
Moleculaire diagnostiek

Dr. E. van Pelt-Verkuil
Dr. W.B. van Leeuwen

Tweede druk

Syntax Media – Utrecht

©2013, Uitgeverij Syntax Media, Utrecht

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Voorzover het maken van kopieën uit deze uitgave is toegestaan op grond van artikel 16b Auteurswet 1912 j° het Besluit van 20 juni 1974, Stb. 351, zoals gewijzigd bij Besluit van 23 augustus 1985, Stb. 471 en artikel 17 Auteurswet 1912, dient men de daarvoor wettelijk verschuldigde vergoedingen te voldoen aan de Stichting Reprorecht (Postbus 882, 1180 AW Amstelveen). Voor het overnemen van (een) gedeelte(n) uit deze uitgave in bloemlezingen, readers en andere compilatiewerken (artikel 16 Auteurswet 1912) dient men zich tot de uitgever te wenden.

ISBN: 978 90 77423 95 0

www.syntaxmedia.nl

Ontwerp omslag: Lapis Vivus grafisch ontwerp, Oosterbeek

Foto omslag: © Agsandrew, Dreamstime.com

Auteurs en uitgever verklaren dat deze publicatie met de grootst mogelijk zorgvuldigheid tot stand is gekomen. Zij staan echter niet in voor mogelijke (druk)fouten en/of onvolledigheden in de tekst of de afbeeldingen en aanvaarden derhalve geen enkele aansprakelijkheid voor schade, van welke aard dan ook, die uit het gebruik van de informatie uit deze publicatie zou kunnen voortvloeien.

De uitgever heeft ernaar gestreefd de auteursrechten te regelen volgens de wettelijke bepalingen. Zij die desondanks rechten menen te kunnen doen gelden, kunnen zich alsnog tot de uitgever wenden.

Voorwoord

Met moleculaire diagnostiek worden laboratoriumtechnieken aangeduid waarmee op het niveau van DNA of RNA ziekten bij mens, plant en dier worden gekarakteriseerd. Pathogenen en afwijkingen in het erfelijk materiaal zijn doelwit van de moleculaire analyses.

In 2001 kwam de eerste druk van *Moleculaire Diagnostiek* uit. Moleculaire diagnostiek als subdiscipline in het diagnostisch onderzoek was toen net begonnen aan een explosieve groei. De auteurs kozen voor een indeling in theoretische hoofdstukken die de gemeenschappelijk achtergronden bevatten en een aantal hoofdstukken met destijds geïmplementeerde toepassingen, geschreven door deskundigen in de betreffende vakgebieden.

In de tweede druk is deze indeling gehandhaafd. Wel is het boek inhoudelijk volledig vernieuwd en sterk uitgebreid. Dit geldt zowel voor de theoretische hoofdstukken als voor de toepassingen die door specialisten uit hun vakgebied zijn ingevuld. Nieuwe onderwerpen van toepassingen zijn microbiële voedselveiligheid en bio-informatica; enkele theoretische hoofdstukken gaan over nieuwe sequencing-technieken, micro-arrays en DNA-chips. Ook deze laatste techniek vormt een onderdeel in de diagnostische laboratoria, zij het voor zeer specifieke vragen. Intermezzo's binnen het betreffende hoofdstuk diepen bepaalde aspecten verder uit.

Sinds de uitgave van de eerste druk in 2001 zijn de beschikbare technieken explosief gegroeid en op veel terreinen goedkoper en gevoeliger geworden. Waren in het begin van deze eeuw PCR en hybridisatie zeer belangrijk, nu zijn sequenzen (hoofdstuk 8), microarrays, DNA-chips (hoofdstuk 9), en zelfs spectroscopische technieken (hoofdstuk 10) toegevoegd aan het diagnostisch arsenaal. Steeds meer aandacht voor kwaliteitszorg en -borging maakt de moleculaire diagnostiek veel betrouwbaarder dan voorheen. Een zeer uitgebreid hoofdstuk over optimalisatie, validatie en kwaliteitszorg geeft richting aan de implementatie van nieuwe moleculair diagnostische technieken.

Technieken blijken naar elkaar toegegroeid en hebben andere accenten gekregen. Zo is hybridisatie een basistechniek geworden bij PCR, microarray en DNA-chips, sequencing-technieken en moderne multiplextechnieken zoals de Luminex assays. Bio-informatica wordt niet alleen ingezet bij grootschalige analyse van

(sequence)-data en annotatie van genen die worden verkregen met ‘next generation sequencing’ (hoofdstuk 8), maar is ook een onmisbaar onderdeel geworden bij primer- en probe-design. De real-time PCR is niet meer weg te denken uit de diagnostische laboratoria, die hiermee een groot probleem m.b.t. contaminatie van monsters aanzienlijk hebben kunnen oplossen. Ook de methoden om real-time PCR-resultaten beter te kunnen analyseren zijn geïmplementeerd op de apparatuur of als free ware beschikbaar. Speciaal hiervoor is een addendum opgenomen.

De auteurs, deskundigen vanuit het Lectoraat innovatieve moleculaire diagnostiek en het Centrum bioscience en diagnostiek van Hogeschool Leiden met veel ervaring in het onderwijs aan HLO-studenten en laboratoriummedewerkers uit het beroepenveld bespreken de achtergronden van de technieken grondig en uitgebreid en staan borg voor een volledige herziening van *Moleculaire Diagnostiek*, samen met gastschrijvers uit het complete moleculair diagnostisch werkveld.

In 2001 stond E. van Pelt-Verkuil samen met M.F. van Berlo, A. Van Belkum en H.G.M. Niesters aan de wieg van dit boek. Voor de tweede druk is een nieuw schrijf- en redactieteam gevormd, bestaande uit W.B. Van Leeuwen en E. van Pelt-Verkuil.

Wij bedanken alle medeauteurs voor hun professionele inzet bij de totstandkoming van dit handboek.

Tot slot wensen wij de lezers veel leesplezier en een vruchtbaar gebruik van dit boek.

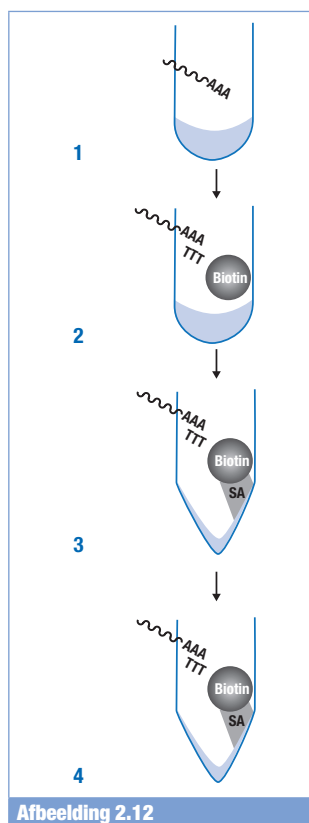
Dr. Bep van Pelt-Verkuil
Dr. Willem van Leeuwen

Leiden, mei 2013

Inhoud

Hoofdstuk 1 Betekenis van nucleïezuren in de diagnostiek	3
Hoofdstuk 2 Achtergronden en analyse van nucleïezuren	9
<i>E. van Pelt-Verkuil</i>	
Hoofdstuk 3 Primers en probes	53
<i>E. van Pelt-Verkuil</i>	
Hoofdstuk 4 Nucleïezuurhybridisatie: principes en basisbegrippen	105
<i>E. van Pelt-Verkuil</i>	
Hoofdstuk 5 Principes van de PCR	141
<i>E. van Pelt-Verkuil</i>	
Addendum bij hoofdstuk 5 Informatie in de amplificatiecurve	217
<i>E. van Pelt-Verkuil en J.M. Ruijter</i>	
Hoofdstuk 6 Kwaliteitsborging, -zorg en -controle in de moleculaire diagnostiek	243
<i>E. van Pelt-Verkuil</i>	
Hoofdstuk 7 Kwantitatieve isotherme moleculaire technieken	353
<i>H.G.M. Niesters</i>	
Hoofdstuk 8 DNA-sequenzen: verleden, heden en de 'next generation'	369
<i>C. Vink</i>	
Hoofdstuk 9 DNA-microarrays	387
<i>J.M. Boer</i>	
Hoofdstuk 10 Biofysische methoden	409
<i>W.B. van Leeuwen, K. Maquelin en M. Bruins</i>	

Hoofdstuk 11	
Moleculaire diagnostiek van parasitaire infecties	431
<i>J.J. Verweij</i>	
Hoofdstuk 12	
Ontwikkelingen en toekomstige trends van moleculaire diagnostiek in het microbiologisch laboratorium	443
<i>W.B. van Leeuwen</i>	
Hoofdstuk 13	
Moleculaire technieken voor de diagnostiek van virale infecties	453
<i>M. Schutten</i>	
Hoofdstuk 14	
Moleculaire diagnostiek in de pathologie	465
<i>J.W.J. Hinrichs, R.A. de Weger, W.T.M. van Blokland, G.J.A. Offerhaus en P.J. van Diest</i>	
Hoofdstuk 15	
Moleculaire diagnostiek van lymfatische maligniteiten	499
<i>A.W. Langerak en V.H.J. van der Velden</i>	
Hoofdstuk 16	
Moleculaire diagnostiek in de klinische chemie	525
<i>R. Castel, D.W. Swinkels, R.H.N. van Schaik</i>	
Hoofdstuk 17	
Moleculaire diagnostiek in de klinische genetica	553
<i>A.M.W. van den Ouweland en F.B.L. Hogervorst</i>	
Hoofdstuk 18	
Forensisch DNA-onderzoek	569
<i>A.J. Meulenbroek</i>	
Hoofdstuk 19	
De groene PCR: toepassingen in de sierteelt	607
<i>W. Martin, J. van Doorn en W.B. van Leeuwen</i>	
Hoofdstuk 20	
Microbiële voedselveiligheid	633
<i>H.J. M. Aarts</i>	
Hoofdstuk 21	
Toepassing van bio-informatica tools bij de interpretatie van diagnostische sequentie- en arraydata	645
<i>P.E.M. Taschner</i>	
Begrippenlijst	671
Register	685



Afbeelding 2.12

Affiniteitschromatografie (poly-A capture) voor eukaryotisch mRNA:

- 1) monster opnemen in lysisbuffer; nucleïnezuren (o.a. RNA) komen in oplossing;
- 2) biotine gelabelde oligodT(dT)₂₀ mengen met gelyseerd monster; poly dA)RNA hybridiseert met oligodT probe;
- 3) voeg 50 µl van deze mix toe aan streptavidine (SA) gecoat welleetje, reactievaatje; biotine bindt met hoge affiniteit aan streptavidine (CSA);
- 4) was 3X met buffer; monster is nu gereed voor PCR.

Men kan kiezen voor de isolatie van totaal RNA of zich beperken tot het mRNA. Uit 10⁶ zoogdiercellen is ongeveer 1 mg totaal RNA te isoleren. Er is dan ook voldoende van de laag tot expressie komende mRNA's beschikbaar. Eukaryotisch mRNA is te isoleren uit een ruw extract door hybridisatie van poly-dA-staarten aan met poly-dT beladen magnetische bolletjes of membranen. Na wegwassen van alle andere stoffen wordt de mRNA-fractie van het oligo-dT gedissocieerd in RNase-vrij water.

2.6.3 Kwaliteitscriteria voor DNA- en RNA-isolaten

Voor de moleculaire diagnostiek dienen de nucleïnezuren van zo hoog mogelijke kwaliteit en zo zuiver mogelijk te zijn. Onvoldoende verwijdering van contaminanten tijdens de zuivering en beschadiging van de targets vormen de grootste risico's. Vooral hydrolyse van 3'-5'-suiker-fosfaatbruggen waardoor enkel- en dubbelstrengsbreuken ontstaan (fragmentatie) en verlies of modificatie van stikstofbasen treden gemakkelijk op. Deze problemen kunnen voor, tijdens en na de isolatie (en eventueel concentratie) ontstaan. Direct na monsterafname en tijdens transport treden vooral enzymatische processen (RNase, DNase) op de voorgrond. Fragmentatie tijdens isolatie en opslag door chemische hydrolyse geeft grote kans op fout-negativiteit. Vooral herhaaldelijk vriezen/dooien is een (vermijdbaar) risico.

Kwaliteit, zuiverheid (na afloop van isolatie/extractieprocedures) en *concentratie* van nucleïnezuren zijn met diverse methoden te bepalen (intermezzo's 2.2 en 2.3). Dit laatste hangt sterk af van de vraagstelling. Zo is de concentratie van positief controlemateriaal vaak bekend, maar in klinisch materiaal met onbekende pathogenen heeft concentratiebepaling geen zin. Bij forensisch materiaal daarentegen wordt de concentratie juist weer wel vastgesteld (zie hoofdstuk 18, afb. 18.3). De meest gebruikte methoden zijn UV-absorptie (OD), elektroforese en soms fluorescentiemeting m.b.v. DNA/RNA-intercalerende kleurstoffen. Hiervan is meting van UV-absorptie het meest eenvoudig. Deze laatste geeft deze ook informatie over de mate waarin het monster ontdaan is van contaminerende eiwitten. Het zegt helaas vaak weinig over de hoeveelheid target. Een bekend probleem is bijvoorbeeld een kleine hoeveelheid prokaryotisch target DNA of RNA in een grote hoeveelheid eukaryotisch DNA.

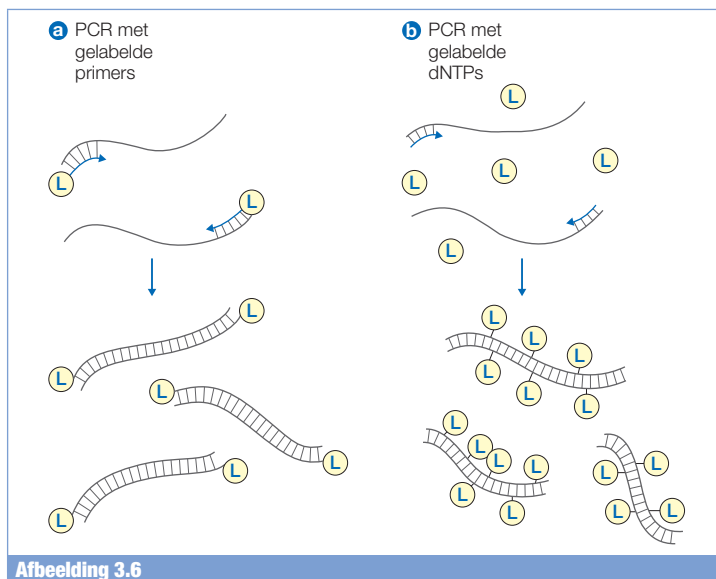
Intermezzo 2

J. W. J. Hinrichs

Integriteit nucleïnezuren in paraffine-ingebed archiefmateriaal

Bij de disciplines pathologie, histologie en celbiologie worden de meeste weefsels chemisch gefixeerd. Deze worden zo beschermd tegen afbraak door autolytische processen en bederf alsook tegen schadelijke stappen tijdens het verwerken van de weefsels tot paraffineblokjes. Bovendien zorgt het voor stabilisatie van structuren, zodat er in het lichtmicroscopisch beeld een zo minimaal mogelijke verandering ten opzichte van de werkelijkheid optreedt. In essentie komt dat met chemische fixatieven meestal neer op het onoplosbaar maken van structurele componenten, zoals eiwitten, nucleïnezuur-eiwitcomplexen en lipide-eiwitcomplexen. In de pathologie is (neutrale, gebufferde) formaline het meest gebruikte fixatief dat via methyleenbruggen tussen bovengenoemde componenten het weefsel fixeert. Het gefixeerde materiaal wordt vervolgens ingebed in paraffine voor het verwerken tot microscopie-coupees en archivering voor toekomstig gebruik. Behalve voor (immuno-) histologische doeleinden wordt hieruit ook DNA en RNA geïsoleerd voor moleculaire diagnostiek. Dit betekent dat voorafgaand aan de DNA/RNA-isolatie eerst het paraffinemateriaal dient te worden verwijderd (afb. 4.12). Voor de daadwerkelijke DNA/RNA-isolatie wordt het weefsel eerst gelyseerd en vervolgens gecentrifugeerd, waarna het ongezuiverde DNA zich in het supernatans bevindt. Hoewel dit ruwe isolaat in principe al bruikbaar is voor veel moleculaire analyses wordt het meestal nog gezuiverd (door bijvoorbeeld een kolomzuivering) van eiwit en membraanresten. Gezuiverd DNA geeft meestal een betere kwaliteit van de analyse en verhoogt de duurzaamheid van het DNA, omdat enzymen die het DNA afbreken zijn verwijderd.

Een groot nadeel van formaline-fixatie is dat het geïsoleerde DNA/RNA sterk is gefragmenteerd. De mate van fragmentatie hangt direct samen met de fixatieduur en de fixatiesnelheid, die afhangt van de grootte van het te fixeren materiaal. Dit heeft gevolgen voor de bruikbaarheid van moleculaire technieken, zoals PCR en sequentieanalyse. In de praktijk betekent dit dat er redelijkerwijs amplimeren tot maximaal 400 basenparen kunnen worden gesynthetiseerd. Voor mutatieanalyse van genen waarvan de mutaties willekeurig kunnen



Afbeelding 3.6

Probe labeling tijdens PCR. De PCR-gesynthetiseerde amplimeren zijn te gebruiken als probe. Ze kunnen tijdens de PCR worden gelabeld door gebruik te maken van gelabelde primers (a), of gelabelde dNTP's te gebruiken (bijv. DIG-dUTP of biotine-dUTP; afb. 3.5). Na afloop van de PCR worden de probes d.m.v. preparatieve elektroforese gezuiverd. Men kan ook op gezuiverde amplimeren een eindlabelingsprocedure toepassen.

3.3.3 Kloneren m.b.v. recombinant-DNA-technieken

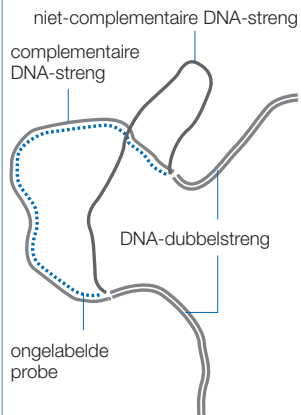
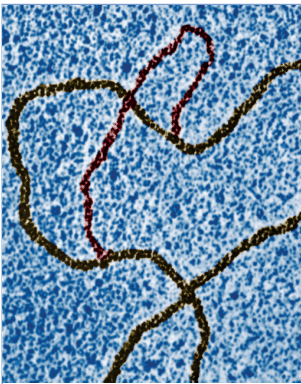
De recombinant-DNA-techniek wordt gebruikt bij het aantonen van grote targets en in situaties waarbij m.b.v. PCR bereide probes of mengsels van oligoprobes niet bruikbaar zijn. Er worden specifieke vectoren gebruikt waar de toekomstige probe als DNA-fragment wordt ingebouwd. Meestal is dit een plasmide of het DNA van een bacteriofaag. Deze constructen worden tot grote hoeveelheden in een bacterie vermeerderd. Na afloop wordt het dubbelstrengs DNA-fragment met behulp van moleculaire extractie-technieken weer uit de vector teruggewonnen. Een veelheid aan vectoren en bijbehorende gastheren zijn inmiddels commercieel beschikbaar. Met recombinant-DNA-technieken zijn kunstmatige chromosomen gebouwd die in bacteriën (BAC) of gisten (YAC) worden vermeerderd.⁵

Enkelstrengs RNA- of riboprobes met een gewenste polariteit (sense of antisense) zijn met speciale plasmiden te bereiden. Vanaf een promotor voor DNA-afhankelijke RNA-polymerasen (uit bacteriofaag SP6 of T7) synthetiseert een DNA-afhankelijk RNA-polymerase enkelstrengs de RNA-probes. Ook deze techniek wordt alleen toegepast wanneer oligo- en of PCR-probes niet geschikt zijn.

3.4 Labels, inbouw en detectie van gelabelde nucleotiden in primers en probes

3.4.1 Labels: het herkennen en detecteren van hybridisatie en PCR-producten

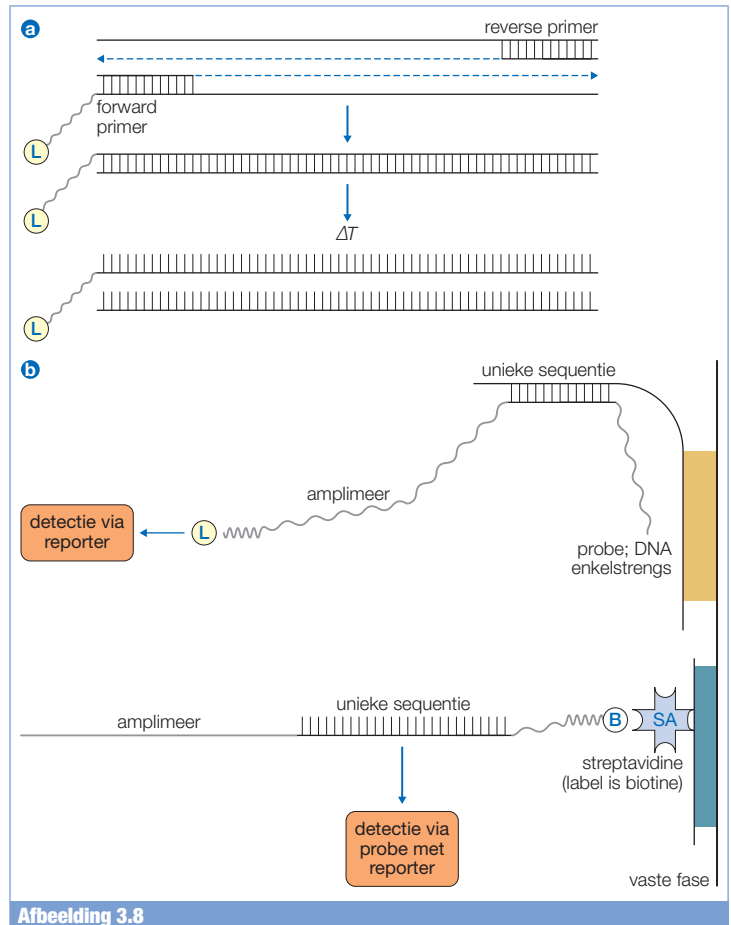
Klassieke transmissie-elektronenmicroscopie heeft hybridisatie gevisualiseerd (afb. 3.7). Het is duidelijk te zien hoe de oorspronkelijke complementaire streng is verdrongen door de probe. Momenteel wordt hybridisatie altijd zichtbaar gemaakt door middel van labels en eventuele vervolgstappen met reporter-moleculen (afb. 3.1). Er zijn diverse typen labels die via een spacer-arm vooral aan uracil worden gekoppeld.⁶ Proefondervindelijk is vastgesteld dat de optimale lengte van de spacer varieert tussen 11 en 16 atomen.



Afbeelding 3.7

Beeld van een hybridisatie met gemisch DNA, verkregen m.b.v. transmissie elektronenmicroscopie (TEM) en een schaduwtechniek (a). Deze techniek maakt op basis van dikte onderscheid tussen enkel en dubbelstrengs DNA zichtbaar.

In (b) is de interpretatie van het TEM-beeld weergegeven. Duidelijk zichtbaar is, dat de probe de native DNA-streng heeft verdrongen en dat deze als 'lus' ernaast ligt.



Afbeelding 3.8

Twee methoden om een gelabeld ampliceer weg te vangen uit de PCR-mix.

- Gelabeld ampliceer wordt door een probe, gehecht aan een vaste fase (bijv. glas of een nylon membraan) weggevangen op basis van een unieke sequentie. Tenzij het label een fluorochroom is, volgt detectie via een reporter.
- Gebiotinyleerd PCR-product met de gelabelde primer streng-specifiek scheiden op vaste fase (bijv. ELISA-plaat) gecoat met streptavidine. Na de capture kan met een specifiek probe (met reporter) de unieke sequentie worden gedetecteerd.

Sleutelmomenten uit de eerste tien jaar PCR

- 1976 beschrijving DNA-afhankelijk DNA-polymerase uit de hittestabiele Archae *Thermus aquaticus* door Chien
- 1985 eerste publicatie over de PCR in 1985 door Saiki
- 1985 eerste patent m.b.t. PCR van Cetus
- 1987 eerste commerciële systeem voor PCR: Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler
- 1988 hittestabiel *Taq*-DNA-polymerase is toepasbaar in de PCR
- 1988 eerste commerciële gezuiverde *Taq*-DNA-polymerase
- 1989 prijsdalingen voor *Taq*-DNA-polymerase en het beschikbaar komen van recombinante enzymen; Cetus verkoopt patent voor *in vitro*-diagnose van humane monsters aan Hoffman-LaRoche
- 1989 *Taq*-DNA-polymerase is molecuul van het jaar
- 1991 eerste publicatie over 5'-nucleasechemie (voorloper van real-time PCR)
- 1992 eerste commerciële HIV-test
- 1993 eerste real-time PCR-machine
- 1993 fluorogene hydrolyse-probes bij allel-specifieke analyse bij cystic fibrosis
- 1993 Mullis krijgt Nobelprijs voor de uitvinding van de PCR
- 1996 real-time PCR komt commercieel als techniek beschikbaar
- 1996 hitte-labele enzymen
- 1997 eerste smeltcurve-analyse van FV Leiden

PCR kan worden ingezet als 'eindpuntechniek', waarbij de PCR op een geschikt punt wordt gestopt t.b.v. nadere analyse en vervolgstappen. Dit wordt ook wel *conventionele PCR* genoemd. Met de *real-time PCR* is het mogelijk om het gehele PCR-proces te vervolgen d.m.v. fluorescentiemetingen, zonder dat vervolgstappen nodig zijn. Veel diagnostische methoden berusten tegenwoordig op het real-time PCR-principe.

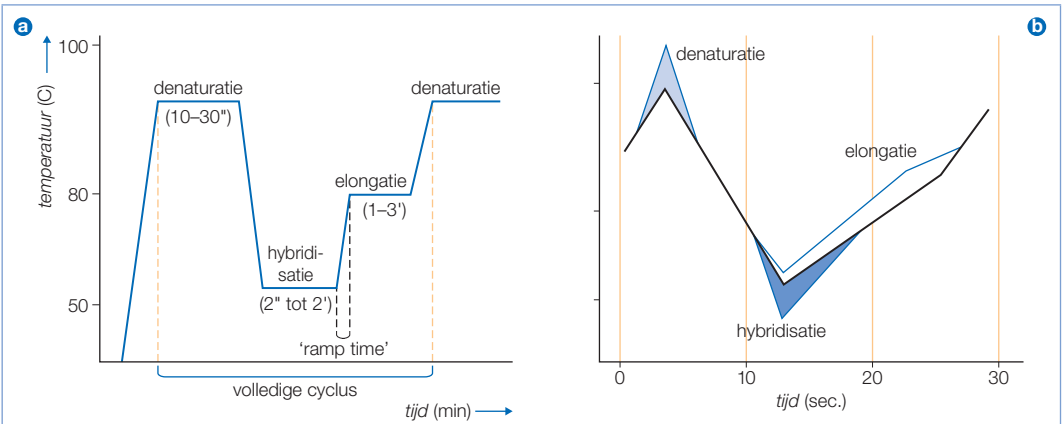
PCR is dus niet de enige nucleïnezuur-detectietechniek; ook wel aangeduid met de algemene naam NAT ('Nucleic acid Amplification Techniques'). Signaalamplificatie (bDNA, hybrid capture) en isotherme amplificatie (NASBA, LAMP, SDA, TMA) zijn geïmplementeerd in commerciële testen die worden beschreven in hoofdstuk 7.

Op dit moment is een minimale hoeveelheid DNA of RNA in het monstermateriaal geen beperking meer in moleculaire diagnostiek.

In dit hoofdstuk worden de theoretische achtergronden en implicaties voor de laboratoriumpraktijk van de PCR besproken. Daarna komen voor de diagnostiek belangrijke varianten van specifieke PCR-technieken aan de orde.

5.2 Het principe van de PCR

Met de PCR wordt een specifiek nucleïnezuurfragment vanaf een DNA-matrijs in grote hoeveelheden *in vitro* gedupliceerd m.b.v. DNA-afhankelijk hittestabiel DNA-polymerase uit *Thermus aquaticus*. Het proces verloopt cyclisch, waarbij per cyclus drie stappen zijn te onderscheiden: denaturatie, hybridisatie van primers en verlenging (elongatie) van de primers d.m.v. DNA-synthese (afb. 5.1). In totaal zijn twintig tot veertig cycli nodig.

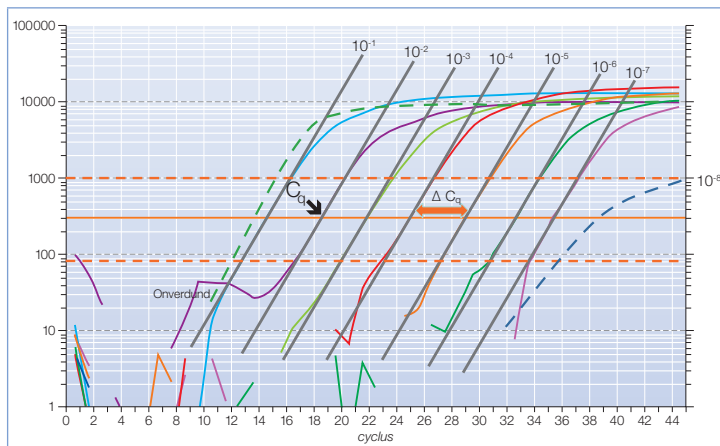


Afbeelding 5.1

Weergave van de incubatietemperaturen tijdens een volledige PCR-cyclus. Elke cyclus begint met een denaturatie waarbij dsDNA bij 94 °C wordt uitgesmolten tot enkelstrengs DNA-moleculen. Terwijl de temperatuur omlaag wordt gebracht tot 45-60 °C hybridiseren primers (annealen). Tot slot vindt DNA-synthese (elongatie/extensie) plaats waarbij de temperatuur wordt verhoogd naar 72 °C. Bij a) is de zogenaamde 'evenwichtscyclus' weergegeven. Naarmate volumina kleiner worden en de temperatuuroverdracht sneller wordt, zal het temperatuurverloop meer vloeiend worden. Bij real-time PCR op kleine fragmenten (maximaal 120 bp), in kleine volumina en snelle temperatuurwisselingen zal steeds meer sprake zijn van een 'kinetische PCR' (b).

Sleutel bij dit proces zijn twee oligonucleotide primers (zie ook hoofdstuk 3).² Bij de juiste T_m hybridiseren (annealen) de primers op de geselecteerde posities aan twee gedeneatureerde, enkelstrengs DNA-moleculen, met dien verstande dat zij, elk op een complementaire streng binden en hiermee het target-nucleïnezuur begrenzen. De primers worden van het 3'-OH-uiteinde verlengd tot nieuwe, complementaire DNA-strengen door het DNA-polymerase (afb. 5.2). Essentieel hierbij is volledige complementariteit tussen primer en target aan de 3'-OH kant. De bouwstenen van het DNA in de vorm van dATP, dGTP, dCTP en dTTP dienen in overmaat in oplossing aanwezig te zijn. Na afloop van de synthese zijn twee nieuwe dubbelstrengsmoleculen DNA gevormd en is één synthese-cyclus afgerond. De tweede cyclus begint met denaturatie, waarna het proces van primer-annealing en DNA-synthese opnieuw plaatsvindt. De producten van deze DNA-duplicatie (amplimeren of amplicons) fungeren bij een volgende hybridisatie met de primers ook als matrijzen voor een nieuwe replicatie-ronde. Hierbij ontstaan steeds meer amplicomen van de gewenste lengte (het target) (afb. 5.3).

gelijk aan 3,32. Tussen vier datapunten zitten dan driemaal 3,32 cycli (~ 10 cycli) verschil of wel een 2^{-10} ($= 10^3$) verschil in initiële targetconcentratie. Daalt de efficiëntie dan wordt ΔC_q groter. In afbeelding A.9 zijn de ΔC_q 's ongelijk; dit zou kunnen wijzen op verschillen in concentratie als gevolg van een verdunningsfout of het uitverdunnen van een PCR-remmer.



Afbeelding A.9

Kwaliteitseisen aan de standaardcurve. Resultaten van een PCR-experiment met een verdunningsrij t/m 10^7 waarbij de C_q -waarden worden bepaald met de 'threshold'-methode (getrokken oranje lijn). Elke afzonderlijke amplificatiecurve is log-lineair weergegeven met daarbij de 'rechte' (raaklijn) die de werkelijke exponentiële fase weergeeft. Het snijpunt met de 'threshold' geeft de C_q voor een individuele curve. Duidelijk is te zien dat ondanks verschillen in initiële targetconcentratie de amplificeren tijdens de exponentiële fase met een gelijke efficiëntie toenemen. In het ideale geval verschilt ook de afstand tussen de opeenvolgende C_q 's (ΔC_q) niet. In dit experiment is dit niet het geval tussen de verdunningen 10^{-4} en 10^{-5} .

De 'threshold' kan op meerdere posities in het log-lineaire gedeelte worden gepositioneerd (gestippelde oranje lijnen). Let op: dit mag alleen binnen één PCR-run worden gedaan. Bij extreem hoog (groene stippellijn) en laag (blauwe stippellijn) geconcentreerde monsters worden vaak afwijkende amplificatiecurven gezien. Bij extreem hoge concentratie kan de curve samenvallen met de volgende curve (groen) (ongunstiger synthesecondities) of een afwijkende vorm laten zien. Bij extreem lage concentratie wordt de curve vaak vlakker (blauw) en wordt de maximale fluorescentie niet meer bereikt. De C_q -waarden van de afzonderlijke PCR-bepalingen met de concentraties 10^{-1} t/m 10^{-7} worden gebruikt om de standaardcurve op te bouwen.

3.2 De individuele amplificatie curven

Aan de vorm van de individuele amplificatiecurven kunnen verschillende kwaliteitskenmerken worden afgelezen. Omdat de standaardcurve is afgeleid van de amplificatiecurven voor de gebruikte verdunningsreeks moeten de eisen die gesteld worden aan

de amplificatiecurven ook gesteld worden aan de curven die voor de standaardcurve worden gebruikt.

Achtergrond

- De achtergrond mag niet hoger zijn dan 10% van de plateau-waarde. Verlaging van de primerconcentratie en van de DNA- of cDNA-input kan helpen de achtergrond te verlagen.

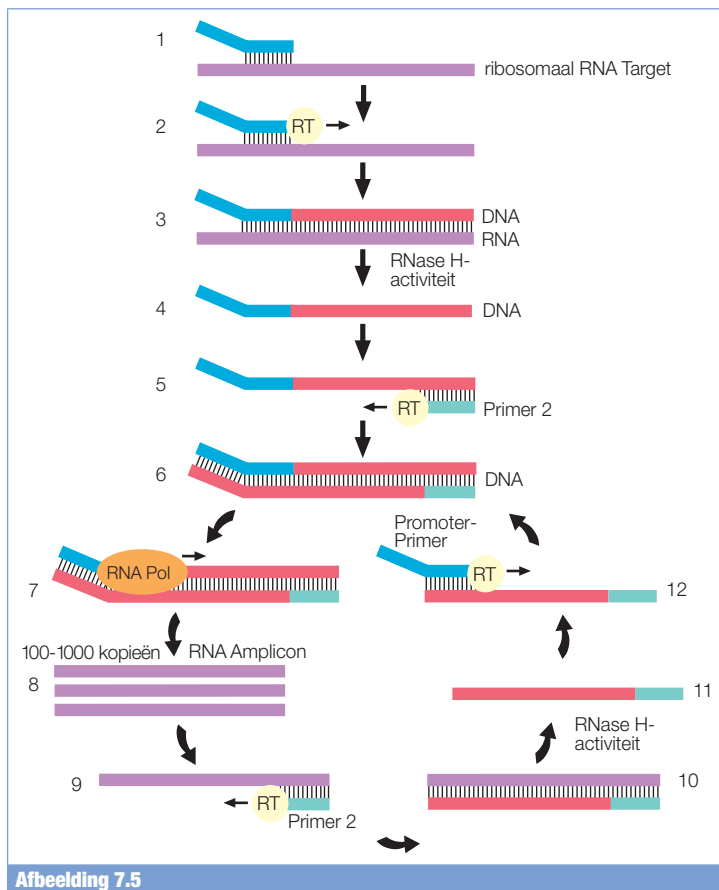
Plateaufase

- De plateaufase moet vlak zijn (dalend of stijgend kan duiden op een verkeerd bepaalde achtergrond-fluorescentie).
- De plateaufase van de amplificatiecurven moet per amplimeer even hoog zijn. Het plateau wordt bereikt wanneer amplimeren en primers met elkaar gaan concurren of wanneer er te weinig fluorochroom is om alle amplimeren te laten fluoresceren. Verschillen in plateauhoogte duiden dus op fouten in de input van reactiecomponenten, verkeerd gekozen reactiecondities of aanmaak van nevenproducten. Op gel brengen van het eindproduct kan inzicht geven in het ontstaan van nevenproducten.

Exponentiële fase (bekijken op log-schaal)

- De exponentiële fase moet recht zijn. Systematische bochten duiden op een foutieve instelling van de achtergrondcorrectie (afb. A.3B). Nevenproducten, met afwijkende efficiëntie, vervormen de curve ook.
- Hij mag niet te steil zijn. De efficiëntiewaarde kan niet boven de 2 zijn, wat overeenkomt met een helling van 0,301 (op een logaritmische fluorescentie-as). Een te hoge efficiëntie duidt op een overschatting van de achtergrondwaarde. Ook nevenproducten worden genoemd als mogelijke reden voor een schijnbare efficiëntie van hoger dan 2.
- Hij mag niet te vlak zijn. Een te flauwe helling duidt op PCR-remmers of suboptimale reactiecondities. Hoewel dit de analyse van de curven niet hoeft te verhinderen moet gecontroleerd worden of deze afwijkende efficiëntie niet incidenteel is.
- Hij moet lang zijn, om voldoende punten in de exponentiële fase te kunnen onderscheiden. Voor een goed geoptimaliseerde kwantitatieve PCR-assay is een exponentiële fase van tien cycli haalbaar. Dit geeft dan een plateau achtergrond-ratio van ongeveer drie log-schalen. Verlaging van de primer-concentratie kan helpen om de achtergrond te verlagen en zo meer bruikbare punten te krijgen.
- Die gedeelten van de amplificatiecurven die het exponentiële gedeelte representeren, moeten parallel lopen. Dit geldt wanneer de PCR-efficiëntie per amplimeer constant is. Sterk afwijkende monsters moeten worden uitgesloten van berekening van de gemiddelde PCR-efficiëntie of van de gehele analyse (afb. A.9).

Hierdoor ontstaat een cyclisch proces dat vele kopieën RNA oplevert.

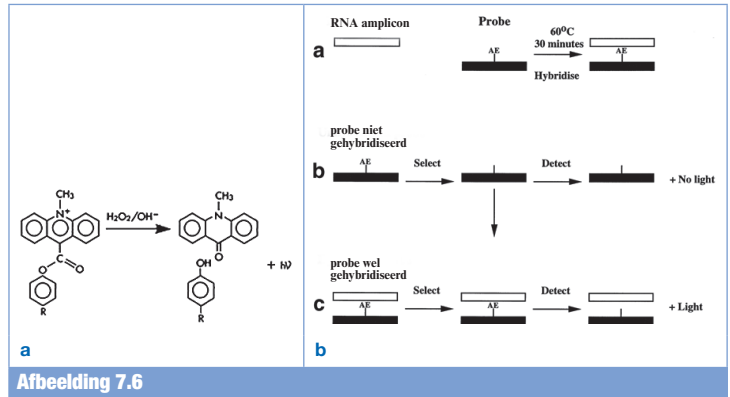


Afbeelding 7.5

Schematische weergave van de TMA-techniek.

De detectie vindt plaats d.m.v. HPA (hybridisatie beschermings-assay), een techniek die in veel isotherm amplificatiemethoden wordt toegepast (afb. 7.6). Er wordt gebruikgemaakt van een AE-gelabelde probe (AE: acridine ester) die hybridiseert aan het es-RNA amplicon. Direct hierna wordt de AE van de niet-gehybrideerde probe door hydrolyse afgekoppeld. Als laatste stap wordt een luminescentiesignaal gegenereerd door behandeling met een alkalische oplossing van H_2O_2 die de ester afsplitst onder afgifte van licht.

De TMA-technologie wordt gebruikt voor onder andere de detectie van HIV-1, HCV, Mycobacterium tuberculosis en een aantal seksueel overdraagbare pathogenen, zoals *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* en *Trichomonas vaginalis*. Dit zijn wel kwalitatieve testen, maar de verwachting is dat ook kwantitatieve testen in de toekomst in de markt worden gezet.



Afbeelding 7.6

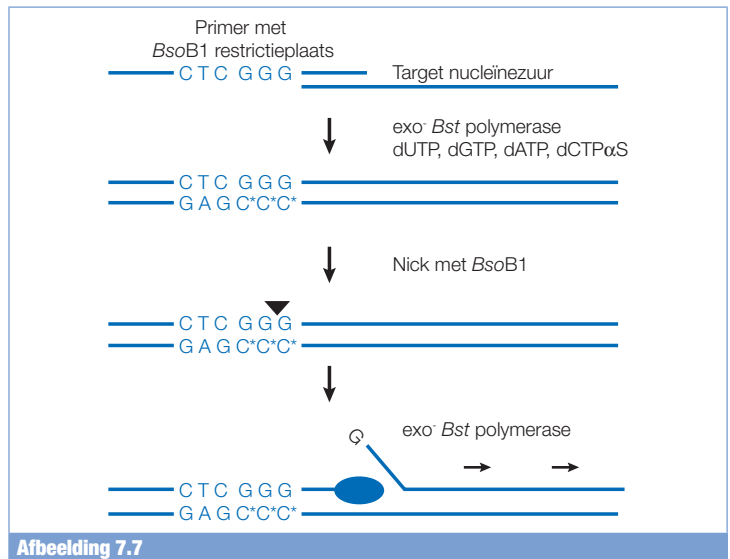
Hybridization protection assay.

a) chemiluminescentie-reactie van een acridine ester;

b) detectie van een acridine ester-gelabelde probe met een hybridisatie-protectie assay.

7.3.3 SDA (Strand Displacement Amplification)

De SDA-techniek is een isotherme DNA-amplificatietechniek die voor het eerst in 1992 door Walker en medewerkers is beschreven, als een van de vele alternatieve methoden voor de gepatenteerde PCR-techniek. Deze methode is gebaseerd op de eigenschap van DNA-polymerases om DNA-synthese te starten op een breukpunt van enkelstrengs DNA en dan vervolgens de rest van het DNA weg te duwen. Dit gebeurt door een speciaal DNA-polymerase, namelijk (exo)*Bst* DNA-polymerase dat geen exonuclease-activiteit meer bezit; dus een exonuclease deficiënt Klenow-fragment (afb. 7.7). Een primer wordt verlengd door dit enzym in



Afbeelding 7.7

De initiële stappen van de SDA-amplificatietechniek.