

Opinnäytetyö AMK

Bioanalytikkokoulutus

NBIOAK14

2017

Anna-Aurora Vilkinen, 1400431

INCONTINENTIA PIGMENTI - MENETELMÄVERTAILU

– IP-MLPA-kitin soveltuvuus genetiikan
laboratorion käyttöön

Anna-Aurora Vilkinen

INCONTINENTIA PIGMENTI - MENETELMÄVERTAILU

- IP-MLPA-kitin soveltuvuus genetiikan laboratorion käyttöön

Incontinentia pigmenti on dominantisti periytyvä kromosomaalinen sairaus. Sairauden aiheuttaa toiminnaltaan vaillinainen X-kromosomissa sijaitseva IKBKG-geeni. Yleisin kromosomimuutos geenissä on 4-10 eksonien deleetio. IKBKG-geeni on tärkeässä osassa elimistön proteiini tuotannossa. Incontinentia pigmenti on jo kohdussa letaali poikalapsille. Tyttölapset selviävät toisen terveen X-kromosomin toiminnalla. Incontinentia pigmentin taudinkuvaan kuuluu nelivaiheinen lapsuuden iho-oireilu. Harvinaisempia oireita ovat hampaiden ja hiusten kasvupoikkeamat.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, onko MLPA-menetelmä pitkän templaatin PCR-menetelmää parempi Incontinentia pigmentin diagnostisena työkaluna. Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopistollisen keskussairaalan lääketieteellisen genetiikan laboratoriolle. Opinnäytetyön tarkoituksena on parantaa lääketieteellisen genetiikan laboratorion tekemää tutkimusta. Opinnäytetyön tekijä perustelee lähdekirjallisuuden ja menetelmävertailun avulla MLPA-menetelmän paremmuuden pitkän templaatin PCR- menetelmään nähden.

Tutkimus toteutettiin syksyllä 2016 lääketieteellisen genetiikan laboratorion tiloissa. Kuusitoista valmiiksi eristettyä DNA-näytettä valittiin tutkimukseen tulostensa perusteella laboratorion näytevalikoimasta. Näytteet ovat vuosilta 2003– 2015, ja niille kaikille on tehty pitkän templaatin PCR Incontinentia pigmenti -tutkimuksena. Näytteille tehtiin MLPA-tutkimus, jonka tuloksia verrattiin edellisiin pitkän templaatin PCR-tutkimuksen tuloksiin. Tämän jälkeen valittiin kaksi MLPA näytettä, joille tehtiin pitkän templaatin PCR-tutkimus.

Tulokset kertovat, että MLPA-menetelmä on valtamutaation (4–10 deleetio) suhteen tarkempi kuin pitkän templaatin PCR. MLPA-menetelmä kärsii kuitenkin IKBKG-geenin pseudogeenistä joka aiheuttaa pahimmillaan vääriä positiivisia tuloksia. Pitkän templaatin PCR pystyy erottamaan IKBKG-geenin ja sen pseudogeenin toisistaan alukkeidensa avulla. Kaikille MLPA-positiivisille näytteille tulee tehdä pitkän templaatin PCR varmistuskokeena. Näiden tulosten perusteella lääketieteellisen genetiikan laboratorio jatkaa Incontinentia pigmenti -tutkimusta pitkän templaatin PCR:ää käyttäen.

ASIASANAT:

geenivirhe, pitkän templaatin PCR, MLPA, IKBKG-geeni

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical laboratory science | Cell and molecular biology

2017 | 31 pages + 17 attachments

Anna-Aurora Vilkinen

METHOD COMPARISON OF INCONTINENTIA PIGMENTI

- suitability of MLPA method in the study of Incontinentia pigmenti for medical genetics laboratory

Incontinentia pigmenti is a dominantly inherited chromosomal disease. The source of the disease is the dysfunctionality of a gene called IKBKG located in the X chromosome. The IKBKG gene plays a vital role in protein production. The most common chromosomal change regarding Incontinentia pigmenti is exon deletion 4–10. Incontinentia pigmenti is lethal to male children. Female children can live with only one functional X-chromosome. The most common symptom of the disease is a four-phased adolescence skin-condition. Rarer symptoms include teeth and hair abnormalities.

This bachelor's thesis aims to discover if the MLPA method is a better diagnostic tool in the study of Incontinentia pigmenti than long template PCR. The thesis is made for Finland's Southwest Hospital District's Medical genetics laboratory. The purpose of this thesis is to improve the study conducted by medical genetics department. The author of this thesis will use source material and method comparison to prove that MLPA is better for Incontinentia pigmenti diagnostics than long template PCR.

The method comparison of the two methods was carried out in the laboratory of the medical genetics department in 2016. Sixteen pre-extracted DNA -samples were selected from the laboratory's sample archive. The samples were from years 2003 to 2015 and had already been analyzed once using long template PCR. First, MLPA was performed on all samples. The results were compared with previous long template PCR results and were found matching. After this two MLPA samples were selected and long PCR was performed on them.

The results show that MLPA is more sensitive than long PCR in detecting the main mutation of Incontinentia pigmenti; exon deletion 4-10. However, MLPA suffers majorly from the IKBKG-pseudogene and cannot tell the difference between a normal IKBKG-gene deletion and the pseudogene. This often results in false positive results. Long template PCR can distinguish between IKBKG gene and its pseudogene. All MLPA positive samples must be confirmed with long PCR or another similar method. Based on these results the medical genetics department will continue using long PCR as the main study method for Incontinentia pigmenti and the IKBKG - gene.

KEYWORDS:

gene error, long template PCR, MLPA, IKBKG gene

SISÄLTÖ

SANASTO	6
1 JOHDANTO	8
2 INCONTINENTIA PIGMENTI	9
2.1 Geneettinen tausta	9
2.1.1 Somaattinen mosaikismi IP-tapauksissa	10
2.1.2 IKBKG-pseudogeeni	11
2.2 Taudinkuva	11
3 POLYMERAASIKETJUREAKTIO	13
3.1 MLPA	14
3.2 Pitkän templaatin PCR	16
4 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT	17
5 TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	18
5.1 Tutkimusaineisto	18
5.2 Laitteet ja tilat	18
5.3 MLPA	19
5.4 Pitkän templaatin PCR	21
6 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	22
6.1 MLPA	22
6.2 Pitkän templaatin PCR	26
6.3 Lopputulos	27
7 POHDINTA	28
7.1 Tutkimuksen luotettavuus	28
7.2 Tutkimuksen eettisyys	29
7.3 Jatkotutkimusaiheet	29
LÄHTEET	30

TAULUKOT

Taulukko 1. MLPA-tulokset ja edellisen tutkimuksen pitkän templaatin PCR:n tulokset.

KUVAT

Kuva 1 X-kromosomin rakenne ja IKBKG-geenin sijainti. (Lähde: Genome Decoration Page/NCBI)	10
Kuva 2. IKBKG ja IKBKGP1 suhteessa toisiinsa X-kromosomissa.	11
Kuva 3 PCR:n kulku ja komponentit.	13
Kuva 4 MLPA:n kulku. (MRC Hollandin kuvaa mukailten. http://www.mlpa.com)	15
Kuva 5 Pitkän templaatin PCR:n kulku.	16
Kuva 6 MLPA PCR-ohjelma. (Lähde: Lääketieteellisen genetiikan laboratorion MLPA-työohje.)	20
Kuva 7 Pitkän templaatin PCR-ohjelma. (Lähde: Lääketieteellisen genetiikan laboratorion IP-työohje.)	21
Kuva 8. DN13-482, normaali näyte. Tuloksista voidaan päätellä, ettei näytteestä löytynyt IKBKG-geenin 4-10 deleetiota.	24
Kuva 9. DN07-913, positiivinen näyte. Tulosten perusteella nähdään, että näytteestä löytyy IKBKG-geenin 4-10 deleetio.	24
Kuva 10. DN03-584, poika. MLPA ei tunnista deleetiota IKBKG-geenin suhteen.	25
Kuva 11. Pitkän templaatin PCR geelillä. Näytteet DN07-913 ja DN03-584.	26

LIITTEET

Liite 1. MLPA-näytetaulukko ja pipetointijärjestys sekvensointiin
Liite 2 (1-16). MLPA-tulokset

SANASTO

amplifikaatio	tutkittavan DNA-aineksen määrän lisääminen
annealing	alukkeiden kiinnittyminen, PCR-menetelmän toinen vaihe
deleetio	kromosomin osan puuttuminen
denaturaatio	nukleiinihapon rakenteen tuhoaminen, jonka seurauksena nukleiinihappo menettää toimivuutensa; PCR-menetelmän ensimmäinen vaihe: DNA-juosteiden erottaminen.
DNA	deoksiribonukleiinihappo: sisältää solujen geneettisen materiaalin eli tiedon perimästä
duplikaatio	kromosomin osan monistuma
hybridisaatio	kahden yksijuosteisen nukleiinihapon (DNA tai RNA) sitoutuminen toisiinsa
eksoni	proteiinia koodaava DNA-jakso (vrt. introni)
eksonukleaasi	nukleiinihappojuosteen päistä hajottava entsyymi
ekstensio	uuden DNA-juosteen rakentaminen; PCR-menetelmän kolmas vaihe
geenivirhe	kromosomin osan puuttuminen tai kromosomiluvun muutos joka aiheuttaa sairauden
genomi	eliön koko perimä-aines kromosomeissa
heterotsygootti	kaksi eri geenimuotoa samassa geenissä
homotsygootti	yksi geenimuoto yhdessä geenissä
in house	organisaation oma käytäntö tai menetelmä
introni	DNA-jakso joka ei koodaa proteiinia (vrt. eksoni)
IKBKG	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma (IKK), geeni Incontinentia pigmentin taustalla
Incontinentia pigmenti	Incontinentia (hallitsematon) pigmenti (värinmuunnos), kromosomaalinen sairaus joka manifestoituu iho-oireluna (IP)
koetin	jakso yksijuosteista DNA:ta jolla on sama emäsjärjestys kuin etsityllä DNA-jaksolla
kromosomi	yhtäjaksoinen DNA-rihma histoniproteiinien ympärillä: ihmisen kromosomistossa 46 kromosomia
ligaatio	DNA-juosteiden yhteen sitominen päistään

mosaikismi	kahden erigenotyypin solupopulaation esiintyminen yhdestä munasolusta kehittyneessä yksilössä
MLPA	multiplex ligation-dependant probe amplification, MRC Hollandin PCR-pohjainen analyysimenetelmä. Pohjautuu reaktion ligaatiovaiheeseen.
nukleotidi	nukleiinihappojen (DNA ja RNA) rakenneyksikkö. Rakentuvat emäksestä, sokeri-osasta ja fosfaatista
PCR	polymeraasiketjureaktio, molekyylogeneettinen kolmivaiheinen DNA:n monistusmenetelmä.
posttsygootti	munasolun hedelmöitymisen jälkeinen tapahtuma: ei synnynäinen
pseudogeeni	geenin peilikappale, toiminnaltaan vaillinainen
sekvensointi	nukleiinihapon nukleotidijärjestyksen selvittäminen
somaattinen	ruumiillinen, kehoon kuuluva, fyysinen
translokaatio	kromosomien osan tai osien paikan vaihtuminen

1 JOHDANTO

Incontinentia pigmenti on geneettinen sairaus, jonka taustalla on virhe X-kromosomin puutteellisessa IKBKG-geenissä. IKBKG-geeni tuottaa proteiinia jota solut tarvitsevat toimiakseen oikein. Incontinentia pigmenti näyttäytyy erilaisina iho-ongelmina varhaislapsuudessa. Yleisin oire on nelivaiheinen rakkulaisuudesta viivatyypiseksi ihottumaksi muuttuva iho-oireilu, joka arpeutuu aikuisikään mennessä. Sairaus sai alkujaan nimensä oletuksesta, etteivät ihottuma-alueet voineet muodostaa luonnollista pigmenttiä. Nykyään tiedetään, että värinmuunnos johtuu geenivirheestä. Incontinentia pigmentia sairastavat ovat lähes aina naispuoleisia, sillä tauti on miespuoleisille yksilöille letaali jo sikiövaiheessa. Tautia sairastava miespuoleinen sikiö kuolee yleensä jo kohdussa. (Incontinentia Pigmenti International Foundation, 2016.) Muita Incontinentia pigmentin oireita ovat silmä-ongelmat, sekä hampaiden ja hiusten kasvupoikkeamat (Heikkilä, 2010).

Incontinentia pigmentin dermatologiset löydökset varmistetaan DNA-tutkimuksella. Yleisin Incontinentia pigmentin käytössä oleva tutkimusmenetelmä on pitkän templaatin PCR. Pitkän templaatin PCR hyödyntää kahta DNA-polymeraasia perinteisen yhden sijaan pidemmän DNA-jakson monistamisessa. (Haiying ym. 2014.) Toinen mahdollinen menetelmä on MRC Hollandin kehittämä MLPA (multiplex ligation-dependant probe amplification). MRC Hollandin Incontinentia pigmentin tutkimukseen tarkoitettu salsa-MLPA-kitin IKBKG-koetinseos tuli markkinoille helmikuussa 2016. (MRC Holland, 2016.)

Tämän opinnäytetyön tarkoitus on vertailla keskenään Turun yliopistollisen keskussairaalan lääketieteellisen genetiikan laboratorion käyttämää Rochen Long Extend PCR-kittiä ja sen kanssa käytettävää in house -alukeparia 3FH ja JF3R, sekä käyttöönotettavaa MRC Hollandin salsa-MLPA-kittiä ja sen IKBKG-koetinseosta. Jälkimmäinen myös validoidaan laboratorion käyttöön, jos se todetaan kelvolliseksi korvaamaan vanha menetelmä. Opinnäytetyö tehdään juuri nyt, sillä MLPA IKBKG-seos tuli markkinoille helmikuussa 2016 ja sitä halutaan kokeilla heti. Tutkimusaineistona käytetään genetiikan laboratorion näytemateriaalista 16 valmiiksi DNA-eristettyä potilasnäytettä. Tarkoituksena on todentaa menetelmävertailun avulla uuden menetelmän kelvollisuus vanhan korvaamisessa. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on parantaa genetiikan laboratorion tekemää tutkimusta.

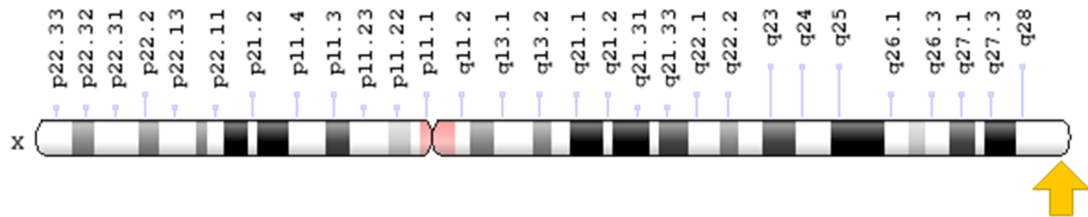
2 INCONTINENTIA PIGMENTI

Incontinentia pigmenti on harvinainen kromosomaalinen sairaus, joka tunnetaan myös nimillä Siemens-Bloch-tyypin pigmentidermatoosi ja Bloch-Shultzbergerin oireyhtymä (Harvinaiset-verkosto, 2016). Se periytyy dominantisti, joten vain toisen vanhemman kantajuus riittää aiheuttamaan sairauden. Sairauden yleisin ilmenemismuoto on nelivaiheinen lapsuusajan iho-oireilu. Incontinentia pigmentiin sairastuvat ovat naispuoleisia, koska miespuoleinen sikiö kuolee yleensä jo kohdussa. Poikkeuksia on havaittu somaattisen mosaikismin muodossa. Incontinentia pigmentia esiintyy kaikkialla maailmassa. Italialaisen tutkimusryhmän vuosina 2000-2013 suorittaman 386 IP-tapausta kattavan esiintyvyytutkimuksen mukaan noin 90,4 prosenttia tutkituista oli naisia ja yleisin geneettinen poikkeus IKBKG-geenin eksonien 4-10 deleetio. Tutkimuksessa todettiin myös, että IP:n esiintyminen on hyvin harvinaista ja tapaukset satunnaisia. (Fusco ym. 2014.)

2.1 Geneettinen tausta

X-kromosomi on Y-kromosomin ohella toinen ihmisen genomien sukupuolta määrittävistä kromosomeista. Poikkeustilanteita lukuun ottamatta ihmisellä on aina kaksi sukupuolta määrittävää kromosomia: naisilla kaksi X-kromosomia ja miehillä yksi X-kromosomi ja yksi Y-kromosomi. (U.S. National Library of Medicine, 2016). Incontinentia pigmentissa toinen X-kromosomi on toiminnaltaan vaillinainen. Naispuoleinen sikiö perii kummaltakin vanhemmalta yhden X-kromosomin: toisessa kromosomissa on virheellinen geeni ja toinen on normaali toimiva kromosomi. Miespuoleinen sikiö perii yhden X-kromosomin ja yhden Y-kromosomin. IKBKG-geeni sijaitsee X-kromosomissa. Geenivirhe Incontinentia pigmentin taustalla on häiriö IKBKG-geenin toiminnassa. (Incontinentia Pigmenti International Foundation, 2016). Geenivirheellä tarkoitetaan kromosomin osan puuttumista tai kromosomiluvun muutosta joka aiheuttaa sairauden (Tieteen termipankki, 2016). Miespuoleinen sikiö tarvitsee toimivan IKBKG-geenin, ja siksi kohdunsisäinen kuolema on hyvin yleinen geenivirheen omaavilla sikiöillä. Muutama poikkeus mahdollistaa miespuoleisen sikiön eloonjäämisen ja niistä kerrotaan myöhemmin tässä opinnäytetyössä. Naispuoleinen sikiö tulee toimeen normaalin X-kromosomin toimivalla IKBKG-geenin proteiinituotannolla. (Incontinentia Pigmenti International Foundation, 2016.)

IKBKG-geeni sijaitsee X-kromosomin pitkässä käsivarressa kohdassa 28 (Kuva 1). Tämän kohdan nimi on Xq28. IKBKG-geeni sisältää ohjeet IKK-kompleksin yhden kappaleen valmistukseen. IKBKG-geeni aktivoi muut kompleksin geenit ja yhdessä ne vastaavat elimistön tautivasteen muodostamisesta. (U.S. National Library of Medicine, 2016.)



Kuva 1 X-kromosomin rakenne ja IKBKG-geenin sijainti. (Lähde: Genome Decoration Page/NCBI)

Brasilialainen tutkimusryhmän mukaan X-kromosomin eksonien 4-10 deleetio on yleisin Incontinentia pigmentin kromosomipoikkeavuus. Tutkimusryhmä painotti myös IP-tapausten jälkiseurantaa, sillä geenivirhe altistaa useille muille sairauksille. Näitä ovat ryhmän mukaan Willmsin tuumori eli nefroblastooma ja Stillsin syndrooma. (Poziomczyk, ym, 2016). Muita Incontinentia pigmenttiä aiheuttavia geenivirheitä ovat IKBKG-pistemutaatio ja IP-lokuksen uudelleenjärjestäytyminen (Fusco, ym. 2014). Pistemutaatiossa yksi emäs vaihtuu toiseksi geenin sisällä, eikä aina aiheuta oireita kantajassaan (Solunetti, 2017).

2.1.1 Somaattinen mosaikismi IP-tapauksissa

Somaattinen mosaikismi tarkoittaa kahden geneettisesti poikkeavan solupopulaation esiintymistä yhdessä elävässä olennossa. Tilanteen on aiheuttanut posttsygoottinen mutaatio. Posttsygoottinen mutaatio ei ole peritty vaan se muodostuu tietyssä kasvuvaiheessa. Se voi olla koolta yhden nukleotidin tai jopa yhden kromosomin laajuinen. Mutaation voimakkuus riippuu juuri kasvuvaiheesta ja se vaikuttaa vain osaan elimistöstä. Mitä aiemmassa kehitysvaiheessa mutaatio syntyy, sitä laajempaan kehon alueeseen se vaikuttaa. Mosaikismi löydetään yleensä vain silloin, jos se manifestoituu ulkoisesti. (Freed ym. 2014.)

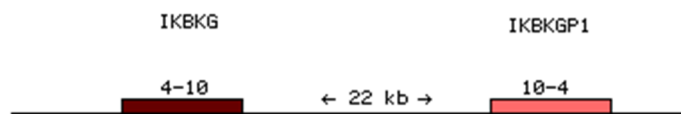
Posttsygoottisen mutaation esiintyminen mahdollistaa poikalapsen hengissä selviytymisen IKBKG-geenin vaikutuksesta huolimatta (Hull ym. 2015). Somaattisen mosaikismin

lisäksi karyotyyppi 47, XXY voi varmistaa eloonjäämisen. Karyotyyppi XXY tarkoittaa tilaa jossa sikiö perii vanhemmiltaan kolme sukupuolikromosomia. (Scheuerle ja Ursini, 2015.)

2.1.2 IKBKG-pseudogeeni

Pseudogeeni on tietyn geenin peilikappale, joka löytyy yleensä samasta kromosomista kuin geeni itse. Pseudogeeni on rakenteeltaan hyvin samanlainen alkuperäisen geenin kanssa. Se ei kuitenkaan toimi samalla tavalla tai on vaillinainen toiminnaltaan. Tämä vaikeuttaa tutkimusta ja voi pahimmillaan antaa väärän positiivisen tuloksen. (Gerstein Laboratory, 2016.)

IKBKG:n pseudogeeni IKBKGP1 on läsnä X-kromosomissa. IKBKG ja IKBKGP1 ovat X-kromosomissa 22 kb:n päässä toisistaan, ja asettuneet toistensa peilikuviksi (Kuva 2). Pseudogeeni vaikeuttaa erityisesti kopiolumäärityksiä, sillä kaikki tutkimusmenetelmät eivät erota sitä IKBKG-geenistä. (Scheuerle ja Ursini, 2015.)



Kuva 2. IKBKG ja IKBKGP1 suhteessa toisiinsa X-kromosomissa.

2.2 Taudinkuva

Yleisin Incontinentia pigmentin oire on nelivaiheinen ihottuman kaltainen iho-oireilu joka alkaa, kun lapsi syntyy. Harvinaisempia oireita ovat silmä- ja näkö-ongelmat, kynsien, hampaiden ja luuston poikkeamat, ja päänahan alueen epämuodostumat. Myös neurologisia ongelmia esiintyy. (U.S. National Library of Medicine, 2016). IP-diagnoosi perustuu yleensä dermatologisiin löydöksiin. Ihosta voidaan ottaa koepala, josta osoitetaan molekyyligeneettisellä tutkimuksella IKBKG-geenin läsnäolo. Myös vanhemmat voidaan testata, jos epäillä taudin periytyvän perheessä. (Scheuerle ja Ursini, 2015.)

Vaikka nelivaiheinen iho-oireilu on IP:lle ominaista, ei ihottuma aina kulje tasaisesti neljän vaiheen läpi. Vaiheita voi jäädä välistä, ne voivat tapahtua eri järjestyksessä, tai ne tapahtuvat päällekkäin. Ihottuma sijoittuu pääosin raajojen ja päänahan alueelle. Lapsilla

tämä ihottuma näkyy harmaina tai ruskeina juovina, aikuisilla taas viiva-arpeumana. Iho-oireilu alkaa vastasyntyneellä ihon punoituksena ja rakkuloina. Ihomuutos voi olla läsnä lapsen syntyessä tai muodostua pian syntymän jälkeen. Tämä ensimmäinen ihomuutos on läsnä 90 prosentilla potilaista. Muutaman kuukauden sisällä ihottuma-alue alkaa muuttua syylämäiseksi ja märkiväksi. Kun ihottuma-alue umpeutuu ja paranee, se jättää jälkeensä tummapigmenttisiä viiva-alueita. Noin puolitoistavuotiaana ihottuma muuttuu tummemmaksi ja märkiminen loppuu. Hiljalleen iho arpeutuu ja jäljelle jää viiva-arpeuma joka näkyy usein aikuisellakin. Iho-oireita voidaan hoitaa aivan kuten normaaleissa oloissa ilmeneviä ihottumia. (Heikkilä, 2010.)

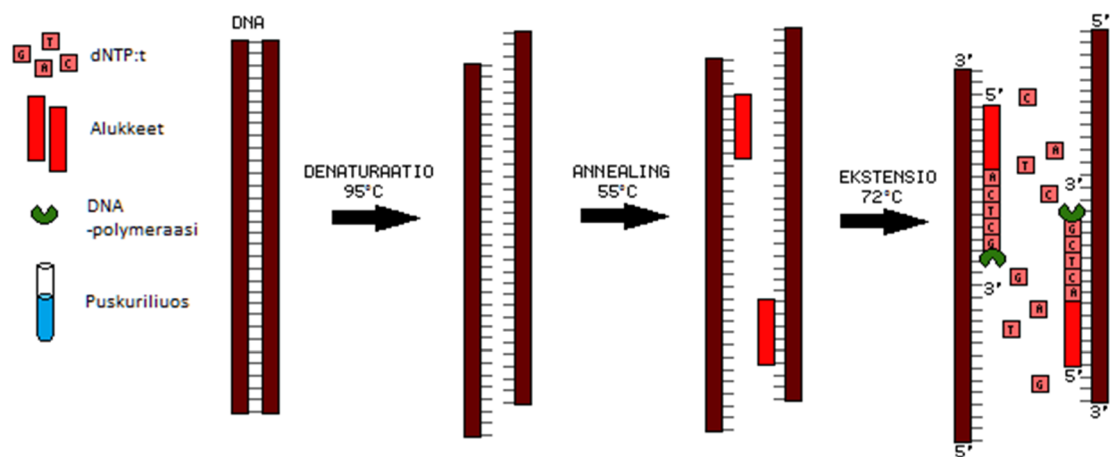
Incontinentia pigmentin harvinaisemmat oireet ovat moninaisia. Silmä- ja näköongelmat ovat yhteydessä Incontinentia pigmenttiin. Erityisesti silmän rakennepoikkeavuuksia esiintyy paljon. Brasiliaalitutkimusryhmän esimerkkitapauksessa tutkittiin kahta Incontinentia pigmenti -tapausta, joissa molemmissa esiintyi silmä- ja näkö-ongelmia. Molemmissa tapauksissa IP-diagnoosi oli saatu ihokoepalasta, ja potilaiden näkökyvyn muutoksia seurattiin useita vuosia. Löydöksenä silmätutkimuksissa olivat silmän verkkokalvonpoikkeamat. Toisella potilaista silmän verkkokalvo oli irronnut kokonaan. Tutkimustuloksena ehdotetaan, että näkö-ongelmat IP-tapauksissa ovat paljon oletettua yleisempiä ja että niiden seuranta on hyvin tärkeää. (Neto, ym. 2014.)

Luuston erilainen muodostuminen liittyy myös Incontinentia pigmenttiin. Eniten tämä näkyy hampaissa, mutta myös raajojen eripituisuutta on havaittu. Myös kynsien kuoppaisuutta esiintyy Incontinentia pigmentin vaikutuksesta. (Genetic and Rare Diseases Information center, 2017). Iranilaisessa esimerkkitapauksessa kymmenvuotiaan tytön IP-tapauksesta tytön hampaat olivat muotoutuneet kartiomaisiksi ja hampaiden juuret olivat poikkeuksellisen muotoiset. Tytöllä oli todettu pian syntymän jälkeen Incontinentia pigmenti iho-oireilun perusteella. Tutkimuksissa todettiin, että häneltä lisäksi puuttui hampaita, mikä teki hammasväleistä poikkeuksellisen suuret. (Rafatjoo ja Taghdisi Kashani, 2016). Hiuspohjan ongelmia ovat ihottuman lisäksi hiuksettomat kohdat pääläella ja hiuksien elottomuus ja karheus (Heikkilä, 2010).

Epilepsia ja migreeni ovat osana Incontinentia pigmentin neurologisia oireita. Muut neurologiset ongelmat liittyvät yleensä kehityksen hitauteen ja kehitysvammaisuuteen. (Incontinentia Pigmenti International Foundation, 2016). Neurologiset oireet ovat yleisempiä miespuoleisilla potilailla. Alankomaalainen genetiikan tutkimusryhmä yhdistää IP:n neurologisten oireiden katsauksessaan oireet keskushermoston piilevään vaskuliittiin. (Meuwissen ja Mancini, 2012).

3 POLYMEERAASIKETJUREAKTIO

Koska PCR eli polymeerasiketjureaktio on molempien vertailtavien menetelmien pohjana, käydään sen peruspiirteet tässä läpi. PCR on todella monipuolinen molekyylligeeneettisen tutkimuksen työkalu. PCR:stä on kehitetty paljon menetelmävariaatioita, joita käytetään nykyään enemmän kuin perusmenetelmää. PCR:n joustavuus onkin yksi sen parhaista puolista. PCR:n tarkoitus on monistamaan DNA:ta tulevien tutkimusten käyttöön. Sen avulla voidaan monistaa liki loputtomiin DNA:ta DNA-templaatin, DNA-polymeeraasin, dNTP:den, alukkeiden ja lämpötilan vaihteluiden avulla. (Solunetti, 2016.)



Kuva 3 PCR:n kulku ja komponentit.

PCR:n komponentit toimivat yhdessä tuottaen optimaalisen määrän DNA:ta tutkimustarkoituksiin (Kuva 3). DNA-templaatti eli lähtö-DNA on aines, josta DNA:ta halutaan monistaa lisää. Laboratorio-olosuhteissa se on usein potilasnäyte, jonka rakennetta halutaan selvittää. Alukkeet ovat pieniä emäsjaksoja jotka määrittävän monistettavan DNA-kohdan. Alukkeista toinen määrää aloituspaikan ja toinen lopetuskohdan. DNA-polymeeraasi havaitsee aloitusalukkeen ja alkaa rakentaa uutta DNA-juostetta dNTP:stä eli nukleotideista adeniini (A), tymiini (T), sytosiini (C) ja guaniini (G). Nukleotidit pariutuvat säännöllä A-T ja C-G. A-T-parin väliin muodostuu kaksinkertainen vetysidos, C-G-parin väliin kolminkertainen vetysidos. Muita PCR-komponentteja käytetään parantamaan lopputuotteen laatua. Yleisin lisäkomponentti on magnesium, joka pitää huolta DNA-polymeeraasin toimivuudesta ja varmistaa ettei vääriä positiivisia tuloksia synny ainakaan polymeeraasin vääränlaisen vaikutuksen suhteen. Erilaisia pesuliuoksia voidaan käyttää,

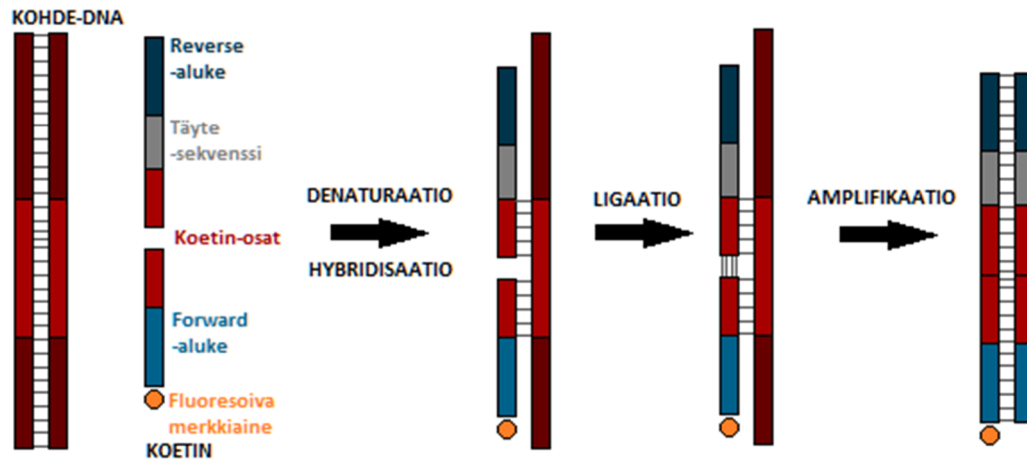
jotta DNA-polymeraasi ei kiinnity itseensä tai näyteastian seinämiin. (US. National Library of Medicine, 2016.)

Jotta PCR-ajo voidaan suorittaa, komponentit sekoitetaan ja pipetoidaan kuoppalevylle tai näyteputkeen. Polymeraasiketjureaktiota varten tarvitaan laite, jonka lämpötilaa voidaan säädellä ja johon kuoppalevy voidaan laittaa. PCR:n kolme vaihetta ovat denaturaatio, alukkeiden kiinnittyminen (annealing) ja ekstensio-vaihe (kuva 3). Denaturaatio-vaiheessa DNA:n kaksijuosteinen rakenne aukeaa kahdeksi juosteeksi. Tähän vaiheeseen tarvitaan korkea lämpötila, noin 95 astetta. Toisessa vaiheessa alukkeet kiinnittyvät tutkittavaan DNA-alueeseen vetysidoksin. Kiinnittymisen onnistumiseksi lämpötilaa lasketaan 50-65 asteeseen. Kolmannessa eli ekstensio-vaiheessa lämpötilaa nostetaan noin 72-asteeseen, ja polymeerasientsyymi luo uuden DNA-juosteen alukkeiden väliinseen kohtaan. Uusi juoste rakentuu 5'-3'-suuntaan. Näitä kolmea vaihetta toistetaan useita kertoja optimaalisen DNA-monistuman aikaansaamiseksi. Kun DNA:ta on tarpeeksi, valmis tuote viedään post-PCR-tilaan. Jatko tästä eteenpäin voi olla esimerkiksi tuotteen värjäys ja geelijaço, kuten pitkän templaatin PCR:ssä tapahtuu. (Your Genome, 2016.)

3.1 MLPA

MLPA (multiplex ligation-dependant probe amplification) on MRC Hollandin kehittämä PCR-pohjainen työkalu. MLPA poikkeaa muista markkinoilla olevista menetelmistä sillä, että se monistaa PCR-reaktiossa koetinpareja eikä lähtö-DNA:ta. Tämä ominaisuus tekee siitä tarkemman ja minimoi PCR:n virheitä. MLPA hyödyntää myös vain yhtä alukeparia. MRC Holland tekee kullekin tutkimukselle erilliset koetinseokset: Incontinentia pigmenti-koetinseos on nimeltään P073-A1 IKBKG-probe mix. MLPA on todella hyvä menetelmä suurien kopiolumäärien määrittämiseen. Sen avulla voidaan analysoida yli 50 koetinparia samassa reaktiossa. (MRC Holland, 2016.)

MLPA:ta varten tarvitaan lähtö-DNA ja koetinseos. Koettiin on kiinnitetty fluoresoiva merkkiaine tulosten myöhempää lukemista varten. Koetinseos pipetoidaan lähtö-DNA:n päälle ja denaturaatio-vaiheen jälkeen koettimet hybridisoituvat tutkittavaan DNA:han (Kuva 4). Vasta ligaatio-vaiheessa koettimet kiinnittyvät toisiinsa, mikä vähentää epäspesifistä monistumista. Tämän jälkeen suoritettavassa PCR-ohjelmassa kopioituvat näin kokonaiset koettimet. Analyysi tehdään perustuen kopioituneisiin koettimiin, ja sekvensaattori lukee tulokset fluoresoivan merkkiaineen avulla. (MRC Holland, 2016.)



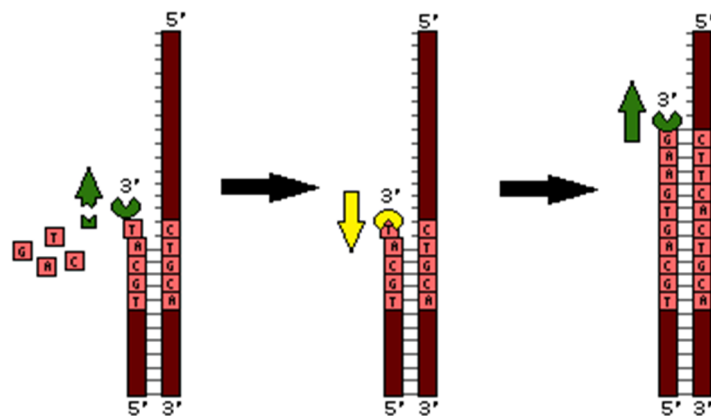
Kuva 4 MLPA:n kulku. (MRC Hollandin kuvaa mukaillen. <http://www.mlpa.com>)

MLPA:n avulla on mahdollista saada suuria määriä tietoa yhdessä reaktiossa jonka tulokset ovat valmiina 24 tunnin sisällä. Itse menetelmä on halpa ja helposti suoritettava. MLPA on kyvykäs tunnistamaan hyvin pieniä DNA-jaksoja (50-70 nukleotidia). Tällaiset yhden geenin pienet muunnokset ovat liian pieniä esimerkiksi FISH-menetelmän (fluorescent in situ hybridization) havaittavaksi. Multipelin myelooman suhteen MLPA huomaa geenivirheen, jos noin 50 prosenttia tutkittavista soluista kantaa sitä. (Zhang, M, ym 2015.) Tämä viidenkymmenen prosentin sääntö pätee myös syöpätutkimuksessa. Tulevaisuudessa MLPA-menetelmää voidaan käyttää suurien kopiolumujen määrittämisessä, sillä tutkimukset ovat osoittaneet juuri geenin kopiolumumuunnoksilla olevan osansa monimutkaisten sairauksien synnyssä, ja että tietyt kopiolumumuunnokset ovat oletettua yleisempiä. (Stuppia ym. 2012.)

MLPA-menetelmää ei voi käyttää koko genomin sekvensointiin, eikä se tunnista IP-liittämissä translokaatioita tai tuntemattomia pistemutaatioita. Pistemutaatiot kattavat noin 20-25 prosenttia IP-tautitapauksista. Sen avulla ei voi tutkia vain yhtä solua kuten FISH-menetelmällä. MLPA ei myöskään erota IKBKG 4-10 deleetiota IKBKG-pseudogeenistä. Tästä voi pahimmillaan seurata vääriä positiivisia tuloksia. MLPA-menetelmää käyttäessä on siis tärkeää itse tietää mitä ollaan tutkimassa, jotta tuloksia voidaan tulkita. MLPA on hyvin herkkä kontaminaatiolle, ja siksi DNA:n puhtauteen tulee kiinnittää erityistä huomiota. (MRC Holland, 2017.)

3.2 Pitkän templaatin PCR

Pitkän templaatin PCR on herkempi versio perinteisestä PCR:stä. Menetelmä on herkeistetty käyttämällä kahta DNA-polymeraasia perinteisen yhden sijaan. Toinen polymeraasi korjaa toisen virheet ja on näin spesifimpi tutkimukseen nähden (kuva 5). Parhaimmillaan DNA:ta saadaan monistettua tällä menetelmällä 30-50 kb. Pitkän templaatin PCR-ohjelmassa syklejä toistetaan useasti, jotta lopputuotetta saadaan riittävästi. (Haiying ym, 2014.)



Kuva 5 Pitkän templaatin PCR:n kulku.

Pitkän templaatin PCR:ssä PCR-vaiheita toistetaan 20-40 kertaa. Ekstensiovaiheessa juostetta rakentaa Taq-polymeraasi, joka kulkee suunnassa 5'-3'. Taq-polymeraasi rakentaa juostetta emäksistä, ja toinen spesifinen eksonukleaasi-polymeraasi seuraa sitä 3'-5' suunnassa (kuva 5). Jos Taq-polymeraasi lisää virheellisen emäksen juosteeseen spesifinen polymeraasi poistaa emäksen seuraavassa ekstensio-vaiheessa ja korjaa näin virheen. Taq-polymeraasi on tässä vaiheessa hypännyt virheellisen emäsparin yli, eli juosteen rakentaminen on loppunut (kuva 5). Juosteen rakentaminen voi jatkua seuraavalla ekstensio-kierroksella korjatun kohdan yli ja DNA-jakso monistuu pidempänä. (Sighma Aldrich, 2017.)

Pitkän templaatin PCR erottaa IKBKG-geenin sen pseudogeenistä spesifisten alukkeidensa avulla. (Ming-Jun Song, ym, 2010). Pitkän templaatin PCR:ää käytetään suurimolekyylisten tuotteiden valmistamiseen kloonaukseen, geenikartoitukseen ja sekvensointia varten. Alukkeiden kiinnittymisajan ja ekstensio-ajan muutoksilla saadaan aikaan optimaaliset olot kullekin reaktiolle. Entsyymien toiminta on hyvin tärkeää PCR-reaktion onnistumisen kannalta. (Haiying ym, 2014.)

4 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön päätarkoituksena on vertailla keskenään Incontinentia pigmenti -tutkimuksesta nykyistä pitkän templaatin PCR-menetelmää (Roche Long Extend PCR-kitin ja in house alukepari 3FH ja JF3R) ja sen tilalle suunniteltua MLPA-menetelmää (MRC Holland salsa MLPA-kitti ja P073-A1 IKBKG-koetinseos). Menetelmävertailu tehdään validoinnin ja nykyisen menetelmän testauksen perusteella, perustellen tulokset alan kirjallisuudella ja aiemmillä tutkimustuloksilla.

Tämä opinnäytetyö on luonteeltaan kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus. Määrällinen tutkimus on numeerisiin arvoihin perustuvaa ilmiön selittämistä, kuvaamista ja tulkitsemistä (Jyväskylän yliopisto, 2017). Tässä opinnäytetyössä on tarkoitus tutustua kahteen molekyyligeneettiseen menetelmään ja ymmärtää niiden toimintaa menetelmävertailun kautta. Tarkoitus on myös vertailla keskenään menetelmien laatua ja sopivuutta Incontinentia pigmentin tutkimiseen. Potilas-aineisto on valittu Incontinentia pigmentin esiintyvyyden mukaan, joten kyseessä on harkinnanvarainen otanta. Nämä seikat tuovat työhön hiukan kvalitatiivista näkökulmaa. Taustatietoa on kerätty juuri pohjustamaan menetelmävertailua, jonka tulokset esitetään lopuksi yhteenvetona taulukossa. Tutkimustulosten avulla pyritään tarkentamaan ja parantamaan laboriodiagnostiikkaa Incontinentia pigmentin suhteen. Jos tässä onnistutaan, tutkimus on validi ja tukee kvantitatiivisen tutkimuksen tavoitteiden saavuttamista.

Tämän opinnäytetyön tutkimuskysymyksenä on *Onko MLPA kelvollinen korvaamaan pitkän templaatin PCR:n Incontinentia pigmentin diagnostiikassa?*

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on pystyttää diagnostinen menetelmä Incontinentia pigmentin geenitestaukseen. Tavoitteeseen päästään validoimalla MLPA-menetelmä oikeaoppisesti esimerkin ja työohjeiden mukaisesti. Tavoite toteutuu vain jos MLPA todetaan pitkän templaatin PCR:ää paremmaksi menetelmäksi. Tavoitteen täytyessä laboratorion tutkimustoimivuus parantuu ja potilaan hoidon taso säilyy ennallaan. Opinnäytetyön tehtävänä on edistää työn tekijän tietoutta MLPA-menetelmästä ja pitkän templaatin PCR-menetelmästä. Tekijä esittää tieteelliset perustelut MLPA-menetelmän paremmuudelle Incontinentia pigmenti -tutkimuksessa. Opinnäytetyön tekijä sitoutuu tekemään tutkimuksen noudattaen hyviä eettisiä periaatteita.

5 TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Menetelmävertailun laboratorio-osuus suoritettiin Turun yliopistollisen keskussairaalan lääketieteellisen genetiikan laboratorion tiloissa syksyllä 2016. Ensin kaikille kuudelletoista näytteelle tehtiin MLPA-tutkimus. Tämän jälkeen 11 valittiin kaksi MLPA näytettä, joille tehtiin pitkän templaatin PCR.

5.1 Tutkimusaineisto

MLPA-näytteinä käytettiin kuuttatoista valmiiksi DNA-eristettyä näytettä lääketieteellisen genetiikan laboratorion näytevalikoimasta. Näytteet on kerätty vuosina 2003-2015. Ne on lähetetty lääketieteellisen genetiikan laboratorioon eri puolilta Suomea. Näytteistä 1-11 ovat verestä eristettyä DNA:ta (Taulukko 1). Näyte 12 on sikiökudoksesta eristetty DNA ja näyte 13 istukasta eristetty DNA. Näytteet 14 ja 15 ovat veri-eristettyä DNA:ta. Näyte 16 on fibroblasti-DNA:ta. Näytteet on valittu tutkimukseen harkinnanvaraisesti. Niiden joukossa on IP-positiivisia kantajanäytteitä ja normaaleja potilasnäytteitä. Kaikille näytteille on aiemmin tehty pitkän templaatin PCR, joten tulokset tiedetään etukäteen. Lääketieteellinen laboratorio nimeää tutkimusvaiheessa näytteet suoritettavan kokeen, potilaan nimikirjaimilla ja näytenumerolla joka sisältää näytteenottovuoden ja juoksevan numeroinnin. Tässä tapauksessa etuliite IKBKG kertoo, että kyseessä on Incontinentia pigmentin geenitutkimus. Potilaiden anonymiteetin säilyttämiseksi tässä opinnäytetyössä näytteet nimetään vain näytenumeron avulla. Näytteet on jaettu ryhmiin DNA:n eristysmenetelmän mukaan: kitti-eristys, Maxwell-laite-eristys ja fenolikloroformiuutos-eristys. Kittieristys-sarja on jaettu kahteen osaan. Tässä opinnäytetyössä näytteen esitetään taulukossa (Liite 1), josta ilmenee näytteen numero ja sille tehtävä tutkimus ja myöhemmin MLPA-tulostaulukkona (taulukko 1). MLPA-sarjassa on mukana CMT-validointisarja, jonka tarkoitus on kertoa pipetointivirheistä, jos tulokset ovat epäselvät.

5.2 Laitteet ja tilat

Tutkimus suoritettiin kokonaisuudessaan lääketieteellisen laboratorion tiloissa. Suurin osa työstä tehtiin DNA-laboratorion puhdastilassa. Pipetoinnit tehtiin puhdastilan laminaarivirtauskaapissa. Laminaarikaapin ilmanvaihto pitää ilman kaapissa puhtaana ja kun

kaappi ei ole käytössä se puhdistetaan UV-valolla mikrobeista (Solunetti, 2016). Geeli- ja sekvensointiajo suoritettiin laboratorion sekvensaattorihuoneessa. MLPA:ssa käytettävä PCR-kone on puhdastilan Applied Biosystems 9700-laite ja pitkän templaatin PCR:ssä samanmerkinen laite DNA-laboratoriossa. Geelinä käytettiin Bio-Radin yksiprosenttista kahdeksankaivoista valmisgeeliä. Pitkän templaatin PCR:n geelijaotuote kuvattiin UV-transluminaattorilla BIO-Rad Gel Doc 2000.

5.3 MLPA

MLPA-tutkimus suoritettiin ensimmäisellä kerralla työohjeen mukaan. Koska saaduissa tuloksissa oli liian paljon taustaa, joka häiritsi niiden tulkintaa, tutkimus päätettiin tehdä uudestaan. MLPA on hyvin herkkä kontaminaatioille, mutta DNA:n uudelleenpuhdistus auttaa yleensä saavuttamaan hyvän lopputuloksen (MRC Holland, 2017). Seuraavan sarjan tuloksissa ei ollut taustaa ja ne hyväksyttiin. Työ seurasi alla kerrottua tapaa molemmilla suorituskertoilla.

Työn aikana noudatettiin lääketieteellisen genetiikan MLPA-työohjetta. Viisitoista DNA-näytettä laimennettiin konsentraatioon 50 ng/μl. Yksi näyte (DN15–1586) laimennettiin konsentraatioon 10 ng/μl, sillä lähtö-DNA:ta ei ollut riittävästi. Laskukaava 50ng/μl:n DNA-laimennoksille oli

$$50 / X \text{ ng/}\mu\text{l} \times 50 \text{ ng} = X \mu\text{l}$$

Tulokseksi saatiin lähtö-DNA:n mikrolitramäärä, johon lisättiin laboratoriovettä siihen asti, että kokonaismäärä on 50 μl. Esimerkiksi näytteen DN07-913 tulos pyöristettynä

$$3,1\mu\text{l} + 46,9 \mu\text{l H}_2\text{O} = 50 \mu\text{l}$$

MLPA-validoinnista tehtiin työlista lääketieteellisen genetiikan laboratorion valmiille pohjalle (Liite 1). IKBKG-näytteitä oli kontrollit mukaan lukien 26. Mukaan lisättiin neljän kontrollin CMT-sarja, jonka tarkoitus oli varmistaa tulosten paikkansapitävyys ja poissulkea pipetointivirheet, jos tuloksissa olisi poikkeavuuksia. Näytteet on eristetty kolmella eri tavalla: kitillä, Maxwell-eristyslaitteella ja fenoli-kloroformilla. Näille kaikille haettiin kolmen kontrollin sarjat. Kontrollit ja vesi mukaan lukien näytteitä oli 30. Näytelistä eristysmenetelmiseen löytyy tämän opinnäytetyön liitteestä 1.

DNA-laimennokset haettiin jääkaapista ja kontrollit etsittiin pakkasesta. Näyteputkiin (0,2 ml) merkittiin juokseva numerointi ja ne jaettiin telineeseen kahdeksan riveihin työpohjan

mukaan. GeneAmp PCR-laite (Applied Biosystems9700) avattiin ja ohjelmaksi valittiin MLPA-denaturaatio. Putkiin pipetoitiin laminaarikaapissa 5 µl:aa DNA-laimennosta ja kontrolleja. CMT ja IKBKG-sarjoilla oli molemmilla myös vesikontrolli. Pipetoinnin jälkeen putkien korkit varmistettiin ja putket siirrettiin laitteeseen. Putkien on erityisen tärkeää pysyä kunnolla kiinni, sillä PCR-koneen kuumuus haihuttaa nestettä hyvin tehokkaasti. Viiden minuutin denaturaatio-ohjelman aikana valmistettiin hybridisaatioliuos. Denaturaatio-ohjelman jälkeen PCR-koneen kansi avattiin ja näytteiden päälle pipetoitiin hybridisaatioliuosta varovasti pipetillä sekoittaen. Putket otettiin käsittelyyn yksi kerrallaan ja pistettiin takaisin PCR-koneeseen heti kun pipetointi oli tehty. Näytteet jäivät yön yli hybridisaatio-ohjelmalle ja työtä jatkettiin seuraavana päivänä.

Seuraavana päivänä valmistettiin aluksi ligaatioseos työohjeen mukaisesti ja ligaatio-ohjelma käynnistettiin. Kun lämpötila laski 54:n asteeseen ohjelma pysäytettiin ja 32 µl ligaatioseosta pipetoitiin suoraan koneessa oleviin putkiin. Samalla varmistettiin, ettei putkista ollut yön aikana haihtunut seosta pois. PCR-laite antaa työn suorittajalle 10 minuuttia aikaa suorittaa pipetointi ennen ohjelman jatkamista, joten pipetointi suoritettiin nopeasti. Tämän jälkeen ohjelma jatkettiin loppuun asti. Ohjelman loppumisen aikana valmistettiin PCR-seos, joka pipetoitiin (10 µl) ohjelman loputtua putkiin. Pipetoinnin aikana putket nostettiin pois koneesta yksi kerrallaan. Tämän jälkeen putket vietiin pois puhdas-tilasta DNA-laboratorion PCR-koneeseen. PCR-ohjelman (kuva 6) jälkeen näytelistä syötettiin ABI 3730-laitteen päätteelle ohjeiden mukaisesti. Näytteet pipetoitiin putkista kuoppalevyille (1 µl) joka toiselle riville DNA-laboratorion vetokaapissa. LIZ 500 kostandardista ja Hi-Di-formamidista tehtiin seos, jota lisättiin pipetoidun näytteiden päälle 14 µl. Loput kuopat täytettiin Hi-Di-formamidilla levyn tasapainottamiseksi. Levy siirrettiin PCR-koneeseen ja seitsemän minuutin kestoisen denaturointi-ohjelma käynnistettiin. Denaturointi-ohjelman jälkeen levy syötettiin sekvensaattoriin joka ohjelman valmistuttua lähettää vastaukset suoraan sairaalageneetikkojen analysoitavaksi.

Vaihe	Lämpötila	Kesto	Toisto
1. Denaturaatio	95 °C	30 s	1.-3. x 35
2. Annealing	60 °C	30 s	
3. Ekstensio	72 °C	60 s	
4. Loppuelongaatio	72 °C	20 min	
5. Hold	15 °C	hold	

Kuva 6 MLPA PCR-ohjelma. (Lähde: Lääketieteellisen genetiikan laboratorion MLPA-työohje.)

5.4 Pitkän templaatin PCR

Pitkän templaatin PCR:ää varten valittiin kaksi MLPA-positiivista näytettä: DN07-913 ja DN03-584. Työn aikana noudatettiin lääketieteellisen genetiikan PCR-työohjetta. Molemmat DNA-näytteet laimennettiin konsentraatioon 100 ng/μl. Kaava laskulle on

$$100 / X \text{ ng/}\mu\text{l} \times 100 \text{ ng} = X \mu\text{l}$$

Pitkän templaatin PCR:ssä laboratoriovettä lisättiin 100 μl:aan asti. PCR-reaktio pipetoitiin puhdastilan laminaarivirtauskaapissa kuoppalevyille. Työn aikana varottiin kontaminaatioita. Levyille pipetoitiin järjestyksessä kaksi kontrollia, näyte ja vesi, kutakin 1 mikrolitraa. Kaikkien päälle lisättiin 15 μl PCR-reaktioseosta. PCR-reaktioseos tehtiin erikseen tutkimusta varten ja se sisältää alukkeet 3FH ja JF3R, reaktiopuskurin, SequalPrep Long-polymeraasin ja SequalPrep Enhancer A:n. Alukkeet kattavat alueet

3FH: 5'- GAC CAG CTC CCC TCC ACT GTC -3'

JF3R: 5' CTC GGA GAC ACA GGA ACC AGC A -3'

Pipetoinnin jälkeen levy tuotiin pois puhdastilasta ja laitettiin DNA-laboratorion PCR-laitteeseen IP-ohjelmalle (kuva 7). PCR-ohjelma sisältää useita syklejä, jotta tutkittavaa DNA:ta saadaan paljon. PCR-ohjelman jälkeen 10 μl PCR-tuotetta ja 1 μl latauspuskuria yhdistetään. Pipetointi suoritettiin DNA-laboratoriossa. Valmis purppurainen seos pipetoitiin 1 prosenttiselle agarosigeelille. PCR-tuotteiden jälkeen geelin kuudenteen kuoppaan lisätään molekyylipainomarkkeri. Molekyylipainomarkkeriin vertaamalla selvitetään PCR-tuotteen koko. Geelija jo tehtiin 80 voltin jännitteellä ja ajo kesti noin tunnin. Ajon jälkeen geeli kuvattiin UV-transluminaattorilla.

Vaihe	Lämpötila	Kesto	Toisto
1. Alkudenaturaatio	94 °C	2 min	
2. Denaturaatio	94 °C	10 s	
3. Annealing	66 °C	30 s	2.-4. x 10
4. Ekstensio	68 °C	10 min	
5. Denaturaatio	94 °C	10 s	5.-7. x 20
6. Annealing	66 °C	30 s	ekstensioon +20 s joka
7. Ekstensio	68 °C	10 min	syklillä
8. Loppuekstensio	72 °C	7 min	
9. Hold	4 °C	hold	

Kuva 7 Pitkän templaatin PCR-ohjelma. (Lähde: Lääketieteellisen genetiikan laboratorion IP-työohje.)

6 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Teoriatieto kertoo MLPA-menetelmän olevan tarkempi ja herkempi IKBKG-valtamutaa-tion määrittämisessä. Silti IKBKG-pseudogeenin tiedetään jo tässä vaiheessa vaikutta-van paljon tulosten laatuun, sillä MLPA ei erota sitä IKBKG-geenistä. Muita tulosten laa-tuun vaikuttavia tekijöitä ovat DNA:n laatu ja puhtaus, kontrollinäytteiden laatu, eristys-menetelmän toimivuus, mahdolliset kontaminaatiot ja pipetointitarkkuus (MRC Holland, 2017). MLPA-tuloksia verrataan näytteille aiemmin tehtyihin pitkän templaatin PCR:n tu-loksiin. Tuloksena on ollut joko negatiivinen tai positiivinen näyte IKBKG-geenin 4-10 deleetion suhteen.

6.1 MLPA

Sekvensaattori lähettää tiedot tutkimuksesta suoraan Genemarker-ohjelmaan jonka avulla tulokset tulkitaan. Tulosten analysointi aloitettiin vertaamalla koettimien piikin pinta-alaa muiden näytteiden vastaaviin piikkeihin, saman näytteen kontrollikoettimen piikkiin ja synteettisen kontrollinäytteen piikkiin. Tulokseksi saadaan analysaattorin las-kema suhdeluku, joka osoittaa koettimen kohdealueen määrään suhteessa saman näyt-teen muihin alueisiin. Normaali kopioluku on 1. Tällöin geenissä ei ole havaittu kopiolu-vun muutoksia ja potilas ei sairasta tai kannaa Incontinentia pigmentia. Tulos joka jää alle 0,75 tarkoittaa deleetiota. Geeni on homotsygootti, jos tulos on 0 ja heterotsygootti jos tulos on noin 0,75. Jos suhdeluku on 1,3-1,7 kyseessä on kolmen kopion muutos, eli heterotsygootti duplikaatio. Suhdeluku 1,8-2,5 kertoo, että kopioita on neljä ja kyseessä on hemitsygootti duplikaatio. Laatu heikkenee sitä mukaan mitä enemmän kopioita on. (Toivonen, M, 2015)

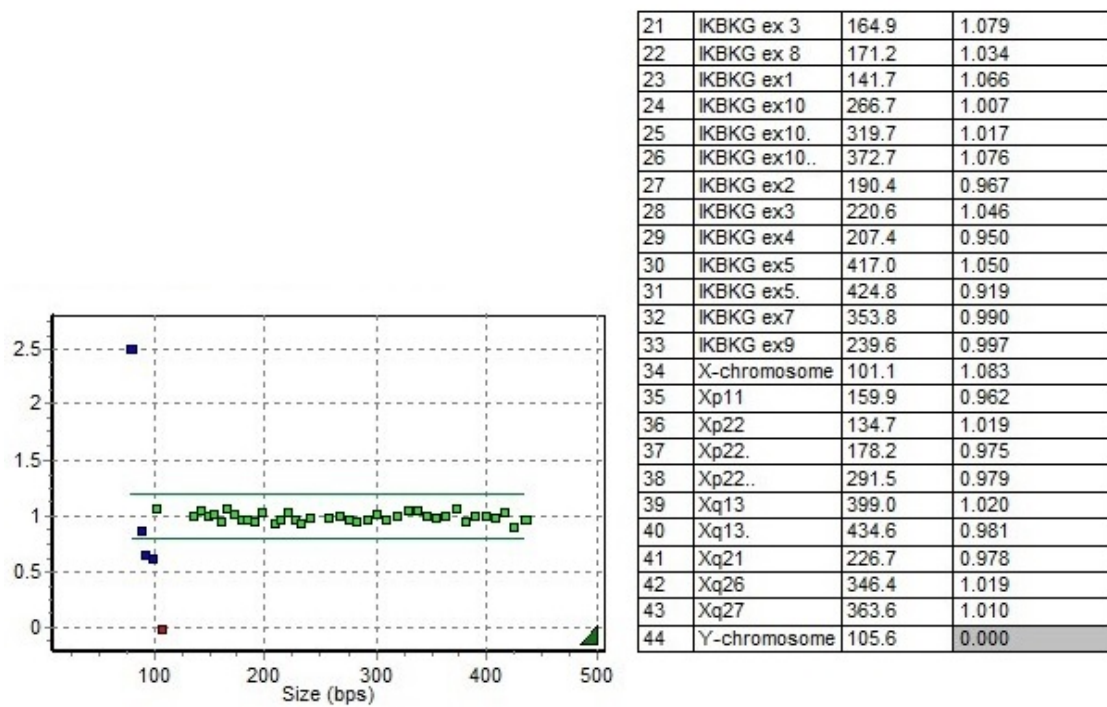
Analysoinnin alussa CMT-sarja tarkistettiin. Tässä tutkimuksessa CMT-sarja oli onnistu-nut hyvin. Tämä takaa, että IKBKG-sarjan mahdolliset virheet eivät liity pipetointitarkkuu-teen. Arvot suhteutetaan, ja analysaattori valmistaa A4-kokoisen sivun josta tuloksia voi tarkastella. Poikkeavat tulokset näkyvät tulossivun oikeanpuoleisessa taulukossa har-maalla taustalla (Soft Genetics, 2016). Tulossivut löytyvät kokonaisuudessaan tämän opinnäytetyön liitteestä 2. MLPA-tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa (Taulukko 1). Tuloksena on joko positiivinen, eli MLPA on löytänyt eksonien 4-10 deleetion tai

negatiivinen, eli deleetiota ei ole löytynyt näytteestä. Taulukon ensimmäisessä sarakeessa on juokseva numerointi 1-16, toisessa näytteen numero, kolmannessa pitkän templaatin PCR:n tulos edelliseltä tutkimuskerralta, neljännessä tämän opinnäytetyön MLPA-tulos ja viidennessä tulossivun numero liitteissä.

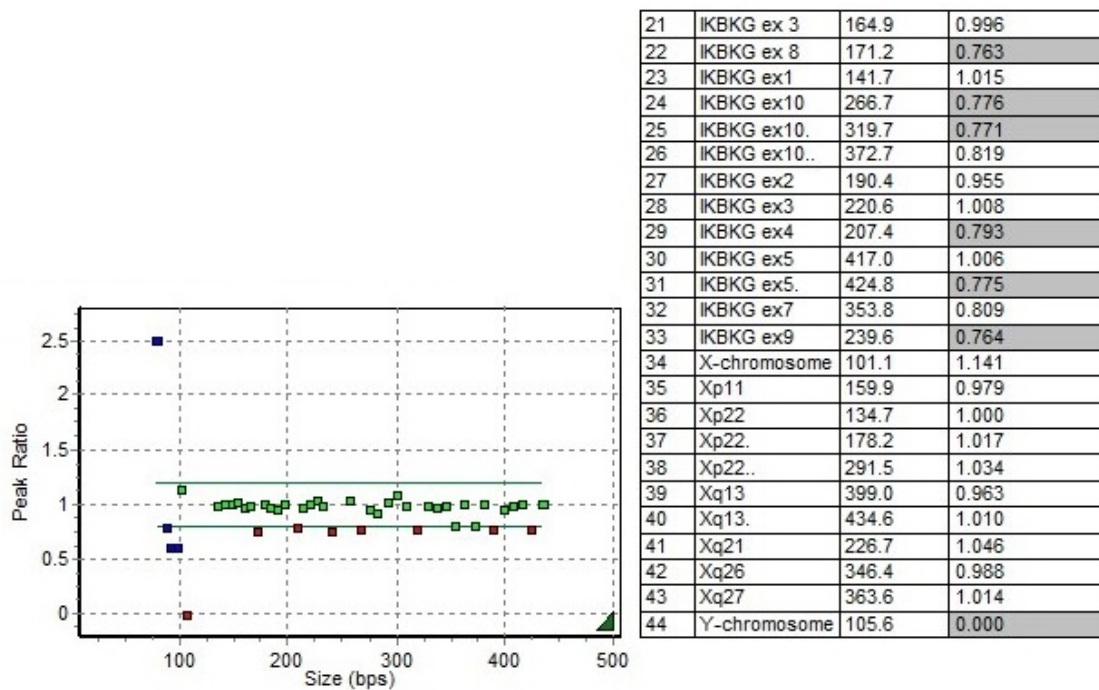
	Näyttenumero	Edellinen tulos	MLPA-tulos	Liite
1	DN07-913	positiivinen	positiivinen	2 (1)
2	DN12-498	positiivinen	positiivinen	2 (2)
3	DN08-1206	positiivinen	positiivinen	2 (3)
4	DN15-1096	negatiivinen	negatiivinen	2 (4)
5	DN13-482	negatiivinen	negatiivinen	2 (5)
6	DN13-256	negatiivinen	negatiivinen	2 (6)
7	DN08-465	positiivinen	positiivinen	2 (7)
8	DN03-584	positiivinen	negatiivinen	2 (8)
9	DN15-566	negatiivinen	negatiivinen	2 (9)
10	DN14-1058	negatiivinen	negatiivinen	2 (10)
11	DN15-1586	Ei tulosta	positiivinen	2 (11)
12	DN15-689	positiivinen	Ei tulosta	2 (12)
13	DN08-1201	positiivinen	Ei tulosta	2 (13)
14	DN13-915	positiivinen	positiivinen	2 (14)
15	DN15-1179	positiivinen	positiivinen	2 (15)
16	DN03-979	positiivinen	negatiivinen	2 (16)

Taulukko 1 MLPA-tulokset ja edellisen tutkimuksen pitkän templaatin PCR:n tulokset.

DNA:n säilytys ja ikä eivät näytä vaikuttaneen tuloksiin, sillä vanhemmistakin näytteistä on saatu sama tulos. Työn suorittajan kokemattomuus pipetoijana näkyy tuloksista epätasaisuutena. Tulokset ovat kuitenkin hyväksyttäviä. Näytteiden DN15-689 ja DN08-1201 tulokset eivät ole onnistuneet. Syynä voi olla pipetointivirhe, tai DNA:n laatu ja alkuperä. Näytteet oli alun perin eristetty sikiökudoksesta (DN15-689) ja istukasta (DN08-1201), eikä verestä kuten muut näytteet. Fibroblasti-näyte DN03-979 antaa MLPA-negatiivisen tuloksen. Kyseessä on kuitenkin vanhan tutkimuksen perusteella somaattista mosaikismia IKBKG-geenin suhteen sairastava poika. DN15-1586 josta ei ollut aiemmin saatu tulosta, sai positiivisen MLPA-tuloksen. Tässä opinnäytetyössä tarkastellaan tarkemmin DN07-913 kantajapotilaan tuloksia verraten niitä DN13-482 normaaliin potilaaseen. Näyte DN03-584 tuodaan esille erikoisuutensa vuoksi, sillä kyseessä on poika.

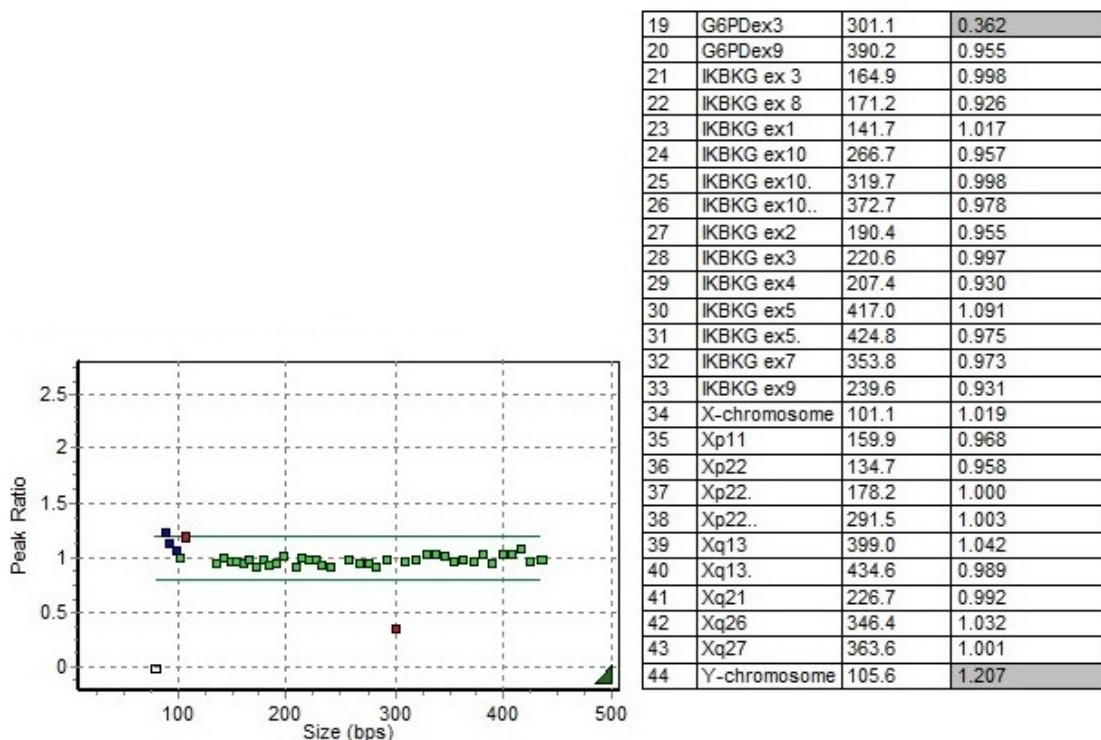


Kuva 8. DN13-482, normaali näyte. Tuloksista voidaan päätellä, ettei näytteestä löytynyt IKBKG-geenin 4-10 deleetiota.



Kuva 9. DN07-913, positiivinen näyte. Tulosten perusteella nähdään, että näytteestä löytyy IKBKG-geenin 4-10 deleetio.

Molemmissa näytekuviissa (kuvat 8 ja 9) on tulostaulukko oikealla ja tulokset kuvaajaan havainnollistettuna vasemmalla. Taulukon ensimmäisessä sarakkeessa näkyy tutkittavan alueen nimi, toisessa koko ja kolmannessa tulos. Kuvaajassa kontrollit on merkitty sinisellä, normaalit tulokset vihreällä ja tulokset jotka eivät ole normaalivälillä 0,25-1,25 punaisella (Soft Genetics, 2017). Kuvaajaa tarkasteltaessa näyte on normaali, kun vihreät merkit pysyvät viitealueella ja arvo on noin 1 eli normaali tulos (Kuva 8). Optimaalissa oloissa merkit olisivat samalla viivalla. Arvot pysyvät silti normaali-alueella, joten niitä voidaan tulkita ja niihin voidaan luottaa. Taulukossa poikkeavat arvot näkyvät harmaalla taustalla. Näytteessä jossa deleetio on havaittavissa, arvo laskee (kuva 9) ja näkyy kuvaajassa punaisella. Arvon ollessa noin 0,75 kyseessä on deleetio. Referenssitaulukko kertoo normaalista poikkeavien tulosten olevan 4-10 deleetio. Kuitenkaan vain MLPA-tuloksen perusteella ei voi tehdä IP-diagnoosia, vaan tulos tulee aina tarkistaa toisella PCR-menetelmällä (MRC Holland, 2017). Molemmissa kuvissa vasemmassa alakulmassa näkyvä punainen tulos on Y-kromosomi, jota ei siis ole havaittu näytteessä. Tutkittavat ovat näin molemmat naispuoleisia.



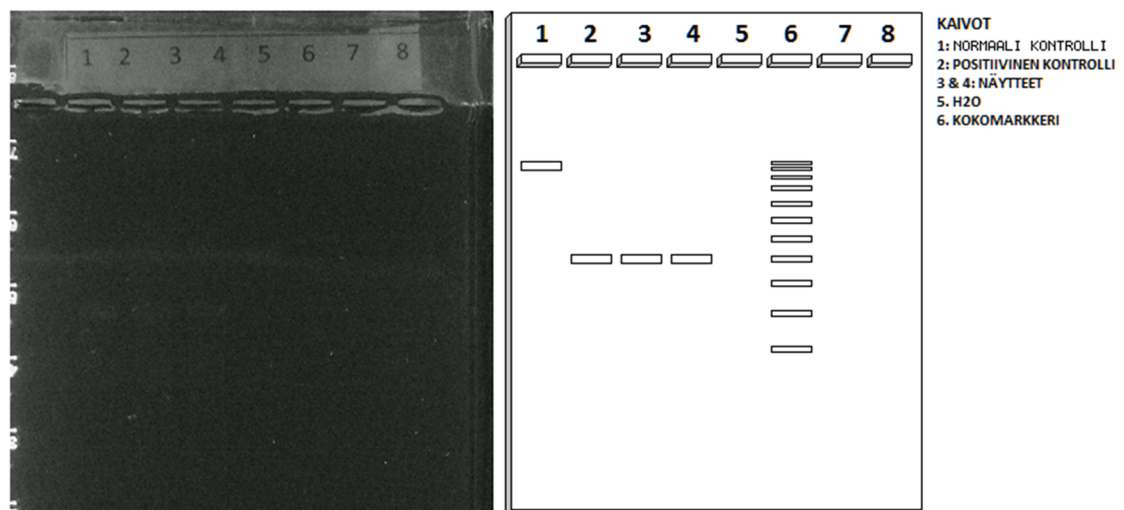
Kuva 10. DN03-584, poika. MLPA ei tunnista deleetiota IKBKG-geenin suhteen.

DN03-584-näyte on Incontinentia pigmentia sairastavan pojan DNA-näyte (kuva 10). Poika on pysynyt hengissä somaattisen mosaikismin vaikutuksesta. Pojan on todettu

olevan heterotsygootti taudinkantaja. Tämä tarkoittaa, että puolesta pojan soluista löytyy IKBKG-geenin vajautta ja puolet soluista ovat normaaleja. MLPA ei pysty tunnistamaan tällaisia poikkeavia mutaatioita, ja siksi tulos olisi helppo mieltää negatiiviseksi vain MLPA:n perusteella. Edellisten tutkimusten tuloksista tiedetään kuitenkin pojalla olevan somaattinen mosaikismi. MLPA on sen sijaan havainnut deleetion IKBKG-geenin viereisen geenin G6PD-geenin eksonissa 3. Kyseessä on kuitenkin hyvin varmasti pipetointivirhe. Kuvaajassa Y-kromosomi näkyy punaisena merkinä, eli MLPA tunnistaa kromosomin heterotsygoottiseksi.

6.2 Pitkän templaatin PCR

Pitkän templaatin PCR:ää varten valikoituivat MLPA-positiivinen näyte DN07-913 ja DN03-584, jonka tiedetään olleen aiemmassa PCR-tutkimuksessa positiivinen. MLPA ei havainnut tässä näytteessä poikkeavuutta. Molempien näytteiden aiemmat tulokset tarkistettiin ja geelikuvat käytiin läpi. Tällä tavalla varmistettiin, että myös edellisessä tutkimuksessa näytteet olivat olleet positiiviset. Geeli oli jäänyt haaleaksi. Vaikka tutkimuksen nähtiin onnistuneen haaleudesta huolimatta, on tässä opinnäytetyössä esitetty geelikuvan rinnalla kaaviokuva siitä, miltä tulosten kuuluu näyttää (kuva 10).



Kuva 11. Pitkän templaatin PCR geelillä. Näytteet DN07-913 ja DN03-584.

Valmiista geelistä otetaan kameralla kuva ja silmämääräisesti tarkistetaan, että kontrollit ovat onnistuneet. Geelissä ensimmäisellä rivillä on normaali kontrolli, toisella positiivinen

kontrolli, kolmannella ensimmäinen potilasnäyte DN07-913, neljännellä toinen potilasnäyte DN03-584, viidennellä vesikontrolli ja kuudennella kokomarkkeri (kuva 11). Jos näyte on positiivinen, näyte piirtyy samalle kohdalle positiivisen näytteen kanssa. Jos näyte on normaali ja Incontinentia pigmentia ei esiinny, näyte jää normaalin kontrollin tasolle. Molemmat tutkittavat näytteet olivat pitkän templaatin PCR:n mukaan positiivisia, eli näytteistä löytyi IKBKG-geenin 4-10 eksonien deleetio. Vaikka näytteen DN03-584 kohdalla kyse on somaattisesta mosaikismista, pitkän templaatin PCR havaitsee sen ja tulos on positiivinen. Alukkeiden spesifisyyden takia voidaan olla varmoja tulosten tarkoittavan IKBKG-geenin deleetiota, eikä sen pseudogeeniä.

6.3 Lopputulos

Tämän opinnäytetyön tutkimuskysymyksenä oli *Onko MLPA kelvollinen korvaamaan pitkän templaatin PCR:n Incontinentia pigmentin diagnostiikassa?* Tutkimustuloksista ja valmistajan ohjeista käy ilmi, että pitkän templaatin PCR tarvitaan varmistamaan kaikki positiiviset MLPA-näytteet. Näin ei ole mahdollista, että MLPA yksin korvaisi pitkän templaatin PCR:n, vaan optimaalisissa olosuhteissa ne toimivat rinnakkain täydentäen toisiinsa.

MLPA:n suurin haitta Incontinentia pigmenti -tutkimuksessa on, ettei se tunnista eroa IKBKG-geenin ja IKBKG-pseudogeenin välillä. Koska jopa 2 prosenttia normaaliväestöstä voi kantaa IKBKG-pseudogeeniä, positiivinen MLPA-tulos on aina varmistettava muulla menetelmällä (MRC Holland, 2017). MLPA ei myöskään tunnista somaattista mosaikismia, kuten DN03-584 kohdalla voidaan havaita. Tutkimustuloksia tarkasteltaessa huomaa MLPA:n antavan tarkemman vastauksen eksonideleetiosta eritellen jokaisen eksonin, siinä missä pitkän templaatin tulos on joko positiivinen tai negatiivinen. MLPA:n etu on siis sen antamissa herkemmissä tuloksissa. MLPA-tutkimus sisältää paljon pieniä pipetointimääriä, mikä tekee siitä teknisesti haastavamman kuin pitkän templaatin PCR. Tulosten perusteella päätettiin kuitenkin, ettei lääketieteellisen genetiikan laboratorio luovu pitkän templaatin PCR-menetelmästä, eikä MLPA-menetelmää oteta sen tilalle tai rinnalle Incontinentia pigmenti -tutkimuksessa. Kliinisissä oloissa tehdyllä taudinmäärityksellä yksittäisillä eksonideleetiolla ei ole kovin suurta painoarvoa, kun etsitään suurempaan deleetiota, kuten Incontinentia pigmentin 4-10 deleetio. Näin pitkän templaatin PCR kykenee antamaan tarpeeksi tarkan tutkimustuloksen ja takaamaan potilaan oikeanlaisen hoidon.

7 POHDINTA

MLPA ja pitkän templaatin PCR ovat molemmat toimivia menetelmiä Incontinentia pigmenti-tutkimuksessa. Pitkän templaatin PCR on toki nopeampi tutkimus suorittaa, mutta sen tulokset eivät ole yhtä tarkkoja kuin MLPA:n. MLPA on haastavampi pipetoida, mutta varmasti helppo suorittaa kun työhön rutinoituu tarpeeksi. Ilman pseudogeenin vaikutusta tuloksiin MLPA olisi parempi tutkimusmenetelmä Incontinentia pigmentin suhteen.

Opinnäytetyö edisti bioanalytiikkakoulutuksessa opittuja taitoja molekyyligeneettisten tutkimusten suhteen, ja auttoi ymmärtämään menetelmävertailun periaatteet. Tutkimuksen aikana sovellettiin koulussa opittua PCR-menetelmien ja molekyyligeneettisen laboratoriotyöskentelyn suhteen. Teoriatiedon prosessoinnin aikana oppi soveltamaan aiempia tutkimuksia työhönsä ja vertailemaan kriittisesti tutkimustuloksia. Molempien menetelmien työstäminen ja oppiminen kehittivät pipetointitaitoja ja kykyä hallita isompikin laborioproessi. Vaikka MLPA-menetelmä ei otettu käyttöön, työn tekeminen antoi paljon uutta varmuutta laboratoriotyöhön ja antoi tekijälleen kallisarvoista kokemusta DNA-laboratoriotyöskentelystä. Opinnäytetyön tekijä sai työn aikana opetella käyttämään Genemarker-ohjelmaa, joka on lääketieteellisen genetiikan laboratoriossa vain geneetikkojen käytössä. Tällä tavalla varmistettiin, että työn tekijä saa MLPA-tutkimuksessa mahdollisimman kokonaisvaltaisen kuvan ja osaa näin ymmärtää menetelmää paremmin.

7.1 Tutkimuksen luotettavuus

Aineisto rajattiin sisältämään mahdollisimman tuoretta tutkimusaineistoa. Lähdemateriaalista suurin osa on vuosilta 2012-2016. Näin pidetään huolta, että tutkimustulokset ovat tuoreita ja palvelevat tämän opinnäytetyön ajankohtaisuutta. Suomenkielisen aineiston vähäisyyden vuoksi tutkimusaineisto on suurimmaksi osaksi englanninkielistä. Muutamia tutkimuksia jouduttiin jättämään pois niiden maksullisuuden takia. Nämä korvattiin mahdollisimman samankaltaisella tiedolla maksuttomasti saatavilla olevasta materiaalista.

Tutkimus suoritettiin työohjeiden mukaan, ja päivän päätteeksi kirjattiin muistiin mitä päivän aikana oli tehty. Aikaisempia tutkimuksia hyödynnettiin tutkimuksen suorittamisessa ja teoriatietopohjan luomisessa. Erityisesti MLPA-tuloksissa näkyy selvästi tutkimuksen

tekijän kokemattomuus pipetoijana. Tulokset ovat silti hyväksyttävissä rajoissa. Tutkimuksen katsottiin täyttävän asetetut vaatimukset, sillä MLPA-menetelmän pipetoinnit ovat hyvin haastavia vasta-alkajalle. Tutkimus suoritettiin aseptisia periaatteita noudattaen. Tutkimuksen pipetoinnit tehtiin suurimmaksi osaksi laminaarikaapissa ja DNA-laboratorion puhdastilassa kontaminaatioiden välttämiseksi. Laboratoriotakki ja käsineet edistivät aseptista työskentelyä.

7.2 Tutkimuksen eettisyys

Tutkimustyössä tulee noudattaa rehellisyyttä, yleistä huolellisuutta ja tarkkuutta tutkimustyössä sekä tulosten tallentamisessa ja esittämisessä (Tutkimuseettinen neuvottelukunta, 2017). Tutkimuksen tekijä noudatti hyvää eettistä käytäntöä parhaan ymmärryksensä mukaan koko opinnäytetyöprosessin ajan. Teoriapohja luotiin plagioimatta muiden teoksia ja merkitsemällä lähteet oikein, näin kunnioittaen toisten tutkijoiden työtä. Tutkimuksessa käytettiin edellisiä tutkimuksia mahdollisimman laajasti lähteenä niin, että käytettävien menetelmien vahvuuksia ja heikkouksia tarkasteltiin muidenkin kuin valmistajan näkökulmasta. Tietoa haettaessa yritettiin löytää mahdollisimman paljon luotettavaa tutkimustietoa sekä Incontinentia pigmentista, että käytettävistä menetelmistä.

Tutkittavien anonymiteettiä suojeltiin käsittelemällä näytteet ilman henkilötietoja. Näytteet on kerätty vuosilta 2003–2015, ja ne on tutkittu jo kerran Incontinentia pigmentin suhteen. Uutta tietoa tutkittavien terveydentilasta ei siis ole odotettavissa. Työn tekijä tietää tutkittavien sukupuolen ja nimikirjaimet mutta ei pääse missään vaiheessa työtä käsiksi muihin potilastietoihin. Nimikirjaimet poistetaan valmiin opinnäytetyön tuloksista ja on todettu, ettei potilaiden henkilöllisyyttä voida näin jäljittää. Tälle opinnäytetyölle haettiin tutkimuslupa Turku CRC:ltä.

7.3 Jatkotutkimusaiheet

MLPA-menetelmän soveltuvuutta voi kokeilla toiselle geneettiselle sairaudelle jonka pseudogeeni ei hallitse kromosomissa niin voimakkaasti kuin IP-tapauksessa. Esimerkiksi Duchennen lihasdystrofian geenimäärityksessä on saatu lääketieteellisen genetiikan laboratoriossa MLPA:n avulla hyviä tuloksia. Myös Incontinentia pigmentin taudin kuvan ja muiden siihen vaikuttavien tai sen avulla laukeavien sairauksien ominaisuuksia voi tutkia.

LÄHTEET

Freed, D, ym, 2014. Somatic Mosaicism in the Human Genome Viitattu 12.1.2017. Luettavissa [www-osoitteessa https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4276927/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4276927/)

Fusco, F, ym. 2014. Incontinentia pigmenti: report on data from 2000 to 2013. Viitattu 1.12.2016. Luettavissa [www-osoitteessa http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4083330/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4083330/)

Harvinaiset-verkosto, 2016. Incontinentia pigmenti. Viitattu 30.12.2016. <http://www.harvinaiset.fi> Home -> Diagnoosit.

Haiying J, ym, 2014. Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer. Viitattu 2.12.2016. Luettavissa [www-osoitteessa https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102922/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102922/)

Heikkilä, H, 2010. Incontinentia pigmenti. Viitattu 14.8.2016. Luettavissa osoitteessa: <https://iho-liitto-fi.directo.fi/@Bin/519928/Incontinentia+pigmenti,+22.3.2010.pdf>

Hull, S, ym. 2015. Somatic mosaicism of a novel IKBKG mutation in a male patient with Incontinentia pigmenti. Viitattu 12.1.2017. Saatavana maksullisena [www-osoitteessa https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25944529](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25944529)

Incontinentia pigmenti International Foundation, 2016. Nemo - the gene that causes Incontinentia pigmenti. IP in males. Viitattu 2.12.2016. <http://www.ipif.org/>

Jyväskylän yliopisto, 2017. Koppa: Määrällinen tutkimus. Viitattu 3.3.2017. <https://koppa.jyu.fi> Etusivu -> Avoimet -> Humanistinen tiedekunta -> Menetelmäpolkuja humanisteille -> Menetelmäpolku -> Tutkimusstrategiat -> Määrällinen tutkimus

Meuwissen, M ja Mancini, G, 2012. Neurological findings in Incontinentia pigmenti; a review. Viitattu 16.1.2017. Saatavilla maksullisena [www-osoitteessa http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1769721212001346](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1769721212001346)

Ming-Jun Song, ym, 2010. The Common NF-κB Essential Modulator (NEMO) Gene Rearrangement in Korean Patients with Incontinentia Pigmenti. Viitattu 12.1.2017. Luettavissa kokonaisuudessaan [www-osoitteessa https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946664/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946664/)

MRC Holland, 2016. MLPA procedure. Viitattu 2.12.2016 <http://www.mlpa.com> Home -> MLPA procedure.

MRC Holland, 2016. Product Description SALSA® MLPA® probemix P073-A1 IKBKG. Viitattu 30.12.2016. <http://www.mlpa.com> Home -> Products -> SALSA MLPA P073 IKBKG probemix

Neto, C, ym. 2014. Ophthalmic evaluation, treatment, and follow-up of two cases of Incontinentia pigmenti. Viitattu 16.1.2017. Saatavilla PDF-muodossa [osoitteessa http://www.scielo.br/pdf/abo/v77n1/0004-2749-abo-77-01-0047.pdf](http://www.scielo.br/pdf/abo/v77n1/0004-2749-abo-77-01-0047.pdf)

Poziomczyk CS, ym, 2016. Clinical study of 20 patients with Incontinentia pigmenti. Viitattu 30.12.2016. Luettavissa [www-osoitteessa https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26547887](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26547887)

Rafatjoo R ja Taghdisi Kashani, A, 2016. Incontinentia Pigmenti; a Rare Multisystem Disorder: Case Report of a 10-Year-Old Girl. Viitattu 16.1.2017. Luettavissa [www-osoitteessa https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5006834/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5006834/)

Genetic and rare diseases information center, 2017. Incontinentia pigmenti. Viitattu 20.1.2017. Luettavissa [osoitteessa https://rarediseases.info.nih.gov/](https://rarediseases.info.nih.gov/) Home -> Diseases -> I.

- Scheuerle, A ja Ursini, M, 2015. Genereviews: Incontinentia pigmenti. Viitattu 16.1.2017. Luettavissa [www-osoitteessa https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1472/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1472/)
- Sigma Aldrich, 2017. Long and accurate PCR. Viitattu 20.1.2017. [http://www.sigmaldrich.com Product Directory -> Molecular Biology -> PCR / Amplification.](http://www.sigmaldrich.com/ProductDirectory->MolecularBiology->PCR/Amplification)
- Soft Genetics, 2016. Gene Marker User manual. Viitattu 30.12.2016. PDR-tiedosto luettavissa osoitteessa http://www.softgenetics.com/PDF/GeneMarker_2-4_UserManual_July2012.pdf
- Soft Genetics, 2017. Application Note: GeneMarker® Software for Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA™). Viitattu 1.2.2017. PDF-tiedosto luettavissa osoitteessa <http://www.softgenetics.com/papers/MLPA%20Application%20Note.pdf>
- Solunetti, 2016. Nukleiinihappojen monistaminen. Viitattu 2.12.2016. <http://www.solunetti.fi>
- Solunetti, 2017. DNA:n pistemutaatio. Viitattu 16.1.2017. <http://www.solunetti.fi>
- Stuppia, L, ym. 2012. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. Viitattu 30.1.2017. Luettavissa [www-osoitteessa https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317712/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317712/)
- Tieteen termipankki, 2016. Biologia. Viitattu 2.12.2016. <http://www.tieteentermipankki.fi/>
- Toivonen, M, 2015. MLPA teoriassa ja käytännön diagnostiikassa. Dia-sarja. Viitattu 30.12.2016
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta, 2017. Hyvä tieteellinen käytäntö. Viitattu 5.2.2017. <http://www.tenk.fi>
- U.S. National library of Medicine, 2016. Genetics Home Reference. G6PD gene. Viitattu 30.2.2017 [https://ghr.nlm.nih.gov/ Home -> Genes -> G6PD](https://ghr.nlm.nih.gov/Home->Genes->G6PD)
- U.S. National library of Medicine, 2016. Genetics Home Reference. IKBKG gene summary.. Viitattu 2.12.2016 [https://ghr.nlm.nih.gov/ Genes -> IKBKG](https://ghr.nlm.nih.gov/Genes->IKBKG)
- U.S. National library of Medicine, 2016. Genetics Home Reference. X chromosome. Viitattu 2.12.2016 [https://ghr.nlm.nih.gov/ Home -> Chromosomes & mtDNA -> X chromosome](https://ghr.nlm.nih.gov/Home->Chromosomes%20&%20mtDNA->X%20chromosome)
- U.S. National Library of Medicine, 2016. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). Viitattu 19.1.2016 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>
- Yale University, Gerstein Laboratory, 2016. Pseudogene. Viitattu 3.12.2016. <http://www.pseudogene.org>
- Your Genome, 2016. What is PCR (polymerase chain reaction)? Viitattu 27.10.2016. [http://www.yourgenome.org Facts -> Methods and Technology.](http://www.yourgenome.org/Facts->Methods%20and%20Technology)
- Zhang, M, ym, 2015. Detection of recurrent cytogenetic aberrations in multiple myeloma: A comparison between MLPA and iFISH. Viitattu 30.1.2017. Luettavissa [www-osoitteessa https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4741451/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4741451/)

MLPA-näytetaulukko ja pipetointijärjestys sekvensointiin

Tekijä: Rora

MLPA

Pvm: 5.10.2016

A1	CMT NORM1
B1	CMT NORM2
C1	CMT NORM3
D1	CMT H2O
E1	CMT NORM1
F1	IKBKG DN07-913
G1	CMT NORM2
H1	IKBKG DN12-498
A-H2	
A3	CMT NORM3
B3	IKBKG DN08-1206
C3	IKBKG DN15-1096
D3	IKBKG DN13-482
E3	IKBKG DN13-256
F3	IKBKG DN08-465
G3	IKBKG DN03-584
H3	IKBKG NORM 4
A-H4	
A5	IKBKG DN15-566
B5	IKBKG NORM5
C5	IKBKG DN14-1058
D5	IKBKG NORM6
E5	IKBKG DN15-1586
F5	IKBKG NORM7
G5	IKBKG DN15-689
H5	IKBKG NORM8
A-H6	
A7	IKBKG DN08-1201
B7	IKBKG NORM9
C7	IKBKG DN13-915
D7	IKBKG DN15-1179
E7	IKBKG DN03-979
F7	IKBKG H2O
G7	
H7	

Eristysmenetelmän värikoodit:

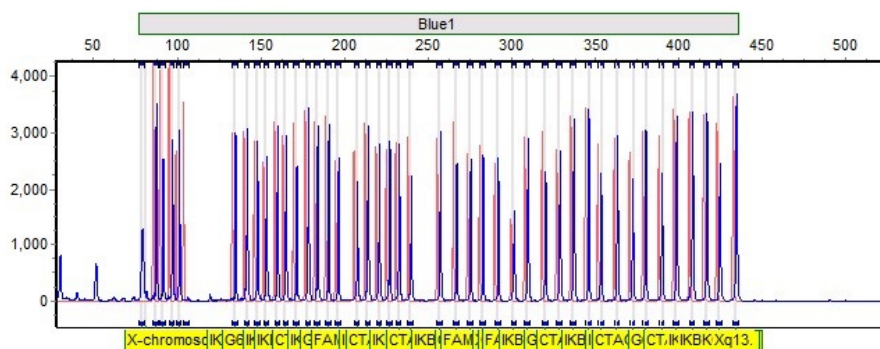
KITTI

MAXWELL

FENOLI-KLOROFORMI

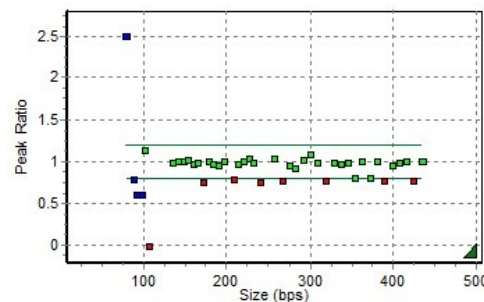
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:49	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN07-913_003.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN07-913
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

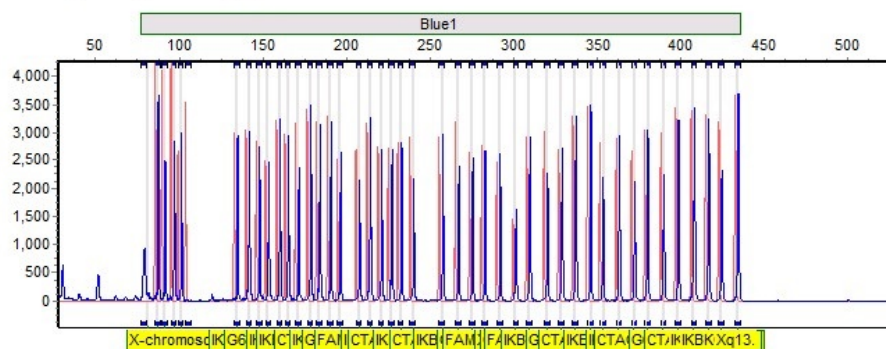


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	1.000
2	88	87.5	0.801
3	92	91.4	0.615
4	97	97.0	0.609
5	CTAG1A	147.9	1.007
6	CTAG1A up	183.8	0.979
7	CTAG1A/Bex2	232.4	0.997
8	CTAG1A down	257.0	1.039
9	CTAG1a down	380.6	1.010
10	CTAG2down.	408.4	1.000
11	CTAG2up	336.8	0.986
12	FAM223Bdown	213.9	0.981
13	FAM223Bup	309.3	0.996
14	FAM3Aex1	282.4	0.936
15	G6PD ex 13	153.3	1.038
16	G6PD ex5	196.3	1.020
17	G6PDex1	275.2	0.963
18	G6PDex2	328.4	0.990
19	G6PDex3	301.1	1.101
20	G6PDex9	390.2	0.770
21	IKKBG ex 3	164.9	0.996
22	IKKBG ex 8	171.2	0.763
23	IKKBG ex1	141.7	1.015
24	IKKBG ex10	266.7	0.776
25	IKKBG ex10.	319.7	0.771
26	IKKBG ex10..	372.7	0.819
27	IKKBG ex2	190.4	0.955
28	IKKBG ex3	220.6	1.008
29	IKKBG ex4	207.4	0.793
30	IKKBG ex5	417.0	1.006
31	IKKBG ex5.	424.8	0.775
32	IKKBG ex7	353.8	0.809
33	IKKBG ex9	239.6	0.764
34	X-chromosome	101.1	1.141
35	Xp11	159.9	0.979
36	Xp22	134.7	1.000
37	Xp22.	178.2	1.017
38	Xp22..	291.5	1.034
39	Xq13	399.0	0.963
40	Xq13.	434.6	1.010
41	Xq21	226.7	1.046
42	Xq26	346.4	0.988
43	Xq27	363.6	1.014
44	Y-chromosome	105.6	0.000

DN07-913

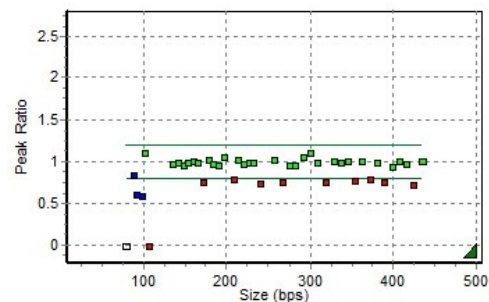
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:49	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN12-498_001.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN12-498
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

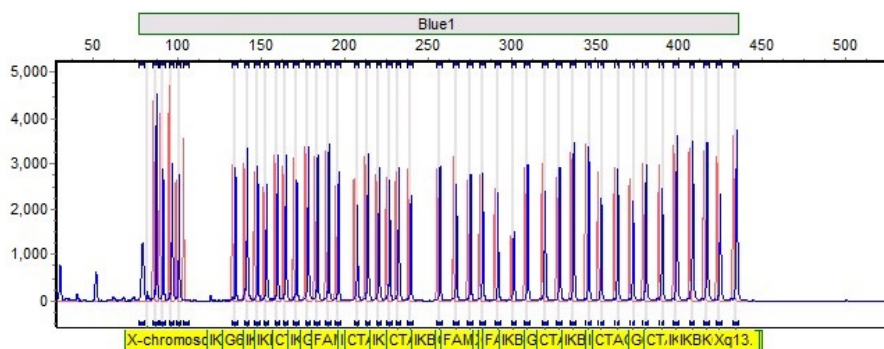


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	-1
2	88	87.5	0.837
3	92	91.4	0.605
4	97	97.0	0.597
5	CTAG1A	147.9	0.965
6	CTAG1A up	183.8	0.980
7	CTAG1A/Bex2	232.4	0.999
8	CTAG1A down	257.0	1.023
9	CTAG1a down	380.6	1.001
10	CTAG2down.	408.4	1.019
11	CTAG2up	336.8	1.002
12	FAM223Bdown	213.9	1.026
13	FAM223Bup	309.3	1.000
14	FAM3Aex1	282.4	0.965
15	G6PD ex 13	153.3	0.997
16	G6PD ex5	196.3	1.058
17	G6PDex1	275.2	0.969
18	G6PDex2	328.4	1.009
19	G6PDex3	301.1	1.109
20	G6PDex9	390.2	0.754
21	IKKBG ex 3	164.9	0.991
22	IKKBG ex 8	171.2	0.754
23	IKKBG ex1	141.7	0.992
24	IKKBG ex10	286.7	0.757
25	IKKBG ex10.	319.7	0.755
26	IKKBG ex10..	372.7	0.799
27	IKKBG ex2	190.4	0.968
28	IKKBG ex3	220.6	0.979
29	IKKBG ex4	207.4	0.797
30	IKKBG ex5	417.0	0.977
31	IKKBG ex5.	424.8	0.732
32	IKKBG ex7	353.8	0.778
33	IKKBG ex9	239.6	0.750
34	X-chromosome	101.1	1.114
35	Xp11	159.9	1.009
36	Xp22	134.7	0.976
37	Xp22.	178.2	1.023
38	Xp22..	291.5	1.064
39	Xq13	399.0	0.939
40	Xq13.	434.6	1.006
41	Xq21	226.7	0.996
42	Xq26	346.4	1.009
43	Xq27	363.6	1.010
44	Y-chromosome	105.6	0.000

DN12-498

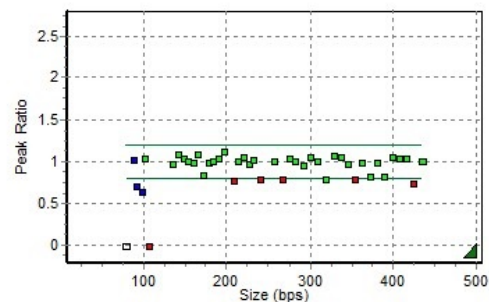
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:49	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN08-1206_015.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN08-1206
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

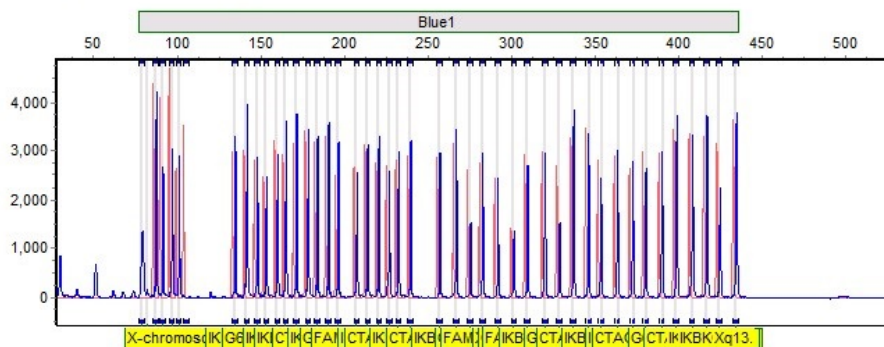


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	-1
2	88	87.5	1.033
3	92	91.4	0.703
4	97	97.0	0.639
5	CTAG1A	147.9	1.044
6	CTAG1A up	183.8	1.007
7	CTAG1A/Bex2	232.4	1.032
8	CTAG1A down	257.0	1.019
9	CTAG1a down	380.6	0.992
10	CTAG2down.	408.4	1.045
11	CTAG2up	336.8	1.057
12	FAM223Bdown	213.9	1.019
13	FAM223Bup	309.3	1.016
14	FAM3Aex1	282.4	1.013
15	G6PD ex 13	153.3	1.019
16	G6PD ex5	196.3	1.131
17	G6PDex1	275.2	1.055
18	G6PDex2	328.4	1.082
19	G6PDex3	301.1	1.056
20	G6PDex9	390.2	0.823
21	IKKBG ex 3	164.9	1.091
22	IKKBG ex 8	171.2	0.841
23	IKKBG ex1	141.7	1.102
24	IKKBG ex10	266.7	0.799
25	IKKBG ex10.	319.7	0.803
26	IKKBG ex10..	372.7	0.825
27	IKKBG ex2	190.4	1.040
28	IKKBG ex3	220.6	1.056
29	IKKBG ex4	207.4	0.779
30	IKKBG ex5	417.0	1.051
31	IKKBG ex5.	424.8	0.742
32	IKKBG ex7	353.8	0.796
33	IKKBG ex9	239.6	0.791
34	X-chromosome	101.1	1.040
35	Xp11	159.9	1.000
36	Xp22	134.7	0.978
37	Xp22.	178.2	1.000
38	Xp22..	291.5	0.955
39	Xq13	399.0	1.060
40	Xq13.	434.6	1.020
41	Xq21	226.7	0.974
42	Xq26	346.4	0.984
43	Xq27	363.6	0.997
44	Y-chromosome	105.6	0.000

DN08-1206

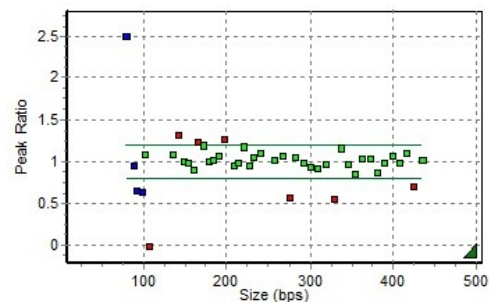
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:49	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN15-1096_014.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN15-1096
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

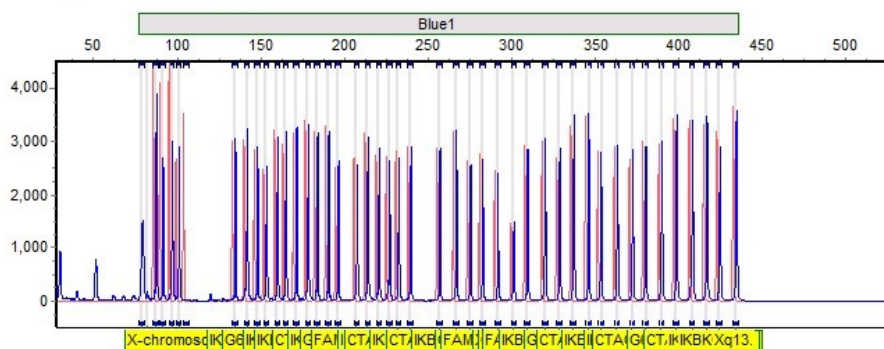


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	1.000
2	88	87.5	0.961
3	92	91.4	0.655
4	97	97.0	0.645
5	CTAG1A	147.9	1.017
6	CTAG1A up	183.8	1.038
7	CTAG1A/Bex2	232.4	1.064
8	CTAG1A down	257.0	1.024
9	CTAG1a down	380.6	0.884
10	CTAG2down.	408.4	0.990
11	CTAG2up	336.8	1.168
12	FAM223Bdown	213.9	0.991
13	FAM223Bup	309.3	0.922
14	FAM3Aex1	282.4	1.071
15	G6PD ex 13	153.3	0.993
16	G6PD ex5	196.3	1.260
17	G6PDex1	275.2	0.579
18	G6PDex2	328.4	0.563
19	G6PDex3	301.1	0.954
20	G6PDex9	390.2	1.005
21	IKKBG ex 3	164.9	1.229
22	IKKBG ex 8	171.2	1.192
23	IKKBG ex1	141.7	1.315
24	IKKBG ex10	286.7	1.079
25	IKKBG ex10.	319.7	0.985
26	IKKBG ex10..	372.7	1.052
27	IKKBG ex2	190.4	1.087
28	IKKBG ex3	220.6	1.187
29	IKKBG ex4	207.4	0.959
30	IKKBG ex5	417.0	1.122
31	IKKBG ex5.	424.8	0.711
32	IKKBG ex7	353.8	0.869
33	IKKBG ex9	239.6	1.109
34	X-chromosome	101.1	1.098
35	Xp11	159.9	0.919
36	Xp22	134.7	1.101
37	Xp22.	178.2	1.013
38	Xp22..	291.5	0.999
39	Xq13	399.0	1.088
40	Xq13.	434.6	1.035
41	Xq21	226.7	0.958
42	Xq26	346.4	0.982
43	Xq27	363.6	1.042
44	Y-chromosome	105.6	0.000

DN15-1096

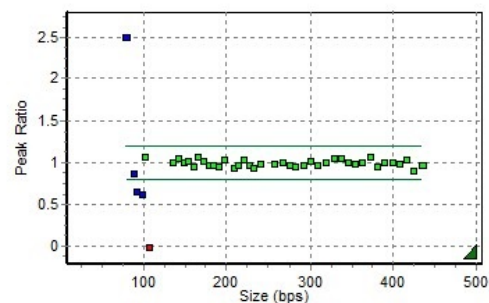
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:49	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN13-482_013.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN13-482
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

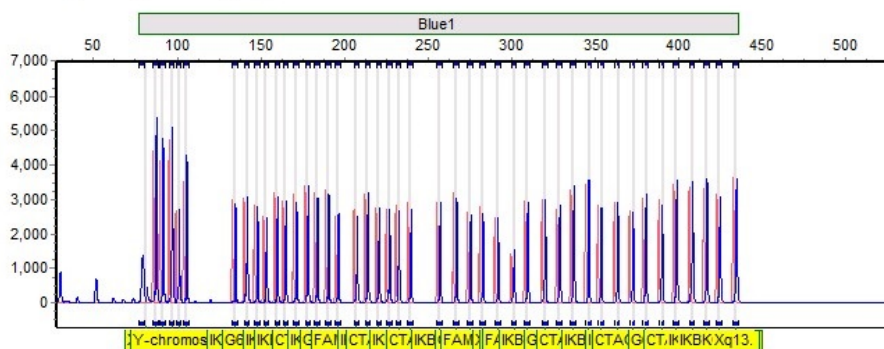


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	1.000
2	88	87.5	0.886
3	92	91.4	0.653
4	97	97.0	0.634
5	CTAG1A	147.9	1.020
6	CTAG1A up	183.8	0.987
7	CTAG1A/Bex2	232.4	0.949
8	CTAG1A down	257.0	0.993
9	CTAG1a down	380.6	0.961
10	CTAG2down.	408.4	1.000
11	CTAG2up	336.8	1.067
12	FAM223Bdown	213.9	0.972
13	FAM223Bup	309.3	0.977
14	FAM3Aex1	282.4	0.956
15	G6PD ex 13	153.3	1.022
16	G6PD ex5	196.3	1.049
17	G6PDex1	275.2	0.975
18	G6PDex2	328.4	1.065
19	G6PDex3	301.1	1.023
20	G6PDex9	390.2	1.017
21	IKKBG ex 3	164.9	1.079
22	IKKBG ex 8	171.2	1.034
23	IKKBG ex1	141.7	1.066
24	IKKBG ex10	266.7	1.007
25	IKKBG ex10.	319.7	1.017
26	IKKBG ex10..	372.7	1.076
27	IKKBG ex2	190.4	0.967
28	IKKBG ex3	220.6	1.046
29	IKKBG ex4	207.4	0.950
30	IKKBG ex5	417.0	1.050
31	IKKBG ex5.	424.8	0.919
32	IKKBG ex7	353.8	0.990
33	IKKBG ex9	239.6	0.997
34	X-chromosome	101.1	1.083
35	Xp11	159.9	0.962
36	Xp22	134.7	1.019
37	Xp22.	178.2	0.975
38	Xp22..	291.5	0.979
39	Xq13	399.0	1.020
40	Xq13.	434.6	0.981
41	Xq21	226.7	0.978
42	Xq26	346.4	1.019
43	Xq27	363.6	1.010
44	Y-chromosome	105.6	0.000

DN13-482

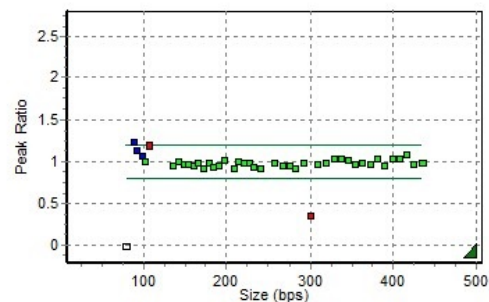
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:49	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN03-584_010.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN03-584
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

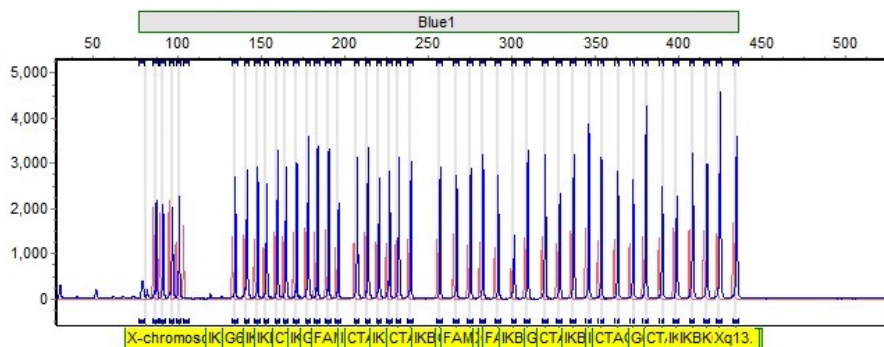


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	-1
2	88	87.5	1.227
3	92	91.4	1.155
4	97	97.0	1.074
5	CTAG1A	147.9	0.987
6	CTAG1A up	183.8	0.952
7	CTAG1A/Bex2	232.4	0.943
8	CTAG1A down	257.0	1.002
9	CTAG1a down	380.6	1.048
10	CTAG2down.	408.4	1.046
11	CTAG2up	336.8	1.039
12	FAM223Bdown	213.9	1.008
13	FAM223Bup	309.3	0.986
14	FAM3Aex1	282.4	0.936
15	G6PD ex 13	153.3	0.988
16	G6PD ex5	196.3	1.028
17	G6PDex1	275.2	0.968
18	G6PDex2	328.4	1.045
19	G6PDex3	301.1	0.362
20	G6PDex9	390.2	0.955
21	IKKBG ex 3	164.9	0.998
22	IKKBG ex 8	171.2	0.926
23	IKKBG ex1	141.7	1.017
24	IKKBG ex10	286.7	0.957
25	IKKBG ex10.	319.7	0.998
26	IKKBG ex10..	372.7	0.978
27	IKKBG ex2	190.4	0.955
28	IKKBG ex3	220.6	0.997
29	IKKBG ex4	207.4	0.930
30	IKKBG ex5	417.0	1.091
31	IKKBG ex5.	424.8	0.975
32	IKKBG ex7	353.8	0.973
33	IKKBG ex9	239.6	0.931
34	X-chromosome	101.1	1.019
35	Xp11	159.9	0.968
36	Xp22	134.7	0.958
37	Xp22.	178.2	1.000
38	Xp22..	291.5	1.003
39	Xq13	399.0	1.042
40	Xq13.	434.6	0.989
41	Xq21	226.7	0.992
42	Xq26	346.4	1.032
43	Xq27	363.6	1.001
44	Y-chromosome	105.6	1.207

DN03-584

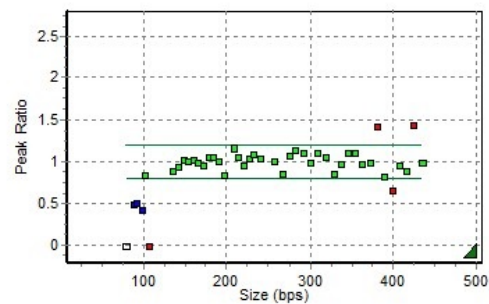
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:50	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_-M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_-M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_-M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_-F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_-F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_-F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN15-566_-M_024.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN15-566_-M
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

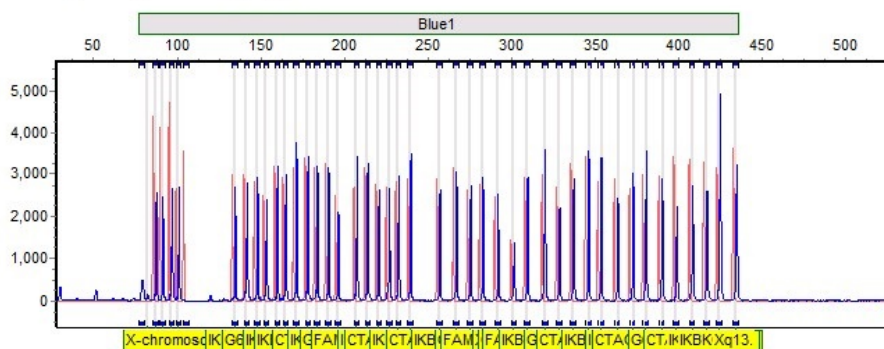


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	-1
2	88	87.5	0.494
3	92	91.4	0.506
4	97	97.0	0.428
5	CTAG1A	147.9	1.036
6	CTAG1A up	183.8	1.064
7	CTAG1A/Bex2	232.4	1.105
8	CTAG1A down	257.0	1.012
9	CTAG1a down	380.6	1.416
10	CTAG2down.	408.4	0.962
11	CTAG2up	336.8	0.978
12	FAM223Bdown	213.9	1.061
13	FAM223Bup	309.3	1.121
14	FAM3Aex1	282.4	1.146
15	G6PD ex 13	153.3	1.017
16	G6PD ex5	196.3	0.839
17	G6PDex1	275.2	1.089
18	G6PDex2	328.4	0.856
19	G6PDex3	301.1	0.989
20	G6PDex9	390.2	0.833
21	IKKBG ex 3	164.9	0.990
22	IKKBG ex 8	171.2	0.958
23	IKKBG ex1	141.7	0.942
24	IKKBG ex10	266.7	0.858
25	IKKBG ex10.	319.7	1.059
26	IKKBG ex10..	372.7	0.992
27	IKKBG ex2	190.4	1.014
28	IKKBG ex3	220.6	0.964
29	IKKBG ex4	207.4	1.168
30	IKKBG ex5	417.0	0.898
31	IKKBG ex5.	424.8	1.438
32	IKKBG ex7	353.8	1.110
33	IKKBG ex9	239.6	1.043
34	X-chromosome	101.1	0.845
35	Xp11	159.9	1.030
36	Xp22	134.7	0.903
37	Xp22.	178.2	1.056
38	Xp22..	291.5	1.112
39	Xq13	399.0	0.660
40	Xq13.	434.6	0.989
41	Xq21	226.7	1.039
42	Xq26	346.4	1.116
43	Xq27	363.6	0.972
44	Y-chromosome	105.6	0.000

DN15-566

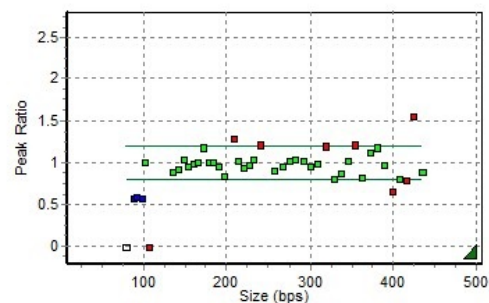
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:49	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_-M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_-M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_-M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_-F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_-F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_-F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN14-1058_SE_022.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN14-1058_-M
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

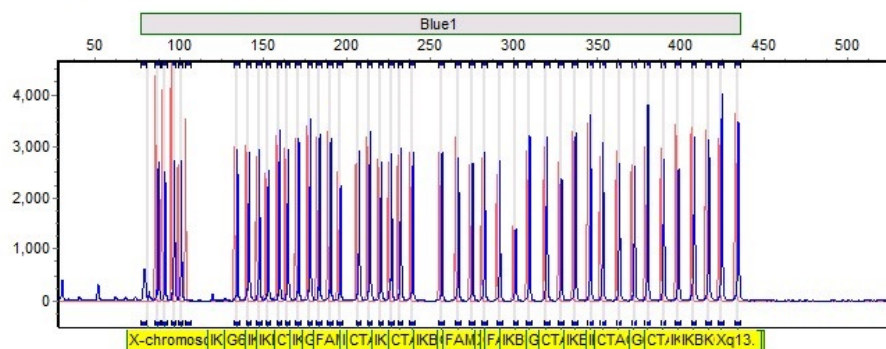


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	-1
2	88	87.5	0.583
3	92	91.4	0.599
4	97	97.0	0.568
5	CTAG1A	147.9	1.044
6	CTAG1A up	183.8	1.006
7	CTAG1A/Bex2	232.4	1.051
8	CTAG1A down	257.0	0.913
9	CTAG1a down	380.6	1.190
10	CTAG2down.	408.4	0.808
11	CTAG2up	336.8	0.887
12	FAM223Bdown	213.9	1.038
13	FAM223Bup	309.3	1.001
14	FAM3Aex1	282.4	1.051
15	G6PD ex 13	153.3	0.963
16	G6PD ex5	196.3	0.837
17	G6PDex1	275.2	1.032
18	G6PDex2	328.4	0.807
19	G6PDex3	301.1	0.959
20	G6PDex9	390.2	0.977
21	IKKBG ex 3	164.9	1.018
22	IKKBG ex 8	171.2	1.186
23	IKKBG ex1	141.7	0.931
24	IKKBG ex10	266.7	0.964
25	IKKBG ex10.	319.7	1.204
26	IKKBG ex10..	372.7	1.138
27	IKKBG ex2	190.4	0.967
28	IKKBG ex3	220.6	0.952
29	IKKBG ex4	207.4	1.283
30	IKKBG ex5	417.0	0.788
31	IKKBG ex5.	424.8	1.546
32	IKKBG ex7	353.8	1.212
33	IKKBG ex9	239.6	1.210
34	X-chromosome	101.1	1.015
35	Xp11	159.9	1.002
36	Xp22	134.7	0.900
37	Xp22.	178.2	1.009
38	Xp22..	291.5	1.029
39	Xq13	399.0	0.656
40	Xq13.	434.6	0.892
41	Xq21	226.7	0.978
42	Xq26	346.4	1.037
43	Xq27	363.6	0.836
44	Y-chromosome	105.6	0.000

DN14-1058

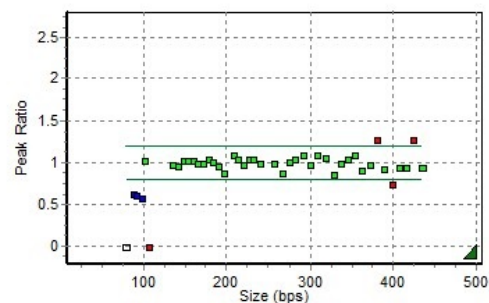
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:50	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_-M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_-M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_-M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_-F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_-F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_-F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN15-1586_-M_020.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN15-1586_-M
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

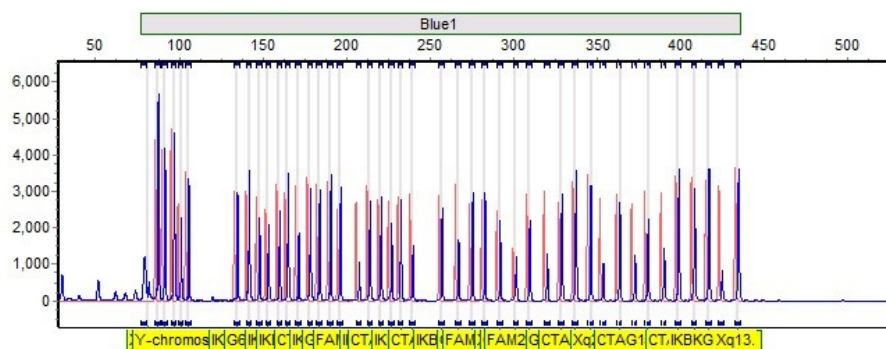


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	-1
2	88	87.5	0.620
3	92	91.4	0.612
4	97	97.0	0.579
5	CTAG1A	147.9	1.034
6	CTAG1A up	183.8	1.016
7	CTAG1A/Bex2	232.4	1.049
8	CTAG1A down	257.0	1.004
9	CTAG1a down	380.6	1.263
10	CTAG2down.	408.4	0.945
11	CTAG2up	336.8	0.992
12	FAM223Bdown	213.9	1.042
13	FAM223Bup	309.3	1.098
14	FAM3Aex1	282.4	1.045
15	G6PD ex 13	153.3	1.022
16	G6PD ex5	196.3	0.887
17	G6PDex1	275.2	1.017
18	G6PDex2	328.4	0.869
19	G6PDex3	301.1	0.978
20	G6PDex9	390.2	0.930
21	IKKBG ex 3	164.9	0.990
22	IKKBG ex 8	171.2	0.998
23	IKKBG ex1	141.7	0.964
24	IKKBG ex10	266.7	0.873
25	IKKBG ex10.	319.7	1.061
26	IKKBG ex10..	372.7	0.982
27	IKKBG ex2	190.4	0.961
28	IKKBG ex3	220.6	0.977
29	IKKBG ex4	207.4	1.092
30	IKKBG ex5	417.0	0.949
31	IKKBG ex5.	424.8	1.265
32	IKKBG ex7	353.8	1.091
33	IKKBG ex9	239.6	1.002
34	X-chromosome	101.1	1.028
35	Xp11	159.9	1.034
36	Xp22	134.7	0.981
37	Xp22.	178.2	1.043
38	Xp22..	291.5	1.105
39	Xq13	399.0	0.744
40	Xq13.	434.6	0.953
41	Xq21	226.7	1.054
42	Xq26	346.4	1.044
43	Xq27	363.6	0.920
44	Y-chromosome	105.6	0.000

DN15-1586

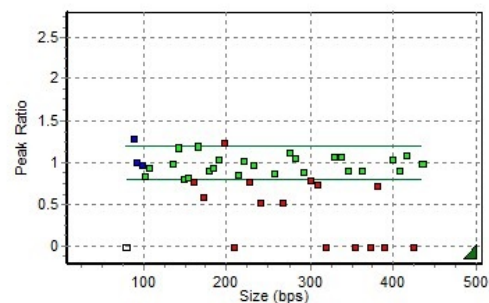
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:50	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_-M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_-M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_-M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_-F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_-F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_-F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN15-689_-F_018.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN15-689_-F
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

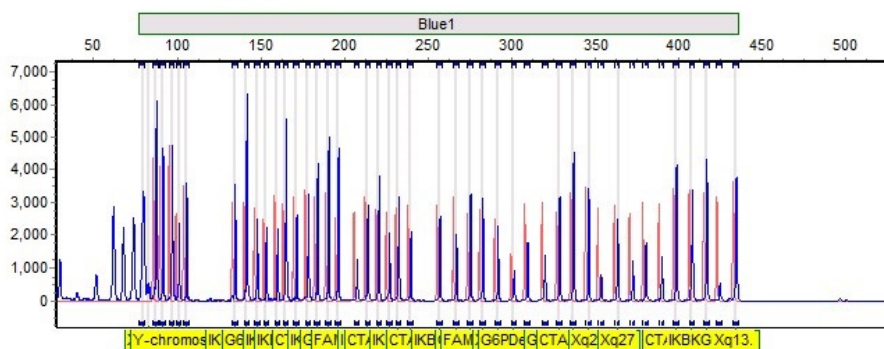


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	-1
2	88	87.5	1.291
3	92	91.4	1.012
4	97	97.0	0.977
5	CTAG1A	147.9	0.807
6	CTAG1A up	183.8	0.953
7	CTAG1A/Bex2	232.4	0.974
8	CTAG1A down	257.0	0.874
9	CTAG1a down	380.6	0.735
10	CTAG2down.	408.4	0.918
11	CTAG2up	336.8	1.089
12	FAM223Bdown	213.9	0.863
13	FAM223Bup	309.3	0.750
14	FAM3Aex1	282.4	1.069
15	G6PD ex 13	153.3	0.834
16	G6PD ex5	196.3	1.241
17	G6PDex1	275.2	1.128
18	G6PDex2	328.4	1.080
19	G6PDex3	301.1	0.787
20	G6PDex9	390.2	0.000
21	IKKBG ex 3	164.9	1.192
22	IKKBG ex 8	171.2	0.588
23	IKKBG ex1	141.7	1.184
24	IKKBG ex10	266.7	0.529
25	IKKBG ex10.	319.7	0.000
26	IKKBG ex10..	372.7	0.000
27	IKKBG ex2	190.4	1.053
28	IKKBG ex3	220.6	1.037
29	IKKBG ex4	207.4	0.000
30	IKKBG ex5	417.0	1.092
31	IKKBG ex5.	424.8	0.000
32	IKKBG ex7	353.8	0.000
33	IKKBG ex9	239.6	0.532
34	X-chromosome	101.1	0.844
35	Xp11	159.9	0.772
36	Xp22	134.7	0.993
37	Xp22.	178.2	0.908
38	Xp22..	291.5	0.895
39	Xq13	399.0	1.053
40	Xq13.	434.6	0.989
41	Xq21	226.7	0.773
42	Xq26	346.4	0.916
43	Xq27	363.6	0.920
44	Y-chromosome	105.6	0.946

DN15-689

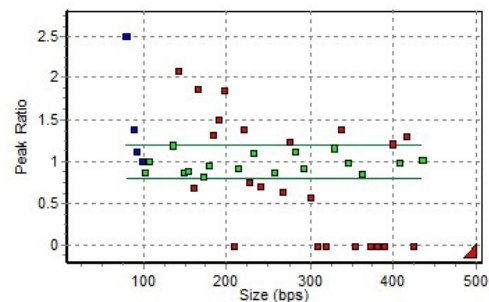
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:49	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_-M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_-M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_-M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_-F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_-F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_-F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN08-1201_-F_032.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN08-1201_-F
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

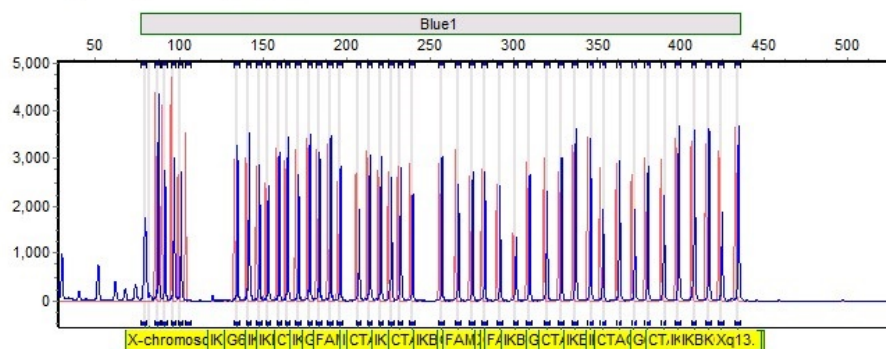


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	1.000
2	88	87.5	1.389
3	92	91.4	1.129
4	97	97.0	1.005
5	CTAG1A	147.9	0.877
6	CTAG1A up	183.8	1.325
7	CTAG1A/Bex2	232.4	1.119
8	CTAG1A down	257.0	0.887
9	CTAG1a down	380.6	0.000
10	CTAG2down.	408.4	0.999
11	CTAG2up	336.8	1.382
12	FAM223Bdown	213.9	0.922
13	FAM223Bup	309.3	0.000
14	FAM3Aex1	282.4	1.126
15	G6PD ex 13	153.3	0.889
16	G6PD ex5	196.3	1.862
17	G6PDex1	275.2	1.237
18	G6PDex2	328.4	1.170
19	G6PDex3	301.1	0.579
20	G6PDex9	390.2	0.000
21	IKKBG ex 3	164.9	1.879
22	IKKBG ex 8	171.2	0.823
23	IKKBG ex1	141.7	2.086
24	IKKBG ex10	266.7	0.647
25	IKKBG ex10.	319.7	0.000
26	IKKBG ex10..	372.7	0.000
27	IKKBG ex2	190.4	1.509
28	IKKBG ex3	220.6	1.385
29	IKKBG ex4	207.4	0.000
30	IKKBG ex5	417.0	1.308
31	IKKBG ex5.	424.8	0.000
32	IKKBG ex7	353.8	0.000
33	IKKBG ex9	239.6	0.715
34	X-chromosome	101.1	0.886
35	Xp11	159.9	0.689
36	Xp22	134.7	1.194
37	Xp22.	178.2	0.960
38	Xp22..	291.5	0.926
39	Xq13	399.0	1.209
40	Xq13.	434.6	1.036
41	Xq21	226.7	0.758
42	Xq26	346.4	0.988
43	Xq27	363.6	0.856
44	Y-chromosome	105.6	1.016

DN08-1201

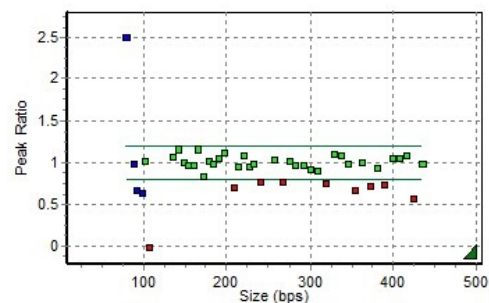
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:49	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN13-915_F_030.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN13-915_F
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

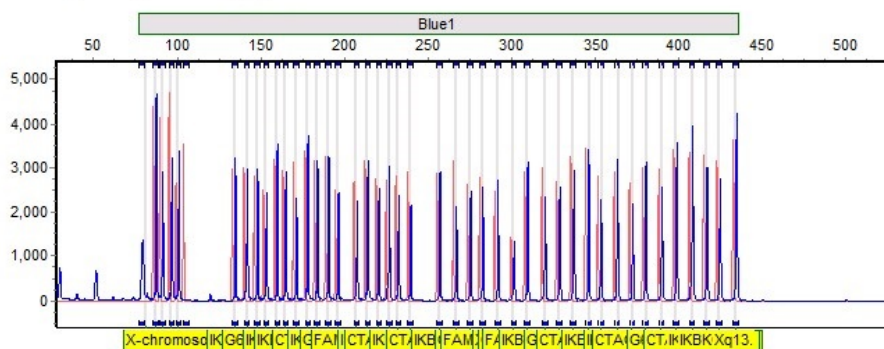


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	1.000
2	88	87.5	0.992
3	92	91.4	0.672
4	97	97.0	0.642
5	CTAG1A	147.9	1.017
6	CTAG1A up	183.8	0.989
7	CTAG1A/Bex2	232.4	0.992
8	CTAG1A down	257.0	1.055
9	CTAG1a down	380.6	0.939
10	CTAG2down.	408.4	1.059
11	CTAG2up	336.8	1.104
12	FAM223Bdown	213.9	0.971
13	FAM223Bup	309.3	0.904
14	FAM3Aex1	282.4	0.973
15	G6PD ex 13	153.3	0.975
16	G6PD ex5	196.3	1.125
17	G6PDex1	275.2	1.029
18	G6PDex2	328.4	1.111
19	G6PDex3	301.1	0.925
20	G6PDex9	390.2	0.745
21	IKKBG ex 3	164.9	1.164
22	IKKBG ex 8	171.2	0.839
23	IKKBG ex1	141.7	1.171
24	IKKBG ex10	286.7	0.773
25	IKKBG ex10.	319.7	0.762
26	IKKBG ex10..	372.7	0.724
27	IKKBG ex2	190.4	1.056
28	IKKBG ex3	220.6	1.102
29	IKKBG ex4	207.4	0.709
30	IKKBG ex5	417.0	1.089
31	IKKBG ex5.	424.8	0.581
32	IKKBG ex7	353.8	0.678
33	IKKBG ex9	239.6	0.774
34	X-chromosome	101.1	1.025
35	Xp11	159.9	0.986
36	Xp22	134.7	1.086
37	Xp22.	178.2	1.027
38	Xp22..	291.5	0.984
39	Xq13	399.0	1.070
40	Xq13.	434.6	1.004
41	Xq21	226.7	0.957
42	Xq26	346.4	0.992
43	Xq27	363.6	1.011
44	Y-chromosome	105.6	0.000

DN13-915

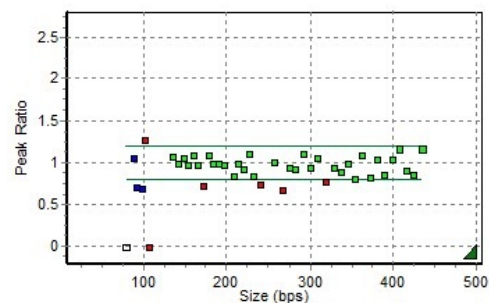
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:50	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN15-1179_F_029.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN15-1179_F
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

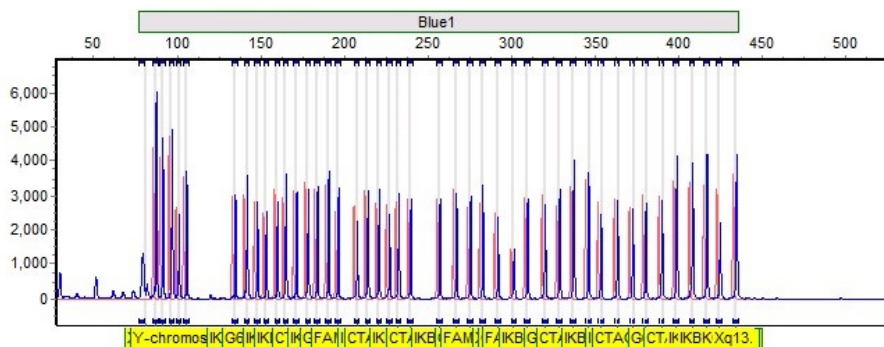


	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	-1
2	88	87.5	1.064
3	92	91.4	0.713
4	97	97.0	0.687
5	CTAG1A	147.9	1.056
6	CTAG1A up	183.8	0.994
7	CTAG1A/Bex2	232.4	0.843
8	CTAG1A down	257.0	1.011
9	CTAG1a down	380.6	1.041
10	CTAG2down.	408.4	1.167
11	CTAG2up	336.8	0.898
12	FAM223Bdown	213.9	1.000
13	FAM223Bup	309.3	1.070
14	FAM3Aex1	282.4	0.924
15	G6PD ex 13	153.3	0.981
16	G6PD ex5	196.3	0.977
17	G6PDex1	275.2	0.940
18	G6PDex2	328.4	0.948
19	G6PDex3	301.1	0.940
20	G6PDex9	390.2	0.860
21	IKKBG ex 3	164.9	0.987
22	IKKBG ex 8	171.2	0.734
23	IKKBG ex1	141.7	0.989
24	IKKBG ex10	266.7	0.670
25	IKKBG ex10.	319.7	0.781
26	IKKBG ex10..	372.7	0.823
27	IKKBG ex2	190.4	0.998
28	IKKBG ex3	220.6	0.924
29	IKKBG ex4	207.4	0.841
30	IKKBG ex5	417.0	0.912
31	IKKBG ex5.	424.8	0.868
32	IKKBG ex7	353.8	0.806
33	IKKBG ex9	239.6	0.741
34	X-chromosome	101.1	1.264
35	Xp11	159.9	1.106
36	Xp22	134.7	1.086
37	Xp22.	178.2	1.094
38	Xp22..	291.5	1.108
39	Xq13	399.0	1.044
40	Xq13.	434.6	1.160
41	Xq21	226.7	1.117
42	Xq26	346.4	0.988
43	Xq27	363.6	1.106
44	Y-chromosome	105.6	0.000

DN15-1179

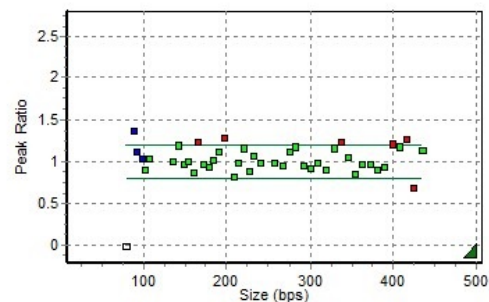
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: Genemarker V2.6.7	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization
Report Time: 10/10/2016 - 14:24:49	Quantification By: Peak Height
Panel: IP_200916	Classification: Loss < 0.80 <= Equivalent <= 1.20 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Height Ratio
Synthetic Used: 2016-10-06_IKKBG_NORM1_004.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM2_002.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM3_016.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM4_M_009.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM5_M_023.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM6_M_021.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM7_F_019.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM8_F_017.2.fsa /// 2016-10-06_IKKBG_NORM9_F_031.2.fsa	

2016-10-06_IKKBG_DN03-979_F_028.2.fsa



Sample Name: IKKBG_DN03-979_F
 Machine: 1522-034-1522-034
 Run Time: 10/06/2016 - 13:08:57 -> 10/06/2016 - 13:40:41

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



	Probe Name	Bin Size	Height Ratio
1	82	79.3	-1
2	88	87.5	1.369
3	92	91.4	1.129
4	97	97.0	1.044
5	CTAG1A	147.9	0.988
6	CTAG1A up	183.8	1.026
7	CTAG1A/Bex2	232.4	1.079
8	CTAG1A down	257.0	1.004
9	CTAG1a down	380.6	0.914
10	CTAG2down.	408.4	1.177
11	CTAG2up	336.8	1.235
12	FAM223Bdown	213.9	1.000
13	FAM223Bup	309.3	0.990
14	FAM3Aex1	282.4	1.184
15	G6PD ex 13	153.3	1.006
16	G6PD ex5	196.3	1.287
17	G6PDex1	275.2	1.129
18	G6PDex2	328.4	1.168
19	G6PDex3	301.1	0.928
20	G6PDex9	390.2	0.953
21	IKKBG ex 3	164.9	1.231
22	IKKBG ex 8	171.2	0.981
23	IKKBG ex1	141.7	1.193
24	IKKBG ex10	286.7	0.962
25	IKKBG ex10.	319.7	0.906
26	IKKBG ex10..	372.7	0.978
27	IKKBG ex2	190.4	1.129
28	IKKBG ex3	220.6	1.158
29	IKKBG ex4	207.4	0.830
30	IKKBG ex5	417.0	1.267
31	IKKBG ex5.	424.8	0.690
32	IKKBG ex7	353.8	0.860
33	IKKBG ex9	239.6	0.995
34	X-chromosome	101.1	0.914
35	Xp11	159.9	0.885
36	Xp22	134.7	1.008
37	Xp22.	178.2	0.942
38	Xp22..	291.5	0.960
39	Xq13	399.0	1.213
40	Xq13.	434.6	1.149
41	Xq21	226.7	0.894
42	Xq26	346.4	1.062
43	Xq27	363.6	0.974
44	Y-chromosome	105.6	1.051

DN03-979