



Høgskulen
på Vestlandet

BACHELOROPPGAVE

Isolering av DNA fra spyttprøver og munnhuleavskrap
– Sammenligning av DNA kvantitet målt med ulike metoder

Isolation of DNA from saliva samples and oral cavity samples – Comparison of DNA quantity measured with different methods

Celine Nybakk Vedvik, Marie Cristine Pedersen og Sandra Eikeland

Bioingeniørutdanningen ved Høgskulen på Vestlandet (HVL)

Fakultet for ingeniør- og naturvitenskap (FIN)

Veiledere: Gry Sjøholt (HVL) og Vibeke Sognes (MGM)

22. Mai 2023

Jeg bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle kilder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1.

INNHOILDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	4
ABSTRACT	5
FORORD	6
FORKORTELSER	7
1. INTRODUKSJON.....	8
1.1. BAKGRUNN FOR PROSJEKTET	8
2. TEORI	9
2.1. DNA OG RNA.....	9
2.1.1. <i>Oppbygning av DNA og RNA</i>	9
2.1.2. <i>Isolering av DNA</i>	10
2.2. SPEKTROFOTOMETRI	11
2.2.1 <i>Absorpsjonsspektrofotometri og absorpsjonsspektrofotometer</i>	11
2.2.2 <i>Ratioverdier for vurdering av renhet til DNA</i>	12
2.2.3 <i>Absorpsjon og emisjon</i>	13
2.2.4 <i>Emisjonsspektrofotometri og emisjonsspektrofotometer</i>	14
2.3. ULIKE SPEKTROFOTOMETRISKE METODER SOM UTFØRES VED MGM FOR KVANTITATIVE MÅLINGER AV DNA.....	15
2.3.1 <i>Thermo Scientific Nanodrop ND 1000 absorpsjonsspektrofotometer</i>	16
2.3.2 <i>Unchained Labs Big Lunatic UV/Vis absorpsjonsspektrofotometer</i>	16
2.3.3 <i>Life Technologies Qubit 3.0 fluorometer</i>	17
2.4. REAL-TIME KVANTITATIV PCR (QPCR) FOR MÅLING AV DNA KVANTITET	17
2.4.1 <i>Metodeprinsippet for kvantitativ PCR med TaqMan probe</i>	17
2.4.2 <i>CT-verdi benyttes for å kvantifisere målgenet</i>	19
2.4.3 <i>Ribonuklease P benyttes for å kvantifisere humant DNA</i>	19
2.5. PROBLEMSTILLING	20
3. MATERIALE OG METODE	21
3.1. INNSAMLING AV PRØVEMATERIALE	21
3.2. RENS AV DNA FRA MUNNHULEAVSKRAP	21
3.3. RENS AV DNA FRA SPYTTPRØVER.....	22
3.4. MÅLING AV DNA-KONSENTRASJON BASERT PÅ SPEKTROFOTOMETRISKE METODER	23
3.5. REAL-TIME QPCR	24
4. RESULTATER.....	26
4.1. DELTAKERNES PREFERANSER AV MUNNHULESWABENE	26
4.2. MENGDE DNA ISOLERT FRA DE TRE ULIKE PRØVETAKINGSMETODENE, MÅLT MED FIRE ULIKE METODER FOR KONSENTRASJONSMÅLING.....	27
4.3. MENGDE HUMANT DNA I PRØVENE	29
4.4. RENHET AV DNA I PRØVENE	31
4.4.1 <i>Proteinkontaminering vurdert ved ratio 260/280 nm</i>	31
4.4.2 <i>Kontamineringer vurdert ved ratio 260/230 nm</i>	33
4.5. SAMMENLIGNING AV MUNNHULEAVSKRAPENE – ISOHELIX OG ORACOLLECT	34
5. DISKUSJON.....	36
5.1. INNSAMLINGEN AV PRØVEMATERIALE	36
5.2. SAMMENLIKNING AV DNA-UTBYTTET FOR ALLE 3 PRØVETAKINGSMETODENE MÅLT MED NANODROP, LUNATIC, QUBIT OG REAL-TIME QPCR.....	37
5.3. RATIOVERDIER FRA SPEKTROFOTOMETERENE NANODROP OG LUNATIC FOR Å VURDERE RENHET AV DNA I PRØVENE	40
5.4. MENGDE HUMANT DNA SAMMENLIKNET MED MENGDE TOTALT DNA	40
5.5. SAMMENLIKNING AV DNA-UTBYTTE FRA MUNNHULESWABENE ORACOLLECT OG ISOHELIX	42
6. KONKLUSJON	44

7.	KILDER	45
8.	VEDLEGG.....	49

SAMMENDRAG

Denne bacheloroppgaven ble utført ved Avdeling for medisinsk genetikk (MGM), Haukeland Universitetssjukehus (HUS). Avdelingen ønsket å sammenlikne munnhuleswaber fra Isohelix og Oracollect ved å undersøke mengden humant DNA i prøvene, altså kvantiteten.

Munnhuleswabenes spesifisitet for humant DNA ble også undersøkt, ved å beregne andelen humant DNA av totalt DNA i prøvene. Det var også ønskelig å undersøke spesifisiteten for humant DNA for spyttprøver sammenlignet med munnhuleswabene.

Det ble samlet inn prøver fra 30 frivillige, anonymiserte deltakere, med henholdsvis Isohelix og Oracollect for munnhuleavskrap, og Oragene for spyttprøver. DNA fra samtlige prøver ble isolert i henhold til etablerte prosedyrer for munnhuleavskrap og spyttprøver.

Munnhuleavskrapene ble renset med kittet QIAamp DNA Mini Kit på tilnærmet samme måte, mens spyttprøvene ble renset ved bruk av reagenset Oragene Purifier. Etter DNA-isolering ble det utført kvantitative analyser med tre ulike spektrofotometriske metoder og Real-Time qPCR.

Oracollect ga størst prosentandel humant DNA i prøvene, men det var imidlertid Isohelix som ga størst mengde humant DNA med Real-Time qPCR. Ifølge MGM er DNA-mengden av størst betydning for utførelsen av genetiske analyser. Sammenligningen av spesifisiteten til spyttprøvene i forhold til munnhuleavskrapene viste at munnhuleavskrapene ga størst prosentandel humant DNA.

Det konkluderes derfor med at munnhuleswabene fra Isohelix anbefales for videre bruk ved MGM, og med at munnhuleavskrap har høyere spesifisitet for humant DNA enn spyttprøver.

ABSTRACT

This bachelor thesis was written in connection with Department of Medical Genetic (MGM), Haukeland University Hospital (HUS). The Department wanted to compare the oral cavity swabs from Isohelix and Oracollect by examining the amount of human DNA in the samples, that is the quantity. The specificity of human DNA for the oral cavity swabs was also examined, by calculating how much of the total DNA that was human DNA in the samples. Furthermore, it was desirable to examine the specificity of saliva samples compared to the oral cavity swabs.

An amount of 30 samples were collected from voluntary and anonymous participants, with Isohelix and Oracollect for oral cavity samples, and Oragene for saliva samples. DNA from the samples was isolated based on the procedures for oral cavity samples and saliva samples. The oral cavity samples were isolated by means of the kit QIAamp DNA Mini Kit, and the saliva samples were isolated by means of Oragene Purifier. After DNA-isolation, the samples were analyzed with three different spectrophotometric methods and Real-Time qPCR.

The Oracollect oral cavity swab gave the highest percentage of human DNA in the samples, but the Isohelix oral cavity swab gave the highest amount of human DNA with Real-Time qPCR. According to MGM, the amount is of highest significance when performing genetic analysis. The comparison of specificity for saliva samples and oral cavity samples, proved that the oral cavity samples gave the highest percentage of human DNA.

It is concluded that the oral cavity swab from Isohelix is recommended for further usage at MGM, and that the oral cavity samples have higher specificity for human DNA than saliva samples.

FORORD

Denne bacheloroppgaven er skrevet i sammenheng med avslutning av 3-årig bioingeniørutdanning ved Høgskulen på Vestlandet (HVL), våren 2023. Oppgaven er utført i samarbeid med Avdeling for medisinsk genetikk, Haukeland universitetssjukehus. Prosjektet har vært lærerikt og gøy, men også utfordrende til tider. Vi sitter derfor igjen med mye god erfaring og kunnskap, som vi vil ta med oss videre i framtiden som bioingeniører.

Vi ønsker å rette en stor takk til vår interne veileder, førsteamanuensis Gry Sjøholt, for god støtte og veiledning under prosessen. Samtidig ønsker vi også å rette en stor takk til våre eksterne veiledere; Vibeke Sognnes, Linda Fjellstad, Hanne Margrethe Jacobsen, Atle Brendehaug og Per Morten Knappskog. Samtlige har vært til stor hjelp, både med det analytiske arbeidet på laboratoriet og under skriveprosessen. Det settes stor pris på deres tilgjengelighet for oss når det har vært nødvendig, selv utenfor deres arbeidstid. Vi ønsker også å rette en takk til alle frivillige, anonyme deltakere som har bidratt med å avgi prøvemateriale fra munnhule og spytt. Uten dem hadde ikke prosjektet vært mulig å gjennomføre.

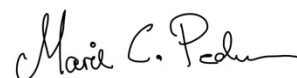
Bergen, 22.05.2023



Celine Nybakk Vedvik



Sandra Eikeland



Marie Cristine Pedersen

FORKORTELSER

PBS: fosfatbufret saltvann

PCR: polymerase kjedereaksjon

DNA: deoksyribonukleinsyre

RNA: ribonukleinsyre

UV: ultrafiolett

VIS: synlig lys

dNTP: deoksyribonukleosidtrifosfat

nm: nanometer

cm: centimeter

M: molar eller mol/L

RNase P: ribonuklease P

RPM: Rounds Per Minute

qPCR: kvantitativ PCR

MGM: Avdeling for medisinsk genetikk

HUS: Haukeland Universitetssjukehus

HVL: Høgskulen på Vestlandet

CT: Threshold Cycle

tRNA: transfer RNA

ng: nanogram

dsDNA: double-stranded DNA

ssDNA: single-stranded DNA

1. INTRODUKSJON

1.1. Bakgrunn for prosjektet

Ved Avdeling for medisinsk genetikkk mottas det spyttprøver og munnhuleavskrap for genetiske analyser, dersom blodprøver ikke lar seg gjøre eller ikke er hensiktsmessig. Eksempler på situasjoner der blodprøvetaking kan være utfordrende, er prøvetaking av barn og/eller pasienter med utfordrende blodårer. Ved slik form for prøvetaking, er det imidlertid viktig at prøvematerialet er av god kvalitet og gir nok humant DNA til videre laboratorieanalyser. Per i dag benyttes Isohelix SK-2S Buccal Swabs fra *Isohelix* for munnhuleavskrap, og ORAgene•DNA OG-500 fra *DNA Genotek* for spyttprøver. Ifølge MGM er prisene for disse henholdsvis 21,60 NOK og 22,80 NOK. Avdeling for medisinsk genetikkk vurderer å ta i bruk en ny munnhuleswab, ORAcollect•Dx OCD-100 fra *DNA Genotek*, da den etter erfaring fra andre sykehus i landet er vurdert som mykere for munnhulen og selve prøvetakingen tar mindre tid. Prisen for denne er 96,30 NOK.

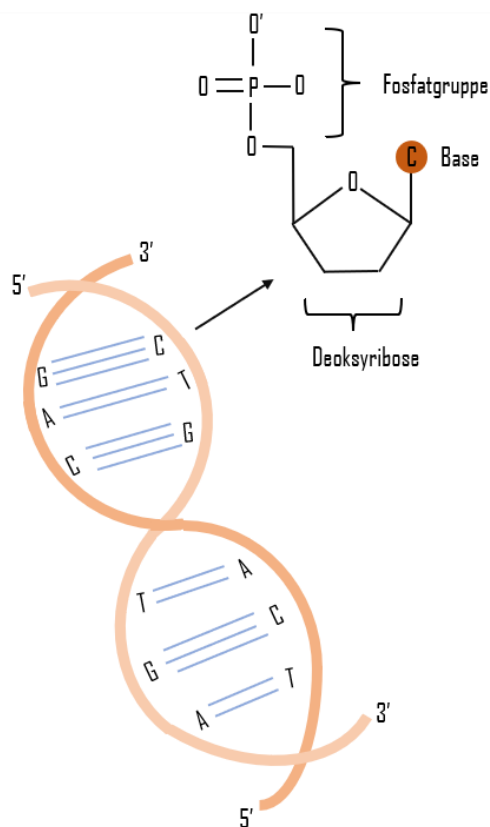
Både spyttprøver og en av munnhuleavskrapene vil uansett bli benyttet videre ved avdelingen, da hvilken prøvetakingsmetode som benyttes avhenger av hva rekvirent bestiller og hva legekantor og poliklinikker har tilgjengelig. MGM mottar og renser begge deler, og analysene som utføres avhenger ikke av om det er spyttprøve eller munnhuleavskrap. Likevel er det noen analyser som krever store mengder prøvemateriale, som f.eks. Southern blott. Da vil gjerne spyttprøver være enklere enn munnhuleavskrap, men dette er en sjelden analyse.

2. TEORI

2.1. DNA og RNA

2.1.1. Oppbygning av DNA og RNA

Levende organismer består av celler som inneholder arvematerialet, kalt deoksyribonukleinsyre (DNA) (1, s. 228). DNA-molekylet er formet som en dobbeltheliks, som består av to polynukleotidtråder holdt sammen ved hjelp av hydrogenbindinger (se Figur 1). Et nukleotid består av en nitrogenbase, enten adenin, cytosin, guanin eller tymin. I tillegg består det også av suktermolekylet deoksyribose og en fosfatgruppe (1, s. 175). DNA-tråden har to ender, der den ene er en 5' ende og den andre er en 3' ende. 5' enden består av en fosfatgruppe, mens 3' enden består av en hydroksidgruppe (1, s. 176). I motsetning til DNA som er dobbeltrådet, består ribonukleinsyre (RNA) av en enkelttråd. Suktermolekylet i RNA er også annerledes enn hos DNA, da RNA har ribose framfor deoksyribose. I RNA er også nitrogenbasen tymin byttet ut med en annen nitrogenbase kalt urasil (1, s. 229).



Figur 1: Generell oppbygning av et DNA-molekyl. Det består av to polynukleotidtråder som henger sammen ved hjelp av hydrogenbindinger mellom sine respektive baser. Videre ser man et nukleotid bestående av fosfatgruppe, en vilkårlig base og deoksyribose (1, s. 175). Figuren er basert på figur i (1, s. 175) og molekylær oppbygning av DNA i (1, s. 176).

2.1.2. Isolering av DNA

Ved rensing av DNA til medisinsk genetiske analyser, benyttes normalt blod som prøvemateriale. DNA kan isoleres fra helblod, buffycoat eller kun lymfocytter som er separert fra øvrige blodkomponenter (2). Buffycoat er et lite lag med leukocytter og trombocytter som ligger mellom plasmalaget og laget med erytrocytter (3). Blod som prøvemateriale er foretrukket, ettersom blodstrømmen i kroppen er fri for mikrober og dermed steril (4, s. 395). Dette er en fordel da man unngår å få med DNA fra bakterier.

Ved isolering av DNA fra munnhuleavskrap og saliva derimot, kan det forventes å finne både humant DNA fra eukaryote celler og bakterielt DNA fra prokaryote celler. Dette fordi kroppens slimhinner har en normalflora med bakterier (5, s. 66). I munnhule og tenner kan det normalt sett befinne seg et mangfold av mikrober, hovedsakelig anaerobe bakterier og grønne streptokokker. Disse mikrobene kan også danne en biofilm i munnhulen da de fester seg til for eksempel tenner (5, s. 68).

Isolert DNA brukes til genetiske analyser innenfor laboratoriemedisin, da DNA inneholder genetisk informasjon i form av gener (1, s. 3). Alle friske mennesker har de samme genene, men man har unike variasjoner i DNA-sekvensen som gjør at alle får hvert sitt unike uttrykk, kalt fenotype (6). Genetiske analyser utføres derfor for å se etter eventuelle mutasjoner i genene som kan medføre sykdommer, syndromer eller andre genetiske tilstander. Eksempler på genetiske analyser som utføres ved MGM er analyser i sammenheng med arvelig kreft, arvelige hjertesykdommer, sykdomsutredning ved medfødte misdannelser, fosterdiagnostikk og dersom det er mistanke om andre genetiske sykdommer (7).

2.2. Spektrofotometri

2.2.1 Absorpsjonsspektrofotometri og absorpsjonsspektrofotometer

Spektrofotometri er en målemetode hvor det benyttes lys til deteksjon av kjemiske komponenter i en prøve (8, s. 414). Instrumentet som brukes kalles et spektrofotometer. Her benyttes forskjellige bølgelengder av lys for måling, avhengig av hvilket stoff i prøven som skal undersøkes, da ulike stoffer absorberer lys ved forskjellige bølgelengder (9).

Instrumentet består av en lyskilde som enten avgir synlig lys eller ultrafiolett stråling (se Figur 2). Lyset passerer videre til en monokromator, hvor det går gjennom en spalte til enten et prisme eller gitter som deler det i forskjellige bølgelengder. Videre vil kun lys av en bestemt bølgelengde sendes gjennom en spalte og treffe prøven som skal analyseres. På andre siden av prøven er det en detektor som registrerer mengden lys som har passert gjennom prøven. Denne informasjonen benyttes videre for å beregne absorpsjonskoeffisienten:

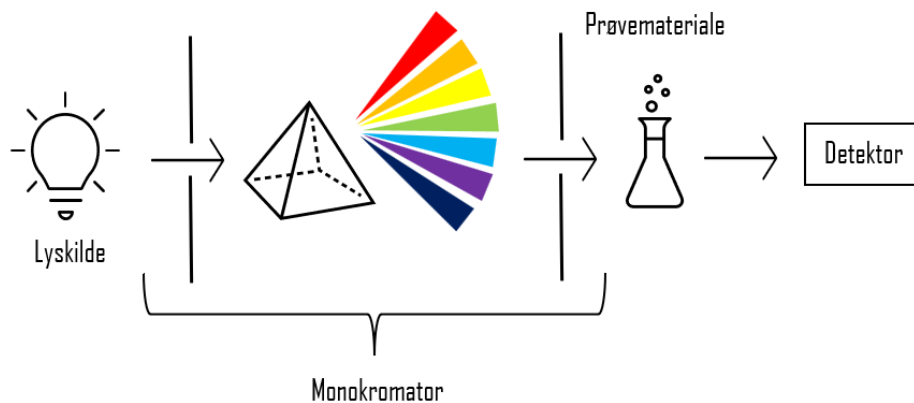
$$A = \log \frac{P_0}{P} \quad (8, \text{s. } 396)$$

I formelen står A for absorpsjonskoeffisienten. P_0 er lyset som sendes fra lyskilden og inn i prøven, mens P er lyset som detekteres av detektoren på den andre siden av prøven. Dersom $P_0 = P$, har det ikke skjedd absorpsjon av lys i prøven (8, 396). Absorpsjonskoeffisienten er direkte proporsjonal med konsentrasjonen i prøven, og er gitt ved Beer Lambert's lov:

$$A = \varepsilon \times b \times c \quad (8, \text{s. } 396)$$

ε ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) står for molar absorptivitet, som beskriver karakteristikken til substansen i prøven som skal måles, og hvor mye lys som da blir absorbert ved en bestemt bølgelengde. b (cm) står for lengden på lysveien gjennom prøven, og c (M) representerer konsentrasjonen av prøven (8, s. 396).

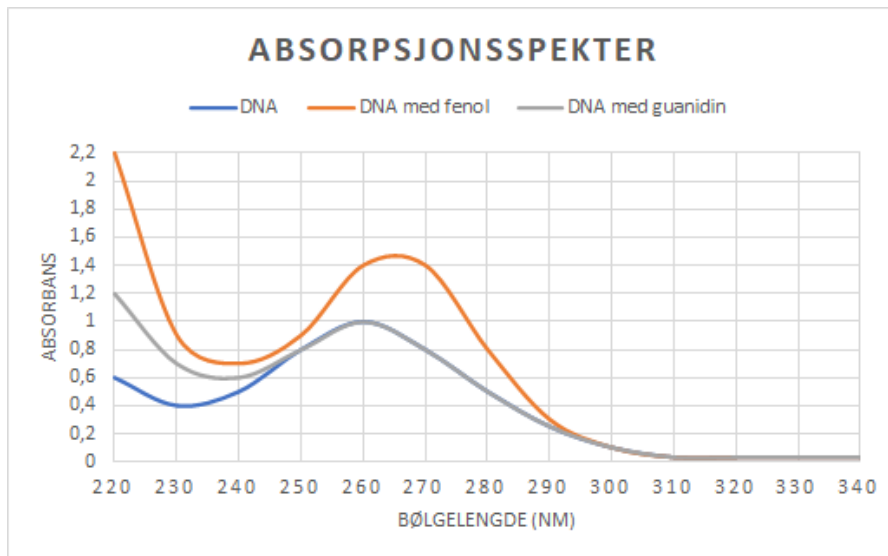
På grunn av det proporsjonale forholdet mellom absorbansen og konsentrasjonen (uttrykt ved Beer Lambert's lov), kan et spektrofotometer kalibreres på forhånd slik at man får en standardkurve. Basert på denne standardkurven, beregnes en konsentrasjonsverdi hver gang det måles en ukjent prøve (10, s. 140).



Figur 2: Generell oppbygning av et absorpsjonsspektrofotometer. Lyskilden sender ut lys av et bredt spekter av bølgelengder. Videre går lyset til en monokromator hvor en bestemt bølgelengde velges ut som deretter treffer prøven. Komponenter i prøven vil absorbere en bestemt bølgelengde og resten av lyset sendes mot detektor (8, s. 396).

2.2.2 Ratioverdier for vurdering av renhet til DNA

Ved absorpsjonsspektrofotometri blir konsentrasjonen av DNA beregnet ut ifra absorbans ved bølgelengden 260 nm, og konsentrasjonen av proteiner beregnes ut fra absorbans ved bølgelengden 280 nm (11). For å vurdere renhet av DNA, beregnes ratioverdier for absorbans ved bølgelengdene 260/280 nm og 260/230 nm. Ratio 260/280 nm indikerer god renhet for DNA dersom verdien er tilnærmet 1,8. En ratio høyere enn verdien 2,0 vil derimot indikere RNA i prøven. Dersom ratioverdien er lavere enn 1,8 kan dette indikere at proteiner, fenoler eller andre komponenter som absorberer lys ved 280 nm er til stede i prøven (se Figur 3). Ratio 260/230 nm bør befinne seg innenfor verdiene 2,0-2,2, da dette indikerer god renhet for DNA. En ratioverdi lavere enn 1,8 kan tyde på at komponenter som absorberer bølgelengder ved 230 nm er til stede i prøven (se Figur 3). Slike komponenter kan være guanidin eller fenol (11). Dette er generelle optimalverdier for måling av ratioer ved DNA-analyser, men enkelte produsenter kan likevel ha utarbeidet egne verdier for optimal ratio for sine instrumenter.



Figur 3: Overlappende absorpsjonsspektre for DNA og DNA med rester fra henholdsvis fenol og guanidin under DNA-isolering. Figur er basert på (11).

2.2.3 Absorpsjon og emisjon

Et atom vil absorbere lys av ulike bølgelengder (12, s. 455). Etter absorpsjonen har skjedd, vil elektroner i atomet gå opp til et høyere energinivå. Det kalles for eksitasjon, og skyldes at et atom tar til seg energi (12, s. 457). Denne energien trenger ikke nødvendigvis å komme fra energirike fotoner eller lys, men kan også komme fra kjemiske reaksjoner. Fluorescens er et resultat av at elektronene eksiteres på grunn av fotoner. Kjemiluminescens er et resultat av at elektronene eksiteres på grunn av en kjemisk reaksjon, mens bioluminescens kommer av at den levende organismen selv er i stand til å skape emisjon av synlig lys (12, s. 492). Fellesbetegnelsen på all emisjon av synlig lys er luminescens (12, s. 458).

Etter eksitasjon, vil elektronene gå tilbake til et lavere energinivå. Det kalles emisjon, og skjer fordi atomet er mer stabilt i sin grunntilstand, og derfor ønsker å kvitte seg med denne ekstra energien. Avhengig av hvilken rute elektronet velger nedover til et lavere energinivå, vil man få ulike former for emisjonsenergi. Emisjonsenergien kan være i form av varme eller lys (12, s. 458).

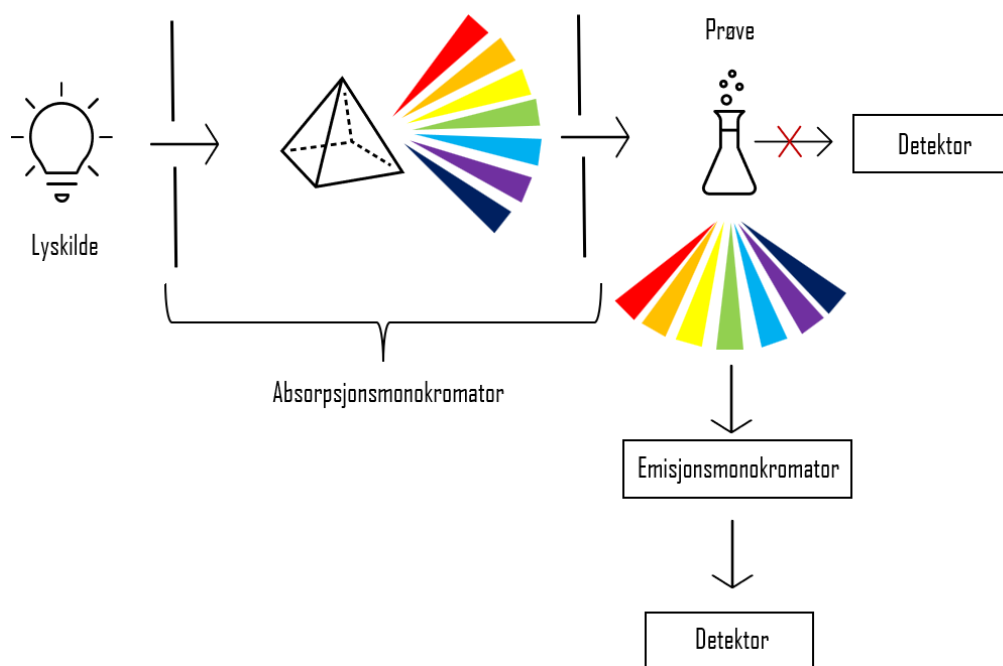
Ved absorpsjon får man et absorpsjonsspekter som viser hvilket bølgelengdeområde atomet absorberer energi i, og ved emisjon får man et emisjonsspekter som viser hvilket

bølgelengdeområde atomet gir fra seg emisjonsenergi i. Forskjellen mellom et emisjonsspekter og et absorpsjonsspekter, er at absorpsjonsspekteret har topper ved et bølgelengdeområde med kortere bølgelengder sammenliknet med et emisjonsspekter. Altså vil atomer absorbere kortere bølgelengder og høyere energi sammenliknet med bølgelengdene de emitterer (12, s. 460).

2.2.4 Emisjonsspektrofotometri og emisjonsspektrofotometer

Et absorpsjonsspektrofotometer har som formål å måle absorbans ved en bestemt bølgelengdeverdi. Et emisjonsspektrofotometer har derimot som formål å måle mengde emittert synlig lys, det vil si mengde luminescens. For å måle lyset som atomet emitterer, trenger man også en monokromator i etterkant av prøven for å velge ut hvilken av de utsendte bølgelengdene som skal måles (se Figur 4) (12, s. 461-462). For emisjonsspektrofotometeret er det viktig at detektoren ikke er posisjonert slik at den detekterer lys fra lyskilden, men kun emisjonslyset.

Emisjon kan benyttes for å kvantifisere DNA ved å merke den delen av DNA som er av interesse med et fluorescerende reagens som binder til akkurat denne delen av DNA (15). Det er også andre muligheter, som å fusjonere DNA som koder for proteinet man er ute etter å visualisere med genet som koder for grønt fluorescerende protein (12, s. 491).



Figur 4: Oppbygning av et emisjonsspektrofotometer. Etter at en bestemt bølgelengde når prøven, vil ikke lyset sendes videre til en detektor umiddelbart. I stedet vil det fluorescerende lyset som prøven utstråler sendes til en monokromator, som velger ut en bestemt bølgelengde. Deretter vil lyset sendes mot en detektor (12, s. 461-462). Figuren er inspirert av figur i (12, s. 461).

2.3. Ulike spektrofotometriske metoder som utføres ved MGM for kvantitative målinger av DNA

Av disse tre metodene er det stort sett bare Nanodrop som benyttes i rutinen ved MGM, da dette er en godt innarbeidet metode i laboratoriet til å måle DNA-konsentrasjon. Det er i tillegg blodprøver som i størst grad benyttes, og for disse vil det ikke være nødvendig å ta hensyn til humant DNA. Per i dag benyttes også Nanodrop for munnhuleavskrap og spyttprøver, til tross for at metoden ikke er spesifikk for humant DNA. Dersom det ikke er nok humant DNA i prøvene, vil ikke videre analyser få resultater. I dette prosjektet benyttes alle tre metodene for å få mer informasjon om DNA-innholdet i prøvene, slik at det sikres riktig grunnlag for vurdering av prøvetakingsmetodene.

2.3.1 *Thermo Scientific Nanodrop ND 1000* absorpsjonsspektrofotometer

Nanodrop ND 1000 er et tradisjonelt absorpsjonsspektrofotometer. En dråpe (1-2 μL) av prøvematerialet appliseres direkte på instrumentet (13). Dråpen ligger mellom to elektrodeplater, og det dannes en overflatespenning som holder prøven på plass. Instrumentet har mulighet for å måle prøver med konsentrasjon opp til 3700 $\text{ng}/\mu\text{L}$, i motsetning til andre kyvettespektrofotometere som krever fortynnede prøver ved høye konsentrasjoner. En annen fordel med Nanodrop, er at det bare kreves 1-2 μL prøvemateriale for å kunne måle nukleinsyrekonsentrasjon på instrumentet. Dette fører til at minimalt av prøvemateriale går til konsentrasjonsmåling, og dermed er mest mulig prøvemateriale tilgjengelig for videre analyser. Nanodrop måler ratio 260/280nm med optimal verdi på 1,8, og ratio på 260/230 nm med optimal verdi på 1,8-2,2 (13).

2.3.2 *Unchained Labs Big Lunatic UV/Vis* absorpsjonsspektrofotometer

Lunatic spektrofotometer er et instrument som baserer seg på absorpsjonsspektrofotometri, men instrumentet har ikke en monokromator som velger ut en bestemt bølgelengde (14). Prøvene som analyseres på dette instrumentet måles derfor ved hele ultrafiolett/synlig lys (UV/Vis) spekteret, 230-750 nm. Det vil si at hvitt lys sendes mot prøven, hvor ulike bølgelengder absorberes ut fra hvilke komponenter prøven inneholder. På andre siden av prøven vil det gjenværende lyset sendes mot et prisme/gitter som deler lyset i forskjellige bølgelengder. Disse treffer deretter et speil som reflekterer dem mot detektoren. Basert på målt transmisjon, avdekkes hvilke bølgelengder komponentene har absorbert. Ut fra dette beregnes konsentrasjonen.

Instrumentet er platebasert, og kan derfor lese opp til 96 prøver på 5 minutter. Prøven appliseres i en oppbevaringskanal på en plate, og befinner seg i denne kanalen fram til analysering på instrumentet (14). Når platen med appliserte prøver plasseres i instrumentet, plasseres det en pumpe over ventilasjonshullene på platen, slik at prøvematerialet overføres fra oppbevaringskanalen til en mikrokyvette. Samtidig som mikrokyvetten fylles med prøvemateriale, vil instrumentet detektere endring i transmisjon, og beregne absorbans og konsentrasjon. Fordelen med denne metoden er at man kan analysere flere prøver samtidig

på instrumentet. Platene som prøvene appliseres på brukes bare en gang, noe som reduserer sannsynligheten for Carry-Over. Lunatic måler ratio 260/280 nm med optimal verdi på 1,7-1,8.

2.3.3 Life Technologies Qubit 3.0 fluorometer

Qubit fluorometer er et emisjonsspektrofotometer som måler mengde synlig lys som emitteres (15). Med Qubit metode måles dobbeltrådig DNA spesifikt, ettersom et fluorescerende reagens, *Qubit™ dsDNA HS reagent*200X concentrate in DMS* (lotnummer 2549241), binder spesifikt til dette i prøven. Dermed kan dobbeltrådig DNA kvantifiseres i prøven basert på at DNA emitterer fluorescens. Det er også mulighet til å tilsette andre fluorescerende reagenser som binder til RNA eller proteiner, slik at analysen kan tilpasses avhengig av hvilken målanalytt man er ute etter. Qubit har høy spesifisitet ettersom instrumentet kun detekterer målanalytten. Instrumentet har også høy sensitivitet ettersom det kan detektere svært lave konsentrasjoner (15). Ulempen med denne metoden er at den er tidkrevende, da det i forkant av analyseringen må tilsettes reagenser.

2.4. Real-Time kvantitativ PCR (qPCR) for måling av DNA kvantitet

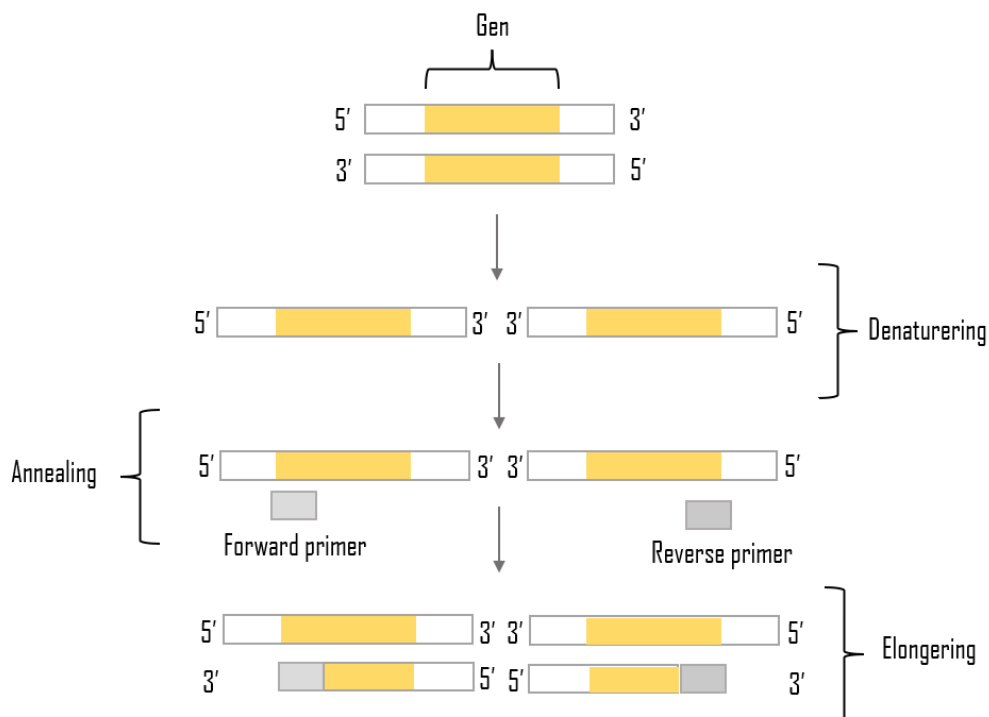
Ved MGM benyttes ikke denne metoden i rutinen, men den benyttes i dette prosjektet for å få et sikrere mål på mengden humant DNA. Dette gir større og sikrere grunnlag for sammenligning og vurdering av prøvetakingsmetodene.

2.4.1 Metodeprinsippet for kvantitativ PCR med TaqMan probe

Real-Time kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR) er en metode som benyttes for kvantitativ undersøkelse av DNA (16). Ved denne metoden blir PCR-produktet målt etter hver syklus, i motsetning til endepunkts-PCR, der kvantifisering av PCR-produktet bestemmes etter siste syklusen i PCR-reaksjonen. Ved Real-Time qPCR monitoreres amplifisering av DNA i den eksponentielle amplifikasjonsfasen. Det dannes da en reaksjonskurve av den eksponentielle fasen i et amplifikasjonsplot, der fluorescensintensitet er plottet mot antall sykluser. Fluorescenssignalet øker proporsjonalt med antall PCR-produkt i prøven.

I hver syklus i en Real-Time qPCR reaksjon er det tre steg som skjer (se Figur 5) (16). Det første som skjer er denaturering av DNA, der man benytter høy temperatur for å separere dobbeltrådet DNA til enkeltrådet DNA. Det neste steget er annealing, hvor temperaturen senkes, slik at primerne hybridiseres til templat DNA-trådene. Det siste steget kalles elongering, der temperaturen øker slik at det blir optimale forhold for enzymet DNA-polymerase. Den vil da feste seg til primeren og starte syntese, med templat DNA-tråden som utgangspunkt (16). DNA-polymerasen sørger for at flere deoksyribonukleosidtrifosfat (dNTP) kan binde seg til DNA-tråden og polymerisere med hverandre. På denne måten forlenges DNA-tråden slik at man ender opp med en kopi av den dobbeltrådede DNA (1, s. 342).

TaqMan proben som benyttes i Real-Time qPCR består av et fluorofor og en quencher (17). Sistnevnte absorberer emisjonslyset til fluoroforen når proben binder til målgenet, og følgelig avgis ikke emisjonslys. Etter hvert som DNA-tråden blir forlenget av Taq Polymerase, separeres quencher fra fluorofor slik at det avgis fluorescens. Fluorescenssignalet øker proporsjonalt med antall PCR-sykluser, da mer og mer fluorofor frigjøres fra quencheren.



Figur 5: Real-Time qPCR prosessen, hvor man har et målgen som man ønsker å amplifisere. Dette skjer gjennom de tre stegene denaturering, annealing og elongering. I det første steget brytes dobbeltrådet DNA (dsDNA) opp til enkeltrådet DNA (ssDNA), før primere festes på i det neste steget. Videre vil DNA-polymerase sørge for at dNTP hekter seg på (16). Basert på figur i (1, s. 342).

2.4.2 CT-verdi benyttes for å kvantifisere målgenet

Threshold Cycle-verdien (CT-verdien), også kalt terskelverdien, er skjæringspunktet mellom amplifikasjonskurven og terskellinjen i amplifikasjonsplottet som dannes under Real-Time qPCR (18). Terskellinjen er en horisontal linje som skjærer gjennom amplifikasjonskurven og angir en bestemt mengde fluorescens. Den plasseres vanligvis i den eksponentielle delen av grafen. Enheten på y-aksen i amplifikasjonsplottet viser fluorescerende enheter (ΔRn) og x-aksen viser antall PCR-sykluser. CT-verdien indikerer hvor høy konsentrasjon man har av DNA. En høy CT-verdi betyr at man har lite DNA. Med lite DNA kreves det mange sykluser med PCR før man klarer å produsere nok DNA-kopier og fluorescens signal til å kunne passere terskellinjen. Motsatt vil en lav CT-verdi indikere mye DNA (18). Det vil altså være et proporsjonalt forhold mellom CT-verdi og DNA-konsentrasjonen i en prøve. Dermed kan man kalibrere Real-Time qPCR instrumentet på forhånd ved å lage en standardkurve. Ved måling av en ukjent prøve vil instrumentet utgi en konsentrasjonsverdi basert på standardkurven (10, s. 140).

2.4.3 Ribonuklease P benyttes for å kvantifisere humant DNA

Ribonuklease P (Rnase P) er en nuklease som er viktig for modifiseringen av transfer RNA (tRNA) i levende organismer, da det ferdigstiller pre-tRNA til et ferdig tRNA (19, s. 995). Enzymet finnes hos bakterier, arker og eukaryoter, men har ulik oppbygning i hver av rikene. Hos bakterier vil enzymet ha et enkelt katalytisk RNA i tillegg til et lite protein, mens arker og eukaryote celler har en mer kompleks proteinsammensetning i sine RNase P enzym (20). Grunnet forskjellen i oppbygning av enzymet mellom bakterier, arker og eukaryoter, vil også gensekvensen for enzymet være forskjellig mellom disse rikene. RNase P kan derfor, i analytisk sammenheng, brukes for å kvantifisere eukaryot DNA i en prøve ved hjelp av Real-Time qPCR. Dersom man amplifiserer RNase P ved hjelp av primere som binder spesifikt til den eukaryote gensekvensen, kan man finne mengden humant DNA. Ved å sammenligne qPCR resultatene med spektrofotometriske målinger av total DNA, kan man finne ut hvor mye av den totale DNA-konsentrasjonen som består av humant DNA.

2.5. Problemstilling

Hensikten med dette prosjektet kan deles i to;

- å sammenligne DNA fra munnhuleswaber fra Oracollect og Isohelix med hverandre
- å se på spesifisiteten til spyttprøver i forhold til munnhuleavskrap

Sammenligningen av de ulike metodene baseres på måling av kvantitet med hensyn til humant DNA. Basert på resultatene fra dette prosjektet, vil det gis en anbefaling til Avdeling for medisinsk genetikk om hvilken av de to munnhuleswabene som vil være mest hensiktsmessig å benytte videre.

3. MATERIALE OG METODE

3.1. Innsamling av prøvemateriale

Prøvematerialet ble innhentet fra 30 frivillige personer i alderen 18-62 år. Hver deltaker tok tre ulike prøver hver, hvorav to typer munnhuleavskrap, Isohelix SK-2S Buccal Swabs fra *Isohelix* og ORAcollect•Dx OCD-100 fra *DNA Genotek*, og en spyttprøve, ORAgene•DNA OG-500 fra *DNA Genotek* (se Vedlegg 1-3). Deltakerne utførte prøvetakingen selv, da det var ønskelig at prøvene skulle være så reelle som mulig. Ved en reell prøvetakingssituasjon er det pasienten selv som tar prøven før den sendes til laboratoriet. I forbindelse med prøvetakingen fikk også hver deltaker mulighet til å avgi svar på hvilken av munnhuleswabene de foretrakk.

Det ble ikke utført analyser som ga persondata eller sensitiv informasjon om deltakerne i dette prosjektet. Prøvene var anonymisert og kunne dermed ikke spores tilbake til deltakerne. På bakgrunn av dette, var ikke prosjektet omfattet av Helseforskningsloven og dens krav (21). Det var dermed ikke nødvendig å søke forhåndsgodkjennelse av Regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) før prosjektets start (22;23). Av samme årsak var det heller ikke nødvendig å melde om bruk av persondata i prosjektet til Sikt (24), eller med skriftlig informasjon og utfylling av samtykkeskjema fra deltakerne (25). Deltakerne fikk derfor muntlig informasjon om prosjektet og ga frivillig, informert samtykke muntlig før prøvetakingen ble gjennomført.

3.2. Rens av DNA fra munnhuleavskrap

DNA fra munnhuleavskrapene ble isolert på tilnærmet samme måte, ved hjelp av rensekittet QIAamp DNA Mini Kit fra *Qiagen* (lotnummer 172045449) (26). Det første steget i renseprosessen var lysering av celler fra munnhulen. Isohelix munnhuleswabene ble overført til et 1,5 mL eppendorfrør, før det ble tilsatt 400 µL fosfatbufret saltvann (PBS), 20 µL proteinase K og 400 µL AL buffer. Dette ble pulsvortexet, inkubert ved 56°C i 10 minutter på en varmeblokk og spunnet ned. Enzymet proteinase K ble benyttet i lyseringsprosessen for å bryte ned proteiner i cellene (27). AL buffer bidro i lyseringen av cellene (28).

For Oracollect munnhuleswabene, ble prøvene satt i vannbad på 50°C i forkant av lyseringen. Til lyseringsprosessen ble 200 µL av stabiliseringsvæsken i beholderen til munnhuleswabben benyttet framfor PBS, og overført til et 1,5 mL eppendorfrør. Deretter ble 20 µL proteinase K og 200 µL AL buffer tilsatt, før blandingen ble pulsvortexet (29).

Det neste steget var binding av DNA til kolonne. Det ble tilsatt 400 µL 96% etanol (200 µL etanol for Oracollect munnhuleswabene) før prøvematerialet ble overført til en spinnkolonne og sentrifugert ved 8000 Rounds Per Minute (RPM) i 1 minutt, og supernatanten ble kastet. Formålet med dette steget var å sørge for at DNA skulle binde seg til kolonnen (26). Herfra var prosedyren for DNA-rens for de to munnhuleswabene like.

Prosedyre fra produsenten ble fulgt for vaskesteget (26). Formålet med vaskesteget var å eliminere alle former for urenheter slik at man sto igjen med renest mulig DNA.

Det siste steget var eluering, der kolonnen ble overført til et 1,5 mL eppendorfrør, tilsatt 50 µL MilliQH₂O og sentrifugert ved 8000 RPM i 1 min. MilliQH₂O er ultrarent vann, og fungerer som et løsemiddel for DNA, slik at det kan passere gjennom kolonnen. Eluatet ble tilbakeført til kolonnen og sentrifugert på nytt ved samme program til samme rør, for å sikre at alt DNA var kommet ut av kolonnen (26).

3.3. Rens av DNA fra spyttprøver

Til rens av spyttprøvene var reagenset Oragene Purifier PrepIT L2P fra *DNA Genotek* (lotnummer AB02) sentralt. Prøvene sto 1 time i vannbad på 50°C for inkubering. Deretter ble prøvematerialet overført til 15 mL falconrør og tilsatt Oragene Purifier tilsvarende 1/25 av totalvolumet av saliva (30).

Prøvene ble deretter inkubert 10 minutter på is før de ble sentrifugert ved 3500 xg i 10 minutter. Supernatanten ble deretter overført til nye falconrør. Det ble så tilsatt 96% etanol til supernatanten, og falconrørene ble vendt rolig 10 ganger for å felle ut DNA. Videre ble prøvene inkubert i 10 minutter i romtemperatur før de ble sentrifugert i 10 minutter, og supernatanten ble fjernet. DNA var da samlet i en pellet i bunnen av falconrørene. For å fjerne

eventuelle rester av salter fra pelleten, ble det tilsatt 1 mL 70% etanol til hvert rør. Prøvene ble deretter inkubert i 1 minutt før supernatanten ble fjernet. Pelleten ble så løst i 150 μ L MilliQH₂O og overført til 1,5 mL eppendorfrør. Til slutt ble eppendorfrørene inkubert ved 56°C på varmeblokk over natt, før de ble sentrifugert på nytt. Dette var for å fjerne eventuelle rester av proteiner og andre kontaminanter, for å få en så ren prøve som mulig. Etter dette ble supernatanten med rensset DNA overført til nye eppendorfrør (30).

3.4. Måling av DNA-konsentrasjon basert på spektrofotometriske metoder

Samtlige prøver ble analysert på de tre instrumentene Nanodrop ND 1000 spektrofotometer, Lunatic UV/Vis spektrofotometer og Qubit fluorometer for måling av DNA-konsentrasjon og eventuelt DNA/protein ratio.

Alle prøvene ble først målt på Nanodrop ND 1000 spektrofotometer. Analysering på Nanodrop krevde ikke forhåndsfortynning av prøvene. Før konsentrasjonsmåling av prøvene, ble 1,3 μ L MilliQH₂O målt i to omganger for å nullstille instrumentet. Deretter ble 1,3 μ L prøvemateriale pipettert på instrumentet, og det ble målt DNA-konsentrasjon og ratioer ved bruk av metoden konsentrasjonsmåling Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (31).

Til måling av prøvene på Lunatic UV/Vis spektrofotometer ble det overført prøvemateriale til en plate med 6 strips, som hver av dem hadde 16 brønner. Dermed kunne man måle alle prøvene i en og samme omgang. Pipetteringen ble utført ved bruk av multipipette med 8 kanaler som var innstilt på 2 μ L. Platen med stripsene ble posisjonert i instrumentet og DNA-konsentrasjoner og DNA/protein ratio ble målt ved bruk av metoden Lunatic UV/Vis spektrofotometer (32).

Til analysering av prøvene på Qubit fluorometer, ble det benyttet Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit, som måler verdier mellom 0,005 ng/ μ L og 120 ng/ μ L (33). Først måtte prøvene forhåndsfortynnes med MilliQH₂O ettersom instrumentets øvre kvantifiseringsgrense ikke var høy nok til å kunne måle de høyeste konsentrasjonene. Munnhuleavskrapene ble fortynnet

1:10 og spyttprøvene 1:50. Etter fortynningen ble det preparert 2 ulike standardprøver (til senere bruk for en topunktskalibrering) og 8 prøver av gangen.

Det ble først laget en arbeidsløsning som prøvene skulle blandes med. Den besto av 199 µL buffer og 1 µL fluorescerende reagens per prøve (34). Ettersom det var totalt 10 prøver (2 standarder og 8 prøver) per analysering, ble det laget en felles arbeidsløsning med total 1990 µL Qubit™ dsDNA HS buffer (lotnummer 2549241) og 10 µL fluorescerende reagens (Qubit™ dsDNA HS reagent*200X concentrate in DMSO, lotnummer 2549241). Av denne arbeidsløsningen ble det pipettert 190 µL i rørene til standardene (rør 1-2), og 195 µL i rørene til prøvene (rør 3-10). Det ble deretter pipettert 10 µL av hvert standardmateriale til sitt respektive rør (Standard 1 i rør 1 og standard 2 i rør 2), og 5 µL prøvemateriale til prøverørene (Rør 3-10). Deretter ble rørene vortexet og spunnet ned, før de ble lagt til inkubering under aluminiumfolie i 2 minutter for å unngå lyseksponering av det fluorescerende reagentet (34).

Standardene ble så målt på fluorometeret for å framstille en topunkts kalibreringskurve, før prøvene ble analysert. DNA-konsentrasjonen i prøvene ble beregnet ut fra målt fluorescens basert på standardkurven (34).

3.5. Real-Time qPCR

Konsentrasjonen av gensekvensen for RNase P ble målt med Real-Time qPCR for å undersøke mengde humant DNA i prøvene (35). Det ble først laget en mastermix av TaqMan Universal PCR Master Mix, 20X RNase P Primer-Probe mix og MilliQH₂O i pre-PCR sone (se Tabell 1 for volummengder). Videre ble 7,5 µL av mastermixen overført til alle brønnene på en 384-brønnsplate (35). Det ble benyttet 15x8 brønner per plate.

Tabell 1: Volummengder til å lage PCR mastermix basert på at det var totalt 120 reaksjoner.

Reagens	Volummengde
Taqman Universal PCR Master Mix	5 µL x 120 reaksjoner x 1,2 = 720 µL
20X RNase P Primer Probe mix	0,5 µL x 120 reaksjoner x 1,2 = 72 µL
MilliQH ₂ O	2 µL x 120 reaksjoner x 1,2 = 288 µL

Det ble også laget en standardrekke med kjent DNA-konsentrasjon (DNA fra RNase P Detection Reagents Kit) i 7 ulike fortynninger, ved å bruke tofold fortynningsmetode. Dette ble brukt til å lage en standardkurve for analysen. Det ble først tilsatt 10 µL MilliQH₂O til alle rørene i en strips med 8 PCR-rør, og deretter tilsatt 10 µL kontrollmateriale til første rør (S1), det vil si kontroll-DNA. Dette ble blandet og spunnet ned før det ble overført 10 µL fra S1 til neste rør (S2). Dette ble repetert fram til S7. Siste røret i stripsen ble brukt til en blankprøve og bestod kun av MilliQH₂O. Fortynningene hadde da konsentrasjonene 5 ng/µL, 2,5 ng/µL, 1,25 ng/µL, 0,625 ng/µL, 0,3125 ng/µL, 0,15625 ng/µL og 0,078125 ng/µL. Det ble så pipettert 2,5 µL av hver standard i 3 paralleller over på platen (se Figur 1) (35). Kravet for godkjenning av standardkurvene fra Real-Time qPCR, var korrelasjonskoeffisient (R^2) større en 0,98.

Munnhuleprøvene ble i forkant av analyseringen fortynnet 1:50 og 1:100, mens spyttprøvene ble fortynnet 1:500 og 1:1000. Deretter ble 2,5 µL av hver fortynning overført i tre paralleller til 384-brønnsplaten (35). All overføring av materiale til 384-brønnsplatene ble gjort med multipipette med 8 kanaler. En og en plate ble deretter analysert på Real-Time qPCR maskinen 7900HT Fast Real-Time PCR Systems fra *Applied Biosystems*. Programmet som ble brukt var “Standard Thermal Cycling Conditions” som lå inne som default på instrumentet. Temperaturprogrammet besto av en initialiseringsdel og en PCR-del (se Tabell 2). Initialiseringen gikk ut på å aktivere enzymer, her Taq polymerase og AmpErase (UNG) (36). Sistnevnte er et enzym som benyttes for å unngå forurensning i analysen i form av Carry-Over (36)

Tabell 2: Temperaturprogram etter innstillingen “Standard Thermal Cycling Conditions” på Real-Time qPCR maskinen 7900HT Fast Real-Time PCR Systems fra Applied Biosystem.

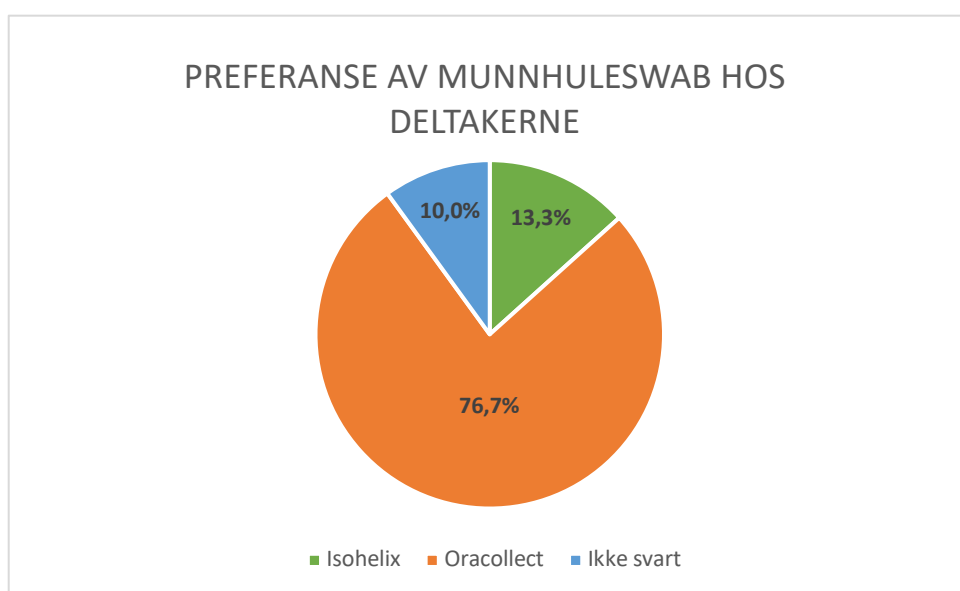
	Funksjon	Temperatur	Tid
Initialisering	AmpErase (UNG) aktivering	50°C	2 minutter
	Aktivering av Taq polymerase	95°C	10 minutter
PCR (med 40 sykluser totalt)	Denaturering	95°C	15 sekunder
	Annealing	60°C	1 minutt

4. RESULTATER

Rådata og beregninger gjort for å komme frem til resultatene som vises i dette kapitlet, kan sees i vedlegg 4 – «Rådata og beregninger av DNA-konsentrasjoner målt med fire ulike metoder».

4.1. Deltakernes preferanser av munnhuleswabene

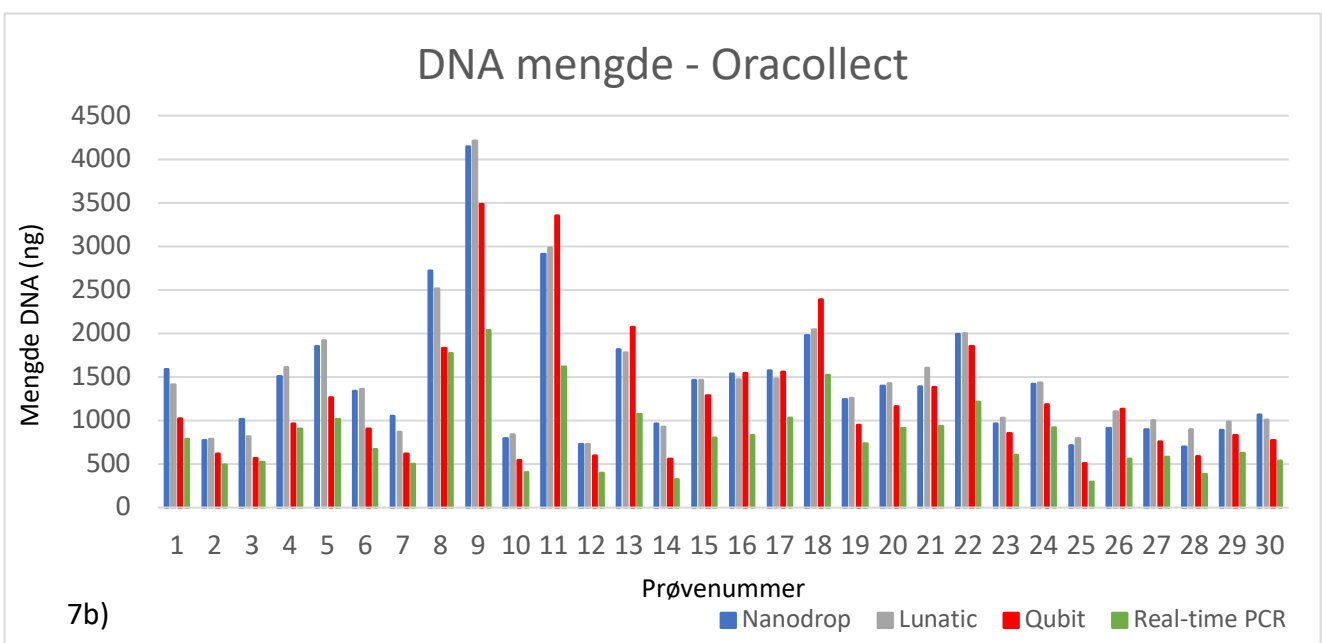
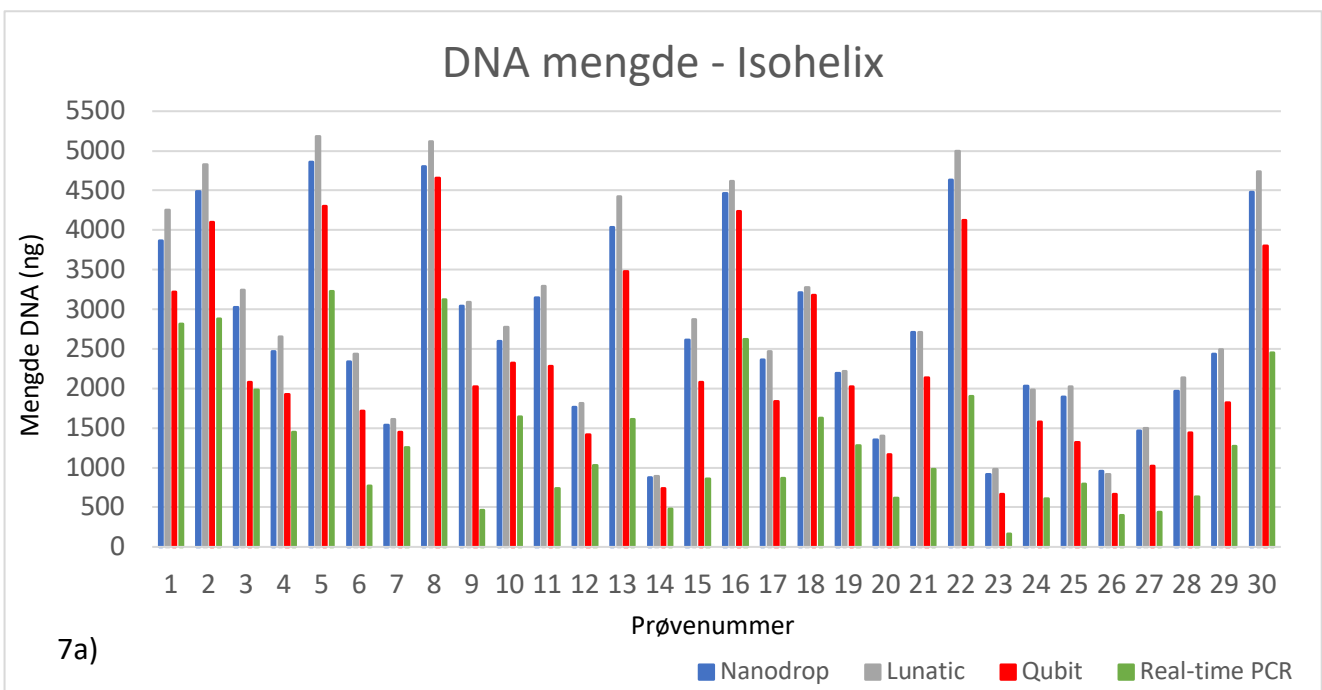
Størst andel av deltakerne som svarte på spørsmålet foretrakk Oracollect (76,7%) mens fåtallet (13,3%) foretrakk Isohelix. 10% av deltakerne har ikke svart på spørsmålet (se Figur 6).

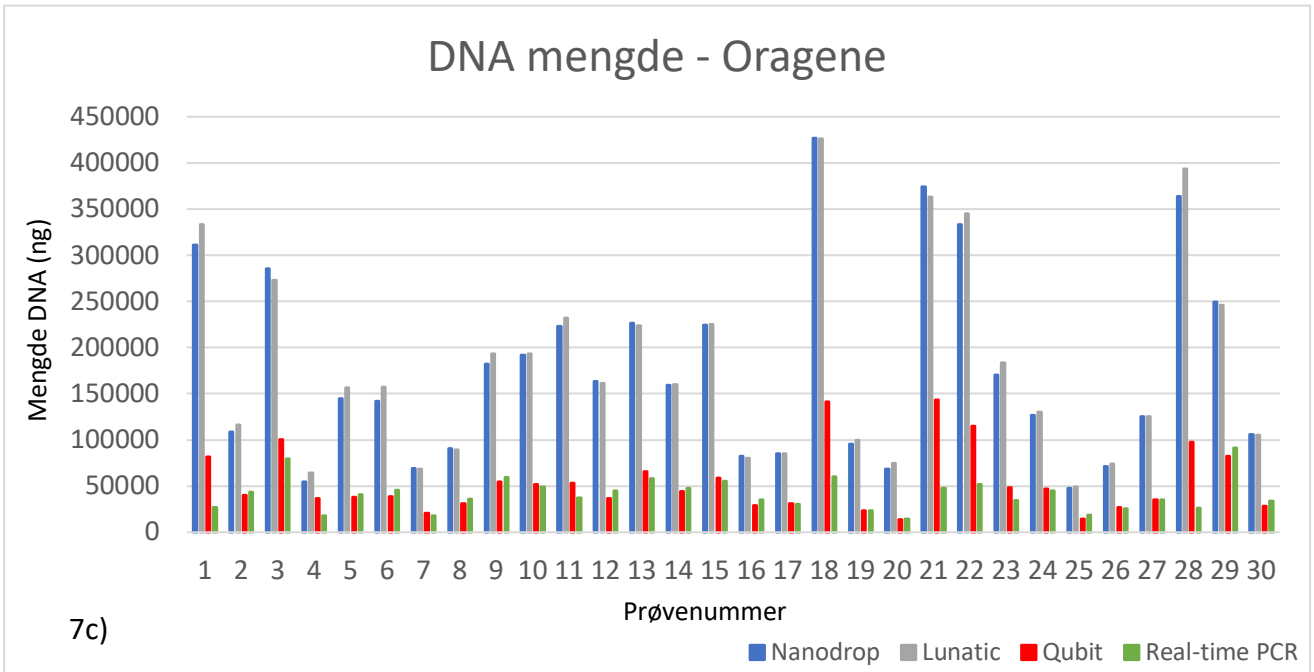


Figur 6: Resultater fra spørsmål til deltakerne om hvilken av munnhuleswabene de foretrakk.

4.2. Mengde DNA isolert fra de tre ulike prøvetakingsmetodene, målt med fire ulike metoder for konsentrasjonsmåling

Ved å sammenligne hvilke mengder DNA den samme prøven får på de ulike instrumentene (se Figur 7), ser man at Nanodrop og Lunatic gir relativt høye og like resultater. For munnhuleavskrapene (Isohelix og Oracollect) ligger DNA-mengdene fra Qubit en del lavere enn Nanodrop og Lunatic, mens DNA-mengdene fra Real-Time qPCR ligger lavest. For spyttprøvene (Oragene) er også DNA-mengdene fra Qubit og Real-Time qPCR en del lavere enn resultatene fra Nanodrop og Lunatic, men de ligger relativt likt i forhold til hverandre.

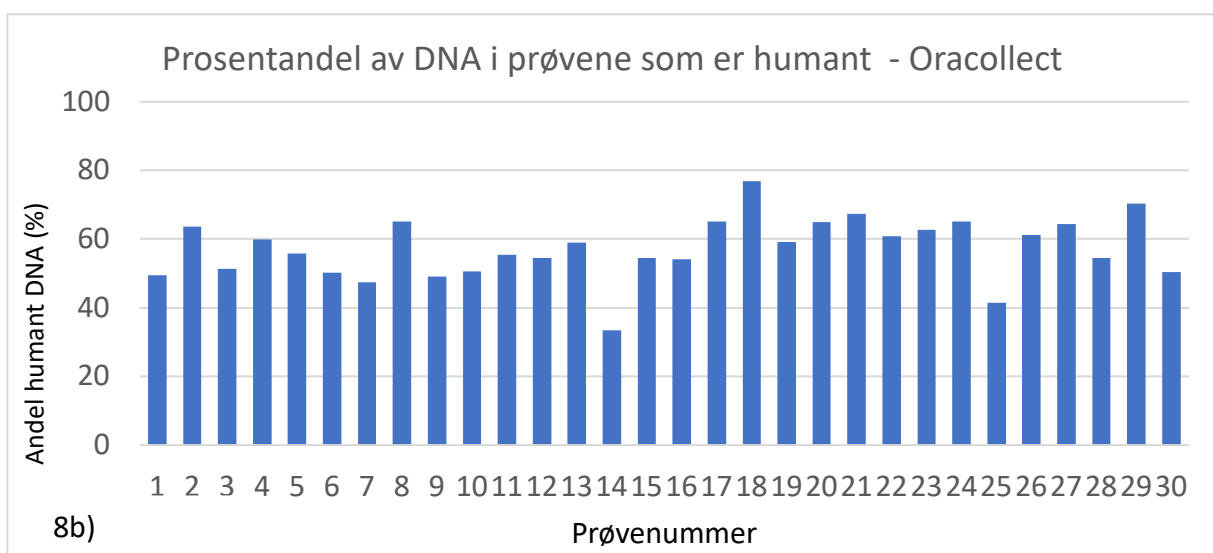
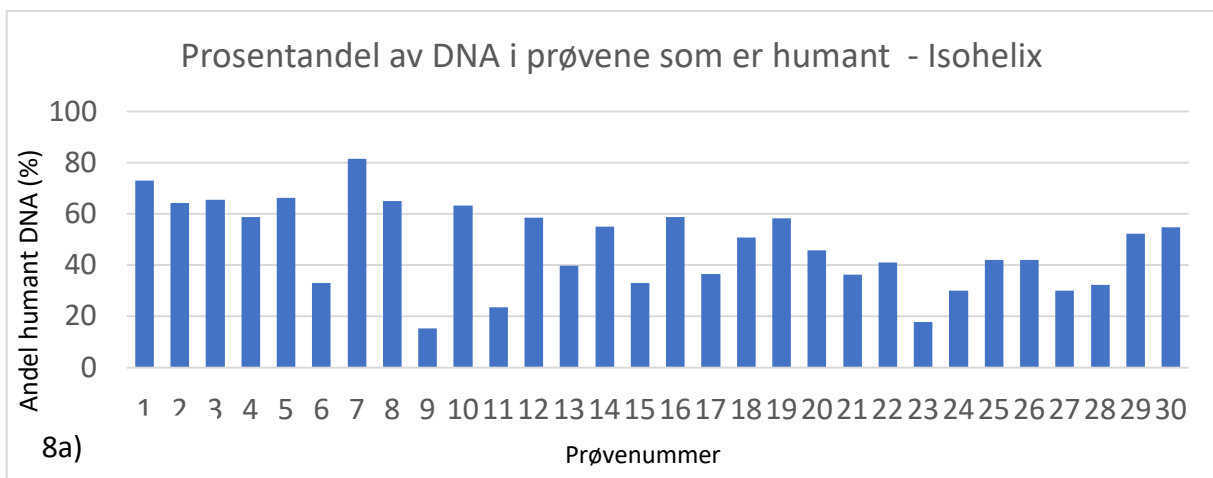


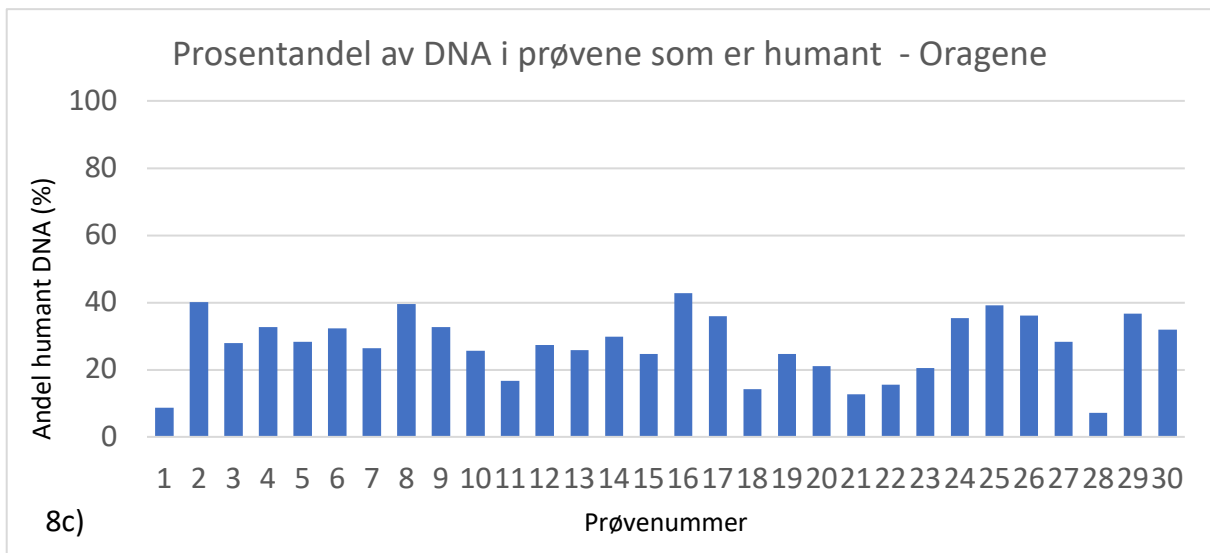


Figur 7: Mengde DNA fra tre ulike prøvetakingsmetoder; A) Isohelix, B) Oracollect og C) Oragene. Mengde DNA er målt med fire ulike metoder; Nanodrop, Lunatic, Qubit og Real-Time qPCR. X-aksen viser prøvenummeret, og y-aksen representerer mengden DNA i nanogram (ng)

4.3. Mengde humant DNA i prøvene

Det ble beregnet prosentandel humant DNA for hver av prøvetakingsmetodene ved å sette mengde DNA fra Nanodrop til total mengde DNA, og beregne prosentandelen DNA-mengden fra Real-Time qPCR utgjør av dette (Se Figur 8). Årsaken til at Nanodrop sine resultater settes som total mengde DNA i prøvene, er at MGM i størst grad benytter Nanodrop til å måle DNA-konsentrasjoner i diagnostikken. Det er derfor av interesse å undersøke hvor mye av DNA-mengden fra Nanodrop som er humant. Real-Time qPCR detekterer kun humant DNA, og resultatene fra dette settes derfor som mengde humant DNA. Beregningene viser at Isohelix har varierende andel humant DNA da flere prøver ligger høyt (60-80%), mens noen ligger relativt lavt (15-25%). Oracollect-prøvene ligger jevnt rundt 40-60%. Oragene-prøvene ligger lavere enn munnhuleswabenes resultater, med andel humant DNA på rundt 10-40%.





Figur 8: Prosentandel humant DNA av total DNA-mengde i prøvene, tatt med tre ulike prøvetakingsmetoder; A) Isohelix, B) Oracollect og C) Oragene. DNA-mengden fra Nanodrop er her satt som 100 %, og DNA-mengden fra Real-Time qPCR som humant DNA. Prosentandelen humant DNA er altså beregnet i forhold til DNA-mengdene på Nanodrop. X-aksen viser prøvenummeret, og y-aksen representerer mengden humant DNA av total mengde DNA i prøvene, i prosent.

Det ble utført beregning av gjennomsnittlig prosentandel humant DNA, gjennomsnittlig mengde humant DNA og prosentavvik mellom høyeste og laveste prøve for de tre prøvetakingsmetodene for å kontrollere observasjonene i Figur 8 (se Tabell 3). Disse beregningene viser at Oracollect gir høyest prosentandel av humant DNA i prøvene med gjennomsnittsverdi på 57,2% og Oragene gir lavest med 27,3%. På gjennomsnittlig mengde av humant DNA er det Oragene som kommer best ut med høyest gjennomsnittlig mengde på 41,14 µg, og Oracollect som kommer lavest med 0,83 µg. Beregning av prosentavvik mellom høyeste og laveste prøve viser at Oragene har minst variasjon i prøvene med 145,4%, og Isohelix har høyest med 155,7%.

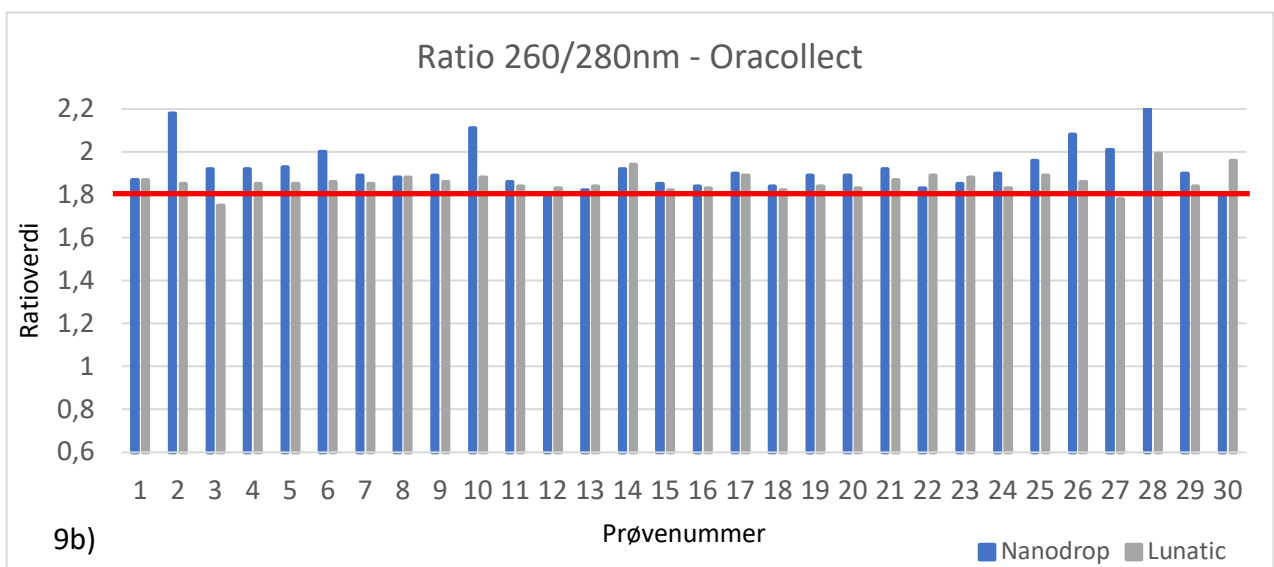
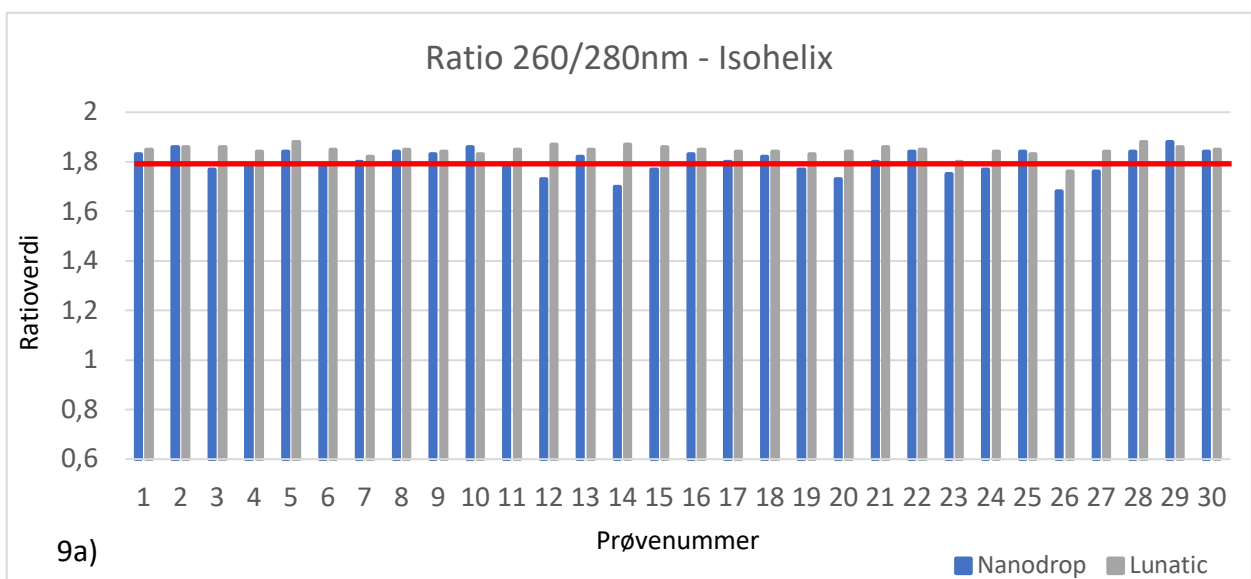
Tabell 3: Gjennomsnittsverdier av prosentandel humant DNA og mengde/utbytte DNA i prøvene, og beregnet varians hos de ulike prøvene.

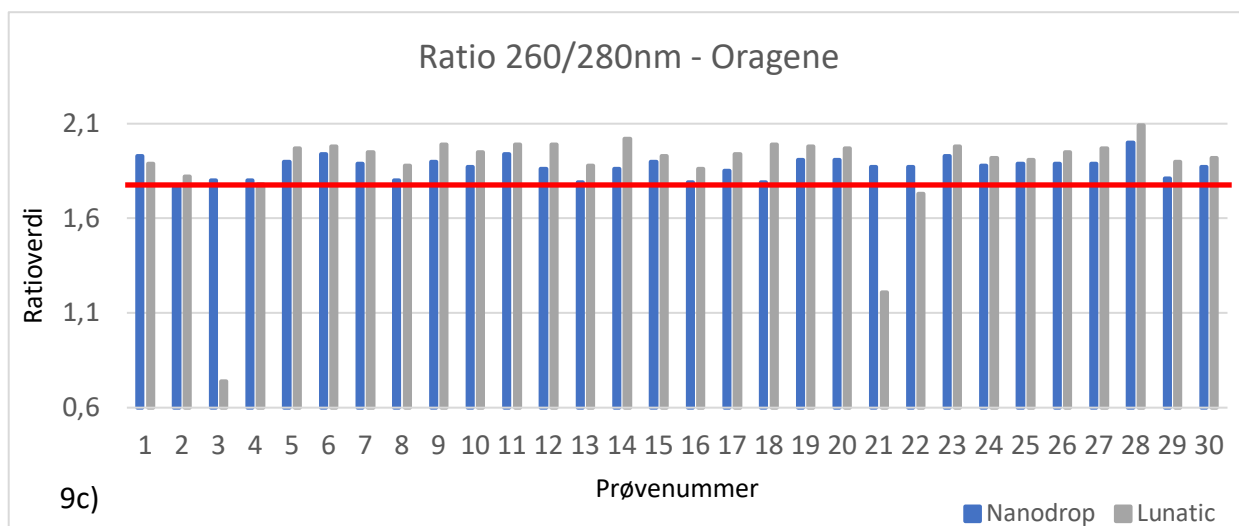
GJENNOMSNIITTSVERDIER FOR HUMANT DNA I PRØVE			
	Gjennomsnittlig prosentandel (%)	Gjennomsnittlig mengde humant DNA (µg)	Prosentavvik mellom høyeste og laveste verdi (%)
Isohelix	45,7	1,37	155,7
Oracollect	57,2	0,83	149,2
Oragene	27,3	41,14	145,4

4.4. Renhet av DNA i prøvene

4.4.1 Proteinkontaminering vurdert ved ratio 260/280 nm

På Nanodrop og Lunatic ble det målt ratio for absorbans ved 260 nm og 280 nm. Denne ratioen (260/280 nm) sier om renheten av DNA i prøvene. For målinger på Nanodrop er den optimale ratioverdien satt til 1,8, mens for Lunatic er den satt til 1,7-1,8. Siden prøvene kun måles på begge instrumentene for å sikre så riktige resultater som mulig, og begge instrumentene har 1,8 inkludert i optimal verdi, ble dette satt som optimal verdi for vurdering av prøvenes ratio. DNA isolert fra Isohelix har ratioverdier på jevnt rundt 1,8, mens Oracollect og Oragene har større variasjoner i absorbans ved 260/280 nm ratio (Se Figur 9).

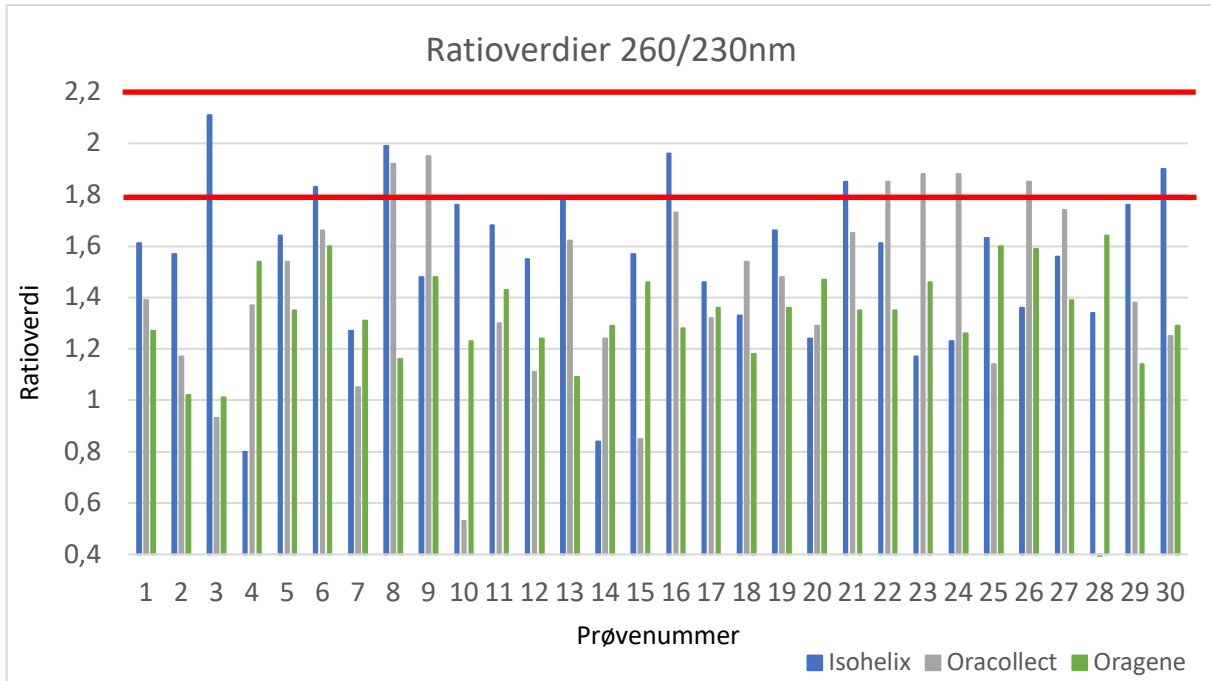




Figur 9: 260/280 nm ratio fra målinger av prøver fra tre prøvetakingsmetoder på Nanodrop og Lunatic; A) Isohelix, B) Oracollect og C) Oragene. Den røde streken markerer den optimale ratioverdien, på 1,8. X-aksen viser prøvenummeret, og y-aksen representerer ratioverdiene for prøvene.

4.4.2 Kontamineringer vurdert ved ratio 260/230 nm

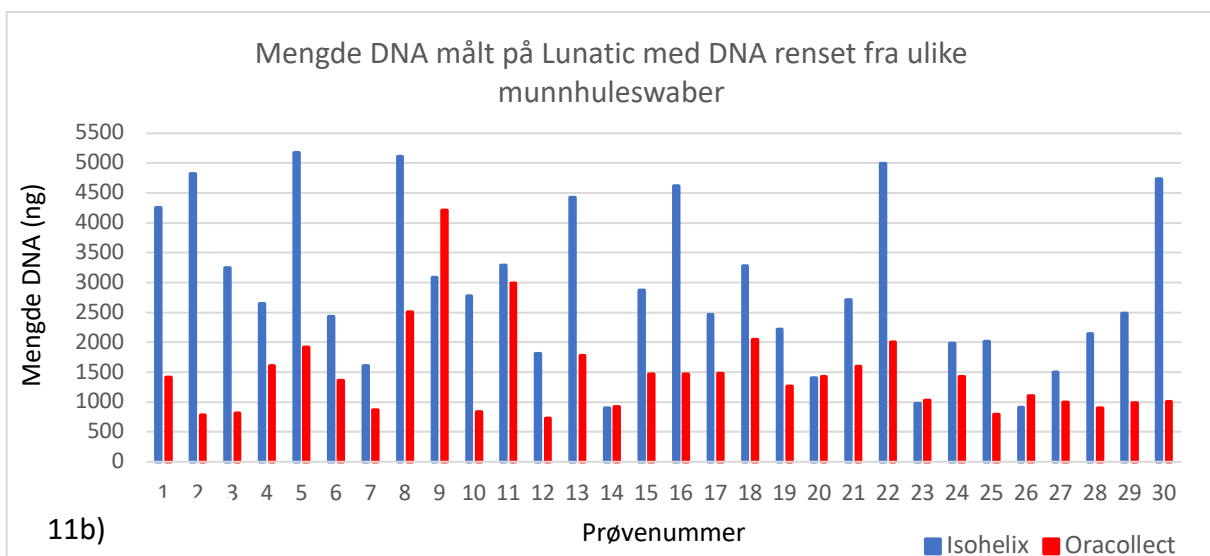
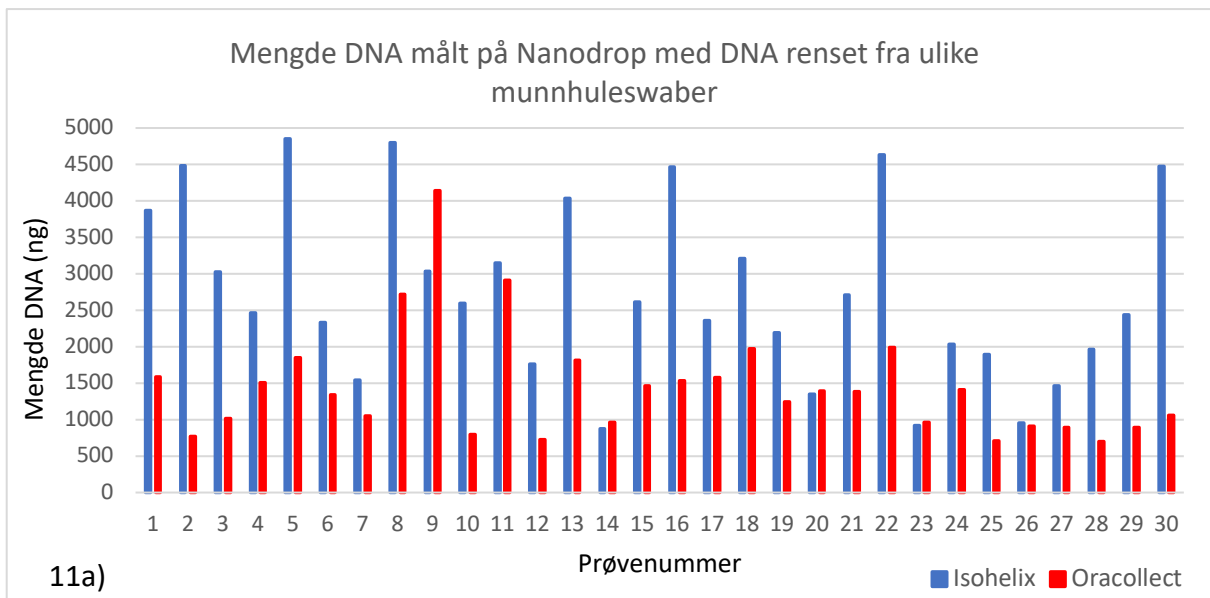
Ratioverdiene for absorbans ved 260 og 230 nm målt på Nanodrop skal optimalt sett ligge mellom 1,8-2,2. De fleste prøvene, for alle tre prøvetakingsmetodene, har ratioverdi under dette (Se Figur 10).

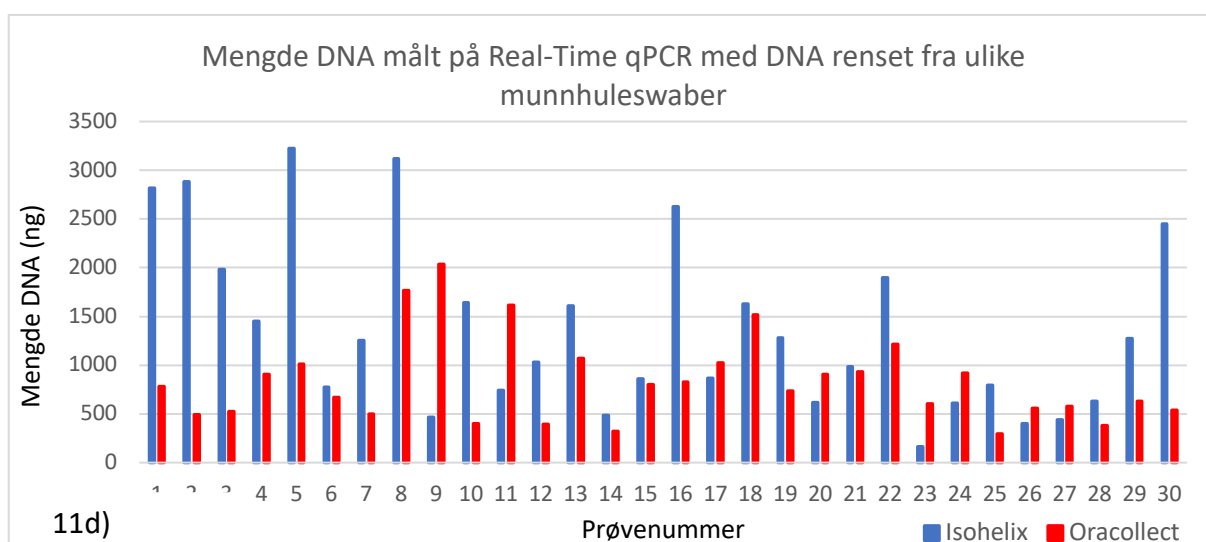
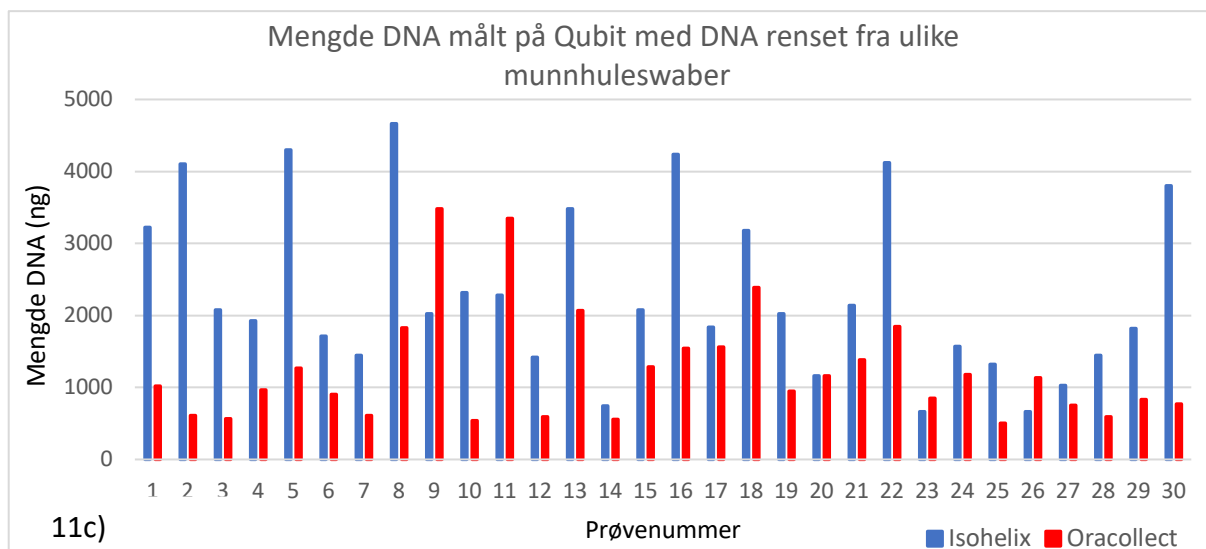


Figur 10: 260/230 nm ratio fra målinger av Isohelix-, Oracollect-, og Oragene-prøver på Nanodrop. De to røde strekene markerer området ratioverdiene optimalt sett bør ligge i, som er 1,8 og 2,2. X-aksen viser prøvenummeret, og y-aksen representerer ratioverdiene for prøvene.

4.5. Sammenligning av munnhuleavskrapene – Isohelix og Oracollect

For å illustrere forskjellen mellom de to munnhuleswabene (Isohelix og Oracollect) målt med de fire ulike instrumentene, på en tydeligere måte enn i figur 8, er de samme resultatene her presentert med begge munnhuleswabenes resultater fra samme instrument i samme figur (Se Figur 11). Samtlige av de fire figurene viser at prøvene tatt med Isohelix gir høyere DNA-mengder enn prøvene tatt med Oracollect, for alle prøvene med unntak av prøve 9 og 11.





Figur 11: Sammenligning av DNA-mengde i munnhuleavskrapene (Isohelix og Oracollect) målt med de fire ulike instrumentene; A) Nanodrop, B) Lunatic, C) Qubit og D) Real-Time qPCR. X-aksen viser prøvenummeret, og y-aksen representerer mengde DNA i prøvene i nanogram (ng).

For å undersøke om Isohelix gir signifikant høyere DNA-mengder enn Oracollect, ble det utført en ensidig, paret T-test. Dette er en test som kontrollerer om det ene av to ulike datasett er signifikant høyere enn det andre, altså om Isohelix faktisk gir høyere DNA-mengder enn Oracollect. Det testes da om forskjellene er av betydning eller skyldes tilfeldige feil. Det ble utført fire T-tester, en for hvert instrument, for å teste hypotesen på ett instrument av gangen. Alle T-testene ga samme resultat som observasjonene gjort på figur 11, altså at Isohelix gir signifikant høyere DNA-mengder enn Oracollect. For å se beregningene og utførelsen av T-testene, se siden «Sammenligning av munnhuleswaber» i Vedlegg 4 – «Rådata og beregninger av DNA-konsentrasjoner målt med fire ulike metoder».

5. DISKUSJON

5.1. Innsamlingen av prøvemateriale

Etter innsamlingen av prøvemateriale, fikk deltakerne mulighet til å gi muntlig tilbakemelding på hvilken av munnhuleswabene de foretrakk. De fleste deltakerne svarte at de likte munnhuleswabben fra Oracollect best (76,7%) (Se Figur 6). Ikke alle deltakerne oppga hvorfor de foretrakk Oracollect. De som derimot oppga grunn, begrunnet dette med at prøvetakingen tok kortere tid, det vil si kun 10 sekunder sammenliknet med Isohelix som tar 1 minutt. Noen svarte også at svampen på Oracollect munnhuleswabben opplevdes som mykere enn på Isohelix munnhuleswabben. Dette tyder på at Oracollect munnhuleswab trolig kan være mer behagelig for pasientene enn Isohelix munnhuleswab til munnhuleavskrap.

Prøvetakingens art, med tanke på komfort, kan spille en stor rolle ved prøvetaking av utfordrende pasientgrupper. Dette kan være barn, enkelte eldre eller pasienter med utviklingshemming. Dersom det for eksempel skal tas prøve av et barn, kan man oppleve at barnet, ofte avhengig av alder, motsetter seg prøvetakingen. Dette kan skyldes at det oppleves som skummelt eller fordi barnet ser for seg at prøvetakingen kan være ubehagelig. Det er derfor viktig at prøvetakerne gjør det de kan for å bremse barnets motstand (37). Dette kan blant annet gjøres ved at det benyttes utstyr som er minst mulig tidskrevende og som fører til at barnet opplever minst mulig ubehag. Eldre og meget syke pasienter kan også ha skjøre og ømfintlige slimhinner, derfor kan det ha stor betydning for denne typen pasienter hvor mild munnhuleswabben er for slimhinnene. Ved prøvetaking av disse pasientene, kan derfor en mykere munnhuleswabben være best å benytte.

Det tyder altså på at Oracollect vil være den mest behagelige munnhuleswabben å bruke på barn, eldre og veldig syke pasienter. Samtidig burde ikke dette resultatet alene avgjøre hvilken munnhuleswabben som er mest hensiktsmessig å benytte i klinikken, men det kan bidra i en helhetsvurdering.

I dette prosjektet ble prøvetakingen utført av deltakerne selv, da det i en diagnostisk situasjon vil være pasienten selv som tar prøvene hjemme. Det ble derfor vurdert som hensiktsmessig at deltakerne fikk ta prøvene selv, slik at resultatene ble tilnærmet likt en reell diagnostisk

situasjon. Likevel var det også ønskelig at prøvene skulle representere prøvetakingsmetodene og deres respektive prosedyrer (se Vedlegg nr. 1-3 for prosedyrer for prøvetaking) slik at eventuelle feil under prøvetaking ikke ville påvirke vurderingen av munnhuleswabene. Deltakerne fikk derfor informasjon på forhånd om å ikke innta mat og/eller drikke minst én time før prøvetakingen, og fikk muntlig instruksjon om hvordan prøvetakingen skulle utføres. Ettersom prøvene er tatt på ulike personer og de har utført prøvetakingen selv, vil det kunne være varierende kvalitet og/eller kvantitet på prøvene. Siden det er 30 personer som har avgitt prøver, vil likevel ikke enkeltprøver med dårlig kvalitet og/eller kvantitet påvirke resultatet i betydelig grad da man likevel vil kunne se den reelle sammenhengen mellom prøvetakingsmetoden og resultatene.

5.2. Sammenlikning av DNA-utbyttet for alle 3 prøvetakingsmetodene målt med Nanodrop, Lunatic, Qubit og Real-Time qPCR

Figur 7a-c sammenlikner resultatene for hver munnhuleswab og spytt-samleren, fra hvert analyseinstrument. For begge munnhuleswabene og spytt-samleren, var det Nanodrop og Lunatic spektrofotometrene som ga høyest DNA-mengder. Fluorometeret Qubit ga betydelig lavere DNA-mengder i prøvene. Dette kan være som følge av Qubit instrumentets spesifisitet for dobbeltrådig DNA (34). I motsetning til Nanodrop og Lunatic spektrofotometrene, vil derfor Qubit i større grad utelukke andre komponenter i sine målinger av DNA. Dette kan for eksempel være RNA, proteiner eller andre komponenter i prøven som anses som støy. Resultatene fra Real-Time qPCR viser, generelt sett, lavest DNA-mengder for begge munnhuleswabene og spytt-samleren. Dette er forventet da det i munnhulen finnes bakterielt DNA i tillegg til humant (5, s. 68), og dette er en metode som kvantifiserer og identifiserer kun humant DNA. Likevel ser man at for nokså mange av spyttprøvene ligger Real-Time qPCR resultatene høyere enn Qubit resultatene, noe som strider imot tanken om at Real-Time qPCR har den høyeste spesifisiteten. Årsaken til dette er usikker, men kan trolig skyldes at små dråper av prøvematerialet har vært igjen i pipetten under fortytning av prøvene til analyse på Qubit. Dette er fordi rensed DNA fra spyttprøvene opplevdes som mer viskøst enn rensed DNA fra munnhuleprøvene. Dette kan ha ført til at for lite DNA ble tilsatt under fortytningene, som da kan ha ført til at resultatene fra Qubit ble lavere enn det reelt skulle være for spyttprøvene. Det kan likevel ikke utelukkes at det kan skyldes andre årsaker.

Fra Real-Time qPCR analysen var det noen av parallellene som hadde store prosentavvik. Det ble valgt å ikke forkaste noen av parallellene, fordi MGM ikke har en spesifikk grense og etablerte rutiner for når enkeltverdier skal forkastes. Årsaken til de høye prosentavvikene mellom parallellene kan mistenkes å være at noe av prøvematerialet hang igjen i pipettespissen, ved pipettering til 384-brønns platen. Dette er fordi tilfeldige feil ikke ville gitt så høye prosentavvik. Ved en eventuell forkastning av de parallellene som forårsaket de høyeste prosentavvikene, framkommer det fra beregninger utført (se Vedlegg 5), at det ikke vil bli endringer i resultatene som vil medføre noen endringer i betydningen av resultatene. Forholdene mellom de ulike prøvetakningsmetodenes resultater forblir den samme, og dermed vil det ikke påvirke totalvurderingen av prøvetakingsmetodene om disse parallellene forkastes eller ikke. Det ble derfor besluttet å beholde resultatene fra alle parallelle målinger i Real-Time qPCR metoden.

I dette prosjektet ble det ønsket å følge MGM sine prosedyrer og rutiner. Siden avdelingen ikke har satt grenser for slike avvik, ble det utfordrende å vurdere om verdiene som skilte seg ut i parallellene, skulle forkastes. Det vil derfor være hensiktsmessig om MGM utarbeider en slik prosedyre for når enkeltverdier fra duplikate målinger i Real-Time qPCR kan forkastes for denne metoden.

For Oracollect og Isohelix munnhuleswabene observeres det at analysemetodene med minst spesifisitet (Nanodrop og Lunatic), gir høyest DNA-mengder (Figur 7a-b). Det merkes også i resultatene at DNA-mengden synker etter hvert som analysemetodene blir mer spesifikke. Derfor ser man at resultatene fra Qubit (Figur 7a-c), er lavere enn resultatene fra Nanodrop og Lunatic. Videre ser man at målingene på Real-Time qPCR (Figur 7a-c) gir lavest resultater. Dette er også metoden som er mest spesifikk for humant DNA. For spyttprøvene observeres det derimot at konsentrasjonene synker mer drastisk, og ikke like kontinuerlig og jevnt som munnhuleprøvene, fra analysemetoden med minst spesifisitet til analysemetoden med høyest spesifisitet. Nanodrop og Lunatic gir betraktelig høyere DNA-mengde enn Qubit og Real-Time qPCR for spyttprøvene. Forklaringen på dette kan være at det blir sterkere oppkonsentrering av mikrober ved innsamling av spytt, ettersom det samles inn et større volum av biologisk materiale sammenliknet med munnhuleavskrap. Dette kan føre til at det totale antallet

nukleinsyrer i spyttprøvene blir høyere. Derfor vil det være stor forskjell mellom totalt antall nukleinsyrer målt med absorpsjonsspektrofotometri, sammenliknet med dobbeltrådig DNA og humant DNA, målt på henholdsvis Qubit og Real-Time qPCR.

Resultatene i denne studien tyder altså på at det kan være hensiktsmessig å måle konsentrasjon av DNA for spyttprøvene på Qubit i forkant av genetiske analyser. Grunnen til at dette anbefales fremfor Real-Time qPCR, til tross for at Real-Time qPCR er den mest spesifikke metoden for kvantifisering av humant DNA av de fire metodene, er at Real-Time qPCR normalt sett ikke benyttes i rutinen. Dette er en metode med mye forberedelser og flere reagenser. I tillegg er det en mer tidkrevende metode, både med tanke på pipettering til brønnene og selve analysetiden på instrumentet. Qubit krever også forberedelser i forkant av analyseringen, men det er færre reagenser, og både forberedelsene og analysetiden er betydelig kortere. Samtidig er Qubit fortsatt mer spesifikk enn Nanodrop og Lunatic. Dette fordi Nanodrop og Lunatic detekterer flere komponenter i prøven, mens Qubit kun detekterer dobbeltrådig DNA, og dermed gir en mer riktig tilnærming på mengde humant DNA i prøven. På grunn av dette ble Qubit vurdert som mest hensiktsmessig for måling av DNA-konsentrasjon i spyttprøver.

I en lignende studie har det blitt testet utbyttet av DNA fra munnhule- og spyttprøver av barn. Denne studien konkluderte med at spyttprøvene ga størst utbytte av DNA kontra munnhuleprøvene, men begge metodene ga gode kvalitative og kvantitative resultater som var tilstrekkelig for utførelse av større genetiske analyser (38). Samme tendenser vises i dette prosjektet, da spyttprøvene ga høyest DNA-mengder, men likevel ga samtlige av munnhuleprøvene tilstrekkelig med DNA til å kunne utføre genetiske analyser. Det er selvfølgelig en fordel å kunne ha ekstra prøvemateriale tilgjengelig, dersom det skal settes opp flere genetiske analyser. Basert på dette, vil det være gunstig å velge metoden som gir mest utbytte med hensyn til kvantitet. I dette prosjektet hadde spyttprøvene gjennomsnittlig utbytte på 41,14 µg (Tabell 3) for humant DNA kvantifisert ved hjelp av Real-Time qPCR. Isohelix munnhuleswab hadde gjennomsnittlig utbytte på 1,37 µg og Oracollect hadde gjennomsnittlig utbytte på 0,83 µg. Derfor vil det være gunstig å benytte spyttprøver som innsamlingsmetode, dersom det kreves større mengder med humant genetisk materiale til genetiske analyser.

Ved MGM er det et ønske at konsentrasjonen av DNA skal være over 10 ng/ μ L, men avhengig av metode må det vurderes om DNA kan brukes. Noen metoder er mer sensitive enn andre, og kvaliteten på prøvematerialet må derfor vurderes for å se om det kan brukes eller ikke. Noen ganger må man be om ny prøve selv om konsentrasjonen er over 10 ng/ μ L, andre ganger kan det holde med lavere konsentrasjoner dersom kvaliteten er god nok. Alle tre prøvetakingsmetodene som er benyttet i dette prosjektet, anses som tilstrekkelig med tanke på kvantitet.

5.3. Ratioverdier fra spektrofotometerene Nanodrop og Lunatic for å vurdere renhet av DNA i prøvene

Renheten til ferdig isolert DNA kan vurderes ut fra 260/280nm ratio til prøvene målt på Nanodrop og Lunatic, og 260/230 nm ratio målt på Nanodrop. Ut fra Figur 9 a-c, ser man at DNA-prøvene fra Isohelix har flest ratioverdier som ligger nærmest kravet på 1,8 for 260/280 nm ratio på både Nanodrop og Lunatic. Dette kan tyde på at renseprosedyren for Isohelix har vært vellykket. Dermed er DNA-prøvene fra Isohelix av best renhet når det gjelder 260/280 nm ratio sammenliknet med prøvene fra Oragene og Oracollect. Man ser likevel i Figur 10, at det er få DNA-prøver som tilfredsstiller kravet på 1,8-2,2 for 260/230 ratio. Dette kan tyde på at det i mange av prøvene er interfererende komponenter som absorberer ved 230 nm (11). Det er vanskelig å si med sikkerhet hvilke komponenter dette kan være. Det kan tenkes at PBS bufferen absorberer ved 230 nm, da dette er en saltløsning på lik linje med guanidinsalt som absorberer ved 230 nm. I så fall er det mulig at det er rester av denne bufferen i noen av prøvene, noe som har bidratt til lavere 260/230 nm ratio.

5.4. Mengde humant DNA sammenliknet med mengde totalt DNA

I Tabell 3 vises den gjennomsnittlige prosentandelen av humant DNA i prøvene. Resultatene viser at Isohelix har en gjennomsnittlig prosentverdi på 45,7%, Oracollect på 57,2% og Oragene på 27,3%. Det er altså munnhuleswabene, med Oracollect i spissen, som gir størst andel humant DNA i forhold til mengden totalt DNA innhentet ved prøvetaking. Dette kan

også sees i Figur 8a-c, hvor man ser fordelingen av humant DNA mot totalt DNA i prøven, for de tre ulike prøvetakingsmetodene. At Oracollect kommer høyest ut basert på prosentandel humant DNA i prøvene, kan skyldes at Oracollect har en stabiliseringsvæske som munnhuleswaben plasseres i umiddelbart etter prøvetaking, noe som kan bidra til redusert vekst av bakterier i prøvematerialet. Munnhuleswaben fra Isohelix kommer ikke med en slik stabiliseringsvæske, og munnhuleswaben blir derfor plassert i en tom beholder frem til den kommer til laboratoriet, noe som kan ha ført til vekst av bakterier fra munnhulen, og dermed forklare hvorfor prosentandelen humant DNA er lavere. Oragene har også en slik stabiliseringsvæske som skal hindre bakterievekst, men har likevel lavest prosentandel humant DNA sammenlignet med munnhuleswabene. Dette kan skyldes, som tidligere nevnt, at oppkonsentreringen av mikrober er høyere ved denne prøvetakingsmetoden. Ut ifra dette, kan det tyde på at munnhuleprøvene gir bedre spesifisitet enn spyttprøvene.

Ser man derimot på gjennomsnittlig mengde av humant DNA (Tabell 3), ser man at Oragene gir høyest utbytte med 41,14 µg. Deretter kommer Isohelix med 1,37 µg og til slutt kommer Oracollect med 0,83 µg, som dermed har det laveste utbyttet av humant DNA. Dette viser at til tross for at Oracollect har høyest andel humant DNA i prøvene, og dermed har høyest spesifisitet på prøvematerialet, så gir den lavest utbytte.

Til tross for at Oracollect gir høyest andel humant DNA, av den totale mengden DNA samlet med munnhuleswaben, betyr det altså ikke at denne metoden er den mest hensiktsmessige å benytte i klinikken. Isohelix viser seg å gi større utbytte av DNA enn Oracollect. Ifølge MGM er det mengden humant DNA som er av størst betydning for om de genetiske analysene kan utføres. Dermed vil mengden humant DNA som innhentes ha større betydning for sammenligningen av munnhuleswabene, enn hvor stor prosentandelen det humane DNA-et utgjør av prøven. Altså kommer Isohelix bedre ut i sammenligningen av munnhuleswabene, fordi den gir høyere mengde humant DNA, til tross for at Oracollect gir høyere prosentandel humant DNA i prøvene.

5.5. Sammenlikning av DNA-utbytte fra munnhuleswabene Oracollect og Isohelix

Ved sammenlikning av munnhuleswabene fra Oracollect og Isohelix, gir Oracollect lavere mengder av DNA enn munnhuleswabene fra Isohelix. Den største forskjellen i DNA-mengdene vises i Figur 11a-b, der mengdene fra munnhuleswabene er sammenliknet på Lunatic og Nanodrop spektrofotometrene. I disse figurene observeres det at for flere av prøvene har Isohelix dobbelt så høy mengde av DNA enn Oracollect. Det vises også generelt sett at Isohelix har høyere DNA-mengder enn Oracollect.

Samme tendenser forekommer også ved sammenlikning av Oracollect og Isohelix på Qubit og Real-Time qPCR (Figur 11c-d). Her er det derimot generelt sett mindre forskjeller i DNA-mengde mellom de to munnhuleswabene, men man ser at antall prøver der Isohelix har høyest DNA-mengde dominerer. Grunnen til at forskjellene blir mindre mellom Isohelix og Oracollect etter hvert som analysene blir mer spesifikke, kan være fordi det er mindre bakterielt DNA i prøvene samlet med munnhuleswabene fra Oracollect, sammenliknet med prøvene samlet med munnhuleswabene fra Isohelix.

Grunnen til at Isohelix viser høyere mengder av DNA enn Oracollect, kan ha en sammenheng med varigheten på prøvetakingen. Prosedyren til Isohelix forteller at munnhuleswabene skal beveges rundt i munnen i ett minutt. Oracollect sin prosedyre sier derimot at munnhuleswabene skal beveges fram og tilbake 10 ganger på hver side av munnen, og stiller ikke krav til hvor fort eller hvor sakte dette skal gjøres. Dette kan muligens ha en betydning for forskjellene i resultatene, da prøvetakingen med begge munnhuleswabene ikke har blitt utført likt. Derfor kan det ikke utelukkes at Oracollect ville gitt samme resultater som Isohelix, dersom munnhuleswabene hadde blitt benyttet etter samme prosedyre som for munnhuleswabene fra Isohelix.

De ensidige parete T-testene for sammenlikning av munnhuleswabene, ble utført basert på mengden DNA i prøvene (se Kapittel 4.5). Alle T-testene ga samme resultat, og bekreftet dermed hypotesen om at Isohelix ga betydelig høyere DNA-mengder enn Oracollect. Dermed er det veldig lite sannsynlig at dette skyldes tilfeldige feil i målingene. Det kan antas at

resultatene legger seg tilnærmet normalfordelt ettersom det er 30 forskjellige resultater per metode. Ifølge *Skovlund* vil 30 observasjoner eller mer være nok til å anta at resultatene automatisk legger seg normalfordelt (39). Det blir derfor benyttet en ikke-parametrisk metode i dette prosjektet, altså T-test.

I vurderingen av munnhuleswabene kan det også være fordelaktig å se på det økonomiske aspektet. Ifølge prisene oppgitt fra MGM er Isohelix den rimeligste munnhuleswab (for priser se Kapittel 1.1). Prisen på Oracollect munnhuleswab er over fire ganger så stor som prisen for Isohelix. Ved innføring av Oracollect munnhuleswab, vil derfor kostnad på prøvetakingsutstyret øke. Av den grunn vil det være en økonomisk fordel å beholde Isohelix munnhuleswab til bruk for munnhuleavskrap.

6. KONKLUSJON

Ut fra resultatene fra dette prosjektet kan det konkluderes med at både spyttprøver og munnhuleavskrap gir tilstrekkelig humant DNA til å kunne utføre videre laboratorieanalyser. Spyttprøvene viste seg å ha dårligst spesifisitet, men begge prøvetakingsmetodene vil være gode alternativer til innhenting av prøvemateriale for videre DNA-analyser. Sammenligningen av de to munnhuleswabene til munnhuleavskrap viste, basert på resultatene fra dette prosjektet, at munnhuleswaben fra Isohelix var mest hensiktsmessig å bruke, både med hensyn til kvantitet for humant DNA og økonomi. Det anbefales derfor å beholde munnhuleswaben fra Isohelix for videre prøvetaking ved munnhuleavskrap ved MGM, Haukeland Universitetssjukehus.

7. KILDER

1. Alberts B, Hopkin K, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. Essential Cell Biology. 5.Utg. New York: W.W. Norton & Company; 2019. 734 s.
2. Qiagen. QIAamp DNA Blood Kits [Internett]. Qiagen; u.å. [Hentet 28.04.2023].
Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-blood-kits>
3. Tsai, R. DNA Purification Using Buffy Coat [Internett]. Thermo Fisher Scientific; 01.08.2015. [Hentet 18.05.2023] Tilgjengelig fra:
<https://www.thermofisher.com/blog/biobanking/dna-purification-using-buffy-coat/>
4. Sand O, Sjaastad Ø.V, Haug E, Bjålie J.G. Menneskekroppen. 3.Utg. sted: Gyldendal; årstall. 666 s.
5. Steen M, Degré M. Mikrober, helse og sykdom. 3.Utg. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS; 2020. 280 s.
6. Bioteknologirådet. Arv og genetikk [Internett]. Bioteknologirådet; u.å. [Oppdatert April 2023; Hentet 20.05.2023]. Tilgjengelig fra:
<https://www.bioteknologiradet.no/temaer/arv-og-genetikk/>
7. Helse Bergen. Seksjon for klinisk genetikk [Internett]. Bergen: Helse Bergen; 23.09.2016. [Oppdatert 24.01.2022; Hentet 02.05.2022]. Tilgjengelig fra:
<https://helse-bergen.no/avdelinger/laboratorieklinikken/medisinsk-genetikk/seksjonar/seksjon-for-klinisk-genetikk>
8. Harris DC. Quantitative chemical analysis. 8. Utg. New York: W. H. Freeman and Company Higher Education; 2010. 720 s.
9. Universitetet i Oslo. Spektrofotometri [Internett]. Oslo; 5. September 2019 [Oppdatert 6. September 2019; Hentet 10.04.2023]. Tilgjengelig fra:
<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/spektrofotometri.html>
10. Helbæk M. Statistikk for kjemikere. 2. Utg. Bergen: Vigmostad og Bjørke AS; 2016. 296 s.
11. Matlock, B. Assessment of Nucleic Acid Purity [Internett]. Wilmington: Thermo Fisher Scientific; u.å. [Hentet 08.05.2023]. Tilgjengelig fra:

<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

12. Harris DC, Lucy CA. Quantitative chemical analysis. 10. Utg. New York: Macmillan International Higher Education; 2020. 833 s.
13. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop 1000 Spectrophotometer: V3.8 User's Manual. [Internett]. Thermo Fisher Scientific; u.å. [Hentet 13.04.2023]. Tilgjengelig fra: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>
14. Unchained Labs. A look under the hood of Lunatic [Internett]. Unchained Labs; 2020. [Hentet 13.04.2023]. Tilgjengelig fra: https://www.unchainedlabs.com/wp-content/uploads/2021/12/Tech_Note_A_look_under_the_hood_of_Lunatic.pdf
15. Thermo Fisher Scientific. Qubit Fluorometric Quantification System Features. [Internett]. Thermo Fisher Scientific; u.å. [Hentet 02.05.2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/features.html>
16. Life Technologies. Real Time PCR Handbook [Internett]. Life Technologies Corporation; 2012. [Hentet 10.04.2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
17. Thermo Fisher Scientific. How TaqMan Assays Work [Internett]. Thermo Fisher Scientific; u.å. [Hentet 19.05.2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>
18. Thermo Fisher Scientific. Understanding Ct Values in Real-Time PCR [Internett]. Thermo Fisher Scientific; 17.10.2022. [Hentet 13.05.2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/understanding-ct-values/>
19. Berg J.M, Tymoczko J.L, Gatto Jr G.J, Stryer L. Biochemistry. 9.Utg. Sted: Macmillan International; årstall. 1096 s.
20. Walker SC, Engelke DR. Ribonuclease P: the evolution of an ancient RNA enzyme. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2006;41(2):77-102
21. Regjeringen. Veileder til lov 20.juni 2008 nr. 44 om medisinsk og helsefaglig forskning (helseforskningsloven) [Internett]. Regjeringen; u.å. [Hentet 09.05.2023]. Tilgjengelig

fra: <https://www.regjeringen.no/globalassets/upload/hod/hra/veileder-til-helseforskningsloven.pdf>

22. Helsedirektoratet. Helseforskningsloven [Internett]. Helsedirektoratet; u.å. [Hentet 14.03.2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.helsedirektoratet.no/tema/helseforskningsloven>
23. Lovdata. Lov om medisinsk og helsefaglig forskning (Helseforskningsloven) [Internett]. Lovdata; 20.06.2008. [Oppdatert 01.06.2021; Hentet 14.03.2023]. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2008-06-20-44?q=Helseforskningsloven>
24. Sikt. Gjennomføre et prosjekt uten å behandle personopplysninger [Internett]. Sikt; u.å. [Hentet 14.03.2023]. Tilgjengelig fra: <https://sikt.no/gjennomfore-et-prosjekt-uten-behandle-personopplysninger>
25. Sikt. Vanlige behandlingsgrunnlag i forskning [Internett]. Sikt; u.å. [Hentet 14.03.2023]. Tilgjengelig fra: <https://sikt.no/samtykke-og-andre-behandlingsgrunnlag>
26. Avdeling for medisinsk genetik. QIAamp - Rens av DNA fra munnhuleavskrap. I: EK kvalitetshåndbok. Bergen: Helse Bergen; 30. September 2021.
27. QIAGEN. QIAGEN Protease and Proteinase K [Internett]. [Hentet 09.04.2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/lab-essentials/enzymes/qiagen-protease-and-proteinase-k>
28. QIAGEN. Buffer AL [Internett]. [Hentet 09.04.2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/lab-essentials/buffers-reagents/buffer-al>
29. ORAcollect•dx. Laboratory protocol for DNA extraction from ORAcollect® •dx (OCD-100) using QIAamp® DNA mini kit [Internett]. DNA Genotek: Februar 2018. [Hentet 19.04.2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.dnagenotek.com/us/pdf/PD-PR-00668.pdf>
30. Avdeling for medisinsk genetik. Oragene - Rens av DNA fra spytt. I: EK kvalitetshåndbok. Bergen: Helse Bergen, 22. Oktober 2021.
31. Avdeling for medisinsk genetik. Konsentrasjonsmåling Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. I: EK kvalitetshåndbok. Bergen: Helse Bergen, 17. September 2021.
32. Avdeling for medisinsk genetik. Lunatic UV/Vis Spektrofotometer brukerveiledning. I: EK kvalitetshåndbok. Bergen: Helse Bergen, 13. Februar 2023.

33. Thermo Fisher Scientific. Qubit™ dsDNA HS and BR Assay Kits [Internett]. Thermo Fisher Scientific; u.å. [Hentet 14.03.2023]. Tilgjengelig fra: [Qubit™ dsDNA HS and BR Assay Kits \(thermofisher.com\)](https://www.thermofisher.com)
34. Avdeling for medisinsk genetikk. Qubit Fluorometer, Brukerveiledning. I: EK kvalitetshåndbok. Bergen: Helse Bergen, 18. Oktober 2022.
35. Ion Torrent. (2013, 16. September). *Demonstrated Protocol: Sample Quantification for Ion AmpliSeq Library Preparation Using the TaqMan RNase P Detection Reagents Kit*. (User Bulletin, Publication number: MAN0007732). Life technologies.
36. Thermo Fisher Scientific. Relative Quantitation Using Comparative CT Getting Started Guide [Internett]. Foster City: Thermo Fisher Scientific; 06.2010. [Hentet 09.05.2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2F4364016.pdf>
37. Storvik, N. Barn som gjør motstand mot prøvetaking [Internett]. Tromsø: Bioingeniøren; 09.12.2021. [Oppdatert 09.12.2021; Hentet 01.05.2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.bioingenioren.no/fag/fag-kronikk/barn-som-gjor-motstand-mot-provetaking/>
38. Koni AC, Scott RA, Wang G, Bailey MES, Peplies J, Bammann K, Pitsiladis YP. DNA yield and quality of saliva samples and suitability for large-scale epidemiological studies in children. *Int J Obes*. 2011;35(1). Tilgjengelig fra: <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.43>
39. Skovlund E. Når bør man velge en ikke-parametrisk metode? [Internett]. *Tidsskriftet*. 2017;16. DOI: 10.4045/tidsskr.17.0219. Tilgjengelig fra: <https://tidsskriftet.no/2017/05/medisin-og-tall/nar-bor-man-velge-en-ikke-parametrisk-metode>

8. VEDLEGG

Vedlegg 1: Prosedyre for prøvetaking - Isohelix

Vedlegg 2: Prosedyre for prøvetaking - Oracollect

Vedlegg 3: Prosedyre for prøvetaking – Oragene

Vedlegg 4: Rådata og beregninger av DNA-konsentrasjoner målt med fire ulike metoder.xlsx

Vedlegg 5: Vurdering av forkastning av paralleller.xlsx