

Titel:

Sporadiske DNA mutationer og sensitiviteten af målemetoder.

Undertitel:

Screening af DNA for sporadiske mutationer stiller store krav til sensitiviteten af de anvendte målemetoder. I en prøve der ønskes undersøgt, vil andelen af celler der indeholder DNA med mutationer i genomet kunne være meget mindre en anden af celler uden DNA mutationer. Hvordan fanger man de få celler med forandringer i DNAet og hvor langt kan man gå ned i fortynding før metodernes sensitivitet bliver en begrænsning?

Forkortelser og begrebsdefinitioner:

Heteroduplex:	Når et nukleotid i en dobbelt strenget DNA ikke er bundet til sit Komplementære nukleotid, kaldes det et heteroduplex. F.eks. når A eller T bindes til C eller G. Dannes kun in vitro.
Heterozygot:	Et gen med forskellige allele former.
Homoduplex:	dobbelt strenget DNA hvor de enkelte nukleotider er komplementære.
Homozygot:	Et gen med ens allele former.
T _m :	Smeltetemperaturen for en given DNA sekvensmængde hvoraf 50% er denatureret.
T _c :	Kritisk smeltetemperatur. Temperaturen hvor kun heteroduplex og ikke homoduplex denatureres.
PCR:	Polymerase Chain Reaction. Metode til at amplificere en given mængde DNA.
Cykler:	Cykler er betegnelsen for de temperaturgentagelser der gennemgås ved PCR i en termocycler.
COLD PCR:	PCR protokol med eksperimentelt fastsat T _c .
Touch-Up PCR:	PCR protokol med dynamisk denatureringstemperatur.
WT2:	Wild-Type DNA uden mutationer i udvalgte sekvens.
WT3:	Wild-Type DNA med homozygote punktmutationer for exon 11-4 Nt;2201 samt exon 13 nt;4227.

Indledning

Hvert år får ca. 15.000 danske mænd og 15.000 danske kvinder stillet en cancer diagnose. Dette øger behovet for udvikling af stadig mere brugbare og effektive molekylær diagnostiske metoder, da cancer opstår på baggrund af mutationer i DNA.

På sektion for molekylær genetisk diagnostik på Rigshospitalet arbejdes der på at udvikle sensitive metoder til mutationsscreening af DNA. Dette gøres ved brug af de 2 metoder smeltekurveanalyse (forklares senere) og sekventering. Begge metoder er baseret på en forudgående PCR reaktion.

Mit projekt undersøgte, hvorvidt PCR protokollen "COLD" eller "Touch-Up" var bedst til at opformere heteroduplex (forklares senere). Jo mere heteroduplex der opformeres, jo større sandsynlighed er der for at en variant kan detekteres ved sekventering. Standard protokollen Touch-Down blev brugt som reference.

Touch-Up og COLD PCR protokollerne adskiller sig fra hinanden ved at have henholdsvis en dynamisk og en eksperimentelt fastsat denatureringstemperatur. Opsætningen af mit forsøg er baseret på fremstillingen af en række fortyndinger af DNA med en homozygot punktmutation i BRCA1 genet med DNA uden mutationen. Fortyndingerne rækker fra 1:1 til 1:75.

Forsøget viste at Touch-Up protokollen er bedst til at opformere DNAet med mutationer. Der var dog enkelte resultater der viste at COLD protokollen var overlegen under bestemte forhold.

Resultaterne for forsøget kan tænkes at blive anvendt til at reducere ressourceforbruget ved omfattende folkesundhedsundersøgelser for genvarianter. Mine resultater viser, at jeg ved blot 1:10 kan se en variant ved sekventering. Udfra dette ville det blive muligt at poole patientprøver i grupper af 10 personer. Er der *ikke* en variant, så ved man, at det ikke er fordi, at man bare ikke har en metode, der er sensitiv nok til at registrere den.

Visse folkeundersøgelser, som for eksempel Østerbroundersøgelsen, rummer mutationsscreeninger på op mod 75.000 deltagere. En reduktion på blot 10% af antallet af udførte analyser er enorm. Fra 75.000 til 7500. Perspektivet for den økonomiske og ressourcemæssige besparelse er anseelig.

Procedure ved svarafgivelse

Ved en variationsscreening af en patientprøve skal prøvesvaret, uanset valg af PCR protokol til amplifikation af heteroduplex til smeltekurveanalysen, efterfølgende verificeres ved anden metode før et svar kan frigives. På Rigshospitalet anvendes sanger sekventering som anden metode.

Metodernes sensitivitet

Sekventering er som metode er ikke lige så sensitiv til detektion af varianter som smeltekurveanalyserne. Derfor vil begrænsningen for den mindst mulige detekterbare koncentration af varianter i en prøve være fastsat af sekventeringsmetodens sensitivitet. For det er jo fint nok at kunne påvise heteroduplex, og dermed også forekomsten af en variation i en prøve via smeltekurveanalyser. Men hvad nytter dette, hvis det efterfølgende ikke er muligt at få bekræftet resultatet via sekventering, fordi andelen af dannet heteroduplex ikke er stor nok til at det kan ses på sekventeringen?

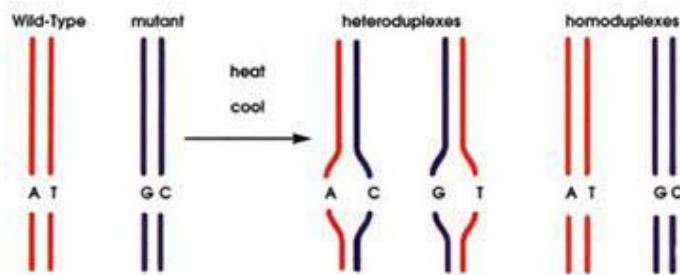
Heteroduplex

Af en samlet mængde oprenset DNA fra et prøvemateriale med genmutation i udgør celler hvis DNA der indeholder genvarianten en vis procentdel i forhold til de celler uden.

Det er derfor hensigtsmæssigt at udvikle en metode der er sensitiv nok til at kunne detektere forekomsten af selv meget små koncentrationer af celler med variationer i generne.

Rent metodemæssigt er det man benytter sig af dannelsen af heteroduplex.

Der er 2 alleler fra de normale gener, WT (homozygot normal), og 2 alleler fra de varierende, mut (homozygot mutation). Under opformering ved PCR sker der det, at ét afskrevet allel fra WT kan sætte sig sammen med ét allel fra mut. Herved opstår det såkaldte heteroduplex som altså er en dobbelt strenget DNA sekvens med en enkelt baseafvigelse på det ene allel. Se billed 1.

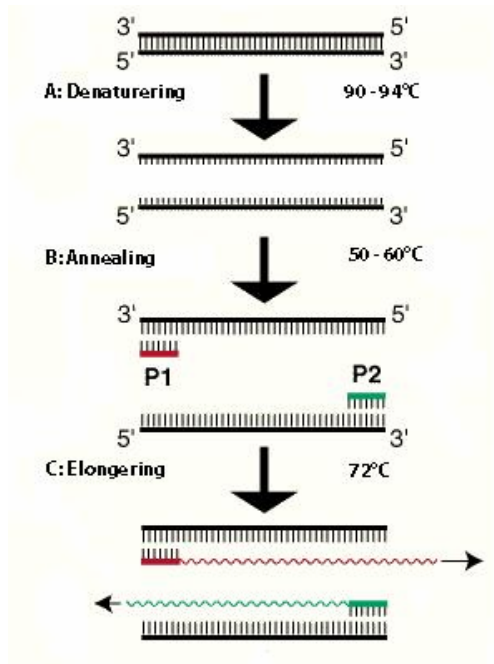


Billede 1 : Her ses hvordan en heteroduplex dannes ved PCR, under afkøling af et opvarmet produkt.

Det viser sig at heteroduplex har en lavere denatureringstemperatur end homoduplex idet den svagere binding i punktmutationen brydes ved lavere varmepåvirkning.

Dog er der for hver nye denatureringscykel mulighed for, at denaturerede strenge fra heteroduplex sætter sig sammen med sin egen komplementære streng og danner en homoduplex. Man kan derfor ikke teoretisk regne med, at blot fordi heteroduplex amplificeres, så vil alle nye produkter også blive heteroduplex. Teoretisk beregning vil estimere 1:1 dannelse af heteroduplex i forhold til homoduplex, hvis man forudsætter at der er lige stor sandsynlighed for at de hver især dannes. Det er altså den samlede mængde af heteroduplex der øges, mens forholdet mellem heteroduplex og homoduplex forbliver konstant.

PCR



Billede 2: Her ses den proces som anvendes ved PCR. A: Et DNA fragment bliver denatureret ved 90 – 94 °C. B: Primerne sætter sig på de denaturerede stykker DNA(50 – 60 °C). C: Polymerasen forlænger den enkelte primer ved at tilføre det komplementære nukleotid på det amplicon hvorpå primeren sidder(72 °C).

T_m og T_c.

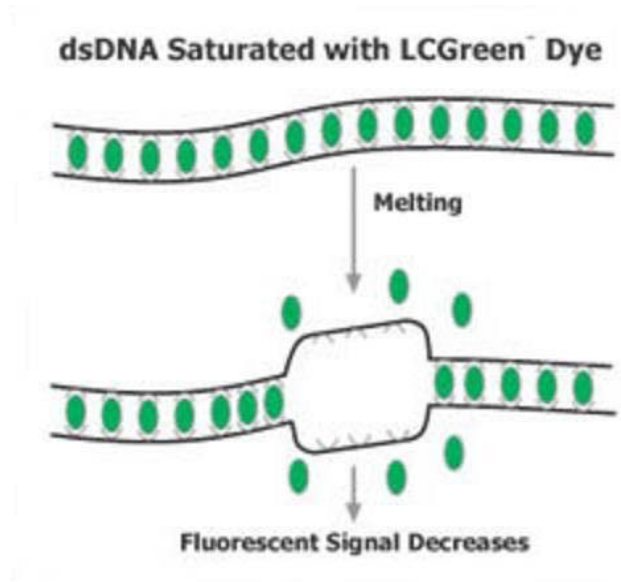
T_m er den temperatur, hvorved en given dobbelt strenget DNA sekvens er denatureret for 50% af sekvensernes vedkommende i et PCR produkt.

Hvis der blandt de afskrevne sekvenser er dannet heteroduplex, vil disse have en lidt lavere denatureringstemperatur pga. den lidt svagere binding ved varianten. Dette kan man anvende. Ved at finde den specifikke denatureringstemperatur for en sekvens med varianten, kan man i protokollen fastholde denne temperatur og derved minimere afskrivning af sekvenser uden varianten, idet disse slet ikke er denatureret endnu og derfor ikke afskrives. Det lille temperaturinterval hvori kun heteroduplex er denatureret og endnu ikke homoduplex kaldes T_c, den kritiske temperatur. Den kritiske temperatur T_c, hvorved der denatureres forholdsvis flest heteroduplexer i forhold til homoduplexer, kan fastsættes specifikt for hver sekvens der ønskes afskrevet. T_c er afhængig af basesammensætning samt længde på sekvensen. T_c er omstændig at fastsætte og findes eksperimentelt for hver sekvens der arbejdes med i laboratoriet.

Smeltekurveanalysen

Via smeltekurver kan detektion og separation af heteroduplex fra homoduplex opnås.

Farvestoffet, LCGreen+ der er et fluorocrom, binder til dsDNA og tilsættes i PCR mixet.⁽¹⁾ Det afgiver fluorescens som funktion af den temperatur hvormed dsDNAet udsættes. Se billed 3.

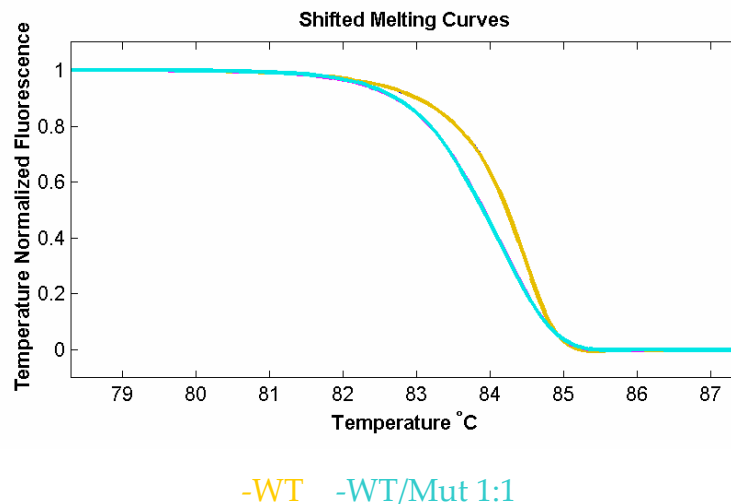


Billede 3: Øverst i figuren ses hvordan LCGreen+ har bundet sig til et dsDNA. Nederst ses hvordan LCGreen+ frigives ved denaturering af dsDNA, hvorved fluorescensen formindskes.⁽¹⁾

I takt med varmebaseret denaturering af dsDNA vil der ske et proportionalt fald af fluorescens. Til måling af dette anvendes en såkaldt LightScanner og metoden er Hi-Res MeltingTM som er et softwareprogram der kan behandle data fra fluorescens.⁽²⁾

I en given mængde amplificeret DNA vil en vis procentdel af dette, den del der er heterozygot, altså foranledige fald i fluorescens signalet før den mængde DNA der er homozygot.

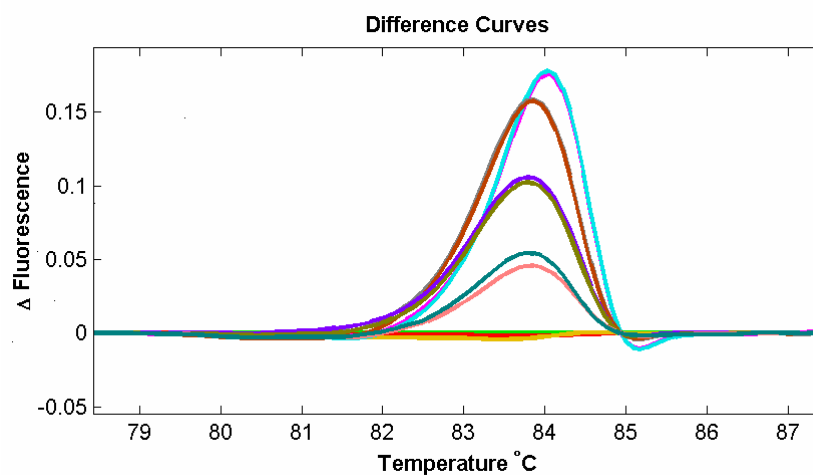
Dette visualiseres af Hi-Res MeltingTM som såkaldte smeltekurver, hvorved der tydeligt kan detekteres tilstedeværelsen af heteroduplex. Se billed 4.



Billede 4: Her ses to kurver, med fluorescensen(y) som funktion af temperaturen(x).
Man kan se, at faldet på kurverne sker ved forskellige temperaturværdier.

Metoden kan derved fungere som direkte indikator på, om det afskrevne gen for en vis procentdel af cellerne indeholder en variant, altså en mulig mutation der kan være potentielt cancerfremkaldende.

Ved hjælp af softwaren på lightscanneren kan man kigge på et afgrænset forløb af kurven. Det der er interessant er det sted, hvor kurvefaldet ligger. Billede 5 viser et zoom af dette sted.



Billede 5: Her ses heteroduplexdetektion for forskellige fortyndingsgrader, hvor fluorescensforskellen(y) er en funktion af temperaturen(x). Man kan tydeligt se af toppunkterne på kurverne, at de har forskellige fluorescensværdier men næsten samme smeltetemperatur for dobbeltbestemmelser af fortyndinger på 1:1, 1:10, 1:20, 1:75 samt WT.

PCR protokollerne

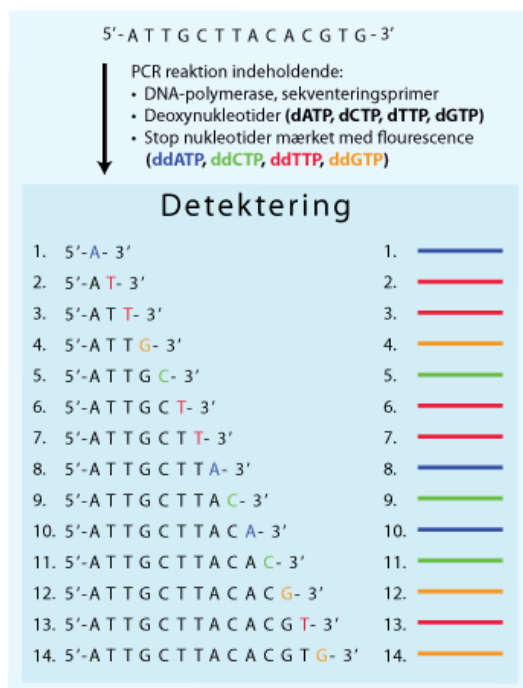
COLD-PCR protokollen

COLD-PCR protokollen har en eksperimentelt fastsat T_c temperatur. Som beskrevet i afsnittet om T_m og T_c , skulle denne fastsættelse gerne sikre, at der fortrinsvis denatureres og opformeres heteroduplex

Touch-Up protokollen

Touch-Up protokollen er skabt til at undgå dette eksperimentelle arbejde. Tanken er, at der ved en dynamisk øgning af denatureringstemperaturen automatisk vil opformeres flere heteroduplex, fordi den dynamiske temperatur vil ramme T_m for heteroduplex i flere cykler før T_m for homoduplex rammes. Herved skulle amplificationen af heteroduplex automatisk øges i forhold til homoduplex uanset T_c . Herved undgår man det store eksperimentelle arbejde med fastsættelse af T_c , hvilket er både tids og ressource besparende.

Sanger sekventering



Figur 6. princippet i sekventering.

Ved hjælp af primere og DNA-polymerase syntetiseres en stor mængde nye DNA strenge der er identiske i 5'enden (primeren) som vist på figur 6. Der anvendes dNTP og syntesen udføres parallelt i 4 rør (ABIprism-systemet) hvor der i hver rør kun er én type ddNTP.

DNA syntesen standses, reaktionsblandingen varmedenatureres og reaktionsblandingen fra de 4 rør adsilles via gel-elektroforese.

Ved sekventering i dette projekt vil de forskelligefarvetoppe repræsentere:

∩ = Adenin ∩ = Cytosin

∩ = Thymin ∩ = Guanin

Materialer og metode

Jeg fremstillede fortyndingsrækker af prøvematerialet:

- WT2: Wild Type nr. 2 DNA uden en mutation i BRCA1 exon 11-4.
- WT3: Wild Type nr. 3. DNA med en punktmutation i BRCA1 exon 11-4 kaldet 2201.

BRCA1 WT3	Type punktmutation
exon 11-4	Nt2201 C→T

Fortyndingerne er lavet I følgende forhold:

WT3	WT2
1	1
1	10
1	20
1	50
1	75

Alt prøvematerialet der overføres til PCR reaktionspladerne stammer altså fra samme pool.

Kontroller: Jeg laver dobbeltbestemmelser til alle prøver, samt blindprøver. Jeg laver 2 dobbeltbestemmelser på DNA uden variationen, WT, for at sikre at der ikke er signal fra WT.

Primere/primer design:

Primerene er designet efter gældende regler for primerdesign. Primerne er testet og optimeret inden det eksperimentelle laboratoriearbejde er startet. Jeg har arbejdet med 3 primersæt der placerer varianten 3 forskellige steder i den afskrevne sekvens og giver en sekvenslængde på 150 base par.. Jeg har gjort dette, for at undersøge om det havde betydning for resultatet.

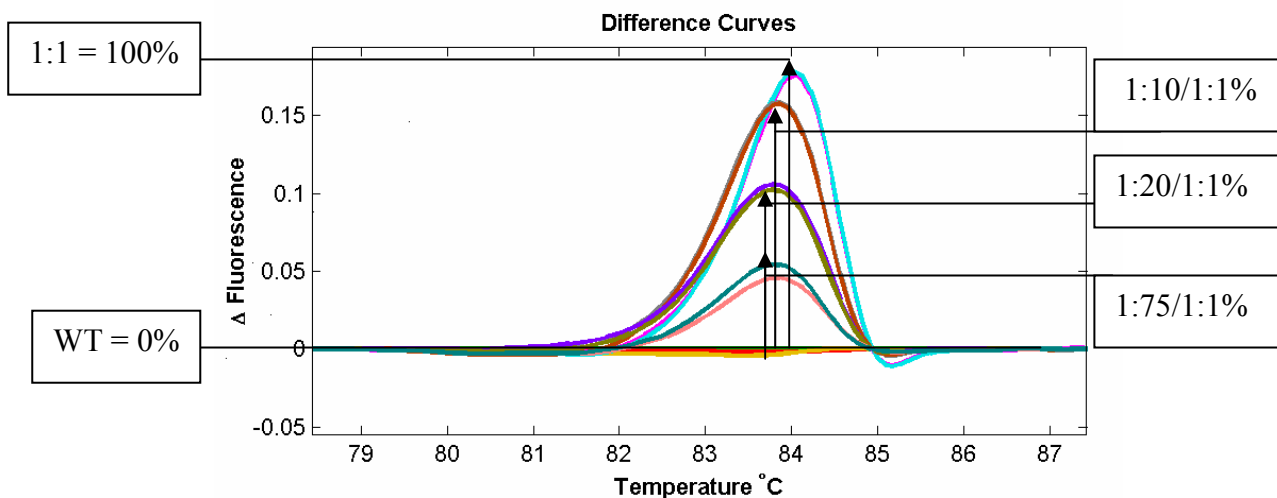
Der tilsættes prøvemateriale og reagenser af ens mængde til 3 PCR plader og herefter er fremgangsmåden;

- Touch-Up, COLD og Touch-Down protokollerne udføres på PCR maskinen.
- Smeltekurveanalyser udføres.
- Sekventering på PCR produkterne fra de 3 PCR plader.
- Data opsamles og udprintes.

Tolkning af resultater

Smeltekurveanalyserne

Det optimale er en opformering af heteroduplex. Hvis det lykkes at få et resultat hvor de høje fortyndingsgrader 1:20-1:75 giver et højt fluorescenssignal, dvs. et signal der tilnærmer sig signalet for fortyndingen 1:1, betyder det at primersæt og protokol i samspil har været velegnet til opformering af heteroduplex. Måden at vurdere smeltekurverne på er vist på billed 6.



Billed 6. Figuren viser smeltekurven for varianten med anvendt primersæt 3. Der ses tilstedeværelse af heteroduplex for fortyndingerne, samt en lille afvigelse for dobbelt bestemmelserne. Alle WT giver 0 i faldændring.

For det enkelte primersæt vil der være et max. fluorescenssignal for fortyndingen 1:1 der udgør 100%. Bundlinjen for WT2 udgør 0%. For hver enkelt fortynding udregnes det procentvise forhold for fluorescenssignalet i forhold til 1:1. Dette gøres for samtlige 3 protokoller.

Sekventeringen

Det skal som minimum være muligt at skelne de enkelte baser fra hinanden. Er det ikke det forkastes data for pågældende prøve. Der er udført sekventering for de udvalgte prøver med både forward og reverse primere.

Af de vellykkede sekventeringer udvalgte jeg de prøver, hvor sammenligning gav mening. Det vil sige en udvalgt prøve fra Touch-Up PCR eller COLD PCR skulle således kunne sammenholdes med tilsvarende prøve for Touch-Down PCR.

Jeg undersøgte, ved hvilke fortyndingsgrader og ved hvilke primere varianten fremkommer tydeligst ved sekventering. Dette er gjort på baggrund af visuel inspektion.

Det optimale er en tydelig sekvensafvigelse for varianten ved så høj en fortyndingsgrad som muligt, i forhold til signalet for fortyndingen 1:1, der udgør det teoretiske højst mulige signal for denne prøve.

Resultater

Alle primersæt har virket. Fortyndingen 1:50 mislykkedes for alle 3 protokoller.

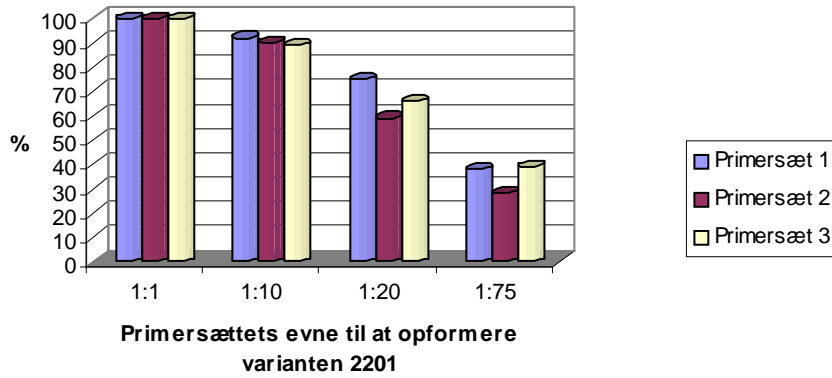
Jeg godkender mine kontroller.

Smeltekurver.

Touch-Up Protokollen

	i %			
	2201	Primersæt 1	Primersæt 2	Primersæt 3
1:1		100	100	100
1:10		92	90	89
1:20		75	59	66
1:75		38	28	39

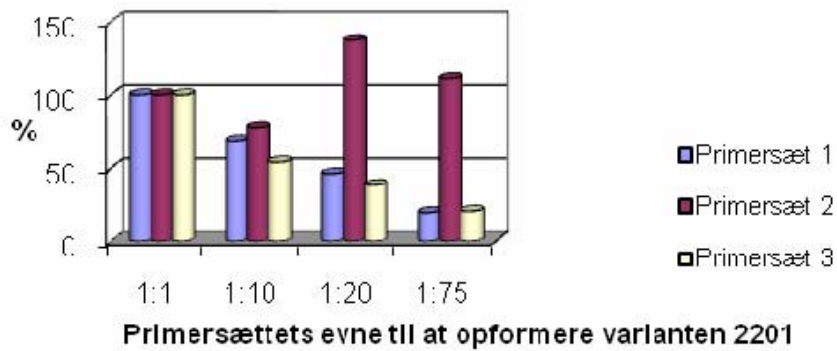
Touch-Up 2001



Cold Protokollen

	i %			
	2201	Primersæt 1	Primersæt 2	Primersæt 3
1:1		100	100	100
1:10		68	77	54
1:20		46	137	38
1:75		19	111	20

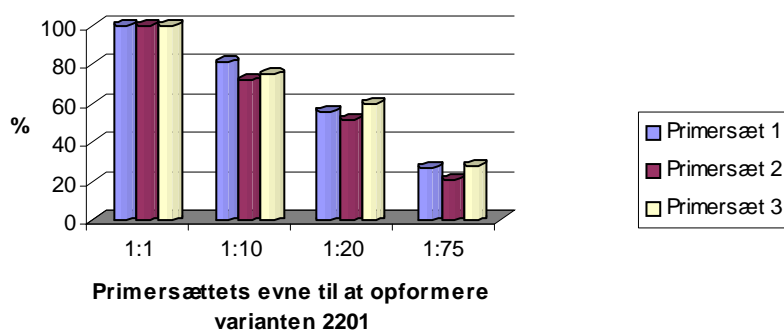
COLD 2201



Touch Down Protokollen

	i %			
	2201	Primersæt 1	Primersæt 2	Primersæt 3
1:1		100	100	100
1:10		81	72	75
1:20		56	52	60
1:75		27	21	28

Touch-Down 2201



Sekventering:

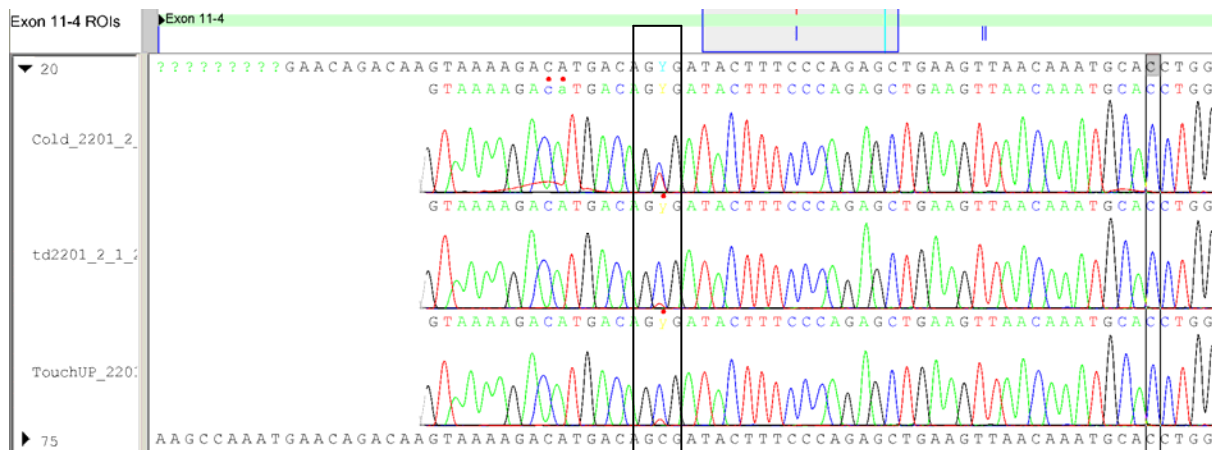
Resultaterne af sekventeringen viser de 4 basers placering på sekvensen for exon 11-4 lige omkring varianten 2201.

∩ = Adenin ∩ = Cytosin

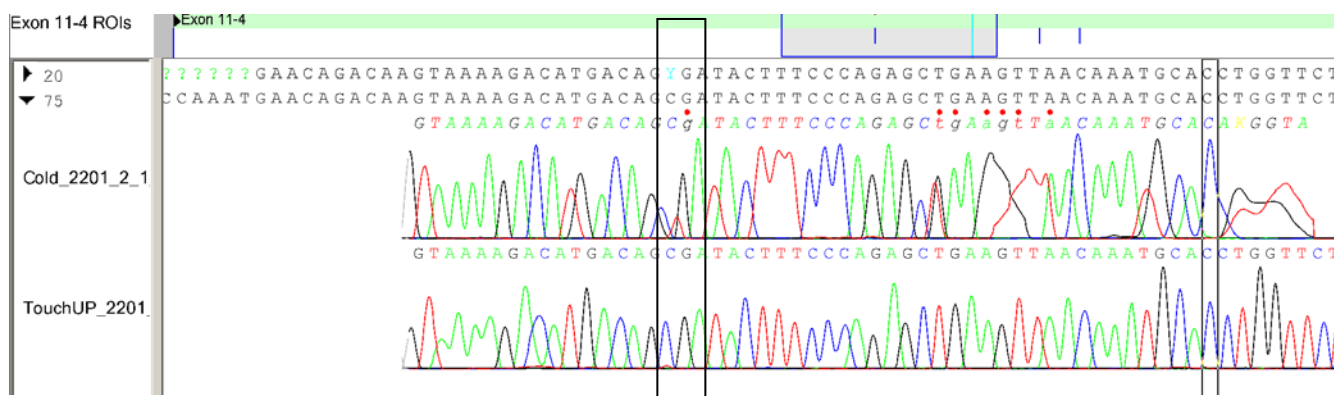
∩ = Thymin ∩ = Guanin

På forward sekvensen ses tilstedeværelsen af thymin ∩ på samme punkt som cytosin ∩, der er altså en synlig variant. (rød prik inde i sorte rektangel). Cytosin er wild type basen. At der også er thymin på samme basetop viser, at der er opformeret både wildtype og variant sekvenser.

Sekventering Resultat for 2201 primersæt 2 fortynding 1:20



Sekventerings resultat for 2201 primersæt 2 fortynding 1:75



Diskussion

Primersæt 2 skiller sig ud ved at have opformeringsevne på over 100% for COLD protokollen for 1:20 og 1:75. Herved ikke blot tilnærmer fortyndingerne sig forholdet 1:1, de ligefrem overskrider det. Dette burde teoretisk set ikke være muligt. Men resultaterne viser, at det er sket.

Hvad dette skyldes står åbent. Min første tanke var, at jeg havde lavet en fejl. Ombyttet prøver. Men resultatet af sekventeringen på prøven "afviste" denne forklaring, da den efterfølgende påviste at det var den rigtige sekvens der var amplificeret. En elektroforese gel viste at kun ét produkt var afskrevet. Der var altså ikke tale om uspecifik primerbinding. Et eller andet er sket i denne prøve.

Teorien beskriver et max. på 1:1 mellem hetero- og homoduplex. Det er derfor et interessant resultat, som det giver mening at undersøge nærmere.

Det er påfaldende at resultatet tilsyneladende kun gør sig gældende for primersæt 2. Alle fortyndinger stammer fra den samme opløsning for samtlige prøver. Det eneste der er afvigende for primersæt 2, er netop anvendelsen af primersæt 2. Dette indikerer en meget stor vigtighed af, hvilke primere der anvendes til mutationscreeninger.

Teorien der er beskrevet omkring fastsættelse af Tc i COLD protokollen kunne bekræftes af mine resultater. De peger ihvertfald i retning af, at noget tyder på at jeg har ramt den helt præcise Tc for sekvensen og primerne og at dette optimerer resultatet for mutationscreening. Ganske som udviklerne af COLD protokollen har beskrevet i artiklen af Jin Li et. al.^(A7) Jeg vil nu nok alligevel afvise denne forklaringsmodel, idet det undrer mig, at samme øgning i opformeret heteroduplex ikke er fundet sted for fortyndingen 1:1 samt 1:10. Det samme billede burde være gældende for denne fortynding, hvis jeg skal følge forklaringen om et præcist ramt Tc.

Resultatet er også interessant, da det kan henlede opmærksomheden på de patientprøver der evt. kan vise sig at blive diagnosticeret falsk positive/negative, idet der kan forekomme denne slags resultater. Dette er overordentligt vigtigt at holde sig for øje.

Det er vanskeligt at finde en teoretisk forklaringsmodel på hvad der kan være sket. En kontaminering af mine PCR brønde med ren heteroduplex lyder usandsynlig, for hvor skulle de være kommet fra?

Primernes og protokollers evne til opformering i samspil sammenfattet for variant 2201

Resultatene viser at Touch-Up protokollen opnår de bedste opformeringer af heteroduplex, bortset fra hvis det lykkes at ramme Tc, hvorved COLD protokollen bliver overlegen. (hvis det antages at resultatet skyldes optimale Tc betingelser).

Resultaterne kan give anledning til en forklaring på hvorfor Touch Up er bedre til at opformere heteroduplex end referencen Touch Down. Den dynamiske temperaturøgning under denaturering må formodes at afstedkomme at Tc tangeres undervejs i cyklen. Af resultatet for COLD protokollen primersæt 2 ses det, hvor stor opformeringen rent faktisk bliver i forhold til de andre protokoller,

hvis det forudsættes at det er den nøjagtigt ramte T_c , der er årsagen til resultatet. Der er sket en øgning af opformering fra 52% for Touch Down til 137% for COLD for 1:20 primersæt 2. Jeg ser det som en sandsynlighed, at det er det interval hvor Touch-Up protokollen rammer de optimale betingelser for T_c , som øger mængden af opformeret heteroduplex, i en sådan grad at den er bedre til opformering end referencen Touch Down.

COLD protokollen er væsentligt ringere til generel opformering af heteroduplex. Den klarer sig % vis ligefrem ringere end Touch Down protokollen ved anvendelse af visse primersæt. Dette er overraskende, da en nøjagtig fastsat T_c burde give optimale betingelser for dannelse af heteroduplex. Jeg mistænker, at jeg har fastsat min denatureringstemperatur fejlagtigt for COLD protokollen. Jeg havde ikke tid til at lave det eksperimentelle arbejde for at fastsætte T_c , så jeg fastsatte T_c på et teoretisk grundlag. Det er en meget stor fejlkilde for de generelle COLD resultater,

Rent praktisk er Touch-Up protokollen lettere at anvende en COLD protokollen, idet den ikke kræver et stort eksperimentelt forarbejde.

Primere

Jeg har anvendt 3 forskellige primere. Der er bortset fra de afvigende resultater for COLD protokollen, ikke noget der tyder på at der er bemærkelsesværdig stor forskel på resultatet alt efter hvilken man benytter.

Sekventering

Alle 3 protokoller er anvendelige til detektion af varianter i frtyndingen 1:1 og 1:10. For 1:20 er det kun Touch-Up der viser en variant der er så tydelig at "man ikke skulle vide at den var der for at se den". Generelt vil der være en variation i hvor pæne sekvenserne bliver, dvs. hvor meget baggrund der fremkommer, alt efter hvilket materiale der sekventeres på.

1:75 giver for alle 3 protokoller en så lille variation, at den ikke vurderes som synlig. Jeg kan se en lille variation, men det er kun fordi jeg ved, hvor jeg skal kigge. Jeg vurderer dog endnu engang, at det trods alt er synligheden af varianten i PCR produktet for Touch-Up der er mest fremtrædende.

Sammenligning af smeltekurver og sekvenser

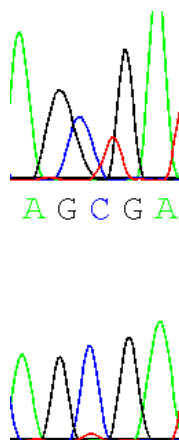
Touch-Up har en synlig variant ved sekventering ved fortyndingen 1:20. Det svarer på smeltekurven til et forhold for fluorescenssignalet mellem 1:1 og 1:20 på 66%. Jeg vurderer derfor at en variant vil kunne ses på sekventering, hvis forholdet for fluorescenssignalet 1:1 og en given fortynding ligger på 66% eller derover

Jeg vurderer, at fortyndingsgrænsen for Touch-Up protokollens evne til at opformere heteroduplex der efterfølgende giver en synlig variant ved sekventering ligger et sted mellem 1:20 og 1:75. Det svarer til et % tal for forhold for fluorescenssignalet mellem 1:1 og en given fortynding på mellem 66% og 39%. Varianten er tydelig ved 1:20 men da der er et meget stort forholdsmæssigt spring ned til en 1:75 fortynding der ikke giver synlig variant, er det ikke til at sige, hvor den præcise grænse ligger.

Det er ærgeligt at fortyndingen 1:50 mislykkedes. Resultater fra denne prøve ville have kunnet afsløre en større præcision i intervallet mellem synlig/ikke synlig variant.

Den visuelle vurdering er dog mangelfuld, fordi den repræsenterer et individuelt fastsat skøn. Det er muligt at varianten for både Touch-Down og COLD ved 1:20 af mere rutinerede og erfarne bioanalytikere ville betragtes som en tydelig variant. Forskellen er så lille, at det er vanskeligt at vurdere præcist.

Men jeg vil mene, at fortyndingsforholdet kan øges yderligere fra 1:20 med stadig synlig variant for Touch-Up.



Af resultaterne ses det ganske specielle forhold der opstår ved anvendelse af primersæt 2 for hhv. 1:20 og 1:75 for COLD. Varianten er tydelig ved sekventering for begge fortyndinger. Da jeg dog ikke er helt sikker på at resultatet er gyldigt som grundlag at lave postulater på, vil jeg blot konstatere det, og vente med at konkludere noget til en evt. reproducering af resultatet er fundet sted.

Billede 7 . Sekventering af 1:75 for 2201 med primersæt 2. COLD øverst og Touch-Up nederst.

Konklusion

Touch-Up protokollen er generelt bedst til at amplificere heteroduplex i et PCR mix, idet variationen efterfølgende skal verificeres ved sekventering. Konklusionen gælder for en sekvenslængde på ca. 150bp. COLD er muligvis bedst til at amplificere heteroduplex i et PCR mix, idet variationen efterfølgende skal verificeres ved sekventering, hvis Tc for opsættet rammes nøjagtigt.

Perspektivering

Jeg anbefaler en gentagelse af forsøget for variationen 2201 med primersæt 2 for at få bekræftet/afkræftet, om det afvigende resultat opstod på baggrund af en fejl/tilfældighed eller om resultatet var reelt. Hvis resultatet kan reproduceres er det åbentlyst fornuftigt at arbejde videre med COLD protokollen. Viser det sig omvendt ikke at kunne reproduceres, vil jeg mene at det er for stort et arbejde at skulle fastsætte Tc for at få brugbare COLD resultater, når Touch-Up giver så generelt gode resultater.

Jeg mener også, at det skal overvejes, hvor stor en fortyndingsgrad det giver mening at anvende i det hele taget, idet fund af varianter i celler skal være repræsentativt for patienten. Der vil være en grænse for dette. Fastsættelse af denne grænse kan hjælpe med at afgrænse behovet for en metodes sensitivitet, og dermed også tidkonsumerende videreudvikling og ressourceforbrug. Jeg anbefaler en gentagelse af forsøget med fortyndingsintervaller mellem 1:20 og 1:75 på intervaller af fx. 1:10. Herved vil der opnås en langt mere præcis grænse for hvornår varianter er synlige på sekvenser, sammenholdt med % vise forhold for smeltekurverne.

Jeg anbefaler en matematisk tilgang til dette. Ved at erstatte min visuelle inspektion af sekvenserne med en nøgtern forholdsbergning for variationens tophøjde af basen i forhold til tophøjden af WT tophøjden af basen, kan man lave en kalibreringskurve. Det er nemlig min klare formodning at der forefindes et proportionalitetsforhold mellem forholdet for 1:1 og div. fortyndinger på smeltekurverne, samt forholdet mellem varianternes tophøjde på sekvenserne. Denne kalibreringskurve vil derfor sige noget generelt om forholdet mellem de 2 metoder, da sammenligningsgrundlaget for begge er baseret på forholdsbergning og ikke visuel inspektion.

Der laves store undersøgende mutations screeninger på befolkningsgrupper, for at afdække/undersøge om der er forekomst af bestemte mutationer i forbindelse med bestemte lidelser og kliniske symptomer. Mine resultater kan tænkes at blive anvendt til at reducere ressourceforbruget ved omfattende folkesundhedsundersøgelser for genvarianter, idet mine resultater viser, at jeg ved blot 1:10 kan se en variant ved sekventering. Udfra dette ville det blive muligt at poole patientprøver i grupper af 10 personer, og er der ikke en variant, så ved man at det ikke er fordi, at man bare ikke har en metode der er sensitiv nok til at registrere den. Dette er naturligvis forudsat at mutationen er homozygot. Ved heterozygote mutationer vil allelforholdet blive halveret.

Referenceliste

1: Producent af LCGreen+. Salt Lake City, USA:Idaho Technology Inc.

<http://www.idahotech.com/LCGreen/index.html>

2: Producent af LightScanner[®]. Salt Lake City, USA:Idaho Technology Inc.

<http://www.idahotech.com/LightScanner/>

3: Kielberg V, Nørby S, Rasmussen L. DNA og RNA – en håndbog. København: Gads Forlag, 2003.

A4: Pals G, Pindolia K, Worsham MJ. A rapid and sensitive approach to mutation detection using real-time polymerase chain reaction and melting curve analyses, using BRCA1 as an example. *Mol Diagn.* 1999 Sep;4(3):241-6.

A5: Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Molec Pat* 85. 2008 50-58.

A6: Hung CC, Lee CN, Chang CH, Jong YJ, Chen CP, Hsieh WS, Su YN, Lin WL. Genotyping of the G1138A mutation of the FGFR3 gene in patients with achondroplasia using high-resolution melting analysis. *Clin Bio* 41 (2008) 162-166.

A7: Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos, GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. Nat med. 2008 may; 14(5): 579-84

8: Dan Lyngvild, okt.2008- jan.2009. Forbedring af protokollen til Touch-Up PCR - Bioanalytiker bachelorprojekt.

9: Caroline Maria Bæk Lassen, Sept.2008-jan.2009. Screening for genvarianter v.h.a. Cold PCR – Bioanalytiker bachelorprojekt.

10: Kræftens bekæmpelses Hjemmeside <http://www.cancer.dk/Alt+om+kraeft/fakta+om+kraeft/kraeft+i+tal/>

Billede 1: <http://www.migal.org.il/dhplc.html>

Billede 2: <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>

Billede 3: <http://www.bioke.com/lightscanner/lcgreen+melting+dyes/why+lcgreen+works>

Billede 4: Billedet er impoteret fra billedbehandlingsprogrammet for lightscanneren.

Billede 5: Wordbehandlet billede 4.

Billede 6: http://www.biotechacademy.dk/upload/institutter/bic/sites/biotech%20academy/darwin/grafik_darwin