

Litteratur

1. Lundsteen C, Vejerslev L. Prenatal diagnosis in Denmark. *Eur J Hum Genet* 1997; 5(suppl 1):14-21.
2. Jensen PKA. Kromosomafvigelser hos mennesket. København: CEC Gads Forlag, 1998.
3. Bryndorf T, Lundsteen C, Lamb A et al. Rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies by interphase fluorescence in situ hybridization: a one year clinical experience with high-risk and urgent fetal and post-natal samples. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79:8-14.
4. Kirchhoff M, Rose H, Gerdes T et al. Påvisning af submikroskopiske kromosomfejl med komparativ genomisk hybridisering. *Ugeskr Læger* 2001;163:5652-7.
5. Levett LJ, Liddle S, Meredith R. A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;17:115-8.

»Polymerase chain reaction«-teknikkens anvendelsesmuligheder

STATUSARTIKEL

Lic.scient. Niels Rüdiger

Siden slutningen af 1980'erne er udviklingen i molekylær-biologiske teknikker til undersøgelser af DNA og RNA nærmest eksploderet. Dette skyldes alt overvejende *Karry Mullis* idé i 1983 om anvendelse af DNA-polymeraser til gentagne udbygninger af det dobbeltstrengede DNA-molekyle (*polymerase chain reaction* [PCR]). Ideen anvendt i praksis beskrev *Mullis et al* bl.a. i en artikel i *Nature* i 1986 (1), og den indbragte ham i 1993 nobelprisen i kemi.

Tiden herefter har været hektisk. PCR-teknikken har således haft umådelig stor betydning for kortlægningen af det humane genom. Kloningsarbejder, som før kunne tage fra uger til måneder, kan nu afsluttes på få dage. Teknikken viste på ganske kort tid, at mange års arbejde med at opnå kendskab til DNA, RNA, gener, genstrukturer og genregulering nu stod over for potentielle anvendelsesmuligheder også uden for universiteterne. Det var klart, at denne teknik, hvis den var pålidelig, ville revolutionere hele vort molekylære informationsniveau. Klinikere fik i højere grad mulighed for at relatere variationer i genotypen til fænotypen. Netop enkeltheden i teknikken og den deraf følgende minimale omkostning ved at udføre den, er vel nok en af de alt-overvejende grunde til den eksplosive anvendelse, som PCR-teknikken fik helt fra starten.

Grundlaget for en optimal klinisk udnyttelse er imidlertid et indgående kendskab til arvmassen hos mennesker. Flere gigantiske projekter har været iværksat for at kortlægge menneskets genom, som nu også foreligger. Fordi man i denne kortlægning har beskrevet genernes sekvens base for base, er det muligt forholdsvist enkelt at udvælge et område af arvmassen, som ønskes opformet og analyseret. Opformeringen sker ved anvendelse af to syntetisk fremstillede, små DNA-stykker (*primere*), der flankerer det genområde, som ønskes analyseret. Ved hjælp af en termostabil polymerase kan kopieringen resultere i en fordobling af genområdet mellem primerne for hver gang reaktionen gennemgår en cyklus, der består af 2-3 forskellige temperaturniveauer. Selv om PCR-teknikken forekommer at være

enkel at udføre, er den praktiske anvendelse ofte forbundet med store håndterings-/kontamineringsproblemer. Konsekvensen heraf er, at sensitive, klinisk relevante PCR-analyser kun bør udføres i specialindrettede laboratorier, hvor kontamineringsrisici kan minimeres. Hvis laboratoriet indrettes korrekt fra starten, åbner der sig en verden af muligheder baseret på PCR-teknikken, hvoraf jeg her vil nævne enkelte simple og andre mere avancerede metoder.

PCR-baserede teknikker til påvisning af genvariationer

En af de mest anvendte PCR-baserede genetiske undersøgelser tager udgangspunkt i polymorfe områder i og omkring generne. En genetisk variation siges at være en polymorfi, hvis den i normalbefolkningen forekommer med en hyppighed, der er større end 1%. En type polymorfi kunne eksempelvis være faktor V (Leiden)-mutationen (med en hyppighed på ca. 6,5% i den danske befolkning) (2) eller *variable number of tandem repeat* (VNTR)-sekvenser. Sidstnævnte er korte DNA-sekvenser, der hos forskellige individer ofte forekommer i varierende antal. Sådanne sekvenser kan forekomme såvel i som tæt ved kodende DNA-områder. VNTR-sekvenser anvendes hyppigt til at følge nedarvningsmønstre. Dette sker, ved at PCR opformerer et område, som dækker over en region med VNTR-sekvenser. Forskelle i antallet af VNTR vil resultere i varierende længde af de PCR-opformede DNA-fragmenter. Samme situation gør sig gældende for mutationer, hvor der er sket en deletion (mangler DNA) eller insertion (ekstra DNA), der ligeledes vil medføre DNA-fragmenter, som størrelsesmæssigt adskiller sig fra normale genområder. Størrelsesforskelle i DNA-fragmenter kan erkendes visuelt ved en simpel gelelektroforetisk adskillelse.

Påvisning af kendte punktmutationer/variationer

Mange sygdomsforbundne genmutationer kendes i dag, og for de fleste er det forholdsvist enkelt at opsætte en specifik PCR-baseret analyse for at teste en mutations tilstedeværelse i en given prøve. Design af genspecifikke primere til opformeringen af et DNA-fragment kan f.eks. udformes således, at normalfragmentet i det opformede PCR (DNA)-

fragment efterfølgende kan kløves af et bestemt restriktionsenzym. I analysen for faktor V (Leiden)-mutationen anvendes restriktionsenzymet Mnl I, som kløver normalsekvensen, men ikke faktor V (Leiden)-sekvensen. En homozygot tilstedeværelse af normalfragmentet vil således resultere i en fuldstændig kløvning af de opformerede DNA-fragmenter til to mindre DNA-fragmenter. Hvis derimod kun det muterede gen er til stede, vil ingen af de opformerede fragmenter være kløvede. I de tilfælde, hvor der opformeres DNA fra en heterozygot, vil halvdelen af fragmenterne indeholde mutationen og kun denne halvdel vil blive kløvet af restriktionsenzymet. En gelelektroforetisk undersøgelse af kløvningens fragmenter vil afsløre genotypen for patienten. Disse tre kombinationer er vist i **Fig. 1**, som illustrerer undersøgelse for faktor V (Leiden)-mutationen. Af kvalitetsmæssige årsager anvendes som vist et kontrolkløvningsted. I dette tilfælde er de anvendte primere designet til at opformere et område, der dækker såvel Faktor V (Leiden)-mutationen, som et naturligt forekommende kløvningsted for restriktionsenzymet Mnl I. Uanset gensammensætningen vil dette sted blive kløvet af restriktionsenzymet Mnl I. Herved opnås en sikkerhed for, at det anvendte enzym er aktivt, hvilket er en altafgørende forudsætning for analysen. Hvis et internt kontrolkløvningsted ikke findes, kan et sådant indsættes i DNA-fragmentet via de anvendte PCR-primere.

Allelspecifik hybridisering

En anden af de forholdsvis simple PCR-baserede undersøgelser tager udgangspunkt i en hybridisering mellem det PCR-opformerede DNA-fragment og en eller flere prober. Proberne er mærket med en fluorochrom, som efterfølgende kan detekteres i en række forskellige udstyr. Hybridiseringsforholdene, som i al væsentlighed er baseret på tilpassede salt- og temperaturbetingelser, resulterer i, at prober kun vil hybridisere til det opformerede DNA, hvis alle probens baser er involveret i en baseparring med prøvematerialet. I praksis ville man også kunne anvende denne metode til påvisning af faktor V (Leiden). Metoden anvendes i meget vid udstrækning til påvisning af enkeltbasevariationer (*single nucleotide polymorphism* [SNP]). I modsætning til den ovenfor anførte metode, der involverer et restriktionsenzym, ændres strukturen af det opformerede DNA ikke under denne analyse, hvilket gør det muligt at foretage flere SNP-analyser på samme DNA. SNP-assay anvendes ofte til analyse af større prøvematerialer for tilstedeværelse af kendte sygdomsrelaterede genpolymorfier. SNP-assays søges i dag automatiseret ved anvendelse af udstyr, med hvilket man såvel kan regulere hybridiseringsbetingelserne som foretage de kolorimetriske aflæsninger. Det gælder bl.a. udstyr som *melting curve analysis* (MCA) fra Hybaid, som er designet til at hybridisere og monitorere SNP-analyser, der er foretaget i titerbakker. Andre mere avancerede f.eks. *quantitative PCR* (QPCR)-maskiner kan bringes til at udføre såvel PCR-opformeringen som den efterfølgende SNP-detektion.

Ud over at finde anvendelse i beskrivelsen af forbindelser mellem forskellige SNP'er og arvelige sygdomme, anvendes

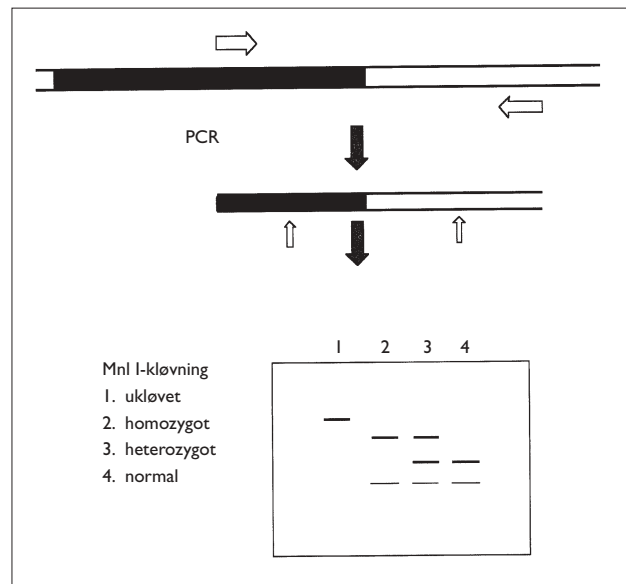


Fig. 1. Genetisk analyse for forekomsten af faktor V (Leiden)-mutationen. Opformering ved hjælp af faktor V-genområde ved brug af to primere. Området, der er markeret med sort, svarer til en kodende region (exon) af Faktor V-genet, mens den øvrige del svarer til en ikkekodende region (intron). Lodrette pile viser kløvningsteder i normalt DNA. Faktor V (Leiden)-mutationen ændrer ved baseændring kløvningsmønstret i den kodende region. Kløvningstedet i den ikkekodende region er medtaget som kontrol af restriktionsenzymets kløvningseffektivitet.

SNP-analyser i visse lande også inden for retsgenetikken. Her undersøges forekomsten af et mindre antal SNP'er hos de involverede/mistænkte individer, og på basis af prævalensen af de undersøgte SNP'er i befolkningen kan sandsynligheden for en sammenhæng mellem to prøver beskrives.

Monitorering af genaktivitet ved hjælp af PCR

Blandt de mest hotte anvendelsesområder for PCR er *real-time reverse transcriptase-PCR* (RT-PCR). RT-PCR tager udgangspunkt i mRNA, som ved anvendelse af enzymet revers transkriptase kopieres til DNA, der herefter anvendes som udgangspunkt for en PCR-opformering. Ved at optimere reaktionsbetingelserne kan denne metode gøres kvantitativ, hvorved det er muligt at bestemme mængden af mRNA i udgangsmaterialet. I dag findes en vifte af såkaldte QPCR-maskiner, hvoraf man med flere har muligheden for at kvantificere forekomsten af mere end en mRNA pr. reaktion via en såkaldt multiplex-PCR. Denne adskiller sig fra den nævnte RT-PCR, ved at reaktionsblandingen bl.a. indeholder primere til opformering af op til fire forskellige genprodukter. Kvantificeringen foregår ved at addere genspecifikke prober med hver sin mærkning. QPCR-maskiner monitorerer fluorescenssignalet for hver af de adderede prober som udtryk for mængden af de opformerede produkter. Den store udfordring ved at anvende multiplex-PCR er optimeringen af reaktionsbetingelserne til at kunne give kvantitative resultater. Det vil ofte være en god idé at bruge lidt tid på at besøge en af de mange *bulletin boards*, som eksisterer på internettet (f.eks. qpcrlistserver@yahoo.com), hvor både brugere og leverandører deltager i rådgivning.

Anvendelse af prober til SNP-detektion og i *real time*-PCR (realtidsmonitorering af mængden af opformet DNA) har betydet en kraftig udvikling af nye fluorokromer til anvendelse inden for dette felt. Fordi såvel anvendelsesområderne, sensitiviteten som prisen på disse fluorokromer varierer meget, er det ved opstart af nye projekter relevant at foretage en nøje vurdering af de ønskede behov. Det bør overvejes, dels hvilke applikationer udstyret skal og forventes at skulle anvendes til, dels hvilke fluorokromer som kan bruges til dette formål, og sidst om sensitivitet og pris pr. analyse er realistisk. Disse centrale elementer vil endvidere være en nyttig hjælp ved valg af en QPCR-maskine. I øvrigt henvises til oversigtsartiklen af S.A. Bustin (3), der for nylig har resumeret en lang række aspekter inden for RT-PCR og valg af udstyr.

PCR som del af en diagnostisk metode

DNA- og RNA-diagnostiske undersøgelser baseres i vidt omfang på anvendelse af PCR-teknikken. Dette skyldes, at teknikken kan bringes til at have høj såvel specificitet som sensitivitet. Det faktum, at sensitiviteten er baseret på en enzymatisk opformering af et specifikt DNA-fragment, er også grunden til, at metoden er yderst følsom over for kontaminerende prøvematerialer. Kontaminerende DNA skyldes alt overvejende omformet DNA, der overføres via aerosolpartikler, og uhensigtsmæssig arbejdsgang i laboratoriet. Som udgangspunkt kræver anvendelsen af PCR-teknikken til diagnostiske formål et indgående kendskab til design af primere, prober og metodeparametre foruden metoder til korrekt oprensning og behandling af prøvematerialer. Valget af den korrekte termostabile polymerase er en del af PCR-videnskaben. Mere end 30 forskellige termostabile polymeraser giver mulighed for at optimere analysernes sensitivitet og specificitet. Eksempelvis findes der termostabile polymeraser, som først aktiveres efter et længere opvarmningstrin ved 92 grader. Herved minimeres risikoen for, at de tilsatte primere indgår i en DNA-udbygning med hinanden. Andre termostabile polymeraser er specielt velegnede til opformering af GC-rige DNA-områder, til at kopiere lange DNA-fragmenter eller til at kopiere DNA korrekt. Sidstnævnte sker ved anvendelse af en enzymatisk »korrekturlæsning«.

Fremtiden er i gang

Overbygningen til PCR-teknikken er implementeret i flere førende danske laboratorier. Det drejer som om den såkaldte *chip-array*-teknologi. Denne teknologi gør det eksempelvis muligt at screene en enkelt patient for et stort antal kendte mutationer (*SNP-array*), screene for genaktiviteten for tusindvis af gener i f.eks. tumorer og sammenholde dette billede med tilsvarende analyser fra normalt væv. Firmaet Affymetrix var først med udviklingen af et *high throughput system* (www.affymetrix.com). Firmaet sælger færdigdesignede *arrays* til disse formål. I efterfølgende verificerende/diagnostiske undersøgelser anvendes i højere grad andre *array*-platforme. En af disse er Nanogen. Nanogen har udviklet et andet genialt *array*-system, som giver brugeren den fulde fleksibilitet til at foretage SNP-analyser, påvisning af ukendte mutationer i store DNA-fragmenter (4) og påvis-

ning af DNA-protein-interaktioner m.m. Den principielle forskel mellem disse to udstyr består primært i, at mens man med Affymetrix' *chip-array* foretager mange undersøgelser på et prøvemateriale, så muliggør *chip-array*'et fra Nanogen relativt få undersøgelser, men på mindst 100 forskellige prøvematerialer (www.nanogen.com).

Microarray-markedet er meget stort, og yderligere oplysninger kan med fordel hentes på internettet (f.eks. www.Gene-Chips.com) for en mere fuldstændig beskrivelse af markedet i relation til de foreliggende behov.

Summary

Niels Rüdiger: The applications of the polymerase chain reaction technique.

Ugeskr Læger 2003;165:783-5.

Our knowledge of genes and genetic diseases has increased tremendously since the polymerase chain reaction technique (PCR) was introduced as a technique in molecular biology. The technique has become a critical tool for basic research, molecular biology, and biotechnology. PCR has been the link between science and molecular biology as a diagnostic tool. High sensitivity within a short time and low labour cost have been the key elements for the success of PCR. Furthermore, combinations with other techniques in molecular biology have opened up for still new perspectives as e.g. fluorescence-based real-time reverse transcription PCR (RT-PCR). In addition to providing a snapshot of the state-of-the-art applications of PCR, a look is made into the new DNA-microarray era.

Reprints: Niels Rüdiger, AH Diagnostics, Runetoften 18, DK-8210 Århus V.

Antaget den 20. januar 2003.
AH Diagnostics, Århus.

Litteratur

1. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT et al. Nature 1986;324:163-6.
2. Larsen TB, Lassen JF, Brandslund I et al. The Arg506Gln mutation (FV Leiden) among a cohort of 4188 unselected Danish newborns. Thromb Res 1998;89:211-5.
3. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol 2002;29:23-39.
4. Behrendorf HA, Pignot M, Windhab N et al. Rapid parallel mutation scanning of gene fragments using a microelectronic protein-DNA chip format. Nucleic Acids Res 2002;30:e64.