

## Appendix A:

DNA concentration of scale samples as measured by using a Nanodrop (Reading 1 – 3) and the mean DNA concentration. Sample ID shows the protocol used (where T = TNES-phenol/chloroform, A = Amniocyte-phenol/chloroform and K = Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits), experimental repeat (T1-T3), scale number (S1-S6) and region (xx-xx.1 – xx-xx.3). Eg. **T1-S1.1 = TNES-phenol/chloroform DNA extraction, experimental repeat 1, scale 1 and region 1.** If xx-xx.1 – xx-xx.3 is absent = whole scale was used as part of the extraction.

Sample ID	Temp	DNA concentration				Sample ID	Temp	DNA concentration			
		R1 ng/ul	R2 ng/ul	R3 ng/ul	Mean ng/ul			R1 ng/ul	R2 ng/ul	R3 ng/ul	Mean ng/ul
T1-S1.1	42 °C	8,8	7,9	8,1	8,27	A1-S6	42 °C	62,6	54,2	53,4	56,73
T1-S1.2	42 °C	8,9	6,2	6,2	7,1	A2-S1	42 °C	26,7	26,9	25,8	26,47
T1-S1.3	42 °C	9,4	8,5	10	9,3	A2-S2	42 °C	31,8	31	31,6	31,47
T1-S2.1	42 °C	25,1	24,7	23	24,27	A2-S3	42 °C	18,2	16,8	17,4	17,47
T1-S2.2	42 °C	9,5	10,4	9,1	9,67	A2-S4	42 °C	53,7	55,3	52,9	53,97
T1-S2.3	42 °C	20	22,9	24,1	22,33	A2-S5	42 °C	64,2	62,6	60,4	62,4
T1-S3.1	42 °C	42,1	42,5	43,4	42,67	A2-S6	42 °C	15,5	16,2	18,8	16,83
T1-S3.2	42 °C	11,9	11,5	12,8	12,07	A3-S1	42 °C	59,8	61,3	54,5	58,53
T1-S3.3	42 °C	5,5	5,7	5,8	5,67	A3-S2	42 °C	62,4	63,1	63,6	63,03
T1-S4.1	42 °C	10	9,2	9	9,4	A3-S3	42 °C	25,1	25,4	20,9	23,8
T1-S4.2	42 °C	7,3	7,6	7,4	7,43	A3-S4	42 °C	23,1	22,8	34	26,63
T1-S4.3	42 °C	14,7	12,6	13,6	13,63	A3-S5	42 °C	44,7	45,4	43,6	44,57
T1-S5.1	42 °C	61,5	57,9	59,1	59,5	A3-S6	42 °C	37,2	36,4	37,2	36,93
T1-S5.2	42 °C	13,8	13,3	13,5	13,53	A1-S1	56 °C	26,3	26,3	24	25,53
T1-S5.3	42 °C	38	38,9	39,1	38,67	A1-S2	56 °C	4,7	2,2	6,3	4,40
T1-S6.1	42 °C	29,9	28,4	28,7	29	A1-S3	56 °C	15,5	15,4	15,3	15,40
T1-S6.2	42 °C	11,6	10,6	10,8	11	A1-S4	56 °C	7,8	7	7,8	7,53
T1-S6.3	42 °C	9,7	9,7	10,1	9,83	A1-S5	56 °C	9,4	9,7	9,9	9,67
T2-S1.1	42 °C	35,8	37,2	38,2	37,07	A1-S6	56 °C	24,5	24,2	24,7	24,47
T2-S1.2	42 °C	14,7	14,6	14,5	14,6	A2-S1	56 °C	3,5	3,4	3,6	3,50
T2-S1.3	42 °C	29,7	31	30,6	30,43	A2-S2	56 °C	11	11,1	11,4	11,17
T2-S2.1	42 °C	22,9	25,7	24,3	24,3	A2-S3	56 °C	5,3	5	5,5	5,27
T2-S2.2	42 °C	21,7	21,4	22,4	21,83	A2-S4	56 °C	9,4	9,1	9,6	9,37
T2-S2.3	42 °C	34	34,8	34,1	34,3	A2-S5	56 °C	8,6	8,2	8,4	8,40

T2-S3.1	42 °C	57,1	53,1	56,7	55,63	A2-S6	56 °C	7,4	7,5	7,5	7,47
T2-S3.2	42 °C	38,6	39,9	40	39,5	A3-S1	56 °C	7,5	7,3	7,3	7,37
T2-S3.3	42 °C	34,3	35,8	36,1	35,4	A3-S2	56 °C	8,5	8,3	8,4	8,40
T2-S4.1	42 °C	31,1	31,9	29,8	30,93	A3-S3	56 °C	5,9	5,8	6,3	6,00
T2-S4.2	42 °C	20,9	21,1	23,9	21,97	A3-S4	56 °C	36,3	36,5	36,4	36,40
T2-S4.3	42 °C	27,2	26,6	30	27,93	A3-S5	56 °C	16,5	16,6	17,4	16,83
T2-S5.1	42 °C	21,7	19,4	18,9	20	A3-S6	56 °C	15,9	16,4	15,9	16,07
T2-S5.2	42 °C	19,6	20,1	20,5	20,07	K1-S1	42 °C	38,9	37,4	35,1	37,13
T2-S5.3	42 °C	30,5	31,6	30,8	30,97	K1-S2	42 °C	41,3	38,8	38,7	39,6
T2-S6.1	42 °C	40,1	41,6	41	40,9	K1-S3	42 °C	18,7	18,1	18,8	18,53
T2-S6.2	42 °C	21,4	21,1	21	21,17	K1-S4	42 °C	40,5	37	36,6	38,03
T2-S6.3	42 °C	35,2	37,3	34,9	35,8	K1-S5	42 °C	39,4	39	44,5	40,97
T3-S1.1	42 °C	18,6	18,9	18,5	18,67	K1-S6	42 °C	36,3	34,3	36,4	35,67
T3-S1.2	42 °C	14	13,5	13,4	13,63	K2-S1	42 °C	21,5	17,5	20,4	19,8
T3-S1.3	42 °C	16,5	16,6	16,5	16,53	K2-S2	42 °C	36,7	34,2	31,7	34,2
T3-S2.1	42 °C	61,9	61	63,4	62,1	K2-S3	42 °C	30	28,1	28,1	28,73
T3-S2.2	42 °C	18,5	18,7	18,9	18,7	K2-S4	42 °C	32,9	28,9	28,6	30,13
T3-S2.3	42 °C	26,6	26,8	25,7	26,37	K2-S5	42 °C	30,5	29,7	27,8	29,33
T3-S3.1	42 °C	25,1	24,4	24,6	24,7	K2-S6	42 °C	32,7	30,1	29,6	30,8
T3-S3.2	42 °C	38,4	38,5	37,8	38,23	K3-S1	42 °C	28,4	26,8	25,4	26,87
T3-S3.3	42 °C	20,7	20,9	21,1	20,9	K3-S2	42 °C	24,1	23,6	23,1	23,6
T3-S4.1	42 °C	12,9	12,1	11,9	12,3	K3-S3	42 °C	27,3	28,5	29	28,27
T3-S4.2	42 °C	20,5	21,3	19,9	20,57	K3-S4	42 °C	24,7	23,5	22,4	23,53
T3-S4.3	42 °C	26,6	26,1	26,1	26,27	K3-S5	42 °C	26	24,2	22	24,07
T3-S5.1	42 °C	39,6	38	37	38,2	K3-S6	42 °C	24,5	26,7	22,9	24,7
T3-S5.2	42 °C	15,6	15,2	15,4	15,4	K1-S1	56 °C (2 hrs)	53,2	53,5	55,6	54,1
T3-S5.3	42 °C	12,9	12,7	12,6	12,73	K1-S2	56 °C (2 hrs)	52,6	49,4	48,4	50,13
T3-S6.1	42 °C	43,1	41,4	42	42,17	K1-S3	56 °C (2 hrs)	58,6	56,9	54	56,5
T3-S6.2	42 °C	14	14	13,6	13,87	K1-S4	56 °C (2 hrs)	54,1	53,9	55,2	54,4
T3-S6.3	42 °C	40,1	37	40	39,03	K1-S5	56 °C (2 hrs)	44,3	42,3	43,5	43,37
T1-S1	42 °C	98,5	98,4	96,6	97,83	K1-S6	56 °C (2 hrs)	53	50,7	51	51,57
T1-S2	42 °C	102,3	93,2	94,1	96,53	K2-S1	56 °C (2 hrs)	27,5	26,2	26,8	26,83
T1-S3	42 °C	57,5	58,5	61,5	59,17	K2-S2	56 °C (2 hrs)	39,8	41,3	41,5	40,87
T1-S4	42 °C	81,6	83,6	81,3	82,17	K2-S3	56 °C (2 hrs)	42,5	38,7	40,6	40,6
T1-S5	42 °C	72	73,4	72,7	72,7	K2-S4	56 °C (2 hrs)	45,3	42,5	43,4	43,73
T1-S6	42 °C	21,4	21	24,4	22,27	K2-S5	56 °C (2 hrs)	37,5	37,5	33,7	36,23
T2-S1	42 °C	66,8	78,6	61,9	69,1	K2-S6	56 °C (2 hrs)	35,2	32,5	33,1	33,6
T2-S2	42 °C	66,4	70,9	66,8	68,03	K3-S1	56 °C (2 hrs)	30,1	31,9	31,8	31,27
T2-S3	42 °C	98,9	96,6	101	98,83	K3-S2	56 °C (2 hrs)	24,3	23,9	22	23,4
T2-S4	42 °C	50,5	56,6	57,9	55	K3-S3	56 °C (2 hrs)	31,3	31,7	32,1	31,7
T2-S5	42 °C	15,2	13,5	13,9	14,2	K3-S4	56 °C (2 hrs)	42,1	42,2	40,9	41,73

T2-S6	42 °C	47,9	48,4	51,7	49,33	K3-S5	56 °C (2 hrs)	35,2	36,8	37,2	36,4
T3-S1	42 °C	130,2	135,3	137,6	134,37	K3-S6	56 °C (2 hrs)	22,9	22,5	21,1	22,17
T3-S2	42 °C	102,1	100,6	106,6	103,1	K1-S1	56 °C	19,8	17	19,4	18,73
T3-S3	42 °C	80,1	76,1	79,2	78,47	K1-S2	56 °C	29,5	35,3	34,7	33,17
T3-S4	42 °C	102,4	104,8	104,8	104	K1-S3	56 °C	19,3	19,4	18,7	19,13
T3-S5	42 °C	196,3	185,3	177,9	186,5	K1-S4	56 °C	39,8	35,9	37,6	37,77
T3-S6	42 °C	75,5	80,7	82,6	79,6	K1-S5	56 °C	23,5	22,8	22,9	23,07
T1-S1	56 °C	150,8	153,6	156,4	170,43	K1-S6	56 °C	29	30,8	27,2	29
T1-S2	56 °C	55,2	53,1	53,6	53,97	K2-S1	56 °C	43,4	41,8	40	41,73
T1-S3	56 °C	178,1	180,6	181	175,8	K2-S2	56 °C	29	27,3	28,7	28,33
T1-S4	56 °C	78,7	83,3	79,7	80,57	K2-S3	56 °C	31,7	29,8	34,2	31,9
T1-S5	56 °C	117,4	118,9	117,8	170,63	K2-S4	56 °C	44,9	44,2	41,2	43,43
T1-S6	56 °C	100,6	103,7	101,8	100,5	K2-S5	56 °C	44,3	42,8	40	42,37
T2-S1	56 °C	127,8	130,3	129	129,03	K2-S6	56 °C	32,5	31,6	31,7	31,93
T2-S2	56 °C	75,6	75,4	77,5	76,17	K3-S1	56 °C	31,5	28,1	41,8	33,8
T2-S3	56 °C	96,7	99,3	100	98,67	K3-S2	56 °C	54,4	49,2	52,3	51,97
T2-S4	56 °C	100	95,5	99,9	98,47	K3-S3	56 °C	37,2	32,4	116,2	61,93
T2-S5	56 °C	131,7	135,6	133,2	133,5	K3-S4	56 °C	36,5	35,5	36,6	36,2
T2-S6	56 °C	152,4	154,7	156	154,37	K3-S5	56 °C	25,1	22,5	20,2	22,6
T3-S1	56 °C	85,5	85,2	85,4	85,37	K3-S6	56 °C	31,5	30,5	27,4	29,8
T3-S2	56 °C	88,4	150,2	110,5	116,37	K2-S4	56 °C	44,9	44,2	41,2	43,43
T3-S3	56 °C	74,7	72,3	73	73,33	K2-S5	56 °C	44,3	42,8	40	42,37
T3-S4	56 °C	387,5	960,6	293,7	547,27	K2-S6	56 °C	32,5	31,6	31,7	31,93
T3-S5	56 °C	173,4	169,6	184,9	175,97	K3-S1	56 °C	31,5	28,1	41,8	33,8
T3-S6	56 °C	137,4	137,4	128,4	134,4	K3-S2	56 °C	54,4	49,2	52,3	51,97
A1-S1	42 °C	9,8	9,3	11,4	10,17	K3-S3	56 °C	37,2	32,4	116,2	61,93
A1-S2	42 °C	12	14,6	9,6	12,07	K3-S4	56 °C	36,5	35,5	36,6	36,2
A1-S3	42 °C	26,5	28,6	26,1	27,07	K3-S5	56 °C	25,1	22,5	20,2	22,6
A1-S4	42 °C	15,2	13,6	12,4	13,73	K3-S6	56 °C	31,5	30,5	27,4	29,8
A1-S5	42 °C	25,5	50,1	22,5	32,7						

## **Appendix B:**

R code used for statistical analysis and creation of Figures 3, 5 & 6.

```
####Packages####
```

```
library(car)
```

```
library(readxl)
```

```
####TNES Temp Comparison####
```

```
TempTNES
```

```
TempTNES$Temp <- as.factor(TempTNES$Temp)
```

```
is.factor(TempTNES$Temp)
```

```
is.numeric(TempTNES$Concentration)
```

```
shapiro.test(TempTNES$Concentration)
```

```
wilcox.test(TempTNES$Concentration~TempTNES$Temp)
```

```
names1<-c("42 °C", "56 °C")
```

```
Boxplot1 <- boxplot(Concentration~Temp, data=TempTNES, ylab="Concentration (ng/μl)",
```

```
xlab="Temperature", names=names1)
```

Boxplot1

####Comparing Regions####

Regions

```
Regions$Region <- as.factor(Regions$Region)
```

```
is.factor(Regions$Region)
```

```
is.numeric(Regions$Concentration)
```

```
Model1 <- lm(Concentration~Region, data= Regions)
```

Model1

```
summary(Model1)
```

```
ANOVA1 <- aov(Model1)
```

```
TUKEY1 <- TukeyHSD(ANOVA1, conf.level = 0.99)
```

TUKEY1

```
plot(TUKEY1)
```

####Comparing TNES to Amnio at 42 degrees####

AmnioTNES

```
AmnioTNES$Buffer <- as.factor(AmnioTNES$Buffer)
```

```
is.factor(AmnioTNES$Buffer)
```

```
is.numeric(AmnioTNES$Concentration)
```

```
shapiro.test(AmnioTNES$Concentration)
```

```
wilcox.test(AmnioTNES$Concentration~AmnioTNES$Buffer)
```

```
names2<-c("TNES", "Amniocyte")
```

```
AmnioTNES$Buffer <- factor(AmnioTNES$Buffer , levels=c("TNES", "AMNIO"))
```

```
Boxplot2 <- boxplot(Concentration~Buffer, data=AmnioTNES, ylab="Concentration (ng/μl)",
```

```
xlab="Buffer Type", names=names2)
```

```
Boxplot2
```

```
#####Comparing the incubation time using the kit at 56 degrees#####
```

TimeKit

```
TimeKit$Hours <- as.factor(TimeKit$Hours)
```

```
is.factor(TimeKit$Hours)
```

```
is.numeric(TimeKit$Concentration)
```

```
shapiro.test(TimeKit$Concentration)
```

```
t.test(TimeKit$Concentration~TimeKit$Hours)
```

```
names3<-c("2", "12")
```

```
Boxplot3 <- boxplot(Concentration~Hours, data=TimeKit, ylab="Concentration (ng/μl)",
```

```
xlab="Incubation Time (Hours)", names=names3)
```

```
Boxplot3
```

```
####Comparing Temperatures using the kit####
```

```
TemperatureKit
```

```
TemperatureKit$Temp <- as.factor(TemperatureKit$Temp)
```

```
is.factor(TemperatureKit$Temp)
```

```
is.numeric(TemperatureKit$Concentration)
```

```
shapiro.test(TemperatureKit$Concentration)
```

```
t.test(TemperatureKit$Concentration~TemperatureKit$Temp)
```

```
names4<-c("56 °C", "42 °C")
```

```
TemperatureKit$Temp <- factor(TemperatureKit$Temp , levels=c("Degrees56",  
"Degrees42"))
```

```
Boxplot4 <- boxplot(Concentration~Temp, data=TemperatureKit, ylab="Concentration  
(ng/μl)", xlab="Temperature", names=names4)
```

```
Boxplot4
```

```
#####Comparing all 3 protocols at 42 degrees#####
```

```
Protocol
```

```
Protocol$Protocol <- as.factor(Protocol$Protocol)
```

```
is.factor(Protocol$Protocol)
```

```
is.numeric(Protocol$Concentration)
```

```
Model2 <- lm(Concentration~Protocol, data= Protocol)
```

```
Model2
```

```
ANOVA2 <- aov(Model2)
```

```
TUKEY2 <- TukeyHSD(ANOVA2, conf.level = 0.99)
```



```
TUKEY2
```

```
plot(TUKEY2)
```

```
names5<-c("TNES-Phenol/Chloroform" , "Amniocyte-Phenol/Chloroform", "Kit")
```

```
Protocol$Protocol <- factor(Protocol$Protocol , levels=c("TNES", "AMNIO" , "KIT"))
```

```
Boxplot5 <- boxplot(Concentration~Protocol, data=Protocol, ylab="Concentration (ng/μl)",
```

```
xlab="Protocol", names=names5)
```

```
Boxplot5
```

```
####Compariong temps with Amnio buffer####
```

```
is.factor(Amnio$Temp)
```

```
Amnio$Temp <- as.factor(Amnio$Temp)
```

```
is.numeric(Amnio$Concentration)
```

```
shapiro.test(Amnio$Concentration)
```

```
wilcox.test(Amnio$Concentration~Amnio$Temp)
```

```
names1<-c("42 °C", "56 °C")
```

```
Boxplot6 <- boxplot(Concentration~Temp, data=Amnio, ylab="Concentration (ng/μl)",  
                    xlab="Temperature", names=names1, col="white")
```