



FACULTEIT GENEESKUNDE EN  
GEZONDHEIDSWETENSCHAPPEN

*Next-generation sequencing*  
bij heterogene netvliesandoeningen

Ellen De Meester

Verhandeling ingediend tot  
het verkrijgen van de graad van  
Master in de Biomedische Wetenschappen

Promotor: Prof. Dr. E. De Baere  
Begeleider: Lic. Frauke Coppieters  
Vakgroep: Pediatrie en Genetica GE02

**Academiejaar 2009-2010**





*Next-generation sequencing*  
bij heterogene netvliesandoeningen

Ellen De Meester

Verhandeling ingediend tot  
het verkrijgen van de graad van  
Master in de Biomedische Wetenschappen

Promotor: Prof. Dr. E. De Baere  
Begeleider: Lic. Frauke Coppieters  
Vakgroep: Pediatrie en Genetica GE02

**Academiejaar 2009-2010**

*'De auteur en de promotor geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.'*

Datum

Ellen De Meester

Prof. Dr. E. De Baere

# Woord vooraf

Het schrijven van een masterproef is als een achtbaan, een afwisseling van hoogtepunten en moeilijkere momenten maar met een prettig gevoel na afloop. Deze masterproef zou niet zijn wat ze is zonder de hulp van enkele bijzondere mensen.

Vooreerst zou ik graag mijn promotor Prof. Dr. Elfride De Baere, en mijn begeleidster Lic. Frauke Coppieters willen bedanken om mij de kans te geven mee te werken aan dit baanbrekend *next-generation sequencing* project. Hun theoretische kennis, hun praktische ervaring, hun bereidwillige hulp en kritische opmerkingen waren een stimulans om deze masterproef tot een goed einde te brengen.

Graag zou ik ook Bram De Wilde, het NXTGNT-team, de laborantes van 1MRB en alle andere medewerkers van het CMGG willen bedanken voor het beantwoorden van mijn vele vragen, voor de hulp bij onverwachte problemen, voor de diepgaande gesprekken en de leuke momenten die ik tijdens mijn stage mocht meemaken.

Mijn medestudenten zou ik graag bedanken voor de vele toffe tijden en de steun wanneer ik het even moeilijk had. In het bijzonder wil ik de medestudenten van 1MRB bedanken. Zij zorgden voor aangenaam gezelschap in het tweede semester.

Ten slotte nog een speciaal woord van dank voor mijn vader Marc De Meester, voor het nalezen van deze masterproef en voor mijn familie en vrienden. Zonder hun onvoorwaardelijke steun zou ik hier nu niet staan.

Ellen De Meester

Mei 2010

## Afkortingen

A	adenosine
AD	autosomaal dominant
adRP	autosomaal dominante retinitis pigmentosa
ADVIRC	autosomaal dominante vitreoretinochoroidopathie
AFA	<i>adaptive focused acoustics</i>
AMP	adenosine monofosfaat
APEX	<i>Arrayed Primer Extension</i>
AR	autosomaal recessief
arRP	autosomaal recessieve retinitis pigmentosa
ATP	adenosine trifosfaat
bp	basepaar
C	cytosine
CACD	centrale areolaire choroidale dystrofie
CCD	<i>charged coupled device</i>
ChIP	chromatine immunoprecipitatie
CMGG	Centrum voor Medische Genetica Gent
Cq	<i>quantification cycle</i>
ddNTP	dideoxyribonucleoside trifosfaat
DNA	desoxyribonucleïnezuur
dNTP	deoxyribonucleotide trifosfaat
EGT	Eurogentec
G	guanine
GA	<i>Genome Analyzer</i>
gDNA	genomisch DNA
HGP	Humaan Genoom Project
LCA	Leber Congenitale Amaurosis
LOC	<i>lab-on-chip</i>
MID	<i>multiplex identifiers</i>
MPC	<i>Magnetic Particle Concentrator</i>
MRCS	Microcornea, <i>rod-cone dystrofie</i> , cataract en <i>posterior staphyloma</i>
<i>N. opticus</i>	<i>Nervus opticus</i>
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
NHGRI	<i>National Human Genome Research Institute</i>
nm	nanometer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	polyethyleen glycol
PGD	preïmplantatie genetische diagnostiek
PGP	<i>Personal Genome Project</i>
pH	zuurtegraad

pM	picomolair
PPi	pyrofosfaat
qPCR	kwantitatieve PCR
RC	<i>reverse complement</i>
Rfu	relatieve fluorescentie eenheid
RNA	ribonucleïnezuur
RP	retinitis pigmentosa
RPE	retinaal pigment epitheel
RPM	<i>revolutions per minute</i>
SDS	sodium dodecyl sulfaat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SPRI	<i>solid-phase reversible immobilization</i>
T	thymidine
T <sub>m</sub>	smelttemperatuur
USD	<i>United States Dollar</i>
USH	Usher syndroom
USH2A	Usherie type IIA
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultra violet
μg	microgram
μl	microliter
μTAS	<i>micro Total Analysis System</i>
° C	graden Celsius

# Inhoudstafel

Samenvatting .....	1
1. Inleiding .....	2
1.1 Erfelijke netvliesaanandoeningen .....	2
1.1.1. Leber Congenitale Amaurosis .....	3
1.1.2. Retinitis pigmentosa .....	4
1.1.3. Usher syndroom type IIA .....	5
1.1.4. Erfelijke maculaire dystrofieën .....	6
1.1.4.1. Ziekte van Stargardt .....	6
1.1.4.2. Ziekte van Best .....	6
1.1.4.3. Adulte vitelliforme maculaire dystrofie .....	7
1.1.4.4. Fundus dystrofie van Sorsby .....	7
1.1.5. Behandeling .....	8
1.1.5.1. Retinale gentherapie .....	8
1.1.6. Genetische testen .....	10
1.1.6.1. Huidige genetische test .....	10
1.2 <i>Next-generation sequencing</i> .....	12
1.2.1. Principe van NGS .....	13
1.2.2. Illumina (Solexa) Genome Analyzer (GA <sub>IIe</sub> ) .....	14
1.3 Doelstelling en werkplan van deze masterproef .....	19
2. Materiaal en Methoden .....	20
2.1 Kwantitatieve polymerase ketting reactie (qPCR) .....	20
2.1.1. Principe .....	20
2.1.2. DNA stalen .....	20
2.1.3. Primers .....	21
2.1.3.1. Primerdesign .....	21
2.1.3.2. Primerverdunning .....	22
2.1.4. <i>Mastermixen</i> .....	23
2.1.5. qPCR-protocol .....	23
2.1.6. Data-analyse .....	24
2.2 <i>Poolen</i> van de amplicons .....	24
2.3 Zuivering .....	24
2.3.1. Principe .....	24



2.3.2. Protocol .....	25
2.4 Concentratiebepaling.....	25
2.4.1. NanoDrop® ND-1000 .....	25
2.4.1.1. Principe.....	25
2.4.1.2. Protocol .....	26
2.4.2. Molecular Probes PicoGreen® Assay op de FLUOstar OPTIMA.....	26
2.4.2.1. Principe.....	26
2.4.2.2. Protocol .....	26
2.5 A/T additie.....	27
2.5.1. Principe.....	27
2.5.2. Protocol .....	27
2.6 <i>End-it</i> reactie .....	27
2.6.1. Principe.....	27
2.6.2. Protocol .....	27
2.7 Ligatiereactie.....	27
2.7.1. Principe.....	27
2.7.2. Protocol .....	28
2.7.3. Analyse.....	28
2.7.3.1. Interne primers .....	28
2.7.3.2. <i>Reverse complement</i> primers.....	29
2.8 Microchip electroforese.....	30
2.8.1. Principe.....	30
2.8.2. Protocol .....	31
2.8.2.1. MCE®-202 MultiNA .....	31
2.8.2.2. Labchip® GX II .....	31
2.8.2.3. Agilent 2100 Bioanalyzer.....	31
2.9 <i>Size selection</i> .....	32
2.9.1. Principe.....	32
2.9.2. Protocol .....	32
2.10 Fragmentatie.....	32
2.10.1. Principe.....	32
2.10.2. Protocol .....	33
2.11 Sequeneren .....	33

3.	Resultaten .....	34
3.1	qPCR .....	34
3.1.1.	qPCR <i>mastermix</i> kits .....	34
3.1.2.	BioRad: Lang en kort qPCR-protocol .....	35
3.1.3.	BioRad: Primers NGS project .....	36
3.1.3.1.	NGS primers .....	36
3.1.3.1.	qPCR .....	37
3.1.4.	BioRad: Slechte amplicons .....	38
3.2	Ligatie .....	39
3.2.1.	Ligatieprotocol .....	39
3.2.2.	End-it .....	40
3.2.3.	Verdunningsreeks .....	41
3.2.4.	Herhaling van de verdunningsreeks .....	43
3.3	<i>Size selection</i> .....	43
3.4	Het volledige protocol .....	45
4.	Bespreking .....	47
4.1	Primer <i>design</i> .....	48
4.2	qPCR .....	48
4.3	Ligatie .....	49
4.4	<i>Size selection</i> en fragmentatie .....	50
4.5	Algemene conclusie .....	50
4.6	Toekomstperspectief .....	51
5.	Referentielijst .....	52
	Bijlagen .....	55

## Samenvatting

*Probleemstelling.* Erfelijke netvliesafwijkingen zijn een heterogene groep afwijkingen, gekarakteriseerd door de degeneratie van fotoreceptoren en/of retinaal pigment epitheel (RPE) in het netvlies of retina. Ze worden gekenmerkt door een grote genetische heterogeniteit, hetgeen een moleculaire diagnose van deze afwijkingen bemoeilijkt. Dit is nochtans van groot belang voor het inschatten van de prognose van de afwijking, voor reproductieve beslissingen en niet in het minst voor toekomstige retinale geneeskunde.

*Doelstelling.* De doelstelling van deze masterproef was het ontwikkelen van een nieuw *next-generation sequencing* (NGS) platform voor hoge doorvoer en parallelle sequentie-analyse van ziektegenen betrokken bij een selectie van netvliesafwijkingen, meer bepaald Leber Congenitale Amaurosis (LCA), retinitis pigmentosa (RP), Usher type IIA en maculaire dystrofieën.

*Patiënten en methoden.* Hiertoe werd een nieuw protocol ontwikkeld voor amplicon sequentie-analyse op de *Illumina Genome Analyzer*. Verschillende condities en methoden werden uitgetest op controle DNA en op DNA van een LCA patiënt.

*Resultaten.* Er werden primers ontwikkeld en uitgetest voor 559 amplicons afkomstig van 21 genen. Het eigenlijke protocol bestaat uit drie onderdelen: (1) kwantitatieve PCR (qPCR), (2) ligatie en (3) fragmentatie. (1) Voor de qPCR werd een protocol geoptimaliseerd dat toelaat om zowel korte als lange amplicons te amplificeren onder uniforme condities, namelijk met een geselecteerde commerciële *mastermix* en een ‘lang’ qPCR-protocol. (2) Het ligatie-protocol bestond uit groeperen van qPCR-producten en zuivering door middel van kolommen. Deze zuivering werd gevolgd door een *end-it* stap om *blunt end*-fragmenten te genereren, en een ligatie van deze fragmenten. (3) Op het ligatieproduct werd een grootte selectie uitgevoerd, met als doel fragmenten kleiner dan 500 baseparen te verwijderen. Fragmentatie van de geselecteerde ligatieproducten tot 300 baseparen – wat de gewenste lengte is voor sequentie-analyse op de *Illumina Genome Analyzer* - gebeurde op een *Covaris* toestel. Het uitvoeren van dit protocol op patiënten met LCA, RP, Usher type IIA en maculaire dystrofieën, het maken van een sequentie-bibliotheek en de sequentie-analyse op de *Illumina Genome Analyzer* maakte geen deel uit van deze masterproef.

*Conclusie:* Er werd een piloot NGS platform ontwikkeld voor 21 ziektegenen betrokken bij LCA (16), RP (9), Usher type IIA (1) en maculaire dystrofieën (4). Het uitgevoerde onderzoek draagt bij tot de *proof-of-concept* van dit ligatieprotocol.

# 1. Inleiding

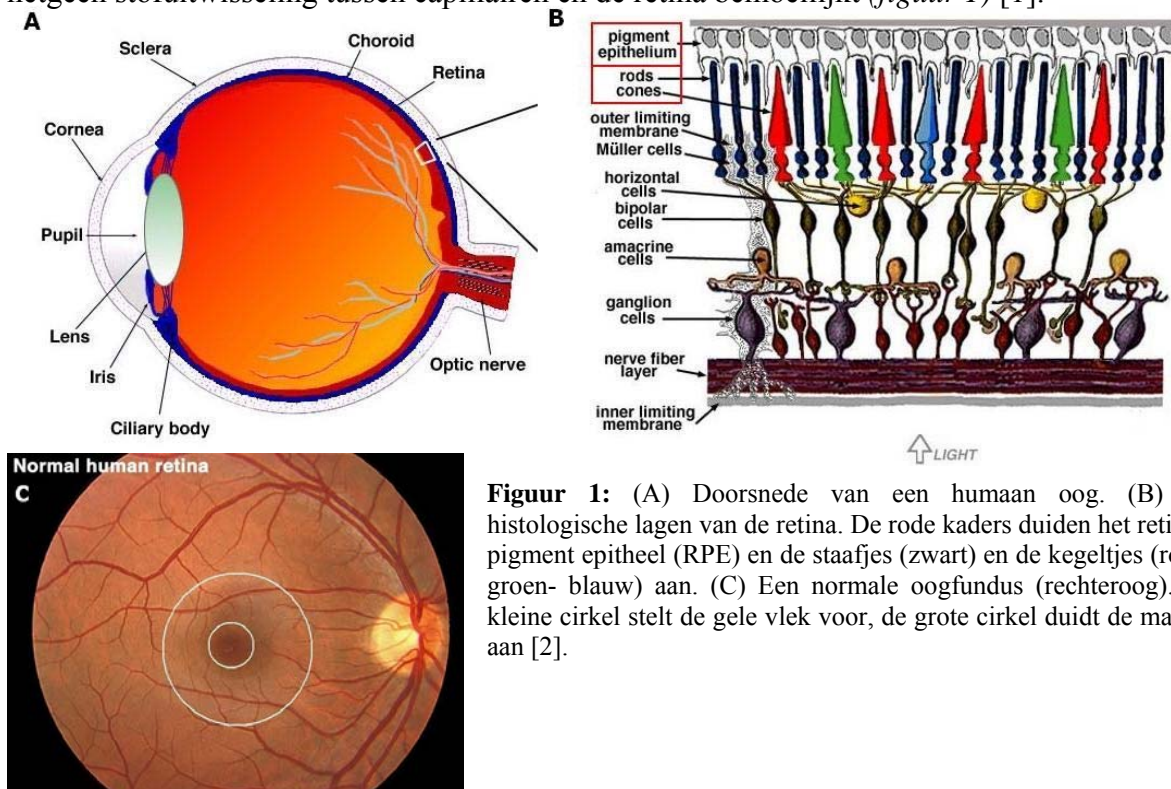
## 1.1 Erfelijke netvliesaanandoeningen

Erfelijke netvliesaanandoeningen vertegenwoordigen een heterogene groep monogenische aanandoeningen, gekenmerkt door degeneratie van de fotoreceptoren en/of het retinaal pigment epitheel (RPE) in de retina.

De omzetting van licht naar elektrische signalen is een belangrijke functie van het netvlies. Deze elektrische signalen gaan via de *N. opticus* naar de visuele cortex, waar ze worden geïnterpreteerd. De retina bekleedt de binnenste laag van het oog en kan opgedeeld worden in (1) de macula, met de gele vlek of fovea, verantwoordelijk voor scherp- en kleurenzicht en (2) de retinale periferie, verantwoordelijk voor het perifeer gezichtsveld en nachtzicht. Histologisch bestaat de retina uit 10 lagen (*figuur 1B*). De negende laag bevat de fotoreceptoren of lichtgevoelige cellen, die kunnen opgedeeld worden in twee types:

- Staaftjes: voornamelijk terug te vinden in de retinale periferie en verantwoordelijk voor nachtzicht.
- Kegeltjes: fotoreceptoren geconcentreerd in de gele vlek en belangrijk voor kleurenzicht.

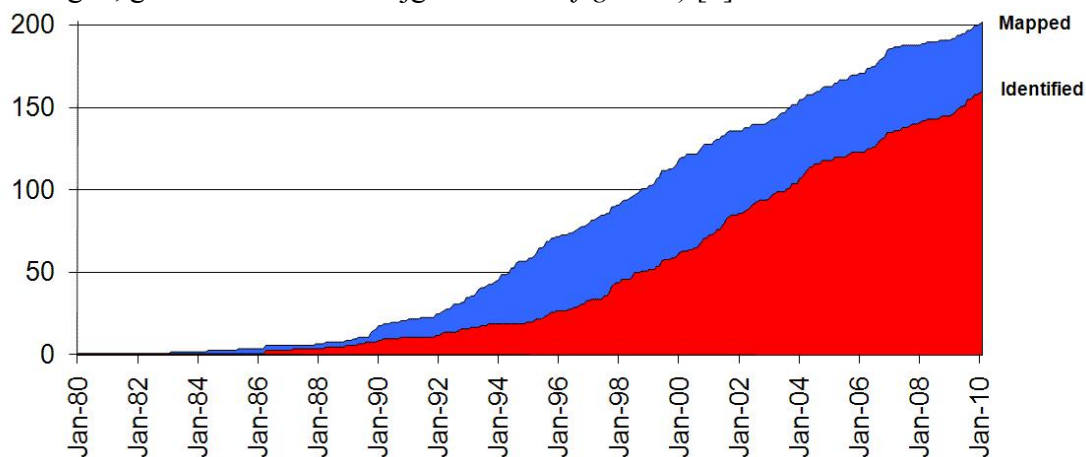
Waar de *N. opticus* het oog verlaat zijn er geen fotoreceptoren aanwezig, dit is de blinde vlek. Onder de fotoreceptoren bevindt zich het retinaal pigment epitheel (RPE), de tiende cellaag. De RPE cellen zijn zeer nauw met elkaar verbonden en vormen een bloed-retina barrière, hetgeen stofuitwisseling tussen capillairen en de retina bemoeilijkt (*figuur 1*) [1].



**Figuur 1:** (A) Doorsnede van een humaan oog. (B) De histologische lagen van de retina. De rode kaders duiden het retinaal pigment epitheel (RPE) en de staaftjes (zwart) en de kegeltjes (rood-groen- blauw) aan. (C) Een normale oogfundus (rechteroog). De kleine cirkel stelt de gele vlek voor, de grote cirkel duidt de macula aan [2].

De fototransductie cascade en de retinoïd of vitamine A of visuele cyclus spelen een belangrijke rol in de omzetting van een lichtprikkel in een elektrisch signaal. In de fototransductie cascade valt een foton in op een fotoreceptor. Dit resulteert in de omzetting van 11-*cis*-retinal, een vitamine A isomeer, naar all-*trans*-retinal. Via een cascade wordt membraan hyperpolarisatie geïnduceerd hetgeen uiteindelijk als signaal via de *N. opticus* naar de visuele cortex wordt doorgegeven. In de retinoïd cyclus, die plaats vindt in zowel de fotoreceptoren als het RPE, wordt het all-*trans* retinal opnieuw omgezet naar 11-*cis* retinal [1].

Erfelijke netvliesandoeningen tasten naar schatting ongeveer 1 op 3.000 individuen aan in de Westerse wereld [3]. Doorgaans zijn deze aandoeningen genetisch zeer heterogeen. Eén enkel fenotype kan veroorzaakt worden door mutaties in één of verschillende genen. Omgekeerd kunnen mutaties in één gen, of zelfs één specifieke mutatie, aanleiding geven tot verschillende fenotypes [4]. Momenteel zijn er minstens 43 loci en 173 genen, verantwoordelijk voor deze aandoeningen, gekend. Dit aantal stijgt zeer snel (*figuur 2*) [5].



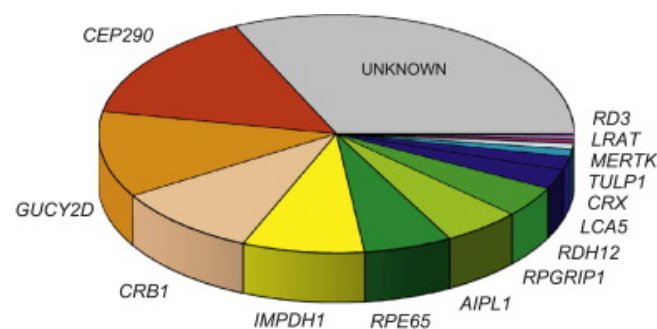
**Figuur 2: Het aantal gemapte en geïdentificeerde genen van januari 1980 tot en met januari 2010 [5].**

Hieronder zullen enkele van deze aandoeningen meer in detail besproken worden.

### **1.1.1. Leber Congenitale Amaurosis**

Leber Congenitale Amaurosis (LCA) omvat een groep erfelijke netvliesandoeningen die klinisch gekenmerkt worden door een ernstig visusverlies in het eerste levensjaar, nystagmus en een vlak electroretinogram. Deze klinische kenmerken kunnen sterk variabel zijn. LCA kan geïsoleerd of syndromaal voorkomen. Het Alström syndroom, de ziekte van Batten, het Joubert syndroom, peroxisomale aandoeningen en het Senior-Løken syndroom zijn hiervan belangrijke voorbeelden. De prevalentie van LCA varieert tussen 1/30.000 en 1/80.000. LCA is verantwoordelijk voor ongeveer 5% van alle erfelijke retinopathieën.

De aandoening is niet enkel klinisch, maar ook genetisch zeer heterogeen. Er zijn reeds 1 locus en meer dan 400 mutaties in 15 ziektegenen beschreven [5]. In ongeveer 30 à 40% van alle LCA-patiënten is de moleculaire oorzaak echter onbekend. De gekende ziektegenen spelen een rol in verschillende essentiële retinale ontwikkelingsfuncties en fysiologische signalisatiepaden waaronder fotoreceptor morfogenese, de fototransductiecascade, de vitamine A cyclus, guanine synthese, fagocytose van de buitenste segmenten en intra-fotoreceptor ciliair transport. In het algemeen zijn mutaties in *CEP290*, *GUCY2D* en *CRB1* het meest frequent (*figuur 3*). Er zijn *founder* mutaties gekend, onder meer een unieke intronische *CEP290* mutatie (c.2991+1665A>G) die aangetroffen wordt in ongeveer 20% van de LCA-patiënten in Noordwest Europa. De aandoening wordt voornamelijk autosomaal recessief overgeërfd. Autosomaal dominante overerving is zeldzaam [6].



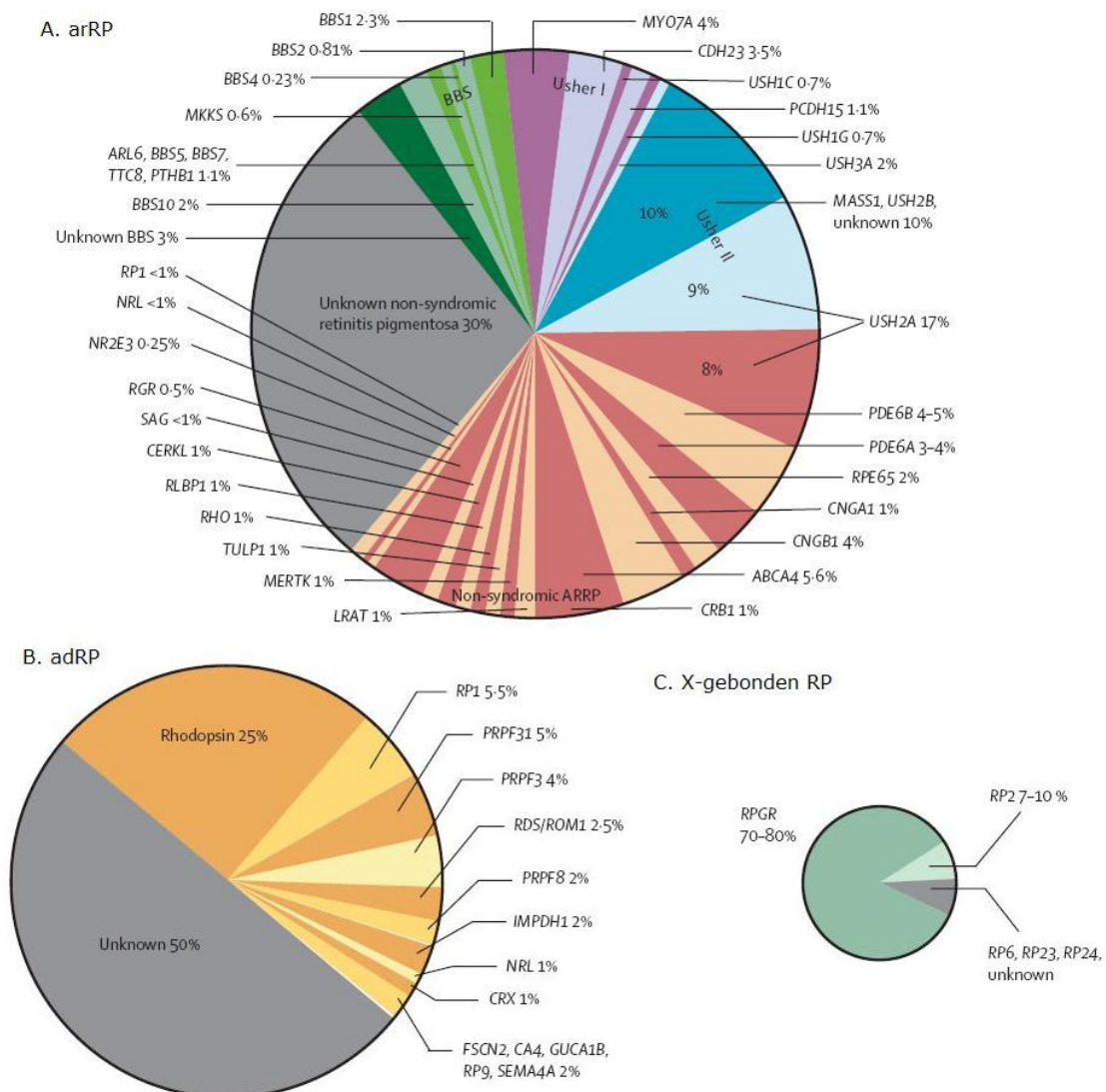
**Figuur 3: Prevalentie van LCA-geassocieerde mutaties.** Mutaties in 14 LCA-geassocieerde genen. Mutaties in *CEP290* (15%), *GUCY2D* (12%) en *CRB1* (10%) vertegenwoordigen het grootste aandeel. Bij ongeveer 30% van de patiënten blijft de moleculaire oorzaak onbekend [6].

### 1.1.2. Retinitis pigmentosa

Retinitis pigmentosa (RP) omvat een groep erfelijke netvliesandoeningen gekarakteriseerd door progressief gezichtsverlies te wijten aan degeneratie van staafjes en nadien de kegeltjes in de retina. Dit gezichtsverlies is zeer variabel en uit zich door verlies van nachtzicht tijdens de adolescentie, gevolgd door tunnelzicht en uiteindelijk tot volledig visusverlies. Bij 20 tot 30% van de patiënten is er een associatie met syndromen zoals Usher syndroom (USH), Bardet-Biedl syndroom en de ziekte van Refsum [7,8]. Het is een vaak voorkomende oorzaak van erfelijke blindheid/slechtziendheid. Met een incidentie van 1 op 4.000 zijn wereldwijd ongeveer 1 miljoen mensen aangetast [7].

Er zijn momenteel 8 loci en 48 ziektegenen geïdentificeerd [5]. RP kan autosomaal dominant (adRP) (30-40%), autosomaal recessief (arRP) (40-50%), of X-gebonden (5-15%) overgeërfd worden [7,8]. Complexe overervingspatronen zoals digenische overerving en effecten van genetische *modifiers* werden reeds beschreven [6]. In zeldzame gevallen kan er sprake zijn van mitochondriale overerving [8]. Samen zijn mutaties in *RHO* (adRP), *USH2A* (arRP) en

*RPGR* (X-gebonden RP) verantwoordelijk voor 30% van de RP-patiënten. Andere gekende ziektegenen zijn slechts verantwoordelijk voor een klein aantal van de totale groep patiënten. In ongeveer 50% van de gevallen blijft de oorzaak van RP ongekend (*figuur 4*) [7].



**Figuur 4: Prevalentie van RP-geassocieerde genen. (A)** Ziektegenen voor arRP. arRP vertegenwoordigt 50-60% van RP. In ongeveer 30% van de arRP patiënten blijft de oorzaak onbekend. **(B)** Ziektegenen voor adRP. adRP vertegenwoordigt 30-40% van RP. Mutaties in *RHO* vertegenwoordigen het grootste aandeel (25%). Bij de helft van de adRP patiënten blijft de oorzaak onbekend. **(C)** X-gebonden RP vertegenwoordigt 5-15% van RP. Mutaties in *RPGR* omvatten het grootste aandeel (80%) [8].

### 1.1.3. Usher syndroom type IIA

Mutaties in *USH2A* zijn niet enkel betrokken bij niet-syndromaal arRP, maar ook bij Usher syndroom type IIA (*figuur 4*). Het Usher syndroom (USH) omvat een groep recessieve aandoeningen gekenmerkt door zowel gehoor- als gezichtsverlies. USH vertegenwoordigt ongeveer de helft van patiënten met gecombineerd gehoor- en gezichtsverlies. De prevalentie wordt geschat op 3 tot 6 per 100.000. Klinisch is USH opgedeeld in 3 subtypes: USH1, USH2 en USH3. Ze zijn van elkaar te onderscheiden volgens de ernst en progressiviteit van het

gehoorverlies, en de aan- of afwezigheid van vestibulaire dysfunctie. RP komt voor in alle subtypes. De diagnose van USH2 wordt gesteld op klinische basis. Voor USH2 zijn er drie gekende ziektegenen: *USH2A*, *GPR98 (VLGRI)* en *WHRN*, respectievelijk verantwoordelijk voor 80%, 15% en een mineure fractie van de gevallen [9].

#### **1.1.4. Erfelijke maculaire dystrofieën**

Deze heterogene groep erfelijke aandoeningen wordt gekenmerkt door een grote klinische variabiliteit met verlies van het centrale zicht en atrofie van de macula en het onderliggende RPE. De aanvangsleeftijd verschilt tussen de verschillende types maculaire dystrofieën, maar de meeste komen vóór het 20<sup>ste</sup> levensjaar tot uiting.

De aandoeningen zijn genetisch zeer heterogeen, met zowel autosomaal dominante, autosomaal recessieve, X-gebonden als mitochondriale overervingsvormen. De meeste van deze aandoeningen zijn echter zeldzaam (*tabel 1*) [10].

##### *1.1.4.1. Ziekte van Stargardt*

De ziekte van Stargardt is de meest voorkomende maculaire dystrofie. De aandoening wordt gekenmerkt door een verlies van het centraal zicht en een typisch maculair beeld. De klinische presentatie, ernst van de aandoening en aanvangsleeftijd zijn zeer variabel. De aandoening vangt meestal aan tussen 10 en 20 jaar, maar kan zich ook vroeger of later manifesteren. De prevalentie ligt tussen 1 op 8.000 en 1 op 10.000.

De ziekte van Stargardt wordt autosomaal recessief overgeërfd en wordt veroorzaakt door mutaties in het *ABCA4* gen. Er werden reeds meer dan 400 verschillende mutaties en varianten in *ABCA4* beschreven. Mutaties in *ABCA4* kunnen ook aanleiding geven tot arRP en *cone-rod* dystrofie [10,11].

##### *1.1.4.2. Ziekte van Best*

De ziekte van Best, ook wel vitelliforme maculaire dystrofie genoemd, wordt gekenmerkt door een gele subretinale maculaire afzetting, een atrofiezone in het RPE en subretinale fibrose [10]. De aanvangsleeftijd varieert van kinderleeftijd tot in de zesde decade, met een gemiddelde rond de vierde decade. De ernst van de aandoening is sterk variabel, maar de visuele prognose is relatief goed [10,12].

De ziekte van Best is één van de meest voorkomende autosomaal dominante retinale dystrofieën. Er werd reeds gereduceerde penetrantie beschreven. Meer dan 100 verschillende mutaties in *BEST1* werden reeds beschreven in de ziekte van Best [10,12].



### 1.1.4.3. *Adulte vitelliforme maculaire dystrofie*

De klinische kenmerken van adulte vitelliforme maculaire dystrofie vertonen sterke overeenkomsten met deze van de ziekte van Best. De grote verschillen zijn een latere aanvangsleeftijd, gemiddeld na de vijfde decade, en een trager ziekteverloop. De aandoening komt vaker voor bij vrouwen dan bij mannen [12].

Adulte vitelliforme maculaire dystrofie komt voornamelijk sporadisch voor, maar in een klein aantal families is er een autosomaal dominante overerving. De aandoening wordt bij ongeveer 20% van de patiënten veroorzaakt door mutaties in *PRPH2* (*RDS*) en bij ongeveer 25% door mutaties in *BEST1*. Bij de overige patiënten blijft de oorzaak onbekend [10,12,13].

### 1.1.4.4. *Fundus dystrofie van Sorsby*

De fundus dystrofie van Sorsby is een zeer zeldzame aandoening gekenmerkt door nachtblindheid in de derde decade en verlies van centraal zicht in de vijfde decade. De aandoening wordt autosomaal dominant overgeërfd en wordt veroorzaakt door mutaties in *TIMP3* [10].

Naast de hogervermelde fenotypes, kunnen mutaties in *ABCA4*, *BEST1*, *PRPH2* en *TIMP3* aanleiding geven tot andere, zeldzamere maculaire dystrofieën en retinale aandoeningen (*tabel 1*).

**Tabel 1: Gekende ziektegenen voor maculaire dystrofieën [10-13].**

Gen	Aandoening	Overervingsvorm
<i>ABCA4</i> (OMIM 601691)	Ziekte van Stargardt <i>Cone-rod</i> dystrofie Retinitis pigmentosa	AR AR AR
<i>BEST1</i> ( <i>VMD2</i> ) (OMIM 607854)	Ziekte van Best Adulte vitelliforme maculaire dystrofie Autosomaal dominante vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) Microcornea, <i>rod-cone</i> dystrofie, cataract en <i>posterior staphyloma</i> (MRCS) syndroom Autosomal recessive bestrophinopathy	AD AD AD  AD AR
<i>PRPH2</i> ( <i>RDS</i> ) (OMIM 179605)	Adulte vitelliforme maculaire dystrofie Patroon dystrofie Centrale areolaire choroidale dystrofie (CACD) <i>Cone</i> en <i>Cone-rod</i> dystrofie <i>Butterfly-shaped</i> pigmentaire dystrofie Retinitis pigmentosa	AD AD AD AD AD AD en digenisch ( <i>ROM1</i> )
<i>TIMP3</i> (OMIM 188826)	Fundus dystrofie van Sorsby	AD

### 1.1.5. *Behandeling*

De huidige behandelingen van RP zijn gericht op het vertragen van het degeneratieve proces [8]. Met uitzondering van LCA bestaan er tot op heden geen genezende behandelingen voor RP, maculaire dystrofieën en USH [3,14-16]. Sinds 2008 zijn er bij de mens echter veelbelovende klinische studies van retinale gentherapie voor erfelijke blindheid lopend.

#### 1.1.5.1. *Retinale gentherapie*

Gentherapie is het inbrengen van genetisch materiaal in een cel met een therapeutische doelstelling. Afhankelijk van de aandoening is de doelstelling verschillend:

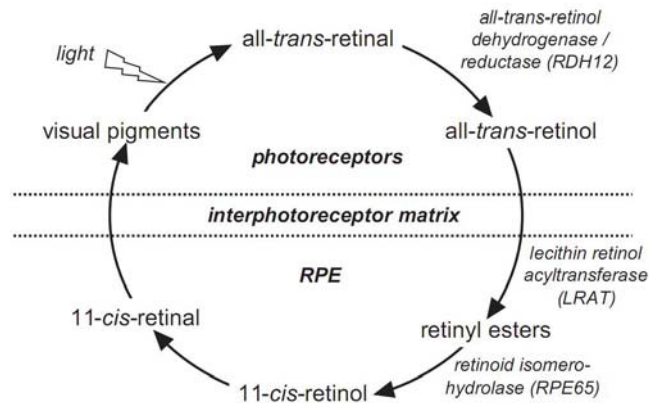
1. Het vervangen van een gemuteerd ziektegen.
2. Het aanreiken van extra kopijen van een gen.
3. Doelgerichte inhibitie van genexpressie.
4. Doelgericht vernietigen van specifieke cellen.

De gentransfer kan *ex vivo* of *in vivo* plaats vinden. Bij *ex vivo* gentransfer worden de doelwitcellen geïsoleerd, opgegroeid in cultuur en door middel van gentransfer wordt het gendefect gecorrigeerd. Vervolgens worden de gecorrigeerde cellen terug in het lichaam geplaatst. Bij *in vivo* gentransfer wordt het therapeutische gen aangebracht met behulp van een drager of vector. Deze vector kan een liposoom, een recombinant virus of een plasmide zijn [17].

De laatste jaren werd veel onderzoek verricht naar de ontwikkeling van gentherapie voor erfelijke netvliesaanandoeningen. Dit heeft recent geleid tot de initiatie van enkele fase I klinische studies bij de mens [3,14-16,18]. *In vivo* gentherapie van erfelijke netvliesaanandoeningen is mogelijk door enkele unieke eigenschappen van het oog. Ten eerste is het oog relatief gemakkelijk toegankelijk en heeft het een natuurlijke subretinale ruimte waarin een bolus van een therapeutische oplossing kan geïnjecteerd worden. Door de aanwezigheid van de bloed-retina barrière is lekkage naar de systemische circulatie, en bijgevolg ook de immunologische respons, minimaal. Tenslotte kan het oog relatief eenvoudig klinisch geëvalueerd worden op visuele functie en structurele veranderingen van de retina [3,6].

Sinds 2008 vonden verschillende fase I klinische studies plaats die het effect bestudeerden van gentherapie bij LCA patiënten met mutaties in *RPE65*. Deze *RPE65* mutaties zijn verantwoordelijk voor ongeveer 6-16% van de LCA gevallen [14,19] en voor 2% van de arRP

patiënten [19]. *RPE65* komt tot expressie in het RPE waar het een sleutelrol speelt in de retinoïd cyclus (figuur 5) [15,16].



**Figuur 5: Retinoïd cyclus.** *RPE65* speelt een rol in de omzetting van all-*trans*-retinol naar 11-*cis*-retinol [6].

De drie eerste studies hadden als doel het veiligheidsaspect en de doeltreffendheid van gentherapie te onderzoeken bij 9 patiënten (3 per studie) [15,16,18]. Een vierde studie bestudeerde de dosage van de vector en het leeftijdseffect bij 12 patiënten tussen 8 en 44 jaar [14]. De studies toonden afwezigheid van blijvende nadelige effecten [14-16,18]. Er werd een verband aangetoond tussen de leeftijd van de patiënt en het effect van de therapie (groter op jongere leeftijd), vermoedelijk te wijten aan een betere preservatie van de retina op jonge leeftijd [14]. Twaalf maanden na de behandeling bleken geteste patiënten nog steeds gezond en zonder ernstige vector-gerelateerde bijwerkingen. Ook was de verbetering in visuele functie nog aanwezig in de onderzochte individuen [20].

Andere kandidaatgenen voor retinale gentherapie zijn logischerwijs nauw verwant met *RPE65*-gerelateerde retinale dystrofie. In de retinoïd cyclus bevinden zich nog drie ziektegenen voor erfelijke netvliesandoeningen, namelijk *LRAT*, *RDH12* en *ABCA4*. *Lrat*-deficiënte muizen werden reeds met succes behandeld door middel van gentherapie [21]. *LRAT* mutaties zijn echter zeldzaam als oorzaak van retinale dystrofieën. *ABCA4* werd tot voor kort te groot bevonden voor *packaging* in virale vectoren. Recent werd aangetoond dat recombinante genomen tot 9 kilobasen kunnen opgenomen worden in een *AAV5*-gebaseerde vector. Subretinale injectie met het therapeutische gen in *Abca4*-deficiënte muizen toonden een verbeterde retinale morfologie en functie aan [22]. Gentherapie in *RDH12* deficiënte diermodellen werd nog niet geëvalueerd [3].

Er werden niet enkel gentherapeutische experimenten uitgevoerd op diermodellen deficiënt voor genen/eiwitten die een rol spelen in de retinoïd cyclus. Met wisselend succes werden reeds genen uit de fototransductiecascade, het ciliair transport, structurele eiwitten en andere domeinen getransduceerd [3,6].

### 1.1.6. Genetische testen

De grote klinische en genetische heterogeniteit van erfelijke netvliesandoeningen zorgt voor een grote uitdaging op gebied van genidentificatie, mutatie-analyse en het ontwikkelen van genspecifieke therapieën. Moleculair genetisch onderzoek is belangrijk om de klinische diagnose te bevestigen. In sommige gevallen laat dit toe om de patiënt een accuratere prognose te geven op basis van genotype-fenotype correlaties indien deze gekend zijn. Er is bovendien een meer gerichte klinische *follow-up* mogelijk voor extra-oculaire manifestaties wanneer het genotype gekend is [4,6,7].

Moleculair genetisch testen biedt ook perspectieven voor reproductieve beslissingen, zoals prenatale diagnostiek, of preïmplantatie genetische diagnostiek (PGD). Presymptomatische diagnostiek bij *late-onset* aandoeningen zoals RP kan een leidraad bieden voor ondermeer beroepskeuze en een optimale visuele begeleiding. Tenslotte is moleculaire diagnostiek van belang in het licht van genspecifieke therapieën, zoals retinale genterapie (*zie 1.1.5.1*) [6,7].

#### 1.1.6.1. Huidige genetische test

Moleculair genetisch testen is mogelijk op verschillende manieren. Sommige testen zijn ontwikkeld om snel gekende mutaties te onderzoeken (allel-specifieke testen, direct mutatie-detectie). Bij andere testen wordt de coderende sequentie van één of meerdere genen onder de loep genomen. Dit biedt de mogelijkheid om nog niet eerder beschreven ziekteveroorzakende mutaties op te sporen. Allel-specifieke testen zijn echter vaak goedkoper en bieden sneller een resultaat [4].

*Apex chips*. In het DNA Laboratorium van het Centrum voor Medische Genetica Gent (CMGG) [23] worden genetische testen voor LCA, RP, de ziekte van Stargardt en USH2A aangeboden. De eerstelijnstest is gebaseerd op *Arrayed Primer Extension* (APEX) chips van de firma Asper Ophthalmics (Estland) [24]. De APEX technologie combineert *microarray*-gebaseerde toepassingen met mini-sequencing. Op een chip zijn oligonucleotiden aangebracht die hybridiseren met doelwit DNA, geamplificeerd met behulp van de polymerase kettingreactie (PCR). De oligosequentie eindigt net voor het nucleotide van interesse. Na de hybridisatiestap volgt een primer extensie stap met behulp van een DNA polymerase, waarbij vier uniek fluorescent gelabelde 3',5'-dideoxyribonucleoside trifosfaten (ddNTPs) de reactie stoppen. Het fluorescent signaal komt overeen met het nucleotide op deze doelwitplaats [24].

Asper Ophthalmics biedt verschillende testen aan voor retinale aandoeningen (*tabel 2*).

**Tabel 2: De chips van de firma Asper Ophthalmics voor diagnostiek van LCA, RP, de ziekte van Stargardt en USH.** Per chip staan het aantal geteste genen, het aantal onderzochte sequentievarianties en de verschillende genen aangeduid. In de kolom CMGG staan de genen waarvoor bij een negatief chipresultaat sequentie-analyse uitgevoerd wordt [23,24].

AANDOENING	AANTAL GENEN	AANTAL VARIANTEN	GENEN	CMGG
Ziekte van Stargardt <i>Cone-rod</i> dystrofie arRP	1	558	<i>ABCA4</i>	<i>ABCA4</i>
adRP	16	385	<i>CA4, FSCN2, IMPDH1, NRL, PRPF3, PRPF31, PRPF8, PRPH2, RHO, ROM1, RP1, RP9, CRX, TOPORS, PNR</i>	Geen sequentie-analyse
arRP	19	594	<i>CERKL, CNGA1, CNGB1, MERTK, PDE6A, PDE6B, PNR, RDH12, RGR, RLBP1, SAG, TULP1, CRB, RPE65, USH2A, USH3, LRAT</i>	Geen sequentie-analyse
LCA	13	641	<i>AIPL1, CRB1, CRX, GUCY2D, LRAT, TULP1, MERTK, CEP209, RDH12, RPGRI1, LCA5, RPE65</i>	<i>AIPL1, CRB1, CRX, GUCY2D, CEP209, RPE65</i>
USH	9	612	<i>CDH23, MYO7A, PCDH15, Harmonin, SANS, USH2A, VLGR1, USH3A, Whirlin</i>	<i>USH2A</i>

Deze chips bevatten echter enkel gekende ziekteveroorzakende mutaties, bijgevolg kunnen geen nieuwe mutaties met deze methode gedetecteerd worden. De klinische mutatiedetectie ratio's van deze chips zijn variabel, afhankelijk van de indicatie en de populatie: (1) LCA chip: ongeveer 60% in de Belgische LCA-populatie [25]; (2) *ABCA4*-chip: meer dan 70% voor de ziekte van Stargardt; (3) arRP- en adRP-chip: ongeveer 20% voor arRP en adRP; (4) Usher-chip: ca. 20% voor de ziekte van Usher (De Baere E. Persoonlijke communicatie).

*Stroomafwaartse sequentie-analyse.* Indien de eerste stap van de test negatief is, kan een tweede test aangevraagd worden voor de volgende aandoeningen: (1) LCA: Sanger sequentie-analyse van 6 prevalentie ziektegenen (tabel 2); (2) de ziekte van Stargardt: Sanger sequentie-analyse van de coderende regio van *ABCA4*; (3) *USH2A*: Sanger sequentie-analyse van de coderende regio van *USH2A* [23].

Voor RP (arRP en adRP) wordt niet routinematig sequentie-analyse aangeboden in een tweede tijd. Mutaties in veel genen zijn immers verantwoordelijk voor slechts een klein percentage van de RP gevallen. In het kader van onderzoek kunnen bepaalde stalen toch verder uitgewerkt worden [23]. Routine testing voor X-gebonden RP wordt uitbesteed aan het *National Genetics Reference Laboratory* in Manchester (Verenigd Koninkrijk) [26].

*Andere.* De genetische test voor de ziekte van Best en vitelliforme maculaire dystrofie bestaat respectievelijk uit Sanger sequentie-analyse van het *BEST1 (VMD2)* en *PRPH2 (RDS)* gen

(tabel 2). Voor Sorsby dystrofie wordt tot op heden geen routine testing van *TIMP3* aangeboden.

Momenteel gebeurt mutatiescreening door middel van sequentie-analyse in het CMGG met behulp van de Sanger sequenceringsmethode. Deze methode werd voor het eerst beschreven in 1977 en is sinds het begin van de jaren '90 de voornaamste DNA sequenceringsstechniek. In zijn huidige vorm worden fluorescent gelabelde ddNTPs in ondermaat toegevoegd aan een mengsel van de vier niet-gelabelde deoxyribonucleotide trifosfaten (dNTPs) en DNA polymerase. Bij het inbouwen van een ddNTP stopt de elongatie, dit is de terminatie. Door capillaire electroforese worden de sequentie-producten gescheiden. De gedetecteerde fluorescentie wordt bepaald door de aard van het ingebouwde ddNTP [17,27,28]. Voor sequentiebepaling van DNA kunnen tot 500-600 baseparen gelezen worden met een accuraatheid van bijna 100% [27]. Deze techniek is echter relatief duur en arbeidsintensief.

## **1.2 Next-generation sequencing**

*Next-generation sequencing* (NGS) technologieën, ook wel *now-generation sequencing* of *second-generation sequencing* genoemd, zijn recent ontwikkelde sequenceringsstechnieken.

Deze nieuwe strategieën voor sequenceringsstechnieken zijn ontstaan op 4 niveau's:

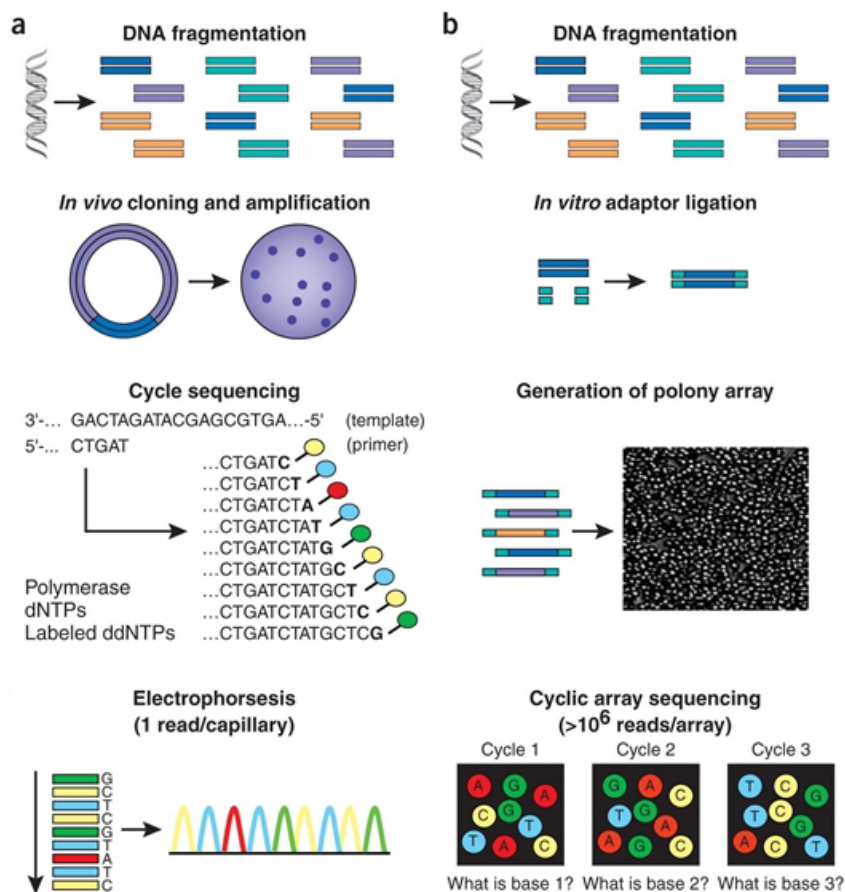
1. Het Humaan Genoom Project (HGP) heeft de conventionele sequenceringsstechnieken zo geoptimaliseerd dat er nog weinig kostprijzvermindering mogelijk is.
2. De beschikbaarheid van *whole genome assemblies* van het menselijke genoom maakt van het mappen van *short-read* sequenties een sterke strategie.
3. Een steeds groter aantal verschillende moleculaire technieken maakt sequenceringsstechnieken mogelijk voor een groter aantal biologische fenomenen.
4. Technologische vooruitgang in verschillende domeinen, zoals microscopie, biochemie en dergelijke, laat alternatieve strategieën voor DNA sequenceringsstechnieken mogelijk toe.

Bij NGS wordt het doelwit-DNA gesequeneerd door herhaalde cycli van enzymatische manipulatie en datacollectie gebaseerd op beeldvormingstechnieken. De commercieel beschikbare NGS-platformen zijn momenteel: de 454 technologie (Roche Applied Science), Solexa technologie (*Illumina Genome Analyzer*), het SOLiD platform (Applied Biosystems), de Polonator (Dover/Harvard) en de *HeliScope Single Molecule Sequencer* technologie (Helicos) [26].

De ontwikkeling en snelle evolutie van deze technologieën wordt gestimuleerd door onder andere de *Advanced Sequencing Technology Development Award*, de *X PRIZE foundation* en het *Personal Genome Project (bijlage 1)* [29-31].

### 1.2.1. Principe van NGS

Hoewel de verschillende platformen een verschillende sequenceringsbiochemie hebben, is de werkwijze zeer gelijkaardig. Een staalbibliotheek wordt aangemaakt door willekeurige fragmentatie van DNA, gevolgd door een ligatie van adaptoren. Vervolgens worden de fragmenten clonaal geamplificeerd om clusters te vormen. De sequeneringstechniek bestaat uit alternerende cycli van enzym-gedreven biochemische reacties en een beeldvorming-gebaseerde verzameling van data. De sequeneringstechniek zelf wordt gekenmerkt door ‘*sequencing by synthesis*’, dit is een seriële extensie van doelwit-DNA met behulp van een primer. Het enzym dat deze reactie drijft kan een polymerase of een ligase zijn. Per cyclus wordt de *array* gevisualiseerd en worden de gegenereerde data verzameld (*figuur 6*) [26].



**Figuur 6: Werkwijze van conventionele sequenering en NGS.**

(a) *Shotgun* Sanger sequenering. Het doelwit genomische DNA wordt gefragmenteerd en gecloneerd in een plasmide vector. Deze vector wordt gebruikt om *E. coli* te transformeren. Het plasmide DNA wordt vervolgens uit de bacteriële kolonies geïsoleerd. Als alternatief kan het doelwit-DNA geamplificeerd worden met behulp van PCR. Tijdens de eigenlijke sequeneringsreactie worden fluorescent gelabelde ddNTPs in ondermaat toegevoegd aan een mengsel van vier niet-gelabelde dNTPs en DNA polymerase. Bij het inbouwen van een ddNTP stopt de elongatie. Vervolgens wordt met behulp van capillaire elektroforese de plaats van de ingebouwde nucleotide bepaald. Het fluorescente label bepaalt de aard van de ingebouwde nucleotide.

(b) Het doelwit DNA wordt gefragmenteerd en aan adaptoren geligeerd. Vervolgens worden deze fragmenten clonaal geamplificeerd, resulterend in kolonies, ook wel ‘*polonies*’ genoemd. De kolonies worden cyclisch en in parallel gesequeneerd en gevisualiseerd [26].

De verschillende platformen hebben uiteraard elk hun eigen specificaties (*tabel 3*).

**Tabel 3: Verschillende specificaties per platform [28,32-35].**

Platform (firma)	Staal-bibliotheek aanmaken	NGS chemie	Leeslengte (bp)	Tijd per run (dagen)	Kostprijs toestel (USD)	Accuraatheid
454 GS FLX Titanium (Roche)	Emulsie PCR	Pyrosequencing	250-450	0,35	500.000	≥ 99,5%
Solexa GA <sub>II</sub> (Illumina)	<i>Bridge amplification</i>	Reversibele terminatoren	75-100	2-9,5	540.000	≥ 99 %
SOLiD 3 (Applied Biosystems)	Emulsie PCR	Ligatie met kliefbare probes	50	7-14	595.000	≥ 99,94 %
Polonator (Dover/Harvard)	Emulsie PCR	Ligatie met niet-kliefbare probes	26	5	170.000	≥ 98 %
HeliScope (Helicos)	Emulsie PCR	Reversibele terminatoren	25-55	8	999.000	≥ 99,99 %

NGS wordt gekenmerkt door een lagere kostprijs en een hogere *throughput* in vergelijking met conventionele (Sanger) sequenceringsmethoden. De kostprijs per 1000 basen bijvoorbeeld is theoretisch 1,5 euro voor het Illumina platform. Voor de Sanger methode kost het sequencen per fragment 2 euro [26].

### 1.2.2. Illumina (Solexa) Genome Analyzer (GA<sub>IIe</sub>)

Het Solexa sequenceringsplatform is sinds 2006 commercieel beschikbaar. Begin 2007 werd het bedrijf Solexa overgenomen door Illumina en door deze samenwerking is het *Illumina Genome Analyzer* platform tot stand gekomen [32,36].

Het werkingsmechanisme van dit NGS platform bestaat uit drie grote delen. De eerste stap, het aanmaken van een staalbibliotheek, is verschillend voor de verschillende soorten startmateriaal: genomisch DNA (gDNA), PCR-product (amplicon), RNA en CHIP<sup>1</sup>-DNA. Op dit startmateriaal kunnen twee types sequencing uitgevoerd worden: *single-read* en *paired-end* sequencing. Door gebruik te maken van *multiplex identifiers* (MIDs) of indexen, korte nucleotide adaptoren toegevoegd aan het einde van een DNA fragment, kunnen verschillende patiënten in één baan van een run samen gesequeneerd worden. Momenteel zijn er 96 indexen beschikbaar voor de *Illumina (Solexa) Genome Analyzer* [32]. In deze masterproef zullen 12 indexen gebruikt worden.

Onderstaand wordt aan de hand van figuur 9 *single-read* sequencing van gDNA beschreven.

<sup>1</sup> Chromatine immunoprecipitation (ChIP) is selectief voor DNA gebonden aan een eiwit.



## 1. BIBLIOTHEEK AANMAKEN

*Fragmentatie – ligatie.* Gezuiverd gDNA wordt gefragmenteerd met behulp van de Covaris Adaptive Focused Acoustics™, of Covaris AFA™, tot een lengte van 300 baseparen (bp) (A). Op deze fragmenten wordt *end-repair* uitgevoerd met behulp van een T4 DNA polymerase en een *Klenow* enzym. De uiteinden van de fragmenten worden *blunt end* gemaakt door de 3'-overhang te verwijderen en de 5'-overhang aan te vullen. Een adenosine wordt aan het 3'-uiteinde toegevoegd (B). Tijdens de TA-ligatiestap waarbij een adaptor aan het fragment wordt geligeerd verhindert dit adenosine zelfligatie van het fragment en bevordert het de ligatie aan de adaptor die een 3'-thymine overhang bevat (C). Het ligatieproduct wordt gezuiverd op een agarosegel. Ongeligerde adaptoren en adaptordimeren worden verwijderd. Door het uitsnijden van een 2 millimeter breed gelbandje wordt een *size selection* of grootte selectie op de fragmenten uitgevoerd. Enkel fragmenten van de gewenste grootte worden uitgesneden.

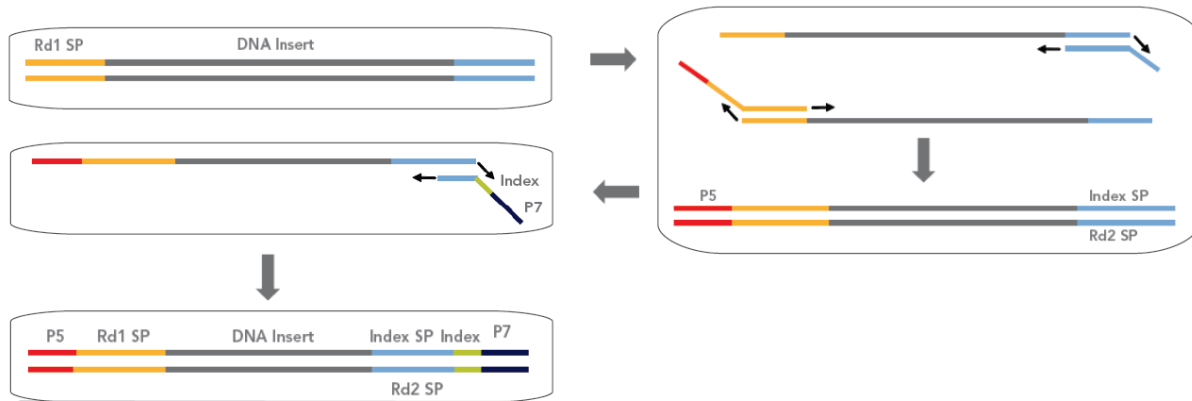
*Amplificatie.* Met behulp van PCR-amplificatie wordt het DNA aangereikt. Deze amplificatie heeft vier belangrijke doelstellingen:

1. De geamplificeerde fragmenten bevatten sequenties die hybridisatie aan de primers, gebonden op de *flow cell*, mogelijk maken.
2. Enkel fragmenten met adaptoren aan beide uiteinden worden geamplificeerd.
3. Adaptordimeren worden geëlimineerd.
4. Deze stap zorgt voor voldoende materiaal voor kwantificatie van de uiteindelijke staalbibliotheek.

Bij multiplexen worden fragmenten van indexen voorzien tijdens deze PCR. Dit gebeurt met behulp van een '3-primer' PCR (*figuur 7*). Het reactiemengsel van deze PCR bevat naast dNTPs, polymerase en buffer drie verschillende primers:

1. De rood-gele primer bevat een *bridge amplification* sequentie (rood), nodig voor amplificatie.
2. De blauwe primer bevat een extra sequentie, nodig voor het inbouwen van de indexen die aanwezig zijn in de blauw-groen-zwarte primer.
3. De blauw-groen-zwarte primer bevat dezelfde extra sequentie als in de blauwe primer, een index (groen) en een *bridge amplification* sequentie (zwart) nodig voor amplificatie.

De complementaire sequentie van de sequenceringsprimer bevindt zich reeds in de adaptoren (geel en blauw).



**Figuur 7: 3-primer PCR** met adaptorsequenties (geel en blauw) en de drie verschillende primers [32].

De grootte van dit aangerijkt product wordt geanalyseerd met de Agilent 2100 Bioanalyser [37]. Met behulp van de FLUOstar OPTIMA wordt de concentratie bepaald (D) [38]. Het dubbelstrengige DNA wordt gedenatureerd met behulp van natriumhydroxide en verdund tot een concentratie van ongeveer 6 pM [32].

## 2. VORMING DOELWIT-DNA CLUSTERS

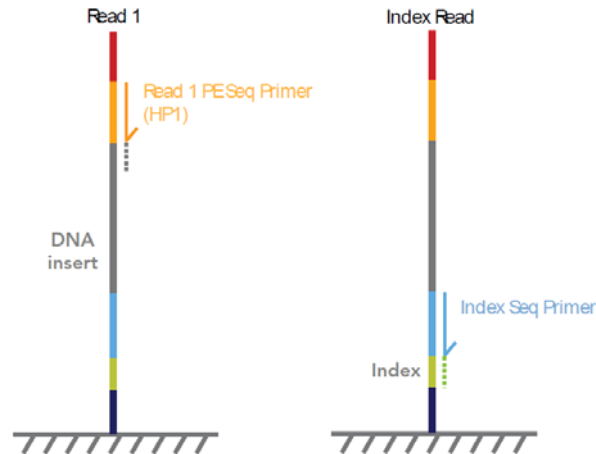
In het ‘*Cluster Station*’ vindt de vorming van doelwit-DNA clusters plaats. Het enkelstrengig DNA van de staalbibliotheek hybridiseert aan een *single-molecule array*, ook wel een *flow cell* genoemd. Deze *flow cell* is *gecoat* met twee verschillende oligonucleotidesequenties, de primers die complementair zijn aan de adaptoren. Vanaf deze primer elongeert een DNA-polymerase het gehybridiseerd fragment. Het dubbelstrengige DNA wordt gedenatureerd en de originele streng wordt weggewassen. De nieuwe streng is covalent gebonden aan het *flow cell* oppervlak (E).

Het DNA van de nieuwe streng buigt om en het vrije uiteinde van het fragment hybridiseert aan de complementaire primersequentie op de *flow cell*, zodat het fragment als het ware een ‘brug’ vormt. Tijdens de *bridge amplification* verlengt een polymerase het fragment en een dubbelstrengige brug wordt gevormd (F). Het DNA wordt gedenatureerd. Deze stappen worden gedurende verschillende cycli herhaald. De gevormde amplicons clusteren samen op één punt op de *flow cell*. Het dubbelstrengige DNA wordt een laatste maal gedenatureerd en het DNA dat niet covalent gebonden is aan een primer, wordt weggewassen. Zo worden clusters van enkelstrengig DNA, met een 5’- naar 3’-oriëntatie, gevormd. Deze stap heet ‘linearisatie’ (G). Meer dan 40 miljoen van dergelijke clusters kunnen zo gevormd worden, met elk ongeveer 1.000 clonale kopijen van het doelwit DNA-fragment [26,32]. Na deze linearisatie volgt de ‘*combined blocking*’. Het 3’-uiteinde van de DNA-fragmenten wordt geblokkeerd zodat de fragmenten niet meer kunnen ombuigen en een brug vormen met de

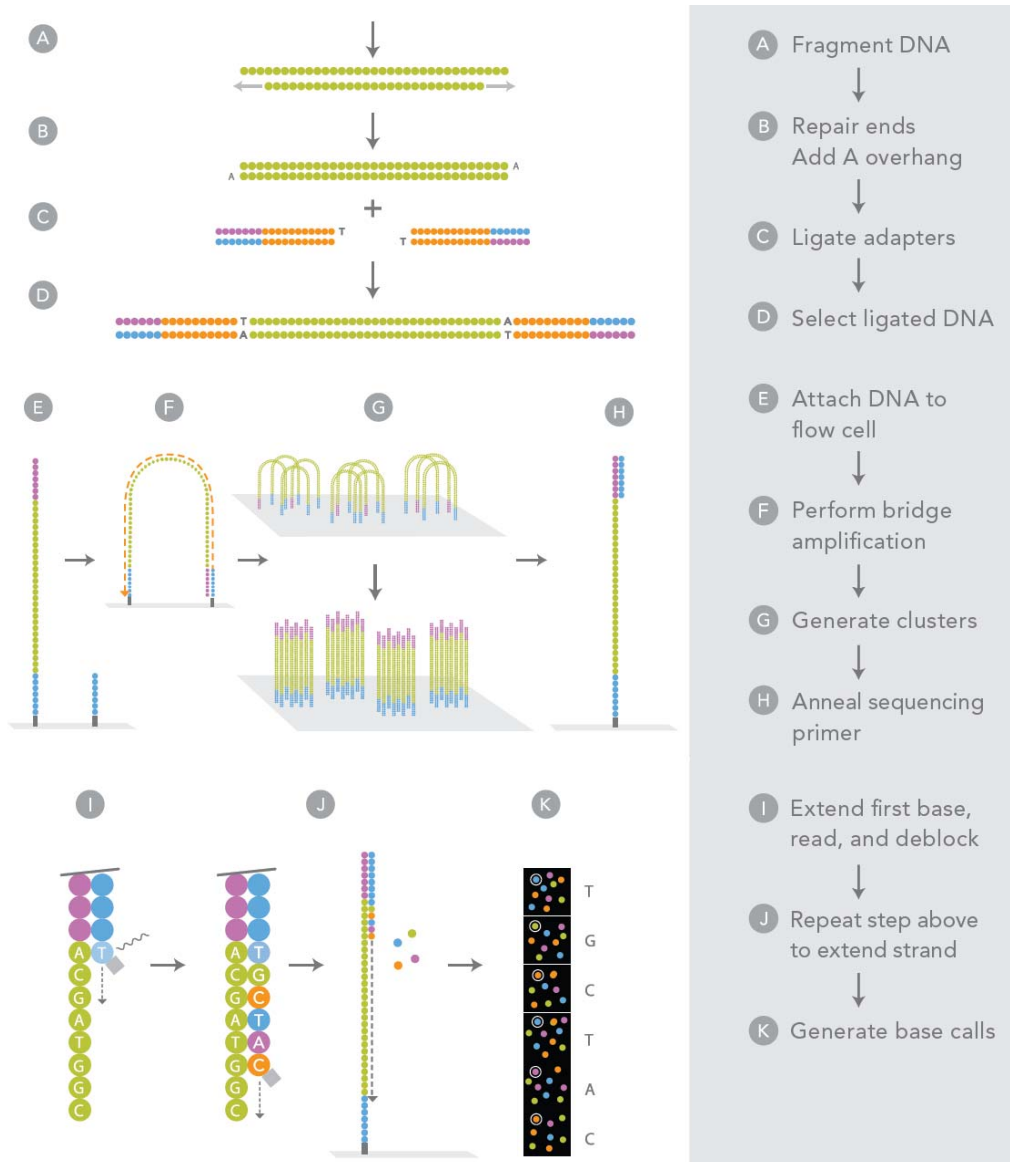
complementaire primersequentie. De laatste stap op het ‘*Cluster Station*’ is de hybridisatie van de sequenceringsprimer aan de adaptorsequentie die de doelwitsequentie flankeert (H) [32].

### 3. SEQUENEREN

De sequenering zelf gebeurt in de *Illumina Genome AnalyzerIIe*. De sequenering is gebaseerd op de ‘*sequencing-by-synthesis*’ technologie, waarbij iedere cyclus bestaat uit de extensie met één base. Sequenceringsreagens wordt over de *flow cell* aangebracht. Dit reagens bevat de vier ‘*reversible terminator*’ nucleotiden en gemodificeerd DNA-polymerase. Het gemodificeerd DNA-polymerase bouwt één van de vier nucleotiden in. De gebruikte nucleotiden bevatten op het 3’-uiteinde een terminatorgroep, zodat er slechts één nucleotide per cyclus geïncorporeerd kan worden. Het zijn ‘*reversible terminators*’ of omkeerbare terminatoren. De verschillende nucleotiden dragen ook elk één van de vier verschillende fluorescente labels. Na incorporatie wordt het nucleotide gelocaliseerd en geïdentificeerd met behulp van zijn fluorescent label en een *Charged Coupled Device (CCD)* camera. De terminator groep en het fluorescente label worden afgesplitst, waarna de cyclus zich herhaalt (I-K) [26,36]. De indexen worden in een extra stap gesequeneerd (*figuur 8*). De volgorde van de 6 basen bepaalt de identiteit van het staal [32].



**Figuur 8:** (A) De sequenceringsprimer hybridiseert aan de complementaire nucleotidesequentie (geel). (B) De index primer hybridiseert in een tweede sequenceringscyclus aan diens complementaire nucleotidesequentie (groen). Zeven sequenceringsreacties bepalen de volgorde van de 6 basen en aldus de identiteit van het staal [32].



**Figuur 9: Workflow Illumina (Solexa) Genome Analyzer [32].**

Per run worden 80 tot 100 miljoen sequenties per *flow cell* in parallel gesequeneerd. Eén *flow cell* bevat 8 lanen waarop met behulp van indexen 12 verschillende stalen kunnen aangebracht worden. Dit resulteert in een hoge *throughput*, tot 20 gigabasen. De maximale leeslengte bedraagt momenteel 2 maal 100 bp. Deze leeslengte wordt bereikt met de *paired-end* methode [32,35]. Met een accuraatheid groter dan 99% is de Illumina een uiterst efficiënt sequenceringsplatform. Vooral bij het sequencen van homopolymeren heeft de Illumina een voordeel ten opzichte van de andere platformen [32].

### 1.3 Doelstelling en werkplan van deze masterproef

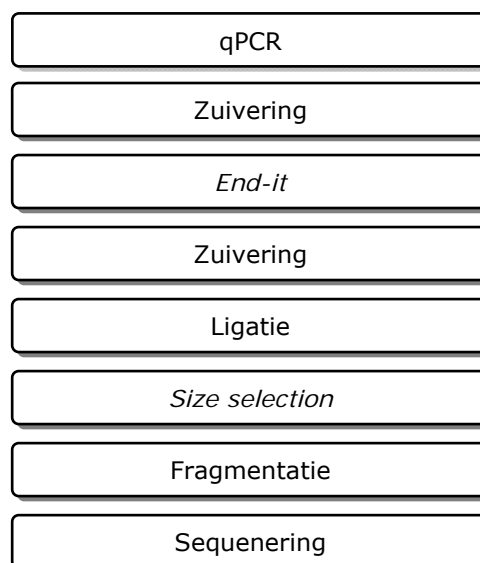
Erfelijke netvliesandoeningen worden gekenmerkt door een grote genetische heterogeniteit, hetgeen een moleculaire diagnose van deze aandoeningen bemoeilijkt. De huidige mutatiedetectie methoden voor deze aandoeningen zijn duur, arbeidsintensief en hebben een relatief lage klinische sensitiviteit, afhankelijk van de indicatie en populatie. De lagere kostprijs en hogere doorvoer van NGS ten opzichte van de conventionele mutatiedetectie methoden kan een oplossing bieden. Een moleculaire diagnose is nochtans van groot belang voor het inschatten van de prognose van de aandoening, voor reproductieve beslissingen en niet in het minst voor toekomstige retinale genterapie.

De algemene doelstelling van deze masterproef was het ontwikkelen van een piloot NGS platform voor een selectie van erfelijke netvliesandoeningen.

De specifieke doelstelling was hoge doorvoer en parallelle sequentie-analyse van 21 ziektegenen betrokken bij:

1. Leber Congenitale Amaurosis (LCA): *AIPL1, CEP290, CRB1, CRX, GUCY2D, IMPDH1, IQBC1(NPHP5), LCA5, LRAT, MERTK, RD3, RDH12, RPE65, RPGRIP1, SPATA7* en *TULP1*.
2. Retinitis pigmentosa (RP): *CRX, IMPDH1, LRAT, MERTK, RPE65, SPATA7, TULP1, USH2A* en *ABCA4*
3. Usher type IIA: *USH2A*
4. Maculaire dystrofieën: *ABCA4, BEST1, PRPH2 (RDS), TIMP3*

Hiertoe werd een protocol ontwikkeld voor amplicon sequencing op het Illumina NGS platform, bestaande uit volgende onderdelen:



## 2. Materiaal en Methoden

### 2.1 Kwantitatieve polymerase ketting reactie (qPCR)

#### 2.1.1. Principe

Polymerase ketting reactie laat de selectieve amplificatie toe van een doelwit nucleotide sequentie. Dit wordt mogelijk gemaakt door de hybridisatie van primers op het doelwit-DNA. De primers worden zo gekozen dat de synthese van de nieuwe streng aan een primer in de richting van de bindingsplaats van de andere primer is. Deze gevormde strengen kunnen op hun beurt als doelwit voor een nieuwe synthese gebruikt worden wat een kettingreactie veroorzaakt met een exponentiële aanmaak van PCR-product [18].

Een conventionele PCR bestaat uit een cyclische herhaling van drie onderdelen:

- Denaturatie van het DNA bij een temperatuur tussen 93 en 96 graden Celcius (°C).
- Primerbinding bij een temperatuur tussen 50 en 70 °C, afhankelijk van de smelttemperatuur van de gevormde duplex.
- Elongatie of DNA synthese. De primers initiëren de synthese van een nieuwe complementaire DNA-streng door middel van een DNA-polymerase in aanwezigheid van de vier dNTPs [18,39].

Deze cycli vinden plaats in een ‘*thermal cycler*’ waarin de duur en de temperatuur van iedere stap geprogrammeerd kan worden [39].

Kwantitatieve PCR (qPCR), ook wel *real-time* PCR genoemd, combineert deze DNA amplificatie met het onmiddellijk, in *real-time*, detecteren van product. Door de aanwezigheid van primers, oligonucleotide probes gelabeld met een fluorofoor of door gebruik te maken van een intercalerende kleurstof wordt de onmiddellijke detectie van het amplicon mogelijk gemaakt. De grootte van het fluorescent signaal is gerelateerd met de hoeveelheid amplicon aanwezig in de reactie tijdens de cyclus [39].

#### 2.1.2. DNA stalen

Volgende stalen worden gebruikt om de testen uit te voeren:

- *Human genomic DNA* van de firma Roche [40]. Dit product bevat DNA van hoog moleculair gewicht (>50 kilobasen) geïsoleerd uit leukocyten.
- Een controle DNA staal van een LCA-patiënt met mutaties in *CEP290*.

### 2.1.3. Primers

#### 2.1.3.1. Primerdesign

Voorafgaand aan een qPCR moeten primers ontworpen worden. Deze primers zorgen voor een specifieke amplificatie van een doelwit nucleotidesequentie. De primers gebruikt in deze masterproef werden ontworpen met behulp van PrimerXL, een in huis ontwikkeld hoge doorvoer *primerdesign pipeline* [41].

De primers worden ontworpen volgens qPCR condities. Ze bevinden zich in een regio tot 400 basen stroomop- en afwaarts van het exon en voldoen aan de volgende voorwaarden:

- Intronische sequentie: Naast het exon moeten de primers ook minstens 40 basen intronische sequentie 5' en 3' van het exon overspannen.
- Overlap: Indien een fragment opgesplitst wordt in verschillende amplicons bedraagt de overlap tussen deze amplicons minstens 20 basen.
- Primerlengte: een optimale lengte van 20 basen, een minimum en maximum lengte van respectievelijk 16 en 30 basen.
- Ampliconlengte: verschillende minimum en maximum ampliconlengtes worden gebruikt:
  - 250 – 500 basen (gebruikt voor de qPCR-testen)
  - 500 – 1500 basen (gebruikt voor de qPCR-testen)
  - 60 – 400 basen (gebruikt voor het finaal *design*)
  - 60 – 600 basen (gebruikt voor het finaal *design*)
- Primer T<sub>m</sub>: een optimale primer smelttemperatuur (T<sub>m</sub>) van 60 °C, een minimum en maximum T<sub>m</sub> van respectievelijk 57 °C en 63 °C. Het verschil in T<sub>m</sub> tussen de *forward* en *reverse* primer bedraagt maximum 2 °C.
- Primer GC%: een optimaal primer GC-percentages van 50%, een minimum en maximum primer GC-percentages van respectievelijk 30% en 80%.
- Primer SNP: Er werden geen SNPs toegelaten in de primer.
- Secundaire structuren: er werden geen *loops* toegelaten in de primers en de Gibbs vrije energie werd zo laag mogelijk gehouden.

Voor amplicons waarvoor geen primers konden ontworpen worden volgens bovenstaande voorwaarden, worden primers ontworpen volgens alternatieve voorwaarden gebruikt:

- Ampliconlengte: verschillende alternatieve minimum en maximum ampliconlengtes worden gebruikt:

- 60 - 800 basen voor de amplicons MERTK\_extra\_E9EnsD, MERTK\_extra\_E12A en MERTK\_extra\_E12B.
  - 110 - 450 basen voor het amplicon IMPDH1\_400\_E17A.
  - 110 - 650 basen voor het amplicon MERTK\_600\_E19C.
  - 110 – 700 basen voor het amplicon TULP1\_600\_E15B.
  - 210 - 550 basen voor de amplicons CEP290\_IVS26 en MERTK\_400\_E18EnsB.
- Primer Tm: De *reverse* primer van het amplicon RDH12\_400\_E1NCBI heeft een smelttemperatuur van 45 °C.

De gebruikte primer*designs* en primerparen zijn terug te vinden in *bijlage 2*.

Door de combinatie van het ‘lange’ en het ‘korte’ primer*design* daalt het totaal aantal geselecteerde amplicons, het totaal aantal baseparen en bijgevolg de kostprijs voor primers, qPCR en sequenering (*bijlage 2.3*). De primers uit het 400 en het 600 *design* worden aan de hand van BED files ingeladen in de USCS genome browser en manueel geselecteerd [42].

- Het 400 *design* wordt gekozen indien het 400 en het 600 *design* één amplicon omvat.
- Het 600 *design* wordt gekozen indien het 400 *design* twee amplicons en het 600 *design* één amplicon omvat.
- Een manueel geselecteerde combinatie van de *designs* wordt gebruikt indien een exon werd opgesplitst in verschillende fragmenten in beide *designs*.

### 2.1.3.2. Primerverdunning

Voor het verdunnen van de primers wordt gewerkt met de TECAN EVO<sup>®</sup> pipetteerrobot [43]. Deze robot laat toe om met een hoge capaciteit, een hoge reproduceerbaarheid en een hoge accuraatheid primers te verdunnen.

**Tabel 4: De concentratie van werkoplossingen per *mastermix*.** Dit is de concentratie waarnaar de *stock* primers verdund worden. Door toevoeging van 1 tot 2 µl primer aan de mix van *mastermix*, DNA en water wordt de eindconcentratie bereikt. Er wordt gestreefd naar een volume van 2µl voor 1 reactie. Dit volume is beter pipetteerbaar door de TECAN EVO<sup>®</sup> pipetteerrobot.

	Concentratie Werkoplossing	Volume voor 1 reactie	Eindconcentratie
EUROGENTEC	1,5 µM	1,25 µl	0,25 µM
	0,5 µM	2 µl	0,2 µM
KAPA	1,5 µM	1 µl	0,2 µM
	1 µM	1 µl	0,2 µM
BIORAD	1,5 µM	1,25 µl	0,25 µM
	0,625 µM	2 µl	0,25 µM
QUANTA	1,5 µM	1,25 µl	0,25 µM



De primers worden met RNase-vrij water verdund tot de concentratie nodig voor de qPCR volgens de specificaties van de gebruikte *mastermix* (tabel 4). Voor de aanmaak van lage primerconcentraties (0,5 en 0,625  $\mu\text{M}$ ) wordt eerst naar een tussenoplossing van 20  $\mu\text{M}$  verdund.

#### 2.1.4. Mastermixen

Vier verschillende qPCR *mastermixen* worden gebruikt: De *custom made mastermix* (Eurogentec), de KAPA SYBR<sup>®</sup> Fast, de SsoFast<sup>™</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix (BioRad) en de PerfeCta<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green SuperMix (Quanta). Deze *mastermixen* bevatten het polymerase, de intercalerende fluorescente stof, de dNTPs, de buffer en de zouten. Iedere *mastermix* heeft zijn eigen specificaties (tabel 5).

**Tabel 5: Samenstelling van de reactiemengsels van de verschillende *mastermixen*.** Vier *mastermixen* worden gebruikt: Eurogentec, KAPA SYBR<sup>®</sup> Fast, SsoFast<sup>™</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix (BioRad) en PerfeCta<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green SuperMix (Quanta). Per *mastermix* wordt het volume, eindvolume en de eindconcentratie van iedere component vermeld.

EUROGENTEC					
3,75 $\mu\text{l}$	<i>Mastermix</i> buffer	1x	2,5 $\mu\text{l}$	<i>Mastermix</i> buffer	1x
1 $\mu\text{l}$	Doelwit DNA	0,7 ng/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	Doelwit DNA	0,8 ng/ $\mu\text{l}$
1,5 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O		0,5 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O	
1,25 $\mu\text{l}$	Primer mix F/R	0,25 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	Primer mix F/R	0,2
7,5 $\mu\text{l}$	TOTAAL		5 $\mu\text{l}$	TOTAAL	

KAPA					
3,75 $\mu\text{l}$	<i>Mastermix</i> buffer	1x	2,5 $\mu\text{l}$	<i>Mastermix</i> buffer	1x
1 $\mu\text{l}$	Doelwit DNA	0,7 ng/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	Doelwit DNA	0,7 ng/ $\mu\text{l}$
1,75 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O		0,5 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O	
1 $\mu\text{l}$	Primer mix F/R	0,2 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$	Primer mix F/R	0,2
7,5 $\mu\text{l}$	TOTAAL		5 $\mu\text{l}$	TOTAAL	

BIORAD					
3,75 $\mu\text{l}$	<i>Mastermix</i> buffer	1x	2,5 $\mu\text{l}$	<i>Mastermix</i> buffer	1x
1 $\mu\text{l}$	Doelwit DNA	0,7 ng/ $\mu\text{l}$	0,35 $\mu\text{l}$	Doelwit DNA	0,7 ng/ $\mu\text{l}$
1,5 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O		0,15 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O	
1,25 $\mu\text{l}$	Primer mix F/R	0,25 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{l}$	Primer mix F/R	0,625 $\mu\text{M}$
7,5 $\mu\text{l}$	TOTAAL		5 $\mu\text{l}$	TOTAAL	

QUANTA			
3,75 $\mu\text{l}$	<i>Mastermix</i> buffer		1x
1 $\mu\text{l}$	Doelwit DNA		0,7 ng/ $\mu\text{l}$
1,5 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O		
1,25 $\mu\text{l}$	Primer mix F/R		0,25 $\mu\text{M}$
7,5 $\mu\text{l}$	TOTAAL		

#### 2.1.5. qPCR-protocol

Alle qPCRs worden uitgevoerd met de LightCycler<sup>®</sup> 480 van de firma Roche [40].

De stappen die voor een qPCR uitgevoerd moeten worden staan beschreven in *bijlage 3*.

### 2.1.6. Data-analyse

Data-analyse van de qPCR gebeurt aan de hand van de volgende referentiewaarden:

- De *quantification cycle* (Cq). De Cq-waarde is het punt waar de fluorescentie een vooraf bepaalde drempelwaarde overschrijdt.
- De eindpuntfluorescentie.
- De qPCR-efficiëntie.
- De specificiteit van de amplificatie.
- De amplicon lengte.
- Het amplicon nucleotide percentage.

Volgende programma's worden gebruikt:

- De qPCR-efficiëntie wordt berekend met behulp van *real-time PCR miner* [44]. Deze berekeningen zijn gebaseerd op de *single-curve amplification* techniek en zijn onafhankelijk van een standaardcurve.
- R, een programmeertaal en grafisch programma voor statistische analyse werd gebruikt voor de analyse van de data en de aanmaak van grafieken [45].
- Voor de analyse van de specificiteit wordt gebruik gemaakt van de Caliper in combinatie met het programma [mellfire.ugent.be/brdwilde/Sandbox/](http://mellfire.ugent.be/brdwilde/Sandbox/).

## 2.2 Poolen van de amplicons

Na de qPCR en voorafgaand aan de eerste zuiveringsstap worden de amplicons gegroepeerd.

Volgende stappen worden doorlopen:

- Vortex en centrifugeer de 384-*well* qPCR platen 10 minuten op 1500 rpm.
- Pipetteer per *well* eenzelfde volume qPCR-product, 3 of 4  $\mu$ l, samen in een 1,5 ml epje.
- Vortex en centrifugeer kort vooraleer de volgende stappen aan te vangen.

## 2.3 Zuivering

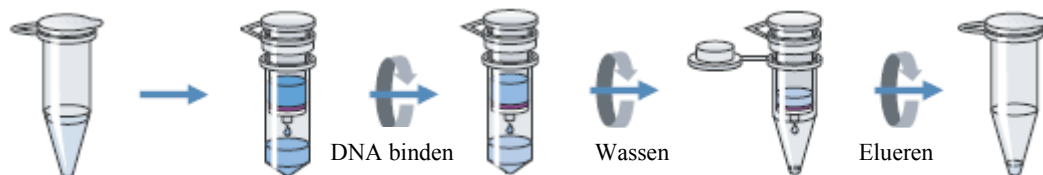
### 2.3.1. Principe

Door middel van een zuiveringsreactie worden overtollige primers, nucleotiden, polymerasen en zouten verwijderd zodat zuiver DNA bekomen wordt. Voor de zuivering worden zuiveringskolommen van QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) gebruikt [46].

De zuivering gebeurt in drie stappen (*figuur 10*):

1. Onder de juiste zuurtegraad (pH) en zoutconcentratie adsorbeert het DNA aan het silica membraan van de kolom. Onzuiverheden zoals primers, nucleotiden, enzymen, agarose, kleurstoffen, olie, detergenten en zouten adsorberen niet maar stromen door het membraan van de kolom, in het opvangreservoir.
2. Overgebleven zouten en buffer worden gewassen met behulp van een tweede, ethanolhoudende buffer.
3. Het gezuiverde DNA wordt geëluëerd in Tris-buffer.

Met deze kolommen kan tot 10 µg DNA met een grootte van 100 basen tot 10 kilobasen gezuiverd worden met een opbrengst van 95% [46].



**Figuur 10: Werkwijze van de QIAquick zuiveringskolom.** Stap 1: DNA wordt aangebracht op het silica membraan, terwijl onzuiverheden doorstromen. Stap 2: Overgebleven zouten en buffer uit stap 1 worden gewassen. Stap 3: DNA wordt geëluëerd in Tris-buffer [46].

### 2.3.2. Protocol

De stappen doorlopen voor een zuiveringsreactie met de QIAquick zuiveringskolommen zijn beschikbaar in *bijlage 4*.

## 2.4 Concentratiebepaling

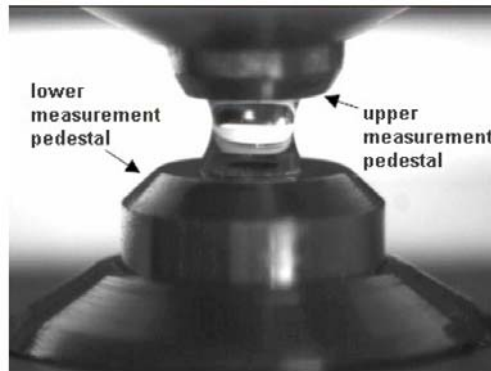
### 2.4.1. NanoDrop® ND-1000

#### 2.4.1.1. Principe

Door middel van de NanoDrop technologie kan de concentratie van DNA, RNA, eiwit en andere biomoleculen bepaald worden. Het is een spectrofotometrisch systeem dat zowel het ultra violet (UV) als het zichtbaar spectrum bevat. De golflengten 260 en 280 nm en de ratio 260/280 zijn belangrijk voor DNA meting en het bepalen van de zuiverheid.

Het staal, met een volume tussen 1 en 2 µl, wordt aangebracht op het contactpunt van het voetstuk van de Nanodrop. Met behulp van oppervlaktespanning, gegenereerd door een lichte druk tussen de contactpunten van het voetstuk en de staalarm, vormt het staal een kolom (*figuur 11*). Vervolgens wordt de spectrummeting uitgevoerd door twee optische vezels aanwezig in de contactpunten. De optische vezel in het voetstuk zendt licht uit van een Xenon

lamp. Het spectrum wordt gemeten in de optische vezel in de staalkolom die een spectrofotometer met CCD *array* bevat [47].



**Figuur 11: Staalkolom op de NanoDrop® ND-1000.** Het onderste voetstuk bevat een optische vezel met Xenon lamp. De staalkolom bevat een optische vezel met spectrofotometer [47].

#### 2.4.1.2. Protocol

Voor het bepalen van de DNA concentratie wordt de NanoDrop® ND-1000 van de firma NanoDrop technologies gebruikt [47]. De doorlopen stappen zijn beschikbaar in *bijlage 5*.

### 2.4.2. Molecular Probes PicoGreen® Assay op de FLUOstar OPTIMA

#### 2.4.2.1. Principe

Met de FLUOstar OPTIMA, van de firma BMG LABTECH [38], kan een staal gedetecteerd worden door middel van vier verschillende methoden: meten van de fluorescentie intensiteit, luminescentie, *time-resolved* fluorescentie en de UV/Vis absorptie. Bij gebruik van PicoGreen® probes wordt de fluorescentie intensiteit gemeten. De probes binden bij de juiste zoutconcentratie zeer specifiek aan dubbelstrengig DNA. De FLUOstar OPTIMA meet de fluorescentie van een staal met behulp van een Xenon lamp en een *photomultiplier tube*, een zeer specifieke detector voor 240-900 nm licht. Een controlestaal wordt steeds meegelopen in verschillende verdunningen, om een standaardcurve te kunnen opstellen. De exacte concentratie DNA wordt aan de hand van deze curve bepaald.

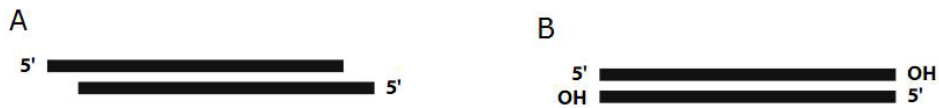
#### 2.4.2.2. Protocol

De stappen doorlopen voor het bepalen van de DNA concentratie door middel van de Molecular Probes PicoGreen® Assay op de FLUOstar OPTIMA zijn beschikbaar in *bijlage 6*.

## 2.5 A/T additie

### 2.5.1. Principe

Het doel van deze reactie is de conversie van *blunt end*-fragmenten naar *sticky end*-fragmenten met behulp van een *Taq* polymerase. Dit polymerase bouwt 5' en 3' extra dNTPs in. Afhankelijk van het toegevoegd dNTP, adenosine (A) of thymidine (T), ontstaat een A of T overhang. Fragmenten met zo'n overhang worden *sticky end*-fragmenten genoemd en hebben een hogere ligatie-efficiëntie dan fragmenten zonder deze overhang, de *blunt end*-fragmenten.



**Figuur 12: Sticky versus blunt end-fragmenten.** (A) *Sticky end*-fragmenten met een 5'-overhang. (B) *Blunt end*-fragmenten zonder overhang.

### 2.5.2. Protocol

De stappen die doorlopen worden voor een A/T additie zijn beschikbaar in *bijlage 7*.

## 2.6 End-it reactie

### 2.6.1. Principe

De *end-it* reactie is een ligatie-gebaseerde additie van nucleotiden aan de uiteinden van een fragment. Hierdoor worden *sticky ends* omgezet naar *blunt ends* (*figuur 12*). Deze reactie gaat de eigenlijke ligatie vooraf.

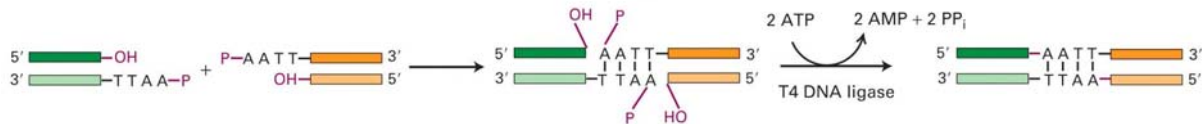
### 2.6.2. Protocol

Voor de *end-it* reactie wordt gebruik gemaakt van de *End-It™ DNA End-Repair Kit* van de firma Epicentre Biotechnologies [48]. Deze kit laat toe om DNA-fragmenten met *sticky ends*, *blunt ended* te maken. Het gebruikte protocol is beschikbaar in *bijlage 8*.

## 2.7 Ligatiereactie

### 2.7.1. Principe

Een DNA-ligase is een enzym actief tijdens de DNA-replicatie. Het enzym katalyseert met behulp van ATP de vorming van fosfodiësterbruggen tussen een 3'-OH en een 5'-PO<sub>4</sub> groep. Dit enzym kan ook gebruikt worden om DNA fragmenten covalent te binden. Deze fragmenten kunnen *sticky* of *blunt ends* hebben (*figuur 13*) [49].



**Figuur 13: Ligatie van twee DNA fragmenten met sticky ends.** Met behulp van T4 DNA ligase en 2 ATP moleculen worden de fragmenten geligeerd. Bij deze reactie worden 2 adenosine monofosfaten (AMP) en 2 pyrofosfaten (PPi) gevormd [49].

### 2.7.2. Protocol

De ligatie wordt uitgevoerd met de *Fast-Link™ DNA Ligation Kit* van de firma Epicentre Biotechnologies [48]. Deze kit is ontworpen om DNA snel en efficiënt in een vector te ligeren. In deze masterproef wordt de kit echter gebruikt om PCR-producten aan elkaar te ligeren. De doorlopen stappen zijn beschikbaar in *bijlage 9*.

### 2.7.3. Analyse

De ligatie-efficiëntie wordt getest met behulp van qPCR. Er wordt nagegaan welke amplicons aan elkaar geligeerd zijn en in welke mate ligatie plaats gevonden heeft.

Twee verschillende qPCR-protocollen en twee types primers worden gebruikt.

#### 2.7.3.1. Interne primers

Interne primers kunnen gebruikt worden om de efficiëntie van ligatie te testen. Deze primers overspannen het ligatiepunt van twee amplicons (*figuur 14*). Door amplificatie met behulp van qPCR wordt gecontroleerd welke amplicons geligeerd zijn en in welke mate de ligatie plaats gevonden heeft. De primers worden ontworpen met behulp van RTprimerDB. Via de *in silico* PCR van de UCSC Genome Browser en Primer-BLAST worden primers gecontroleerd op respectievelijk de aanwezigheid van SNPs en de specificiteit [42,50,51]. Veertien lange en tien korte amplicons worden geselecteerd. Ieder amplicon heeft maximum één interne primer (*bijlage 10*).



**Figuur 14: Interne primers.** (A) Primers van 2 amplicons. Oranje en blauwe primers van respectievelijk het eerste en tweede amplicon. (B) Het ligatieproduct van deze amplicons. De groene primers zijn interne primers die het ligatiepunt van de beide amplicons overspannen.

Als *mastermix* wordt KAPA SYBR® Fast met een eindvolume van 5 µl gebruikt in combinatie met het lange protocol (KAPA lang) (*tabel 5 en bijlage 3*).

### 2.7.3.2. Reverse complement primers

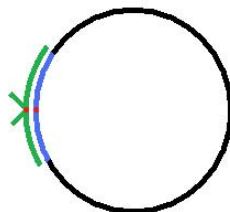
*Reverse complement* primers kunnen gebruikt worden om de efficiëntie van de ligatie te testen. Deze primers zijn het *reverse complement* van de originele primers van het amplicon. Bij een qPCR met deze primers wordt enkel het ligatiepunt van twee amplicons geamplificeerd (figuur 15). Zo wordt gecontroleerd welke amplicons geligeerd zijn en in welke mate de ligatie plaats gevonden heeft.

De primers worden ontworpen door het omgekeerde complement van de originele primers te nemen. Dit wordt gedaan met behulp van een *reverse complement* software op internet [52].



**Figuur 15: Reverse complement primers.** (A) Primers van 2 amplicons. Oranje en blauwe primers van respectievelijk het eerste en het tweede amplicon. (B) Het ligatieproduct van deze amplicons. De groene primers zijn de *reverse complement* primers van de blauwe en oranje primers.

De ontworpen set *reverse complement* primers bevat primers afgeleid van 32 *forward* en 32 *reverse* primers uit de 400 en 600 *primerdesigns*. De helft van de primers is afkomstig van het lange *design* (600 bp), de andere helft van het korte *design* (400 bp). De helft van de primers zijn ontworpen om zelfligatie te testen, dit is de ligatie van het 3'- en 5'-uiteinde van hetzelfde amplicon (figuur 16). Een kwart van de primers is afkomstig uit de onvertaalde regio's (UTRs) van het gen (bijlage 11).



**Figuur 16: Zelfligatie.** De 3' en 5' uiteinden van het amplicon zijn geligeerd aan elkaar. De groene primers kunnen gebruikt worden om zelfligatie te testen met behulp van qPCR.

De Eurogentec *mastermix* met een eindvolume van 5µl worden gebruikt in combinatie met het bijhorende qPCR-protocol (Eurogentec(RC)) (tabel 5 en bijlage 3). Met dit protocol is het enkel mogelijk om één ligatiepunt te detecteren. Verschillende aan elkaar geligeerde amplicons zullen niet geamplificeerd worden.

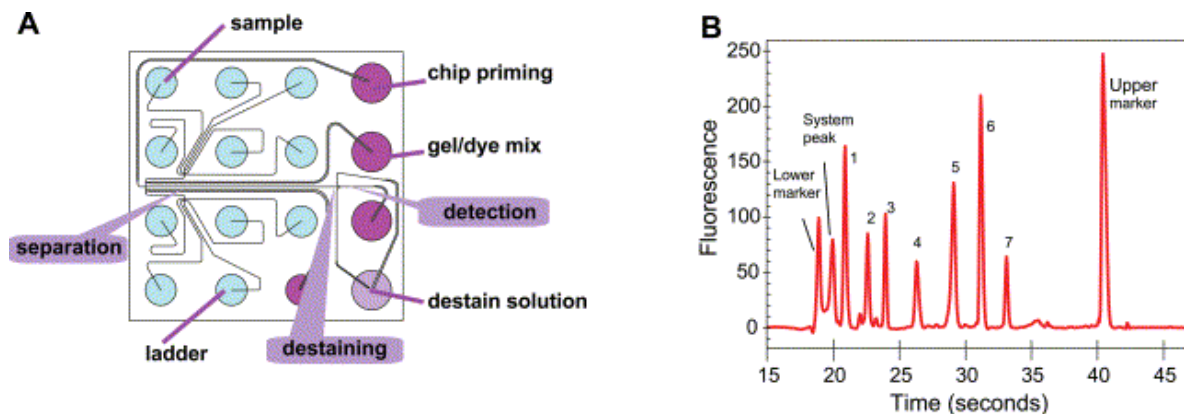
## 2.8 Microchip electroforese

### 2.8.1. Principe

Microchip technologie, ook wel *lab-on-chip* (LOC) of *micro Total Analysis System* ( $\mu$ TAS) genoemd, is gericht op het reduceren van processen tot zeer kleine dimensies. Ze worden gekenmerkt door kleine volumes staal, hoge doorvoer, relatief korte analysetijd en automatisatie van het proces. Deze technologie kan gebruikt worden voor de analyse van RNA, DNA en eiwit.

De microchip technologieën gebruiken *chips* bestaande uit twee samengebonden glazen platen. In één van de glazen platen zijn microkanalen geëtst. De andere plaat bevat reservoirs voor staal en buffer, met toegang tot de kanalen. Een *chip* omvat enkel functionele elementen, zoals systemen voor staalbehandeling, een scheidingskolom of een reactiesysteem en een detectiesysteem.

Microchip electroforese kan toegepast worden op DNA, RNA of gedenatureerde eiwitten negatief geladen door interactie met sodium dodecyl sulfaat (SDS)-moleculen. Met behulp van een stroom bewegen de fragmenten zich over de kolom. De kolom bevat polymeren die functioneren als ‘zeef’ zodat de fragmenten gescheiden worden volgens grootte (*figuur 17.A*). Een intercalerende fluorescente kleurstof kleurt de fragmenten zodat ze gedetecteerd kunnen worden. Om de grootte van een fragment te kunnen bepalen, wordt per *chip* een *sizing ladder* meegelopen. Na de detectie evalueert de software de gegenereerde data zodat de grootte en relatieve concentratie van de fragmenten kan bepaald worden (*figuur 17.B*) [53].



**Figuur 17: Microchip electroforese.** (A) Voorbeeld van een microchip met reservoirs voor staal (*sample*), buffer, kleurstof, ladder. In het midden de kolom waarop de fragmenten gescheiden worden. (B) Voorbeeld van een elektroferogram. De eerste en de laatste piek zijn merkers. Fragmenten 1 tot 7 zijn fragmenten van een verschillende grootte, waarbij 1 het kleinste en 7 het grootste fragment is. Hoe groter de fluorescentie, hoe hoger de concentratie van het fragment aanwezig in het staal. De relatieve concentratie kan berekend worden aan de hand van de fluorescentie van de merkers [53].



Drie verschillende microchip electroforese technologieën worden gebruikt voor de analyse van fragmenten: de MCE<sup>®</sup>-202 MultiNA, de Labchip<sup>®</sup> GX en de 2100 Bioanalyzer. De basiskenmerken van deze systemen zijn gelijk, doch de specificaties verschillen (*bijlage 12*).

### **2.8.2. Protocol**

#### *2.8.2.1. MCE<sup>®</sup>-202 MultiNA*

De MCE<sup>®</sup>-202 MultiNA van de firma Shimadzu Biotech kan gebruikt worden voor grootte- en concentratiebepaling van DNA en RNA [54].

Voor analyse worden verschillende kits gebruikt:

- DNA-1000 voor analyse van fragmenten tussen 100 en 1.000 basenparen.
- DNA-2500 voor analyse van fragmenten tussen 100 en 2.500 basenparen.

Per 3 µl staal wordt 7 µl water toegevoegd om een totaalvolume van 10 µl te bekomen.

#### *2.8.2.2. Labchip<sup>®</sup> GX II*

De Labchip<sup>®</sup> GX II van de firma Caliper LifeSciences kan gebruikt worden voor de grootte- en concentratiebepaling van DNA, RNA en eiwitten [55].

Voor analyse wordt de DNA 5K Assay Version 2 kit gebruikt. Deze kit kan fragmenten tot 5.000 bp analyseren.

Per 3µl staal wordt 17µl water toegevoegd om een totaalvolume van 20 µl te bekomen.

#### *2.8.2.3. Agilent 2100 Bioanalyzer*

De Agilent 2100 Bioanalyzer van de firma Agilent Technologies wordt gebruikt voor de grootte- en concentratiebepaling van DNA, RNA, eiwitten en volledige cellen [37].

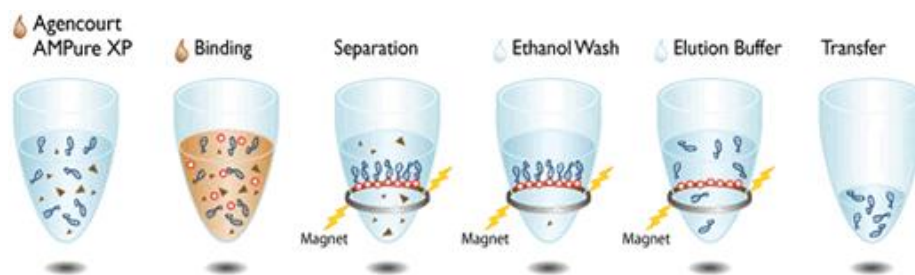
Voor de analyse van DNA-fragmenten wordt de Agilent DNA 7500, 12000 en de High Sensitivity Kit gebruikt. Het protocol gebruikt voor deze kits staat beschreven in *bijlage 13*.

## 2.9 Size selection

### 2.9.1. Principe

Het doel van deze stap is om kleine, niet-geligeerde PCR-fragmenten te verwijderen. Deze *size selection* gaat de fragmentatie vooraf omdat de Covaris AFA™ kleine fragmenten minder efficiënt fragmenteert dan grote. Deze selectie laat ook toe om kleine amplicons, niet-geïncorporeerde dNTP's, primers, primerdimeren, zouten en andere contaminanten te verwijderen.

Het Agencourt AMPure systeem is gebaseerd op *solid-phase reversible immobilization* (SPRI) technologie, die gebruik maakt van magnetische *beads*, gecoat met carboxyl. Bij hoge zout- (1,25 M) en polyethyleen glycol (PEG) concentraties bindt DNA aan het oppervlak van de *beads*. Met behulp van een magnetisch veld worden de *beads* uit de oplossing getrokken. Dit wordt gevolgd door een wasstap met behulp van ethanol en vervolgens wordt het gezuiverde product geëluëerd in elutie buffer.



Figuur 18: SPRI methode uitgevoerd met AMPure beads [56].

De methode is snel, relatief goedkoop en vermijdt filtratie en centrifugatie stappen [54].

### 2.9.2. Protocol

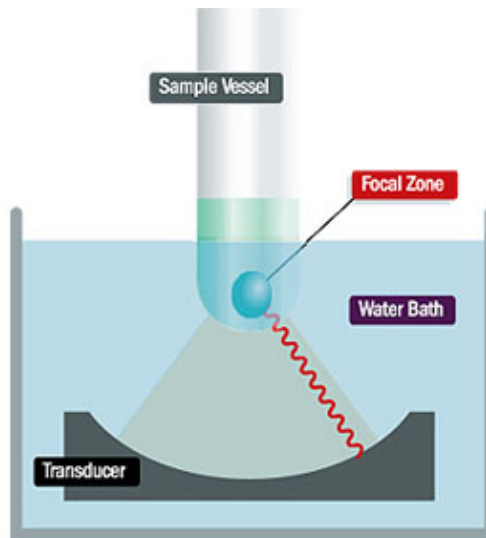
Voor de *size selection* van het ligatieproduct wordt gebruik gemaakt van Agencourt AMPure systeem van de firma Beckman Coulter Genomics [57]. In deze masterproef worden fragmenten tot 500 bp verwijderd. Het gebruikte protocol is beschikbaar in *bijlage 14*.

## 2.10 Fragmentatie

### 2.10.1. Principe

In de Covaris AFA™ worden akoestische energiegolven uitgezonden van een komvormige *transducer*, die de energiestroom convergeert en focuseert naar het punt van interesse (*figuur 19*). Als gevolg van de intensiteit van de energiegolven worden in het staal ‘bellen’ gevormd. Deze bellen krimpen en zetten uit tot de bel uiteindelijk implodeert. Dit veroorzaakt een korte maar krachtige energiestoot die het staal kan fragmenteren.

De duur en de intensiteit van deze energiegolven bepalen tot welke lengte er gefragmenteerd wordt [56].



**Figuur 19: Covaris AFA™ [58].**

Om de fragmentatie efficiënt te laten doorgaan is er minimaal 300 à 500 ng en maximaal 3 µg dubbelstrengig DNA nodig.

### **2.10.2. Protocol**

Fragmentatie van de geligeerde fragmenten wordt uitgevoerd met de Covaris Adaptive Focused Acoustics™, of de Covaris AFA™, van de firma Covaris [58]. Voor fragmentatie wordt het ligatieproduct met TE buffer aangelengd tot 100 µl. Om een lengte van 300 bp te bekomen, worden volgende instellingen gebruikt:

<i>Duty Cycle</i>	10%
Intensiteit	4
<i>Cycles per Burst</i>	200
Tijd (seconden)	120

## **2.11 Sequeneren**

De fragmenten worden gesequeneerd op een *Illumina Genome AnalyzerIIe* [32]. Het sequeneren zelf is geen onderdeel van de masterproef, maar zal na dit protocol uitgevoerd worden door medewerkers van het NXTGNT consortium. NXTGNT is een interdisciplinair, interfacultair platform van de Universiteit Gent, opgericht voor *next-generation* genomanalyse. NXTGNT beschikt over twee NGS platformen: de 454 sequencer van de firma Roche Applied Science en de *Illumina Genome AnalyzerIIe* van de firma Illumina [59]. Het sequeneren van de stalen verloopt volgens de stappen beschreven in 1.2.5. *Illumina (Solexa) Genome Analyzer*.

## 3. Resultaten

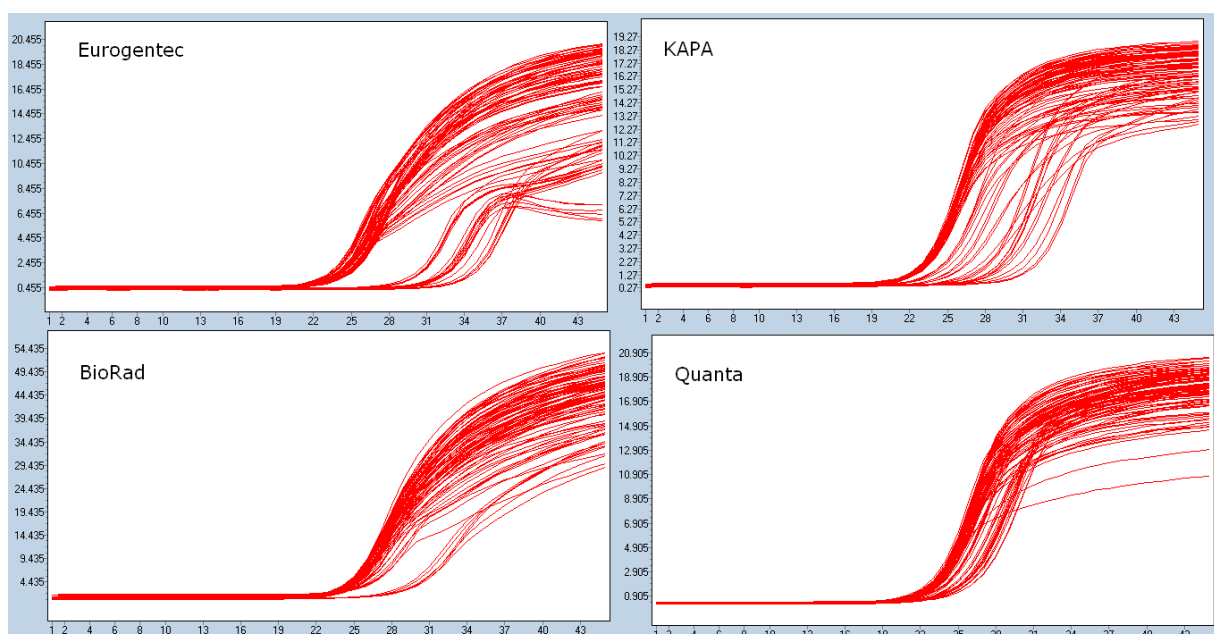
### 3.1 qPCR

Met als uitgangspunt een zo gelijk mogelijk *coverage* van alle amplicons is het belangrijk om met een equimolaire hoeveelheid van alle amplicons, per patiënt en tussen patiënten onderling, te starten. Gezien bij de start van deze masterproef nog geen maximale grootte van qPCR amplicons met een efficiënte amplificatie gekend was, werden intitueel *primerdesigns* gecreëerd voor amplicons met een lengte gaande van 250 tot 1500 bp. Op deze amplicons werden vervolgens verschillende qPCR-*mastermixen* en qPCR-protocollen uitgetest.

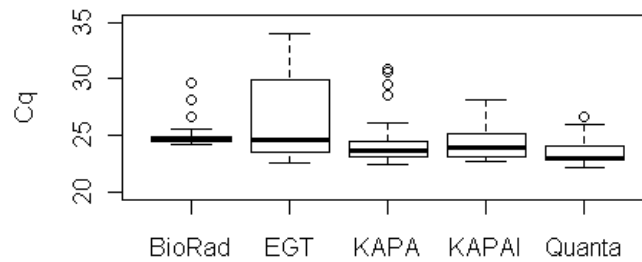
#### 3.1.1. qPCR mastermix kits

Met 4 verschillende *mastermixen* werd qPCR uitgevoerd op de primersets 500 en 1500 (*bijlage 2*). De uniformiteit van de verschillende amplificatiecurven werd vergeleken (*figuur 20*). Volgende parameters werden geëvalueerd:

1. de C<sub>q</sub>-waarde ligt bij alle *mastermixen* rond 25, wat men verwacht gezien uitgegaan werd van dezelfde hoeveelheid startmateriaal. Deze is het meest uniform bij BioRad en vertoont de meeste spreiding bij Eurogentec (*figuur 21*). De C<sub>q</sub>-waarde onderging geen invloed van de lengte bij BioRad, maar vertoonde respectievelijk een (i) zwakke, (ii) milde en (iii) sterke stijging volgens de lengte bij (i) KAPAlang en Quanta, (ii) KAPA en (iii) Eurogentec (*bijlage 15 en 16*).



Figuur 20: Amplificatiecurves van de vier *mastermixen* (*bijlage 15*).



**Figuur 21: Boxplot Cq van de vier mastermixen.**

2. De efficiëntie, berekend met *real-time PCR miner*, vertoonde een daling volgens lengte bij KAPA, KAPAlang en Quanta (*bijlage 16 en 17*). Bij Eurogentec was een initiële daling van de efficiëntie en vervolgens een sterke stijging volgens ampliconlengte waarneembaar. Bij BioRad was er een lichte daling en vervolgens een uniforme efficiëntie volgens de ampliconlengte zichtbaar (*bijlage 16*).
3. De specificiteit werd geanalyseerd met de MCE<sup>®</sup>-202 MultiNA voor de 16 lange en 16 korte amplicons (*bijlage 16*). Aspecifieke amplicons werden hieruit geselecteerd door visuele inspectie.

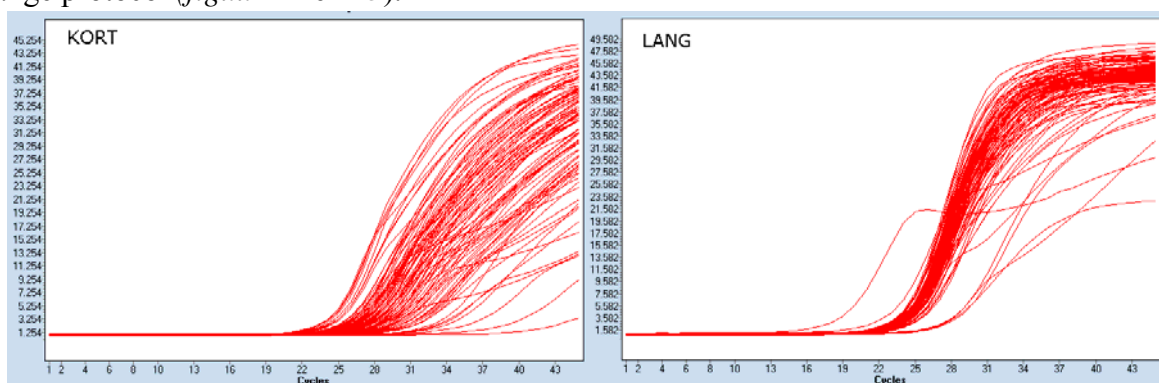
**Tabel 6: Aspecifieke amplicons per design.**

Design	EGT	KAPA	KAPAlang	BioRad	Quanta
500	5	0	/	0	4
1500	14	7	6	3	3

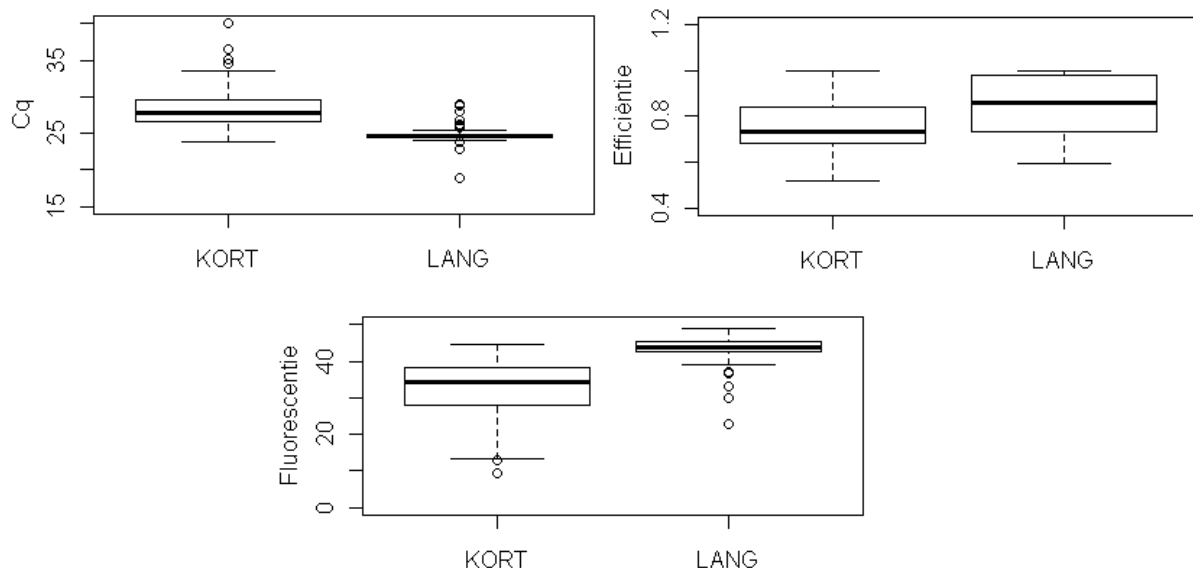
Er werd geopteerd om in verdere stappen de BioRad *mastermix*, wegens meest uniforme amplificatie, en een primerdesign tot 400 en 600 bp te gebruiken.

### 3.1.2. BioRad: Lang en kort qPCR-protocol

Er werd qPCR werd uitgevoerd op één van de zes NGS primerplaten: LCA1 (*bijlage 2*). Er werd een lang en een kort qPCR-protocol uitgevoerd om het effect op de amplificatie van lange amplicons te testen. De Cq-waarde, de efficiëntie, de eindpuntfluorescentie en de specificiteit werden vergeleken (*bijlage 3*). De amplificatie was het meest uniform bij het lange protocol (*figuur 22 en 23*).



**Figuur 22: BioRad amplificatiecurves van de plaat LCA1 bij een lang en een kort qPCR-protocol.**



**Figuur 23: Boxplot Cq-waarden, efficiëntie en eindpuntfluorescentie van het lange en het korte protocol.**

De specificiteit werd geïnspecteerd op de MCE<sup>®</sup>-202 MultiNA en de Labchip<sup>®</sup> GX II. Het elektroferogram werd per amplicon ingedeeld in één van drie categorieën:

- Goed: één sterke piek dus specifiek.
- Licht specifiek: één sterke piek en enkele kleinere pieken.
- Sterk specifiek: geen pieken of verschillende pieken van gelijke sterkte.

Het totaal aantal geteste amplicons was 96. Het korte protocol telde 5 sterk specifieke amplicons en 6 licht specifieke amplicons. Het lange protocol telde 3 sterk specifieke en 5 licht specifieke amplicons.

### 3.1.3. BioRad: Primers NGS project

Nadat de optimale qPCR condities werden bepaald, werden deze uitgetest op alle primers geselecteerd voor het retina NGS-project. Deze werden verdeeld over zes 96-well platen: LCA1-LCA4, ABCA4, USH2A (*bijlage 2*). Deze hebben betrekking op vier aandoeningen, en overspannen 21 genen, 394 exonen en 559 amplicons. Voor de LCA platen werden drie *replicates* gebruikt, voor ABCA4 en USH2A gaat het om vier *replicates*.

#### 3.1.3.1. NGS primers

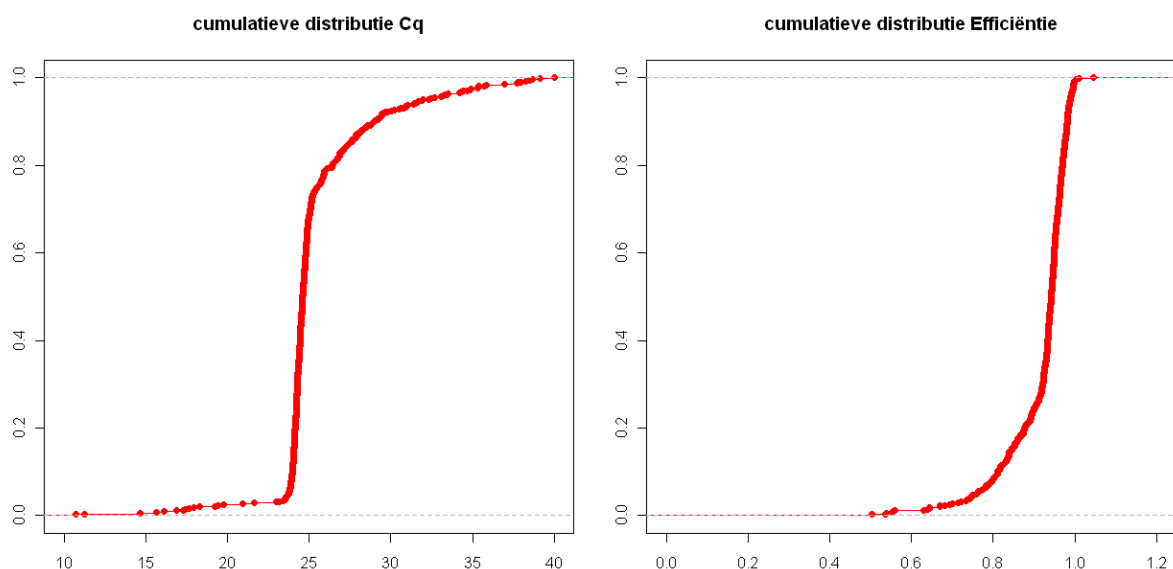
De primers die gebruikt werden voor het retina NGS platform werden manueel geselecteerd uit het 400 en 600 primerdesign. Er werd gestreefd naar amplicons met zo weinig mogelijk overtollige en overlappende basen. Door de twee *designs* te combineren, werd een ampliconlengte bekomen die 1,55 keer groter is dan de geselecteerde exonlengte plus de 40 bp stroomop- en afwaarts van het exon. Indien enkel het 400 of 600 *design* gebruikt was, zou de ampliconlengte meer dan 2 maal groter zijn (*tabel 7* en *bijlage 2.3*).

**Tabel 7: Specificaties van de beide primerontwerpen en de uiteindelijke primerselectie.** Het aantal amplicons bij de beide ontwerpen en bij de uiteindelijke selectie. Het aantal amplicons uitgezet als procent van het aantal exonen. De totale lengte van de amplicons en de totale lengte ten opzichte van de totale exonlengte plus 80 bp.

	<i>Design 400</i>	<i>Design 600</i>	<i>Selectie</i>
Aantal amplicons	962	695	559
% aantal exonen	244,16	176,40	141,88
Totale lengte (bp)	298,216	303,347	223,444
% exon lengte + 80 (bp)	207,33	210,90	155,35

### 3.1.3.1. qPCR

Er werd een qPCR uitgevoerd met de NGS primerset, de BioRad *mastermix* en het lange protocol. De geamplificeerde producten werden geëvalueerd aan de hand van de C<sub>q</sub>-waarden, de efficiëntie, de eindpuntfluorescentie en de specificiteit. Er werd gestreefd naar een zo uniform mogelijke amplificatie. De cumulatieve distributie beschrijft de distributie van een variabele. Bij uniforme amplificatie geeft de distributie een steile rechte. Bij ongeveer 80% van de amplicons werden uniforme C<sub>q</sub>-waarden en efficiëntie gezien (*figuur 24 en bijlage 18*).



**Figuur 24: Cumulatieve distributie van de C<sub>q</sub>-waarden en efficiënties van de amplicons.**

De specificiteit van de amplificatie werd geëvalueerd met behulp van de Labchip<sup>®</sup> GX II. De criteria werden bepaald volgens de specificaties van het toestel, meer bepaald:

- Een ampliconlengte die niet meer dan 20% afwijkt van de verwachte lengte.
- Een concentratie van het amplicon groter of gelijk aan 70% van de totale DNA-concentratie in de reactie.

In totaal werden 137 van de 559 amplicons aspecifiek bevonden volgens deze criteria.

De amplificatie bleek sterk genafhankelijk. Amplicons met een hoog GC-percentages en lage vrije energie bleken minder uniform te amplificeren. De invloed van het gebruikte primerpaar op de amplificatie uniformiteit was te verwaarlozen (*bijlage 18*).

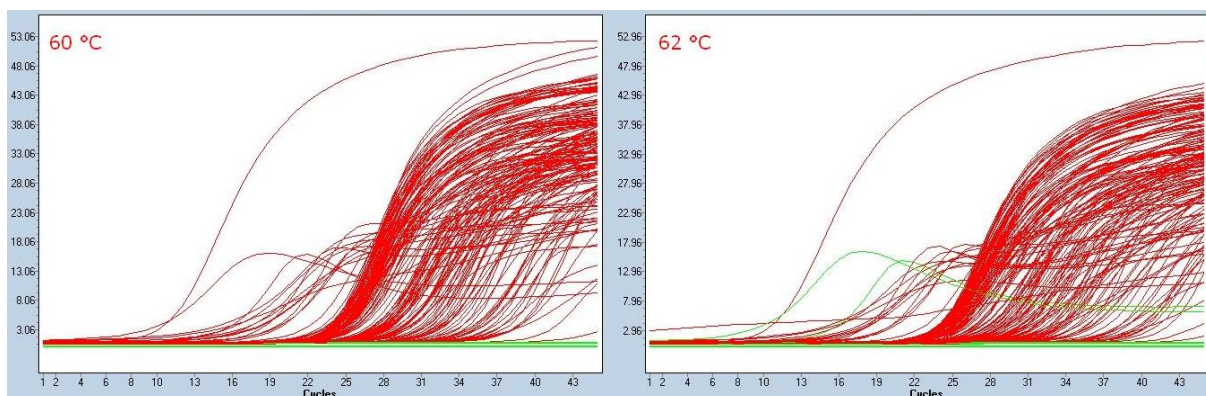
Volgende criteria werden gebruikt voor het selecteren van amplicons met een slechte amplificatie:

- Aspecificiteit volgens de specificaties van de Labchip<sup>®</sup> GX II (*zie 3.1.2.*).
- Andere criteria, die manueel geëvalueerd werden (*bijlage 18*):
  - Vreemde amplificatiecurve
  - Te late amplificatie
  - Te vroege amplificatie
  - Eindfluorescentie te laag
  - Eindfluorescentie te hoog

### 3.1.4. BioRad: Slechte amplicons

Voor de amplicons die een slechte amplificatie vertoonden bij gebruik van het voorgaande protocol werden twee verschillende qPCR-protocollen vergeleken, met *annealings*-temperaturen van respectievelijk 60 °C en 62 °C.

Er was geen noemenswaardig verschil tussen de twee qPCR-protocollen wat betreft de C<sub>q</sub>-waarde, de efficiëntie, de eindpuntfluorescentie en de specificiteit (*figuur 25* en *bijlage 20*).

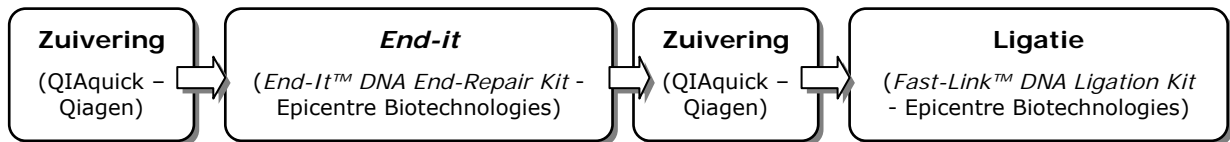


**Figuur 25: Amplificatiecurves van de 'slechte' amplicons met verschillende protocollen.**



## 3.2 Ligatie

Na de qPCR volgt de ligatie die uit verschillende stappen bestaat:



Na iedere zuiveringsstap wordt de concentratie van het product gemeten met behulp van de NanoDrop® ND-1000. Deze concentratie geeft een idee van de hoeveelheid DNA gebruikt in de *end-it* en ligatiereactie. Verschillende condities werden getest om de verschillende stappen voorafgaand aan de ligatie en de eigenlijke ligatie, zo optimaal mogelijk te laten doorgaan en om het protocol zo gebruiksvriendelijk mogelijk te maken, met het oog op diagnostiek.

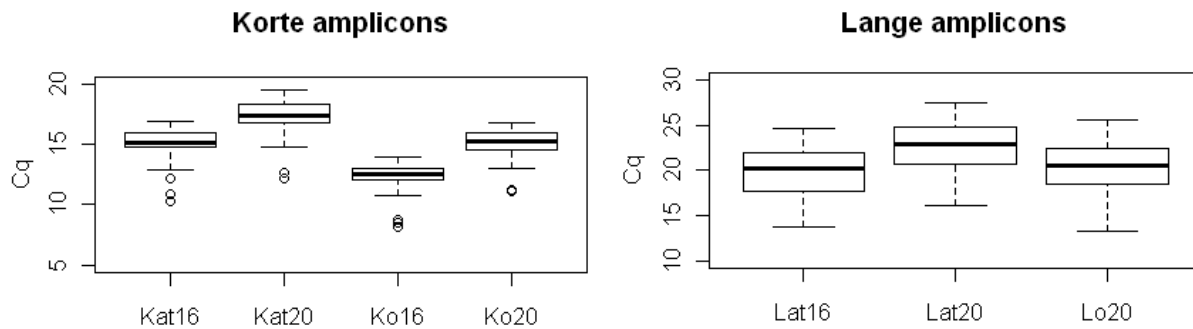
### 3.2.1. Ligatieprotocol

In een eerste ligatie-experiment werden twee condities uitgetest (*bijlage 21*):

- *Sticky end-* (door middel van A/T additie) versus *blunt end-*ligatie. A/T additie vond plaats na de *end-it* stap. Fragmenten met sticky ends zouden immers een ligatievoordeel hebben.
- Ligatie gedurende 15 minuten bij 20 °C (kamertemperatuur) versus 1 uur bij 16 °C. De ligatie zou beter verlopen als deze voor een langere periode op een lagere temperatuur doorgaat.

Deze test werd uitgevoerd op het BioRad qPCR-product uit het experiment 3.1.1. Tien amplicons uit het korte (250-500) en tien amplicons uit het lange (500-1500) *design* werden onderling geligeerd. De efficiëntie van de verschillende ligatiecondities werd gecontroleerd door middel van qPCR met interne primers (*bijlage 10*).

De ligatie bleek het meest efficiënt door te gaan zonder de A/T additie en gedurende 1 uur bij 16 °C. Dit resultaat was zichtbaar zowel bij de lange als de korte amplicons. De Cq-waarde is een indicator voor de aanwezige hoeveelheid uitgangsmateriaal. Een lage Cq-waarde duidt op veel startmateriaal terwijl een hoge Cq-waarde wijst op een kleinere hoeveelheid startmateriaal. De Cq-waarden bleken gemiddeld hoger te zijn bij A/T additie en bij 15 minuten op 20 °C (*figuur 26* en *bijlage 22*). Wegens een pipetteerfout bij de bereiding van de *mastermix* was de qPCR van de conditie Lo16 niet gelukt.



**Figuur 26: Boxplot Cq van de ligatie qPCR voor korte en lange amplicons.** K en L duiden respectievelijk op korte en lange amplicons. At en o duiden op A/T additie of geen A/T additie. De cijfers 16 en 20 verwijzen naar het ligatieprotocol.

In verdere experimenten werd geopteerd om de ligatie gedurende één uur bij 16 °C te laten doorgaan, zonder een voorafgaande A/T additie.

### 3.2.2. End-it

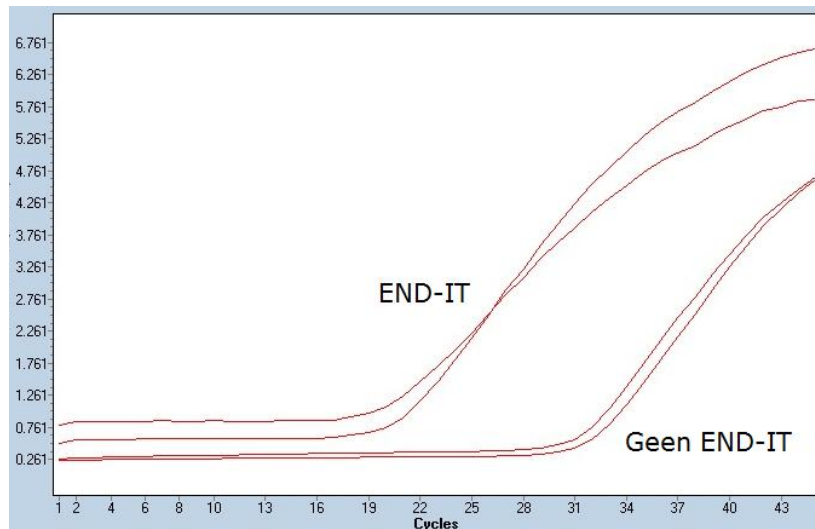
De efficiëntie van de ligatie zonder een *end-it* stap werd uitgetest, aangezien dit het protocol zou vereenvoudigen (wegvallen *end-it* en zuiveringsstap).

Als startmateriaal werden drie verschillende pools gebruikt afkomstig van experiment 3.1.3.:

1. De amplicons afkomstig van de 4 LCA qPCR-platen.  
Deze *pool* bevat 6 µl product per amplicon (3 µl product van 2 *replicates*).
2. De amplicons afkomstig van de ABCA4 qPCR-plaat.  
Deze *pool* bevat 12 µl product per amplicon (4 µl product van 3 *replicates*).
3. De amplicons afkomstig van de USH2A qPCR-plaat.  
Deze *pool* bevat 12 µl product per amplicon (4 µl product van 3 *replicates*).

Deze pools werden, onafhankelijk van elkaar, in parallel geligeerd (*bijlage 23*). Het resultaat werd gecontroleerd door middel van qPCR met *reverse complement* primers (*bijlage 11*). In de plaat met primers werden manueel drie permutaties gemaakt, zodat 64 (LCA) en 32 (ABCA4 en USH2A) verschillende combinaties van geligeerde amplicons geanalyseerd konden worden.

Er was een duidelijk verschil merkbaar tussen de ligatiereactie met en zonder de *end-it* stap. De reacties met *end-it* hebben een beduidend lagere Cq-waarde, hetgeen duidt op een hoger aantal geligeerde amplicons (*figuur 27* en *bijlage 24*).



**Figuur 27:** Amplificatiecurves van de *reverse complement* qPCR. Links de reactie met een *end-it* stap, rechts de reactie zonder *end-it* stap.

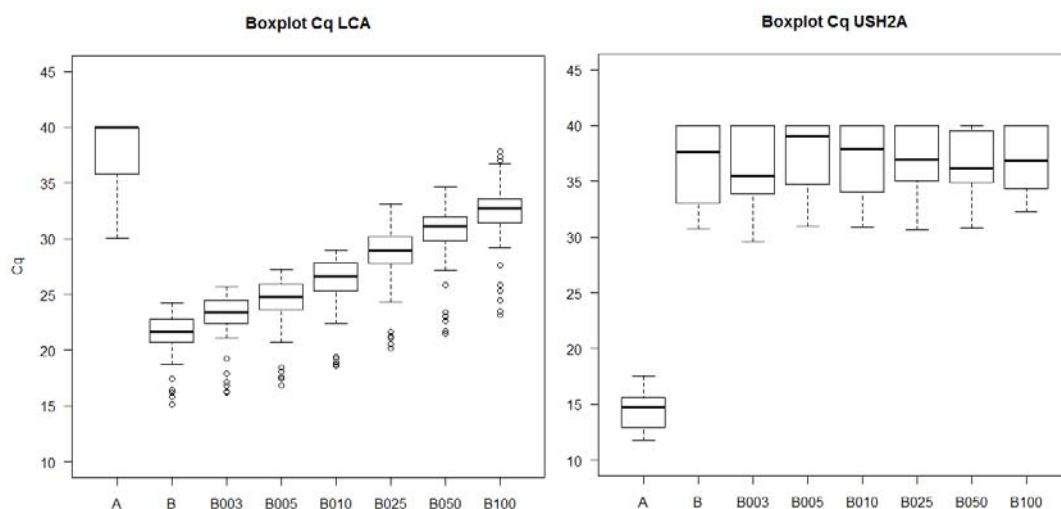
Ligatie met een UTR-exon bleek niet beter of slechter door te gaan dan ligatie aan een coderend exon. De amplicons voor zelfligatie bleken over het algemeen een lagere C<sub>q</sub>-waarde te hebben, wat geïnterpreteerd kan worden als een groter aantal amplicons die aan zichzelf geligeerd zijn. Indien er geen zelfligatie is verwacht men immers dat de C<sub>q</sub>-waarde van deze zelfligatie amplicons gelijk is aan de C<sub>q</sub>-waarde van amplicons zonder zelfligatie (*bijlage 24*).

In verdere experimenten werd geopteerd om voorafgaand aan de ligatie steeds een *end-it* stap uit te voeren.

### 3.2.3. Verdunningsreeks

Aan de hand van een verdunningsreeks werd gezocht naar de optimale hoeveelheid startmateriaal voor de ligatie. Twee verschillende qPCR *pools* werden in parallel gebruikt: LCA en USH2A. Per *pool* werden drie zuiveringsreacties uitgevoerd. Deze werden gegroepeerd en vervolgens werden op dit product vier parallelle *end-it* reacties uitgevoerd. Eén van deze reacties werd onmiddellijk gezuiverd (product A) terwijl de andere drie eerst gegroepeerd en vervolgens gezuiverd werden (product B). Deze stappen konden niet in één reactie doorgaan omwille van het maximumvolume van de zuiveringsreacties. De aanmaak van product B had als doel de hoogst mogelijke concentratie te bekomen. Van dit product werd ook de verdunningsreeks gemaakt, bestaande uit de volgende zeven verdunningen: onverdund, 1/3, 1/5, 1/10, 1/25, 1/50 en 1/100 (*bijlage 25*). De ligatie werd aan de hand van qPCR met *reverse complement* primers geëvalueerd. Dezelfde primerpermutaties uit 3.2.2. werden gebruikt.

In de LCA-*pool* bleek onverdund product B het beste resultaat te geven. Deze verdunning gaf de laagste Cq-waarde wat duidt op een grote hoeveelheid startmateriaal en dus ook geligeerd product (*figuur 28*). In de USH2A-*pool* scoorde product A het beste. De resultaten van product B zijn echter niet zoals verwacht (*bijlage 26*). Een mogelijke verklaring is dat de ligaties van product A bij LCA en product B bij USH2A niet goed hebben plaatsgevonden. De concentratie van de stalen werd na de laatste zuiveringsstap voor de eigenlijke ligatie gemeten. De resultaten van deze metingen zijn niet opvallend afwijkend voor beide *pools*. Dit kan dus geen verklaring bieden voor deze afwijkende resultaten (*bijlage 26*).



**Figuur 28: Boxplot Cq-waarden van de verschillende verdunningen bij LCA en USH2A.**

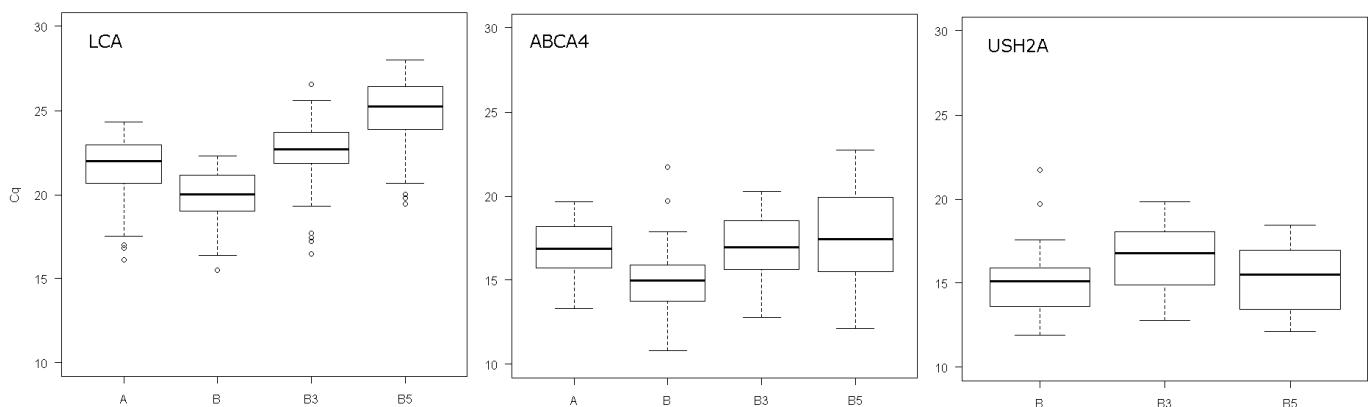
De *reverse complement* primerset, die gebruikt werd om de efficiëntie van de ligatie te testen (*bijlage 11*), bevat enkele primerparen ontworpen om zelfligatie na te gaan. Dit is de ligatie van het 5'-uiteinde van het amplicon aan het 3'-uiteinde van hetzelfde amplicon. Dit type van ligatie is niet wenselijk voor het NGS project aangezien dit geligeerde fragment in een latere *size selection* stap zal verwijderd worden. Er wordt gestreefd naar een ligatieprotocol waarin de proportie zelfligatie minimaal is.

In de LCA *pool* bleken de zelfligatie amplicons in alle LCA-verdunningen, met uitzondering van product A een lagere Cq-waarde te hebben. In de USH2A-*pool* was dezelfde trend ongeveer zichtbaar, maar moet men rekening houden met het feit dat deze resultaten niet zijn zoals verwacht. In de LCA-*pool* is ook zichtbaar dat er relatief gezien meer zelfligatie plaatsvindt bij een sterkere verdunning, doch deze trend is zeer zwak (*bijlage 26*).

### 3.2.4. Herhaling van de verdunningsreeks

Het voorgaande experiment werd herhaald om de reproduceerbaarheid na te gaan. In de drie pools (LCA, USH2A en ABCA4) werden vier verdunningen getest: product A, product B onverdund, 1/3 en 1/5. Bij deze herhaling werd product A enkel getest bij de LCA- en de ABCA4-pools wegens te weinig startproduct voor de USH2A-pool. De conditie van product A werd licht aangepast om dicht bij het *end-it* experiment (3.2.2.) aan te leunen. In de laatste zuiveringsstap werd zoveel mogelijk *end-it* product gebruikt om de zuiveringsreactie en ligatiereactie optimaal te laten doorgaan (bijlage 27).

Product B onverdund bleek het beste resultaat te geven in de LCA- en ABCA4-pool (laagste Cq-waarde). De resultaten van de USH2A-pool liggen eerder dicht bij elkaar, waardoor geen uitgesproken ‘beste conditie’ te onderscheiden is (figuur 29).



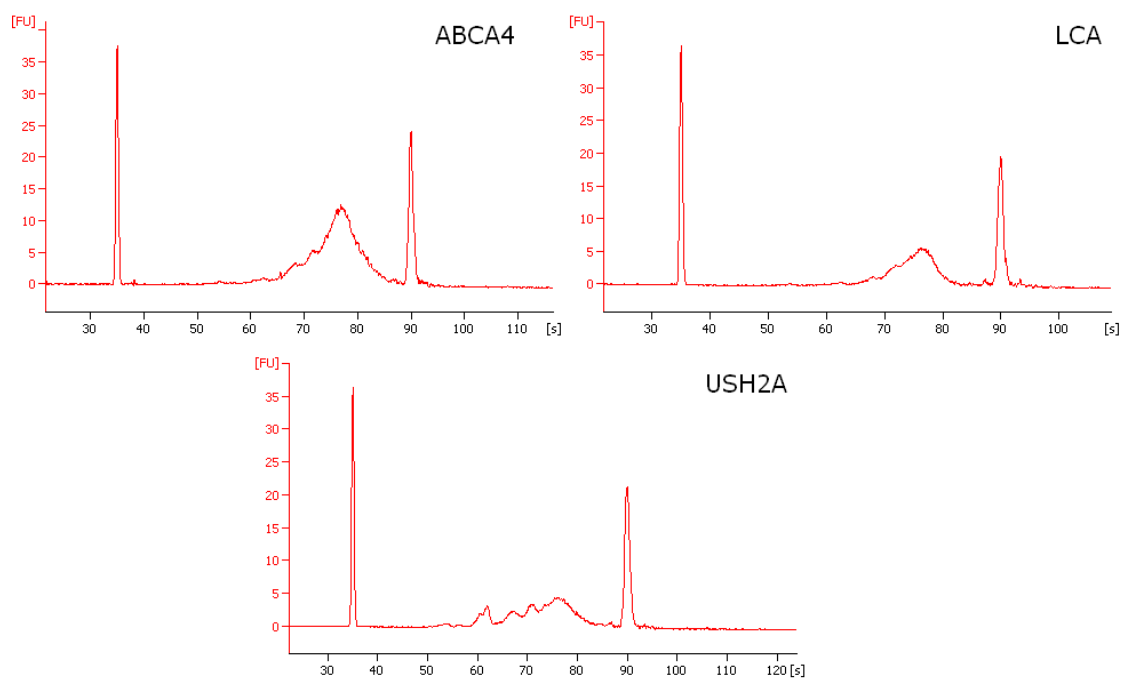
**Figuur 29: Boxplot van de Cq-waarden van de verschillende verdunningen bij LCA, ABCA4 en USH2A.**

Wat de zelfligatie amplicons betreft, was dezelfde trend merkbaar als in experiment 3.2.3. In dit experiment bleken de zelfligatie amplicons in alle verdunningen een lagere Cq-waarde te hebben dan in de ‘gewone’ amplicons. Dat er relatief gezien meer zelfligatie plaats vindt bij sterkere verdunning is minder uitgesproken dan in het voorgaande experiment (bijlage 28).

### 3.3 Size selection

Na de ligatie volgt een *size selection* met behulp van het Agencourt AMPure systeem. Fragmenten van een bepaalde lengte worden geselecteerd en kleinere fragmenten worden verwijderd. Deze stap gaat de fragmentatie met behulp van de Covaris AFA™ vooraf, aangezien dit toestel fragmenten kleiner dan 500 bp minder efficiënt fragmenteert. Deze fragmenten, voornamelijk bestaande uit niet-geligeerde amplicons, zijn dus minder gewenst in het te fragmenteren product. .

Op het ligatieproduct uit experiment 3.2.4. werd een *size selection* uitgevoerd. Het resultaat werd geanalyseerd met behulp van de Agilent 2100 Bioanalyzer en de Agilent DNA 12000 Kit. Het product voor en na de AMPure *size selection* werd vergeleken. Het product voor de AMPure stap was te sterk aangengend om goed gedetecteerd te kunnen worden door de Agilent *chip*. Product B bleek de beste conditie te zijn voor ABCA4 en LCA. Fragmenten kleiner dan 500 bp werden efficiënt verwijderd. Het is ook duidelijk dat de ligatie is doorgegaan, aangezien een piek zichtbaar is rond 1800 bp (*figuur 30*). De resultaten in de USH2A-*pool* zijn onduidelijk (*bijlage 29*).



**Figuur 30: Product B na AMPure size selection.** De lengte van het gemiddelde ABCA4-fragment is 1815 bp. De lengte van het gemiddelde LCA-fragment is 1836 bp. De lengte van het gemiddelde USH2A-fragment is 2157 bp. Producten kleiner dan 500 bp zijn afwezig. De x-as wordt weergegeven in seconden [s] en kon wegens een afwijking in de software niet in [bp] gezet worden.

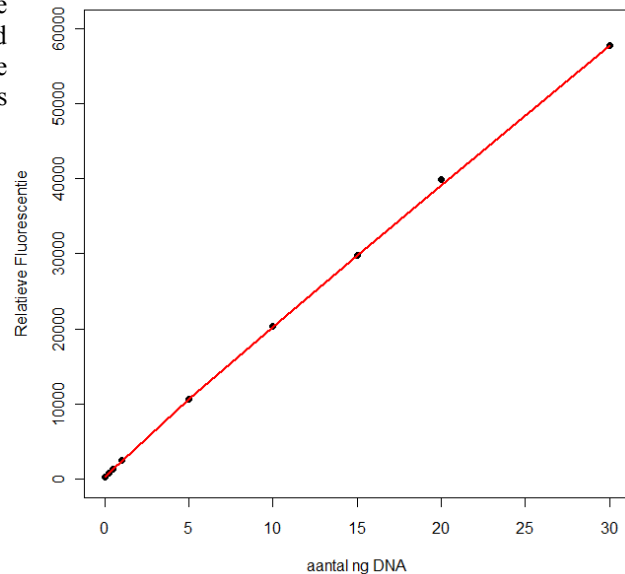
Er werd geopteerd om product B te gebruiken als voorbereiding op de sequencer van het staal met de *Illumina Genome AnalyzerIIe*.

De minimale hoeveelheid DNA nodig voor fragmentatie op de Covaris AFA™ ligt tussen de 300 en 500 ng in 100  $\mu$ l. De concentratie van het product na *size selection* werd gemeten door middel van de Molecular Probes PicoGreen® Assay op de FLUOstar OPTIMA. Deze techniek is veel nauwkeuriger dan de NanoDrop® ND-1000 voor het meten van dubbelstrengig DNA. Aan de hand van een verdunningsreeks van een controle DNA-staal kan een standaardcurve gemaakt worden (*figuur 31*). De concentratie van de stalen kan berekend worden volgens de vergelijking 'y =ax+b' waarbij a de richtingscoëfficiënt en b het snijpunt met de y-as is (*tabel 8*).

**Tabel 8:** Aantal ng DNA aanwezig per staal en de overeenkomstige relatieve fluorescentie eenheid (Rfu). Aan de hand van deze tabel kan de richtingscoëfficiënt en het snijpunt met de y-as berekend worden.

Standaardcurve	
ng	Rfu
0	264
0,25	761
0,5	1313
1	2494
5	10691
10	20349
15	29735
20	39842
30	57706

Richtingscoëfficiënt = 1928,3  
 Snijpunt met de y-as = 612,7



**Figuur 31: Standaardcurve.**

Staal	Rfu	ng/μl	ng beschikbaar
LCA_B	16259	8,1	195
ABCA4_B	31500	16,0	384

**Tabel 9: Resultaat van de fluorescentiemeting.** Per staal de Rfu en de concentratie (ng/μl) berekend volgens de vergelijking. Per staal staat ook de hoeveelheid dubbelstrengig DNA beschikbaar in 24 μl, het volume verkregen na *size selection* met AMPure beads.

De hoeveelheid dubbelstrengig DNA beschikbaar voor fragmentatie is voldoende bij de ABCA4-pool maar te laag bij de LCA-pool (< 300 ng) (tabel 8).

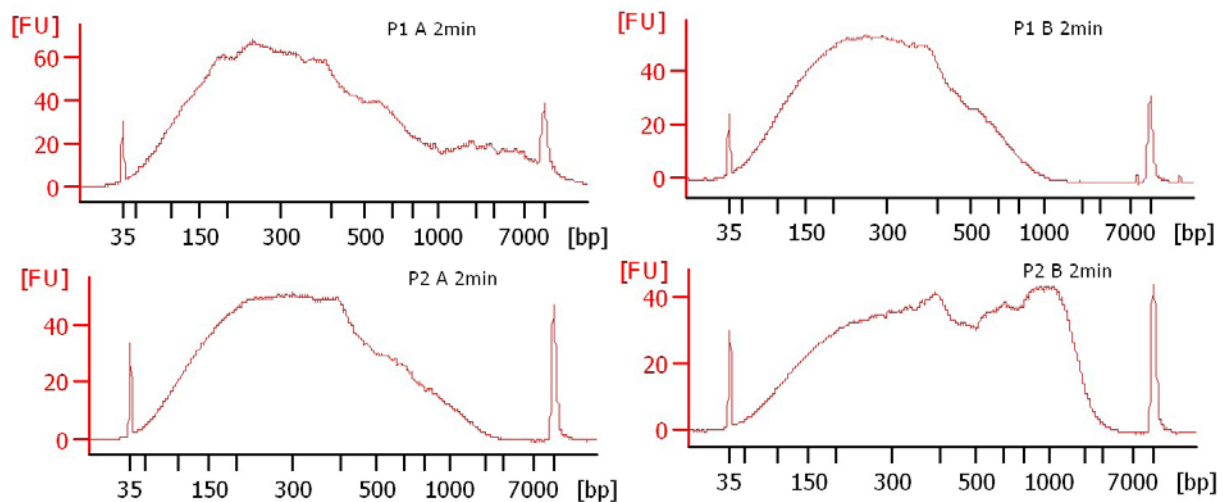
### 3.4 Het volledige protocol

Het volledige protocol, gaande van qPCR tot en met fragmentatie op de Covaris AFA™, werd doorlopen. Als startmateriaal werd DNA van een patiënt gebruikt. Twee verschillende protocollen werden gebruikt voor de stappen voorafgaand aan de ligatie (bijlage 30). Het tweede protocol (P2) is goedkoper en eenvoudiger dan het eerste (P1). Er is bij P2 echter meer kans op verlies van DNA.

De gebruikte primers zijn afkomstig van de vier LCA-primerplaten (bijlage 2). Bij het pipetteren van de qPCR-platen werd de LCA1-primerplaat twee maal gebruikt en de LCA2-plaat niet. De amplicons van deze plaat werden niet opgenomen in dit experiment. De amplificatiecurves van deze amplicons waren vergelijkbaar met deze in voorgaande experimenten, waarbij dezelfde primers gebruikt werden (bijlage 31.1).

De AMPure *size selection* verliep naar wens in beide protocollen (bijlage 31.2). De concentratie van de stalen werd met de Molecular Probes PicoGreen® Assay op de FLUOstar OPTIMA gemeten. De concentratie van alle stalen was groter dan de maximaal meetbare concentratie met deze techniek. Er werd geopteerd om de stalen na AMPure *size selection* te

verdunnen. Deze stalen zijn het startmateriaal voor de Covaris AFA™. De stalen werden aangelengd tot 100 µl. De hoeveelheid DNA aanwezig voor P1 en P2 waren respectievelijk 5716 en 2998 ng in 100 µl staal. De maximale hoeveelheid DNA die gefragmenteerd kan worden door de Covaris AFA™ is 5 µg DNA. P1 overschrijdt deze waarde. Er werd geopteerd om het staal in drie groepen te verdelen: A, B en C. Deze groepen werden afzonderlijk gefragmenteerd. De fragmentatie-efficiëntie is afhankelijk van de duur van de energiestroom. Verschillende tijden tussen één en vijf minuten, werden gebruikt. Fragmentatie gedurende twee minuten bleek ideaal om de gewenste lengte van 300 bp te verkrijgen (*figuur 32 en bijlage 31*).



**Figuur 32: Product na 2 minuten fragmentatie op de Covaris AFA™.** De afwijkende curve van staal P2 B is vermoedelijk te wijten aan de aanwezigheid van een luchtbel in het staal tijdens fragmentatie.



## 4. Bespreking

Sinds 2005 is er een omwenteling in sequencingstechnologieën, met een verschuiving van conventionele Sanger sequencing naar NGS. Gedurende het Humaan Genoom Project (HGP) domineerde de geautomatiseerde Sanger sequencingstechnologie. Ondanks de technische vooruitgang die het HGP met zich meebracht, bleven er beperkingen, zoals de doorvoer, capaciteit en relatief hoge kostprijs. De NGS technologie biedt hierop een antwoord. NGS kan aangewend worden voor een brede waaier aan toepassingen: onderzoek naar regulerende sequenties en varianten in een specifieke regio van of in het volledige genoom, *de novo* sequencen van genomen, transcriptoomanalyse, profilering van epigenetische merkers en chromatine structuren, classificatie van nieuwe dier- en plantensoorten [35]. Het brede spectrum van mogelijkheden, de verschillende NGS platformen en de snelle evolutie van deze technologie laten het toe om de juiste techniek voor een specifieke toepassing te vinden.

Het doel van deze masterproef was het ontwikkelen van een *high-throughput* NGS platform voor moleculaire diagnostiek van gekende retinale ziektegenen. Ondanks de beschikbaarheid van verscheidene commerciële NGS platformen sinds de laatste vijf jaar, is de impact op diagnostiek nog vrij beperkt gebleven [60]. Wat diagnostiek betreft voor retinale aandoeningen, zijn er twee commerciële NGS-testen beschikbaar voor in totaal 7 arRP-genen<sup>2</sup>. Deze testen worden aangeboden door *GeneDx*, een Amerikaans bedrijf gespecialiseerd in diagnostische tests voor zeldzame genetische aandoeningen [61] en *Gendia*, een bedrijf dat een waaier aan genetische testen aanbiedt (Antwerpen, België). Naast deze test voor arRP biedt *Gendia* ook diagnostische NGS-testen aan voor 12 andere aandoeningen [62].

Via het interfacultaire NXT-GNT consortium heeft het CMGG toegang tot de *Illumina Genome Analyzer<sub>IIe</sub>* en de 454 sequencer van Roche. Het Roche platform wordt momenteel meer gebruikt voor amplicon sequencing in het kader van diagnostiek dan het *Illumina* platform, aangezien de leeslengte tot 500 bp meer aanleunt bij de gemiddelde lengte van een PCR-product. Een nadeel van deze ‘één amplicon/één *read*’ strategie is echter dat voor amplicons kleiner dan 500 bp ook een volledige *read* gebruikt wordt, waardoor de capaciteit van het toestel niet volledig benut wordt. In deze masterproef werd geopteerd om een protocol te ontwikkelen voor sequencing op het *Illumina* platform. In het protocol geoptimaliseerd in deze masterproef wordt een selectie gemaakt van amplicons die zo dicht mogelijk gelegen

---

<sup>2</sup> *USH2A, EYS, CRB1, PDE6A, PDE6B, ABCA4, RPE65* en *CNGA1*

zijn bij de intron-exon grenzen, en worden alle amplicons eerst geligeerd en vervolgens gefragmenteerd. Het eindmateriaal van dit protocol kan gesequeneerd worden op het Illumina platform en vereist geen grote leeslengte. De doorvoer van de *Illumina Genome AnalyzerIIe* is hoger dan deze van de 454 sequencer, en de kostprijs per base is lager. Deze argumenten motiveerden de keuze voor het Illumina platform.

Het nieuwe protocol bestaat uit amplicon sequencing door qPCR amplificatie van de doelwit DNA-sequenties, gevolgd door ligatie en fragmentatie. Aangezien het de bedoeling is dit protocol te gebruiken in een diagnostische context, was het van belang om dit eenvoudig en gebruiksvriendelijk te houden. Aangezien dit NGS platform moet kunnen gebruikt worden in diagnostiek, werd geopteerd voor amplicon sequencing in plaats van *capturing* van de doelwitgenen door middel van *microarrays* of ‘in oplossing’ [37,63]. *Capturing* technologieën laten immers niet toe een doelwitregio volledig te capteren, en zijn nog zeer duur.

#### 4.1 Primerdesign

In vergelijking met de verschillende primerdesigns afzonderlijk, was het door de combinatie van verschillende primerdesigns mogelijk het totaal aantal geselecteerde amplicons en het totaal aantal baseparen overspannen door deze amplicons, te verminderen. Deze vermindering heeft ook een effect op de kostprijs van de gebruikte primers, de qPCR en de sequencing. Het ontwerpen van deze primers en het manueel selecteren van de juiste combinaties is zeer arbeidsintensief, maar dit hoeft slechts éénmalig te gebeuren bij een goede selectie.

#### 4.2 qPCR

De doelstelling van de qPCR amplificaties was een zo uniform mogelijke amplificatie van de doelwit sequenties. Verschillende qPCR *mastermixen* en protocollen werden getest. De amplificaties werden geëvalueerd aan de hand van de Cq-waarden, de specificiteit, de eindpuntfluorescentie en de efficiëntie. De BioRad *mastermix*, in combinatie met een zelf ontwikkeld ‘lang’ qPCR-protocol, amplificeerde zowel korte als lange amplicons op een zeer uniforme wijze. De efficiëntie van de amplificatie bleek voornamelijk gehinderd te zijn door intrinsieke kenmerken van de doelwit DNA sequentie: een hoog percentage aan guanine en cytosine basen en de aanwezigheid van secundaire structuren. Een hogere *annealings*-temperatuur bleek geen merkbaar verschil te geven op de amplificatie van deze ‘moeilijke’ amplicons.

### 4.3 Ligatie

De geamplificeerde producten werden aan elkaar geligeerd, om grote fragmenten te vormen. Ligatie kits zijn echter ontworpen om kleine fragmenten, zoals PCR-amplicons, in een vector te ligeren [47]. Het ligeren van PCR-producten werd tot nu toe weinig toegepast. Het was daarom van belang om verschillende condities voor (1) de voorbereidende stappen, (2) de ligatiecondities zelf en (3) de concentratie van het startmateriaal en uit te testen. De concentratie van het enzym, de incubatietijd en -temperatuur, de gebruikte hoeveelheid DNA, spelen immers een belangrijke rol bij de efficiëntie van de ligatie [64].

(1) De stappen voorafgaand aan de ligatie bestaan uit zuivering en het maken van *blunt end* of *sticky end*-fragmenten. Fragmenten met *sticky ends* hebben een voordeel bij ligatie [49]. Door de manipulatie van het fragment kan echter DNA verloren gaan. *Blunt end*-fragmenten, gegenereerd door de *end-it* stap, bleken efficiënter te ligeren dan *sticky end*-fragmenten, gegenereerd door middel van A/T-additie. De BioRad *mastermix* bevat een polymerase met *proofreading* activiteit, wat *blunt end*-fragmenten zou genereren. De ligatie ging echter efficiënter door bij fragmenten die *blunt end*-gemaakt werden.

(2) Verschillende ligatieprotocollen werden uitgetest. Voor de gebruikte kit werd een incubatietijd van 15 minuten op kamertemperatuur aanbevolen voor *blunt end*-fragmenten [47]. De optimale ligatietemperatuur van het T4 DNA-ligase varieert tussen 16 en 25 °C. Voor *blunt end*-fragmenten wordt 16 °C aangeraden. Ook een langere incubatietijd heeft een positieve invloed op ligatie van *blunt end* fragmenten [64]. Wij toonden aan dat de ligatie efficiënter doorging bij een incubatietijd van 1 uur bij 16 °C, zowel voor zowel fragmenten met *sticky* als *blunt ends*.

(3) Als startmateriaal werden verschillende startconcentraties van het PCR-product gebruikt. Aangezien de kit gericht is op ligatie van DNA in een vector, was de optimale hoeveelheid PCR-product niet bekend bij de start van de masterproef. De verschillende concentraties werden bekomen door sterker te concentreren met behulp van zuiveringskolommen - die behalve voor zuivering hiervoor kunnen gebruikt worden - en het aanmaken van een verdunningsreeks. De ligatiereactie ging het efficiëntste door bij de hoogste concentraties aan startmateriaal. In deze producten kwam bovendien minder zelfligatie voor, wat vermeden dient te worden aangezien deze producten in een latere stap (de *size selection*), verwijderd worden. Een hoge concentratie startmateriaal geeft ook een voordeel voor de volgende

stappen: voor fragmentatie is er minstens 500 ng ligatieproduct nodig, een hoeveelheid die niet kan bereikt worden bij een lage hoeveelheid startmateriaal.

We toonden aan dat ligatiefragmenten een gemiddelde lengte hadden van 1800 bp. De lengte van de amplicons gebruikt voor ligatie varieerde tussen de 120 en 800 bp, met een piek rond 400 en 600 bp. Dit houdt in dat één ligatiefragment gemiddeld bestaat uit 3 tot 5 amplicons.

#### **4.4 *Size selection* en fragmentatie**

Na de ligatie volgt een *size selection* met het Agencourt AMPure systeem, waardoor fragmenten kleiner dan 500 bp weggeselecteerd worden. Deze fragmenten worden immers minder efficiënt gefragmenteerd door de Covaris AFA™. De *size selection* is bij alle stalen efficiënt doorgegaan, er waren nauwelijks fragmenten kleiner dan 500 bp te zien.

Fragmentatie van ligatieproduct op de Covaris AFA™ werd nog niet eerder beschreven. Verschillende fragmentatietijden werden uitgetest. De optimale fragmentatietijd bleek 2 minuten te zijn, en komt overeen met de tijd gebruikt voor fragmentatie van gDNA.

#### **4.5 Algemene conclusie**

In deze masterproef werd een piloot protocol ontwikkeld voor amplicon NGS op de *Illumina Genome AnalyzerIII*. Er werden primers ontwikkeld en uitgetest voor 559 amplicons afkomstig van 21 genen betrokken bij LCA (16), RP (9), Usher type IIA (1) en maculaire dystrofieën (4). Voor de drie verschillende onderdelen van het protocol werden volgende condities geselecteerd: (1) Voor de qPCR werd een commerciële *mastermix* van Biorad en een ‘lang’ qPCR-protocol geselecteerd; (2) voor de ligatiestap werden qPCR-producten gegroepeerd, gezuiverd door middel van kolommen, gevolgd door een *end-it* stap om *blunt end*-fragmenten te genereren, een tweede zuivering en een ligatie van deze fragmenten; (3) op het ligatieproduct werd een grootte selectie uitgevoerd, met als doel fragmenten kleiner dan 500 bp te verwijderen. Fragmentatie van de geselecteerde ligatieproducten gebeurde op een *Covaris* toestel.

Het uitgevoerde onderzoek draagt bij tot de *proof-of-concept* van dit ligatieprotocol.

## 4.6 Toekomstperspectief

Dit protocol sluit aan bij andere, reeds geteste protocollen ter voorbereiding van sequenceren op de *Illumina Genome AnalyzerIIe*, zoals *long-range* PCR en *microdroplet*-gebaseerde PCR [65,66].

Het uitvoeren van dit protocol op patiënten met LCA, RP, Usher type II en maculaire dystrofieën, het maken van een sequentie-bibliotheek, sequentie-analyse op het Illumina platform, en data-analyse van de sequenties maakte geen deel uit van deze masterproef, maar zal plaatsvinden kort na het indienen van deze masterproef.

Bij een gunstig resultaat van deze *proof-of-concept* run, zal dit nieuwe ligatieprotocol in de toekomst toegepast worden voor het optimaliseren van een ‘RetNet platform’, bestaande uit alle gekende retinale ziektegenen, die opgelijst zijn in RetNet [5].

NGS baant zich steeds meer een weg zowel in het onderzoek als in de diagnostiek. Deze trend zal zich in de toekomst enkel versterken aangezien meer ziektegenen geïdentificeerd worden, en een moleculaire diagnose van een aandoening belangrijk is voor het inschatten van de prognose, voor reproductieve beslissingen, en niet in het minst voor toekomstige gentherapie. Naast de reeds ontwikkelde testen zullen diagnostische NGS-testen voor genetische aandoeningen snel volgen en ook de reeds bestaande NGS-platformen zullen zich meer aan diagnostiek aanpassen. Met de ontwikkeling van het 454 *Genome Sequencer Junior* systeem door de firma Roche, is deze trend reeds gestart [67].

## 5. Referentielijst

- [1] Leroy BP (2006). *Contribution to the Understanding of Genotypes and Phenotypes in Inherited Retinal Dystrophies. Leber Congenital Amaurosis & Autosomal Dominant vitreoretinopathy*. Nautilus Academic Books.
- [2] Kolb H, Fernandez E, Nelson R (2007). *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. University of Utah, John Moran Eye Center.
- [3] Smith AJ, Bainbridge JW, Ali RR (2009). *Prospects for retinal gene replacement therapy*. Trends in Genetics: 25(4):156-65.
- [4] Drack AV, Lambert SR, Stone EM (2010). *From the laboratory to the clinic: Molecular genetic testing in Pediatric Ophthalmology*. American journal of Ophthalmology 149(1):10-17.
- [5] [www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/](http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/)
- [6] den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FPM (2008). *Leber congenital amaurosis: Genes, proteins and disease mechanisms*. Progress Retinal Eye Research 27(4):391-419.
- [7] Wang DY, Chan WM, Tam POS, Baum L, Lam DSC, Chong KKL, Fan PJ, Pang CP (2005). *Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications*. Clinica Chimica Acta 351:5-16.
- [8] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP (2006). *Retinitis pigmentosa*. The Lancet 368: 1795-1809.
- [9] Saihan Z, Webster AR, Luxon L, Bitner-Glindzicz (2009). *Update on Usher Syndrome*. Current Opinion in Neurology 22(1):19-27.
- [10] Michaelides M, Hunt DM, Moore AT (2003). *The genetics of inherited macular dystrophies*. Journal of Medical Genetics 40(9):641-650.
- [11] Walin S (2009). *Natural History of Phenotypic Changes in Stargardt Macular Dystrophy*. Ophthalmic Genetics 30(2):63-68.
- [12] Boon CJF, Klevering BJ, Leroy BP, Hoyng CB, Keunen JE, den Hollander AI (2009). *The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene*. Progress in Retinal and Eye Research 28(3):187-205.
- [13] Boon CJF, den Hollander AI, Hoyng CB, Cremers FPM, Klevering BJ, Keunen JEE (2008). *The spectrum of retinal dystrophies caused by mutations in the peripherin/RDS gene*. Progress in Retinal and Eye Research 27(2):213-235.
- [14] Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozzi F, Bennicelli JL, Ying GS, Rossi S, Fulton A, Marshall KA, Banfi S, Chung DC, Morgan JI, Hauck B, Zeleniaia O, Zhu X, Raffini L, Coppieters F, De Baere E, Shindler KS, Volpe NJ, Surace EM, Acerra C, Lyubarsky A, Redmond TM, Stone E, Sun J, McDonnell JW, Leroy BP, Simonelli F, Bennett J (2009). *Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial*. Lancet 374(9701):1597-1605.
- [15] Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR (2008). *Effect of gene therapy on visual function in Leber's Congenital Amaurosis*. New England Journal of Medicine 358(21):2231-2239.
- [16] Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zeleniaia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J (2008). *Safety and efficiency of gene transfer for Leber's Congenital Amaurosis*. New England Journal of Medicine 358(21):2240-2248.
- [17] Strachan T, Read AP (2004). *Human molecular genetics 3*.
- [18] Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon, TJ, Boye SL, Flotte TR, Byrne BJ, Jacobson SG (2008). *Phase I trial of Leber Congenital Amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short term results*. Human Gene Therapy 19(10):979-990.
- [19] Cai X, Conley SM, Naash MI (2009). *RPE65: Role in the visual cycle, human retinal disease, and gene therapy*. Ophthalmic Genetics 30(2):57-62.

- [20] Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Schwartz SB, Boye SL, Windsor EA, Conlon TJ, Sumaroka A, Pang JJ, Roman AJ, Byrne BJ, Jacobson SG (2009). *Human RPE gene therapy for leber congenital amaurosis: Persistence of early visual improvements and safety at 1 year*. Human Gene Therapy 20(9):999-1004.
- [21] Batten ML, Imanishi Y, Tu DC, Doan T, Zhu L, Pang J, Glushakova L, Moise AR, Baehr W, Van Gelder RN, Hauswirth WW, Rieke F, Palczewski K (2009). *Pharmacological and rAAV Gene Therapy Rescue of Visual Functions in a Blind Mouse Model of Leber Congenital Amaurosis*. PLoS Medicine 2:1177-1189.
- [22] Kong J, Kim SR, Binley K, Pata I, Doi K, Mannik J, Zernant-Rajang J, Kan O, Iqbal S, Naylor S, Sparrow JR, Gouras P, Allikmets R (2008). *Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy*. Gene Therapy 15:1311–1320.
- [23] [medgen.ugent.be](http://medgen.ugent.be)
- [24] [www.asperophthalmics.com](http://www.asperophthalmics.com)
- [25] Coppiters F, Casteels I, Meire F, De Jaegere S, Hooghe S, van Regemorter N, Van Esch H, Matulevičien A, Nunes L, Meersschaut V, Walraedt S, Standaert L, Coucke P, Hoeben H, Kroes HY, Vande Walle J, de Ravel T, Leroy BP, De Baere E (2010). *Genetic screening of LCA in Belgium: predominance of CEP290 and identification of potential modifier alleles in AH1 of CEP290-related phenotypes*. Under review in Human Mutation.
- [26] [www.ngml.org.uk](http://www.ngml.org.uk)
- [27] Shendure J, Ji H (2008). *Next-generation DNA sequencing*. Nature Biotechnology 26:1135-1144.
- [28] Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A (2009). *Generations of sequencing technologies*. Genomics 93:105-111.
- [29] [www.genome.gov](http://www.genome.gov)
- [30] [www.xprize.org](http://www.xprize.org)
- [31] [www.personalgenomes.org](http://www.personalgenomes.org)
- [32] [www.illumina.com](http://www.illumina.com)
- [33] [www.helicobio.com](http://www.helicobio.com)
- [34] [www3.appliedbiosystems.com](http://www3.appliedbiosystems.com)
- [35] Metzker ML (2010). *Sequencing Technologies – the next generation*. Nature reviews genetics 11:31-46.
- [36] Ansorge WJ (2009). *Next-generation DNA sequencing techniques*. New Biotechnology 25(4):195-203.
- [37] [www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com)
- [38] [www.bmglabtech.com](http://www.bmglabtech.com)
- [39] MacKay IM (2004). *Real-time PCR in the microbiology laboratory*. Clinical Microbiology and Infection 10(3):190-212.
- [40] [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)
- [41] [knowledgeforgrowth.be/speakers/328](http://knowledgeforgrowth.be/speakers/328)
- [42] [genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)
- [43] [www.tecan.com](http://www.tecan.com)
- [44] [www.evindup.info/miner/version2](http://www.evindup.info/miner/version2)
- [45] [www.r-project.org](http://www.r-project.org)
- [46] QIAGEN (2008). *QIAquick Spin Handbook*.
- [47] [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)
- [48] [www.epibio.com](http://www.epibio.com)
- [49] Lodish H (2004). *Molecular Cell Biology*.
- [50] [www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)
- [51] [medgen.ugent.be/rtprimerdb](http://medgen.ugent.be/rtprimerdb)
- [52] [www.bioinformatics.org/SMS/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/SMS/rev_comp.html)
- [53] Goetz H, Kuschel M, Wulff T, Sauber C, Miller C, Fisher S, Woodward C (2004). *Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 60(3):281-293.
- [54] [www.shimadzu-biotech.net](http://www.shimadzu-biotech.net)

- [55] [www.caliperls.com](http://www.caliperls.com)
- [56] DeAngelis MM, Wang DG, Hawkins TL (1995). *Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products*. Nucleic Acid Research 23(22):4742-4743.
- [57] [www.beckmangenomics.com](http://www.beckmangenomics.com)
- [58] [www.covarisinc.com](http://www.covarisinc.com)
- [59] [www.nxtgnt.com](http://www.nxtgnt.com)
- [60] Morgan JE, Carr IM, Sheridan E, Chu CE, Hayward B, Camm N, Lindsay HA, Mattocks CJ, Markham AF, Bonthron DT, Taylor GR (2010). *Genetic diagnosis of familial breast cancer using clonal sequencing*. Human Mutation 31(4):484-491.
- [61] [www.genedx.com](http://www.genedx.com)
- [62] [www.gendia.net](http://www.gendia.net)
- [63] [www.nimblegen.com](http://www.nimblegen.com)
- [64] Invitrogen (2002). *T4 DNA Ligase*. Technical Bulletin 15244-2.
- [65] Harismendy O, Frazer KA (2009). *Method for improving sequence coverage uniformity of targeted genomic intervals amplified by LR-PCR using Illumina GA sequencing by-synthesis technology*. Biotechniques 46(3):229-231.
- [66] Tewhey R, Warner J, Nakano M, Libby B, Medkova M, David P, Kotsopoulos S, Samuels M, Hutchinson JB, Larson JW, Topol EJ, Weiner MP, Harismendy O, Olson J, Link DR, Frazer KA (2009). *Microdroplet-based PCR amplification for large scale targeted sequencing*. Nature Biotechnology 27(11):1025-1031.
- [67] [www.gsjunior.com](http://www.gsjunior.com)



# Bijlagen

Bijlage 1: Geschiedenis NGS .....	1
Bijlage 2: Primerdesign .....	2
Bijlage 3: Protocol qPCR .....	16
Bijlage 4: Protocol QIAquick zuiveringskolom .....	17
Bijlage 5: Protocol NanoDrop® ND-1000 .....	18
Bijlage 6: Protocol Molecular Probes PicoGreen® Assay op de FLUOstar OPTIMA .....	19
Bijlage 7: Protocol A/T additie .....	20
Bijlage 8: Protocol <i>End-It™ DNA End-Repair Kit</i> .....	21
Bijlage 9: Protocol <i>Fast-Link™ DNA Ligation Kit</i> .....	22
Bijlage 10: Interne primers .....	23
Bijlage 11: <i>Reverse complement</i> primers .....	24
Bijlage 12: Microchip analyse .....	26
Bijlage 13: Protocol Agilent DNA 7500, 12000 en High Sensitivity Kit .....	27
Bijlage 14: Protocol Agencourt AMPure systeem .....	28
Bijlage 15: Resultaten qPCR <i>mastermix</i> kits - amplificatiecurves .....	29
Bijlage 16: Resultaten qPCR <i>mastermix</i> kits - Cq-waarde, efficiëntie en specificiteit .....	31
Bijlage 17: Vergelijking lange en korte amplicons bij de <i>mastermixen</i> .....	33
Bijlage 18: Resultaten qPCR NGS primers .....	35
Bijlage 19: Manueel geselecteerde amplicons met slechte amplificatie .....	41
Bijlage 20: Resultaten van protocol 60 - 62 'slechte amplicons' .....	42
Bijlage 21: <i>Workflow</i> A/T additie en ligatie op 21 °C versus 16 °C .....	43
Bijlage 22: Resultaten A/T additie en ligatie op 21 °C versus 16 °C .....	44
Bijlage 23: <i>Workflow End-it</i> .....	45
Bijlage 24: Resultaten <i>End-it</i> .....	46
Bijlage 25: <i>Workflow</i> verdunningsreeks .....	49
Bijlage 26: Resultaten verdunningsreeks .....	50
Bijlage 27: <i>Workflow</i> herhaling van de verdunningsreeks .....	53
Bijlage 28: Resultaten herhaling van de verdunningsreeks .....	54
Bijlage 29: Resultaten <i>Size-selection</i> .....	56
Bijlage 30: <i>Workflow</i> van het volledige protocol .....	58
Bijlage 31: Resultaten van het volledige protocol .....	61

## Bijlage 1: Geschiedenis NGS

### 1. Advanced Sequencing Technology Development Award

De *Advanced Sequencing Technology Development Award* wordt jaarlijks uitgereikt door het *National Human Genome Research Institute* (NHGRI), een deel van de *National Institutes of Health* in de Verenigde Staten. Jaarlijks worden beurzen uitgereikt, met als doel de ontwikkeling van innovatieve technologieën op het gebied van DNA-sequencing, en het doen dalen van de kostprijs aan het sequencen. De eerste doelstelling is het sequencen van een zoogdier-genoom voor minder dan 100.000 dollar en uiteindelijk voor minder dan 1.000 dollar. Deze verlaagde kost zou op zijn beurt de medische toepassingen van genomische informatie stimuleren. In de gezondheidszorg streeft men naar het sequencen van individuele genomen om zo over te gaan tot *personalised medicine*, waarbij men de patiënt behandelt volgens diens genotype [29].

### 2. X PRIZE Foundation

De *X PRIZE Foundation* stelt een specifieke doelstelling voorop. Het eerste *team* dat deze doelstelling met succes bereikt, wint een prijs van 10 miljoen dollar. De doelstelling is zo opgesteld dat de mensheid er mogelijk baat bij heeft. In het kader van ruimtevaart werd de eerste *X PRIZE* doelstelling opgesteld. Ondertussen zijn er verschillende *X PRIZE* doelstellingen die betrekking hebben op verschillende onderzoeksdomeinen. Zo kondigde de *X PRIZE Foundation* in 2006 de ‘*Archon X PRIZE for Genomics*’ aan, een prijs van 10 miljoen dollar voor het eerste team dat 100 humane genomen in kaart brengt in een periode van maximum 10 dagen, met een foutenpercentage lager dan één fout op 100.000 basen en voor een kostprijs onder de 10.000 dollar per genoom [30].

### 3. Personal Genome Project

Op het vlak van *personalised medicine* speelt het *Personal Genome Project* (PGP) een essentiële rol. Dit project stimuleert de ontwikkeling van *personal genomics technology* in onderzoeken die efficiënt, informatief en verantwoord zijn. Ook zijn de voordelen van deze onderzoeken identificeerbaar en verbeterbaar terwijl de risico's relatief laag zijn. Verder zijn de resultaten van de onderzoeken toegankelijk en hebben ze een voordeel voor iedereen [31].

## Bijlage 2: Primerdesign

Tabel 1: Specifieke eigenschappen van de verschillende primerdesigns.

	<i>Primerdesign 500</i>	<i>Primerdesign 1500</i>	<i>Primerdesign 400</i>	<i>Primerdesign 600</i>
organism	<i>Homo sapiens</i> (9606)	<i>Homo sapiens</i> (9606)	<i>Homo sapiens</i> (9606)	<i>Homo sapiens</i> (9606)
product size	250 - 500	500 - 1500	60 - 400	60 - 600
search region	400	400	400	400
extra basepairs	25	25	40	40
overlap	10	10	20	20
cutoff outside exon	175	175	-1	-1
cutoff inside exon	225	225	-1	-1
primer size	16 - 20 - 30	16 - 20 - 30	16 - 20 - 30	16 - 20 - 30
primer Tm	57 - 60 - 63	57 - 60 - 63	57 - 60 - 63	57 - 60 - 63
primerpair diff. Tm	2	2	2	2
primer GC%	30 - 50 - 80	30 - 50 - 80	30 - 50 - 80	30 - 50 - 80
min GC bases in last 3 bases	1	1	1	1
primer dNTP conc	1,2	1,2	1,2	1,2
primer DNA conc	250	250	250	250
no SNPs in	5	5	30	30

1. Primerset 500

Tabel 2: 16 amplicons van het 500 primerdesign.

Gen	Exon	<i>Forward primer (5'-3')</i>	<i>Reverse primer (5'-3')</i>	<b>Amplicon Lengte</b>
<i>CEP290</i>	E34A	TCCAGCAATGAGAATCACAAAC	TAAGACAGGAGCTCAGGGAA	402
<i>CEP290</i>	E34B	TTTGCCAACTGCTGTGAA	ACCCTGGTCATCTTATTCCC	438
<i>CRB1</i>	E12B	CGAGTGGAAATGTGGAACCTT	GGAGAAGTGAGAAATGTAGCC	487
<i>CRB1</i>	E12C	TTCTGTGGCTTTAGTGGCTA	GCAGGTTCTTCAAATGTTCTT	391
<i>CRB1</i>	E6A	TCTTCATGACACAGGTGGAA	AAATGAAAGTGTGTTGCGA	480
<i>CRB1</i>	E6B	GGTACTTGTGAGAACTTGCC	TGTGGGAAATGAACAGAAGC	453
<i>CRB1</i>	E6C	GCTGCTAAGTGGCTACATTC	AATGATGAGCCAGACGAGAT	383
<i>CRB1</i>	E6D	TGGTTTACCAGTGGGAATGA	CTTTCTCATCAGTGGGCAAC	431
<i>CRB1</i>	E7A	TCCAGAAAGAGGCCAAATCA	TTGGGAGAGTTTGGAGTCAG	403
<i>CRB1</i>	E7B	ACTCCACTGGTTATGTCATCTT	CAGCCTTGGGTTACATTGAC	495
<i>CRB1</i>	E7C	ACTAGCAATGCTGACTCCAA	CTGGTGGGTCAGTAACATCA	479
<i>RPGRIP1</i>	E9A	CCGACCTTCAATTGGTTCAA	TAGTAACACTGCTCTGGGAC	275
<i>RPGRIP1</i>	E14A	ACCCTCCTCTACCCTAAGAA	GGGTACAGTGGGTTTCAAAG	303
<i>RPGRIP1</i>	E14B	CAACCTACCACCTTCTGCAC	TGGGAAATTCTGCATTGGTG	322
<i>RPGRIP1</i>	E20B	AGTGGATTGGAGATGTGTGT	TGACTGGCCACTGTCATTAT	250

## 2. Primerset 1500

**Tabel 3: 16 amplicons van het 1500 primerdesign.**

Gen	Exon	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon Lengte
<i>CEP290</i>	E33	ATAGCTGCTTGTTGTTCTGC	GGAATCTCGGAAAGAGGCTA	902
<i>CEP290</i>	E34	TCCAGCAATGAGAATCACAAAC	ACCCTGGTCATCTTATTCCC	780
<i>CEP290</i>	E51	AAAGACATACCTCCAGTTCAT	GACTGAGATGGGAAGATTGC	714
<i>CRB1</i>	E2	CAGCACAAAGGTCACAAAGA	AAGTCAGCACTAGAAACCCA	1075
<i>CRB1</i>	E5	TTGTTTCCACTAAGCCTCCT	TCATCCCTTTCATTCCCTCTT	577
<i>CRB1</i>	E6	ACCTGAGCTATTCATGCACT	CTTTCTCATCAGTGGGCAAC	1208
<i>CRB1</i>	E7	GTCCAGAAAGAGGCCAAATC	GAGAAGCCTATAGCCGAAGT	988
<i>CRB1</i>	E9	TCAGACCATCCCAGTTTGAT	TTGAGGAGAGAGCTTTCCAA	1291
<i>CRB1</i>	E10	AGTGCTTGGGTAGTAGAGTG	TTACCTCGACAGCAACCATA	873
<i>CRB1</i>	E12	GCAAGGGAGGAAAGAGATCA	AATGTCAGTGTGGGCACTG	1449
<i>CRX</i>	E4B	CTACAAGGATCAGAGTGCCT	GTGCCTTTCATTTCCCTACC	1410
<i>CRX</i>	E4C	TTCGCTCATTAGCACATTGG	CACGGAAACTGACAAACT	680
<i>CRX</i>	E4D	GCTCTCCAAGGAAGAGGAA	CCACAGACAGAAGGAACAGA	1499
<i>RPE65</i>	E3	AAAGATGGGTTCTGATGGGT	TGCATTTCTGGCTGTTTGAA	548
<i>RPGRIP1</i>	E14	ACCCTCCTCTACCCTAAGAA	GTGGCAAGGATCAAGAACAA	638
<i>RPGRIP1</i>	E16	CGAGCTACATCCTTCATCCT	GGAATGTTGTCTTTGTGGCT	827

## 3. NGS primers

**Tabel 4: Aantal genen en exonen waarvoor primers werden ontworpen.** De totale lengte van alle exonen in bp en de totale lengte van de exonen plus 40 bp *up-* en *downstream* van het exon.

<i>Aantal genen</i>	21
<i>Aantal exonen</i>	394
<i>Totale lengte (bp)</i>	112.314
<i>Totale lengte + 80 (bp)</i>	143.834

De NGS-primers werden aangekocht bij IDT en zijn opgelost in TE buffer (pH 8). LCA1 heeft een stockoplossing 200  $\mu$ M, de andere platen hebben een stockoplossing van 250  $\mu$ M.

## 4. Primerset 400-600 'LCA1'

Tabel 5: De 96 primerparen in de qPCR-plaat 'LCA1'.

Gen	Exon	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon lengte	Design
CEP290	E1	AAGAACACTTCCAGATTGTGAC	TTTGTGGCCCAATTGTCTG	378	60-400
CEP290	E2	GTTCCACTAATAGCCAAACCT	TCCAAGGTGCTTAATTGGTC	302	60-400
CEP290	E3	GAGTCCATCATGATTATAAGGTAACA	ATTGCTGGCACTAAGGATCA	378	60-400
CEP290	E4	ACAACCATATGCTCAGTCCT	TGTTACCTTATAATCATGATGGACTC	360	60-400
CEP290	E5	GGTAACAAGTTTGTATGTCCTGA	TGTTGTTGACTCATTGAACT	466	60-600
CEP290	E6A	TTTACCCGCATAGACCTGAG	GTTGGCTCTTCGAAATGAGG	272	60-400
CEP290	E6B	TGTTGAACCACCACAACACTAC	AGTAATCCAGCTACTCGGT	272	60-400
CEP290	E7	TCTGAAGGTAACCAACACA	TTGGTTCTACTGAGCCAAAT	386	60-400
CEP290	E8	CCAGGGAATTTACATGTAGGG	GTGAGGCTTTAAGTGTGGTG	375	60-400
CEP290	E9	GTGTTTGTGAGGTGATTGGA	TGCCTGTCTTGGTCATTAAG	574	60-600
CEP290	E10	CCCTAATAAACGTGTTATAAACCCAG	AATCCAGGATGACTTCAATGAT	393	60-400
CEP290	E11	AGACATCGTTCAGAGTTCCA	AGGAACAGAGATTATGCCAGT	349	60-400
CEP290	E12	TCCATCATTTACAAATGTAAGCACT	AAGGCATACTTGACCCACA	435	60-600
CEP290	E13	AATGCTCAAAGGTTTCAATAGTT	TGGGATCACTGATTTGAAGG	399	60-400
CEP290	E14	TCAATCAGGTTAGCTCCACTT	AGAGTCACTTTGCCTTAGGA	554	60-600
CEP290	E15	TTTCTTGAGCCATTTGACGAA	CACAGCCAAGAATCTGGAAG	562	60-600
CEP290	E16	CTGAACCCACTGACACTCA	TTTGAAAGAGGCAAGTGTGG	338	60-400
CEP290	E17	GGATCACGAGGTCAGAAGAT	AAATGAGAAGCTTGTATTGGCT	557	60-600
CEP290	E18	AATCCCACTTTCTCCCTCTC	ATGACGTCTCTAACAAAGTTCTG	355	60-400
CEP290	E19	AACAGCAAGGCAAATCAACT	GCTATGTCTTCATAGCTCGT	388	60-400
CEP290	E20	GGAGATCTGTACACAGCAGA	TTCCAATGATGTCTTTGGTATATGT	320	60-400
CEP290	E21	AACCATACTTCAGTTTCTGC	TTATCATGCTTGGCAATGAA	535	60-600
CEP290	E22	CTATCTGCATGCTTTGGTGAT	GGCAGGGCATTACATATC	364	60-400
CEP290	E23	GCAAAGGAAGAAGAAGAAGGG	TCTGTGTTGCTTACAGATTGG	357	60-400
CEP290	E24	CCATCTGAAGAGCATTGAGC	GCTATGATACCTCTGTGTTGAG	333	60-400
CEP290	E25	TGCAATTCAAACATCCCACA	GATCAAGTCCAACAAGATGCT	524	60-600
CEP290	E26A	TCATGCAAGTGACCTAAGGA	GACTGCTAAGTACAGGGACA	347	60-600
CEP290	E26B	ACAACTTACCTCCAGGTGT	TCCGAGTGATATTCCTGCT	480	60-600
CEP290	E27A	GCACTCAGTGAAAGAACTCA	AGAACTGGAGATTACCAAGGA	394	60-400
CEP290	E27B	TAGTTTCTGTTCCAGGCT	GGACACAGCCAAACCATATC	327	60-400
CEP290	E28	AGATCCAGACAAACCACTT	TCCATGGAATAATGCTTTC	396	60-400
CEP290	E29	TTGTATACCTGTAATTGGGTTTCTT	CCCTCCTCAGTCTGTTCTT	387	60-400
CEP290	E30	ACATATCCCACTCCCAACAT	CAAACATGATAACCTCTGATGGA	382	60-400
CEP290	E31A	AGTTCCAGCTATGTTGCAC	CTCGTTTGGAGGGAAGAAAC	366	60-400
CEP290	E31B	CCAAGGGTAAAGCTCCACTA	TTGTAGATCTCATGTGCCACT	390	60-400
CEP290	E32	CAGGAGAATGGCATGAACC	ATCATTATCATCAATGGAGGAATGT	394	60-400
CEP290	E33	AAAGCAGTTGCAGCATTGAG	ATGCCTGTTATGTGCCTGAT	358	60-400
CEP290	E34	CATTCTATGCATTGCCCTCA	AGAGAAGTTGACCTGGAACG	522	60-600
CEP290	E35A	AGTACTCGTGGTTTAGTCA	TCAAACCATTGCAAACATGC	305	60-400
CEP290	E35B	CTTGCATGTTTGAATGGTT	GCATGCAAATAACTGCTGTC	388	60-400
CEP290	E36	AGGAGGAAGAATGATCAGAGC	GGGACATGCATACCAGTCTA	418	60-600
CEP290	E37	TGGCATAGCAAACACTTATG	TTTGATCATTTGAGGAACCAA	369	60-400
CEP290	E38	CAACACGGAGATTTATACTACCAT	GGTGACAGAGTGAGACTGG	396	60-400
CEP290	E39	GTGTCTATGTCTAGCCACCA	TCAATGTGGAAGAATTGAGTGT	475	60-600
CEP290	E40	CTACTACCTCTATATTGTAATCAGACA	TTGTGGGTGTTGTTGAAGA	529	60-600

BIJLAGEN

CEP290	E41	AGCCAGGTCATCAAATTAAGG	AAATGCAGAAGCAGCTACC	390	60-400
CEP290	E42	AATTTCCAGGTCCTAAAGGA	CGTTTCGTAAGGGATACTCA	370	60-400
CEP290	E43	CCCAAGCTTAAGACAACACA	TGGTTTGGTAATGAGTATGCAA	328	60-400
CEP290	E44	TGGCCAGATTAAGAAAGAAGT	GAGCTTCTTGAGAAGACCAT	593	60-600
CEP290	E45	AAACATAACAACCTAAGGAAGGAGT	TTTCACCAGAACACTCCGA	338	60-400
CEP290	E46	ACAGATGCAGAATAAACACTGAA	TGGTTTGGCAATACAGTTGAA	332	60-400
CEP290	E47	AGCCTTGCCCTCATAAGTT	GCCTGTTGTATTGTTGGTACTT	394	60-400
CEP290	E48	ACAGACACTCTCATCAAGGAT	TGGGAACCTCGTTCTCACT	377	60-400
CEP290	E49	AGGAAGAAACCAGGTTATCCA	TTGAATACACTGAATCTATGAGAACA	340	60-400
CEP290	E50	GCAAGGAACATCTTGCGAT	CCTTATCTCTTGCCACCACT	381	60-400
CEP290	E51	TGCTTGTCTCTAGTTGTAGCA	CTAGGACAATGCCAGTTATGC	361	60-400
CEP290	E52	AGACCCAAAGCTTATCAGGA	GGTGACATTGTAGCATTGAGA	377	60-400
CEP290	E53	AGGATACGTAGTTAAAGATGGT	TAGCACATACCTCTTTCTGC	382	60-400
CEP290	E54	GAAATTCACCAGAGCTCACT	TTCTTCTGCCTTTATTGCTGT	598	60-600
CRB1	E1	ATGAATCCAATCCAGCCTGA	TGACTGTTACATTGACTGG	515	60-600
CRB1	E2A	CAGCACAAGGTCACAAAGA	CATTTGCACAGAAAGCTCCT	303	60-400
CRB1	E2B	CAACATGAAAGACCCCTTGCT	AGCACACTCATCGTATCTA	255	60-400
CRB1	E2C	CCAACATGGAGGTATTTGCC	TCTGCTTCTGCCACTTAGAA	359	60-400
CRB1	E3	TGACAAGTGCTCTGGTAAACA	TTAAGCCGAGAACGTGAGAG	392	60-400
CRB1	E4	AGTAAGATGATGCCATGGGT	TCATTTGTCTATAAGCGATATGTGT	322	60-400
CRB1	E5A	CCTCCTCTTACCAGATTTCC	ATCCAGGCTGACAGATACAG	330	60-400
CRB1	E5B	AGCTGTCTCAGAGAAACAA	CAGTACAGCTCTTCTGCTA	201	60-400
CRB1	E6	TATGTAATCCCTCGTTCTGC	ATGTTCTAGCTCTTTGGCAAG	366	60-400
CRB1	E7	TGTGTTAAGCAGGGATAGGA	CTGTTATAGCATTAAACAATAGTTGC	395	60-400
CRB1	E8A	TCTTCATGACACAGGTGGAA	GGCAAGTTCTCACAAGTACC	263	60-400
CRB1	E8B	GAATCCACTGCGAAGAAGAC	AAAGTGTGGTTGCGATTCA	287	60-400
CRB1	E8C	ATCCCTCACTTCCAAGATGG	GGTGTGTGGGAAATGAACA	317	60-400
CRB1	E8D	GCTGCTAAGTGGCTACATTC	AATGATGAGCCAGACGAGAT	383	60-400
CRB1	E8E	GGTGTGCTCTGCTTAACTT	TGTTTCATAGCAGGCAGAAG	355	60-400
CRB1	E9	GTCTGAGAGTAATTGTAACGG	TTGCCTCAGCATAATTTCCC	342	60-400
CRB1	E10A	GTCTTCCATCCCTTCTGTCT	TTTGGGAGAGTTTGGAGTCA	291	60-400
CRB1	E10B	AGATTTGGCCAGGATGACTC	AGGCCACCAATGTAGATGAC	361	60-400
CRB1	E10C	TGAACTGTATCAGTCTTCACAA	TACTGGTGGGTGAGTAACAT	379	60-400
CRB1	E11	AAAGATGCAGGGAAATTAGCA	TGTTTGCTCTTGGAACT	345	60-400
CRB1	E12A	TCAGACCATCCCAGTTTGAT	GTGATATTGGTGTGTTCTCTGG	386	60-400
CRB1	E12B	TTAATGGACAAAGCGGTCAA	TCGTTGTCCACTTCCATTTG	312	60-400
CRB1	E12C	TCAATTTGCAAAGTGGCAACA	TTAACTGCAAACAGCCAGTG	391	60-400
CRB1	E12D	GGGAGACAGAGCTATTGACA	TGTCTTACAGTTTCTCTCCA	223	60-400
CRB1	E12E	CCTGCAAGGGTGTCTAAGTA	GTTACAGTGTTCCTGAC	250	60-400
CRB1	E12F	CTGTTTGCATGGAGGAAACT	TTGAGGAGAGAGCTTTCCAA	394	60-400
CRB1	E13A	AAGCATTTGTAGTCTCTCCA	TTCCAGAAGGCTCTAATGTGA	287	60-400
CRB1	E13B	GACAGAGCAGATTACCCTCA	CTGTCTGAACCTCTATTTACGC	264	60-400
CRB1	E13C	ATATGGTTGCTGTGAGGTA	CCCTAGCCACTCAAATACAT	234	60-400
CRB1	E13D	AAATGGAGTTGGTCAATGGC	ACCTCTCAGCCTCAGTTTAC	331	60-400
CRB1	E13E	CTGTGCTGTTCCAGAGAGAT	CAAAGGCAACATCACAGAGG	203	60-400
CRB1	E13F	CTCTGATCCGTGTGCAATG	CACAGACAAAGTGCTTCTGAT	388	60-400
CRB1	E14A	TTTGCCTTTGTTGCTACATGA	ACTGAGCCAATAGTGGTGAA	343	60-400
CRB1	E14B	TTCACTACTATTGGCTCAGT	AGTGTAAATCCAGTTGCAGA	297	60-600
CRB1	E14C	TTTAGGAGCATTGTGTCCT	TGATAGCCACTAAAGCCACA	296	60-600
CRB1	E14D	GTGCCAGTAATTTAGCCTT	AGTCATTTCCAGAGCTTTCT	312	60-400
CRB1	E14E	TGTGGCTTTAGTGCTATCA	GCAGGTTCTTCAAATGTTCT	388	60-400

### 5. Primerset 400-600 'LCA2'

Tabel 6: De 94 primerparen in de qPCR-plaat 'LCA2'.

Gen	Exon	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon lengte	Design
AIPL1	E1	GCACACCTGGAATGTTGAA	AAAGGTGGATGGGATAGGAG	379	60-400
AIPL1	E2	CTCCATCTTCACATGCACAG	CTTCTGCCGGGCCTTG	398	60-400
AIPL1	E3	TGGCTTATGAACCCTCTCG	TTTATGGCCACCTAGCTC	388	60-400
AIPL1	E4	CTCCTGCCCAGGGAGA	GGGAGATGTGCCACAGG	396	60-400
AIPL1	E5	AAAGTCCAGGAAGGCTATGG	TAAGGAACCTGCAGACCAAG	368	60-400
AIPL1	E6A	TGGGTGTGTCTGACTTTGAT	CTTGGAGGCTGGTGAGTC	588	60-600
AIPL1	E6B	GTGTCCTGCGTAAAGTTACAA	GGTCACTTCTGGTTCGATTG	398	60-400
AIPL1	E6C	CCTGACCTCAGGTGATCC	GCTCTGATCCTTTCTCATGC	329	60-400
AIPL1	E6D	ACACTGCAGCTTCAATACAG	CCAGTGGTAGGGTAGAAGAA	403	60-600
AIPL1	E6E	ATCAGACACAGAAGGAGGTC	CGCTATAATCCCAGCTACT	573	60-600
AIPL1	E6F	TTGCTTACAGAGCAGAAGGT	TTAGTCTGGTGTCCAAGCTC	385	60-600
AIPL1	E6G	GTCACGAAATTGGAACCACA	ACCTTCTGCTCTGTAAGCAA	175	60-600
CRX	E1	GCCCTAATTGCCAAGATGTC	CAAACACAGCCACGAATAAGA	365	60-400
CRX	E2	GAGGACACAGAGGTACAGAG	CCAGAGGTCTCCAAGAGA	341	60-400
CRX	E3	GTAGAAGGGCAGGGAATGT	CTCCTCCCATCACTCTTTGT	377	60-400
CRX	E4A	GCTGGATGCAAAGTAGACAG	CCATGGGAGAAAGGTAGGG	553	60-600
CRX	E4B	TCTCCGAGCTCCTATTTTCA	GATCTAAACTGCAGGGAAGC	349	60-600
CRX	E4C	CTACAAGGATCAGAGTGCCT	GTAATTCAGCGGTCAACAATC	301	60-600
CRX	E4D	CATTCTGAGAAAGCAACCC	CACGGTGATTCTGACCTAAC	282	60-600
CRX	E4E	GAAAGTGGTCTGAGAACTT	CCCAGCTAATTGGGAGATTG	599	60-600
CRX	E4F	TGCAGACACAGTCTAGCTC	CTGTAATCCCAGCACTTTGG	573	60-600
CRX	E4G	TTACAGGTGTGCTCCATCAT	AGGTGCCTTTCATTTCCCTA	489	60-600
CRX	E4H	GGACCGTTTGAGAGACAAAG	ATGACCTCAATCCGTCTTCA	549	60-600
CRX	E4I	GCAGCCCTACATTTCAAACA	GACAAACTCCACAACCAA	421	60-600
CRX	E4J	TTGGTTGTGGAGTGTGTC	CAAAGTGTGGGATTACAGG	404	60-600
CRX	E4K	GGGAGGTATCAGATGACGTT	GTAGAGACAGGGTTTCACCA	296	60-600
CRX	E4L	CTGTAATCCCAGCACTTTGG	CCCGGTGAATAAGGAGAAGA	536	60-600
CRX	E4M	GTTGGGACCAGAATCCACTA	GGCCTTCACTACTTCTCACT	210	60-600
CRX	E4N	GTTCTGGGAAGGAGTGAGAA	AAGGAAAGGAGGGTGATGAG	528	60-600
GUCY2D	E1	AAGGACCCTAATCAGCTTGG	GGAGGCTGGGAAGACTAAC	341	60-400
GUCY2D	E2A	ATCATCCCATGGGTTACTCG	GCGATCCCGGCTTCTT	550	60-600
GUCY2D	E2B	TCGTGGGTCCGGTGAA	GTAGTGGATCGTGTGAAGG	561	60-600
GUCY2D	E3	GACTTCCATGGAGCCCTT	GTGGTCTTTCTCCATTGGC	559	60-600
GUCY2D	E4	CCTGGGAACAATAACTGGA	GCATCGAAGACGGATTACAG	574	60-600
GUCY2D	E5	CTATCATTCCCAGCCTCTCC	TTGCTGCAGACTTCCATTTT	312	60-400
GUCY2D	E6	GGTCACTCAGGAGTAGAGG	CCAGGGAAGGAACCAATTTAC	371	60-400
GUCY2D	E7	CGCCTCCCATCTTTAAATCC	TTTGAGGGATCCATGACCTT	374	60-400
GUCY2D	E8	GAAGATGCATTCTGGGACAG	GGGACACTTAACTGAGACCT	295	60-400
GUCY2D	E9	TTCTGGGTCTGGATACTCAA	TTGGAATGGGTAGGTAAGA	399	60-400
GUCY2D	E10	GTTCAAGTCTCCCTCCTG	ATGTGGGATGAAGAGAGTGC	396	60-400
GUCY2D	E11	CTTTCTCTGAGATGGCTCCT	TTTAGAGGAAAGAGTGAGGCT	399	60-400
GUCY2D	E12	ACACACACTGAACCTCTGAT	TGTCTCAGGTTGCTGACAA	360	60-400
GUCY2D	E13	TAAAGAGGGCATGGCAAC	ACAGTGTCACTTGTCAAAG	384	60-400
GUCY2D	E14	GACCGCTGCTTACACA	GCTGGAGGCTGGTGAAG	374	60-400
GUCY2D	E15	CTCAGTCTTCCACTAGCA	GCCTCTCTACAGGAAATCT	377	60-400
GUCY2D	E16	GAGGATGCACTTAACAAGGC	CACAGTGTCAAGTTCACG	345	60-400

<i>GUCY2D</i>	E17	GCATCTCCACAGGTCCAT	AGGGTGAGCTGAGGTTTG	381	60-400
<i>GUCY2D</i>	E18_E19	CAAACCTCAGCTCACCTT	TCTAAGTCAGAAAGGGATCGG	558	60-600
<i>GUCY2D</i>	E20	TGTTTACTACTCTTGCCA	TCTTCAGGCCATCTCTAAGG	555	60-600
<i>IMPDH1</i>	E1Hav	CTGCTACGCAGATGCC	AGATTACAGGCTGTGGAGAT	374	60-400
<i>IMPDH1</i>	E1	CCTAACCCCTTCGCACAGT	TGTACCCTCGCTGAATCTG	598	60-600
<i>IMPDH1</i>	E2_E3	GTCTTCGGAGAGACCTTGAG	GAAGGGTTAGGTGCTTCGT	353	60-400
<i>IMPDH1</i>	E4	CCACGTCCGTCTGCTC	GCTGAGCCCTTTGTGC	528	60-600
<i>IMPDH1</i>	E5	GTCTCTCCATCTCTCCATGC	TGTAGCCTCTGCTCCTCTA	264	60-400
<i>IMPDH1</i>	E6	TGAAACCAATACCTCCCATCA	ATGTAGGAGCTCAGTGAGTG	317	60-400
<i>IMPDH1</i>	E7	TTCTGCGGGCAGAGATG	TGTGAGTTACACACCTGCAT	477	60-600
<i>IMPDH1</i>	E8	GTGAGGGTCTCTCTACAC	ACAGCTGCATCCTCTGTT	342	60-400
<i>IMPDH1</i>	E9	TGTAAGGCTGTGAAGGAACA	TTTCTTGCTGAGAAGGACCA	355	60-400
<i>IMPDH1</i>	E10	TAAACCTCCACTCTGCTGAA	TCCACTTTCATCTTACCCT	345	60-400
<i>IMPDH1</i>	E11	ATCACCTAGGGATGCTGAAG	GTTACCTCACTCAGGCTCT	253	60-400
<i>IMPDH1</i>	E12	CTGGCAGAGAGAGTACTTGAT	CCCTCCAATGAGTAACCCTT	381	60-400
<i>IMPDH1</i>	E13	GGGAGCCCATCATCACTAC	TTATGCCTCAGACACCCAT	397	60-400
<i>IMPDH1</i>	E14	CCCACCTCTTAAGGGCAA	GTGTACAAGGTGGCTGAGTA	588	60-600
<i>IMPDH1</i>	E15	ATGGACCTAGGAGGAAGGTA	CTTAAGTAGCAGACCCAGGA	407	60-600
<i>IMPDH1</i>	E16	CCTCAGCTTGACCTCAGAA	CATAGCAGGCATCCAACAC	318	60-400
<i>IMPDH1</i>	E16Hav	TCCATCATGGTGTGGAGTT	CAGTAGTTGCAGGCATGTG	293	60-400
<i>IMPDH1</i>	E17A	GGTGCCTACAGGAGAAG	CACACACCCACTTTGTTC	413	110-450
<i>IMPDH1</i>	E17B	GTGCAAAGTTAAAGCCTTCG	CTCCTGGCTTCTCCTGTAG	331	60-400
<i>IMPDH1</i>	E17C	CAGGGCATAACAGACAGGAT	ACTTCTGAGCTCCTGACCTA	312	60-400
<i>IMPDH1</i>	E17D	CTCAACACCTCAAACCTTC	GCTTTAACTTTGCACACTTGG	193	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E1	TGCATGTAAGTACTGGACT	GCAAGATGTCCACAGTGAG	224	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E2	ATGCTCTCTGGACAAGATGT	CTGAGGTCAGGAGTTCAAGA	493	60-600
<i>RPGRIP1</i>	E3	GCCCTCAAAGAGTTACAGTG	AAAGGAGGGAGTGAGAACAA	576	60-600
<i>RPGRIP1</i>	E4	GCCCTTATGTTCCAGTTTC	TTGACCTAGGGTCGACTTTC	314	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E5	GTACCAAGGTTACTGATTCACTT	CTCTGAGATGGAGGAAAGGT	398	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E6	TAAGACGGGAAGGCAAGAG	GTTGTGAGGCTTGATTTGA	385	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E7	AGTGTGCTAAGTAACAGTACCT	ATTTGCTCCAGCAATAGGC	598	60-600
<i>RPGRIP1</i>	E8	GAGAAATGCTAGGGTTGCTG	CCAAGCTTTCCTCTAATGG	395	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E9	CCGACCTTCAATTGGTTCAA	AGTGTCAAATTCCTTCCAA	397	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E10	AAGGCAGTTGGTAAATGACAG	TTCTCCCAAACCAGAGGTAG	377	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E11	ACTTGATCCAACCTGACCA	TCTTCCCTAGAGATATTTGCCA	298	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E12	TTGGAGTAGTTTCTGCTGCT	TCAGGATAGCACATCACCTG	381	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E13	GTCTTCTTGACCTAGCCAGT	TATGAGAGGCACCCCTTCTTG	336	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E14	CCTCCTTACCCTAAGAAAG	AAAGCAACTGTAGGCTTTG	586	60-600
<i>RPGRIP1</i>	E15	CTTGTTCTTGATCCTTGCCA	ACTAGTTGTGGTGTGACAGT	348	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E16	TCATAGCTTCTCACCAC	GGCTCTAAGTCTTCTGCTCT	596	60-600
<i>RPGRIP1</i>	E17	GTGCTGACAAATGCTCACT	TCTCCTTCAAATCTGCTCCA	316	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E18	CCCAAATCCCTTTCTTGTGT	TGCTTATCTTGTGTGCTGC	384	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E19	GAAGGCAGGAAGGAAGGAA	CTTGAAAGCCTGATCTCGTG	295	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E20	GTGGATTGGAGATGTGTGTG	GTTTCTCCATGTTGGTCAGG	348	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E21	GATGGCGTATAAGCACTTGG	TGCACACAACACTTTGAACA	394	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E22	TTTCAAAGCAGTTGGTCCAT	AAATATTCAGCATCAGCACAA	325	60-400
<i>RPGRIP1</i>	E23	TCAAGTGATCTCACCTCAGC	AGATTTCAATCCACTTTGTGTCT	599	60-600
<i>RPGRIP1</i>	E24	CAGTACCTAACCTGACAAATACC	CTGCCTGGTAAAGTGCTAAG	399	60-400



## 6. Primerset 400-600 'LCA3'

Tabel 7: De 93 primerparen in de qPCR-plaat 'LCA3'.

Gen	Exon	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon lengte	Design
CEP290	IVS26	GGAGGATGTAAGACTGGAGA	TAACGCTTACTGCATCCTCT	523	210-550
LRAT	E1	TGAGCTTCCGGTCTG	GAGGGCGTCTGGAGAG	394	60-400
LRAT	E2A	TCCTTATCCGTCTCATTCCC	TAGATGCCATAGTGGGTCAG	416	60-600
LRAT	E2B	CTTCACGCTCTTTAGTTCGG	GGAGGTGTCCAGGAATTAGAT	583	60-600
LRAT	E3A	CTTGGGTTTAGCCACCTTTC	CAGTAAGCACTTTGCGTGAT	352	60-400
LRAT	E3B	TATGGATGGCTGGCTAACTT	TTTCCAAGGTTTGGATGGTG	244	60-400
LRAT	E3C	AAAGCACCATCCAAACCTTG	ACACACACATGCCAAATACC	590	60-600
LRAT	E3D	ACTAGGAAGCCTGGAATTCAT	AAGACCTCAGCAGAATCAA	541	60-600
LRAT	E3E	ACCCAAACAAGTAGAACCCA	GTTGTGGCAAATTAGTGGT	358	60-600
LRAT	E3F	AGCTAGACTTGCATTTGAGG	ATCTTAAGAACGTCCTTGGC	550	60-600
LRAT	E3G	GGTGTCTCTGGACCTATTCT	GCCTCTGCATACAGATTTT	509	60-600
LRAT	E3H	TACAGTGCTGTGGGAATACA	CATGAGTAGCTGGGACTACA	491	60-600
LRAT	E3I	AGCACATTTCTGATCACA	TGCAGGAGCATAAAGGATGAA	446	60-600
LRAT	E3J	AAGAAGAAACCTGAGCCAT	TTCCTTCACTCAGTCAGCTT	381	60-600
LRAT	E3K	TGTCAGATACTAGGCAGGTG	GTACCAGACCATTGCTTTCC	445	60-600
LRAT	E3L	AGGAAAGCAATGGTCTGGTA	GAGTCTTCTTGACACTCCA	277	60-600
LRAT	E3M	CCTGATGGAGTGTCAAGGAA	TCAGTCTGAAGACAGATCCAC	595	60-600
RD3	E1A	TTTCCAGCTGCTGGT	CTGCTTTATTTCACACAATCA	599	60-600
RD3	E1B	CAAGACCATTCTCACCCAAC	TGTAGGAGGGAGCTGATAGA	123	60-600
RD3	E1C	TATCTGTAGAGGGAGTGGCT	GAAACATTTGCCAACAGCAG	198	60-600
RD3	E1D	GGCAGTCTACATCCTCAAGT	GAATGCCATCTGGACACAAG	404	60-600
RD3	E1E	CCTCAGCCCTAACTTCCAA	AGAGAACCAAAGAGAGGCAA	294	60-600
RD3	E2	CCCTTTGCTCCTTCTAACA	GAGCAGGTCTTCTCTCTG	558	60-600
RD3	E3A	GATGGTCTGATGTCGCT	CTAATTGGCCATGAGGATGC	316	60-400
RD3	E3B	AGAACCAGGAGATGAGGATG	AGAGGATGAAGCAGGAAGAG	527	60-600
RD3	E3C	ACTAGCAAGAAGGCATACCA	TCCCTAACTGGCAGATTCAA	199	60-600
RD3	E3D	ACCCTGGAATTGAGAAACCT	TGGTATGCCTTCTTGTAGT	497	60-600
RD3	E3E	TCATCAAGGCCTAACCATGT	GGCAGTGGGATGAGAATCTA	345	60-600
RD3	E3F	TTCCACTGAGGGAATACACA	GCAGCTGAGTGAAATGTTCT	315	60-600
RD3	E3G	GACCATTCTGGGCAACATAG	GGAAGTGTCTACCCTCAACT	582	60-600
RD3	E3H	AAGTGTAGAACTCCACCAG	TTCACTTGGTTGCCAACTT	387	60-400
RD3	E3I	GAACACCACATTGAAAGCCT	TATGTTGCCAGAATGGTCT	503	60-600
RD3	E3J	GTCTTGAACACACTCAACCC	ACCTGGAGGGAGATTCAAAG	444	60-600
RDH12	E1NCBI	TTGCCTACCTTTCTCTTT	GCAGGTGGATCATTTGAGAT	297	60-400
RDH12	E1	GATATGATGGTGGCCTTTGG	ATCAGATCATTCCCAGCAGA	236	60-400
RDH12	E2	GGGTTTGTGGCTAAAGTTAGAA	CCTCTGTCAGCCTCCTTC	590	60-600
RDH12	E3	CAAGGAAAGTCTCCATTGGC	AAGCCTAGGAGGAAACACAA	502	60-600
RDH12	E4	GATGGCTGGGAGAATGAATG	GGTGGATGATGGTTCTGATG	365	60-400
RDH12	E5	AAGGGAAAGGGCAATTATGC	CAGGAGAGGTACAGTGAACA	349	60-400
RDH12	E6	AATTGGTTCACCCAGAAG	GCTGTGGACCTCTAATTTGG	383	60-400
RDH12	E7	CCCTCCTTCTCACTTGTGTA	TCAGCTTCTCAGGATGAACA	369	60-400
RDH12	E8A	ACATTCTGAGAAAGGGACCA	AGTCTCACAAGAGTGTGAGG	359	60-400
RDH12	E8B	GAATCCTGCCTGCTCTGA	GGCTGGTTTCTGATTGTT	557	60-600
RPE65	E1	CTCAAGACTGCTTCCAAACC	TCCCAAAGCCATAACTCCTT	358	60-400
RPE65	E2	TGAGAGACGCCAAGGAATAG	CAGCTCTGCCTCTATCTCTG	232	60-400
RPE65	E3	ATAGGTTGCCTCCTGAGTTC	CCTTACCAAGGACAAGCCTA	319	60-400

BIJLAGEN

<i>RPE65</i>	E4	TTGTCAGTAACCTCTACTCCTC	ATGGCCATTCTAAGCTCCA	326	60-400
<i>RPE65</i>	E5	AGAATCATACATTGCGAGCA	ACTGAACCCAAACTGAATGT	335	60-400
<i>RPE65</i>	E6	GATGAGGGCAGTACTTCTGA	TGCACTTAGGATGAGAGTTCA	398	60-400
<i>RPE65</i>	E7	GTATCAAAGGTAGGCAAAGCA	CGTTTCCAATCTGCTGCTA	367	60-400
<i>RPE65</i>	E8	TGGAAGAGGTTGAAAGGAGA	CAAATTTGTCTGTGGCTTGAG	385	60-400
<i>RPE65</i>	E9	TGTGATTGAGATTGAGTGCAG	GAGCCAACACATGGATTGTT	384	60-400
<i>RPE65</i>	E10	AAGCTCCTTCTAGCTCTCAA	ATACACCTGGCTCAATAGCA	383	60-400
<i>RPE65</i>	E11	ACCCTATCTGGAACAAAGTGA	TGCATTTCTGGCTGTTTGAA	367	60-400
<i>RPE65</i>	E12	CAAAGATGGGTTCTGATGGG	CCTCGTCAAGGTGAGATGA	382	60-400
<i>RPE65</i>	E13	ACGAACTAACATACAGAAGTGC	TCACTTTGTTCCAGATAGGGT	297	60-400
<i>RPE65</i>	E14A	TTCAGTTATGGCCTGTCTCA	CAGGTGGTACAAGAGTCAGA	535	60-600
<i>RPE65</i>	E14B	GTTGAGAGGCCTCAGTTGAT	AAAGCACTGAGTTGAGCAAG	495	60-600
<i>RPE65</i>	E14C	CTGGTCAGTCTGTTCTTCA	TGCGTATACGTAAGTCTCA	567	60-600
<i>SPATA7</i>	E1	CAACTGTCCTCTAGTACCG	CGGCCTTGCACTCAGC	356	60-400
<i>SPATA7</i>	E1Ens	GCCCAAAGGAAAAGTTGAGTT	TACAAGTCAAGGTGATGCCA	221	60-400
<i>SPATA7</i>	E2	ACCTGATAGCAAAGTACCC	GCCAGTAAAGGAAAACACTC	399	60-400
<i>SPATA7</i>	E3	AGGTTTGAACCCAAATGGTC	AATGAGAAGTGAAGCTGGAG	355	60-400
<i>SPATA7</i>	E4	GATAAACAGCTGCAAGGTCT	TGGCACAGGAATTTCAAGTTT	337	60-400
<i>SPATA7</i>	E5	TCCATTTATTACTCTAACAAGACCAA	CCAATGGCAGAGTAGTTGTG	386	60-400
<i>SPATA7</i>	E6A	TTGTAAACCCCTGAGGCTATC	GGAGTTCTTCTCAGGACCAT	258	60-400
<i>SPATA7</i>	E6B	GAACCGCAAATTGAGGATGA	ATCAGATCTTAAGGCTGGCA	563	60-600
<i>SPATA7</i>	E7A	AAACCTTGTACCACAGTGC	CAACTTCTGCACTACTCTGC	480	60-600
<i>SPATA7</i>	E7B	ATTACTAGAGGAGCCAGCAG	ATTAAGCCCTTACCAGGCTA	596	60-600
<i>SPATA7</i>	E7C	CCTCTGAGAGCTGAATTTCC	CTGTGCCAAGCATTTACTCA	380	60-600
<i>SPATA7</i>	E7D	GTGAGTAAATGCTTGGCACA	TGCTGAAGAGCATCATCCTT	591	60-600
<i>SPATA7</i>	E8	AAAGTGCTGGATGGATAGAA	ATTAATAGTACTTATGCGGCAA	375	60-400
<i>SPATA7</i>	E9	TCTGAAACACTTCTGTTCC	GTTTCGAGATGATGGATATGCT	395	60-400
<i>SPATA7</i>	E10	AGTACATTGGTAATGGTAGAGATAGAT	TTCTCCCAAGTGGTGAACCTT	399	60-400
<i>SPATA7</i>	E11	CAGGAAAGGATTAGTCTTCCAGC	CCTTTCACCTTCTCCACCA	351	60-400
<i>SPATA7</i>	E12A	GGTGGGAGAAGTAAAAGGAA	GACGTTCTGCTGAATTGTT	287	60-600
<i>SPATA7</i>	E12B	CTGGGAATTCAGAACCAAATGA	CCGCTAGGTTTCTGGTAACT	597	60-600
<i>TULP1</i>	E1	GCTCAGGCTTTCTTCTTCA	CTGGAGTTGAGATTCTTCCC	386	60-400
<i>TULP1</i>	E2	TATTCCTTCCCTGGAAACCC	CTCTGACAGGTCTGGAAGG	359	60-400
<i>TULP1</i>	E3	CGGCTTCCATTGAGCTTC	CGGCTCAAGGGATTAGAGG	393	60-400
<i>TULP1</i>	E4	TCTCTGGGCCGTTCCC	GTGTGGGCTGCGGAAG	580	60-600
<i>TULP1</i>	E5	ACCATCACAGCATTGATTCAT	AGCAGTCTGGAGGAACTG	597	60-600
<i>TULP1</i>	E6	CCCAACCAGAAACATGGC	GGGACTATAGGCAGGACAAG	345	60-400
<i>TULP1</i>	E7	GCAAACCTCTTACCTAGCAC	GACCAAGAAGAAGGTGAGC	312	60-400
<i>TULP1</i>	E8	TCTGTTTGACAAAATCTGGT	GGAGCATCCAAGTGAACAT	359	60-400
<i>TULP1</i>	E9	GGAAGTAGGAGGGATACATGC	CCAGAGCCTCCTAACTTGG	371	60-400
<i>TULP1</i>	E10	TGAGCTGCAGGGAGAAATC	ACAGAAAGCGGTGAGTTGT	371	60-400
<i>TULP1</i>	E11	CTATGTACATCAAAGCGAGAGG	CAAACGGGCCTGATTTCTC	352	60-400
<i>TULP1</i>	E12	TGCCAGGAATGATGACG	GCCTAGATAATTTGGCAGGT	599	60-600
<i>TULP1</i>	E13	TGTCCACTGATGTCTTCCAG	CTATGTGAGGACTCCACCTG	481	60-600
<i>TULP1</i>	E14	GCTTGAATGAAGGTGAGCAT	TGCCAAGCCTATTCTCAGAT	389	60-400
<i>TULP1</i>	E15A	AGAGGCACTGAGAGGTCA	AAGGTTGAGGGCACTGTC	343	60-400
<i>TULP1</i>	E15B	TTCTCCCTTTCTCCCTCTTC	AAAGGATTCAGTGGAGGCT	659	160-700

## 7. Primerset 400-600 'LCA4'

Tabel 8: De 84 primerparen in de qPCR-plaat 'LCA4'.

Gen	Exon	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon lengte	Design
<i>IQCB1</i>	E1	AGTTTCCACACCAGATCTCTA	CTCACGTTCTGATTGGCTTA	341	60-400
<i>IQCB1</i>	E2A	TCCCAATTTGAACAATGAGCA	GGAGAAAGAGGATTCCGAGA	592	60-600
<i>IQCB1</i>	E2B	TGTAGAGCTGGGCCTTAAAT	GTGACTTTGTGCCAGCTAAT	191	60-600
<i>IQCB1</i>	E3	GTACCAACGATGGAACCATT	CCTCTCAAACAAGGCAAGAAA	295	60-400
<i>IQCB1</i>	E4	CCAATGCTTGTTAGGCAGATA	AGAGGTCTTAACACTATAATAGAACAG	395	60-400
<i>IQCB1</i>	E5	TTTCAGCCAAATATTGCACA	CAGTGTCTCTAGAAGCTTGA	289	60-400
<i>IQCB1</i>	E6	TGTGGTTATCTGCACAGTTC	AGATCCAGAAACTGTATCCTCT	309	60-400
<i>IQCB1</i>	E7	GGTGATGGAACCTCAGCATT	GTCATGCTTTGATTGGTTTGA	388	60-400
<i>IQCB1</i>	E8	TCTACATAGGTCAGTTATCAACTCT	GTCCGGCATCAAGTFACTG	388	60-400
<i>IQCB1</i>	E9	AAGAGAAAGAAAGTGAGGAACA	AATTCTCAGGAGGGAGGAAT	398	60-400
<i>IQCB1</i>	E10	AAGTCATCTGGTACTGGA	ACCCATCTTGTTAGAGCTAGAG	395	60-400
<i>IQCB1</i>	E11	GGAGATTGTTTCATCGTCAACT	GAAAGATTGCACAACAGCAG	519	60-600
<i>IQCB1</i>	E12	TTGACCAAGGCTTTACAACA	CATTGTCTGATTCCAGAACT	316	60-400
<i>IQCB1</i>	E13	GCAGAGTCTCCTTCACTACT	GTCACTGTTCTCCTGCATTT	513	60-600
<i>IQCB1</i>	E14	ATTGTGTGCTGGTCTGATCT	CTGCTAAGTGGTGGGACT	377	60-400
<i>IQCB1</i>	E15A	CTCTTTGCTTACTGCAGGTC	GCTCTGTAGCTTCCAAGTTC	449	60-600
<i>IQCB1</i>	E15B	AACAGGGAAATGTCCTTCAA	ACCACCTTAGTGAGTAACCC	489	60-600
<i>IQCB1</i>	E15C	GGTTGGAACCAAATAATCATAAAGG	GTTAACATAGGAGGTGTGTGC	284	60-400
<i>LCA5</i>	E1A	CTTCAAAGCCACCTCAA	TTCCAGTCCACTGAAGCC	379	60-400
<i>LCA5</i>	E1B	TCCTAGGTCTTCTTCTCCT	TGGGAGTTTGGTCTAAGAG	267	60-400
<i>LCA5</i>	E2	TGTTCTCGCATTACTGAGGT	ATGGGTCCTAGGAATTGGTC	292	60-400
<i>LCA5</i>	E3A	ATGTACTTGGCCATCTGAAG	CAGAAGTAGTTGTATGTCAGGT	598	60-600
<i>LCA5</i>	E3B	AACGTAATCAGCCCACTTC	ACAAACTCAGATGGCCAAG	162	60-600
<i>LCA5</i>	E4A	TCATCTCGTTCAGGTAGGTG	AGAATGTTACGGACCCACTT	559	60-600
<i>LCA5</i>	E4B	TGTGGCATCTCTTACACAGT	TTACAGCACTCAAAGAACGC	550	60-600
<i>LCA5</i>	E5	ATTC AACCATGCAACACAGT	ACACTGCCATGTGTTATGTT	514	60-600
<i>LCA5</i>	E6	TTCCTTCCCTTCCATTTCAGA	AAAGGAAGCTGAACCAGGTA	302	60-400
<i>LCA5</i>	E7	ACACGATACCTTTCCCTT	CATGCCAGCTGAATTCCAT	365	60-400
<i>LCA5</i>	E8	ATGCAACTTGCCTTATTCCC	GGAATAATCCTGTGCGGTT	569	60-600
<i>LCA5</i>	E8HavA	CATGATCTTGTACCAGAGGGA	GGCTTATCAGGAGCCATACA	471	60-600
<i>LCA5</i>	E8HavB	GGAAGAAAGGTTCTTTGCCT	GTGAGTGAGTTGTGTCATGC	584	60-600
<i>LCA5</i>	E9A	CTTTCTTCTCCTCTCCTTGC	AGTGTAGAGCTTTGCTCCAT	481	60-600
<i>LCA5</i>	E9B	CACTGGCACCAAATAACTGT	GGGAAACTGGAAGGTACCAA	530	60-600
<i>LCA5</i>	E9C	GTCTCCTTACTGGAAGCCA	ATGAGTTCGCATTTGGTAGC	253	60-600
<i>LCA5</i>	E9D	AAAGCTCCTTCACTTCTGG	CAAATCTGTGGCTTCCAGT	420	60-600
<i>LCA5</i>	E9E	AGGACTGCCACGTAAGATAG	ACATGCAGACGATAAACCAG	582	60-600
<i>LCA5</i>	E9F	AGTGTGTTAGCTGTGGGTA	AGTCTGTGTTGGGAAGTGA	179	60-600
<i>LCA5</i>	E9G	GGCAGAAGTCTATGTCTGA	GGCAGTCTAAGCTACTCTT	533	60-600
<i>LCA5</i>	E9H	TCATACCCAGCATGATCCAA	TCCTCAAACCAAGGAGACAA	211	60-600
<i>LCA5</i>	E9I	TTTGAGAGATTCTGTTCCCAA	TAGGACTTCTGCCTTGTGTA	486	60-600
<i>LCA5</i>	E9J	TCTGTCTTGTGCATCTTGT	TATGATTTCTGACGCCAGTC	515	60-600
<i>LCA5</i>	E9K	AGTAGCCTCAGGTATCACTT	ATTGGGAACAGAATCTCTCAA	564	60-600
<i>MERTK</i>	E1A	TCTACTCCTCTCCCACCTTC	ACGGATGGACAGATGGAC	508	60-600
<i>MERTK</i>	E1B	CCGCTCCTCTCCTCCA	TTTGCAAATGTCCAGCAG	401	60-600
<i>MERTK</i>	E2A	GCTGTGCATCACCTTCTTC	GTGTCCAATGTGTGTTTGA	556	60-600
<i>MERTK</i>	E2B	ACATACAGGAAACGTAGCCA	GCCTGGGCTACAGAATGATA	356	60-600

BIJLAGEN

MERTK	E3	TTTGACCAACAACACTGCGT	GCAAGGTTTGCATACAGAGT	377	60-400
MERTK	E4	TTGGGCTCTGTCTCTGTTT	CTGGTCCCATAACTTTGCTG	372	60-400
MERTK	E5	CTCCATAGCTAGCACACCTT	TTGAGACAGTGAGAAAGCCA	348	60-400
MERTK	E6	TTGTTTGGTAGCTGTAGCCT	GCATGGACATGGAATAGTGC	361	60-400
MERTK	E7	TTACCTGCCACAGTGAGAAT	CCTCCAGAGACAAAGTCCAA	546	60-600
MERTK	E8	CTTGGTCTCATTTGAGTGCTT	ACTCAATCACACCAGGTCTT	383	60-400
MERTK	E9	TACATCCTGTCCCTACCTGA	TCTCAAACCTCCTCTGCTTT	500	60-600
MERTK	E9EnsA	GCACAGATTGCCAGAAAGTA	GACCTATGGGTATCAGCAGT	435	60-600
MERTK	E9EnsB	CATGCTTTACAGAACTGCTGA	GTCTGAGGATGGCTTCCATA	339	60-400
MERTK	E9EnsC	AAACGGCTGCATAAAGTCC	CCAGAAACTGTGCCTATGTG	219	60-400
MERTK	E9EnsD	CACATAGGCACAGTTTCTGG	GATGCCGTTGGTCATGATAG	783	60-800
MERTK	E9EnsE	ACCAACGGCATCATTTCTTT	TTTGACAGTGTGCTTTCTC	369	60-400
MERTK	E9EnsF	GAGAAAGCGACACTGTCAAA	CACACTGTACTCCACAGGTA	392	60-400
MERTK	E10A	ACCTGTGGAGTACAGTGTG	CCAAAGATGATGAGCACAGG	320	60-400
MERTK	E10B	TTCCCTGTTACAAGCCAGT	CATCTGGGAGCAATGTAAGC	327	60-400
MERTK	E11	CATCCTTGTGGAATCAGTGC	ATGGCAATGTCTGGCTATCT	326	60-400
MERTK	E12A	TAACCTTGCCTGAAGGATT	TGCTTACCTTACCCAGAAT	610	60-800
MERTK	E12B	GGGAGTCAGTGAGGAAGTAC	GGTGCCAAGAACAATGAACT	415	60-800
MERTK	E13	ATTTCTGTGGTCAGGGAAGA	ATGGAGCACCCAATACTGAA	206	60-400
MERTK	E14	ACCACTCATCTGTTTCCTGT	TTCACCTTTATCCCCTGCT	594	60-600
MERTK	E14Ens	TACTTCCGAGAAATGCAGGA	GAGTGCAAAGCCAAATTAC	519	60-600
MERTK	E15	GTAACACACGGCTTCAGTTT	TTGCTCTGGCTAAGTCACAT	278	60-400
MERTK	E15EnsA	ATGTGACTTAGCCAGGACAA	TTCAATGGCCTTCCCATAGT	301	60-400
MERTK	E15EnsB	CCCACATGTACTCCTGTTCT	AGAAAGGTTAGCCACTGTCA	392	60-400
MERTK	E15EnsC	ACTCTTCAAAGAGGTGAGG	TCCTCAGCTTAGATTCCACT	374	60-400
MERTK	E15EnsD	CATTCTCTTAACACGGGCAAA	AAGGATGGGCACAGAGTTA	393	60-400
MERTK	E16	CTGAAGGATACACGGAAGGA	AACAGGTCTCTACTAACC	494	60-600
MERTK	E16Ens	TCTTCTTGTGTAGGAGCTGT	AGTGGATAGAAACAGCTGGA	321	60-400
MERTK	E17	TGTGTCTGATACAGACCAGTAA	CTGCCAACCCCTCAGTTTATC	349	60-400
MERTK	E18	TGCGTCTCACACATAATTGC	ACCTGGCTAACAGCAGTC	381	60-400
MERTK	E18EnsB	GGCCAGGAGTTTGAAATCAG	GAGAGGAGAGGAACTGACTG	422	210-550
MERTK	E18EnsA	CTCCCTTCCATACTCTGCAT	TTCAAGGACCTCATGCACT	335	60-400
MERTK	E18EnsC	CCCATTCTCTCCTCAATACA	TCCAAGTAGAATAGTATCAATCAC	365	60-400
MERTK	E18EnsD	CAACTCTGCCATTGTGACAT	GTCTAAGGGATCGGTTCTCC	458	60-600
MERTK	E19A	CTGGGAGACAATCCACTTCT	TTGCTGTGATGAACTTCTGC	314	60-600
MERTK	E19B	CACTGGACTTGAACATCGAC	CATCAGGACTTCTGAGCCTT	322	60-600
MERTK	E19C	AAACCTCATGAAGGACGGTA	TACATCAAGACCAGAAGCCA	649	110-650
MERTK	E19D	CTTCAGCTGCTCCTTGATATT	GCTATTACGAAGTGGCAGAG	576	60-600

### 8. Primerset 400-600 'ABCA4'

Deze plaat bevat naast het *ABCA4* gen ook de *BEST1*, *PRPH2* en *TIMP3* genen.

**Tabel 9: De 96 primerparen in de qPCR-plaat 'ABCA4'.**

Gen	Exon	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon lengte	Design
<i>ABCA4</i>	E1	GTCCAGCTAAACACTGCTTC	AAAGGGATTATGCTTTGAAGGG	379	60-400
<i>ABCA4</i>	E2	GCCATGGTCCTAACACTGTA	TGTCTGCTCTGGTTACGTT	399	60-400
<i>ABCA4</i>	E3	TGCCCTGACAGTTAACAGAA	CTAGGTCTGCATCCTGCTT	386	60-400
<i>ABCA4</i>	E4	CACCAAGGTGATGTTCAAGC	TGGGTGACAGAGCGAGA	389	60-400
<i>ABCA4</i>	E5	CTGAATGTGAACACAAGGAAGA	CCTTCTCTGAGAGTTGAGT	348	60-400
<i>ABCA4</i>	E6	CAAGGATTGTCCAGAACACC	ACACAAGGTATTCCCAGGTT	396	60-400
<i>ABCA4</i>	E7	GATGTGAACAGGTGCTTTGA	ATCAGACTGTGCCTATGTGT	316	60-400
<i>ABCA4</i>	E8	CCCAGGTTTGGTTTCACCTA	GGCCTCACAGCAGATTATGA	391	60-400
<i>ABCA4</i>	E9	AAACGCAAGAGTCCACTTAG	GCATGGAGTTGAATGAGACA	378	60-400
<i>ABCA4</i>	E10	ACAAGTGGAACTTCTTGCC	GGAGATGGTGAATTGTTCTGG	355	60-400
<i>ABCA4</i>	E11	CCACTTGACTTGCTAAGGGA	ATGGCTGAAGAACAAGACCA	352	60-400
<i>ABCA4</i>	E12	ATGAGTCCAGTCTCAATCCC	TCCTGTGACTTCTGTGTGTA	374	60-400
<i>ABCA4</i>	E13	GGCTCTCTCTAAAGACATGGA	AAGAGAATGAGTCCGAGTCA	377	60-400
<i>ABCA4</i>	E14	ACATGAACAGGAGGAAAGGG	CTGGGCTTTGTTCTCAACAC	391	60-400
<i>ABCA4</i>	E15	GACTGCTACGGACCCTTC	CCCTTAGGGCAGAATGAGA	354	60-400
<i>ABCA4</i>	E16	GGTGGTGACAAGAGATCAGA	TGAGCTGACCTTACACTGAG	541	60-600
<i>ABCA4</i>	E17	TCATCAGGAATCACACCGT	TTCTGGGAGCCTGAGAATAG	336	60-400
<i>ABCA4</i>	E18	GACCTCTGAGAAGGGATCTG	ATTTGCTCCCTGTACCTCTC	336	60-400
<i>ABCA4</i>	E19	CGCTGATAGGGAAGACTA	AGAATACAAGGGCTGGAG	332	60-400
<i>ABCA4</i>	E20	TGCAAGTAGGACAAAGGACT	AGTTCTACTGAACCTGGTG	382	60-400
<i>ABCA4</i>	E21	CCACCCTTAGAAGCTCTCC	TGTAAGATCAGCTGCTGGAA	310	60-400
<i>ABCA4</i>	E22	AGTCATTGTGGTTCCTGTACT	CAAACCACTGCTGGGTTAAG	353	60-400
<i>ABCA4</i>	E23	ATGGTCCCAGAACAAGACA	TGCTGTACACCTTTACCAA	394	60-400
<i>ABCA4</i>	E24	TCCCTTTGGGAATGAAGGAA	ACTACACTTGGCAGTGAGAA	385	60-400
<i>ABCA4</i>	E25	AGATAGTTGCTATGCTTGGGT	AACCTCACAGTCTTCCAGTT	397	60-400
<i>ABCA4</i>	E26	CTTTCGAGATGGAACCTGGG	CTTGTGGTACTGTGTGCTT	288	60-400
<i>ABCA4</i>	E27	GGGAAGGCTGGGAGAG	TGGCATTAGAGATCCAGACC	384	60-400
<i>ABCA4</i>	E28	CTTCTAAGCAGCATGTGACC	GAGGCTGCAGGATAAATGTT	297	60-400
<i>ABCA4</i>	E29	TATAGAGCTGTCCAGTGGTG	TCCAGTAAAGGCTCTGAGTT	392	60-400
<i>ABCA4</i>	E30	GTGAGAGACTCAGGAGATACC	CTGGGTCTAAAGAGGAGGAG	377	60-400
<i>ABCA4</i>	E31	TGTATGTGCCTCAATTGCTT	AGACAACAAGCAGTTTCACA	344	60-400
<i>ABCA4</i>	E32	TGTCTTCTGAGTCTGGGATG	GGGAAAGAAAGTTAACGGCA	277	60-400
<i>ABCA4</i>	E33	GTTTCTAGATGTTTAAGGAAATCAGGT	CCCGAAAGTTCATGTTTCCC	390	60-400
<i>ABCA4</i>	E34	GGTAGCTGGAAGACATTCTCT	GCCGGATCATGAATGTGAG	363	60-400
<i>ABCA4</i>	E35	TATGTGCCTGACTAAACAGC	AGGAATGTCTTCCAGCTACC	410	60-600
<i>ABCA4</i>	E36	TGCGGTGACAGTGATTATTG	TCTTCTCCTCCTTCTGCTCT	537	60-600
<i>ABCA4</i>	E37	ACAGATCCCTGGTTATCAGC	TCGAATCAGAATCCCAGACC	394	60-400
<i>ABCA4</i>	E38	GAAGAAAGTGGCACTCATCC	CCAGACGTATTGTAGGTGGA	338	60-400
<i>ABCA4</i>	E39	TAACCCTCCCAGCTTTGG	CTCCATTGCAAACCCATGAT	363	60-400
<i>ABCA4</i>	E40	GCCAGGCTTTGAGAATGTAG	CACATAAGGCCTGGTCTAGT	355	60-400
<i>ABCA4</i>	E41	TCAGTGCCCGAGATGAATAG	TCCCATTGAAAGGACAGTG	396	60-400
<i>ABCA4</i>	E42	CTCATGTGGCTAGTGAAGA	TGTCTCAGTACTACCACAC	373	60-400
<i>ABCA4</i>	E43	TGATGATCACCTTCCTATTCTT	CAGCTCACACACACTTAC	266	60-400
<i>ABCA4</i>	E44	TACTTGGCACACAGTAGACA	CCTAGCTCTATGGTCATCCC	357	60-400
<i>ABCA4</i>	E45	GCTGTGTGAACCAAACT	CCCAAGGCTTTGAACTGG	382	60-400

<i>ABCA4</i>	E46	TACTTGACTTGAGATGCTGA	GGAAGCAGTAATCAGAAGGG	335	60-400
<i>ABCA4</i>	E47	GACTCTCCAAGTGTCAATGG	CTGTGGCTCACATCCC	271	60-400
<i>ABCA4</i>	E48	CCCAATAAACAGAGGGCAAG	AAGTGATCCTCCCACCTCTA	544	60-600
<i>ABCA4</i>	E49	AGTTCTTCAGCACAGAACAC	TAGAGAGCAAAGTGGGTAGG	374	60-400
<i>ABCA4</i>	E50	TGCACCCATCTAAGAATGTC	TGAGTGCCCTTCAGAAATTG	585	60-600
<i>BEST1</i>	E1A	GGTGATGAAATCCCAAGCA	GTCAACAGTCCTGGTTCTG	128	60-400
<i>BEST1</i>	E1B	TTCAGATAAGGGCACTGAGG	TTCTTCTGGAGGGTGTGG	362	60-400
<i>BEST1</i>	E1C	CCAACACCTCCAAGAAGAA	TCCCACACAAATACGCAAGA	350	60-400
<i>BEST1</i>	E2	CCTATGGGAGAGTTGAGGTC	GGAGCTCAGCTTAGTCTTGT	413	60-600
<i>BEST1</i>	E3	ACAGTCTCAGCCATCTCCT	GGCAGGACGCTTACCTAAC	354	60-400
<i>BEST1</i>	E4	GCTGACATCATGGTCCCT	CTCCACCCATCTTCCATTCC	597	60-600
<i>BEST1</i>	E5	TTCTATAGGTCAGCAGGTG	AAACCTTGTTTCTGTGGAC	299	60-400
<i>BEST1</i>	E6	AGAGGTTTAGTGAGCTTCCC	CTGCTTCTTGGTCTTCTA	284	60-400
<i>BEST1</i>	E7	CATCCTGATTTAGGGTCC	CTGAACCTTAGGGCTTTGTT	513	60-600
<i>BEST1</i>	E8	GGACTGGCTCAGAAGAGTTA	GGTTGATCATTACTGTGAGG	398	60-400
<i>BEST1</i>	E9	GAGGGAGAGATTCTCCAAG	AGTGCCTGACACTACTGAA	357	60-400
<i>BEST1</i>	E10A	GACAGATCAGGAGAGAGGTG	TGTGACTGTGAAGCTTTG	538	60-600
<i>BEST1</i>	E10B	GCAAACCTCAAGGACCAAAC	GTTGGTTGGTGATTGTTCCA	470	60-600
<i>BEST1</i>	E10C	TTAACCTGACGGATATGCCA	GCACAACCTCATCTTCTTCC	387	60-600
<i>BEST1</i>	E10D	TCACCTCACCTGGTATCAC	AGCCCTAGAAGCAAGACTG	595	60-600
<i>BEST1</i>	E11	CTCAACCTTTGCCCTCCTA	GTTGTCTTTAGGTCTTGGG	547	60-600
<i>PRPH2</i>	E1A	GTTGAAGACACAGGATAGCAC	ATGGGATGAACCTGGCTAAA	570	60-600
<i>PRPH2</i>	E1B	GCCACTCACTCTTTGACTTC	GAAAGAGGAGCGATGTGATG	453	60-600
<i>PRPH2</i>	E1C	CACCTGATACACCTCACAT	GCTGCAGATCGAGTTCAAAT	259	60-600
<i>PRPH2</i>	E2	AGTGGTGGGAAAGAAACCA	AGTGTGCGAGTGAATGACTA	589	60-600
<i>PRPH2</i>	E3A	TGGGTCAAGTCAACAAC	GCTCCTGTGGTTTCTAATG	483	60-600
<i>PRPH2</i>	E3B	CTGTTTAGAGCCCTCAATGC	GGCACCATTTACAGAGACT	486	60-600
<i>PRPH2</i>	E3C	GGAGATCACCTGGCACTTA	GCTTAATGCCAGAAGTTGGG	272	60-400
<i>PRPH2</i>	E3D	CCCTGAAAGCTTCTCTTCC	TCACTGAGTCTGGAGTGAAC	437	60-600
<i>PRPH2</i>	E3E	CTATCCCAAACACCATCGG	TGAGATAGCCATCTTCTG	270	60-600
<i>PRPH2</i>	E3F	TTGGATCTGGTCTTCTGCTT	ACTTACCTCTGCTTCTGACC	161	60-600
<i>PRPH2</i>	E3G	GAGATGGCAAGATGGAGAGA	AAGCAGAAGACCAGATCCAA	431	60-600
<i>TIMP3</i>	E1A	TAGTTGGTTCTGGTTTGGGT	CAAGAGGAGGAGGAGAAGC	410	60-600
<i>TIMP3</i>	E1B	GGCGGCATTATCCCTATAA	CTCTCCAAGTTGCCGTG	462	60-600
<i>TIMP3</i>	E1C	TTCTCCTCCTCTTCTGCT	ACATCGAGTTTCTCCTCC	523	60-600
<i>TIMP3</i>	E2	TGAGATGCTGTTCTGATGT	CCTTAGCCAGGACTTCTCTG	216	60-400
<i>TIMP3</i>	E3	TTAGGGATCATACGGGTGTC	ACTGGGTAAAGTGGGATGAAT	323	60-400
<i>TIMP3</i>	E4	TGAATTCTCTCTGGGCTAGG	GATGTTTCTAGGGCTGCAAG	248	60-400
<i>TIMP3</i>	E5A	TAACCTCTCAGAGCCTCCTA	TGTGGCATTGATGATGCTTT	431	60-600
<i>TIMP3</i>	E5B	TTCCAAGAACGAGTGTCTCT	CTGGGAAGAGTTAGTGTCCA	233	60-600
<i>TIMP3</i>	E5C	AAGCATCATCAATGCCACAG	AGACACAGACAGACACAGTC	598	60-600
<i>TIMP3</i>	E5D	TGAAAGGCCAACCATTTTCCAG	TGACCTCAGGCAGATGTTTA	308	60-600
<i>TIMP3</i>	E5E	AGGCCAGAATAACAGAGCTT	TGGATAGTGTATGGTGTGTGT	224	60-400
<i>TIMP3</i>	E5F	AACGCTTTGGTAGATTTGGC	CAAACATGAAGCAGGGACAA	416	60-600
<i>TIMP3</i>	E5G	TGTCGTTGCTTGTGTTGAAGA	CACCTACTCTCAGCATCTCA	525	60-600
<i>TIMP3</i>	E5H	ACCAGTTGTAGGGTTTCTGT	CCACAATGGGAAAGGTACAC	441	60-600
<i>TIMP3</i>	E5I	AGCAGACAACACACTGTAGA	AGTTCCTCTTGTGTGAGAG	416	60-600
<i>TIMP3</i>	E5J	ACAAGTGGACATCAGTGTCT	CAGCCTACACATGACACAAG	375	60-600
<i>TIMP3</i>	E5K	TCTTGTGTCATGTGTAGGCT	GTTCAAGAACCATGTTGCCA	549	60-600
<i>TIMP3</i>	E5L	TACTGGGAGACTCCTGTCTT	TTAGGTAGCCAGAAGCCAAA	236	60-600
<i>TIMP3</i>	E5M	CTCTGTCTGCATGTGACAAT	TTCAAGGCCTGCTGGT	598	60-600

### 9. Primerset 400-600 'USH2A'

Tabel 10: De 96 primerparen in de qPCR-plaat 'USH2A'.

Gen	Exon	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon lengte	Design
USH2A	E1	CCATCTGTCTGTCCTATGCT	GCAGCTCAGTTCCAAGAG	373	60-400
USH2A	E2A	AGCTACTGAGGCCTGCT	GGCCTGGGATGAGCTTC	595	60-600
USH2A	E2B	TTCAGCCATACAGCTAAGGT	TGCCATACAGATCTTCACA	202	60-600
USH2A	E2C	TGAAGGCTAAGACCAAAGGT	CCTAACGCCCATAGCAATTC	412	60-600
USH2A	E3	GAGAGAAAGGAAGACAAATCCT	TGAGCAAAGTTTGAGGTCAT	334	60-400
USH2A	E4	TAATCTGCCATCCAGTTGGT	GTCTCCAGCTGAACAAAG	399	60-400
USH2A	E5	GGAGTTCCTCAAGAGTAGCA	CTTGTCAGGTATTGCTTGGT	320	60-400
USH2A	E6	TGAAGTTTGTGGGCATTTGT	GAAAGCTAAACGAGTGACA	459	60-600
USH2A	E7	CCTAGAGAGCTAGCATACTTGT	CCATGGTTTGATATATACTGATGGT	329	60-400
USH2A	E8	CTTGAAATCTGGCTTGCTCT	TTTCAGATTGTTTGGCAAGTT	558	60-600
USH2A	E9	TTTGTTAGGCCAAGATTAAGTTCA	CGGGTTTGATATTGGTGAC	398	60-400
USH2A	E10	TGCATTGTAGATAGAAGCACA	GTGCTTTACTTCTGGTAAAG	350	60-400
USH2A	E11	ACATAGAGGATTTCTGGCA	AGGTAGAGATGAAAGGTGCAT	383	60-400
USH2A	E12	CTCTTCAGTTAAGAAATCAAATAGAG	TGTCTTGACCTAATGAGCA	352	60-400
USH2A	E13A	CACATCTGGCAGTGTGAA	GTGTCTCGTCTATCTTGAATGAA	597	60-600
USH2A	E13B	ACCAGAAACAGGGAGAAAGTT	AGGTCTTCGCTGTAATCAGT	264	60-600
USH2A	E14	CTTGGTCTCTCAAAGTGCTG	TTGACACACTGAAGGACAGA	485	60-600
USH2A	E15	AGCCTTTCTGATGGGTTCTA	ACAAGCCGTCTTACTCTACA	366	60-400
USH2A	E16	ACAACAGCATTATCCTCAATGT	AGAAAGACCTCTTTGCTGGA	338	60-400
USH2A	E17A	TGGTGAGACCAATTCTACAT	AGCAATGATTCTTCACCAACT	544	60-600
USH2A	E17B	TGTTCCACTAACCAGGACAA	CCCAAAGCTAAGTCCACCT	255	60-600
USH2A	E18	GCTGCAAGTACTTTATGACCT	TTAACTGACCTGTCCCTACC	538	60-600
USH2A	E19	GACATACAAAGAGGGAGGCT	TGCAAGTAGAAAGTAGCTGGT	565	60-600
USH2A	E20	AGAGTTAGTGAGGGAGGAGA	ATGGAACCTTGACTGCCAAG	347	60-400
USH2A	E21A	AAAGCTATCAAAGGGCTGAA	TCAGTTCCTAGAGCCATACA	514	60-600
USH2A	E21B	TGCAAACCTATTTGCTCAGA	TCCACTCACCCAGTCAATAC	371	60-600
USH2A	E21C	TTTGTGACCGAAACAAGAGC	TTGTGAAGTATGTGCCAGGA	361	60-600
USH2A	E21D	AGCTGTAAGTCACAGAGGTC	AGCCAGGACTATGGTAAAGC	268	60-600
USH2A	E21E	TCAGGGAGGTAGTTTCCATTT	CCCATGACCTCTGTGACTTA	561	60-600
USH2A	E22	CTCAGTACCAGGCACCTAC	AGACCATGCGAGTATATTGCT	331	60-400
USH2A	E23	CCCAAAGGCCAAATCAACAG	GTATGCATGCTGTATCAGGA	390	60-400
USH2A	E24	ACAAGTCATATGGAATACATGGTT	AGAGAGTGGTATCCCAAAGG	385	60-400
USH2A	E25	TGAGGTCAAGTTAATCAACAGG	GAGGCTAGTGGCAGATGAA	579	60-600
USH2A	E26	AAATGTTTCACAGGACTTCAA	GACTGTGCTCCTAGAGTTTCT	382	60-400
USH2A	E27	AGCCTGAGTCTATTGCTATCT	TAGAGTGCTTTCAGGGAAT	489	60-600
USH2A	E28	GGCTATCACTCGATACAGGT	AATGTAGTGCTGCAGAGGA	437	60-600
USH2A	E29	CTGCTTCAGGTAATAGTCCT	TGTTTACGAGGGTGGTCTC	331	60-400
USH2A	E30	TAGATGCAGGCTTCCACTAC	GAATGGCTCAAGATGTGCAG	530	60-600
USH2A	E31	GCAATGCACTTTGTCATCAA	TCTGTCTCTGGTCTCTTTGT	363	60-400
USH2A	E32	CTGGATATCGAGAGCCAATA	CATGCATGGGATTTAGGTT	350	60-400
USH2A	E33	ATCAAAGTTCCAGATCCA	AGGACTATAGTGGAGGAGTGA	386	60-400
USH2A	E34	AAGATGGACCACGGGAAG	CAAATCCAAGTTCAAATGTGCTC	332	60-400
USH2A	E35	CACCACATATAAGCTGCCAT	ATGAATCTCTTCTCAATGTTC	307	60-400
USH2A	E36	AATCTCCCATCCTGCTTGAA	CACATCAAGAGTGCTTGCTT	357	60-400
USH2A	E37	GGGCAGTAGCTTATCCGTA	CTCAAAGCGAAGCATGTACT	376	60-400
USH2A	E38	ACCAGAAATACAATTGAGCCT	ACTCAAATAATAGCAGGAATGAA	374	60-400
USH2A	E39	TGAGAAGTACCTACTCTTCAA	GGAAGTACAGGAGTTCAGGA	397	60-400

USH2A	E40	GTCCTAAACAACAAGTAAATAAGGG	GAGATCTCATTGATGGCAGAA	399	60-400
USH2A	E41A	TTTGTGCCTCCATGAAGAGT	TTTGAGGAGAGGTGGGACAT	595	60-600
USH2A	E41B	AGTCTGCAAAGGAGAGAGAA	GAGGAGTCATTCCATGAGGT	230	60-600
USH2A	E42	GCCTCCTTCATTTCCCTACT	AAGGCCTCAGGAGAATGTAG	540	60-600
USH2A	E43	AACTGATAACACGCTCACAC	ATATATCACACGCACATGCC	323	60-400
USH2A	E44	ATTTACCAGTAACACTTCACTATCAA	GGGTGGAAGGAAATCCTGTA	387	60-400
USH2A	E45	CCGGCAAGAATCAATCAATTTTC	ACAAAGGCTCTCTAAACTTCTT	388	60-400
USH2A	E46	ATCCACTTGAAGACATAGCCT	GAGGAACCCCTTGCTAAACC	380	60-400
USH2A	E47	TGTCATGGCTGAGAGGATAC	AGCTCATTCTTTGGAGTCA	371	60-400
USH2A	E48	TTTCACCTGGAGTCTTGAGT	AGTATCTATTGCTGCCACTT	350	60-400
USH2A	E49	GGAGTTAGCCAGATCTCCAG	TGGTCTCAGATCTTCTATGCC	544	60-600
USH2A	E50	TCTCACTCTCTGCTTCTC	AATCAGTTGGGATCTGCAAG	379	60-400
USH2A	E51	TGAACAATGTATTTCTCTTTCCA	ACTTTATAGCAGCCTCAGTT	356	60-400
USH2A	E52	AGGAGAGTTGATGTCAGAGT	AAGCCTACCCTATGTATGTCT	371	60-400
USH2A	E53	CTACGAGGACTACACCACAA	CAATTCGATCCCTGCATC	582	60-600
USH2A	E54	AACACGCTACTTAACACCAC	TTGCATTTCTCCGAACACT	378	60-400
USH2A	E55	GAACACGCTCTTTGGAAGT	AGTGACATTCTCATTGATCAGG	388	60-400
USH2A	E56	AGGAGTTTACAGATTCCACCT	TGCCCAATACTTAGCCTCTT	353	60-400
USH2A	E57	GGCCAATGAATGAGGAAGTT	ATCCACTGCTAGTTGTCTGA	533	60-600
USH2A	E58	CAGGAGACCGACTATGTCTT	TGTCACAAATTTAGGACTAAGCA	374	60-400
USH2A	E59	TTACTCGATGCCAGACTGTG	CACACACACACACACACAC	399	60-400
USH2A	E60	TTGATTCTGCTGTGTTGGAG	CCCTTCTGTATGAATATGTAGTTCT	304	60-400
USH2A	E61	TCATATATTTAAGCCCTAAGTGAAGA	ATGACACCAGGAAGAAACAG	594	60-600
USH2A	E62	TGGAGGAGCTATCAAGGAGA	TCTGGTCCACTTTCTGAGTG	593	60-600
USH2A	E63A	AGGATATCACAGGTGGAGAG	GGGCTAAGTAACTACACAAAGA	589	60-600
USH2A	E63B	GCATTTATTCTTTGAAGCC	GCCTGTTAACCCTAATGGAA	385	60-400
USH2A	E63C	GGAGGTTTCCAGGTGATTTT	GATCCCACCAGAACAGTCTA	545	60-600
USH2A	E63D	TTGCTGGCAGTTACTGTGTA	CTCCAACATTGCAAGTCACA	192	60-400
USH2A	E63E	GCTCAGGCAATAGAAAGGTC	TAGGAGGGATGGAACCATTG	436	60-600
USH2A	E64	GTCCTACATTTCTTTAAGTGCCT	CAGGTTCAAGCCATTCTCAA	588	60-600
USH2A	E65	AAGTTCACCGTAGAGCAACT	GTTACATGGTCAAAGGCAA	569	60-600
USH2A	E66	ACCATGAGTTCATATGTCTGT	GGTGGGATCTGGATAACAT	382	60-400
USH2A	E67	AAGCTTCTCTGACCACAT	GAGCCTGTAGCTCTGTGAA	385	60-400
USH2A	E68	GGTCAGCTTTTTCAGATTTAGCA	TTGGATTGGTTCGGTTTGAT	365	60-400
USH2A	E69	AAACTCTGACAACACTTGGC	CATGTGCCCTATTGTAGGTG	287	60-400
USH2A	E70	CTAGGGTTAGCCTCTCTTGG	TGCTTTCTGCTTTCAACTCC	504	60-600
USH2A	E71	ACTCATGTTGTTTTCAGCTTTCC	TGCTGTCTTGGAGAAATGC	272	60-400
USH2A	E72	ATTCGGTGAAGTACAGGCA	CCCTTCACTGACAATGTGTG	396	60-400
USH2A	E73A	CCAAACAGAACCAAGTGACA	GTGCATGTGATGTGATCCTT	562	60-600
USH2A	E73B	GCAGTGACATCCTTTCAACA	CTCCTGGGTTATCACTCACA	346	60-600
USH2A	E73C	TAGAACCTTCAGCCTTGCA	CAAGATGGCTCACAGTTGTT	261	60-400
USH2A	E73D	CTAGAGCAGGTGACAGACAT	TGACAAGGCTGAAGTTCT	572	60-600
USH2A	E73E	AGGATGAAGGAAGACAAGAGG	GCAATATTAGGCTGCGTGAA	377	60-600
USH2A	E73F	AGGTGGTAGAACTTCTGCTT	GTCTGTACCTGCTCTAGTT	458	60-600
USH2A	E73G	ATGCAAGTTTGTGACCACTC	CTCCTCAGACTGACCAACTC	359	60-600
USH2A	E73H	GCCCTAAGCTATGGAGTCAA	ATATGCCGATTCTGGGACAA	411	60-600
USH2A	E73I	ACATCAGTGGGTCTCAACAT	AGTGGTCACAAACTTGATC	561	60-600
USH2A	E73J	ATAGTCCCTGTGCATAGCAT	ACTCGCCTCTAGAGATTCTG	157	60-600
USH2A	E73K	TTGTGCATTTGAAACCAACT	CCCACTGATGTTCCACAATC	448	60-600



### Bijlage 3: Protocol qPCR

Alle qPCRs worden uitgevoerd met de LightCycler<sup>®</sup> 480 van de firma Roche.

Volgende stappen worden voor een qPCR doorlopen.

1. Voeg de *mastermix* buffer, het doelwit DNA en het RNase-vrij water volgens de benodigde hoeveelheid samen (*tabel 5, p23 in de masterproef*).
2. Verdun de primers in een *96-well* plaat tot de gewenste concentratie. Dit wordt gedaan met behulp van de TECAN EVO<sup>®</sup> pipetteerrobot volgens het script '2009\_07\_03\_samenVOEGEN\_primerverdunningen'.
3. Voeg de primers en de *mastermix* samen in een *384-well* plaat met behulp van de TECAN EVO<sup>®</sup> pipetteerrobot, volgens het script '20090921\_mastermix\_test'.
4. Centrifugeer deze *384-well* plaat af (3 minuten bij 1500 rpm).
5. Plaats de *384-well* plaat in de LightCycler<sup>®</sup> 480 en selecteer het gewenste qPCR-programma (*tabel 12*).

**Tabel 11: qPCR-protocollen van de verschillende *mastermixen*.** Vier *mastermixen* worden gebruikt: Eurogentec (EGT), KAPA SYBR<sup>®</sup> Fast, SsoFast<sup>™</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix (BioRad) en PerfeCta<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green SuperMix (Quanta). Voor EGT, KAPA en BioRad werden twee verschillende protocollen gebruikt. RC = protocol voor qPCR met *reverse complement* primers. LANG = een zelf ontworpen 'lang' protocol.

	EGT		EGT(RC)		KAPA		KAPA (LANG)	
	Temp	Tijd	Temp	Tijd	Temp	Tijd	Temp	Tijd
	95° C	10 min	95° C	10 min	95° C	10 min	95° C	10 min
Amplificatie (x45)	95°C	10sec	95°C	10sec	95°C	10sec	95°C	15 sec
	60°C	1 min 30 sec	60°C	45 sec	60°C	1min30sec	60°C	40 sec
	72°C	1sec	72°C	1sec	72°C	1sec	72°C	1 min 30 sec
Smeltcurve	95°C	5 sec	95°C	5 sec	95°C	5 sec	95°C	5 sec
	60°C	1 min	60°C	1 min	60°C	1 min	60°C	1 min
	95°C	Continue	95°C	Continue	95°C	Continue	95°C	Continue
<i>Cooling</i>	40°C	30 sec	40°C	30 sec	40°C	30 sec	40°C	30 sec

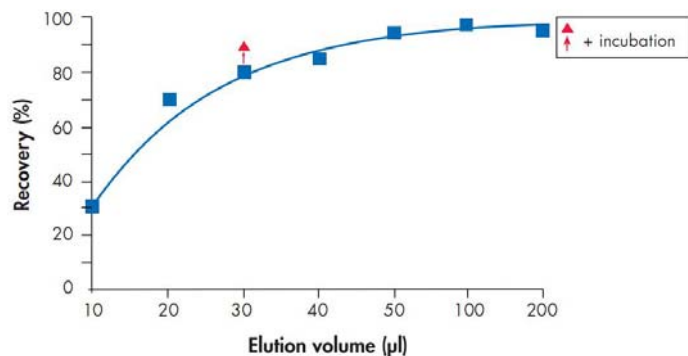
	BioRad		BioRad (LANG)		Quanta	
	Temp	Tijd	Temp	Tijd	Temp	Tijd
Pre-incubatie	98°C	5 min	98°C	5 min	98°C	5 min
Amplificatie (x45)	98°C	10 sec	98°C	15 sec	98°C	15 sec
	60°C	10 sec	60°C	30 sec	60°C	30 sec
	72°C	20 sec	72°C	1 min 30 sec	72°C	1 min 30 sec
Smeltcurve	95°C	5 sec	95°C	5 sec	95°C	5 sec
	60°C	1 min	60°C	1 min	60°C	1 min
	95°C	Continue	95°C	Continue	95°C	Continue
<i>Cooling</i>	40°C	30 sec	40°C	30 sec	40°C	30 sec

## Bijlage 4: Protocol QIAquick zuiveringskolom

Volgende stappen worden doorlopen voor een zuiveringsreactie met behulp van de QIAquick zuiveringskolommen:

1. Voeg 5 volumes buffer PB toe aan 1 volume PCR reactiemix en centrifugeer de kolom gedurende 1 minuut aan 13.000 rpm.
2. Verwijder *flow-through* en plaats de kolom terug in het epje.
3. Voeg 0,75 ml buffer PE toe aan de kolom en centrifugeer de kolom gedurende 1 minuut aan 13.000 rpm.
4. Verwijder *flow-through* en plaats de kolom terug in het epje. Centrifugeer de kolom nog 1 minuut aan 13.000 rpm.
5. Plaats de kolom in een 1,5 ml epje en voeg 50  $\mu$ l buffer EB toe aan de kolom. Alternatief kan 30  $\mu$ l buffer EB toegevoegd worden, zodat er in een kleiner volume geëluëerd wordt. Centrifugeer de kolom gedurende 1 minuut aan 13.000 rpm.

Opmerking: indien men naar 30  $\mu$ l elueert, is het aan te raden de kolom 1 minuut te laten rusten alvorens men centrifugeert. Dit verlaagt de hoeveelheid DNA die verloren wordt in de zuiveringsreactie.



**Figuur 1: De procentuele hoeveelheid DNA na zuivering ten opzichte van het elutievolume.** De hoeveelheid DNA stijgt na incubatie van 1 minuut (rode driehoek).

## Bijlage 5: Protocol NanoDrop® ND-1000

Voor een meting op de NanoDrop® ND-1000 worden volgende stappen doorlopen:

1. Open de software van de NanoDrop® ND-1000 en selecteer [nucleic acid].
2. Reinig de contactpunten met behulp van een vezelvrije doek.
3. Initialiseer het toestel door 1,5 µl RNase-vrij water aan te brengen op het contactpunt van het voetstuk.
4. Selecteer *sample type* [DNA-50].
5. Reinig de contactpunten.
6. Breng 1,5 µl buffer of RNase-vrij water op het voetstuk. Gebruik de stof waarin je staal is opgelost. Klik op [Blank].
7. Reinig de contactpunten met een vezelvrije doek.
8. Breng 1,5 µl staal aan op het voetstuk. Vul in [Sample ID] de staalnaam in. Klik op [Measure].
9. Herhaal deze laatste twee stappen voor alle stalen.
10. Reinig na gebruik de contactpunten nogmaals met een vezelvrije doek.

## Bijlage 6: Protocol Molecular Probes PicoGreen® Assay op de FLUOstar OPTIMA

Voor de bepaling van de DNA-concentratie met de Molecular Probes PicoGreen® Assay op de FLUOstar OPTIMA worden volgende stappen doorlopen:

1. Voeg 500 µl 20x TE buffer toe aan 9,5 ml water.
2. Voeg 10 µl PicoGreen en 19990 µl TE buffer samen.
3. Maak controle DNA aan voor de standaardcurve:
  - Verdun het controle DNA tot een eindconcentratie van 2 µg/ml door 20 µl controle DNA en 980 µl water samen te voegen.
  - Verdun het controle DNA uit de voorgaande stap tot een eindconcentratie van 20 ng/ml door 10 µl van het DNA (2 µg/ml) en 990 µl water samen te voegen.
4. Voeg het controle DNA en de TE-buffer samen volgens volgende specificaties om een standaardcurve aan te maken:

DNA (µl)	TE (µl)	Eindhoeveelheid DNA (ng)
0	50	0
12,5 (20 ng/ml)	37,5	0,25
25 (20 ng/ml)	25	0,5
50 (20 ng/ml)	0	1
2,5 (2 µg/ml)	47,5	5
5 (2 µg/ml)	45	10
7,5 (2 µg/ml)	42,5	15
10 (2 µg/ml)	40	20
15 (2 µg/ml)	35	30

Deze controlestalen worden in tweevoud aangemaakt.

5. Voeg 49 µl en 1 µl staal samen om de stalen voor te bereiden.
6. Voeg aan elk staal en aan het controle DNA 1 µl PicoGreen reagens (uit stap 2) toe. Dit PicoGreen reagens wordt als allerlaatste, net voor de meting, toegevoegd.
7. Start de FLUOstar OPTIMA software op. Klik op [Administrator].
8. Controleer de kabel in het toestel. De kabel met 2 poorten moet gebruikt worden.
9. Stel de [Setup: reader configuration] in op fluorescentie.
10. Stel de [Test setup] in op het picogreen protocol en geef in de [Layout] de plaats van de stalen en het controle DNA in. Duid de hoogste standaard aan en klik op [Gain adjustment].
11. Klik op [Start measurement].

12. Klik na afloop van de meting op [Results] en vervolgens [Raw data] om de resultaten te verkrijgen.
13. Maak een standaardcurve en bereken aan de hand van deze curve de concentratie van het staal.

## Bijlage 7: Protocol A/T additie

Voor een A/T additie worden volgende stappen doorlopen:

1. Voeg de verschillende componenten van de reactie samen in een epje.

De reacties met adenosine en thymidine verlopen gescheiden.

11,5	µl	Product
2	µl	dATP/dTTP (10 mM)
3	µl	Buffer Invitrogen (x10)
0,9	µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
1	µl	<i>Taq</i> polymerase
11,6	µl	H <sub>2</sub> O

---

30 µl Totaal

2. Incubeer deze mix vervolgens voor 2 minuten op 94 °C en 30 minuten op 72 °C. Deze reactie gaat door in een PCR-blok.
3. Incubeer het reactiemengsel op ijs om het enzym te inactiveren.

## Bijlage 8: Protocol *End-It™ DNA End-Repair Kit*

Voor de *end-it* reactie werd gebruik gemaakt van de *End-It™ DNA End-Repair Kit* van de firma Epicentre Biotechnologies. Deze kit laat toe om DNA fragmenten met *sticky ends*, *blunt ended* te maken. Dit laat efficiënte ligatie van fragmenten in vectoren toe.

Voor de *end-it* reactie worden volgende stappen doorlopen:

1. Voeg de verschillende componenten van de ligatiereactie samen in een epje. Deze stap wordt uitgevoerd op ijs.

### **Volume voor 1 reactie**

5	µl	10x Buffer
5	µl	dNTP
5	µl	ATP
1	µl	Enzym
x	µl	H <sub>2</sub> O
x	µl	DNA

---

50 µl Totaalvolume

2. Incubeer het reactiemengsel gedurende 45 minuten op 21 °C.
3. Incubeer het reactiemengsel gedurende 10 minuten op 70 °C om het *end-it* enzym te inactiveren.

Om de incubatie tijd en temperatuur zo constant mogelijk te houden, gaan deze incubaties door in een PCR-blok.

## Bijlage 9: Protocol *Fast-Link™ DNA Ligation Kit*

De ligatie wordt uitgevoerd met de *Fast-Link™ DNA Ligation Kit* van de firma Epicentre Biotechnologies. Deze kit is ontworpen om snel en efficiënt DNA in een vector te ligeren. In deze masterproef wordt de kit echter gebruikt om PCR-product aan elkaar te ligeren.

Voor een ligatie worden volgende stappen doorlopen:

1. Voeg de verschillende componenten van de ligatiereactie samen in een epje. Deze stap wordt uitgevoerd op ijs.

Het volume toegevoegd ATP is verschillend voor een ligatiereactie afhankelijk van het gebruik van DNA-fragmenten met *sticky* of *blunt ends*.

Het volume toegevoegd DNA en water varieert. Het totaalvolume is steeds 15µl.

<b>Blunt End: Volume voor 1 reactie</b>	<b>Sticky End: Volume voor 1 reactie</b>
1,5 µl 10x Buffer	1,5 µl 10x Buffer
0,75 µl 10mM ATP	1,5 µl 10mM ATP
1 µl Ligase	1 µl Ligase
x µl H <sub>2</sub> O	x µl H <sub>2</sub> O
x µl DNA	x µl DNA
15 µl Totaal reactievolume	15 µl Totaal reactievolume

2. Incubeer de reactie. Twee reactietijden en -temperaturen zijn mogelijk.

	<b>Korte incubatie</b>		<b>Lange Incubatie</b>	
	Tijdsduur	Temperatuur	Tijdsduur	Temperatuur
<b>Blunt End</b>	5 minuten	21 °C	<b>Blunt End</b> 15 minuten	21 °C
<b>Sticky End</b>	1 uur	16 °C	<b>Sticky End</b> 1 uur	16 °C

3. Incubeer de reactie gedurende 15 minuten op 70 °C om het ligase te inactiveren.

Om de incubatie tijd en temperatuur zo constant mogelijk te houden gaan deze incubaties door in een PCR-blok.

## Bijlage 10: Interne primers

Tabel 12: Interne *forward* en *reverse* primers.

<i>Forward primers (5'-3')</i>		<i>Reverse primers (5'-3')</i>	
Amplicon	Primer	Amplicon	Primer
CRB1_NGS_E6D	ttctgcctgctatgaaacat	CRB1_NGS_E6A	aagtgcctgaatagctcagg
CRB1_NGS_E7C	actaggtatatactgtatgctaaact	CRB1_NGS_E7A	acacaagcatacacactcat
RPGRIP1_NGS_E9A	tgacaaactcttagaaaggtga	CRB1_NGS_E12A	gcaaaggcaaataaatattcaGG
RPGRIP1_NGS_E20B	aaggcagtaagtacactgga	RPGRIP1_NGS_E9A	tgagaagccatccaactaga
CEP290_NGS_E34B	aacaaccagacGGGAATAAG	RPGRIP1_NGS_E20B	aaagcacttagccaagaa
RPGRIP1_NGS_E14B	gccacactgattgtaagt	CEP290_NGS_E34A	tctttgggtgaagaGTTGTG
CRB1_NGSI_E6	tctgcctgctatgaaacataa	CRB1_NGSI_E5	aatctgtaagAGGAGGCTT
CRB1_NGSI_E12	aggtaaatCAGTGCCAAACA	RPGRIP1_NGSI_E14	ttaaaggtagggagctctT
CRX_NGSI_E4D	ggcaggtagaacaggaac	CRX_NGSI_E4C	gcctttcatttcctaccaa
CEP290_NGSI_E51	gctcaaGCAATCTTCCCAT	RPGRIP1_NGSI_E16	gaatggcacagagaagctat
CEP290_NGSI_E34	aacaaccagacGGGAATAAG	CRX_NGSI_E4B	atggagagagatggagactg
CRB1_NGSI_E10	caaaTATGGTTGCTGTCGAG	CRB1_NGSI_E6	tcttcagaAGTGCATGAAT



## Bijlage 11: *Reverse complement* primers

Deze selectie werd uitgevoerd voor de 3 *pools* van genen: LCA, USH2A en ABCA4 (inclusief genen oorzakelijk voor andere maculaire dystrofieën).

**Tabel 13: De *reverse complement* primers voor de LCA-pool.** Per primer staat de ampliconnaam, waarbij F en R verwijzen naar *forward* respectievelijk *reverse* primer, de mogelijkheid om zelfligatie te testen, de positie in het gen en de categorie van het amplicon (lang of kort *design*).

LCA				
Amplicon	Primer (5'-3')	Info	Positie	Categorie
CRB1_RC_E10A_F	ACAGCAATAAAGGCAGAAGAA	Zelfligatie	Exon	Kort
NPHP5_RC_E12_F	AGTTCTGGAATCAGGACAATG	Zelfligatie	Exon	Kort
RDH12_RC_E4_F	CATCAGAACCATCATCCACC	Zelfligatie	Exon	Kort
GUCY2D_RC_E14_F	CTTCACCAGCCTCCAGC	Zelfligatie	Exon	Kort
AIPL1_RC_E6F_F	AGTAGCTGGGATTATAGGCG	Zelfligatie	UTR	Kort
LRAT_RC_E2A_F	CTGACCCACTATGGCATCTA	Zelfligatie	Exon	Lang
LCA5_RC_E5_F	AACATAACACATGGCAGTGT	Zelfligatie	Exon	Lang
CEP290_RC_E54_F	ACAGCAATAAAGGCAGAAGAA	Zelfligatie	UTR	Lang
RD3_RC_E1C_F	CTGCTGTTGGCAAATGTTTC	Geen zelfligatie	UTR	Kort
CRB1_RC_E2B_F	TAGATCACGATGAGTGTGCT	Geen zelfligatie	Exon	Kort
MERTK_RC_E11_F	AGATAGCCAGACATTGCCAT	Geen zelfligatie	Exon	Kort
IMPDH1_RC_E7_F	ATGCAGGTGTGTAATCACA	Geen zelfligatie	Exon	Lang
CRX_RC_E4A_F	CCCTACCTTTCTCCCATGG	Geen zelfligatie	UTR	Lang
SPATA7_RC_E6B_F	TGCCAGCCTTAAGATCTGAT	Geen zelfligatie	Exon	Lang
MERTK_RC_E19D_F	CTCTGCCACTTCGTAATAGC	Geen zelfligatie	UTR	Lang
CEP290_RC_E44_F	ATGGTCTTCTCAAGAAGCTC	Geen zelfligatie	Exon	Lang
CRB1_RC_E10A_R	AGACAGAAGGGATGGAAGAC	Zelfligatie	Exon	Kort
NPHP5_RC_E12_R	TGTTGTAAAGCCTTGGTCAA	Zelfligatie	Exon	Kort
RDH12_RC_E4_R	CATTCATTCTCCAGCCATC	Zelfligatie	Exon	Kort
GUCY2D_RC_E14_R	TGTGTAAGCAGCCGGTC	Zelfligatie	Exon	Kort
AIPL1_RC_E6F_R	GACCTCCTTCTGTGTCTGAT	Zelfligatie	UTR	Kort
LRAT_RC_E2A_R	CACTGTAACCTTTGAGGGC	Zelfligatie	Exon	Lang
LCA5_RC_E5_R	ACTGTGTTGCATGTTGAAT	Zelfligatie	Exon	Lang
CEP290_RC_E54_R	AGTGAGCTCTGGTGAATTC	Zelfligatie	UTR	Lang
LCA5_RC_E6_R	TCTGAAATGGAAGGGAAGGAA	Geen zelfligatie	Exon	Kort
TULP1_RC_E7_R	GTGCTAGGTAAGGAGTTTGC	Geen zelfligatie	Exon	Kort
CEP290_RC_E18_R	GAGAGGGAGAAAAGTGGGATT	Geen zelfligatie	Exon	Kort
CRB1_RC_E1_R	TCAGGCTGGATTGGATTCAT	Geen zelfligatie	Exon+UTR	Lang
NPHP5_RC_E11_R	AGTTGACGATGAACAATCTCC	Geen zelfligatie	Exon	Lang
GUCY2D_RC_E3_R	AAGGGCTCCATGGAAGTC	Geen zelfligatie	Exon	Lang
RPE65_RC_E14C_R	TGAAGGAACAGACTGACCAG	Geen zelfligatie	UTR	Lang
RPGRIP1_RC_E3_R	CACTGTAACCTTTGAGGGC	Geen zelfligatie	Exon	Lang

**Tabel 14: De reverse complement primers voor de ABCA4-pool.** Per primer staat de ampliconnaam, waarbij F en R verwijzen naar *forward* respectievelijk *reverse* primer, de mogelijkheid om zelfligatie te testen, de positie in het gen en de categorie van het amplicon (lang of kort *design*).

<b>ABCA4</b>				
<b>Amplicon</b>	<b>Primer (5'-3')</b>	<b>Info</b>	<b>Positie</b>	<b>Categorie</b>
TIMP3_RC_E2_F	CAGAAGAGTCCTGGCTAAGG	Zelfligatie	Exon	Kort
BEST1_RC_E1B_F	CCAACACCCTCCAAGAAGAA	Zelfligatie	UTR	Kort
ABCA4_RC_E16_F	CTCAGTGTAAGGTCAGCTCA	Zelfligatie	Exon	Lang
PRPH2_RC_E2_F	TAGTCATTCACCTCGCACACT	Zelfligatie	Exon	Lang
BEST1_RC_E6_F	TAGAAGGACCAAGGAAGCAG	Geen Zelfligatie	Exon	Kort
ABCA4_RC_E22_F	CTTAACCCAGCAGTGGTTTG	Geen Zelfligatie	Exon	Kort
PRPH2_RC_E3G_F	TTGGATCTGGTCTTCTGCTT	Geen Zelfligatie	UTR	Lang
ABCA4_RC_E36_F	AGAGCAGAAGGAGGAGAAGA	Geen Zelfligatie	Exon	Lang
TIMP3_RC_E2_R	ACATCAGGAACAGCATCTCA	Zelfligatie	Exon	Kort
BEST1_RC_E1B_R	CCTCAGTGCCTTATCTGAA	Zelfligatie	UTR	Kort
ABCA4_RC_E16_R	TCTGATCTCTTGTCACCACC	Zelfligatie	Exon	Lang
PRPH2_RC_E2_R	TGGTTTCTTTCCCACCACT	Zelfligatie	Exon	Lang
TIMP3_RC_E4_R	CCTAGCCCAGAGAGAATTCA	Geen Zelfligatie	Exon	Kort
ABCA4_RC_E29_R	AACTCAGAGCCTTTACTGGA	Geen Zelfligatie	Exon	Kort
BEST1_RC_E7_R	GGAACCCTGAAATCAGGATG	Geen Zelfligatie	Exon	Lang
TIMP3_RC_E5K_R	AGCCTACACATGACACAAGA	Geen Zelfligatie	UTR	Lang

**Tabel 15: De reverse complement primers voor de USH2A-pool.** Per primer staat de ampliconnaam, waarbij F en R verwijzen naar *forward* respectievelijk *reverse* primer, de mogelijkheid om zelfligatie te testen, de positie in het gen en de categorie van het amplicon (lang of kort *design*).

<b>USH2A</b>				
<b>Amplicon</b>	<b>Primer (5'-3')</b>	<b>Info</b>	<b>Positie</b>	<b>Categorie</b>
USH2A_RC_E17B_F	AGGTGGACTTAGTCTTTGGG	Zelfligatie	Exon	Kort
USH2A_RC_E73_7_F	GAGTTGGTCAGTCTGAGGAG	Zelfligatie	UTR	Kort
USH2A_RC_E6_F	TGTCACCTCGTTTAGTGCTTTC	Zelfligatie	Exon	Lang
USH2A_RC_E14_F	TCTGTCCTTCAGTGTGTCAA	Zelfligatie	Exon	Lang
USH2A_RC_E35_F	GAACATTGAGGAAAGAGAATTCAT	Geen Zelfligatie	Exon	Kort
USH2A_RC_E21B_F	GTATTGACTGGGTGAGTGGA	Geen Zelfligatie	Exon	Kort
USH2A_RC_E73_11_F	GATTGTGGAACATCAGTGGG	Geen Zelfligatie	UTR	Lang
USH2A_RC_E57_F	TCAGACAACCTAGCAGTGGAT	Geen Zelfligatie	Exon	Lang
USH2A_RC_E17B_R	TTGTCCTGGTTAGTGGAACA	Zelfligatie	Exon	Kort
USH2A_RC_E73_7_R	GAGTGGTCACAAACTGTCAT	Zelfligatie	UTR	Kort
USH2A_RC_E6_R	ACAAATGCCACAAACTTCA	Zelfligatie	Exon	Lang
USH2A_RC_E14_R	CAGCACTTTGAGAGACCAAG	Zelfligatie	Exon	Lang
USH2A_RC_E69_R	GCCAAGTGTGTCAGAGTTT	Geen Zelfligatie	Exon	Kort
USH2A_RC_E29_R	AGGACTATTACCCTGAAGCAG	Geen Zelfligatie	Exon	Kort
USH2A_RC_E21A_R	TCTGAGCAAATGAGTTTGCA	Geen Zelfligatie	Exon	Lang
USH2A_RC_E73_1_R	TGTCACCTGGTTCTGTTTGG	Geen Zelfligatie	UTR	Lang

## Bijlage 12: Microchip analyse

Drie verschillende microchip electroforese technologieën worden gebruikt voor de analyse van fragmenten: de MCE<sup>®</sup>-202 MultiNA, de Labchip<sup>®</sup> GX en de 2100 Bioanalyzer. De basiskennmerken van deze systemen zijn gelijk, doch de specificaties verschillen.

**Tabel 16: De specificaties van microchip electroforese technieken.** De hoeveelheid staal, groottelimiet, concentraties en foutenpercentages hebben enkel betrekking op DNA stalen. [51-53]




	MCE <sup>®</sup> -202 MultiNA		Labchip <sup>®</sup> GX II		2100 Bioanalyzer	
Staal	DNA	RNA	DNA Eiwit	RNA	DNA Eiwit	RNA Volledige cel
Hoeveelheid staal (µl)	3		2-4		1-4	
Groottelimiet (bp)	100 - 2500		100 - 5000		25-12000	
Foutenpercentage groottebepaling	15%		20%		10%	
Minimumconcentratie (ng/µl)	0,2		0,25		0.1	
Maximumconcentratie (ng/µl)	50		80 (50 ng/µl per fragment)		50	
Foutenpercentage concentratiebepaling	30%		30%		20%	
Aantal stalen per run	96		384		10	
Aantal <i>chips</i> per run	4		1		1	
Analysetijd	80 seconden/staal		80 seconden/staal		30 minuten/run	

## Bijlage 13: Protocol Agilent DNA 7500, 12000 en High Sensitivity Kit

De Agilent 2100 Bioanalyzer van de firma Agilent Technologies voor de grootte- en concentratiebepaling van DNA, RNA, eiwitten en volledige cellen.

Voor de analyse van DNA-fragmenten wordt de Agilent DNA 7500, 12000 en de High Sensitivity Kit gebruikt.

Volgende stappen werden doorlopen voor analyse van DNA-fragmenten met de Agilent DNA 7500, 12000 en High Sensitivity Kit:

1. Aanmaken van de gel-kleurstof mix:
  - Laat de kleurstof en de gel matrix 30 minuten acclimatiseren op kamertemperatuur.
  - Vortex vervolgens de kleurstof en voeg 25 µl toe aan het gel matrix epje.
  - Vortex en centrifugeer deze oplossing.
  - Voeg deze mix toe aan een *spin filter* en centrifugeer aan 1500 g voor 10 minuten.
  - Stel deze oplossing zo weinig mogelijk bloot aan het licht.
2. De gel-kleurstof mix op de *chip* laden:
  - Plaats de *chip* in het *chip priming station*.
  - Pipeteer 9 µl gel-kleurstof mix in de *well* gemerkt met 
  - Positioneer de *plunger* op 1 ml en sluit het *chip priming station*.
  - Duw de *plunger* voorzichtig onder de voorziene klem en wacht 30 seconden.
  - Trek de *plunger* vervolgens traag terug naar de 1 ml positie en open het *chip priming station*.
  - Pipeteer 9 µl gel-kleurstof mix in de *wells* gemerkt met 
3. De merkers laden:
  - Pipeteer 5 µl merker in de 12 staal *wells* en de ladder *well*.
4. Het staal laden:
  - Pipeteer 1µl DNA ladder in de *well* gemerkt met 
  - Pipeteer in iedere *well* 1 µl staal of 1 µl gedeïoniseerd water.
  - Vortex aan 2400 rpm voor 1 minuut.
5. Laat de *chip* binnen de 5 minuten op de Agilent 2100 Bioanalyzer lopen.

## Bijlage 14: Protocol Agencourt AMPure systeem

Voor de *size selection* van het ligatieproduct wordt gebruik gemaakt van het Agencourt AMPure systeem van de firma Beckman Coulter Genomics. Fragmenten tot 500 bp worden verwijderd.

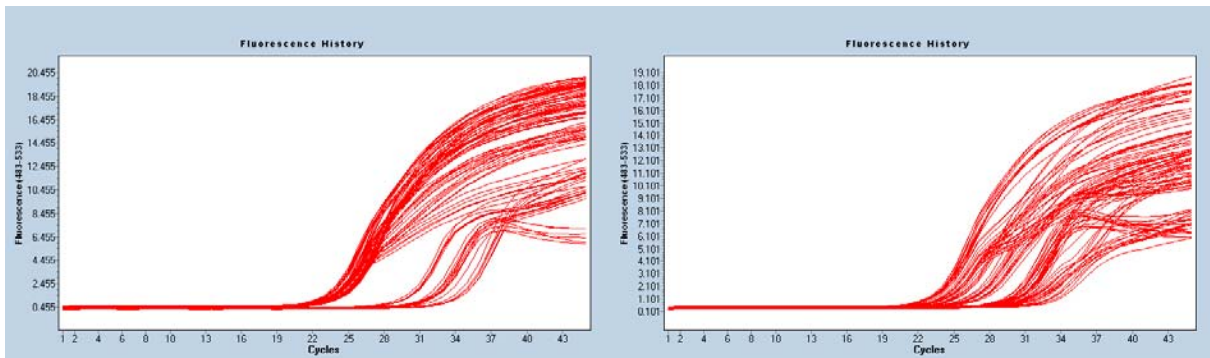
Voor de *size selection* worden volgende stappen doorlopen:

1. Voeg EB buffer (Qiagen) tot een totaal volume van 100  $\mu$ l bereikt is.
2. Voeg een hoeveelheid AMPure beads toe, aangepast volgens de calibratie. Deze calibratie is de *size selection* voorafgegaan.
3. Vortex en incubeer gedurende 5 minuten aan kamertemperatuur.
4. Trek de *beads* naar de rand met behulp van de Magnetic Particle Concentrator (MPC).
5. Verwijder het supernatans en was de *beads* twee maal met 500  $\mu$ l 70% ethanol. Incubeer telkens 30 seconden.
6. Verwijder supernatans en laat de *beads* drogen door ze in een hitteblok op 37 °C te plaatsten. De incubatietijd kan variëren.
7. Haal het epje uit de MPC en voeg 24  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 (of Qiagen's buffer EB) en vortex. Zo vormen de *beads* terug een suspensie.
8. Trek de *beads* nogmaals naar de rand met behulp van de MPC en transfereer het supernatans, met gezuiverd DNA, naar een nieuw epje.

## Bijlage 15: Resultaten qPCR *mastermix* kits - amplificatiecurves

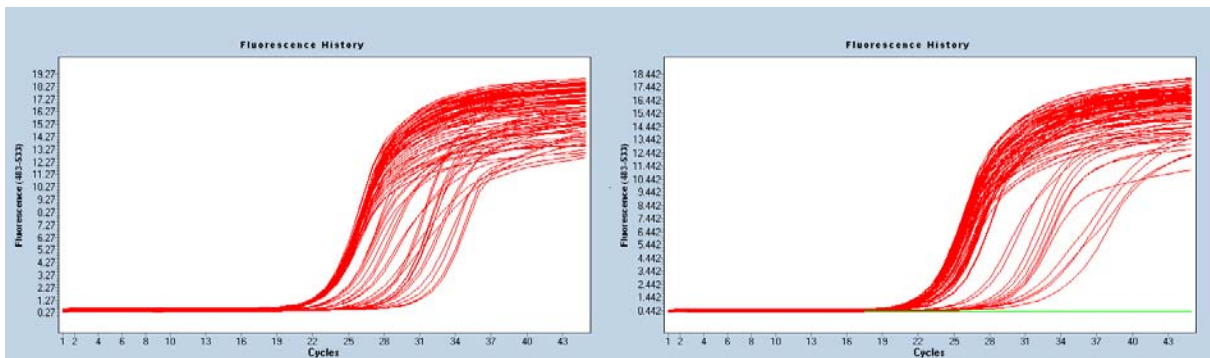
Per kit werden in totaal 32 amplicons, met elk 6 verschillende *replicates*, geamplificeerd. Deze amplicons waren verdeeld over twee platen. Lange en korte amplicons zijn over beide platen verdeeld. Deze *replicates* bestonden elk uit 4x Roche Human Genome DNA en 2x uit genomisch DNA van een patiënt die geen mutatie bezit in de geamplificeerde genen.

### 1. Eurogentec

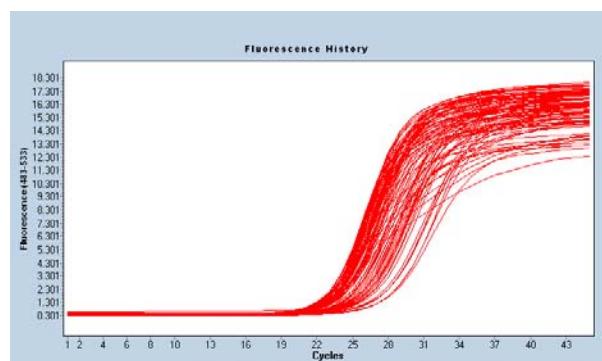


**Figuur 2: Amplificatiecurves met de Eurogentec *mastermix*.** Rechts plaat 1, links plaat 2.

### 2. KAPA SYBR® Fast

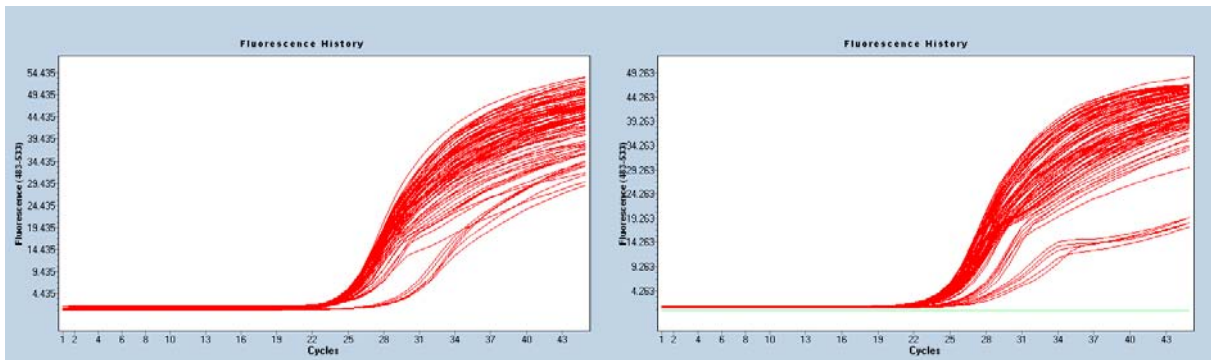


**Figuur 3: Amplificatiecurves met de KAPA SYBR® Fast *mastermix*.** Rechts plaat 1, links plaat 2.



**Figuur 4: Amplificatiecurves met KAPA SYBR® Fast *mastermix*, het lange protocol.** Enkel de amplicons van het lange (1500) design werden geamplificeerd.

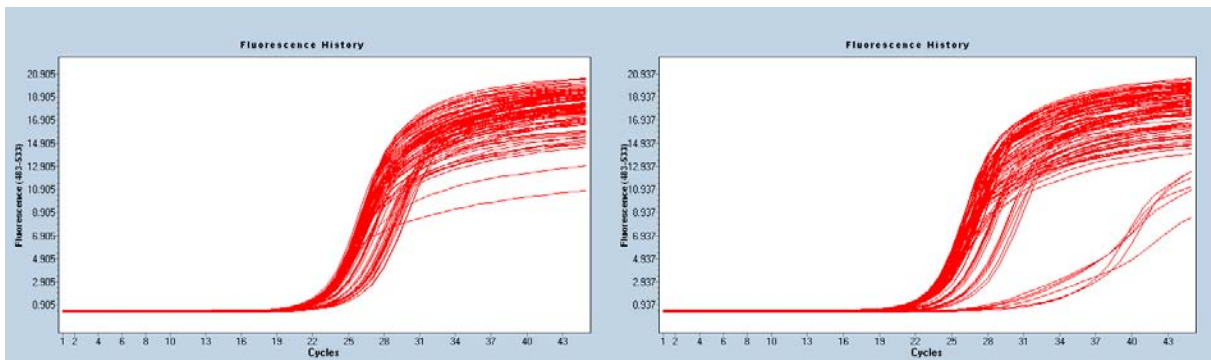
3. SsoFast™ EvaGreen® Supermix (BioRad)



**Figuur 5: Amplificatiecurves met de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (BioRad) *mastermix*.**

Rechts plaat 1, links plaat 2.

4. PerfeCta™ SYBR® Green SuperMix (Quanta)

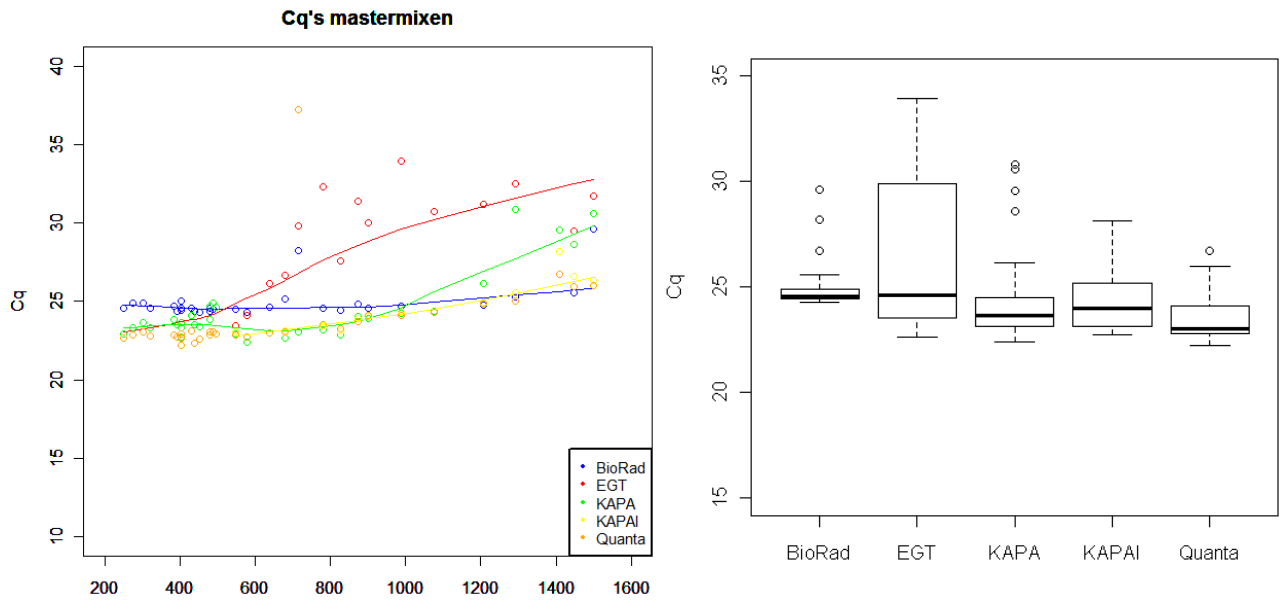


**Figuur 6: Amplificatiecurves van de PerfeCta™ SYBR® Green SuperMix (Quanta) *mastermix*.**

Rechts plaat 1, links plaat 2.

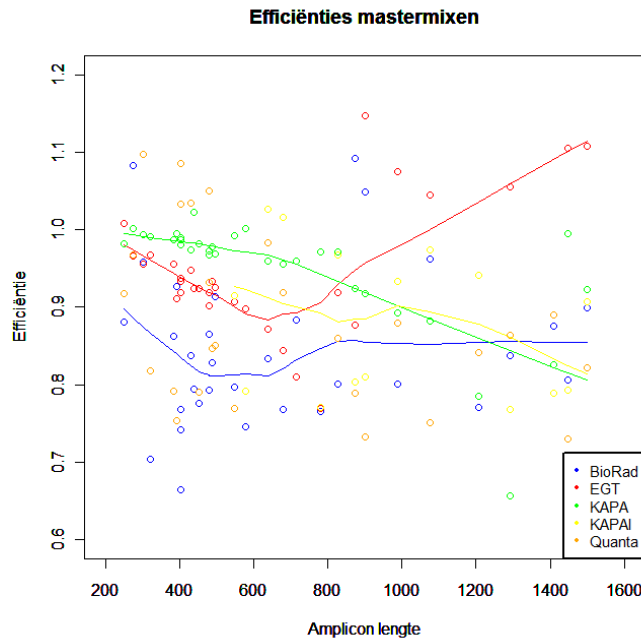
Bijlage 16: Resultaten qPCR *mastermix* kits – Cq-waarde, efficiëntie en specificiteit

1. Cq-waarden



**Figuur 7:** Rechts: De Cq-waarde ten opzichte van de ampliconlengte voor de verschillende *mastermixen*. Links: Boxplot van de Cq-waarden per *mastermix*.

2. Efficiëntie



**Figuur 8:** De efficiëntie ten opzichte van de ampliconlengte voor de verschillende *mastermixen*.



### 3. Specificiteit

De specificiteit van de amplificaties werd geanalyseerd met behulp van de MCE<sup>®</sup>-202 MultiNA. Ieder amplicon werd manueel bekeken en gecategoriseerd volgens:

- OK: deze amplicons zijn specifiek volgens het elektroferogram.
- Mild aspectiefiek: deze amplicons hebben 1 sterke piek en enkele kleinere pieken.
- Sterk aspectiefiek: deze amplicons vertonen geen pieken of verschillende pieken van gelijke sterkte op het elektroferogram.

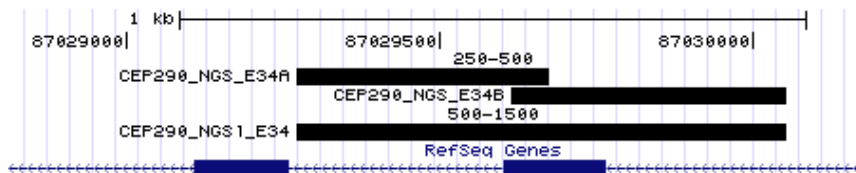
**Tabel 17: Specificiteit per amplicon per *mastermix*, gesorteerd volgens de ampliconlengte.**

Amplicon	Lengte	EGT	KAPA	KAPAlang	BioRad	Quanta
RPGRIP1E20B	250	OK	OK	/	OK	OK
RPGRIP1E9A	275	OK	OK	/	OK	OK
RPGRIP1E14A	303	OK	OK	/	OK	OK
RPGRIP1E14B	322	OK	OK	/	OK	OK
CRB1E6C	383	OK	OK	/	OK	OK
CRB1E12C	391	OK	OK	/	OK	OK
CEP290E34A	402	Mild	OK	/	OK	Sterk
CRB1E12A	403	Mild	OK	/	OK	OK
CRB1E7A	403	Mild	OK	/	OK	Mild
CRB1E6D	431	OK	OK	/	OK	OK
CEP290E34B	438	Sterk	OK	/	OK	OK
CRB1E6B	453	OK	OK	/	OK	OK
CRB1E7C	479	OK	OK	/	OK	OK
CRB1E6A	480	Mild	OK	/	OK	Mild
CRB1E12B	487	OK	OK	/	OK	OK
CRB1E7B	495	OK	OK	/	OK	Sterk
RPE65longE3	548	Sterk	OK	OK	OK	OK
CRB1longE5	577	OK	OK	OK	OK	OK
RPGRIP1longE14	638	OK	OK	OK	OK	OK
CRXlongE4C	680	Sterk	Mild	OK	OK	OK
CEP290longE51	714	Sterk	OK	Mild	Sterk	Sterk
CEP290longE34	780	Sterk	OK	OK	OK	Sterk
RPGRIP1longE16	827	Sterk	OK	OK	OK	OK
CRB1longE10	873	Sterk	Mild	OK	OK	OK
CEP290longE33	902	Sterk	OK	OK	OK	OK
CRB1longE7	988	Sterk	OK	OK	OK	OK
CRB1longE2	1075	Sterk	OK	Mild	OK	OK
CRB1longE6	1208	Sterk	Mild	Mild	OK	OK
CRB1longE9	1291	Sterk	Sterk	OK	OK	OK
CRXlongE4B	1410	Sterk	Sterk	Sterk	Sterk	OK
CRB1longE12	1449	Sterk	Sterk	Sterk	Mild	Sterk
CRXlongE4D	1499	Sterk	Sterk	Mild	OK	OK

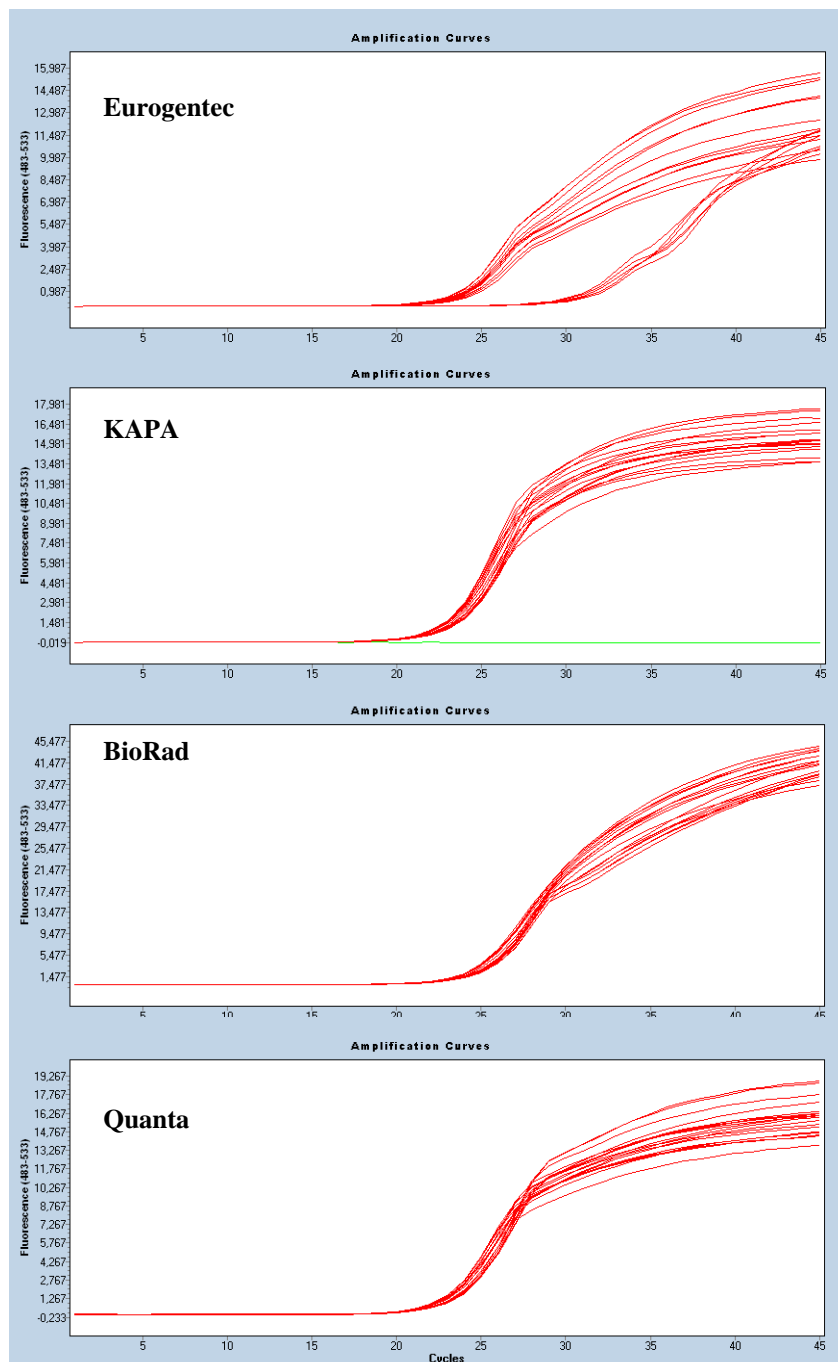
## Bijlage 17: Vergelijking lange en korte amplicons bij de *mastermixen*

Voor enkele van de lange amplicons werden korte amplicons ontworpen die hetzelfde exon overspannen. De efficiëntie van amplificatie tussen deze amplicons kan vergeleken worden. Onderstaand twee voorbeelden.

### 1. *CEP290 E34 (780bp)*



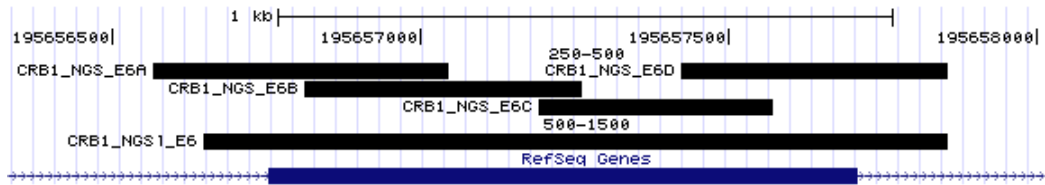
Figuur 9: De amplicons van het grote en kleine design overspannen dezelfde sequentie.



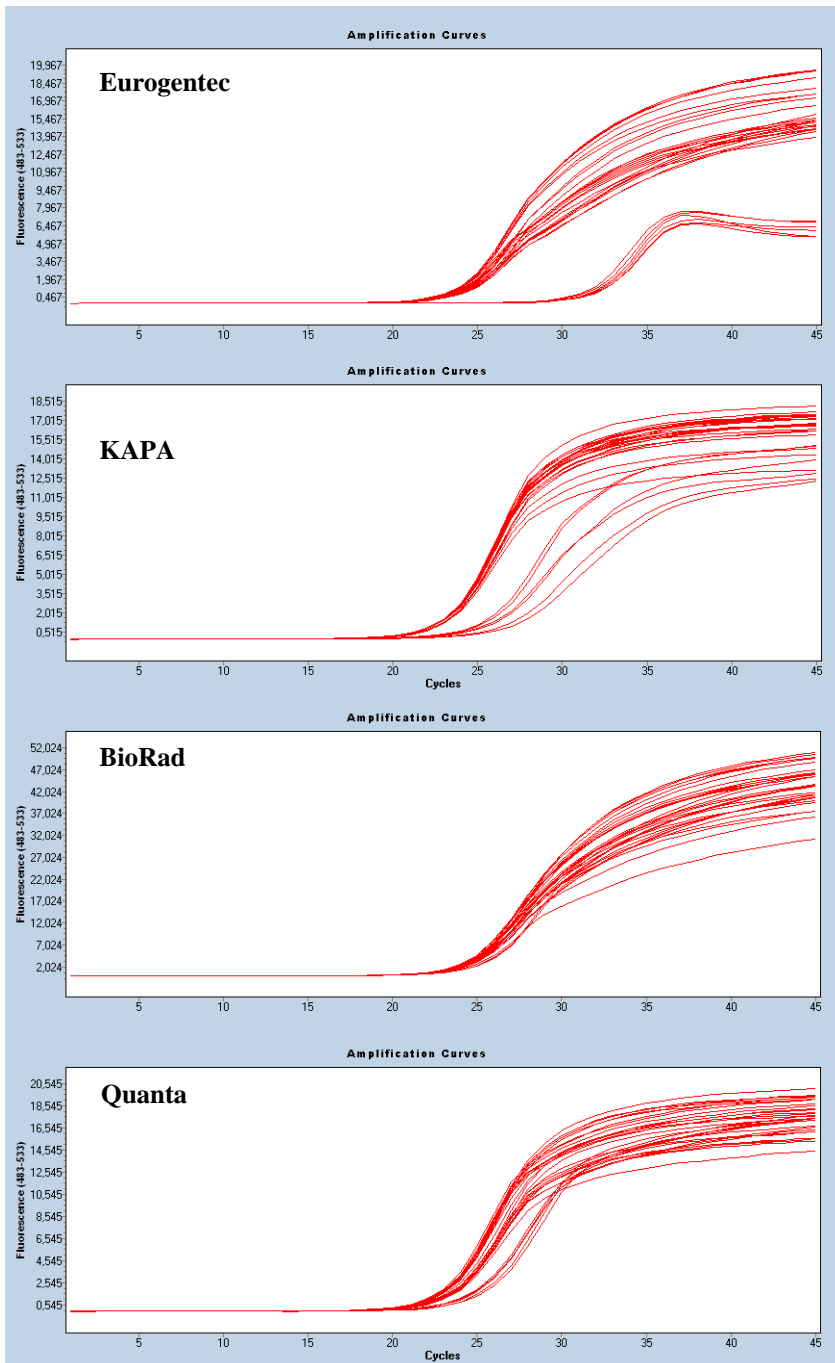
Figuur 10: Amplificatiecurves voor *CEP290* exon 4 met de verschillende *mastermixen*.

Er is geen verschil in C<sub>q</sub> waarneembaar tussen lange en korte amplicons bij KAPA(lang), BioRad en Quanta. Er is een duidelijk verschil zichtbaar bij de Eurogentec *mastermix*. De amplicons met de hoge C<sub>q</sub>'s zijn de amplicons ontworpen met het lange design.

2. *CRB1 E6 (1208bp)*



**Figuur 11:** De amplicons van het grote en kleine design overspannen dezelfde sequentie.

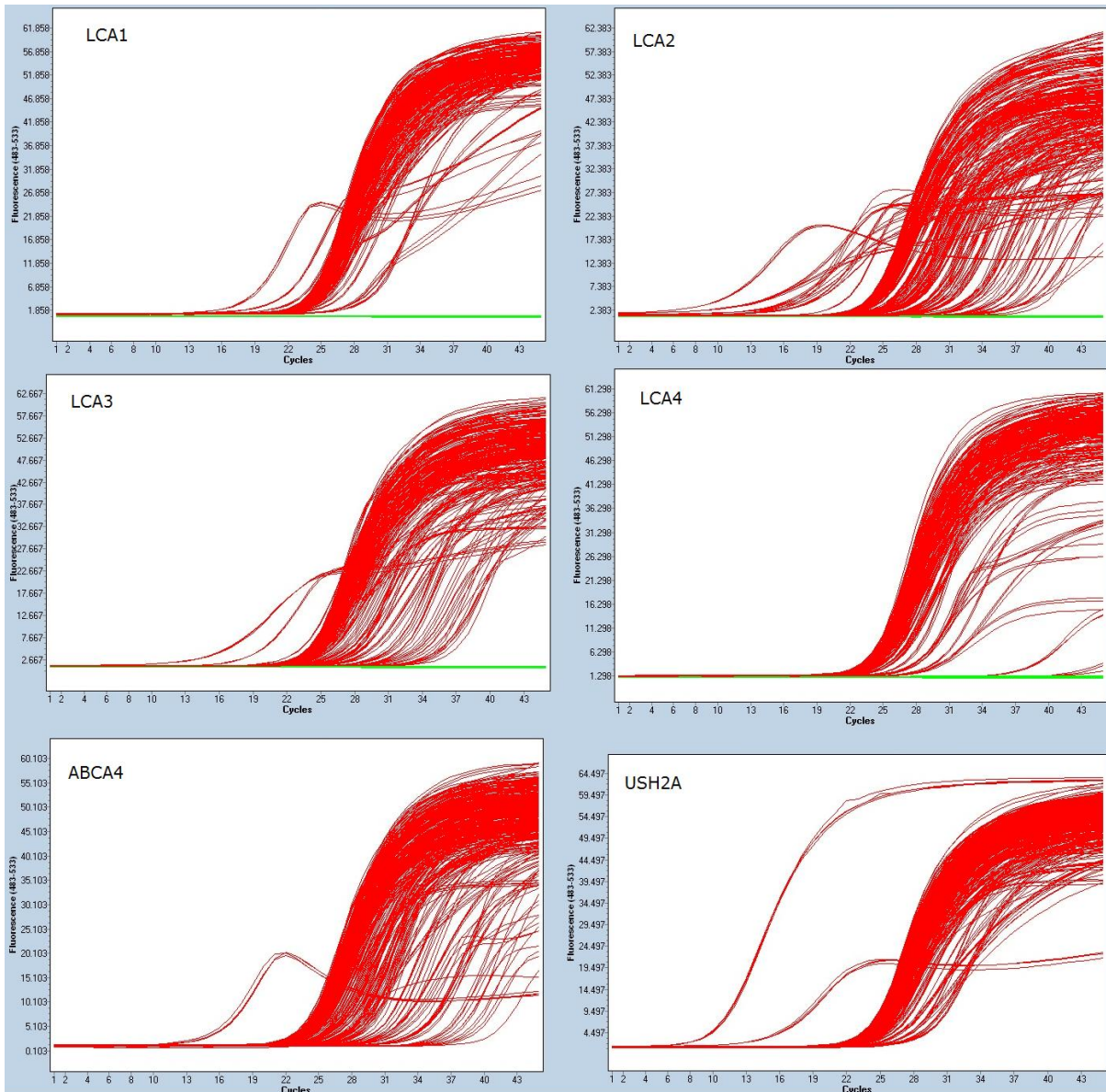


**Figuur 12:** Amplificatiecurves voor *CRB1* exon 6 met de verschillende *mastermixen*.

Er is geen verschil in Cq waarneembaar tussen lange en korte amplicons bij BioRad. Er is een duidelijk verschil zichtbaar bij de Eurogentec, KAPA(lang) en Quanta *mastermix*. De amplicons met de hoge Cq's zijn de amplicons ontworpen met het lange design. Bij zeer lange amplicons blijkt BioRad een voordeel te hebben op de andere *mastermixen*.

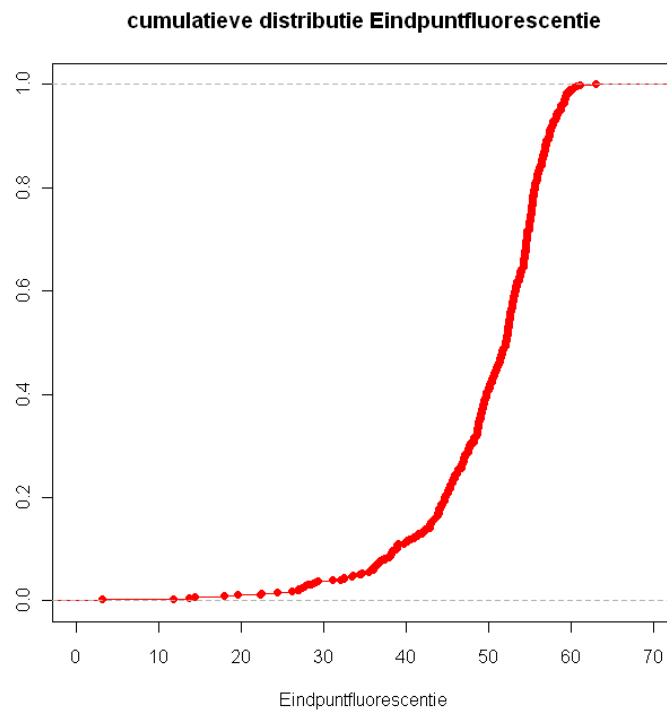
## Bijlage 18: Resultaten qPCR NGS primers

Een qPCR werd uitgevoerd op alle primers geselecteerd voor het NGS project. Dit zijn de 6 platen: LCA1-LCA4, ABCA4, USH2A. In totaal gaat dit om 3 aandoeningen, 21 genen, 394 exonen en 559 amplicons.



**Figuur 13 : Amplificatiecurves van de 6 NGS platen.**

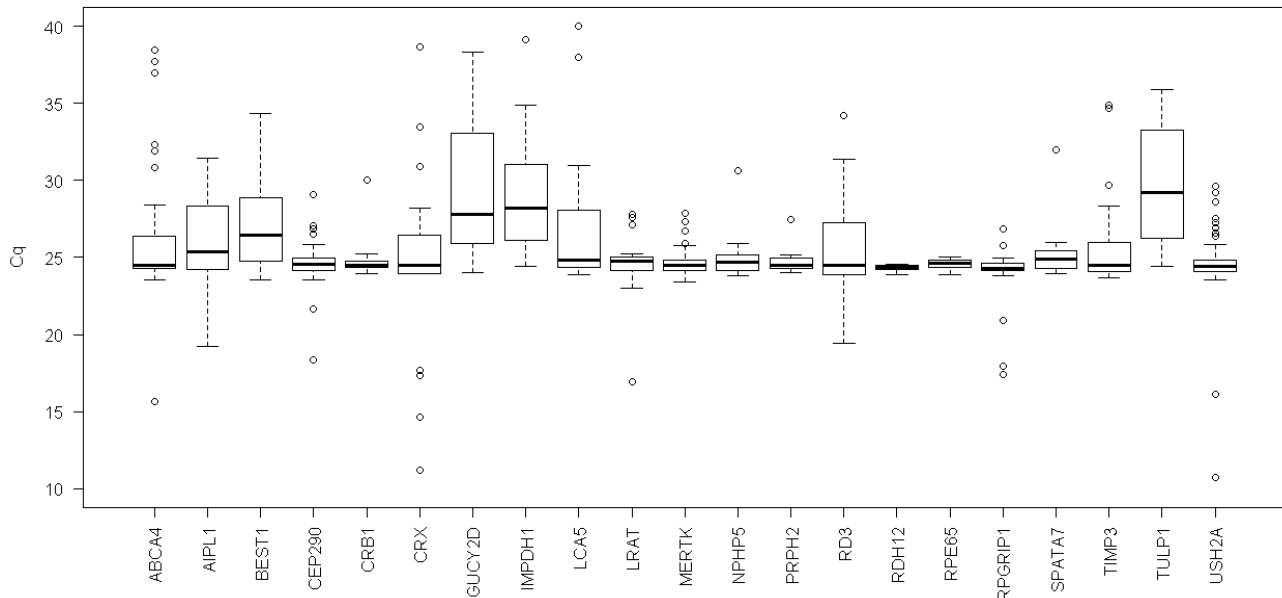
Er wordt gestreefd naar een zo uniform mogelijke amplificatie. Dit kan snel geanalyseerd worden met behulp van de cumulatieve distributie van een variabele. De cumulatieve distributie beschrijft de distributie van een variabele. Bij uniforme amplificatie geeft de distributie een steile rechte. Onderstaand de cumulatieve distributie van de eindpuntfluorescentie. De spreiding op deze distributiecijve is groter dan op de curves van de Cq-waarden en de efficiëntie (zie 3.1.3.). Ongeveer 80% van de amplicons bevindt zich tussen de waarden 40 en 60.



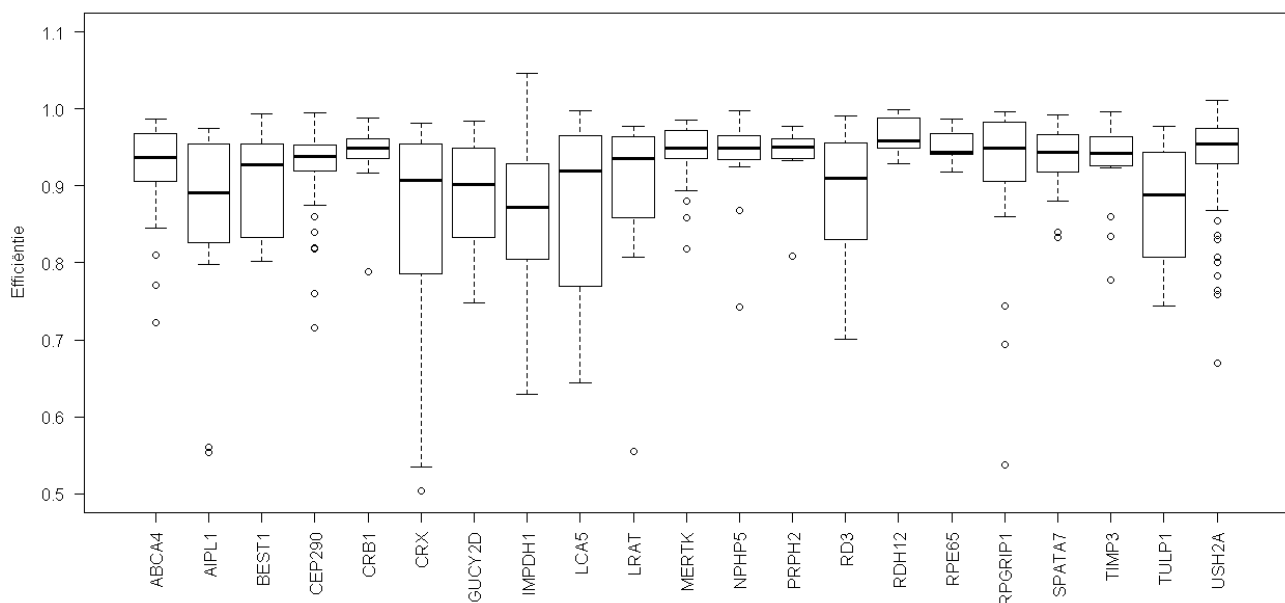
**Figuur 14: Cumulatieve distributie van de eindpuntfluorescentie.**

## 1. Gen

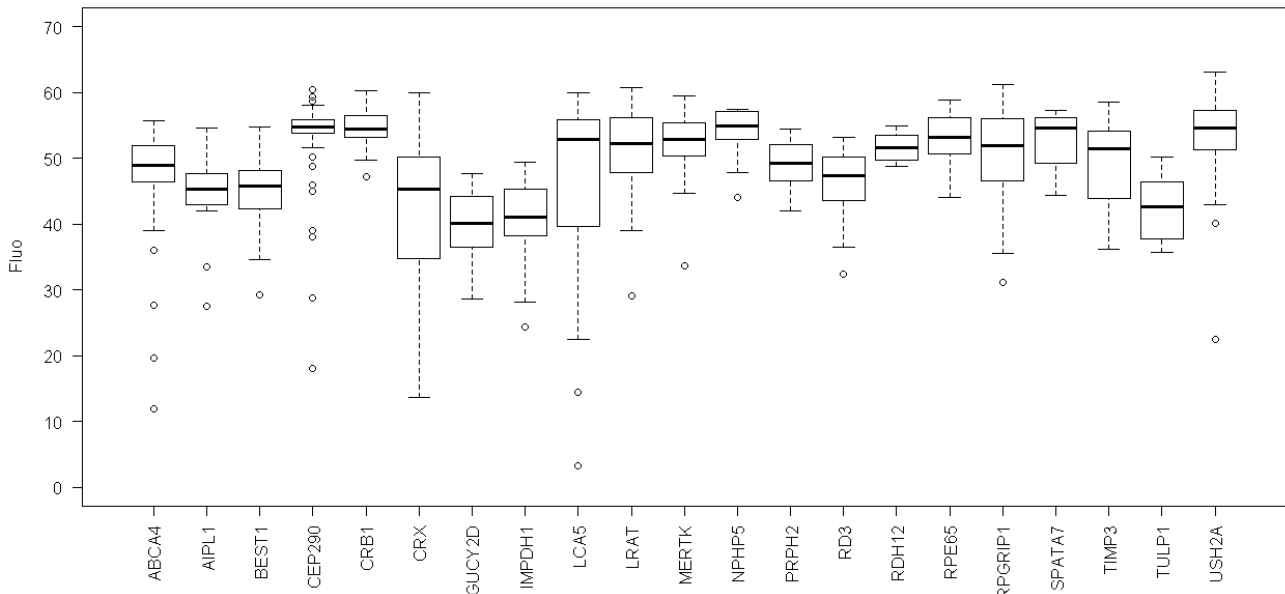
De uniformiteit van de amplificatie bleek sterk verschillend tussen de genen onderling. Drie parameters (Cq-waarde, efficiëntie en eindpuntfluorescentie) werden bekeken aan de hand van boxplots voor ieder gen.



**Figuur 15: Cq-waarde per gen.** De Cq-waarde is sterk gebonden. Sommige genen hebben een grote spreiding in Cq-waarde terwijl andere juist zeer uniform zijn. Deze spreiding heeft niets te maken met de grootte van het gen. *TULP1* bijvoorbeeld heeft 16 amplicons en een grote spreiding terwijl *USH2A*, met 96 amplicons, zeer uniform amplificeert.



**Figuur 16: Amplificatie efficiëntie per gen.** De genen met een hoge en gespreide Cq-waarde hebben ook een minder efficiënte amplificatie.

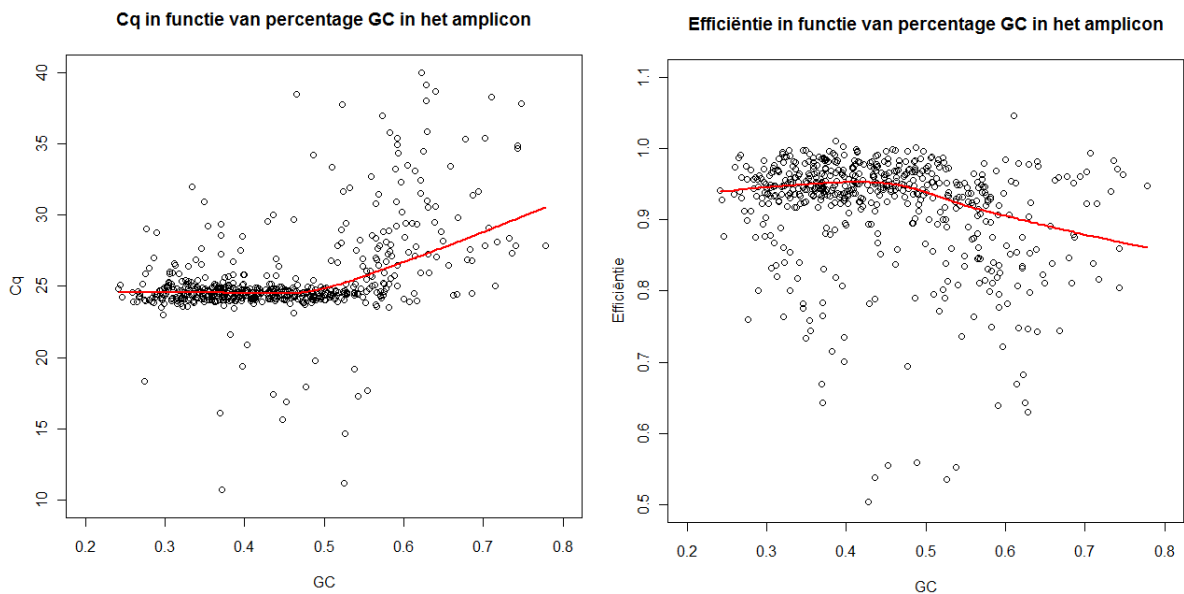


**Figuur 17: Eindpuntfluorescentie per gen.** De eindpuntfluorescentie is lager bij genen met een hoge Cq-waarde en een lagere efficiëntie.

## 2. Amplicon

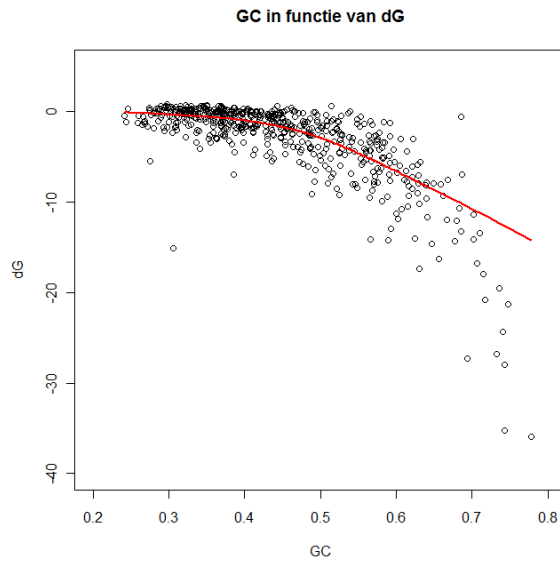
Deze verschillen tussen de genen doen vermoeden dat er bepaalde factoren in de amplicons zelf verantwoordelijk zijn voor minder uniforme amplificatie.

Vanaf een GC percentage van 50% stijgt de Cq-waarde en daalt de efficiëntie.

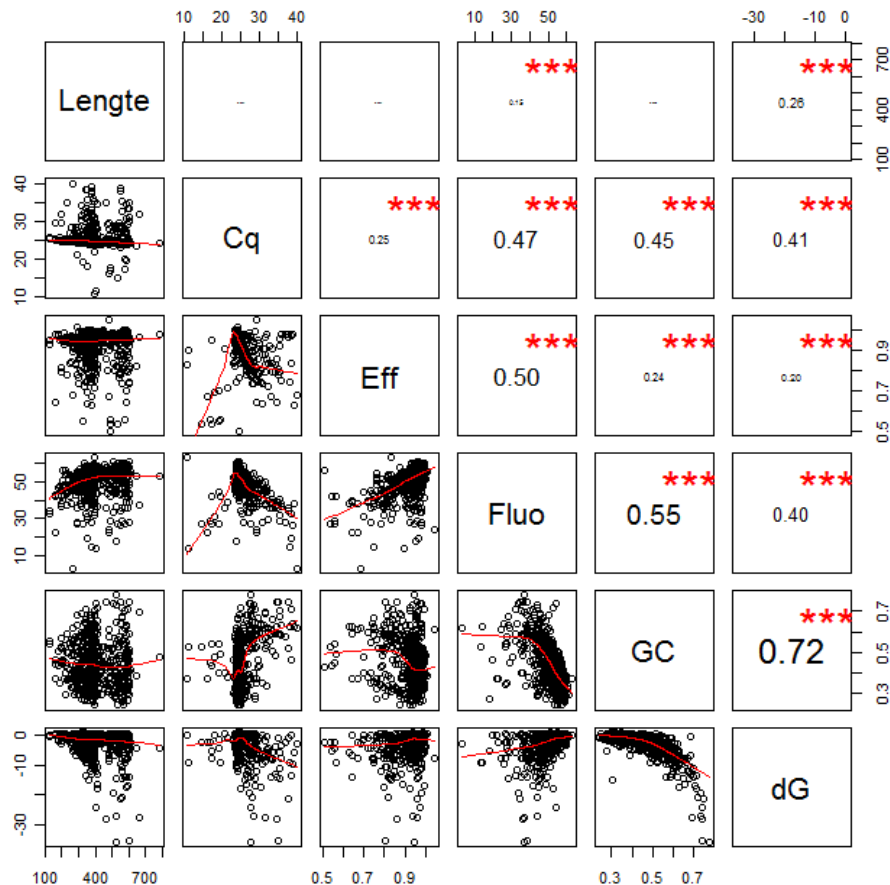


**Figuur 18: Cq-waarde en efficiëntie in functie van het amplicon GC%.**

Een hoog GC percentage gaat vaak gepaard met een lage vrije energie (dG) omdat een GC rijke regio meer kans geeft op secundaire structuren zoals *loops*. Deze *loops* kunnen de amplificatie efficiëntie verminderen.



**Figuur 19: Vrije energie (dG) in functie van het amplicon GC%.**

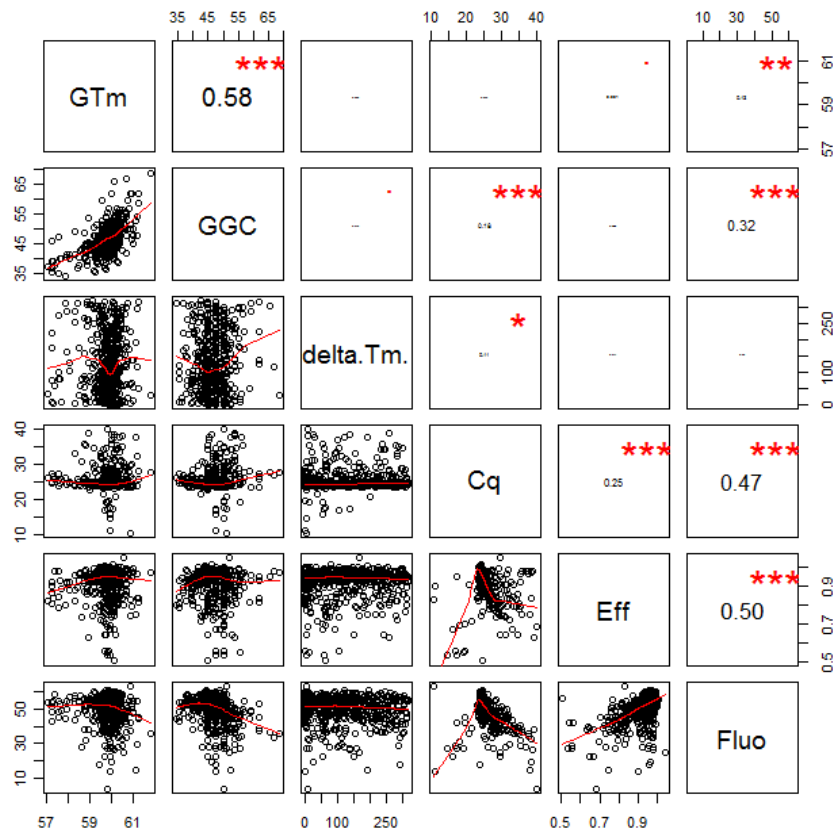


**Figuur 20: Pearson correlatie plot.** De pearson correlatie coëfficiënt is een waarde tussen -1 en 1 die duidt op het lineair verband tussen twee variabelen. Eff = efficiëntie. Fluo = eindpuntfluorescentie. GC = GC percentage van het amplicon. dG = vrije energie van het amplicon. Op deze plot is te zien dat er een verband is tussen amplificatie uniformiteit en het GC percentage en de vrije energie van een amplicon. De lengte van een amplicon heeft geen invloed op de amplificatie.



### 3. Primer

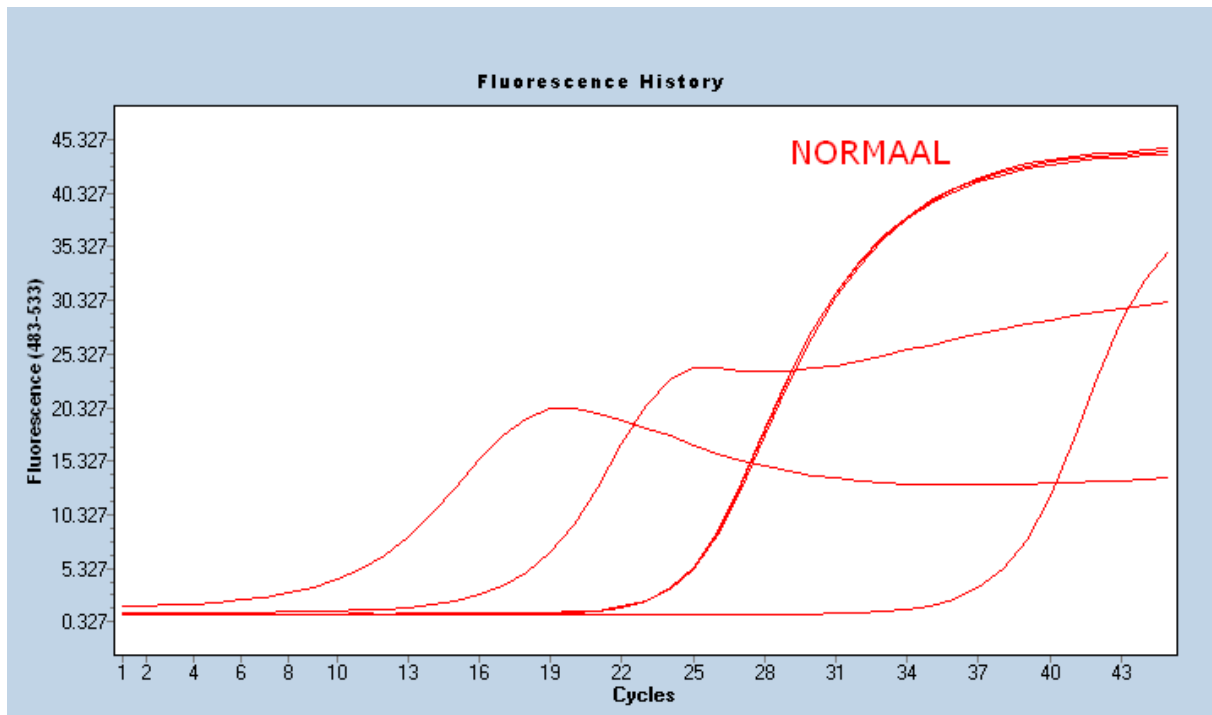
Naast het amplicon is ook de primer een belangrijke factor in de amplificatie van een fragment. De invloed van de gebruikte primers blijkt echter beperkt. De smelttemperatuur van de primer heeft geen invloed en de invloed van het GC percentage van de primer is beperkt. De primers werden zo geselecteerd dat ze geen SNPs, noch secundaire structuren bevatten. De vrije energie van primers werd zo laag mogelijk gehouden.



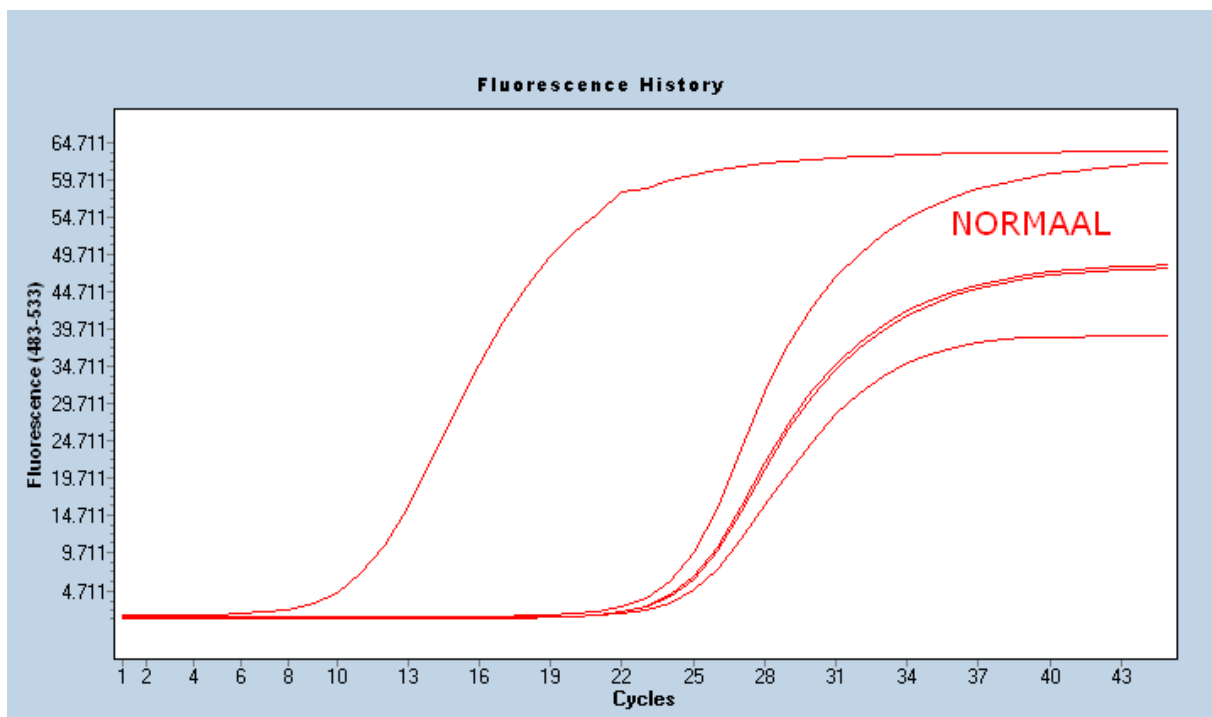
**Figuur 21: Pearson correlatie plot.** De pearson correlatie coëfficiënt is een waarde tussen -1 en 1 die duidt op het lineair verband tussen twee variabelen. GTm = gemiddelde smelttemperatuur van de *forward* en *reverse* primer. GGC = gemiddelde GC percentage van de *forward* en *reverse* primer. delta.Tm = verschil tussen smelttemperatuur van de *forward* en *reverse* primer. Eff = efficiëntie. Fluo = eindpuntfluorescentie. Op deze plot is te zien dat er weinig verband is tussen amplificatie uniformiteit en het GC percentage en de smelttemperatuur van de primers.

## Bijlage 19: Manueel geselecteerde amplicons met slechte amplificatie

Enkele ‘slechte amplicons’ werden geselecteerd op basis van een afwijkende amplificatiecurve. Onderstaand enkele voorbeelden van deze amplicons.



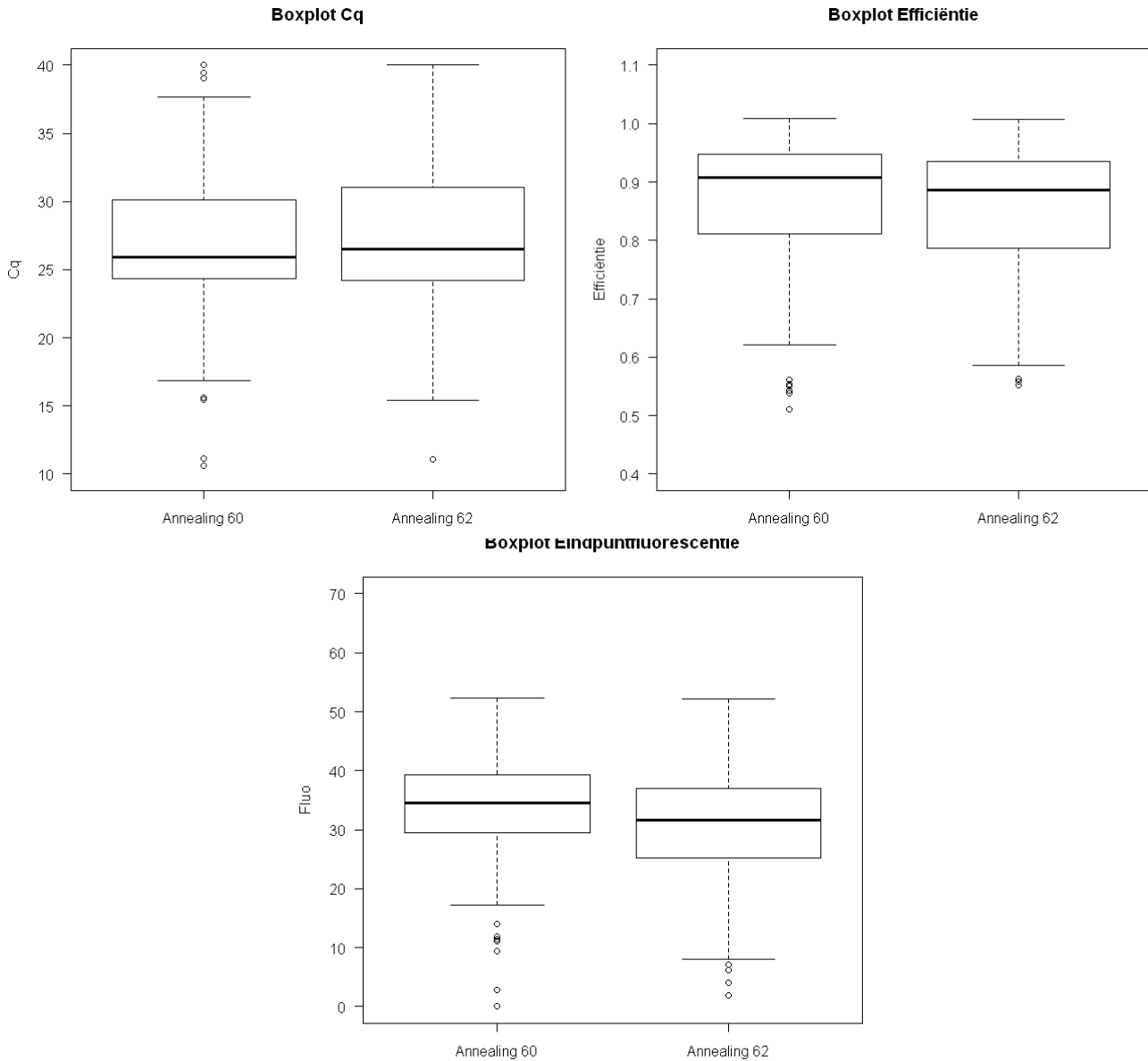
**Figuur 22: Vreemde amplificatiecurves van de qPCR plaat LCA2.**  
Voorbeelden van vreemde, te late en te vroege amplificatiecurves.



**Figuur 23: Vreemde amplificatiecurves van de qPCR plaat LCA2.**  
Voorbeelden van te vroege amplificatiecurves en curves met te hoge en te lage fluorescentie.

Bijlage 20: Resultaten van protocol 60 – 62 ‘slechte amplicons’

Er was geen noemenswaardig verschil merkbaar tussen de twee qPCR protocollen op vlak van Cq-waarde, efficiëntie, eindpuntfluorescentie en specificiteit.



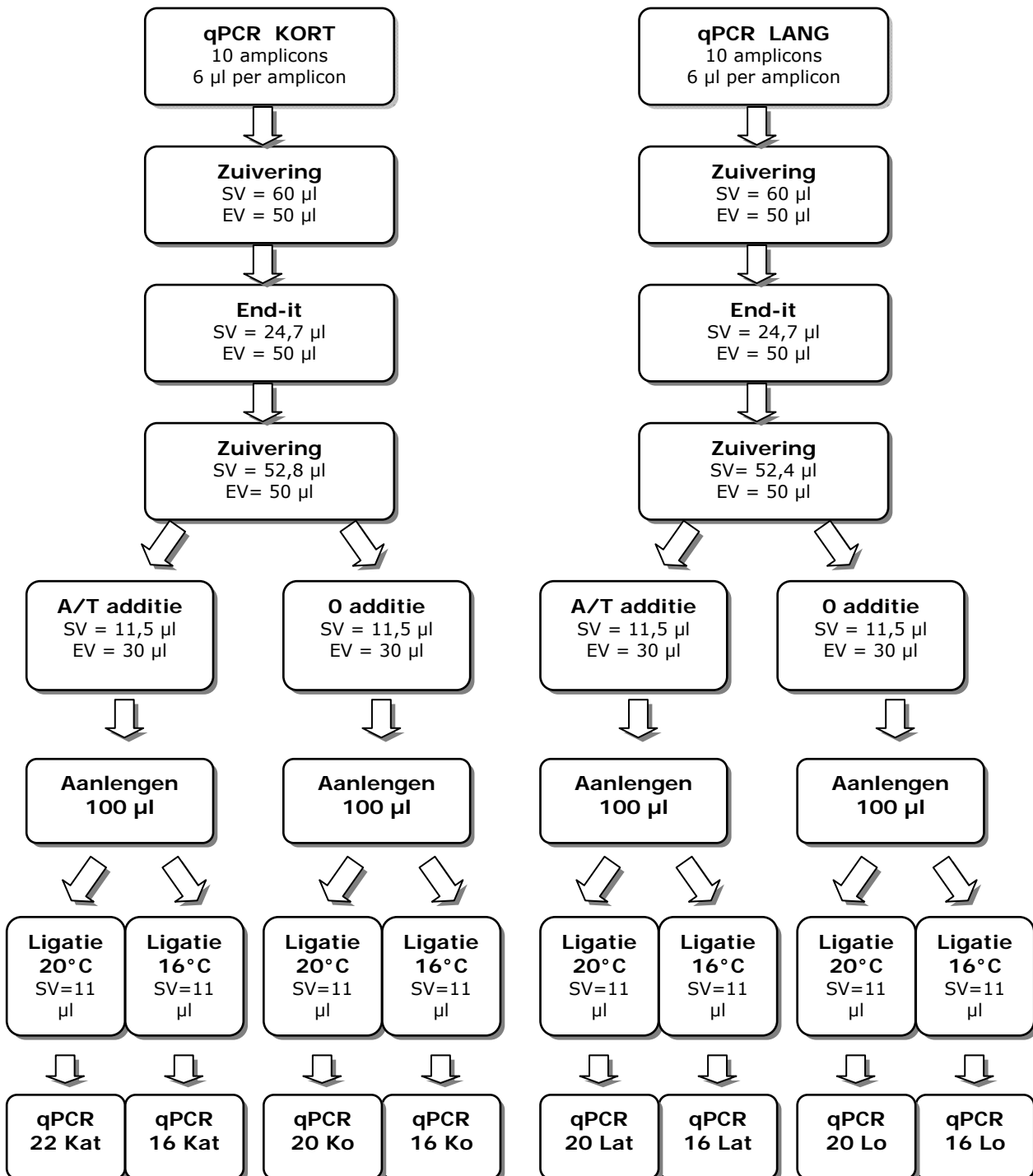
**Figuur 24: Boxplots van de Cq, efficiëntie en eindpuntfluorescentie bij de twee verschillende protocollen.**

**Tabel 18: Aspecifieke amplicons bij de twee verschillende protocollen.** Aantal amplicons aspecifiek volgens concentratie en lengte en het totale aantal aspecifieke amplicons zijn aangeduid.

	60 °C	62 °C
	Aantal aspecifieke amplicons	Aantal aspecifieke amplicons
Concentratie	45	48
Lengte	54	51
Totaal	62	65

Bijlage 21: *Workflow* A/T additie en ligatie op 21 °C versus 16 °C

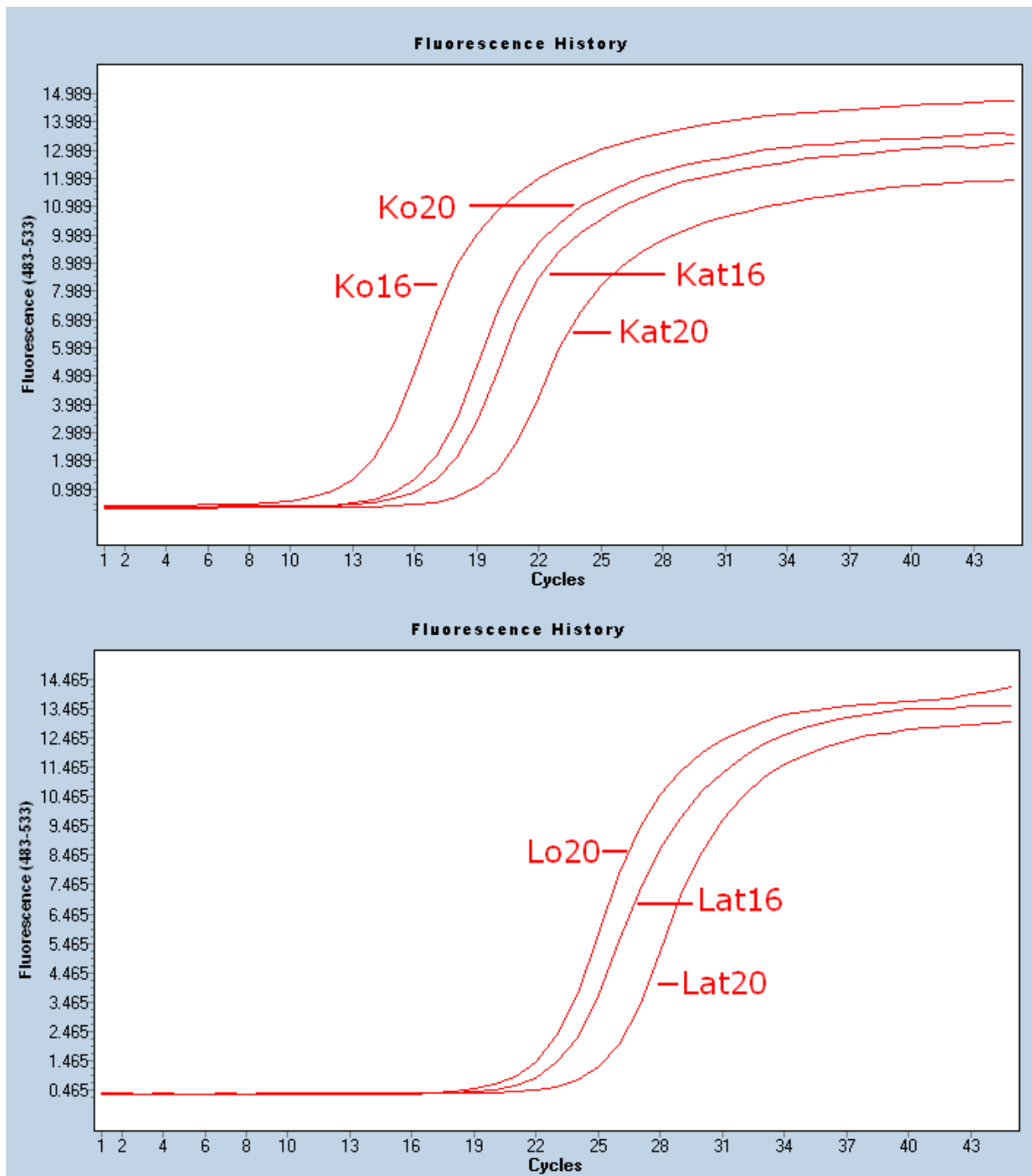
Onderstaand de gebruikte *workflow* voor experiment 3.2.1. Zowel A/T additie en de ligatie tijd en temperatuur werden bekeken. Twee verschillende startpools met amplicons werden gebruikt: een *pool* met 10 korte amplicons en een *pool* met 10 lange amplicons.



**Figuur 25: Workflow A/T additie en ligatietemperatuur en tijd.** SV = startvolume van het gebruikte product. EV = eindvolume na reactie. A/T additie = toevoegen van een adenosine of thymidine aan het amplicon om *sticky ends* te creëren. 0 additie = het niet toevoegen van een adenosine of een thymidine zodat deze amplicons *blunt end* blijven. Ligatie 20 °C = ligatie op 20 °C (kamertemperatuur) gedurende 15 minuten, afhankelijk van al dan niet A/T additie. Ligatie 16 °C = ligatie op 16 °C gedurende 1 uur.

## Bijlage 22: Resultaten A/T additie en ligatie op 21 °C versus 16 °C

De ligatie bleek het meest efficiënt door te gaan zonder de A/T additie en 1 uur op 16 °C. Dit resultaat was zichtbaar zowel bij de lange als de korte amplicons.



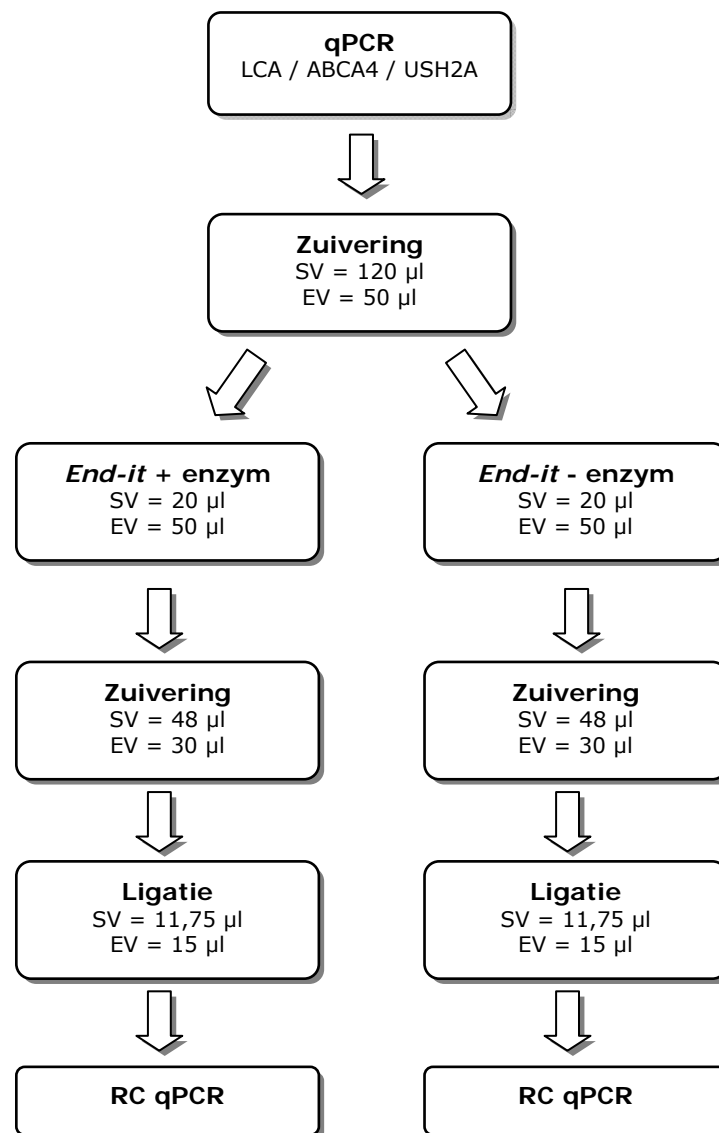
**Figuur 26: Amplificatiecurves van de korte (boven) en lange (onder) amplicons.** Per curve staat de conditie aangeduid. o = *blunt end*. at = *sticky end*. 20 en 16 zijn de gebruikte ligatietemperaturen.

## Bijlage 23: *Workflow End-it*

Onderstaand de gebruikte *workflow* voor experiment 3.2.2. Het protocol met en zonder de *end-it* stap werd vergeleken. Als startmateriaal werden drie verschillende *pools* gebruikt:

1. De amplicons afkomstig van de 4 LCA qPCR-platen.  
Deze *pool* bevat 6  $\mu\text{l}$  product per amplicon (3  $\mu\text{l}$  product van 2 *replicates*).
2. De amplicons afkomstig van de ABCA4 qPCR-plaat.  
Deze *pool* bevat 12  $\mu\text{l}$  product per amplicon (4  $\mu\text{l}$  product van 3 *replicates*).
3. De amplicons afkomstig van de USH2A qPCR-plaat.  
Deze *pool* bevat 12  $\mu\text{l}$  product per amplicon (4  $\mu\text{l}$  product van 3 *replicates*).

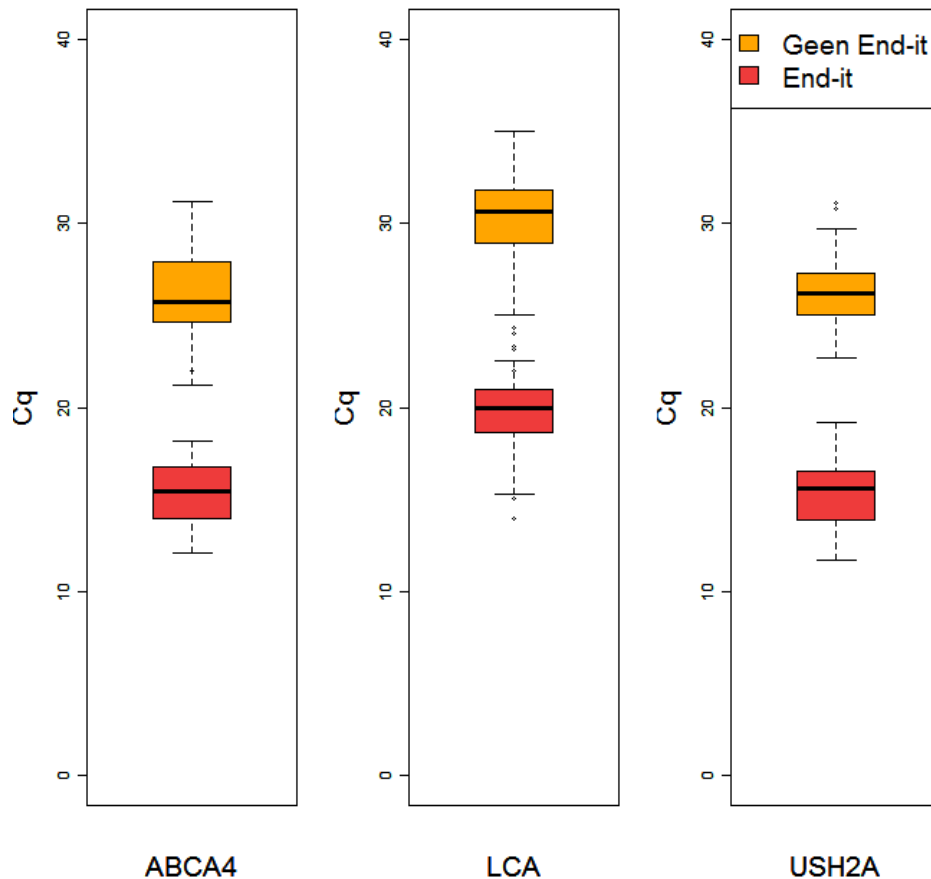
Deze *pools* werden, onafhankelijk van elkaar, in parallel geligeerd.



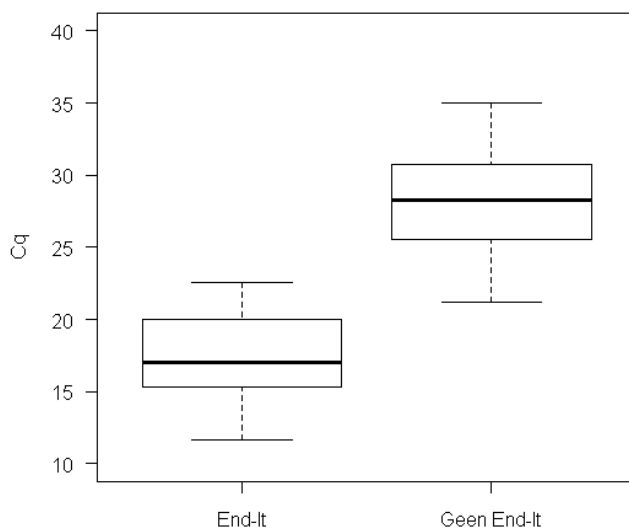
**Figuur 27:** *Workflow end-it voor één pool.* De drie *pools* werden, onafhankelijk van elkaar, in parallel geligeerd. SV = startvolume van het gebruikte product. EV = eindvolume na reactie. *End-it + enzym* (- enzym) = *end-it* reactie waaraan enzym werd toegevoegd (zonder enzym). RC qPCR = *reverse complement* qPCR.

## Bijlage 24: Resultaten *End-it*

Er was een duidelijk verschil merkbaar tussen de ligatiereactie met en zonder de *end-it* stap. De reacties met *end-it* hebben een beduidend lagere Cq-waarde, hetgeen duidt op een hoger aantal geligeerde amplicons. Dit is zeer duidelijk zichtbaar op een boxplot van de Cq-waarden.



**Figuur 28: Boxplot Cq per pool (ABCA4, LCA, USH2A).** De Cq-waarden van de ligatiereactie zonder de *end-it* stap (oranje) liggen hoger dan de Cq-waarden van de ligatiereactie met de *end-it* stap. Dit duidt op een verlaagde ligatie efficiëntie wanneer geen *end-it* wordt uitgevoerd.

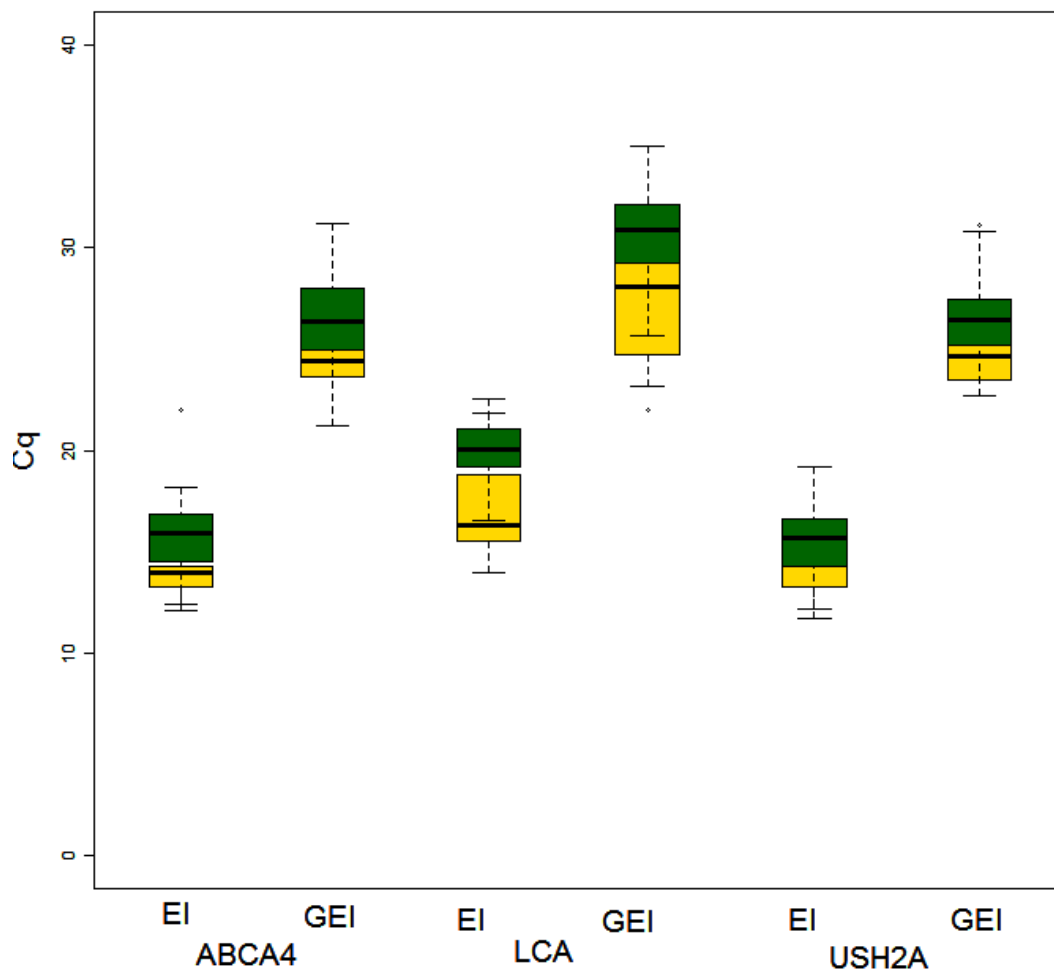


**Figuur 29: De gemiddelde Cq van de drie pools bij een ligatiereactie met de *end-it* stap en zonder de *end-it* stap.**

### 1. Zelfligatie

De *reverse complement* primerset, die gebruikt werd om de efficiëntie van de ligatie te testen (bijlage 11), bevat enkel primerparen ontworpen om zelfligatie na te gaan. Dit is de ligatie van het 5' uiteinde van het amplicon aan het 3' uiteinde van hetzelfde amplicon. Dit type van ligatie is niet wenselijk voor het NGS project aangezien dit geligeerde fragment in een latere *size selection* stap zal verwijderd worden. Er wordt gestreefd naar een ligatieprotocol waarin het aantal amplicons geligeerd aan zichzelf, minimaal is.

In dit experiment bleken de zelfligatie amplicons in alle *pools* een lagere Cq-waarde te hebben. Dit kan geïnterpreteerd worden als een grotere hoeveelheid startmateriaal en dus een groter aantal amplicons die aan zichzelf geligeerd zijn. Indien er geen zelfligatie is, verwacht men immers dat de Cq-waarde van deze zelfligatie amplicons gelijk is aan de Cq-waarde van amplicons zonder zelfligatie.



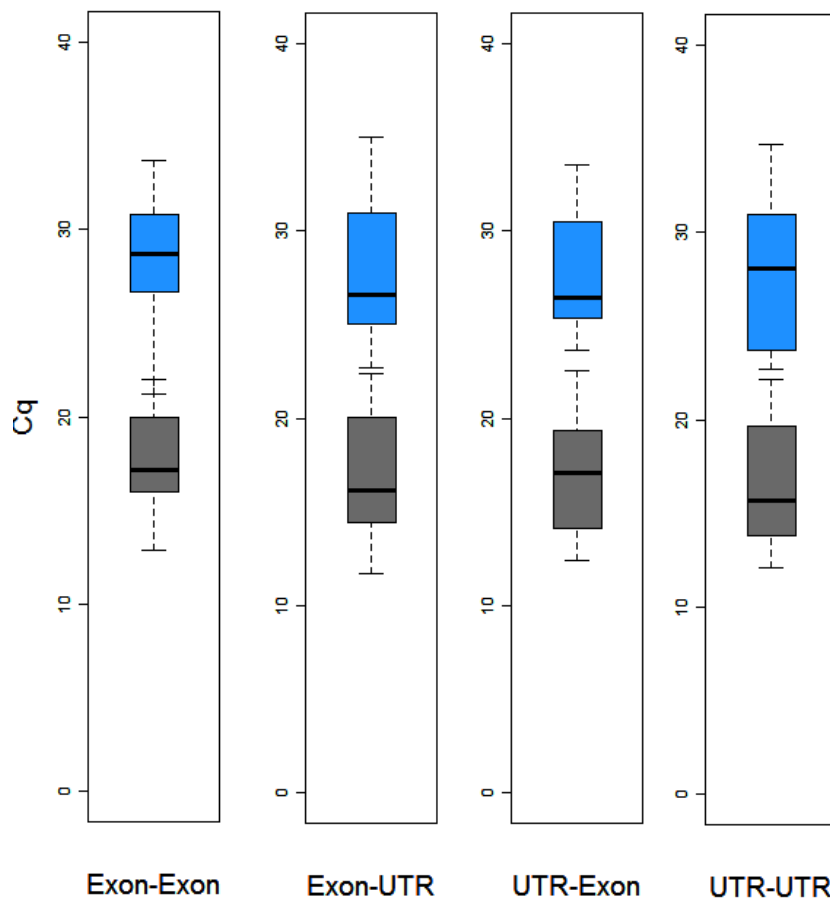
**Figuur 30: Zelfligatie.** Groen zijn de gewone amplicons, geel de zelfligatie amplicons.



## 2. UTR versus exon

De *reverse complement* primerset, die gebruikt werd om de efficiëntie van de ligatie te testen (bijlage 11), geeft informatie over het type amplicon. Twee verschillende types werden gebruikt: UTRs en exonen.

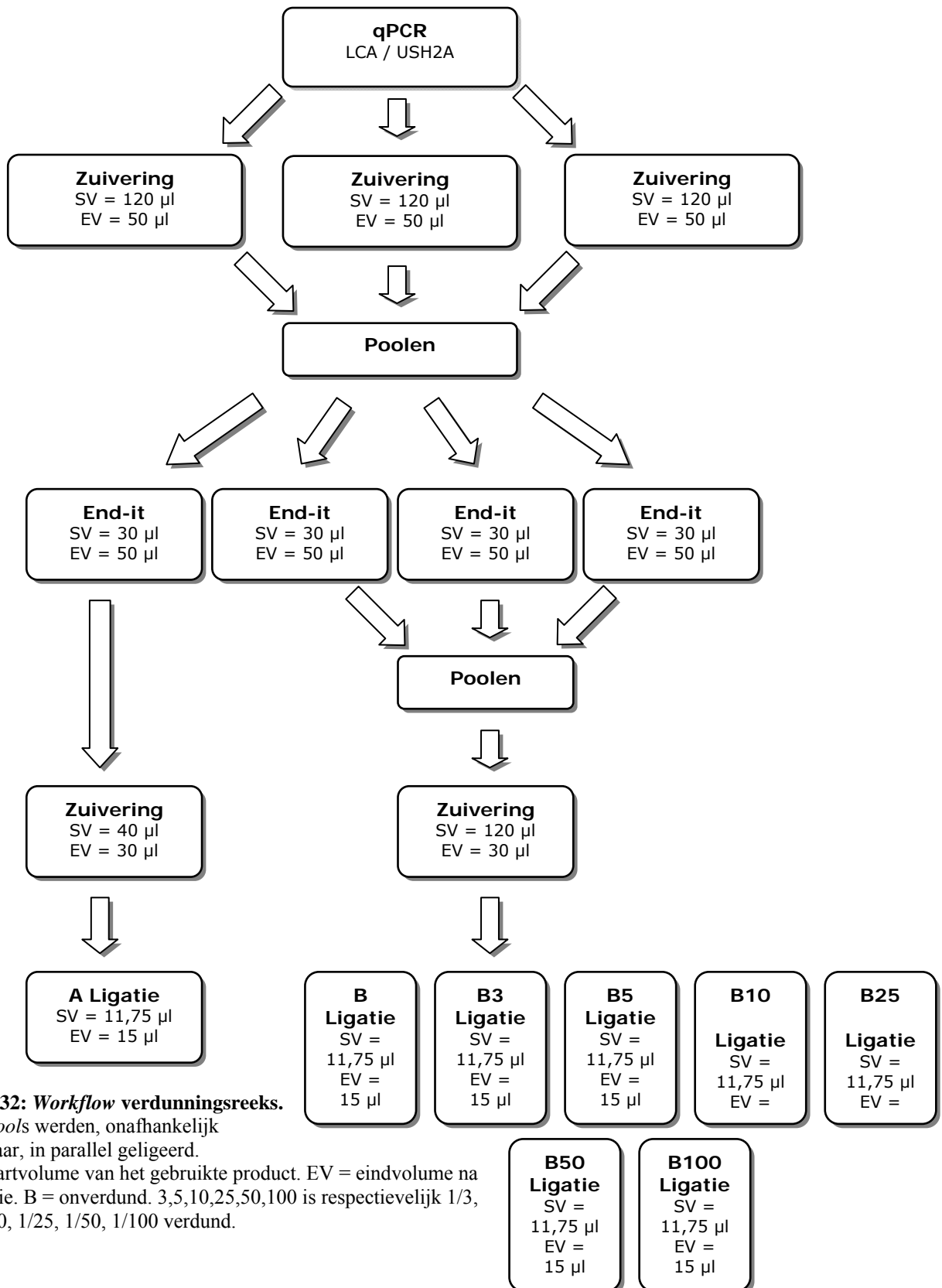
In dit experiment bleek het type amplicon geen invloed te hebben op de efficiëntie van de ligatie. De C<sub>q</sub>-waarden van product bestaande uit exon-exon ligatie, exon-UTR, UTR-exon en UTR-UTR ligatie liggen allen in dezelfde *range*. Het eerste type duidt op het amplicon van de *forward* primer, het tweede op het amplicon van de *reverse* primer.



**Figuur 31: C<sub>q</sub>-waarden van alle ligatieproducten opgesplitst volgens een protocol met *end-it* (grijs) en zonder *end-it* (blauw).**

Bijlage 25: *Workflow* verdunningsreeks

Onderstaande *workflow* werd voor experiment 3.2.3. gebruikt. Twee *pools* van startmateriaal (LCA en USH2A) werden, onafhankelijk van elkaar, in parallel geligeerd. Op conditie B werd een verdunningsreeks uitgevoerd.



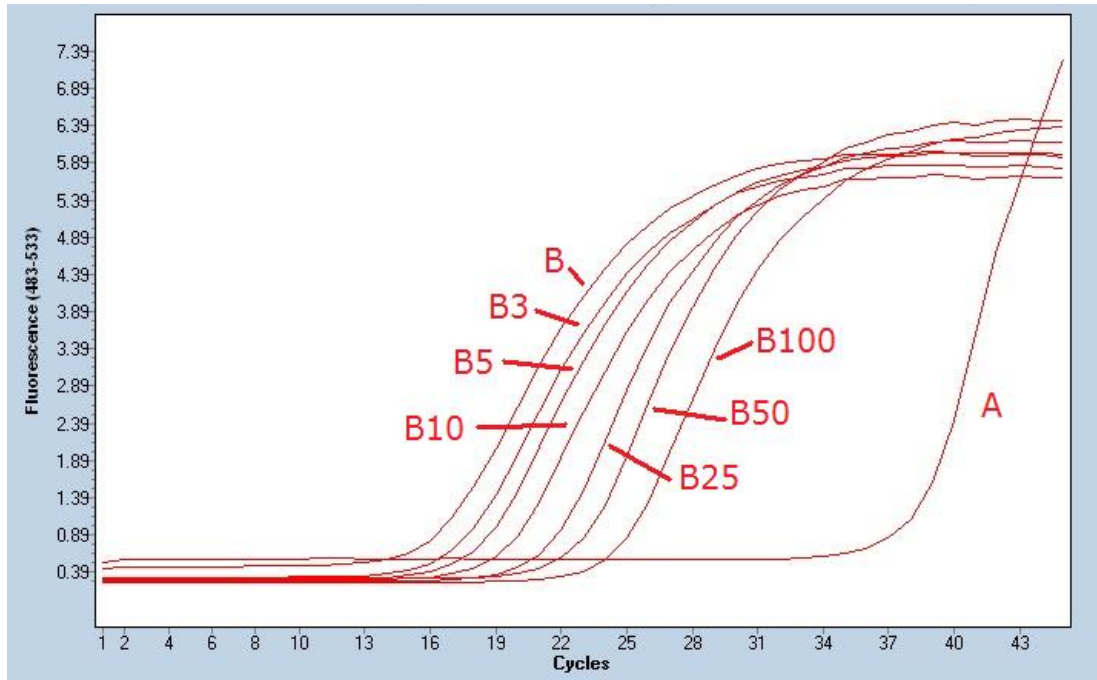
**Figuur 32: Workflow verdunningsreeks.**

Twee *pools* werden, onafhankelijk van elkaar, in parallel geligeerd.

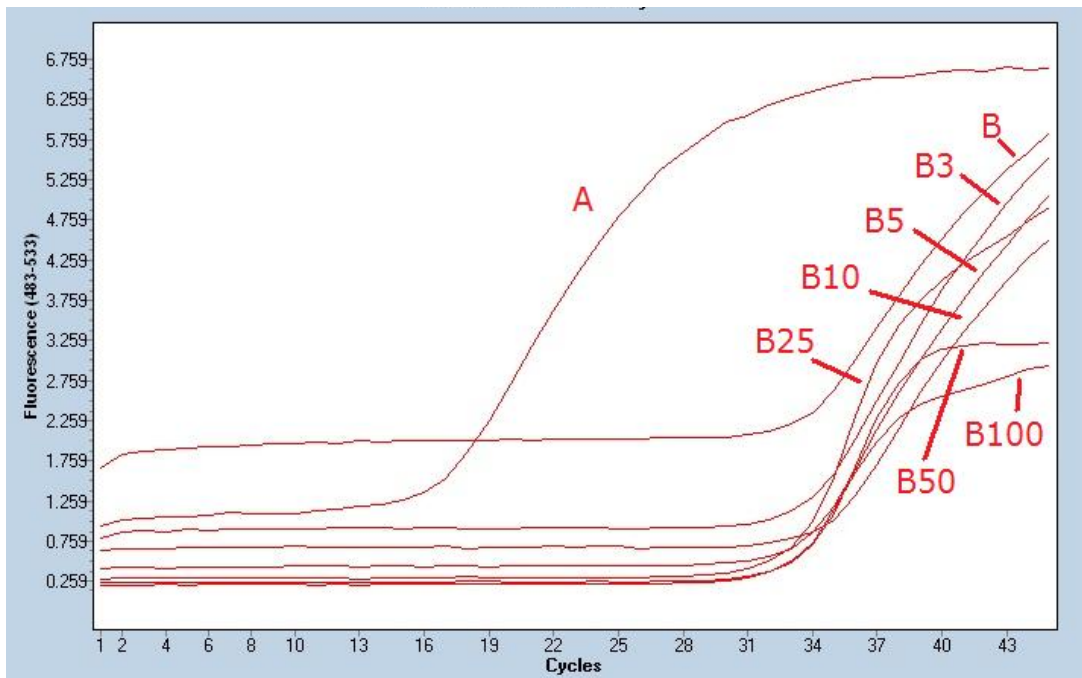
SV = startvolume van het gebruikte product. EV = eindvolume na de reactie. B = onverdund. 3,5,10,25,50,100 is respectievelijk 1/3, 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 verdund.

## Bijlage 26: Resultaten verdunningsreeks

Verdunning B bleek het beste resultaat te geven in de LCA-*pool*, verdunning A in de USH2A-*pool*. Deze verdunning gaf de laagste C<sub>q</sub>-waarde wat duidt op een grote hoeveelheid startmateriaal en dus ook geligeerd product.



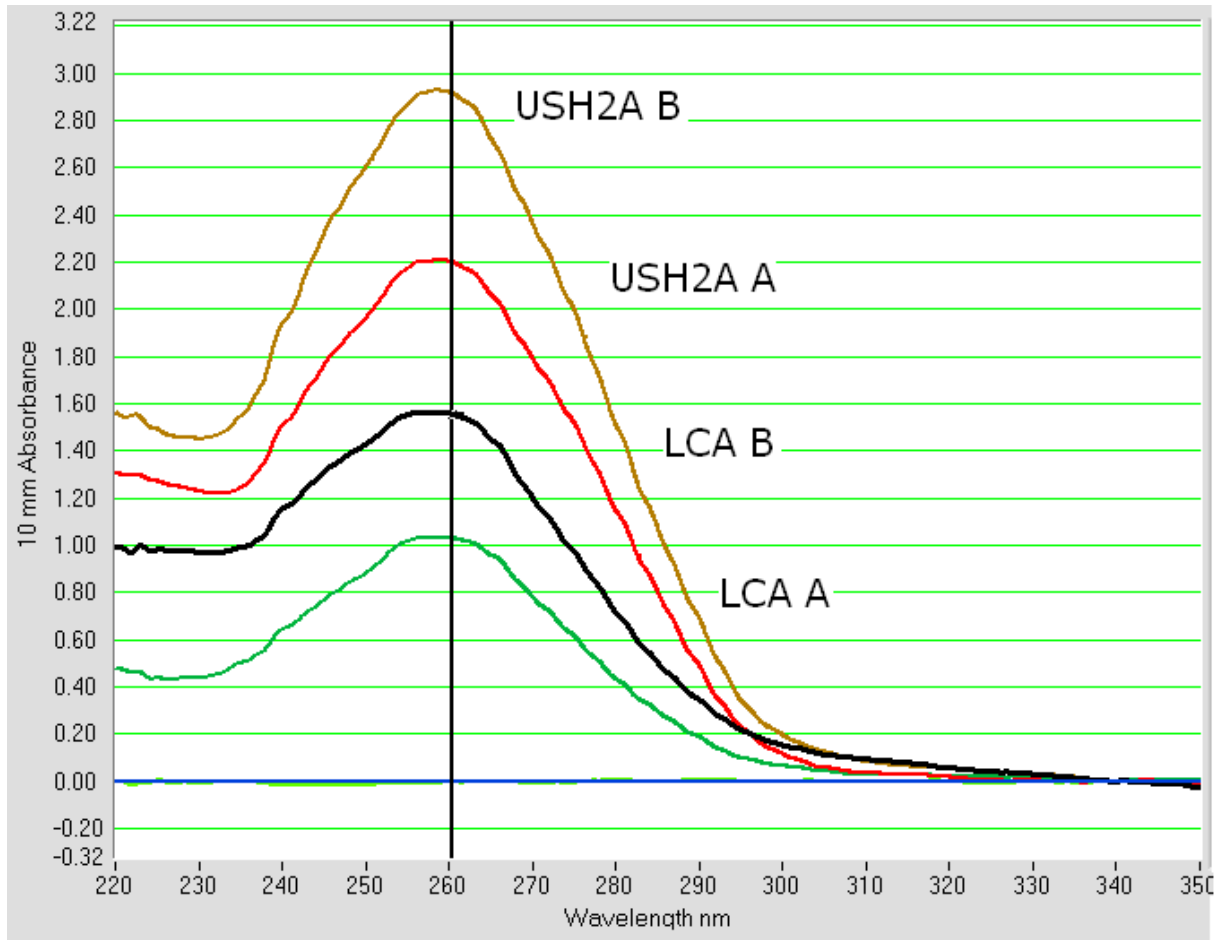
**Figuur 33: Amplificatiecurves van de LCA- *pool*.** De verschillende verdunningsreeksen zijn aangeduid.



**Figuur 34: Amplificatiecurves van de LCA- *pool*.** De verschillende verdunningsreeksen zijn aangeduid.

### 1. Concentratie meting NanoDrop® ND-1000

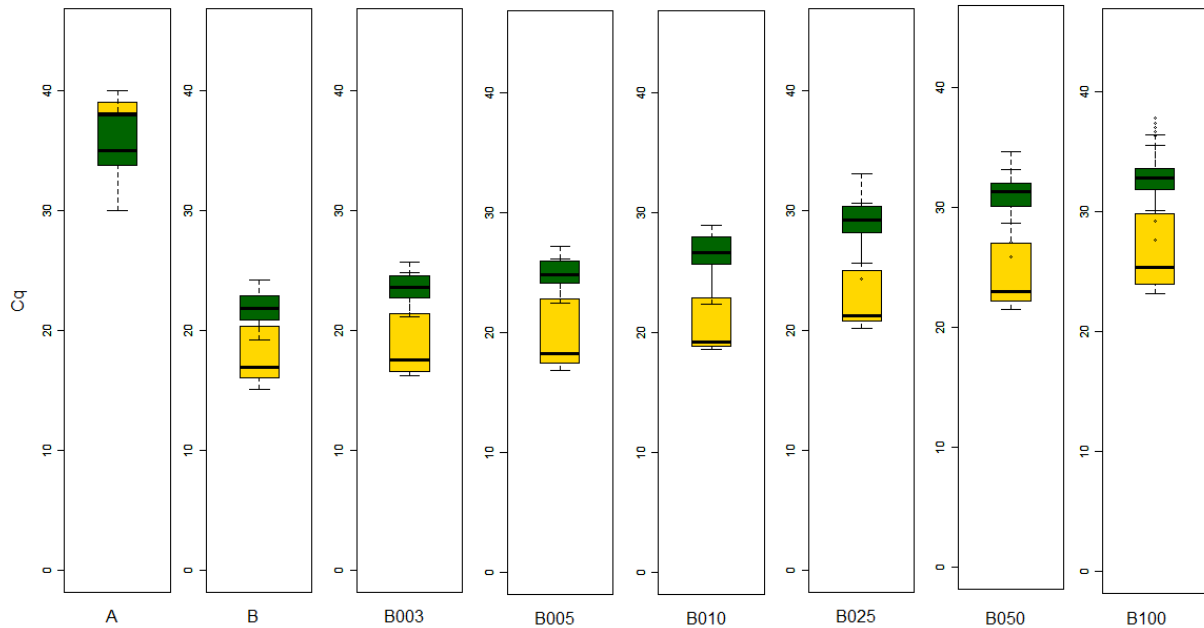
De concentratie van de stalen werd na de laatste zuiveringsstap, voor de eigenlijke ligatie, gemeten. De resultaten van deze meting waren voor de LCA-pool en de USH2A-pool niet buitensporig afwijkend: conditie B heeft zoals verwacht (want meer geconcentreerd tijdens zuivering) een hogere concentratie in vergelijking met conditie A. Deze concentraties kunnen bijgevolg geen verklaring bieden voor de afwijkende ligatieresultaten.



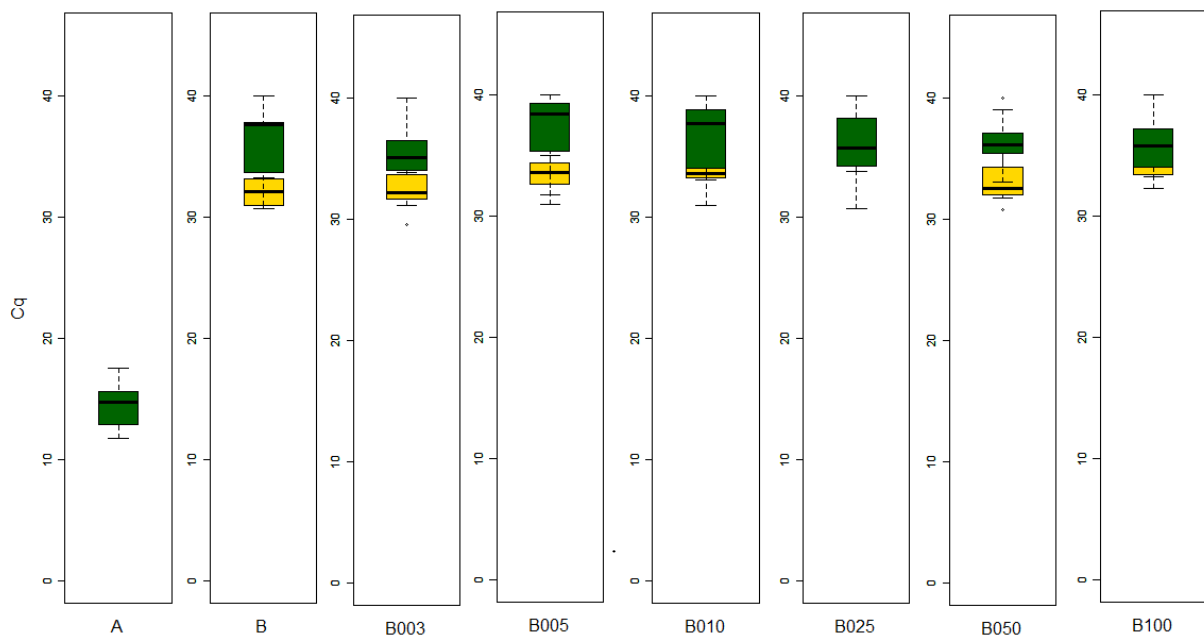
**Figuur 35: Concentratie meting per staal.** Absorbantie van het DNA van het staal uitgezet ten opzichte van de golflengte. Hoe hoger de absorbantie, hoe hoger de concentratie van het staal.

## 2. Zelfligatie

In dit experiment bleken de zelfligatie amplicons in alle LCA verdunningen, met uitzondering van conditie A, een lagere C<sub>q</sub>-waarde te hebben. In de USH2A-pool was dezelfde trend ongeveer zichtbaar, maar moet men rekening houden met het feit dat deze resultaten niet zijn zoals verwacht.



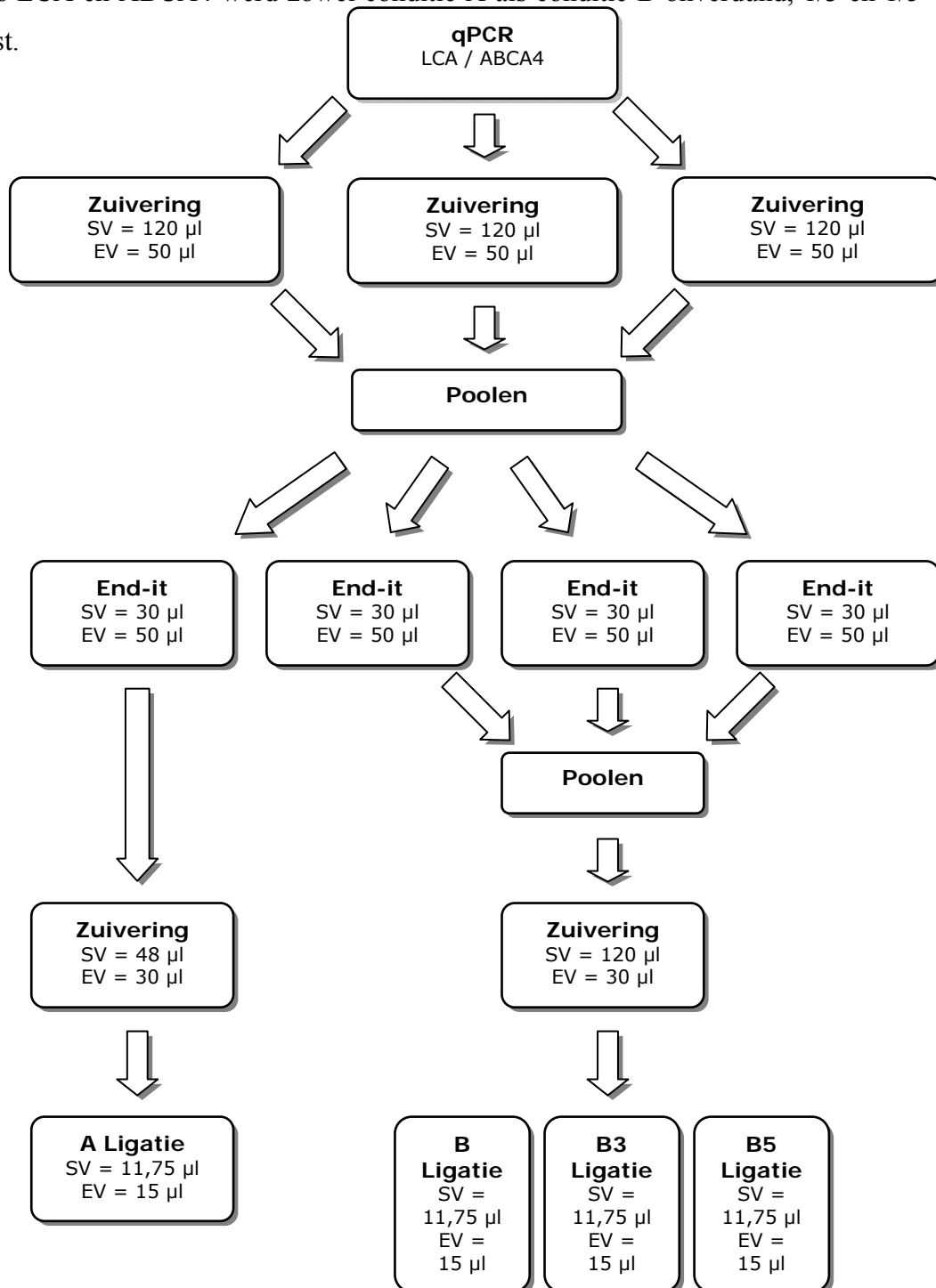
**Figuur 36: Zelfligatie versus geen zelfligatie in de LCA-pool.**  
De gele boxen duiden op zelfligatie, de groene op geen zelfligatie.



**Figuur 37: Zelfligatie versus geen zelfligatie in de USH2A-pool.**  
De gele boxen duiden op zelfligatie, de groene op geen zelfligatie.

## Bijlage 27: Workflow herhaling van de verdunningsreeks

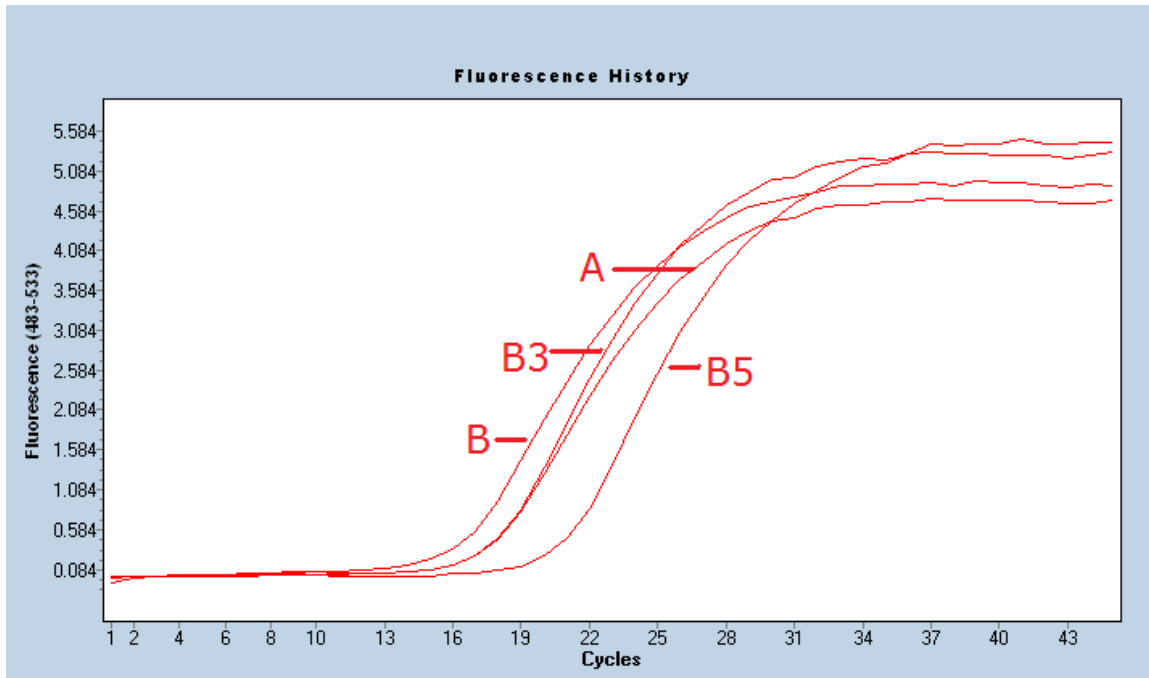
Onderstaande *workflow* werd voor experiment 3.2.4. gebruikt. Twee pools van startmateriaal (LCA, ABCA4 en USH2A) werden, onafhankelijk van elkaar, in parallel geligeerd. Op de pools LCA en ABCA4 werd zowel conditie A als conditie B onverdund, 1/3 en 1/5 verdund getest.



**Figuur 38: Workflow herhaling van de verdunningsreeks.** Twee pools werden, onafhankelijk van elkaar, in parallel geligeerd. SV = startvolume van het gebruikte product. EV = eindvolume na de reactie. B = onverdund. 3,5,10,25,50,100 is respectievelijk 1/3, 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 verdund. In de USH2A pool werd de eerste zuiveringsreactie 2 maal uitgevoerd en de *end-it* reactie 3 maal.

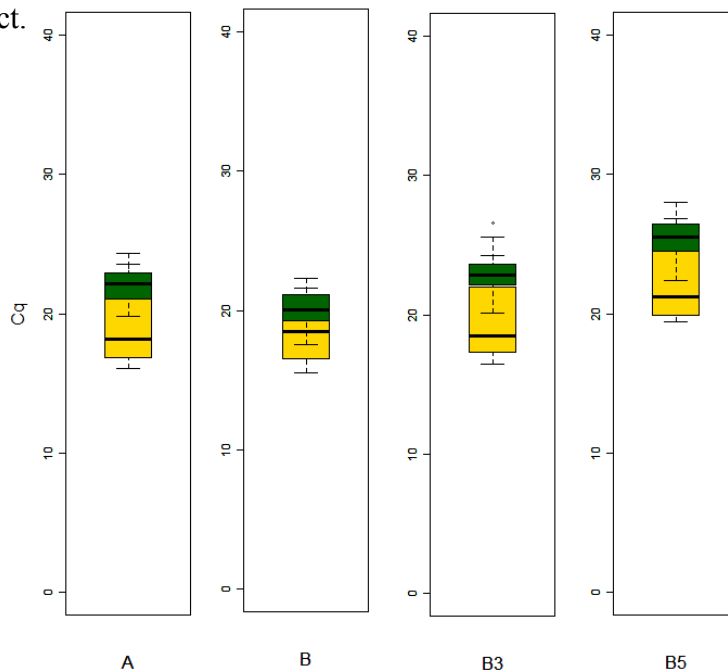
## Bijlage 28: Resultaten herhaling van de verdunningsreeks

Verdunning B bleek het beste resultaat te geven in de LCA- en ABCA4-*pool*. Deze verdunning gaf de laagste C<sub>q</sub>-waarde wat duidt op een grote hoeveelheid startmateriaal en ook een grote hoeveelheid geligeerd product.

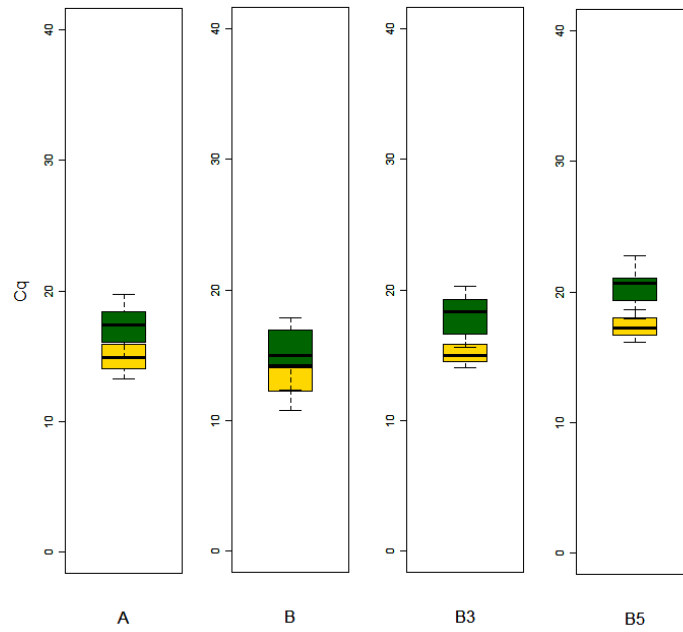


**Figuur 39:** Een voorbeeld van de amplificatiecurves van een verdunningsreeks. Het voorbeeld is afkomstig van de LCA-*pool*. De verschillende verdunningsreeksen zijn aangeduid.

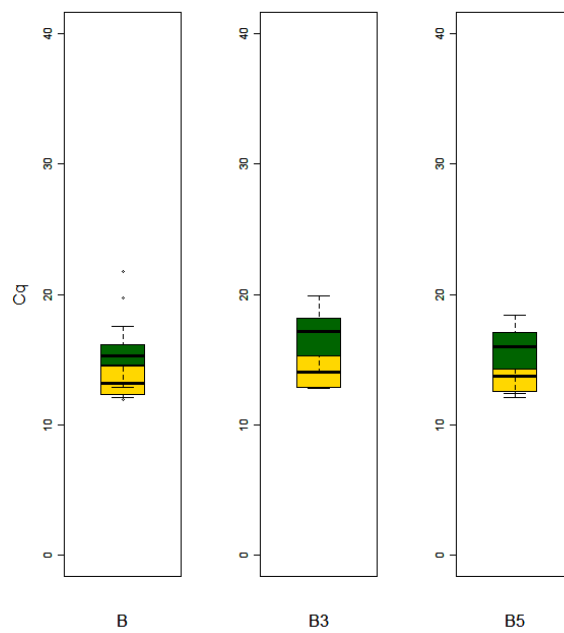
In dit experiment bleken de zelfligatie amplicons in alle verdunningen een lagere C<sub>q</sub>-waarde te hebben. Dit duidt op een grote hoeveelheid zelfligatie product in vergelijking met ‘gewoon’ geligeerd product.



**Figuur 40:** Zelfligatie versus geen zelfligatie in de LCA-*pool*. De gele boxen duiden op zelfligatie, de groene op geen zelfligatie.



**Figuur 41: Zelfligatie versus geen zelfligatie in de ABCA4-pool.**  
De gele boxen duiden op zelfligatie, de groene op geen zelfligatie.

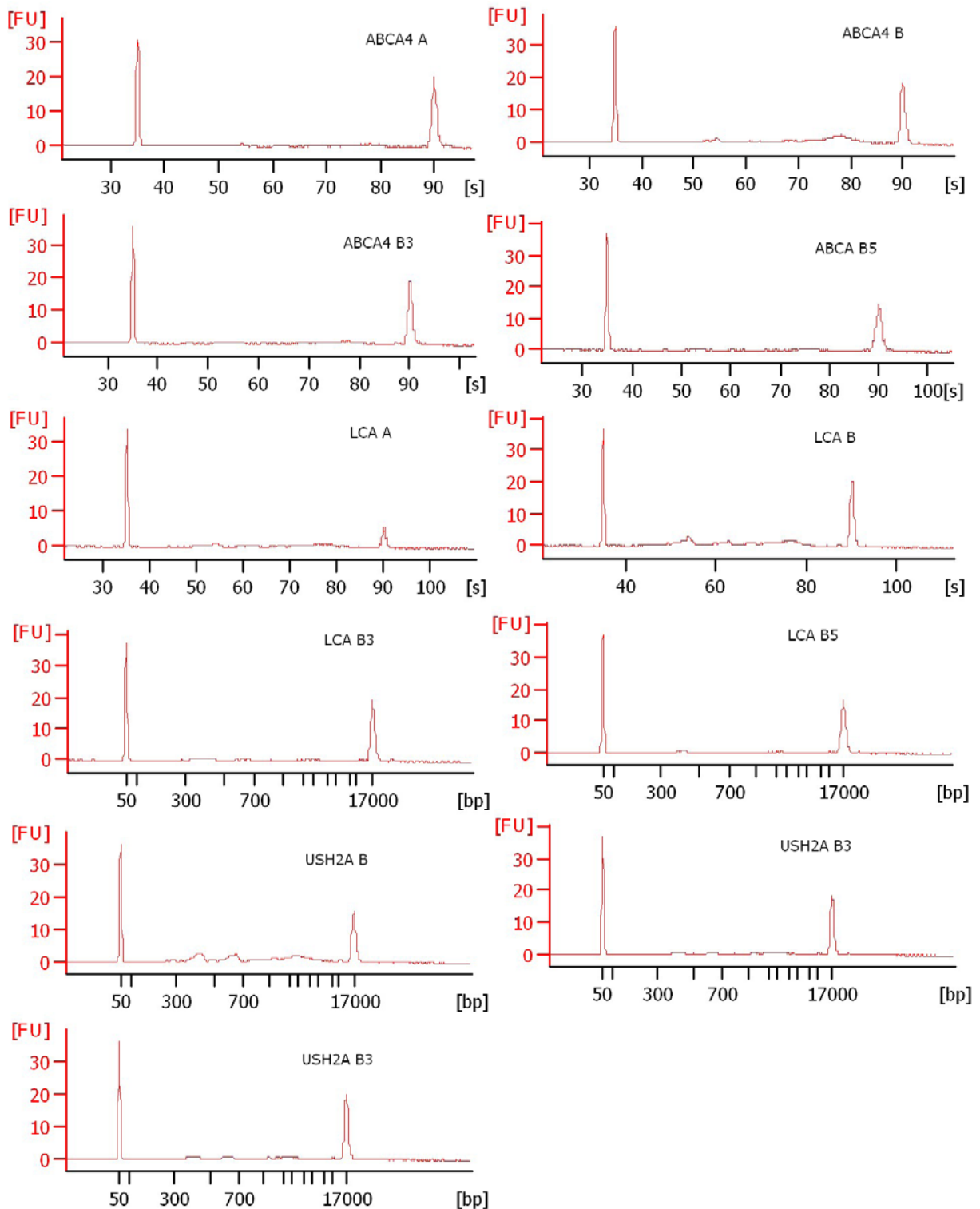


**Figuur 42: Zelfligatie versus geen zelfligatie in de USH2A-pool.**  
De gele boxen duiden op zelfligatie, de groene op geen zelfligatie.



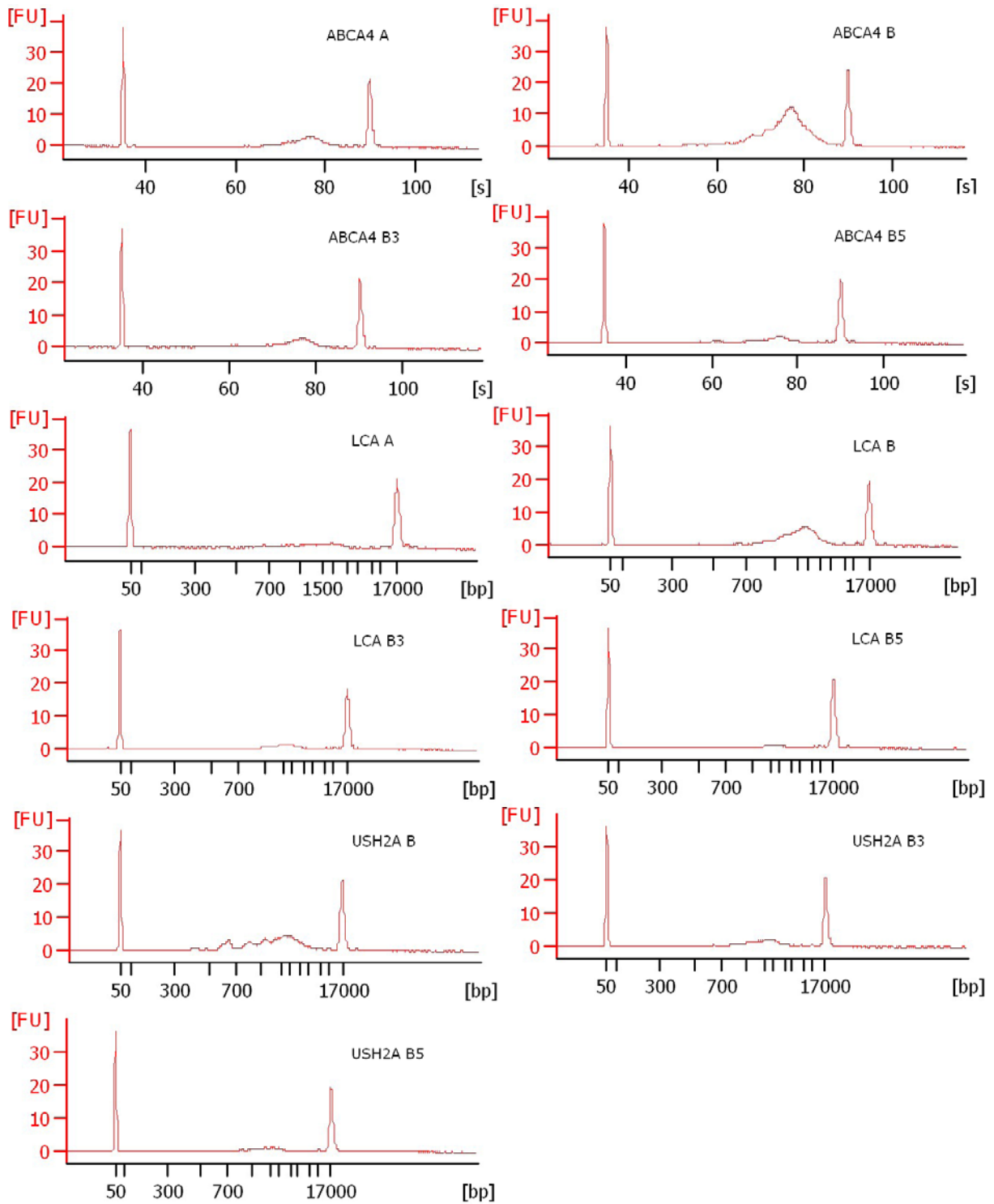
## Bijlage 29: Resultaten *Size-selection*

Op het ligatieproduct uit experiment 3.2.4. werd een *size selection* uitgevoerd.



**Figuur 43: Distributie van de fragmenten voor AMPure zuivering.** De x-as staat in seconden [s] of baseparen [bp]. Wegens een afwijking in de software kunnen deze assen niet aangepast worden.

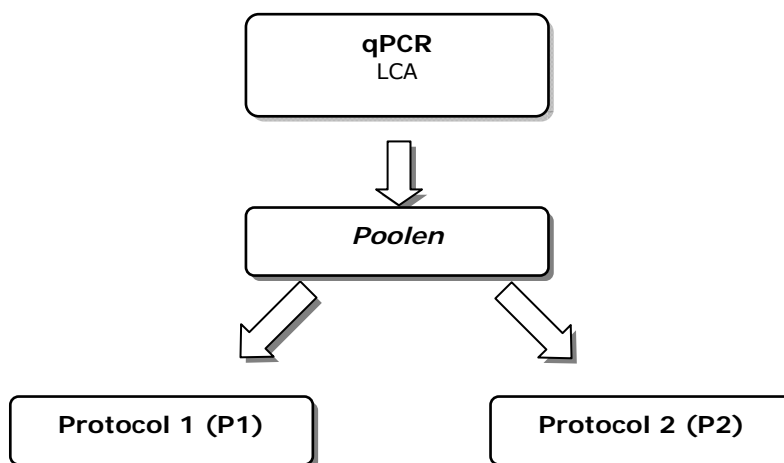
De stalen voor AMPure zuivering werden te sterk verdund om een meetbaar resultaat te bekomen.



**Figuur 44: Distributie van de fragmenten na AMPure zuivering.** De x-as staat in seconden [s] of baseparen [bp]. Wegens een afwijking in de software kunnen deze assen niet aangepast worden.

### Bijlage 30: *Workflow* van het volledige protocol

Onderstaand de *workflow* voor experiment 3.4. Het volledige protocol, van qPCR tot en met fragmentatie op de Covaris AFA™, werd doorlopen. Als startmateriaal werd DNA van een patiënt gebruikt.



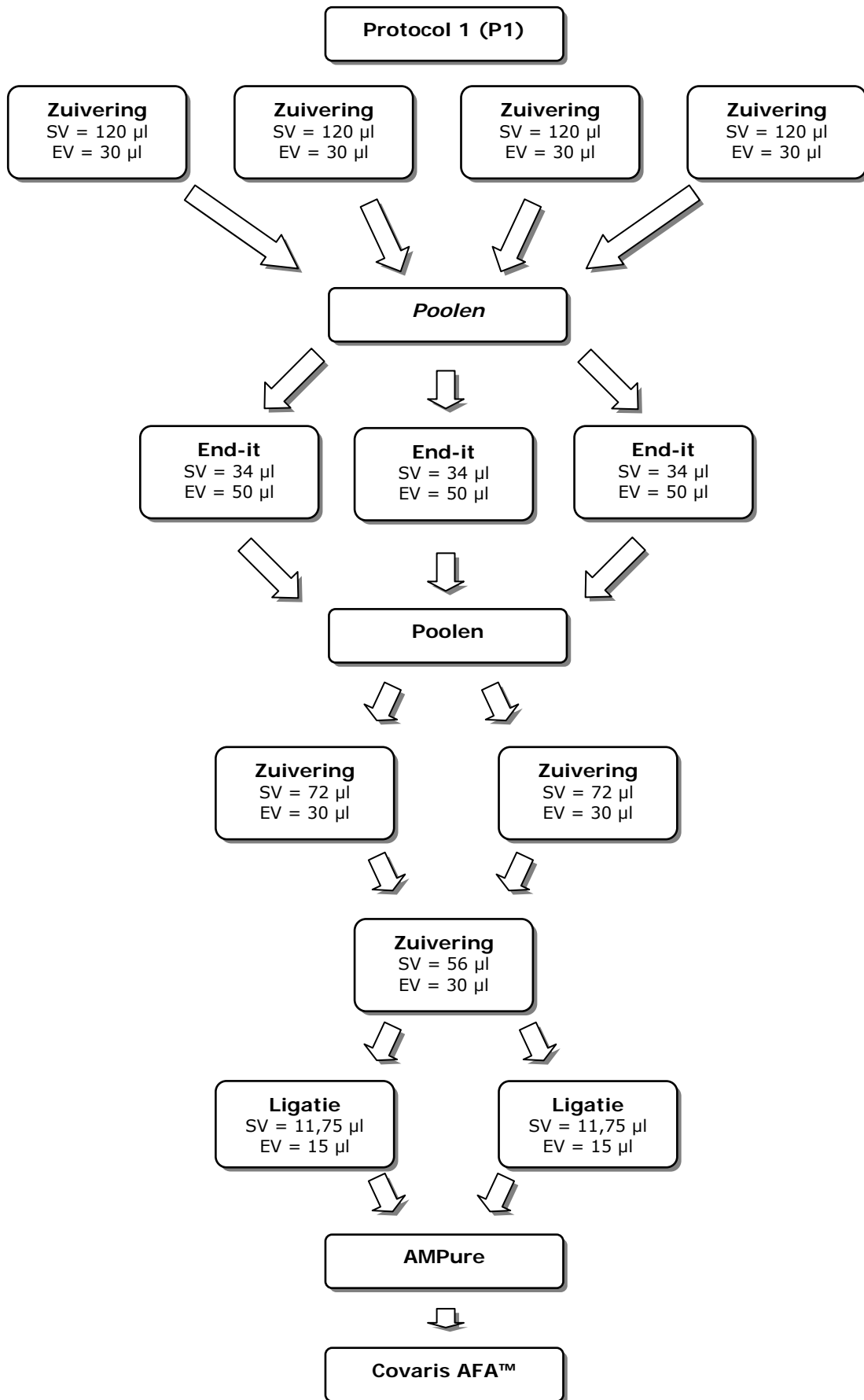
**Figuur 45:** Na het *poolen* van de qPCR-producten wordt per protocol 480  $\mu$ l staal gebruikt.

Twee verschillende protocollen werden gebruikt voor de stappen voorafgaand aan de ligatie, respectievelijk protocol 1 (P1) en protocol 2 (P2). P2 is goedkoper en eenvoudiger in uitvoering dan P1, maar bij P2 is er meer kans op verlies van DNA.

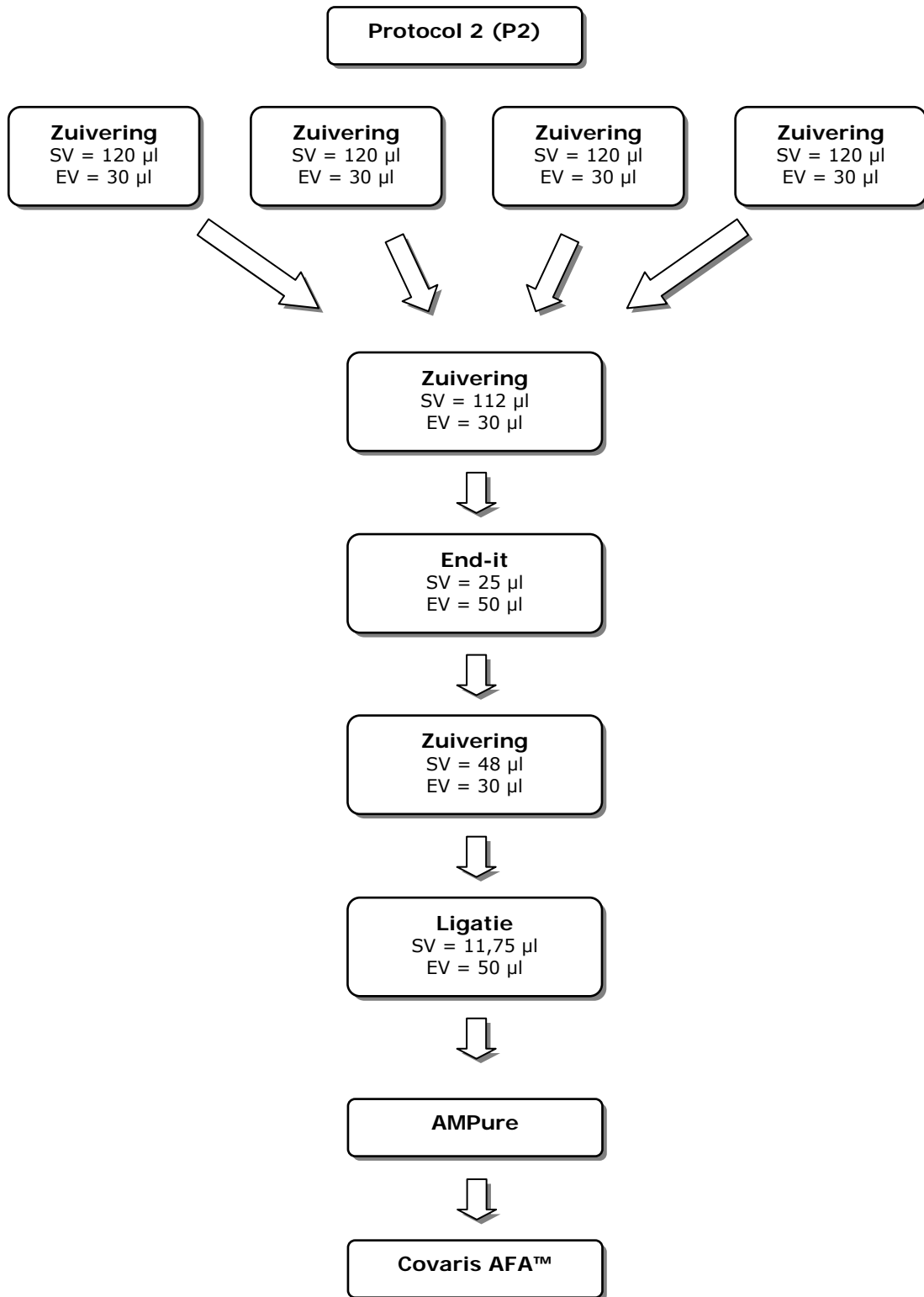
Na iedere zuiveringsstap werd 3  $\mu$ l product aan de kant gezet. De concentratie van het dubbelstrengig DNA in dit staal werd achteraf gemeten aan de hand van de Molecular Probes PicoGreen® Assay op de FLUOstar OPTIMA.

Voor en na AMPure *size selection* werd ook 3  $\mu$ l staal achter de hand gehouden. De concentratie van het dubbelstrengig DNA in dit staal werd achteraf gemeten aan de hand van de Molecular Probes PicoGreen® Assay op de FLUOstar OPTIMA. Het effect van de *size selection* werd geanalyseerd op de Agilent 2100 BioAnalyzer.

Na fragmentatie op de Covaris AFA™ werden de verschillende stalen geanalyseerd op de Agilent 2100 BioAnalyzer.

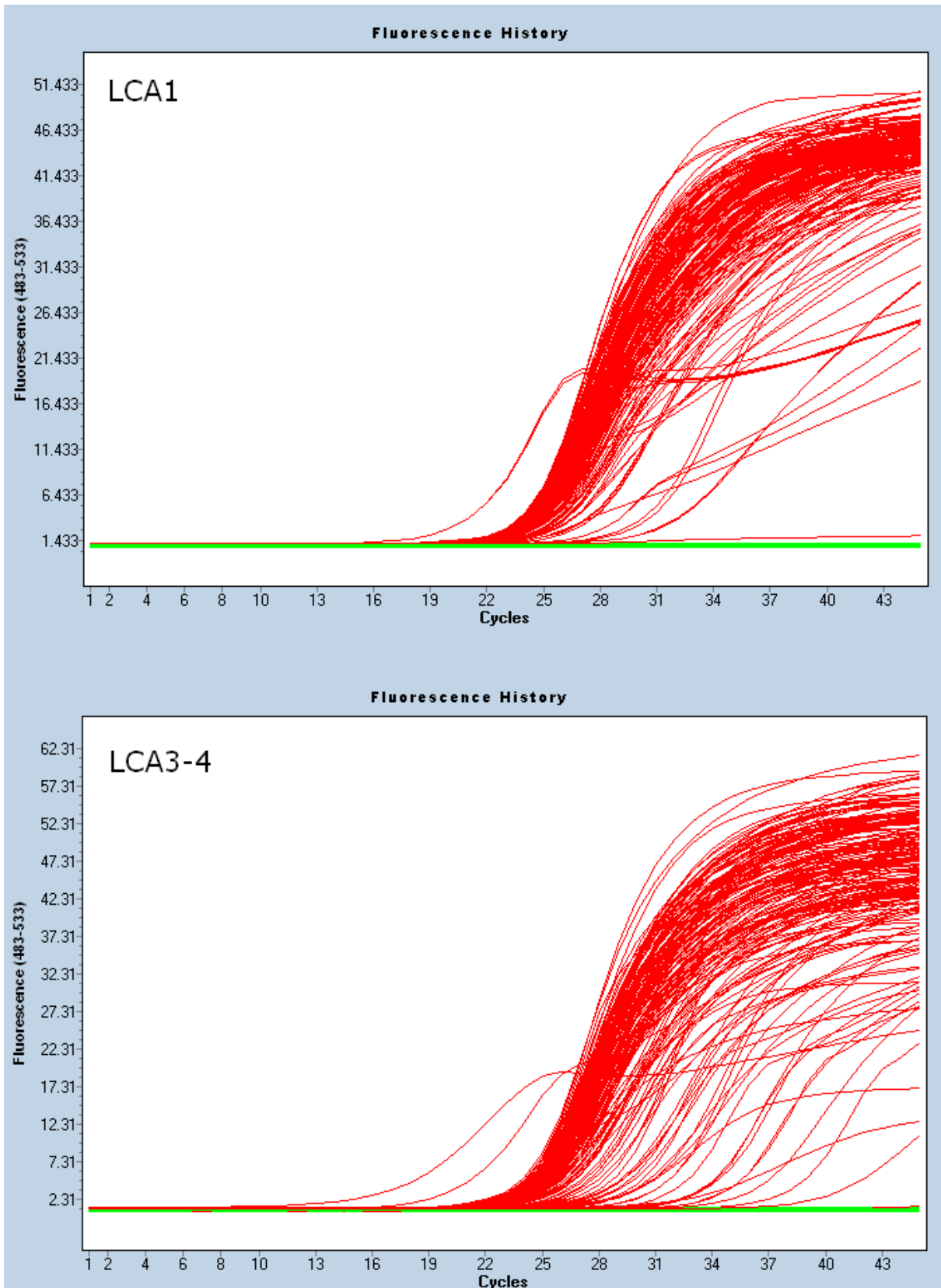


Figuur 46: Workflow protocol 1.



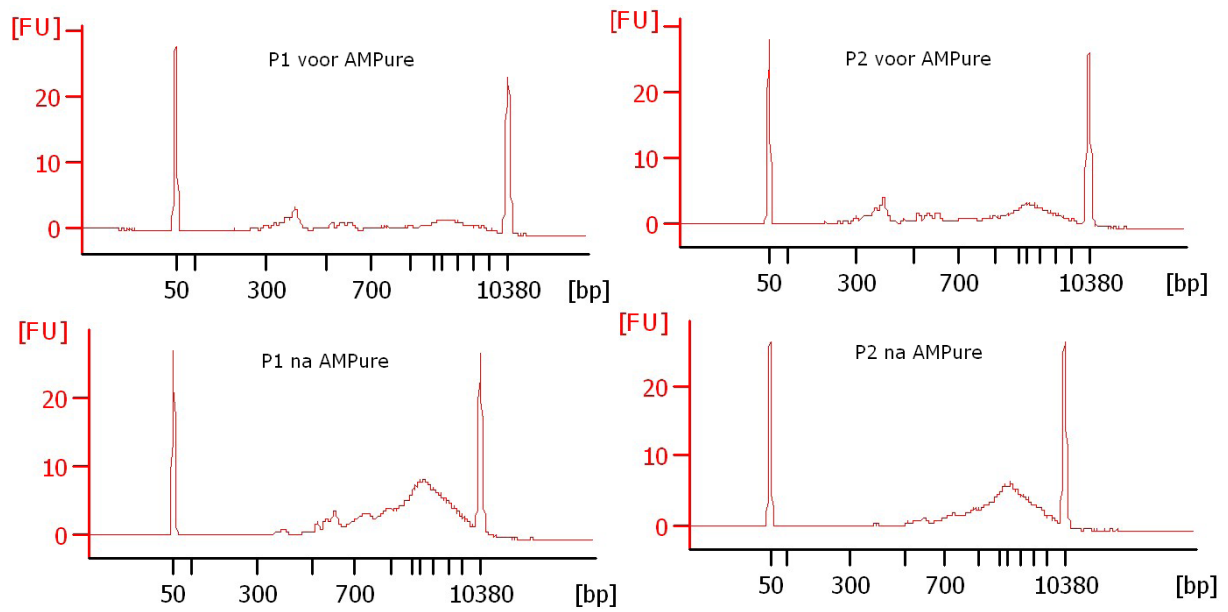
Figuur 47: *Workflow protocol 2.*

## Bijlage 31: Resultaten van het volledige protocol

1. qPCR

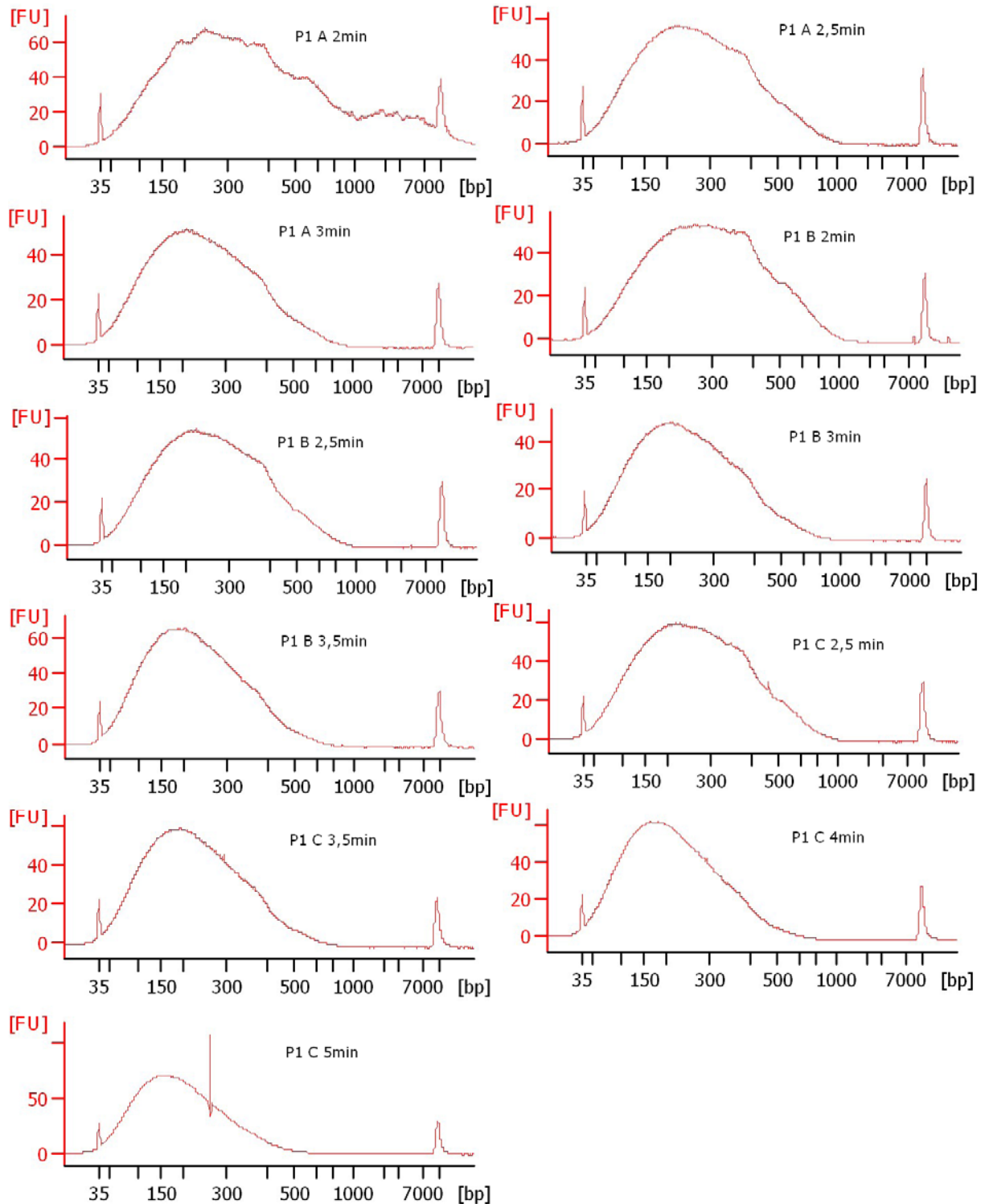
Figuur 48: Amplificatiecurves van de platen LCA1, LCA3 en LCA4.

## 2. AMPure size selection



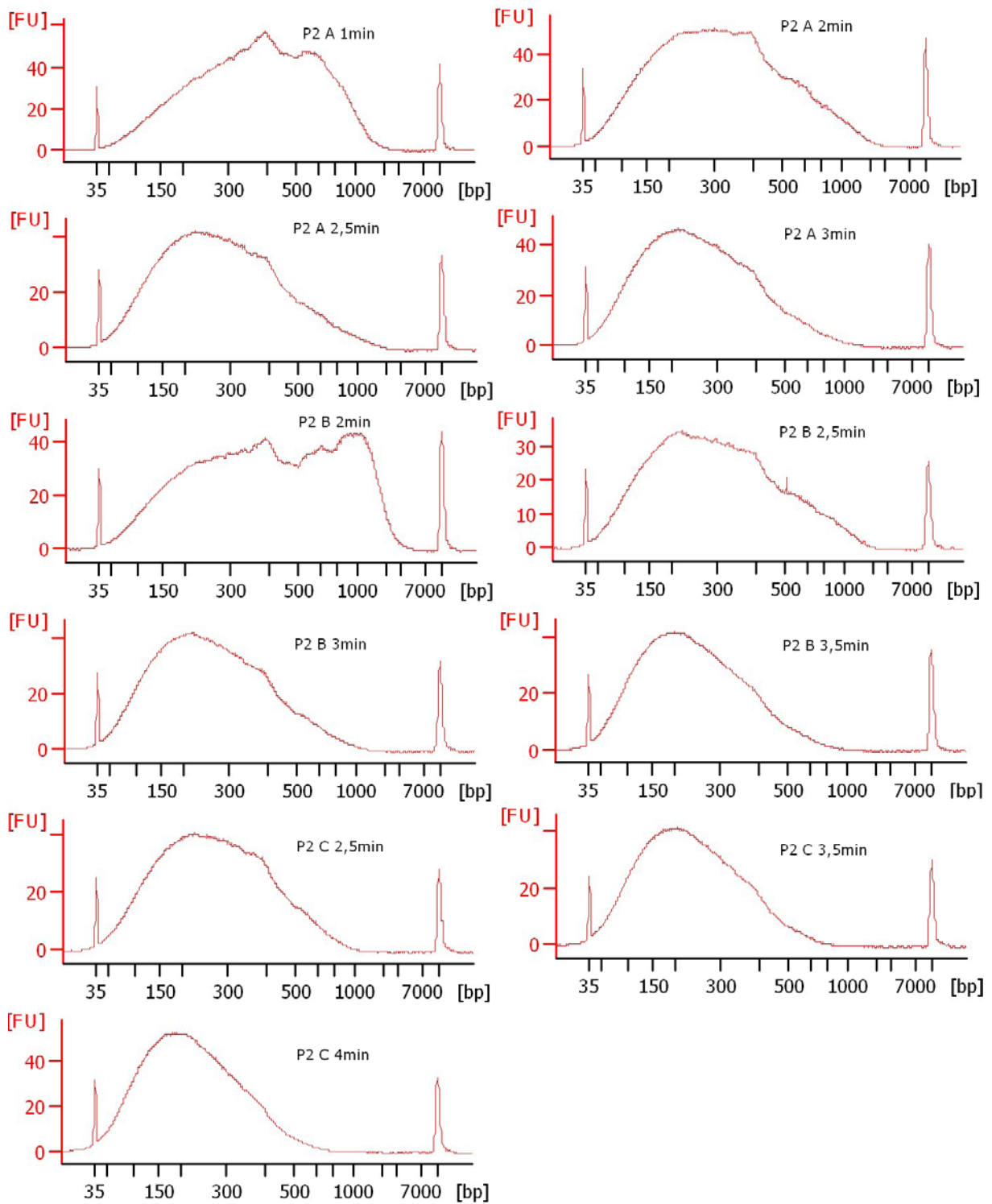
**Figuur 49: Product voor en na AMPure size selection.** De fragmenten kleiner dan 500 bp zijn verdwenen.

### 3. Fragmentatie op Covaris AFA™



**Figuur 50: Product P1 na fragmentatie op de Covaris AFA™.** Verschillende fragmentatietijden werden gebruikt. De afwijkende piek, rond 200 bp, in staal P1 C 5 min is het gevolg van een luchtbel tijdens de Agilent 2100 BioAnalyzer run.





**Figuur 51: Product P2 na fragmentatie op de Covaris AFA™.** Verschillende fragmentatietijden werden gebruikt. De afwijkende piek in staal P2 B 2 min is vermoedelijk het gevolg van een luchtbel tijdens de fragmentatie op de Covaris AFA™.