April 2009 • 64ste jaargang Nr: 3

Analyse

Vakblad
bioMedisch Laboratoriummedewerkers

NVML



• Kwaliteitskring
Semenanalyse Utrecht

• **Erfelijke ziekten** *Kwantitatieve real-time PCR*

• **Neonatale diagnostiek** *Congenitale infecties*

• **Bof** *Mogelijke oorzaken van bof onder gevaccineerden*

Analyse_03_09.indd 69 3/26/09 4:23:41 PM

Screening van patiënten op de genetische afwijking van Charcot-Marie-Tooth type 1A

L. van Dorsten[1], E. Lommen[1], C. van Beuningen[2]
[1] student Fontys Hogescholen, Hogeschool voor Toegepaste Natuurwetenschappen, Applied Science, Eindhoven
[2] docent Fontys Hogescholen, Hogeschool voor Toegepaste Natuurwetenschappen, Applied Science, Eindhoven, medewerker Lectoraat Moleculaire Medische Diagnostiek

De ziekte van Charcot-Marie-Tooth type 1A (CMT1A) wordt veroorzaakt door een duplicatie van het PMP22-gen (perifeer myelineproteïne 22). Door deze duplicatie stijgt het totale aantal genkopieën van twee naar drie. Het eiwit PMP is een belangrijke component van myeline, de stof die de beschermende huls vormt rond zenuwen en zorg draagt voor efficiënte geleiding van zenuwimpulsen. Het doel van deze studie was het testen van een dertigtal familieleden op CMT1A met behulp van een kwantitatieve real-time polymerasekettingreactie (q-RT-PCR). Van deze familieleden was een persoon al genetisch gediagnosticeerd voor CMT1A. Enkele andere familieleden zijn op basis van klinische verschijnselen gediagnosticeerd. Uit de resultaten bleek dat de q-RT-PCR met SYBR green I als reporterkleurstof de duplicatie van het PMP22-gen kon aantonen. Q-RT-PCR gaf een significant onderscheid weer (T-toets, $p<0,0001$) tussen het aantal genkopieën bij familieleden met de PMP22-genduplicatie en dat van familieleden zonder de duplicatie en zonder klinische verschijnselen. Duplicatie werd bij 15 familieleden (50%) gevonden en alle familieleden met klinische verschijnselen bleken positief te zijn. Tevens kon geconcludeerd worden dat ook kleine hoeveelheden DNA, verkregen uit mondspoelingen, als uitgangsmateriaal gebruikt kunnen worden.

De ziekte van Charcot-Marie-Tooth

Hereditaire motorische en sensorische neuropathie (HMSN) is de Nederlandse benaming voor de ziekte van Charcot-Marie-Tooth (CMT; de term die buiten Nederland het meest in gebruik is), een chronische vorm van een erfelijke polyneuropathie (poly betekent: meervoudig). Hierbij staat hereditair voor erfelijk; motorisch voor het bewegingsapparaat betreffende; sensorisch heeft betrekking op het gevoel (tastzin) en neuropathie betekent zenuwaandoening. De kans op vererving is 50%, ongeacht het geslacht. HMSN is onderverdeeld in een aantal typen, te weten: I, II en III, waarvan type I weer gesplitst wordt in IA en IB. Synoniem voor type III is de naam (syndroom van) Déjerine Sottas. De typeaanduidingen IV t/m VII zijn in onbruik geraakt door nieuwe onderzoeksmethoden en de daardoor verworven kennis. Deze krijgen daardoor een eigen naam, zoals type IV nu ziekte van Refsum wordt genoemd.
De ziekte HMSN is langzaam progressief en tot op heden nog niet te genezen, al wordt daar wel onderzoek naar gedaan. Deze erfelijke aandoening kan worden vastgesteld door middel van DNA-onderzoek, sinds in de jaren negentig is ontdekt op welk chromosoom de fout zich bevindt.

Verschijnselen

De ledematen die het verst van het ruggenmerg afliggen worden het eerst aangedaan (voeten en handen). Die ziekte valt onder de spierziekten, ondanks dat eigenlijk de spieren zelf niet zijn aangedaan, maar de zenuwbanen die de spieren aan moeten sturen, waardoor er toch motorische en gevoelsproblemen zijn en de spieren niet meer goed functioneren. Eerste verschijnselen van de ziekte kunnen zich al voordoen vanaf de geboorte tot soms pas op 65- tot 70-jarige leeftijd. De klachten kunnen variëren van klompvoeten, hamertenen, klauwhanden tot spierzwakte in onderbenen en -armen waar verder weinig aan is te zien. Ten opzichte van gezonde mensen kan de spierkracht wel tot 50% minder zijn.
Bron: Wikipedia

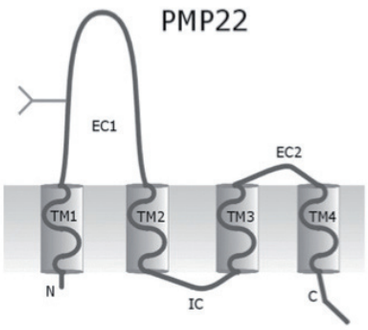
Afkortingen

CMT: Charcot-Marie-Tooth, PMP: perifeer myelineproteïne, Mb: megabasen, SD: standaarddeviatie, Ct: threshold-cycle, HNPP: hereditary neuropathy pressure palsies, HSA: humaan serumalbumine, q-RT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction, FISH: fluorescentie in-situ-hybridisatie

De ziekte van Charcot-Marie-Tooth (CMT) is de meest voorkomende vorm van een hereditaire motorische en sensorische neuropathie. CMT is een heterogene groep van aandoeningen die wordt gekarakteriseerd door een progressieve zwakte van het perifere zenuwstelsel (1,2).
De meest voorkomende vorm is CMT type 1A (CMT1A), een autosomaal dominante aandoening die wordt gekenmerkt door hypertrofische zenuwen, verlaagde zenuwgeleidingssnelheden en tekenen van de- en remyelinisatie. CMT1A wordt veroorzaakt door een duplicatie van een fragment van 1.5 Mb in de regio 17p11.2-12. Dit resulteert in een duplicatie van het perifere myelineproteïne 22-gen (PMP22-gen) (3).
De duplicatie van het PMP22-gen wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van twee homologe DNA-segmenten die het PMP22-gen flankeren. Deze configuratie kan leiden tot instabiliteit van de tussenliggende regio met als gevolg een duplicatie of deletie van het gebied dat tussen de gerepeteerde sequenties van het PMP22-gen ligt. In het geval van een deletie van het PMP22-gen is er sprake van erfelijke drukneuropathie ofwel 'heriditary neurpathy pressure palsies' (HNPP) (4,5). Twee tot vijf procent van het totale PMP22-gen codeert voor

vervolg op volgende pagina >

Analyse_03_09.indd 77 3/26/09 4:24:42 PM



Figuur 1 Structurele weergave van het myelinemembraanproteïne PMP 22. N: amino-uiteinde; TM: transmembraan; EC: extracellulaire loop; IC: intracellulaire loop; C: carboxyluiteinde (6).

een membraangebonden eiwit. Het PMP22-gen bevat twee weefselspecifieke promotors, waarvan er een specifiek is voor neuronen. PMP22-expressie in het perifere zenuwstelsel wordt gereguleerd door contact met axonen. Het PMP22-eiwit heeft vier transmembraangebieden, twee extracellulaire loops en een cytoplasmatisch amino- en carboxyluiteinde **(figuur 1)** (6). Na synthese in het ruw endoplasmatisch reticulum wordt het grootste deel van het PMP22-eiwit gedegradeerd. De overgebleven fractie van het PMP22-eiwit wordt in het Golgi-apparaat bewerkt en vervolgens getransporteerd naar het celmembraan. Hoewel de functie van het eiwit nog onbekend is, wordt gesuggereerd dat het betrokken zou kunnen zijn bij de inhibitie van celgroei en apoptose en bij de aanmaak van myeline (7). Er zijn reeds verschillende moleculair-genetische testen ontwikkeld voor het aantonen van een deletie dan wel duplicatie van het PMP22-gen. Deze technieken berusten enerzijds op hybridisatie, zoals Southern blotting (2,4,5), en fluorescentie bij in-situ-hybridisatie (FISH) (1) en anderzijds op kwantitatieve real-time polymerasekettingreactie (q-RT-PCR) met gebruikmaking van TaqMan-probes (8). In dit onderzoek werd gebruikgemaakt van q-RT-PCR voor de detectie van een eventuele duplicatie van het PMP22-gen, waarbij echter kwantificering mogelijk gemaakt werd door het gebruik van SYBR Green I. In tegenstelling tot eindpunt-kwantitatieve PCR, kan met real-time PCR in de logaritmische fase de threshold-cycle (Ct) worden bepaald (9). Door gebruik te maken van de Ct-bepaling, kon de relatieve hoeveelheid PMP22-DNA, ten opzichte van een referentie bepaald worden. Voor normalisering van de hoeveelheden DNA werd gebruikgemaakt van het HSA-gen (humaan serumalbumine). Eerdere publicaties toonden aan dat een q-RT-PCR de duplicatie van het PMP22-gen kon aantonen (7,8). Hierbij werd echter gebruikgemaakt van grote hoeveelheden DNA verkregen uit bloed. Momenteel wordt er nog altijd bloed afgenomen bij patiënten die zich willen laten diagnosticeren op CMT1A. In dit onderzoek werden door een mondspoeling wangslijmvliescellen verzameld. Hieruit werd DNA geïsoleerd. Het ongemak voor de proefpersonen werd hierdoor verminderd.

Daarnaast werd in dit onderzoek gebruikgemaakt van SYBR Green I als reporterkleurstof, waarmee aanzienlijk bespaard werd op de kosten. In deze studie werd een familie onderzocht met een historie gerelateerd aan CMT, met instemming van de hele familie ('informed consent'). Acht personen zijn in het verleden op basis van klinische verschijnselen gediagnosticeerd als CMT-patiënt. Onlangs is een van hen genetisch gediagnosticeerd als CMT type 1A. Op basis van de klinische verschijnselen kan verondersteld worden dat ongeveer 50% van de familieleden is aangedaan. Dit komt overeen met autosomaal dominante overerving. Verscheidene familieleden lopen met een onbeholpen tred, met de neiging om zich op hun tenen voort te bewegen. Van deze personen wordt onderzocht of zij wel of niet de PMP22-genduplicatie bezitten.

Methode

Tijdens deze studie werden dertig familieleden getest op CMT1A. In deze familie is een persoon al eerder gediagnosticeerd als CMT1A-drager. Het DNA van deze persoon werd gebruikt als positieve controle. Een niet-gerelateerd DNA-monster (geen familie en geen klinische verschijnselen die CMT1A zouden kunnen veronderstellen) werd gebruikt als negatieve controle.

Mondspoeling

De mondspoeling, waarbij wangslijmvliescellen werden verzameld, werd uitgevoerd met 9 ml fysiologische zoutoplossing (0,9% NaCl) gedurende 1 minuut, wat weinig ongerief met zich meebracht.

DNA-extractie

Chromosomaal DNA werd door middel van de QIAamp DNA bloodkit (QIAGEN, Venlo, Nederland) geëxtraheerd uit de wangslijmvliescellen. De concentratie van het DNA werd spectrofotometrisch met de nanodrop (Nanodrop® ND-1000, ISOGEN) bepaald door de absorptie bij 260 nm te meten. Het DNA werd verdund in gedestilleerd water tot een concentratie van 2 ng/µl en opgeslagen bij -20 °C tot verder gebruik.

Primerontwerp en q-RT- PCR

De primersequenties van het PMP22-gen waren als volgt: exon 3 forward primer, 5'-TCTGTCCAGGCCACCATGA-3', exon 3 reverse primer, 5'-GAAGAGTTGGCAGAAGAACAGGA-3'. Als controle, om de hoeveelheid geïsoleerd DNA in ieder monster tegen te normaliseren, werd het HSA-gen gebruikt: exon 12 forward 5'-TGTTGCATGAGAAAACGCCA-3', exon 12 reverse primer, 5'-GTCGCCTGTTCA CCAAGGAT-3' (Biolegio, Nijmegen, Nederland) (7). PCR-amplificatie werd uitgevoerd in een 96 wells-plaat (Bio-Rad, Veenendaal, Nederland) in een volume van 20 µl. Deze reactie bevatte 10 µl SYBR Green I PCR mastermix, met hotstartpolymerase (Bio-Rad, Veenendaal, Nederland), 1 µl forward primer (20 µM), 1µl reverse primer (20 µM) en 5 µl chromosomaal DNA (2 ng/µl). Elke analyse bevatte een onafhankelijke controle van DNA van een persoon die geen familie was en geen klinische verschijnselen vertoonde die zouden kunnen duiden op CMT1A, en een controle zonder template-DNA.

De verschillende monsters werden in triplo getest voor zowel PMP22 als HSA (7). Aan de DNA-amplificatie werd vooraf een eerste denaturatiestap gedaan van 10 min. bij 95 °C, waarbij activatie van het polymerase optrad. Vervolgens werd het DNA geamplificeerd tijdens 40 cycli van 15 sec. bij 95 °C, 1 min. bij 65 °C en 1 min. bij 72 °C. De fluorescentie werd telkens gemeten aan het einde van de extensiefase. Hierna werd een extra extensiestap van 7 min. bij 72 °C uitgevoerd. De DNA-amplificatie werd uitgevoerd in de MyiQ™ Single-Color RT-PCR van Bio-Rad (Venendaal, Nederland).

Data-analyse

Data-analyse werd uitgevoerd met behulp van Microsoft Excel versie 2003. De comparatieve Ct-methode werd gebruikt om de resultaten kwantitatief te analyseren. De reacties werden in triplo en in aparte wells uitgevoerd. Om het PMP22-gen te kwantificeren werd dit genormaliseerd tegen het HSA-gen.

Analyse_03_09.indd 78 3/26/09 4:24:45 PM

De q-RT-PCR is een kinetische benadering waarbij in het begin van de PCR de reactie gemeten wordt, wanneer deze nog lineair is in de logaritmische fase en uitputting van reagentia geen rol speelt (10). Dit wordt weergegeven door de drempelwaarde, ook wel 'threshold' genoemd. Het cyclusnummer waarop het monster deze drempelwaarde passeert, wordt de threshold-cycle (Ct) genoemd. De Ct-waarde werd vastgelegd voor alle monsters. De threshold werd automatisch bepaald bij een baseline van 3-15.
Van de verkregen Ct-waarden werden het gemiddelde (ΔCt) en de standaarddeviatie (SD) bepaald. Vervolgens werd het verschil tussen de PMP22- en HSA-uitslagen per monster berekend met de volgende formule: [(ΔCt HSA (gezond persoon) - ΔCt PMP22 (gezond persoon)] - [ΔCt HSA (patiënt) - ΔCt PMP22 (patiënt)]. Deze waarde werd gedefinieerd als ΔΔCt. De ratio tussen het aantal genkopieën van PMM22 van een (mogelijke) patiënt ten opzichte van een gezond persoon kon vervolgens bepaald worden door de formule: 2-ΔΔCt. De berekening zoals hier geschetst, wordt de comparatieve Ct-methode genoemd (7). Hierbij werd aangenomen dat beide genen, zowel PMP22 als HSA, even efficiënt gekopieerd werden. Daarnaast werd aangenomen dat een verdubbeling van het aantal kopieën van PMP22 een vermindering van één Ct-waarde opleverde. Bij gebruik van deze methode wordt daarom theoretisch een waarde van 1 verwacht bij gezonde personen en een waarde van 1,5 bij personen met CMT1A.

Resultaten

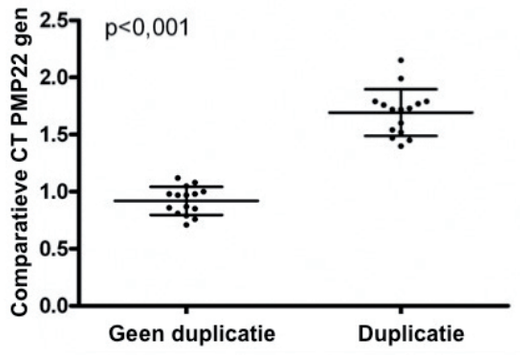
De PCR-amplificatie van het DNA van de gezonde referentie liet zien dat de Ct-waarde van PMP22 en HSA nagenoeg gelijk is. Voor PMP22 was dit 23,2 met een SD van 0,28 en voor HSA 23,2 met een SD van 0,010. In monsters positief voor de PMP22-duplicatie is de Ct-waarde van PMP22 afgenomen in vergelijking met HSA. De triplo-amplificaties van PMP22 en HSA lieten vrijwel gehele overlap zien van de amplificatiegrafieken; voor alle monsters was de Ct-standaarddeviatie erg laag (reikwijdte 0,02-0,21).

De gemiddelde variatiecoëfficiënt van alle triplobepalingen was slechts 1,1%. De lage variatiecoëfficiënt is beslissend voor de betrouwbaarheid van de test en is het resultaat van nauwkeurig pipetteren van de PCR-reactiemix en het DNA-monster en van de hoge kwaliteit van het DNA-monster.
Tabel 1 laat de relatieve PMP22-ratio [2-(ΔΔCt)] zien van personen met de duplicatie van het PMP22-gen (CMT1A) en van gezonde personen zonder de duplicatie van het PMP22-gen ten opzichte van een onafhankelijke, gezonde controle, verkregen door middel van de comparatieve Ct-methode. De resultaten laten geen overlap zien tussen de twee groepen (T-toets: p<0,0001).

In **figuur 2** zijn deze resultaten in een 'scatterplot' weergegeven, opgemaakt is het programma Graph Pad Prism.
Na berekening volgens de comparatieve Ct-methode geeft de reductie in de Ct-waarde een ΔΔCt-ratio [2-(ΔΔCt)] van meer dan 1,50. Dit resultaat laat zien dat de methode voldoet om een verschil van 50% in DNA-hoeveelheid aan te tonen, door het berekenen van de ratio tussen de gemiddelde PMP22-genhoeveelheid van een persoon zonder PMP22-genduplicatie en een persoon met PMP22-genduplicatie, beide genormaliseerd tegen albumine.
Vijftien van de dertig onderzochte familieleden die zijn getest op CMT1A zijn positief bevonden voor de aandoening. Hieronder vielen alle 8 personen die op basis van klinische verschijnselen gediagnosticeerd waren. De vier aangetrouwde familieleden die onderzocht werden, waren zoals verwacht negatief en de persoon die reeds genetisch gediagnosticeerd was, was ook in

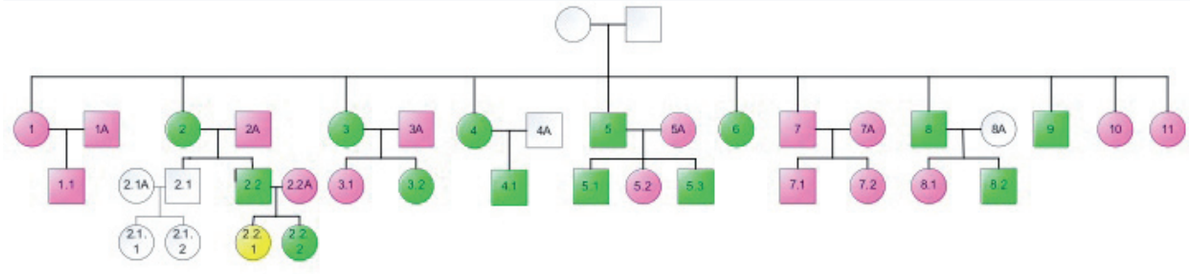
Tabel 1 PMP22 relatieve ratio. PMP22-duplicatie werd gedetecteerd door kwantitatieve real-time PCR. Er werd gebruikgemaakt van de comparatieve Ct-methode, waarin de ΔΔCt ratio (2- ΔΔCt) de relatieve genhoeveelheid weergeeft van de familieleden zonder de PMP22-genduplicatie (gezond) en van familieleden met duplicatie van het PMP22-gen (CMT1A) ten opzichte van de gezonde referentie. Een P-waarde <0,0001 in een T-toets geeft een hoge mate van betrouwbaarheid aan, voortvloeiend uit een gemiddelde variatiecoëfficiënt van alle Ct-waarden van 1,1%.

Monsters	*PMP22 relatieve ratio*	
	2^ΔΔCt	*Reikwijdte*
Gezond (n=15)	*0,92*	*0,71 - 1,12*
CMT1A (n=15)	*1,69*	*1,40 - 2,15*



Gemiddelde: lange streep met SD's.

Figuur 2 Scatterplot waarin de comparatieve Ct-ratio van het PMP22-gen van alle proefpersonen is weergegeven, met voor beide groepen (duplicatie en geen duplicatie) als middellijn de gemiddelde ratio en als buitenste lijnen de reikwijdte.



Figuur 3 **Stamboom familie.** Aan het hoofd van deze familie staan een vader en moeder van 11 kinderen (weergegeven in nummers 1 tot en met 11). Hiervan hebben er 7 met een partner (+A) voor nakomelingen gezorgd, deze nakomelingen zijn aangegeven met getallen achter een punt.

- familieleden negatief bevonden voor CMT1A
- familieleden positief bevonden voor CMT1A
- positieve controle CMT1A
- familieleden waarvan geen monster beschikbaar is
- vrouwelijke familieleden ongeacht de kleur
- mannelijke familieleden ongeacht de kleur

vervolg op volgende pagina >

Analyse_03_09.indd 79 3/26/09 4:24:51 PM

deze test positief (zie **figuur 3**: positieve controle CMT1A).

Discussie

Het doel van deze studie was het testen van een dertigtal familieleden op CMT1A met behulp van q-RT-PCR waarbij het DNA verkregen werd uit mondspoelsels.

Wij hebben aangetoond dat de q-RT-PCR-methode betrouwbaar is om de PMP22-duplicatie aan te tonen in monsters met kleine hoeveelheden DNA, verkregen uit een mondspoeling. De comparatieve Ct-methode heeft verschillende voordelen ten opzichte van andere screeningsmethoden voor CMT1A. Moleculaire diagnostiek op basis van hybridisatie, zoals Southern blotting (2,4,5), vergt grote hoeveelheden DNA, is tijdrovend en detectie geschiedt nog altijd vaak met behulp van radio-isotopen. Ook FISH (1) is tijdrovend.

De gebruikte q-RT-PCR-methode is snel, precies en reproduceerbaar. Het gebruik van SYBR Green 1 maakt de methode goedkoop in vergelijking met een q-RT-PCR gebruikmakend van TaqMan-probes. De methode is gebaseerd op Ct-waardes die worden bepaald in de logaritmische fase in plaats van een meting op het eindpunt, waar geen betrouwbare relatie is tussen de starthoeveelheid DNA en de hoeveelheid PCR-product. Q-RT-PCR behoeft DNA van goede kwaliteit. In dit onderzoek werd dat bereikt door middel van de QIAamp DNA bloodkit. Een lage gemiddelde variatiecoëfficiënt (1,1%) van de q-RT-PCR voor het HSA- en PMP22-gen was ook essentieel voor adequate resolutie en reproduceerbaarheid van het onderzoek. Een voordeel van het gebruik van DNA geïsoleerd uit een mondspoeling ten opzichte van DNA geïsoleerd uit een bloedmonster is dat de patiënt het zelf kan afnemen, naast het feit dat het niet belastend is voor de patiënt.

Door middel van q-RT-PCR met DNA verkregen uit mond-spoelingen is aangetoond dat 15 van de 30 familieleden een duplicatie van het PMP22-gen bezitten.

Geconcludeerd is dat q-RT-PCR een duidelijk onderscheid geeft tussen de genhoeveelheid bij de PMP22-genduplicatie in CMT1A en de genhoeveelheid bij een onafhankelijk monster afgenomen bij een gezond persoon. De doorvoersnelheid van de methode is erg hoog, omdat 96 onafhankelijke DNA-monsters (13 verschillende personen) kunnen worden geanalyseerd in 4 uur met de gebruikte PCR-apparatuur (MyiQ™ Single-Color RT-PCR van Bio-Rad, Veenendaal, Nederland).

De methode is erg specifiek, reproduceerbaar en behoeft een minimale hoeveelheid aan DNA. De methode is goed bruikbaar voor diagnostiek, niet alleen voor de aandoening Charcot-Marie-Tooth type 1A, maar naar alle waarschijnlijkheid ook voor andere erfelijke ziekten waarbij sprake is van een duplicatie of deletie.

Een woord van dank gaat uit naar: dr. A. van der Brule, lector medische moleculaire diagnostiek, Fontys Hogescholen, Eindhoven; dr. M. Gosens, docent Fontys Hogescholen, Eindhoven en ir. ing. J. Theunissen, docent Fontys Hogescholen, Eindhoven.

Literatuur

1 Roa BB, Garcia CA, e.a. Charcot Marie Tooth Disease type 1A – Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. N Engl J Med. 1993;329:96-101.

2 MacMillan JC, Upadhyaya M, Harper PS. Charcot-Marie-Tooth disease type la (CMT1a): evidence for trisomy of the region p 11.2 of chromosome 17 in south Wales families. J Med Gen. 1992;29:12-3.

3 Bernard R, Boyer A, e.a. Prenatal detection of the 17p11.2 duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: necessity of multidisciplinary approach for heterogeneous disorders. Eur J Hum Gen. 2002;10:297-302.

4 Lupski JR, Oca Luna RM de, e.a. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Cell. 1991;66:219-32.

5 Raeymaekers P, Timmerman V, e.a. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. Neuromuscul Disord. 1991;1:93-7.

6 Meuleman J, Timmerman V, e.a. Molecular genetics of inherited peripheral neuropathies: who are the actors? Acta Neurol Belg. 2000;100:171-80.

7 Kim S, Lee K, e.a. Rapid detection of duplication/deletion of the PMP22 gene in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsy by real-time quantitative PCR using SYBR green I dye. J Korean Med Sci. 2003;18:727-32.

8 Aarskog NK, Vedeler CA. Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. Hum Genet. 2000;107:494-8.

9 Young P, Stogbauer F, e.a. PCR-based strategy for the diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and Charcot-Marie- Tooth disease type 1A. Neurology. 1998;50:760-3.

10 Karlen Y, McNair A, e.a. Statistical significance of quantitative PCR. BMC Bioinformatics. 2007;8:131.

Analyse_03_09.indd 80 3/26/09 4:24:52 PM