

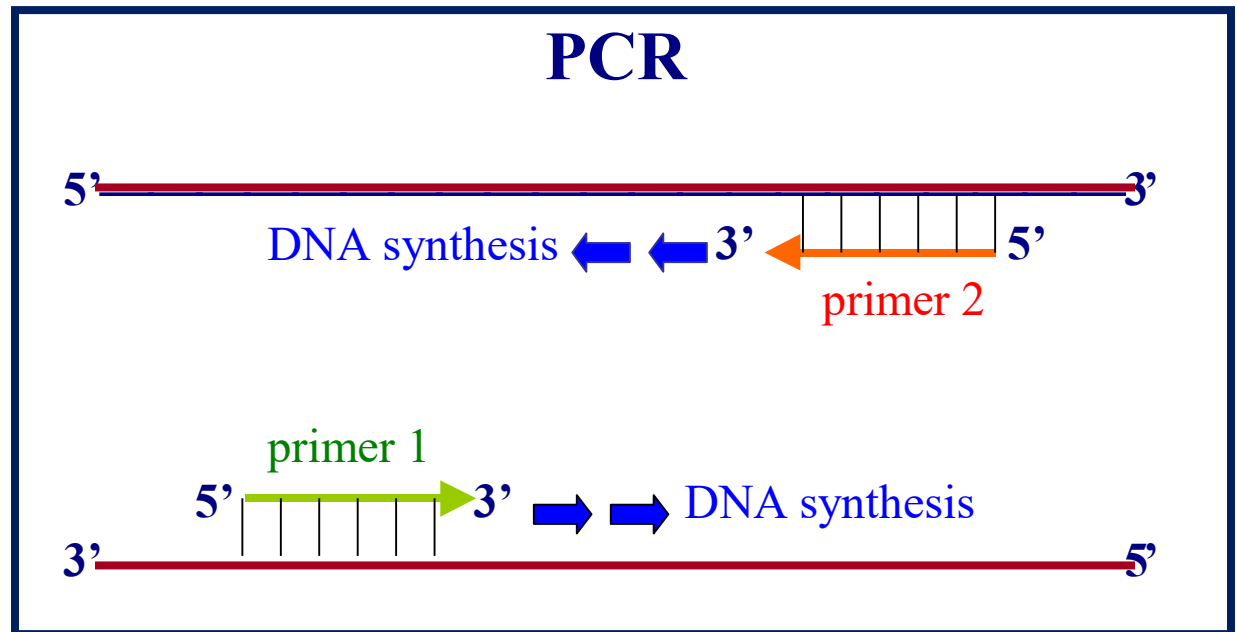
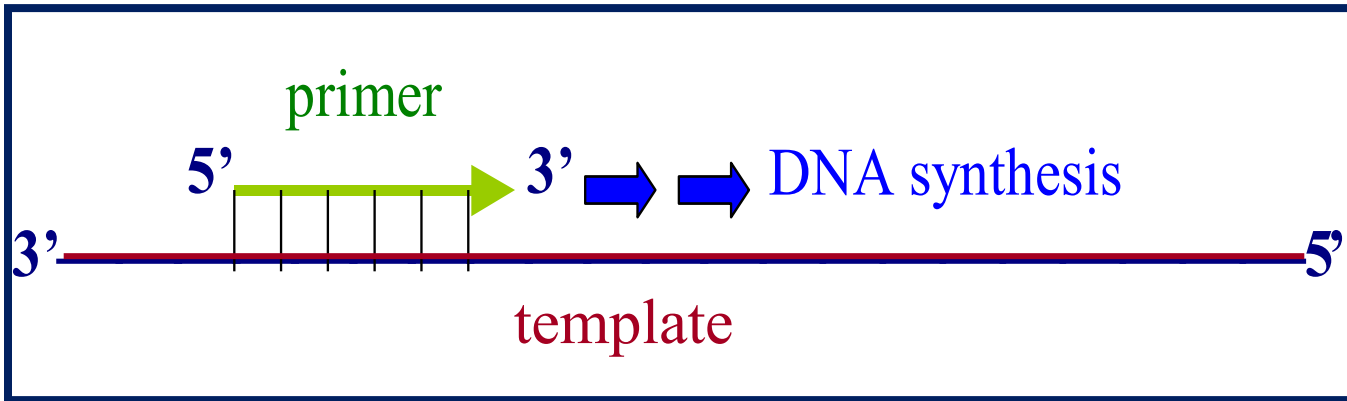
Hfst 13. DNA-replicatie in vitro

13.1. Polymerase Chain Reaction

- Polymerase Chain Reaction (**PCR**)
 - = exponentiële amplificatie van DNA in proefbuis
 - = is in staat in vitro zeer kleine hoeveelheden DNA te vermenigvuldigen voor detectie.
- Een specifieke DNA-sequentie wordt geamplificeerd wegens het gebruik van twee **primers** = oligonucleotides = korte synthetische enkelstrengige DNA-fragmenten.
- De primers worden gebruikt om DNA-synthese te starten. Voor PCR moeten de twee primers op de anti-parallelle strengen en naar elkaar toe binden.

Polymerase Chain Reaction

PRIMERS !!



PCR

1. Denaturatie

(strengscheiding): 95 °C

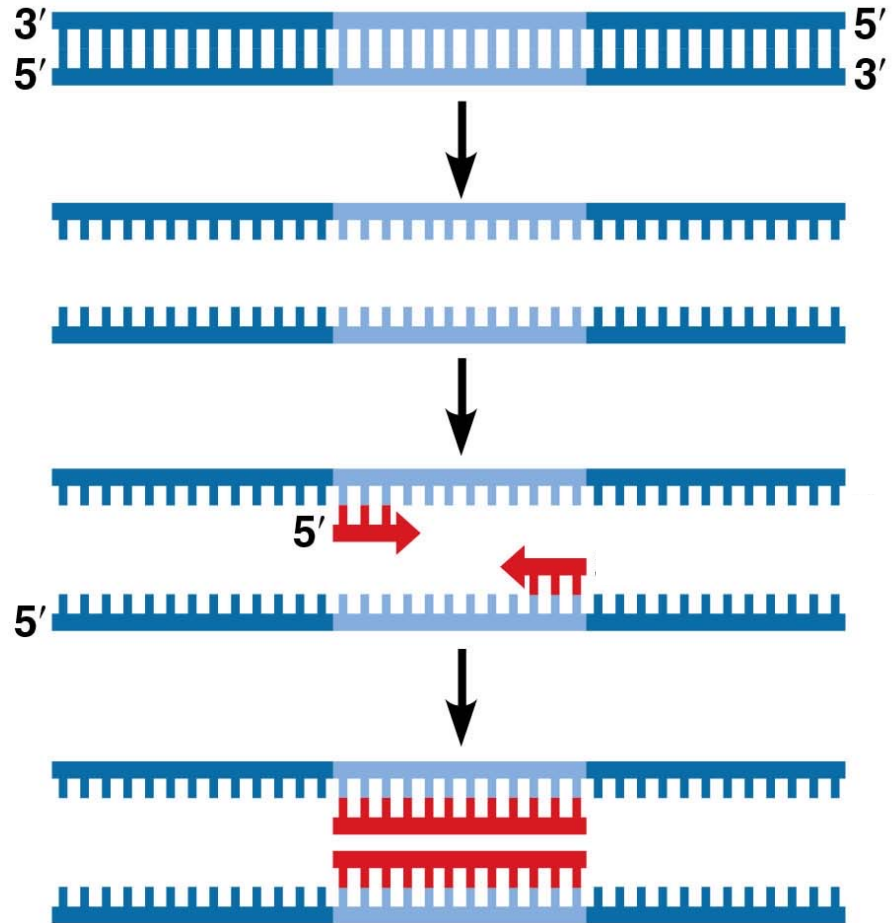
2. Primer annealing:

(40 - 60 °C)

3. Extensie

(DNA-synthese): 72 °C

30x herhalen!



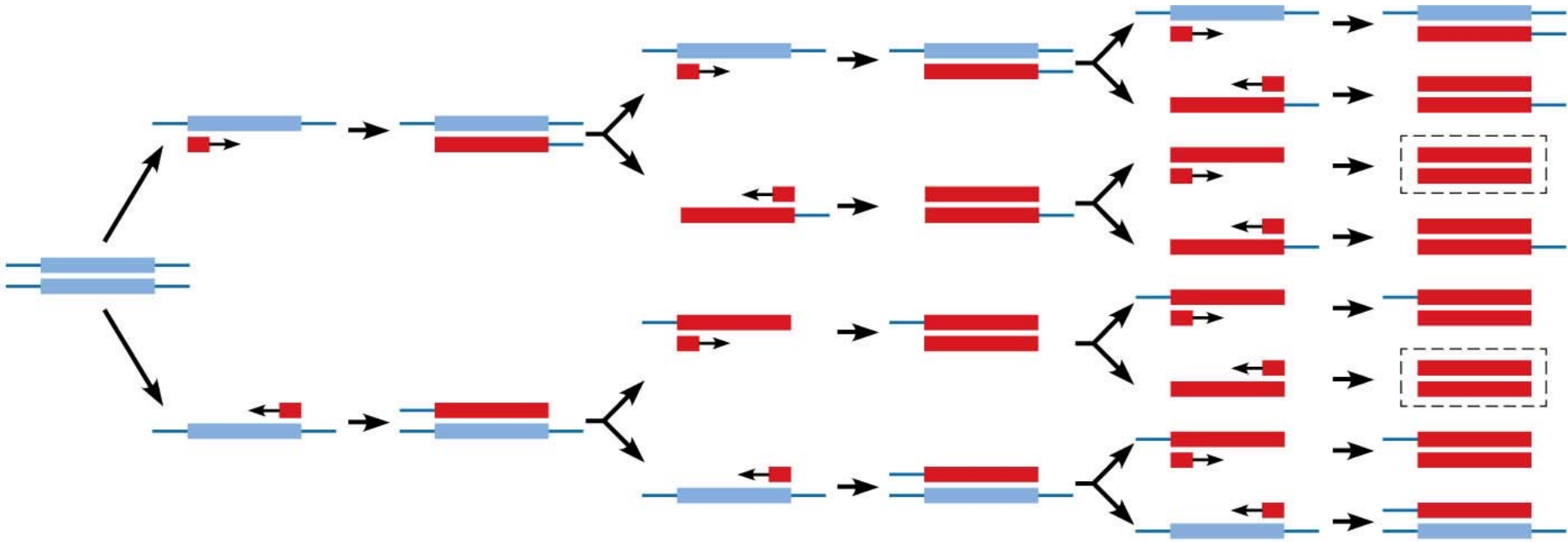
Tijdens PCR worden de primers bij elke
cyclus

A. gerecycleerd

B. afgebroken

C. ingebouwd

Polymerase Chain Reaction



<https://dnalc.cshl.edu/resources/animations/pcr.html>

<https://dnalc.cshl.edu/resources/animations/pcr-video.html>

PCR: thermocycler



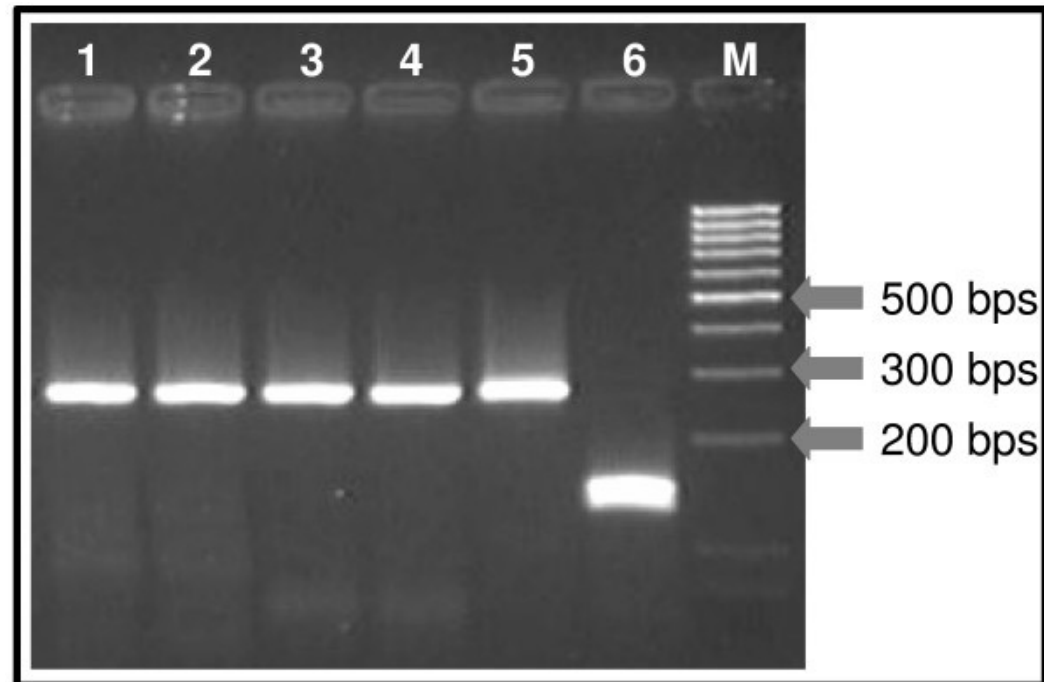
DNA-polymerase
voor PCR =

Taq-polymerase

geïsoleerd uit
thermofiele bacterie
(*Thermus aquaticus*)

Gelelektroforese

Visualisatie van banden in gel via fluorescente kleurstof: Ethidiumbromide, SYBR Green e.a.



Ontwerp twee primers voor amplificatie van deze sequentie

5' AAGCTTCCATCACTCTCAGACTTATGGAACGGTGACAAACAAGAAGACACTGAAAAAGAG 60
ATCTGAAACTAGCGCGCTAATAATAATAATAATTACTAACTAATACTGTACTTGTAG 120
TTTCATTATGTGTTTTTATTTTTTGTATTTTGTTCAAAATCCAAAGTAATATTGGATTT 180
TTGTTTGATTTTCCAAAACCCTGTTTTTGGGGTTTCATTAAAAATTACAAGTAAGTTCCTT 240
ATTTTGTAAACTATAAACTCCAAACCAAATAATTGGATACCATATTCGAACGTATCACTT 300
TATCTGCACCCCACTCTCCCTATTAATACAAAATCAATTCACCTTTTATTTTTTCTAAAGTT 360
ATATTTTTTCAAAGTTCAAATTAATTAGATTATATTAATTAGTTTTTTTAAATAAAAAT 420
TTCTGATATTCAAAAAAATATTAAGGAAAGTATTATACATTGCAATCTTTTTTACATATC 480
AATATGATGAAAAAATATATTTAAAAATATTAATCAAAACTTTTATAGTTTAATTCTAAA 540
AATGAAAAATGAAAAATATGACAATTAATAGTGAATGGGGAGAGTATCACTACTCTTTAT 600
TTTAATTTATATATATTGGTAGTGTTTAACTGAATATTAACGTAACGTTATTTTGTGTA 660
GCATAAAATTTAGGAATATAAATCTTAGGTGATTATAAATCATTTTATCAAAAAAAAAAAA 720
ACGTAAAATTGTATCATGAATTAAATTATTCTTTTAAAGTATAACTATAGGACAAACAAA 780 3'

Primer linksboven

5' AAGCTTCCATCACTCTCAGACTTATGGAACGGTGACAAA
ATCTGAAACTAGCGCGCTAATAATAATAATAATTAC
TTTCATTATGTGTTTTTATTTTTTGTATTTTGTTTCAAA
TTGTTTGATTTTCCAAAACCCTGTTTTGGGGTTTCATTA

- A. AAGCTTCCATCACTCTCAGA
- B. TTCGAAGGTAGTGAGAGTCT
- C. AGACTCTCACTACCTTCGAA
- D. TCTGAGAGTGATGGAAGCTT

Primer rechtsbeneden

ATGACAATTAATAGTGAATGGGGAGAGTATCACTACTCTTTAT	600
TGGTAGTGTTTAACTGAATATTAAACGTAACGTTATTTTGTTGA	660
TATAAATCTTAGGTGATTATAAATCATTTTATCAAAAAAAAAA	720
TGAATTAAATTATTCTTTTAAAGTATAACTATAGGACAAACAAA	780

3'

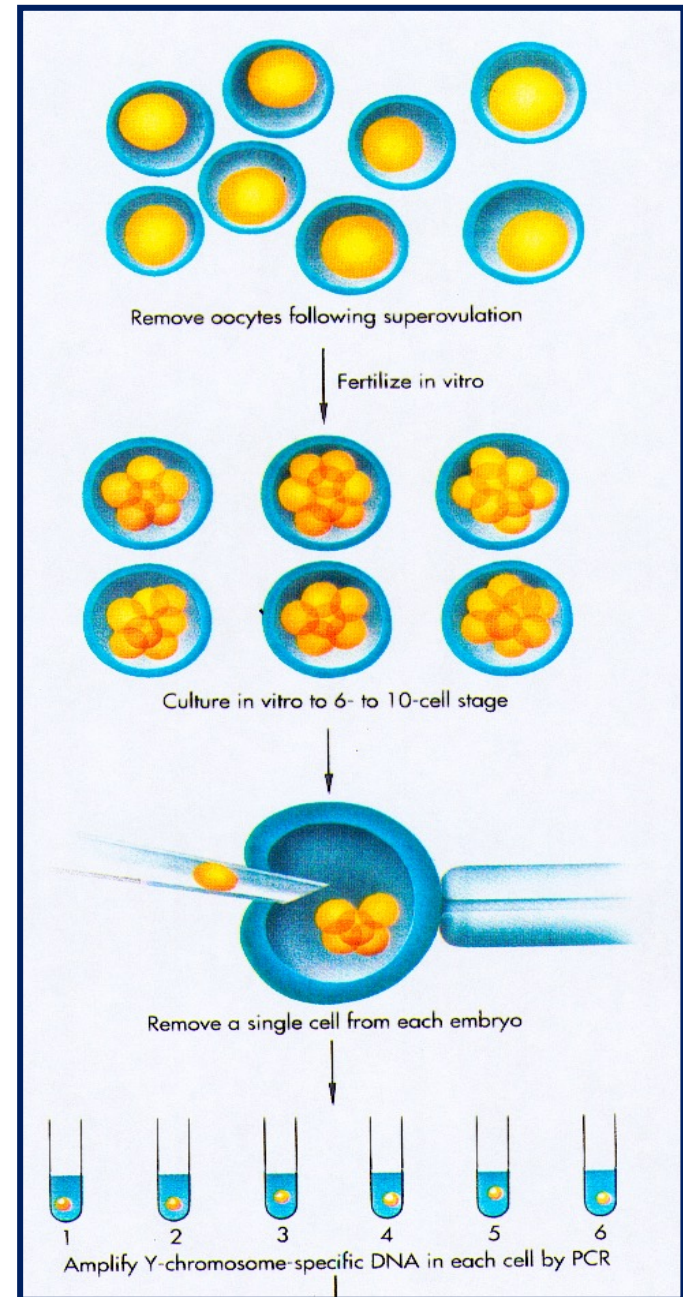
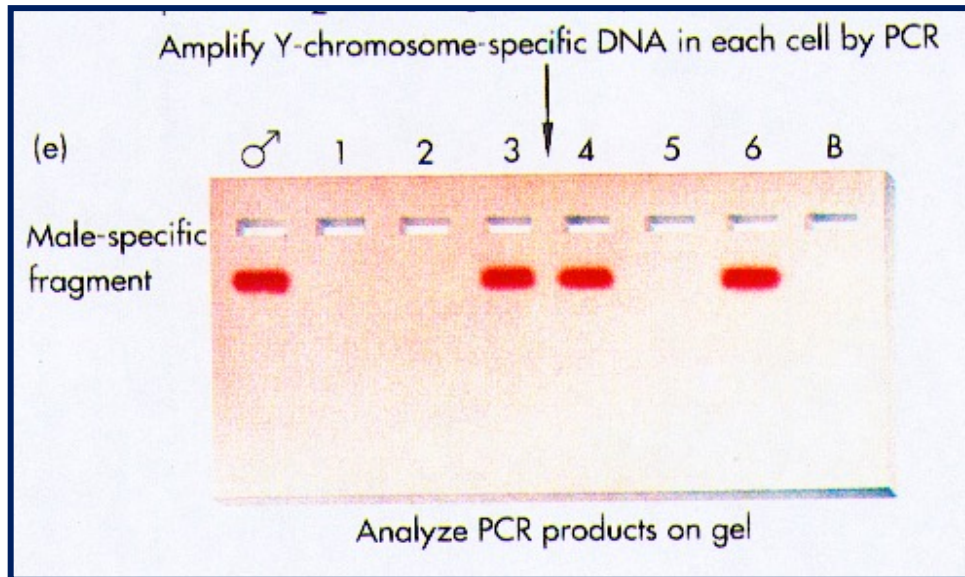
- A. ATAACTATAGGACAAACAAA
- B. TATTGATATCCTGTTTGTTT
- C. AAACAAACAGGATATCAATA
- D. TTTGTTTGTCCTATAGTTAT

Polymerase Chain Reaction

- PCR: op enkele uren een grote hoeveelheid van een specifiek stukje DNA,
analyse kan bv. via gelelektroforese.
- **Gevoeligheid** van PCR
 - = kracht van de techniek
 - = grootste probleem (vals positieve).

PCR

De gevoeligheid van PCR:
amplificatie van één DNA
molecule is mogelijk (vb.
pre-implantatiediagnose).



DNA-“vingerafdrukken”

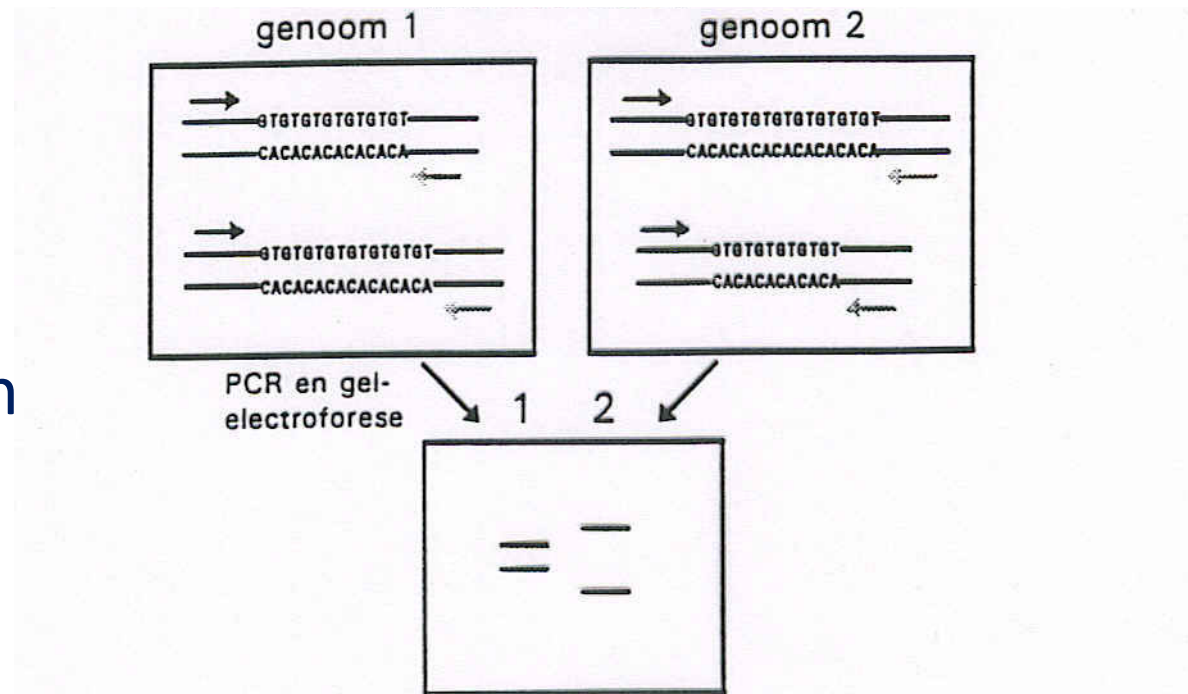
- Individueel DNA-bandenpatroon: via hypervariabele DNA-sequenties.
- VNTR: **micro-satelliet** of mini-satelliet, hypervariabel!!!
- Microsatelliet: herhaling van motief van 1-5 basen, **variatie = aantal herhalingen, te detecteren via lengteverschil van fragment na PCR.**
- Synoniemen microsatelliet:
 - SSR = simple sequence repeat
 - STR = short tandem repeat.

Microsatellietanalyse

Single locus:
2 banden.

Multilocus:
complexer patroon

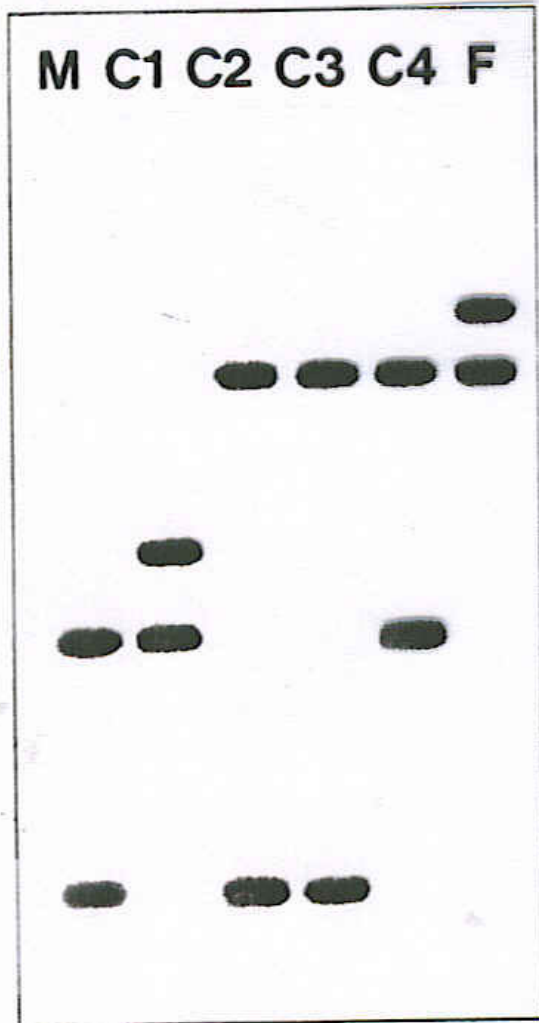
PAGE!



Figuur 11. Detectie van microsatelliet-polymorfismen via PCR

In deze figuur worden schematisch vier verschillende allelen van een microsatelliet-locus voorgesteld (slechts een klein aantal herhalingen zijn getekend, in werkelijkheid zijn er veel meer). Door expansie-contractie van het aantal herhalingen zijn microsatellieten zeer polymorf. Aangezien microsatellieten van bijvoorbeeld het type (GT)_n verspreid over het genoom voorkomen, zal een (GT)_n probe vele banden detecteren. Analyse van één bepaalde locus kan gebeuren door specifieke primers te maken voor de unieke sequenties die de microsatelliet-herhaling flankeren. De verschillende lengte van de allelen wordt dan gedetecteerd als geamplificeerde bandjes van verschillende grootte.

Vaderschapsanalyse: 1 locus is voldoende om verschil aan te tonen



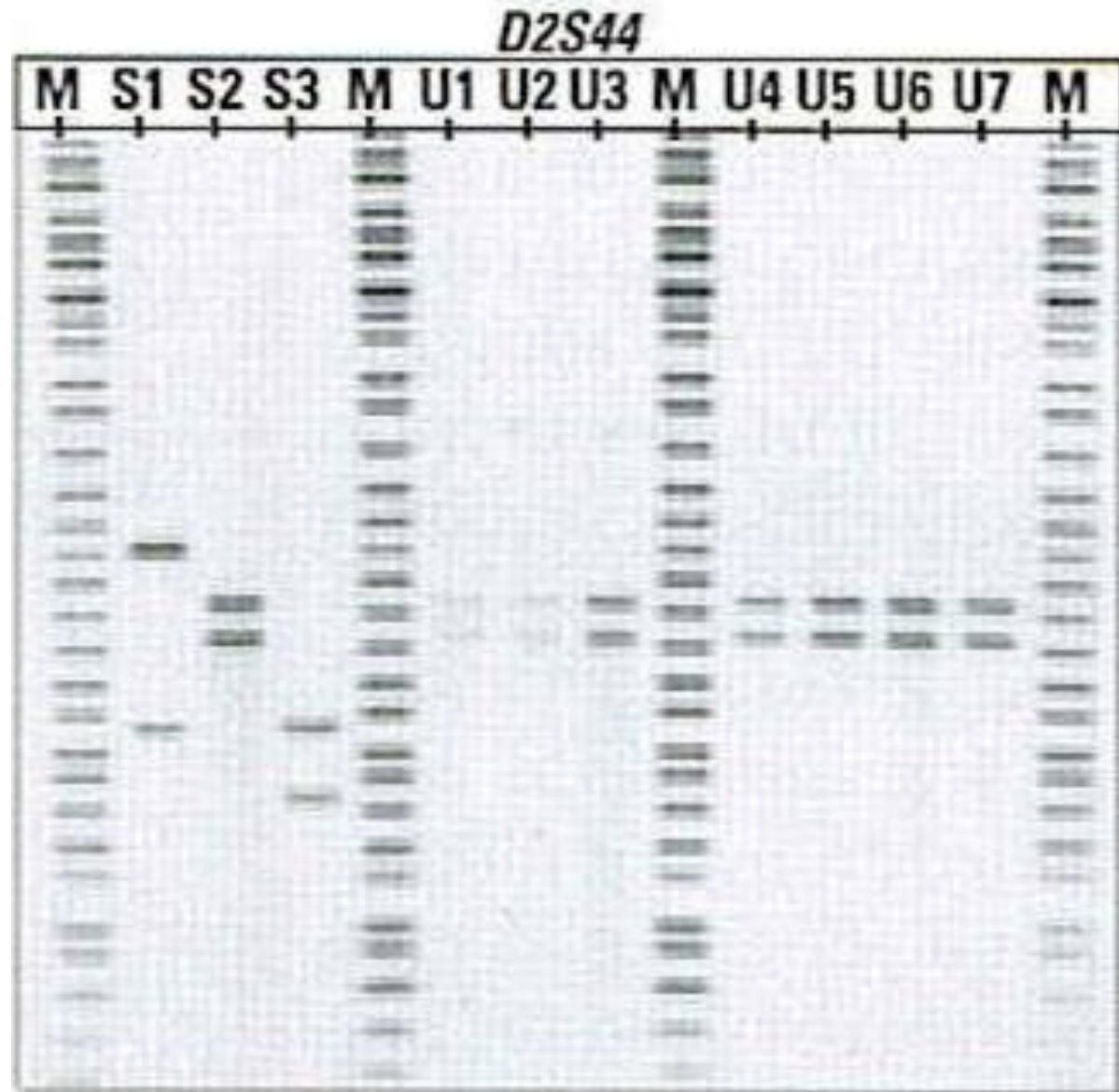
Elk kind (C) krijgt 1 allel van de moeder (M) en 1 van de vader (F).

Misdaad

Eén locus is voldoende om onschuld te bewijzen. Combinatie nodig van meerdere single locus analyses om gelijke identiteit te bewijzen.

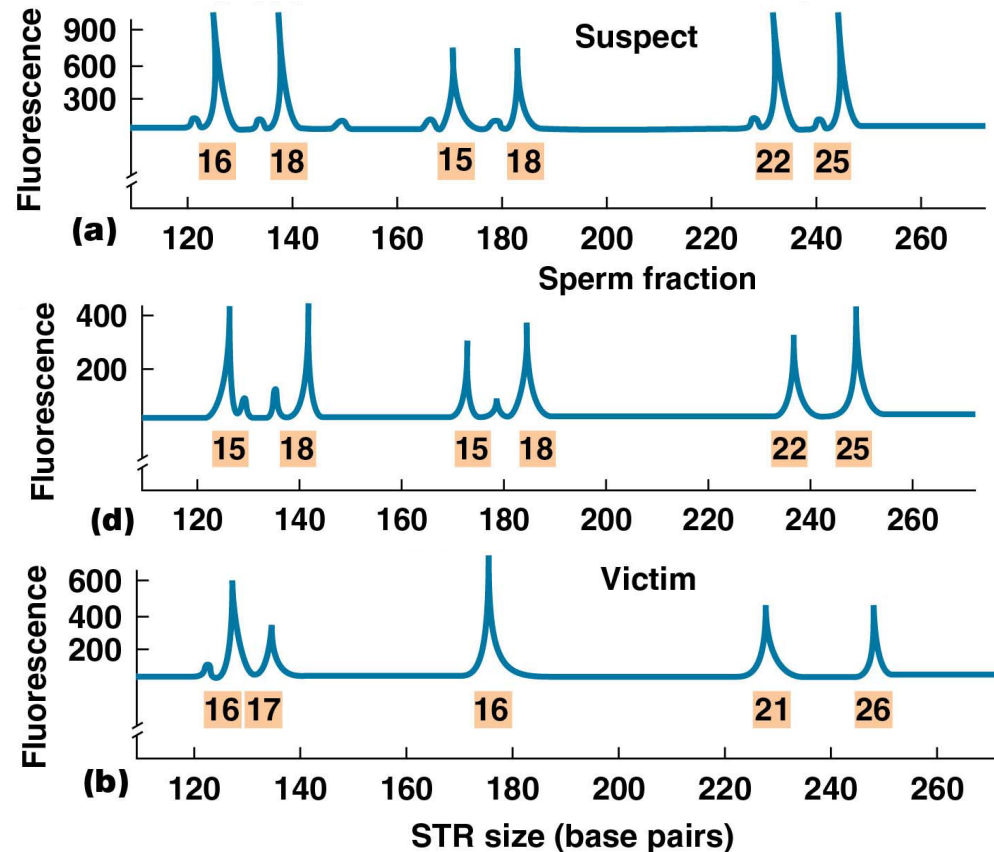
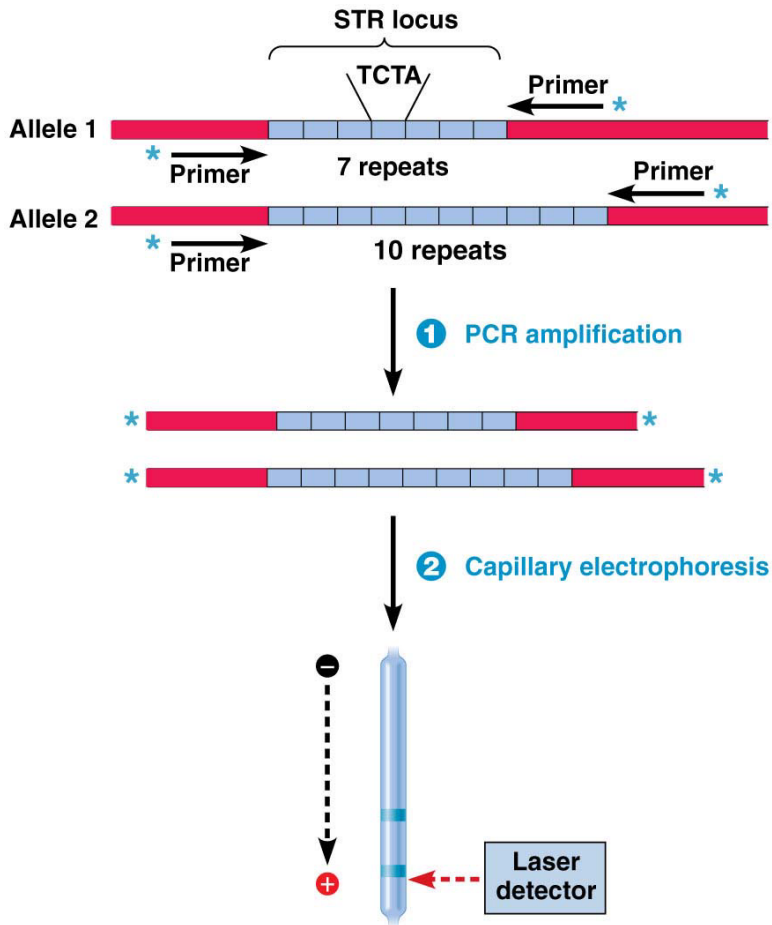
S1, S2, S3: de verdachten

U1 tot U7: spermastalen na verkrachting.



STR-analyse via capillaire elektroforese =

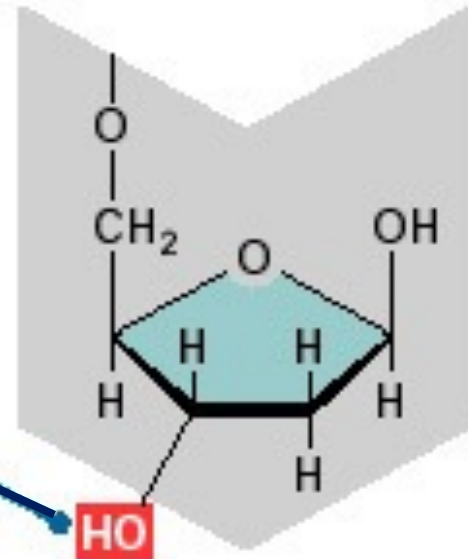
PAGE in buisje, detectie via laser, 3 loci in fig.



13.2. DNA-sequentie-analyse

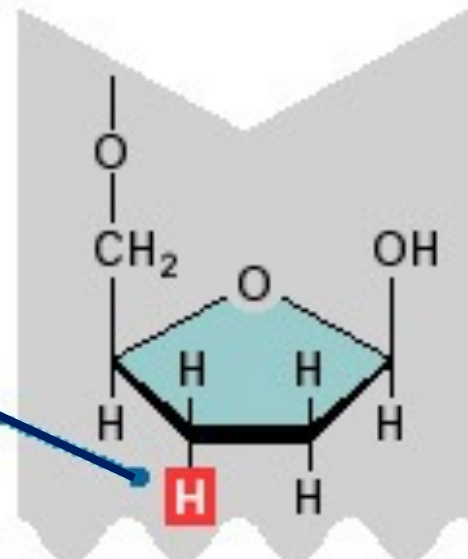
- DNA sequentie-analyse bepaalt nucleotidevolgorde in DNA.
- **Dideoxymethode** (van **Sanger**) vroeger meest gebruikt, nog steeds voor analyse van enkele DNAs.
- **Primer** (???) voor start DNA-synthese.
- Mengsel van 4 dNTPs + 4 **ddNTP** (dideoxyribosenucleotiden). Deze abnormale nucleotiden, elk met een fluorescente kleur, veroorzaken ketenterminatie.
- Resultaat = mengsel van alle mogelijke lengtes van DNA-moleculen die eindigen op een bepaalde nucleotide.
- PAGE kan deze moleculen nu scheiden volgens lengte.

- 3' OH laat DNA-elongatie toe



Deoxyribose

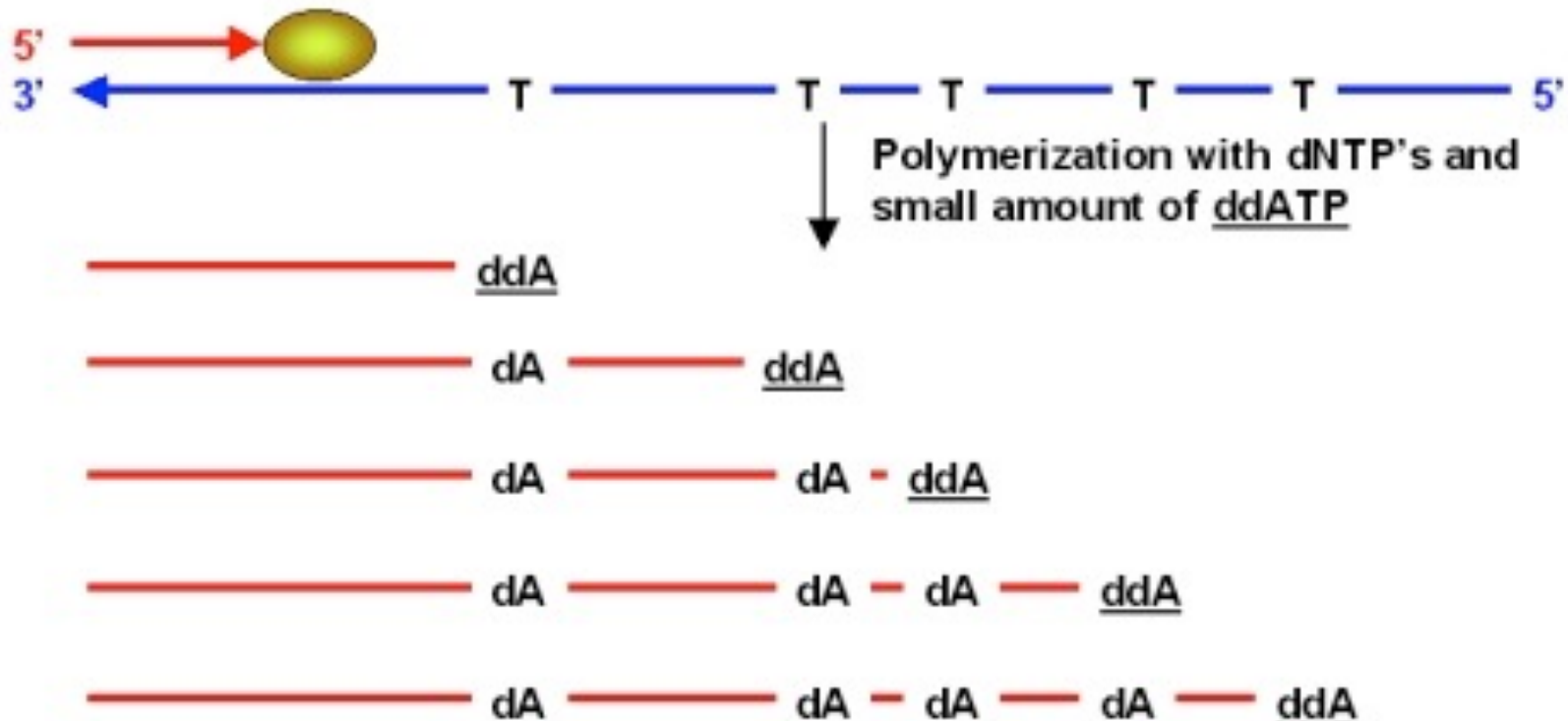
- 3'H (dideoxy) veroorzaakt ketenterminatie



Dideoxyribose

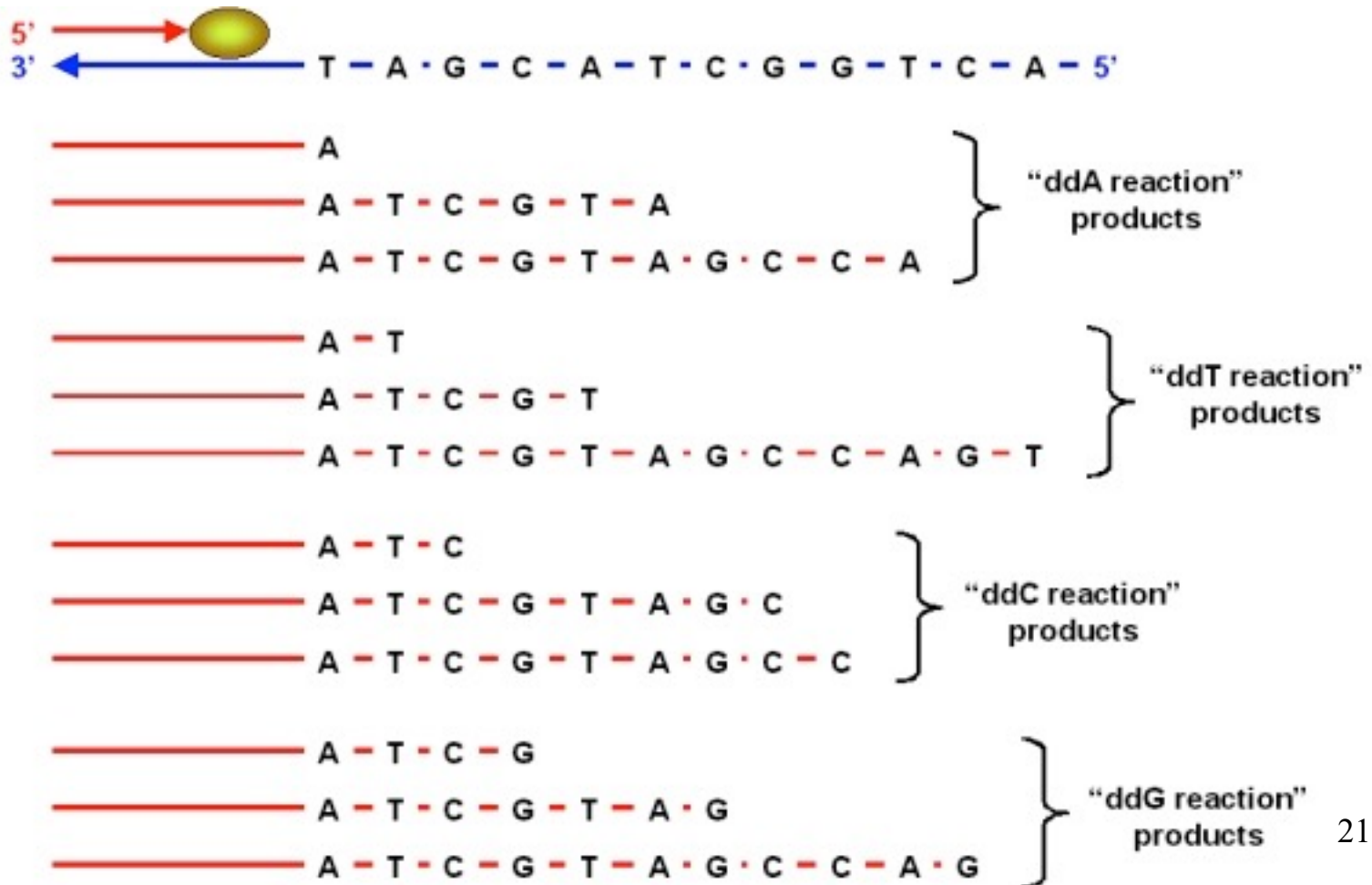
DNA-sequentie-analyse

Location of Thymine bases in DNA template

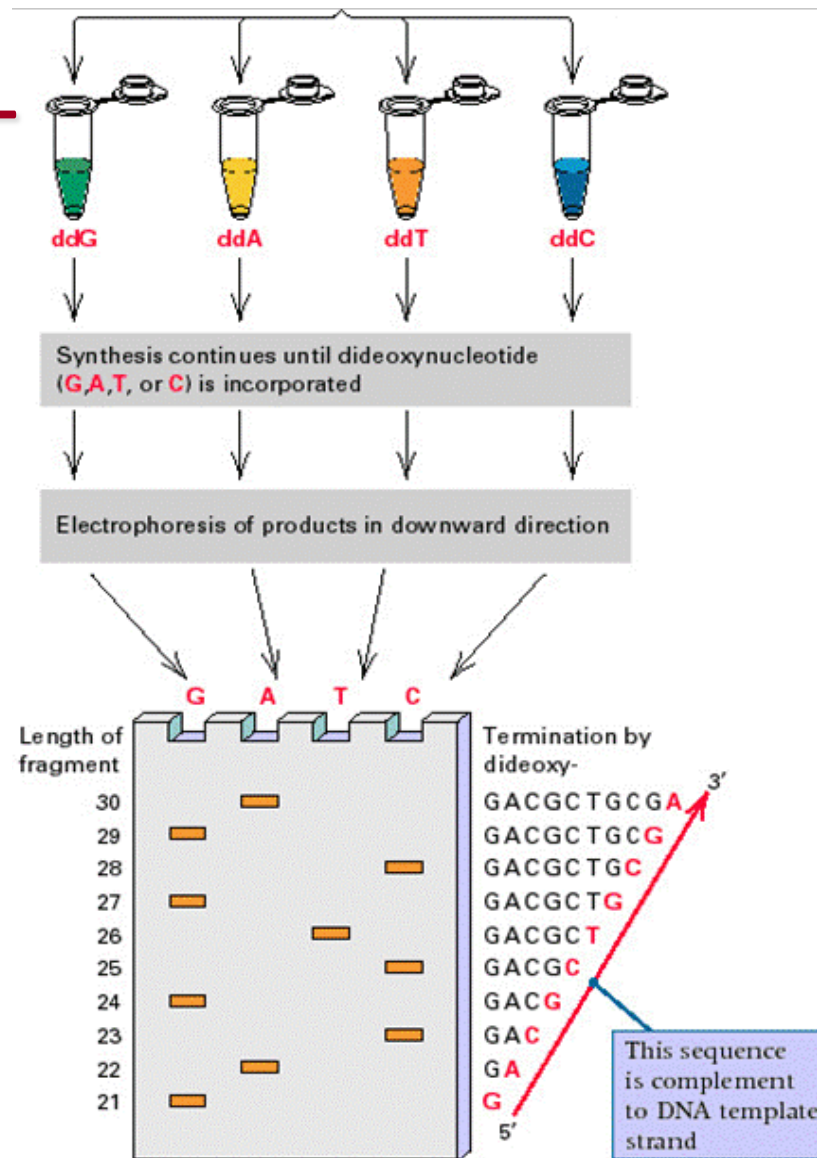


Collection of fragments of newly synthesized DNA:
They all end in ddA at locations of complementary T bases in the template

DNA-sequentie-analyse

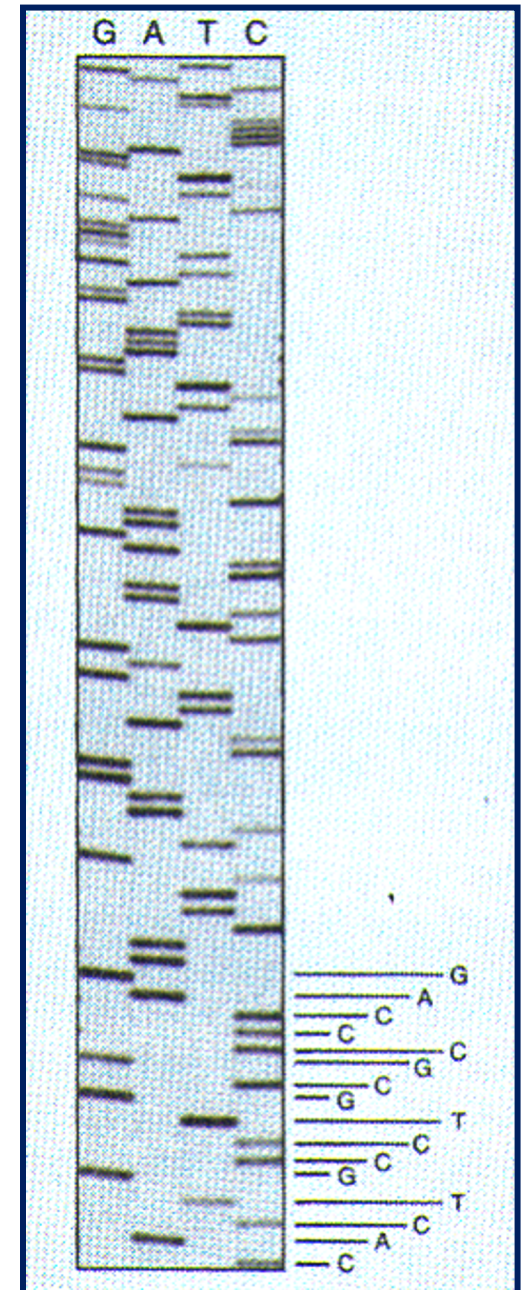


DNA-sequencing-analyse



Radioactieve merking

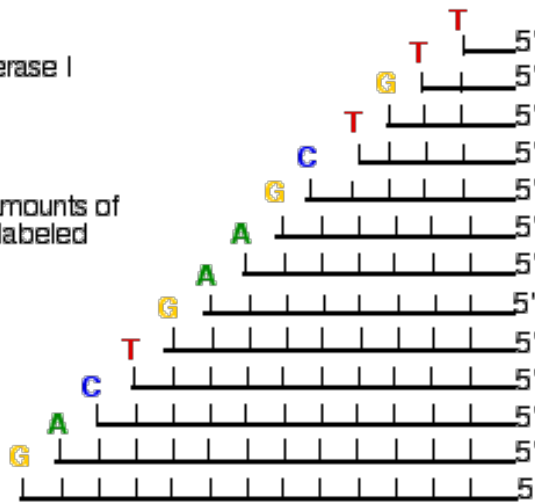
- Initieel P^{32} inbouw, detectie via gevoelige film.
- DNA-sequentie aflezen 5' -to-3' vanaf onderkant van gel.
- Elke volgende band is 1 base langer dan de band eronder op het gel.
- Identiteit basen wordt afgeleid uit gellaan.



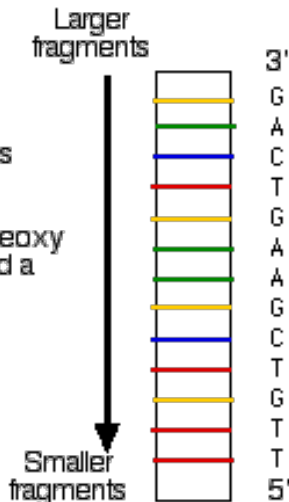
<https://dnlc.cshl.edu/resources/animations/cycseq-video.html>

Fluorescent merking

Add:
 DNA polymerase I
 dATP
 dGTP
 dCTP
 dTTP
 plus limiting amounts of
 fluorescently labeled
 ddATP
 ddGTP
 ddCTP
 ddTTP



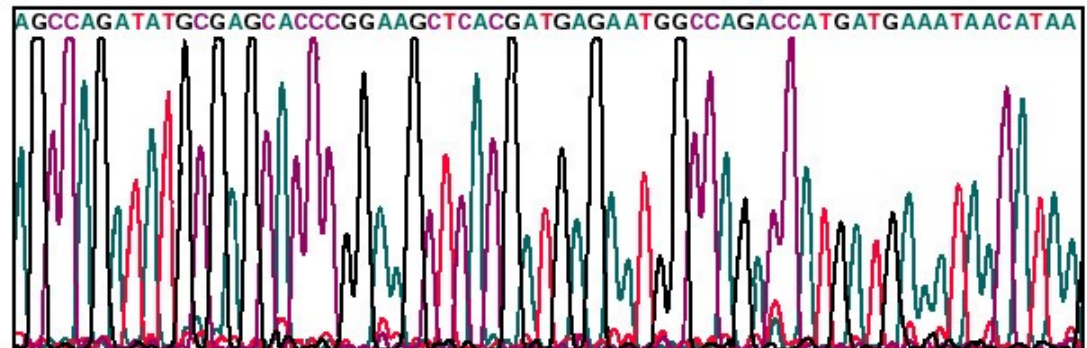
Electrophoresis
 using laser to
 activate the
 fluorescent dideoxy
 nucleotides and a
 detector to
 distinguish the
 colors



So the
 sequence
 of the
 template
 strand is

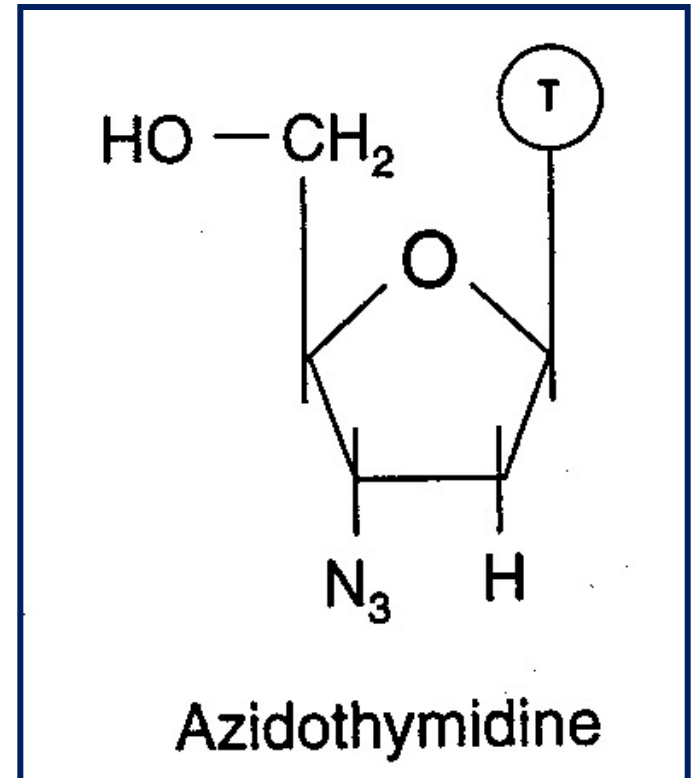
5' C T G A C T T C G A C A A 3'

- Automatische sequentie-analyse via fluorescente ddNTPs.
- 4 reacties op 1 laan, laser + info rechtstreeks naar computer.



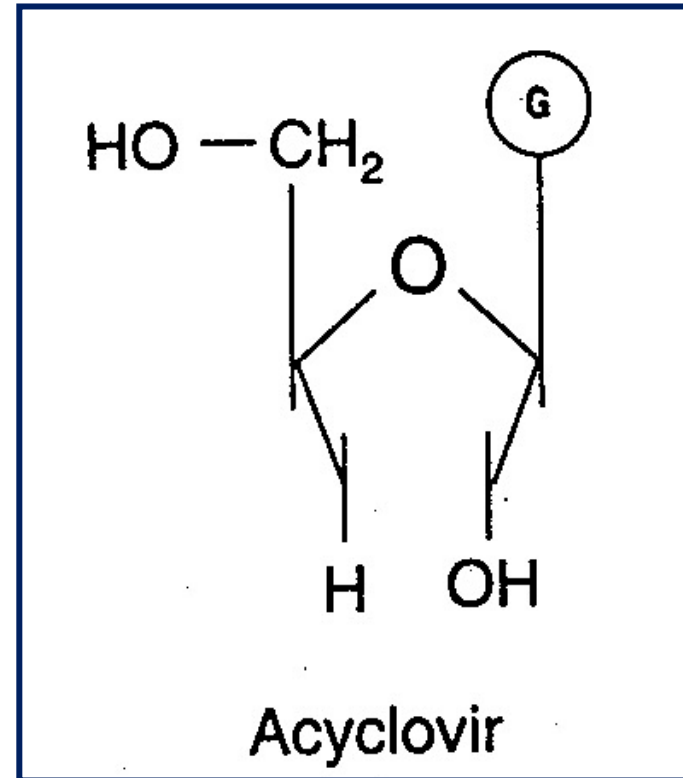
Ketenterminators in geneeskunde

AZT: ketenterminator die efficiënt als bouwsteen gebruikt wordt door het reverse transcriptase van het HIV-virus, veel minder door normale DNA- polymerase van de cel.



Ketenterminators in geneeskunde

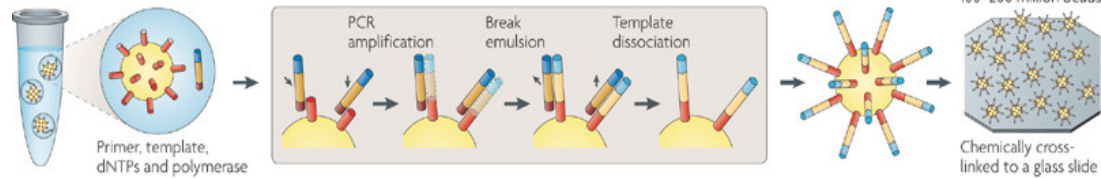
Acyclovir: ketenterminator die niet door cellulaire kinasen maar wel door het virale Herpes simplex thymidine kinase (tk) gefosforyleerd wordt, waarna het in DNA kan ingebouwd worden.



Next generation sequencing: veel tegelijk, geen gel.

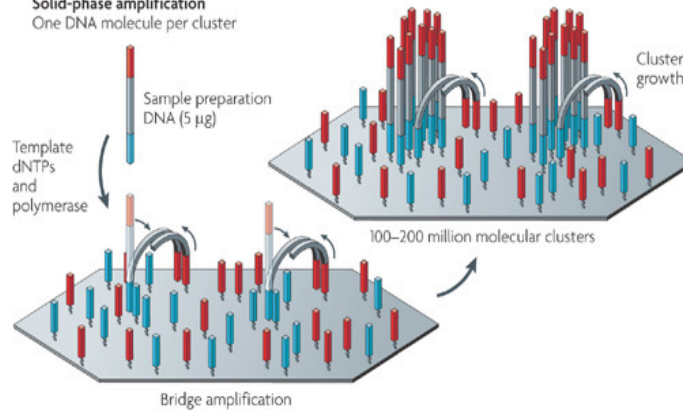
a Roche/454, Life/APG, Polonator Emulsion PCR

One DNA molecule per bead. Clonal amplification to thousands of copies occurs in microreactors in an emulsion



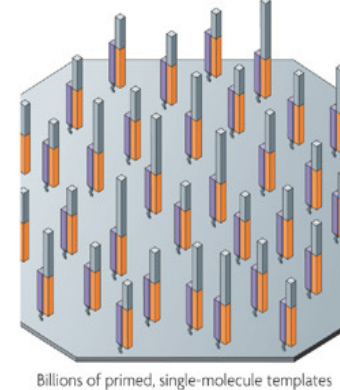
b Illumina/Solexa Solid-phase amplification

One DNA molecule per cluster



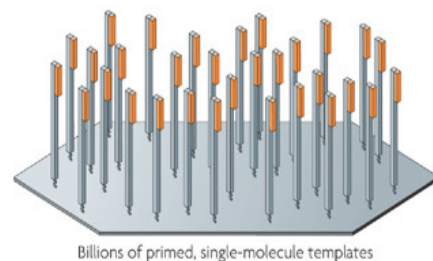
c Helicos BioSciences: one-pass sequencing

Single molecule: primer immobilized



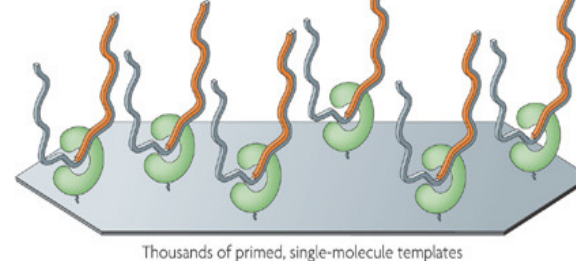
d Helicos BioSciences: two-pass sequencing

Single molecule: template immobilized



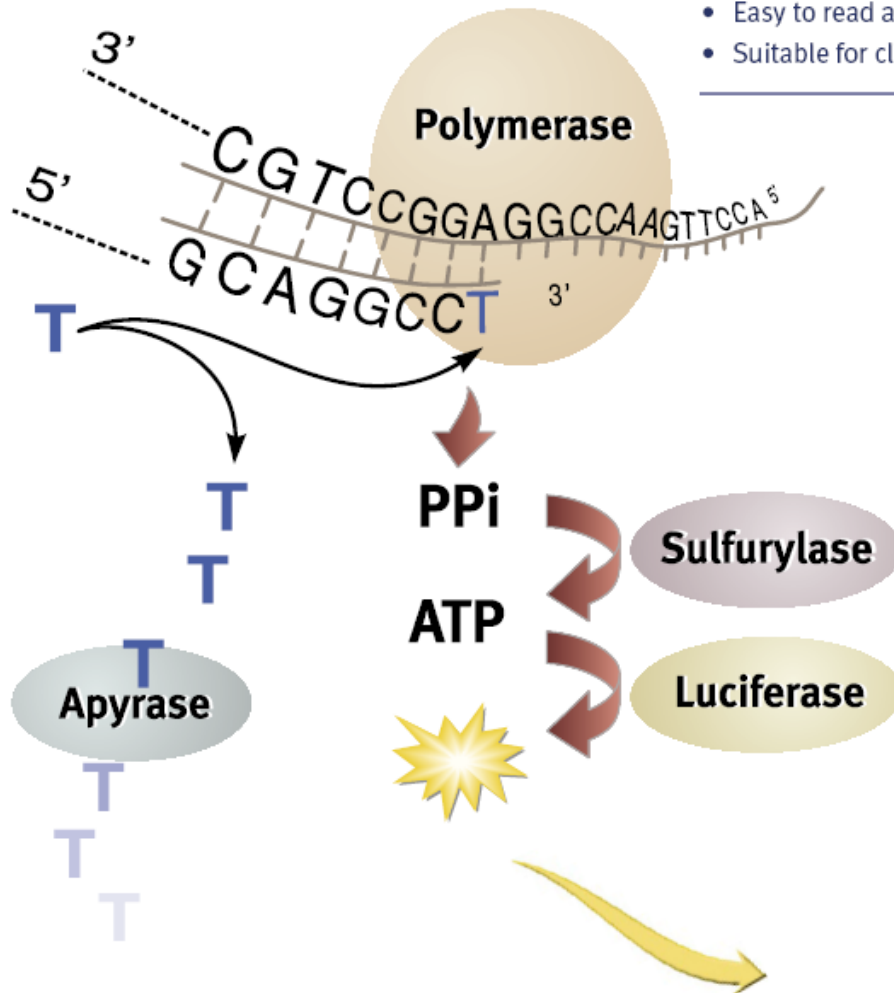
e Pacific Biosciences, Life/Visigen, LI-COR Biosciences

Single molecule: polymerase immobilized



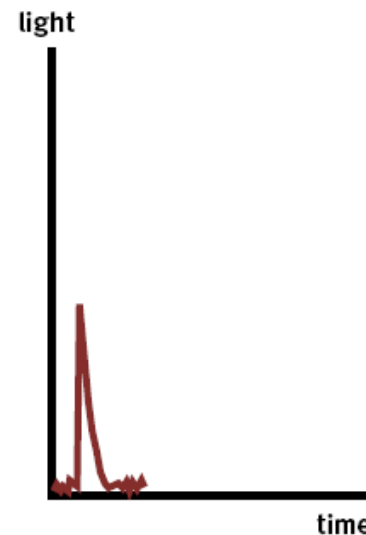
Pyrosequencing

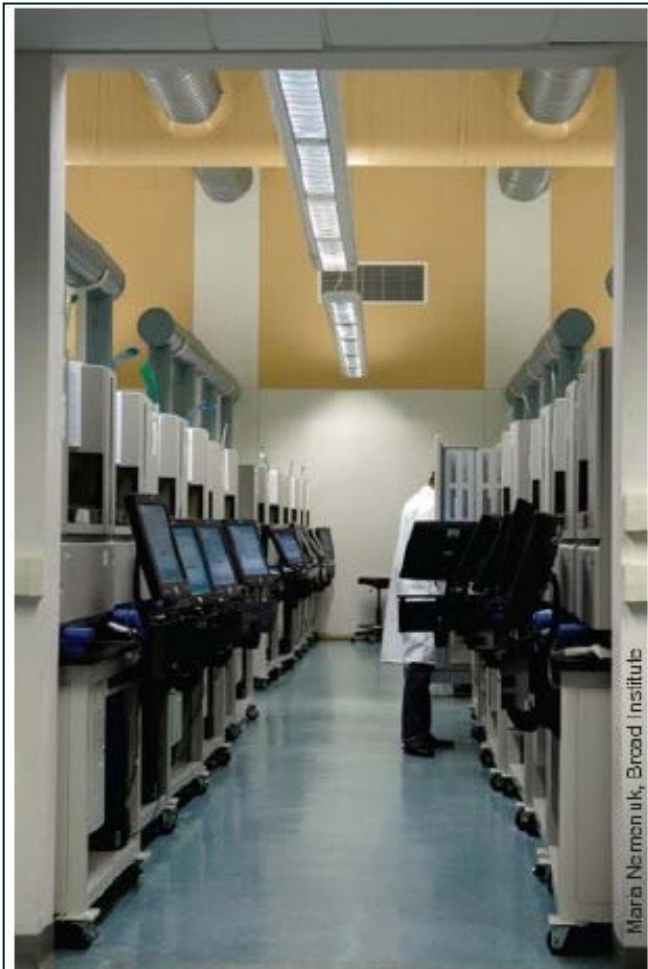
- True sequence information
- Fully quantitative genotyping
- Easy to read and share
- Suitable for clinical research



454 methode (Roche)

Enkel als dNTP past, wordt licht geproduceerd, achtereenvolgens worden de verschillende basen getest en afgebroken.





Sequencing centers producing the Sanger sequence data for mammalian genome projects are factory-like outfits with a large number of personnel.

<- dideoxy: 250 Kb/run (1000€ / Mb)

**Nieuwe generatie-
sequentietechnologie ↓**



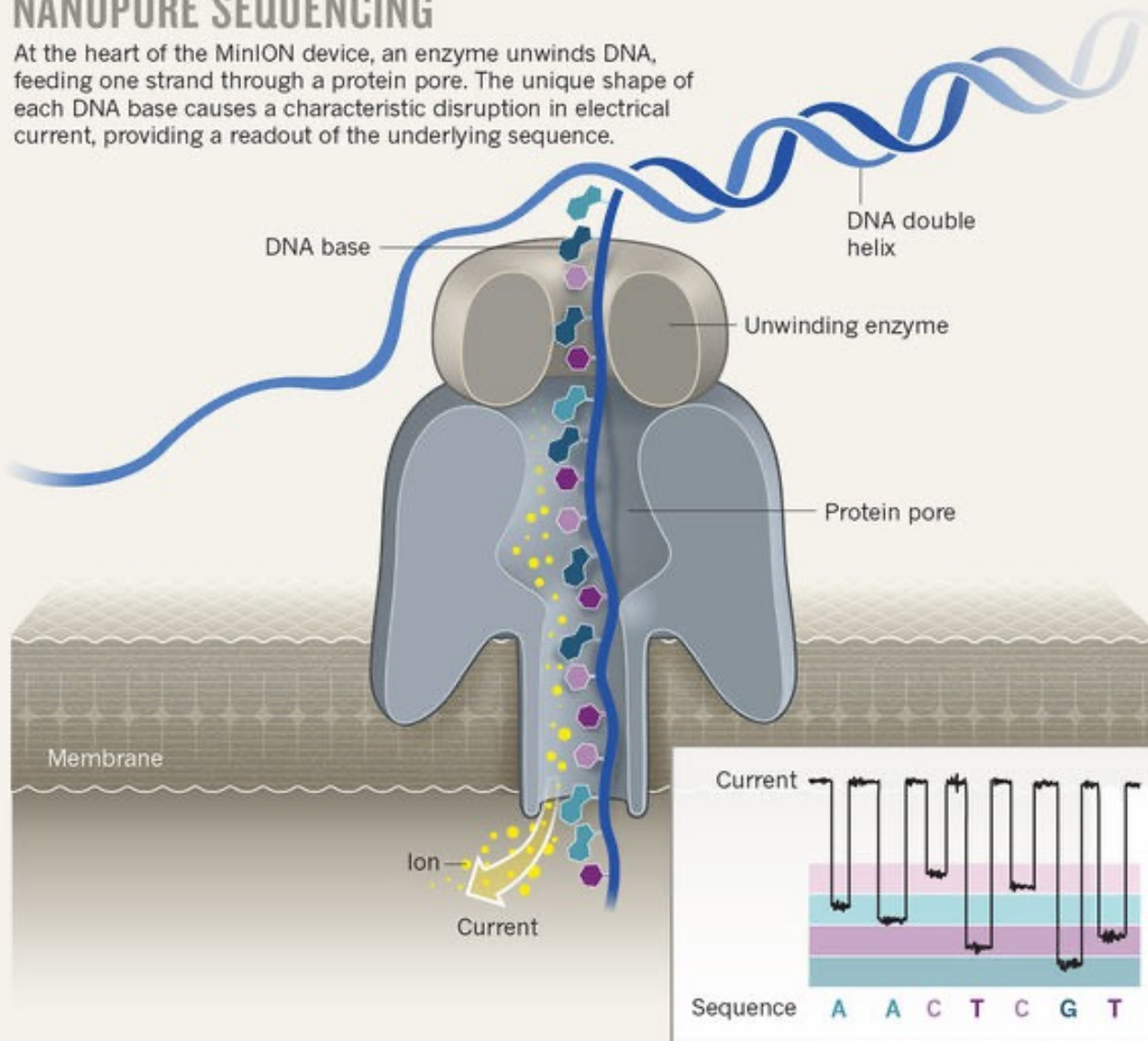
The latest next-generation sequencing instruments can generate as much data in 24 h as several hundred Sanger-type DNA capillary sequencers, but are operated by a single person.

Roche (454-methode): 500 Mb /run (50€/Mb)

Illumina :10.000 Mb/run (0,5€/Mb)

NANOPORE SEQUENCING

At the heart of the MinION device, an enzyme unwinds DNA, feeding one strand through a protein pore. The unique shape of each DNA base causes a characteristic disruption in electrical current, providing a readout of the underlying sequence.



13.3. DNA-analyse en ethiek

- Via micro-arrays (chips) kan je je DNA laten analyseren op bepaalde eigenschappen.
- DNA sequentie-analyse wordt steeds goedkoper. Het is nu al betaalbaar om je eigen genoom te laten sequencen.
- Wat is nuttig? Aanvaardbaar?

Wie mag toegang krijgen tot mijn DNA-gegevens?

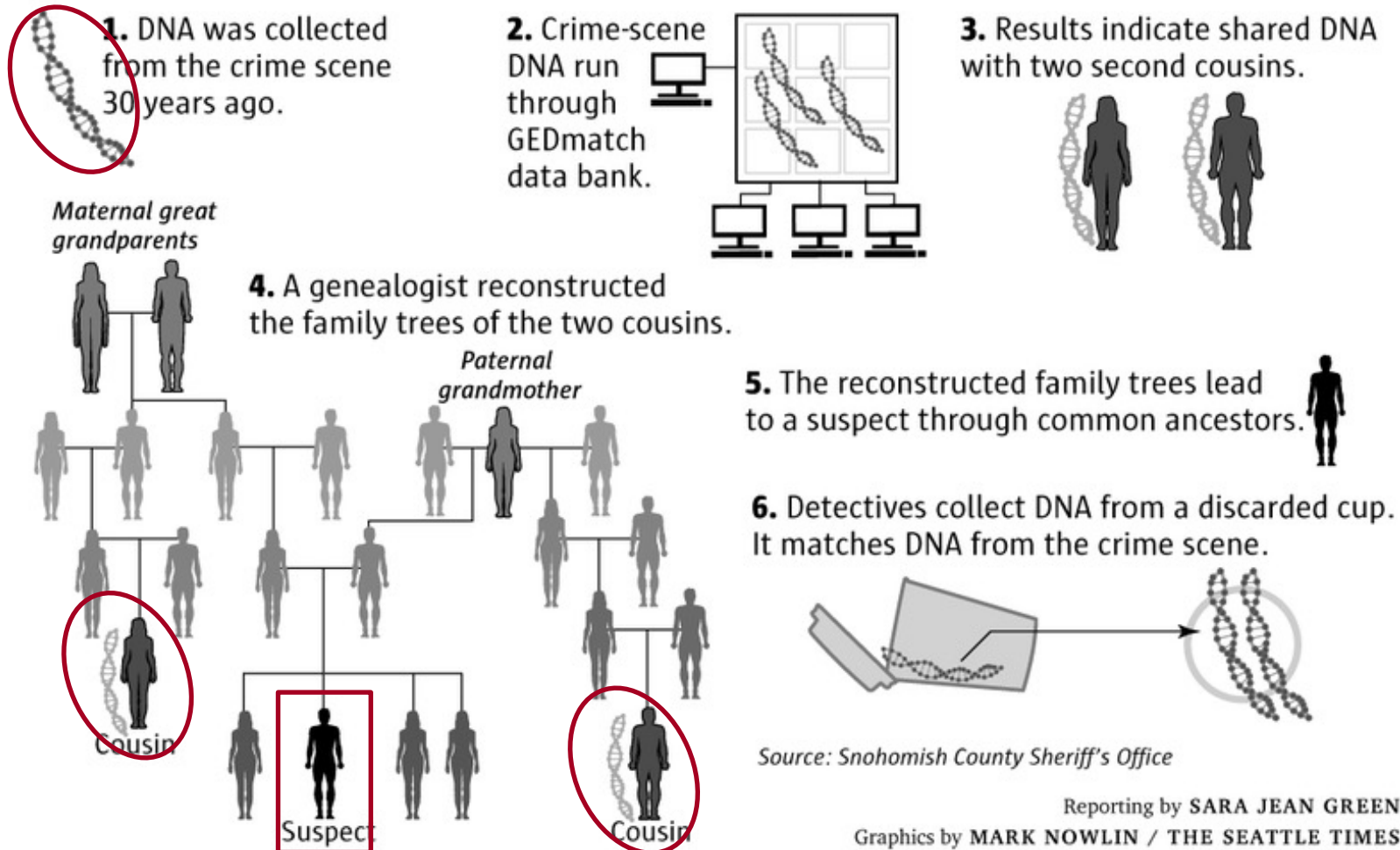
1. Enkel ikzelf
2. Dokter
3. Familie
4. Politie
5. Werkgever
6. Iedereen

Ik wil mijn genoom kennen om

- A. Mijn afkomst. (voorouders) te kennen
- B. Te weten welke erfelijke ziekten/defecten ik mogelijks heb.
- C. Te weten welke talenten ik heb.
- D. Alles te weten over mezelf.

Seriemoordenaar gevonden via neef&nicht

DNA, reverse genealogy used to catch alleged cold-case killer



Je bent zwanger, wil je het DNA van je
foetus laten testen?

A. Ja

B. Neen

Nip-test: niet invasieve prenatale test

De Nip-test spoort niet alleen down op bij baby's, maar verraaft ook veel over de genen van de moeder. 'Er is een stille verschuiving aan de gang naar een brede genetische analyse.'

Nip-test screent ook moeder op genetische defecten

Nip-test verraaft of
moeder draagster van
Duchenne is

Lees verder onderaan



Vooraf aan implantatie kunnen in vitro embryo's getest worden om enkel de beste in te planten.

Vind je dit een goeie strategie?

A. Ja

B. Neen

3. DNA-analyse en ethiek

- DNA sequentie-analyse steeds goedkoper. Betaalbaar om je eigen genoom te laten sequencen.
- Kennis DNA-verschillen --> bepaalde fenotypes breidt uit.
- Wil je de “defecten” in je DNA wel weten? Waarom wel/niet?
- Nu al worden embryo's voor implantatie gescreend om alleen de “beste” in te planten. Nu enkel voor zware (?) afwijkingen, maar wat als dat uitgebreid wordt?
- Bij misdaadanalyse vergelijkt men nu stalen van de plaats van de misdaad met stalen in de databank van eerdere misdaden. Software om op basis van DNA te voorspellen hoe iemand er uit ziet (gezichtsvorm huidkleur, leeftijd) wordt steeds beter.

Ontwerp twee primers

5'

AAGCTTCCATCACTCTCAGACTTATGGAACGGTGACAAACAAGAAGACACTGAAAAAGAG	60
ATCTGAAACTAGCGCGCTAATAATAATAATAATTACTAACTAATACTGTACTTGTAG	120
TTTCATTATGTGTTTTTATTTTTTGTATTTTGTTCAAAATCCAAAGTAATATTGGATTT	180
TTGTTTGATTTTCCAAAACCCTGTTTTTGGGGTTTCATTAAAAATTACAAGTAAGTTCCTT	240
ATTTTGTAAACTATAAACTCCAAACCAAATAATTGGATACCATATTCGAACGTATCACTT	300
TATCTGCACCCCACTCTCCCTATTAATACAAAATCAATTCACCTTTTATTTTTCTAAAGTT	360
ATATTTTTCAAAGTTCAAATTAATTAGATTATATTAATTAGTTTTTTAAATAAAAAT	420
TTCTGATATTCAAAAAAATATTAAGGAAAGTATTATACATTGCAATCTTTTTTACATATC	480
AATATGATGAAAAAATATATTTAAAAATATTAATCAAACCTTTTATAGTTTAATTCTAAA	540
AATGAAAAATGAAAAATATGACAATTAATAGTGAATGGGGAGAGTATCACTACTCTTTAT	600
TTTAATTTATATATATTGGTAGTGTTTAACTGAATATTAACGTAACGTTATTTTGTGGA	660
GCATAAAATTTAGGAATATAAATCTTAGGTGATTATAAATCATTTTATCAAAAAAAAAAA	720
ACGTAAAATTGTATCATGAATTAAATTATTCTTTTAAAGTATAACTATAGGACAAACAAA	780

3'

- Primer 1 (forward) = AAGCTTCCATCACTCTCAGA
 - Primer 2 (reverse) = TTTGTTTGTCTTATAGTTAT
- (in praktijk niet goed want teveel AT, te weinig GC bp)