

DNA technieken

Reading nature's harddisk



M. (Marc) van Bommel, M.Sc.
CEO
mvanbommel@orvion.nl



Diensten bodem en water

ORVIdetect qPCR analyses

ORVIdecode NGS analyses, incl. Bio-IT en interpretatie

Biologische afbraaktesten (aeroob/anaeroob)

Bioaugmentatie producten (ontwikkeling en levering)

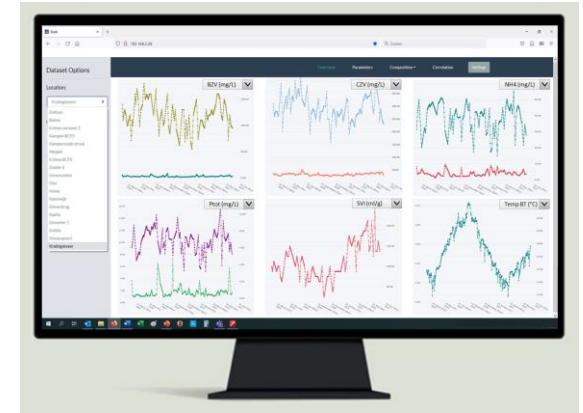
Advies, ontwerp en MKB (BRL 6002) bio bodemsaneringen

Big (bio)data management

Ontwikkeling en validatie nieuwe qPCR analyses

Ontwikkeling applicaties voor ontsluiten DNA-data

Visualisatie voor gebruikers (interactieve grafieken/kaarten)



Orvion Udetect®: mobiele qPCR

Snelle detectie (< 2 uur) van micro-organismen in water

Gelijktijdig testen van meerdere soorten

Ook voor gebruik door niet-specialisten



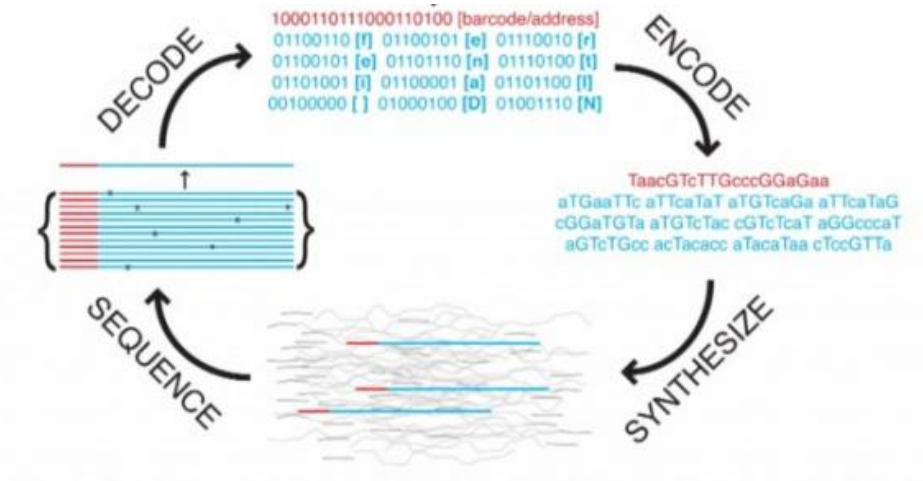
Inhoud presentatie:

1. Wat is DNA/RNA en waarom is het belangrijk?
2. Next Generation Sequencing (NGS)
3. Quantitative Polymerase Chain reaction (qPCR)
4. Samenvattend NGS en qPCR
5. Bodemtoepassingen
6. Vragen

STORAGE LIMITS

Estimates based on bacterial genetics suggest that digital DNA could one day rival or exceed today's storage technology.

	Hard disk	Flash memory	Bacterial DNA	WEIGHT OF DNA NEEDED TO STORE WORLD'S DATA ~1 kg ©nature
Read-write speed (µs per bit)	~3,000–5,000	~100	<100	
Data retention (years)	>10	>10	>100	
Power usage (watts per gigabyte)	~0.04	~0.01–0.04	<10 ⁻¹⁰	
Data density (bits per cm ³)	~10 ¹³	~10 ¹⁶	~10 ¹⁹	

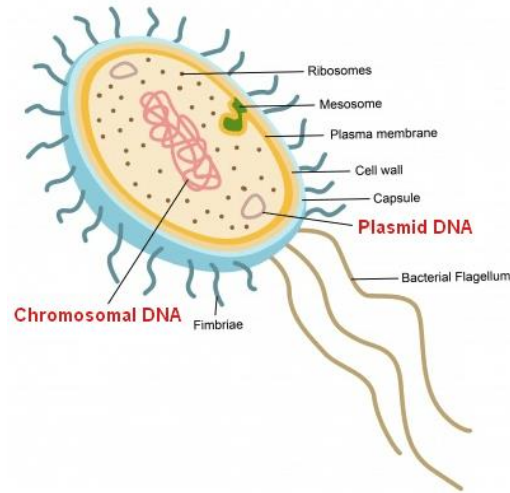


1. DNA = de harddisk van de natuur!

- DNA: een perfecte manier van data opslag
- In de natuur draait alles om behoud en overdracht van informatie
- DNA heeft een enorme informatie dichtheid



Cellen analyseren



Wie is dit?

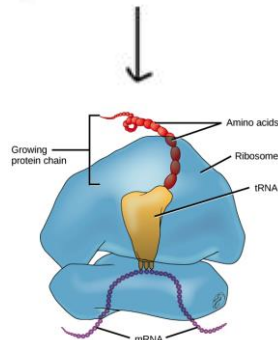
DNA



rRNA



Ribosoom



Wat is deze cel aan het doen?

DNA

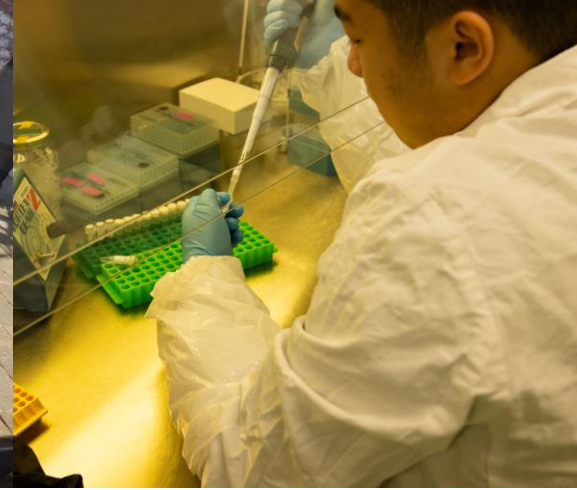


mRNA



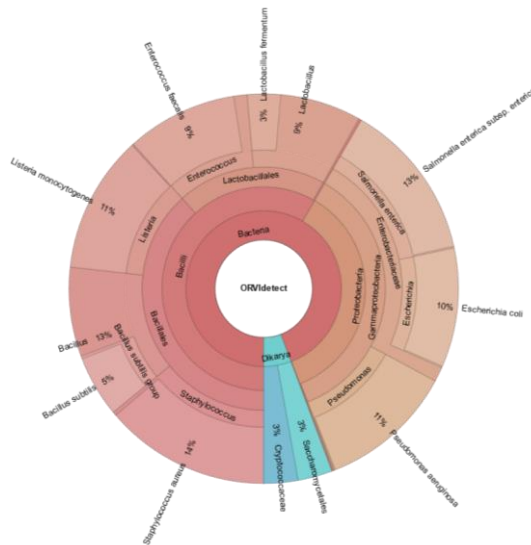
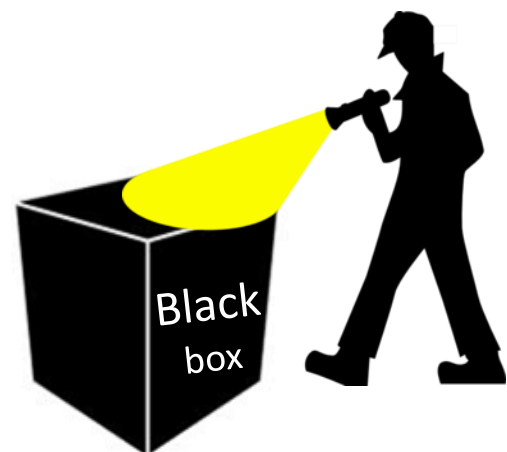
Eiwit





DNA technieken: Monstername, logistiek en transport

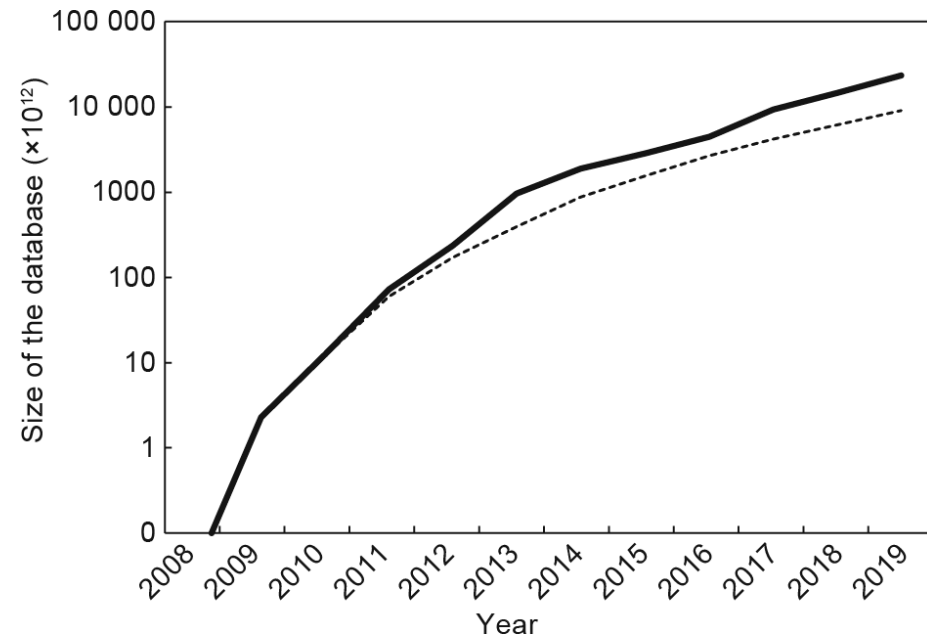
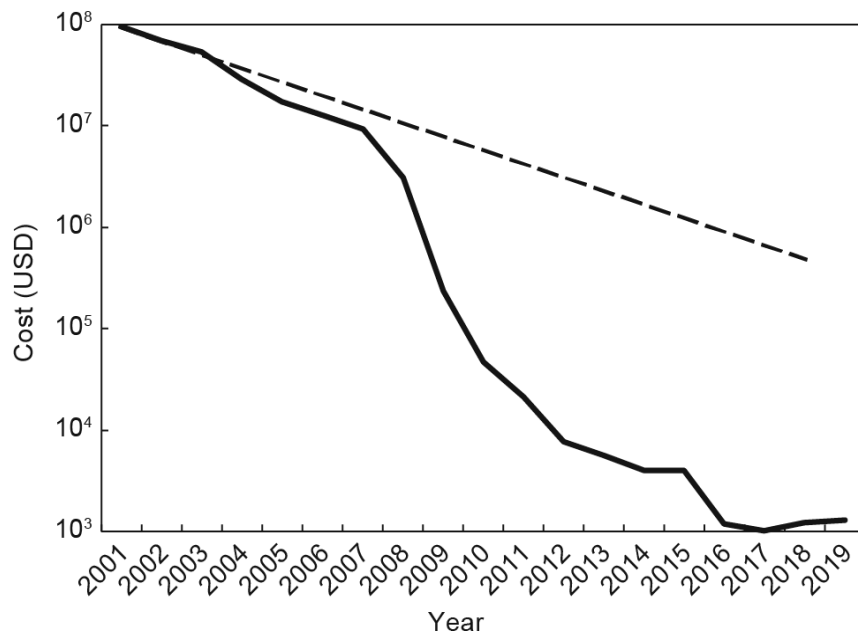
- Monstername: grond of grondwater
- Monstername: conform NEN / BRL
- Monstervolume: 150 ml (standaard) tot enkele liters
- Conservering veld (DNA)
- Transport per post: koeling niet nodig (DNA)
- 5 werkdagen (qPCR) tot 10 werkdagen (NGS)
- DNA extracten zijn lang te bewaren, meerdere analyses mogelijk
- RNA kan worden omgezet in DNA
- DNA extracten kunnen zowel voor NGS als voor qPCR worden gebruikt



2. Next generation sequencing (NGS)

Al het DNA meten om de volledige populatie micro-organismen in kaart te brengen

- Inzichtelijk maken onbekende populaties & hun genen/eigenschappen
- Profielen maken van microbiomen
- Digitale DNA-data ontsluiten een bruikbaar maken voor eindgebruikers
- Nanopore sequencing: How nanopore sequencing works - YouTube



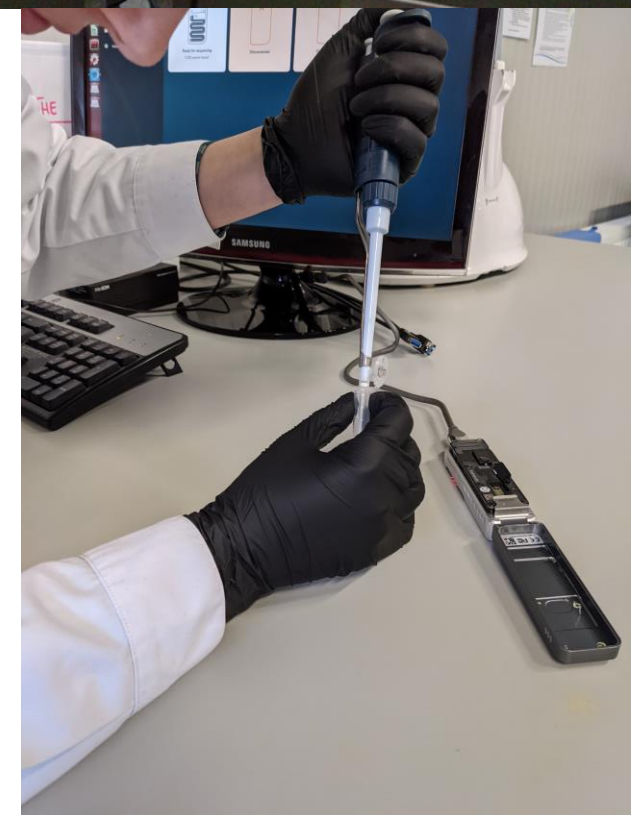
NGS: Technologie ontwikkeld zich snel

- De kosten zijn hard omlaag gegaan en gestabiliseerd sinds 2017
- De technologie wordt steeds beter
- Referentie databases groeien exponentieel
- Tot 100 GB aan data per monster geen uitzondering
- Een enorme Bio-IT / Big Data uitdaging!

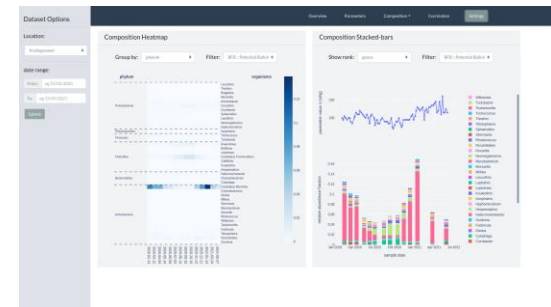
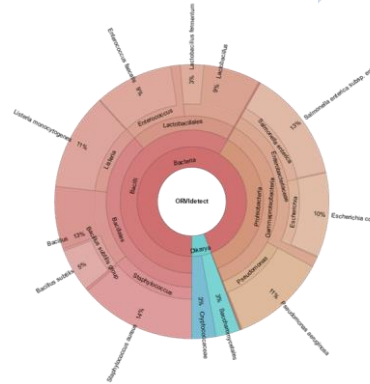
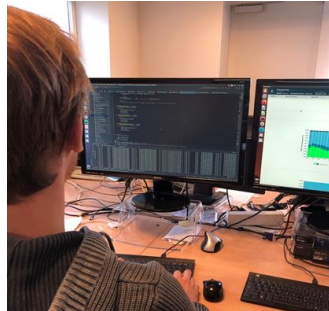
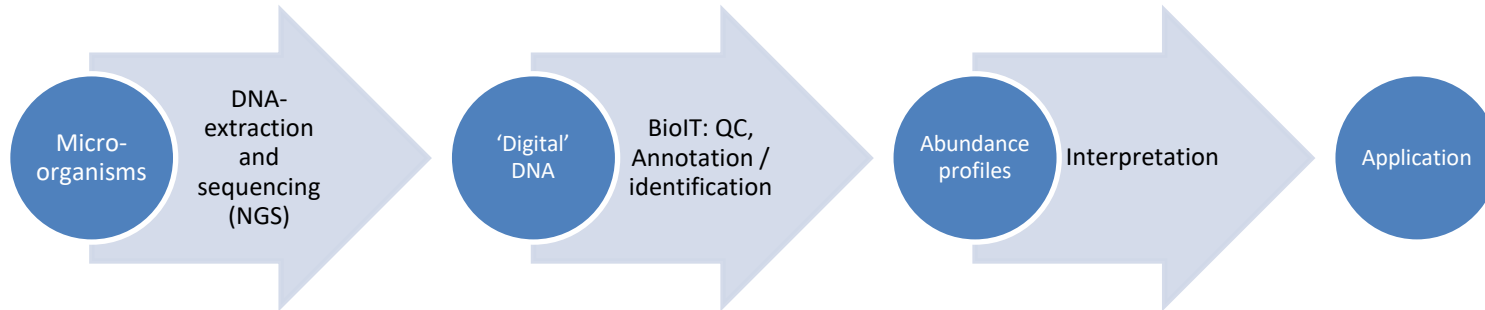


NGS: Diverse technieken/methodes

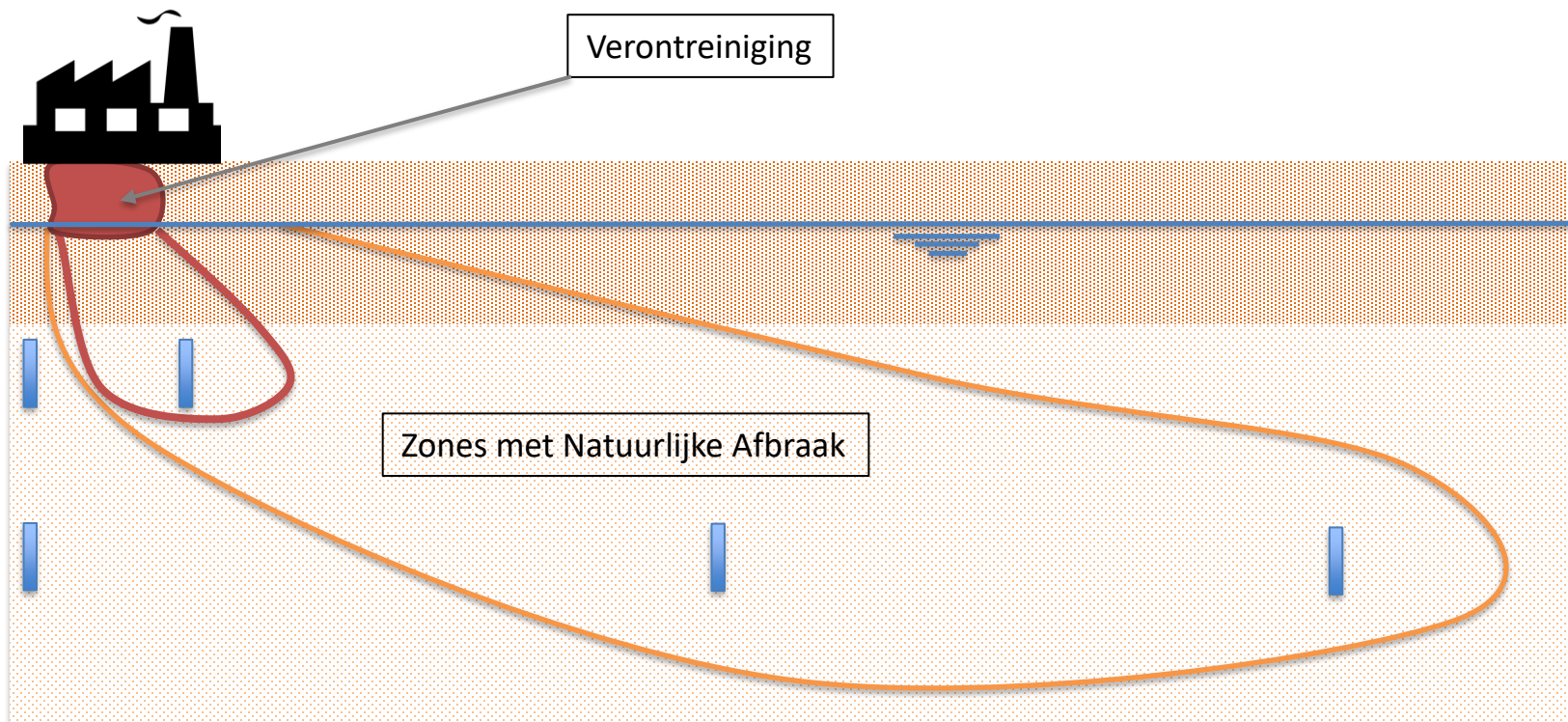
- Lange of korte DNA “reads” (Illumina vs Nanopore en andere...)
- Met of zonder pre-amplificatie (voorkeur: geen pre-amplificatie)
- Diverse Bio-IT methodes voor identificatie
- Databases worden steeds verder gevuld
- Data ontsluiting en visualisatie



NGS: van monster naar resultaat



- Voor elk onderdeel zijn er vele variabelen en keuzes
- Stappen moeten goed op elkaar aansluiten
- Toe te passen NGS werkwijze moet zijn afgestemd op de toepassing / onderzoeksvraag



NGS: Toepassing Natuurlijke Afbraak

Het onderbouwen van natuurlijke afbraakprocessen voor de verontreinigingen

Het vaststellen van de dominante soorten op de locatie die het werk doen

Selectie van monsters **Stroombaan: REF → BRON → PLUIM**

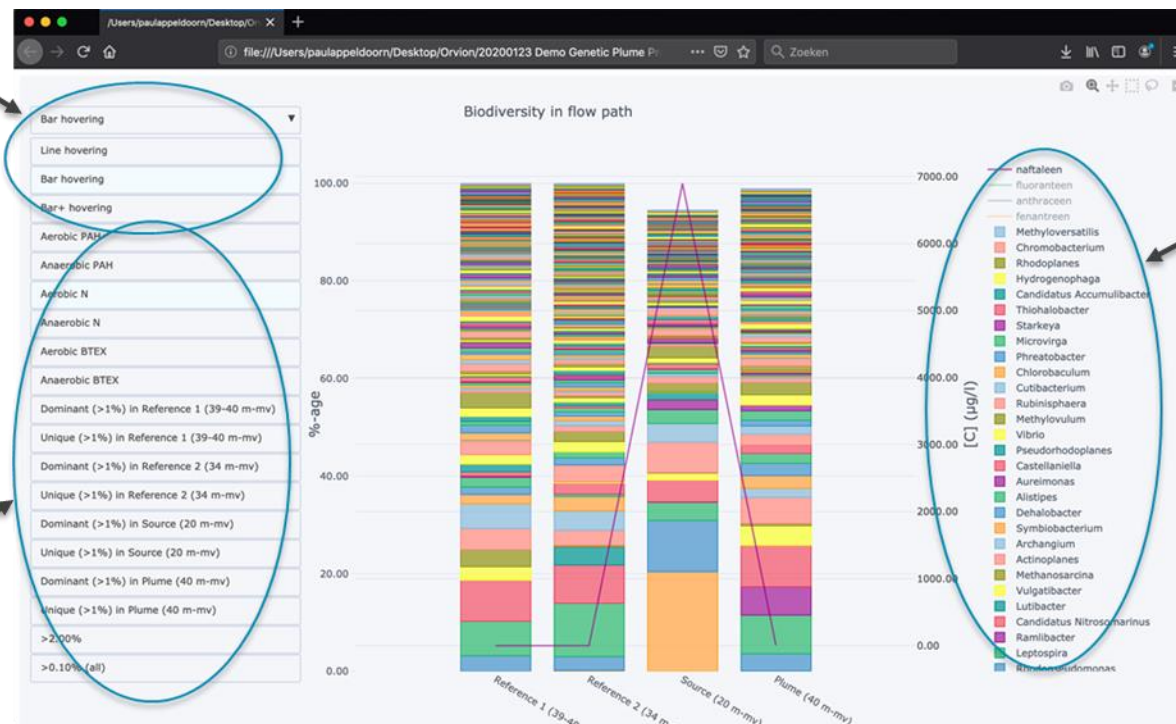
Hover-over

Select *bar hovering* to see biodiversity values (%-age)

Select *line hovering* to see contaminant values ($\mu\text{g/L}$)

Data filtration

Click on a filter to only visualise these parameters (see text below)



NGS: Interactieve file

Populaties in stroombaan gevisualiseerd

Inclusief locatieparameters, verontreinigingen, pH, redoxparameters

Filters om door relevante gegevens te bladeren, bv. "dominante soorten in bron", BTEX, VOCI

Selecteer parameters en/of soorten voor gedetailleerde informatie

VOORBEELD

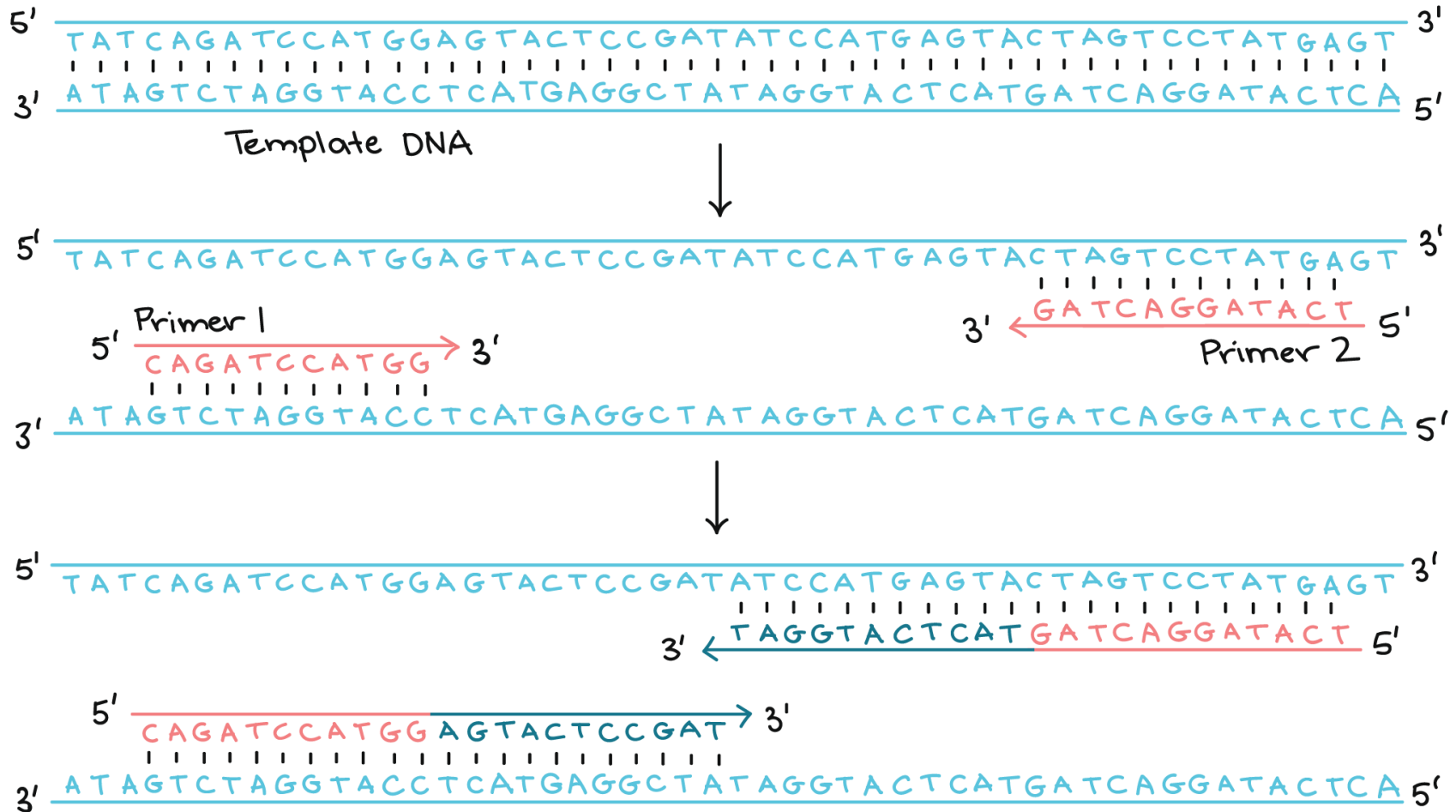


3. Quantitative Polymerase Chain Reaction ORVIdetect (qPCR)

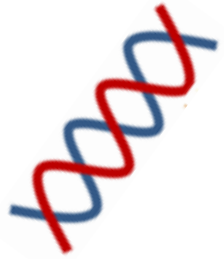
Kwantificeren van specifieke soorten, groepen of eigenschappen

- Aantallen per ml of per g ds
- Geschikt voor routinematige monitoring en bulkanalyses
- Eenvoudig nieuwe analyses ontwikkelen voor andere micro-organismen
- On-site qPCR voor snel resultaat (<2 uur)

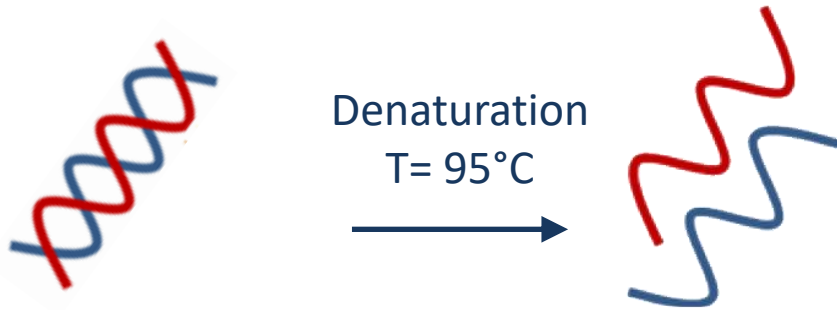
qPCR – hoe primers werken



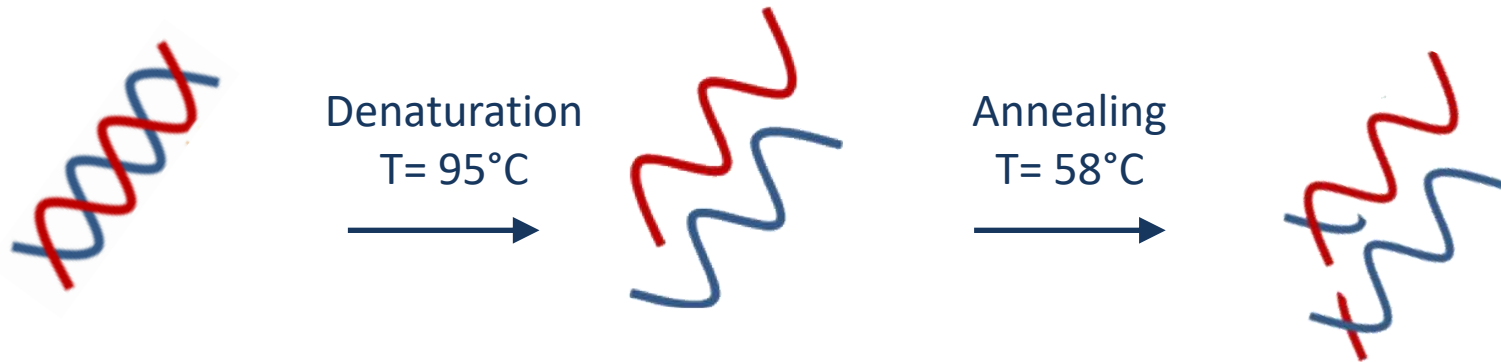
qPCR: quantitative polymerase chain reaction



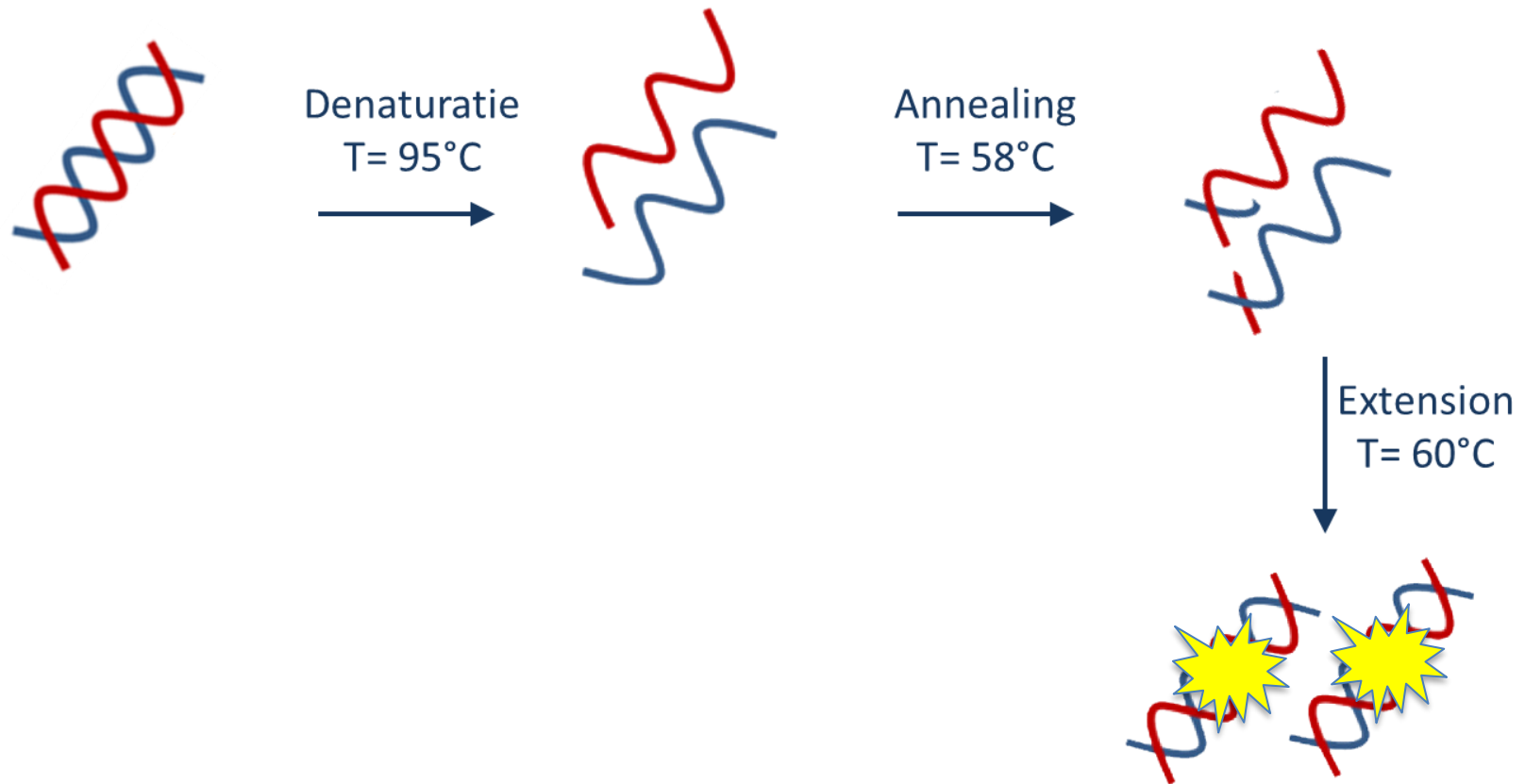
qPCR: quantitative polymerase chain reaction

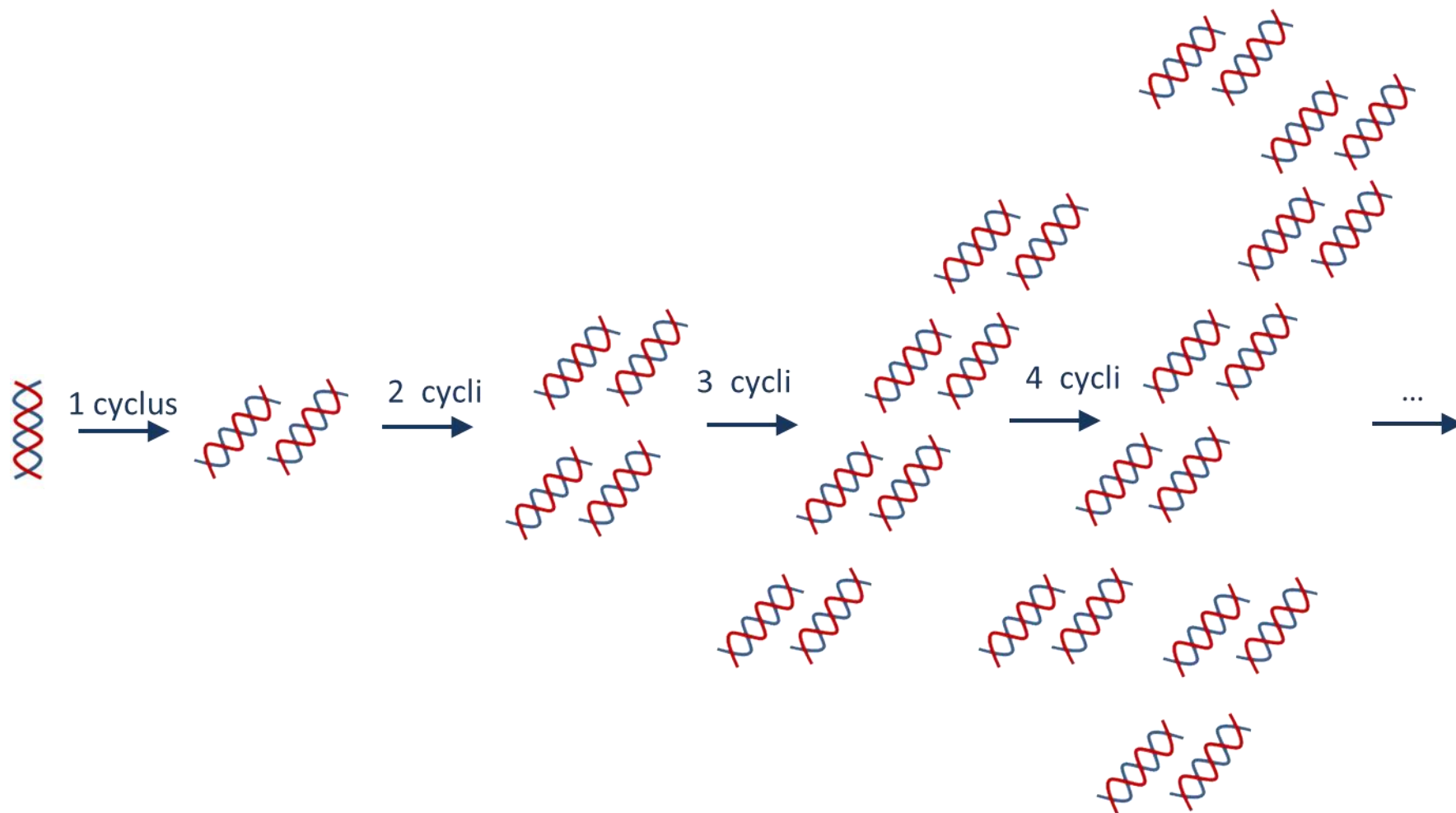


qPCR: quantitative polymerase chain reaction



qPCR: quantitative polymerase chain reaction

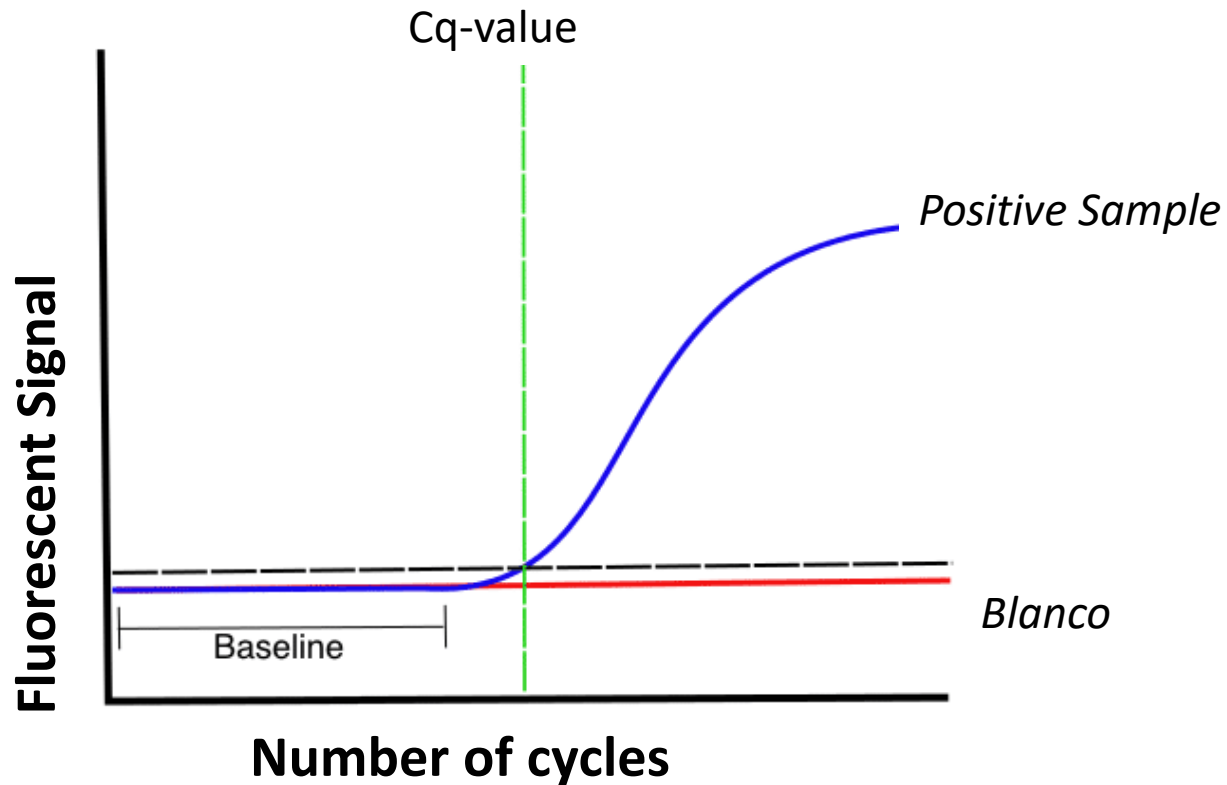






qPCR of kwantitatieve polymerase chain reaction

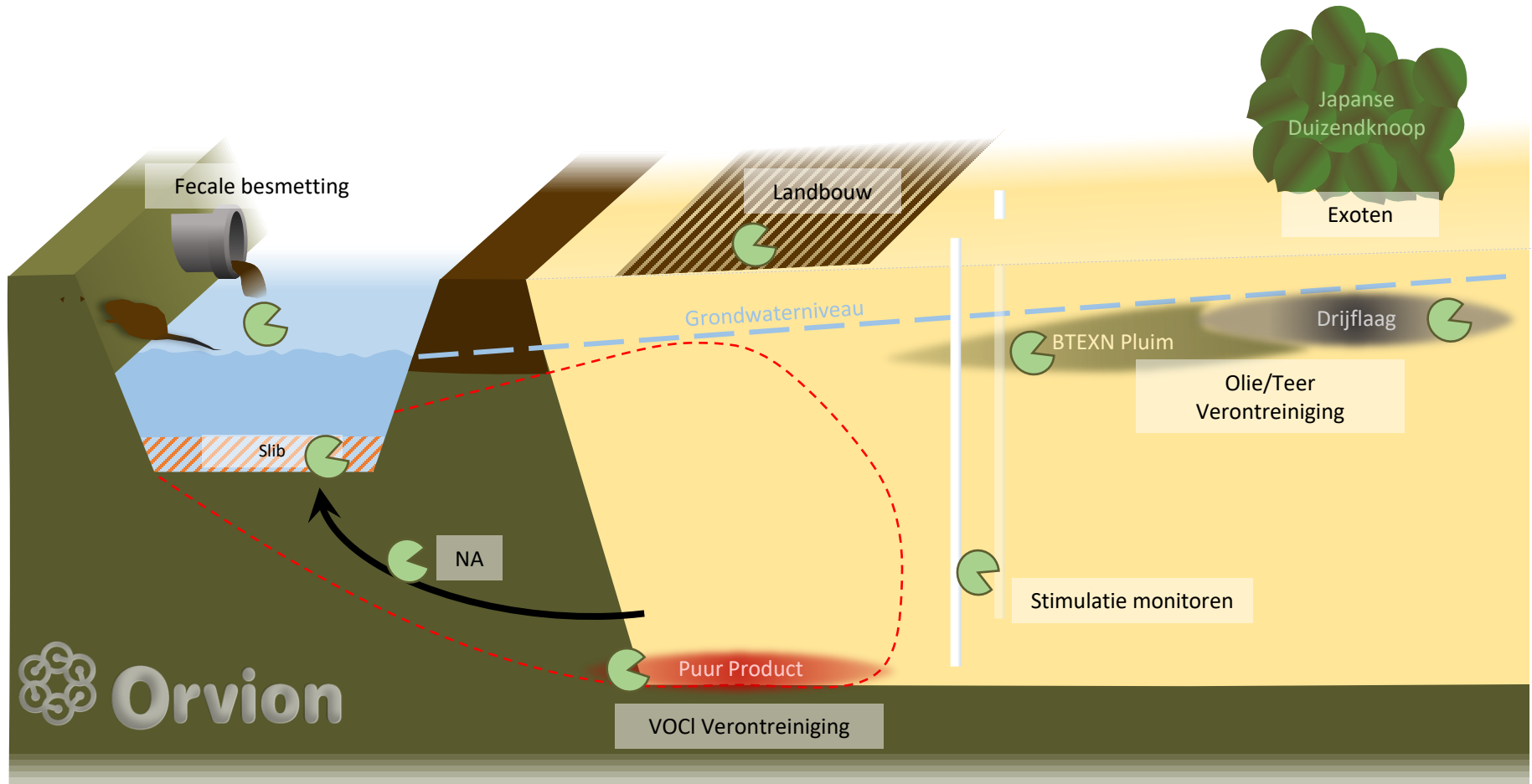
Measuring fluorescence

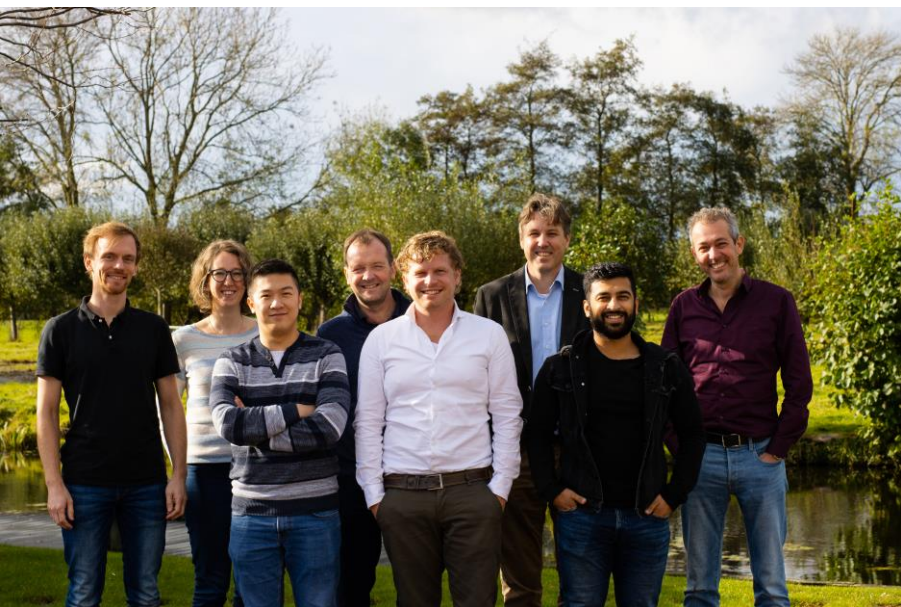


4. Samenvattend: NGS en qPCR

NGS	qPCR
Volledige populaties in kaart brengen en vergelijken	Alleen specifieke targets
Alle identificaties tegelijk in één analyse	Meerdere targets per monster mogelijk
Identificatie afhankelijk van referentie databases	Identificatie en kwantificatie afhankelijk van kwaliteit primers/probes
Abundantie (% van totaal), niet kwantitatief	Kwantitatief
Hogere detectielimiet	Lage detectielimiet
Minder gevoelig voor contaminatie	Gevoelig voor contaminatie
Relatief kostbaar	Relatief goedkoop
Enorm veel data per monster	Eén getal per qPCR reactie

5. Toepassingen bodemsysteem





Vragen?