

OTKA zárójelentés 2007  
Részletes összefoglaló

Célkitűzések:

1. Human papillomavírusok (HPV) kimutatása colorectalis daganatok miatt eltávolított biopszia mintákból nukleinsav hybridizációs próbával.
2. HPV-ok kimutatása cervix mintákból nukleinsav hybridizációs próbával, PCR (consensus és short fragment), és valós idejű PCR módszerekkel.
3. HPV típusok meghatározása RFLP analízissel, típus-specifikus PCR módszerrel és blot assay módszerrel.
4. P53 gén, és a p16, 21 és 73 fehérjét kódoló gének, valamint ciklinek és ciklindependens kináz inhibitorok kimutatása.

Eredmények:

Ad 1.

Colorectalis daganatok miatt eltávolított biopszia mintákból nukleinsav hybridizációs próbával mutattuk ki a human papillomavírusokat (HPV). A betegek kor szerinti megoszlása 26 és 87 év között volt. A férfiak átlag életkora 64 év, a nők átlag életkor 60,2 év volt. A mintákat hisztológiailag is értékeltük. 11 biopszia minta férfiaktól, 4 nőktől került vizsgálatra. A 15 mintából egy alacsony rizikótípusú, 2 magas rizikótípusú és 2 egyidejűleg alacsony és magas rizikótípusú volt. A hisztológiai diagnózis minden esetben adenocarcinoma volt, különböző lokalizációval. Feltételezéseink szerint a HPV-k a colon és rectum mucosáját megfertőzhetik, és szerepük lehet a colorectalis carcinomák kialakításában. Magyarországon először végeztünk ilyen irányú vizsgálatokat. A minták száma alacsony, közlésre még nem alkalmas. Ezért további minták feldolgozására várunk. A partner intézetben ilyen indikációval végzett műtétek száma ennél lényegesen magasabb, azonban az Etikai Bizottság által jóváhagyott kérdőív kitöltésére az operált betegek közül kevesen vállalkoznak (Deák, 2002). Ennek ellenére szeretnénk publikálni eredményeinket.

Ad 2.

Korábbi vizsgálataink alapján a nem nukleinsav amplifikáción alapuló, nukleinsav hybridizációs módszer szenzitivitását 60, specificitását 80%-osnak becsültük. A HPV prevalencia 17,5%-nak bizonyult. A HPV fertőzöttek átlag életkora 28,4, a negatívak átlag életkora 32,6 év volt (Kornya et al. 2002). A kapott érték korrekciójára a Bayes teorémát alkalmaztuk annak érdekében, hogy a HPV fertőzés valódi prevalenciáját megbecsüljük és a szenzitivitás, valamint a specificitás hiányosságait kiküszöböljük (Nyári et al., 2001).

A nőgyógyászati vizsgálatokkal egyidejűleg történő méhnyakrák szűrésre algoritmust dolgoztunk ki a Mikrobiológiai, Pathológiai, valamint Szülészeti és Nőgyógyászati Szakmai Kollégiumok felkérésére (Deák és mtsai, 2001). Elemeztük a HPV meghatározáson alapuló kezeléseket és azok hatékonyságát (Deák Major 2003)

Tünetmentes nők HPV vizsgálata (N=397) alkalmával 2000-ben 23% HPV prevalenciát mutattunk ki cervix mintákban. Az átlag életkor 35,5 év volt. HPV fertőzést 91 (23%) esetben mutattunk ki. Magas HPV rizikótípusok 15 nő esetében voltak kimutathatóak, az összes fertőzés 16%-ában. A 15 páciensből 11-nek volt kóros cytológiai eredménye. Az egyváltozós elemzésekhez chi-négyzet próbát használtunk. Többváltozós regressziós analízist használtunk és három változót találtunk független prediktornak. A fiatal kort, a kóros cytológiai leletet és az esetlegesen jelenlévő condylomás elváltozást (Nyári 2004).

2002-2003 között 347 nő (átlag életkor: 42,9 év) mintáinak vizsgálata történt. Kontrollként 178 mintát vettünk figyelembe, melyek cytológiai eredménye negatív volt. Ebben a csoportban a HPV-fertőzöttek száma is alacsony volt; 7 (4%) esetben mutattuk ki a vírusokat.

Az eset/kontroll vizsgálatokban 169 esetben kóros cytológiai leletet regisztráltunk. 130 (55%) nő közül 72 volt HPV fertőzött. A legmagasabb fertőzöttség (75%) a legfiatalabb, 20-29 éves korcsoportban volt. A következő korcsoportban 30-39 év között 68 %, a 40-49 év között 38%, az 50-59 év között 40%, és a 60-69 év között 0% volt a HPV fertőzöttség. A további kóros cytológiai lelettel rendelkező 39 nő esetében invazív carcinoma volt a diagnózis, közöttük 29 (74%) volt HPV fertőzött. Az első, 20-29 éves korcsoportban nem volt cervix carcinómás páciens. A 30-39 éves korcsoportban 67%, a 40-49 éves korcsoportban 80%, az 50-59 éves korcsoportban 57%, a 60-69 éves korcsoportban 89% volt a HPV fertőzöttek aránya (Kalmár 2005). A 29 HPV fertőzött páciensből 25 esetben magas rizikótípusokat, 4 esetben alacsony rizikótípusokat mutattunk ki.

Megállapításunkat abból a szempontból tekintjük fontosnak, hogy egyrészt relatíve nagyobb számban fordultak elő alacsony rizikótípusok a cervix carcinomák etiopathogenezisében, másrészt hangsúlyozzuk, hogy az alacsony rizikótípusok nem alacsonyabb malignitást jelentenek. Ezen típusok malignitása is magas, az alacsony

rizikótípus azt jelenti, hogy ezek a típusok, ritkábban fordulnak elő, és ezért okozhatnak ritkábban cervix carcinomát.

Azoknak a nőknek az esélyhányadosa, akik kóros cytológiai lelettel rendelkeznek és HPV fertőzöttek: 2,16. Szignifikánsan magasabb az esélyük cervix carcinoma kialakulására, mint akiknél nem mutatható ki HPV fertőzés.

### Ad 3

2003-ban 802 cervix mintából 432 esetben mutattunk ki nukleinsav hybridizációs próbával (Hybride Capture Assay - HCA) HPV-t. Mind a 432 esetben meghatároztuk a kópiaszámot is. Ezekből a mintákból randomszerűen 100 mintát választottunk ki a már bevezetett MY09/11 consensus PCR és 65 mintát az ún. „short” fragmenteket amplifikáló PCR módszerrel a HPV-k kimutatására. (Deák et al 2005). Azokban az esetekben volt sikeres a két vagy több módszerrel történő HPV kimutatás és a vírus típus meghatározás, amelyekben > 5000 víruskópia volt jelen a mintákban. Mindkét PCR módszert adaptáltuk a valós idejű, real-time PCR (RT-PCR) készülékhez (Deák 2004, Deák 2005, Deák et al 2005).

## Módszerek

### A restrikciós enzim analízis

A HPV típusok az amplifikált termékek a restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmusa (RFLP) alapján meghatározhatóak. Restrikciós fragmensek generálásával készül a hasítási térkép. Körkörös DNS-ből kiindulva a hasítási helyeket lokalizálni lehet. Ez a megfelelő restrikciós enzim lassú, folyamatos emésztésével és a hasítási termékek méretének gélelektroforetikus meghatározásával érhető el. Ugyanazon a DNS molekulán különböző restrikciós enzimek eltérő restrikciós térképet adnak. Részletes hasítási térképet több restrikciós enzim egyidejű emésztése ad. Legalkalmasabbak azok a restrikciós enzimek, melyeknek ritka a felismerési szekvenciájuk. A felismerés gyakorisága összefügg a felismerési szekvencia méretével.

Alkalmazott enzimek: *BamHI*-B, *Dde I*-H, *Hae III*-M, *Hinf I*-H, *Pst I*-H, *Rsa I*-L

Reagens	Mennyiség (µl)
Desztillált víz	2,50
Puffer (minden enzimnek saját puffere van)	1,50
Enzim	1,00
Amplikon	5-10

Az enzimemésztés lépései:

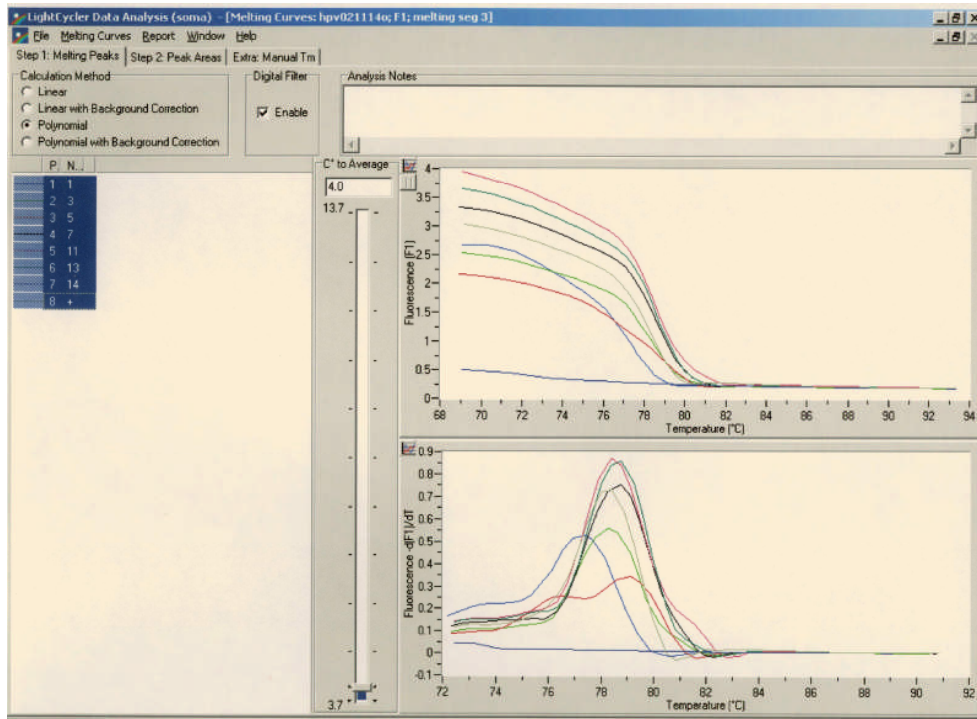
Az amplikonokat 6 különböző Eppendorf csőbe szétmértük, majd a desztillált víz, puffer, enzim bemérése következik a táblázat szerint. Ezután inkubálás következik 2-3 h-ig 37°C-on majd +4°C-on, vagy jobb -20°C-on tároltuk. A gélelektroforézis, 2%-os agaróz gél használunk (50ml 0,5x-es TBE-ben feloldottunk 1,0 g agarózt). A felmelegített gélhez 50 µl EtBr-ot mérünk. Az emésztett mintákra rámértük a 2-4µl loading puffert és a gélben 65-70 V-on, 50 mA-en 1h-ig elektroforetizáltuk.

### Real time PCR, fluorimetrikus detektálással

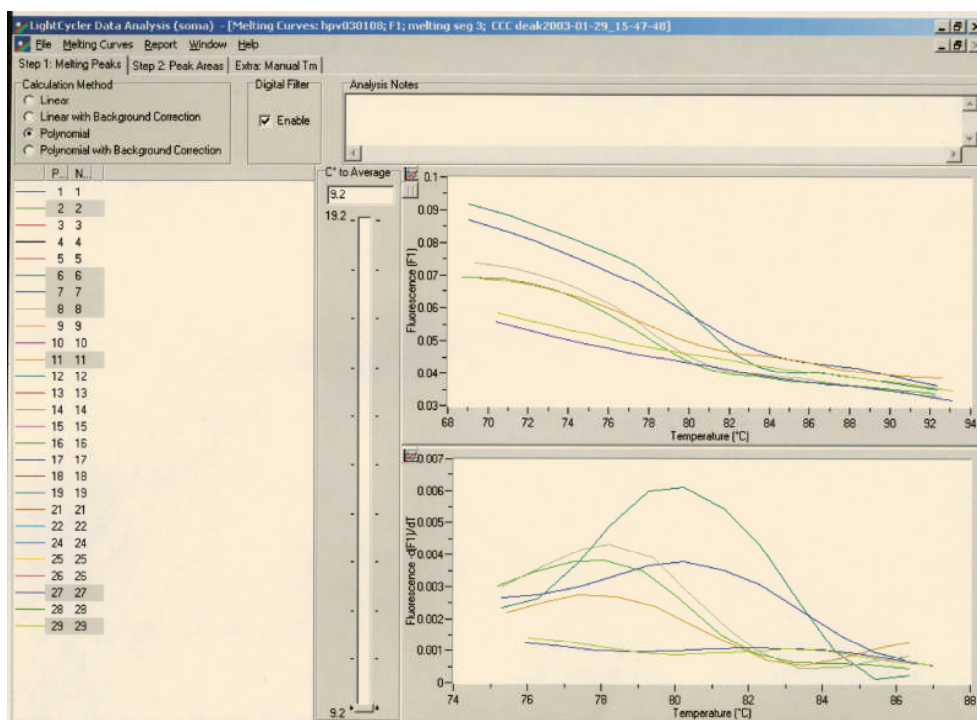
A PCR termékeket a ds DNS–kötő SYBR Green 1 fluorofor festék alkalmazásával mutattuk ki, mely kötődik minden ds DNS molekulához függetlenül a szekvenciától. A fluoreszcencia mértéke fokozódik, amikor bekötődik a ds DNS kis árkába. A PCR alatt a SYBR Green 1 kötődik azokhoz a DNS termékekhez, amelyek megszintetizálódtak. Így minden elongációs ciklus végén a SYBR Green 1 fluoreszcenciájának fokozódása jelzi a kialakult PCR termék mennyiségét a ciklus alatt. A SYBR Green 1 detekció specificitása és szenzitivitása nő, az amplifikációs reakció alatt egy melting curve analízist végez. A LC minden elongációs fázis végén méri a SYBR Green 1 fluorimetrikus intenzitását. A SYBR Green 1 festék maximális gerjesztése 497 nm-en, míg a SYBR Green 1 festéssel kötött DNS maximális kibocsátása 521 nm-en van. Ez a festék hőmérséklet és pH stabil. A SYBR Green 1 festék kevésbé mutagén, mint az EtBr. A LC-PCR-t egyszer használatos üvegkapillárisokban végeztük. A reakcióelegy összetérfogata 10 µl, mely 1 µl DNS-t (40-80 ng), 0,2 µM (mindkét) primert (GP5+ és GP6+), 1 µl reakció puffert (Light Cycler DNA master hybridization probes 10\*buffer, Roche Diagnostics), 0,4 µl 25 mM-os MgCl<sub>2</sub>-ot és 0,5 µl dimethyl-sulfoxide-ot tartalmazott.

## Betegminták vizsgálata GP5+/6+ primerekkel

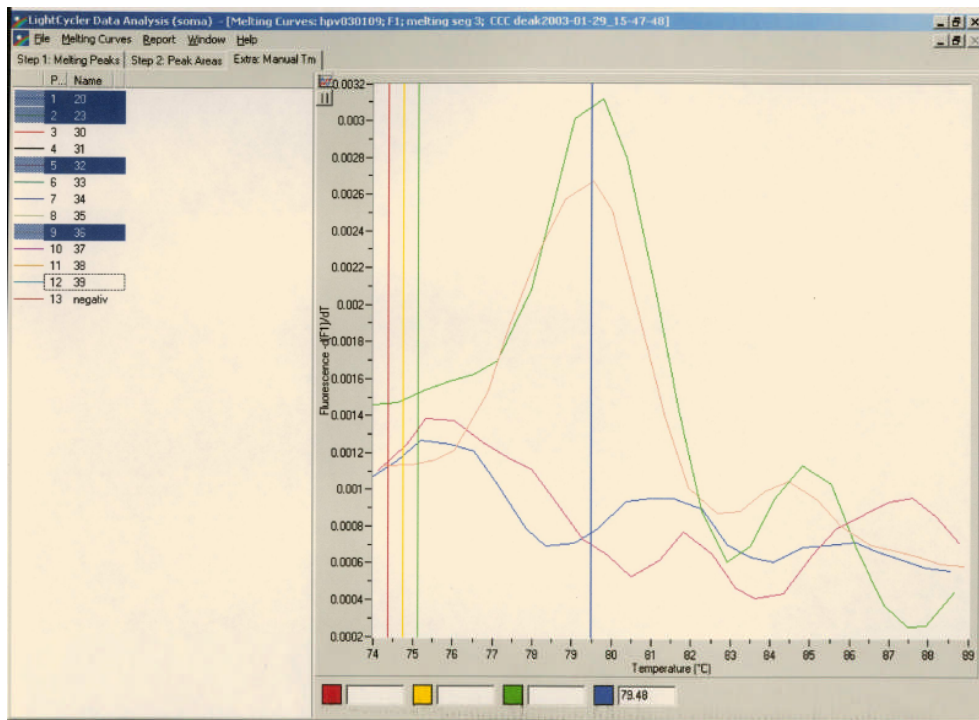
Az alábbi ábrán az 1. (452), 3. (455), 5. (457), 7. (459), 11. (463), 13. (1107) pozitív és a 14.-edik (1108) negatív minta látható.



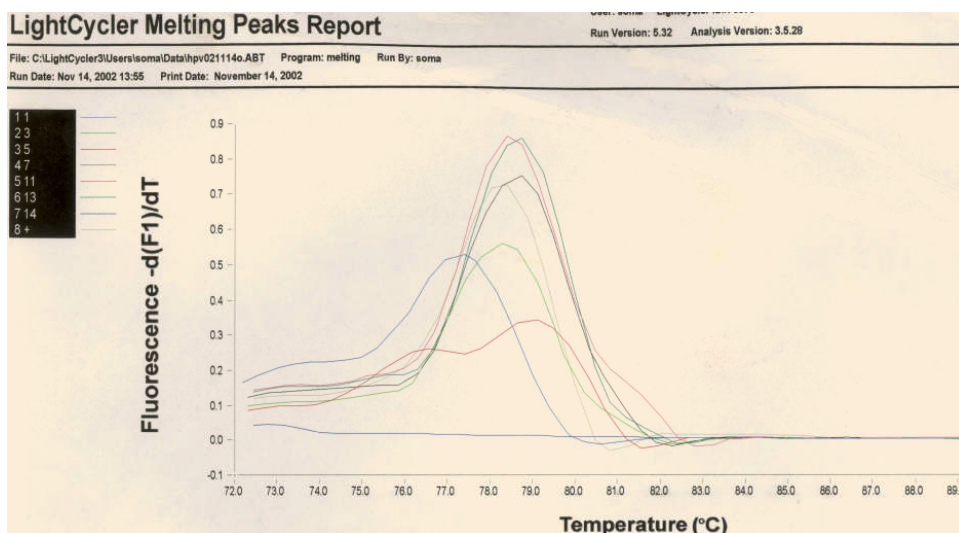
Az alábbi ábrán cervix minták vizsgálata látható GP5+/6+ primerekkel: 2. (417), 6. (424), 7. (425), 8. (427) 11. (433) pozitív, és a 27. (1103), 29.-edik (465) negatív minta.



Az alábbi ábrán betegminták vizsgálata látható GP5+/6+ primerekkel: a 20. (460), 23.-adik (463) negatív, a 32. (469) és a 36.-odik (474) pozitív minta.



Melting point analízissel az 1. (452), 3. (455), 5. (457), 7. (459), 11. (463), 13. (1107) és a 14. (1108) minta látható.



Két módszer összehasonlítása hagyományos, consensus primereket használó PCR és HCA módszerekkel 100 esetben történt meg. 58 minta bizonyult mindkét módszerrel megegyezően

pozitívnak. 10 esetben csak HCA módszerrel, míg 1 mintánál csak PCR-rel kaptunk pozitív eredményt:

Összehasonlító vizsgálatok PCR és HCA módszerrel HPV kimutatására

PCR	HCA		Összesen
	Pozitív	Negatív	
Pozitív	58	1	59
Negatív	10	31	41
Összesen	68	32	100

Magasabb százalékban mutattunk ki HPV-eket nem amplifikált módszerrel, mint amplifikált eljárással. Feltételezéseink szerint a HCA módszer számára rendszeresített mintavevő kitben lévő transzport oldat amplifikációt gátló összetevőket tartalmazhatott.

A 68 pozitívnak bizonyult mintából 61 esetben tudtunk RFLP típust meghatározni:

RFLP típusok előfordulása	
N (minta száma)	HPV típus
6	IS 39
14	W I 38
4	HPV 73
2	HPV 53
1	CP 8304
2	HPV 52
4	HPV 33
7	HPV 16
3	HPV 58
2	HPV 61
7	HPV 59
2	HPV 68
4	HPV 18
1	HPV 39
2	HPV 6

Az RT-PCR és a HCA módszerek összehasonlítása HPV kimutatására (N 69)

RT-PCR	HCA		Összesen N (%)
	Pozitív N (%)	Negatív N (%)	
Pozitív N (%)	34 (49,2)	9 (13,0)	43 (62,2)
Negatív N (%)	6 (8,7)	20 (28,9)	26 (37,6)
Összesen N (%)	40 (57,9)	29 (41,9)	69 (99,8)

34 esetben mindkét módszerrel megegyezően pozitív, 20 esetben megegyezően negatív eredményeket kaptunk. 6 minta esetében csak a HCA és 9 minta esetében csak az RT-PCR módszerrel kaptunk pozitív eredményt.

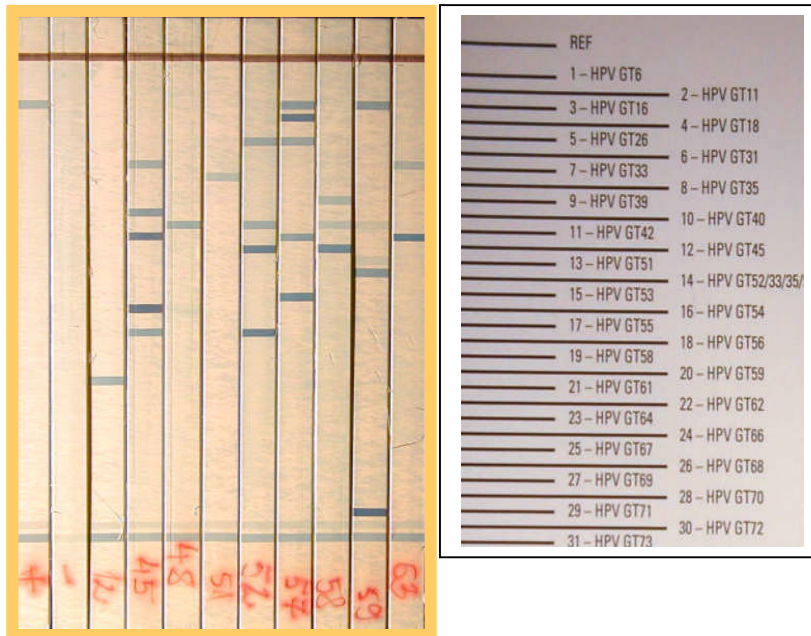
2006-ban 181 páciens vett részt manuális és kolposzkópos nőgyógyászati vizsgálaton. Cytológiai szűrésre és HPV kimutatásra is történt mintavétel. A molekuláris genetikai mikrobiológiai diagnosztikát DNS amplifikációs módszerrel végeztük. A női populáció 31,1%-a volt fertőzött. 18-24 éves korcsoportban volt legmagasabb a fertőzöttség. A leggyakoribb HPV típusok: 16, 18, 31, 56-os típusok voltak

A PCR és a cytológiai eredmények összefüggése

PCR	Cytológia		Összesen N (%)
	Pozitív N (%)	Negatív N (%)	
Pozitív N (%)	8 (4,4)	48 (26,5)	56 (29,3)
Negatív N (%)	0 (0,0)	125 (69,1)	125 (70,7)
Összesen N (%)	8 (4,4)	173 (95,6)	181 (100,0)



A vírusok konszenzus PCR módszerrel történt kimutatása után a pozitív mintákat short fragment PCR vizsgálattal ismét megsokszoroztuk. Ezt követően genotípus meghatározást végeztünk „linear array” módszerrel. Az eredmények leolvasása az alábbi ábrán kódkártya segítségével történt.

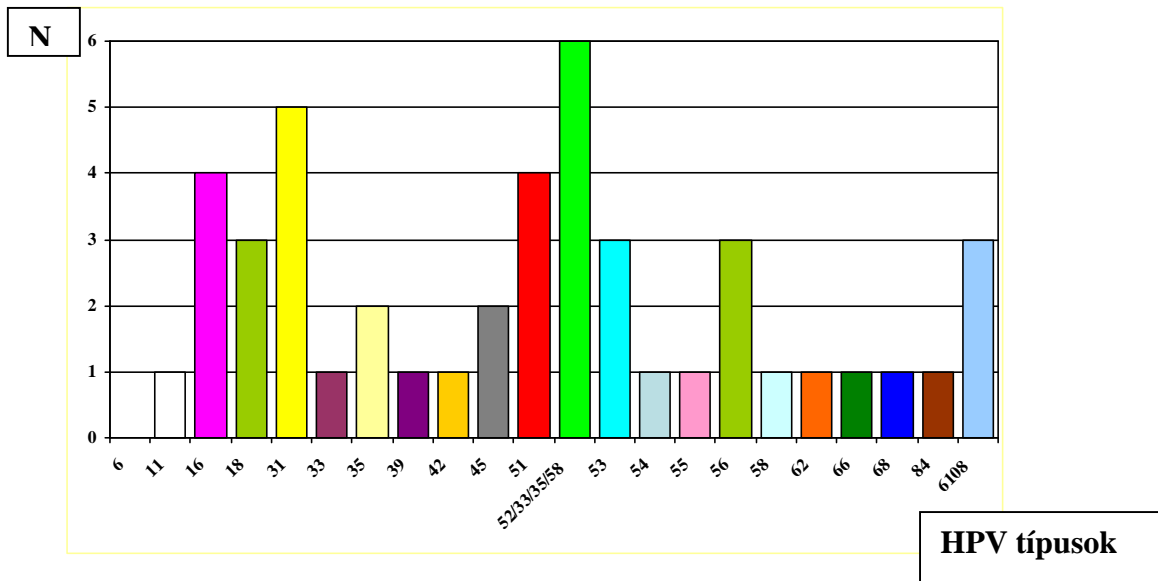


A HPV PCR vizsgálat eredménye korcsoportos megoszlásban (N 181)

Korcsoport (év)	Pozitív N (%)	Negatív N (%)	Összesen N (%)
12-17	7 (3,9)	17 (9,4)	24 (13,3)
18-24	27 (14,9)	29 (16,0)	56 (30,9)
25-34	15 (8,3)	35 (19,3)	50 (27,6)
35-45	7 (3,9)	44 (24,3)	51 (28,2)

A négy korcsoportba (12-17, 18-24, 25-34 és 35-45 év) sorolt felnőtt női populáció 31,1%-a bizonyult HPV fertőzöttnek. A HPV prevalencia a 18-24 éves korcsoportban volt a legmagasabb. A leggyakrabban előforduló típusok a 16, 18, 31, 56, 56-os típusok voltak. A vizsgált 181 páciens 11,0%-ánál voltak jelen magas kockázati típusú (16, 18, 31) HPV-ok.

## HPV típusok megoszlása (N 181)



Azok körében fordultak elő leggyakrabban HPV fertőzések, akik szexuális életüket fiatalon kezdték, sok partnerük volt és életük során kevés (1-3) citológiai vizsgálaton jelentek meg. A 2006-ban bevezetett tetraavalens preventív vakcina a négy leggyakoribb genotípus ellen (6, 11, 16, 18) hatásos. Még a prevenció lehetőség mellett sem mellőzhetik a nők az **évente** javasolt nőgyógyászati és cytológiai szűrővizsgálatokat. Az Egészségügyi Minisztérium rendelettel szabályozta a virológiai vizsgálatot, a HPV kimutatását molekuláris genetikai módszerrel. A nukleinsav hybridizációs módszer és a konszenzus PCR is 15 HPV kimutatását teszi lehetővé. A short fragment PCR eljárás nagy előnye, hogy majdnem valamennyi anogenitális típus kimutatása, a 40-ből 37 típus eredményesen kimutatható. Tapasztalataink szerint mindazon esetekben ezt a módszert lenne szükséges alkalmazni, amikor klinikailag, és cytológiailag pozitív, de HCA és konszenzus PCR vizsgálattal negatív eredményt kaptak.

Megállapításaink:

A HPV fertőzés kolposzkópos és cytológiai elváltozás nélkül is jelen lehet. Ez a cytológiai elváltozást még nem mutató állapot kizárólag molekuláris genetikai vizsgálatokkal detektálható. A felnőtt női populáció közel 1/3-a fertőzött volt a délmagyarországi régióban. A leggyakoribb HPV típusok magas kockázati típusba tartoznak. Az évenkénti nőgyógyászati szűrővizsgálat elengedhetetlen. A megelőzés lehetősége a tetraavalens, vagy bivalens vakcina.

Ad 4

A p53 gén kimutatására a p53-72 sense és p53-72 antisense amplifikációs primerekhez hybridizációs próbákat terveztünk (p53-TAMRA hybridizációs és p53-FAM anchor próba). Elvégeztük az optimalizációs kísérleteket, majd 10 mintából kíséreltük meg a p53 gén kimutatását. Az alkalmazott RT-PCR módszer lehetővé teszi az amplifikációval egyidejűleg történő hybridizáció kivitelezését. Az eddig beállított kísérletek minden esetben negatív eredménnyel zárultak.

Kiválasztottuk és elkészítettük a p16 sense és p16 antisense, a p21 sense és p21 antisense amplifikációs primereket valamint a GADD45 sense és GADD45 antisense amplifikációs primereket, továbbá a p27 sense és p27 antisense amplifikációs primereket. B-actin sense és B-actin antisense primereket választottunk internális kontrollnak. Ezek a vizsgálataink megfelelő minták hiányában nem realizálódtak.

A kutatásból fennmaradt összeget az alábbi kísérletekre fordítottuk:

Megállapodást kötöttünk a szegedi székhelyű Avidin Kft-vel közös diagnosztikai kit kifejlesztésére vonatkozóan. A cégnek Európában egyedülálló készülék áll rendelkezésükre, amely egy nanokapilláris elven működő QRT-PCR microarray technológián alapul. A készülék alkalmas nagyszámú genomi DNS mintán több alcsoportra bontva SNP-ék analízisére TaqMan protokollal, illetve SYBR Green protokollt használva génexpressziós analízisekre is. Ennek a modern műszernek a használatával egyrészt nagyszámú minta párhuzamos és validált analízisére nyílik mód, másrészt a felhasznált anyagköltségek is jóval alatta maradnak a hagyományos, kis sűrűségű valós idejű QRT-PCR műszerekénél. Ezek miatt egy nanokapilláris alapú HPV kimutatási eljárás nem csak olcsóbbá tenné a HPV kimutatást, de sokkal több párhuzamos szekvencia kimutatásával az altípusok besorolása is pontosabb lehet.

Mi mind a TaqMan, mind a SYBR Green alapú technikákra alapoztunk. Első lépésben specifikus primereket terveztünk a HPV L1 génjének konzervatív régióira a következő 29 altípusban:

*6,7,11,16,18,26,31,33,34,35,39,40,42,44,45,51,52,53,54,55,56,58,59,66,68,73,82,83,84*

Irodalmi adatok azt mutatták, hogy a legmegbízhatóbb HPV kimutatási eljárások az L1 gén különböző szakaszainak amplifikációján és/vagy hybridizációján alapulnak. Emellett

figyelembe vettük azokat a szekvenciákat, amelyek nem az L1, hanem egy korai gén, az E7 génre specifikusak.

Ezekre a génekre irodalmi adatok alapján a következő altípusokra készítettünk próbákat:

16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68

Sajnos ennél a génnél olyan nagy a típuseltérés, hogy konszenzus közös amplifikációt nem lehet tervezni. Ebből adódóan nested-PCR technikára ezek a próbák nem alkalmasak.

Az oligonukleotid szekvenciák közül a következő primereket terveztük a további kísérletekhez (L1 gén specifikus oligonukleotidok):

hvp	Forward	Reverse	TaqMan
6	gccagggacataacaatggt	gatcagtatccttgggacg	caaagcccactcctgaaaagSa
7	cccagggcataacaatggc	gatcaatttccattaggacg	agcgtgatgcacccccaaaag
16	gcacagggccacaataatggc	gatcagtttcctttaggacg	caaaaacatacacctccagcacctaa
18	gcacagggcataacaatggtg	gatcaatatccccttggacg	caaaaggatgctgcaccPgctg
26	gcacagggcataacaatggt	gatcaatttccactaggcg	tcagcgtaacgcccctcctgt
31	gctcagggacacaataatggt	gatcagtttccactgggtcg	aaaactgcccccaaaaagcc
33	gcacaaggtcataacaatggt	gatcagtttccttgggacg	tgtcaaaaaacagtacctccaaagg
34	cccagggacaaaacaatggc	gatcagtttgccttaggtag	ttcaggtactttagaagaacatag
35	gcacaaggccataacaatggt	gatcagtttccgttgggacg	aaaccagtgacccaaaacc
39	gccagggcataacaatggt	gatcagtatccccttgggacg	aaaggatgctccagcacctgaa
44	gcgagggccacaataatggt	gatcaatatccccttggtag	tggatcttagagaaaagttttct
51	gcgagggccacaataatggc	gaccaatttgcattgggtcg	accctccacaggctaagccag
52	gcgagggccacaataatggc	gatcagtttcctttaggtag	aacacaccacctaaggaaaggaaga
53	cccagggacataacaatggc	gatcagtttccttggcag	aaaggatcagccccctcc
54	gccagggcacaacaatggt	gaccagtttccttgggtcg	aataatgccctgcaaaggaaaagg
55	gcgagggccacaataatggt	gatcaatatccccttggtag	agatctcagagaaaagttttcta
56	ccaagggcacaataatggc	gatcaatttccactgggtag	aacagccaccaacagaaaaacagg
58	gcacaaggtcataacaatggc	gatcagtttccttgggacg	caaaaaacagcaccctctaaa
59	gctcagggtttaacaatggt	gatcagtttccttgggacg	aaaggacaccgaccgccagt
66	gcacagggccataacaatggc	gatcagtttccttgggtag	agggaacagcccctgcagaaaa
68	gcacagggacacaacaatggt	gaccagtttcctttaggacg	aaagacgcccctgcacctaactaaa
73	gcacagggacaaaataatggt	gaccagtttccttgggaag	cacaggctattagttgccaacgtcc
82	cccagggccacaataatggc	gatcagtttgcattgggtcg	tgtcacaaggacagtcctccaca
83	cccagggacataacaatggc	gatcagtttccttgggacg	aaagggtccttccgcccctgc

Bár mindegyik génre terveztük TaqMan próbákat, a TaqMan alapú módszer igazolására a továbbiakban csak hat TaqMan próbát szereztünk be:

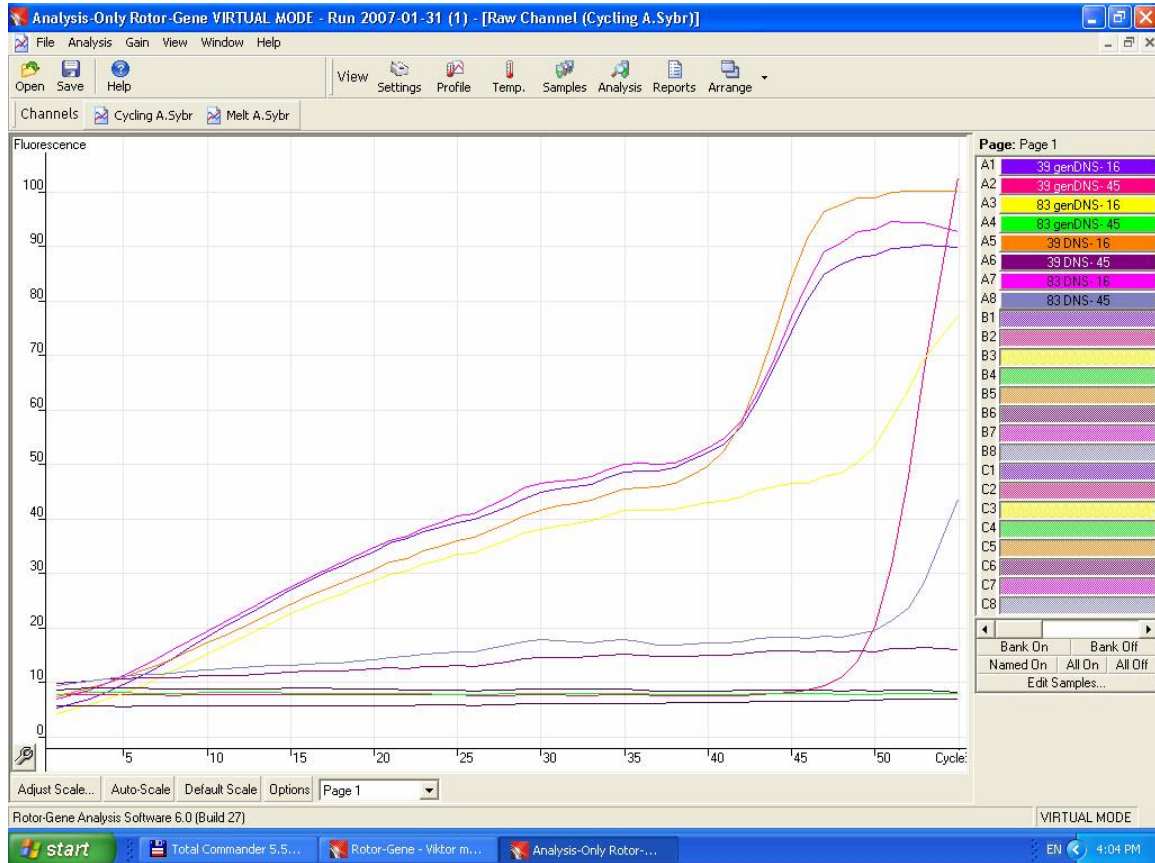
Name	Sequence	Length	Scale	Modification
hp16P	caaaaacatacacctccagcacctaa	26	50 nmol	5'FAM, 3'TAMRA
hp18P	caaaaggatgctgcaccPgctg	22	50 nmol	5'FAM, 3'TAMRA
hp31P	aaaactgcccccaaaagcc	20	50 nmol	5'FAM, 3'TAMRA
hp33P	tgtcaaaaaacagtacctccaaagg	25	50 nmol	5'FAM, 3'TAMRA
hp35P	aaaccctgacccaaaacc	20	50 nmol	5'FAM, 3'TAMRA
hp45P	tacacctccagaaaagcaggatc	23	50 nmol	5'FAM, 3'TAMRA

Első lépésben klinikai izolátumokból genomi DNS-t preparáltunk, majd ezt használtuk templátként valós-idejű PCR rendszerben specifikus HPV DNS-ek kimutatására.

A reakciót a templát hosszának és a primerek szekvenciájának ismeretében optimalizáltuk (annealing hőmérséklet, extenziós idő, stb.).

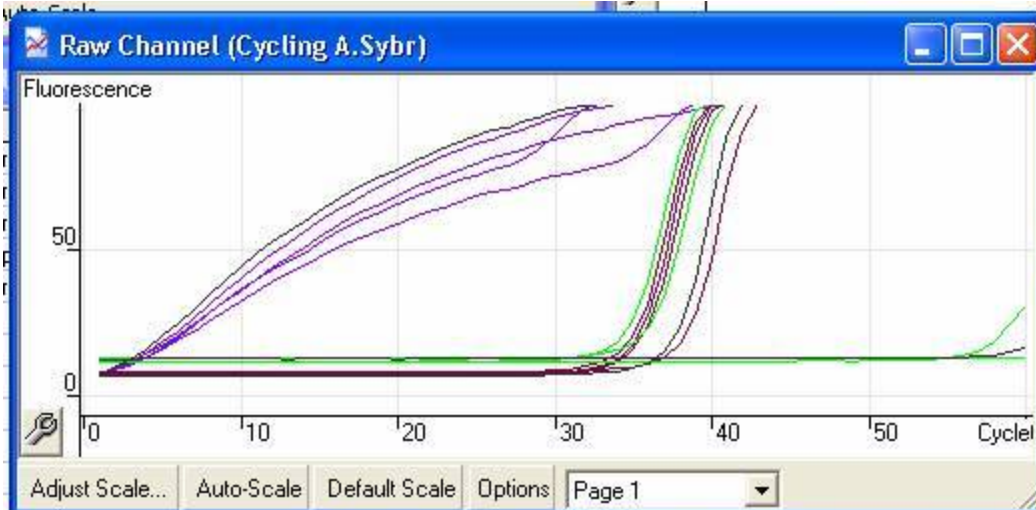
Az általunk vizsgált HPV-t tartalmazó mintákat előzőleg Roche kittel feldolgoztuk és az altípust eszerint határoztuk meg.

Az 1. ábra 2 minta pozitív amplifikációját mutatja be. Két altípus esetében sikerült specifikus amplifikációt elérni (16 és 45). Az amplifikáció specificitását tükrözi, hogy a negatív kontrollok esetében nem, vagy csak nagyon későn indult be az exponenciális sokszorozás. A 39-es számú beteg mintája esetében azonban a Roche rendszerrel ellentétben nem csak a 16-os, hanem a 45-ös izolátumot is kimutattuk. Ennek oka az érzékenységben (a mi QRT-PCR rendszerünk érzékenyebb lenne a Roche rendszernél) illetve a specificitásban (a mi rendszerünk kevésbé specifikus és amit látunk fals pozitív eredmény) keresendő. Ezt szekvenálással kívánjuk meghatározni.

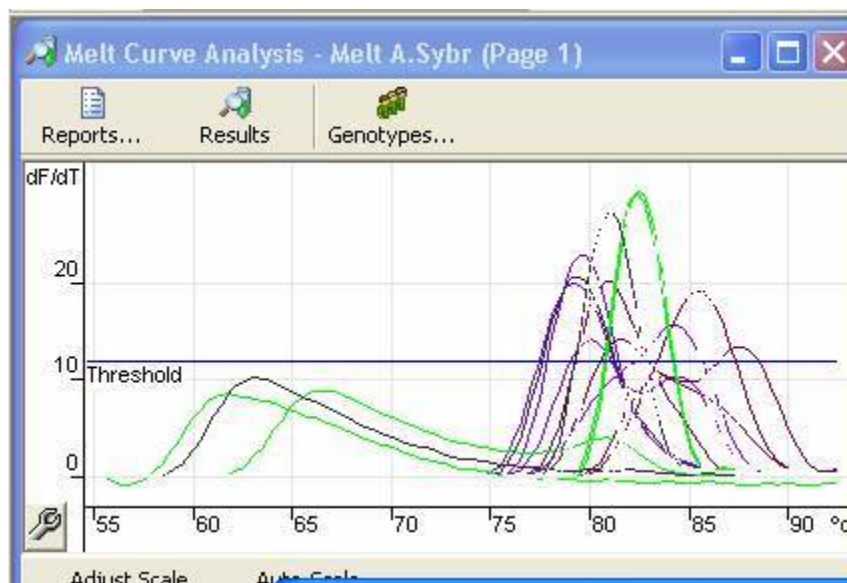


A következőkben egy előamplifikációt végeztünk el degenerált, illetve kevert primerpárokat tartalmazó reakcióban. Az előamplifikációs reakcióból alikvotot futtattunk meg egy újabb reakcióban, amelyet már valós-idejű PCR készülékben futtattunk le SYBR Green protokollokkal, már egyedi, típus-specifikus reakciókban.

Érdekes, hogy az általános szekvenciákkal újraamplifikált templát negatív kontroll reakciója is hamar elindult, ami azt sugallja, hogy aspecifikus amplifikáció történik valószínűleg a primerek nagy degeneráltsági foka miatt.



A második vonalban exponenciális sokszorozást mutató minták (28-31 ciklus környékén) specifikus amplifikációra utalnak.



A fenti ábrák a kiértékelt amplifikációs lefutást és a  $T_m$  pont analízist mutatja be.

Az ábrákról leolvasható (figyelembe véve a Roche rendszerrel kapott validációs eredményeket is), hogy nem elegendő a lefutási görbét analizálni, a  $T_m$  pont is fontos. Ez főképpen azokban az esetekben igaz, ahol aspecifikus tipizálás történik. Ez rendkívül fontos a fals pozitív minták kiszűrésekor.



További reakciókat futtattunk TaqMan próbákkal is, de az amplifikációs hatékonyság nem volt elegendő, illetve sokszor fals negatív eredményt kaptunk valószínűleg a TaqMan próbával komplementer vírusszekvencia heterogenitása és altípus függősége miatt.

Az eddigi tapasztalatok és eredmények a hagyományos QRT-PCR technika esetében a következők:

1. Preamplifikáció a mintafeldolgozás érzékenységét növeli, de egyelőre csak az L1 génre megoldott.
2. A típus-specifikus amplifikációs görbék önmagukban nem alkalmazhatóak megbízhatóan a HPV altípusainak kiszűrésére.
3. A típus meghatározásához olyan módszer is szükséges, amely a  $T_m$  analízist is lehetővé teszi (SYBR Green jelölés, TaqMan ilyen esetben nem jöhet szóba).
4. A sok fals negatív TaqMan futtatások miatt a Sybr Green protokoll a preferált.

A nanokapilláris QRT-PCR módszer lényege, hogy olcsón nagy számú mintán, nagyszámú SNP vizsgálható, génexpressziós vizsgálat hajtható végre.

A továbbiakban az amplifikációs termékeket az előbb említett, nagy áteresztőképességű technikával, nanokapilláris QRT-PCR módszerrel (Avidin-Biotrove) fogjuk elemezni és adaptáljuk azokat az eredményeket és optimalizált primereket, amelyek a hagyományos QRT-PCR-ben futottak.

Megállapítottuk, hogy TaqMan próbák (és a BioTrove SNP analízis modulja) helyett SybrGreen protokollt fogunk alkalmazni (BioTrove génexpressziós modulnak megfelelő), aminek az amplifikáció folyamatos és nagy mintán történő valós nyomonkövetése mellett további előny a kapillárisokban a  $T_m$  pont meghatározás is.

Ezáltal sokkal pontosabb kit létrehozására nyílik mód. A továbbiakban a nanokapilláris rendszerre dolgozzuk ki a HPV altípusainak egy- illetve kétkörös amplifikáción alapuló módszerét.