

Rest-DNA detectie d.m.v. een qPCR

Rest-DNA detection by means of a qPCR



Saskia Veerman
Nederlands Vaccin Instituut
27 mei 2011, Bilthoven

Rest-DNA detectie d.m.v. een qPCR

Rest-DNA detection by means of a qPCR

Saskia Veerman

**Nederlands Vaccin Instituut
Quality Control Virology, Gebouw H
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9-11
3721 MA Bilthoven**



**Hogeschool Utrecht
Faculteit Natuur en Techniek
Life Sciences and Chemistry
Medische Microbiologie
F.C. Dondersstraat 65
3572 JE Utrecht**



**Stagebegeleider: Dhr. D.R. Mekkes
Stagecoördinator: Dhr. D.G. van Brenk**

Handtekening stagiaire:

Handtekening stagebegeleider:

S. Veerman

Dhr. D.R. Mekkes

Voorwoord

Bij de opleiding Medische Microbiologie te Utrecht hoort in het laatste jaar een afstudeeronderzoek van zeven maanden. Mijn afstudeeronderzoek heb ik volbracht bij het Nederlands Vaccin Instituut te Bilthoven bij de afdeling QCV (Quality Controle Virologie). Op deze afdeling werd er in het verleden een hybridisatie test uitgevoerd om Rest-DNA in het poliovaccin aan te tonen. Deze test bleek niet meer aan de eisen te voldoen waardoor het doel van dit onderzoek is het opzetten van een qPCR om Rest-DNA in het poliovaccin aan te tonen.

Graag wil ik mijn stagebegeleider, Dirk Mekkes, bedanken voor de goede begeleiding, de fijne samenwerking en de tijd die hij voor mij vrijgemaakt heeft. Ook wil ik Michael Geurtsen en Justin Mouthaan bedanken voor het inwerken van de LightCycler, gel-electroforese, MagNa Pure en de fotospectrometer. Verder wil ik alle overige collega's bedanken die mij op de één of andere manier geholpen hebben.

Samenvatting

Poliomyelitis wordt veroorzaakt door het poliovirus en is een ontsteking van de grijze stof in het ruggenmerg. De ziekte wordt ook wel kinderverlamming genoemd en komt alleen bij mensen voor. Het poliovirus komt via de mond binnen, verspreid zich dan naar het maagdarmkanaal en kan vervolgens via de lymfeklieren in het zenuwstelsel terecht komen.

Poliomyelitis kent drie verschillende fases namelijk de prodromale, non- of preparalytische en paralytische fase. Sinds 1957 is er in het Rijksvaccinatieprogramma een vaccin opgenomen tegen poliomyelitis dat in combinatie met difterie, kinkhoest en tetanus wordt gegeven. Om een poliovaccin te maken moet het poliovirus eerst op Vero cellen gekweekt worden en in het uiteindelijke vaccin mag er maar een bepaalde hoeveelheid residueel DNA (rest-DNA) van deze Vero cellen aanwezig zijn. Dit kan door middel van een polymerase chain reaction aangetoond worden waarbij er gebruik gemaakt wordt van SYBR Green of een hydrolyse probe. Om de rest-DNA concentratie van Vero cellen te bepalen wordt er een klein deel van een gen aangetoond. Er wordt een gen gebruikt dat erg vaak in de Vero cel voorkomt, namelijk het beta-actin gen. Voor het opzetten van de polymerase chain reaction wordt uit de cellen eerst DNA geïsoleerd, vervolgens wordt de polymerase chain reaction geoptimaliseerd met SYBR Green en een hydrolyse probe. Tijdens het onderzoek zijn er enkele problemen maar uiteindelijk is er een goed werkende polymerase chain reaction ontworpen.

Abstract

Poliomyelitis is a disease caused by an infection with poliomyelitis virus and is characterized by an inflammation of the grey matter in the spinal cord. Poliomyelitis is often called infantile paralysis and the only host are humans. The poliovirus enters through the mouth, migrates to the gastro-enteric channel and enters the central nervous system through the lymph glands.

There are three different phases of poliomyelitis, namely prodromale, non- or preparalytic and paralytic phase. Since 1957 there is a vaccine against poliomyelitis that is given in combination with diphtheria, whooping cough (*B. pertussis*) and tetanus. The poliovirus must be cultivated on Vero cells to get a poliovaccine and in the final poliovaccine there is a maximum specification for the amount of residual Vero cell DNA in the vaccine. This Vero cell DNA can be detected by means of a polymerase chain reaction with SYBR Green or a hydrolysis probe. To detect the concentration of residual Vero cell DNA, a small part of the beta-actin gene, of which there are many copies present in the Vero cell, is used. To develop a polymerase chain reaction optimization of cellular DNA isolation and a polymerase chain reaction using SYBR green and a hydrolysis probe were performed. During this research there were some problems but the final result is a working polymerase chain reaction that is able to detect residual Vero cell DNA in vaccine samples.

Afkortingenlijst/begrippenlijst

- °C = graden Celsius
- % = procent
- ± = plusminus
- Aërosolen = kleine vaste en vloeibare deeltjes die door de atmosfeer zweven.
- BEL cellen = Bovine Embryonic Lung cellen
- bp = baseparen
- Bulbair polioomyelitis = een bepaalde vorm van polioomyelitis waarbij de hersenzenuwen zijn aangetast.
- CD155 = een receptor waar het poliovirus aan bindt.
- Covalente verbindingen = de verbindingen tussen de nucleotiden in een enkele DNA streng.
- Cp = crossing point
- Ct = crossing threshold
- Cyno cellen = Cynomolgus cellen
- Cytoplasma = alle inhoud van een cel behalve de celkern.
- DaKTP-Hib = Difterie, acellulaire Kinkhoest componenten, Tetanus, Polio, Haemophilus influenza type B
- DaKTP = Difterie, acellulaire Kinkhoest componenten, Tetanus, Polio
- DKTP = Difterie, Kinkhoest, Tetanus, Polio
- DKTP-Hib = Difterie, Kinkhoest, Tetanus, Polio, Haemophilus influenza type B
- d.m.v. = door middel van
- DNA = desoxyribonucleïnezuur
- dNTP = desoxyribonucleotide trifosfaat
- DTP = Difterie, Tetanus, Polio
- Europese Pharmacopoeia = een belangrijke Europese organisatie die betrokken is bij de harmonisatie en coördinatie van de wettelijke kwaliteitscontrole, bloedtransfusie, orgaantransplantatie, farmaceuten en farmaceutische patiëntenzorg.
- Farynx = keelholte
- fg = figogram
- Formaldehyde = een vluchtige organische verbinding met een prikkelende geur.
- Gelfiltratie = een chromatografie methode voor het scheiden van verschillende moleculen.
- H5N1 = vogelgriep virus
- Ionenwisseling = een chromatografiemethode waarbij een stof in een vloeistof wordt gebracht en daarin bepaalde ionen afgeeft en tegelijkertijd weer andere ionen daaruit opneemt.
- min = minuut
- ml = milliliter
- mm = millimeter
- nm = nanometer
- Nucleotiden = de bouwstenen van het genetische materiaal bestaande uit adenine (A), cytosine (C), guanine (G) en thymine (T).
- Oligonucleotiden = een nucleotidesequentie (DNA of RNA), met een beperkt aantal nucleotiden.
- PCR = Polymerase Chain Reaction
- pg = picogram
- Poliomyelitis = een ontsteking van de grijze stof in het ruggenmerg.
- Primerdimeren = tijdens een PCR binden de primers aan elkaar.
- qPCR = kwantitatieve Polymerase Chain Reaction
- RK13 cellen = Rabbit Kidney 13 cellen
- RNA = Ribonucleïne zuur
- rpm = revolutions per minuut
- RVP = Rijksvaccinatie programma
- Sequenzen = een techniek waarbij de basenvolgorde van een DNA streng worden bepaald.
- Tm = Smelt temperatuur
- t.o.v. = ten opzichte van
- µl = microliter
- VP = Viral Proteïne = een eiwit dat geproduceerd wordt door een virus.
- Waterstof verbindingen = de verbindingen tussen de nucleotiden in een dubbelstrengs DNA.

Inhoudsopgave	Pagina
VOORWOORD	3
SAMENVATTING	4
ABSTRACT	4
AFKORTINGENLIJST/BEGRIPPENLIJST	5
INHOUDSOPGAVE	6
1. POLIOMYELITIS	8
1.1 VIRUS	8
1.2 PATHOGENESE	8
1.3 ZIEKTEVERSCHIJNSELEN	8
1.3.1 Prodromale fase	8
1.3.2 Non- of preparalytische fase	8
1.3.3 Paralytische fase	9
1.4 HET VACCIN	9
1.4.1 Vero cellen	9
1.4.2 De productie	10
1.4.3 Rest-DNA	10
2. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	11
2.1 REAL-TIME PCR	11
2.1.1 Denaturatie fase	11
2.1.2 Annealing fase	11
2.1.3 Extensie fase	11
2.2 SYBR GREEN I	12
2.2.1 Smelt curve	12
2.3 PROBES	13
2.3.1 Hydrolyse probe	13
2.4 KWANTITATIEVE PCR (QPCR)	14
2.4.1 Absolute kwantificatie	14
3. BETA-ACTIN	15
4. MATERIAAL EN METHODE	16
4.1 DNA ISOLATIE	16
4.2 REAL-TIME PCR	16
4.3 GEL-ELECTROFORESE	16
4.4 SPECTROFOTOMETRISCHE ANALYSE	16
5. RESULTATEN	17
5.1 PCR OPTIMALISATIE SYBR GREEN I	17
5.1.1 Detectielimiet	19
5.1.2 Bijproducten	20
5.2 PCR OPTIMALISATIE HYDROLYSE PROBE	21
5.2.1 Detectielimiet	22
5.2.2 Standaardlijn	22
5.2.3 Vaccins	23
5.3 SPECIFICITEIT	24
5.4 DNA ISOLATIE	25
6. CONCLUSIE EN DISCUSSIE	26
7. LITERATUURLIJST	28

BIJLAGE I: DNA ISOLATIE M.B.V. DE QIAGEN MINI KIT	30
BIJLAGE II: DNA ISOLATIE M.B.V. DE MAGNA PURE COMPACT	31
BIJLAGE III: REAL-TIME PCR M.B.V. SYBR GREEN I.....	32
BIJLAGE IV: REAL-TIME PCR M.B.V. EEN HYDROLYSE PROBE	34
BIJLAGE V: GEL-ELECTROFORESE	36
BIJLAGE VI: SPECTROFOTOMETER.....	37

1. Poliomyelitis

Poliomyelitis, ook wel polio of kinderverlamming genoemd, is afgeleid van het Grieks; polios = grijs en myelos = ontsteking van het ruggenmerg. Poliomyelitis is dus een ontsteking van de grijze stof in het ruggenmerg die veroorzaakt wordt door een infectie met het poliovirus. [1, 2, 3, 4, 5, 6]

1.1 Virus

Het poliovirus is een enterovirus en behoort tot de familie van de *Picornaviridae*. Het is het kleinste humaan pathogene virus met een diameter van ± 30 nm. Het erfelijke materiaal bestaat uit enkelvoudig RNA, heeft geen enveloppe maar is wel omgeven door een capside dat uit vier viruseiwitten bestaat (VP1, VP2, VP3, VP4). Het poliovirus bindt aan een specifiek plasma membraan eiwit (poliovirus receptor CD155), waardoor de capside structuur verandert en het genoom in het cytoplasma vrijkomt. Het virus blijft infectieus in een zure omgeving en kan maanden bij riool- en oppervlakte water ($<4^{\circ}\text{C}$), maar ook enkele dagen bij kamertemperatuur overleven. Er zijn drie verschillende serotypen van het poliovirus, namelijk;

- Mahoney (serotype 1)
- MEF-1 (serotype 2)
- Saukett (serotype 3)

Tussen deze drie serotypen zitten kleine verschillen waardoor er na een infectie van één serotype geen bescherming zal zijn tegen de andere twee serotypen. [1, 3, 5, 6, 7, 8]

1.2 Pathogenese

Het poliovirus komt alleen bij mensen voor en wordt voornamelijk fecaal-oraal verspreid, maar kan ook via direct contact of aërosolen verspreid worden. Het virus komt dus via de mond binnen en vermenigvuldigt zich als eerste in de farynx en het maagdarmkanaal. Voordat er ziekteverschijnselen optreden kan het poliovirus via de keel en de ontlasting verspreid worden. Een week nadat de ziekteverschijnselen opgetreden zijn, zal het poliovirus niet meer in de keel aanwezig zijn, maar nog wel enkele weken in de ontlasting. Het poliovirus kan via de lymfeklieren in de bloedbaan komen om vervolgens de cellen van het centrale zenuwstelsel te infecteren. Wanneer het poliovirus zich gaat vermenigvuldigen in de motorneuronen van het ruggenmerg en de hersenstam, zal er celafbraak plaatsvinden waardoor er poliomyelitis ontstaat. [1, 3, 6, 9, 10]

1.3 Ziekteverschijnselen

Bij de meeste infecties (90-95%) treden er nauwelijks of geen symptomen op en zal het virus vanzelf weer verdwijnen. Wanneer er wel ziekteverschijnselen zijn, dan worden de symptomen in drie verschillende fases onderverdeeld, namelijk; de prodromale fase, de non- of pre-paralytische fase en de paralytische fase. [1, 3, 9]

1.3.1 Prodromale fase

De eerste symptomen van het poliovirus bestaan uit lichte hoofdpijn, koorts, keelpijn, misselijkheid, braken, diarree, rusteloosheid en moeheid. Echter zijn er geen neurologische symptomen of signalen. De klachten herstellen weer binnen drie tot vier dagen. [1, 3, 9, 11]

1.3.2 Non- of pre-paralytische fase

Bij één tot twee procent van de polio infecties ontstaat deze fase enkele dagen na de prodromale fase. Symptomen die hierbij horen zijn koorts, malaise, braken, hoofdpijn, nekstijfheid, rugpijn en pijn aan de ledematen. Patiënten kunnen binnen een week spontaan genezen, maar dit komt helaas zelden voor. De non- of pre-paralytische fase gaat in een paralytische fase over zodra het virus de motorneuronen in het centrale zenuwstelsel bereikt. [1, 3, 9]

1.3.3 Paralytische fase

De paralytische fase, ook wel verlamningsfase genoemd, komt bij minder dan één procent van alle polio infecties voor. Normaal gesproken worden de signalen van de hersenen d.m.v. motorimpulsen naar de spieren geleid waardoor er contractie ontstaat. In de paralytische fase worden deze motorimpulsen geblokkeerd, waardoor de spieren verslappen en ze niet meer kunnen samentrekken. De plaats waar het virus zich bevindt en de hoeveelheid zenuwcellen die geïnfecteerd worden, bepaald de ernst van de verlamming. De verlamming ontwikkelt zich snel en is meestal asymmetrisch. Na twee tot drie dagen heeft de verlamming zijn maximum bereikt wat enkele dagen tot weken aan blijft houden en vervolgens weer kan verminderen. [1, 3, 11]



Figuur 1: Poliopatiënt met Een kromgetrokken, dun been

Als de verlamming alleen in de spieren van de ledematen en de romp voorkomt, dan zijn er weinig complicaties. Complicaties die kunnen optreden zijn kromgetrokken ledematen of zelfs een abnormale ontwikkeling van de aangetaste ledematen (zie figuur 1). Helaas zullen er wel ernstige verschijnselen optreden zodra de hersenzenuwen aangetast worden (bulbaire poliomyelitis). Er ontstaan dan slik- en ademhalingsproblemen waardoor er vaak kunstmatige beademing noodzakelijk is. Twee tot tien procent, van de patiënten in de paralytische fase, overlijdt dan ook door deze ademhalingsverlamming. [1, 3, 6, 10, 11]

1.4 Het vaccin

In 1957 is het poliovaccin in het Rijksvaccinatieprogramma opgenomen omdat er regelmatig polio epidemieën waren en er geen behandeling mogelijk is voor poliomyelitis. Het poliovaccin wordt in combinatie gegeven met difterie, kinkhoest, tetanus en Haemophilus influenzae-B (DKTP-Hib, DKTP of DTP). In 2005 zijn de kinkhoestvaccins (DKTP-Hib en DKTP) vervangen door vaccins met een acellulaire kinkhoestcomponent (DaKTP-Hib en DaKTP). [12, 13, 14, 15]

Het DaKTP-Hib vaccin wordt bij kinderen van 2, 3, 4 en 11 maanden gegeven. Om de immuniteit tegen difterie, kinkhoest, tetanus en polio op een goed beschermend niveau te houden, krijgen kinderen na de eerste vier vaccinaties nog twee hervaccinaties. Deze hervaccinaties worden op een leeftijd van vier jaar (DaKTP) en op een leeftijd van 9 jaar (DTP) gegeven (zie figuur 1). De beschermingsduur van de vaccinaties varieert per infectieziekte. De 4 DaKTP-Hib vaccinaties geven, samen met de DaKTP en DTP, vermoedelijk een levenslange bescherming tegen polio. Bijwerkingen die na een vaccinatie kunnen optreden zijn mild en van korte duur. De meest voorkomende bijwerkingen zijn koorts, huilen, hangerigheid en lokale klachten rond de injectieplaats zoals roodheid, zwelling en pijn. [14, 15, 16]

Leeftijd	Vaccinatie
2 maanden	DaKTP-Hib
3 maanden	DaKTP-Hib
4 maanden	DaKTP-Hib
11 maanden	DaKTP-Hib
4 jaar	DaKTP
9 jaar	DTP

Tabel 1: Vaccinatieschema

1.4.1 Vero cellen

Om een vaccin te maken moet het poliovirus eerst gekweekt worden op Vero cellen. De Vero cel is een cellijn die afkomstig is van nierepitheelcellen van de volwassen aap *Cercopithecus aethiops*, ook wel de African Green Monkey genoemd. De Vero cellijn is op 27 maart 1962 op een universiteit in Japan ontwikkeld door Y. Yasumura en Y. Kawakita. [17]

Vero cellen kunnen voor verschillende doeleinden gebruikt worden bijvoorbeeld voor het screenen op toxinen van de bacterie *Escherichia coli* maar dus ook als gastheer om virussen te laten groeien voor vaccinproductie. Vero cellen worden niet alleen in de productie van het poliovaccin gebruikt, maar ook in de productie van bijvoorbeeld het influenza vaccin (o.a. H5N1) en het hondsdoelheid vaccin. [18, 19]

Vero cellen zijn niet getransformeerd waardoor ze niet hun contact inhibitie verloren zijn. Het is zeer belangrijk om een subcultuur van de Vero cellen te maken als ze samensmeltende monolayers vormen. Zodra de Vero cellen samensmelten zullen de cellen stoppen met delen waardoor ze dood gaan. Een Vero cultuur verdubbelt elke 24 uur en moet twee tot drie keer in de week gesplitst worden in een subcultuur. [20]

1.4.2 De productie

Zoals eerder vermeld, zal er na een infectie met één serotype geen bescherming zijn tegen de andere twee serotypen. Het poliovaccin bestaat daarom ook uit alle drie de serotypen (Mahoney, MEF-1 en Saukett).

De totale cel- en virusweek duurt 18 dagen en bestaat uit drie passages. De Vero cellen worden eerst op microcarriers gekweekt en zullen vervolgens (derde passage) geïnfecteerd worden met het poliovirus. Na de cel- en virusweek worden de cel restanten verwijderd en blijft er een ruwe virusoogst over. Deze virusoogst wordt gezuiverd d.m.v. gelfiltratie en ionenwisseling. Hierna wordt het poliovirus geïnactiveerd door toevoeging van formaldehyde gedurende een incubatietijd (inactiveringsperiode) van 13 dagen. [14, 15, 16, 21, 22, 23]

1.4.3 Rest-DNA

In een vaccin mag er maar een minimale hoeveelheid DNA van gastheer cellen (rest-DNA of host cell DNA) voorkomen. Deze eis is opgesteld omdat het rest-DNA anders voor problemen kan zorgen in de gastheer. Ten eerste is er een kans dat er latente virussen en andere pathogenen naar de gastheer overgebracht worden en ten tweede kan het cellulaire DNA in het gastheer DNA integreren. Volgens de eis van de Europese Pharmacopoeia mag er maar 100 pg host cell DNA per humane vaccindosis in het uiteindelijke poliomyelitis vaccin voorkomen. Dit host cell DNA is bij de polio vaccinproductie het DNA dat afkomstig is van de Vero cellen. [24, 25]

Er zijn verschillende testen beschikbaar voor een DNA bepaling, namelijk UV spectrofotometrie, picogreen, drempel methode, hybridisatie en een kwantitatieve PCR (qPCR). Echter is de hybridisatie test en de qPCR specifiek geschikt voor de rest-DNA bepaling van vero cellen. [26]

Methode:	Specificiteit:	Sensitiviteit:
UV Spectrofotometrie	Concentratie van de totale oplossing	-
Picogreen	Concentratie van dubbelstrengs DNA	0.5 ng
Drempel methode	Concentratie van het totale DNA	2 pg
Hybridisatie	Concentratie van een specifieke DNA of RNA sequentie	1 ng
qPCR	Concentratie van een specifieke DNA of RNA sequentie	5 fg

Tabel 2: Overzicht van verschillende methoden voor DNA bepalingen

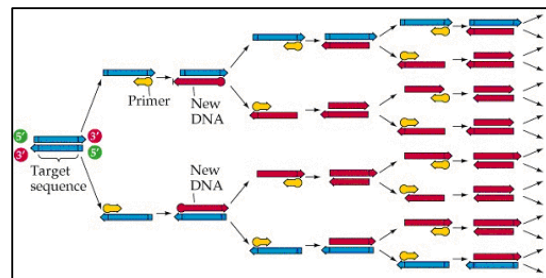
2. Polymerase chain reaction (PCR)

De polymerase chain reaction (PCR) is een methode om een specifiek DNA fragment in grote hoeveelheden te kopiëren. Voor een PCR zijn er twee oligonucleotide primers nodig die aan een specifieke DNA sequentie (enkelstrengs) kunnen binden. Deze primers worden door een enzym (polymerase) verlengd waardoor er dubbelstrengs DNA gevormd wordt. [27, 28, 29]

2.1 Real-Time PCR

Het principe van een Real-Time PCR is hetzelfde als een gewone PCR. Echter werkt het Real-Time apparaat beduidend sneller en is het makkelijker om een monster te detecteren. Bij een Real-Time PCR kan de reactie namelijk constant via de computer gevolgd worden, waardoor het PCR product niet meer geëlectroforeerd hoeft te worden. Bij een Real-Time PCR wordt er gebruik gemaakt van kleurstoffen die in de aanwezigheid van of gebonden aan DNA fluoresceren. Een fluorescentie komt direct tot stand met kleurstoffen die tussen dubbelstrengs DNA gaan zitten (SYBR Green) of indirect met fluorescerend gelabelde oligonucleotiden die aan een specifiek deel van het enkelstrengs DNA binden (probes). Fluorescerende stoffen kunnen tijdens de Real-Time PCR gemeten worden waardoor er bij productvorming een grafiek met een S-curve waarneembaar is. [27, 28, 29]

Elke PCR bestaat uit meerdere cycli. Eén cyclus bestaat uit drie fases, namelijk een denaturatie fase, een annealing fase en een extensie fase. Na elke cyclus wordt het DNA verdubbeld, waardoor er aan het eind van de run duizenden tot miljoenen dezelfde specifieke DNA fragmenten gevormd zijn (zie figuur 2). [27, 28, 29]



Figuur 2: Schematische PCR weergave (blauw= oorspronkelijke DNA streng, rood = nieuwe DNA streng)

2.1.1 Denaturatie fase

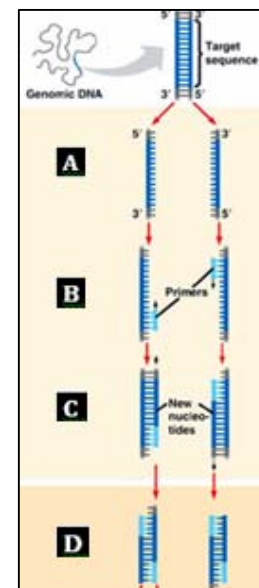
Het dubbelstrengs DNA wordt in de denaturatie fase omgezet naar enkelstrengs DNA. Bij hoge temperaturen blijven de covalente verbindingen intact, terwijl de waterstof verbindingen verbreken. In de denaturatie fase wordt de temperatuur naar 95°C verhoogd waardoor de waterstof verbindingen in het dubbelstrengs DNA verbreken en er dus enkelstrengs DNA ontstaat (zie figuur 3A). [27, 30]

2.1.2 Annealing fase

In de annealing fase zullen de primers (en de eventuele probe) aan het specifieke DNA binden (zie figuur 3B). Primers zijn kleine sequenties van 18 tot 30 nucleotiden lang. Elke primer heeft een eigen optimale annealing temperatuur waardoor de temperatuur in de annealing fase kan variëren van 40-65°C. Deze annealing temperatuur hangt af van de lengte, maar ook van de hoeveelheid G en C nucleotiden in de sequentie. [27, 30]

2.1.3 Extensie fase

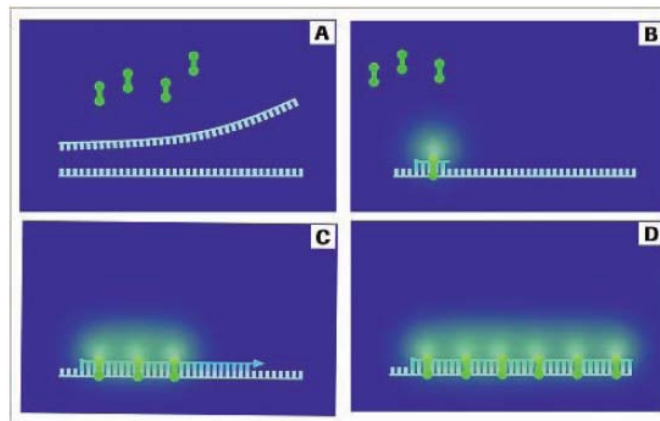
In de extensie fase wordt de temperatuur verhoogd naar 72°C waardoor het polymerase enzym nieuwe nucleotiden aan het enkelstrengs DNA synthetiseert (zie figuur 3C). Deze nucleotiden zijn identiek aan de originele complementaire DNA streng. Het polymerase enzym gebruikt nucleotiden die in de oplossing zitten (dNTP's). Het enzym begint altijd aan de 3' kant van de primer en werkt in de 5' naar 3' richting. Aan het einde van de extensie fase is er een nieuwe dubbelstrengs DNA sequentie ontstaan (zie figuur 3D). [27, 30]



Figuur 3: Denaturatie, annealing en extensie fase

2.2 SYBR Green I

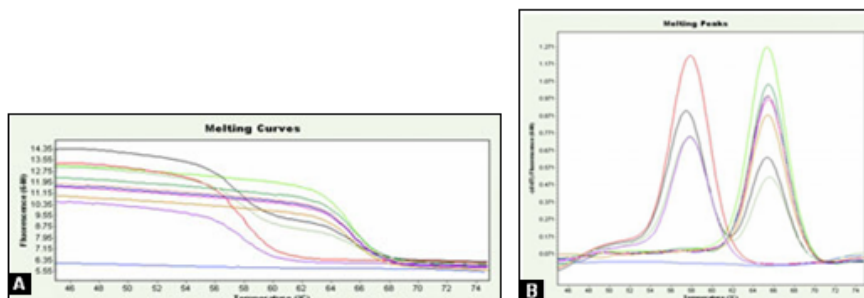
SYBR Green I is een fluorescerende stof die aan dubbelstrengs DNA bindt. Er ontstaat een fluorescentie zodra SYBR Green I tussen het dubbelstrengs DNA gaat zitten. Tijdens de verschillende fases van de PCR run, zal de intensiteit van de fluorescentie variëren. Wanneer SYBR Green I niet aan dubbelstrengs DNA kan binden, dan zal de intensiteit van de fluorescentie laag zijn. Dit zal tijdens de denaturatie fase gebeuren omdat het DNA dan enkelstrengs wordt (zie figuur 4A). Tijdens de annealing fase ontstaan er kleine stukjes dubbelstrengs DNA omdat de primers binden. Op dat moment zal de intensiteit van de fluorescentie een klein beetje toenemen (zie figuur 4B). Tijdens de extensie fase ontstaat er steeds meer dubbelstrengs DNA waardoor de intensiteit van de fluorescentie steeds meer zal toenemen (zie figuur 4C). Aan het einde van de extensie fase is al het DNA dubbelstrengs geworden en zal de intensiteit van de fluorescentie maximaal zijn (zie figuur 4D). Voor een optimaal resultaat wordt de fluorescentie na elke extensie fase bij 530 nm gemeten zodat de toename van het PCR product na elke cyclus kan worden waargenomen via de computer. Echter kan SYBR Green I geen onderscheid maken tussen de verschillende dubbelstrengs DNA producten. Hierdoor detecteert de SYBR Green I zowel het specifieke product als eventuele niet-specifieke producten en gevormde primerdimeren. [27, 31]



Figuur 4: Schematische weergave van SYBR Green 1

2.2.1 Smelt curve

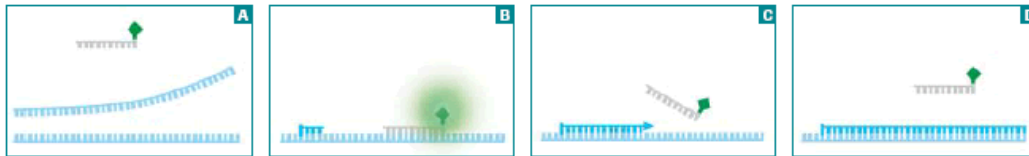
Om toch onderscheid te maken tussen de specifieke producten, de niet-specifieke producten en de primerdimeren, wordt er gebruikt gemaakt van de smelt curve analyse. De smelt curve analyse vindt aan het einde van de PCR run plaats. Tijdens deze smelt curve analyse wordt de temperatuur langzaam verhoogd naar 95°C. Hierdoor wordt het dubbelstrengs DNA weer enkelstrengs DNA. De SYBR Green I zal steeds minder aan het DNA kunnen binden waardoor de fluorescentie zal afnemen. Op het moment dat er 50% enkelstrengs DNA en 50% dubbelstrengs DNA overgebleven is, wordt de smeltemperatuur bepaald. De fluorescentie tijdens de smelt procedure wordt continue gemeten waardoor de fluorescentie afname via de computer kan worden waargenomen (zie figuur 5A). Aan het einde van de smelt curve analyse kunnen deze gegevens omgezet worden in een grafiek waarin de smelt pieken worden weergegeven (zie figuur 5B). Zodra er meerdere pieken met verschillende smelt temperaturen aanwezig zijn, dan betekent dit dat er meerdere verschillende producten gevormd zijn. [27, 32]



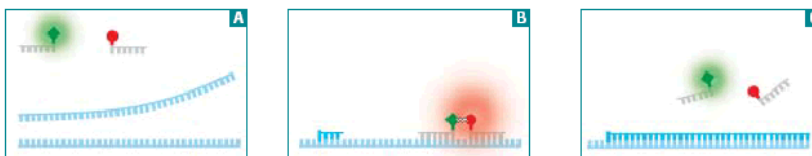
Figuur 5A-B: Smelt curve analyse

2.3 Probes

Om een specifiek PCR product te detecteren kan er gebruik gemaakt worden van een probe. Een probe is een speciaal ontworpen sequentie die op een specifiek stukje enkelstrengs DNA kan binden. Een probe bestaat uit oligonucleotiden die gelabeld zijn met een fluorochroom. Doordat probes op een specifieke sequentie binden worden er geen bijproducten zoals primerdimeren en niet-specifieke producten gedetecteerd. Het is dus niet nodig om tussen deze bijproducten onderscheid te maken d.m.v. een smeltcurve. Er zijn drie verschillende typen probes die gebruikt kunnen worden voor een real time PCR, namelijk single probes, hybridisatie probes en hydrolyse probes. Een single probe bestaat uit één sequentie en heeft één fluorochroom (zie figuur 6), terwijl een hybridisatie probe uit twee probe sequenties bestaat met allebei een eigen fluorochroom (zie figuur 7). [27, 31, 33, 34]



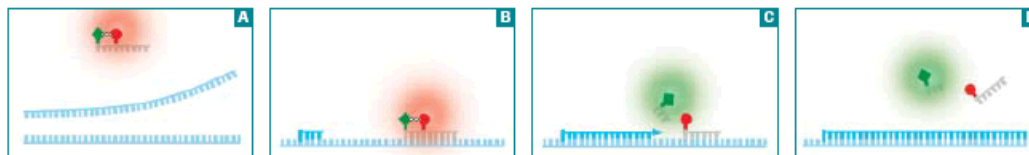
Figuur 6: Schematische weergave van een single probe



Figuur 7: Schematische weergave van een hybridisatie probe

2.3.1 Hydrolyse probe

Een hydrolyse probe, ook wel Taqman® probe genoemd, bestaat net als een single probe uit één probe sequentie. De hydrolyse probe is gelabeld met twee verschillende fluorochromen (een reporter en een quencher). Deze twee fluorochromen zitten dicht bij elkaar. De probe zal tijdens de denaturatie fase nog niet aan het DNA binden, waardoor de quencher een (rode) fluorescentie afgeeft (zie figuur 8A). Tijdens de annealing fase zal de probe aan het specifieke DNA binden. Op dit moment geeft de quencher nog steeds hetzelfde signaal af (zie figuur 8B). De probe is aan de 3' kant gefosforyleerd, waardoor de probe niet verlengd kan worden tijdens de extensie fase. Tijdens de extensie fase zal de polymerase op een gegeven moment de probe tegenkomen en de probe van het DNA breken. Zodra de reporter afgebroken wordt, ontstaat er een (groene) fluorescentie (zie figuur 8C). Aan het einde van de extensie fase is er een dubbelstrengs PCR product gevormd en zal de probe nog steeds een (groene) fluorescentie afgeven (zie figuur 8D). Dit signaal zal gedurende de PCR run in de oplossing aanwezig blijven en zal per cyclus vermeerderen. Het signaal is dus recht evenredig met de hoeveelheid van het gevormde PCR product. Voor een optimaal resultaat wordt de fluorescentie na elke extensie fase bij 530 nm gemeten zodat de toename van het PCR product na elke cyclus kan worden waargenomen via de computer. [27, 31, 33, 34]



Figuur 8A-D: Schematische weergave van een hydrolyse probe

2.4 Kwantitatieve PCR (qPCR)

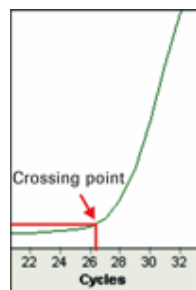
DNA monsters kunnen gekwantificeerd worden door middel van een absolute kwantificatie of een relatieve kwantificatie. Bij een absolute kwantificatie wordt de DNA hoeveelheid bepaald, terwijl er bij een relatieve kwantificatie bepaald wordt wat de verhouding tussen twee verschillende DNA hoeveelheden is. Zoals eerder vermeld, is er door de Europese Pharmacopoeia een eis gesteld dat er maar 100 pg host cell DNA per humane dosis in het uiteindelijke poliomyelitis vaccin mag voorkomen. Bij de real time PCR, om rest-DNA in het poliovaccin te kunnen aantonen, wordt er gekozen voor de absolute kwantificatie methode omdat alleen de DNA hoeveelheid van de Vero cellen in het poliovaccin aangetoond hoeft te worden. [31, 35, 36]

2.4.1 Absolute kwantificatie

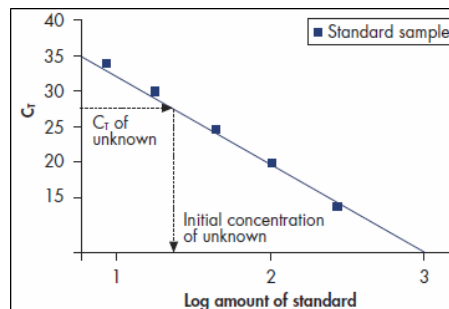
Bij een absolute kwantificatie wordt er gebruik gemaakt van een standaard curve om de concentratie van een onbekend monster te bepalen. In een standaard curve worden de concentraties van standaard monsters uitgezet tegen de crossing points van deze standaard monsters. Hierbij staan de concentraties op de X-as en de crossing points op de Y-as. [35, 36, 37]

Het moment waarop de fluorescentie boven de beginwaarden uitkomt en er een stijgende lijn ontstaat, wordt het crossing point (ook wel cycle threshold) genoemd, afgekort als Cp of Ct (zie figuur 9). Op het moment van de crossing points is het geamplificeerde product dus voor het eerst meetbaar (t.ov. de achtergrond). [35, 36, 37]

Zodra er een PCR van een monster met een onbekende concentratie afgerond is, kan de concentratie dus bepaald worden d.m.v. het crossing point en de standaard curve (zie figuur 10). [35, 36, 37]



Figuur 9: Crossing point

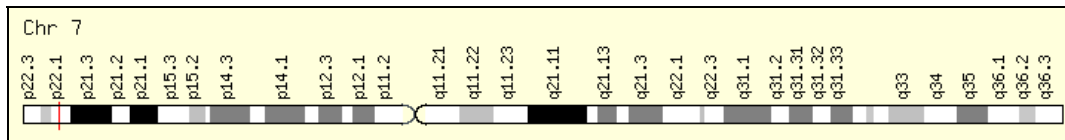


Figuur 10: Standaard curve

3. Beta-actin

Om de DNA concentratie van Vero cellen m.b.v. een Real-Time PCR te bepalen, wordt er een klein deel van een gen aangetoond. Uit de literatuur is bekend dat er al een Real-Time PCR voor Vero cellen bestaat waarbij er gebruik gemaakt wordt van het beta-actin gen. Beta-actin is een huishoudgen en komt in alle cellen van een organisme voor. Het is dus makkelijk om een huishoudgen aan te tonen omdat het in grote hoeveelheden in het DNA aanwezig is. Om deze twee redenen is er gekozen om bij dit onderzoek ook gebruik te maken van het beta-actin gen.

Het beta-actin gen, ook wel ACTB gen genoemd, bevindt zich op chromosoom 7 locatie 22.1 (zie figuur 11). Bij de mens (*Homo sapiens*) bestaat het beta-actin gen uit 1852 baseparen en bij de *Cercopithecus aethiops* aap uit 1138 baseparen. Het target DNA dat tijdens dit onderzoek aangetoond wordt, bestaat uit 107 baseparen (zie figuur 12). [38, 39, 40]



Figuur 11: Chromosoom 7

<u>caccatgtaccctggcatt</u>gctgacaggatgcagaaggagattactgcctggcgcccagcacgatgaaaatcaagatcattgctcctc<u>ctgagcgcaagtactctg</u> Forward primer Reverse primer

Figuur 12: Target DNA (107bp)

4. Materiaal en methode

Om een nieuwe kwantitatieve PCR op te zetten wordt er gebruik gemaakt van verschillende technieken. Een PCR kan niet uitgevoerd worden zonder dat er DNA geïsoleerd wordt. De eerste stap is dan ook een DNA isolatie. Na deze DNA isolatie, kan er een Real-Time PCR uitgevoerd worden. Om zeker te zijn dat het goede product ontstaat (juiste aantal baseparen), worden de PCR producten gescheiden op grootte m.b.v. een gel-electroforese en beoordeeld.

4.1 DNA isolatie

Om een Real-Time PCR te kunnen uitvoeren moeten de monsters uit zuiver DNA bestaan. Zuiver DNA wordt verkregen d.m.v. een DNA isolatie. Dit kan met de hand gedaan worden d.m.v. kolommen of geautomatiseerd m.b.v. bijvoorbeeld apparatuur als de Roche MagnaPure.

Tijdens het opzetten van een kwantitatieve PCR voor Vero cellen, wordt er eerst gebruik gemaakt van een DNA isolatie d.m.v. kolommen (zie bijlage I). Zodra de Real-Time PCR optimaal werkt worden de Vero cellen automatisch geïsoleerd met de Magna Pure Compact (zie bijlage II). In figuur 13 is te zien hoe de Magna Pure er uitziet. Deze methode bespaart veel tijd en geeft waarschijnlijk zuiverder DNA omdat er minder kans is op kruiscontaminatie. De twee isolatie methoden - handmatig en geautomatiseerd - zullen met elkaar vergeleken worden.



Figuur 13: MagNa Pure Compact

4.2 Real-Time PCR

Er wordt gebruik gemaakt van een Real-Time PCR systeem op basis van capillairen, namelijk de LightCycler Carousel-based System (zie figuur 14). Als eerste wordt er gewerkt met SYBR Green I (zie bijlage III). Er wordt gekeken of de primers binden en of er het juiste product ontstaat. Als dit het geval is dan wordt het PCR programma zo aangepast totdat er een optimale PCR bereikt is.

Zodra er een optimale PCR bereikt is, zal de Real-Time PCR specifiek gemaakt worden d.m.v. een hydrolyse probe (zie bijlage IV). Er wordt weer opnieuw gekeken of de probe bindt en of het juiste product aangetoond wordt. Tevens zullen er experimenten gedaan worden bij welke concentraties er de beste resultaten verkregen worden en welke verdere optimalisaties er nog nodig zijn.



Figuur 14: LightCycler Carousel-based System

4.3 Gel-electroforese

Naast de Real-Time PCR wordt er als controle ook steeds een gel-electroforese uitgevoerd (zie bijlage V). Hierbij wordt er gekeken of het juiste product met de juiste grootte wel geamplificeerd is.

4.4 Spectrofotometrische analyse

Op het moment dat de Real-Time PCR specifiek genoeg is, worden er experimenten uitgevoerd met een DNA standaardlijn uit Vero cellen. In deze standaardlijn zal ook de maximaal toegestane Vero DNA concentratie (van het uiteindelijke vaccin) passen. De concentraties van deze standaardlijn worden gemeten met een spectrofotometer (zie bijlage VI). Dit is een apparaat dat m.b.v. ethidiumbromide de concentratie van dubbelstrengs nucleïnezuur (zowel DNA als RNA) kan bepalen.

5. Resultaten

In eerste instantie was het de bedoeling dat er met de LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit gewerkt zou worden. Deze kit is speciaal ontworpen voor het opzetten van een kwantitatieve PCR. Na een aantal experimenten waren er nog steeds geen resultaten, waardoor er gekeken werd of er met de LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I kit wel een resultaat was. Omdat deze kit wel werkte, werd er voor gekozen om tijdens het verdere onderzoek met deze kit te werken.

Tijdens het bepalen van de optimale annealing temperatuur werden er, naast het target DNA, continu bijproducten van 200-250 bp gevormd. Deze bijproducten waren ook na het optimaliseren van de Real-Time PCR nog steeds aanwezig. Er werd een literatuuronderzoek gedaan en hieruit bleek dat de gebruikte primers aan het beta-actin gen van de *Pan troglodytes* (de chimpanzee) aap binden, terwijl de Vero cellen afkomstig zijn van de *Cercopithecus aethiops* aap. Het beta-actin gen van de *Pan troglodytes* is niet identiek aan het beta-actin gen van de *Cercopithecus aethiops* waardoor de primers niet volledig aan het beta-actin gen konden binden. Tevens was er een mogelijkheid dat de primers wel aan een ander gen konden binden waardoor er dus een bijproduct ontstond. Er werden nieuwe primers ontworpen die aan het beta-actin gen van de *Cercopithecus aethiops* konden binden. In figuur 16 worden de primers en het target DNA van de verschillende aapsoorten weergegeven.

Pan troglodytes: 108 baseparen

caccatgtaccctggcattgccgacaggatgcagaaggagatcactgccttggcaccagcacaatgaagatcattgctctctcctgagcgcaagtactcgt
Forward primer Reverse primer

Cercopithecus aethiops: 107 baseparen

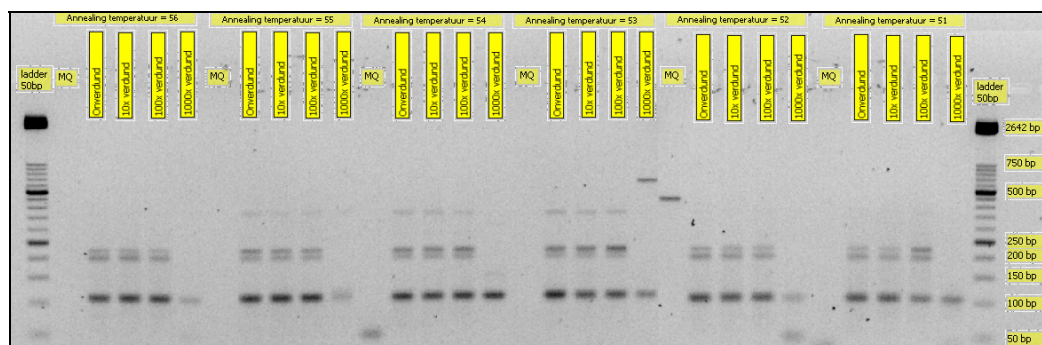
caccatgtaccctggcattgctgacaggatgcagaaggagattactgccttggcgccagcacgatgaaatcaagatcattgctctctcctgagcgcaagtactcgt
Forward primer Reverse primer

Figuur 16: Amplificatie producten van de verschillende aapsoorten

5.1 PCR optimalisatie SYBR Green I

Volgens de primerberekening ($T_m = 2^\circ\text{C} (A+T) + 4^\circ\text{C} (G+C)$) zou de annealing temperatuur 51°C moeten zijn, terwijl de leverancier suggereert dat de PCR annealing temperatuur tussen de 59°C en 63°C zal zitten.

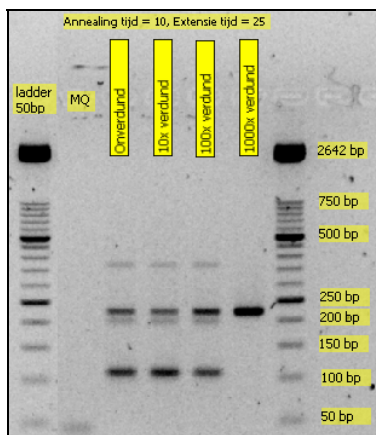
Er werd ervoor gekozen om eerst te experimenteren met lage annealing temperaturen. In figuur 17 worden de resultaten van deze experimenten weergegeven. Hierin is te zien dat er bij alle annealing temperaturen producten van 107 bp gevormd werden, maar ook PCR producten van 200-250 bp. Bij sommige annealing temperaturen werden er zelfs PCR producten van 350-400 bp en 550-600 bp gevormd.



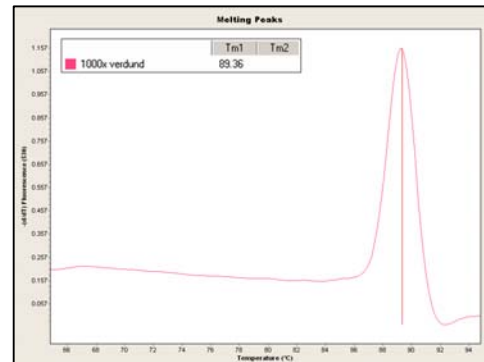
Figuur 17: Gel-electroforese van PCR producten met verschillende annealing temperaturen

Na literatuur onderzoek bleek dat de primers ook voor een deel aan andere genen van de *Cercopithecus aethiops* kunnen binden. De PCR producten die dan gevormd worden bestaan uit 365 en 582 bp. Zodra de primers a-specifiek binden dan worden er bijproducten gevormd wat betekent dat de annealing temperatuur te laag is. Om de bijproducten kwijt te raken werd er geëxperimenteerd met hogere annealing temperaturen, maar ook met langere annealing- en extensie tijden.

In figuur 18 wordt de gel-electroforese van PCR producten met een annealing temperatuur van 63°C weergegeven. Een annealing temperatuur van 63°C was te hoog omdat er bij een 1.000x verdunning geen producten van 107 bp meer gevormd werden en omdat er meer bijproducten van 200-250 bp gevormd waren. Tijdens de Real-Time PCR werden er continue twee smeltpieken ($\pm 84^\circ\text{C}$ en $\pm 89^\circ\text{C}$) weergegeven wat betekent dat er meerder DNA producten gevormd zijn. Omdat er bij de 1.000x verdunning een product van 200-250 bp gevormd werd met een smeltpiek van $\pm 89^\circ\text{C}$ (zie figuur 19), kon er geconcludeerd worden dat het target DNA (107 bp) een smeltpiek van $\pm 84^\circ\text{C}$ heeft.

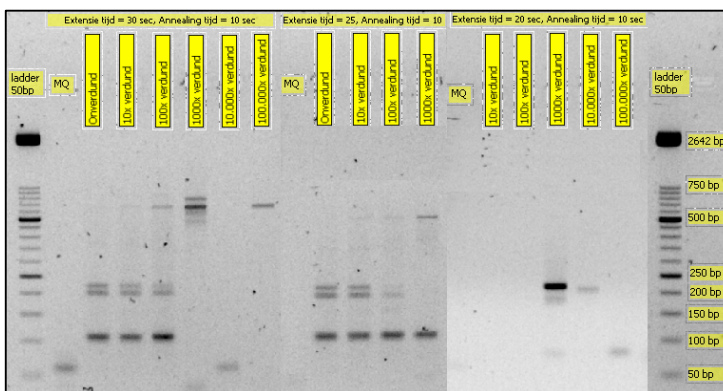


Figuur 18: Gel-electroforese van PCR producten met een annealing temperatuur van 63°C

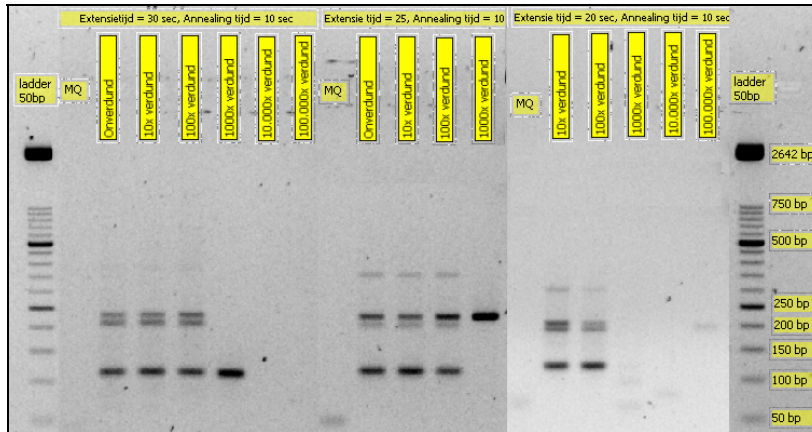


Figuur 19: Smeltpiek van de 1.000x verdunning

De resultaten van de PCR producten met een annealing temperatuur van 58°C en 60°C waren identiek, waarna er geëxperimenteerd werd met verschillende extensie tijden (zie figuur 20 en 21). In figuur 20 is te zien dat een extensie tijd van 25 seconde het beste was. Bij elke verdunning werden er producten van 107 bp gevormd en werden de bijproducten (200-250 bp) minder naar mate de verdunning hoger werd. In figuur 21 is te zien dat een extensie tijd van 30 seconde het beste was. Echter werden er bij deze extensie tijd geen producten van 107 bp gevormd bij een 10.000x en 100.000x verdunning en verminderden de bijproducten niet wanneer de verdunning hoger werd.



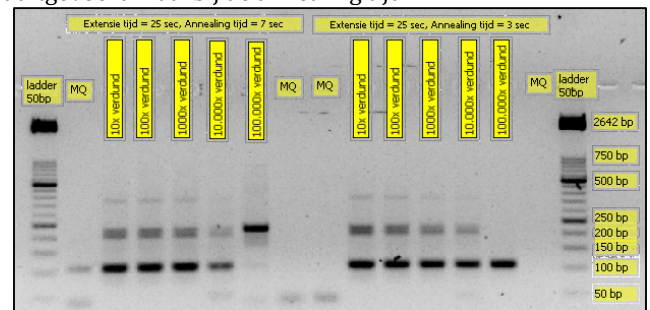
Figuur 20: Gel-electroforese van PCR producten met een annealing temperatuur van 58°C



Figuur 21: Gel-electroforese van PCR producten met een annealing temperatuur van 60°C

Omdat de PCR producten met een annealing temperatuur van 58°C en een extensie tijd van 25 seconden er het beste uitzagen, werd er een experiment uitgevoerd waarbij de annealing tijd verlaagd werd naar 7 en 3 seconden (zie figuur 22).

Bij een annealing tijd van 3 seconden werd er bij elke verdunning een product van 107 bp gevormd terwijl dit niet het geval was bij een annealing tijd van 7 seconden waardoor de optimale annealing tijd 3 seconden is. Het optimale PCR programma voor Vero cellen bestaat dus uit een annealing temperatuur van 58°C, een annealing tijd van 3 seconden en een extensie tijd van 25 seconden. Echter worden er nog wel bijproducten van 200-250 bp gevormd.

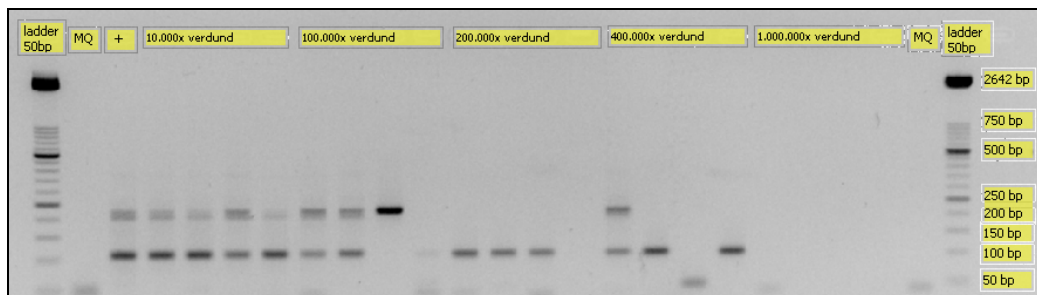


Figuur 22: Gel-electroforese van PCR producten met een annealing temperatuur van 58°C

5.1.1 Detectielimiet

Om te testen hoe gevoelig de Real-Time PCR is, werd er een experiment uitgevoerd om de detectielimiet te bepalen. Hierbij werden verschillende verdunningen vier keer getest (zie figuur 23). Bij de 100.000x, 200.000x en 400.000x verdunningen zijn er drie van de vier monsters positief en bij de 1.000.000x verdunning zijn ze alle vier negatief. Het detectielimiet zit dus tussen de 400.000x verdunning en de 1.000.000x verdunning.

Zoals eerder vermeld mag er in het uiteindelijke vaccin maximaal 100 pg Vero cel DNA per ml voorkomen. Zodra de qPCR gebruikt zal worden om vaccins op rest-DNA te controleren, dan wordt er niet op het uiteindelijke vaccin maar op een 10x geconcentreerde trivalente bulk getest. In deze trivalente bulk mag dan maximaal 1.000 pg/ml rest-DNA aanwezig zijn dat overeenkomt met een 40.000x verdunning. Deze verdunning valt ruim binnen de detectielimiet waardoor het minder van belang is om de exacte detectielimiet te bepalen.



Figuur 23: Detectielimiet bepaling

5.1.2 Bijproducten

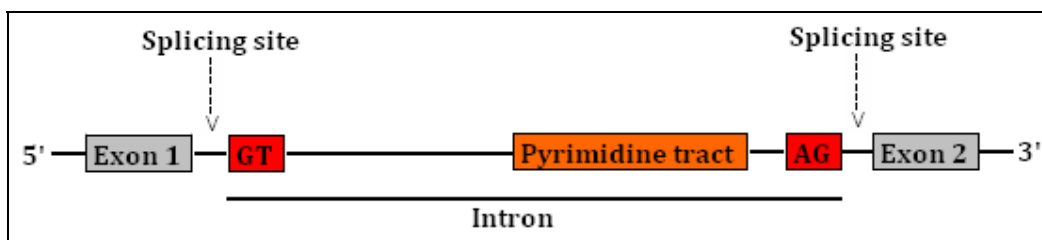
Tijdens de Real-Time PCR werden er telkens bijproducten van 200-250 bp gevormd. Er werd geprobeerd om deze bijproducten kwijt te raken door het uitvoeren van een nieuwe DNA isolatie maar ook door een Real-Time PCR uit te voeren met een extra extensie stap. Er werden nog steeds bijproducten gevormd waardoor er vervolgens met uracil-DNA glycosylase getest werd of er sprake was van een contaminatie. Na toevoeging van uracil-DNA glycosylase werden er nog steeds bijproducten gevormd. Deze bijproducten werden gesequenced zodat achterhaald kon worden waar dit product vandaan kwam. Het bijproduct bestaat uit 223 bp en komt voor een groot deel met het voorste en het achterste deel van het target DNA overeen (zie figuur 24). In BLAST was het middelste deel (blauwe gemarkeerd) niet bekend waardoor er gedacht werd dat er meerdere onbekende Vero celtypen in de celkweek aanwezig waren. Er werd getest of deze bijproducten ook in andere Vero celkweeken aanwezig waren en dat was het geval. Er kon dus nog geen conclusie getrokken worden of er meerdere Vero cel typen aanwezig waren maar na veel literatuuronderzoek bleek dat het middelste deel een intron was.

Bijproduct	1	CACCATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATTACTGCCCTGGCGCCCAGCAGCATGAAAATCAAGCTGGGTCTC	
Target DNA	1	CACCATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATTACTGCCCTGGCGCCCAGCAGCATGAAAATCAAG.....	
Bijproduct		CTTCCACCCTGAGCTGACCTGGGCAGGTGGGCGGTGGTGCCTGTGGTGTGTGGGGAGCTGTCACATCCGGGGTTCTCACTGCCTG	
Target DNA			
Bijproduct		TTTGTTCCTTCCTCCTCAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCAG	223
Target DNA		ATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCTG	107

Figuur 24: Overeenkomsten tussen het bijproduct en het target DNA

Een intron is een niet coderende DNA sequentie in een onderbroken gen. Zodra een cel zich gaat delen dan wordt het genoom overgeschreven naar pre-mRNA waarin zowel intronen als exonen aanwezig zijn. Door middel van een splicing proces worden intronen door speciale eiwitten uit het pre-mRNA geknipt waardoor er mRNA ontstaat. De speciale eiwitten herkennen een intron door speciale codes (splicing sites) waar een intron mee begint en eindigt. Een intron begint vrijwel altijd met GT, heeft een pyrimidine tract en eindigt met AG (zie figuur 25).

Er is dus een Vero cel geweest die tijdens de celdeling gefaald heeft waardoor er een intron niet uit het pre-mRNA gespliced werd. Hierdoor is er een intron in het mRNA en uiteindelijk in het DNA gekomen. Het gevonden bijproduct bestaat dus uit het target DNA met een intron ertussen. Om een goed resultaat te krijgen is het belangrijk om allebei de producten aan te tonen (zowel het bijproduct als het target DNA). Wanneer dit niet gebeurt ontstaat er een fout-negatief resultaat omdat niet alle Vero cellen dan aangetoond worden.



Figuur 25: Schematische weergave van een intron

5.2 PCR optimalisatie hydrolyse probe

Om de PCR specifiek te maken werd er gebruik gemaakt van een hydrolyse probe nummer 37. Deze probe bindt zowel aan het normale target DNA als aan het target DNA dat een intron bevat (zie figuur 26).

Target DNA met intron	1	CACCATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATTAC TGCCCTGG CGCCCAGCACGATGAAATCAAGTGGGTGTC	
Target DNA	1	CACCATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATTAC TGCCCTGG CGCCCAGCACGATGAAATCAAG.....	
Target DNA met intron		CTTCCACCCTGAGCTGACCTGGGCAGGTGGGCCGTGGTCCCTGTGGTGTGTGGGGAGCTGCACATCCGGGGTCTCACTGCCTG	
Target DNA			
Target DNA met intron		TTTGTTCCTTCCCTCCTCAGATCATTTGCTCTCTGAGCGCAAGTACTCAG	223
Target DNA		ATCATTGCTCTCTGAGCGCAAGTACTCTG	107

Figuur 26: Bindingsplaats van de hydrolyse probe nummer 37 (blauwe gemarkeerd)

De handleidingen van de probe en de Taqman master kit kwamen niet met elkaar overeen. Er werden verschillende PCR programma's en verschillende primer en probe hoeveelheden geadviseerd. Daarom werd er een aantal experimenten uitgevoerd waarbij de protocollen van beide handleidingen gevolgd werden, maar ook waarbij de protocollen door elkaar gebruikt werden. De resultaten van deze experimenten worden weergegeven in tabel 2.

Eerst werd er geëxperimenteerd met het geoptimaliseerde PCR programma van SYBR Green (PCR programma 1*) met primer hoeveelheden van 2µl en verschillende probe hoeveelheden (0.4-2µl). De PCR resultaten gaven niet zo'n heel hoog signaal waardoor de primer concentratie verhoogd werd naar 20µM. Echter gaf dit hetzelfde resultaat. Er werd geëxperimenteerd of er met het geadviseerde PCR programma van de probe handleiding (PCR programma 2**) een hoger signaal was. Hierbij werden er opnieuw primer hoeveelheden van 2µl en verschillende probe hoeveelheden (0.4-0.8µl) gebruikt. Dit keer was er een hoger signaal en werden de crossing points per verdunning (op de 100.000x verdunning na) telkens met drie cycles verhoogd. Vervolgens werd er geëxperimenteerd met de geadviseerde primer en probe hoeveelheden (0.4µl) van de probe beschrijving. Deze hoeveelheden werden zowel op PCR programma 1 als op PCR programma 2 getest. Hieruit bleek dat als PCR programma 2 gebruikt werd, dat de crossing points dan het laagste waren. Tevens was er met PCR programma 2 een hoger signaal. Als laatste werd er getest of de PCR producten eerder opkwamen als er dubbele primer en probe hoeveelheden (0.8µl) gebruikt werden. Deze crossing points waren hoger wat betekent dat de PCR producten later opkwamen. Het optimale PCR programma voor probe nummer 37 bestaat dus uit PCR programma 2 met primer en probe hoeveelheden van 0.4µl. Ook wordt er in de annealing fase het aantal cycli verhoogd naar 55 cycli zodat de crossing points boven de 40 cycli voortaan ook als cijfer weergegeven worden.

																Negatief		
																Lage score		
PCR programma		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2
Primer concentratie (µM)		10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	20	10	10	10	20	20	20
Probe concentratie (µM)		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Forward primer (µl)		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4	0.4	0.8
Reverse primer (µl)		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4	0.4	0.8
Probe (µl)		0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.6	2	0.6	0.8	1	1.2	0.4	0.6	0.8	0.4	0.4	0.8
Crossing point	Negatieve controle											>40.00		>40.00	>40.00			
	100x verdund	28.60	29.01	29.72	29.68	30.31	31.90	33.99	28.76	29.02	29.08	29.90	27.94	28.52	29.95	31.01	28.73	30.34
	1.000x verdund	31.80	31.62	32.71	32.87	33.79	35.38	37.85	31.64	31.94	32.74	33.36	30.56	31.27	32.84	33.84	31.34	33.98
	10.000x verdund	33.94	34.53	35.45	35.55	36.66	>40.00	>40.00	34.60	35.22	36.39	37.50	33.10	34.71	35.06	37.13	34.17	36.86
	100.000x verdund	37.31	38.40	37.37	39.37		>40.00	>40.00	36.98	37.37	>40.00	39.76		35.00	>40.00	>40.00	38.39	>40.00
	Negatieve controle						N.v.t.	N.v.t.							>40.00			37.32

Tabel 2: Resultaten probe optimalisatie

* PCR programma 1: Annealing temperatuur = 58°C, Annealing tijd = 3 sec, Extensie tijd = 25 sec

**PCR programma 2: Annealing temperatuur = 60°C, Annealing tijd = 30 sec, Extensie tijd = 1 sec

5.2.1 Detectielimiet

Bij de hydrolyse probe werd er ook naar de gevoeligheid van de Real-Time PCR gekeken. Opnieuw werden verschillende verdunningen vier keer getest (zie tabel 3). Hierin is te zien dat de crossing points van de 10.000x verdunning alle vier bij elkaar liggen. Bij de 100.000x verdunning liggen drie crossing points dicht bij elkaar. De crossing points van de 200.000x verdunning liggen erg ver uit elkaar wat betekent dat de PCR hier al minder nauwkeurig is. Bij de 400.000x en de 1.000.000x verdunning zijn er drie van de vier monsters negatief. De detectielimiet ligt dus tussen de 100.000x en de 200.000x verdunning. Omgerekend ligt de detectielimiet tussen de 460 en 230 pg/ml. Dit is dus ruim voldoende om 1.000 pg/ml rest-DNA aan te kunnen tonen.

Negatief					
Lage score					
Verdunning	10.000x	100.000x	200.000x	400.000x	1.000.000x
Crossing	33.29	38.23	47.87		
points	33.51	37.96	39.91		45.22
	33.54	37.58	[-50.00]		
	34.31	45.92		43.16	

Tabel 3: Resultaten detectielimiet bepaling

5.2.2 Standaard lijn

Op het moment dat er gebruik gemaakt wordt van een kwantitatieve PCR, is er een standaard lijn nodig. Aan de hand van deze standaardlijn kan dan de concentratie van een monster bepaald worden. Een standaardlijn bestaat uit vijf of zes verschillende concentraties.

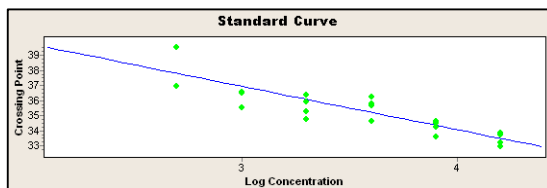
Er werden verschillende experimenten gedaan om te achterhalen wat de beste standaardlijn voor deze test zou zijn. Zoals eerder vermeld zit de detectielimiet tussen de 230 en 460 pg/ml waardoor ervoor gekozen werd om de laagste concentratie van de standaardlijn op 200 pg/ml te zetten. Er werd een standaardlijn ontworpen waarbij er telkens met stappen van 200 pg/ml gewerkt werd (zie tabel 4, experiment 1). In de resultaten is te zien dat de crossingpoints erg dicht bij elkaar liggen en de berekende concentraties niet overeenkomen met de exacte concentraties. Bovendien kon er een goede standaard curve gemaakt worden waardoor er standaardlijnen met grotere stappen getest werden (zie tabel 4, experiment 2 en 3). Bij deze experimenten was er weer hetzelfde probleem alleen kon er van experiment 3 wel een goede standaard curve gemaakt worden. Echter kwamen de berekende concentraties weer niet overeen met de exacte concentraties.

Volgens de literatuur zou er een verschil moeten zijn van één cyclus wanneer er met een tweevoudige verdunning gewerkt wordt. Wanneer de crossing points van de standaardlijn telkens één cyclus verschilt, dan zou er een goede standaard curve gemaakt kunnen worden. Er werd dus een experiment uitgevoerd waarbij er een standaardlijn gebruikt werd die uit een tweevoudige verdunning bestond (zie tabel 4, experiment 4). Van deze standaardlijn kon een redelijke standaard curve gemaakt worden (zie figuur 27), maar er was per concentratie wel een grote spreiding. Bovendien waren de crossing points van de 2.000 en 4.000 pg/ml exact hetzelfde wat eigenlijk niet zou mogen. Experiment vier werd overgedaan om te kijken of de 2.000 en 4.000 pg/ml dan wel verschillend waren, maar dat was niet het geval (zie tabel 4, experiment 5).

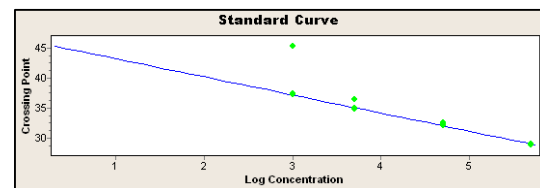
Wanneer er gebruik gemaakt wordt van een tienvoudige verdunning, dan zullen de crossing points telkens 3.3 cycli verschillen. Er werd een standaardlijn ontworpen waarbij er gebruik gemaakt werd van een tienvoudige verdunning (zie tabel 4, experiment 6). Omdat er maximaal 1.000 pg/ml Vero DNA in de monovalente bulk aanwezig mag zijn, werd deze concentratie ook aan de standaardlijn toegevoegd. In de resultaten van experiment 6 is te zien dat er een duidelijk verschil in de crossing points is en de berekende concentraties redelijk met de exacte concentraties overeenkomen. Ook kon er van deze standaardlijn een goede standaard curve gemaakt worden waarbij de crossing points per concentratie erg dicht bij elkaar lagen (zie figuur 28).

Experiment	Concentratie (pg/ml)	200	400	600	800	1.000	1.200
1	Mean Crossing point	[43.46]	38.92	36.75	36.12	37.73	37.15
	Mean Concentratie (pg/ml)	134	392	419	654	238	332
2	Concentratie (pg/ml)	500	750	1.000	1.250	1.500	
	Mean Crossing point	41.16	36.99	[43.37]	36.5	41.89	
	Mean Concentratie (pg/ml)	520	940	[490]	963	381	
3	Concentratie (pg/ml)	400	700	1.000	1.300	1.600	
	Mean Crossing point	44.47	39.29	35.8	36.54	36.43	
	Mean Concentratie (pg/ml)	463	1100	1340	1200	1220	
4	Concentratie (pg/ml)	500	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000
	Mean Crossing point	38.25	36.21	35.57	35.57	34.23	33.42
	Mean Concentratie (pg/ml)	562	1950	3370	3380	9330	17600
5	Concentratie (pg/ml)	500	1.000	2.000	4.000	8.000	
	Mean Crossing point	44.57	[36.77]	36.36	36.39	34.92	
	Mean Concentratie (pg/ml)	0.692	1290	2570	2510	11200	
6	Concentratie (pg/ml)	500	1.000	5.000	50.000	500.000	
	Mean Crossing point	[44.60]	37.37	35.32	32.32	28.94	
	Mean Concentratie (pg/ml)	122	893	4720	41800	542000	

Tabel 4: Resultaten standaardlijn



Figuur 27: Standaard curve experiment 4, tabel 4



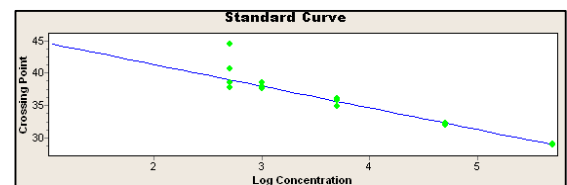
Figuur 28: Standaard curve experiment 6, tabel 4

5.2.3 Vaccins

Bij de polio productie worden er in verschillende fases monster fracties afgenomen om te kijken of het Vero DNA door de zuiveringsstappen afneemt. Deze monsters worden na de gelfiltratie (fractie 3.1), na de ionenwisseling (fractie 4.1) en uit de monovalente bulk (fractie 6.1) afgenomen. In fractie 3.1 zou dus nog veel Vero DNA aanwezig moeten zijn, in fractie 4.1 al een stuk minder en in fractie 6.1 zou minder dan 1.000 pg/ml aanwezig moeten zijn. Er werd een experiment uitgevoerd om te testen of dit met de Real-Time PCR aan te tonen is. De standaard curve van dit experiment wordt weergegeven in figuur 29 en in tabel 5 worden de resultaten van de standaardlijn en de monsters weergegeven. Hierin is te zien dat fractie 3.1 nog veel Vero DNA bevat, terwijl de monsters van fractie 4.1 en 6.1 niet eens opkomen en dus minder dan 500 pg/ml Vero DNA bevatten.

Standaardlijn (pg/ml)	Mean crossing point	Mean concentratie (pg/ml)
500	40.34	514
1.000	37.95	1.050
5.000	35.67	5.140
50.000	32.07	57.600
500.000	28.98	480.000
Monster	Mean crossing point	Mean concentratie (pg/ml)
Fractie 3.1	33.75	18.300
Fractie 4.1	x	x
Fractie 6.1	x	x

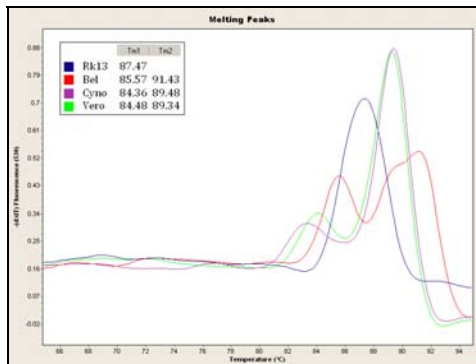
Tabel 5: Resultaten Real-Time PCR van drie vaccin fracties



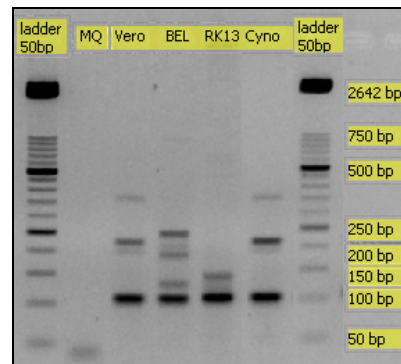
Figuur 29: Standaard curve

5.3 Specificiteit

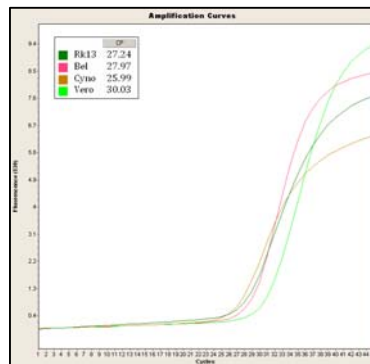
Om de specificiteit van de Real-Time PCR te testen werd er geëxperimenteerd met andere cellijnen. Voor dit experiment werden er drie verschillende cellijnen gebruikt, namelijk Rabbit Kidney 13 (RK13 = konijn), Bovine Embryonic Lung (BEL = rund) en Cynomolgus (Cyno = aap) cellen. In figuur 30 en 31 worden de SYBR Green resultaten weergegeven waarin te zien is dat alle drie de cellijnen met de primers reageren. De RK13 en BEL cellen hebben allebei andere smeltpieken dan de Vero cellen, terwijl de Cyno cellen dezelfde smeltpieken als de Vero cellen heeft. Vero en Cyno cellen zijn beide afkomstig van de aap waardoor het beta-actin gen hoogstwaarschijnlijk overeenkomt en ze dus dezelfde smeltpieken hebben. In figuur 32 worden de PCR resultaten weergegeven waarbij de specifieke probe gebruikt wordt. Ook nu waren alle cellijnen positief wat betekent dat de probe ook aan alle cellijnen kan binden. Dit is geen nadeel voor de test omdat er bij de productie van het poliovaccin uitsluitend gebruik gemaakt wordt van Vero cellen. Deze werkplekken worden dus niet grondig schoongemaakt om vervolgens voor een andere cellijn te gebruiken.



Figuur 30: Smeltpieken SYBR Green



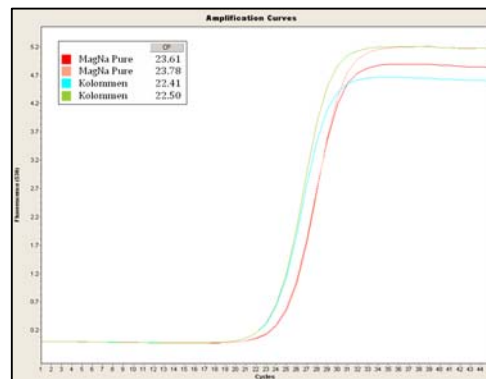
Figuur 31: Gel-electroforese van PCR producten van de verschillende cellijnen



Figuur 32: PCR resultaten probe 37

5.4 DNA isolatie

Nadat de Real-Time PCR optimaal werkte werd er geëxperimenteerd met twee verschillende isolatie methoden, met de hand (kolommen) of geautomatiseerd (MagNa Pure). Van een bepaalde hoeveelheid cellen werd een DNA isolatie gedaan met zowel de MagNa Pure als met de kolommen. De eluaten van deze DNA isolatie werden getest met de Real-Time PCR (zie figuur 33). In bijlage I en II is te zien dat het eluaat bij allebei de isolaties uit 200µl bestaat. Bij de kolommen wordt er 200µl Vero cellen toegevoegd, terwijl er bij de MagNa Pure 100µl toegevoegd wordt. Dit betekent dat er dubbel zoveel DNA in het eluaat van de kolommen zit. Het eluaat van de MagNa Pure zou dus in principe een twee maal verdunning (factor twee) moeten zijn van het eluaat van de kolommen. Zoals eerder vermeld zou er tijdens een Real-Time PCR een verschil van één cyclus moeten zijn wanneer er met een factor twee verdunning gewerkt wordt omdat er theoretisch na iedere cyclus een verdubbeling van het DNA plaatsvindt. In figuur 30 is te zien dat er tussen de kolommen en de MagNa Pure één cyclus zit wat betekent dat in beide eluaten evenveel DNA zit. Het maakt voor de DNA hoeveelheid dus niet uit welke DNA isolatie er gebruikt wordt. Echter wordt ervoor gekozen om voortaan gebruik te maken van de MagNa Pure omdat deze sneller, handiger en betrouwbaarder werkt.



Figuur 33: PCR resultaten van verschillende isolatie methoden

6. Conclusie en discussie

Om de Real-Time PCR te optimaliseren werden er 107 verschillende experimenten uitgevoerd om de beste annealing temperatuur en annealing- en extensie tijden te bepalen. Het optimale PCR programma voor SYBR Green bestaat uit een annealing temperatuur van 58°C, een annealing tijd van 3 seconden en een extensie tijd van 25 seconden. In de PCR worden er telkens twee verschillende producten gevormd dat uit 107 bp (target DNA) en 200-250 bp (bijproduct) bestaan. Het target DNA heeft een smeltpiek van $\pm 84^{\circ}\text{C}$ en het bijproduct heeft een smeltpiek van $\pm 89^{\circ}\text{C}$.

Uit de detectielimiet bepaling blijkt dat de detectiegrens van SYBR Green omgerekend tussen de 46 en 115 pg/ml zit. Wanneer de eindproducten getest worden op rest-DNA, dan mag er maximaal 100 pg/ml Vero DNA in het poliovaccin voorkomen. De rest-DNA bepaling wordt getest op een 10x geconcentreerde trivalente bulk waar maximaal 1.000 pg/ml Vero DNA in mag voorkomen. De exacte detectielimiet is dus niet bepaald omdat de 1.000 pg/ml eis ruim binnen de detectielimiet valt. Wanneer het toch van belang is om te weten wat de exacte detectielimiet is, dan wordt aanbevolen om de stappen tussen de 115 en 46 pg/ml steeds kleiner te maken totdat de exacte detectiegrens bereikt is.

Na veel onderzoek bleek dat het extra product van 200-250 bp veroorzaakt wordt door een intron. In de Vero cel suspensie zitten dus Vero cellen met een intron en Vero cellen zonder een intron. Om een fout-negatief resultaat te vermijden zullen dus beide producten in de PCR aangetoond moeten worden waardoor de PCR eigenlijk opnieuw geoptimaliseerd moest worden. Echter werd ervoor gekozen om verder te gaan met de PCR optimalisatie van de probe omdat de kwantitatieve PCR daar uiteindelijk mee zal gaan werken.

Er werd een hydrolyse probe gebruikt die zowel aan het target DNA met een intron als aan het target DNA zonder een intron bindt. Het optimale PCR programma bestaat uit een annealing temperatuur van 60°C, een annealing tijd van 30 seconden en een extensie tijd van 1 seconden. De annealing fase bestaat uit 55 cycli en er worden primer en probe hoeveelheden van 0.4 μl gebruikt.

De detectielimiet van de hydrolyse probe ligt tussen de 100.000x en de 200.000x verdunning wat overeenkomt met 230 en 460 pg/ml. Dit betekent dat de eis van 1.000 pg/ml Vero DNA in een trivalente bulk met deze detectielimiet ruimschots aangetoond kan worden.

Wanneer er een tienvoudige verdunning gebruikt wordt, dan zou er volgens de literatuur per verdunning een verschil van 3.3 cycli moeten zijn. Op basis van deze gegevens werd er een standaardlijn ontworpen waarbij de concentraties steeds tien keer vermenigvuldigen. Van deze standaardlijn kon een goede standaard curve gemaakt worden, was er per concentratie een duidelijk verschil te zien in crossing points en kwamen de berekende concentraties redelijk overeen met de exacte concentraties. De standaardlijn die gebruikt wordt voor de PCR bestaat dus uit de volgende concentraties: 500 pg/ml – 1.000 pg/ml – 5.000 pg/ml – 50.000 pg/ml – 500.000 pg/ml.

Om te testen of de PCR en de standaardlijn werkte werden er drie verschillende vaccinfractionen getest. De 4.1 en de 6.1 fractie bevatte allebei minder dan 500 pg/ml Vero DNA. Echter bevatte de 3.1 fractie volgens de PCR 18.300 pg/ml. Deze vaccinfractionen zijn ook door een ander bedrijf, met een andere PCR methode, getest waar vreemde resultaten uit kwamen. Op basis van deze vergelijkende testen kunnen er geen conclusies getrokken worden. Er zal dus nog een PCR uitgevoerd moeten worden met andere en meer vaccinfractionen die al een keer getest zijn.

Om de specificiteit te testen werd er gebruik gemaakt van drie verschillende celsoorten (Rk13, Bel en Cyno cellen). Echter zijn deze cellen zowel bij de SYBR green als bij de hydrolyse probe alle drie positief wat betekent dat de primers en probe ook met β -actin sequenties in deze cellen lijken te reageren. Dit betekent dat de PCR niet honderd procent specifiek is voor Vero cellen. Echter wordt bij de productie van het polio vaccin uitsluitend gebruik gemaakt van Vero cellen zodat dit in de praktijk geen problemen geeft. Een voordeel hiervan is dat de PCR in de toekomst

mogelijk ook gebruikt kan worden voor deze drie celsoorten. Er moet dan nog wel een standaardlijn van dat celtype gemaakt worden.

Als laatste werd de handmatige isolatie methode (kolommen) met de geautomatiseerde isolatie methode (MagNa Pure) vergeleken. Hieruit bleek dat het voor de DNA concentratie niet uit maakt welke methode er gebruikt wordt. De MagNa Pure werkt wel sneller, handiger en is betrouwbaarder dan wanneer er met de hand gewerkt wordt. Er kunnen minder fouten gemaakt worden en er is minder kans op kruiscontaminatie.

Er kan dus geconcludeerd worden dat de cellen het beste geïsoleerd kunnen worden met de MagNa Pure en dat er een kwantitatieve PCR ontworpen is. Echter moet er dus nog wel één keer op bekende vaccinfractionen getest worden en zal er nog een analysevoorschrift gemaakt moeten worden voordat de PCR verder gevalideerd en gebruikt kan worden.

7. Literatuurlijst

1. http://www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/Poliomyelitis_anterior_acuta/index.jsp; 04-01-2011
2. http://www.nvi-vaccin.nl/Vaccinformatie/RVP/Polio/Polio_het_virus; 04-01-2011
3. <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/polio.pdf>; 04-01-2011
4. <http://mens-en-gezondheid.infonu.nl/ziekten/1719-polio-poliomyelitis.html>; 04-01-2011
5. P.D. Minor; *Poliomyelitis*; third edition; Encyclopedia of Virology; 2008; p. 242-249
6. V.R. Racaniello; *Polio*; third edition; Encyclopedia of Microbiology; 2009; p. 459-468
7. <http://www.medic8.com/infectious-deseases/polio.htm>; 12-01-2010
8. *Polio laboratory manual*; fourth edition; Department of Immunization, Vaccines and Biologicals; 2004; p. 4-6
9. MD. Mary T. Caserta; *Poliomyelitis (Infantile Paralysis; Acute Anterior Poliomyelitis)*; The Merck manual for healthcare professionals; December 2009
10. http://www.unicef.org/immunization/23245_polio.html; 04-01-2011
11. <http://www.brittanica.com/EBchecked/topic/467378/polio>; 04-01-2011
12. <http://www.nvi-vaccin.nl/Vaccinformatie/RVP/Polio>; 12-01-2011
13. http://www.rivm.nl/rvp/overzicht_ziekten/polio; 12-01-2011
14. http://www.rivm.nl/cib/binaries/DKTP-Hib_tcm92-48193.pdf; 30-03-2011
15. http://www.rivm.nl/cib/binaries/DKTP%204-jarigen_tcm92-48196.pdf; 30-03-2011
16. http://www.rivm.nl/cib/binaries/DTP_tcm92-48198.pdf; 30-03-2011
17. <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CCL-81&Template=cellBiology>; 06-04-2011
18. BJ. Montagnon; *Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line*; Institut Médecine Humaine, Marcy l'Etoile, France; 1989
19. Nicolai v. Kaverin et al.; *Impairment of Multicycle Influenza Virus Growth in Vero (WHO) Cells by Loss of Trypsin Activity*; Journal of Virology; April 1995; p. 2700-2703
20. Nicole C. Ammerman et al.; *Growth and Maintenance of Vero Cell Lines*; Current protocols in Microbiology; November 2008; Appendix-4E
21. Productie van het polio vaccin, documentatie Nederlands Vaccin Instituut (NVI)
22. <http://www.lgcstandards-atcc.org/Home/tabid/477/Default.aspx>; 13-01-2011
23. <http://binnen.nvi-vaccin.nl/Kernactiviteiten/Productie>; 13-01-2011
24. World Health Organization; *Global Advisory Committee on Vaccine Safety*; Weekly epidemiological record (WER); No. 1; January 2005; p. 3-7

25. Analytische procedure, documentatie Nederlands Vaccin Instituut (NVI)
26. Jinho Shin et al.; *WHO informal consultation on the application of molecular methods to assure the quality, safety and efficacy of vaccines*, Geneva, Switzerland, 7-8 April 2005; Biologicals; March 2007; p. 63-71
27. Roche Applied Science; *PCR applications Manual*; Roche Diagnostics GmbH; third edition; 2006; p. 9-10, 195-205
28. E. van Pelt-Verkuil et al.; *Moleculaire diagnostiek*; 2001; p. 120-126
29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>; 14-01-2011
30. <http://molecular.roche.com/About/pcr/Pages/PCRProcess.aspx>; 14-01-2011
31. Roche Applied Science; *LightCycler Real-Time PCR Systems, Application Manual*; Roche Diagnostics GmbH; 2009; p. 15-27
32. <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/index.jsp?id=LC01060104>; 14-01-2011
33. https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/index.jsp?id=lct_010400; 14-01-2011
34. https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/lightcycler_docs/technical_notes/lc_18.pdf; 14-01-2011
35. http://www.qiagen.com/resources/info/guidelines_rtpcr/quantifying.aspx#select; 18-01-2011
36. Qiagen; *Critical factors for successful Real-Time PCR*; Real-Time PCR Brochure; 2010; p. 16
37. Roche Applied Science; *LightCycler 2.0 Instrument Operator's Manual*; Roche Diagnostics GmbH; 2005; p. 102-105
38. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACTB>; 26-01-2011
39. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/2116654?report=genbank&log\\$=nucletop&blast_rank=1&RID=M026G8RD011](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/2116654?report=genbank&log$=nucletop&blast_rank=1&RID=M026G8RD011); 26-01-2011
40. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/168480144?report=genbank&log\\$=nucletop&blast_rank=2&RID=M2CD21UR01S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/168480144?report=genbank&log$=nucletop&blast_rank=2&RID=M2CD21UR01S); 26-01-2011

Bijlage I: DNA isolatie m.b.v. de Qiagen DNA Mini kit

Benodigdheden

Materiaal	Stoffen	Apparatuur
Steriele handschoenen	Vero cellen	CleanAir Biohazard kast
Eppen houder	Qiagen DNA Mini kit*	Eppendorf Thermomixer comfort
Eppendorf cupjes (0.5ml)	Ethanol (absolute)	Vortex
Eppendorf cupjes (1.5ml)		Eppendorf Centrifuge 5417R
Pipetten		
Steriele pipetpunten		

* Qiagen DNA Mini kit: ATL buffer, proteïnase K, AL buffer, AW1 buffer, AW2 buffer, AE buffer, QIA amp kolommen, opvangtubes

Methode

- Controleer van een nieuwe kit het voorschrift op veranderingen die mogelijk aangebracht zijn door de fabrikant.
- Maak de buffers aan volgens voorschrift van de leverancier (ethanol toevoegen aan AW1 buffer en AW2 buffer).
- Stel de thermomixer in op 55°C (druk twee keer op start/stop om de temperatuur omhoog te laten komen).
- Pipetteer 200µl cellen in een gecodeerde 1.5ml ep.
- Voeg 180µl ATL buffer aan de 200µl monsters toe. Bij kristalvorming van ATL buffer even bij warm water verwarmen.
- Voeg 20µl proteïnase K oplossing toe aan de eppen en vortex 15 seconden.
- Incubeer alle eppen 1 a 1.5 uur in de thermomixer bij 55°C (volledige lysis).
- Stel de thermomixer in op 70°C.
- Voeg 200µl AL buffer toe, mix en incubeer 10 min. in de 70°C thermomixer.
- Voeg 200µl ethanol toe en breng het complete mengsel over in de QIA amp kolom.
- Centrifugeer de kolom 1 min. bij 8000 rpm. Plaats de kolom vervolgens in een nieuwe opvangtube en gooi de oude weg.
- Trek nieuwe handschoenen aan.
- Breng 500µl AW1 buffer op de kolom en centrifugeer deze 1 min. bij 8.000 rpm. Plaats de kolom in een nieuwe opvangtube en gooi de oude weg.
- Trek nieuwe handschoenen aan.
- Breng 500µl AW2 buffer op de kolom en centrifugeer deze 3 min. bij 13.000 rpm. Plaats de kolom in een nieuwe, **gecodeerde** opvangtube en gooi de oude weg.
- Trek nieuwe handschoenen aan.
- Breng 200µl AE buffer op de kolom en laat deze minimaal 1 min. bij kamertemperatuur incuberen. Centrifugeer de kolom 3 min. bij 8000 rpm om het DNA te elueren. Verwijder de kolom, maar bewaar de gecodeerde opvangtube!
- Pipetteer het eluaat over in een gecodeerde 0.5ml ep.

BEWAARSTAP. Vries de eluaten (= uit monster geïsoleerd DNA) in bij -20°C voor opslag langer dan 1 dag, of bewaar ze in de koelkast bij 2-8°C totdat de PCR wordt ingezet.

Bijlage II: DNA isolatie m.b.v. de MagNa Pure Compact

Benodigdheden

Materiaal	Stoffen	Apparatuur
Steriele handschoenen	Vero cellen ($\leq 1 \times 10^6$ cellen/100ul)	MagNa Pure Compact System
Pipetten	MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I*	CleanAir Biohazard kast
Steriele pipetpunten		

* MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I: Reagent Cartridge (Proteinase K, Lysis Buffer, MGP's, Wash Buffer I, Wash Buffer II, Wash Buffer III, Elution Buffer), Tip Tray, Sample Tube, Elution Tube, Elution Tube Cap

Methode

1. Zet de MagNa Pure aan en open de MagNa Pure.
2. Druk op het scherm van de MagNa Pure op de Run knop om toegang te krijgen tot het Sample Ordering Screen 1.
3. Verwijder de verpakking van de voorgevulde Reagent Cartridge en controleer op beschadigingen en volume hoeveelheden (gebruik geen Cartridges die verschillende hoeveelheden hebben of die beschadigd zijn).
4. Scan de barcode van de Reagent Cartridge en plaats vervolgens de Reagent Cartridge in het Cartridge rek. Herhaal deze stap voor het aantal monsters dat geïsoleerd moet worden.
5. Ga verder naar Sample Ordering Screen 2 en selecteer het protocol 'DNA_Culture_Cells' met een elutie volume van 200µl.
6. Zet de juiste hoeveelheid Tip Trays (één per isolatie) in het Tip rek van de MagNa Pure.
7. Ga verder naar Sample Ordering Screen 3.
8. Plaats de Sample Tubes in de eerste en tweede rij van het buizenrek (zorg ervoor dat de rand van de buis in het rek vast zit) en vul de monsternamen in.
9. Haal het buizenrek uit de MagNa Pure en pipetteer (in de biohazard kast) 100µl van de monsters in de Sample Tubes.
10. Ga verder naar Sample Ordering Screen 4.
11. Plaats het buizen rek terug in de MagNa Pure.
12. Ga verder naar Sample Ordering Screen 5.
13. Scan de barcodes van de Elution Tubes en plaats ze in het elutie rek (zorg ervoor dat de rand van de buis in het rek vast zit).
14. Controleer de informatie die op het scherm van de MagNa Pure staat. Als de informatie klopt, klik dan op 'Confirm Data'. Sluit vervolgens de klep van de MagNa Pure en start de run.
15. Als de MagNa Pure met de isolatie klaar is, dan staan de resultaten van elke isolatie op het scherm van de MagNa Pure weergegeven als:
 - PASS → De isolatie is goed gegaan
 - FAIL → De isolatie is onderbroken of fout gegaan
16. Sluit de Elution Tubes met de Elution Tube Caps en verwijder het elutie rek of de Elution Tubes direct na de isolatie uit de MagNa Pure.

BEWAARSTAP. Bewaar de eluaten bij 2 tot 8°C totdat de PCR wordt ingezet of vries de eluaten in bij -20°C voor opslag langer dan 1 dag.

Bijlage III: Real-Time PCR m.b.v. SYBR Green I

Benodigdheden Ruimte 1

Materiaal	Stoffen	Apparatuur
Handschoenen	LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I kit*	Labcaire PCR6 flowkast
Piepschuim bak	Forward primer**	Vortex
Koel element (-10°C)	Reverse primer***	VWR Galaxy mini centrifuge
Gekoeld aluminium blok		
Eppendorf cupjes (1.5ml)		
Pipetten		
Steriele pipetpunten		

* LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I kit:

- Reactiemix (reactie buffer, MgCL₂, SYBR Green I kleurstof, DNTTP mix)
- Enzym (FastStart Taq DNA Polymerase)
- Water, PCR-Grade

** Forward primer: 5'caccatgtaccctggcat

*** Reverse primer: 5'cagagtacttgcgctcag

Benodigdheden Ruimte 2 en 3

Materiaal	Stoffen	Apparatuur
Steriele handschoenen	DNA monsters	CleanAir Biohazard kast
Eppendorf cupjes (0.5ml)		LightCycler Carousel Centrifuge 2.0
Pipetten		LightCycler Carousel-based System 2.0
Steriele pipetpunten		LightCycler software 4.05
LightCycler aluminium koel blok		
20µl LightCycler Capillairen + stoppers		
LightCycler Capping tool		
LightCycler Sample Carousel (20µl)		
LightCycler capillary releaser		

Methode

Ruimte 1: Bereiding van de MasterMix

1. Ontdooi één vial 'Reactie mix' (vial 1b, groene dop) en bescherm het tegen licht.
2. Centrifugeer de 'Reactie mix' en één vial 'Enzym' (vial 1a, kleurloze dop).
Plaats de vials na het centrifugeren terug in het ijs.
3. Pipetteer 14µl van vial 1a, naar vial 1b.
4. Mix voorzichtig door op en neer te pipetteren (niet vortexen).
5. Plaats een nieuw etiket op vial 1b (groene dop), die bij de kit zit → Vial 1: MasterMix (één etiket op de top van de dop, één etiket op de vial).
6. Bewaar de MasterMix tot gebruik op ijs.

Ruimte 1: Bereiding van de PCR Mix

7. Bereid een primeroplossing met een concentratie van 10 μ M.
8. Pipetteer in een 1.5ml ep de volgende PCR Mix:

1	Vial 2, Water, PCR-grade	9	μ l
2	Forward primer	2	μ l
3	Reverse primer	2	μ l
4	Vial 1: Master Mix	4	μ l

9. Mix voorzichtig door op en neer te pipetteren.

Ruimte 2 en 3: Klaarmaken PCR

10. Plaats het benodigde aantal capillairen in het gekoelde LightCycler blok.
11. Pipetteer 15 μ l PCR mix in een LightCycler Capillair.
12. Voeg aan het capillair 5 μ l DNA monster toe en maak het capillair dicht met een stopper m.b.v. de LightCycler capping tool.
13. Doe alle capillairen in de LightCycler Sample Carousel en centrifugeer in de LC Carousel Centrifuge.
14. Zet de LightCycler Sample Carousel over in de LightCycler Carousel-Based System (Ruimte 3) en start de PCR volgens onderstaand schema:

	Analysis mode	Cycles	Segment	Temperatuur °C	Tijd	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubatie	None	1		95	10 min	20	None
Amplificatie	Quantification	45	Denaturatie	95	10 sec	20	None
			Annealing	58	3 sec	20	None
			Extension	72	25 sec	20	Single
Smelt curve	Melting Curves	1	Denaturatie	95	0 sec	20	None
			Annealing	65	60 sec	20	None
			Melting	95	0 sec	0.1	Continuous
Koelen	None	1		40	30 sec	20	None

Bewaarinstructies LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit:

- Bewaar de kit bij -15°C tot -25°C.
- Bewaar vial 1a, 1b en 2 bij -15°C tot -25°C.
- Bewaar vial 1 bij -15°C tot -25°C voor maximaal 3 maanden.
- Wanneer vial 1 ontdooid is, bewaar dan bij +2°C tot +8°C voor maximaal 1 week.
- Vermijd het herhaaldelijk invriezen en ontdooien.
- Houdt vial 1b en 1 weg van het licht.

Bijlage IV: Real-Time PCR m.b.v. een hydrolyse probe

Benodigheden Ruimte 1

Materiaal	Stoffen	Apparatuur
Handschoenen	LightCycler TaqMan Master kit*	Labcaire PCR6 flowkast
Piepschuim bak	Forward primer**	Vortex
Koel element (-10°C)	Reverse primer***	VWR Galaxy mini centrifuge
Gekoeld aluminium blok	Hydrolyse probe Nr. 37****	
Eppendorf cupjes (1.5ml)		
Pipetten		
Steriele pipetpunten		

* LighCycler TaqMan Master kit:

- Reactiemix (reactie buffer, MgCl₂, dNTP mix)
- Enzym (FastStart Taq DNA Polymerase)
- Water, PCR-grade

** Forward primer: 5'caccatgtaccctggcat

*** Reverse primer: 5'cagagtacttgcgctcag

**** Hydrolyse probe Nr. 37: 5'tgccctgg

Benodigheden Ruimte 2 en 3

Materiaal	Stoffen	Apparatuur
Steriele handschoenen	DNA monsters	CleanAir Biohazard kast
Eppendorf cupjes (0.5ml)		LightCycler Carousel Centrifuge 2.0
Pipetten		LightCycler Carousel-based System 2.0
Steriele pipetpunten		LightCycler software 4.05
LightCycler aluminium koel blok		
20µl LightCycler Capillairen + stoppers		
LightCycler Capping tool		
LightCycler Sample Carousel (20µl)		
LightCycler capillary releaser		

Methode

Ruimte 1: Bereiding van de MasterMix

1. Ontdooi één vial 'Reactie mix' (vial 1b, rode dop) en bescherm het tegen licht.
2. Centrifugeer de 'Reactie mix' en één vial 'Enzym' (vial 1a, witte dop). Plaats de vials na het centrifugeren terug in het ijs.
3. Pipetteer 10µl van vial 1a, naar vial 1b.
4. Mix voorzichtig door op en neer te pipetteren (niet vortexen).
5. Plaats een nieuw etiket op vial 1b (rode dop), die bij de kit zit → Vial 1: Master Mix (één etiket op de top van de dop, één etiket op de vial).
6. Bewaar de MasterMix tot gebruik op ijs.

Ruimte 1: Bereiding van de PCR Mix

7. Bereid een primeroplossing met een concentratie van 20 μ M.
8. Bereid een probe oplossing met een concentratie van 10 μ M.
9. Pipetteer in een 1.5ml ep de volgende PCR Mix:

1	Vial 2, Water, PCR-grade	9.8	μ l
2	Forward primer	0.4	μ l
3	Reverse primer	0.4	μ l
4	Probe Nr. 37	0.4	μ l
5	Vial 1: Master Mix	4	μ l

10. Mix voorzichtig door op en neer te pipetteren.

Ruimte 2 en 3: Klaarmaken PCR

11. Plaats de benodigde aantal capillairen in het gekoelde LightCycler blok.
12. Pipetteer 15 μ l *PCR mix* in een LightCycler Capillair.
13. Voeg aan het capillair 5 μ l DNA monster toe en maak het capillair dicht met een stopper m.b.v. de LightCycler capping tool.
14. Doe alle capillairen in de LightCycler Sample Carousel en centrifugeer in de LC Carousel Centrifuge.
15. Zet de LightCycler Sample Carousel over in de LightCycler Carousel-Based System (Ruimte 3) en start de PCR volgens onderstaand schema:

	Analysis mode	Cycles	Segment	Temperatuur °C	Tijd	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubatie	None	1		95	10 min	20	None
Amplificatie	Quantification	55	Denaturatie	95	10 sec	20	None
			Annealing	60	30 sec	20	None
			Extension	72	1 sec	20	Single
Koelen	None	1		40	30 sec	20	None

Bewaarinstructies LightCycler TaqMan Master kit:

- Bewaar de kit bij -15°C tot -25°C.
- Bewaar vial 1a, 1b en 2 bij -15°C tot -25°C.
- Bewaar vial 1 bij -15°C tot -25°C voor maximaal 3 maanden.
- Wanneer vial 1 ontdooid is, bewaar dan bij +2°C tot +8°C voor maximaal 1 week.
- Vermijd het herhaaldelijk invriezen en ontdooien.
- Houdt vial 1b en 1 weg van het licht.

Bewaarinstructies Probe Nr. 37:

- Bewaar de vial bij -15°C tot -25°C tot de expiratie datum.
- Wanneer de vial ontdooid is, bewaar dan bij +2°C tot +8°C voor maximaal 1 maand.
- Vermijd het herhaaldelijk invriezen en ontdooien.
- Houdt de vial weg van het licht.

Bijlage V: Gel-electroforese

Benodigdheden

Materiaal	Stoffen	Apparatuur
Handschoenen	TBE buffer 10 maal	Magneetroerder
Eppendorf houder	Gedestilleerd water	Magnetron
Eppendorf cupjes (1.5ml)	Multi purpose agarose	Electroforese voedingsbron
Gelbasis	Ethidiumbromide (0,01%)	Proxima 16 Phi-Isogen
Casting tray	Orange G loading buffer	Proxima AQ-4 software
Kam	DNA Marker XIII (50 bp)	
Maatcilinder (1.000ml & 250ml)		
Roerflow		
Erlenmeyer		
80ml pipet		
Automatische pipet		
Pipetten		
Steriele pipetpunten		
Terasaki plaatje		
Electroforese bak		

Methodes

Gel bereiding

1. Klem de gelbasis goed vast in de castingtray en plaats de kam in de gelbasis.
2. Zet de castingtray op een vlakke ondergrond en stel waterpas.
3. Maak 1.000ml TBE 1x buffer (100ml TBE buffer 10 maal + 900ml gedestilleerd water).
4. Weeg voor een 2% gel 1.6g agarose af en doe de agarose vervolgens in een erlenmeyer.
5. Voeg 80ml TBE 1x aan de agarose toe en verwarm het mengsel in de magnetron (maximaal 5 minuten) tot de vloeistof begint te koken.
6. Haal de erlenmeyer uit de magnetron als de vloeistof kookt en zwenk voorzichtig. Herhaal het koken minimaal drie keer totdat de agarose opgelost is.
7. Laat de erlenmeyer zwenkend onder de kraan afkoelen.
8. Voeg 800µl ethidiumbromide aan de agarose oplossing toe.
9. Giet de agarose oplossing in de castingtray en verwijder eventuele luchtbelletjes met een schone pipetpunt.
10. Laat de agarose bij kamers temperatuur stollen en verwijder daarna voorzichtig de kam uit de gel.
11. Giet de TBE 1x buffer in de electroforese bak en plaats hier de gelbasis met gel in. Vul zodanig de TBE 1x buffer aan totdat de gel circa 2-3mm onder de TBE 1x ligt.

Monster voorbereiding

12. Pipetteer 18µl TBE 1x buffer + 2µl Orange G loading buffer + 2µl monster op een terasaki plaatje en meng door op en neer te pipetteren.
13. Pipetteer vervolgens 7µl van het terasaki plaatje op de gel.

Electroforese run

14. Run met een voltage van 100V voor 40 minuten.

Bijlage VI: Spectrofotometer

Benodigdheden

Materiaal	Stoffen	Apparatuur
Handschoenen	Calfthymus DNA (100 µg/ml)	LS 55 Fluorescence Spectrometer
Cuvetten	Salmon sperm dsDNA	FL WinLab software
Pipetten	Vero DNA	
Steriele pipetpunten	Ethidiumbromide (0.01%)	
50ml buis	Gedestilleerd water	
Elkay cuvet dopjes	TNE 10x buffer	

Methode

Standaardlijn

- Label de cuvetten van St00A t/m St07B en verdun de DNA-stock (Calfthymus DNA 100 µg/ml) volgens onderstaand schema (eerst de standaard en daarna het water toevoegen):

Label	Concentratie (µg/ml)	Calfthymus DNA (µl)	Gedestilleerd water (µl)
ST004A en B	0	0	500
ST01 A en B	2	10	490
ST02 A en B	4	20	480
ST03 A en B	5	25	475
ST04 A en B	6	30	470
ST05 A en B	8	40	460
ST06 A en B	10	50	450
ST07 A en B	12	60	440

Monsters

- Label de cuvetten (M1A t/m M4B) en verdun de monsters volgens onderstaand schema (eerst het monster en daarna het water toevoegen):

Verdunning	Monster (µl)	Gedestilleerd water (µl)
1/5	100	400
1/8.33	60	440
1/10	50	450
1/14.29	35	465

Referentie

- Label de cuvetten (Ref1A t/m Ref2B) en verdun de referentie (Salmon sperm dsDNA) volgens onderstaand schema (eerst de referentie en daarna het water toevoegen):

Verdunning	Referentie (µl)	Gedestilleerd water (µl)
1/16.67	30	470
1/20	25	475

Werkoplossing

- Maak een werkoplossing van 50ml (10ml 10x TNE buffer + 5ml Ethidiumbromide 0.01% + 35ml gedestilleerd water).
- Voeg 500µl werkoplossing toe aan de standaardlijn, referenties en monsters. De test moet nu binnen 2 uur afgerond worden.
- Sluit de cuvetten en meng door ze een aantal keer ondersteboven te zwenken.
- Voer de meting van de standaardlijn, referentie en monsters uit.
- Bereken de DNA concentratie van de monsters aan de hand van de standaardlijn.