

Helping to make a difference

Research models
Diets & bedding
Technical services
Biological products & services
Project management
Containment solutions

Door te blijven luisteren naar uw wensen, zijn wij in staat onze producten & diensten voortdurend te innoveren en verbeteren.

Biologische Producten & Diensten

Samen met andere Harlan ondernemingen produceren wij een groot aantal hoogwaardige serum, plasma en andere bloedproducten voor celkweek en andere laboratorium procedures. Wij gebruiken hiervoor laboratorium-proefdieren uit eigen Harlan productie units welke constant onder microbiologische bewaking staan. Hierdoor kunnen wij een minimale variatie van geleverde batches garanderen.

Harlan

www.harlaneurope.com

Access to excellence

Alles wat u altijd al wilde weten maar nooit durfde te vragen over de PCR

Departement Dier, Wetenschap en Maatschappij, Faculteit
Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht
j.m.baars@uu.nl & m.c.laarakker@uu.nl

Veel lezers van *Biotechniek* zullen wel eens weefsel hebben afgenomen bij transgene muizen of ratten zodat de onderzoekers hiermee een PCR kunnen doen. Het gaat hierbij meestal om een stukje staart of oor, waarbij het voordeel van de oorknip is dat de dieren dan ook meteen gemarkeerd zijn. De PCR speelt vooral in genetisch onderzoek een belangrijke rol maar ook op andere vakgebieden wordt deze techniek regelmatig toegepast. Zo valt te denken aan het opsporen van infectieziekten bij proefdieren. Ook in de forensische wetenschap is het een veelgebruikte techniek.

Het weefsel wordt opgevangen in een epje, voorzien van de naam van de muis en verdwijnt dan het lab in en is uit het zicht van de diervverzorgers en biotechnici. Heeft u zichzelf wel eens de vraag gesteld 'Wat gebeurt er nou eigenlijk precies in dat lab?' Dan is onderstaand verhaal zeker de moeite waard.

PCR staat voor Polymerase Chain Reaction (Polymerase Ketting Reactie). Deze techniek wordt onder andere gebruikt om kleine hoeveelheden van een specifiek stuk DNA een groot aantal keren te vermeerderen. Vaak kun je maar een klein beetje DNA uit een weefsel isoleren.

Voor verder onderzoek heb je voor analyses van het DNA meer materiaal nodig. Met PCR laat je het kleine beetje DNA zichzelf vermenigvuldigen tot een grotere hoeveelheid waarmee je bijvoorbeeld transgene muizen kunt genotypen.

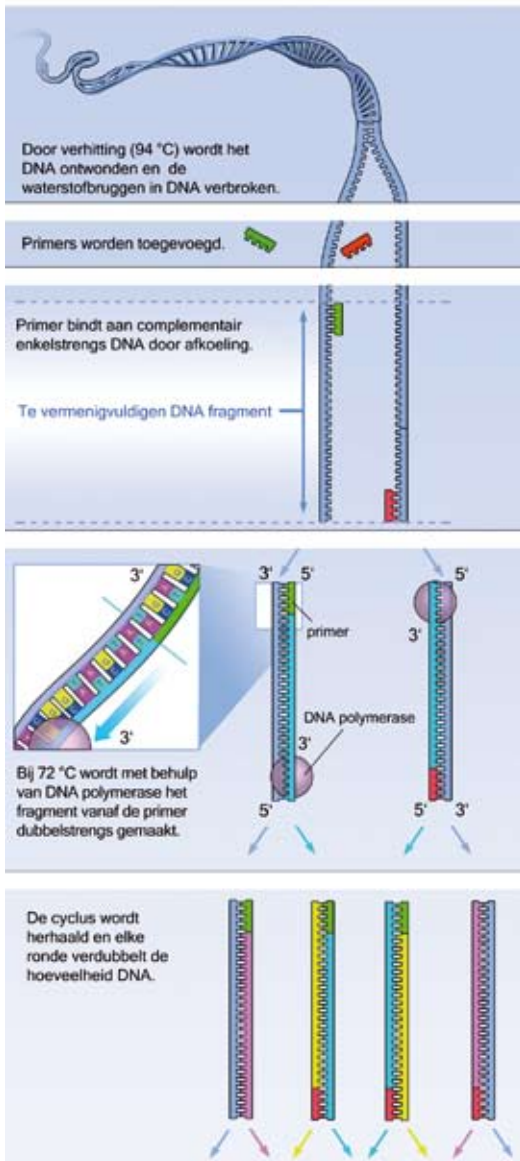
DNA-EXTRACTIE

Om DNA te kunnen onderzoeken moet het eerst worden gezuiverd van allerlei celmateriaal, zoals eiwitten, membranen en celorganellen. Dit wordt DNA-extractie (ook wel DNA-isolatie) genoemd. Er zijn verschillende technieken om het DNA uit een cel te isoleren. Dit is afhankelijk van het soort cel (dierlijk of plantaardig). Ook ligt het eraan hoe zuiver het geïsoleerde DNA moet zijn. De mate van zuiverheid geeft de complexiteit van de extra zuiveringsstappen weer.

Anne-Marie Baars, Marijke Laarakker

Afbeelding 1.
Het oplichten van de DNA-bandjes onder uv-licht.

PCR

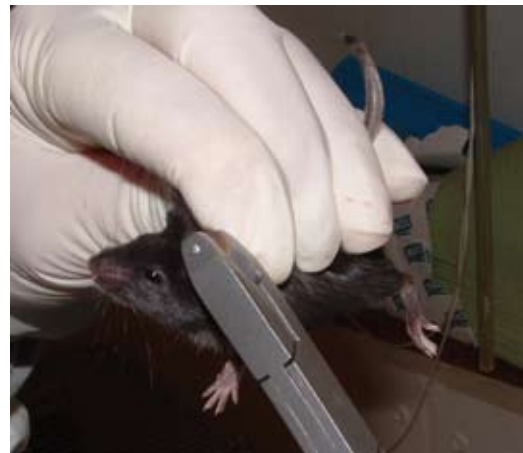


Afbeelding 2. DNA-replicatie.

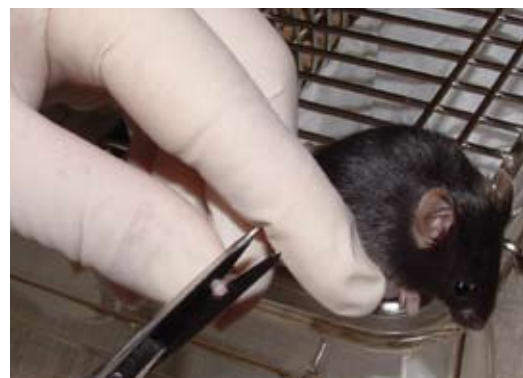
HOE WERKT PCR?

De PCR-reactie bestaat uit drie verschillende fasen. De eerste stap is een temperatuursverhoging waardoor het DNA denatureert. Dat wil zeggen dat de waterstofbruggen tussen de DNA-strengen worden verbroken. Daardoor valt de dubbele helix van het DNA uit elkaar. Vervolgens worden er primers toegevoegd. Dit zijn kleine stukjes chemisch gesyn-

thetiseerd DNA, waarvan de basenvolgorde (volgorde van de bouwstenen C, A, G en T) complementair is met die van de uiteinden van het te vermeerderen DNA-fragment. Deze primers zorgen ervoor dat aan de opengebroke streng DNA, weer nieuwe basen gekoppeld kunnen worden. Dit gebeurt onder invloed van het enzym polymerase. Dit is de laatste fase van de PCR-reactie. Polymerase zorgt ervoor dat de primers verder worden verlengd tot een compleet stuk DNA, door de toegevoegde losse DNA-bouwstenen op de juiste plaats aan elkaar te koppelen. Tegen beide gesplitste strengen ontstaat een nieuwe streng van DNA en zo wordt de hoeveelheid DNA verdubbeld. Door de stappen meerdere malen te herhalen, wordt een specifiek stuk DNA zeer vaak vermenigvuldigd. Het product van deze reactie noemen we het amplicon.



Afbeelding 3. Oorknip bij de muis.



Afbeelding 4. Staartknip bij de muis.

Gelelektroforese



Afbeelding 5. Gelelektroforese.

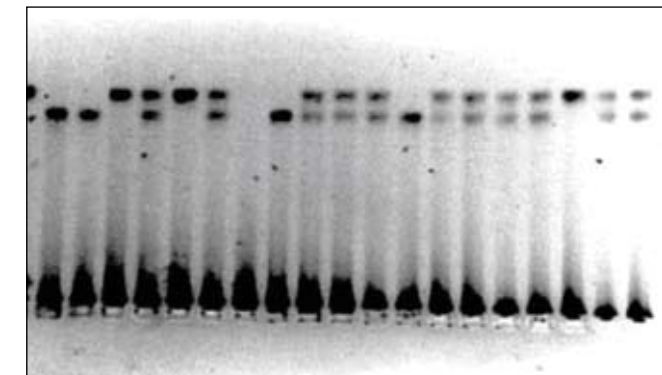
GELELEKTROFORESE

We hebben nu dus een DNA-mengsel dat een verzameling bevat van DNA-fragmenten van verschillende lengtes. Om de DNA-fragmenten uit elkaar te halen, kun je gebruik maken van de techniek gelelektroforese. Dit is een techniek die stukjes DNA op basis van hun grootte van elkaar scheidt met gel en elektriciteit. Op de gel laat men een DNA-marker (dit is een DNA-mengsel waarvan de lengtes van de fragmenten bekend zijn) meelopen om te kunnen achterhalen hoe groot de vermenigvuldigde fragmenten zijn. Het bandenpatroon dat ontstaat, geeft de onderzoeker informatie over het DNA-monster, bijvoorbeeld over de aanwezigheid van een be-

paald gen of specifiek DNA-fragment dat zich onderscheidt op lengte.

Met gelelektroforese kun je een mengsel van DNA-fragmenten van elkaar scheiden op basis van grootte. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van de negatieve lading die DNA bezit, veroorzaakt door de negatief geladen fosfaatgroepen in het molecuul. Het spanningsverschil dat zal worden aangebracht op de gel, zorgt ervoor dat aan de bovenkant de gel negatief geladen, en aan de onderkant positief geladen wordt. DNA-fragmenten worden aangetrokken door de positieve pool en zullen zich van boven naar beneden in de gel gaan bewegen. Door de structuur van de gel zullen kleine fragmenten hier sneller doorheen gaan dan de grotere fragmenten. Hierdoor zullen op het moment dat het elektrische veld wordt opgeheven, de kleine fragmenten verder naar beneden zijn gelopen dan de grotere fragmenten. In de gel wordt dan een patroon van smalle bandjes zichtbaar (Afb. 5). Elk streepje bevat miljoenen of miljarden stukjes identiek DNA, die dus even lang zijn. Omdat het er zo veel zijn, zijn ze zichtbaar te maken met een kleurstof die aan DNA bindt.

Maar waarom staat dit stukje nu eigenlijk in het themanummer 'Streepjes'? Dat heeft natuurlijk te maken met het eindresultaat.



Afbeelding 6. DNA-'streepjes'.

Met dank aan Sebastiaan Donders voor het verstrekken van de illustraties en Frans van Dam voor het beschikbaar stellen van de informatie van de website www.watistgenomics.nl

Literatuur

- 1 www.watisgenomics.nl
- 2 www.nobelprize.org
- 3 Saiki, R.K. et al, *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science. 1988. vol 239, pp.487-491.
- 4 <http://www.espionageinfo.com/Pa-Po/Polymerase-Chain-Reaction-PCR.html>

DE EERSTE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

'(...) Op een vrijdagavond zat ik in de auto op weg van Berkeley naar Mendocino naar een afgelegen hutje midden in het bos, mijn vriendin lag naast me te slapen, en ik zat te denken; aangezien oligo's niet meer al te moeilijk te maken zijn, zou ik niet gewoon twee verschillende hiervan in een reactie stoppen, waarbij eentje aan de bovenste DNA-streng bindt en de andere aan de onderste. Door toevoeging van DNA-polymerase zou het tussenliggende basenpaar gerepliceerd kunnen worden...'

Over het hele denkproces voorafgaand aan de uiteindelijke uitvinding van de PCR vertelde Mullis tijdens zijn toespraak die hij hield naar aanleiding van de Nobelprijs in de Chemie die hij in op 8 december 1993 kreeg voor het ontwikkelen van de eerste PCR.

Kary B. Mullis promoveerde in het vakgebied van de biochemie en wilde daarna neuro-chemicus worden. Na een paar jaar, waarin hij wisselende baantjes had, werd hij in 1979 door Cetus Corporation, onder andere opgericht door Don Glaser, die in 1960 de Nobelprijs voor de Natuurkunde kreeg, als onderzoeker aangenomen. Hier hielp hij bij het ontwikkelen van nieuwe methoden ten behoeve van DNA-synthese en al gauw kwam er een apparaat op de markt dat DNA-fragmenten veel sneller kon synthetiseren dan de moleculair

biologen bij Cetus ze konden gebruiken voor hun onderzoek. Andere technieken die in die tijd of al gebruikt werden of in een redelijk gevorderd stadium van hun ontwikkeling stonden, waren het opsporen van puntmutaties door middel van oligo's, sequencing-technieken en voorlopige experimenten waarbij DNA-polymerases gebruikt werden.

Uiteraard leidden deze eerste ideeën niet zomaar tot wat tegenwoordig bekend is als de PCR, maar besteedde Mullis veel tijd aan experimenten die steeds een stapje verder leidden en uiteindelijk ook de problemen waar hij tegenaan liep oplossen. Wat begon met het synthetiseren van een enkel basenpaar leidde uiteindelijk tot een pcr-techniek waarbij stukken dna met willekeurige lengtes en sequenties gesynthetiseerd werden. Pas toen drong tot hem door dat deze 'uitvinding' voorgoed het einde betekende voor veel vervelende dna-problemen in de biochemie, al duurde het even voordat anderen enthousiast raakten van zijn idee. Toch bleef hij volhouden en veel experimenten volgden – veel experimenten die mis gingen. Ron Cook, oprichter van Biosearch en producent van de eerste succesvolle commerciële DNA-synthese machine, geloofde wel in zijn idee en uiteindelijk voerde Mullis samen met Fred Faloona, een bevriende wiskundige, de eerste succesvolle PCR uit. Beiden realiseerden zich dat ze daarmee de regels van de moleculaire biologie voorgoed veranderd hadden (2,3).

DIET

**Dierverzorging
m/v
Proefdiercentrum (PDC)**

In het Leids Universitair Medisch Centrum werken we continu aan de verbetering van de gezondheidszorg. We streven naar de hoogste kwaliteit. Of het nu gaat om patiëntenzorg, onderzoek, onderwijs, opleiding of bij- en nascholing. Wij zijn op zoek naar een dierverzorging met een dierenklantvriendelijke instelling.

■ Het Proefdiercentrum (PDC) is primair verantwoordelijk voor de basisvoorzieningen op proefdiergebied. Zoals huisvesting en verzorging, het fokken en registreren van proefdieren en het verrichten van biotechnische handelingen en cryopreservatie. Het PDC is sinds 2006 gehuisvest in een centrale faciliteit. Medewerkers van het PDC zorgen voor optimale condities waarbinnen dierexperimenteel onderzoek kan worden verricht. Uiteraard voldoen we daarbij aan de geldende wet- en regelgeving.

■ Wij zijn op zoek naar een **dierverzorging** die ons team versterkt. In een universitair medisch centrum is werken met proefdieren een onmisbaar onderdeel bij de uitoefening van wetenschappelijk onderzoek. Daarom gaan we bij het LUMC professioneel en met de grootste zorg om met proefdieren. Uw werkzaamheden bestaan uit hun dagelijkse verzorging. U beoordeelt hun wel-

zijn en verricht eenvoudige biotechnische ingrepen in het kader van verzorging én experiment. Tevens heeft u administratieve taken, met name op het gebied van registratie. U beschikt over een MBO werk- en denkniveau en bent in het bezit van een certificaat proefdiervoorzorging (Artikel 12 Wod). Daarnaast heeft u aantoonbare ervaring in een dienstverlenende functie, bent u flexibel en accuraat en kunt u volgens protocol werken.

■ U werkt in een dienstverband van 36 uur per week. In eerste instantie krijgt u een aanstelling voor een jaar, met uitzicht op verlenging. Uw salaris bedraagt maximaal € 2.175,- bruto per maand voor een fulltime functie (schaal 4, CAO-UMC).

■ Een uitgebreide beschrijving van deze vacature vindt u op onze vacaturesite. Ga naar www.lumc.nl en kies 'vacatures'.

Daar kunt u bovendien lezen wat het LUMC als werkgever te bieden heeft. U kunt ook telefonisch contact met ons opnemen. Voor vragen over de functie belt u met de heer P.L. Bijl, telefoon 071 526 96 88.

■ Wilt u solliciteren, stuur dan vóór 21 juli 2008 uw sollicitatiebrief met motivatie en CV naar: LUMC, Divisie 5, dienst Personeel & Organisatie (J7-P), Postbus 9600, 2300 RC Leiden. Vermeld zowel op de envelop als op de brief duidelijk het vacaturnummer van de functie. Voor de functie van Proefdiervoorzorging is dat E.08.JM.23/BT27. U kunt ook direct solliciteren via www.lumc.nl, kies 'vacatures'.

**LUMC
Postbus 9600,
2300 RC Leiden
Telefoon 071 526 91 11**



WWW.LUMC.NL

