

Thema Moleculaire Biologie

Kwaliteitsbewust werken met moleculair biologische technieken

A. MARTENS, J. DANNEBERG en J. GERRITS

In dit artikel worden een aantal aspecten besproken met betrekking tot kwaliteitsborging van moleculair biologisch onderzoek binnen de Nederlandse ziekenhuis laboratoria. Zowel interne- als externe kwaliteitsbewaking komen aan de orde. Daarnaast wordt ook aandacht besteed aan scholing en ontwikkeling van nieuwe toepassingen.

Trefwoorden: moleculair biologisch onderzoek; PCR; DNA; kwaliteitscontrole

Moleculair biologische technieken zijn inmiddels niet meer weg te denken uit de Nederlandse ziekenhuislaboratoria. Alleen al aan de externe kwaliteitscontrole rondzendingen die enkele jaren geleden door de WMBD (Werkgroep Moleculair Biologische Diagnostiek, een werkgroep van de NVKC) zijn geïnitieerd, nemen intussen meer dan 30 klinisch-chemische laboratoria deel. Ook door onze collega's in de Medische Microbiologie en Pathologie worden deze technieken breed toegepast. Vele diagnostische problemen worden m.b.v. moleculair biologische technieken snel, eenduidig en efficiënt opgelost.

Zoals bij elke laboratoriumtechniek kent echter ook de moleculaire biologie specifieke problemen en valkuilen. Door voldoende kennis van de gebruikte technieken, passende voorzorgsmaatregelen en adequate kwaliteitscontroles kunnen onjuiste interpretaties tot een minimum worden beperkt. Veel problemen zijn terug te voeren tot de grote gevoeligheid van de Polymerase Chain Reaction (PCR), een zeer veel gebruikte techniek binnen de moleculaire biologie. Met behulp van de PCR wordt een klein DNA-fragment tot wel een miljard maal vermenigvuldigd. Een minimale 'besmetting' (contaminatie) van een monster kan leiden tot een vals positief resultaat; anderzijds is de PCR (en de eventueel daar op volgende digestie) gevoelig voor sporen van remmende stoffen wat weer kan leiden tot een vals negatief resultaat.

Binnen de ziekenhuis laboratoria zijn op het gebied van moleculair biologische diagnostiek globaal drie toepassingsgebieden te onderscheiden:

- *erfelijke aandoeningen*: detectie van mutaties/deleties/polymorfismen/etc. die in principe in *alle* kernhoudende cellen van het lichaam aantoonbaar zijn, z.g. kiemlijnmutaties
- *maligniteiten*: detectie van *verworven* mutaties/deleties/translocaties/etc. die worden gezien bij maligne transformaties van cellen
- *infecties*: detectie van DNA of RNA van bacteriën, virussen of ander micro organismen

Daarnaast zijn er in Nederland enkele laboratoria die zich bezig houden met forensische toepassingen (CLB en TNO) waaronder bijvoorbeeld vaderschapsonderzoek of onderzoek voor justitie kan worden gerekend. Afhankelijk van de toepassing zal extra aandacht moeten worden geschonken aan cruciale onderdelen van de toegepaste techniek. Zo zal bijvoorbeeld bij forensische toepassingen de uiterste zorg worden besteed aan identificatie van personen terwijl bij de diagnostiek van infecties preventie van contaminatie van materiaal de hoogste prioriteit heeft.

Hieronder worden een aantal aspecten met betrekking tot kwaliteitsborging van moleculair biologisch onderzoek behandeld (1,2,3,4,5); het is verre van volledig en is slechts bedoeld als een ruwe schets om enkele hoofdlijnen van kwaliteitszorg onder de aandacht te brengen die voor een ziekenhuis laboratorium van waarde kunnen zijn.

Inrichting van het laboratorium

Ter preventie van contaminatie worden binnen een moleculair biologisch laboratorium meestal drie fysiek gescheiden *niveaus* onderscheiden. Op niveau 1 vindt reagensbereiding plaats (DNA-'vrije' ruimte), op niveau 2 wordt DNA (RNA) geïsoleerd uit monsters en toegevoegd aan het reagens in de microreactievaatjes en op niveau 3 vindt de PCR, digestie en detectie plaats.

Niveau 3 is dan ook het meeste 'vervuilde' gedeelte van het laboratorium; d.m.v. de PCR zijn miljarden kopieën van het target gevormd die al bij het openen van het PCR-cupje zich via aerosolen kunnen verspreiden. Als deze gevormde producten reagens op niveau 1 zouden besmetten leidt dit massaal tot vals positieve reacties. Op niveau 2 kan een dergelijke contaminatie leiden tot bijvoorbeeld vals positieve reacties bij enkele individuele isolaten. Om verspreiding van PCR-producten te voorkomen wordt in niveau 3 in een zuurkast gewerkt of wordt binnen de

Twenteborg Ziekenhuis Almelo

Correspondentie: A. Martens, Klinisch Laboratorium, Twenteborg Ziekenhuis, Postbus 7600, 7600 SZ Almelo.
Ingekomen: 06.07.99

gehele ruimte een onderdruk gecreëerd. Indien dit soort constructies niet mogelijk zijn wordt tenminste gestreefd naar een fysiek zo groot mogelijke afstand tussen de verschillende niveaus. Op niveau 1 wordt gewerkt in een flowkast (of heerst overdruk). Een UV lamp op niveau 1 kan eventueel aanwezig DNA crosslinken zodat dit niet meer geschikt is als target in een PCR.

Sommige laboratoria, waar 'nested' PCR's worden uitgevoerd, werken nog met een niveau 4 om contaminatie te voorkomen omdat anders PCR-producten weer terug moeten worden gebracht naar niveau 2.

Laboratoriumbenodigdheden en reagens

Het werken met drie (of vier) fysiek gescheiden laboratoriumniveaus houdt ook in dat deze niveaus allemaal voorzien zijn van een eigen volledig pakket benodigdheden en reagentia. Dit betekent *per niveau* de aanwezigheid van bijvoorbeeld: microreactievaatjes (epjes), buizen met stoppen, rekjes, een serie pipetten van variabel volume met bijbehorende filtertips. Ook voorschriften en materiaal voor administratieve doeleinden zoals formulieren, pennen, stiften, mappen, papier, etc. dienen per niveau aanwezig te zijn. Deze materialen mogen dan ook niet tussen de locaties wisselen. Verwisseling kan worden voorkomen door zoveel mogelijk materialen, zoals rekjes, pipetten, identificatielabels per niveau kleur-gecodeerd te labelen (bijvoorbeeld niveau 1 = rood, niveau 2 = geel, niveau 3 = blauw). Een eventuele verwisseling valt zo direct op.

Transport van reactiemengsels vindt alleen plaats van niveau 1 naar 2 en vervolgens naar 3. Transport in de tegenovergestelde richting zou kunnen leiden tot contaminatie bijvoorbeeld via PCR-producten die zich hechten aan kleding, handen, etc., of omdat geïsoleerd DNA op niveau 2 het reagens op niveau 1 zou besmetten.

Door *filtertips* te gebruiken wordt aerosolvorming in het inwendige van de pipet voorkomen. Extra voorzieningen wat betreft kleding worden toegepast op niveau 1 (OK-jas + muts + slofjes) en op niveau 3 (OK-jas). Op alle niveaus worden handschoenen gedragen. Chemische contaminatiepreventie is mogelijk door toepassing van het '*UNG-protocol*' (Uracil-N-Glycosylase-protocol). Bij deze procedure wordt in plaats van Thymine de daarop gelijkende base Uracil in het PCR-product ingebouwd (door gebruik te maken van dUTP's in plaats van dTTP's). Tevens wordt elke PCR gestart met een UNG-incubatie. De werking van het enzym UNG berust erop dat het Uracil verwijderd uit de DNA-keten. Als vervolgens de oplossing wordt verhit valt de DNA-keten uiteen op de plaatsen waar Uracil is verwijderd en tevens wordt het UNG door de hoge temperatuur geïnactiveerd. Mocht er tijdens de voorbereidingen van de PCR ergens een contaminatie zijn opgetreden met (Uracil bevattend!) PCR-product dan zal dit product door deze procedure in dermate kleine fragmenten uiteenvallen dat dit niet meer bruikbaar is als target in de reactie. Het UNG-protocol wordt nogal eens gebruikt bij moleculair biologisch onderzoek naar infecties en maligniteiten omdat juist hier minimale contaminatie leidt tot vals positieve resultaten.

Het werken met RNA verdient speciale aandacht. In verband met de instabiliteit van dit materiaal moeten soms bijzondere maatregelen worden genomen; speciale afname condities, snel werken, zo veel mogelijk RNase-vrij, gekoeld centrifugeren, epjes op ijs, zo nodig RNase-remmers toevoegen, etc. Met name het RNase-'vrij' werken blijkt in de praktijk vaak moeilijk haalbaar.

Er wordt gestreefd naar een grote mate van uniformiteit (vaste pipetteervolumes voor bijvoorbeeld primers, DNA; vaste concentraties voor stockoplossingen van primers) om vergissingen te voorkomen. Door reactiecomponenten als bulk samen te voegen in een *mastermix* (bijvoorbeeld PCR-buffer + dNTP's + Taq-polymerase) kan het aantal pipetteerstappen geminimaliseerd worden en wordt de reproduceerbaarheid en snelheid van werken verbeterd. Ook wordt op deze wijze de steeds identieke samenstelling van het reagens per reactiecupje beter gewaarborgd.

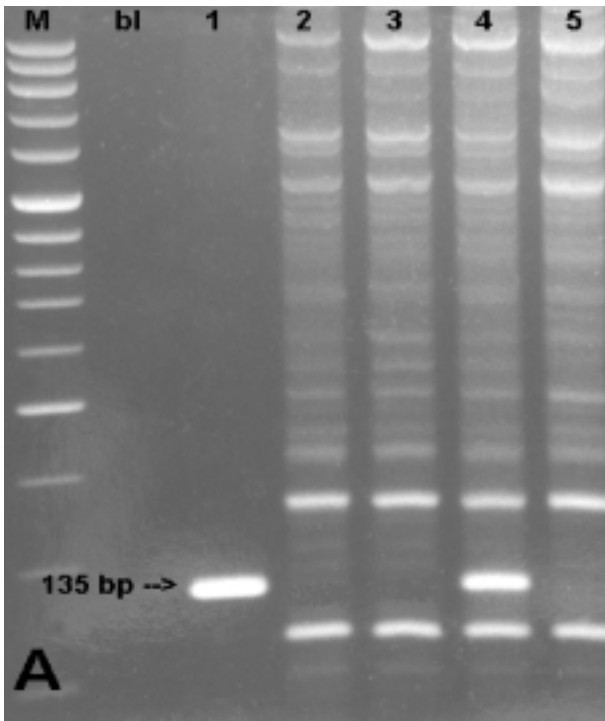
Na elke werkzaamheid wordt gereinigd met een 10% hypochloriet oplossing (tafeloppervlak, centrifuge, etc.) om eventueel nog aanwezig DNA af te breken. Met name niveau 1 kan het best worden gereinigd door goed geïnstrueerd personeel; onbevoegden kan men op dit niveau weren door de ruimte na gebruik goed af te sluiten.

Controles

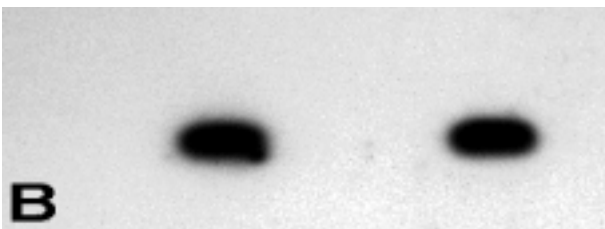
Bij moleculair biologisch onderzoek is het raadzaam om controles mee te nemen voor elk mogelijk resultaat; wild type, heterozygoot gemuteerd, homozygoot gemuteerd, de verschillende isotypen, etc. Op deze wijze zal blijken of het verkregen resultaat ook overeenstemt met het te verwachten resultaat. Dit geldt voor zowel de kwalitatieve testen als bij de (semi-) kwantitatieve testen. Voor deze laatste groep dienen controlematerialen te worden gebruikt, welke een waarde kunnen opleveren rond de cut-off-waarde; dit geldt bijvoorbeeld voor virologische testen.

Watercontroles (6,7) worden meegenomen om vast te stellen of er geen besmet reagens c.q. besmette laboratoriumbenodigdheden zijn gebruikt. Bij een watercontrole wordt aan het PCR-reagens in plaats van het geïsoleerde DNA (RNA) water toegevoegd. In principe mogen alleen primerbanden zichtbaar worden bij deze controle. Indien andere producten zijn gevormd wijst dit op contaminatie en dienen passende maatregelen (bron van contaminatie opsporen) te worden genomen. In ieder geval dient de gehele serie opnieuw te worden ingezet.

Bij de 'all or none' response testen (bijvoorbeeld onderzoek naar HLA-B27) dient een extra controle te worden ingebouwd om naast vals positieve vooral vals negatieve resultaten te detecteren. Het ontbreken van een PCR-product kan namelijk, naast het ontbreken van het desbetreffende polymorfisme, ook het gevolg zijn van een niet goed verlopen PCR. Een controle hiervan is bijvoorbeeld mogelijk met behulp van de *duplex-PCR-techniek*. Hiertoe wordt aan de PCR-mix een extra set primers, gericht tegen een andere (in principe altijd aanwezige) target toegevoegd ter controle van het verloop van de PCR. Voorwaarde



Figuur 1A. LS-PCR-patroon van HLA-B27. Van de DNA-samples 1-5 is een Low-Stringency-PCR uitgevoerd met de primers E91s/E136as [8] zoals beschreven onder de paragraaf controles. Bij de negatieve samples 2, 3 en 5 ontbreekt de 135-bp-band, wel is het controlepatroon aanwezig. De positieve samples 1 en 4 vertonen wel de 135-bp-band. Bij sample 1 ontbreekt het controlepatroon. In geval van positieve samples is het RAPD-patroon soms zwakker of afwezig. Mogelijk speelt voorkeur van de primers voor de specifieke target hierbij een rol (8).



Figuur 1B. Southern-blot hybridisatie van HLA-B27. Het patroon uit figuur 1A is gehybridiseerd met de HLA-B27 specifieke oligonucleotide-probe CL-7. Alléén de HLA-B27-specifieke band van 135 bp geeft een hybridisatiesignaal, waarmee de specificiteit van de LS-PCR is aangetoond. Bij de negatieven is geheel geen band te zien (8). M: molecuulgewichtmarker; 1: pos. controle; 2: neg. controle; bl: water-blanco.

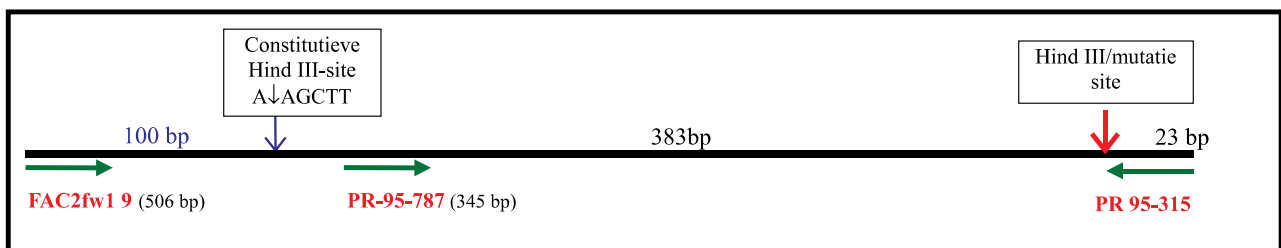
voor deze vorm van controle is, dat de verschillende primersets dezelfde optimale PCR-condities moeten hebben. Een andere controlemogelijkheid is het toepassen van *LS-PCR* (Low Stringency-PCR) (8). Door de eerste PCR-cycli bij laag stringente condities uit te voeren (bijvoorbeeld lage temperatuur) ontstaan zgn. RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA's). Het aspecifieke patroon dat ontstaat bij deze PCR vormt een interne controle op het verlopen van de PCR. Het al dan niet aanwezig zijn van het specifieke product kan op deze wijze betrouwbaar worden geïnterpreteerd. In Figuur 1A is het aspecifieke LS-PCR-patroon duidelijk zichtbaar bij het onderzoek naar het HLA-B27-gen.

In veel gevallen wordt op een PCR-product ook een digestie met behulp van een restrictie-enzym uitgevoerd. Daarbij is het van belang vast te stellen of de digestie goed is verlopen. Dit kan door middel van een *digestiecontrole*. De meest betrouwbare vorm voor digestiecontrole is de zogenaamde constitutieve knipplaats (9). Een constitutieve knipplaats is een natuurlijk voorkomende digestie-site op het PCR-product die door het betreffende restrictie-enzym wordt herkend (zie figuur 2A). Het PCR-product zal bij een normaal verlopende digestie op deze natuurlijke knipplaats altijd volledig worden geknipt. In Figuur 2B zijn de banden van 100 bp die ontstaan zijn ten gevolge van een constitutieve knipplaats goed zichtbaar. Indien geen constitutieve knipplaats kan worden gevonden kan eventueel Lambda-DNA of een ander PCR-product (met digestie-site) vlak voor de digestie worden toegevoegd. Het specifieke digestiepatroon dat bij deze DNA-fragmenten behoort kan als digestiecontrole worden gebruikt. In Figuur 2C zijn digestiefragmenten van Lambda-DNA duidelijk zichtbaar.

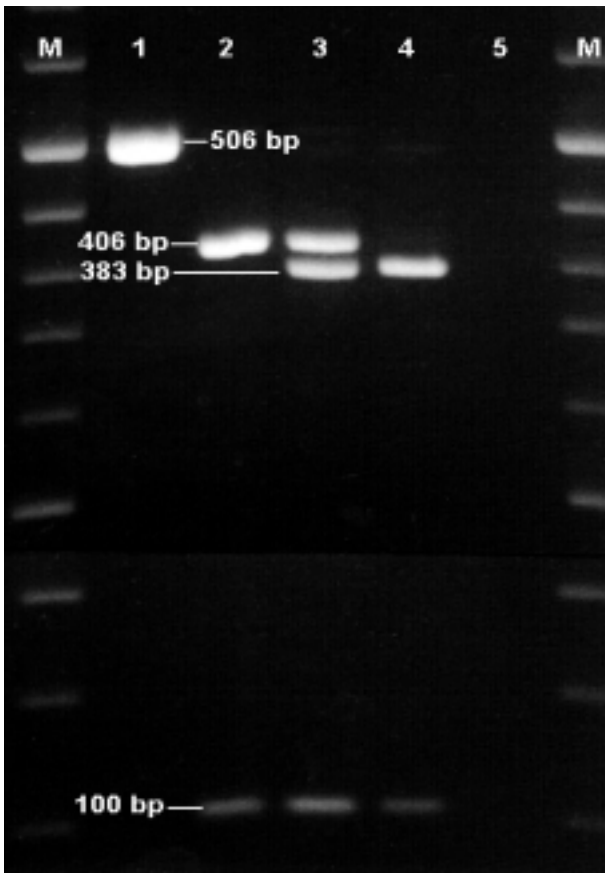
Door een geschikte DNA-*molecuulgewichtmarker* te gebruiken bij elektroforese is enige controle mogelijk op de lengte van de PCR- c.q. digestieproducten. Tal van 'ladders' zijn commercieel verkrijgbaar en kunnen als een soort van liniaal dienen om de lengte van de geproduceerde DNA-fragmenten te schatten.

Logistiek en uitslagverwerking

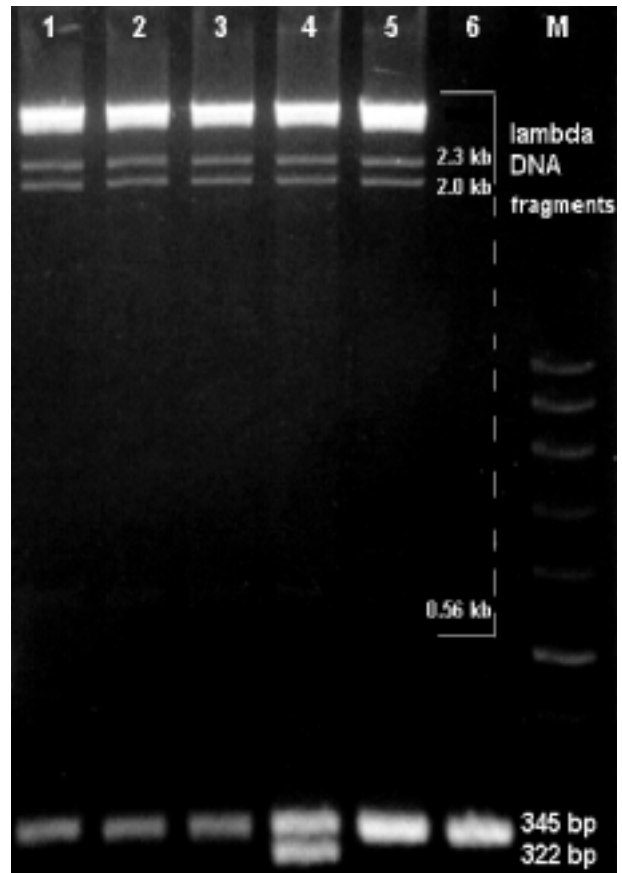
Afhankelijk van de toepassing zal men onderzoek in enkelvoud, duplo of misschien zelfs in triplo inzetten. In geval van onderzoek naar een kiemlijnmutatie dient men zich te realiseren dat in principe de uitslag van een dergelijk onderzoek altijd geldig zal blijven



Figuur 2A. Locatie van primers en restrictie-sites in het geamplificeerde gebied van het gen voor stollingsfactor II (prothrombine) (9). In geval van een mutant allel wordt een HindIII/mutatie-site gegenereerd door de mutagene primer PR 95-315. Een wild-type allel wordt op deze plaats niet geknipt door het restrictie-enzym HindIII. Alleen primer Fac2fw1 co-amplificeert de constitutieve HindIII-site, primer PR 95-787 echter niet. Deze constitutieve restrictie-site dient *altijd* volledig te worden geknipt in alle PCR-producten (zowel wild-type als mutant); zodoende wordt een betrouwbare *interne* digestiecontrole gerealiseerd. -bp: baseparen



Figuur 2B. Interne digestie-controle voor HindIII in PCR-gebaseerde detectie van stollingsfactor II (prothrombine) puntmutatie G-20210-A [9]. PCR is uitgevoerd met de primers Fac2fw1 en PR 95-315 [9]. Ook een wild-type sample, waarbij de HindIII/mutatie-site ongeknipt blijft, zal wel worden geknipt op de constitutive HindIII-site. Het PCR-product wordt verkort met het 100 bp controle-fragment en een 406 bp wild-type band resteert. Mutante allelen zullen tevens worden geknipt op de HindIII/mutatie-site wat resulteert in een 383 bp band (het resterende 23 bp-bandje is niet detecteerbaar op deze gel). Laan M: Low Ladder Molecular weight marker; laan 1: ongeknipt PCR-product (506 bp); laan 2: wild-type patroon (406 + 100 bp); laan 3: heterozygoot patroon (406 + 383 + 100 bp); laan 4: homozygoot patroon (383 + 100 bp); laan 5: water-blanco; -bp: baseparen.



Figuur 2C. Externe digestie-controle voor HindIII in PCR-gebaseerde detectie van stollingsfactor II (prothrombin) puntmutatie G-20210-A. PCR is uitgevoerd met de primers PR 95-787 and PR 95-315 [9]. Primer PR 95-787 co-amplificeert niet de constitutieve HindIII-site. Externe HindIII digestie-controle kan worden toegepast door additie van 0,5 µg lambda-DNA aan de digestiereactie. In elk gedigesteerd sample dient lambda-DNA te worden geknipt in specifieke HindIII-fragmenten. Een wild-type sample geeft tevens het ongeknipte factor II PCR-fragment van 345 bp. Een mutant allel zal ook worden geknipt op de HindIII/mutatie-site wat resulteert in een 322 bp band (het resterende 23 bp-bandje is niet detecteerbaar op deze gel). Laan M: Low Ladder Molecular weight marker; laan 6: ongeknipt PCR-product; lanen 1-3 en 5: wild-type patroon; laan 4: heterozygoot patroon. -bp: baseparen; kb: kilo baseparen.

(conform bloedgroepenonderzoek) en dus ook geen herhaling behoeft. Het valt dan ook te overwegen om dit type onderzoek in principe tweemaal uit te voeren uit twee onafhankelijk afgenomen bloedmonsters om de gevolgen van eventuele monsterverwisselingen of administratieve fouten tot een minimum te beperken. Bij onderzoek naar de aanwezigheid van micro-organismen of maligne cellen kan de input in de PCR dermate laag zijn dat de hoeveelheid PCR-product rond het detectieniveau ligt. Het in duplo/triplo inzetten van de PCR kan in deze situaties zinnig zijn. Niet alle klinici zijn altijd even goed op de hoogte wat betreft de (on)mogelijkheden van moleculair biologisch onderzoek. Een goede begeleiding vanaf de indicatie van het onderzoek tot en met de uitslag blijft daarom van het grootste belang. Zo zal bijvoorbeeld onderzoek in perifere bloed naar de Factor V mutatie Leiden bij een patiënt na een allogene beenmergtransplantatie niet zinnig zijn. Het DNA van zijn/haar

bloedcellen is afkomstig van de donor en zegt niets over de DNA-status van de levercellen waar Factor V wordt geproduceerd. In een dergelijke situatie kan onderzoek in bijvoorbeeld epitheelschraapsel van de mond worden geadviseerd. Ook de (klinische) interpretatie van de verschillende polymorfismen, een uitslag als wildtype, heterozygoot en homozygoot worden niet altijd even goed begrepen. Begeleiding van en toelichting op de uitslag verdient daarom veel aandacht. Ook dienen aanvragers voldoende op de hoogte te worden gebracht van de zin en onzin van moleculair biologisch onderzoek bij symptoomloze familieleden van een patiënt. Zo is bijvoorbeeld DNA-onderzoek naar HHC (hereditaire hemochromatose) bij broers en zusters van een homozygote (Cys282Tyr) patiënt een zeer zinvol advies. Op deze wijze kunnen potentiële patiënten worden opgespoord en zo nodig tijdig worden behandeld om ernstige en vaak niet te herstellen orgaanschade te voorkomen.

Scholing

Moleculaire biologie vormt inmiddels een onderdeel van het opleidingsprogramma tot klinisch chemicus c.q. arts klinische chemie. Ook krijgt dit onderdeel een steeds prominentere plaats binnen de reguliere HLO-opleidingen.

Buiten deze reguliere opleidingen vinden op veel terreinen en in vele vormen bij- en nascholingen plaats. Actief hierin zijn onder andere de WMBD, de reguliere opleidingen zelf in de vorm van post-HLO of post-academische cursussen en vaak ook de betreffende firma's welke actief zijn in dit aandachtsgebied. Ook op congressen/symposia en in de literatuur is het onderwerp moleculaire biologie niet meer weg te denken.

Met name *praktijk gerichte* scholing vindt plaats op hiervoor speciaal bedoelde cursussen en vaak ook binnen de laboratoria zelf. De praktische instructies zijn veelal gericht op het logistieke aspect van het werken in fysiek gescheiden ruimtes en het werken met zeer kleine hoeveelheden. Het benadrukken van de gevaren voor en de gevolgen van contaminatie is essentieel.

Bij- en nascholing van de medische staf (en eventuele andere aanvragers) op het terrein van de moleculaire biologie, bijvoorbeeld in de vorm van een cursus, kan bijdragen tot meer begrip en rationele aanvragen door klinici.

Voor de laboratoriumspecialist blijven, naast de genoemde vormen van bij- en nascholing, goede contacten met, op dit terrein actieve collegae onontbeerlijk.

Externe kwaliteitsrondzendingen

Sinds drie jaar worden onder auspiciën van de WMBD externe kwaliteitsrondzendingen ten behoeve van moleculair biologisch onderzoek georganiseerd. Inmiddels doen ruim dertig laboratoria mee aan deze vorm van externe kwaliteitscontrole. De rondzendingen vinden twee maal per jaar plaats. Naast het feitelijke moleculair biologisch onderzoek worden ook zaken als logistiek, uitslagverwerking, gebruikte methodieken, nieuwe toepassingen, etc. geïnventariseerd. In feite zijn drie verschillende vormen van externe kwaliteitscontrole mogelijk; monsters met daarbij een specifieke diagnostische vraag, een 'technische' kwaliteitsrondzending en een mini-rondzending voor de meer exotische bepalingen.

Bij een 'diagnostische' rondzending krijgen de deelnemers monsters ter analyse aangeboden (zowel volbloed als geïsoleerd DNA) waarin, al dan niet, bepaalde mutaties c.q. polymorfismen aantoonbaar zijn. Het betreft met name onderzoek dat in de Nederlandse laboratoria relatief veel wordt uitgevoerd; bijvoorbeeld onderzoek naar de Factor V mutatie Leiden, de Factor II mutatie, HLA-B27, etc. De resultaten van alle inzenders van dergelijke rondzendingen worden anoniem teruggerapporteerd.

Voor meer exotische bepalingen kunnen 'mini-rondzendingen' worden georganiseerd. Hierbij krijgt een beperkt aantal laboratoria materiaal toegezonden voor gespecialiseerd onderzoek.

Ten slotte bestaat nog de mogelijkheid van een z.g.

'technische rondzending' (10). Hierbij worden bijvoorbeeld primers en DNA rondgestuurd evenals een beschrijving van de optimale PCR-omstandigheden. De PCR-producten van de deelnemers worden vervolgens vergeleken. Deze vorm van kwaliteitscontrole is vooral gericht op procedures, werkwijze en apparatuur.

Voor de rondzendingen is het van belang dat de organisatie steeds goed op de hoogte wordt gehouden van het type onderzoek dat door de deelnemende laboratoria wordt verricht. Om deze reden wordt regelmatig een enquête meegestuurd voor inventarisatie van de stand van zaken. Ook naar informatie wat betreft procedures, werkwijze, reagens, laboratoriumbenodigheden en apparatuur wordt gevraagd. Naast een schriftelijke (anonieme) terugrapportage wordt het een en ander ook nog toegelicht op de WMBD-themabijeenkomsten. Voor opgave of informatie kunt u zich wenden tot de eerste auteur.

Ontwikkeling van nieuwe toepassingen

Bij de introductie van nieuwe moleculair biologische toepassingen kunnen, naast het gebruik van commercieel verkrijgbare kant en klare kits, op het laboratorium zelf ook tests worden ontwikkeld.

Naast voorbereiding door middel van *literatuur* kan onderlinge uitwisseling van kennis en ervaring (pitfalls) vaak zeer verhelderend werken. Internet kan hierbij een zeer behulpzame informatiebron zijn (BioMedNet, PubMed).

Informatie over DNA/RNA-sequenties kunnen verkregen worden uit commercieel verkrijgbare *sequentiendatabases* zoals bijvoorbeeld EMBL (European Molecular Biology Laboratory) of via het internet (BLAST; info@ncbi.nlm.nih.gov). Bijvoorbeeld informatie over pseudogenen, die soms hinderlijk kunnen interfereren bij moleculair biologisch onderzoek, kan in dergelijke databases worden gevonden.

Voor het ontwikkelen van nieuwe primers of het virtueel testen van specifieke priming-sites op de aangeboden template-sequentie zijn diverse *softwareprogramma's* verkrijgbaar. Deze zijn onmisbaar bij het snel en accuraat bepalen van optimale primercondities zoals: annealingtemperatuur, percentage GC/AT, onderlinge complementariteit (welke kan leiden tot primer dimeren), specifieke priming-sites op de aangeboden template-sequentie. Daarnaast kan ook worden gezocht naar specifieke sequenties zoals restrictie-sites. Men dient zich te realiseren dat er soms polymorfismen bestaan ter hoogte van de annealing-site waardoor een gekozen primer niet of slecht zal hechten. Dit kan bijvoorbeeld in geval van een heterozygoot gemuteerd gen leiden tot een onterechte beoordeling (homozygoot c.q. wild-type). Voor het onderzoek naar hereditaire hemochromatose is dit verschijnsel, dat leidt tot een overschatting van de homozygote C282Y mutatie, inmiddels beschreven (11).

Het is raadzaam om zoveel mogelijk van reeds 'routinematige', robuuste procedures en reactiemixen gebruik te maken. Hierbij kan gedacht worden aan DNA/RNA-isolatie, PCR-mastermixen, procedures voor digestie en detectie. Optimalisatie van een nieuwe PCR-test kan meestal worden beperkt tot

bepaling van de beste annealingtemperatuur en de concentratie van de primers in de reactie. Primers zijn eenvoudig en relatief goedkoop commercieel verkrijgbaar. Het materiaal wordt meestal gevriesdroogd aangeleverd, voorzien van een specificatierapport aan de hand waarvan een zelf te kiezen stock-concentratie kan worden bereid.

Detectie van PCR-producten kan op verschillende wijzen plaatsvinden. De meest eenvoudige methode is elektroforese en kleuring met ethidiumbromide welke intercalleert tussen de basen van het dubbelstrengs DNA. Deze methode is echter aspecifiek en is alleen gebaseerd op de lengte van het verkregen PCR-fragment. Om vast te stellen of een verkregen amplificaat inderdaad het verwachte product is, kan een bevestiging door middel van *hybridisatie of sequencing* worden uitgevoerd. Sequencing vereist speciale apparatuur/kennis en is bewerkelijk. Hybridisatie met een gelabelde oligo-probe is relatief eenvoudig. Deze probe herkent specifiek een bepaalde sequentie in het doelgebied, waarna een positief detectiesignaal van het label bewijst dat het juiste DNA-fragment is geamplificeerd. In Figuur 1B is de specificiteit van de HLA-B27 band (135 bp) met behulp van een gelabelde probe bevestigd. Een dergelijke confirmatie behoeft meestal slechts in de ontwikkelingsfase van een nieuwe test of incidenteel bij twijfelgevallen te worden uitgevoerd. Indien een PCR-methode betrouwbare en reproduceerbare resultaten geeft, kan meestal worden volstaan met detectie middels elektroforese en ethidiumbromidekleuring. De specifieke digestiefragmenten die ontstaan door bijvoorbeeld het knippen van een constitutieve restrictie-site ondersteunen ook de specificiteit van het PCR-product. Een nieuwe toepassing wordt pas gevalideerd indien de nodige controles zoals hierboven genoemd, voorhanden zijn (pos, neg, wildtype, heterozygoot, homozygoot, etc).

Bij het ontwikkelen van eigen testen waarbij nieuwe, voor het laboratorium nog onbekende procedures worden geïntroduceerd, zijn (in het ontwikkelingsstadium) extra controlestappen raadzaam. Elk stadium in het analysetraject dient, voor zover mogelijk, te worden gevalideerd teneinde onbetrouwbare resultaten te voorkomen. Gedacht kan worden aan bijvoorbeeld de kwaliteit/houdbaarheid van het te analyseren monster/isolaat, de reactieproducten (eventuele tussenproducten zoals cDNA bij RT-PCR), digestieproducten, etc.

Toekomstige ontwikkelingen zullen zich vooral richten op verdergaande *automatisering* (robotisering) waarbij wordt gestreefd naar combinatie van alle analyse-stadia, vanaf isolatie t/m detectie, in één automaat. In dergelijke *closed tube* systemen zal het contaminatiegevaar tot een minimum worden beperkt en tevens kan kosteneffectiever worden gewerkt. Met name in de virologie en bacteriologie heeft deze ontwikkeling zijn intrede reeds gedaan. Ook het streven naar kwantificering van amplificatietechnieken is volop in gang; real-time-PCR is hierbij een veelbelovende techniek. Bij *real-time PCR* vindt continue monitoring plaats van elke lopende amplificatie reactie

waardoor de hoeveelheid PCR-product die per cyclus wordt gevormd kan worden gemeten. De informatie die zo per cyclus wordt verkregen kan onder andere worden gebruikt voor kwantificering van de hoeveelheid DNA (RNA) die oorspronkelijk uit een monster is geïsoleerd (12,13).

Literatuur

1. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
2. Kwok S. Procedures to Minimize PCR Product Carryover. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ eds; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, 1990: 142-145.
3. Farkas DH. *Molecular Biology and Pathology. A Guidebook for Quality Control*. Academic Press, Inc. San Diego, 1993.
4. Biemans ALBM, Jochems AAF, Sprangers JAP. DNA, een blauwdruk. Bohn Stafleu Van Loghum, Houten/Zavetem, 1993.
5. Orrego C. Organizing a Laboratory for PCR work. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White TJ eds; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, 1990: 447-454.
6. Victor T, Jordaan A, Du Toit R, and Helden PD van. Laboratory Experience and Guidelines for Avoiding False Positive Polymerase Chain Reaction Results. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31: 531-535.
7. Kwok S, and Higuchi R. Avoiding False Positives with PCR. *Nature* 1990; 344: 337-338.
8. Danneberg J, Gerrits J, Martens A. LS-PCR toegepast voor detectie van HLA-B27: Low Stringency but High Performance. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1998; 23: 248-253.
9. Danneberg J, Abbes AP, Bruggeman BJM, Engel H, Gerrits J and Martens A. Reliable genotyping of the G-20210-A Mutation of Coagulation Factor II (Prothrombin). *Clinical Chemistry* 1998; 44: 349-351.
10. Braun et al. External Quality Assessment of Molecular Biology-Based Methods Used in Laboratories of Clinical Chemistry and Human Genetics. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 231-223.
11. Jeffrey GP, Chakrabarti S, Hegele RA, and Adams PC. Polymorphism in intron 4 of HFE may cause overestimation of C282Y homozygote prevalence in haemochromatosis. *Nature Genetics* 1999; 22: 325-26.
12. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time Quantitative PCR. In: *Genome methods*. Genome Research. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISSN 1054-9803/96, 1996; 986-994.
13. Mensink E, Locht A van der, Schattenberg A, Linders E, Schaap N, Geurts van Kessel A, Witte T de. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia patients using real time quantitative RT-PCR. *Br J Haematology* 1998; 102: 768-774.

Summary

Quality assurance in relation with molecular biological techniques. Martens A, Danneberg J and Gerrits J. Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 329-334.

In this paper a number of aspects of quality assurance of molecular biological techniques in dutch clinical laboratories are discussed. Next to internal and external quality assessment also matters like training and the introduction of new techniques are considered.

Key-words: molecular biological techniques; PCR; DNA; quality control