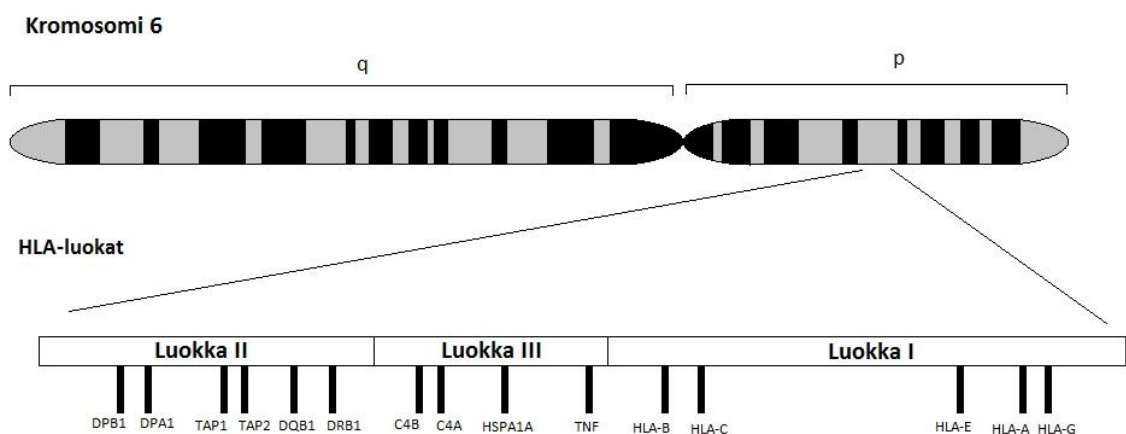
Mikäli johonkin komplementin toimintaa säätelevään tai sen toiminnan kannalta keskeisessä osassa olevaan osaan tulee häiriö tai se puuttuu kokonaan, tämä voi johtaa immuunisairauteen, jolloin immuunisysteemi ei toimi ollenkaan tai vain osittain, tai systeemi voi käydä omia soluja vastaan tuhoten omia kudoksia. Koska komplementtisysteemi toimii dynaamisena osana yhdessä synnynnäisen ja hankitun immunitietin osien kanssa, häiriöillä tai puutoksilla voi olla vakavia seurauksia koko immuunipuolustukselle. Klassisen reitin varhaisen vaiheen molekyylien (C1, C2, C4) puutokset johtavat autoimmuunitautien kehittymiseen ja infektiokerkkyyden lisääntymiseen. Esimerkiksi C4-puutoksiin yhdistettyjä tauteja ovat systeeminen lupus erythematosus (SLE), sarkoidoosi ja sepelvaltimotauti. [4; 8.]

3 HLA-järjestelmä

3.1 HLA-alue

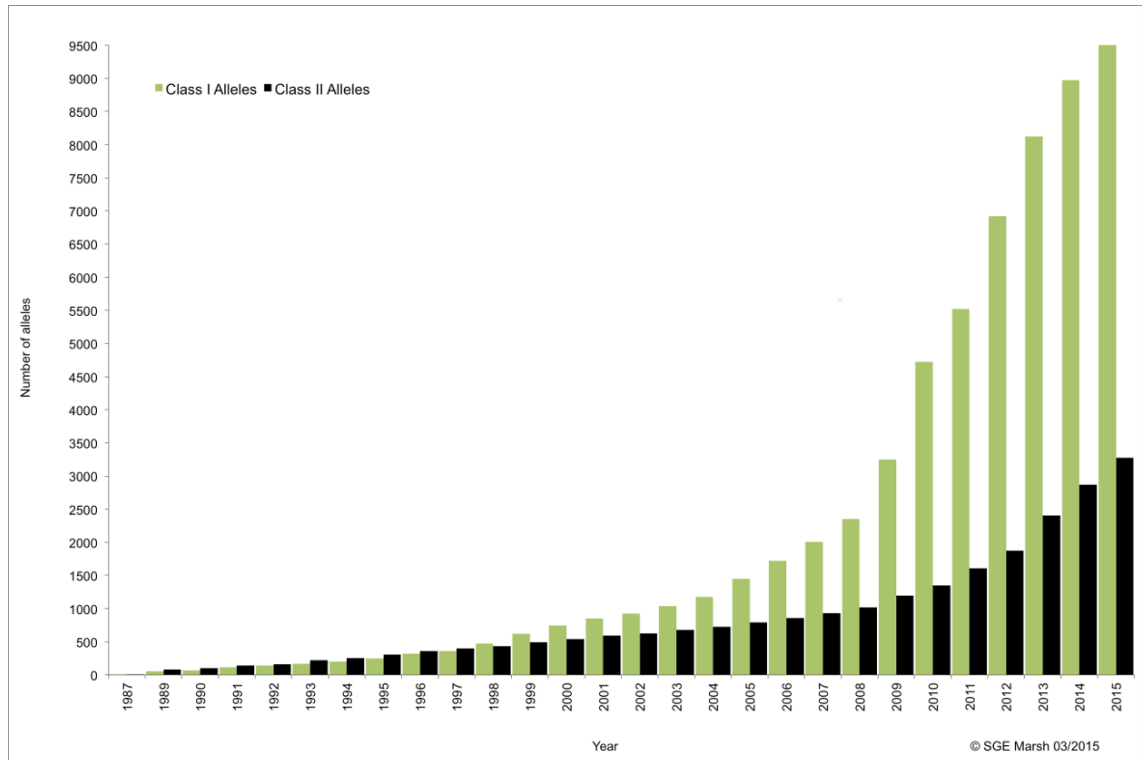
MHC eli Major Histocompatibility Complex on nimitys geenialueelle, joka liittyy kaikilla selkärangkaisilla keskeisesti immuunisysteemin toimintaan. Ihmisillä MHC-aluetta kutsutaan HLA-alueeksi (Human Leukocyte Antigen) ja se sijaitsee kromosomissa 6. HLA-alueella sijaitsee yli 200 geeniä, jotka koodaavat erilaisia immuunisysteemin toiminnan kannalta oleellisia molekyyliä. [9; 10,11.]

HLA-alue jaetaan kolmeen eri luokkaan (Kuva 3), joista luokat I ja II sisältävät HLA-molekyyliä koodaavia geenejä, kun taas luokassa III sijaitsee muita immuunivasteeseen ja solujen väliseen viestintään liittyviä geenejä, kuten komplementin C4-proteiineja koodaavia geenejä. [9; 10; 12.]



Kuva 3. Kromosomi 6 ja eri HLA-luokat.

HLA-alue on geneettisesti erittäin monimuotoinen ja eri HLA-geeneille tunnetaan tuhansia eri alleleita. Vuosien 1987-2015 välillä tunnettujen alleelien määrä on moninkertaistunut ja jatkuvasti löydetään uusia (Kuva 4). [13.]



Kuva 4. Löydettyjen HLA-alleelien määrän kehitys vuosien 1987-2015 välillä [13].

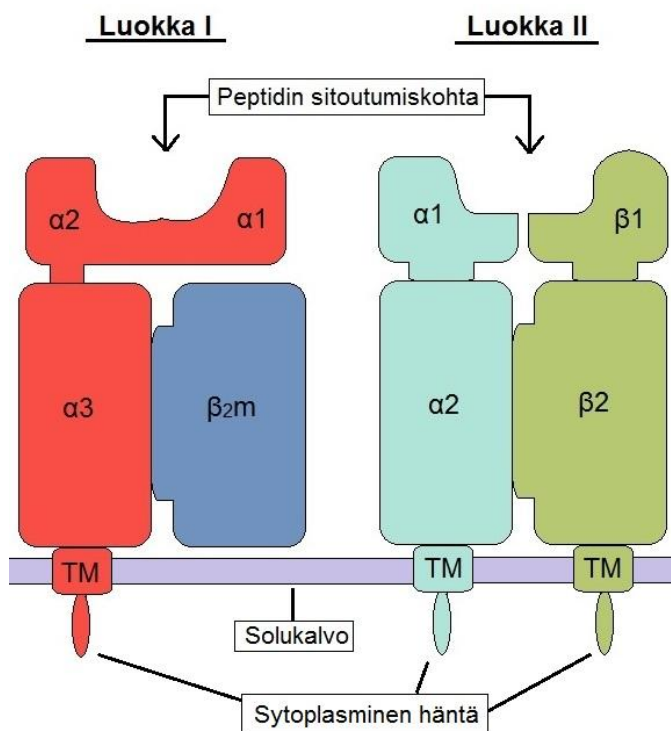
Uusien HLA-geenien valvonnasta vastuussa on WHO:n Nomenclature Committee for Factors of the HLA System, joka tarkistaa uusien alleelien sekvenssit ja hoitaa niiden nimeämisen [13].

3.2 HLA-molekyylit ja antigeenien esittely

HLA-molekyylit muodostuvat kahdesta polypeptidiketjusta, α -ketjusta ja β -ketjusta. Luokan I ja II HLA-molekyylit eroavat rakenteeltaan hieman toisistaan. Luokan I molekyylissä α -ketju muodostaa viisi aluetta: kaksi peptidinsitoutumiskohtaa ($\alpha 1$ ja $\alpha 2$) eli sitä osaa, mihin antigeeni sitoutuu, yksi immunoglobuliinin kaltainen alue ($\alpha 3$), joka toimii molekyylin ”runkona”, sekä transmembraanialue (eli TM, kiinnittää HLA-molekyylin solukalvoon) ja sytoplasminen häntä (Kuva 5). α -ketjun lisäksi luokan I molekyylissä on β -ketju (β_2m), joka toimii toisena ”runkomolekyylinä” $\alpha 3$:n vieressä. β -

ketjua koodaa kromosomissa 15 sijaitseva beta₂-mikroglobuliinigeeni. Luokan I HLA-geenejä on n. 20, joista HLA-A, B ja C eli ns. klassiset kudossopeutuvuusgeenit ovat tärkeässä osassa immuunisysteemissä ja niillä on huomattava määrä eri alleleita verrattuna muihin luokan I geeneihin. [10; 13].

Luokan II HLA-molekyylin molemmat ketjut puolestaan koodataan luokan II HLA-geenien toimesta. Molemmat ketjut muodostuvat neljästä alueesta (α -ketju: $\alpha 1$, $\alpha 2$, TM ja sytoplasmisen häntä; β -ketju: $\beta 1$, $\beta 2$, TM, ja sytoplasmisen häntä). Luokan II geenit nimetään sen mukaan, mihin luokkaan (D) ja geeniperheeseen (M, O, P, Q tai R) ne kuuluvat ja kumpaa HLA-molekyylin ketjua ne koodaavat (A = α -ketju ja B = β -ketju). Kirjainten jälkeen tulevilla numeroilla erotetaan yksittäiset geenit ja niiden eri variaatiot (alleelit) toisistaan. Esimerkiksi tässä työssä testattu *HLA-DRB1*15*-geeni koodaa luokan II HLA-molekyylin β -ketjua ja se kuuluu R-perheeseen, alleeliryhmään 15. [10; 14.]



Kuva 5. HLA-luokkien rakenteelliset erot yksinkertaistetussa muodossa.

HLA-molekyylit esittelevät T-soluille lyhyitä peptidipätkiä, jotka ovat peräisin solun omasta jätehuolto- ja kierrätysjärjestelmästä. Solussa loppuun kuluneet, lyhytikäiset ja vialliset proteiinit merkataan ubiquitiiniproteiinilla, jolloin ne kulkeutuvat proteasomiehien pilkkottaviksi lyhyiksi peptidipätkiksi. Ubiquitiini-proteasomi-systeemi pilkkoo jatkuvasti solun tuottamia proteiineja, jotka ovat käyneet tarpeettomiksi. Siten syntyy peptidipät-

kiä, joista osa päätyy takaisin kiertoon uusien proteiinien rakennusaineiksi, kun taas osa kulkeutuu HLA-molekyylien esiteltäviksi solun pinnalla. Myös vieraat, kuten esimerkiksi virusperäiset proteiinit pilkotaan ubikitiini-proteasomi -systeemin kautta. Siten infektoituneiden solujen sisällä olevien mikrobien antigeenit päätyvät myös HLA-molekyylien esittelemiksi solun pinnalle, josta T-solut voivat ne tunnistaa. [10; 15-19.]

3.3 HLA-alue ja autoimmuunisairaudet

HLA-geenialue on erittäin polymorfinen ja vastuussa sekä omien että vieraiden peptidien tunnistuksesta. Mahdolliset mutaatiot tai virheet HLA-alueen geneeissä tai niiden koodaamissa proteiineissa voivat johtaa siihen, että immuunisysteemi hyökkää omia soluja vastaan. Myös jotkin tietyt geenialleelit voivat altistaa sairauksille.

Tiedetään, että esimerkiksi *HLA-B*27* -alleeliryhmän tietyt alleelit vaikuttavat selkärangan kareuman syntyyn yhtenä osatekijänä (Taulukko 2). On esitetty, että *HLA-B*27* -alleelien koodaaman α -ketjun virheellinen laskostuminen luokan I HLA-molekyylin koamisvaiheessa saattaa olla sairauden synnyssä keskeisessä roolissa. Luokkaan II kuuluvan DRB1-geenin eri alleelien on havaittu liittyvän alttiuteen sairastua mm. sarkoidoosiin. [20; 21; 22; 23.]

1	B*27:02
2	B*27:03
3	B*27:04
4	B*27:05
5	B*27:07
6	B*27:08
7	B*27:10
8	B*27:14
9	B*27:15
10	B*27:19

Taulukko 2. HLA-B*27 –alleelit, jotka ovat esiintyneet selkärangan kareumatapauksissa. Alleelit 1-7 ovat esiintyneet riittävän monessa selkärangan kareumatapauksessa, jotta voidaan vetää yhteys niiden välille. Alleeleille 8-10 ei ole riittävästi tutkimustietoa, jotta voitaisiin sanoa niiden liittyvän sairauden syntyyn, mutta ainakaan ne eivät toimi suojaavina tekijöinä selkärangan kareumaa vastaan.

4 Laitteet ja metodit

4.1 PCR

Kun elävä solu valmistautuu jakautumaan, se tekee kopiot koko genomistaan, jotta tulevassa kloonissa on sama perintöainees, kuin alkuperäisessä. DNA:n kopiointi eli kahdentuminen solussa vaatii useita vaiheita, sekä erilaisia entsyymeitä, jotka avaavat DNA:n kaksoiskierteen ja tekevät kopion alkuperäisen DNA-juosteen mukaan. [24; 25.]

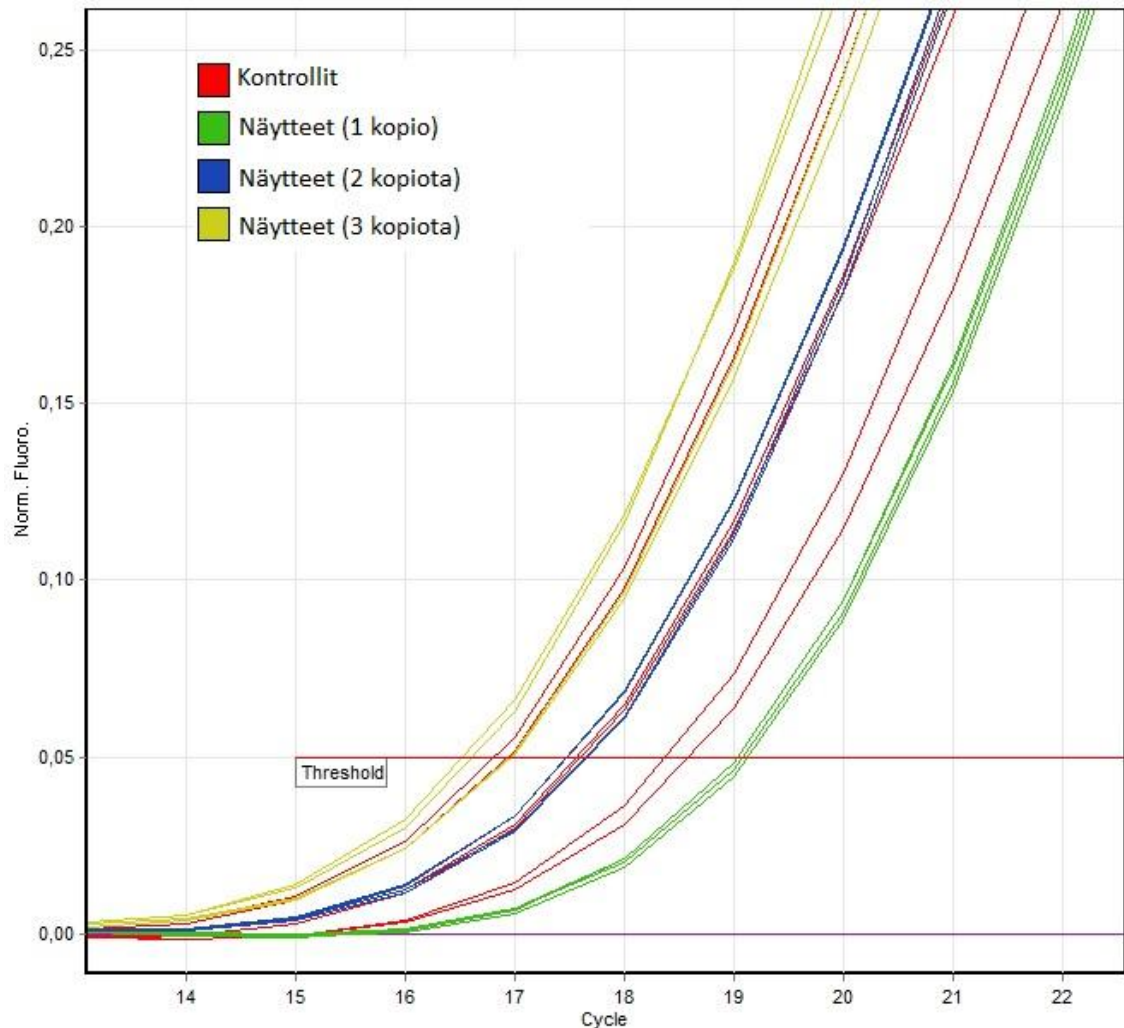
Jos DNA:ta halutaan monistaa ja tutkia solun ulkopuolella, solussa olevien samojen entsyymien ja reaktio-olosuhteiden käyttäminen olisi erittäin hankalaa ja työlästä. Sen vuoksi PCR-menetelmä (Polymerase Chain Reaction) ja sen sovellukset ovat korvaamattomia työkaluja nykyaikaisessa geenitutkimuksessa. PCR-menetelmä perustuu DNA-polymeraasientsyymiin, joka aikoinaan eristettiin kuumissa lähteissä elävästä *Thermus aquaticus* -bakteerista. Polymeraasientsyymi säilyy toimintakykyisenä korkeissakin lämpötiloissa, mikä mahdollistaa lämpötilan vaihteluun perustuvan DNA:n monistamisen alukkeiden avulla. Alkujaan PCR-reaktiot suoritettiin siirtämällä reaktioputki käsin lämpöhauteesta toiseen. Tämä oli paljon aikaa vievä prosessi, sillä syklejä tarvitaan 25-40 riittävän kopiolumäärän saavuttamiseksi. Tekniikan kehittyessä toimintoja on saatu automatisoitua ja uusia tehokkaampia polymeerasientsyymejä kehitettyä. Niiden myötä PCR-ajoon saattaa kulu enää 1-3 tuntia, riippuen monistettavan geenin koosta ja käytettävästä entsyymistä. Myös reaktioiden spesifisyys on parantunut huomattavasti parempien alukkeiden ja tarkempien laitteiden ansiosta. [26.]

Nykyään perinteisen PCR:n rinnalle on tullut monia erilaisia PCR-tekniikkaan perustuvia sovelluksia. Näitä ovat mm. Sagner-sekvensointi, Real-Time PCR, sekä uusimpana Next-Generation (NG) -sekvensointi. Näissä DNA:ta monistetaan edelleen PCR-menetelmällä, mutta sovelluksesta riippuen saadaan eri määrä tietoa tutkittavasta geenistä tai geneistä. Sagner- ja NG-sekvensoinneissa saadaan monistettavan geenin tai geenien nukleotidijärjestys selville, kun taas qPCR:llä, samoin kuin tavallisella PCR:llä, tulos on joko positiivinen tai negatiivinen jonkin geenin suhteen.

4.2 qPCR

Kvantitatiivinen PCR eli qPCR (myös Real-Time PCR) on tavallisesta PCR:stä kehitetty sovellutus, jossa fluoresoivan merkkiaineen avulla saadaan ”reaaliajassa” tietoa monistettavan geenin kopiolumäärästä (Kuva 6). PCR-tuotteen monistumista voidaan seu-

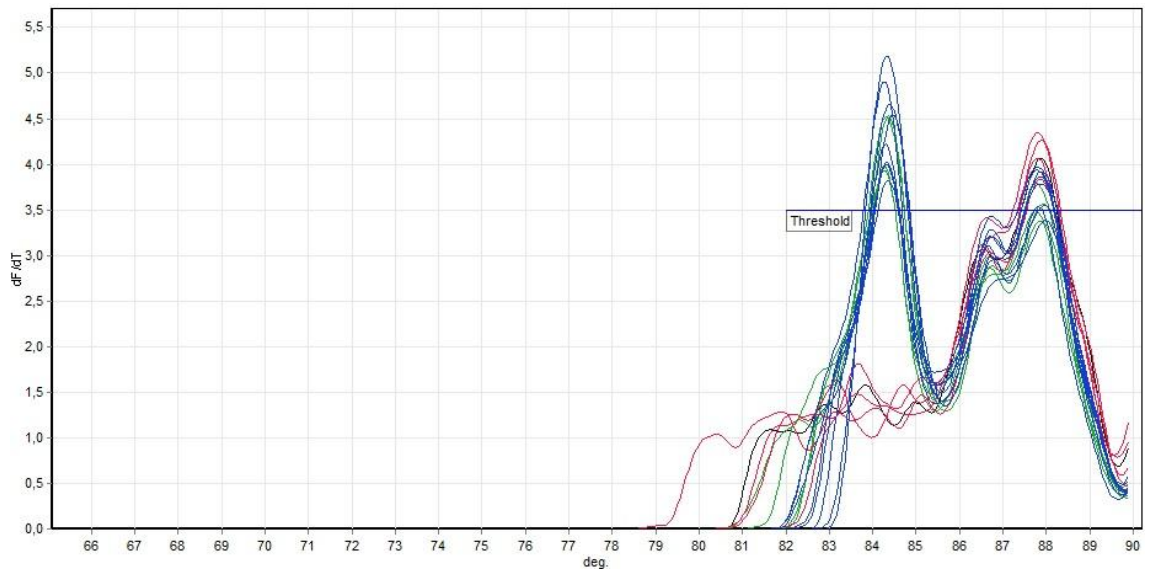
rata tietokoneen ruudulta, kun jokaisen syklin jälkeen laite mittaa näytteen fluoresenssin ja muuttaa saadun tuloksen lukuarvoksi. Saaduista lukuarvoista laite piirtää kuvan. [27.]



Kuva 6. Tässä on tutkittu, montako eri C4B-geeniä missäkin näytteessä on. Mukana ovat kontrollinäytteet eri kopyolukumäärille (0,1,2 ja 3 kopiota). Laitteena on käytetty Corbett Researchin Rotor-Gene 3000 qPCR-laitetta.

qPCR-menetelmällä voidaan laitteesta riippuen tutkia suuriakin määriä näytteitä kerralla. Menetelmän etuja ovat nopeus ja melko vähäinen työmäärä verrattuna tavalliseen PCR:ään. qPCR:ssä ei tarvitse ajaa näytteitä agarosigeelillä PCR-ajon jälkeen, vaan tulokset näkee saman tien ajon päätyttyä. qPCR:llä saatu data analysoidaan laitteen mukana tulleella ohjelmalla. Esimerkiksi Rotor-Gene 6000 -ohjelma (Corbett Research) toimii sekä laitteen ohjainohjelmistona, että datan analysointiohjelmalla. [27.]

Tulosten tulkinnassa voidaan käyttää apuna sulamispisteanalyysiä (melt). Tarvittaessa se voidaan lisätä ajon lopuksi, jolloin PCR-tuotetta kuumennetaan ja tuotteen sulaessa (DNA-juosteet erkanevat toisistaan) SYBR Green vapautuu ja fluoresenssin intensiteetti vähenee. PCR-tuotteen sulamispiste riippuu DNA-juosteen koosta ja koostumuksesta, jolloin väärät positiiviset voidaan erottaa oikeista positiivisista, mikäli niiden kokoero on riittävä (Kuva 7). [27.]



Kuva 7. Melt-käyrä HLA-B*35 geeniajosta. Kuvasta näkee hyvin, miten kaikki näytteet tuottavat kaksi vierekkäistä piikkiä 86-88°C välillä, kun taas positiiviset näytteet tuottavat tämän lisäksi n. 84,5°C kohdalla kolmannen piikin, jonka avulla voidaan erottaa positiiviset ja negatiiviset toisistaan. Tässä tapauksessa positiiviset ja negatiiviset näytteet nousevat lähelle toisiaan qPCR-ajossa, minkä vuoksi sulamispisteanalyysi on mukana.

qPCR-ajoon tarvitaan sopivaan konsentraatioon laimennetut näytteet, sekä jokaiselle tutkittavalle geenille oma reaktiomiksinä, joka sisältää alukkeet kumpaankin suuntaan (molemmille DNA-juosteille oma alukkeensa), sekä master mixin, joka sisältää tarvittavat nukleotidit (dNTP, DNA:n rakennuspalikat), polymeerasientsyymiin, fluoresoivan väriaineen ja reaktiopuskurin, sekä magnesiumkloridia magnesiumionien (Mg^{2+}) lähteeksi. qPCR-ajoon jokaiselle näytteelle tarvitaan oma putki jokaista tutkittavaa geeniä kohti. Jokaiseen reaktioputkeen lisätään näyte sekä reaktiomix, jonka jälkeen qPCR-ajo käynnistetään ja näytteet ajetaan tietyn protokollan mukaan. Ajoprotokolla riippuu useista tekijöistä, kuten tutkittavasta geenistä, käytössä olevasta laitteesta ja polymeerasientsyymistä. [27.]

4.3 Rotor-Gene 3000 ja 6000

Tämän työn tekemiseen käytettiin Corbett Researchin Rotor-Gene 3000 qPCR-laitetta. Laitteella tehdyt qPCR-ajot toimivat myös uudemmalla mallilla (Rotor-Gene 6000) ilman muokkauksia ja molempien laitteiden ajotiedostoja voidaan lukea samalla ohjelmalla. Lisäksi molempien laitteiden roottorit ovat yhteensopivia toistensa kanssa. Käytännössä kaikki vanhemmalle 3000-mallille suunnitellut ajot toimivat suoraan myös uudemmalla 6000-mallilla. Ainoa ero on laitteiden ulkonäössä ja koossa, minkä lisäksi vanhempi malli käyttää omaa vanhempaa hallintaohjelmaansa laitteen pyörittämiseen.



Kuva 8. Roottori 72 koeputkelle.

Molempiin laitteisiin on saatavilla keskenään yhteensopivia vaihtoroottoreita eri näyttemäärille. Vaihtoehtoja löytyy 32 näytteen koeputkiroottorista 100 näytteen kiekaille tarkoitettuun roottoriin asti. Rotor-Gene 3000 –laitteessa käytettiin testauksiin 72 koeputkelle tarkoitettua roottoria (Kuva 8), jossa koeputkien reaktiutilavuus oli 10 μ l.

5 PCR-reaktiomix

5.1 qPCR master mix

Tällä hetkellä markkinoilta löytyy useita eri valmistajia, jotka tarjoavat lukuisia eri master mix -vaihtoehtoja erityyppisille qPCR-laitteille joko polymeraasientsyymillä tai ilman. Master mixien peruskomponentit ovat kaikissa pääosin samat, mutta pieniä eroja löytyy mm. niiden pitoisuuksissa ja koostumuksessa, jotka voivat olla reaktion toimivuuden

kannalta merkittäviä. Mixit ovat konsentroituja (esim. 2 x liuoksia), jotka laimentuvat 1 x liuoksiksi lopullisessa reaktiilavuudessa, johon on lisätty templaatti, alukkeet ja vettä.

5.1.1 Polymeraasientsyymi

Useimmista master mixeistä löytyvä polymeraasientsyymi pohjautuu *Thermus aquaticus* -bakteerista peräisin olevaan polymeraasientsyymiin (Taq). Eri yritykset ovat voineet kehittää omia verisoitaan Taq-entsyymistä, minkä vuoksi mixien välillä voi olla pieniä eroja, jotka vaikuttavat PCR-reaktion nopeuteen ja lopputulokseen.

qPCR-reaktioissa käytettävät polymeraasientsyymit ovat yleensä ns. hot start -versioita, jotka vaativat inkuboinnin kuumassa (n. 95 °C) aktivoituakseen. Niissä polymeraasientsyymien toiminta on estetty joko vasta-aineiden avulla tai kemiallisesti, minkä vuoksi ne eivät toimi huoneenlämmössä. Esto poistetaan PCR-reaktion alussa kuumentamalla, jolloin polymeraasientsyymien toiminnan estävä molekyyli irtoaa. Samalla myös kaksijuosteinen DNA denaturoituu ja juosteet irtoavat toisistaan, jotta alukkeet ja entsyymi pääsevät toimimaan. Hot start -mekanismi tekee PCR-reaktiosta spesifisemmän, kun entsyymi ei pääse toimimaan pipetoinnin aikana ja muodostamaan epäspesifisiä tuotteita reaktioputkessa. [26; 28; 29; 30.]

5.1.2 Magnesium (Mg^{2+})

Magnesiumin määrä kaupallisissa mixeissä on yleensä ”optimoitu” valmiiksi, useimmiten välille 1,5-5 mM. Magnesiumionien määrällä on merkittävä vaikutus PCR-reaktiossa, sillä ne vaikuttavat alukkeiden liittymiseen DNA:han. Liian suuri määrä magnesiumia voi johtaa alukkeiden epäspesifiseen sitoutumiseen ja liian vähäinen määrä taas voi johtaa liian vähäiseen saantoon. [26; 30.]

5.1.3 Muut komponentit

Puskuriliuos, nukleotidit ja fluoresoiva väriaine muodostavat master mixin loppuosan. Puskuriliuos koostuu tyypillisesti Tris-HCl ja KCl, joiden pitoisuudet vaihtelevat hieman valmistajasta riippuen. Näiden lisäksi puskuriliuoksessa saattaa olla muitakin komponentteja, riippuen siitä, minkä polymeraasientsyymien kanssa ne on tarkoitettu käytettäväksi. [26; 31.]

Master mixeissä käytettävistä fluoresoivista väriaineista SYBR Green on tällä hetkellä yksi suosituimmista, johtuen sen ominaisuudesta sitoutua vain kaksijuosteiseen DNA:han ja ollessaan aktiivinen vain sitoutuneena. Se ei siis fluoresoi vapaana ollessaan. Tämän vuoksi sitä voidaan käyttää monistetun DNA:n havaitsemiseen sekä tavallisessa että qPCR:ssä. Lisäksi SYBR Green on käyttäjälleen turvallinen, eikä sen käsittely vaadi erityistoimenpiteitä.

5.2 Alukkeet

PCR-reaktiossa tarvitaan master mixin lisäksi spesifiset alukkeet, jotka sitoutuvat vain monistettavaan geeniin. PCR-reaktiossa alukkeet kiinnittyvät templaatti-DNA:han, jonka jälkeen polymeerasientsyymi kiinnittyy alukkeisiin ja lähtee liittämään nukleotideja peräjälkeen kyseisen geenin sekvenssin mukaan. Mikäli alukkeet eivät ole optimaaliset tai tutkittava geenialue on erittäin hankala sen polymorfisuuden vuoksi (esim. HLA-geenialue, yli 9500 eri alleelia luokan I HLA-geeneissä), PCR:ssä voidaan saada epäspesifisiä tuotteita. Epäspesifisyyttä voidaan vähentää optimoimalla ajolämpötilaa ja -aikaa alukkeille sopivimmiksi. [13; 26; 30.]

5.3 Templaatti-DNA

Templaatti-DNA on eristetty tutkittavan kohteen soluista, kuten esimerkiksi ihmisellä veren valkosoluista tai posken epiteelisoluista. Templaatti-DNA:n tulee olla eristyksen jälkeen riittävän puhdasta, sillä erilaiset epäpuhtaudet, kuten proteiinijäämät, inhiboivat PCR-reaktiota. Lisäksi DNA:n konsentraation tulee olla riittävän korkea, jotta PCR-ajo onnistuu. DNA:n konsentraatio voidaan tarkistaa spektrofotometrisesti DNA:n absorptioaallonpituudella 260nm ja puhtaus voidaan arvioida suhteiden A_{260}/A_{280} ja A_{230}/A_{260} avulla (proteiinit absorboivat alueella 280nm, kun taas muut epäpuhtaudet voidaan todeta 230nm alueella). DNA:n voidaan katsoa olevan riittävän puhdasta, jos absorptiosuhteen suhde on lähellä arvoa 1,8. [32; 33.]

6 Mixien testaus

6.1 Testattavat master mixit

qPCR:ään sopivia mixejä etsittiin eri valmistajilta ja lopulta valittiin 4 ehdokasta testejä varten. Mixeistä tilattiin kokeilupakkaukset, joista 3 ehti saapua ajoissa testausta varten. Neljännen valmistajan miksi saapui kesken testausten ja siitä tehtiin yksi testiajo, mutta sen testausta ei jatkettu sen pidemmälle.

Ennen varsinaisten ajojen tekemistä, perehdyttiin jokaisen mixin ominaisuuksiin ja valmistajien antamiin PCR-protokolliin. Niistä kävi ilmi, että kahta mixiä, PerfeCTaa ja Brilliant III:a voitiin käyttää lyhyempään ja nopeampaan PCR-protokollaan, kuin kolmatta vaihtoehtoa (FastStart SYBR Green). PerfeCTa ja Brilliant III soveltuivat valmistajan mukaan kaksivaiheiseen qPCR-ajoon, jossa annealing ja extension -vaiheet ovat samassa lämpötilassa. Tämän vuoksi näille kahdelle mixille päätettiin suunnitella kokonaan oma protokolla, jossa on yksi vaihe vähemmän ja siten ajoaika lyhyempi. FastStartille valmistaja oli antanut vain kolmivaiheisen ajoprotokollan, minkä vuoksi se testattiin erikseen vanhan mixin ajojen protokollalla.

6.2 Kontrollinäytteet

Testien kontrolleina käytettiin ennestään potilasajoissa käytettyjä kontrolleita, minkä lisäksi valittiin mukaan aikaisemmin genotyyhitettyjä potilasnäytteitä. Kontrollien ja potilasnäytteiden puhtaus ja laatu tarkistettiin ennen testejä spektrofotometrisesti Nano-Drop 1000 -laitteella, sekä tekemällä β -aktiinimääritys qPCR:llä laboratorion ohjeen mukaisesti. β -aktiinigeeni on ylläpitogeeni, joka löytyy ihmisen kaikista soluista ja jonka avulla voidaan määrittää tunnettujen standardien avulla kontrollien ja näytteiden DNA-pitoisuus ja vertailukelpoisuus. β -aktiinimäärityksessä kontrollinäytteestä tehdään standardit (8, 10 ja 14 ng/ μ l) ja näytteet laimennetaan konsentraatioon 10 ng/ μ l, jonka jälkeen niistä tehdään qPCR-ajo, käyttäen β -aktiinigeenille spesifisiä alukkeita. Ajon jälkeen vertaamalla näytteitä standardeihin nähdään, onko jokin näytteistä huonompi kuin muut (näyte on alempana kuin muut eli vaatii enemmän monistussyklejä) tai onko josakin enemmän DNA:ta (näyte nousee ajossa muita enemmän eli vaatii vähemmän monistussyklejä).

Lisäkontrollinäytteet ja niiden kopiolumäärät eri geenien suhteen							
	H300B	H300C	H060	H094	H097	H061A	H061B
Näyte no.	C4B	C4ins	B*27	DR*04	DR*15	B*35	B*35
TX-4089	2	0	0	0	2	0	
TX-4225	1	0	0	0	2	0	
TX-4273	0	0	2	0	0	0	
TX-4346	3	0					
TX-4377	1	0	0	0	0	2	2
TX-4500	2	0	0	1	1	1	1
TX-4501	3	0	0	0	0	0	
TX-4516			2	1	0	0	
TX-4523	1	1	0	0	0		
TX-4625			1	2	0	0	
TX-4632	0	0	0	0	0	2	2
TX-4703	0	0	0	0	0	1	1
TX-4705	2	1	0	0	0	0	1
TX-4746	2	0	0	2	0	0	
TX-4843			1	1	1	0	0
Potilasajojen kontrollit							
TX-3281	1	0	1	1	0	1	1
TX-3201	2	0	0	2	0	0	0
TX-1625	1	0	2	0	0	0	0
TX-2415	2	0	0	0	2	0	0
TX-3752	2	1					
TX-3800			0	0	0	2	2
TX-3506/2	3	0	0	0	1	0	0
TX-2248	0	0	0	0	0	0	0
TX-2534		2					

Taulukko 3. Kontrolleina käytetyt näytteet ja niiden kopiolumäärät. Värilliset kohdat ilmaisevat, mitä näytettä voidaan käyttää missäkin geenitestissä. Pystysarakkeet kertovat, mistä geenitestistä on kyse ja vaakarivit puolestaan sen, montako kopiota kyseistä geeniä on missäkin näytteessä.

Potilasnäytteet valittiin uudemmassa päästä, jolloin DNA-materiaali oli mahdollisimman tuoretta. Vanhoissa näytteissä DNA voi olla hajonnutta, jolloin se ei toimi yhtä hyvin kuin tuoremmat näytteet. Jokaiseen geenitutkimukseen valittiin kontrolleiksi negatiivisia näytteitä, sekä positiivisia näytteitä eri kopiolumäärillä (Taulukko 3). Kaikkia taulukossa olevia näytteitä ei välttämättä käytetty kaikissa niissä testeissä, mihin ne on merkitty taulukossa, vaan osa näytteistä otettiin varalle, mikäli tutkitut eivät ole laadultaan tyydyttäviä. Laadun tarkistamiseksi kaikista näytteistä tehtiin β -aktiiniajo qPCR:llä.

6.3 Sopivien ajo-olosuhteiden etsiminen C4B-geenitestiin

Testeissä pyrittiin löytämään kaikille geenitutkimuksille ne olosuhteet, jossa kaikki testit toimivat riittävän hyvin. Testeillä piti pystyä erottamaan negatiiviset ja positiiviset toisistaan, minkä lisäksi positiiviset näytteet piti pystyä erottelemaan kopiokääränsä perusteella heterotsygoottisiin (1 geeni) ja homotsygoottisiin (2 geeniä) tai duplikaatioihin (3-4 geeniä). qPCR-ajoa suunniteltaessa, täytyi ottaa huomioon mixien ominaisuuksien lisäksi ajon eri vaiheiden vaikutus lopputulokseen, eli mitä aikoja ja lämpötiloja voi muuttaa ilman, että sillä on merkittävää negatiivista vaikutusta lopputulokseen. Ajojen suunnittelussa lähdettiin liikkeelle vanhalla mixillä tehtyjen ajojen protokollista. Ensiksi testattiin mixejä C4B-geenitutkimuksen suhteen. Pohjana käytettiin kyseisen geenitestiin qPCR-protokollaa, jota muokattiin tarpeen mukaan. Poikkeuksena FastStart SYBR Green Master, jota testattiin suoraan vanhoilla ajo-olosuhteilla (Taulukko 4). qPCR-ajot tehtiin laboratorion omien ohjeiden mukaan (Liite 1).

Vanha qPCR-ajo muodostui kahdesta eri vaiheesta. Ensimmäisen vaiheen aikana lämpötila nostettiin $+95^{\circ}\text{C}$ ja pidettiin siellä 10min ajan. Tämä aktivoi polymeerasientsyymiä (ns. hot-start) ja denaturoi DNA:n, jolloin kaksoisjuosteet erkanivat toisistaan. Tämä vaihe oli kaikissa ajoissa sama mixistä riippumatta. Toinen vaihe muodosti varsinaisen PCR-syklin, jossa DNA:n monistus tapahtui. FastStart ja vanha master mix tarvitsivat tämän vaiheen kolmiportaisena. Ensimmäinen askel ($+95^{\circ}\text{C}$, 15sek) denaturoi DNA:n. Seuraava askel ($+57^{\circ}\text{C}$, 45sek) eli annealing-vaihe, jossa lämpötilaa laskettiin riittävästi, jotta alukkeet sitoutuivat aukinaiseen kaksoisjuosteeseen omille paikoilleen. Kolmannessa ja viimeisessä askeleessa ($+72^{\circ}\text{C}$, 45sek) eli extension-vaiheessa polymeerasientsyymi rakensi uuden juosteen alkuperäisen rinnalle alukkeiden väliselle matkalle. Tämän jälkeen sykli alkoi alusta ja tätä toistettiin 30 kertaa.

FastStart SYBR Green Master		
Tutkimus:	H300B	
T(°C)		1
95		10min
30 cycles		
95		15s
57		45s
72		45s

Taulukko 4. FastStart SYBR Green Master ja C4B-geenin testaus. Ensimmäinen 10min 95°C aktivoi polymeerasientsyymiä ja denaturoi DNA:n, jolloin kaksoisjuosteet erkane-

vat toisistaan. Seuraavat kolme eri lämpötilaa ja aikaa muodostavat PCR-syklin, jota toistetaan 30 kertaa.

FastStart master mixillä testattiin kaikki geenitestit läpi käyttäen vanhan mixin protokollia, jonka jälkeen testaus keskeytettiin, johtuen muiden mixien nopeudesta. Vaikka FastStartilla tulokset olivatkin lupaavia, muut mixit olivat yhtä hyviä ehdokkaita, minkä lisäksi ne olivat myös nopeampia. Ajan ja rahan säästämiseksi keskityttiin kahden nopeamman mixin testaukseen ja optimointiin.

Brilliant III ja Perfecta testattiin C4B-geenitestillä, mutta muokatulla ajoprotokollalla. qPCR-ajojen ensimmäinen vaihe (denaturaatio) pidettiin samana, samoin kuin PCR-syklin ensimmäinen askel (15sek +95°C). Nämä olivat vaiheita, joilla ei ollut merkitystä testauksen kannalta. Sen sijaan annealing ja extension -vaiheet yhdistettiin, jolloin jätettiin viimeisen askeleen erillinen extension-vaihe pois. Yhdistettyä annealing/extension -vaihetta testattiin neljällä eri ajalla (Taulukko 5). Kokeet 1, 2 ja 3 tehtiin ensin, jonka jälkeen haluttiin tehdä testi vielä lyhyemmällä ajalla, jolloin tehtiin vielä koe 4.

Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix					
Tutkimus:	H300B				
T(°C)		1	2	3	4
95		10min	10min	10min	10min
30 cycles					
95		15s	15s	15s	15s
57		60s	45s	30s	20s
PerfeCta SYBR Green FastMix					
Tutkimus:	H300B				
T(°C)		1	2	3	4
95		10min	10min	10min	10min
30 cycles					
95		15s	15s	15s	15s
57		60s	45s	30s	20s

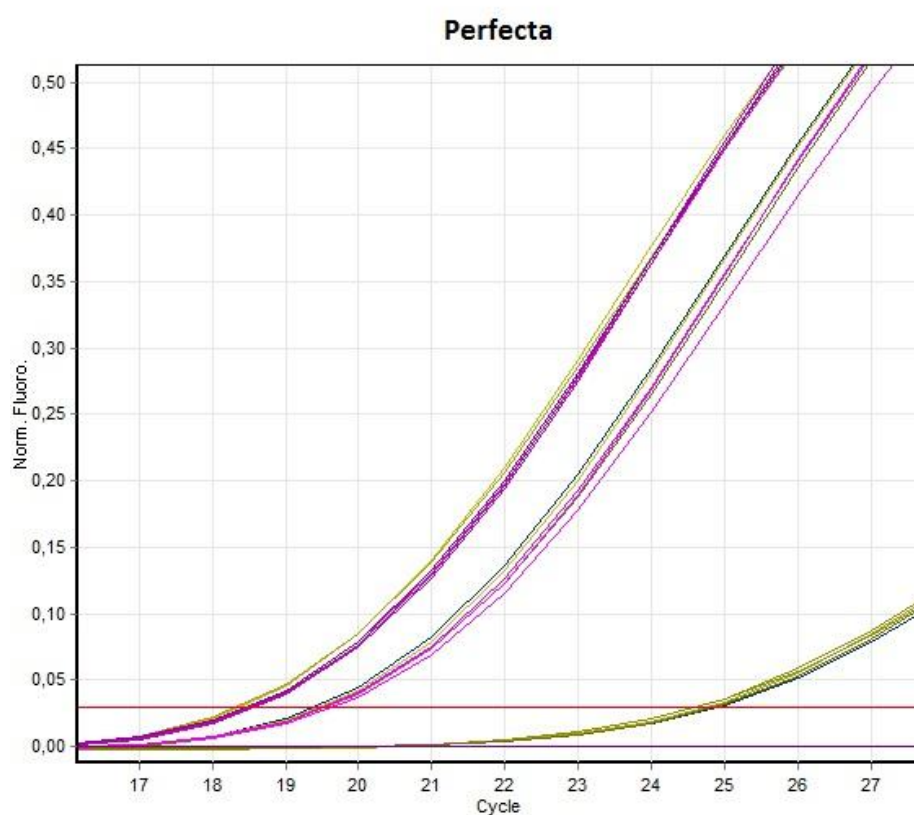
Taulukko 5. Perfectan ja Brilliant III:n koesuunnitelma. Punaisella merkityssä viimeisessä vaiheessa (57°C) testattiin ajan vaikutusta lopputulokseen.

Ensimmäisten testien jälkeen todettiin, että Perfecta toimi melko hyvin kaikissa testatuissa olosuhteissa, kun taas Brilliant III toimi parhaiten annealing/extension -ajan ol-

lessa lyhyempi. Brilliant III:n ongelmana oli pitemmillä ajoilla negatiivisten kontrollien nouseminen.

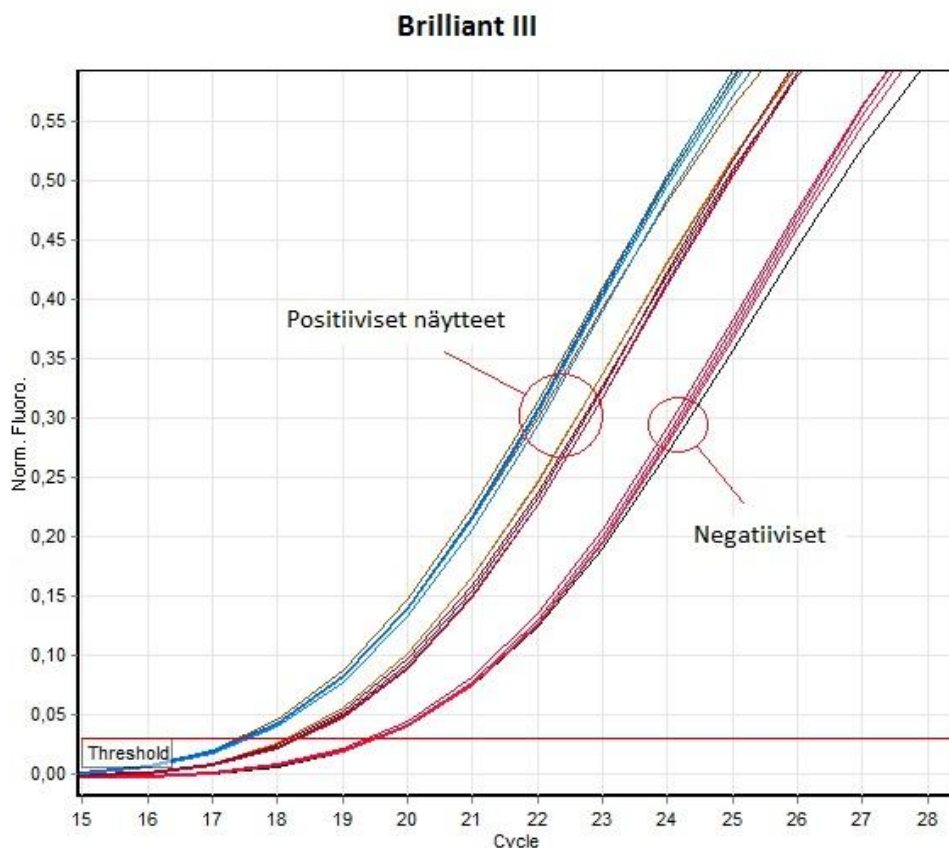
6.4 Mixien toimivuuden testaus eri geenitutkimuksissa

Ensimmäisten testien perusteella lähdettiin testaamaan mixejä muillakin tutkimuksilla. Ensin testattiin HLA-DRB1*15 -geeni. Testit tehtiin sekä Perfectalle että Brilliant III:lle edellisen testauksen (Taulukko 5) toiseksi nopeimmalla kokeella (koe 3), jossa viimeinen aika on 30sek.



Kuva 9. HLA-DRB1*15 Perfectalla tehtynä. Negatiiviset näytteet nousevat vain hieman, kun taas positiiviset nousevat selkeästi.

Mixeistä Perfecta toimi näissä olosuhteissa paremmin (Kuva 9). Positiivisten näytteiden välille jää selkeä ero (n. 1 syklin verran) ja eri geenilukumäärät pystytään erottamaan toisistaan. Negatiiviset näytteet nousevat hieman, mutta eivät häiritsevästi.



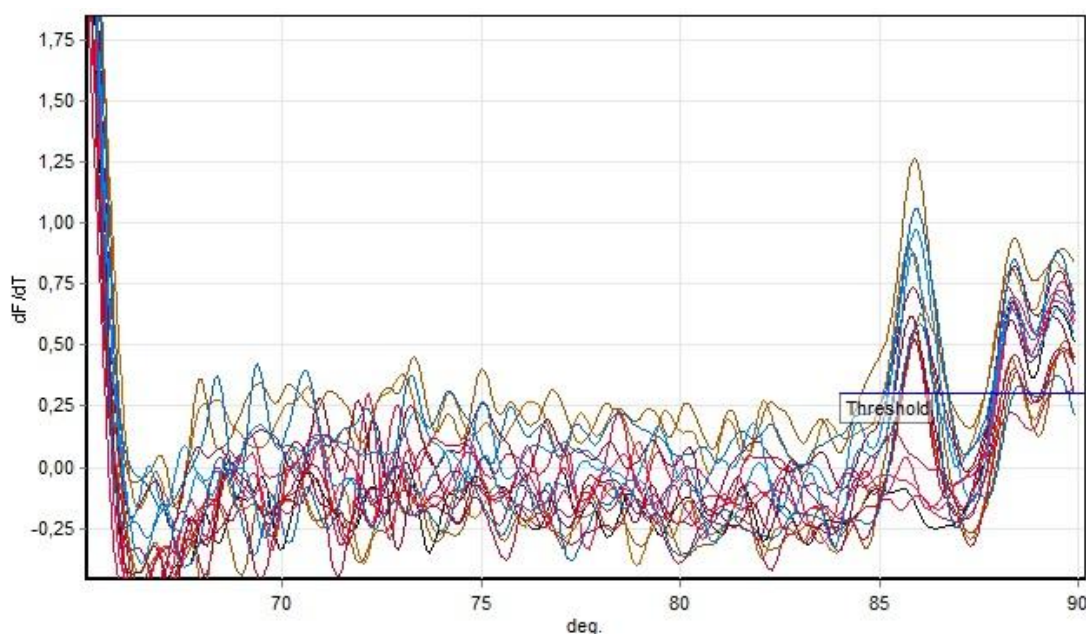
Kuva 10. Brilliant III:lla positiiviset ja negatiiviset näytteet nousivat molemmat.

Brilliant III puolestaan ei toiminut aivan toivotulla tavalla, sillä negatiiviset näytteet nousivat reippaasti lähelle positiivisia näytteitä (Kuva 10). Koska ensimmäisessä testissä (Taulukko 5) havaittiin, että Brilliant III antaa paremman tuloksen lyhyillä annealing/extension –ajoilla, päätettiin seuraavaan testiin lyhentää aikaa entisestään. Brilliant III:lle tehtiin uusi ajo 15sek annealing/extension –ajalla. Tuloksena negatiiviset nousivat edelleen, mutta eivät aivan yhtä korkealle kuin edellisessä testissä. Ajolla pysyttiin erottamaan negatiiviset ja positiiviset toisistaan. Lisäksi positiivisten heterotsygoottien ja homotsygoottien välillä oli riittävä ero niiden erottamiseksi toisistaan. Tuloksen ollessa ”riittävän hyvä”, päätettiin jatkaa testien tekoa Brilliant III:lla samoissa olosuhteissa.

Seuraavaksi tehtiin testit Brilliant III:lla HLA-B*27 geenille ja HLA-DRB1*04 geenille samassa ajossa (15sek annealing/extension -aika) ajan säästämiseksi. Lisäksi samoja olosuhteita käytettiin tämän jälkeen, kun tehtiin testaus HLA-B*35 –geenille. Geenin määrittämiselle on kaksi eri testiä (menetelmien tunnukset H061A ja H061B). Aina tutkit-

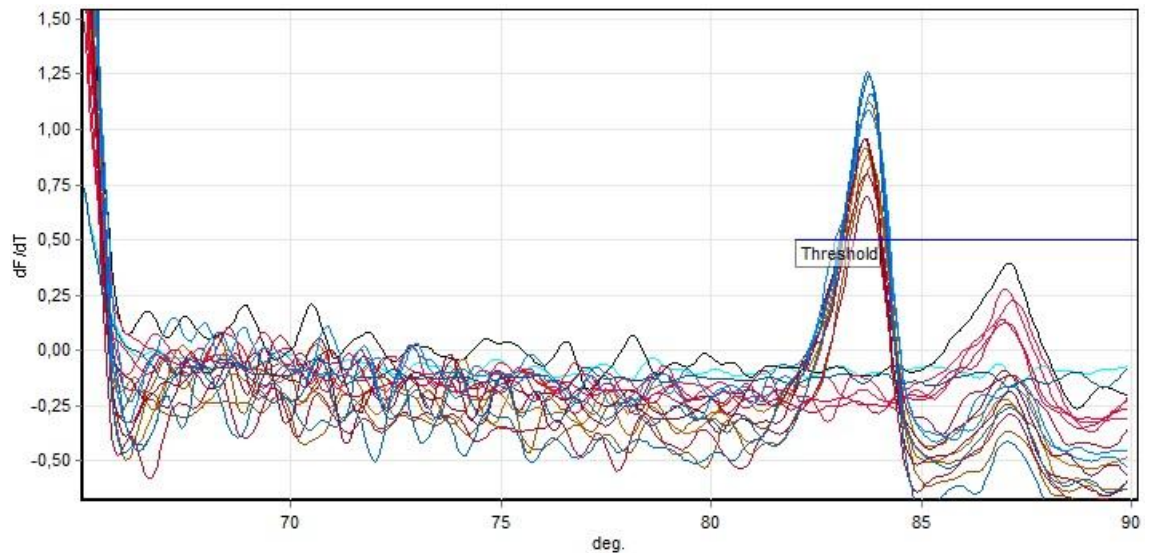
taessa tuntemattomia näytteitä, tehdään H061A ensin ja mikäli tulos on positiivinen, tehdään myös H061B tuloksen varmistamiseksi. Syynä tähän on se, että B*35 –geenille on erittäin haasteellista tehdä yhtä ainoaa alukeparia, joka tunnistaisi pelkästään kyseisen geenin. Toisella testillä siis suljetaan pois ensimmäisessä testissä mahdollisesti monistuvat muut geenit.

HLA-B*27 –ajossa negatiiviset näytteet nousivat jonkin verran, mutta jäivät riittävän alas eivätkä häirinneet positiivisten tunnistusta. HLA-DRB1*04 –ajossa puolestaan Brilliant III toimi hyvin, eivätkä negatiiviset nousseet ollenkaan. HLA-B*35:n H061A–ajossa Brilliant III:lla kaikki näytteet nousivat sekalaiseksi kimpuksi eikä näytteiden erottaminen ollut mahdollista. Poikkeuksena muihin ajoihin, tässä ajossa oli mukana melt-analyysi (Kuva 11). Tämä ei kuitenkaan tuonut tilanteeseen parannusta. Myöskään H061B-ajo ei ollut sen parempi.



Kuva 11. Huono melt-ajo Brilliant III:lla.

HLA-B*27 ja HLA-B*35 testattiin myös Perfectalla samoissa olosuhteissa kuin Brilliant III. B*27 –geenijossa negatiiviset pysyivät nollassa ja positiiviset nousivat hyvin, vaikkakin näytteet harottivatkin hieman (eli osuivat kontrollien ala- tai yläpuolelle, tehden heterotsygoottien ja homotsygoottien erottamisesta haastavampaa). B*35 –ajossa negatiiviset nousivat hieman, mutta eivät lähestykään niin paljon kuin Brilliant III:lla. Lisäksi melt-ajo oli selkeästi parempi Brilliant III:en ajoon verrattuna (Kuva 12).



Kuva 12. Perfectalla tehty HLA-B*35 melt-käyrä. Annealing/extension –aika 15sek.

Perfectan melt-käyrässä erottuvat selkeästi positiiviset näytteet negatiivisista. Monistetava geeni näkyy kuvassa selvänä piikkinä ja epäspesifisten tuotteiden aikaansaama piikki jää huomattavasti matalammaksi.

Viimeinen jäljellä oleva geenitutkimus C4A geenimutaatiolle, jossa yksi lisänukleotidi muuttaa geenisekvenssiä ja saa aikaan geenin toimimattomuuden (C4 insertti), testattiin molemmilla mixeillä samassa ajossa, annealing/extension –ajan ollessa 20sek. Tässäkin Perfecta toimi hyvin, mutta Brilliant III:lla negatiiviset näytteet nousivat.

Tässä vaiheessa testaukset olivat osoittaneet, että Brilliant III:lla negatiiviset näytteet nousivat useissa testeissä, kun taas Perfecta toimi huomattavasti paremmin samoissa olosuhteissa niissä geenitutkimuksissa, missä sitä oli testattu. Koska Perfectalla ei oltu vielä testattu kaikkia genejä ja jo ajetuissa testeissä se oli toiminut kohtalaisesti lyhyillä annealing/extension –ajoilla, haluttiin kaikkia geenitutkimuksia testata hieman pidemmällä annealing/extension –ajoilla spesifisyyden lisäämiseksi. (Taulukko 6).

PerfeCTa SYBR Green FastMix							
T(°C)	C4 ins	T(°C)	B*27	B*35 A	B*35 B	DRB1*04	DRB1*15
95	10min	95	10min	10min	10min	10min	10min
30 cycles		30 cycles					
95	15s	95	15s	15s	15s	15s	15s
57	45s	60	45s	45s	45s	45s	45s

Taulukko 6. Testit Perfectalle. C4 insertti tehtiin erikseen.

Näiden testien perusteella voitiin todeta, että Perfecta toimi 45sek ajalla kaikissa ajoissa melko hyvin, vaikkakin negatiiviset nousivat lähes kaikissa ajoissa hieman, B*35-ajossa hiukan enemmän kuin muut. Brilliant III puolestaan toimi pääosin huonommin kuin Perfecta. Erityisesti merkittävin ero mixien välillä oli haasteellisen B*35-geenin kohdalla. Tämän vuoksi Perfecta valittiin näistä kahdesta jatkotestauksiin.

7 Ajojen optimointi

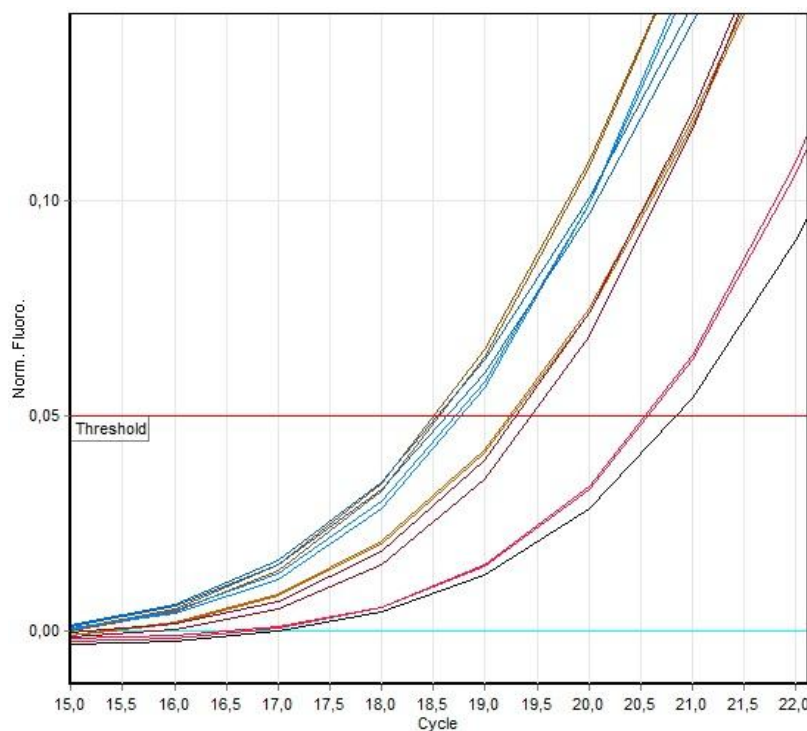
7.1 Perfectan lisättestaukset

Ensimmäisen testirupeaman perusteella ja erityisesti B*35-geeniajtoa tarkastellessa, päätettiin Perfectaa testata vielä 30sek annealing/extension –ajalla. Tähän päädyttiin tarkasteltaessa 15 sekunnin ja 45 sekunnin B*35-ajoja ja havaitessa, että melt-käyrä on sitä parempi, mitä pienempi annealing/extension –aika on. Sen sijaan positiivisten, 1 ja 2 kopiota sisältävien näytteiden välillä oleva ero on suurempi pidemmällä ajalla. Testeihin annealing/extension -ajaksi valittiin 30sek sen ollessa puolessa välissä jo testattuja aikoja. Samalla päätettiin testata kaikkia geenitestejä samassa ajossa ja C4-geenitestien lämpötilaa nostettiin samalle tasolle muiden kanssa (Taulukko 7) 60°C:een.

PerfeCTa SYBR Green FastMix							
T(°C)	C4B	C4 ins	B*27	B*35 A	B*35 B	DRB1*04	DRB1*15
95	10min	10min	10min	10min	10min	10min	10min
30 cycles							
95	15s	15s	15s	15s	15s	15s	15s
60	30s	30s	30s	30s	30s	30s	30s

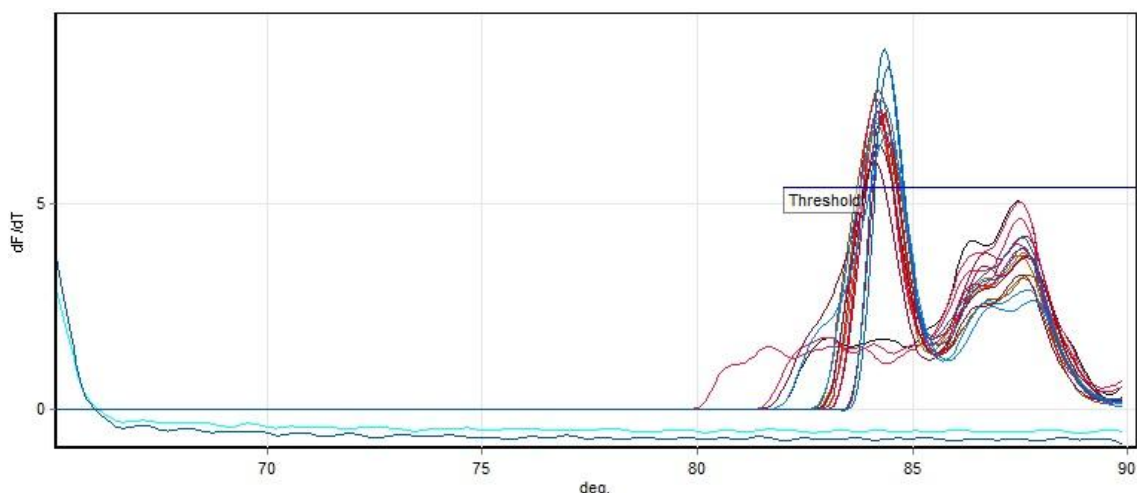
Taulukko 7. Prefectan lisättestaukset.

Testeissä master mix toimi hyvin ja negatiiviset näytteet pysyivät pääosin nollassa. Ainoat poikkeukset, joissa negatiiviset nousivat, olivat B*35 ja DRB1*15 –ajot. B*35 ajossa negatiiviset nousivat reilusti, mutta jättivät riittävän suuren välin positiivisiin näytteisiin, eivätkä siten häirinneet testin erotuskykyä. Myös positiivisten hetero- ja homotsygoottien välillä oli tarpeeksi suuri ero, jotta eri kopiolukumäärät pystyttiin erottamaan (Kuva 13).



Kuva 13. Kuvassa näkyy, miten B*35 -ajossa eri kopiolukumäärät pystytään erottamaan toisistaan. Käyrät vsemmalta oikealle: 2, 1 ja 0 kopiota tutkittavasta geenistä.

Melt-ajossa (Kuva 14) pystyttiin erottamaan negatiiviset näytteet toisistaan. 30sek ajalla melt-käyrä ei ole yhtä hyvä kuin 15sek käyrä, mutta kuitenkin parempi 45sek käyrään verrattuna.



Kuva 14. Melt-analyysi 30sek B*35-ajosta. Melt-käyrässä näkyy selvästi tutkittavan geenituotteen kohdalla korkeampi piikki (n. 84 astetta), kuin epäspesifisen tuotteen kohdalla sen jälkeen.

DRB1*15 -geenijossa negatiiviset näytteet eivät nousseet läheskään yhtä korkealle, kuin B*35 -ajossa. Lämpötilan nosto C4-testeissä ei haitannut testiä, mikä mahdollistaa testien ajon samoissa olosuhteissa.

7.2 Variaatioajot

Ensimmäisen testikierroksen jälkeen tehtiin Perfectalla variaatioajot, joissa oli mukana sekä kontrolleja, että uusia potilasnäytteitä. Ajo-olosuhteina käytettiin taulukon 7 olosuhteita. Perfectalla saatuja tuloksia verrattiin vanhalla mixillä saatuihin tuloksiin ja varmistettiin niiden paikkansapitävyys.

7.3 Yhteenveto

Testien perusteella valittiin lopullisiksi ajo-olosuhteiksi viimeisen testin ajo-olosuhteet (Taulukko 7). Kyseisillä olosuhteilla pystyttiin erottamaan geenien kopiolumäärät riittävän hyvin, vaikkakaan kaikki ajot eivät olleet täysin optimaalisia kyseisille geeneille.

8 Loppupäätelmät

HLA-alueen geenien eri alleelien erottaminen toisistaan on haastavaa, johtuen alueen suuresta polymorfiasta. Joidenkin alleelien sekvenssit voivat olla hyvin lähellä toisiaan, mikä tekee spesifisten alukkeiden suunnittelusta vaikeaa. Tämän vuoksi joidenkin alleelien määrittämiseen voidaan tarvita useampia alukepareja, jotta väärät positiiviset saadaan eliminoitua. HLA-alueen geenien määrittämisessä alukkeiden spesifinen sitoutuminen on määrittämisen onnistumisen kannalta erittäin tärkeää. Tähän ei riitä pelkästään hyvin suunnitellut alukkeet, vaan myös master mixin koostumus ja ajo-olosuhteet vaikuttavat testin lopputulokseen merkittävästi. Tässä työssä käytetyt alukkeet oli validoitu laboratorion toimesta. Koska niitä käytettiin myös potilasdiagnostiikkaan, ne kävivät vuosittain läpi erittäin tarkan laadunvalvontaprosessin, jossa oli mukana ulkopuolinen laadunvalvontaan erikoistunut yritys (esim. UK NEQAS). Tämän vuoksi voidaan olettaa, että käytössä olleet alukkeet antoivat oikean tuloksen, eli ne olivat riittävän hyvin suunniteltuja.

Testauksissa master mixin koostumukseen ei voitu vaikuttaa, joten ainoastaan ajo-olosuhteita säätämällä voitiin vaikuttaa testien spesifisyyteen. Suurin osa testeistä saatiin toimimaan hyvin lopullisissa olosuhteissa, mutta esim. HLA-B*35 -määrittämisessä saatiin runsaasti epäspesifisiä tuotteita, mikä viittaa alukkeiden epäspesifiseen sitoutumiseen. Yhtenä alukkeiden sitoutumiseen vaikuttavana tekijänä on Mg^{2+} -ioneiden ylimäärä, mikä saa alukkeet sitoutumaan epäspesifisesti. Myös liian matala annealing-lämpötila saa alukkeet sitoutumaan epäspesifisesti. Mikäli epäspesifisyyttä haluttaisiin vähentää, täytyisi ajo-olosuhteita optimoida lisää. Tämä vaatisi lisää resursseja testauksiin ja testien tekemistä omissa ajoissaan, mikä lisäisi työn määrää huomattavasti. Lisäksi optimointi vaatisi mahdollisesti myös master mixin ilman magnesiumia, mikä mahdollistaisi Mg^{2+} -ionien määrän säätämisen ajoon sopivaksi.

Työlle asetetut tavoitteet, eli uuden master mixin löytäminen ja testien tekeminen samoissa ajo-olosuhteissa, saavutettiin kohtalaisen hyvin. Kaikista testeistä ei saatu täysin optimaalisia, mutta siitä huolimatta ne saatiin toimimaan riittävän hyvin samoissa olosuhteissa, jotta testit voitiin validoida ja Perfecta ottaa laboratorioissa jokapäiväiseen käyttöön. Uuden master mixin käyttöönoton myötä testien ajoajat lyhenivät n. 30 minuuttia.

Lähteet

- 1 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Cellular and Molecular Immunology, Seventh Edition. Philadelphia, USA: Elsevier Saunders.
- 2 Varkila K, Hurme M. Auttaja-T-solujen alaryhmien merkitys infektioitaudeissa ja allergiassa. *Duodecim* 1992;108(21):1849. Verkkojulkaisu. Luettu 27.5.2015.
- 3 Benjamini E, Sunshine G, Leskowitz S. 1996. Immunology: A Short Course, 3rd edition. New York: Wiley-Liss Inc.
- 4 Huovinen P, Meri S, Peltola H, Vaara M, Vaheri A, Valtonen V. 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet, Kirja 1. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- 5 Panelius J, Meri S. Complement system in dermatological diseases – fire under skin. *Frontiers in medicine* 2015 January 29, volume 2, article 3.
- 6 Volanakis JE, Frank MM. 1998. The Human Complement System in Health and Disease. USA . Marcel Dekker Inc.
- 7 Kemper C, Pangburn MK, Fishelson Z. Complement Nomenclature 2014. Elsevier. *Molecular Immunology* 61 (2014) 56–58.
- 8 Liszewski MK, Atkinson JP. Complement regulators in human disease: lessons from modern genetics. *Journal of Internal Medicine*, 2015, 277; 294–305.
- 9 Paakkanen R. 2013. Major Histocompatibility Complex Genes: Method of Analysis, Association with Acute Coronary Syndromes and Effect on Immune Reactions. Helsinki Biomedical Dissertation Series number 177. Helsinki: Helsinki University Print.
- 10 Klein J, Sato A. The HLA System: First of Two Parts. *The New England Journal of Medicine*, 2000 September 7, 343(10):702-709.
- 11 Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Mayr WR, Maiers M, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. 2010. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens*, 2010, 75:291-455.
- 12 Lokki M-L. HLA ja infektiot. Verkkojulkaisu. *Duodecim* 2005; 121(4):369-75.
- 13 Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Research* (2015) 43:D423-431. Verkkosivu. < hla.alleles.org >. Luettu 1.6.2015.

- 14 HLA-DRB1. 2015. Verkkodokumentti. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3123>> Luettu 1.6.2015.
- 15 Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. 2009. Proteasome System of Protein Degradation and Processing. Moscow: Uspekhi Biologicheskoi Khimii.
- 16 Krüger E, Kloetzel P-M. Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme. *Current Opinion in Immunology* 2012, 24:77–83.
- 17 Seifert U, Krüger E. Remodelling of the ubiquitin–proteasome system in response to interferons. *Biochemical Society Transactions* 2008, 36:879–884.
- 18 Warnatsch A, Bergann T, Krüger E. Oxidation matters: The ubiquitin proteasome system connects innate immune mechanisms with MHC class I antigen presentation. Elsevier: *Molecular Immunology* 2013, 55:106– 109.
- 19 Goldberg AL. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochemical Society Transactions* 2007, 35:12– 17.
- 20 Colbert RA, Tran M, Layh-Schmitt G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. Elsevier, *Molecular Immunology* 57 (2014) 44– 51.
- 21 Robinson PC, Brown MA. Genetics of ankylosing spondylitis. Elsevier, *Molecular Immunology* 57 (2014) 2– 11.
- 22 Colbert RA, DeLay ML, Klenk EI. From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. National Institute of Health, NIH Public Access Author Manuscript, *Immunol Rev.* 2010 January ; 233(1): 181–202.
- 23 Wennerström A, Pietinalho A, Vauhkonen H, Lahtela L, Palikhe A, Hedman J, Purokivi M, Varkki E, Seppänen M, Lokki M-L, Selroos O, Finnish Sarcoidosis Study Group. HLA-DRB1 allele frequencies and C4 copy number variation in Finnish sarcoidosis patients and associations with disease prognosis. Elsevier, *Human Immunology* 73 (2012) 93-100.
- 24 Travers P., Walport M. et al. 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th edition. New York, USA.
- 25 David M. Gilbert. Making Sense of Eukaryotic DNA Replication Origins. *Science*, 2001 October 5; 294(5540): 96–100.
- 26 Mike McPherson, Simon Møller. 2006. *The Basics: PCR*. Taylor & Francis Group
- 27 M. Tefik Dorak (Ed.). 2006. *Advanced Methods: Real-time PCR*. UK, Taylor & Francis Group

- 28 Sharkey DJ, Scalice ER, Christy KG Jr, Atwood SM, Daiss JL. Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction. *Biotechnology (N Y)*. 1994 May;12(5):506-9.
- 29 Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasik T, Siebert PD, Chenchik A. TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques*. 1994 Jun;16(6):1134-7
- 30 Logan J, Edwards KJ, Saunders N. 2009. *Performing Real-Time PCR: Current Technology and Applications*. Norfolk, UK. Caister Academic Press.
- 31 Wolffs P, Grage H, Hagberg O, Rådström P. Impact of DNA Polymerases and Their Buffer Systems on Quantitative Real-Time PCR. *Journal of clinical microbiology*. Jan. 2004, p. 408–411.
- 32 Thermo Scientific. T042-TECHNICAL BULLETIN. NanoDrop Spectrophotometers. Assessment of Nucleic Acid Purity.
- 33 Teare JM, Islam R, Flanagan R, Gallagher S, Davies MG, Grabau C. Measurement of Nucleic Acid Concentrations using the DyNA Quant and the GeneQuant. *BioTechniques* 22:1170-1174 (June 1997).

Menetelmäohje qPCR

MENETELMÄOHJE	H061A	PAINOS 4	
HLA-B-GREENIN *35-ALLEELIRYHMÄN MÄÄRITYS JA KVANTITOINTI REAL-TIME PCR-MENETELMÄLLÄ			
Laadittu	12.10.2011	Hyväksytty	12.10.2011
Laatija	Kaisa	Hyväksyjä	Marja-Liisa Lokki
Roine		Nimikirjoitus	
Nimikirjoitus			
Tarkastettu pvm/nimi:			
Hyväksytty pvm/nimi:			

MENETELMÄN PERIAATE

Menetelmällä tutkitaan mm. reumaattisten sairauksien sairastumisalttiutta määrittämällä alttiusalleeli HLA-B*35 genomisesta DNA:sta. Menetelmässä käytetään alleelispesifisiä alukkeita ja SYBR Green väriä, joka sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han eli syntyvään PCR-tuotteeseen. Ulkoisena kontrollina käytetään β -aktiinigeeniä, jolla varmistetaan DNA-näytteen laimennoksen toimivuus kvantitatiivisessa PCR:ssa (H191). Jos DNA-näyte monistuu kontrollireaktiossa (β -aktiinimäärityksessä), voidaan luottaa negatiivisen tuloksen muissa menetelmissä johtuvan siitä, ettei näytteessä ole menetelmällä tutkittavaa alleelia.

B*35A-alukkeilla monistuvat seuraavat alleelit:

Ryhmä B*18: *useita alleeleita*

Ryhmä B*35: *useita alleeleita*

Ryhmä B*37: B*37:xx

Ryhmä B*39: B*39:xx

Ryhmä B*56: B*56:xx

Ryhmä B*78: *useita alleeleita*

Alukkeilla monistuu todennäköisesti myös alleeli: B*3536. Tarkempi selvitys kaikkien HLA-B-alleelien monistumisesta B*35A-alukkeilla on menetelmän validointiraportissa.

KIRJALLISUUS

REV-alukesekvenssi perustuu immunohistogenetiikan työryhmän (IHWG) suosituksiin.
FOR-alukesekvenssi on laboratoriossa kehitetty.

TARVIKKEET (ks. tarkemmin tarvikeluettelo)

0,5 tai 1,5 ml:n putkia ("mixiputki"), steriilejä
Pipetteihin sopivat filtteroidut, steriilit pipetinkärjet
PCR-putket (100 µl) ja kannet, Corbett Research
Putkiteline (jääkaappikylmä), Corbett Research

REAGENSIT (ks. tarkemmin tarvikeluettelo)

Brilliant SYBR Green QPCR master mix, Stratagene (QPCR master mix)
PCR-työskentelyyn soveltuva steriili vesi
Alukkeet B35A-FOR ja B35A-REV (20 pmol/µl), Sigma Genosys tai vastaava

LAITTEET (ks. tarkemmin laiteluettelo)

Pipetit esim. 0,5–10 µl/10–100 µl
Annostelija 5–100 µl
Sentrifuugi
Vortex
Real-time PCR-laite Rotor-Gene 3000

ALUKKEIDEN SEKVENSIT

B35A_FOR 5'-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx-3'
B35A_REV 5'-yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyy-3'

PCR-OHJELMA

95 °C **10 min** 1 sykli

95 °C 15 sek

60 °C 45 sek 30 sykliä

72 °C 45 sek*

* Fluoresenssi kerätään tämän vaiheen lopussa kanavalla Sybr, Gain = 8

Melt curve

95 °C 30 sec

60 °C 30 sec

65 - 90 °C 2 sec hold, 0,2°C/step increment*

* Fluoresenssi kerätään tämän vaiheen lopussa kanavalla Sybr, Gain = 8

NÄYTE

DNA-näyte, jonka tavoitekonsentraatio on 10 ng/μl (β-aktiinimäärityksellä H191 todettu) ja puhtausaste (A_{260}/A_{280}) vähintään 1,6 tai suurempi. DNA-näyte on laimennettu PCR-työskentelyyn soveltuvaan steriiliin veteen.

SUORITUS

Työ suoritetaan PRE-huoneessa. PRE-huoneessa työskentelyssä noudatetaan yleisohjetta Y001.

1. Laadi työlista (sisäänkirjaushuoneessa). Työlistaan merkitään näytteet, kontrollit sekä näiden laimennospäivät, reagenssien lotit, pipetoitavat reagenssimäärät sekä mahdolliset työn aikana tapahtuneet poikkeamat. Työlistaa laadittaessa kannattaa huomioida, että menetelmän H061A kanssa samoissa olosuhteissa voidaan ajaa myös menetelmät H060, H061B, H094 ja H097.

2. Kutakin näytettä ja positiivisia kontrolleja (B*35 hetero- ja homotsygoottikontrollit) kohti tarvitaan kaksi PCR-putkea, negatiiviselle DNA-kontrollille riittää yksi PCR-putki (vrt. työlista). Jokaista sarjaa kohden tehdään lisäksi kaksi vesinäytettä (joista toinen on sarjan ensimmäinen ja toinen viimeinen) mahdollisten kontaminaatioiden toteamiseksi. Eli jos näytteiden lukumäärä on n, niin tarvittavien putkien määrä on $2n+7$.

Taulukossa 1 on tarvittavat reagenssimäärät yhtä putkea kohti. Kerro määrät työlistan osoittamalla putkimäärällä. Huomaa pipetointivara – laske putkimäärään muutama (esim. 2-5 näytesarjan koosta ja omasta pipetointikäsiälästä riippuen) ylimääräinen putki. Kirjaa määrät työlistaan.

Taulukko 1

	1 putki
Steriili vesi	2,5 µl
QPCR master mix	5,0 µl
Aluke B35A_FOR, 20 pmol/µl	0,25 µl
Aluke B35A_REV, 20 pmol/µl	0,25 µl
Yhteensä	8,0 µl

3. Varmista, että putkiteline on jääkaapissa, teline toimii kylmäblokkina pipetoinnin aikana. Ota reagenssit, kontrollit sekä näytteet temperoitumaan huoneenlämpöön vähintään 15 minuuttia ennen pipetoinnin aloittamista. QPCR master mixin pitämistä huoneenlämmössä vältetään; QPCR master mix sulatetaan juuri ennen sen pipetointia ja laitetaan takaisin pakkaseen mahdollisimman pian pipetoinnin jälkeen.

4. Näytteet ja reagenssit fuugataan pohjaan ja vorteksoidaan. *Huom. QPCR master mix:iä ei saa vorteksoida. QPCR master mix sekoitetaan tasaiseksi varovasti pipetin kärjellä.*

5. Järjestä tarvittava määrä PCR-putkia jääkaappikylmään putkitelineeseen.

6. Pipetoi PCR-putkien **pohjalle** 2 µl steriiliä vettä, kontrolleja sekä näytteitä työlistan mukaisesti.

Vältä koskettamasta pipetinkärjillä PCR-putkien reunoja – varsinkaan yläreunoja. Rinnauskaiset näytteet pipetoidaan kumpikin omalla kärjellään. Tarkista putket pipetoinnin osalta – kunkin putken pohjalta löytyy näytemäärä eikä yläreunassa näy näytepisaroita. Mikäli näytepisaroita putken yläreunassa esiintyy, tulee ne huomioida reagenssiseosta putkiin jaettaessa (kts. kohta 8).

7. Pipetoi reagenssit (vesi, alukkeet ja QPCR master mix) mixiputkeen. Fuugaa tarvittaessa pohjaan ja sekoita vorteksoimalla *kevyesti*.

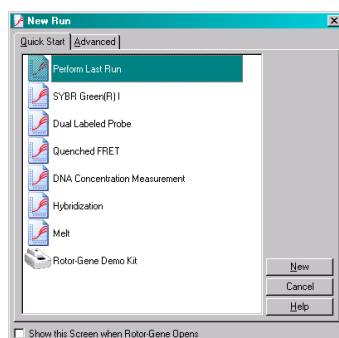
8. Pipetoi 8 µl reagenssiseosta PCR-putkiin (käyttämällä annostelijaa). Pipetoi reagenssiseos putken **seinämään**, ei pohjalle. Annostelijassa voidaan käyttää samaa kärkeä. Huomioi mahdolliset näytepisarat yläreunassa, nämä putket voi jättää pipetointisarjan viimeiseksi ja/tai laittaa erikseen erillisillä kärjillä! Koputtele putkitelinettä kevyesti pöytää vasten, jotta kaikki neste menee putken pohjalle.

9. Sulje PCR-putket tiiviisti kansilla.

10. Laita PCR-putket Real-time PCR-laitteeseen työlistan mukaisesti. Tyhjiin paikkoihin käytetään kannettomia PCR-putkia. Laita putkien päälle lukitusrenkas ja sulje laitteen kansi.

11. Avaa tietokoneessa esim. viimeisin B*35A-ajotiedosto.

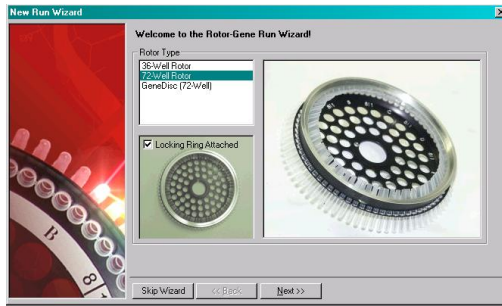
12. Klikkaa yläpalkin *New* toimintonäppäintä.



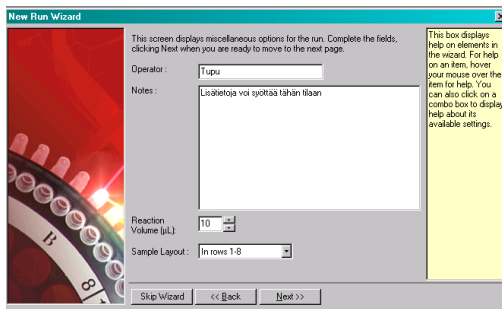
13. Valitse klikkaamalla avautuneessa *New Run* ikkunassa *Advanced* välilehdessä vaihtoehto *Perform Last Run*. Klikkaa sitten *New*.

(Huomaa: Kuvat ovat viitteellisiä!)

14. Täytä tarvittavat kentät *New Run wizard* ikkunoissa:

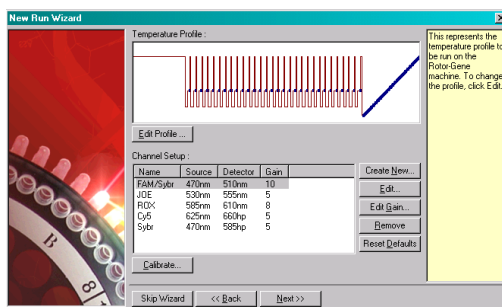


Valitse roottorin tyyppi, esim. *72-well rotor* ja ruksaa *Locking ring attached* toiminto. Klikkaa sitten *Next*.



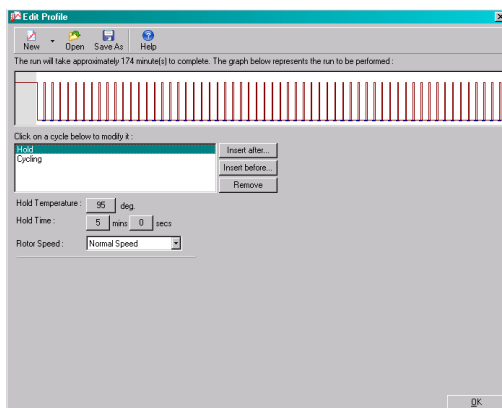
Täytä *Operator*-kenttään oma nimesi/puumerkkisi. *Notes*-kenttään voi täyttää lisätietoja, esimerkiksi mitä näytteitä ajossa on mukana jne.

Tarkista, että *Reaction volume* -kentän arvo on 10 µl ja *Sample Layout* esim. A1, A2, A3.



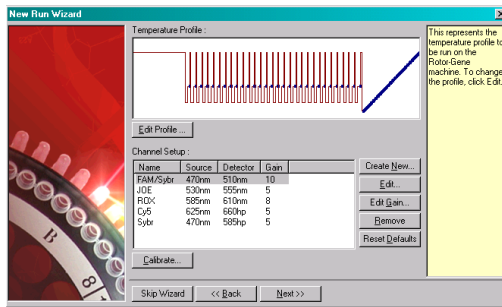
Kun kentät on täytetty, klikkaa *Next*.

Tarkista ajon parametrit: klikkaa avautuneesta ikkunasta *Edit Profile*.



Parametrit saa näkyville valitsemalla syklistauksesta tarkistettava vaihe (*hold, cycling, melt*). Korjaa ajon parametrit tarvittaessa. Oikeat arvot löytyvät työlistasta (PCR-ohjelma).

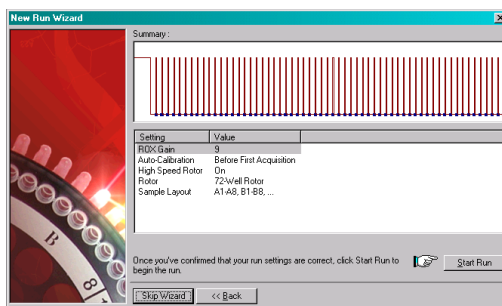
Kun olet valmis, klikkaa *OK*. Ohjelma palaa takaisin edelliseen ikkunaan.



Tarkista, että *Sybr* (tai *Green*) kanavan *Gain* -arvo on 8.

Arvon saa tarvittaessa muutettua klikkaamalla *Edit Gain* ja syöttämällä arvo 8 kenttään.

Sulje *Edit Gain* -ikkuna klikkaamalla *OK*.
Klikkaa sitten *Next*.

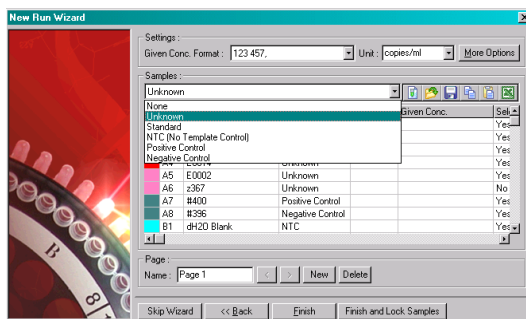


Voit vielä tarkistaa viimeisessä ikkunassa että syöttämäsi tiedot ovat tallentuneet oikein. Jos näin ei ole, pääset palaamaan takaisinpäin klikkaamalla *Back*.

15. Kun tiedot ovat oikein, klikkaa *Start Run*.

Kun ajo käynnistyy, avautuu *Save as* -ikkuna. Tallenna tiedosto työlistan mukaisesti esim. nimellä *H061A_potilaat_pvm* menetelmän ajotiedostokansioon. Ajotiedoston tallennusmuoto on *.rex*.

Hetken kuluttua ohjelmaan avautuu automaattisesti *New Run Wizard* ikkuna, jossa syötetään ja muokataan näytetietoja (näytetiedot voidaan syöttää myös myöhemmin ajon aikana tai ajon päätyttyä);



Nimeä näytteet (esim. *B35A_TX-xxxx* ja näytteen laimennospäivämäärä) *Name* -sarakeeseen, merkitse näytteen tyyppi *Type* -sarakeeseen *Samples* -vetovalikosta. Vesinäytteet merkitään tyyppiä *NTC (No Template Control)*, negatiivinen kontrolli tyyppiä *Negative Control*, positiiviset kontrollit tyyppiä *Standard* ja tutkittavat näytteet tyyppiä *Unknown*.

Samples :					
Yes					
C	ID	Name	Type	Given Conc.	Selected
	A1	#400	Standard	1,00	Yes
	A2	#396	Standard	2,00	Yes
	A3		None		Yes
	A4		None		Yes

Standardeihin merkitään sarakkeeseen *Given Conc.* kopioiden lukumäärä (*copies/reaction*), heterotsygootilla 1 ja homo- tsygootilla 2.

Selected –sarakeessa valikoidaan ajon aikana mitattavat putket. Käytännössä kannat-
taa valita kaikki putket (sarakeessa arvona Yes). Kun olet täyttänyt kentät, klikkaa
Finish.

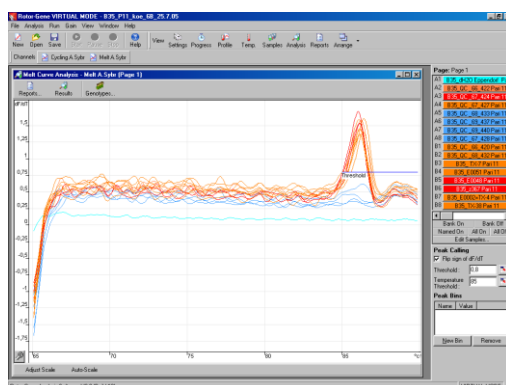
Ruutuun avautuvasta ikkunasta voi seurata ajon kulkua.

16. Kun ajo on päättynyt, sulje ohjelma ja kopioi ajotiedosto verkkolevylle sille varat-
tuun kansioon, esim. Rotoajot 2011 -> H061A.

TULOSTEN ANALYSOINTI JA RAPORTTI

Melt Curve:

Klikkaa hiirellä yläpalkin *Analysis*-toimintonäppäintä ja valitse avautuneesta *Analysis* -
ikkunasta klikkaamalla välilehti *Melt*. Kaksoisklikkaa ikkunassa *Melt A. Sybr* (tai *Melt A.*
Green) vaihtoehtoa, jolloin mm. *Melt Curve Analysis* -ikkuna avautuu.



Aseta analysoinnin parametrit.

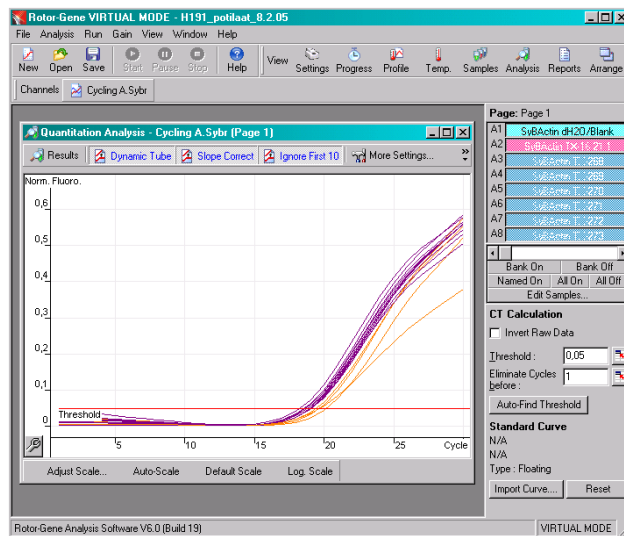
Threshold = 0,8 ja

Temperature Threshold= 82.

Kvantitatiivinen:

Valitse edelleen avoimena olevasta (tai avaa kuten edellä kuvattu) *Analysis* -ikkunasta
klikkaamalla välilehti *Quantitation*. Kaksoisklikkaa ikkunassa *Cycling A. Sybr* -

vaihtoehtoa, jolloin mm. *Quantitation Analysis* -ikkuna avautuu. *Analysis* -ikkunan voi tämän jälkeen sulkea.



Aseta analysoinnin parametrit;
Linear Scale,
Dynamic tube = ON,
Slope Correct = ON,
Ignore First = 0 Cycles* sekä
Threshold = 0,05 ja
Eliminate cycles before = 15.

Lisäksi *Outlier Removal* -valikosta kannattaa määritellä *NTC Threshold* arvoksi 5% ylimääräisen taustakohinan tasaamiseksi.

Normaali fluoresenssitaso näytteillä nousee yleensä välille 0,4-0,6.

*Normaalisti menetelmän H061A ajoja analysoitaessa käytetään *Ignore First* -asetuksena arvoa 0. Huomioitavaa on, että rotoajon ensimmäiset kierrokset eivät välttämättä anna koko ajoa tarkastellen edustavaa tulosta. Tästä syystä saattaa saada paremman näköisen tuloksen kun jättää ajon alusta muutaman ensimmäisen kierroksen huomioimatta, eli valitsee *Ignore First* -asetuksen arvoksi 0 sijasta arvon 1-10. Jos ensimmäiset kierrokset taas näyttävät samankaltaisilta seuraavien kanssa, voi analysoinnissa *Ignore First* -asetuksen arvoksi asettaa arvon 0, tällöin ohjelman normalisointialgoritmit on enemmän dataa työstettäväksi. Maksimissaan huomiotta voidaan jättää 10 ensimmäistä kierrosta.

Onnistuneen PCR-sarjan hyväksymisperiaatteet:

Melt Curve:

PCR-sarjan vesinäytteissä **ei saa olla** *Threshold*-arvon ylittävää sulamispikkiä välillä 83,0-85,0 astetta, jotta PCR-sarja voidaan hyväksyä.

PCR-sarjan negatiivisessa kontrollinäytteessä **ei saa olla** *Threshold*-arvon ylittävää sulamispiikkiä välillä 83,0-85,0 astetta, jotta PCR-sarja voidaan hyväksyä.

PCR-sarjan molemmissa standardeissa **tulee olla** *Threshold*-arvon ylittävä sulamispiikki välillä 83,0-85,0 astetta, jotta PCR-sarja voidaan hyväksyä.

PCR-sarjan näytteiden positiivisuus/negatiivisuus määritetään sulamispiikin sijainnin (lämpötila) ja korkeuden (*threshold*) avulla. Kun näytteessä ei ole sulamispiikkiä välillä 83,0-85,0 astetta tai piikki on alle *threshold*-arvon on näyte negatiivinen HLA-B*35 –alleelin suhteen. Kun näytteessä on *threshold*-arvon ylittävä sulamispiikki välillä 83,0-85,0 astetta, on näyte positiivinen. Kun näytteessä on *threshold*-arvon ylittävä sulamispiikki viitealueen (välillä 83,0-85,0 astetta) ulkopuolella, näyte on negatiivinen HLA-B*35 –alleelin suhteen.

Kvantitatiivinen:

PCR-sarjan vesinäytteissä ei saa olla huomattavaa monistumistuotetta, jotta PCR-sarja voidaan hyväksyä. Jos vesinäytteessä on havaittavissa monistumistuotetta, arvioidaan ajon hyväksyminen/hylkääminen perustuen vesinäytteen nousun voimakkuuteen ja muihin kontrolleihin perustuen.

PCR-sarjan kontrollien tulisi monistua loogisesti, jotta PCR-sarja voidaan hyväksyä; Negatiivisessa kontrollissa on tässä menetelmässä havaittavissa kvantitatiivisessa kuvaajassa nousua, mutta oikea monistumistuote havaitaan analysoimalla ajon meltosuus (vrt. yllä). Positiivisista kontroleista heterotsygoottikontrolli alkaa kopioitua homotsygoottista myöhemmin (Ct arvo heterotsygoottikontrollissa suurempi, käyrät kuvaajassa alempana).

Kontrollien Ct-arvot - Ct-arvo kuvaa sykklilukumäärää, missä kyseisen näytteen fluoressintaso ylittää asetetun raja-arvon (*threshold*) - vaihtelevat mm. laimennosten iästä, reagenssimiksien ja alukkeiden lotista, tekijän käsialasta ja ajosta riippuen. Heterotsygoottikontrollin (1 geeni) Ct-arvo vaihtelee suunnilleen 20stä yli 23n ja homotsygoottikontrollin (2 geeniä) Ct-arvo suunnilleen välillä 19stä yli 22n. Kontrollien keskinäinen Ct-arvojen väli on keskimäärin yhden syklin verran, vaihdellen välillä 0,5-1,5. Mikäli toinen kontroleista selkeästi poikkeaa odotetusta tasosta, esim. koska kontrollin lai-

mennos on vanha tai kontrollin rinnakkaiset putket antavat selkeästi toisistaan eroavat tulokset, voidaan ajo harkinnanvaraisesti hyväksyä.

PCR-sarjan näytteiden tulokset määritetään kontrolleihin verraten. Näytteen tuloksen määrittämiseksi käytetään kolmea rinnakkaista tapaa;

1. Verrataan silmämääräisesti näytteen käyrää kontrollien käyriin.
2. Lasketaan positiivisten kontrollien Ct-arvojen viitealueet:
 - Kirjaa *Quant. Results* -taulukosta työlistaan kontrollien Ct-arvot (rinnakkaisten putkien keskiarvo).
 - Viitealueen alaraja lasketaan vähentämällä kontrollin Ct-arvosta luku 0,20 ja yläraja lasketaan lisäämällä kontrollin Ct-arvoon luku 0,20. Kirjaa arvot työlistaan.
 - Positiivisen näytteen Ct-arvon pitäisi osua vastaavan kontrollin (heterotai homotsygoottikontrolli) viitealueen rajojen sisään.
3. Analysointiohjelma laskee näytteille kontrolleihin verraten geenin kopiokumäärän.

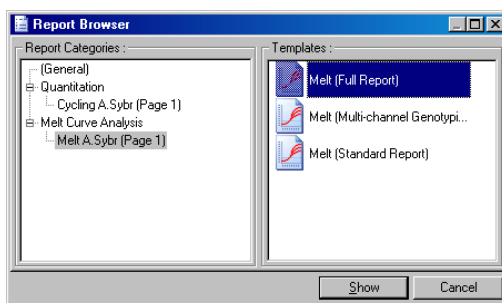
Tulokset kirjataan ajon työlistaan.

Ajosta tulostetaan raportit:

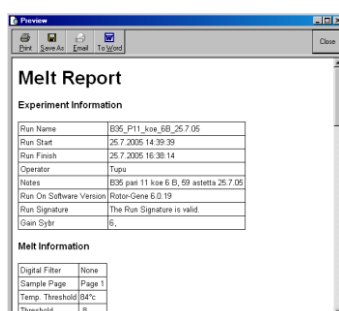
Klikkaa ensin *Named on* toimintonäppäintä näytenuumeropaneelin alaosassa. Näin raporttiin tulee kaikki ajatut näytteet. Mikäli halutaan jakaa ajo esim. projekti- ja potilasnäytteet sisältäviin raporteihin, valikoidaan näytevalikosta kontrollit ja halutut näytteet.

Melt Curve -raportti:

1. Klikkaa yläpalkista toimintonäppäintä *Reports*.



2. Valitse *Report Browser* -ikkunassa *Melt A. Sybr* ja vaihtoehto *Melt (Full report)* ja klikkaa *Show*



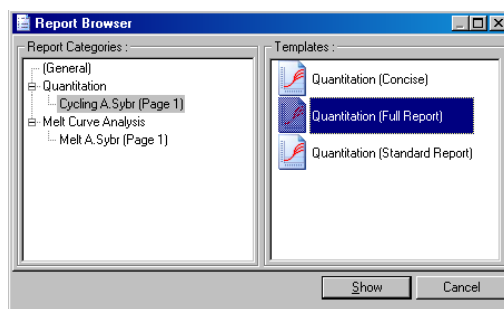
3. Klikkaa *Preview* -ikkunan yläpalkista *To Word*.

4. Talleta raportti verkkolevylle esim. kansioon Fullreports 2011 -> H061A samalla nimellä kuin ajotiedosto ja lisäämällä ajotiedoston nimen perään tunniste _melt. (kiinnitä huomiota eri projekteja sisältävien ajoraporttien erilaiseen nimeämiseen!).

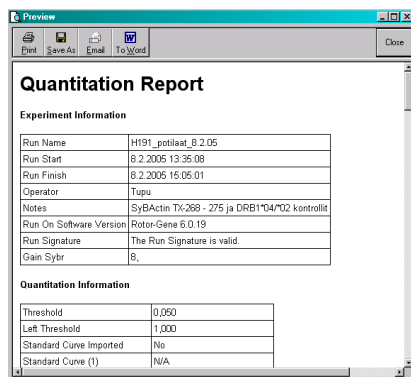
5. Tulosta raportti ja liitä se ajon työlistan kanssa.

Kvantitatiivinen:

1. Klikkaa yläpalkista toimintonäppäintä *Reports*.



3. Valitse *Report Browser* -ikkunassa *Cycling A. Sybr* ja vaihtoehto *Quantitation (Full report)* ja klikkaa *Show*.



4. Klikkaa Preview -ikkunan yläpalkista *To Word*.

5. Talleta raportti verkkolevylle esim. kansioon Fullreports 2011 -> H061 samalla nimellä kuin ajotiedosto (kiinnitä huomiota eri projekteja sisältävien ajoraporttien erilaiseen nimeämiseen!).

6. Tulosta raportti ja liitä se ajon työlistan kanssa.

TULOSTEN HYVÄKSYMINEN

Tulokset käydään läpi sekä tekijän että asiantuntijan toimesta. Asiantuntija hyväksyy ja allekirjoittaa lopullisen tuloksen (eli HLA-B*35 geenien lukumäärän näytteessä) työlistaan sekä päättää mahdollisista jatkotoimenpiteistä, ellei toisin ole sovittu.

Käytännössä B*35A menetelmässä positiivisiksi todetut näytteet testataan edelleen B*35B menetelmällä. Vasta näiden molempien ajojen yhteenlaskettu tulos kertoo onko potilas B*35:n suhteen positiivinen. B*35A –menetelmässä negatiivisiksi todettuja näytteitä ei tarvitse ajaa B*35B –ajossa. Negatiiviset näytteet voidaan vastata B35A-ajon jälkeen, B35A-ajossa positiivisiksi todetut näytteet voidaan vastata vasta B35B-ajon tuloksen ollessa tiedossa.

VASTAAMINEN

Tyypitystulos kirjataan työlistasta (joka on nk. primääridataa) potilastiedostoon sekä vastauslomakkeelle (S012). Asiantuntija kirjaa lopullisen tyypitystuloksen vastauslomakkeeseen ja antaa tuloksesta lausunnon. Vastauksessa annetaan tieto, onko potilas B*35:n suhteen positiivinen vai negatiivinen. Jos potilas on positiivinen, tarkennetaan vastausta kertoen, onko potilas alleelin suhteen heterotsygoottinen vai homotsygoottinen. Vastaus allekirjoitetaan ja päivätään.

LAADUNSEURANTA

Uusi reagenssierä (QPCR master mix ja alukkeet) testataan esim. kontrollinäytteillä rinnan vanhan reagenssierän kanssa samassa ajossa. Testinäytteet pipetoidaan samalla tavoin kuin muutkin näytteet ja testauksesta täytetään lomake S004. Testaustulos säilytetään kansiossa (Lot-testaus) laboratoriossa.

Kontrolleista tehdään uudet laimennokset tarvittaessa, kuitenkin vähintään noin kuu-kauden välein. Kontrollien heikkeneminen/vanheneminen näkyy Ct-arvojen nousuna. Uudet kontrollilaimennokset ajetaan ensimmäisen kerran rinnan vanhojen kontrollilaimennosten rinnalla.

VALIDOINNIN YHTEENVETO

Stratagene™ QPCR SYBR® Green Mix reagenssi soveltuu HLA-B-geenin *35-alleeliryhmän määrittämiseen ja kvantitointiin verinäytteistä eristetyistä DNA-preparaateista tässä raportissa kuvatuissa reaktio-olosuhteissa. Menetelmän analyttinen herkkyys ja spesifisyys ovat 100% kun noudatetaan validointiraportissa kuvattuja menettelytapoja.

SÄILYTYS

PCR-reagensseja säilytetään PREhuoneen pakastimessa (-20 °C). Alukkeiden ja veden käyttöerät sekä DNA-näytteiden laimennokset säilytetään PREhuoneen jääkaapissa (+4 °C). Alukkeet säilyvät 5 vuotta liuotuspäivästä lukien. Reagenssit säilyvät valmistajan ilmoittamaan säilymispäivämäärään saakka. DNA-käyttölaimennokset (alle 15 ng/µl) säilyvät käyttökelpoisina noin kuukauden.

Ajotiedostot, primääritulokset ja vastausdokumentit säilytetään niille varatuissa kansioissa laboratorion arkistointisuunnitelman mukaisesti.

JÄTTEENKÄSITTELY

Pipetinkärjet kerätään läpäisemättömään muoviasiaan, joka suljettuna voidaan hävittää energijätteenä. Muut kertakäyttötavarat lajitellaan energia- tai sekajätteeseen (ks. tarkemmin laitoksen jäteohje).

PUHTAUSVAATIMUKSET

PRE-huoneessa käytetään vain tähän tilaan varattua laboratoriotakkia ja tarvikkeita (Y001).

Työpöydällä käytetään kertakäyttöistä alustaa. Pipetit, pienlaitteet, muut käyttötavarat ja työtasot pyyhitään työviikon päätyttyä tai tarvittaessa laimennetulla hypokloriitilla (Y001, L001).

LIITTEET

Menetelmän työlista