

**Bachelorproef**  
**Ontwikkeling en optimalisatie van**  
**microsatellietmerkes voor het Heideblauwtje**  
**(*Plebejus argus*)**

Instituut voor Natuur – en Bosonderzoek (INBO)  
Onderzoeksgroep *Genetische Diversiteit*  
Gaverstraat 4  
9500 Geraardsbergen  
An Vanden Broeck (dr. ir.)  
Leen Verschaeve (onderzoeksmedewerker, laborante)

**Melissa Claus**

Departement GL  
Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie  
Afstudeerrichting: Farmaceutische en Biologische  
Laboratoriumtechnologie

2018-2019

**Bachelorproef**  
**Ontwikkeling en optimalisatie van**  
**microsatellietmerkes voor het Heideblauwtje**  
**(*Plebejus argus*)**

Instituut voor Natuur – en Bosonderzoek (INBO)

Onderzoeksgroep *Genetische Diversiteit*

Gaverstraat 4

9500 Geraardsbergen

An Vanden Broeck (dr. ir.)

Leen Verschaeve (onderzoeksmedewerker, laborante)

**Melissa Claus**

Departement GL

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Afstudeerrichting: Farmaceutische en Biologische  
Laboratoriumtechnologie

2018-2019

*Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor als de auteur is overnemen, kopiëren of gebruiken van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen in verband met het overnemen en/of gebruik uit deze publicatie, kan u zich richten via e-mail tot [an.vandenbroeck@inbo.be](mailto:an.vandenbroeck@inbo.be).*

## VOORWOORD

---

Beste lezers,

Dit eindwerk vormt de afsluiter van mijn bacheloropleiding Biologische en Farmaceutische laboratoriumtechnologie aan de Erasmushogeschool te Jette. De stage die ik liep aan het departement Genetische Diversiteit bij het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek was daarbij zeer vernieuwend en leerrijk. Vanaf het eerste moment werd ik opgenomen in de groep en volwaardig betrokken bij het project.

Graag zou ik een dankwoord willen richten aan iedereen die bijgedragen heeft bij het tot stand komen van deze bachelorproef.

In de eerste plaats wil ik graag mijn promotor An Van den Broeck bedanken voor het mogelijk maken van deze stage en de fantastische begeleiding en ondersteuning doorheen het hele traject. Daarnaast wil ik haar zeker bedanken voor de tijd die ze telkens nam om mijn bachelorproef meermaals te lezen en daarbij iedere keer leerzame feedback te geven.

Vervolgens wil ik mijn co-promotor Leen Verschaeve ook van harte bedanken voor de praktische begeleiding in het laboratorium, de gegeven feedback en alle tijd die ze aan mij heeft besteed. Ik heb zowel binnen als buiten het laboratorium heel veel uitleg, informatie en tips gekregen omtrent het onderzoek wat mij zeker geholpen heeft inhoudelijke en structurele verbeteringen aan te brengen.

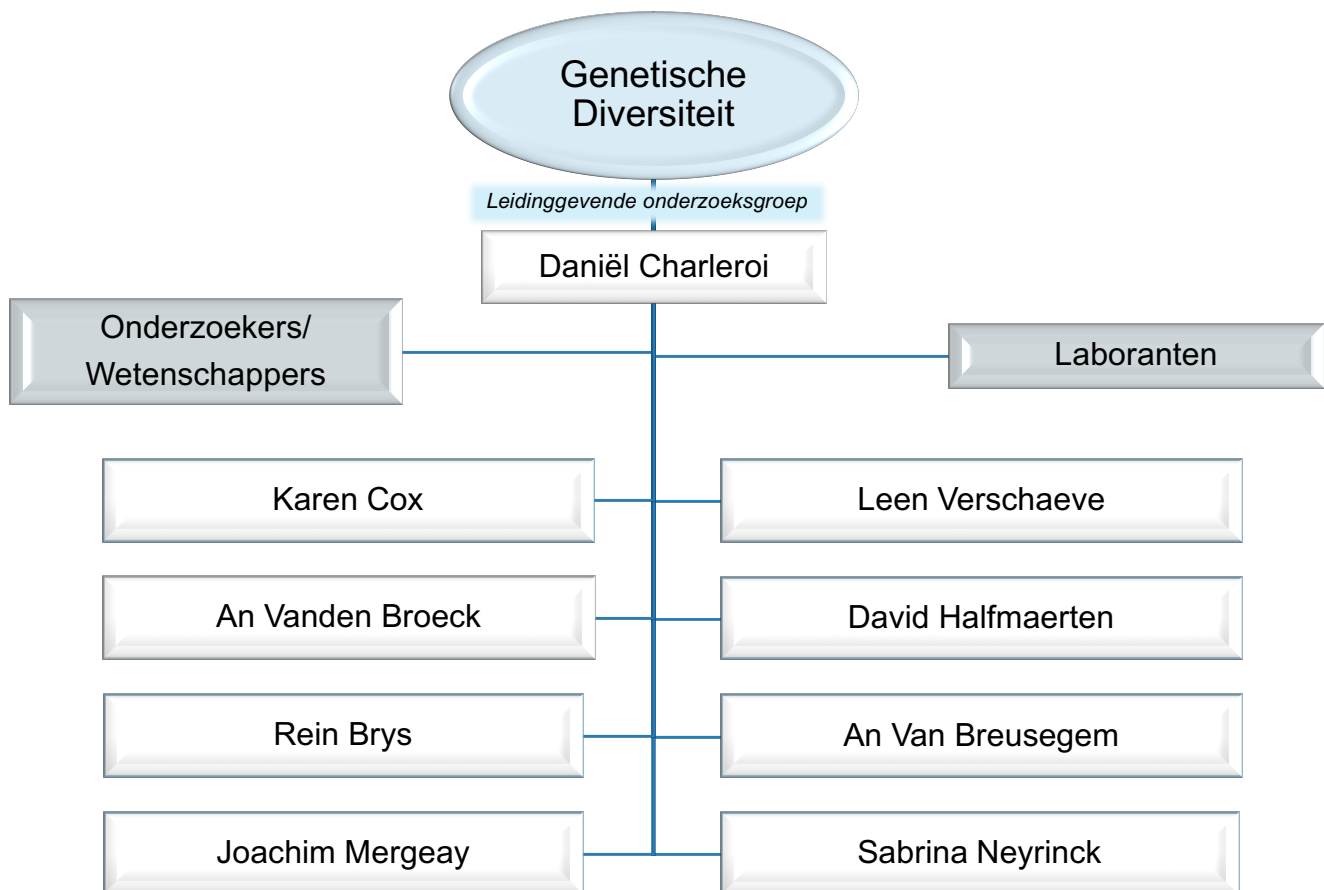
Graag wil ik alle medewerkers van het departement Genetische Diversiteit eveneens bedanken voor de nodige begeleiding en ondersteuning.

Ook een woord van dank aan mijn EHB promotor Ellen Merckx en alle andere docenten die mij begeleid hebben tijdens mijn studie.

Ten slotte wil ik mijn ouders, oma en vriend bedanken voor de mogelijkheden, de onvoorwaardelijke steun tijdens mijn opleiding en het verwezenlijken van mijn eindwerk. Hun enthousiasme en geloof in mij hebben mij steeds gemotiveerd om door te gaan.

# ORGANIGRAM

---



# INHOUDSOPGAVE

---

<b>VOORWOORD</b> .....	<b>4</b>
<b>ORGANIGRAM</b> .....	<b>5</b>
<b>LIJST MET AFBEELDINGEN</b> .....	<b>8</b>
<b>LIJST MET TABELLEN</b> .....	<b>9</b>
<b>AFKORTINGEN</b> .....	<b>10</b>
<b>SAMENVATTING</b> .....	<b>11</b>
ACHTERGROND.....	11
DOEL.....	11
METHODE.....	11
RESULTATEN.....	11
CONCLUSIE.....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
BACKGROUND.....	12
GOAL.....	12
METHOD.....	12
RESULTS.....	12
CONCLUSION.....	12
<b>VOORSTELLING INBO</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INLEIDING</b> .....	<b>2</b>
<b>2. LITERATUURSTUDIE</b> .....	<b>4</b>
2.1. MICROSATELLIETEN OF SSRs.....	4
2.2. DNA-ISOLATIE.....	7
2.2.1. Principe.....	7
2.2.2. Chelex ® extractie.....	7
2.2.3. Cleanroom of pre-PCR.....	8
2.3. PCR.....	9
2.4. CAPILLAIRE ELEKTROFORESE.....	10
<b>3. EXPERIMENTEEL GEDEELTE</b> .....	<b>12</b>
3.1. STAALNAME.....	12
3.2. DNA-EXTRACTIE OP RECENTE STALEN.....	13
3.2.1. Principe.....	13
3.2.2. Apparatuur en materiaal.....	13
3.2.3. Reagentia.....	14
3.2.4. Methode.....	14
3.3. DNA-EXTRACTIE OP MUSEUMSTALEN.....	15
3.3.1. Principe.....	15
3.3.2. Apparatuur en materiaal.....	15
3.3.3. Reagentia.....	15
3.3.4. Methode.....	16
3.4. DNA-PLATEN.....	16
3.5. MICROSATELLIETONTWIKKELING.....	19
3.5.1. Genome sequencing – AllGenetics.....	19
3.5.2. Flanking sites.....	19
3.5.3. Selectie primerparen.....	20

3.5.4.	Simplex en multiplex.....	21
3.5.5.	Resultaat.....	21
3.6.	PCR-REACTIE .....	22
3.7.	ANALYSE: PCR-OPTIMALISATIE.....	23
3.7.1.	Principe.....	23
3.7.2.	Apparatuur en materiaal .....	23
3.7.3.	Reagentia .....	23
3.7.4.	Methode.....	24
3.7.4.1.	PCR-mix.....	24
3.7.4.2.	Genescan™ 600 LIZ® size standard/ Hi-Di™ Formamide.....	25
3.7.4.3.	Aanmaak testplaat.....	25
3.7.5.	Resultaten.....	26
3.6.	ANALYSE: ROUTINE PCR .....	28
3.6.1.	Capillaire elektroforese .....	28
3.7.	RESULTATEN .....	30
<b>4.</b>	<b>BESLUIT .....</b>	<b>31</b>
<b>5.</b>	<b>REFERENTIES .....</b>	<b>32</b>
<b>6.</b>	<b>BIJLAGEN .....</b>	<b>34</b>

## LIJST MET AFBEELDINGEN

---

<b>FIGUUR 1: ORGANISATIESTRUCTUUR INBO</b> .....	1
<b>FIGUUR 2: MANNETJE HEIDBLAUWTJE (DIRK MAES, 2018)</b> .....	2
<b>FIGUUR 3: VROUWTJE HEIDBLAUWTJE (DIRK MAES, 2018)</b> .....	2
<b>FIGUUR 4: VOORBEELD ELEKTROFEROGRAM IN GENEMAPPER® (A) HETEROZYGOTE SPECIES (B) HOMOZYGOTE SPECIES</b> .....	4
<b>FIGUUR 5: VOORBEELD ELEKTROFEROGRAM IN GENEMAPPER® MET STUTTERPIEKEN</b> .....	4
<b>FIGUUR 6: VOORBEELD VAN EEN DNA-STRENG MET ATT REPEATS EN FLANKERENDE FORWARD EN REVERSE PRIMER</b> .....	6
<b>FIGUUR 7: PRINCIPE VAN DE CHELEX® METHODE (SCIENEDIRECT, 2019)</b> .....	7
<i>WATER WORDT VERVANGEN DOOR HET ENZYME PROTEINASE K</i> .....	7
<b>FIGUUR 8: BIOVEILIGHEIDSKABINET MET HEPA-FILTER (UNIVERSITY OF NEBRASKA, 2018)</b> .....	8
<b>FIGUUR 9: SCHEMATISCHE VOORSTELLING VAN DE DRIE STAPPEN IN EEN PCR-CYCLUS (BENCHLING, 2019)</b> .....	9
<b>FIGUUR 10: SCHEMATISCHE VOORSTELLING VAN DE DETECTIE VAN SSR (BUTLER, 2005)</b> .....	11
<b>FIGUUR 11: WING CLIP BIJ EEN MANNELIJK HEIDBLAUWTJE OP DE SONNISHEIDE IN HOUTHALEN-HELCHTEREN (DIRK MAES, 2018)</b> .....	12
<b>FIGUUR 12: OVERZICHT VAN EEN PLAAT LAY-OUT VOOR DNA-PLAAT 1 VAN DE RECENTE STALEN</b> .....	18
<b>FIGUUR 13: SCHEMATISCHE VOORSTELLING VAN FLANKERENDE REGIO'S EN VARIABELE SSRs (BUTLER, 2010)</b> .....	20
<b>FIGUUR 14: VOORBEELD VAN TWEE ELEKTROFEROGRAMMEN VOOR MP 2 IN GENEMAPPER® AFKOMSTIG VAN ÉÉN RECENT INDIVIDU (A) PCR-REACTIES 1:10 VERDUND (B) PCR-REACTIES NIET VERDUND</b> .....	26



## LIJST MET TABELLEN

---

<b>TABEL 1: OVERZICHT VAN DE PRIMERSETS VERDEELD IN 3 MULTIPLEXEN .....</b>	<b>22</b>
<b>TABEL 2: SAMENSTELLING PCR-OPLOSSING .....</b>	<b>24</b>
<b>TABEL 3: PCR PROGRAMMA (ALL GENETICS, 2018).....</b>	<b>24</b>
<b>TABEL 4: VISUELE VOORSTELLING MP-TESTPLAAT IN EEN 96-WELL PLAAT (ABI).....</b>	<b>25</b>
<b>TABEL 5: 12 GEOPTIMALISEERDE MICROSATELLIETMERKERS VOOR HET HEIDEBLAUWTJE VERDEELD OVER DRIE MULTIPLEXEN. ....</b>	<b>30</b>

## AFKORTINGEN

---

bp	Basenparen
BSC	Biosafety Cabinet
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
HEPA	High efficiency particulate air
INBO	Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek
KBIN	Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen
LAF	Laminaire airflow
LIMS	Laboratory Information Management System
MP	Multiplex
MS	Microsatellieten
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	Polymerisation Chain Reaction
QC	Quality Control
rpm	Rotaties per minuut
RFU	Relative Fluorescence Units
SSR	Simple Sequence Repeats
SP	Simplex
TE	Tris-EDTA

# SAMENVATTING

---

## Achtergrond

---

Vlinders behoren tot de meest bedreigde soorten in België en Nederland. Versnippering en het verdwijnen van het leefgebied zijn belangrijke oorzaken van deze achteruitgang. Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek lanceert een nieuw onderzoek naar de genetische diversiteit van het Heideblauwtje (*Plebejus argus*), een vervolg op het soortgelijke onderzoek naar de zeldzame vlinder het Gentiaanblauwtje (*Maculinea alcon*).

## Doel

---

Om de studie naar de genetische diversiteit van beide soorten aan te vatten, zijn er geschikte en geoptimaliseerde moleculaire merkers vereist die sterk gedegradieerd DNA kunnen amplificeren zoals microsatellietmerkers (MS) of Simple Sequence Repeats (SSR) om na te gaan of de achteruitgang van de heidegebieden een impact heeft op de toestand van de genetische diversiteit van de populaties.

## Methode

---

Staalname gebeurt op basis van vleugelstukjes. Zowel Heideblauwtjes uit huidige als uit historische populaties (1938-1949) worden bemonsterd en het DNA wordt geëxtraheerd. Voor de ontwikkeling van SSRs worden op basis van de repeats in het genoom van één individu, flankerende sequenties als potentieel geschikte primerparen opgesteld die korte fragmenten moeten amplificeren en polymorfismen tussen individuen weergeven. Er worden 72 primers uitgetest op acht individuen waarbij 12 SSRs geselecteerd en geoptimaliseerd worden volgens de multiplex-methode. Vervolgens vonden amplificaties en capillaire elektroforese plaats.

## Resultaten

---

Het eindresultaat omvat een selectie van 12 primerparen specifiek ontwikkeld voor de amplificatie van korte DNA fragmenten bij het Heideblauwtje.

## Conclusie

---

De ontwikkelde SSRs zijn polymorf en informatief voor de genetische studie. De SSRs kunnen als genetische merkers gebruikt worden op recente en historische populaties om de genetische diversiteit in kaart te brengen.

# ABSTRACT

---

## Background

---

Butterflies are among the most endangered species in Belgium and the Netherlands. Fragmentation and the disappearance of the habitat are important causes of this decline. The Institute for Nature and Forest research launches a new study on the genetic diversity of the butterfly *Plebejus argus*, a follow-up to the similar investigation into the rare butterfly *Maculinea alcon*.

## Goal

---

To start the study of the genetic diversity of both species, suitable and optimized molecular markers are required that can amplify highly degraded DNA in particular microsatellite markers (MS) or Simple Sequence Repeats (SSR) to determine if the decline of the heath areas have an impact on the state of the genetic diversity of the populations.

## Method

---

Sampling is based on wing pieces. Butterflies from current and historical populations (1938-1949) are sampled and the DNA is extracted. For the development of SSRs, based on the repeats in the genome of one individual, flanking sequences are listed as potentially suitable primer pairs that should amplify short fragments and represent polymorphisms between individuals. 72 Primers are tested on eight individuals and 12 SSRs were selected and optimized according to the multiplex method. After this, amplifications and capillary electrophoresis will follow.

## Results

---

The final result includes a selection of 12 primer pairs specifically developed for the amplification of short DNA fragments of the Silver-studded blue.

## Conclusion

---

The developed SSRs are polymorphic and informative for the genetic study. The SSRs can be used as genetic markers on recent and historical populations to determine the genetic diversity.

## VOORSTELLING INBO

Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) is een wetenschappelijk onderzoekscentrum, binnen de Vlaamse overheid, dat onderzoek verricht en wetenschappelijke informatie levert over veranderingen die optreden binnen de biodiversiteit en haar abiotische omgeving. In eerste instantie zal deze informatie geleverd worden aan de Vlaamse overheid maar dit is eveneens mogelijk voor internationale rapporteringen (INBO, 2019).

Het instituut beschikt over verschillende teams, afdelingen en laboratoria (figuur 1). Het laboratorium voor genetisch onderzoek maakt deel uit van het team 'genetische diversiteit' en heeft als taak het ontwikkelen en toepassen van moleculaire merkers voor de studie van genetische diversiteit. Dit team doet voornamelijk onderzoek naar de genetische diversiteit van populaties van zeldzame en prioritair te beschermen soorten om het behoud van de biodiversiteit op het genetisch niveau te evalueren en eventueel bij te sturen. Zij werken hiervoor samen met het team 'soortendiversiteit' die de toestand en trends van populaties van soorten onderzoeken in een regionale (Vlaanderen), nationale (België) en internationale context in functie van het behoud van de biodiversiteit. Het team bestaat uit vier wetenschappers en vier laboratoriumtechnici (INBO, 2019; Vanden Broeck, 2019).



Figuur 1: Organisatiestructuur INBO

## 1. INLEIDING

---

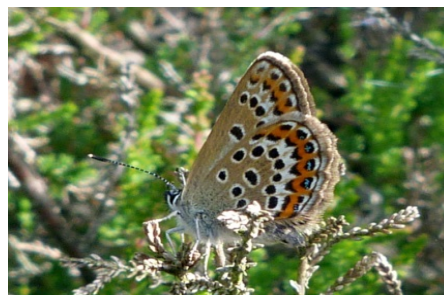
Vlinders, zijn ze met uitsterven bedreigd door de impact van de mens? Waarom worden sommige populaties zo zeldzaam? Wat kunnen we doen om de verdere achteruitgang van dagvlinders tegen te gaan?

Dagvlinders behoren tot de meest bedreigde soorten in België en Nederland. Gemiddeld over alle soorten dagvlinders, is er sprake van een achteruitgang van 35 procent in de afgelopen 25 jaar. Versnippering en het verdwijnen van het leefgebied zijn belangrijke oorzaken van deze achteruitgang, maar ook het gebruik van pesticiden en de toename van kunstmest met stikstof in de landbouw. Stikstof zorgt voor een afname van zowel het bloemenaanbod voor vlinders als kruidachtige waardplanten voor de rupsen. Voornamelijk soorten met beperkte mobiliteit zijn sterk bedreigd.

Recentelijk heeft het INBO een nieuw onderzoek opgestart rond de genetische diversiteit van het Heideblauwtje (*Plebejus argus*). Dit is een vervolg op het soortgelijke onderzoek naar het zeldzame Gentiaanblauwtje (*Maculinea alcon*). Deze studies kaderen binnen het behoud van biodiversiteit en van bedreigde soorten in Vlaanderen. Beide dagvlinders leven in heidegebieden en worden gekenmerkt door een beperkte mobiliteit; de afstand die een individuele vlinder kan overbruggen beperkt zich tot maximaal enkele kilometers. Door deze beperkte mobiliteit en door de versnippering van hun leefgebied vormen deze soorten sterk geïsoleerde populaties en kunnen ze moeilijker nieuwe gebieden koloniseren. De kans op achteruitgang van deze soorten is daarom ook groot. Bovendien hebben beide soorten een zeer specifieke ecologie; ze zijn afhankelijk van specifieke plantensoorten als waardplanten voor het afleggen van de eitjes en als voedsel voor de rupsen. Het Gentiaanblauwtje heeft één waardplant, namelijk de klokjesgentiaan (*Gentiana pneumonanthe*). Het Heideblauwtje daarentegen is afhankelijk van enkele waardplanten zoals Gewone dophei (*Erica tetralix*), Stekelbrem (*Genista angelica*) en Struikhei (*Calluna vulgaris*). De verpoping van de rupsen vindt plaats onder de grond in een mierennest. Voor de ontwikkeling van rups tot vlinder, zijn beide soorten immers afhankelijk van mieren, die de rupsen voederen.



**Figuur 2: Mannetje Heideblauwtje (Dirk Maes, 2018)**



**Figuur 3: Vrouwtje Heideblauwtje (Dirk Maes, 2018)**

Deze studie kadert in het onderzoek waarbij de genetische diversiteit wordt vergeleken van een uiterst zeldzame dagvlinder, het Gentiaanblauwtje, met een eveneens zeldzame, maar toch meer voorkomende dagvlinder, het Heideblauwtje. Door twee soorten van hetzelfde leefgebied (heidegebied) maar met een andere ecologie (verschillende waardplanten en verschil in afhankelijkheid van mieren) te vergelijken, en dit zowel voor historische als recente populaties, is het mogelijk meer gegronde uitspraken te doen omtrent de eventuele afname van de genetische diversiteit over de tijd en de oorzaken daarvan. Het is immers ook mogelijk dat sterk geïsoleerde soorten, zoals het Heideblauwtje maar vooral het Gentiaanblauwtje, zowel vroeger als nu, een lage genetische diversiteit vertonen binnen populaties. Het is mogelijk dat de zeer specifieke ecologie en de afhankelijkheid van waardplanten en mieren, aan de basis liggen van sterk geïsoleerde populaties. In dit geval verwacht men dat de genetische diversiteit van zowel recente als van historische populaties laag is en in mindere mate afhankelijk van de oppervlakte van het leefgebied, de heidegebieden.

Door de studie van de genetische diversiteit van beide soorten doorheen de tijd, willen we bestuderen of de achteruitgang van de heidegebieden een impact heeft op de toestand van de genetische diversiteit van populaties. De museumstalen vertegenwoordigen populaties van de periode 1938 – 1950, toen de heidegebieden nog veel uitgebreider waren, er minder pesticiden werden gebruikt en er minder stikstof in de bodem aanwezig was. Deze periode was veel gunstiger voor de vlinderpopulaties. Indien de afname van de heideoppervlakte en de intensivering van de landbouw een negatieve impact heeft gehad op de populaties, verwachten we een hogere genetische diversiteit in de historische populaties ten opzichte van de genetische diversiteit in de recente populaties, en dit voor zowel Heideblauwtje als Gentiaanblauwtje (Vanden Broeck, 2019).

Om de studie naar de genetische diversiteit aan te vatten, zijn er geschikte moleculaire merkers vereist, zoals microsatellietmerkers. Microsatellietmerkers of Simple Sequence Repeats (SSRs) laten toe sterk gedegradeerd DNA te amplificeren. Dit werd in het verleden beschreven over andere vlindersoorten waarbij eveneens historische populaties werden onderzocht (Ugelvig et al., 2011).

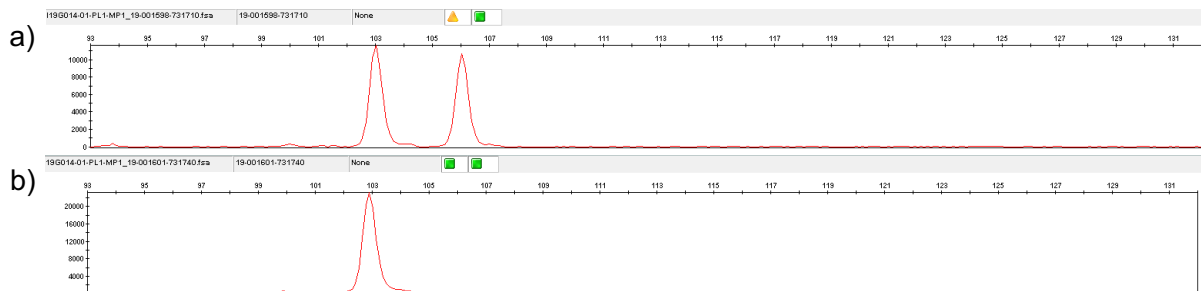
In dit project zal de focus voornamelijk liggen op de ontwikkeling en optimalisatie van microsatellietmerkers voor Heideblauwtje aangezien hierover in de literatuur nog niets werd beschreven.

## 2. LITERATUURSTUDIE

### 2.1. Microsatellieten of SSRs

Microsatellieten (MS) of SSRs zijn kleine stukjes niet-coderend DNA die opgebouwd zijn uit repeats of herhalingen, bestaande uit twee tot vier nucleotiden die 10 tot 100 keer kunnen voorkomen. De repeats liggen verspreid over het hele genoom en het aantal repeats op een bepaalde locus is tussen individuen van dezelfde soort hypervariabel of sterk polymorf. Hypervariabiliteit ontstaat doordat er mutaties kunnen optreden. SSRs hebben een hogere mutatiesnelheid dan andere delen van het DNA die leiden tot een hoge genetische diversiteit. Een repeat kan bijvoorbeeld zeer makkelijk verloren gaan (deletie) of er kunnen juist meerdere repeats ingebouwd worden (insertie).

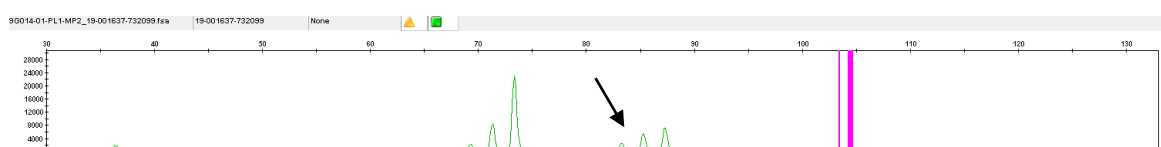
Om een SSR-analyse uit te voeren is er geen hoge kwaliteit of kwantiteit aan DNA vereist. SSRs werken op gedegraded DNA of kleine fragmenten DNA zoals op museumstalen. Nog een belangrijk voordeel is de co-dominantie waardoor zowel heterozygoot (twee verschillende allelen zichtbaar als twee pieken) als homozygoot (twee gelijke allelen, zichtbaar als één piek) zichtbaar is (figuur 4).



**Figuur 2: Voorbeeld elektroferogram in GeneMapper® (a) heterozygote species (b) homozygote species**

Er zijn ook een aantal praktische nadelen verbonden aan SSRs, bijvoorbeeld:

- **Stutter:** stutterpieken zijn pieken die net voor of na de hoofdpijk voorkomen en zijn opmerkelijk lager dan de hoofdpijk (figuur 5). Tijdens de amplificatie kan het DNA-polymerase slippen waardoor het enzym zijn plaats verliest tijdens de DNA-synthese. Hierdoor zullen deze pieken één tot vier basenparen (bp) kleiner of groter zijn dan de hoofdpijk. Het resultaat is een klein aantal kopieën van DNA-fragmenten, die geen SSR-allelen vertegenwoordigen en bijgevolg niet zullen gescoord worden.

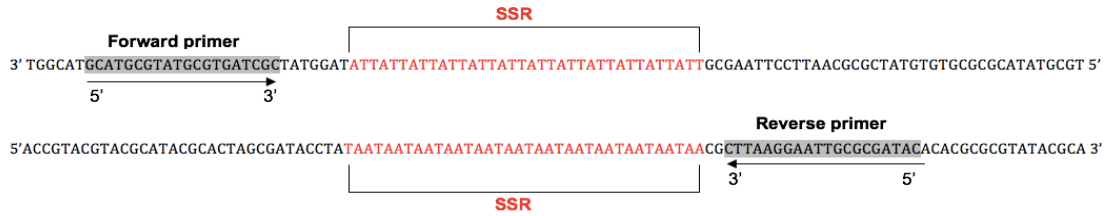


**Figuur 3: Voorbeeld elektroferogram in GeneMapper® met stutterpieken**



- **Nul-allelen:** een nul-allel wordt gedefinieerd als een aanwezig allel dat na PCR niet geamplificeerd werd door een puntmutatie in de primer-bindingsplaats. Een individu kan heterozygoot zijn voor een nul-allel met één geamplificeerd allel, in welk geval het individu als homozygoot voor het geamplificeerde allel wordt beschouwd. Het individu kan een nul homozygoot zijn, in welk geval het overeenkomt met ontbrekende gegevens (geen amplificatie/geen pieken). Een nul-allel is een vorm van allel drop-out.
  
- **Allel drop-out:** een allel drop-out treedt op wanneer na PCR één of beide allelen op een bepaalde locus van een diploïd individu niet werden geamplificeerd. Indien slechts één allel wegvalt, wordt één allel (band of piek) gescoord en wordt het individu bijgevolg verkeerd geïnterpreteerd als homozygoot op de betreffende locus. Dit verschijnsel kan bijvoorbeeld voorkomen wanneer primers niet perfect overeenkomen met de flankerende sequenties (b.v. door een mutatie) waardoor deze niet zullen binden aan het DNA-fragment en niet geamplificeerd worden of door te weinig DNA waardoor slechts een stukje van de amplificatie lukt.
  
- **Allel drop-in:** een allel drop-in komt voor wanneer een allel geamplificeerd is dat niet eigen is aan het geanalyseerde staal maar het gevolg van contaminatie. Contaminatie kan plaatsvinden via de aanwezigheid van PCR-amplicons (PCR producten) aanwezig in de lucht, in pipetten, handschoenen, ... (Vanden Broeck, 2019).
  
- **Aspecifieke amplificatie:** niet specifieke PCR producten treden op wanneer de SSR-primers binden op meerdere loci. Dit uit zich in extra pieken, meestal van grotere fragmentlengte dan de beoogde SSR-locus (Vanden Broeck, 2019).
  
- **Homoplasie:** dit verschijnsel omvat fragmenten van dezelfde grootte die niet dezelfde sequentie bevatten (b.v. door een puntmutatie of SNP (Single Nucleotide Polymorfisme)). Bij fragmentanalyse kunnen deze fragmenten verkeerdelijk beschouwd worden als eenzelfde allel omdat enkel de grootte van het fragment en niet de DNA-sequentie (basensamenstelling van het fragment) gekend is. Dit leidt tot een onderschatting van de genetische diversiteit. Homoplasie treedt voornamelijk op indien primerparen worden gebruikt die niet specifiek voor de onderzochte soort werden ontwikkeld, maar wel voor een andere, verwante soort (Vanden Broeck, 2019).

Elke SSR wordt gekenmerkt door een unieke flankerende sequentie of een flanking site die zich aan beide uiteinden van het SSR bevinden. De flanking sites worden herkend door een specifieke, complementaire forward en reverse primer en waarbij het gedeelte tussen beide primers (= amplicon) zal geamplificeerd worden (figuur 6).



**Figuur 4: Voorbeeld van een DNA-streng met ATT repeats en een flankerende forward en reverse primer**

## 2.2. DNA-isolatie

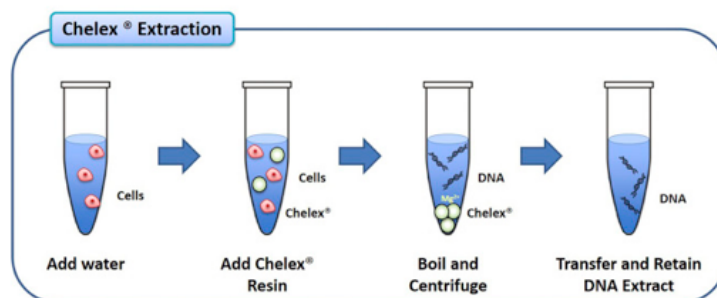
### 2.2.1. Principe

Desoxyribonucleïnezuur (DNA) is de meest belangrijke chemische drager van erfelijke informatie in de meeste organismen. Om het DNA effectief te kunnen onderzoeken, moet het DNA geïsoleerd of geëxtraheerd worden uit een cel. Dit is nodig om het DNA te zuiveren en vrij te stellen van allerlei ander celmateriaal zoals proteïnen, celorganellen, ... Een traditionele DNA-extractie bestaat meestal uit drie opeenvolgende stappen, namelijk:

- Het openbreken van de cellen (mechanisch of chemisch) en de cellulaire membranen (detergens)
- Wegwassen van overbodige celbestanddelen zoals proteïnen, RNA, ...
- Neerslaan van het opgeloste DNA ter vorming van een pellet (met alcohol)

### 2.2.2. Chelex® extractie

Er bestaan verschillende methoden en technieken om een DNA-extractie uit te voeren. De keuze hangt af van de vereiste zuiveringsgraad van het geïsoleerde DNA en of de cel plantaardig of dierlijk is. Uit reeds uitgevoerde experimenten door het INBO is gebleken dat de Chelating Ion Exchange Resin (Chelex) methode de meest efficiënte methode is. Bij figuur 7 wordt het principe van de methode weergegeven: het weefsel wordt gemengd met twee componenten, namelijk proteinase K en InstaGene™ Matrix. Vervolgens wordt het mengsel gekookt om het enzyme te inactiveren en gecentrifugeerd. Het DNA bevindt zich in de bovenstaande vloeistof (= supernatans) en kan gebruikt worden voor PCR of bewaard worden bij -20°C.



**Figuur 5: Principe van de Chelex® methode (SciencDirect, 2019)**

*Opmerking: water wordt vervangen door het enzyme proteinase K*

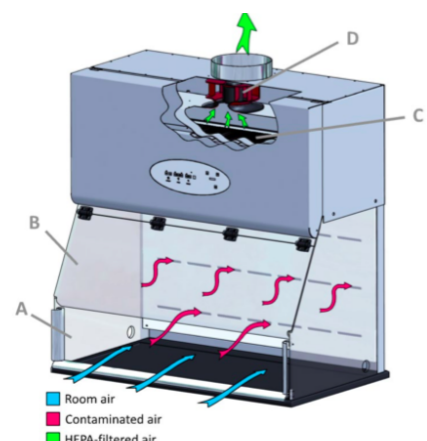
De techniek heeft als voordeel dat het snel en goedkoop is én dat het DNA uit kleine hoeveelheden (< 10 mg) weefsel kan isoleren. Ook worden de drie extractiestappen gereduceerd tot één stap om contaminatie tot een minimum te beperken. Daardoor is het echter wel een methode die vrij onzuivere DNA-extracten oplevert vermits onzuiverheden niet worden weggevoerd en vervolgens worden meegenomen in de Polymerisation Chain

Reactions (PCR). Toch is volgens het INBO gebleken dat dit de meest doeltreffende methode is aangezien de zuiverheid van minder belang is voor een SSR-analyse. De extracties worden uitgevoerd op stalen die zeer weinig startmateriaal bevatten waardoor de kleinste hoeveelheid aan DNA liefst wordt behouden. Door een traditionele zuiveringsstap uit te voeren, zou dit mogelijk tot DNA-verlies leiden.

### 2.2.3. Cleanroom of pre-PCR

De genetische analyse van museumstalen is contaminatiegevoelig. Het DNA van deze vlinders is vaak grotendeels gedegradeerd en de hoeveelheid DNA aanwezig in de stalen is heel erg laag (< 1 ng). De DNA-extracties en opzuiveringen voor de museumstalen worden daarom uitgevoerd onder zeer steriele omstandigheden. Het INBO heeft een "cleanroom" ter beschikking, die een zeer zuivere werkomgeving biedt, waar dergelijke stalen in een bioveiligheidskabinet (BSC) kunnen behandeld worden. In de cleanroom of pre-PCR dienen alle manipulaties (b.v. DNA-extracties) te gebeuren die voorafgaan aan de PCR. Er zijn een aantal belangrijke voorschriften gekoppeld aan de cleanroom alvorens de ruimte mag betreden worden (zie bijlage 3). Om te beginnen zit er tussen de gang en de cleanroom een omkleedsluis waar een lichte overdruk heerst om de eerste contaminatie van buiten naar binnen te voorkomen. Alvorens de sluis te betreden, moet er over een kleefmat gestapt worden om overtollige deeltjes aan de schoenzool niet mee naar binnen te nemen. De omkleedsluis is bedoeld om volgende zaken aan te doen in de juiste volgorde: steriele handschoenen, overschoenen, haarnetje en een wegwerpoveral. Dit is noodzakelijk om contaminatie afkomstig van de operator te vermijden (b.v. huidschilfers, vezels of stofdeeltjes van kleding, haren, PCR-amplicons, ...). De operator kan hierna de cleanroom betreden.

In de cleanroom wordt gebruik gemaakt van een bioveiligheidskabinet, meer bepaald een verticale laminaire airflow/luchtstroom (LAF-) kast klasse I. Deze is uitgerust met een High Efficiency Particulate Air (HEPA-) filter en een UV-lamp (figuur 8). HEPA-filters zullen luchtdeeltjes tot 0,3 µm verwijderen met een effectiviteit van 99,97%. Door een specifiek gerichte luchtstroom en een zeer efficiënte deeltjesfiltratie worden ongewenste verontreinigingen (b.v. DNA-amplicons) verwijderd binnen de BSC. De combinatie van bleach (natriumhypochloriet of NaOCl) en UV-stralen breekt DNA af met een effectiviteit van 100%. Hierdoor wordt het BSC vrij gemaakt van ongewenste DNA-partikels.



A. front opening, B. sash, C. exhaust HEPA filter, D. blower.

**Figuur 6: Bioveiligheidskabinet met HEPA-filter (University of Nebraska, 2018)**

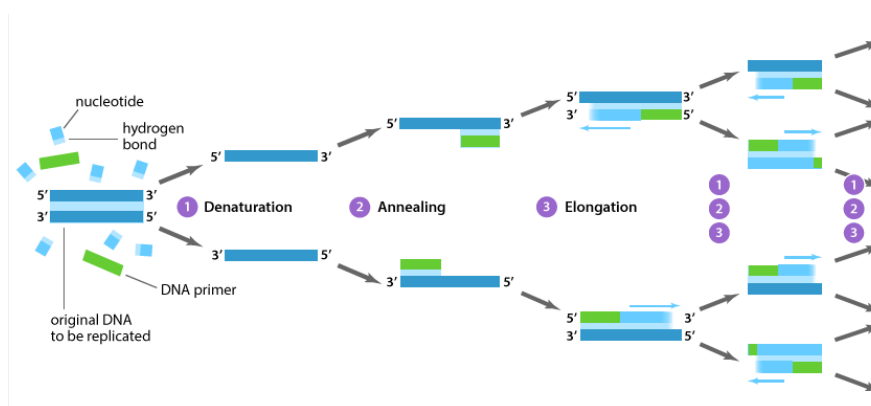
De manipulatiwerkruimte wordt verder voorzien van een overdruksysteem. Via een rooster wordt lucht afgezogen. Door meer lucht in te blazen dan af te zuigen, ontstaat er een overdruk. De cleanroom is daarom ook luchtdicht afgewerkt zodanig dat de druk kan worden opgebouwd. Het doel van een overdruksysteem is om contaminatie van de buitenwereld naar de cleanroom toe te vermijden.

## 2.3. PCR

Om MS of SSRs te amplificeren, wordt er geopteerd voor een klassieke PCR. De PCR is een laboratoriumtechniek dat gebruikt wordt voor selectieve amplificaties van target DNA-sequenties die gelegen zijn tussen gekende flankerende sequenties.

Voor de PCR-optimalisatie worden 12 primerparen verdeeld volgens hun annealingtemperatuur ( $T_a$ ). De  $T_a$  zal grotendeels de bindingspecificiteit van de primers bepalen. Hierbij zal dus eveneens getest worden of de gebruikte  $T_a$  ( $60^\circ\text{C}$ ) tijdens de amplificaties optimale resultaten zullen opleveren. Er zijn namelijk drie primerparen waarvan de  $T_a$  lager ligt dan  $60^\circ\text{C}$ .

Een volledige PCR-cyclus wordt opgedeeld in drie stappen: eerst wordt het dsDNA gesplitst in twee ketens ssDNA (denaturatie) door een temperatuurverhoging tot  $94^\circ\text{C}$ . De waterstofbruggen tussen beide ketens worden verbroken en de twee ssDNA-strengen dienen als matrijs voor de aanmaak van twee nieuwe complementaire DNA-strengen. Vervolgens hybridiseren de primers bij hun ideale  $T_a$  aan het ssDNA (annaeling) zodanig het enzyme, Taq-polymerase, een startpunt heeft in de vorm van een stukje dsDNA. Het Taq-polymerase, een thermostabiel enzym, gaat beginnen met de aanmaak van een complementaire DNA-streng ter hoogte van de primers (elongatie). Hieruit ontstaan twee nieuwe dsDNA-ketens, volledig identiek aan de oorspronkelijke moedermolecule.



**Figuur 7: Schematische voorstelling van de drie stappen in een PCR-cyclus (Benchling, 2019)**

## 2.4. Capillaire elektroforese

---

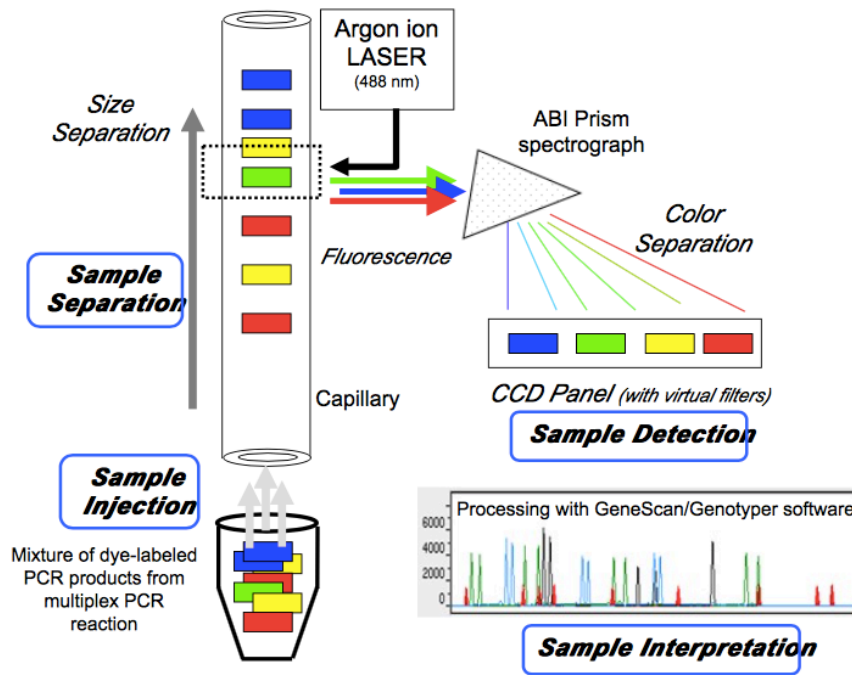
De scheiding en detectie van fluorescent gelabelde PCR-amplicons gebeurt door middel van capillaire elektroforese op een capillaire DNA sequencer ABI3500 (Applied Biosystems), een geautomatiseerd toestel die fluorescent gelabelde PCR-amplicons op basis van hun grootte scheiden.

De stalen worden geïnjecteerd door middel van elektrokinetische injectie. Hierbij worden de stalen verdund in een injectieoplossmiddel, namelijk Hi-Di™ Formamide (sterk gedeïoniseerd en geformuleerd met een stabilisator). Dit sterk gedeïoniseerde formamide wordt gebruikt om monsters te hersuspenderen vóór de elektrokinetische injectie in capillaire elektroforesesystemen (ThermoFischer, 2019). Bij een elektrokinetische injectie worden enkel negatief geladen (of de meest beweeglijke deeltjes) moleculen geïnjecteerd en er wordt een elektrisch veld aangelegd tussen de anode- en kathode buffer. Door het elektrisch veld migreert het negatief geladen DNA via het polymeer doorheen het capillair van de negatieve pool naar de positieve pool. De kleinste fragmenten migreren het snelst.

Via het venster op het einde van het capillair worden in de detectiecel de fluorescente labels geëxciteerd door een argon ion laser en het geëmitteerd licht wordt gemeten met een CCD-camera (charge-coupled device). De CCD-camera zet het opgevangen licht om in een elektrisch signaal dat kan gemeten worden. De grootte (in bp) van de gemeten amplicons kan worden bepaald doordat bij elke run een 600 LIZ™ dye Size Standard wordt meegenomen. Anderzijds normaliseert deze interne standaard mobiliteitsverschillen tussen injecties.

De bekomen elektroferogrammen of piekenpatronen worden vervolgens geanalyseerd met behulp van GeneMapper v. 4.1®. Aan de hand van dit programma kunnen pieken of allelen gescoord worden en kan er afgeleid worden of een staal hetero- of homozygoot is.

Het toepassen van deze techniek leidt tot een hoge resolutie elektroforetische scheiding van SSR-loci. Capillaire elektroforese biedt dus een efficiënte scheiding, resolutie, gevoeligheid en precisie van SSR (Moretti et al., 2001).



Figuur 8: Schematische voorstelling van de detectie van SSR (Butler, 2005)

## 3. EXPERIMENTEEL GEDEELTE

---

### 3.1. Staalname

---

Staalname voor genetisch onderzoek gebeurt op zowel huidige populaties als historische populaties. De huidige populaties werden eind juni 2018 bemonsterd op verschillende plaatsen in Vlaanderen (zie bijlage 1A en 1B). De bemonstering gebeurt op basis van vleugelclips, hierbij wordt met behulp van een pincet een klein stukje van de vleugel genomen waarin een ader aanwezig is. Het DNA kan enkel geëxtraheerd worden uit een ader aangezien de vleugel is opgebouwd uit chitine en verder geen DNA bevat. De vlinder zal na de bemonstering een stukje van zijn of haar vleugel ontbreken maar ondervindt hiervan geen leed en wordt nadien terug vrijgelaten in de natuur. De vleugelclips worden bewaard in zuiver ethanol (100%) en op 7°C waar micro-organismen geen kans hebben om in te overleven. Ze zouden namelijk het DNA kunnen afbreken wanneer het weefsel op een verkeerde manier zou geconserveerd worden.



**Figuur 9: Wing clip bij een mannetje Heideblauwtje op de Sonnisheide in Houthalen-Helchteren (Dirk Maes, 2018)**

Anderzijds zijn er de historische populaties, deze populaties bestaan uit opgepinde vlindercollecties die opgeslagen en bewaard worden in het Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen (KBIN). Het instituut bevat verschillende populaties uit variërende jaartallen. Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke Heideblauwtjes uitgekozen die het meest aanleunen tegen de jaartallen en plaatsen van de toen uitgekozen Gentiaanblauwtjes om beide soorten optimaal te kunnen vergelijken en tot een algemeen besluit te komen op het einde van het onderzoek. De Heideblauwtjes die gebruikt worden tijdens de experimenten zijn afkomstig van populaties uit Kalmthout, Genk en Beverloo uit volgende jaartallen; 1938, 1939, 1942, 1946, 1947, 1948 en 1949.



## 3.2. DNA-extractie op recente stalen

---

### 3.2.1. Principe

---

Op de weefselstalen worden DNA-extracties uitgevoerd volgens de Chelex-methode. Er wordt gebruik gemaakt van InstaGene-matrix, met een speciaal geformuleerde 6% w/v Chelex-hars, die snel en gemakkelijk DNA-extracten van PCR-kwaliteit opleveren.

Chelex-hars (Chelex-100) is een ionenuitwisselingshars die in staat is tweewaardige metaalkationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  en  $\text{Mg}^{2+}$ ) en andere verontreinigingen te cheleren. Metaalkationen, aanwezig in het cellysaat, gedragen zich als katalysator bij de degradatie van DNA en zijn bijgevolg nuclease co-factoren en potentiële PCR-remmers.

De sterk alkalische eigenschappen van de Chelex-oplossing (pH 10-11) en het blootstellen aan 99°C, resulteert in het openbreken van celmembranen en het denatureren van het DNA. De vrijgekomen producten (b.v. metaalkationen en andere verontreinigingen) die kunnen interfereren tijdens de PCR, worden door de Chelex matrix gebonden en het DNA wordt daarbij ook beschermd tegen DNases. Het verkregen gedeneureerd DNA in het supernatans is klaar voor verdere PCR-analyses.

Proteinase K, een serine-protease, wordt eveneens aan de weefsels toegevoegd. Het enzym zal aanwezige proteïnen verteren en nucleasen zoals DNase en RNase inactiveren. Bovendien is het enzym stabiel over een breed pH-bereik (4,0 – 12,0) en bij een temperatuur tussen 25 – 65 °C.

### 3.2.2. Apparatuur en materiaal

---

Om de DNA-extracties te kunnen uitvoeren, zijn volgende apparaten en materialen nodig:

#### **Apparatuur**

- Microcentrifuge zonder koelsysteem (Eppendorf, 5517C)
- Thermomixer met themoblok (Eppendorf)
- Vortex (Biosan, V-1 plus)
- Magnetische roerder (IKA, colorsquid)
- Ethanol afzuigkast (Erlab, captair flex m321)

#### **Materiaal**

- Steriele microbuisjes van 1,5 ml
- Pincet
- Doekjes (Kimberly-Clark)
- Pipetten: 1-5 µl en 100-1.000 µl met bijbehorende steriele tips

---

### 3.2.3. Reagentia

---

Om de DNA-extracties te kunnen uitvoeren, zijn volgende reagentia nodig:

- Ethanol 100%
- Proteinase K (20 mg/ml, Qiagen – 19131)
- InstaGene™ Matrix 6% (20 ml, Bio-Rad Cat. No. 732-6030)

---

### 3.2.4. Methode

---

De vleugelclips van de vlinders worden bewaard op zuiver ethanol (100%). Elk weefselstaal krijgt een Laboratory Information Management System (LIMS)-code die overeenstemt met de LIMS-code op het epje.

De vleugelstukjes worden, onder een ethanol (EtOH-) filterkast, met een pincet uit de tube gehaald en drooggedept op een doekje om overtollig EtOH te verwijderen. De vleugelstukjes worden telkens overgebracht in een epje met de overeenkomstige LIMS-code. De epjes moeten minstens 30 minuten onder de filterkast blijven staan zodanig dat overige EtOH-restanten volledig kunnen verdampen, EtOH heeft namelijk een negatief effect op de DNA-extractie.

Hierna wordt het weefsel ondergedompeld in 5 µl proteinase K en kort geïncubeerd op kamertemperatuur. De InstaGene™ Matrix van BioRad wordt op een magnetische roerder geplaatst om de oplossing te homogeniseren en er wordt 100 µl toegevoegd aan elk staal. Vervolgens worden de stalen in een thermomixer geplaatst voor minstens 1 uur (of tot volledige lysis van het weefsel) en geïncubeerd bij 56°C op 750 rotaties per minuut (rpm). Door de temperatuurverhoging zullen nog enkele eiwitten ontvouwen wat het voor het proteinase K gemakkelijker maakt om ze te degraderen.

Na minstens 1 uur wordt de temperatuur van de thermomixer verhoogd tot 99°C om de enzymactiviteit van het proteinase K te inhiberen. De stalen worden gedurende 15 minuten gekookt. Vervolgens worden ze op kamertemperatuur gebracht en gedurende 3 minuten gecentrifugeerd bij 14 000 rpm. Het DNA bevindt zich in de bovenstaande vloeistof, het supernatans. De pellet onderaan bestaat uit gebonden PCR-inhibitoren aan de Chelex matrix. De DNA-extracten worden bewaard bij -20°C.

### 3.3. DNA-extractie op museumstalen

---

#### 3.3.1. Principe

---

Zoals bij de recente stalen wordt ook op de museumstalen de Chelex-extractiemethode uitgevoerd (zie 3.1.4.), alleen is er bij deze stalen een extra stap vereist. De DNA-extracten worden nog opgezuiverd met behulp van een OneStep PCR Inhibitor Removal kit van Zymo Research omdat het startmateriaal sterk gedegrademd en onzuiver is. Uit onderzoek naar het Gentiaanblauwtje (INBO, 2018) is gebleken dat de opzuiveringsstap onzuiverheden of interferenties reduceert (minder stutterpieken) wat zou leiden tot een verbeterde concentratie aan DNA (hogere pieken, betere amplificatie).

De OneStep PCR Inhibitor Removal Kit is een opzuiveringskit die alle componenten bevat nodig voor een efficiënte verwijdering van verontreinigingen. De kolom matrices zijn specifiek ontworpen voor de efficiënte verwijdering van PCR-inhibitoren (b.v. polyfenolische verbindingen, fulvinezuren, melanine, ...) van de meest onzuivere DNA-preparaten (Zymo Research, 2019).

#### 3.3.2. Apparatuur en materiaal

---

Om de DNA-extracties te kunnen uitvoeren, zijn volgende apparaten en materialen nodig:

##### **Apparatuur**

- Microcentrifuge zonder koelsysteem (Eppendorf™, 5517C)
- Pipetten: 1-5 µl en 100-1.000 µl met filtertips
- Thermomixer met themoblok (Eppendorf™)
- Vortex (Biosan, V-1 plus)
- Magnetische roerder (IKA, colorsquid)
- Bioveiligheidskabinet klasse I (Angelantoni Industrie™)

##### **Materiaal**

- Steriele microbuisjes van 1,5 ml
- Pincet
- Doekjes (Kimberly-Clark)
- Vlindercollectie
- Steriel mesje
- Blokje isomo

#### 3.3.3. Reagentia

---

Om de DNA-extracties te kunnen uitvoeren, zijn volgende reagentia nodig:

- Ethanol 100%
- Proteinase K (20 mg/ml, Qiagen – 19131)
- InstaGene™ Matrix 6% (20 ml, Bio-Rad Cat. No. 732-6030)
- OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (Cat. No. D6030)

---

### 3.3.4. Methode

---

Om DNA uit de vleugelstukjes van de museumstalen te isoleren zijn meerdere stappen vereist. In eerste instantie vindt de DNA-extractie plaats in een clean room (voor de Chelex-extractiemethode wordt verwezen naar 3.2.4.). In tegenstelling tot de recente stalen worden de museumstalen overnacht geïncubeerd in een thermomixer bij 56°C op 750 rpm. Een overnacht incubatie is nodig omdat het weefsel zeer weinig DNA bevat. De temperatuur van de thermomixer wordt de volgende dag verhoogd naar 99°C gedurende 15 minuten op 400 rpm. De stalen worden vervolgens op kamertemperatuur gebracht en gedurende 3 minuten gecentrifugeerd op 14 000 rpm.

De DNA-extracten van de museumstalen worden bovendien opgezuiverd met behulp van een OneStep PCR Inhibitor Removal Kit. Om te beginnen wordt er een Zymo-Spin<sup>TM</sup> III-HRC – kolom geplaatst in een verzamelbuis (= collection tube). Op de kolom wordt 600 µl Prep-solution gepipetteerd. De collection tube wordt samen met de kolom gedurende 3 minuten gecentrifugeerd op 5200 rpm in een microcentrifuge. De collection tube wordt verwijderd en de kolom wordt overgebracht in een microbuisje van 1,5 ml. De kolom is nu klaar om te laden met DNA. Er wordt een volume van 60 µl DNA gepipetteerd op de kolom en de kolom wordt nogmaals gecentrifugeerd gedurende 3 minuten op 11 200 rpm. De kolom wordt verwijderd en het gezuiverd DNA is klaar voor PCR of kan bewaard worden bij -20°C.

## 3.4. DNA-platen

---

Na het afronden van de DNA-extracties worden er DNA-platen aangemaakt. Met behulp van het computerprogramma LIMS wordt er telkens een plaat lay-out opgesteld voor een DNA-plaat met 96 stalen (DNA-extracten). De lay-out van een DNA-plaat is belangrijk omdat er een aantal voorwaarden aan gekoppeld zijn, namelijk:

- Op elke plaat moet een vast gekozen QC (Quality Control = kwaliteitscontrole) meegenomen worden die telkens herhaald wordt op dezelfde plaats. Het QC-staal is een referentiestaal, namelijk een gekend staal dat telkens opnieuw wordt meegenomen op elke plaat;
- Op elke plaat moet één NTC (No Template Control = negatieve controle) worden meegenomen bij de recente stalen en drie NTC's bij de museumstalen, die telkens zullen herhaald worden op dezelfde plaats. Een NTC bevat enkel ultrapure-DEPC-H<sub>2</sub>O. Dit is water met diethyl-pyrocbonaat waardoor RNAse-enzymen worden afgebroken;
- Elke plaat moet 10% herhalingen (vanaf hetzelfde DNA-extract) bevatten en elke herhaling mag maximaal twee keer extra worden herhaald;

- Er worden 20 duplostalen meegenomen voor de recente stalen en 15 duplostalen voor de museumstalen. Duplostalen zijn stalen waarvan twee verschillende DNA-extracties worden gemaakt.
- Op elke plaat wordt ook een blanco's (blanco extracties) meegenomen, deze bevatten enkel lysisbuffer.

De QC die gebruikt wordt voor de DNA-platen bestaat uit een museumstaal van het Heideblauwtje uit 1947. Van dit staal is het piekenpatroon bekend door het R&D-project. Er kan dus gecontroleerd worden of het museumstaal na de PCR's telkens hetzelfde piekenpatroon weergeeft. Indien dit niet het geval zou zijn dan is er mogelijk iets verkeerd gelopen met het verdelen van het DNA op de plaat of kan de PCR niet goed verlopen zijn, ...

De NTC bevat alle componenten (DEPC-H<sub>2</sub>O + PCR-mix), behalve DNA. Op elke plaat wordt telkens een NTC meegenomen op dezelfde plaats. Het is de bedoeling dat deze NTC absoluut geen allelen vertoont, dit zou wijzen op contaminatie. Het is mogelijk dat er tijdens de analyse wel piekenpatronen optreden, met een fragmentgrootte tussen 40 – 70 bp, afkomstig van niet opgebruikte primers.

Elke DNA-plaat zal 10% herhalingen bevatten, dit betekent dat er ongeveer 8 tot 10 herhalingen van verschillende stalen, vanaf het DNA-extract, per plaat zullen worden meegenomen. De herhalingen zouden na de PCR en SSR-analyse telkens hetzelfde piekenpatroon moeten vertonen. Zo niet, dan is er mogelijk contaminatie opgetreden of een pipetteerfout gebeurd.

Voor de recente DNA-extracten worden 20 duplostalen gepipetteerd op één van de 8 DNA-platen. Bij de DNA-extracten van de museumstalen worden 15 duplostalen meegenomen op plaat 4. Een duplostaal is een verdeling van twee stukjes vleugel afkomstig van één individu (twee DNA-extracten van eenzelfde individu). Beide weefselstukjes worden afzonderlijk geëxtraheerd en het tweede staal zal worden meegenomen als duplostaal. De duplostalen worden willekeurig gekozen op basis van de hoeveelheid weefsel. Figuur 6 geeft een overzicht weer van één plaat lay-out voor DNA-plaat 1 van de recente stalen.

Plaat: 000279-01

Project: I-19G014-01

QC Method

Calmthout 1947

	Lane01	Lane02	Lane03	Lane04	Lane05	Lane06	Lane07	Lane08	Lane09	Lane10	Lane11	Lane12
A	M0 D0 19-001587	M0 D0 19-001595  4D5 5A11 5D11 5A12	M0 D0 19-001603	M0 D0 19-001611	M0 D0 19-001619	M0 D0 19-001625	M0 D0 19-001633	M0 D0 19-001641	M0 D0 19-001649	M0 D0 19-001657	M0 D0 19-001665	M0 D0 19-001673
B	19-001588	19-001596	19-001604  4D1 4C2 4D6 6D6 M0 D0	19-001612	19-001620	19-001626	19-001634	19-001642	19-001650	19-001658	19-001666	19-001674
C	M0 D0 19-001589	M0 D0 19-001597	M0 D0 19-001605	M0 D0 19-001613	M0 D0 19-001621	M0 D0 19-001627	M0 D0 19-001635	M0 D0 19-001643	M0 D0 19-001651	M0 D0 19-001659	M0 D0 19-001667	M0 D0 19-001675
D	19-001590  4B4 6D7 6D12 6F12 M0 D0	19-001598	19-001606	19-001614	19-001622	19-001628	19-001636	19-001644	19-001652	19-001660	19-001668	19-001676
E	19-001591	19-001599	19-001607	19-001615  2A2 2F2 2A7 7A1 M0 D0	BLANK *  M0 D0	19-001629  3F3 3E6 3E12 5B3 M0 D0	19-001637	19-001645	19-001653	19-001661	19-001669	19-001677
F	19-001592	19-001600	19-001608	19-001616	MS_HEIDEBLAUW10  **  M0 D0	19-001630	19-001638	19-001646	19-001654	19-001662	19-001670	19-001678
G	19-001593	19-001601	19-001609	19-001617  4E2	19-001623	19-001631	19-001639	19-001647	19-001655  2D9 6D4 6C6 6D8 M0 D0	19-001663	19-001671  3F2 3F7 3A9 8F2 M0 D0	19-001679  M0 D0
H	19-001594  5A2 7H3 7H6 7A12 M0 D0	19-001602	19-001610	19-001618  7G1 7B5 7G9 8G7 M0 D0	19-001624	19-001632	19-001640	19-001648	19-001656	19-001664	19-001672	19-001680

Figuur 10: Overzicht van een plaat lay-out voor DNA-plaat 1 van de recente stalen

\*Blanco

\*\*QC

\*\*\*voorbeeld: staal die herhaald zal worden op; plaat 4: laan 4B, plaat 6: laan 7D, 12D en F12.

## 3.5. Microsatellietontwikkeling

---

### 3.5.1. Genome sequencing – AllGenetics

---

Aan de keuze van geschikte primerparen voor de amplificatie van MS gaat een heel proces vooraf. De eerste stap voor de ontwikkeling van primerparen werd uitbesteed aan het INBO bij de firma AllGenetics. Hierbij werd eerst een DNA-extractie uitgevoerd volgens de Chelex-methode op een recent weefselstaal van één individu van een Heideblauwtje en opgestuurd naar AllGenetics. Het geëxtraheerd DNA moet, volgens de firma, een minimale concentratie van 10 ng/ $\mu$ L DNA in 50  $\mu$ L water of TE-buffer bevatten en de absorptie ratio's 260/280 en 260/230 moeten hoger zijn dan 1,8.

Op basis van Next Generation Sequencing (NGS) gaat deze firma op zoek naar SSRs en repeats die gelegen zijn op het genoom. Hierdoor werden sequenties van miljoenen stukjes DNA verkregen van dat ene individu. Via computeranalyse worden uit die verkregen sequenties MS-sequenties geselecteerd: fragmenten waarin repeats voorkomen met een bepaalde sequentie zoals CAGCAGCAG of CGCGCGCGCG. Op basis van de MS-sequenties, worden de flankerende primers bepaald.

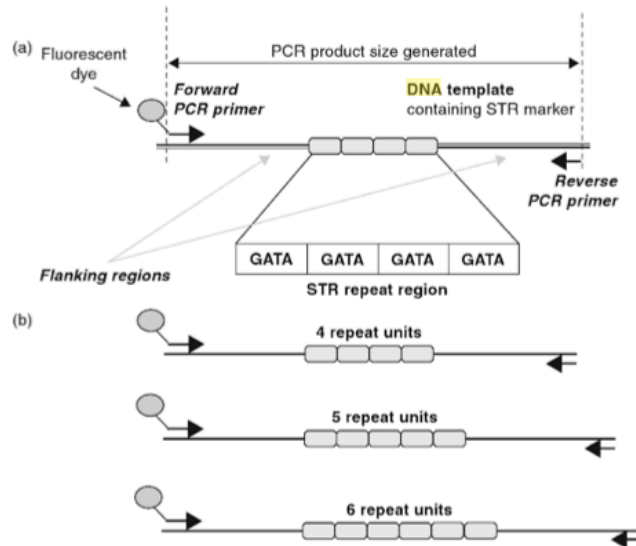
All Genetics maakte op basis hiervan een lijst op van 500 primerparen. Hierbij maken ze een selectie van fragmenten waarbij de repeats in totaal kleiner zijn dan 150 bp. Het INBO heeft namelijk primers nodig die enkel korte DNA-fragmenten (<150 bp) amplificeren omdat die meer succesvol zijn voor de analyse van museumstalen (deze bevatten gedegradeerd DNA en voornamelijk korte DNA-fragmenten).

### 3.5.2. Flanking sites

---

Primers worden zodanig ontwikkeld dat ze kunnen gekoppeld worden aan unieke, consistente sequenties in de flankerende gebieden, gelegen naast het variabele SSR-gebied. De algemene groottes van SSR-allelen verschillen van elkaar omdat ze afhankelijk zijn van het aantal aanwezige repeats op een bepaalde locus (figuur 13) (Butler, 2010).

Het ontwikkelen van primerparen gebeurt op basis van één individu. In een verdere stap zal worden uitgetest of dit geamplificeerde stuk variatie of polymorfismen bevat tussen individuen. Aangezien SSRs heel variabel zijn, is het te verwachten dat er onder de 500 primerparen heel wat primerparen zijn die geschikt zijn voor de studie naar genetische diversiteit via SSRs.



**Figuur 11: Schematische voorstelling van flankerende regio's en variabele SSRs (Butler, 2010)**

### 3.5.3. Selectie primerparen

Uit de lijst van 500 primerparen wordt door het INBO een selectie gemaakt van 72 primerparen op basis van de fragmentgrootte van het amplicon (< 150 bp) en een hoog aantal repeats. Een hoog aantal repeats verhoogt de kans op polymorfismen tussen individuen. Volgens literatuurstudie (Ugelvig et al., 2011) zouden DNA-fragmenten, van de museumstalen, groter dan 150 bp niet geamplificeerd worden en worden er dus MS vereist met een grootte tussen 90 en 150 bp. In bijlage 2 wordt een tabel weergegeven met de 72 geselecteerde primerparen die vervolgens worden uitgetest.

Geschikte primerparen voor genetisch onderzoek van het Heideblauwtje moeten in eerste instantie polymorfismen weergeven tussen individuen, goed scoorbare piekenprofielen (b.v. weinig of geen stutter, geen aspecifieke amplificaties, ...) en ze moeten bovendien samen met andere primerparen onder gelijkaardige PCR-condities optimaal kunnen werken (multiplex methode).

Om primerparen te kunnen evalueren op polymorfismen, dient een analyse te gebeuren van meerdere individuen. De 72 geselecteerde primerparen worden besteld bij Sigma-Aldrich (ongelabeld; zonder fluorescentielabel) en uitgetest op acht individuen van Heideblauwtjes, dit omvat 3 museumstalen en 5 recent bemonsterde individuen.

De resultaten worden geanalyseerd via SSR-analyse waarbij volgende vragen opnieuw worden beoordeeld: vertonen de resultaten polymorfisme? Zijn er aspecifieke banden aanwezig? Is er veel of juist weinig stutter?



Uiteindelijk werden 12 uit de 72 primerparen geselecteerd die goed scorebare profielen geven en besteld bij Lifetech (gelabeld; met een fluorescentielabel om detectie op de capillaire sequencer mogelijk te maken).

---

#### 3.5.4. Simplex en multiplex

---

Van de ongelabelde primerparen wordt er slechts één forward primer met een tail en een universele gelabelde primer besteld om de kostprijs te reduceren. De 72 primerparen worden simplex uitgetest op acht individuen (vijf museumstalen waarvan één in duplo wordt gemeten en twee recente stalen). Simplex-PCR houdt in dat er één enkele SSR-locus wordt geamplificeerd door één primerpaar.

Er wordt 2 µl onverdund DNA gebruikt op een totaalvolume van 10 µl. De verhouding van de primers in de PCR-mix is 1/3/6; forward primer met tail/ reverse primer/ gelabelde tail. Het is belangrijk dat de hoeveelheid forward primer met tail opgebruikt wordt tijdens de eerste 25 cycli van de PCR en dat daarna een gelabelde universele primer zich kan binden in het tweede deel van de reactie. Op die manier kunnen de geamplificeerde amplicons gedetecteerd worden via de capillaire DNA sequencer (ABI3500).

Van de 12 geselecteerde primerparen worden de forward primers fluorescent gelabeld. Op die manier kunnen er meerdere primersets in één multiplex (MP) samengevoegd worden (= multiplex-PCR). Tijdens een multiplex-PCR worden, in dit geval, vier SSR-loci geamplificeerd door vier verschillende primerparen (zie tabel 1). De kostprijs wordt daardoor eveneens gereduceerd. Elk primerpaar krijgt binnen één MP een fluorescent label, namelijk VIC, FAM, PET of NED.

---

#### 3.5.5. Resultaat

---

Het uiteindelijke resultaat van deze studie wordt weergegeven in een tabel (tabel 1); een selectie van 12 primerparen die geschikt zijn voor de genetische analyse van het Heideblauwtje, met de verdeling van de primerparen in PCR-multiplexen en geoptimaliseerde PCR-condities.

Deze primerparen kunnen gebruikt worden voor de analyse van alle bemonsterde stalen. Op basis van de genetische screening kan onder andere de genetische structuur worden bepaald en de verwantschap tussen populaties (Vanden Broeck et al., 2017).

**Tabel 1: Overzicht van de primersets verdeeld in 3 multiplexen**

Primerset (10 µM)	Locus	Fragment grootte (bp)	Sequentie motief	Fluorescent label op forward primer	Ta (°C)
<b>MP 1</b>					
	AG-PAR 008	97	AG	VIC	60,179
	AG-PAR 019	94	ATC	FAM	60,108
	AG-PAR 122	110	ATC	PET	60,07
	AG-PAR 245	105	AC	NED	61,017
<b>MP 2</b>					
	AG-PAR 182	106	AC	FAM	58,618
	AG-PAR 203	102	AG	PET	57,873
	AG-PAR 297	92	AC	VIC	55,406*
	AG-PAR 334	108	AG	NED	58,758
<b>MP 3</b>					
	AG-PAR 355	109	AC	FAM	58,895
	AG-PAR 405	92	AC	NED	59,906
	AG-PAR 468	90	AG	PET	56,371*
	AG-PAR 477	95	AG	VIC	56,02*

\*Opmerking: Ta die lager liggen dan de gebruikte Ta (60°C)

### 3.6. PCR-reactie

Van de 12 geselecteerde primers, die weergegeven worden in tabel 1, worden verdunningen gemaakt. Er zijn ongelabelde primers (= reverse primers) en fluorescent gelabelde primers (= forward primers). Van de forward en reverse primers worden telkens twee afzonderlijke verdunningen gemaakt, één voor de museumstalen en één voor de recente stalen.

De stockoplossingen van de forward primers hebben een concentratie van 200 µM. Om een finale concentratie van 10 µM te bekomen wordt een verdunning gemaakt van 1/20. De verdunning voor de museumstalen wordt in een eindvolume van 100 µl gemaakt. Hiervoor wordt 5 µl gelabelde primer verdund in 95 µl DEPC-H<sub>2</sub>O. Voor de recente stalen wordt in een eindvolume van 200 µl gewerkt waarbij 10 µl stockoplossing wordt verdund in 190 µl ultrapure-DEPC-H<sub>2</sub>O.

De stockoplossingen van de reverse primers hebben een concentratie van 50 µM. Ook voor deze primers is een finale concentratie van 10 µM nodig. Om een verdunning van 1/5 te maken voor de museumstalen (eindvolume 100 µl) wordt 20 µl stockoplossing verdund in 80 µl DEPC-H<sub>2</sub>O. De verdunning bedoeld voor de recente stalen wordt opnieuw in 200 µl gemaakt waarbij 40 µl ongelabelde primer wordt verdund in 160 µl DEPC-H<sub>2</sub>O.

## 3.7. Analyse: PCR-optimalisatie

---

### 3.7.1. Principe

---

Om te beginnen is er een PCR-optimalisatie vereist. Dit houdt in dat er representatieve stalen geselecteerd worden, met name; vijf recente stalen, een QC (museumstaal) en twee R&D-stalen waarop 12 primerparen zullen worden uitgetest. De primers worden onderverdeeld in drie MP met telkens vier primersets. Het doel is om enerzijds na te gaan of de verkregen piekenpatronen in de juiste verhoudingen en voldoende detecteerbaar zijn om te analyseren en anderzijds visueel te controleren of de fluorescente labels niet met elkaar interfereren of overlappen.

Bovendien wordt tijdens de optimalisatie de verdunningsfactor van het PCR product bepaald. Het PCR product van de geselecteerde stalen wordt zowel onverdund als 1/10 verdund gerund op de ABI. Het doel is om enerzijds na te gaan of de verkregen pieken niet out-off-scale zijn en voldoende detecteerbaar zijn om te analyseren en anderzijds visueel te controleren of de fluorescente labels niet met elkaar interfereren of overlappen.

### 3.7.2. Apparatuur en materiaal

---

Om een PCR te kunnen uitvoeren, zijn volgende apparaten en materialen nodig:

#### **Apparatuur**

- Genetic Analyzer - ABI (3500, Hitachi)
- Microcentrifuge
- Vortex
- Plaatcentrifuge
- DNA/RNA UV-cabinet
- Thermocycler 96 (Biometra)

#### **Materiaal**

- Pipetten: 100-1.000 µl, 1-100 µl met steriele tips en filtertips
- 96-well PCR platen
- ABI platen (96-well), toestelspecifiek
- Elektronische repeteerpipet
- Afdekfolie voor 96-well platen
- Koelelement
- Plaatunit + septa
- Repeteerpipet

### 3.7.3. Reagentia

---

Om een PCR te kunnen uitvoeren, zijn volgende reagentia nodig:

- GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard
- Formamide
- 12 primerparen
- DEPC-H<sub>2</sub>O
- MgCl<sub>2</sub>
- BSA (Bovine Serum Albumine)

- Qiagen ® Multiplex PCR Master Mix

### 3.7.4. Methode

#### 3.7.4.1. PCR-mix

Alle componenten - MgCl<sub>2</sub>, BSA, Qiagen ® Multiplex PCR Master Mix en de primers - worden ontdooid, gemengd en kort gecentrifugeerd. De Qiagen ® Multiplex PCR Master Mix bevat onder meer het HotstarTaq ® DNA-polymerase, een enzyme geïsoleerd uit een thermofiele bacterie (*Thermus aquaticus*), die geen polymerase-activiteit vertoont bij kamertemperatuur. HotstarTaq ® wordt pas geactiveerd door een incubatietijd van 15 minuten op 95°C. Dit voorkomt primer-dimeren en verkeerd gebonden primers aan het template DNA. De primers dienen afgeschermd te worden opdat het licht de primers zou afbreken.

Voor elk te analyseren staal is er 8 µl PCR-mix nodig dat verdeeld wordt in een 96-well plaat. Hieraan wordt telkens 2 µl DNA, vanuit een gecentrifugeerde DNA-plaat, toegevoegd. De samenstelling van een PCR-reactie oplossing wordt weergegeven in tabel 2.

**Tabel 2: Samenstelling PCR-oplossing**

Component		Volume (µl)
<b>PCR-mix</b>		
	DEPC-H <sub>2</sub> O	0,4
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,8
	BSA (10 mg/ml)	1
	Qiagen ® Multiplex PCR Mastermix (2x)	5
	Primer (10 µM)	0,1*
<b>DNA</b>		2
		<b>Totaalvolume 10</b>

\*Opmerking: per PCR oplossing zit telkens 0,1 µl van 4 verschillende forward – en reverse primers (10 µM).

De PCR plaat wordt bijgevolg afgeschermd, gecentrifugeerd en in een PCR toestel geplaatst. De optimale PCR-condities (All Genetics, 2018) worden weergegeven in tabel 1.

**Tabel 3: PCR programma (All Genetics, 2018)**

Stap	Tijd	T (°C)
Hot Start	15 min	95
<b>Amplificatie 35 cycli</b>		
	Denaturatie	30 sec 95
	Annealing (locus-specifiek)	30 sec 60
	Elongatie	30 sec 72
Finale elongatie	30 min	72
Hold	15 min	4
	/	15

### 3.7.4.2. Genescan™ 600 LIZ® size standard/ Hi-Di™ Formamide

Na het amplificeren van de drie MP testplaten wordt vervolgens een verdunning gemaakt van de interne standaard/formamide in een verhouding 20/1250 (20 µl interne standaard + 1250 µl formamide). Van deze oplossing wordt telkens 12 µl verdeeld in een 96-well ABI-plaat, specifiek voor de genetic analyzer (ABI3500), met een repeteerpipet.

### 3.7.4.3. Aanmaak testplaat

De drie MP met microsatellietmerkers of primerparen zullen vervolgens uitgetest worden op basis van drie testplaten die zullen geanalyseerd worden op de genetic analyzer. Van elk PCR product wordt een verdunning gemaakt van 1/10 (2 µl DNA + 18 µl DEPC-H<sub>2</sub>O). Nadien wordt er opnieuw een verdeling gemaakt, van zowel onverdund als verdund PCR product in een 96-well ABI-plaat. De indeling van de MP-testplaat ziet er als volgt uit (zie tabel 4):

- Laan 1 tot 6 bevat 12 µl interne standaard/formamide;
- Laan 1 bevat 1 µl PCR product - MP 1 (onverdund), laan 2 bevat 1 µl PCR product- MP 1 (10x verdund);
- Laan 3 bevat 1 µl PCR product - MP 2 (onverdund), laan 4 bevat 1 µl PCR product - MP 2 (10x verdund);
- Laan 5 bevat 1 µl PCR product - MP 3 (onverdund), laan 6 bevat 1 µl PCR product - MP 3 (10x verdund).

**Tabel 4: Visuele voorstelling MP-testplaat in een 96-well plaat (ABI)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RD1												
19-001588												
19-001589												
QC												
19-001592												
19-001593												
RD5												

}	}	}
MP 1	MP 2	MP 3

	Onverdund
	1:10

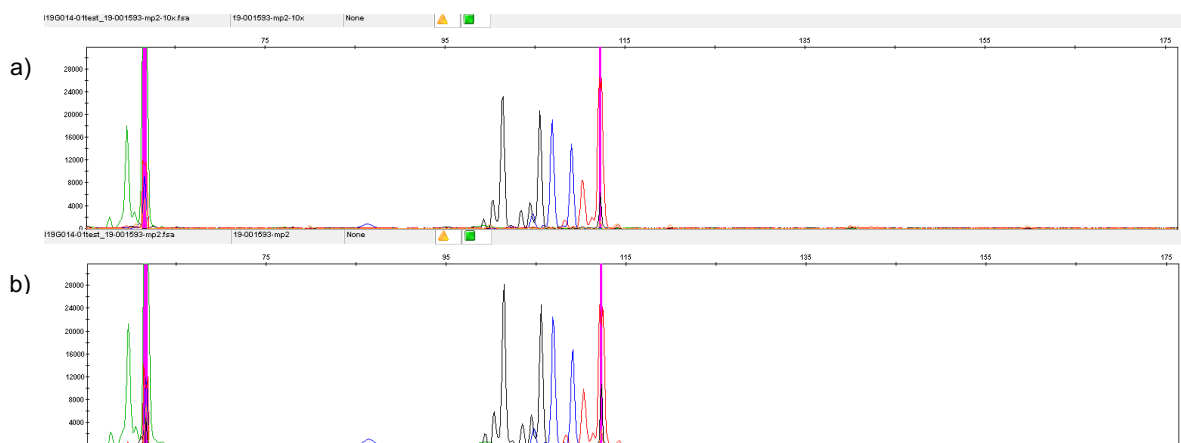
De drie MP testplaten worden afgeschermd met afdekfolie en bewaard bij -20°C. De drie nieuwe 96-well ABI platen worden, alvorens te analyseren, kort gecentrifugeerd en in de thermocycler (PCR-toestel) geplaatst gedurende 5 minuten op 95°C om de amplicons te denatureren. Vervolgens moeten de platen minstens 5 minuten op een koelblok geplaatst worden om renaturatie te vermijden. De MP testplaten worden vervolgens geanalyseerd op de genetic analyzer (ABI3500) waarbij de geamplificeerde DNA-fragmenten volgens hun grootte zullen gescheiden worden met behulp van capillaire elektroforese.

### 3.7.5. Resultaten

Elke multiplex wordt vervolgens via het computerprogramma GeneMapper® geanalyseerd op basis van volgende criteria:

- Zijn er pieken aanwezig binnen het verwachte bereik van fragmentgrootte (80-150 bp)? Weerspiegelen die pieken het genotype (homozygoot of heterozygoot) van het individu?
- Zijn de pieken van de verschillende microsatellietloci ongeveer even hoog? Of is de verhouding van de gebruikte primerparen in elke MP goed? Zijn de pieken van de verschillende fluorescente kleuren ongeveer even hoog?
- Zijn er out-off-scale pieken?
- Wordt een bepaald fluorescerend label beïnvloed door een ander label (omhooggetrokken pieken, deze worden aangeduid door paarse lijnen)?
- Bevatten de NTC's allelen, met andere woorden zijn deze gecontamineerd?

Indien er geen pieken aanwezig zijn dan moet de LIZ-standaard manueel worden nagekeken zodanig dat alle pieken correct benoemd zijn. Indien hierna nog steeds geen pieken worden waargenomen dan is er mogelijk geen DNA aanwezig. Vervolgens wordt er gekeken naar de verhouding van de piekhoogten van de microsatellieten. Elke forward primer draagt een fluorescent label in één MP waardoor de vier microsatellieten afzonderlijk te analyseren zijn op GeneMapper®. De piekhoogten van de verschillende microsatellieten zouden ongeveer rond dezelfde hoogte moeten liggen. Eventueel kan de primerconcentratie aangepast worden om de piekhoogte te verhogen of te verlagen. Tot slot wordt er gecontroleerd op de aanwezigheid van off-scale pieken. Dit zijn pieken waarvan de top niet wordt weergegeven in het elektroferogram. Door de PCR-reacties te verdunnen kunnen de pieken gereduceerd worden. Onderstaande figuur (figuur 14) geeft twee elektroferogrammen weer van één recent weefselstaal.



**Figuur 12: Voorbeeld van twee elektroferogrammen voor MP 2 in GeneMapper® afkomstig van één recent individu (a) PCR-reacties 1:10 verdund (b) PCR-reacties niet verdund**

Op beide elektroferogrammen zijn off-scale pieken te zien, deze worden aangeduid met een roze band. Aan de linkerzijde (tussen 55 – 65 bp) zijn primerresten aanwezig die tijdens de amplificatie niet opgebruikt zijn.

Er is een klein verschil waar te nemen tussen beide elektroferogrammen voor MP 2. Figuur 14a geeft de onverdunde PCR producten van de MP weer waarbij iets hogere pieken zichtbaar zijn voor de vier gebruikte microsatellieten. De zwarte piek (**NED**) ligt bij de verdunde MP ongeveer op 22.000 RFU (Relative Fluorescents Units) terwijl de piek bij de onverdunde MP zich bevindt op 28.000 RFU. De overige pieken (**VIC** en **FAM**) bevinden zich eveneens op een lagere RFU bij een 1/10 verdunning. Bij één van de rode pieken (**PET**) is er een off-scale piek zichtbaar ter hoogte van de roze band. Deze piek bereikt een hogere RFU doordat fluorescente labels met elkaar kunnen interfereren waarbij er een sterker signaal wordt gedetecteerd.

Er kan geconcludeerd worden dat de verhouding tussen de kleuren goed is, alle kleuren zijn namelijk duidelijk zichtbaar. Er is dus geen aanpassing nodig aan de concentraties van de verschillende primers in de PCR-reactie. Om de off-scale pieken voor de rode kleur (**PET**) te reduceren in de hoogte wordt geopteerd voor een verdunning van de PCR producten. Dit zorgt eveneens voor een reductie in piekhoogte voor alle kleuren.

Op basis van de bekomen elektroferogrammen voor MP 1, 2 en 3 worden er per MP concrete aanpassingen uitgevoerd, namelijk:

- Een 50x verdunning van de PCR producten voor MP 1 bij de recente stalen;
- Een 25x verdunning van de PCR producten voor MP 2 bij de recente stalen;
- Een 10x verdunning van de PCR producten voor MP 3 bij de recente stalen.

Voor de museumstalen worden alle PCR producten onverdund gerund op de ABI. Aangezien deze stalen heel weinig DNA bevatten is het absoluut niet nodig om deze te gaan verdunnen. Enkel de concentratie van de primers AG-PAR 355 en AG-PAR 477 worden verdubbeld in de reactie om hogere pieken te bekomen voor MP 3 bij de museumstalen.

### 3.6. Analyse: routine PCR

---

De optimalisatie voor de PCR reacties werd in een vorig onderdeel besproken en op punt gezet. Alle recente en museumstalen kunnen bij deze volgens de geoptimaliseerde condities geamplificeerd en gerund worden op de ABI. Dit gebeurt telkens op dezelfde manier waardoor er wordt gesproken over routine PCR; (1) voor zowel de recente als de museumstalen wordt telkens 8 µl PCR oplossing en 2 µl DNA gebruikt. Enkel bij MP 3 van de museumstalen wordt het volume van de primers (AG-PAR 355 en AG-PAR 477) in de PCR oplossing verdubbeld om de concentratie te verhogen. Vervolgens worden telkens drie platen in een PCR toestel geplaatst om het DNA te amplificeren.

Na de DNA-amplificatie worden, enkel bij de recente stalen, de PCR producten verdund in verdunningen van 50x, 25x en 10x in 96-well platen:

- Plaat 1 met een 50x verdunning bevat 49 µl DEPC-H<sub>2</sub>O + 1 µl PCR product;
- Plaat 2 met een 25x verdunning bevat 24 µl DEPC-H<sub>2</sub>O + 1 µl PCR product;
- Plaat 3 met een 10x verdunning bevat 18 µl DEPC-H<sub>2</sub>O + 2 µl PCR product.

Vervolgens worden er 96-well platen specifiek voor de ABI aangemaakt. Één welletje bevat 12 µl interne standaard/Formamide waaraan slechts 0,5 µl van een PCR verdunning wordt toegevoegd. Voor de museumstalen wordt er 1 µl PCR product gebruikt.

---

#### 3.6.1. Capillaire elektroforese

---

Uiteindelijk worden de stalen onderworpen aan capillaire elektroforese om de geamplificeerde DNA-fragmenten volgens grootte te scheiden. Om de bepaling van de fragmentgrootte mogelijk te maken wordt, samen met de PCR producten, een interne standaard meegelopen, namelijk Genescan™ 600 LIZ® size standard. De standaard bevat 36 ssDNA-fragmenten met een grootte van 20, 40, 60, 80, 100, 114, 120, 140, 160, 180, 200, 214, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 314, 320, 340, 360, 380, 400, 414, 420, 440, 460, 480, 500, 514, 520, 540, 560, 580 en 600 bp en zijn gelabeld met het LIZ® fluorofoor wat resulteert in pieken bij het runnen onder gedenatureerde omstandigheden (ThermoFischer, 2019).

Alvorens de ABI platen in het toestel te plaatsen, worden ze eerst gecentrifugeerd en verwarmd op 95°C gedurende 5 minuten in een PCR toestel om het dsDNA te denatureren. Om te voorkomen dat het ssDNA terug zou renatureren, worden de platen gedurende 2 minuten op een ijsblok geplaatst.

De buffer- en polymeeroplossingen van de Genetic Analyzer worden eventueel vervangen en de 96-well ABI platen worden in het toestel geplaatst.



De Genetic Analyzer zal bij het begin van de run de capillaire kolommen vullen met POP-7™ Performance Optimized Polymer. De stalen worden zodanig gemengd met een EDTA bevattende buffer waardoor het ssDNA negatief geladen een krijgt en een elektro-injectie mogelijk wordt. Een elektrisch veld trekt de negatief geladen DNA-fragmenten doorheen de capillaire kolom. Tijdens de capillaire elektroforese zorgen een temperatuur van 60°C en de Hi-Di™ Formamide dat het DNA gedenatureerd blijft.

Het DNA loopt tijdens de run doorheen het capillair en de DNA-fragmenten worden volgens grootte gescheiden.

### 3.7. Resultaten

Het eindresultaat van deze bachelorproef wordt weergegeven in de onderstaande overzichtstabel (tabel 5). Het resultaat bestaat uit 12 ontwikkelde, uitgeteste en geoptimaliseerde microsatellietmerkers die DNA-amplificaties van het Heideblauwtje toelaten bij recente populaties én historische populaties. De primerparen kunnen samengevoegd worden in drie multiplexen.

**Tabel 5: 12 Geoptimaliseerde microsatellietmerkers voor het Heideblauwtje verdeeld over drie multiplexen.**

Primerset	Locus	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5 – 3')	Fragment grootte (bp)	Sequentie motief	Fluorescent label op de forward primer	Ta (°C)
<b>MP 1</b>							
	AG-PAR 008	GCGGCAACCTCAGGATGTAT	AGGCCCTAAGAGTCGTACGT	97	AG	VIC	60,179
	AG-PAR 019	ACCCGATGAGGTGATGCTTG	TTTGGCTGGTAAGTGCAGGT	94	ATC	FAM	60,108
	AG-PAR 122	GCAAGTCTGTCAACAAGCTTCG	GTGTACCTGCTAGCTGTGGC	110	ATC	PET	60,07
	AG-PAR 245	TTATCTGTCAACGGCCGTGC	AGCTATCTCTGCGTAGTTCCCTT	105	AC	NED	61,017
<b>MP 2</b>							
	AG-PAR 182	AAACCTGCGGTGTTTACGTT	TGCGTTCTTACAACAGCTGT	106	AC	FAM	58,618
	AG-PAR 203	GCTGGGTCTTTGTCACCTTAGT	TACTAGGGCATGACGTCGTG	102	AG	PET	57,873
	AG-PAR 297	GATTGTAACCTCGTCACACTCT	AAGCGTGAAGGATGCTGGAT	92	AC	VIC	55,406
	AG-PAR 334	TGAAGGCTTACAGACATTGTACG	CAAGCGCACGTTGGTCTC	108	AG	NED	58,758
<b>MP 3</b>							
	AG-PAR 355	GCCCAAGCTGATGCACAATA	TGGAATATTCACGTCGTTAGATCT	109	AC	FAM	58,895
	AG-PAR 405	GTTCACTGTGAAAGTAGCAACACA	CGAATGTAATGAAACCTTCCAAGC	92	AC	NED	59,906
	AG-PAR 468	TTTGATGCTGATGCGGATG	ATACAGCTAATACAATATTGCCAC	90	AG	PET	56,371
	AG-PAR 477	GCCTTTGCCCAATAGTGG	GCCCTTACAGCATATGAATTAAT	95	AG	VIC	56,02

## 4. BESLUIT

---

In deze studie werden microsatelliet primerparen ontwikkeld voor het Heideblauwtje. Vertrekkend van een lijst van 500 primerparen, specifiek ontwikkeld aan de hand van sequentieanalyse van het genoom van één individu Heideblauwtje, werden 72 primerparen geselecteerd en getest op hun bruikbaarheid voor een populatiegenetische studie van het Heideblauwtje. Dit resulteerde in 12 bruikbare primerparen voor microsatelliet analyse, met bijbehoren geoptimaliseerde PCR-condities en multiplexen. Deze primerparen geven scorebare, herhaalbare en polymorfe piekenpatronen en laten toe om de genetische verschillen tussen individuen van het Heideblauwtje te analyseren. De methode is hierbij op punt gesteld en kan toegepast worden voor de analyse van bemonsterde populaties Heideblauwtje. De SSRs kunnen dus gebruikt worden als genetische merkers op recente en historische populaties van de vlinder om de huidige en historische genetische diversiteit in kaart te brengen.

Dergelijk genetisch onderzoek zal toelaten om inzicht te krijgen in de ecologie van de soort; een noodzaak voor het opstellen van wetenschappelijk onderbouwde beheersmaatregelen ter behoud van het Heideblauwtje in Vlaanderen.

## 5. REFERENTIES

---

AG Scientific. (2018, 26 maart). *10 Questions you want to ask about proteinase K*. Geraadpleegd op 28 januari 2019, beschikbaar op <http://agscientific.com/blog/2018/03/proteinase-k-faqs/>

AllGenetics. (z.d.). *Experts in microsatellite genotyping – AllGenetics*. Geraadpleegd op 20 januari 2019, beschikbaar op <https://www.allgenetics.eu/index.php/services/genomics-for-researchers/microsatellite-genotyping.html>

BAKER - Enviroments For Science. (2017, oktober). *The effectiveness of HEPA filters on DNA [PDF]*. Geraadpleegd op 22 februari 2019, beschikbaar op <http://files.massbio.org/file/XleEwhv.zp8vqG9l0jj.1.pdf>

Benchling, (z.d.). *Protocols – Benchling*. Geraadpleegd op 22 maart 2019, beschikbaar op <https://benchling.com/protocols/GP1fQ08o/pcr-amplification-of-gfp/sbs>

Bio-Rad. (z.d.). *InstGene™ Matrix / Life Science Research / Bio-Rad*. Geraadpleegd op 23 januari 2019, beschikbaar op <http://www.bio-rad.com/en-be/product/instagene-matrix?ID=6c2be54f-6c95-43de-8ce3-e9aee8229eeb>

Butler, J.M. et al., (2010). *Fundamentals of Forensic DNA typing*. Geraadpleegd op 22 maart 2019, beschikbaar op [https://books.google.be/books?id=-OZeEmqzE4oC&printsec=frontcover&hl=nl&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.be/books?id=-OZeEmqzE4oC&printsec=frontcover&hl=nl&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

De Jong, R. (1995, februari). *Het Heideblauwtje – Vlinders*. Geraadpleegd op 19 januari 2019, beschikbaar op <http://natuurtijdschriften.nl/download?type=document;docid=557968>

De polymerasekettingreactie in de klas (2005). [PDF]. (z.d.). Geraadpleegd op 12 maart 2019, beschikbaar op [https://wet.kuleuven.be/wetenschapinbreedbeeld/lesmateriaal\\_biologie/lespakket2005/1lerarentekst.pdf](https://wet.kuleuven.be/wetenschapinbreedbeeld/lesmateriaal_biologie/lespakket2005/1lerarentekst.pdf)

De Vries et al., (2017, juli). *Wild van Vlinders – Herstelplan voor dagvlinders in Zuidoost-Nederland [PDF]*. Geraadpleegd op 19 januari 2019, beschikbaar op [https://www.ark.eu/sites/default/files/media/Vlinder/Herstelplan\\_Dagvlinders.pdf](https://www.ark.eu/sites/default/files/media/Vlinder/Herstelplan_Dagvlinders.pdf)

Forensic Bioinformatics. (z.d.). *Possible Issues with DNA Evidence*. Geraadpleegd op 10 maart 2019, beschikbaar op <http://www.bioforensics.com/dna-testing-issues/>

Instituut Natuur- en Bosonderzoek. (z.d.). *Genetische Diversiteit - Medewerkers - INBO Expert Portal*. Geraadpleegd op 9 januari 2019, beschikbaar op [https://pureportal.inbo.be/portal/nl/organisations/genetic-diversity\(0312ebbe-a38e-49cd-82c6-ab79daa84bd1\)/persons.html](https://pureportal.inbo.be/portal/nl/organisations/genetic-diversity(0312ebbe-a38e-49cd-82c6-ab79daa84bd1)/persons.html)

Instituut Natuur- en Bosonderzoek. (2017). *Strategische Meerjarenplanning 2014-2019 [PDF]*. Geraadpleegd op 9 januari 2019, beschikbaar op <https://drive.google.com/drive/folders/1K2hhPsFAXSdreheFeM0PrYs8Ju-IKVat>

Maes D, Vanreusel W, Van Dyck H (2013). *Dagvlinders in Vlaanderen: nieuwe kennis voor betere actie*. Uitgeverij Lannoo nv, Tielt. 542 pp.

McKiernan, H.E., & Danielson, P.B. (2017). *Phenol-Chloroform Extraction – an overview / ScienceDirect Topics*. Geraadpleegd op 8 maart 2019, beschikbaar op <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/phenol-chloroform-extraction>

Moretti T.R. et al., (2001, mei). *Validation of STR typing by capillary electrophoresis*. - PubMed - NCBI. Geraadpleegd op 9 maart 2019, beschikbaar op <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373005>

Séré M., Kaboré J., Jamonneau V., Gaston Belem A.M., Ayala J.F. & De Meeûs T. (2014, juli). Null allele, allelic dropouts or rare sex detection in clonal organisms: simulations and application to real data sets of pathogenic microbes. *Pubmed Central*, 7-331. doi: 10.1186/1756-3305-7-331

Ugelvig L.V., Nielsen P.S., Boomsma J.J., Nash D.R. (2011). *Reconstructing eight decades of genetic variation in an isolated Danish population of the large blue butterfly *Maculinea arion**. BMC Evolutionary Biology 11(1):201.

University of Nebraska. (z.d.). *BIOSAFETY CABINETS [PDF]*. Geraadpleegd op 28 maart 2019, beschikbaar op <https://ehs.unl.edu/sop/s-bio-cabinet.PDF>

Vanden Broeck A., Maes D., Kelager A., Wynhoff I., Wallis de Vries M.F., Nash D.R., Oostermeijer G., Van Dyck H., Mergeay J. *Gene flow and effective population sizes of the Alcon blue butterfly *Malculineaalcon* in a highly fragmented, anthropogenic landscape; (2017) 2017*.

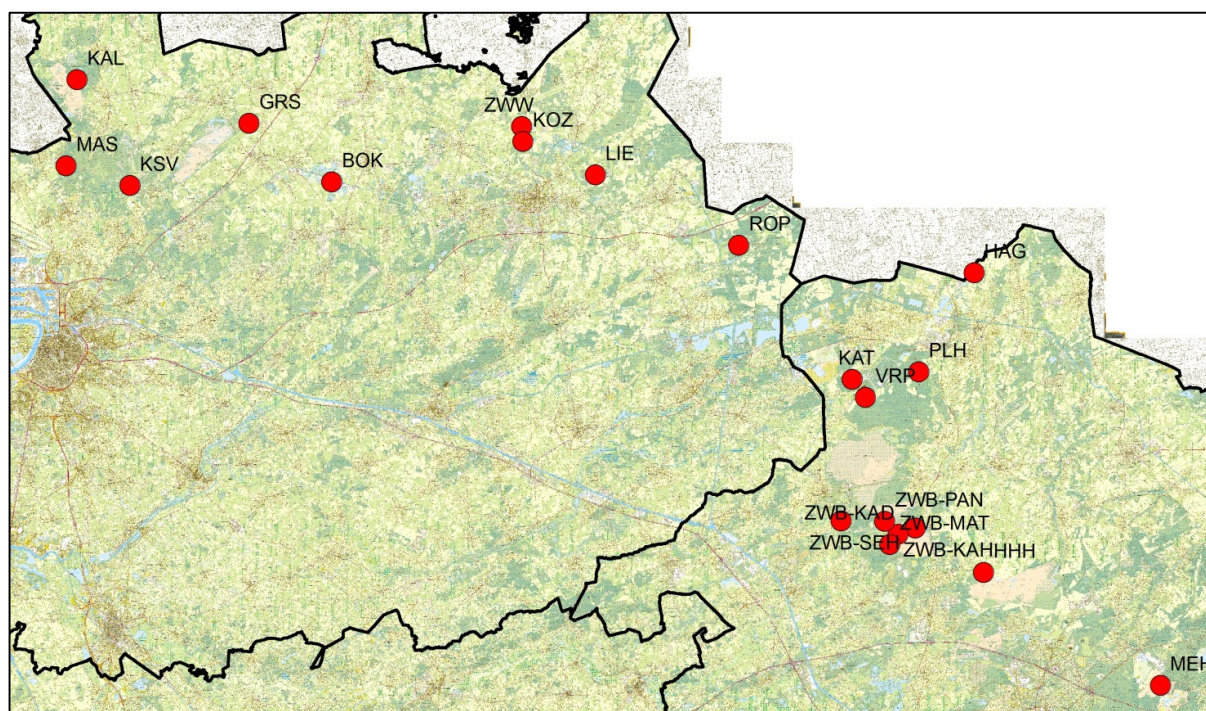
Wyseure, E. (2015-2016). *Studie van meiose en toepassing van vaderschapsanalyses in de veredeling naar hogere zaadopbrengst bij tetraploïde rode klaver [PDF]*. Geraadpleegd op 2 februari 2019, beschikbaar op [https://pure.ilvo.be/portal/files/4399767/Elise\\_Wyseure\\_thesis.pdf](https://pure.ilvo.be/portal/files/4399767/Elise_Wyseure_thesis.pdf)

Zymo Research. (z.d.). *OneStep PCR Inhibitor Removal Kit*. Geraadpleegd op 10 maart 2019, beschikbaar op <https://www.zymoresearch.com/collections/onestep-pcr-inhibitor-removal-kits/products/onestep-pcr-inhibitor-removal-kit>

Zymo Research. (z.d.). *Zymo-Spin III Columns*. Geraadpleegd op 10 februari 2019, beschikbaar op <https://www.zymoresearch.com/products/zymo-spin-iii-columns>

## 6. BIJLAGEN

### Bijlage 1A



### Bijlage 1B

Gebied	Gemeente	Datum	Lmbrt_X	Lmbrt_Y	Aantal	mm ww
<b>Antwerpen</b>						
Groot Schietveld (GRS)	Brecht	20/06/2018	168023	229413	30	27 3
Klein Schietveld (KSV)	Kapellen	20/06/2018	158862	224815	30	25 5
Kalmthoutse Heide (KHH)	Kalmthout	20/06/2018	154808	232814	30	28 2
Mastenbos (MAS)	Kapellen	20/06/2018	153982	226138	30	27 3
Liereman (LIE)	Oud-Turnhout	21/06/2018	194694	225465	30	25 5
Zwart Water (ZWW)	Turnhout	21/06/2018	189032	229159	30	24 6
Koeiven – Zandven (KOZ)	Turnhout	21/06/2018, 2/07/2018	189119	227985	19	14 5
Bonte Klepper (BOK)	Rijkevorsel	23/06/2018	174454	224931	30	21 9
Ronde Put (ROP)	Mol	23/06/2018	205632	220111	30	17 13
<b>Limburg</b>						
Mechelse Heide (MEH)	Maasmechelen	24/06/2018	238206	186246	30	30 -
Sonnisheide (HHH)	Houthalen-Helchteren	24/06/2018	224620	194904	30	25 5
Zwarte Beek – Katershoeve (ZWB-KAH)	Houthalen-Helchteren	24/06/2018	219315	198353	30	25 5
Hageven (HAG)	Neerpelt	25/06/2018	223727	217886	30	24 6
Plat-Holven (PLH)	Overpelt	25/06/2018	219583	210317	1	- 1
Vriesput (VRF)	Lommel	25/06/2018	215452	208345	30	25 5
Kattenbosserheide (KAT)	Lommel	25/06/2018	214462	209723	1	1 0
Zwarte Beek – Mathiashoeve (ZWB-MAT)	Beringen	26/06/2018	217294	197060	30	22 8
Zwarte Beek – Katersdelle (ZWB-KAD)	Beringen	26/06/2018	217998	197837	30	25 5
Zwarte Beek – Panoramaduinen (ZWB-PAN)	Hechtel-Eksel	26/06/2018	216935	198817	30	28 2
Zwarte Beek – Staleikerheide (ZWB-SEH)	Beringen	26/06/2018	213606	198867	30	24 6
Schotelputten (SPU)	Hechtel-Eksel	29/06/2018	215581	205102	30	29 1
Laambeekvallei (LBV)	Houthalen-Helchteren	3/07/2018	226318	192520	30	15 15
Monnikwijer (MON)	Meeuwen-Gruitrode	3/07/2018	230067	195240	30	27 3
<b>Grote onbemonsterde populaties</b>						
Brialmontlaan	Leopoldsburg		212972	202944		
Centraal schietveld	Houthalen-Helchteren		227517	194045		
<b>Totaal</b>	<b>23</b>			<b>621</b>	<b>508</b>	<b>113</b>

## Bijlage 2

Locus	Forward primer	Reverse primer	Amplicon size	Motif	Repeat number
AG_Par_367	ACAACATTCTGGCAATAAAGAC	TGACAGCTCAGTGTTCATGCA	105	AAATC	6
AG_Par_401	TGGGCACATTGTTTGTCTGA	CCCAAATATACAGAACCCAGTATCA	105	AATG	6
AG_Par_436	ACCGTTCTTGAGTTACAGCCA	AGCTATTACATGCTATTACCTTCTT	105	ACAG	6
AG_Par_258	ACCACTAAATTGTCAGTGTCGAGT	TACGTGTGGGTGTGAGTGAG	106	AC	6
AG_Par_369	CGCTACTACGACCGGTACG	TGCATAAATCTCCTAAACCTCAACT	107	ACG	6
AG_Par_103	TGGATACTGCGCATTTCCTT	AGTTGGAACGATGTGGTGGT	110	ACC	6
AG_Par_232	TGACTGGTGAGACAATACCGA	GGCCTACGTAATCCCGGC	110	AC	6
AG_Par_261	TCGTTGTCTGTCCGTCTGTC	ACAGAGAATTTGAGTCTCGGA	90	ACGG	7
AG_Par_281	CAAGGACAGCTAGTAAGGACTGT	GCTGTAGGACGTATGGTGTG	90	AG	7
AG_Par_312	CCGTCAGTCCATCCGTCAG	CCACAGTAGTCTTGAGATACAGC	90	ACGG	7
AG_Par_393	ATTACCAAGAATTCGTTGTCTGTCC	TACCGTCTTGAGATACAGCCTG	90	ACAG	7
AG_Par_424	GCTATAGCGGTTCTTGAGATACAG	ATTACCAAGACTTCGTTGTCTGT	90	ACAG	7
AG_Par_469	TGTGAATAACAAGTTGAAACATCA	AGGTGATATTCTGTTGGTGAATCG	90	AAAT	7
AG_Par_009	GTCTCATTACGGTCCGCCA	TTTACGGTGTCCCAAGCGAA	91	AAAT	7
AG_Par_216	TCGTGGCTAAATCTAATAGCGC	TGATGTGCCCTATTGCTGA	91	AC	7
AG_Par_230	TCATTACCGCGCTGTGTTT	ACGCAAGCACGTACGTACG	91	AC	7
AG_Par_405	GTTCACTGTGAAAGTAGCAACACA	CGAATGTAATGAAACCTTCCAAGC	92	AC	7
AG_Par_019	ACCCGATGAGGTGATGCTTG	TTTGGCTGGTAAGTGCAGGT	94	ATC	7
AG_Par_033	TCTGAGGGTGCCGCTATCA	AGGTCCGTCAACTGCCTATG	96	AC	7
AG_Par_378	GGGTTAGATTGTTTGACATGAAACG	ACGAAGTTCACCGAGTCATC	96	AG	7
AG_Par_226	TCATTTGATGTGACCAGTAGCA	CTCACTGAGGCCGCCATAAT	97	AAG	7
AG_Par_221	CCAGGTATGCGAACACAAACA	CAGCGTGAGAATAAATGTGCCA	98	ACAT	7

AG_Par_452	TATGTTGCTGGTTGACCGAG	TTTACAATGTACGTGAACTACATAG	99	AC	7
AG_Par_470	GGCTACCGTCACCGAAAC	ATAACATCTGCATTACTIONACTTT	99	AAT	7
AG_Par_395	GTCTGTCCGTCCGTCTGTC	TGTTCTGATTGATTCTTGATCCT	100	ACAG	7
AG_Par_203	GCTGGGTCTGTCACTTTAGT	TACTAGGGCATGACGTCGTG	102	AG	7
AG_Par_459	TGTCTGACTGTCTATCTGTCTGT	AATCCATACCAAATTTACAGAAA	102	ACAG	7
AG_Par_351	TATGAGCCTCTGATGCCCGA	TGGTCTACATTATACTGCTGACT	105	AATC	7
AG_Par_182	AAACCTGCGGTGTTTACGTT	TGCGTTCTTACAACAGCTGT	106	AC	7
AG_Par_211	ATGTCTCACCAGTCACGCAG	ACAGTCAGTACAGTAGACAACAC	106	AC	7
AG_Par_291	CGTGGTGTGAAGCGTCCATA	CAAGGCTAGATTGTGTTCTGA	106	AAT	7
AG_Par_441	TTGTACCTGCATTCTAAGCAA	CAGTCGTTCTTGCTAGAATTCA	108	AGAT	7
AG_Par_354	AGCCTGTAAACTTTCTGGACACT	ACTTACCCTGAGTAGCAATCAGA	109	AG	7
AG_Par_122	GCAAGTCTGTCACAAGCTTCG	GTGTACCTGCTAGCTGTGGC	110	ATC	7
AG_Par_188	TCGATATTTGTCCGTCTGTCC	GCTACAGCGGTTCTCGAGTT	90	ACAG	8
AG_Par_377	TAAGACTTCGATGTCTGTCCGAC	GAGTTACAGCCTCAAGACATACA	90	ACAG	8
AG_Par_468	TTTGATGCTGATGCGGATG	ATACAGCTAATACAATATTGCCAC	90	AG	8
AG_Par_438	TTTGTCACTTGTCAACCGTG	GCCAATGCCACTGTCAAA	91	AAG	8
AG_Par_003	CTGGCTCGCCGGTGTATTAT	GATCTGTCCGTCCGTCTGTC	92	ACAG	8
AG_Par_306	GTCCGTCCGTCTGTCTGTC	ACAGCTTTGTAGGTCCTTTAGTC	94	ACAG	8
AG_Par_490	ACAGTGCCAATGTGCGACTA	TGCCAAGGTTTATGGCACCA	95	AG	8
AG_Par_245	TTATCTGTCAACGGCCGTGC	AGCTATCTCTGCGTAGTTTCCTT	105	AC	8
AG_Par_317	CGTAGGTGGATTGCCTTAACC	GCCTTTGCCAGCAGTG	107	AAT	8
AG_Par_318	AGCGGGAACAGATAATACACA	CGTCTGTCCGTCTGTCCG	107	ACAG	8
AG_Par_254	TTGCACACGGTTGGGTTACA	CTGTGCCGTATACAGTATTGTGT	110	ACAT	8
AG_Par_143	CCCGTTTGGATGCTACGATG	CTGTCCGTCTGTCCGTCTGT	90	ACAG	9
AG_Par_207	TGATTTACAGCCTGGAGACAC	GTCCGTCTATCCGTCTGTCC	90	ACAG	9



AG_Par_366	TGCTATACGCTTTGGGCCTT	AAGTCTACATCATTACATAGCGT	96	AAT	9
AG_Par_008	GCGGCAACCTCAGGATGTAT	AGGCCCTAAGAGTCGTACGT	97	AG	9
AG_Par_227	ACTGTACATTTCACTCTGGCA	TTAGTGGTGAGGCAGTGTCC	97	AAT	9
AG_Par_144	GATTGTCTTCGCTGCAACCG	TCGCTAACATTGCGAATTCCA	99	AC	9
AG_Par_416	ACTATGAGTTTGTTCAGCGT	AGGTCATAGATTAATGATGGGTCT	104	CG	9
AG_Par_334	TGAAGGCTTACAGACATTGTACG	CAAGCGCACGTTGGTCTC	108	AG	9
AG_Par_001	CACCCGGATGGAAGAACGAA	CAGGTGCGCTCTTAAGACCA	109	AG	9
AG_Par_054	TTCAGCAGTGGACGGCAATA	CTGTATCCTGTGTGCGCGAC	90	ATC	10
AG_Par_110	GCATGCGCGTGTTTCTTCT	TCGAGAAGTGACAAGGGACAC	90	AG	10
AG_Par_302	GCGTGTGATGTGCGTATGC	AGAATCAATACACATTCACCCACG	91	AC	10
AG_Par_035	ATGTTCTCAGTGGACCGCA	GAGACGCTCAGCTCACTCAG	94	AG	10
AG_Par_477	GCCTTTGCCCAATAGTGG	GCCCTTTACAGCATATGAATTAAT	95	AG	10
AG_Par_139	AGTGGACCGCAATTATAGGC	TCGTGTAAGGTGTGCAGACC	94	ATC	11
AG_Par_293	TCTCAGACATCTCAGACATCT	TCCACCCGTTTGGATGCTAC	94	ACAG	11
AG_Par_071	GGCGGGACCCTATTACTGAG	GTTCCGTACCCAAAGACGGA	109	ACAG	11
AG_Par_415	CGAGCTGGTCGGTGTGC	CCCAGACTCGCACCCGC	90	AC	12
AG_Par_444	ACCTTATACCTACACGGGCT	ATCTTAAATCTTTAAAGGGAAGGGA	90	AC	12
AG_Par_210	TGCTTCATGTAACAGCCTCA	GTCCGTCTGTCCGTCTGTC	96	ACAG	12
AG_Par_355	GCCCAAGCTGATGCACAATA	TGGAATATTCACGTCGTTAGATCT	109	AC	12
AG_Par_190	GCTGCGTGCGGATCTCAC	AGCCGTACGTGTTGTGTCAT	92	AC	13
AG_Par_268	GACACCCGGATGGAACGAAG	ACAGTTTAGTACAGCAAGTCGT	101	AG	15
AG_Par_111	AGTACTTTGCGGTGCGTATGA	AGCCTTGTCGAACTGTACGT	106	AC	16
AG_Par_297	GATTGTAACCTGTCACACTCT	AAGCGTGAAGGATGCTGGAT	92	AC	21
AG_Par_240	ACACATACACGCACGCG	GTAAGTCTGCGGTGCGCTTT	112	AC	25
AG_Par_313	GTACCGCGTACGTGCATG	TGGCTAAGATAAACTGGCAGTGA	100	AC	27

## Bijlage 3

### Voorschriften cleanroom

#### A. Bij het binnen gaan

1. Ga naar kleedruimte (gerief, kledij in locker plaatsen).
2. Leg het plakvel (ligt bovenop de locker in de kleedruimte) voor de deur van het lokaal en trek het bovenste vel eraf.
3. Activeer de overdruk indien nog niet werkzaam door enkele seconden op de zwarte knop te drukken.
4. Was grondig de handen met de ontsmettingszeep die voorzien is in de kleedruimte (premiumzeep antibacterieel)
5. Doe een paar wegwerphandschoenen aan
6. Verzet het bordje van "VRIJ" naar "BEZET"
7. Stap een paar keer over het plakvel
8. Ga het SAS van het lokaal binnen, doe deur onmiddellijk dicht en trek onmiddellijk je handschoenen uit en trek een paar oranje handschoenen, schoenenovertrek, haarnetje en een wegwerpoverall aan.
9. Maak de reinigingsproducten (= bleach/bleekwater) aan in een spuitfles:

• **Bleekwater 8°:** 1:2 verdunnen

• **Bleekwater 15°:** 1:4 verdunnen

10. Ontsmet uw handschoenen door ze onder de automatische zeepdispenser te houden en ze goed te reinigen.
11. Druk met je elleboog op de knop en ga het lokaal binnen.
12. Trek over je oranje handschoenen onmiddellijk een tweede paar individueel voorverpakte handschoenen aan.
13. Registreer in logboek (datum + reden)
14. Voer de reiniging uit:
  - Reinig eerst de bench in de volgorde: EtOH – bleekwater – EtOH

#### B. Bij het buiten gaan

1. Verzamel het vaste afval in een afvalzak
2. Verlaat het labo en neem de afvalzak
3. Giet het overige bleekwaterverdunding in de lavabo
4. Trek je handschoenen, wegwerpoverall en haarnetje uit en deponeer het in de afvalzak
5. Verlaat het SAS en neem al het afval mee naar buiten
6. Doe de deur op slot.
7. Deactiveer het overdruksysteem.