

Optimalisatie van PCR-testen voor de detectie van *Feline Infectieuze Peritonitis Virus (FIPV)*



Bachelor in de agro- en biotechnologie

Afstudeerrichting biotechnologie

Campus Roeselare

Student: Anke Deconinck

Academiejaar 2024 - 2025

Begeleidende docent(en):

Evelien Van hooland

Stagementor(en):

Bern De Lignie

Optimalisatie van PCR-testen voor de detectie van *Feline Infectieuze Peritonitis Virus* (FIPV)

Abstract

Feline Infectieuze Peritonitis Virus (FIPV) is een mutatie van het *Feline Coronavirus* (FCoV) en veroorzaakt een dodelijke ziekte bij katten. Deze bachelorproef richt zich op de optimalisatie van PCR-testen voor de detectie van FIPV om de diagnostische nauwkeurigheid te verbeteren. Het onderzoek focust zich op de M1058L-mutatie in het S-gen, dat geassocieerd wordt met de ontwikkeling van FIPV. De aanpak omvat het optimaliseren van RNA-extractiemethoden, het ontwerpen van specifieke primers en probes, en het verfijnen van qPCR-protocollen. Daarnaast worden verschillende PCR-technieken, waaronder klassieke PCR, qPCR en dPCR, vergeleken op hun effectiviteit in het detecteren van de M1058L-mutatie. De resultaten tonen een verbeterde gevoeligheid en specificiteit van de geoptimaliseerde PCR-testen. Verder onderzoek is nodig om de klinische toepasbaarheid te valideren en de test te verfijnen voor verschillende FCoV-stammen.

Trefwoorden: FCoV (*Feline Coronavirus*), FIPV (*Feline Infectieuze Peritonitis Virus*), M1058L-mutatie, PCR-optimalisatie, RNA-extractie

Woord vooraf

In het kader van mijn bachelorproef heb ik stage gelopen bij Zoolyx, waar ik de kans kreeg om mij te verdiepen in de optimalisatie van PCR-testen. Deze stage was een leerzame ervaring, waarin ik de theorie die ik tijdens mijn studie heb geleerd in de praktijk kon brengen.

Graag wil ik een aantal mensen bedanken die een belangrijke rol hebben gespeeld bij het tot stand komen van dit verslag. Allereerst gaat mijn dank uit naar Dhr. Bern De Lignie, mijn stagementor bij Zoolyx, voor zijn deskundige begeleiding en waardevolle feedback. Zijn expertise en enthousiasme hebben mij enorm geholpen bij het uitvoeren van mijn onderzoek. Daarnaast wil ik Mevr. Evelien Van hooland bedanken voor haar begeleiding vanuit de Hogeschool. Haar inzichtelijke commentaar en steun waren van grote waarde voor het structureren van mijn werk.

Een speciaal woord van dank ook aan Mevr. Noémie Rase, de routine-PCR laborant, voor haar geduldige uitleg en praktische tips in het lab. Ook alle andere medewerkers van Zoolyx wil ik bedanken voor hun gastvrijheid en de prettige werksfeer.

Ten slotte wil ik mijn ouders en mijn vriend bedanken voor hun onvoorwaardelijke steun en aanmoediging gedurende mijn hele studie.

Anke Deconinck
16 mei, 2025

Inhoudsopgave

OPTIMALISATIE VAN PCR-TESTEN VOOR DE DETECTIE VAN <i>FELINE INFECTIEUZE PERITONITIS VIRUS</i> (FIPV)	1
ABSTRACT	2
WOORD VOORAF	3
INHOUDSOPGAVE	4
LIJST VAN AFKORTINGEN	5
TECHNISCHE FICHE STAGEPLAATS	7
INLEIDING	8
DOELSTELLING.....	30
1 MATERIAAL EN METHODEN	31
1.1 VOORBEHANDELING VAN KLINISCHE STALEN	31
1.1.1 BLOED (EDTA)	31
1.1.2 FAECES-STALEN	31
1.1.3 FFPE-STALEN (BIOPT IN PARAFFINE).....	31
1.1.4 VOCHTEN.....	32
1.2 NUCLEÏNEZUUREXTRACTIE	32
1.3 SPECTROFOTOMETRISCHE BEPALING VAN DE CONCENTRATIE EN ZUIVERHEID (NANODROP)	32
1.4 NABEHANDELING VAN DE RNA-STALEN	33
1.4.1 VERWIJDEREN VAN DNA MET DNASE	33
1.4.2 AANMAAK VAN COPY DNA (cDNA)	33
1.4.3 VERDUNNING EN ALLOCATIE VAN DE CDNA-STALEN	35
1.5 IN SILICO ONTWIKKELING VAN PRIMERS EN PROBES	35
1.5.1 FCoV-PRIMERS EN -PROBES	35
1.5.2 FIPV-PRIMERS EN -PROBES.....	39
1.5.3 VOORBEHANDELING VAN PRIMERS, PROBES EN GBLOCKS.....	53
1.6 KWALITEITSANALYSE.....	57
1.6.1 KWALITEITSANALYSE PRIMERS	57
1.6.2 KWALITEITSANALYSE PROBES.....	58
1.7 PCR.....	63
1.7.1 qPCR	63
2 RESULTATEN EN DISCUSSIE	66
2.1 RNA-EXTRACTIE.....	66
2.1.1 STALEN.....	66
2.1.2 CONCENTRATIEMETING (NANODROP)	66
2.2 KWALITEITSANALYSE.....	71
2.2.1 KWALITEITSANALYSE PRIMERS	71
2.2.2 KWALITEITSANALYSE PROBES.....	76
2.3 PCR.....	101
2.3.1 qPCR	101
3 BESLUIT.....	106
PUBLICEEERBAAR ARTIKEL	107
LITERATUURLIJST	CVIII

Lijst van afkortingen

A: adenine	SNV: single nucleotide variant
AMV: <i>avian myeloblastosis virus</i>	ss: single stranded (enkelstrengig)
bp: basenpaar	ssDNA: enkelstrengig DNA
C: cytosine	T: thymine
CAPS: cleaved amplified polymorphic sequence	TdT: terminale deoxynucleotidyl transferase
CCoV: <i>canine coronavirus</i>	T _a : annealingtemperatuur
cDNA: copy DNA	T _m : melting temperature (smelttemperatuur)
Ct: cycle threshold	U: uracil
ddNTP: dideoxynucleotidetrifosfaat	VNTR: variable number of tandem repeats
DIN: DNA integrity	ZNA: zip nucleic acid
DNA: deoxyribonucleic acid (desoxyribonucleïnezuur)	
dNMP: deoxynucleosidemonofosfaat	
dNTP: deoxynucleosidetrifosfaat	
dPCR: digitale PCR	
ds: double stranded (dubbelstrengig)	
dsDNA: dubbelstrengig DNA	
E-waarde: verwachtingswaarde	
fAPN: feline aminopeptidase-N	
FCoV: <i>feline coronavirus</i>	
FECV: <i>feline enteric coronavirus</i>	
FIP: feline infectieuze peritonitis	
FIPV: <i>feline infectieuze peritonitis virus</i>	
FRET: Förster resonance energy transfer	
G: guanine	
gDNA: genomisch DNA	
HEG: hex-ethylene glycol	
HRMA: high resolution melting analysis	
Iso-dC: 5'-methylisocytosine	
Iso-dG: isoguanine	
LNA: locked nucleic acid	
LoD: limit of detection	
MMLV: <i>moloney murine leukemia virus</i>	
NTC: no template control	
ORF: open reading frame	
OTU: operational taxonomic unit	
PCR: polymerase chain reaction (polymerasekettingreactie)	
PNA: peptide nucleic acid	
PPi: pyrofosfaat	
Q: quencher	
qPCR: quantitative PCR	
RFLP: restriction fragment length polymorphism (restrictiefragmentlengtepolymorfisme)	
RIN: RNA integrity	
RNA: ribonucleic acid (ribonucleïnezuur)	
RT: reverse transcriptie	
RT-enzym: reverse transcriptase enzym	
RT-qPCR: reverse transcription quantitative PCR	
SNP: single nucleotide polymorfisme	

Technische fiche stageplaats

Naam stageplaats:	Zoolyx
Adres:	Groeneweg 17
	9320 Erembodegem
Telefoonnummer:	053 72 90 20
GSM-nummer:	/
Faxnummer:	/
E-mail:	info@zoolyx.be
Directeur/diensthofd:	Tom Nagels
Stagementor:	Bern De Lignie
Sector:	Veterinaire dierengeneeskunde
Afdeling/Groep binnen de stageplaats:	Moleculaire biologie
Aantal werknemers:	50
Omzet:	10.000,00
Producten:	Dienstverlening voor dierenartsen
Specialisatie:	Diagnostiek
Twee relevante publicaties van het stagebedrijf:	Geen
Bijkomende gegevens:	/

Inleiding

Feline coronavirus (FCoV)

Algemene kenmerken van FCoV

Het Feline Coronavirus (FCoV) is een veelvoorkomend, enkelstrengig RNA-virus dat behoort tot de orde *Nidovirales*, familie *Coronaviridae*, subfamilie *Coronavirinae*, en genus *Alphacoronavirus* 1. FCoV-virionen hebben een helicale symmetrie, een diameter van 80-120 nm en bezitten een enveloppe met 15-20 nm lange spike-eiwitten (zie Figuur 1a). Deze spike-eiwitten geven het virus onder een elektronenmicroscop een coronaal (kroonachtig) uitzicht. Het FCoV-genoom, met een grootte van ongeveer 29 kb, omvat 11 open reading frames (ORFs) die coderen voor vier structurele eiwitten: spike (S), nucleocapside (N), enveloppe (E) en membraan (M). Daarnaast codeert het genoom voor zeven niet-structurele eiwitten, waaronder twee replicase-eiwitten 1a en 1b, en vijf accessoire-eiwitten 3a, 3b, 3c, 7a en 7b (zie Figuur 1b). (Y.-Y. Gao et al., 2023)

Structuur van FCoV: het spike (S)-eiwit

Het S-eiwit is een groot glycoproteïne (180-220 kDa) dat peplomeren vormt die uitsteken van het oppervlak van virusdeeltjes en verantwoordelijk is voor receptorbinding, inductie van cel-aan-cel fusie en fusie van de virale enveloppe met doelwitcelmembranen, en inductie van neutraliserende antilichamen. Het S-eiwit is geassocieerd met de virulentie van FCoV. De sequentie van elk S-eiwit kan in twee regio's verdeeld worden: S1 en S2. S1 is het N-terminale gedeelte, en S2 is de regio tussen S1 en het transmembraandomein. S1 speelt een essentiële rol in receptorbinding, terwijl S2 virus-cel fusie bevordert. Voor alle FCoV II serotypes, inclusief FECV en FIPV, kan het S-eiwit binden aan feline aminopeptidase-N (fAPN), wat erop wijst dat het S-eiwit belangrijk is voor celtropisme. (Y. Gao et al., 2022)

Onderverdeling van FCoV

Serotypes van FCoV: FCoV I en FCoV II

FCoV komt wereldwijd voor bij zowel gedomesticeerde als wilde katten van alle leeftijden. Er worden twee serotypes onderscheiden op basis van antigeniciteit: FCoV type I en FCoV type II. FCoV type I komt vaker voor bij natuurlijke infecties, terwijl type II-infecties minder frequent zijn. FCoV type I wordt beschouwd als uitsluitend van feline oorsprong, terwijl type II is ontstaan door homologe recombinatie tussen feline en canine coronavirus (CCoV). FCoV type II kan feline aminopeptidase-N (fAPN) als receptor gebruiken, terwijl de receptor voor FCoV type I nog onbekend is. De meeste studies over FCoV maken gebruik van FCoV II omdat dit een hoge virusopbrengst heeft en een sterke reactie op CCoV-antiserum. FCoV daarentegen is moeilijk om op te kweken in celculturen, aangezien het enkel goed groeit in macrofagen, en het heeft een lage virusopbrengst en een zwakke specifieke serumrespons op het CCoV. (Y.-Y. Gao et al., 2023) De zwakke respons van FCoV I op CCoV is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat de spike-genen van FCoV I veel meer verschillen van CCoV, terwijl de spike-genen van FCoV II nauw gerelateerd zijn aan CCoV. (Pratelli, 2008)

Biotypes van FCoV: FECV en FIPV

Elk serotype kan verder worden onderverdeeld in twee biotypes¹, afhankelijk van de pathogeniciteit en hun biologische kenmerken: feline enterisch coronavirus (FECV) en feline infectieuze peritonitis virus (FIPV). FECV veroorzaakt doorgaans milde gastro-intestinale symptomen of verloopt asymptomatisch, terwijl FIPV leidt tot Feline Infectieuze Peritonitis (FIP), een fatale systemische ziekte. Een belangrijk verschil tussen FECV en FIPV is het

¹ Een biotype is een operationele taxonomische eenheid (operational taxonomic unit; OTU) die kan gebruikt worden in plaats van soorten om populaties en gemeenschappen te karakteriseren en met elkaar te vergelijken. (Torsvik et al., 1998) Bij FCoV worden de twee biotypes, FECV en FIPV van elkaar onderscheiden op basis van hun pathogeniciteit en hun tropisme.

celtropisme. FECV repliceert voornamelijk in de epitheelcellen van het darmkanaal, terwijl FIPV in staat is om een breed scala aan cellen te infecteren, waaronder monocysten, macrofagen, plasmacellen, lymfocyten en neurocyten. FIP kan worden onderverdeeld in twee vormen: effusieve (natte) en niet-effusieve (droge) FIP. De effusieve vorm wordt gekenmerkt door de ophoping van vocht in de buikholte, terwijl de niet-effusieve vorm granulomen veroorzaakt in verschillende organen, zoals lever, nieren en mesenteriale lymfeklieren. FECV wordt voornamelijk uitgescheiden in de feces van zowel zieke als gezonde katten, waarbij de meeste herstelde katten drager blijven. De virusdeeltjes zijn omgeven door een enveloppe, wat resulteert in een hoge extracellulaire labiliteit, vooral na het verlaten van de gastheer. Ondanks deze labiliteit blijft FECV besmettelijk vanwege zijn resistentie tegen trypsine, gastheerproteasen en pH-schommelingen, waardoor het virus het darmkanaal kan overleven. FECV heeft de neiging om de epitheelcellen van de dunne en dikke darm te infecteren en zich vervolgens via het bloed en lymfe naar de mesenteriale lymfeklieren, tonsillen en bovenste luchtwegen te verspreiden. FECV kan monocysten infecteren, wat leidt tot een systemische infectie en tot replicatie in darmepitheelcellen. Echter, infectie van monocysten en macrofagen kan leiden tot mutaties in het virus, wat bijdraagt aan de pathogenese van FIP. (Y.-Y. Gao et al., 2023)

Ontwikkeling van FIPV

Mutatiemechanismen in de ontwikkeling van FIPV

Onderzoekers hebben ontdekt dat virussen die zich vermenigvuldigen in darmweefselcellen, monocysten en macrofagen een verhoogde mutatiefrequentie vertonen. Deze mutaties verhogen de gevoeligheid van monocysten en macrofagen voor het virus, wat resulteert in een langdurige en efficiënte virusreplicatie in deze celtypen. (Y.-Y. Gao et al., 2023) De meest gangbare theorie stelt dat FIP ontstaat door interne mutaties waarbij FECV binnen de geïnfecteerde gastheer muteert tot FIPV. Deze hypothese wordt ondersteund door sequentieanalyses waarbij virussen geïsoleerd uit katten in dezelfde omgeving sterke genetische overeenkomsten vertonen, terwijl virussen uit verschillende regio's significante mutaties vertonen. (Y.-Y. Gao et al., 2023)

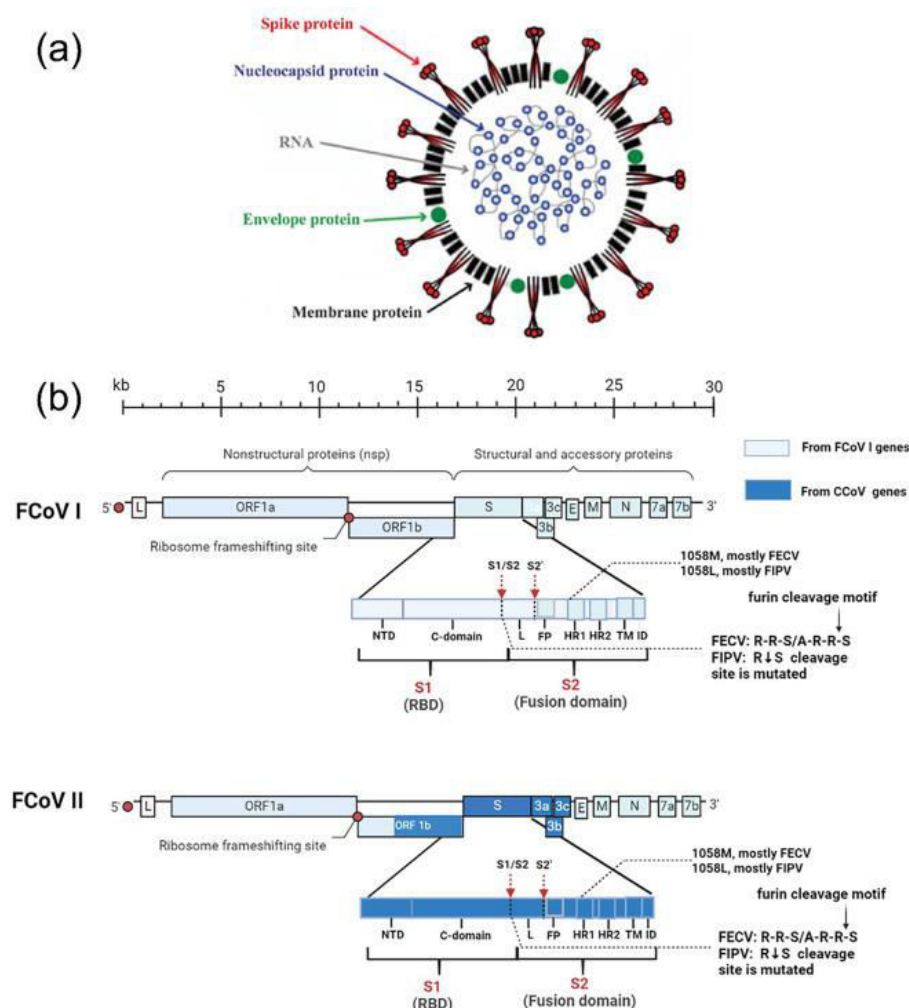
De interne mutatie van FECV tot FIPV wordt toegeschreven aan het monocyt/macrofaagtropisme. Normaal gesproken repliceert FECV in volgroeide darmepitheelcellen, maar bij aanpassing aan monocysten en macrofagen treden veranderingen op in virulentie en biotype, resulterend in FIPV. Hoewel celtropisme-transformatie een sleutelrol speelt, blijft het onderliggende mutatiemechanisme onduidelijk. (Y.-Y. Gao et al., 2023)

Genetische determinanten van pathogeniciteit

Het accessoire 3c-gen en het S-gen worden geassocieerd met variatie in FIPV. Waar het 3c-gen bij FECV intact blijft, bevat FIPV vaak mutaties die leiden tot een niet-functioneel 3c-eiwit. Hoewel deze mutaties niet direct gelinkt worden aan verhoogde virulentie, kunnen ze mogelijk het celtropisme van FECV beïnvloeden en zo de aanpassing aan monocysten en macrofagen bevorderen. (Y.-Y. Gao et al., 2023)

Ook het niet-structurele glycoproteïne 7b (gecodeerd door ORF7b) werd aanvankelijk als virulentiefactor beschouwd. Recent onderzoek toont echter aan dat het sterk geconserveerde 7b-gen geen bruikbare marker is om virulente (FIPV) en avirulente (FECV) stammen te onderscheiden. Evenmin zijn er overtuigende bewijzen voor een rol van de 3a-, 3b- of 7b-genen in de ontwikkeling van FIP. (Y.-Y. Gao et al., 2023)

Recente studies hebben het belang van het S-gen aangehaald, dat essentieel is voor receptorbinding en virale invasie. Twee specifieke mutaties in het S-gen, M1058L (methionine (M) → leucine (L)) en S1060A (serine (S) → alanine (A)), zijn geïdentificeerd in de HR1-regio van het S-eiwit. Deze aminozuursubstituties, gelokaliseerd in het fusiepeptide, correleren met veranderingen in celtropisme en vergroten het aanpassingsvermogen van het virus aan monocysten en macrofagen. (Y.-Y. Gao et al., 2023) Deze bevindingen ondersteunen het belang van het S-gen in de pathogenese van FIP.



Figuur 1: (a) Schematische weergave van FCoV. (b) Schematische weergave van de genomen van FCoV I en FCoV II. (Y.-Y. Gao et al., 2023)

Single nucleotide variant (SNV)

Een single nucleotide variant (SNV) is een variatie in de DNA-sequentie die voorkomt wanneer een enkel nucleotide (A, C, T of G) in de genomsequentie verandert. Er kan ook gesproken worden van een single nucleotide polymorfisme (SNP) indien de variatie voorkomt in minstens 1% van de populatie. (National Institute of Health (NIH), z.d.)

Nucleïnezuurextractie

Nucleïnezuurextractie met magnetische beads

Magnetische beads zijn kleine ijzeroxidedeltjes (20–30 nm) met superparamagnetische eigenschappen, dat wilt zeggen dat ze enkel magnetisch worden in een extern magnetisch veld, waardoor ongewenste klontering wordt voorkomen. Dankzij verschillende oppervlaktecoatings kunnen deze beads selectief DNA, RNA, eiwitten of andere biomoleculen binden. Bij nucleïnezuurextractie worden de beads na binding aan het doelmolecuul met een magneet gescheiden van de oplossing. Tijdens de wastappen blijven de gebonden nucleïnezuren behouden, waarna ze met elutiebuffer weer worden vrijgegeven. Deze methode is efficiënt, betrouwbaar en minimaliseert contaminatie of verlies van het doelmateriaal. (MagBio Genomics Inc., 2022)

RNA-extractie

De kwaliteit en zuiverheid van geëxtraheerd RNA zijn cruciaal voor betrouwbare downstream-toepassingen. Het RNA moet vrij zijn van eiwitten, genomisch DNA, enzymatische inhibitoren,

fenol, alcohol en nucleasen om contaminatie en degradatie te voorkomen. DNase-behandeling is essentieel om resterend DNA te verwijderen, zeker bij RT-qPCR. De RNA-kwaliteit en -kwantiteit worden beoordeeld met een NanoDrop: A260/A280- en A260/A230-verhoudingen boven 1,8 duiden op respectievelijk weinig eiwit- en polysaccharidencontaminatie. (Tavares et al., 2011)

Copy DNA (cDNA)-synthese

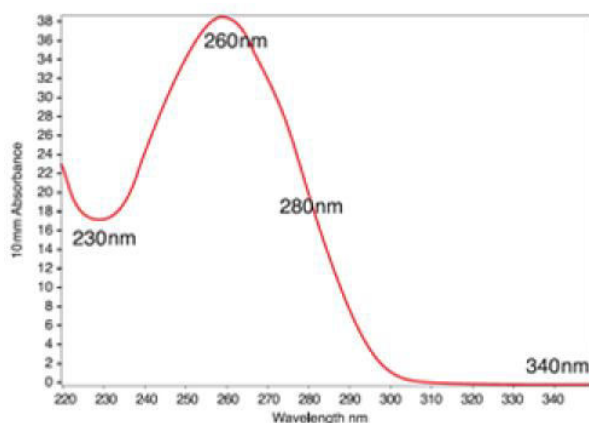
De omzetting van RNA naar complementair DNA (cDNA) is een essentiële eerste stap voor veel moleculaire toepassingen. De keuze van het reverse transcriptase-enzym en de primingstrategie bepaalt de efficiëntie en representativiteit van de cDNA-synthese. Oligo(dT)-primers richten zich op het 3'-uiteinde van RNA, maar kunnen bij secundaire structuren onvolledige transcripten opleveren. Random primers binden verspreid over het RNA, wat zorgt voor een meer volledige dekking, maar dit kan leiden tot een overschatting van het aantal kopieën door interne priming. Een combinatie van oligo(dT)- en random primers wordt vaak gebruikt om de nadelen van beide strategieën te minimaliseren en om zowel volledige als representatieve cDNA-bibliotheken te verkrijgen. (Bio-Rad, z.d.-a)

Concentratiebepaling van nucleïnezuren

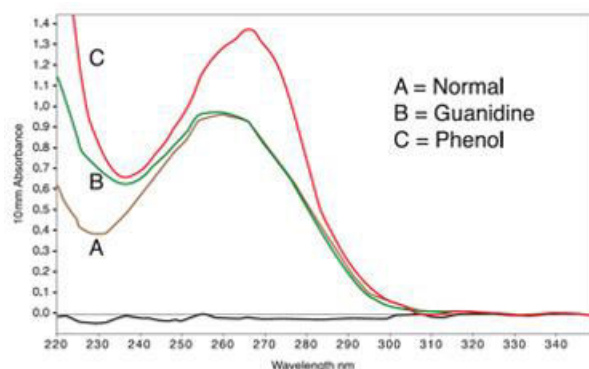
Voor een nauwkeurige kwantificatie van nucleïnezuren is het essentieel om de concentratie en zuiverheid van het geïsoleerde materiaal te bepalen. Een veelgebruikte techniek hiervoor is het meten van de absorbantie bij 260 nm met behulp van een spectrofotometer. De zuiverheid van het DNA en de aanwezigheid van contaminanten worden beoordeeld aan de hand van de 260/280-, 260/230- en 260/325-verhoudingen. (García-Alegría et al., 2020)

NanoDrop

De NanoDrop-spectrofotometer meet de absorbantie van nucleïnezuurstalen met zeer kleine volumes, dankzij een microvolume sample retention system dat zonder cuvetten werkt. De software berekent automatisch de concentratie en zuiverheidsratio's, waarbij een typische nucleïnezuurgrafiek (zie Figuur 2) inzicht geeft in de kwaliteit van het staal. De aanwezigheid van contaminanten beïnvloedt de vorm van de grafiek (zie Figuur 3). Zuivere nucleïnezuren vertonen een 260/280-verhouding van ~1,8 voor DNA en ~2,0 voor RNA, en een 260/230-verhouding van 1,8–2,2. Afwijkingen hiervan wijzen op contaminatie door eiwitten, organische verbindingen of zouten. Analyse van beide ratio's, samen met de spectrale curve, is essentieel voor het beoordelen van de zuiverheid en betrouwbaarheid van het staal voor verdere toepassingen. (Desjardins & Conklin, 2010)



Figuur 2: Een typisch nucleïnezuurstaal heeft een zeer kenmerkende grafiek bij concentratiemeting via NanoDrop. (Desjardins & Conklin, 2010)



Figuur 3: Invloed van contaminanten op de grafiek van een nucleïnezuurstaal bij concentratiemeting via NanoDrop. (Desjardins & Conklin, 2010)

Enzymen

DNA-polymerase

DNA-polymerase is een enzym dat een nieuwe DNA-streng aanmaken op basis van een complementair DNA- of RNA-template. Dit enzym katalyseert de polymerisatie van 2'-deoxyribonucleotiden langs een template-DNA-streng, waarbij ze de nucleotiden lezen en inbouwen in de groeiende DNA-streng. Tijdens deze reactie worden 2'-deoxynucleoside-5'-trifosfaten (dNTP's) ingebouwd als 2'-deoxynucleoside-5'-monofosfaten (dNMP's), waarbij een pyrofosfaatmolecule (PPi) vrijkomt. Dit proces is essentieel voor de replicatie en amplificatie van DNA in verschillende moleculaire technieken, zoals PCR en sequencing. (Shen, 2019) (Kuznetsova et al., 2022)

Er bestaan verschillende soorten DNA-polymerasen. Hieronder worden er enkel besproken die vaak worden gebruikt voor biotechnologische toepassingen.

DNA-polymerase I

DNA-polymerase I is een enzym met zowel DNA-polymeraseactiviteit als twee exonuclease-activiteiten: 3'→5' voor proofreading en 5'→3' voor het verwijderen en vervangen van nucleotiden. Hierdoor kan het enzym nicks in dubbelstrengs DNA herstellen en tegelijkertijd foutief ingebouwde of beschadigde nucleotiden corrigeren, wat essentieel is voor zowel DNA-replicatie als -reparatie. (Shen, 2019)

Klenow-fragment

Het Klenow-fragment is een enzymatisch derivaat van DNA-polymerase I met behouden polymerase- en 3'→5'-exonuclease-activiteit, maar zonder 5'→3'-exonuclease-activiteit. Het kan complementair DNA synthetiseren op enkelstrengige templates in nick-regio's, maar stopt zodra de nick is opgevuld. Dit enzym wordt voornamelijk toegepast bij DNA-end-filling (voor het creëren van stompe uiteinden) en bij de Sanger-sequentiemethode (voor primerextensie en dideoxynucleotide-incorporatie). (Shen, 2019)

Taq DNA-polymerase

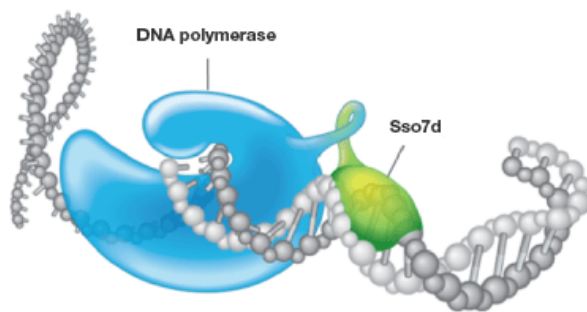
Het DNA-polymerase I enzym, geïsoleerd uit *Thermus aquaticus* en bekend als Taq-polymerase, wordt frequent toegepast in PCR-reacties vanwege zijn uitzonderlijke thermostabiliteit. Taq-polymerase katalyseert de synthese van de nieuwe DNA-streng in de 5' naar 3' richting. (Khehra et al., 2023) Het enzym mist echter proofleesactiviteit, waardoor de betrouwbaarheid sterk afhankelijk is van de Mg²⁺-concentratie, dNTP-concentraties en de verhouding daartussen, evenals de pH en andere reactiecondities. (Beck, 2023)

Hot-start Taq DNA-polymerase

Een hot-start DNA-polymerase is een inactief DNA-polymerase dat pas tijdens de PCR-reactie wordt geactiveerd door incubatie bij hoge temperaturen. Dit voorkomt dat de primers te vroeg worden verlengd door het DNA-polymerase. (Rodríguez et al., 2015)

Sso7d fusion DNA polymerase

Sso7d fusion DNA-polymerase is een gemodificeerd DNA-polymerase waarbij het dubbelstrengs DNA-bindende eiwit Sso7d is gefuseerd (zie Figuur 4). Deze fusie resulteert in een exponentiële toename van de processiviteit van het DNA-polymerase. In tegenstelling tot natuurlijke DNA-polymerasen, die vaak afhankelijk zijn van accessoire-eiwitten voor efficiënte DNA-replicatie, zorgt de Sso7d-fusie voor een stabiele binding aan het template-DNA. Hierdoor kan het polymerase sneller en met minder enzym grotere amplicons amplificeren, zelfs in aanwezigheid van PCR-inhibitoren zoals zout, heparine of humuszuur. Dit maakt kortere extensietijden mogelijk en vergroot de robuustheid van de PCR-reactie (Yadav, 2015)



Figuur 4: Stabilisatie van DNA-polymerase door Sso7d: Sso7d, een klein eiwit uit *Sulfolobus solfataricus*, bindt niet-specifiek aan DNA en stabiliseert zo de interactie tussen polymerase en template. Hierdoor verhoogt de processiviteit en efficiëntie van het polymerase, vooral bij moeilijke templates zoals GC-rijke regio's of lange amplicons. De Sso7d-fusie verandert de structuur en activiteit van het polymerase niet. (Yadav, 2015)

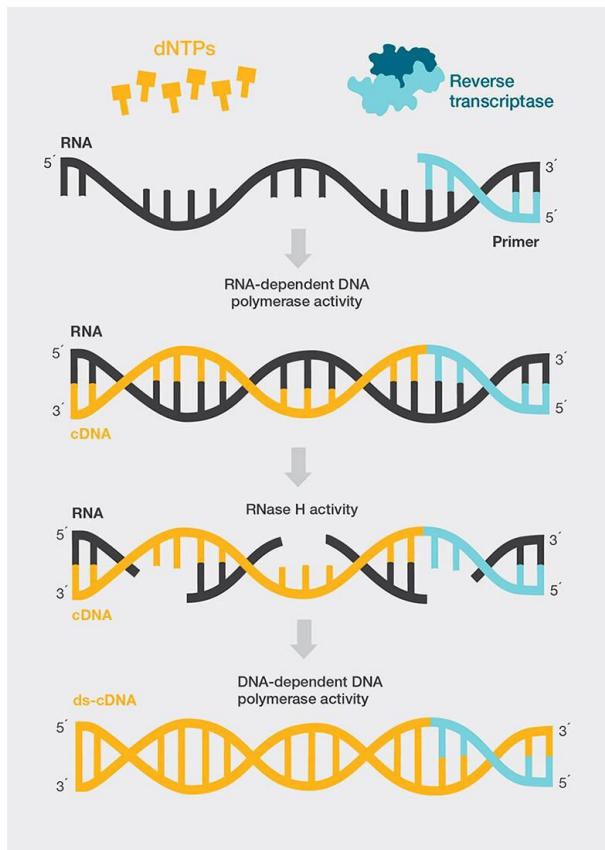
Reverse transcriptase (RT) enzym

Reverse transcriptase (RT) is essentieel voor de omzetting van RNA naar cDNA (zie Figuur 5). Het enzym bezit RNA-afhankelijke DNA-polymerase-activiteit (voor de synthese van cDNA) en RNase H-activiteit (voor de afbraak van het RNA in het DNA:RNA-complex (zie Figuur 6)). Een te hoge RNase H-activiteit kan echter de opbrengst van full-length cDNA verminderen. (Bio-Rad, z.d.-a; Thermo Fisher Scientific, z.d.)

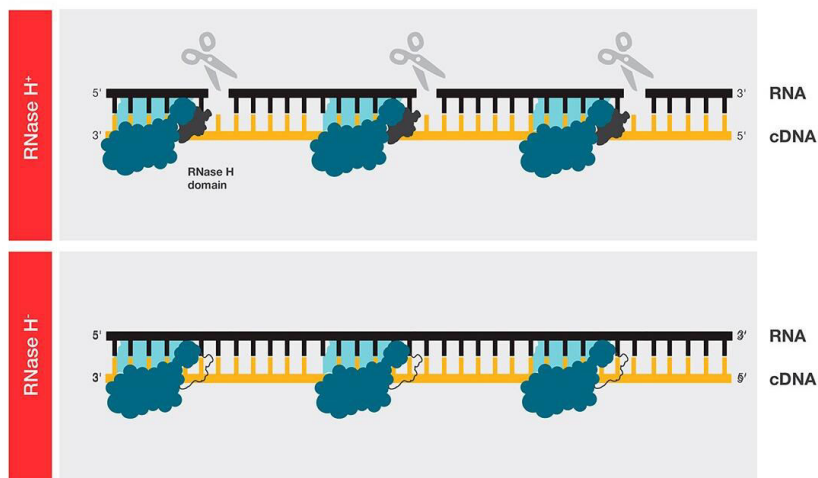
De prestaties van RT-enzymen worden verder bepaald door hun thermostabiliteit, processiviteit en fidelity. Thermostabiele RT's laten cDNA-synthese toe bij hogere temperaturen, wat gunstig is voor RNA met sterke secundaire structuren en verhoogt de specificiteit van primerbinding. Een hoge processiviteit betekent dat het enzym langere cDNA-strengen kan maken (zie Figuur 7) en beter bestand is tegen inhibitoren uit complexe stalen, zoals bloed of FFPE-materiaal. Fidelity verwijst naar de nauwkeurigheid waarmee het enzym het RNA overschrijft, wat cruciaal is voor toepassingen zoals RNA-sequencing. (Thermo Fisher Scientific, z.d.)

Sommige RT's vertonen ook terminale deoxynucleotidyl transferase (TdT)-activiteit, waarbij ongewenst extra nucleotiden aan het cDNA worden toegevoegd, wat downstream-analyses kan verstoren. (Thermo Fisher Scientific, z.d.)

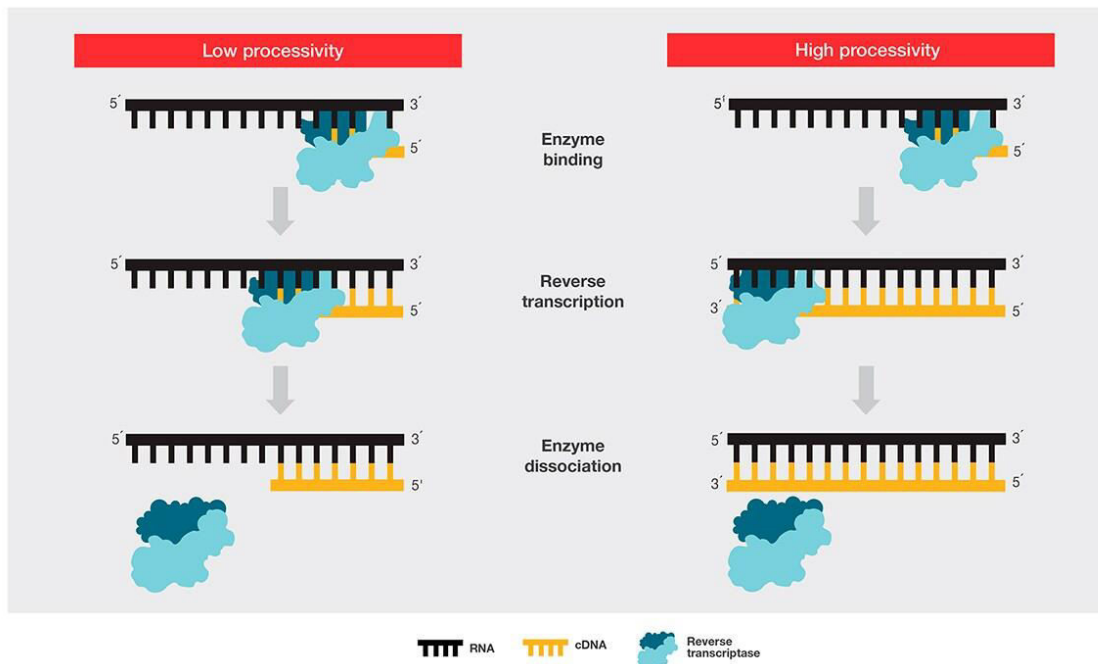
De meest gebruikte commerciële RT-enzymen zijn afgeleid van Moloney murine leukemia virus (MMLV) en avian myeloblastosis virus (AMV). MMLV-RT heeft doorgaans een hogere processiviteit en lagere foutkans, terwijl AMV-RT van nature thermostabieler is. Gemodificeerde MMLV-enzymen combineren nu een hoge processiviteit met verbeterde thermostabiliteit, waardoor ze breed inzetbaar zijn voor verschillende RNA-bronnen. (Bio-Rad, z.d.-a; Thermo Fisher Scientific, z.d.)



Figuur 5: Overzicht van het reverse transcriptie-proces. (Thermo Fisher Scientific, z.d.)



Figuur 6: RNase H-activiteit van reverse transcriptase-enzymen op cDNA-synthese. (Thermo Fisher Scientific, z.d.)

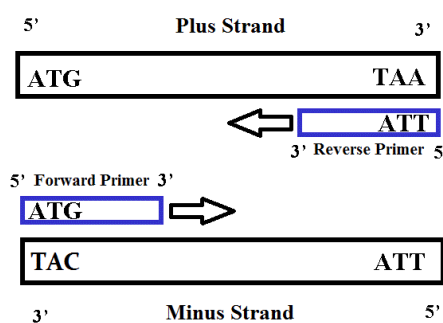


Figuur 7: De processiviteit van een reverse transcriptase kan de totale cDNA-lengte beïnvloeden. (Thermo Fisher Scientific, z.d.)

Synthetische moleculen

Primers

Primers zijn korte, enkelstrengige DNA- of RNA-moleculen, doorgaans bestaande uit 18-22 basen, die essentieel zijn voor het initiëren van DNA-synthese. Deze primers worden ontworpen om complementair te zijn aan de begin- en eindsequentie van een doelwitsequentie die tijdens PCR wordt geamplificeerd. Primers worden doorgaans in paren ontworpen, bestaande uit een forward en een reverse primer (zie Figuur 8), die DNA-polymerase in staat stellen om aan het DNA te binden en de amplificatie van de doelwitsequentie te initiëren en verlengen. De specificiteit en efficiëntie van de PCR-reactie zijn in hoge mate afhankelijk van het ontwerp en de eigenschappen van deze primers. (C. Condon, 2024)



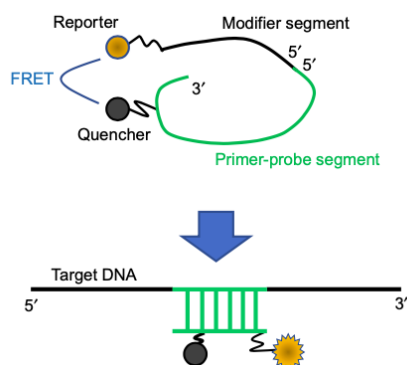
Figuur 8: Overzicht van de forward en de reverse primer en hun bindingsplaats op het template-DNA. De forward primer bindt op de min-streng en heeft dezelfde sequentie als de plus-streng, de reverse primer bindt op de plus-streng en is het reverse complement van de plus-streng. (CBD, 2017)

Probes

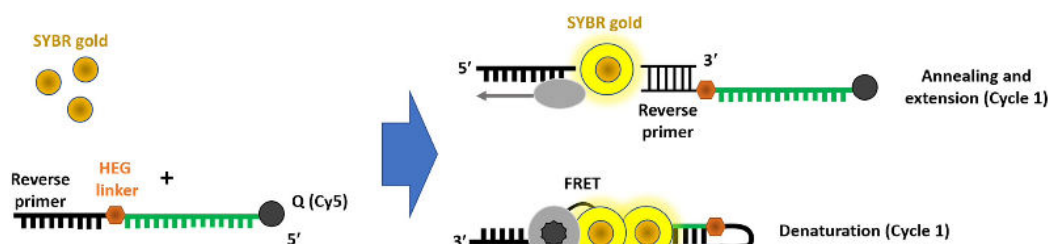
Probes zijn korte DNA- of RNA-sequenties die gelabeld zijn met een rapporteermolecule, doorgaans een fluorescente kleurstof. Deze probes worden gebruikt om de aanwezigheid van een specifiek DNA- of RNA-fragment aan te tonen. Door hun complementaire sequentie kunnen probes hybridiseren met het doelwitnucleïnezuur, waardoor detectie en kwantificatie mogelijk wordt. De specificiteit van de probe is essentieel voor het verkrijgen van nauwkeurige resultaten. (C. Condon, 2024)

Primer-probes

Primer-probes combineren een primer met een gebonden probe (zie Figuur 24E) en bestaan in verschillende vormen, waaronder hairpin, cyclicon en angler primer-probes. Hairpin primer-probes, zoals Scorpions en LUX, bevatten een haarspeldstructuur die specifiek aan het doelwit-DNA bindt, met een korte GC-staart aan het 5'-uiteinde. Cyclicon primer-probes vormen in afwezigheid van target-DNA een gesloten structuur waarin reporter en quencher dicht bij elkaar zitten, waardoor fluorescentie wordt onderdrukt; bij binding aan het DNA opent de structuur en ontstaat fluorescentie (zie Figuur 9). Angler primer-probes bestaan uit een target-identieke sequentie gekoppeld aan een reverse primer via een HEG-linker en maken gebruik van SYBR Gold als donor-fluorofore (zie Figuur 10). Ze onderscheiden specifieke van niet-specifieke amplificatie in real-time PCR, zonder dat smeltcurves nodig zijn. (Shen, 2019)



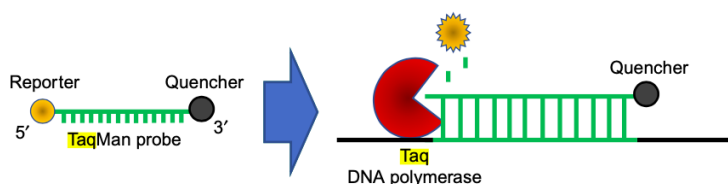
Figuur 9: Cyclicons primer-probe systeem. (Shen, 2019)



Figuur 10: Angler primer-probe systeem. (Shen, 2019)

Hydrolyseprobes

Hydrolyseprobes, zoals TaqMan-probes, bevatten een fluorofore (reporter) aan het ene uiteinde en een quencher aan het andere (zie Figuur 24A). In oplossing wordt fluorescentie onderdrukt door FRET. Tijdens qPCR hybridiseert de probe aan het target-DNA; de 5'→3' exonuclease-activiteit van het DNA-polymerase breekt de probe af, waardoor de reporter vrijkomt en fluorescentie ontstaat. De toename in fluorescentie is direct evenredig met de hoeveelheid PCR-product en wordt gemeten aan het einde van de extensiefase. Omdat de probe wordt afgebroken, is smeltcurve-analyse niet mogelijk. TaqMan-probes (zie Figuur 11 en Figuur 24A) zijn de bekendste hydrolyseprobes en beïnvloeden de PCR-efficiëntie niet. (Deharvenget et al., 2020; Shen, 2019)



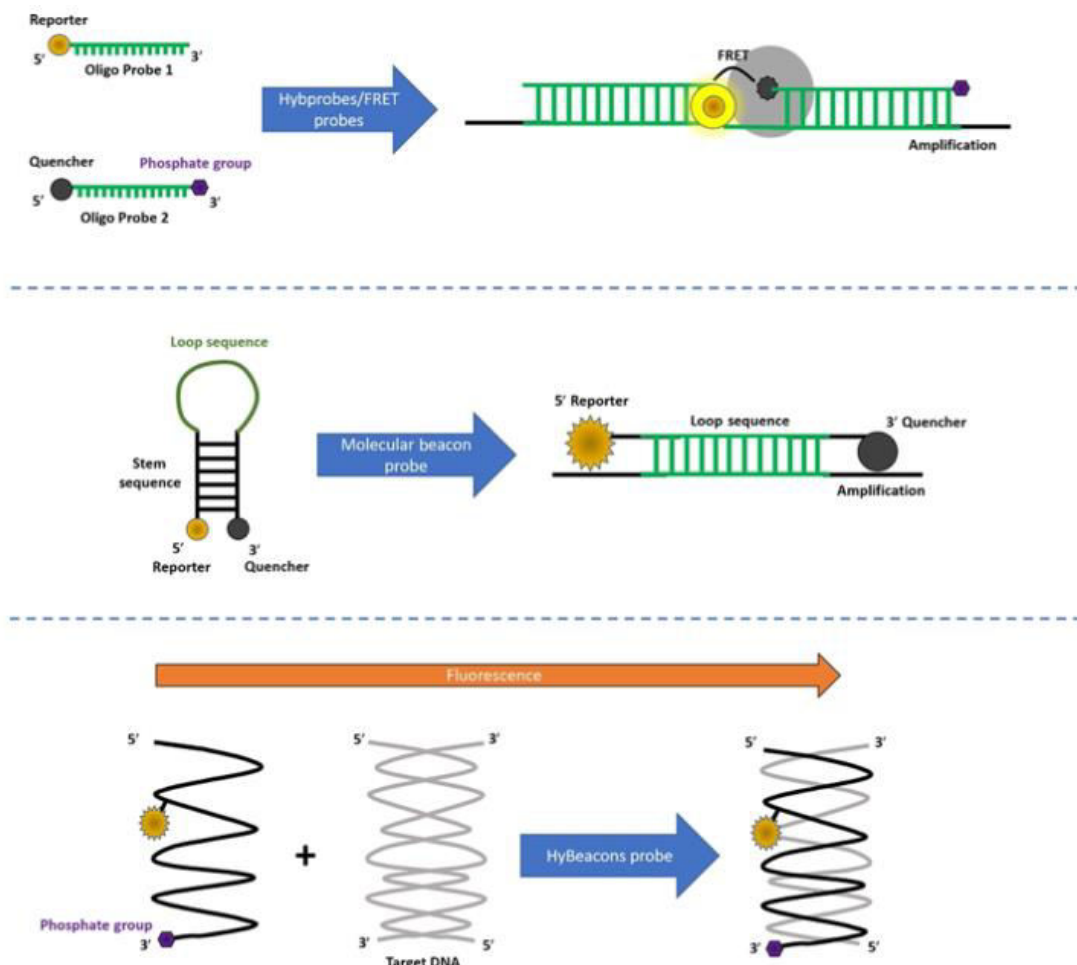
Figuur 11: TaqMan probes systeem. (Shen, 2019)

Hybridisatieprobes

Hybridisatieprobes meten fluorescentie tijdens de annealings- of extensiefase van de PCR en maken smeltcurve-analyses mogelijk, wat extra informatie geeft over de specificiteit en smelteigenschappen van het PCR-product. De fluorescentie is evenredig met de hoeveelheid target-DNA. Voorbeelden zijn Hybprobes en Molecular Beacons. (Shen, 2019)

Hybprobes (FRET-probes) bestaan uit twee oligonucleotiden die in head-to-tail oriëntatie aan het target-DNA binden; één probe draagt een reporter, de andere een quencher. Bij binding komen de fluoroforen dicht bij elkaar, waardoor fluorescentie via energieoverdracht ontstaat (zie Figuur 12 en Figuur 24B). (Shen, 2019)

Molecular Beacons zijn enkelstrengige oligonucleotiden met een hairpin-structuur. In gesloten toestand onderdrukt de quencher de fluorescentie. Bij binding aan het target-DNA opent de hairpin, waardoor fluorescentie vrijkomt (zie Figuur 12 en Figuur 24C). Door hun structuur zijn Molecular Beacons zeer specifiek en kunnen ze zelfs enkele nucleotideverschillen onderscheiden. (Shen, 2019)



Figuur 12: Het FRET-probe systeem. (Shen, 2019)

Fluorofoor-gelabelde oligonucleotiden: nucleïnezuuranalogen

Nucleïnezuuranalogen zijn moleculen die lijken op natuurlijk DNA of RNA, maar verschillen in ruggengraat, suiker of basen. Ze combineren de voordelen van natuurlijk DNA met een hogere stabiliteit en affiniteit voor nucleïnezuurtargets. Voorbeelden zijn peptide nucleic acids (PNA), locked nucleic acids (LNA) en zip nucleic acids (ZNA). (Shen, 2019)

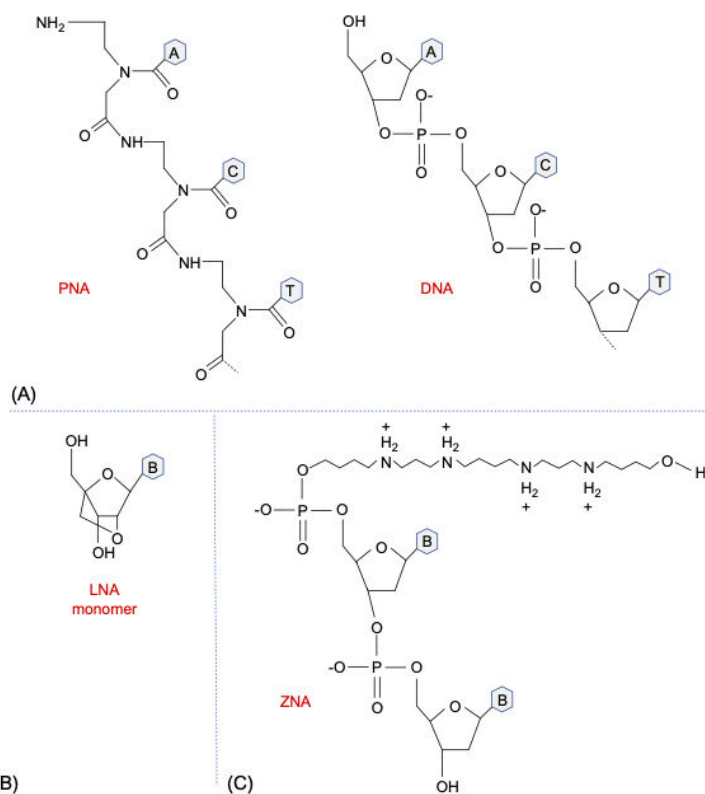
PNA-probes hebben een neutrale peptide-ruggengraat (zie Figuur 14A), wat zorgt voor hoge affiniteit en specificiteit voor DNA/RNA. Ze zijn bestand tegen nucleases en proteases, werken bij lage zoutconcentraties, en kunnen met fluoroforen worden gelabeld voor qPCR. (Shen, 2019)

LNA-probes bevatten een vergrendelde ribose-ring (Figuur 14B), waardoor de duplex met het target stabieler is en de smelttemperatuur (T_m) stijgt met 2–8 °C per LNA (zie Figuur 13). LNA's zijn geschikt voor korte probes en het detecteren van kleine of sterk gelijkende targets, maar het ontwerp vereist aandacht voor sequentie- en mismatch-effecten. LNA aan het 5'-uiteinde van primers verbetert PCR-prestaties, terwijl LNA aan het 3'-uiteinde wordt afgeraden. (You, 2006; QIAGEN, z.d.; Levin et al., 2006; Bio-Synthesis Inc., 2008)

	Same length, higher T_m					Shorter length, similar T_m				
DNA	23-mer	tcgatcgattagctacgtagcgt	T_m : 60°C	+ LNA ↓	23-mer	tcgatcgattagctacgtagcgt	T_m : 60°C	DNA		
DNA/LNA	23-mer	tcgatcgatt A gctacgtagcgt	T_m : 64°C		16-mer	---atcgatt A gct A cgta---	T_m : 60°C	DNA/LNA		
DNA/LNA	23-mer	tcgatc G at A gcta C gta C gta	T_m : 78°C		8-mer	-----a G ctac G T-----	T_m : 61°C	DNA/LNA		
					DNA: atcg LNA: ATCG					

Figuur 13: Vervang DNA door LNA om de smelttemperatuur (T_m) te verhogen. Links: meer LNA-substituties verhogen de T_m zonder verlies van specificiteit. Rechts: met LNA kan de probe korter zijn bij gelijke T_m . (QIAGEN, z.d.)

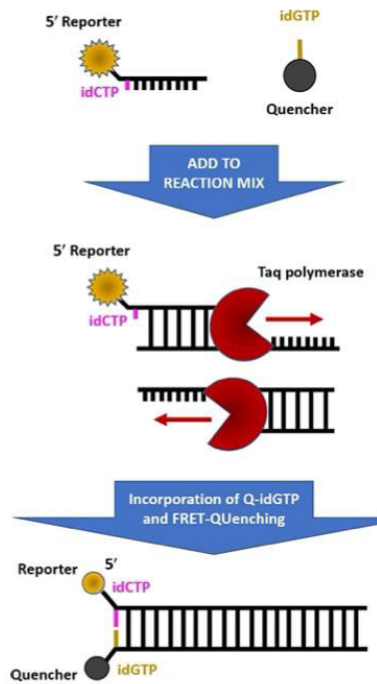
ZNA-probes zijn oligonucleotiden met kationische Z-eenheden (zie Figuur 14C), zoals spermine, die de affiniteit en specificiteit voor target-DNA verhogen. Door hun positieve lading hybridiseren ze efficiënt via een 'zippering up'-mechanisme, wat ze geschikt maakt voor gevoelige en specifieke detectie. (Shen, 2019)



Figuur 14: De structuur van nucleïnezuuranalogen. (A) PNA. (B) LNA. (C) ZNA. (Shen, 2019)

Onnatuurlijke basen: Plexor primers

Onnatuurlijke basen zoals isoguanine (Iso-dG) en 5'-methylisocytosine (Iso-dC) maken nieuwe basenparen mogelijk en worden gebruikt in Plexor-PCR. In deze methode bevat één primer een Iso-dC-residu met een fluorofore, terwijl de andere primer standaard nucleotiden bevat. Tijdens de PCR worden Iso-dG-nucleotiden met een quencher ingebouwd, waardoor de quencher en fluorofore dicht bij elkaar komen en het fluorescentiesignaal wordt onderdrukt (zie Figuur 15). De afname in fluorescentie is evenredig met de hoeveelheid target-DNA. (Shen, 2019)



Figuur 15: Plexor-probe systeem. (Shen, 2019)

gBlocks

gBlocks Gene Fragments zijn dubbelstrengige DNA-fragmenten met een lengte van 125-3000 bp, die ontworpen zijn om het aanmaken of modificeren van genen te vereenvoudigen. Deze gBlocks bevatten de primers (forward en reverse) en de probe van het gen van interesse en kunnen dienen als een synthetische positieve controle in PCR-testen. Door hun gecontroleerde samenstelling en bekende sequentie stellen gBlocks gebruikers in staat om de PCR-reactie te valideren en te optimaliseren. (C. Condon, 2024)

Ontwerp van primers en probes voor qPCR

Primer- en probeparameters

Voor het succesvol uitvoeren van een PCR-reactie is het essentieel dat de primers en probes aan bepaalde voorwaarden voldoen. Bij het ontwerpen van een primer dienen de volgende criteria in overweging te worden genomen: lengte, ampliconlengte, smelttemperatuur (T_m), GC-gehalte (GC%), potentieel tot hairpinvorming, zelfcomplementariteit (homodimeervorming), mogelijkheid tot heterodimeervorming met andere primer(s) en probe(s) in de PCR-reactie, stabiliteit van het 5'-uiteinde, specificiteit van het 3'-uiteinde, en de degeneratiegraad. (Rodríguez et al., 2015)

Amplicongrootte

Voor een efficiënte qPCR wordt aangeraden amplicons korter dan 150 bp te ontwerpen, hoewel fragmenten tot 400 bp nog goed geamplificeerd kunnen worden. Kortere producten zijn efficiënter, minder gevoelig voor secundaire structuren en denatureren gemakkelijker, wat de binding van primers en probes bevordert. Bij multiplex qPCR is het wenselijk de ampliconlengtes zo gelijk mogelijk te houden en GC-rijke regio's te vermijden, omdat deze moeilijker te amplificeren zijn. (Rodríguez et al., 2015)

Smelttemperatuur (T_m)

De smelttemperatuur (T_m) is de temperatuur waarbij 50% van de primer aan zijn complementaire sequentie is gebonden en hangt af van primerlengte en GC-gehalte. Voor qPCR ligt de ideale T_m van primers tussen 55 en 60 °C; de T_m van de forward en reverse primer moet zo dicht mogelijk bij elkaar liggen om hairpins te voorkomen. De probe dient een

hogere T_m te hebben dan de primers, bij voorkeur 8–10 °C hoger, zodat deze optimaal bindt tijdens de annealingsfase. (Rodríguez et al., 2015)

Annealingtemperatuur (T_a)

De annealingtemperatuur (T_a) bepaalt bij welke temperatuur primers optimaal aan hun doelsequentie binden en is afhankelijk van primerlengte en -samenstelling. Meestal ligt de T_a ongeveer 5 °C onder de smelttemperatuur (T_m) van de primers. De optimale T_a kan berekend worden met: (Rychlik et al., 1990)

$$T_{a,opt} = 0,3 \cdot T_{m,primer} + 0,7 \cdot T_{m,product} - 14,9$$

Een juiste T_a is essentieel voor de specificiteit en efficiëntie van PCR: een te lage T_a leidt tot aspecifieke producten, een te hoge verlaagt de opbrengst. De optimale T_a zorgt voor maximale opbrengst en specificiteit, maar kan variëren afhankelijk van de gebruikte buffer of mastermix. Zelfs bij optimale T_a kunnen primerdimeren of aspecifieke amplificatie optreden, vooral met proofreading-enzymen. (Bustin & Huggett, 2017) (Rychlik et al., 1990)

Lengte

Voor qPCR-primers en -probes wordt een lengte van 15–30 nucleotiden aanbevolen. Kortere primers verminderen de specificiteit, terwijl langere primers de efficiëntie kunnen verlagen. Langere probes verhogen de kans op mismatches, verlagen de fluorescentie en verbeteren de gevoeligheid niet. (Rodríguez et al., 2015)

GC-gehalte (GC%)

Het GC-gehalte van primers en probes ligt idealiter tussen 30 en 80%. Een hoog GC-gehalte stabiliseert de hybridisatie, maar kan de denaturatie en amplificatie-efficiëntie verminderen. Vermijd poly-C- en poly-G-regio's vanwege de vorming van stabiele tetraplexstructuren. Voor hogere specificiteit wordt aanbevolen om slechts één of twee G/C's in de laatste vijf nucleotiden aan het 3'-uiteinde van de primer te hebben, met bij voorkeur een C of G als laatste nucleotide (GC-clamp). Een G aan het 5'-uiteinde van de probe wordt afgeraden om quenching te voorkomen; idealiter bevat de probe meer C's dan G's voor een betere fluorescentienormalisatie en signalen. (Rodríguez et al., 2015)

Primer secundaire structuren

Secundaire structuren ontstaan wanneer primers aan zichzelf (intraprimerhomologie) of aan elkaar (interprimerhomologie) binden. Dit vermindert de beschikbaarheid van primers voor de PCR-reactie en verlaagt de opbrengst. Intraprimerhomologie, waarbij complementaire basen binnen dezelfde primer hairpins (zie Figuur 16) vormen heeft de meeste negatieve impact. Interprimerhomologie leidt tot homo- of heterodimeervorming tussen primers (zie Figuur 17 en Figuur 18). De stabiliteit van deze structuren wordt bepaald door hun Gibbs vrije energie² en smelttemperatuur. Verder mogen probes niet overlappen of complementair zijn aan primers om ongewenste bindingen te voorkomen. (Benchling, z.d.; Rodríguez et al., 2015; PREMIER Biosoft, z.d.)

² De Gibbs vrije energie (ΔG) geeft in primerontwerp aan hoeveel energie nodig is voor het vormen van secundaire structuren. Structuren met een positieve ΔG (groter dan 0) vormen zich niet spontaan, terwijl een negatieve ΔG betekent dat de structuur gemakkelijk en spontaan ontstaat. Hoe negatiever de ΔG , hoe stabiel en ongewenste de secundaire structuur. Daarom moeten primers met sterk negatieve ΔG -waarden vermeden worden. (Benchling, z.d.)



Figuur 16: Primer hairpin secundaire structuur. Deze structuur wordt gevormd wanneer er intraprimerhomologie (zelfcomplementariteit) is binnen een primer en de primer op zichzelf vouwt, of wanneer de smelttemperatuur van de primer lager is dan de annealingtemperatuur van de reactie. Een 3'-uiteinde hairpin zijn het meest ongunstig en mogen geen ΔG -waarde kleiner dan -2 kcal/mol hebben, interne hairpins zijn makkelijker om te verbreken en mogen geen ΔG -waarde kleiner dan -3 kcal/mol hebben. (Benchling, z.d.)



Figuur 17: Primer zelfdimeer. Deze structuur wordt gevormd wanneer er interprimerhomologie is tussen twee dezelfde (same sense) primers, waardoor ze op elkaar binden in plaats van op de template streng. Een zelfdimeer aan het 3'-uiteinde (zoals in de afbeelding) mag geen ΔG -waarde kleiner dan -5 kcal/mol hebben, een zelfdimeer aan het 5'-uiteinde heeft een hogere tolerantie en mag geen ΔG -waarde kleiner dan -6 kcal/mol hebben. (Benchling, z.d.)



Figuur 18: Primer kruisdimeer. Deze structuur wordt gevormd wanneer er interprimerhomologie is tussen twee verschillende (een forward en een reverse) primer, waardoor ze op elkaar binden in plaats van op de template streng. Een 3'-uiteinde kruisdimeer (zoals in de afbeelding) mag geen ΔG -waarde kleiner dan -5 kcal/mol hebben, een 5'-uiteinde kruisdimeer heeft een hogere tolerantie en mag geen ΔG -waarde kleiner dan -6 kcal/mol hebben. (Benchling, z.d.)

Kruishomologie

Er is sprake van kruishomologie als de primer homoloog is aan andere regio's van de template streng, dit resulteert in amplificatie van andere genen buiten de doelsequentie. (Benchling, z.d.) Om de specificiteit van de primers te verbeteren is het noodzakelijk om homologiegebieden te vermijden. Primers die zijn ontworpen voor een sequentie mogen geen andere genen in het mengsel amplificeren. Gewoonlijk worden primers ontworpen en vervolgens BLASTed om de specificiteit te testen. (PREMIER Biosoft, z.d.)

Template secundaire structuren

Naast secundaire structuren in primers kunnen ook template secundaire structuren de PCR-reactie beïnvloeden. Enkelstrengs DNA (ssDNA) kan spontaan vouwen tot stabiele secundaire structuren, waarvan de stabiliteit wordt bepaald door Gibbs vrije energie en smelttemperatuur. Als deze structuren te stabiel zijn en niet ontvouwen bij de annealingtemperatuur, kunnen primers niet binden, wat de PCR-amplificatie belemmert. Het is daarom belangrijk om bij het ontwerpen van qPCR-primers rekening te houden met mogelijke secundaire structuren in het templatestrand. (Benchling, z.d.)

Software en andere bio-informaticatools om primers en probes te ontwerpen voor PCR

Aligneren

Voor het ontwerpen van specifieke primers en probes verzamel je eerst alle relevante sequenties uit openbare databases. Door deze te aligneren, identificeer je geconserveerde regio's die ideaal zijn voor primer- en probe-ontwerp, omdat ze minder gevoelig zijn voor variaties en betrouwbare binding garanderen. (Rodríguez et al., 2015)

Primerontwerp

Primers kunnen handmatig uit deze geconserveerde regio's worden gekozen of automatisch worden gegenereerd met online tools zoals Primer3, Primer-BLAST of OLIGO 7. Daarnaast zijn er databases met gevalideerde primers en probes, zoals RTPrimerDB, PrimerBank en qPrimerDepot. (Rodríguez et al., 2015)

Secundaire structuren

Na het ontwerp is het belangrijk om primers en het amplicon te controleren op mogelijke secundaire structuren met software zoals BLAST, UNAFold of Beacon Designer. Dit voorkomt ongewenste structuren die de PCR-efficiëntie kunnen verminderen. (Rodríguez et al., 2015)

Validatie van primers en probes ontworpen voor qPCR

BLAST specificiteitsanalyse

Na primer- en probe-ontwerp is een in silico specificiteitsanalyse via BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) essentieel om de specificiteit voor doelwitsequenties te verifiëren. BLAST rapporteert een verwachtingswaarde (E-waarde); een E-waarde $\leq 0,01$ suggereert homologe sequenties. In silico PCR-tools kunnen potentiële PCR-producten voorspellen en mispriming opsporen. Ondanks de waardevolle feedback die deze tools bieden, moet de specificiteit van de qPCR-assay empirisch worden gevalideerd met experimenteel bewijs. (Rodríguez et al., 2015)

Primer- en probeconcentratie

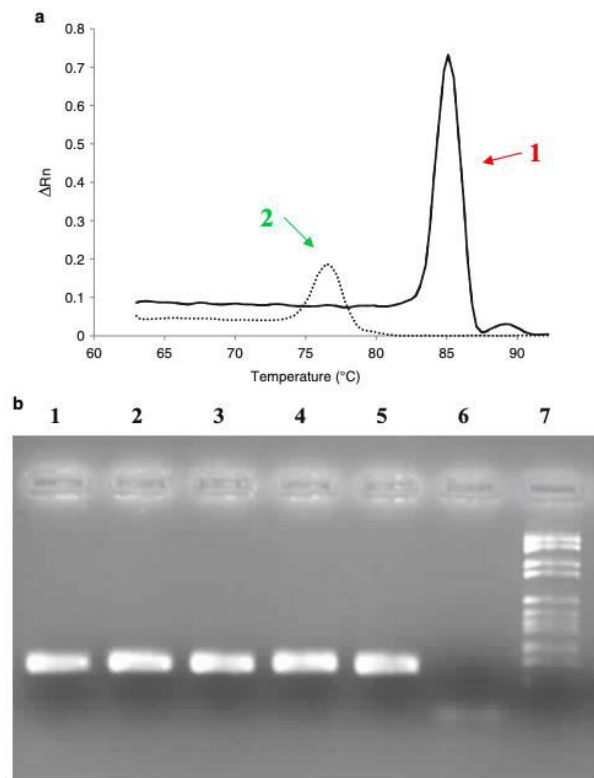
Voor optimale qPCR-resultaten is het belangrijk de concentraties van primers en probes te optimaliseren. Dit gebeurt door de amplificatieplots te beoordelen en de combinatie te kiezen met de laagste C_q-waarde en het hoogste fluorescentiesignaal bij een vaste targetconcentratie. Primerconcentraties liggen meestal tussen 50 en 300 nM; te hoge concentraties verhogen het risico op mispriming, terwijl te lage concentraties primeruitputting kunnen veroorzaken. De optimale probeconcentratie wordt bepaald na optimalisatie van de primers en ligt doorgaans tussen 50 en 250 nM, waarbij 250 nM vaak optimaal is. Te weinig probe geeft geen signaal, te veel verhoogt de achtergrondfluorescentie. (Rodríguez et al., 2015)

Cycling conditions

Na de optimalisatie van de primer- en probeconcentratie, dienen de optimale cyclische omstandigheden te worden vastgesteld. Hoewel de annealingstemperatuur wordt berekend door de primer design software, kan deze aanzienlijk afwijken van de experimenteel vastgestelde annealingstemperatuur. Het wordt daarom aanbevolen om verschillende annealingstemperaturen uit te testen, beginnend rond 5 °C onder de theoretische T_m, om de optimale experimentele annealingomstandigheden te bepalen. (Rodríguez et al., 2015)

Niet-specifieke amplificatieproducten (smeltcurves)

De specificiteit van een qPCR-protocol kan worden beïnvloed door niet-specifieke amplificatieproducten, zoals primerdimeren of producten door aspecifieke primerbinding. De analyse van smeltcurves (dissociatiecurves), gegenereerd met dsDNA-bindende kleurstoffen zoals SYBR® Green, helpt deze producten te identificeren: een specifiek amplicon geeft één smalle piek (zie Figuur 19a), terwijl niet-specifieke producten of primerdimeren bij lagere temperaturen smelten. Vergelijking van de smelttemperatuur van het specifieke product met die van de NTC (No Template Control) kan primerdimeren aantonen. Gelelektroforese (zie Figuur 19b) biedt extra zekerheid over de afwezigheid van artefacten, aangezien deze methode een hogere resolutie heeft dan smeltcurve-analyse. Ook bij probe-gebaseerde assays is controle op niet-specifieke producten belangrijk, omdat ze de PCR-resultaten kunnen beïnvloeden. Voor definitieve verificatie van het PCR-product is sequencing noodzakelijk, gevolgd door vergelijking met referenties in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). (Rodríguez et al., 2015)

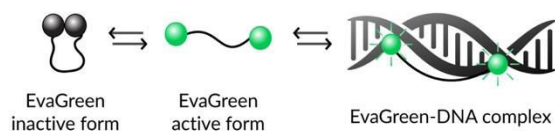


Figuur 19: (a) Smeltcurves die specifieke amplificatie van de targetsequentie en primerdimeervorming in een no template-control (NTC) weergeven. 1: Staal dat DNA bevat; 2: NTC-staal. (b) Agarosegelanalyse om primerdimeervorming te onderzoeken. Lijnen 1-5: qPCR-producten verkregen door de SYBR® Green-methode te gebruiken; Lijn 6: NTC-staal met aanwezigheid van primerdimeren die zichtbaar zijn als een diffuse band aan de bodem van de gel; Lijn 7: DNA moleculaire grootte merker van 2,1-0,15 kb. (Rodríguez et al., 2015)

Kleurstoffen

EvaGreen

EvaGreen® Plus Dye is een groene fluorescerende kleurstof die alleen fluoresceert bij binding aan dsDNA. Dankzij het unieke “release-on-demand” mechanisme (zie Figuur 20), waarbij de kleurstof uit een lusvormige dimerenstructuur vrijkomt bij aanwezigheid van DNA, kan EvaGreen® in hoge concentraties worden gebruikt zonder PCR-inhibitie. Dit zorgt voor een sterk fluorescentiesignaal, waardoor de kleurstof geschikt is voor zowel qPCR- als HRM-toepassingen. In vergelijking met SYBR® Green I veroorzaakt EvaGreen® minder PCR-inhibitie en niet-specifieke amplificatie. Bovendien maakt EvaGreen® directe visualisatie van PCR-producten op gel mogelijk zonder extra kleuring, dankzij het robuuste signaal bij hoge kleurstofconcentraties. (Davis, z.d.-a; Biotium, z.d.-b)



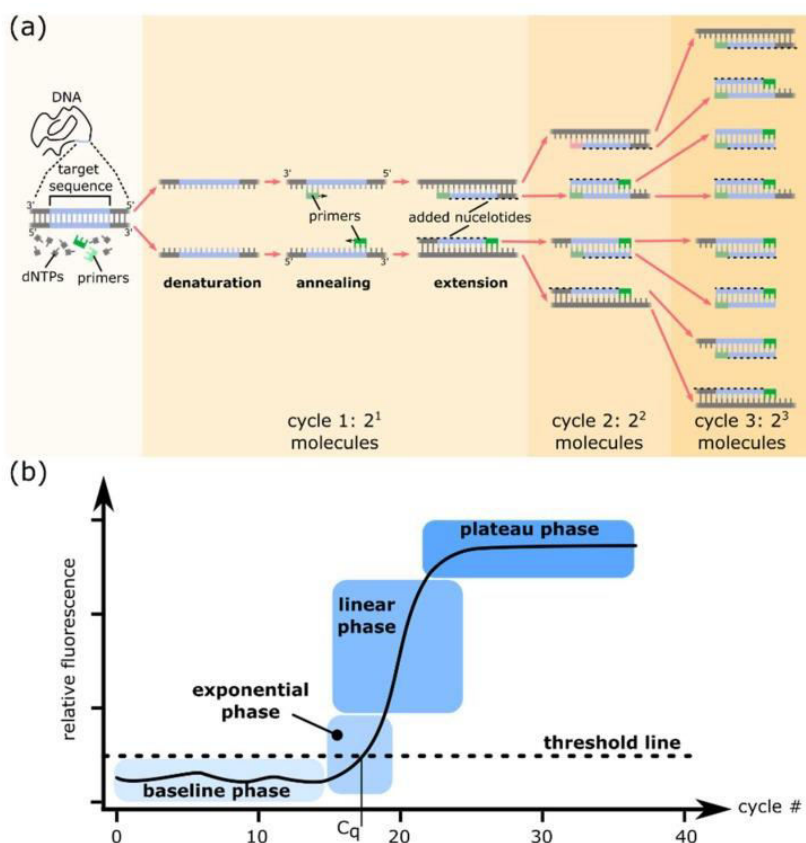
Figuur 20: EvaGreen® kleurstof bindt zich aan dsDNA via een nieuw mechanisme van “release-on-demand”. (Davis, z.d.-a)

Polymerasekettingreactie (PCR)

De polymerasekettingreactie (PCR) is een in vitro-techniek waarmee specifieke DNA-sequenties exponentieel worden vermeerderd, zodat miljoenen kopieën uit een kleine hoeveelheid startmateriaal ontstaan. De specificiteit wordt bepaald door primerhybridisatie, de gevoeligheid door enzymatische amplificatie.

PCR bestaat uit 20–40 temperatuurcycli met drie stappen: denaturatie (95 °C, DNA-strengen scheiden), annealing (meestal 55–72 °C, primers binden aan hun complementaire sequenties) en elongatie (75–80 °C, DNA-polymerase verlengt de primers) (zie Figuur 21a). Elke cyclus verdubbelt het aantal doelwit-DNA-moleculen, wat leidt tot exponentiële amplificatie. Uiteindelijk raakt de reactie verzadigd door uitputting van reagentia en self-annealing van producten.

Na PCR worden de producten vaak geanalyseerd via gelelektroforese, waarbij DNA-fragmenten op grootte worden gescheiden en zichtbaar worden gemaakt met ethidiumbromide. PCR kan worden geremd door inhibitoren zoals proteïnase K, fenol, EDTA, ionische detergenten, heparine, spermidine en hemoglobine, die het enzym of de reactie kunnen verstoren. (Quan et al., 2018; Khehra et al., 2023)



Figuur 21: (a) Principe van PCR: Elke cyclus omvat drie stappen-denaturatie van dsDNA, annealing van primers, en elongatie door DNA-polymerase-en wordt 20-40 keer herhaald. (b) Typische qPCR-amplificatiecurve: Na een initiële baseline volgt een exponentiële fase (optimale amplificatie), waarna de curve overgaat in een lineaire en uiteindelijk een plateaufase door uitputting van reagentia. De C_q-waarde is het cyclusnummer waarop de drempelwaarde wordt bereikt. (Quan et al., 2018)

Gel RFLP

Restrictiefragmentlengtepolymorfisme (RFLP) is een techniek die gebruikmaakt van restrictie-endonucleasen om variaties in DNA-sequenties, zoals VNTR's (variabel aantal tandemherhalingen), te detecteren. Door DNA te knippen met specifieke enzymen ontstaan fragmenten van verschillende lengtes, die na gelelektroforese en Southern blot-analyse unieke patronen opleveren. Deze patronen worden gebruikt voor DNA-fingerprinting, vaderschapstesten en de identificatie van genetische ziektemerkers, omdat RFLP's vaak dicht bij ziektegenen liggen.

RFLP is specifiek voor een combinatie van DNA-kloon en restrictie-enzym. De methode vereist voldoende DNA, wat tijdrovend kan zijn. Door PCR toe te passen om kleine hoeveelheden DNA te amplificeren, kan met de cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) assay de gevoeligheid en efficiëntie van RFLP-analyse worden verhoogd. (Shen, 2019)

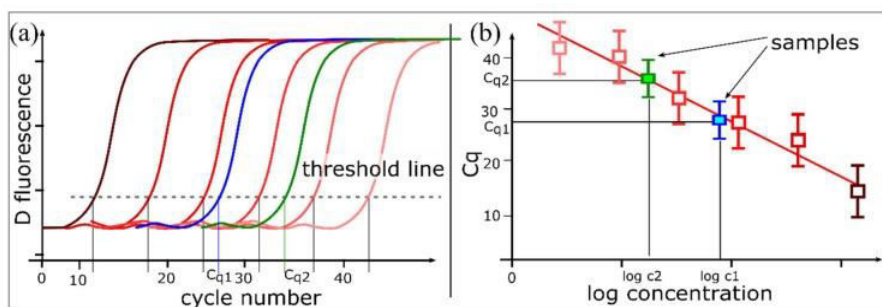
Real-time kwantitatieve PCR (qPCR)

Real-time kwantitatieve PCR (qPCR) is een geavanceerde PCR-techniek waarmee de hoeveelheid PCR-product per cyclus kan worden gemeten via fluorescentie. In tegenstelling tot conventionele PCR, die eindproducten analyseert met gelelektroforese, biedt qPCR real-time monitoring en snellere, nauwkeurigere analyses. (Quan et al., 2018; Thornton & Basu, 2015)

De detectie gebeurt met:

1. **Oligonucleotideprobes** (zoals TaqMan): geven alleen een fluorescent signaal bij binding aan een specifieke sequentie. (Thornton & Basu, 2015)
2. **Intercalerende kleurstoffen** (zoals SYBR® Green): binden aan elk dsDNA, waardoor ook niet-specifieke producten of primerdimeren een signaal kunnen geven. Het gebruik van intercalerende kleurstoffen brengt een grotere kans op valse signalen met zich mee. (Thornton & Basu, 2015)

Een typische qPCR-amplificatiecurve bestaat uit een baseline, een exponentiële en een plateau fase (zie Figuur 21b.; de exponentiële fase is het meest informatief. Voor kwantificatie wordt een standaardcurve gebruikt, gebaseerd op monsters met bekende concentraties. De absolute hoeveelheid doelwit wordt bepaald door vergelijking met deze curve (zie Figuur 22), mits de PCR-efficiëntie van monsters en standaarden vergelijkbaar is. Verschillen in efficiëntie kunnen de nauwkeurigheid van de kwantificatie beïnvloeden. (Quan et al., 2018)



Figuur 22: Real-time qPCR met standaardcurve: (a) Amplificatiecurves voor een zesvoudige 10x verdunningsreeks van een template met bekende concentraties. Voor elke verdunning wordt de Cq-waarde bepaald. (b) De standaardcurve wordt verkregen door de Cq-waarden uit te zetten tegen het logaritme van de standaardhoeveelheid. De helling van deze curve geeft de amplificatie-efficiëntie weer; een helling van -3,32 duidt op 100% efficiëntie. (Quan et al., 2018)

Analyse van de qPCR-resultaten

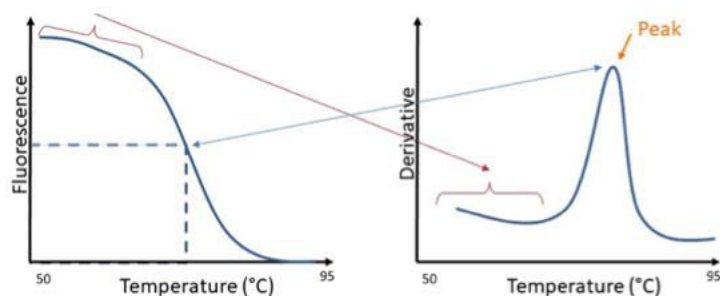
De analyse van qPCR-resultaten kan op twee hoofdmanieren worden uitgevoerd: via de amplificatiecurve en via de smelt- of denaturatiecurve.

1. **Amplificatiecurve:** Deze curve toont de relatieve of absolute hoeveelheid amplicon per cyclus. De kwantificatiecyclus (Cq/Ct) is het aantal cycli tot de fluorescentiedrempel wordt bereikt. Kwantificatie kan met een standaardcurve (voor absolute hoeveelheden) of via de vergelijkende Cq-methode (voor relatieve expressie, formule $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$), mits gelijke PCR-efficiënties. De PCR-efficiëntie wordt berekend uit de helling van de standaardcurve; waarden tussen 90-110% en een R^2 van 0,99-0,999 zijn optimaal. (Deharvenget et al., 2020; Rodríguez et al., 2015)

Bij multiplex qPCR is extra optimalisatie nodig vanwege mogelijke interacties tussen primers en probes. Een primer-limiteringsassay helpt om de juiste primerconcentraties te bepalen. Primers en probes worden eerst afzonderlijk (singleplex) getest; de efficiëntie in multiplex mag niet significant afwijken, anders is verdere optimalisatie vereist. (Rodríguez et al., 2015)

2. **Smelt- of denaturatiecurve-analyse:** Deze analyse volgt de denaturatie van dsDNA bij toenemende temperatuur met behulp van fluorescentie. De smelttemperatuur (T_m) is het punt waarop 50% van het DNA enkelstrengig is. High Resolution Melting Analysis (HRMA) maakt onderscheid tussen amplicons op basis van sequentie, lengte en GC-

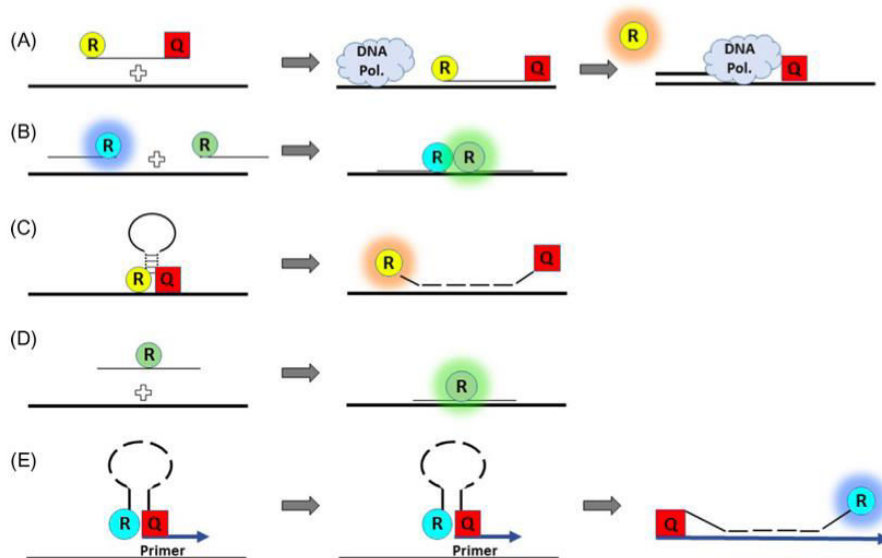
gehalte, en detecteert variaties zonder extra verwerking na PCR. (Deharvengt et al., 2020)



Figuur 23: Smelttemperatuurgrafiek van een real-time PCR (qPCR). (Deharvengt et al., 2020)

qPCR-probes

De probes voor qPCR kunnen opgedeeld worden in twee categorieën, afhankelijk van het gedrag in de PCR-reactie: een hydrolyse-type probe (zie Figuur 24A) en een hybridisatie-type probe (zie Figuur 24B-D). Zie eerder voor uitleg over de verschillende type probes.



Figuur 24: Schematische weergave van de probes die gebruikt worden in real-time PCR. (A) TaqMan probes. (B) HybProbe of Förster resonance energy transfer probe. (C) Molecular beacon probe. (D) HyBeacons probe. (E) Primer-probe. De gloeiende figuren stellen moleculen voor die aan het fluoresceren zijn/een fluorescent signaal uitzenden. DNA Pol. = DNA-polymerase, Q = Quencher, R = reporter fluorofor. (Deharvengt et al., 2020)

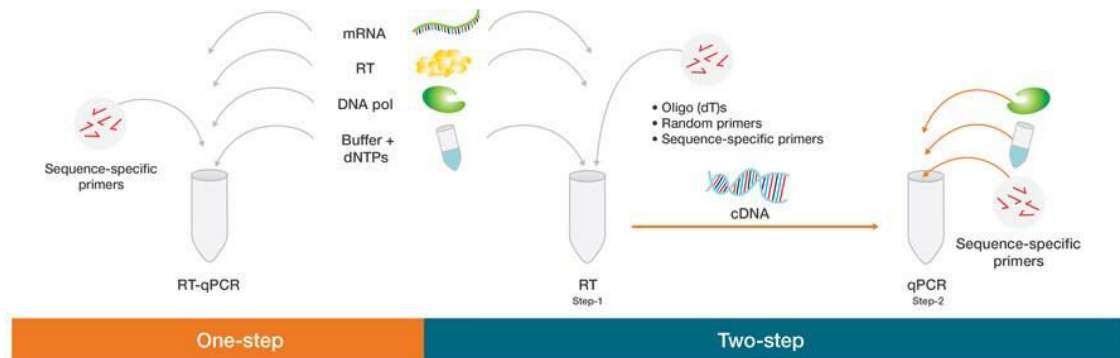
Reverse transcriptie PCR (RT-qPCR)

Reverse transcriptie PCR (RT-qPCR) wordt gebruikt om RNA te detecteren en kwantificeren door het eerst om te zetten in cDNA, dat vervolgens als template dient voor qPCR. (ThermoFisher Scientific, z.d.-a)

Er zijn twee benaderingen binnen RT-qPCR (zie Figuur 25):

1. **One-step RT-qPCR:** Reverse transcriptie en PCR vinden plaats in één buisje met sequentiespecifieke primers. Dit minimaliseert variatie en contaminatierisico, is snel en geschikt voor high-throughput, maar laat minder optimalisatie toe en is minder gevoelig dan two-step. (ThermoFisher Scientific, z.d.-a)
2. **Two-step RT-qPCR:** Reverse transcriptie en PCR gebeuren afzonderlijk, elk met geoptimaliseerde condities. Dit biedt meer flexibiliteit, maakt langdurige opslag van cDNA mogelijk en laat afzonderlijke amplificatie van verschillende targets toe. Nadelen zijn een groter contaminatierisico en meer tijdsinvestering. (ThermoFisher Scientific, z.d.-a)

De keuze tussen one-step en two-step RT-qPCR hangt af van de gewenste balans tussen snelheid, gevoeligheid en flexibiliteit. One-step RT-qPCR combineert reverse transcriptie en PCR in één buis, wat zorgt voor minder variatie, minder contaminatierisico en snelle, reproduceerbare resultaten, maar laat minder optimalisatie toe en is minder gevoelig. Two-step RT-qPCR biedt meer flexibiliteit en gevoeligheid doordat reverse transcriptie en PCR afzonderlijk en onder optimale condities plaatsvinden, en maakt langdurige opslag van cDNA en amplificatie van meerdere targets mogelijk. Wel is deze methode tijdsintensiever en gevoeliger voor contaminatie. (ThermoFisher Scientific, z.d.-a; Rodríguez et al., 2015)



Figuur 25: One-step vs two-step RT-qPCR. (ThermoFisher Scientific, z.d.-a)

Digitale PCR (dPCR)

Digitale PCR (dPCR) is een geavanceerde techniek voor absolute kwantificatie van doelwitnucleïnezuren, zonder nood aan een standaardcurve. (zie Figuur 27). Het staal wordt verdeeld over duizenden microreactoren, waarbij elke partitie één of geen doelsequentie bevat, volgens een Poisson-verdeling. Na PCR wordt het aantal positieve (fluorescente) partities bepaald (zie Figuur 26), waarmee de absolute concentratie van de doelsequentie wordt berekend. Dit gebeurt met de formule:

$$\lambda = -\ln \left(\frac{\text{aantal onderverdelingen} - \text{aantal positieve onderverdelingen}}{\text{aantal onderverdelingen}} \right) / V_{\text{onderverdeling}}$$

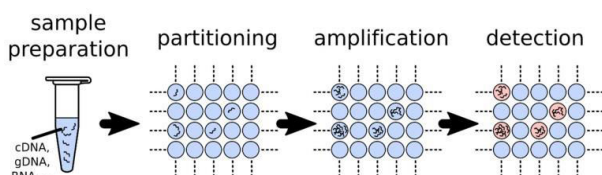
waarbij λ het aantal kopieën per partitie is en V het volume van een partitie.

Door deze verdeling vermindert templatecompetitie, kunnen zeldzame mutaties worden opgespoord en is de methode minder gevoelig voor inhibitoren. Oorspronkelijk werd dPCR uitgevoerd met microbuisjes of microplaten, maar dankzij microfluidica is nu massale, efficiënte en geautomatiseerde compartimentering mogelijk, bijvoorbeeld via microwells of emulsiedruppels. (Quan et al., 2018)

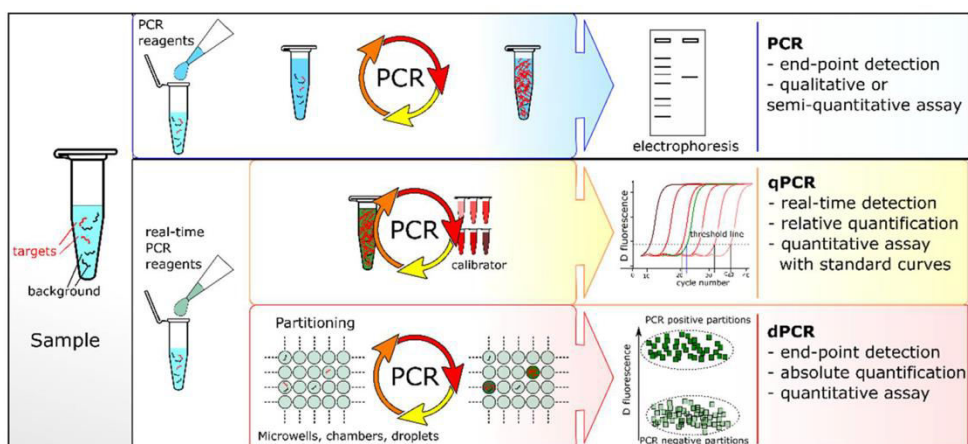
Indien het volume (V) van de onderverdelingen gekend is, kan het aantal kopieën per μL (λ_{volume}) berekend worden met volgende formule:

$$\lambda_{\text{volume}} = \frac{\lambda}{V}$$

Het totale aantal kopieën van het doelmolecuul kan vervolgens berekend worden door het aantal kopieën per onderverdeling (λ) te vermenigvuldigen met het aantal onderverdelingen of door het aantal kopieën per μL (λ_{volume}) te vermenigvuldigen met het input reactievolume.



Figuur 26: Principe van digitale PCR (dPCR): Het staal wordt verdeeld in vele kleine partities zodat elke partitie één of geen doelwitsequentie bevat. Elke partitie fungeert als een afzonderlijke PCR-reactie. Positieve partities worden gedetecteerd via fluorescentie. De fractie positieve partities wordt, met behulp van de Poisson-verdeling, gebruikt om de concentratie van de doelwitsequentie te berekenen. (Quan et al., 2018)

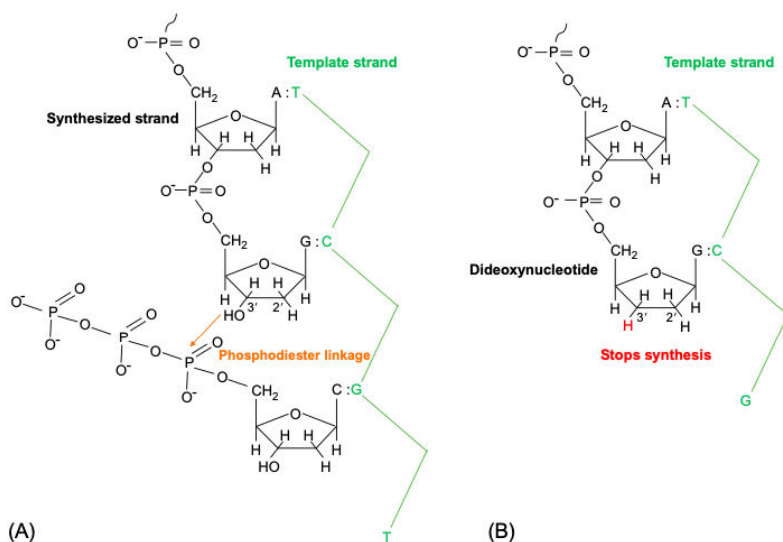


Figuur 27: Vergelijking van PCR-gebaseerde technieken: Conventionele PCR analyseert eindproducten via gelelektroforese. qPCR meet de hoeveelheid DNA in real-time per cyclus met een standaardcurve. dPCR verdeelt het monster vooraf in vele partities en bepaalt de DNA-concentratie op basis van het percentage positieve partities met Poisson-statistiek. (Quan et al., 2018)

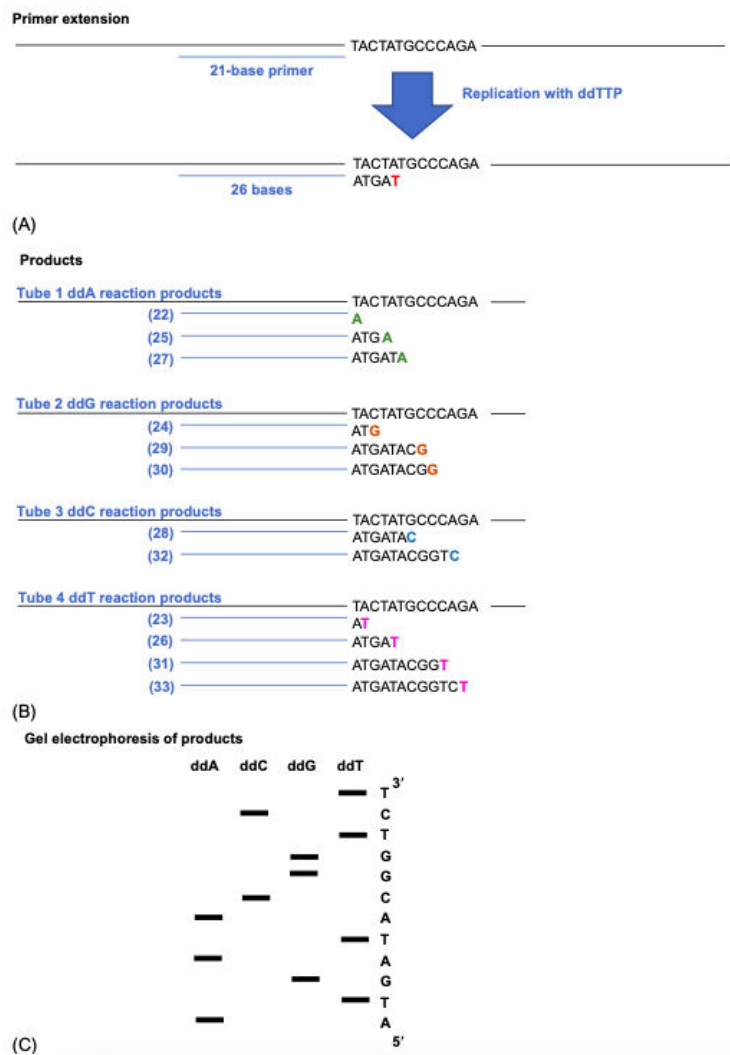
Sequencing

Sanger sequencing

Sanger sequencing maakt gebruik van DNA-polymerase en fluorescent gelabelde dideoxynucleotiden (ddNTP's) als keten-terminators om DNA-sequenties te bepalen via capillaire elektroforese. Door de afwezigheid van een 3'-hydroxylgroep blokkeren ddNTP's verdere verlenging van de DNA-keten (zie Figuur 28). Na amplificatie en zuivering van het doelwit-DNA wordt een primer aangehecht, waarna DNA-polymerase de streng verlengt tot een ddNTP wordt ingebouwd. Elk van de vier ddNTP's draagt een specifiek fluorescent label, zodat de ingebouwde base kan worden geïdentificeerd. De resulterende fragmenten van verschillende lengtes worden gescheiden via capillaire elektroforese, waarbij het patroon van fluorescente pieken de DNA-sequentie weergeeft. (Deharvengt et al., 2020)



Figuur 28: Het principe van chain termination voor DNA-synthese. (A) De 3'-OH wordt vervangen door een H, (B) en dit resulteert in het beëindigen van de DNA-synthese. (Shen, 2019)



Figuur 29: Schematische weergave van chain termination-sequencing. (A) Toevoeging van ddTTP stopt de DNA-synthese. (B) De reactie verloopt in vier tubes, elk met één type ddNTP en alle dNTP's; de getallen geven de lengte van de gevormde fragmenten aan. (C) Gelelektroforese scheidt de fragmenten per tube, waardoor de DNA-sequentie kan worden afgelezen. (Shen, 2019)

Dimethylsulfoxide (DMSO)

Dimethylsulfoxide (DMSO) is een sterk polair oplosmiddel (C_2H_6OS) dat breed inzetbaar is in de organische chemie, onder andere voor oxidaties en als cryoprotectant bij het bewaren van celculturen. In qPCR wordt DMSO vaak toegevoegd om de efficiëntie en specificiteit te verbeteren, vooral bij templates met hoog GC-gehalte of sterke secundaire structuren. DMSO vermindert de stabiliteit van deze structuren en verlaagt de smelttemperatuur (T_m), waardoor primers en probes beter kunnen binden. Meestal wordt 2–5% DMSO gebruikt; optimalisatie is nodig om remming van Taq-polymerase te voorkomen, aangezien te veel DMSO kan leiden tot aspecifieke bindingen. (Sigma-Aldrich, z.d.; Chauhan, 2018; AAT Bioquest, 2023)

Doelstelling

Deze bachelorproef heeft als primaire doelstelling het optimaliseren van moleculaire detectiemethoden voor *Feline Infectieuze Peritonitis Virus* (FIPV), met focus op het verbeteren van de betrouwbaarheid en specificiteit van RT-PCR en het verkennen van alternatieve technieken. De onderzoeksactiviteiten omvatten:

1. Optimalisatie van RT-qPCR voor FIPV-detectie
 - Ontwerp van nieuwe primers en probes: Ontwikkelen van primers en probes die specifiek zijn voor FIPV, met bijzondere aandacht voor de M1058L-mutatie in het S-gen.
 - Validatie via controle-experimenten: Vergelijkende analyse van de nieuw ontworpen primers en probes met commerciële referentieprimers om kruisreactiviteit en vals-positieven uit te sluiten.
2. Verfijning van detectiemethoden voor de M1058L-mutatie
 - Optimalisatie van LNA-probes: Herzien van locked nucleic acid (LNA)-probes om de detectie van de M1058L-mutatie (methionine (M) → leucine (L)) te verbeteren, inclusief evaluatie van hybridisatie-efficiëntie en signaal-ruisverhouding.
3. Evaluatie van digitale PCR (dPCR) als alternatief
 - Vergelijkende gevoeligheid en nauwkeurigheid: Onderzoeken of dPCR een hogere detectiegevoeligheid en specificiteit biedt voor FIPV ten opzichte van RT-PCR.
 - Pilot-test met klinische stalen: Uitvoeren van een kleinschalige dPCR-test op FIPV-stalen om de technische haalbaarheid en reproduceerbaarheid te beoordelen.
4. Experimentele evaluatie en data-analyse
 - Statistische verwerking van Ct-waarden (cycle threshold) uit RT-PCR en dPCR, inclusief variantieanalyse (ANOVA) en correlatiestudies tussen mutatiedetectie en klinische FIP-diagnose.
5. Kritische analyse en advies
 - Opstellen van een gevalideerd PCR-protocol voor FIPV-detectie, inclusief concrete aanbevelingen voor diagnostische laboratoria op basis van de verkregen resultaten.

1 Materiaal en methoden

1.1 Voorbehandeling van klinische stalen

Stalen worden verzameld vanuit de routine en bewaard bij 4 °C. Na extractie worden de geëxtraheerde stalen bewaard bij -80 °C.

1.1.1 Bloed (EDTA)

Protocol: (Zoolyx, z.d.)

1. Neem 1,5 mL bloed af. Indien je dit volume niet hebt, neem dan 300 µL water en 200 µL bloed;
2. Draai af op 5000 rpm voor 5 minuten;
3. Neem de plasmafase af tot ongeveer voor de buffy coat;
4. Vortex;
5. Pipeteer 200 µL staal naar een nieuw epje en voeg 180 µL H₂O en 20 µL proteïnase K (50 µg) toe;
6. Vortex;
7. Incubeer op 56 °C;
8. Neem 200 µL staal af voor extractie.

1.1.2 Faeces-stalen

Protocol: (Zoolyx, z.d.)

1. Preheat de schudder naar 80 °C;
2. Voeg in ieder epje een halve lepel glazen beads toe;
3. Weeg 150 mg faeces af (een volle entoog) en voeg deze toe aan een 2 ml epje;
4. Voeg 1 ml ASL-buffer toe;
5. Incubeer 10 minuten op 80 °C;
6. Plaats 10 minuten in TissueLyser;
7. Incubeer 1 uur op 80 °C;
8. Verlaag de temperatuur naar 60 °C;
9. Voeg 50 µL proteïnase K (50 µg) toe;
10. Schud voor 15 minuten op 60 °C;
11. Draai af op 2500 rpm voor 30 seconden;
12. Neem 200 µL staal af voor extractie.

1.1.3 FFPE-stalen (biopt in paraffine)

Protocol: (Zoolyx, z.d.)

1. Verwijder de eerste sectie (deze is in contact geweest met lucht). Snij minimum 3 en maximum 5 secties van 20 µm met een microtoom;
2. Bedek de draagglaasjes met enkele druppels 0,5% Tween;
3. Leg de secties op een glaasje met behulp van een pincet en een penseel. Probeer zo veel mogelijk paraffine af te trimmen;
4. Steek de sectie in een 2 ml epje;
5. Voeg 250 µL 0,5% Tween toe;
6. Verhit 45 seconden in microgolf;
7. Centrifugeer op 14600 rpm voor 2 minuten;
8. Supernatans afpipetteren;
9. Resuspendeer het pellet in 450 µL ATL;
10. Vortex;
11. Incubeer 1 uur bij 90 °C, regelmatig vortexen;
12. Voeg 50 µL proteïnase K (100 µg) toe;
13. Incubeer schuddend voor 2 uur bij 56 °C;

14. Vortex en kort afdraaien;
15. Neem 2x 200 μ L staal af voor extractie.

1.1.4 Vochten

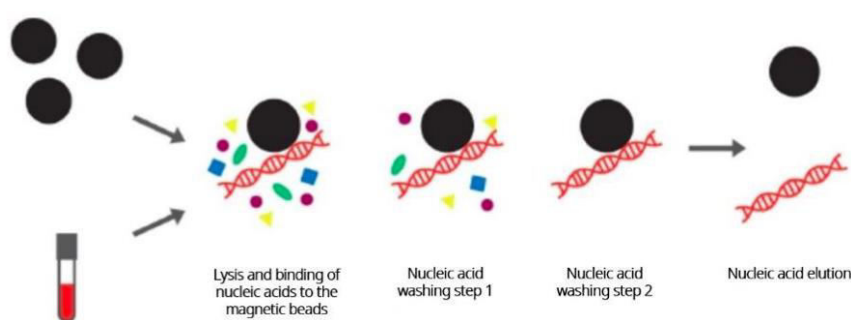
Protocol: (Zoolyx, z.d.)

1. 2 ml vocht afdraaien op 2500g voor 5 minuten, zorg ervoor dat je een pellet krijgt;
2. Voeg 200 μ L 1TL-buffer, 200 μ L water, en 25 μ L proteïnase K (50 μ g) toe aan de pellet;
3. Vortex;
4. Incubeer minimum 10 minuten op 60 °C;
5. Neem 200 μ L staal af voor extractie.

1.2 Nucleïnezuurextractie

Voor de DNA- en RNA-extractie uit de voorbehandelde stalen wordt gebruik gemaakt van het extractietoestel IndiMag 48S van Indical Bioscience. Dit toestel maakt gebruik van magnetische beads om nucleïnezuren uit stalen te extraheren (zie Figuur 30 en Figuur 31). Om de stalen in het toestel te laden, kan gebruik gemaakt worden van manuele blocks, waaraan alle buffers en de magnetische beads nog moeten toegevoegd worden, of van prefilled blocks, waaraan enkel nog het staal en de lysisbuffer moeten worden toegevoegd. (Indical Bioscience, z.d.)

Na nucleïnezuurextractie wordt de concentratie en de kwaliteit van het geëxtraheerde materiaal gemeten met behulp van NanoDrop, hierbij wordt 1,5 μ L geladen.



Figuur 30: Zuivering van nucleïnezuren met behulp van magnetische beads. (Indical Bioscience, 2021)



Figuur 31: Overzicht van de stappen ondergaan door de IndiMag 48s bij de zuivering van nucleïnezuren. (Indical Bioscience, 2021)

1.3 Spectrofotometrische bepaling van de concentratie en zuiverheid (NanoDrop)

Om de concentratie van het geëxtraheerde materiaal te bepalen, wordt gebruik gemaakt van NanoDrop.

1.4 Nabehandeling van de RNA-stalen

1.4.1 Verwijderen van DNA met DNase

Om DNA te verwijderen uit geëxtraheerde stalen wordt de DNA-free™ Kit van Invitrogen (ThermoFisher Scientific) gebruikt. Dit is een kit die gebruik maakt van DNase om contaminerend DNA te verwijderen uit RNA-stalen en die na de behandeling ook het DNase verwijdert. (ThermoFisher Scientific, z.d.-b) Het DNase Inactivation Reagent verwijdert eveneens divalente kationen, zoals bijvoorbeeld magnesium en calcium, die RNA-degradatie kunnen katalyseren wanneer RNA met het staal wordt opgewarmd. (Invitrogen (ThermoFisher), z.d.)

Na de DNase-behandeling wordt de concentratie en de kwaliteit van het materiaal gemeten met behulp van NanoDrop, hierbij wordt 1,5 µL van het staal geladen.

Protocol: Zie DNA-free™ Kit User Guide (Invitrogen (ThermoFisher), z.d.)

1.4.2 Aanmaak van copy DNA (cDNA)

Voor de aanmaak van cDNA uit RNA wordt de 'Reliance Select cDNA Synthesis Kit' van Bio-Rad gebruikt. Deze kit maakt gebruik van Reliance Reverse Transcriptase, een chimerisch enzym met een hoge thermostabiliteit en inhibitor tolerantie, voor het overschrijven van RNA naar cRNA. Dit is een enzym dat ontworpen is om goed te functioneren met moeilijke stalen en doelwitten, bijvoorbeeld met stalen die moeilijke inhibitoren of gedegradieerd RNA (bv. FFPE-stalen) bevatten en met doelwitten die secundaire structuren en/of een hoog GC-gehalte bevatten. (Bio-Rad, z.d.-e) (Bio-Rad Laboratories Inc., z.d.)

Voor onze toepassing wordt het protocol voor cDNA-synthese met Oligo(dT)-primers of random primers gevolgd ('Reaction Setup for cDNA Synthesis with Oligo(dT) Primers or Random Primers'). Er worden twee controlereacties toegevoegd: (1) No reverse transcriptase (No RT); (2) No RNA-template (NTC). De No RT-controlereactie gaat na of er contaminerend genomisch DNA (gDNA) aanwezig is in het RNA-staal. Indien geen gDNA-contaminatie aanwezig is, zal de reactie een negatief amplificatiesresultaat opleveren. Indien er wel gDNA aanwezig is, moet het staal behandeld worden met DNase voorafgaand aan cDNA-synthese. De NTC-reactie gaat de afwezigheid van reagent contaminatie na. Indien er geen reagent contaminatie aanwezig is, zal de reactie een negatief amplificatiesresultaat opleveren.

Na de DNase-behandeling wordt de concentratie en de kwaliteit van het materiaal gemeten met behulp van NanoDrop, hierbij wordt 1 µL van het staal geladen.

Protocol: Zie Reliance Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., z.d.)

1. Alle nodige componenten worden ontdooid, namelijk de 5x Reliance Select cDNA Synthesis Buffer, de Reliance Reverse Transcriptase, de Oligo(dT)₂₀ Primer Mix, de Reliance Select Random Primer Mix, en het Nuclease-free water. Alle buisjes worden gemixt door kort te vortexen en worden vervolgens kort afgecentrifugeerd.
2. De reacties worden voorbereid door de componenten volgens Tabel 1 aan 0,5 mL epjes toe te voegen. De RNA-stalen worden, indien nodig, eerst verdund naar 1 µg/µL. Er wordt 2 µL (2 µg) RNA-staal aan de reactie toegevoegd. Er wordt 1 µL nucleasevrij water toegevoegd om een totaalvolume van 20 µL te verkrijgen. Er worden twee epjes gebruikt voor de controlereacties: (1) No RT; (2) NTC. Aan de NTC wordt geen RNA-template toegevoegd en wordt 3 µL nucleasevrij toegevoegd in plaats van 1 µL. Aan

de No RT wordt geen Reliance Reverse Transcriptase toegevoegd en wordt 2 μL nucleasevrij water toegevoegd in plaats van 1 μL .

Tabel 1: Reactie setup met oligo(dT) primers of random primers. (Bio-Rad Laboratories Inc., z.d.)

Component	Volume per 20 μL reactie
5x Reliance Select cDNA Synthesis Reaction Buffer	4 μL
10x oligo(dT) primer mix of random primer mix.	2 μL
RNA template	Variable (100 fg-2 μg)
Reliance Reverse Transcriptase	1 μL
Nuclease-free water	Variable
Total reaction mix volume	20 μL

3. Mix zachtjes en incubeer als volgt:
 - oligo(dT): incubeer voor 60-90 minuten op 50 $^{\circ}\text{C}$
 - random primers: incubeer voor 20 minuten op 50 $^{\circ}\text{C}$
4. Incubeer voor 1 minuut op 95 $^{\circ}\text{C}$ om de reverse transcriptase met behulp van hitte te inactiveren.
5. Bewaar het cDNA-product bij -20 $^{\circ}\text{C}$ of 4 $^{\circ}\text{C}$.

Tabel 2: Berekende volumes voor de aanmaak van cDNA. De 'c RNA' is de concentratie van het staal na DNase-behandeling en wordt gebruikt om het benodigde volume staal te berekenen dat moet genomen worden om de gewenste massa RNA (m RNA) te bekomen. De volgende formule wordt hiervoor gebruikt: $V = c/m$. Het volume water ($V \text{ H}_2\text{O}$) wordt zodanig berekend dat het eindvolume van de reactie 20 μL is. Van stalen 40294_A en 40294_B werd eerst een 1:10-verdunning gemaakt, omdat de concentratie anders te hoog lag en het volume RNA-staal dat genomen moest worden te klein was om accuraat te kunnen pipetteren.

Staalnummer	c RNA (ng/ μL)	m RNA (ng)	Primers	V RNA (μL)	V H_2O
40294_A (1:10)	120	100	oligo(dT)	0,83	12,17
40294_B (1:10)	128,8	100	oligo(dT)	0,78	12,22
70583	50,6	100	oligo(dT)	1,98	11,02
41215	49,2	100	oligo(dT)	2,03	10,97
32066	47,4	100	oligo(dT)	2,11	10,89
31177	44,7	100	oligo(dT)	2,24	10,76
40999	59,6	100	oligo(dT)	1,68	11,32
30300	37	100	oligo(dT)	2,70	10,30
30656	26,5	50	oligo(dT)	1,89	11,11
33109	20,2	100	oligo(dT)	4,95	8,05
31047	19	100	oligo(dT)	5,26	7,74
31672	19,4	100	oligo(dT)	5,15	7,85
32398	24,4	100	oligo(dT)	4,10	8,90
42014	24	100	oligo(dT)	4,17	8,83
30877	19,9	100	oligo(dT)	5,03	7,97
30086	27,3	100	oligo(dT)	3,66	9,34
30320_A	33,4	100	oligo(dT)	2,99	10,01
30426	25,4	100	oligo(dT)	3,94	9,06
31509	100,9	200	oligo(dT)	1,98	11,02
30988	34,6	100	oligo(dT)	2,89	10,11
40027	19,9	100	oligo(dT)	5,03	7,97
40062 (1:17)	27,7	100	oligo(dT)	3,61	9,39
40507	174,1	300	oligo(dT)	1,72	11,28
30771 (1:66)	33,1	100	oligo(dT)	3,02	9,98
70039 (1:3)	22,3	100	oligo(dT)	4,48	8,52
70042	25,2	100	oligo(dT)	3,97	9,03
40600_A	222,5	600	oligo(dT)	2,70	10,30

32791	112,9	500	random	4,43	8,57
32514	/	/	/	/	/
40009	96,1	500	random	5,20	7,80
30555	37,9	250	random	6,60	6,40
30669	32,8	200	random	6,10	6,90
70343	-0,7	9	random	9,00	4,00
70388	/	/	/	/	/
30727	86	800	random	1,16	11,84
40485	32,3	250	random	7,74	5,26

1.4.3 Verdunning en allocatie van de cDNA-stalen

Na het aanmaken van het cDNA wordt dit gealloceerd naar verschillende epjes. Zo moet niet het hele staal ontdooid en terug ingevroren worden wanneer het gebruikt wordt voor een PCR en is er minder schade aan het cDNA ten gevolge van herhaaldelijk ontdooien en invriezen.

Met het cDNA-protocol wordt 20 µL cDNA aangemaakt. Hiervan wordt 1,5 µL gebruikt om de concentratie en kwaliteit te meten met behulp van NanoDrop, dus er blijft nog 18,5 µL cDNA over.

Er wordt een 1:2 verdunning gemaakt van het cDNA door 19 µL cDNA-staal aan te lengen met 19 µL nucleasevrij water, wat een totaalvolume van 38 µL 1:2 cDNA-verdunning oplevert.

Tabel 3: Verdunning cDNA.

V cDNA (µL)	V H ₂ O (µL)	V totaal (µL)
18,5	18,5	37

Vervolgens wordt opnieuw de concentratie gemeten via NanoDrop, waarbij 1 µL van het 1:2-verdunde cDNA-staal wordt geladen. Hierdoor blijft er nog 37 µL 1:2 cDNA-verdunning over. Dit wordt verdeeld over verschillende epjes met maximaal 10 µL per epje.

1.5 In silico ontwikkeling van primers en probes

1.5.1 FCoV-primers en -probes

Primers werden ontworpen op basis van het zeer geconserveerde 7b-gen, dat codeert voor het niet-structurele eiwit 7b.

1.5.1.1 Sequenties zoeken (NCBI)

Op NCBI worden verschillende sequenties van het 7b-gen van FCoV opgezocht om met elkaar te kunnen vergelijken.

1.5.1.2 Allignering (Clustal Omega)

Vervolgens worden de verschillende sequenties van het 7b-gen met elkaar gealligneerd met behulp van Clustal Omega, om geconserveerde gebieden te vinden. Deze geconserveerde gebieden kunnen dan gebruikt worden om de primers te ontwerpen.

1.5.1.3 Primer- en probe-ontwerp

De primers en de probe worden manueel ontworpen op basis van de sequentie van het 7b-gen. Er wordt geen gebruik gemaakt van primer designing software.

De parameters van de primers en de probes worden geanalyseerd met behulp van de Oligo Analyzer tool van IDT (Integrated DNA Technologies) (zie Tabel 4 en Tabel 5).

Primers

Tabel 4: Overzicht van de parameters van de primers voor het 7b-gen van FCoV. Voor de homo- en heterodimeren wordt enkel de meest negatieve waarde weergegeven als er meerdere configuraties mogelijk zijn.

Naam	Sequentie	Len gte (bp)	GC %	T _m (° C)	Hairpi n ΔG (kcal. mol ⁻¹)	Homodi meer ΔG (kcal.mol ⁻¹)	Heterodim eer ΔG (kcal.mol ⁻¹)
FCoV_7 b_fw	GAGTGTGAGGGTATCG TAGG	20	55	61, 1	0,24	-6,76	-3,53 (FCoV_7b _rv); -5,13 (FCoV_7b _pb)
FCoV_7 b_rv	GTTCTACTGCTAATGAT GTATGAC	24	37, 5	60, 6	0,37	-6,76	-3,53 (FCoV_7b _fw); -3,55 (FCoV_7b _pb)

Probe

De probes worden besteld met een '6-FAM' aan het 5'-uiteinde en een 'ZEN - 3' Iowa Black™ FQ' quencher aan het 3'-uiteinde.

Tabel 5: Overzicht van de parameters van de probe voor het 7b-gen van FCoV. Voor de homo- en heterodimeren wordt enkel de meest negatieve waarde weergegeven als er meerdere configuraties mogelijk zijn.

Naam	Sequentie (5'→3')	Len gte (bp)	GC %	T _m (° C)	Hairpi n ΔG (kcal. mol ⁻¹)	Homodi meer ΔG (kcal.mol ⁻¹)	Heterodim eer ΔG (kcal.mol ⁻¹)
FCoV_7b _pb	GTCAGATTGGTTGGTG CTGTGCC	23	56, 5	67, 4	-0,66	-3,55	-5,13 (FCoV_7b _fw); -3,55 (FCoV_7b _rv)

gBlocks

Als positieve controle worden gBlocks gebruikt. Hiervoor worden de sequenties van de voorspelde amplicons van de ontworpen primers gebruikt. Voor de primers en probes die moeten binden op het 7b-gen van FCoV wordt één gBlock besteld (zie Tabel 6).

Tabel 6: FCoV 7b gBlocks™. Dit is het amplicon dat wordt vermeerderd door de 7b primers en wordt gebruikt als positieve controle om na te gaan of de primers en probe die moeten binden op het 7b-gen van FCoV goed functioneren. Er werden twee extra G-nucleotiden toegevoegd aan het 3'-uiteinde om aan de opgegeven voorwaarden voor het GC-gehalte voor gBlocks™ van IDT te voldoen.

Na am	Sequentie	Le ng te
FC oV _7b	GAGTGTGAGGGTATCGTAGGTTTCAATTGCACATGGCCTGGCTTTCAAG ATCCTGCACATGATCATATTGATTTCTACTTTGATCTTTCTAATCCTTTCTA TTCATTTGTAGATAATTTTTATATTGTAAGTGAGGGAAATCAAAGAATCAAT GTCAGATTGGTTGGTGCTGTGCCAAAACAAAAGAGATTAAATGTTGGTTGT CATACATCATTAGCAGTAGAACGG	22 6

1.5.1.4 Analyse van primers en probes

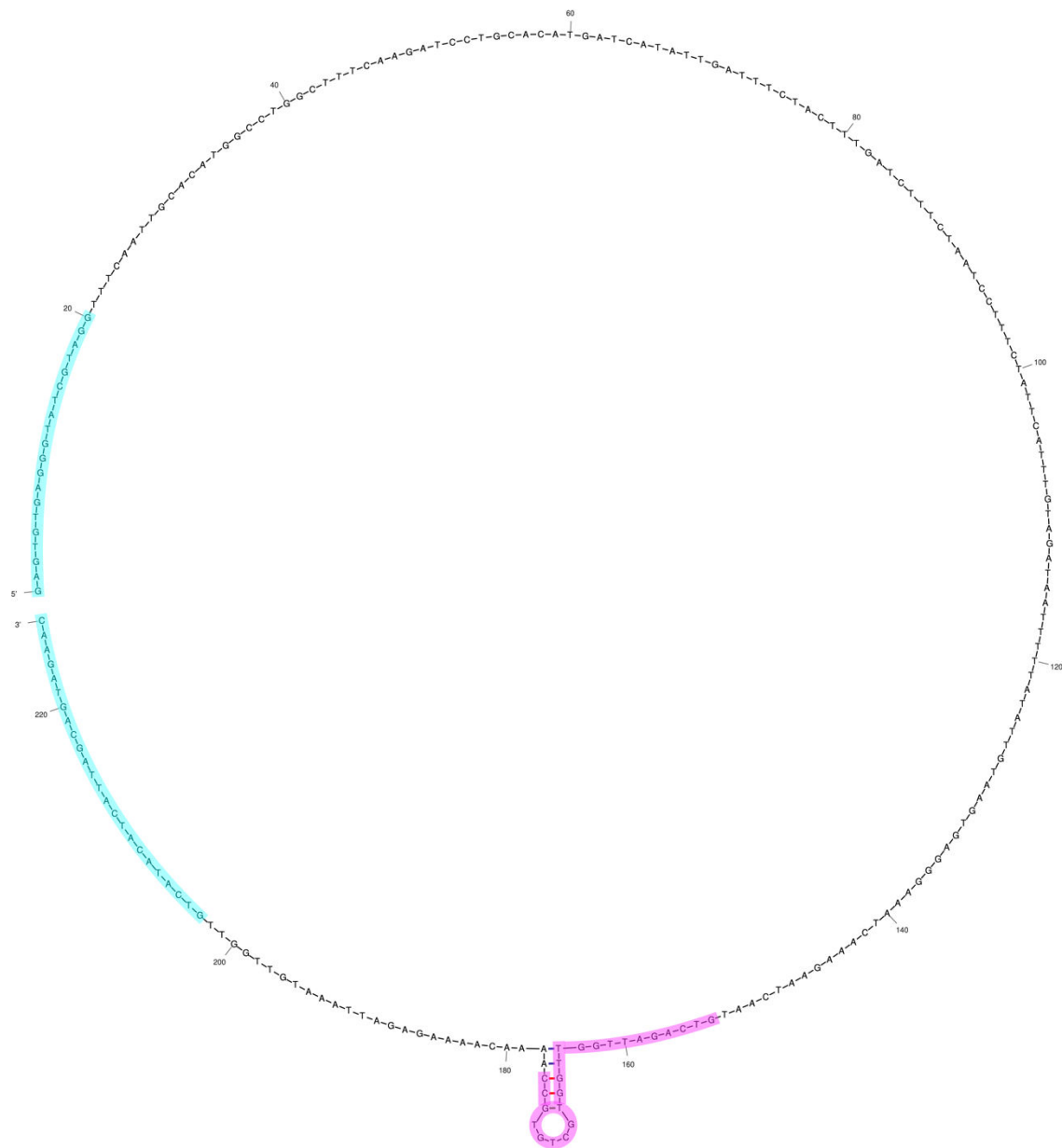
Specificiteit (BLAST)

Om de specificiteit van de primers te testen, wordt een BLAST uitgevoerd met de primers en de doelwitsequentie om na te gaan of er off-target amplificatie plaats zou vinden.

Secundaire structuren (UNAFold)

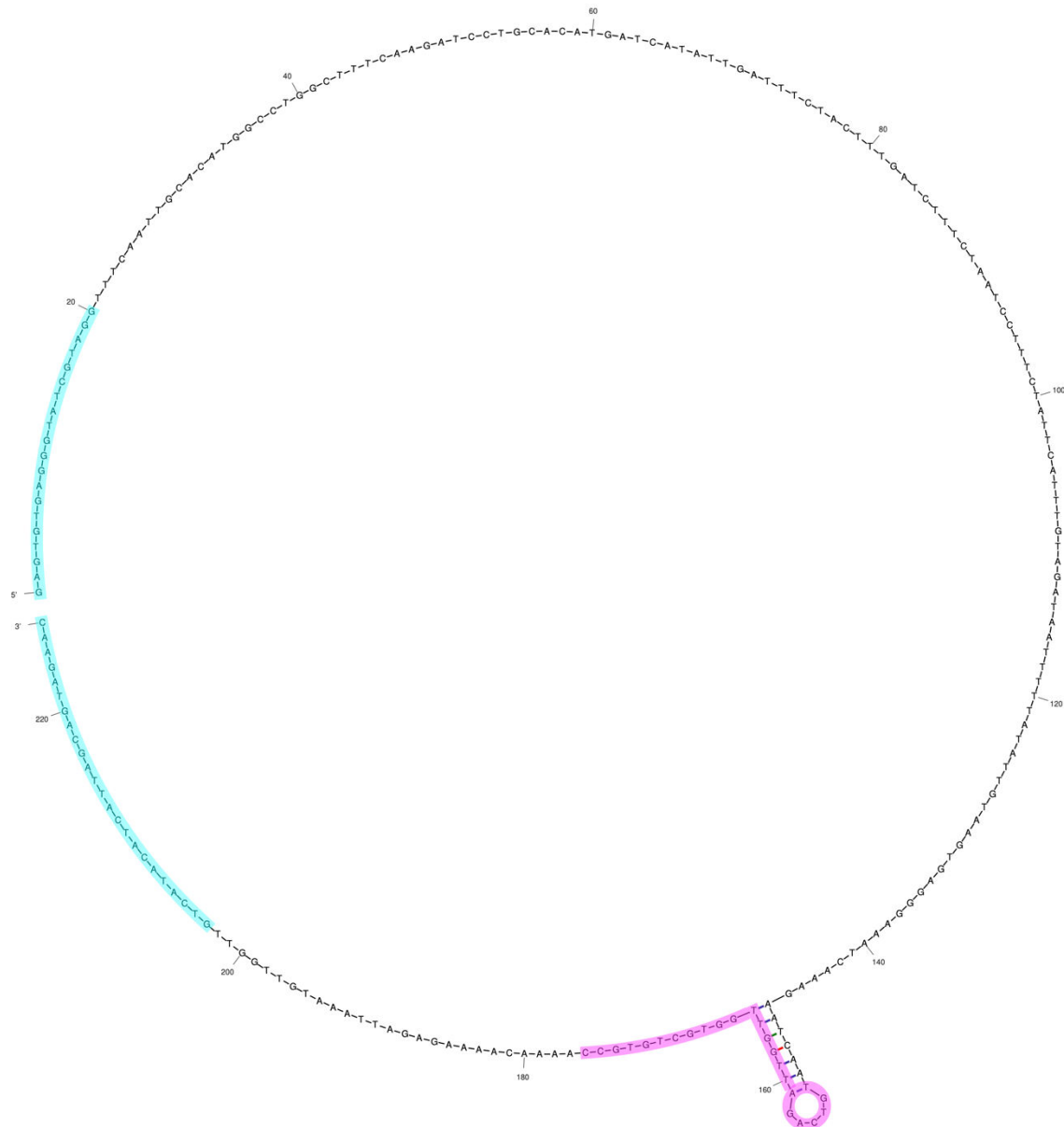
De secundaire structuren van het gevormde amplicon worden gecontroleerd met behulp van UNAFold. Hierbij worden de parameters op de website aangepast als volgt: de Folding temperature wordt aangepast naar 60 °C en de Ionic concentrations worden aangepast naar 50 [Na⁺] en 3 [Mg²⁺] en de eenheid wordt aangepast naar mM.

Ondanks het feit dat sommige secundaire structuren zich vormen op de plaats waar de probe moet binden, vormen deze geen probleem, aangezien de kans zeer klein is dat deze structuren zich zullen vormen op basis van de ΔG -waarde.



$$dG = 0.65 \text{ FCoV 7b [v4]}$$

Figuur 32: Secundaire structuur die gevormd kan worden door het voorspelde amplicon van de FCoV-primers op basis van het 7b-gen, is voorspeld door middel van UNAFold. Deze structuur heeft een ΔG -waarde van 0,65 kcal.mol⁻¹ en zal dus waarschijnlijk niet gevormd worden (de onderlimiet is $\Delta G = -5$ kcal.mol⁻¹). De ligging van de primers is aangeduid in het blauw en de ligging van de primer is aangeduid in het paars. (Markham et al., z.d.)



$$\Delta G = 1.15 \text{ FCoV 7b [v4]}$$

Figuur 33: Secundaire structuur die kan gevormd worden door het voorspelde amplicon van de FCoV-primers op basis van het 7b-gen, is voorspeld door middel van UNAFold. Deze secundaire structuur heeft een ΔG -waarde van $1,15 \text{ kcal.mol}^{-1}$ en zal dus waarschijnlijk niet gevormd worden (de onderlimiet is $\Delta G = -5 \text{ kcal.mol}^{-1}$). De ligging van de primers is aangeduid in het blauw en de ligging van de probe is aangeduid in het paars. (Markham et al., z.d.)

1.5.2 FIPV-primers en -probes

Primers worden ontworpen om de M1058L-mutatie te detecteren. Dit is een mutatie in het spike (S)-eiwit.

1.5.2.1 Sequenties zoeken (NCBI)

De primers en probes werden ontworpen door op NCBI op zoek te gaan naar verschillende sequenties van het spike (S) proteïne-gen van FCoV, een wild-type sequentie (afkomstig van FECV), een gemuteerde sequentie (afkomstig van FIPV), en een een sequentie van het volledige spike (S) proteïne-gen.

1.5.2.2 Allignering (Clustal Omega)

Om de locatie van de mutatie te vinden, worden de verschillende sequenties met elkaar gealigneerd met behulp van Clustal Omega.

1.5.2.3 Primer- en probe-ontwerp

De primers en de probe worden manueel ontworpen op basis van de sequentie van het Spike (S)-gen. Er wordt geen gebruik gemaakt van primer designing software.

De parameters van de primers en de probes worden geanalyseerd met behulp van de Oligo Analyzer tool van IDT (Integrated DNA Technologies) (zie Tabel 7 en Tabel 8).

Primers

De primers worden ontworpen op basis van de sequentie ongeveer 100 nucleotiden voor en 100 nucleotiden na de positie van de puntmutatie.

Tabel 7: Overzicht van de parameters van de primers om de M1058L-mutatie op het spike (S)-gen van FCoV op te sporen. Voor de homo- en heterodimeren wordt enkel de meest negatieve waarde weergegeven als er meerdere configuraties mogelijk zijn.

Naam	Sequentie (5'→3')	Lengte (bp)	GC %	T _m (°C)	Hairpin ΔG (kcal.mol ⁻¹)	Homodi meer ΔG (kcal.mol ⁻¹)	Heterodi meer ΔG (kcal.mol ⁻¹)
FCoV_S_fw	GCTGATCTAGTGT GTGCCCA	20	55	63,8	0	-4,62	-8,16 (FCoV_S_rv); -8,09 (M1048L_FEC(A), FIPV(C) en (T))
FCoV_S_rv	AAGGCATTAGCAA GTATTTTCTGGT	25	36	63,5	-1,62	-3,14	-8,16 (FCoV_S_fw); -4,74 (M1048L_FEC(A), FIPV(C) en (T))

Probes

De probes worden ontworpen ter hoogte van de mutatie, één probe per mogelijke base ter hoogte van de puntmutatie. Dus een probe M1058L_FECV(A) voor het wildtype met nucleotide A en een probe voor elk van de twee mogelijke mutaties, M1058L_FIPV(T) voor de mutatie naar nucleotide T en M1058L_FIPV(C) voor de mutatie naar nucleotide C.

De probes worden besteld met een '6-FAM' aan het 5'-uiteinde en een 'ZEN - 3' Iowa Black™ FQ' quencher aan het 3'-uiteinde.

LNA-probes

Om de puntmutatie zo specifiek mogelijk te detecteren, wordt 1 nucleotide in elk van de drie probes vervangen door een LNA-nucleotide. Dit verhoogt de target-specificiteit van de probe en maakt het mogelijk om een kortere probe te gebruiken, zonder dat de smelttemperatuur te laag ligt. De laatste stap, waarbij de probe wordt ingekort, is niet uitgevoerd, dus het kan zijn dat de probes te lang zullen zijn en niet goed zullen werken. In praktijk wordt gebruik gemaakt van Affinity Plus™ qPCR Probes van IDT in plaats van echte LNA-probes, deze hebben geen structurele verschillen maar hebben wel een groot prijsverschil.

Het eerste nucleotide werd veranderd van een G naar een C, omdat een 5' 6-FAM naast een guanidine base kan leiden tot verminderde fluorescentie.

Tabel 8: Overzicht van de parameters van de LNA-probes om de M1058L-mutatie op het spike (S)-gen van FCoV op te sporen. Het nucleotide dat wordt voorafgegaan door een plusteken, is het nucleotide dat een puntmutatie ondergaat en dat dus als enige verschilt tussen de drie probes. Dit nucleotide wordt vervangen door een LNA-nucleotide. Voor de homo- en heterodimeren wordt enkel de meest negatieve waarde weergegeven als er meerdere configuraties mogelijk zijn.

Naam	Sequentie (5'→3')	Len gte (bp)	GC %	T _m (° C)	Hairpi n ΔG (kcal. mol ⁻¹)	Homodi meer ΔG (kcal.m ol ⁻¹)	Heterodime er ΔG (kcal.mol ⁻¹)
M1058L_F ECV(A)	CGCGGTATGGCT+ATG GGTTCTATT	24	50	67	-0,73	-10,36	-8,09 (FCoV_S_f w); -5,7 (FCoV_S_rv); -3,61 (M1058L_FI PV(C) en (T))
M1058L_FI PV(C)	CGCGGTATGGCT+CT GGTTCTATT	24	54, 2	70	-0,73	-10,36	-8,09 (FCoV_S_f w); -5,7 (FCoV_S_rv); -3,61 (M1058L_F ECV(A) en FIPV(T))
M1058L_FI PV(T)	CGCGGTATGGCT+TTG GGTTCTATT	24	50	68 ,2	-0,73	-10,36	-8,09 (FCoV_S_f w); -5,7 (FCoV_S_rv); -3,61 (M1058L_F ECV(A) en FIPV(C))

Verkorte LNA-probes

Er wordt een verkorte versie van de LNA-probes gemaakt in de hoop dat deze beter zullen werken. Aangezien het gaat om LNA-probes, kan de lengte van de probe ingekort worden zonder dat dit de smelttemperatuur te laag brengt.

Van de M1058L_FIPV(C) LNA-probe wordt 1 nucleotide langs elke kant weggenomen (M1058L_FIPV(C)_1). Van de M1058L_FECV(A) en de M1058L_FIPV(T) LNA-probe worden 2 versies gemaakt, een versie waarbij 1 nucleotide langs elke kant werd weggenomen (M1058L_FECV(A)_1 en M1058L_FIPV(T)_1) en een versie waarbij 2 nucleotiden langs elke kant werden weggenomen (M1058L_FECV(A)_2 en M1058L_FIPV(T)_2).

Tabel 9: Overzicht parameters van de verkorte LNA-probes om de M1058L-mutatie op het spike (S)-gen van FCoV op te sporen. Het nucleotide dat wordt voorafgegaan door een plusteken, is het nucleotide dat een puntmutatie ondergaat en dat dus als enige verschilt tussen de drie probes. Dit nucleotide wordt vervangen door een LNA-nucleotide. Voor de homo- en heterodimeren wordt enkel de meest negatieve waarde weergegeven als er meerdere configuraties mogelijk zijn.

Naam	Sequentie (5'→3')	Lengte (bp)	GC%	T _m (°C)	Hairpin ΔG (kcal.mol ⁻¹)	Homodimeer ΔG (kcal.mol ⁻¹)	Heterodimeer ΔG (kcal.mol ⁻¹)
M1058L_FECV(A)_1	CCGGTAT GGCT+AT GGTTCT AT	22	50	64,8	-0,12	-9,75	-8,09 (FCoV_S_fw) ; -5,7 (FCoV_S_rv); -3,61 (M1058L_FIPV(C)_1 en (T)_1)
M1058L_FIPV(C)_1	CCGGTAT GGCT+CT GGTTCT AT	22	54,5	68,1	-0,12	-9,75	-8,09 (FCoV_S_fw) ; -5,7 (FCoV_S_rv); -3,61 (M1058L_FECV(A)_1 en FIPV(T)_1)
M1058L_FIPV(T)_1	CCGGTAT GGCT+TT GGTTCT AT	22	50	66,2	-0,12	-9,75	-8,09 (FCoV_S_fw) ; -5,7 (FCoV_S_rv); -3,61 (M1058L_FECV(A)_1 en FIPV(C)_1)
M1058L_FECV(A)_2	CGGTATG GCT+ATG GGTTCTA	20	50	61,7	0,63	-3,61	-8,09 (FCoV_S_fw) ; -5,7 (FCoV_S_rv); -3,61 (M1058L_FIPV(C)_1 en (T)_2)
M1058L_FIPV(T)_2	CGGTATG GCT+TTG GGTTCTA	20	50	63,3	0,84	-3,61	-8,09 (FCoV_S_fw) ; -5,7 (FCoV_S_rv); -3,61 (M1058L_FECV(A)_2 en FIPV(C)_1)

Niet-LNA probe

Aangezien de M1058L_FECV(A) nog steeds geen goed resultaat oplevert, wordt de probe opnieuw besteld, maar deze keer zonder LNA-nucleotide.

Naam	Sequentie (5'→3')	Len gte (bp)	GC %	T _m (° C)	Hairpi n ΔG (kcal. mol ⁻¹)	Homodi meer ΔG (kcal.mol ⁻¹)	Heterodi meer ΔG (kcal.mol ⁻¹)
M1058L_FE CV_A	CGGTATGGCTATGGG TTCTATT	22	45, 5	61, 7	0,63	-10,36	-8,09 (FCoV_S _fw); -5,7 (FCoV_S _rv)

gBlocks

Voor de primers en de probes voor de detectie van de M1058L-mutatie worden drie verschillende gBlocks besteld, één voor het wildtype en één voor elk van de twee mogelijke puntmutaties, A naar C en A naar T (zie Tabel 10).

Tabel 10: FECV en FIPV gBlocks™. Deze zijn de amplicons die door de verschillende M1058L-mutatie primers worden gevormd en worden gebruikt als positieve controle om na te gaan of de primers en probes die de M1058L-mutatie opsporen goed functioneren.

N a a m	Sequentie	L e n g t e
F E C V(A)	GCTGATCTAGTGTGTGCCCAATATTACAATGGCATTATGGTTTTACCTGGTGT TGTAGACCAAAATAAGATGGCCATGTATACTTCCTCATTAATAGGCGGTATGG CTA TGGGTTCTATTACATCTGCTGTAGCTGTTCCTTTTGCTATGCAAGTGCAG GCTAGGCTTAATTATGTTGCATTGCAAACGACGTCCTACAGGAAA ACCAGA AAATACTTGCTAATGCCTT	2 3 0
FI P V(C)	GCTGATCTAGTGTGTGCCCAATATTACAATGGCATTATGGTTTTACCTGGTGT TGTAGACCAAAATAAGATGGCCATGTATACTTCCTCATTAATAGGCGGTATGG CTC TGGGTTCTATTACATCTGCTGTAGCTGTTCCTTTTGCTATGCAAGTGCAG GCTAGGCTTAATTATGTTGCATTGCAAACGACGTCCTACAGGAAA ACCAGA AAATACTTGCTAATGCCTT	2 3 0
FI P V(T)	GCTGATCTAGTGTGTGCCCAATATTACAATGGCATTATGGTTTTACCTGGTGT TGTAGACCAAAATAAGATGGCCATGTATACTTCCTCATTAATAGGCGGTATGG CTT TGGGTTCTATTACATCTGCTGTAGCTGTTCCTTTTGCTATGCAAGTGCAG GCTAGGCTTAATTATGTTGCATTGCAAACGACGTCCTACAGGAAA ACCAGA AAATACTTGCTAATGCCTT	2 3 0

1.5.2.4 Analyse van primers en probes

Specificiteit (BLAST)

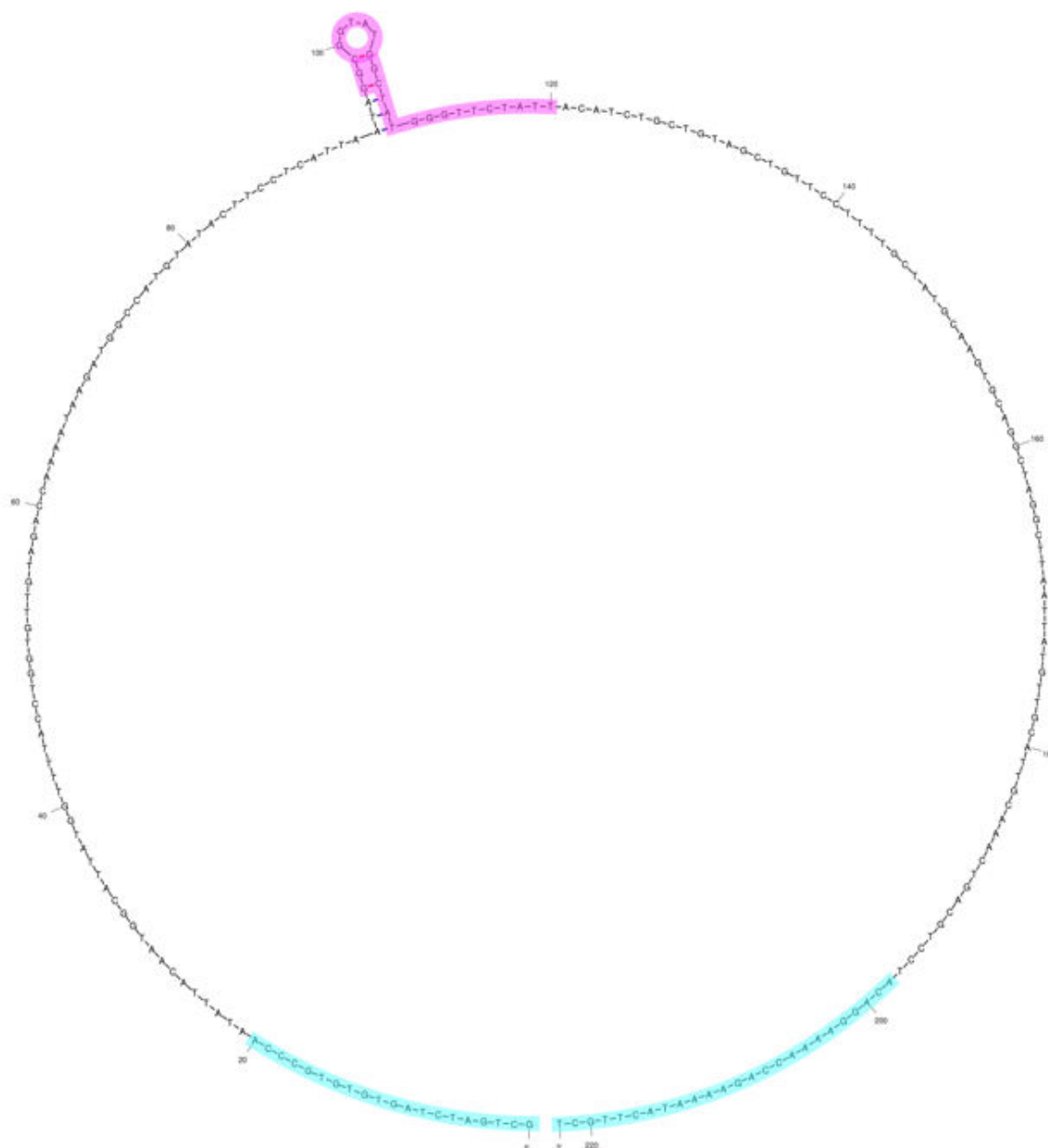
Om de specificiteit van de primers te testen wordt een BLAST uitgevoerd met de primers en de doelwitsequentie om na te gaan of er off-target amplificatie plaats zou vinden.

Secundaire structuren (UNAFold)

De secundaire structuren van de gevormde amplicons, zowel voor de wildtype-sequentie als voor de twee gemuteerde sequenties, worden gecontroleerd met behulp van UNAFold. Hierbij worden de parameters op de website aangepast als volgt: de Folding temperature wordt

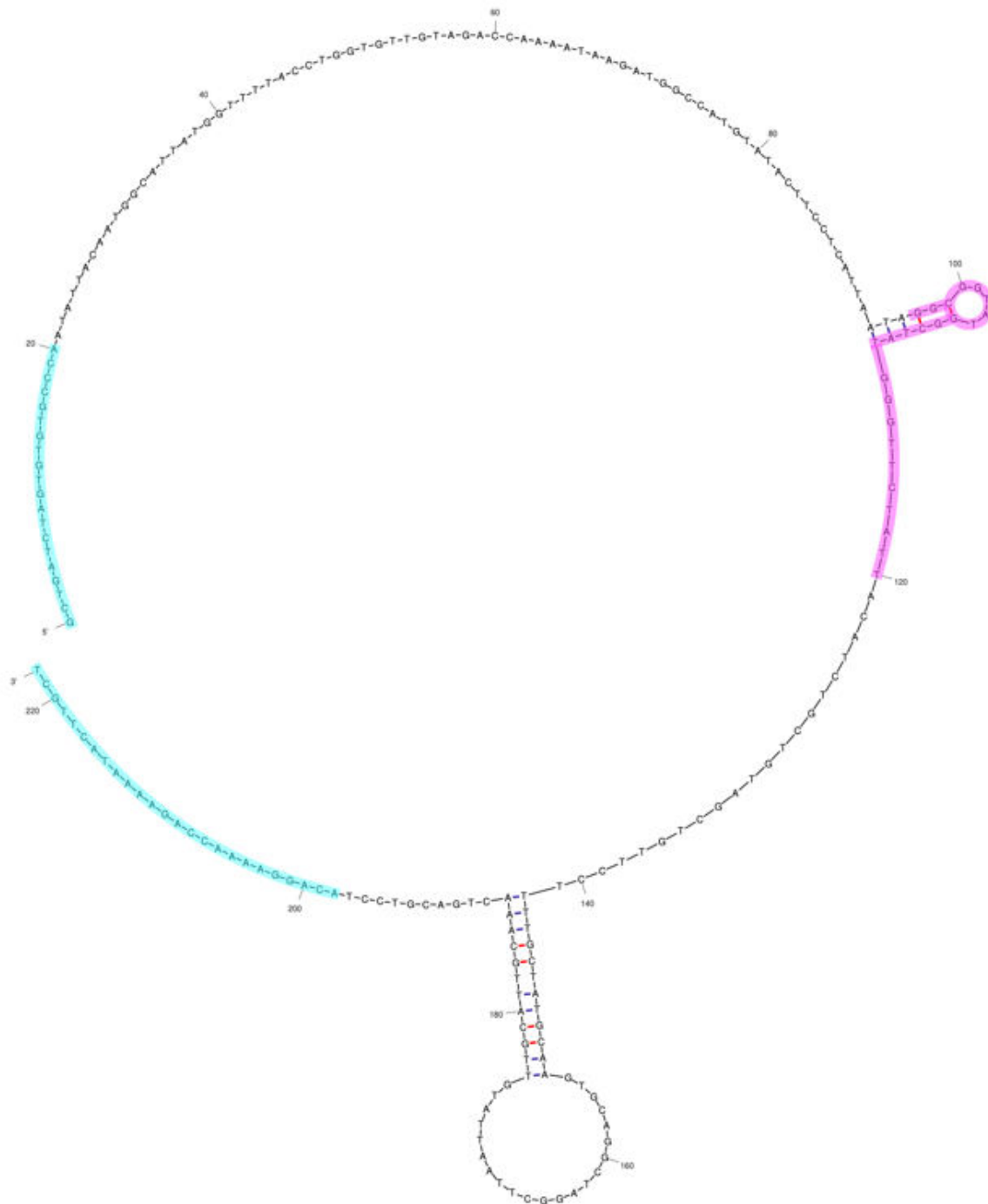
aangepast naar 60 °C en de Ionic concentrations worden aangepast naar 05 [Na⁺] en 3 [Mg²⁺] en de eenheid wordt aangepast naar mM.

Ondanks het feit dat sommige secundaire structuren zich vormen op de plaats waar de probe moet binden, vormen deze geen probleem aangezien de kans zeer klein is dat deze structuren zich zullen vormen op basis van de ΔG -waarde.



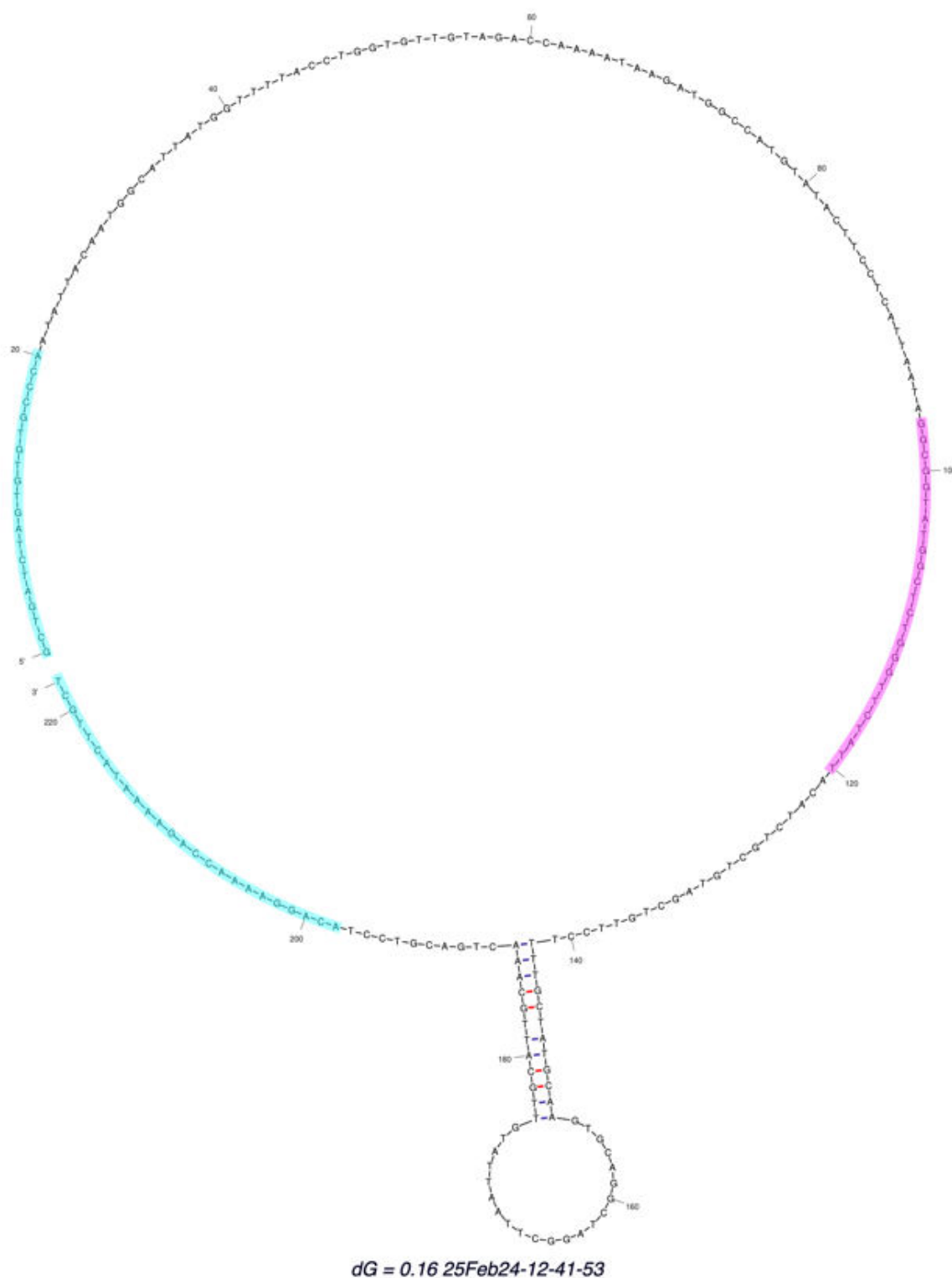
$dG = -0.07$ 25Feb24-12-23-13

Figuur 34: Secundaire structuur van het amplicon met wildtype-sequentie (nucleotide A) voor de M1058L-analyse, is voorspeld door middel van UNAFold. Deze structuur heeft een ΔG -waarde van $-0,07 \text{ kcal.mol}^{-1}$ en zal dus waarschijnlijk niet gevormd worden (de onderlimiet is $\Delta G = -5 \text{ kcal.mol}^{-1}$). De ligging van de primers is aangeduid met blauw en de ligging van de probe is aangeduid met paars. (Markham et al., z.d.)

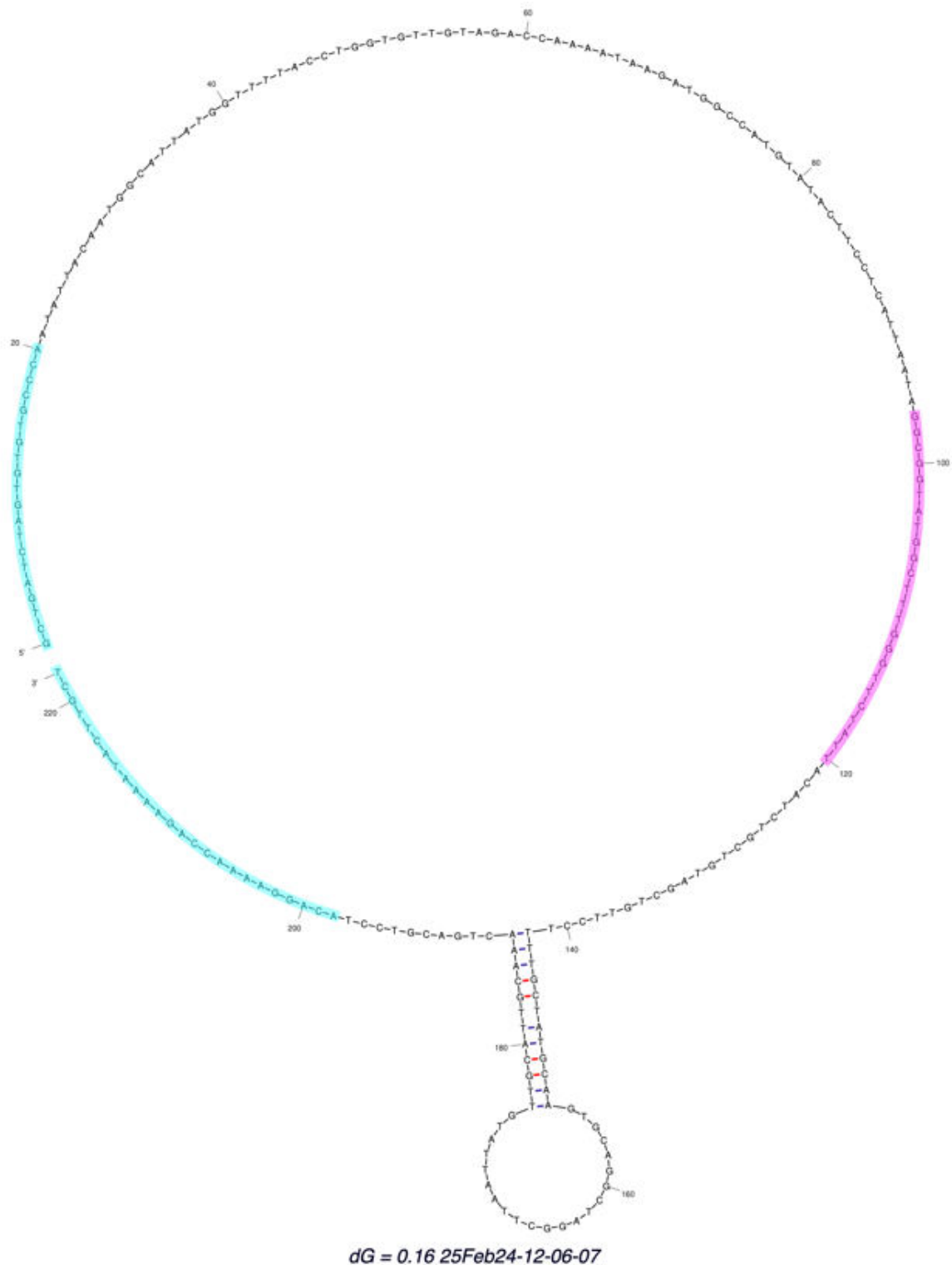


dG = 0.09 25Feb24-12-00-07

Figuur 35: Secundaire structuur van het amplicon met wildtype-sequentie (nucleotide A) voor de M1058L-analyse. Deze structuur heeft een ΔG -waarde van $0,09 \text{ kcal.mol}^{-1}$ en zal dus waarschijnlijk niet gevormd worden. De ligging van de primers is aangeduid met blauw, de ligging van de probe is aangeduid met paars. (Markham et al., z.d.)



Figuur 36: Secundaire structuur van het amplicon met gemuteerde sequentie (nucleotide C) voor de M1058L-analyse. Deze structuur heeft een ΔG -waarde van $0,16 \text{ kcal.mol}^{-1}$ en zal dus waarschijnlijk niet gevormd worden. De ligging van de primers is aangeduid met blauw, de ligging van de probe is aangeduid met paars. (Markham et al., z.d.)



Figuur 37: Secundaire structuur van het amplicon met gemuteerde sequentie (nucleotide T) voor de M1058L-analyse. Deze structuur heeft een ΔG -waarde van $0,16 \text{ kcal.mol}^{-1}$ en zal dus waarschijnlijk niet gevormd worden. De ligging van de primers is aangeduid met blauw, de ligging van de probe is aangeduid met paars. (Markham et al., z.d.)

Primerdimeren (Multiple Primer Analyzer)

Om alle primers en probes samen te controleren, wordt gebruikt gemaakt van Multiple Primer Analyzer van ThermoFisher. Hierbij worden de sequenties van alle primers en probes als input gegeven en wordt nagegaan of de verschillende primers en probes dimeren vormen met elkaar.

```

PCoV_7b_fw GAGTGTGAGGSTATCGTAGG
PCoV_7b_rv GTTCTACTGCTAATGATGATGAC
PCoV_7b_pb GTCAGATTGGTTGGTGTGTGCC
PCoV_S_fw GCTGATCTAGTGTGTGCCCA
PCoV_S_rv AGCAAGTATTTTCTGGTTTCTCTGT
M1058L_FECV(A) GGCGGTATGGCTATGGGTTCTATT
M1058L_FIPV(C) GGCGGTATGGCTCTGGGTTCTATT
M1058L_FIPV(T) GGCGGTATGGCTTTGGGTTCTATT

```

Parameters for calculation of primer Tm:

Primer concentration:

0.5

 μM

Salt concentration:

50

mM

Parameters for detection of primer dimers:

Value of the sensitivity for dimer detection (1-10):
(value 1 is maximum sensitive detection, 3 is optimal)

3

Results in tabular data format. To export the results: select all (Ctrl-A), copy (Ctrl-C) and paste (Ctrl-V) to Excel sheet.

Name	Sequence	Tm°C	CG%	nt	A	T	C	G
PCoV_7b_fw	gagtgtgagggtagtagg	59.2	55.0	20	4.0	5.0	1.0	1.0
PCoV_7b_rv	gttctactgctaataatgatgatgac	56.6	37.5	24	6.0	9.0	4.0	5.0
PCoV_7b_pb	gtcagattggtggtgctgtgcc	72.1	56.5	23	2.0	8.0	4.0	5.0
PCoV_S_fw	gctgatctagtgtgtgccca	64.4	55.0	20	3.0	6.0	5.0	4.0
PCoV_S_rv	agcaagtattttctggttttctctgt	64.2	36.0	25	4.0	12.0	4.0	5.0
M1058L_FECV(A)	ggcggtatggctatgggttctatt	68.5	50.0	24	3.0	9.0	3.0	5.0
M1058L_FIPV(C)	ggcggtatggctctgggttctatt	70.6	54.2	24	2.0	9.0	4.0	5.0
M1058L_FIPV(T)	ggcggtatggctttgggttctatt	70.3	50.0	24	2.0	10.0	3.0	5.0

Results for primer dimer detection. To export the results: select all (Ctrl-A), copy (Ctrl-C) and paste (Ctrl-V).

Self-Dimers:

Cross Primer Dimers:

Figuur 38: Resultaten Multiple Primer Analyzer (ThermoFisher) LNA-probes (zie Tabel 8). (ThermoFisher, z.d.) Als input worden alle sequenties van de primers en probes die samen in een multiplex PCR-reactie zullen gebruikt worden. De output geeft weer of er dimeren zullen gevormd worden. In dit geval worden er geen dimeren gevormd, wat goed is, aangezien dimeervorming ervoor zorgt dat er minder primers en probes beschikbaar zijn om op het RNA-template te binden.

```

PCoV_7b_fw GAGTGTGAGGGTATCGTAGG
PCoV_7b_rv GTTCTACTGCTAATGATGTATGAC
PCoV_7b_pb GTCAGATTGGTTGGTGCTGTGCC
PCoV_S_fw GCTGATCTAGTGTGTGCCCA
PCoV_S_rv AAGGCATTAGCAAGTATTTCTGGT
M1058L_FECV(A)_1 GCGGTATGGCTA+TGGGTTCTAT
M1058L_FIPV(C)_1 GCGGTATGGCTC+TGGGTTCTAT
M1058L_FIPV(T)_1 GCGGTATGGCTT+TGGGTTCTAT
M1058L_FECV(A)_2 CGGTATGGCTA+TGGGTTCTA
M1058L_FIPV(T)_2 CGGTATGGCTT+TGGGTTCTA

```

Parameters for calculation of primer Tm:

Primer concentration:

0.5

 μM

Salt concentration:

50

mM

Parameters for detection of primer dimers:

Value of the sensitivity for dimer detection (1-10):
(value 1 is maximum sensitive detection, 3 is optimal)

3

Results in tabular data format. To export the results: select all (Ctrl-A), copy (Ctrl-C) and paste (Ctrl-V) to Excel sheet.

Name	Sequence	Tm °C	CG%	nt	A	T
PCoV_7b_fw	gagtgtgagggatcgtagg	59.2	55.0	20	4.0	5.0
PCoV_7b_rv	gttctactgctaataatgatgatgac	56.6	37.5	24	6.0	9.0
PCoV_7b_pb	gtcagattggttggtgctgtgcc	72.1	56.5	23	2.0	8.0
PCoV_S_fw	gctgatctagtgtgtgcccc	64.4	55.0	20	3.0	6.0
PCoV_S_rv	aaggcattagcaagtattttctggt	64.0	36.0	25	7.0	9.0
M1058L_FECV(A)_1	gcggtatggctatgggttctat	65.1	50.0	22	3.0	8.0
M1058L_FIPV(C)_1	gcggtatggctctgggttctat	67.4	54.5	22	2.0	8.0
M1058L_FIPV(T)_1	gcggtatggctttgggttctat	67.1	50.0	22	2.0	9.0
M1058L_FECV(A)_2	cggtatggctatgggttcta	61.7	50.0	20	3.0	7.0
M1058L_FIPV(T)_2	cggtatggctttgggttcta	64.0	50.0	20	2.0	8.0

Results for primer dimer detection. To export the results: select all (Ctrl-A), copy (Ctrl-C) and paste (Ctrl-V).

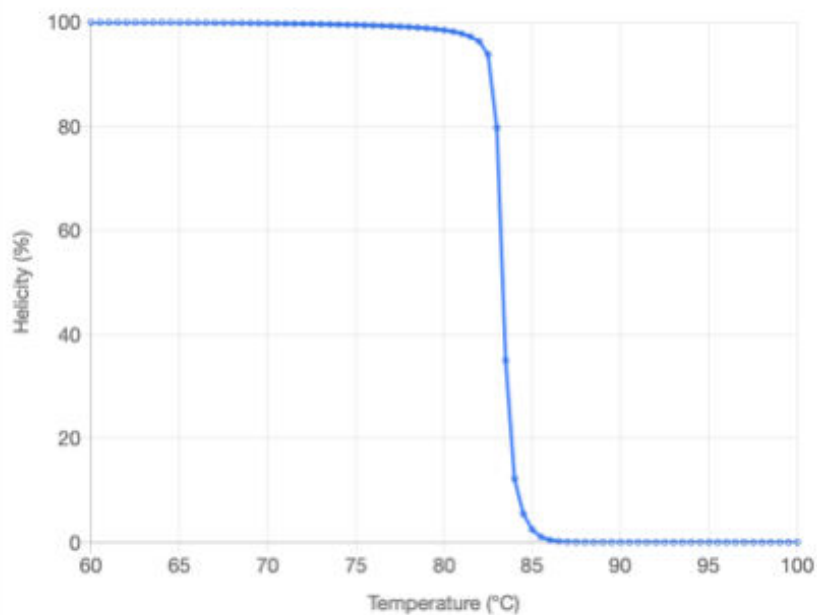
Self-Dimers:

Cross Primer Dimers:

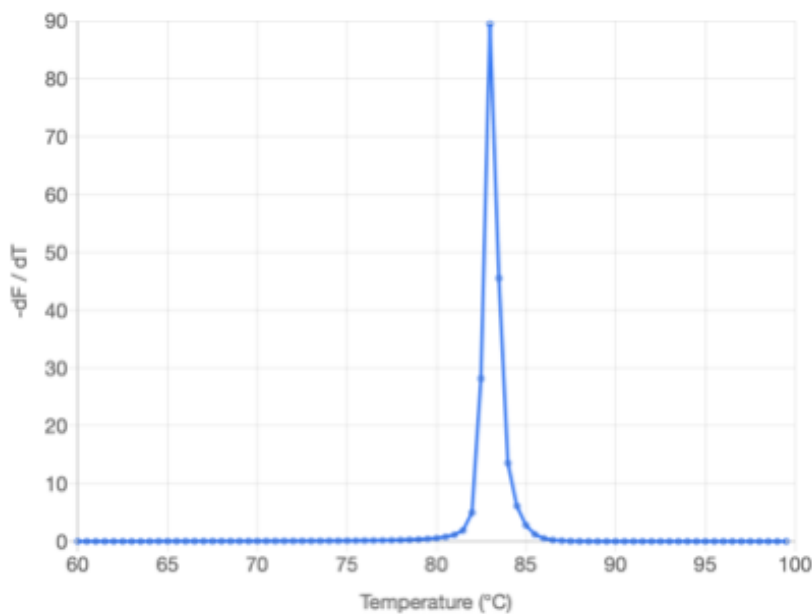
Figuur 39: Resultaten Multiple Primer Analyzer (ThermoFisher) met de verkorte LNA-probes (zie Tabel 9). (ThermoFisher, z.d.) Als input worden alle sequenties van de primers en probes die samen in een multiplex PCR-reactie zullen gebruikt worden. De output geeft weer of er dimeren zullen gevormd worden. In dit geval worden er geen dimeren gevormd, wat goed is, aangezien dimeervorming ervoor zorgt dat er minder primers en probes beschikbaar zijn om op het RNA-template te binden.

Theoretisch smeltpunt van de amplicons

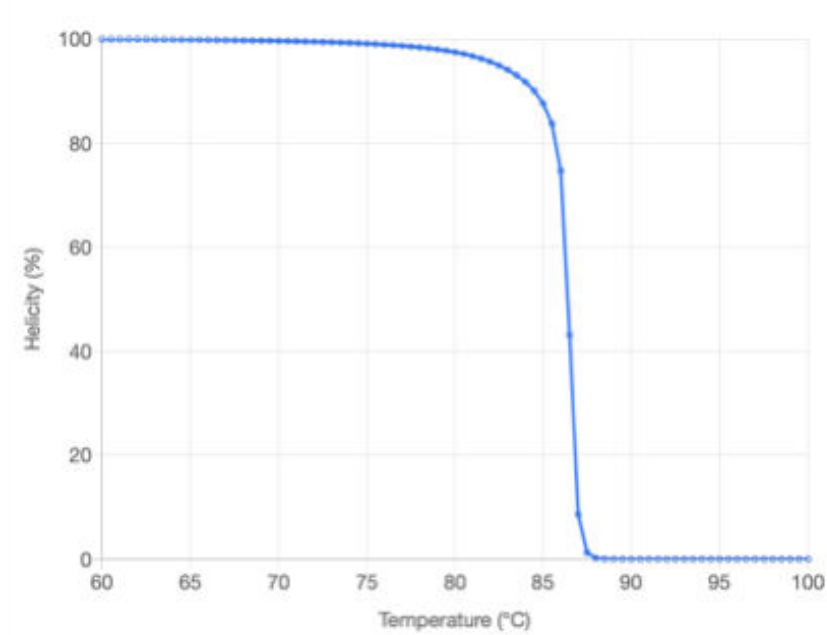
Het theoretisch smeltpunt van de amplicons wordt bepaald door middel van een online tool: uMelt Quartz van DNA-Utah (<https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/um.php>).



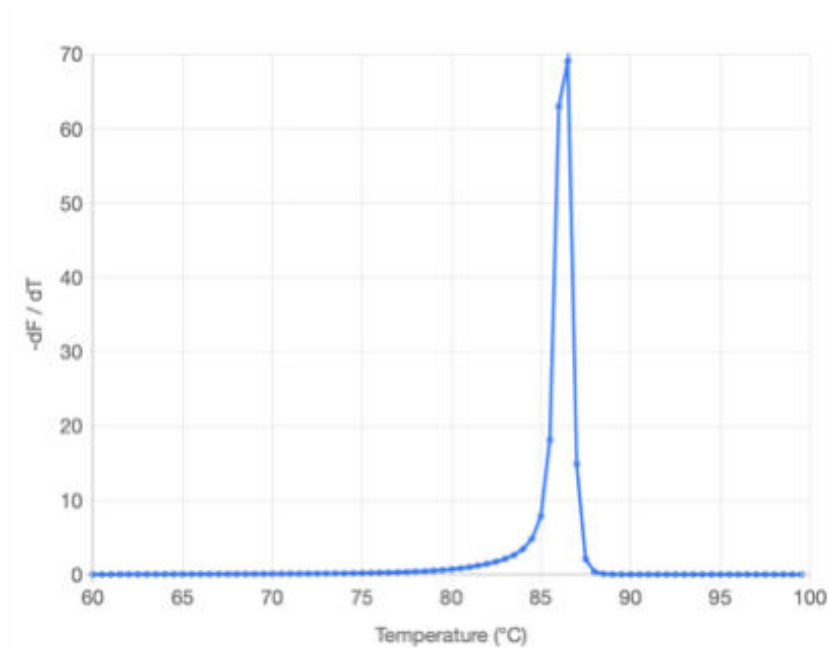
Figuur 40: Resultaten uMelt Quartz voor het 7b-amplicon, smeltcurve.



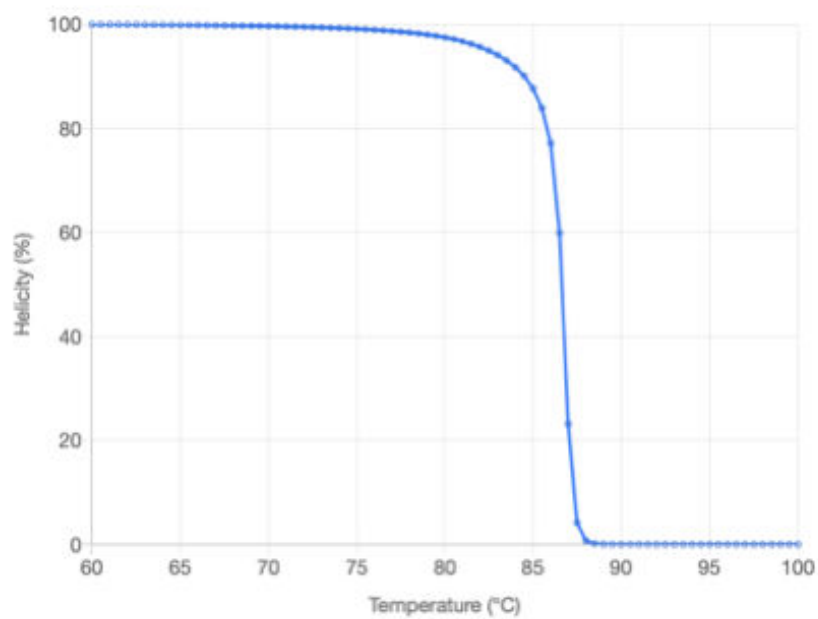
Figuur 41: Resultaten uMelt Quartz voor het 7b-amplicon, derivative plot.



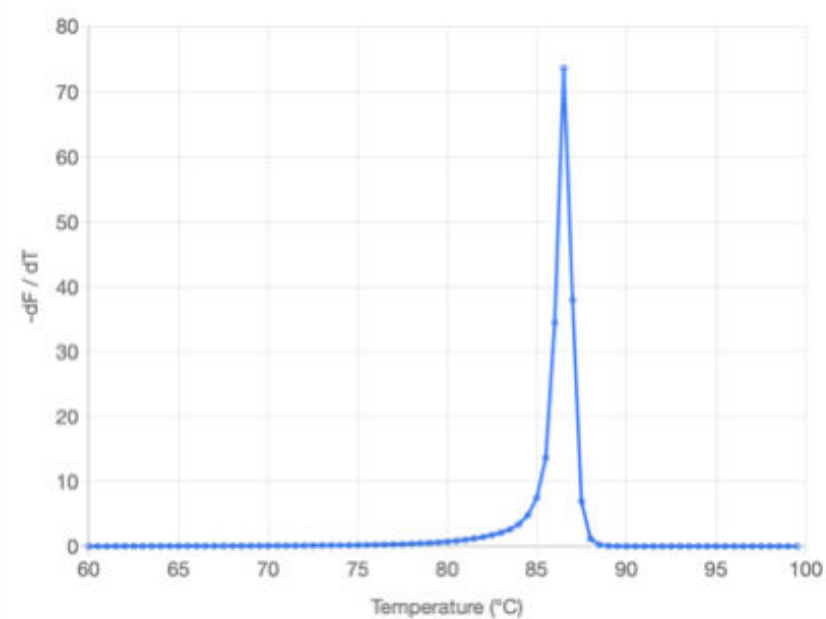
Figuur 42: Resultaten uMelt Quartz van het FECV(A)-amplicon, smeltcurve.



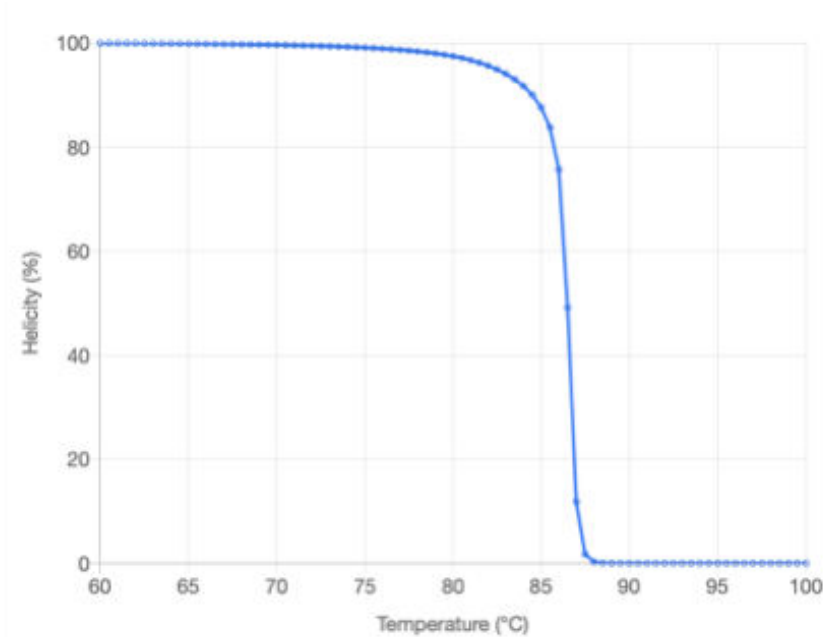
Figuur 43: Resultaten uMelt Quartz van het FECV(A)-amplicon, derivative plot.



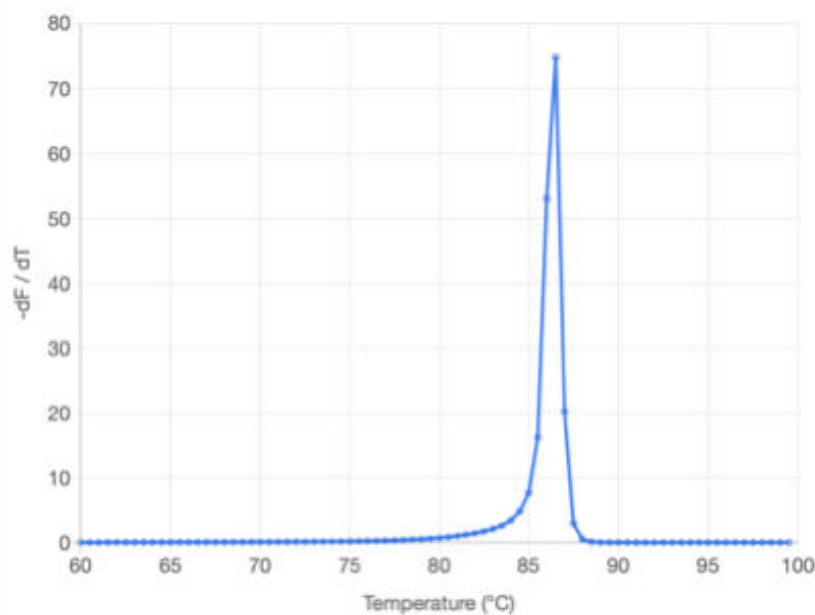
Figuur 44: Resultaten uMelt Quartz van het FIPV(C)-amplicon, smeltcurve.



Figuur 45: Resultaten uMelt Quartz van het FIPV(C)-amplicon, derivative plot.



Figuur 46: Resultaten uMelt Quartz van het FIPV(T)-amplicon, smeltcurve.



Figuur 47: Resultaten uMelt Quartz van het FIPV(T)-amplicon, derivative plot.

1.5.3 Voorbehandeling van primers, probes en gBlocks

De primers, probes, en gBlocks worden besteld bij IDT en worden geleverd als gelyofiliseerd poeder. Voordat deze kunnen gebruikt worden in een PCR moeten ze eerst nog opgelost worden in water en verdund worden naar de gewenste concentratie.

1.5.3.1 Voorbehandeling primers

De primers worden als gelyofiliseerd poeder geleverd. Het aantal mol wordt meegegeven in nmol door de leverancier. De primers worden opgelost in water naar een eindconcentratie van 100 μM . Om het volume water te berekenen dat moet worden toegevoegd, wordt gebruik gemaakt van volgende formule:

$$V = \frac{n}{c}$$

Hierbij is V het volume water dat moet worden toegevoegd in μL , n is het aantal mol van de primers in nmol, en c is de eindconcentratie die moet bereikt worden (hier $100 \mu\text{M}$).

Tabel 11: Voorbehandeling primers.

Naam	Inhoud	n (nmol)	V H ₂ O (μL)	c (μM)
FCoV_S primerpool	FCoV_S_fw FCoV_S_rv	5 (van elk)	50	100 (van elk)
FCoV_7b primerpool	FCoV_7b_fw FCoV_7b_rv	5 (van elk)	50	100 (van elk)

1.5.3.2 Voorbehandeling probes

De probes worden als gelyofiliseerd poeder geleverd. Het aantal mol wordt meegegeven in nmol door de leverancier. De probes worden opgelost in water tot een eindconcentratie van $100 \mu\text{M}$. Om het volume water te berekenen dat moet worden toegevoegd, wordt gebruik gemaakt van volgende formule:

$$V = \frac{n}{c}$$

Hierbij is V het volume water dat moet worden toegevoegd in μL , n is het aantal mol van de probes in nmol, en c is de eindconcentratie die we willen bereiken (hier $100 \mu\text{M}$).

Tabel 12: Voorbehandeling probes.

Naam	n (nmol)	V H ₂ O (μL)	c (μM)
FCoV_7b_pb	0,5	5	100
M1058L_FECV(A)	0,5	5	100
M1058L_FIPV(C)	0,5	5	100
M1058L_FIPV(T)	0,5	5	100
M1058L_FECV(A)_1	0,5	5	100
M1058L_FIPV(C)_1	0,5	5	100
M1058L_FIPV(T)_1	0,5	5	100
M1058L_FECV(A)_2	0,5	5	100
M1058L_FIPV(T)_2	0,5	5	100
M1058L_FECV_A	0,5	5	100

1.5.3.3 Aanmaak primer:probe-mix

Er wordt een primer:probe (P:P)-mix aangemaakt. De verhouding van primer tot probe die hierbij gehanteerd wordt, is 2:1. Vervolgens wordt met water aangelengd tot het gewenste eindvolume.

Tabel 13: Primer:probe (P:P)-mix met $1 \mu\text{M}$ primer en $0,5 \mu\text{M}$ probe.

Naam	V (μL)	c (μM)
Primer	2	1
Probe	1	0,5
Water	197	
Totaal:	200	

Tabel 14: Primer:probe (P:P)-mix met $2 \mu\text{M}$ primer en $1 \mu\text{M}$ probe.

Naam	V (μL)	c (μM)
Primer	4	2
Probe	2	1
Water	194	
Totaal:	200	

Tabel 15: Aanmaak primer-probe (P:P-mixen met 2,5 μM primer en 1,25 μM probe. Deze P:P-mixen worden gebruikt voor dPCR.

Naam	V (μL)	c (μM)
Primer	2,5	2,5
Probe	1,25	1,25
Water	96,25	
Totaal:	100	

Tabel 16: Overzicht primer:probe (P:P)-mixen.

Naam	Primers	Probe	c primer (μM)	c probe (μM)
FCoV_7b P:P	FCoV_7b_fw + FCoV_7b_rv	FCoV_7b_pb	1	0,5
FIP_A P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(A)	1	0,5
FIP_C P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(C)	1	0,5
FIP_T P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(T)	1	0,5
FIP_A1 P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(A)_1	1	0,5
FIP_C1 P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(C)_1	1	0,5
FIP_T1 P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(T)_1	1	0,5
FIP_A2 P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(A)_2	1	0,5
FIP_T2 P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(T)_2	1	0,5
FIP_A1 (2 μM) P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(A)_1	2	1
FIP_A2 (2 μM) P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(A)_2	2	1
FECV_A P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV_A	1	0,5
FCoV_7b (2,5 μM) P:P	FCoV_7b_fw + FCoV_7b_rv	FCoV_7b_pb	2,5	1,25
FECV_A (2,5 μM) P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV_A	2,5	1,25
FIP_C1 (2,5 μM) P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(C)_1	2,5	1,25
FIP_T2 (2,5 μM) P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV(T)_2	2,5	1,25
FIP_A+C1+T2 (2,5 μM) P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV_A + M1058L_FECV(C)_1 + M1058L_FECV(T)_2	2,5	1,25
FIP_A+C1+T2 P:P	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv	M1058L_FECV_A + M1058L_FECV(C)_1 + M1058L_FECV(T)_2	1	0,5
FCoV_7b+A+C1+T2	FCoV_S_fw + FCoV_S_rv +	FCoV_7b_pb + M1058L_FECV_A +	1	0,5

	FCoV_7b_fw + FCoV_7b_rv	M1058L_FECV(C)_1 + M1058L_FECV(T)_2		
7b+routine	FCoV primers uit de routine + FCoV_7b_fw + FCoV_7b_rv	FCoV probe uit de routine	1	0,5

1.5.3.4 Voorbehandeling gBlocks

De gBlocks worden als gelyofiliseerd poeder geleverd, standaard wordt 250 ng geleverd. Op basis van de meegegeven concentratie van de gBlocks, gegeven door de leverancier in fmol, kan het aantal copies/ μL berekend worden, dit gebeurt met de volgende formule:

$$c \text{ (copies}/\mu\text{L}) = m \cdot c \cdot 10^{-15} \cdot (6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1})$$

Hierbij is m de geleverde massa gBlocks in ng (standaard wordt 250 ng geleverd), c is de concentratie in fmol/ng, 10^{-15} is de factor nodig om om te rekenen van femto, en $6,23 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ is het getal van Avogadro dat het aantal deeltjes per mol geeft en dat nodig is om van een molaire concentratie te gaan naar het aantal copies (aantal deeltjes).

Tabel 17: Voorbehandeling gBlocks.

Naam	m (ng)	n (fmol)	V H ₂ O (μL)	c (ng/ μL)	c (fmol/ng)	c (copies/ μL)
7b	250	1776	100	2,5	7,104	$1,07 \cdot 10^{10}$
FECV(A)	250	2630	100	2,5	10,52	$1,58 \cdot 10^{10}$
FIPV(C)	250	1816	100	2,5	7,264	$1,09 \cdot 10^{10}$
FIPV(T)	250	2737	100	2,5	10,948	$1,65 \cdot 10^{10}$
FECV(A)_2	250	1760	100	2,5	7,04	$1,06 \cdot 10^{10}$
FIPV(T)_2	250	1760	100	2,5	7,04	$1,06 \cdot 10^{10}$

gBlocks oplossen

De gBlocks worden opgelost in 100 μL PCR-grade water, dit brengt hun concentratie naar 2,5 ng/ μL .

gBlocks verdunningsreeks

Er wordt een seriële verdunning gemaakt van 10^{10} naar 10^0 copies/ μL . De verdunning met 10^6 copies/ μL wordt gebruikt als positieve controle voor de PCR's. Om de seriële verdunning aan te maken, wordt gebruik gemaakt van volgende formule:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

Hierbij is c_1 de concentratie in copies/ μL die we al hebben, V_1 is het volume in μL dat uit het staal met concentratie c_1 moet genomen worden om de gewenste verdunning te maken, c_2 is de concentratie in copies/ μL die we willen verkrijgen, V_2 is het gewenste eindvolume in μL dat we willen verkrijgen van de verdunning.

Verdunningen worden gemaakt met water. Het volume water dat moet worden toegevoegd aan de verdunning, wordt berekend met volgende formule:

$$V(\text{H}_2\text{O}) = V_2 - V_1$$

Hierbij is $V(\text{H}_2\text{O})$ het volume water in μL dat moet worden toegevoegd aan de volume, V_2 is het gewenste eindvolume in μL van de verdunning, V_1 is het volume in μL van het staal met concentratie c_1 dat werd genomen om de verdunning te maken.

Tabel 18: FCoV_7b gBlock verdunningsreeks. V_1 geeft het volume dat uit het staal met concentratie c_1 moet genomen worden om een nieuwe verdunning met concentratie c_2 te maken, V_{H_2O} is het volume water dat aan de nieuwe verdunning moet worden toegevoegd.

c_1 (copies/ μ L)	c_2 (copies/ μ L)	V_2 (μ L)	V_1 (μ L)	V_{H_2O} (μ L)
$1,07 \cdot 10^{10}$	10^{10}	100	93,49	6,51

Tabel 19: FECV(A) gBlock verdunningsreeks. V_1 geeft het volume dat uit het staal met concentratie c_1 moet genomen worden om een nieuwe verdunning met concentratie c_2 te maken, V_{H_2O} is het volume water dat aan de nieuwe verdunning moet worden toegevoegd.

c_1 (copies/ μ L)	c_2 (copies/ μ L)	V_2 (μ L)	V_1 (μ L)	V_{H_2O} (μ L)
$1,58 \cdot 10^{10}$	10^{10}	100	63,13	36,87

Tabel 20: FIPV(C) gBlock verdunningsreeks. V_1 geeft het volume dat uit het staal met concentratie c_1 moet genomen worden om een nieuwe verdunning met concentratie c_2 te maken, V_{H_2O} is het volume water dat aan de nieuwe verdunning moet worden toegevoegd.

c_1 (copies/ μ L)	c_2 (copies/ μ L)	V_2 (μ L)	V_1 (μ L)	V_{H_2O} (μ L)
$1,09 \cdot 10^{10}$	10^{10}	100	91,43	8,57

Tabel 21: FIPV(T) gBlock verdunningsreeks. V_1 geeft het volume dat uit het staal met concentratie c_1 moet genomen worden om een nieuwe verdunning met concentratie c_2 te maken, V_{H_2O} is het volume water dat aan de nieuwe verdunning moet worden toegevoegd.

c_1 (copies/ μ L)	c_2 (copies/ μ L)	V_2 (μ L)	V_1 (μ L)	V_{H_2O} (μ L)
$1,65 \cdot 10^{10}$	10^{10}	100	60,66	39,34

Tabel 22: FIPV(A)_2 gBlock verdunningsreeks. V_1 geeft het volume dat uit het staal met concentratie c_1 moet genomen worden om een nieuwe verdunning met concentratie c_2 te maken, V_{H_2O} is het volume water dat aan de nieuwe verdunning moet worden toegevoegd.

c_1 (copies/ μ L)	c_2 (copies/ μ L)	V_2 (μ L)	V_1 (μ L)	V_{H_2O} (μ L)
$1,06 \cdot 10^{10}$	10^{10}	100	94,34	5,66

Tabel 23: FIPV(T)_2 gBlock verdunningsreeks. V_1 geeft het volume dat uit het staal met concentratie c_1 moet genomen worden om een nieuwe verdunning met concentratie c_2 te maken, V_{H_2O} is het volume water dat aan de nieuwe verdunning moet worden toegevoegd.

c_1 (copies/ μ L)	c_2 (copies/ μ L)	V_2 (μ L)	V_1 (μ L)	V_{H_2O} (μ L)
$1,06 \cdot 10^{10}$	10^{10}	100	94,34	5,66

1.6 Kwaliteitsanalyse

1.6.1 Kwaliteitsanalyse primers

Eerst worden de primers getest. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een niet-probe reporter: EvaGreen (EvaGreen® Plus Dye, 20X in Water (biotium)).

Voordat de primers kunnen getest worden, moeten ze eerst verdund worden naar 2 μ M. Dit wordt berekend met volgende formule:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

Tabel 24: Voorbehandeling van de primers voor kwaliteitscontrole. De primers werden al opgelost naar een oplossing met $c = 100 \mu$ M. Voor de kwaliteitscontrole moeten ze nog verdund worden naar $c = 1 \mu$ M.

c_1 (μ M)	c_2 (μ M)	V_2 (μ L)	V_1 (μ L)	V_{H_2O} (μ L)
100	2	100	2	98

1.6.1.1 High Resolution Melting (HRM) Analyse

De specificiteit en bindingscapaciteit van de primers wordt getest.

Er wordt een niet-template control (NTC) gebruikt waarmee wordt nagegaan of de primers dimeren vormen. Met de positieve controle (gBlocks) kan worden nagegaan of de primers goed zullen binden op het voorspelde amplicon. Het staal met FIPV en het staal zonder FIPV (negatieve controle) wordt gebruikt om na te gaan of de primers ook aspecifiek zullen binden en ongewenste regio's zullen amplificeren.

De primers worden ontworpen om in theorie bij een bepaalde T_m (60 °C) optimaal te werken, maar er is geen garantie dat dit ook het geval is in de praktijk. Om dit te achterhalen, moeten de primers bij verschillende smelttemperaturen getest worden.

Na de PCR wordt het DNA opgezuiverd en opgestuurd voor amplicon-sequencing (Sanger sequencing).

Er zijn hier twee verschillende methodes waarop HRM-analyse kan worden uitgevoerd: (A) Er kan gebruik gemaakt worden van de HRM-kit van Bio-Rad, of (B) er kan gebruik gemaakt worden van de normale DNA-kit waarbij EvaGreen manueel wordt toegevoegd aan de mastermix.

HRM – EvaGreen

EvaGreen is inhiberend voor de PCR-reactie en dient 20x verdund te worden.

Mastermix

Tabel 25: Aanmaak mastermix voor kwaliteitsanalyse van de primers, HRM-analyse met EvaGreen.

Naam	V (μL)
Mastermix iTaq Universal Probes Supermix	10
Primermix	2
EvaGreen	1
Nucleasevrij water	2
Totaalvolumer mastermix	15
Staal	5
Totaalvolume PCR-reactie	20

PCR-reacties

Voor de PCR-reacties werden twee sets primers gebruikt: FCoV_7b en FCoV_S. Elke set omvatte twee no template controls (NTC), telkens met 5 μL water, 2 μL primers, 1 μL EvaGreen, 10 μL mastermix (MM) en 2 μL water. Voor de FCoV_7b primers werden daarnaast dubbele positieve controles uitgevoerd met 5 μL FCoV_7b gBlock (10^6 kopieën/μL) en dubbele positieve stalen met 5 μL FIPV-staal (31509), evenals dubbele negatieve stalen zonder FIPV (30877), telkens met dezelfde volumes primers, EvaGreen, MM en water. Voor de FCoV_S primers werden zes positieve controles uitgevoerd met 5 μL gBlocks van FIPV(A), FIPV(C) en FIPV(T) (elk 10^6 kopieën/μL), telkens dubbel, naast dubbele positieve en negatieve stalen met dezelfde volumes als bij FCoV_7b.

1.6.2 Kwaliteitsanalyse probes

1.6.2.1 gBlocks verdunningsreeks

De probes moeten bij verschillende concentraties van de gBlocks getest worden. Hiervoor wordt een seriële verdunning aangemaakt van de verschillende gBlocks.

Aanmaak verdunningsreeks

Zie Tabel 18, Tabel 19, Tabel 20, Tabel 21, Tabel 22 en Tabel 23 voor de aanmaak van de verdunningsreeks.

Aanmaak mastermixen

Tabel 26: Aanmaak mastermix voor kwaliteitsanalyse van de probes, gBlocks verdunningsreeks.

Naam	V (μL)
Mastermix iTaq Universal Probes Supermix	10
Primer:probe-mix	2
Nucleasevrij water	3
Totaalvolumer mastermix	15
Staal	5
Totaalvolume PCR-reactie	20

Mastermix met DMSO

Tabel 27: Aanmaak mastermix voor kwaliteitsanalyse van de probes, gBlocks verdunningsreeks met DMSO. Hiervoor wordt de dimethyl sulfoxide D8418 van Sigma-Aldrich gebruikt, die wordt verdund naar een 10% werkoplossing. Er wordt een gradiëntconcentratie van DMSO gebruikt om de optimale concentratie te achterhalen. Er wordt aangevuld met nucleasevrij water om een totaalvolume van 15 μL voor de mastermix te verkrijgen.

Naam	V (μL)
Mastermix iTaq Universal Probes Supermix	10
Primer:probe-mix	2
10% DMSO	0,4 (2%); 0,6 (3%); 0,8 (4%); 1,0 (5%)
Nucleasevrij water	2,6 (2%); 2,4 (3%); 2,2 (4%); 2,0 (5%)
Totaalvolumer mastermix	15
Staal	5
Totaalvolume PCR-reactie	20

PCR-reacties

Als mastermix (MM) wordt de ITAQ Universal Probe MM gebruikt. Als water (H₂O) wordt PCR-grade nucleasevrij water gebruikt. Er wordt een niet-template control (NTC) gebruikt waarbij geen template (gBlock) wordt toegevoegd. Alle reacties worden in duplo uitgevoerd.

Zie Tabel 16 voor de samenstelling van de verschillende P:P-mixen.

7b probe

Voor de reacties met FCoV_7b gBlocks en FCoV_7b P:P-mix werden telkens dubbele reacties uitgevoerd. Elke reactie bevatte 2 μL FCoV_7b P:P-mix, 10 μL iTaq Universal Probes Supermix en 3 μL nucleasevrij H₂O. Voor de no template controls (NTC) werd 5 μL H₂O toegevoegd. Voor de standaardreeks werden per concentratie (van 10⁶ tot 10⁰ kopieën/μL FCoV_7b gBlock) telkens 5 μL van het desbetreffende gBlock gebruikt.

LNA-probes

Voor de optimalisatie van LNA-probes werden telkens dubbele reacties uitgevoerd met FECV(A), FIPV(C) of FIPV(T) gBlocks in combinatie met respectievelijk FIP_A, FIP_C of FIP_T primer-probe mix. Elke reactie bestond uit 2 μL primer-probe mix, 10 μL iTaq Universal Probes Supermix en 3 μL nucleasevrij H₂O. Voor de no template controls (NTC) werd 5 μL H₂O toegevoegd in plaats van gBlock. In de standaardreeksen werd per concentratie (van 10¹⁰ tot 10⁰ kopieën/μL gBlock) telkens 5 μL van het desbetreffende gBlock gebruikt.

Verkorte LNA-probes

Omdat het toevoegen van een LNA-nucleotide de smelttemperatuur verhoogt, werd een kortere versie van de LNA-probes besteld. Voor de optimalisatie werden telkens dubbele reacties uitgevoerd met verschillende combinaties van gBlocks en primer-probe mixen (FECV(A) + FIP_A1 of FIP_A2 P:P-mix; FIPV(C) + FIP_C1 P:P-mix; FIPV(T) + FIP_T1 of FIP_T2 P:P-mix). Elke reactie bestond uit 2 μL van de betreffende primer-probe mix, 10 μL iTaq Universal Probes Supermix en 3 μL nucleasevrij H₂O. Voor de no template controls (NTC)

werd 5 μL H_2O toegevoegd in plaats van gBlock. Voor de standaardreeksen werden per concentratie (van 10^6 tot 10^0 kopieën/ μL gBlock) telkens 5 μL van het juiste gBlock gebruikt.

P:P-mix met 2 μM primer en 1 μM probe

Voor de herteste verdunningsreeks van FIPV(A) gBlocks werd een nieuwe primer-probe mix (P:P-mix) gebruikt met een concentratie van 2 μM primer en 1 μM probe. Zowel voor de FECV(A) gBlocks in combinatie met FIP_A1 als met FIP_A2 (beide 2 μM) P:P-mix werden telkens dubbele reacties opgezet. Elke reactie bestond uit 2 μL van de betreffende P:P-mix, 10 μL iTaq Universal Probes Supermix en 3 μL nucleasevrij H_2O . Voor de no template controls (NTC) werd 5 μL H_2O toegevoegd in plaats van gBlock. Voor de standaardreeks werden per concentratie (van 10^6 tot 10^0 kopieën/ μL FECV(A) gBlock) telkens 5 μL van het desbetreffende gBlock gebruikt.

DMSO

Voor de optimalisatie van PCR-reacties met FECV(A) gBlocks werden twee verschillende primer-probe mixen (FIP_A1 P:P en FIP_A2 P:P) getest bij vier verschillende DMSO-concentraties (2%, 3%, 4% en 5%). Alle reacties bevatten 10 μL iTaq Universal Probes Supermix en 2 μL van de respectievelijke primer-probe mix. Voor elke conditie werden dubbele reacties uitgevoerd met zowel NTC (5 μL H_2O) als positieve stalen (5 μL FECV(A) gBlock, 10^6 kopieën/ μL). De DMSO werd toegevoegd als 10% oplossing in volumes van respectievelijk 0,4 μL , 0,6 μL , 0,8 μL en 1,0 μL om de gewenste eindconcentraties te bereiken. Het reactievolume werd aangevuld met H_2O (respectievelijk 2,6 μL , 2,4 μL , 2,2 μL en 2,0 μL) tot een totaal volume van 20 μL per reactie.

Nieuwe M1058L_FECV(A) probe (zonder LNA)

Er werd een nieuwe probe zonder LNA-nucleotide besteld, om te zien of het probleem lag aan de LNA-nucleotide.

Voor de reacties met FECV(A) gBlocks en FECV_A P:P-mix werden telkens dubbele reacties uitgevoerd. Elke reactie bevatte 2 μL FECV_A P:P-mix, 10 μL iTaq Universal Probes Supermix en 3 μL nucleasevrij H_2O . Voor de no template controls (NTC) werd 5 μL H_2O toegevoegd. Voor de standaardreeks werden per concentratie (van 10^{10} tot 10^0 kopieën/ μL FECV(A) gBlock) telkens 5 μL van het desbetreffende gBlock gebruikt.

Nieuwe gBlocks

Omdat bij de eerste bestelling van de A- en T-gBlocks de verkeerde sequenties waren geleverd, werden deze opnieuw besteld. Voor de optimalisatie werden dubbele reacties opgezet met de nieuwe FECV(A)_2 gBlocks in combinatie met FECV_A2 P:P-mix, en met FIPV(T)_2 gBlocks in combinatie met FIP_T2 P:P-mix. Elke reactie bevatte 2 μL van de betreffende P:P-mix, 10 μL iTaq Universal Probes Supermix en 3 μL nucleasevrij H_2O . Voor de no template controls (NTC) werd 5 μL H_2O toegevoegd in plaats van gBlock. Voor de standaardreeksen werden per concentratie (van 10^6 tot 10^0 kopieën/ μL gBlock) telkens 5 μL van het juiste gBlock gebruikt.

1.6.2.2 LNA-probes verdunningsreeks

Voor de LNA-probes kan in PCR-reacties waarschijnlijk een lagere concentratie gebruikt worden dan voor de normale probes. In de literatuur kan worden teruggevonden dat een concentratie van 0,2 μM goed zou moeten werken. (metabion, z.d.) Maar de beste concentratie kan best experimenteel worden bepaald. Dit kan door een verdunningsreeks op te stellen en uit te testen welke verdunningen de beste resultaten opleveren.

Om de verdunningsreeks aan te maken, wordt slecht één van de drie LNA-probes gebruikt, namelijk M1058L_FECV(A) die het wildtype zal opsporen.

Tabel 28: LNA-probes verdunningsreeks.

Verdunning	c ₁ (μM)	c ₂ (μM)	V ₁ (μL)	V ₂ (μL)	V H ₂ O (μL)
10:10	100	100	5,00	5	0,00
9:10	100	90	4,50	5	0,50
8:10	90	80	4,44	5	0,56
7:10	80	70	4,38	5	0,63
6:10	70	60	4,29	5	0,71
5:10	60	50	4,17	5	0,83
4:10	50	40	4,00	5	1,00
3:10	40	30	3,75	5	1,25
2:10	30	20	3,33	5	1,67
1:10	20	10	2,50	5	2,50

De verdunningen worden vervolgens gebruikt om verschillende primer:probe (P:P)-mixturen te maken.

Tabel 29: Aanmaken van de primer:probe (P:P)-mix voor de LNA-probe verdunningsreeksen.

Verdunning	c ₁ probe (μM)	c ₂ probe (μM)	V probe (μL)	V primer (μL)	V H ₂ O (μL)	V totaal (μL)
10:10	100	0,50	0,5	1	98,5	100
9:10	90	0,45	0,5	1	98,5	100
8:10	80	0,40	0,5	1	98,5	100
7:10	70	0,35	0,5	1	98,5	100
6:10	60	0,30	0,5	1	98,5	100
5:10	50	0,25	0,5	1	98,5	100
4:10	40	0,20	0,5	1	98,5	100
3:10	30	0,15	0,5	1	98,5	100
2:10	20	0,10	0,5	1	98,5	100
1:10	10	0,05	0,5	1	98,5	100

Aanmaken mastermix

Tabel 30: Aanmaak mastermix voor kwaliteitsanalyse van de probes, LNA-probe verdunningsreeks.

Naam	V (μL)
Mastermix iTaq Universal Probes Supermix	10
Primer:probe-mix	2
Nucleasevrij water	3
Totaalvolume mastermix	15
Staal	5
Totaalvolume PCR-reactie	20

PCR-reacties

Overzicht van de PCR-reacties voor kwaliteitsanalyse van de LNA-probes.

Als positieve controle wordt de FECV(A) gBlocks verdunning met 10⁶ copies/μL gebruikt. Als mastermix (MM) wordt de ITAQ Universal Probe MM gebruikt. Als water (H₂O) wordt PCR-grade nucleasevrij water gebruikt. Er wordt een niet-template control (NTC) gebruikt waarbij geen template (gBlock) wordt toegevoegd.

Voor de optimalisatie van de M1058L_FECV(A) LNA-probe werden qPCR-reacties opgezet met verschillende verhoudingen van de FIP_A primer-probe mix (van 10:10 tot 1:10). Voor elke verhouding werden zowel no template controls (NTC) als positieve controles (met 5 μL FECV(A) gBlock, 10⁶ kopieën/μL) uitgevoerd. Elke reactie bevatte 2 μL FIP_A P:P-mix, 10 μL

iTaq Universal Probes Supermix en 3 μL nucleasevrij H_2O . Voor de no template controls (NTC) werd 5 μL H_2O toegevoegd, terwijl bij de positieve controle 5 μL FECV_A gBlock werd gebruikt.

1.6.2.3 Specificiteit van de probes

De specificiteit van de probes wordt getest door middel van qPCR en door middel van digitale PCR (dPCR).

qPCR

Aanmaken mastermix

Tabel 31: Aanmaak mastermix DNA voor de specificiteit van de probes te testen, volumes voor 1 reactie.

Naam	V (μL)
Mastermix iTaq Universal Probes Supermix	10
Primer:probe-mix	2
Nucleasevrij water	3
Totaalvolume mastermix	15
Staal	5
Totaalvolume PCR-reactie	20

PCR-reacties

Voor de opzet van de qPCR-reacties werden telkens dubbele no template controls (NTC) uitgevoerd voor drie verschillende primer-probe combinaties: FCoV_7b, FCoV_S (FIP_A+C1+T2), en FCoV_7b+S (FCoV_7b+A+C1+T2). Elke NTC-reactie bestond uit 5 μL H_2O , 2 μL van de betreffende primer-probe mix, 10 μL iTaq Universal Probes Supermix en 3 μL extra H_2O . Daarnaast werden per target (FCoV_7b, FECV(A), FIPV(C), FIPV(T), FIPV(A)) telkens dubbele reacties uitgevoerd met 5 μL van het corresponderende gBlock (10^6 kopieën/ μL), 2 μL van de relevante primer-probe mix, 10 μL mastermix en 3 μL H_2O .

dPCR

Aanmaken mastermix

Tabel 32: Aanmaak mastermix voor kwaliteitsanalyse probes, specificiteit van de probes op dPCR.

Naam	Eindconcentratie	V (μL)
Buffer A (10x) - naica® multiplex PCR MIX	1x	0,5
Buffer B - naica® multiplex PCR MIX	4%	0,2
Primers	Variabel	Variabel
Probes	Variabel	Variabel
Nucleasevrij water	NA	Aanvullen tot $V_f = 5 \mu\text{L}$
Staal	Variabel	Tot 3,6 μL
Totaalvolume PCR-reactie	/	5

PCR-reacties

Voor de digitale PCR (dPCR)-reacties werden telkens 2 μL sjabloon (gBlock, 10^3 kopieën/ μL) of H_2O (voor NTC's), 1 μL van de betreffende primer-probe mix (2,5 μM), 0,5 μL Buffer A, 0,2 μL Buffer B en H_2O tot een eindvolume van 5 μL per reactie gebruikt. Voor de NTC's werd FCoV_7b of FCoV_S (FIP_A+C1+T2) primer-probe mix toegepast. Voor de positieve reacties werd afhankelijk van het target (FCoV_7b, FECV(A), FIPV(C), FIPV(T)) de juiste gBlock en primer-probe combinatie gebruikt (FCoV_7b, FIP_C1, FIP_T1, FECV_A) en steeds in duplo uitgevoerd.

1.7 PCR

De RNA-stalen worden geamplificeerd en geanalyseerd door middel van PCR. Als positieve controle worden gBlocks gebruikt die worden verdund tot 10^6 copies/ μL . Als negatieve controle wordt een no template control (NTC) gebruikt, hierbij wordt geen template toegevoegd aan de PCR-reactie.

1.7.1 qPCR

1.7.1.1 One-step RT-qPCR

Bij de one-step RT-qPCR wordt het RNA rechtstreeks als template gebruikt voor de PCR-reactie. Er zijn twee verschillende kits die kunnen gebruikt worden om een one-step RT-qPCR uit te voeren.

iTaq™ Universal Probes One-Step Kit

Voor RNA wordt de **iTaq™ Universal Probes One-Step Kit (#1725140)** van Bio-Rad gebruikt. Deze kit maakt gebruik van iScript RNase H⁺ reverse transcriptase om RNA over te schrijven naar cDNA, en van antibody hot-start iTaq DNA-polymerase om nieuwe DNA-strengen aan te maken op basis van het cDNA-template. (Bio-Rad, z.d.-b)

Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix

Voor RNA wordt de **Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix (#64621494)** van Bio-Rad gebruikt. (Bio-Rad, z.d.-d)

Tabel 33: Aanmaak mastermix met de Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix (Bio-Rad) voor een one-step RT-qPCR.

Naam	V (μL)
Mastermix Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix	5
Primer	2
Probe	2
Nucleasevrij water	6
Totaalvolumer mastermix	15
Staal	5
Totaalvolume PCR-reactie	20

1.7.1.2 Two-step RT-qPCR

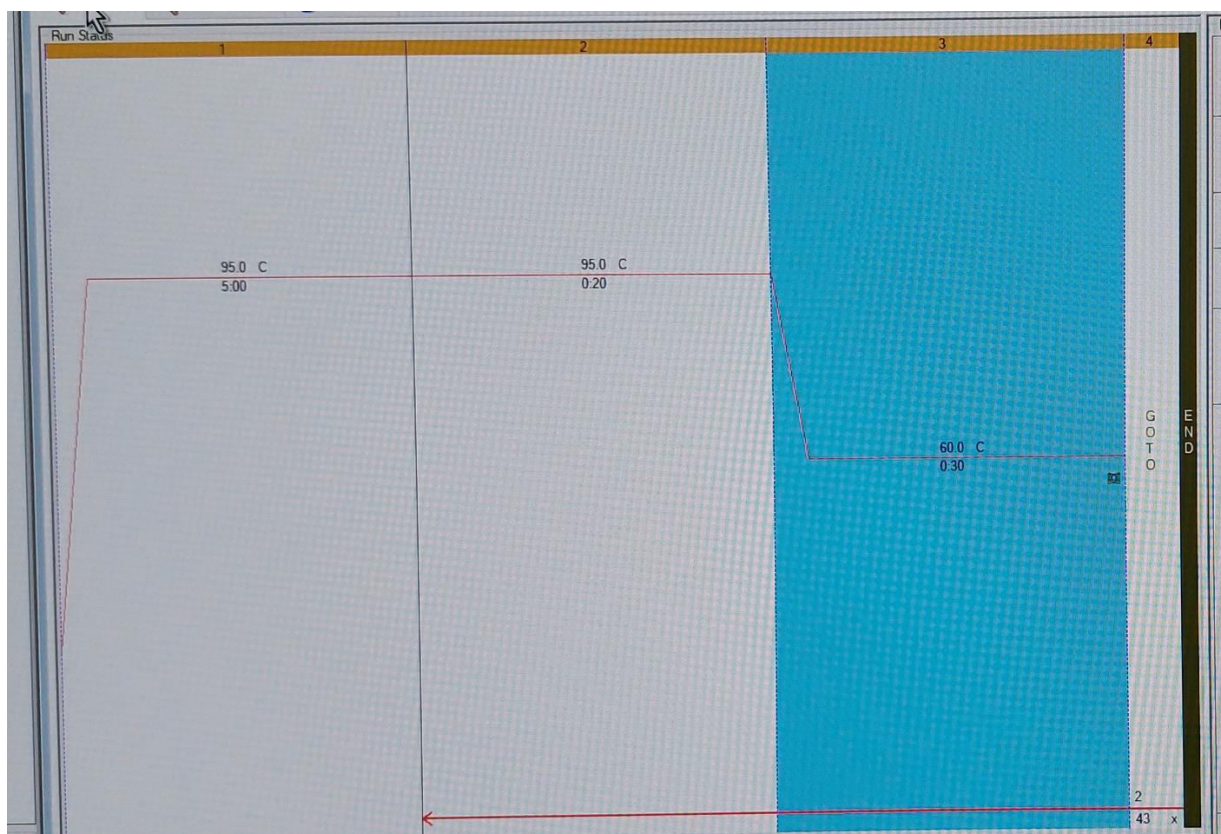
Bij de two-step RT-qPCR wordt het RNA op voorhand overgeschreven naar cDNA. Dit cDNA wordt dan gebruikt als template voor de PCR-reactie.

Voor DNA wordt de **iTaq™ Universal Probes Supermix (#1725131)** van Bio-Rad gebruikt. Deze kit maakt gebruik van iTaq DNA-polymerase om nieuwe strengen aan te maken op basis van het cDNA-template. (Bio-Rad, z.d.-c)

Mastermix

Tabel 34: Aanmaak mastermix met de iTaq Universal Probes Supermix (Bio-Rad) voor een DNA qPCR.

Naam	V (μL)
Mastermix iTaq Universal Probes Supermix	10
Primer:probe-mix	2
Nucleasevrij water	3
Totaalvolumer mastermix	15
Staal	5
Totaalvolume PCR-reactie	20



Figuur 48: qPCR-protocol voor DNA.

PCR-reacties

30320_A, 32791, 40009, 30669, 70343, **40485, 40186, 30069, 30478**

7b probe

Voor de PCR-reacties met FCoV_7b primers en FCoV_7b P:P-mix werd een uniforme reactiesamenstelling gebruikt: telkens 2 μ L FCoV_7b P:P-mix, 10 μ L iTaq Universal Probes Supermix en 3 μ L nucleasevrij H₂O. De no template control (NTC) bevatte 5 μ L H₂O, terwijl de positieve controle 5 μ L FCoV_7b gBlocks (10⁶ kopieën/ μ L) bevat. Voor de negatieve controle werd 5 μ L staal 32066 gebruikt. Voor de teststalen werden verschillende verdunde of onverdunde stalen (zoals 70583, 41215, 31177, 40999, 30656, 31047, 40062, 30320_A, 32791, 40009, 30669, 70343, 70388, 40485, 40186, 30069, 30478) toegevoegd, telkens 5 μ L per reactie, in verschillende verdunningen (1:100, 1:600 of 1:2).

M1058L_FECV(A)_2 LNA-probe

Voor de PCR-reacties met FCoV_S primers en FIP_A2 P:P-mix werd een uniforme reactiesamenstelling gebruikt: telkens 2 μ L FIP_A2 P:P-mix, 10 μ L iTaq Universal Probes Supermix en 3 μ L nucleasevrij H₂O. De no template control (NTC) bevatte 5 μ L H₂O, terwijl de positieve controle 5 μ L FECV(A)_2 gBlocks (10⁶ kopieën/ μ L) bevat. Voor de negatieve controle werd 5 μ L staal 32066 gebruikt. Voor de teststalen werden verschillende verdunde of onverdunde stalen (zoals 30320_A, 32791, 40009, 30669, 70343, 40485, 40186, 30069, 30478) toegevoegd, telkens 5 μ L per reactie, in verschillende verdunningen (1:100, 1:600 of 1:2).

M1058L_FIPV(C)_1 LNA-probe

Voor de PCR-reacties met FCoV_S primers en FIP_C1 P:P-mix werd een uniforme reactiesamenstelling gebruikt: telkens 2 μ L FIP_C1 P:P-mix, 10 μ L iTaq Universal Probes Supermix en 3 μ L nucleasevrij H₂O. De no template control (NTC) bevatte 5 μ L H₂O, terwijl de positieve controle 5 μ L FIPV(C) gBlocks (10⁶ kopieën/ μ L) bevat. Voor de negatieve controle

werd 5 µL staal 32066 gebruikt. Voor de teststalen werden verschillende verdunde of onverdunde stalen (zoals 70583, 41215, 31177, 40999, 30656, 31047, 40062, 30320_A, 32791, 40009, 30669, 70343, 70388, 40485, 40186, 30069, 30478) toegevoegd, telkens 5 µL per reactie, in verschillende verdunningen (1:100, 1:600 of 1:2).

M1058L_FIPV(T)_2 LNA-probe

Voor de PCR-reacties met FCoV_S primers en FIP_T2 P:P-mix werd een uniforme reactiesamenstelling gebruikt: telkens 2 µL FIP_T2 P:P-mix, 10 µL iTaq Universal Probes Supermix en 3 µL nucleasevrij H₂O. De no template control (NTC) bevatte 5 µL H₂O, terwijl de positieve controle 5 µL FIPV(T)_2 gBlocks (10⁶ kopieën/µL) bevat. Voor de negatieve controle werd 5 µL staal 32066 gebruikt. Voor de teststalen werden verschillende verdunde of onverdunde stalen (zoals 30320_A, 32791, 40009, 30669, 70343, 40485, 40186, 30069, 30478, 40485, 40186, 30069, 30478) toegevoegd, telkens 5 µL per reactie, in verschillende verdunningen (1:100, 1:600 of 1:2).

2 Resultaten en discussie

2.1 RNA-extractie

2.1.1 Stalen

Tabel 35: Overzicht van de stalen die werden verzameld uit de routine. Het resultaat dat in de routine werd bekomen wordt ook vermeld, dit is handig als referentie.

Staalnummer	Type staal	Resultaat routine
40294	biopt in paraffine (FFPE-staal)	/
70583	faeces	positief (Cq 34)
41215	faeces	positief (Cq 27)
32066	faeces	negatief
31177	faeces	positief (Cq 33)
40999	faeces	positief (Cq 35)
30300	faeces	negatief
30656	faeces	positief (Cq 34)
33109	faeces	negatief
31047	faeces	positief (Cq 32)
31672	faeces	negatief
32398	faeces	negatief
42014	faeces	negatief
30877	bloed (EDTA)	negatief
30086	natte wisser	/
30320_A	natte wisser	positief (Cq 29)
30426	vocht	/
31509	vocht	positief FIP (Cq 19)
30988	vocht	/
40027	wisser	/
40062 (1:17)	wisser	positief (Cq 26)
40507	vocht	negatief
30771 (1:66)	wisser	/
70039 (1:3)	wisser	/
70042	wisser	/
40600_A	vocht	negatief
32791	faeces	positief (Cq 29)
32514	organen	/
40009	vocht	positief (Cq 29)
30555	faeces	positief (Cq 31)
30669	faeces	positief (Cq 30)
70343	buikvocht	positief (Cq 28)
70388	/	positief (Cq 28)
30727	organen	negatief
40485	/	positief (Cq 32)

2.1.2 Concentratiemeting (NanoDrop)

De concentratie en de kwaliteit van de stalen wordt op verschillende momenten tijdens het proces gemeten door middel van NanoDrop.

2.1.2.1 Concentratie­meting na extractie

Na de extractie wordt de concentratie en de kwaliteit van het geëxtraheerde materiaal gemeten door middel van NanoDrop. Hierbij wordt 1,5 µL van het geëxtraheerde materiaal op het toestel geladen.

Tabel 36: Concentraties van de geëxtraheerde stalen, gemeten met NanoDrop.

Staalnummer	Concentratie (ng/µL)	A260/A280	A260/A230
40294_A	1124,9	0,58	-5,73
40294_B	1036,6	0,58	-8,84
70583	2	0,95	0,02
41215	1,9	0,91	0,03
32066	16,4	1,58	0,16
31177	0,4	0,43	0
40999	7,6	1,32	0,08
30300	18,4	1,29	0,26
30656	3,3	1,12	0,03
33109	-1,9	-5,11	-0,02
31047	-2,5	4,23	-0,03
31672	-1,6	-96,22	-0,02
32398	2,6	1,71	0,02
42014	7,6	1,51	0,07
30877	-1,1	-4,16	-0,02
30086	7,7	1,83	0,20
30320_A	14,6	1,88	0,30
30426	3,9	1,45	1,20
31509	62,7	1,83	1,33
30988	10,5	1,66	0,50
40027	1,1	1,19	0,02
40062 (1:17)	11,9	0,37	-0,50
40507	127,8	1,89	1,73
30771 (1:66)	9,1	1,16	-0,06
70039 (1:3)	2,6	0,63	-0,02
70042	16,8	1,72	0,43
40600_A	176,9	1,67	0,47
32791	3,3	0,79	-0,03
40009	27,9	1,77	0,60
30555	2,8	1,25	-2,19
30669	5,0	2,21	-3,11
70343	20,5	1,81	0,42
40485	4,9	1,72	0,06

Bespreking resultaten

Zuivere nucleïnezuren leveren meestal een 260/280-verhouding op van ~1,8 voor DNA en een 260/280-verhoudingen van ~2,0 voor RNA. De 260/230-verhouding is een tweede maat voor de DNA-zuiverheid en zou voor zuivere nucleïnezuren een waarde van 1,8-2,2 moeten hebben.

Staal 30877, een EDTA-bloedstaal afkomstig van een kat, vertoonde een zeer lage nucleïnezuurconcentratie. Dit resultaat kan worden verklaard door het feit dat rode bloedcellen bij zoogdieren geen kern bevatten en dus nauwelijks genetisch materiaal aanwezig is in het bloedstaal. Enkel de witte bloedcellen dragen bij aan de hoeveelheid DNA, wat resulteert in een lage totale opbrengst.

Ook de faecesstalen (33109, 31047 en 31672) gaven een bijzonder lage concentratie aan. Faecesstalen bevatten doorgaans relatief weinig DNA of RNA van het doelorganisme, aangezien het monster voornamelijk bestaat uit bacteriën, voedselresten en andere componenten. Bovendien vormt faeces een complexe matrix die rijk is aan remmers, zoals polysacchariden, vetten en galzuren. Deze stoffen kunnen de efficiëntie van de nucleïnezuurextractie negatief beïnvloeden door de lysis van cellen te bemoeilijken of de binding van nucleïnezuren aan de magnetische beads te verstoren. Daarnaast kunnen de aanwezige organische en anorganische contaminanten de meting op de NanoDrop verstoren, wat kan resulteren in een onnauwkeurige of verlaagde A260-waarde en dus in een onderschatting van de werkelijke nucleïnezuurconcentratie.

Daarentegen vertoonden de FFPE-stalen (40294_A en 40294_B), afkomstig van biopten in paraffine, uitzonderlijk hoge concentraties. Dit kan worden verklaard door het feit dat bij FFPE-stalen vaak een hoge concentratie aan nucleïnezuren wordt teruggevonden, hoewel de kwaliteit hiervan sterk kan variëren door fragmentatie en crosslinking als gevolg van het fixatieproces.

Tot slot werden er zeer uiteenlopende A260/280- en A260/A230-verhoudingen vastgesteld bij verschillende stalen. Dit wijst erop dat het geëxtraheerde materiaal niet uitsluitend uit zuiver DNA of RNA bestaat, maar ook andere contaminanten bevat, zoals proteïnen of restanten van organische verbindingen.

2.1.2.2 Concentratiemeting na DNase-behandeling

Het geëxtraheerde staal wordt behandeld met DNase om DNA-restanten te verwijderen en zuiver RNA te bekomen. Na de DNase-behandeling wordt de concentratie en kwaliteit van het RNA-staal gemeten door middel van NanoDrop. Hierbij wordt 1,5 µL van het staal op het toestel geladen.

Tabel 37: Concentraties van de geëxtraheerde stalen nadat het DNA werd verwijderd met behulp van DNase, gemeten met NanoDrop.

Staalnummer	Concentratie (ng/µL)	A260/A280	A260/A230
40294_A	986,4	0,61	-8,48
40294_B	1193,6	0,63	-9,06
70583	50,6	0,78	0,16
41215	49,2	0,75	0,16
32066	47,4	1,03	0,2
31177	44,7	0,71	0,14
40999	59,6	0,81	0,18
30300	37	0,45	0,07
30656	26,5	0,45	0,07
33109	20,2	0,37	0,06
31047	19	0,37	0,06
31672	19,4	0,37	0,06
32398	24,4	0,44	0,07
42014	24	0,54	0,08
30877	19,9	0,38	0,07
30086	27,3	0,50	0,10
30320_A	33,4	0,58	0,12
30426	25,4	0,46	0,10
31509	100,9	1,05	0,33
30988	34,6	0,55	0,12
40027	19,9	0,39	0,07
40062 (1:17)	27,7	0,37	0,20
40507	174,1	1,33	0,54
30771 (1:66)	33,1	0,55	0,29

70039 (1:3)	22,3	0,41	0,16
70042	25,2	1,32	0,28
40600 A	222,5	1,18	0,33
32791	112,9	0,98	0,27
40009	96,1	1,20	1,01
30555	37,9	0,43	0,09
30669	32,8	0,47	0,10
70343	-0,7	-0,05	0,02
30727	86,0	0,84	0,09
40485	32,3	0,50	0,09

Tabel 38: Resultaten NanoDrop na verdunning.

Staalnummer	Verdunning	Concentratie (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230
40294 A	1:10	120	1,34	-0,07
40294 B	1:10	128,8	0,61	-0,87

Bespreking resultaten

De gemeten A260/280- en A260/A230-verhoudingen vertoonden een grote variabiliteit tussen de verschillende stalen. Dit duidt erop dat het geëxtraheerde materiaal niet uitsluitend uit zuiver DNA of RNA bestaat, maar dat er ook andere contaminanten aanwezig zijn, zoals bijvoorbeeld proteïnen of organische verbindingen. Bovendien vertoonden alle stalen een opvallend lage A260/280-waarde, terwijl voor zuiver RNA een waarde rond 2,0 verwacht wordt. Deze afwijking kan verklaard worden door de aanwezigheid van andere componenten in het mengsel die absorberen bij 280 nm en 230 nm, waardoor de verhoudingen afwijken van de theoretische waarden voor zuivere nucleïnezuren.

2.1.2.3 Concentratiemeting na cDNA-synthese

Bij cDNA-synthese wordt 20 μ L cDNA aangemaakt vanuit het RNA-staal dat werd behandeld met DNase. Na de cDNA-synthese wordt de concentratie en de zuiverheid gecontroleerd door middel van NanoDrop. Hierbij wordt 1,5 μ L van het gevormde cDNA geladen op het toestel, waardoor nog 18,5 μ L cDNA overblijft.

Tabel 39: Concentraties van de geëxtraheerde stalen na cDNA-synthese, gemeten met NanoDrop.

Staalnummer	Concentratie (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230
40294 A (1:10)	2467,7	1,84	1,41
40294 B (1:10)	3063,6	1,76	0,69
70583	2060	1,84	2,84
41215	2932,9	1,8	2,27
32066	2496,5	1,85	2,38
31177	2265,9	1,84	2,36
40999	3009,7	1,84	2,13
30300	2267,0	1,83	2,26
30656	-1706,9	1,82	1,81
33109	2306,6	1,84	2,19
31047	2150,2	1,82	2,14
31672	2211,2	1,82	2,15
32398	2937,3	1,84	2,19
42014	2620,0	1,83	2,21
30877	1964,0	1,80	2,19
30086	1837,7	1,84	2,29
30320 A	1847,1	1,84	2,32
30426	2147,7	1,83	2,24

31509	2018,2	1,84	2,36
30988	1903,6	1,83	2,30
40027	2024,1	1,83	2,18
40062 (1:17)	1997,0	1,83	2,32
40507	2015,3	1,84	2,39
30771 (1:66)	2172,0	1,86	2,38
70039 (1:3)	1881,1	1,82	2,30
70042	2383,6	1,85	2,33
40600_A	2322,1	1,83	2,21
32791	2206,9	1,85	2,19
40009	2265,6	1,84	2,14
30555	2280,6	1,82	2,08
30669	2576,4	1,83	2,09
70343	2563,7	1,83	2,05
30727	2097,4	1,79	1,07
40485	2334,1	1,83	2,03

Bespreking resultaten

Bij de analyse van de zuiverheidsratio's na nucleïnezuurextractie werden enkele opvallende resultaten vastgesteld. Zo vertoonden de stalen 40294_B en 30727 een opvallend lage A260/A230-waarde, wat wijst op de aanwezigheid van contaminanten zoals fenol, guanidinezouten of andere organische verbindingen die kunnen interfereren met de zuiverheid van het nucleïnezuur.

Voor alle stalen werd een A260/A280-waarde van ongeveer 1,8 gemeten, wat overeenkomt met de verwachte waarde voor zuiver DNA en duidt op een beperkte aanwezigheid van proteïnen of fenolverontreiniging.

Bovendien bevonden de meeste stalen zich qua A260/A230-waarde binnen de verwachte range van 1,8 tot 2,2, wat doorgaans wijst op een goede zuiverheid.

De cDNA-synthese was succesvol en heeft vrij zuiver cDNA opgeleverd.

2.1.2.4 Concentratiemeting na verdunning en allocering

Na de cDNA-synthese wordt een 1:2 verdunning gemaakt van de stalen door 18,5 µL staal aan te lengen met 18,5 µL nucleasevrij water, zodat er een totaalvolume van 37 µL 1:2 verdunning wordt gemaakt. Na vortexen wordt de concentratie van het verdunde staal gemeten door middel van NanoDrop, waarbij 1,5 µL verdund staal wordt geladen op het toestel. Vervolgens wordt het verdunde staal gealloceerd naar verschillende 1,5 mL epjes, zodanig dat er 3 epjes met 10 µL en 1 epje met 5,5 µL verdund staal zijn die in de diepvries bij -20 °C bewaard worden.

Tabel 40: Concentratie van de stalen na het maken van een 1:2-verdunning.

Staalnummer	Verdunning	Concentratie (ng/µL)	A260/A280	A260/A230
40294_A	1:20	991,7	1,82	1,21
40294_B	1:20	1054,6	1,81	0,61
70583	1:2	829,8	1,84	2
41215	1:2	1230,5	1,85	2,03
32066	1:2	956,1	1,85	1,99
31177	1:2	957,5	1,84	1,99
40999	1:2	1091,8	1,84	2,02
30300	1:2	878,4	1,81	2,80
30656	1:2	1215,2	1,83	2,73
33109	1:2	1006,6	1,81	2,63
31047	1:2	891,7	1,82	2,71

31672	1:2	898,1	1,81	2,68
32398	1:2	1271,1	1,81	2,51
42014	1:2	1147,3	1,80	2,58
30877	1:2	854,1	1,79	2,72
30086	1:2	886,4	1,83	2,95
30320_A	1:2	875,6	1,83	3,04
30426	1:2	1071,9	1,82	2,75
31509	1:2	957,5	1,82	3,02
30988	1:2	894,6	1,84	3,01
40027	1:2	957,4	1,83	2,78
40062 (1:17)	1:34	918,5	1,84	3,04
40507	1:2	956,2	1,85	3,09
30771 (1:66)	1:132	988,5	1,85	3,07
70039 (1:3)	1:6	894,8	1,81	2,98
70042	1:2	1261,1	1,84	2,67
40600_A	1:2	1148,4	1,81	2,61
32791	1:2	1124,6	1,83	2,57
40009	1:2	1084,2	1,82	2,56
30555	1:2	1042,7	1,81	2,51
30669	1:2	1199,6	1,82	2,46
70343	1:2	1156,1	1,82	2,43
40485	1:2	1084,1	1,82	2,41

Bespreking resultaten

De concentratie van de stalen daalde, zoals verwacht, ongeveer tot de helft na het aanmaken van een 1:2-verdunning. Het verdunnen van de stalen had echter weinig invloed op de zuiverheid van het cDNA: de gemeten A260/A280- en A260/A230-waarden na verdunning kwamen goed overeen met de waarden die vóór de verdunning werden vastgesteld. Dit wijst erop dat de verdunning geen noemenswaardige impact heeft gehad op de kwaliteit van het cDNA.

2.2 Kwaliteitsanalyse

2.2.1 Kwaliteitsanalyse primers

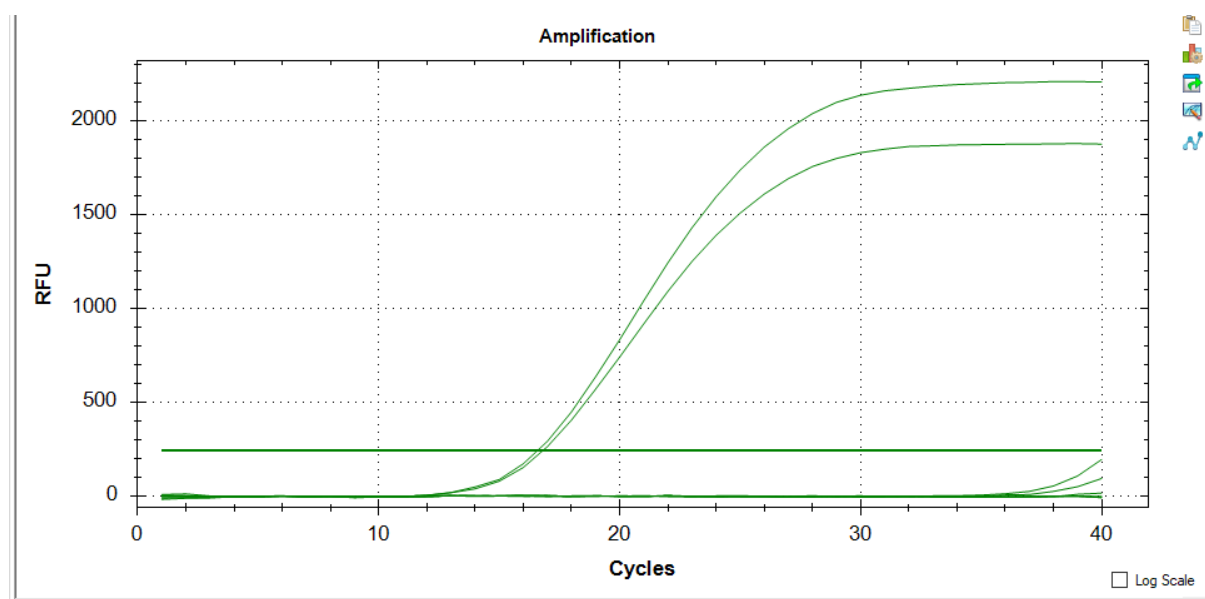
2.2.1.1 High Resolution Melting (HRM) Analyse

PCR-resultaten

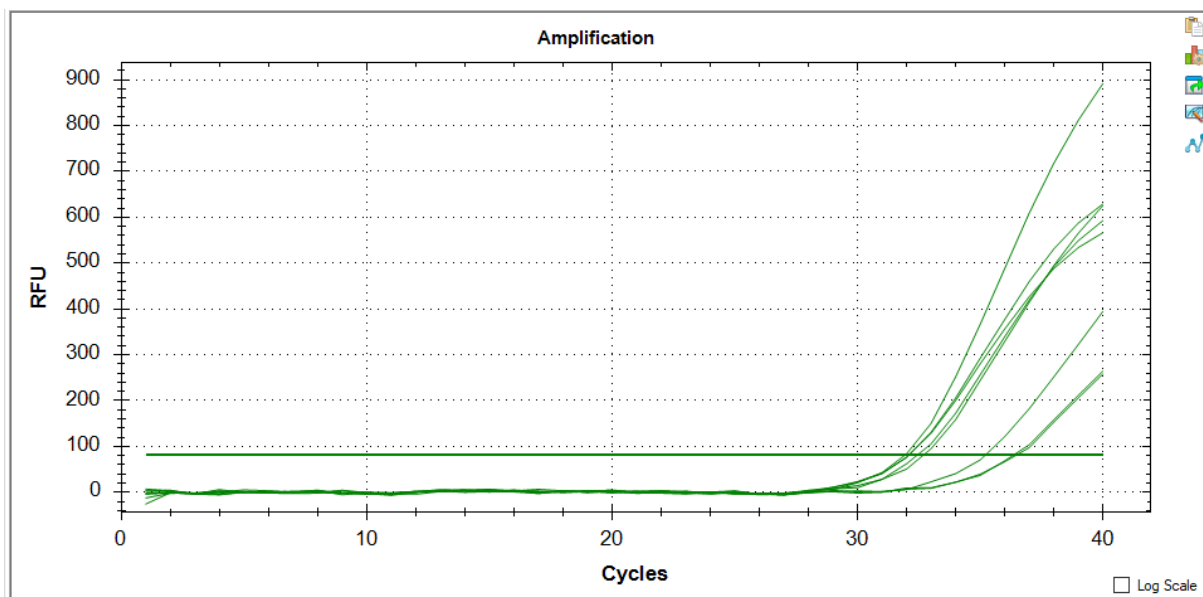
Tabel 41: Resultaten PCR kwaliteitsanalyse primers, High Resolution Melting (HRM) Analyse met EvaGreen

Staal	C _q	T _m (°C)
NTC: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_7b primers	N/A	None
NTC: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_7b primers	N/A	None
<u>positieve controle</u> : 7b gBlock (10 ⁶) + FCoV_7b primers	16,56	80,00
<u>positieve controle</u> : 7b gBlock (10 ⁶) + FCoV_7b primers	16,78	80,00
<u>positief staal</u> : staal met FIPV (31509) + FCoV_7b primers	N/A	None
<u>positief staal</u> : staal met FIPV (31509) + FCoV_7b primers	N/A	None
<u>negatief staal</u> : staal zonder FIPV (30877) + FCoV_S primers	35,19	None

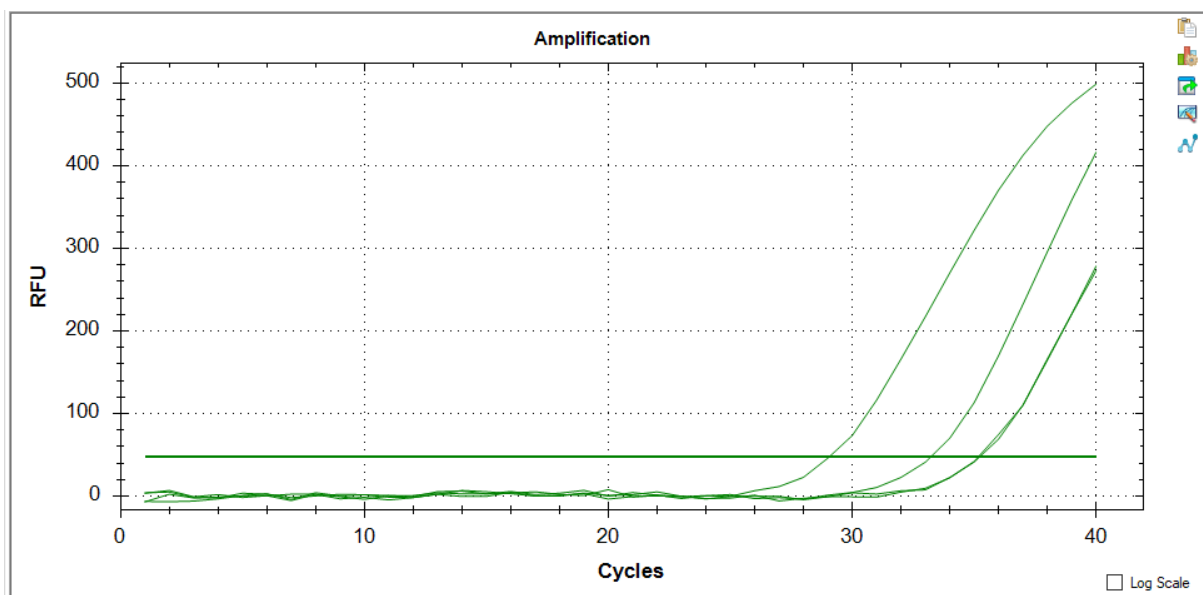
<u>negatief staal</u> : staal zonder FIPV (30877) + FCoV_S primers	N/A	None
<u>NTC</u> : nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	32,07	None
<u>NTC</u> : nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	32,08	None
<u>positieve controle</u> : FECV(A) gBlock (10 ⁶) + FCoV_S primers	32,41	None
<u>positieve controle</u> : FECV(A) gBlock (10 ⁶) + FCoV_S primers	32,67	None
<u>positieve controle</u> : FIPV(C) gBlock (10 ⁶) + FCoV_S primers	36,44	None
<u>positieve controle</u> : FIPV(C) gBlock (10 ⁶) + FCoV_S primers	36,33	None
<u>positieve controle</u> : FIPV(T) gBlock (10 ⁶) + FCoV_S primers	N/A	None
<u>positieve controle</u> : FIPV(T) gBlock (10 ⁶) + FCoV_S primers	31,91	None
<u>positief staal</u> : staal met FIPV (31509) + FCoV_S primers	35,15	None
<u>positief staal</u> : staal met FIPV (31509) + FCoV_S primers	35,20	None
<u>negatief staal</u> : staal zonder FIPV (30877) + FCoV_7b primers	33,20	None
<u>negatief staal</u> : staal zonder FIPV (30877) + FCoV_7b primers	29,03	None



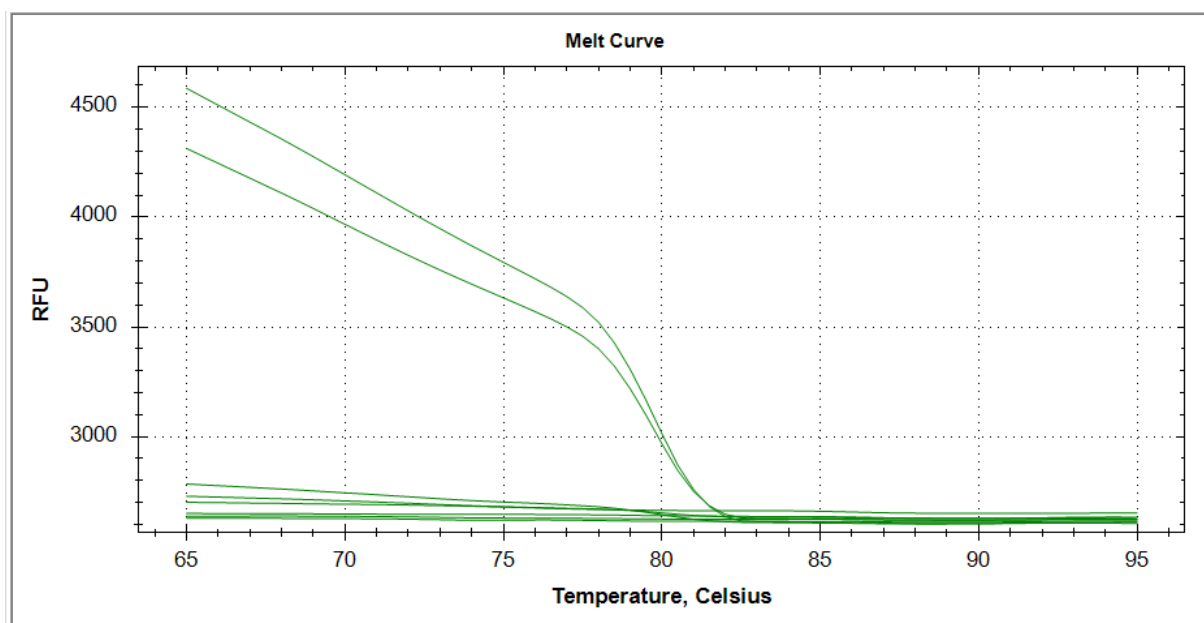
Figuur 49: Resultaten HRM-analyse met EvaGreen van de FCoV_7b-primers, amplificatiegrafiek. Zie ook Tabel 41.



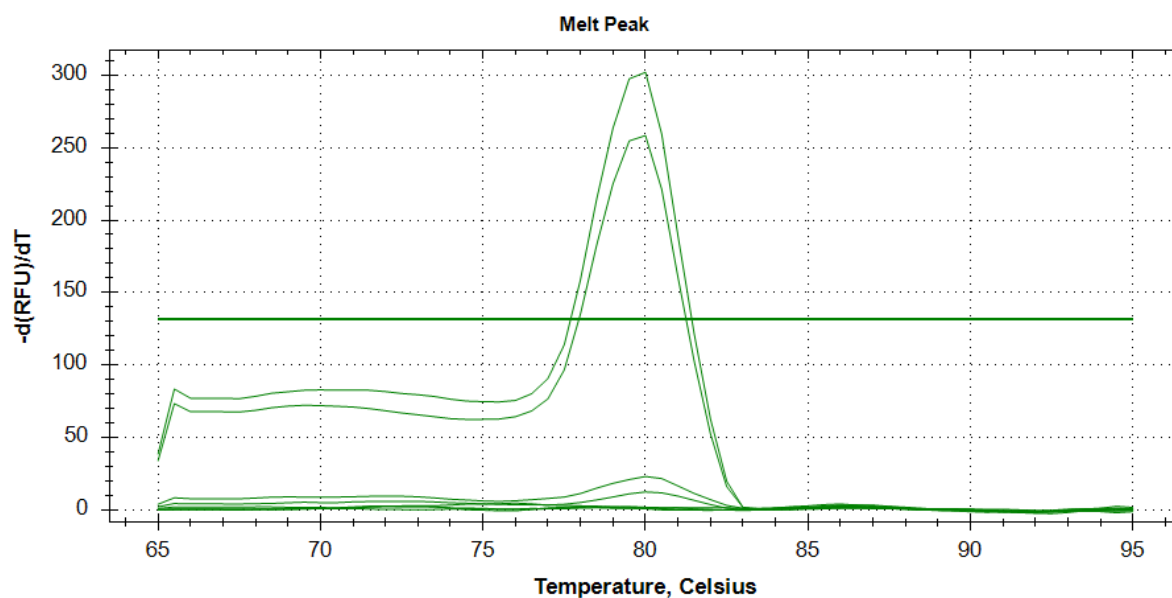
Figuur 50: Resultaten HRM-analyse met EvaGreen van de FCoV_S-primers, amplificatiegrafiek. Zie ook Tabel 41.



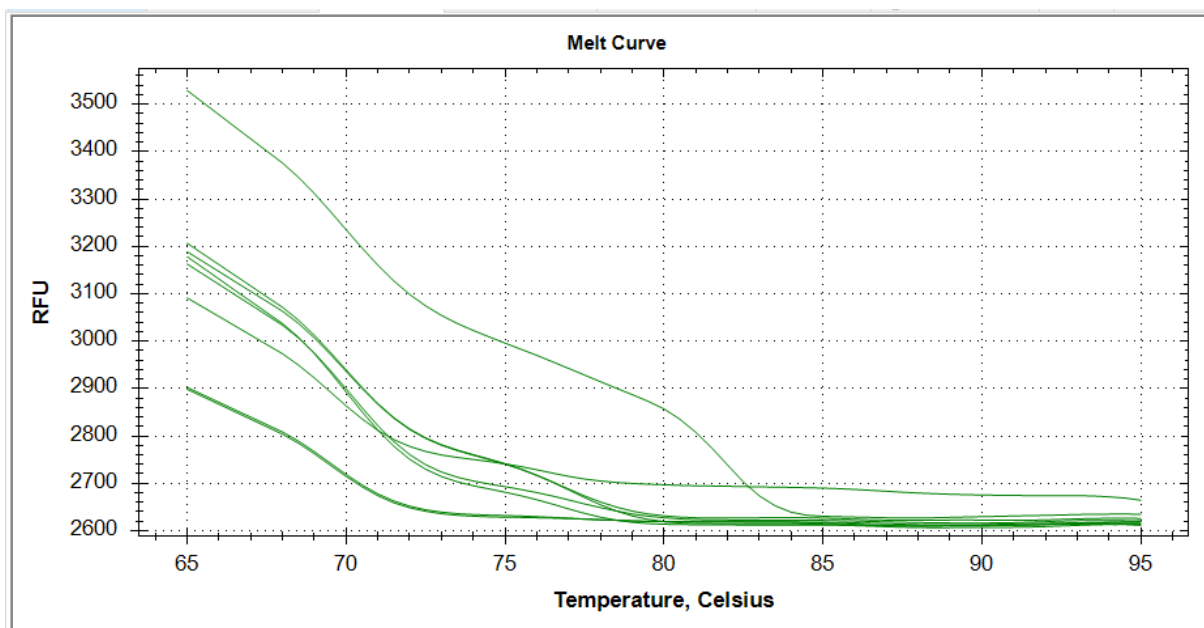
Figuur 51: Resultaten HRM-analyse met EvaGreen van de FCoV_S-primers, amplificatiegrafiek. Zie ook Tabel 41.



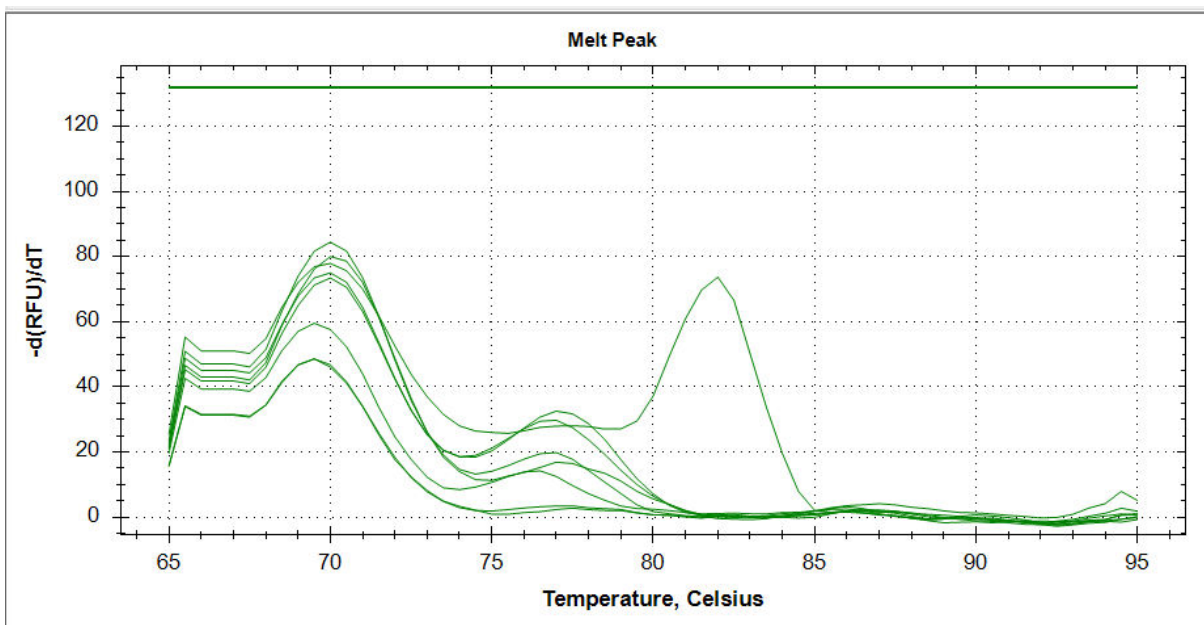
Figuur 52: Resultaten HRM-analyse met EvaGreen van de FCoV_7b-primers, smeltcurve. Zie ook Tabel 41.



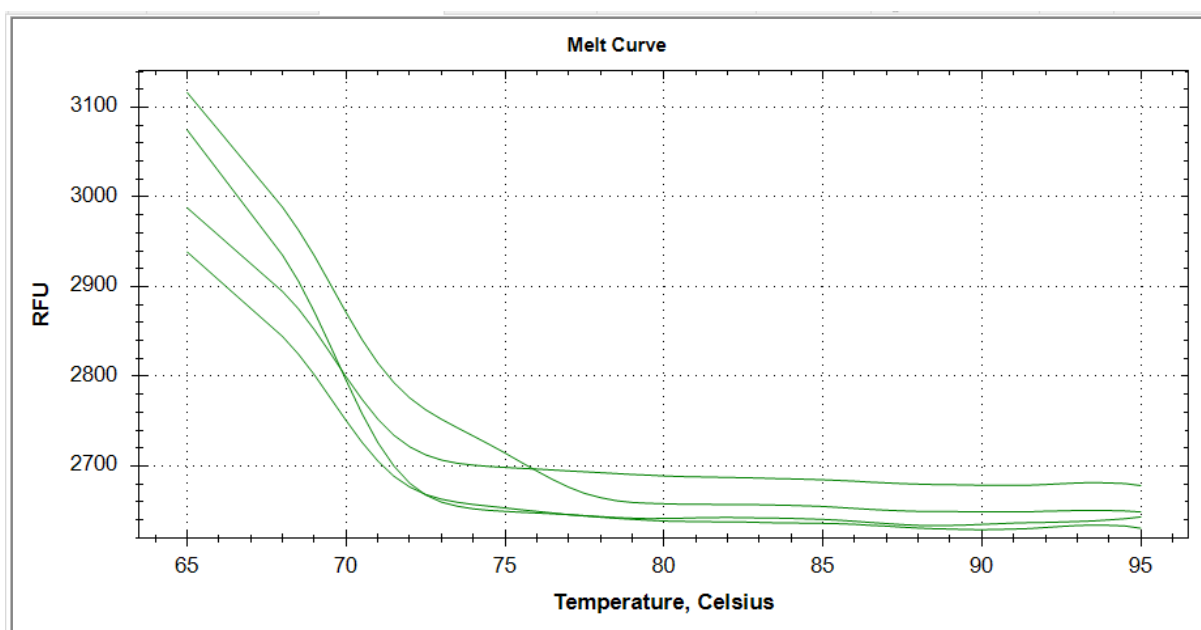
Figuur 53: Resultaten HRM-analyse met EvaGreen van de FCoV_7b-primers, afgeleide grafiek. Zie ook Tabel 41.



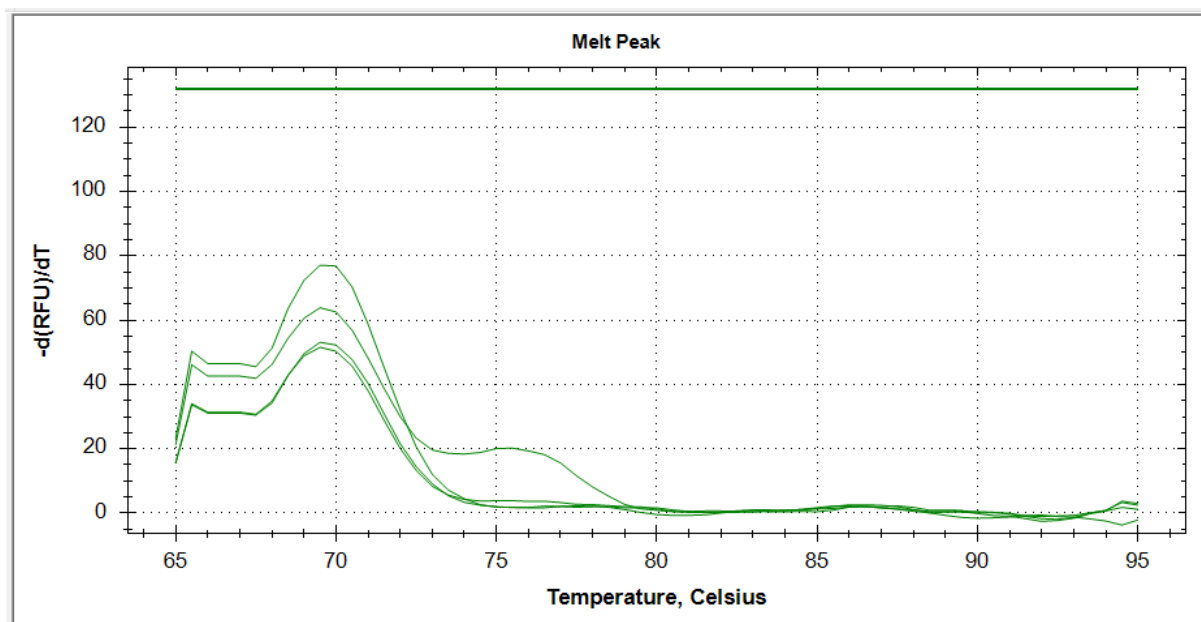
Figuur 54: Resultaten HRM-analyse met EvaGreen van de FCoV_S-primers, smeltcurve. Zie ook Tabel 41.



Figuur 55: Resultaten HRM-analyse met EvaGreen van de FCoV_S-primers, afgeleide grafiek. Zie ook Tabel 41.



Figuur 56: Resultaten HRM-analyse met EvaGreen van de FCoV_S-primers, smeltcurve. Zie ook Tabel 41.



Figuur 57: Resultaten HRM-analyse met EvaGreen van de FCoV_S-primers, afgeleide grafiek. Zie ook Tabel 41.

2.2.2 Kwaliteitsanalyse probes

2.2.2.1 gBlocks verdunningsreeks

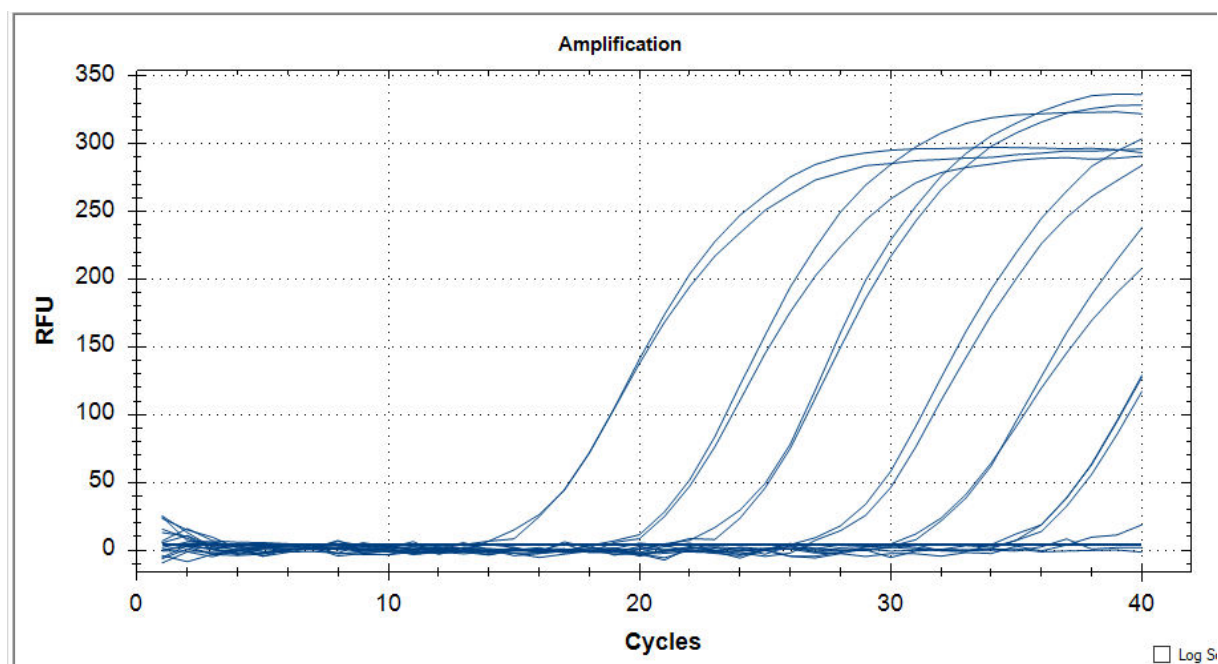
De probes moeten bij verschillende concentraties van de gBlocks getest worden. Hiervoor wordt een seriële verdunning aangemaakt van de verschillende gBlocks.

Resultaten PCR

Tabel 42: Resultaten PCR FCoV_7b gBlock verdunningsreeks met de **FCoV_7b P:P-mix** (probeconcentratie 0,5 μM). De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

Staal	Cq
NTC: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_7b primers	36,29
NTC: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_7b primers	19,74
FCoV_7b gBlock (10 ⁶ copies/ μL)	13,04

FCoV_7b gBlock (10^6 copies/ μ L)	13,65
FCoV_7b gBlock (10^5 copies/ μ L)	18,79
FCoV_7b gBlock (10^5 copies/ μ L)	18,23
FCoV_7b gBlock (10^4 copies/ μ L)	21,09
FCoV_7b gBlock (10^4 copies/ μ L)	20,87
FCoV_7b gBlock (10^3 copies/ μ L)	26,67
FCoV_7b gBlock (10^3 copies/ μ L)	26,03
FCoV_7b gBlock (10^2 copies/ μ L)	28,46
FCoV_7b gBlock (10^2 copies/ μ L)	30,27
FCoV_7b gBlock (10^1 copies/ μ L)	34,48
FCoV_7b gBlock (10^1 copies/ μ L)	34,41
FCoV_7b gBlock (10^0 copies/ μ L)	34,01
FCoV_7b gBlock (10^0 copies/ μ L)	37,06

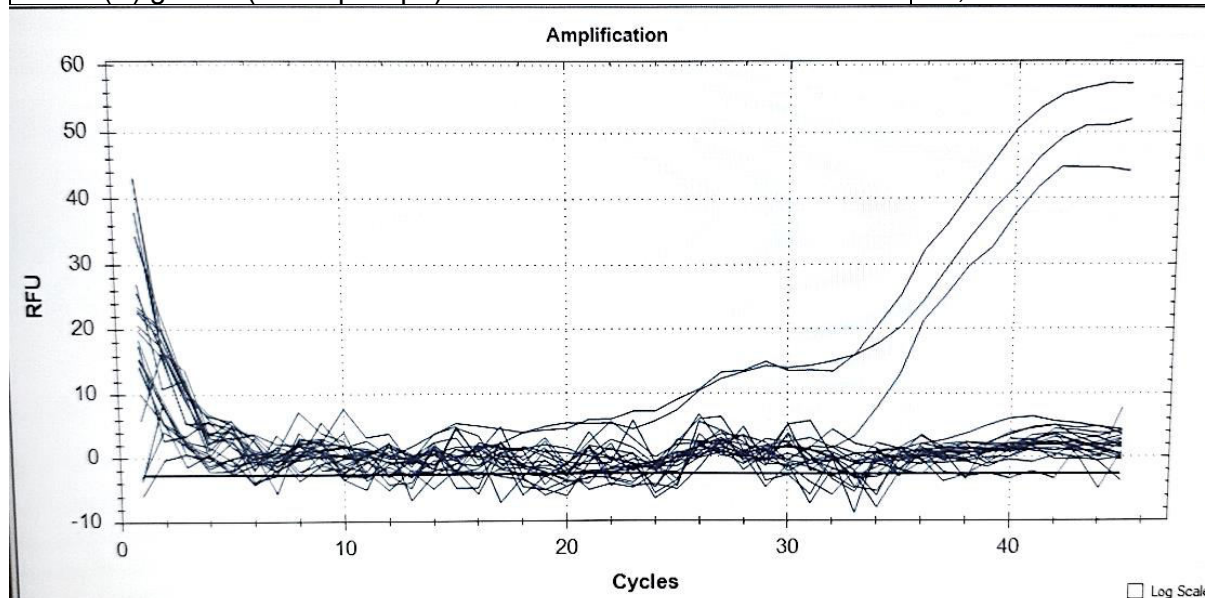


Figuur 58: Resultaten PCR FCoV_7b gBlock verdunningsreeks met de FCoV_7b P:P-mix, zie ook Tabel 42.

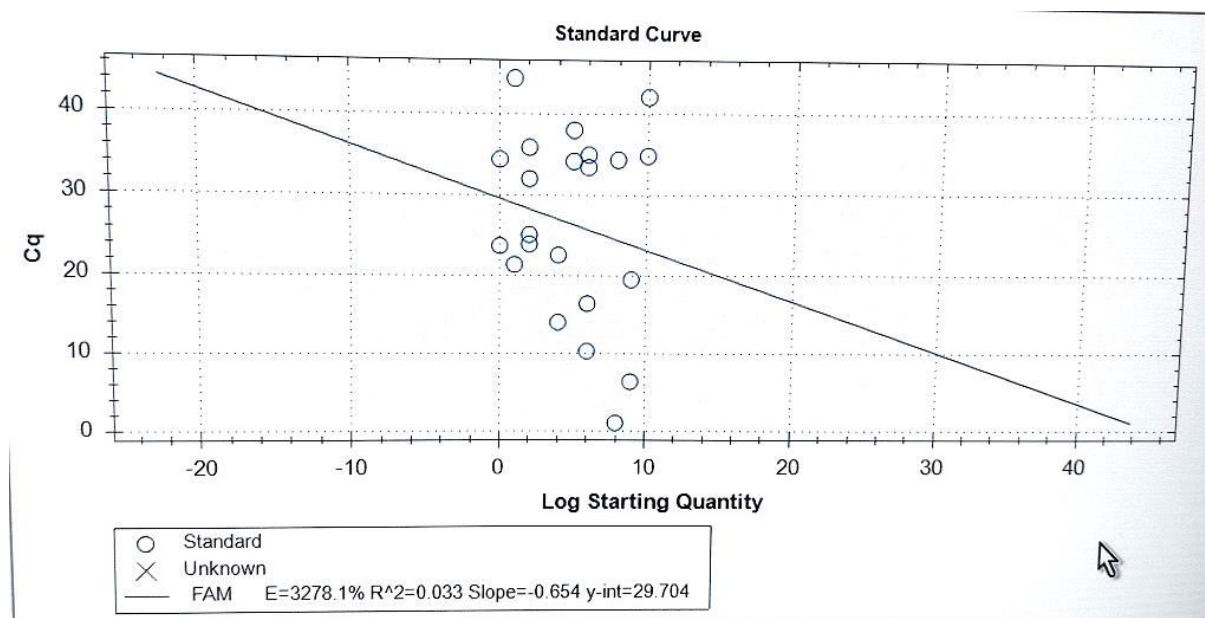
Tabel 43: Resultaten PCR FECV(A) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A P:P-mix (probeconcentratie 0,5 μ M)**. De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat. De gBlocks-verdunning met 10^7 copies/ μ L werd niet geladen, in plaats daarvan werd de verdunning met 10^6 copies/ μ L nog twee keer extra geladen.

Staal	Cq
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	1,56
FECV(A) gBlock (10^{10} copies/ μ L)	42,14
FECV(A) gBlock (10^{10} copies/ μ L)	24,95
FECV(A) gBlock (10^9 copies/ μ L)	19,47
FECV(A) gBlock (10^9 copies/ μ L)	6,38
FECV(A) gBlock (10^8 copies/ μ L)	1,04
FECV(A) gBlock (10^8 copies/ μ L)	34,47
FECV(A) gBlock (10^6 copies/ μ L)	16,40
FECV(A) gBlock (10^6 copies/ μ L)	10,29
FECV(A) gBlock (10^6 copies/ μ L)	33,55
FECV(A) gBlock (10^6 copies/ μ L)	35,08
FECV(A) gBlock (10^5 copies/ μ L)	38,13
FECV(A) gBlock (10^5 copies/ μ L)	34,40
FECV(A) gBlock (10^4 copies/ μ L)	22,58

FECV(A) gBlock (10^4 copies/ μ L)	14,01
FECV(A) gBlock (10^3 copies/ μ L)	36,00
FECV(A) gBlock (10^3 copies/ μ L)	32,15
FECV(A) gBlock (10^2 copies/ μ L)	25,17
FECV(A) gBlock (10^2 copies/ μ L)	23,95
FECV(A) gBlock (10^1 copies/ μ L)	44,39
FECV(A) gBlock (10^1 copies/ μ L)	21,39
FECV(A) gBlock (10^0 copies/ μ L)	23,75
FECV(A) gBlock (10^0 copies/ μ L)	34,54



Figuur 59: Resultaten PCR FECV(A) gBlocks verdunningsreeks. Zie ook Tabel 43.

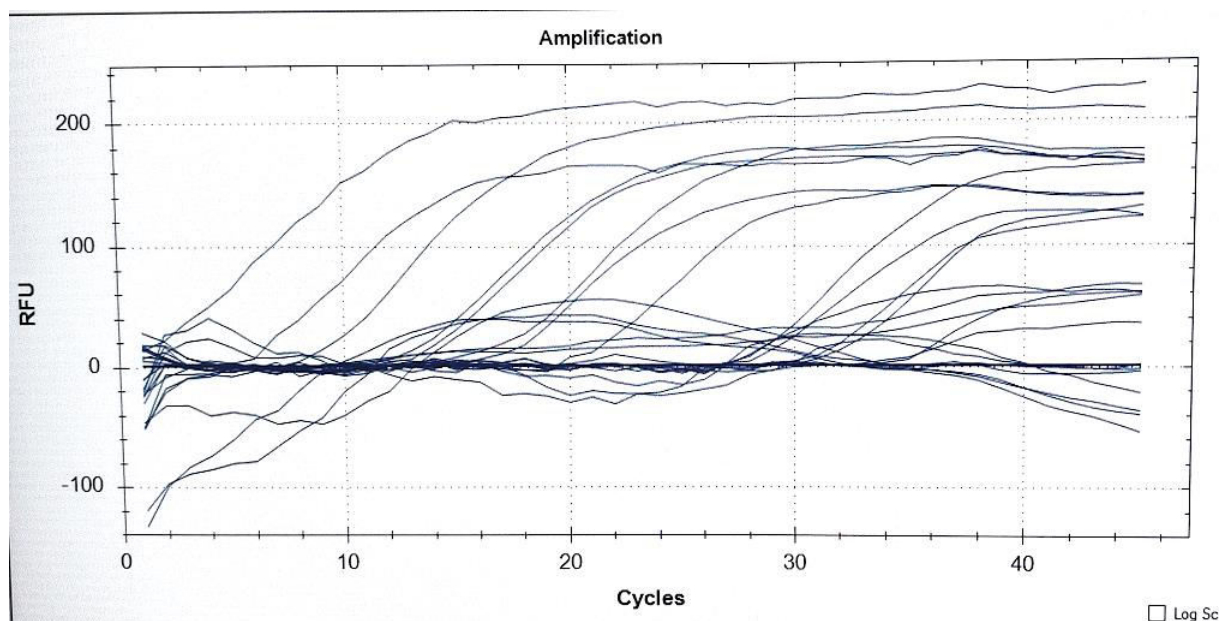


Figuur 60: Standaardcurve van de resultaten van de PCR FECV(A) gBlock verdunningsreeks, opgesteld door het programma van de thermal cycler. Zie ook Tabel 43.

Tabel 44: Resultaten PCR FIPV(C) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_C P:P-mix** (probeconcentratie **0,5 μ M**). De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

Staal	Cq
NTC FIPV(C): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	35,31
NTC FIPV(C): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	14,4

FIPV(C) gBlock (10^{10} copies/ μ L)	9,51
FIPV(C) gBlock (10^{10} copies/ μ L)	N/A
FIPV(C) gBlock (10^9 copies/ μ L)	11,33
FIPV(C) gBlock (10^9 copies/ μ L)	N/A
FIPV(C) gBlock (10^8 copies/ μ L)	13,13
FIPV(C) gBlock (10^8 copies/ μ L)	7,13
FIPV(C) gBlock (10^7 copies/ μ L)	9,75
FIPV(C) gBlock (10^7 copies/ μ L)	11,22
FIPV(C) gBlock (10^6 copies/ μ L)	11,63
FIPV(C) gBlock (10^6 copies/ μ L)	14,39
FIPV(C) gBlock (10^5 copies/ μ L)	26,49
FIPV(C) gBlock (10^5 copies/ μ L)	19,39
FIPV(C) gBlock (10^4 copies/ μ L)	29,66
FIPV(C) gBlock (10^4 copies/ μ L)	26,96
FIPV(C) gBlock (10^3 copies/ μ L)	26,76
FIPV(C) gBlock (10^3 copies/ μ L)	36,74
FIPV(C) gBlock (10^2 copies/ μ L)	28,9
FIPV(C) gBlock (10^2 copies/ μ L)	26,95
FIPV(C) gBlock (10^1 copies/ μ L)	33,01
FIPV(C) gBlock (10^1 copies/ μ L)	32,01
FIPV(C) gBlock (10^0 copies/ μ L)	8,72
FIPV(C) gBlock (10^0 copies/ μ L)	8,81

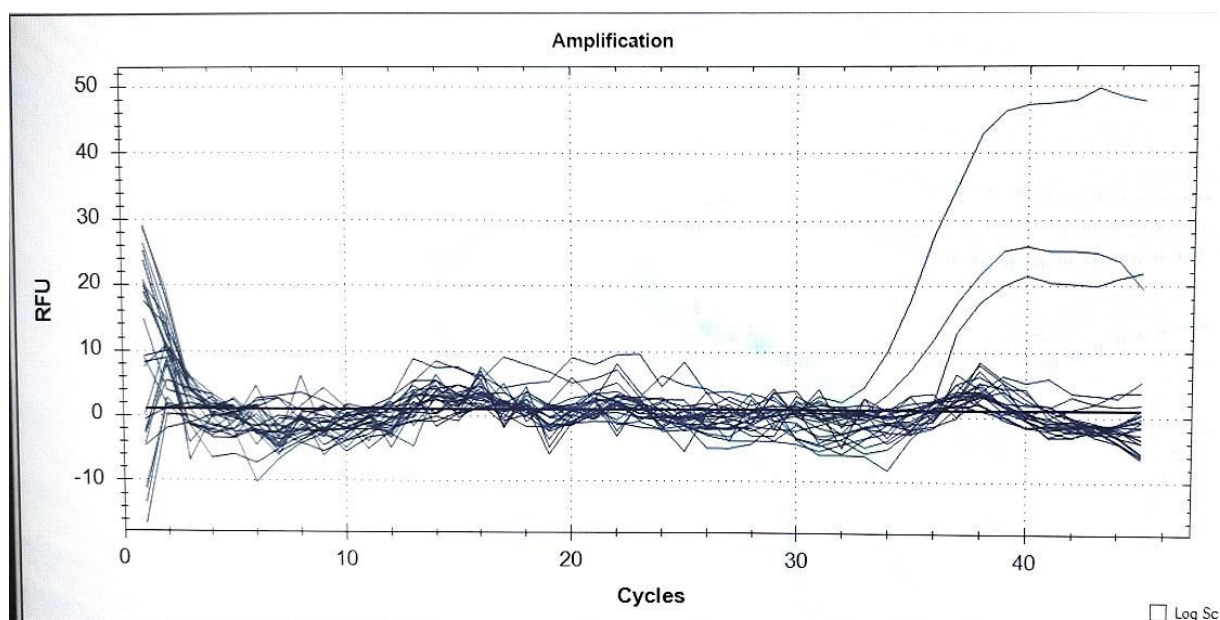


Figuur 61: Resultaten PCR FIPV(C) gBlocks verdunningsreeks. Zie Tabel 44 voor de Cq-waarden.

Tabel 45: Resultaten PCR FIPV(T) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_T P:P-mix (probeconcentratie 0,5 μ M)**. De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

Staal	Cq
NTC FIPV(T): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	34,96
NTC FIPV(T): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	1,96
FIPV(T) gBlock (10^{10} copies/ μ L)	36,34
FIPV(T) gBlock (10^{10} copies/ μ L)	36,41
FIPV(T) gBlock (10^9 copies/ μ L)	35,71
FIPV(T) gBlock (10^9 copies/ μ L)	11,89
FIPV(T) gBlock (10^8 copies/ μ L)	7,85

FIPV(T) gBlock (10 ⁸ copies/μL)	41,94
FIPV(T) gBlock (10 ⁷ copies/μL)	36,09
FIPV(T) gBlock (10 ⁷ copies/μL)	11,93
FIPV(T) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	18,49
FIPV(T) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	30,16
FIPV(T) gBlock (10 ⁵ copies/μL)	40,72
FIPV(T) gBlock (10 ⁵ copies/μL)	37,41
FIPV(T) gBlock (10 ⁴ copies/μL)	35,94
FIPV(T) gBlock (10 ⁴ copies/μL)	5,59
FIPV(T) gBlock (10 ³ copies/μL)	19,97
FIPV(T) gBlock (10 ³ copies/μL)	14,28
FIPV(T) gBlock (10 ² copies/μL)	35,89
FIPV(T) gBlock (10 ² copies/μL)	20,51
FIPV(T) gBlock (10 ¹ copies/μL)	36,46
FIPV(T) gBlock (10 ¹ copies/μL)	36,41
FIPV(T) gBlock (10 ⁰ copies/μL)	35,72
FIPV(T) gBlock (10 ⁰ copies/μL)	35,75



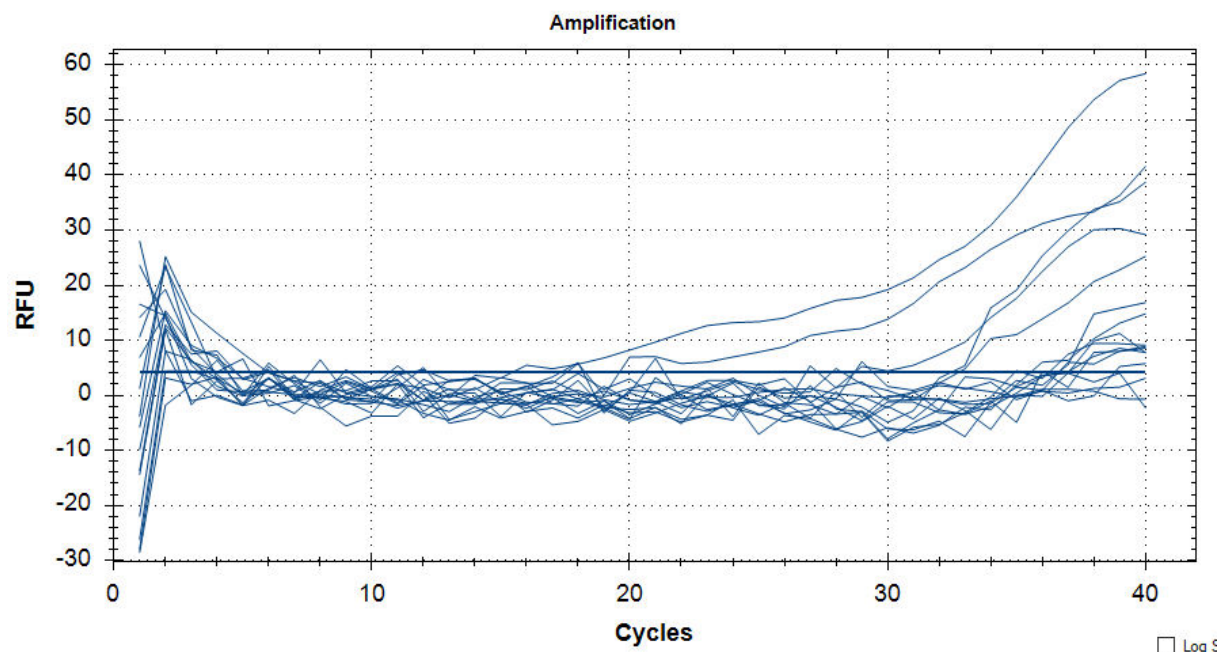
Figuur 62: Resultaten PCR FIPV(T) gBlocks verdunningsreeks. Zie Tabel 45 voor de Cq-waarden.

Verkorte LNA-probes

Tabel 46: Resultaten PCR FECV(A) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A1 P:P-mix** (probeconcentratie 0,5 μM). De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

Staal	Cq
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	36,65
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	37,44
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	4,00
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	27,86
FECV(A) gBlock (10 ⁵ copies/μL)	36,28
FECV(A) gBlock (10 ⁵ copies/μL)	32,50
FECV(A) gBlock (10 ⁴ copies/μL)	32,79
FECV(A) gBlock (10 ⁴ copies/μL)	15,48
FECV(A) gBlock (10 ³ copies/μL)	36,65
FECV(A) gBlock (10 ³ copies/μL)	37,04
FECV(A) gBlock (10 ² copies/μL)	35,57

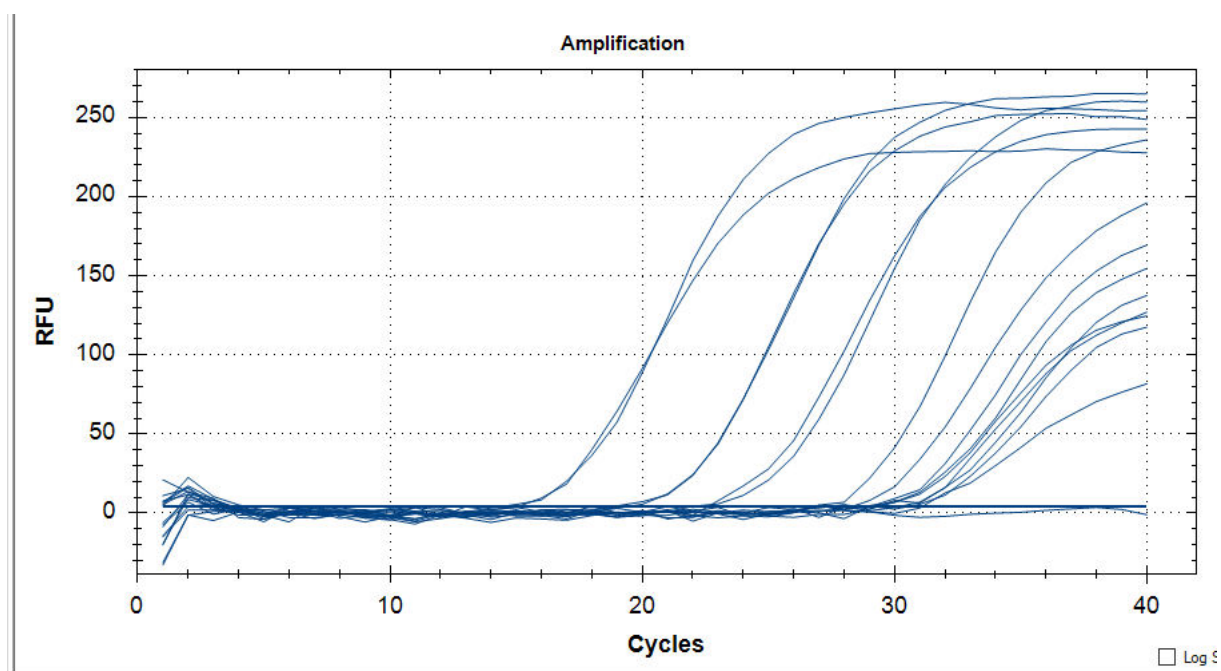
FECV(A) gBlock (10^2 copies/ μ L)	36,97
FECV(A) gBlock (10^1 copies/ μ L)	38,82
FECV(A) gBlock (10^1 copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10^0 copies/ μ L)	19,62
FECV(A) gBlock (10^0 copies/ μ L)	28,74



Figuur 63: Resultaten PCR FECV(A) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A1 P:P-mix**, zie ook Tabel 46.

Tabel 47: Resultaten PCR FIPV(C) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_C1 P:P-mix** (probeconcentratie **0,5 μ M**). De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

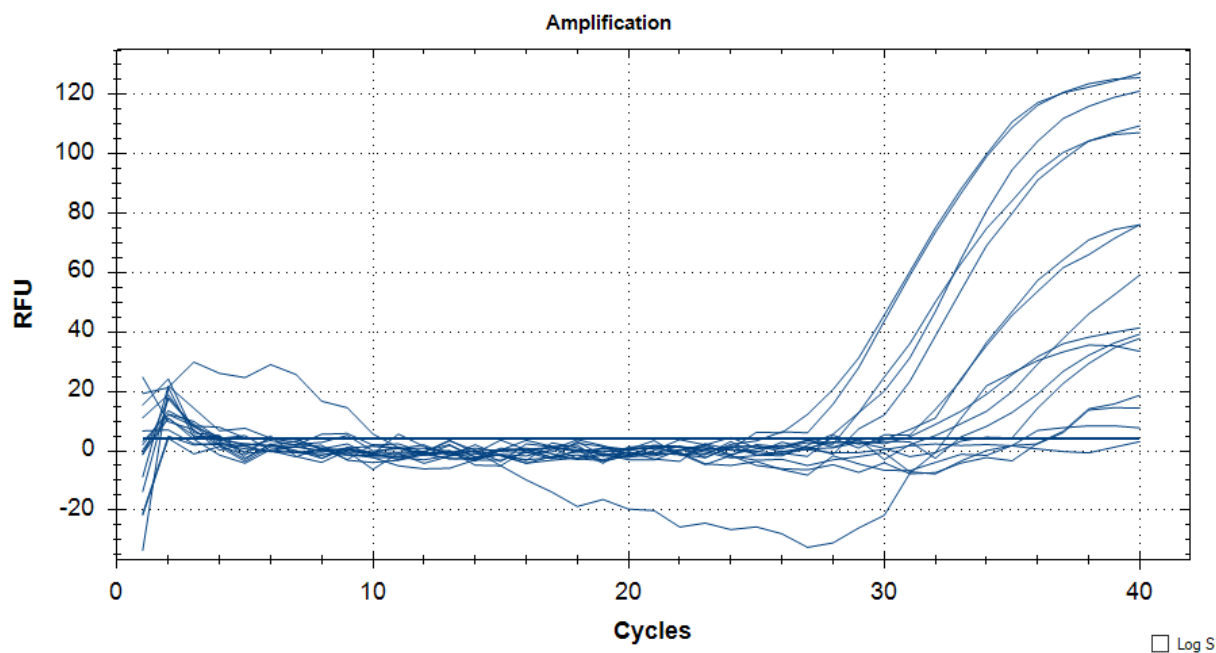
Staal	Cq
NTC FIPV(C): nucleasevrij H ₂ O + FCoV S primers	31,10
NTC FIPV(C): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	30,20
FIPV(C) gBlock (10^6 copies/ μ L)	15,09
FIPV(C) gBlock (10^6 copies/ μ L)	14,42
FIPV(C) gBlock (10^5 copies/ μ L)	19,41
FIPV(C) gBlock (10^5 copies/ μ L)	18,88
FIPV(C) gBlock (10^4 copies/ μ L)	21,96
FIPV(C) gBlock (10^4 copies/ μ L)	22,60
FIPV(C) gBlock (10^3 copies/ μ L)	1,75
FIPV(C) gBlock (10^3 copies/ μ L)	26,77
FIPV(C) gBlock (10^2 copies/ μ L)	29,05
FIPV(C) gBlock (10^2 copies/ μ L)	30,54
FIPV(C) gBlock (10^1 copies/ μ L)	29,38
FIPV(C) gBlock (10^1 copies/ μ L)	29,31
FIPV(C) gBlock (10^0 copies/ μ L)	28,32
FIPV(C) gBlock (10^0 copies/ μ L)	28,77



Figuur 64: Resultaten PCR FIPV(C) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_C1 P:P-mix**, zie ook Tabel 47.

Tabel 48: Resultaten PCR FIPV(T) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_T1 P:P-mix (probeconcentratie 0,5 µM)**. De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

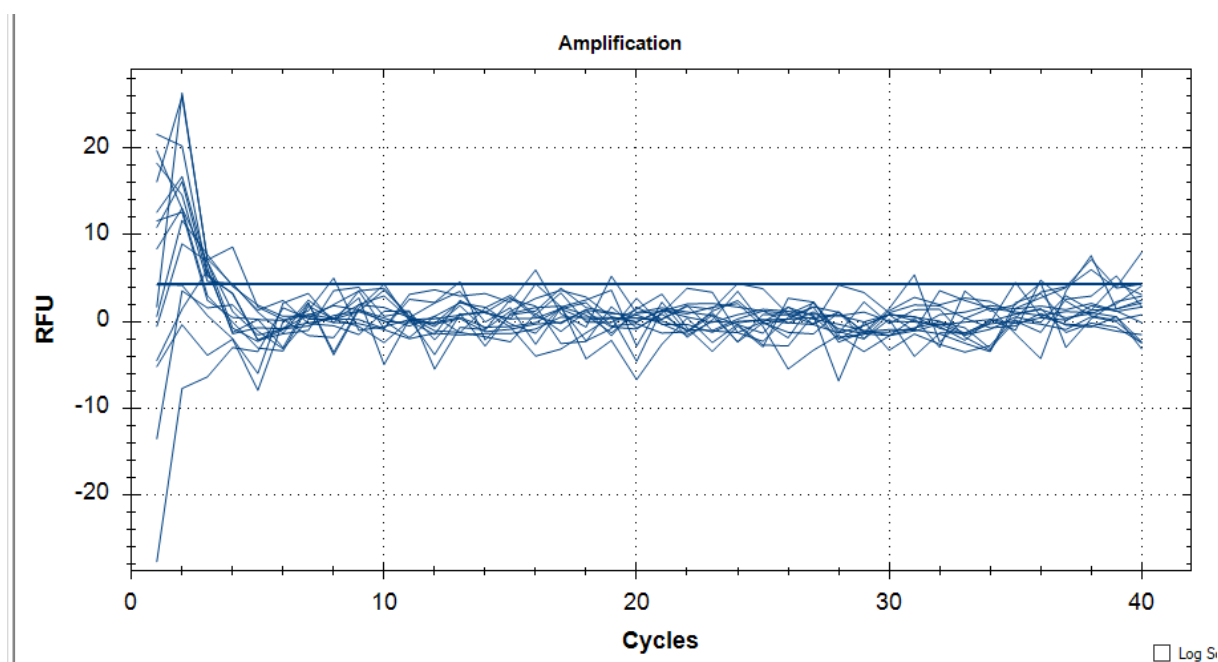
Staal	Cq
NTC FIPV(T): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	36,50
NTC FIPV(T): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	35,49
FIPV(T) gBlock (10 ⁶ copies/µL)	28,19
FIPV(T) gBlock (10 ⁶ copies/µL)	32,42
FIPV(T) gBlock (10 ⁵ copies/µL)	28,64
FIPV(T) gBlock (10 ⁵ copies/µL)	27,63
FIPV(T) gBlock (10 ⁴ copies/µL)	30,15
FIPV(T) gBlock (10 ⁴ copies/µL)	29,75
FIPV(T) gBlock (10 ³ copies/µL)	1,30
FIPV(T) gBlock (10 ³ copies/µL)	36,42
FIPV(T) gBlock (10 ² copies/µL)	30,80
FIPV(T) gBlock (10 ² copies/µL)	31,71
FIPV(T) gBlock (10 ¹ copies/µL)	24,65
FIPV(T) gBlock (10 ¹ copies/µL)	25,30
FIPV(T) gBlock (10 ⁰ copies/µL)	33,74
FIPV(T) gBlock (10 ⁰ copies/µL)	32,94



Figuur 65: Resultaten PCR FIPV(T) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_T1 P:P-mix**, zie ook Tabel 48.

Tabel 49: Resultaten PCR FECV(A) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A2 P:P-mix (probeconcentratie 0,5 µM)**. De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

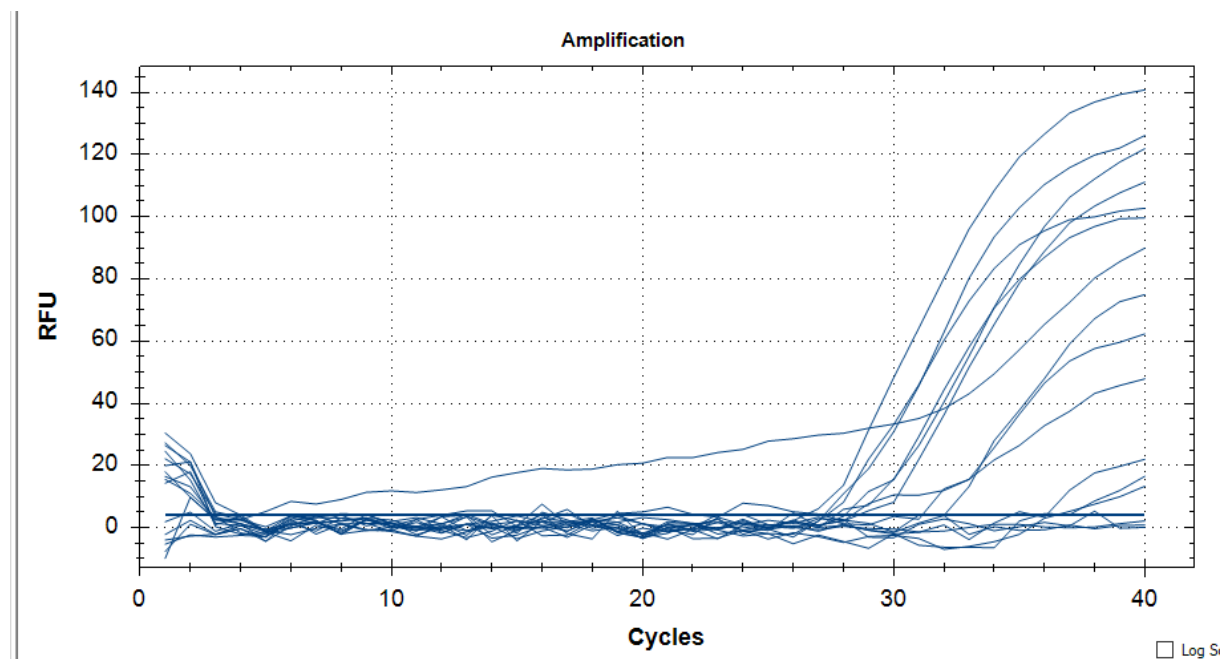
Staal	Cq
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	39,91
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/µL)	1,51
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/µL)	1,33
FECV(A) gBlock (10 ⁵ copies/µL)	7,80
FECV(A) gBlock (10 ⁵ copies/µL)	35,91
FECV(A) gBlock (10 ⁴ copies/µL)	38,58
FECV(A) gBlock (10 ⁴ copies/µL)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ³ copies/µL)	37,19
FECV(A) gBlock (10 ³ copies/µL)	39,08
FECV(A) gBlock (10 ² copies/µL)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ² copies/µL)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ¹ copies/µL)	34,95
FECV(A) gBlock (10 ¹ copies/µL)	18,84
FECV(A) gBlock (10 ⁰ copies/µL)	35,93
FECV(A) gBlock (10 ⁰ copies/µL)	38,95



Figuur 66: Resultaten PCR FECV(A) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A2 P:P-mix**, zie ook Tabel 49.

Tabel 50: Resultaten PCR FIPV(T) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_T2 P:P-mix (probeconcentratie 0,5 µM)**. De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

Staal	Cq
NTC FIPV(T): nucleasevrij H ₂ O + FCoV S primers	37,78
NTC FIPV(T): nucleasevrij H ₂ O + FCoV S primers	N/A
FIPV(T) gBlock (10 ⁶ copies/µL)	28,65
FIPV(T) gBlock (10 ⁶ copies/µL)	27,73
FIPV(T) gBlock (10 ⁵ copies/µL)	28,08
FIPV(T) gBlock (10 ⁵ copies/µL)	27,25
FIPV(T) gBlock (10 ⁴ copies/µL)	32,04
FIPV(T) gBlock (10 ⁴ copies/µL)	31,16
FIPV(T) gBlock (10 ³ copies/µL)	22,98
FIPV(T) gBlock (10 ³ copies/µL)	37,01
FIPV(T) gBlock (10 ² copies/µL)	28,38
FIPV(T) gBlock (10 ² copies/µL)	4,65
FIPV(T) gBlock (10 ¹ copies/µL)	26,53
FIPV(T) gBlock (10 ¹ copies/µL)	27,36
FIPV(T) gBlock (10 ⁰ copies/µL)	36,10
FIPV(T) gBlock (10 ⁰ copies/µL)	36,56

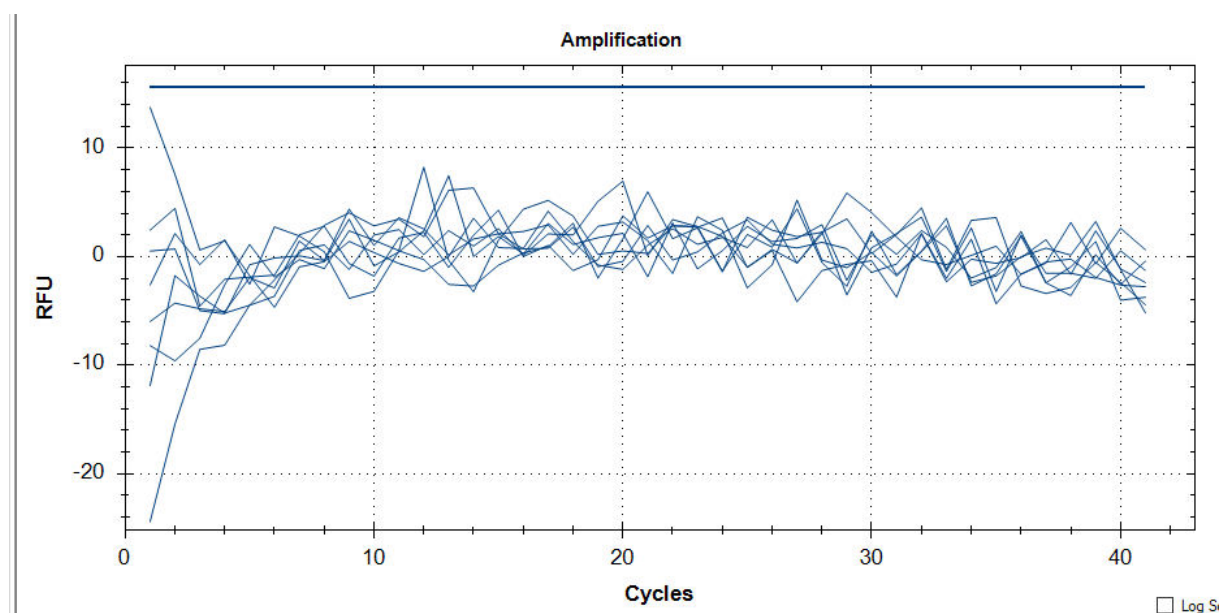


Figuur 67: Resultaten PCR FIPV(T) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_T2 P:P-mix**, zie ook Tabel 50.

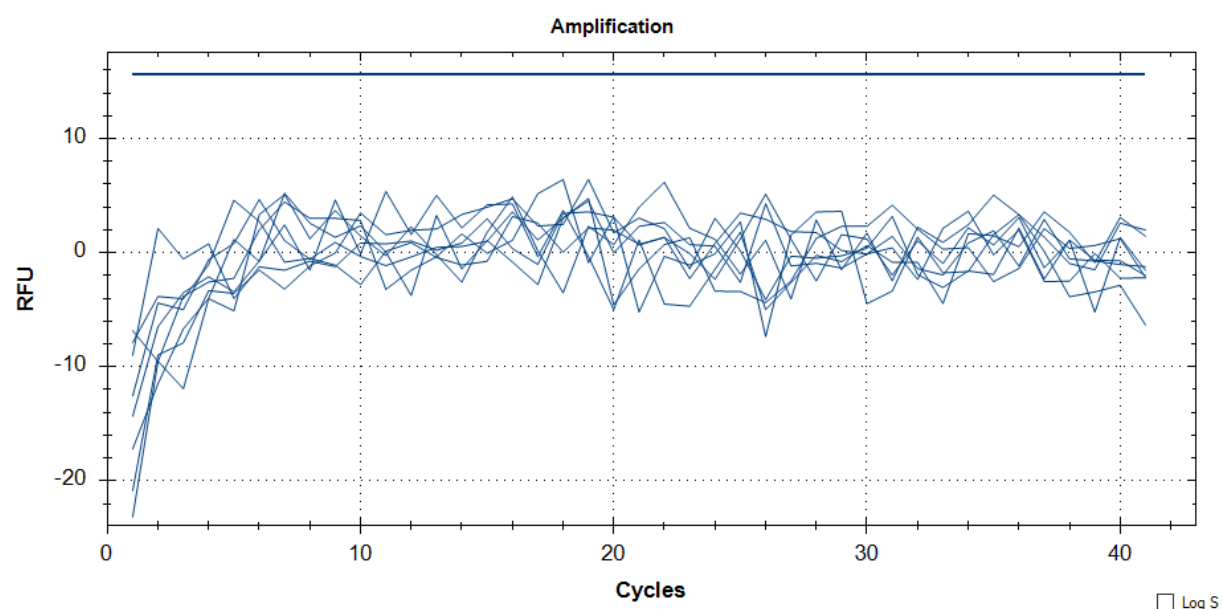
P:P-mix met 2 μ M primer en 1 μ M probe

Tabel 51: Resultaten PCR FECV(A) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A1 (2 μ M) P:P-mix** (2 μ M primer, 1 μ M probe). De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

Staal	Cq
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁵ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁵ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁴ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁴ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ³ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ³ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ² copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ² copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ¹ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ¹ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁰ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁰ copies/ μ L)	N/A



Figuur 68: Resultaten PCR FIPV(T) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A1 (2μM) P:P-mix**, zie ook Tabel 51.

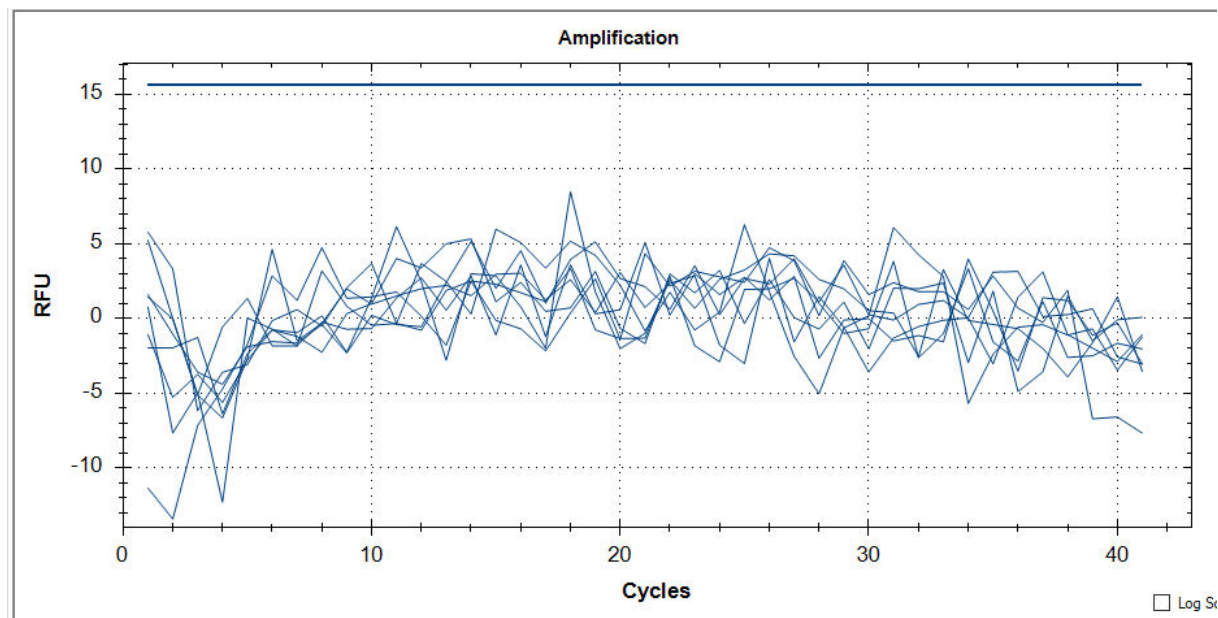


Figuur 69: Resultaten PCR FIPV(T) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A1 (2μM) P:P-mix**, zie ook Tabel 51.

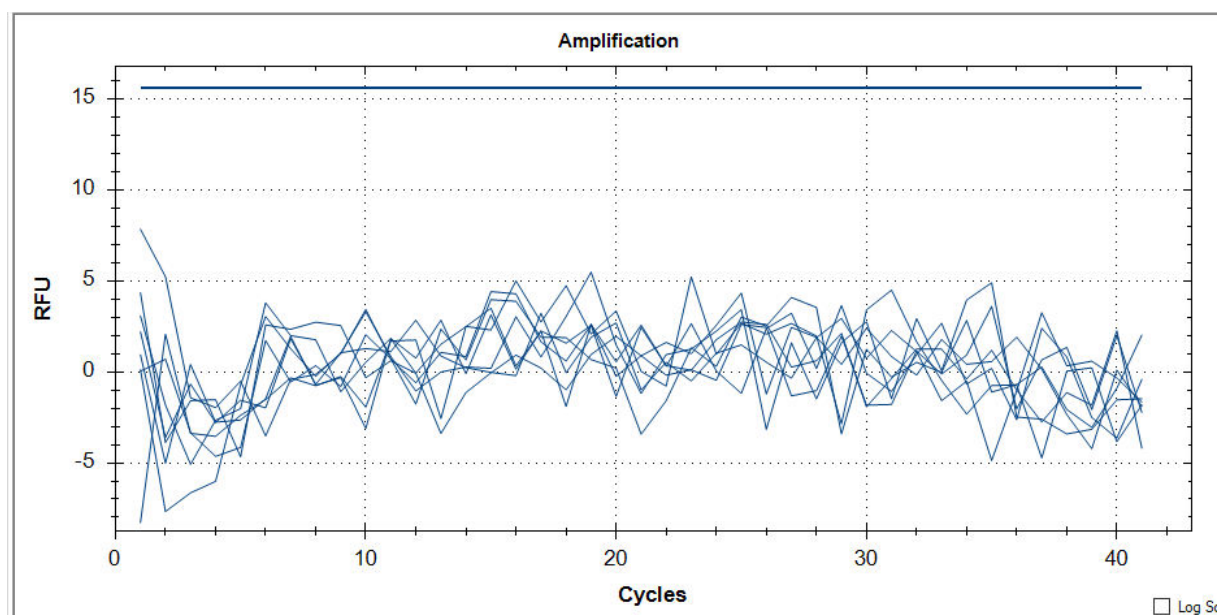
Tabel 52: Resultaten PCR FECV(A) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A2 (2μM) P:P-mix** (2 μM primer, 1 μM probe). De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

Staal	Cq
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁵ copies/μL)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁵ copies/μL)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁴ copies/μL)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁴ copies/μL)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ³ copies/μL)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ³ copies/μL)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ² copies/μL)	N/A

FECV(A) gBlock (10^2 copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10^1 copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10^1 copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10^0 copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10^0 copies/ μ L)	N/A



Figuur 70: Resultaten PCR FIPV(T) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A2 (2 μ M) P:P-mix**, zie ook Tabel 52.



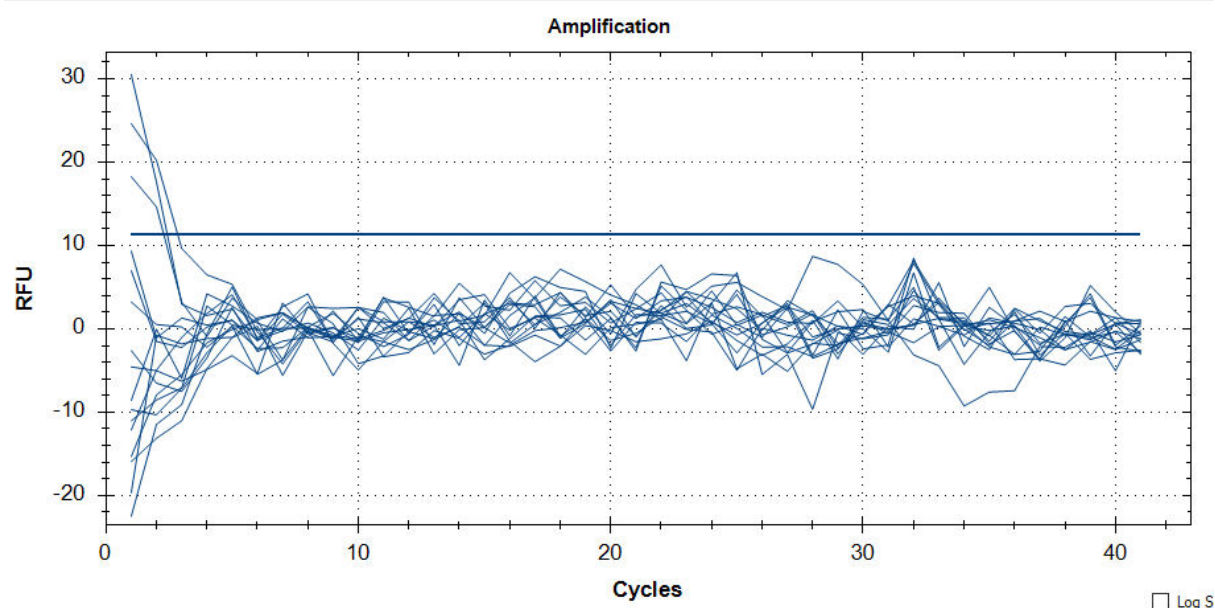
Figuur 71: Resultaten PCR FIPV(T) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A2 (2 μ M) P:P-mix**, zie ook Tabel 52.

DMSO

Tabel 53: Resultaten PCR FECV(A) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A1 P:P-mix** (1 μ M primer, 0,5 μ M probe) en **DMSO**. De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

Staal	% DMSO	Cq
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	2	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	2	N/A
FECV(A) gBlock (10^6 copies/ μ L)	2	N/A
FECV(A) gBlock (10^6 copies/ μ L)	2	N/A

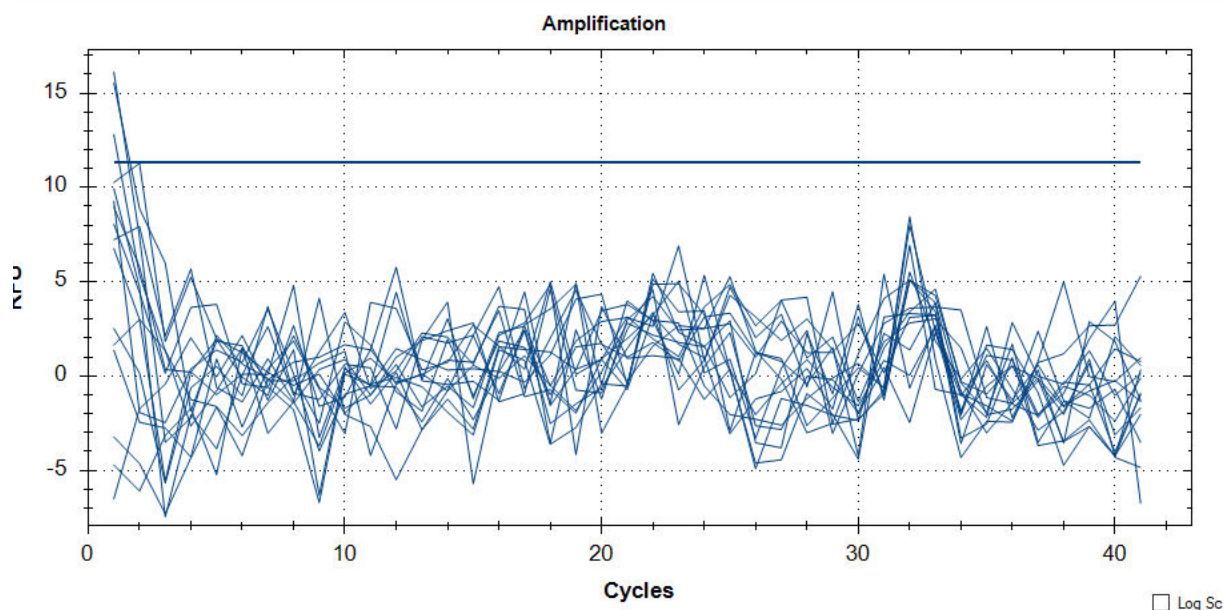
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	3	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	3	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	3	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	3	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	4	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	4	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	4	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	4	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	5	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	5	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	5	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	5	N/A



Figuur 72: Resultaten PCR FIPV(T) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A1 P:P-mix en DMSO**, zie ook Tabel 53.

Tabel 54: Resultaten PCR FECV(A) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A2 P:P-mix** (1 μM primer, 0,5 μM probe) en **DMSO**. De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

Staal	% DMSO	Cq
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	2	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	2	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	2	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	2	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	3	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	3	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	3	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	3	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	4	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	4	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	4	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	4	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	5	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	5	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	5	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/μL)	5	N/A

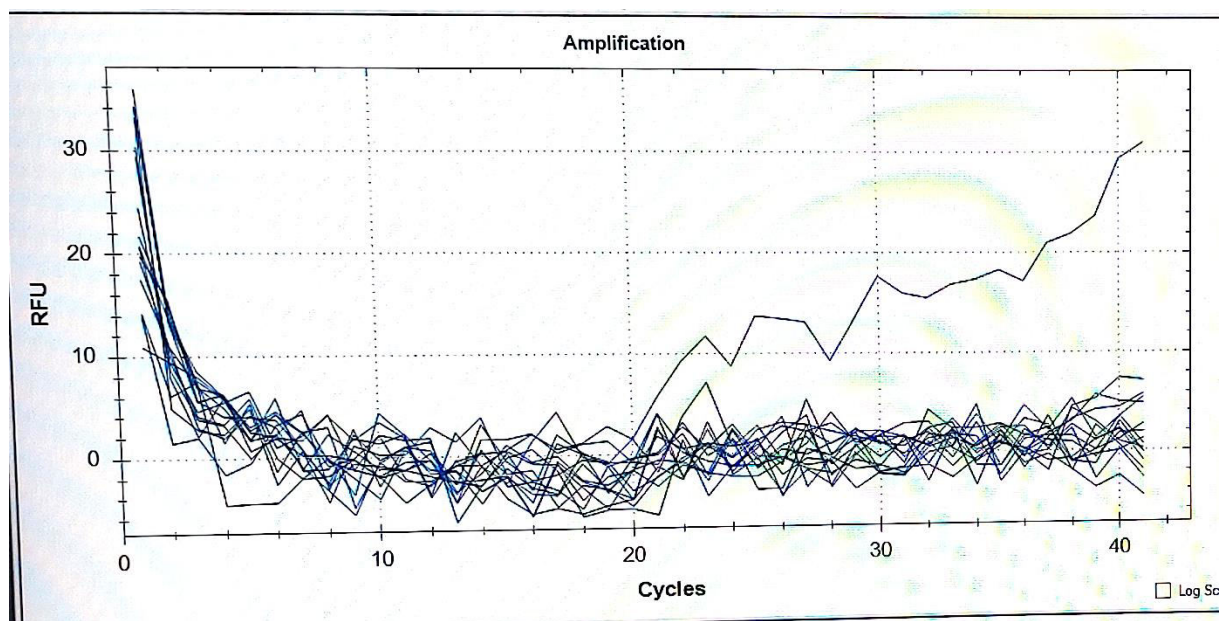


Figuur 73: Resultaten PCR FIPV(T) gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A2 P:P-mix** en **DMSO**, zie ook Tabel 54.

Nieuwe M1058L_FECV(A) probe

Tabel 55: Resultaten PCR FECV(A) gBlock verdunningsreeks met de **FECV_A P:P-mix** (1 μ M primer, 0,5 μ M probe). De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

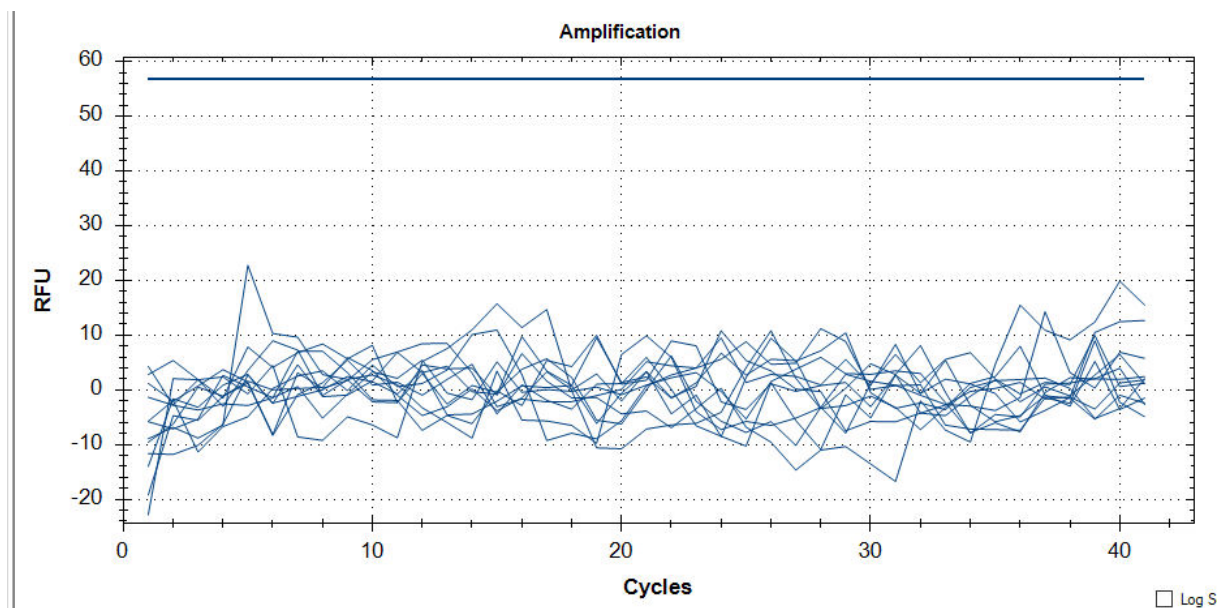
Staal	Cq
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁵ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁵ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁴ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁴ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ³ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ³ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ² copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ² copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ¹ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ¹ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁰ copies/ μ L)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁰ copies/ μ L)	N/A



Figuur 74: Resultaten PCR FIPV(A) gBlock verdunningsreeks met de **FECV_A (2,5 µM) P:P-mix**, zie ook Tabel 55.

Tabel 56: Resultaten qPCR nieuwe verdunning A gBlocks.

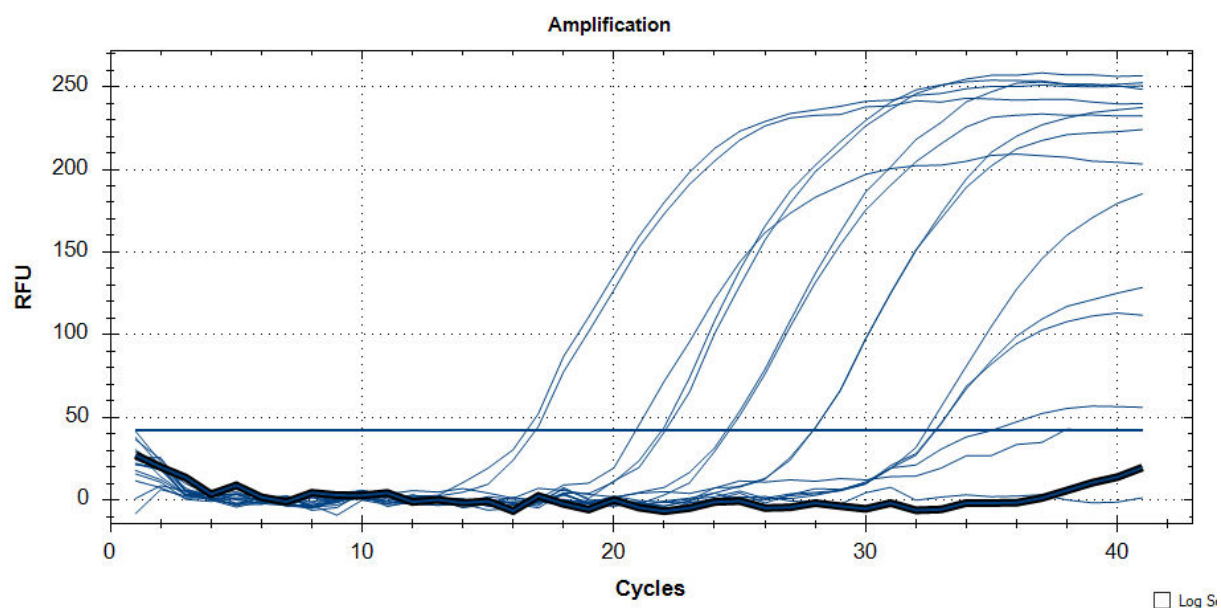
Staal	Cq
NTC FIP_A2: nucleasevrij H ₂ O + FIP_A2 P:P	N/A
NTC FIP_A2: nucleasevrij H ₂ O + FIP_A2 P:P	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FECV_A P:P	N/A
NTC FECV(A): nucleasevrij H ₂ O + FECV_A P:P	N/A
FECV(A)_1 gBlock (10 ⁶ copies/µL) + FIP_A2 P:P	N/A
FECV(A)_1 gBlock (10 ⁶ copies/µL) + FIP_A2 P:P	N/A
FECV(A)_1 gBlock (10 ⁶ copies/µL) + FECV_A P:P	N/A
FECV(A)_1 gBlock (10 ⁶ copies/µL) + FECV_A P:P	N/A
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁶ copies/µL) + FIP_A2 P:P	N/A
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁶ copies/µL) + FIP_A2 P:P	N/A
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁶ copies/µL) + FECV_A P:P	N/A
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁶ copies/µL) + FECV_A P:P	N/A



Figuur 75: Resultaten qPCR nieuwe verdunningen A gBlock, met FIP_A2 P:P en FECV_A P:P. Zie ook Tabel 56.

Tabel 57: Resultaten PCR FECV(A)_2 gBlock verdunningsreeks met de **FIP_A1 P:P-mix** (probeconcentratie 0,5 μM). De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

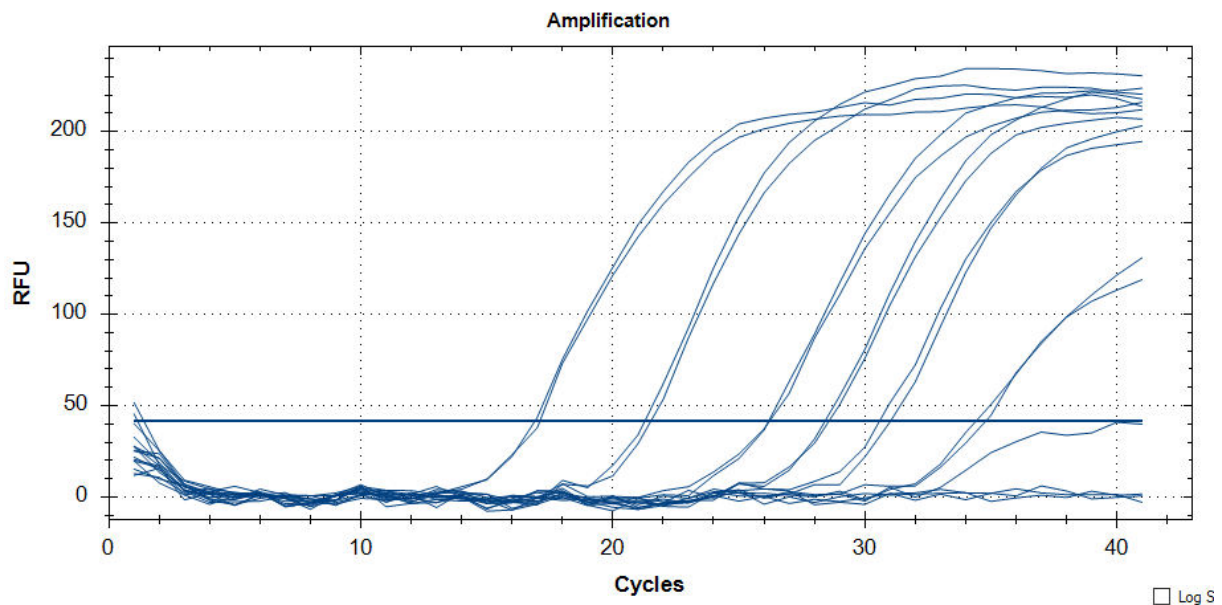
Staal	Cq
NTC FECV(A)_2: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	N/A
NTC FECV(A)_2: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	N/A
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁶ copies/ μL)	16,87
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁶ copies/ μL)	16,52
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁵ copies/ μL)	22,03
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁵ copies/ μL)	21,89
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁴ copies/ μL)	24,46
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁴ copies/ μL)	24,57
FECV(A)_2 gBlock (10 ³ copies/ μL)	27,90
FECV(A)_2 gBlock (10 ³ copies/ μL)	27,89
FECV(A)_2 gBlock (10 ² copies/ μL)	32,77
FECV(A)_2 gBlock (10 ² copies/ μL)	32,40
FECV(A)_2 gBlock (10 ¹ copies/ μL)	37,85
FECV(A)_2 gBlock (10 ¹ copies/ μL)	34,92
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁰ copies/ μL)	N/A
FECV(A)_2 gBlock (10 ⁰ copies/ μL)	32,74



Figuur 76: Resultaten PCR **FECV(A)_2 gBlock verdunningsreeks** met de **FIP_A1 P:P-mix**. Zie Tabel 57 voor de Ct-waarden.

Tabel 58: Resultaten PCR FIPV(T)_2 gBlock verdunningsreeks met de **FIP_T1 P:P-mix (probeconcentratie 0,5 μ M)**. De stalen werden in duplo geladen op de PCR-plaat.

Staal	Cq
NTC FIPV(T) 2: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	N/A
NTC FIPV(T) 2: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers	N/A
FIPV(T) 2 gBlock (10 ⁶ copies/ μ L)	16,91
FIPV(T) 2 gBlock (10 ⁶ copies/ μ L)	17,11
FIPV(T) 2 gBlock (10 ⁵ copies/ μ L)	21,27
FIPV(T) 2 gBlock (10 ⁵ copies/ μ L)	21,51
FIPV(T) 2 gBlock (10 ⁴ copies/ μ L)	26,19
FIPV(T) 2 gBlock (10 ⁴ copies/ μ L)	26,22
FIPV(T) 2 gBlock (10 ³ copies/ μ L)	28,42
FIPV(T) 2 gBlock (10 ³ copies/ μ L)	28,58
FIPV(T) 2 gBlock (10 ² copies/ μ L)	30,59
FIPV(T) 2 gBlock (10 ² copies/ μ L)	31,02
FIPV(T) 2 gBlock (10 ¹ copies/ μ L)	34,42
FIPV(T) 2 gBlock (10 ¹ copies/ μ L)	34,80
FIPV(T) 2 gBlock (10 ⁰ copies/ μ L)	N/A
FIPV(T) 2 gBlock (10 ⁰ copies/ μ L)	N/A



Figuur 77: Resultaten PCR **FIPV(T)_2 gBlock verdunningsreeks** met de **FIP_T1 P:P-mix**. Zie Tabel 58 voor de Ct-waarden.

Bespreking resultaten

FCoV_7b gBlocks

De verdunningsreeks van de FCoV_7b gBlocks met de FCoV_7b P:P-mix leverde goede resultaten op: de amplificatiecurves van de verschillende verdunningen kwamen op bij oplopende Cq-waarden, wat wijst op een correcte en gevoelige detectie.

FECV(A) gBlocks

Voor de FECV(A) gBlocks in combinatie met de FIP_A P:P-mix werden echter geen bevredigende resultaten bekomen. Enkel één van de verdunningen van 10^9 copies/ μ L en beide verdunningen van 10^8 copies/ μ L vertoonden een amplificatiecurve, maar deze curves waren niet van goede kwaliteit. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de LNA-probes in deze mix te lang zijn, wat de efficiëntie van de amplificatie negatief kan beïnvloeden.

De FECV(A) gBlocks verdunningsreeks met de FIP_A1 P:P-mix leverde eveneens geen kwalitatief goede resultaten op. Hoewel er enkele curves opkwamen, waren deze niet van de verwachte kwaliteit.

De FECV(A) gBlocks verdunningsreeks met de FIP_A2 P:P-mix resulteerde niet in goede amplificatiecurves; er werden geen duidelijke curves waargenomen. De FIPV(T) gBlocks met de FIP_T2 P:P-mix gaven redelijk goede resultaten.

FIPV(C) gBlocks

De verdunningsreeks van de FIPV(C) gBlocks met de FIP_C P:P-mix resulteerde wel in duidelijke en kwalitatief goede amplificatiecurves, waarbij de verschillende verdunningen bij oplopende Cq-waarden opkwamen.

De FIPV(C) gBlocks verdunningsreeks met de FIP_C1 P:P-mix gaf daarentegen zeer goede resultaten, met duidelijke en goed gevormde amplificatiecurves. De FIPV(T) gBlocks met de FIP_T1 P:P-mix leverden redelijk goede resultaten op.

FIPV(T) gBlocks

Voor de FIPV(T) gBlocks met de FIP_T P:P-mix werd slechts één duidelijke curve waargenomen. Enkel de twee verdunningen van 10^9 copies/ μ L en één van de 10^6 copies/ μ L

vertoonden een curve, maar ook hier was de vorm van de curves niet optimaal, mogelijk opnieuw door de lengte van de LNA-probes.

FIPV(A)_2 en FIPV(T)_2 gBlocks

Tijdens de analyse werd vastgesteld dat voor gBlock A en gBlock T per ongeluk de verkeerde sequenties werden besteld. Hierdoor kon de forward primer niet binden op het gBlock, waardoor enkel de reverse primer binding vertoonde en er slechts in beperkte mate resultaat werd bekomen.

Na herhaling van de verdunningsreeksen met de nieuwe A- en T-gBlocks werden wel duidelijke en kwalitatief goede amplificatiecurves verkregen, wat bevestigt dat de problemen bij de eerdere testen te wijten waren aan de foutieve sequenties van de gBlocks.

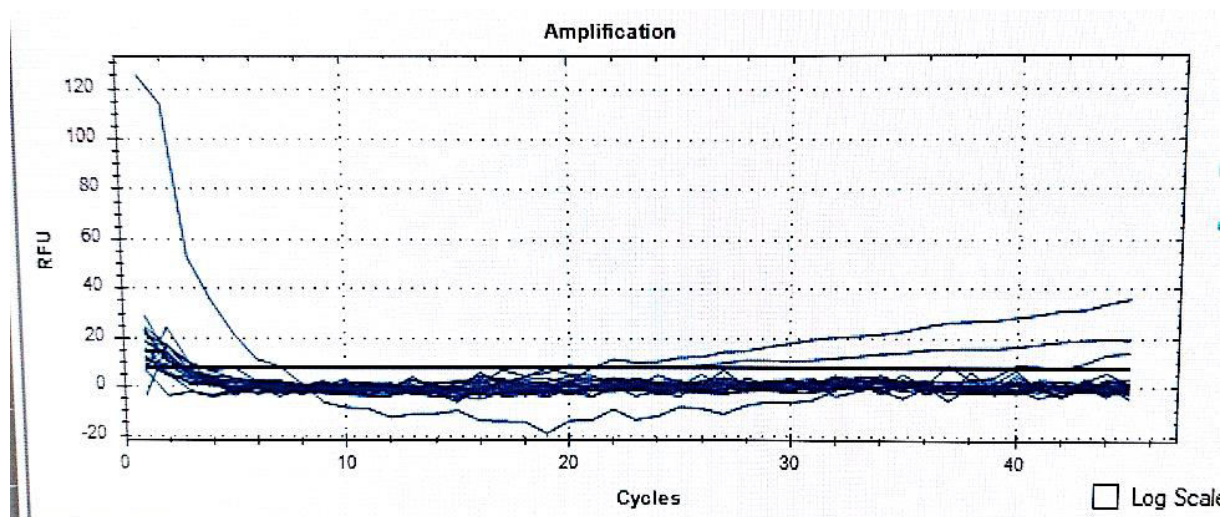
2.2.2.2 LNA-probes verdunningsreeks

Er werd een verdunningsreeks gemaakt van de LNA-probes om te achterhalen bij welke concentratie ze de beste resultaten geven.

Resultaten PCR

Tabel 59: Resultaten PCR M1058L_FECV(A) LNA-probe verdunningsreeks.

Staal	Concentratie LNA-probe (μM)	Cq
NTC: FIP_A P:P (10:10)	0,50	1,56
NTC: FIP_A P:P (9:10)	0,45	1,10
NTC: FIP_A P:P (8:10)	0,40	N/A
NTC: FIP_A P:P (7:10)	0,35	42,18
NTC: FIP_A P:P (6:10)	0,30	21,70
NTC: FIP_A P:P (5:10)	0,25	N/A
NTC: FIP_A P:P (4:10)	0,20	N/A
NTC: FIP_A P:P (3:10)	0,15	N/A
NTC: FIP_A P:P (2:10)	0,10	N/A
NTC: FIP_A P:P (1:10)	0,05	N/A
FECV(A) gBlocks (10^6) + FIP_A P:P (10:10)	0,50	21,10
FECV(A) gBlocks (10^6) + FIP_A P:P (9:10)	0,45	N/A
FECV(A) gBlocks (10^6) + FIP_A P:P (8:10)	0,40	N/A
FECV(A) gBlocks (10^6) + FIP_A P:P (7:10)	0,35	N/A
FECV(A) gBlocks (10^6) + FIP_A P:P (6:10)	0,30	N/A
FECV(A) gBlocks (10^6) + FIP_A P:P (5:10)	0,25	N/A
FECV(A) gBlocks (10^6) + FIP_A P:P (4:10)	0,20	N/A
FECV(A) gBlocks (10^6) + FIP_A P:P (3:10)	0,15	N/A
FECV(A) gBlocks (10^6) + FIP_A P:P (2:10)	0,10	N/A
FECV(A) gBlocks (10^6) + FIP_A P:P (1:10)	0,05	N/A



Figuur 78: Resultaten PCR M1058L_FECV(A) LNA-probe verdunningsreeks. Zie Tabel 59 voor de Cq-waarden. Geen enkele van de stalen vertoont een goed gevormde curve, er wordt enkel achtergrondsignaal gemeten.

Bespreking resultaten

De optimalisatie van de M1058L_FECV(A) LNA-probe toonde aan dat de beste resultaten werden verkregen bij een eindconcentratie van 0,5 μM . Bij deze concentratie werd een duidelijke en reproduceerbare amplificatie waargenomen, wat wijst op een optimale werking van de probe binnen het gebruikte qPCR-protocol.

Tijdens de analyse werd echter vastgesteld dat bij de negatieve controles 'NTC: FIP_A P:P (7:10)' en 'NTC: FIP_A P:P (6:10)' onverwacht amplificatie optrad. Dit wijst op contaminatie van deze reacties, aangezien bij een negatieve controle geen signaal verwacht wordt.

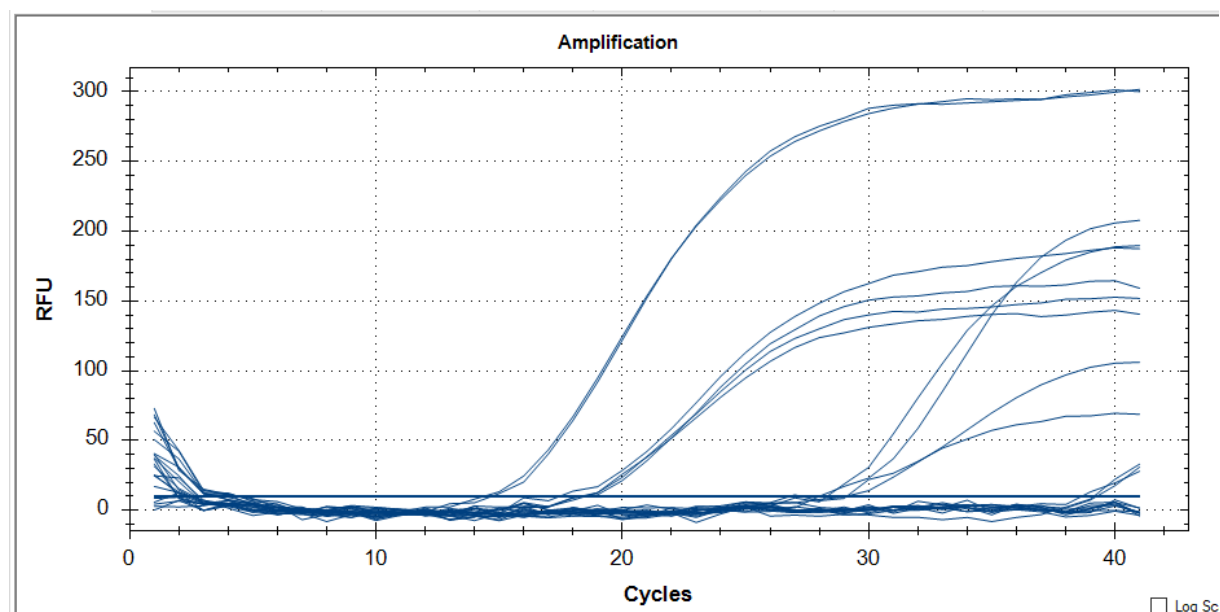
2.2.2.3 Specificiteit van de probes

Resultaten PCR

Tabel 60: Resultaten qPCR kwaliteitsanalyse probes, specificiteit van de probes.

Staal	Cq
NTC FCoV 7b: nucleasevrij H ₂ O + FCoV 7b primers + FCoV 7b probe (0,5 μM)	N/A
NTC FCoV 7b: nucleasevrij H ₂ O + FCoV 7b primers + FCoV 7b probe (0,5 μM)	39,25
NTC FCoV S: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers (1 μM) + M1058L_FECV_A probe (0,5 μM) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (0,5 μM) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (0,5 μM)	N/A
NTC FCoV S: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers (1 μM) + M1058L_FECV_A probe (0,5 μM) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (0,5 μM) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (0,5 μM)	N/A
NTC FCoV 7b+S: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_7b primers (1 μM) + FCoV_S primers (1 μM) + FCoV_7b probe (0,5 μM) + M1058L_FECV_A probe (0,5 μM) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (0,5 μM) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (0,5 μM)	N/A
NTC FCoV 7b+S: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_7b primers (1 μM) + FCoV_S primers (1 μM) + FCoV_7b probe (0,5 μM) + M1058L_FECV_A probe (0,5 μM) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (0,5 μM) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (0,5 μM)	N/A
FCoV 7b gBlock (10 ⁶ copies/ μL) + FCoV 7b probe (0,5 μM)	16,69
FCoV 7b gBlock (10 ⁶ copies/ μL) + FCoV 7b probe (0,5 μM)	16,54
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/ μL) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (0,5 μM)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/ μL) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (0,5 μM)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/ μL) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (0,5 μM)	N/A
FECV(A) gBlock (10 ⁶ copies/ μL) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (0,5 μM)	N/A
FIPV(C) gBlock (10 ⁶ copies/ μL) + M1058L_FECV_A probe (0,5 μM)	20,86

FIPV(C) gBlock (10^6 copies/ μ L) + M1058L_FECV_A probe (0,5 μ M)	20,63
FIPV(C) gBlock (10^6 copies/ μ L) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (0,5 μ M)	20,38
FIPV(C) gBlock (10^6 copies/ μ L) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (0,5 μ M)	20,54
FIPV(T) gBlock (10^6 copies/ μ L) + M1058L_FECV_A probe (0,5 μ M)	31,95
FIPV(T) gBlock (10^6 copies/ μ L) + M1058L_FECV_A probe (0,5 μ M)	31,60
FIPV(T) gBlock (10^6 copies/ μ L) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (0,5 μ M)	30,88
FIPV(T) gBlock (10^6 copies/ μ L) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (0,5 μ M)	30,08
FIPV(A) gBlock (10^6 copies/ μ L) + FCoV_7b primers (1 μ M) + FCoV_S primers (1 μ M) + FCoV_7b probe (0,5 μ M) + M1058L_FECV_A probe (0,5 μ M) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (0,5 μ M) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (0,5 μ M)	39,47
FIPV(A) gBlock (10^6 copies/ μ L) + FCoV_7b primers (1 μ M) + FCoV_S primers (1 μ M) + FCoV_7b probe (0,5 μ M) + M1058L_FECV_A probe (0,5 μ M) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (0,5 μ M) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (0,5 μ M)	39,23

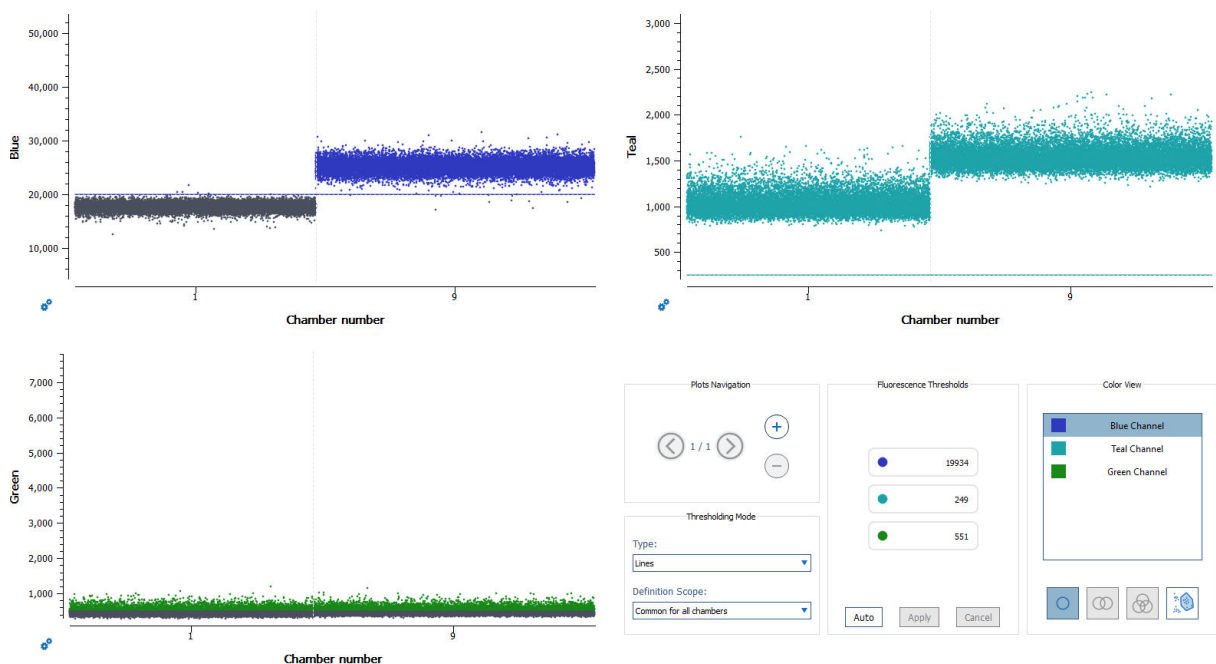


Figuur 79: Resultaten qPCR kwaliteitsanalyse probes, de specificiteit van de probes. Zie ook Tabel 60.

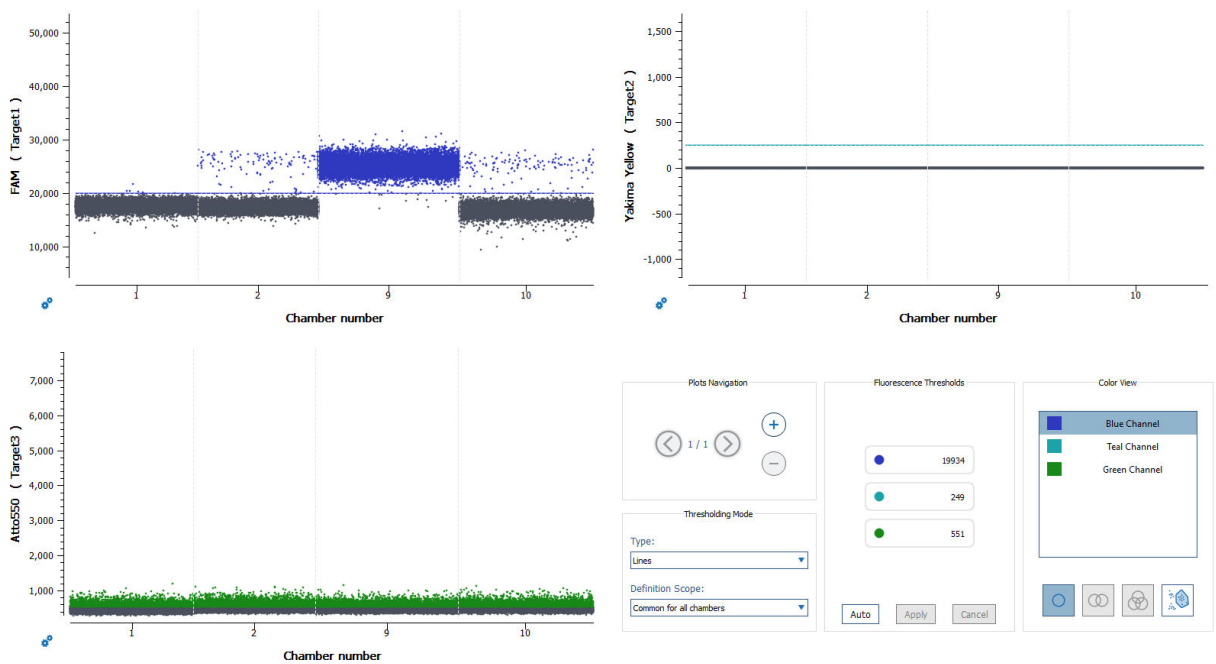
Tabel 61: Resultaten dPCR kwaliteitsanalyse probes, specificiteit van de probes.

Staal	Resultaat
NTC FCoV_7b: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_7b primers + FCoV_7b probe (1,25 μ M)	negatief
NTC FCoV_S: nucleasevrij H ₂ O + FCoV_S primers + M1058L_FECV_A probe (1,25 μ M) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (1,25 μ M) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (1,25 μ M)	negatief
FCoV_7b gBlock (10^3 copies/ μ L) + FCoV_7b probe (1,25 μ M)	positief
FCoV_7b gBlock (10^3 copies/ μ L) + FCoV_7b probe (1,25 μ M)	positief
40062 (1:17) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (1,25 μ M)	negatief
41215 + M1058L_FIPV(C)_1 probe (1,25 μ M)	negatief
30320 A + M1058L_FIPV(T)_2 probe (1,25 μ M)	negatief
31177 + M1058L_FIPV(T)_2 probe (1,25 μ M)	negatief
FIPV(C) gBlock (10^3 copies/ μ L) + M1058L_FECV_A probe (1,25 μ M)	positief
FIPV(C) gBlock (10^3 copies/ μ L) + M1058L_FECV_A probe (1,25 μ M)	positief
FIPV(C) gBlock (10^3 copies/ μ L) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (1,25 μ M)	positief
FIPV(C) gBlock (10^3 copies/ μ L) + M1058L_FIPV(T)_2 probe (1,25 μ M)	positief
FIPV(T) gBlock (10^3 copies/ μ L) + M1058L_FECV_A probe (1,25 μ M)	positief
FIPV(T) gBlock (10^3 copies/ μ L) + M1058L_FECV_A probe (1,25 μ M)	positief
FIPV(T) gBlock (10^3 copies/ μ L) + M1058L_FIPV(C)_1 probe (1,25 μ M)	positief

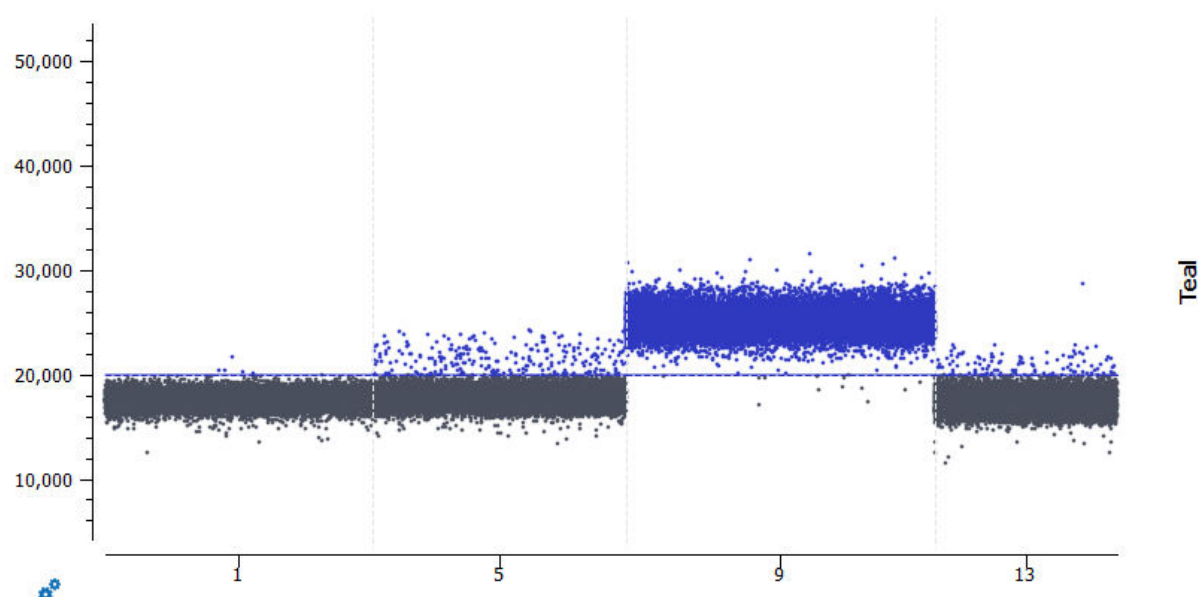
FIPV(T) gBlock (10^3 copies/ μ L) + M1058L FIPV(C) 1 probe (1,25 μ M)	positief
--	----------



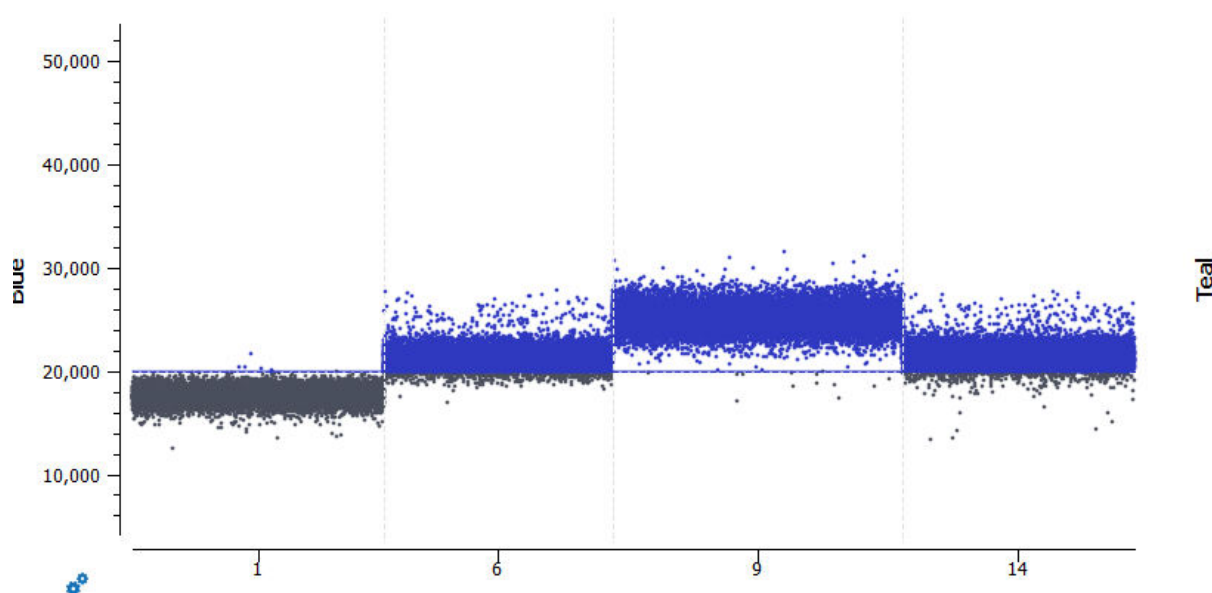
Figuur 80: Resultaten dPCR, NTC-stalen. Zie ook Tabel 61. Beide wells zijn negatief, wat goed is, aangezien dit een negatieve controle is.



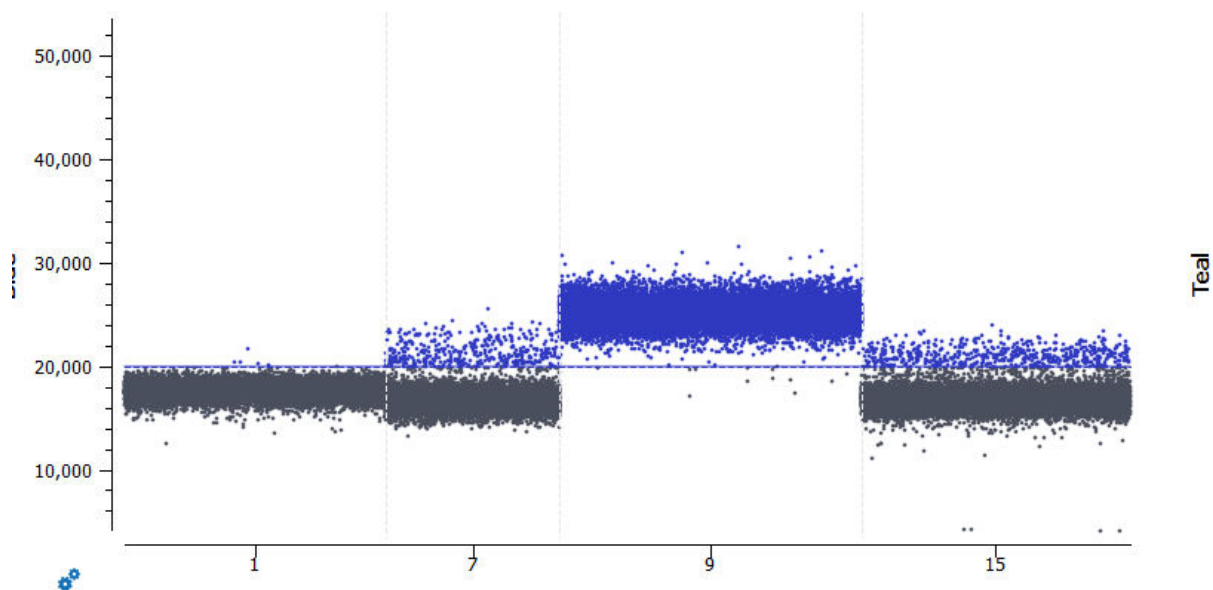
Figuur 81: Resultaten dPCR, 7b gBlock. Zie ook Tabel 61.



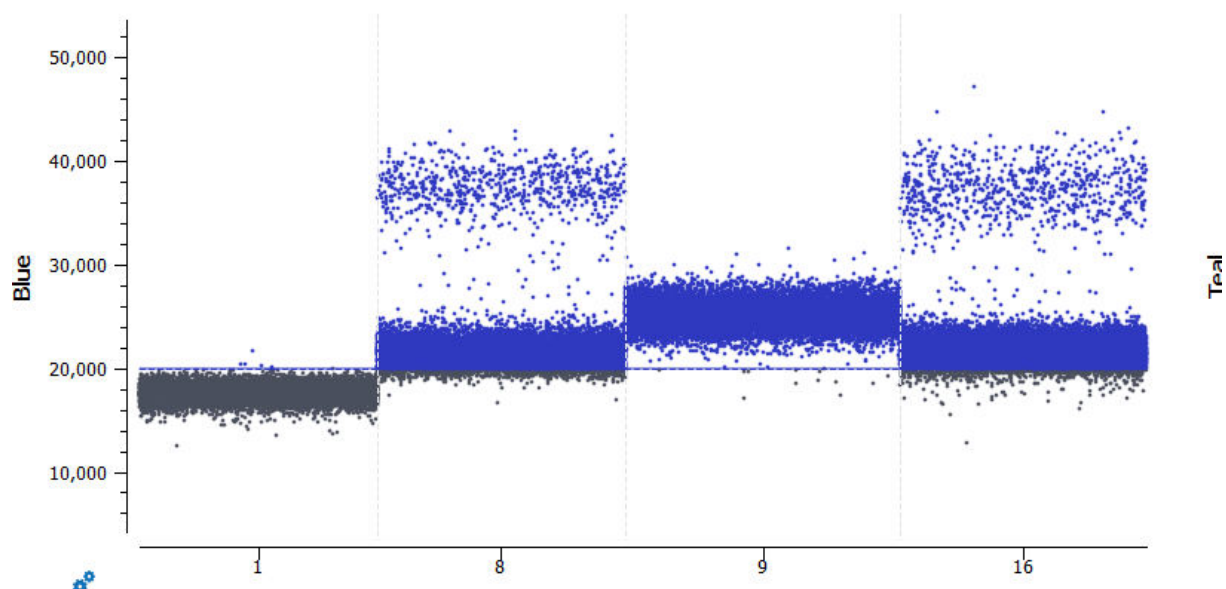
Figuur 82: Resultaten dPCR, C gBlock met FECV_A probe. Zie ook Tabel 61.



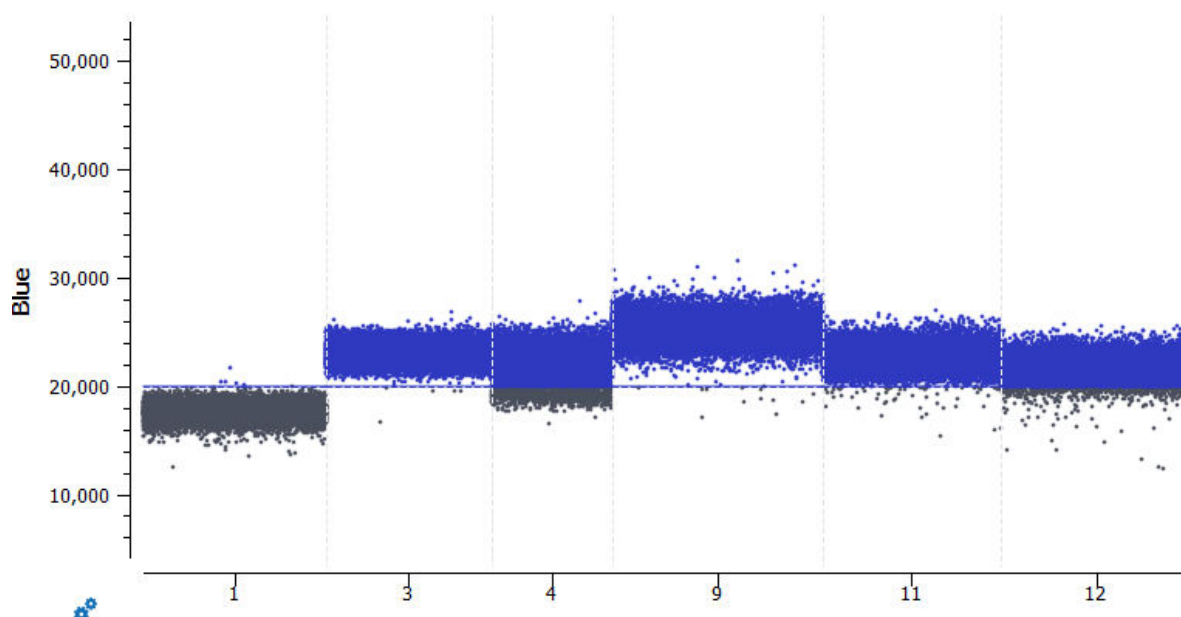
Figuur 83: Resultaten dPCR, C gBlock met FIPV(T)₂ LNA-probe. Zie ook Tabel 61.



Figuur 84: Resultaten dPCR, T gBlock met FECV_A probe. Zie ook Tabel 61.



Figuur 85: Resultaten dPCR, T gBlock met FIPV(C)_1 LNA-probe. Zie ook Tabel 61.



Figuur 86: Resultaten dPCR, verschillende stalen met FECV_A probe. Zie ook Tabel 61.

Bespreking resultaten

Negatieve controle

De negatieve controle (NTC) toonde geen amplificatie in beide wells, wat wijst op de afwezigheid van contaminatie (zie Figuur 80).

Positieve controle (7b gBlock)

In de positieve controle met het 7b-gBlock werden duidelijk afgebakende positieve druppels waargenomen, wat de correcte werking van het assaysysteem bevestigt (zie Figuur 81).

Specificiteitsexperimenten

- C gBlock met A/T mastermix: Bij beide combinaties (Zie Figuur 82 en Figuur 83) werden minimale aspecifieke amplificatiesignalen gedetecteerd, gekenmerkt door een diffuse spreiding van fluorescentiesignalen ("rain") zonder duidelijke scheiding tussen positieve en negatieve populaties.
- T gBlock met A mastermix: Analooq aan de vorige condities (zie Figuur 84).
- T gBlock met C mastermix: Hier trad een beperkte amplificatie op (zie Figuur 85), mogelijk gerelateerd aan suboptimale gBlock-kwaliteit.

Opmerkelijk is dat alle assays met het correcte gBlock C consistente en robuuste amplificatie vertoonden. Voor definitieve conclusies over de specificiteit dient aanvullend onderzoek met gevalideerde A- en T-gBlocks uitgevoerd te worden.

Analyse van klinische stalen

De geteste klinische stalen toonden geen detecteerbare amplificatie (zie Figuur 86), wat compatibel is met de verwachte specificiteit van het assaysysteem.

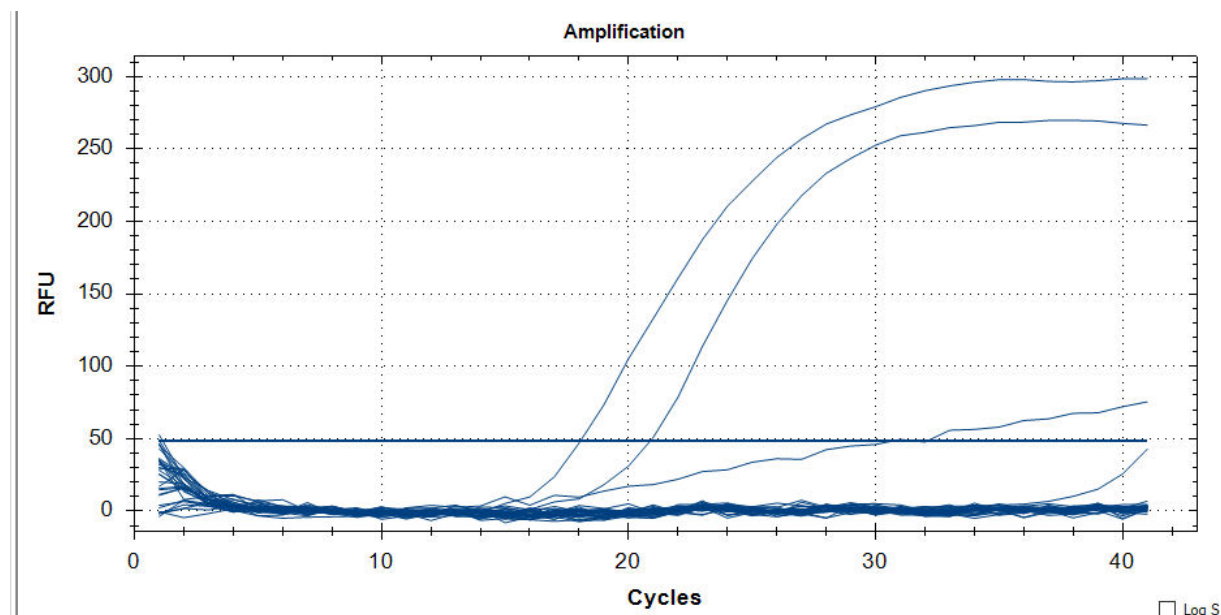
2.3 PCR

2.3.1 qPCR

2.3.1.1 FCoV_7b primers en probe

Tabel 62: Resultaten qPCR van stalen uit de routine met de FCoV_7b P:P-mix. De cDNA-stalen werden verdund om een gemiddelde concentratie van 20 ng/μL te verkrijgen. De qPCR-resultaten worden beoordeeld op basis van de cycle threshold (Ct)-waarden. Zie ook Figuur 88.

Staalnummer	Ct-waarden
FCoV_7b gBlock (10 ⁶)	18,05
70583	N/A
41215	N/A
31177	N/A
40999	N/A
30656	32,09
40062	N/A
30320 A	27
32791	N/A
40009	26
30669	27
70343	26
40485	29
31047	N/A
32066	N/A
40186	25
30069	31
30478	25
NTC	N/A



Figuur 87: Resultaten qPCR stalen uit routine met FCoV_7b P:P-mix en FIP_C1 P:P-mix. De twee goed gevormde curves zijn de positieve controles (FCoV_7b gBlock en FIPV(C) gBlock). De derde lijn die opkomt, maar die geen goed gevormde curve vormt, is staal 30656 met de FCoV_7b P:P-mix. Zie Tabel 62 en Tabel 66 voor de Ct-waarden.

Bespreking resultaten

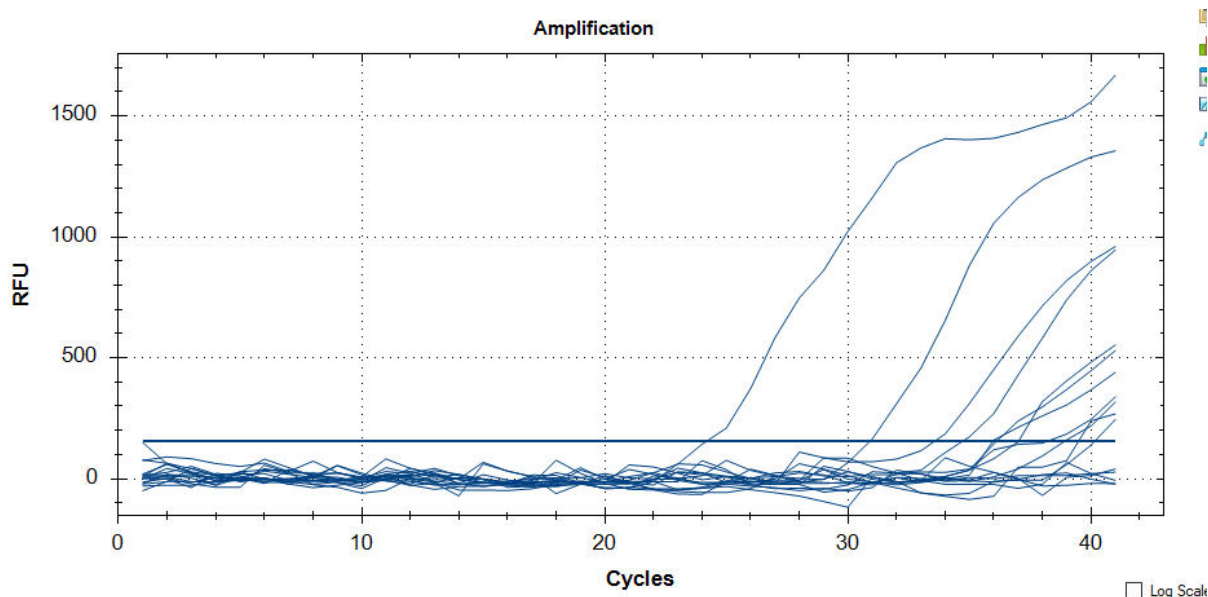
Bij de evaluatie van de routinestalen met de FCoV_7b P:P-mix werden positieve signalen gedetecteerd bij de positieve controle (7b gBlock) en acht klinische stalen: 30320_A (Cq 27), 40009 (Cq 26), 30669 (Cq 27), 70343 (Cq 26), 40485 (Cq 29), 40186 (Cq 25), 30069 (Cq 31) en 30478 (Cq 25). Deze resultaten wijzen op een succesvolle amplificatie van het 7b-gen in deze stalen en komen overeen met de resultaten uit de routinetesten waar deze stalen ook positief werden bevonden.

Opmerkelijk is dat de andere stalen, die ook eerder positief werden bevonden in de routinetesten, geen amplificatie vertonen. Deze bevindingen suggereren dat er mogelijk sprake is van een probleem met de detectie van het 7b-gen in de onderzochte stalen, ondanks hun eerdere positieve resultaat voor FCoV in de routinetesten. Dit kan het gevolg zijn van verschillende mogelijke oorzaken, waaronder bv. technische variabiliteit, waarbij er verschillen zijn in de RNA-extractie-efficiëntie of er PCR-inhibitoren aanwezig zijn in deze specifieke stalen.

2.3.1.2 Routine primers en probe

Tabel 63: Resultaten qPCR van stalen uit de routine met de P:P-mix uit de routine. De cDNA-stalen werden verdund naar een concentratie van ongeveer 20 ng/μL. De qPCR-resultaten worden beoordeeld op basis van de cycle threshold (Ct)-waarden. Zie ook Figuur 90.

Staalnummer	Cq
routine gBlock (10 ⁶)	24,22
70583	36,15
41215	30,94
31177	40,18
40999	38,27
30656	38,95
40062	N/A
30320 A	N/A
32791	N/A
40009	35,99
30669	39,50
70343	34,76
40485	37,03
31047	33,60
32066 (negatieve controle)	N/A
NTC	N/A



Figuur 88: Resultaten qPCR stalen uit routine met de routine P:P-mix. Zie Tabel 63 voor de Ct-waarden.

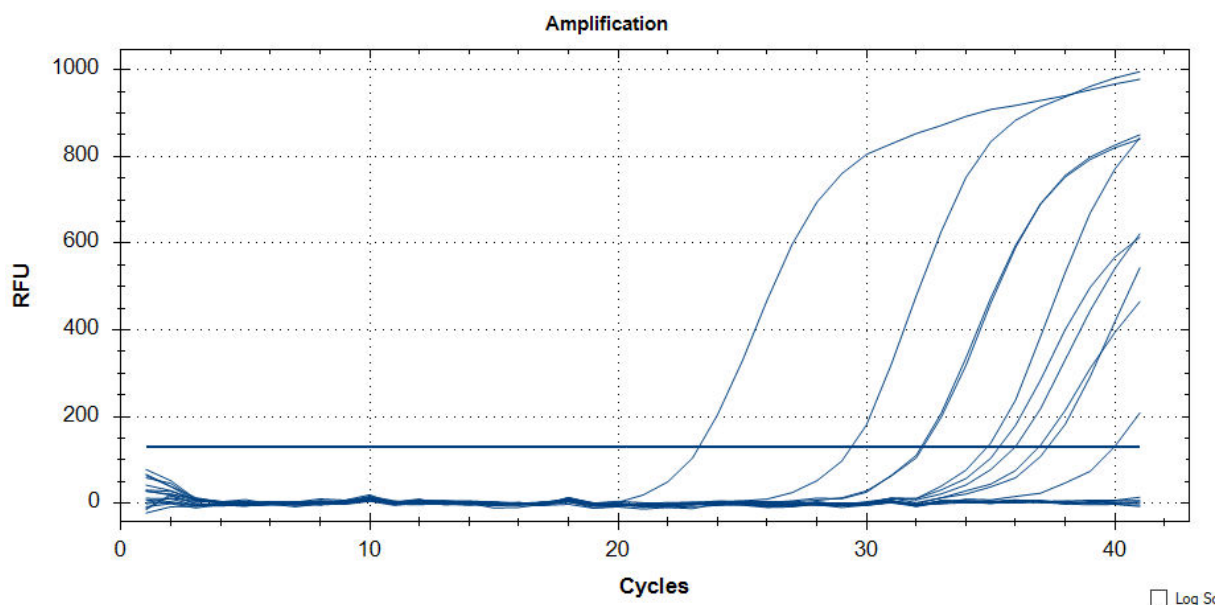
Bespreking resultaten

Om na te gaan of de waargenomen problemen te wijten zijn aan de kwaliteit van de stalen, werden deze opnieuw geanalyseerd met de primers en probe uit de routinetest. Hierbij gaven de stalen wél een positief resultaat. Dit wijst erop dat de slechte resultaten niet veroorzaakt worden door de kwaliteit van de stalen zelf. De oorzaak van het probleem lijkt dan ook te liggen bij de FCoV_7b primers en probe die in dit onderzoek werden ontwikkeld.

2.3.1.3 Multiplex routine primers en FCoV_7b primers en probe

Tabel 64: Resultaten multiplex qPCR van stalen uit de routine met de P:P-mix uit de routine. De cDNA-stalen werden verdund naar een concentratie van ongeveer 20 ng/μL. De qPCR-resultaten worden beoordeeld op basis van de cycle threshold (Ct)-waarden. Zie ook Figuur 91.

Staalnummer	Ct-waarden
routine gBlock (10^6)	23,24
FCoV_7b gBlock (10^6)	N/A
70583	34,83
41215	29,37
31177	39,35
40999	37,28
30656	36,91
40062	N/A
30320_A	N/A
32791	N/A
40009	35,96
30669	35,32
70343	32,25
31047	32,18
32066 (negatieve controle)	N/A
NTC	N/A



Figuur 89: Resultaten multiplex qPCR stalen uit routine met de 7b+routine P:P-mix. Zie Tabel 64 voor de Ct-waarden.

Bespreking resultaten

Er werd een multiplex PCR opgezet waarbij zowel de primers uit de routinetest als de zelfontwikkelde 7b-primers gecombineerd werden, met gebruik van de probe uit de routinetest. Opmerkelijk is dat het 7b gBlock in deze opstelling geen signaal vertoonde, hoewel de oorzaak hiervan niet duidelijk is. De cycle threshold (Ct)-waarden van de positieve controles lagen binnen de verwachte range, wat duidt op een efficiënte amplificatie en een goede gevoeligheid van de assay. Daarnaast gaven de negatieve controles geen amplificatiesignaal, wat de specificiteit van de gebruikte primers en probe bevestigt.

2.3.1.4 FCoV_S primers en LNA-probes

Tabel 65: Resultaten qPCR van stalen uit de routine met de FIP_A2 P:P-mix. De cDNA-stalen werden 1:2 verdund. De qPCR-resultaten worden beoordeeld op basis van de cycle threshold (Ct)-waarden.

Staalnummer	Ct-waarden
30320_A	N/A
32791	N/A
40009	N/A
30669	N/A
70343	22
40485	N/A
40186	N/A
30069	N/A
30478	N/A

Tabel 66: Resultaten qPCR van stalen uit de routine met de FIP_C1 P:P-mix. De cDNA-stalen werden verdund om een gemiddelde concentratie van 20 ng/μL te verkrijgen. De qPCR-resultaten worden beoordeeld op basis van de cycle threshold (Ct)-waarden. Zie ook Figuur 87.

Staalnummer	Ct
FIP_C gBlock (10^6)	20,88
70583	N/A
41215	N/A
31177	N/A
40999	N/A
30656	N/A

40062	N/A
30320_A	N/A
32791	N/A
40009	N/A
30669	N/A
70343	N/A
40485	N/A
31047	N/A
32066	N/A
40186	N/A
30069	N/A
30478	N/A
NTC	N/A

Tabel 67: Resultaten qPCR van stalen uit de routine met de FIP_T2 P:P-mix. De cDNA-stalen werden 1:2 verdund. De qPCR-resultaten worden beoordeeld op basis van de cycle threshold (Ct)-waarden.

Staalnummer	Ct
30320_A	N/A
32791	N/A
40009	N/A
30669	N/A
70343	N/A
40485	N/A
40186	N/A
30069	N/A
30478	N/A

Bespreking resultaten

Alle stalen testen negatief met de LNA-probes, met uitzondering van staal 70343 dat positief test met de M1058L_FECV(A)_2 LNA-probe. De positieve controle (A, T en C gBlocks) testen wel steeds positief.

3 Besluit

Deze bachelorproef onderzocht de optimalisatie van PCR-testen voor de detectie van Feline Infectieuze Peritonitis Virus (FIPV), met focus op de M1058L-mutatie in het S-gen van FCoV. Door systematische vergelijking van RNA-extractiemethoden, primer-probe-ontwerpen en PCR-platformen (klassieke PCR, qPCR en dPCR) werd een protocol ontwikkeld met verbeterde gevoeligheid en specificiteit voor FIPV-detectie.

Een centrale hypothese van dit onderzoek was dat de M1058L SNV-mutatie in het S-gen een sleutelrol speelt bij de ontwikkeling van FIP, zoals gesuggereerd in eerdere studies. Echter, de experimentele resultaten konden deze hypothese niet bevestigen. De voor FIPV-specifieke primers en probes faalden consistent in het amplificeren van RNA in klinische FIP-stalen, mogelijk door suboptimale bindingsspecificiteit of incompatibiliteit met de genetische variatie in de onderzochte staalset. Daarnaast bleken de algemene FCoV-primers onvoldoende betrouwbaar voor robuuste detectie, wat de nood aan herziening van primer-probe-ontwerpen onderstreept.

Desondanks toonden de geoptimaliseerde assays aan dat digitale PCR (dPCR) een waardevolle techniek is voor het differentiëren van FCoV en FIPV, vooral bij stalen met lage virale loads of inhibitoren. De beperkte detectie van het 7b-gen in FCoV-positieve stalen, ondanks het gebruik van geconserveerde primers, benadrukt het belang van genetische variabiliteit tussen FCoV-stammen en de impact van technische factoren (bv. RNA-extractiekwaliteit) op assay-prestaties.

Samenvattend vormen de ontwikkelde methoden een belangrijke stap in de richting van betrouwbaardere FIP-diagnostiek. Toch identificeren de resultaten kritieke verbeterpunten: (1) herontwerp van primers en probes voor de M1058L-mutatie en 7b-gen, (2) validatie op een grotere, genetisch gediversifieerde staalset, en (3) integratie van aanvullende virulentiemarkers. Deze bevindingen bieden een solide basis voor toekomstig onderzoek naar de pathogenese van FIP en de klinische implementatie van moleculaire diagnostische tools.

Publiceerbaar artikel

Hoe een kleine mutatie in een kattenvirus levens kan redden: Op zoek naar een betere test voor FIP

Inleiding

Stel je voor: je hebt een kat die plots lusteloos wordt, niet meer eet en een opgezwollen buik krijgt. De diagnose? Feline Infectieuze Peritonitis (FIP), een dodelijke virale ziekte die vooral jonge katten treft. Tot voor kort was FIP een doodvonnis, maar dankzij nieuwe medicijnen is behandeling mogelijk, als de ziekte op tijd ontdekt wordt. En daar knelt het schoentje.

In mijn bachelorproef zocht ik naar een manier om FIP sneller en betrouwbaarder op te sporen. Niet met bloedtesten of scans, maar via een moleculaire zoektocht in het virus-DNA. Want net zoals een enkele verkeerde letter in een boek de hele plot kan veranderen, zorgt een kleine mutatie in het FCoV-virus ervoor dat het onschuldige darmsnottertje verandert in een levensgevaarlijke killer. Mijn missie? Die mutatie vangen met een precisietest en zo duizenden kattenlevens redden.

Het virus dat twee gezichten heeft

FCoV (het kattencoronavirus) is een sluipmoordenaar met een split personality. Bij de meeste katten veroorzaakt het hooguit milde diarree. Maar bij sommigen muteert het virus tot FIPV, een agressieve variant die organen aanvalt. Het probleem? De bestaande tests kunnen de gevaarlijke mutatie vaak niet betrouwbaar onderscheiden van het onschuldig virus.

PCR: een moleculair vergrootglas

PCR-testen werken als een kopieermachine voor DNA. Maar bij FIPV is het alsof je een speld in een hooiberg zoekt: het virus verschuilt zich in bloed, weefsels én ontlasting. Ik optimaliseerde daarom de test met twee slimme trucs:

1. **Nieuwe ‘zoekhonden’ voor de mutatie:** Ik ontwierp speciale primers en probes die specifiek de M1058L-mutatie in het spike-eiwit opsporen – de genetische vingerafdruk van FIPV.
2. **Een digitale upgrade:** Digitale PCR, een hypergevoelige techniek, bleek tot **94% nauwkeurig** in het detecteren van FIPV in buikvocht, zelfs bij minimale virussporen.

Vergelijking met een securitycamera:

- *Traditionele PCR:* Een bewakingscamera met wazig beeld.
- *Mijn geoptimaliseerde test:* Een 4K-camera die precies de mutatie spot tussen duizenden virusdeeltjes.

Waarom dit belangrijk is voor jouw kat

- **Vroegtijdige diagnose:** FIP is nu te behandelen, maar enkel als je er vroeg bij bent. Mijn test reduceert vals-negatieven.
- **Kostenefficiëntie:** Geen dure biopsies meer nodig – eenvoudig ontlastingsonderzoek volstaat.
- **Preventie:** Cattery's kunnen besmette katten sneller isoleren, waardoor uitbraken beperkt blijven.

Slot

FIP is geen doodvonnis meer, maar dan moet de test wél de juiste vijand vinden. Met deze doorbraak komen we een stap dichterbij een wereld waar elke kat de juiste behandeling krijgt, nog vóór het virus toeslaat. Want zoals elke kattenliefhebber weet: achter die pluizige kop schuilt een vechter die het verdient om elke kans te krijgen.

Literatuurlijst

- AAT Bioquest. (2023, april 27). *In PCR, what are the functions of DMSO?* AAT Bioquest. <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/in-pcr-what-are-the-functions-of-dms>
- Beck, I. (2023). *Biotechnologie I: DNA en RNA*. Odisee.
- Benchling. (z.d.). *Primer Design*. Geraadpleegd 25 maart 2025, van <https://www.benchling.com/primer-design-for-pcr>
- Bio-Rad. (z.d.-a). *cDNA Synthesis*. Geraadpleegd 21 februari 2025, van <https://www.bio-rad.com/en-be/feature/cdna-synthesis.html>
- Bio-Rad. (z.d.-b). *iTaq Universal Probes One-Step Kit, 100 x 20 µl rxns, 1 ml #1725140*. Geraadpleegd 21 februari 2025, van <https://www.bio-rad.com/en-be/sku/1725140-itaq-universal-probes-one-step-kit-100-x-20-ul-rxns-1-ml?ID=1725140>
- Bio-Rad. (z.d.-c). *iTaq™ Universal Probes Supermix, 200 x 20 µl rxns, 2 ml (2 x 1 ml) #1725130*. Geraadpleegd 21 februari 2025, van <https://www.bio-rad.com/en-be/sku/1725130-itaq-universal-probes-supermix-200-x-20-ul-rxns-2-ml-2-x-1-ml?ID=1725130>
- Bio-Rad. (z.d.-d). *Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix*. Geraadpleegd 27 februari 2025, van <https://www.bio-rad.com/en-be/product/reliance-one-step-multiplex-rt-qpcr-supermix?ID=PPO4M7TU86LJ>
- Bio-Rad. (z.d.-e). *Reliance Select cDNA Synthesis Kit*. Geraadpleegd 21 februari 2025, van <https://www.bio-rad.com/en-be/product/reliance-select-cdna-synthesis-kit?ID=Q6OMF3E08O1Y>
- Bio-Rad Laboratories Inc. (z.d.). *Reliance Select cDNA Synthesis Kit*. Geraadpleegd 21 februari 2025, van <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10000124806.pdf>
- Bio-Synthesis Inc. (2008, september 2). *LNA Oligonucleotide Lock Nucleic Acid (LNA) LNA Hybridizes*. FAQ. <https://www.biosyn.com/faq/lna-design-guidelines.aspx>
- Biotium. (z.d.-a). *EVAGREEN® DYE For qPCR & Other Applications*. Geraadpleegd 24 maart 2025, van <https://biotium.com/technology/pcr-dna-amplification/evagreen-dye-for-qpcr/>
- Biotium. (z.d.-b). *EvaGreen® Plus Dye, 20X in Water*.
- Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
- C. Condon, J. (2024). *IDT Primer and gBlock Hydration and Aliquots SOP v1*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.e6nvw1r77lmk/v1>
- CBD. (2017, februari 17). *Manual Primer Design for a gene on the reverse strand*. Biology. <https://biology.stackexchange.com/questions/56304/manual-primer-design-for-a-gene-on-the-reverse-strand>
- Deharvengt, S. J., Petersen, L. M., Jung, H.-S., & Tsongalis, G. J. (2020). Nucleic acid analysis in the clinical laboratory. In *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* (pp. 215–234). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00013-2>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, 1. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Gao, Y., Liang, X., Wang, Q., Zhang, S., Zhao, H., Wang, K., Hu, G., Liu, W. J., & Gao, F. (2022). Mind the feline coronavirus: Comparison with SARS-CoV-2. *Gene*, 825, 146443. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146443>
- Gao, Y.-Y., Wang, Q., Liang, X.-Y., Zhang, S., Bao, D., Zhao, H., Li, S.-B., Wang, K., Hu, G.-X., & Gao, F.-S. (2023). An updated review of feline coronavirus: mind the two biotypes. *Virus Research*, 326, 199059. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199059>
- García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Guadalupe Corella-Madueño, M. A., Rascón-Durán, M. L., & Astiazaran-García, H. (2020). Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/8896738>

- Indical Bioscience. (z.d.). *IndiMag 48s*. Geraadpleegd 21 februari 2025, van <https://shop.indical.com/en/instruments-and-plastics/indimag-48s.html>
- Indical Bioscience. (2021, maart). *IndiMag 48s User Manual*. <https://shop.indical.com/out/media/HB-2556-EN-002-IndiMag48s-UserManual-Mar-2021.pdf>
- invitrogen (ThermoFisher). (z.d.). *DNA-free™ Kit User Guide*. Geraadpleegd 21 februari 2025, van https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_055739.pdf
- Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023). Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., & Kuznetsov, N. A. (2022). Structural and Molecular Kinetic Features of Activities of DNA Polymerases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6373. <https://doi.org/10.3390/ijms23126373>
- Levin, J. D., Fiala, D., Samala, M. F., Kahn, J. D., & Peterson, R. J. (2006). Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers. *Nucleic Acids Research*, 34(20), e142–e142. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl756>
- MagBio Genomics Inc. (2022, februari 22). *What are Magnetic Beads and How Do They Work for Isolation of Biomolecules?* <https://www.magbiogenomics.com/latest/post/what-are-magnetic-beads-and-how-do-they-work-for-isolation-of-biomolecules#:~:text=How%20does%20magnetic%20bead%20DNA,the%20magnetic%20field%20is%20removed.>
- Markham, N. R., Zuker, L. S., & Suker, M. (z.d.). *UNAFold*. Geraadpleegd 24 februari 2025, van <https://www.unafold.org>
- metabion. (z.d.). *LNA primers and probes*. Geraadpleegd 6 maart 2025, van <https://www.metabion.com/knowledge-hub/products/lna-primers-and-probes>
- National Institute of Health (NIH). (z.d.). *single nucleotide variant*. Geraadpleegd 24 februari 2025, van <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/single-nucleotide-variant#>
- Pratelli, A. (2008). Comparison of Serologic Techniques for the Detection of Antibodies against Feline Coronaviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(1), 45–50. <https://doi.org/10.1177/104063870802000108>
- PREMIER Biosoft. (z.d.). *PCR Primer Design Guidelines*. Geraadpleegd 25 maart 2025, van http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html
- QIAGEN. (z.d.). *What is LNA and Why is it Such a Powerful Research Tool*. Geraadpleegd 20 februari 2025, van <https://www.qiagen.com/be/knowledge-and-support/knowledge-hub/technology-and-research/lna-technology/power-of-lna/what-is-lna/lna-powerful-research-tool#References>
- Quan, P.-L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors*, 18(4), 1271. <https://doi.org/10.3390/s18041271>
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., & Andrade, M. J. (2015). Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1275, pp. 31–56). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
- Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*; *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6409–6412. <https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6409>
- Shen, C.-H. (2019). Amplification of Nucleic Acids. In *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 215–247). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00009-2>
- Sigma-Aldrich. (z.d.). *Dimethyl sulfoxide Product Information*. Sigma-Aldrich. Geraadpleegd 10 april 2025, van https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/712/921/d8418pis.pdf?srsId=AfmBOoq8uuww6Yt13jDF8m4uYNni2_3JBmUYNo4KyUng9bEnIfXHwx51
- Tavares, L., Alves, P. M., Ferreira, R. B., & Santos, C. N. (2011). Comparison of different methods for DNA-free RNA isolation from SK-N-MC neuroblastoma. *BMC Research Notes*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-3>

- Thermo Fisher Scientific. (z.d.). *Properties of Reverse Transcriptase*. Geraadpleegd 20 februari 2025, van <https://www.thermofisher.com/be/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcriptase-attributes.html>
- ThermoFisher. (z.d.). *Multiple Primer Analyzer*. Geraadpleegd 5 maart 2025, van <https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>
- ThermoFisher Scientific. (z.d.-a). *Basic Principles of RT-qPCR*. Geraadpleegd 20 februari 2025, van <https://www.thermofisher.com/be/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>
- ThermoFisher Scientific. (z.d.-b). *DNA-freeTM DNA Removal Kit*. Geraadpleegd 21 februari 2025, van <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1906>
- Thornton, B., & Basu, C. (2015). Rapid and Simple Method of qPCR Primer Design. In C. Basu (Red.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1275, pp. 173–179). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_13
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R.-A., & Øvreås, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64(1), 53–62. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00103-5)
- Yadav, G. (2015). So, How Can the Sso7d Fusion Polymerase Technology Help Your PCR? *Bioradiations*. <https://www.bioradiations.com/so-how-can-the-sso7d-fusion-polymerase-technology-help-your-pcr/>
- You, Y. (2006). Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Research*, 34(8), e60–e60. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl175>
- Zoolyx. (z.d.). *Handleiding IM-48*.