



**FAKULTET FOR NATURVITENSKAP**

**Institutt for bioingeniørfag**

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet  
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

RT-PCR basert mutasjonsanalyse av BRCA1/2 i eggstokkreft

RT-PCR based mutation analysis of BRCA1/2 in ovarian cancer

*Av / by*

Daniel Martinsen & Helge Stugaard Monsson

**Trondheim, 2021**

## Forord

Dette prosjektet er den avsluttende delen av bioingeniørstudiet ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), Trondheim. Oppgaven ble gitt av faglig veileder, overingeniør Hong Yan Dai, PhD, ved Avdeling for patologi, enhet for molekylærpatologi, på St. Olavs hospital i Trondheim. Det praktiske arbeidet har blitt utført ved Avdeling for patologi, enhet for molekylær patologi og ved Avdeling for medisinsk genetikk, begge på St. Olavs hospital i Trondheim.

Vi vil takke alle ansatte ved Avdeling for patologi som har hjulpet oss med opplæring i forbindelse med det praktiske arbeidet til oppgaven. En spesiell takk rettes til vår faglige veileder, overingeniør Hong Yan Dai, PhD, og fagansvarlig bioingeniør ved enhet for molekylærpatologi, Torild Gladsø, for all hjelp. Takk for at dere brukte deres arbeidstid til å hjelpe oss med oppgaven. Dette gjorde arbeidet vårt lettere å gjennomføre og bidro til at hele prosessen gikk så bra som den kunne.

Vi vil avslutte med å takke vår prosessveileder ved Institutt for bioingeniørfag, førstelektor Kristin Gabestad Nørsett, PhD, for god hjelp underveis med oppgaven. Takk for at du alltid var tilgjengelig hvis vi lurte på noe og for at du ga oss gode, konstruktive tilbakemeldinger underveis i skriveprosessen.

*Daniel Martinsen*

---

Trondheim, 19.05.2021

*Felge Stugaard Monsson*

---

Trondheim, 19.05.2021

## Sammendrag

Bryst- og eggstokkreft er to av de vanligste krefttypene og rammer i hovedsak kvinner. Breast cancer gene 1/2 (BRCA 1/2) er to gener der mutasjoner, både arvelige og somatiske, kan forårsake disse krefttypene. Avhengig av mutasjonsstatus i disse genene, så kan det åpne for å gi vedlikeholdsbehandling med en poly (ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP1)-inhibitor. Dette er en farmakologisk inhibitor, som hemmer PARP enzymer. Disse enzymene har kritiske funksjoner innen reparasjon av DNA-skader. Tumorceller med en mutert BRCA1/2 variant er vesentlig mer sensitiv for PARP1-inhibitorer enn normale celler, da de ofte mangler disse reparasjonsmekanismene. PARP1-inhibitorer kan derfor benyttes som behandlingsform til bryst- og eggstokkreft.

Dagens metode for å teste mutasjoner i BRCA1/2 er basert på Ion Torrent neste generasjons sekvensering (NGS). Denne metoden kan gi usikre resultater i enkelte tilfeller, da fragmentering av nukleinsyrer er et problem i formalinfikserte, parafininnstøpte (FFPE) vevsprøver. Dette kan gjøre enkelte typer mutasjoner, som store eksondelesjoner, vanskelig å påvise. På bakgrunn av dette var det ønskelig å finne en metode for å kunne verifisere usikre resultater fra NGS-analyser, og det ved å benytte RT-PCR og sangersekvensering på isolert RNA fra FFPE vevsprøver.

RNA ble isolert fra tumorrike områder i tre FFPE vevsprøver med påviste eksondelesjoner, og fra tre normale prøver som kontroll. Som kvalitetskontroll ble RNA-konsentrasjonen målt og kvaliteten til prøvene ble sjekket ved real-time RT-PCR med  $\beta$ -actin som kontroll. Av prøvene ble cDNA-syntese og PCR med spesifikke primere gjort, før gelelektroforese ble benyttet for å kontrollere størrelsen på PCR-produkter. Til slutt ble relevante PCR-produkter sekvensert og analysert med kapillærelektroforese for å bekrefte mutasjonene.

Resultatene etter sekvensering og dataanalyse, viste at eksondelesjonene ble påvist og bekreftet med denne metoden, men resultatet var avhengige av kvaliteten på det opprinnelige prøvematerialet. Av prøvene med eksondelesjoner, så var prøve 2 av for lav kvalitet og ga ikke et tilfredsstillende resultat. Både prøve 1 og 3, samt de normale prøvene som ble benyttet som kontroller, ga forventede resultater, selv med relativt lav prøve kvalitet.

Resultatene viste at denne metoden er egnet til å påvise store eksondelesjoner i BRCA1/2 fra FFPE vevsprøver, ved bruk av RT-PCR og sangersekvensering. Den kan derfor benyttes som et alternativ til å verifisere Ion Torrent NGS-analyser, hvis disse gir usikre resultater. Det må dog tas forbehold om at metoden bare er testet på et lite antall prøver. Metoden må testes i større grad for å kunne trekke en definitiv konklusjon.

## Abstract

Breast and ovarian cancer are two of the most frequently occurring types of cancer, and are almost exclusively found in women. Mutations, both germline and somatic, in BRCA1/2, can cause these types of cancer. Depending on mutational status in BRCA1/2, patients with ovarian cancer can be eligible for maintenance treatment with a PARP1-inhibitor. This is a pharmaceutical inhibitor that inhibits PARP enzymes. These enzymes have important functions regarding to the repair of damaged DNA. Tumor cells with a mutated variant of BRCA1/2 are highly sensitive to this type of treatment, compared to normal cells. This is because they lack important DNA repair pathways. Because of this, PARP1-inhibitors can be used as maintenance treatment for patients with breast and ovarian cancer.

Today's method for testing BRCA1/2 mutations are based on Ion Torrent NGS. This method may give uncertain results in some cases, because fragmentation of nucleic acids is a common source of error in formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue samples. This can make some types of mutations, like large exon deletions, hard to verify. Because of this, it was desirable to find another way to verify these mutations and uncertain results from NGS-analyses. This was accomplished by using RT-PCR and sanger sequencing on FFPE tissue samples.

RNA was isolated from tumor rich areas in three FFPE tissue samples, with previous evidence of exon deletions, and from three normal samples used as controls. As a quality control, the RNA concentration was measured in the isolated samples, and a real-time RT-PCR reaction, with  $\beta$ -actin used as a control, was performed. A synthesis method using cDNA and an RT-PCR reaction was used to amplify the amount of relevant DNA in the samples, using specific primer pairs. Gel electrophoresis was implemented to check and verify the size of the products from the previous PCR reactions. Finally, sequencing using capillary electrophoresis and data analysis was used to confirm the exon deletions.

The results from the sanger sequencing and data analysis showed large exon deletions. However, the result was affected by the quality of the samples. Of the samples with exon deletions, sample 2 was of too low quality to yield any satisfactory results. However, sample 1, 3 and the samples used as controls produced sufficient results, even with a relatively low RNA quality.

The results show that this method is suited for detection of large exon deletions in BRCA1/2 genes from FFPE tissue samples, by using RT-PCR and sanger sequencing. It may therefore be an alternative method for verifying results from Ion Torrent NGS, if those results prove to be uncertain. However, a limitation of this study is the small number of samples, with limited variation which needs to be considered. This method therefore needs to be tested on a larger scale to draw any definitive conclusions.



# Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag .....	II
Abstract.....	III
Forkortelser .....	VIII
1 Innledning .....	1
1.1 Forekomst av bryst- og eggstokkreft i Norge og generelle risikofaktorer .....	1
1.2 Behandlingsmuligheter for eggstokkreft.....	2
1.3 BRCA1/2 sine funksjoner og mutasjonsrisiko.....	2
1.4 Poly (ADP-Ribose) polymerase 1 og bruk til kreftbehandling .....	3
1.5 PARP1s rolle i reparasjonsmekanismer av DNA.....	3
1.6 Generelt om mutasjoner og mulige konsekvenser .....	4
1.7 Generelt om polymerasekjedereaksjoner og prinsippet bak metoden.....	5
1.7.1 Trinnene i en polymerasekjedereaksjon.....	5
1.7.2 Generell informasjon om revers transkriptase PCR.....	6
1.7.3 Generelt om real-time PCR.....	6
1.8 Prinsipp for ekstraksjon av RNA fra vevsprøver .....	7
1.9 Kvalitetskontroll av RNA-ekstrakt .....	8
1.10 Generelt om elektroforese og hva det brukes til .....	8
1.10.1 Prinsippet bak gelelektroforese.....	9
1.10.2 Prinsippet bak kapillærelektroforese.....	9
1.11 Generell informasjon og prinsipp for sangersekvensering.....	10
1.12 Hensikt med oppgaven.....	11
2 Material og metode .....	12
2.1 Prøvemateriale som ble benyttet til oppgaven .....	12
2.2 Isolering av RNA fra pasientprøver .....	12
2.3 Kvantitativ kvalitetskontroll av RNA-ekstrakter .....	14
2.4 Kvalitativ kvalitetskontroll av RNA-ekstrakter med real-time RT-PCR.....	14
2.5 Resuspensjon og fortynning av primere.....	15
2.6 Tillaging av mastermix og kjøring av RT-PCR fra RNA-ekstrakt .....	15
2.7 cDNA-syntese fra RNA-ekstrakt med random hexamer primer.....	16
2.8 Tillaging av mastermix og kjøring av PCR fra syntetisert cDNA .....	16
2.9 Gelelektroforese av PCR-produkter.....	17
2.10 Rensing av PCR-produkter før DNA-sekvensering.....	17
2.11 Tillaging av mastermix og sekvensering av PCR-produkt .....	17
2.12 Rensing av sekvenseringsprodukt.....	18
2.13 Analysering av sekvenseringsprodukt på Applied Biosystems 3500XL Genetic Analyzer .....	18

2.14	Dataanalyse av sekvenseringsprodukt etter analysering .....	18
3	Resultater .....	19
3.1	Måling viste at RNA-konsentrasjon i isolerte prøver var tilfredsstillende.....	19
3.2	Kvalitetskontroll viste at amplifisering av RNA-ekstrakter ved real-time PCR er tilfredsstillende..	20
3.3	Gelelektroforese etter one-step RT-PCR av prøver med eksondelesjoner viste ingen resultat...	22
3.4	Gelelektroforese etter PCR viste tilfredsstillende resultat for to av prøvene med eksondelesjoner, prøve 1 og 3, samt for normal prøve, men lite tilfredsstillende for den siste prøven med eksondelesjon, prøve 2.....	23
3.5	Gelelektroforese etter PCR av eksondelesjonsprøven med tidligere dårlig resultat, og normalprøve med tidligere tilfredsstillende resultat, viste at eksondelesjonsprøven fortsatt har gitt for lite relevant PCR-produkt.....	26
3.6	Sekvenseringsresultat av de normale prøvene og prøvene med eksondelesjoner viste resultat som stemmer overens med tidligere gitt informasjon om prøvematerialet.....	28
4	Diskusjon .....	32
4.1	Forslag til videre arbeid .....	35
4.2	Konklusjon.....	35
5.0	Referanser .....	36
6	Vedlegg .....	39
	Vedlegg 1: Prosedyre for RNA-isolering fra vevsprøver .....	40
	Vedlegg 2: Prosedyre for måling av RNA-konsentrasjon i RNA-ekstrakter .....	47
	Vedlegg 3: Prosedyre for kvalitetskontroll av RNA-ekstrakter med $\beta$ -actin.....	55
	Vedlegg 4: Eksempel på utfylt arbeidsark til $\beta$ -actin kvalitetskontroll.....	60
	Vedlegg 5: BRCA1/2 primere som ble benyttet i oppgaven .....	61
	Vedlegg 6: Eksempel på utfylt arbeidsark til PCR-oppsett som ble utført under oppgaven.....	62
	Vedlegg 7: Eksempel på utfylt arbeidsark til rensing og sekvensering av PCR-produkt .....	63
	Vedlegg 8: Oversikt over fullstendige sekvenseringsresultater fra normale prøver .....	64
	Vedlegg 9: Oversikt over fullstendige sekvenseringsresultater fra prøver med eksondelesjoner.....	66





## Forkortelser

BRCA1/2 – Breast Cancer gene 1/2

cDNA – Komplementært DNA

Ct – Cycle Threshold

dNTP – Deoksynukleotidtrifosfat

DNase - Deoksyribonuklease

ddNTP – Dideoksynukleotidtrifosfat

ddPCR – Droplet-digital polymerasekjedereaksjon

DSB – Double Stranded Breaks, dobbelttrådbrudd i DNA

FAM – Fluorescein amidite

FFPE – Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

HR – Homolog Rekombinasjon

PARP – Poly (ADP-Ribose) Polymerase

PCR – Polymerasekjedereaksjon

qPCR – Real-time polymerasekjedereaksjon, kvantitativ polymerasekjedereaksjon

RFU – Relative Fluorescence Units

RIN – RNA integrity number

RNase – Ribonuklease

RT – Revers transkriptase

RT-PCR – Revers transkriptase polymerasekjedereaksjon

RT-qPCR – Real-time revers transkriptase polymerasekjedereaksjon

SSB – Single Stranded Breaks, enkelttrådbrudd i DNA

# 1 Innledning

## 1.1 Forekomst av bryst- og eggstokkreft i Norge og generelle risikofaktorer

Bryst- og eggstokkreft er to krefttyper, som i hovedsak rammer kvinner. I 2019 fikk 3726 kvinner diagnosen brystkreft, mot bare 27 menn (1). Dette er det høyeste antallet tilfeller av brystkreft i Norge siden det har blitt ført statistikk på sykdomsprevalensen. Til sammenligning fikk 528 kvinner diagnosen eggstokkreft i 2019 (2). Mens forekomsten av brystkreft har økt kraftig de foregående tiårene, så har forekomsten av eggstokkreft gradvis sunket (2). Felles for begge kreftformene, er at dødeligheten er på en nedadgående trend. Den 5-års relative overlevelsesraten for brystkreft er på over 90%, mens den for eggstokkreft bare er på vel 50% (1,2). Dette kommer sannsynligvis av at symptomene er mer fremtredende ved brystkreft og at alle kvinner mellom 50 og 69 år tilbys screening til mammografi hvert andre år gjennom mammografiprogrammet (3).

Risikofaktorene ved begge kreftformene er i stor grad ukjent, men visse faktorer har vist en sammenheng med økt risiko for utvikling av sykdommene. For brystkreft er det sannsynlig at en del livsstilsfaktorer kan påvirke sannsynligheten for å få diagnosen. Dette kan for eksempel omhandle kosthold, overvekt og fysisk aktivitet (3). I tillegg er det kjent at langvarig bruk av østrogenilskudd kan øke risikoen for å utvikle brystkreft, særlig i forbindelse med overgangsalderen (3). Fødsel i høy alder, eller det å ikke få barn, kan også gi forhøyet risiko (3). For eggstokkreft er det en del lignende risikofaktorer. Denne typen kreft oppstår oftere hos kvinner som ikke har født barn, enn hos de som har det. Videre er det vist at når kvinnene utvikler menstruasjon og når overgangsalder, påvirker dette risikoen for eggstokkreft (2). Felles for begge kreftformene er at det er en tydelig arvelig risiko for begge sykdommene. For brystkreft anslås det at ca. 5% av alle tilfellene skyldes arv, mens tallet er ca. 5-15% for eggstokkreft (1,2). Mutasjoner i to gener, BReast CAncer gene 1 & 2 (BRCA 1 og 2), som har som funksjon å reparere kromosomal skade, er forbundet med svært høy risiko for å utvikle bryst- og eggstokkreft (4).

## 1.2 Behandlingsmuligheter for eggstokkreft

Dagens behandlingstilbud for eggstokkreft omhandler kirurgi og eventuelt medikamentell behandling i tillegg (5). Ved mistanke om risiko for genetisk disposisjon, er gentesting og eventuell profylaktisk fjerning av bryster eller eggstokker mulige utrednings- og behandlingsmuligheter (5). Den medikamentelle behandlingen består som regel av kjemoterapeutiske medikamenter. Flere av disse medikamentene er komplekser som inneholder platinamolekyler. Generelt fungerer slike medikamenter på den måten at de inhiberer mekanismer for DNA-reparasjon og DNA-syntese ved å krysstbinde DNA-trådene, noe som resulterer i celledød via apoptose (6). Denne behandlingen fungerer ofte en periode, men mange opplever tilbakefall (residiv) (7). Slike pasienter, som kan sies å ha platina sensitiv eggstokkreft, vil kunne oppleve at en annen type medikamentell behandling fungerer bedre mot kreften. Poly (ADP-Ribose) polymerase (PARP) inhibitorer er et eksempel på slike medikamenter (4).

## 1.3 BRCA1/2 sine funksjoner og mutasjonsrisiko

BRCA1 og BRCA2 er to proteinproduserende gener. BRCA1 finnes på kromosom 17 og inneholder 24 eksoner, mens BRCA2 finnes på kromosom 13 og inneholder 27 eksoner (4). Disse proteinene har som hovedfunksjon å reparere skadet DNA. BRCA1 og BRCA2 er tumor suppressor gener. Dette er gener som regulerer celledeling og DNA-replikasjon, og som skal hindre ukontrollert cellevekst. En person arver to varianter av både BRCA1 og BRCA2. Dersom en person skulle arve en "skadet" variant, vil den normale varianten kunne ta over. Somatiske mutasjoner gjennom livet kan gjøre nok skade på den normale varianten, og pasienter som har arvet en mutert variant er dermed vist å ha mer enn 3 ganger så stor risiko for å utvikle brystkreft, og opptil 30 ganger så stor risiko for å utvikle eggstokkreft i løpet av livet (1,2). Det er vist at mutasjoner i BRCA1/2 genene også kan øke risikoen for andre krefttyper, som peritoneal og pankreatisk kreft. Noen varianter er også assosiert med økt risiko for akutt myelogen leukemi (4).

## 1.4 Poly (ADP-Ribose) polymerase 1 og bruk til kreftbehandling

Poly (ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP1) er et enzym som finnes i et stort antall i de aller fleste cellene i mennesker. Dette enzymet, samt andre PARP-enzymmer, har en rekke funksjoner som omhandler alt fra DNA-reparasjon til celledød (8). Oppdagelse av brudd i DNA-tråden av PARP1 blir sett på som et av de tidligste tegnene på skadet DNA (8). PARP1 kan syntetisere kjeder av poly (ADP-Ribose), og disse kan fungere som et signal for rekruttering av proteiner til DNA-reparasjon (8). På bakgrunn av dette kan PARP1-inhibitorer benyttes til å selektivt angripe tumorceller som ikke reparerer en slik skade på DNA, ved å hindre produksjon av PARP-enzymmer. PARP-inhibitorer konkurrerer om plassen med NAD<sup>+</sup> og bindes til det katalytiske setet i PARP-enzymmer (9). Dersom cellene ikke har en intakt BRCA-funksjon, vil cellen ikke ha tilstrekkelig DNA-reparasjonskapasitet. Da vil cellen dø, for eksempel ved å undergå apoptose (8). Normale celler, som fremdeles har et normal allel, kan fortsatt reparere det skadde DNAet. Studier har vist at både personer som har arvet en mutert utgave (germline) av BRCA 1 eller BRCA2, eller som har en somatisk mutasjon, og utviklet kreft, kan få vedlikeholdsbehandling med PARP1-inhibitor (4). Denne behandlingen har vist seg å være effektiv for å hindre videre progresjon av sykdommen, sammenlignet med utviklingen hos personer som ikke har fått denne behandlingen. Studiene viste også at personer som ble gitt behandling med PARP1-inhibitorer hadde betydelig lengre overlevelse enn personer som ikke har fått denne behandlingen (10). I dag er én PARP1-inhibitor godkjent av Statens Legemiddelverk for vedlikeholdsbehandling i Norge (5).

## 1.5 PARP1s rolle i reparasjonsmekanismer av DNA

Gjennom livet vil organismer bli eksponert for flere potensielt DNA-skadende stoffer. Som respons på dette, har en flere forskjellige mekanismer for å reparere eller fjerne disse skadene. En av disse mekanismene er for enkeltrådbrudd (Single stranded breaks, SSB) i DNA-tråden. Denne typen skade er oftest forårsaket av en oksideringsskade på DNA-basene (11). Mekanismen for å reparere denne typen skade er avhengig av PARP1 for å detektere skadestedet og for å rekruttere proteiner for reparasjon. Om PARP1 ikke er i stand til å reparere skaden, vil bruddet i enkeltråden danne dobbeltrådbrudd (Double stranded breaks, DSB) i cellene etter replikasjon. Denne typen skade kan repareres med blant annet homolog rekombinasjon (HR), som er en svært effektiv reparasjonsmekanisme med veldig lav sjans for feil (8). Denne mekanismen er avhengig av BRCA1 og BRCA2 for å fungere. BRCA1 hemmer inhibitorene for HR-mekanismene og BRCA2 hjelper til med danningen av strukturer for reparasjon (12). PARP-inhibitorer reduserer HR-aktiviteten i cellene,

slik at SSB ikke blir reparert. Dette fører til at et høyt antall DSB ikke blir reparert og resultatet kan være apoptose (9).

## 1.6 Generelt om mutasjoner og mulige konsekvenser

En mutasjon er en endring i rekkefølgen av nukleotider i genomet til en organisme, altså en endring i DNA-sekvensen (13). En mutasjon kan skje som følge av mange ulike årsaker. Mutasjoner kan oppstå tilfeldig, som følge av en skade på DNAet eller eksponering for mutagener, men de kan også nedarves genetisk. Mutasjoner kan føre til flere forskjellige endringer av nukleotidrekkefølgen, for eksempel punktmutasjoner (stille-, missense-, nonsense-, og frameshiftmutasjoner) og kromosomale mutasjoner (delesjon, inversjon, translokasjon og duplisering).

Punktmutasjoner fører som regel til en endring innbefattende ett basepar (14). Slike mutasjoner oppstår som regel under DNA-replikasjonen, og kan skje tilfeldig, eller som følge av eksponering med mutagener. En stillemutasjon har ingen konsekvens for proteinet som dannes, da aminosyren ikke endres som følge av endringen av baseparet. En missense-mutasjon fører til at endringen i basepar gir en ny aminosyre. Dette kan påvirke proteinet som dannes i varierende grad, basert på de kjemiske egenskapene til den nye aminosyren, sammenlignet med den originale. En nonsense-mutasjon er mer dramatisk, da endringen av basepar vil føre til at det originale kodonet endres til et stoppkodon, og at DNA-sekvensen termineres for tidlig og leder til et ufullstendig protein. Ved en frameshift-mutasjon vil ett basepar legges til nukleotidsekvensen, og alle kodoner vil forskyves én plass. Resultatet av dette blir at alle aminosyrene fra denne posisjonen vil endres. Dette kan påvirke proteinet i stor grad, men vil avhenge av når i nukleotidsekvensen mutasjonen oppstår. Kromosomale mutasjoner fører til ulike forandringer i selve kromosomene. Slike mutasjoner er som regel et resultat av en feil under celledelingen i mitosen / meiosen.

De vanligste mutasjonene som oppstår i BRCA1/2-genene er enkle delesjoner eller insersjoner, som bare endrer ett eller noen få nukleotider i genet. Slike enkle punktmutasjoner endrer den kodende sekvensen til genet, og har høyest prevalens av de arvelige mutasjonene i BRCA1/2-genene (15). Store genomiske omorganiseringer er mer sjeldent, og prevalensen til slike mutasjoner i BRCA1/2 er lav, men varierer en del etter ulike etnisiteter og populasjoner (15). Disse mutasjonene, som kan føre til at hele eksoner forsvinner, er i hovedsak alltid patogene. Dette fører som regel til et translasjonsprodukt med en annen struktur og/eller funksjon enn det opprinnelige.

## 1.7 Generelt om polymerasekjedereaksjoner og prinsippet bak metoden

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en metode som går ut på å amplifisere DNA, eller en spesifikk DNA-sekvens, flerfoldige ganger. I løpet av en PCR-reaksjon kan den spesifikke regionen av DNAet ha blitt amplifisert millioner til milliarder av ganger (16). Dette muliggjør det å studere DNA-sekvensen av interesse i detalj, og benyttes blant annet til å påvise virus, bakterier og mutasjoner, men benyttes også hyppig innenfor kriminalteknikk. Prinsippet bak en PCR-metode går ut på at en spesifikk del av en DNA-tråd blir amplifisert mange ganger (17). For at dette skal være mulig kreves en rekke komponenter. De helt nødvendige komponentene for et PCR-oppsett er et templat av DNAet som skal amplifiseres, varmeresistent DNA-polymerase, spesifikke primere som er komplementære til målregionen av DNA-tråden, deoksy nukleosidtrifosfater (dNTP), bivalente kationer og en bufferløsning (17). Magnesiumioner blir i hovedsak benyttet, og disse er nødvendig som en kofaktor for DNA-polymerase. Bufferløsningen tilfører stabilitet til reaksjonen, mens dNTP, som inneholder dATP, dTTP, dCTP og dGTP, er nødvendig for at DNA-polymerase skal danne en ny DNA-tråd.

### 1.7.1 Trinnene i en polymerasekjedereaksjon

Selve PCR-reaksjonen foregår vanligvis i ca. 25-40 sykluser i små reaksjonsrør. Til reaksjonen benyttes en PCR-maskin (termosyklus). De ulike delene av syklusene består av de følgende fasene: initialisering (første syklus), denaturering, hybridisering og elongering (17). Det første som skjer i en PCR-reaksjon, er initialiseringen. Da vil PCR-maskinen varmes opp til 94-96 grader celsius. Dette har to funksjoner: Det hindrer uspesifikk DNA-amplifisering og det tillater at reaksjonen kan settes opp i romtemperatur. Neste trinn i syklusen er denaturering. PCR-maskinen vil varmes opp til 94-98 grader celsius i ca. 30 sekunder, og da vil DNA-tråden denatureres, som følge av at hydrogenbindingene som holder tråden sammen blir brutt. Resultatet av dette trinnet er da to enkeltråder av DNA-templatet (17).

Den neste fasen i PCR-reaksjonen er hybridisering. Temperaturen i PCR-maskinen senkes ganske kraftig til nærmere 50-65 grader celsius, avhengig av optimal temperatur for primerne. Dette tillater at de spesifikke og komplementære primerne kan feste seg til enkeltrådene av DNA-templatet (17). Primerne, som er korte, enkeltrådede sekvenser av nukleotider, vil feste seg til komplementære deler av DNA-templatet. Det er kritisk at temperaturen i dette trinnet er optimal. Hvis den er for høy eller for lav kan det medføre at primerne enten ikke fester seg til DNA-templatet, eller at de binder seg uspesifikt, altså til andre deler av DNA-templatet enn den regionen som ønskes å amplifisere (17). Etter at primerne har festet seg til DNA-templatet vil også DNA-polymerase starte fremstillingen av en ny DNA-tråd ved å binde seg til primer-templat hybrid.

Den siste fasen av PCR-reaksjonen er elongering. Temperaturen på PCR-maskinen økes til 72 grader celsius, men denne temperaturen vil variere noe med hva som er optimalt for den spesifikke DNA-polymerasen som benyttes. Poenget med dette trinnet er at DNA-polymerase syntetiserer en ny komplementær DNA-tråd til templattråden, som i tidligere trinn har blitt denaturert hybridisert med primere. Dette kan skje på grunn av at dNTP i løsningen blir lagt til templattråden i 5'-3' retning, fra bindingsstedene til primerne (17). Etter at DNA-polymerase har syntetisert ferdig den nye DNA-tråden, vil den nye DNA-tråden og den originale templattråden bli nye templattråder for neste syklus. Slik blir antallet PCR-produkter doblet for hver syklus som går, og fører til eksponentiell vekst av den originale DNA-tråden.

### 1.7.2 Generell informasjon om revers transkriptase PCR

Revers transkriptase PCR (RT-PCR) er en variant av den konvensjonelle PCR-metoden. Revers transkriptase er et enzym som kan danne komplementær DNA (cDNA) fra et RNA-templat (mRNA). RT-PCR benytter samme prinsipp som en vanlig PCR-metode, men ved bruk av denne metoden er det ikke en DNA-sekvens som er målsekvens, men rett og slett en RNA-sekvens (18). RNA-sekvensen av interesse, vil revers transkriberes til et komplementært cDNA-produkt, før dette produktet amplifiseres som følge av en normal PCR-reaksjon (16). På grunn av dette kan RT-PCR benyttes til å detektere og amplifisere transkripsjonsprodukter til de fleste gener, men også til å detektere RNA-virus, som for eksempel SARS-CoV-2 (19). En negativ kontroll bør alltid benyttes ved slike metoder. Den negative kontrollen bør inneholde alle komponentene til reaksjonen, med unntak av revers transkriptase. Hvis det likevel ender opp med PCR amplifisering etter reaksjonen i kontrollen, så tyder det på DNA-kontaminering fra tidligere PCR-reaksjon, eller fra genomisk DNA.

### 1.7.3 Generelt om real-time PCR

Ved analysing av genuttrykk eller viralt RNA med RT-PCR, kan også mengden av nevnte RNA kvantifiseres. En vanlig metode å gjøre dette på er ved å måle fluorescensen i sanntid under amplifiseringstrinnene. Dette kalles real-time PCR, eller kvantitativ PCR (qPCR), og i kombinasjon med RT-PCR kan den kombinerte metoden forkortes til RT-qPCR (16). Målingen av fluorescens underveis i PCR-reaksjonen kan gjøres ved å benytte en TaqMan probe. En TaqMan probe inneholder en fluorofor, og vil hybridisere til DNA-tråden. Fluoroforen, for eksempel FAM (fluorescein amidite), bindes til 5'-enden av proben. Til 3'-enden av proben vil det være festet en quencher, altså en hemmer. Så lenge proben er intakt, vil quencheren inhibere all fluorescens. Etter hvert som DNA-

polymerasen forlenger DNA-tråden i elongeringstrinnet av PCR-reaksjonen, vil eksonuklease-aktivitet fra DNA-polymerase begynne å degradere og fjerne proben fra DNA-tråden. Da vil quencheren slutte å inhibere fluorescenssignalet, og mengden målt fluorescens vil være proporsjonalt med antall dannede PCR-produkter i reaksjonen (16).

PCR-reaksjonen med denne metoden kan foregå i ett eller to trinn. Med to trinn, menes det at dannelsen av cDNA ved hjelp av revers transkriptase og amplifiseringen av cDNA-produktet, foregår i to forskjellige rør. En reaksjon i ett trinn innebærer at både revers transkribering og amplifisering av cDNA skjer i samme PCR-rør.

## 1.8 Prinsipp for ekstraksjon av RNA fra vevsprøver

For å kunne utføre laboratoriearbeid på RNA, må det ekstraheres og isoleres fra vevsprøver.

Vevsprøvene som en patologisk avdeling mottar, vil være behandlet med parafin og formalin. Dette gjør at vevet bevares, ved at kryssbindinger blir dannet mellom formalin og nukleinsyrer i proteinene. Varmerbehandlingen som vevet gjennomgår under parafinstøpning, har lignende effekt på nukleinsyrene og modifierer dem også kjemisk. Når vevet når romtemperatur igjen og lagres, vil disse modifieringene føre til fragmentering og splitting av RNA og DNA. Spesielt er RNA påvirket av dette, da RNA har svakere struktur og mindre kjemisk beskyttelse enn DNA.

Først i isoleringsprosessen fra vevssnitt tilsettes noe som deparafinerer (her: Xylen) prøven, og videre må RNA-et frigjøres fra vevet. Dette gjøres som oftest ved hjelp av en lysesbuffer, som inneholder enzymer som bryter ned proteiner med spesielt fokus på deoksyribonukleaser (DNaser) og ribonukleaser (RNaser). Disse enzymene kan ødelegge RNA-et som det jobbes med å frigjøre. Etter dette går prøven gjennom en DNase-behandling, der målet er å ødelegge alt genomisk DNA, og små DNA-fragmenter i prøven. RNA og DNA deler mange egenskaper, og DNA kontaminasjon i prøven kan dermed være en stor potensiell feilkilde. Til slutt, for å kunne isolere RNA-et fra resten av prøven, brukes membraner som er spesifikke for RNA. RNAet bindes til membranen, diverse kontaminanter vaskes vekk, og RNAet elueres med nukleasefritt vann. Gjennom varmebehandling kan noen av kryssbindingene dannet i formalinbehandlingen delvis reverseres. Dermed økes utbyttet og kvaliteten av RNA-et i den ferdig isolerte prøven.



## 1.9 Kvalitetskontroll av RNA-ekstrakt

Kvalitetskontroll av isolert RNA kan gjøres ved hjelp av RT-qPCR. Denne metoden baserer seg på at  $\beta$ -actin genet amplifiseres i PCR-reaksjonen, og merkes av en fluorescerende probe.  $\beta$ -actin finnes i nesten alle humane celler og er på denne måten en god kontroll for kvaliteten på det isolerte RNAet, samt at det kan si noe om mengden RNA som skal brukes videre må justeres (20). Til denne reaksjonen benyttes RNA, som er isolert fra en  $\beta$ -actin positiv prøve, som en positiv kontroll. Det benyttes også RNase-fritt vann som en negativ kontroll / blindprøve.

Ved hver syklus i en RT-qPCR reaksjon vil fluorescensen avleses (16). Etter at alle syklusene er ferdig, vil programvaren tilhørende instrumentet gi ut et amplifikasjonsplott basert på disse avlesningene. Plottet til prøven sammenlignes med den positive kontrollen. For å sjekke kvaliteten på RNAet og reaksjonen, må det ses på bakgrunnsstøyen og Ct-verdien (Cycle threshold) på plottet. Bakgrunnsstøyen er de verdiene som måles i de første syklusene, før instrumentet registrerer en økning i fluorescens. Denne verdien vil trekkes fra verdien til selve PCR-produktet. Ct-verdien på plottet vil være den syklusen der økningen i fluorescens krysser threshold, altså terskelverdien, og dette skjer like før den log-lineære fasen. Jo lengre til høyre i plottet før prøven når Ct-verdien, jo mer fragmentert er RNAet i prøven, og desto dårligere er kvaliteten på prøven. Optimalt sett skal prøven med det isolerte RNAet nå Ct-verdien i området rundt den positive kontrollen. Formen på kurven, det vil si når og hvor mye den flater ut, vil også si noe om kvaliteten på produktet. En visuell fremstilling av et amplifikasjonsplott kan ses i vedlegg 3.

## 1.10 Generelt om elektroforese og hva det brukes til

Elektroforese er et generelt begrep som omhandler separasjon og migrasjon av ladde partikler eller molekyler under påvirkning av et strømførende felt (21). Elektroforese av nukleinsyrer, som DNA og RNA, blir hyppig brukt i forbindelse med medisinsk diagnostisering og forskning. Elektroforese er et veldig nyttig hjelpemiddel innenfor DNA-sekvensering og andre molekylærbiologiske metoder (21). Det finnes flere ulike varianter innenfor elektroforese, og to vanlige er gelelektroforese og kapillærelektroforese. Felles for disse metodene er det generelle elektroforeseprinsippet, som separerer molekylene av interesse etter størrelse.

### 1.10.1 Prinsippet bak gelelektroforese

Gelelektroforese er en metode som benyttes til å skille proteiner, eller DNA- og RNA-fragmenter. Prinsippet for gelelektroforese er basert på å separere for eksempel ulike DNA-fragmenter basert på deres størrelse, mens de vandrer nedover en gel som er tilført strøm (21). DNA har en negativ ladning pga. fosfatgruppene i DNAets rygggrad. Siden DNA-fragmentene har lik ladning, vil deres separering i gelen kun være basert på fragmentenes størrelse (21). Gelen som benyttes er ofte en agarosegel, men kan også bestå av for eksempel polyakrylamid. Agarose er et polysakkarid som stammer fra ulike typer alger. Mindre fragmenter vil vandre raskere gjennom gelen enn store fragmenter. Dette er basert på agarosekonsentrasjonen i gelen og hvor lett fragmentene kan migrere gjennom porene (21). Gelelektroforese kan benyttes til å sjekke PCR-produktene etter endt PCR-reaksjon. Ved å benytte størrelsesmarkører med kjente antall basepar, kan vandringsen til PCR-produkter på gelen sammenlignes med bånd på markøren, som vil tilsvare spesifikke antall basepar.

### 1.10.2 Prinsippet bak kapillærelektroforese

Kapillærelektroforese er en elektroforeseteknikk som benytter tynne kapillærrør til separasjon av analytter av interesse, for eksempel DNA-sekvenser (22). Disse kapillærrørene er oftest laget av kvarts og er styrket med et lag polyamid. Fordelen med kapillærelektroforese, er at den har mer varmespredning enn andre metoder, og kan dermed nytte høyere spenninger for bedre og raskere separasjon. I tillegg er det enklere for kapillærelektroforese å benytte seg av prinsippet om isoelektrisk fokusering, som baserer seg på at proteiner har forskjellige ladninger og ladningsstyrke når pHen endres. Når spenning blir satt på, oppnås en elektroosmotisk flow, som separerer molekylene. Denne oppstår på grunn av forskjellen mellom de negativt ladde kapillærrørveggene og de positivt ladde bufferionene, som vil vandre mot katoden.

## 1.11 Generell informasjon og prinsipp for sangersekvensering

DNA-sekvensering omhandler å finne rekkefølgen av nukleotidene i en gitt DNA-sekvens.

Sangersekvensering er en type DNA-sekvensering som baserer seg på bruken av dideoksynukleotider (ddNTP – ddATP, ddTTP, ddCTP og ddGTP) til å bestemme rekkefølgen av nukleotidene. I dag har ulike neste generasjons sekvenseringsanalyser (NGS-analyser) tatt over for mye av DNA-sekvenseringen (23), men sangersekvensering er fortsatt brukt, da det er en særdeles spesifikk metode innen DNA-sekvensering. En sangersekvensering krever en del like komponenter som en vanlig PCR-reaksjon, for eksempel et DNA-templat, primere, DNA-polymerase, dNTP og en bufferløsning. Ved å inkorporere ddNTP til reaksjonen, vil ikke DNA-polymerasen kunne forlenge DNA-tråden når den møter på disse nukleotidene i løsningen (24). Dette er fordi DNA-polymerase forlenger DNA-tråden i 5'-3' retning, og siden ddNTP mangler et oksygen på karbon nummer tre i ribosemolekylet, vil ikke DNA-polymerasen kunne fortsette å danne fosfodiesterbindinger til neste nukleotid (25). Dette vil skje på ulike steder i nukleotidsekvensen og resultatet vil være produkter av ulik lengde, basert på når de ulike ddNTP har terminert DNA-replikasjonen. De ulike ddNTP vil være merket med ulike fluorescerende forbindelser for identifisering senere.

Etter at de ulike produktene er dannet, kan de separeres ved hjelp av kapillærelektroforese eller gelelektroforese. De ulike produktene fra sekvenseringen, separeres basert på størrelse, og en laser vil eksitere den fluorescerende forbindelsen på de ulike ddNTP. Dette vil sende ut lys med en bestemt bølgelengde, og avgi et signal som detekteres av en sensor. Ulik programvare kan videre interpretere lyssignalet til en base (A, T, C eller G). Etter av programvaren har gjort dette med alle produktene er resultatet en datafil, som blant annet vil inneholde informasjon om DNA-sekvensen i form av et elektroferogram og en fullstendig rekkefølge av nukleotidene, samt at det gjøres en kvalitetsvurdering av resultatet.

## 1.12 Hensikt med oppgaven

Den nåværende metoden for å finne store eksondelesjoner i BRCA1- og BRCA2-genene, for å vurdere mulig behandling med PARP1-inhibitor, er basert på Ion Torrent NGS. Denne metoden blir sterkt påvirket av fragmentert DNA, som ofte kan finnes i formalinfikserte, parafininnstøpte (FFPE) vevsprøver, og som dermed kan gjøre resultatet usikkert. Dette kan være et problem med spesielt BRCA1/2 mutasjonsanalyser, da behandling med en godkjent PARP1-inhibitor er signifikant mer effektivt for kreftpasienter med germline/somatisk mutert BRCA1/2, enn for personer uten muterte BRCA1/2-gener. Dermed ønsker vi å finne alternative metoder for å identifisere BRCA1/2 mutasjoner som har forårsaket store eksondelesjoner, og som videre kan benyttes som et alternativ til å verifisere usikre resultater fra Ion Torrent NGS.

## 2 Material og metode

### 2.1 Prøvemateriale som ble benyttet til oppgaven

Ti forskjellige pasientprøver ble utlevert av faglig veileder ved Avdeling for patologi på St. Olavs hospital. Tre av prøvene hadde påvist store BRCA1/2 delesjoner, der hele eksoner var borte. Disse tre prøvene ble brukt som patogent prøvemateriale for denne oppgaven. De sju andre prøvene hadde mindre, eller ingen mutasjoner i BRCA1/2. Tre av disse prøvene ble brukt som normale prøver for denne oppgaven. Prøvene var fiksert med formalin og innstøpt i parafinblokker. Etter fiksering var de lagret som vevsblokker i romtemperatur, i Avdeling for patologi sitt lager på St. Olavs hospital i Trondheim. Alderen på prøvematerialet varierte fra år 1998 til år 2020, men de aller fleste prøvene var fra de siste fem årene. Av hensyn til personvern, ble prøvene gitt en nummerverdi fra 1-6, der 1-3 var prøvene med eksondelesjoner og 4-6 var de normale prøvene. Tabell 1 viser en oversikt over hvilket gen som var relevant og hvilke eksoner som manglet fra de forskjellige pasientprøvene.

Tabell 1: Oversikt over aktuelle gener og eksoner for prøvematerialet som ble benyttet til oppgaven

Prøvenummer	Aktuelt gen	Type mutasjon	Manglende ekson
1	BRCA2	Eksondelesjon	25
2	BRCA2	Eksondelesjon	22-24
3	BRCA1	Eksondelesjon	16
4-6	BRCA1/2	Normal	

### 2.2 Isolering av RNA fra pasientprøver

RNA ble isolert fra vevsblokkene, både med påviste eksondelesjoner i BRCA1/2 og med normale varianter av BRCA1/2-genene, fra pasientbiopsier med eggstokk- og brystkreft. RNA ble isolert etter fremgangsmåten til Avdeling for patologi på St. Olavs hospital sin prosedyre (Vedlegg 1). Områder med høy forekomst av tumorceller var markert på vevsblokkene, etter tidligere vurdering i mikroskop av ansatte på avdelingen. Disse delene av vevet ble snittet med Microm 440E sledemikrotom, med snittykkelse 20  $\mu\text{m}$ , og tilsatt i ulike Eppendorfrør. Snittene til prøvene 1-3 ble snittet av fagansvarlig bioingeniør ved avdelingen, mens snitt til prøvene 4-6 ble snittet av oss.

Rørene ble tilsatt xylen under avtrekk for deparafinering. Rørene ble blandet og sentrifugert i to minutter ved 13200 RPM. Prosessen ble gjentatt to ganger. Videre ble abs. alkohol tilsatt, og rørene ble sentrifugert igjen i to minutter på 13200 RPM. Deretter ble supernatanten fra rørene fjernet med finepoint plastpipetter, og denne prosessen ble gjentatt enda en gang. Videre ble rørene plassert på varmeblokk, satt til 37 °C frem til alkoholen hadde fordampet fullstendig.

Til resterende trinn av RNA-isoleringen ble det benyttet et RNeasy FFPE kit (Qiagen, Tyskland). Kitet inneholdt RNeasy MinElute spinnkolonner, oppsamlingsrør (1,5 og 2,0 mL), RBC-buffer (Qiagen), PKD-buffer (Qiagen), Proteinase K (Qiagen), RNase-fritt DNase (Qiagen), RNase-fritt vann (Qiagen), DNase Booster Buffer (Qiagen) og RPE-buffer (Qiagen). Proteinase K og PKD bufferen sine funksjoner var å fordøye proteiner i løsningen og delvis reversere modifiserte nukleinsyrer fra formalin. RNase-fritt DNase og DNase Booster Buffer sine funksjoner var å fjerne eventuelle rester av DNA i løsningen. RBC-bufferen ble benyttet for å ha best mulige bindingsforhold av RNA til membranen i spinnkolonnen. RPE-bufferen sin funksjon var å fjerne rester av eventuelle salter fra tidligere benyttede buffere dersom disse fremdeles var tilstede i kolonnene.

Til hvert av rørene ble det tilsatt 240 µl Buffer PKD. Deretter ble 10 µl Proteinase K tilsatt i hvert rør og rørrinnholdene ble blandet ved å skylle pipetten flere ganger. Videre, ble prøvene plassert på en Eppendorf Thermomixer med risting og en temperatur satt til 56 °C. Her sto de til vevet var fullstendig oppløst i løsningene. Videre ble termomixeren satt til 80 °C, og de stod i nye 15 minutter. Etter dette, ble rørene tilsatt 25 µl med DNase Booster Buffer og 10 µl med DNase I stock solution, og forsiktig blandet med pipette. Prøvene ble inkubert i romtemperatur i 15 minutter. Videre ble 500 µl Buffer RBC og 1200 µl abs. alkohol tilsatt, før prøvene ble forsiktig blandet med pipette.

700 µl av prøvene ble overført til RNeasy MinElute spinnkolonner med oppsamlingsrør. De ble sentrifugert i 15 sekunder på 10000 RPM og væsken i oppsamlingsrøret (filtratet) ble kastet. Resten av prøvene ble overført til samme spinnkolonne, med nytt oppsamlingsrør, og igjen sentrifugert i 15 sekunder. Filtratet ble kastet. Etter dette, ble kolonnene overført til nye oppsamlingsrør. 500 µl med Buffer RPE ble tilsatt, og prøvene sentrifugert på 10000 RPM i 15 sekunder. Filtratet ble kastet. Denne prosessen med Buffer RPE ble gjentatt, men sentrifugert på 10000 RPM i 2 minutter, i stedet for 15 sekunder. Etter dette ble kolonnene med prøvene overført til nye oppsamlingsrør og igjen sentrifugert på 13200 RPM i 5 minutter. Videre, ble kolonnene overført til 1,5 ml elueringsrør og åpnet for lufttørking på benk i 5 minutter. 80 µl RNase-fritt vann ble tilsatt direkte på membranen i spinnkolonnen og sentrifugert på 13200 RPM i 1 minutt. Etter dette ble kolonnene kastet og elueringsrørene markert og tatt med videre for måling av RNA-konsentrasjon.

### 2.3 Kvantitativ kvalitetskontroll av RNA-ekstrakter

Konsentrasjonen av RNA fra de ulike prøvene ble målt på Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen – USA, CA), etter prosedyren til Avdeling for patologi på St. Olavs hospital (Vedlegg 2). Til metoden ble det benyttet Qubit RNA HS Assay kit og RNA BR Assay kit (Invitrogen). Den eneste praktiske forskjellen mellom kitene, var i hvilket konsentrasjonsområde de målte. HS, high sensitivity, målte i et område fra 250 pg/ $\mu$ L-100 ng/ $\mu$ L. BR, broad range, målte i et område fra 1 ng/ $\mu$ L-1 $\mu$ g/ $\mu$ L.

Originalrør fra Invitrogen (0,5 mL) ble markert med enten prøvenummer eller standard. Det ble laget en arbeidsløsning av henholdsvis Qubit RNA HS og BR Reagent (Invitrogen) i et 1:200 forhold med Qubit RNA HS og BR buffer (Invitrogen). Etter dette ble det tilsatt 190  $\mu$ L arbeidsløsning til standardrørene og 195  $\mu$ L arbeidsløsning til prøverørene. Til de respektive standardrørene, ble det videre tilsatt 10  $\mu$ L av Qubit RNA HS og BR Standard (Invitrogen). Prøverørene ble tilsatt 5  $\mu$ L av respektive prøver, slik at alle rørene hadde et totalvolum på 200  $\mu$ L. Alle rørene ble blandet med vortex og spunnet ned, før rørene ble inkubert i 2 minutter i romtemperatur. Standardene ble avlest på fluorometeret, og etter dette ble prøvene avlest.

### 2.4 Kvalitativ kvalitetskontroll av RNA-ekstrakter med real-time RT-PCR

Kvalitetskontroll av RNA-ekstraktet ble utført med en real-time RT-PCR analyse på Bio-Rad CFX96, etter gjeldende prosedyre fra Avdeling for patologi på St. Olavs hospital (Vedlegg 3). Det ble fylt ut et arbeidsark for metoden, som inkluderte all informasjon om prøver, tillagingsvolum og nødvendige reagenser. Et eksempel på utfylt arbeidsark kan ses i vedlegg 4. Til kvalitetskontrollen ble det benyttet et OneStep RT-PCR Kit (Qiagen). Det ble laget en mastermix bestående av reagensene i kitet, som inneholdt følgende: RNase-fritt vann (Qiagen), PCR buffer (inkl. MgCl<sub>2</sub>) (Qiagen), dNTP mix (Qiagen) og OneStep enzyme mix (Qiagen). I tillegg til kitet, ble det benyttet  $\beta$ -actin sense og antisense primer og en  $\beta$ -actin probe (FAM). Disse var designet og tilpasset til metoden av faglig veileder. Totalvolumet av mastermixen tilsvarte én reaksjon mer enn det som skulle analyseres, for å sikre et tilstrekkelig reaksjonsvolum til alle prøvene og kontrollene. Det ble benyttet en positiv og en negativ kontroll for å kontrollere metoden. Den positive kontrollen var en  $\beta$ -actin positiv prøve fra isolert RNA, og den negative kontrollen var sterilt vann.

Det ble tilsatt 20  $\mu$ L av mastermixen til de forskjellige rørene på en hvit PCR-strip, som var spesifikk for måling av fluorescens. Konsentrasjonen av RNA i de ulike prøvene ble justert til 2 ng/ $\mu$ L, ved å fortynne med RNase-fritt vann. Videre ble 5  $\mu$ L av prøvene og den positive kontrollen tilsatt til respektive rør, slik at den totale mengden RNA til hver reaksjon var 10 ng. Til den negative kontrollen

ble det bare tilsatt 5 µL vann. Totalvolumet i hvert rør til analysering var da 25 µL. PCR-programmet som ble kjørt på Bio-Rad CFX96 innebar 50°C i 30 minutter for cDNA-syntese, 95°C i 15 minutter for inaktivering av revers transkriptase, og 40 sykluser med henholdsvis 94°C i 30 sekunder, 60°C i 1 minutt og en fluorescensavlesning. Etter endt PCR-reaksjon ble amplifikasjonsplott fra instrumentets programvare vurdert med hensyn på Ct-verdi til prøver og kontroller.

## 2.5 Resuspensjon og fortykning av primere

Primerne som ble resuspendert og fortennet, var spesialtilpasset til prøvene som ble benyttet til oppgaven, og laget av Eurogentec. Faglig veileder hadde designet og bestilt disse i forkant av prosjektet. Vedlegg 5 viser en oversikt over sekvensene til de ulike primerne, samt hvilke eksoner i BRCA 1 og 2 de hører til.

Ønsket sluttkonsentrasjon for primer stockløsning var 120 µM (200x PCR-reaksjon). Nødvendig mengde med Tris-EDTA-buffer for å oppnå disse konsentrasjonene, ble utregnet basert på stoffmengden med primer som var oppgitt fra produsent av primerne. Denne mengden ble tilsatt primerrørene for å lage stockløsningene. Videre ble 10 µl av stockløsning overført til nye rør, som var tilsatt 190 µl Tris-EDTA-buffer for å oppnå bruksløsninger med 1:20 fortykning. Stockløsningen og bruksløsningene ble så markert og overført til boks som ble oppbevart i fryser for lagring til videre bruk.

## 2.6 Tillaging av mastermix og kjøring av RT-PCR fra RNA-ekstrakt

Mastermix ble tillaget på RNA-lab, under avtrekksskap, med et OneStep RT-PCR kit (Qiagen). Det ble laget en mastermix bestående av reagensene i kitet, som inneholdt: RNase-fritt vann, PCR buffer (inkl. MgCl<sub>2</sub>), dNTP mix og OneStep enzyme mix. Totalvolum mastermix tillaget, tilsvarte én reaksjon mer enn det som skulle analyseres, for å sikre tilstrekkelig volum for pipettering. 30 µl av mastermixen ble fordelt til hvert sitt prøverør. Prøvene ble fortennet med nukleasefritt vann, slik at RNA ekstraktet skulle tilsvare 10 ng/µl. Deretter ble 10 µl av de fortynnete prøvene tilsatt til hvert prøverør. For blindprøven ble det kun tilsatt 10 µl med vann. Etter dette, ble 5 µl av forward- og reversprimere tilsatt til sine respektive prøverør. Videre ble prøvene satt på en Applied Biosystems 2720 PCR-maskin med følgende PCR program: 50 °C i 30 minutter, 95 °C i 15 minutter, og 40 sykluser bestående av 95 °C i 30 sekunder, 56 °C i 30 sekunder og 72 °C i 30 sekunder, og til slutt 72 °C i 10 minutter.



## 2.7 cDNA-syntese fra RNA-ekstrakt med random hexamer primer

cDNA ble syntetisert direkte fra RNA-ekstraktene ved å benytte SuperScript IV VILO Master Mix (Invitrogen). Kitet inneholdt en ferdigblandet mastermix, bestående av: SuperScript IV Reverse Transcriptase, RNase inhibitor, stabiliserende proteiner, oligo (dT) 18 og random hexamer primere, MgCl<sub>2</sub> og dNTP (Invitrogen). Det ble beregnet hvor stort volum av RNA-ekstraktet som var nødvendig for å oppnå en total mengde RNA på 200 ng til hver reaksjon. RNA-ekstraktet ble først tilsatt til PCR-rør og kjørt på 80°C i 10 minutter på en Applied Biosystems 2720 PCR-maskin for å reversere noen av kryssbindingene med formalin. Etter dette, ble beregnet volum av RNA-ekstraktet blandet med mastermix, og tilsatt nukleasefritt vann til et totalvolum på 20 µL i nye PCR-rør. PCR-programmet som ble kjørt innebar 25°C i 10 minutter for hybridisering av primere, 50°C i 20 minutter for revers transkribering og 85°C i 5 minutter for inaktivering av enzymet. Ferdig syntetisert cDNA ble oppbevart i fryser for fremtidig bruk.

## 2.8 Tillaging av mastermix og kjøring av PCR fra syntetisert cDNA

Mastermix ble tillaget på PCR-prep lab, under avtrekksskap, basert på utfylt arbeidsark i Excel, etter avdeling for patologi ved St. Olavs hospital sin metode (Vedlegg 6). Mastermixen inneholdt sterilt vann (Applied Biosystems, UK), PCR buffer (Applied Biosystems), dNTP mix (Applied Biosystems), BRCA1/2 sense og antisense primere, AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems) og MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems). Det ble tillaget et totalvolum av mastermixen tilsvarende én reaksjon mer enn det som skulle benyttes for å sikre nok volum uten luftbobler. Det ble fordelt 25 µL av mastermixen til ulike PCR-rør og deretter ble 5 µL av prøvene tilsatt til respektive rør, slik at totalvolumet til PCR-reaksjonen var 30 µL. PCR-rørene ble satt på en Applied Biosystems 2720 PCR-maskin og PCR-programmet som ble kjørt innebar 95°C i 10 minutter, 40 sykluser med 95°C i 30 sekunder, 56°C i 30 sekunder og 72°C i 30 sekunder, før det ble avsluttet med 72°C i 10 minutter.

## 2.9 Gelelektroforese av PCR-produkter

En 2% E-gel (Invitrogen) ble valgt ut og kammen i gelen fjernet. Etter dette, ble 10 µl med PCR-produkt av prøvene tilsatt i hver sine brønner i gelen, og 20 µl E-Gel 50 bp DNA ladder (Invitrogen) ble tilsatt i brønnene på hver ende av prøvebrønnene, som en størrelsesmarkør. Deretter ble gelen satt i E-Gel iBase (Invitrogen) på E-gel program satt til 15 minutter. For avlesning, ble gelen satt i et gel-dokumentasjonssystem, GeneFlash Bio Imaging (Syngene – USA, MD), med UV lys, og utskrift ble tatt. Båndene fra prøvebrønnene ble sammenlignet med båndene til størrelsesmarkøren.

## 2.10 Rensing av PCR-produkter før DNA-sekvensering

Etter endt PCR-reaksjon, ble 4 µl ExoProStar (Illustra, UK) blandet med 10 µl PCR-produkt. Videre ble prøvene inkubert på 37 °C i 15 minutter i en Applied Biosystems 2720 PCR-maskin for å aktivere enzymet og bryte ned overflødig primere og nukleotider. Deretter ble prøvene inkubert på nytt på 80°C i 15 minutter for å deaktivere enzymet.

## 2.11 Tillaging av mastermix og sekvensering av PCR-produkt

Før sekvensering, ble det fylt ut et arbeidsark i Excel, med tillagingsvolum og fordelingsvolum for mastermix, samt PCR-program (Vedlegg 7). Mastermixen ble tillaget basert på arbeidsarket med nukleasefritt vann (Applied Biosystems), BigDye Terminator 3.1 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems), BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) og de tilsvarende primerne til prøvene, som ble benyttet under foregående PCR-reaksjon. Det ble laget ett rør med sense-primer og ett rør med antisense-primer for hver prøve. De samme primerne som ble benyttet til den opprinnelige PCR-reaksjonen, ble brukt videre. 14 µl av mastermixen ble fordelt i respektive rør, sammen med 6 µl rensert PCR-produkt fra de ulike prøvene. Deretter ble løsningene satt på en Applied Biosystems 2720 PCR-maskin med et sekvenseringsprogram som tilsvarte 96 °C i 1 minutt og 25 sykluser med 96 °C i 10 sekunder, 56 °C i 5 sekunder og 60 °C i 2 minutter og 30 sekund.

## 2.12 Rensing av sekvenseringsprodukt

For rensing av sekvenseringsprodukt, ble det benyttet BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). Dette kitet inneholdt BigDye XTerminator Solution og SAM Solution (Applied Biosystems). Før bruk, ble reagensene blandet godt. SAM Solution og BigDye XTerminator Solution ble blandet i et traub til en homogen løsning, og 55 µl av denne blandingen ble fordelt i en ABI-plate (Applied Biosystems), med 10 µl sekvenseringsprodukt for hver prøve. Deretter ble platen forsegleet med MicroAmp Clear Adhesive Film (Applied Biosystems) og ristet på Eppendorf Mixmate i 30 minutter på 2000 RPM. Videre, ble platen sentrifugert i 2 minutter på 1000g. Til slutt, ble plastfilmen fjernet, gummilokk satt på, og platen tatt med videre til analysering.

## 2.13 Analysering av sekvenseringsprodukt på Applied Biosystems 3500XL Genetic Analyzer

ABI-platen med rensert sekvenseringsprodukt, ble satt i en beholder spesifikt for instrumentet, og videre ble platen plassert i instrumentet. Informasjon om prøvene som skulle bli analysert, ble lagt til i dataprogrammet tilhørende til instrumentet. Det ble importert en ferdiglaget platemal til systemet. Riktig sekvenseringsprogram ble valgt, og ABI-platen ble linket for analysering.

## 2.14 Dataanalyse av sekvenseringsprodukt etter analysering

Etter endt analysering, ble resultatene gjennomgått med faglig veileder i programmet Applied Biosystems SeqScape Software. Dette programmet bearbeidet resultatene fra instrumentet og produserte et elektroferogram, der de ulike basene var gitt ulike farger etter resultater fra sekvenseringen. Programvaren hadde også omgjort elektroferogrammene til fullstendige sekvenser med bokstaver, samt gitt en kvalitetsvurdering av hver enkelt base.

Resultatene fra sekvenseringen, ble bearbeidet videre ved å sjekke databaser og nettsider som inneholdt fullstendige sekvenser til BRCA1 og BRCA2. Ensembl.org og GeneCards.org ble brukt til å finne og sammenligne oppnådde sekvenseringsresultater, med fasitsekvenser for BRCA 1 og 2.

## 3 Resultater

### 3.1 Måling viste at RNA-konsentrasjon i isolerte prøver var tilfredsstillende

Måling av RNA-konsentrasjon etter isolering ble gjort for å sikre at prosedyren var vellykket og at prøvene kunne benyttes videre. RNA-isolering av prøvene ble utført etter metoden beskrevet i kapittel 2.2, og måling av RNA-konsentrasjon i de ulike prøvene ble gjort som forklart i kapittel 2.3. Alle prøvene hadde en målt konsentrasjon innenfor måleområdet til de ulike reagensene. Det var derfor ikke nødvendig med fortynning av RNA-ekstraktene. Målt konsentrasjon tilsvarte forventningene, etter mengden vev som ble tilsatt under RNA-isolering. Målte konsentrasjoner fra de isolerte prøvene på Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) er presentert i tabell 2.

*Tabell 2: Oversikt over målte RNA-konsentrasjoner fra RNA-ekstraktene til de ulike prøvene etter isolering. Måling av konsentrasjon ble gjort med Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen).*

Prøvenummer	Målt RNA-konsentrasjon (ng/ $\mu$ l)
1	22,4
2	74,0
3	40,0
4	182,0
5	212,0
6	212,0

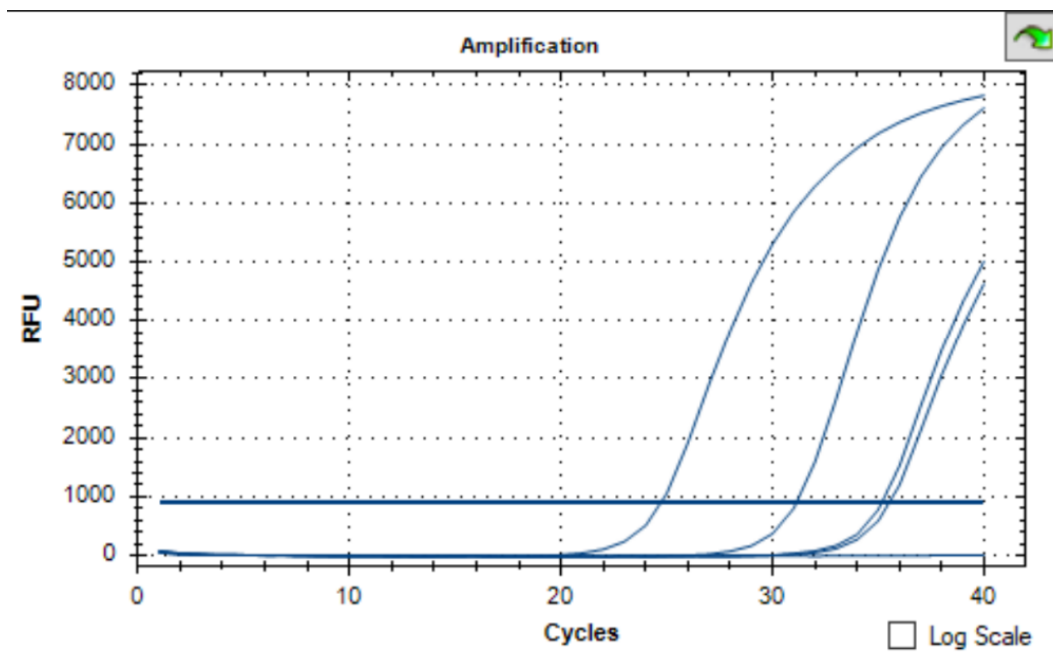
### 3.2 Kvalitetskontroll viste at amplifisering av RNA-ekstrakter ved real-time PCR er tilfredsstillende

Real-time PCR, med  $\beta$ -actin som kontroll, ble utført for å sikre tilstrekkelig kvalitet av prøvene og for eventuelt å justere mengden RNA til videre bruk. Kvalitetskontroll av RNA-ekstraktene, ble utført etter metoden som er beskrevet i kapittel 2.4. Metoden ble utført to ganger, ved separate anledninger. Et eksempel på utfylt arbeidsark i Excel fra metoden kan ses i vedlegg 4. Samtlige RNA-ekstrakter hadde en Ct-verdi som var vesentlig høyere enn den positive kontrollen. Den negative kontrollen hadde ingen målbar fluorescens etter endt reaksjon, og de andre resultatene kunne bli sett på som troverdige. Tabell 3 viser en samlet oversikt over Ct-verdiene til de ulike prøvene samt de positive og negative kontrollene. Oppnådde resultater fra kvalitetskontrollene kan ses i figur 1 og 2. Figurene viser amplifikasjonsplottene til de forskjellige prøvene, samt en positiv og en negativ kontroll.

Tabell 3: Oversikt over oppnådde Ct-verdier etter kvalitetskontroll med real-time PCR av RNA-ekstrakter og kontroller.

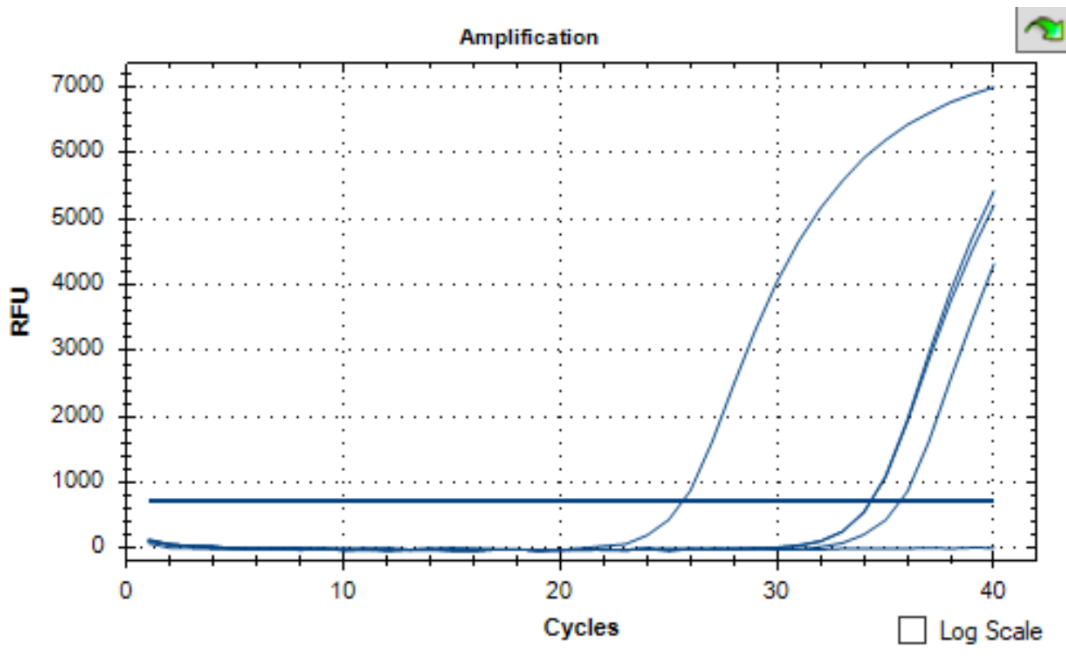
Prøvenummer	Ct-verdi
Negativ kontroll (1-3)	0
Negativ kontroll (4-6)	0
Positiv kontroll (1-3)	25,63
Positiv kontroll (4-6)	24,74
1	34,31
2	35,66
3	34,32
4	35,53
5	35,18
6	31,14

Resultatene etter RT-qPCR, med  $\beta$ -actin som kontroll, viste at en tilfredsstillende mengde DNA av de normale prøvene hadde blitt amplifisert etter endt reaksjon. Ct-verdiene var ikke optimale, da de var høye sammenlignet med positiv kontroll, men mengden amplifisert DNA var tilstrekkelig. Figur 1 viser amplifikasjonsplottet til de tre prøvene som ble benyttet som normale prøver i oppgaven. Kurven lengst til venstre, tilsvarer den positive kontrollen og har en Ct-verdi på 24,74. Den negative kontrollen er den linjen som ligger på rundt null relative fluorescens units (RFU) gjennom hele plottet. Skjæringspunktet mellom linjen på rundt 1000 RFU og de andre kurvene, vil tilsvare Ct-verdiene til de forskjellige prøvene.



Figur 1: Amplifikasjonsplott av normale prøver etter real-time PCR med  $\beta$ -actin primere og probe. Plottet viser Ct-verdiene (cycle threshold) til de ulike prøvene og kontrollene, der den første kurven er den positive kontrollen, og de andre er prøvene som brukes som normale prøver. Prøve 6 er den andre kurven og de to siste kurvene er for prøve 4 og 5. Den negative kontrollen er den flate linjen som ligger rundt 0 relative fluorescence units (RFU).

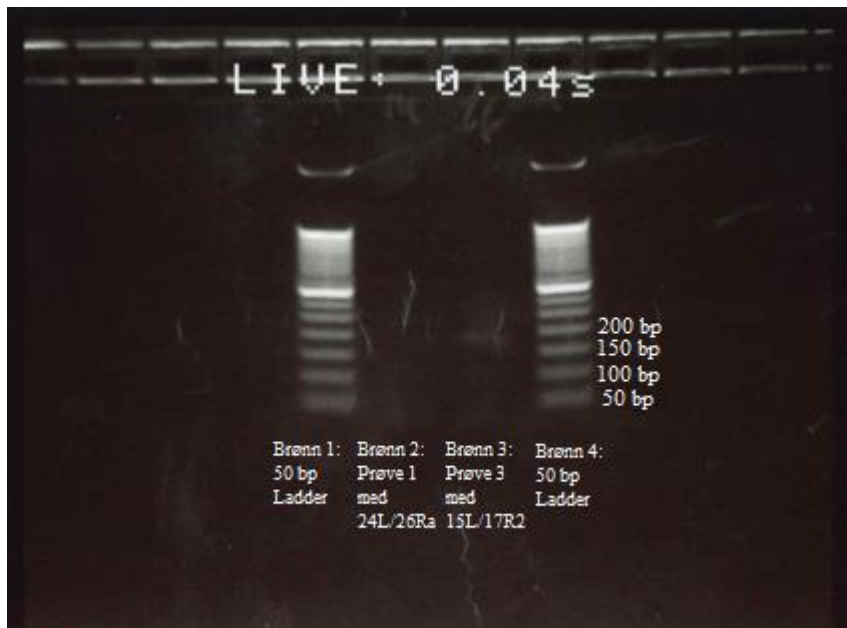
Resultatene etter RT-qPCR, med  $\beta$ -actin som kontroll, viste at en tilfredsstillende mengde DNA av prøvene med eksondelesjoner hadde blitt amplifisert etter endt reaksjon. Ct-verdiene var høye sammenlignet med positiv kontroll, men mengden amplifisert DNA var tilstrekkelig for videre bruk av prøvematerialet. Figur 2 viser amplifikasjonsplottet til prøvene med påviste eksondelesjoner i BRCA 1 og 2, i tillegg til en positiv og en negativ kontroll. Kurven for positiv kontroll er lengst til venstre og har en Ct-verdi på 25,63. Linjene til negativ kontroll og skjæringspunktene mellom den andre linjen og prøvene vil tilsvare tidligere forklaring til figur 1.



Figur 2: Amplifikasjonsplott av prøver med eksondelesjoner, etter real-time PCR med  $\beta$ -actin primere og probe. Plottet viser Ct-verdiene (cycle threshold) til kontrollene og prøvene. Den første kurven tilhører den positive kontrollen, og de tre andre tilhører prøvene med eksondelesjoner. Den negative kontrollen er den flate kurven, som ligger rundt 0 relative fluorescence units (RFU).

### 3.3 Gelelektroforese etter one-step RT-PCR av prøver med eksondelesjoner viste ingen resultat

Gelelektroforesen av prøvene med eksondelesjoner ble utført etter one-step RT-PCR, for å vurdere tilstedeværelse og mengde relevant PCR-produkt, samt størrelse på eventuelle bånd etter hvilke primerpar som ble brukt. Oppsett av one-step RT-PCR, og kjøring av gelelektroforese, ble utført etter metodene som er beskrevet i kapittel 2.6 og 2.9. Til brønn 1 og 4 ble det tilsatt størrelsesmarkøren 50 bp DNA Ladder. Som det kommer frem i figuren, er det ingen PCR-produkt i brønn 2, som var tilsatt prøve med eksondelesjon, prøve 1. Brønn 3, som inneholdt prøve 3 med eksondelesjon i BRCA1, har fått frem et veldig svakt bånd, som ikke ble benyttet videre til sekvensering. Primerne som ble benyttet til denne PCR-reaksjonen, var BRCA2 24L/26Ra og BRCA1 15L/17R2. Primersekvensene kan ses i vedlegg 5. Figur 3 viser resultatet av gelelektroforese etter endt one-step RT-PCR reaksjon av to av prøvene med eksondelesjoner, prøve 1 og 3.



Figur 3: Gelelektroforesen ble utført etter one-step RT-PCR av to av prøvene med eksondelesjoner, prøve 1 og 3, med primerpar BRCA2 24L/26Ra og BRCA1 15L/17R. 50 bp DNA ladder ble tilsatt i brønn 1 og 4. Prøve 1 fikk dårlig resultat uten synlig bånd i brønnen. Prøve 3 fikk et svakt bånd synlig i brønnen på lengde rundt 175 bp, men båndet var svakt og lite tydelig.

3.4 Gelelektroforese etter PCR viste tilfredsstillende resultat for to av prøvene med eksondelesjoner, prøve 1 og 3, samt for normal prøve, men lite tilfredsstillende for den siste prøven med eksondelesjon, prøve 2.

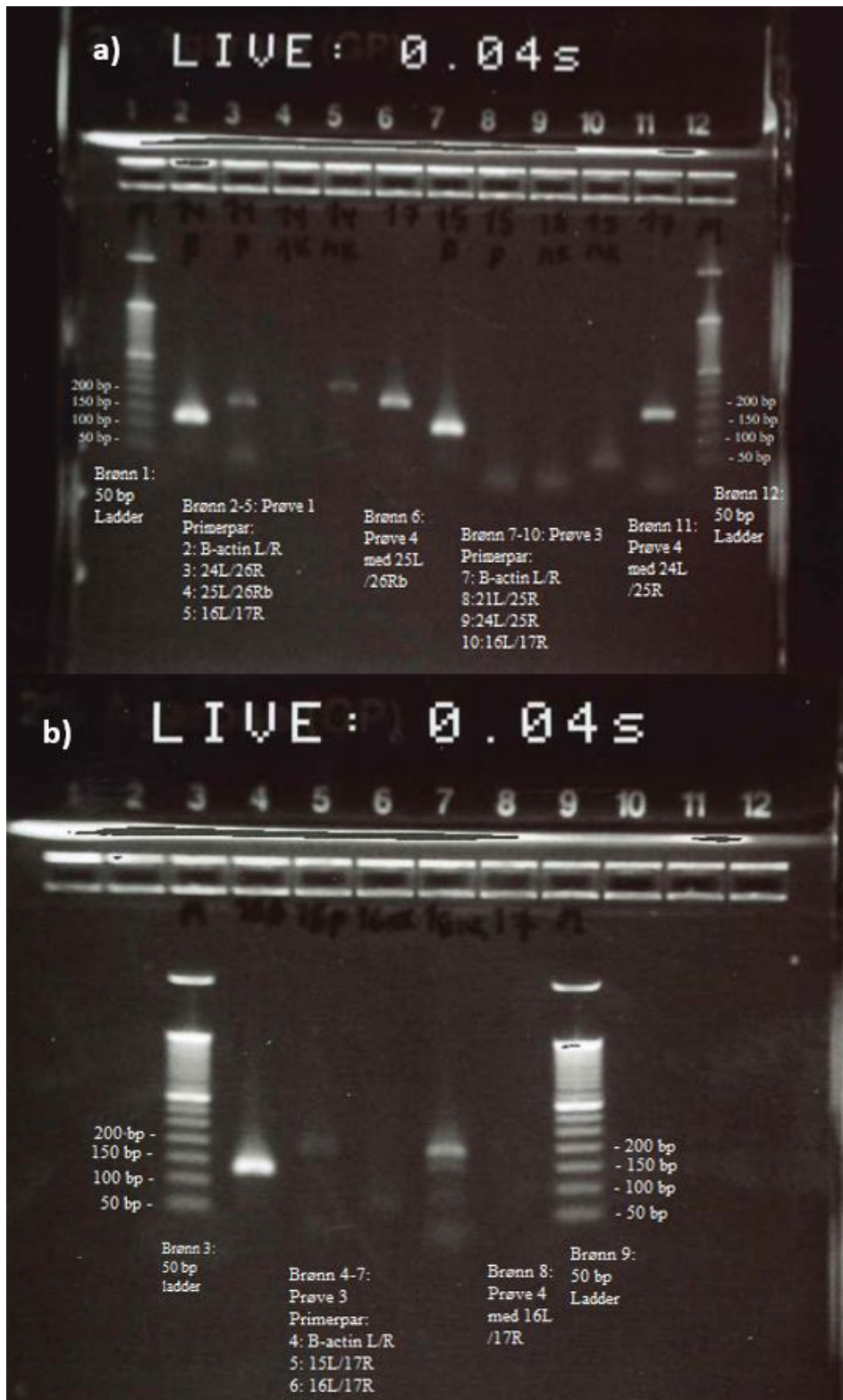
Syntetisering av cDNA med random hexamer primer og påfølgende PCR-reaksjon ble utført på bakgrunn av manglende resultat etter one-step RT-PCR, og gelelektroforese etter PCR-reaksjon. cDNA-syntese og PCR ble utført etter metodene beskrevet i kapittel 2.7 og 2.8. Gelelektroforesen ble utført etter metoden beskrevet i kapittel 2.9. Det ble utført i to geler på grunn av begrensinger med antall brønner i gelen. Til brønn 1 og 12 i første gel og brønn 1 og 6 i andre gel ble det tilsatt størrelsesmarkør 50bp DNA ladder. Prøvene som ble brukt i denne PCR-reaksjonen og gelelektroforesen var alle prøvene med eksondelesjoner samt en prøve tatt med som normal. Primerne som ble benyttet til PCR-reaksjonen var  $\beta$ -actin L/R, BRCA2 24L/26Ra, BRCA2 25L/26Rb, BRCA1 16L/17R, BRCA2 21L/25R, BRCA2 24L/25R, BRCA1 15L/17R og BRCA2 25L/26R. En oversikt over primersekvensene kan ses i vedlegg 5.



Oppsettet av gelelektroforesen er vist i tabell 4 som også inneholder forventet størrelse på PCR-produktene. Figur 4 og 5 viser resultatet av gelelektroforese etter cDNA-syntese og PCR-oppsett av prøvene med eksondelesjoner samt normalprøven. Som figur 4 viser, så hadde prøve 2 et svært dårlig resultat uten bånd med forventet lengde. På bakgrunn av at primerparene fungerte bra med andre prøver, var det forventet å få PCR-produkter med lengder fra 150-250 bp, avhengig av brønn. Videre analyse og sammenligning med normalprøve ble derfor utført på prøve 2 for å bekrefte at prøven var av for dårlig kvalitet for sekvensering.

Tabell 4: Oppsett av gelelektroforese etter cDNA-syntese og PCR. Tabellen viser innholdet i de forskjellige brønnene og hvilke primerpar som ble benyttet. Tabellen viser også forventet størrelse på PCR-produkter, basert på hvilke primerpar som ble benyttet.

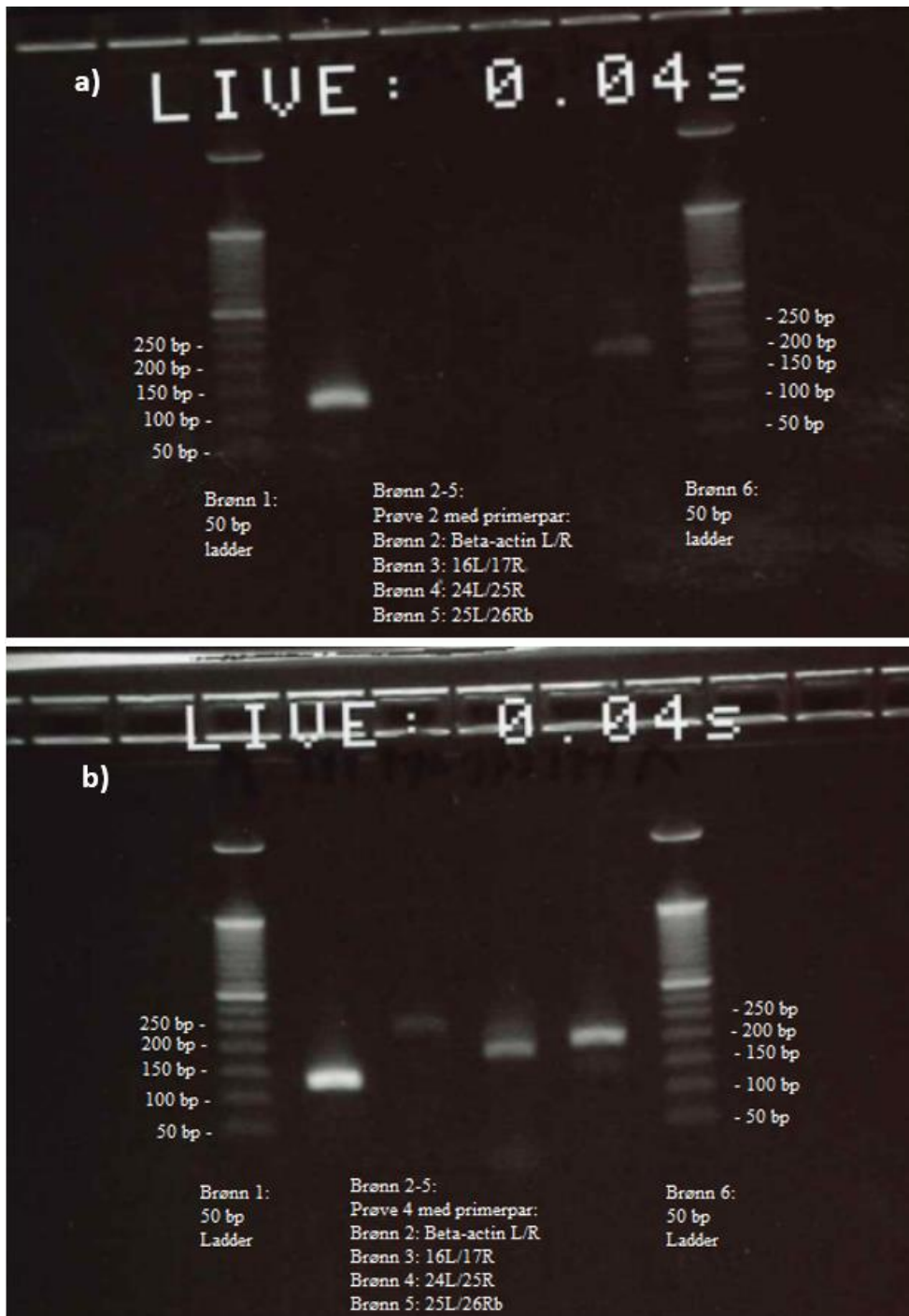
Gel 1												
Brønn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Prøve	50 bp ladder	1	1	1	1	4	2	2	2	2	4	50 bp ladder
Primerpar (BRCA1/BRCA2)	NA	$\beta$ -actin L/R	24L/26Ra	25L/26Rb	16L/17R	25L/26Rb	$\beta$ -actin L/R	21L/25R	24L/25R	16L/17R	24/25R	NA
Forventet bp lengde	NA	125 bp	175 bp	196 bp	240 bp	196 bp	125 bp	222 bp	247 bp	240 bp	247 bp	NA
Gel 2												
Brønn	3	4	5	6	7	8	9					
Prøve	50 bp ladder	3	3	3	3	4	50 bp ladder					
Primerpar	NA	$\beta$ -actin L/R	BRCA1 15L/17R	BRCA1 16L/17R	BRCA2 25L/26Ra	BRCA1 16L/17R	NA					
Forventet bp lengde	NA	125 bp	205 bp	240 bp	196 bp	240 bp	NA					



Figur 4: Gelelektroforese ble utført etter cDNA-syntese og PCR-amplifisering for å finne ut om det ble produsert nok relevant PCR produkt. Resultatet av gel 1 er vist i a) og resultatet av gel 2 er vist i b). En av prøvene med eksondelesjon i a), prøve 2, ga dårlige resultat i alle brønnene og det ble dermed utført videre analyse på for å sammenligne med en normalprøve. De to andre prøvene med eksondelesjon, prøve 1 og prøve 3, ga forventet resultat. Normalprøven fikk forventet resultat i alle brønnene med unntak av brønn 8 i b) der det ikke ble noe synlig bånd.. NB! Grunnet måten gelen sprer strøm på vandrer de midterste brønnene lengst, bp-linjene fra 50 bp-ladder blir dermed konveks.

### 3.5 Gelelektroforese etter PCR av eksondelesjonsprøven med tidligere dårlig resultat, og normalprøve med tidligere tilfredsstillende resultat, viste at eksondelesjonsprøven fortsatt har gitt for lite relevant PCR-produkt

Gelelektroforese ble utført på eksondelesjonsprøven med dårlig resultat fra 3.4, og prøven brukt som normal i 3.4 med samme primere, for å bekrefte at kvaliteten til eksondelesjonsprøven var for svak, og at primerne fungerte som de skulle på normalprøven. cDNA-syntesen og PCR-oppsettet ble utført etter metodene beskrevet i kapittel 2.7 og 2.8 før gelelektroforese. Gelelektroforesen ble utført etter metoden beskrevet i kapittel 2.9. Primerparene som ble benyttet for denne metoden var  $\beta$ -actin L/R, BRCA1 16L/17R, BRCA2 24L/25R og BRCA2 25L/26Rb med 50bp DNA ladder i første og siste brønn. Primersekvensene kan ses i vedlegg 5. Oppsettet var likt for begge prøvene. Den normale prøven, prøve 4, hadde synlige bånd i alle brønnene. Eksondelesjonsprøven, prøve 2, hadde et tydelig bånd i  $\beta$ -actin brønnen og et svakt bånd i brønnen med BRCA2 25L/26Rb. PCR-produktene til prøve 4 ble benyttet videre til sekvensering. Figur 5 viser resultatet etter gelelektroforese av eksondelesjonsprøven og normalprøven, etter cDNA-syntese, PCR og med oppsett med kontrollprimere.



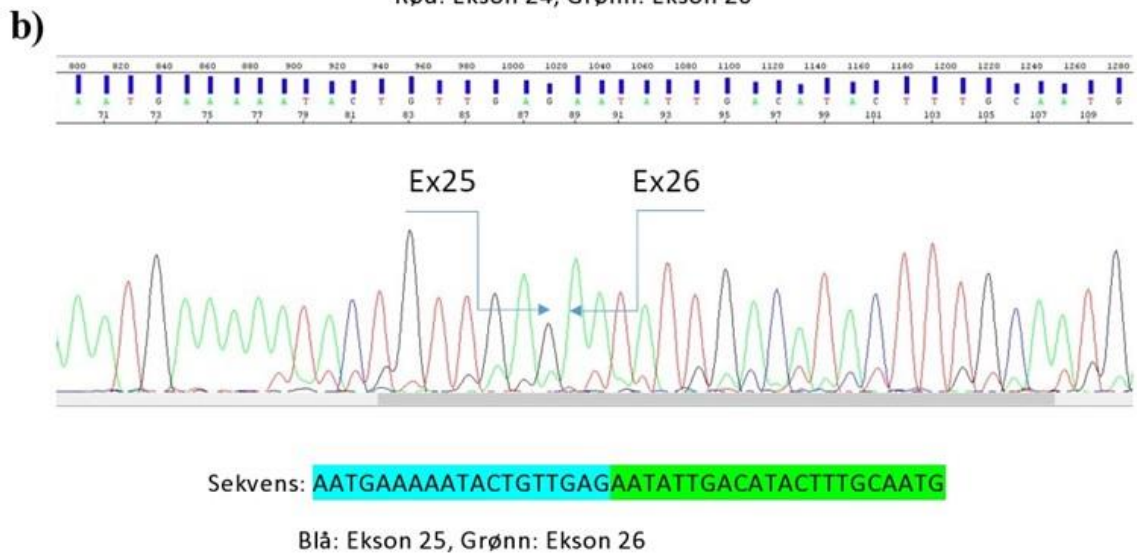
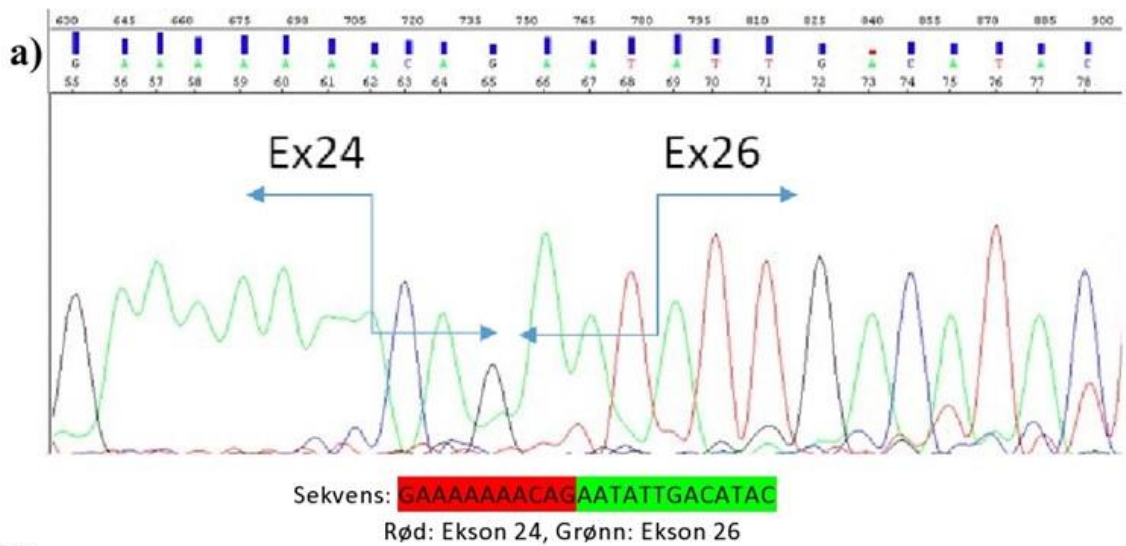
Figur 5: Ny gelelektroforese ble satt opp på eksondelesjonsprøven med tidligere dårlig resultat, prøve 2, (a) og prøven brukt som normal i 3.4, prøve 4, (b) for å bekrefte at eksondelesjonsprøven var for fragmentert til å gi nok PCR-produkt til sekvensering. Normalprøven ble brukt for sammenligning, og samme primerpar ble brukt i brønnene for begge prøvene. Resultatet viste tydelige bånd for normalprøven, men svake eller ingen bånd for eksondelesjonsprøven, som tydet på at primerene fungerte og at eksondelesjonsprøven var for fragmentert.

### 3.6 Sekvenseringsresultat av de normale prøvene og prøvene med eksondelesjoner viste resultat som stemmer overens med tidligere gitt informasjon om prøvematerialet

De ulike prøvene ble sangersekvensert for å bekrefte rekkefølgen av nukleotider på PCR-produktene, og for å kunne med sikkerhet påvise eksondelesjonene i de utleverte prøvene. Fra tidligere analyser utført av annet personell, skulle en av prøvene ha eksondelesjon av BRCA2 ekson 25 og en annen prøve eksondelesjon av BRCA1 ekson 16. Av prøven med eksondelesjon av BRCA2 ekson 22 til ekson 24 ble det ikke utført sekvensering, da denne ble vurdert som for fragmentert i 3.4. Tidligere behandling av prøvene, og forventede eksondelesjoner, står nærmere forklart i 2.1. Prøvene ble gjort klar for sekvensering etter metodene beskrevet i kapittel 2.10, 2.11 og 2.12. Videre, ble sekvenseringen utført på Applied Biosystems 3500 XL Genetic Analyzer, som beskrevet i kapittel 2.13 og resultatene analysert og gjennomgått som beskrevet i kapittel 2.14. Fullstendige resultater av sekvenseringene finnes i vedlegg 8 og 9.

Figur 6.a er et utsnitt av sekvenseringsresultatet, som viser overgangen fra ekson 24 til ekson 26 i BRCA2-genet til eksondelesjonsprøven med forventet eksondelesjon av BRCA2 ekson 25. Dette bekrefter at mutasjonen i prøven har ført til en eksondelesjon av ekson 25. Elektroferogrammet, som sekvenseringsprogramvaren ga ut etter analysering, ble gitt ulike farger etter hvilke nukleotider som toppene tilsvarte. Nukleotidrekkefølgen ble sammenlignet med BRCA2-sekvenser vist i figur 6.c, for å bekrefte tilstedeværelsen av eksondelesjonen. Primerne som ble benyttet for denne prøven var BRCA2 24L og 26Ra. Figur 6.b viser også et utsnitt av sekvenseringsresultatet for BRCA2-genet til prøve brukt som normalprøve uten eksondelesjon, som viser den normale overgangen fra ekson 25 til ekson 26. Primerne som ble benyttet for denne prøven var BRCA2 25L og 26Rb.





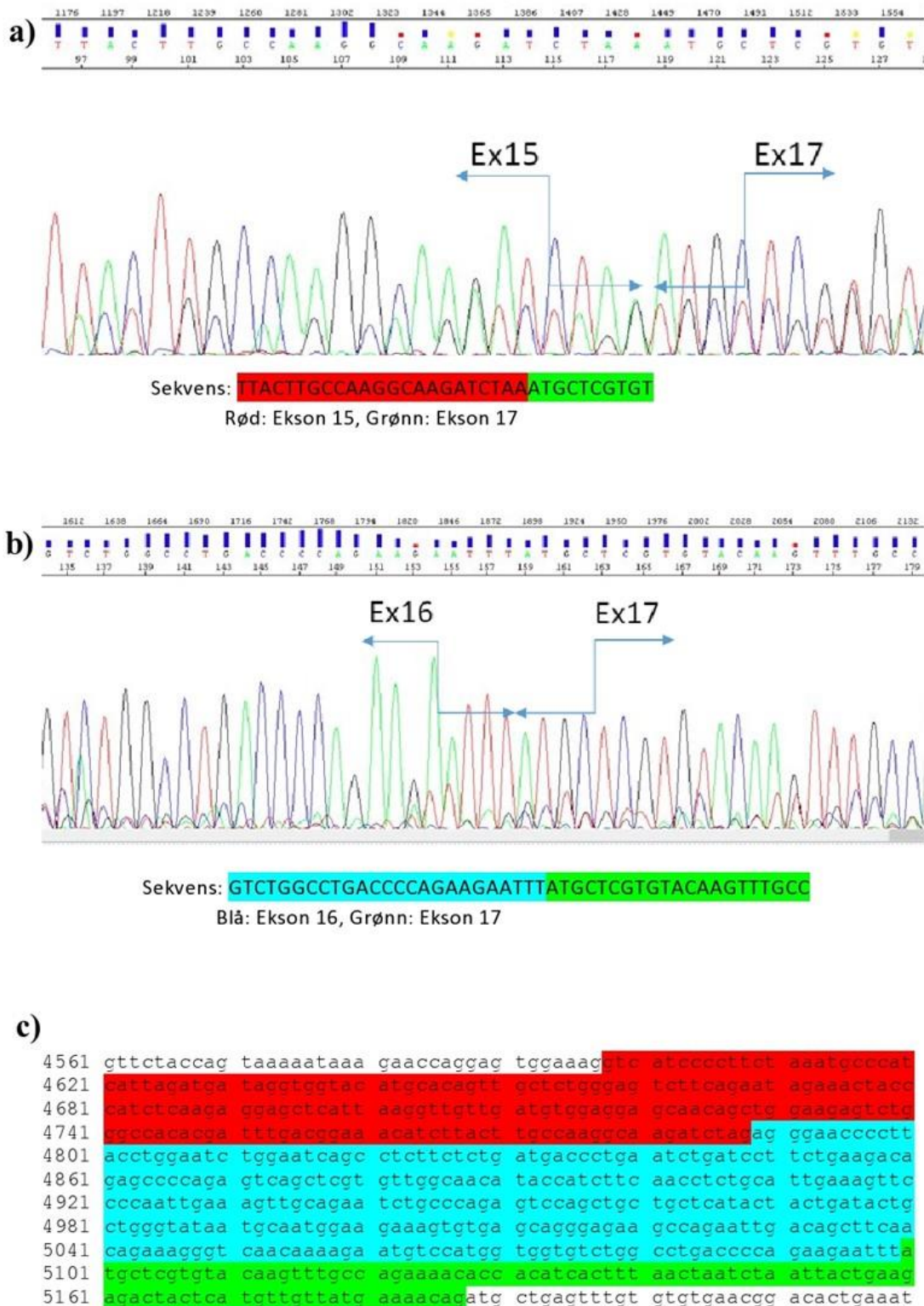
c)

```

9301 gtatcaacaa ctaccgggttt cagatgaaat tttatttcag attfaccagc cacgggagcc
9361 ccttcacttc agcaaatctt tagatccaga ctttcagcca tcttgctctg aggtggaact
9421 aataggattt gtcctttctg ttgtcaaaaa aacaggactt gccctttctg tctatttgtc
9481 agacgaatgt tacaatttac tggcaataaa gttttggata gacctaatg aggacattat
9541 taagcctcat atgttaattg ctgcaagcaa cctccagtgg cgaccagaat ccaaatcagg
9601 ccttcttact ttatttgctg gagatttttc tgtgtttct gctagtcaa aagaggcca
9661 ctttcaagag acattcaaca aaatgaaaa tactgttgag aatattgaca tactttgcaa
9721 tgaagcagaa aacaagctta tgcataact gcatgcaaat gatcccaagt ggtccacccc
9781 aactaaagac tgtacttcag ggccgtaac tgctcaaatc attctctgta caggaacaaa
9841 gcttctgatg tcttctccta attgtgagat atattatcaa agtcctttat cactttgtat
  
```

Figur 6: Sekvensering ble utført på prøven med eksondelesjon av BRCA2 ekson 25, etter RT-PCR med primerpar BRCA2 24L/26Ra. Sekvensering ble også utført på prøve 4, den normale prøven, sitt BRCA2-gen i samme eksonområde, etter PCR-oppsett med primerpar BRCA2 25L/26Rb. Dette for å få et resultat å sammenligne med. Resultatet ble analysert i (a og b) og bearbeidet av programvaren, Applied Biosystems SeqScape software. De grønne toppene i utskriften markerer adenin (A), røde markerer thymine (T), svarte markerer guanine (G) og blå markerer cytosine (C). Rekkefølgen på disse basene danner en sekvens. Disse sekvensene ble sammenlignet med nettressurser, som nevnt i kapittel 2.14 (Ensembl.org & GeneCards.org), av BRCA2 genet, for å finne overgangene mellom ekson 24, 25 og 26. Disse er fargekodet som rød, blå og grønn (c). Dette viste at prøven med eksondelesjon, prøve 1, mangler BRCA2 ekson 25, og går fra ekson 24 til ekson 26. Dette viste også at i den normale prøven, prøve 4, så har sekvensen en normal overgang fra ekson 25 til ekson 26 i BRCA2.

Figur 7.a er et utsnitt av sekvenseringsresultatet i form av et elektroferogram, som viser overgangen fra ekson 15 til ekson 17 i BRCA1-genet, for prøven med forventet eksondelesjon av BRCA1 ekson 16. Dette bekrefter at mutasjonen i prøven har ført til eksondelesjon av ekson 16. Elektroferogrammet, som sekvenseringsprogramvaren ga ut etter analysering, ble gitt ulike farger etter hvilke nukleotider som toppene tilsvarte. Nukleotidrekkefølgen ble sammenlignet med BRCA1-sekvenser for å bekrefte tilstedeværelsen av eksondelesjonen vist i figur 7.c. Primerne som ble benyttet for denne prøven, var BRCA1 15L og 17R. Figur 7.b viser også et utsnitt av sekvenseringsresultatet for BRCA2 genet til en prøve uten eksondelesjoner, som viser den normale overgangen fra ekson 25 til ekson 26. Primerne som ble benyttet for denne prøven, var BRCA1 16L og 17R.



Figur 7: Sekvensering ble utført på prøven med eksondelesjon av BRCA1 ekson 16, etter PCR-oppsett med primerpar BRCA1 15L/17R. Sekvensering ble også utført på en normalprøve sitt BRCA1-gen i samme eksonområde, etter PCR-oppsett med primerpar BRCA1 16L/17R for å få et resultat å sammenligne med. Resultatet ble analysert og bearbeidet av programvaren (Applied Biosystems SeqScape software) (a og b). De grønne toppene i utskriftene markerer adenin (A), røde markerer thymine (T), svarte markerer guanine (G) og blå markerer cytosine (C). Rekkefølgen på disse basene danner en sekvens. Disse sekvensene ble sammenlignet med nettressurser, som nevnt i kapittel 2.14 (Ensembl.org & GeneCards.org), av BRCA1 genet, for å finne overgangene mellom ekson 15, 16 og 17. Disse er fargekodet som rød, blå og grønn (c). Dette viste at eksondelesjonprøven sitt BRCA1-gen mangler ekson 16 og går direkte fra ekson 15 til ekson 17. Dette viste også at BRCA1-gen sekvensen går direkte fra ekson 16 til ekson 17 i den normale prøven, noe som var forventet.



## 4 Diskusjon

Formålet med denne oppgaven, var å teste om RT-PCR og sangersekvensering av RNA fra FFPE vevsprøver, kunne benyttes til å verifisere mutasjoner som har forårsaket eksondelesjoner i BRCA1/2. Grunnen er at det ønskes et alternativ til dagens metode, som er basert på Ion Torrent NGS, da den blir lett påvirket av fragmenterte nukleinsyrer i prøvematerialet.

Lignende studier har vist at RT-PCR av RNA fra FFPE-vevsprøver er en egnet metode til å påvise BRCA1/2-mutasjoner. En fransk studie fra 2020 har vist at metoden fungerer som et supplement til NGS-analyser, der disse har gitt et usikkert resultat. Dette har vist seg å ha en direkte påvirkning for pasienter med eggstokkreft, som kan være kvalifisert for vedlikeholdsbehandling med PARP1-inhibitor (26). Denne studien har mange likhetstrekk med metoden som er blitt brukt i denne oppgaven, og det ble i tillegg benyttet RNA av lav kvalitet for å sikre at metoden fungerer med det også. Nyere forskning legger også vekt på at RNA-kvaliteten i enkelte prøver vil være for lav, og kan være en begrensende biologisk faktor for denne metoden (26). Prøve 2 er et eksempel på hvordan prøve kvaliteten kan være en begrensende faktor for å påvise mutasjonene.

En italiensk studie fra 2021 har vist at store eksondelesjoner i BRCA1, fra blant annet FFPE vevsprøver, kan påvises med høy spesifisitet med droplet-digital PCR (ddPCR) (27). Denne studien har vist veldig lovende resultater, men til motsetning fra denne oppgaven ble det ekstrahert DNA fra FFPE-prøvene og ikke RNA (27). Metoden er derfor ikke helt lik oppsettet som ble benyttet i denne oppgaven, men denne fremgangsmåten og bruk av ddPCR kunne vært interessant å prøve ut for å sammenligne resultater.

RNA-kvaliteten i FFPE-vevsprøver er ofte dårlig. Dette er på grunn av flere faktorer, men de viktigste som innvirker på RNA-kvaliteten er tiden fra prøvetaking til fiksering, hvor lenge de blir fiksert, oppbevaringstid og temperatur. Studier har vist at tiden det tar fra prøvetaking til fiksering, og hvor lenge prøvematerialet blir fiksert i formalin, er de aller viktigste faktorene (28). Som nevnt i kapittel 2.1, var prøvematerialet som ble benyttet til oppgaven fra 5 til 22 år gammelt. Annet enn alderen på de ulike prøvene, var det ingen tilgjengelig informasjon som kunne si noe om RNA-kvaliteten til prøvene.

Fra resultatene etter kvalitetskontrollene av prøvene, kom det tydelig frem at kvaliteten på det isolerte RNAet var ganske lav. Ved tilgang på andre instrumenter, kunne RNA-kvaliteten blitt målt direkte. Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen) har en ny funksjon som gir en kvalitetsscore til RNA-ekstraktet (29). Det finnes andre tilgjengelige instrumenter som kunne gitt en kvalitetsscore på RNAet, for eksempel Bioanalyser instrumenter fra Agilent. Disse kan gi et RNA integrity number (RIN), som er en objektiv verdi på RNA-kvaliteten (30). Dette hadde vært gunstig å vite i forbindelse med oppgaven, da en kvalitetsscore på RNAet fra prøvene kunne sagt noe om hvor grensen går på hva som

er mulig å påvise med metoden. Den dårlige RNA-kvaliteten kan skyldes at prøvene var fragmenterte og/eller at de kan inneholde mange kryssbindinger mellom formalin og proteiner, etter selve fikseringsprosessen med formalin (28). Der kryssbindinger er et resultat av fikseringsprosessen med formalin, så kan fragmentering av RNA skyldes flere ulike årsaker, blant annet tiden mellom prøvetaking og fiksering, og autolyse av vevet (28). Lang oppbevaringstid vil også kunne føre til fragmentering av nukleinsyrene i prøvematerialet.

Den relativt dårlige prøve kvaliteten kan ses på Ct-verdiene i tabell 3, og visuelt på amplifikasjonsplottene i figur 1-2 i kapittel 3.2. Forskjellen i Ct-verdier mellom den positive  $\beta$ -actin kontrollen og de ulike prøvene var jevnt over ca. 10 enheter. Det vil si at den positive kontrollen oppnådde et høyt nok fluorescenssignal til å krysse terskelverdien ca. 10 sykluser før prøvene. På bakgrunn av de jevnt over svake resultatene fra kvalitetskontrollen av RNA-ekstraktene, så ble bare to prøver uten eksondelesjoner benyttet som normale prøver til cDNA-syntese, PCR og til slutt sekvensering. Dette var tilstrekkelig, da begge disse prøvene kunne testes med flere ulike kombinasjoner av primerpar. Prøven med tidligere påvist eksondelesjon av BRCA2 ekson 22 til 24, ga utilstrekkelige resultater og tilnærmet ingen PCR-produkter, selv med flere forskjellige primerpar, som vist i figur 5. Denne prøven ble derfor ikke sekvensert. Dette gjorde at det bare var to prøver, prøve 1 og 3, som hadde eksondelesjoner og ble sekvensert. Dette resulterte i et begrenset utvalg i prøver med påviste eksondelesjoner, som skulle påvises og verifiseres med denne metoden.

Resultatene etter første PCR-reaksjon av de brukbare prøvene med eksondelesjoner, der det ble benyttet Qiagen OneStep RT-PCR Kit, var utilstrekkelige. Gelelektroforesen etter denne PCR-reaksjonen, som vist i figur 3, hadde tilnærmet ikke noe PCR-produkt av prøven med eksondelesjon av BRCA2 ekson 25, og veldig lite av prøven med eksondelesjon av BRCA1 ekson 16. Dette ble etter diskusjon med faglig veileder sett på som en for liten mengde DNA til å kunne gå videre med sekvensering. Den lave mengden DNA etter endt PCR-reaksjon, kan skyldes at RNAet i prøven var for fragmentert, og at revers transkriptase og/eller primerne derfor ikke var i stand til å binde seg til målsekvensen i de ulike prøvene. Hvis antallet intakte RNA-molekyler var lavt i utgangspunktet, eller lengden på RNA-fragmentene var for korte, så vil ikke revers transkribering og følgende PCR-reaksjon være særlig effektivt (31). Dette er en sannsynlig årsak for de svake resultatene med prøven med eksondelesjon av BRCA2 ekson 22 til 24, da selv manglende PCR-produkt etter cDNA-syntese med random hexamer primer ikke ga et resultat. Denne prøven var mest sannsynlig svært fragmentert.

På bakgrunn av svake resultater med one-step RT-PCR, ble det besluttet å bruke en random hexamer primer, og benytte denne til cDNA-syntese med prøvene. Denne primeren er mye mindre spesifikk og vil binde seg til mange forskjellige plasser i RNAet. Målet med å benytte denne var å kopiere opp masse cDNA, slik at det ville være flere målsekvenser for de spesifikke primerne i den påfølgende PCR-reaksjonen. Lignende studier har vist at en fremgangsmåte, der en mindre spesifikk primer har

blitt benyttet til cDNA-syntese, har gitt gode resultater ved påfølgende PCR-oppsett (26). Denne metoden viste seg å fungere bedre, noe som kan observeres i resultatene etter kjøring av gelelektroforese i figur 4. Selv om det ble benyttet en random hexamer primer, var PCR-produktene ganske rene. Risikoen ved å benytte en slik primer, er at påfølgende PCR-produkter kan være mindre spesifikke og at det kan bli en følgefeil ved videre sekvensering av produktet (32). Ettersom denne metoden krevde flere trinn, var det også større sannsynlighet for forurensing underveis.

Sekvenseringsresultatene i kapittel 3.6 viser at prøvene med eksondelesjoner, prøve 1 og prøve 3, har påvist mutasjoner som har gitt eksondelesjoner. Dette tyder på at BRCA1/2 genet til disse prøvene ikke fungerer som normalt, og dermed at vedlikeholdsbehandling med en PARP1-inhibitor vil være mulig for disse pasientene. Sekvenseringsresultatene viser også at prøve 4 og 6 ikke har påviste eksondelesjoner og dermed at BRCA1/2 genene kan fungere som normalt. For disse prøvene kan det tyde på at PARP1-inhibitor behandling ikke vil være en effektiv metode for pasientene. Resultatene fra de normale prøvene, prøve 4 og 6, viser også at primerparene fungerte som de skulle og festet seg på relevante områder i målgenene. Disse resultatene stemte overens med tidligere analyser av disse prøvene og tyder på at denne metoden med cDNA-syntese, RT-PCR og sangersekvensering, er en mulig alternativ metode for å påvise og verifisere eksondelesjoner i FFPE vevsprøver.

Sekvenseringene ga et noe varierende resultat med litt støy i deler av elektroferogrammene, som kan ses i vedlegg 8 og 9. Etter diskusjon med faglig veileder, og oppslag i feilsøkingshefte, kom vi frem til flere mulige grunner til dette. Den mest sannsynlige grunnen kan være dårlig kvalitet på primerne, eller dårlig rensing av PCR-produkt før sekvensering. Dette kan observeres som mindre topper under de store toppene i elektroferogrammene, men har ellers ingen påvirkning på resultatet, da støyen fra de mindre toppene ikke var stor nok til å overstige hovedtoppene. Andre grunner kunne være dårlig kalibrering i instrumentet, eller elektrisk støy, men disse ble vurdert som mindre sannsynlige. I tillegg viste BRCA1 16L/17R primerparet generelt dårligere resultat i alle gelelektroforesene som ble kjørt, samt under sekvensering, enn det de andre primerparene gjorde. Dette kan igjen tyde på at disse primerne hadde dårligere kvalitet, men dette har ikke påvirket resultatet signifikant, da resultatet fortsatt var som forventet, som vist i figur 7.

Prøvematerialet som ble benyttet til oppgaven, var som tidligere nevnt ikke ferskt, og alderen på prøvene kan ha påvirket resultatene, og da spesielt prøven med eksondelesjoner av BRCA2 ekson 22 til ekson 24. Store eksondelesjoner i BRCA-genene er ganske sjeldne mutasjoner, og omhandler bare 5-10% av tilfellene hos familier som er rammet av arvelig bryst- og eggstokkreft (33). På bakgrunn av hyppigheten til disse mutasjonene, var det ikke mulig å teste et nyere prøvemateriale. Metodens relevans vil normalt være gjeldende for ferskere FFPE-vevsprøver, da det er snakk om å gi PARP1-inhibitor eller ikke til personer med germline eller somatisk mutert BRCA1/2 hos personer med eggstokkreft. Det kan antas at en ferskere prøve vil kunne gi et bedre resultat og kanskje fungere med

bruk av one-step RT-PCR, uten bruk av en random hexamer primer til cDNA-syntese. Den dårlige prøve kvaliteten støtter derimot oppunder metoden i seg selv, da resultatene jevnt over var gode, selv med eldre prøver.

#### 4.1 Forslag til videre arbeid

Videre arbeid med studien er mulig for å optimalisere metoden. Ulike faktorer som kan testes for optimalisering, er hybridiseringstemperatur for primerne, andre primersekvenser og selve PCR-oppsettet. Det hadde også vært ønskelig å kunne teste et større og mer variert prøvemateriale, og gjerne prøver som mangler flere eksoner, slik som prøve 2. Testing av et større prøvemateriale, og bruk av verktøy som kan si noe om RNA-kvaliteten, kan i tillegg si noe om hvor grensen går angående RNA-kvaliteten og gunstige resultater. Ved bruk av et nyere prøvemateriale vil det i tillegg potensielt være mulig å benytte seg av one-step RT-PCR, i stedet for å måtte gå via cDNA-syntese med random hexamer primer. Optimalisering av metoden kan føre til renere PCR-produkter og enda bedre sekvenseringsresultater, samt mindre støy.

#### 4.2 Konklusjon

Hensikten med denne oppgaven var å teste om RT-PCR og sangersekvensering av RNA fra FFPE vevsprøver, kunne benyttes til å verifisere mutasjoner som har forårsaket eksondelesjoner i BRCA1/2. Dagens metode er basert på Ion Torrent NGS og kan gi usikre resultater på grunn av fragmentering av nukleinsyrene i vevsprøvene. Det er viktig å påvise disse mutasjonene, da mutasjonsstatus vil avgjøre om pasienten møter kravene for vedlikeholdsbehandling med PARP1-inhibitor eller ikke.

Resultatene viste at denne metoden er egnet til å påvise store eksondelesjoner i BRCA1/2 fra FFPE vevsprøver ved bruk av RT-PCR og sangersekvensering. Den kan derfor benyttes som et alternativ til å verifisere Ion Torrent NGS-analyser, hvis disse gir usikre resultater. Det må dog tas forbehold om at metoden bare er testet på et fåtall pasientprøver, der ingen er av nyere dato, og metoden bør derfor testes videre for å kunne trekke en definitiv konklusjon.

## 5.0 Referanser

1. Brystkreft - krefregisteret [Internett]. [sitert 15. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.krefregisteret.no/Temasider/kreftformer/Brystkreft/>
2. Eggstokkreft [Internett]. [sitert 15. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.krefregisteret.no/Temasider/kreftformer/eggstokkreft/>
3. Brystkreft [Internett]. 2019 [sitert 15. mars 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.helsenorge.no/sykdom/kreft/brystkreft/>
4. Faraoni I, Graziani G. Role of BRCA Mutations in Cancer Treatment with Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors. *Cancers* [Internett]. 4. desember 2018 [sitert 15. mars 2021];10(12). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6316750/>
5. 3 Eggstokk-, eggleder- og bukhinnekreft (OC) - Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for gynekologisk kreft [Internett]. [sitert 11. april 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/gynekologisk-kreft/eggstokk-eggleder-og-bukhinnekreft>
6. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 5. oktober 2014;0:364–78.
7. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primer.* 25. august 2016;2:16061.
8. Malyuchenko NV, Kotova EYu, Kulaeva OI, Kirpichnikov MP, Studitskiy VM. PARP1 Inhibitors: antitumor drug design. *Acta Naturae.* 2015;7(3):27–37.
9. Mittica G, Ghisoni E, Giannone G, Genta S, Aglietta M, Sapino A, mfl. PARP Inhibitors in Ovarian Cancer. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* 3. oktober 2018;13(4):392–410.
10. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, mfl. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 1. juli 2014;15(8):852–61.
11. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* juni 2017;58(5):235–63.
12. Zhao W, Wiese C, Kwon Y, Hromas R, Sung P. The BRCA Tumor Suppressor Network in Chromosome Damage Repair by Homologous Recombination. *Annu Rev Biochem.* 20. juni 2019;88:221–45.
13. Paus B. Når vi snakker om gener. *Tidsskr Den Nor Legeforening* [Internett]. 5. mai 2015 [sitert 11. april 2021]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2015/05/sprakspalten/nar-vi-snakker-om-gener>
14. Rédei GP, redaktør. Point Mutation. I: *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics* [Internett]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2008 [sitert 7. mai 2021]. s. 1516–1516. Tilgjengelig på: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9\\_13085](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_13085)

15. Ewald IP, Ribeiro PLI, Palmero EI, Cossio SL, Giugliani R, Ashton-Prolla P. Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review. *Genet Mol Biol.* 2009;32(3):437–46.
16. Mo Y, Wan R, Zhang Q. Application of Reverse Transcription-PCR and Real-Time PCR in Nanotoxicity Research. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;926:99–112.
17. Green MR, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protoc.* 6. januar 2019;2019(6):pdb.top095109.
18. Haddad F, Baldwin KM. Reverse Transcription of the Ribonucleic Acid: The First Step in RT-PCR Assay. I: King N, redaktør. *RT-PCR Protocols: Second Edition [Internett].* Totowa, NJ: Humana Press; 2010 [siteret 7. mai 2021]. s. 261–70. (*Methods in Molecular Biology*). Tilgjengelig på: [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0_17)
19. Xiao AT, Tong YX, Zhang S. Profile of RT-PCR for SARS-CoV-2: A Preliminary Study From 56 COVID-19 Patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 19. november 2020;71(16):2249–51.
20. Dominguez R, Holmes KC. Actin Structure and Function. *Annu Rev Biophys.* 9. juni 2011;40:169–86.
21. Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp JoVE [Internett].* 20. april 2012 [siteret 11. april 2021];(62). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846332/>
22. Durney BC, Crieffield CL, Holland LA. Capillary electrophoresis applied to DNA: determining and harnessing sequence and structure to advance bioanalyses (2009–2014). *Anal Bioanal Chem.* 2015;407:6923–38.
23. Zakrzewski F, Gieldon L, Rump A, Seifert M, Grützmann K, Krüger A, mfl. Targeted capture-based NGS is superior to multiplex PCR-based NGS for hereditary BRCA1 and BRCA2 gene analysis in FFPE tumor samples. *BMC Cancer.* 27. april 2019;19(1):396.
24. Slatko BE, Albright LM, Tabor S, Ju J. DNA Sequencing by the Dideoxy Method. *Curr Protoc Mol Biol.* 1999;47(1):7.4A.1-7.4A.39.
25. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet.* 2011;52(4):413–35.
26. Chevalier L-M, Billaud A, Fronteau S, Dauvé J, Patsouris A, Verrièle V, mfl. Somatic mRNA Analysis of BRCA1 Splice Variants Provides a Direct Theranostic Impact on PARP Inhibitors. *Mol Diagn Ther.* 1. april 2020;24(2):233–43.
27. De Paolis E, De Bonis M, Concolino P, Piermattei A, Fagotti A, Urbani A, mfl. Droplet digital PCR for large genomic rearrangements detection: A promising strategy in tissue BRCA1 testing. *Clin Chim Acta.* 1. februar 2021;513:17–24.
28. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA Quality from FFPE Samples. *PLoS ONE [Internett].* 5. desember 2007 [siteret 3. mai 2021];2(12). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2092395/>
29. Qubit RNA IQ Assay - NO [Internett]. [siteret 19. mai 2021]. Tilgjengelig på: [//www.thermofisher.com/uk/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-assays/qubit-rna-iq-assay.html](https://www.thermofisher.com/uk/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-assays/qubit-rna-iq-assay.html)

30. RNA Electrophoresis, RNA Integrity, Bioanalyzer RIN | Agilent [Internett]. [siteret 19. mai 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems/bioanalyzer-rna-kits-reagents/bioanalyzer-rna-analysis-228256>
31. Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirodda M, Fleischmann A, mfl. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest.* august 2005;85(8):1040–50.
32. van Gurp TP, McIntyre LM, Verhoeven KJF. Consistent Errors in First Strand cDNA Due to Random Hexamer Mispriming. *PLoS ONE* [Internett]. 30. desember 2013 [siteret 3. mai 2021];8(12). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3875578/>
33. James PA, Sawyer S, Boyle S, Young M-A, Kovalenko S, Doherty R, mfl. Large genomic rearrangements in the familial breast and ovarian cancer gene BRCA1 are associated with an increased frequency of high risk features. *Fam Cancer.* 1. juni 2015;14(2):287–95.

## 6 Vedlegg

### Vedleggsliste

Vedlegg 1: Prosedyre for RNA-isolering fra vevsprøver

Vedlegg 2: Prosedyre for måling av RNA-konsentrasjon i RNA-ekstrakter

Vedlegg 3: Prosedyre for kvalitetskontroll av RNA-ekstrakter med  $\beta$ -actin

Vedlegg 4: Eksempel på utfylt arbeidsark til  $\beta$ -actin kvalitetskontroll

Vedlegg 5: BRCA 1/2 primere som ble benyttet i oppgaven

Vedlegg 6: Eksempel på utfylt arbeidsark til PCR-oppsett som ble utført under oppgaven

Vedlegg 7: Eksempel på utfylt arbeidsark til rensing og sekvensering av PCR-produkt

Vedlegg 8: Oversikt over fullstendige sekvenseringsresultater fra normale prøver

Vedlegg 9: Oversikt over fullstendige sekvenseringsresultater fra prøver med eksondelesjoner



# Vedlegg 1: Prosedyre for RNA-isolering fra vevsprøver

Dokument «RNA-isolering vev, MolPat Lab», ID 10026 - EQS

## RNA-isolering vev, MolPat Lab

Forfatter: Ingeborg Engesvold, Tone Furre  
Godkjent av: Gudrun Hovstein Erikstad

Gyldig fra: 09.04.2021  
Revisjonsfrist: 09.04.2023

Revisjon: 3.2  
ID: 10026

### Hensikt og omfang

Isolere og rense RNA fra formalinfiksert, parafinnstøpt vev. Grunnlagsinformasjon, validering og referanser under «innledning».

### Ansvar

Seksjonsleder, Seksjon for spesialanalyser patologi, Avd. for patologi.

### Arbeidsbeskrivelse

#### Prosedyren utføres av

Opplært laboratoriepersonell ved Enhet for molekylærpatologi, Seksjon for spesialanalyser patologi, Avdeling for patologi.

#### Reagenser og utstyr

Vær obs på løsninger som er faremerket **Δ**, i forhold til verneutstyr og avfallshåndtering m.h.p. ytre miljø.  
For mer informasjon henvises til datablad i ECOonline.

Varenavn	Fare-merking	Opp-bevaring	Avfalls-håndtering	Artikkelnr.	Materialnr. (SAP)
RNeasy FFPE Kit  - nærmere spesifisert under "innledning".	<b>Δ</b>	FISH-lab, Romtemp., kjøleskap PAT0015 og fryser PAT0015.  - nærmere spesifisert under "innledning".	Se under "innledning"	QIAGEN, cat.no. 73504	4013101 (kort, FISH-lab)
Xylen	<b>Δ</b>	Kjemikalieskap "FYR"	Tømmes i avløp merket "TissueClear/Xylen/Alkohol" på rom 232.04.011		
Absolutt alkohol prima (u/tilsetn.)	<b>Δ</b>	FISH-lab og spritskap	Tømmes i avløp merket "TissueClear/Xylen/Alkohol" på rom 232.04.011		4013080 (lagerstyrt A114)
Sterilt vann		FISH-lab			Hylleware på lageret

RNase-Free Microfuge Tubes 2,0 ml.		FISH-lab			4013102 (kort, FISH-lab)
Sterile Fine-Tip transfer pipetter		FISH-lab			4013282 (kort, FISH-lab)
RNaseZap™ Wipes	▲	FISH-lab		AM9786	Hyllevare på lageret

### Fremgangsmåte

**Før første gangs bruk av kitet gjøres dette:**

**DNase I stock løsning:**

Åpne forsiktig og tilsett 550 µl RNase-fritt vann. Bland ved å vende på røret, ikke vortex. Alikvotør med litt dødvolum (eks. (10+1), (20+2), (30+3)) µl pr. rør. Bruk f.eks. 0,2 ml PCR-rør) og frys ned ved -15°C til -30°C i inntil 9 måneder.

**Buffer RPE:**

Tilsett 44 ml abs.alkohol til konsentratet.

**Generelle forberedelser:**

Vask over knivholder, preparatnål, benk, pipetter etc. med en RNaseZap våtserviett.

Bruk hansker under hele prosedyren (både for å beskytte prøven fra RNaser på huden og fordi enkelte av reagensene kan virke irriterende på huden).

Jobb i avtrekksskap fra punkt 2 – 15.

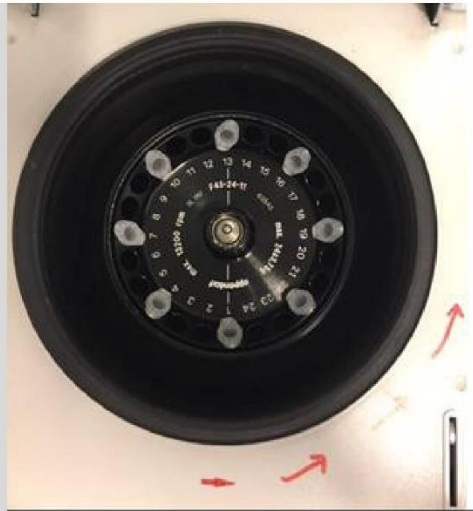
**Tegnforklaringer/forkortelser:**

▲ :volum ved lite vev, eks. 1-2 snitt  
● : volum ved mye vev, eks. >2 snitt  
RT: romtemperatur

**Plassering av rør i sentrifuge (Eppendorfsentrifuge med plass til 24 rør):**

Bilde 1:

Jobb med max 8 rør om gangen:



Bilde 2:  
Plassering av åpne rør:  
Sentrifugen roterer MOT klokka, se røde piler på bildet. Rørene skal plasseres slik at lokket henger som en «hale» bak røret. Hvis lokket ligger den andre veien, slites det lettere av.



Bilde 3:  
Eksempel på plassering av 5 kolonner i åpne eppendorfrør. Kolonnene skal være lukket og det legges til et ekstra rør for balanse.



1. Snitt først bort overflaten på parafinblokk for å fjerne vevet som har vært utsatt for luft. Skjær snitt, tykkelse 5-20  $\mu\text{m}$  (max 40  $\mu\text{m}$  totalt i hvert rør) og overfør til sterile, RNAse-frie 2 ml sentrifugerør.
2. Tilsett 1 ml xylen og vortex kraftig i ca. 10 sek. Sentrifuger i 2 min. ved max hastighet.
3. Fjern forsiktig supernatant med fine-tip transfer pipette uten å ta med vevspellet i bunnen av røret. Gjenta pkt. 2 og 3 dersom det er mye parafin i røret.
4. Tilsett 1 ml abs.alkohol, vortex og sentrifuger i 2 min. ved max hastighet, fjern supernatant. Gjenta en gang.
5. La røret stå med lokket åpent og tørke i romtemperatur eller på varmeblokk ved ca. 37°C inntil alkoholen har fordampet fullstendig/ vevet er tørt.
6. Tilsett ▲ 150  $\mu\text{l}$  eller ● 240  $\mu\text{l}$  Buffer PKD. Vortex. Tilsett 10  $\mu\text{l}$  Proteinase K. Bland ved å pipettere noen ganger opp og ned.
7. Inkuber (med risting) i 15 min – 60 min. ved 56°C og deretter i nøyaktig 15 min. ved 80°C. Hvis det brukes kun en termomixer, la prøvene stå i romtemperatur inntil temperaturen på termomixeren når 80°C.
8. Eventuelt fjerne uoppløst vev ved å sentrifugere ekstraktet (1 min. ved max hastighet) og deretter overføre supernatant til et nytt rør.
9. Tilsett ▲ 16  $\mu\text{l}$  eller ● 25  $\mu\text{l}$  DNase Booster Buffer og 10  $\mu\text{l}$  DNase I stock solution. Bland ved å pipettere noen ganger opp og ned. Spinn lett ned.
10. Inkuber i 15 min. ved romtemperatur.
11. Tilsett ▲ 320  $\mu\text{l}$  eller ● 500  $\mu\text{l}$  Buffer RBC. Vortex.
12. Tilsett ▲ 720  $\mu\text{l}$  eller ● 1200  $\mu\text{l}$  abs.alkohol. Bland ved å pipettere noen ganger opp og ned og fortsett umiddelbart til punkt 13 (ikke sentrifugér).
13. Overfør 700  $\mu\text{l}$  av prøven til en spinnkolonne m/ oppsamlingsrør. Lukk lokket forsiktig og sentrifugér i 15 sek ved 10000 rpm. Prøvematerialet sitter nå i membranen på kolonna,

væsken i oppsamlingsrøret (heretter kalt filtratet) kastes. Gjenta prosessen for resten av prøven.

14. Tilsett 500 µl Buffer RPE. Lukk lokket forsiktig og sentrifuger i 15 sek ved 10000 rpm. Kast filtratet.
15. Tilsett 500 µl Buffer RPE en gang til. Lukk lokket forsiktig og sentrifuger i 2 min. ved 10000 rpm. Kast filtratet.
16. Overfør kolonna til et nytt oppsamlingsrør. Lokket på kolonna skal være lukket (plassering i sentrifuge, se bilde 3). Sentrifuger i 5 min på full hastighet (for å fjerne rester av etanol).
17. Overfør kolonna til et nytt 1,5 ml elueringsrør (følger med kitet). Åpne kolonna for lufttøking på benk i 3-5 min. Tilsett 60-100 µl RNase-fritt vann direkte på membranen i spinnkolonna (vurder elueringsvolum ut fra mengde vev/ størrelse på vevspellet). Lukk lokket forsiktig. Plassering i sentrifuge, se bilde 3. Sentrifuger i 1 min på full hastighet for å eluere RNA.
18. Mål RNA-konsentrasjon med Broadrange (BR) kit, se [Metode: Måling av DNA-/ RNA-konsentrasjon i ekstrakter med Qubit 2.0 Fluorometer, MolPat Lab.](#)

RNA-ekstrakter fryses umiddelbart ved -20°C eller kaldere.

## Grunnlagsinformasjon

### RNeasy FFPE Kit

RNeasy FFPE prosedyren bruker veletablert RNeasy teknologi for RNA-rensing. Spesielt optimaliserte lyseringsforhold gjør at total RNA renses effektivt fra FFPE- vevssnitt. DNase-behandling fjerner effektivt DNA-forurensning, inkludert svært fragmenterte molekyler.

Først fjernes parafin fra nysnittede FFPE- vevssnitt ved å behandle med Deparaffinization Solution eller en alternativ deparaffinering som f.eks. xylene. Deretter inkuberes prøven i en optimalisert lyseringsbuffer som inneholder proteinase K, for å frigjøre RNA fra vevet. En kort inkubering ved en høyere temperatur reverserer delvis kryssbindinger forårsaket av formalin, forbedrer RNA-utbytte og kvalitet, så vel som RNA ytelse i nedstrøms enzymatiske analyser. Dette etterfølges av DNase behandling som er optimalisert for å eliminere all genomisk DNA, inkludert svært små DNA-fragmenter som ofte er til stede i FFPE-prøver etter lengre formalinfiksering og/ eller lange lagringstider. Deretter blir lysatet blandet med buffer RBC. Etanol tilsettes for å opprette passende bindingsforhold for RNA og prøven blir så overført til en RNeasy MinElute spinnkolonne, hvor den totale RNA binder til membranen og forurensninger vaskes bort. RNA elueres i RNase-fritt vann.

### Reagenser og utstyr i kitet

#### MERK:

Kitet åpnes umiddelbart ved mottak, da enkelte reagenser skal tas ut og oppbevares i kjøleskap (se tabell under).

Vær obs på løsninger som er faremerket **Δ**, i forhold til verneutstyr og avfallshåndtering m.h.p. ytre miljø.  
For mer informasjon henvises til datablad i ECOonline.

Varenavn	Fare-merking	Oppbevaring FISH-lab, rom 232.04.021	Avfalls- håndtering
RNeasy MinElute® Spin Columns (rosa) i 2 ml oppsamlingsrør		Kjøleskap PAT0015	
Collection Tubes, 1.5 ml		Romtemp.,	
Collection Tubes, 2 ml		Romtemp.,	
Buffer RBC*	<b>Δ</b>	Romtemp.,	Avfall må IKKE blandes med syrer, sterke oksiderende midler eller cyanider. Sjekk datablad
Buffer PKD		Romtemp.,	
Proteinase K		Kjøleskap PAT0015 (tåler godt å stå i romtemp.)	
RNase-Free DNase I		Alikvoterer når kitet åpnes, 10-30 µl i hvert rør.	
RNase-Free Water (til bruk med RNase-Free DNase I)		Fryser PAT0015 (-20°C),	
DNase Booster Buffer		Romtemp.	
Buffer RPE (konsentrat)		Romtemp.	
RNase-Free Water (til eluering)		Romtemp.	

### **Faktorer som påvirker utbyttet av RNA fra formalinfiksert, parafininstøpt vev**

Utbyttet av RNA fra formalinfiksert, parafininstøpt vev (FFPE) kan variere mye og avhenger av hvilken type vev det er, fikseringsmetode og lagring av prøven (før og etter isolering).

Kryssbindinger som skjer mellom nukleinsyrer og proteiner under formalinfikseringen modifiserer nukleinsyrene kjemisk og gjør at de fragmenteres lettere. Hovedproblemet er for øvrig den høye temperaturen som kreves for parafininstøpning. Den akselererer de kjemiske reaksjonene som modifiserer RNA og DNA. Ved lagring forårsaker disse




modifikasjonene fragmentering (RNA degraderes lettere enn DNA).

Optimal fikseringstid (i formalin) er 12-24 timer. Vevet må være godt dehydrert ved innstøping for å være egnet til RNA isolering.

### **Referanser**

RNeasy FFPE Handbook 12/2014, vedlegg under relatert.

### **Validering**

Metoden er optimalisert høsten 2017, se valideringsrapport  [Valideringsrapport - Isolering av RNA fra vev](#)

### **Relaterte vedlegg:**

 [RNeasy FFPE Handbook 12/2014](#)

## Vedlegg 2: Prosedyre for måling av RNA-konsentrasjon i RNA-ekstrakter

Dokument «Metode; Måling av DNA-/ RNA-konsentrasjon i ekstrakter med Qubit 2.0 Fluorometer, MolPat Lab», ID 30176 - EQS

### Metode; Måling av DNA-/ RNA-konsentrasjon i ekstrakter med Qubit 2.0 Fluorometer, MolPat Lab

Forfatter: Ingeborg Engesvold, Tone Furre  
Godkjent av: Gudrun Hovstein Erikstad

Gyldig fra: 09.02.2021  
Revisjonsfrist: 09.02.2023

Revisjon: 1.5  
ID: 30176

## Hensikt og omfang

Måle konsentrasjon av dobbeltrådet DNA (dsDNA) og RNA i ekstrakter fra formalinfixert parafininnstøpt vev. Grunnlagsinformasjon referanser, se under «innledning».

## Validering

Se valideringsrapporter:

[Valideringsrapport; Qubit 2.0 Fluorometer og Qubit dsDNA BR Assay Kit, MolPat Lab](#)

[Valideringsrapport - Qubit RNA HS Assay Kit, MolPat Lab](#)

### Validering Qubit® dsDNA BR Assay Kit og Qubit® RNA HS Assay Kit

Målemetoden er den samme for disse kitene som for Qubit® dsDNA BR Assay Kit og Qubit® RNA HS Assay Kit. Det er kun måleområdet som er forskjellig. Det er derfor tilstrekkelig å henvise til validering av Qubit® dsDNA BR Assay Kit og Qubit® RNA HS Assay Kit som viste at bruk av Qubit® Fluorometer er en bedre metode å måle DNA- og RNA-konsentrasjon enn å måle med Nanodrop.

## Risikovurdering

Alle reagenser er risikovurdert i EcoOnline med resultat «grønt», dvs det kan jobbes på benk med alle kitene.

NB! Ny versjon av databladet for Qubit® dsDNA BR Reagent \*200X concentrate in DMSO\*foreligger og reagenset er risikovurdert på nytt, (nov-18).

## Ansvar

Seksjonsleder ved Seksjon for spesialundersøkelser i patologi, Avdeling for patologi, har det overordnede ansvar for oppgaven.

## Arbeidsbeskrivelse

Prosedyren gjelder for opplært laboratoriepersonell ved Enhet for molekylærpatologi, Seksjon for spesialanalyser patologi, Avdeling for patologi.

## Instrument

Qubit® 2.0 Fluorometer (rom 232.05.024)

## Reagenser og utstyr

Varenavn	Fare-merking	Oppbevaring	Avfalls-håndtering	Artikkelnr.	Materialnr. (SAP)/bestilling
		FISH-lab: rom 232.04.021			



Qubit® dsDNA BR Assay Kit  -nærmere spesifisert under "innledning".		FISH-lab og isoleringslab, romtemp. og kjøleskap  -nærmere spesifisert under «innledning».	Se under «innledning»	Invitrogen, Q32853	Matrialnr: 4012075 (kort)
Qubit® dsDNA HS Assay Kit		FISH-lab og isoleringslab, romtemp. og kjøleskap  -nærmere spesifisert under «innledning»	Se under «innledning»	Invitrogen Q32854	Matrialnr: 4022024 (kort)
Qubit® RNA HS Assay Kit		FISH-lab og isoleringslab, romtemp. og kjøleskap  -nærmere spesifisert under «innledning»	Se under «innledning»	Invitrogen Q32852	Matrialnr (kort)
Qubit® RNA BR Assay Kit  -nærmere spesifisert under "innledning".		FISH-lab og isoleringslab, romtemp. og kjøleskap  -nærmere spesifisert under «innledning».	Se under «innledning»	Invitrogen, Q10210	Matrialnr: 4019906 (kort)
Qubit® assay tubes (500 tubes)		FISH-lab, skuff 6.		Invitrogen, Q32856	573336 (FISH-lab)
Rør for å mikse Qubit arbeidsløsning, for eksempel disse:  5 mL Microtube. RNase, DNase & Pyrogen Free (200/PK)		FISH-lab, skuff 6.		Argos Technologies, T2080A	573342 (FISH-lab)

## Fremgangsmåte

**DNA**

**Velg dsDNA BR Assay kit eller dsDNA HS Assay kit. I rutinen brukes BR-kit.**

1. Sett opp riktig antall 0,5-mL rør for standarder og prøver og merk rørene. NB! Kun originalrør (Invitrogen, Q32856) kan brukes.
2. Lag arbeidsløsning ved å fortynne **Qubit® dsDNA BR reagent/ Qubit® dsDNA HS reagent** 1:200 med **Qubit® dsDNA BR buffer/ Qubit® dsDNA HS buffer**: Bruk et 5 ml mikrorør. Lag 200 µL arbeidsløsning for hver standard og hver prøve.

**Qubit® dsDNA BR reagent/ Qubit® dsDNA HS reagent:** 1 x n µL  
**Qubit® dsDNA BR buffer/ Qubit® dsDNA HS buffer:** 199 x n µL

**Tips:** lag arbeidsløsning til 1 prøve ekstra (n + 1) for å sikre at det blir nok løsning uten bobler.

3. Tilsett 190 µL arbeidsløsning til hvert av standardrørene og rør 195 µL arbeidsløsning til hvert av prøve-rørene.
4. Tilsett 10 µL av hver **Qubit® dsDNA BR standard/ Qubit® dsDNA HS standard** (#1 og #2) til respektive rør med arbeidsløsning. Vortex 2-3 sek., unngå bobler. Spinn ned.
5. Tilsett 5 µL av hver prøve til respektive rør med arbeidsløsning. Vortex 2-3 sek., unngå bobler. Spinn ned.
6. Inkubør rørene i minst 2 min. på benk (maks. 3 timer).

**RNA**

**Velg RNA HS Assay kit eller RNA BR Assay kit.**

1. Sett opp riktig antall 0,5-mL rør for standarder og prøver og merk rørene. NB! Kun originalrør (Invitrogen, Q32856) kan brukes.
2. Lag arbeidsløsning ved å fortynne **Qubit® RNA HS reagent/ Qubit® RNA BR reagent** 1:200 med **Qubit® RNA HS buffer/ Qubit® RNA BR buffer**. Et 5 ml mikrorør e.l kan brukes (ikke glass). Lag 200 µL arbeidsløsning for hver standard og hver prøve.

**Qubit® RNA HS reagent/ Qubit® RNA BR reagent:** 1 x n µL

**Qubit® RNA HS buffer/ Qubit® RNA BR buffer:** 199 x n µL

**Tips:** lag arbeidsløsning til 1 prøve ekstra (n + 1) for å sikre at det blir nok løsning uten bobler.

3. Tilsett 190 µL arbeidsløsning til hvert av standardrørene og rør 195 µL arbeidsløsning til hvert av prøve-rørene.
4. Tilsett 10 µL av hver **Qubit® RNA HS Standard/ Qubit® RNA BR Standard** (#1 og #2) til respektive rør med arbeidsløsning. Vortex 2-3 sek., unngå bobler. Spinn ned.
5. Tilsett 5 µL av hver prøve til respektive rør med arbeidsløsning. Vortex 2-3 sek., unngå bobler. Spinn ned.
6. Inkubér rørene i minst 2 min. på benk (maks. 3 timer).

**Avlesning på fluorometer ved DNA-måling**

Standarder og prøver skal ha romtemperatur ved måling.

Slå på fluorometeret, velg <DNA> og deretter <dsDNA Broad Range>.

Read new standards? <Yes>

Sett inn standard 1, <Read>

Sett inn standard 2, <Read>

Sett inn prøve 1, <Read>

Velg <calculate stock conc.> og les av konsentrasjon i <ng/µL>

Velg «Volume og sample used»: <5 µL>

Velg <Read next sample> og fortsett på samme måte til alle prøvene er avlest.

**Måling med Qubit® dsDNA BR Assay Kit:**

Målinger >200 ng/µl (ved tilsetning av 5ul prøve er utenfor standardkurven (5x200 ng/ul = 1000ng)), og må regnes som usikre. Fortynn eller tilsett mindre prøve og mål på nytt, slik at konsentrasjonen blir <1000 ng totalt i løsningen.

**Måling med Qubit® dsDNA HS Assay Kit:**

Målinger >20 ng/µl ( ved tilsetning av 5ul prøve) er utenfor standardkurven (5x20ng/ul=100 ng) og må regnes som usikre. Fortynn prøven eller tilsett mindre prøve og mål på nytt, slik at konsentrasjonen blir <100 ng, eller bruk Qubit® dsDNA BR Assay Kit:

### Avlesning på fluorometer ved RNA-måling

Standarder og prøver skal ha romtemperatur ved måling.

Slå på fluorometeret, velg <RNA> og deretter <RNA>.

Read new standards? <Yes>

Sett inn standard 1, <Read>

Sett inn standard 2, <Read>

Sett inn prøve 1, <Read>

Velg <calculate stock conc.> og les av konsentrasjon i <ng/μL>

Velg «Volume og sample used»: <5 μL>

Velg <Read next sample> og fortsett på samme måte til alle prøvene er avlest.

### Måling med RNA HS Assay Kit:

Målinger >20 ng/μl (ved tilsetning av 5ul prøve) er utenfor standardkurven (5x20ng/ul=100 ng) og må regnes som usikre. Fortynn prøven eller tilsett mindre prøve og mål på nytt, slik at konsentrasjonen blir <100 ng, eller bruk Qubit® dsRNA BR Assay Kit:

### Måling med RNA BR Assay Kit:

Målinger >200 ng/μl (ved tilsetning av 5ul prøve er utenfor standardkurven (5x200 ng/ul =1000ng)), og må regnes som usikre. Fortynn eller tilsett mindre prøve og mål på nytt, slik at konsentrasjonen blir <1000 ng totalt i løsningen..

Se eventuelt brukermanualen, kap. 3 (under «relatert») for beskrivelse av hvordan fluorometeret kalkulerer DNA/RNA-konsentrasjonen i prøven.

### Registrering i Sympathy

Skriv inn DNA- eller RNA-konsentrasjon i noteringsfeltet til analysekoden <ISOL>. Hvis ekstraktet er misfarget (gult/brunt), skriv en kommentar om dette i samme noteringsfelt. Legg inn kommentar hvis prøven er fortynnet og målt på nytt, (jfr punktene *Måling med ....Assay Kit*)

## Grunnlagsinformasjon

### Qubit® dsDNA BR Assay Kit og Qubit® dsDNA HS Assay Kit

Qubit® dsDNA BR (Broad-Range) Assay Kit og Qubit® dsDNA HS (High Sensitive) Assay Kit kvantiterer DNA enkelt og nøyaktig. Kitet inneholder konsentrert reagens, fortynningsbuffer og ferdigfortynnede standarder. Metoden selekterer dobbeltrådet DNA (dsDNA) og er gir nøyaktig konsentrasjon i området 100 pg/μL – 1000 ng/μl for *Qubit® dsDNA BR Assay Kit* og 10pg/uL- 100 ng/ul for *Qubit® dsDNA HS Assay Kit*

Analysen skal utføres ved romtemperatur, - en prøve som skal måles på nytt bør taes ut av instrumentet og stå på benk i 30 sek., før den måles på nytt. Signalene er stabile i 3 timer (1).

### Reagenser i kitene

Ingen av løsningene som er faremerket <b>Δ</b> , i forhold til verneutstyr og avfallshåndtering m.h.p. ytre miljø. For mer informasjon henvises til datablad i ECOonline. ( Logg inn med firmakode 71)			
Varenavn	Faremerking	Oppbevaring	Avfallshåndtering
		FISH-lab: rom 232.04.021 Isoleringslab: rom 232.05.024	

Qubit® dsDNA BR reagent (Component A), 1.25 mL 200X konsentrat i DMSO		FISH-lab, skuff (RT*, beskyttet mot lys)	Kast rørene med fortdynnet reagens i risikoavfallsboks på isoleringslaben.
Qubit® dsDNA BR buffer (Component B), 250 mL		FISH-lab, skuff (RT*)	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® dsDNA BR standard #1 (Component C), 5 mL 0 ng/μL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® dsDNA BR standard #2 (Component D), 5 mL 100 ng/μL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® dsDNA HS reagent (Component A), 1.25 mL 200X konsentrat i DMSO		FISH-lab, skuff (RT*, beskyttet mot lys)	Kast rørene med fortdynnet reagens i risikoavfallsboks på isoleringslaben.
Qubit® dsDNA HS buffer (Component B), 250 mL		FISH-lab, skuff (RT*)	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® dsDNA HS standard #1 (Component C), 5 mL 0 ng/μL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® dsDNA HS standard #2 (Component D), 5 mL 10 ng/μL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.

\*: romtemperatur

### **Qubit® RNA HS Assay Kit og Qubit® RNA BR Assay Kit**

Qubit® RNA HS (High Sensitivity) Assay Kit og Qubit® RNA BR Assay Kit kvantiterer RNA enkelt og nøyaktig. Kitene inneholder konsentrert reagens, fortdynningsbuffer og ferdigfortynnede standarder. Metoden selekterer RNA og er gir nøyaktig konsentrasjon i området 250 pg/μL – 100 ng/μL for Qubit® RNA HS Assay Kit og 1ng/uL – 1000ng/ul for Qubit® RNA BR Assay Kit

Analysen skal utføres ved romtemperatur, - en prøve som skal måles på nytt bør taes ut av instrumentet og stå på benk i 30 sek., før den måles på nytt. Signalene er stabile i 3 timer (2).

#### **Reagenser i kitene**

Ingen av løsningene som er faremerket **Δ**, i forhold til verneutstyr og avfallshåndtering m.h.p. ytre miljø.  
For mer informasjon henvises til datablad i ECOonline. ( Logg inn med firmakode 71)

Varenavn	Faremerking	Oppbevaring FISH-lab: rom 232.04.021 Isoleringslab: rom 232.05.024	Avfalls- håndtering
Qubit® RNA HS reagent (Component A), 250 µL  200X konsentrat i DMSO		FISH-lab, skuff (RT*, beskyttet mot lys)	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® RNA HS buffer (Component B), 50 mL		FISH-lab, skuff (RT*)	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® RNA HS standard #1 (Component C), 1 mL  0 ng/µL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® RNA HS standard #2 (Component D), 1 mL  10 ng/µL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® RNA BR reagent (Component A), 250 µL  200X konsentrat i DMSO		FISH-lab, skuff (RT*, beskyttet mot lys)	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® RNA BR buffer (Component B), 50 mL		FISH-lab, skuff (RT*)	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® RNA BR standard #1 (Component C), 1 mL  0 ng/µL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.
Qubit® RNA BR standard #2 (Component D), 1 mL  100 ng/µL i TE-buffer		Isoleringslab, kjøleskap G, dør	Kan tømmes i avløp/ kastes i restavfall.

\*: romtemperatur

## Referanse

1: Kitets produktspesifikasjon/ brukermanual, se vedlegg under «relatert»: Molecular Probes, Life Technologies: Qubit® dsDNA BR Assay Kits (for use with the Qubit® Fluorometer (all models)), cat.nr. Q32850, Q32853, 16.Februar 2015.

2: Kitets produktspesifikasjon/ brukermanual, se vedlegg under «relatert»: Molecular Probes, Life Technologies: Qubit® RNA HS Assay Kits (for use with the Qubit® Fluorometer (all models)), cat.nr. Q32852, Q32855, 16.Februar 2015.

3: Kitets produktspesifikasjon/ brukermanual, se vedlegg under «relatert»: Molecular Probes, Life Technologies: Qubit® dsDNA HS Assay Kits (for use with the Qubit® Fluorometer (all models)), cat.nr. Q32851, Q32854, 16.Februar 2015

4: Kitets produktspesifikasjon/ brukermanual, se vedlegg under «relatert»:

Dokument «Metode; Måling av DNA-/ RNA-konsentrasjon i ekstrakter med Qubit 2.0 Fluorometer, MolPat Lab», ID 30176 - EQS

Molecular Probes, Life Technologies: Qubit® dsRNA BR Assay Kits (for use with the Qubit® Fluorometer (all models)), cat.nr. Q10210, Q10211, 16. Februar 2015

**Relaterte dokumenter:**

 Valideringsrapport - Qubit RNA HS Assay Kit, MolPat Lab

 Valideringsrapport; Qubit 2.0 Fluorometer og Qubit dsDNA BR Assay Kit, MolPat Lab

**Relaterte vedlegg:**

 Userguide: Qubit dsDNA BR Assay Kits

 Userguide: Qubit RNA HS Assay Kits

 Userguide: Qubit RNA BR Assay Kit

 Userguide: Qubit dsDNA HS Assay Kit

## Vedlegg 3: Prosedyre for kvalitetskontroll av RNA-ekstrakter med $\beta$ -actin

Dokument «RT-PCR - Kvalitetskontroll for RNA-ekstrakter (b-actin), MolPat Lab», ID 21020 - EQS

### RT-PCR - Kvalitetskontroll for RNA-ekstrakter (b-actin), MolPat Lab

Forfatter: Tone Furre

Gyldig fra: 09.03.2021

Revisjon: 1.3

Godkjent av: Gudrun Hovstein Erikstad

Revisjonsfrist: 09.03.2023

ID: 21020

### Hensikt og omfang

Kvalitetskontroll for RNA isolert fra formalinfiksert parafininnstøpt vev. Genet  $\beta$ -actin amplifiseres ved realtime revers transkriptase PCR (RT-PCR).

Prosedyren omfatter:

1. Lagring av data, dokumentasjon
2.  $\beta$ -actin kvalitetskontroll
  - PCR oppsett
  - Analysing av data
  - Godkjenning av kvalitetskontroll
  - Resultatregistrering
3. Rydding og arkivering

Grunnlagsinformasjon og referanser under «innledning».

### Ansvar

Seksjonsleder, Seksjon for spesialanalyser patologi, Avdeling for patologi.

### Validering/ verifisering

Metoden har vist gyldighet gjennom lang tids bruk. Metoden verifiseres løpende ved bruk, ved bruk av positiv kontroll og reagenskontroll (blindprøve) for hvert prøveoppsett.

### Arbeidsbeskrivelse

#### **Prosedyren utføres av**

Analysen er utviklet av overingeniør Hong Yan Dai, som er ansvarlig for tekniske aspekt ved analysen. Prosedyren utføres av opplært laboratoriepersonell ved Enhet for molekylærpatologi, Seksjon for spesialanalyser patologi, Avdeling for patologi.

#### **Prøvemateriale**

RNA ekstrahert fra formalinfiksert parafininnstøpt vev (FFPE).

#### **Instrument**

Realtime PCR maskin Bio-Rad CFX96.

#### **Reagenser og lab-utstyr**

Vær obs på løsninger som er faremerket **A**, i forhold til verneutstyr og avfallshåndtering m.h.p. ytre miljø.  
For mer informasjon henvises til datablad i ECOonline.



Varenavn	Fare-merking	Oppbevaring	Avfalls-håndtering	Artikkelnr.	Materialnr. (SAP)
QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit		Cellelab, 232.05.024A, fryser GEN0015	Restavfall	QIAGEN, 210210	4013230 Lagerstyrt, molpat A131
Low-Profile 0.2 ml 8-Tube Strips without Caps		Prep.lab.		BIO-RAD, TLS0851	4013284 Hyllevare. Lagerstyrt, medgen A119
Optical Flat 8-Cap Strips		Prep.lab.		BIO-RAD, TCS0803	4013285 Hyllevare. Lagerstyrt, medgen A119

Primere og probe, se vedlegg under "relatert".

## **Fremgangsmåte**

### **Isolering av RNA**

[RNA-isolering vev, MolPat Lab](#)

### **Måling av RNA-konsentrasjon**

[Metode; Måling av DNA-/ RNA-konsentrasjon i ekstrakter med Qubit 2.0 Fluorometer, MolPat Lab](#)

#### **1. Lagring av data, dokumentasjon**

Opprett mappe her:

I: - STOLAV – Patologen – Patologi – Seksjon for spesialanalyser patologi – Molekylær patologi – Arbeidsark og resultater – B-ACTIN - <ÅÅÅÅ> - måned - <ÅÅÅÅMMDD\_sign>

Lagre arbeidsark og datafil fra CFX Manager (realtime PCR). Hvis det er håndskrevne notater på arbeidsarket skal det scannes inn og legges her.

#### **2. $\beta$ -actin kvalitetskontroll**

##### **PCR-oppsett (realtime PCR)**

[Arbeidsark; b-actin, MolPat lab](#)

Positiv kontroll:

RNA isolert fra b-actin positiv prøve.

Negativ reagenskontroll (blindprøve):

Sterilt vann i stedet for RNA (RNase-fritt vann følger med kitet).

NB! PCR-prep skal foregå på kjølebrett. Prøvene (RNA-et) tines like før tilsetting, - skal ikke romtempereres.

### **Analysering av data**

Software: Bio-Rad CFX Manager

**Positiv PCR-reaksjon** for  $\beta$ -actin vil gi økende fluorescence med antall sykluser (se fanen "innledning", Grunnlagsinformasjon, Realtime PCR, figur 1). Lav Ct indikerer mye templat og lengden på log-lineær-fasen sier noe om hvor mye PCR-produkt som dannes (effektivitet). Dersom kurven flater ut tidlig er det dårligere kvalitet på ekstraktet enn om log-lineær-fasen varer lenge.

**Negativ PCR-reaksjon** for  $\beta$ -actin gir ingen fluorescence. Dette kan bl.a skyldes at RNAet er for mye fragmentert, at RNA-isoleringen har vært mislykket eller at det er inhibitorer for PCR i ekstraktet. Ekstraktet kan ikke brukes til PCR, isolering av RNA må gjøres på nytt.

### **Resultatregistrering**

Den som har utført analysen skriver inn Ct-verdi og setter status <Analyse utført> på B-ACTIN.

Hong Yan Dai eller stedfortreder kontrollerer amplifikasjonsplot.

- godkjenner kontrollen og gir ut prøvesvaret
- underkjenner kontrollen og ber om ny RNA-isolering
- underkjenner kontrollen men gir ut svaret med forbehold om at prøvematerialet er for sparsomt og/eller av dårlig kvalitet.

## **3. Rydding og arkivering**

RNA-ekstrakter arkiveres i fryser (fortynninger kastes).

PCR-produkter kastes.

Arbeidsark (lagret/ innscannet jfr avsnitt 1.) kastes.

Lagre datafil fra CFX Manager (realtime PCR).

Mappene under «Arbeidsark og resultater» på I:\ skal lagres i minst 3 år. De er ikke skrivebeskyttet, men adgangsbegrensning og regelmessig sikkerhetskopiering gjør at dokumentene er godt nok beskyttet.

## **Grunnlagsinformasjon**

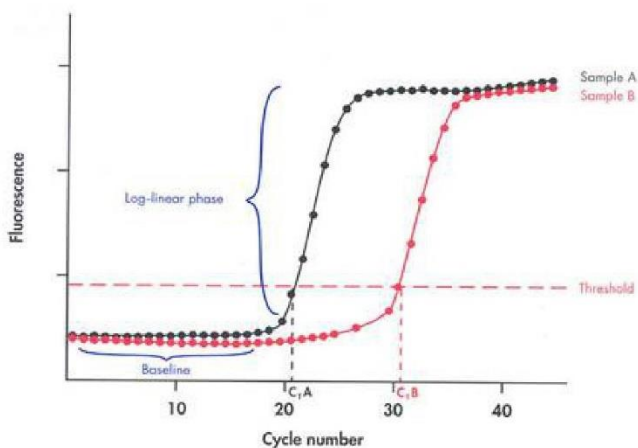
### ***$\beta$ -actin som endogen kontroll ("husholdningsgen")***

$\beta$ -actin er et "husholdningsgen" som kan brukes til å kontrollere at RNA-isoleringen har vært effektiv og til å normalisere/ evt. justere mengden RNA som skal brukes i den påfølgende analysen/ PCR-reaksjonen. "Husholdningsgener" koder for proteiner som er nødvendige for de normale cellefunksjonene og disse genene er aktive hele tiden i mange celletyper.

## Realtime PCR

Ved real-time PCR registreres fluorescens for hver PCR-syklus. Fluorescensen registreres som et amplifikasjonsplot der fluorescensen vil være proporsjonal med økning i mengde PCR-produkt.

Figur 1: eksempel på amplifikasjonsplot



**Baseline:** støynivået i de første syklusene, fra syklus 3 til ca. 15 hvor det ennå ikke detekteres økning i fluorescens. Baseline-fluorescens trekkes fra fluorescensen fra PCR-produktet.

**Threshold:** legges nederst i lineær-fasen i et logaritmisk amplifikasjonsplot.

**Threshold cycle (Ct):** Dette er den syklusen hvor amplifikasjonsplotet krysser "threshold", det vil si den syklusen hvor vi ser den første økningen i fluorescens.

Amplifikasjonsplotet viser økende fluorescens fra 2 prøver (A og B). Prøve A inneholder mer templat for denne PCR-reaksjonen enn prøve B.

## TaqMan probe

TaqMan-probe binder seg til PCR-produktet og induserer fluorescens etter følgende prinsipp:

TaqMan probe er et enkelttrådet oligonukleotid som er komplementær til en del av sekvensen i den ene av DNA-trådene i PCR-produktet. En fluorofor (for eksempel FAM) er bundet til 5'-enden av proben og en quencher (for eksempel Eclipse™ DarkQuencher) er bundet til 3'-enden.

## QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit

Med QIAGEN OneStep RT-PCR Kit gjøres revers transkripsjon (RNA → cDNA) og PCR i samme rør/reaksjon. Enzymene revers transkriptase og HotStarTaq® DNA Polymerase er blandet sammen, men virker uavhengig av hverandre pga forskjellig temperaturoptimum.


PCR-program	
50°C i 30 min.	Det dannes cDNA (fra RNA) ved hjelp av enzymet revers transkriptase (RT-PCR).

95°C i 15 min.	Enzymet revers transkriptase inaktiveres. Enzymet HotStarTaq® DNA Polymerase aktiveres.
94°C 30 sek 60°C 1 min. Plate Read	PCR


## Referanser

QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit, 2012 (vedlegg under "relatert").

### Relaterte dokumenter:

 Arbeidsark; b-actin, MolPat lab

 Metode; Måling av DNA-/ RNA-konsentrasjon i ekstrakter med Qubit 2.0 Fluorometer, MolPat Lab


 RNA-isolering vev, MolPat Lab

### Relaterte vedlegg:

 OneStep RT-PCR håndbok, 2012

 Primer- og probeoversikt b-actin


## Vedlegg 4: Eksempel på utfylt arbeidsark til $\beta$ -actin kvalitetskontroll

									
<b>Arbeidsark; <math>\beta</math>-actin, MolPat Lab</b>							Dato:	03.05.21	
							Sign:	DM/HSM	
<b>Metode: Realtime RT(Reverse Transkriptase) PCR, 25<math>\mu</math>l</b>									
<b>Kit: QIAGEN OneStep RT-PCR Kit <span style="color: red;">NB! Sett opp reaksjonen på kjølebrett</span></b>									
<b>Primere</b>									
Forw ard (sense)	b-actin L								
Reverse (antisense)	b-actin R								
<b>Preparering av mastermix</b>									
<b>Reagenser</b>	<b>Reaksj.løs</b>	<b>Volum (<math>\mu</math>l/reaksjon)</b>	<b>7</b>						
dH <sub>2</sub> O, RNase-fritt		5,5	38,5						
PCR Buffer (inkl. 12,5 mM	5 x	5,0	35,0						
dNTP mix	10 mM	1,0	7,0						
Primer, forw ard (sense)	6 $\mu$ M (10x)	2,5	17,5						
Primer, reverse (antisense)	6 $\mu$ M (10x)	2,5	17,5						
OneStep Enzyme Mix	2 $\mu$ l / reaksjo	1,0	7,0						
Probe, <b>b-actin</b> (FAM)	2 $\mu$ M (10x)	2,5	17,5						
Volum til fordeling		<b>20,0</b>							
<b>Preparering og tilsetning av templat RNA</b>									
Preparer templat RNA til 2 ng/ $\mu$ l og tilsett 5 $\mu$ l (10 ng). RNA-ekstrakt < 2 ng/ $\mu$ l tilsett 5 $\mu$ l.									
<b>Preparering av templat RNA</b>							<b>Tilsette RT-PCR reaksjonen</b>		
<b>PCR rør nr.</b>	<b>Boks nr.</b>	<b>røvenummer</b>	<b>RNA ekstrakt (ng/<math>\mu</math>l)</b>	<b>RNA ekst. (<math>\mu</math>l)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Volum (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Templat (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Merknad</b>	
1		1	22,4	1,0	10,0	11	5		
2		2	74,4	1,0	36,0	37	5		
3		3	40	1,0	19,0	20	5		
4		4	182	1,0	89,0	90	5		
5		5	212	1,0	109,0	110	5		
6		6	212	1,0	109,0	110	5		
7									
8									
9									
10									
<b>PCR progra</b>		50 °C 30 min	95 °C 15 min	94 °C 30 sek					
				60 °C 1 min					
				Plate Read	END	Realtime PCR maskin nr:			
				x 40		Datafil navn:			


Vedlegg 5: BRCA1/2 primere som ble benyttet i oppgaven

Primernavn	Primersekvens	Produsent
<b>BRCA1ex15L</b>	5'-GGTGGTACATGCACAGTTGC-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA1ex15L2</b>	5'-GGTGGTACATGCACAGTTGC-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA1ex16L</b>	5'-TGCATTGAAAGTTCCCAAT-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA1ex16L2</b>	5'-GTTCCCAATTGAAAGTTGC-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA1ex17R</b>	5'-GATTAGTTAAAGTGATGTGGTGTTC-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA1ex17R2</b>	5'-TCATAACAACATGAGTAGTCTCTTCAG-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA2ex21L</b>	5'-AGTTCGTGCTTTGCAAGATG-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA2ex22R</b>	5'-CAGATTCCATGGCCTTCCTAA-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA2ex24L</b>	5'-GCCCCTTCACTTCAGCAAAT-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA2ex25L</b>	5'-GCGACCAGAATCCAAATCAG-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA2ex25R</b>	5'-AAGGCCTGATTTGGATTCTG-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA2ex26Ra</b>	5'-GTGGACCACTTGGGATCATT-3'	Eurogentec, Belgia
<b>BRCA2ex26Rb</b>	5'-TGGACCACTTGGGATCATTT-3'	Eurogentec, Belgia

Vedlegg 6: Eksempel på utfylt arbeidsark til PCR-oppsett som ble utført under oppgaven

											
<b>Arbeidsark: BRCA1/2 - Prosjekt, MolPat Lab</b>								Volum:		30 µl	
								Dato:		03.05.21	
								Sign.:		DM/HSM	
Metode: PCR, 30 ul											
<b>Prøvenum</b>	sense primer	antisense primer R									
1	BRCA2ex24	BRCA2ex26Ra									
3	BRCA1ex15	BRCA1ex17R1									
4	BRCA2ex25	BRCA2ex26Rb									
6	BRCA1ex16	BRCA1ex17R2									
<b>Preparering av mastermix</b>				1		3		4		6	
<b>Reagenser</b>	<b>Reaksj.løsn.</b>	<b>Volum (µl/reaksjon)</b>		<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>				
dH <sub>2</sub> O*		12,70		25,4	25,4	25,4	25,4				
PCR Buffer	10 X	3,0		6,0	6,0	6,0	6,0				
dNTP mix	10 mM	1,2		2,4	2,4	2,4	2,4				
Primer, forward (sense)	6 µM (10x)	3,0		6,0	6,0	6,0	6,0				
Primer, reverse (antisense)	6 µM (10x)	3,0		6,0	6,0	6,0	6,0				
AmpliTaq Gold DNA Polym	5 U/µL	0,30		0,6	0,6	0,6	0,6				
MgCl <sub>2</sub>		1,8		3,6	3,6	3,6	3,6				
Volum til fordeling		25,00		* juster ut fra templatmengden som skal tilsettes							
<b>Preparering og tilsetting av templat:</b>											
<b>PCR rør nr.</b>	<b>Boks nr.</b>	<b>Prøvenummer</b>	<b>DNA kons (ng/µl)</b>	<b>Tilsette PCR reaksjonen</b>	<b>Primerpar</b>						
1		1	x	5	24L/26Ra						
2		3	x	5	15L/17R						
3		4	x	5	25L/26Ra						
4		6	x	5	15L/17R2						
<b>Default PCR program:</b>											
<b>PCR progr.</b>	96 °C 10 min	94 °C 30 sek	72 °C 10 min								
		56 °C 30 sek		10 °C ∞							
		72 °C 30 sek									
		x 40		PCR-maskin nr.:							

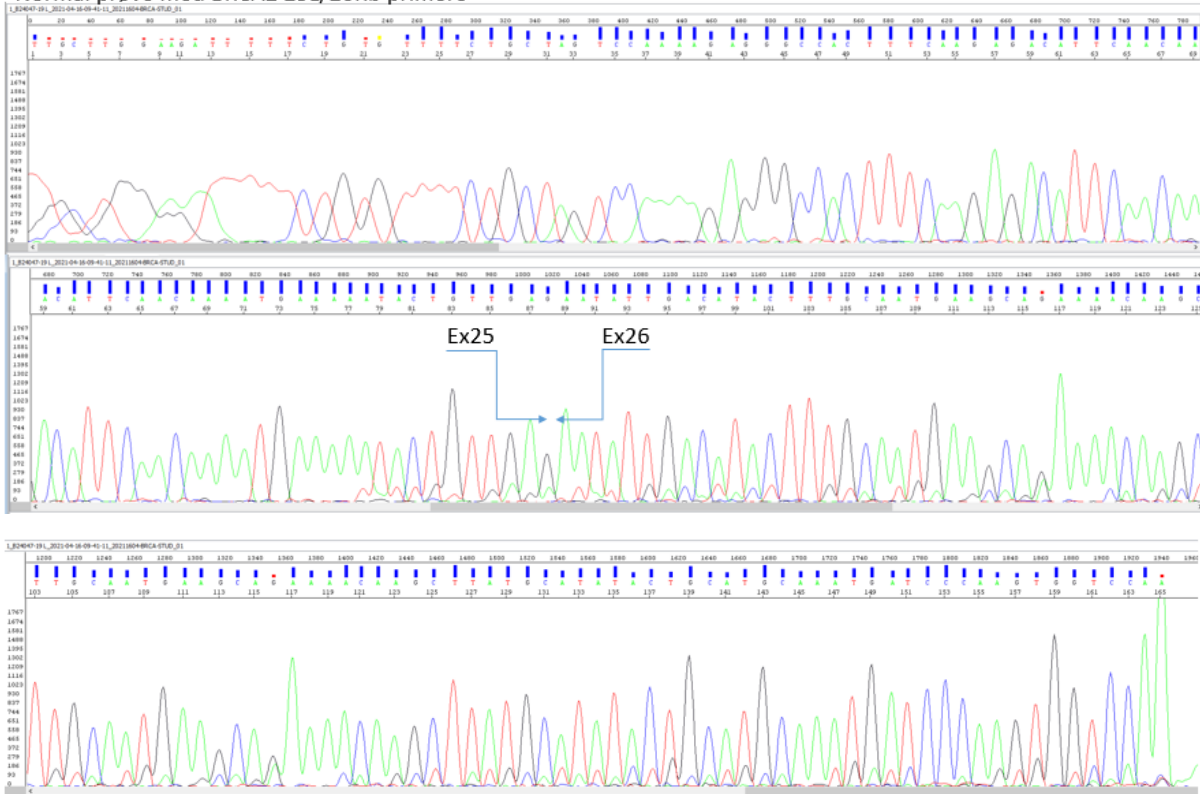
Vedlegg 7: Eksempel på utfylt arbeidsark til rensing og sekvensering av PCR-produkt

					
				Dato:	03.05.2021
				Sign:	DM/HSM
<b>Arbeidsark: Preparering Cycle Sequencing, MolPat Lab</b>					
<b>Rensing av PCR-produkt med ExoStar. NB! Utføres på kjøleblokk</b>					
Bland 4 µl ExoStar med 10 µl PCR-produkt i ABI-plate eller merkede PCR-rør.					
Kjør programmet ExoStar: 37°C i 15min, 80°C i 15min, 4°C ∞					
<b>Cycle Sequencing Master Mix 20 µl</b>					
		<b>UniL-mix</b>	<b>UniR-mix</b>		
<b>Reagens</b>	<b>Volum n=1</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		
dH <sub>2</sub> O	7,6	38,0	38,0		
5x Buffer	4,0	20,0	20,0		
BigDye v3	2,0	10,0	10,0		
Primer (0,6µM)	0,4	2,0	2,0		
Volum til fordeling	14,0	14,0	14,0		
PCR-produkt m/Exosap- it	6	6	6		
PCR-progr.					
96°C 1 min					
96°C 10 sek					
56°C 5 sek					
x 25					
60°C 2,5 min					PCR-maskin nr:
→ 6°C					
<b>Rensing av sekvenseringsprodukt med BigDye Xterminator Purification</b>					
<b>Reagens</b>	<b>Volum n=1</b>	<b>0</b>			
SAM løsning	45,0	0,0			NB! ved oppsett av 20ul Cycle Seq må 10ul sekvenser
Xterminator	10,0	0,0			overføres til ny ABI-plate før tilsetting av BigDye Xter
Til fordeling	55 µl				

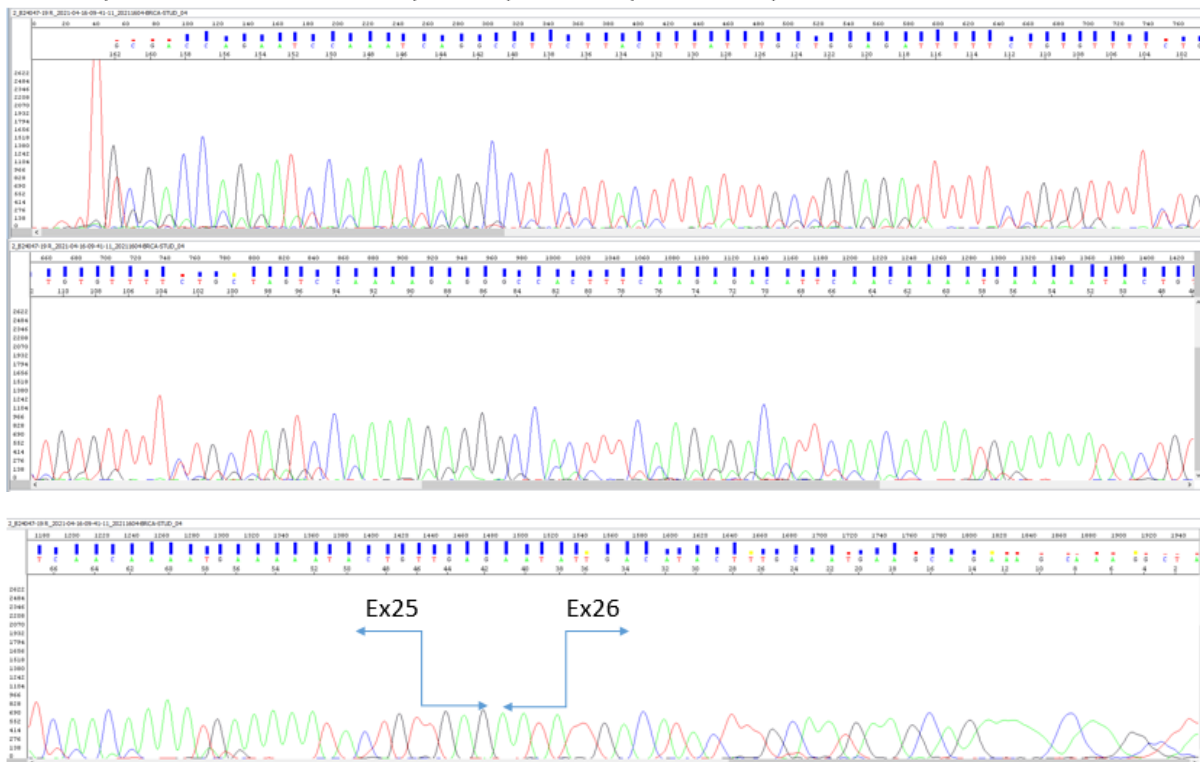


## Vedlegg 8: Oversikt over fullstendige sekvenseringsresultater fra normale prøver

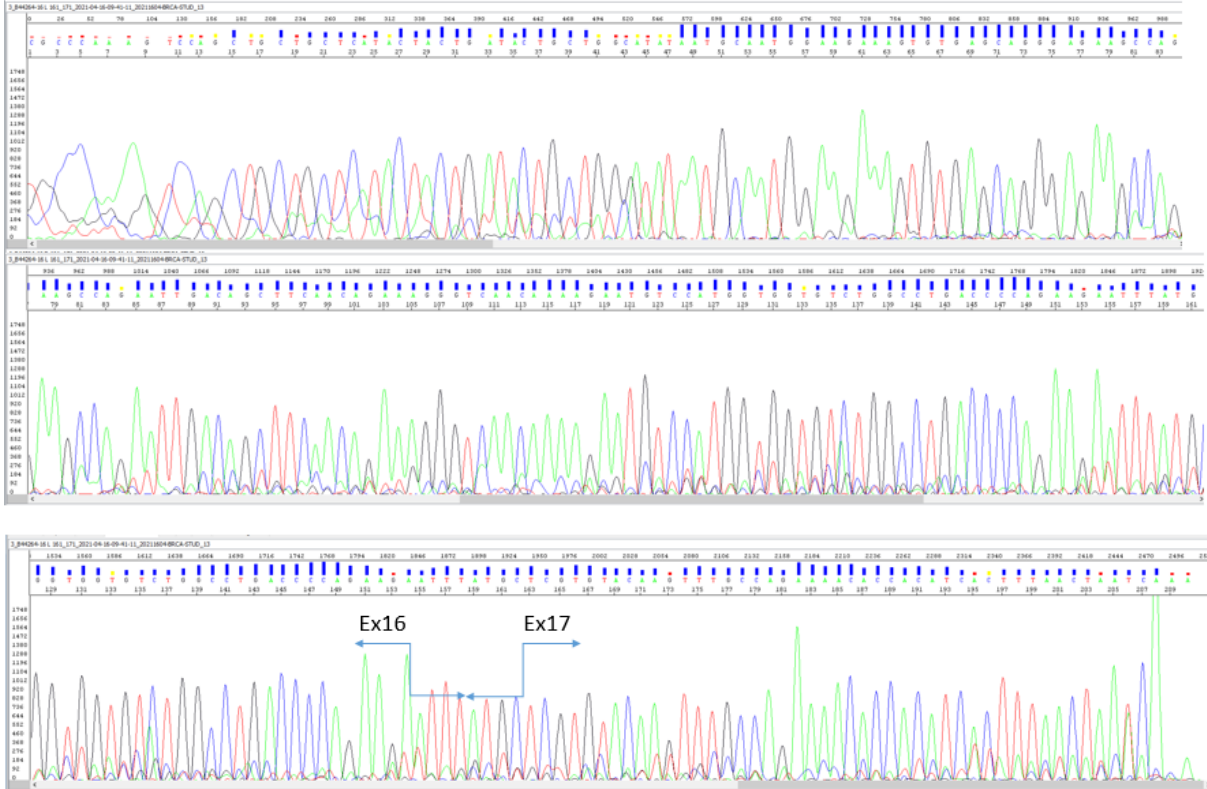
### Normal prøve med BRCA2 25L/26Rb primere



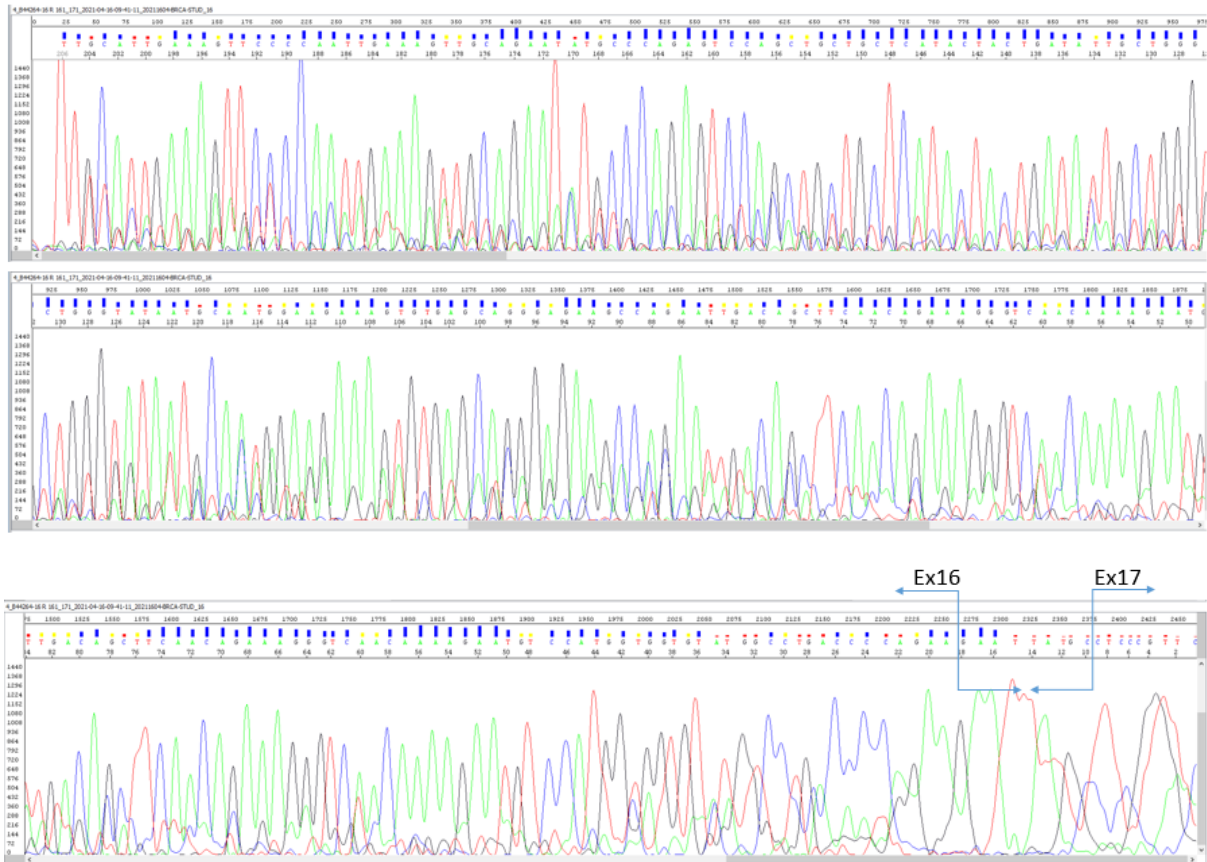
### Normal prøve med BRCA2 25L/26Rb primere (revers komplementert R)



Normal prøve med BRCA1 16L/17R1 primere

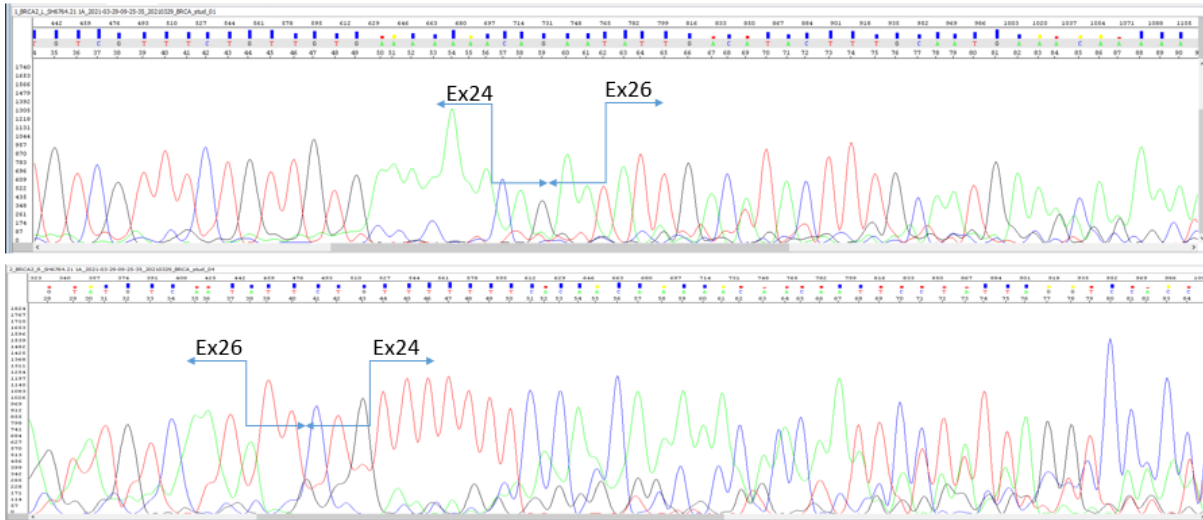


Normal prøve med BRCA1 16L/17R1 primere (revers komplementert fra R)

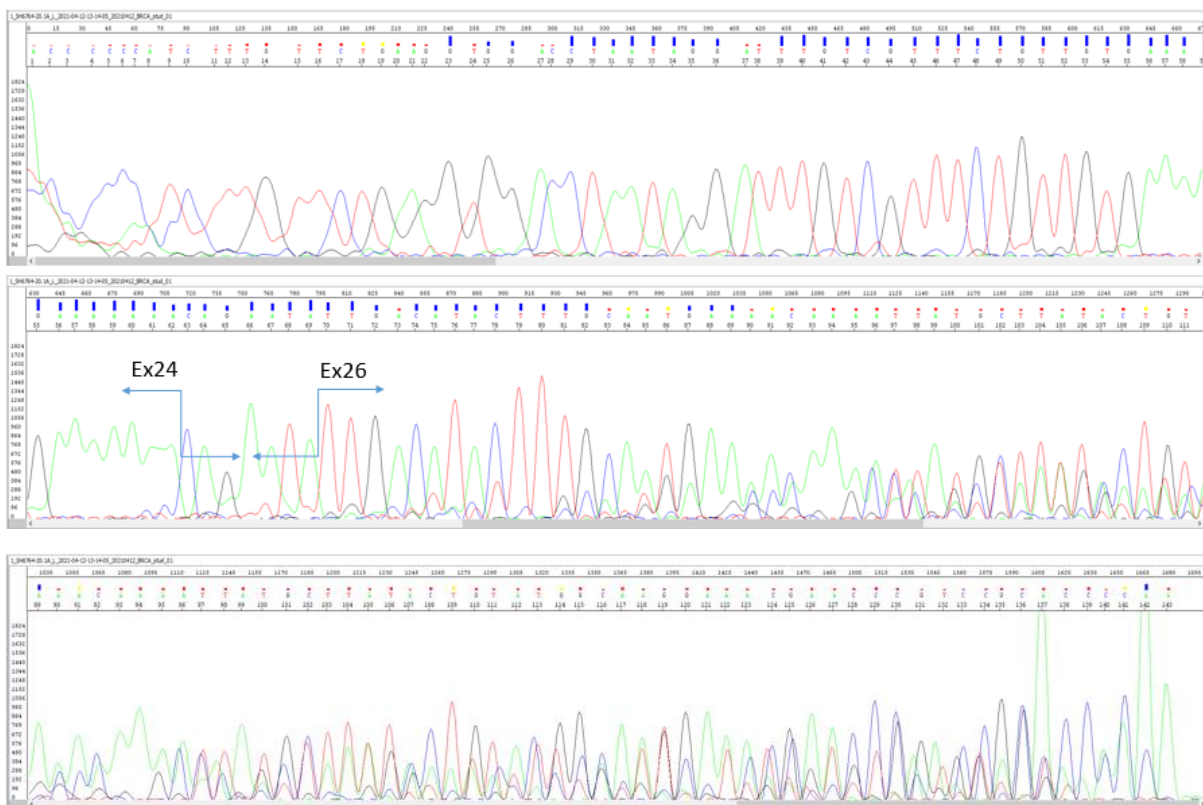


# Vedlegg 9: Oversikt over fullstendige sekvenseringsresultater fra prøver med eksondelesjoner

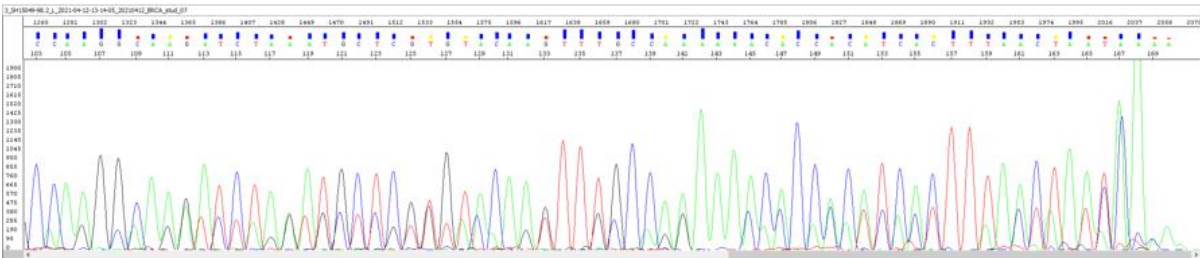
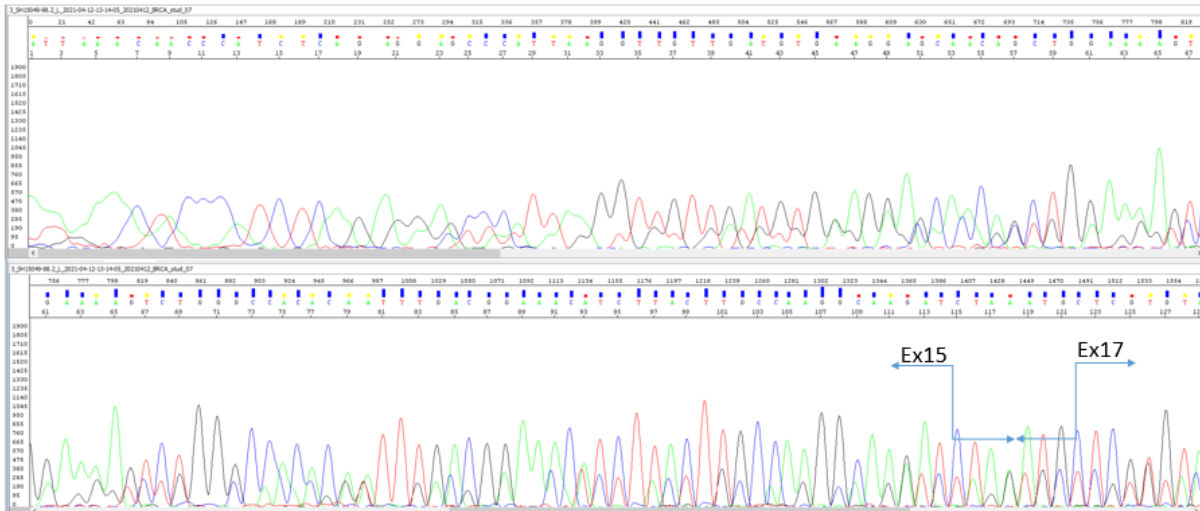
Prøve med eksone 25 delesjon, med BRCA2 24L/26Ra primere



Prøve med eksone 25 delesjon, med BRCA2 24L/26Ra primere



Prøve med ekson 16 deleksjon, påvist med BRCA1 15L/17R1 primere



Prøve med ekson 16 deleksjon, påvist med BRCA1 15L/17R1 primere (revers komplementert)

