

Torill Johnsen og Larina Haugen

Optimalisering av sangersekvensering av *BRCA1*- og *BRCA2*-genene

Bacheloroppgave i bioingeniørfag

Veileder: Eva K. Svaasand, Wenche Sjursen og Vlado Kovcic

Medveileder: Kaisa Lehti

Mai 2023

Torill Johnsen og Larina Haugen

Optimalisering av sangersekvensering av *BRCA1*- og *BRCA2*-genene

Bacheloroppgave i bioingeniørfag

Veileder: Eva K. Svaasand, Wenche Sjursen og Vlado Kovcic

Medveileder: Kaisa Lehti

Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne bacheloroppgaven er gitt av avdeling for medisinsk genetikk (AMG) ved St. Olavs hospital i forbindelse med avslutningen av bioingeniørfaglig utdanning ved Norsk teknisk-naturvitenskapelig universitet i Trondheim. Alt praktisk laboratoriearbeid er utført i lokalene til AMG.

Først og fremst vil vi rette en stor takk til vår engasjerte faglige veileder, molekylærbiolog Eva K. Svaasand. Hun har hjulpet oss med alt praktisk laboratoriearbeid, kommet med god teoretisk veiledning og generelt vært svært motiverende gjennom hele bachelorperioden. Vi vil også benytte anledningen til å takke faglige veiledere klinisk laboratoriegenetiker og professor Wenche Sjursen og molekylærbiolog Vlado Kovcic, for enormt faglig engasjement for oppgaven vår. Vi verdsetter den store interessen de har vist under hele skriveprosessen. Vi ønsker også å takke molekylærbiologene Liss Anne Solberg Lavik og Bodil Gilde for gode tips og laboratorieteknisk veiledning.

En takk rettes til AMG for lån av laboratoriearealer og utstyr, samt alle ansatte ved avdelingen for en hjertelig mottagelse og en fin bachelorperiode.

En siste takk rettes også til prosessveileder Kaisa Lehti.

Trondheim, 19.mai 2023



Larina Haugen



Torill Johnsen

Sammendrag

I denne bacheloroppgaven er hensikten å optimalisere primere for sangersekvensering av *BRCA1* og *BRCA2*. Dette gjelder for de primere som ikke følger standard betingelser for rutinen ved Avdeling for medisinsk genetikk (AMG), eller som gir uspesifikke og svake produkter ved gelelektroforese. Disse *BRCA*-primere redesignes med mål om å følge avdelingens standardbetingelser for temperatur ved touchdown-PCR og konsentrasjon av primerbruksløsning.

Ved design av primere finnes det et sett med regler som bør følges. Det er disse reglene som har lagt grunnlaget for redesign av *BRCA*-primere. Gelelektroforese og sangersekvensering ble utført for å teste ut og validere primere.

Resultatene fra gelelektroforese viser at de redesignene primere produserer spesifikke og sterke bånd. Sekvenseringsproduktene ga høy signalstyrke og lite bakgrunnsstøy.

Konklusjonen er at de nye primere fungerer optimalt. Primerne er validert og kan implementeres i rutinen ved AMG. Vi anbefaler at avdelingen redesigner de resterende primere.

Abstract

In this bachelor's thesis, the purpose is to optimize primers for Sanger sequencing of *BRCA1* and *BRCA2*. This applies to the primers that do not follow the standard conditions applied in the routine at The Department of Medical Genetics. This also applies to the primers that produce nonspecific and weak bands by gel electrophoresis. Some of these *BRCA*-primers are redesigned with the aim of following the department's standard conditions for temperature and touchdown PCR and concentration of the working primer solution.

When redesigning primers there is a set of rules that should be followed. Gel electrophoresis and Sanger sequencing was performed in order to validate the new primers.

The results from gel electrophoresis show that the redesign has been successful. The bands produced show that the products are strong and specific. The signal intensity generated from the Sanger sequencing products is within acceptable range. When sequencing there is little to no background noise.

In conclusion the new primers follow the standard conditions applied in the routine at The Department of Medical Genetics. The primers have been tested and validated and is now ready to be implemented in the routine. We recommend that the department continues our work and redesigns the remaining primers.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract.....	III
Liste med forkortelser.....	6
1. Innledning.....	8
1.1 <i>BRCA1</i> og <i>BRCA2</i>	12
1.2 Genvarianter	15
1.3 Viktighet av testing.....	16
1.4 Identifisering av <i>BRCA</i> -varianter ved sekvensering.....	17
1.5 Generell beskrivelse av metoder.....	18
1.5.1 PCR.....	18
1.6 Sekvensering.....	20
1.6.1 Nestegenerasjonssekvensering	20
1.6.2 Sangersekvensering	21
1.7 Elektroforese.....	22
1.7.1 Gelelektroforese.....	22
1.7.2 Kapillærelektroforese	23
1.8 Regler for primerdesign.....	23
1.8.1 Feilkilder.....	25
1.9 Problemstilling.....	26
2. Materiale og metode	27
2.1 Primerdesign	29
2.2 Arbeidsflyt ved sangersekvensering	31
2.2.1 Genspesifikk PCR.....	31
2.2.2 Gelelektroforese.....	32
2.2.3 Rensing av PCR-templat til sangersekvensering.....	33
2.2.4 Sangersekvenserings-PCR.....	33
2.2.5 Rensing av sekvenseringsprodukt	34
2.2.6 Kapillærelektroforese	34
2.3 Analysering av sekvenser	35
2.3.1 Sequence Scanner 2	35
2.3.2 Sequence Pilot	35
2.4 Primervalidering	36
3. Resultater	37
3.1 Primerdesign.....	37

3.1.1 Primerdesign <i>BRCA2</i> ekson 15.....	41
3.2 Positiv kontroll	41
3.3 Gelelektroforese.....	42
3.4 Resultatbehandling	43
3.4.1 Sequence Scanner	43
3.4.2 Sequence Pilot	44
4. Diskusjon	47
5. Konklusjon.....	51
6. Referanser	52
7. Innholdsfortegnelse vedlegg.....	58

Liste med forkortelser

A:	Adenin
ACMG-AMP:	American College of Medical Genetic and Genomics-Association for Molecular Pathology
AMG:	Avdeling for medisinsk genetikk
ATM:	Ataxia-telangiectasia mutated
ATR:	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BB-ktr:	Blodbankkontroll
<i>BRCA</i> :	Breast cancer susceptibility gene
BRCT:	<i>BRCA1</i> C-terminal
BRNT:	<i>BRCA1</i> N-terminal
C:	Cytosin
CTD:	C-terminal DNA-binding domain
DBD:	DNA-binding domain
ddNTP:	Dideoxynukleotider
DNA:	Deoksyribonukleinsyre
dNTP:	Deoxynukleotider
G:	Guanin
HR:	Homolog rekombinasjon
LRG:	Locus Reference Genomic
MEN2:	Multippel endokrin neoplasi type 2
NCBI:	National Centre for Biotechnology Information
NGS:	Nestegenerasjonssekvensering
NHEJ:	Non-homologous end-joining
NMD:	Nonsense mediated mRNAdecay
NT:	Nukleotider
NTC:	Non template control
NTD:	N-terminal DNA-binding site
PCR:	Polymerasekjedereaksjon
Pos-ktr:	Positiv kontroll
<i>RET</i> :	Reseptor tyrosinkinase
RFU:	Relative Fluorescent Units
RRSO:	Risikoreduserende salpingooforektomi

ROS:	Reactive oxygen species
SCD:	Serine cluster domain
SNP:	Single nucleotide polymorphism
T:	Tyrosin
TD:	Toucdownd
Tm:	Smeltepunkt
T.V.:	Tekniske kvalitetskrav
VUS:	Variant av usikker klinisk betydning

1. Innledning

Kreft er en samlebetegnelse på flere ulike sykdommer som karakteriseres av unormal celledeling. Celledelingen er unormal, enten fordi cellene deler seg i økt tempo eller fordi cellene unngår programmert celledød (apoptose) (1). Hele 4 av 10 nordmenn vil utvikle en eller annen form for kreft før de fyller 80 år. Kreft i lunger, tykktarmen eller huden er de vanligste formene for kreft hos begge kjønn, men forekomsten er noe større hos menn enn hos kvinner. Prostatakreft er dog den kreftformen som forekommer hyppigst blant menn, og brystkreft forekommer hyppigst hos kvinner (2).

En rekke faktorer, som f.eks. alder, livsstil og arv, kan påvirke risikoen for å utvikle kreft. Det er en tydelig sammenheng mellom alder og forekomst av kreft. Anslagsvis inntreffer 85-90% av alle krefttilfeller etter fylte 50 år. Røyking, høyt inntak av alkohol og dårlig kosthold er eksempler på livsstilsfaktorer som øker kreftrisikoen. Mellom 5-10% av alle krefttilfeller settes i sammenheng med arv. I slike tilfeller ser en at en feil i genomet er nedarvet (2).

Kreft er et resultat av endring i DNA og kan oppstå sporadisk eller være et resultat av arv. Sporadisk kreft oppstår spontant ved at somatiske celler muterer. Slike endringer vil være isolerte og vil ikke kunne gå i arv. Dersom en kimcelle muterer, vil denne endringen nedarves til alle cellene hos eventuelle avkom. Dette kalles en kimbane-variant (3). Kimbane-variant gir opphav til familiær kreft. Varianten arves som oftest dominant, men da kreftutvikling krever en endring på begge alleler betyr det at et avkom kun vil være predisponert for kreft.

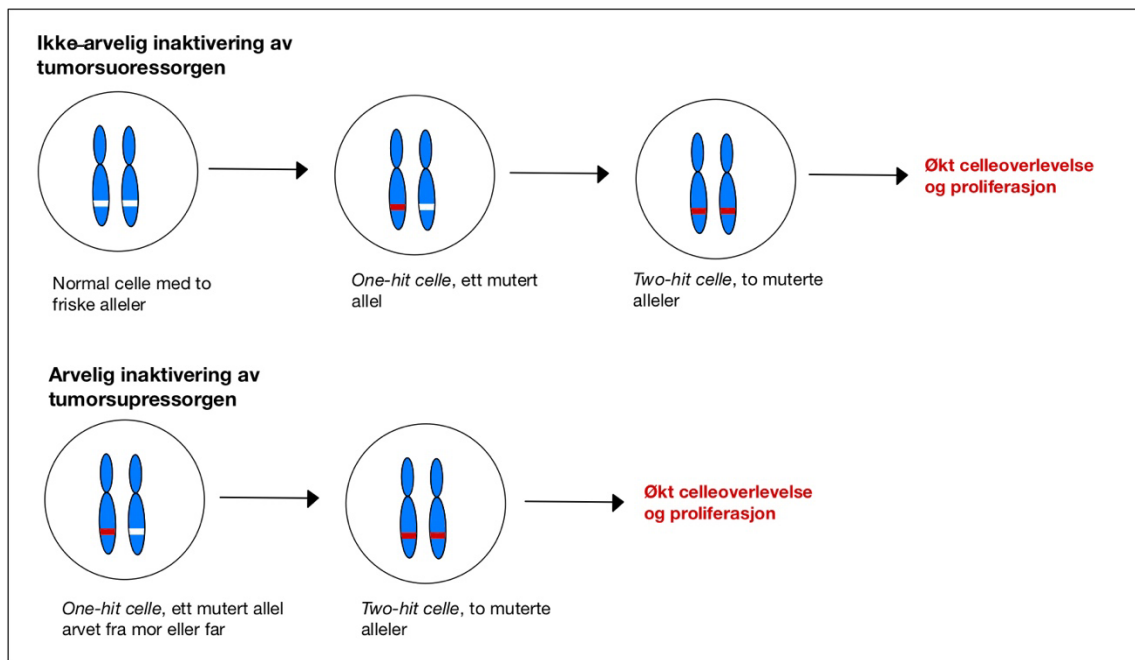
Endringer i DNA refereres ofte til som mutasjoner. Dette begrepet er negativt ladet og mange assosierer begrepet med alvorlige sykdommer, som f.eks. kreft. Det er viktig å huske på at dette ikke alltid er tilfellet. I klinikken benyttes derfor begrepet variant om alle mutasjoner. Vi velger å bruke begrepet variant i denne oppgaven.

Det finnes to typer gener som er viktig med tanke på tumorutvikling. Proto-onkogener koder for proteiner som tar del i regulering av normal celledeling, cellevekst og apoptose. Dersom det oppstår en endring i et proto-onkogen kalles det et onkogen. Et onkogen kan kode for proteiner som fremmer økt og ukontrollerbar cellevekst, og kan dermed gi kreft (4). Endringer i proto-onkogener kalles «gain-of-function»-varianter, og er dominante (5). Det vil si at endring av DNA i ett allel vil gi endring av fenotype. I de fleste tilfeller kan dermed ikke

varianter i proto-onkogener være arvelig. Det finnes unntak, som f.eks. syndromet Multipel endokrin neoplasi type 2 (MEN2), som oftest forårsakes av kimbane-varianter i proto-onkogenet reseptor tyrosinkinase (*RET*) (6).

Tumorsuppressorgener er gener som vanligvis koder for proteiner som hemmer cellevekst ved å blokkere utvikling og overlevelse av omdannede celler (5) (7). På denne måten hindrer tumorsuppressorgener kreftutvikling. Dersom det oppstår endringer i tumorsuppressorgener kan dette derimot føre til kreftutvikling. Slike endringer kalles «loss-of-function»-varianter, og er recessive. Dette innebærer at begge allelene må ha tapt funksjon for å bidra til kreftutvikling (5).

Varianter i tumorsuppressorgener kan både være arvelig betinget eller oppstått spontant (8). Tidligere var det antatt at kreft kun oppsto som en følge av arvelige varianter, noe Knudsons two-hit hypotesen motbeviste. I 1971 foreslo Knudson at retinoblastom, en svulst som utgår fra netthinnen hos barn (9), skyldes en variant med inaktiverende effekt i begge allel av et tumorsuppressorgen. Knudson forklarte i hypotesen sin hvordan kreft kunne oppstå dersom spontane varianter forårsaket ikke-arvelige svulster i somatisk vev (10). Spontan kreft grunnet inaktivering av et tumorsuppressorgen kan bare oppstå dersom begge alleler av genet muteres. Dette kan skje over en lang tidsperiode (8). Personer med arvet mutert allel i tumorsuppressorgen har økt sjanse for å utvikle kreft ettersom et av to alleler er endret. De behøver bare en mutasjon i det andre allelet for å utvikle kreft. Figur 1 illustrerer Knudsons two-hit hypotese.



Figur 1: Figuren viser hvordan aktiviteten til et tumorsupressorgen kan mistes ved arvelig og ikke-arvelig inaktivering. Individene uten arvelig variant må ha en variant i begge allelene før tumorsupressorgen mister sin effekt. Individene med arvet variant på ett allel utvikler kreft i yngre alder, da de kun behøver en variant i det andre allelet før tumorsupressorgen mister sin effekt. Figuren er modifisert fra (11). Illustrasjon laget ved hjelp av GoodNotes 5.

I 2021 ble 4 023 kvinner og menn diagnostisert med brystkreft, og 531 kvinner ble diagnostisert med eggstokkreft i Norge (12). Av alle brystkrefttilfeller skyldes 5-10% arv (13), og tilsvarende skyldes 5-15% tilfeller av eggstokkreft arv. *BRCA* (Breast Cancer Susceptibility Gene)-genene er særlig forbundet med økt risiko for bryst- og eggstokkreft (14). Varianter i *BRCA1* assosieres også med kreft i pankreas og prostata, mens varianter i *BRCA2* kan forbindes med hud-, pankreas- og prostatakreft (15). Ved arvelige krefttilfeller i bryst eller eggstokker, skyldes 40% varianter i *BRCA1* og *BRCA2* (16). Risikoen for å utvikle kreft ved varianter i *BRCA1/2* er listet opp i tabell 1 og 2. Varianter i *BRCA1/2* kan også assosieres med andre sykdommer, som f.eks. fanconi anemi. Fanconi anemi karakteriseres av abnormal utvikling av store organsystemer, beinmargssvikt med pancytopeni som oppstår tidlig, og økt disposisjon for kreft (17). Sykdommen nedarves autosomt recessivt, som innebærer at et sykt allel må arves fra både mor og far før fenotypen endres (18).

Tabell 1: Risiko for kreftutvikling ved varianter i BRCA1 (19).

Krefttype	Alder	Risiko for kreftutvikling	Risiko for generell befolkning
Bryst (kvinner)	Opptil 50 år	28,0 – 51,0%	2,0%
	Opptil 70 år	46,0 – 87,0%	7,4%
	Risiko for å utvikle kreft på nytt 5 år etter første brystkreftdiagnose	8,9 – 20,0%	2,0%
Ovarier	Opptil 50 år	8,0 – 23,0%	0,2%
	Opptil 70 år	39,0 – 63,0%	0,6%
	Risiko for å utvikle eggstokkreft innen 10 år etter brystkreftdiagnose	12,7%	<1,0%
Prostata	Opptil 70 år	Opptil 16%	6,1%
Bryst (menn)	Opptil 70 år	1,2%	<0,1%
Pankreas	Opptil 80 år	Økt risiko	1,1%

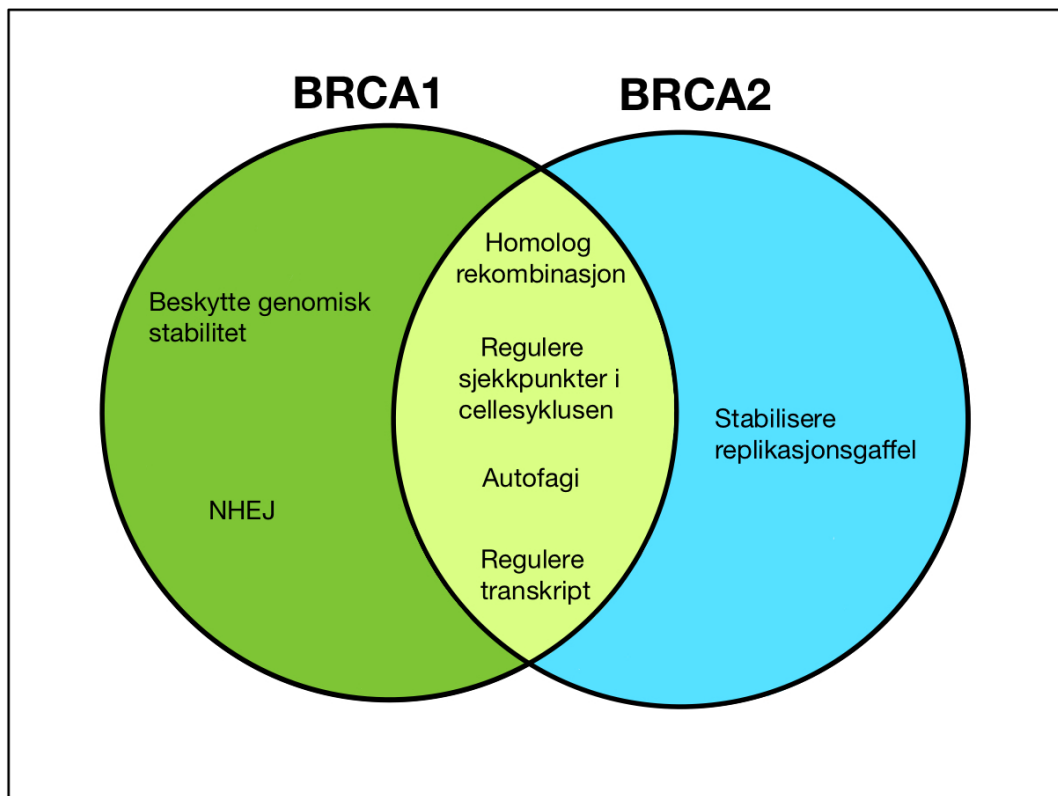
Tabell 2: Risiko for kreftutvikling ved variant i BRCA2 (20).

Krefttype	Alder	Kreftrisiko	Risiko for generell befolkning
Bryst (kvinner)	Opptil 50 år	23,0 – 35,0%	2,0%
	Opptil 70 år	43,0 – 84,0%	7,4%
	Risiko for å utvikle kreft på nytt 5 år etter første brystkreftdiagnose	3,9 – 12,0%	2,0%
Ovarier	Opptil 50 år	0,4 – 4,0%	0,2%
	Opptil 70 år	15,0 – 27,0%	0,6%
	Risiko for å utvikle eggstokkreft innen 10 år etter brystkreftdiagnose	6,8%	<1,0%
Pankreas	Opptil 80 år	7,0%, eller høyere ved familie historikk (pankreaskreft)	1,1%

Bryst (menn)	Opptil 70 år	6,8%	<0,1%
Prostata	Opptil 70 år	20,0%	6,1%
Melanom	Opptil 80 år	Økt risiko for melanom i både hud og øyne	1,7%

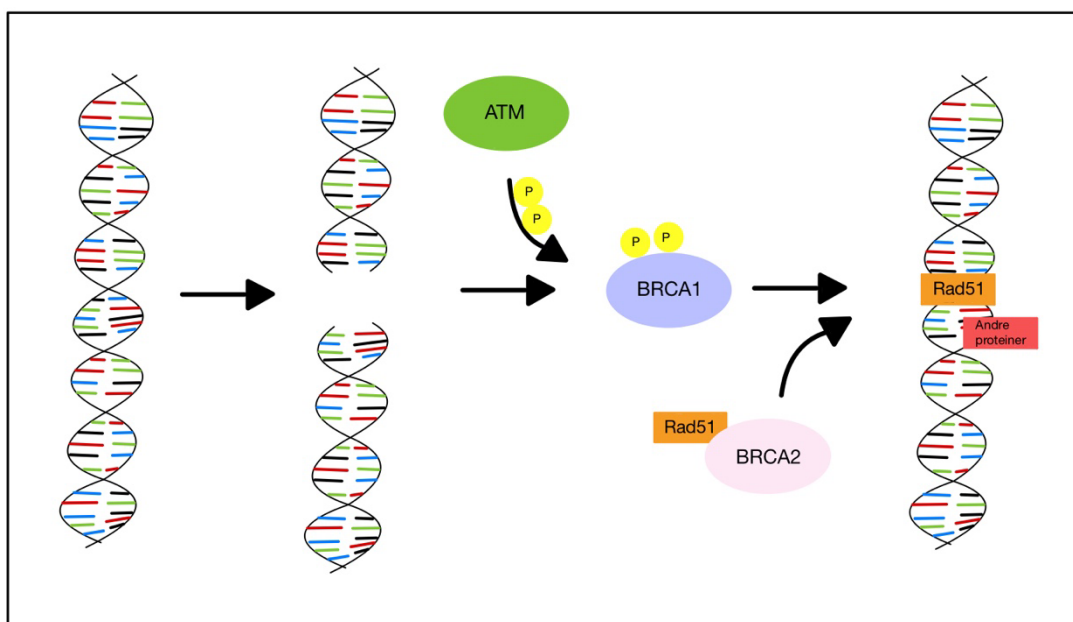
1.1 BRCA1 og BRCA2

BRCA1 og *BRCA2* er tumorsuppressorgener, og koder for proteiner som tar del i DNA-reparasjon og regulering av transkripsjon som respons på DNA-skade. Mer spesifikt er genene involvert i signalveier som er viktige for skadegjenkjennelse, reparasjon av dobbeltrådet brudd av DNA, kontroll av sjekkpunkter i cellyklusen og kromatin-remodelering. Figur 2 viser hovedfunksjonene til *BRCA1/2* samlet og hver for seg. *BRCA*-relaterte signalveier benyttes på flere steder i kroppen, men ser ut til å ha en sentral rolle i bryst- og eggstokker (21).



Figur 2: Figuren viser et venndiagram av hovedfunksjonene til *BRCA1* og *BRCA2*. Figuren er modifisert fra (22). Illustrasjonen er laget ved hjelp av GoodNotes 5.

BRCA-genene spiller en viktig rolle i reparasjon av dobbelttrådet DNA-brudd ved hjelp av homolog rekombinasjon (HR). Denne reparasjonsmekanismen innebærer bruk av homolog templat som søsterkromatider, og kan utføres ved enkelte trinn i cellyklusen (22). Skadet område av DNA kan repareres ved å hente informasjon fra det homologe kromosomet slik at DNA-polymerase kan forlenge tråden (23). Ligase binder trådene sammen. Proteinet RAD51 bidrar i stor grad ved den homologe rekombinasjonen. Figur 3 viser hvordan *BRCA*-genene tar del i homolog rekombinasjon. *BRCA1* regulerer også Non-homologous end-joining- (NHEJ) reparasjonssignalvei. Dette er en av de viktigste reparasjonsmekanismene når endene på det skadde DNA-et kan direkte liggeres uten bruk av homologt templat, og kan gjøres ved alle trinnene i cellyklusen (22).



Figur 3: Figuren viser *BRCA1* og *BRCA2* sin rolle i homolog rekombinasjon. *BRCA1* fosforyleres av genen *ATM* og aktiverer reparasjon av dobbelttrådet brudd av DNA ved homolog rekombinasjon. Ligase binder trådene sammen. Reparasjonen skjer ved hjelp av *BRCA2* og proteinet *RAD51*. Figuren er modifisert fra (24). Illustrasjon laget ved hjelp av GoodNotes 5.

BRCA1 beskytter genomisk stabilitet fra oksidativt stress som forårsakes av reaktive molekyler kalt Reactive Oxygen Species (ROS). ROS spiller en viktig rolle i cellyksalisering og homeostase, og kan gi skade på cellulære strukturer ved økt mengde. Tap av funksjon hos *BRCA1* fører til økt cellulær ROS (22).

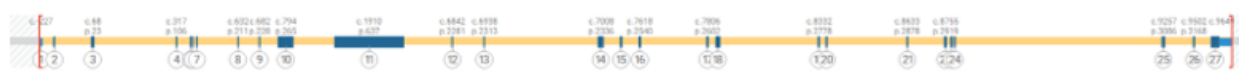
BRCA2 har en stor rolle i genomisk stabilisering av stress som kan oppstå under replikasjon av DNA. Slik stabilisering gjøres ved å regulere replikasjonsgaffelen ved hjelp av polymerisert *RAD51* (22). *BRCA1/2* er også involvert i transkripsjonsregulering, autofagi, det vil si prosesser hvor celler bryter ned og resirkulerer egne organeller (25), og mange flere prosesser.

BRCA1 består av 24 eksoner og *BRCA2* består av 27 eksoner (25). Proteinet BRCA1 består av 1863 aminosyrer (26), mens proteinet BRCA2 består av 3418 aminosyrer (27). Figur 4 viser alle introner og eksoner i henholdsvis *BRCA1* og *BRCA2*. Felles for de to genene er at ekson 11 utgjør omtrent halvparten av genets kodende del (16). *BRCA1* ekson 11 består av 3426 nukleotider (nt) (28), og tilsvarende ekson på *BRCA2* består av 4932 nt (28).

A



B

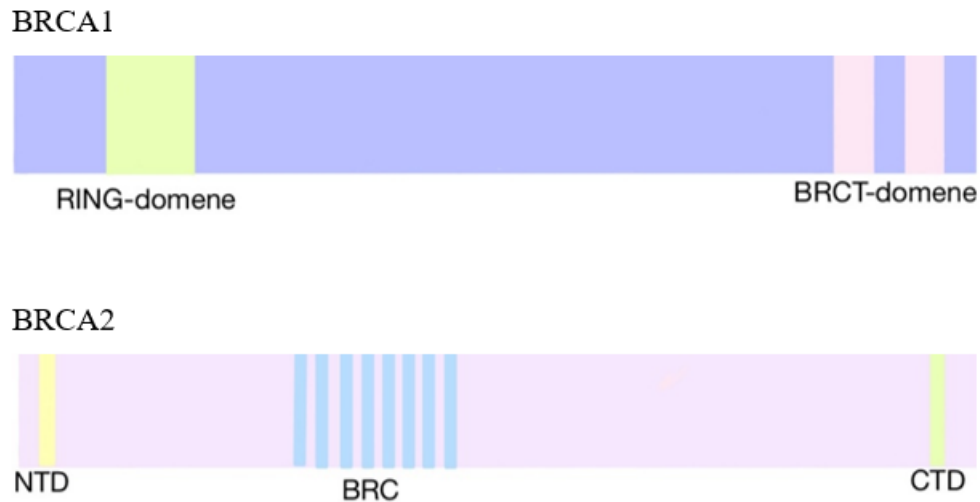


Figur 4: Figur 4A viser introner og eksoner for *BRCA1*, mens 4B viser introner og eksoner for *BRCA2*. Figurene er hentet fra Alamut Visual Plus.

Varianter i *BRCA1* forekommer med høyest frekvens i ekson 11-13, RING-domenet i N-terminalen i ekson 2-7 og *BRCA1* C-terminal (**BRCT**)-domenet i ekson 16-24 (29). Ekson 11-13 koder for over 65% av sekvensen til *BRCA1*. *BRCA1* N-terminal (**BRNT**) inneholder en svært konservert sink-binding, også kjent som et **RING**-fingerdomene, som er involvert i flere cellulære funksjoner. Varianter i begynnelsen av C₃HC₄-regionen av ekson 2, spesielt varianter som medfører rammeskift, kan forstyrre funksjonen av **RING**-domenet, samt domeneene som følger (30). *BRCA1* er et klasse I **BRCT**-domene, noe som betyr at det gjenkjenner overskudd av fosfoserin. Hovedfunksjonen er å regulere interaksjon mellom *BRCA1* og fosfolipider, men **BRCT** bidrar også til å mediere DNA-binding og ikke fosfoproteininteraksjoner. Serine cluster-domenet (**SCD**) er lokalisert på ekson 11-13 og inneholder en konsentrert mengde av antatt fortylingssteder. **SCD** fosforyleres av to kinaser, «Ataxia telangiectasia mutated» (ATM) og «Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein» (ATR), som aktiveres ved skade på DNA. *BRCA1*-varianter i dette området kan påvirke denne funksjonen (29).

I *BRCA2* er **BRC**-repetisjoner og DNA bindingsdomener (**DBD**) viktige. **BRC** kodes av ekson 11 og består av 8 konservative kopier bestående av 30-80 repeterende aminosyrer. Det antas at noen av disse repetisjonene er involvert ved binding av *BRCA2* til RAD51. **NTD** (N-terminal DNA binding site) interagerer med protein-produktet fra *EMSY*-genet, et onkogen som ofte amplifiseres ved sporadisk brystkreft, samt høygradig eggstokkreft (16). I C-terminal ende har *BRCA2* et DNA-bindingsdomene (**DBD**) som kalles (C-terminal DNA binding

domain (CTD). Dette domenet binder enkelttrådet DNA (31). Figur 5 viser noen av de viktigste domenene for *BRCA1* og *BRCA2*.



Figur 5: Figuren viser noen av de viktigste domenene i *BRCA1* og *BRCA2*. Figuren er modifisert fra (22). Illustrasjonen er laget ved hjelp av GoodNotes 5.

1.2 Genvarianter

Varianter som oppstår i introner eller utenfor gener gir som oftest ikke merkbare konsekvenser, men det finnes for lite forskning på dette til å si noe sikkert. Varianter som oppstår i spleisesete kan gi store konsekvenser, da feil ved spleising vil kunne medføre at det blir dannet et annet protein enn normalt. En punktvariant vil si at én base blir endret. Denne typen varianter kan være synonyme, ikke-synonyme eller nonsense. Synonyme varianter kalles også for stille varianter, da baseendringen ikke medfører endring av aminosyre. Ikke-synonyme varianter kalles for missense-varianter. Slike varianter medfører at aminosyren som blir inkorporert endres. Lokaliseringen av en slik variant har mye å si for hvor stor effekt varianten vil ha på proteinnivå, for eksempel dersom aminosyreendringen er til stede i domener som er viktige for proteiner. En deleksjon er et resultat av at en eller flere baser fjernes fra sekvensen, mens en insersjon vil si at det tilføres en eller flere baser i sekvensen. Dette kan medføre et leserammeskift, som kan føre til at et stoppkodon (UGA, UAA, UAG) inkorporeres tidligere enn det skal. Dette kalles en nonsense variant (32). Slike varianter vil gi mRNA med for tidlig stoppkodon som degraderes av kvalitetskontrollmekanismen nonsense mediated mRNAdecay (NMD). Slik hindres produksjon av forkortede proteiner som kan medføre sykdom hos mennesker (33).

Det finnes ulike metoder for å klassifisere en variant, f.eks. American College of Medical Genetic and Genomics – Assosiation for Molecular Pathology (ACMG-AMP). Metoden

baserer seg på ulike bevis, som vektet veldig sterke, sterke, moderat eller støttende. De ulike vektingene av bevis har en tallverdi. Alle bevisene summeres, og totalsummen gjør at variantene havner innenfor en klasse. Varianter klassifiseres som nøytral (klasse 1), sannsynlig nøytral (klasse 2), variant av usikker klinisk betydning (VUS, klasse 3), sannsynlig patogen (klasse 4) eller patogen (klasse 5) (34). Alle varianter skal klassifiseres, da formålet er å avgjøre om varianten kan være årsak til sykdom eller ikke (35).

Dersom bevisene fører til at varianten plasseres i klasse 1 eller 2 regnes dette som en benign variant, altså ikke sykdomsgivende. Dersom bevisene klassifiserer varianten som klasse 4 eller 5 regnes dette som sannsynlig patogen eller patogen variant, det vil si sykdomsgivende (35). Det finnes spesifikke retningslinjer for klassifisering av varianter i *BRCA1* og *BRCA2* (36).

I Norge er det fire varianter i *BRCA1* som forekommer med høy frekvens. De fire founder mutasjonene er c.1556del, c.3328_3229del, c.697_698del og c.1016dup (NM_007294.3). Varianten c.5217_5223del (NM_000059.3) forekommer hyppigst av alle *BRCA2* varianter (37).

1.3 Viktighet av testing

Ved høy frekvens av kreft i en familie kan en kimbane-variant mistenkes. Før familien får tilbud om en prediktiv test, må et av de syke familiemedlemmene få genetisk veiledning. Genetiske veiledere hjelper personer å forstå de medisinske og familiære konsekvensene av en genetisk betinget sykdom. Index-personen, det vil si første oppdaget person med sykdom, får tilbud om genetisk veiledning. Under veiledningen settes det opp et familiekart, hvor kartlegger forekomsten av kreft i familien. Basert på familiehistorie og sykehistorie kan genetisk veileder vurdere sannsynligheten for at det er en genetisk årsak til sykdom i familien (38).

For at en lege skal kunne gi henvisning til diagnostisk testing må pasienten utfylle visse kriterier. Eksempler på noen kriterier er at kvinnen med brystkreft er 60 år eller yngre, eller at kvinnen har bilateral brystkreft og er 65 år eller yngre. Kvinner med eggstokkreft i alle aldre får alltid tilbud om en genetisk diagnostisk test. Det samme gjelder menn med brystkreft uansett alder. Helst skal den yngste med relevant kreftsykdom i en familie tilbys diagnostisk

test, men ofte er det nødvendig å teste flere syke i familien for å avgjøre om sykdommen kan skyldes arv (39).

Reglene er noe annerledes ved prediktiv testing, som er aktuelt for friske risikopersoner. Førstegradsslektninger til en kvinne med brystkreft eller eggstokkreft som er 50 år eller yngre har alltid krav på en prediktiv test. Dette gjelder også for andregradsslektninger til to kvinner med brystkreft som hadde gjennomsnittsalder 55 år eller yngre, eller andregradslektninger til tre kvinner med brystkreft uavhengig av alder (39). Listen over kriterier er lang, og dermed nevnes bare noen her.

Enkelte vil ha krav på oppfølging i form av ulike undersøkelser. Slik oppfølging tilbys blant annet ved familiær brystkreft der det ikke er påvist genfeil i familien. Da må andre kriterier utfylles, f.eks. at et familiemedlem under 40 år har hatt brystkreft. Ved slike tilfeller kan utsatte familiemedlemmer følges opp ved årlig mammografi (40). Lignende risikotiltak finnes ved familiær eggstokkreft uten påvist familiær genfeil. Da kan utsatte familiemedlemmer få tilbud om risikoreducerende salpingooforektomi (RRSO) (41). RRSO innebærer å kirurgisk fjerne ovarier og tuber (42).

Kvinner i alderen 25-60/70 år med påvist variant i *BRCA1* eller *BRCA2* får også tilbud om årlig MR-bryst og mammografi (39). Risikoreducerende mastektomi, det vil si kirurgisk fjerning av bryst (43) og RRSO tilbys pasienter med påvist variant i *BRCA1/2* (39). RRSO anbefales hovedsakelig for kvinner i alderen 35-40 ved påvist variant i *BRCA1*, mens for kvinner med påvist variant i *BRCA2* anbefales RRSO i alderen 40-45 (44). Tiltak som dette skal forebygge krefttilfeller hos de med genetisk høy risiko for å utvikle sykdom. For å kunne tilby risikoforebyggende tiltak og screening til de trengende er det viktig at variantbærere identifiseres. Da kan variantbærere få riktig oppfølging, og risikoen for å utvikle kreft blir lavere. Dette er et langt bedre alternativ enn behandling av oppstått kreft.

1.4 Identifisering av *BRCA*-varianter ved sekvensering

For å identifisere varianter av *BRCA*-genene benyttes nestegenerasjonssekvensering (NGS) og sangersekvensering. Sekvenseringsdataene må tolkes og vurderes i etterkant av analysen, for å avgjøre om eventuelle varianter kan være årsak til sykdom hos pasienten.

Dersom sannsynligheten er høy for at familien har en kimbane-variant, vil index-personen få tilbud om en diagnostisk gentest. Det tas en blodprøve som blir satt opp på et kreftpanel som analyseres med NGS. Dersom det blir påvist en variant i *BRCA*-genene som er sannsynlig sykdomsgivende, vil funnet bekreftes med sangersekvensering. Dersom samme variant blir funnet med begge metodene, vil det kunne lages en familie-test, som hele familien får tilbud om å ta. Familie-test benytter sangersekvensering som metode for å lete etter den spesifikke varianten som ble funnet hos index-personen (45).

AMG ved St. Olavs Hospital tilbyr ulike diagnostiske gentester. Analysene utføres ved hjelp av NGS eller sangersekvensering, avhengig av bakgrunn for undersøkelsen. Kreftpaneler analyseres i hovedsak på syke pasienter, mens prediktive tester kan tilbys familier dersom det er funnet en patogen variant hos et familiemedlem. Analysetilbudet ved AMG er fremvist i utklippet fra rekvisisjon for genetiske analyser, se Vedlegg 1 (46).

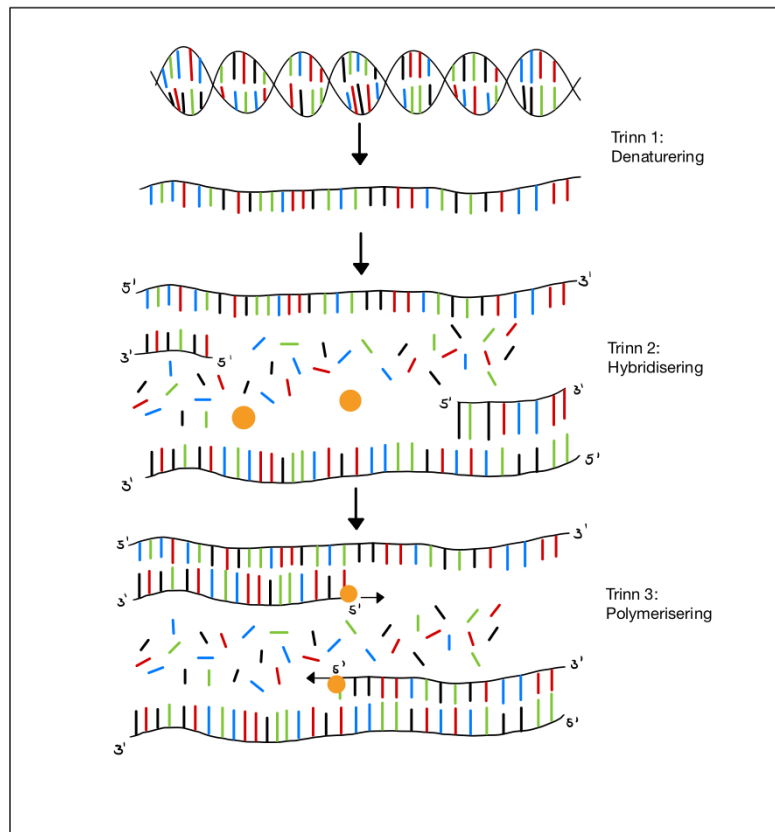
1.5 Generell beskrivelse av metoder

1.5.1 PCR

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en molekylærbiologisk metode for å amplifisere en ønsket nukleotidsekvens (5). For å utføre PCR er det viktig å ha DNA-polymerase og spesifikke primere, det vil si korte sekvenser med DNA som induserer syntese (47). Primerne må kunne binde seg spesifikt til hver ende på målsekvensen, slik at syntetiseringen skjer i begge ender. PCR krever også en rekke andre komponenter. Dette innebærer DNA-templat, nukleotider, DNA-polymerase, buffer (48) og magnesiumklorid ($MgCl_2$). Magnesium virker som en kofaktor for DNA-polymerase, og øker dermed enzymets katalytiske aktivitet (49).

PCR utføres i tre trinn, vist i figur 6. Ved første trinn holdes temperaturen ved 94-98°C, slik at DNA i prøven denaturerer. Hydrogen-bindingene mellom basene brytes opp, slik at DNA-tråden danner to enkelttråder. Temperaturen senkes til 50-65°C slik at primerne kan hybridisere til endene av den komplementære målsekvensen. Ved å øke temperaturen igjen til ca. 72°C (50), kan DNA-polymerase sette i gang syntetisering av ny DNA-tråd.

Amplifiseringen foregår i flere sykluser over et par timer. Etter 20 til 30 sykluser kan målsekvensen være amplifisert flere milliarder ganger (5).



Figur 6: Figuren viser de tre trinnene som gjentas ved PCR. Trinn 1: dobbeltrådet DNA denaturerer. Trinn 2: primerne hybridiserer til hver ende av enkelttrådet DNA. Trinn 3: DNA-polymerase setter i gang syntetisering av ny DNA-tråd. Figuren er modifisert fra (51). Illustrasjon laget ved hjelp av GoodNotes 5.

Touchdown (TD) PCR er en spesiell type PCR som benyttes for å optimalisere PCR og øke spesifisitet, sensitivitet og utbytte av PCR. Smeltepunkt (T_m) er den temperaturen hvor halvparten av templatet er enkelttrådet og den andre halvparten er dobbeltrådet. Dersom beregnet smeltepunkt er feilestimert, vil dette kunne medføre dannelse av uspesifikke PCR-produkter da primerne binder seg uspesifikt. TD PCR innleder hybridiseringstrinnet med en temperatur som er over antatt smeltepunkt for primerne. Primerne vil ved høyere temperatur binde seg spesifikt, og dermed øker sannsynligheten for å amplifisere ønsket produkt. I løpet av de påfølgende syklusene vil temperaturen senkes gradvis. I det temperaturen er lav nok til at primerne kan bindes uspesifikt, vil det ønskede PCR-produktet allerede ha blitt amplifisert til en viss grad. Dermed utkonkurreres de uspesifikke produktene ved å utnytte den eksponentielle økningen av produkter under PCR (52) (53).

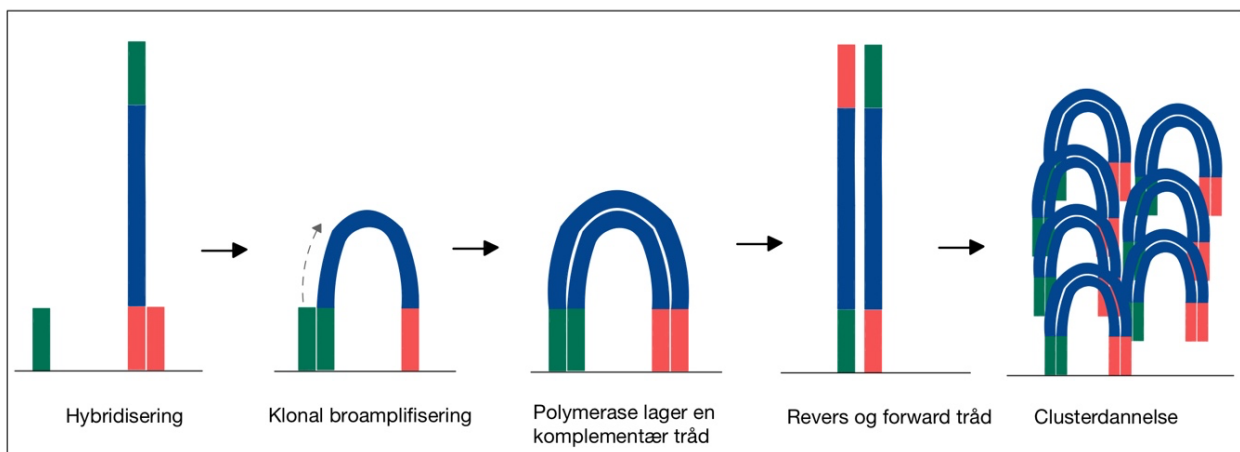
1.6 Sekvensering

1.6.1 Nestegenerasjonssekvensering

Arbeidsflyten for en prøve som skal analyseres ved hjelp av NGS kan grovt sett deles inn i isolering av DNA, bibliotekspreparering, sekvensering, analysering og resultatbehandling. Under biblioteksprepareringen blir det isolerte DNA-et fragmentert, slik at hvert fragment består av 200-500 bp. Hvert fragment blir merket med en adapter i 5'- og 3'-ende. Det er denne adapteren primerne vil feste seg til under PCR-reaksjonen som utføres for å oppkonsentrere de merkede fragmentene etter rensing (54).

Under neste del av biblioteksprepareringen dannes et cluster ved at PCR-produktet skylles over en flowcelle. Endene på primerne, som nå er en del av fragmentene, vil feste seg til oligoer (korte DNA-fragmenter) i flowcellen. Fragmentene bro-amplifiseres gjentatte ganger, slik at det dannes clusterer som består av mange kopier av ett enkelttrådet DNA.

Broamplifisering er vist i figur 7. Antisense-trådene kuttes av slik at kun sense-trådene står igjen for sekvensering. Det utføres deretter et vasketrinn for å fjerne avkuttete tråder. Ved å utføre dette trinnet amplifiseres intensiteten på lyssignalet hver base genererer under sekvenseringen. Biblioteksprepareringen er nå fullført (54).



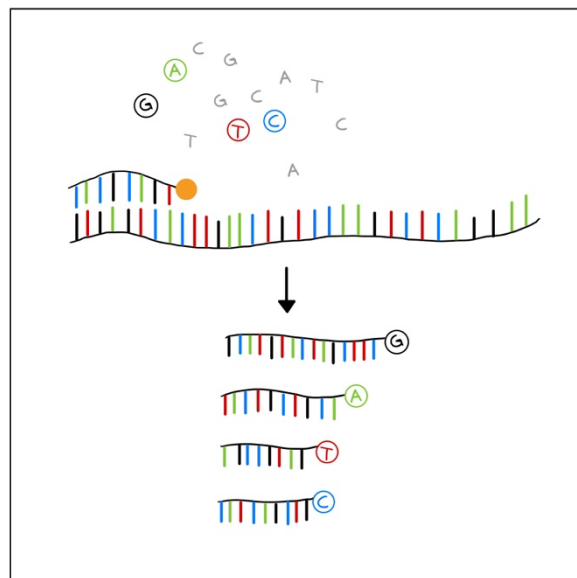
Figur 7: Illustrasjonen viser et viktig punkt i biblioteksprepareringen; broamplifisering. Primere fester seg til komplementære oligoer på flowcellen. Ved broamplifisering kopieres DNA-fragmentene millioner av ganger. Dette resulterer i dannelse av clusterer. Figuren er modifisert fra (55). Illustrasjon laget ved hjelp av GoodNotes 5.

Neste trinn er sekvensering ved syntese, det vil si at det legges til en og en base. Under den første delen av dette trinnet sekvenseres sense-tråden. I neste trinn vaskes sekvenseringsproduktet bort, og det dannes en ny antisense-tråd. Sense-tråden vaskes bort og antisense-tråden sekvenseres. Hver gang det legges til en base blir det tatt et bilde som registrerer et fluorescens-signal, før det legges til en ny base. Hver base har en særegen farge som gjør at fluorescens-signalet kan konverteres til en sekvens (54).

Sekvensene som genereres under sekvenseringen må analyseres i en bioinformatisk pipeline, hvor sekvenseringsdata kobles opp til et referansegenom. Det genereres ulike datafiler som importeres til ulike dataverktøy som benyttes for å tolke sekvenseringsdata. Eventuelle varianter som blir funnet tolkes, og svaret gis ut til rekvirent (54).

1.6.2 Sangersekvensering

Sangersekvensering, også kalt dideoxysekvensering, er basert på tilfeldig inkorporering av kjedeterminerende dideoxynukleotider (ddNTP) av DNA-polymerase under syntese av DNA. For å bestemme basesekvensen av et enkelttrådet fragment av DNA, hybridiserer en kort primer til DNA-sekvensen. Deretter tilsettes DNA-polymerase, et overskudd av deoxynukleotider (dNTP) og en blanding som vil inneholde små mengder av alle fire kjedeterminerende ddNTP-er. Hver av de fire typene ddNTP vil være merket med et fluorescerende molekyl. DNA-tråden vil bare kunne kopieres av DNA-polymerasen helt til ddNTP inkorporeres. ddNTP blokkerer videre forlengelse av tråden, ettersom den mangler 3'-hydroksylgruppen (-OH) som derimot finnes på dNTP. Da de kjedeterminerende ddNTP-ene bare settes inn fra tid til annen, produserer hver reaksjon et mangfoldig sett med DNA-kopier som avsluttes på ulike punkter i DNA-sekvensen. Denne prosessen er vist i figur 8. DNA-fragmentene kan separeres ved elektroforese. Et kamera leser av fluorescensfargen til hvert bånd på gelen, og dataene kan tolkes ved hjelp av ulike programvarer (5).



Figur 8: Figuren viser en blanding som inneholder dNTP og ddNTP som er merket med et fluorescerende molekyl. DNA-polymerase inkorporerer dNTP fra blandingen for å forlenge DNA-tråden. Når en ddNTP inkorporeres stopper forlengelse av tråden, og det dannes fragmenter med ulikt slutt punkt i DNA-sekvensen. Fragmentene har en ddNTP merket med fluorescens på enden som markerer slutten på fragmentet. Figuren er modifisert fra (56). Illustrasjon laget ved hjelp av GoodNotes 5.

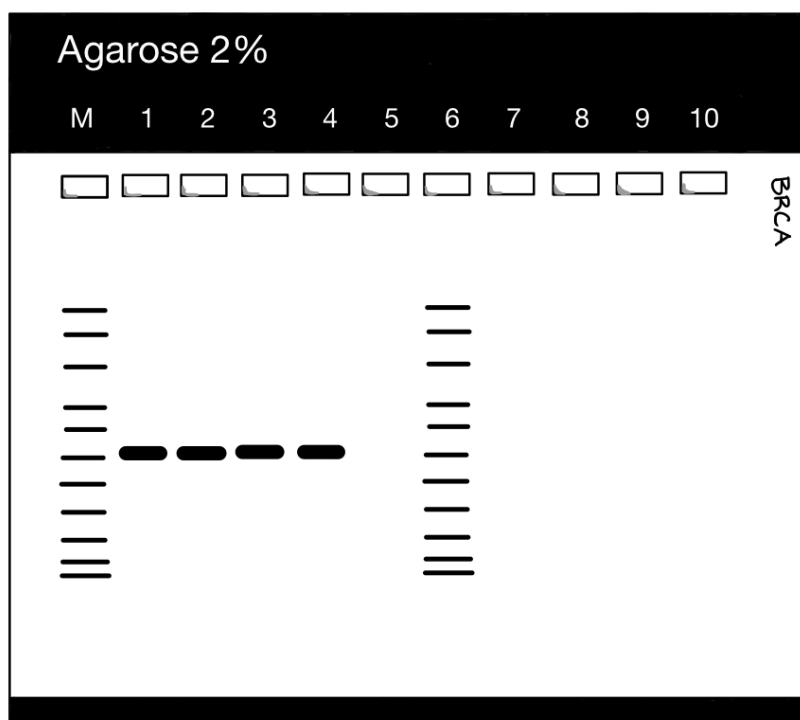
1.7 Elektroforese

1.7.1 Gelelektroforese

Gelelektroforese er en metode som kan benyttes bl.a. for å kunne si noe om lengde, kvalitet og mengde DNA-fragment som produseres under en PCR-reaksjon. De ulike fragmentene separeres i gelen basert på nukleotidlengde. PCR-produktet appliseres i en brønn på agarosedelen, før spenning appliseres. DNA-fragmentene har en negativ ladning, og vil derfor migrere mot den positive elektroden. Store fragmenter møter mer motstand i gelen og vil av denne grunn bevege seg saktere enn små fragmenter, som kan bevege seg relativt kjapt gjennom den porøse gelen (5).

Etter en gitt tid, vil de ulike fragmentene ha separert seg i ulike bånd, basert på antall nukleotider. Da skrus strømmen av. DNA-båndene må visualiseres, f.eks. ved å farge gelen med et fargestoff som binder seg til DNA og fluoriserer under UV-lys. Gelen kan så plasseres i et UV-lys basert geldokumentasjonssystem, for å synliggjøre båndene (5). Et eksempel på en gel er vist i figur 9.

For å kunne si noe om en har oppnådd ønsket lengde på PCR-produktet, benyttes en størrelsesmarkør. Denne markøren har fragmenter med kjent størrelse, og appliseres i den første, og evt. siste, brønnen i gelen. Ved å sammenlikne båndene med størrelsesmarkøren kan en si noe om størrelsen på PCR-produktet. Gelelektroforese fungerer dermed som en kvalitetssikring av PCR-produkt før selve sekvenseringen (5).



Figur 9: Agarosegel 2% med 11 brønner. Brønn M og brønn 6 inneholder størrelsesmarkør, mens brønn 1-5 inneholder PCR-produkt. Tykke bånd indikerer her ønsket PCR-produkt. Illustrasjon laget ved hjelp av GoodNotes 5.

1.7.2 Kapillærelektroforese

Kapillærelektroforese kan benyttes bl.a. ved sangersekvensering og fragmentanalyse for å separere og detektere DNA. Ved sangersekvensering og fragmentanalyse baserer separasjon seg på fragmentstørrelse. Deteksjon ved sangersekvensering gjøres ved hjelp av fluorescensmerkede nukleotider, mens det ved fragmentanalyse baserer seg på primere som er merket med fluorescens (57). Ved sangersekvensering benyttes kapillærelektroforese for å separere fragmenter ned til en-base nivå (58).

Typisk vil kapillærelektroforese inkludere et kapillær som fungerer som et elektroforetisk kammer, analogt med en brønn på en gel. Kapillæret er koblet til bufferløsning i hver ende, som videre er koblet til en strømforsyning. Det benyttes oftest kapillærer laget av silika. Disse er belagt med polymid, som gir styrke og fleksibilitet (57).

Analytter som separeres ved kapillærelektroforese blir detektert og målt optisk. Slik optisk måling baserer seg for eksempel på fotometrisk absorpsjon (57).

1.8 Regler for primerdesign

Ved design av primere følges en rekke regler for å oppnå best mulig PCR-produkt. Primerens lengde, guanin (G)/cytosin (C)-konsentrasjon, nukleotidkomposisjon i 3' primer-ende, og T_m ,

samt differanse i nukleotidlengde og smeltepunkt mellom de to primerne er viktige faktorer å ta hensyn til ved primerdesign. Det er også viktig å unngå at primerparet danner sekundærstrukturer som primer-dimerer eller hårnålstrukturer. En primer-dimer innebærer at sense- og antisense-primeren hybridiserer, mens en hårnålstruktur dannes dersom en del av primerens nukleotidsekvens er komplementær med en annen del på den samme primeren (59).

Den ideelle primerlengden er 16-28 nt. Forskjellen på antall nukleotider mellom sense- og antisense-primeren skal helst ikke være mer enn tre nukleotider for å oppnå en optimal PCR-reaksjon (59).

For å oppnå ønsket smeltepunkt i PCR-reaksjonen, må primerne ha riktig konsentrasjon av GC. I DNA danner G og C et basepar, som bindes sammen av tre hydrogenbindinger. Baseparet adenin (A) og tyrosin (T) bindes sammen av kun to hydrogenbindinger, noe som gjør at de lettere går fra hverandre under denatureringstrinnet (5). En primer skal helst ha et GC-innhold på 40-60% (59).

Det er ønskelig at primeren har et GC-par i 3'ende, da dette baseparet er mer termodynamisk stabilt enn et AT-par. DNA-polymerase vil selektivt legge til baser i 3'ende av primet dobbeltrådet DNA (59).

Smeltepunkt er kritisk for suksessfull PCR. Smeltepunktet til primerparet skal ideelt sett være mellom 50°C - 62°C. For at PCR-reaksjonen skal være best mulig, bør ikke forskjellen mellom smeltepunktet til primerne være over 5°C. En primers smeltetemperatur kan beregnes ved hjelp av ulike formler (59). Wallace formelen (60), formel 1, er et eksempel.

$$T_m = 4x(C + G) + 2x(T + A) \quad (1)$$

Sekvenseringen gjøres i begge retninger slik at nukleotidrekkefølgen kan bestemmes helt ut med overlapp. Ved primerdesign er det viktig å tenke over at de første 40 basene etter at primeren har bundet seg til sekvensen ikke blir godt separert. En må derfor flytte primeren ca. 40 baser utenfor ekson (Vedlegg 2).

For å dekke store eksoner kreves det flere overlappende primere. Årsaken til dette er at produkter som består av mer enn ca. 500 bp ikke kan sekvenseres under de betingelsene som er satt ved AMG. I slike tilfeller bør primerne overlappe med 70-80 baser (Vedlegg 2).

1.8.1 Feilkilder

Dersom nukleotidene i primerparet er delvis komplementære, vil dette kunne resultere i dannelse av en primer-dimer. Dette vil redusere effekten av PCR-reaksjonen, da primerne er bundet opp til seg selv. Da vil ikke PCR-produktet dannes som forventet. Tilsvarende problemstilling vil oppstå dersom det dannes hårnålstrukturer. Hvis dette skjer, vil en kun få amplifisert den ene DNA-tråden under PCR-reaksjonen (59).

Noen primere gir uspesifikke produkter da de kan hybridisere til andre DNA-områder. Dette kan observeres allerede ved gelelektroforese, som uspesifikke bånd på gelen. I slike tilfeller bør man forsøke å flytte primersekvensen. Et annet problem kan oppstå dersom et fragment på genet har poly-base regioner. Et poly-område er et område med flere gjentakende baser (61). DNA-polymerase har en tendens til å falle av i slike områder, som gjør at deler av fragmentet ikke sekvenseres (62). For å løse dette problemet kan en indre sekvenseringsprimer benyttes. En slik primer plasseres så nært poly-base regionen som mulig slik at mest mulig av eksonet blir sekvensert. I samråd med erfaren molekylærbiolog Liss Anne Solberg Lavik ble det avklart at deler av poly-base området kan inkluderes i den indre sekvenseringsprimeren.

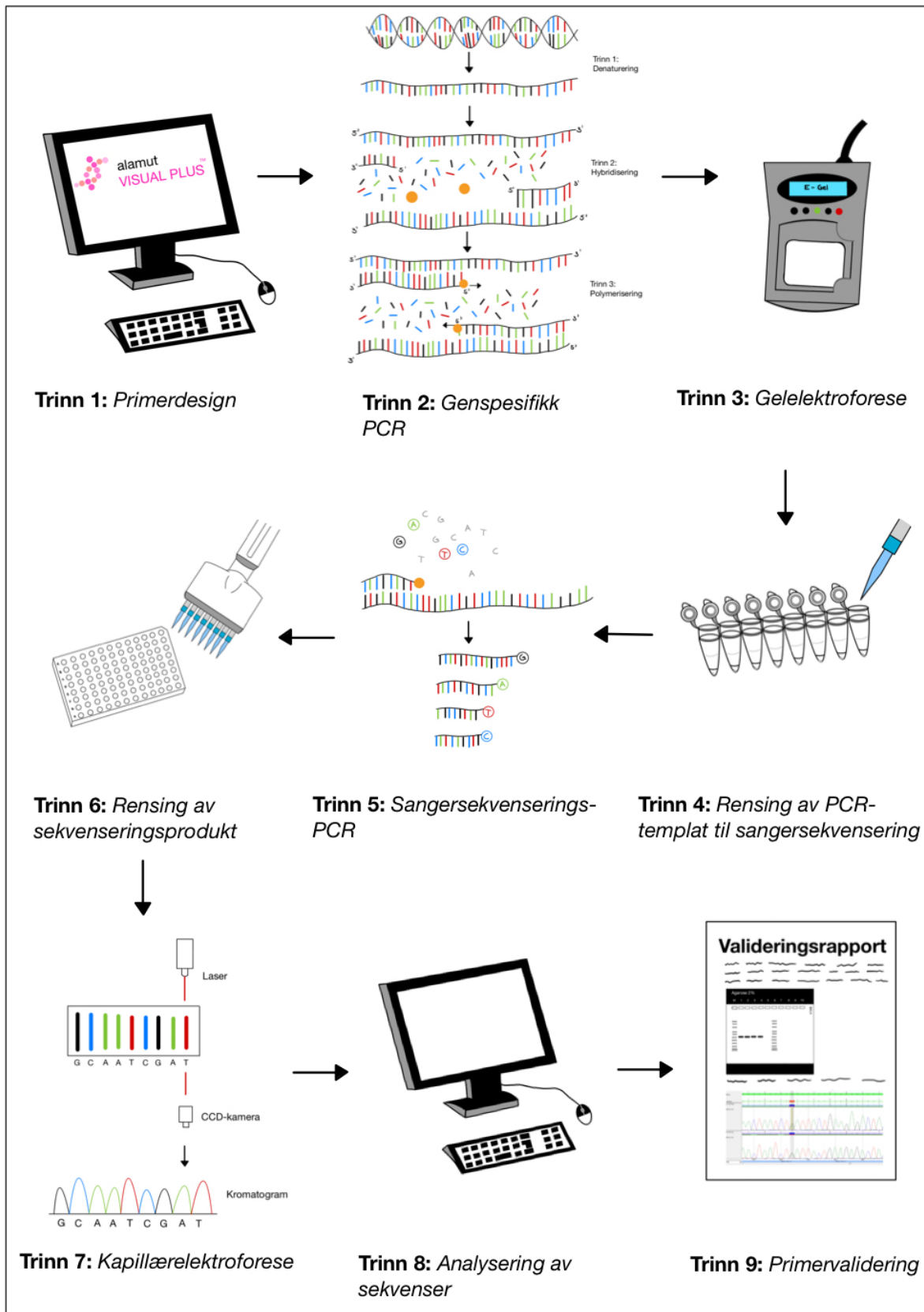
1.9 Problemstilling

Sangersekvensering av *BRCA1* og *BRCA2* benyttes ved AMG ved St. Olavs hospital til å verifisere varianter funnet ved genpaneltesting, prediktiv testing ved kjent variant eller dersom en hasteprobe ikke kan vente på neste genpaneloppsett. Det er derfor viktig for AMG å ha en alternativ metode til NGS for diagnostisering. Det er viktig at den alternative metoden, som ved AMG er sangersekvensering, er robust og fungerer optimalt for diagnostisering. Primersekvensene som benyttes til sangersekvensering ved AMG i dag er hentet fra det kommersielle firmaet Nimagen (Vedlegg 3). Disse sekvensene ble tilpasset rutinen ved å legge til en sekvens for haleprimere, som forenkler sekvenseringen. Av de primersekvensene som benyttes til sangersekvensering av *BRCA1* og *BRCA2* i dag er det flere som ikke fungerer optimalt. Flere av primerne gir uspesifikke eller svake produkter, og mange genfragmenter må ofte sekvenseres på nytt. I tillegg er det noen av primerne som ikke kan ha samme standard TD annealing-temperatur som benyttes ved AMG (63-55°C). Enkelte primerløsninger må dessuten ha høyere konsentrasjon enn standard.

Hensikten med dette bachelorprosjektet er å optimalisere sangersekvenseringen av *BRCA1* og *BRCA2* ved AMG. For å nå dette målet skal vi designe, teste ut og validere nye primere. Vi har tatt for oss 15 *BRCA*-primerpar som gir svake eller uspesifikke PCR-produkt. På sikt vil avdelingen forsøke å optimalisere alle *BRCA*-primere som ikke følger standard betingelser.

2. Materiale og metode

Fra primerdesign til ferdig validert primer er det mange mellomtrinn. Før selve laboratoriearbeidet kan starte må primeren bestilles og ankomme laboratoriet. Deretter må det settes opp PCR, med påfølgende gelelektroforese for å sjekke at det er dannet PCR-produkt. Rensing av produkt gjøres både før og etter sangersekvenserings-PCR. Sekvenseringsproduktet separeres ved hjelp av kapillærelektroforese, og kan deretter analyseres med ulike analyseprogram. Når en primer er ferdig validert ved laboratoriet, skal dette dokumenteres i en valideringsrapport. Ytterligere forklaring av hvert trinn i arbeidsflyten forklares fra punkt 2.1 Primerdesign til punkt 2.4 Primervalidering. Figur 10 viser arbeidsflyten fra primerdesign til valideringsrapport. En oversikt over dataprogrammer, utstyr og reagenser er vedlagt (Vedlegg 4 og Vedlegg 5).

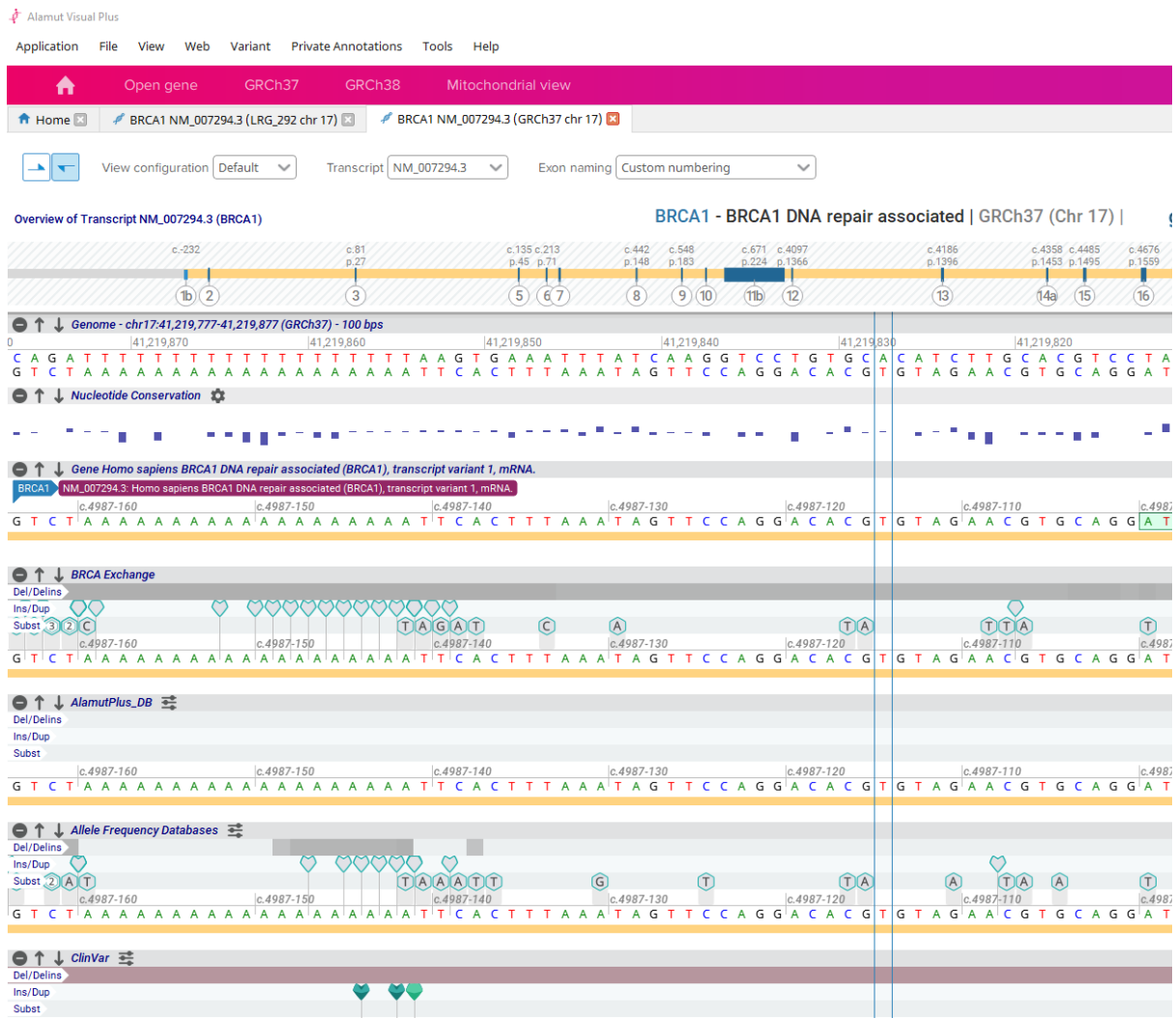


Figur 10: Arbeidsflyt for de ulike trinnene som utføres under oppsett av sangersekvensering. Hva som skjer i de ulike trinnene er beskrevet i teksten fra punkt 2.1 til punkt 2.4. Trinn 7 i figuren: Kapillærelektroforese er modifisert fra (63). Laget ved hjelp av GoodNotes 5.

2.1 Primerdesign

Ved design av primer benytter man ulike dataverktøy som hjelpemidler. Ved AMG benyttes Alamut Visual Plus og Oligo Primer Analysis Software. For å designe primere trengs en referansesekvens for det aktuelle genet. Denne finner man ved hjelp av National Centre for Biotechnology Information (NCBI). Det er viktig at det ved design av DNA-primere velges en NG-sekvens som referanse, da denne angir genomisk region. NG-sekvensen må lastes ned og åpnes i Oligo. Referansesekvens i Alamut må velges basert på laboratoriets prosedyrer (Vedlegg 2).

Alamut er et analyseprogram med en rekke nyttige funksjoner. Programmet kan benyttes som et verktøy ved design av primere og tolkning av NGS-resultater. Alamut er knyttet opp mot ulike databaser, slik som f.eks. ClinVar, og kan benyttes til å se på «single nucleotide polymorphism» (SNP) i et gitt område på et gen. De ulike segmentene av programvaren tilbyr ulike funksjoner, se figur 11. «Nucleotide conservation» viser f.eks. hvilke områder av et gen som er konserverte, noe som er en svært nyttig funksjon både ved primerdesign og klassifisering av nyoppdagede varianter. De ulike klinikkene som benytter Alamut kan også legge inn sin egen database. Her kan det legges inn alle varianter som er tolket og klassifisert tidligere.



Figur 11: Figuren viser et utklipp fra programvaren Alamut Visual Plus.

Ved primerdesign benyttes Alamut for å visualisere NG-sekvensen og se om det evt. ligger noen nøytrale sekvenser, SNP, i det området primeren plasseres. SNP-er kan føre til allel-dropout. Dette innebærer at det kun oppamplifiseres tråd i en retning, noe som kan medføre at man gir ut feil svar (64). Når et ønsket område er lokalisert i Alamut, kan den gitte basesekvensen overføres til Oligo (Vedlegg 2).

I Oligo kan man se egenskapene sense- og antisense-primeren en designer vil få. Programmet kalkulerer bla. smeltepunkt og varsler om primerne danner sekundærstrukturer som primer-dimerer eller hårnålstrukturer. Dersom smeltepunktet til primerne blir for lavt i forhold til PCR-produktet vil programmet gi beskjed. Siste trinn før en primer kan godkjennes innebærer å sjekke (blaste) sekvensen opp mot den globale sammenligningsdatabasen NCBI primerblast. Ved mange treff på blast kan dette indikere at primeren ikke er spesifikk nok. Uspesifikke produkter på mer enn 1000 basepar vil derimot ikke interferere, da PCR-reaksjonen utført

med betingelsene benyttet ved AMG i prinsipp ikke klarer å danne produkter større enn dette (Vedlegg 2).

Dersom et primerpar har den smeltepunkttemperaturen som er ønskelig, ingen SNP og få eller ingen interfererende treff på primerblast, kan bestilling legges inn. En universalhale legges til hver primer, og bestillingen sendes til BioNordika, som sender bestillingen videre til Eurogentec i Belgia. Eurogentec produserer primerne ut ifra bestilling og sender de direkte til AMG (Vedlegg 2).

2.2 Arbeidsflyt ved sangersekvensering

2.2.1 Genspesifikk PCR

PCR er det første trinnet ved sangersekvensering, og gjøres for å amplifisere spesifikke områder på valgte gener. På bakgrunn av hvilke sekvenser som skal amplifiseres, tilsettes komplementære primere til PCR-blandingen. Ved validering av nye DNA-primere stiller seksjonen krav om at hvert valideringsoppsett må inkludere minst tre kontroller, f.eks. to blodbankkontroller (BB-ktr) og en positiv kontroll (pos-ktr) med kjent variant, eller tre blodbankkontroller. I tillegg må oppsettet inkludere en kontaminasjonskontroll, Non Template Control (NTC). NTC inneholder kun mastermiks og primermiks, men ikke templat fra prøve og skal dermed ikke danne PCR-produkt. Vi benytter én positiv kontroll i tillegg til tre blodbankkontroller for validering av primere i denne bacheloroppgaven. Positiv kontroll inkluderes for å kontrollere at varianten kan detekteres som forventet ved hjelp av primeren. (Vedlegg 6).

I rutinen pipetteres reagenser og prøver til PCR-reaksjonen med en pipetteringsrobot, da dette er tidsbesparende og gir kvalitetssikring. Unntaket er prøver som skal settes opp på ufortynnet DNA eller primere som ikke følger standard oppsett. Dette innebærer at prøvene må settes opp på en annen temperatur enn 63-55°C eller med en annen komposisjon av mastermiks enn den som benyttes rutinemessig. Slike prøver settes opp manuelt (Vedlegg 6). Alt laboratoriearbeid som gjøres i forbindelse med denne bacheloroppgaven gjøres manuelt. Arbeidsark er kvalitetsstyrt og benyttes som et hjelpemiddel ved oppsett av sangersekvensering.

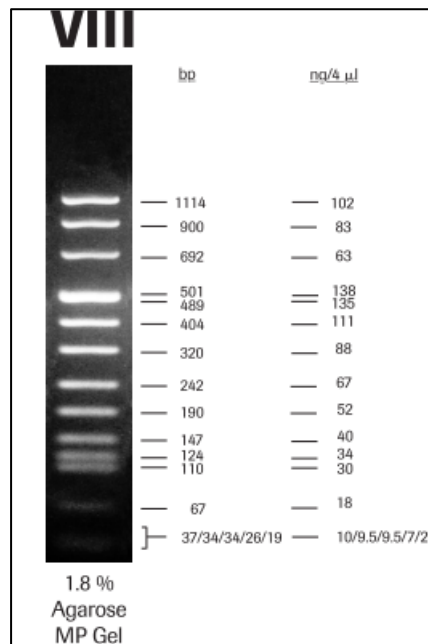
DNA isoleres fra EDTA-blod ved hjelp av QIA Symphony (Qiagen) (65). Ved oppsett av PCR benyttes 30 ng DNA av positiv kontroll og blodbankkontroller (Vedlegg 6). For å beregne hvor stort volum som kreves for å oppnå riktig DNA-mengde av positiv kontroll benyttes formel 2.

$$Volum = \frac{masse}{konsentrasjon} \quad (\text{formel 2})$$

2.2.2 Gelelektroforese

Gelelektroforese blir utført ved validering av nye primere for å kontrollere at det ikke dannes uspesifikke produkter, og om PCR-produktet som dannes er av ønsket størrelse. Dersom det er uforventede bånd på gelen, betyr det at primerne ikke er spesifikke. Hvis DNA-et som benyttes er degradert vil dette fremkomme som multiple bånd av ulik størrelse. For å kunne si noe om størrelsen på produktet benyttes en størrelsesmarkør. I denne bacheloroppgaven er E-gel EX Agarose Gel 2% med SYBR Gold II som farge (66) og størrelsesmarkøren DNA Molecular Weight Marker VIII benyttet.

Størrelsesmarkør VIII består av 18 fragmenter, og er designet for å kunne bestemme størrelsen på PCR-produkt som består av 19-1114 bp. De 18 fragmentene vil fordele seg på 13 bånd etter elektroforese, vist i figur 12. Fragmentet som består av 501 bp og fragmentet som består av 489 bp vil se ut som ett sterkt bånd i gelen. Fragmentene som består av 37, 34 (x2), 26 og 19 bp vil også danne ett bånd i gelen, men dette båndet vil bli svært svakt og kan være vanskelig å visualisere på bilder (67).



Figur 12: Figuren viser hvordan de ulike fragmentene i størrelsesmarkøren DNA Molecular Weight Marker VIII vil fordeles i ulike bånd ved gelelektroforese, samt basestørrelsen på de ulike fragmentene. Figur: Roche Diagnostics GmbH.

2.2.3 Rensing av PCR-templat til sangersekvensering

Før sekvensering av PCR-produkt er det viktig at dette er renset, slik at produktet er fritt for ubundet dNTP og primer. I dette trinnet benyttes A'SAP, som er et reagens som renser PCR-produktet slik at man kan gå videre med produktet direkte. Reagenset er et enzym som bryter ned, og på denne måten fjerner primere og nukleotider som er til overs etter den genspesifikke PCR-reaksjonen. Nedbrytningen skjer ved 37°C. Ved å øke temperaturen til 80°C inaktiveres enzymet. Dersom PCR-produktet ikke renses tilstrekkelig, vil dette kunne gi støy ved sekvensering (68).

2.2.4 Sangersekvenserings-PCR

Etter at PCR-produkt er renset utføres sangersekvenserings-PCR for å amplifisere enkelttrådet DNA. Under sangersekvensering settes fluorescerende nukleotider på små DNA-fragmenter slik at baserekkefølgen kan detekteres.

Alle primere bestilles med en universal haleprimer, da dette forenkler sekvenseringsreaksjonen. Haleprimeren gjør at samme sense- og anti-sense primer kan benyttes for alle fragmentene (universale sekvenseringsprimere). Dersom det foreligger et poly-base-område mellom den regionen man ønsker å sekvensere og PCR-haleprimere, bør det lages en indre sekvenseringsprimer som ligger etter dette poly-området. DNA-polymerasen vil ikke kunne jobbe nøyaktig i slike områder, og det vil føre til baseforskyvning

som gjør sekvensen uleselig. En indre sekvenseringsprimer, som tilsettes i stedet for den universale haleprimeren, løser dette problemet. Sekvensen blir noe kortere, men sekvenseringsdata blir av bedre kvalitet.

Reagensene som benyttes ved sangersekvenserings-PCR inneholder blant annet fluorescensmerkede ddNTP som hindrer at et nytt nukleotid inkorporeres. Det lages fragmenter av ulik lengde under sekvenseringsreaksjonen. Hver primer vil ha en spesifikk annealing-temperatur ved sekvenserings-PCR. Denne temperaturen kan ikke avvike mer enn 2-3°C fra den temperaturen som ble benyttet til PCR-reaksjonen. Temperaturen skal heller ikke være høyere enn 60°C (Vedlegg 6).

2.2.5 Rensing av sekvenseringsprodukt

Etter utført sangersekvenserings-PCR må produktet renses ved hjelp av BigDye XTerminator Purification kit, som består av to reagenser. Det første reagenset, BigDye XTerminator Solution består av små kuler som utfører selve rensingen. Det andre reagenset, SAM solution, styrker virkningen av det første reagenset og sørger for at sekvensproduktet stabiliseres etter at det er rensset. Kitet fjerner overskudd av fluorescensmerkede nukleotider som ikke er inkorporert i templatet som skal sekvenseres, samt salter og molekyler med ladning. Disse komponentene binder seg til kulene, som ved sentrifugering legger seg i bunnen av brønnen. ABI 3730 henter produkter fra supernatanten og sekvenseringen påvirkes dermed ikke av interfererende elementer, da disse er bundet til kulene (69).

2.2.6 Kapillærelektroforese

Sekvenseringsproduktet separeres ved kapillærelektroforese på ABI 3730 DNA Analyser. Produktet blir injisert elektrokinetisk, det vil si det tilføres en spenning som fører til at prøven blir tatt opp i kapillærene (57). Grunnet sterk strøm vil negativt ladet DNA bevege seg mot positivt ladet elektrode, hvor fragmentene beveger seg gjennom en laserstråle. Det sendes ut et spektrum fra hver av de fire nukleotidene når fluorescensen treffer laserlyset. På samme tid vil et CCD-kamera detektere signalene fra fragmentene ettersom de passerer deteksjonscellen. CCD-kameraet konverterer fluorescenssignalene til digitale signaler som kan tolkes videre ved hjelp av et basecaller program. Programmet konverterer signalene fra kromatogrammene til lesbare nukleotider som deretter kan vurderes i ulike analyseprogram (Vedlegg 6).

2.3 Analysering av sekvenser

2.3.1 Sequence Scanner 2

Etter analysering på ABI 3730 hentes sekvenseringsdata inn i analyseprogrammet Sequence Scanner 2. Programmet gir et fargekodet oversiktsbilde i «Plate report» som angir kvaliteten til sekvenseringsdata fra hver brønn. «Plate report» gir en grafisk representasjon av oppsettet på ABI, samt en sammensatt vurdering av kvalitet basert på ulike kvalitetsparametere og søylediagram som angir signalstyrken til de ulike basene (70).

NTC er med som en kontroll på at ingen av reagensene som benyttes i oppsettet er kontaminert, og skal alltid være negativ. For at en NTC skal regnes som negativ må signalstyrken være på nivå med grunnlinjen (71). Kontaminasjon kan forekomme i reagensene eller utstyret som benyttes til den første PCR-reaksjonen, eller under sekvenseringstrinnene. En kan differensiere mellom disse to formene for kontaminasjon ved å undersøke om den er til stede i både sense- og antisense-tråden, eller bare en av dem. Dersom kun sense eller antisense er kontaminert kan det bety at det har oppstått krysskontaminasjon mellom brønnene i ett av sekvenseringstrinnene. Dersom begge trådene er kontaminert tyder det på at kontaminasjonen har skjedd i PCR-trinnet, og skyldes kontaminasjon av primer eller mastermiks. For å bekrefte dette kjøres PCR-produktet fra kontaminert NTC på E-gel EX Agarose Gel 2%. Dersom det forekommer bånd, bekrefte mistanken om kontaminasjon fra PCR-reaksjonen (Vedlegg 7).

2.3.2 Sequence Pilot

Sekvenseringsdata overføres til analyseprogrammet Sequence Pilot dersom NTC er godkjent i Sequence Scanner 2. NTC-filer overføres ikke til Sequence Pilot. Det er et minimumskrav at sekvensen må ha minst 50 lesbare baser i resultatfilen for at den skal kunne lastes opp i Sequence Pilot. Sekvenseringsdata til sense- og antisense-tråd vil sorteres i mapper basert på bakgrunn av primernavn. Varianter som blir funnet av analyseprogrammet legger seg øverst i programmet under «Variant table». Kvaliteten til hver sekvens må vurderes på bakgrunn av tekniske kvalitetskrav (T.V.) (Vedlegg 8). Signalintensitet og bakgrunn må kontrolleres som en del av kvalitetsvurderingen.

Vanligvis vil hele ekson og 25 basepar av intron på hver side av eksonet vises, og dermed har de kodende sekvensområdene som regel god kvalitet. Noen ganger må sekvensene likevel

editeres før validering. Før sekvensen har stabilisert seg vil basene være av dårlig kvalitet, og slike områder bør dermed fjernes før funn av varianter kan vurderes (Vedlegg 8).

Hver positiv kontroll og de tre blodbankkontrollene må vurderes ved å se på sekvenseringsdata. I blodbankkontrollene forventes det ikke å finne en variant. Polymorfier kan derimot observeres i blodbankkontrollene og er å anse som normalsekvens. Dersom patogene varianter oppdages i blodbankkontroller, må dette rapporteres tilbake til den aktuelle blodgiveren, så sant blodgiveren har samtykket til slik informasjon.

Det forventes å finne en variant i positiv kontroll. Dersom varianten ligger for nær PCR-primeren eller en eventuell indre sekvenseringsprimer kan den risikere å ikke bli detektert. Dette skyldes at de første basene ikke produserer informativ sekvens. I diagnostikken er det viktig at begge DNA-trådene er informative for å kunne bekrefte at en variant ikke er tilstede. Dersom en variant er detektert, er det adekvat med en DNA-tråd, selv om det er ønskelig at begge DNA-trådene gir informativ sekvens også her.

2.4 Primervalidering

Ved validering av primere benytter vi i denne oppgaven «Mal for validering sekvensprimere» (Vedlegg 9). I rutinen er malen i ferd med å fases ut, da dette skal utføres i Beaker. Beaker er St. Olavs Laboratory Information Management System.

Valideringsrapporten skal blant annet inneholde informasjon om hvilken primer som skal valideres, årsaken til valideringen, samt hvilken metode primeren skal benyttes til. Resultater skal føres opp i en tabell med prøveidentifikasjon og funn, hvor eventuelle bilder fra gelelektroforese legges inn som en dokumentasjon på primerens spesifisitet. Lagringssted for alle resultater skal dokumenteres, slik at de lett kan slås opp ved eventuelle spørsmål. Rapporten skal ende i en konklusjon, som sier hvorvidt primeren kan godkjennes eller ikke. Selve valideringsrapporten må også godkjennes ved seksjonen.

3. Resultater

Målet med denne bacheloroppgaven er å designe og validere primere for sangersekvensering av *BRCA1* og *BRCA2* som følger standard betingelser som benyttes i rutinen ved AMG.

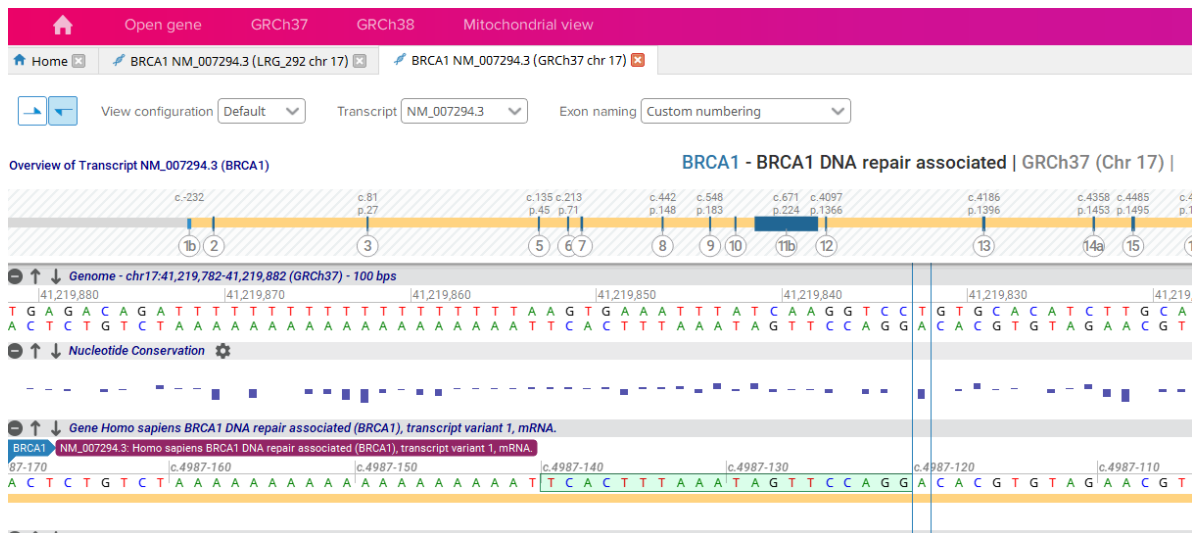
Under valideringen er det benyttet tre blodbankkontrollene og en positiv kontroll med kjent variant. I en validering inngår vurdering av gelelektroforese, samt vurdering av sekvenseringsdata i Sequence Scanner og Sequence Pilot.

For å unngå stor grad av repetisjon under diskusjon av resultater velger vi å vise frem resultatene fra primerdesign og primervalidering av *BRCA1* ekson 2 og 17, og *BRCA2* ekson 10D, 11B og 15. Vi har valgt å vise frem resultatene for disse primerne da de er representative for ulike problemstillinger som kan oppstå under primerdesign. Resterende resultater ligger vedlagt i form av valideringsrapporter (Vedlegg 10).

3.1 Primerdesign

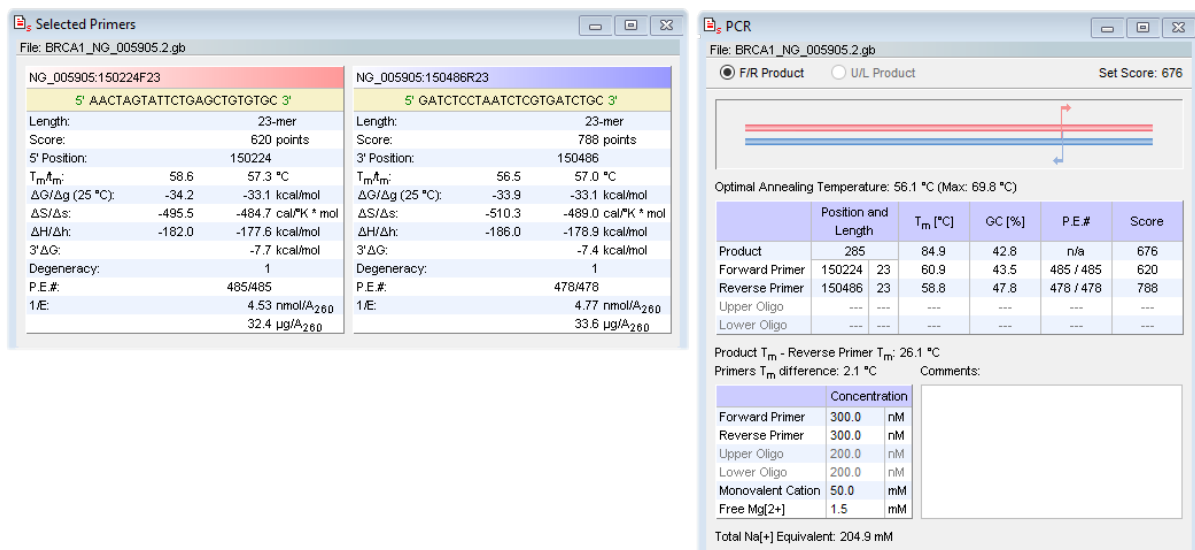
For å kunne gjennomføre primerdesign trenger man en referansesekvens som benyttes i Oligo og et transkript som skal benyttes i Alamut. Referansesekvensen finner man i NCBI Home (Vedlegg 2). Vi har benyttet det genomiske transkriptet NG_005905.2 for *BRCA1* og NG_012772.3 for *BRCA2* som referansesekvens i Oligo. Primeroversikten til avdelingen angir hvilket transkript som skal benyttes. Locus Reference Genomic (LRG) er valgt som transkript da dette er et mye brukt transkript hvor mange varianter er dokumentert (72). Vi har benyttet det kodende transkriptet NM_007294.3 for *BRCA1* og NM_000059.3 for *BRCA2*.

Alamut benyttes for å finne et egnet område på genet hvor primeren kan plasseres. Eksempel på et slikt område er vist i figur 13. Vi endte opp med å plassere sense-primeren til *BRCA1* ekson 17 i posisjon c.4987-65.



Figur 13: Figuren viser et utklipp fra Alamut Visual Plus. Den markerte sekvensen i grønt viser et område i intronet før ekson 17. Sense-primer til ekson 17 kan plasseres her.

I Oligo velger man om sekvensen skal benyttes som sense- eller antisense-primer. Etter å ha angitt posisjon for begge primerne kan man hente opp ulike faner, som f.eks. «selected primers» og «PCR». Disse fanene, som er vist i figur 14, gir informasjon om bl.a. lengde på primer-sekvens, størrelse på PCR-produkt, smeltepunkt og eventuelle problemer med designet.



Figur 14: Figuren viser to faner fra Oligo. Fanen med navn «Selected Primers» viser sekvensen for sense- (rød) og antisense- (blå) primeren angitt fra 5'- til 3'-ende. Denne fanen viser også lengden på primer-sekvensene. PCR-fanen gir bl.a. informasjon om størrelse på PCR-produkt, antatt smeltepunkt og eventuelle designproblemer.

Før primerparet kan bestilles må det undersøkes om primersekvensen inneholder eventuelle SNP-er, samt utføres en primerblast. Dersom primerne oppfyller kravene kan primerbestillingen sendes.

Figur 15 og 16 viser utklipp av resultater fra NCBI primerblast. Sekvensene er her oppgitt i 5' til 3' retning. «Template» er i denne sammenhengen det samme som et referansegenom. Primersekvensen sammenliknes med dette genomet for å undersøke om det teoretisk sett kan dannes uspesifikke produkter under PCR. Prikkene som angis i templat-sekvensen indikerer at primeren og referansegenomet er komplementære, mens bokstavene indikerer at de aktuelle basene ikke er komplementære.

Ved primerblast av primerne for *BRCA1* ekson 17 fikk vi over 100 treff. I figur 15 vises to eksempler fra disse. Vi har valgt ut to eksempler, hvor det ene produktet er stort mens det andre består av få basepar. Resultatene viser at problemene oppstår i forbindelse med antisense-primeren.

```

product length = 1162
Features associated with this product:
  cyclin-dependent kinase 12 isoform x5

  cyclin-dependent kinase 12 isoform x5

Reverse primer 1      GATCTCCTAATCTCGTGATCTGC 23
Template       39493792  A.....G.C..... 39493770

Reverse primer 1      GATCTCCTAATCTCGTGATCTGC 23
Template       39492631  .....G.C..... 39492653

product length = 312
Features associated with this product:
  gastric inhibitory polypeptide preproprotein

Reverse primer 1      GATCTCCTAATCTCGTGATCTGC 23
Template       48962900  .....G.C..... 48962878

Reverse primer 1      GATCTCCTAATCTCGTGATCTGC 23
Template       48962589  A.G.....G.C.....T... 48962611

```

Figur 15: Figuren viser to eksempler på resultater i NCBI primerblast for *BRCA1* ekson 17.

Ved NCBI primerblast av primeren for *BRCA1* ekson 2 var det kun to mulige interfererende produkter. Disse er vist i figur 16.

```

product length = 104
Features flanking this product:
  33017 bp at 5' side: nuclear receptor subfamily 4 group a member 2 isoform x7
  110476 bp at 3' side: glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial precursor

Reverse primer 1          ACTAGACATGTCTTTTCTTCC 21
Template       156365629  ....A....TA.....T. 156365609

Reverse primer 1          ACTAGACATGTCTTTTCTTCC 21
Template       156365526  CAG...G.A..... 156365546

product length = 741
Features flanking this product:
  93092 bp at 5' side: reduced folate transporter isoform x9
  224271 bp at 3' side: poly(rc)-binding protein 3 isoform 5

Reverse primer 1          ACTAGACATGTCTTTTCTTCC 21
Template       45625814  C.AT.....T.....T. 45625794

Reverse primer 1          ACTAGACATGTCTTTTCTTCC 21
Template       45625074  GGG.....A...G..... 45625094

```

Figur 16: Figuren viser treffi i NCBI primerblast for *BRCA1* ekson 2.

I denne oppgaven er totalt 27 primere designet og validert. Av disse er 13 primerpar, mens primeren for *BRCA2* ekson 10D er en indre sekvenseringsprimer. PCR-fragmentene som disse primerne skal dekke er listet opp i tabell 3. Totalt sett vurderte vi at 25 primerpar for *BRCA1* og *BRCA2* ikke fungerer optimalt. Vi anbefaler dermed at avdelingen redesigner de resterende primerparene. Disse er listet opp i tabell 4.

Tabell 3: Tabellen viser en oversikt over hvilke PCR-fragment det er redesignet primere for i forbindelse med denne oppgaven. Kolonne én viser PCR-fragmentene hvor primere var designet på forhånd av AMG, mens kolonne to viser egendesignede primere.

PCR-fragment der primere ble forhåndsdesignet av AMG	PCR-fragment med eget primerdesign
BRCA2_11B	BRCA1_02
BRCA2_11D	BRCA1_17
BRCA2_11I	BRCA2_02
BRCA2_11K	BRCA2_10D
BRCA2_11O	BRCA2_11L
BRCA2_11P	BRCA2_13
BRCA2_11Q	BRCA2_27A

Tabell 4: Tabellen viser en oversikt over hvilke PCR-fragmenter der primere gjenstår å redesignes.

<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
BRCA1_03	BRCA2_05 BRCA2_06
BRCA1_09	BRCA2_14
BRCA1_23	BRCA2_15
	BRCA2_16
	BRCA2_18
	BRCA2_19
	BRCA2_20
	BRCA2_26

3.1.1 Primerdesign *BRCA2* ekson 15

Det ble forsøkt å designe primere til *BRCA2* ekson 15. Dette viste seg å være en stor utfordring. Vi prøvde å lage flere ulike primerdesign, men det var vanskelig å finne noe egnet sted for å definere primeren uten at det ble mange treff i NCBI primerblast. Det lot seg derfor ikke gjøre å finne egnede primere til dette eksonet innenfor tidsrammen for dette bachelorprosjektet.

3.2 Positiv kontroll

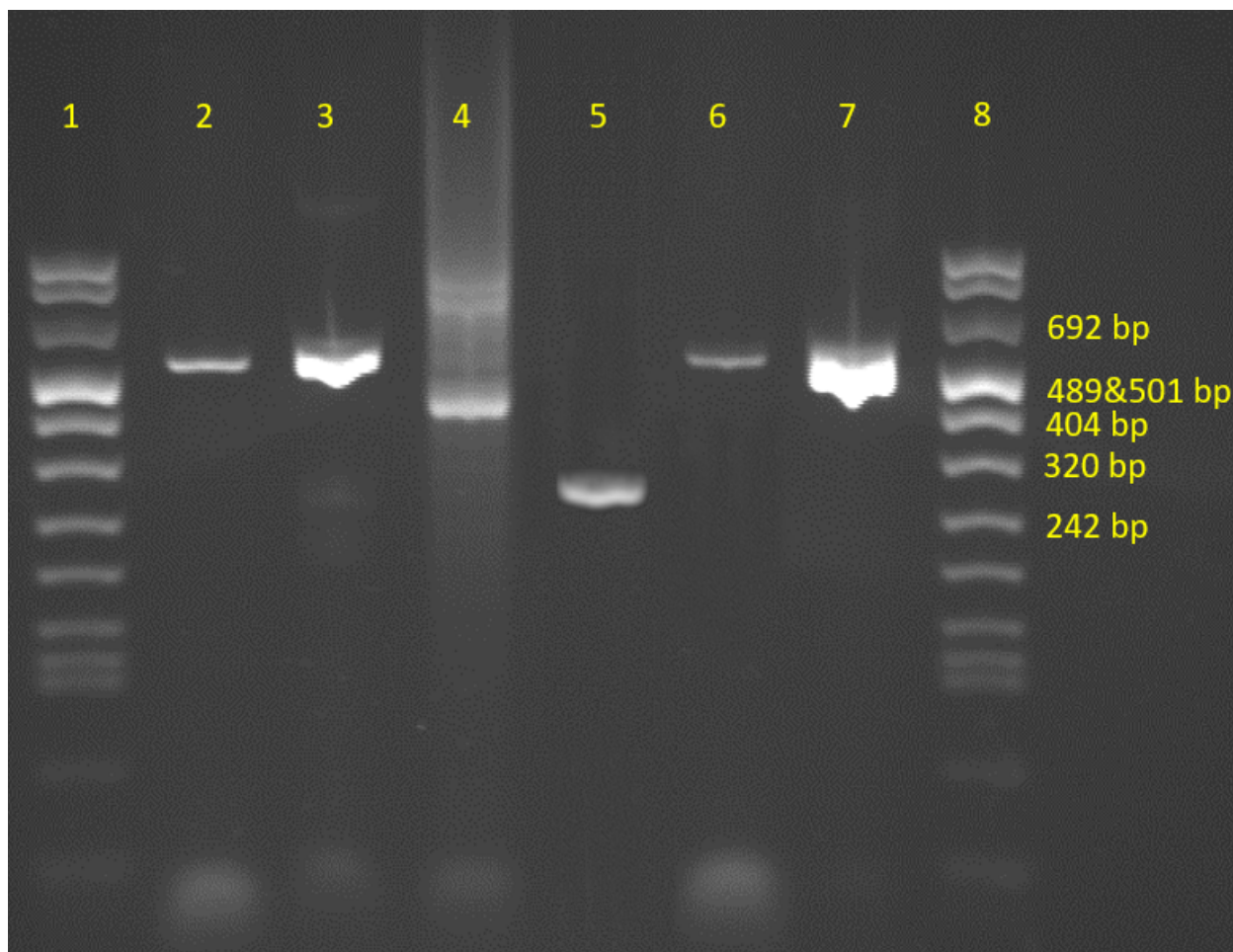
Vi har benyttet en positiv kontroll med kjent variant for alle primerne vi diskuterer. Disse er listet opp i tabell 5. Tilsvarende tabell finnes for alle kontrollene benyttet i denne bacheloroppgaven (Vedlegg 11).

Tabell 5: Tabellen viser en oversikt over navn på kontroll, DNA-konsentrasjon til kontroll og volum som er benyttet av kontrollen per PCR-reaksjon for å oppnå 30 ng totalt.

Kontroll	Variant	DNA-konsentrasjon (ng/μL)	Volum (μL) per PCR-reaksjon
Pos-ktr-BRCA1-02	A	23,5	1,3
Pos-ktr-BRCA1-17	B	71,1	0,4
Pos-ktr-BRCA2-10D	D	70,2	0,4
Pos-ktr-BRCA2-11B	E	76,4	0,4

3.3 Gelelektroforese

Etter sekvenserings-PCR utføres gelelektroforese for å undersøke om ønsket PCR-produkt er oppformert og hvorvidt eventuelt produkt er spesifikt. Figur 17 viser resultatet fra en gelelektroforese hvor PCR-produkt amplifisert med nye og gamle primere er satt opp parallelt.



Figur 17: Figuren viser resultater fra elektroforese av PCR-produkt amplifisert med nye og gamle primere. Brønn 1 og 8 er tilsatt størrelsesmarkør VIII. Brønn 2 og 3 er tilsatt PCR-produkt amplifisert fra henholdsvis gammel og ny versjon av primer for *BRCA1* ekson 2. Brønn 4 og 5 inneholder PCR-produkt amplifisert fra gammel og ny primer for *BRCA1* ekson 17. Brønn 6 og 7 er tilsatt PCR-produkt amplifisert fra gammel og ny primer for *BRCA2* ekson 11B.

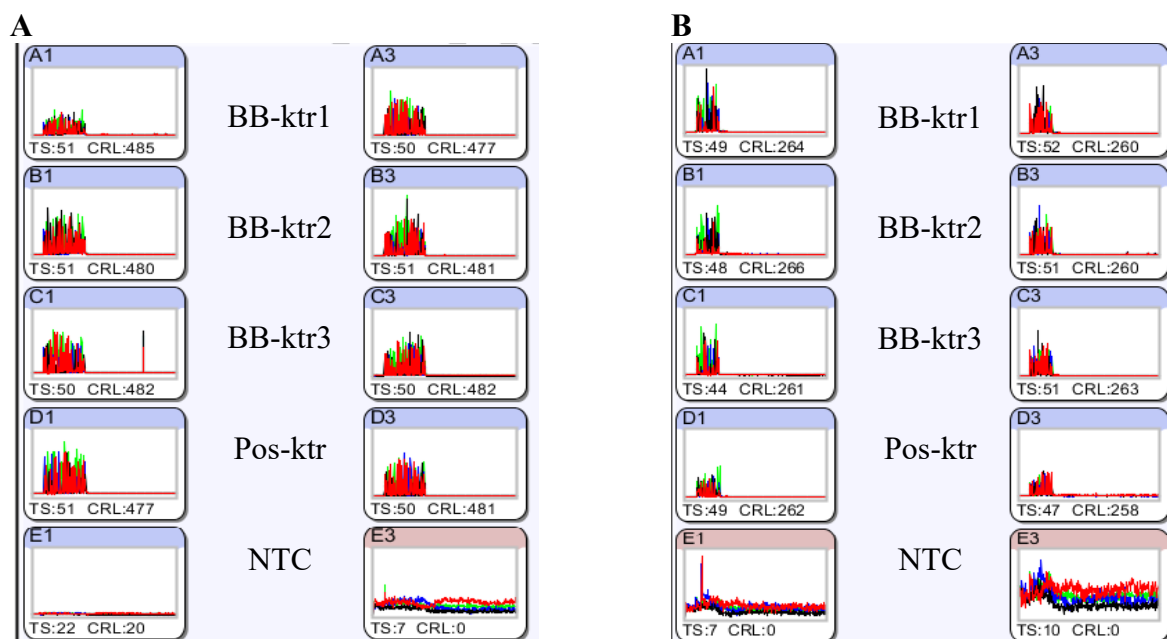
PCR-produktet som skal dannes fra de nye primerne for *BRCA1* ekson 2 skal være på 506 bp. Dette er noe større enn det PCR-produktet på 473 bp som ble dannet med gammel primer. Gelbåndet for denne primeren legger seg mellom størrelsesmarkøren som består av 692 bp og 489&501 bp. PCR-produktet fra gammel primer for *BRCA1* ekson 17 danner et produkt på 398 bp. PCR-produktet fra *BRCA1* ekson 17 legger seg under størrelsesmarkør 320 bp, og skal teoretisk sett bestå av 285 bp. Gammel primer for *BRCA2* ekson 11B danner et PCR-produkt på 470 bp. *BRCA2* ekson 11B skal danne et PCR-produkt på 508 bp. Båndet for denne primeren legger seg like over størrelsesmarkør 489&501 bp.

3.4 Resultatbehandling

Etter kapillærelektroforese er utført vurderes rådata fra sekvenseringen i Sequence Scanner og Sequence Pilot.

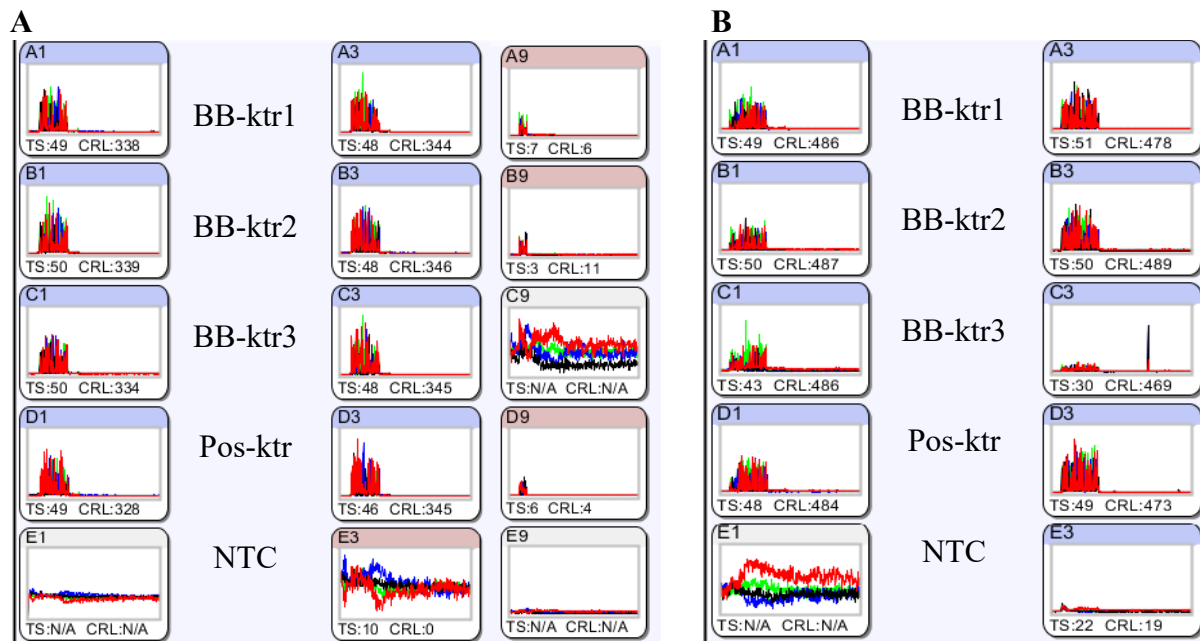
3.4.1 Sequence Scanner

Før resultater kan hentes inn i Sequence Pilot må NTC godkjennes. Denne vurderingen gjøres i Sequence Scanner. Figur 18A viser «Plate report» for *BRCA1* ekson 2, mens figur 18B viser plate report for *BRCA1* ekson 17. «Plate report» gir som tidligere nevnt en visuell representasjon av prøvebrettet. Figur 19A viser «Plate report» for *BRCA2* ekson 10D med henholdsvis vellykket og mislykket indre sekvenseringsprimer i kolonne 3 og 9. Figur 19B viser «Plate report» for *BRCA2* ekson 11B. Brønnene i kolonne 1 viser rådata for sense-tråd og kolonne 3 viser rådata for antisense-tråd. Koordinatene E1 og E3 referer til brønnposisjonen på brettet, og representerer her NTC. Det foretas også en generell vurdering av signalstyrke og søylediagram til de ulike kontrollene.



Figur 18: Figur 18A viser 2 «Plate report» for *BRCA1* ekson 2 «Plate report» fra Sequence Scanner 2

Figur 18B viser «Plate report» for *BRCA1* ekson 17.

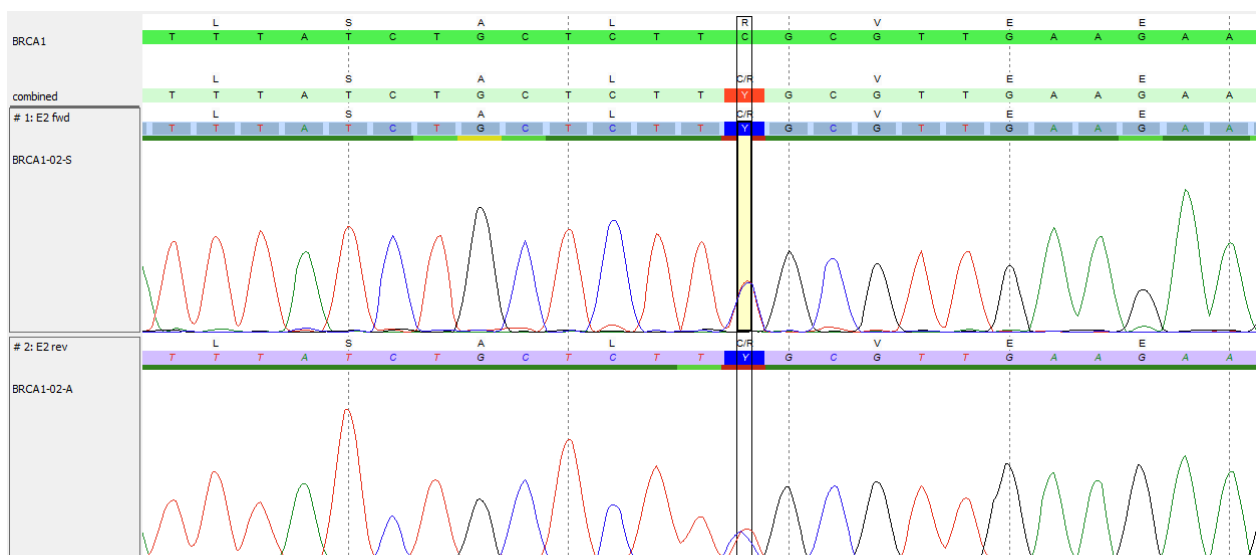


Figur 19: Figur 19A viser «Plate report» for BRCA2 ekson 10D. «Plate report» fra Sequence Scanner 2.

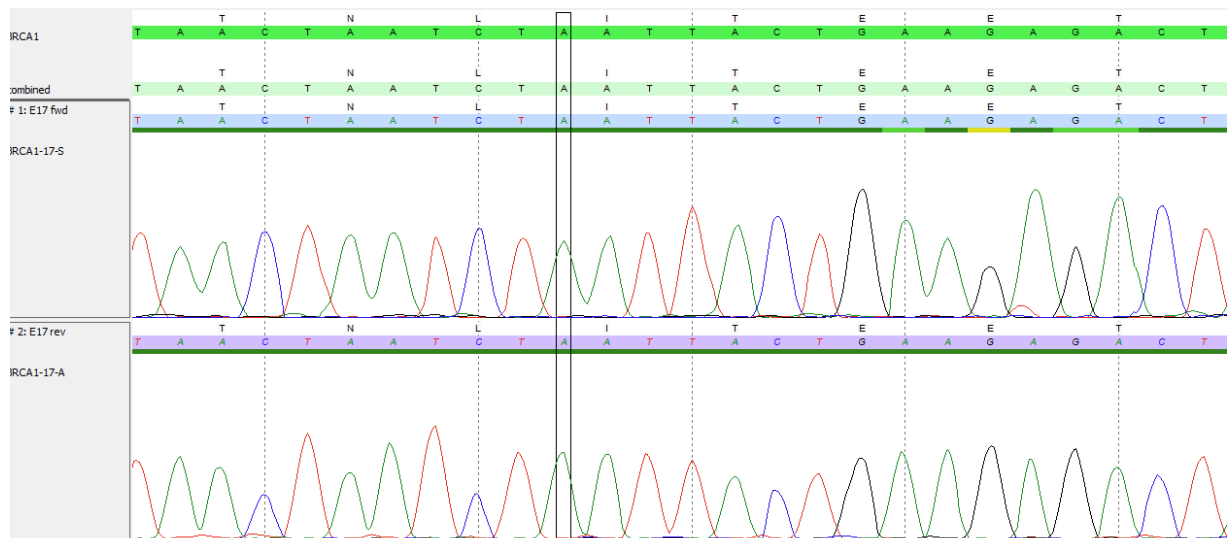
Figur 19B viser «Plate report» for BRCA2 ekson 11B.

3.4.2 Sequence Pilot

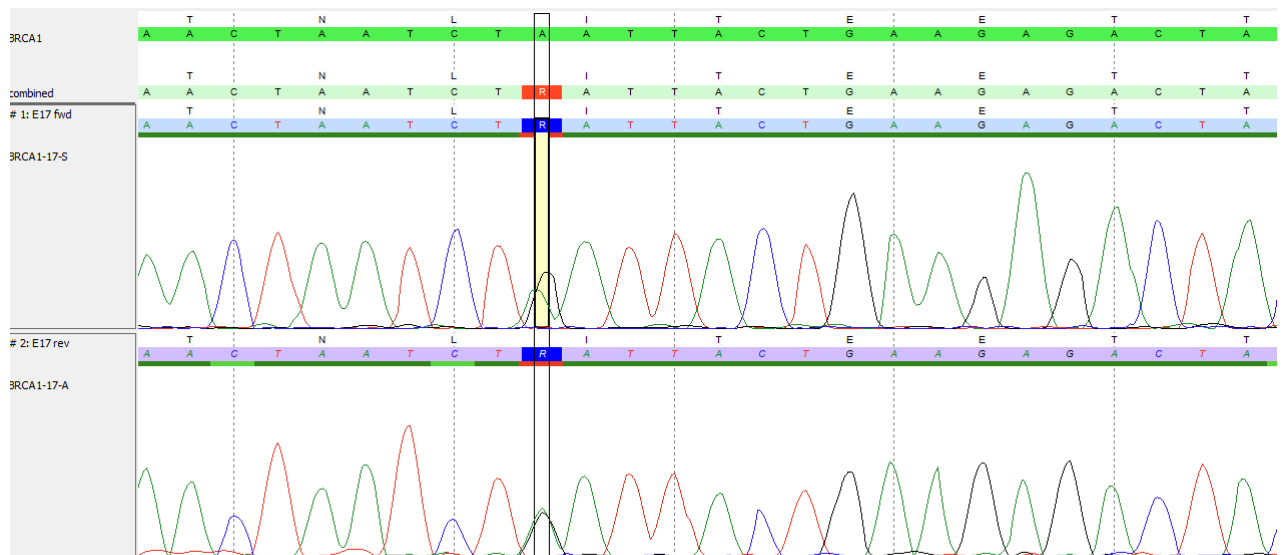
Etter at NTC er godkjent i Sequence Scanner kan sekvenseringsdata vurderes i Sequence Pilot. Denne programvaren sammenlikner prøvens sekvens til referansesekvensen og ser etter likheter og ulikheter med denne. Avvik fra referansesekvensen detekteres som endringer og kalles varianter. Det undersøkes også om varianten i en eventuell positiv kontroll detekteres. Sekvenseringsresultater for de 4 primerne er vist i figur 20-24.



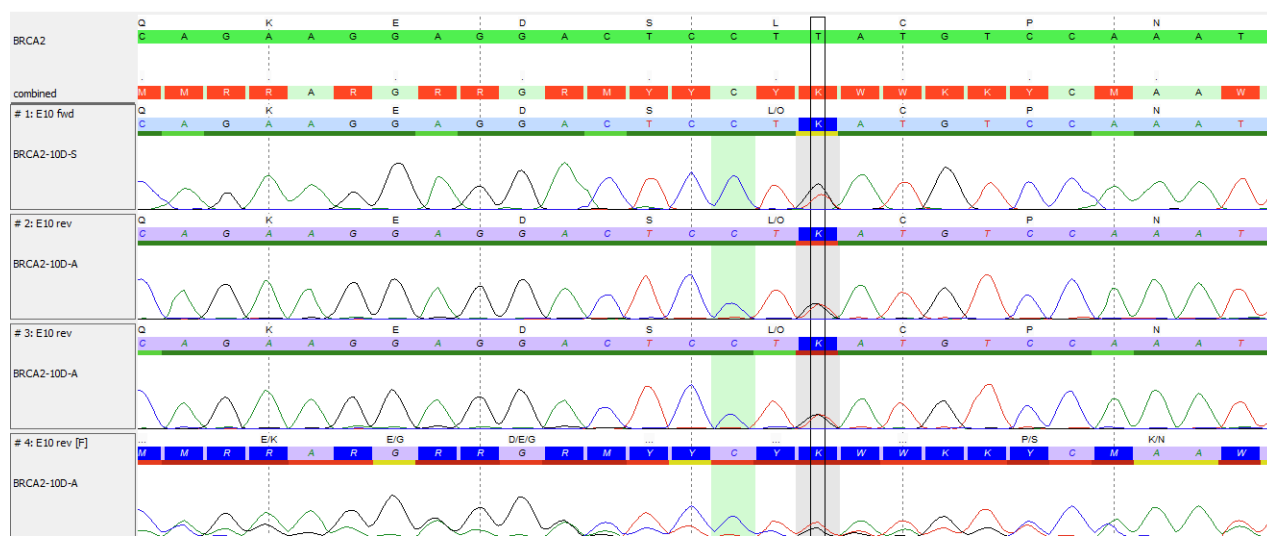
Figur 20: Figuren viser et utklipp fra Pos-ktr-BRCA1-02 i Sequence Pilot. Variant A viser baseendringen C>T.



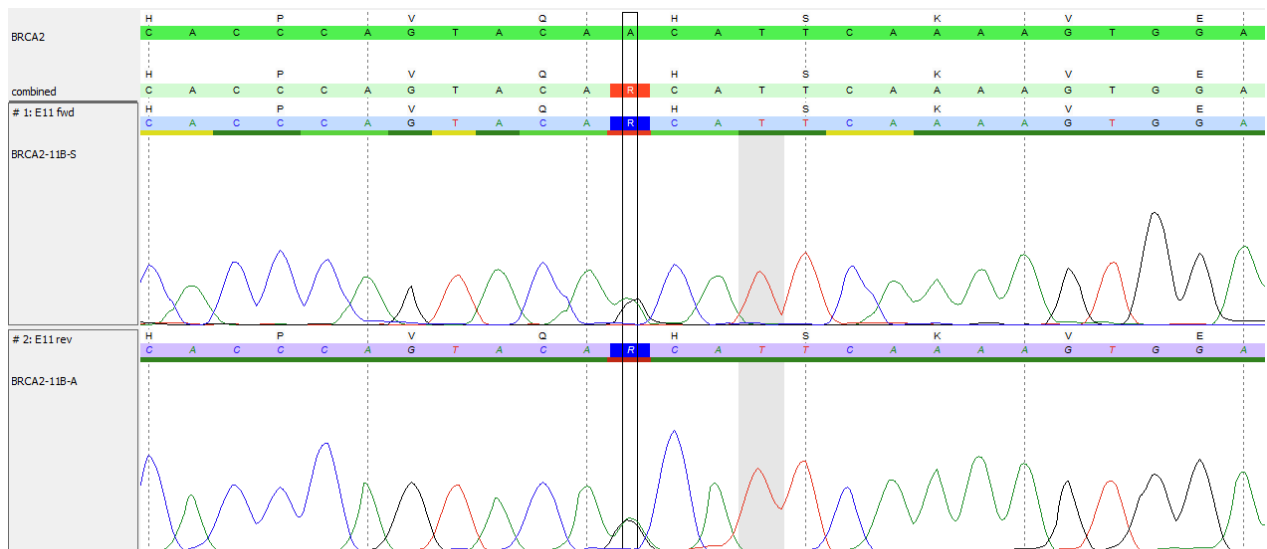
Figur 21: Figuren viser et representativt utklipp av BB-ktr1-BRCA1-17 i Sequence Pilot som viser normal sekvens.



Figur 22: Figuren viser et utklipp av Pos-ktr-BRCA1-17 i Sequence Pilot. Variant B viser baseendringen A>G.



Figur 23: Figuren viser et utklipp av Pos-ktr-BRCA2-10D i Sequence Pilot. Variant D viser baseendringen T>G



Figur 24: Figuren viser et utklipp av Pos-ktr-BRCA2-11B i Sequence Pilot. Variant E viser baseendringen A>G.

For å vurdere hvilken indre sekvenseringsprimer som fungerer best og bør implementeres i rutinen vurderes signalstyrke (relative fluorescent units). Signalstyrken til de to primerne er listet opp i tabell 6.

Tabell 6: Tabellen viser målt signalstyrke i relative fluorescent units (RFU) for de ulike basene til de to indre sekvenseringsprimer-alternativene for PCR-fragment BRCA2 ekson 10D

Kontroll	Signalstyrke (RFU)	
	BRCA2_10D-sek-A (alt. 1)	BRCA2_10D-indsek-A (alt.2)
Pos-ktr-BRCA2-10D-sek-A	740, 1029, 1680, 1044	1483, 1979, 3475, 2051
BB-ktr1-BRCA2-10D-sek-A	2724, 3583, 4513, 3120	3421, 4964, 6099, 4330
BB-ktr2-BRCA2-10D-sek-A	4252, 5354, 7191, 4585	1777, 2458, 3146, 2103
BB-ktr3-BRCA2-10D-sek-A	1278, 1688, 2289, 1400	8334, 11890, 17679, 11131

4. Diskusjon

Hensikten med denne bacheloroppgaven er å optimalisere primere som benyttes til sangersekvensering av *BRCAl*- og *BRCAl2*-genene. Målet er at de nye primerne skal følge standardbetingelser for rutine-PCR-oppsettet, med tanke på primerkonsentrasjon (1,4 μ M) og annealing-temperatur (63-55°C). Vi nådde målet om å optimalisere 14 av de 25 primerparene som ikke fungerte optimalt ved sangersekvensering av *BRCAl/2*. De resterende 11 primerparene bør optimaliseres av AMG.

Ved primerdesign er det viktig å følge reglene beskrevet i introduksjonen (punkt 1.8). Underveis i designprosessen møtte vi på ulike problemer, som f.eks. dannelse av sekundærstrukturer som hårnålstrukturer og primer-dimerer, eller tilstedeværelsen av en eller flere SNP-er i primerbindingssekvensen med høyere frekvens enn prosedyren tillater (se Vedlegg 2). SNP-er kan føre til allele-dropout, som innebærer utilstrekkelig amplifikasjon av et allel under PCR-reaksjonen (64). Dersom det er en SNP til stede i primerbindingssettet i den ene DNA-tråden, spesielt i 3'-enden av primerbindingssettet, kan det hende at primeren ikke vil binde seg og DNA-tråden blir dermed ikke amplifisert. Den andre tråden som ikke inneholder denne SNP-en vil derimot amplifiseres og detekteres. I slike tilfeller vet en ikke om man har fått opp begge trådene eller bare den ene, fordi sekvenser som er like legger seg «oppå hverandre». Da vet man ikke om den tråden som ikke amplifiseres inneholder en patogen variant. Allele-dropout kan dermed føre til et falskt negativt svar (77). For å løse slike problemer må posisjonen til den aktuelle primersekvensen endres slik at den ikke inneholder SNP-er med høye frekvenser.

Flere tilsynelatende gode primerforslag måtte forkastes, da avdelingens krav for smeltepunkt ikke ble oppfylt. Målet med denne bacheloroppgaven er at de nye primerne skal havne innenfor AMG sitt krav til temperatur (63-55°C). I rutinen ved et sykehuslaboratorium fører dette til effektivisering og mindre rom for feilkilder.

Før en primer kan bestilles legges primersekvensene inn i NCBI primerblast for å se om primerparet vil kunne danne uspesifikke produkter. Optimalt skal primerne kun bindes én plass i genomet. Hvis primerblast viser at primerne kan hybridisere til flere plasser i genomet, øker sannsynligheten for at det dannes uspesifikke produkter. I tilfeller hvor primersekvensen får mange treff vil man forsøke å flytte sekvensen hvor primerne skal bindes, om mulig.

Dersom primersekvensen ikke kan flyttes foretas det individuell vurdering. Dette innebærer å vurdere størrelse på de uspesifikke produktene, se på hvor primersekvensen binder seg til andre deler av genomet og om det er primerparet eller bare én primer som får treff i blast (73).

En slik vurdering ble foretatt for *BRCA1* ekson 17, da primeren for dette eksonet fikk over 100 treff i primerblast. Mange av de uspesifikke PCR-produktene som kan dannes er over 1000 bp. Da er produktene av en størrelse som gjør at det ikke er tilstrekkelig med oppformerings-tid i PCR-reaksjonen for at disse kan bli amplifisert. Den genspesifikke PCR-protokollen har en begrenset syntesetid (trinn 3 i PCR-reaksjonen) som ikke tillater dannelse av større PCR-produkter. Av de små uspesifikke produktene har de fleste store ulikheter i 3'-enden som gjør det lite sannsynlig at primeren binder seg. DNA-polymerase vil alltid syntetisere ny DNA-tråd i 5'- til 3'-ende. Ved uoverensstemmelser i 3'-ende vil ikke primeren kunne hybridisere og danne uspesifikke produkter (73). I dette tilfellet var det antisense-primeren som ga mulige PCR-produkter, og dermed vil eventuelle problemer gjelde for antisense-tråden. Primeren ble bestilt likevel ettersom den gamle primeren utpekte seg som spesielt problematisk, da den produserte flere uspesifikke produkter.

Ved design av primere for *BRCA2* ekson 15 møtte vi på flere av de samme problemene som for *BRCA1* ekson 17. Primerblast ga mange treff på mulige uspesifikke produkter som kunne dannes med sense-primeren. Dette problemet lot seg ikke løse ved å forsøke å flytte på primeren. På grunn av tidsbegrensning for denne oppgaven ble ingen primere bestilt for *BRCA2* ekson 15.

BRCA2 ekson 11 er så stort at det må lages flere primersett for å dekke denne delen av genet. Ifølge prosedyren AMG benytter for primerdesign (Vedlegg 2), skal slike primere overlappes med 70-80 baser. Dette kan være fort gjort å glemme da generell regel for primerdesign er at primeren må legges minst ca. 40 baser unna området som skal sekvenseres. Dersom primerne ikke overlapper med tilstrekkelig mange baser kan man risikere at deler av eksonet ikke sekvenseres. Ved design av overlappende primere inni et ekson er det sjelden et problem med mange treff i blast, da ekson stort sett er godt konserverte områder. Dermed var det relativt uproblematisk å designe primere for *BRCA2* ekson 11B.

BRCA2 ekson 10 må også deles opp i flere fragmenter da dette er et stort ekson, på samme måte som ekson 11. Fragment 10D er det siste fragmentet i dette eksonet. I starten av intronet

som følger ekson 10 finnes det et poly-T-område som fører til problemer for polymerasen under syntetisering. Dette problemet lar seg ikke løse ved å flytte på plasseringen av antisense-primeren, da poly-base-området er så nært slutten av eksonet at det uansett blir med i PCR-produktet og skaper problemer ved sekvensering. Løsningen blir dermed å lage en indre sekvenseringsprimer. Dette er en primer som plasseres på innsiden av et poly-base-område. Ved design av indre primere er det viktig å passe på at primersekvensen lages i riktig retning.

I vårt tilfelle ville vi lage en antisense indre sekvenseringsprimer for 10D. Vi glemte å snu sekvensen og bestilte dermed en sense-primer. Denne feilen ble oppdaget ettersom vi ikke fikk sekvenseringsdata (figur 19A, kolonne 9). Det ble da designet to nye indre sekvenseringsprimere, hvorav den ene var antisense-sekvensen til den første primeren som ble bestilt. Vi oppdaget at denne primeren kunne danne hårnålstrukturer. Primere er alltid i overskudd, og dannelse av hårnålstrukturer vil ikke alltid bli et problem. For sikkerhets skyld designet vi en alternativ indre primer for 10D. Denne primeren inneholdt en større del av poly-T-området enn det første alternativet. Ved å ta med deler av poly-base-området får man sekvensert større deler av eksonet enn om primeren plasseres innenfor poly-base-området.

Til slutt forsøkte vi å designe nye primere for *BRCA1* ekson 2. Denne primeren fikk ni treff i NCBI primerblast, hvorav syv produkter er for store til å kunne syntetiseres under de betingelsene som benyttes. De resterende produktene har en del uoverensstemmelser med primeren, og matcher ikke i flere posisjoner. Disse produktene vil dermed mest sannsynlig ikke interferere.

Fra gelelektroforesen ser man at de redesignede primerne gir vesentlig bedre bånd. Dette kommer tydelig frem i figur 17. De gamle primerne for *BRCA1* ekson 2 og *BRCA2* ekson 11B ga veldig svake bånd, mens de nye primerne gir skarpere bånd. Den gamle primeren for *BRCA1* ekson 17 ga mye uspesifikke produkter, noe som kommer tydelig frem på gelen. Den nye primeren for *BRCA1* ekson 17 gir derimot ikke uspesifikke produkter, til tross for mange treff i NCBI primerblast. Alle produktene dannet av de nye primerne ble av forventet størrelse og er litt større enn produktene som ble dannet av de gamle primerne. Gelelektroforese er ikke utført på *BRCA2* ekson 10D da den indre sekvenseringsprimeren ikke tilsettes før sekvenserings-PCR. Den genspesifikke PCR-reksjonen ble derfor satt opp med de gamle primerne.

I Sequence Scanner foretas en generell vurdering av signalstyrke. NTC godkjennes dersom det ikke detekteres produkt i sekvensen, altså når signalstyrken er på nivå med grunnlinjen eller hvis den merkes med N/A (not applicable). Dette er tilfellet for NTC-ene til *BRCA1* ekson 2 og 17, samt *BRCA2* ekson 10D og 11B. Signalstyrken til alle kontrollene som ble benyttet til disse primerne er innenfor gitte kvalitetsparametere.

Sequence Pilot benyttes for å vurdere sekvenseringsdata. Sekvensene for *BRCA1* ekson 2 og 17, og *BRCA2* ekson 10D og 11B er av god kvalitet og har lite bakgrunnsstøy. Signalstyrken for de ulike sekvensene er godkjent i henhold til avdelingens kvalitetskrav. Kjent variant i de ulike positive kontrollene ble detektert i både sense- og antisense-tråd.

BRCA2 ekson 10D har to fungerende alternativer for en indre sekvenseringsprimer. For å velge hvilken av disse to primerne som skal implementeres i rutinen vurderes blant annet signalstyrke. Signalstyrken for kontrollene var høyest når primeralternativ to ble benyttet til sekvensering. På bakgrunn av at primeralternativ én danner hårnålstrukturer og har lavere signalstyrke forkastes dette alternativet.

Resultatene fra gelelektroforese og sekvensering av *BRCA1* ekson 17 viser store forbedringer av primeren etter redesign. Denne primeren gikk fra å produsere flere uspesifikke gelbånd, til å produsere ett skarpt og tydelig bånd. Sekvenseringsdata er av god kvalitet. Denne primeren fungerer dermed bra til tross for de mange treffene i primerblast. Det kan derfor være verdt å ta en liknende sjans ved design av primere for *BRCA2* ekson 15.

5. Konklusjon

I denne bacheloroppgaven var målet å optimalisere primersekvenser som benyttes til sangersekvensering av *BRCA1* og *BRCA2*. For å gjøre dette har vi designet nye primersekvenser og utført primervalidering. Av de 25 primerparene som ikke fungerte optimalt har vi forbedret 13 av disse, samt designet en indre sekvenseringsprimer. Basert på resultater fra gelelektroforese produserer de nye primerne sterkere og mer spesifikke produkter. Sekvenseringsresultatene viser lite bakgrunnsstøy og høy signalstyrke. De redesignede primerne er validert og kan implementeres i rutinen ved avdeling for medisinsk genetik ved St. Olavs hospital. Videre anbefaler vi at avdelingen optimaliserer de resterende primerne. For de primerne som er utfordrende å designe kan det være verdt å avvike fra enkelte regler for primerdesign, f.eks. kan det være verdt å gå videre med primeren selv ved mange treff i NCBI primerblast. Basert på vår erfaring behøver ikke teoretiske treff i NCBI primerblast å bli et reelt problem, og primeren kan fortsatt gi spesifikt produkt.

6. Referanser

1. Roald B, Sauer T, Klepp O. Kreft. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [sitert 31. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/kreft>
2. Kreft [Internett]. Folkehelseinstituttet. 2014 [sitert 3. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/ikke-smittsomme/kreft/>
3. Gong Y, Deng J, Wu X. Germline mutations and blood malignancy (Review). *Oncol Rep.* januar 2021;45(1):49–57.
4. Paul P. Liu. Oncogene [Internett]. Genome.gov. 2022 [sitert 11. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Oncogene>
5. Alberts B, Hopkin K, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, mfl. *Essential Cell Biology*. 5. utg. New Yoork: W.W. Norton & Company; 2019.
6. Hansford J, Mulligan L. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet.* november 2000;817–27.
7. Børresen-Dale AL. Tumorsuppressorgener. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2022 [sitert 26. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/tumorsuppressorgener>
8. Oncogenes, Tumor Suppressor Genes, and DNA Repair Genes [Internett]. American Cancer Society. 2022 [sitert 26. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.cancer.org/healthy/cancer-causes/genetics/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html>
9. Sandvig K. Retinoblastom. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [sitert 11. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/retinoblastom>
10. Chernoff J. The two-hit theory hits 50. *Mol Biol Cell* [Internett]. 1. desember 2021 [sitert 11. april 2023]; Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8694077/>
11. Knudson's «Two-Hit» Theory of Cancer Causation [Internett]. Fox Chase Cancer Center - Temple Health. 2016 [sitert 14. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.foxchase.org/about-us/history/discoveries-fox-chase-research/knudsons-two-hit-theory-cancer-causation>
12. Cancer in Norway [Internett]. [sitert 14. mars 2023]. Tilgjengelig på: https://www.kreftregisteret.no/globalassets/cancer-in-norway/2021/cin_report.pdf
13. Brystkreft [Internett]. Kreftregisteret. [sitert 14. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.kreftregisteret.no/Temasider/kreftformer/Brystkreft/>
14. Eggstokkreft - symptomer og behandling [Internett]. Helsenorge. 2019 [sitert 14. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.helsenorge.no/sykdom/kreft/eggstokkreft/>

15. Gene Table [Internett]. Myriad Genetics. [sitert 3. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://myriad.com/gene-table/>
16. Palma M, Ristori E, Ricevuto E, Giannini G, Gulino A. BRCA1 and BRCA2: The genetic testing and the current management options for mutation carriers. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internett]. 1. januar 2006;57(1). Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1040842805001198>
17. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. I: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, mfl., redaktører. *GeneReviews®* [Internett]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [sitert 16. april 2023]. Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>
18. Mehta PA, Ebens C. Fanconi Anemia. I: *Genereviews* [Internett]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2002 [sitert 9. mai 2023]. Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559133/>
19. Gene Results BRCA1 [Internett]. Myriad Genetics. [sitert 12. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://myriad.com/gene-results/>
20. Gene Results BRCA2 [Internett]. Myriad Genetics. [sitert 12. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://myriad.com/gene-results/>
21. Friedenson B. BRCA1 and BRCA2 Pathways and the Risk of Cancers Other Than Breast or Ovarian. *Medscape Gen Med* [Internett]. 29. mai 2005 [sitert 26. mars 2023];7(2). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1681605/>
22. Gorodetska I, Kozeretska I. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *J Cancer* [Internett]. 14. mai 2019 [sitert 19. april 2023]; Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6548160/>
23. Dissen E. Homolog rekombinasjon. I: *Store medisinske leksikon* [Internett]. 2023 [sitert 19. april 2023]. Tilgjengelig på: https://sml.snl.no/homolog_rekombinasjon
24. Miki Y, Yoshida K. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. Department of Molecular Genetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University; 2004.
25. Karami F, Mehdipour P. A Comprehensive Focus on Global Spectrum of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Breast Cancer. *BioMed Res Int* [Internett]. 2013;2013. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3838820/>
26. Rama M, Bonavida B. *Prognostic and Therapeutic Applications of RKIP in Cancer*. Elsevier; 2020.
27. Rimoin D, Pyeritz R, Korf B, redaktører. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. 6. utgave. Elsevier; 2013.
28. *Alamut Visual Plus*. Sophia Genetics;

29. Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GDV, Boehning D. Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J* [Internett]. 19. mars 2012 [sitert 5. april 2023];1. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3380633/>
30. Johnson NC, Kruk PA. BRCA1 Zinc RING Finger Domain Disruption Alters Caspase Response in Ovarian Surface Epithelial Cells. *Cancer Cell Int.* 5. juli 2002;2:7.
31. von Nicolai C, Ehlén Å, Martin C, Zhang X, Carreira A. A second DNA binding site in human BRCA2 promotes homologous recombination. *Nat Commun* [Internett]. 15. september 2016 [sitert 17. april 2023];7(1). Tilgjengelig på: <https://www.nature.com/articles/ncomms12813>
32. Sjøberg NO. Molekylær genetikk. I: 4. utgave. Vett & viten; 2006.
33. Kurosaki T, Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J Cell Sci* [Internett]. 1. februar 2016 [sitert 9. mai 2023];129(3). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4760306/>
34. Garrett A, Allen S, Loong L, Durkie M, Drummond J, Burghel GJ, mfl. CanVIG-UK Consensus Specification for Cancer Susceptibility Genes (CSGs) of ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification. 20. desember 2022;
35. Garrett A, Durkie M, Callaway A, Burghel GJ, Robinson R, Drummond J, mfl. Combining evidence for and against pathogenicity for variants in cancer susceptibility genes: CanVIG-UK consensus recommendations. *J Med Genet.* mai 2021;58(5):297–304.
36. Garrett A, Loong L, King L, Allen S, Durkie M, Drummond J, mfl. BRCA1/BRCA2: CanVIG-UK Gene-Specific Guidance. 31. mars 2023;
37. Heramb C, Wangensteen T, Grindedal EM, Ariansen SL, Lothe S, Heimdal KR, mfl. BRCA1 and BRCA2 mutation spectrum – an update on mutation distribution in a large cancer genetics clinic in Norway. *Hered Cancer Clin Pract* [Internett]. 10. januar 2018 [sitert 19. april 2023];16. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5761139/>
38. Paus B. Klinisk genetikk. 1. utgave. Gyldendal akademisk; 2009.
39. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic. National Comprehensive Cancer Network; 2021.
40. Brystkreft – handlingsprogram [Internett]. Helsedirektoratet. [sitert 14. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/brystkreft-handlingsprogram>
41. Gynekologisk kreft – handlingsprogram [Internett]. Helsedirektoratet. [sitert 18. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/gynekologisk-kreft-handlingsprogram>
42. Dørum A. Premenopausal risikoreduse- rende salpingo-ooforektomi og bruk av hormonerstatning. *BestPractice Nord.* august 2018;

43. Engstrøm MJ. Mastektomi. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [sitert 3. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/mastektomi>
44. The BRCA1 c.5096G>A p.Arg1699Gln (R1699Q) intermediate risk variant: breast and ovarian cancer risk estimation and recommendations for clinical management from the ENIGMA consortium.
45. Ellard S, Charlton R, Yau S, Gokhale D, Taylor GR, Wallace A, mfl. Practice guidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation. Assoc Clin Genet Sci [Internett]. 2016 [sitert 6. mai 2023]; Tilgjengelig på: https://www.acgs.uk.com/media/10788/acgs_sanger_sequencing_bpg_update_2016.pdf
46. Genetikkportalen [Internett]. [sitert 6. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.genetikkportalen.no/>
47. Primer - Institutt for biovitenskap [Internett]. 2011 [sitert 26. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/primer.html>
48. Polymerase Chain Reaction (PCR) [Internett]. [sitert 26. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
49. What is the Role of MgCl₂ in PCR? [Internett]. Excedr. 2022. Tilgjengelig på: <https://www.excedr.com/resources/what-is-the-role-of-mgcl2-in-pcr/>
50. PCR - Institutt for biovitenskap [Internett]. 2011 [sitert 6. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>
51. Fig. 4 Steps in polymerase chain reaction [Internett]. ResearchGate. [sitert 12. mai 2023]. Tilgjengelig på: https://www.researchgate.net/figure/Steps-in-polymerase-chain-reaction_fig1_225812991
52. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nat Protoc [Internett]. september 2008 [sitert 4. april 2023];3(9). Tilgjengelig på: <https://www.proquest.com/docview/1326296220/abstract/BD1F408DD26E4A2FPQ/1>
53. Hecker KH, Roux KH. High and Low Annealing Temperatures Increase Both Specificity and Yield in Touchdown and Stepdown PCR. BioTechniques [Internett]. mars 1996 [sitert 4. april 2023];20(3). Tilgjengelig på: <https://www.future-science.com/doi/epdf/10.2144/19962003478>
54. cdadmin. Principle and Workflow of Illumina Next-generation Sequencing | CD Genomics Blog [Internett]. 2018 [sitert 23. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.cd-genomics.com/blog/principle-and-workflow-of-illumina-next-generation-sequencing/>
55. Cluster generation [Internett]. Labster Theory. 2018 [sitert 14. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://theory.labster.com/cluster-generation/>

56. Shrestha A. DNA Sequencing - Sanger Sequencing [Internett]. Microbe Online. 2022 [sitert 12. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://microbeonline.com/dna-sequencing-sanger-sequencing-method/>
57. Rifai N, Horvath AR, Wittwer C. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 8. utgave. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2019.
58. Behind The Bench Staff. Sanger Sequencing by CE 1: Foundations [Internett]. ThermoFisher Scientific. 2015 [sitert 10. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/sanger-sequencing-by-ce-1-foundations/>
59. Chuang LY, Cheng YH, Yang CH. Specific primer design for the polymerase chain reaction. Biotechnol Lett. 21. juni 2013;
60. Tong Y. Isothermal amplification of specific sequences. I: Biological Identification [Internett]. Elsevier; 2014 [sitert 23. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/B9780857095015500039?token=C9BC925E3536D5CBC4C6CFB7822C05D9458DD32696F32F4BF99FF88E11427521A205AF8CE494817C2B3A7F5BB7984874&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230323131811>
61. Papapetrou P, Benson G, Kollios G. Mining poly-regions in DNA. Int J Data Min Bioinforma. 2012;6(4).
62. Sequencing Troubleshooting [Internett]. Center for Quantitative Life Sciences. 2014 [sitert 8. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://cqls.oregonstate.edu/core/sequencing/sanger-sequencing/sequencing-troubleshooting>
63. Nguyen J. Sanger Sequencing [Internett]. Apollo Institute. 2021 [sitert 12. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://apollo-institute.org/sanger-sequencing/>
64. Shestak AG, Bukaeva AA, Saber S, Zaklyazminskaya EV. Allelic Dropout Is a Common Phenomenon That Reduces the Diagnostic Yield of PCR-Based Sequencing of Targeted Gene Panels. Front Genet [Internett]. 1. februar 2021 [sitert 8. mai 2023];12. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7901947/>
65. QIAasymphony DNA Handbook. Qiagen; 2010.
66. E-Gel™ EX Agarose Gels, 2% [Internett]. ThermoFisher Scientific. [sitert 15. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/G402022>
67. DNA Molecular Weight Marker VIII (19 - 1114 bp). Roche Diagnostics GmbH; 2018.
68. Shrimp Alkaline Phosphatase [Internett]. ArcticZymes Technologies; 2021 [sitert 15. mai 2023]. Tilgjengelig på: https://aztechnology.wpenginepowered.com/wp-content/uploads/2021/06/AZT_SAP_v2.0.pdf
69. BigDye X Terminator™ Purification Kit [Internett]. ThermoFisher Scientific. [sitert 15. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4376486>

70. Applied Biosystems Sequence Scanner Software v1.0 Sequence Trace Viewer and Editor [Internett]. Applied Biosystems; 2005 [sitert 8. mai 2023]. Tilgjengelig på: https://genomique.genotoul.fr/intranet/fileadmin/download/2005/doc_seqscanner_ABI.pdf
71. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. Applied Biosystems; 2016.
72. Locus Reference Genomic [Internett]. Locus Reference Genomic. [sitert 14. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.lrg-sequence.org/>
73. Jian Ye, George Coulouris, Irena Zaretskaya, Iona Cutcutache, Steve Rozen, Thomas L. Madden. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 2012;

7. Innholdsfortegnelse vedlegg

Vedlegg 1: Utklipp av rekvisisjon for genetiske undersøkelser	59
Vedlegg 2: Metode; Design og bestilling, AMG (ID: 28903)	60
Vedlegg 3: Oversikt over nye og gamle primersekvenser	65
Vedlegg 4: Oversikt over dataprogrammer og utstyr	70
Vedlegg 5: Oversikt over reagenser	71
Vedlegg 6: Metode; Sangersekvensering, AMG (ID: 27572)	72
Vedlegg 7: Resultatbehandling; Seq Scanner 2 - Vurdering av NTC, AMG (ID: 34612) ..	87
Vedlegg 8: Resultatbehandling; SeqPilot, AMG (ID: 41510)	92
Vedlegg 9: Mal for valideringsrapporter	103
Vedlegg 10: Valideringsrapporter for <i>BRCA</i> -primere	106
Vedlegg 11: En oversikt over positive kontroller	137



Medisinsk Genetisk Laboratorium

Avd. for medisinsk genetik

St. Olavs Hospital HF

PASIENT
Fødselsnr:
Navn:

ANALYSER - se www.genetikportalen.no

NGS GENPANEL

- NGS-Arvelig kreft-CNV-UTV, v5.0
Se genliste i www.genetikportalen.no
- NGS-Brystkreft-CNV, v1.0
ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2, RAD51C og RAD51D
- NGS-Bryst- og eggstokkreft-CNV, v2.0
BRCA1, BRCA2
- NGS-Bryst- og eggstokkreft-CNV-UTV, v2.1
ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, DICER1, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, NF1, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53
- NGS-Bukspyttkjertelkreft-CNV, v2.0
ATM, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, PMS2, POLD1, POLE, PRSS1, SPINK1, STK11, TP53
- NGS-Cowden syndrom-CNV, v3.0
AKT1, PIK3CA, PTEN, SDHB, SDHC, SDHD
- NGS-Eggstokkreft-CNV, v3.0
BRCA1, BRCA2, BRIP1, DICER1, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, RAD51C, RAD51D, STK11
- NGS-Endokrine tumores-CNV, v5.0
AIP, AP2S1, APC, BRCA1, BRCA2, CASR, CDC73, CDKN1B, DICER1, EPCAM, FH, GNA11, KIF1B, MAX, MEN1, MLH1, MSH2, MSH6, NF1, PMS2, PRKAR1A, PTEN, RET, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, TMEM127, TP53, VHL, WRN
- NGS-GIST-CNV, v2.1
NF1, PDGFRA, KIT, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD
- NGS-Gorlin syndrom-CNV, v3.0
PTCH1, PTCH2, SMO, SUFU
- NGS-Hyperkalsemi og hyperparathyroidisme-CNV, v1.0
AP2S1, CASR, CDC73, CDKN1B, GNA11, MEN1, RET
- NGS-Lynch syndrom-CNV, v2.0
EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2
- NGS-Mage- og tarmkreft-CNV, v2.1
APC, ATM, AXIN2, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, CTNNA1, EPCAM, GREM1, MLH1, MSH2, MSH3, MSH6, MUTYH, NTHL1, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, SMAD4, STK11, TP53
- NGS-Malignt melanom-CNV, v3.0
BAP1, BRCA1, BRCA2, CDK4, CDKN2A, EPCAM, MITF, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, POT1
- NGS-Nevroblastom-CNV, v2.0
ALK, KIF1B, NF1, PHOX2B
- NGS-Nevrologiske tumores-CNV, v3.0
AIP, APC, BRCA1, BRCA2, CDKN1B, CDKN2A, DICER1, EPCAM, MEN1, MLH1, MSH2, MSH6, NF1, NF2, PMS2, POT1, PRKAR1A, PTCH1, PTCH2, PTEN, RB1, SMARCA4, SMARCB1, SUFU, TP53, TSC1, TSC2, VHL
- NGS-Nyrekreft-CNV, v4.0
BAP1, BRCA1, BRCA2, CDC73, DICER1, EPCAM, FH, FLCN, MET, MITF, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, PTEN, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, TSC1, TSC2, VHL, WT1
- NGS-Prostatakreft-CNV, v3.0
ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2, EPCAM, HOXB13, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, TP53
- NGS-Schwannomatose og meningeomatose-CNV, v2.0
BAP1, LZTR1, NF1, NF2, PRKAR1A, PTEN, SMARCB1, SMARCE1, SUFU
- NGS-Tuberøs sclerose-CNV, v2.0
TSC1, TSC2

NEUROFIBROMATOSE

- NGS-Neurofibromatose type 1 og Legius syndrom-CNV, v1.0
NF1, SPRED1
Pasient > 6 år: EDTA-blod
Pasient < 6 år: EDTA- og heparin-blod
Ved vanskelig prøvetakning, prioriter heparin

NGS FOKUS-GEN

Det er mulig å utføre analyse av ett eller noen få gener (fokus-gen). Skriv ønsket gen(er) i feltet nedenfor.

ANDRE ANALYSER

- Metakromatisk leukodystrofi (ARSA)
- DNA-basert trisomitest, kromosom 13, 18, 21
- RNA-analyse

Genlister for panelene blir jevnlig oppdatert. Genpanelversjon og genlister angis i svarrapporten fra laboratoriet.

Seksjon for Medisinsk genetisk laboratorium

Laboratoriesenteret , 5.etg
Erling Skjalgssons gt. 1
N-7006 Trondheim

Laboratorium
E-mail: genetikklab@stolav.no
www.stolav.no

Poliklinikk
Tel: 728 36 370
E-mail: genetikkk@stolav.no

Primere; Design og bestilling, AMG

Forfatter: Liss Anne Solberg Lavik
Godkjent av: Margit Dagsdatter Haugsnes

Gyldig fra: 04.01.2023
Revisjonsfrist: 03.01.2026

Revisjon: 1.22
ID: 28903

Hensikt og omfang

Prosedyren skal være en veileder for design og bestilling av primere ved Seksjon for medisinsk genetisk laboratorium. Prosedyren omfatter grunnlagsinformasjon, beskrivelse av dataprogram og arbeidsflyt ved design av primere, samt fremgangsmåte ved navngiving og bestilling av primere.

Ansvar

Prosedyren utføres av kvalifisert laboratoriepersonell, og ansvar for prosedyren ligger hos seksjonsleder, ved Seksjon for Medisinsk genetisk laboratorium, Avdeling for Medisinsk genetikk, St. Olavs Hospital.

Arbeidsflyt ved Primer-design

Søk etter gen og referansesekvens

- Åpne NCBI Home, og velg «Gene», skriv inn gen-navn i søkefeltet, trykk Search.
- Det kommer opp en liste, velg riktig gen og Homo sapiens (human), trykk på gensymbolet (f.eks MSH2).
- **DNA-primere:** Skroll nedover siden til man møter NG_sekvensen under overskriften «NCBI Reference Sequences (RefSeq)» og «Genomic».
 1. Trykk på linken «GeneBank» under NG_nr, og man kommer nå til selve DNA-sekvensen.
 2. Velg “Whole sequence” og “Update View” under “Change region shown” øverst i høyre hjørne.
 3. Last ned sekvensen i gb. format; trykk på haken like ved «Send to» (øverst), hak av «File», la det stå «GeneBank» i Format-feltet og trykk «Create File».
 4. Nå kommer filen opp under «Nedlastninger»; trykk på filen og åpne med programmet Notepad.
 5. Lagre filen under det aktuelle genet i gen-mappa på denne måten; Gen_NG-nr (f.eks: MSH2_NG_0023456.1).
- **RNA-primere:** Skroll nedover siden til man møter NM_sekvensen under overskriften «NCBI Reference Sequences (RefSeq)» og «mRNA and Protein(s)».
 1. Trykk på riktig NM_transkript..
 2. Last ned sekvensen i gb. format; trykk på haken like ved «Send to» (øverst), hak av «File», la det stå «GeneBank» i Format-feltet og trykk «Create File».
 3. Nå kommer filen opp under «Nedlastninger»; trykk på filen og åpne med programmet Notepad.
 4. Lagre filen under det aktuelle genet i gen-mappa på denne måten; Gen_NM-nr (f.eks: MSH2_NM_001258281.1).
- Den lagrede sekvensen skal brukes i Oligo ved design av primere.

Design av primere ved bruk av Oligo, Alamut og NCBI Primerblast

- Åpne Oligo programmet; File – Open og velg det aktuelle lagrede dokumentet med NG_ eller NM_referansen.
- Under Files of type, må det stå; **All Files**, for å kunne se dokumentet, se også brukerveiledning Oligo.
- Åpne Alamut; velg riktig referansesekvens.
- Alamut benyttes for å se plassering av primere og for å få oversikt over SNP

- Kontroller at primere ikke legges over SNP ev noter frekvens (se tabell under innledning for tillatt frekvens av SNP).
- Kontroller at det innenfor primere ikke kommer et langt poly-A eller –T strekk som ofte vil forårsake bakgrunn i PCR-produktet.
- Velg primere i Oligo, og sjekk at Tm ligger i ønsket område og at GC-innholdet ligger på 35-55%
- Skriv inn riktig primer-konsentrasjon (300 nM), saltkonsentrasjon (50 mM) og ionekonsentrasjon (1,5 mM), se på lengden av PCR produktet om det er passe lengde (200-450). Store ekson kan deles opp og primerne bør da overlape med 70-80 baser.
- Åpne NCBI Primerblast.
- Under primer parameters legges inn primersekvensene i feltet for for «Use my own forward primer» og «Use my own reverse primer».
- La default-innstillingene stå, men under «Primer Pair Specificity Checking Parameters» og «Database» velges innstillingen «Genome for selected organisms» for DNA-primere og «Refseq mRNA» for RNA-primere.
- Under «Organism» velges innstillingen «Homo sapiens».
- Hak av i boksen «Show results in a new window» og trykk «Get primers».
- Det kommer opp en liste over mulige PCR-produkt som primerparet kan danne.
- Store likheter i 3'enden av primerne vil gi uspesifikke produkt og forkastes, juster i så fall plassering av primeren.

Navngiving av primere

Det benyttes gjeldende LRG referanse og systematisk exon-nummerering. For gener som ikke har LRG_referanse, benyttes i hovedsak det transkriptet som gir den lengste isoformen.

DNA-primere: Primernavnet skal inneholde forkortelse av gen-navnet og exon-nummerering samt avsluttes med S (sense) eller A (antisense). Primer-nummerering skal være to-sifret, slik at -01 kommer før -10 i diverse lister.

RNA-primere: Primernavnet for revers transkripsjon og cDNA-syntese med spesifikke primere (OneStep og TwoStep) skal inneholde forstavelsen c (cDNA), deretter gen-navnet, så nummerering (hvis det er flere fragment) og til slutt S (sense) eller A (antisense). Se eksempler for navngiving av bruksløsninger (under).

Eksempler: Primere som i et gen definerer;

... et helt exon: MSH2-02-S/ MSH2-02-A/ BRCA1-11B

... exon som er delt opp: BRCA1-11A-S/ BRCA1-11A-A , BRCA1-11B-S/BRCA1-11B-A

... to hele exon sammen: BRCA2-05-06-S/ BRCA2-05-06-A

... en intron-region: LZTR1-int06-S/ LZTR1-int06-A

... en promotorregion: APC-Pro-S/ APC-Pro-A

... en UTR-region: BRCA1-5UTR-S/ BRCA1-5UTR-A

... en cDNA analyse: cNF1-1-A, cNF1-1-B (hvor 1 står for fragment 1 og A og B er primer A og B)

... et exon som benyttes til DNA fra parafininnstøpt vev: pCDH1-08B-S/pCDH1-08B-A

... en sekvenseringsprimer: MSH6-07sek-S

Generelt: Benytt alltid bindestrek (-) som skilletegn, da dette er navngiving som både SeqPilot, Hamilton pipetteringsrobot og sekvensatoren (ABI 3730) aksepterer i arbeidslistene.

Bestilling av primere

- Det benyttes et forhåndsdefinert Excel-dokument fra firmaet Bionordica som bestillingsskjema for primere.
- Mal ligger under I: SEKSJON FOR MEDISINSK GENETIKK OG KONTOR/Lab Bestillinger/Primerbestilling (årstall).

- Rabattkode som er oppgitt under «Your profile» eks: STOlavs-22, oppdateres årlig og må endres ved hevert årsskifte. Avtalen innebærer at vi får 10 % rabatt på primere og fri frakt ved bestilling av mer enn 4 primere.
- Fyll ut bestillingsskjema (se eksempel under).
- Sett inn universell hale der det er aktuelt:

Sense: CACGACGTTGTAAAACGAC
 Antisense: CAGGAAACAGCTATGACC

NAME	SEQUENCE (5' > 3') 5-139 bases according to the synthesis scale	LENGTH	SYNTHESIS SCALE	PURIFICATION	FORMAT
RP1-04-S	CACGACGTTGTAAAACGACAATCAGTAAGAGGCTGGCAAC	40	10 nmol (Unmodified 10-79 bases)	RP-Cartridge - Gold	Dried
RP1-04-A	CAGGAAACAGCTATGACCTCTTGGGTAAGTTCGCCACTG	39	10 nmol (Unmodified 10-79 bases)	RP-Cartridge - Gold	Dried
SCN2A-21-S	CACGACGTTGTAAAACGACCTGATAAGAGCTTGCATCG	38	10 nmol (Unmodified 10-79 bases)	RP-Cartridge - Gold	Dried
SCN2A-21-A	CAGGAAACAGCTATGACCGATACAGTGTACTGAGTGC	38	10 nmol (Unmodified 10-79 bases)	RP-Cartridge - Gold	Dried

- Lagre dokumentet med riktig dato og initialer i mappen; SEKSJON FOR MEDISINSK GENETIKK OG KONTOR/Lab Bestillinger/Primerbestilling (årstall).

Eks: Oligo Primer bestilling 20200205_lala

- Bestillingen til leverandør utføres per mail:
 - Mailadresser: info@bioberg.no med kopi til herman@bionordika.no
 - Link dokumentet med primerbestilling som attachement
 - Emne: Primerbestilling
 - Skriv følgende tekst:

Hei,
 ny bestilling av primere som vedlagt i Excel-ark
 Rabattkode: STOlavs-22 (oppdateres årlig).
 Referansenummer: RESH-nr 4209474
 Hilsen

- Dokumentene med informasjon om de produserte primerne, blir sent elektronisk fra Eurgentec (my.oligos@eurogentec.com) til personen som er oppgitt i primerbestillingsskjemaet (Excel-arket) og til Medisinsk genetik sin Innboks. Dokumentene kommer når primerne blir sendt fra Erogentec; et par dager før primerne ankommer lab'en.
- PDF- og Excel-dokument som er dokumentasjon for primerne lagres under mappen for det aktuelle genet (lagres flere ganger ved flere gen på samme dokument). Dette utføres av den som har bestilt primere og mottatt mail fra Eurogentec.
- Når primerne ankommer labben sjekkes det at antallet stemmer, og pakkseddel signeres og legges egen eske merket «Pakksedler» på Teamkontoret.
- Primere og primerpapirer legges så i egen kassett merket «Primere» i hylla på Teamkontoret.

Validering av nye primere

Alle nye primere skal valideres før de benyttes i rutinediagnostikken. Se prosedyrene [Beaker - Validering, PCR primer og MLPA kit](#), [Metode; Sangersekvensering, AMG](#) og [Valg, validering og innføring av nye analyser, metoder eller utstyr - AMG](#).

Grunnlagsinformasjon

Ved design av primere er det viktig å velge den riktige referansesekvensen for DNA (NG_) eller RNA (NM_) for genet (NCBI). Referansesekvensen skal være den samme som skal brukes som templat i Oligo og SeqPilot. Ved design av RNA-primere må man ta hensyn til at gener kan ha flere

alternative transkript som gir forskjellige isoformer på proteinnivå. Det er i hovedsak det lengste alternative transkriptet som blir benyttet. Transkriptet (NM_) som blir valgt for et gen benyttes også i analyseprogrammene Ella og Alamut. Se dokumentet [TAR; Kreftpanel - INFO, AMG](#) for oversikt over alle referansesekvensene som er benyttet i gener som tilhører genpanel og se dokumentet [Beaker - Validering, PCR primer og MLPA kit](#) for fremgangsmåte for validering.

Ved design av primere for amplifisering av et spesifikt produkt, er plassering av primere, smeltepunkts-temperatur (T_m) for primerne og fordeling av G/C og T/A i primeren viktig. Det optimale PCR temperaturen for Touch-down-programmet som benyttes mest i rutinen er 63-55°C. Avgjørende for PCR-temperaturen er saltinnhold og ione-mengde (Mg⁺/Cl⁻) i PCR-buffere og primernes smeltepunkts-temperatur (T_m). T_m for primerne avhenger av lengde og basesammensetningen (A, T, G, C). $T_m = (C+G) \times 4 + (T+A) \times 2$. Optimal primerlengde ligger mellom 18 og 25 baser.

Oligo benyttes for å se på egenskapene for primerne, hvilke T_m de har, lengde og basesammensetning, og om det danner hairpins, eller bindinger mellom de valgte primerne. Programmet gir beskjed hvis primere har for lavt smeltepunkt i forhold til PCR-produktet og om primerne binder til seg selv eller hverandre i for høy grad. For mer informasjon om Oligo, se <http://www.oligo.net/downloads.html>.

Alamut benyttes for å se om det ligger SNP (Single Nucleotide Polymorphism) dvs nøytrale sekvensvarianter, i området der man ønsker å legge primere. Primere skal i utgangspunktet helst ikke legges over SNP med en frekvens >0,01 % i europeisk befolkning, og i områder med mange SNP kan man tolerere en høyere frekvens i forhold til hvilken folkegruppe det er. Det er viktig at dette noteres i primeroversikten så man er oppmerksom på allel drop-out. Se tabell under for spesifisering. Det som skal noteres er c.-posisjonen, etnisitet og frekvens. F. eks: c.123 Afr 0,7 %, E Asia 0,9 %.

Folkegruppe:	African	Latino	Other	European	South Asian	Ash. Jewish	East Asian	Eur. Finn.
Noteres i primeroversikt	≥0,5 %	≥0,1 %	≥0,1 %	≥0,01 %	≥0,5 %	≥0,1 %	≥0,5 %	≥0,1 %
Flytter primer	≥5 %	≥1 %	≥1 %	≥0,1 %	≥5 %	≥1 %	≥5 %	≥1 %

gnomAD er en offentlig tilgjengelig database som inneholder i normalpopulasjon. Gamle primere som ikke er sjekket for SNP etter at gnomAD-databasen ble publisert, bør sjekkes. Databasen dekker de fleste gener samt en god del av intron-sekvensene, har sekvenser fra rundt 245000 allel fra flere ulike etnisiteter og er derfor en god kontrollpopulasjon for SNP. I tillegg til å sjekke SNP i primerposisjonen, bør man også sjekke for SNP i de første basene etter primerens 5'-ende. En SNP her som gjør at templatet stemmer med universal hale, vil ved tilstedeværelse kunne føre til at det ene allelet oppformerer bedre enn det andre, og dermed kamuflere en annen variant ved oppformering av fragmentet. Man legger i hovedsak primere +/- 40 baser utenfor exon. For mer informasjon om Alamut se hjemmesiden <http://www.interactive-biosoftware.com/alamut-visual/features/>

NCBI primer-blast benyttes for å finne ut om primerne er spesifikke for den sekvensen man ønsker å oppformere. Her vil man kunne se om det kommer opp uspesifikke PCR-produkt, eller om det finnes pseudogen med lik sekvens. Hvis man i Oligo har funnet primere som passer i posisjon og smeltepunkt, og kontrollert for SNP i Alamut, kan man skrive inn disse i Primer Blast. Det velges referanse (genomisk DNA eller mRNA), og spesifisiteten må være høy. For mer informasjon om PrimerBlast i NCBI, se <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>

Referanser og dataprogram/websider

- Oligo <http://www.oligo.net/downloads.html>

- ALAMUT <http://www.interactive-biosoftware.com/alamut-visual/features/>
- gnomAD <http://www.interactive-biosoftware.com/alamut-visual/features/>
- NCBI Home (National Center for Biotechnology Information) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- NCBI Primer-BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>

Relaterte dokumenter:

 Beaker - Validering, PCR primer og MLPA kit

 Metode; Sangersekvensering, AMG

 TAR; Kreftpanel - INFO, AMG

 Valg, validering og innføring av nye analyser, metoder eller utstyr - AMG

Relaterte lenker:

[Alamut](#)

[NCBI](#)

[NCBI Primerblast](#)

[Oligo](#)

Vedlegg 3: Oversikt over gamle og nye primere

Tabellen viser en oversikt over gamle og nye sekvenser for BRCA1-primere. S står for sense og A står for antisense. R angir retning.

Primere	R	Gammel primersekvens (Nimagen)	Bp	Ny primersekvens	Bp
BRCA1-02	S	GGACGTTGTCATTAGTTCT	19	CTAAGGCTACCACCACCTACC	21
	A	CCACAGGATTTGTGTTGA	18	ACTAGACATGTCTTTTCTTCC	21
BRCA1-17	S	CACTTTAAATAGTTCCAGGAC	21	AACTAGTATTCTGAGCTGTGTGC	23
	A	GTAGAGACGGGGTTTCACC	19	GATCTCCTAATCTCGTGATCTGC	23

Tabellen viser en oversikt over plassering, størrelse på produkt og konsentrasjon av bruksløsning for gamle og nye primere for BRCA1.

Primere	R	Gammel primersekvens (Nimagen)			Ny primersekvens		
		c.	Bp u/hale	Kommentar	c.	Bp u/hale	Kommentar
BRCA1-02	S	c.-19-145	473	Bruksløsning 2,8 µM	c.-19-303	506	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.80+229		Bruksløsning 2,8 µM	c.80+104		Standard bruksløsning 1,4 µM
BRCA1-17	S	c.4987-139	398	Standard bruksløsning 1,4 µM	c.4987-65	285	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.5074+171		Standard bruksløsning 1,4 µM	c.5074+132		Standard bruksløsning 1,4 µM

Tabellen viser en oversikt over gamle og nye sekvenser for BRCA1-primere. S står for sense og A står for antisense. R står for retning

Primere	R	Gammel primersekvens (Nimagen)	Bp	Ny primersekvens	Bp
BRCA2-02	S	TACCTCAGTCACATAATAAG	20	TAAGCTGTTACCGTTCCAGG	20
	A	CGTACTGGGTTTTTAGCA	18	ATGTGGTTAACCTGCAAACG	20
BRCA2-10D	S	CAATGCAAGTTTTTCAGGTCA	21	(Indre primer)	19
	A	TCATGTATACAGATGATGCCTA	22	CAGGTACCTCTGTCTTTTT	
BRCA2-11B	S	AAAAGTTTCAGATATAAAAG	20	ACAGTGTGAAAATGATCCAAAAAGC	25
	A	CTTCAGAGTCTGGATTGACA	20	CTGAGAAAAGTTCTTCAGAGTCTGG	25
BRCA2-11D*	S	CTGTCAATCCAGACTCTGAAG	21	CTGTCAATCCAGACTCTGAAG	21
	s			ATAACTGTCAATCCAGACTCTGAAG	25
	A	CAATATCTTTGAAGAACATTT	21	CTTCTTAATGTTATGTTTCAGAGAGC	25
BRCA2-11I	S	CATAACTTAGAATTTGATGGC	21	TGAAGATAACAAATATACTGCTGCC	25
	A	TCCATTTTGTCTTTCTTATGT	22	TGTTTCCTCATAACTTAGAATGTCC	25
BRCA2-11K	S	AAAAAGTTAAAATTGCAAAGG	21	GAATCTTTGGACAAAGTGAAAAACC	25
	A	TGCAGTATTTATTCTTTCT	19	TGTTTCCTCATAACTTAGAATGTCC	25
BRCA2-11L	S	GTCCTGCAACTTGTTACA	18	AAAACTTCTGTGAGTCAGACTTC	24
	A	TCACAAGTTCCTCAACG	17	ACTGGCTCAATACCAGAATCAAG	23
BRCA2-11O	S	CCAAAATATGTCTGGATTGG	20	TGTGATGTTAGTTTGGAACTTCAG	25
	A	TCTAGACGTAGGTGAATA	18	CGTAGGTGAATAGTGAAGACTATGC	25
BRCA2-11P	S	CTCCAGAACATTTAATATCC	20	CAAAAAGGCTTTTCATATAATGTGG	25
	A	TCCATTTTACGTTTTTAGG	20	AGTTTACCAATTTCCATTTTACG	25
BRCA2-11Q	S	TTGAAGGTGGTTCTTCAGA	19	GTGGTTCTTCAGAAAATAATCACTC	25
	A	AGCATACCAAGTCTACTGAATA	22	TAACACTCTTAATTGTTAGCATACC	25
BRCA2-13	S	CATTCACTGAAAATTGTAAA	20	TGTACTGTGAGTTATTTGGTGC	22
	A	CTCAACCTTAGTACTTCATC	20	TCCTCTCAACCTTAGTACTTCATC	24
BRCA2-27A	S	TGTGTGTAATATTTGCGT	18	AGACTGTGTGTAATATTTGCGTG	23
	A	GCTTGGGTATTTATCAAT	18	TCAATGCAAGTTCTTCGTCAGC	22

*Det ble bestilt to sense-primere for BRCA2_11D. Den ene primeren (S) er ny batch av gammel primer, og den andre primeren (s) er tilført fire baser slik at den er lik i størrelse som antisense-primeren.

Tabellen viser en oversikt over plassering, størrelse på produkt og konsentrasjon av bruksløsning for gamle og nye primere for BRCA2.

Primere	R	Gammel primersekvens (Nimagen)			Ny primersekvens		
		c.	Bp u/hale	Kommentar	c.	Bp u/hale	Kommentar
BRCA2-02	S	c.-39-64	250	Standard bruksløsning 1,4 µM	c.-39-134	408	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.67+80			c.67+168		Standard bruksløsning 1,4 µM
BRCA2-10D	S	c.1548	492	Standard bruksløsning 1,4 µM	-	-	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.1909+130			c.1909+20 (indre primer)		Standard bruksløsning 1,4 µM
BRCA2-11B	S	c.2172	470	Bruksløsning 2,8 µM	c.2145	508	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.2641			c.2653		Standard bruksløsning 1,4 µM
BRCA2-11D	S	c.2621	483	Standard bruksløsning 1,4 µM	c.2621	457/ 461	Standard bruksløsning 1,4 µM
	s				c.2617		Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.3103			c.3078		Standard bruksløsning 1,4 µM

BRCA2-11I	S	c.3994	434	Standard bruksløsning 1,4 µM	c.3957	492	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.4427			c.4449		Standard bruksløsning 1,4 µM
BRCA2-11K	S	c.4589	536	Bruksløsning 2,8 µM	c.4609	501	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.5124			c.5110		Standard bruksløsning 1,4 µM
BRCA2-11L	S	c.4949	495	Standard bruksløsning 1,4 µM	c.5031	294	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.5443			c.5323		Standard bruksløsning 1,4 µM
BRCA2-11O	S	c.5799	499	Standard bruksløsning 1,4 µM	c.5842	449	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.6297			c.6291		Standard bruksløsning 1,4 µM
BRCA2-11P	S	c.6104	475	Bruksløsning 2,8 µM	c.6124	467	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.6578			c.6591		Standard bruksløsning 1,4 µM
BRCA2-11Q	S	c.6413	503	Standard bruksløsning 1,4 µM	c.6419	513	Standard bruksløsning 1,4 µM

	A	c.6847+74			c.6841+91		Standard bruksløsning 1,4 µM
BRCA2-13	S	c.6938-115	436	Bruksløsning 2,8 µM	c.6938-200	525	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.7007+251			c.7007-255		Standard bruksløsning 1,4 µM
BRCA2-27A	S	c.9649-108	512	Standard bruksløsning 1,4 µM	c.9649-112	503	Standard bruksløsning 1,4 µM
	A	c.10052			c.10039		Standard bruksløsning 1,4 µM

Vedlegg 4: Oversikt over dataprogrammer og utstyr

Tabellen viser hvilke dataprogrammer som er benyttet i denne bacheloroppgaven.

Program	Versjon	Leverandør
Alamut Visual Plus	1.6.1	Sophia Genetics
Oligo Primer Analysis software	7.60	Molecular Biology Insights, Inc.
Sequence Pilot	5.1.0	JSI medical systems
Sequence Scanner	2.0	Applied Biosystems

Tabellen viser hvilke instrumenter som er brukt på laboratoriet under denne bacheloroppgaven.

Utstyr	Navn	Leverandør
PCR maskin	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems
Elektroforese instrument	E-Gel® iBase™ Power System	Invitrogen
Geldoc	Gene Flash	Syngene Bio Imaging
ABI	3730 DNA Analyzer (modellnummer 625-0010)	Applied Biosystems

* Andre instrumenter og utstyr benyttet regnes som standard laboratorieutstyr og er derfor ikke listet opp.

Vedlegg 5: Oversikt over reagenser

Tabellen viser en oversikt over leverandør og referansenummer for alle reagenser brukt på laboratoriet.

Reagens	Leverandør	Referansenummer
AmpliTaq Gold 360 Master Mix	Applied biosystems	4398881
Genspesifikke PCR primere	Eurogentec	Ikke oppgitt
Universale sekvenserings haleprimere, sense (S) og antisense (A)	Eurogentec	Ikke oppgitt
A'SAP PCR clean up kit	ArcticZymes	803050-2000
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied biosystems	4336919
BigDye™ X-Terminator™ Purification kit: SAM™ Solution og XTerminator™ Solution Buffer	Applied biosystems	4376487
Sterilt vann	Braun Melsungen AG Medical AS	88992
E-Gel® EX 2% Agarose	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	G401002
DNA Molecular Weight Marker VIII	Roche Diagnostics GmbH	11336045001
Polymer for 3730/3730xl DNA Analyzers	Applied biosystems	4363929
3730 Buffer (10x) with EDTA	Applied biosystems	4335613

Metode; Sangersekvensering, AMG

Forfatter: Eva Kathrine Svaasand
Godkjent av: Margit Dagsdatter Haugsnes

Gyldig fra: 17.11.2021
Revisjonsfrist: 17.11.2023

Revisjon: 2.6
ID: 27572

Hensikt og omfang

Prosedyren skal sikre korrekt prøvebearbeidelse i alle arbeidstrinn som er involvert i sangersekvensering og gi en oversikt over metoden.

Analysen er kvalitativ, og godkjennes kun dersom rådata oppfyller kvalitetskriteriene (se [Resultatbehandling; Seq Scanner 2-Vurdering av NTC, AMG](#)).

Prosedyren er delt inn i tre deler

Del 1- Grunnlagsinformasjon og arbeidsbeskrivelse for sangersekvensering

Del 2- Vurdering av kvalitet på rådata

Del 3- Feilsøking og kvalitetssikring

Ansvar

Prosedyren utføres av opplært laboratoriepersonell og ansvarlig er seksjonsleder ved Seksjon for medisinsk genetisk laboratorium, Avdeling for medisinsk genetikk, St Olavs Hospital.

Instrumentansvarlig for hvert enkelt analyseinstrument er særskilt ansvarlig for opplæring og skal være behjelpelig ved feilmeldinger, endringer av oppsett og kontakt mot firma.

Arbeidsbeskrivelse

Prøvemateriale:

Prøvemateriale som benyttes til denne metoden er hovedsakelig DNA isolert fra blod, og det lages PCR fragmenter som er mellom 100-500 bp i størrelse. For cDNA analyser er fragmentene større. Rutinemessig, og om mulig brukes 30 ng DNA per 25 µl PCR reaksjon, men både høyere og lavere mengder fungerer.

Metoden kan også benyttes til DNA isolert fra alle typer vev. DNA fra fiksert/parafinninnstøpt (FFPE) vev er ofte fragmentert og mer utfordrende å analysere. Det henvises til egen prosedyre for sangersekvensering på FFPE vev [Metode; Sangersekvensering parafinsnitt, AMG](#).

For ferskfrosset vev, og celler fra munnvask og spytt benyttes ordinære PCR primere og ordinære oppsett. Det er som regel små mengder med DNA fra slike prøver, så de må settes opp manuelt. Denne type prøvemateriale rekvireres ofte ved utredning av mosaikktilstander, noe som det er viktig å være oppmerksom på ved analysering.

For sangersekvensering av cDNA av lange DNA fragmenter (>500-2000 bp, Long Range) henvises til egne prosedyrer, henholdsvis [Metode; RNA analyser, AMG](#), [Arbeidsark; RNA, TwoStep sekvensering av cDNA, AMG](#), [Arbeidsark; RNA, TwoStep sekvensering av NF1 cDNA, AMG](#), [Arbeidsark; RNA, OneStep RT-PCR og sekvensering av cDNA, AMG](#) og [Arbeidsark; DNA - Sangersekvensering LongRange, AMG](#) da det benyttes litt andre reagenser og fremgangsmåte for PCR og sekvensering enn for DNA.

For oppbevaring og isolering av prøvemateriale som brukes til metoden henvises det til [Beaker; Registrering, mottaksvalidering, og svarutsendelse, AMG](#) og [QIASymphony, DNA- og RNA-isolering, AMG](#).

Del 1- Sangersekvensering; metode

Tabell 2 Oversikt over trinnene i DNA Sangersekvensering

1	Genspesifikk PCR
2	Rensing av PCR-templat som skal brukes til sangersekvensering
3	Sangersekvenserings-PCR
4	Rensing av sekvenseringsprodukt
5	Kapillærelektroforese

Reagenser og utstyr:

Noen av disse reagensene er faremerket. Disse er merket med Δ i reagensoversikten. Les HMS-datablad for disse reagensene og ta anbefalte forholdsregler.

Tabell 3 Reagenser og Utstyr

Reagens/Utstyr	Faremerking	Oppbevaring	Avfallshåndtering
AmpliTaq Gold 360 mastermix med enhancer. Kit: Part nr. 4398881, Applied Biosystems; inneholder 5ml AmpliTaq Gold 360 master mix og 1.5 ml 360 GC Enhancer.		Som kit og som alikvotert bruksløsning i Fryser på PCR Prep Lab	Restavfall
Genspesifikke PCR primere fra Eurogentech sense (S) og antisense (A)		Bruksløsninger med S +A på 1.4 μ M eller unntaksvis 2.8 μ M i fryser på PCR Prep Lab Stockløsning 100 μ M i fryser på renrom	Restavfall

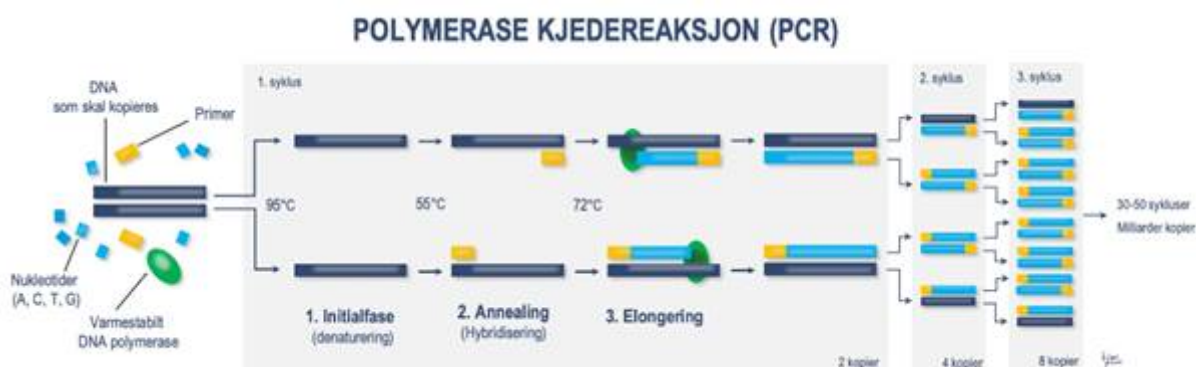
Universale sekvenserings primere (haleprimere), sense (S) og antisense (A) Fra Eurogentech		10 µM bruksløsning i fryser på PCR Prep Lab	Restavfall
Indre sekvenseringsprimere Fra Eurogentech		100 µl stock i fryser på Renlab	
A'SAP™ A'SAP PCR clean up kit: P/N 803050-2000, ArcticZymes. (Kit inneholder 2 ml Shrimp Alkaline Phosphatase og 2 ml Exonuclease)		Bruksløsning 1:4 A'SAP: flaskevann i fryser i på Hovedlab	Restavfall
Big Dye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit med 5x sequencing buffer P/N: 4337455, ThermoFisher scientific.		Fryser på PCR Prep lab	Restavfall
BigDye X- Terminator™ Purification kit P/N: 4376484, ThermoFischer scientific	Δ	I kjøleskap på Hovedlab, bruksløsning kan vare 4 -5 dager i kjøleskap. (Arbeides med i avtrekkskap)	I gul avfallsdunk merket med risikoavfall.
Rensekitet sekvenserings- reaksjons består av: -X Terminator™ Solution -SAM™ Solution			
ABI 10x og 1X buffer m/EDTA		I kjøleskap på Instrumentrom	Tømmes i vasken
3730 POP 7™ polymer	Δ	I kjøleskap på Instrumentrom	I gul avfallsdunk merket med risikoavfall.
Applied Biosystem™, blanke brett i pakker på 20 stk. Mikro Amp Endura Plate Optical Well, Vare nr. 4483354.		På lageret og i skap på PCR Prep Lab og Hovedlab	Restavfall
PCR hood		PCR Prep Lab og Instrumentrom	IA
Gummilokk		På benk ved pipetteringsrobot på PCR Prep Lab og Hovedlab	Gjenbrukes, legges til vask i balje på Hovedlab etter bruk
Gummi septa til ABI		På trillebord på Instrumentrom	Gjenbrukes, legges til vask i balje på Hovedlab etter bruk
3730 Capillary Array		I skap på Instrumentrom	I gul avfallsdunk merket med risikoavfall.
MicroAmp™ Clear Adhesive Film P/N: 4306311, Thermo Fisher Scientific		I hylle på Hovedlab	Restavfall
Plasttrau		I hylle på Hovedlab	I gul avfallsdunk merket med risikoavfall.
Beholder til prøvebrett (Plate Base 96-well)		På trillebord, på Instrumentrom	IA

Risteblokk, Eppendorf mixmate		Hovedlab	IA
Plate-sentrifuge, Eppendorf		Hovedlab	IA
Hamilton Pre PCR pipetteringsrobot (Instr nr 5859)		PCR Prep Lab	Spisser kastes automatisk i risikoavfall, gul boks. Se Metode; Vedlikehold Hamilton StarLet robotene, AMG for håndtering.
Hamilton Post PCR pipetteringsrobot (Instr nr 6663)		Hovedlab	Spisser kastes automatisk i risikoavfall, gul boks. Se Metode; Vedlikehold Hamilton StarLet robotene, AMG for håndtering.
ABI 3730 og ABI 3500 (backup instrument)		Instrumentrom	IA

IA = ikke aktuelt

Arbeidsbeskrivelse av Trinn 1- Genspesifikk PCR

PCR (polymerasekjedereaksjon) brukes til å selektivt kopiere opp utvalgte kodende områder på enkeltgener. Dette er en enzymreaksjon der enkeltrådig DNA fungerer som en mal. På grunnlag av nukleotidesammensetningen i de aktuelle områdene på DNA lages syntetiske oligonukleotider som kalles primere. Disse er komplementære til det området på templat-DNA hvor disse skal feste seg, og en primermiks for et DNA fragment består av både en sense- og en antisenseprimer. Figur 1 viser skjematisk PCR, som skjer i tre trinn som gjentas i sykluser.



Figur 1. Skjematisk beskrivelse av genspesifikk-PCR.

For alle DNA fragmenter settes det også opp en kontaminasjonskontroll, Non Template Control (NTC), som inneholder mastermiks og primermiks, men ikke templat.

Rutineprøver settes fortrinnsvis opp på Pre PCR pipetteringsrobot. Det innebærer at man har så mange prøver at det er mest praktisk å automatisere oppsettet, og at prøvene skal settes opp på

samme betingelser. Det innebærer også at prøvene er fortynnet til lik konsentrasjon slik at en lik mengde pipetteres av alle (3 µl) og at det er nok mengde av prøven (roboten trenger 100 µl dødvolum).

1. **Velge ut prøver til PCR og opprette batch i labdatasystemet.** Henviser til [Metode; Arbeidsprosess ved bruk av Beaker og pre-PCR robot; AMG](#) for fremgangsmåte i labdatasystemet Beaker.

Dersom det er mange prøver som har samme betingelser som er lik men avviker fra standardbetingelsene kan disse også settes opp sammen på roboten. Prosedyre [Utfaset dokument, ID 33425](#) viser oversikt over alle gener og fragmenter vi har tilgjengelig til sangersekvensering med mastermiks- og temperaturbetingelser. Begrensningen er at man kun kan sette opp med en type mastermiks i ett robotoppsett, og per i dag kan vi kun kjøre ett PCR brett på ett PCR program (dvs. med samme annealingstemperatur). Man kan på roboten velge å pipettere i ulike brett, som kan settes på ulik temperatur, men da med samme mastermiks.

Prøver som settes opp på manuelt oppsett er i hovedsak prøver som skal settes opp på original DNA (ufortynnet DNA), og prøver som krever en egen temperatur (ikke standard 63-55°C) eller mastermiks (ikke standard 0.7 enhancer). For tillaging av mastermiks, se [Arbeidsark; Bruksløsninger til pre- og post-PCR pipetteringsrobot, AMG](#)

2. **Opprett arbeidsark:** Åpne [Arbeidsark; DNA - Sangersekvensering med ABI3730, AMG](#). Lagres med dato-batch nummer-initialer og lagres i mappa «Arbeidsark og Resultater» på avdelingens hjemmeområde. For robotoppsett, følg anvisning i arbeidsarket om å lage plukklister for prøver og primere fra Labdatasystemet, se også prosedyre [Metode; Arbeidsprosess ved bruk av Beaker og pre-PCR robot; AMG](#). For manuelt oppsett, skriv inn informasjon om prøver direkte i fanen «manuelt» i arbeidsarket, initialer, prøvenummer, gen, fragment. Felte «Container ID» skal stå åpent til man kommer på lab, og prøverøret skannes inn i dette feltet. Husk å føre inn en NTC per fragment (primer).
3. DNA hentes fra kjøleskap på Isolerings lab, der de spinnes lett ned. Primer bruksløsninger hentes fra fryser på Prep Lab, der de tines og spinnes lett ned. Mastermiks bruksløsning hentes fra fryser på Prep lab, spinnes ned, og evt luftbobler fjernes med en pipette. Beregn omtrent ett rør med mastermiks bruksløsning per PCR brett, se prosedyre [Metode; Pipetteringsrobot Pre-PCR, AMG](#) for nærmere informasjon
4. For manuelt oppsett: Reagensene pipetteres i PCR hood på prep lab etter rekkefølgen i arbeidsarket. Merkes godt. Tar rørene med på isolerings lab, der DNA skannes inn i arbeidsarket før det pipetteres i PCR hood der. Rutineoppsett bruker enzymet Gold360, men det finnes andre enzym som er egnet til utfordrende PCR reaksjoner, se [Arbeidsark; DNA - Sangersekvensering ulike polymeraser, AMG](#)

For robotoppsett: Følg forøvrig instruksene i prosedyrene [Metode; Kort brukerveiledning for pipetteringsrobot pre-PCR, AMG](#), [Metode; Pipetteringsrobot Pre-PCR, AMG](#), [Metode; Arbeidsprosess ved bruk av Beaker og pre-PCR robot; AMG](#)

5. Prøver spinnes ned på isoleringslab, prøver fra robot i brett spinnes ned på Hovedlab. Prøvene settes i PCR maskin på rett program på instrumentrom. Husk å reservere PCR maskin på liste på veggen i forkant.

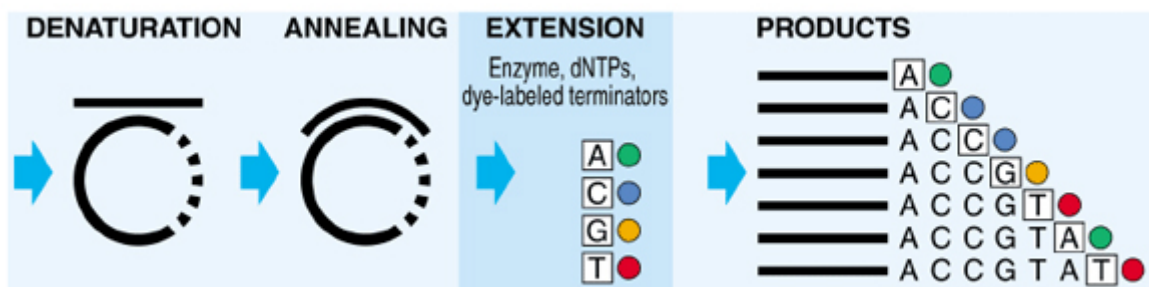
Arbeidsbeskrivelse av Trinn 2- Rensing av PCR-templat som skal brukes til sangersekvensering

Ved sekvensering er det viktig at PCR-produktet er spesifikt. Rensereagensene fjerner overflødige primere og nukleotider enzymatisk fra PCR-reaksjonen uten tap av PCR-produkt. Enzymet tilsettes direkte til PCR-produktet, og under inkubering ved 37 °C blir overflødige primere og nukleotider brutt ned av enzymet. Enzymet blir deretter inaktivert ved 80 °C. Enzymatisk rensing av PCR-produkt kan brukes på PCR-produkt større enn 100 bp.

1. PCR produkt må renses med A'SAP. Dette kan gjøres manuelt ved få prøver eller på post robot hvis det er flere prøver [Metode; Pipetteringsrobot, Post-PCR, AMG](#). Til manuell rensing kan man bruke en av to fremgangsmåter; enten bruke ufortynnet A'SAP og mindre mengde PCR produkt, eller man bruker A'SAP fortynnet 1:4 som ved robotoppsett med mengder av enzym og PCR produkt som ved robotoppsett. Følg instruksene i under fanen «sekvensering» på arbeidsarket [Arbeidsark; DNA - Sangersekvensering med ABI3730, AMG](#). Til rensing på post robot benyttes A'SAP fortynnet 1:4, og det må benyttes 4 rør, [Arbeidsark; Bruksløsninger til pre- og post-PCR pipetteringsrobot, AMG](#). Rørene settes i kjøleblokk i roboten. Både ufortynnet og fortynnet A'SAP står i fryser på Hovedlab. Ferdigblandet, ufortynnet A'SAP fryser ikke, brukes til det er tomt. Fortynnet A'SAP fryser, tiner rester opptil 5x. Sett kryss på lokket hver gang det tines.
2. PCR brett dekkes til med gummilokk. Rør/strips lukkes med lokk.
3. Spin ned.
4. Settes i PCR maskin på A'SAP program, henviser til fanen «Post-robot sekvensering» i arbeidsarket [Arbeidsark; DNA - Sangersekvensering med ABI3730, AMG](#).

Arbeidsbeskrivelse av Trinn 3- Sangersekvenserings-PCR

Ved sekvenserings-PCR amplifiseres enkeltrådet DNA. Sekvenserings-reagensene består blant annet av fluorescensmerkede ddNTP. Fluorescensmerkede ddNTP (dideoxy nucleotide triphosphates) mangler 3'OH grupper som er nødvendig for binding til neste nukleotid. Fluorescensmerkede nukleotider kobles på enden av hvert fragment. Under sekvenseringsreaksjonen blir det laget fragmenter med ulik lengde. Antallet som blir laget av hvert fragment er tilfeldig, dvs at forholdet mellom de ulike fragmentene i sekvenseringsmiksen ikke er 1:1. Se figur 2.



Figur 2. Skjematisk beskrivelse av sekvenserings-PCR.

Annealing-temperaturen under sekvenserings-PCR vil være spesifikk for hver primer som benyttes. Temperaturen skal være lik eller 2-3 °C lavere enn temperaturen som benyttes ved PCR-reaksjonen. Annealing-temperaturen bør ikke være høyere enn 60 °C (som er extension-temperaturen).

Et godt templat er essensielt for å få en vellykket sekvensering. Eventuell endring i DNA-tråden bør ikke være for nært verken sense eller antisense primer (også omtalt som revers og forward primer). De første ca. 40 basene i sekvensen vil normalt ikke kunne analyseres. Det bør alltid sekvenseres i begge retninger for å kunne sekvensere helt ut til motgående primer og for å kunne dobbeltsjekke eventuelle

Sekvenserings PCR settes opp på det rensede PCR produktet. Dette kan gjøres manuelt ved få prøver eller på Post PCR robot hvis det er flere prøver.

For automatisk opparbeidelse:

Henviser til prosedyre [Metode; Pipetteringsrobot, Post-PCR, AMG](#), [Metode; Dataoverføring fra Hamilton Pre-robot til ABI 3730, AMG](#) og [Arbeidsark; DNA - Sangersekvensering med ABI3730, AMG](#), arkfane «Sekv».

For manuell opparbeidelse:

Henviser til [Arbeidsark; DNA - Sangersekvensering med ABI3730, AMG](#), arkfane «Sekv».

1. Beskytt enzymet fra lys, og hold på kjøleblokk
3. **Indre primere:** Noen fragment krever at det brukes indre sekvenseringsprimere i stedet for universal primere. Oversikt over hvilke det gjelder står i Beaker ved primerfragmentet, i primeroversikten eller [Utfaset dokument, ID 33425](#). Dersom det skal benyttes indre primere og det er benyttet robot til oppsett av PCR, er det best å importere overview lista fra pre PCR roboten inn i arbeidsarket og deretter skrive ut oversikt over brettet før man starter på lab [Metode; Dataoverføring fra Hamilton Pre-robot til ABI 3730, AMG](#). Se arbeidsarket for tillaging av sekvenseringsmiks, følg volumene til manuelt oppsett.

For indre primere ved robot oppsett: Alle prøvene pipetteres først med universal sense og antisense primer, også de som skal ha indre primere. Bruk utskriften med oversikt over hvor de ulike prøvene står på PCR brettet (opprinnelig fra overview fila fra Pre PCR Roboten). Tilsett miks/er med indre primer i tom kolonne på det respektive brettet (sense eller antisense). Hent 2 µl rensede prøve fra A'SAP brettet fra den posisjonen prøven er oppført i på listen, og tilsett i ønsket brønn med indre primer (tips: tegn med tusj rundt den brønnen på A'SAP brettet som prøven skal hentes fra. Noter på oversiktsarket hvor prøven hentes fra og hvor den settes med indre primer). Dette må brukes når man oppdaterer ABI prosjektet via arbeidsarket. Det lages altså en ekstra reaksjon med indre primer i tillegg til universal sense og antisense. På ABI prosjektet justeres dette før kjøring, slik at kun en sense og en antisense reaksjon kjøres. Der indre primer er tilsatt slettes den universale primer for denne prøven i ABI prosjektet.

For indre primere ved manuelt oppsett: Her pipetteres alle reaksjoner enkeltvis, og for de prøvene det gjelder benyttes kun den indre primer direkte, i tillegg til den universale på den andre tråden. Her er det ikke behov for å justere ABI prosjektet.

Arbeidsbeskrivelse av Trinn 4- Rensing av Sekvenseringsprodukt

Etter sekvenseringsreaksjonen vil det være rester av fluorescensmerkede nukleotider som ikke har blitt inkorporert i aktuell sekvens. BigDye XTerminator Purification kit fjerner uinkorporerte nukleotider, salter og andre ladede molekyler som kan ha innvirkning på sekvenseringen som gjøres ved kapillærelektroforese på ABI3730. BigDye XTerminator Purification Kit består av to reagenser: BigDye XTerminator Solution som står for rensingen og SAM Solution som forsterker virkningen av XTerminator Solution og stabiliserer sekvensproduktet etter rensing.

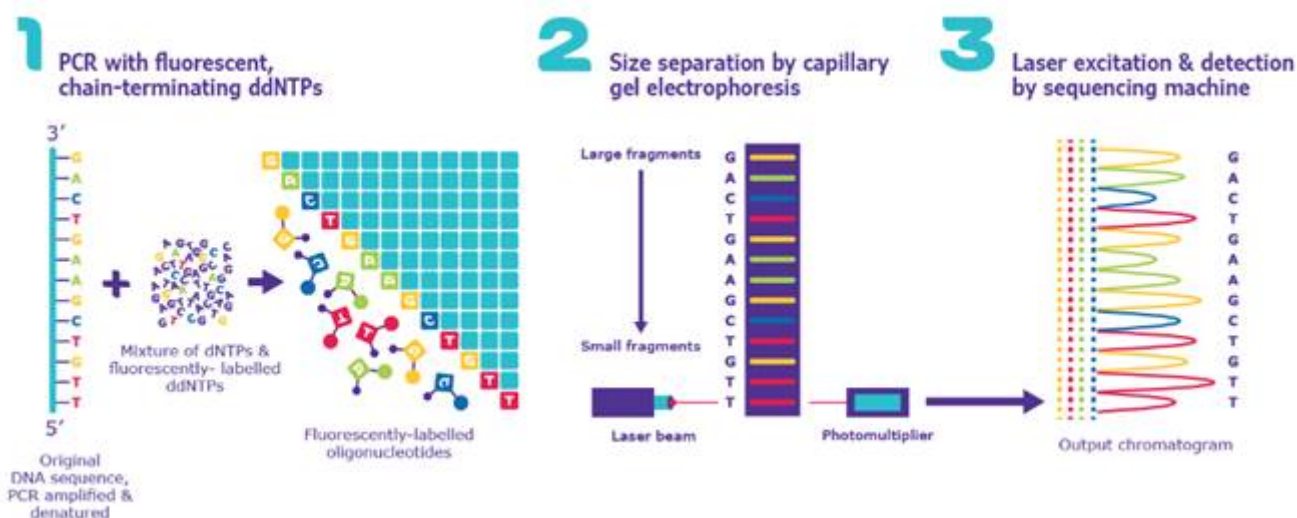
Henviser til  [Arbeidsark; DNA - Sangersekvensering med ABI3730, AMG](#), arkfane «Sekv» for mengdeforhold.

1. Sam og XTerminator kan tilsettes hver for seg hvis få prøver skal renses
2. Arbeid med BigDye XTerminator Kit gjøres i avtrekk
3. XTerminator solution må vortexes minst 10 sekunder før bruk (kan stå i maks 2 minutter før den må vortexes på nytt)
4. Bland og vortex miksen til løsningen er homogen (kan stå i maks 1 minutt før den må vortexes på nytt)
5. Miksen kan lagres i en lukket beholder i opptil 5 dager i kjøleskap. Skriv dato og sign. på beholderen hvis miksen skal lagres.
6. Hvis trau brukes, kan miksen blandes ved å bevege trauet frem og tilbake slik at det dannes en "bølgebevegelse" i miksen
7. Fordel miksen, forsegle platen, og rist på Eppendorf MixMate i 30 min ved 2000 rpm.
8. Platen sentrifugeres i 2 minutter ved 1000xg.
9. Prøvene kan stå i romtemperatur i 48 timer, i kjøleskap eller fryser i opptil 10 dager. Husk å forsegle platen med plastfilm.

Arbeidsbeskrivelse av Trinn 5- Kapillærelektroforese

ABI Genetic Analyser er et automatisert kapillærelektroforesesystem. Sekvenseringsproduktet blir injisert elektrokinetisk inn i kapillærene som er fylt med polymer. Sterk strøm gjør at det negativt ladede DNAet beveger seg mot den positivt ladede elektroden. Like ved den positivt ladede elektroden, beveger fragmentene seg gjennom en laserstråle. Når fluorescensen treffer lyset fra laseren i instrumentet, sendes det ut et karakteristisk spektrum fra hver av de fire nukleotidene. Samtidig detekterer et CCD-kamera disse signalene etter som fragmentene i økende lengde passerer deteksjonscellen under elektroforesen.

Data Collection-software konverterer fluorescenssignalene til digitale data og videre til elektrogram som behandles videre i egne analyseprogram. Se figur 3.



Figur 3. Skjematisk oversikt over ABI-kapillærelektroforese.

Henviser til instrumentprosedyrer [Metode; Brukerveiledning til ABI 3730, AMG](#) og [Metode; ABI 3500xL - Brukerveiledning for kjøring MolPatLab](#). Rutineprøver kjøres fortrinnsvis på ABI3730, men ABI3500 brukes som backup instrument.

ABI prosjektet eksporteres fra arbeidsarket over på intranettet se prosedyre: [Metode; Dataoverføring fra Hamilton Pre-robot til ABI 3730, AMG](#). Det importeres deretter på ABI.

Etter sekvenseringen er ferdig benyttes analyseprogrammer for å kvalitetssikre og analysere sekvensene, se [Resultatbehandling; Seq Scanner 2-Vurdering av NTC, AMG](#) og [Resultatbehandling; SeqPilot, AMG](#).

Del 2- Vurdering av kvalitet på rådata

Det er viktig at man vurderer kvaliteten på pasientprøvenes sekvensdata, både på rådata og på analysert sekvensdata. Dette er for å sikre at ikke artefakter kan resultere i uklare eller uriktige resultater, og for å indikere når en prøve må kjøres om.

Vurdering av rådata er empirisk, og det er derfor ikke så enkelt å sette konkrete regler for dette. I tillegg er det multiple faktorer som er involvert i sanger sekvensering og som påvirker sekvenseringskvaliteten (type sekvenserings teknologi: BigDye Terminator v1.1 eller v3.1, valg av polymer, metode for rensing, begrensninger i oligo design, kvalitet på input DNA, instrument for kapillære elektroforese, og software egenskaper).

Men tre parametre viser seg å være tilstrekkelige og nødvendige for å vurdere kvaliteten når de vurderes sammen; visuell vurdering, kvalitet og intensitet (ref. Noguchi et al 2014);

1. Kvalitet: gjennomsnittlig kvalitetsverdi (QVa = average quality value)
2. Intensitet: gjennomsnittlig signalstyrke (sekvens intensitet, rfu = relative fluorescence unit)
3. Visuell vurdering: rådata/analysert elektroferogram (visuelt)

Denne informasjonen er sammenfattet i Figur 1.

Sekvensdata kan deles inn på følgende måte, i soner som vist i grafen i figur 1.

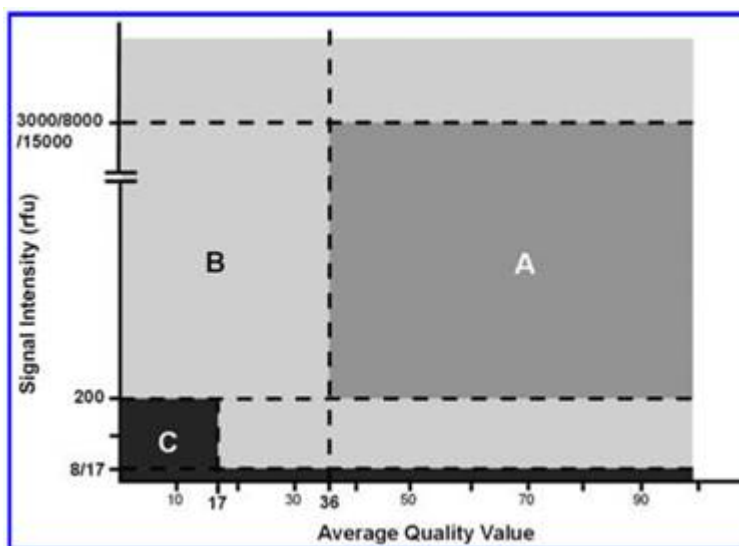
4 ulike soner basert på **signal styrke**;

1. Sonen med bakgrunns støy. Her er signal intensiteten lavere enn 8/17 rfu, avhengig av instrumentet som er brukt (8 rfu for ABI3500 og 17 rfu for ABI3730).

2. Sone med tilfeldig variasjon, 9 eller 18 til 200 rfu.
3. Sone med mulig signalmetning. Her er signal intensiteten høyere enn 8000/15.000 rfu, avhengig av instrumentet som er brukt (8000 rfu for ABI3500 og 15.000 for ABI3730)
4. Intermediær sone som de fleste signal intensitetene faller innenfor, mellom 200 til 8000/15.000 rfu avhengig av instrumentet som er brukt.

Og 3 ulike soner basert på **QVa verdi**;

1. $QVa \geq 37$; sekvenser med høy kvalitetsverdi
2. $18 \leq QVa < 36$; sekvenser med en medium kvalitetsverdi
3. $QVa \leq 17$; sekvenser med lav kvalitetsverdi



Figur 3. QVa, signal intensitet, og electrophoretogram profil forhold mellom QVa og signal intensitet.

Sekvensene klassifiseres i tre kategorier: A. brukbare sekvenser; B. brukbare, men heterogene sekvenser (trenger visuell inspeksjon); C. ubrukelige sekvenser.

Når $QVa \geq 37$ og verdien på signal intensiteten er mellom 200 og 8000/15.000 rfu er sekvensene nesten fri for bakgrunnsstøy og kun normale sekvenser og/eller sekvenser med substitusjonsmutasjoner er tilstede.

Når signalintensiteten er lavere enn 200 rfu, må sekvensdiagrammene sjekkes visuelt (både rådata og analyserte sekvensdiagrammer) pga tilfeldig variasjon eller tilstedeværelse av frameshiftmutasjoner.

Hvis signalstyrken er høyere enn 8000/15.000 rfu, må sekvensdiagrammene sjekkes visuelt (både rådata og analyserte sekvensdiagrammer) pga mulig høy bakgrunnsstøy pga sekvensmetning. Sekvensdiagrammer med QVa mellom 37 og 49 kan ha moderat bakgrunnsstøy.

Når QVa er mellom 18 og 36, må alle sekvensene sjekkes visuelt (både rådata og analyserte sekvensdiagrammer) av forskjellige årsaker; Hvis signalintensiteten er lavere enn 200 rfu, kan sekvenskvaliteten være svært varierende pga tilfeldig variasjon. Noen sekvenser kan inneholde relevant klinisk informasjon som for eksempel en frameshiftmutasjon. Hvis signalintensiteten er mellom 200 og 8000/15.000 rfu, har de fleste sekvensene en frameshiftmutasjon.

Hvis signalintensiteten er høyere enn 8000 (ABI3500) eller 15.000 (ABI3730), vil sekvensene kunne ha høy bakgrunnsstøy pga sekvensmetning.

Når QVa er lavere enn 17, og signalintensiteten lavere enn 200 rfu, kan sekvensene avvises uten en visuell sjekk.

Dersom signalintensiteten er høyere enn 200 rfu, inneholder sekvensene mest sannsynlig en frameshiftmutasjon og må derfor sjekkes visuelt.

En QVa på 36 er mest egnet som referanseverdi for kliniske prøver. Men det er viktig å påpeke at uansett kvalitetsverdi vil den reelle sekvenseringskvaliteten kunne variere betydelig som en funksjon av signalintensitets verdien.

Tabell 4. Kvalitetsparametre ABI

Tabell 4 oppsummerer dette og kan brukes som en veileder for å vurdere sekvensdata. Ruter markert i grønt indikerer godkjente parametre, ruter markert i gult kan godkjennes ved en visuell vurdering.

QV*:	Signalintensitet [rfu]:	Anbefalt handling:	Begrunnelse:
>50	<20	finnes ikke	finnes ikke
	20-200	visuell vurdering	lav kvalitet
	200-15,000	analyser	ok for analyse
	>15,000	finnes ikke	finnes ikke
49-36	<20	ikke analyser	for dårlig
	20-200	visuell vurdering	lav kvalitet og/eller leserammeskift
	200-15,000	analyser	ok for analyse
	>15,000	visuell vurdering	gått i metning?
37-17	<20	ikke analyser	for dårlig
	20-200	visuell vurdering	lav kvalitet og/eller leserammeskift
	200-15,000	analyser	ok for analyse
	>15,000	visuell vurdering	gått i metning?
<16	<20	ikke analyser	for dårlig
	20-200	visuell vurdering	lav kvalitet og/eller leserammeskift
	200-15,000	finnes ikke	finnes ikke
	>15,000	finnes ikke	finnes ikke

*QV er oppgitt i SeqPilot i tabellen "Positions / Result files" i kolonne average Phred

Sekvensdata vurderes i analyseprogrammene Seq Scanner 2 og Seq Pilot.

For **Seq Scanner 2**, se samme fremgangsmåte for å se på kvalitet på sekvensdata som for vurdering av NTC.

Seq Scanner 2 er et egnet program for å oversiktlig og enkelt kunne vurdere kvaliteten på sangersekvensen fra **hele** oppsettet fra ABI. Filene fra ABI lastes opp som «.abi1» filer til Seq Scanner Software 2 og åpnes så i Trace Manager.

Her skaleres signalene for å se etter store kvalitetsforstyrrelser og vurdere relativ signal styrke. Sekvensdataene, kalt «trace», undersøkes for de vanligste potensielle kvalitetsproblemene og rådata variasjon mellom prøvene.

I **Seq Pilot** ligger det inne default innstillinger for varslings ved kritiske verdier (Phred verdier), men disse verdiene kan også stilles inn manuelt. Phred kvalitet er et mål på kvaliteten av nukleotidbasene som genereres ved sekvensering, og ligger mellom 1 til 100. Ved basecalling av automatiserte sekvensfiler (ABI filer) vil Phred kvalitets score bli tilegnet hver base. For prøvene vil det dermed komme opp default eller de egeninnstilte kvalitetsverdier på hver base automatisk, og for hver resultat-fil er det kalkulert en gjennomsnittlig Pred verdi.

Phred verdier kan også hjelpe med å finne heterozygote posisjoner som ikke blir gjenkjent automatisk. Phred verdiene vises i elektroforetogrammet som alternerende fargede linjer under basesekvensen på resultatfilen. Skalaen går fra Grønn som indikerer fine Phred verdier (nær 100), til Rød som indikerer dårlige Phred verdier (nær 1).

Følgende fargekoder er default i programmet:

0-9 = mørk rød
 10-19 = rød
 20-29 = gul
 30-39 = lys grønn
 40-99 = grønn

Advarsel («Warning» =W) er tilstede for posisjoner der Phred verdien går under den akseptable terskelen for en ABI fil. For heterozygote posisjoner er det ingen Phred verdi tilstede.

Andre kvalitetsparametre:

Vi har satt som krav at det må være flankerende sekvens tilstede i sekvensene ≥ 25 nt før og etter målsekvensen (som oftest i intron før og etter ekson).

Del 3- Feilsøking og kvalitetssikring

Generell feilsøking.

For feilsøking relatert til sekvenseringskjemi og kapillærelektroforen henvises det til eget vedlegg i denne prosedyren, [Sangersekvensering feilsøking](#) og til [DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, Applied Biosystems Chemistry Guide, 3rd. edition, Thermo Fisher, Spesielt kapittel 8 Troubleshooting.](#)

Kvalitetssikring Prøver og Primere

For hver primer som benyttes i sangersekvensering settes det opp en kontaminasjonskontroll (NTC) som inneholder mastermiks og primer. Disse må godkjennes før prøvene kan analyseres. Se [Resultatbehandling; Seq Scanner 2-Vurdering av NTC, AMG](#) for nærmere beskrivelse.

Tiltak for å forhindre prøveforbytting

Forhindring av prøveforbytting er hele tiden et hovedfokus, og logistikken i metodene er alltid lagt opp med dette som hovedregel.

Metoden for PCR oppsett med Hamilton robot er laget med hensyn på å minimalisere faren for prøveforbytting. Metoden er ikke helautomatisk, men ved å scanne prøvene inn i rack mens man lager arbeidslista for prøvene har man redusert muligheten for forbytting til et absolutt minimum. Det er viktig å huske på å ikke sette prøver i posisjon 1 på prøverack 1 (posisjon reservert for NTC), se [Metode; Pipetteringsrobot Pre-PCR, AMG](#) og [Metode; Kort brukerveiledning for pipetteringsrobot pre-PCR, AMG](#).

Prøverør skal alltid spinnes ned før lokkene åpnes for å hindre at aerosol og dråper fra prøven kommer i lufta eller i kontakt med hansker, reagenser eller utstyr. Det skal skiftes hansker ofte når man håndterer PCR oppsettet, spesielt når prøverørene åpnes, for å hindre kontaminasjon av reagensene med DNA og for å hindre kontaminasjon mellom prøvene.

Prøvene kobles mot analysen de skal på (DNA-primer) på en kvalitetssikker måte ved å koordinere trinnene med PCR Software på roboten samtidig som prøvene sorteres i laboratedatasystemet på en egen PC, se [Metode; Arbeidsprosess ved bruk av Beaker og pre-PCR robot; AMG](#).

Ved manuelle oppsett må prøverør scannes direkte inn i arbeidsarkene på lab for å være sikker på at riktig prøverør er benyttet. Ellers samme forhåndsregler som beskrevet over.

Tiltak for å forhindre primerforbytting

Rør med primere er merket manuelt, noe som gir en risiko for feilmerking. Mange primere har nesten likt navn, og det er en risiko for å plukke feil primer til oppsettet. Det er laget et system for datafiler med etiketter som printes med fargekode som skal redusere faren for både å merke og å plukke feil primer. Det er foreløpig ingen barkode på DNA-primerrørene, og disse rørene må settes inn i robot rack manuelt etter anvisning av posisjoner fra Liquid list som genereres på roboten. Dersom analysen er satt opp med feil DNA- primer vil dette oppdages ved analyseringen. Sekvensen lar seg da ikke aligne med den referansesekvensen og referanseområde som forventes.

Referanser

[Applied Biosystems, Presentasjon fra DNA Sequencing Setup and Troubleshooting workshop, Lara Cullen, 2009](#)

[Applied Biosystems. Troubleshooting Sanger sequencing data https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0014435_Trbleshoot_Sanger_seq_data_UB.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0014435_Trbleshoot_Sanger_seq_data_UB.pdf)

[DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, Applied Biosystems Chemistry Guide, 3rd. edition, Thermo Fisher, Spesielt kapittel 8 Troubleshooting, Copyright © CMGS 2009](#)

Copyright © SINUS 2009

[Ellard et al, 2016, Practice guidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation.](#)[Manual Sequence Pilot module Seq Patient, Version 5.1.0, 15.Januar 2020.](#)

Noguchi T, Bourdon V, Sobol H. About Sequence Quality: Impact on Clinical Applications. Genet Test Mol Biomark. 12. mars 2014;18(5):299–305.

[Sanger Sequencing Steps & Method \(sigmaaldrich.com\)](#)<https://sml.snl.no/Sanger-sekvensering><https://studmed.uio.no/elaring/fag/mikrobiologi/kurs/bakgrunn/dokumenter/pcr.html>

ThermoFisher, Applied Biosystems: Sanger Sequencing Workflow.

<https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger-sequencing-workflow.html>

Innledning

Validering/verifisering

Metoden har vist sin gyldighet gjennom lang tids bruk. Det første ABI instrumentet og Sangersekvensering ble tatt i bruk i 1998. Metoden blir løpende verifisert. Dette skjer ved verifisering av funn i tillegg til deltakelse i eksterne kvalitetsprogrammer, samt gjennom løpende verifisering av de enkelte del metoder.

Bruksområde for sekvensering

Sekvensering er en teknikk som benyttes i stor utstrekning for påvisning av kjente og ukjente DNA- og RNA-sekvensvarianter. Metoden benyttes for å kunne lese av rekkefølgen på bokstavene (baseparene) i DNA. Målet med DNA-sekvensering er å få tilgang til organismenes genetiske kode. Sanger-sekvensering eller dideoksysekvensering er oppkalt etter Frederick Sanger som utviklet metoden. Dette er i dag omtalt som førstegenerasjons sekvensering.


















Sangersekvensering utføres på DNA fra blod, ferskt- og fiksert vev, og på RNA isolert fra lymfocyttkultur.

Tabell 1 Romnummer

I prosedyren henvises det til romnavn.

Navn på rom	Romnummer
PCR Prep Lab	232.05.019 (i sluse)
PCR Renlab	232.05.021 (i sluse)
Isoleringslab	232.05.024 (i sluse)
Instrumentrom	232.05.031
Hovedlab	232.05.030 + 232.05.033
Lageret	232.05.035


Relaterte dokumenter:


-  Arbeidsark; DNA - Sangersekvensering LongRange, AMG
-  Arbeidsark; Bruksløsninger til pre- og post-PCR pipetteringsrobot, AMG
-  Arbeidsark; DNA - Sangersekvensering med ABI3730, AMG
-  Arbeidsark; DNA - Sangersekvensering ulike polymeraser, AMG
-  Arbeidsark; RNA, OneStep RT-PCR og sekvensering av cDNA, AMG
-  Arbeidsark; RNA, TwoStep sekvensering av cDNA, AMG
-  Metode; ABI 3500xL - Brukerveiledning for kjøring_MolPatLab
-  Metode; Arbeidsprosess ved bruk av Beaker og pre-PCR robot; AMG
-  Metode; Brukerveiledning til ABI 3730, AMG
-  Metode; Dataoverføring fra Hamilton Pre-robot til ABI 3730, AMG
-  Metode; Gelelektroforese, AMG
-  Metode; Kort brukerveiledning for pipetteringsrobot pre-PCR, AMG
-  Metode; Pipetteringsrobot Pre-PCR, AMG
-  Metode; Pipetteringsrobot, Post-PCR, AMG
-  Metode; RNA analyser, AMG
-  Metode; Vedlikehold Hamilton StarLet robotene, AMG
-  Primere; mottak og fortynning, MedGen Lab
-  Resultatbehandling; Seq Scanner 2-Vurdering av NTC, AMG
-  Resultatbehandling; SeqPilot, AMG
-  Rutiner ved prenataldiagnostikk (PND), molekylærgenetisk fosterdiagnostikk, AMG
-  Temperaturkontroll av PCR-maskinene ved AMG

Relaterte vedlegg:

 [Sangersekvensering feilsøking](#) (En beskrivelse av aktuelle problemstillinger relatert til sekvenseringskjemi og elektroforese. Omhandler også informasjon om kvalitetskontroller som kan benyttes.)

Relaterte lenker:

 [DNA Sequencing by Capillary electrophoresis chemistry guide](#) (Applied Biosystems egen manual for sekvensering med deres reagenser og utstyr.)

 [Sanger DNA Sequencing Workflow](#) (Beskrivelse fra leverandør av instrument og reagenser)

Resultatbehandling; Seq Scanner 2-Vurdering av NTC, AMG

Forfatter: Eva Kathrine Svaasand
Godkjent av: Margit Dagsdatter Haugsnes

Gyldig fra: 03.12.2021
Revisjonsfrist: 03.12.2023

Revisjon: 3.0
ID: 34612

Hensikt og omfang

Prosedyren beskriver rutiner for bruk av non template control (NTC) ved oppsett av PCR for Sangersekvensering. Dette innebærer vurdering av NTC i Seq Pilot Verify, Seq Scanner 2, og det henvises til oppfølging i Beaker.

Ansvar

Det overordnede ansvaret ligger hos seksjonsleder ved Seksjon for medisinsk genetisk laboratorium (MGGL), Avdeling for medisinsk genetikk (AMG), St. Olavs Hospital. Oppgavene beskrevet i prosedyren utføres av opplært laboratoriepersonell ved Enhet for Generell DNA.

Grunnlagsinformasjon

Det er viktig å ha gode rutiner for kvalitetskontroll. Sangersekvensering med PCR er sensitivt og det er mange trinn involvert. En kontaminasjon av reagenser som brukes til den første PCR reaksjonen vil kunne føre til falske positive eller negative svar, og det er viktig at en slik kontaminasjon detekteres raskt. Det er viktig å skille mellom kontaminasjon som har oppstått ved PCR og kontaminasjon som har oppstått under sekvenseringstrinnene siden oppfølgingen vil være forskjellig. Det er kontaminasjon som har oppstått under PCR som er mest omfattende både i konsekvens og oppfølging.

En NTC inkluderes for hver primer som er benyttet i oppsettet, og en godkjenning av NTC er påkrevet før man starter med analysen av prøvene fra det samme oppsettet.

NTC som benyttes vil detektere kontaminasjon som har oppstått i forbindelse med PCR; i enzymmiks, primerbruksløsning eller engangsutstyr benyttet i PCR reaksjonen (pre PCR). Den vil også oppdage kontaminasjon som har oppstått post PCR, altså i forbindelse med sekvensering. Man kan hovedsakelig skille på de to ved å se om kontaminasjonen finnes i begge trådene, i sense (S) og antisense (AS), eller bare i den ene av de to. Dersom kontaminasjonen er tilstede i begge er det grunn til tro at den har oppstått i forbindelse med PCR reaksjonen, og om den er i bare den ene av de to trådene er det grunn til å ro at det har skjedd i forbindelse med rensing eller oppsett til sekvenserings reaksjonen. Dette kan enkelt sjekkes ved å kjøre PCR reaksjonen fra NTC på en 2% E-gel (agarosegel) og se om det er antydning til bånd på gelen, noe som bare vil være tilfelle om kontaminasjonen var i PCR reaksjonen.

NTC tas med på følgende måte på oppsett på Sangersekvensering, enten det er et manuelt oppsett eller oppsett på Pre PCR Robot: For hvert PCR-oppsett skal hver enkelt primer ha en tilhørende NTC. NTC identifiseres med primernavn og NTC (f eks. BRCA2_ex3_NTC_ktr). NTC skal kun bestå av mastermix og primer-bruksløsning (det skal ikke tilsettes vann som erstatning for DNA). For mer utfyllende arbeidsbeskrivelse av PCR-oppsett til sangersekvensering med pipetteringsrobot, se egen prosedyre. [Metode; Pipetteringsrobot Pre-PCR, AMG](#)

Vurdering av NTC

NTC analyseres i programmet Seq Pilot Verify

Analyseprogrammet Seq Pilot har ikke en egnet funksjon for å analysere NTC kontroller. Seq Pilot Verify er et analyseprogram laget spesielt for å gjøre det mulig å analysere NTC kontrollene, og det fungerer i samarbeid med analyseprogrammet Seq Scanner 2. Seq Pilot Verify (Verify) ligger tilgjengelig i startmenyen og har følgende symbol:



Oppgaven til Verify er å finne NTC, og å slå sammen NTC med primerne, åpne NTC lista i Seq Scanner og gi mulighet til å eksportere kun de resultatfilene som har blitt godkjent (uten

kontaminasjon). Verify lager en tabell (en kolonne med prøver og en med NTC) slik at det blir enklere å se hvilke prøver som er berørt av en eventuell kontaminasjon.

Etter godkjenning av NTC eksporteres prøvene til Seq Pilot for analysering

Fremgangsmåte- Seq Pilot Verify

Se også [Resultatbehandling; SeqPilot, AMG](#)

1. Åpne programmet Seq Pilot Verify.
2. For å laste inn filene som skal analyseres fra ABI: Velg alle mappene som hører til oppsettet ved å trykke i boksen ved siden av fila i kolonnen til venstre: Fellesområde Seksjon for MedGen (K:)/Analysedata-MedGen/Analyseresultater_ABI3730 eller ABI3500/MedGen/Sekvensering.
3. I høyre vindu velges alle primerpar ved å klikke «Ctr + A» mens musepekeren står i dette vinduet, og klikk «**Inspect**».
4. Seq Scanner 2 vil da åpnes i et nytt vindu, og alle NTC filer fra oppsettet kommer opp.
5. Trykk på «show reports», og se gjennom de diverse kvalitetsrapportene her, blant annet «Plate Report» og «Quality Control Report».
6. Diverse kvalitetsparametrene er oppgitt i disse rapportene. TS = Trace Score, som er gjennomsnittlig kvalitetsverdi på basecallingen for basene etter sekvensene har blitt konfigurert. CRL = Contiguous Read Length, som er den lengste uavbrutte sekvensen av baser med en kvalitet høyere enn en spesifikk grense. Ved evaluering av kvaliteten på hver base, er ikke bare kvalitetsverdien på den basen brukt, men også på de nærliggende basene innenfor et spesifikt størrelsesområde. Utslag på TS og CRL indikerer at det er sekvens tilstede, og denne må inspiseres visuelt for å vurdere om det er et reelt produkt i NTC kontrollen (kontaminasjon) slik at den ikke kan godkjennes, eller om det gjenspeiler tilstedeværelse av en primer-dimer sekvens, og dermed kan godkjennes. Utslag på TS og CRL fremkommer også med blå bakgrunn i Seq Scanner 2. Rød eller grå bakgrunn = utslag N/A= ingen sekvens, og NTC kan i utgangspunktet godkjennes.
7. Plate Report viser de posisjonene på 96-brønners platen der det er NTC kontroller tilstede, husk S og AS er i hver sin brønn. Inspiser hver NTC manuelt ved å trykke på hver enkelt NTC i Plate Report. For hver kommer det opp et nytt vindu med 6 faner (Analyzed, Raw, Analyzed+Raw, Annotation, Sequence og EPT). Bruk disse fanene og retningslinjene i Tabell 2 for fullføre vurderingen.
8. Dersom alle NTC i oppsettet oppfyller kravene for å godkjenne NTC, gå deretter tilbake til Seq Pilot Verify og trykk på «**Export**». Da flyttes alle tilhørende *AB1-filer* over til Seq Pilot automatisk og oppsettet er dermed godkjent.
9. Ved kontaminasjon av en eller flere NTC skal tilsvarende filer ikke eksporteres til Seq Pilot. Da må disse «avmerkes» før eksporteringen. Dermed blir ikke de pasientprøvene som er kjørt med samme primer som denne NTC heller ikke overført til Seq Pilot.
10. For tiltak ved kontaminasjon av NTC, se Tabell 2.

Tabell 1. Eksempler på godkjente og ikke godkjente NTC

Eksempler på godkjent NTC	
<p>NTC = ingen sekvens = blank</p>	<div data-bbox="371 271 1308 472"> </div> <p data-bbox="395 499 566 533"> 1 NNNNN</p> <p data-bbox="371 555 1460 622">Lav signalstyrke (bakgrunnsstøy, alle fire fargene ligger i samme flate profil), og signalstyrke er lik eller under nivået for bakgrunnsstøy.</p>
<p>NTC = kort sekvens = Primer peak</p>	<div data-bbox="371 629 989 831"> </div> <p data-bbox="395 864 1193 898"> 1 CTAATGCATG GCAAGAACGT ACATGTCGTA TTATGCGTGG TGATTACA</p> <p data-bbox="371 925 1460 1037">Ved å gå inn på fanen Sequence ser man lengden på produktet mer tydelig, og kan raskt vurdere om det er primer eller primerdimer. Primer gir en veldig kort sekvens på ca. 20 baser, sammen med sterke signal.</p>
<p>NTC = kort sekvens = Primer-dimer peak</p>	<div data-bbox="371 1077 1316 1279"> </div> <p data-bbox="395 1335 1316 1368"> 1 GCTTTCTCTC TGAGACTGOC AAGGCACACA GGGGATAGGT TCCACTTCAG ATACAATGG TGGTTTTACG ACGTCGIG</p> <p data-bbox="371 1395 1460 1496">Ved å gå inn på fanen Sequence ser man lengden på produktet mer tydelig, og kan raskt vurdere om det er primer eller primerdimer. Primer gir en veldig kort sekvens på ca. 40 baser, sammen med sterke signal.</p>
<p>Eksempel på IKKE godkjent NTC</p>	

<p>NTC = sekvens i både S og AS = kontaminert*</p>	<div data-bbox="368 100 630 309" data-label="Figure"> </div> <p>Ved å gå inn på fanen Sequence ser man en sekvens av betydelig lengde, dvs. høye jevne reelle signal og sekvens som er av samme lengde som et PCR produkt (150-450bp). I eksemplet her er størrelsen på 391 bp (CRL = 391).</p> <p>Dersom kontaminasjonen har oppstått under PCR vil sekvensen være tilstede både i S og i AS brettet (må sjekke i begge). NTC godkjennes ikke dersom det er sekvens som dette både i S og i AS.</p> <p><u>Unntak 1*</u>; Dersom det kun er sekvens i den ene av de to NTC kontrollene for samme primer (S eller AS) kan NTC godkjennes, for da tyder det på at kontaminasjonen har skjedd post PCR og mest sannsynlig som spill-over i forbindelse med opprensing av sekvenserings reaksjonen</p> <p><u>Unntak 2</u>; Dersom sekvensen i NTC kontrollen har under 1/10 del av intensiteten av prøven/-e med samme primer, kan man i hvert tilfelle vurdere om prøven kan godkjennes, men det må da alltid lages ny bruksløsning av primer før neste oppsett.</p>
---	---

Tabell 2. Tiltak ved kontaminasjon av NTC

Hendelse	Indikasjon	Mulig årsak	Eventuelle tiltak
Bare sense eller antisense kontaminert for en/flere NTC	Kontaminasjon <u>etter</u> PCR-reaksjonen	Pipetteringsfeil Prøveforbytting Kontaminering mellom brønner pga. f. eks risting, plastfilm etc.	Sekvenser aktuell prøve og NTC på nytt fra opprinnelig PCR-produkt.
Både sense og antisense kontaminert for en/flere NTC	Kontaminasjon <u>før</u> PCR-reaksjonen	Kontaminert primer Pipetteringsfeil Prøveforbytting	NTC godkjennes ikke i Seq Pilot Verify, og prøvene kjørt med samme primerbruksløsning eksporteres ikke til Seq Pilot. Registrer kontaminasjon og sett prøven med denne primeren til omkjøring i Beaker. Det må da lages ny bruksløsning av primeren først.
Alle NTC kontaminert	Kontaminasjon før PCR-reaksjon	Mastermix	Registrer avvik i EQS Lag ny mastermix Sette opp hele PCR-oppsettet på nytt

Husk å gi beskjed til Molekylærpatologi dersom vi oppdager kontaminasjon i flere av løsningene våre, da vi har samlokalisering og metodefelleskap.

Beaker

Når NTC er inispisert skal resultatet registreres i Beaker. Velg det som er aktuelt i tråd med beskrivelsen i tabell 1; «**Ikke kontaminasjon**», «**Kontaminasjon, PCR godkjent**» (velges dersom kontaminasjonen er som beskrevet i Unntak 1 eller 2 i tabellen) eller «**Kontaminasjon, PCR ikke godkjent**». Se [Beaker - Behandling av NTC - AMG](#) for mer detaljer.

Relaterte dokumenter:

-  [Beaker - Behandling av NTC - AMG](#)
-  [Metode; Pipetteringsrobot Pre-PCR, AMG](#)
-  [Metode; Sangersekvensering, AMG](#)
-  [Resultatbehandling; SeqPilot, AMG](#)
-  [Risikovurdering; Arbeidsprosess PCR-robot AMG](#)

Resultatbehandling; SeqPilot, AMG

Forfatter: Bodil Gilde

Godkjent av: Margit Dagsdatter Haugsnes

Gyldig fra: 01.12.2022

Revisjonsfrist: 30.11.2024

Revisjon: 1.6

ID: 41510

Hensikt og omfang

Dokumentet skal sikre riktig bruk av analyseprogrammet «Sequence Pilot» ved analysing av sekvensdata fra ABI.

Analyseprogrammet sammenligner referansesekvenser med sekvensene fra analyseinstrumentet og brukes til påvisning av sekvensvarianter i DNA og RNA. Endringer i forhold til referansesekvensen avmerkes.

Denne prosedyren vil gi en oversikt over analyserutinen. Detaljer og forklaringer finner du i manualen, som åpnes slik:



Figur 1: Manualen «SeqPatient» ligger tilgjengelig i SeqPilot. Den oppdateres automatisk sammen med programvaren.

Arbeidsbeskrivelse

Tabell 1: Arbeidsoppgaver i SeqPilot

Utføres av	Arbeidsoppgave
Laboratoriepersonell	<ul style="list-style-type: none"> Vurdering av rådata og NTC vha. «SeqPilot Verify» og «SeqScanner2» Resultatbehandling: Seq Scanner 2-Vurdering av NTC, AMG Overføring av sekvenseringsdata til SeqPilot Funksjon: <i>Analyst</i>
Laboratoriepersonell	<ul style="list-style-type: none"> T.V. (teknisk validering) M.V. (medisinsk validering) Funksjon: <i>Analyst</i>
M-ansvarlige	<ul style="list-style-type: none"> Kontroll av: funn, editerte posisjoner og advarsler → M.V. Funksjon: <i>Analyst</i>
Ansvarlige for primerdesign	<ul style="list-style-type: none"> Oppdatering av gen- og primerdatabasen under primervalidering eller –endring Optimalisering av synlig sekvensområde Oppdatering av variantdatabasen ved tolkning av benigne varianter Funksjon: <i>Primerdesign</i>
Superbruker	<p>Ukentlig:</p> <ul style="list-style-type: none"> Sjekk av aktive prøver Slett avglemte sekvenser i «Joining» <p>Månedlig:</p> <ul style="list-style-type: none"> Slett kansellerte pasientmapper og sjekk for ufullstendige pasientmapper <p>Etter behov:</p> <ul style="list-style-type: none"> Ta kontakt med IKT-koordinator, MTA og SeqPilot support Oppdatering av prosedyren Opplæring av nye brukere Funksjon: <i>Superbruker</i>
IKT-koordinator, MTA-Administrator	<ul style="list-style-type: none"> Oppdatering av programvaren Gir tilganger

Tabell 2: Tilgangsrettigheter i SeqPilot

Funksjon	Tilgangsrettigheter
User	<div style="border: 1px solid gray; padding: 5px;"> <p>User is authorised to:</p> <p><input type="checkbox"/> edit users</p> <p><input type="checkbox"/> edit masterfiles</p> <p><input type="checkbox"/> make medical validation</p> <p><input type="checkbox"/> delete orders</p> <p><input type="checkbox"/> edit scheduler</p> </div>

Analyst	<p>User is authorised to:</p> <input type="checkbox"/> edit users <input type="checkbox"/> edit masterfiles <input checked="" type="checkbox"/> make medical validation <input type="checkbox"/> delete orders <input type="checkbox"/> edit scheduler
Primerdesign	<p>User is authorised to:</p> <input type="checkbox"/> edit users <input checked="" type="checkbox"/> edit masterfiles <input checked="" type="checkbox"/> make medical validation <input type="checkbox"/> delete orders <input type="checkbox"/> edit scheduler
Superbruker	<p>User is authorised to:</p> <input checked="" type="checkbox"/> edit users <input checked="" type="checkbox"/> edit masterfiles <input checked="" type="checkbox"/> make medical validation <input checked="" type="checkbox"/> delete orders <input checked="" type="checkbox"/> edit scheduler

Tabell 3: Fordeling av arbeidsoppgaver i SeqPilot og Beaker ved analyse av sekvenser.

Type analyse	Labbers. 1	Labbers. 2	M-ansvarlig	Bestillingsper.	Legge inn svar	Verifisering	Skrive svarrapport
NGS lav dekning/ tilleggsanalyser	T.V.	M.V.	-	-	Enhet Generell, T.V.	Enhet Generell, M.V.	Enhet NGS
NGS Sjekk	T.V.	-	-	M.V.	Enhet Generell, T.V.*	Bestillingsperson	Bestillingsperson
Verifisering originalrør	T.V.	-	-	M.V.	Enhet Generell, T.V.*	Bestillingsperson	Bestillingsperson
Kjent variant	T.V.	-	-	-	Enhet Generell, T.V.	H-ansvarlig NB: M.V også	Enhet Generell, T.V. og signerer som M-ansvarlig**
Fullscreening	T.V.	M.V.	-	-	Enhet Generell, T.V.	H-ansvarlig	Enhet Generell, T.V.
cDNA-analyse	T.V.	-	M.V.	-	Enhet Generell, T.V.	H-ansvarlig	Enhet Generell, T.V.

*Sender oppfølgingsoppgave til personen som har bestilt analysen.

** Sender oppfølgingsoppgave til H-ansvarlig som går inn og M.V. før han ser over svaret, signerer og verifiserer

1. Overføring av sekvenseringsdata

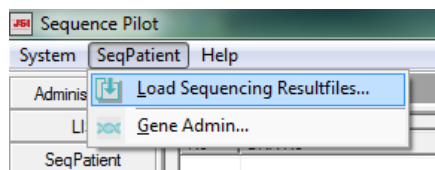
1.1. Automatisk overføring vha. «SeqPilot Verify»

For vurdering av NTC-kontroller, sjekk prosedyren: [Metode: Resultatbehandling; Seq Scanner 2-Vurdering av Kontaminasjonskontroll og Kvalitet på Sekvensering rådata](#) [Resultatbehandling; Seq Scanner 2-Vurdering av NTC, AMG](#)

Åpne programmet *SeqPilot Verify* og velg alle mapper som hører sammen: L:\Analysedata_MedGen\Analyseresultater_ABI3730\MedGen\Sekvensering. Velg alle primerpar ved å klikke «Ctrl + A» på tastatur og klikk på «Inspect». *SeqScanner2* vil da åpnes i et nytt vindu, som brukes for å vurdere alle NTC-kontroller. Deretter gå tilbake til *SeqPilot Verify* og trykk på «Export». Så flyttes alle tilhørende ABI-filer over til SeqPilot automatisk og oppsettet er dermed godkjent. Ved kontaminasjon av én eller flere NTC-kontroller skal tilsvarende filer ikke eksporteres til SeqPilot.

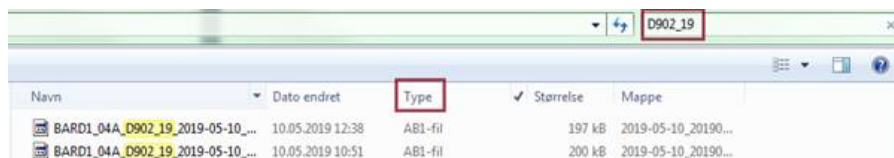
1.2. Manuell overføring

Dersom sekvenser har blitt slettet ved en feil eller hvis noen forventede sekvenser mangler, kan en når som helst laste dem opp manuelt. For å gjøre dette må en åpne fellesområdet «Analysedata (L:)» ved å trykke på «Load Sequencing Resultfiles ...» og «Destination: ABI files».



Figur 2: Manuell opplasting av nye sekvenseringsdata

Når man har funnet riktig mappe (f.eks. L:\Analysedata_MedGen\Analyseresultater_ABI3730\MedGen\Sekvensering), anbefales det å bruke søkefeltet på høyre side (pasient-ID, primer, dato) også filter-panelet (.ABI-fil). NB: NTC-filer skal ikke lastes opp.

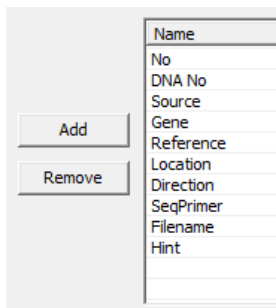


Figur 3: Filtring av analyseresultater

2. Joining

2.1. Innstillinger

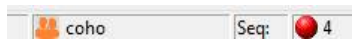
SeqPilot blir mer oversiktlig hvis du justerer programmet slik at bare nødvendig informasjon vises. Programmet lagrer brukerinnstillingene brukerspesifikk. Stå i «Joining», høyretrykk på øverste grå overskriftslinjen og deretter på «Manage table columns».



Figur 4: Anbefalte innstillinger (Joining)

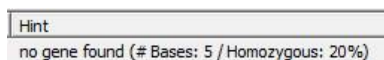
2.2. Basecalling

Under opplastingen kjøres en programintern basecaller. Man kan se om programmet fremdeles er opptatt ved å sjekke lyssignalet nederst på statuslinjen. Antallet resultatfiler reduseres gradvis, til et grønt signal indikerer at prosessen er ferdig. Deretter trykk på «Update».

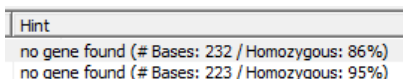


Dersom minimumskravet er oppfylt (minst antall baser som må være gådt lesbare i resultatfilen er 50) blir sekvenseringsdata lastet opp. Sekvenser som ikke blir funnet mens de blir sammenlignet med referansesekvens (gene-file + hg19) blir automatisk koblet til «Patient ID» som hos oss er det samme som «DNA No» (prøve-ID) og «SeqPrimer» (ekson).

Hvis sekvensen er for dårlig, f.eks. pga. leserammeskift kombinert med dårlig sekvenseringskvalitet, vil den vises i «Joining» på denne måten:

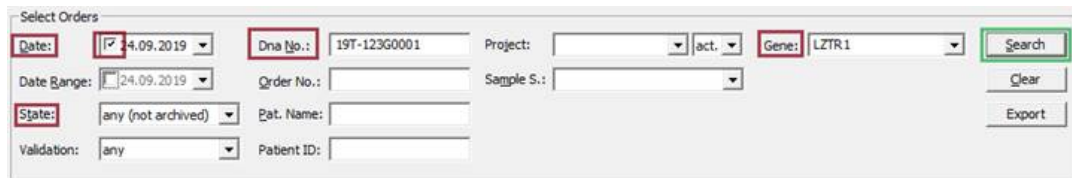


Hvis kvaliteten er bra, men filformatet ikke blir gjenkjent fordi det enten er feil i formateringen eller primeren ikke er lagt inn i primer-databasen, forblir sekvensen i «Joining» og merkes med et «Hint». I så fall må det informeres en valideringsansvarlig eller superbruker.



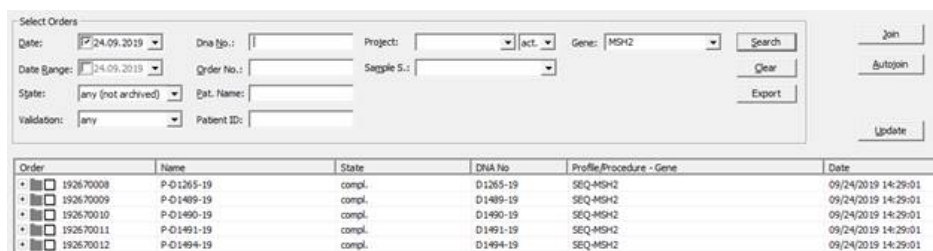
2.3. Worklist

«Worklist»-modul brukes til å søke etter ønsket sekvens, f.eks. «Pasient ID» eller «Gene». Man kan søke etter prøve-ID i «DNA no.» eller «Patient ID».



Figur 5: Betjeningsmodul for å filtrere pasientmapper. De røde rammene viser felt det kan være aktuelt å bruke.

Dersom man ønsker å analysere flere pasienter rett etter hverandre, kan man bruke dato og gen til å lage en arbeidsliste, som da vises under «Worklist»-modulen. Dette gjør det mulig å trykke på N-tasten eller klikke på «Next»-knappen i «Sequence»-vinduet uten å hoppe frem og tilbake innenfor programmet hele tiden.



Figur 6: Worklist lav dekning

3. Sequence

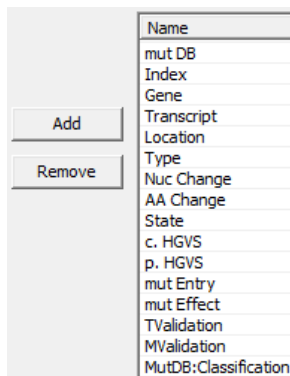
Analysevinduet åpnes enten ved å trykke på «Sequence» på venstre side eller ved å dobbeltklikke på pasienten i arbeidslisten. Her vises alle resultatene som tilhører samme pasient-ID (det vil si både DNA- og RNA-analyser). Før en starter å analysere kan det være lurt å først sjekke «Joining»-listen for sekvenser som ikke har blitt tilordnet automatisk. Dette er viktig fordi disse sekvensene ofte må bestilles om i LIMS, dersom en manuell tilordning også mislykkes.

3.1. Teknisk validering

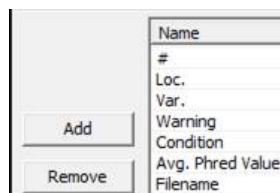
I den øvre delen, også kalt for «Variant table», vises alle varianter som SeqPilot har funnet. Det er viktig å huske at denne listen ikke er 100% pålitelig. Derfor må vi først redigere sekvensene og sjekke kvaliteten.

	Kjent sekvensvariant	Fullscreening
Flankerende sekvens	≥ 10 nt før og etter sekvensvariant Ved normal resultat (prediktiv) må være 2 sekvenser sekvensert.	≥ 20-30 nt før og etter exon * Varianter ±25 nt før og etter exon skal tolkes
Signal-to-noise	Ikke essensielt	Må være mindre enn ¼ av totale signalstyrken
Basecalls PHRED	>20	≥30
Visuell vurdering	Essensielt mtp mosaikk	Essensielt mtp mosaikk
Positiv kontroll	Ved varianter som ikke tidligere er påvist/analysert	Nei
Normal kontroll	Ved PND-prøver	Nei

Tabell 3: Oversikt over tekniske kvalitetskrav (T.V.) Det må alltid brukes skjønn ved vurdering av kvaliteten på sekvensene. Når vi for eksempel kun får opp sekvens en vei på normal prediktiv prøve må kvaliteten på denne sekvensen vurderes, og se på pasientens klinikk og type sykdom. Har vi kjørt positivt familiemedlemmer tidligere er det mindre sjanse for allel drop out. * med unntak av de fragmentene hvor ønskede analysekriterier ikke er oppfylt.



Figur 7: Anbefalte innstillinger (Variant table)

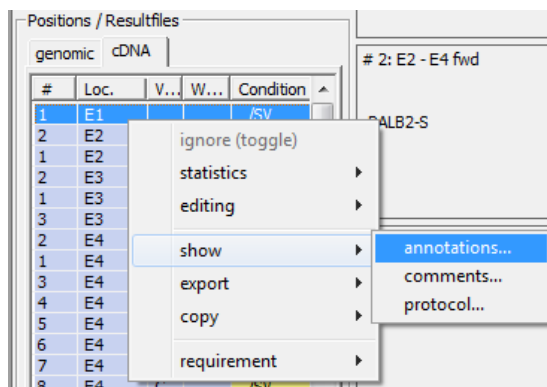


Figur 8: Anbefalte innstillinger (Resultfiles)

3.1.1. Kvalitetsvurdering:

For å evaluere kvalitet må en vurdere forskjellige kvalitetsparametere. SeqPilot har flere filtreringstrinn avhengig av kvalitet:

- Hvis sekvensen er kortere enn 50 bp, blir den ikke lastet opp i det hele tatt.
- Hvis sekvensen ikke kan tilordnes fordi intensiteten er for lav eller bakgrunnen for høy vil den vises i «Joining».
- «Avg Phred Value» viser den gjennomsnittlige PHRED-verdien beregnet for en resultatfil. PHRED tilsvarer QV og er et kvalitetsmål til identifisering av nukleobaser generert ved automatisert DNA-sekvensering. Verdien bør ligge over PHRED>10.
- Hvis sekvensen ikke godkjennes pga. dårlige PHRED-verdier vil den vises som «ignored». Dette må vurderes individuelt for hver eneste resultatfil og kan endres manuelt.
- Klikk på «annotations» for å evaluere signalintensitet og bakgrunn ved hjelp av konkrete tallverdier. For visualisering av rådata anbefales bruk av SeqScanner 2.



Figur 9: Signalstyrke av «resultfile» (annotations)

- I tillegg bør man alltid sjekke «peak height ratio»-diagrammet som skal hjelpe til å detektere baser med høy bakgrunn: blå → forward tråd, lilla → revers tråd.



Figur 10: Heterozygot variant til stede (merket rødt), ellers lite bakgrunn (peak height ratio)

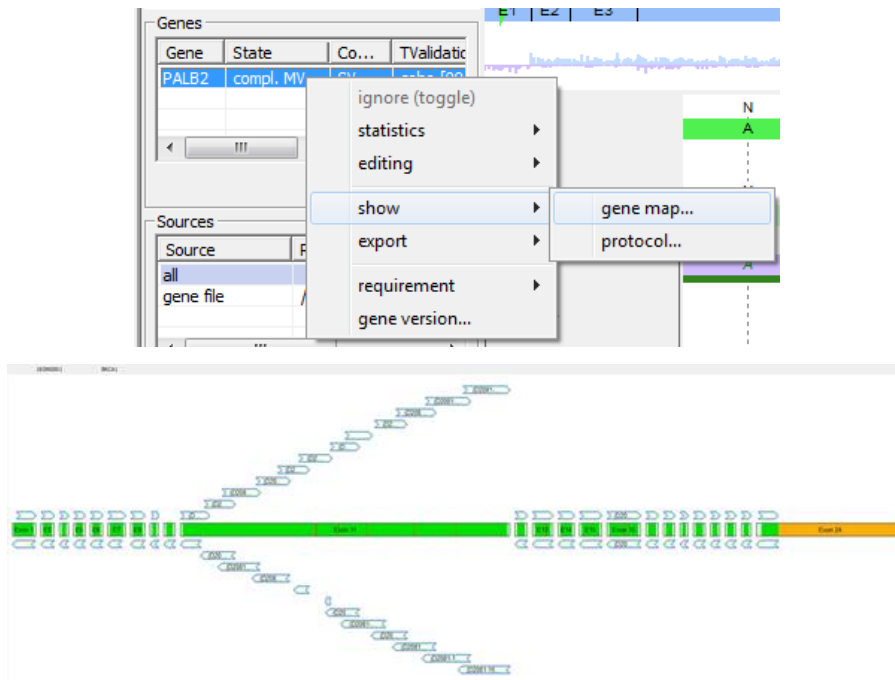


Figur 11: Ingen variant til stede, men høy bakgrunn (peak height ratio)

3.1.2. Gene map

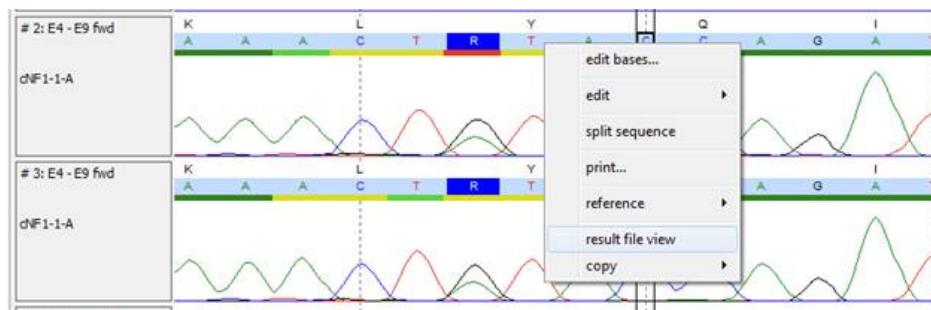
Ved analysering av fullscreening eller RNA er det nyttig å åpne disse to vinduene:

- «gene map»: gir oversikt over hele genet, primere og funn



Figur 12: Sekvensoversikt over hele genet (gene map)

- «result file view»: gir oversikt over primerovergang, dekning og enklere redigering av store eksoner eller ved mange omkjøringer.



Figur 13: Sekvensoversikt over hele eksonet (result file view)

3.1.3. Procedures

For RNA analyser og fullscreening er det opprettet «procedures». Disse tildeles automatisk når sekvensene lastes opp og indikerer når visse områder eller eksoner mangler. Dette kan overstyres ved å høyreklikke på genet som står i «Genes» tabellen → requirement → procedures.

Fraværet av forhåndsbestemte «SeqPrimer» vises oransje i «Resultfiles»-vinduet. I tillegg vil pasientmappen merkes som «incomplete». En liste med forklaring finnes under «Help → Conditions».

	E5		/PVQ
	E5		/PVQ
1	E6		/PVQ
	E6		QR
	E6		/IQ
	E7		M/PVQ
	E7		M/PVQ

Figur 14: R = required, I = ignored (og C = cancelled)

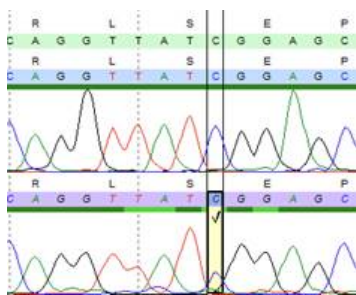
3.1.4. Editering

Som regel skal innstillingene opprettes slik at bare sekvensområder med god kvalitet vises. I utgangspunktet vises hele exon og +/-25bp før/etter fragmentet. Likevel kan det skje at sekvenser må redigeres før de kan valideres.

Ved å trykke M-tasten (mismatch) på tastatur ved gjennomsyn av sekvensene kommer man automatisk til neste reelle sekvensvariant eller artefakt. Flere tastatur-snarveier finnes i manualen.

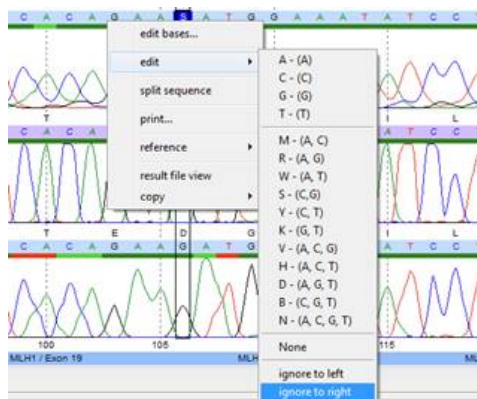
Avhengig av kvaliteten kan man vurdere følgende editeringsalternativer. Man kan f.eks.

- editere en enkelt «artefakt» ved å venstreklikke på den feilmerkede basen, dersom dette området er dekket av en annen sekvens med PHRED>20 på denne posisjonen:



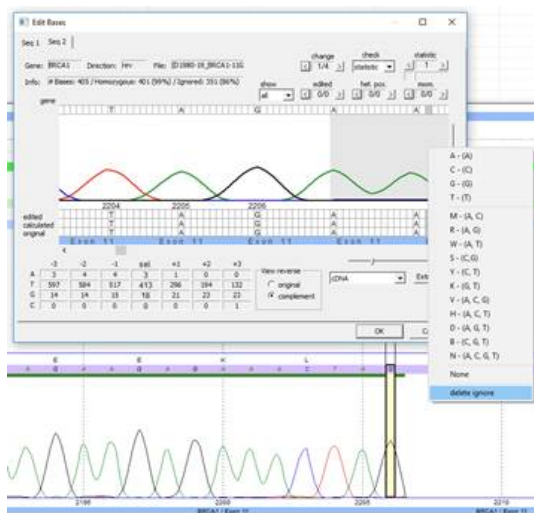
Figur 15: Etter editering av variant

- fjerne deler av sekvensen ved å høyreklikke på den posisjonen sekvensen skal ignoreres fra og trykke på «edit → ignore to left / right». Hvis man har overlappende amplikoner et det kun det avmerkede amplikonet som berøres. Dette anbefales spesielt for start- og sluttområder av sekvensen:



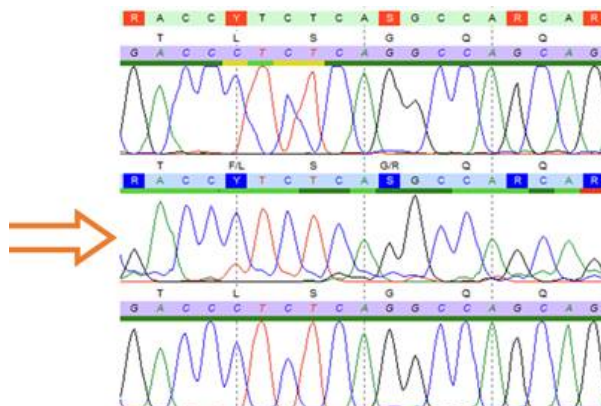
Figur 16: Eksempel på hvordan man kan «ignore» deler av en sekvens

- gjenopprette en ignorert sekvens dersom man har tatt bort feil del av sekvens ved å høyreklikke på slutten av sekvensen og velge «edit bases». Dette åpner et nytt vindu hvor man kan igjen høyreklikke på det grå området og velge «delete ignore». I «edit bases» vindu kan man også tilordne baser manuelt, som kan være en fordel i noen tilfeller.








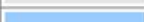
Figur 17: Eksempel på gjenoppretting av en ignorert sekvens

- ignorere hele sekvensen ved å høyreklikke på tilsvarende «resultfile» og velge «ignore». Dette anbefales hvis hele tråden har en dårlig sekvenseringskvalitet eller hvis sekvensen ikke skal inkluderes i analysen eller statistikken.



Figur 18: Eksempel på sekvens som kan vurderes å bli ignorert.

- Programmet sliter med å gjenkjenne store delesjoner. For å redusere antall foreslåtte varianter i «variant table» likevel, kan det være hjelpsomt å bruke «InDel-gaps»-funksjonen: høyreklikk på gen → editing → InDel-gaps. Skriv in «3» i begge de feltene der og trykk «OK».
- Man kan også deaktivere «frameshift» funksjon ved å høyreklikke på aktuelle ekson i «Positions / Resultfiles» → editing → frameshift analysis on/off.

Color	Description
	resultfile medically validated (S)
	resultfile required (Q) and/or resultfile repeated (R), but not loaded yet statistic warning (lower limit is overstep)
	resultfile ignored (I) statistic warning (upper limit is overstep)/warning missing bases
	resultfile required (Q), but cancelled (C)
	resultfile selected
	resultfile technically validated (V)

Figur 19: Fargemerker (Resultfiles).

3.1.5. Variantvurdering

Når alle eksoner er både editert og validert, kan man sjekke variantlisten igjen og merke de øvrige, godkjente variantene som reelle ved å hake av «mut DB». Disse blir da automatisk inkludert i den programinterne statistikken, som etter hvert vil lette både vurdering av sekvenser og deteksjon av varianter.

Obs: statistikken inneholder også prediktive/kontrollprøver.

mut DB	Index	Gene	Transcript	Location	Type	Nuc Change	AA Change	State	c.HGVs	p.HGVs	mut Entry	mut Effect	Tvalidation	Mvalidation	MutDB: Clas...
<input checked="" type="checkbox"/>	1	BRCA2	NM_000059.3	E2	C	G -> A (het)	S'UTR	SV	c.265>A		1/0 of 4		bog [07/19/2019 11:24:13]	coho [09/24/2019 15:54:16]	benign
<input checked="" type="checkbox"/>	2	BRCA2	NM_000059.3	E10	C	A -> C (het)	N -> H (372)	SV	c.1114A>C	p.Asn372>As	0/0 of 4		coho [07/23/2019 15:04:32]	coho [09/24/2019 15:54:16]	benign
<input checked="" type="checkbox"/>	3	BRCA2	NM_000059.3	E11	C	A -> G (het)	K -> K (1132)	SV	c.3396A>G	p.Lys1132=	1/0 of 4		coho [07/23/2019 15:04:02]	coho [09/24/2019 15:54:16]	benign
<input checked="" type="checkbox"/>	4	BRCA2	NM_000059.3	E11	C	A -> G (homo)	L -> L (1521)	SV	c.4563A>G	p.Leu1521=	2/0 of 4		coho [07/23/2019 15:04:02]	coho [09/24/2019 15:54:16]	benign
<input checked="" type="checkbox"/>	5	BRCA2	NM_000059.3	E11	C	G -> C (homo)	V -> V (2171)	SV	c.6513G>C	p.Val2171=	2/0 of 4		coho [07/23/2019 15:04:02]	coho [09/24/2019 15:54:16]	benign
<input checked="" type="checkbox"/>	6	BRCA2	NM_000059.3	E14	C	T -> C (homo)	V -> A (2466)	SV	c.7397T>C	p.Val2466Ala	4/0 of 4		bog [07/19/2019 13:58:23]	coho [09/24/2019 15:54:16]	undefined

Figur 20: Reelle varianter (Variant table)

Vær oppmerksom på følgende:

- Ikke reelle varianter skal ikke hakes av!
 - Programmet tar ikke hensyn til ekson-overganger. Derfor bør c.-posisjonene til de reelle variantene korrigeres tilsvarende når man analyserer RNA!

3.1.6. Advarsler

Under feltet «Resultfiles» er det to vassel-lamper: «bases» og «statistic».

Disse kan til sammen vise 4 forskjellige advarsler: «peak height, PHRED, missing bases and statistics»:

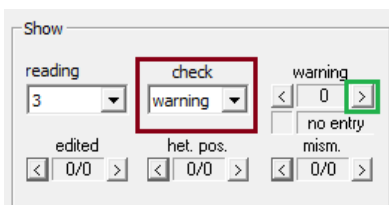
3.1.6.1. Bases:

Warning: I tilfelle det er posisjoner der peak height $H < 200$ eller average PHRED value $P < 10$ for en ABI-fil, skal det vises en «W» i det tilsvarende feltet i kolonnen «Warning», dessuten er «bases» merket oransje. Du kan sjekke disse posisjonene ved å velge «warning» i rullegardinen «check» og ved å trykke på pilene.

Missing bases: Hvis lampen «bases» lyser rødt betyr det at noen av de forventede basene mangler (sammenlignet med SeqPrimer-innstillingene).

#	Loc.	Dir	Warning	Co...	Bas	Zyg	HT	Am...
1	E2	fwd	W	/	270	het.	1+2	S3A
2	E2	rev	W	/	270	het.	1+2	S3A
	E3	fwd	W	/	276	het.	1+2	S3A
	E3	rev	W	A/	277	het.	1+2	S3A

Figur 21: Eksempel på P- eller H-advarsel.



Figur 22: Slik kan posisjonene sjekkes som er merket med en advarsel.

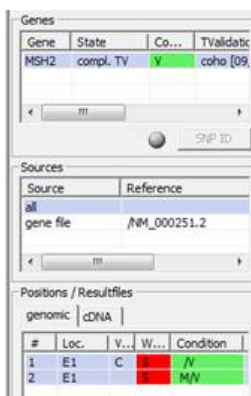
3.1.6.2. Statistikk:

SeqPilot har et eget varslingsystem som gir advarsler når de beregnede basene avviker for mye fra det statistiske gjennomsnittet (dissimilarity score: 0 - 10). Hvis scoren passerer den første grensen (20), gir programmet en advarsel ved å vise et «S» i det tilsvarende feltet i kolonnen «Warning» og farger den oransje. Hvis scoren passerer den andre grensen (40) vil det vises et rødt «S». Kun da er den tilsvarende posisjonen i elektroferogrammet merket grønt i tillegg.

3.1.7. Teknisk validering

Når man godkjenner sekvensene som tilhører til et ekson, trykker man på «T.V.»-knappen på venstre side som merker dermed hvert enkelt ekson som teknisk validert.

Dersom sekvensen er dårlig, IKKE trykk T.V. Bestill om i Beaker. I tillegg kan man om nødvendig legge inn kommentarer i det nedre feltet ved å klikke på det med en dobbeltklikk. Disse blir deretter lagret i pasient-mappen og er også synlige etter arkiveringen.



Figur 23: Eksempel på teknisk validering av et ekson.

3.1.8. Medisinsk validering

Når en har utført den medisinske valideringen, er analysen merket som «completed M.V.» og pasient-mappen arkiveres automatisk etter 30 dager. Den som har ansvaret for M.V. skal

- Visuelt verifisere funn og dens nomenklatur
- Kontrollere alle editerte posisjoner
- Sjekke for advarsler
- Sjekke for kommentarer

4. Gene Admin, SeqPrimer- og Mutation-masterfile

4.1. Gen-database

Selv om SeqPilot kan sammenligne ukjente sekvenser med referanse-genomet, blir det lettere for brukerne hvis man vedlikeholder gen-databasen. For å gjøre dette velges «SeqPatient → Gene Admin» i det øverste båndet:

- Trykk på «Extras → new gene».
- Velg «File ID: GenBank», skriv inn gennavnet i «Gene:»-feltet
- Vurder å tilpasse antall downstream-basepar og klikk på «browse...».
- NCBI-databasen vil åpne seg i et nytt browser-vindu og man skal da kopiere og lime inn alt som er merket lyseblått. Trykk «Save».

Name/Gene ID	Description	Location
<input type="checkbox"/> BRCA1 ID: 672	BRCA1 DNA repair associated [Homo sapiens (human)]	Chromosome 17 NC_000017.11 (43044295 43125364 complement)

Figur 24: NCBI informasjon til Gene Admin.

- Velg riktig «Transcript ID», dobbeltsjekk både start- og stoppkodon-posisjonene.
- Sjekk at antall exon stemmer og trykk «Save».
- Ved å velge «Extras → map to genome → hg19 → all current genes» er det nye genet på riktig vis lagt inn i gen-databasen.

4.2. Primer-database

Før en kan validere nye primere, må man opprette dem i primerdatabasen «SeqPrimer». Det finnes to muligheter. Enten bruker man en txt-mal som kan importere både S og A-primere eller man oppretter primerne manuelt:

- Skriv inn genet i «Gene:»-feltet med store bokstaver.
- Sjekk antall eksoner («Locations») og «Transkript ID».
- Velg det ønskete eksonet og tilpass «Seq Type: genomic / cDNA».
- Velg enten fwd. eller rev. i rullegardinen «Direction».
- Tilpass navnet i «Name»-feltet slik: gen-ekson-sekvenseringsretning, (f.eks. BRCA1-01-S)
- Trykk på «Add 1» knappen og deretter «Save».

Husk at det også gjelder spesielle formateringsregler for prøve-ID når en validerer nye gener eller primere ved hjelp av kontrollprøver: FDXX-YY-primernavn (f.eks. FD65-19-BRCA1). Alle ABI-resultatfiler ser sånn ut: (FD65-19-BRCA1_BRACA1-01-S)...

For UTR-områder bør det velges «Organism: hg19» slik at det vises som et eget 'fragment' under «Resultfiles» i «Sequence»-vinduet.

Act...	Name	Source	Gene	Direction	Location	Reference	Anal...	Seq Type
<input checked="" type="checkbox"/>	SMARCB1-UTR	chr range	chromo...	rev.	1[24176532..24176745]	hg19		genomic
<input checked="" type="checkbox"/>	AIP-04-A	gene file	AIP	rev.	E4[-25..25]	NM_003977.2		genomic

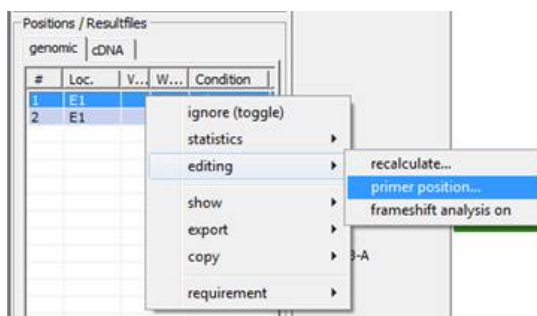
Figur 25: Eksempel på UTR-primer (SeqPrimer).

For cDNA-primere bør det velges «SeqType: cDNA» slik at intron-områder ikke vil vises i «Sequence»-vinduet.

Act...	Name	Source	Gene	Direction	Location	Reference	Anal...	Se...
<input checked="" type="checkbox"/>	cSTK11-S	gene file	STK11	fwd.	E1[1100..]-E3[.0]	NM_000455.4		cDNA
<input checked="" type="checkbox"/>	AIP-04-A	gene file	AIP	rev.	E4[-25..25]	NM_003977.2		genomic

Figur 26: Eksempel på cDNA-primere.

Under valideringen skal valideringsansvarlige bestemme sekvensområder («Locations») enda mer detaljert for å gjøre det lettere og tryggere å editere sekvensene under driften. Innstillingene kan sees i SeqPrimer-databasen, men det er mer hensiktsmessig å tilpasse disse innstillingene i «Sequence»-vinduet. Etter å ha lastet opp resultatfiler, bør man justere starten og slutten av sekvensene slik at det viste sekvensområdet er kun så langt som nødvendig, men likevel så kort som mulig. Som retningslinje gjelder +/-25 baser i intron-regionen. For mer detaljerte forklaringer om hvordan posisjonene beregnes, må en lese manualen.



Figur 27: Justering av SeqPrimer-området

Dersom man ønsker å importere flere primere samtidig, anbefales å åpne «Mal import SeqPrimer» (vedlegg). Skriv inn «gen, transcript ID, primernavn & ekson». I samme arket vil en liste med -S og -A primerne lages automatisk. Slett alle tomme linjer, lagre fanene GEN_S og GEN_A som txt-fil. Åpne SeqPilot (Seq. Primer master file) og velg «Import».

4.3. Mutation-database

For å påse at «benigne» (Class 1-Certainly not pathogenic) varianter vises i «variant table», kan en variant-liste importeres til mutasjons-databasen. Det finnes to forskjellige muligheter:

4.3.1 Tilføring av en benign variant

Åpne «Mal import benigne varianter» (vedlegg), skriv inn «gen, transcript ID & Nuc Name». Lagre som txt-fil. Åpne SeqPilot (Mutation master file) og trykk på «Import» og deretter OK. Til slutt må variantene mappes mot referansegenomet: «Extras→Map to genome→hg19→Map».

Når prosessen er ferdig («Saved genome...done»), kan vinduet lukkes og databasen er oppdatert.

4.3.2 Tilføring av en variantliste

For å gjøre dette må man først eksportere den komplette listen fra Alamut og formatere den på nytt ved å holde seg til malen nedenfor. Til slutt må variantene mappes mot referansegenomet:

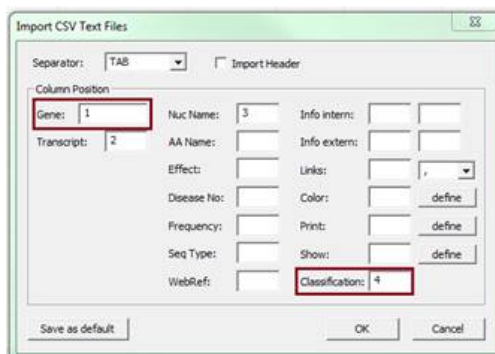
«Extras→Map to genome→hg19→Map».

Når prosessen er ferdig («Saved genome...done»), kan vinduet lukkes og databasen er oppdatert.

NB! Av hensyn til kvalitetssikring bør det kun importeres «benigne» varianter!

	A	B	C	D
4	AIP	NM_003977.2	c.516C>T	benign
5	AIP	NM_003977.2	c.*60G>C	benign
6	AKT1	NM_005163.2	c.*323G>A	benign
7	ALK	NM_004304.4	c.27C>G	benign

Figur 28: Mal import av varianter (.txt)



Figur 29: Tilpasning av malen ved import av flere gener (kolonne A→posisjon 1).

4.4. Fargemarkering

For å merke varianter som finnes ofte hos mange prøver, finnes det også en annen mulighet. I «Sequence»-vinduet kan man fremheve artefakter, benigne varianter og ROIs ved å legge til en kommentar eller velge en fargemarkering. Det anbefales å bruke begge deler:

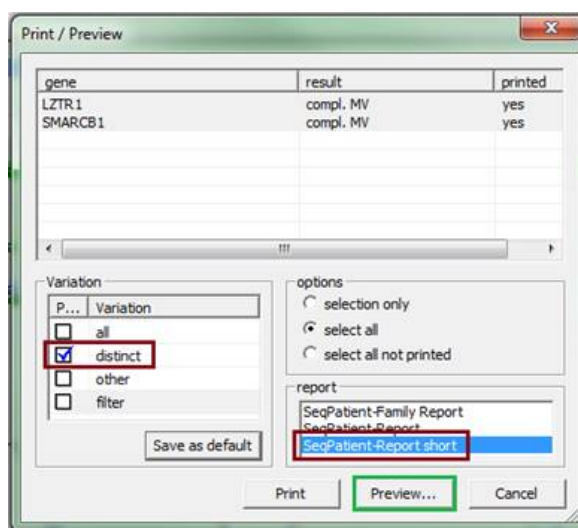
4.4.1. Mut Effect

- Velg tilsvarende variant i «variant table».
- Høyreklikk på den og velg «Add mut to DB».
- Skriv inn ønsket informasjon i «Mut Effect»-feltet, som skal vises i den tilsvarende kolonnen i «variant table». Trykk OK.

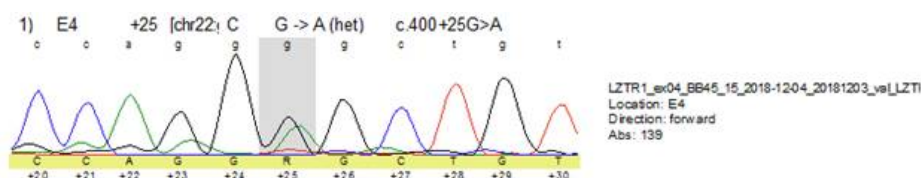
4.4.2. Local info

- Når man høyreklikker på den øverste grønne linjen (referansesekvens), velg «Reference→local info→ show». Her kan man legge inn en kort forklaring.
- Etter at noe ble lagt inn her, kan man høyreklikke på referansesekvensen igjen→»Reference→local info→ change». Til slutt kan man tilpasse fargemarkeringen og skrive inn en kort tekst eller kommentar som skal vises i det gule pop-up-vinduet.

Når en vil kopiere sekvenser til et valideringsark som også viser både prøve-ID og ekson, kan man trykke på «Print» og tilpasse innstillinger. Når man trykker på «Preview» vil det åpnes et nytt vindu hvor man ved hjelp av «Utklippingsverktøyet» (Windows applikasjon) kan klippe ut sekvenser.



Figur 30: Preview-dokument som rapporterer funn.



Figur 31: Eksempelsekvens som kan brukes til tolkningsark

5. Vedlikehold av programvaren

Siden superbrukerne skal være godt kjent med programmet, nevnes det ingen detaljer her, da disse er godt forklart i manualen.

5.1. Sletting av sekvensfiler (Joining)

Åpne pasientmappen ved å trykke på «+»-tegnet foran. Marker alle resultatfiler som skal slettes og velg «unjoin». I «Joining» kan sekvensene fullstendig slettes.

5.2. Sletting av pasientmapper (LIS)

Kriteriene for å slette resultatfiler i SeqPilot er:

- NTC kontaminert og ved en feil eksportert i SeqPilot
- Feil ekson var satt opp som ikke skulle analyseres
- Feil pasient var satt opp
- Prøveforbytting

Hvis man ønsker å slette en pasientmappe og alle inneliggende resultatfiler, må man først klikke på «order»-mappen og deretter «cancel order». Husk å rydde regelmessig i «LIS→ Orderlist» ved å fjerne haken fra «Date»-feltet og sortere etter «State: cancelled». Nå kan alle de kansellerte pasient-mappene slettes.

5.3. Sjekk for ufullstendige pasientmapper (Joining)

For å forhindre at ufullstendige analyser samler seg opp i programmet, sjekk at de automatisk valgte prosedyrene fungerer og for å unngå at ikke omkjøring av enkelte sekvenser blir avglemt, må en jevnlig filtrere etter «State: incomplete». Her kan det være nyttig å sjekke hver mappe individuelt og å endre statusen for individuelle resultatfiler om nødvendig ved å høyreklikke på disse og så velge «requirement→ cancel».

6. Når programmet har sluttet å virke

Det kan skje at SeqPilot har sluttet å virke. Det vil vises at programmet har stoppet å laste opp nye sekvenser eller at tilgang til enkelte pasientmapper blokkeres selv om den aktuelle brukeren har lukket programmet. I disse tilfellene må programmet startes på nytt på servernivå. For å kommunisere dette må vi først ta kontakt med IKT-koordinatoren. Hvis den ikke er tilgjengelig, kan vi kontakte MTA-teamet direkte - helst via telefon. Det er viktig å fremheve at meldingen handler om driftsstans.

7. Vedlegg

Under vedlegg finnes et dokument som beskriver hvordan vi ordner resultatene til MOL3101-kurset for NTNU i SeqPilot og et dokument med hvordan filnavn forandres til SeqPilot format før import inn i SeqPilot.

Relaterte dokumenter:

 [Resultatbehandling; Seq Scanner 2-Vurdering av NTC, AMG](#)

Relaterte vedlegg:

[Forandring av filnavn før import i SeqPilot](#)

[Mal import benigne varianter](#)

[Mal import SeqPrimer](#)

[Resultatbehandling av sekvensene til MOL3101](#)


1 Validering av sekvenseringsprimere																			
Gen- og primernavn																			
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																		
Valideringsperiode																			
Oppdragsgiver																			
Kontaktperson	Gen-ansvarlig ev. person involvert i design/bestilling.																		
Årsak til validering	Verifisering av variant/er påvist ved gen-panel. Dekke områder med lav dekningsgrad ved gen-panel. Primere for et nytt område på et kjent gen. Flytting av primer/e innenfor et kjent område på genet.																		
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																		
2 Valideringsresultater																			
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod/vev.																		
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table> <p>*Hvis mulig; ta med en kjent heterozygot variant *Ved DNA fra blod; 3 DNA-prøver derav 1 med kjent variant hvis mulig. *Ved DNA fra vev; samme som over og i tillegg 3 vevsprøver. *Når en primer flyttes; en prøve fra hver potensielt kjent familievariant i aktuelt fragment inkluderes.</p> <p>Ved eventuelt funn (kl 3/4/5) i blodbankprøver skal dette følges opp. Ta kontakt med fagansvarlig.</p>	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat															
Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat																	
Arkivering av resultater	Angi hvor resultatene er lagret (adresse for mappe).																		
3 Implementering																			
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Ja/Nei • SeqPilot-templat: Ja/Nei • Genetikportalen: Ja/Nei 																		
Laborieredatasytem	Primer legges inn i LIMS: Ja/Nei (følg rutine for melding)																		
Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Ja/Nei • Primere lagt inn i primerliste for robot: Ja/Nei • Skal gamle primere kastes: Ja (spesifiser)/Nei 																		
4 Konklusjon																			
Vurdering av validering. For kvalitetsparametere se nederst	Akseptert eller ikke? Tilfredsstillende? Konkluder																		
Validert dato																			
5 Godkjenning																			
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:																			

Kontaktperson	Gen-ansvarlig ev. person involvert i design/bestilling.
Validering utført av	Person utført lab. + Person utført analyse
Resultatene kontrollert av	Person som godkjenner resultatene og konklusjonen.
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator

Malen kan brukes ved følgende valideringer:

- Nye primere som tilhører eksisterende analyser, men som er endret/flyttet.
- Nye primere for verifisering av funn og ved lav dekning fra NGS-sekvensering (følg rutine for verifisering av funn).
- Nye primere til prediktiv test av varianter i gen som screenes med NGS.
- Nye primere som gir kortere produkt for deteksjon av varianter i DNA fra parafininnstøpt vev.
- Nye primere til analyse av varianter ved PND (Pre Natal Diagnostikk).
- Som supplerende til valideringsrapport for nye gen-analyser der det skal valideres nye sekvenseringsprimere

Fremgangsmåte validering av primere

1. Detaljert informasjon om ønsket primer/primere leveres til kvalifisert personell som designer primere.
2. Primere designes og bestilles, se  Primere; Design og bestilling, MedGen Lab.
3. Valideringsplan lagres i valideringsmappe for aktuelt gen.
4. DNA fra 3 blodbankprøver eller fra 2 blodbankprøver og en pasientprøve med en kjent heterozygot variant analyseres (se pkt c) for vev).
 - a. Ved verifisering av variant funnet ved NGS, skal det alltid settes opp analyse med DNA fra originalrør.
 - b. Ved verifisering av ny prediktiv variant, bør det settes opp analyse med DNA fra indeks-person (med funn).
 - c. Ved verifisering av variant som også skal benyttes på DNA fra parafininnstøpt vev, bør 2 normalvev og en prøve med varianten (helst fra vev) analyseres i tillegg til 2 blodbankprøver og blodprøve med den aktuelle heterozygote varianten
 - d. Ved flytting av etablerte primere skal det inkluderes prøver med kjente sekvensvarianter i det aktuelle fragmentet om dette er tilgjengelig
5. Hvis resultatene ikke er tilfredsstillende, gjentas analysen for gjeldende primerpar med ny fortykning av bruksløsning som settes opp sammen med den første fortykningen for å se om det er kontaminering eller feil ved fortykning. Ved svært lave sekvenser og mistanke om lav konsentrasjon på nye primere, kan det måles konsentrasjon på Nanodrop (velg innstillingen ssDNA (single stranded DNA). Ved mistanke om feil på primer, sendes dokumentasjon på dette til primer-leverandør (Bionordika; info@bioberg.no med kopi til herman@bionordika.no).
6. Valideringsskjema for enkeltprimere ferdigstilles av den som analyserer sekvensene, lagres i gen-mappe og godkjennes via høringsrunde(r) i EQS for tilhørende primeroversikt.

Kvalitetsparametre til godkjenning av Sanger sekvenseringer ved validering av primere

- Vurdering av rådata
 - o Intensitet av fluorescens-signalet:

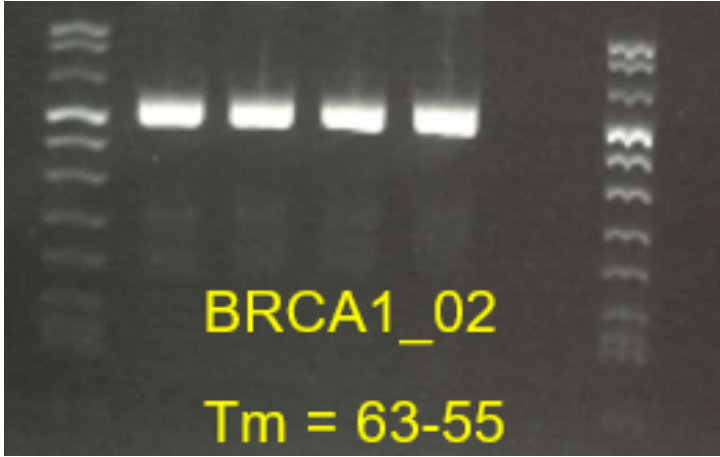
- ABI3730: 500-10000 rfus
 - Strukturartefakter
 - Unormale topper (peaks)
 - Tilblanding av andre PCR-produkt (krysskontaminering)
 - Primerrester
- Sekvensene: Visuell vurdering av «base calling» kvaliteten
 - Regelmessig base spacing (G-rike regioner kan være tettere)
 - Jevne høyde på toppene (Peak height)
 - Lave topper pga bakgrunnsstøy.
- Kvalitetsverdiene – QV- (gjennomsnitt for et definert område) må være
 - ≥ 20 hvis en har to sekvensert tråder
 - ≥ 30 hvis en har sekvensert kun en tråd

Oversikt over kvalitetskravene

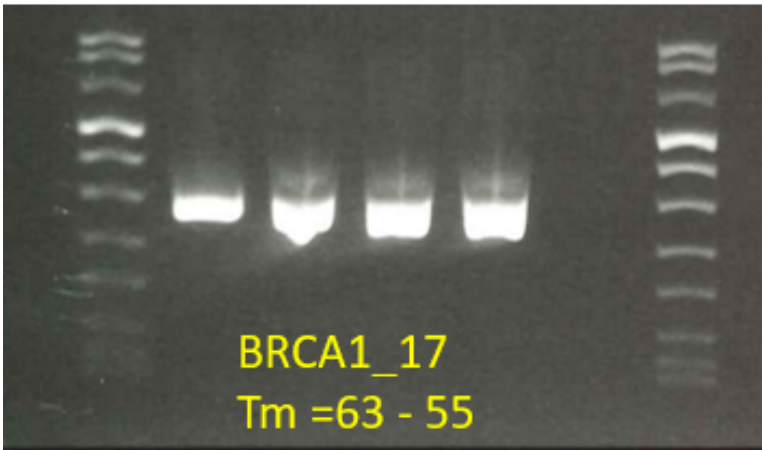
	Prediktiv/kontrollprøve/kjent sekvensvariant	Fullscreening/Mutasjonsscreening
Flankerende sekvens	≥ 10 nt før og etter sekvensvariant	$\geq 20-30$ nt før og etter exon*
Signal-to-noise	Ikke essensielt	Må være mindre enn 1/4 av totale signalstyrken
Basecalls QV	> 20	≥ 30
antall sekvenserte tråder	en vei, når det verifiseres en kjent variant somatiske varianter: to veier essensielt	QV ≥ 20 hvis en har sekvensert to veier QV ≥ 30 hvis en har sekvensert kun en vei
visuell vurdering	essensielt	

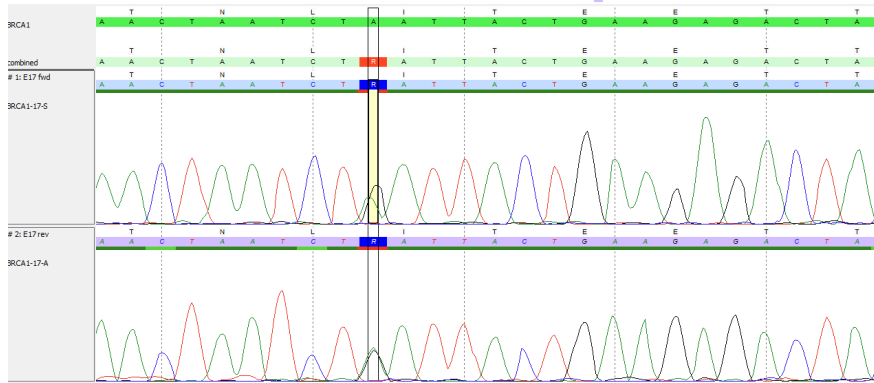
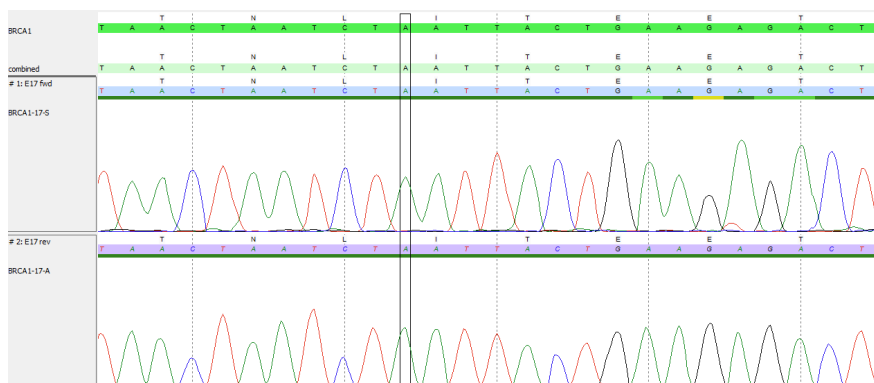
*med unntak av de fragmentene hvor ønskede analysekriterier ikke er oppfylt.

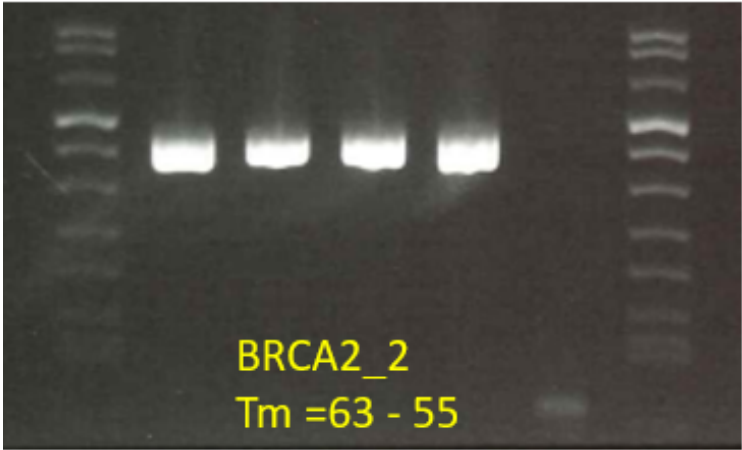
Referanse: Ellard et al. 2016, Practice guidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation. Association for Clinical Genetic Science (ACGS).

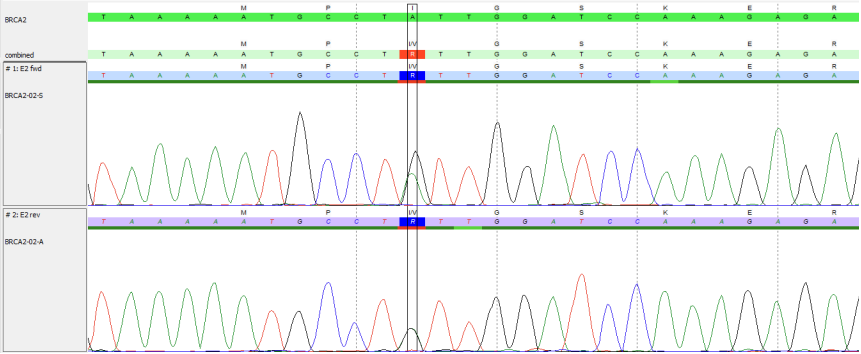
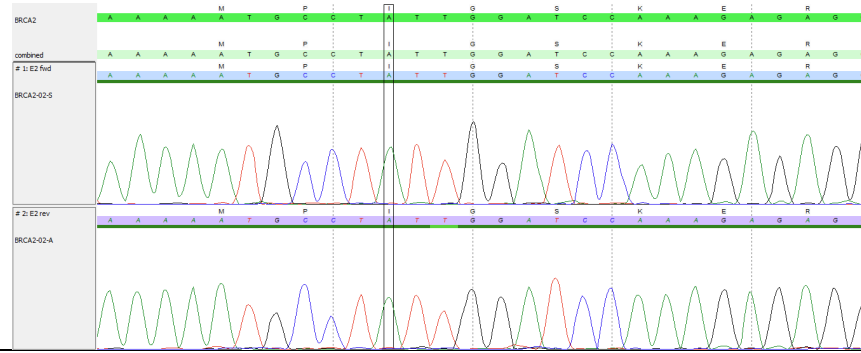
1 Validering av sekvenseringsprimere																									
Gen- og primernavn	BRCA1_02																								
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																								
Valideringsperiode	Våren 2023																								
Oppdragsgiver	AMG																								
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen																								
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA1.																								
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																								
2 Valideringsresultater																									
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																								
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA1-2</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA1-2</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA1-2</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA1-2</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant A</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Std. VIII; gelbrønn 1 og 7</p> 	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.	BB-ktr1-BRCA1-2	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA1-2	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA1-2	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA1-2	Originalrør	Variant A	5	NTC	Ingen	Godkjent	6
Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.																						
BB-ktr1-BRCA1-2	Fortynningsrør	Villtype	2																						
BB-ktr2-BRCA1-2	Fortynningsrør	Villtype	3																						
BB-ktr3-BRCA1-2	Fortynningsrør	Villtype	4																						
Pos-ktr-BRCA1-2	Originalrør	Variant A	5																						
NTC	Ingen	Godkjent	6																						
Arkivering av resultater	<p>Pos.ktr</p> <table border="0"> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030002</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr1-BRCA1-2</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr1-BRCA1-2</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:33:36</td> </tr> </table> <table border="0"> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030005</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr2-BRCA1-2</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr2-BRCA1-2</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:32:43</td> </tr> </table> <table border="0"> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030008</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr3-BRCA1-2</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr3-BRCA1-2</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:33:09</td> </tr> </table>	Order No:	231030002	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA1-2	DNA No.:	BB-ktr1-BRCA1-2	Date:	04/13/2023 08:33:36	Order No:	231030005	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA1-2	DNA No.:	BB-ktr2-BRCA1-2	Date:	04/13/2023 08:32:43	Order No:	231030008	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA1-2	DNA No.:	BB-ktr3-BRCA1-2	Date:	04/13/2023 08:33:09
Order No:	231030002																								
Patient:	P-BB-ktr1-BRCA1-2																								
DNA No.:	BB-ktr1-BRCA1-2																								
Date:	04/13/2023 08:33:36																								
Order No:	231030005																								
Patient:	P-BB-ktr2-BRCA1-2																								
DNA No.:	BB-ktr2-BRCA1-2																								
Date:	04/13/2023 08:32:43																								
Order No:	231030008																								
Patient:	P-BB-ktr3-BRCA1-2																								
DNA No.:	BB-ktr3-BRCA1-2																								
Date:	04/13/2023 08:33:09																								

3 Implementering	
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikkportalen: Nei
Laboratoriedatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere
Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere • Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere • Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA1-02</p> <p>BB-ktr1-BRCA1-02</p>
Validert dato	13.04.23
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen og Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

1 Validering av sekvenseringsprimere																																					
Gen- og primernavn	BRCA1_17																																				
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																																				
Valideringsperiode	Våren 2023																																				
Oppdragsgiver	AMG																																				
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen																																				
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA1.																																				
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																																				
2 Valideringsresultater																																					
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																																				
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA1-17</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA1-17</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA1-17</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA1-17</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant B</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.	BB-ktr1-BRCA1-17	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA1-17	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA1-17	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA1-17	Originalrør	Variant B	5	NTC	Ingen	Godkjent	6												
	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.																																	
	BB-ktr1-BRCA1-17	Fortynningsrør	Villtype	2																																	
	BB-ktr2-BRCA1-17	Fortynningsrør	Villtype	3																																	
	BB-ktr3-BRCA1-17	Fortynningsrør	Villtype	4																																	
	Pos-ktr-BRCA1-17	Originalrør	Variant B	5																																	
	NTC	Ingen	Godkjent	6																																	
* Std. VIII: Gelbrønn 1 og 7																																					
																																					
Arkivering av resultater	<p>Pos ktr</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231080001</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr-1-BRCA1-17</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr-1-BRCA1-17</td> <td>Date:</td> <td>04/18/2023 08:15:08</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/18/2023 08:15:17</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231080002</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr-2-BRCA1-17</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr-2-BRCA1-17</td> <td>Date:</td> <td>04/18/2023 08:15:09</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/18/2023 08:15:09</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231080003</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr-3-BRCA1-17</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr-3-BRCA1-17</td> <td>Date:</td> <td>04/18/2023 08:15:10</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/18/2023 08:15:10</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Order No:	231080001	Patient:	P-BB-ktr-1-BRCA1-17	DNA No.:	BB-ktr-1-BRCA1-17	Date:	04/18/2023 08:15:08	Date:	04/18/2023 08:15:17			Order No:	231080002	Patient:	P-BB-ktr-2-BRCA1-17	DNA No.:	BB-ktr-2-BRCA1-17	Date:	04/18/2023 08:15:09	Date:	04/18/2023 08:15:09			Order No:	231080003	Patient:	P-BB-ktr-3-BRCA1-17	DNA No.:	BB-ktr-3-BRCA1-17	Date:	04/18/2023 08:15:10	Date:	04/18/2023 08:15:10		
Order No:	231080001	Patient:	P-BB-ktr-1-BRCA1-17																																		
DNA No.:	BB-ktr-1-BRCA1-17	Date:	04/18/2023 08:15:08																																		
Date:	04/18/2023 08:15:17																																				
Order No:	231080002	Patient:	P-BB-ktr-2-BRCA1-17																																		
DNA No.:	BB-ktr-2-BRCA1-17	Date:	04/18/2023 08:15:09																																		
Date:	04/18/2023 08:15:09																																				
Order No:	231080003	Patient:	P-BB-ktr-3-BRCA1-17																																		
DNA No.:	BB-ktr-3-BRCA1-17	Date:	04/18/2023 08:15:10																																		
Date:	04/18/2023 08:15:10																																				

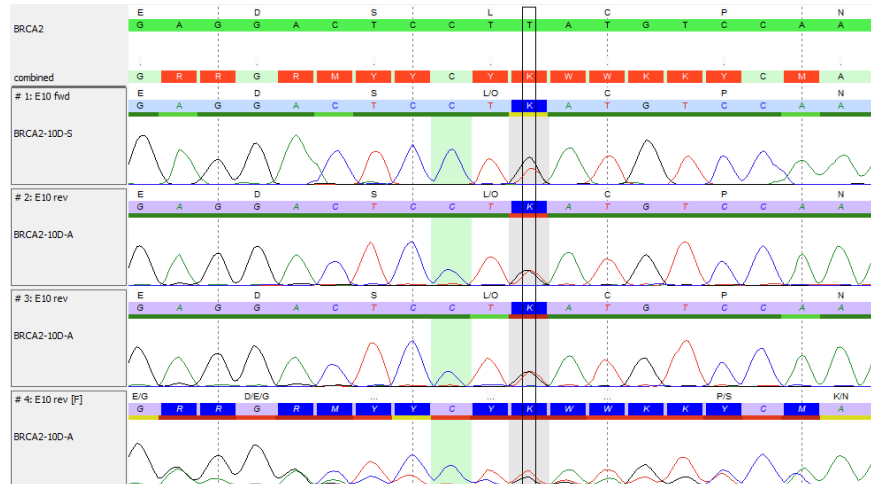
3 Implementering	
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikkportalen: Nei
Laboratoriedatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere
Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere • Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere • Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA1-17</p>  <p>BB-ktr1-BRCA1-17</p> 
Validert dato	18.04.23
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen og Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

1 Validering av sekvenseringsprimere																													
Gen- og primernavn	BRCA2_02																												
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																												
Valideringsperiode	Våren 2023																												
Oppdragsgiver	AMG																												
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen																												
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																												
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																												
2 Valideringsresultater																													
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																												
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-02</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-02</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-02</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-02</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant C</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr	BB-ktr1-BRCA2-02	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA2-02	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA2-02	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA2-02	Originalrør	Variant C	5	NTC	Ingen	Godkjent	6				
	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr																									
	BB-ktr1-BRCA2-02	Fortynningsrør	Villtype	2																									
	BB-ktr2-BRCA2-02	Fortynningsrør	Villtype	3																									
	BB-ktr3-BRCA2-02	Fortynningsrør	Villtype	4																									
	Pos-ktr-BRCA2-02	Originalrør	Variant C	5																									
	NTC	Ingen	Godkjent	6																									
* Std VIII: Gelbrønn 1 og 7																													
																													
Arkivering av resultater	<p>Pos ktr</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030015</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr-1-BRCA2-2</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr-1-BRCA2-2</td> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:34:12</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:35:22</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030018</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr-2-BRCA2-2</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr-2-BRCA2-2</td> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:34:34</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030021</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr-3-BRCA2-2</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr-3-BRCA2-2</td> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:34:56</td> </tr> </tbody> </table>	Order No:	231030015	Patient:	P-BB-ktr-1-BRCA2-2	DNA No.:	BB-ktr-1-BRCA2-2	Date:	04/13/2023 08:34:12	Date:	04/13/2023 08:35:22			Order No:	231030018	Patient:	P-BB-ktr-2-BRCA2-2	DNA No.:	BB-ktr-2-BRCA2-2	Date:	04/13/2023 08:34:34	Order No:	231030021	Patient:	P-BB-ktr-3-BRCA2-2	DNA No.:	BB-ktr-3-BRCA2-2	Date:	04/13/2023 08:34:56
Order No:	231030015	Patient:	P-BB-ktr-1-BRCA2-2																										
DNA No.:	BB-ktr-1-BRCA2-2	Date:	04/13/2023 08:34:12																										
Date:	04/13/2023 08:35:22																												
Order No:	231030018	Patient:	P-BB-ktr-2-BRCA2-2																										
DNA No.:	BB-ktr-2-BRCA2-2	Date:	04/13/2023 08:34:34																										
Order No:	231030021	Patient:	P-BB-ktr-3-BRCA2-2																										
DNA No.:	BB-ktr-3-BRCA2-2	Date:	04/13/2023 08:34:56																										
3 Implementering																													
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikportalen: Nei 																												

Laboratoriedatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere
Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA2-02</p>  <p>BB-ktr-1-BRCA2-02</p> 
Validert dato	13.04.23
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen og Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

1 Validering av sekvenseringsprimere																			
Gen- og primernavn	BRCA2_10D-indsek-A																		
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																		
Valideringsperiode	Våren 2023																		
Oppdragsgiver	AMG																		
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen																		
Årsak til validering	Design av indre sekvenseringsprimer for å unngå poly-T-område og oppnå bedring dekning av BRCA2_10D.																		
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																		
2 Valideringsresultater																			
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																		
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-10D-sek-A</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-10D-sek-A</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-10D-sek-A</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-10D-sek-A</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant D</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> </tr> </tbody> </table>	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	BB-ktr1-BRCA2-10D-sek-A	Fortynningsrør	Villtype	BB-ktr2-BRCA2-10D-sek-A	Fortynningsrør	Villtype	BB-ktr3-BRCA2-10D-sek-A	Fortynningsrør	Villtype	Pos-ktr-BRCA2-10D-sek-A	Originalrør	Variant D	NTC	Ingen	Godkjent
Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat																	
BB-ktr1-BRCA2-10D-sek-A	Fortynningsrør	Villtype																	
BB-ktr2-BRCA2-10D-sek-A	Fortynningsrør	Villtype																	
BB-ktr3-BRCA2-10D-sek-A	Fortynningsrør	Villtype																	
Pos-ktr-BRCA2-10D-sek-A	Originalrør	Variant D																	
NTC	Ingen	Godkjent																	
Arkivering av resultater	<p>Pos ktr</p> <div style="border: 1px solid #ccc; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> Order No: 231080004 Patient: P-BB-ktr1-BRCA2-10D-s ... DNA No.: BB-ktr1-BRCA2-10D-sek-A Date: 04/18/2023 08:15:18 </div> <div style="border: 1px solid #ccc; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> Order No: 231080005 Patient: P-BB-ktr2-BRCA2-10D-s ... DNA No.: BB-ktr2-BRCA2-10D-sek-A Date: 04/18/2023 08:15:13 </div> <div style="border: 1px solid #ccc; padding: 5px;"> Order No: 231080006 Patient: P-BB-ktr3-BRCA2-10D-s ... DNA No.: BB-ktr3-BRCA2-10D-sek-A Date: 04/18/2023 08:15:15 </div>																		
3 Implementering																			
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikportalen: Nei 																		
Laboratoriedatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere																		
Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere • Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere • Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere 																		
4 Konklusjon																			
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Det ble testet ut to alternativer for indre sekvenseringsprimer. Alternativ 1 (BRCA2_10D-sek-A) har lavere signalstyrke enn alternativ 2 (BRCA2_10D-indsek-A). Se utklipp «Comments» under. Valideringen godkjennes for BRCA_10D-indsek-A.</p>																		

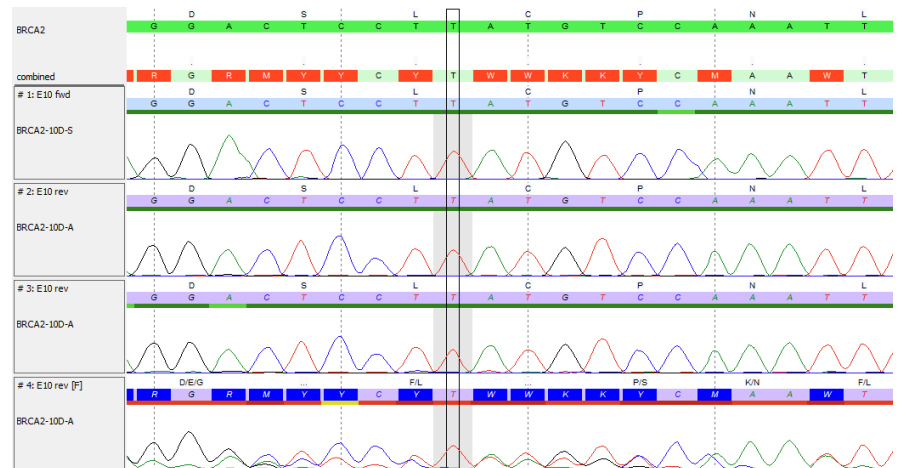
Pos-ktr-BRCA2-10D-sek-A



Comments

1 = 317, 446, 700, 432 / 740, 1029, 1680, 1044
2 = 1483, 1979, 3475, 2051

BB-ktr1-BRCA2-10D-sek-A

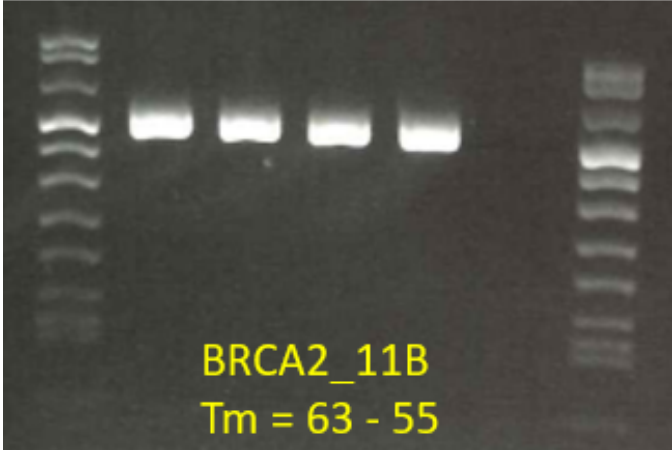


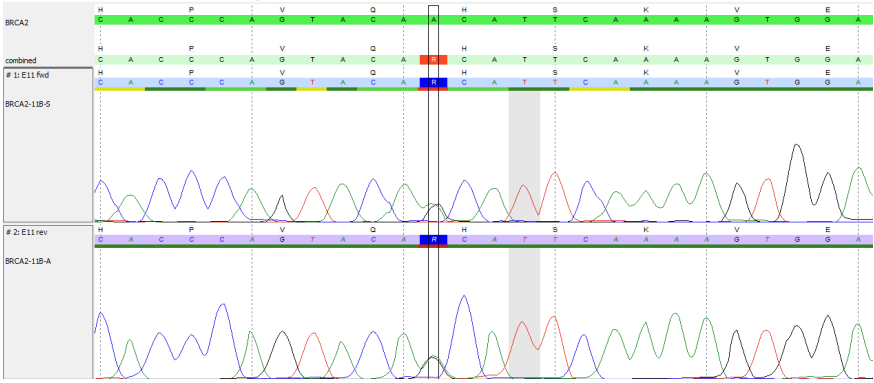
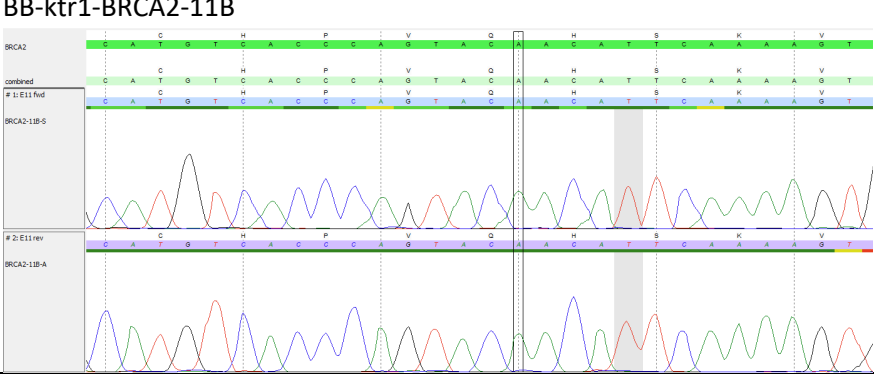
Validert dato 04.05.23

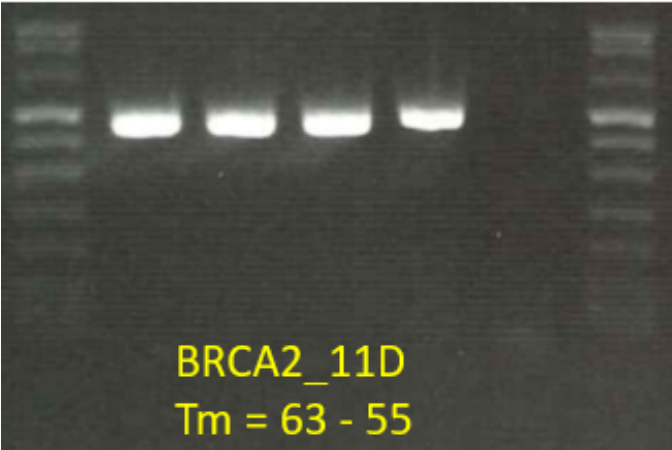
5 Godkjenning

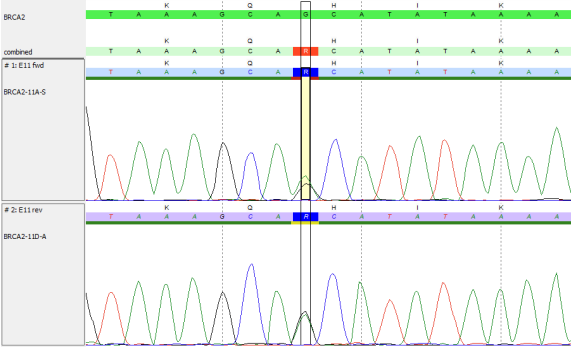
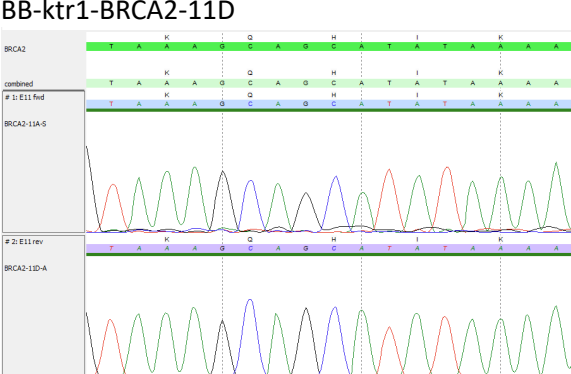
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:

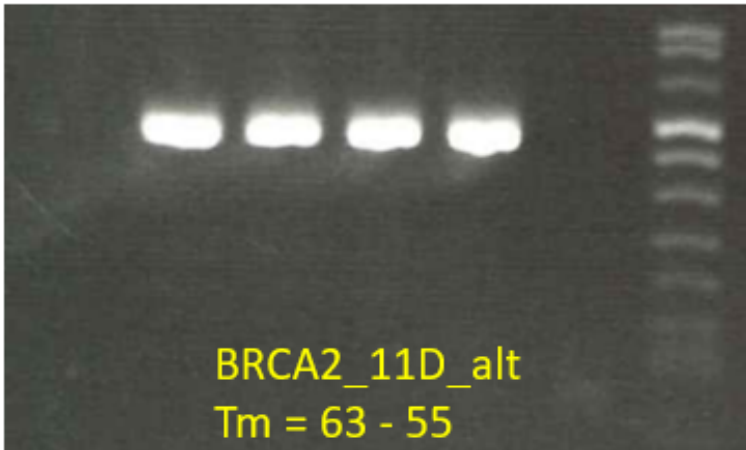
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen og Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

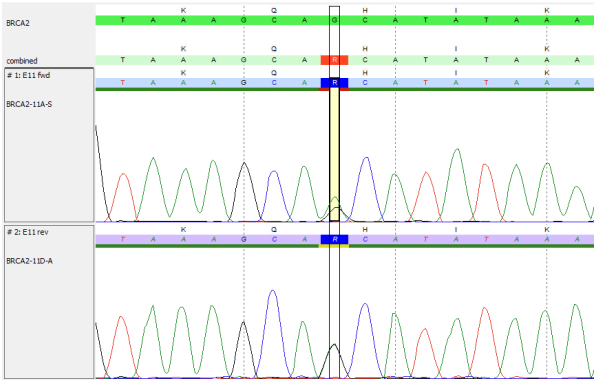
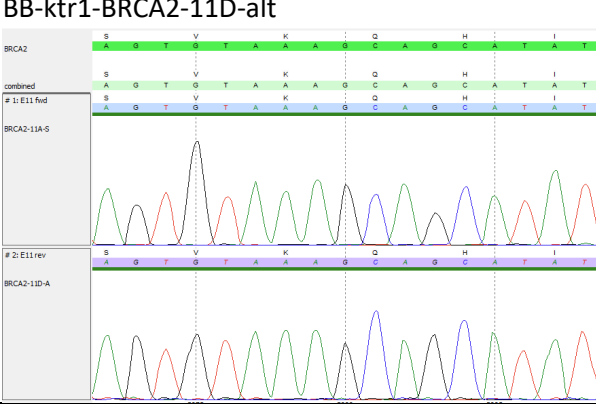
1 Validering av sekvenseringsprimere																													
Gen- og primernavn	BRCA2_11B																												
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																												
Valideringsperiode	Våren 2023																												
Oppdragsgiver	AMG																												
Kontaktperson	Eva K. Svaasand																												
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																												
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																												
2 Valideringsresultater																													
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																												
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-11B</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-11B</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-11B</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-11B</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant E</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.	BB-ktr1-BRCA2-11B	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA2-11B	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA2-11B	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA2-11B	Originalrør	Variant E	5	NTC	Ingen	Godkjent	6				
	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.																									
	BB-ktr1-BRCA2-11B	Fortynningsrør	Villtype	2																									
	BB-ktr2-BRCA2-11B	Fortynningsrør	Villtype	3																									
	BB-ktr3-BRCA2-11B	Fortynningsrør	Villtype	4																									
	Pos-ktr-BRCA2-11B	Originalrør	Variant E	5																									
	NTC	Ingen	Godkjent	6																									
*Std. VIII: Gelbrønn 1 og 7																													
																													
Arkivering av resultater	<p>Pos ktr</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230860032</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr1-BRCA2-11B</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr1-BRCA2-11B</td> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:33:19</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:33:30</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230860034</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr2-BRCA2-11B</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr2-BRCA2-11B</td> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:33:23</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230860036</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr3-BRCA2-11B</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr3-BRCA2-11B</td> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:33:27</td> </tr> </tbody> </table>	Order No:	230860032	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-11B	DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-11B	Date:	03/27/2023 13:33:19	Date:	03/27/2023 13:33:30			Order No:	230860034	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-11B	DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-11B	Date:	03/27/2023 13:33:23	Order No:	230860036	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-11B	DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11B	Date:	03/27/2023 13:33:27
Order No:	230860032	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-11B																										
DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-11B	Date:	03/27/2023 13:33:19																										
Date:	03/27/2023 13:33:30																												
Order No:	230860034	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-11B																										
DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-11B	Date:	03/27/2023 13:33:23																										
Order No:	230860036	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-11B																										
DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11B	Date:	03/27/2023 13:33:27																										

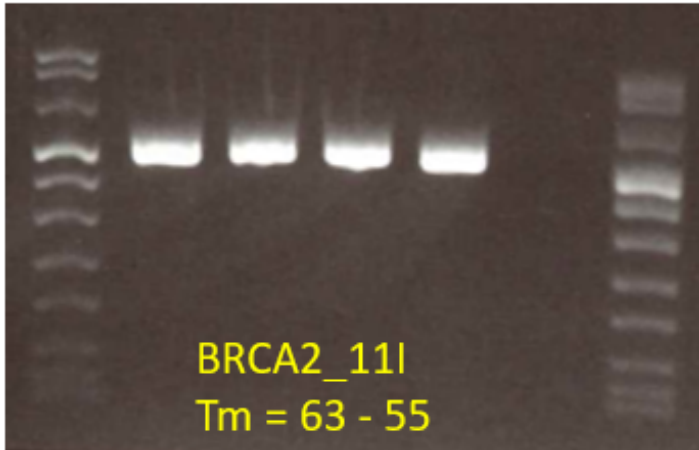
3 Implementering	
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikportalen: Nei
Laborieredatasytem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere
Primer-oppevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere • Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere • Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA2-11B</p>  <p>BB-ktr1-BRCA2-11B</p> 
Validert dato	27.03.23
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

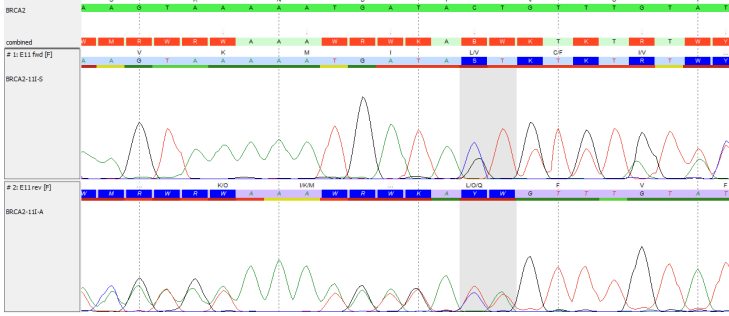
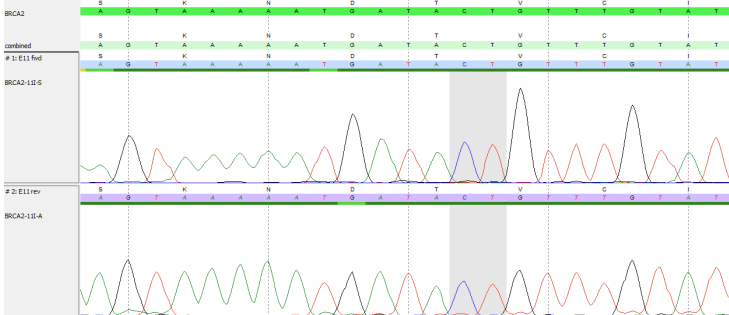
1 Validering av sekvenseringsprimere																									
Gen- og primernavn	BRCA2_11D																								
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																								
Valideringsperiode	Våren 2023																								
Oppdragsgiver	AMG																								
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen																								
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																								
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																								
2 Valideringsresultater																									
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																								
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-11D</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-11D</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-11D</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-11D</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant F</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.	BB-ktr1-BRCA2-11D	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA2-11D	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA2-11D	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA2-11D	Originalrør	Variant F	5	NTC	Ingen	Godkjent	6
	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.																					
	BB-ktr1-BRCA2-11D	Fortynningsrør	Villtype	2																					
	BB-ktr2-BRCA2-11D	Fortynningsrør	Villtype	3																					
	BB-ktr3-BRCA2-11D	Fortynningsrør	Villtype	4																					
	Pos-ktr-BRCA2-11D	Originalrør	Variant F	5																					
	NTC	Ingen	Godkjent	6																					
*Std VIII: Gelbrønn 1 og 7																									
																									
Arkivering av resultater	Pos ktr <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230880002</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr 1-BRCA2-11D</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr 1-BRCA2-11D</td> <td>Date:</td> <td>03/29/2023 11:08:00</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230880004</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr 2-BRCA2-11D</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr 2-BRCA2-11D</td> <td>Date:</td> <td>03/29/2023 11:08:02</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230880010</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr 3-BRCA2-11D</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr 3-BRCA2-11D</td> <td>Date:</td> <td>03/29/2023 11:37:55</td> </tr> </tbody> </table>	Order No:	230880002	Patient:	P-BB-ktr 1-BRCA2-11D	DNA No.:	BB-ktr 1-BRCA2-11D	Date:	03/29/2023 11:08:00	Order No:	230880004	Patient:	P-BB-ktr 2-BRCA2-11D	DNA No.:	BB-ktr 2-BRCA2-11D	Date:	03/29/2023 11:08:02	Order No:	230880010	Patient:	P-BB-ktr 3-BRCA2-11D	DNA No.:	BB-ktr 3-BRCA2-11D	Date:	03/29/2023 11:37:55
Order No:	230880002	Patient:	P-BB-ktr 1-BRCA2-11D																						
DNA No.:	BB-ktr 1-BRCA2-11D	Date:	03/29/2023 11:08:00																						
Order No:	230880004	Patient:	P-BB-ktr 2-BRCA2-11D																						
DNA No.:	BB-ktr 2-BRCA2-11D	Date:	03/29/2023 11:08:02																						
Order No:	230880010	Patient:	P-BB-ktr 3-BRCA2-11D																						
DNA No.:	BB-ktr 3-BRCA2-11D	Date:	03/29/2023 11:37:55																						
3 Implementering																									
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikportalen: Nei 																								
Laborieredatasytem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere																								

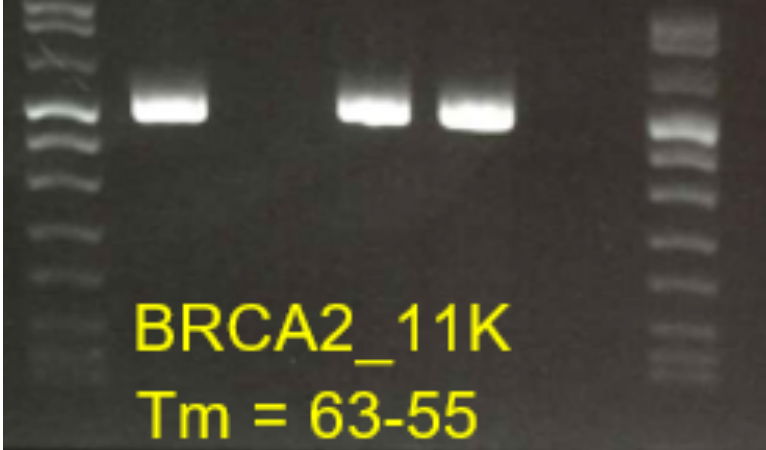
Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA2-11D</p>  <p>BB-ktr1-BRCA2-11D</p> 
Validert dato	30.03.2023
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen og Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

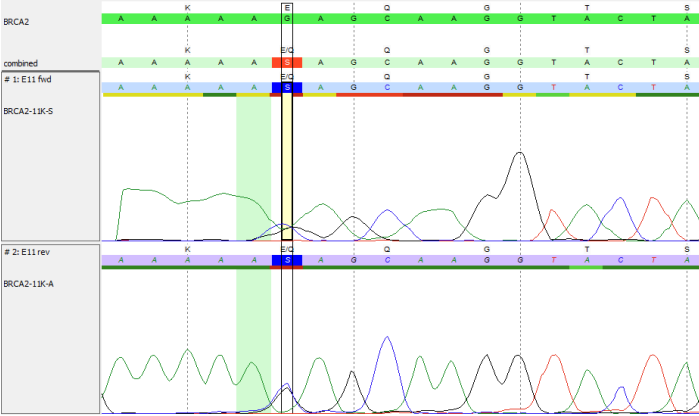
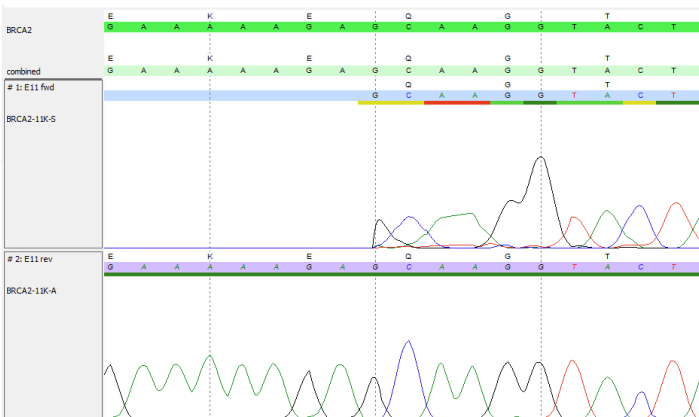
1 Validering av sekvenseringsprimere																													
Gen- og primernavn	BRCA2_11D-alt																												
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																												
Valideringsperiode	Våren 2023																												
Oppdragsgiver	AMG																												
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen																												
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																												
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																												
2 Valideringsresultater																													
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																												
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-11D-alt</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-11D-alt</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-11D-alt</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-11D-alt</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant F</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr	BB-ktr1-BRCA2-11D-alt	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA2-11D-alt	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA2-11D-alt	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA2-11D-alt	Originalrør	Variant F	5	NTC	Ingen	Godkjent	6				
	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr																									
	BB-ktr1-BRCA2-11D-alt	Fortynningsrør	Villtype	2																									
	BB-ktr2-BRCA2-11D-alt	Fortynningsrør	Villtype	3																									
	BB-ktr3-BRCA2-11D-alt	Fortynningsrør	Villtype	4																									
	Pos-ktr-BRCA2-11D-alt	Originalrør	Variant F	5																									
	NTC	Ingen	Godkjent	6																									
* Std VIII: gelbrønn 1 og 7																													
																													
Arkivering av resultater	Pos ktr <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230880001</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr1-BRCA2-11D-a</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>03/29/2023 11:08:06</td> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr1-BRCA2-11D-alt</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Date:</td> <td>03/29/2023 11:07:59</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230880003</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr2-BRCA2-11D-a</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>03/29/2023 11:08:01</td> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr2-BRCA2-11D-alt</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230880009</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr3-BRCA2-11D-a</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>03/29/2023 11:20:17</td> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr3-BRCA2-11D-alt</td> </tr> </tbody> </table>	Order No:	230880001	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-11D-a	Date:	03/29/2023 11:08:06	DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-11D-alt			Date:	03/29/2023 11:07:59	Order No:	230880003	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-11D-a	Date:	03/29/2023 11:08:01	DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-11D-alt	Order No:	230880009	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-11D-a	Date:	03/29/2023 11:20:17	DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11D-alt
Order No:	230880001	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-11D-a																										
Date:	03/29/2023 11:08:06	DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-11D-alt																										
		Date:	03/29/2023 11:07:59																										
Order No:	230880003	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-11D-a																										
Date:	03/29/2023 11:08:01	DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-11D-alt																										
Order No:	230880009	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-11D-a																										
Date:	03/29/2023 11:20:17	DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11D-alt																										

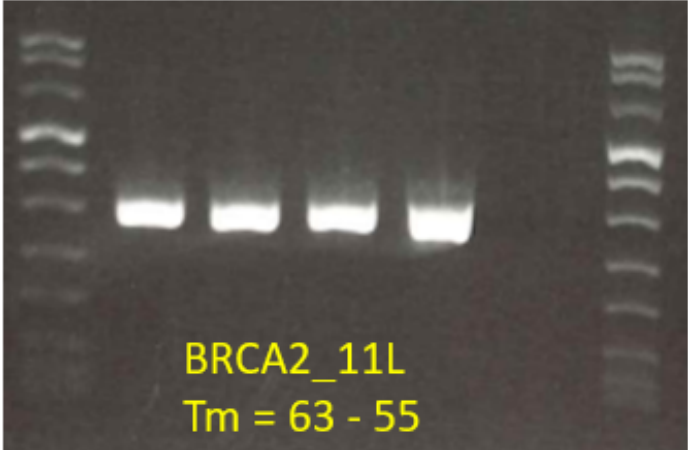
3 Implementering	
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikkportalen: Nei
Laboratoriedatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere
Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere • Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere • Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ctr-BRCA2-11D-alt</p>  <p>BB-ctr1-BRCA2-11D-alt</p> 
Validert dato	30.03.2023
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen og Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator

1 Validering av sekvenseringsprimere																									
Gen- og primernavn	BRCA2_11I																								
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																								
Valideringsperiode	Våren 2023																								
Oppdragsgiver	AMG																								
Kontaktperson	Eva K. Svaasand																								
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																								
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																								
2 Valideringsresultater																									
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																								
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-11I</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-11I</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-11I</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-11I</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant G</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr	BB-ktr1-BRCA2-11I	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA2-11I	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA2-11I	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA2-11I	Originalrør	Variant G	5	NTC	Ingen	Godkjent	6
	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr																					
	BB-ktr1-BRCA2-11I	Fortynningsrør	Villtype	2																					
	BB-ktr2-BRCA2-11I	Fortynningsrør	Villtype	3																					
	BB-ktr3-BRCA2-11I	Fortynningsrør	Villtype	4																					
	Pos-ktr-BRCA2-11I	Originalrør	Variant G	5																					
	NTC	Ingen	Godkjent	6																					
* Std VIII: gelbrønn 1 og 7																									
																									
Arkivering av resultater	Pos ktr <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230860033</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr1-BRCA2-11I</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr1-BRCA2-11I</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:33:32</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230860035</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr2-BRCA2-11I</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr2-BRCA2-11I</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:33:24</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230860037</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr3-BRCA2-11I</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr3-BRCA2-11I</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:33:28</td> </tr> </tbody> </table>	Order No:	230860033	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-11I	DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-11I	Date:	03/27/2023 13:33:32	Order No:	230860035	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-11I	DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-11I	Date:	03/27/2023 13:33:24	Order No:	230860037	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-11I	DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11I	Date:	03/27/2023 13:33:28
Order No:	230860033																								
Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-11I																								
DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-11I																								
Date:	03/27/2023 13:33:32																								
Order No:	230860035																								
Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-11I																								
DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-11I																								
Date:	03/27/2023 13:33:24																								
Order No:	230860037																								
Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-11I																								
DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11I																								
Date:	03/27/2023 13:33:28																								

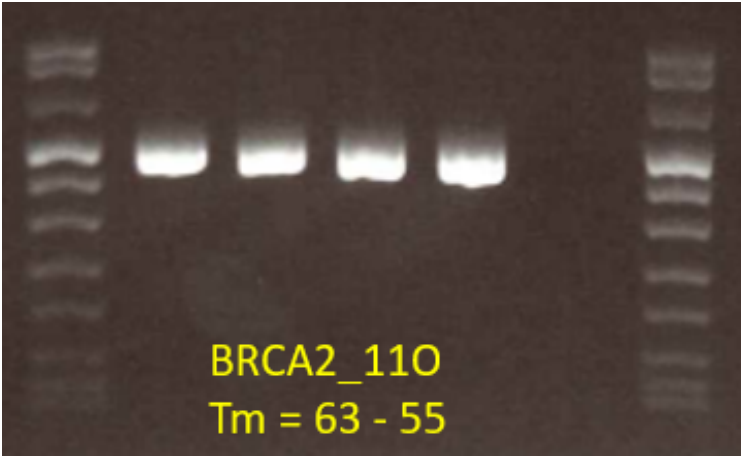
3 Implementering	
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikportalen: Nei
Laborieredatasytem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere
Primer-oppevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Gjøres av AMG senere • Primere lagt inn i primerliste for robot: Gjøres av AMG senere • Skal gamle primere kastes: Gjøres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA2-111</p>  <p>BB-ktr2-BRCA2-111</p> 
Validert dato	27.03.23
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

1 Validering av sekvenseringsprimere																					
Gen- og primernavn	BRCA2_11K																				
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																				
Valideringsperiode	Våren 2023																				
Oppdragsgiver	AMG																				
Kontaktperson	Eva K. Svaasand																				
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																				
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																				
2 Valideringsresultater																					
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																				
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-11K</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-11K</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-11K</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant H</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr	BB-ktr1-BRCA2-11K	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr3-BRCA2-11K	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA2-11K	Originalrør	Variant H	5	NTC	Ingen	Godkjent	6
	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr																	
	BB-ktr1-BRCA2-11K	Fortynningsrør	Villtype	2																	
	BB-ktr3-BRCA2-11K	Fortynningsrør	Villtype	4																	
	Pos-ktr-BRCA2-11K	Originalrør	Variant H	5																	
	NTC	Ingen	Godkjent	6																	
* Std VIII: gelbrønn 1 og 7																					
																					
Arkivering av resultater	Pos ktr <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>Order No:</td> <td>230860025</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr1-BRCA2-11K</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr1-BRCA2-11K</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:05:51</td> </tr> </table> <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>Order No:</td> <td>230860028</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr3-BRCA2-11K</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr3-BRCA2-11K</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:05:48</td> </tr> </table>	Order No:	230860025	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-11K	DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-11K	Date:	03/27/2023 13:05:51	Order No:	230860028	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-11K	DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11K	Date:	03/27/2023 13:05:48				
Order No:	230860025																				
Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-11K																				
DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-11K																				
Date:	03/27/2023 13:05:51																				
Order No:	230860028																				
Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-11K																				
DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11K																				
Date:	03/27/2023 13:05:48																				
3 Implementering																					
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikkportalen: Nei 																				
Laboratoriedatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere																				

Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. BB-ktr2-BRCA2-11K fikk ikke produkt. Primeren godkjennes likevel da to av tre blodbankkontroller godkjennes, samt at det er med en positiv kontroll. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA2-11K</p>  <p>BB-ktr3-BRCA2-11K</p> 
Validert dato	28.03.2023
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

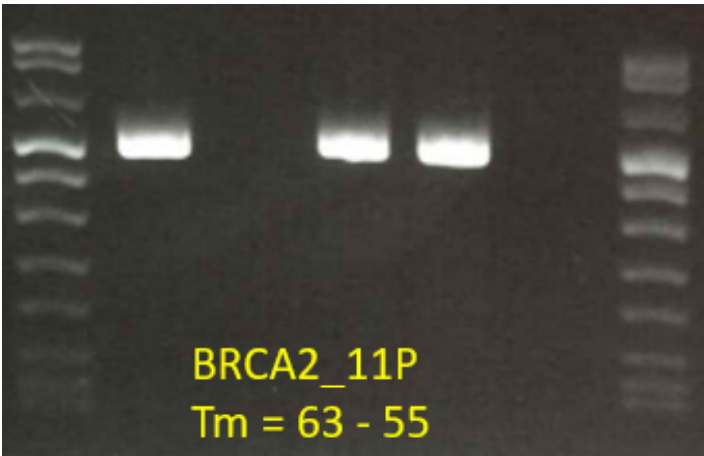
1 Validering av sekvenseringsprimere																													
Gen- og primernavn	BRCA2_11L																												
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																												
Valideringsperiode	Våren 2023																												
Oppdragsgiver	AMG																												
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen																												
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																												
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																												
2 Valideringsresultater																													
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																												
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-11L</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-11L</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-11L</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-11L</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant I</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table> <p>* Std VIII: gelbrønn 1 og 7</p> 	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.	BB-ktr1-BRCA2-11L	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA2-11L	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA2-11L	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA2-11L	Originalrør	Variant I	5	NTC	Ingen	Godkjent	6				
	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.																									
BB-ktr1-BRCA2-11L	Fortynningsrør	Villtype	2																										
BB-ktr2-BRCA2-11L	Fortynningsrør	Villtype	3																										
BB-ktr3-BRCA2-11L	Fortynningsrør	Villtype	4																										
Pos-ktr-BRCA2-11L	Originalrør	Variant I	5																										
NTC	Ingen	Godkjent	6																										
Arkivering av resultater	<p>Pos ktr</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030003</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr 1-BRCA2-11L</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr 1-BRCA2-11L</td> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:32:29</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:33:49</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030006</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr2-BRCA2-11L</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr2-BRCA2-11L</td> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:32:55</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030009</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr 3-BRCA2-11L</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr3-BRCA2-11L</td> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:33:22</td> </tr> </tbody> </table>	Order No:	231030003	Patient:	P-BB-ktr 1-BRCA2-11L	DNA No.:	BB-ktr 1-BRCA2-11L	Date:	04/13/2023 08:32:29	Date:	04/13/2023 08:33:49			Order No:	231030006	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-11L	DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-11L	Date:	04/13/2023 08:32:55	Order No:	231030009	Patient:	P-BB-ktr 3-BRCA2-11L	DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11L	Date:	04/13/2023 08:33:22
Order No:	231030003	Patient:	P-BB-ktr 1-BRCA2-11L																										
DNA No.:	BB-ktr 1-BRCA2-11L	Date:	04/13/2023 08:32:29																										
Date:	04/13/2023 08:33:49																												
Order No:	231030006	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-11L																										
DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-11L	Date:	04/13/2023 08:32:55																										
Order No:	231030009	Patient:	P-BB-ktr 3-BRCA2-11L																										
DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11L	Date:	04/13/2023 08:33:22																										
3 Implementering																													
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikportalen: Nei 																												

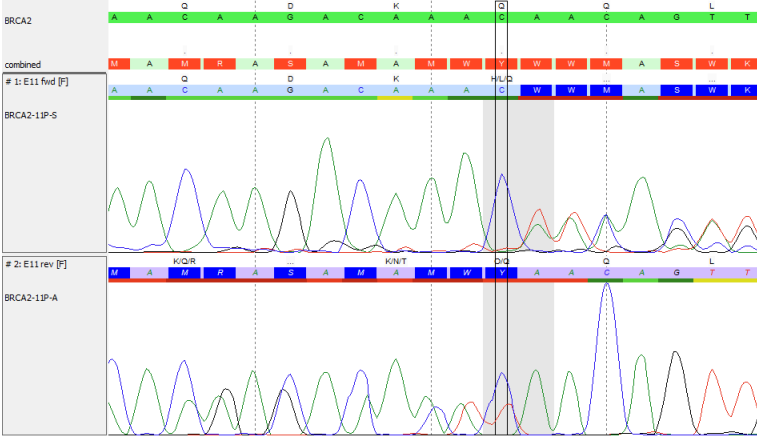
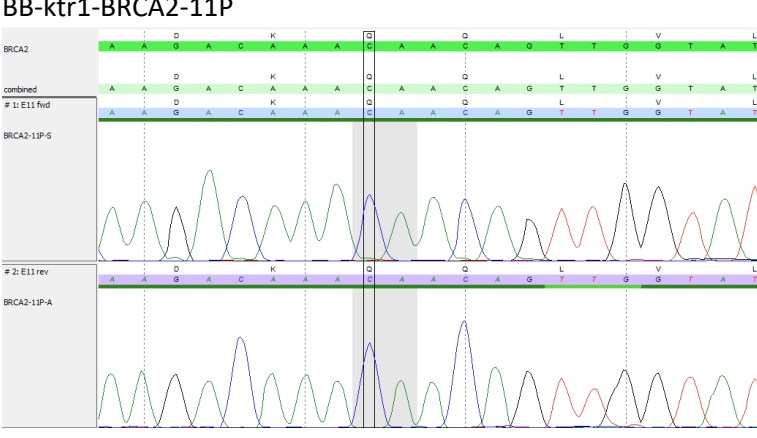
Laboratoriedatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere
Primer-oppebevaring	<ul style="list-style-type: none"> Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Varianten som er valgt for positiv kontroll ligger i starten av det området primeren dekker, og detekteres derfor ikke av sense-tråden. For å detektere varianten i sense-tråden benyttes overlappende primer (BRCA2-11K). Varianten i positiv kontroll dekkes kun av antisense-tråden, men dette er tilstrekkelig for diagnostisering av denne varianten. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur ($T_m = 63-55$). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA2-11L</p> <p>BB-ktr1-BRCA2-11L</p>
Validert dato	13.04.23
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen og Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

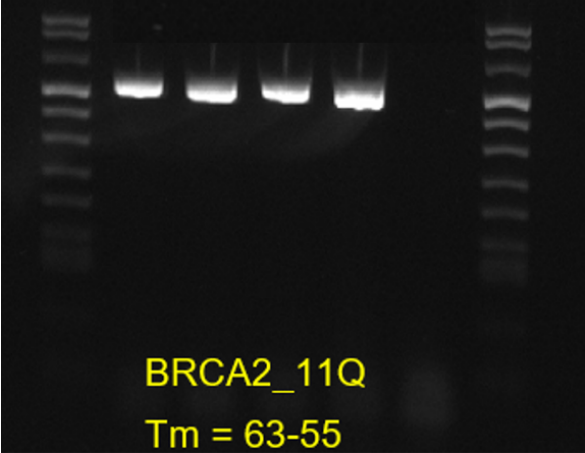
1 Validering av sekvenseringsprimere																													
Gen- og primernavn	BRCA2_110																												
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																												
Valideringsperiode	Våren 2023																												
Oppdragsgiver	AMG																												
Kontaktperson	Eva K. Svaasand																												
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																												
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																												
2 Valideringsresultater																													
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																												
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-110</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-110</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-110</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr1-BRCA2-110</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant j</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr2-BRCA2-110</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant J</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> </tr> </tbody> </table> <p>Benytter to positive kontroller. Varianten i Pos-ktr1-BRCA2-110 ligger i slutten av ekson 110, og ble ikke detektert med ny BRCA2_110. Tok derfor med Pos-ktr2-BRCA2-110 i et annet oppsett, hvor varianten er plassert lenger mot midten av eksonet. Denne ble detektert vha. primeren. (Variant i Pos-ktr1-BRCA2-110 ble detektert vha. ny BRCA2-11P). Siden Pos-ktr2 ikke var med i det første oppsettet er den ikke med på gel-bildet.</p> 	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	BB-ktr1-BRCA2-110	Fortynningsrør	Villtype	BB-ktr2-BRCA2-110	Fortynningsrør	Villtype	BB-ktr3-BRCA2-110	Fortynningsrør	Villtype	Pos-ktr1-BRCA2-110	Originalrør	Variant j	Pos-ktr2-BRCA2-110	Originalrør	Variant J	NTC	Ingen	Godkjent							
Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat																											
BB-ktr1-BRCA2-110	Fortynningsrør	Villtype																											
BB-ktr2-BRCA2-110	Fortynningsrør	Villtype																											
BB-ktr3-BRCA2-110	Fortynningsrør	Villtype																											
Pos-ktr1-BRCA2-110	Originalrør	Variant j																											
Pos-ktr2-BRCA2-110	Originalrør	Variant J																											
NTC	Ingen	Godkjent																											
Arkivering av resultater	<p>Pos ktr</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230860026</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr1-BRCA2-110</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr1-BRCA2-110</td> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:05:44</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:06:02</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230860027</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr2-BRCA2-110</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr2-BRCA2-110</td> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:05:47</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230860029</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr3-BRCA2-110</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr3-BRCA2-110</td> <td>Date:</td> <td>03/27/2023 13:05:49</td> </tr> </tbody> </table>	Order No:	230860026	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-110	DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-110	Date:	03/27/2023 13:05:44	Date:	03/27/2023 13:06:02			Order No:	230860027	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-110	DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-110	Date:	03/27/2023 13:05:47	Order No:	230860029	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-110	DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-110	Date:	03/27/2023 13:05:49
Order No:	230860026	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-110																										
DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-110	Date:	03/27/2023 13:05:44																										
Date:	03/27/2023 13:06:02																												
Order No:	230860027	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-110																										
DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-110	Date:	03/27/2023 13:05:47																										
Order No:	230860029	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-110																										
DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-110	Date:	03/27/2023 13:05:49																										

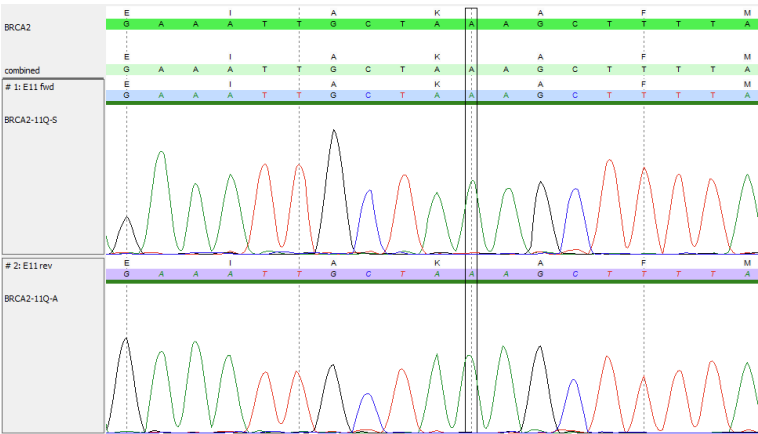
	<p>Pos ktr (sekvensert med primer for BRCA2_11P)</p> <div style="float: right; border: 1px solid gray; padding: 5px; margin-top: 10px;"> Order No: 230890007 Patient: P-PK-BRCA2-11n DNA No.: PK-BRCA2-11n Date: 03/30/2023 13:43:28 </div> <p>Date: 03/30/2023 13:43:13</p>
3 Implementering	
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikportalen: Nei
Laboratoriedatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere
Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere • Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere • Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Normalkontroller viser normal sekvens.</p> <p>Varianten i pos-ktr1-BRCA110 detekteres ikke med nye BRCA2_110-primere da den ligger i slutten av eksonet. Kjørte derfor samme kontroll med nye BRCA2_11P-primere. Varianten ble detektert.</p> <p>For å gjøre en ekstra kontroll av ny BRCA_110 benyttet vi pos-ktr2-BRCA-110. Varianten ble detektert.</p> <p>Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr1-BRCA2-110</p>  <p>Pos-ktr2-BRCA2-110</p> 

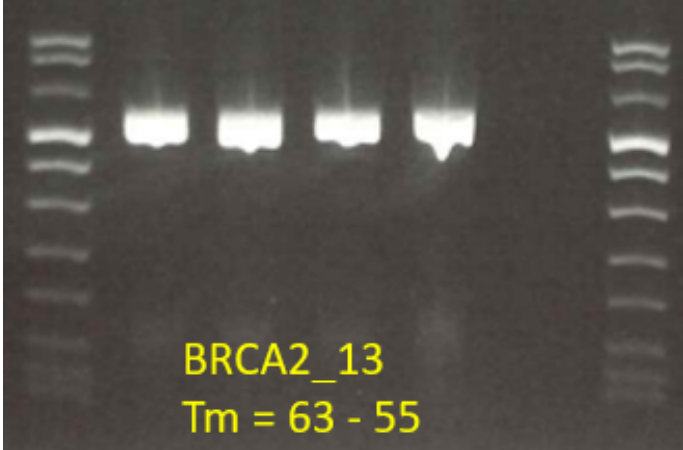
	<p>BB-ktr1-BRCA2-110</p> <p>(Primeren har fin sense- og anti-sense-tråd, men figuren viser kun sense-tråden, da bildet er tatt fra ca. samme posisjon som varianten)</p>
Validert dato	31.03.2023
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

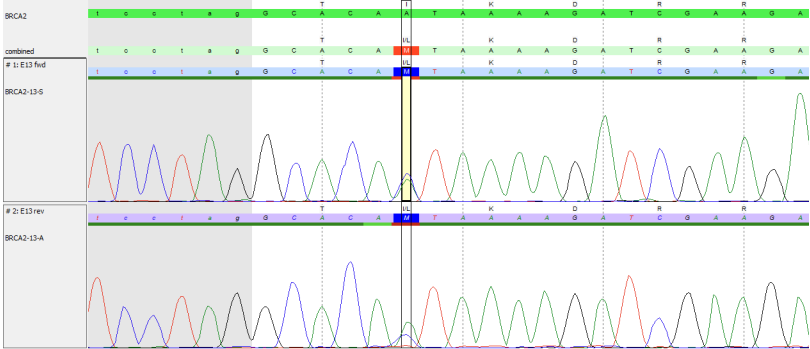
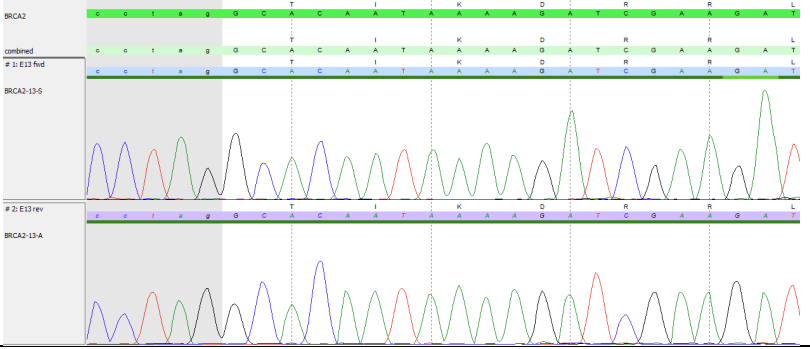
1 Validering av sekvenseringsprimere																									
Gen- og primernavn	BRCA2_11P																								
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																								
Valideringsperiode	Våren 2023																								
Oppdragsgiver	AMG																								
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen																								
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																								
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																								
2 Valideringsresultater																									
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																								
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-11P</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-11P</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-11P</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-11P</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant K</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table> <p>* Std VIII: gelbrønn 1 og 7</p> 	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.	BB-ktr1-BRCA2-11P	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA2-11P	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA2-11P	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA2-11P	Originalrør	Variant K	5	NTC	Ingen	Godkjent	6
Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.																						
BB-ktr1-BRCA2-11P	Fortynningsrør	Villtype	2																						
BB-ktr2-BRCA2-11P	Fortynningsrør	Villtype	3																						
BB-ktr3-BRCA2-11P	Fortynningsrør	Villtype	4																						
Pos-ktr-BRCA2-11P	Originalrør	Variant K	5																						
NTC	Ingen	Godkjent	6																						
Arkivering av resultater	<p>Pos ktr</p> <table border="0"> <tr> <td>Order No: 230880011</td> <td>Patient: P-BB-ktr1-BRCA2-11P</td> </tr> <tr> <td>DNA No.: BB-ktr1-BRCA2-11P</td> <td>Date: 03/29/2023 13:00:01</td> </tr> </table> <p>Date: 03/29/2023 13:00:30</p> <table border="0"> <tr> <td>Order No: 230880013</td> <td>Patient: P-BB-ktr2-BRCA2-11P</td> </tr> <tr> <td>DNA No.: BB-ktr2-BRCA2-11P</td> <td>Date: 03/29/2023 13:00:10</td> </tr> </table> <table border="0"> <tr> <td>Order No: 230880015</td> <td>Patient: P-BB-ktr3-BRCA2-11P</td> </tr> <tr> <td>DNA No.: BB-ktr3-BRCA2-11P</td> <td>Date: 03/29/2023 13:00:22</td> </tr> </table>	Order No: 230880011	Patient: P-BB-ktr1-BRCA2-11P	DNA No.: BB-ktr1-BRCA2-11P	Date: 03/29/2023 13:00:01	Order No: 230880013	Patient: P-BB-ktr2-BRCA2-11P	DNA No.: BB-ktr2-BRCA2-11P	Date: 03/29/2023 13:00:10	Order No: 230880015	Patient: P-BB-ktr3-BRCA2-11P	DNA No.: BB-ktr3-BRCA2-11P	Date: 03/29/2023 13:00:22												
Order No: 230880011	Patient: P-BB-ktr1-BRCA2-11P																								
DNA No.: BB-ktr1-BRCA2-11P	Date: 03/29/2023 13:00:01																								
Order No: 230880013	Patient: P-BB-ktr2-BRCA2-11P																								
DNA No.: BB-ktr2-BRCA2-11P	Date: 03/29/2023 13:00:10																								
Order No: 230880015	Patient: P-BB-ktr3-BRCA2-11P																								
DNA No.: BB-ktr3-BRCA2-11P	Date: 03/29/2023 13:00:22																								
3 Implementering																									
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikkportalen: Nei 																								
Laborieredatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere																								

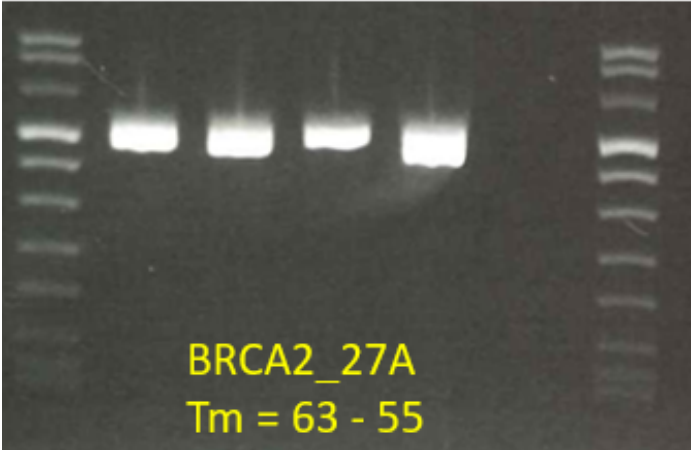
Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA2-11P</p>  <p>BB-ktr1-BRCA2-11P</p> 
Validert dato	30.03.2023
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen og Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

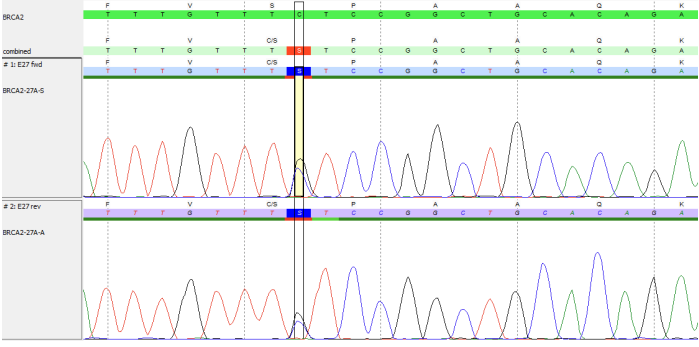
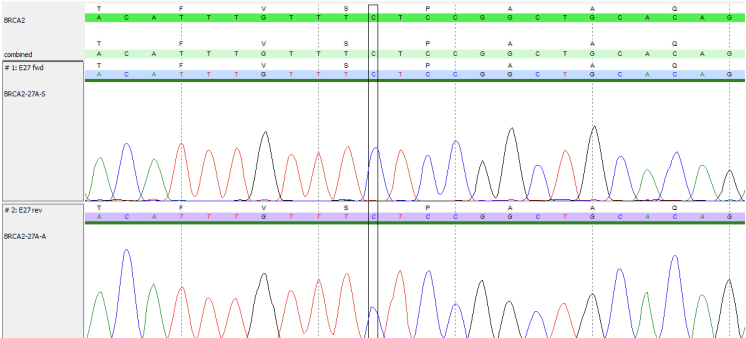
1 Validering av sekvenseringsprimere																									
Gen- og primernavn	BRCA2_11Q																								
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																								
Valideringsperiode	Våren 2023																								
Oppdragsgiver	AMG																								
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen																								
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																								
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																								
2 Valideringsresultater																									
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																								
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-11Q</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-11Q</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-11Q</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-11Q</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant L</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.	BB-ktr1-BRCA2-11Q	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA2-11Q	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA2-11Q	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA2-11Q	Originalrør	Variant L	5	NTC	Ingen	Godkjent	6
	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.																					
	BB-ktr1-BRCA2-11Q	Fortynningsrør	Villtype	2																					
	BB-ktr2-BRCA2-11Q	Fortynningsrør	Villtype	3																					
	BB-ktr3-BRCA2-11Q	Fortynningsrør	Villtype	4																					
	Pos-ktr-BRCA2-11Q	Originalrør	Variant L	5																					
	NTC	Ingen	Godkjent	6																					
* Std VIII: gelbrønn 1 og 7																									
																									
Arkivering av resultater	Pos ktr <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230880012</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr1-BRCA2-11Q</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr1-BRCA2-11Q</td> <td>Date:</td> <td>03/29/2023 13:00:06</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230880014</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr2-BRCA2-11Q</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr2-BRCA2-11Q</td> <td>Date:</td> <td>03/29/2023 13:00:15</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>230880016</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr3-BRCA2-11Q</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr3-BRCA2-11Q</td> <td>Date:</td> <td>03/29/2023 13:00:26</td> </tr> </tbody> </table>	Order No:	230880012	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-11Q	DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-11Q	Date:	03/29/2023 13:00:06	Order No:	230880014	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-11Q	DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-11Q	Date:	03/29/2023 13:00:15	Order No:	230880016	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-11Q	DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11Q	Date:	03/29/2023 13:00:26
Order No:	230880012	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-11Q																						
DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-11Q	Date:	03/29/2023 13:00:06																						
Order No:	230880014	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-11Q																						
DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-11Q	Date:	03/29/2023 13:00:15																						
Order No:	230880016	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-11Q																						
DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-11Q	Date:	03/29/2023 13:00:26																						
3 Implementering																									
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikkportalen: Nei 																								
Laboratoriedatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere																								

Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere • Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere • Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA2-11Q</p>  <p>BB-ktr1-BRCA2-11Q</p> 
Validert dato	31.03.2023
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen og Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

1 Validering av sekvenseringsprimere																									
Gen- og primernavn	BRCA2_13																								
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																								
Valideringsperiode	Våren 2023																								
Oppdragsgiver	AMG																								
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen																								
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																								
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																								
2 Valideringsresultater																									
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																								
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-13</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-13</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-13</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-13</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant M</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.	BB-ktr1-BRCA2-13	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA2-13	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA2-13	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA2-13	Originalrør	Variant M	5	NTC	Ingen	Godkjent	6
	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr.																					
	BB-ktr1-BRCA2-13	Fortynningsrør	Villtype	2																					
	BB-ktr2-BRCA2-13	Fortynningsrør	Villtype	3																					
	BB-ktr3-BRCA2-13	Fortynningsrør	Villtype	4																					
	Pos-ktr-BRCA2-13	Originalrør	Variant M	5																					
	NTC	Ingen	Godkjent	6																					
* Std VIII: gelbrønn 1 og 7																									
																									
Arkivering av resultater	<p>Pos ktr</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030013</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr-1-BRCA2-13</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr-1-BRCA2-13</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:35:08</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030016</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr-2-BRCA2-13</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr-2-BRCA2-13</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:34:22</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231030019</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr-3-BRCA2-13</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr-3-BRCA2-13</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:34:01</td> </tr> </tbody> </table>	Order No:	231030013	Patient:	P-BB-ktr-1-BRCA2-13	DNA No.:	BB-ktr-1-BRCA2-13	Date:	04/13/2023 08:35:08	Order No:	231030016	Patient:	P-BB-ktr-2-BRCA2-13	DNA No.:	BB-ktr-2-BRCA2-13	Date:	04/13/2023 08:34:22	Order No:	231030019	Patient:	P-BB-ktr-3-BRCA2-13	DNA No.:	BB-ktr-3-BRCA2-13	Date:	04/13/2023 08:34:01
Order No:	231030013																								
Patient:	P-BB-ktr-1-BRCA2-13																								
DNA No.:	BB-ktr-1-BRCA2-13																								
Date:	04/13/2023 08:35:08																								
Order No:	231030016																								
Patient:	P-BB-ktr-2-BRCA2-13																								
DNA No.:	BB-ktr-2-BRCA2-13																								
Date:	04/13/2023 08:34:22																								
Order No:	231030019																								
Patient:	P-BB-ktr-3-BRCA2-13																								
DNA No.:	BB-ktr-3-BRCA2-13																								
Date:	04/13/2023 08:34:01																								
3 Implementering																									
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikportalen: Nei 																								
Laboratoriedatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere																								

Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA2-13</p>  <p>BB-ktr1-BRCA2-13</p> 
Validert dato	13.04.23
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen og Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføre senere)

1 Validering av sekvenseringsprimere																									
Gen- og primernavn	BRCA2_27A																								
Analysemetode/bruksområde	PCR og Sangersekvensering																								
Valideringsperiode	Våren 2023																								
Oppdragsgiver	AMG																								
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen																								
Årsak til validering	Flytting av primer/e for å få primere innenfor standard betingelser for sangersekvensering av BRCA2.																								
Produsent/leverandør	BioNordica (Eurogentec)																								
2 Valideringsresultater																									
Prøvemateriale	Hvilke prøvemateriale er metoden beregnet på; DNA fra blod.																								
Resultater	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Prøve ID</th> <th>Prøvemateriale</th> <th>Resultat</th> <th>Gelbrønn nr</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BB-ktr1-BRCA2-27A</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr2-BRCA2-27A</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>BB-ktr3-BRCA2-27A</td> <td>Fortynningsrør</td> <td>Villtype</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Pos-ktr-BRCA2-27A</td> <td>Originalrør</td> <td>Variant N</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>NTC</td> <td>Ingen</td> <td>Godkjent</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table> <p>* Std VIII: gelbrønnen 1 og 7</p> 	Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr	BB-ktr1-BRCA2-27A	Fortynningsrør	Villtype	2	BB-ktr2-BRCA2-27A	Fortynningsrør	Villtype	3	BB-ktr3-BRCA2-27A	Fortynningsrør	Villtype	4	Pos-ktr-BRCA2-27A	Originalrør	Variant N	5	NTC	Ingen	Godkjent	6
Prøve ID	Prøvemateriale	Resultat	Gelbrønn nr																						
BB-ktr1-BRCA2-27A	Fortynningsrør	Villtype	2																						
BB-ktr2-BRCA2-27A	Fortynningsrør	Villtype	3																						
BB-ktr3-BRCA2-27A	Fortynningsrør	Villtype	4																						
Pos-ktr-BRCA2-27A	Originalrør	Variant N	5																						
NTC	Ingen	Godkjent	6																						
Arkivering av resultater	<p>Pos ktr</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Order No:</td> <td>231080009</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr1-BRCA2-27A</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr1-BRCA2-27A</td> <td>Date:</td> <td>04/13/2023 08:35:09</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/18/2023 08:29:58</td> <td>Order No:</td> <td>231080010</td> </tr> <tr> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr2-BRCA2-27A</td> <td>Patient:</td> <td>P-BB-ktr3-BRCA2-27A</td> </tr> <tr> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr2-BRCA2-27A</td> <td>DNA No.:</td> <td>BB-ktr3-BRCA2-27A</td> </tr> <tr> <td>Date:</td> <td>04/18/2023 08:29:59</td> <td>Date:</td> <td>04/18/2023 08:30:01</td> </tr> </tbody> </table>	Order No:	231080009	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-27A	DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-27A	Date:	04/13/2023 08:35:09	Date:	04/18/2023 08:29:58	Order No:	231080010	Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-27A	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-27A	DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-27A	DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-27A	Date:	04/18/2023 08:29:59	Date:	04/18/2023 08:30:01
Order No:	231080009	Patient:	P-BB-ktr1-BRCA2-27A																						
DNA No.:	BB-ktr1-BRCA2-27A	Date:	04/13/2023 08:35:09																						
Date:	04/18/2023 08:29:58	Order No:	231080010																						
Patient:	P-BB-ktr2-BRCA2-27A	Patient:	P-BB-ktr3-BRCA2-27A																						
DNA No.:	BB-ktr2-BRCA2-27A	DNA No.:	BB-ktr3-BRCA2-27A																						
Date:	04/18/2023 08:29:59	Date:	04/18/2023 08:30:01																						
3 Implementering																									
Dokumentasjon	<ul style="list-style-type: none"> • Primeroversikt: Utføres av AMG senere • SeqPilot-templat: Nei • Genetikkportalen: Nei 																								
Laboratoriedatasystem	Primer legges inn i LIMS: Utføres av AMG senere																								

Primer-oppbevaring	<ul style="list-style-type: none"> • Beskjed til person som har utført validering (e-post) om at primere kan settes tilgjengelig for bruk: Utføres av AMG senere • Primere lagt inn i primerliste for robot: Utføres av AMG senere • Skal gamle primere kastes: Utføres av AMG senere
4 Konklusjon	
Vurdering av validering	<p>Signalintensiteten er innenfor kvalitetsrammene til AMG (EQS 27572). Positiv kontroll viser varianten i 50/50-ratio. Normalkontroller viser normal sekvens. Sekvensen dekker forventet område med god dekning. Primeren fungerer godt ved ønsket temperatur (Tm = 63-55). Valideringen godkjennes.</p> <p>Pos-ktr-BRCA2-27A</p>  <p>BB-ktr-BRCA2-27A</p> 
Validert dato	18.04.23
5 Godkjenning	
Godkjennes gjennom hørings- og godkjenningsrunder i EQS, sendes til følgende:	
Kontaktperson	Larina Haugen, Torill Johnsen og Eva K. Svaasand
Validering utført av	Larina Haugen, Torill Johnsen
Resultatene kontrollert av	Eva K. Svaasand
Faglig ansvarlig	Seksjonsleder (Utføres senere)
Valideringsansvarlig	Kvalitetskoordinator (Utføres senere)

Vedlegg 11: Oversikt over positive kontroller

Tabellen viser beregnede pipetteringsvolum av kontrollmateriale per PCR-reaksjon.

Kontroll	Variant	DNA-konsentrasjon (ng/ μ L)	Volum (μ L) per PCR-reaksjon
Pos-ktr-BRCA1-02	A	23,5	1,3
Pos-ktr-BRCA1-17	B	61,7	0,5
Pos-ktr-BRCA2-02	C	34,5	0,9
Pos-ktr-BRCA2-10D	D	70,2	0,4
Pos-ktr-BRCA2-11B	E	76,4	0,4
Pos-ktr-BRCA2-11D	F	89,0	0,3
Pos-ktr-BRCA2-11I	G	20,4	1,5
Pos-ktr-BRCA2-11K	H	21,5	1,4
Pos-ktr-BRCA2-11L	I	49,0	0,6
Pos-ktr-BRCA2-11O	J	28,3	1,1
Pos-ktr-BRCA2-11P	K	30,7	1,0
Pos-ktr-BRCA2-11Q	L	31,6	1,0
Pos-ktr-BRCA2-13	M	53,6	0,6
Pos-ktr-BRCA2-27A	N	38,3	0,8

