

Viivi Laitinen

Tuorekudosnäytteiden NGS-tutkimuksen validointi *BRCA1/2*-geenien kliniseen diagnostiikkaan

Syventävien opintojen kirjallinen työ
Kevätlukukausi 2021

Viivi Laitinen

Tuorekudosnäytteiden NGS-tutkimuksen validointi *BRCA1/2*-geenien kliiniseen diagnostiikkaan

Biolääketieteen laitos

Kevätlukukausi 2021

Vastuuhenkilö: Johanna Schleutker

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Sisällys

1 JOHDANTO	7
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	7
2.1 RINTA- JA MUNASARJASYÖVÄN EPIDEMIOLOGIA.....	7
2.2 ETIOLOGIA JA RISKITEKIJÄT.....	8
2.2.1 <i>Etniset tekijät</i>	8
2.2.2 <i>Elämäntavat ja ympäristö</i>	8
2.2.3 <i>Perinnöllinen alttius</i>	9
2.3 BRCA1- JA 2-GEENIT	9
2.3.1 <i>Toiminta</i>	9
2.3.2 <i>Mutaatiot</i>	10
2.3.3 <i>Testaus</i>	11
2.4 NEXT GENERATION SEQUENCING	12
2.5 PARP-INHIBITIO	12
3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS	12
4 AINEISTO JA TUTKIMUSMENETELMÄT	12
4.1 QUBIT MITTAUS	14
4.2 NANODROP 2000 MITTAUS.....	14
4.3 ENSIMMÄINEN VALIDOINTIAJO	14
4.4 TOINEN VALIDOINTIAJO	20
4.5 PRIMERIEN SUUNNITTELU.....	26
4.6 PRIMERIEN OPTIMOINTI.....	27
4.7 SANGER SEKVENSOINTI	29
5 TULOKSET	30
6 POHDINTA	32
LÄHTEET	32

1 Johdanto

Rinta- ja munasarjasyöpä ovat naisten tavallisimpia syöpiä maailmanlaajuisesti. Osa tapauksista voidaan luokitella perinnöllisen alttiuden aiheuttamiksi, mutta osalla ei ole sukurasitetta lainkaan. On arvioitu, että noin 10 % perinnöllisistä rintasyövistä selittyisi korkean riskin mutaatioiden kuten BRCA1/2-geenien mutaatioilla. (Aittomäki ym. 2013.) BRCA1/2-geenit toimivat DNA-korjausreitin proteiineina erityisesti silloin kun molemmat DNA-juosteet katkeavat (Double Strand Break). Myös muita perinnölliselle rintasyöväälle altistavia geenejä tunnetaan (Aittomäki ym. 2013).

Perinnöllistä syöpäalttiutta on selvitetty ja tiettyjä BRCA1/2-mutaatioita on testattu Suomessa jo aikaisemmin, mutta nyt uusien PARP-inhibiittorilääkkeiden takia kannattaa testata DNA-korjausreitin mutaatioita myös niiltä munasarjasyöpäpotilailta, joilla ei ole altistavaa sukutaustaa. PARP-inhibiittorilääkkeet tehoavat kaikilla potilailla, joilla on virheitä DNA-korjausreitin toiminnassa. Toiminnan häiriöt voivat johtua joko perinnöllisestä geenivirheestä tai somaattisesta mutaatiosta.

Uusien PARP-inhibiittorilääkkeiden takia Suomessakin on aloitettu BRCA1/2-geenien mutaatioiden rutiininomainen testaus kaikilta munasarjasyöpäpotilailta, vaikka heillä ei olisikaan syöväälle altistavaa sukutaustaa. Tämän takia Tyks-Sapan Mikrobiologian ja genetiikan palvelualueelle, Lääketieteellisen genetiikan osastolle pystytettiin BRCA1/2-geenien mutaatioiden diagnostista testausta sekä perinnöllisille että somaattisille mutaatioille. Tämän työn tarkoituksena oli validoida BRCA MASTR Dx -kitti tuorekudosnäytteistä tehtävään geenitestaukseen kliinistä diagnostiikkaa varten.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Rinta- ja munasarjasyövän epidemiologia

Rinta- ja munasarjasyöpä ovat naisten tavallisimpia syöpiä maailmanlaajuisesti. Vuonna 2012 arviolta 1 671 149 naista sairastui rintasyöpään ja 238 719 munasarjasyöpään. Ne kattavat yhdessä 19,0 % kaikesta naisten syöpäkuolleisuudesta. (GLOBOCAN 2012. <http://globocan.iarc.fr>.)

Suomessa rintasyöpä on naisten yleisin syöpä ja samalla yleisin syöpäkuolemansyy. Suomessa vuonna 2014 rintasyövän ilmaantuvuus oli 95,7/100 000 ja kuolleisuus oli 11,8/100 000. Rintasyöpää esiintyy myös miehillä, mutta se on huomattavasti harvinaisempaa kuin naisilla. Vuonna 2014 rintasyöpään sairastui Suomessa 25 miestä. Rintasyöpäpotilaiden suhteellinen elossaololuku viiden vuoden jälkeen oli vuosina 2012-2014 seuratuilla naispotilailla 91 %. Suhteellinen elossaololuku voidaan tulkita elossaolotodennäköisyyden arvioksi tilanteessa, jossa potilaan sairastama syöpä on ainoa mahdollinen kuolemansyy. Rintasyöpä voidaankin harvoin tulkita potilaan kuolemansyyksi. (Suomen Syöpärekisteri. <http://www.cancer.fi/syoparekisteri/>).

Ovariosyöpä on rintasyöpää harvinaisempi sairaus, mutta se kattaa silti maailmanlaajuisesti 3,6 % kaikista naisten syöpätapauksista ja 4,3 % syöpäkuolemista (GLOBOCAN 2012.

<http://globocan.iarc.fr>.) Munasarjasyövän ennuste on rintasyövän ennustetta huonompi: Suomessa ovariosyöpäpotilaiden suhteellinen elossaololuku viiden vuoden jälkeen syövän toteamisesta oli vuosina 2012-2014 seuratuilla potilailla 44 %. Vuonna 2014 ovariosyövän ilmaantuvuus Suomessa oli 7,3/100 000 ja kuolleisuus 4,8/100 000. Suomessa ovariosyöpää diagnosoidaan eniten yli 60-vuotiailla naisilla. (Suomen Syöpärekisteri. <http://www.cancer.fi/syoparekisteri/>.)

Rintasyövän kuolleisuus ei ole lisääntynyt viimeisten vuosikymmenien aikana merkittävästi, vaikka ilmaantuvuus on noussut tasaisesti. Tätä on selitetty parantuneilla hoidoilla ja mahdollisuudella aikaisempaan diagnosointiin. (Jemal ym. 2010).

2.2 Etiologia ja riskitekijät

2.2.1 Etniset tekijät

Rintasyövän sairastuvuuteen vaikuttaa oleellisesti etninen tausta. Pohjois-Amerikassa rintasyöpä on lähes neljä kertaa yleisempää kuin Itä-Aasiassa tai Keski-Afrikassa, joissa sairastuu keskimäärin 27/100 000. (GLOBOCAN 2012. <http://globocan.iarc.fr>.) Alueellinen vaihtelu on suurta, mutta myös alueen sisäisiä eroja löytyy, sillä USA:n valkoisella väestöllä rintasyövän ilmaantuvuus on 86,0/100 000, mustalla 82,0/100 000 ja Amerikan intiaaneilla 49,2/100 000 (Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X^b. <http://ci5.iarc.fr>.) Pelkkä etninen tausta ei kuitenkaan selitä kaikkea, sillä esimerkiksi Pohjois-Amerikassa aasialaisten ja latinoiden rintasyöpä on selvästi yleisempää kuin Aasiassa tai Etelä-Amerikassa (Jemal ym. 2010).

Ovariosyöpään sairastutaan eniten Pohjois-Amerikassa ja Euroopassa. Kehittyneissä maissa sairastuvuus ja kuolleisuus ovat hieman laskeneet 80-luvun jälkeen, kun taas Aasiassa munasarjasyöpä on vastaavana aikana yleistynyt. Etninen tausta ja perimä vaikuttavat myös ovariosyövän ilmaantuvuuteen, sillä esimerkiksi USA:ssa munasarjasyövän ilmaantuvuus vuosina 2000-2007 oli valkoisella väestöllä 10,5/100 000 ja mustalla väestöllä 7,6/100 000. (Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X^b. <http://ci5.iarc.fr>).

2.2.2 Elämäntavat ja ympäristö

Elämäntavat ja ympäristö vaikuttavat sekä rinta-, että munasarjasyöpärisäkiin. Tunnettuja rintasyöpärisäkiä lisääviä tekijöitä ovat lapsettomuus (Kvåle ym. 1987), myöhäinen ensisynnytys (MacMahon ym. 1970), aikaisin alkaneet säännölliset kuukautiset ja myöhään alkaneet vaihdevuodet

(Henderson ym. 1985) yhdistelmäehkäisy pillereiden (Marchbanks ym. 2002) ja vaihdevuosiina hormonikorvaushoidon käyttö (million women study collaborators 2003, Kelsey ym. 1993). Myös ylipainon (Bianchini ym. 2002, Saarinen ja Mäkelä 2014) ja runsaan alkoholin käytön (Smith-Warner ym. 1998) on todettu kohottavan rintasyöpäriskiä.

Munasarjasyövän riskiä lisäävät endometrioosi, synnyttämättömyys ja vaihdevuosiajan hormonikorvaushoito. Munasarjasyövältä sen sijaan suojaa yhdistelmäehkäisy pillereiden käyttö ja useat raskaudet. (Leminen ja Loukovaara, 2011).

2.2.3 Perinnöllinen alttius

Rinta- ja munasarjasyöpiin liittyy joissakin suvuissa perinnöllinen syöpäalttius. Suomessa on arvioitu jopa 30 % rintasyöpätauksista olevan jossain määrin perinnöllisiä (Aittomäki ym. 2013). USA:ssa arvio perinnöllisten rintasyöpätapausten osuudesta kaikista diagnosoiduista rintasyöivistä on noin 10 % (Pharoah ym. 2002). Perinnöllisestä rintasyöpäalttiudesta osa selittyy korkean penetranssin mutaatioilla syöväälle altistavissa geeneissä, kuten BRCA1, BRCA2 tai TP53, osa kohtalaisen riskin geenivirheillä, kuten CHEK2-geenin mutaatio 1100delC, mutta suurimmasta osasta rintasyöpäsukuja ei löydy tunnettua geenivirhettä (Aittomäki ym. 2013).

2.3 BRCA1- ja 2-geenit

BRCA1-geeni paikallistettiin kromosomiin 17q21 ja eristettiin samalla ensimmäistä kertaa vuonna 1994. Hieman myöhemmin löydettiin BRCA2-geeni kromosomista 13q12. BRCA1/2-geenien proteiinituotteiden pituudet ovat 1,863 and 3,350 aminohappoa ja molemmat muodostuvat yli 20 eksonista. (Brose ym. 2003)

2.3.1 Toiminta

BRCA1/2-proteiinit toimivat DNA:n korjauksessa molempien juosteiden katketessa (DSB= Double Strand Break) homologisen rekombinaation avulla. Niiden tiedetään toimivan tuumorisuppressorigeenien eli kasvunrajoitegeenien tavoin. (Sattar 2013). Tuumorisuppressorigeenit toimivat kuin jarrut syövän kasvussa: tuumori ei pääse kasvamaan niin pitkään kun edes toinen jarruista eli geenin alleeleista toimii. Vastaavasti proto-onkogeenit ovat kuin kaasut, tuumorin kasvu kiihtyy kun yksikin poljin painetaan pohjaan.

DSB voi tapahtua esimerkiksi solun metabolian sivutuotteena syntyvien reaktiivisten happiradikaalien tai ulkoisen röntgensäteilyn vaikutuksesta ja niiden korjausreitti tarvitsee toimivia BRCA-proteiineja. DSB johtaa korjaamattomana tavallisesti solun kuolemaan ja tätä käytetäänkin hyödyksi muun muassa sädehoidossa. Periytyvä rintasyöpäalttius johtuu BRCA-geenien tapauksessa sukusolulinjassa dominantisti periytyvistä mutaatioista, joiden seurauksena toinen kopio on valmiiksi toimimaton.

Syöpä pääsee tavallisesti syntymään vasta kun normaalisti toimiva alleeli menetetään somaattisen eli elämänaikaisen mutaation seurauksena. (Aittomäki ym. 2013, Lord ja Ashworth 2016.)

2.3.2 Mutaatiot

BRCA1/2-geenien mutaatioita tunnetaan satoja erilaisia, joista kaikki eivät kuitenkaan ole patogeenisia eli syöpää aiheuttavia. Lisäksi eri mutaatioiden patogeenisyyden aste vaihtelee: osa mutaatioista aiheuttaa rintasyöpää keskimäärin toisia aikaisemmin. Tunnetaan myös paljon mutaatioita, joiden patogeenisyyttä ei ole vielä pystytty arvioimaan. (Sattar 2013). Suomalaisista rintasyöpäsuvuista on pystytty tunnistamaan väestössämme yleisiä valtamutaatioita. (taulukko 1) (<https://huslab.fi/ohjekirja/20532.html>, Suvisaari 2017). Syöväälle altistavat BRCA1/2-geenien valtamutaatiot ovat suomalaisessa väestössä pieniä deleetioita tai duplikaatioita, tai SNP:ja eli yhden emäksen muutoksia toiseksi.

Taulukko 1

BRCA1 (NM_007294.3):		BRCA2 (NM_000059.3):	
<i>emäsjärjestyksen muutos</i>	<i>proteiinin muutos</i>	<i>emäsjärjestyksen muutos</i>	<i>proteiinin muutos</i>
c.68_69delAG	p.(Glu23fs*17)	c.445delA	p.(Thr149Hisfs*3)
c.594_597delTGTTG	p.(Ser198Argfs*35)	c.517-2A>G	
c.667_668delAA	p.(Lys223Glyfs*4)	c.755_758delACAG	p.(Asp252Valfs*24)
c.737delT	p.(Leu246Ter)	c.771_775delTCAAA	p.(Asn257Lysfs*17)
c.928C>T	p.(Gln310Ter)	c.1286T>G	p.(Leu429Ter)
c.1082_1092delCAGAGAATCCT	p.(Ser361Ter)	c.1594G>T	p.(Glu532Ter)
c.1504_1508delTTAAA	p.(Leu502Alafs*2)	c.1813dupA	p.(Ile605Asnfs*11)
c.1687C>T	p.(Gln563Ter)	c.3847_3848delGT	p.(Val1283Lysfs*2)
c.1805delA	p.(Asn602Ilefs*10)	c.3860dupA	p.(Asn1287Lysfs*2)
c.1962dupG	p.(Tyr655Valfs*18)	c.3881T>A	p.(Leu1294Ter)
c.2154_2220dup67	p.(Ser741Ter)	c.4169delT	p.(Leu1390Trpfs*20)
c.2475delC	p.(Asp825Glufs*21)	c.4226T>A	p.(Leu1409Ter)
c.2599C>T	p.(Gln867Ter)	c.5303_5304delTT	p.(Leu1768Argfs*5)
c.2685_2686delAA	p.(Pro897Lysfs*5)	c.5388delT	p.(Asp1796Glufs*9)
c.2713delC	p.(Gln905Lysfs*95)	c.5569G>T	p.(Glu1857Ter)
c.2923C>T	p.(Gln975Ter)	c.5621_5624delTTAA	p.(Ile1874Argfs*34)
c.3091dupA	p.(Ile1031Asnfs*2)	c.5851_5854delAGTT	p.(Ser1951Trpfs*11)
c.3145delT	p.(Ser1049Profs*13)	c.6267_6269delGCainsC	p.(Glu2089fs*2)
c.3228_3229delAG	p.(Gly1077Alafs*8)	c.6275_6276delTT	p.(Leu2092Profs*7)
c.3388delT	p.(Ser1130Glnfs*4)	c.7480C>T	p.(Arg2494Ter)
c.3485delA	p.(Asp1162Valfs*48)	c.8314G>T	p.(Glu2772Ter)
c.3607C>T	p.(Arg1203Ter)	c.8327T>G	p.(Leu2776Ter)
c.3622A>T	p.(Lys1208Ter)	c.8331+2T>C	
c.3626delT	p.(Leu1209Ter)	c.8332-2A>G	
c.3756_3759delGTCT	p.(Ser1253Argfs*10)	c.8629G>T	p.(Glu2877Ter)
c.3785C>A	p.(Ser1262Ter)	c.8633-1G>C	
c.4035delA	p.(Glu1346Lysfs*20)	c.8940dupA	p.(Glu2981Argfs*37)
c.4097-2A>G	p.(Gly1366fs*2)	c.8978C>G	p.(Ser2993Ter)

c.4183C>T	p.(Gln1395Ter)	c.9118-2A>G	p.(Val3040Metfs*20)
c.4327C>T	p.(Arg1443Ter)	c.9692_9699dupCACTTTGT	p.(Met3234Hisfs*18)
c.4357+1G>A	p.(Arg1397Tyrfs*2)		
c.4480G>T	p.(Glu1494Ter)		
c.4656C>A	p.(Tyr1552Ter)		
c.4997dupA	p.(Tyr1666Ter)		
c.5026_5036delTTAACTAATCT	p.(Leu1676Asnfs*3)		
c.5074+1G>A			
c.5075-1G>A			
c.5095C>T	p.(Arg1699Trp)		
c.5117G>A	p.(Gly1706Glu)		
c.5123C>A	p.(Ala1708Glu)		
c.5209dupA	p.(Arg1737Lysfs*93)		
c.5251C>T	p.(Arg1751Ter)		
c.5266dupC	p.(Gln1756Profs*74)		
c.5278-1G>C			
c.5503C>T	p.(Arg1835Ter)		
c.5569delC	p.(Glu1857Argfs*65)		

2.3.3 Testaus

Suomessa suositetaan perinnöllisyysneuvontaa jos suvussa on useita rintasyöpätapauksia, joista ainakin yksi nuorella iällä tai suvussa esiintyy lisäksi munasarjasyöpää. Geenitestauksessa pidetään rajana 10 % todennäköisyyttä löytää mutaatio. Päätös geenitestauksesta tehdään useimmiten perinnöllisyyslääketieteen yksikössä annettavan neuvonnan yhteydessä. (Aittomäki ym. 2013.) Geenitesti voidaan tehdä myös jos suvussa on jo tunnistettu syöväälle altistava mutaatio. Suvun mutaatiota kantavan jäsenen seulonnat aloitetaan tavallista joukkoseulontaikää aikaisemmin, yleensä viisi vuotta ennen suvun nuorimpana sairastuneen sairastumisikä. (Stuckey ja Onstad 2015.)

Tällä hetkellä HUSLAB tekee perinnöllisen syöpäalttiuden selvittämisen yhteydessä BRCA-geenimutaatioiden tutkimusta, jolla voidaan tunnistaa 78 Suomessa aikaisemmin tunnistettua mutaatiota (taulukko 1) (<https://huslab.fi/ohjekirja/20532.html> , Suvisaari 2017). Turussa validoidulla testillä löydetään kaikki BRCA1/2-geenien eksonien alueelle tai eksoni-introni rajakohtaan sijoittuvat geenimutaatiot.

Viime vuosina on kehitetty uusia PARP-inhibiittoreita, jotka tehoavat kaikilla BRCA1/2-mutaatiota kantavilla munasarjasyöpäpotilailla riippumatta siitä, onko mutaatio periytyvä vai somaattinen. Tästä johtuen on Suomessakin aloitettu mutaatioiden testaus myös niiltä munasarjasyöpäpotilailta, joilla ei periytyvää muotoa epäillä.

2.4 Next Generation Sequencing

Next Generation Sequencing (NGS) eli massiivinen rinnakkaissekvensointi ei viittaa suoraan yhteen tiettyyn sekvensointi tekniikkaan, vaan useisiin erilaisiin perinteisen Sanger-sekvensoinnin jälkeen kehitettyihin menetelmiin. Yleisin ja myös TYKS:ssä käytössä oleva menetelmä on Illuminan kehittämä Sequencing-by-synthesis. Tässä menetelmässä on yhtä aikaa miljoonia templaatteja, jotka kiinnittyvät levyille ja pysyvät paikallaan. Jokaista templaattia vasten muodostuu komplementaarinen juoste yksi merkitty emäs kerrallaan. Jokaisen lisätyn emäksen jälkeen fluoresenssit ja niiden paikat levyllä rekisteröidään mikroskoopilla, ja fluoresoivat osat poistetaan. Tämä mahdollistaa seuraavan emäksen kiinnittymisen ja kierron jatkumisen. Sekvensoinnin lopussa mikroskooppikuvien saman kohdan peräkkäiset fluoresenssit kootaan emäsjärjestykseksi. Nämä muodostuneet "readit" (emäsparien luenta) asetetaan järjestykseen osittain päällekkäisten sekvenssien avulla ja emäksen peittävyys nousee kohdalle osuvien readien määrän mukaisesti. (Muzzey ym. 2015.)

2.5 PARP-inhibitio

PARP (poly ADP-ribose Polymerase) on DNA korjausreitissä toimiva proteiiniperhe. Ne korjaavat vaurioita kun toinen DNA-juoste on vaurioitunut, mutta toinen on vielä ehjä (Single Strand Break, SSB). Korjaamaton SSB muuntuu herkästi DSB:ksi ja tätä hyödynnetään BRCA1/2-mutatoituneen syövän hoidossa. PARP inhibiittorien teho perustuukin syöpäsolujen ympäröivää kudosta nopeampaan jakaantumiseen ja sitä kautta suurempaan DNA:n replikaatiossa ilmaantuvien virheiden määrään, joiden korjaamisessa BRCA1/2 ja PARP ovat merkittävässä asemassa. Jos BRCA1/2-riippuvainen homologinen DSB korjausreitti ei toimi normaalisti ja toinenkin DNA korjauksen kannalta tärkeän proteiinin toiminta inhiboidaan, päädytään tilanteeseen, jossa syöpäsoluihin kertyy nopeasti kriittisiä DNA-vaurioita, jotka johtavat syöpäsolujen kuolemaan. (Crafton ym. 2016, Carey ja Sharpless 2011.)

3 Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksen tarkoituksena oli validoida BRCA1/2-geenien mutaatioiden testaus kliiniseen diagnostiikkaan. Tutkimuksessa testataan BRCA MASTR Dx -kittiä tuorekudosnäytteistä eristetyllä DNA:lla ja varmistaa sen soveltuvuus näytteiden analysointiin kliinisessä diagnostiikassa. Lisäksi kaikista näytteistä analysoitiin todetut variantit ja varmistettiin NGS-ajoihin liittyvien laatukriteerien täyttyminen.

4 Aineisto ja tutkimusmenetelmät

Tutkimusaineistona oli 18 rinnan tuorekudosnäytettä, jotka oli kerätty rintasyöpäpotilailta. Yhdessä näytteistä ooli tunnettu BRCA2-geenin mutaatio. Muissa potilasnäytteissä ei ole tiedossa olevia

BRCA1/2-mutaatioita tai tunnettuja polymorfioita. Osasta potilasnäytteistä DNA oli eristetty Maxwell-automaatilla ja lopuista eristettiin DNA fenoli-kloroformieristyksellä. Muutamasta Maxwell-automaatilla eristetystä näytteestä eristettiin DNA myös fenoli-kloroformieristyksellä vertailuaineiston saamiseksi. Lisäksi käytettiin Sophia Geneticsin omia kontrollinäytteitä, joissa oli yrityksen tuntema mutaatio. Sophia Geneticsin kontrollinäytteet olivat valmiiksi eristettyä DNA:ta.

Eristetystä DNA:sta valmistettiin amplikonikirjastot Multiplicom BRCA MASTR Dx -kitillä, joka on CE-IVD-hyväksytty. Kitti on tarkoitettu BRCA1- ja BRCA2-geenien NGS-sekvensointiin. Menetelmä perustuu 93 genomisen kohdealueen targetointiin, jotka yhdessä kattavat kaikki BRCA1- ja BRCA2-geenien eksonit ja eksoni-intronirajakohdat. Menetelmällä on mahdollista tunnistaa kaikki BRCA1- ja BRCA2-geenien pistemutaatiot ja kopiolumuutokset. Menetelmän ohjeiden mukaan suoritettiin kaksi peräkkäistä multiplex-PCR-reaktiota, joista ensimmäisessä kohdealueet monistetaan ja toisessa monistettuihin kohdealueisiin liitetään indeksit ja adaptorit sekvensointia varten. Valmiit amplikonikirjastot sekvensoitiin Next Generation Sequencing (NGS) -menetelmällä, Illumina MiSeq sekvenssaattorilla. Tulosten analysoinnin ja tarkastelun teki Sophia Genetics DDM-ohjelmistollaan.

Näytteet jaettiin kahteen erilliseen sekvensointiajoon, joissa molemmissa oli 16 näytettä ja negatiivinen kontrolli ristikontaminaation toteamiseksi. Molemmissa ajoissa käytettiin Sophia Geneticsin tunnettua kontrollinäytettä ja tunnettua BRCA2-geenin mutaation sisältävää näytettä. Osasta näytteistä tehtiin toistoja ajojen välillä ja osasta ajojen sisällä, jotta saatiin varmistettua testin toistettavuus. Taulukossa (1) on kerättyä tietoa näytteistä.

Osa löydettyistä BRCA-1- ja BRCA-2-varianteista varmistettiin vielä Sanger-sekvensoinnilla.

Taulukko 2 Näytetaulukko

näyte	ajo jossa mukana	Maxwell-eristys	fenoli-kloroformieristys	tunnettu mutaatio
S1	2	x		
S2	1	x		
S3	1 ja 2	x	x	
S4	1	x	x	
S5	1 ja 2	x	x	
S6	1	x	x	
S7	1	x		
S8	1	x		
S9	1	x		
S10	1 ja 2	x		
S11	1 ja 2	x		
S12	1 ja 2	x	x	BRCA2 Valtamutaatio c. 9118-2 A>G
S13	1	x		
S14	2		x	

S15	2		x	
S16	2		x	
S17	2		x	
S18	2		x	

4.1 Qubit mittaus

Qubit mittaus perustuu konsentraation määrittämiseen fluorofotometrisesti. Konsentraation mittaaminen Qubitilla tehtiin Broad Range -kitillä ja aina rinnakkaisnäytteiden kanssa. Valmistettiin mastermix pipetoimalla Qubit Broad Range buffer -liuosta 199 µl per mitattava näyte ja Qubit reagent -liuosta 1 µl per mitattava näyte. Mastermix sekoitettiin pipetoimalla edestakaisin. Tämän jälkeen mastermixia jaettiin Qubit-mittausputkiin 199 µl näytteille ja 190 µl standardeille. Lisättiin näytteet (1 µl per näyte) ja BR standard 1 ja 2 (10 µl per standardi) merkittyihin Qubit-putkiinsa ja sekoitettiin vorteksoimalla. Lopuksi mitattiin konsentraatiot asettamalla yksi putki kerralla laitteeseen ja merkittiin muistiin saadut tulokset. Jos saman näytteen konsentraatiot erosivat toisistaan merkittävästi, toistettiin mittaus valmistamalla ja mittaamalla uudet rinnakkaisnäytteet.

4.2 NanoDrop 2000 mittaus

NanoDrop-mittaus perustuu spektrofotometriseen konsentraation mittaamiseen. Konsentraation mittaaminen NanoDropilla tehtiin seuraavasti. Lisättiin mittausalustalle 1 µl näytteiden liuottamiseen käytettyä bufferia ja kalibroitiin sen avulla laitteisto. Pyyhittiin nukkaamattomalla paperilla mittausalusta, jonka jälkeen siirryttiin mittauksiin. Pipetoitiin mittausalustalle 1 µl DNA-laimennosta ja mitattiin sen konsentraatio. Pyyhittiin mittausten välissä mittausalusta nukkaamattomalla paperilla. Mittausten jälkeen pipetoitiin mittausalustalle 3 µl H₂O ja pyyhittiin se pois nukkaamattomalla paperilla.

4.3 Ensimmäinen validointiajo

Ensimmäisen ajon valmistelu aloitettiin mittaamalla konsentraatiot Qubitilla mukaan tulevista Maxwell-eristetyistä näytteistä. Osasta konsentraatio oli mitattu jo heti eristyksen jälkeen, mutta kaikista tehtiin kuitenkin uusi Qubit-mittaus rinnakkaisnäytteiden kanssa. Osa näytteistä jouduttiin mittaamaan uudestaan ei-yhdenmukaisten rinnakkaisnäytteiden takia. Kahdessa näytteessä DNA:n määrä oli niin pieni, ettei sitä pystytty mittaamaan tarkasti käytössä olleella Qubit Broad Range kitillä, joten konsentraatio mitattiin lopulta NanoDrop 2000 -laitteella. Viimeisimmät mittaustulokset on merkitty taulukkoon 1 ja niistä on laskettu keskiarvo. NanoDropilla mitatut näytteet on merkitty taulukkoon tähdellä.

Taulukko 3 Ensimmäisen ajon näytteiden konsentraatiot

Näyte	c ng/μl mittaus 1	c ng/μl mittaus 2	c ng/μl keskiarvo
S2	2,84	2,10	2,47
S3	53,2	57,2	55,2
S4	7,64	6,90	7,27
S5	16,5	23,4	20,0
S6	90,8	102	96,4
S7*	-	-	13,2
S8	68,6	78,2	73,4
S9	128	128	128
S10	119	114	117
S11	296	286	291
S12*	-	-	3,9
S13	6,74	6,76	6,73

Konsentraatioiden mittaamisen jälkeen päätettiin käyttää näytteestä S12 fenoli-kloroformieristettyä DNA:ta, jotta DNA:n konsentraatio olisi riittävä kirjastojen tekemiseen. Näytteen S12 fenoli-kloroformieristetyn DNA:n konsentraatio oli 570 ng/μl.

Seuraavaksi tehtiin 30 μl 10 ng/μl laimennokset kaikista ajossa käytettävistä näytteistä, joiden konsentraatio oli yli 10. Tästä poikkeuksena näytteet S10, S11 ja S12 (fenoli-kloroformi) joita valmistettiin 55 μl ajon sisäisiä replikaatteja varten. Näytteitä S2, S4, S7 ja S13 päätettiin käyttää laimentamattomina, niiden matalan konsentraation vuoksi. Sophia Geneticsin kontrollinäytettä oli 7,5 μl 20 ng/μl. Multiplex PCR -reaktiota varten kontrollinäytteestä tehtiin laimennos, jonka tilavuus oli 30 μl ja konsentraatio 5 ng/μl. Näytteet ja laimennokset säilytettiin suljettuina jäällä kun niitä ei tarvittu. Laimennokset tehtiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin vetokaapissa pre-PCR-tilassa.

Master Mixien valmistus aloitettiin ottamalla Plexit ja Taq-polymeraasi jäille sulamaan. Putkien sulaessa piirrettiin pipetointikaavion mukaiset alueet 96-kuoppalevyille, kirjoitettiin siihen valmiiksi tunnistetiedot ja leikattiin foliokannesta suikaleita, joilla voitaisiin myöhemmin sulkea valmiiksi pipetoidut kaivot. Merkittiin myös valmiiksi Plex Mixien putket pipetointikaavion mukaisilla väreillä. Plexien ja Taq-polymeraasin sulamista nopeutettiin lopulta pitämällä putkia kädessä. Kun putket olivat sulaneet, Plexit vorteksoitiin lyhyesti, jonka jälkeen kaikki putket spinnattiin sentrifugilla.

Sulatuksen jälkeen putket säilytettiin jäällä kun niitä ei tarvittu. Jokainen Master Mix pipetoitiin vuorollaan 1,5 ml Eppendorf-putkeen, jonka jälkeen putki suljettiin ennen seuraavan Mixin pipetointia ristikontaminaation välttämiseksi. Jokaiseen Plex Mixiin pipetoitiin 180 µl PCR Mix Plex n (n=1, 2, 3, 4 tai 5) ja 1,35 µl Taq DNA polymeraasia. Kun kaikki Mixit oli pipetoitu valmiiksi, vorteksoitiin putket lyhyesti ja spinnattiin sentrifugilla alas.

Master Mixit pipetoitiin 96-kuoppalevyille pipetointikaavion 1 mukaisiin kaivoihin yksi Plex Mix kerrallaan. Plex Mixiä pipetoitiin kaikkiin 17 kaivoon 10 µl, jonka jälkeen lisättiin Plexin kaivoihin pipetointikaavion 1 mukaista näytettä tai vettä 5 µl. Pipetoinnin jälkeen suljettiin kaikki kyseistä Plexiä sisältävät kaivot foliosuikaleilla, ennen seuraavan Plexin jakamista omiin kaivoihinsa. Sulkemalla kaivot foliokansilla pyrittiin välttämään ristikontaminaatiota Plexien välillä. Plex Mixit pipetoitiin numerjärjestyksessä. Kun kaikkiin kaivoihin oli lisätty Plex Mix ja näyte, poistettiin foliosuikaleet ja suljettiin levy huolellisesti kumikannella. Levy vorteksoitiin kevyesti ja seokset spinnattiin sentrifugilla alas.

Pipetointikaavio 1 Ensimmäisen ajon näytteiden ja Plexien sijainti 96-kuoppalevyllä

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	S11(1)	S11(2)	S11(1)	S11(2)	S11(1)	S11(2)	S11(1)	S11(2)	S11(1)	S11(2)		H ₂ O	Plex 1
B	S12(1)	S12(2)	S12(1)	S12(2)	S12(1)	S12(2)	S12(1)	S12(2)	S12(1)	S12(2)		H ₂ O	Plex 2
C	S10(1)	S10(2)	S10(1)	S10(2)	S10(1)	S10(2)	S10(1)	S10(2)	S10(1)	S10(2)		H ₂ O	Plex 3
D	S2	S8	S2	S8	S2	S8	S2	S8	S2	S8		H ₂ O	Plex 4
E	S9	S3	S9	S3	S9	S3	S9	S3	S9	S3		H ₂ O	Plex 5
F	SG1	S6	SG1	S6	SG1	S6	SG1	S6	SG1	S6			
G	S4	S13	S4	S13	S4	S13	S4	S13	S4	S13			
H	S5	S7	S5	S7	S5	S7	S5	S7	S5	S7			
	Plex 1		Plex 2		Plex 3		Plex 4		Plex 5				

96-kuoppalevy asetettiin Veriti 96 Well Thermal Cycler -laitteeseen ja ajettiin taulukon 2 mukainen Multiplex PCR ohjelma. Heti näytteiden saavutettua loppulämpötilan 4 °C, ne siirrettiin yöksi -20 °C pakkaseen.

Taulukko 4 Multiplex-PCR ohjelma

Vaihe **Syklien määrä** **Lämpötila** **aika**

1	1	98 °C	10 min
2	20	95 °C	45 s

		60 °C	45 s
		68 °C	2 min
3	1	72 °C	10 min
4	1	4 °C	< 1 h

Seuraavana päivänä jatkettiin näytteiden laimentamisella 1/1000 Universal PCR varten. Sulatettiin yön pakastimessa olleet Multiplex PCR tuotteet, vorteksoitiin levy ja spinnattiin nesteet alas. Piirrettiin kahteen uuteen 96-kuoppalevyyn samat merkinnät kuin ensimmäiseen ja merkittiin laimennokset 1/100 ja 1/1000. Pipetoitiin 1/100 levyille 99 µl vettä kuhunkin merkittyyn kaivoon, jonka jälkeen siirrettiin monikanavapipetillä 1 µl Multiplex PCR tuotetta niille merkittyihin kaivoihin. Laimennos sekoitettiin pipetoimalla 10 µl tilavuus kymmenen kertaa edestakaisin. Seuraavaa laimennosta varten pipetoitiin 1/1000 levyille 9 µl vettä kaikkiin merkittyihin kaivoihin, jonka jälkeen siirrettiin monikanavapipetillä 1 µl 1/100 Multiplex PCR laimennosta omiin kaivoihinsa. Laimennos sekoitettiin pipetoimalla 8 µl tilavuus kymmenen kertaa edestakaisin. Levy spinnattiin, suljettiin kumikannella huolellisesti ja laitettiin -20 °C yöksi.

Valittiin Universal PCR:ssä käytettävät MID-primerit näytteille käyttäen Multiplicomin valintatyökalua IFU142 Selection MID 1-48/49-96 for Illumina MiSeq. Valitut MID:t on merkitty taulukkoon 3. Otettiin pakastimesta jäille sulamaan 1/1000 laimennetut Multiplex PCR tuotteet, Universal PCR-mix, Amplification reagent (AR1), Taq-polymeraasi ja MID:t. Merkittiin valmiiksi 1,5 ml Eppendorf-putket kaikkien näytteiden mastermixejä varten. Nopeutettiin Universal PCR-mixin, AR1:n, Taq-polymeraasin ja MID-primerien sulamista lämmittämällä niitä kädessä. Kaikki sulaneet putket Taq-polymeraasia lukuun ottamatta vorteksoitiin, jonka jälkeen kaikki putket spinnattiin sentrifugilla lyhyesti. Putket säilytettiin jäällä kun niitä ei tarvittu.

Taulukko 5 Ensimmäisen ajon näytteiden MID:t

Näyte	MID 7 index	MID 5 index
S11 (1)	p7-02 TGATAGTG	p5-06 TATCCATC
S12 (1)	p7-03 ATCAAAGG	p5-04 CGATATGA
S10 (1)	p7-02 TGATAGTG	p5-03 ATCATGAG
S2	p7-03 ATCAAAGG	p5-02 ACTTGAGT
S9	p7-04 CACCGGGA	p5-06 TATCCATC
SG1	p7-05 CCGTAGTT	p5-05 TCTGGCAG
S4	p7-04 CACCGGGA	p5-04 CGATATGA
S5	p7-05 CCGTAGTT	p5-03 ATCATGAG

S11 (2)	p7-01	TAATGGAG	p5-01	GTCAATAC
S12 (2)	p7-08	TTGGCCAC	p5-06	TATCCATC
S10 (2)	p7-01	TAATGGAG	p5-05	TCTGGCAG
S8	p7-06	TGTCGAAA	p5-01	GTCAATAC
S3	p7-07	ACTGCCAT	p5-06	TATCCATC
S6	p7-06	TGTCGAAA	p5-05	TCTGGCAG
S13	p7-07	ACTGCCAT	p5-04	CGATATGA
S7	p7-08	TTGGCCAC	p5-02	ACTTGAGT
H ₂ O	p7-08	TTGGCCAC	p5-03	ATCATGAG

Seuraavaksi pipetoitiin jokaisen näytteen eri MID:t sisältävä mastermix erikseen. Valmiiksi merkittyihin putkiin pipetoitiin 60 µl Universal PCR Mix, 60 µl AR1, 0,75 µl Taq-polymeraasia ja 12 µl kumpaakin näytteelle valittua MID-primeriä. Kun putkeen oli pipetoitu kaikki tarvittava, siirrettiin se jälle odottamaan muiden putkien valmistumista, jonka jälkeen kaikki mastermixit vorteksoitiin, spinnattiin lyhyesti ja asetettiin takaisin jälle.

Merkittiin uudelle 96-kuoppalevyllä pipetointikaavio 1 mukaiset merkinnät ja pipetoitiin kutakin mastermixiä 24 µl kaikkiin viiteen näytteen kaivoon. Kun kaikki mastermixit oli pipetoitu, siirrettiin monikanavapipetillä 1 µl 1/1000 Multiplex PCR laimennosta kyseisen näytteen kyseiselle Plexille merkittyyn kaivoon. 96-kuoppalevy vorteksoitiin, spinnattiin ja suljettiin kumikannella. Levy asetettiin Veriti 96 Well Thermal Cycler -laitteeseen ja ajettiin taulukon 4 mukainen Universal-PCR ohjelma.

Taulukko 6 Universal-PCR ohjelma

Vaihe Syklien määrä Lämpötila aika

1	1	98 °C	10 min
2	20	95 °C	45 s
		64 °C	45 s
		68 °C	2 min
3	1	72 °C	10 min
4	1	4 °C	max 12 h

Näytteiden ollessa PCR ajossa merkittiin valmiiksi 1,5 ml Eppendorf-putket puhdistamattomia amplikonikirjastoja varten. Universal PCR -ohjelman jälkeen yhdistettiin näytteiden eri plexit amplikonikirjastoiksi taulukon 5 mukaisessa suhteessa. Valmiit aplikonikirjastot siirrettiin yöksi -20 °C pakkaseen.

Taulukko 7 Plexien yhdistäminen

Plex	Tilavuus
Plex 1	8 µl
Plex 2	11 µl
Plex 3	13 µl
Plex 4	8 µl
Plex5	10 µl

Seuraavana päivänä puhdistettiin amplikonikirjastot käyttäen AMPure XP beadsia (magneettihelmiä). Otettiin magneettihelmet huoneenlämpöön ja haettiin näytteet jälle sulamaan. Merkittiin tunnistetarroilla valmiiksi 1,5 ml Eppendorf-putket puhdistettuja amplikonikirjastoja varten ja toiset tussilla puhdistusta varten. Näytteiden sulettua ne vorteksoitiin ja spinnattiin lyhyesti, jonka jälkeen jatkettiin näytteiden S11 (1), S12 (1), S10 (1) S2, S9, SG1, S4 ja S5 puhdistusta ja asetettiin muut näytteet jälle odottamaan vuoroaan.

Pipetoitiin puhdistettavista kirjastosta 40 µl sille merkittyyn puhdistusputkeen. Kun magneettihelmet olivat olleet puoli tuntia huoneenlämmössä, ne vorteksoitiin hyvin ja jokaiseen puhdistettavaan näytteeseen pipetoitiin 34 µl magneettihelmiä. Nesteet sekoitettiin pipetoimalla 34 µl kymmenen kertaa edestakaisin. Inkuboitiin putkia tavallisessa telineessä 5 minuuttia, jonka jälkeen ne siirrettiin magneettierottelijaan ja inkuboitiin vielä 2 minuuttia lisää ennen erottuneen nesteen pipetoimista pois. Kaikkiin putkiin lisättiin 200 µl 70 % etanolia ja putkia pyöriteltiin telineessä pariin kertaan, jonka jälkeen neste poistettiin. Lisättiin uudestaan 200 µl 70 % etanolia ja toistettiin pyörittelyt ja nesteen poistaminen. Lopulta etanolia poistettiin vielä 10 µl pipetillä, jotta kaikki saataisiin varmasti pois. Kuivatettiin jäljelle jäänyttä magneettinappia putken ollessa avoinna magneettierottelijassa. Kun kukin nappi alkoi vuorollaan halkeilla, lisättiin kyseiseen putkeen 20 µl vettä, poistettiin putki magneettierottelijasta ja sekoitettiin pipetoimalla 10 kertaa edestakaisin. Asetettiin putket telineeseen odottamaan muiden magneettinappien kuivumista ja kaikkien putkien tultua valmiiksi siirrettiin ne takaisin magneettierottelijaan. Minuutin kuluttua pipetoitiin mahdollisimman tarkasti erottunut neste tunnistetarroitettuun Eppendorf-putkeen. Valmiiden amplikonikirjastojen tilavuudet vaihtelivat 15 µl ja 19 µl välillä ja ne vietiin -20 °C pakastimeen.

Ensimmäisen kahdeksan näytteen jälkeen puhdistettiin loput kahdeksan näytettä ja vesikontrolli samalla tavalla kuin ensimmäiset näytteet ja vietiin nekin -20 °C pakastimeen.

4.4 Toinen validointiajo

Toisen ajon valmistelu aloitettiin mittaamalla konsentraatiot ja puhtaus fenoli-kloroformieristetyistä näytteistä S14, S15, S16, S17 ja S18 ja Maxwell eristetystä näytteestä S11. Näytteiden S14-S18 konsentraatioita tai puhtautta ei aikaisemmin ollut mitattu ja näytteen S11 konsentraatio ja puhtaus haluttiin varmistaa aikaisemman tuloksen ollessa paljon muita näytteitä korkeampi. Mitattiin ensin näytteiden puhtaus NanoDrop 2000 -laitteella, jonka jälkeen mitattiin näytteiden konsentraatiot Qubitilla.

Ei-yhdenmukaisten tulosten takia valmistettiin kustakin näytteestä 1:10 laimennos ja toistettiin mittaukset kahdessa osassa, jolloin saatiin yhtenevät tulokset. Lopulliset tulokset on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 8 1/10 laimennoksesta mitatut konsentraatiot ja näiden keskiarvo, sekä näytteen konsentraatio

Näyte	c (mittaus 1) ng/ μ l	c (mittaus 2) ng/ μ l	ka ng/ μ l	c (näyte)
S18	10,9	13,4	12,2	122
S17	62,6	54,5	58,5	585
S16	9,38	9,4	9,39	93,9
S14	54,2	61,6	57,9	579
S15	39	39,4	39,2	392
S11	30,4	29,6	30	300

Taulukoiden 1 ja 6 konsentraatioiden perusteella valmistettiin 30 μ l 10 ng/ μ l laimennosta kaikista ajoon tulevista näytteistä lukuun ottamatta näytteitä S12 ja SG1. Näytteestä S12 tehtiin 60 μ l 10 ng/ μ l laimennosta, jotta sitä riittäisi ajon sisäiseen toistoon. Sophia Geneticsin SG1 näytettä oli 30 μ l 20 ng/ μ l, ja se laimennettiin kokonaisuudessaan konsentraatioon 4 ng/ μ l. Laimennokset tehtiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin pre-PCR-tilan vetokaapissa. Näytteet ja laimennokset säilytettiin suljettuina jäällä kun niitä ei käytetty ja näytteet vietiin takaisin -20 °C pakkaseen kun laimennokset oli saatu valmiiksi.

Aloitettiin Multiplex-PCR:n valmistelu hakemalla Plex-putket ja Taq-polymeraasi jäille sulamaan. Merkittiin 96-kuoppalevyille eri Plexien kaivot ja leikattiin valmiiksi foliokannesta paloja ja suikaleita, joilla voisi peittää yksittäistä Plexiä sisältävät kaivot ja pienentää siten ristikontaminaation riskiä. Merkittiin myös valmiiksi viisi 1,5 ml Eppendorf-putkea eri Plex mixejä varten. Lopulta Plex-putkia ja Taq-polymeraasia sulamista nopeutettiin pitämällä niitä kädessä. Sulaneet Plex-putket vorteksoitiin, jonka jälkeen ne ja sulanut Taq-polymeraasi sentrifugoitiin lyhyesti. Sulatuksen jälkeen putket

säilytettiin jäällä. Kaikkiin Plex mixeihin pipetoitiin 180 µl PCR Mix Plex n (n=1, 2, 3, 4 tai 5) ja 1,35 µl Taq DNA polymeraasia. Jokainen Plex mix pipetoitiin erikseen ristikontaminaation välttämiseksi. Kun kaikki Plex mixit oli pipetoitu valmiiksi ne vorteksoitiin ja sentrifugoitiin lyhyesti ja siirrettiin jäälle odottamaan käyttöä.

Aloitettiin pipetoimalla 10 µl Plex Mix 1 kaikkiin sille merkittyihin 17 kaivoon, jonka jälkeen lisättiin Plexin kaivoihin pipetointikaavion 2 mukaista näytettä tai vettä 5 µl. Pipetoinnin jälkeen suljettiin kaikki kyseistä Plexiä sisältävät kaivot foliosuikaleilla, ennen seuraavan Plexin jakamista omiin kaivoihinsa. Sulkemalla kaivot foliokansilla pyrittiin välttämään Plexien välistä ristikontaminaatiota. Plex Mixit pipetoitiin numerojärjestyksessä edellä mainitulla tavalla loppuun. Kun kaikkiin kaivoihin oli lisätty Plex Mix ja näyte, poistettiin foliosuikaleet ja suljettiin levy huolellisesti kumikannella. Levy vorteksoitiin kevyesti ja sentrifugoitiin lyhyesti ennen sen siirtämistä Veriti 96 Well Thermal Cyclor -laitteeseen. Ajettiin taulukon 2 mukainen Multiplex-PCR ohjelma.

Pipetointikaavio 2

Toisen ajon näytteiden ja Plexien sijainti 96-kuoppalevyllä

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	SG1(1)	SG1(2)	SG1(1)	SG1(2)	SG1(1)	SG1(2)	SG1(1)	SG1(2)	SG1 (1)	SG1(2)		H ₂ O	Plex 1
B	S12(1)	S12(2)	S12(1)	S12(2)	S12(1)	S12(2)	S12(1)	S12(2)	S12 (1)	S12(2)		H ₂ O	Plex 2
C	S3 F	S6	S3 F	S6	S3 F	S6	S3 F	S6	S3 F	S6		H ₂ O	Plex 3
D	S3 M	S10	S3 M	S10	S3 M	S10	S3 M	S10	S3 M	S10		H ₂ O	Plex 4
E	S5	S11	S5	S11	S5	S11	S5	S11	S5	S11		H ₂ O	Plex 5
F	S15	S1	S15	S1	S15	S1	S15	S1	S15	S1			
G	S17	S16	S17	S16	S17	S16	S17	S16	S17	S16			
H	S18	S14	S18	S14	S18	S14	S18	S14	S18	S14			
	Plex 1		Plex 2		Plex 3		Plex 4		Plex 5				

Multiplex-PCR:n aikana valmisteltiin laimennokset. Merkittiin kahdelle 96-kuoppalevyllä pipetointikaavio 2 mukaiset kaivot ja tunnistet 1/100 ja 1/1000. Pipetoitiin kaikkiin 1/100 levyn käytettäviin kaivoihin 99 µl vettä ja kaikkiin 1/1000 levyn kaivoihin 9 µl vettä. Molemmat levyt suljettiin foliokannella kunnes niitä tarvittaisiin. Kun Multiplex-PCR-ohjelma valmistui, otettiin 96-kuoppalevy laitteesta ja sentrifugoitiin lyhyesti höyryjen saamiseksi pois kannesta. Tämän jälkeen kansi avattiin ja aloitettiin laimennosten teko pipetoimalla monikanavapipetillä 1 µl jokaista näytettä 1/100 levyllä merkittyihin kaivoihin. Vesi ja PCR-tuotteet sekoitettiin pipetoimalla 10 µl kymmenen

kertaa edestakaisin. Seuraavaksi siirrettiin monikanavapipetillä 1 µl 1/100 laimennosta 1/1000 levyille ja sekoitettiin pipetoimalla 8 µl kymmenen kertaa edestakaisin. Kaikki levyt suljettiin huolellisesti kumikansilla ja siirrettiin yöksi -20 °C pakkaseen.

Valittiin Universal PCR:ssä käytettävät MID-primerit näytteille käyttäen Multiplicomin valintatyökalua IFU142 Selection MID 1-48/49-96 for Illumina MiSeq. Valitut MID:t on merkitty taulukkoon 7.

Taulukko 9 Toisen ajon näytteiden MID:t

Näyte	MID 7 index		MID 5 index	
SG1 (1)	p7-08	TTGGCCAC	p5-02	ACTTGAGT
S12 (1)	p7-07	ACTGCCAT	p5-02	ACTTGAGT
S3 F	p7-06	TGTCGAAA	p5-02	ACTTGAGT
S3 M	p7-05	CCGTAGTT	p5-02	ACTTGAGT
S5	p7-04	CACCGGGA	p5-01	GTCAATAC
S15	p7-03	ATCAAAGG	p5-01	GTCAATAC
S17	p7-02	TGATAGTG	p5-01	GTCAATAC
S18	p7-01	TAATGGAG	p5-01	GTCAATAC
SG1 (2)	p7-08	TTGGCCAC	p5-03	ATCATGAG
S12 (2)	p7-07	ACTGCCAT	p5-03	ATCATGAG
S6	p7-06	TGTCGAAA	p5-03	ATCATGAG
S10	p7-05	CCGTAGTT	p5-04	CGATATGA
S11	p7-04	CACCGGGA	p5-04	CGATATGA
S1	p7-03	ATCAAAGG	p5-05	TCTGGCAG
S16	p7-02	TGATAGTG	p5-05	TCTGGCAG
S14	p7-01	TAATGGAG	p5-04	CGATATGA
H2O	p7-07	ACTGCCAT	p5-06	TATCCATC

Haettiin 1/1000 Multiplex-PCR laimennokset, Universal PCR-mix, Amplification reagent (AR1), MID:t (indexit) ja Taq-polymeraasi jälle sulamaan. Putkien sulaessa piirrettiin pipetointikaavion 2 mukaiset alueet 96-kuoppalevyille ja kirjoitettiin siihen valmiiksi tunnistetiedot, sekä merkittiin valmiiksi 17 1,5 ml Eppendorf-putkea kaikkien näytteiden omia mastermixejä varten. Lopulta putkien sulamista nopeutettiin pitämällä niitä kädessä. Kun reagenssit olivat sulaneet vorteksoitiin kaikki putket Taq-polymeraasia lukuun ottamatta, jonka jälkeen kaikki reagenssit sentrifugoitiin lyhyesti ja asetettiin jälle kun niitä ei tarvittu. Myös 1/1000 Multiplex-PCR laimennokset vorteksoitiin ja sentrifugoitiin lyhyesti sulamisen jälkeen.

Kaikki näytteiden eri MID-yhdistelmät sisältävät mastermixit valmistettiin erikseen ristikontaminaation välttämiseksi. Valmiiksi merkittyihin putkiin pipetoitiin 60 µl Universal PCR Mix, 60 µl AR1, 0,75 µl Taq-polymeraasia ja 12 µl kumpaakin näytteelle valittua MID-primeriä. Pipetoinnin jälkeen putket asetettiin jälle odottamaan muiden mastermixien valmistumista, jonka jälkeen ne vorteksoitiin ja sentrifugoitiin lyhyesti ja asetettiin takaisin jälle. Jaettiin ensimmäistä mastermixia 24 µl kyseisen näytteen viiteen kaivoon, jonka jälkeen siirryttiin pipetoimaan seuraavaa mastermixia. Kun kaikki mastermixit oli jaettu näytteensä kaivoihin, lisättiin monikanavapipetillä 1 µl 1/1000 Multiplex-PCR laimennosta. Levy suljettiin kumikannella huolellisesti, vorteksoitiin ja sentrifugoitiin lyhyesti, jonka jälkeen se asetettiin Veriti 96 Well Thermal Cycler -laitteeseen ja ajettiin taulukon 4 mukainen Universal-PCR ohjelma.

Universal-PCR:n aikana merkittiin valmiiksi tunnistetarroilla 1,5 ml Eppendorf-putket jokaisen näytteen ja vesikontrollin puhdistetuille amplikonikirjastoille. Samalla nimikoitiin vastaavat putket puhdistusta varten ja haettiin AMPure XP beads -reagenssi huoneenlämpöön. PCR-ajon loputtua 96-kuoppalevy sentrifugoitiin höyryjen saamiseksi pois kannesta. Plexit yhdistettiin taulukon 5 mukaisessa suhteessa nimikoituihin putkiinsa, vorteksoitiin ja spinnattiin ne ja pipetoitiin jokaisesta putkesta 10 µl pois. Siirrettiin näytteet SG1 (2), S12 (2), S6, S10, S11, S1, S16, S14 ja vesikontrolli jälle odottamaan ja aloitettiin muiden näytteiden puhdistaminen.

Lisättiin puhdistettaviin näytteisiin 34 µl AMPure XP beadsia ja sekoitettiin pipetoimalla 10 kertaa edestakaisin. Inkuboitiin putkia viisi minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne siirrettiin magneettierottelijaan ja jatkettiin inkubointia vielä kahden minuutin ajan. Erottunut neste pipetoitiin pois ja lisättiin kaikkiin putkiin 200 µl 70 % etanolia. Putkia pyöriteltiin telineessä puolen minuutin ajan, jonka jälkeen etanoli pipetoitiin pois. Lisättiin uudestaan 200 µl 70 % etanolia, pyöriteltiin putkia ja poistettiin etanoli. Lopulta etanolia jouduttiin poistamaan vielä 10 µl pipetillä, jotta kaikki saatiin varmasti pois. Seuraavaksi kuivatettiin putken jäänyttä magneettinappia putken ollessa avoinna magneettierottelijassa. Kun kukin nappi alkoi vuorollaan halkeilla, lisättiin kyseiseen putkeen 20 µl vettä, poistettiin putki magneettierottelijasta ja sekoitettiin pipetoimalla 10 kertaa edestakaisin. Asetettiin putket suljettuina telineeseen odottamaan muiden magneettinappien kuivumista ja kaikkien putkien tultua valmiiksi siirrettiin ne takaisin magneettierottelijaan. Minuutin kuluttua pipetoitiin mahdollisimman tarkasti erottunut neste tunnistetarroitettuun Eppendorf-putkeen. Valmiiden amplikonikirjastojen tilavuudet vaihtelivat 16 µl ja 20 µl välillä ja ne vietiin -20 °C pakastimeen.

Ensimmäisen kahdeksan kirjaston valmistuttua puhdistettiin loput kirjastot ja vesikontrolli samalla tavalla kuin ensimmäisetkin ja vietiin ne -20 °C pakastimeen.

Haettiin pakastimesta puhdistetut amplikonkirjastot jälle sulamaan konsentraatioiden määrittystä varten. Sulanut levy vorteksoitiin ja sentrifugoitiin lyhyesti. Mitattiin ensin näytteiden SG1 (1), S12 (1), S3 F ja S3 M konsentraatiot Qubitilla.

Näytteiden SG1 (1) ja S3 F matalan tuloksen takia päätettiin mitata niiden konsentraatiot uudestaan samalla kun mitattiin konsentraatiot näytteistä S5, S15, S17 ja S18.

Näytteiden SG1 (1) ja S3 F konsentraatiot olivat yhä niin matalia, että tarkkoja tuloksia ei saatu, joten päätettiin käyttää ainutta tarkkaa arvoa tulevissa laskelmissa.

Lopuksi mitattiin vielä näytteiden SG1 (2), S12 (2), S6, S10, S11, S1, S16 ja S14 konsentraatiot Qubitilla. Taulukossa 8 on esitetty kaikkien kirjastojen mitatut konsentraatiot ja laskettu niiden keskiarvo.

Taulukko 10 Valmiiden amplikonkirjastojen mitatut konsentraatiot ja niiden keskiarvo

Näyte	c ng/μl mittaus 1	c ng/μl mittaus 2	c ng/μl ka
SG1 (1)	3,16		3,16
S12 (1)	5,10	8,66	6,88
S3 F	2,44		2,44
S3 M	5,82	9,64	7,73
S5	3,58	4,00	3,79
S15	20,2	19,7	20,0
S17	3,94	3,70	3,82
S18	19,1	17,5	18,3
SG1 (2)	11,6	9,47	10,7
S12 (2)	10,9	10,6	10,8
S6	11,8	11,5	11,7
S10	14,9	13,8	14,4
S11	13,9	13,5	13,7
S1	12,2	10,6	11,4
S16	22,0	23,2	22,6
S14	15,5	14,2	14,9

Näytteiden konsentraatioiden keskiarvot (ng/μl) sijoitettiin Excel-taulukkoon, joka laskee konsentraation yksikössä nM seuraavan yhtälön mukaan.

$$\text{näytteen konsentraatio [nM]} = \frac{\text{näytteen konsentraatio [ng/}\mu\text{l]} \times 10^6}{656,6 \times 480}$$

Yhtälössä luku 480 on amplikonien keskipituus emäspareina Universal PCR:n jälkeen.

Kaikista amplikonikirjastoista tehtiin 4 nM laimennos samalle platelle. Laimennoksien pipetointimäärien laskemiseen käytettiin Excel-taulukon kaavaa. Taulukkoon 9 on merkitty näytteiden mitattu ja laskettu konsentraatio, tehtävän laimennoksen tilavuus ja konsentraatio sekä yhdistettävät DNA- ja vesitilavuudet.

Taulukko 11 Kirjastojen konsentraatiot ja tehtävä laimennos

Näyte	mitattu konsentraatio (ng/μl)	laskettu konsentraatio (nM)	haluttu konsentraatio (nM)	tilavuus (μl)	yhdistetään	
					DNA (μl)	vesi (μl)
SG1(1)	3,16	10,0	4	15	6,02	9
S12 (1)	6,88	21,7	4	15	2,76	12,2
S3 F	2,44	7,70	4	15	7,79	7,2
S3 M	7,73	24,4	4	15	2,46	12,5
S5	3,79	11,8	4	15	5,07	9,9
S15	19,95	63,0	4	15	0,95	14
S17	3,82	12,1	4	15	4,98	10
S18	18,3	57,8	4	15	1,04	14
SG1(2)	10,69	33,7	4	15	1,78	13,2
S12 (2)	10,75	33,9	4	15	1,77	13,2
S6	11,65	36,8	4	15	1,63	13,4
S10	14,35	45,3	4	15	1,32	13,7
S11	13,7	43,2	4	15	1,39	13,6
S1	11,4	36,0	4	15	1,67	13,3
S16	22,6	71,3	4	15	0,84	14,2
S14	14,85	46,9	4	15	1,28	13,7

Laimennokset tehtiin 96-kuoppalevyllä pipetointikaavion 3 mukaisiin kaivoihin siten, että ensin kuhunkin kaivoon pipetoitiin taulukon 9 osoittama määrä vettä, jonka jälkeen pipetoitiin järjestyksessä näytteitä taulukon 9 osoittama määrä. Levy suljettiin kumikannella, vorteksoitiin ja sentrifugoitiin lyhyesti, jonka jälkeen se siirrettiin jälle odottamaan poolausta.

Pipetointikaavio 3 Laimennettujen kirjastojen sijainti 96-kuoppalevyllä

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			SG1(1)	SG1(2)								
B			S12(1)	S12(2)								
C			S3 F	S6								
D			S3 M	S10								
E			S5	S11								
F			S15	S1								
G			S17	S16								
H			S18	S14								

4.5 Primerien suunnittelu

Varmistettavaksi valittuja variantteja (taulukko 10) varten suunniteltiin primerit käyttäen Primer Blast -ohjelmaa.

Taulukko 12 Sanger varmistettavaksi valitut variantit

näyte	geeni	eksoni	genominen positio	mutaatio
S14	BRCA1	11b	g. 41245471	c. 2077 G>A
S9	BRCA1	11b	g.41245471	c. 2077 G>A
S10	BRCA2	11	g. 32912560	c. 4068 G>A
S17	BRCA1	16	g. 41222975	c. 4956 G>A
S4	BRCA2	i3	g. 32893207	c. 68-7 T>A
S3	BRCA2	14	g. 32929387	c. 7397 T>C
S10	BRCA1	23	g. 41199708	c. 5419 A>G
S12	BRCA2	i24		c. 9118-2 A>G

Näytteelle S12 oli tilattu primerit jo aikaisemmin. Kaikille muille paitsi näytteen S10 mutaatioille eksonissa 23 saatiin suunniteltua spesifiset primerit. Spesifisiä primereita oli kyseiseen kohtaan erittäin hankala löytää ja lopulta päädyttiin tilaamaan yhdet hieman epäspesifiset, joiden voitiin kuitenkin olettaa ideaalitulanteessa toimivan. Koska primerien spesifisyydestä ei ollut takeita, päätettiin tilata kahdet muut primerit samalla kertaa. Ensimmäisillä monistettaisiin Long Range PCR:n avulla halutun mutaation sisältävä alue, jonka jälkeen toisia käytettäisiin lyhyemmän alueen sekvensointiin.

Taulukko 13 primerien sekvenssit ja analysoitavat näytteet

Primerin nimi	Sekvenssi	Sekvensoitava näyte
BRCA1_11b_FOR	TCAGGCACAGCAGAAACCTA	S14, S9
BRCA1_11b_REV	TCTTGAAGGCTAGGATTGACA	

BRCA1_16_REV	CAGCTGCTGCTCATACTAC	S17
BRCA1_16_REV	TGTGATTGTTTTCTAGATTTCTTCC	
BRCA1_23_FOR	TGAGATGGAAGGATTGCTTGAGCCCA	S10
BRCA1_23_REV	TGTTTTTGTGATGAACATTCATATCTTACTCCC	
BRCA1_23_long_FOR	GCTTTCATCATTACCCTTGGCACAG	
BRCA1_23_long_REV	GGTGCCTCACACATCTGCCCAATTG	
BRCA1_23_seq_FOR	TGAGATCACACCACTGCACT	
BRCA1_23_seq_REV	AAACCCATGCAAAAGGACCC	
BRCA2_11_FOR	TGCTGCCAGTAGAAATTCTCA	S10
BRCA2_11_REV	TGCTCCGTTTTAGTAGCAGTT	
BRCA2_14_FOR	CATTTTCACAGAGTTGAACAGTGT	S3
BRCA2_14_REV	GGGAAAACCATCAGGACAT	
BRCA2_i3_FOR	TCGCAAGAGAATGGATTAATGATC	S4
BRCA2_i3_REV	GATTGGTACAGCGGCAGAG	

4.6 Primerien optimointi

Koska kaikki Primerit olivat itse suunnittelemlamme, piti suorittaa niiden optimointi. Testattiin kuutta primer-paria kuudessa eri lämpötilassa (56-58-60-62-64-66 °C) gradientti PCR:n avulla kontrolli DNA:lla. Ensimmäisellä kerralla käytettiin taulukon 11 mukaista Master Mixiä.

Taulukko 14 PCR-mix yhteen kaivoon ja tehtävän mixin määrä pipetointivaralla

	1	8
dH₂O	15,1	105,7
F-aluke (10 µM)	1	7
R-aluke (10 µM)	1	7
AmpliTaq 360 Buffer 10x	2,5	17,5
dNTP (2,5 mM each)	2,5	17,5
MgCl (25 mM)	1,8	12,6
AmpliTaq 360 –polymeraasi (5U/µl)	0,1	0,7
tot.vol. (µl)	24	168

Kaikkia Master Mixejä pipetoitiin 96-kuoppalevyille 24 µl pipetointikaavion mukaisiin kaivoihin ja lisättiin H₂O merkittyihin kaivoihin 1 µl vettä ja muihin 1 µl 50 ng/µl kontrolli DNA:ta. Ajettiin taulukon 14 mukainen PCR-ohjelma.

Pipetointikaavio 4 Gradientti PCR:n pipetointikaavio

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	11b		11b		11b		11b		11b		11b	
B	16		16		16		16		16		16	
C	11		11		11		11		11		11	
D	14		14		14		14		14		14	

E	i3		i3		i3		i3		i3		i3	
F	23		23		23		23		23		23	
G	11b (H ₂ O)	16 (H ₂ O)	11 (H ₂ O)	14 (H ₂ O)	i3 (H ₂ O)	23 (H ₂ O)						
H												
	56 °C		58 °C		60 °C		62 °C		64 °C		66 °C	

Taulukko 15 Gradientti-PCR

Vaihe	lämpötila	kesto	toistot
1. alkudenaturaatio	95 °C	10 min	1x
denaturaatio	95 °C	30 s	30x
2. annealing	* °C	30 s	
ekstensio	72 °C	30 s	
3. loppuekstensio	72 °C	7 min	1x
4. pito	10 °C	∞	1x

PCR tuotteet ajettiin 1,5 % agarosigeelille 50 bp ladderin kanssa. Geelit kuvattiin ja kuvista tulkittiin mikä lämpötiloista toimii millekin alukkeelle parhaiten. Vain BRCA2-geenin eksonin 11 alukkeet toimivat ensimmäisellä kierroksella hyvin. Muita testattiin erilaisissa olosuhteissa muutamia kertoja, kunnes lopulta löydettiin sopivat olosuhteet kullekin primer parille. Master Mixien suhteet ja primereille sopivat lämpötilat on esitetty taulukossa.

Taulukko 16 Primereiden spesifiset Master Mixit ja käytettävä lämpötila

	11b	16	23	11	14	i3	25
dH ₂ O	13,1 µl	14,1 µl	14,1 µl	15,1 µl	14,1 µl	14,1 µl	14,1 µl
DMSO	1 µl	1 µl	1 µl			1 µl	1 µl
F-aluke	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
R-aluke	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
360° Gold Buffer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl		2,5 µl	2,5 µl	
360° Buffer				2,5 µl			2,5 µl
dNTP	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
MgCl	2,8 µl	1,8 µl	1,8 µl	1,8 µl	2,8 µl	1,8 µl	1,8 µl
360° Gold polymeraasi	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl		0,1 µl	0,1 µl	
360° polymeraasi				0,1 µl			0,1 µl
Lämpötila	57 °C	56 °C	56 °C	57 °C	56 °C	56 °C	62 °C

4.7 Sanger sekvensointi

Sekvensointitutkimusta varten tutkittavat alueet monistettiin PCR:llä ylläolevan ohjeen mukaisesti ja laitettiin yöksi jääkaappiin. Seuraavana päivänä PCR-tuotteet puhdistettiin Exo-SAP menetelmällä. 96-kuoppalevylle pipetoitiin 5 µl PCR-tuotetta ja 2 µl Exo-Sap-lt reagenssia, jonka jälkeen levy suljettiin kumikannella tiiviisti ja vorteksoitiin, sekä sentrifugoitiin nopeasti. Laitettiin levy PCR-laitteeseen, jossa se oli ensin 15 minuuttia lämpötilassa 37 °C (aktivointi) ja tämän jälkeen 15 minuuttia lämpötilassa 80 °C (deaktivointi).

Sekvensointia varten jokaiseen käytettävään 96-kuoppalevyn kaivoon pipetoitiin 12 µl dH₂O, 4 µl 5x puskuria (Big Dye Sequencing Buffer, Applied Biosystems) ja 2 µl Ready Reaction Mixiä (Applied Biosystems). Lisäksi lisättiin kutakin primer laimennosta (konsentraatio 3,2 pmol) 1 µl omiin kaivoihinsa ja puhdistettuja PCR-tuotteita 1 µl omiinsa pipetointikaavion 5 mukaisesti. Suljettiin levy huolellisesti kumikannella ja ajettiin taulukon 16 mukainen Sekvensointi PCR-ohjelma.

Pipetointikaavio 5 Sekvensointireaktioiden paikat 96-kuoppalevyllä

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		S17 (16)		S17 (16)								
B		S10 (23)		S10 (23)								
C		S3 (14)		S3 (14)								
D		S4 (i3)		S4 (i3)								
E		S14 (11b)		S14 (11b)								
F		S9 (11b)		S9 (11b)								
G		S10 (11)		S10 (11)								
H		S12 (2)		S12 (2)								
		forward		reverse								

Taulukko 17 Sekvensointi PCR

Vaihe	lämpötila	aika	toistot
Alkudenaturaatio	96 °C	1 min	1
denaturaatio	96 °C	10 s	
alukkeiden kiinnittymisvaihe	50 °C	5 s	25
ekstensio	60 °C	4 min	
pito	4 °C	∞	1

Sekvensointireaktiot saostettiin suoraan kyseiselle kuoppalevyille lisäämällä ensin kaikkiin näytteen sisältäviin kaivoihin 2 µl 125 mM EDTA. Tämän jälkeen lisättiin annostelijalla vastaaviin kaivoihin 2 µl 3M natriumasetaattia ja 50 µl 95 % etanolia. Kuoppalevy suljettiin kalvolla ja vorteksoitiin kevyesti, jonka jälkeen reaktioiden annettiin saostua huoneenlämmössä noin puoli tuntia. Tämän jälkeen levyä sentrifugoitiin puoli tuntia nopeudella 2000 x g, Poistettiin kansi, ja spinnattiin paperin päällä ylösalaisin nopeuteen 1000 rpm asti. Lisättiin kaivoihin 75 µl 70 % etanolia, suljettiin levy kannella ja sentrifugoitiin 10 minuuttia nopeudella 2000 x g. Tämän jälkeen kansi avattiin, ja spinnattiin levyä ylösalaisin paperin päällä 1000 rpm asti. Vietiin levy ilman kantta kuivumaan yön yli +37 °C lämpökaappiin.

Seuraavana päivänä jatkettiin lisäämällä kaikkiin parillisten sarakkeiden kaivoihin vetokaapissa 15 µl Hi-Di formamidia. Suljettiin levy septalla, vorteksoitiin ja spinnattiin, jonka jälkeen levy oli valmis sekvensointiin.

5 Tulokset

Sophia Genetics lähetti DDM-ohjelmalla analysoidut tulokset kaikista näytteistä löydetyistä varianteista ja kopiolumuutoksista. Samalla oli tutkittu ajojen sisäisten ja ajojen välisten kontrollien eroja ja sitä kautta menetelmän luotettavuutta. Ajon sisäisiä replikaatteja oli kuusi ja ajojen välisiä seitsemän. BRCA1/2-geenien variantteja löytyi 18 näytteestä yhteensä 81.

Ajojen sisäisissä toistoissa löytyi ainoastaan yksi ei-yhdenmukainen variantti, joka johtui toisen S11 näytteen matalasta peittävydestä yhdellä sekvensoidulla alueella. Sekvensoinnin toistettavuus oli kaikkien muiden näytteiden kohdalla yli 99,991 %. Ajojen välisessä toistettavuudessa ilmeni sama ongelma näytteiden S11 ja S10 kohdalla: peittävyys oli osittain huono, joten täysin yhdenmukaisia tuloksia ei saatu. Muiden näytteiden kohdalla sekvensoinnin toistettavuus oli yli 99,996 %.

Kopioluvut kaikille näytteille olivat yli 1,2 miljoonaa. Ensimmäisen ajon sisällä kopiolumujen erot olivat pienempiä ja vaihtelivat välillä 1 299 990 ja 1 834 290. Toisen ajon sisällä hajontaa oli enemmän kun kopioluvut vaihtelivat välillä 1 266 445 ja 3 034 964. Kopioluvut olivat kokonaisuudessaan riittäviä, mutta aiemmin mainittujen näytteiden kohdalle jäi silti matalan peiton alueita.

Luettujen sekvenssien pituudet olivat kaikilla näytteillä molemmissa ajoissa noin 250. Luettujen sekvenssien laatu oli hyvä. Ilman soft clippingiä oli pystytty analysoimaan näytteestä riippuen 96,1–96,9 % kopioista. Ensimmäisessä ajossa keskimäärin 98,73 % ja toisessa ajossa keskimäärin 98,80 % kopioista oli On-Target eli ne pystyttiin sijoittamaan BRCA1/2-geenien alueelle. Loput kopioista oli joko Off-Target eli muualle genomiin sijoittuvia tai Unmapped eli genomiin sopimattomia.

Kaikki variantit, jotka päätettiin varmistaa Sanger-sekvensoinnilla, pystyttiin tällä varmistamaan. NGS:n ilmoittamat varianttifraktiot vaihtelivat välillä 30–99 % ja tämä vaihtelu näkyi osittain myös Sangerissa. Sanger-sekvensoinnin tuloksista ei pysty lukemaan tarkkaa varianttifraktiota, mutta NGS-tulosten kanssa samansuuntaisia kuvioita oli havaittavissa.

Testin sensitiivisyydeksi TYKS:ssä saatiin 100 %. Sensitiivisyys määriteltiin prosenttiosuutena, joka kuvaa löydettyjä tunnettuja variantteja. Sensitiivisyys laskettiin seuraavalla kaavalla:

$$\text{Sensitiivisyys} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

Menetelmän Spesifisyydeksi saatiin 99,99 %. Spesifisyys määriteltiin prosenttiosuutena kaikista negatiivisista kohdista, jotka tulkittiin oikein negatiivisina. Spesifisyys laskettiin seuraavalla kaavalla:

$$\text{Spesifisyys} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

Menetelmän tarkkuudeksi (engl. Accuracy) saatiin 99,99 %. Tarkkuus määriteltiin prosenttiosuutena oikein tulkituista tunnetuista kohdista (sekä negatiiviset, että positiiviset). Tarkkuus (accuracy) laskettiin seuraavalla kaavalla:

$$\text{Tarkkuus (accuracy)} = \frac{TP + AV + TBC + TN}{TP + AV + TBC + FP + TN + FN} \times 100$$

Menetelmän tarkkuudeksi (engl. Precision) saatiin 91,18 %. Tarkkuus määriteltiin todellisten positiivisten prosenttiosuutena kaikista positiivisista. Tarkkuus (precision) laskettiin seuraavalla kaavalla:

$$\text{Tarkkuus (precision)} = \frac{TP + AV + TBC}{TP + AV + TBC + FP} \times 100$$

Menetelmän toistettavuus laskettiin sekä ajon sisäisesti (engl. Repeatability) että ajojen välisesti (engl. Reproducibility). Ajojen sisäinen toistettavuus oli 97,17 % ja ajojen välinen toistettavuus oli 94,15 %. Toistettavuus määriteltiin ajon sisäisten tai ajojen välisten replikaattien yhtenevien emästen prosenttiosuutena kaikista luetuista emäksistä. Toistettavuus laskettiin seuraavilla kaavoilla:

$$\text{Varianttien Toistettavuus} = \frac{\sum_{i: i \in SP_A \wedge i \in SP_B \wedge SP_A[i] = SP_B[i]} 1}{\sum_{i: i \in SP_A \wedge i \in SP_B} 1}$$

$$\text{Sekvensoinnin Toistettavuus} = \frac{\sum_{i: i \in SP_A \wedge i \in SP_B} 1}{\sum_{i: i \in SP_A \wedge i \in SP_B} 1}$$

$$\text{Toistettavuus} = \text{Varianttien Toistettavuus} \times \text{Sekvensoinnin Toistettavuus} \times 100$$

6 Pohdinta

BRCA MASTR Dx -kitillä ja Illumina MiSeq -sekvensoinnilla saadut tulokset olivat korkealaatuisia ja voitiinkin todeta menetelmän soveltuvan kliiniseen diagnostiikkaan. Tämän geenitestin myötä otettiin Turussa ensimmäistä kertaa kliiniseen käyttöön koko BRCA1/2-geenien NGS-pohjainen sekvensointimenetelmä. Menetelmän käyttöönotto oli merkittävää, sillä aiemmin käytössä olleet BRCA1/2-geenitestit ovat tunnistaneet vain suomalaisessa väestössä tavallisimmin esiintyvät BRCA1/2-geenien mutaatiot, mutta PARP-inhibiittoreiden kehittämisen myötä, on yhä tärkeämpää havaita kaikki BRCA1/2-geenien toimintaa estävät mutaatiot.

Henkilökohtainen lääketiede kehittyi tällä hetkellä nopeasti ja uskotaankin, että tulevaisuudessa kaikkien lääkkeiden sopivuus voidaan tarkistaa ennen lääkkeen määräämistä henkilön geenivarianttien perusteella. Tämä parantaisi tulevaisuudessa potilasturvallisuutta ja myös lääkeshoidon kustannustehokkuutta, kun potilaalla toimimattomia lääkeshoitoja ei tarvitse kokeilla ja seurata kliinistä vastetta.

NGS eli massiivinen rinnakkaissekvensointi laskee suurten sekvensointien kustannuksia, joka taas tekee eksomin ja genomien sekvensoinnista entistä käyttökelpoisempaa. Tällä hetkellä ongelmana on kaiken sekvensoidun geenitiedon tulkinta, sillä vain pienen osan merkitys tunnetaan. On yhä suurelta osin selvittämättä, miten erilaiset mutaatiot esimerkiksi proteiinia koodaamattomassa genomissa osassa vaikuttavat henkilön fenotyyppiin.

Tämän työn tekemisessä oli kaksi erityisesti huomiota ja aikaa vienyttä osaa, joista toinen oli ensimmäisen tieteellisen tekstini kirjoittaminen ja toinen konsentraatioiden mittaaminen. Konsentraatiomittauksia toistettiin Qubitilla ja Nano Dropilla yleensä useita kertoja, yhdenmukaisten tulosten saamiseksi ja tämä vei toisinaan pitkiäkin aikoja. Molemmat laitteet ovat erittäin herkkiä konsentraation mittareita ja pienetkin erot DNA:n liukenemisen tasaisuudessa, pipetoinnissa tai näytteen lämpötilassa vaikuttavat saatuun tulokseen.

Laboratorio-osuudessa oli Multiplicomin (BRCA MASTR Dx -kitin valmistaja) mukaan suuri ristikontaminaation riski osassa pipetointivaiheita ja tämän huomioiminen vaati erityistä tarkkuutta. Ristikontaminaatiolta kuitenkin vältyttiin tarkkuuden ja järjestelmällisyyden avulla ja tulokset olivat laadukkaita. Tulosten laatu yllätti jopa itseni, sillä kyseessä oli ensimmäinen laboratoriprojektini yliopiston harjoitustyökurssien jälkeen.

Lähteet

Aittomäki, K., Kääriäinen, H., Mecklin, J. & Palva, T. 2013, "BRCA1- ja BRCA2-geenivirheet ja niihin liittyvä rinta- ja munasarjasyövän riski" in *Syöpätaudit*, eds. H. Joensuu, P. Roberts, P. Kellokumpu-Lehtinen, S. Jyrkkö, M. Kouri & T. Lyly, Kustannus Oy Duodecim, .

- Aittomäki, K., Kääriäinen, H., Mecklin, J. & Palva, T. 2013, "Rintasyöpä ja gynekologiset syövät" in *Syöpätaudit Duodecim*, .
- Bianchini, F., Kaaks, R. & Vainio, H. 2002, "Overweight, obesity, and cancer risk", *The Lancet Oncology*, vol. 3, no. 9, pp. 565-574.
- Brose, M., Smyrk, T., Weber, B. & et, a. 2003, "Genetic Basis of Cancer Syndromes" in **Holland-Frei Cancer Medicine**, ed. Hamilton, 6th edition. edn, BC Decker, .
- Carey, L. & Sharpless, N. 2011, "PARP and Cancer - If It's Broke, Don't Fix It", vol. 364, no. 3, pp. 277.
- Crafton, S.M., Bixel, K. & Hays, J.L. 2016, "PARP inhibition and gynecologic malignancies: A review of current literature and on-going trials", *Gynecologic oncology*, vol. 142, no. 3, pp. 588-596.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D. & Bray, F. 2016, , *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. [Homepage of Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013], [Online]. Available: <http://globocan.iarc.fr> [2016, 7/13].
- Forman, D., Bray, F., Brewster, D., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., Piñeros, M., Bray, F., Swaminathan, R. & Ferlay, J. 2014, *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X*, IARC Scientific Publication No. 164. edn, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Henderson, B.E., Ross, R.K., Judd, H.L., Krailo, M.D. & Pike, M.C. 1985, "Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk?", *Cancer*, vol. 56, no. 5, pp. 1206-1208.
- Jemal, A., Center, M.M., DeSantis, C. & Ward, E.M. 2010, "Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends", *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 19, no. 8, pp. 1893-1907.
- Kelsey, J.L., Gammon, M.D. & John, E.M. 1993, "Reproductive factors and breast cancer", *Epidemiologic reviews*, vol. 15, no. 1, pp. 36-47.
- KVÅLE, G., HEUCH, I. & EIDE, G.E. 1987, "A PROSPECTIVE STUDY OF REPRODUCTIVE FACTORS AND BREAST CANCER: I. PARITY", *American Journal of Epidemiology*, vol. 126, no. 5, pp. 831-841.
- Leminen, A. & Loukovaara, M. 2011, "Epiteliaalinen munasarjasyöpä" in *Naistentaudit ja synnytykset*, eds. O. Ylikorkala & J. Tapanainen, Duodecim, , pp. 240-240-253.
- Lord, C.J. & Ashworth, A. 2016, "BRCAness revisited", *Nature reviews.Cancer*, vol. 16, no. 2, pp. 110-120.
- MacMahon, B., Cole, P., Lin, T.M., Lowe, C.R., Mirra, A.P., Ravnihar, B., Salber, E.J., Valaoras, V.G. & Yuasa, S. 1970, "Age at first birth and breast cancer risk", *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 43, no. 2, pp. 209-221.
- Marchbanks, P.A., McDonald, J.A., Wilson, H.G., Folger, S.G., Mandel, M.G., Daling, J.R., Bernstein, L., Malone, K.E., Ursin, G., Strom, B.L., Norman, S.A., Wingo, P.A., Burkman, R.T., Berlin, J.A., Simon, M.S., Spirtas, R. & Weiss, L.K. 2002, "Oral Contraceptives and the Risk of Breast Cancer", *N Engl J Med*, vol. 346, no. 26, pp. 2025-2032.
- Million Women Study Collaborators 2003, "Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study", *The Lancet*, vol. 362, no. 9382, pp. 419-427.
- Muzzey, D., Evans, E.A. & Lieber, C. 2015, "Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling", *Current genetic medicine reports*, vol. 3, no. 4, pp. 158-165.

- Saarinen, N. & Mäkelä, S. 2014, "Lihavuuden vaikutus estrogeenisignaalointiin ja rintasyöpäriskiin", vol. 69, no. 21, pp. 1561-1562-1566.
- Sattar, H. 2013, "Female Genital System and Breast" in *Robbins Basic Pathology*, eds. V. Kumar, A. Abbas & J. Aster, pp. 681-681-714.
- Smith-Warner, S.A., Spiegelman, D., Yaun, S., van den Brandt, Piet A, Folsom, A.R., Goldbohm, R.A., Graham, S., Holmberg, L., Howe, G.R. & Marshall, J.R. 1998, "Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies", *Jama*, vol. 279, no. 7, pp. 535-540.
- Stuckey, A.R. & Onstad, M.A. 2015, "Hereditary breast cancer: an update on risk assessment and genetic testing in 2015", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 213, no. 2, pp. 161-165.
- Suvisaari, J. 2017, , *Periytyvä rinta- ja munasarjasyöpäalttius, BRCA1- ja BRCA2-geenien suomalaisten mutaatioiden tutkimus, verestä*. Available: <https://huslab.fi/ohjekirja/20532.html> [2017, 05/23].