

Abstract

Formålet med dette bachelorprojekt var at sammensætte den bedste oprensingsprotokol af RNA fra hjernevæv, til senere anvendelse ved forskning af genekspressionsprofiler hos patienter med epilepsi. Hjernevæv fra mus blev udskåret i to størrelser (20mg og 60mg,) og efterfølgende opsamlet i flydende nitrogen eller RNAlater. RNA blev herefter oprenset med QiaCube eller Trizol. Derudover blev betydningen af tiden fra vævet udtages til det opsamles, også undersøgt. Dette blev undersøgt ved, at vævet blev efterladt ved stuetemperatur til 6 forudbestemte tider mellem $t=0$ og $t=160$ minutter. Det oprensede udbytte blev målt ved NanoDrop 2000 og RIN-værdier bestemt ved Bioanalyzer 2100. Det blev konstateret at det højeste udbytte kunne opnås ved at anvende flydende nitrogen som opsamlingsmedie i kombination med Trizol som opsamlingsmetode. Derudover blev der fundet en tendens til, at små vævsstykker oprenset via QiaCube gav højere RIN-værdier. Dog bør denne tendens undersøges yderligere

Indstilling

Udviklingen af den molekylærgenetisk diagnostik er indenfor de sidste 10 år eksploderet, i takt med at sekventeringsteknikkerne kontinuerligt er blevet både bedre og billigere. Forskning i feltet har flyttet mange milepæle og gjort op med tidligere tiders ellers fasttømrede ideer om sygdomsprocesser og sygdommes opståen, hvilket har haft og fortsat har stor betydning for den kliniske praksis. I dag er teknikkerne dog stort set så optimerede, at videre fremskridt for bedre og billigere diagnostik må søges i andre led af den diagnostiske proces. RNA sekventering (transkriptomanalyse) anvendes i dag til diagnostik af bla. kræftpatienter. Biopsier fra børn med hjernetumorer udgør en særlig sårbar gruppe, idet indgrebet er forbundet med risiko og prøvematerialet som vindes er sparsomt. Det stiller høje krav til den efterfølgende analyse, da ingen ønsker at skulle genudtage en biopsi pga. et mislykkedes prøveresultat. Kvaliteten af RNA til transkriptomanalyser vurderes ud fra en golden standard om at RNA molekylets integritet (RIN værdi) skal være ≥ 7 . I praksis er det dog ikke altid muligt at opnå så høj RIN værdi, og på mange afdelinger sekventeres RNA med lavere RIN værdier med efterfølgende brugbare diagnostiske resultater til følge. Der findes dog på nuværende tidspunkt ikke noget samlet studie eller nogen kliniske retningslinjer, som beskriver hvilke præanalytiske forhold der påvirker kvaliteten af RNA oprenset fra hjernevæv og på hvilken måde. Maja og Pernille er med deres projekt: "OPTIMERING AF OPSAMLING OG OPRENSNING AF RNA FRA HJERNEVÆV", gået ind i denne problemstilling og har designet et forsøg som undersøger 4 parametre som kan tænkes at påvirke RIN værdien. Maja og Pernille valgte at undersøge vævsstørrelsens, opsamlingsmediets, oprensingsmetodens, samt den tid det tager fra vævet er udtaget til det opsamles effekt på RIN værdien i deres forsøgsdesign ved brug af biologiske replikater af musehjerter. Resultaterne viser overraskende nok, at variation i vævsstørrelse, opsamlingsmedie og oprensingsmetode ikke har signifikant indvirkning på den efterfølgende RIN værdi. Et usædvanligt og spændende fund blev ligeledes gjort i tidsstudiet, som viste at der heller ikke var et signifikant tab af RIN værdi, selvom vævet havde ligget i hele 120 minutter før det blev opsamlet. Resultaterne af dette studie stiller således spørgsmålstegn ved den fortsatte relevans af at bestemme RIN værdien forud for RNA sekventering. Er tiden løbet fra denne kvalitetsparameter, fordi teknologien og bioinformatikken har udviklet sig så kolossalt? Hvis resultaterne af dette studie kan eftervises i flere prøver og andet væv vil det være revolutionerende indenfor laboratoriepraksis, som i så fald kan spare enorme summer på at udelade de kostbare analyser. Derudover kan resultaterne få stor betydning for den fremtidige praksis på hospitalerne, hvis personalet på operationsstuerne ikke længere behøves at bruge tid på at klargøre opsamlingsmedie til væv og biopsier. Da opsamlingsmedie til RNA analyser i sig selv er meget bekostelige, ligger der derudover en potentiel enorm besparelse i at kunne udelade opsamlingsmedie. Projektet i artikelform er oplagt inspiration for fremtidigt arbejde i samme område.