

Karoline Wethal Kristoffersen
Synne Svensson

Etablering av supplerende analyse for området med repeterende sekvenser i RPGR-genet

Bacheloroppgave i bioingeniørfag
Veileder: Eva K. Svaasand, Per J. Wahlberg, Wenche Sjursen
Medveileder: Wenche S. Prestvik
Mai 2024

Karoline Wethal Kristoffersen
Synne Svensson

Etablering av supplerende analyse for området med repeterende sekvenser i RPGR-genet

Bacheloroppgave i bioingeniørfag
Veileder: Eva K. Svaasand, Per J. Wahlberg, Wenche Sjursen
Medveileder: Wenche S. Prestvik
Mai 2024

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne bacheloroppgaven ble tildelt av Avdeling for medisinsk genetikk (AMG) ved St. Olavs hospital i sammenheng med avslutningen av den bioingeniørfaglige utdanningen ved Norsk Teknisk-naturvitenskapelig universitet i Trondheim. Alt praktisk laboratoriearbeid ble gjennomført på AMGs lokaler.

I forbindelse med denne bacheloroppgaven ønsker vi å rette en spesielt stor takk til faglig veileder og molekylær biolog Eva K. Svaasand. Hun har vist stort engasjement på laboratoriet og motivert oss gjennom hele bachelorperioden. Under hennes veiledning har vi lært utrolig mye om praktisk laboratoriearbeid som vi vil ta med oss videre. Ved møte på utfordringer har Svaasand vært en fantastisk sparringspartner og et sant forbilde. Grunnet hennes smittende gode humør har tiden som bachelorstudent ved AMG vært en stor glede. Vi vil også benytte anledningen til å takke klinisk laboratorietekniker Professor Wenche Sjursen og molekylær biolog Per J. Wahlberg som har vært viktige ressurser i det faglige teamet av veiledere. Sjursen og Wahlberg har vist stort faglig engasjement for oppgaven vår og gitt oss fornyet motivasjon og råd i møte med utfordringer. Det setter vi uendelig stor pris på.

Vi vil gjerne takke alle de behjelpelige ansatte ved Avdeling for medisinsk genetikk ved St. Olavs hospital for en varm velkomst og en fin bachelorperiode. I tillegg vil vi takke Avdeling for medisinsk genetikk ved Haukeland Universitetssykehus, spesielt fagbioingeniør Angel Haugetun, for rådføring under utarbeidingen av oppgaven.

Sist, men ikke minst, ønsker vi også å gi prosessveileder Wenche S. Prestvik en stor takk. Hennes veiledning gjennom bachelorperioden har vært uvurderlig.

Trondheim, 21. mai 2024



Karoline Wethal Kristoffersen



Synne Svensson

Sammendrag

Avdeling for medisinsk genetikk (AMG) ved St. Olavs hospital i Trondheim ønsker å etablere en supplerende analyse som er i stand til å detektere varianter i RPGR^{ORF15}. X-bundet retinitis pigmentosa fører til progressivt synstap og skyldes i hovedsak patogene varianter i ORF15. Grunnet repeterende AG-sekvenser gir ikke NGS fullstendig dekning av området. Det er derfor nødvendig å etablere en ny analysemetode i klinikken som kan føre til at flere individer får en molekylærgenetisk diagnose og derav mer tilrettelagt oppfølging.

Sangersekvensering er en analyse som er bedre egnet til å detektere varianter i sekvenser med høyt innhold av repeterende sekvenser, slik som i ORF15. For å kunne etablere sangersekvensering som en supplerende analyse i klinikken måtte derfor Long-range PCR (LR PCR), Nested PCR og sekvenserings-PCR optimaliseres. Gelelektroforese ble benyttet til å undersøke renheten og den omtrentlige mengden av PCR-produkt fra LR- og Nested PCR. Kvaliteten på sekvenseringsdata fra sangersekvenseringen, samt eventuelle normalvarianter i blodbankkontrollene og oppgitte genvarianter i positiv kontroll, ble vurdert.

Resultatene fra LR PCR var svært tilfredsstillende og reproducerbare. Det ble imidlertid bestemt å forkaste Nested PCR som mellomtrinn i metoden, da resultatene av amplifiseringen ikke viste seg å være reproducerbare. Sangersekvenseringen ble derfor utført direkte på LR PCR-produktene. De oppgitte variantene i positiv kontroll ble detektert med den optimaliserte sangersekvenseringsmetoden med LR PCR-produkt som templat.

Med sangersekvensering har vi klart å få fullstendig dekning over RPGR^{ORF15}, men det gjenstår å optimalisere primeren RPGR-E15SR1 før en fullstendig metodevalidering kan utføres. Et solid fundament er lagt for prosjektet, og det gjenstår kun mindre justeringer før analysemetoden er fullstendig utviklet og klar til å bli anvendt for deteksjon av varianter i RPGR^{ORF15}-genet.

Abstract

The Department of Medical Genetics (AMG) at St. Olavs hospital in Trondheim aims to establish a supplementary analysis capable of detecting variants in RPGR^{ORF15}. X-linked retinitis pigmentosa leads to progressive vision loss and is primarily caused by pathogenic variants in ORF15. Due to repetitive AG sequences, NGS does not provide complete coverage of ORF15. It is therefore necessary to establish a new analytical method, to enable more individuals to receive a molecular genetic diagnosis.

Sanger sequencing is better suited for detecting variants in sequences with high levels of repetitive sequences, such as ORF15. To establish Sanger sequencing as a supplementary analysis in the clinic, Long-range PCR (LR PCR), Nested PCR and sequencing PCR had to be optimized. Gel electrophoresis was used to examine the purity and approximate amount of PCR product from LR and Nested PCR. The quality of sequencing data from Sanger sequencing, as well as any normal variants in blood bank controls and reported gene variants in the positive control, was assessed.

The results from LR PCR were highly satisfactory and reproducible. However, it was decided to discard Nested PCR as an intermediate step in the method, as the amplification results were not reproducible. Sanger sequencing was therefore performed directly on the LR PCR products. The reported variants in the positive control were detected with the optimized Sanger sequencing method using LR PCR product as template.

With Sanger sequencing, we have managed to achieve complete coverage of RPGR^{ORF15}, but further optimization of the RPGR-E15SR1 primer is needed before a complete method validation can take place. A solid foundation has been laid for the project, and only minor adjustments remain before the analytical method is fully developed and ready for use in detecting variants in the RPGR^{ORF15} gene.

Innhold

Forord.....	i
Sammendrag	ii
Abstract.....	iii
Liste med forkortelser	vi
1. Innledning.....	1
1.1 Retinitis pigmentosa.....	1
1.2 Next Generation Sequencing.....	2
1.3 Long-range PCR.....	4
1.4 Nested PCR	5
1.5 Sangersekvensering.....	5
1.5.1 Kapillærelektroforese	6
1.6 Problemstilling	8
2. Materiale og metode	9
2.1 Prøvemateriale.....	9
2.2 Valg av primere	10
2.3 Long-range PCR.....	12
2.4 Nested PCR	13
2.4.1 Optimalisering av Nested PCR.....	14
2.5 Gelelektroforese	14
2.6 Sangersekvensering.....	15
2.6.1 Rensing av PCR-templat for sekvensering.....	15
2.6.2 Sekvenserings-PCR	15
2.6.3 Rensing av sekvenseringsprodukt	17
2.7 Resultatbehandling	18
2.7.1 Sequence Scanner 2	18
2.7.2 Sequence Pilot	18

3. Resultater	20
3.1 Long-range PCR.....	20
3.2 Nested PCR	21
3.3 Sekvenseringsresultater	22
3.3.1 Sequence Scanner 2	22
3.3.2 Rådata med og uten betain.....	23
3.3.3 Sequence Pilot	24
3.3.4 Optimalisering av sekvenserings-PCR	28
4. Diskusjon	29
5. Konklusjon.....	32
Bidrag.....	33
6. Referanser	34
7. Vedlegg	37

Liste med forkortelser

AMG:	Avdeling for medisinsk genetikk
BB:	Blodbankkontroll
bp:	Basepar
ddNTP:	Dideoxynukleotider
DNA:	Deoksyribonukleinsyre
dNTP:	Deoxynukleotider
LR PCR:	Long-range PCR
MGM:	Avdeling for medisinsk genetikk
NGS:	Next Generation Sequencing
NTC:	Non-Template Control
ORF:	Open reading-frame
PCR:	Polymerase Chain Reaction
RP:	Retinis Pigmentosa
RPGR:	Retinitis pigmentosa GTPase regulator-gen
T _m :	Smeltepunkt
XLRP:	X-bundet retinitis pigmentosa

1. Innledning

1.1 Retinitis pigmentosa

Retinitis pigmentosa (RP) er i hovedsak en fellesbetegnelse for en rekke arvelige netthinnesykdommer som kan gi sterk synshemming. Dette skyldes forstyrrelser i funksjonen til netthinnen (1). Den progressive degenerasjonen av fotoreseptorer er karakteristisk for RP. Sykdommen vil over tid kunne føre til blindhet på begge øynene, etter hvert som fotoreseptorer dør og netthinnens pigmentepitel reduseres (2,3). I ungdomsårene vil den progressive sykdommen være fremtredende i form av nattblindhet (4). Etter hvert som sykdommen utvikler seg, vil stadig mer av sidesynet bortfalle. RP kan føre til at synsfeltet innskrenkes fra 180 til 3 grader. Derfor brukes ofte begrepet «tunnelsyn» for å beskrive sykdomsbildet (1,4). I Norge har om lag 1500 personer diagnosen RP. På verdensbasis anslåes det at sykdommen forekommer hos 1 av 4-5000 personer (1).

RP er en genetisk heterogen sykdom, noe som betyr at den kan være forårsaket av patogene varianter i ulike gener. Over ca. 100 gener har blitt assosiert med RP, og flere blir kontinuerlig oppdaget etter hvert som genetisk forskning fremskrider. Disse genene spiller ulike roller i funksjon og vedlikehold av netthinnen. Mutasjoner i noen av disse genene kan føre til utvikling av RP (4,5). RP er hovedsakelig en arvelig sykdom som kan arves i flere forskjellige mønstre, inkludert autosomal-dominant, autosomal-recessive, X-bundet arv og mitokondriell arv (3). Ved autosomal-dominant arv er en patogen variant i én kopi av genet tilstrekkelig til å forårsake sykdommen. Ved autosomal-recessive arvegang kreves det at begge kopier av genet (en fra hver forelder) muteres for å manifestere sykdom. Foreldre til et berørt individ er vanligvis bærere av et mutert gen, men viser ikke symptomer selv. X-bundet arv forårsakes av patogene varianter lokalisert på X-kromosomet. Menn er oftere rammet fordi de kun har ett X-kromosom, arvet fra moren. Kvinner, som har to X-kromosom, er vanligvis bærere og kan eller kan ikke vise symptomer avhengig av eventuell X-kromosom inaktivering. Det ikke-muterte kromosomet kan altså kompensere for et defekt RPGR-gen på det andre kromosomet (4). I sjeldne tilfeller kan også RP oppstå på grunn av mitokondriell arv, hvor patogene varianter i mitokondrielt DNA overføres fra mor til barn (4-7).

X-bundet retinitis pigmentosa (XLRP) er årsaken for om lag 6-20 % av alle RP-tilfeller (8). Menn med XLRP vil ha en alvorligere fenotype sammenlignet med de som har autosomal-recessiv- og autosomal-dominant arvegang (2). Per dags dato er det heller ingen kur for sykdommen, og man kan derfor si at XLRP er en av de alvorligste formene for RP (3,4,9).

Mutasjoner i Retinitis pigmentosa GTPase regulator-gen (RPGR-genet) er den dominerende årsaken til XLRP (2). Patogene varianter er blitt funnet og beskrevet over hele RPGR-genet, men én spesifikk region lokalisert i ekson 15 er blitt beskrevet som et “hotspot” for mutasjoner, og kan forklare 60-70% av alle X-koblede RP tilfeller (2,5). Denne regionen av RPGR-genet er vanligvis kjent i litteraturen som ORF15 (open reading frame). RPGR med ORF15 (RPGR^{ORF15}) har høyt innhold av repeterende sekvenser med guanin og adenin, noe som gjør RPGR-genet veldig ustabil og utsatt for patogene mutasjoner (2). De purinrike sekvensene danner tandem-repitisjonsstrukturen, som er mer utsatt for DNA-replikasjonsfeil og genetisk ustabilitet, og gir derfor opphav til en generelt høyere mutasjonshastighet sammenlignet med andre deler av genet. Gitt den repeterende naturen til ORF15 er flertallet av patogene varianter observert i ORF15 rammeskift, som oppstår når nukleotider enten settes inn (inersjoner) eller slettes (delesjoner) fra DNA-sekvensen i andre multipler enn tre, og forstyrrer leserammen til genet (2). Disse mutasjonene kan føre til innsetting av et for tidlig stoppkodon, noe som resulterer i produksjon av et avkortet og sannsynligvis ikke-funksjonelt RPGR-protein (8). Det er imidlertid også andre typer mutasjoner, slik som missense-mutasjoner (der en enkelt nukleotidendring resulterer i at en annen aminosyre blir inkorporert i proteinet), som kan forekomme i ORF15 og bidra til utviklingen av X-bundet RP (2,5,8).

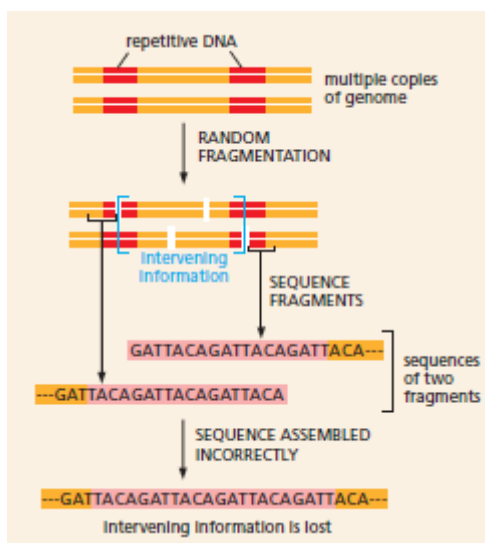
RPGR-genet uttrykkes hovedsakelig i fotoreseptorer og spiller en viktig rolle i reguleringen av ciliefunksjonen (8). I netthinnen på øyet har man spesialiserte sensoriske cilia i fotoreseptorer som konverterer lysstimuli til nevrologiske signaler som oppfattes og tolkes av hjernen (10). Funksjonen til RPGR-genet er ikke fullstendig kartlagt, men basert på proteinene det interagerer med er det rimelig å anta at det regulerer proteintransporten fra den indre til den ytre delen av fotoreseptorceller (2,9,11).

1.2 Next Generation Sequencing

Next Generation Sequencing (NGS) er en DNA-sekvenseringsteknikk som har revolusjonert genomisk analyse ved å muliggjøre rask og kostnadseffektiv sekvensering av DNA og RNA. Ved bruk av NGS kan man generere hele genomet eller eksomet til en pasient innen noen få dager. Dette er muliggjort av teknologiens evne til å utføre multiplekse sekvenseringsreaksjoner av millioner av korte DNA-fragmenter samtidig innenfor et enkelt eksperiment. Sammenlignet med sangersekvensering er kostanden per sekvensert basepar

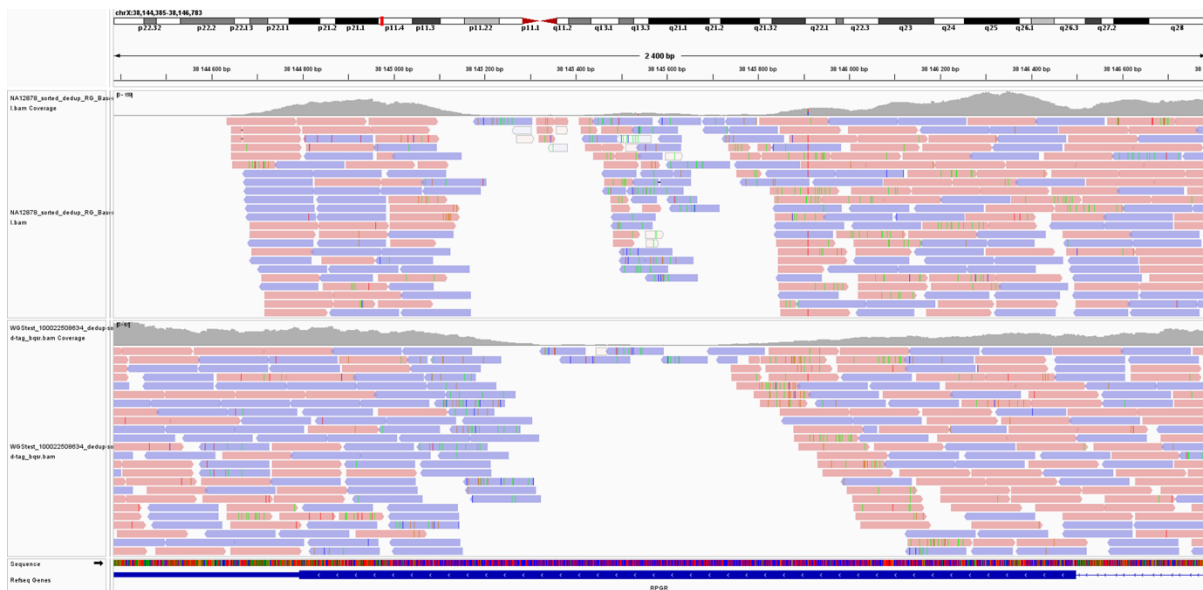
lavere. Dette gjør metoden til et raskere og billigere alternativ. Likevel er det noen områder av genomet hvor NGS ikke vil gi tilstrekkelig dekning til å oppdage genetiske varianter. I disse tilfellene kan sangersekvensering være å foretrekke, eller en kombinasjon av de to metodene kan brukes for å øke den genomiske dekningen og dermed muligheten til å oppdage varianter som ligger til grunn for genetiske sykdommer. (7,12,13).

Utfordringene med NGS er at leselengden er kortere og nøyaktigheten per basepar er lavere sammenlignet med sangersekvensering (14,15). Dette gjør det vanskelig å sette sammen hele genomiske sekvenser med høy nøyaktighet. Enkelte områder i genene våre består nemlig av repetitive DNA-sekvenser. Disse sekvensene er spesielt utfordrende å sette sammen fra de korte fragmentene som NGS produserer. Sannsynligheten for at fragmentene settes sammen feil er stor, dette illustreres i figur 1. I disse tilfellene vil sangersekvensering være bedre egnet grunnet den betydelige lengre leselengden av fragmenter. Det er enklere å konstruere et sammenhengende helhetsbilde når de individuelle sekvensene er av betydelig størrelse (7,12,16).



Figur 1: Repetitive DNA-sekvenser i et genom gjør det utfordrende å sette sammen fragmentene korrekt. I dette eksempelet inneholder DNA-et to segmenter av repetitiv DNA. Begge segmentene inneholder mange kopier av sekvensen «GATTACA». Når resultatene fra sekvenseringen vurderes kan man se at to fragmenter fra forskjellige områder i DNA-et overlapper. Dersom disse sekvensene settes sammen feil vil informasjonen som ligger i det originale repetitive området gå tapt (7).

NGS har vanligvis god dekning når det kommer til sekvensering av alle genene som er kjent for å forårsake RP. Unntaket er når DNA-sekvensene inneholder mange repeterende nukleotider, slik som i en del av ORF15-regionen i RPGR-genet. Et område i ORF15 på 550 bp (fra c.2400 til c.2950) har ingen dekning i det hele tatt, dette kan observeres i figur 2. NGS gir altså mangelfull data, noe som gjør at det er vanskelig å stille diagnosen XLRP (2).



Figur 2: Figuren gir et overblikk av ORF15 sekvensert med NGS. Posisjon c.2400 til c.2950 i ORF15 er inkludert i dataen. Den mangelfulle sekvenseringsdataen viser at RPGR^{ORF15} er en utfordrende region å sekvensere. Figuren er hentet fra programvaren IGV Desktop Application (IGV 2.16).

1.3 Long-range PCR

Long-range PCR (LR PCR) er en type PCR (Polymerase Chain Reaction) som brukes for å amplifisere lengre og/eller kompliserte DNA-fragmenter som ikke kan amplifiseres ved bruk av standard PCR-betingelser og reagenser (17). LR PCR kombinert med sekvensering fører til en mer sensitiv og ressurseffektiv metode for å detektere varianter i genet av interesse (18). Det fører til rask kartlegging av store genetiske områder, og er mer kostnadseffektiv sammenlignet med klassisk PCR.

Metoden for LR PCR ligner på mange måter en klassisk PCR-reaksjon som utføres i tre trinn; denaturering, hybridisering og polymerisering. I første trinn vil hydrogenbindinger mellom DNA-basene denatureres slik at man går fra dobbeltrådet til enkelttrådet DNA. I hybridiseringstrinnet vil primere binde seg til spesifikke sekvenser. Det siste trinnet består av en polymeriseringsfase hvor DNA-polymerasen syntetiserer nye DNA-tråder med primerne som utgangspunkt og DNA-templat som mal (7).

Ved LR PCR er det forventet at denatureringstrinnet vil ta lengre tid på grunn av det økte antallet hydrogenbindinger som må brytes for å skape et enkelttrådet DNA-molekyl (19). Videre vil valg av DNA-polymerase være avgjørende for PCR-resultatet. DNA-polymeraser har ulike egenskaper som påvirker deres evne til å syntetisere DNA. Derfor er det viktig å benytte DNA-polymeraser optimalisert for syntetisering av lange sekvenser. Eksempelvis kan

det tilsettes et «proof reading»-enzym sammen med DNA-polymerasen som korrekturleser den syntetiserte DNA-tråden. Disse enzymene har høy presisjon og nøyaktighet under DNA-syntesen, noe som reduserer risikoen for introduksjon av feil under amplifiseringen av lange DNA-fragmenter (20).

1.4 Nested PCR

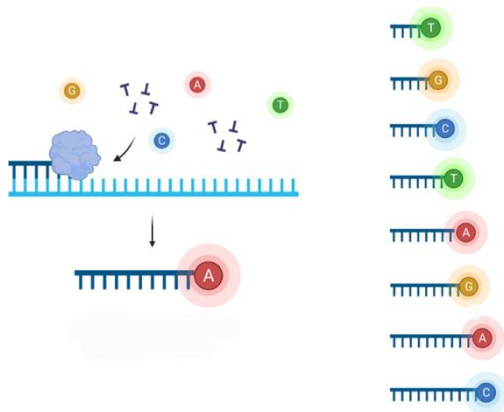
Nested PCR blir brukt for å sikre et mer spesifikt PCR-produkt, samt å få kopiert en større mengde produkt fra ønsket område på målgenet. Metoden innebærer å først utføre en konvensjonell PCR med DNA som templat. Deretter gjennomføres det en sekundær PCR med et annet sett primere, hvor man bruker produktet fra den første PCR-reaksjonen som templat (21). Det blir altså brukt et dobbelt sett med primere som binder seg ulike steder på målgenet. Dette vil minimere sjansen for uspesifikt PCR-produkt slik at man får økt spesifisitet. Videre vil bruk av to sett primere tillate et høyere antall sykluser å bli utført, og dermed øker sensitiviteten til PCR siden templat-DNA vil amplifiseres i to runder (22). Metoden brukes dersom det er små mengder mål-DNA i prøven, eller dersom man vil unngå uspesifikk amplifisering av DNA-sekvenser som kan ligne på mål-DNA (22,23).

1.5 Sangersekvensering

For å kunne si noe om nukleotidsammensetningen til et gen er man avhengig av å foreta en sekvensering. Sangersekvensering, eller dideoxysekvensering, benytter seg av kjedeterminerende nukleotider (7). Fordelen med sangersekvensering, sammenlignet med andre sekvenseringsmetoder, er at man kan lese av lengre sekvenser med større nøyaktighet (14). Metoden er derimot mer tidskrevende og brukes i dag ofte for å korrigere for svakheter ved NGS-sekvensering, for eksempel i sekvenser med mange repeterende baser (13).

Sangersekvensering starter med at spesifikke sekvenseringsprimere fester seg på angitt område på enkelttrådet DNA i prøven. Dette gir oss grunnlaget for sekvenseringsstart. Videre vil det tilsettes DNA-polymerase og et overskudd av ordinære deoxynukleotider (dNTP) og modifiserte, kjedeterminerende dideoxynukleotider (ddNTP) som mangler 3'-hydroksylgruppen. Når ddNTP inkorporeres i DNA-tråden får man en blokkering som hindrer videre tråddannelse. DNA-polymerasen henter inn nukleotider og det er tilfeldig om det blir et deoxynukleotid eller et dideoxynukleotid. Til slutt får man en samling av ulike

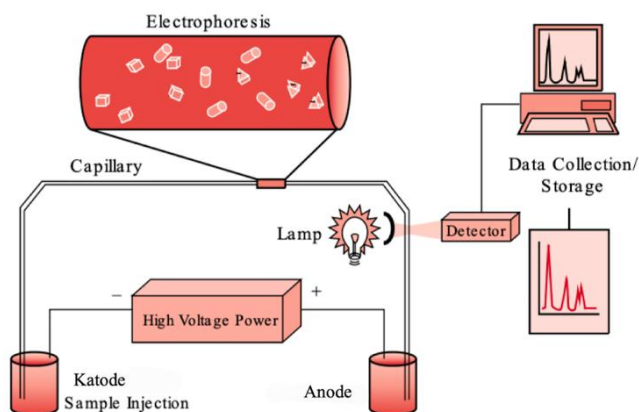
kopier som termineres i hver posisjon i den opprinnelige DNA-sekvensen. Hver enkelt av de modifiserte nukleotidene har påkoblet et fluorescerende molekyl som samsvarer med hver av de fire basene, illustrert i figur 3. De fluorescerende molekylene emitterer lys på forskjellig bølgelengde, slik at det er mulig å skille basene fra hverandre (7).



Figur 3: ddNTP er kjedeterminerende og inkorporeres tilfeldig under polymeriseringen. Hver ddNTP har påkoblet et fluorescerende molekyl som avgir farge og gir informasjon om nukleotidsammensetningen i DNA (24).

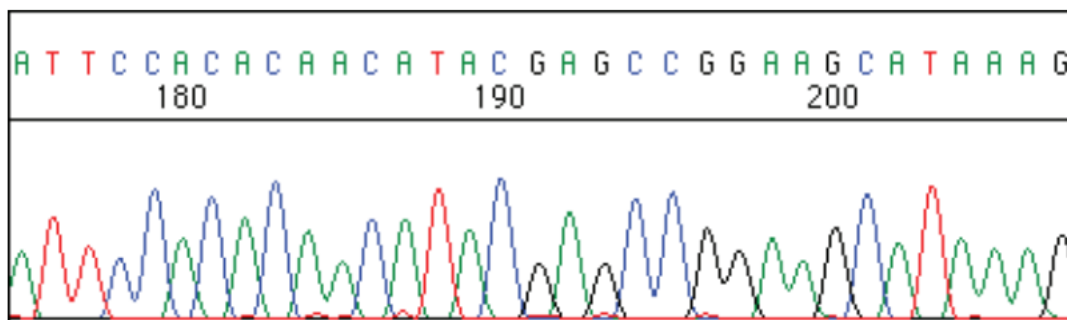
1.5.1 Kapillærelektroforese

I kombinasjon med sangersekvensering er det vanlig å bruke kapillærelektroforese for å separere og detektere resultatet fra sekvenseringen. Ved å bruke kapillærelektroforese har man muligheten til å påføre høyere spenning sammenlignet med gelelektroforese. Dette resulterer i raskere separasjon og høyere gjennomstrømming. Kapillæren er typisk laget av silica og kledd med polyamid (25). Endene på kapillæren plasseres i en anode- og en katodebuffer og når det blir påsatt spenning vil de negativt ladede DNA-fragmentene i prøven migrere mot anoden. DNA-fragmentene separeres basert på størrelse, hvor migrasjonstiden er lineær med fragmentets størrelse (13). Det betyr at kortere fragmenter vil passere gjennom kapillæren raskere enn lengre fragmenter. Prosessen er illustrert i figur 4.



Figur 4: Skjematiske fremstilling av kapillærelektroforese som illustrerer hvordan DNA-fragmentene vandrer mot anoden når det blir påsatt spenning. Fragmentene bestråles så med laser og detekteres, og resultatene bearbejdes i et bioinformatisk verktøy slik at de kan brukes til videre tolkning (25).

Når fragmentene, merket med fluorescerende molekyl, beveger seg gjennom kapillæren vil de passere et vindu hvor DNA-fragmentene bestråles med laser. Det emitterte lyset spres og detekteres av et kamera som også registrerer tiden det tar for DNA-fragmentene å migrere gjennom kapillæren. Hvert fragment er av ulik lengde og ettersom hver base har en fluorescensmerking som eksiterer lys med ulik bølglengde, får man et resultat som representerer baserekkefølgen i det aktuelle genet (26). Rådata sendes videre til et bioinformatisk verktøy og presenteres som topper i et elektroferogram som kan brukes til videre analysering (figur 5).



Figur 5: Eksempel på elektroferogram hvor hver topp angir en base. De ulike fargene representerer hver sin base slik at man får en visuell fremvisning av baserekkefølgen i et gen (26).

1.6 Problemstilling

Ved Avdeling for medisinsk genetikk (AMG) ved St. Olavs hospital i Trondheim gjøres eksomsekvensering og bioinformatisk filtrering av gener assosiert med øyesykdommer når pasienten er affisert med synsproblemer. Når det gjelder diagnostisering av RP er det særskilte utfordringer knyttet til deteksjon av patogene varianter i RPGR-genet med NGS, grunnet repeterende AG-sekvenser i ekson 15. NGS dekker rett og slett ikke opp den repetitive delen av genet. Å få fullstendig dekning av RPGR^{ORF15} er spesielt viktig ettersom mange av de patogene variantene finnes der og i dag har AMG ingen fungerende metode for dette. Denne oppgaven har derfor til hensikt å etablere en ny analysemetode, som vil gi nøyaktig identifisering av patogene varianter i ORF15, med sikte på å forbedre diagnostiseringen og oppfølgingen av individer med X-bundet RP.

Sangersekvensering kan brukes for å gi større dekning av ORF15. For å få etablert en metode for sekvensering av RPGR^{ORF15} i klinikken vil vi ta utgangspunkt i artikkelen til Li et al. (2), som beskriver LR PCR, Nested PCR og sangersekvensering av RPGR^{ORF15}.

2. Materiale og metode

2.1 Prøvemateriale

For utarbeiding og optimalisering av metoden ble det brukt DNA fra blodgivere (blodbankkontroller). En oversikt over prøvene er vist i tabell 1. Hver prøve ble fortynnet til 20 ng/ μ L og er i utgangspunktet å anse som normalkontroller. De har tidligere ikke vært undersøkt for RPGR-genet ved AMG. RPGR-genet er lokalisert på X-kromosomet og det ble derfor prioritert å benytte prøver fra menn for å utarbeide metoden, da de er forventet å gi mest håndterlig sekvenseringsdata (siden de kun har én kopi av genet).

Videre ble det tilsendt en positiv kontroll fra Avdeling for medisinsk genetikk ved Haukeland sykehus, som har etablert tilsvarende metode for sekvensering av RPGR^{ORF15}. Ved MGM ble det detektert to ulike genvarianter i RPGR^{ORF15}, hvorav den ene varianten var en patogen delesjon som gir leserammeskift, c.2426_2427del. Den andre varianten var en normalvariant, c.2389_2409del som ikke gir leserammeskift. Den positive kontrollen er en viktig del av metodeetableringen for å kunne teste metodens spesifisitet, spesielt siden variantene i denne kontrollen ligger i området som ikke dekkes med NGS-metodikk (fra c.2400 til c.2950) (2). Referansesekvensen som ble brukt til sammenligning er NM_001034853.2.

Tabell 1: Oversikt over blodbankkontrollene og kjønn.

Blodbankkontroller	Kjønn
BB1	Mann
BB2	Mann
BB3	Mann
BB4	Mann
BB5	Mann
BB6	Mann
BB7	Mann
BB8	Mann
BB9	Mann
BB10	Mann
BB11	Kvinne
BB12	Kvinne
BB13	Kvinne

2.2 Valg av primere

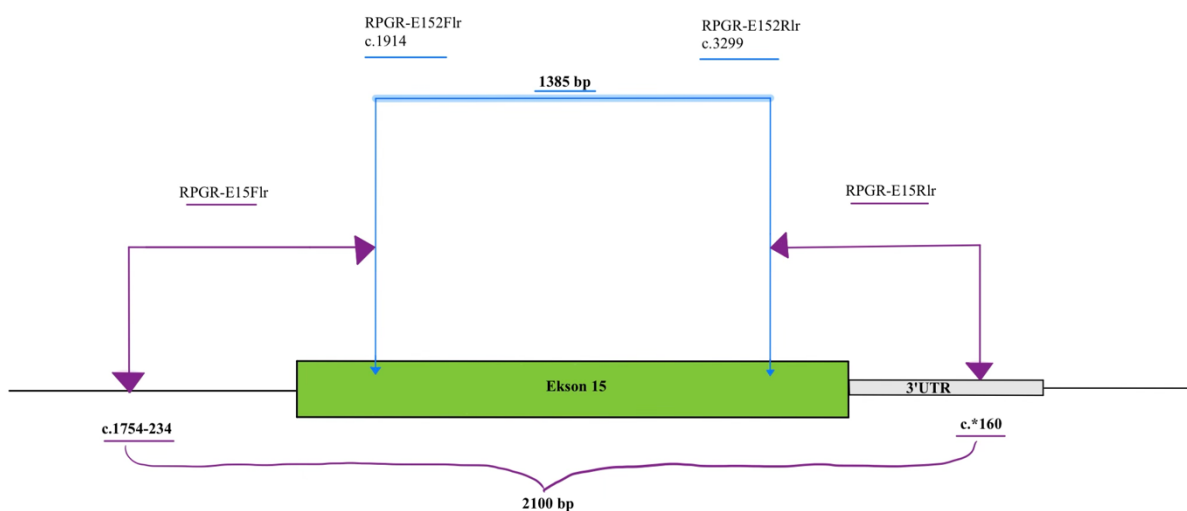
Primerne benyttet i denne bacheloroppgaven er oligonukleotider som blir syntetisert hos Eurogentec på bestilling. De ankommer laboratoriet som tørrstoff og løses rutinemessig til 100 μM med vann (stockløsning). Deretter fortynnes de til 10 μM med vann til bruksløsning.

Primere for LR PCR og Nested PCR ble hentet fra artikkelen til Li et al. (2). Tabell 2 viser sekvensen og størrelsen på PCR-produktet ved bruk av LR PCR og Nested PCR.

Tabell 2: PCR-primere benyttet til LR og Nested PCR.

Primer	Primersekvens	Størrelse på PCR-produkt (type PCR)
RPGR-E15F1r	5' -AGCCAGACAGTTACATGGAAGGTGCAA- 3'	2100 bp (LR-PCR)
RPGR-E15R1r	5' -TGTCTTTGGCTCCTTAACACAGCTGCA- 3'	
RPGR-E15-2F1r	5' -AGGCAAGGCAAAAATCAGTGG -3'	1386 bp (Nested PCR)
RPGR-E15-2R1r	5' -TGTTTGCCATATTTACAGATCCT- 3'	

Figur 6 viser hvor primerne binder seg på RPGR-genet. RPGR-E15F1r binder seg i intron og RPGR-E15R1r binder seg i 3'UTR. Primer RPGR-E15R1r ligger i 3'UTR i posisjon *160, det vil si 160 baser etter stoppkodon i ekson 15.



Figur 6: Oversikt over hvor de ulike primerne binder seg på RPGR-genet. Illustrasjon laget i Goodnotes.

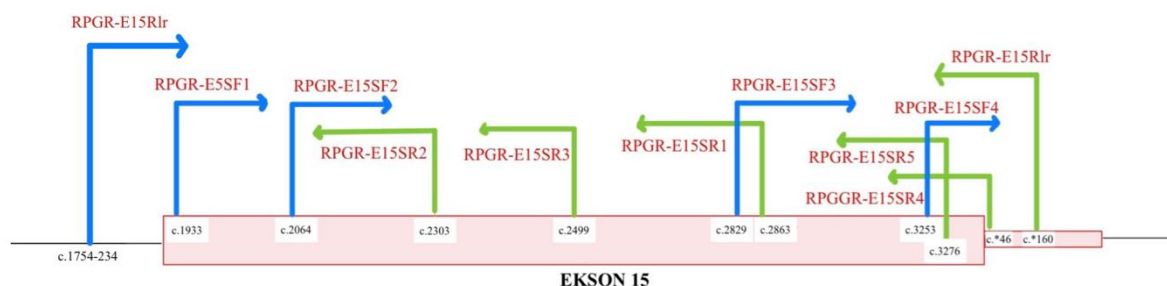
I likhet med PCR-primere, er også sekvenseringsprimerne hentet fra artikkelen til Li et al. (2). Det ble brukt fem sense-primere (forward-primere) og seks antisense-primere (revers-primere) for å sekvensere RPGR ekson 15. I tillegg til sekvenseringsprimerne fra artikkelen,

ble det besluttet å bruke RPGR-E15Flr fra LR PCR som en supplerende sekvenseringsprimer ettersom det er gunstig med flere primere som dekker samme område av sekvensen. RPGR-E15Rlr fra LR PCR ble også utprøvd som sekvenseringsprimer. Det er ekstra viktig å ha primere med tilstrekkelig dekning i området fra ca. c.2400 til c.2950, hvor man ikke har dekning med NGS (2). Primere brukt til sekvensering, med tilhørende primersekvens og bindingssete på RPGR ekson 15, er presentert i tabell 3.

Tabell 3: Primere brukt til sekvensering med tilhørende primersekvens og posisjon for bindingssete på RPGR ekson 15.

Primer	Primersekvens	Posisjon (RPGR ekson 15)
RPGR-E15Flr	5' -AGCCAGACAGTTACATGGAAGGTGCAA- 3'	c.1754-234
RPGR-E15SF1	5' - AGGCAAGGCAAAATCAGTGG - 3'	c.1933
RPGR- E15SF2	5' – GTAGAGGAGAAATGGAGAGG – 3'	c.2064
RPGR- E15SF3	5' - AAGGAGAAGGGGAAGGGGAGGAT - 3'	c.2829
RPGR- E15SF4	5' - AAGGCAGGATGGAGAGGAGT - 3'	c.3253
RPGR- E15SR1	5' - TCCTTCCTCCTCTTCCCCCTCCA - 3'	c.2863
RPGR- E15SR2	5' – CTCTCCTTCCTCCTTTTCAC - 3'	c.2303
RPGR- E15SR3	5' – CCTTCCTCCTCTTCCCCCTCA - 3'	c.2499
RPGR- E15SR4	5' - GCCCGTTATATGCAAGGC - 3'	c.46*
RPGR- E15SR5	5' – TGTTTGCCATATTTACAGATCCT -3'	c.3276
RPGR-E15Rlr	5' -TGTCTTTGGCTCCTTAACACAGCTGCA- 3'	c.160*

Sekvenseringsprimere og hvor de binder seg er illustrert i figur 7. RPGR-E15SR4 binder seg i 3'UTR (c.*46), mens resten av primere binder seg i ekson 15.



Figur 7: Oversikt over hvor sekvenseringsprimere binder seg på RPGR-genet. Illustrasjon laget i Goodnotes.

2.3 Long-range PCR

Første steg i sekvenseringsprosessen er amplifisering av RPGR ekson 15 ved bruk av LR PCR. For å undersøke om de valgte betingelsene for LR PCR-programmet var gunstige ble det analysert to blodbankkontroller (BB), før flere prøver ble analysert. I oppsettene ble det inkludert en kontaminasjonskontroll, Non Template Control (NTC), bestående av kun reagenser (uten DNA).

Betingelsene for PCR-programmet ble basert på artikkelen til Li et. al (2). De valgte konsentrasjonene og volumene til de ulike komponentene i mastermiksen ble bestemt på bakgrunn av reagensvedlegget fra produsenten av polymerasen (TaKaRa) (*vedlegg 1*), som vist i tabell 4. DNA-polymerasen er en Taq Polymerase med korrekturlesing som minimerer sannsynligheten for feil-innsatte baser under amplifikasjonen (27).

Tabell 4: Oversikt over alle reagenser som ble brukt til LR PCR.

Reagens	Bruksløsning	Sluttkonsentrasjon	Volum pr. prøve (µL)
dH ₂ O			12,75
dNTP Mix	2,5 mM	400 µM	4,00
10X LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	10X	1X	2,50
RPGR-E15F1r (Sense)	10 µM	0,6 µM	1,50
RPGR-E15R1r (Antisense)	10 µM	0,6 µM	1,50
DNA polymerase LA Taq HS	5 U/µL	0,5 U	0,25
Volum til fordeling			22.50
Templat DNA 20 ng/µL			2.50
Totalvolum (µL)			25

Tabell 5 viser hvilke betingelser som ble valgt ved utføring av LR PCR. I enkelte situasjoner kan det være gunstig å bruke en totrinns-PCR, fremfor en tretrinns-PCR. Hvis smeltepunktet (T_m) til primer nærmer seg polymeriseringstemperaturen på 72 C° anbefales det å vurdere en totrinnsreaksjon. En totrinnsreaksjon inkluderer ett denatureringstrinn og ett trinn som kombinerer hybridisering og polymerisering. Dette innebærer at selve hybridiseringen og polymeriseringen skjer på samme temperatur (28).

Tabell 5: PCR-program for LR PCR på 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

PCR-trinn	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Denaturering	95	15 min	
Denaturering	95	45 sek	35
Hybridisering	72	3 min og 30 sek	
Polymerisering	72	15 min	
Etterreaksjonsperiode	4	∞	

2.4 Nested PCR

Basert på artikkelen til Li et al. (2) ble det utført Nested PCR for å sikre en rikelig mengde av RPGR^{ORF15} til videre sekvensering. Dette PCR-trinnet ble antatt å være nødvendig grunnet de repeterende AG-sekvensene i ORF15. Produktet fra LR PCR på 2100 bp ble brukt som templat i Nested PCR. Det ble testet ulike fortynninger av LR PCR-produkt for å undersøke hvilken effekt de ulike fortynningene av LR-PCR-produkt ville ha på Nested PCR-produktets spesifisitet. Det ble besluttet å bruke en fortynning på 1:100 som var antatt å være optimal mengde templat. Fortynning ble laget ved å tilsette 2 µL LR PCR-produkt og 198 µL sterilt vann til et eppendorf-rør. Mastermiksen som ble brukt til Nested PCR inneholder de samme reagensene og mengdene som ved LR PCR, vist i tabell 4. Primerne som ble benyttet var RPGR-E15-2Flr og RPGR-E15-2Rlr.

Etter optimalisering ble det utarbeidet et endelig Nested PCR-program brukt til å amplifisere ORF15 (1386 bp), presentert i tabell 6. Betingelsene for dette PCR-programmet ble basert på anbefalingene til produsenten av PCR-polymerasen (28).

Tabell 6: PCR-program for Nested PCR på 2720 Thermal Cycler.

PCR-trinn	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Denaturering	95	1 min	
Denaturering	95	45 sek	35
Hybridisering	64	30 sek	
Polymerisering	72	2 min og 30 sek	
Polymerisering	72	10 min	
Etterreaksjonsperiode	4	∞	

2.4.1 Optimalisering av Nested PCR

For å finne ut hvilke betingelser som var mest gunstige for Nested PCR ble det utført flere optimaliseringstrinn for å oppnå ønskelig resultat. Det ble først brukt et tottrinns-PCR-program tilsvarende programmet oppgitt i artikkelen til Li et al. (2), før tretrinns-PCR ble utprøvd. Det ble videre undersøkt om det var mulig å oppnå bedre resultater med en alternativ DNA-polymerase, Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Platinum Taq er utviklet spesielt med hensyn på utfordrende sekvenser som krever en DNA-polymerase med høyere nøyaktighet. Optimaliseringstrinn gjort på PCR-programmet er presentert i tabell 7.

Tabell 7: Oversikt over ulike betingelser i PCR-programmet som ble forsøkt optimalisert.

Utprøvde betingelser i PCR-programmet	
Hybridiseringstemperatur	60 °C
	62 °C
	64 °C
Hybridiseringstid	30 sekunder
	40 sekunder
Antall sykluser	15 sykluser
	25 sykluser
	35 sykluser

En klassisk Nested PCR benytter PCR-produkt som templat, men under optimaliseringen av Nested PCR ble også primerparet RPGR-E152Flr og RPGR-E152Rlr testet direkte på DNA isolert fra prøvene. Det var ønskelig å undersøke om primerparet kunne klare å binde seg på rett plass når dette DNA-et ble benyttet som templat. I tillegg var det interessant å undersøke om utfordringene med Nested PCR skyldtes LR PCR-produkt som templat eller selve primerparet.

2.5 Gelelektroforese

Gelelektroforese benyttes for å undersøke PCR-produktets lengde, kvalitet og relativ mengde. De ulike DNA-fragmentene migrerer med ulik hastighet gjennom den porøse gelen og separeres basert på størrelse (7). For å visualisere resultatene fra LR PCR og Nested PCR ble det utført gelelektroforese på 1% E-gel EX agarose gel with SYBR Gold II (Invitrogen). Det

ble tilsatt fortdynnet størrelsesmarkør, DNA Molecular Weight Marker VII (Roche) (*vedlegg 4*), med totalvolum på 20 μL . Størrelsesmarkøren ble brukt til å bestemme omtrentlig størrelse på PCR-produktene, det vil si hvor mange basepar de består av. Til slutt ble de resterende brønnene tilsatt 15 μL sterilt vann og 5 μL PCR-produkt. E-gel iBase Power System (Invitrogen) er strømkilden som ble benyttet til elektroforese av gelen. For å oppnå best mulig separasjon av PCR-produktene og størrelsesmarkøren foregikk gelelektroforesen i omtrent 30 minutter. Videre ble resultatene fra gelelektroforesen synliggjort med UV-lys fra GeneFlash gel doc (Syngene). PCR-produktenes størrelse ble sammenlignet med størrelsesmarkøren for å forsikre at rett produkt ble amplifisert.

2.6 Sangersekvensering

2.6.1 Rensing av PCR-templat for sekvensering

Før sekvensering er det viktig å rense PCR-produktet for å hindre at ubrukte reagenser fra LR PCR blir med videre. Rensetrinnet ble utført ved å tilsette et reagens, A'SAP PCR Cleanup Kit (ArcticZymes), som renser PCR-produktet enzymatisk ved å fjerne overflødig primere og nukleotider (29). Reagenset består av to ulike enzymer; Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) og eksonuklease I. SAP defosforylerer overflødig nukleotider og eksonuklease I degraderer overflødig primere (30). Det ble tilsatt A'SAP til PCR-produktet i et 1:2,5 forhold. Det vil si at for 2,5 μL PCR-produkt, ble det tilsatt 1 μL ufortynnet A'SAP. PCR-produktet med tilsatt A'SAP ble deretter satt på PCR-maskinen (2720 Thermal Cycler) for inkubering. Betingelsene er presentert i tabell 8.

Tabell 8: PCR-program for rensing av PCR-produkt med A'SAP og hensikten med de ulike betingelsene.

Betingelser	Hensikt
37 °C i 15 min	Nedbrytning av overflødig primer (eksonuklease I) og dNTP (SAP)
80 °C i 1 min	Inaktivering av enzymene (A'SAP)
4 °C	Nedkjøling

2.6.2 Sekvenserings-PCR

Etter rensing må produktet amplifiseres i en sekvenserings-PCR. Stockløsningene av sense- og antisense-primere (Eurogentec) ble fortdynnet til 10 μM (bruksløsning), med unntak av

RPGR-E15SR1 som ble satt opp rett fra stockløsningen på 100 μM . Mastermiks ble tillaget for hver primer, det vil si fem sense-primere og seks antisense-primere (figur 7). Det ble brukt BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) som sekvenseringsreagens. Kitet består av to ulike reagens, en bufferløsning (BigDye Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer) og et sekvenseringsreagens bestående av DNA-polymerase, dNTP, fluorescensmerkede ddNTP og 2,5X Sequencing Buffer (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction mix). I tillegg ble Betain Enhancer Solution (VWR Chemicals) brukt som en sekvenseringsenhancer. En enhancer er en kjemisk forbindelse som har som hensikt å øke metodens spesifisitet, sensitivitet og effektivitet. En oversikt over volum av de ulike reagensene er presentert i tabell 9.

Betain virker ved å destabilisere GC-rike områder i DNA ved å binde seg til AT-rike basepar. Betain bidrar til å øke effektiviteten av DNA-polymerasen, samt hjelpe den til å redusere "pauser" i polymerisering. Disse pausene forårsakes av dannelsen av sekundære strukturer som kan få DNA-polymerasen til å skille seg fra DNA-tråden. Betain endrer T_m til DNA, slik at denatureringstemperaturen kan reduseres 1-5 $^{\circ}\text{C}$. T_m til primerbindingene vil også effektivt reduseres av betain. Betain vil generelt sett gjøre det lettere å kunne velge de betingelsene i PCR-programmet som vil føre til at det amplifiserte PCR-produktet blir spesifikt og rikelig i mengde (vedlegg 2).

Tabell 9: Oversikt over alle reagenser som ble brukt til sangersekvenserings-PCR.

Reagens	Volum per prøve (μL)
dH ₂ O	1,8
Betain	2,0
5x Buffer	2,0
Sekvenseringsmiks	1,0
Primer	0,2*
Volum miks	7,0

*Unntak: 4 μL av RPGR-E15SR1. dH₂O og 5x buffer ble sløyfet for å beholde riktig totalvolum.

Det ble tilsatt 7 μL av mastermiks i en 96-brønners mikroplate. Deretter ble det tilsatt 3 μL rensert LR PCR-produkt i hver brønn slik at totalvolum i hver brønn var 10 μL . Mikroplaten ble satt på 2720 Thermal Cycler.

Det ble gjennomført flere ulike optimaliseringstrinn for å forbedre resultatene på enkelte primere. For sekvenserings-PCR-programmet ble det først brukt en hybridiseringstemperatur

på 54°C, som er standard prosedyre ved Avdeling for Medisinsk genetikkk ved St. Olavs hospital. Ved hjelp av Oligo Primer Analysis Software ble smeltepunktet for hver primer undersøkt. På grunn av at flere sekvenseringsprimere ikke fungerte optimalt ved standard betingelser, i tillegg til å ha en relativt høy T_m (over 60 °C) (*vedlegg 3*) ble det bestemt å bruke en hybridiseringstemperatur på 58 °C. For primeren RPGR-E15SF3 ble det utført ytterligere optimaliseringstrinn. Det ble forsøkt å øke denatureringstiden i kombinasjon med å øke hybridiseringstemperaturen til 59 °C. Økt denatureringstid ble valgt på bakgrunn av at templatet er GC-rikt og man har derfor flere hydrogenbindinger som må brytes for å få fullstendig denaturering av DNA-trådene (*vedlegg 2*). Hypotesen var at 10 sekunder ikke var nok til å bryte alle hydrogenbindingene, slik at primeren ikke hadde mulighet til å feste seg i bindingssetet. Denatureringstiden ble derfor økt til 15 sekunder. Økt hybridiseringstemperatur ble forsøkt fordi primer RPGR-E15SF3 har et smeltepunkt på ca. 66 °C og trenger høyere temperatur enn 58 °C for å binde seg spesifikt.

PCR-betingelser som ble brukt ved sangersekvenserings-PCR er presentert i tabell 10. Det ble tatt utgangspunkt i standardprogrammet for sekvenserings-PCR ved AMG, men med en høyere hybridiseringstemperatur på grunn av primernes smeltepunkt.

Tabell 10: Betingelser brukt ved sangersekvenserings-PCR på 2720 Thermal Cycler.

PCR-trinn	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Denaturering	96	1 min	
Denaturering	96	10 sek	26
Hybridisering	58	5 sek	
Polymerisering	60	4 min	
Etterreaksjonsperiode	4	∞	

2.6.3 Rensing av sekvenseringsprodukt

Etter sangersekvenserings-PCR er det nødvendig med et rensesteg som fjerner rester av overflødig ddNTP. Dette minimerer risiko for uønsket fluorescens under kapillærelektroforesen, og forhindrer dermed støy. Sekvenseringsproduktet ble renset ved bruk av BigDye XTerminator Purification Kit (Applied biosystems). Kitet består av to ulike resinkuler; BigDye Xterminator Solution og SAM Solution. BigDye XTerminator Solution består av kuler som binder opp ddNTP, samt salter og ladede molekyler. SAM Solution

stabiliserer det rensede produktet og forsterker virkningen til BigDye XTerminator Solution (31). Ved sentrifugering vil kulene legge seg i bunnen og supernatanten vil dermed være fri for ddNTP, salter og ladete molekyler som kan forstyrre under kapillærelektroforesen. 55 µL XTerminator bruksløsning (10 µL Big Dye Xterminator Solution og 45 µL SAM solution) ble alikvotert til hver brønn i mikroplaten (totalt 65 µL). Mikroplaten ble ristet i 30 minutter ved 2000 rpm og deretter sentrifugert ved 1000 g i 2 minutter. Til slutt ble prøvene lastet på instrumentet ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). ABI3730 er et automatisert instrument for kapillærelektroforese, og brukes for å separere og detektere DNA-sekvensene i prøvene.

2.7 Resultatbehandling

2.7.1 Sequence Scanner 2

Resultatene fra ABI370 ble overført til programvaren Sequence Scanner 2 (Applied Biosystems). Sequence Scanner 2 er en programvare som kan fremstille kvalitet og intensitet på sekvenseringsdata i ulike rapporter. Første steg i resultatbehandlingen var å vurdere sekvenseringsresultatene i Sequence Scanner 2. "Plate Report" gir et oversiktsbilde av rådata fra sekvenseringen hvor man kan vurdere elektroferogrammene visuelt, samt bedømme sammenhengende leselengde (Continuous Read Length, CRL) som et direkte mål på kvaliteten på sekvenseringsdata. I "Quality Control Report" kan man hente kvalitetsparametere om gjennomsnittlig signalstyrke for hver enkelt base, oppgitt i signalintensitet (Relative Fluorescent Units, RFU). Sequence scanner 2 gjorde det lett å vurdere datakvaliteten, samt å oppdage trender i sekvenseringsdataen og eventuelle prøver som feilet (32).

2.7.2 Sequence Pilot

Sekvenseringsdataen ble vurdert i Sequence Pilot etter å ha kvalitetssjekket den i Sequence Scanner 2. I Sequence Pilot ble prøvenes sekvenser sammenlignet med referansesekvensen slik at avvik, fra det som anses som normalsekvensen, kunne detekteres. Programmet er altså spesielt nyttig å bruke for å avdekke sekvensvarianter i DNA. I tillegg kan man vurdere dekningsgraden av prøvesekvensene siden de aligner seg mot referansesekvensen. Det er mulig å se på hvordan de ulike sekvensene overlapper hverandre, slik at det blir en sammenhengende sekvens som kan avleses i sin helhet. Den positive kontrollen ble undersøkt

for oppgitte delesjoner for å kunne gi en konklusjon om sekvenseringsbetingelsene var av god nok kvalitet. Vurdering av signalintensitet og bakgrunnsstøy inngikk i kvalitetsvurderingen av sekvenseringsdataen. Kvaliteten er god dersom det er tydelige skiller mellom hvert nukleotid (33).

I Sequence Pilot ble sekvensene fra prøvene redigert. På begynnelsen og enden av hver sekvens er det som regel et uleselig område på omtrent 30 bp. Dette skyldes at DNA-polymerasen bruker tid på å stabilisere seg etter at den har festet seg til hver primer, og mot slutten av sekvensen vil DNA-polymerasen brukes opp. Dette gir uleselige sekvenser. Disse områdene ble derfor klippet bort for å få et mer oversiktlig bilde av den reelle dekningen av ekson 15 med de valgte sekvenseringsprimerne. I tillegg var det behov for manuell redigering på enkelte områder i sekvensene hvor bakgrunnsstøyen var av betydelig signifikans (33).

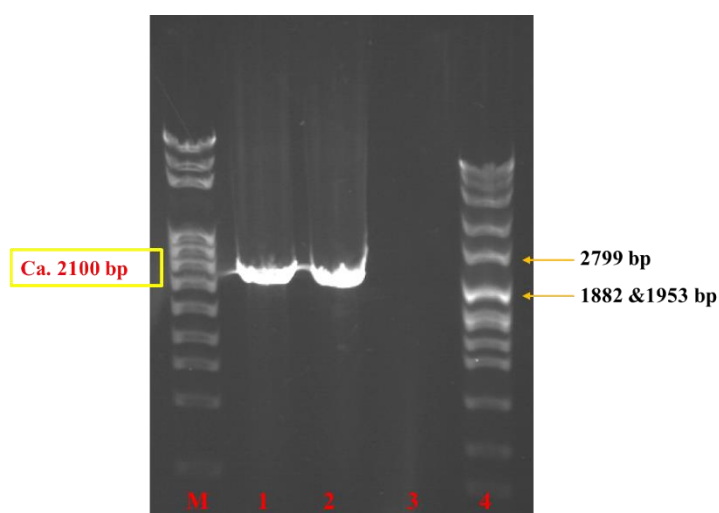
3. Resultater

Målet med denne oppgaven var å etablere en metode for sekvensering av RPGR ekson 15, som kan gi nøyaktig identifikasjon av patogene varianter i ORF15. Denne regionen er utfordrende å sekvensere med NGS, ettersom regionen har høyt innhold av repeterte baser av typen adenin og guanin (98% i en del av ORF15) (2). Det er derfor ønskelig å bruke sangersekvensering som en supplerende sekvenseringsmetode.

Under utarbeiding av sangersekvenseringsmetoden ble metodene for LR PCR og Nested PCR forsøkt optimalisert. PCR-produktene fra arbeidet med disse metodene ble visualisert med gelelektroforese. Etter sekvensering ble sekvensene fra LR PCR-produktene vurdert i Sequence Scanner 2 og Sequence Pilot. For å kontrollere metodens spesifisitet ble det benyttet en positiv kontroll med kjente varianter.

3.1 Long-range PCR

Gelelektroforese ble utført etter LR PCR for å undersøke om ønsket produkt var blitt amplifisert, og om det var spesifikt (i rett størrelse, og ingen uspesifikke bånd til stede). Figur 8 viser resultatene fra en representativ gelelektroforese hvor PCR-produktene er amplifisert med LR PCR, resterende resultater fra LR PCR er dokumentert i vedlegg 5. Primerparet brukt i analysen er RPGR-E15Flr og RPGR-E15Rlr.



Figur 8: Gelelektroforese med PCR-produkter fra LR PCR. På bildet av gelen inneholder brønn M og 4 størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). Brønn 1 er tilsatt LR PCR-produkt fra BB13 og brønn 2 er tilsatt LR PCR-produkt fra BB12. Brønn 3 inneholder NTC. Elektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 25 minutter.

Ønsket PCR-produkt fra LR PCR er på 2100 bp når man bruker primerparet RPGR-E15Flr og RPGR-E15Rlr. Ved å sammenligne med størrelsesmarkøren ser man at de amplifiserte

produktene i brønn 1 og 2 legger seg mellom DNA-fragmentene med lengde 2799 bp og 1953 bp. Dette indikerer at ønsket PCR-produkt på 2100 bp har blitt amplifisert. Det er ingen tegn til uspesifikke PCR-produkt, noe som er viktig for å få produsert gode resultater ved sangersekvensering. Den negative kontrollen i brønn 3 viser ingen tegn til kontaminasjon av reagensene.

3.2 Nested PCR

Nested PCR-produktene ble visualisert på gel med gelelektroforese i likhet med LR PCR-produktene som er beskrevet i kapittel 3.1. I tillegg ble isolert DNA fra blodbankkontrollene benyttet som templat med primerparet RPGR-E15-2Flr og RPGR-E15-2Rlr som en kvalitetskontroll for PCR-betingelsene og primerparet i Nested PCR (kapittel 2.4.1).

Resultatene fra gelelektroforesen i vedlegg 6 (figur 26) viser at primerne og PCR-betingelsene fungerte optimalt når isolert DNA fra blodbankkontrollene ble benyttet som templat. PCR-produktene ble mer spesifikke og av høyere konsentrasjon sammenlignet med når fortynnet LR PCR ble brukt som templat. For å få god kvalitet på sekvenseringsdataen egner det seg ikke å sekvensere fra uspesifikke PCR-produkt.

I vedlegg 6 er Nested PCR-produktene fra flere optimaliseringstrinn visualisert med gelelektroforese. Under optimalisering av Nested PCR ble det testet ulike fortynninger, hvor man fant ut at den optimale fortynningen var 1:100 (figur 26). Nested PCR med fortynning 1:100 ble forsøkt reproduisert (figur 27), men istedenfor å gi det ønskelige produktet på 1386 bp, ble det amplifisert et produkt med en størrelse nært opptil LR PCR-produktet. Det har altså blitt amplifisert en overvekt av feil PCR-produkt. Dette skyldes mest sannsynlig carry-over fra LR-PCR, enten av selve LR PCR-produktet eller ubrukte reagenser (inkl. primere). Resultatene fra gelelektroforesen i vedlegg 6 (figur 27) viser at Nested PCR-metoden ikke er reproducerbar. I tillegg er Nested-PCR-produktene preget av flere uspesifikke bånd med stor variasjon i størrelse, noe som er ugunstig for videre sekvensering. På grunn av at Nested PCR har vist seg å være vanskelig å reproducere, ble det bestemt å forkaste Nested PCR som mellomtrinn i metoden og ikke bruke ytterligere ressurser på optimalisering.

3.3 Sekvenseringsresultater

3.3.1 Sequence Scanner 2

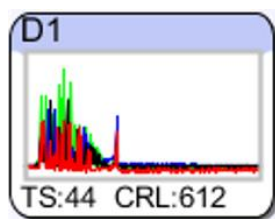
Et representativt utvalg av rådata fra sekvenseringen av fem blodbankkontroller (BB) kan observeres i figur 9A. De resterende resultatene fra sekvenseringen av positiv kontroll og blodbankkontrollene er dokumentert i vedlegg 7 og 8. BB1-BB7 er prøver fra menn, og BB11 er en kvinnelig prøve. All sekvensering ble foretatt på prøver amplifisert direkte med LR PCR (RPGR-E15Flr og RPGR-E15Rlr), da det viste seg å gi tilfredsstillende sekvenseringsresultater.

Ved å vurdere sammenhengende leselengde (CRL) ser man at alle sense-primene, bortsett fra RPGR-E15Flr, har gjennomgående lav leselengde. En ideell primer skal kunne lese opptil 5-600 nukleotider, men RPGR-E15SF1, RPGR-E15SF2 og RPGR-E15SF3 ligger alle under 500 nukleotider. I figur 9A ser man at CRL til RPGR-E15SF2 på prøve BB2 er så lav som 109 nukleotider. Antisense-primene har derimot akseptabel leselengde, hvor alle bortsett fra RPGR-E15SR5 ligger over 500 nukleotider. I vedlegg 8 kan man se at leselengden til RPGR-E15SR1 varierer helt fra 165 til 647 nukleotider. Dette tilsier at primeren er svært ustabil.

Ved sekvensering på ABI3730 er det ønskelig at gjennomsnittlig signalstyrke bør være minimum 200 RFU for hver primer (26). "Quality Control Report" i vedlegg 11 og 12 viser at det er variasjon i signalstyrken mellom primerne, spesielt RPGR-E15SR5 har gjennomgående lav signalstyrke. Sense-primene har lav gjennomsnittlig signalstyrke, sammenlignet med antisense-primene.



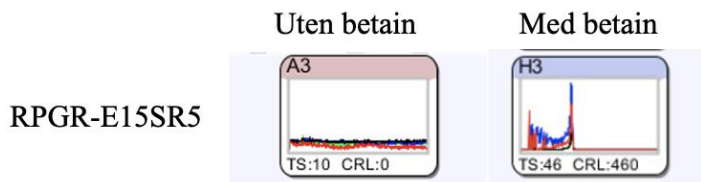
Figur 9A: Utskrift av rådata fra sekvensering med LR PCR-produkt (RPGR-E15Flr og RPGR-E15Rlr) hentet fra Sequence Scanner 2. Figuren viser resultater fra BB1, BB2, BB3, BB4 og BB5.



Figur 9B: Et forstørret bilde fra rådataen i figur 9A fra en vilkårlig sekvenseringsprimer. Koordinatene øverst i hvert bilde refererer til posisjonen den enkelte sekvensen har på PCR-brettet. CRL for den enkelte sekvensen vises nederst til høyre i hvert bilde.

3.3.2 Rådata med og uten betain

For å teste funksjonen til Betain Enhancer Solution i sekvenseringsreaksjonen ble primer RPGR-E15SR5 testet med og uten betain i reaksjonen, hvor valg av primer var tilfeldig. Figur 10 viser at primeren RPGR-E15SR5 ikke ga sekvens uten tilsetning av betain. Prøven med tilsatt betain ga betydelig bedre resultater med akseptabel leselengde.

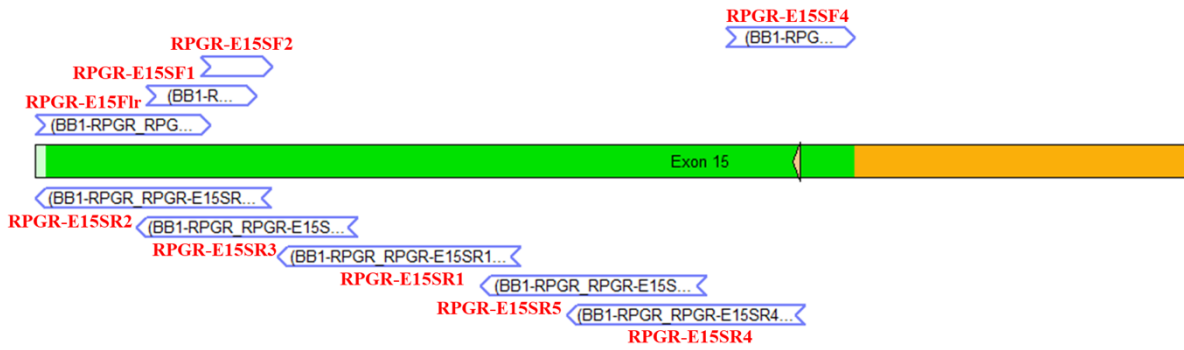


Figur 10: Rådata fra sekvensering av BB8 med og uten betain hentet fra Sequence Scanner 2. Rad til venstre viser RPGR-E15SR5 uten betain, og rad til høyre viser RPGR-E15SR5 med betain. CRL lik 0 tyder på at ingen lesbare sekvenseringsdata er produsert.

3.3.3 Sequence Pilot

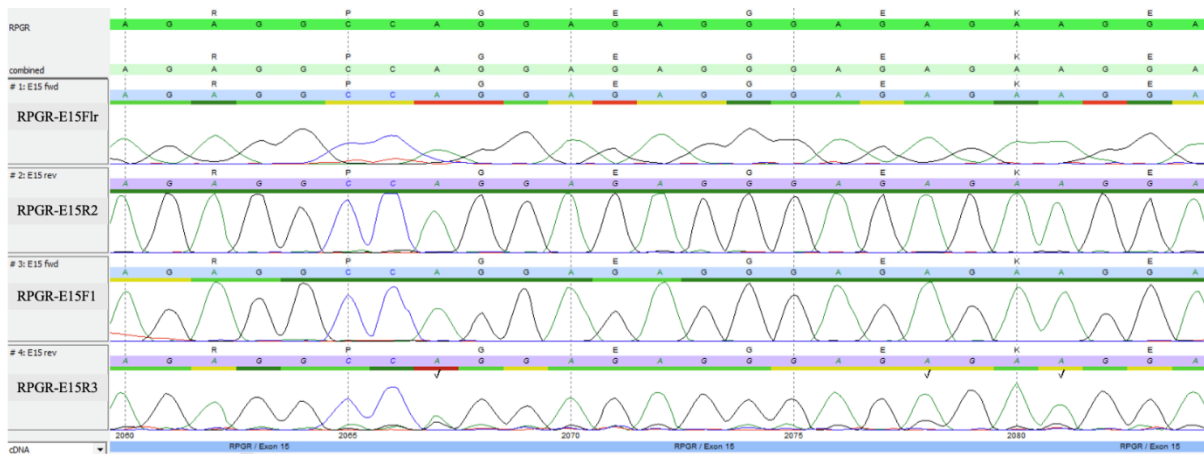
All sekvenseringsdata ble vurdert i Sequence Pilot, som ble brukt til å se hvordan sekvensene stemmer overens med referansesekvensen til RPGR-genet (NM_001034853.2). I dette kapittelet vil det bli presentert et representativt oversiktsbilde som viser deknningen av ekson 15 med de ulike primerne. I tillegg vil utvalgte bilder fra sekvenseringen og detekterte varianter i blodbankkontrollene og i positiv kontroll bli presentert. Sekvenseringsdata fra BB1 gir et representativt bilde for sekvenseringen av alle blodbankkontrollene og positiv kontroll. Påfølgende figurer vil derfor være fra denne prøven. Resterende sekvenseringsdata er dokumentert i vedlegg 13-21.

Oversiktsbildet fra sekvenseringen av BB1 er presentert i figur 11. Den grønne markeringen indikerer overensstemmelse mellom referansesekvensen og prøvesekvensen og den oransje markeringen viser området uten dekning av primere. Det oransje området, til høyre for den gule pilen på ekson 15, er 3'UTR. Siden denne delen av eksonet dekkes med NGS er det ikke nødvendig å ha dekning her med sangersekvenseringsprimere. Figuren viser at det er god overlapp mellom sense- og antisense-primere i begynnelsen av ekson 15. Midtpartiet av eksonet dekkes derimot kun av antisense-primere (RPGR-E15SR1, RPGR-E15SR5 og RPGR-E15SR4). Det er kun én primer (RPGR-E15SR1) som dekker ekson 15 fra omtrentlig posisjon c.2840 til c.2500 (ca. 340 bp). RPGR-E15SR5 dekker også et område alene, fra omtrentlig posisjon c.2960 til c.2840 (ca. 120 bp). I tillegg er leselengden til sense- og antisense-primere verdt å merke seg. Figuren viser at antisense-primere fungerer betydelig bedre med hensyn på leselengden.



Figur 11: Oversiktsbilde fra sekvenseringen av BB1 hentet fra Sequence Pilot. Figuren illustrerer hvor primerne binder seg på RPGR ekson 15, hvilken retning de har og hvor de dekker.

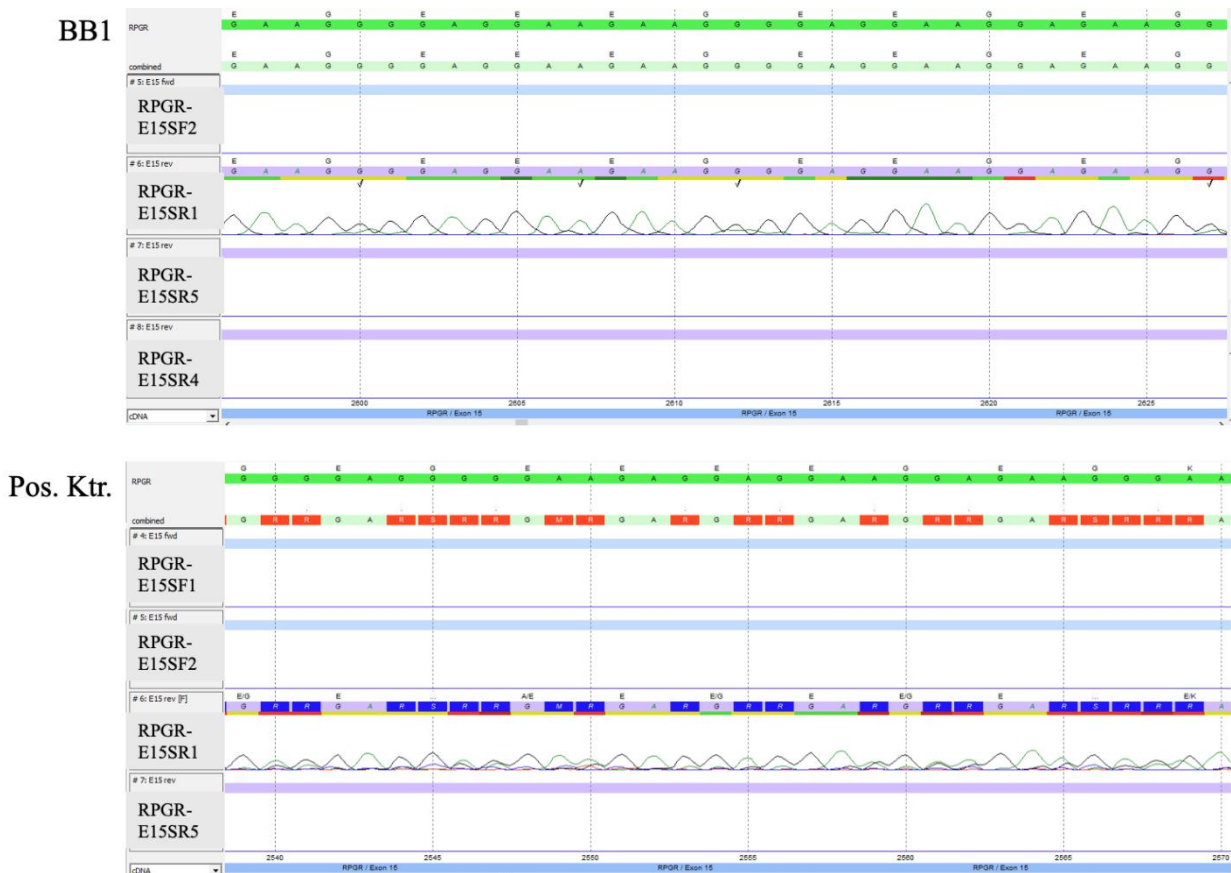
Et utklipp fra sekvenseringsdataen til BB1 presenteres i figur 12. Sekvenseringsdataen er hentet fra området med overlappende sense- og antisense-primere. Figuren viser at primer RPGR-E15SR2 og RPGR-E15SF2 gir minimal bakgrunnsstøy og reproduserbare sekvenser. Primer RPGR-E15Flr og RPGR-E15SR3 har også dekning i dette område, men de gir ikke like stabile sekvenser. Dette skyldes at utklippet er tatt fra området hvor disse primerne nærmer seg slutten av sekvenseringen. Primerne vil altså gi renest sekvenser med sterkest signal i midtpartiet. Videre kan man observere at spesielt RPGR-E15SR3 har en del bakgrunnsstøy.



Figur 12: Sekvenseringsdata til BB1 hentet fra Sequence Pilot. Området som vises dekker posisjon c.2060 til c.2084. Hver rad representerer en sekvenseringsprimer; hver topp representerer ett nukleotid, og A, T, C og G er representert med hver sin farge.

Sekvenseringsprimer RPGR-E15SR1 gir betydelig bakgrunnsstøy, se figur 13. I den positive kontrollen er denne bakgrunnsstøyen mer markant enn i BB1, noe som igjen viser hvor ustabile sekvenser RPGR-E15SR1 gir. BB1 er redigert manuelt, mens den positive kontrollen er uredigert. Positiv kontroll vil derfor ha blå felt på prøvesekvensen og røde felt på referansesekvensen som indikerer uoverensstemmelse mellom referansesekvens og avlest sekvens. Under basene med “hake” på BB1 er det utført manuell redigering fordi signalene

ikke var enstydig. Primeren gir betydelig bakgrunnsstøy som kan gjøre punktmutasjoner vanskelig å bestemme.



Figur 13: Sekvenseringsdata til BB1 og positiv kontroll hentet fra Sequence Pilot. Området dekkes kun av RPGR-E15SR1.

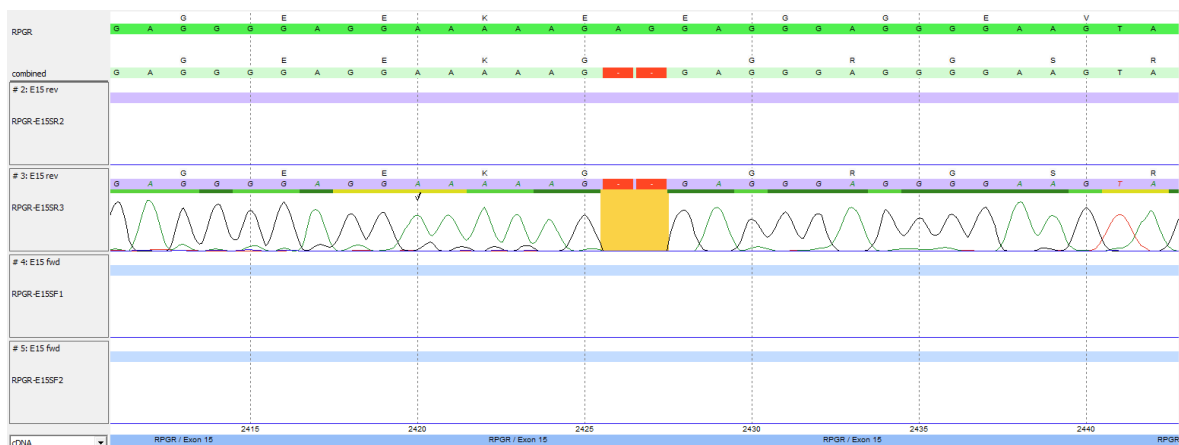
I likhet med RPGR-E15SR1 gir også RPGR-E15SR5 og RPGR-E15SR1r betydelig bakgrunnsstøy. Vedlegg 14 (Figur 31) viser et utklipp fra sekvenseringen av BB1 med fokus på RPGR-E15SR5. Fra omtrentlig posisjon c.2850 gir primeren spesielt mye bakgrunnsstøy. Dette kan være problematisk ettersom den dekker ca. 120 bp alene (ca. c.2960 til c.2840). Vedlegg 14 (figur 32) viser resultatene fra sekvensering med RPGR-E15R1r (BB1). Området hvor RPGR-E15R1r gir sekvens blir overlappet av andre primere (RPGR-E15SR4 og RPGR-E15SF4) som gir renere og mer pålitelig sekvenseringsdata.

I den positive kontrollen ble det detektert en inframe deleksjon, c. 2389_2409del. Denne kan observeres ut ifra sekvenseringsdataen i figur 14. Ettersom deleksjonen består av 21 baser og er delelig med 3 vil den ikke føre til leserammeskiift. Ut fra informasjonen i programvaren Alamut Visual Plus (v 1.9) og databasen Clinvar ble det med sikkerhet bestemt at varianten er benign. Dette samsvarer med oppgitt normalvariant beskrevet i kapittel 2.1. Deleksjonen ligger i et område på eksonet som dekkes av primeren RPGR-E15SR3.



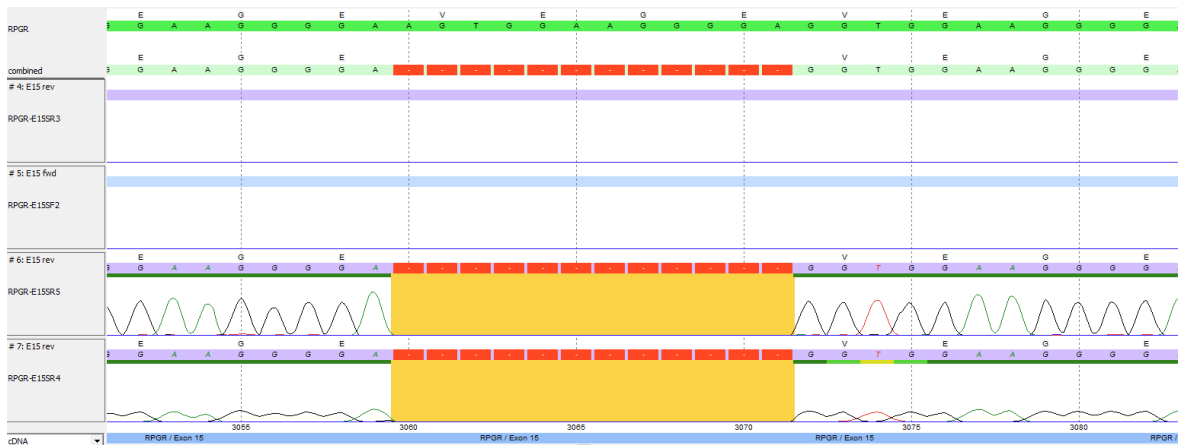
Figur 14: Sekvenseringsdata fra positiv kontroll som viser inframe deletjonen med posisjon c. 2389_2409del.

I den positive kontrollen ble det også detektert en out-of-frame deletjon, c. 2426_2427del. Denne kan observeres ut ifra sekvenseringsdataen i figur 15. Ettersom deletjonen består av kun to baser vil den føre til leserammeskift. I Alamut og Clinvar ble varianten oppgitt som patogen. Deletjonen ligger i et område på eksonet som dekkes av primeren RPGR-E15SR3.



Figur 15: Sekvenseringsdata fra positiv kontroll hentet fra Sequence Pilot som viser den patogene deletjonen med leserammeskift i posisjon c.2426_2427del.

I prøve BB4 ble det detektert en inframe deletjon, c.3060_3071del, som kan observeres i figur 16. I Clinvar er varianten klassifisert som benign (34), og den har høy allelfrekvens i befolkningen (Alamut). Funnet er trolig en polymorfi, som er definert som genvarianter til stede i minst 1% av befolkningen og derfor sannsynligvis ikke patogene (7). Deletjonen ligger i et område på eksonet som dekkes av to primere; RPGR-E15SR4 og RPGR-E15SR5.



Figur 16: Sekvenseringsdata fra BB4 hentet fra Sequence Pilot som viser inframedlesjonen med posisjon c. 3060_3071del.

3.3.4 Optimalisering av sekvenserings-PCR

Resultatene fra optimaliseringen av sekvenserings-PCR er presentert i vedlegg 9. Utskrifter fra rådataen viser at primeren RPGR-E15SR5 har en betydelig lengre leselengde ved hybridiseringstemperatur på 58 °C. Primer RPGR-E15SF1 derimot gir lengre sekvens ved hybridiseringstemperatur på 54 °C. Det er minimal forskjell mellom sekvenseringskvaliteten til de resterende sekvenseringsprimerne i de to PCR-programmene.

Resultatene fra forsøkt optimalisering av primeren RPGR-E15SF3 er dokumentert i vedlegg 10. Ved å øke denatureringstiden ga RPGR-E15SF3 en kort sekvens på om lag 20 nukleotider. Økt hybridiseringstemperatur, samt økt hybridiseringstemperatur i kombinasjon med økt denatureringstid ga ingen sekvens (CRL lik 0). Primer RPGR-E15SF3 måtte derfor forkastes, da den ikke ga resultater som bidro til å øke dekningen av RPGR ekson 15.

4. Diskusjon

Hensikten med oppgaven er å etablere en ny analysemetode i diagnostikken ved AMG, som skal gi en nøyaktig identifisering av patogene varianter i RPGR^{ORF15}. Dette spesifikke området er svært utfordrende å sekvensere ettersom genet består av mange repeterende sekvenser, og i dag har AMG ingen fungerende metode for dette. Vi har lyktes med å sekvensere hele ekson 15, inkludert ORF15 og området uten dekning av NGS (ca. c.2400 til c.2950) (2), ved bruk av sangersekvensering. Det er derimot varierende kvalitet på sekvensene som er produsert. Behovet for å optimalisere enkelte primere er stort, og er avgjørende for å få benyttet metoden i klinikken.

Metoden for LR PCR og Nested PCR er hentet fra artikkelen til Li et. al (2). Det ble gjort minimale endringer når LR PCR ble utprøvd ved AMG da metoden ga vellykket amplifisering av det ønskede PCR-produktet. Vi fant også at metoden er reproducerbar, siden resultatene viste det samme for de ulike blodbankkontrollene. Siden artikkelen til Li et al. ble brukt som utgangspunkt for etablering av metoden, var det ønskelig å teste Nested PCR for amplifisering av RPGR^{ORF15}. Denne PCR-metoden ble antatt å være nødvendig for å sikre stor nok mengde og spesifikt produkt av ORF15 til videre sekvensering. På grunn av dette ble det utført flere optimaliseringstrinn for å få etablert PCR-metoden, men den viste seg å ikke gi reproducerbare resultater. Det ble derfor bestemt å forkaste Nested PCR som mellomtrinn i metoden. Avgjørelsen underbygges av konklusjonen til MGM ved Haukelands universitetssykehus, som også har valgt å forkaste Nested PCR i sin metode. Det kan derimot ikke utelukkes at bruken av Nested PCR i metoden kunne gitt sekvenseringsresultater av høyere kvalitet. Blueprint Genetics har oppnådd et resultat med 100% sensitivitet ved å bruke Nested PCR i metoden (35). Det er imidlertid ikke oppgitt detaljert metode, noe som gjør det vanskelig å fastslå om andre faktorer kan ha bidratt til de gode sekvenseringsresultatene.

Årsaken til at Nested PCR ikke ga reproducerbare resultater skyldes at vi ikke kunne standardisere fortynningsfaktoren til LR PCR-produktene. Resultatene viser at dersom man skal bruke Nested PCR, må fortynningsfaktoren tilpasses mengden LR PCR-produkt fra hver prøve. Hvis ikke dette gjøres risikerer man å få for lav konsentrasjon av templatet som kan føre til utilstrekkelig amplifisering av Nested PCR-produktet, eller for høy konsentrasjon av templatet som kan føre til carry-over fra LR PCR. Å tilpasse fortynningsfaktoren etter hver prøve medfører unødvendig bruk av ressurser som ikke egner seg når metoden skal anvendes i rutinediagnostikk.

Ved sekvensering av utfordrende områder, som RPGR^{ORF15}, er bruk av en enhancer ofte nødvendig. Dette genet består hovedsakelig av repeterende sekvenser med adenin (A) og guanin (G). For å få god nok kvalitet på sekvenseringsdataene, ble tilsetning av en enhancer viktig for å øke signalstyrken på basene og forlenge leselengden på sekvensene. Enhancere rettet spesifikt mot AG-rike områder er ikke kommersielt tilgjengelig, men selv om ORF15 er et AG-rikt område vil fremdeles tilsetning av GC-enhancere forbedre sekvenseringsresultatene (*vedlegg 2*). I henvist artikkel (2) ble det brukt et sekvenseringskit, dGTP Big Dye Terminator v3.0 fra Applied Biosystems, som er spesifikt laget for å sekvensere utfordrende templat og håndtere tilfeller hvor sekvensene dør ut tidlig. Kitet inneholder guanin (dGTP), istedenfor inosin (dITP) som brukes i standard sekvenseringskit fra Applied Biosystems. dITP benyttes for å minimere sekundærstrukturer, men ulempen er at det kan bidra til tidlig signaltap (36). Det ble altså ikke brukt en enhancer for å øke kvaliteten på sekvenseringsresultatene, men heller et spesifikt sekvenseringsreagens. MGM ved Haukeland Universitetssykehus har imidlertid fått gode resultater ved å bruke standard sekvenseringsreagens (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) med betain som enhancer. Sammenlignet med dGTP Big Dye Terminator v3.0 er betain billigere, og enklere å kombinere med sekvenseringsreagensene som allerede er i bruk på laboratoriet ved AMG. Vi ønsket derfor å teste betain fremfor dette spesial kitet i første omgang. Betain har vært en avgjørende faktor for få produsert sekvenser som kan brukes i deteksjon av patogene varianter i RPGR^{ORF15}. Likevel er det mulig at det overnevnte kunne ha forbedret sekvenseringsresultatene våre i enda større grad.

Det er ønskelig å få dekning over hele RPGR ekson 15 ved bruk av sangersekvensering. Metoden skal være en supplerende analyse til NGS og det er derfor avgjørende å få gode sekvenser med sangersekvenseringen i det området hvor NGS ikke har dekning. Sekvenseringsresultatene fra den positive kontrollen tilsier at vi har fått god nok dekning i det aktuelle området med vår utarbeidede metode for sangersekvensering. Vi har klart å detektere oppgitte varianter i positiv kontroll og én delesjon i BB4. Variantene i positiv kontroll ligger i et område som kun er dekket av én sekvenseringsprimer (RPGR-E15SR3). Dette gjør sekvenseringen sårbar, men likevel er det godt nok fordi det er en svært utfordrende del av genet å sekvensere.

Selv om dekningen av ekson 15 er fullstendig, gjør mangelen på velfungerende sense-primere metoden mindre robust. Det er ønskelig å ha primere som dekker samme område i begge retninger for å minimere risiko for feiltolkning, men store deler av den purinrike regionen i

ORF15 dekkes kun av antisense-primere. Dette skyldes at de fleste sense-primere binder seg i utkanten av ekson 15 og at de generelt gir kortere leselengde. Sekvenseringsresultatene fra RPGR-E15SF3 viser at det er utfordrende å designe primere som vil binde seg spesifikt i gener med repeterende sekvenser, men det er rimelig å anta at metodens kvalitet ville blitt forbedret dersom man hadde lyktes med dette. I tillegg er det mulig at dekningen med sense-primere kunne blitt bedre ved bruk av dGTP Big Dye Terminator v.3.0 fra Applied Biosystems ettersom kitet inneholder dGTP istedenfor dITP (36).

De fleste antisense-primere gir bakgrunnsstøy av ulik grad. I de tilfellene hvor man har overlappende sekvenser, vil ikke dette ha like stor innvirkning på tolkningen av sekvenseringsdataene. Bakgrunnsstøyen vil derimot være mer problematisk i de områdene man kun har dekning med én primer. En betydelig del av ORF15 dekkes kun av antisense-primeren RPGR-E15SR1. Sekvenseringsresultatene fra denne primeren viser at sekvensene er preget av betydelig bakgrunnsstøy, noe som gjør det vanskelig å avgjøre om en eventuell genvariant er reell eller ikke. Det er derfor helt avgjørende å få optimalisert denne primeren slik at den gir sekvenser av god kvalitet, før analysemetoden kan benyttes til deteksjon av patogene varianter i ORF15. For å i det hele tatt gi sekvens krever RPGR-E15SR1 en sekvenseringsmiks som inneholder 200x så mye primer som de andre sekvenseringsprimere. Konsentrasjonen i primerløsningen er altså lavere enn oppgitt av Eurogentec, noe som trolig skyldes produksjonsfeil. Vi bestilte en ny primerløsning fra samme produsent, men problemet var gjentakende. Én løsning kan derfor være å bestille en ny primerløsning fra en annen produsent, for eksempel produsenten Sigma Aldrich som MGM ved Haukeland Universitetssykehus bestiller fra.

5. Konklusjon

Under dette bachelorprosjektet har vi arbeidet med å utvikle en supplerende analysemetode til NGS som kan gi nøyaktig deteksjon av patogene varianter i RPGR^{ORF15}, slik at flere individer med X-bundet RP kan få en molekylærgenetisk diagnose og mer tilrettelagt oppfølging. Vi benyttet artikkelen til Li et al. (2) som utgangspunkt for utarbeiding av metoden, men vi valgte å forkaste Nested PCR til fordel for å sekvensere direkte på LR PCR-produkt.

Sekvenseringsresultatene fra sangersekvenseringen viser at vi har fått dekning over hele ORF15. Sekvensene har varierende grad av bakgrunnsstøy, men de er likevel av akseptabel kvalitet da ORF15 inneholder mange repeterende sekvenser som å utfordrende å sekvensere. Vi lyktes med å påvise de oppgitte variantene i positiv kontroll som befinner seg i området uten dekning fra NGS. Dette tyder på at metoden vår har høy spesifisitet.

På grunn av mangel på tid var det ikke mulig å gjennomføre en fullstendig metodevalidering. Denne bør inkludere sekvensering av flere prøver, spesielt fra kvinner. Før en fullstendig metodevalidering kan gjennomføres må sekvenseringsprimeren RPGR-E15SR1 optimaliseres ytterligere. Vår anbefaling er å bestille primeren fra en annen produsent, for eksempel Sigma Aldrich. Det er viktig at denne primeren gir reproducerbare resultater av høy kvalitet slik at AMG kan benytte metoden til å detektere patogene varianter i RPGR^{ORF15}.

Bidrag

Planlegging: KWK og SS

Gjennomføring av laboratoriearbeid: KWK og SS

Bearbeidelse av resultater: KWK og SS

Utforming av figurer og tabeller: KWK og SS

Litteratursøk og sammenskriving av oppgaven: KWK og SS

6. Referanser

1. Blindeforbund N. Norges Blindeforbund. [sitert 21. mars 2024]. Retinitis pigmentosa (RP). Tilgjengelig på: <https://www.blindeforbundet.no/oyehelse-og-synshemninger/retinitis-pigmentosa-rp>
2. Li J, Tang J, Feng Y, Xu M, Chen R, Zou X, mfl. Improved Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies by High-Fidelity PCR of ORF15 followed by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn.* 1. november 2016;18(6):817–24.
3. Liu W, Liu S, Li P, Yao K. Retinitis Pigmentosa: Progress in Molecular Pathology and Biotherapeutical Strategies. *Int J Mol Sci* [Internett]. mai 2022 [sitert 19. mars 2024];23(9). Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9101511/>
4. Gene Therapy for X-Linked Retinitis Pigmentosa [Internett]. [sitert 21. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.ndcn.ox.ac.uk/research/clinical-ophthalmology-research-group/trials/xlrp-gene-therapy>
5. Ruddle JB, Ebenezer ND, Kearns LS, Mulhall LE, Mackey DA, Hardcastle AJ. RPGR ORF15 genotype and clinical variability of retinal degeneration in an Australian population. *Br J Ophthalmol.* 1. september 2009;93(9):1151–4.
6. De Silva SR, Arno G, Robson AG, Fakin A, Pontikos N, Mohamed MD, mfl. The X-linked retinopathies: Physiological insights, pathogenic mechanisms, phenotypic features and novel therapies. *Prog Retin Eye Res.* 1. mai 2021;82:100898.
7. Alberts B, Hopkin K, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, mfl. *Essential cell biology.* Fifth edition.; International student edition. New York, London: W. W. Norton & Company; 2019.
8. Tsang SH, Sharma T. X-linked Retinitis Pigmentosa. I: Tsang SH, Sharma T, redaktører. *Atlas of Inherited Retinal Diseases* [Internett]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [sitert 19. mars 2024]. s. 31–5. Tilgjengelig på: https://doi.org/10.1007/978-3-319-95046-4_8
9. Lyraki R, Megaw R, Hurd T. Disease mechanisms of X-linked retinitis pigmentosa due to RP2 and RPGR mutations: *Biochemical Society Transactions.* *Biochem Soc Trans.* 15. oktober 2016;44(5):1235–44.
10. Bujakowska KM, Liu Q, Pierce EA. Photoreceptor Cilia and Retinal Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* oktober 2017;9(10):a028274.
11. Moreno-Leon L, West EL, O'Hara-Wright M, Li L, Nair R, He J, mfl. RPGR isoform imbalance causes ciliary defects due to exon ORF15 mutations in X-linked retinitis pigmentosa (XLRP). *Hum Mol Genet.* 15. november 2020;29(22):3706–16.
12. Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost.* oktober 2019;45(07):661–73.
13. Capillary electrophoresis applied to DNA: determining and harnessing sequence and structure to advance bioanalyses (2009–2014) | *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [Internett]. [sitert 11. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-015-8703-5>
14. Staff BTB. Behind the Bench. 2015 [sitert 5. april 2024]. *Sanger Sequencing by CE 1: Foundations.* Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/sanger-sequencing-by-ce-1-foundations/>

15. Bonetti G, Cozza W, Bernini A, Kaftalli J, Mareso C, Cristofoli F, mfl. Towards a Long-Read Sequencing Approach for the Molecular Diagnosis of RPKGORF15 Genetic Variants. *Int J Mol Sci.* januar 2023;24(23):16881.
16. Next-generation sequencing technologies: An overview - ScienceDirect [Internett]. [siteret 11. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885921000628?via%3Dihub>
17. Long Range PCR | NEB [Internett]. [siteret 10. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.neb.com/en/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/specialty-pcr/long-range-pcr>
18. Jia H, Guo Y, Zhao W, Wang K. Long-range PCR in next-generation sequencing: comparison of six enzymes and evaluation on the MiSeq sequencer. *Sci Rep Nat Publ Group.* juli 2014;4:5737.
19. Foord OS, Rose EA. Long-distance PCR. *Genome Res.* 6. januar 1994;3(6):S149–61.
20. LA Taq DNA polymerase, hot-start version [Internett]. [siteret 12. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.takarabio.com/products/pcr/long-range-pcr/la-taq-products/la-taq-dna-polymerase-hs>
21. Dey P. Polymerase Chain Reaction: Principle, Technique and Applications in Pathology. I: Dey P, redaktør. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology* [Internett]. Singapore: Springer Nature; 2022 [siteret 14. mars 2024]. s. 215–28. Tilgjengelig på: https://doi.org/10.1007/978-981-19-6616-3_20
22. Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc.* 1. februar 2019;2019(2).
23. Legrand B, Lesobre J, Colombet J, Latour D, Sabart M. Molecular tools to detect anatoxin-a genes in aquatic ecosystems: Toward a new nested PCR-based method. *Harmful Algae.* 1. september 2016;58:16–22.
24. Sanger Sequencing | AAT Bioquest [Internett]. [siteret 24. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.aatbio.com/catalog/sanger-sequencing>
25. Rifai Nader, Andrea Rita Horvath, Carl T. Wittwer. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* 7. utgave. St. Louis: Elsevier; 2015.
26. *Applied Biosystems Chemistry Guide. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis.* 2016.
27. LA Taq DNA polymerase: A high-fidelity PCR enzyme for long-range PCR [Internett]. [siteret 21. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.takarabio.com/products/pcr/long-range-pcr/la-taq-products/la-taq-dna-polymerase>
28. Optimizing your PCR [Internett]. [siteret 22. mars 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.takarabio.com/learning-centers/pcr/faq/optimization>
29. ArcticZymes SAP is the gold standard and the first heat-labile rSAP [Internett]. [siteret 29. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.arcticzymes.com/product-details/shrimp-alkaline-phosphatase>
30. PCR Product Clean-Up Solutions | ArcticZymes Technologies [Internett]. [siteret 8. mai 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.arcticzymes.com/application/pcr-product-clean-up>
31. BigDye X Terminator Purification Kit - NO [Internett]. [siteret 29. april 2024]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger-sequencing-kits-reagents/bigdye-xterminator-purification-kit.html>
32. Applied Biosystems Sequence Scanner Software v1.0 Sequence Trace Viewer and Editor.

33. JSI medical systems [Internett]. [sitert 29. april 2024]. SEQPATIENT. Tilgjengelig på: <https://www.jsi-medisys.de/products/sequence-pilot/seqpatient/>
34. VCV000403391.11 - ClinVar - NCBI [Internett]. [sitert 14. mai 2024]. Tilgjengelig på: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/403391/?oq=RPGR\[gene\]+c.3060_3071del&m=NLM_001034853.2\(RPGR\):c.3060_3071del%20\(p.1021_1024VEGE%5B1%5D\)#new-submission-germline](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/403391/?oq=RPGR[gene]+c.3060_3071del&m=NLM_001034853.2(RPGR):c.3060_3071del%20(p.1021_1024VEGE%5B1%5D)#new-submission-germline)
35. Käsäkoski J, Sistonen J, Kämpjärvi K, Mehine M, Valori M, Salmenperä P, mfl. Improved Genetic Diagnostics of RPGR ORF15 - associated Retinal Dystrophy.
36. Applied Biosystems. ABI PRISM® dGTP BigDye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit [Internett]. [sitert 15. mai 2024]. Tilgjengelig på: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2Fcms_041496.pdf

7. Vedlegg

Vedlegg 1: Reagensvedlegg for enzymet LA Taq Hot start version (Takara)	38
Vedlegg 2: Regensvedlegg for Betaine Enhancer Solution (VWR Life Science).....	39
Vedlegg 3: Smeltepunkt (Tm) til primere brukt til sekvensering.....	40
Vedlegg 4: DNA Molecular Weight Marker VII (Roche)	41
Vedlegg 5: Gelelektroforese fra LR PCR.....	42
Vedlegg 6: Gelelektroforese fra Nested PCR.....	43
Vedlegg 7: Rådata fra sekvensering (BB6, BB7, BB11 og positiv kontroll).....	45
Vedlegg 8: Rådata fra sekvensering med primer RPGR-E15SR1 (alle blodbankkontroller og positiv kontroll).....	46
Vedlegg 9: Rådata fra optimalisering av sekvenserings-PCR.....	47
Vedlegg 10: Rådata fra optimalisering av RPGR-E15SF3.....	48
Vedlegg 11: Quality Control Report.....	49
Vedlegg 12: Quality Control Report.....	54
Vedlegg 13: Sekvenseringsresultater fra positiv kontroll.....	57
Vedlegg 14: Sekvenseringsresultater fra BB1	58
Vedlegg 15: Sekvenseringsresultater fra BB2.....	59
Vedlegg 16: Sekvenseringsresultater fra BB3.....	61
Vedlegg 17: Sekvenseringsresultater fra BB4.....	63
Vedlegg 18: Sekvenseringsresultater fra BB5	65
Vedlegg 19: Sekvenseringsresultater fra BB6.....	67
Vedlegg 20: Sekvenseringsresultater fra BB7.....	69
Vedlegg 21: Sekvenseringsresultater fra BB11	71

Vedlegg 1: Reagensvedlegg for enzymet LA Taq Hot start version (Takara)

TaKaRa LA Taq® Hot Start Version

Code No. RR042A **Size:** **125 U**
 Conc.: **5 U/μl**

Supplied Reagents:

10X LA PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) (25 mM) **1 ml**
dNTP Mixture (2.5 mM each) **400 μl**

Description :

TaKaRa LA Taq HS is designed for hot start PCR; it includes a neutralizing monoclonal antibody that recognizes *LA Taq* DNA polymerase. This antibody inhibits polymerase activity by binding to *LA Taq*, thereby preventing nonspecific amplification due to mispriming and/or formation of primer dimers during reaction set-up before thermal cycling. Antibody-mediated repression is released during the initial DNA denaturation step of PCR. This enzyme can be used with standard PCR conditions.

Storage Buffer :

20 mM	Tris-HCl, pH 8.0
100 mM	KCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.5%	Tween 20
0.5%	NP-40
50%	Glycerol

Storage: -20°C

dNTP Mixture :

dNTP Mixture is ready for use in PCR without dilution.
Concentration : 2.5 mM of each dNTP
Form : Dissolved in water (sodium salts), pH 7 - 9
Purity : ≥ 98% for each dNTP

Unit definition :

One unit is the amount of enzyme that will incorporate 10 nmol of dNTPs into acid-insoluble products in 30 minutes at 74°C with activated salmon sperm DNA as the template-primer.

Reaction mixture for unit definition :

25 mM	TAPS (pH 9.3 at 25°C)
50 mM	KCl
2 mM	MgCl ₂
0.1 mM	DTT
200 μM	each dATP·dGTP·dCTP
100 μM	[³ H]-dTTP
0.25 mg/ml	activated salmon sperm DNA

Purity :

Nicking, endonuclease, and exonuclease activity were not detected after the incubation of 0.6 μg of supercoiled pBR322 DNA, 0.6 μg of λ DNA, or 0.6 μg of λ-*Hind* III digest with 10 units of this enzyme for 1 hour at 74°C.

Application :

For DNA amplification by hot start PCR. Specifically, for amplifying fragments > 15 kb.

PCR products :

As most PCR products amplified with *TaKaRa LA Taq* HS have one A at the 3'-termini, the obtained PCR products can be directly cloned into T-vectors. When cloning long products (> 5 kb) into T-vectors, the cloning efficiency may be very low. It is also possible to clone the product in blunt-end vectors after blunting and phosphorylation of the ends.

Quality Control Data :

Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

General reaction mixture for PCR (50 μl reaction volume) :

<i>TaKaRa LA Taq</i> HS (5 U/μl)	0.5 μl
10X LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μl
Template	< 1 μg
Primer 1	0.2 - 1.0 μM (final conc.)
Primer 2	0.2 - 1.0 μM (final conc.)
Sterile purified water	up to 50 μl

PCR conditions :

This enzyme can be used with standard PCR conditions, since the monoclonal antibody is denatured in the initial DNA-denaturation step. There is no need for an additional step to denature the anti-*LA Taq* antibody.

Example : Amplification of a 17.5 kb DNA fragment

94°C	1 min] 30 cycles
↓		
98°C	10 sec	
68°C	15 min	
↓		
72°C	10 min	

(Note) Denaturation conditions vary depending on the thermal cycler and tubes used for PCR. Denaturation for 5 - 10 sec at 98°C, or 20 - 30 sec at 94°C is recommended.

TaKaRa LA Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6972 or from our website at www.takarabio.com. Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

v202110Da

Takara Bio Inc. website : <https://www.takarabio.com>

Vedlegg 2: Regensvedlegg for Betaine Enhancer Solution (VWR Life Science)



Betaine Enhancer Solution

Conc.: 5 M



Cat. No.: 733-1361 (500 Reactions)

Cat. No.	No. of 50 µl Reactions	5x Betaine Enhancer solution
ID No.	-	5400000
Cap colour	-	White
733-1361	500	5 x 1 ml

Store at -20 °C

General Description

Three factors make a particular enhancer desirable: high potency, high specificity and a wide effective range or window of applicability. Based on these criteria, one enhancer has been selected as the most effective additive over a wide range of different templates, including GC-rich sequences and templates known to be extremely difficult to amplify.

The Betaine Enhancer Solution is an excellent enhancer especially when used with GC-rich regions or templates with a high degree of secondary structures.

Working Mechanism of Betaine Enhancer Solution

Betaine works by destabilizing GC-rich DNA by binding to AT rich base pairs in the major groove or by binding to the minor groove and increasing the hydration of GC base pairs. Betaine aids the processivity of a thermostable polymerase and reduces "pauses" in polymerization caused by secondary structure that can induce the polymerase to disassociate from the DNA strand.

Betaine changes the melting temperature of DNA, so denaturation temperatures may be reduced (1 – 5 °C) in order to selectively amplify PCR amplicons and not template DNA. Also, primer binding T_m 's will be effectively reduced by betaine and consequently primer annealing temperatures should be reduced by 1 – 2 °C.

Protocol

When using the betaine solution for the first time, always perform parallel reactions with and without the betaine solution. When using the betaine solution, the following effects may be observed depending on the individual PCR assay:

- Betaine solution enables amplification of a reaction that previously failed
- Betaine solution increases PCR specificity
- Betaine solution has no effect
- Betaine solution causes reduced PCR efficiency or failure.

1. Set up each PCR reaction as in table 1.

Table 1.

Component	Vol./Reaction	Final Conc.
2x Hot Start Master Mix	25 µl	-
Primer A (10 µM)	1 µl (0.5 – 5 µl)	0.2 µM (0.1 – 1.0 µM)
Primer B (10 µM)	1 µl (0.5 – 5 µl)	0.2 µM (0.1 – 1.0 µM)
PCR-grade H ₂ O	X µl	-
5x Betaine solution	10 µl	1 M
Template DNA	X µl	genomic DNA: 50 ng (10 – 500 ng) plasmid DNA: 0.5 ng (0.1 – 1 ng) bacterial DNA: 5 ng (1 – 10 ng)
TOTAL volume	50 µl	-

* Suggested starting conditions; theoretically used conditions in brackets

2. Mix gently by pipetting the solution up and down a few times.
3. Program the thermal cycler according to the manufacturer's instructions.

Since Betaine alters the melting temperature of DNA and primers, the annealing temperatures of the primers in presence of Betaine need to be adjusted.

Version: VWR 10/2019

Made in Denmark

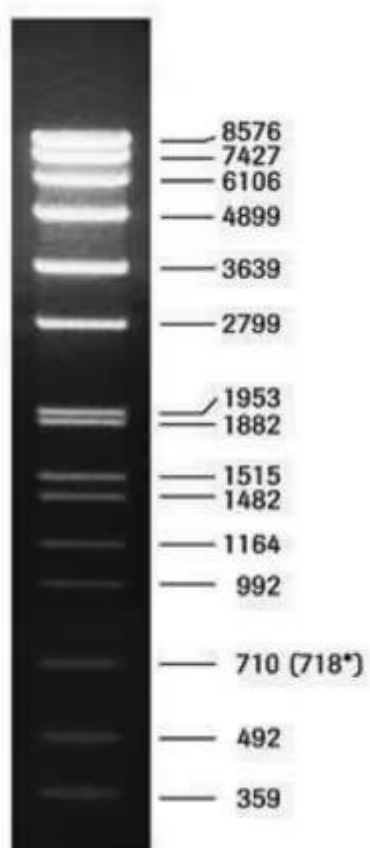
VWR International bvba/sprl
Haasrode Researchpark Zone 3
Geldenaaksebaan 464
B-3001 Haasrode
Belgium
Phone: + 32 16385011

Vedlegg 3: Smeltepunkt (Tm) til primere brukt til sekvensering

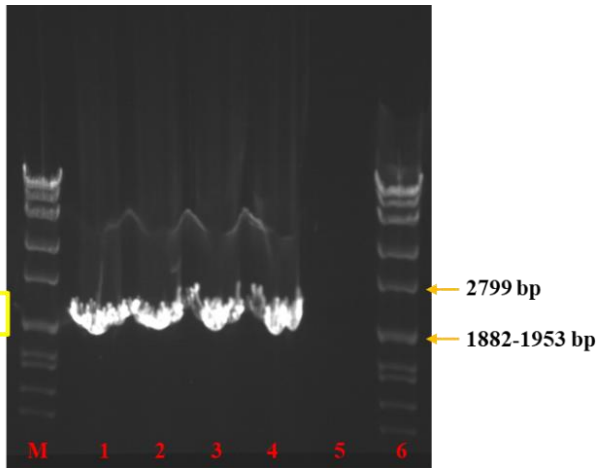
Tabellen viser en oversikt over primere brukt til sekvensering, med tilhørende smeltepunkt (Tm). Informasjonen om Tm er hentet fra Oligo Primer Analysis software (Molecular Biology Insights, Inc.)

Primer	Primersekvens	Smeltepunkt (Tm)	Posisjon (RPGR ORF15)
RPGR-E15SR2	5' – CTCTCCTTCCTCCTTTTCAC - 3'	54,1-54,3 °C	c.2303
RPGR-E15SR3	5' – CCTTCCTCCTCTTCCCCCTCA - 3'	60,5-62,2 °C	c.2499
RPGR-E15SF4	5' - AAGGCAGGATGGAGAGGAGT - 3'	61,3-58,8 °C	c.3253
RPGR-E15SR4	5' - GCCCGTTATATGCAAGGC - 3'	56,5-55,6 °C	c.46*
RPGR-E15SR5	5' – TGTTTGCCATATTTACAGATCCT -3'	59,5-57,7 °C	c.3276
RPGR-E15SF1	5' - AGGCAAGGCAAAATCAGTGG - 3'	57,8-58,4 °C	c.1933
RPGR-E15SF2	5' – GTAGAGGAGAAATGGAGAGG – 3'	54,1-53,2 °C	c.2064
RPGR-E15SF3	5' - AAGGAGAAGGGGAAGGGGAGGAT - 3'	67,0-64,0 °C	c.2829
RPGR-E15SR1	5' - TCCTTCCTCCTCTTCCCCCTCCCA - 3'	66,9-67,6 °C	c.2863
RPGR-E15Flr	5' -AGCCAGACAGTTACATGGAAGGTGCAA- 3'	65,8-65,3 °C	c.1754-234
RPGR-E15Rlr	5' -TGTCTTTGGCTCCTTAACACAGCTGCA- 3'	66,1-65,6 °C	c.*160

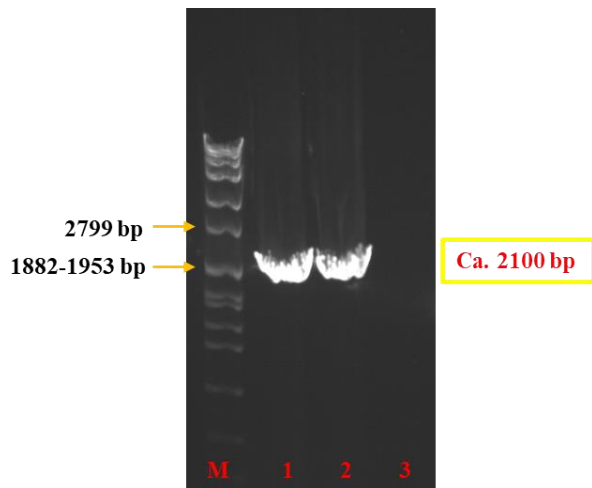
Vedlegg 4: DNA Molecular Weight Marker VII (Roche)



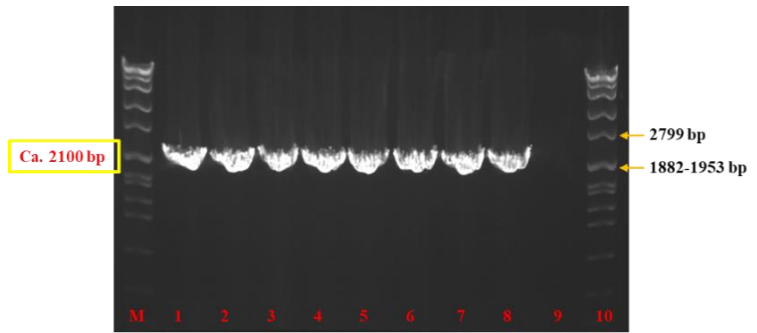
Vedlegg 5: Gelelektroforese fra LR PCR



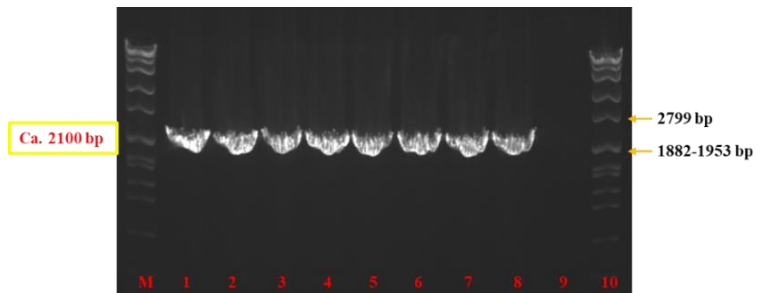
Figur 17: Gelelektroforese fra LR PCR. Brønn M og 6 inneholder størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). Brønn 1-4 inneholder LR PCR-produkt. Brønn 5 er NTC. Gelelektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 25 minutter.



Figur 18: Gelelektroforese fra LR PCR med positiv kontroll. Brønn M inneholder størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). Brønn 1 og 2 inneholder LR PCR-produkt. Brønn 3 er NTC. Gelelektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 25 minutter.



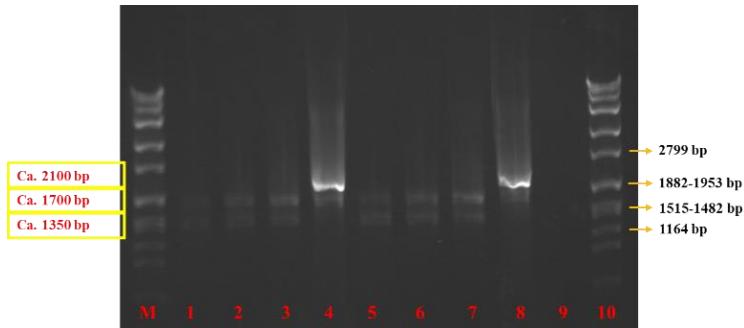
Figur 19: Gelelektroforese fra LR PCR med duplikater av blodbankkontroller (BB1-BB4). Brønn M og 10 inneholder størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). Brønn 1-8 inneholder LR PCR-produkt. Brønn 9 er NTC. Gelelektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 25 minutter.



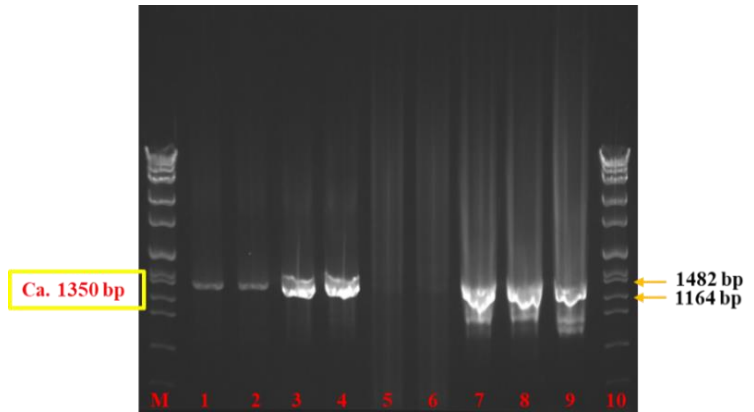
Figur 20: Gelelektroforese fra LR PCR med duplikater av blodbankkontroller (BB5-BB7 og BB11). Brønn M og 10 inneholder størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). Brønn 1-8 inneholder LR PCR-produkt. Brønn 9 er NTC. Gelelektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 25 minutter.

Vedlegg 6: Gelelektroforese fra Nested PCR

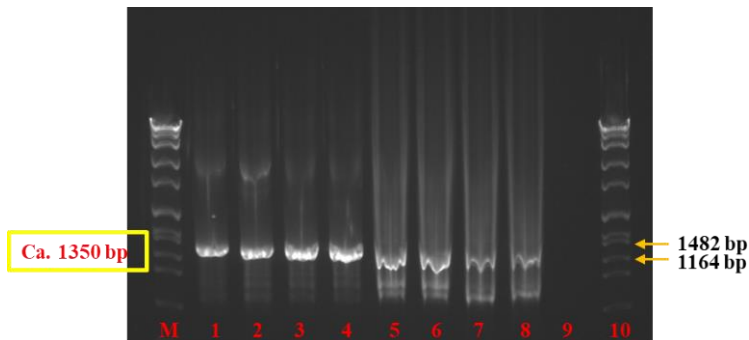
Det er kun avvik fra PCR-programmet i tabell 6 som er dokumentert i figurtekstene. Der det er brukt isolert DNA fra blodbankkontrollene i PCR-reaksjonene betegnes dette som «DNA som templat».



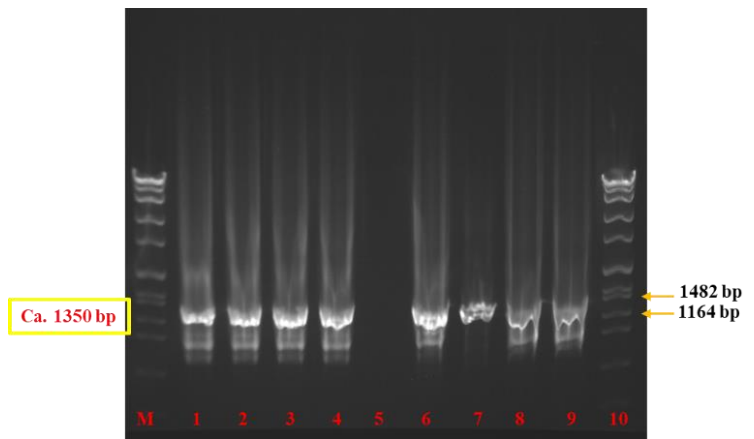
Figur 21: Gelelektroforese fra 2 trinns Nested PCR. Denaturering: 95 °C 15 min. Hybridiseringstemp.: 95 °C 45 sek. 35 sykluser. Polymerisering: 72 °C 2 min. 35 sykluser. Polymerisering: 72 °C 15 min. Brønn M og 11 inneholder størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). I Brønn 1 og 5 ble LR-PCR-produktet fortynnet 1:100 før Nested PCR. I brønn 2 og 6 ble LR-PCR-produktet fortynnet 1:50. I brønn 3 og 7 ble LR-PCR-produktet fortynnet 1:25. I brønn 4 og 8 ble ikke LR-PCR-produktet fortynnet før Nested PCR. Brønn 9 inneholder NTC. Elektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 25 minutter.



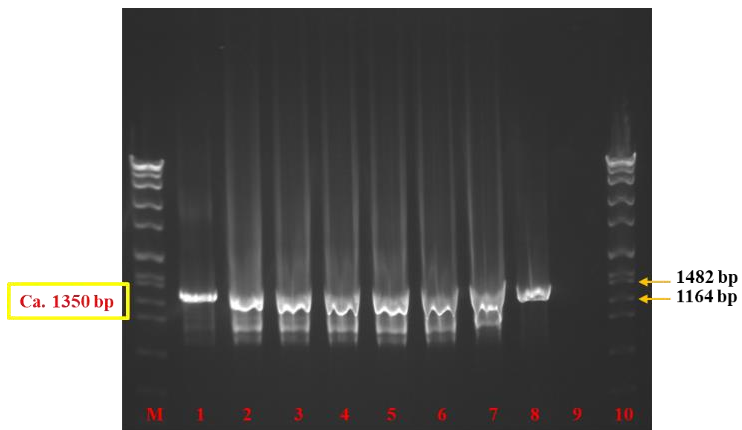
Figur 23: Gelelektroforese med DNA og LR PCR-produkt som templat med primerparet RPGR-E15-2Flr og RPGR-E15-2Rlr. Brønn M og 10 inneholder størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). Brønn 1-4 inneholder PCR-produkt med DNA som templat, hvor Platinum Taq-polymerase er benyttet i brønn 3 og 4. Brønn 5-9 inneholder Nested PCR-produkt (LR PCR-produkt fortynnet 1:50 før Nested PCR), hvor Platinum Taq-polymerase er benyttet i brønn 5 og 6. I brønn 9 er hybridiseringstemp. 62 °C. Elektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 25 minutter.



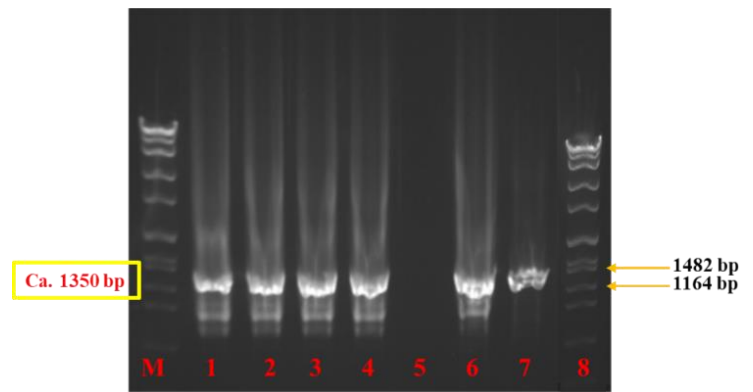
Figur 22: Gelelektroforese med DNA og LR PCR-produkt som templat med primerparet RPGR-E15-2Flr og RPGR-E15-2Rlr. Brønn M og 10 inneholder størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). Brønn 1-4 inneholder PCR-produkt med DNA som templat, hvor hybridiseringstemp. er 60°C (brønn 1 og 2) og 62 °C (brønn 3 og 4). Brønn 5-8 inneholder Nested PCR-produkt (LR PCR-produkt fortynnet 1:50 før Nested PCR). Hybridiseringstemp. er 62 °C (brønn 5 og 6) og 60 °C (brønn 7 og 8). Brønn M og 10 inneholder størrelsesmarkør VII og brønn 9 er NTC. Elektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 25 minutter.



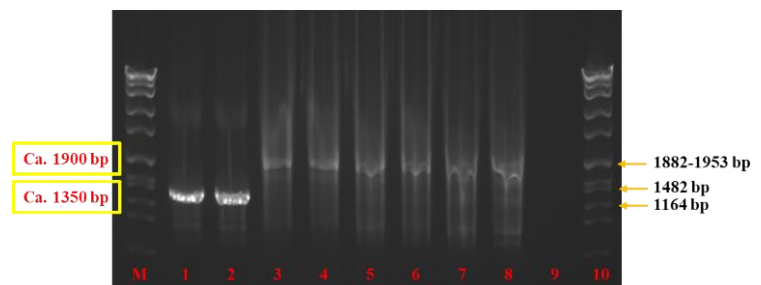
Figur 24: Gelelektroforese med DNA og LR PCR-produkt som templat med primerparet RPGR-E15-2Flr og RPGR-E15-2Rlr. Brønn M og 10 inneholder størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). Brønn 1-4, 6, 8 og 9 inneholder Nested PCR-produkt, hvor LR PCR-produktet ble fortynnet 1:100 (brønn 1, 2 og 8), 1:1000 (brønn 3, 4 og 9) og 1:50 (brønn 6) før Nested PCR. Brønn 5 er NTC og Brønn 7 inneholder PCR-produkt med DNA som templat. I brønn 8 og 9 er annealingtiden 40 sek. Gelelektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 25 minutter.



Figur 25: Gelelektroforese med DNA og LR PCR-produkt som templat med primerparet RPGR-E15-2Flr og RPGR-E15-2Rlr. Brønn M og 10 inneholder størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). Brønn 1 og 8 inneholder PCR-produkt med DNA som templat. Brønn 2-7 inneholder Nested PCR-produkt, hvor LR PCR-produktet ble fortynnet 1:50 (brønn 2 og 3), 1:100 (brønn 4 og 5) og 1:1000 (brønn 6 og 7) før Nested PCR. Brønn 9 er NTC. I brønn 1-7 er annealingtiden 40 sek. Gelelektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 25 minutter.



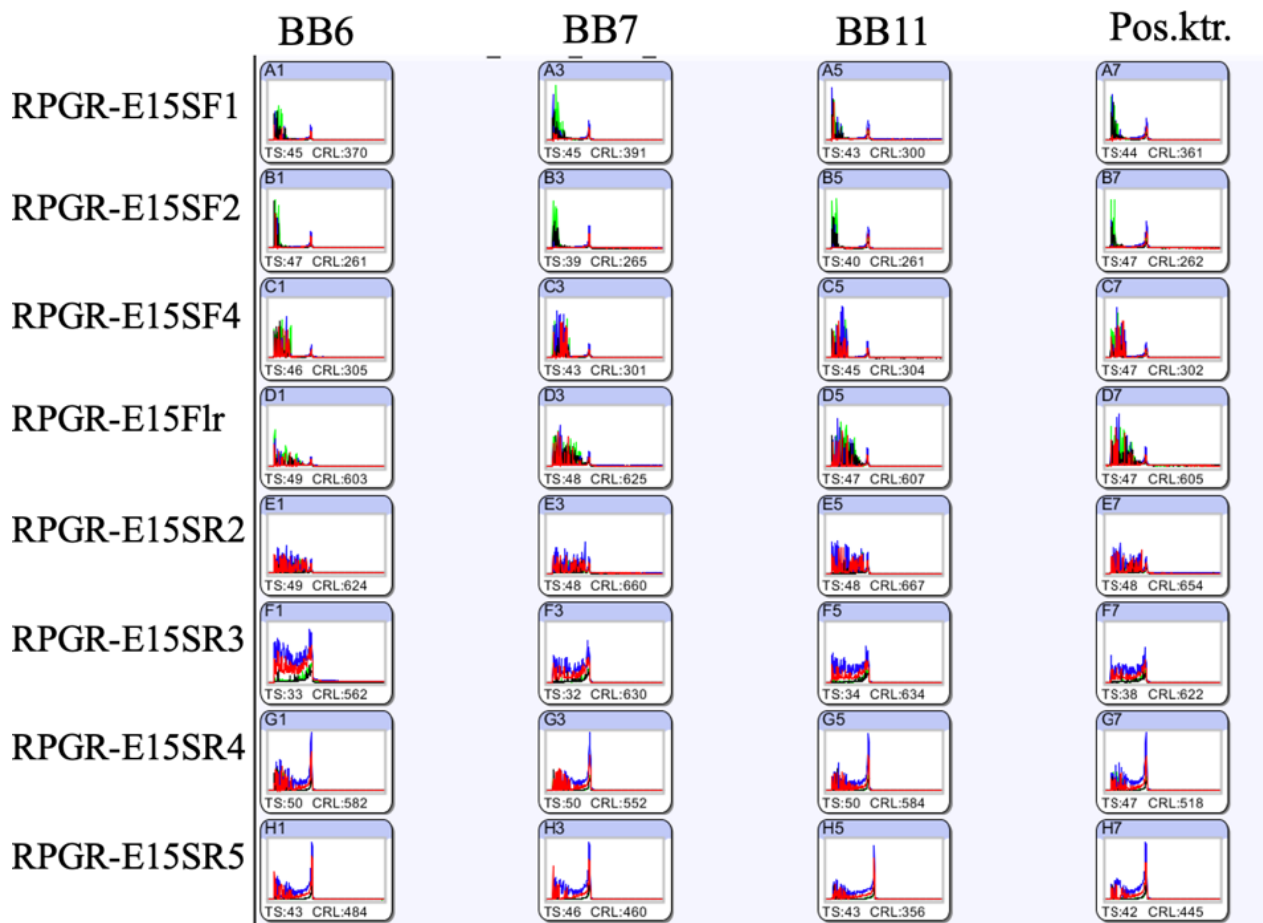
Figur 26: Gelelektroforese med LR PCR-produkt og DNA som templat med primerparet RPGR-E15-2Flr og RPGR-E15-2Rlr. Brønn M og 8 inneholder størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). Brønn 1-4 og 6 inneholder Nested PCR-produkt fra BB13, hvor LR PCR-produktet ble fortynnet 1:100 (brønn 1 og 2), 1:1000 (brønn 3 og 4) og 1:50 (brønn 6) før Nested PCR. Brønn 5 er NTC og Brønn 7 inneholder PCR-produkt med DNA fra prøve BB8 som templat. Elektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 25 minutter.



Figur 27: Gelelektroforese med LR PCR-produkt og DNA som templat med primerparet RPGR-E15-2Flr og RPGR-E15-2Rlr. Brønn M og 10 er tilsatt størrelsesmarkør VII (vedlegg 4). Brønn 1 og 2 inneholder PCR-produkt med DNA som templat. Brønn 3-8 inneholder Nested PCR-produkt hvor LR PCR-produkt ble benyttet som templat. Nested PCR-produktene i brønn 5 og 6 er amplifisert med 25 sykluser, mens prøvene i brønn 7 og 8 er amplifisert med 15 sykluser. Brønn 9 er NTC. Elektroforesen ble utført på 1% E-gel EX agarosegel med SYBR Green i 35 minutter.

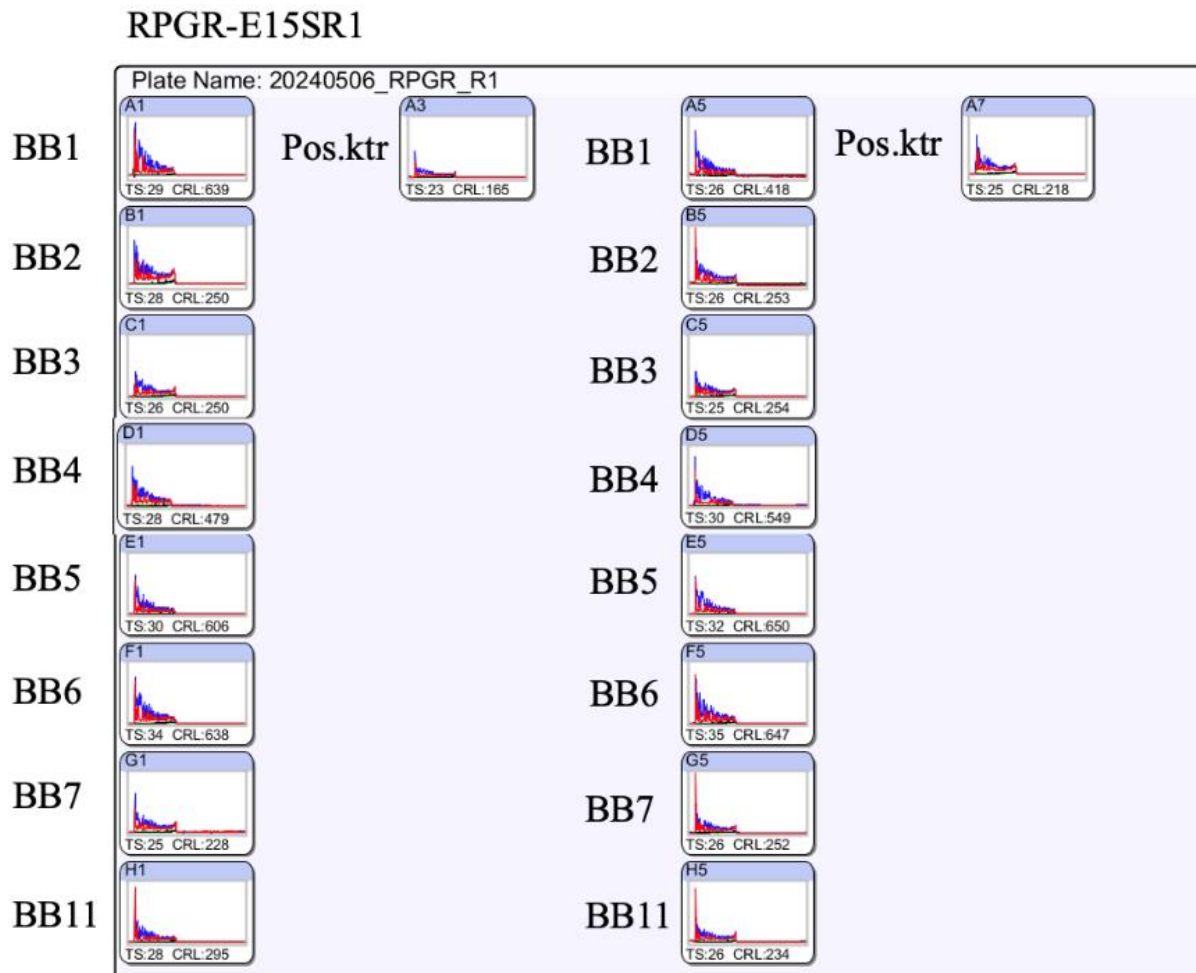
Vedlegg 7: Rådata fra sekvensering (BB6, BB7, BB11 og positiv kontroll)

Rådata fra sekvensering med LR PCR-produkt (RPGR-E15Flr og RPGR-E15Rlr) hentet fra Sequence Scanner 2. Figuren viser resultater fra BB6, BB7, BB11 og positiv kontroll.



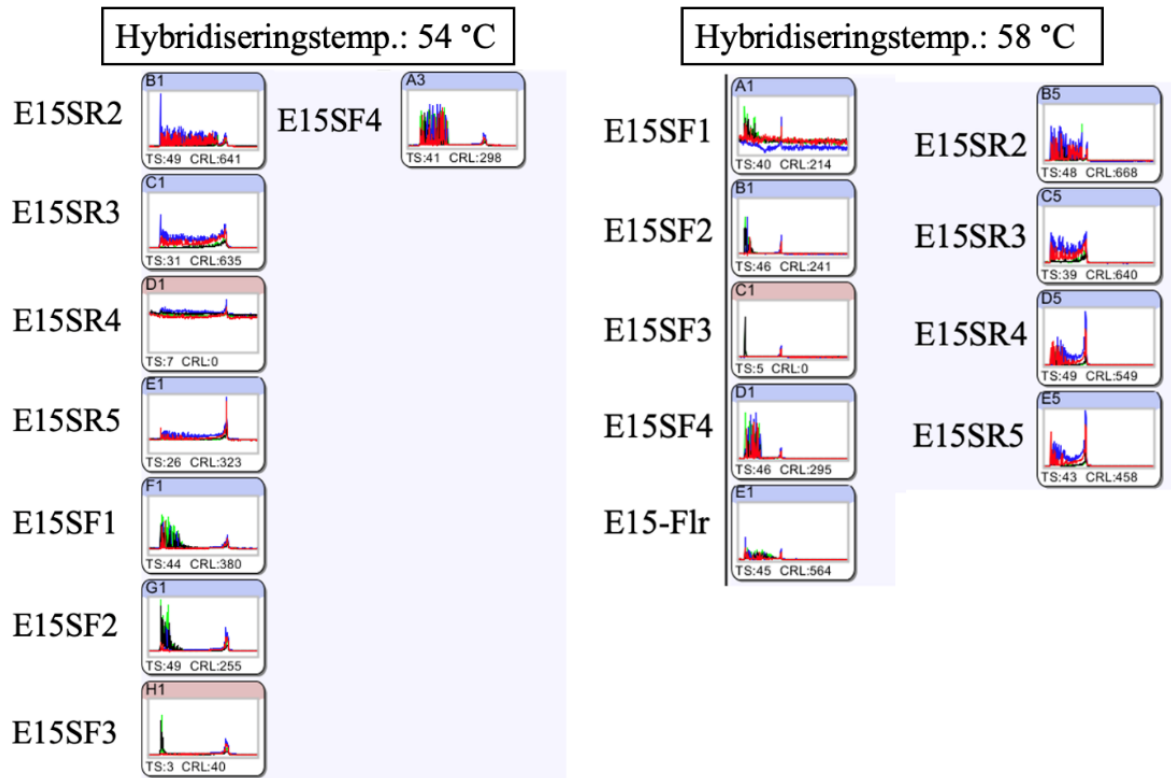
Vedlegg 8: Rådata fra sekvensering med primer RPGR-E15SR1 (alle blodbankkontroller og positiv kontroll)

Rådata fra sekvensering med LR PCR-produkt (RPGR-E15Flr og RPGR-E15Rlr) hentet fra Sequence Scanner 2. Figuren viser resultater fra alle blodbankkontroller og positiv kontroll, sekvensert med primer RPGR-E15SR1.



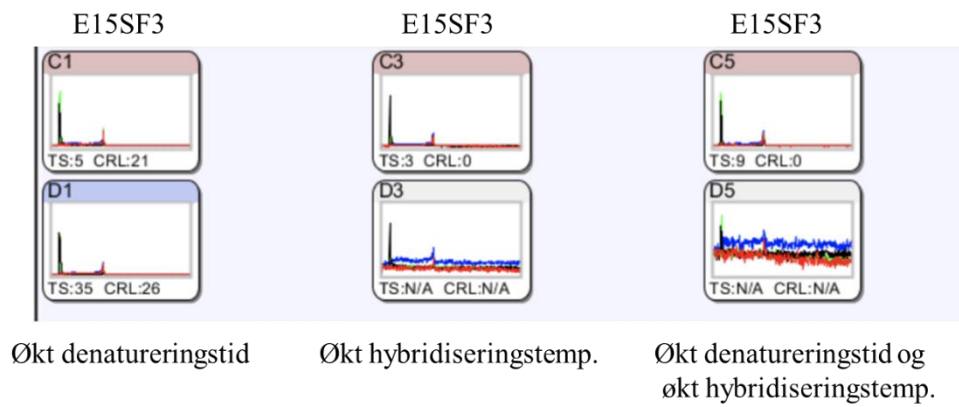
Vedlegg 9: Rådata fra optimalisering av sekvenserings-PCR

Rådata fra sekvensering med LR PCR-produkt hentet fra Sequence Scanner 2. Til venstre i figuren finner man resultatene fra sekvensering med hybridiseringstemperatur satt til 54 °C. Resultatene fra 58 °C hybridiseringstemperatur er presentert til høyre.



Vedlegg 10: Rådata fra optimalisering av RPGR-E15SF3

Rådata fra sekvensering med LR PCR-produkt hentet fra Sequence Scanner 2.



Vedlegg 11: Quality Control Report

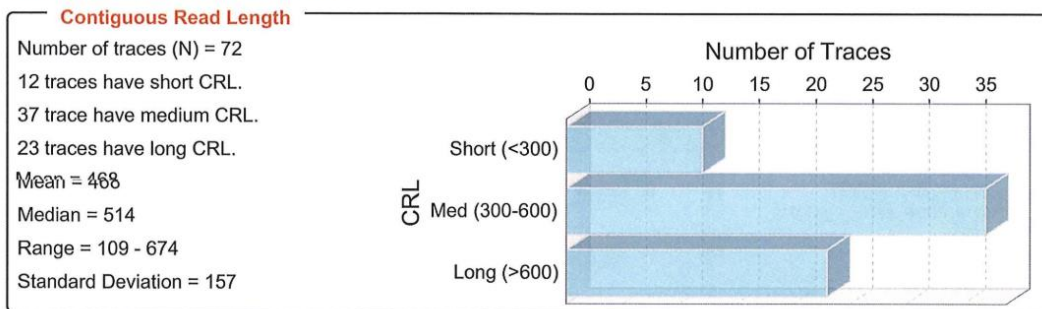
Quality Control Report viser gjennomsnittlig leselengde (CRL) og signalintensitet for BB1-BB7, BB11 og positiv kontroll.

I oversikten inngår alle primere bortsett fra RPGR-E15SR1 og RPGR-E15Rlr. Quality Control Report er hentet fra Sequence Scanner 2.



Printed on apr 22, 2024
Sequence Scanner Software 2

Quality Control Report



Trace File Name	Well#	Cap#	Trace Score	CRL	QV20+	Signal Intensity				Comments
						A	C	G	T	
(BB1_RPGR-E15F1r)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_005_MedGen.ab1	D1	5	44	612	577	291	104	159	141	
(BB1_RPGR-E15SF1)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_008_MedGen.ab1	A1	8	48	323	320	1498	577	944	477	
(BB1_RPGR-E15SF2)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_007_MedGen.ab1	B1	7	44	224	214	1112	323	702	187	
(BB1_RPGR-E15SF4)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_006_MedGen.ab1	C1	6	45	301	305	232	177	112	186	
(BB1_RPGR-E15SR2)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_004_MedGen.ab1	E1	4	49	659	643	309	1147	224	939	
(BB1_RPGR-E15SR3)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_003_MedGen.ab1	F1	3	32	515	588	36	203	35	153	
(BB1_RPGR-E15SR4)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_002_MedGen.ab1	G1	2	46	590	591	410	994	335	991	
(BB1_RPGR-E15SR5)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_001_MedGen.ab1	H1	1	45	456	514	113	1344	113	967	
(BB2_RPGR-E15F1r)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_013_MedGen.ab1	D3	13	47	599	602	2298	988	1378	986	
(BB2_RPGR-E15SF1)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_016_MedGen.ab1	A3	16	48	329	337	1967	676	1281	501	
(BB2_RPGR-E15SF2)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_015_MedGen.ab1	B3	15	41	109	101	515	184	316	117	
(BB2_RPGR-E15SF4)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_014	C3	14	45	297	299	838	722	420	675	

Legend

Trace Score

CRL



Trace File Name	Well#	Cap#	Trace Score	CRL	QV20+	Signal Intensity				Comments
						A	C	G	T	
_MedGen.ab1										
(BB2_RPGR-E15SR2)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_012_MedGen.ab1	E3	12	47	672	657	221	854	216	683	
(BB2_RPGR-E15SR3)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_011_MedGen.ab1	F3	11	32	645	618	95	647	93	489	
(BB2_RPGR-E15SR4)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_010_MedGen.ab1	G3	10	50	546	569	166	408	140	393	
(BB2_RPGR-E15SR5)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_009_MedGen.ab1	H3	9	45	460	504	51	485	43	343	
(BB3_RPGR-E15F1r)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_021_MedGen.ab1	D5	21	48	613	585	253	128	152	120	
(BB3_RPGR-E15SF1)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_024_MedGen.ab1	A5	24	49	335	341	1343	453	910	359	
(BB3_RPGR-E15SF2)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_023_MedGen.ab1	B5	23	41	196	189	540	191	354	113	
(BB3_RPGR-E15SF4)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_022_MedGen.ab1	C5	22	47	302	308	1637	1320	875	1393	
(BB3_RPGR-E15SR2)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_020_MedGen.ab1	E5	20	49	634	651	472	1977	412	1543	
(BB3_RPGR-E15SR3)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_019_MedGen.ab1	F5	19	33	639	610	155	1185	155	841	
(BB3_RPGR-E15SR4)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_018_MedGen.ab1	G5	18	50	548	578	525	1380	424	1264	
(BB3_RPGR-E15SR5)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_017_MedGen.ab1	H5	17	44	490	527	51	554	47	364	
(BB4_RPGR-E15F1r)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_029_MedGen.ab1	D7	29	48	617	594	3375	1533	2058	1475	
(BB4_RPGR-E15SF1)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_032_MedGen.ab1	A7	32	48	357	361	2257	783	1559	572	
(BB4_RPGR-E15SF2)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_031_MedGen.ab1	B7	31	44	234	258	1034	332	704	181	
(BB4_RPGR-E15SF4)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_030_MedGen.ab1	C7	30	47	297	300	4688	4075	2638	3955	
(BB4_RPGR-E15SR2)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_028_MedGen.ab1	E7	28	49	674	652	432	1848	408	1448	

Legend

Trace Score

CRL

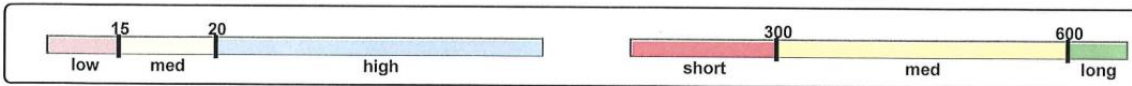


Trace File Name	Well#	Cap#	Trace Score	CRL	QV20+	Signal Intensity				Comments
						A	C	G	T	
(BB4_RPGR-E15SR3)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_027_MedGen.ab1	F7	27	32	643	615	253	1933	272	1413	
(BB4_RPGR-E15SR4)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_026_MedGen.ab1	G7	26	49	541	561	568	1545	473	1364	
(BB4_RPGR-E15SR5)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_025_MedGen.ab1	H7	25	45	478	517	76	1070	86	683	
(BB5_RPGR-E15Fir)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_037_MedGen.ab1	D9	37	47	605	607	4585	1977	2654	2211	
(BB5_RPGR-E15SF1)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_040_MedGen.ab1	A9	40	48	227	225	286	113	177	90	
(BB5_RPGR-E15SF2)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_039_MedGen.ab1	B9	39	40	215	246	518	172	345	102	
(BB5_RPGR-E15SF4)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_038_MedGen.ab1	C9	38	46	317	314	4090	3599	2287	3495	
(BB5_RPGR-E15SR2)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_036_MedGen.ab1	E9	36	48	615	619	917	3697	742	2938	
(BB5_RPGR-E15SR3)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_035_MedGen.ab1	F9	35	34	548	570	114	776	113	597	
(BB5_RPGR-E15SR4)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_034_MedGen.ab1	G9	34	50	559	598	845	2335	644	2129	
(BB5_RPGR-E15SR5)_2024-04-19_20240419_RPGR_sekv6_1_SS_033_MedGen.ab1	H9	33	41	514	538	142	1908	125	1279	
(BB11_RPGR-E15Fir)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_021_MedGen.ab1	D5	21	47	607	596	3321	1556	1992	1454	
(BB11_RPGR-E15SF1)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_024_MedGen.ab1	A5	24	43	300	374	1479	506	1042	404	
(BB11_RPGR-E15SF2)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_023_MedGen.ab1	B5	23	40	261	330	911	315	631	152	
(BB11_RPGR-E15SF4)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_022_MedGen.ab1	C5	22	45	304	310	3603	3043	1921	2697	
(BB11_RPGR-E15SR2)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_020_MedGen.ab1	E5	20	48	667	666	525	1938	467	1500	
(BB11_RPGR-E15SR3)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_019_MedGen.ab1	F5	19	34	634	627	268	1887	284	1440	
(BB11_RPGR-E15SR4)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_018_MedGen.ab1	G5	18	50	584	597	580	1405	486	1368	

Legend

Trace Score

CRL

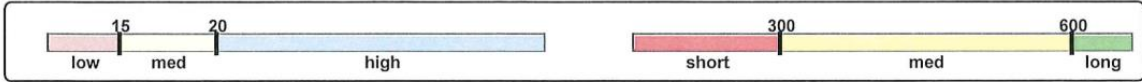


Trace File Name	Well#	Cap#	Trace Score	CRL	QV20+	Signal Intensity				Comments
						A	C	G	T	
en.ab1										
(BB11_RPGR-E15SR5)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_017_MedG en.ab1	H5	17	43	356	432	43	396	40	288	
(BB6_RPGR-E15Flr)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_005_MedG en.ab1	D1	5	49	603	592	2588	1105	1334	1179	
(BB6_RPGR-E15SF1)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_008_MedG en.ab1	A1	8	45	370	415	1794	595	1145	467	
(BB6_RPGR-E15SF2)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_007_MedG en.ab1	B1	7	47	261	289	1138	357	722	180	
(BB6_RPGR-E15SF4)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_006_MedG en.ab1	C1	6	46	305	310	3080	2319	1531	2571	
(BB6_RPGR-E15SR2)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_004_MedG en.ab1	E1	4	49	624	640	829	3234	643	2620	
(BB6_RPGR-E15SR3)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_003_MedG en.ab1	F1	3	33	562	566	241	1687	227	1295	
(BB6_RPGR-E15SR4)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_002_MedG en.ab1	G1	2	50	582	571	717	1665	584	1670	
(BB6_RPGR-E15SR5)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_001_MedG en.ab1	H1	1	43	484	522	81	918	70	645	
(BB7_RPGR-E15Flr)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_013_MedG en.ab1	D3	13	48	625	612	3980	1731	2208	1678	
(BB7_RPGR-E15SF1)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_016_MedG en.ab1	A3	16	45	391	418	1623	529	1108	414	
(BB7_RPGR-E15SF2)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_015_MedG en.ab1	B3	15	39	265	296	903	296	605	153	
(BB7_RPGR-E15SF4)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_014_MedG en.ab1	C3	14	43	301	304	4678	3889	2437	3608	
(BB7_RPGR-E15SR2)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_012_MedG en.ab1	E3	12	48	660	661	742	2791	674	2191	
(BB7_RPGR-E15SR3)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_011_MedG en.ab1	F3	11	32	630	611	322	2072	300	1558	
(BB7_RPGR-E15SR4)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_010_MedG en.ab1	G3	10	50	552	589	590	1469	436	1374	
(BB7_RPGR-E15SR5)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_009_MedG en.ab1	H3	9	46	460	515	134	1789	124	1163	

Legend

Trace Score

CRL



Trace File Name	Well#	Cap#	Trace Score	CRL	QV20+	Signal Intensity				Comments
						A	C	G	T	
(Pos-ktr_RPGR-E15Flr)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_029_MedGen.ab1	D7	29	47	605	583	2841	1383	1704	1323	
(Pos-ktr_RPGR-E15SF1)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_032_MedGen.ab1	A7	32	44	361	365	1173	432	841	348	
(Pos-ktr_RPGR-E15SF2)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_031_MedGen.ab1	B7	31	47	262	284	602	227	420	115	
(Pos-ktr_RPGR-E15SF4)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_030_MedGen.ab1	C7	30	47	302	306	4007	3665	2111	3319	
(Pos-ktr_RPGR-E15SR2)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_028_MedGen.ab1	E7	28	48	654	647	658	2754	617	2047	
(Pos-ktr_RPGR-E15SR3)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_027_MedGen.ab1	F7	27	38	622	625	264	1709	255	1285	
(Pos-ktr_RPGR-E15SR4)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_026_MedGen.ab1	G7	26	47	518	534	488	1203	402	1125	
(Pos-ktr_RPGR-E15SR5)_2024-04-19_202404_RPGR_sekv6_2_025_MedGen.ab1	H7	25	42	445	460	116	1339	102	837	

Vedlegg 12: Quality Control Report

Quality Control Report viser gjennomsnittlig leselengde (CRL) og signalintensitet for BB1-BB7, BB11 og positiv kontroll (RPGR-E15SR1).

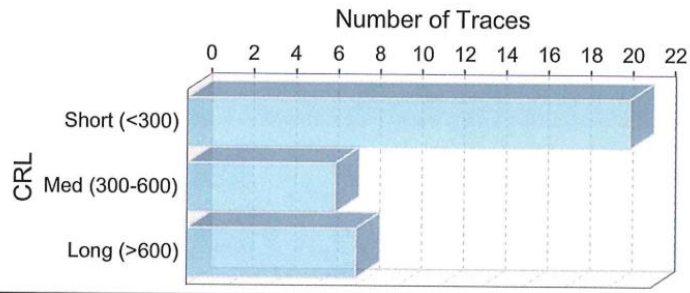


Printed on mai 07, 2024
Sequence Scanner Software 2

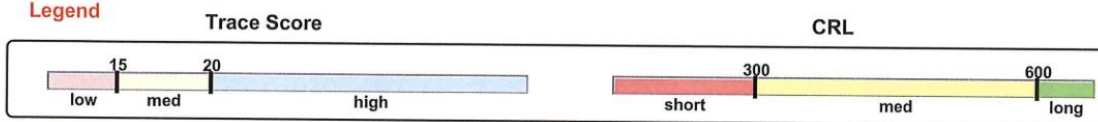
Quality Control Report

Contiguous Read Length

Number of traces (N) = 36
21 traces have short CRL.
7 trace have medium CRL.
8 traces have long CRL.
Mean = 372
Median = 254
Range = 48 - 650
Standard Deviation = 181



Legend

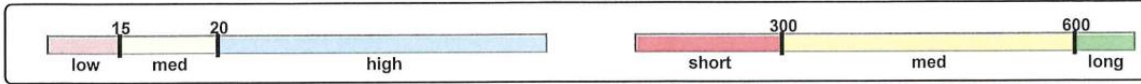


Trace File Name	Well#	Cap#	Trace Score	CRL	QV20+	Signal Intensity				Comments
						A	C	G	T	
(BB1-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_008_MedGen.ab1	A1	8	29	639	564	190	7352	213	4807	
(BB1-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_024_MedGen.ab1	A5	24	26	418	490	20	232	20	146	
(BB11-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_001_MedGen.ab1	H1	1	28	295	534	45	1623	50	1100	
(BB11-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_017_MedGen.ab1	H5	17	26	234	383	24	358	24	259	
(BB2-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_007_MedGen.ab1	B1	7	28	250	492	229	6551	207	4930	
(BB2-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_023_MedGen.ab1	B5	23	26	253	406	21	200	19	146	
(BB3-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_006_MedGen.ab1	C1	6	26	250	485	38	961	37	718	
(BB3-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_022_MedGen.ab1	C5	22	25	254	501	94	3143	99	2191	
(BB4-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_005_MedGen.ab1	D1	5	24	48	126	19	107	17	74	
(BB4-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_021_MedGen.ab1	D5	21	32	379	555	34	1050	37	595	
(BB5-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_004_MedGen.ab1	E1	4	30	606	543	75	3551	93	2185	
(BB5-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_020_MedGen.	E5	20	32	650	600	55	2213	69	1379	

Legend

Trace Score

CRL

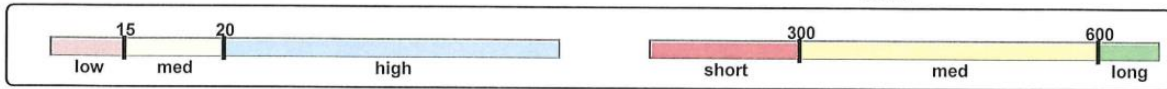


Trace File Name	Well#	Cap#	Trace Score	CRL	QV20+	Signal Intensity				Comments
						A	C	G	T	
ab1										
(BB6-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_003_MedGen.ab1	F1	3	34	638	608	119	4312	130	3093	
(BB6-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_019_MedGen.ab1	F5	19	35	647	609	82	3306	108	2138	
(BB7-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_002_MedGen.ab1	G1	2	25	228	393	20	188	17	144	
(BB7-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_018_MedGen.ab1	G5	18	26	252	490	57	1802	60	1285	
(Pos-ktr-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_016_MedGen.ab1	A3	16	23	165	287	23	246	20	184	
(Pos-ktr-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_032_MedGen.ab1	A7	32	25	218	321	176	4116	131	2805	
(BB1-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_008_MedGen.ab1	A1	8	29	577	587	96	3940	136	2563	
(BB1-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_024_MedGen.ab1	A5	24	30	573	598	25	589	29	365	
(BB11-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_001_MedGen.ab1	H1	1	28	255	528	91	3521	107	2380	
(BB11-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_017_MedGen.ab1	H5	17	25	235	404	82	2531	85	1695	
(BB2-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_007_MedGen.ab1	B1	7	27	249	432	37	796	37	589	
(BB2-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_023_MedGen.ab1	B5	23	30	254	454	26	469	26	326	
(BB3-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_006_MedGen.ab1	C1	6	26	252	433	63	1679	61	1235	
(BB3-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_022_MedGen.ab1	C5	22	26	251	462	31	668	33	466	
(BB4-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_005_MedGen.ab1	D1	5	28	479	524	23	364	23	231	
(BB4-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_021_MedGen.ab1	D5	21	30	549	552	27	663	30	380	
(BB5-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-	E1	4	29	495	544	123	5072	149	3156	

Legend

Trace Score

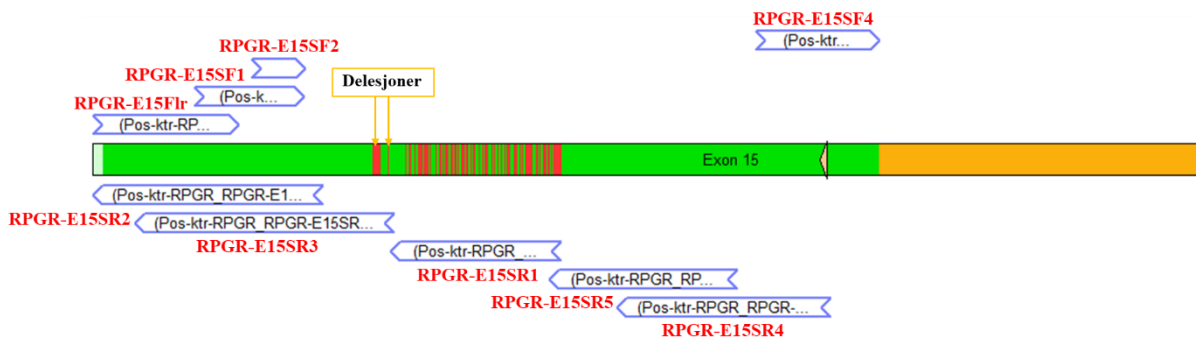
CRL



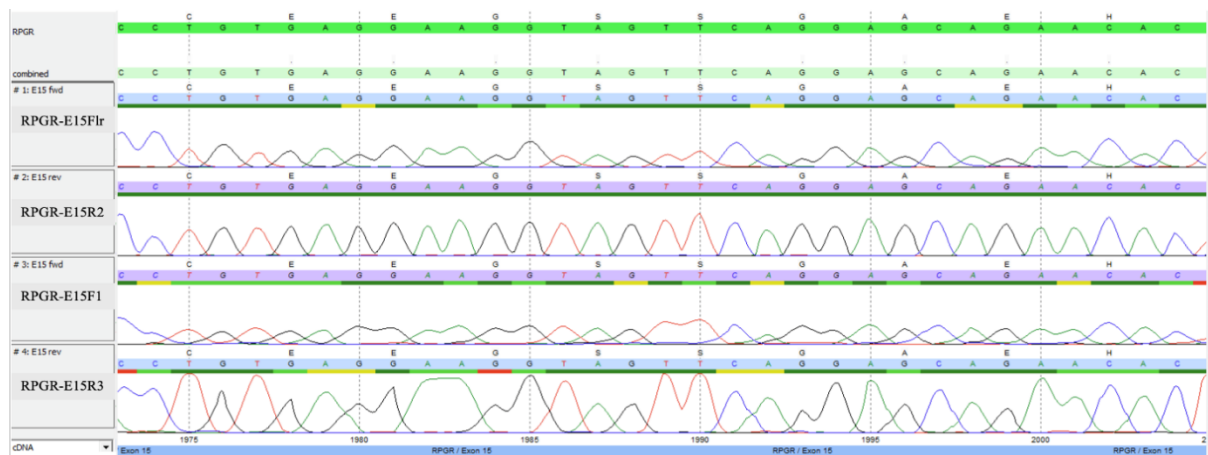
Trace File Name	Well#	Cap#	Trace Score	CRL	QV20+	Signal Intensity				Comments
						A	C	G	T	
06_20240506_RPGR_R1_om_004_Med Gen.ab1										
(BB5-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_020_Med Gen.ab1	E5	20	32	647	604	51	1871	64	1171	
(BB6-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_003_Med Gen.ab1	F1	3	34	622	609	84	2902	103	2012	
(BB6-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_019_Med Gen.ab1	F5	19	35	614	600	28	583	31	375	
(BB7-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_002_Med Gen.ab1	G1	2	26	253	451	32	686	28	506	
(BB7-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_018_Med Gen.ab1	G5	18	25	250	468	34	777	34	520	
(Pos-ktr-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_016_Med Gen.ab1	A3	16	23	218	309	35	751	33	531	
(Pos-ktr-RPGR_RPGR-E15SR1)_2024-05-06_20240506_RPGR_R1_om_032_Med Gen.ab1	A7	32	23	206	271	21	225	18	163	

Vedlegg 13: Sekvenseringsresultater fra positiv kontroll

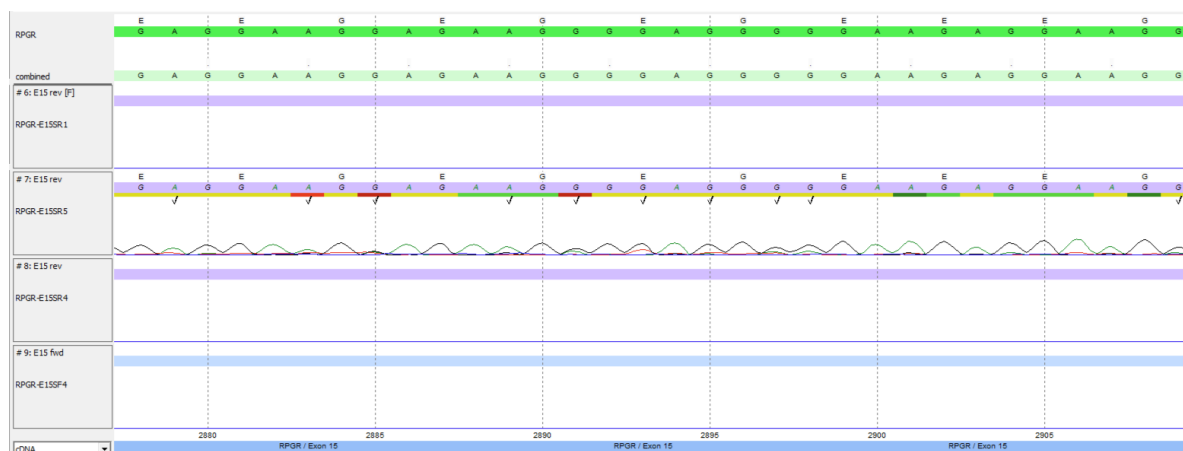
Figurene er hentet fra Sequence Pilot.



Figur 28: Oversiktsbildet fra sekvenseringen av positiv kontroll. Figuren illustrerer hvor primere binder seg på RPGR ekson 15, hvilken retning de har og hvor de dekker. Det er ikke foretatt manuell redigering av baser i sekvensen som dekkes av RPGR-E15SR1.



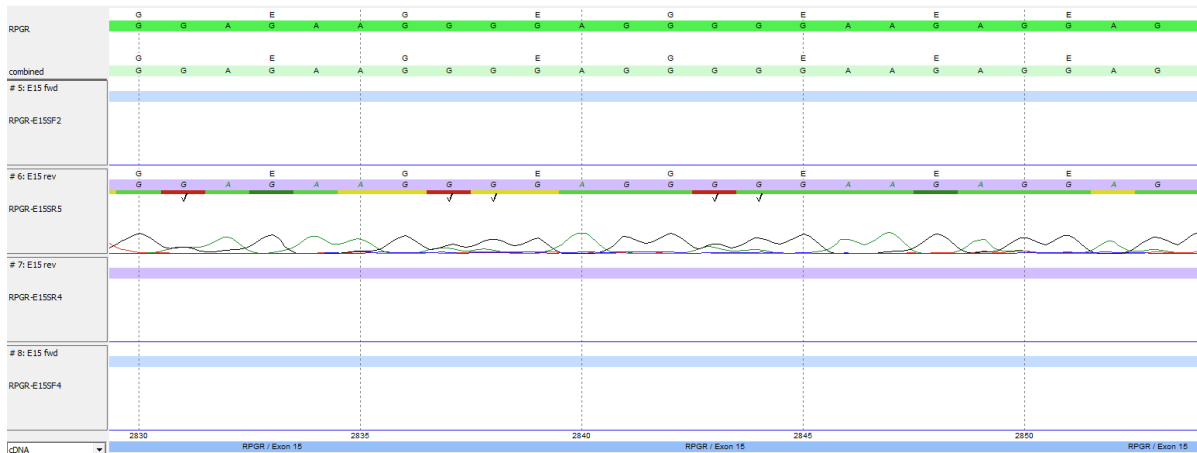
Figur 29: Sekvenseringsdata fra positiv kontroll. Figuren viser et representativt område med god dekning. Hver rad representerer en sekvenseringsprimer, hver topp representerer ett nukleotid, og A, T, C og G er representert med hver sin farge.



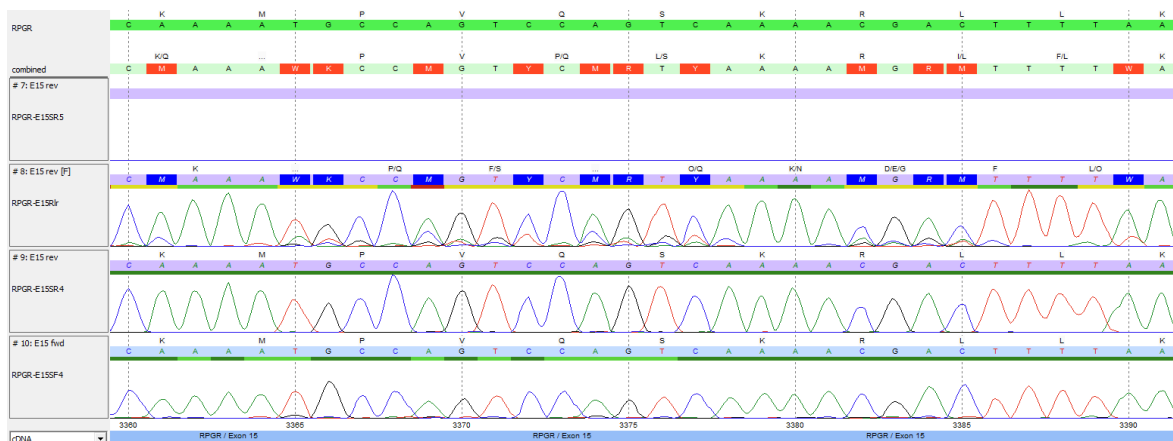
Figur 30: Sekvenseringsdata til positiv kontroll. Området som vises dekker posisjon c.2875 til c.2910, et område som kun dekkes av RPGR-E15SR5.

Vedlegg 14: Sekvenseringsresultater fra BB1

Figurene er hentet fra Sequence Pilot.



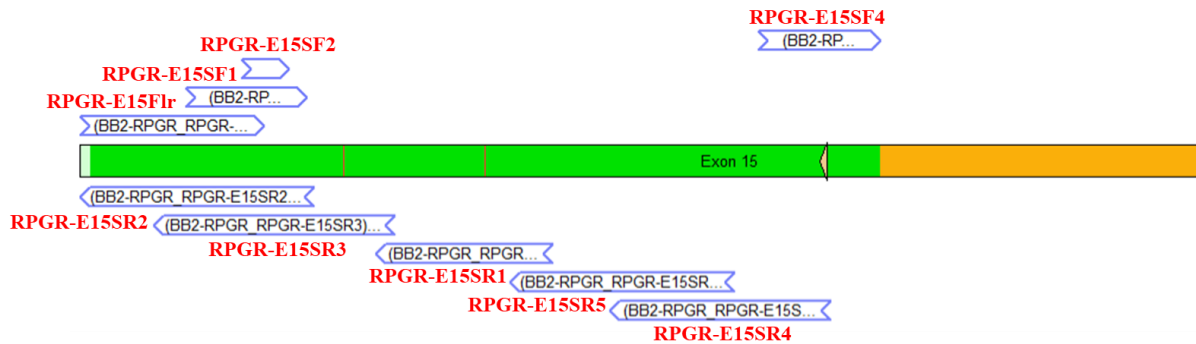
Figur 31: Sekvenseringsdata til BB1. Området som vises dekker posisjon c.2830 til c.2853, et område som kun dekkes av RPGR-E15SR5.



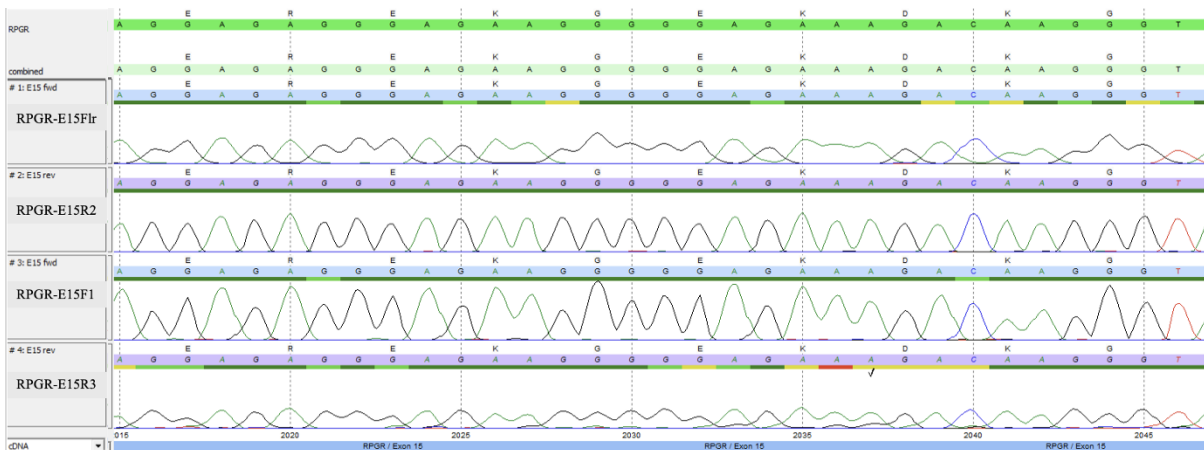
Figur 32: Sekvenseringsdata fra BB1 med hensyn på primeren RPGR-E15Rl (øverste sekvens). RPGR-E15Rl overlappes av RPGR-E15SR4 (midterste sekvens) og RPGR-E15SF4 (nederste sekvens).

Vedlegg 15: Sekvenseringsresultater fra BB2

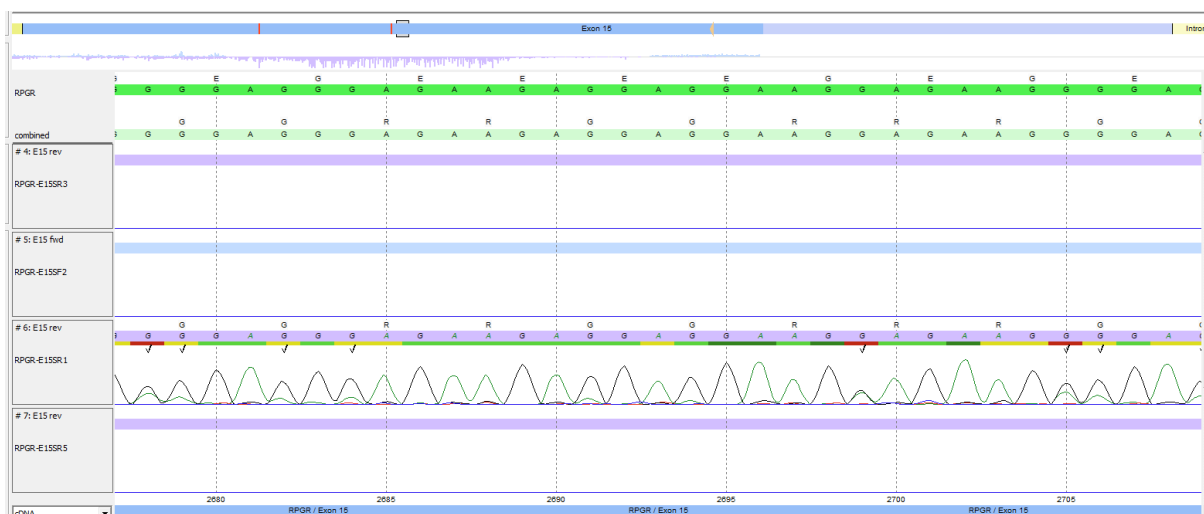
Figurene er hentet fra Sequence Pilot.



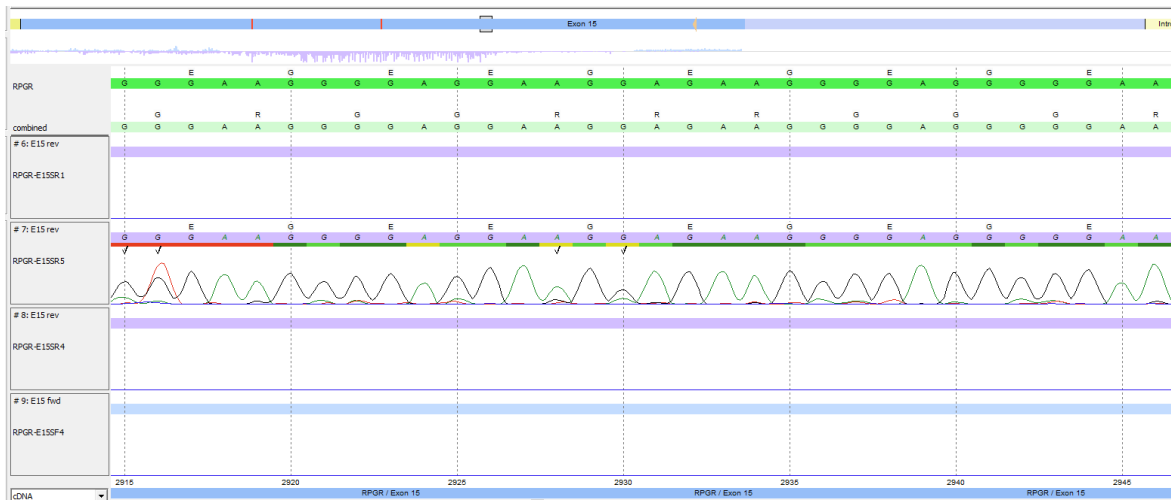
Figur 33: Oversiktsbilde fra sekvenseringen av BB2.



Figur 34: Sekvenseringsdata fra BB2. Figuren viser et representativt område med god dekning.



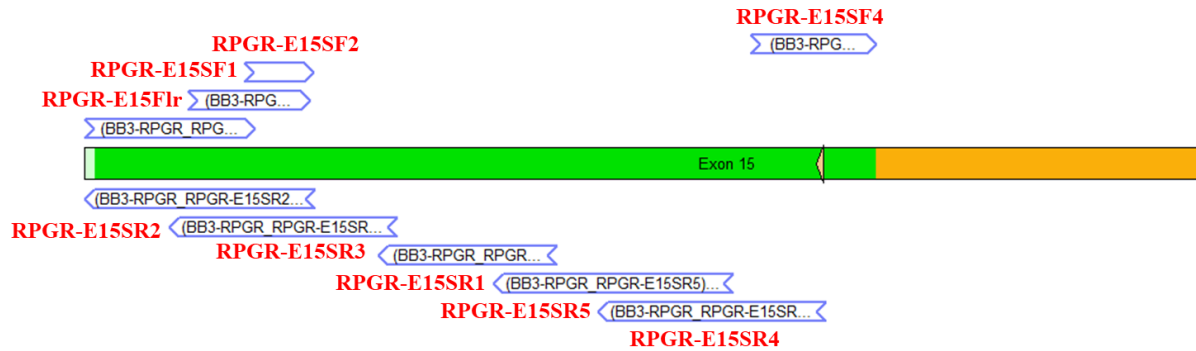
Figur 34: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR1 i BB2. Området vist på figuren er fra ca. c.2675 til c.2710.



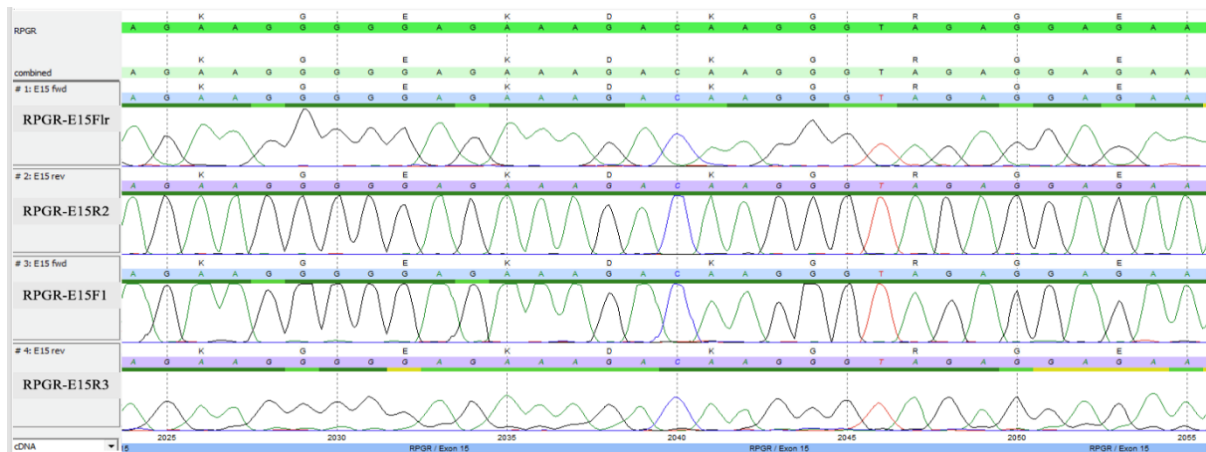
Figur 35: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR5 i BB2. Området vist på figuren er fra ca. c.2915 til c.2945.

Vedlegg 16: Sekvenseringsresultater fra BB3

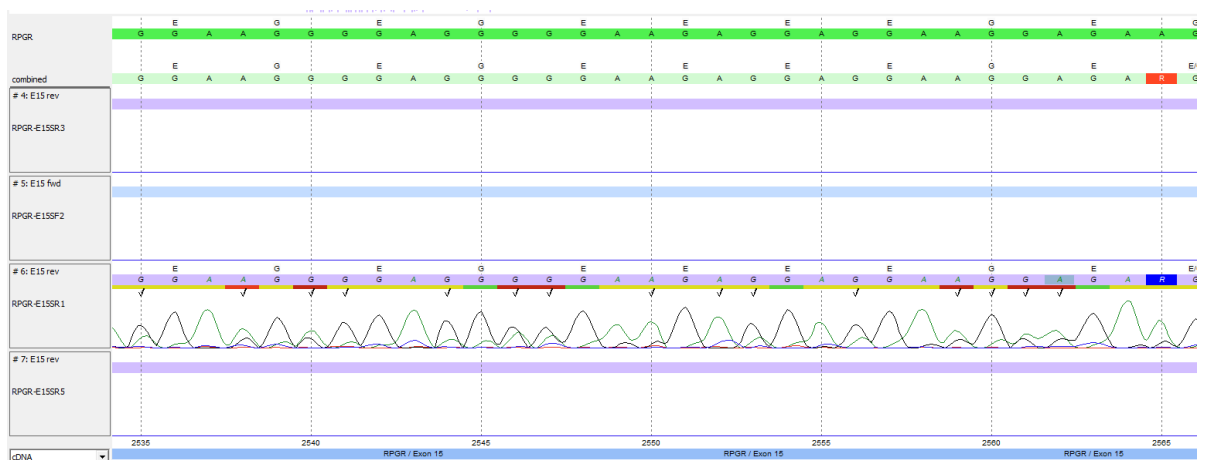
Figurene er hentet fra Sequence Pilot.



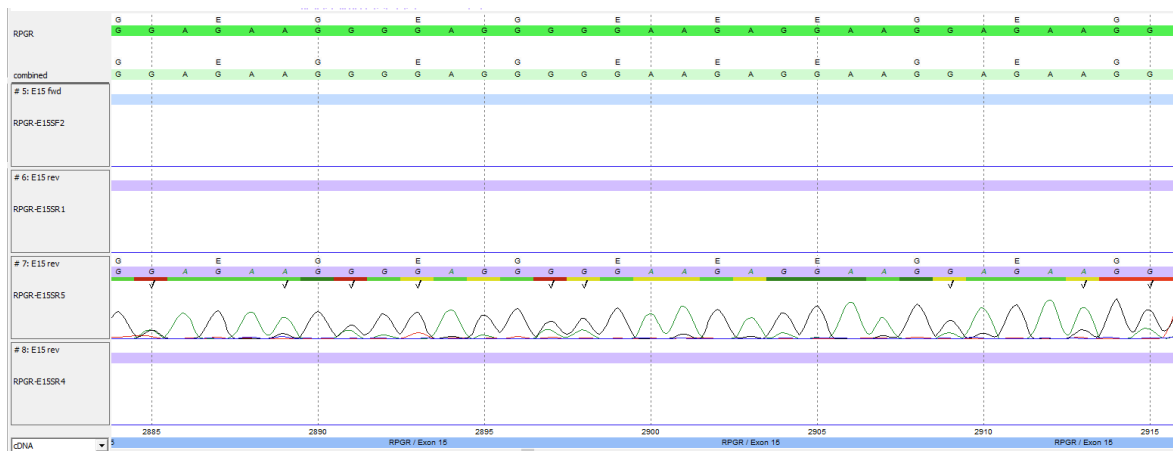
Figur 36: Oversiktsbilde fra sekvenseringen av BB3.



Figur 37: Sekvenseringsdata fra BB3. Figuren viser et representativt område med god dekning.



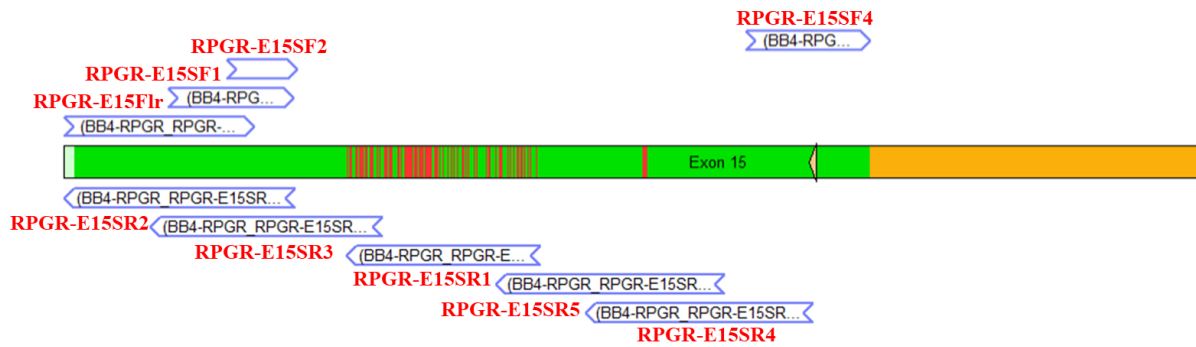
Figur 38: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR1 i BB3. Området vist på figuren er fra ca. c.2535 til c.2565.



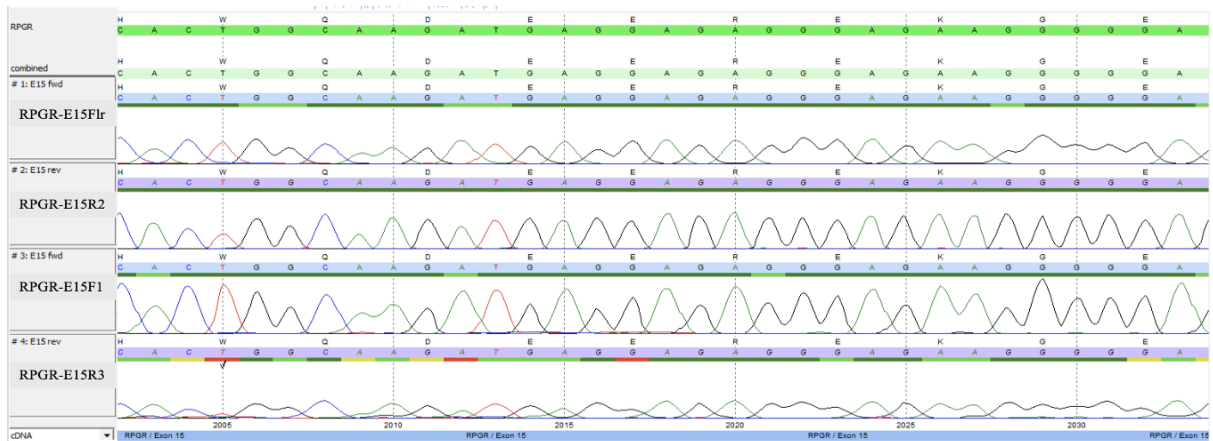
Figur 39: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR5 i BB3. Området vist på figuren er fra ca. c.2885 til c.2915

Vedlegg 17: Sekvenseringsresultater fra BB4

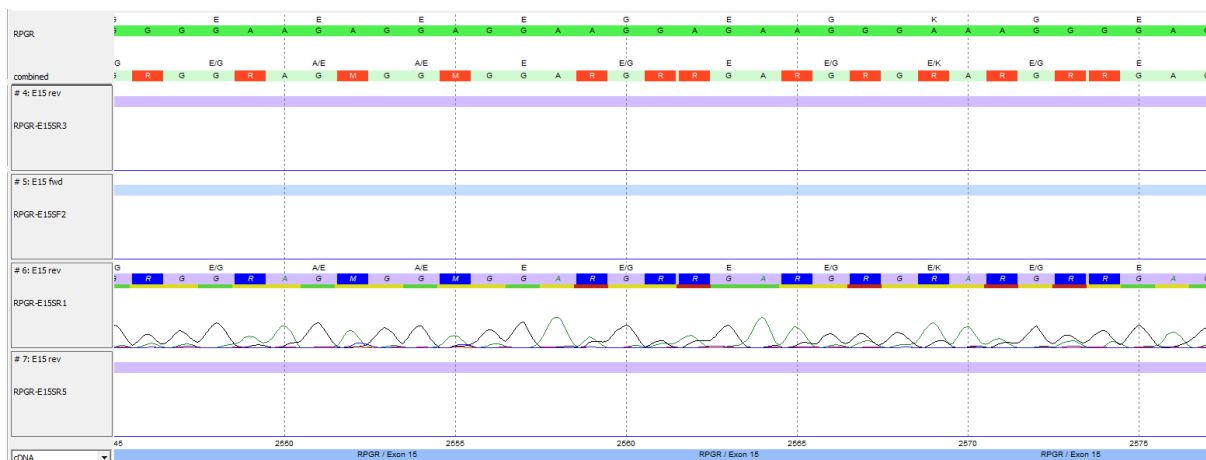
Figurene er hentet fra Sequence Pilot.



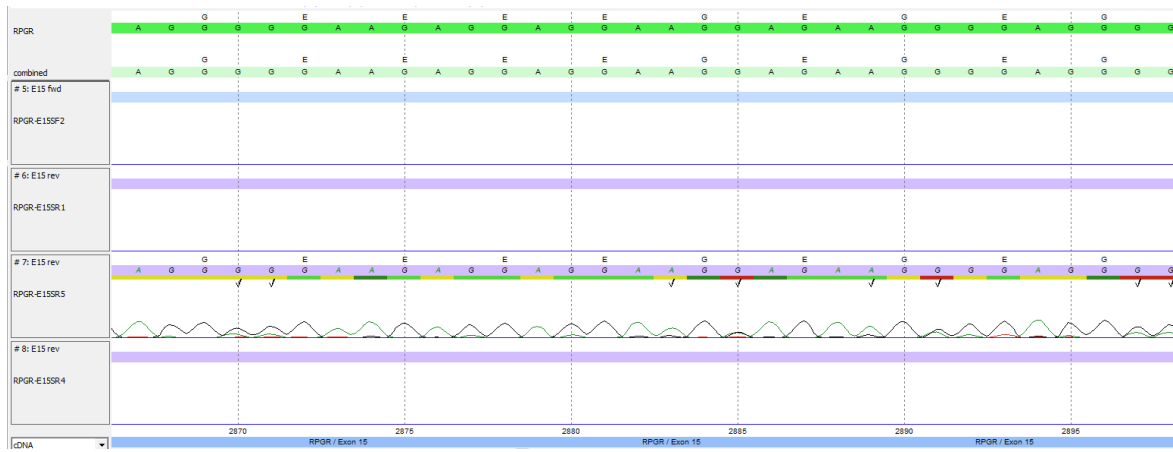
Figur 40: Oversiktsbilde fra sekvenseringen av BB4. Det er ikke foretatt manuell redigering av baser i sekvensen som dekkes av RPGR-E15SR1.



Figur 41: Sekvenseringsdata fra BB4. Figuren viser et representativt område med god dekning.



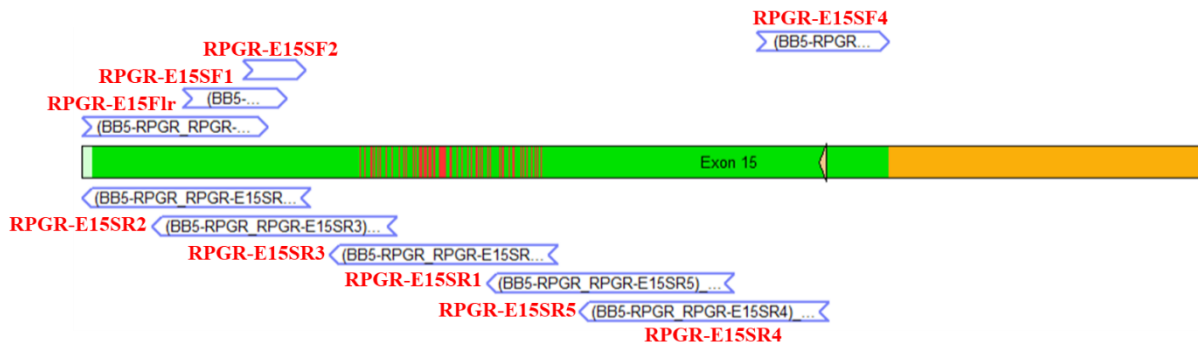
Figur 42: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR1 i BB4. Området vist på figuren er fra ca. c.2545 til c.2575



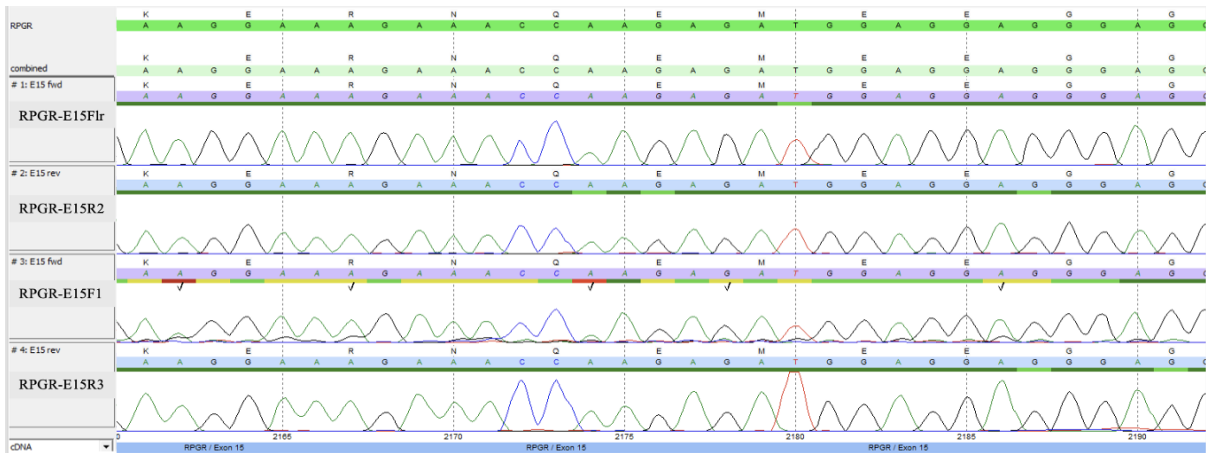
Figur 43: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR5 i BB4. Området vist på figuren er fra ca. c.2865 til c.2895.

Vedlegg 18: Sekvenseringsresultater fra BB5

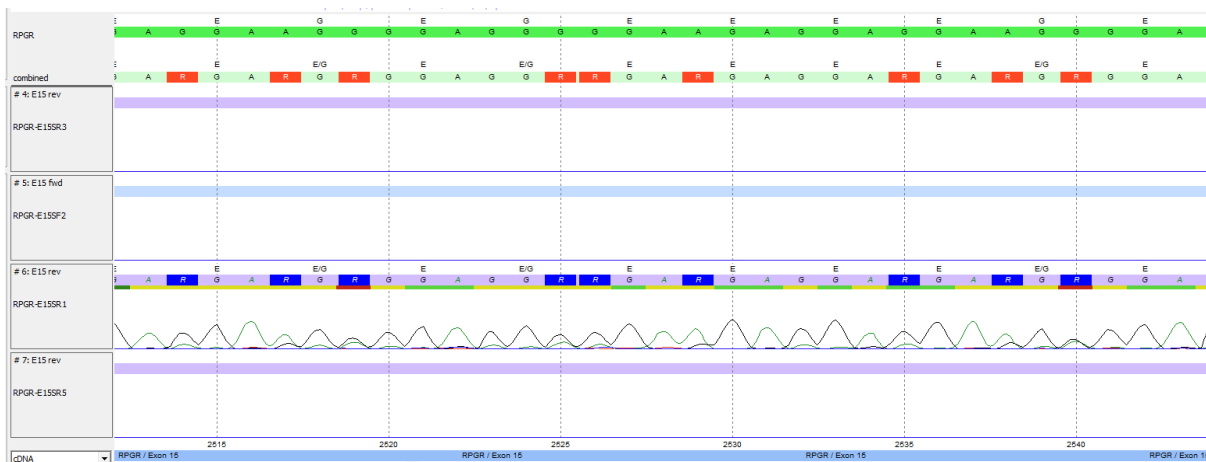
Figurene er hentet fra Sequence Pilot.



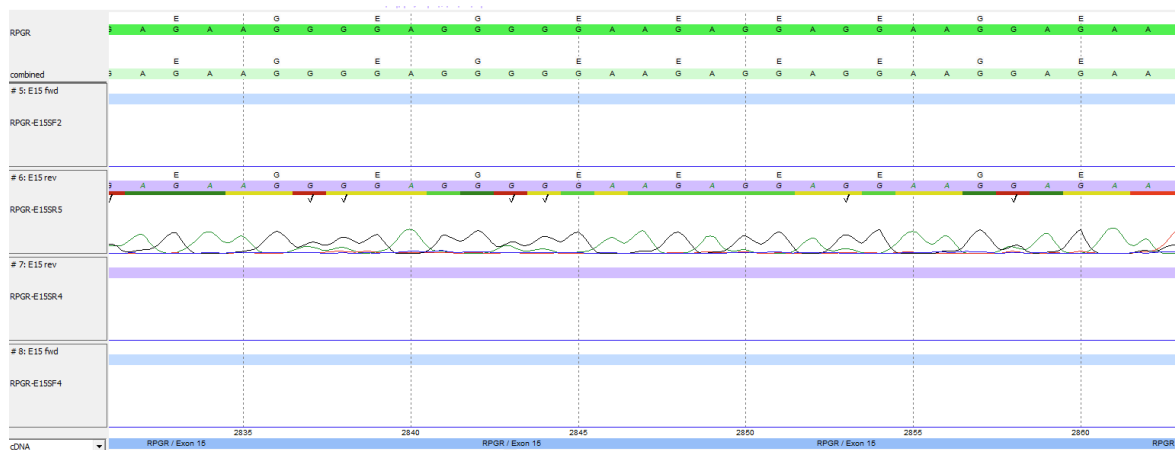
Figur 44: Oversikt over sekvenseringen av BB5. Det er ikke foretatt manuell redigering av baser i sekvensen som dekkes av RPGR-E15SR1.



Figur 45: Sekvenseringsdata fra BB5. Figuren viser et representativt område med god dekning.



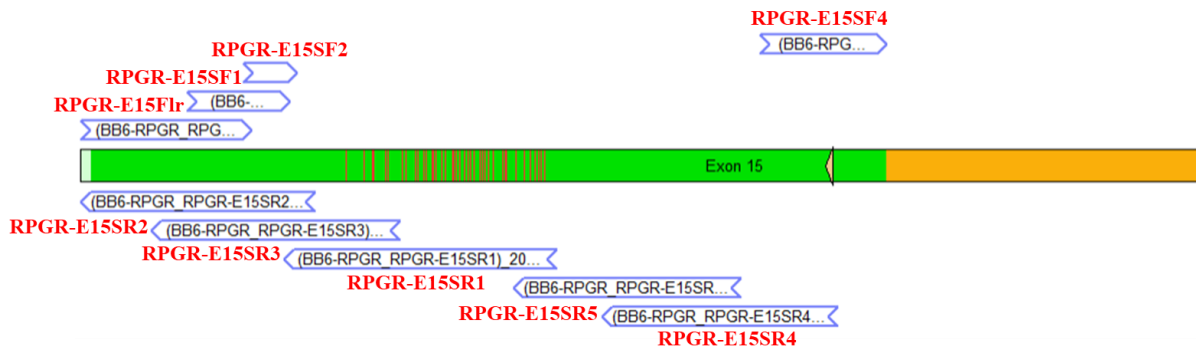
Figur 46: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR1 i BB5. Området vist på figuren er fra ca. c.2510 til c.2545.



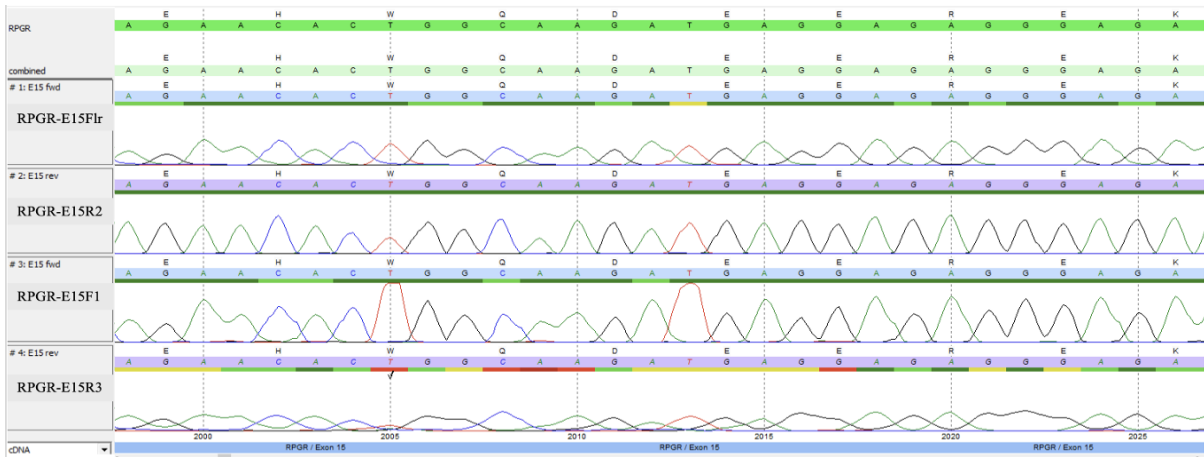
Figur 47: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR5 i BB5. Området vist på figuren er fra ca. c.2830 til c.2865.

Vedlegg 19: Sekvenseringsresultater fra BB6

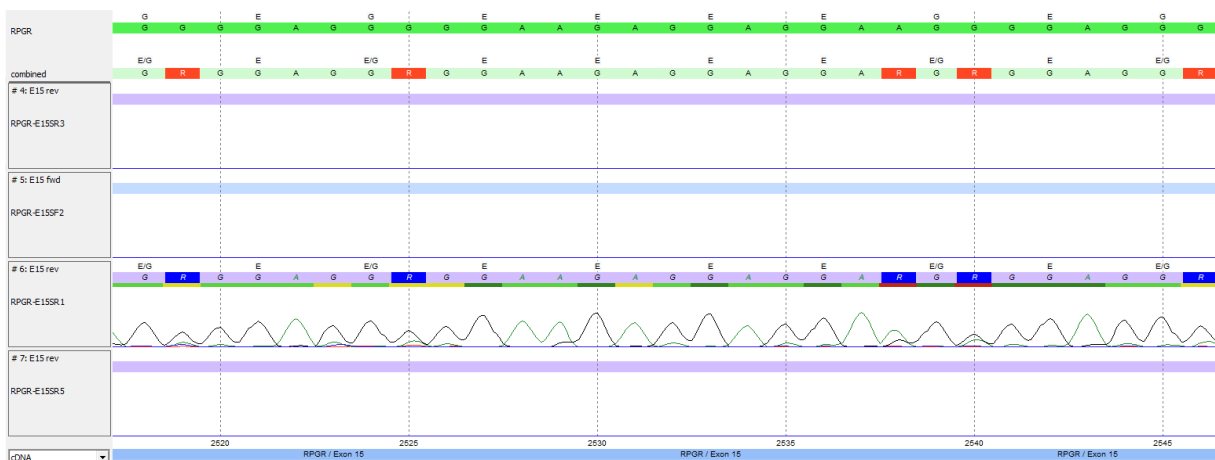
Figurene er hentet fra Sequence Pilot.



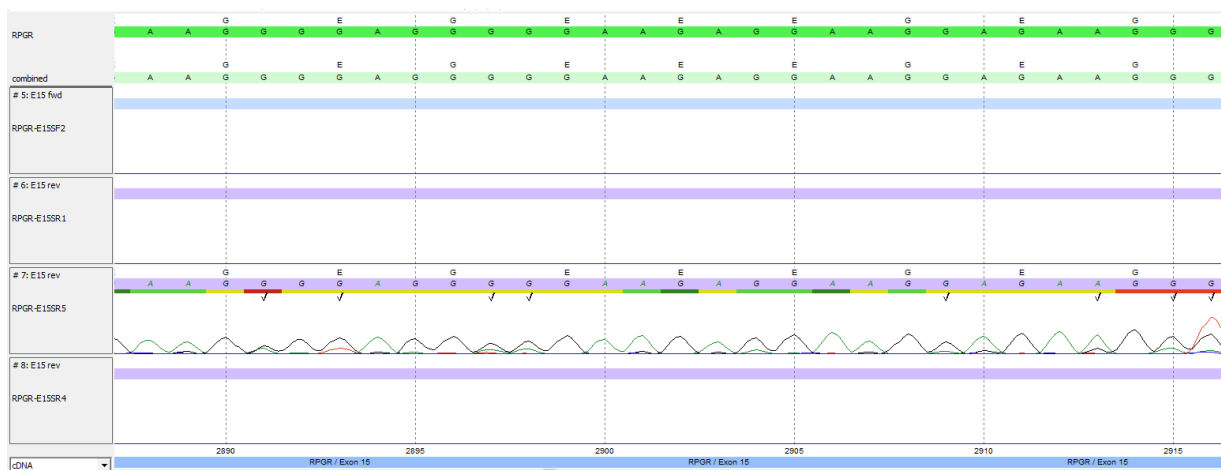
Figur 48: Oversiktsbilde fra sekvenseringen av BB6. Det er ikke foretatt manuell redigering av baser i sekvensen som dekkes av RPGR-E15SR1.



Figur 49: Sekvenseringsdata fra BB6. Figuren viser et representativt område med god dekning.



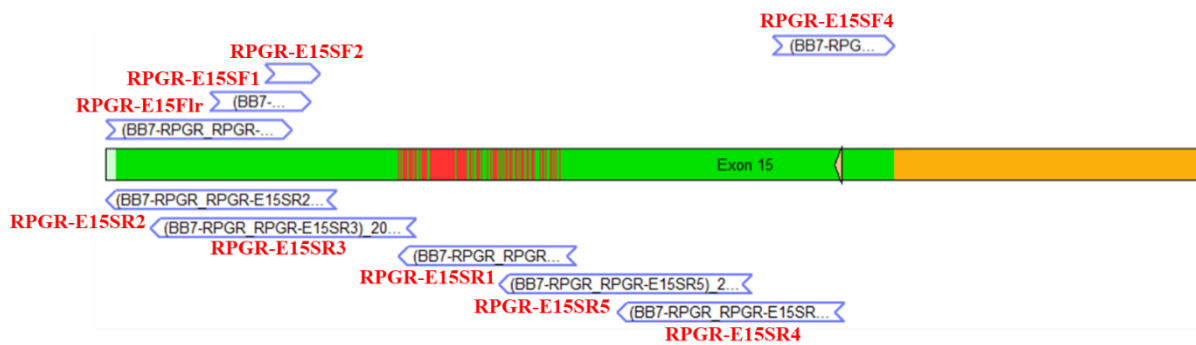
Figur 50: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR1 i BB6. Området vist på figuren er fra ca. c.2865 til c.2895.



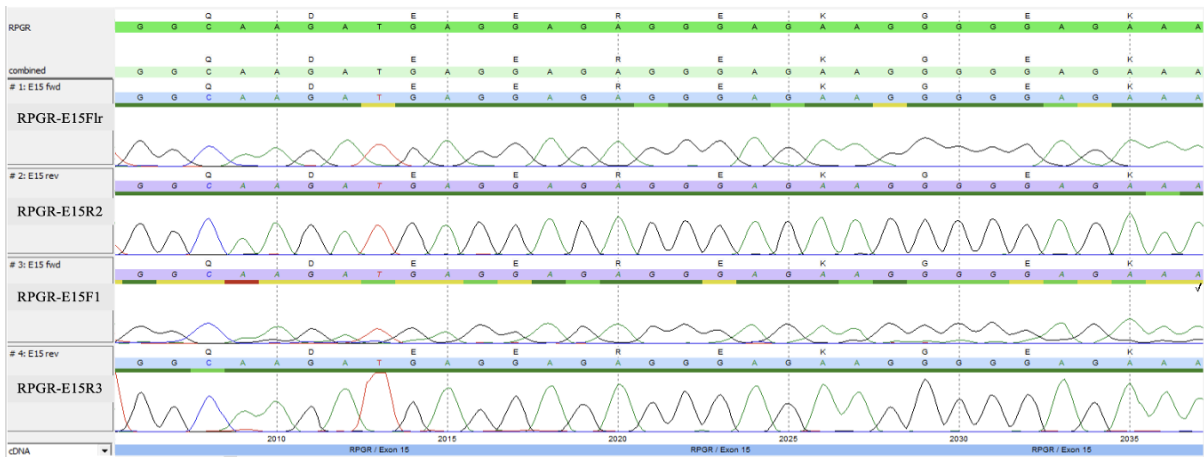
Figur 51: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR5 i BB6. Området vist på figuren er fra ca. c.2885 til c.2915.

Vedlegg 20: Sekvenseringsresultater fra BB7

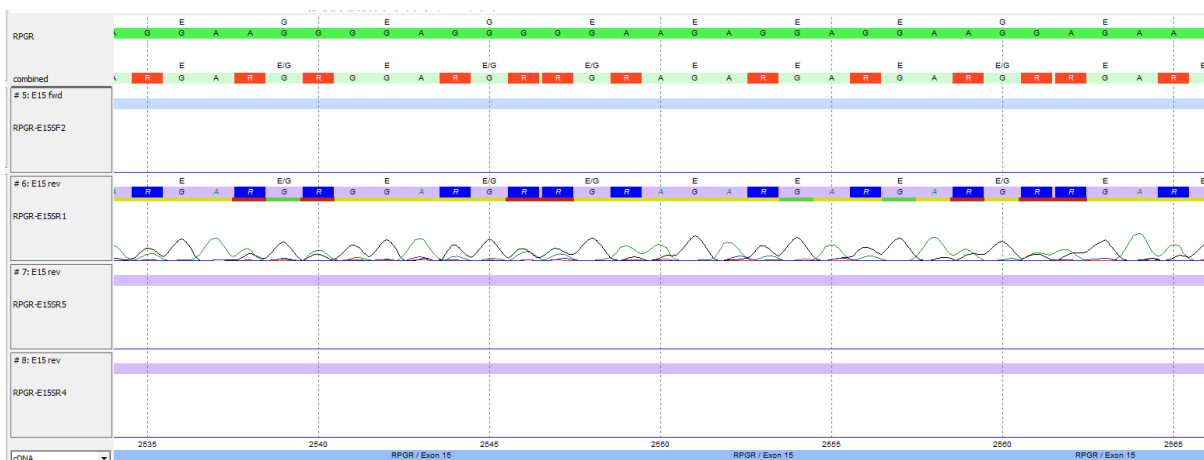
Figurene er hentet fra Sequence Pilot.



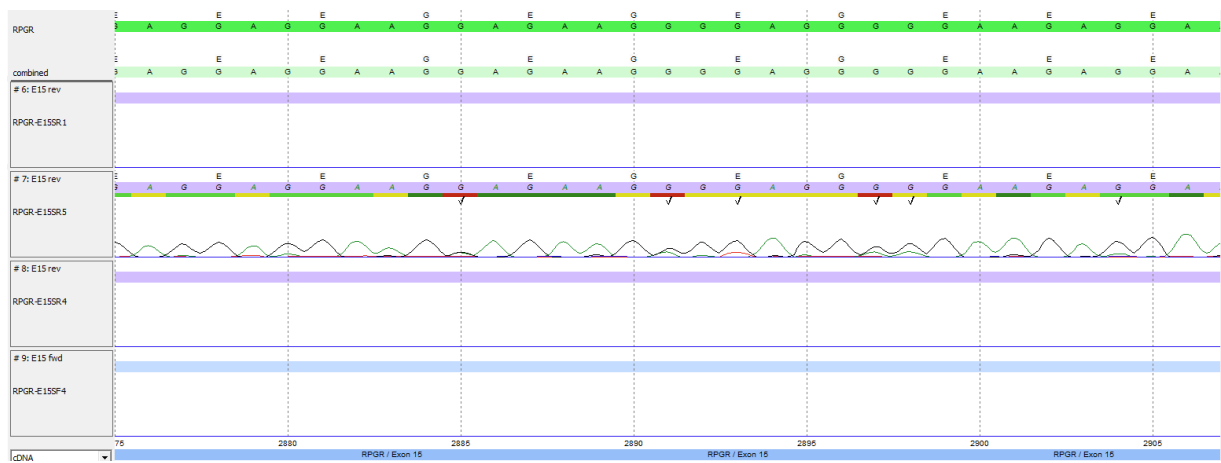
Figur 52: Oversiktsbilde fra sekvenseringen av BB7. Det er ikke foretatt manuell redigering av baser i sekvensen som dekkes av RPGR-E15SR1.



Figur 53: Sekvenseringsdata fra BB7. Figuren viser et representativt område med god dekning.



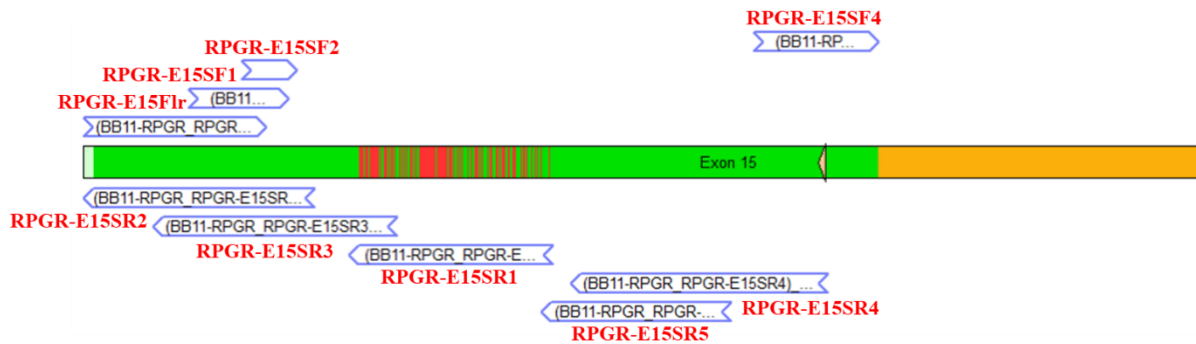
Figur 54: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR1 i BB7. Området vist på figuren er fra ca. c.2535 til c.2565.



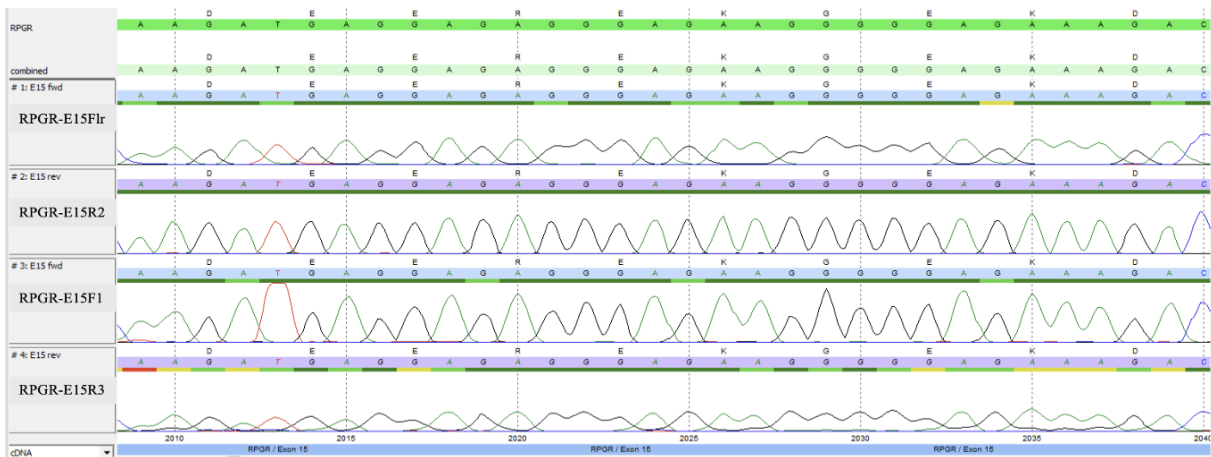
Figur 55: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR5 i BB7. Området vist på figuren er fra ca. c.2875 til c.2905.

Vedlegg 21: Sekvenseringsresultater fra BB11

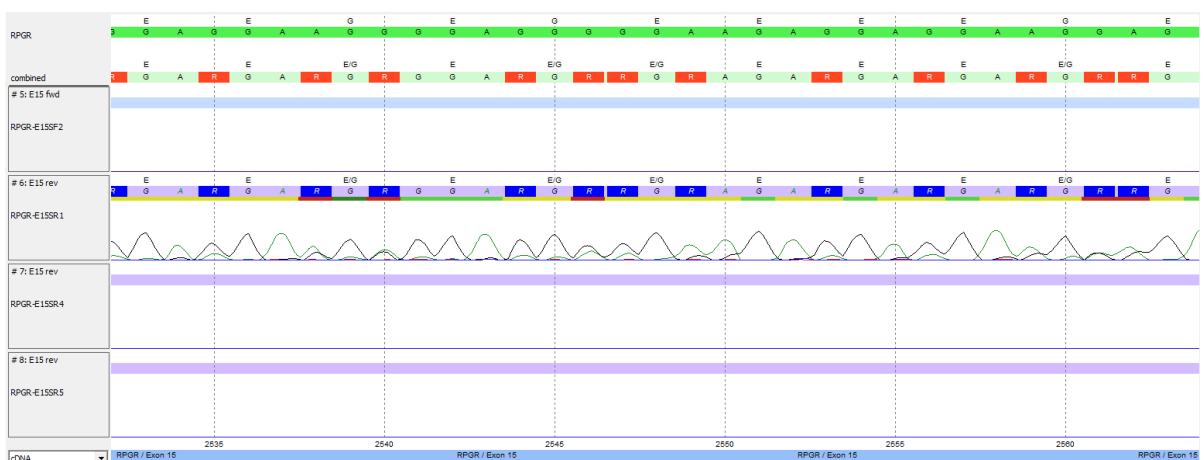
Figurene er hentet fra Sequence Pilot.



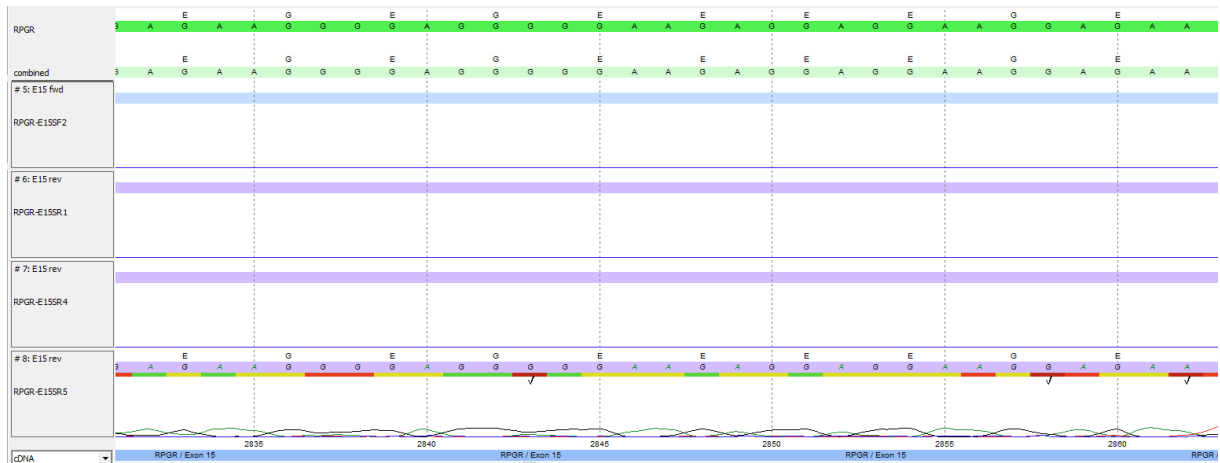
Figur 56: Oversiktsbilde fra sekvenseringen av BB11. Det er ikke foretatt manuell redigering av baser i sekvensen som dekkes av RPGR-E15SR1.



Figur 57: Sekvenseringsdata fra BB11. Figuren viser et representativt område med god dekning.



Figur 58: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR1 i BB11. Området vist på figuren er fra ca. c.2530 til c.2565.



Figur 59: Sekvenseringsdata som viser sekvensen til RPGR-E15SR5 i BB11. Området vist på figuren er fra ca. c.2830 til c.2860.

