

BIOTECHNOLOGIE**HOE PCR EEN GOUDEN**

DOOR PAULINE VAN SCHAYCK

Sinds de covid-19-pandemie kent het grote publiek PCR als diagnostische test. De techniek maakte jarenlang een stormachtige ontwikkeling door en groeit nog steeds verder met nieuwe toepassingen. 'Je kunt PCR'ren op werkelijk alles wat leeft of heeft geleefd.'

Halverwege de jaren tachtig slaagde bio-chemicus Kary Mullis erin om selectief dna-strengen te vermeerderen met enzymen uit heetwaterbronnen. Zijn doel was om een nieuwe methode te ontwikkelen om puntmutaties voor sikkelcelanemie aan te tonen. Hij werkte daarom, net als velen in die tijd, aan verbetering van al bestaande methodes om dna te kopiëren. De uitvinding van Mullis bracht dit proces echter in een stroomversnelling. Het leverde hem de Nobelprijs voor de chemie op. In de jaren die volgden werd de polymerase-kettingreactie een standaard labmethode met uiteenlopende toepassingen. Vorig jaar zomer overleed Mullis, net voordat het grote publiek kennis zou maken met PCR als diagnostisch hulpmiddel.

Mullis was destijds de eerste die de thermostabiele taq-polymerase gebruikte. Dit enzym was acht jaar daarvoor geïsoleerd uit *Thermus aquaticus*-cellen, die te vinden zijn in heetwaterbronnen in Yellowstone National Park (VS). De soort werd later ingedeeld bij de archaea. Het grote voordeel van taq-polymerase was dat niet elke keer nieuwe enzymen moesten worden toegevoegd na het denatureren van de dubbele dna-streng. Dat scheelde veel tijd en moeite. Vanaf dat moment kon PCR de tijdrovende kweekmethodes van voorheen gaan vervangen. Behalve in de diagnostiek, maakte PCR ook in ander moleculair onderzoek een enorme opmars door (zie kader: PCR: de basis).

Moleculair bioloog Maria Plug leidt het Centrum voor Bioscience en Diagnostiek van de Hogeschool Leiden en

heeft jarenlang zelf PCR-trainingen aan studenten en professionals gegeven. Zij was tijdens haar promotieonderzoek eind jaren tachtig een van de pioniers die met PCR werkte. 'Dat ging nog helemaal niet efficiënt. We hadden een slechtwerkende robotarm en drie waterbaden. Op het hete bad lagen plastic bolletjes om te voorkomen dat het water te snel verdampde.' Ze was met iets dat nu in drie kwartier kan minstens een dag bezig. Toch waren de voordelen voor allerlei onderzoekers ook toen al groot. Daarvoor duurde een virus diagnosticeren bijvoorbeeld een paar weken, nu slechts een dag. Een ander probleem uit de begintijd was het ontbreken van software. Plug: 'Er waren nog geen programma's om primers te ontwikkelen. Je moest toen zelf maar gaan zoeken in de bekende sequenties en bedenken wat goede primers zouden zijn. We bestelden vervolgens veel primerparen in de hoop dat er een eentje werkte. Nu geef je gewoon een sequentie aan een primerdesignprogramma en die geeft je de meest waarschijnlijke kandidaten.'

DATABASES

In de loop van de tijd is niet alleen het proces volledig geautomatiseerd, maar zijn ook de databases met dna-sequenties enorm uitgebreid, weet Rob van Gijlswijk, docent diagnostiek en moleculaire biologie, ook bij de Hogeschool Leiden. Hij werkt daarnaast met PCR voor waterschapslaboratorium Aquon, dat onderzoek doet naar waterkwaliteit. 'Tot voor kort deden waterschappen onderzoek naar de biodiversiteit door diertjes te tellen in een watermonster. Nu gaat dat ook anders. Je neemt een schepje water uit een sloot en daar zit dna van al die dieren in. Als ik bijvoorbeeld rivierkreeftjes wil onderzoeken, kan ik het hele genoom en ook al het mitochondriaal dna in databases opzoeken. In een halve dag heb je alle probes en primers bij elkaar gezocht. Dat duurde vroeger weken', legt Van Gijlswijk uit. Ondertussen neemt de gevoeligheid van PCR steeds verder toe met de verfijning van de techniek. Plug: 'Je kunt nu in principe op alles wat leeft of heeft geleefd PCR toepassen, alleen het uitgangsmateriaal is niet altijd geweldig. Denk aan een slagtang van honderdduizend jaar oud of een lijk dat heel lang in de sloot heeft gelegen. Toch zit daar vaak nog wel bruikbaar dna in. Daarom zijn de toepassingen ook zo ontzettend breed geworden. Het gebruik in onderzoekslaboratoria, diagnostische laboratoria, de farmaceutische industrie en biotech bedrijven neemt nog steeds toe.'

De komst van multiplex PCR – met meerdere dna-fragmenten –, RT-PCR (reverse-transcriptie-PCR), qPCR (quantitative PCR), de hot start PCR en dPCR (digitale PCR) (zie kader: Geschiedenis van PCR) leidde de afgelopen 35 jaar tot nieuwe toepassingen en meer nauwkeurigheid. 'Er zijn bovendien al heel kleine PCR-apparaatjes die je aan een smartphone kan koppelen', vertelt Plug. 'Die kun je meenemen naar een patiënt, op het land of naar een crime-scene. Dat noemen we *point-of-care*-testen (POC-testen). Het is de afgelopen jaren overigens best stil geweest rondom die ontwikkeling, maar nu is POC weer ontzettend in opkomst. Hier komen steeds meer toepassingen voor, verwacht ik. Dat lijkt mij ook een uitkomst in ontwikkelingslanden.' Van Gijlswijk vult aan: 'Bij grote bierbrouwerijen lopen mensen met een POC-apparaatje rond zonder biologiekennis. Die bepalen even snel hoeveel gist er in de tank zit. De bio-informaticus krijgt

PCR: de basis

De polymerasekettingreactie bestaat uit een aantal cycli waarin de temperatuur verhoogd en verlaagd wordt om een specifiek stuk dna te vermeerderen. Eerst wordt de temperatuur verhoogd tot 90-95 graden Celsius, zodat het dubbelstrengs dna splits in twee complementaire strengen (denaturatie). Na het verlagen van de temperatuur tot 55-70 graden binden primers aan de dna-strengen (hybridisatie). Door de temperatuur opnieuw te verhogen tot 70-75 graden bindt taq-polymerase aan de primer. Losse nucleotiden in de oplossingen vormen vervolgens weer dubbelstrengs dna (verlenging). Het gewenste dna is nu verdubbeld. In de volgende cyclus wordt er opnieuw verhit en afgekoeld waardoor de nieuwe dubbele strengen gescheiden worden en elk afzonderlijk gekopieerd door het taq-polymerase. Na ongeveer dertig cycli zijn er genoeg dna-kopieën voor verder onderzoek aanwezig. In de moleculaire biologie is PCR de standaard methode om dna te vermeerderen voor onderzoek naar de functies van genen en eiwitten, voor kloneren en voor *genome editing* met Crispr-Cas9. In de diagnostiek draait PCR om het aantonen van een specifiek stuk dna in een sample.

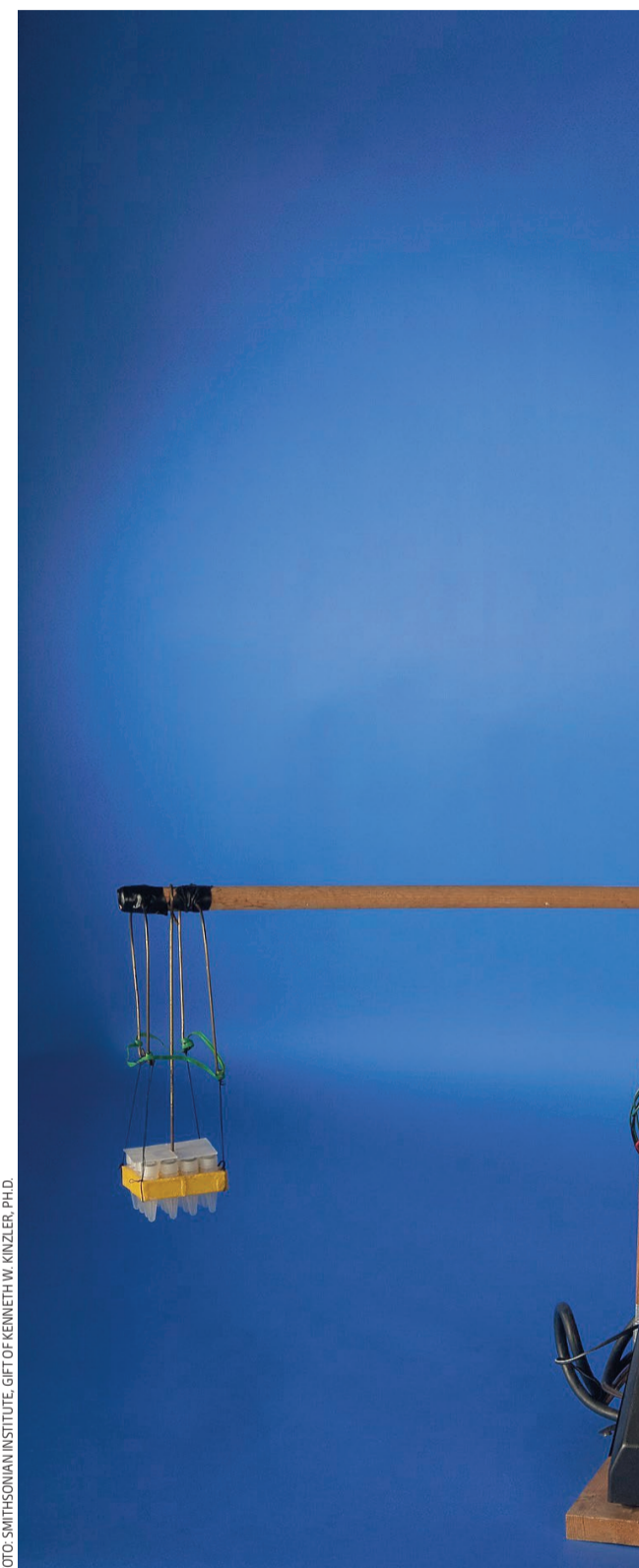
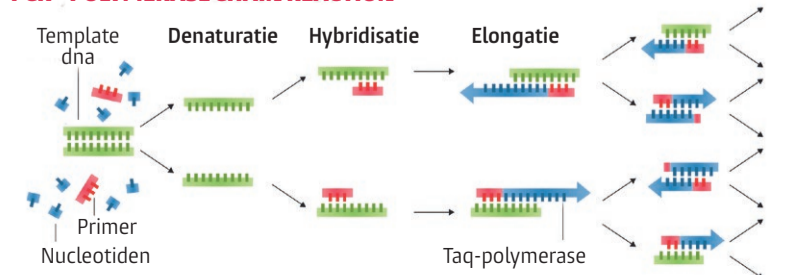
PCR - POLYMERASE CHAIN REACTION

FOTO: SMITHSONIAN INSTITUUT, GIFT OF KENNETH W. KINZLER, PH.D.

Deze zelfgemaakte PCR-robot uit 1987 verplaatst dna-monsters met een... van de John Hopkins-universiteit maakten hem van onderdelen uit hu... seerde PCR-apparaten in die tijd zeer gewild en daardoor duur en moei...

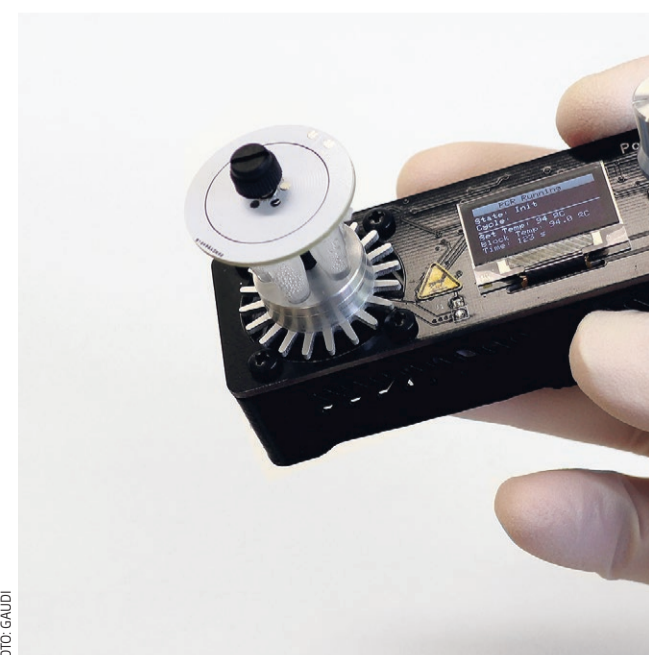
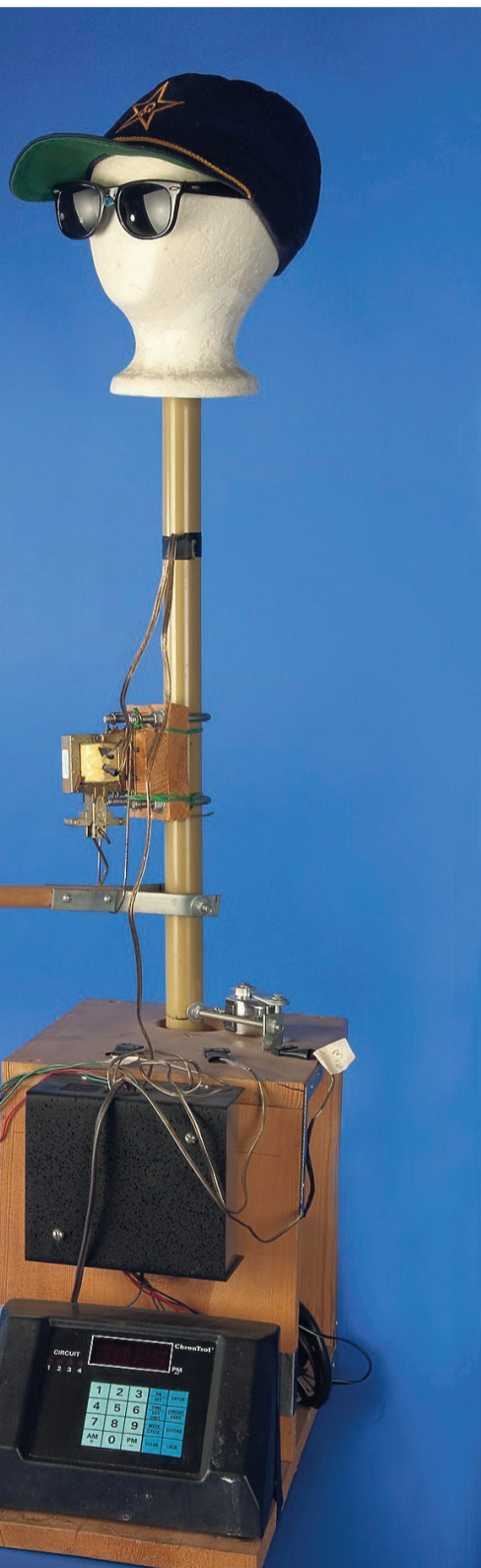


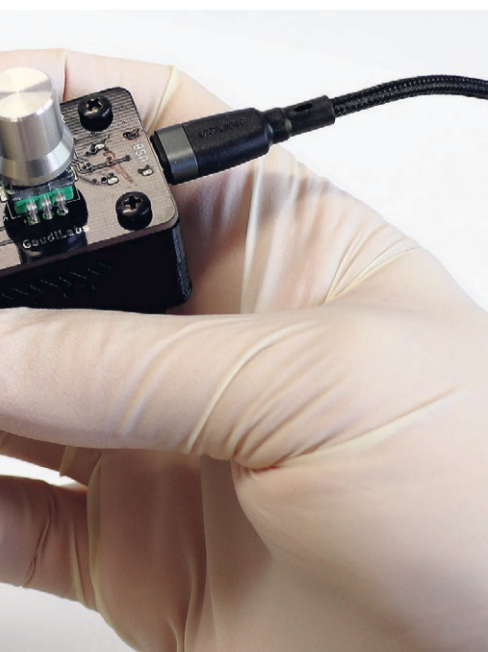
FOTO: GAUDI

Dit ultrakleine apparaatje, de PocketPCR, weegt slechts 50 gram en is... computer te koppelen.

STANDAARD WERD



en robotarm tussen twee waterbaden. Onderzoekers in lab en plaatselijke ijzerwinkels, omdat geautomatiseerd verkrijgbaar waren.



met een usb-ingang aan een smartphone of



FOTO: THERMO-FISHER

de gegevens binnen. Ze hebben daar geen lab meer voor nodig. Zo'n apparaatje is eenvoudig geschikt te maken voor andere testen. Je hebt alleen andere primers nodig.'

Naast de nieuwere methodes, zoals digitale PCR, blijven ook de oudere populair. 'Als je geen exact aantal hoeft te weten, is het ook niet nodig om digitale PCR te doen. Dat is duurder en meer werk, dus qPCR is in zulke gevallen goed genoeg', legt Van Gijlswijk uit. 'En in forensisch onderzoek, de prenatale diagnostiek en de transplantatie-geneeskunde is *end-point*-PCR nog steeds de standaard', zegt Plug. Het aantonen van verwantschap lukt met deze oude methode beter dan met qPCR, omdat er op een groot aantal fragmenten tegelijk kan worden getest. Na de PCR worden de dna-fragmenten door capillaire elektroforese gescheiden in buisjes met buffer onder invloed van een elektrisch veld, dat veel sterker is dan bij de traditionele gelelektroforese.

BRIL

Ondanks alle mogelijkheden van PCR, kent de methode ook nog steeds beperkingen. Bij PCR vind je namelijk precies wat je zoekt. Plug: 'Je kijkt met een bepaalde bril op, terwijl als je dna uit een monster gaat sequencen, dan weet je precies wat erin zit. Mede daarom is sequencing in opkomst.' Toch komen beide technieken op een bepaalde manier steeds dicht bij elkaar, bijvoorbeeld door het aantal targets bij qPCR te verhogen. 'Je kunt nu maximaal vier of vijf targets tegelijk testen met qPCR', vertelt Van Gijlswijk. 'Je werkt met fluorescentie en het is ingewikkeld om meer kleuren uit elkaar te houden. Als iemand een onbekende longinfectie heeft bijvoorbeeld, dus niet covid-19, dan gaan ze voor zeventien targets PCR doen. Dat zijn vier of vijf testen in duplo. Dat wil je het liefst in één keer doen. In de PCR is dat de heilige graal op dit moment. Straks doen we misschien wel vijftig testen tegelijk en dan hoop je erachter te komen wat de patiënt heeft. Dit gaat in heel kleine stapjes vooruit.'

Aan de andere kant ontwikkelt de sequencing zich ook steeds verder en dat leidt straks tot concurrentie voor PCR, denkt Plug. 'Wat denk je', vraagt ze aan haar collega, 'als *nanopore* sequencing steeds beter en toegankelijker wordt, zou PCR dan gaan verdwijnen, omdat je dan je targets helemaal niet meer hoeft te vermeerderen?' 'Ja, dat gaat straks waarschijnlijk wel een aanzienlijk deel van de PCR-markt voor diagnostiek vervangen', verwacht Van Gijlswijk. De gouden PCR-standaard zal daardoor uiteindelijk haar glans weer verliezen, al denken beiden dat het nog jaren duurt voordat het zover is. ■

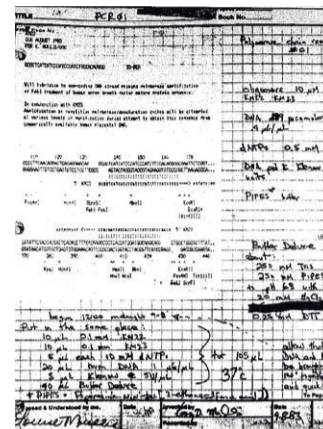


FOTO: AGESWORTH/WIKIPEDIA

Geschiedenis van PCR

1976:

Alice Chien en John Trela van de University of Cincinnati (VS) isoleren en purificeren een thermostabiele dna-polymerase uit *Thermus aquaticus* met een temperatuuroptimum rond 75 graden Celsius.

1983-1985:

Van het Eureka-moment tot de publicatie in *Science*: Kary Mullis legt bij biotechbedrijf Cetus Crops de basis voor PCR, door selectief dna-strengen te vermeerderen met taq-polymerase.

1992:

RT-PCR doet zijn intrede. Deze methode voegt een stap toe om met reverse transcriptase c-dna te maken van rna.

1993:

Kary Mullis wint de Nobelprijs voor de chemie.

1993:

Uitvinding van qPCR, waarbij een camera de toename van dubbelstrengs dna in elke PCR-cyclus meet met fluorescerend ethidiumbromide. Hieruit is de oorspronkelijke hoeveel-

heid dna uit te rekenen. De methode is veel sneller dan de oorspronkelijke *end-point*-PCR.

1999:

Dankzij digitale PCR wordt het mogelijk om het exacte aantal dna-moleculen te meten, bijvoorbeeld door elk molecuul in een aparte druppel te verpakken (ddPCR) en te meten of het gezochte dna daarin zit. Sinds een jaar of tien is dPCR sterk in opkomst.

2003:

Koudegevoelige mutanten van taq-polymerase (onder andere Klentaq) bieden een nieuwe mogelijkheid voor een *hot start*. Door de taq-polymerase pas te laten werken bij 95 graden worden zo bijproducten voorkomen. Het is de tweede methode voor een hot start. De eerste methode, met antilichamen (Anti-Taq), bestond al wat langer. Een hot start werd daarna al snel de standaard.

LAATSTE JAREN:

Opkomst van *point-of-care*-toepassingen van PCR, die versnelt tijdens de huidige covid-19-uitbraak.

'In een halve dag heb je alle probes en primers bij elkaar gezocht. Dat duurde vroeger weken'