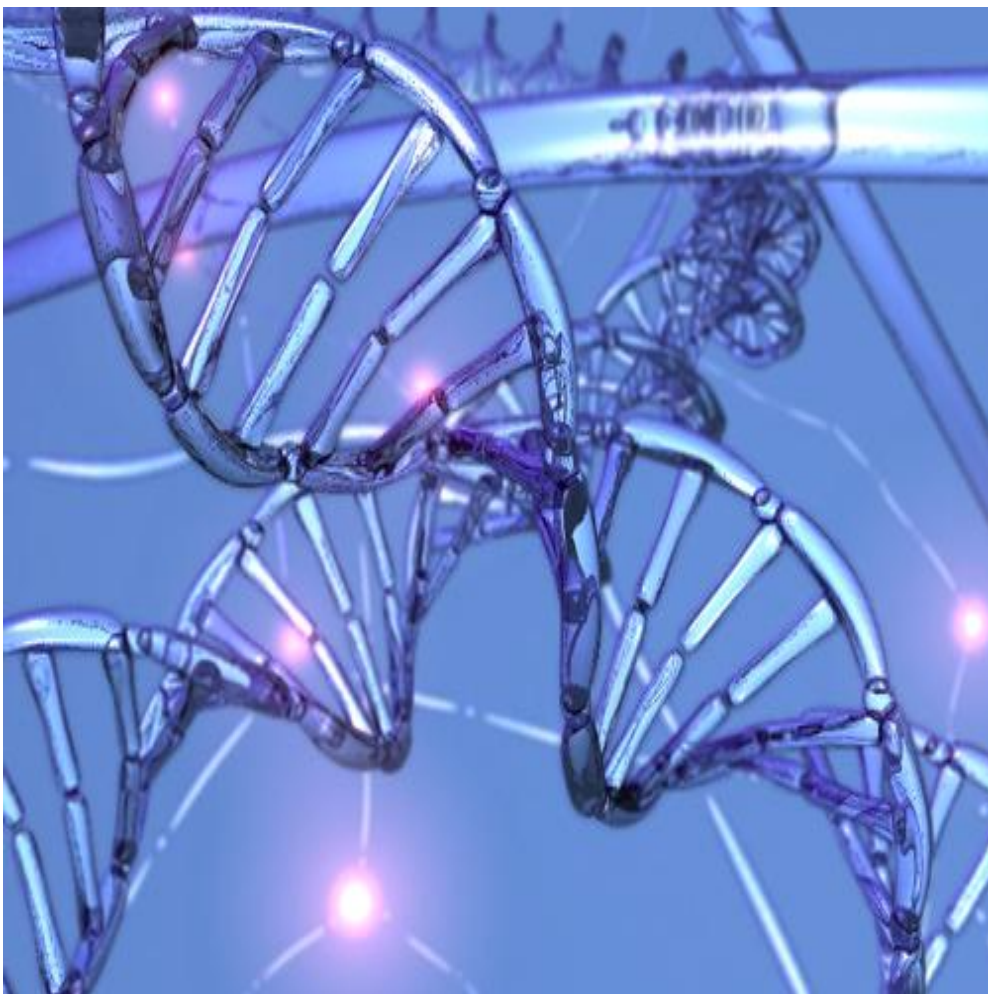


Analyse af geners ekspressionsprofil i arkiveret lymfoidt materiale:

Undersøgelse af metode til kvalitetsbaseret udvælgelse af tumorvæv, der er fikseret i formalin og indstøbt i paraffin



**Afgangsprojekt for diplomingeniører
Sara Elung-Jensen
Aalborg Universitet, 2008**

Det Teknisk-Naturvidenskabelige Fakultet

Titel: *Analyse af geners ekspressionsprofil i arkiveret lymfoidt materiale: Undersøgelse af metode til kvalitetsbaseret udvælgelse af tumorvæv, der er fikseret i formalin og indstøbt i paraffin.*

Projektperiode: 1. september 2007 – 15. februar 2008.

Synopsis:

I projektet undersøges effekten af forøget inkubering med proteinase K i forbindelse med oprensning af RNA fra tumorvæv, der er fikseret i formalin og indstøbt i paraffin (FFPE-væv). Forskellige modifikationer af proteinase K inkuberingstrinnet for to kommercielle oprensningskits (Qiagen RNeasy FFPE Kit og MasterPure RNA Purification Kit) undersøges med NanoDrop, Agilent Bioanalyzer, real-time kvantitativ PCR og med DNA-chip. Det fandtes, at forøget proteinase K inkubering resulterer i højere kvalitet af RNA. Yderligere fandtes Qiagens RNeasy FFPE Kit bedre til oprensning af FFPE-væv og at det er nødvendigt at udføre yderligere DNase I-behandling af det oprensede RNA. For at undersøge en metode til kvalitetsbaseret udvælgelse af tumorvæv, der er tilstrækkelig høj kvalitet til genekspressionsanalyse på DNA-chip, er et 3'/5'-forhold beregnet ved brug af kvantitativ PCR med GAPDH som endogen kontrol. Analyse af fem tilfældige FFPE-prøver viste et meget meget lavt antal RNA-fragmenter, der er længere end 800 nukleotider i RNA-oprensningen og at i gennemsnit ét ud af 100 RNA-fragmenter er 300 eller flere nukleotider lange.

Vejledere:

Jesper Dahlgaard, Ph.D., Seniorforsker.
Hæmatologisk afdeling,
Aalborg sygehus, Aarhus Universitetshospital.

Hans Erik Johnsen, DMSc, Professor.
Hæmatologisk afdeling,
Aalborg sygehus, Aarhus Universitetshospital.

Lars Haastrup Pedersen, Ph.D., Lektor.
Sektion for Bioteknologi,
Aalborg Universitet.

Bivejleder:

Karen Dybkær, Ph.D., Seniorforsker.
Hæmatologisk afdeling,
Aalborg sygehus, Aarhus Universitetshospital.

Oplagstal: 7

Sideantal: 77

Bilagsantal: 13

Forord

Denne rapport er et 7. semesters afgangprojekt for diplomingeniører på bioteknologisk fagretning ved Aalborg Universitet. Den er udarbejdet i perioden fra den 1. september 2007 til den 15. februar 2008 afbrudt af et to måneder langt sygdomsforløb i oktober og november. Rapporten er udarbejdet hos Hæmatologisk Forskningslaboratorium, hæmatologisk afdeling ved Aalborg sygehus.

Gennem rapporten er Harvard-metoden benyttet til kildehenvisninger efter gældende regler med en detaljeret referenceliste sidst i rapporten. Rapporten henvender sig hovedsageligt til medstuderende på 7. semester ved bioteknologisk fagretning, vejledere og andre med interesse for emnet. På vedlagte datadisk findes benyttede regneark samt originale protokoller.

Der rettes en særlig tak til overlæge ved patologisk institut på Aalborg sygehus, Preben Johansen, hvis venlige udlån af FFPE-vævsprøver har gjort projektet muligt. Yderligere rettes stor tak til personale og studerende ved Hæmatologisk Forskningslaboratorium i Forskningens Hus for støtte og assistance gennem hele projekt perioden.

Aalborg den 15. februar 2008

Indholdsfortegnelse

FORORD	5
PROJEKTETS FORMÅL	11
INDLEDNING	13
<i>Vævs fiksering med formalin</i>	13
<i>Nedbrydning af væv</i>	14
<i>Udvælgelse af oprensningsmetoder</i>	15
<i>Polymerase chain reaction</i>	16
<i>Udvælgelse af husholdningsgener</i>	18
MATERIALER OG METODER	19
<i>Udskæring af FFPE-væv</i>	20
<i>Fjernelse af paraffin fra FFPE-væv</i>	20
<i>Behandling af oprenset RNA</i>	20
<i>Oprensning af total RNA fra FFPE-væv med MasterPure RNA Purifications Kit</i>	21
<i>Oprensning af total RNA fra FFPE-væv med Qiagen RNeasy FFPE Kit</i>	21
<i>Forlænget inkubation med højere proteinase K koncentration</i>	22
<i>Modificeret oprensning med Qiagen RNeasy FFPE Kit (lang inkubation)</i>	22
<i>Modificeret oprensning med MasterPure RNA Purification Kit (lang inkubation)</i>	23
<i>Modificeret oprensning med MasterPure RNA Purification Kit (lang inkubation, tilpasset volumen)</i>	23
<i>Måling af RNA-koncentration og renhed på NanoDrop</i>	23
<i>Analyse af RNA på Bioanalyser med Agilent RNA 6000 Nano Reagent Kit</i>	23
<i>Analyse af RNA på Bioanalyser med Agilent RNA 6000 Pico Reagent Kit</i>	24
<i>Syntese af First-Strand cDNA revers transskriberet med en T7-Oligo(dT) primer</i>	24
<i>Indstillinger af MX 3000P-instrumentet</i>	25
<i>Temperaturprofil for MX 3000P-instrumentet</i>	25
<i>Q-PCR TaqMan Gene Expression Assays</i>	25
<i>GeneChip Expression Analysis</i>	26
<i>Fremstilling af 2 % agarose-gel</i>	28
<i>Primere med β-actin som endogen kontrol</i>	29
<i>Optimering af primer koncentrationer</i>	29
<i>Temperaturprofil for G-storm PCR Thermal Cycler</i>	30
<i>Kvalitativ bestemmelse af 3'/5'-forhold med β-actin som endogen kontrol</i>	30
<i>Primere med GAPDH som endogen kontrol</i>	31
<i>Kvantificering af 3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol</i>	32
<i>Test af DNA-kontaminering med Q-PCR</i>	33
<i>DNase I-behandling på membran med Qiagen RNeasy mini Kit</i>	33
<i>DNase I-behandling af oprenset RNA med Amplification Grade DNase I kit</i>	33
<i>Statistik og databehandling</i>	34
RESULTATER	35
<i>Undersøgelse af oprensningsmetoder</i>	35
<i>Valg af oprensningsmetode</i>	42
<i>Kvalitetsparametre for oprensede FFPE-vævsprøver</i>	42
<i>Real-time kvantitativ PCR</i>	45
<i>Korrelation mellem frossent væv og FFPE-væv</i>	47
<i>Optimering af primerkoncentration til PCR-assay med β-actin som endogen kontrol</i>	48
<i>Analyse af 3'/5'-forhold for FFPE-vævsprøver med β-actin som endogen kontrol</i>	48
<i>Analyse af 3'/5'-forhold for FFPE-vævsprøver med GAPDH som endogen kontrol</i>	49
<i>DNase I-behandling</i>	50
<i>3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol</i>	53
<i>3'/5'-forhold med center 5' primer-probe-parret</i>	54
DISKUSSION	55

Analyse af geners ekspressionsprofil i arkiveret lymfoidt materiale: Undersøgelse af metode til kvalitetsbaseret udvælgelse af tumorvæv, der er fikseret i formalin og indstøbt i paraffin

<i>Undersøgelse af oprensningemetoder</i>	<i>55</i>
<i>Genekspressionsanalyse af FFPE-vævsprøver.....</i>	<i>57</i>
<i>Valg af oprensningemetode.....</i>	<i>58</i>
<i>Kvalitetsparametre for oprensede FFPE-vævsprøver.....</i>	<i>58</i>
<i>Korrelation mellem analyserede kvalitetsparametre.....</i>	<i>59</i>
<i>Real-time kvantitativ PCR.....</i>	<i>59</i>
<i>Korrelation mellem frossent væv og FFPE-væv</i>	<i>60</i>
<i>DNA-kontaminering</i>	<i>60</i>
<i>3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol</i>	<i>61</i>
KONKLUSION.....	63
REFERENCER.....	65
BILAG.....	67

Oversigt over bilag

- BILAG A:** Struktur og sekvens af GAPDH (NM_002046)
- BILAG B:** Opmærkning af mRNA til analyse med DNA-chip
- BILAG C:** Procedure for prøveudtag
- BILAG D:** Procedure for analyse på NanoDrop
- BILAG E:** Protokol til fremstilling af 2 % Agarose-gel
- BILAG F:** Protokol for oprensning af total RNA med MasterPure RNA Purification Kit
- BILAG G:** Modifieret protokol for oprensning af RNA med MasterPure RNA Purification Kit (forlænget proteinase K inkubering)
- BILAG H:** Protokol for oprensning af total RNA med Qiagen RNeasy FFPE Kit
- BILAG I:** Modifieret protokol for oprensning af RNA med Qiagen RNeasy FFPE Kit (forlænget proteinase K inkubering)
- BILAG J:** cDNA syntese med SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix
- BILAG K:** Protokol til analyse på Agilent Bioanalyser
- BILAG L:** Protokol til 3'/5'-forhold med β -actin som endogen kontrol
- BILAG M:** Protokol for GeneChip Expression Analysis
- BILAG N:** Protokol til 3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol
- BILAG O:** Protokol til TaqMan Gene Expression Assays

Indhold på datadisk

- Analyse af vævsprøver for bedste oprensning.xls*
- Længst mulige fragment og toppunkter, test af bedste oprensning.xls*
- Q-PCR, test af bedste oprensning.xls*
- Analyse på picochip.xls*
- Biotin-mærket cRNA.xls*
- Længst mulige fragment, areal og toppunkter for alle 31 prøver.xls*
- Koncentrationer af alle 31 prøver.xls*
- 3'5' forhold med GAPDH som endogen kontrol.xls*
- 3'5' forhold med center 5' primere.xls*
- Q-PCR på alle 31 prøver.xls*
- Korrelation ml. frossent og FFPE-væv.xls*
- Statistik, bedste oprensningsmetode.doc*
- En opdateret original version af Stratagene: Introduction to Quantitativ PCR*

Protokoller:

- Affymetrix: GeneChip Expression Analysis Technical Manual*
- Brilliant QPCR Handbook.pdf*
- TaqMan Gene Expression Assays Protocol.pdf*
- Qiagen RNeasy Mini Handbook.pdf*
- RNeasy FFPE Handbook.pdf*
- MasterPure RNA Purification Handbook.pdf*
- Sigma-Aldrich DNase I behandling.pdf*

Forkortelser

ABL: Abelson murine leukaemia viral
ANOVA: Analysis of Varians
B2M: Beta-2-Microglobulin
BHQ: Black Hole Quencher
cDNA: Complementary DNA
Ct: Threshold cycle
DEPC: Diethylen Pyrocarbonat
DLBCL: Diffuse storcellet B-celle lymfomer
DNA: Deoxyribonukleinsyre
DNase: Deoxyribonuklease
FAM: 6-carboxy fluorescein
FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded
GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HEX: Hexachloro-carbonyl-fluorescein
mRNA: Messenger RNA
No RT: No reverse transcriptase kontrol
NP: No primer control
Nt: Nukleotider
NT: No template control
NTP: Nukleosid tri-phosphat
PPIA: Peptidyl prolyl Isomerase A
RPLPO: Ribosomal Protein, Large, P0
PRKG1: Protein Kinase cGMPdependent, Type I
Q-PCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA: Ribonukleinsyre
RNase: Ribonuklease
RIN: RNA Integrity Number
ROX: 6-carboxy-X-rhodamin
RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
Taq: Thermus Aquaticus
TBP: TATA-box Binding Protein

Projektets formål

I forsøget på bekæmpelse af kræft og andre mere almindelige sygdomme har bestemmelse af genekspression gennem kvantitativ Polymerase Chain Reaction (Q-PCR) og DNA-chipanalyser vist sig at være stærke redskaber til at give en detaljeret forståelse af sygdomsmekanismer samt muligheden for identifikation af nye sygdomsgener. Det skyldes, at der ofte observeres ændringer i genekspressionsmønstret under sygdomsforløbet. Problemet med genekspressionsanalyser er en begrænset adgang til vævsprøver i høj kvalitet. Adgangen til nedfrosset tumurvæv med tilhørende klinisk information, der strækker sig over en dækkende periode, er begrænset. Derimod findes der verden over meget store samlinger af vævsprøver, der er fikseret i formalin og indstøbt i paraffin (FFPE), med tilhørende klinisk information om sygdomsforløbet. Problemet med FFPE-vævet er dog, at der efter fiksering sker en gradvis nedbrydning af RNA, hvorfor det oprensede RNA hidtil er blevet betragtet som værende af så dårlig kvalitet, at det kun i meget begrænset omfang kan benyttes til genekspressionsanalyser.

Nyligt publicerede studier har vist positive resultater med analyse af genekspression ud fra RNA-præparationer oprenset fra FFPE-væv og har tilmed, med succes, genereret DNA-chipprofiler fra total RNA oprenset fra FFPE-væv. Det sidste har vakt stor interesse hos forskere verden over. Da profilering af genekspressionen ved hjælp af DNA-chip er en bekostelig metode, er det ønskeligt at udvikle en hurtig og nem metode til at vurdere kvaliteten af det oprensede RNA tidligt i analyseforløbet. Etablering af en pålidelig metode til udvælgelse FFPE-væv med en tilstrækkelig høj kvalitet af total RNA vil gøre det muligt at indsamle patientmateriale i et omfang, der ikke tidligere er set.

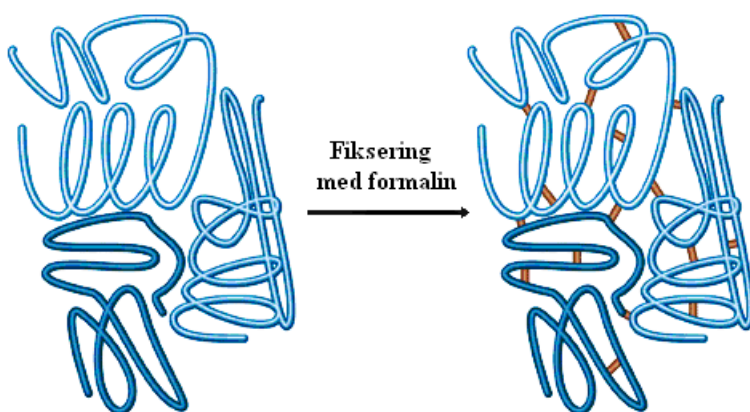
På den baggrund er formålet med dette projekt at undersøge, hvorvidt det er muligt tidligt i et analyseforløb at bestemme RNA-kvaliteten af en given FFPE-vævsprøve med henblik på at vurdere, om prøven kan anvendes til analyse af genekspression samt til DNA-chipanalyser af den globale genekspression.

Projektet tager udgangspunkt i en hypotese om, at kvaliteten af prøvepræparationen er afhængig af oprensningmetoden, hvorfor et væsentligt formål her er at undersøge effekten af forskellige modifikationer af oprensningmetoder udvalgt på baggrund af teori fundet i litteraturen.

INDLEDNING

Vævs fiksering med formalin

Formålet med fiksering af vævsprøver med formalin er at kunne bevare cellerne i vævet så godt som muligt uden at cellerne ændrer morfologi samt at stoppe alle metaboliske processer i cellerne. Yderligere har formalin en toksisk effekt på mikroorganismer, der modvirker fordærv og kolonidannelse i det fikserede væv. Ved tilsætning af formalin dannes krydsbindende methylenbroer og Schiffbaser primært mellem de basiske aminosyrerester i lysin og de mindre reaktive amider (glutamin, asparagin) både indenfor og imellem proteiner, hvorved den oprindelige proteinstruktur bevares rimeligt. Fiksering med formalin resulterer i en meget lille beskadigelse af den tertiære struktur. (Fox *et al.*, 1985) På Figur 1 nedenfor er krydsbindinger indeni og imellem proteiner illustreret.



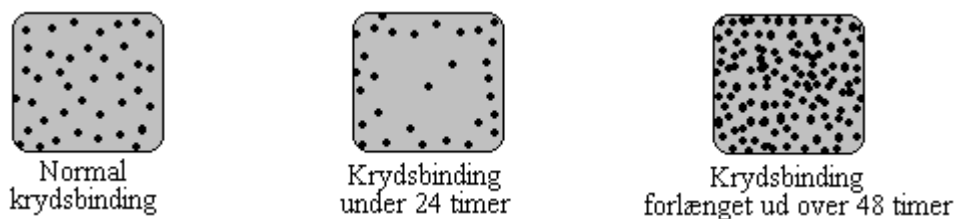
Figur 1. Princippet bag krydsbinding mellem lysin aminosyrerester og amider i og imellem proteiner. Krydsbindingerne, der dannes ved fiksering med formalin, tilfører cellen mekanisk styrke og bevarer proteinernes tertiære struktur. Frit redigeret ud fra National diagnostics, 2005

For at bevare morfologien af vævsprøven er en hurtig fiksering afgørende. Dette er bl.a. grunden til at formalin er et af de mest populære fikseringsmidler, da formalin, sammenlignet med andre ikke-aldehydfikseringsmidler, trænger hurtigt ind i hele vævet, bevarer de morfologiske detaljer godt. For at mindske nedbrydning anbefales det, at væv fikseres indenfor 30 minutter efter det fjernes fra patienten, og at større vævsprøver inddeles i mindre prøver, da fikseringstiden er proportional med størrelsen af vævet. Det kan i midlertidigt være et problem for mange, f.eks. i forbindelse med

operationer, at overholde tidsrammen, hvorfor en omfattende nedbrydning af vævet risikeres allerede inden fikseringen. Der eksisterer på nuværende tidspunkt ikke anerkendte verdensdækkende retningslinier for fiksering af væv, hvilket er medvirkende til stor forskel på kvaliteten af fikseret væv. (Werner *et al.*, 2000)

Et andet problem med fikseringstiden er at bestemme den optimale tid, hvori vævet fikseres med formalinen. Det anbefales, at vævet opbevares i formalin i 24-48 timer. Forlænges fikseringen ud over 48 timer, opstår problemer med omfattende krydsbinding af vævet, hvilket kan resultere i irreversibel skade og umuliggøre oprensning. Tilsvarende giver fiksering under 24 timer problemer, da man risikerer at vævets midte ikke fikseres og med tiden vil undergå autolyse. (Werner *et al.*, 2000)

Problemerne med forskel i fikseringstiden er illustreret på Figur 2.



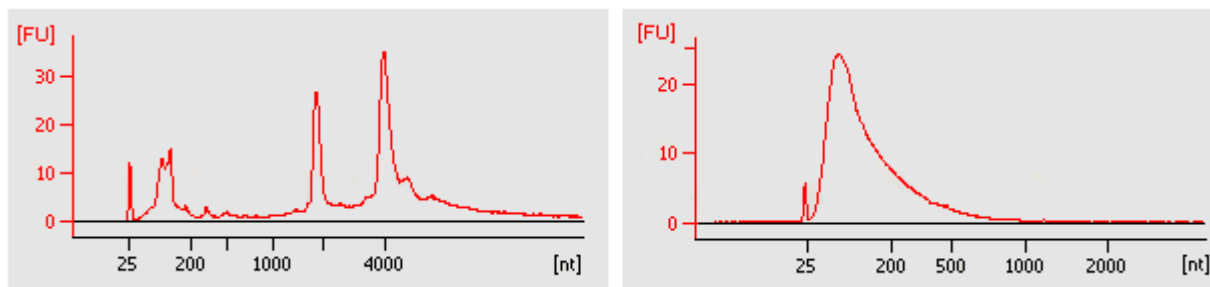
Figur 2. Illustration af henholdsvis normal formaldehyd krydsbinding i væv, krydsbinding ved for kort fikseringstid samt krydsbinding ved overfiksering. Frit redigeret efter Werner *et al.*, 2000.

Den ulige behandling af væv inden fiksering og af opbevaring af vævet efter behandling vil resultere i problemer i forbindelse med at fastsætte generelle retningslinier for oprensning af formalin fikseret væv i fremtiden (Werner *et al.*, 2000).

Nedbrydning af væv

Den største ulempe ved formalinfiksering er, at der med tiden sker en nedbrydning af RNA, som skyldes en fortsat ribonuklease- (RNase-) aktivitet i vævet. RNase er en nuklease, der katalyserer hydrolysen af RNA til nukleotider, hvilket resulterer i forkortede RNA-fragmenter (Berg *et al.*, 2002). Grundet den fortsatte nedbrydning af RNA i fikseret væv vil der normalt alene kunne oprenses mindre RNA-fragmenter, typisk af størrelse 200-300 nukleotider. Dette besværliggør, og i mange tilfælde umuliggør, genekspressionsbestemmelse både med PCR og på DNA-chip.

På Figur 3 nedenfor er til to elektroferogrammer vist for at illustrere forskellen i nedbrydning af væv imellem en frossen vævsprøve og en FFPE-vævsprøve. Begge prøver stammer fra samme patient prøve. Elektroferogrammet til venstre illustrerer RNA oprenset fra en frossen prøve (RIN = 9) mens elektroferogrammet til højre illustrerer RNA oprenset fra FFPE-væv (RIN = 2,4). På elektroferogrammet til venstre ses tydeligt de to ribosomale bånd (18S og 28S), mens disse ikke er mulige at detektere på elektroferogrammet til højre, hvilket indikerer omfattende nedbrydning af vævet.



Figur 3. Elektropherogrammer frembragt af bioanalyseren for RNA oprenset fra prøver udtaget fra samme patient. Elektropherogrammet til venstre repræsenterer en frossen vævsprøve (RIN = 9); elektropherogrammet til højre repræsenterer en FFPE-vævsprøve (RIN = 2,4).

For at undersøge problemet med omfattende nedbrydning af vævet i FFPE-vævsprøver, er der forud for projektet foretaget et litteraturstudie, hvor der er søgt efter viden på området gennem videnskabelige tidsskrifter. Søgningen er primært foretaget i den internationale søgebase PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Via litteraturstudiet fandtes nyligt publicerede studier, der viser positive resultater med at forøge længden af RNA-fragmenter ved at justere på parametre under selve oprensningen. De bedste resultater er opnået ved at justere på et trin under oprensningen, hvor vævsprøvens proteiner nedbrydes med proteinase K (Chen *et al.*, 2007, Frank *et al.*, 2007, Chung *et al.*, 2006, Godfrey *et al.*, 2000 m.fl.) Disse justeringer indbefatter både forlængelse af inkubationstiden med enzymet samt forøgelse af enzymets koncentration i forhold til anvisninger fra kendte protokoller for oprensning af formalin fikseret væv.

Udvælgelse af oprensningsmetoder

I dette projekt er der konkret taget udgangspunkt i en artikel publiceret i 2007 i tidsskriftet Diagnostic Molecular Pathology af Chen *et al.* I dette studie finder forfatterne, at de, ved at forlænge inkuberingen med proteinase K samt ved at øge koncentrationen af enzymet, kan oprense længere RNA-fragmenter på op til 3000 nukleotider (Chen *et al.*, 2007). Forfatterne af artiklen har valgt at benytte det kommercielle oprensningskit MasterPure RNA purifications Kit forhandlet af Epicentre Biotechnologies. Idet andre studier (Gianni *et al.*, 2005, Cronin *et al.*, 2004, Thomázy *et al.*, 2002 m.fl.) også for nylig har publiceret positive resultater ved brug af samme kit udvælges MasterPure RNA purifications Kit til at blive sammenlignet med et andet kommercielt tilgængeligt oprensningskit forhandlet af Qiagen Denmark. Qiagens kit til oprensning af FFPE-væv har vist lovende resultater i præliminære undersøgelser udført ved Hæmatologisk Forskningslaboratorium i Forskningshuset. Qiagens kit til oprensning af total RNA fra frisk væv er ligeledes anbefalet af Affymetrix, der er verdens førende fabrikant af DNA-chip, hvilket tilsammen udgør grundlaget for inddragelsen af dette kit i undersøgelsen. For at se om positive resultater, der er opnået ved justering af protein nedbrydningstrinnet, kan overføres til andre kommercielle kits, ønskes det også undersøgt, hvorvidt en øget protein nedbrydning har positiv indflydelse på længden af RNA-fragmenter oprenset med Qiagens RNeasy FFPE Kit.

Et formål ved at oprense RNA-fragmenter af højere kvalitet er at kunne revers transskribere fragmenterne med en T7-Oligo(dT) primer, da teknologien bag opmærkning af prøver til analyse med DNA-chip bygger på dette princip (se bilag B). Hvorvidt revers transskription er muligt kan undersøges med PCR.

Polymerase chain reaction

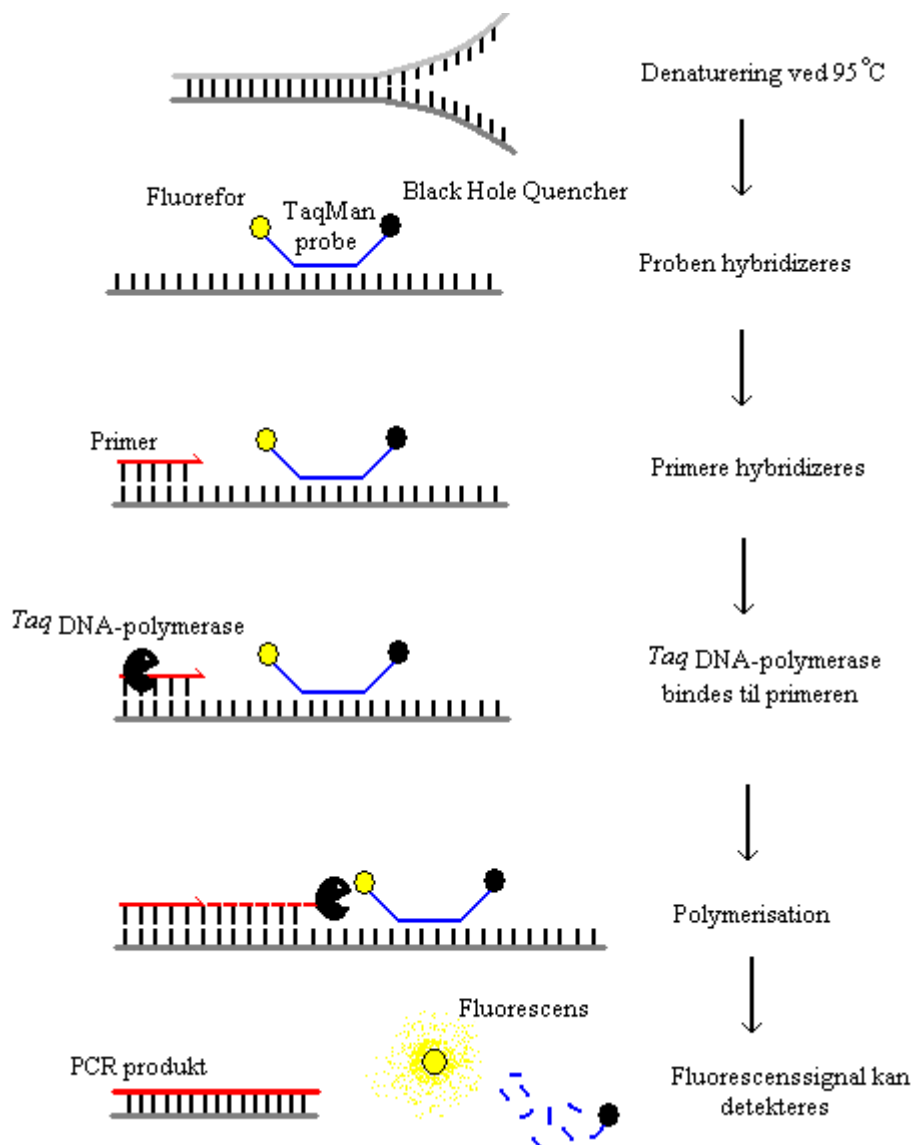
PCR er en metode til amplifikation af specifikke DNA-sekvenser, der blev udviklet af Kary Mullis i 1984. Metoden er utrolig sensitiv, hvorfor blot ét enkelt DNA-molekyle teoretisk kan blive amplificeret og detekteret efter 40 amplifikationscykler. (Berg *et al.*, 2002)

Indledelsesvist opvarmes reaktionsopløsningen til 95 °C i 10 minutter inden opløsningen sættes til at reagere i et defineret antal amplifikationscykler. Hver amplifikationscyklus består af tre trin, der kan modificeres og optimeres til det enkelte PCR-assay. Det første trin består af en separation af de to DNA-streng. Dette gøres ved at denaturere DNA ved 95 °C i 15-30 sekunder. Denatureringen afbrydes ved at temperaturen i det andet trin sænkes drastisk til omkring 54 °C. Denne temperatur (annealing temperatur) er afhængig af det specifikke PCR-assay og kræver typisk indledende optimering. Afbrydelsen af denatureringen tillader primerparrene at hybridizere til DNA-strengen. Hvert primerpar består af en primer, der hybridizes til 3' enden på den ene DNA-streng og en primer, der hybridizes til 3' enden af den komplementære DNA-streng. Disse primere er typisk 20 til 30 nukleotider lange. I det sidste og tredje trin syntetiseres DNA via en *Taq* DNA-polymerase. Dette trin udføres typisk ved en temperatur på omkring 72 °C, der er den optimale temperatur for *Taq* DNA-polymerasen. (Berg *et al.*, 2002) Denne temperatur kan ligeledes afhænge af det specifikke PCR-assay og bør optimeres i forhold til de benyttede primere og prober. Som udgangspunkt bør det sidste trin udføres ved en temperatur 7-10 °C lavere end probens smeltepunkt (T_m) for TaqMan[®] prober, da en for høj temperatur vil bevirke, at proben blot flyttes uden at blive nedbrudt. Dette vil resultere i, at fluorescenssignalet ikke kan detekteres (se forklaring nedenfor). (Stratagene, 2007)

Alle tre trin gennemgås i hver PCR-cyklus. Antallet af PCR-cykler afhænger af kvaliteten af de analyserede vævsprøver, men er normalt omkring 40 cykler. Hvis PCR-assayet amplificerer DNA-molekylerne i opløsningen med en effektivitet på 100 %, vil antallet af molekyler fordobles efter hver amplifikationscyklus. Dette bevirker, at DNA-sekvensen vil være amplificeret 2^n gange efter n cykler. (Berg *et al.*, 2002)

De PCR-assays, der er udført på MX 3000P PCR-instrumentet i dette projekt, er real-time kvantitativ PCR (RT-Q-PCR), hvilket refererer til, at instrumentet kontinuert registrerer et fluorescenssignal fra en eller flere amplifikationscykler over et defineret antal cykler og efterfølgende omregner fluorescenssignalet til en numerisk værdi for hver prøve. (Dorak, 2006) I disse PCR-assays er en TaqMan[®] probe benyttet sammen med de specifikke primere. Princippet med denne probe er, at den i 5' enden er udstyret med en fluorofor (i projektet er både FAM og

HEX benyttet) og en såkaldt Black Hole Quencher (BHQ) i probens 3' ende. Så længe at fluoroforen og den mørke quencher fastholdes tæt sammen, absorberer quencheren emissionen, og PCR-instrumentet vil ikke kunne detektere et fluorescenssignal. Da *Taq* DNA-polymerasen besidder 5'-3' nukleaseaktivitet vil polymerasen nedbryde proben, når den bevæger sig ned langs DNA-strengen og frigive både fluoroforen og quencheren. Da quencheren ikke længere er tilstrækkelig tæt på det fluorescerende stof til at absorbere emissionen fra fluoroforen, vil PCR-instrumentet kunne detektere fluorescenssignalet. (Dorak, 2006) Dette er illustreret på Figur 4 nedenfor.



Figur 4. Princippet bag TaqMan prober, der er mærket med et fluorescerende stof i 5' enden og en Black Hole Quencher i 3' enden. Proben nedbrydes af en *Taq* DNA-polymerase med 5'-3' nukleaseaktivitet under polymerisationen. Nedbrydningen af proben resulterer i et detekterbart fluorescenssignal.

Reaktionsmekanismen bag ikke-kvantitativ PCR er den samme som vist på Figur 4 med den undtagelse, at det undlades at tilsætte en probe til opløsningen. Dermed detekteres ikke et fluorescerende signal, hvorfor PCR-produktet efter reaktionen i stedet ofte analyseres på en gel.

For at kunne dokumentere, at en PCR-reaktion er forløbet ensartet for alle prøver medtages ofte en reference. Denne reference kan bruges til at normalisere opnået data samt til at bestemme om cDNA syntesen er forløbet ensartet for alle prøver. Ofte vælges et husholdningsgen som reference, da et husholdningsgen antages at være udtrykt ens i alle celletyper og kan fungere som en endogen kontrol.

Udvælgelse af husholdningsgener

I forsøget på at opnå en endogen kontrol i forbindelse med de tre forskellige PCR-assays, der anvendes i projektet, benyttes et husholdningsgen som endogen kontrol. Valg af husholdningsgener er foretaget på baggrund af litteraturstudiet. Husholdningsgener til brug ved Q-PCR er foretaget ud fra en artikel publiceret af Lossos *et al.* i 2003. I dette studie er en af delkonklusionerne, at husholdningsgenet TATA-box Binding Protein (TBP) er et af de gener, der er mest egnet til RNA kvalitets- og kvantitetskontrol i både B- og T-celler samt i tumorvæv. Denne delkonklusion ligger til grund for, at TBP blev udvalgt. Husholdningsgenet Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) blev også undersøgt i samme studie og senere undersøgt gennem et specialeprojekt (Pedersen, 2006) konkret for celler fra diffuse storcellede B-celle lymfomer (DLBCL). Gennem det sidst nævnte studie fandtes TPB og PPIA at være de meste stabile husholdningsgener blandt syv undersøgte husholdningsgener (TBP, PPIA, PRKG1, GAPDH, RPLPO, B2M og ABL). Delkonklusionen for specialeprojektet ligger til grund for at PPIA-genet blev udvalgt som det andet gen, der ønskes undersøgt.

Til kvalitativ bestemmelse af et 3'/5'-forhold (se afsnit Materialer og Metoder) er husholdningsgenet β -actin udvalgt som endogen kontrol med udgangspunkt i en artikel publiceret af Frank *et al.* i 2007, hvor det lykkedes forfatterne at opstille et PCR-assay - med specifikke primere og β -actin som endogen kontrol - der giver et udtryk for nedbrydningsgraden af FFPE- vævsprøver. I det sidste af de analyserede PCR-assays (se afsnit Materialer og Metoder) er den endogene kontrol udvalgt ved at tage udgangspunkt i en protokol publiceret af Nolan *et al.* i 2006, hvor der opstilles et kvantitativt PCR-assay med specifikke primere og prober med glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) som endogen kontrol, der ligeledes har til formål at give et udtryk for nedbrydningsgraden af FFPE-vævsprøver.

MATERIALER OG METODER

Tabel 1. Apparat- og forhandlerliste for apparatur benyttet til analyser gennem rapporten.

Produkt navn	Forhandler
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
BIO RAD PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, København, Danmark
GS1 PCR Thermal Cycler (G-storm)	Gene technologies Ltd, Rayne, Essex, UK
High performance ultraviolet transilluminator	Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK
HM440E Microm	Microm, Waldorf, Tyskland
IKA Vortex mixer med chip adaptor	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Microcentrifuge (5424)	Eppendorf Ag, Hamburg, Tyskland
ND-1000 NanoDrop	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
Refrigerated centrifuge (5810R)	Eppendorf Ag, Hamburg, Tyskland
Stratagene MX 3000P	AH diagnostics A/S, Århus, Danmark
VWR galaxy mini bordcentrifuge	VWR International ApS, Rødovre, Danmark
VWR heatblock (digital)	VWR International ApS, Rødovre, Danmark
VWR MS2 Minishaker	VWR International ApS, Rødovre, Danmark

Tabel 2. Materiale- og forhandlerliste for materialer benyttet til analyser gennem rapporten.

Produkt navn	Forhandler
Affymetrix GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit	Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA
Agarose SeaKem GTG	Cambrex Bioscience Rockland Inc, Basel, Switzerland
Agilent RNA 6000 Nano reagent kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Agilent RNA 6000 Pico reagent kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Amplification Grade DNase I kit	Sigma-Aldrich Danmark A/S, Brøndby, Danmark
Brilliant QPCR Master Mix	Stratagene, La Jolla, CA, USA
DEPC-behandlet H ₂ O	Invitrogen A/S, Taastrup, Danmark
Ethanol, 100 %	Sygehus Apoteket, Danmark
Ethidium Bromid Solution [10 g/l]	Bio-Rad Laboratories, København, Danmark
Flydende kvælstof	AGA A/S, København, Danmark
HPLC-grade H ₂ O	Merck & CO Inc, Whitehouse Station, NJ, USA
Human reference RNA	Stratagene, La Jolla, CA, USA

Isopropanol (2-propanol), Chromasol V Plus, 99,9 %	Sigma-Aldrich Danmark A/S, Brøndby, Danmark
MasterPure RNA Purifications Kit	Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA.
Primere og prober	DNA Technology A/S, Århus, Danmark
Proteinase K, RNA grade, [20 g/l]	Invitrogen A/S, Taastrup, Danmark
Qiagen RNeasy FFPE Kit	Qiagen Denmark, Ballerup, Danmark
Qiagen RNeasy mini Kit	Qiagen Denmark, Ballerup, Danmark
Quick-Load 100 bp DNA ladder	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RNase Away	Molecular BioProducts Inc, San Diego, CA, USA
Sample Loading buffer	Bio-Rad Laboratories, København, Danmark
SuperScript III First-strand Synthesis SuperMix	Invitrogen A/S, Taastrup, Danmark
TaqMan Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TBE buffer (10X)	Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, UK
Xylen, ren	Bie & Berntsen AS, Herlev, Danmark

Udskæring af FFPE-væv

Mikrotomen blev indstillet således, at vævsprøven lå så plant som muligt, inden prøven blev trimmet med snit på 10 µm. Efter trimning blev de første fire snit kasseret, hvorefter snittykkelsen blev ændret til 20 µm. Der blev skåret to snit, der blev overført til et 2 ml rør med en RNase-fri pincet og straks frosset i flydende kvælstof. For at undgå krydskontaminering blev bladet skiftet mellem hver vævsprøve. De udskårne vævsprøver blev efterfølgende opbevaret ved -80 °C.

Fjernelse af paraffin fra FFPE-væv.

Prøven blev tilsat 1 ml ren xylen, kraftigt blandet og centrifugeret ved rumtemperatur i 2 minutter ved 14.000 rpm. Efterfølgende blev supernatanten fjernet med en pipette, og det tilbageværende væv opløst i 1 ml 100 % ethanol. Opløsningen blev kraftigt blandet og centrifugeret ved rumtemperatur i 2 minutter ved 14.000 rpm, hvorefter den overskydende ethanol blev fjernet med en pipette. Efterfølgende blev prøven inkuberet uden låg i et stinkskaab ved rumtemperatur, indtil alt ethanol øjensynligt var fordampet (minimum 10 minutter).

Behandling af oprenset RNA

Behandling af oprenset RNA foregik på samme måde for alle oprensningemetoder. Af det oprensede RNA blev der udtaget 3 µl aliquot til brug på NanoDrop og Bioanalyser, der straks blev nedfrosset og opbevaret ved -20 °C til analyse samme dag. Den resterende mængde oprenset RNA blev nedfrosset og opbevaret ved -80 °C til videre analyse.

Inden behandlingen af prøver blev påbegyndt, blev arbejdsområdet rengjort med RNase Away. Der blev brugt handsker ved al håndtering af prøver.

Oprensning af total RNA fra FFPE-væv med MasterPure RNA Purifications Kit

Oprensningen blev foretaget efter forhandlerens anvisninger. Med undtagelse af isopropanol og ethanol er alle benyttede reagenser inkluderet i MasterPure RNA Purification Kittet.

Et rør indeholdende to vævssnit (20 µm) blev optøet og tilsat 300 µl opløsning bestående af 2 µl proteinase K [50 g/l] og 300 µl Tissue and Cell Lysis Solution. Efterfølgende blev prøven inkuberet ved 65 °C i 30 minutter. Prøven blev efter inkubation nedkølet 3-5 minutter på is, tilsat 175 µl MPC Precipitation Reagent, blandet og centrifugeret ved rumtemperatur i 10 minutter ved 12.000 g. Supernatanten blev overført til et nyt 2 ml rør, fortyndet med 500 µl isopropanol og igen centrifugeret ved 4 °C i 10 minutter ved 12.000 g. Efter fældning af RNA og DNA blev isopropanolen hældt fra pellet, der blev opløst i 200 µl DNase I-opløsning, bestående af 5 µl RNase-frit DNase I fortyndet op til 200 µl med 1 x DNase-buffer. Prøven blev inkuberet med DNase I-opløsningen i 30 minutter ved 37 °C. Efter inkubationen blev prøven fortyndet med 200 µl Tissue and Cell Lysis Solution, 200 µl MPC Protein Precipitation Reagent og placeret 3-5 minutter på is, inden prøven blev centrifugeret ved rumtemperatur i 10 minutter ved 12.000 g. Efter centrifugering blev supernatanten tilsat 500 µl isopropanol og efterfølgende centrifugeret igen ved 4 °C i 10 minutter ved 12.000 g. Isopropanolen blev forsigtigt hældt fra RNA-pellet, der efterfølgende blev vasket to gange med 75 % ethanol. Pellet blev siden opløst i 20 µl TE buffer og sidst tilsat 1 µl ScriptGuard RNase Inhibitor. Se protokol i bilag F.

Oprensning af total RNA fra FFPE-væv med Qiagen RNeasy FFPE Kit

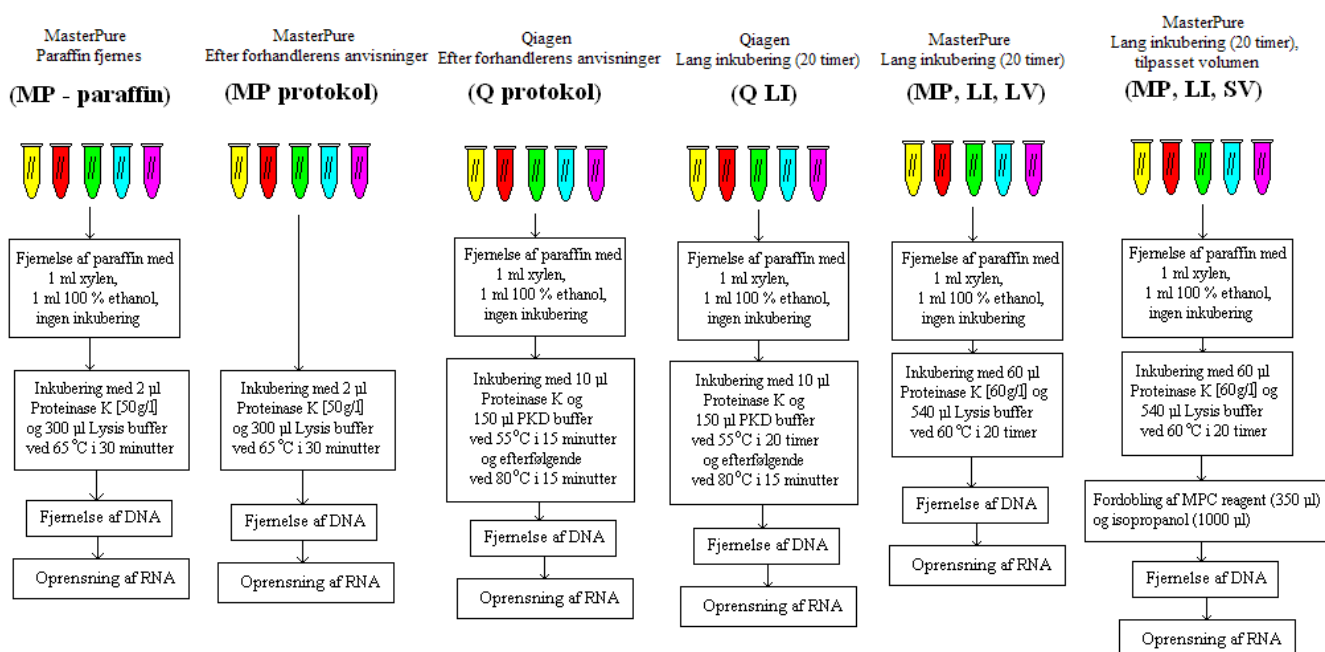
Oprensningen blev foretaget efter forhandlerens anvisninger. Med undtagelse af ethanol er alle benyttede reagenser og kolonner inkluderet i Qiagens RNeasy FFPE Kit.

Et rør indeholdende to vævssnit (20 µm) blev optøet, paraffinen blev fjernet og bundfaldet blev opløst i 150 µl PKD-buffer samt 10 µl proteinase K, hvorefter opløsningen blev inkuberet først i 15 minutter ved 55 °C og så i 15 minutter ved 80 °C. Prøven blev tilsat 320 µl RBC buffer, inden DNA blev fjernet ved at tilføje prøven på en gDNA Eliminator Spin kolonne og centrifugere prøven i 30 sekunder ved 12.000 rpm. Prøven blev efterfølgende tilsat 720 µl 100 % ethanol og blev ad to omgange centrifugeret ned gennem en RNeasy MinElute Spin kolonne i 15 sekunder ved 12.000 rpm. Kolonnen blev vasket to gange ved at centrifugere kolonnen med 500 µl RPE buffer ved 12.000 rpm og efterfølgende overført til et nyt 2 ml rør, hvori kolonnen blev centrifugeret med åbent låg ved rumtemperatur i 5 minutter ved 14.000 rpm. Kolonnen blev igen overført til en nyt 1,5 ml rør, hvor den blev tilsat 25 µl RNase-frit H₂O direkte på kolonnens membran og centrifugeret ved rumtemperatur i 1 minut ved 14.000 rpm. For at opkoncentrere den gennemløbne prøve, blev denne igen pipetteret over kolonnens membran og centrifugeret på tilsvarende vis, hvorefter kolonnen blev kasseret. Se protokol i bilag H.

Forlænget inkubation med højere proteinase K koncentration

Da det ønskes undersøgt, hvorvidt en længere inkuberingstid med en forhøjet proteinase K-koncentration har indflydelse på RNA-udbyttet, ændres fremgangsmåden i de ovenstående protokoller. De konkrete ændringer er beskrevet med fremgangsmåde under Figur 5.

Til undersøgelsen er benyttet fem uafhængige vævsprøver (nummereret T1-T5). Samtidig blev det undersøgt, hvorvidt paraffin fra prøverne havde indflydelsen på mængden og kvaliteten af RNA i forbindelse med oprensning med MasterPure RNA Purification Kit. Forsøgsopstillingen er illustreret på Figur 5.



Figur 5. Forsøgsopstilling for ændret fremgangsmåde for oprensningsmetoder, hvor det undersøges, om forlænget inkubation med forhøjet proteinase K koncentration har indflydelse på RNA-udbyttet efter oprensning. Yderligere undersøges eventuel indflydelse af paraffin ved oprensning med MasterPure RNA Purification Kit.

Forkortelser for oprensningsmetoderne benyttes til beskrivelse af forskelle mellem metoderne i resultatafsnittet.

Modificeret oprensning med Qiagen RNeasy FFPE Kit (lang inkubation)

Oprensningen af RNA blev udført efter samme fremgangsmåde som beskrevet i den originale protokol ovenfor med den undtagelse, at prøven blev inkuberet med proteinase K i 20 timer ved 55 °C frem for de anbefalede 15 minutter. Koncentration af proteinase K og PKD buffer blev ikke ændret i forhold til protokollen. Der blev benyttet den proteinase K, der fulgte med kittet, hvor koncentration og aktivitet af enzymet er ukendt. Se protokol i bilag I.

Modificeret oprensning med MasterPure RNA Purification Kit (lang inkubation)

Paraffin blev fjernet fra prøven og RNA blev oprenset efter samme fremgangsmåde som beskrevet i den originale protokol ovenfor med de undtagelser, at der i stedet for 300 µl opløsning bestående af 2 µl proteinase K [50 g/l] og 300 µl Tissue and Cell Lysis Solution blev tilsat 600 µl opløsning bestående af 60 µl proteinase K [60 g/l] og 540 µl Tissue and cell Lysis solution. Yderligere blev inkuberingstiden med proteinase K opløsningen forlænget fra 30 minutter til 20 timer. Se protokol i bilag G.




Modificeret oprensning med MasterPure RNA Purification Kit (lang inkubation, tilpasset volumen)


Paraffin blev fjernet fra prøven og RNA blev oprenset efter samme fremgangsmåde som beskrevet i den originale protokol ovenfor med de undtagelser, at mængden af opløsning med Tissue and Cell Lysis Solution og proteinase K [60 g/l] ligeledes blev hævet til 600 µl samtidig med at inkuberingstiden blev hævet til 20 timer. Yderligere blev de efterfølgende volumener af MPC Precipitation Reagent tilpasset til 350 µl og isopropanol til 1000 µl. De resterende volumener forblev uændret i forhold til den originale protokol.

Måling af RNA-koncentration og renhed på NanoDrop

Spektrofotometeret blev nulstillet med HPLC-grade H₂O, der ligeledes blev brugt som kontrol inden og efter måling af koncentration af prøver. Der blev brugt et volumen på 1 µl oprenset RNA ved hver måling og absorbansen blev målt ved en bølgelængde på 260 nm. Mellem hver prøve blev detektoren aftørret med linsepapir. Se protokol i bilag D.

Analyse af RNA på Bioanalyser med Agilent RNA 6000 Nano Reagent Kit

Forberedelse af prøven blev fortaget efter forhandlerens anvisninger med anvendelse af de medfølgende reagenser inkluderet i Agilent RNA 6000 Nano Kitten. RNA Nano Dye Concentrate og Agilent RNA 6000 Nano Marker blev udtaget af køleskab 30 minutter inden brug og beskyttet mod lys. Alle RNA-oprensninger blev fortyndet med HPLC-grade H₂O til en endelig RNA-koncentration på omkring 250 mg/l. 1 µl omrørt RNA Nano Dye Concentrate blev tilsat 65 µl filtreret Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix, blandet godt og efterfølgende centrifugeret i 10 minutter ved 13.000 g. 9 µl Gel-Dye mix blev pipetteret i brønden markeret med  på nano chippen, hvorefter primingstationen blev lukket og stemplet blev trykket ned, til det blev holdt af chippen i præcis 30 sekunder. Primingstationen blev åbnet igen, og der blev pipetteret 9 µl Gel-Dye mix i hver af de to brønde markeret med . Til alle prøvebrøndene samt til størrelsesmarkøren (markeret med ) blev tilsat 5 µl markør. Til hver brønd blev tilsat 1 µl prøve. I tilfælde af et mindre antal prøver end antallet af brønde blev 1 µl ekstra markør tilsat til de brønde, der ikke indeholdte prøve. Størrelsesmarkøren blev denatureret ved 70 °C i 2 minutter i en varmeblok,

hvorefter der blev tilsat 1 µl størrelsesmarkør til brønden markeret med . Chippen blev mikset i den specialdesignede IKA Vortex-mikser i 1 minut ved 2400 rpm og efterfølgende straks analyseret af bioanalyseren, der forinden var blevet rensset med RNase Away og HPLC-grade H₂O. Se protokol i bilag K.

Analyse af RNA på Bioanalyser med Agilent RNA 6000 Pico Reagent Kit

Forberedelsen af prøven blev ligeledes foretaget efter forhandlerens anvisninger med brug af de medfølgende reagenser fra Agilent RNA 6000 Pico Kittet. Fremgangsmåden for Agilent RNA 6000 Pico Reagent Kit er den samme som for Agilent RNA 6000 Nano Reagent Kit beskrevet ovenfor med den undtagelse, at der efter tilsætning af gel til chippen yderligere tilsættes 9 µl RNA 6000 Pico Conditioning Solution til brønden markeret med CS på pico chippen.

Syntese af First-Strand cDNA revers transskriberet med en T7-Oligo(dT) primer

Revers transskription af RNA til cDNA blev foretaget efter forhandlerens anvisninger med de inkluderede reagenser fra SuperScript III First-strand Synthesis SuperMix kittet. Start koncentrationen af total RNA blev valgt til 1 µg. Det beregnede antal µl total RNA blev pipetteret ud i en 96-brønd plade og siden tilsat HPLC-grade H₂O til et samlet volumen på 6 µl. Fra hver prøve blev udtaget 1 µl RNA, der blev blandet til et reaktionsmix af alle prøverne og 1 µl af reaktionsmixet blev tilsat som template til den negative kontrol No reverse transskriptase (No RT). Den negative kontrol No template (NT) blev tilsat 1 µl HPLC-grade H₂O i stedet for RNA. Begge negative kontroller blev yderligere tilsat 5 µl HPLC-grade H₂O. Efterfølgende blev et mastermix bestående af 1 µl annealing buffer og 1 µl T7-Oligo(dT) primer pr. prøve fremstillet, blandet og 2 µl af mastermixet blev tilsat samtlige prøver samt NT- og No RT-kontrollen. PCR-pladen blev lukket, omrystet, kort centrifugeret og siden inkuberet i en G-storm PCR Thermal Cycler i 5 minutter ved 65 °C. Efter inkubering blev pladen straks placeret på is i 1 minut og efterfølgende igen kort centrifugeret. PCR-pladen blev holdt på is i resten af forberedelsestiden. Der blev tilsat 10 µl 2X First-strand Reaction Mix til samtlige prøver samt de negative kontroller og efterfølgende 2 µl reverse transskriptase enzymmix til alle prøver samt NT-kontrollen. No RT-kontrollen blev tilsat 2 µl HPLC-grade H₂O i stedet for enzymmix. PCR-pladen blev lukket, omrystet og kort centrifugeret, inden prøven blev inkuberet i en G-storm PCR Thermal Cycler; først i 50 minutter ved 50 °C og efterfølgende i 5 minutter ved 85 °C. Pladen blev efter inkuberingen placeret på is i 1 minut, inden pladen blev nedfrosset ved -20 °C indtil videre brug eller straks brugt ved Q-PCR. Se protokol i bilag J.

Sekvensen af en T7-Oligo(dT)₂₄ primer er angivet nedenfor.

5' - GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG -(dT)₂₄ - 3'
(Affymetrix, 2007)

Indstillinger af MX 3000P-instrumentet

I forbindelse med alle PCR-analyser foretaget på MX 3000P PCR-instrumentet er samme indstillinger benyttet.

Det blev valgt at benytte default (adaptive baseline) indstillinger for placering af baseline, hvor instrumentet automatisk fastsætter en baseline på baggrund af sammenligning af fluorescenssignaler for samtlige analyserede prøver.

Det blev valgt at benytte ROX som reference fluorescens og FAM som fluorescerende stof.

Det blev valgt at lade alle prøver undergå 45 amplifikationscykler.

Temperaturprofil for MX 3000P-instrumentet

Temperaturprofilen benyttet ved alle PCR-reaktioner foretaget i MX 3000P-instrumentet er beskrevet nedenfor.

1 cyklus:

Aktivering ved 95 °C i 10 minutter.

45 cykler:

Denaturering ved 95 °C i 15 sekunder.

Annealing/Forlængelse ved 60 °C i 60 sekunder.

Til kvantificering af 3[']/5[']-forholdet med GAPDH som endogen kontrol benyttes dog en anden temperaturprofil på MX 3000P PCR-instrumentet, der er specifikt beskrevet ved den pågældende opsætning.

Q-PCR TaqMan Gene Expression Assays

Alle forsøgsopsætninger for Q-PCR med PPIA som endogen kontrol blev opsat efter anvisningerne i protokollen fra TaqMan Gene Expression Assays med den undtagelse, at der benyttes et totalvolumen på 20,0 µl frem for de anbefalede 50,0 µl ved et 96-brønds setup.

Der blev initialt fremstillet et mastermix i de følgende forhold af reaktanter pr. prøve:

8,0 µl DEPC-behandlet H₂O

1,0 µl TaqMan Gene Expression Assay (20x)

10,0 µl TaqMan Universal PCR MasterMix (2X) (without AmpErase UNG)

Mastermixet blev opblandet i den rækkefølge reaktanterne er præsenteret og opbevaret på is indtil brug. En 96-brøndsplade blev placeret i en Eppendorf køleblok, hvorefter der blev pipetteret 1 µl cDNA fra hver prøve i hver brønd. Ligeledes blev 1 µl af den negative kontrol pipetteret i en brønd for sig. Efterfølgende blev hver brønd tilsat 19 µl af det fremstillede mastermix. Pladen blev

forsvarligt lukket, omrystet og kort centrifugeret. PCR-pladen blev straks herefter analyseret i MX 3000P PCR-instrumentet. Se protokol i bilag O.

GeneChip Expression Analysis

Opmærkningen af prøver til analyse på DNA-chip (se bilag B) er fortaget efter forhandlerens anvisninger med de to undtagelser, at der er tilsat 2 µl SuperScript II enzym i forbindelse med cDNA syntesen, samt at det ikke vælges at fortynde udgangsmaterialet af cDNA til brug i IVT reaktionen. De benyttede reagenser og kolonner er inkluderet i Affymetrix GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kittet. Der vælges som udgangspunkt en RNA-mængde på 10 µg. I tilfælde af prøver med for lav RNA-koncentration vælges en mængde af RNA så tæt på 10 µg som muligt, hvorefter mængden af reagenser tilpasses hertil. Fremgangsmåden er inddelt i afsnit for overblikkets skyld, men hele proceduren er udført med samme kit. I tilfælde af mere end to prøver blev der fremstillet ca. 7 % ekstra mastermix i forhold til det totale volumen for at sikre, at der var tilstrækkeligt mastermix til samtlige prøver.

One-Cycle First-strand cDNA-syntese: Initialt blev tre fortyndingsstamopløsninger fremstillet på hhv. 1:20, 1:50 og 1:5 fortyndinger af en medfølgende Poly-A RNA Control Stock, der blev fortyndet med en medfølgende Poly-A Control Dil Buffer. Ved hver fortynding blev minimum udtaget 2 µl for at mindske usikkerheder på fortyndingerne. Den tredje fortyndingsstamopløsning blev videre brugt til et reaktionsmix, der blev opblandet i følgende forhold af reaktanter til et totalvolumen på 11 µl pr. prøve:

Variierende antal µl RNA svarende til 10 µg
2 µl fortyndet poly-A RNA kontrol (5000x fortynding)
2 µl T7-Oligo(dT) primer [50 µM]
Variierende antal µl DEPC-behandlet H₂O

Reaktionsmixet blev fremstillet ved at tilføje et totalvolumen af RNA svarende til en mængde af total RNA på 10 µg til et 0,2 ml PCR-rør, hvortil der blev tilsat 2 µl fortyndet poly-A RNA kontrol, 2 µl T7-Oligo(dT) primer og en mængde DEPC-behandlet H₂O, der justerede totalvolumen til 11 µl. Røret blev forsigtigt blandet, kort centrifugeret og siden inkuberet i en G-storm Thermal Cycler i 10 minutter ved 70 °C. Efter inkuberingen blev opløsningen kølet ved 4 °C i mindst 2 minutter og efterfølgende centrifugeret kort.

Der blev fremstillet et First-Strand mastermix opblandet i følgende forhold af reaktanter til et totalvolumen på 7 µl pr. prøve:

4 µl 5X 1st Strand Reaction Mix
2 µl DTT [0,1 M]
1 µl dNTP [10 mM]

First-Strand mastermixet blev opblandet i samme rækkefølge som reaktanterne er præsenteret, blandet og kort centrifugeret. Efter fremstilling af First-Strand mastermixet blev 7 µl First-Strand mastermix tilsat hver af prøverne, der blev blandet og kort centrifugeret, hvorefter prøverne inkuberede i 2 minutter ved 42 °C i en G-storm Thermal Cycler.

Efter inkuberingen blev opløsningen tilsat 2 µl SuperScript II enzym, blandet grundigt og kort centrifugeret, hvorefter prøven igen blev inkuberet ved 42 °C i 1 time. Efter anden inkubering nedkøles prøverne ved 4 °C i minimum 2 minutter og siden centrifugeret kort.

One-Cycle Second-Strand cDNA syntese: Der blev initialt fremstillet et Second-Strand mastermix opblandet i følgende forhold af reaktanter til et totalvolumen på 130 µl pr. prøve:

- 91 µl DEPC-behandlet H₂O
- 30 µl 5X 2nd Strand Reaction Mix
- 3 µl dNTP [10 mM]
- 1 µl *E.coli* DNA ligase
- 4 µl *E.coli* DNA-Polymerase I
- 1 µl RNase H

Second-Strand mastermixet blev opblandet i samme rækkefølge som reaktanterne er præsenteret, blandet og kort centrifugeret. Efterfølgende blev 130 µl af Second-Strand mastermixet tilsat hver prøve, der blev blandet og kort centrifugeret inden prøverne blev inkuberet i 2 timer ved 16 °C.

Prøverne blev tilsat 2 µl T4 DNA-Polymerase og inkuberet i 5 minutter ved 16 °C. Efter den anden inkubering blev prøverne tilsat 10 µl EDTA [0,5 M].

Oprensning af dobbeltstrengt DNA: Prøverne blev tilsat 600 µl cDNA Binding Buffer og blandet med en votexer i 3 sekunder. pH-værdien iagttages ved at notere, at opløsningens farve forblev gul. Efterfølgende blev 500 µl af prøven overført til en cDNA Cleanup Spin kolonne og centrifugeret i 1 minut ved 12.000 rpm. Den gennemløbne væske blev bortskaffet, og kolonnen blev gemt, hvorpå den resterende væske blev overført og igen centrifugeret i 1 minut ved 12.000 rpm. Kolonnen blev efterfølgende overført til et nyt 2 ml rør og tilsat 750 µl cDNA Wash Buffer. Kolonnen blev centrifugeret i 1 minut ved 12.000 rpm. Den gennemløbne væske blev bortskaffet, hvorefter kolonnens låg blev åbnet, og kolonnen blev centrifugeret med åbent låg i 5 minutter ved 14.000 rpm. Kolonnen blev overført til et nyt 1,5 ml rør, og der blev pipetteret 14 µl cDNA Elution Buffer direkte ned på kolonnens membran. Kolonnen inkuberede i 1 minut ved rumtemperatur, inden kolonnen blev centrifugeret i 1 minut ved 14.000 rpm.

Syntese af biotin-mærket cRNA: Det blev valgt at fortsætte med hele koncentrationen af cDNA til trods for at forhandleren anbefaler at halvere mængden af cDNA til 6 µl. Der blev initialt fremstillet et mastermix til IVT reaktionen opblandet i følgende forhold af reaktanter til et totalvolumen på 40 µl pr. prøve:

12 µl cDNA template
8 µl DEPC-behandlet H₂O
4 µl 10X IVT Labeling Buffer
12 µl IVT Labeling NTP Mix
4 µl IVT Labeling Enzyme Mix

IVT-reaktionsmastermixet blev opblandet i samme rækkefølge som reaktanterne er præsenteret, blandet forsigtigt og kort centrifugeret. Prøverne blev efter tilsætning af 40 µl mastermix inkuberet i minimum 16 timer i et varmeskab ved 37 °C.

Oprensning og kvantificering af biotin-mærket cRNA: Efter inkuberingen blev en aliquot på 1,5 µl udtaget til senere analyse med gel elektroferese. Herefter blev resten af prøven behandlet ved at tilsætte 60 µl DEPC-behandlet H₂O og blande prøven med en votexer i 3 sekunder, inden der yderligere blev tilsat 350 µl IVT cRNA Binding Buffer. Prøven blev igen opblandet med en votexer i 3 sekunder. 250 µl 100 % ethanol blev tilsat og opblandet ved pipettering, hvorefter 700 µl af opløsningen blev ført over på en IVT cRNA Cleanup Spin kolonne. Kolonnen blev centrifugeret i 15 sekunder ved 12.000 rpm og siden overført til et nyt 2 ml rør, hvor den blev tilsat 500 µl IVT cRNA Wash Buffer og igen centrifugeret i 15 sekunder ved 12.000 rpm. Den gennemløbne væske blev bortskaffet, 500 µl 80 % ethanol blev tilsat kolonnen og centrifugeret i 15 sekunder ved 12.000 rpm. Den gennemløbne væske blev bortskaffet, hvorefter kolonnen blev centrifugeret i 5 minutter ved 14.000 rpm med åbent låg. Gennemløben væske og opsamlingsrør blev bortskaffet, da kolonnen blev overført til et nyt 1,5 ml rør, hvor 11 µl DEPC-behandlet H₂O blev pipetteret direkte ned på kolonnens membran. Kolonnen blev centrifugeret i 1 minut ved 14.000 rpm, hvorefter yderligere 10 µl DEPC-behandlet H₂O blev pipetteret direkte på kolonnens membran. Kolonnen blev igen centrifugeret i 1 minut ved 14.000 rpm.

Efterfølgende blev renheden og koncentrationen af biotin-mærket cRNA kvantificeret på Nanodroppen.

Det blev valgt ikke at fortsætte med fragmenteringen, hvis den målte koncentration af cRNA var under en værdi på omkring 1 g/l. Se protokol i bilag M.

Fremstilling af 2 % agarose-gel

Der blev afvejet 2 g agarose, der blev overført til en 250 ml bluecap flaske og tilsat 100 ml 1 x TBE buffer. Gelen blev opvarmet på en varmeplade under omrøring indtil al agarose var synligt smeltet. Den smeltede gel blev afkølet til ca. 50 °C og tilsat 5 µl ethidium bromid opløsning i et stinkskab. Gelen blev efterfølgende hældt i et støbekar med to kamme hver med 12 tænder, hvori gelen stivnede i ca. 15 minutter. Gelen blev overdækket med 1 x TBE buffer inden prøvepåsætning. Se protokol i bilag E.

Primere med β -actin som endogen kontrol

Sekvensen af primere benyttet til bestemmelse af et 3'/5'-forhold med β -actin som endogen kontrol er beskrevet nedenfor:

3' β -actin:

Primer 1 (forward primer) 5' - 3' sekvens: CCA ACT TGA GAT GTA TGA AGG CT

Primer 2 (revers primer) 5' - 3' sekvens: GGT GTG CAG TTT TAT TCA ACT GG

5' β -actin:

Primer 3 (forward primer) 5' - 3' sekvens: CGG TGA AGG TGA CAG CAG TC

Primer 4 (revers primer) 5' - 3' sekvens: AGA GAA GTG GGG TGG CTT TT

Primerne er fremstillet af DNA Technology A/S, Danmark og sekvensen af β -actin er hentet fra PubMed (PubMed, β -actin, 2007)

Optimering af primer koncentrationer.

For at finde en optimeret koncentration af primere, blev en koncentrationsmatrix undersøgt. I matrixen er andelen af forward primer/revers primer angivet med deres slutkoncentration [nM] i den totale PCR-reaktion. Den undersøgte matrix er som følger:

Forward primer/ reverse primer	0,5 μ M	1 μ M	2 μ M	3 μ M
0,5 μ M	50/50	100/50	200/50	300/50
1 μ M	50/100	100/100	200/100	300/100
2 μ M	50/200	100/200	200/200	300/200
3 μ M	50/300	100/300	200/300	300/300

Koncentrationsmatrixen blev fremstillet ved at fortynde primerne til en stamopløsning med en koncentration på 10 μ M, hvor ud fra de resterende koncentrationer på 3 μ M, 2 μ M, 1 μ M og 0,5 μ M blev fremstillet. 1 x reaktionsmix blev fremstillet i følgende forhold til et totalvolumen på 25 μ l:

5,5 μ l HPLC-grade H₂O

12,5 μ l 2x Brilliant QPCR Master Mix

2,5 μ l forward primer (varierende stamopløsning koncentration jf. matrixen ovenfor)

2,5 μ l revers primer (varierende stamopløsning koncentration jf. matrixen ovenfor)

Optimeringen af primerkoncentration blev udført på cDNA syntetiseret fra human reference RNA. Ud over prøverne blev to negative kontroller medtaget, en NT-kontrol og en no primer-kontrol (NP). Ved NT-kontrollen blev i stedet for 2 µl cDNA tilsat 2 µl HPLC-grade H₂O, og ved NP-kontrollen blev i stedet for primere tilsat 5 µl HPLC-grade H₂O. Til NT-kontrollen blev en koncentration af primere valgt til 100/100 nM for hhv. forward og revers primer. Efter at have fremstillet alle 16 koncentrationskombinationer for hvert primerpar, blev låget på rørene forsvarligt lukket, og rørene blev placeret i en G-storm Thermal Cycler med den temperaturprofil, der er beskrevet nedenfor.

Temperaturprofil for G-storm PCR Thermal Cycler

Temperaturprofilen benyttet ved alle PCR-reaktioner i G-storm PCR Thermal Cycleren med β-actin som endogen kontrol er beskrevet nedenfor.

1 cyklus:

Aktivering ved 95 °C i 10 minutter.

35-45 cykler:

Denaturering ved 95 °C i 30 sekunder.

Annealing ved 57 °C i 30 sekunder.

Forlængelse ved 62 °C i 30 sekunder.

Kvalitativ bestemmelse af 3'/5'-forhold med β-actin som endogen kontrol

Til kvalitativ bestemmelse af et 3'/5'-forhold med β-actin som den endogene kontrol blev det valgt ikke at følge forhandlerens protokol for prøveforberedelse nøjagtigt, da der ikke ønskes et kvantitativt udtryk for prøvens indhold. Derfor blev det besluttet ikke at tilsætte hverken reference farve eller probe til mastermixet og yderligere at udføre PCR-reaktionen i en G-Storm Thermal Cycler frem for det anbefalede MX 3000P PCR-instrument. Med disse undtagelser blev forhandleren af Brilliant Q PCR kittets anvisninger fulgt, og kittets medfølgende reagenser blev benyttet.

Et mastermix for hvert primerpar blev fremstillet bestående af følgende forhold af reaktanter pr. prøve:

5,5 µl HPLC-grade H₂O

12,5 µl 2x Brilliant QPCR Master Mix

2,5 µl forward primer [3 µM]

2,5 µl revers primer [3 µM]

Reaktanterne blev opblandet i samme rækkefølge, som de er præsenteret, blandet og kort centrifugeret. 23 µl mastermix blev pipetteret ud i et 0,2 ml PCR-rør for hver prøve, hvortil der blev tilsat 2 µl cDNA. Mastermix og cDNA blev blandet og kort centrifugeret, inden prøverne sættes til at reagere i en G-storm Thermal Cycler. Der blev medtaget en negativ kontrol med RNA som template for hver prøve, hvor der i stedet for 2 µl cDNA blev tilsat 2 µl fortyndet (1:30) RNA. Prøverne blev ellers behandlet ens. Prøverne undergik PCR-reaktionen med den temperaturprofil, der er beskrevet ovenfor for G-Storm Thermal Cycleren med de forskelle, at prøver med primerparret nærmest 3' enden reagerede gennem 35 amplifikationscykler, mens prøver med primerparret nærmere 5' enden reagerede gennem 40 amplifikationscykler.

Efter PCR-reaktionen blev 8 µl prøve udtaget og tilsat 2 µl loadingbuffer. Blandingen blev tilført en brønd i en 2 % agarosegel, hvorefter gelen blev tilsluttet en strømkilde (100 V). Gelen stod tilsluttet strømkilden i ca. 45 minutter, inden den blev undersøgt i en High Performance Ultraviolet Transilluminator og fotograferet. Se protokol i bilag L

Primere med GAPDH som endogen kontrol

Sekvensen af primere og prober benyttet til kvantificering af et 3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol er beskrevet nedenfor. I projektet er der lagt et primer-probe-par i den utranslaterede region nær 3' enden af GAPDH (betegnet 3' GAPDH nedenfor) og to forskellige primer-probe-par nærmere 5' enden af GAPDH (betegnet 5' GAPDH og center 5' GAPDH nedenfor), der er placeret i forskellig afstand fra primer-probe-parret nærmest 3'enden. Den præcise placering af primer-probe-parret på GAPDH kan ses i bilag A.

3'GAPDH (HEX):

Primer 3 (forward primer) 5'- 3' sekvens: 5'-AGTCCCTGCCACACTCAG

Primer 4 (revers primer) 5'- 3' sekvens: 5'-TACTTTATTGATGGTACATGACAAGG

Probe: 5'-HEX-CCCACCACACTGAATCTCCCCTCCT-BHQ2

5'GAPDH (FAM):

Primer 1 (forward primer) 5'- 3' sekvens: 5'-GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC

Primer 2 (revers primer) 5'- 3' sekvens: 5'-CATGAGTCCTTCCACGATAACC

Probe: 5'-FAM-CCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTG-BHQ1

Center 5' GAPDH (FAM)

Primer 1 (forward primer) 5'- 3' sekvens: 5'-TCAACGACCACTTTGTCAAGC

Primer 2 (revers primer) 5'- 3' sekvens: CCAGGGGTCTTACTCCTTGG

Probe: 5'-FAM-CCTGGTATGACAACGAATTTGGCTACAGC-BHQ-1

Center 5' primer-probe-parret er kun benyttet i tilfælde, hvor det specifikt er beskrevet. Noteringen 5' primer-probe-parret henviser til det først beskrevne 5' primer-probe-par (5' GAPDH)

Primerne er fremstillet af DNA Technology A/S, Danmark ud fra en sekvens publiceret i en Nature protokol af Nolan *et al.* i 2006.

Primernes og probernes placering på GAPDH er vist i bilag A, hvor sekvensen af genet ligeledes kan ses.

Kvantificering af 3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol

Behandling af prøver til kvantificering af et 3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol er udført efter anvisninger fra et studie publiceret af Nolan *et al.* i 2006 med den undtagelse, at det kommercielt tilgængelige TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) er benyttet frem for selv at fremstille den anbefalede buffer. Opblandingsforholdet mellem H₂O og buffer er justeret efter forhandleren af TaqMan Universal PCR Master Mixets anvisninger.

Initialt blev en stamopløsning med en koncentration på 10 µM fremstillet af hver primer og en stamopløsning af hver probe med en koncentration på 5 µM. Disse stamopløsninger blev brugt i fremstillingen af et mastermix opblandet i følgende forhold af reaktanter pr. prøve til et samlet volumen på 19 µl:

7,3 µl HPLC-grade H₂O
10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG)
0,6 µl forward primer [10 µM]
0,6 µl revers primer [10 µM]
0,5 µl probe [5 µM]

Et mastermix blev fremstillet i samme rækkefølge som reaktanterne er præsenteret for både primer-probe-parret nærmest 3' enden og primer-probe-parret længere mod 5' enden. Efterfølgende blev 19 µl mastermix pipetteret i hver brønd på en 96-brøndsplade og siden tilsat 1 µl cDNA fra hver prøve. Pladen blev forsvarligt lukket, omrystet og kort centrifugeret, inden den straks herefter blev analyseret i MX 3000P-instrumentet med nedenstående temperaturprofil. Ved primer-probe-parret nærmere 5' enden er FAM benyttet som fluorescerende stof og ved primer-probe-parret nærmest 3' enden er HEX benyttet som fluorescerende stof. I begge tilfælde er ROX benyttet som reference fluorescens. Se protokol i bilag N.

I forbindelse med kvantificeringen af et 3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol er en speciel temperaturprofil benyttet (Nolan *et al.*, 2006). Den benyttede temperaturprofil for MX 3000P-instrumentet er beskrevet nedenfor:

1 cyklus:

Aktivering ved 95 °C i 10 minutter.

45 cykler:

Denaturering ved 95 °C i 30 sekunder.

Annealing ved 56 °C i 30 sekunder.

Forlængelse ved 62 °C i 30 sekunder.

Test af DNA-kontaminering med Q-PCR

For at bestemme om hvert enkelt prøve af oprenset RNA er kontamineret med DNA, opsættes en Q-PCR med to NT-kontroller for hver prøve. Den ene NT-kontrol blev tilsat 1 µl fortyndet RNA (1:30) frem for 1 µl cDNA, og den anden NT-kontrol blev tilsat 1 µl HPLC-grade H₂O i stedet for 1 µl cDNA. Prøverne blev efterfølgende behandlet på tilsvarende vis som de ukendte prøver. Hver prøve blev udført i dobbelt bestemmelse.

DNase I-behandling på membran med Qiagen RNeasy mini Kit

DNase I-behandling direkte på membranen foregik i forbindelse med oprensningen af FFPE-væv med Qiagens RNeasy FFPE Kit med forlænget proteinase K inkubering. Prøven blev oprenset som tidligere beskrevet med de undtagelser, at mængden af udgangsmateriale blev halveret i forhold til tidligere, og at et DNase I-behandlingstrin blev udført efter at have bundet RNA til RNeasy MinElute spin kolonnen (i mellem trin 19 og trin 20 i bilag H). DNase I-behandlingstrinnet blev udført med reagenser fra Qiagens RNeasy mini Kit efter forhandlerens anvisninger, hvor 350 µl RW1 buffer blev tilført kolonnen og centrifugeret i 15 sekunder ved 12.000 rpm. Membranen blev tilført 80 µl DNase I-opløsning bestående af 10 µl DNase I-stamopløsning og 70 µl RDD-buffer, hvorefter prøven blev inkuberet i 15 minutter ved rumtemperatur. Efter inkubering blev membranen igen vasket med 350 µl RW1-buffer og centrifugeret i 15 sekunder ved 12.000 rpm. Prøven fortsatte efterfølgende oprensning som beskrevet med Qiagens RNeasy FFPE Kit.

DNase I-behandling af oprenset RNA med Amplification Grade DNase I kit

DNase I-behandling af det oprensede RNA blev udført ved brug af reagenser medfølgende Sigma-Aldrichs Amplification Grade DNase I kit efter forhandlerens anvisninger. 8 µl oprenset RNA blev tilført et 2 ml rør og tilsat 1 µl 10X Reaction-buffer samt 1 µl Amplification Grade DNase I [1 unit/µl]. Prøven blev forsigtigt blandet og inkuberet i 15 minutter ved rumtemperatur. Efter inkubering blev 1 µl Stop Solution tilsat prøven, hvorefter prøven blev opvarmet til 70 °C i 10 minutter. Prøven blev nedkølet på is inden effekten af DNase I-behandlingen blev undersøgt med Q-PCR som beskrevet ovenfor.

Statistik og databehandling

For at undersøge om der er signifikant forskel imellem gennemsnittet af målinger imellem de forskellige oprensingsmetoder for alle kvalitetsanalyser, der er præsenteret i afsnit Resultater, udføres en en-vejs variansanalyse (ANOVA).

Modellen benyttet til beregning af en en-vejs variansanalyse for den enkelte prøve er vist nedenfor.

$$y_{i,j} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{i,j} \quad (\text{Eq. 1})$$

μ : Grand mean, der er defineret for alle gennemsnit ved $\mu = \frac{\sum_{i=1}^k \mu_i}{k}$, hvor k er oprensingsmetoden.

$y_{i,j}$: Værdien af den enkelte prøve.

α_i : Effekten af den enkelte oprensingsmetode.

$\varepsilon_{i,j}$: Fejlen.

Det antages, at data for de forskellige oprensingsmetoder er uafhængige og normalt fordelte samt har en homogen varians.

På den baggrund undersøges følgende hypoteser.

$$H_0 = \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_k = 0 \quad \text{for alle } i, j.$$

$$H_1 = \alpha_i \neq \alpha_j \quad \text{for mindst et } i, j.$$

(Walpole *et al.*, 2002)

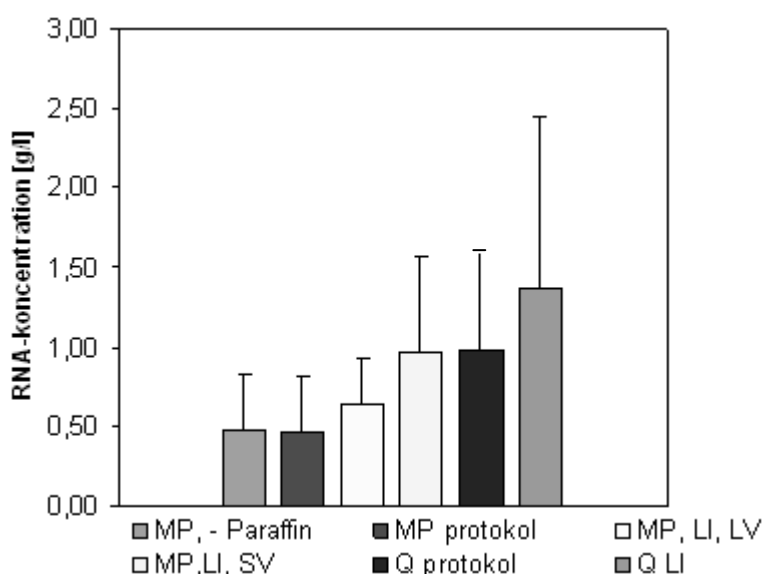
Alt statistisk databehandling er udført i statistik programmet SPSS[®] 15.0 med undtagelse af Fisher's Exact Test for Count Data-testen, der er udført i statistik programmet R[®].

RESULTATER

Undersøgelse af oprensingsmetoder

Koncentration

I forbindelse med bestemmelse af den bedste oprensingsmetode, blev koncentrationen af total RNA målt fra fem tilfældigt udvalgte FFPE-vævsprøver (nummereret T1-T5) oprenset med hver af de seks udvalgte oprensingsmetoder (se Figur 5). Et gennemsnit af målingerne for de fem uafhængige blokke er vist på Figur 6 nedenfor.



Figur 6. RNA-koncentrationen for vævsprøver (N=5) oprenset med forskellige oprensingsmetoder. Standardafvigelser er anført. Forklaring på forkortelser kan ses i Figur 5.

Det ses, at der er en tendens til, at en længere inkuberingstid resulterer i et højere udbytte af total RNA. Det bemærkes dog også, at standardafvigelserne for alle prøverne overlapper hinanden.

For at undersøge om de detekterede forskelle mellem de seks oprensingsmetoder er signifikante er en en-vejs ANOVA-test udført i statistik programmet SPSS[®] 15.0. Den kritiske F-værdi er fundet ved tabelopslag (Rohlf & Sokal, 1995). Inden udførslen af variansanalysen er fordelingen undersøgt for samtlige af de undersøgte kvalitetsparametre. Resultatet viste, at alle prøver, med undtagelse af den længst mulige RNA-fragment længde, kan antages at være normalfordelte. Resultaterne er ikke

vist, men kan findes i *Statistik, bedste oprensingsmetode.doc* på datadisk. I Tabel 3 er resultaterne af en en-vejs ANOVA-test vist for RNA-koncentrationerne præsenteret i Figur 6.

Tabel 3. En-vejs variansanalyse af RNA-koncentrationen fra de seks oprensingsmetoder

RNA-koncentration	Frihedsgrader	Beregnet F	p-værdi.	Kritisk F
Imellem grupper	5			
Indenfor grupper	24	1,732	0,166	2,62
Total	29			

Det ses af p-værdien i Tabel 3, at forskellene på koncentrationer ikke er signifikant forskellige. Yderligere er homogeniteten af variansen undersøgt via Levene statistik, hvor det fandtes, at varianserne ikke er signifikant forskellige med et signifikansniveau på 0,182. Dermed antages variansanalysen at være gældende. Resultaterne af alle test for varianshomogenitet for alle kvalitetsanalyserne kan ses i *Statistik, bedste oprensingsmetode.doc* på datadisk.

Renhed af RNA

260/280-forholdet undersøges for at få et estimat af renheden af de oprensede RNA-prøve. I Tabel 4 er gennemsnitsværdierne for de fem vævsprøver vist for hver af de seks oprensingsmetoder. Individuelle værdier for 260/280- og 260/230-forholdet samt RIN-værdier for hver enkelt prøve findes i *Analyse af vævsprøver for bedste oprensning.xls* på datadisk.

Tabel 4. 260/280-forholdet af vævsprøver (N=5) oprenset med forskellige metoder. Forklaring på forkortelser kan ses i Figur 5.

260/280	MP, - Paraffin	MP protokol	MP, LI, LV	MP, LI, SV	Q protokol	Q LI
Gennemsnitsværdi	1,90	1,90	1,97	1,98	1,95	1,94
Standardafvigelse	0,10	0,12	0,10	0,07	0,05	0,04

Det ses i Tabel 4, at RNA oprenset med MasterPure RNA Purifications Kit med kort inkuberingstid (30 minutter) har tendens til at være mindre rent sammenlignet med RNA oprenset med samme kit blot med forlænget inkuberingstid (20 timer); og med RNA oprenset med Qiagens RNeasy FFPE Kit. Det bemærkes dog, at værdien af 260/280-forholdet for alle seks oprensingsmetoder ligger indenfor intervallet anbefalet af Affymetrix på 1,8-2,1.

Der blev lavet dobbeltbestemmelse af forsøget ved at udskære nye snit af de samme fem vævsprøver, der igen blev oprenset efter samme fremgangsmåde som tidligere, dog kun for de tre umiddelbart bedste oprensingsmetoder; MP, LI, SV; Q protokol og Q LI. Resultaterne af dobbeltbestemmelsen stemmer overens med de tidligere resultater. Dobbeltbestemmelsen kan ses i *Analyse af vævsprøver for bedste oprensning.xls* på datadisk

Som tidligere er en en-vejs ANOVA-test udført for 260/280-forholdet for de seks oprensingsmetoder. I Tabel 5 er resultatet af ANOVA-testen vist.

Tabel 5. En-vejs variansanalyse af 260/280-forholdet for de seks oprensingsmetoder

260/280	Frihedsgrader	Beregnet F	p-værdi.	Kritisk F
Imellem grupper	5			
Indenfor grupper	24	0,748	0,595	2,62
Total	29			

Det ses af analysen, at der ikke er signifikant forskel på 260/280-forholdet for de seks oprensingsmetoder. I forbindelse med ANOVA-testen er varianshomogeniteten undersøgt, hvor det viste sig, at der ikke er signifikant forskel på varianserne for 260/280-forholdet med en p-værdi på 0,633.

Det ønskes undersøgt om det oprensede RNA er kontamineret med uønskede organiske stoffer, hvorfor 260/230-forholdet vurderes. I Tabel 6 nedenfor er gennemsnitsværdierne med tilhørende standardafvigelse for 260/230-forholdet vist for de fem vævsprøver oprenset med de seks udvalgte oprensingsmetoder. På tilsvarende vis som ovenfor er der udført dobbeltbestemmelse af 260/230-forholdet ved på ny at oprense de fem vævsprøver med de tre umiddelbart bedste oprensingsmetoder. Resultatet af dobbeltbestemmelsen var overensstemmende med værdier i Tabel 6 og kan ses i *Analyse af vævsprøver for bedste oprensning.xls* på datadisk.

Tabel 6. 260/230-forholdet af vævsprøver (N=5) oprenset med forskellige metoder. Forklaring på forkortelser kan ses i Figur 5.

260/230	MP, - Paraffin	MP protokol	MP, LI, LV	MP, LI, SV	Q protokol	Q LI
Gennemsnitsværdi	1,35	1,37	1,57	1,68	1,93	2,14
Standardafvigelse	0,48	0,36	0,25	0,25	0,14	0,03

Det kan aflæses i Tabel 6, at alle prøver oprenset med MasterPures RNA Purification Kit ligger under en værdi på 1,8, hvilket indikerer tilstedeværelse af kontaminerende organiske stoffer. Vævsprøver oprenset med Qiagens RNeasy FFPE Kit ligger derimod over denne værdi.

En en-vejs ANOVA-test udført for 260/230-forholdet kan ses i Tabel 7. Indledende undersøgelse af varianshomogeniteten resulterede i en p-værdi på 0,182, hvilket indikerer, at varianserne ikke er signifikant forskellige.

Tabel 7. En-vejs variansanalyse af 260/230-forholdet for de seks oprensingsmetoder.

260/230	Frihedsgrader	Beregnet F	p-værdi.	Kritisk F
Imellem grupper	5			
Indenfor grupper	24	5,782	0,001	2,62
Total	29			

Analysen viser, at forskellene mellem de seks oprensingsmetoder er signifikant forskellige.

RNA-integritet

For at få et udtryk for RNA-kvaliteten sammenlignes RNA Integrity Number (RIN) for de fem oprensede prøver med hver af de seks oprensingsmetoder. RIN vurderes på en skala fra 1 til 10, hvor værdien 1 defineres som fuldstændigt nedbrudt RNA, mens værdien 10 defineres som fuldstændig intakt RNA. I Tabel 8 er gennemsnitsværdier og standardafvigelse for RIN-værdien for alle prøver præsenteret.

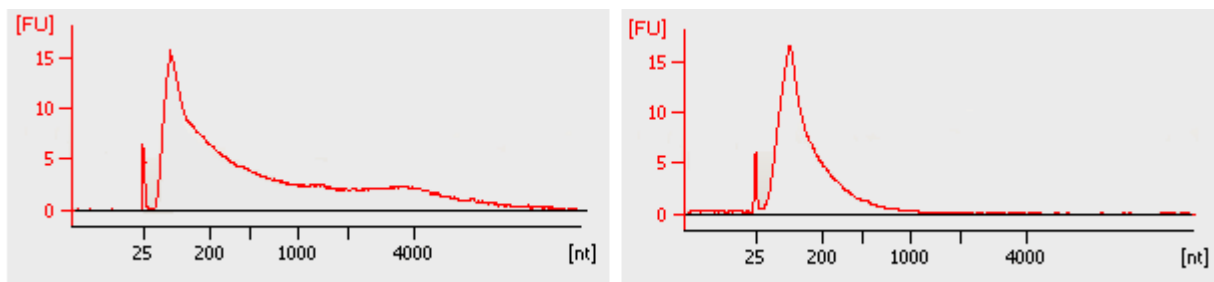
Tabel 8. RNA Integrity Number-værdier af vævsprøver (N=5) hver oprenset med forskellige metoder. Forklaring på forkortelser kan ses i Figur 5.

RIN	MP, - Paraffin	MP protokol	MP, LI, LV	MP, LI, SV	Q protokol	Q LI
Gennemsnitsværdi	2,36	2,38	2,02	2,28	2,28	2,33
Standardafvigelse	0,23	0,11	0,53	0,18	0,08	0,06

Af tabellen ses det, at gennemsnitsværdien for RIN-værdierne er lave for alle seks oprensingsmetoder, hvilket indikerer en omfattende nedbrydning af det oprensede RNA i prøverne. Det var ikke muligt at detektere de to ribosomale bånd (18S og 28S) i nogle af de analyserede prøver.

RNA-fragmentlængder

Da det vil være interessant at kunne bestemme et udtryk for længden af de oprensede RNA-fragmenter, aflæses den højeste værdi for længden af RNA-fragmenter, der er fremkommet for hver vævsprøve analyseret med bioanalyseren. Det skal bemærkes, at den største værdi, det er muligt at aflæse på bioanalyseren er 4000 nukleotider; til trods for at der øjensynligt er registreret højere værdier. Dette er illustreret ved de to udvalgte elektroferogrammer på Figur 7, der begge repræsenterer samme vævsprøve oprenset med to forskellige oprensingsmetoder. Elektroferogrammet til venstre er resultatet for en prøve oprenset med Qiagens RNeasy FFPE Kit med forlænget proteinase K inkubering (20 timers proteinase K inkubering) mens elektroferogrammet til højre viser resultatet af samme prøve oprenset med MasterPures RNA Purification Kit efter forhandlerens anvisninger (30 minutters proteinase K inkubering).

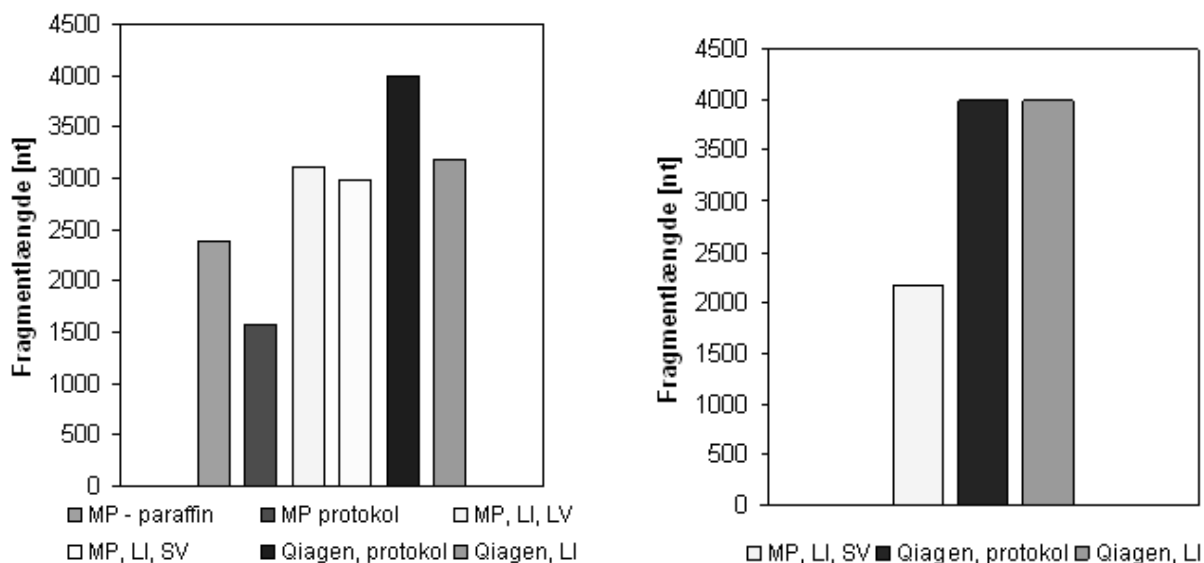


Figur 7. To udvalgte elektroferogrammer, der repræsenterer samme vævsprøve oprenset med to forskellige oprensingsmetoder. Elektroferogrammet til venstre er resultatet for vævsprøven oprenset med Qiagens RNeasy FFPE Kit med forlænget proteinase K nedbrydning; mens elektroferogrammet til højre er resultatet af vævsprøven oprenset med MasterPures RNA Purification Kit efter forhandlerens anvisninger.

Det ses, at der er forskel på længden af det længst mulige detekterbare fragment for de to elektroferogrammer. Det ses også, at bioanalyserens software ikke angiver værdier på x-aksen højere end 4000 nukleotider, hvilket begrænser muligheden for differentiering mellem RNA-fragmentlængden imellem de forskellige oprensingsmetoder. Figur 7 illustrerer også, at den længst mulige detekterbare fragmentlængde ikke er repræsentativ for den gennemsnitlige længde af fragmenter, men derimod er en ekstrem værdi. Yderligere ses det på figuren, at toppunktet angiver den hyppigst fremkommende fragmentlængde, hvilket muligvis kan benyttes til differentiering mellem de forskellige oprensingsmetoder.

På grund af usikkerhed ved manuel aflæsning af længden af RNA-fragmenterne er aflæsningen foretaget tre gange, og et gennemsnit af de tre aflæsninger er viderebehandlet. Alle de aflæste værdier kan ses i *Længst mulige fragment- og toppunkter, test af bedste oprensning.xls* på datadisk.

På Figur 8 er gennemsnitlængden af de fem vævsprøvers højst mulige detekterbare værdi for længden af RNA-fragmenter vist for hver oprensingsmetode (til venstre) og gentaget for de tre umiddelbart bedste oprensingsmetoder (til højre).



Figur 8. Den højst mulige detekterbare værdi for længden af RNA-fragmenter for vævsprøver (N=5) oprenset med seks forskellige metoder (til venstre) og gentaget for tre udvalgte oprensingsmetoder (til højre). Bemærk, at 4000 nukleotider er den højeste værdi, der kan aflæses med den pågældende software indbygget i bioanalyseren.

Der observeres en forskel i gennemsnittet af det længste RNA-fragment mellem de forskellige oprensingsmetoder.

Grundet detektionsgrænsen er fordelingen af data for det længst mulige detekterbare RNA-fragment ikke normalfordelt. Det ønskes undersøgt, om den observerede forskel kan skyldes tilfældigheder, hvorfor en Fisher's Exact Test for Count Data udføres i statistikprogrammet R[®] for at bestemme, om forskellene mellem de seks forskellige oprensingsmetoder er signifikante. Den beregnede p-værdi ses i Tabel 9.

Tabel 9. p-værdien for det længst mulige detekterbare fragment for de seks oprensingsmetoder i Figur 8 beregnet med Fisher's Exact Test for Count Data i statistikprogrammet R[®].

p-værdi	0.0229
---------	--------

Det ses, at forskellene er signifikante i mellem de seks oprensingsmetoder præsenteret i Figur 8.

I forlængelse af foregående analyse er toppunktet for hver vævsprøve ligeledes aflæst for at undersøge, hvorvidt der er forskel mellem længderne af den hyppigste fragmentlængde (toppunkt) mellem de forskellige oprensingsmetoder. Gennemsnitsværdien for toppunkterne for de fem vævsprøver oprenset med de seks forskellige oprensingsmetoder er præsenteret i Tabel 10. De enkelte målinger for toppunkterne kan ses i *Længst mulige fragment og toppunkter, test af bedste oprensning.xls* på datadisk.

Tabel 10. Toppunkter for vævsprøver (N=5) oprenset med forskellige metoder Forklaring på forkortelser kan ses i Figur 5.

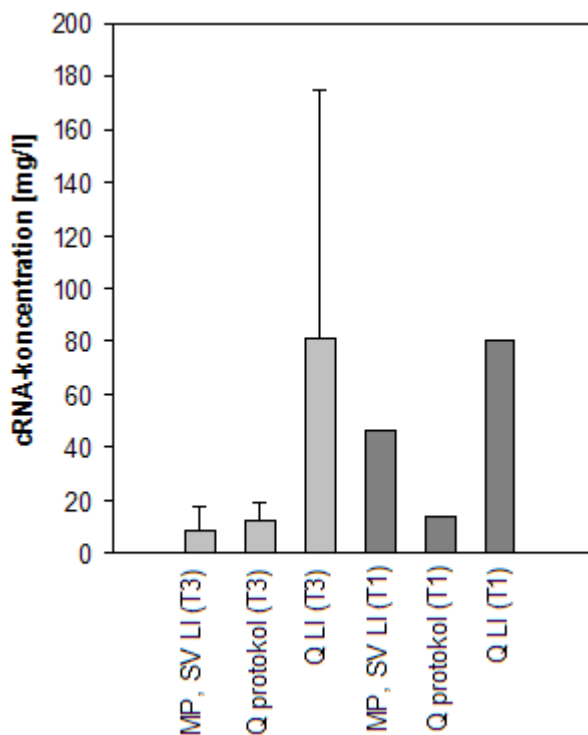
Toppunkt	MP - paraffin	MP protokol	MP, LI, LV	MP, LI, SV	Q protokol	Q LI
Gennemsnitsværdi [nt]	121	123	125	118	112	116
Standardafvigelse [nt]	9,6	5,3	11,3	52,6	14,6	11,6

Til Tabel 10 bemærkes det, at der ikke er signifikant forskel på længden af det hyppigst fremkommende fragment imellem de seks oprensingsmetoder.

In vitro transskription

Det ønskes undersøgt, om der er forskel i resultatet mellem de forskellige oprensingsmetoder efter opmærkning af prøver (cDNA syntese og in vitro transskription) med Affymetrix GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kittet. To vævsprøver - den ene er dobbeltbestemt - med tilstrækkelig høj koncentration og tilfredsstillende kvalitetsparametre udvælges og oprenses med

hver af de tre umiddelbart bedste oprensingsmetoder: MasterPure med forlænget inkuberingstid (MP, SV, LI), Qiagen oprenset efter forhandlerens protokol (Q protokol) samt Qiagen med forlænget inkuberingstid (Q LI). Resultatet af en koncentrationsmåling på biotin-mærket cRNA er vist på Figur 9. Som positiv kontrol blev en prøve med total RNA af høj kvalitet medtaget. Værdien af den humane reference er henholdsvis 1824,69 mg/l for vævsprøve T3 og 1872,59 mg/l for vævsprøve T1 (uillustreret). Den negative kontrol resulterede ikke i et detekterbart signal.



Figur 9. Koncentration af biotin-mærket cRNA efter in vitro transskription for vævsprøve T3 og T1. Koncentrationen er dobbeltbestemt for vævsprøve T3 via to uafhængige opmærkninger. Koncentration af den humane reference er henholdsvis 1824,69 mg/l for vævsprøve T3 og 1872,59 mg/l for vævsprøve T1 (uillustreret). Forklaring på forkortelser kan ses i Figur 5.

På figuren ses en tendens til at koncentrationen af biotin-mærket cRNA er højere for vævsprøver oprenset med Qiagens RNeasy FFPE Kit med forlænget proteinase K inkubering. Det skal dog noteres, at standardafvigelserne for vævsprøve T3 overlapper hinanden, og at analysen af vævsprøve T1 ikke efterfølgende er gentaget.

Prøverne er efterfølgende analyseret med Agilent RNA 6000 Pico reagent kit på en tilhørende pico chip for at få et indtryk af fragmentlængden af det amplificerede cRNA. Data for hver prøve findes i *Analyse på picochip.xls* på datadisk. I Tabel 11 nedenfor er gennemsnit og standardafvigelser for det længst mulige fragmenter og toppunkter præsenteret for analyse af det biotin-mærkede cRNA på pico chippen.

Tabel 11. Det længst mulige detekterbare RNA-fragment og toppunktsmålinger for biotin-mærket cRNA, der er analyseret på pico chip.

Oprensningsmetode	MP, SV, LI	Q protokol	Q LI
Længste RNA-fragment [nt]	3858	3548	4000
Standardafvigelse	245,95	783,46	0,00
Toppunkt [nt]	326	402	400
Standardafvigelse	25,17	2,52	6,81

Bestemmelsen viste, at længden af fragmenter ikke synes særligt ændret i forhold til tidligere analyser, men at længden af det hyppigst fremkommende fragment er øget for alle tre oprensningsmetoder.

Q-PCR

I forlængelse af undersøgelsen af opmærkningen med Affymetrix GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kittet undersøges det, om det er muligt, at revers transskribere det oprensede RNA med en T7-Oligo(dT)-primer. Det syntetiserede cDNA for de fem vævsprøver oprenset med MasterPure RNA Purification Kit og med Qiagen RNeasy FFPE Kit - begge med forlænget proteinase K inkubering - blev analyseret ved real-time Q-PCR. Resultatet af PCR-analysen kan ses i *Q-PCR, test af bedste oprensning.xls* på datadisk. Et gennemsnit af Ct-værdier er vist i Tabel 12.

Tabel 12. Ct-værdier for vævsprøver (N=5) revers transskriberet med en T7-Oligo(dT) primer med PPIA som endogen kontrol.

PPIA	Ct-værdi	Standardafvigelse
Qiagen, lang inkubering	34,69	2,55
MasterPure, lang inkubering	30,54	3,03

Det ikke var muligt at detektere et positivt signal for prøver, hvor TBP blev benyttet som endogen kontrol for FFPE-vævsprøver oprenset med Qiagens RNeasy FFPE Kit. Resultatet af Q-PCR-analysen for prøver oprenset med MasterPures RNA Purification Kit viste et positivt signal i to (Ct-værdi gennemsnit = 39,89, standardafvigelse = 1,97) ud af fem mulige prøver.

Valg af oprensningsmetode

På baggrund af de forudgående resultater og overvejelser beskrevet i diskussionen nedenfor udvælges Qiagens RNeasy FFPE Kit med forlænget inkubering med proteinase K i 20 timer som oprensningsmetode til oprensning af de 31 vævsprøver.

Kvalitetsparametre for oprensede FFPE-vævsprøver

Gennemsnittet af RNA-koncentrations-, 260/280-, 260/230- og RIN-værdimålinger for 31 vævsprøver oprenset med den udvalgte oprensningsmetode er sammenfattet i

Tabel 13 nedenfor. Individuelle værdier for de enkelte prøver kan ses i *koncentrationer af alle 31 prøver.xls*. Standardafvigelser er angivet.

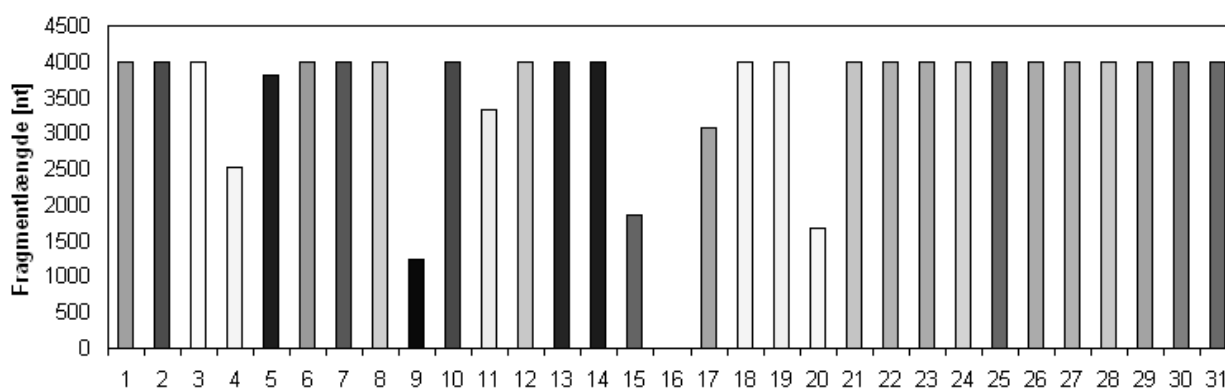
Tabel 13. RNA-koncentration, 260/280-, 260/230-forhold samt RIN-værdier for vævsprøver (N=31), der er oprenset med Qiagens RNeasy FFPE Kit med 20 timers inkubering med proteinase K.

	RNA-koncentration [g/l]	260/280	260/230	RIN-værdi
Gennemsnitsværdi	1,54	1,93	2,08	2,19
Standardafvigelse	1,10	0,10	0,11	0,34

I Tabel 13 ses det, at værdierne for alle fire præsenterede analyseparametre stemmer fornuftigt overens med de tilsvarende værdier bestemt på de fem testvævsprøver. Det bemærkes yderligere, at standardafvigelsen på koncentrationsmålingerne er meget høj.

Det har ikke været muligt at detektere de to ribosomale bånd (18S og 28S) i nogle af de undersøgte prøver.

Længden af det længste detekterbare RNA-fragment er aflæst på tilsvarende måde som ved den indledende undersøgelse. Længderne er vist i Figur 10 nedenfor. Den længst mulige detekterbare længde er 4000 nukleotider, selvom RNA-fragmentlængden for nogle prøver er synligt længere. Gennemsnitsværdien af de længste detekterbare RNA-fragmenter på figuren er 3650 nukleotider. På grund af tekniske problemer har det ikke været muligt at fremkomme med brugbare resultater for prøve 16.



Figur 10. Længder af det længst mulige detekterbare RNA-fragmentlængde for de 31 vævsprøver. Det var ikke muligt at opnå et brugbart resultat fra prøve 16. Gennemsnitslængden for det længst mulige detekterbare fragment er 3650 nukleotider.

På Figur 10 ses det, at de fleste af prøverne når detektionsgrænsen på 4000 nukleotider, som det var tilfældet for testvævsprøverne, men det ses også, at flere af prøverne har en overraskende lav maksimal RNA-fragmentlængde.

I et forsøg på at opstille et andet mål for forskellen mellem RNA-fragmentlængder, er længden af det hyppigst fremkommende RNA-fragment aflæst og vist i Tabel 14.

Tabel 14. Længden af det hyppigst fremkommende RNA-fragment for 31 vævsprøver.

Prøvens navn	Toppunkt [nt]	Prøvens navn	Toppunkt [nt]	Prøvens navn	Toppunkt [nt]
1	25	12	263	23	174
2	179	13	190	24	237
3	175	14	269	25	305
4	261	15	224	26	106
5	174	16	Ikke detekteret	27	109
6	252	17	252	28	105
7	251	18	25	29	108
8	178	19	25	30	172
9	170	20	200	31	200
10	179	21	25	Gennemsnit	171

Det ses i tabellen, at der er stor forskel på, ved hvilken fragmentlængde toppunktet findes, og dermed hvilken længde det hyppigst fremkommende RNA-fragment har.

Det ønskes undersøgt om der er en sammenhæng imellem de undersøgte kvalitetsparametre, hvorfor en mulig korrelation imellem 260/230-, 260/280-forholdene, toppunkterne, RNA-koncentrationerne samt RIN-værdierne er beregnet i statistik programmet SPSS® 15.0. I Tabel 15 er den beregnede Pearsons korrelation samt signifikansniveauet vist for de analyserede kvalitetsparametre.

Tabel 15. Pearsons korrelation imellem toppunkt, RIN-værdi, RNA-koncentration, 260/280- og 260/230-forhold beregnet i statistik programmet SPSS® 15.0. Yderligere er signifikansniveauet vist.

		Toppunkt	RIN-værdi	RNA-koncentration	Abs260/280	Abs260/230
Toppunkt	Pearson korrelation	1	0,448(*)	-0,033	-0,142	-0,562(**)
	Signifikansniveau		0,028	0,861	0,454	0,001
	Antal prøver (N)	30	24	30	30	30
RIN-værdi	Pearson korrelation	0,448(*)	1	0,043	0,000	-0,194
	Signifikansniveau	0,028		0,842	0,999	0,363
	Antal prøver (N)	24	24	24	24	24
RNA-koncentration	Pearson korrelation	-0,033	0,043	1	-0,742(**)	0,086
	Signifikansniveau	0,861	0,842		0,000	0,645
	Antal prøver (N)	30	24	31	31	31
Abs260/280	Pearson korrelation	-0,142	0,000	-0,742(**)	1	0,384(*)
	Signifikansniveau	0,454	0,999	0,000		0,033
	Antal prøver (N)	30	24	31	31	31
Abs260/230	Pearson korrelation	-0,562(**)	-0,194	0,086	0,384(*)	1
	Signifikansniveau	0,001	0,363	0,645	0,033	
	Antal prøver (N)	30	24	31	31	31

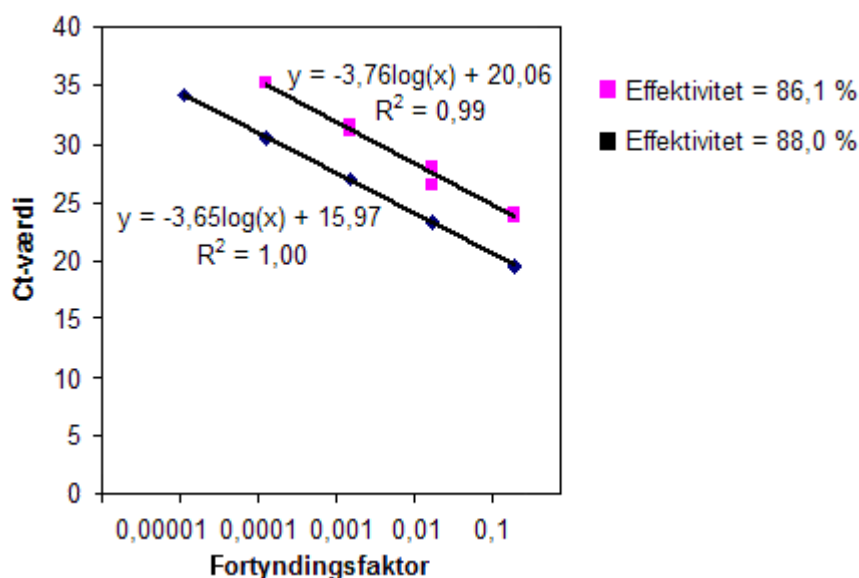
* Korrelation er signifikant på 0,05 niveau (2-sidet test)

** Korrelation er signifikant på 0,01 niveau (2-sidet test)

I tabellen ses en signifikant korrelation imellem 260/280-forholdet og RNA-koncentrationen. Yderligere ses en signifikant korrelation imellem toppunktet og 260/230-forholdet samt RIN-værdier og toppunktsmålinger.

Real-time kvantitativ PCR

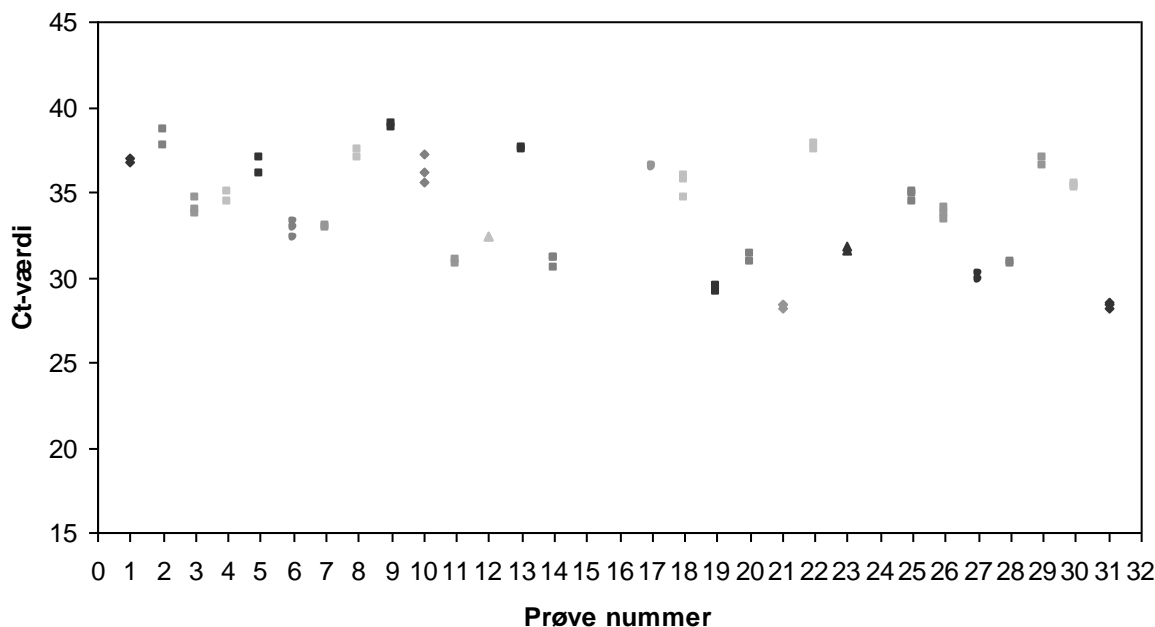
Det ønskes undersøgt, hvorvidt det er muligt at revers transskribere RNA oprenset med Qiagens RNeasy FFPE Kit med forlænget inkubering med en T7-Oligo(dT)-primer med efterfølgende amplifikation af cDNA og PPIA som endogen kontrol. Resultatet analyseres ved Q-PCR på to PCR-plader. For at sikre at resultaterne fra de to PCR-analyser kan sammenlignes, er der på hver plade medtaget en fortyndingsrække udført på fortyndinger af en human reference. De to standardkurver er vist på Figur 11. Effektiviteten af PCR-analysen er beregnet til 86,1 % for den øverste standardkurve, mens effektiviteten af den nederste standardkurve er beregnet til 88,0 %.



Figur 11. Standardkurver for PCR-analyser udført med dobbeltbestemmelse på fortyndinger af en human reference. Den øverste standardkurve har en effektivitet på 86,1 %, mens den nederste standardkurve har en effektivitet på 88 %.

Begge standardkurver ligger på en ret linje, og det ses på Figur 11, at punkterne for dobbeltbestemmelsen ligger meget tæt. Ligheden mellem effektiviteten af de to PCR-analyser er tilfredsstillende. Værdien af effektiviteten er dog lidt lav.

Ct-værdierne for de enkelte prøver for de to Q-PCR-analyser er illustreret på Figur 12. Prøve 15 og prøve 16 er i for lav koncentration, til at der kunne udtages 1 µg RNA til brug til cDNA syntese. Prøve 24 resulterede ikke i en detekterbar Ct-værdi. Prøve 3, 6, 10, 14, 18, 21, 25, 26, 30 og 31 er analyseret i triplikater (øverste standardkurve på Figur 11), mens prøve 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 22, 23, 27, 28 og 29 er analyseret i duplikater (nederste standardkurve på Figur 11)



Figur 12. Ct-værdier for 28 ud af 31 mulige prøver. Prøve 3, 6, 10, 14, 18, 21, 25, 26, 30 og 31 er analyseret i triplikater; mens prøve 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 22, 23, 27, 28 og 29 er analyseret i duplikater.

På figuren ses, at Ct-værdierne for de fleste af prøverne er forholdsvis høje, men at cDNA syntesen med en T7-Oligo(dT)-primer tilsyneladende har fungeret tilfredsstillende. Det bemærkes også, at gentagelserne ligger tæt på hinanden.

Forsøget er gentaget med samme setup blot for husholdningsgenet TBP, men resultatet af denne analyse viste intet positivt resultat for FFPE-prøverne. Prøver oprenset fra frossent væv og positive kontroller kunne detekteres for dette gen med det pågældende analyse-setup, dog med højere Ct-værdier end det var tilfældet med PPIA som endogen kontrol. Disse resultater samt Ct-værdier præsenteret i Figur 12 kan ses i *Q-PCR på alle 31 prøver.xls* på datadisk.

I PCR-analysen vist på Figur 12 blev der registreret et positivt signal i den negative No RT-kontrol, hvilket kunne indikere en DNA-kontaminering af RNA. Til No RT-kontrollen er template fremstillet af mix af RNA fra samtlige analyserede prøver, hvorfor det er umuligt at udtale sig om, hvorvidt en eventuel kontaminering stammer fra en enkelt prøve eller fra samtlige prøver. Forsøget gentages derfor med samme prøver og setup som tidligere, hvor der yderligere medtages to negative kontroller for hver prøve. De negative kontroller indeholder hhv. vand (NT + vand) eller oprenset RNA (NT + RNA) i stedet for template. Prøver er dobbeltbestemte. Resultatet fra undersøgelsen viste et positivt signal i nogle af de negative kontroller med RNA som template, hvilket forventes at være resultatet af DNA-kontaminering. De pågældende prøver er præsenteret i Tabel 16.

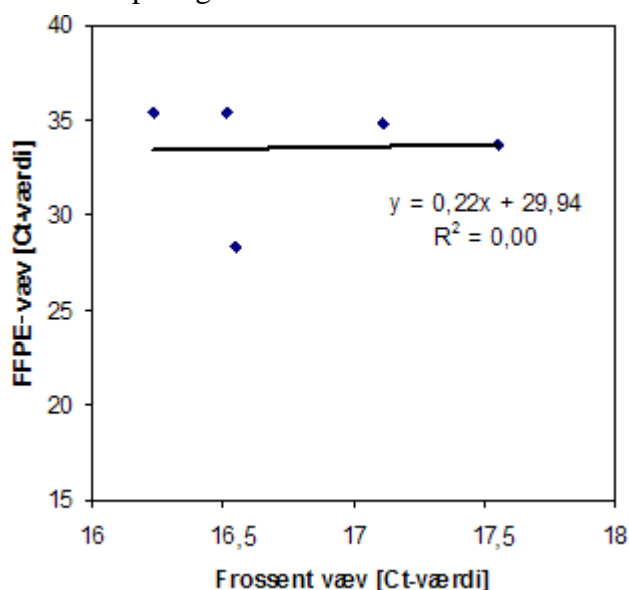
Tabel 16. Ct-værdier for negative kontroller, der resulterede i et positivt resultat ved analyse med Q-PCR. Husholdningsgenet PPIA er benyttet som endogen kontrol.

Prøvens navn	Ct-værdi	Prøvens navn	Ct-værdi
Prøve 19 (NT + RNA)	27,17	Prøve 7 (NT + RNA)	39,98
Prøve 27 (NT + RNA)	29,89	Prøve 9 (NT + RNA)	40,88
Prøve 11 (NT + RNA)	33,39	Prøve 5 (NT + RNA)	41,35
Prøve 23 (NT + RNA)	35,06	Prøve 12 (NT + RNA)	41,67

Det bemærkes dog, at det positive signal for de negative kontroller for prøverne 5, 9 og 12 først registreres fem eller flere amplifikationscykler efter at prøvens signal registreres og derfor muligvis ikke er resultatet af en DNA-kontaminering.

Korrelation mellem frossent væv og FFPE-væv

Det undersøges om der er en korrelation mellem genekspressionen i frossent væv og FFPE-væv ved at se på sammenhængen mellem Ct-værdier for fem udvalgte vævsprøver. Individuelle værdier kan ses i *korrelation ml. frossent og FFPE-væv.xls* på datadisk. Den frosne vævsprøve og FFPE-vævsprøven er udtaget fra samme patient. Hver prøve er trippelbestemt og sammenhængen er illustreret på Figur 13.



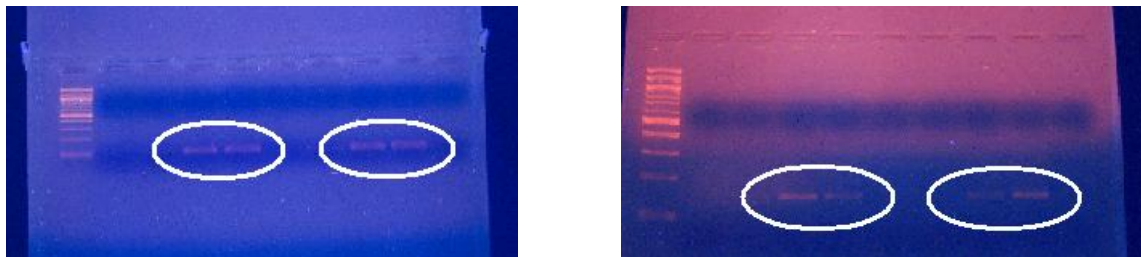
Figur 13. Sammenhæng mellem frossent væv og FFPE-væv fra samme patient (N=5). Prøverne er trippelbestemte og kun gennemsnittet er vist. På figuren er ligningen for regressionslinjen samt determinationskoefficienten angivet.

Det ses af ligningen for regressionslinjen, at det er en svag lineær sammenhæng mellem Ct-værdierne for de frosne vævsprøver og Ct-værdierne for FFPE-vævsprøverne. Yderligere demonstrerer en Pearson korrelationsanalyse, at der ikke er korrelation mellem de fem undersøgte

vævsprøve par ($R^2 = 0,00$). Hele analysen kan ses i *korrelation ml. frossent og FFPE-væv.xls* på datadisk.

Optimering af primerkoncentration til PCR-assay med β -actin som endogen kontrol

For at bestemme en optimeret koncentration af primere analyseres 16 forskellige koncentrationer for hvert primerpar jf. afsnit Materialer og Metoder. Prøver er analyseret på 2 % agarose-gel efter PCR-reaktionen. Gelbilledet til venstre viser analysen af primer 1 og 2, mens gelbilledet til højre viser analysen af primer 3 og 4.



Figur 14. 2 % agarose-gel efter analyse af forskellige primerkoncentrationer for primer 1 og 2 (til venstre) og for primer 3 og 4 (til højre). De hvide cirkler markerer bånd for primerkoncentrationer på hhv. 200/200, 300/200, 200/300 og 300/300 læst fra venstre mod højre for både primer 1 og 2 og primer 3 og 4.

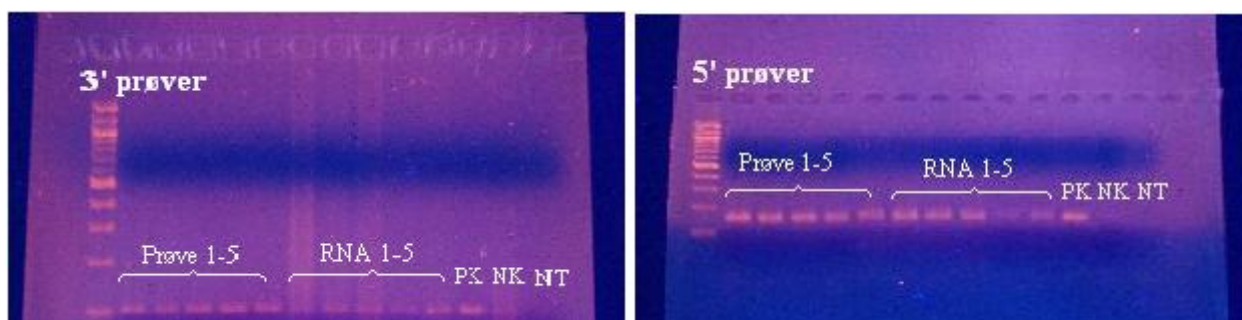
På Figur 14 ses det, at de højeste koncentrationskombinationer af de undersøgte primere giver et positivt resultat i form af et synligt bånd for hver primerparkoncentration. Forskellen i længden af størrelsesmarkøren skyldes, at analysetiden for de to geler har været forskellig.

Ved fremtidig brug af koncentrationskombination af primerpar benyttes 300/300.

Analyse af 3'/5'-forhold for FFPE-vævsprøver med β -actin som endogen kontrol

Efter at have optimeret primerparkoncentrationen benyttes denne til at undersøge 3'/5'-forholdet for de 31 FFPE-vævsprøver. Som følge af indledende analyser blev det bestemt, at prøver udført med 3' primerparret skal amplificeres via 35 cykler; mens prøver udført med 5' primerparret skal amplificeres via 40 cykler.

På Figur 15 ses gelbilledet for de fem første prøver. Til venstre ses prøver, hvor PCR-reaktionen er udført med 3' primerparret og til højre ses prøver, hvor PCR-reaktionen er udført med 5' primerparret. Ud over prøverne er negative kontroller med RNA som template også medtaget for at undersøge en eventuelt DNA-kontaminering. Gelbilledet er sammensat af to geler.



Figur 15. Gelbillede af resultatet for prøve 1-5. Til venstre ses prøver, hvor PCR-reaktionen er udført med 3' primerparret; mens figuren til højre viser resultatet af prøver, hvor PCR-reaktionen er udført med 5' primerparret. PK: positiv kontrol; NK: negativ kontrol og NT: no template-kontrol.

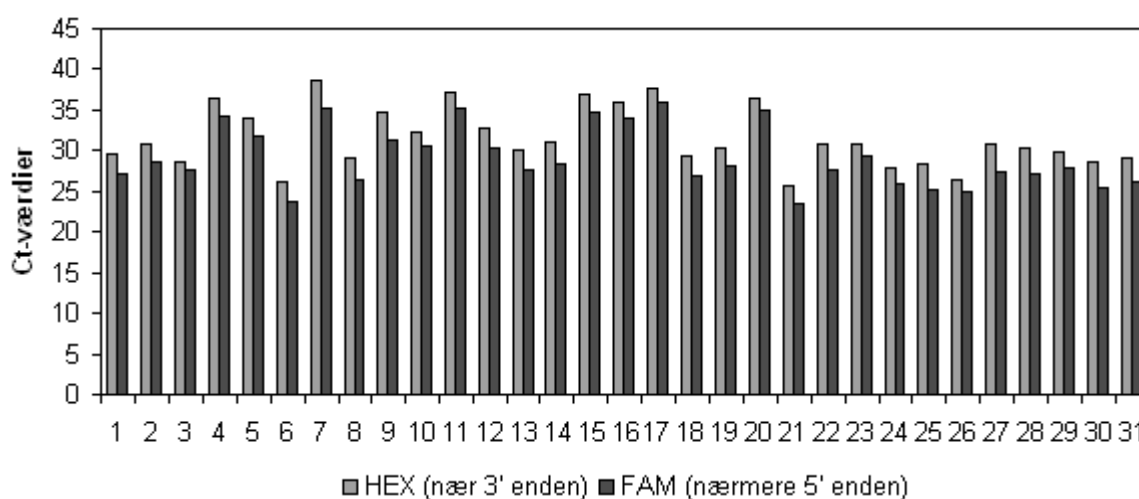
På Figur 15 ses et tydeligt bånd for alle prøver, men også for alle de negative kontroller for både 3' prøverne og 5' prøverne. Der ses intet positivt signal for den negative kontrol (NT), og der registreres et positivt signal i den positive kontrol for prøver med begge primerpar.

Tilsvarende analyse udføres for prøve 6-10 for at undersøge, hvorvidt der også registreres positive signaler i de negative kontroller med RNA som template. Resultatet af denne undersøgelse viste, at der blev registreret et positivt signal i samtlige af de negative kontroller.

På baggrund af disse resultater opsættes et andet PCR-assay med andre primere og med GAPDH som endogen kontrol.

Analyse af 3'/5'-forhold for FFPE-vævsprøver med GAPDH som endogen kontrol

Der blev opsat et kvantitativt PCR-assay med GAPDH som endogen kontrol med primer-probe-par-koncentration og temperaturprofil efter anvisning af Nolan *et al.*, 2006. Resultaterne viste forskel i Ct-værdier mellem FFPE-prøver analyseret med henholdsvis primer-probe-parret nær 3' enden og primer-probe-parret nærmere 5' enden. Som tidligere er assayet yderligere afprøvet med en negativ kontrol for hver FFPE-vævsprøve, hvor oprenset RNA er benyttet som template frem for cDNA. På Figur 16 nedenfor ses resultatet af de negative kontroller for både primer-probe-parret nær 3' enden (HEX fluorescerende) og primer-probe-parret nærmere 5' enden (FAM fluorescerende).

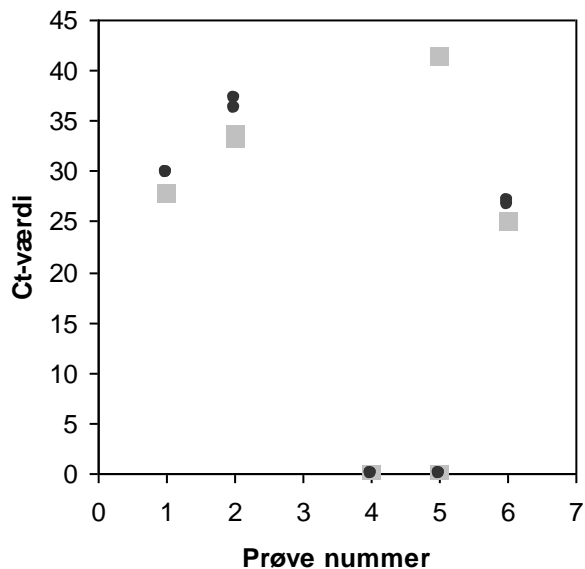


Figur 16. Negative kontroller for hver FFPE-vævsprøve, hvor oprenset RNA er benyttet som template frem for cDNA.

Det ses på figuren, at der blev registreret et positivt signal i samtlige af de negative kontroller, hvilket indikerer DNA-kontaminering.

DNase I-behandling

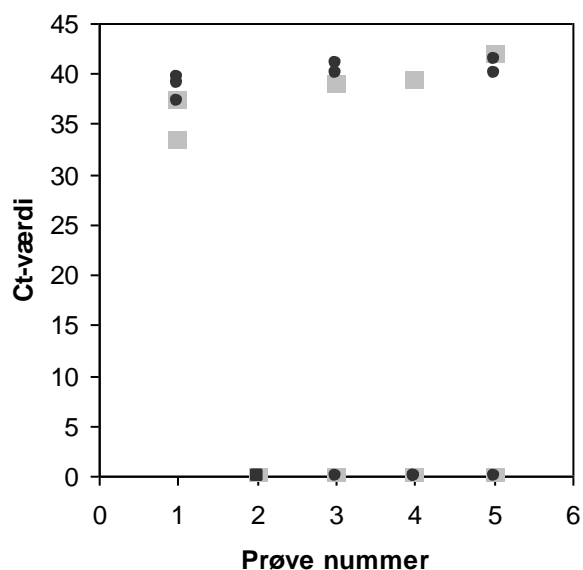
Med udgangspunkt i Figur 16 vælges at DNase I-behandle udvalgte prøver (prøve 1, 2, 4, 5 og 6) med det kommercielt tilgængelige Amplification Grade DNase I kit forhandlet af Sigma-Aldrich, hvorefter ovenstående analyse gentages for de fem prøver. På Figur 17 ses Ct-værdier for negative kontroller for DNase I-behandlede prøver. Prøverne er dobbeltbestemte.



Figur 17. Negative kontroller med RNA som template for prøve 1, 2, 4, 5 og 6 efter behandling med DNase I. Prøverne er dobbeltbestemte. De sorte cirkler: primer-probe-parret nærmest 5' enden af GAPDH; De lyse kvadrater: primer-probe-parret nærmest 3' enden.

Det ses på Figur 17, at DNase I-behandlingen umiddelbart kun har virket effektivt på prøve 4 og prøve 5. Det bemærkes, at den ene af dobbeltbestemmelserne for prøve 5 resulterer i et positivt signal, mens den anden dobbeltbestemmelse ikke gør.

Til sammenligning vælges det på ny at oprense prøve 1-5 med Qiagens RNeasy FFPE Kit med forlænget proteinase K inkubering, hvor der under oprensningen inkluderes et DNase I-behandlingstrin med et andet af Qiagens kommercielle kits, Qiagen RNeasy mini Kit. Yderligere er mængden af udgangsmateriale halveret i forhold til tidligere analyser. På Figur 18 er Ct-værdier angivet for de negative kontroller for de DNase I-behandlede prøver. Prøverne er trippelbestemte.

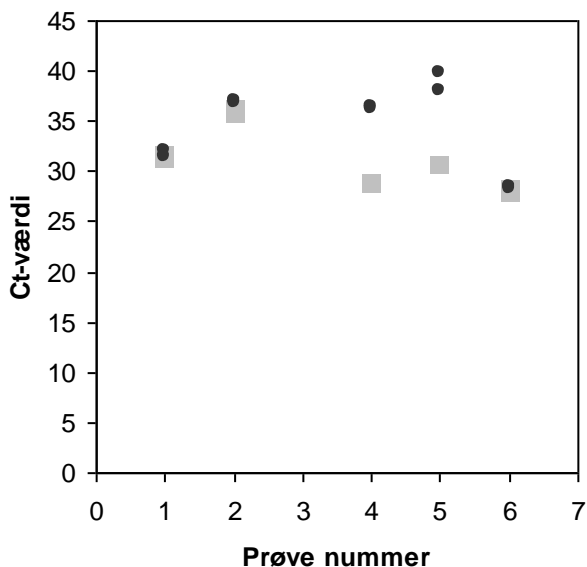


Figur 18. Negative kontroller med RNA som template for prøve 1-5 efter DNase I-behandling på kolonnens membran. Prøverne er trippelbestemte. De sorte cirkler: primer-probe-parret nærmest 5' enden af GAPDH; De lyse kvadrater: primer-probe-parret nærmest 3' enden.

På Figur 18 har DNase I-behandlingen øjensynligt virket fuldstændigt efter hensigten for prøve 2, der ikke resulterer i et detekterbart resultat. For de resterende fire prøver bemærkes det, at der først opnås et positivt signal meget sent, og at det for prøve 3, 4, og 5 synes en tilfældighed, hvorvidt signalet er positivt eller negativt.

Det vælges at revers transskribere det DNase I-behandlede RNA med en T7-Oligo(dT) primer, for at se om der er forskel på de prøver, hvor DNase I-behandlingen synes succesfuld og de prøver, der synes uændret i forhold til signaler inden DNase I-behandlingen. Det forventes, at der ikke er forskel på signaler for hhv. 3' primer-probe-parret og 5' primer-probe-parret for de prøver, der er kontamineret med genomisk DNA. Derimod forventes der en forskel på signalerne for de prøver, hvor kontamineringen er fjernet under DNase I-behandlingen.

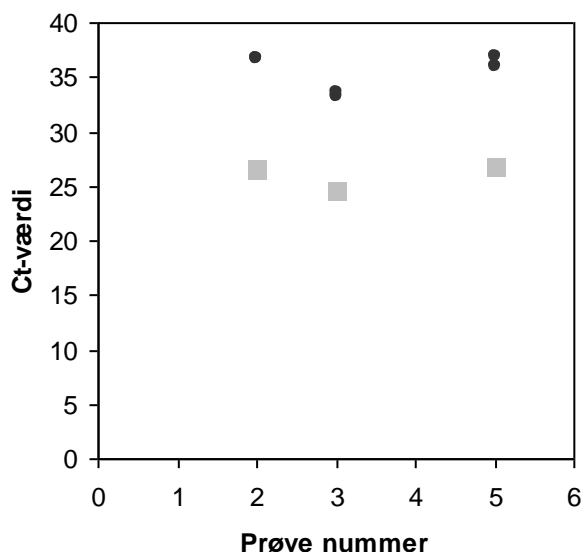
På Figur 19 ses resultatet af en Q-PCR på cDNA, der er revers transskriberet med en T7-Oligo(dT) primer ud fra det oprensede RNA, der efter oprensningen er behandlet med DNase I. Prøverne er dobbeltbestemte



Figur 19. cDNA revers transskriberet med en T7-Oligo(dT) primer af det DNase I-behandlede RNA for prøve 1, 2, 4, 5 og 6. De sorte cirkler: primer-probe-parret nærmest 5' enden af GAPDH; De lyse kvadrater: primer-probe-parret nærmest 3' enden.

På Figur 19 ses tydeligt en forskel på signalerne for prøver med primer-probe-parret nærmest 5' enden (sorte cirkler) og med primer-probe-parret nærmest 3' enden (lyse kvadrater) for prøve 4 og 5. Derimod ses igen forskel på signalerne for prøve 1, 2 og 6.

Et tilsvarende setup er udført for det oprensede RNA, hvor der er udført et DNase I-behandlingstrin direkte på kolonnens membran i forbindelse med selve oprensningen. Resultatet kan ses på Figur 20. Analysen er udført for prøve 2, 3, og 6, da prøve 1 og prøve 4 er af for lav koncentration til at cDNA syntesen kan udføres. Prøverne er dobbeltbestemte.



Figur 20. cDNA revers transskriberet med en T7-Oligo(dT) primer af det RNA, der under oprensningen har undergået et DNase I-behandlingstrin direkte på kolonnens membran. Analysen er udført for prøve 2, 3 og 6. De

sorte cirkler: primer-probe-parret nærmest 5' enden af GAPDH; De lyse kvadrater: primer-probe-parret nærmest 3' enden.

På Figur 20 ses en tydelig forskel på signalerne for prøver med primer-probe-parret nærmest 5' enden (sorte cirkler) og prøverne med primer-probe-parret nærmest 3' enden (lyse kvadrater).

3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol

Da DNase I-behandlingen synes at have fungeret efter hensigten for nogle af prøverne, beregnes et 3'/5'-forhold for prøverne med GAPDH som endogen kontrol ud fra en standardkurve fremstillet ud fra cDNA syntetiseret fra human reference RNA. Det skal bemærkes, at prøve 1, 2 og prøve 6, der er DNase I-behandlet efter oprensningen, højst sandsynligt indeholder betragtelige mængder genomisk DNA, hvilket resulterer i et misvisende lavt 3'/5'-forhold. I Tabel 17 nedenfor er værdier for det beregnede 3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol præsenteret.

Tabel 17. 3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol beregnet for udvalgte DNase I-behandlede prøver. EO: prøven er DNase I-behandlet efter oprensningen; PM: prøven er DNase I-behandlet på kolonnens membran i forbindelse med oprensning af prøven. Forholdet er angivet individuelt for dobbeltbestemmelsen.

Prøvens navn	3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol
Prøve 1 (EO)	3,26
Prøve 1 (EO)	1,37
Prøve 2 (EO)	2,43
Prøve 2 (EO)	3,90
Prøve 4 (EO)	1072,23
Prøve 4 (EO)	1256,54
Prøve 5 (EO)	6116,82
Prøve 5 (EO)	1077,96
Prøve 6 (EO)	3,04
Prøve 6 (EO)	1,83
Prøve 2 (PM)	13 218,63
Prøve 2 (PM)	11 244,84
Prøve 3 (PM)	3613,80
Prøve 3 (PM)	4755,07
Prøve 5 (PM)	11 719,25
Prøve 5 (PM)	5211,62

Der ses tydeligt en forskel på det beregnede 3'/5'-forhold mellem de prøver, der formodes at være kontamineret og de, der ikke gør, idet sidstnævnte har et betragteligt højere 3'/5'-forhold. Yderligere bemærkes det, at der for de høje værdier er stor forskel imellem dobbeltbestemmelserne.

3'/5'-forhold med center 5' primer-probe-parret

Grundet det meget høje 3'/5'-forhold med de benyttede primer-probe-par i Tabel 17, undersøges samme prøver igen efter samme analyse-setup blot med et andet primer-probe-par, hvor primer-probe-parret nærmest 5' enden af GAPDH er rykket længere ned imod 3' enden. Den præcise placering af center 5' primer-probe-parret kan ses i bilag A.

Resultatet af et 3'/5'-forhold med center 5' primer-probe-parret og 3' primer-probe-parret er vist i Tabel 18.

Tabel 18. 3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol med center 5' primer-probe-parret beregnet for udvalgte DNase I-behandlede prøver. EO: prøven er DNase I-behandlet efter oprensningen; PM: prøven er DNase I-behandlet på kolonnens membran i forbindelse med oprensning af prøven. Forholdet er angivet individuelt for dobbeltbestemmelsen.

Prøvens navn	3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol og center 5' primer-probe-par
Prøve 1 (EO)	0,23
Prøve 1 (EO)	0,20
Prøve 2 (EO)	0,43
Prøve 2 (EO)	0,40
Prøve 4 (EO)	18,86
Prøve 4 (EO)	23,45
Prøve 5 (EO)	Ikke detekteret
Prøve 5 (EO)	31,68
Prøve 6 (EO)	0,21
Prøve 6 (EO)	0,16
Prøve 2 (PM)	76,08
Prøve 2 (PM)	33,93
Prøve 3 (PM)	104,05
Prøve 3 (PM)	72,20
Prøve 5 (PM)	312,44
Prøve 5 (PM)	175,31

Igen i Tabel 18 ses et misvisende lavt 3'/5'-forhold i prøve 1 (EO), 2 (EO) og 6 (EO), der formodes at være kontamineret med DNA. Det bemærkes, at 3'/5'-forholdet for de resterende prøver udført med center 5' primer-probe-parret, hvor DNase I-behandlingen antages at have fungeret, er betydeligt lavere end det fundne forhold i Tabel 17.

DISKUSSION

Undersøgelse af oprensningmetoder

Ved undersøgelse af koncentrationsforskellene mellem de udvalgte seks oprensningmetoder, som blev præsenteret i Figur 6, fandtes en tendens til, at der kunne oprenses en højere koncentration af RNA med oprensningmetoder, hvor inkuberingen med proteinase K var øget fra forhandlerens anvisninger på enten 30 minutter eller 15 minutter til 20 timers inkubering. Det fremgik dog også af figuren, at standardafvigelserne for de forskellige oprensninger overlappede hinanden, hvorfor forskellene ikke kan betragtes som signifikante. Dette bekræftes yderligere af resultatet af ANOVA-testen i Tabel 3 ($F = 1,732$, $p = 0,166$). Tendensen til højere koncentration ved længere inkuberingstid stemmer godt overens med en teori præsenteret af Chen *et al*, 2007, om at RNA-fragmenter kan ligge indlejret i proteinklumper, der ikke når at blive tilstrækkeligt nedbrudt ved kortere inkubering. En højere koncentration af RNA er dog ikke nødvendigvis ensbetydende med et bedre resultat i forbindelse med målet om succesfuld genekspression på FFPE-væv, da kvaliteten af de enkelte RNA-fragmenter er altafgørende i dette tilfælde, og koncentrationen af RNA er mindre vigtig.

I det henseende er Tabel 4 mere interessant, da værdierne i denne tabel angiver et mål for renheden af RNA. 260/280-forholdet for vævsprøverne er tæt på to, hvilket betyder, at det oprensede RNA er rent og ikke er forurenede af f.eks. proteiner. Dog ses det i Tabel 8, at RIN-værdierne for prøverne er meget lave, hvilket indikerer en stærk nedbrydning af RNA, til trods for at værdierne for 260/280-forholdet ligger flot, og inden for det kvalitetsinterval som Affymetrix anbefaler. På baggrund af dette vurderes det, at værdierne i Tabel 4 ikke alene er gode nok til at give en reel kvalitetsvurdering af RNA-kvaliteten. ANOVA-testen for 260/280-forholdet i Tabel 5 ($F = 0,748$, $p = 0,595$) viser yderligere, at der ikke er signifikant forskel imellem oprensningmetoderne, hvorfor forholdet ikke kan bruges til differentiering mellem metoderne.

I Tabel 6 er 260/230-forholdet angivet for at kunne vurdere, hvorvidt det oprensede RNA kan være kontamineret med forskellige uønskede organiske stoffer, der vil give forstyrrende resultater i forbindelse med opmærkning af prøver til DNA-chip. Denne værdi bør, også efter anbefalinger fra Affymetrix, ligge så tæt på værdien to som muligt. Ud fra data præsenteret i tabellen er prøver oprenset med MasterPure RNA Purification Kit efter forhandlerens anvisninger kontamineret med

uønskede stoffer. Der ses generelt en tendens til, at prøver oprenset med MasterPure RNA Purification Kit har et lavere 260/230-forhold sammenlignet med prøver oprenset med Qiagen RNeasy FFPE Kit. Det lavere forhold kan muligvis skyldes kontaminering af ethanol, der tilsættes prøverne i et af oprensningens metodens sidste trin. Ved yderligere undersøgelser vil det være fordelagtigt at undersøge, hvorvidt en afdampning i dette trin ville øge 260/230-forholdet for de fire oprensningemetoder.

Det vil være meget interessant at kunne beskrive en forskel i længden af de oprensede RNA-fragmenter, da længere og intakte RNA-fragmenter øger chancen for succesfuld bestemmelse af genekspression. Forfattere af flere artikler (Chen *et al.*, 2007, Chung *et al.*, 2006, Lehmann & Kreipe, 2001, Godfrey *et al.*, 2000 m.fl.) kan citeres for, at de finder målbart længere RNA-fragmenter og højere RNA-koncentration, hvis inkuberingen med proteinase K forlænges. Ved at sammenligne de to udvalgte elektroferogrammer for den samme prøve, der er vist i Figur 7, ses det, at der synes at være forskel i fordelingen af, hvor lange RNA-fragmentlængder, der kan oprenses med de to oprensningemetoder. Det er interessant, hvis det kan vises, at forskellige oprensningemetoder resulterer i forskellige RNA-fragmenter. Da det ikke har været muligt at få et kvantitativt målt for andelen af længere RNA-fragmenter, er det valgt at vurdere ekstremerne og siden at sammenligne dem mellem de seks udvalgte metoder. Derfor angives den højeste værdi - som det er muligt at registrere, inden kurven for elektroferogrammet rammer bundlinjen - og sammenligne om denne værdi varierer mellem de seks oprensningemetoder. Data for dette er præsenteret i Figur 8. Der gøres opmærksom på, at værdien for det længst mulige detekterbare RNA-fragment ikke er repræsentativt for længden af RNA-fragmenter i prøven, men værdien vil alligevel kunne give et indtryk af, om der er en større andel af meget lange RNA-fragmenter i den oprensede prøve. Der er yderligere et problem ved sammenligningen af det længst mulige detekterbare RNA-fragment, da det, på grund af softwaren indbygget i bioanalyseren, ikke er muligt at aflæse værdier højere end 4000 basepar. Dette resulterer i et misvisende indtryk af de konkrete længder af fragmenter og gør det besværligt at skelne forskelle mellem de undersøgte metoder. Ikke desto mindre ses det på Figur 8, at der er en tendens til, at længere inkubering med proteinase K resulterer i flere lange RNA-fragmenter for MasterPure RNA Purification Kit; samt at vævsprøver oprenset med Qiagens RNeasy FFPE Kit har en større andel af lange RNA-fragmenter end de, der oprenses med MasterPure RNA Purification Kit.

Det ses af p-værdien i Tabel 9, at forskellene mellem det længst mulige detekterbare RNA-fragment er signifikante, hvorfor sandsynligheden, for at forskellene mellem RNA-fragmenterne blot er et tilfælde, er lav.

Et andet forsøg på at kunne bestemme forskelle i længden af RNA-fragmenter ses i Tabel 10, hvor gennemsnittet af toppunkterne for hver oprensningemetode er opgivet. Toppunkterne er illustrative for det hyppigst fremkommende fragment, hvorfor det vil være interessant, hvis der kan detekteres forskel mellem toppunkterne imellem de forskellige oprensningemetoder. Desværre synes der ikke

umiddelbart at være en betydende forskel i længden af det hyppigst fremkommende RNA-fragment imellem oprensningsmetoderne. Dette skyldes nok, at de oprensede RNA-fragmenter er nedbrudt i sådan en grad, at langt de fleste fragmenter er meget korte, og at der kun er en lav procentdel af RNA-fragmenter, der er lange nok til at kunne benyttes til genekspression. Toppunktet kan derfor ikke alene bruges til at vurdere kvaliteten af en oprensningsmetode.

Genekspressionsanalyse af FFPE-vævsprøver

På Figur 9 er koncentrationer af biotin-mærket cRNA angivet for tre af de umiddelbart bedste oprensningsmetoder for to forskellige FFPE-vævsprøver, hvor den ene er dobbeltbestemt. Der ses en forskel i koncentrationen mellem de forskellige oprensningsmetoder, men også at standardafvigelse overlapper hinanden for dobbeltbestemmelsen. Måling på vævsprøve T1 er kun udført én gang, hvorfor det er usikkert at udtale sig om, hvorvidt det fundne resultat er en tendens eller et tilfælde. Ikke desto mindre er resultatet for koncentrationsmålingerne vigtige, da disse resultater giver svar på, hvorvidt det er muligt at opmærke FFPE-vævsprøver til analyse med DNA-chip.

Det noteres på Figur 9, at koncentrationen af cRNA for alle tre oprensningsmetoder er betydeligt lavere end en koncentration på omkring 1000 mg/l, der normalt anvendes som minimum i forbindelse analyse på DNA-chip. Dette skyldes et lavt antal RNA-fragmenter i prøven med en intakt poly(A) hale. Problemet med den lave koncentration vil muligvis kunne løses ved at benytte et andet kommercielt tilgængeligt kit fra Affymetrix, hvor der foretages en two-round amplifikation frem for den benyttede one-round amplifikation. Denne ændring ville teoretisk set resultere i en 100-fold forøgelse af koncentrationen af cRNA. Der er delte meninger om, hvorvidt two-round amplifikationen introducerer yderligere usikkerheder til metoden, men metoden vil være et åbenlyst næste trin i bestemmelse af, om FFPE-væv kan opmærkes til analyse med DNA-chip. Det biotin-mærkede cRNA blev efter opmærkningen analyseret på en Agilent RNA 6000 Pico chip, for at se den gennemsnitlige RNA-fragmentlængde var ændret i forhold til udgangsmaterialet. Analysen viste, at længden af det hyppigst fremkommende fragment analyseret på pico chippen, er øget i forhold til tidligere analyser af oprenset RNA på nano chippen. Dette skyldes sandsynligvis teknikken bag opmærkningen af vævsprøverne, hvor kun RNA-fragmenter med en intakt poly(A) hale vil blive opmærket med biotin og resten vil vaskes væk (se bilag B). Derved stemmer den øgede gennemsnitlige RNA-fragmentlængde godt overens med en teori om, at kun RNA-fragmenter af en vis høj kvalitet bliver opmærket.

I forlængelse af opmærkningen til DNA-chip blev det yderligere undersøgt, om FFPE-vævsprøverne kunne revers transskriberes med en T7-Oligo(dT) primer, da teknologien bag DNA-chip bygger på samme principper. Det viste sig at være muligt for alle prøver med PPIA som endogen kontrol, men ikke overbevisende muligt for nogle prøver med TBP som endogen kontrol.

Der blev ved denne analyse registreret et falskt positivt signal i en af de negative kontroller, hvilket blev betragtet som begyndervanskeligheder ved PCR-håndtering.

Valg af oprensningsmetode

På baggrund af de fundne resultater undersøgt for de fem forskellige FFPE-vævsprøver blev Qiagens RNeasy FFPE Kit med 20 timers proteinase K-nedbrydning valgt til oprensning af 31 FFPE-vævsprøver. Det kan diskuteres, om metoden er signifikant bedre end visse af de andre undersøgte oprensningsmetoder, men metoden er valgt på det grundlag, at den i alle af de udvalgte kvalitetsbestemmelser har udvist gode resultater.

Kvalitetsparametre for oprensede FFPE-vævsprøver

I Figur 13 er gennemsnitsværdier for RNA-koncentrationsmålinger, 260/280-, 260/230-forhold samt RIN-værdier sammenfattet for de 31 oprensede prøver. Alle værdier stemmer udmærket overens med resultaterne fundet med samme oprensningsmetode for de fem testprøver. Gennemsnitsværdien for RNA-koncentrationsmålingerne findes en smule højere sammenlignet med testprøverne, men som det også ses i tabellen, er standardafvigelsen meget høj. Den store afvigelse er resultatet af biologisk varians og illustrerer godt, hvor stor forskel der er imellem vævsprøverne. Til trods for at udgangsmaterialet er forsøgt standardiseret ved at udskære samme mængde af vævsprøven, kan selve antallet af lymfeceller i hvert snit være meget forskelligt. Det er ikke muligt at vurdere, hvor stor en del af vævet, der reelt består af lymfeceller og ikke blod, plasma eller andre celletyper. Hertil kommer problemet med behandling af vævet inden fiksering, hvor det ikke vides, hvor længe vævet har været ubehandlet inden fiksering, hvilket har indflydelse på mængden af RNA, der er helt eller delvist nedbrudt. I undersøgelsen af den bedste oprensningsmetode er FFPE-vævsprøvernes alder ikke medberegnet. I et studie foretaget af Frank *et al.*, 2007 fandtes det, at RNA oprenset fra ældre FFPE-vævsprøver er mere nedbrudt end yngre vævsprøver. Hvis dette resultat er korrekt, vil denne faktor ligeledes spille en rolle i både koncentration og kvalitet af RNA. På Figur 10 er den højst mulige detekterbare fragmentlængde vist for de 31 vævsprøver. De fleste af de 30 præsenterede prøver når detektionsgrænsen på 4000 nukleotider, men flere af prøverne ligger også betragteligt under denne værdi. Det var forventet, at stort set alle prøver ville nå detektionsgrænsen, da alle tidligere resultater viser, at den maksimale fragmentlængde lå over grænsen på 4000 nukleotider for den pågældende oprensningsmetode. Anderledes findes det naturligt, at der er forskel i graden af nedbrydning mellem de forskellige vævsprøver. På grund af detektionsgrænsen vurderes det, at værdien for det længst mulige detekterbare fragment ikke alene kan bruges til udvælgelse af prøver med høj kvalitet. I håbet om at understøtte resultaterne for varierende RNA-fragmentlængde er en aflæsning af toppunkterne foretaget og resultatet er præsenteret i Tabel 14. Det kan aflæses i tabellen, at der er stor variation imellem toppunkterne for de enkelte prøver. Der er dog ingen af toppunkterne, der ligger nævneværdigt højt, og det vurderes,

at toppunkterne ikke kan bruges til at vurdere, hvilke prøver, der vil give bedre resultater i en genekspressionsanalyse.

Korrelation mellem analyserede kvalitetsparametre

I Tabel 15 er en mulig korrelation imellem fem af de analyserede kvalitetsparametre undersøgt. Det ville være spændende, hvis der fandtes en tendens til, at eksempelvis en høj værdi for et kvalitetsparameter korrelerede med en høj værdi for et andet kvalitetsparameter. Dette ville eventuelt hjælpe med udvælgelsen af FFPE-vævsprøver af højere kvalitet, da analyse af et enkelt kvalitetsparameter næppe alene vil være tilstrækkeligt til en sikker udvælgelse. En sådan meningsfuld korrelation imellem de analyserede kvalitetsparametre synes dog ikke at findes blandt de undersøgte vævsprøver. Det var forventet at finde en korrelation mellem RIN-værdierne og toppunktet, da det forventes, at mere intakt RNA også burde resultere i gennemsnitlig længere RNA-fragmenter. I tabellen ses dog kun en svag korrelation imellem de to kvalitetsparametre.

Real-time kvantitativ PCR

I Figur 12 er Ct-værdier præsenteret for 28 ud af 31 mulige prøver. PCR-reaktionen er udført af to omgange, hvilket er grunden til, at omkring halvdelen af prøverne er udført som dobbeltbestemmelser, mens den anden halvdel er udført i triplikater. For at kunne sammenligne resultaterne fra de to PCR-reaktioner er der på hver plade medtaget en fortyndningsrække udført på en human reference, hvorfra effektiviteten af PCR-assayet er beregnet. De to standardkurver og den tilhørende effektivitet er præsenteret i Figur 11. Det ses, at standardkurverne, der er udført i dobbeltbestemmelser, ligger flot på en ret linje med en høj determinationskoefficient. Det ses også, at de to standardkurver ikke er identiske, men at effektiviteterne ligger mindre end 5 % fra hinanden, hvorfor resultaterne fra de to PCR-reaktioner kan sammenholdes. Effektiviteten af begge PCR-reaktioner ligger på grænsen til, hvad der normalt accepteres. Der er god grund til at tro, at effektiviteten kan øges ved standardisering under opsætning til PCR og øvelse. Det er valgt at acceptere de lave værdier, da det overordnede formål med analysen er at undersøge, hvorvidt det er muligt, at revers transskribere FFPE-vævsprøver, der er oprenset med Qiagens RNeasy FFPE Kit med forlænget proteinase K inkubering. På baggrund af data præsenteret i Figur 12 synes det muligt, at revers transskribere de oprensede FFPE-vævsprøver med en T7-Oligo(dT)-primer

Grundet et positivt signal i den negativ No RT-kontrol mistænkte en kontaminering med DNA. Hvis en kontaminering er tilfældet er det ikke muligt at vurdere, hvorvidt resultaterne præsenteret i Figur 12 blot er resultatet af et falsk positivt signal. Da der i den negative NT-kontrol med H₂O som template ikke blev registreret et positivt signal, undersøges det om en eventuel kontaminering findes i det oprensede RNA. Efter at have undersøgt hver enkelt prøve blev der kun registreret et positivt signal i 8 af de undersøgte 28 negative kontroller med oprenset RNA som template. Yderligere er 3

af de positive negative kontroller en tvivlsom kontaminering, da de falske positive signaler er registreret fem eller flere amplifikations cykler efter Ct-værdien for den tilsvarende prøve. Det var forventet at observere positive signaler for flere af de negative kontroller, da det findes overraskende, at en så lille mængde DNA kan resultere i det positive signal for No RT-kontrollen.

Korrelation mellem frossent væv og FFPE-væv

På Figur 13 er korrelationen mellem frossent væv og FFPE-væv grafisk vist. Det er vist i andre studier (Chen *et al.*, 2007, Frank *et al.*, 2007 m.fl.), at det er muligt at påvise en korrelation mellem frossent væv og FFPE-væv med R^2 -værdier op til 0,97. Det bemærkes dog, at det meste af det undersøgte FFPE-væv i de to studier er under et år gammelt, og at der, som tidligere nævnt, er en tendens til, at graden af nedbrydning af FFPE-vævet har en direkte sammenhæng med vævets alder (Frank *et al.*, 2007). På baggrund af dette kunne den ringe korrelation i Figur 13 muligvis skyldes FFPE-prøvernes alder, der ikke er medregnet som en betydende faktor gennem rapporten. Det vil dog kræve analyse af et større antal prøver, før der vil kunne dokumenteres en tendens. Det kunne være interessant at inddele FFPE-vævsprøverne efter alder og sammenligne korrelationerne mellem de aldersinddelte FFPE-prøver og tilsvarende frossent væv. Dette ville imidlertid kræve et større antal prøver med tilhørende frossent væv samt flere prøver fikseret inden for de sidste år. Den yngste af de analyserede FFPE-vævsprøver er fikseret i 1997 og de ældste i 1990. Ligeledes interessant ville det være at kunne følge en fikseret vævsprøve fra fikseringstidspunktet og en længerevarende tidsperiode frem i tiden, hvor udsnit af prøven analyseres med passende mellemrum. Dette ville vise om kvaliteten af vævet daler med tiden.

DNA-kontaminering

Der ønskes et udtryk for graden af nedbrydning af det oprensede RNA, hvorfor der opstilles et 3'/5'-forhold med β -actin som endogen kontrol, der vil give et billede af nedbrydningsgraden. Et 3'/5'-forhold på omkring 1 indikerer intakt RNA mens et forhold over 5 antyder nedbrydning af RNA (Nolan *et al.*, 2006) De to benyttede primerpar er udvalgt ud fra sekvensen af β -actin, således at begge primerpar er placeret i den utranslaterede region af genet med en afstand på 437 nukleotider. Formålet med det opstillede PCR-assay er at vise, at der kun blev dannet ét bånd på agarose-gelen, hvorefter prøven skulle farves med SYBR Green[®] for at give et kvantitativt udtryk ved analyse med Q-PCR. Desværre blev der registreret falske positive signaler for alle de analyserede prøver, og der var derfor intet reelt formål ved at fortsætte forsøget med samme setup. Derfor blev et andet Q-PCR setup forsøgt, hvor primer- og probesekvenser blev fundet i et studie publiceret i en Nature Protokol af Nolan *et al.* i 2006. Som det ses af Figur 16 fandtes der desværre også falske positive signaler for alle de analyserede prøver med dette setup. Problemet med DNA-kontamineringen er forsøgt løst ved at DNase I-behandle det oprensede RNA og ved at indføre et DNase I-behandlingstrin under selve oprensningen. Som det ses på Figur 17

synes DNase I-behandlingen af det oprensede RNA kun at have virket effektivt i to ud af de fem analyserede prøver (prøve 4 og 5) for den behandling, hvor DNase I tilsættes det oprensede RNA. Det forekommer bemærkelsesværdigt, at DNase I-behandlingen kun har virket på nogle af prøverne. Det vil derfor være åbenlyst at forsøge optimering af DNase I-behandlingen i tilfælde af videre analyse. I den forbindelse vil det med fordel kunne undersøges, om en højere DNase I-koncentration og/eller en længere inkubering med DNase I vil resultere i bedre resultater. På Figur 18 er effekten af den anden type DNase I-behandling undersøgt, hvor DNase I-behandlingen udføres på kolonnens membran i forbindelse med selve oprensningen af RNA. Denne figur viser, at det synes at være et tilfælde, hvorvidt resultatet af den negative kontrol bliver positivt eller negativt. Sammen med de høje Ct-værdier indikerer dette en meget lav koncentration af eventuelt tilbageblivende DNA-molekyler, hvorfor DNase I-behandlingen vurderes at have virket. Dette understøttes yderligere af resultaterne præsenteret i Figur 20, hvor der observeres tydelig forskel imellem Ct-værdierne for cDNA-prøver med primer-probe-parret nærmest 3' enden og cDNA-prøver med primer-probe-parret nærmere 5' enden. Denne forskel betragtes som et udtryk for, at andelen af genomisk DNA ikke længere bidrager med et overskyggende højt bidrag; og at der er større sandsynlighed for, at forskellen reelt skyldes forskel i nedbrydningsgraden af de oprensede RNA-fragmenter. Inden DNase I-behandling af prøverne resulterede 3'/5'-forhold i en værdi tæt på 1 for alle prøver, hvilket skyldes, at den forskel syntetiseret cDNA måtte bidrage med, druknede i det høje bidrag fra genomisk DNA. I forbindelse med DNase I-behandling på kolonnens membran er det valgt yderligere at halvere mængden af udgangsmateriale, da gDNA Eliminator Spin kolonnen – der har til formål at fjerne genomisk DNA fra oprensningen -, ifølge Qiagens teknikere, har en maksimal kapacitet for binding af DNA. Hvis mængden af DNA i oprensningen overskrider denne kapacitet, vil kolonnen ikke længere kunne tilbageholde DNA-molekylerne, der vil blive ført videre over i RNA-opløsningen. Hvorvidt en tilpas lav DNA-udgangsmængde vil være tilstrækkelig til at give fuldstændig ren RNA-opløsning, er uvist og tvivlsomt. Ikke desto mindre vil dette besværliggøre standardisering af oprensningsmetoden, da det ikke er muligt indledningsvist at vurdere mængden af DNA i en vævsprøve. Det vurderes derfor, at det ekstra DNase I-behandlingstrin er nødvendigt, selvom trinnet kan resultere i mistet prøvemateriale.

På Figur 19 ses samme tendens som i Figur 20, hvor der kun ses en reel forskel på signalet fra 3' primer-probe-parret og 5' primer-probe-parret for prøve 4 og prøve 5, hvilket var de to prøver, hvor DNase I-behandlingen havde elimineret bidraget fra genomisk DNA.

3'/5'-forhold med GAPDH som endogen kontrol


Ud fra det DNase I-behandlede cDNA er et 3'/5'-forhold beregnet i Tabel 17. Som forventet ses misvisende lave værdier for de tre prøver, hvor DNase I-behandlingen ikke har virket efter hensigten, og genomisk DNA udgør så stort et bidrag, at forskellen på cDNA bliver ubetydende lav. Derimod fandtes overraskende høje værdier for 3'/5'-forholdet for de prøver, hvor DNase I-

behandlingen har virket. Disse meget høje værdier indikerer, at der ikke findes RNA-fragmenter i den oprensede opløsning i tilpas høj koncentration, der er så lange, at de når op til primer-probe-parret nærmest 5' enden. Som det kan ses i bilag A er primer-probe-parret nærmest 5' enden placeret ca. 800 nukleotider fra 3' enden af GAPDH, hvorfor de fundne resultater indikerer, at der ikke findes et betragteligt antal RNA-fragmenter i opløsningen, der har en længde på omkring 800 nukleotider. Dette er ikke overraskende, da værdierne for det hyppigst fremkommende fragment (Tabel 10 og Tabel 14) viser, at størstedelen af RNA-fragmenterne er betydeligt kortere. Anderledes kunne det aflæses af elektroferogrammerne for prøverne, at der i nogle af prøverne findes RNA-fragmenter, der er rigtig lange. Desværre må det konstateres, at forekomsten af de lange RNA-fragmenter er for lav til at kunne bidrage brugbart i de fem analyserede prøver.

Ud fra disse resultater er samme analyse gennemført med center 5' GAPDH primer-probe-parret, der er placeret ca. 300 nukleotider fra 3' enden af GAPDH. Resultaterne af denne analyse, der er vist i Tabel 18, viste, at 3'/5'-forholdet er betragtelig lavere ved brug af dette primer-probe-par og giver et mere fornuftigt forhold. Sammenlignet med toppunktsmålingerne for FFPE-prøverne er det også forventet at opleve en større andel af RNA-fragmenter, der er større end 300 nukleotider.

Det ville være ønskværdigt at have fået et endnu lavere 3'/5'-forhold ved brug af et 5' primer-probe-par, der er placeret 300 nukleotider fra GAPDHs 3' ende, da dette ville have givet mere håb for gode resultater ved afprøvning af et primer-probe-par, der er placeret lidt længere imod 5' enden af GAPDH. Standard DNA-chip fra Affymetrix er designet på sådan måde, at alle prober på DNA-chippen binder indenfor de første 600 nukleotider fra 3' enden, hvorfor det vil være fordelagtigt at kunne oprense RNA-fragmenter, der overstiger denne længde. I dag findes en specialdesignet DNA-chip, der ligeledes forhandlet af Affymetrix, specielt designet til FFPE-vævsprøver, hvor alle prober binder indenfor de første 300 nukleotider fra 3' enden. Resultaterne fra Tabel 18 indikerer, at denne DNA-chip vil være anvendelig på de analyserede prøver. Brugen af denne DNA-chip begrænser dog mulighederne for sammenligning af resultater på tværs af laboratorier.

Inden der drages konklusioner om anvendeligheden af FFPE-vævsprøver til genekspressionsanalyse med DNA-chip, skal analysen gennemføres på et større antal vævsprøver og DNase I-behandlingen skal optimeres.



KONKLUSION

I dette projekt er det undersøgt, om der kan detekteres forskelle i RNA-udbytte og kvalitet ved oprensning med forskellige modifikationer af oprensningsmetoder. Efter at have undersøgt flere kvalitetsparametre på fem uafhængige FFPE-vævsprøver, fandtes det, at det er muligt at detektere en forskel i både koncentration og kvalitet af de oprensede RNA-fragmenter. Ved brug af det undersøgte analysesetup, kan det konkluderes, at en forøget proteinase K inkubering resulterer i længere RNA-fragmenter samt højere udbytte.

Det har ikke været muligt at vurdere, hvorvidt den enkelte FFPE-vævsprøve kan anvendes til DNA-chipanalyser af den globale genekspression på baggrund af resultater, der er opnået ved de gennemgåede analyser. Derimod indikerer resultater fundet ved analyse af real-time Q-PCR, at RNA oprenset fra FFPE-væv kan bruges til genekspressionsanalyse med PCR.

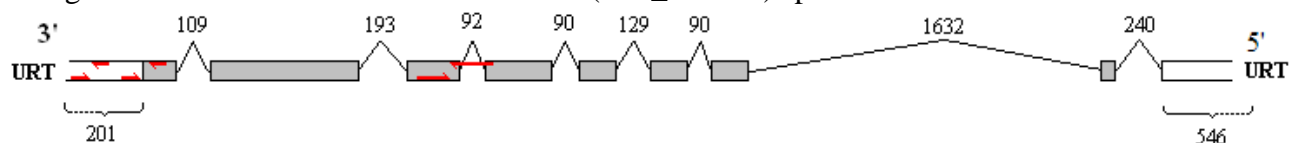
Referencer:

- Berg J, Tymoczko J, Stryer L: *Biochemistry*. 5. udgave, W.H. Freeman and Company, USA, 2002.
- Chen J, Byrne G, Lossos I: *Optimization of RNA Extraction From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Lymphoid Tissues*. *Diagnostic Molecular Pathology*, 16:61-72, 2007.
- Chung J, Braunschweig T, Hewitt S: *Optimization of Recovery of RNA From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue*. *Diagnostic Molecular Pathology*, 15:229-236, 2006.
- Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans J, Shak S, Kiefer M, Esteban J, Baker J: *Measurement of Gene Expression in Archival Paraffin-Embedded Tissues*. *American Journal of Pathology*, vol. 164, No. 1, 2004.
- Dorak M: *Real-time PCR*. Taylor & Francis Group, UK, 2006.
- Fox C, Johnson F, Whiting J, Roller P: *Formaldehyde Fixation*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 33, No. 8, pp. 845-853, 1985.
- Frank M, Döring C, Metzler D, Eckele S, Hansmann M: *Global gene expression profiling of formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples: a comparison to snap-frozen material using oligonucleotide microarrays*. *Virchows Archive*, 450:699-711, 2007
- Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J, Mariani G, Rodriguez J, Carcangiu M, Watson D, Valgussa P, Rouzier R, Symmans W, Ross J, Hortobagyi G, Puztai L, Shak S: *Gene Expression Profiles in Paraffin-Embedded Core Biopsy Tissue Predict Response to Chemotherapy in Woman With Locally Advanced Breast Cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 23:7265-7277, 2005.
- Godfrey T, Kim S, Chavira M, Ruff D, Warren R, Gray J, Jensen R: *Quantitative mRNA Expression Analysis from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues Using 5' Nuclease Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2:84-91, 2000.
- Lehmann U, Kreipe H: *Real-Time PCR Analysis of DNA and RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-embedded Biopsies*. *Methods*, 25, 409-418, 2001.
- Lossos I, Czerwinski D, Wechsler M, Levy R: *Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies*. *Leukemia*, 789-795, 2003.
- Nolan T, Hands R, Bustin S: *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. *Nature Protocols*, vol.1, No. 3: 1559-1582, 2006
- Pedersen M: *Characterisation of human DLBCL cell lines, in the search for a lymphoma stem cell*. Department of Haematology, Aalborg sygehus, Aarhus Universitet, Danmark, 2007.
- Rohlf J & Sokal R: *Statistical tables*. 3. udgave, W.H. Freeman and Company, USA, 1995
- Thomázy V, Luthra R, Uthman M, Davies P, Medeiros L: *Determination of Cyclin D1 and CD20 mRNA Levels by Real-Time Quantitative RT-PCR from Archival Tissue Sections of Mantle Cell Lymphoma and Other Non-Hodgkin's Lymphomas*. *Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 4, No. 4, 2002.
- Walpole R, Myers R, Myers S, Ye K: *Probability & Statistics for Engineers & Scientists*. 7. udgave, Prentice-Hall, Inc., USA, 2002.
- Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H: *Effect of Formalin Tissue Fixation and Processing on Immunohistochemistry*. *The American Journal of Surgical Pathology*, 24(7): 1016-1019, 2000.
-

- Affymetrix, 2007: http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx.
En opdateret original version af manualen er vedlagt på datadisk (*GeneChip Expression Analysis Technical Manual*)
- National diagnostics, 2005: http://nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/94.
Besøgt: d. 10-09-07. Opdateret i 2005
- PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
Besøgt første gang d. 01-09-07. Opdateret i 2007
- Stratagene, 2007: http://www.stratagene.com/tradeshows/Introduction_to_Quantitative_PCR_web-pdf?WT.mc_id=QPCRGuideSM090106
En opdateret original version af teksten er vedlagt på datadisk (*Introduction to Quantitativ PCR*)
- PubMed, β -actin, 2007: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NM_001101.2
Besøgt d. 18-12-07. Opdateret i 2007.
- PubMed, GAPDH, 2008: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c=Gene&l=GAPDH>
Besøgt d. 14-01-08. Opdateret i 2008

BILAG A: Struktur og sekvens af GAPDH (NM_002046)

På figuren nedenfor er strukturen af GAPDH (NM_002046) splice variant c vist.



Figur 21. Struktur af GAPDH (NM_002046) splice variant c. Exons er markeres som farvede bokse, mens introns er markeret med længde [nt] imellem exons. På figuren er primerparrene indtegnet. Proberne er ikke illustreret. Frit efter PubMed, GAPDH, 2008.

Nedenfor er sekvensen af GAPDH mRNA angivet. Den kodende sekvens er angivet med store bogstaver og den utranslaterede sekvens er angivet med små bogstaver. De 9 exon er markeret med skiftevis grøn og blå farve. Yderligere er 5' primer-probe-parret, center 5' primer-probe-paret og 3' primer-probe-parret er vist med rød overstregning.

```

1      5'- gcggtgcagcc gcgagcggtg ctgggctccg gctccaatc cccatctcag tcgttcccaa
61      agtctctctg tttcatccaa gcggtgaagg gtccccgtcc ttgactccct agtgtctctg
121     tgcccacagt ccagtcctgg gaaccagcac cgatcacctc ccatcggggc aatctcagtc
181     ccttcccccc tacgtcgggg cccacacgct cgggtcgtgc ccagttgaac cagggcgtg
241     cggaaaaaaaa aaagcgggga gaaagtaggg cccggctact agcggtttta cgggcgcacg
301     tagctcaggc ctcaagacct tgggctggga ctggctgagc ctggcgggag gcggggtccg
361     agtcaccgcc tgcgcgcgcg cccccggtt ctataaattg agccccgagc ctcccgttc
421     gctctctgct cctcctgttc gacagtcagc cgcactctct tttgcgtcgc cagccgagcc
481     acatcgctca gacaccATGG GGAAGGTGAA GGTCCGAGTC AACGGATTG GTCGTATTGG
541     GCGCCTGGTC ACCAGGGCTG CTTTAACTC TGGTAAAGTG GATATTGTTG CCATCAATGA
601     CCCCTTCATT GACCTCAACT ACATGGTTTA CATGTTCCAA TATGATTCCA CCCATGGCAA
661     ATTCATGGC ACCGTCAAGG CTGAGAACGG GAAGCTTGTC ATCAATGGAA ATCCCATCAC
721     CATCTTCCAG GAGCGAGATC CCTCCAAAAT CAAGTGGGGC GATGCTGGCG CTGAGTACGT
781     CGTGGAGTCC ACTGGCGTCT TCACCACCAT GGAGAAGGCT GGGGCTCATT TGCAGGGGGG
841     AGCCAAAAGG GTCATCATCT CTGCCCCCTC TGCTGATGCC CCCATGTTCC TCATGGGTGG
901     GAACCATGAG AAGTATGACA AAGGCTCAA GATCATCAGC AATGCCTCCT GCACCACCAA
961     CTGCTTAGCA CCCCTGGCCA AGGTCATCCA TGACAACTTT GGTATCGTGG AAGSACTCA
1021    ACCACAGTC CATGCCATCA CTGCCACCCA GAAGACTGTG GATGGCCCCC CCGGGAAACT
1081    GTGGCGTGAT GGCCGCGGGG CTCTCCAGAA CATCATCCCT GCCTCTACTG GCGCTGCCAA
1141    GGCTGTGGGC AAGGTCATCC CTGAGCTGAA CGGGAAGCTC ACTGGCATGG CCTTCCGTGT
1201    CCCCACTGCC AACGTGTCAG TGGTGGACCT GACCTGCCGT CTAGAAAAAC CTGCCAATA
1261    TGATGACATC AAGAAGGTGG TGAAGCAGGC GTCGGAGGGC CCCCTCAAGG GCATCCTGGG
1321    CTACACTGAG CACCAGGTGG TCTCCTCTGA CTTCAACAGC GACACCCACT CCTCCACCTT
1381    TGACGCTGGG GCTGGCATTG CCCGCAACGA CCACCTTGTG AAGGTCATTT CCTGGTATGA
1441    CAACGAATTT GGCTACAGCA ACAGGGTGGT GGACCTCATG GCCCACATGG CCTGCAAGSA
1501    GTAAGaccce tggaccacca gccccagcaa gacacaaga ggaagagaga gaccctcact
1561    gctggggagt cctggccaca ctgctccc caccacactg aatctccct cctcaggtt
1621    gccatgtaga ccccttgaag aggggagggg cctaggggag cgcacttgt catgactca
1681    GAACAAGTGA cctgtgctc aacca-3'

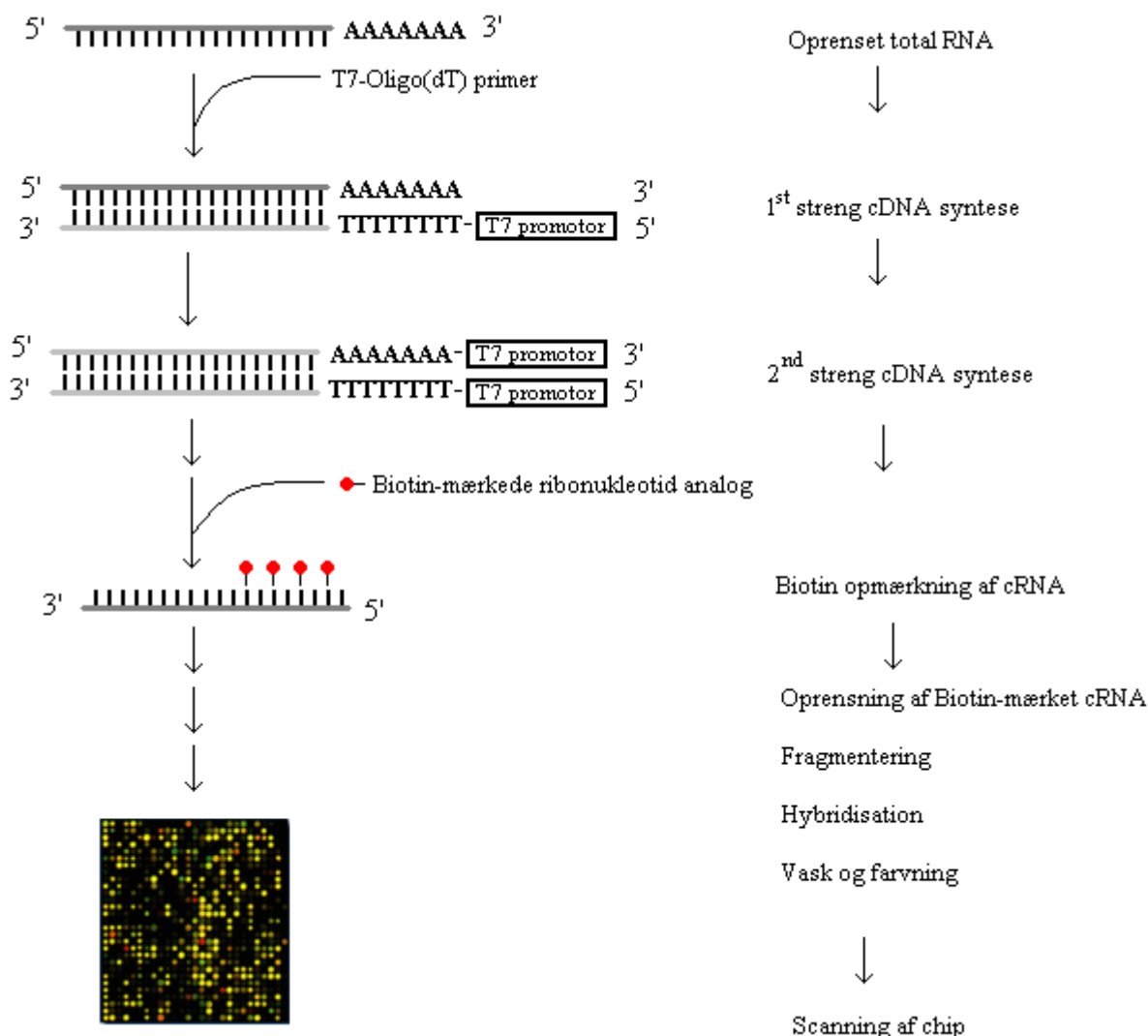
```

(PubMed, GAPDH, 2008)

BILAG B: Opmærkning af mRNA til analyse med DNA-chip

En DNA-chip er et stærkt værktøj til brug ved genekspressionsprofilering, da metoden muliggør, at genekspressionsniveauet for tusindvis af gener kan betragtes samtidig. Inden en prøve kan analyseres på en DNA-chip, skal prøven opmærkes. Dette gøres dels for at sikre, at signaler fra analyse af chippen udelukkende stammer fra mRNA, og dels for at kunne kende signaler fra syge celler fra signaler fra raske celler.

På figuren nedenfor er princippet bag opmærkningen af en prøve illustreret. På figuren bemærkes det, at det kun er muligt at opmærke mRNA, da mRNA, som den eneste type af RNA, har en poly(A) hale. Da der benyttes en Oligo(dT) primer til at syntetisere cDNA, vil der ikke kunne syntetiseres DNA fra RNA-fragmenter, der ikke har en poly(A) hale.



Figur 22. Princippet bag opmærkning af mRNA til analyse med DNA-chip. Frit efter Affymetrix, 2007.

Analyse på DNA-chip kræver, at det benyttede RNA er af høj kvalitet. Dette er et problem i forbindelse med analyse af FFPE-væv, der yderligere typisk har mistet poly(A) halen.

BILAG C: Procedure for prøveudtag

Apparatur:

HM440E Microm, Microm, Waldorf, Tyskland

Materialer:

FFPE-vævsprøver

Fremgangsmåde:

1. Indstil mikrotomen så FFPE-vævsprøven ligger så plant som muligt.
2. Trim blokken med snit af 10 µm.
3. Efter trimning kasseres de første 4 snit.
4. To snit af 20 µm snittes af blokken og føres forsigtigt til en 2 ml Eppendorf rør med klik-låg med en pincet renset i RNase Away.
5. Røret lukkes og placeres straks i flydende kvælstof.
6. Efter alle prøver er skåret og snap frosset, opbevares prøver ved -80 °C til oprensning.
7. Prøverne markeres numerisk efterfulgt af dato for udskæring.

BILAG D: Procedure for analyse på NanoDrop

Apparatur

ND-1000 NanoDrop, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA

Materialer:

HPLC-grade H₂O, Merck & CO Inc, Whitehouse Station, NJ, USA

Fremgangsmåde:

1. Start programmet op og tilføj 1 µl HPLC-grade H₂O til detektoren.
2. Vælg program til analyse af RNA
3. Sæt blank med HPLC-grade H₂O.
4. Analysér 1 µl kontrolprøve med rent HPLC-grade H₂O som første prøve.
5. . Mellem hver prøve aftørres detektoren med linsepapir
6. Tilføj detektoren 1 µl prøve.
7. Afslut med endnu en kontrolprøve bestående af HPLC-grade H₂O.

BILAG E: Protokol til fremstilling af 2 % Agarose-gel

Apparatur:

Varmeplade

Vægt

Gelkar og støbekar

Materialer:

Agarose SeaKem GTG, Cambrex Bioscience Rockland Inc, Basel, Switzerland

10x TBE buffer, Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, UK

Ethidium Bromid Solution [10 g/l], Bio-Rad Laboratories, København, Danmark

Fremgangsmåde:

1. Afvej 2 g agarose og overfør den afvejede mængde til en 250 ml bluecap flaske.
2. Lav 100 ml 1 x TBE buffer ud fra 10 x TBE buffer stamopløsning og tilsæt det agarosen.
3. Smelt agarosen på en varmeplade under omrøring.
4. Efter agarosen synligt er smeltet afkøles gelen til ca. 50 °C, hvorefter der tilsættes 5 µl ethidium bromid [10 g/l] i stinkskebuet.
5. Gelen overføres til et støbekar med et relevant antal tænder, hvor gelen stivner i løbet af ca. 15 minutter.
6. Dæk gelen med 1 x TBE buffer (ca. 300 ml).

BILAG F: Protokol for oprensning af total RNA med MasterPure RNA Purification Kit

Apparatur:

5424 Microcentrifuge, Eppendorf Ag, Hamburg, Tyskland

5810R Refrigerated centrifuge, Eppendorf Ag, Hamburg, Tyskland

VWR heatblock (digital), VWR International ApS, Rødovre, Danmark

Materialer:

MasterPure RNA Purifications Kit, Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA.

75 % ethanol

Isopropanol

Fremgangsmåde:

1. Optø et rør med 2 FFPE-snit på 20 µm fra -80 °C fryseren.
2. Lav en opløsning pr. prøve bestående af 2 µl *proteinase K* (50 g/l) og 300 µl *Tissue and cell Lysis solution*.
3. Tilsæt 300 µl af opløsningen til hver prøve.
4. Inkubér prøven ved 65 °C i 30 minutter.
5. Placér prøven på is i 3-5 minutter.
6. Tilsæt 175 µl *MPC Precipitation Reagent* til prøven og votex i 10 sekunder.
7. Centrifuger prøven i 10 minutter ved 12.000 g.
8. Overfør supernatanten til et rent rør og kassér bundfaldet.
9. Tilføj 500 µl isopropanol til supernatanten og bland ved at vende røret 30-40 gange.
10. Centrifuger opløsningen i 10 minutter ved 12.000 g ved 4 °C.
11. Hæld forsigtigt isopropanolen fra pellet.
12. Fremstil 200 µl DNase I-opløsning per prøve bestående af 5 µl *RNase-frit DNase I*, der fortyndes op til et volumen på 200 µl med 1 x *DNase buffer*.
13. Genopløs pellet fuldstændig i 200 µl DNase I-opløsning.
14. Inkubér prøven i 30 minutter ved 37 °C.
15. Tilsæt 200 µl 2 x *T and C Lysis solution* og votex i 5 sekunder.
16. Tilsæt 200 µl *MPC Protein Precipitation Reagent*, votex i 10 sekunder og placér prøven på is i 3-5 minutter.
17. Centrifuger prøven i 10 minutter ved 12.000 g.
18. Overfør supernatanten til et rent rør og kassér bundfaldet.
19. Tilføj 500 µl isopropanol til supernatanten og bland ved at vende røret 30-40 gange.
20. Centrifuger opløsningen i 10 minutter ved 12.000 g ved 4 °C.
21. Hæld forsigtigt isopropanolen fra pellet.
22. Rens prøven to gange med 75 % ethanol. Vær forsigtig så pellet ikke løsnes. Skulle pellet løsne sig, centrifugeres kort.
23. Fjern alt ethanol med en pipette.
24. Genopløs RNA i 20 µl *TE buffer*.
25. Tilsæt 1 µl *ScriptGuard RNase Inhibitor*.
26. Udtag 3 µl aliquot til et separat rør og frys straks prøven ved -20 °C.
27. Frys straks det resterende oprensede RNA og opbevar den ved -80 °C til videre analyse.

BILAG G: Modificeret protokol for oprensning af RNA med MasterPure RNA Purification Kit (forlænget proteinase K inkubering)

Apparatur:

Uændret i forhold til original protokol

Materialer:

MasterPure RNA Purifications Kit, Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA

Xylen

100 % ethanol

75 % ethanol

Proteinase K [60 g/l]

Isopropanol

Fremgangsmåde:

1. Optø et rør med 2 FFPE-snit på 20 µm fra -80 °C fryseren.
2. Tilsæt 1 ml ren xylen til prøven og votex i 10 sekunder.
3. Centrifuger prøven ved 14.000 rpm i 2 minutter.
4. Fjern supernatanten med en pipette uden at fjerne pellet.
5. Tilsæt 1 ml 100 % ethanol til pellet og votex prøven
6. Centrifuger ved 14.000 rpm i 2 minutter.
7. Fjern supernatanten med en pipette uden at fjerne noget af pellet.
8. Inkuber prøven med åben låg ved rumtemperatur til alt ethanol er fordampet. Inkuber i minimum 10 minutter.
9. Lav en opløsning pr. prøve bestående af 60 µl *proteinase K* (60 g/l) og 540 µl *Tissue and cell Lysis solution*.
10. Tilsæt 600 µl af opløsningen til hver prøve.
11. Inkubér prøven ved 65 °C i 20 timer.
12. Placér prøven på is i 3-5 minutter.
13. Tilsæt 175 µl *MPC Precipitation Reagent* til prøven og votex i 10 sekunder.
14. Centrifuger prøven i 10 minutter ved 12.000 g.
15. Overfør supernatanten til et rent rør og kassér bundfaldet.
16. Tilføj 500 µl isopropanol til supernatanten og bland ved at vende røret 30-40 gange.
17. Centrifuger opløsningen i 10 minutter ved 12.000 g ved 4 °C.
18. Hæld forsigtigt isopropanolen fra pellet.
19. Fremstil 200 µl DNase I-opløsning per prøve bestående af 5 µl *RNase-frit DNase I*, der fortyndes op til et volumen på 200 µl med *1 x DNase buffer*.
20. Genopløs pellet fuldstændig i 200 µl DNase I-opløsning.
21. Inkubér prøven i 30 minutter ved 37 °C.
22. Tilsæt 200 µl *2 x T and C Lysis solution* og votex i 5 sekunder.
23. Tilsæt 200 µl *MPC Protein Precipitation Reagent*, votex i 10 sekunder og placér prøven på is i 3-5 minutter.
24. Centrifuger prøven i 10 minutter ved 12.000 g.
25. Overfør supernatanten til et rent rør og kassér bundfaldet
26. Tilføj 500 µl isopropanol til supernatanten og bland ved at vende røret 30-40 gange.
27. Centrifuger opløsningen i 10 minutter ved 12.000 g ved 4 °C.
28. Hæld forsigtigt isopropanolen fra pellet.
29. Rens prøven to gange med 75 % ethanol. Vær forsigtig så pellet ikke løsnes. Skulle pellet løsne sig, centrifugeres kort.
30. Fjern alt ethanol med en pipette.
31. Genopløs RNA i 20 µl *TE buffer*.
32. Tilsæt 1 µl *ScriptGuard RNase Inhibitor*.
33. Udtag 3 µl aliquot til et separat rør og frys straks prøven ved -20 °C.
34. Frys straks det resterende oprensede RNA og opbevar den ved -80 °C til videre analyse.

BILAG H: Protokol for oprensning af total RNA med Qiagen RNeasy FFPE Kit

Apparatur:

5424 Microcentrifuge, Eppendorf Ag, Hamburg, Tyskland

VWR MS2 Minishaker, VWR International ApS, Rødovre, Danmark

VWR heatblock (digital), VWR International ApS, Rødovre, Danmark

Materialer:

Qiagen RNeasy FFPE Kit, Qiagen Denmark, Ballerup, Danmark

Xylen

100 % ethanol

Fremgangsmåde:

1. Optø et rør med 2 FFPE-snit på 20 µm fra -80 °C fryseren.
2. Tilsæt 1 ml ren xylen til prøven og votex i 10 sekunder.
3. Centrifuger prøven ved 14.000 rpm i 2 minutter.
4. Fjern supernatanten med en pipette uden at fjerne pellet.
5. Tilsæt 1 ml 100 % ethanol til pellet og votex prøven
6. Centrifuger ved 14.000 rpm i 2 minutter.
7. Fjern supernatanten med en pipette uden af fjerne noget af pellet.
8. Inkuber prøven med åben låg ved rumtemperatur til alt ethanol er fordampet. Inkuber i minimum 10 minutter.
9. Genopløs pellet i 150 µl PKD-buffer.
10. Tilsæt 10 µl proteinase K og votex prøven.
11. Inkuber prøven ved 55 °C i præcis 15 minutter.
12. Inkuber prøven ved 80 °C i præcis 15 minutter.
13. Tilsæt 320 µl RBC buffer og mix lysatet grunding.
14. Overfør prøven til en gDNA Eliminator Spin kolonne (lilla) og centrifuger prøven ved 12.000 rpm. i 30 sekunder. Gem væsken og smid kolonnen væk.
15. Er alt væsken ikke passeret kolonnen, gentages trin 14.
16. Tilsæt den gennemløbne væske 720 µl 100 % ethanol og bland opløsningen med pipetten.
17. Overfør 700 µl prøve (med bundfald) til en RNeasy MinElute spin kolonne (lyserød).
18. Luk forsigtigt låget og centrifuger prøven ved 12.000 rpm i 15 sekunder. Smid væsken væk og gem kolonnen.
19. Overfør den resterende prøve til samme kolonne og centrifuger igen ved 12.000 rpm i 15 sekunder. Smid væsken væk og gem kolonnen.
20. Tilføj 500 µl RPE-buffer til kolonnen og centrifuger kolonnen ved 12.000 rpm i 15 sekunder. Smid væsken væk og gem kolonnen.
21. Tilføj 500 µl RPE-buffer til kolonnen og centrifuger igen ved 12.000 rpm i 2 minutter.
22. Flyt forsigtigt kolonnen over i et nyt 2 ml rør uden låg uden at kolonnen kommer i kontakt med den gennemløbne væske.
23. Åben låget på kolonnen og centrifuger kolonnen ved 14.000 rpm i 5 minutter. Vær opmærksom på lågenes placering i centrifugen. Smid opsamlingsrøret med væske væk og gem kolonnen.
24. Placér kolonnen til et 1,5 ml Eppendorf rør og tilsæt 25 µl RNase-frit H₂O direkte på kolonnens membran. Luk forsigtigt låget og centrifuger prøven ved 14.000 rpm i 1 minut.
25. Den gennemløbne væske pipetteres igen over kolonnen og centrifugeres igen ved 14.000 rpm i 1 minut.
26. Udtag 3 µl aliquot til et separat Eppendorf rør og frys straks prøven ved -20 °C.
27. Frys straks det resterende oprensede RNA og opbevar den ved -80 °C til videre analyse.

BILAG I: Modificeret protokol for oprensning af RNA med Qiagen RNeasy FFPE Kit (forlænget proteinase K inkubering)

Apparatur:

Uændret i forhold til original protokol.

Materialer:

Uændret i forhold til original protokol

Fremgangsmåde:

1. Optø et rør med 2 FFPE-snit på 20 µm fra -80 °C fryseren.
2. Tilsæt 1 ml ren xylen til prøven og votex i 10 sekunder.
3. Centrifuger prøven ved 14.000 rpm i 2 minutter.
4. Fjern supernatanten med en pipette uden at fjerne pellet.
5. Tilsæt 1 ml 100 % ethanol til pellet og votex prøven
6. Centrifuger ved 14.000 rpm i 2 minutter.
7. Fjern supernatanten med en pipette uden af fjerne noget af pellet.
8. Inkuber prøven med åben låg ved rumtemperatur (alternativt ved 37 °C) til alt ethanol er fordampet. Inkuber i minimum 10 minutter.
9. Genopløs pellet i 150 µl PKD-buffer.
10. Tilsæt 10 µl proteinase K og votex prøven.
11. Inkuber prøven ved 55 °C i 20 timer.
12. Inkuber prøven ved 80 °C i præcis 15 minutter.
13. Tilsæt 320 µl RBC-buffer og mix lysatet grunding.
14. Overfør prøven til en gDNA Eliminator Spin kolonne (lilla) og centrifuger prøven ved 12.000 rpm. i 30 sekunder. Gem væsken og smid kolonnen væk.
15. Er alt væsken ikke passeret kolonnen, gentages trin 14.
16. Tilsæt den gennemløbne væske 720 µl 100 % ethanol og bland opløsningen med pipetten.
17. Overfør 700 µl prøve (med bundfald) til en RNeasy MinElute spin kolonne (lyserød).
18. Luk forsigtigt låget og centrifuger prøven ved 12.000 rpm i 15 sekunder. Smid væsken væk og gem kolonnen.
19. Overfør den resterende prøve til samme kolonne og centrifuger igen ved 12.000 rpm i 15 sekunder. Smid væsken væk og gem kolonnen.
20. Tilføj 500 µl RPE-buffer til kolonnen og centrifuger kolonnen ved 12.000 rpm i 15 sekunder. Smid væsken væk og gem kolonnen.
21. Tilføj 500 µl RPE buffer til kolonnen og centrifuger igen ved 12.000 rpm i 2 minutter.
22. Flyt forsigtigt kolonnen over i et nyt 2 ml rør uden låg uden at kolonnen kommer i kontakt med den gennemløbne væske.
23. Åben låget på kolonnen og centrifuger kolonnen ved 14.000 rpm i 5 minutter. Vær opmærksom på lågenes placering i centrifugen. Smid opsamlingsrøret med væske væk og gem kolonnen.
24. Placér kolonnen til et 1,5 ml Eppendorf rør og tilsæt 25 µl RNase-frit H₂O direkte på kolonnens membran. Luk forsigtigt låget og centrifuger prøven ved 14.000 rpm i 1 minut.
25. Den gennemløbne væske pipetteres igen over kolonnen og centrifugeres igen ved 14.000 rpm i 1 minut.
26. Udtag 3 µl aliquot til et separat rør og frys straks prøven.
27. Frys straks det resterende oprensede RNA og opbevar den ved -80 °C til videre analyse.

BILAG J: cDNA syntese med SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix

Apparatur:

GS1 PCR Thermal Cycler (G-storm), Gene technologies Ltd, Rayne, Essex, UK

Materialer:

SuperScript III First-strand Synthesis SuperMix, Invitrogen A/S, Taastrup, Danmark

HPLC-grade H₂O

Fremgangsmåde:

1. Beregn mængden af RNA, der skal tilsættes for at tilsætte 1 µg total RNA ud fra $\frac{1000}{\text{konc. af prøve}} = \text{antal } \mu\text{l}$.
2. Beregn hvor mange µl vand, der skal tilsættes. Summen af vand og total RNA skal give 6 µl.
3. Tilsæt det beregnede antal µl total RNA til hver brønd i PCR-pladen.
4. Tilsæt 1 µl H₂O til NT-kontrollen.
5. Lav et mix af 1 µl af alle prøverne.
6. Tilsæt 1 µl af prøvemixet til No RT-kontrollen
7. Tilsæt det beregnede antal µl H₂O til alle prøverne.
8. Tilsæt 5 µl H₂O til NT- og No RT-kontrollen.
9. Lav et mix af Annealing buffer og primer bestående af 1 µl af hver pr. prøve samt til kontrollerne.
10. Tilsæt 2 µl af Annealing/Primer mixet til alle prøver samt til NT- og No RT-kontrollen
11. Inkuber PCR-pladen i Thermal Cycler i 5 minutter ved 65 °C.
12. Placer efterfølgende straks pladen på is i minimum 1 minut.
13. Centrifuger prøven kort.
14. Placer fortsat pladen på is.
15. Tilsæt 10 µl 2X First-strand Reaction Mix til alle prøver samt til de negative kontroller.
16. Tilsæt 2 µl Enzym mix til alle prøver samt NT-kontrollen.
17. Tilsæt 2 µl HPLC-grade H₂O til No RT-kontrollen.
18. Vortex kort prøven og centrifuger efterfølgende kort.
19. Inkuber pladen:
For Oligo(dT) Primer: 50 minutter ved 50 °C.
20. Inkuber prøven i 5 minutter ved 85 °C.
21. Afkøl prøven på is inden den enten nedfryses ved -20 °C eller fortsættes direkte til Q-PCR

BILAG K: Protokol til analyse på Agilent Bioanalyzer

Apparatur:

2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

VWR galaxy mini bordcentrifuge, VWR International ApS, Rødovre, Danmark

IKA Vortex mixer med chip adaptor, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

Materialer:

Agilent RNA 6000 Nano Reagent Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA





Blåt reagens: RNA Nano Dye Concentrate

Grønt reagens: Agilent RNA 6000 Nano Marker

Rødt reagens: Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix

Gult reagens: Agilent RNA 6000 Ladder

Fremgangsmåde:

1. Tag reagenser ud af køleskabet (blå og grøn), pak dem ind i sølvpapir og lad dem ligge i 30 minutter ved rumtemperatur.
2. I ventetiden laves fortyndinger af prøverne således at RNA-koncentrationen bliver ca. 250 mg/l.
3. Hent en aliquot fra -80 °C fryseren med 1,3 µl størrelsesmarkør (markeret med N IIII). Opbevar størrelsesmarkøren i en isblok indtil brug.
4. Find en filtreret gel i køleskabet indeholdende 65 µl gel (markeret med NANO)
5. Vortex den blå reagens i 10 sek., og spin den ned.
6. Tilsæt 1 µl blå farve til røret med gelen og vortex blandingen godt.
7. Centrifuger opløsningen i 10 minutter ved rumtemperatur og 13.000 g.
8. Læg chippen i primingstationen.
9. Pipetter 9 µl af den centrifugerede gel (gel-dye mix) i brønden markeret med .
10. Tjek at sprøjten står på 1 ml og luk priming stationen.
11. Tryk stemplet ned til den holdes fast af chippen.
12. Vent præcis 30 sek. før chippen slippes igen og stemplet selv glider op.
13. Pipetter 9 µl i brøndene, der er markeret med .
14. Smid resten af den centrifugerede gel væk.
15. Pipetter 5 µl grønt reagens i alle brønde, hvortil der skal tilsættes prøve samt til størrelsesmarkør (markeret med )
16. Pipetter 6 µl grønt reagens til de brønde, hvortil der ikke tilsættes prøve.
17. Denaturér størrelsesmarkør i 2 min. ved 70 °C og tilsæt 1 µl til brønden markeret med .
18. Pipetter 1 µl prøve i hver brønd.
19. Vortex chippen i adapteren i 1 minut ved 2400 rpm.
20. Analysér chippen på Bioanalyzeren indenfor 5 minutter. Husk inden prøveindsættelse at rense bioanalyzeren først med RNase away og så HPLC-grade H₂O.
21. Efter endt analyse renses bioanalyzeren igen med RNase away og HPLC-grade H₂O.

BILAG L: Protokol til 3'/5'-forhold med β -actin som endogen kontrol

Apparatur:

GS1 PCR Thermal Cycler (G-storm), Gene technologies Ltd, Rayne, Essex, UK
High performance ultraviolet transilluminator, Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK
BIO RAD PowerPac Basic, Bio-Rad Laboratories, København, Danmark

Materialer:

Brilliant Q-PCR Master Mix, Stratagene, La Jolla, CA, USA
Forward primer, DNA Technology A/S, Århus, Danmark
Revers primer, DNA Technology A/S, Århus, Danmark
HPLC-grade H₂O, Invitrogen A/S, Taastrup, Danmark
2 % agarose-gel
Sample Loading buffer, Bio-Rad Laboratories, København, Danmark
Quick-Load 100 bp DNA ladder, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

Fremgangsmåde:

1. Fremstil et mastermix i pre-PCR rummet bestående pr. prøve af:
 - 5,5 μ l HPLC-grade H₂O
 - 12,5 μ l TaqMan Universal PCR MasterMix (2X) (without AmpErase UNG)
 - 2,5 μ l forward primer [3 μ M]
 - 2,5 μ l revers primer [3 μ M]
2. Ved mere end to prøver laves lidt ekstra mastermix (beregnet 7 % ekstra)
3. Bland mastermixet i den rækkefølge reaktanterne er præsenteret.
4. Tilsæt 23 μ l mastermix til hvert PCR-rør
5. Tilsæt 2 μ l cDNA til hver prøve.
6. Fortynd RNA i forholdet 1:30
7. Tilsæt 2 μ l fortyndet RNA til hver af de negative RNA-kontroller.
8. Tilsæt 2 μ l HPLC-grade H₂O til NT-kontrollen.
9. Luk rørene meget omhyggeligt (brug bunden af en tusch), opbland prøverne og centrifuger prøverne kort.
10. Sæt prøverne i G-storm PCR'en og kørs 3' primerparret prøverne i 35 cykler med en annealing temperatur på 57 °C og 5' primerparret prøverne i 40 cykler med en annealing temperatur også på 57 °C.
11. Efter PCR-programmet loades 8 μ l prøve med 2 μ l loading buffer på en 2 % agarosegel.
12. Tilsæt 8 μ l marker til en af brøndene i hver række.
13. Tilslut gelen en strømkilde ved 100 V og lad den stå i ca. 45 minutter.
14. Gelen undersøges efterfølgende i en High performance ultraviolet transilluminator.

BILAG M: Protokol for GeneChip Expression Analysis

Apparatur:

GS1 PCR Thermal Cycler (G-storm), Gene technologies Ltd, Rayne, Essex, UK

Materialer:

GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit, Affymetrix Inc.

100 % Ethanol, Sygehus apoteket, Danmark

80 % Ethanol, Sygehus apoteket, Danmark

DEPC-behandlet H₂O, Invitrogen A/S, Taastrup, Danmark

Fremgangsmåde:

1. Tilsæt 2 µl Poly-A Control Stock til 38 µl Poly-A Control Dil Buffer for at fremstille første fortynding (1:20).
2. Mix opløsningen grundigt og centrifuger kort.
3. Tilsæt 2 µl af den første fortynding til 98 µl Poly-A Control Dil Buffer for at fremstille anden fortynding (1:50).
4. Mix opløsningen grundigt og centrifuger kort.
5. Tilsæt 2 µl af den anden fortynding til 8 µl Poly-A Control Dil Buffer for at fremstille tredje fortynding (1:5).
6. Mix opløsningen grundigt og centrifuger kort.
7. Opbland og centrifuger kort alle reagenser inden de bruges.
8. Udtag et antal µl RNA, der svarer til en mængde på 10 µg og overført det til et 0,2 ml PCR-rør.
9. Tilsæt røret 2 µl af den tredje Poly-A RNA kontrol fortynding (1:5).
10. Tilsæt røret 2 µl T7-Oligo(dT) Primer [50 µM].
11. Tilsæt et antal µl DEPC-behandlet H₂O, der resulterer i et total volumen på 11 µl.
12. Flik røret et par gange og centrifuger prøver kort.
13. Inkuber prøven i en G-storm Thermal Cycler PCR i 10 minutter ved 70 °C.
14. Afkøl prøven ved 4 °C i minimum 2 minutter efter inkubering og centrifuger kort.
15. I et separat rør fremstilles et first-strand mastermix pr. prøve i følgende forhold af reaktanter:

4 µl 5x 1st Strand Reaction Mix
2 µl DTT [0,1 M]
1 µl dNTP [10 mM]

16. Flik mastermixet et par gange og centrifuger mastermixet kort.
17. Opbevar prøven på is under hele behandlingen indtil IVT reaktionen.
18. Tilsæt hver prøve 7 µl mastermix.
19. Flik prøven og centrifuger den kort.
20. Placer straks prøven i en G-storm Thermal Cycler PCR ved 42 °C i 2 minutter.
21. Tilsæt prøven 2 µl SuperScript II.
22. Flik prøven et par gange og centrifuger kort.
23. Placer straks prøven i en G-storm Thermal Cycler PCR ved 42 °C i 1 time.
24. Afkøl prøven til 4 °C i minimum 2 minutter efter inkuberingen og centrifuger efterfølgende prøven kort.
25. I et separat rør fremstilles et second-strand mastermix pr. prøve i følgende forhold af reaktanter:

91 µl DEPC-behandlet H₂O
30 µl 5X 2nd Strand Reaction Mix
3 µl dNTP [10 mM]
1 µl *E. Coli* DNA ligase
4 µl *E. Coli* DNA-Polymerase I
1 µl RNase H

26. Flik mastermixet et par gange og centrifuger kort.
27. Tilsæt 130 µl af second-Strand mastermixet til hver prøve.
28. Flik prøven et par gange og centrifuger kort.
29. Inkuber prøven i en G-storm Thermal Cycler PCR ved 16 °C i 2 timer.
30. Tilsæt prøven 2 µl T4 DNA-Polymerase til hver prøve og inkuber yderligere i 5 minutter ved 16 °C.
31. Tilsæt 10 µl EDTA [0,5 M] til prøven efter inkuberingen.
32. Tilsæt prøven 600 µl cDNA Binding Buffer og mix prøven med en votexer i 3 sekunder.

33. Tjek at prøvens farve er gul og ikke orange eller lilla.
34. Tilsæt 500 µl af prøven til en cDNA Cleanup Spin kolonne i et 2 ml opsamlingsrør og centrifuger kolonnen ved 12.000 rpm i 1 minut.
35. Smid den gennemløbne væske væk og gem kolonnen.
36. Overfør resten af prøven til samme kolonne og centrifuger den igen ved 12.000 rpm i 1 minut.
37. Smid den gennemløbne væske væk og overfør kolonnen til et nyt 2 ml opsamlingsrør.
38. Pipetter 750 µl cDNA Wash Buffer over kolonnens membran og centrifuger i 1 minut ved 12.000 rpm.
39. Smid den gennemløbne væske væk.
40. Åben kolonnens låg og centrifuger den åbne kolonne i 5 minutter ved 14.000 rpm. Vær opmærksom på lågenes placering i centrifugen.
41. Smid den gennemløbne væske væk og overfør kolonnen til et nyt 1,5 ml opsamlingsrør.
42. Pipetter 14 µl cDNA elution Buffer direkte ned på kolonnens membran.
43. Inkuber kolonnen ved rumtemperatur i 1 minut.
44. Centrifuger kolonnen ved maksimal omdrejninger i 1 minut.
45. Opbevar ikke længere prøven på is.
46. I et separat rør fremstilles i IVT reaktions mastermix pr. prøve i følgende forhold af reaktanter:

Alle 12 µl template cDNA
8 µl DEPC-behandlet H₂O
4 µl 10X IVT Labeling Buffer
12 µl IVT Labeling NTP Mix
4 µl IVT Labeling Enzyme Mix

47. Bland forsigtigt reaktanterne i den præsenterede rækkefølge og centrifuger mixet kort.
48. Tilsæt 40 µl IVT reaktion mastermix til hver prøve og centrifuger kort.
49. Inkuber prøven ved 37 °C i 16 timer.
50. Efter inkubering nedfryses prøven ved -20 °C eller oprenses straks.
51. Udtag 1,5 µl af det uoprensede IVT produkt til senere analyse på bioanalyseren.
52. Tilsæt 60 µl DEPC-behandlet H₂O til prøven med IVT produktet og votex prøven i 3 sekunder.
53. Tilsæt 350 µl IVT cDNA Binding Buffer til prøven og votex i 3 sekunder.
54. Tilsæt 250 µl 100 % ethanol til prøven og bland grundigt ved pipetten. Centrifuger ikke prøven!
55. Overfør prøven til en IVT cRNA Cleanup Spin kolonne i et 2 ml opsamlingsrør og centrifuger kolonnen ved 12.000 rpm i 15 sekunder.
56. Smid den gennemløbne væske og opsamlingsrøret væk.
57. Overfør kolonnen til et nyt 2 ml opsamlingsrør og tilføj kolonnen 500 µl IVT cRNA Wash Buffer.
58. Centrifuger kolonnen ved 12.000 rpm i 15 sekunder og smid efterfølgende den gennemløbne væske væk.
59. Tilføj kolonnen 500 µl 80 % ethanol og centrifuger ved 12.000 rpm i 15 sekunder.
60. Smid den gennemløbne væske væk
61. Åben kolonnens låg og centrifuger ved maksimal hastighed i 5 minutter. Vær opmærksom på lågenes placering.
62. smid den gennemløbne væske og opsamlingsrøret bort og overfør kolonnen til et nyt 1,5 ml opsamlingsrør.
63. Pipetter 11 µl DEPC-behandlet H₂O direkte ned på kolonnens membran og centrifuger kolonnen ved maksimal hastighed i 1 minut.
64. Pipetter yderligere 10 µl DEPC-behandlet H₂O direkte ned på kolonnens membran og centrifuger kolonnen ved maksimal hastighed.
65. Mål fluorescens på det oprensede cRNA med Nanodroppen.
66. Opbevar det oprensede cRNA ved -20 °C indtil kvantificering.

BILAG N: Protokol til 3'/5' forhold med GAPDH som endogen kontrol

Materialer:

TaqMan Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG)
HPLC-grade H₂O
Primere og probe

Apparatur:

Stratagene Mx3000
Centrifuge

Fremgangsmåde:

1. Fortynd primere til et stamopløsning på 10 µM for både forward og revers primer.
2. Fortynd proben til et stamopløsning på 5 µM.
3. Fremstil et mastermix pr. prøve for hvert primerpar bestående af følgende forhold af reaktanter til et total volumen på 19 µl:

7,3 µl HPLC-grade H₂O
10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (No AmpErase UNG)
0,6 µl forward primer
0,6 µl reverse primer
0,5 µl probe

4. Fremstil en tifoldig fortyndingsrække af cDNA fra den humane reference.
5. Overfør 19 µl mastermix til en brønd i en 96-brønns PCR-plade, der er placeret i en isblok. Husk dobbeltbestemmelse.
6. Tilsæt 1 µl cDNA til hver brønd.
7. Fremstil en NT negativ kontrol med 1 µl HPLC-grade H₂O i stedet for cDNA (dobbelbestemmelse)
8. Luk pladen, bland og centrifuger prøverne kort.
9. Analyser straks prøven i Mx'eren

BILAG O: Protokol til TaqMan Gene Expression Assays

Apparatur:

Stratagene MX 3000P, AH diagnostics A/S, Århus, Danmark
5810R Refrigerated centrifuge, Eppendorf Ag, Hamburg, Tyskland

Materialer:

TaqMan Gene Expression Assay
DEPC-behandlet H₂O
TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)

Fremgangsmåde:

1. Fremstil et mastermix i pre-PCR pr. prøve bestående af:
1,0 µl TaqMan Gene Expression Assay (20X)
8,0 µl DEPC Treated H₂O
10,0 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)
 2. Ved mere end to prøver fremstilles lidt ekstra mastermix.
 3. Opbevar mastermixet på is ind til brug efter fremstilling.
 4. Placér en klar 96-brønnsplade i en Eppendorf fryseblok og pipetter 1 µl cDNA i hver brønd.
 5. Tilføj hver brønd 19 µl mastermix.
 6. Forsegl pladen med et låg, omryst pladen og centrifuger pladen kort.
 7. Analysér straks pladen på MX'eren.
-