

Katja Aahos

DNA:n manuaalisen ja automaatiota hyödyntävien differentiaalieristysmenetelmien vertailu seksuaalirikosnäytteiden käsittelyssä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

3.12.2012

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Katja Aahos DNA:n manuaalisen ja automaatiota hyödyntävien differentiaalieristysmenetelmien vertailu seksuaalirikosnäytteiden käsittelyssä 45 sivua + 3 liitettä 3.12.2012
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Rikosteknisti Minna Eriksson Tuntiopettaja (biotieteet) Juha E. A. Knuuttila
<p>Keskusrikospoliisin Rikosteknisessä laboratoriossa tutkitaan paljon erilaisia rikosnäytteitä. Seksuaalirikosnäytteet sisältävät usein sekä naisen epiteelisoluja että miehen siittiöitä. Tällaisten näytteiden DNA:n differentiaalieristyksessä pyritään saamaan eroteltua nais- ja miesperäinen DNA omiin, erillisiin fraktioihin. Laboratoriossa käytössä olevaa manuaalista menetelmää haluttiin kehittää, koska se on työläs ja vaikea saada onnistumaan täydellisesti.</p> <p>Manuaalisen DNA:n Chelex-differentiaalieristysmenetelmän tuloksia haluttiin vertailla automatisoivilla laitteilla saavutettuihin tuloksiin. Pumpulipuikkoihin valmistetut näytteet suunniteltiin vertailun kannalta sopiviksi, ja erilaisia menetelmiä vertailtiin yhdistelemällä Chelex-suspension sekä Qiagenin EZ1 Advanced XL - ja QIAcube®-laitteiden käyttöä.</p> <p>Tulosten perusteella nykyisin käytössä oleva Chelex-menetelmä osoittautui tehokkaaksi ja luotettavaksi menetelmäksi. QIAcuben® käyttö eristyksen siittiösakan pesuvaiheessa paransi hieman tuloksia, ja automaation ansiosta se vapauttaa työntekijän muihin työtehtäviin. Ongelmiksi osoittautuivat pesuvaiheeseen kuluva aika sekä laitteen pieni kapasiteetti samanaikaisesti käsiteltävien näytteiden suhteen. EZ1 Advanced XL -laitteella näytteiden epiteelifraktioiden DNA:n eristys onnistui moninkerroin paremmin kuin Chelex-menetelmällä, mutta siittiöfraktion DNA:ta ei saatu eristettyä juuri lainkaan. Siksi EZ1 Advanced -laitteiden voitiin todeta olevan riittämättömiä tähän tarkoitukseen.</p> <p>Chelex-suspensiolla ja QIAcubella® suoritettavaa menetelmää voidaan kehittää parantamalla aikaa vievää, kontaminaatoriskiä nostavaa ja työn suorittajasta voimakkaasti riippuvaa työvaihetta, jossa irrotetaan soluja näytemateriaalista. Siten voidaan saavuttaa entistä parempia ja puhtaampia tuloksia.</p>	
Avainsanat	DNA-tutkimusmenetelmät, testaus, laboratoriotekniikka, seksuaalirikokset, epiteelisolut, siittiöt.

Author(s) Title Number of Pages Date	Katja Aahos Comparison between manual method and automated instruments in DNA differential extraction in forensic analysis of sexual assault samples 45 pages + 3 appendices 3 December 2012
Degree	Bachelor of Science
Degree Programme	Laboratory Services
Specialisation option	
Instructor(s)	Minna Eriksson, Forensic DNA Expert Juha E. A. Knuuttila, Lecturer
<p>A great amount of different forensic samples are investigated in the Forensic Laboratory of the National Bureau of Investigation. Usually sexual assault samples contain epithelial cells from the female and semen from the male. The aim of DNA differential extraction is to get female DNA and male DNA in two different fractions. The target was to develop the currently used manual method.</p> <p>The results achieved with using the fully manual Chelex-method in differential extraction were compared to results from automated instruments. The samples prepared in cotton swabs were designed to be suitable for the comparison and the different methods were compared combining the use of the Chelex-suspension and the Qiagen instruments EZ1 Advanced XL and QIAcube®.</p> <p>Currently used Chelex-method was proved to be an efficient and reliable method in differential extraction. The use of QIAcube® in sperm washes improved the results, and the automation of the instrument allows the analyst to do other duties at the same time. The problems with QIAcube® turned out to be the long wash time and a low capacity in samples processed at the same time. The results of DNA extraction of epithelial fractions with EZ1 Advanced XL was multifold comparing to the Chelex-method, but the extraction of sperm fractions did not achieve good results. EZ1 Advanced instruments showed to be insufficient for this purpose.</p> <p>There is some development to do with the method done with Chelex-suspension and QIAcube®. The step where cells are released from the sample material is very time consuming and it increases the risk of contamination and is very dependent on the performer. By developing this step, better and cleaner results can be reached.</p>	
Keywords	DNA Fingerprinting, Benchmarking, Laboratory Techniques, Rape, Epithelial cells, Sperm.

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Seksuaalirikosten tutkiminen	2
2.2	DNA-analytiikka	3
2.2.1	Näytteiden esikäsittely	3
2.2.2	qPCR	3
2.2.3	PCR	6
2.2.4	Kapillaarielektroforeesi	7
3	Eristystekniikat	8
3.1	Chelex-eristys	8
3.2	Qiagen EZ1	9
3.2.1	Lyysaus	10
3.2.2	Eristys	11
3.2.3	Laitteiston puhdistus	14
3.3	Qiagen QIAcube®	14
4	Materiaalit ja menetelmät	17
4.1	Näytteet	17
4.2	Valmistelevat kokeet	19
4.2.1	Näytteiden haarukointi Chelex-differentiaalieristyksellä	20
4.2.2	EZ1 Advanced XL	21
4.2.3	QIAcube®	23
4.3	Menetelmien vertailu	25
4.3.1	EZ1 Advanced XL -differentiaalieristys QIAcuben® avulla	27
4.3.2	Chelex-differentiaalieristys QIAcuben® avulla	28
4.3.3	Chelex-differentiaalieristys	30

5	Tulokset	31
5.1	Valmistelevat kokeet	31
5.2	Menetelmien vertailu	34
6	Tulosten tarkastelu	38
6.1	Valmistelevien kokeiden tulokset	38
6.2	Menetelmien vertailu	40
7	Johtopäätökset	43
	Lähteet	45
	Liitteet	

Liite 1. DNA:n differentiaalieristuksen vahvan sekoitustuotteen PCR-tuotteiden kapillarielektroforeesierottelun tulos GeneMapper® *ID-X* -ohjelmalla analysoituna

Liite 2. Nainen B:n DNA-tunniste GeneMapper® *ID-X* -ohjelmalla analysoituna

Liite 3. Mies A:n DNA-tunniste GeneMapper® *ID-X* -ohjelmalla analysoituna

Lyhenteet ja määritelmät

DNA	Deoksiribonukleiinihappo.
DNA-rekisteri	Poliisin tietokannassa oleva rekisteri yksilöivistä DNA-tunnisteista.
DNA-tunniste	Henkilön DNA-tunniste koostuu kaikkien tutkittujen STR-alueiden toistojaksojen lukumääristä, jotka määrittävät DNA-tunnisteena toimivan numerosarjan.
DTT	Ditiotreitoli, $C_4H_{10}S_2O_2$.
EP	Epiteelisolu. Epiteelisoluja sisältävä suspensio tai epiteelisolujen DNA:ta sisältävä fraktio.
EPP	Qiagen Investigator ESSplex Plus Kit.
EP-tulos	Näytteen epiteelisolufraktion kahden PCR-monistuksen tuotteiden kapillaarielektroforeesierotteluiden jälkeen hyväksytyjen alueiden lukumäärän perusteella analysoitu tulos.
EtO	Etyleenioksidi, C_2H_4O .
g	Painovoiman kiihtyvyys, $9,81 \text{ m/s}^2$.
heikko sekoitustulos	PCR-monistustuotteiden kapillaarielektroforeesierottelun jälkeen saatava tulos, jossa on niin vähän kahden henkilön DNA:ta, ettei tuloksesta voida analysoida riittävää DNA-tunnistetta.
hyvä sekoitustulos	PCR-monistustuotteiden kapillaarielektroforeesierottelun jälkeen saatava tulos, jossa on kahden henkilön DNA:ta riittävän paljon, jotta 16 alueesta voidaan hyväksyä 12–16 aluetta.
KRP	Keskusrikospoliisi.

lyysaus	Soluhajotus, jossa solun kalvot ja seinät rikkoutuvat.
PCR	Polymeraasiketjureaktio (Polymerase Chain Reaction).
qPCR	Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio (Quantitative Polymerase Chain Reaction).
rpm	Revolutions per minute, kierrosnopeus, joka kertoo sentrifugin roottorin kierroksien määrän minuutissa.
RTL	Rikostekninen laboratorio.
SP	Sperma, siemenneste. Siittiösoluja sisältävä suspensio tai siittiösolujen DNA:ta sisältävä fraktio.
SP-tulos	Näytteen siittiöfraktion kahden PCR-monistuksen tuotteiden kapillaarielektroforeesierotteluiden jälkeen hyväksytyjen alueiden lukumäärän perusteella analysoitu tulos.
STR	Short Tandem Repeats, lyhyt peräkkäinen toistojakso.
vatkaus	Näyttemateriaalin pyörittely ja puristelu autoklavoidulla, puisella hammastikulla nestettä sisältävässä näyteputkessa solujen irrottamiseksi näyttemateriaalista.

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Keskusrikospoliisin (KRP) Rikosteknisen laboratorion (RTL) biologian osastolla DNA-ryhmässä. Rikostutkinnassa käytetään DNA-tutkimuksia yksilöntunnistusmenetelmänä. Rikosperusteinen DNA-tutkimus on vertailututkimusta, jossa verrataan tunnetuista henkilönäytteistä määritettyjä DNA-tunnisteita rikosnäytteistä määritettyihin DNA-tunnisteisiin ja poliisin DNA-rekisteriin. Seksuaalirikosnäytteet sisältävät usein sekä epiteelisoluja että siemennesteen siittiöitä, jolloin yhdessä näytteessä on useamman henkilön DNA:ta. Näytteiden tutkimisen ja lausuntotulosten kannalta on tärkeää saada eroteltua eri henkilöiden, uhrin ja syyllisen, DNA:t omiin fraktioihinsa, joista voidaan määrittää yksilöivät DNA-tunnisteet. Erotteleva DNA:n eristys, eli differentiaalieristys, on haasteellista saada onnistumaan siten, että tulokseksi saadaan kaksi yksilöivää DNA-tunnistetta. Saatavilla on uusia, menetelmiä automatisoivia ja tuloksia parantavia laitteita tähän tarkoitukseen.

Työn tavoitteena oli vertailla erilaisia DNA:n differentiaalieristysmenetelmiä. Nykyisin käytössä olevaan, täysin manuaaliseen Chelex-eristysmenetelmään verrattiin menetelmiä, joissa käytettiin kahta Qiagenin DNA-eristystä automatisoivaa ja helpottavaa laitetta, EZ1 Advanced XL - sekä QIAcube-laitteita. Automatisoitu differentiaalieristysmenetelmä nopeuttaisi näytteiden käsittelyprosessia laboratoriossa vapauttamalla enemmän työntekijöitä muihin työtehtäviin, ja ristikontaminaatioiden riski pienenesi. Onnistuneen vertailun seurauksena seksuaalirikosnäytteiden käsittelyyn käytettävää differentiaalieristysmenetelmää voidaan kehittää, jolloin saavutetaan parempia tuloksia mahdollisesti nopeammin.

2 Teoria

DNA-tahranäytteitä voidaan tutkia lähes mistä vain: tekstiileistä, esineistä, suurilta pinoilta tai suoraan ihmisistä. Helpoin tapa näytteenottoon on pyyhkiä kohdetta kostutella pumpulipuikolla tai leikata kohteesta pala. DNA:ta voidaan eristää kaikista ihmisen tumallisista soluista. Yleisimpiä näytteitä rikostutkinnassa ovat tahrat, jotka sisältävät verta, sylkeä, ihon ja limakalvojen epiteelisoluja sekä siemennestettä.

KRP:n RTL:ssa seksuaalirikosnäytteiden differentiaalieristykseen käytetään nykyään täysin manuaalista Chelex-menetelmää. Tekniikan kehittyessä markkinoille on tuotu uusia laitteita, jotka helpottavat ja mahdollisesti myös nopeuttavat näytteiden käsittelyä. Tärkeintä on kuitenkin saada mahdollisimman puhtaita ja hyväsaantoisia eristystuotteita, joten differentiaalieristystä helpottavia laitteita on tärkeää testata ja vertailla sekä keskenään että nykyään käytössä olevaan manuaaliseen menetelmään.

Onnistuneen näytteenkäsittelyn seurauksena saadaan yksilöivä, yhden henkilön DNA:sta määritetty tunniste. Sitä voidaan vertailla poliisin DNA-rekisteriin sekä muihin rikospaikalta, asianomistajasta tai epäilystä otettuihin näytteisiin. Riittävän vahvoista ja hyvälaatuisista sekoitustuloksista on mahdollista poistaa tunnetun asianomistajan tunnisteiden alleelit, jolloin näytteistä voidaan analysoida rikoksen tekijän tunniste poissulkumenetelmällä. Yksilöivä tunniste on kuitenkin aina ehdottomasti paras vaihtoehto, kun rikosnäytteiden tuloksia lausutaan oikeuskäsittelyä varten. Jos DNA on hajonnut eristyksen aikana tai jos näyte on alun perinkin ollut heikkolaatuinen, ei näytteestä saada rikosoikeudellisesti käyttökelpoista tunnistetta.

2.1 Seksuaalirikosten tutkiminen

Useimmiten RTL:oon lähetetyt seksuaalirikosnäytteet ovat soluja sisältäviä pumpulipuikkoja ja tekstiileitä. Seksuaalirikosnäytteet sisältävät usein sekä epiteelisoluja että siittiöitä, jolloin epiteelisolujen oletetaan olevan peräisin asianomistajasta ja siittiöiden rikoksen tekijästä. DNA:n differentiaalieristyksessä pyritään erottelemaan näiden solutyypin DNA:t eri fraktioihin. Onnistuneessa differentiaalieristyksessä näytteestä saadaan analysoitua kaksi yksilöivää DNA-tunnistetta. Vertaamalla näitä tunnisteita poliisin DNA-rekisteriin voidaan syyllinen saada vastuuseen. Seksuaalirikosten tutkimisessa tulee kuitenkin ottaa huomioon, että miesperäinen DNA on voinut päätyä asianomista-

jaan tai tekstiileihin esimerkiksi kosketuksessa tarttuneiden ihosolujen myötä. Differentiaalieristyksessä siittiöiden ja epiteelisolujen DNA:t on kuitenkin hyvin vaikea saada eroteltua omiin, täysin puhtaisiin fraktioihinsa, joten ainoa varma tapa osoittaa näytteen sisältäneen siemennestettä on siittiöiden toteaminen näytteestä valmistetulta preparaattilasilta mikroskopoimalla.

2.2 DNA-analytiikka

2.2.1 Näytteiden esikäsittely

Yhteistä kaikkien solujen DNA:n eristyksessä on *Engyodontium album* -sienestä eristettävän entsyymin proteinaasi K:n käyttö. Se pilkkoo proteiineja ja keratiinia, ja auttaa DNA:n eristyksessä rikkomaan solukalvoja ja -seiniä. Soluhajotuksen eli lyysauksen lisäksi proteinaasi K hajottaa proteiinit, jotka suojaavat DNA-molekyylejä niiden ollessa kromosomeissa. Eristyksessä proteinaasi K:n käyttö myös lisää DNA-saantoa, sillä se hajottaa muitakin eristystä häiritseviä proteiineja, kuten DNA:ta hajottavia entsyymejä, nukleaaseja. [1, s. 44; 2.] Siittiöiden tumakalvot ovat niin vahvoja, ettei pelkkä proteinaasi K riitä niiden rikkomiseen. Siittiöitä lyysattaessa soluja sisältävään näytesuspensioon lisätään proteinaasi K:n lisäksi ditiotreitolia eli DTT:a, joka hajottaa siittiöiden tumakalvojen proteiinien disulfidisillat vapauttaen myöskin siittiöiden miesperäisen DNA:n liuokseen. [1, s. 46–47.]

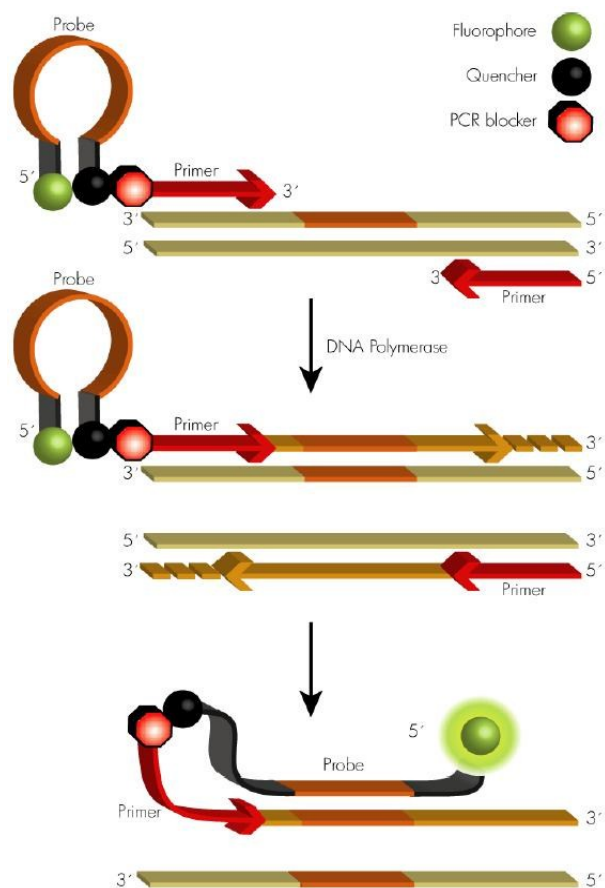
2.2.2 qPCR

PCR-reaktiolla monistetaan kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä oleva jakso DNA-polymeraasientsyymillä. Reaktion etenemistä ohjaa PCR-laite, joka kontrolloi tarkasti näytteiden lämpötilaa. Aluksi monistuksen kohteena eli templaattina käytetty DNA-ketju denaturoidaan korkeassa lämpötilassa, jolloin templaatin juosteet irtoavat toisistaan. Annealing-reaktiossa alukkeet eli primerit kiinnittyvät kohdejuosteisiinsa, kun lämpötilaa lasketaan hetkellisesti. Primerit ovat lyhyitä, noin 15–40 nukleotidin pituisia synteettisiä yksijuosteisia DNA-fragmentteja. Ne suunnitellaan jokaista haluttua reaktiota varten siten, että ne kiinnittyvät templaatin juosteisiin monistettavan alueen molempiin päihin. Annealingia seuraa ekstensio- eli pidennysreaktio, jossa lämpötilaa nostetaan käytetyn entsyymillä optimiin toimintalämpötilaan. Silloin polymeraasi alkaa liittää reaktioseoksessa olevia nukleotideja ketjuksi käyttäen

templaattijuostetta mallina. Ekstension jälkeen lämpötila nostetaan jälleen denaturaatiotasolle, ja kaikki juosteet irtoavat toisistaan. Sarjaa denaturaatio-annealing-ekstensio kutsutaan sykliksi, jota toistetaan useamman kerran peräkkäin. Tällä tavalla haluttujen DNA-jaksojen määrää saadaan kasvatettua liuoksessa tehokkaasti. [3, s. 153–154.]

Eristystuotteiden DNA-pitoisuuksien määrittäminen eli kvantitointi on tärkeää PCR-monistusreaktion pipetointia ja optimointia varten. Kvantitoinnilla voidaan myös selvittää, kuinka hyvin näytteen DNA:n eristys on onnistunut tai onko näyte alun perinkään sisältänyt DNA:ta. Kvantitointi onnistuu qPCR-menetelmällä, joka on PCR-reaktion sovellus. qPCR:lla voidaan seurata syntyvän tuotteen määrää jatkuvasti, mikä mahdollistaa näytteen DNA-pitoisuuden määrittämisen. Reaktioseoksen alkuperäinen DNA-määrä voidaan laskennallisesti ekstrapoloida tarkan DNA-tuotteen määrän kasvun perusteella tunnettuihin kontroleihin verraten. Reaktion reaaliaikainen seuranta onnistuu fluoresoivan merkkiaineen avulla. Sitä voidaan lisätä reaktioseokseen väriaineena tai komplementaarisen koettimen eli proben mukana. Väriaineen emittoima fluoresenssi kasvaa DNA-molekyylien monistuessa PCR-reaktion aikana. qPCR-laite mittaa reaktioseoksen fluoresenssin jokaisen syklin välissä, minkä perusteella tuotteen määrän kasvu voidaan selvittää. [3, s. 166–170.]

Työssä käytettiin Qiagenin kaupallista Investigator® Quantiplex Kittä. Sen Primer Mix IC FQ -liuos sisältää Scorpion-primereita (kuva 1), joihin koettimet ovat sitoutuneet kovalenttisesti. Niissä fluorofori on vuorovaikutuksessa vaimentimen kanssa. Kun koetin sitoutuu valmistuvaan tuotteeseen, sen fluorofori ja vaimennin irtoavat toisistaan ja fluoroforin lähettämä fluoresenssisignaali moninkertaistuu. [3, s. 166–170; 4, s. 6–7.]



Kuva 1. Scorpion-primerit ja niiden toimintaperiaate [4, s. 7].

Rikosnäytteen DNA-pitoisuuden määrittämisen eli kvantitoinnin avulla voidaan määrittää näytteille mahdollisesti tarvittavat laimennuskertoimet PCR-reaktiota valmisteltaessa. Monistumisreaktio tapahtuu tehokkaammin, kun templaattia on reaktioseoksessa sopiva, optimoitu määrä. Samalla myös monistumista heikentävien inhibiittoreiden ja kontaminanttien määrä reaktioseoksessa pienenee.

RTL:ssa kvantitointinäytteiden pipetointi tehdään Qiagenin QIAgility®-pipetointirobotilla. Se on yksikanavainen pipetointirobotti, joka pipetoi näytteet sadan kuopan näyterengkaalle, Rotor-Discille. Automaation myötä satunnaiset pipetointivirheet saadaan poistettua kokonaan. Laite on kytketty tietokoneeseen, ja QIAgilityn® omalla tietokoneohjelmalla suunnitellaan ja ohjataan käytetyt pipetointiohjelmat. Laite pipetoi renkaalle myös standardit, joista muodostetun standardisuoran perusteella näytteiden DNA-pitoisuudet määritellään. Valmiiksi pipetoitu näyterengas suljetaan Qiagenin Rotor-Disc Heat Sealerilla, ja rengas asetetaan lukitusrenkaassa Qiagenin Rotor-Gene Q -kvantitointilaitteistoon. Siinä olevien kuuden eri LED-valonlähteen avulla reaktioseoksen primerei-

den lähettämien fluoresenssisignaalien perusteella detektori määrittää näytteiden alkuperäisen DNA-pitoisuuden.

2.2.3 PCR

Eristetyn näytteen DNA:ta täytyy monistaa ja vahvistaa tulosten analysoinnin onnistumiseksi. Tämä onnistuu PCR:lla. Valitsemalla monistuksen kohteiksi useita DNA-alueita, joissa on vaihtelua eri henkilöiden välillä, voidaan tuloksien avulla saada määritettyä henkilön DNA-tunniste.

Työssä käytettiin Qiagenin kaupallista Investigator ESSplex Plus Kittiä eli EPP-kittiä. Sillä monistetaan 15 eri polymorfista ja yhtä sukupuolesta viitteitä antavaa STR-lokusta samanaikaisesti PCR-reaktion aikana. Monistettavat lokukset ovat D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, FGA [FIBRA], TH01 [TC11], vWA ja sukupuolesta viitteitä antava Amelogenin. Reaktiota varten tarvittava mastermix valmistetaan sekoittamalla kitin kahden liuosta, Fast Reaction Mix -liuosta ja Primer Mix ESSplex Plus -liuosta, oikeassa suhteessa. Primer Mix ESSplex Plus -liuos sisältää reaktioon tarvittavat primerit, ja Fast Reaction Mix -liuos sisältää kaiken muun tarvittavan: DNA-polymeraasientsyymien, reaktiopuskurin ja monistusta tehostavat ionit ja yhdisteet. Mastermixia pipetoidaan 96-kuoppalevyille, jonka jälkeen näytteet, eli reaktioiden templaattit, lisätään pipetoituihin mastermix -liuoksiin. RTL:ssa käytetään eristettyjen DNA-näytteiden PCR-monistamiseen pienempää, 16,8 µl:n tilavuutta. Jos monistuminen ei onnistu riittävän hyvin ensimmäisissä reaktioissa, käytetään uusintareaktioon suurempaa, 25 µl:n tilavuutta. Useimmiten pienempi reaktiutilavuus riittää tuloksien saavuttamiseen, jolloin kitin reaktioliuosten käytössä voidaan säästää. Yhden reaktioseoksen sisältämät liuosmäärät on esitetty taulukossa 1. [5, s. 6–7.]

Taulukko 1. PCR-reaktioseos

Liuos	Määrä (µl)	Määrä uusintareaktioissa (µl)
Fast Reaction Mix	5,1	11,25
Primer Mix ESSplex Plus	1,7	3,75
DNA-näyte	10 (0,2–0,5 ng)	10 (0,2–0,5 ng)

Monistumisen tehokkuuden parantamiseksi templaattia tulee olla reaktioseoksessa 0,2–0,5 ng. Reaktiossa käytetty PCR-ohjelma on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. PCR-monistuksessa käytetty PCR-ohjelma

Lämpötila (°C)	Aika (s)	Syklien lukumäärä
95	300	-
96	10	} X 30
61	120	
10	∞	-

Siittiöiden lyysauksessa käytetty DTT aiheuttaa saostumia PCR-monistuksessa. DTT:n puhdistus ja näytteen konsentrointi onnistuu Milliporen Microcon® Ultracel YM-100 -sentrifugipylväillä. Pylväs asetetaan 1,5 ml:n keräysputkeen valkoinen selluloosakalvo alaspäin, ja näyte pipetoidaan pylvääseen. Yhdistelmää sentrifugoidaan, jolloin näytteessä oleva neste valuu selluloosakalvon läpi keräysputkeen, mutta liuoksessa oleva DNA jää pylvääseen. Sentrifugoinnin jälkeen pylvääseen pipetoidaan vettä, ja yhdistelmää sentrifugoidaan. Vesi valuu selluloosakalvon läpi ja huuhtoo mukanaan DTT:a. Lopuksi pylväs käännetään ympäri puhtaaseen keräysputkeen. Kun yhdistelmää sentrifugoidaan, puhdistettu ja konsentroidu DNA-tuote valuu keräysputkeen ja on käyttövalmis jatkokäsittelyihin (kuva 2).



Kuva 2. Microcon® Ultracel YM-100 -sentrifugipylväs, pylväs 1,5 ml:n keräysputkessa ja ympäri käännetty pylväs 1,5 ml:n keräysputkessa.

2.2.4 Kapillaarielektroforeesi

Kapillaarielektroforeesilla erotellaan PCR-monistuksen tuotteet toisistaan. Laite piirtää monistettujen DNA-ketjujen liikkumista kuvaavia kromatogrammeja (liitteet 1-3), joiden perusteella voidaan määrittää yksilöiviä DNA-tunnisteita.

Eristystuotetta injektoidaan silikakapillaariin, joka on täytetty polymeeripitoisella elektrolyyttiliuoksella. Negatiivisesti varautuneet DNA-ketjut kulkeutuvat kapillaarissa kohti positiivisesti varautunutta elektrodia eli anodia. DNA-tuotteiden erottelussa ainoastaan DNA-jakson pituus vaikuttaa niiden liikkumisnopeuteen, sillä DNA-ketjuilla on tietty varaus yhtä nukleotidia kohden. Erottelun aikana DNA-jaksojen fluoresenssisignaali eli emissio kerätään CCD-kameralla. Alleelien nimeäminen suoritetaan GeneMapper® ID-X -ohjelmaa käyttäen. Siinä kunkin toistojakson PCR-tuotteessa ollut lukumäärä määritetään, ja kapillaarielektroforeesiajossa saatujen kromatogrammien piikit nimetään niiden sijaintialueiden mukaan. Näiden tietojen perusteella voidaan muodostaa numerosarja, joka toimii henkilön DNA-tunnisteena. [6, s. 165.]

3 Eristystekniikat

3.1 Chelex-eristys

Chelex® 100 on kelatoivaa hartsia, jonka käyttö rikosnäytteiden DNA:n eristyksessä on yleistä. Sen käyttö on helppoa ja nopeaa, eikä Chelex-eristyksessä tarvita orgaanisia liuottimia. Myöskään kontaminaatoriskiä lisääviä näytteen siirtoja putkesta toiseen ei tarvita. Tällä menetelmällä voidaan saavuttaa yhtä hyviä tai jopa parempia tuloksia kuin vaihtoehtoisella fenoli-kloroformi-uuttomenetelmällä. [7, s. 506.]

Chelex® 100 koostuu styreenidivinylibentseenikopolymeereistä, jotka sisältävät kela-toivina ryhminä toimivia iminodiasetaatti-ioneja. DNA:n eristykseen käytettäviä suspensioita valmistetaan liuottamalla Chelex® 100:a tislattuun ja autoklavoituun MilliQ-veteen. Näin valmistettua Chelex-suspensiota pipetoidaan suoraan näytteeseen siten, että Chelex® 100:n pitoisuus näyteseoksessa on 5 %. KRP:n rikosteknisessä laboratoriossa käytettyjen Chelex-suspensioiden pH-arvot ovat 11,00–11,20, ja alkalisuutensa avulla suspensio kuumennettaessa rikkoo solujen kalvot. Chelex-suspension lisäksi näytteisiin lisätään myös proteinaasi K:ta tehostamaan lyysautumista. Chelex-suspension ja proteinaasi K:n sisältämää näytteseosta inkuboidaan ensin 56 °C:n lämpötilassa, jolloin proteinaasi K:n aktiivisuus kasvaa ja solut hajoavat. Sen jälkeen näyte siirretään DNA:n denaturoivaan 96 °C:n lämpötilaan, jossa proteinaasi K inaktivoituu. [1, s. 44–45; 2; 7, s. 506;.]

Nukleaasit tarvitsevat magnesiumia aktivoituakseen. Kelatoivan ominaisuutensa ansiosta Chelex® 100 sitoo itseensä monia metalli-ioneja, kuten magnesiumia. Tällöin näytesuspensiossa mahdollisesti olevat nukleaasit inaktivoituvat, ja eristettävä DNA säilyy ehjänä. [1, s. 44–45.]

DNA-eristyksissä käytetään 5-prosenttista ja 20-prosenttista Chelex-suspensioita. Taulukossa 3 on esitetty RTL:ssa käytettyjen suspensioiden valmistusohjeet.

Taulukko 3. 5-prosenttisen ja 20-prosenttisen Chelex-suspension valmistaminen.

Chelex-pitoisuus	Chelex® 100 (g)	Autoklavoitu MilliQ-vesi (ml)
5 %	5	100
20 %	20	100
pH-arvo välillä 11-11,2		

Chelex® 100 on tehokkaimmillaan, kun sen pitoisuus on 5 %. Näytteen sisältäessä vettä lisätään siihen 20-prosenttista suspensiota siten, että näytteen Chelex-pitoisuus on noin 5 %.

3.2 Qiagen EZ1

Qiagenin EZ1 Advanced -laitteet eristävät nukleiinihapot näytteestä täysin automatisoidusti, mikä mahdollistaa eristystuotteen tehokkaan ja standardisoidun puhdistuksen. Laitteita on saatavilla kahta kokoa: EZ1 Advanced ja BioRobot EZ1, joilla voi käsitellä samanaikaisesti 1–6 näytettä, sekä RTL:ssa käytössä oleva EZ1 Advanced XL (kuva 3), jolla DNA:n eristys onnistuu samanaikaisesti 1–14 näytteelle. Qiagenilta on saatavilla laitteille spesifisesti valmistettuja kaupallisia kittejä DNA:n, RNA:n ja viraalisten nukleiinihappojen eristämistä varten. KRP:n RTL:ssa on käytössä EZ1® DNA Investigator Kit, joka sopii muun muassa rikosnäytteiden ja henkilöllisyyden analysointiin. Se sopii genomisen DNA:n eristämiseen erilaisista, heikoistakin näytteistä. [8; 9, s. 9.]



Kuva 3. Qiagen EZ1 Advanced XL [4].

Rikospaikkänäytteitä on suuri kirjo erilaisia, joten esikäsittelynä tehtävä solujen lyysaus tulee valita käsiteltävän näytteen mukaan. Qiagen on laatinut lyysauskäsittelyprotokollat 14 erilaiselle näytetyypille, sekä yhden yleisluonteisen menetelmän, jota voi käyttää Qiagenin listasta poikkeaville näytteille. [9, s. 11.]

3.2.1 Lyysaus

Pääpiirteet ovat kaikissa menetelmissä liuosverta lukuun ottamatta samat: näytemateriaali siirretään 2 ml:n kierrekorkilliseen näyteputkeen, johon lisätään kitin Buffer G2:ta ja Proteinase K:ta, jonka jälkeen näytettä inkuboidaan 56 °C:n lämpötilassa. DNA-saantoa voidaan parantaa siirtämällä näytteet lopuksi 95 °C:n lämpötilaan. Differentiaalieristyksessä näytteen epiteelisolut lyysataan kitin Buffer G2:ta ja Proteinase K:ta käyttäen edellä mainitulla tavalla. Kun epiteelisolujen DNA on vapautettu liuokseen, kerätään ehjät siittiöt putken pohjalle sentrifugoimalla. Epiteelisolujen DNA:n sisältävä supernatantti siirretään toiseen, puhtaaseen 2 ml:n näyteputkeen, ja siittiösakka liuotetaan kitin Buffer G2:een. Putkeen jääneet siittiösolut saadaan lyysattua lisäämällä seokseen kitin Proteinase K:ta ja DTT:a ja inkuboimalla näytteitä 56 °C:n lämpötilassa Thermomixerissä 850 rpm:n kierrosnopeudella yön yli. Siittiöiden lyysauksen jälkeen näytemateriaali poistetaan putkesta. DNA:ta eristetään näin erotelluista lysaateista EZ1 Advanced XL -laitteella. [9, s. 22–43.]

3.2.2 Eristys

EZ1 Advanced -laitteet suorittavat automatisoidusti DNA:n eristuksen. Eristys perustuu magneettipartikkelitekniikkaan, jossa lyaatin DNA sitoutuu silikalla päällystettyjen magneettipartikkelien pinnalle kaotrooppisen suolan läsnäollessa. Magneettien avulla partikkelit saadaan erotettua lyaatista, ja niiden pinnalla olevaa DNA:ta voidaan pestä pesupuskurilla tarkasti ja riittävästi. Lopuksi DNA eluoidaan partikkeleiden silikapinnalta matalan suolapitoisuuden sisältävään eluointipuskuriin tai veteen. Eluointilavuudeksi voi valita joko 40, 50, 100 tai 200 µl. [9, s. 9.] Jokaista eristettävää näytettä kohden EZ1 Advanced -laitteeseen asetetaan kaikki eristykseen tarvittavat liuokset sisältävä, etukäteen täytetty, tiiviisti suljettu reagenssikasetti eli cartridge omassa telineessään (kuva 4). Kun jokainen näyte käsitellään omalla reagenssikasetilla, on ristikontaminaation riski todella pieni. [9, s. 9; 10, s. 164.]



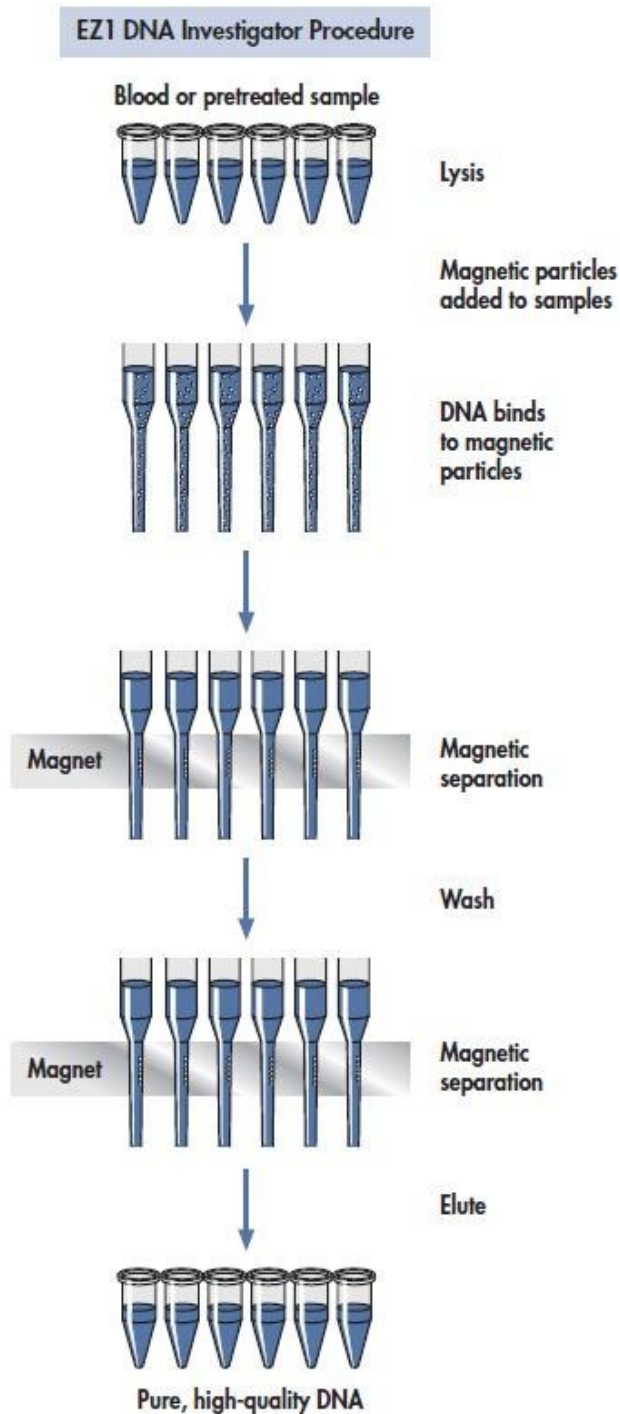
Kuva 4. EZ1 DNA Investigator Kitin cartridge ja EZ1 Advanced -laitteeseen asetettava cartridge-alusta [9, s. 17].

Reagenssikasettien lisäksi EZ1-laitteeseen asetetaan omassa telineessään lyaatin sisältävät näyteputket, tyhjät, steriilit eluutioputket sekä kärkisuojoissa olevat suodattimelliset pipetinkärjet (kuva 5).



Kuva 5. EZ1 Advanced XL -laitteen työskentelyalue: 1. Ensimmäinen rivi: eluutioputket (1,5 ml)
2. Toinen rivi: kärkisuojat ja suodattimelliset kärjet 3. Neljäs rivi: näyteputket (2 ml) 4.
reagenssikasetit

Laite aloittaa eristuksen rei'ittämällä reagenssikasettien foliopäällysteet, minkä jälkeen eristykseen tarvittavat liuokset ovat käytettävissä. Sitten laite poimii kärjet pipetteihinsä ja alkaa siirtää näyteliuoksia reagenssikasettien liuoskaivoista toisiin suorittaen DNA:n eristystä ja puhdistusta.



Kuva 6. DNA:n eristys EZ1-laitteilla [9, s. 10].

Aluksi reagenssikasetin kaivossa 2 oleva magneettipartikkeleita sisältävä liuos sekoitetaan lyaatin kanssa pipetoimalla seosta edestakaisin, ja näytteen DNA sitoutuu partikkeleiden pinnalle. Laitteessa olevan magneetin avulla partikkelit pysyvät pipetissä, kun loput liuoksesta lasketaan pois pipetinkärjestä. Seuraavaksi partikkeleiden pinnalla

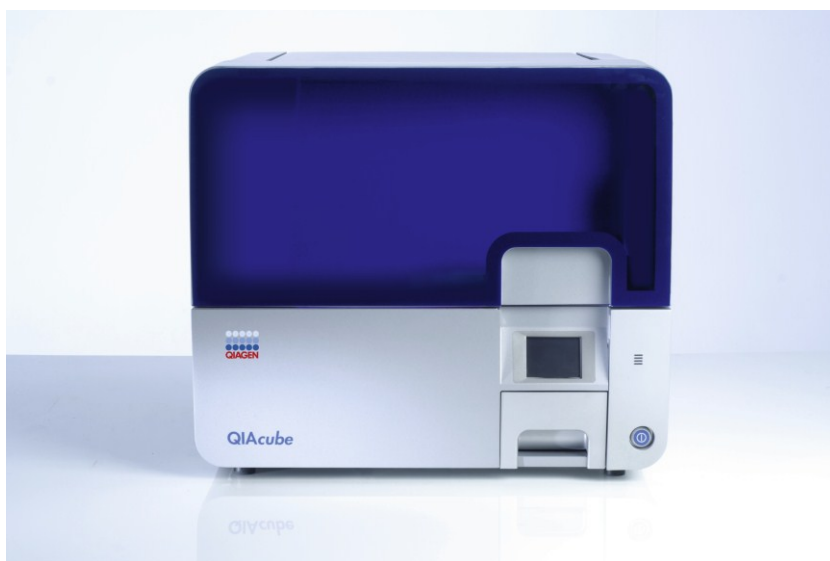
olevaa DNA:ta pestään reagenssikasetissa kaivoissa 4, 5 ja 6 olevalla pesuliuoksilla. Lopulliset eluutioliuokset laite pipetoi tyhjiin eluutioputkiin. DNA:n eristysperiaate EZ1-laitteilla on esitetty kuvassa 6.

3.2.3 Laitteiston puhdistus

Hyvien ja puhtaiden eristystuloksien saamiseksi EZ1-laitteiden puhtaudesta on tärkeää huolehtia. Näyteputkien, pipetinkärkien ja reagenssikasettien alustat pyyhitään ensin tislatulla vedellä ja sitten 70-prosenttisella etanolilla kostutetuilla nukkaamattomilla liinoilla jokaisen eristyssarjan (1–14 näytettä) välissä. Clean-toiminnolla laite siirtää reagenssikasettien foliopäällysteet rei'ittävät piikit näkyville. Piikit pyyhitään ensin tislatulla vedellä ja sitten 70-prosenttisella etanolilla kostutetuilla nukkaamattomilla liinoilla jokaisen näytesarjan välissä. Samalla laitteen alusta voidaan irrottaa ja puhdistaa. Laitteen dekontaminoiva UV-ohjelma viimeistelee puhdistuksen UV-säteilytyksellä, jonka keston voi säätää halutun pituiseksi.

3.3 Qiagen QIAcube®

Qiagenin QIAcube® (kuva 7) on laite, joka suorittaa näytteiden puhdistuksia ja esikäsittelyjä. Qiagenilta on saatavilla useita laitteelle suunniteltuja kaupallisia kittejä erilaisiin tarkoituksiin.



Kuva 7. Qiagen QIAcube® [11, s. 1].

QIAcube® sisältää monia eri toimintoja tekeviä osia: sentrifugin, lämmitettävän ravistelijan, pipetointijärjestelmän ja robottimaiset pihdit (kuva 8). Näiden osien avulla laite voi suorittaa monimutkaisempiakin prosesseja täysin automatisoidusti.



Kuva 8. QIAcuben työalue: 1 sentrifugin kansi, 2 sentrifugi, 3 ravistelija, 4 reagenssipulloteline, 5 kärjen tunnistin, 6 mikrosentrifugiputkien paikka, 7 kärkitelineet, 8 kärkien ja pylväiden poistoaukko, 9 robottikäsivarsi [11, s. 47].

Laitteeseen integroidussa sentrifugissa on pyörimisliikkeeseen mukautuvat keinoosat, joissa on paikat 12 näyteputkelle. Robottikäsivartensa avulla QIAcube® voi käsitellä sentrifugissa olevia näytteitä käyttämällä joko pipetointisysteemiä tai robottisia pihtejä. Kertakäyttöisissä roottorisovittimissa on paikat sekä näyteputkille, sentrifugipylväille että näytteen homogenisoimiselle. [11, s. 48.]

Lämmitettävä ravistelija mahdollistaa 1–12 näytteen automatisoidun lyysauksen. Ravistelijan sovitin numeroiduille paikoille sopivat 2 ml:n mikrosentrifugiputket ja 2 ml:n kierrekorkilliset näyteputket. Mikrosentrifugiputkien korkit asetetaan ravistelijan niille tarkoitettuihin aukkoihin, ja putket pysyvät paikoillaan. Kierrekorkillisia näyteputkia käy-

tettäessä ravistelijan korkeille tarkoitettuihin aukkoihin asetetaan tarkoitusta varten valmistetut tulpat. Ravistelijaa voi käyttää myös kosketusnäytön avulla. [11, s. 47–48.]

QIAcubella® voi käsitellä 1–12 näytettä samanaikaisesti. Useat Qiagenin kaupalliset kitit sisältävät sentrifugipylväitä, joita käyttämällä laitteella voidaan eristää ja puhdistaa genomista DNA:ta ja plasmidi-DNA:ta, RNA:ta, viraalisia nukleiinihappoja ja proteiineja. Käytettävä protokolla valitaan kosketusnäytöllä, ja laitteeseen täytetään tarvittavat muovitarvikkeet, näytteet ja reagenssit. Laitteen ovi suljetaan, ja laite käynnistää ohjelman. Ennen ohjelman aloitusta QIAcube® tarkistaa infrapunaa ja ultraäänen avulla, että kaikki materiaalit ja komponentit on täytetty oikein. [11, s. 41.]

DNA:n differentiaalieristyksessä epiteelisolulysaatin erottelu sekä siittiösakan pesuvaihe voidaan suorittaa QIAcubella®. Epiteelisolulysaatin ja siittiöt sisältävät näyteputket asetetaan laitteen sentrifugiin siihen sopivissa kertakäyttöisissä roottorisovittimissa, ja ravistelijaan asetetaan tyhjät näyteputket epiteelilyysaatteja varten. Differentiaalieristykseen käytetyssä protokollassa ravistelijaa ei tarvitse lämmittää, sillä epiteelisolut on lyysattu etukäteen. Pesupuskuri ja lyysauspuskuri asetetaan laitteen reagenssipullote-lineeseen 30 ml:n reagenssipulloissa ja kärkitelineet täytetään kertakäyttöisillä, suodatimellisilla kärjillä.

Separation and Lysis -ohjelmassa QIAcube® sentrifugoi aluksi siittiöt sentrifugissa olevien näyteputkien pohjille, jonka jälkeen laite pipetoi epiteelisolulysaatin sisältävät supernatantit ravistelijassa oleviin tyhjiin näyteputkiin. Kun näytteiden esikäsittelyt tehdään 200 µl:n tilavuuteen, pipetoi laite epiteelisolulysaattia ravistelijan näyteputkiin noin 200 µl. Sen jälkeen laite suorittaa siittiösakkojen pesun neljästi: laite pipetoi siittiöpelletit sisältäviin näyteputkiin pesupuskuria, liuottaa siittiöpelletit pesupuskuriin, sentrifugoi näyteputkia ja poistaa supernatantit näyteputkista roottorisovittimien nestesäiliöihin. Siittiösakkojen pesujen jälkeen laite liuottaa siittiöpelletit 250 µl:aan lyysauspuskuria. Käsittely 1–6 näytteelle voidaan suorittaa alusta loppuun yhdellä, korkeintaan kuudelle näytteelle laaditulla Separation and Lysis -ohjelmalla, joka kestää yhden tunnin ajan. Kun käsiteltäviä näytteitä on 7–12 kappaletta, on Separation and Lysis -ohjelma suoritettava kahdessa osassa, A- ja B-osassa. Tällöin laitteen kärkiteline on täytettävä ohjelman osien välissä, ja kahdessa osassa suoritettava ohjelma kestää yhteensä puolitoista tuntia.

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Näytteet

Todelliset seksuaalirikosnäytteet ovat lähes aina pumpulipuikoissa tai kankaan paloissa. Tällaiset näytteet on otettu uhrista, uhrin vaatteista ja rikospaikan tekstiileistä sekä esineistä.

Vertailtavat näytteet valmistettiin mahdollisimman samankaltaisiksi kuin todelliset näytteet, jotta eri eristysmenetelmien vertailun tuloksia voidaan hyödyntää menetelmänkehityksessä. Näytemateriaalina käytettiin solususpensioseosta 50 µl yhtä etyleenioksidilla (EtO) steriloitua pumpulipuikkoa kohden. Solususpensioseoksen pumpuliin imeyttämisen jälkeen pumpulipuikkojen annettiin kuivua huoneenlämmössä useita vuorokausia. Työssä käytetty vesi oli autoklavoitua MilliQ-vettä.

Näytteiden käytettyjen solususpensioseosten valmistamista varten tarvittiin mies A:n siemennestettä ja nainen B:n epiteelisoluja. Siemennesteestä tehtiin 1:10-laimennos, siemenneste- eli SP-suspensio, josta tehtiin suorasperma-eristykset Chelex-suspensiota käyttäen 5 µl:n ja 15 µl:n erille RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA17:n mukaan. Siittiöiden lyysauksessa käytetty DTT poistettiin Milliporen Microcon® Ultracel YM-100 -sentrifugipylväillä. Pylväät asetettiin 1,5 ml:n keräysputkiin, ja SP-näytteiden tilavuudet mitattiin pipetillä samalla, kun ne siirrettiin pylväisiin. Keräysputkien korkit suljettiin pylväiden päälle, ja yhdistelmiä sentrifugoitiin 10 min 506 g:tä vastaavalla voimalla. Sen jälkeen pylväisiin pipetoitiin 250 µl vettä, yhdistelmät suljettiin ja niitä sentrifugoitiin 10 min 506 g:tä vastaavalla voimalla. Lopuksi pylväät käännettiin ympäri puhtaaseen keräysputkeen, ja yhdistelmiä sentrifugoitiin 3 min 986 g:tä vastaavalla voimalla. Pylväät poistettiin, ja puhdistettujen, konsentroitujen näytteiden tilavuudet mitattiin pipetillä samalla, kun ne siirrettiin puhtaisiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin. Näytteiden DNA-pitoisuudet kvantitoitiin Investigator Quantiplex Kitillä kahdella replikaatilla QIAgilitya ja RotorGene Q:ta käyttäen (toimintaperiaate kuvattu aiemmin kappaleessa 2.2.1) RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA33:n mukaan, ja kvantitaatioarvojen perusteella voitiin selvittää laimennoksesta tehtyjen näytteiden keskimääräinen DNA-pitoisuus. Kvantitaatiotulokset on esitetty taulukossa 8 luvussa Tulokset.

Epiteelisolut kerättiin 60 pumpulipuikosta, joilla oli pyyhitty naisen B poskien limakalvoja. Pumpulit leikattiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin, joissa oli 500 µl vettä. Jokaista pumpulia vatkattiin eli pyöriteltiin ja puristeltiin manuaalisesti autoklavoidulla, puisella hammastikulla noin kolmen minuutin ajan, jonka jälkeen pumpulit poistettiin putkista ime-mällä ne kuiviksi pipetillä laajempiaukkoista pipetinkärkeä käyttäen. Näin kerätyt epiteelisolut kerättiin putkien pohjille sentrifugoimalla 3 min 15 700 g:tä vastaavalla voimalla. Supernatantit poistettiin ja solusakat yhdistettiin. Solut laimennettiin vedellä noin 2 ml:n tilavuuteen epiteelisoluli EP-suspensioksi. Suspension keskimääräisen DNA-pitoisuuden selvittämiseksi suspensiosta tehtiin Chelex-eristykset RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA3:n mukaan 10, 20 ja 30 µl:n erille siten, että näyte-erät laimennettiin vedellä lopulliseen 30 µl:n tilavuuteen. Eristystuotteet kvantitoitiin kolmella replikaatilla. Kvantitaatiotulokset on esitetty taulukossa 8 luvussa Tulokset.

SP-suspensiosta tehtyjen suspension DNA-pitoisuutta määrittävien näytteiden kvantitaatiotulosten keskiarvot laskettiin, ja näytteeseen käytetyt suspensiotilavuudet otettiin huomioon (1). Näiden tulosten keskiarvolla (2) määritettiin eristetyn SP-näytteen DNA-pitoisuus yhtä mikrolitraa SP-suspensiota kohden:

5 µl:

$$\frac{1,57562 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}{5} = 0,31512 \text{ ng}/\mu\text{l} \quad (1)$$

15 µl:

$$\frac{4,59565 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}{15} = 0,30638 \text{ ng}/\mu\text{l} \quad (1)$$

Keskiarvo:

$$\frac{0,31512 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} + 0,30638 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}{2} = 0,31075 \text{ ng}/\mu\text{l} \approx 0,3108 \text{ ng}/\mu\text{l} \quad (2)$$

EP-suspensiosta tehtiin eristyskiä, joiden avulla määritettiin suspension DNA-pitoisuus. Laskettiin eristettyjen näytteiden kokonaistilavuus (3). Näytteisiin lisätyt DNA-määrät voitiin selvittää näytteiden kvantitaatiotulosten keskiarvojen ja kokonaistilavuuksien avulla (4), ja näytteisiin lisätyt suspensiotilavuudet otettiin huomioon (5). Näiden arvojen keskiarvo (6) määritteli EP-suspension DNA-pitoisuuden:

Kokonaistilavuus:

$$30 \mu\text{l} + 170 \mu\text{l} + 2 \mu\text{l} = 202 \mu\text{l} \quad (3)$$

10 μl :

$$0,99460 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 202 \mu\text{l} = 200,909 \text{ ng} \quad (4)$$

$$\frac{200,909 \text{ ng}}{10 \mu\text{l}} = 20,091 \text{ ng}/\mu\text{l} \quad (5)$$

20 μl :

$$1,67778 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 202 \mu\text{l} = 338,912 \text{ ng} \quad (4)$$

$$\frac{338,912 \text{ ng}}{20 \mu\text{l}} = 16,946 \text{ ng}/\mu\text{l} \quad (5)$$

30 μl :

$$2,68989 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot 202 \mu\text{l} = 543,358 \text{ ng} \quad (4)$$

$$\frac{543,358 \text{ ng}}{30 \mu\text{l}} = 18,112 \text{ ng}/\mu\text{l} \quad (5)$$

Keskiarvo:

$$\frac{20,091 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} + 16,946 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} + 18,112 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}{3} = 18,383 \text{ ng}/\mu\text{l} \approx 18,38 \text{ ng}/\mu\text{l} \quad (6)$$

Näytteiden jatkotutkimuksissa eristettyjä SP-fraktioita analysoitaessa lisätyn DNA:n määrää tärkeämpi suure on fraktion DNA-pitoisuus. Eristetyn DNA:n absoluuttisella määrällä ei ole yhtä suurta merkitystä kuin näytteen DNA-pitoisuudella, kunhan DNA:n määrä on riittävä muodostamaan näytteelle sopivan DNA-pitoisuuden. Tästä syystä näytteet suunniteltiin eristettyjen siittiöfraktioiden laskennallisen DNA-pitoisuuden mukaan. Yhden mikrolitran SP-suspensioerästä eristetyn siittiöfraktion keskimääräiseksi DNA-pitoisuudeksi määritettiin 0,3108 ng/ μl . EP-suspension DNA-pitoisuudeksi määritettiin 18,38 ng/ μl .

4.2 Valmistelevat kokeet

Menetelmien vertailua varten käsiteltäville näytteille tuli suunnitella sopivat solujen sekoitussuhteet. Koska differentiaalieristyksen hankaluus ja ongelmat kohdistuvat miesperäisen DNA:n eristykseen siittiöistä, päätettiin epiteelisoluja lisätä kaikkiin näytteisiin

yhtä paljon, ja muutella siittiöiden määrää. EP-suspensiota lisättiin jokaiseen näytteeseen 15 µl, eli epiteelisolujen DNA:ta oli yhdessä näytteessä keskimäärin 275,7 ng.

4.2.1 Näytteiden haarukointi Chelex-differentiaalieristyksellä

Haarukoivia esikokeita varten päätettiin valmistaa näytteitä kuudella erilaisella solujen sekoitussuhteella, joissa SP-fraktioiden laskennalliset kvantitaatioarvot olivat 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05 ja 0,01 ng/µl. Jokaiselle näytetyypille valmistettiin kolme rinnakkaisnäytettä (näytteet 1.1–1.3, 2.1–2.3, 3.1–3.3, 4.1–4.3, 5.1–5.3 ja 6.1–6.3). Taulukossa 4 on esitetty solususpensioiden sekoitussuhteet yhtä näytettä kohden.

Taulukko 4. Haarukoivien esikokeiden solususpensioiden sekoitussuhteet yhtä näytettä kohden.

Näyte	1	2	3	4	5	6
SP-suspension laskennallinen kvantitaatioarvo (ng/µl)	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01
SP-suspension laimennuskerroin	1:10	1:100	1:100	1:1 000	1:1 000	1:5 000
SP-suspensiota (µl)	16	32	16	32	16	16
EP-suspensiota (µl)	15	15	15	15	15	15
Vettä (µl)	19	3	19	3	19	19

Suspensioita sekoitettiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin yhteensä 150 µl:n tilavuus, josta imeytettiin pipetillä 50 µl yhteen pumpulipuikkoon. Puikkojen annettiin kuivua huoneenlämmössä kaksi vuorokautta.

Näytepuikkojen pumpulit leikattiin 500 µl vettä sisältäviin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin, ja jokaista pumpulia vatkattiin 2,0 min ajan. Pumpulit poistettiin putkista pipetin avulla. Pumpuleista irronneet solut kerättiin putkien pohjalle sentrifugoimalla näyteputkia 1 min 15 700 g:tä vastaavalla voimalla. Supernatantit poistettiin putkista siten, että nestettä jäi solupellettien päälle 30-50 µl, koska solupelletit eivät olleet lyhyestä sentrifugoinnista johtuen kovin kiinteitä. Näin esivalmistelluille näytteille tehtiin Chelex-differentiaalieristykset RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA17:n mukaan. SP-fraktioiden eristystuotteet puhdistettiin Microcon® Ultracel YM-100 -sentrifugipylväillä kuten aiemmin. Eristystuotteen tilavuus mitattiin tarkasti pipetillä siirrettäessä tuotetta sentrifugipylvääseen, ja tuotteen tilavuus mitattiin tarkasti pipetillä puhdistuksen ja konsentroidin jälkeen. Näiden tilavuuksien avulla voidaan laskea, mikä oli tuotteen DNA-pitoisuus ennen puhdistusta ja konsentroidintia.

SP-näytteiden Microcon-puhdistuksen jälkeen kaikki näytteet kvantitoitiin Investigator Quantiplex Kitillä RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA33:n mukaan. qPCR kvantitaatiotulosten perusteella näytteille määritettiin tarvittavat laimennuskertoimet PCR:lla tehtäviä näytteiden määrien lisäämisiä varten. Näytteitä monistettiin PCR-reaktiolla EPP-kittiä käyttäen RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA35:n mukaan, ja ryhmän toinen, tehtävään koulutettu työntekijä suoritti PCR-tuotteiden erottelun kapillaarielektroforeesilla RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA24:n mukaan.

Näytteiden soluseossuhteita haarukoivien esikokeiden tulosten perusteella valittiin eristysmenetelmien suunnitteluun ja kokeiluun näyteseokset 1 ja 5, joissa siittiöiden DNA:n laskennalliset pitoisuudet eristetyissä näytteissä olivat 5 ja 0,05 ng/μl. Näytepuikkoja valmistettiin 15 kappaletta molemmilla solujen sekoitussuhteilla (näytteet 1.4–1.18 ja 5.4–5.18), ja puikkojen annettiin kuivua huoneenlämmössä kaksi vuorokautta.

4.2.2 EZ1 Advanced XL

EZ1 Advanced XL -laitteella kokeiltiin Qiagenin laatimaa differentiaalieristystä sellaiseen molemmilla sekoitussuhteilla kolmella rinnakkaisnäytteellä (näytteet 1.4–1.6 ja 5.4–5.6). Näytepuikkojen pumpulit leikattiin 2 ml:n kierrekorkillisiin näyteputkiin.

Differentiaalieristys aloitettiin epiteelisolujen lyysauksella. Pumpulien päälle lisättiin 240 μl Buffer G2:ta ja 10 μl Proteinase K:ta Qiagenin EZ1[®] DNA Investigator Kitistä. Näyteputket suljettiin ja siirrettiin Eppendorfin Thermomixer Comfort -hauteelle 56 °C:n lämpötilaan 15 min ajaksi 1150 rpm:n kierrosnopeuden sekoitukseen. Inkuboinnin jälkeen putkia sentrifugoitiin nopeasti, ja pumpulit poistettiin putkista pipetin avulla. Ehjinä säilyneet siittiöt kerättiin putkien pohjille sentrifugoimalla 5 min 15 000 g:tä vastaavalla voimalla. Epiteelisolujen DNA:n sisältävät supernatantit siirrettiin puhtaisiin 2 ml:n kierrekorkillisiin näyteputkiin. EZ1 Advanced XL -laitteeseen ladattiin reagenssikasetit, EP-lysaatin sisältävät 2 ml:n näyteputket, tyhjät 1,5 ml:n eluutioputket ja suojuksissa olevat suodattimelliset pipetinkärjet. Laitteeseen valittiin Trace protocol, eluointiin TE-puskuri ja eluutitilavuudeksi 50 μl. Ajo käynnistettiin, ja EZ1 Advanced XL -laite suoritti EP-fraktioiden DNA:n eristyksen.

SP-fraktioihin jääneet epiteelisolujen DNA:t pestiin liuottamalla siittiöpelletit 500 μl:aan Buffer G2:ta, ja näytteitä sekoitettiin vortexin avulla. Siittiöt kerättiin pelleteiksi putkien

pohjalle sentrifugoimalla näytteitä 5 min 15 000 g:tä vastaavalla voimalla, ja supernatantit poistettiin. Pesuvaihe toistettiin kolme kertaa.

Pestyt siittiöpelletit liuotettiin 180 µl:aan Buffer G2:ta ja 10 µl Proteinase K:ta, ja putkiin lisättiin 10 µl 1 M DTT:a. Putkia sekoitettiin voimakkaasti vortexilla, ja putket asetettiin Eppendorfin Thermomixer Comfort -hauteelle 56 °C:n lämpötilaan, jossa niitä inkuboitettiin 850 rpm:n kierrosnopeuden sekoituksessa yön yli. Siittiöiden lyysauksen jälkeen SP-fraktioiden DNA:t eristettiin EZ1 Advanced XL -laitteella samalla tavalla kuin EP-fraktioiden DNA:t. SP-fraktioiden eristystuotteet puhdistettiin Microcon® Ultracel YM-100 -sentrifugipylväillä kuten aiemmin. Kaikki näytteet kvantitoitiin qPCR-menetelmällä kuten aiemmin.

Heikkojen kvantitaatiotulosten perusteella näytteille ei tehty PCR-monistusta eikä kapillarielektroforeesierottelua. Menetelmää päätettiin kokeilla uudelleen lisäämällä molempien solususpensioseosten kolmen rinnakkaisnäytteen (näytteet 1.7–1.9 ja 5.7–5.9) esikäsittelyihin 2 min vatkkaus sekä molempien solususpensioseosten kolmen rinnakkaisnäytteen (näytteet 1.10–1.12 ja 5.10–5.12) esikäsittelyihin pumpulin poisto Promegan DNA IQ™ Spin Basket -välineitä (kuva 9) käyttäen. Näytepuikkojen annettiin kuivua kaksi vuorokautta, ja pumpulit leikattiin 2 ml:n kierrekorkillisiin näyteputkiin.



Kuva 9. Promegan DNA IQ™ Spin Basket.

Näytteisiin 1.7–1.9 ja 5.7–5.9 lisättiin 500 µl vettä, ja pumpuleita vatkattiin 2 min ajan. Pumpulit poistettiin pipetin avulla imemällä ne kuiviksi. Näyteputkia sentrifugoitiin 1 min 15 700 g:tä vastaavalla voimalla. Supernatantit poistettiin siten, että nestettä jäi sakko-

jen päälle noin 30–50 µl. Putkiin lisättiin 190 µl Buffer G2:ta ja 10 µl Proteinase K:ta, ja näytteiden differentiaalieristykset suoritettiin loppuun samoin kuin aiemmin.

Näytteiden 1.10–1.12 ja 5.10–5.12 epiteelisolut lyysattiin kuten aiemmin, jonka jälkeen pumpulit siirrettiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin asetettuihin Spin Basket -välineisiin. Näitä yhdistelmiä sentrifugoitiin 3 min 15 700 g:tä vastaavalla voimalla, jotta pumpuleista saataisiin irroitettua mahdollisimman paljon siittiöitä ja epiteelisolulysaattia. Spin Basket -välineen läpi valunut neste siirrettiin tarkasti alkuperäisiin 2 ml:n kierrekorkillisiin näyteputkiin. Tämän jälkeen näytteiden differentiaalieristykset suoritettiin loppuun kuten aiemmin.

SP-fraktioiden eristystuotteet puhdistettiin Microcon[®] Ultracel YM-100 -sentrifugipylväillä kuten aiemmin. Näytteet 1.7–1.12 ja 5.7–5.12 kvantitoitiin qPCR-menetelmällä, monistettiin PCR-reaktiolla, ja monistustuotteet eroteltiin kapillaarielektroforeesilla RTL:n menetelmäohjeiden mukaan kuten aiemmin.

Näytteiden pumpuleiden vatkkaus paransi tuloksia huomattavasti (taulukko 11 luvussa Tulokset), joten jatkossa EZ1 Advanced XL -laitteella eristettävien näytteiden esikäsittelyihin lisättiin vatkausvaihe.

4.2.3 QIAcube[®]

Differentiaalieristysmenetelmiä suunniteltaessa haluttiin selvittää, suorittaako QIAcube-laitte siittiösakkojen pesun manuaalisia pesuvaiheita paremmin. Näytteille 1.13–1.15 ja 5.13–5.15 DNA-eristykset suoritettiin Chelexilla, ja näytteille 1.16–1.18 ja 5.16–5.18 Qiagenin EZ1 Advanced XL - ja QIAcube[®]-laitteille suunnitteleman differentiaalieristysprotokollan mukaan.

Kaikkien QIAcubella käsiteltävien näytepuikkojen pumpulit leikattiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin, joissa oli 500 µl vettä. Pumpuleita vatkattiin 2,0 min ajan ja pumpulit poistettiin pipetin avulla. Näyteputkia sentrifugoitiin 1 min 15 700 g:tä vastaavalla voimalla ja supernatantit poistettiin. Putkiin lisättiin 190 µl Buffer G2:ta ja 10 µl Proteinase K:ta, ja näytteitä inkuboitiin Eppendorfin Thermomixer Comfort -hauteella 56 °C:n lämpötilassa 2 h ajan 900 rpm:n kierrosnopeuden sekoituksessa.

Inkuboinnin jälkeen EP-lysaatin ja siittiösakan sisältävät näyteputket siirrettiin QIAcuben® sentrifugiin sopiviin roottorisovittimiin L3-asemaan, ja sovittimet asetettiin sentrifugiin numeroiduille paikoille. Laitteen ravistelijaan asetettiin 12 tyhjää, avattua 2 ml:n kierrekorkillista helmatonta näyteputkea epiteelisolulysaatteja varten. Ravistelijan S2-sovittimessa oli niin ahtaat paikat näyteputkille, ettei niitä voitu merkitä näytetarroilla tai tussilla. Reagenssipullotelineen 1-asemaan asetettiin reagenssipullo, johon oli mitattu 15 ml Buffer G2:ta. Kärkitelineet täytettiin 1 000 µl:n suodattimellisilla laajempiaukkoisilla wide bore -kärjillä. QIAcubella® käynnistettiin Separation and Lysis 12 A -ohjelma, jossa laite siirsi EP-lysaatit sentrifugissa olevista näyteputkista ravistelijassa oleviin näyteputkiin ja suoritti siittiösakoille kaksi pesua Buffer G2:lla.

A-ohjelman jälkeen laitteen ravistelija nostettiin pois, ja EP-lysaatin sisältävät näyteputket suljettiin. Putkien korkkeihin merkittiin näytteiden numerotunnisteet ennen telineestä poistamista. Reagenssipullotelineen 1-asemassa olleeseen reagenssipulloon lisättiin 15 ml Buffer G2:ta ja 2-asemaan asetettiin reagenssipullo, johon oli mitattu 5 140 µl Qiagenin ohjeen (taulukko 5) mukaan valmistettua lyysauspuskuriä. Kärkitelineet täytettiin 1 000 µl:n suodattimellisilla wide bore -kärjillä, ja Separation and Lysis 12 B -ohjelma käynnistettiin. Tarkistaessaan täytettyjä komponentteja laite ilmoitti lyysauspuskuriä olevan liian vähän, ja sitä piti lisätä yhteensä 750 µl:n ylimäärä ohjeeseen nähden, jotta ohjelma käynnistyi. B-ohjelmalla laite suoritti siittiösakoille kaksi pesua ja lisäsi niihin lopuksi 250 µl lyysauspuskuriä.

Taulukko 5. Lyysauspuskurin valmistaminen 12 näytteelle

Liuos	V (µl)
Buffer G2	3 900
Proteinase K	260
DTT, 1 M	1 040
tot.	5 200

B-ohjelman käynnistyttyä näytteiden 1.13–1.15 ja 5.13–5.15 EP-lysaatteihin lisättiin 65 µl 20-prosenttista Chelex-suspensiota, jolloin näytteen Chelex-pitoisuus oli noin 5 %. 20-prosenttista Chelex-suspensiota sekoitettiin magneettisekoittajalla ja tarvittava määrä pipetoitiin suodattimellisilla kärjillä, joissa oli normaalia laajempi aukko. Kärki vaihdettiin jokaisen pipetoinnin välissä. EP-näytteitä inkuboitiin 95 °C:n lämpötilassa 8 min ajan. Näytteiden 1.16–1.18 ja 5.16–5.18 EP-lysaattien DNA:t eristettiin EZ1 Advanced XL -laitteella käyttäen Trace-protokollaa, ja DNA:t eluoitiin 50 µl:aan TE-puskuriä.

QIAcuben B-ohjelman valmistuttua näytteiden SP-fraktioiden siittiöt lyysattiin. Näytteiden 1.13–1.15 ja 5.13–5.15 SP-fraktioihin lisättiin 85 µl 20-prosenttista Chelex-suspensiota, jolloin näytteen Chelex-pitoisuus oli noin 5 %. Putkia sekoitettiin vortexilla voimakkaasti, sentrifugoitiin nopeasti ja inkuboitiin lämpökaapissa 56 °C:n lämpötilassa 56 min ajan. Sen jälkeen putket siirrettiin 95 °C:n lämpötilaan 8 min ajaksi. Näytteiden 1.16–1.18 ja 5.16–5.18 SP-fraktioille tehtiin Qiagenin ohjeen mukainen Quick Sperm Lysis. QIAcubella® suoritettua pesuvaiheen jälkeen putkia vortexoitiin voimakkaasti ja ne siirrettiin Eppendorfin Thermomixer Comfort-hauteelle 70 °C:n lämpötilaan 10 min ajaksi 900 rpm:n kierrosnopeuden sekoitukseen.

Eristetyt SP-fraktiot puhdistettiin ja konsentroitiin Microcon® Ultracel YM-100 -sentrifugipylväillä kuten aiemmin. Sen jälkeen kaikki näytteet kvantitoitiin qPCR-menetelmällä, monistettiin PCR-reaktiolla, ja monistustuotteet eroteltiin kapillaarielektroforeesilla RTL:n menetelmäohjeiden mukaan kuten aiemmin.

4.3 Menetelmien vertailu

Epiteelisoluja kerättiin 30:sta pumpulipuikosta, joilla oli pyyhitty naisen B suun limakalvoja. Pumpulit leikattiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin, joissa oli 500 µl vettä. Jokaista pumpulia vatkaattiin noin kolmen minuutin ajan, ja solut kerättiin putkien pohjille sentrifugoimalla putkia 3 min 15 700 g:tä vastaavalla voimalla. Supernatantit poistettiin, solusakat yhdistettiin ja siirrettiin aikaisemmin, valmistelevia kokeita varten kerättyyn EP-suspensioon. Suspensio laimennettiin vedellä noin 1 650 µl:n tilavuuteen. Suspension DNA-pitoisuus määritettiin samalla tavalla kuin aikaisemmin eristämällä suspensiosta 10, 20 ja 30 µl:n erät RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA3:n mukaan. Näytteet kvantitoitiin Investigator® Quantiplex Kitillä RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA33:n mukaan kolmella replikaatilla. Kvantitaatioarvot on esitetty taulukossa 13 luvussa Tulokset.

EP-suspensiosta tehtiin eristyskiä, joiden avulla määritettiin suspension DNA-pitoisuus. Näytteisiin lisätyt DNA-määrät voitiin selvittää näytteiden kvantitaatiotulosten keskiarvojen ja kokonaistilavuuksien avulla (4), ja näytteisiin lisätyt suspensiotilavuudet otettiin huomioon (5). Näiden arvojen keskiarvo (6) määritteli EP-suspension DNA-pitoisuuden:

10 µl:

$$1,14839 \text{ ng/}\mu\text{l} \cdot 202 \text{ }\mu\text{l} = 231,975 \text{ ng} \quad (4)$$

$$\frac{231,975 \text{ ng}}{10 \text{ }\mu\text{l}} = 23,198 \text{ ng/}\mu\text{l} \quad (5)$$

20 µl:

$$1,91964 \text{ ng/}\mu\text{l} \cdot 202 \text{ }\mu\text{l} = 387,767 \text{ ng} \quad (4)$$

$$\frac{387,767 \text{ ng}}{20 \text{ }\mu\text{l}} = 19,388 \text{ ng/}\mu\text{l} \quad (5)$$

30 µl:

$$3,12411 \text{ ng/}\mu\text{l} \cdot 202 \text{ }\mu\text{l} = 631,070 \text{ ng} \quad (4)$$

$$\frac{631,070 \text{ ng}}{30 \text{ }\mu\text{l}} = 21,036 \text{ ng/}\mu\text{l} \quad (5)$$

Keskiarvo:

$$\frac{23,198 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} + 19,388 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} + 21,036 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}{3} = 21,207 \text{ ng/}\mu\text{l} \approx 21,21 \text{ ng/}\mu\text{l} \quad (6)$$

EP-suspension DNA-pitoisuudeksi voitiin määrittää 21,21 ng/µl. Esikokeilla saatujen tulosten perusteella vertailtaviksi näytteiksi valittiin taulukossa 5 esitetyt seossuhteet 2, 4 ja 5, joissa eristettyjen näytteiden siittiöiden laskennalliset kvantitaatioarvot olivat 1, 0,1 ja 0,05 ng/µl. Valmistelevilla kokeilla hyväksi osoittautunutta epiteelisolujen DNA-määrää, noin 275 ng:a, päätettiin käyttää myös menetelmien vertailussa. Taulukossa 6 on esitetty menetelmien vertailun näytteiden valmistukseen käytetyt suspensioseossuhteet yhtä näytettä kohden.

Taulukko 6. Vertailtavien näytteiden valmistukseen käytetyt suspensioseossuhteet yhtä näytettä kohden.

Suspensioseos	2, siittiöitä 1 ng/µl (näytteet 10, 12, 14)	4, siittiöitä 0,1 ng/µl (näytteet 16, 17)	5, siittiöitä 0,05 ng/ µl (näytteet 11, 13,15)
SP-suspension lamenuskerroin	1:100	1:1 000	1:1 000
SP-suspensiota (µl)	32	32	16
EP-suspensiota (µl)	13	13	13
Vettä (µl)	5	5	21

Seossuhteilla 2 ja 5 valmistettiin 33 näytepuikkoa ja seossuhteella 4 valmistettiin 22 näytepuikkoa, joiden annettiin kuivua useita vuorokausia ennen käsittelyä. Vertailtaviksi menetelmiksi valittiin EZ1-eristys QIAcuben® avulla pumpulien vatkauksella tehostettu-

na, Chelex-differentiaalieristys QIAcuben® avulla ja nykyisin käytössä oleva täysin manuaalinen Chelex-differentiaalieristys.

Vertailtavien näytteiden lisäksi valmistettiin kontrollinäytepuikkoja, jotka sisälsivät pelkästään EP- tai SP-suspensiota. Näytepuikkoihin 8.1 ja 8.3 imeytettiin 13 µl EP-suspensiota, näytepuikkoihin 9.1 ja 9.3 imeytettiin siemennesteen 1:100 vesilaimennosta 32 µl, näytepuikkoihin 9.2 ja 9.4 imeytettiin siemennesteen 1:1 000 vesilaimennosta 16 µl, ja näytepuikkoon 9.5 imeytettiin siemennesteen 1:1 000 vesilaimennosta 32 µl. Puikkojen annettiin kuivua huoneenlämmössä useita vuorokausia ennen käsittelyä. Kontrollinäytteiden oli tarkoitus osoittaa, kuinka paljon soluja saadaan irrotettua pumpulipuikosta näytteiden esikäsittelyissä.

4.3.1 EZ1 Advanced XL -differentiaalieristys QIAcuben® avulla

EZ1 Advanced XL:lla ja QIAcubella® tehtävään eristykseen valittiin näytteet 10.1–10.11, joissa siittiöiden laskennallinen kvantitaatioarvo oli 1 ng/µl, ja näytteet 11.1–11.11, joissa siittiöiden laskennallinen kvantitaatioarvo oli 0,05 ng/l. Lisäksi eristykseen otettiin mukaan negatiiviset kontrollit sekä ainoastaan SP- ja EP-suspensioita sisältävät kontrollinäytteet. Negatiiviset kontrollit olivat 10 C ja 11 C, joihin ei lisätty solususpensioita eikä näytemateriaalia ja jotka käsiteltiin näytteiden tavoin reagenssien ja veden puhtauden osoittamiseksi. Ainoastaan EP-suspensiota sisältävä näyte 8.1 sisälsi 275,6 ng epiteelisolujen DNA:ta. Ainoastaan SP-suspensioita sisältävät näytteet olivat 9.1 ja 9.2, joiden laskennalliset siittiöiden DNA-pitoisuudet eristetyissä näytteissä olivat 1 ja 0,05 ng/µl. Näytepuikkojen 10.1–10.11, 10 C ja 8.1 pumpulit leikattiin 2 ml:n kierrekorkillisiin, helmattomiin näyteputkiin, joissa oli 240 µl Buffer G2:ta. Pumpuleita vatkattiin 2,0 min ajan ja pumpulit jätettiin putkiin. Putkiin lisättiin 10 µl Proteinase K:ta, putkia sekoitettiin vortexilla ja asetettiin Eppendorfin Thermomixer Comfort -hauteelle 56 °C:n lämpötilaan 2 h ajaksi 900 rpm:n kierrosnopeuden sekoitukseen. Inkuboinnin jälkeen putkia sentrifugoitiin nopeasti ja pumpulit poistettiin putkista pipetin avulla.

Näyteputket 10.1–10.11 ja 10 C siirrettiin QIAcuben® roottorisovittimiin, jotka asetettiin QIAcuben® sentrifugiin numeroiduille paikoille. Ravistelijaan asetettiin tyhjät 2 ml:n kierrekorkilliset, helmattomat näyteputket. Reagenssipullotelineen 1-asemaan asetettiin reagenssipullo, johon oli mitattu 30 ml Buffer G2:ta ja kärkitelineet täytettiin 1 000 µl:n suodattimellisilla wide bore -kärjillä. QIAcubella® käynnistettiin Separation and Lysis 12 A -ohjelma, jonka jälkeen ravistelijassa olevat EP-fraktion sisältävät näyteputket suljet-

tiin, merkittiin ja poistettiin telineestä. Reagenssipullotelineen 2-asemaan asetettiin reagenssipullo, johon oli mitattu 5 140 µl taulukon 5 mukaan valmistettua lyysauspuskuria. QIAcubella® käynnistettiin Separation and Lysis 12 B -ohjelma, jonka ladattujen komponenttien tarkistuksen yhteydessä laite ilmoitti, ettei lyysauspuskuria ole tarpeeksi. Sitä lisättiin yhteensä 1 150 µl:n ylimäärä, ja ohjelma käynnistyi. B-ohjelman aikana näytepuikon 9.1 pumpuli leikattiin 2 ml:n kierrekorkilliseen, helmattomaan näyteputkeen, jossa oli µl Buffer G2:ta. Pumpulia vatkattiin 2,0 min ja pumpuli poistettiin pipetin avulla. Näyteputkeen lisättiin 10 µl Proteinase K:ta ja 10 µl 1 M DTT:a.

EP-fraktioiden (näyte 8.1 mukaan lukien) DNA:t eristettiin lysaateista EZ1 Advanced XL -laitteella Trace-protokollaa käyttäen, ja eluoimalla DNA:t TE-puskuriin 50 µl:n tilavuuteen. SP-näytteet (näyte 9.1 mukaan lukien) siirrettiin QIAcuben suorittamien pesujen jälkeen Thermomixer Comfort -hauteelle 56 °C:n lämpötilaan 900 rpm:n kierrosnopeuden sekoitukseen, jossa niitä inkuboitiin yön yli. Inkuboinnin jälkeen SP-fraktioiden DNA:t eristettiin kuten EP-fraktioiden DNA:t. Näytteet 11.1–11.11, 11 C ja 9.2 käsiteltiin samalla tavalla. Tällöin QIAcuben® B-ohjelman täyttötarkistuksen yhteydessä laite ilmoitti lyysauspuskuria olevan liian vähän, ja sitä lisättiin 1,0 ml:n ylimäärä, jotta ohjelma käynnistyi.

Kaikki näytteet kvantitoitiin qPCR-reaktiolla, monistettiin PCR-reaktiolla, ja monistustuotteet eroteltiin kapillaarielektroforeesilla RTL:n menetelmäohjeiden mukaan kuten aiemmin. Näytteiden PCR-monistus ja kapillaarielektroforeesierottelu toistettiin luotettavampien tulosten saamiseksi.

4.3.2 Chelex-differentiaalieristys QIAcuben® avulla

QIAcubella® avustettuun Chelex-differentiaalieristykseen valittiin näytteet 12.1–12.11, joissa siittiöiden laskennallinen kvantitaatioarvo oli 1 ng/µl, näytteet 13.1–13.11, joissa siittiöiden laskennallinen kvantitaatioarvo oli 0,05 ng/µl, ja näytteet 16.1–16.11, joissa siittiöiden laskennallinen kvantitaatioarvo oli 0,1 ng/µl. Lisäksi eristykseen otettiin mukaan negatiiviset kontrollit, 12 C, 13 C ja 16 C, joihin ei lisätty solususpensioita eikä näytemateriaalia, ja jotka käsiteltiin näytteiden tavoin reagenssien ja veden puhtauden osoittamiseksi. Näytepuikkojen 12.1–12.11 pumpulit leikattiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin, joihin oli lisätty 500 µl vettä. Pumpuleita vatkattiin 2,0 min ja pumpulit poistettiin pipetin avulla. Pumpuleista irronneet solut kerättiin putkien pohjille sentrifugoimalla niitä 1 min 15 700 g:tä vastaavalla voimalla. Supernatantit poistettiin siten, että sitä jäi solu-

pellettien päälle 30–50 µl. Näytteiden epiteelisolut lyysattiin, ja näytteet sekä negatiivinen kontrollinäyte 12 C käsiteltiin RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA17:n mukaan.

Epiteelisolujen lyysauksen jälkeen eppendorf-putket asetettiin QIAcuben® roottorisovittimiin L3-asemaan. 12 kappaletta 2 ml:n kierrekorkillista, helmatonta näyteputkea täytettiin ravistelijaan EP-lysaatteja varten, ja kärkitelineet täytettiin 1 000 µl:n suodattimellisilla wide bore -kärjillä. Reagenssipullotelimeen 1-asemaan asetettiin reagenssipullo, johon oli mitattu 30 ml taulukossa 7 esitetyllä tavalla valmistettua siittiöpesupuskuria. QIAcubella® käynnistettiin Separation and Lysis 12 A -ohjelma.

Taulukko 7. Siittiöpesupuskuri, pH 7,5

Reagenssi	m (g)	Pitoisuus
Tris	1,21	10 mM
EDTA	3,72	10 mM
NaCl	2,92	50 mM
SDS		2 %
Vesi	1 000 ml	

A-ohjelman jälkeen EP-lysaatin sisältävät näyteputket poistettiin laitteesta, ja niihin lisättiin 65 µl 20-prosenttista Chelex-suspensiota. Putkia vortexoitiin voimakkaasti, sentrifugoitiin nopeasti ja putket siirrettiin 95 °C:n lämpötilaan 8 min ajaksi.

QIAcuben® reagenssipullotelimeen 2-asemaan asetettiin reagenssipullo, johon oli mitattu 6 ml vettä. Kärkitelineet täytettiin 1 000 µl:n suodattimellisilla wide bore -kärjillä, ja käynnistettiin Separation and Lysis 12 B -ohjelma.

QIAcuben® käsittelyjen jälkeen huomattiin, että näytteen 12.8 SP-putki oli työntynyt liian syvälle roottorisovittimeen todennäköisesti laitteen kalibraatiohäiriön takia. Tästä johtuen putkessa ollut nestetilavuus oli paljon suurempi kuin muissa samassa käsittelyssä olleissa rinnakkaisnäyteputkissa, ja neste myös vaahtosu hieman. Näytteen 12.8 EP-fraktion tilavuus oli yhtä suuri kuin muissakin saman käsittelyn EP-fraktioissa, joten voitiin päätellä SP-putkessa olleen nesteen sisältävän putkiin pipetoidun veden lisäksi siittiöpesupuskuria. Liuosta suspensoitiin pipetillä, ja suspensio siirrettiin tarkasti uuteen, puhtaaseen 1,5ml:n eppendorf-putkeen. Putkea sentrifugoitiin 5 min 15 700 g:tä vastaavalla voimalla, supernatantti poistettiin ja putkeen lisättiin 1 ml vettä. Putkea sekoitettiin voimakkaasti vortexilla, jonka jälkeen putkea sentrifugoitiin 5 min 15 700 g:tä vastaavalla voimalla. Supernatantti poistettiin ja solupelletti liuotettiin 250 µl:aan vettä.

Kaikkiin SP-fraktion sisältäviin putkiin lisättiin 85 µl 20-prosenttista Chelex-suspensiota, 2 µl 10 mg/ml proteinaasi K:ta ja 7 µl 1 M DTT:a, ja DNA:n eristys suoritettiin loppuun RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA17:n mukaan. Näytteet 13.1–13.11, 13 C, 16.1–16.11 ja 16 C käsiteltiin samalla tavalla. SP-fraktioiden eristystuotteet puhdistettiin Microcon® Ultracel YM-100 -sentrifugipylväillä kuten aiemmin.

Kaikki näytteet kvantitoitiin, monistettiin PCR-reaktiolla, ja monistustuotteet eroteltiin kapillaarielektroforeesilla RTL:n menetelmäohjeiden mukaan kuten aiemmin. Näytteiden PCR-monistus ja kapillaarielektroforeesierottelu toistettiin luotettavampien tulosten saamiseksi.

4.3.3 Chelex-differentiaalieristys

Chelex-differentiaalieristykseen valittiin näytteet 14.1–14.11, joissa siittiöiden laskennallinen kvantitaatioarvo oli 1 ng/µl, näytteet 15.1–15.11, joissa siittiöiden laskennallinen kvantitaatioarvo oli 0,05 ng/l, ja näytteet 17.1–17.11, joissa siittiöiden laskennallinen kvantitaatioarvo oli 0,1 ng/l. Lisäksi eristykseen otettiin mukaan negatiiviset kontrollit sekä ainoastaan SP- ja EP-suspensioita sisältävät kontrollinäytteet. Negatiiviset kontrollit olivat 10 C, 11 C ja 17 C, joihin ei lisätty solususpensioita eikä näytemateriaalia, ja jotka käsiteltiin näytteiden tavoin reagenssien ja veden puhtauden osoittamiseksi. Ainoastaan EP-suspensiota sisältävä näyte 8.2 sisälsi 275,6 ng epiteelisolujen DNA:ta. Ainoastaan SP-suspensioita sisältävät näytteet olivat 9.3, 9.4 ja 9.5, joiden laskennalliset siittiöiden DNA-pitoisuudet eristetyissä näytteissä olivat 1; 0,05 ja 0,1 ng/µl. Näytepuikkojen pumpulit leikattiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin, joihin oli lisätty 500 µl vettä. Pumpuleita vatkattiin 2,0 min ja pumpulit poistettiin pipetin avulla. Putkia sentrifugoitiin 1 min 15 700 g:tä vastaavalla voimalla, ja supernatantit poistettiin siten, että sitä jäi solupellettien päälle 30–50 µl. Näin esivalmistelluille näytteille ja negatiivisille kontrollinäytteille, 14 C, 15 C ja 16 C, suoritettiin Chelex-differentiaalieristykset RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA17:n mukaan. Näytteelle 8.2 suoritettiin Chelex-eristys RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA3:n mukaan, ja näytteille 9.3 ja 9.4 suoritettiin suoraspermaeristykset Chelex-suspensiota käyttäen RTL:n menetelmäohje RLAB-DNA17:n mukaan. SP-fraktioiden eristystuotteet puhdistettiin Microcon® Ultracel YM-100 -sentrifugipylväillä kuten aiemmin.

Kaikki näytteet kvantitoitiin, monistettiin PCR-reaktiolla, ja monistustuotteet eroteltiin kapillaarielektroforeesilla RTL:n menetelmäohjeiden mukaan kuten aiemmin. Näytteiden

den PCR-monistus ja kapillaarielektroforeesierottelu toistettiin luotettavampien tulosten saamiseksi.

5 Tulokset

5.1 Valmistelevat kokeet

Siemennesteen 1:10-vesilaimennoksesta eli SP-suspensiosta, sekä 60 pumpulipuikosta kerätyistä epiteelisoluista eli EP-suspensiosta tehtiin suspensioiden DNA-pitoisuuden määrittäviä eristyskokeita. Eristettyjen näytteiden qPCR-menetelmällä saadut kvantitaatiotulokset on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8. Solususpensioiden DNA-pitoisuudenmääritysnäytteiden kvantitaatiotulokset.

Suspensio	V (µl)	1. kvantitaatio (ng/µl)	2. kvantitaatio (ng/µl)	3. kvantitaatio (ng/µl)	Keskiarvo (ng/µl)
SP	5	1,26324	1,88799	-	1,57562
SP	15	4,43212	4,75917	-	4,59565
EP	10	1,03265	1,10558	0,84558	0,99460
EP	20	1,59702	1,53715	1,89917	1,67778
EP	30	2,69472	1,94584	3,42911	2,68989

Suspensiosta valmistettiin näytepuikot työn esikokeita varten, millä haarukoitiin sopivaa siittiöpitoisuutta valmistelevia kokeita varten valmistettaville näytteille. Esikokeiden näytteiden qPCR-menetelmällä saadut kvantitaatio- ja PCR-tuotteiden kapillaarielektroforeesierottelun tulokset on esitetty taulukossa 9. SP-fraktion suhteutettu kvantitaatioarvo on laskettu jakamalla kvantitaatioarvon ja Microcon-puhdistuksen jälkeisen tilavuuden tulo eristystuotteen tilavuudella ennen puhdistusta. Suhteutettu kvantitaatioarvo siis kertoo, mikä oli eristystuotteen DNA-pitoisuus ennen tuotteen puhdistusta. SP- ja EP-fraktioiden tulokset on analysoitu eristystuotteiden kahden PCR-monistuksen tuotteiden kapillaarielektroforeesierotteluiden jälkeen hyväksytyjen alueiden lukumäärän perusteella.

Taulukko 9. Chelex-menetelmällä eristettyjen esikoenäytteiden tulokset

Näyte	Siittiötä (ng/μl)	SP kvantitaatioarvo (ng/μl)	SP suhteutettu kvantitaatioarvo (ng/μl)	SP keskiarvo (ng/μl)	SP tulos	EP kvantitaatioarvo (ng/μl)	EP keskiarvo (ng/μl)	EP tulos
1.1	5	1,377	0,6668		-	0,005103		heikko sekoitus
1.2	5	0,8608	0,4115		mies	0,001072		mies
1.3	5	2,056	1,022	0,7001	mies	0,0007061	0,002294	heikko sekoitus
2.1	1	0,2853	0,1346		mies	0,02111		nainen
2.2	1	0,1837	0,07972		mies	0,01275		heikko nainen
2.3	1	0,08303	0,04803	0,08745	mies	0,005135	0,01300	heikko sekoitus
3.1	0,5	0,1075	0,04936		mies	0,01451		-
3.2	0,5	0,05956	0,02661		mies	0,02437		heikko nainen
3.3	0,5	0,03868	0,01752	0,03116	-	0,01118	0,01669	nainen
4.1	0,1	0,00408	0,002114		heikko sekoitus	0,008639		nainen
4.2	0,1	0,01445	0,006931		sekoitus	0,02713		nainen
4.3	0,1	0,00910	0,004693	0,004579	sekoitus	0,01529	0,01702	nainen
5.1	0,05	0,00534	0,003200		heikko sekoitus	0,01475		nainen
5.2	0,05	0,00405	0,002011		heikko sekoitus	0,01635		nainen
5.3	0,05	0,00447	0,002434	0,002548	heikko sekoitus	0,01165	0,01425	nainen
6.1	0,01	0,00379	0,001673		-	0,02020		nainen
6.2	0,01	0,00446	0,002264		heikko nainen	0,01618		nainen
6.3	0,01	0,00074	0,0004006	0,001446	heikko nainen	0,02231	0,01956	nainen

Kapillaarielektroforeesilla erotellut PCR-tuotteet analysoitiin GeneMapper® *ID-X* -ohjelmalla. Kromatogrammien alueiden hyväksymiseen tarvitaan kahden PCR-monistuksen ja kapillaarielektroforeesierottelun tulokset, jotta tuloksia voidaan pitää luotettavina.

Valmistelevia kokeita varten valittiin solususpensioseokset 1 ja 5. Valmistettiin lisää näytteitä, joilla kokeiltiin Qiagenin differentiaalieristysprotokollaa EZ1 Advanced XL -laitetta käyttäen. Näytteiden qPCR-menetelmällä saadut kvantitaatio- ja PCR-tuotteiden kapillaarielektroforeesierottelun tulokset on esitetty taulukossa 10.

Taulukko 10. Qiagenin EZ1 Advanced XL -laitteelle suunnitellun differentiaalieristysprotokollan kokeilu.

Näyte	Siittiöitä (ng/μl)	SP kvantitaa- tioarvo (ng/μl)	SP suhteutettu kvantitaaatioarvo (ng/μl)	SP keskiarvo (ng/μl)	EP kvantitaa- tioarvo (ng/μl)	EP keskiarvo (ng/μl)
1.4	5	0,2680	0,2534		0,7895	
1.5	5	0,1236	0,1034		0,9010	
1.6	5	0,0486	0,0433	0,1334	0,8013	0,8306
5.4	0,05	0	0		0,6311	
5.5	0,05	0	0		0,3401	
5.6	0,05	0	0	0	0,3607	0,4440

Tällä Qiagenin protokollalla ei saavutettu riittävän hyviä tuloksia, joten protokollaa kehitettiin lisäämällä näytteiden esikäsittelyihin solujen irrottamisen näytemateriaalista vatkauksella ja Promegan DNA iQ® Spin Basket -välineitä käyttäen. Näytteiden qPCR-menetelmällä saadut kvantitaatio- ja PCR-tuotteiden kapillaarielektroforeesierottelun tulokset on esitetty taulukossa 11.

Taulukko 11. Qiagenin EZ1 Advanced XL -laitteelle suunnitellun differentiaalieristysprotokollan kokeilu lisätyillä näytteiden esikäsittelymenetelmillä.

Näyte	Siittiöitä (ng/μl)	SP kvantitaatio- arvo (ng/μl)	SP suhteutettu kvantitaatioarvo (ng/μl)	SP keskiarvo (ng/μl)	SP tulos	EP kvantitaatio- arvo (ng/μl)	EP keskiarvo (ng/μl)	EP tulos
Näytteiden esikäsittely vatkauksella								
1.7	5	0,0339	0,0359		mies	0,1634		sekoitus
1.8	5	0,0338	0,0404		-	0,2872		sekoitus
1.9	5	0,0213	0,0239	0,0334	mies	0,2206	0,2237	sekoitus
5.7	0,05	0,0009	0,0008		-	0,1412		-
5.8	0,05	0,0023	0,0018		-	0,1281		nainen
5.9	0,05	0,0017	0,0015	0,0014	heikko nainen	0,1605	0,1433	heikko nainen
Näytteiden esikäsittely Spin Basket -välineillä								
1.10	5	0,0246	0,0246		mies	0,5394		sekoitus
1.11	5	0,0249	0,0245		mies	0,7157		sekoitus
1.12	5	0,0063	0,0059	0,0183	-	0,6145	0,6232	sekoitus
5.10	0,05	0	0		-	0,3903		nainen
5.11	0,05	0	0		-	0,2124		nainen
5.12	0,05	0	0	0	-	0,3169	0,3065	-

Valmistelemina kokeina haluttiin kokeilla myös QIAcuben® vaikutusta differentiaalieristykseen Chelex-suspensiota ja EZ1 Advanced XL -laitetta käyttäen. Näytteiden qPCR-menetelmällä saadut kvantitaatio- ja PCR-tuotteiden kapillaarielektroforeesierottelun tulokset on esitetty taulukossa 12.

Taulukko 12. QIAcuben® kokeilu Chelex-suspensiolla ja EZ1 Advanced XL -laitteella suorite-
tuissa näytteiden differentiaaleristyksissä.

Näyte	Siittiötä (ng/μl)	SP kvantitaa- tioarvo (ng/μl)	SP suhteutettu kvantitaatioarvo (ng/μl)	SP keskiarvo (ng/μl)	SP tulos	EP kvantitaa- tioarvo (ng/μl)	EP keskiarvo (ng/μl)	EP tulos
Näytteiden differentiaaleristykset Chelex-suspensiolla								
1.13	5	0,1018	0,1081		0	0,1121		0
1.14	5	0,0065	0,0069		0	0,2325		heikko sekoitus
1.15	5	0,4064	0,4587	0,1912	0	0,1462	0,1636	0
5.13	0,05	0,0003	0,0003		0	0,0960		0
5.14	0,05	0,0013	0,0014		0	0,0581		0
5.15	0,05	0,0052	0,0054	0,0024	0	0,0582	0,0708	0
Näytteiden differentiaaleristykset EZ1 Advanced XL -laitteella								
1.16	5	0,0003	0,0003		heikko mies	0,4861		sekoitus
1.17	5	0,0570	0,0604		mies	0,5495		nainen
1.18	5	0,0943	0,1036	0,0548	mies	0,1977	0,4111	nainen
5.16	0,05	0	0		-	0,1274		nainen
5.17	0,05	0	0		-	0,0391		-
5.18	0,05	0	0	0	-	0,0441	0,0702	nainen

Valmistelevien kokeiden tulosten perusteella menetelmien vertailuun valittiin solususpensioseokset 2, 4 ja 5.

5.2 Menetelmien vertailu

Epiteelisoluja kerättiin 30 pumpulipuikosta, jotka lisättiin aikaisemmin valmistettuun EP-suspensioon, ja suspensio laimennettiin vedellä noin 1 650 μl:n tilavuuteen. Suspensi-
on DNA-pitoisuuden määrittämiseksi tehtiin eristyskiä. Eristettyjen näytteiden qPCR-
menetelmällä saadut kvantitaatiotulokset on esitetty taulukossa 13.

Taulukko 13. EP-suspension DNA-pitoisuus

V (μl)	1. kvantitaatio (ng/μl)	2. kvantitaatio (ng/μl)	3. kvantitaatio (ng/μl)	Keskiarvo (ng/μl)
10	1,15095	1,24382	1,05041	1,14839
20	1,88303	1,94419	1,93170	1,91964
30	3,64900	2,95497	2,76362	3,12411

Ensimmäiseksi vertailtavaksi menetelmäksi valittiin Qiagenin laatima protokolla QIAcu-
bella® avustetulle differentiaaleristykselle EZ1 Advanced XL -laitetta käyttämällä. Tällä
menetelmällä käsiteltyjen näytteiden qPCR-menetelmällä saadut kvantitaatio- ja PCR-
tuotteiden kapillaarielektroforeesierottelun tulokset on esitetty taulukossa 14.

Taulukko 14. QIAcubella® avustetun EZ1 Advanced XL -laitteella suoritettujen differentiaalieristysten tulokset.

Näyte	Siittiötä (ng/μl)	SP kvantitointiarvo (ng/μl)	SP keskiarvo (ng/μl)	SP tulos (hyväksyttyjä alueita)	EP kvantitointiarvo (ng/μl)	EP keskiarvo (ng/μl)	EP tulos (hyväksyttyjä alueita)
10.1	1	0,0197		mies 16	0,6263		sekoitus (nainen vahvempi)
10.2	1	0,0171		mies 16	0,5198		sekoitus (nainen vahvempi)
10.3	1	0,0059		mies 16	0,4197		sekoitus (nainen vahvempi)
10.4	1	0,0055		-	0,3868		nainen 12
10.5	1	0,0102		mies 16	0,4030		nainen 12
10.6	1	0,0074		mies 15	0,2960		sekoitus (nainen vahvempi)
10.7	1	0,0216		mies 15	0,3870		-
10.8	1	0,0107		mies 13	0,3604		nainen 15
10.9	1	0,0151		mies 15	0,2229		nainen 11
10.10	1	0,0216		mies 15	0,3391		nainen 9
10.11	1	0,0312	0,0151	-	0,4707	0,4029	nainen 12
10 C	0	0		-	0		-
11.1	0,05	0,0010		-	0,2005		nainen 15
11.2	0,05	0		-	0,3064		nainen 14
11.3	0,05	0,0008		-	0,0351		nainen 16
11.4	0,05	0,0022		-	0,1846		nainen 14
11.5	0,05	0,0017		-	0,1518		-
11.6	0,05	0,0004		-	0,1667		nainen 13
11.7	0,05	0		-	0,2423		nainen 15
11.8	0,05	0,0026		-	0,4347		nainen 13
11.9	0,05	0,0014		-	0,1545		nainen 16
11.10	0,05	0,0006		-	0,4581		nainen 14
11.11	0,05	0,0003	0,0010	-	0,1154	0,2227	nainen 15
11 C	0	0		-	0		-

Toiseksi vertailtavaksi menetelmäksi valittiin QIAcubella® avustettu Chelex-differentiaalieristysmenetelmä. Tällä menetelmällä käsiteltyjen näytteiden qPCR-menetelmällä saadut kvantitointi- ja PCR-tuotteiden kapillaarielektroforeesierottelun tulokset on esitetty taulukossa 15.

Taulukko 15. QIAcubella® avustetun Chelex-differentiaalieristuksen tulokset.

Näyte	Siittiöitä (ng/μl)	SP kvanti- taatioarvo (ng/μl)	SP suhteu- tettu kvanti- taatioarvo (ng/μl)	SP keskiar- vo (ng/μl)	SP tulos	EP kvanti- taatioarvo (ng/μl)	EP keskiar- vo (ng/μl)	EP tulos
12.1	1	0,1499	0,0392		mies 15	0,0417		nainen 16
12.2	1	0,2826	0,0417		mies 16	0,0329		nainen 16
12.3	1	0,1142	0,0273		mies 15	0,0076		nainen 14
12.4	1	0,1251	0,0255		mies 16	0,0213		nainen 15
12.5	1	0,1910	0,0406		mies 16	0,0301		nainen 16
12.6	1	0,2147	0,0435		mies 16	0,0367		nainen 16
12.7	1	0,3467	0,0688		mies 13	0,0328		nainen 14
12.8	1	(0,1082)	(0,0185)		(mies 16)	(0,0320)		-
12.9	1	0,1572	0,0302		mies 15	0,0360		nainen 16
12.10	1	0,1842	0,0330		mies 16	0,0172		nainen 15
12.11	1	0,1256	0,0330	0,0383	mies 16	0,0278	0,0287	nainen 14
12 C	0	0	0		-	0		-
13.1	0,05	0,0143	0,0038		sekoitus 16	0,0157		nainen 14
13.2	0,05	0,0368	0,0094		sekoitus 16	0,0526		nainen 15
13.3	0,05	0,0218	0,0054		sekoitus 16	0,0420		nainen 15
13.4	0,05	0,0134	0,0028		sekoitus, hie- man vajaa	0,0404		nainen 16
13.5	0,05	0,0480	0,0096		nainen 12	0,0094		nainen 15
13.6	0,05	0,0247	0,0052		sekoitus 16	0,0243		nainen 15
13.7	0,05	0,0301	0,0056		heikko sekoi- tus	0,0274		nainen 16
13.8	0,05	0,0202	0,0054		sekoitus, hie- man vajaa	0,0463		nainen 16
13.9	0,05	0,0172	0,0050		nainen 14	0,0168		nainen 15
13.10	0,05	0,0326	0,0076		sekoitus 16	0,0493		nainen 16
13.11	0,05	0,0153	0,0028	0,0057	sekoitus, hie- man vajaa	0,0209	0,0314	nainen 15
13 C	0	0	0		-	0		-
16.1	0,1	0,0768	0,0226		sekoitus 16	0,0206		nainen 16
16.2	0,1	0,0727	0,0249		sekoitus 16	0,0267		nainen 16
16.3	0,1	0,1536	0,0434		nainen 12	0,0430		nainen 13
16.4	0,1	0,0649	0,0204		sekoitus 16	0,0528		nainen 12
16.5	0,1	0,0762	0,0258		sekoitus 16	0,0288		nainen 16
16.6	0,1	0,0474	0,0126		sekoitus 16	0,0113		nainen 11
16.7	0,1	0,0583	0,0161		sekoitus 16	0,0108		nainen 16
16.8	0,1	0,0693	0,0212		sekoitus 16	0,0224		nainen 16
16.9	0,1	0,0365	0,0107		sekoitus 16	0,0098		nainen 14
16.10	0,1	0,0931	0,0340		sekoitus 16	0,0579		nainen 15
16.11	0,1	0,0707	0,0134	0,0223	sekoitus 16	0,0419	0,0296	nainen 16
16 C	0	0	0		-	0		-

Kolmanneksi vertailtavaksi menetelmäksi valittiin nykyisin käytössä oleva, täysin ma-
nuaalinen Chelex-differentiaalieristysmenetelmä. Tällä menetelmällä käsiteltyjen näyt-
teiden qPCR-menetelmällä saadut kvantitaatio- ja PCR-tuotteiden kapillaarielektrofo-
reesierottelun tulokset on esitetty taulukossa 16.

Taulukko 16. Chelex-differentiaalieristysten tulokset.

Näyte	Siittiötä (ng/μl)	SP kvanti- taatioarvo (ng/μl)	SP suh- teutet-tu kvanti- taatioarvo (ng/μl)	SP kes- kiarvo (ng/μl)	SP tulos	EP kvanti- taatioarvo (ng/μl)	EP kes- kiarvo (ng/μl)	EP tulos
14.1	1	0,1225	0,0453		mies 16	0,0127		nainen 14
14.2	1	0,1503	0,0551		mies 16	0,0291		nainen 14
14.3	1	0,1386	0,0457		mies 15	0,0503		nainen 13
14.4	1	0,2433	0,0590		mies 15	0,0539		nainen 13
14.5	1	0,1868	0,0659		mies 16	0,0353		nainen 13
14.6	1	0,2767	0,0958		mies 15	0,0491		nainen 13
14.7	1	0,1126	0,0330		mies 16	0,0227		nainen 14
14.8	1	0,1386	0,0495		mies 16	0,0166		nainen 13
14.9	1	0,2042	0,0557		mies 16	0,0484		nainen 15
14.10	1	0,1155	0,0327		mies 16	0,0307		nainen 12
14.11	1	0,0956	0,0374	0,0523	mies 16	0,0368	0,0351	nainen 11
14 C	0	0	0		-	0		-
15.1	0,05	0,0083	0,0026		-	0,0113		nainen 14
15.2	0,05	0,0074	0,0021		-	0,0177		nainen 13
15.3	0,05	0,0153	0,0054		heikko sekoitus	0,0545		nainen 14
15.4	0,05	0,0199	0,0089		sekoitus, lähes 16	0,0601		nainen 15
15.5	0,05	0,0164	0,0047		heikko sekoitus	0,0371		nainen 16
15.6	0,05	0	0		heikko sekoitus	0,0259		nainen 15
15.7	0,05	0,0121	0,0040		-	0,0256		nainen 15
15.8	0,05	0,0147	0,0060		heikko sekoitus	0,0418		nainen 15
15.9	0,05	0,0174	0,0064		heikko sekoitus	0,0411		nainen 12
15.10	0,05	0,0081	0,0034		-	0,0312		nainen 16
15.11	0,05	0,0200	0,0067	0,0046	sekoitus, lähes 16	0,0981	0,0404	nainen 14
15 C	0	0	0		-	0		-
17.1	0,1	0,237	0,1038		sekoitus, lähes 16	0,0466		nainen 15
17.2	0,1	0,0045	0,0015		heikko sekoitus	0,0112		nainen 14
17.3	0,1	0,0098	0,0041		heikko sekoitus	0,0446		nainen 16
17.4	0,1	0,0111	0,0036		heikko sekoitus	0,0274		nainen 16
17.5	0,1	0,0078	0,0038		heikko sekoitus	0,0159		nainen 15
17.6	0,1	0,0119	0,0045		sekoitus 16	0,0289		nainen 16
17.7	0,1	0,0146	0,0072		heikko sekoitus	0,0384		nainen 16
17.8	0,1	0,0150	0,0061		mies 12	0,0147		nainen 14
17.9	0,1	0,0070	0,0030		-	0,0181		nainen 14
17.10	0,1	0,0078	0,0034		-	0,0276		nainen 15
17.11	0,1	0,0075	0,0031	0,0131	heikko sekoitus	0,0308	0,0276	nainen 14
17 C	0	0	0		-	0		-

Pelkkiä SP- ja EP-suspensioita sisältäneiden kontrollinäytteiden qPCR-menetelmällä saadut kvantitaatio- ja PCR-tuotteiden kapillaarielektroforeesierottelun tulokset on esitetty taulukossa 17

Taulukko 17. SP- ja EP-kontrollinäytteiden tulokset.

Näyte	Solususpensio	Määrä	Menetelmä	Kvantitaatioarvo (ng/μl)
8.1	EP	275,6 ng	EZ1	0,1149
8.2	EP	275,6 ng	Chelex	0,1207
9.1	SP	1 ng/μl	EZ1	0,3969
9.2	SP	0,05 ng/μl	EZ1	0
9.3	SP	1 ng/μl	Chelex	0,274
9.4	SP	0,05 ng/μl	Chelex	0,0049
9.5	SP	0,1 ng/μl	Chelex	0,013

Kaikkien eristyksissä mukana olleiden negatiivisten kontrollinäytteiden tulokset olivat negatiivisia.

6 Tulosten tarkastelu

6.1 Valmistelevien kokeiden tulokset

Esikokeina Chelex-differentiaalieristysmenetelmällä käsiteltyjen näytteiden tulosten (taulukko 9) perusteella valittiin sopivat solujen seossuhteet valmisteleviin kokeisiin. Heikoimman seossuhteen, jossa laskennallinen siittiöiden DNA-pitoisuus oli 0,01 ng/μl, näytteiden tuloksissa näkyi, ettei miesperäistä DNA:ta juurikaan ollut yhdessäkään eristetyssä fraktiossa. Tämä seossuhde oli siis liian heikko antamaan luotettavia, vertailukelpoisia tuloksia. Toiseksi heikoimman seossuhteen, jossa laskennallinen siittiöiden DNA-pitoisuus oli 0,05 ng/μl, näytteiden SP-fraktioiden tulokset olivat heikkoja sekoitustuloksia. Miesperäistä DNA:ta saatiin siis eristettyä näytteistä, mutta fraktioiden erottelu Chelex-menetelmällä ei tuottanut puhtaita, ainoastaan miesperäistä DNA:ta sisältäviä SP-fraktioita. EP-fraktioista sen sijaan saatiin selviä naisen DNA-tunnisteita. Esikoe-näytteiden vahvimman seossuhteen, jossa laskennallinen siittiöiden DNA-pitoisuus oli 5 ng/μl, näytteiden SP-fraktioista saatiin yksilöivät ja hyvät miehen tunnisteet, mutta EP-fraktioiden tuloksissa oli sekoitustuloksia sekä yksi miehen DNA-tunniste. Valmisteleviin kokeisiin valittiin solujen seossuhteet, joissa laskennalliset siittiöiden DNA-pitoisuudet olivat 0,05 ng/μl ja 5 ng/μl. Heikoin siittiöpitoisuus, jolla saavutettiin tuloksia, valittiin siksi, että automaatiota hyödyntävien menetelmien oletettiin olevan manuaalista menetelmää tehokkaampia ja tarkempia. Vahvin siittiöpitoisuus valittiin siksi, että manuaaliseen menetelmään verrattujen menetelmien voitiin osoittaa olevan toimivia.

EZ1 Advanced XL -laitetta kokeiltiin ensin täysin Qiagenin laatiman differentiaalieristysprotokollan mukaan. Tuotteiden kvantitaatiotulokset (taulukko 10) kuitenkin osoitti-

vat, ettei heikomman näytteen siittiötä saatu eristettyä ollenkaan kvantitaatioarvon ollessa jokaisessa näytteessä 0 ng/μl. Kyseisen protokollan todettiin olevan riittämätön. Näytteiden esikäsittelyihin lisättiin sekä 2,0 minuutin vatkkaus että pumpulin poisto Spin Basket -välineen avulla. Kvantitaatiotuloksista (taulukko 11) nähdään, että molemmilla lisätyillä esikäsittelyvaiheilla saavutettiin parempia tuloksia kuin täysin Qiagenin protokollaa noudattamalla. Vatkauksella SP-fraktioiden eristys onnistui paremmin, kun taas Spin Basket -välineillä EP-fraktioiden eristys onnistui paremmin. Näytteistä analysoidut tulokset (taulukko 11) sen sijaan olivat lähes identtiset. Todellisten seksuaalirikosnäytteiden tutkinnassa SP-fraktiot ovat EP-fraktioita tärkeämpiä, joten tulosten perusteella osoitettiin vatkauksen olevan Spin Basket -välineitä parempi esikäsittelymenetelmä, ja EZ1 Advanced XL -laitteella suoritettaviin menetelmien vertailukokeisiin lisättiin vatkauksittely.

Valmistelemina kokeina suoritettiin myös differentiaalieristykset QIAcuben[®] avulla sekä Chelex-menetelmällä että EZ1 Advanced XL -laitteella, jossa näytteiden esikäsittelyyn oli lisätty 2,0:n minuutin vatkkaus. Kvantitaatiotulosten (taulukko 12) perusteella Chelex-menetelmällä saatiin eristettyä enemmän DNA:ta kuin EZ1 Advanced XL -laitteella. Tulosten analysoinnissa (taulukko 12) kuitenkin selvisi, että lähes kaikkien Chelex[®] 100:lla eristettyjen näytteiden tulokset antoivat nollatuloksen. Chelex-näytteiden käsittelyssä oli todennäköisesti tapahtunut jotain, mikä oli rikkonut DNA:ta niin paljon, ettei PCR-monistus onnistunut. Häiriö on saattanut johtua joko QIAcubesta[®] tai QIAgilitysta[®], tai jostain manuaalisesta työvaiheesta. QIAcubella[®] avustettuna EZ1 Advanced XL -laitteella eristetyistä näytteistä saatiin paremmat tulokset kvantitaatioarvoissa sekä tarkemmat ja yksilöivät tulokset PCR-monistuksesta, joten voitiin päätellä QIAcuben[®] parantavan näytteiden eristystuloksia ainakin EZ1 Advanced XL -laitteella tehtyinä.

Vertailtaviksi menetelmiksi valittiin QIAcubella avustetut eristysmenetelmät sekä EZ1 Advanced XL -laitteella että Chelex-suspensiolla, ja nykyisin käytössä oleva täysin manuaalinen Chelex-differentiaalieristysmenetelmä. Koska valmistelevien kokeiden vahvempien näytteiden eristykset onnistuivat erittäin hyvin kaikilla menetelmillä, päätettiin vahvempi vertailtava soluseossuhde vaihtaa hieman heikommaksi, jossa laskennallinen siittiöiden DNA-pitoisuus oli 1 ng/μl.

6.2 Menetelmien vertailu

Vertailtaville näytteille tehtiin kaksi PCR-monistusta ja kapillaarielektroforeesierottelua. Jotta DNA-alueen voi hyväksyä, tarvitaan kaksi tulosta osoittamaan tulos luotettavaksi. Tällöin voidaan olla varmoja, että alleelit ovat peräisin näytteestä. Jos näyte kontaminoituu ennen PCR-reaktioseoksen tekoa, ovat molemmat PCR-monistukset kontaminoituneita.

EPP-kitillä monistetaan 16 alleelia, ja 12–16 hyväksyttyä aluetta puhtaasta näytteestä määrittelee tuloksen vahvaksi. Neljän hyväksytyn alueen perusteella henkilö voidaan nimetä, mutta näytteen frekvenssi on laskenut yhteen tuhannesosaan. Yksi hyväksytty alue kymmenkertaistaa frekvenssin, jolloin viiden hyväksytyn alueen tuloksen frekvenssi eli esiintyvyytodennäköisyys on 1/10 000. Tällaisessa tapauksessa siis oletetaan, että hyväksyttyjen alueiden lukumäärän perusteella tuloksena saatu tunnistetäsmää 10 000 henkilön joukossa yhden henkilön DNA-tunnisteeseen.

Hyvässä sekoitustuotteessa (liite 1) sekä mies- että naisperäisen DNA:n muodostamat alleelit ovat niin vahvoja, että rikosjutun tutkintaa varten rikoksen uhrista otetun vertailunäytteen avulla analysoitu tunnetun naisen DNA-tunniste (liite 2) voidaan eliminoida tuloksesta. Tällöin jäljelle jää miehen DNA-tunnisteen (liite 3) aiheuttamat alleelit. Tällöin 14–16 hyväksyttyä aluetta määrittelee tuloksen vahvaksi, ja 11–13 määrittelee näytteen lausuntokelpoiseksi. Jos hyväksyttyjä alueita on vähemmän, voidaan analysoida tulos siten, että epäillyn DNA:n osuutta näytteessä ei voida poissulkea. DNA:n differentiaalieristyksessä mies- ja naisperäiset DNA:t on hyvin vaikea saada erotelluksi täysin omiin fraktioihinsa, joten seksuaalirikosnäytteiden tutkinnassa saadaan hyvin usein sekoitustuloksia.

EZ1 Advanced XL - ja QIAcube®-laitteilla eristettyjen näytteiden tuloksia (taulukko 14) tarkasteltaessa heikompien 0,05 ng/μl:n näytteiden SP-fraktioista ei saatu analysoitua yhtäkään tulosta. Yhdessä näytteessä oli viitteitä sekoitustulokseen, mutta yhtäkään aluetta ei voitu hyväksyä. Sen sijaan viitteitä naisen tunnisteteeseen oli seitsemässä näytteessä, mutta niistäkään ei voitu hyväksyä yhtäkään aluetta. Heikommista näytteistä saatiin siis täysin nollatulokset. Vahvemmista näytteistä sen sijaan saatiin hyvät miehen tunnisteteet kahta nollatulosta lukuunottamatta, mutta kvantitaatioarvot olivat selvästi pienempiä kahteen muuhun menetelmään verrattaessa. Sen sijaan EP-fraktioiden tulokset olivat saman tasoisia kuin kahdella muulla menetelmällä eristetyissä näytteissä,

mutta kvantitaatioarvo oli moninkertainen. EZ1 Advanced XL -laite sopii siis hyvin epiteelisolujen eristämiseen, mutta siittiöiden DNA:ta sillä ei saada eristettyä kovin hyvin pumpulipuikoista.

Vahvempien näytteiden kaikista Chelexilla eristetyistä näytteistä saatiin hyvät ja selkeät miehen tunnisteet (taulukot 15 ja 16). QIAcubella® käsitellyn näyte 12.8:n SP-fraktio päätettiin hylätä (taulukko 15). Kyseisestä fraktiosta saatiin täydellinen miehen tunniste, mutta QIAcuben® häiriöstä johtuen kyseistä fraktiota ei käsitelty samalla tavalla kuin muita samassa käsittelyssä olleita rinnakkaisnäytteitä. Tästä syystä näyte 12.8:n SP-fraktio ei ole vertailukelpoinen, ja se jätetään huomioimatta.

Heikompien näytteiden SP-fraktioista analysoitiin monia sekoitustuloksia. Hyvä sekoitustulos analysoitiin viidestä QIAcubella® käsitellyistä näytteistä (taulukko 15) ja kahdesta manuaalisesti eristetystä näytteestä (taulukko 16). SP-fraktioista kahdesta, 13.5:ssä ja 13.9:ssä, voitiin analysoida vahvat ja selkeät naisen tunnisteet (taulukko 15). Nämä tulokset eivät todennäköisesti johdu kontaminaatiosta, sillä naisen tunnisteet olivat niin puhtaita. Yksilöivät naisen tunnisteet todennäköisesti johtuivat siitä, ettei DTT ollut onnistunut rikkomaan siittiöiden tumakalvoja lyysausvaiheessa, jolloin ainoastaan epiteelisolujen DNA oli vapautunut liuokseen.

Tulosten perusteella ei saatu aikaiseksi selkeää eroa QIAcubella® avustetun sekä manuaalisen Chelex-menetelmän välille. Näillä kahdella menetelmällä suoritettiin differentiaalieristykset kolmannen soluseossuhteen sisältäville näytteille, joissa eristettyjen näytteiden siittiöiden laskennallinen kvantitaatioarvo oli 0,1 ng/μl. QIAcuben® avulla SP-fraktioista saatiin analysoitua 10 hyvää sekoitustulosta ja yksi selkeä naisen tunniste näytteestä 16.3 (taulukko 15). Manuaalisella menetelmällä eristettyjen näytteiden SP-fraktioista saatiin analysoitua yksi miehen tunniste ja vain kaksi hyvää sekoitustulosta (taulukko 16).

Vertaamalla pelkkiä SP- ja EP-suspensioita sisältäneiden näytteiden DNA-tuotteiden kvantitaatitulosia kontrollinäytteiden kvantitaatitulosten keskiarvoihin (taulukko 17) voidaan arvioida, kuinka paljon soluja saadaan irrotettua pumpuleista vatkauksella ja kuinka paljon soluja hukataan differentiaalieristyksen työvaiheissa.

Vatkauksella irrotetuista kontrollinäytteiden siittiöistä eristetyn DNA:n prosentuaalinen määrä näytepuikkoon imeytettyyn näytemäärään vaihtelee paljon. Keskimääräisesti

voidaan arvioida soluja irtoavan vatkauksella vain 10-20 % näytteen sisältämistä soluista. Epiteelisoluja sen sijaan irtosi kontrollinäytteissä näytepuikkoihin imeytettyyn määrään nähden vain 8-9 %.

Yksilöivän miehen tunnisteiden antaneiden vahvimpien näytteiden kvantitaatiotulosten perusteella voidaan olettaa, että differentiaalieristysten työvaiheissa siittiöitä hukataan noin 80 % ja epiteelisoluja noin 75 %. Tästä syystä näytteiden tarkka ja huolellinen käsittely on tärkeää, vaikka hyvin pieni määrä ehjää DNA:ta riittää tunnisteiden saamiseen.

Vertailluista menetelmistä selvästi heikoin oli EZ1 Advanced XL -laitteella suoritettu menetelmä. Nykyisin käytössä oleva täysin manuaalinen Chelex-menetelmä osoittautui hyväksi ja tehokkaaksi, mutta QIAcubella® avustettuna on mahdollista saada vielä parempia tuloksia. QIAcuben® käyttöä hankaloittava tekijä on laitteen puhdistusajojen pitkäkestoisuus ja pieni kapasiteetti samanaikaisesti käsiteltäville näytteille.

Kaikkien eristyksissä mukana olleiden negatiivisten kontrollien tulokset olivat negatiivisia, joten käytettyjen reagenssien ja vesien tiedetään olleen puhtaita.

Taulukossa 18 on esitetty yhteenveto tehdystä työstä, johon on merkitty menetelmien hyvät ja huonot puolet. Vertailun perusteella nykyisin käytössä oleva manuaalinen Chelex-differentiaalieristys on toimiva menetelmä, mutta QIAcuben® avulla saadaan vahvempia ja lausuntokelpoisempia tuloksia.

Taulukko 18. Yhteenveto tehdystä menetelmien vertailusta.

Differentiaali-eristysmenetelmä	Mihin perustuu (kemia)	Mihin perustuu (tekniikka)	SP-fraktioiden laatu	EP-fraktioiden laatu	Nopeus	SP-tulosten lausuntokelpoisuus
Manuaalinen Chelex-eristys (nykyisin käytössä oleva menetelmä)	Chelex 100® -harts	Manuaalinen eristys	Hyvä	Melko heikko	Hidas	Hyvä
EZ1 Arvanced XL -eristys QIAcubella®	Magneettipartikkelit	Automaatio	Heikko	Hyvä	Nopea	Heikko
Chelex-eristys QIAcubella®	Chelex 100® -harts	Manuaalinen eristys hieman automatisoituna	Parempi	Melko heikko	Hidas	Parempi

7 Johtopäätökset

KRP:n RTL:ssa tutkitaan paljon seksuaalirikosnäytteitä, jotka sisältävät useamman kuin yhden henkilön DNA:ta epiteeli- ja siittiösolujen muodossa. Vuonna 2011 seksuaalirikostapauksia tutkittiin 391 kappaletta, ja differentiaalieristystä tehtiin 386 kappaletta. Vuonna 2010 seksuaalirikostapauksia oli 324 kappaletta, joista suoritettiin 302 differentiaalieristystä.

Tutkinnan ja lausuntojen kannalta on tärkeää saada eroteltua eri henkilöiden DNA:t omiin fraktioihinsa. Markkinoille on tuotu uusia, automatisoituja näytteenkäsittelylaitteita. Opinnäytetyön tavoitteena oli verrata automatisoitujen laitteiden saavuttamia tuloksia nykyisin käytössä olevalla, manuaalisella menetelmällä saavutettuihin tuloksiin. Tavoitteena oli myös kehittää käytössä olevaa näytteenkäsittelymenetelmää.

Vertailtavien näytteiden ja menetelmien valintaa varten tehtiin paljon suunnittelutyötä. Manuaaliseen Chelex-menetelmään verrattiin Qiagenin DNA:n eristystä tekevää EZ1 Advanced XL -laitetta ja näytteiden esikäsittelyä tekevää QIAcube[®]. Vertailtavia menetelmiä suunniteltaessa DNA:n differentiaalieristystä kokeiltiin erilaisilla laitteiden ja Chelex-menetelmän yhdistelmillä. Parhaimmiksi osoittautuivat EZ1 Advanced XL -laitteella tehtävä differentiaalieristys QIAcube[®] avulla sekä Chelex-differentiaalieristys QIAcube[®] avulla.

Nykyisin käytössä oleva manuaalinen Chelex-differentiaalieristysmenetelmä osoittautui hyväksi ja tehokkaaksi menetelmäksi. Suurimmaksi ongelmaksi ilmeni EZ1 Advanced XL -laitteella tehdyssä differentiaalieristyksessä siittiöiden DNA:n hyvin heikko eristyminen. Saavutettujen tulosten perusteella saatiin selvitettyä, että DNA:n differentiaalieristysmenetelmää kehitettäessä EZ1 Advanced -laitteet eivät sovellu tarkoitukseen kovin hyvin.

QIAcube[®] voidaan saada hieman parempia tuloksia, mutta ongelmaksi koituu laitteen pitkäkestoiset ohjelmat ja pieni kapasiteetti samanaikaisesti käsiteltäville näytteille. Nämä ongelmat saadaan ratkaistua hankkimalla useampi QIAcube-laite, jotta voidaan käsitellä suurempi näytemäärä samanaikaisesti.

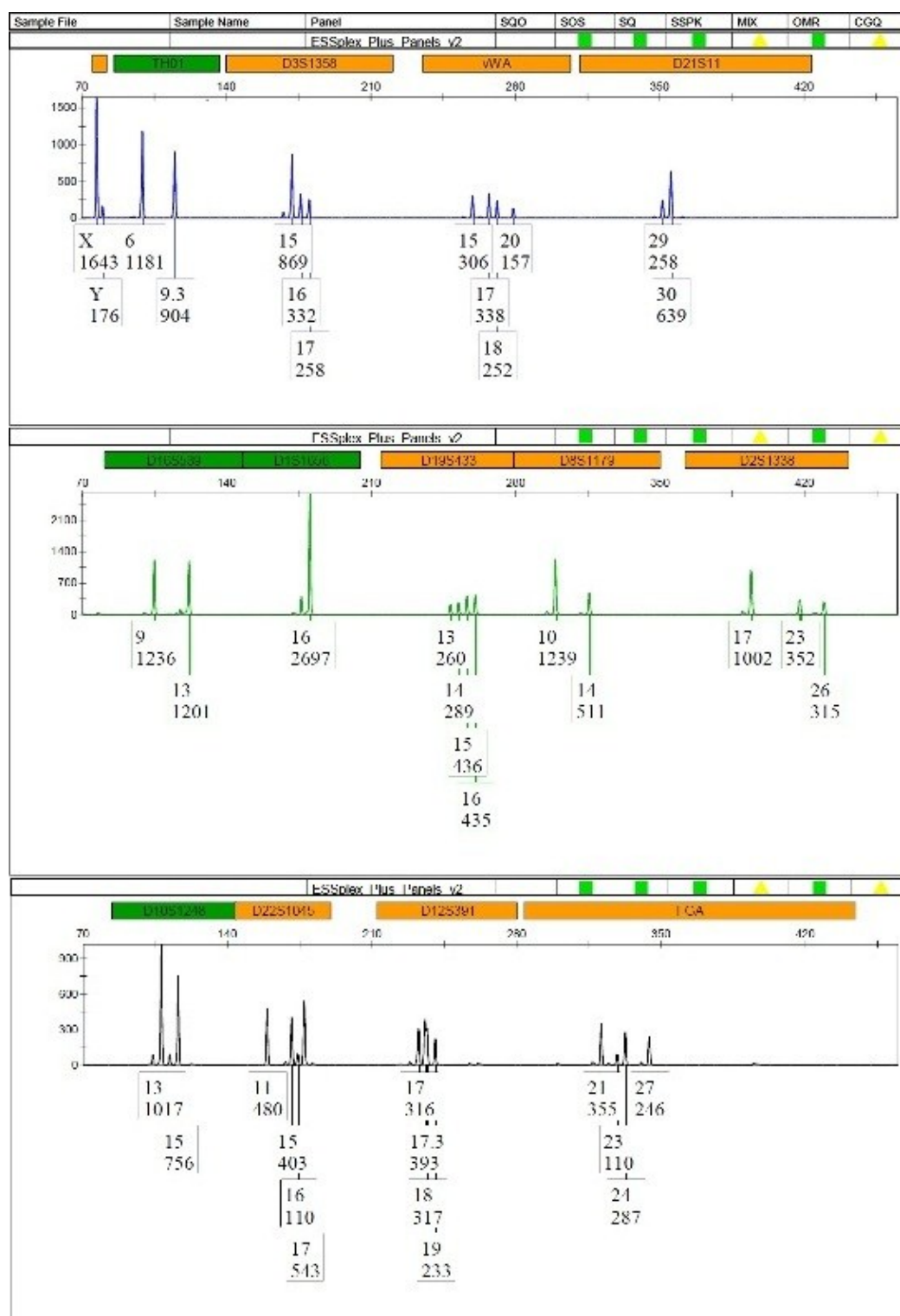
Jatkossa menetelmälle hyvä kehityskohde olisi jatkausvaiheen korvaaminen jollain toisella, soluja näyttemateriaalista irrottavalla menettelyllä. Myös DTT:n puhdistus Mic-

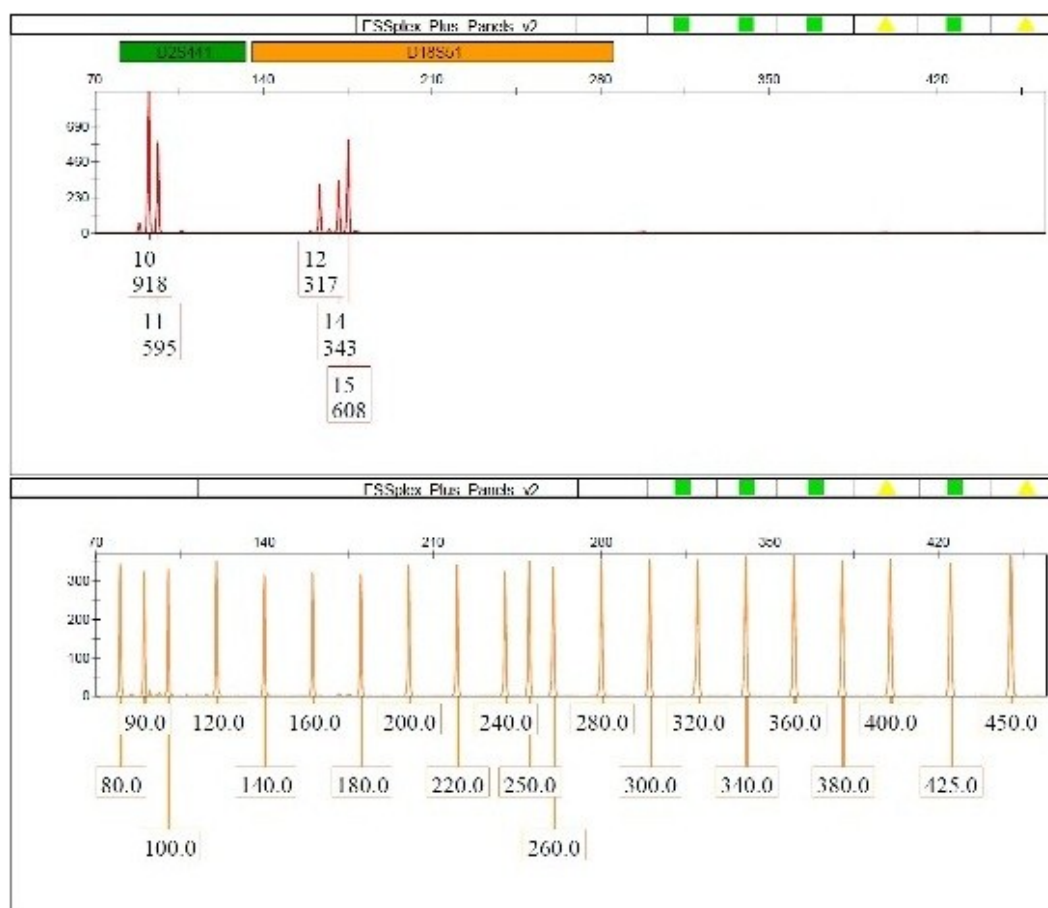
rocon® Ultracel YM-100 -sentrifugipylväillä näytteistä osoittautui melko riittämättömäksi. Tämä työvaihe lisää myös huomattavasti kontaminaatoriskiä, kun useita avoimissa putkissa olevia näytteitä sentrifugoidaan samanaikaisesti samassa sentrifugissa. Menetelmä sisältää myös useita näytteiden siirtoja uusiin putkiin, mikä myöskin lisää kontaminaatoriskiä. Olisi hyödyllistä selvittää, olisiko DTT:n puhdistukselle vaihtoehtoista menetelmää.

Lähteet

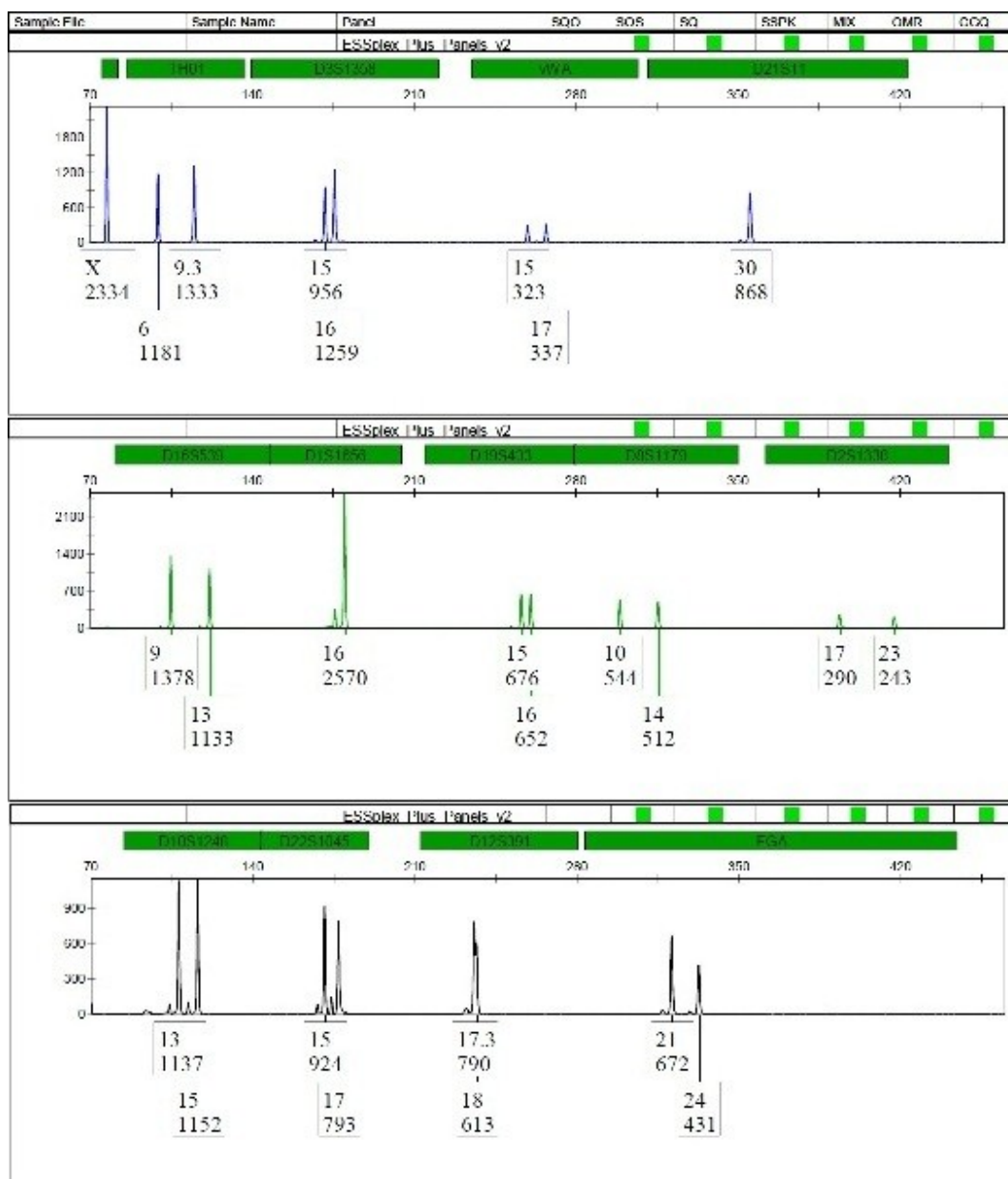
- 1 Butler, John M. 2005. *Forensic DNA Typing, Second Edition: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. Lontoo: Elsevier.
- 2 Sigma-Aldrich. *Analytical Enzymes: Proteinase K*. Verkkodokumentti. Viitattu 8.9.2012. Saatavissa: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/proteinase-k.html>.
- 3 Suominen, Ilari ym. 2010. *Geenitekniikka*. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- 4 Qiagen. *Investigator® Quantiplex Handbook*. Verkkodokumentti. Viitattu 13.9.2012. Saatavissa: <http://www.qiagen.com/products/investigatorquantiplexkit.aspx#Tabs=t2>.
- 5 Qiagen. *Investigator® ESSplex Plus Handbook (Control DNA 9948)*. Verkkodokumentti. Viitattu 8.9.2012. Saatavissa: <http://www.qiagen.com/products/investigatoressplexpluskit.aspx#Tabs=t2>.
- 6 Jaarinen, Soili, Niiranen, Jukka. 2002. Laboratorion analyysitekniikka, 3.–4. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- 7 Walsh, P. S., Metzger, D. A., Higuchi, R. 1991. Chelex 100 As a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-based Typing from Forensic Material. *Bio-techniques*. Apr 10(4): 506–513.
- 8 Qiagen. *EZ1 Advanced Instruments*. Verkkodokumentti. Viitattu 25.9.2012. Saatavissa: <http://www.qiagen.com/products/ez1-advanced-instruments.aspx#Tabs=t1>.
- 9 Qiagen. *EZ1 DNA Investigator Handbook*. Verkkodokumentti. Viitattu 5.10.2012. Saatavissa: <http://www.qiagen.com/products/ez1-advanced-instruments.aspx#Tabs=t2>.
- 10 Anslinger, Katja ym. 2005. Application of the BioRobot EZ1 in a forensic laboratory. *Legal Medicine* 5; 7(3): 164–168.
- 11 Qiagen. *QIAcube® User Manual*. Verkkodokumentti. Viitattu 11.10.2012. Saatavissa: <http://www.qiagen.com/products/automation/qiacube.aspx#Tabs=t5>.

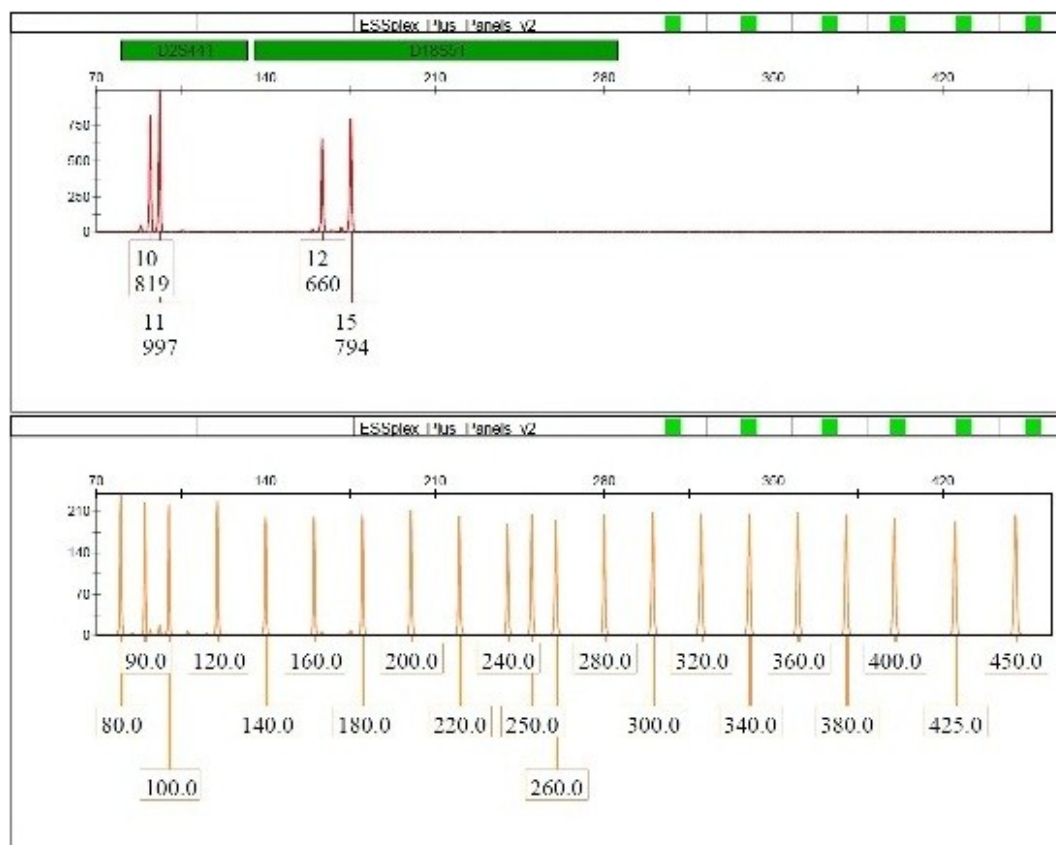
DNA:n differentiaalieristuksen vahvan sekoitustuotteen PCR-tuotteiden kapillaarielektroforeesierottelun tulos GeneMapper® ID-X –ohjelmalla analysoituna





Nainen B:n DNA-tunniste GeneMapper® ID-X -ohjelmalla analysoituna





Mies A:n DNA-tunniste GeneMapper® ID-X-ohjelmalla analysoituna

