

# Identification of important contributions in human DNA isolation and quantification technology

Identificatie van belangrijke bijdragen in de humane DNA-extractie- en kwantificatietechnologie

**Lars Pinxten**

R0385395

Masterproef aangeboden tot  
het behalen van de graad

MASTER IN HET MANAGEMENT  
**Major Strategie, innovatie en entrepreneurship**

Promotor: Prof. Dr. R.Veugelers  
Werkleider: Mr. D. Verhoeven

Academiejaar 2012-2013





# Inhoud

<b>Lijst van tabellen .....</b>	<b>5</b>
<b>Lijst van figuren .....</b>	<b>6</b>
<b>Verklarende woordenlijst .....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>Inleiding .....</b>	<b>9</b>
<b>1 DNA-analysetechnologie .....</b>	<b>11</b>
1.1 <i>Historie van de humane DNA-analysetechnologie</i> .....	11
1.2 <i>DNA-extractie</i> .....	11
1.2.1 Organische DNA-extractie met behulp van Fenol-Chloroform .....	12
1.2.2 DNA-extractiemethode via uitzouten .....	12
1.2.3 DNA-extractie door middel van gedroogde stalen (FTA™-Paper) .....	13
1.2.4 Chelex®100-extractie .....	13
1.2.5 DNA-extractie door middel van chromatografie .....	14
1.2.6 DNA-extractie met behulp van magnetische beads .....	15
1.2.7 Dendrimeer-gebaseerde extractiemethode .....	16
1.2.8 DNA-extractie met behulp van een "Matrix Mill" .....	16
1.3 <i>DNA-kwantificatie</i> .....	17
1.3.1 Niet-specifieke DNA-kwantificatie .....	18
1.3.2 Specifieke DNA-kwantificatie .....	19
<b>2 Identificatie van de innovaties in de DNA-analyse technologie .....</b>	<b>23</b>
2.1 <i>Wat is een radicale innovatie?</i> .....	23
2.2 <i>DNA-extractie</i> .....	24
2.2.1 Organische DNA-extractie met behulp van Fenol-Chloroform .....	24
2.2.2 DNA-extractiemethode via uitzouten .....	26
2.2.3 DNA-extractie door middel van chromatografie .....	26
2.2.4 Mechanische DNA-extractiemethode .....	28
2.2.5 FTA™-paper extractie .....	29
2.2.6 Chelex®100-extractie .....	30
2.2.7 DNA-extractie met behulp van magnetische beads .....	30
2.2.8 Dendrimeer-gebaseerde extractiemethode .....	32
2.2.9 Conclusie en toekomsperspectief .....	32
2.3 <i>DNA-kwantificatie</i> .....	33
2.3.1 Niet-specifieke DNA-kwantificatie .....	33
2.3.2 Specifieke DNA-kwantificatie .....	37
<b>3 Conclusie .....</b>	<b>42</b>
<b>Bibliografie .....</b>	<b>45</b>
<b>Bijlage .....</b>	<b>49</b>



## Lijst van tabellen

Tabel 1: Scoresheet voor de organische guanidinium thiocyanaat-extractie .....	25
Tabel 2: Scoresheet voor de extractiemethode via uitzouten .....	26
Tabel 3: Scoresheet voor de extractie via de chromatografische methoden.....	28
Tabel 4: Scoresheet voor de mechanische extractie via de “Matrix Mill” .....	29
Tabel 5: Scoresheet voor de FTA <sup>TM</sup> -paper extractie .....	29
Tabel 6: Scoresheet voor de Chelex®100-extractie .....	30
Tabel 7: Scoresheet voor de DNA-extractie met magnetische beads .....	31
Tabel 8: Scoresheet voor de DNA-extractie met behulp van dendrimeren .....	32
Tabel 9: Scoresheet voor fluorescentiespectroscopie .....	34
Tabel 10: Scoresheet voor Picogreen en Oligreen microtiterplaat analyse.....	35
Tabel 11: Scoresheet voor gelelektroforese .....	36
Tabel 12: Scoresheet voor capillaire gelelektroforese.....	37
Tabel 13: Scoresheet voor slot-blot kwantificatie .....	38
Tabel 14: Scoresheet voor het Aluquant <sup>TM</sup> humaan DNA-kwantificatiesysteem .....	39
Tabel 15: Scoresheet voor real-time PCR .....	40
Tabel 16: Scoresheet voor end-point PCR .....	41
Tabel 17: Chronologisch overzicht van DNA-isolatie- en DNA-kwantificatietechnologie ..	42

## Lijst van figuren

Figuur 1: Het DNA-analyseproces .....	9
Figuur 2: De organische extractie .....	12
Figuur 3: FTA Paper extractie .....	13
Figuur 4: Chelex-extractie .....	13
Figuur 5: Het DNA-extractieproces met behulp van de Spin Column.....	15
Figuur 6: Het DNA-extractieproces met behulp van magnetische beads .....	15
Figuur 7: Voorbeeld van een dendrimeer-gebaseerde extractiemethode .....	16
Figuur 8: DNA-extractieproces door middel van een matrix mill.....	17
Figuur 9: DNA-kwantificatie met (a) teveel geamplificeerd DNA (b) te weinig DNA, waar de pijl wijst op allel drop-out vanwege stochastische effecten en (c) de juiste hoeveelheid DNA.....	17
Figuur 10: Voorstelling van een humaan DNA-kwantificatieresultaat via de slot-blot procedurde. ....	20
Figuur 11: Aluquant™ humaan DNA-kwantificatiesysteem .....	21
Figuur 12: De TaqMan® probe en de SYBR® Green I kwantificatiemethode.....	22
Figuur 13: De conventionele organische extractiemethode (rechts) versus de organische extractiemethode via silicagel bevattende buisjes (links). ....	25
Figuur 14: De BioMek®2000 robot voor geautomatiseerde DNA-extracties. ....	31

## Verklarende woordenlijst

<i>Alu</i> -sequentie	kort stukje DNA, oorspronkelijk gekenmerkt door het <i>Alu</i> -restrictie-enzym (afkomstig van <i>Arthrobacter luteus</i> )
ATP	Adenosinetrifosfaat
CCD	charged-coupled device
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindool
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
ssDNA	enkelstrengig DNA
dsDNA	dubbelstrengig DNA
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
FTA	Fast Technology for Analysis of nucleic acids
PCR	Polymerase-kettingreactie
qPCR	Kwantitatieve PCR
Q-TAT	Quantitative Template Amplification Technology
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonucleïnezuur
SDS	Natriumdodecylsulfaat
TE-buffer	Tris-EDTA-buffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethaan
UV	Ultraviolet

## Abstract

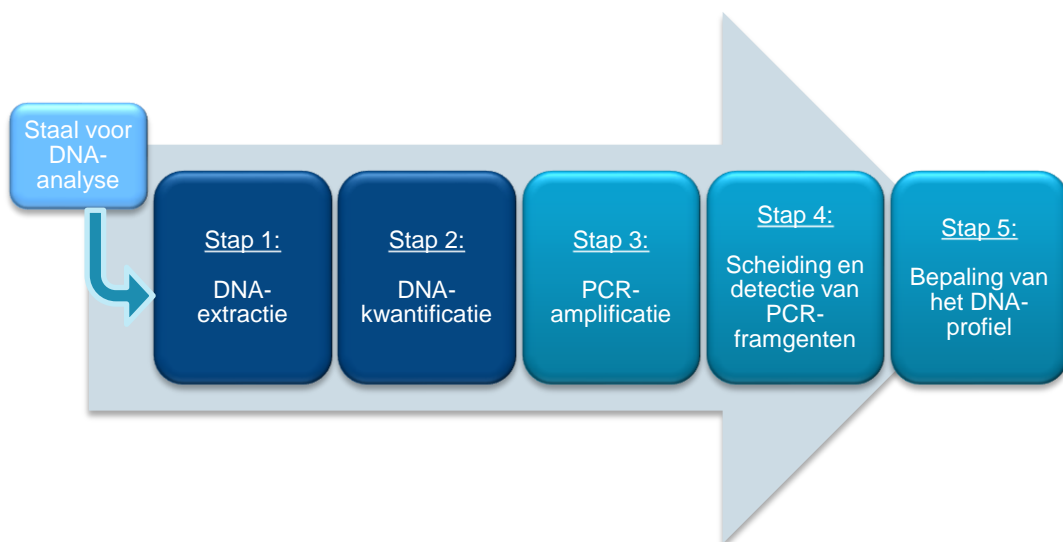
Deze masterproef handelt over de identificatie van de belangrijke bijdragen in zowel de humane DNA-extractietechnologie als in de DNA-kwantificatietechnologie. De doelstelling bestaat erin om de innovaties in deze technologische velden op een gedetailleerde wijze in kaart te brengen. Hierin staat het concept radicale innovatie centraal en worden de innovaties bijgevolg geëvalueerd volgens de criteria die een radicale innovatie beschrijft. In deze masterproef is er sprake van een radicale innovatie indien voldaan wordt aan drie criteria. Ten eerste moeten de principes en de kennis van de innovatie origineel zijn. Als tweede dient de innovatie te zorgen voor vernieuwing en een verbeterde functionaliteit; en als laatste behoort de innovatie ook een impact uit te oefenen op toekomstige technologieën. Uiteindelijk worden de belangrijke contributies gelinkt aan de overeenkomstige patenten en gebeurt een validatie van de patentgegevens om de technologische dimensies van radicale innovatie te identificeren.



## Inleiding

In vele technologische velden heeft de introductie van de DNA-analysetechnologie voor een grote doorbraak gezorgd. Sommige onderzoeken konden vroeger niet gerealiseerd worden of werden stilgelegd door een gebrek aan informatie. Door middel van de DNA-technologie zijn deze onderzoeken tegenwoordig wel mogelijk geworden. Denk maar aan de genetische identificatieonderzoeken zoals vaderschapstesten of forensisch onderzoek.

Het proces van de DNA-analyse verloopt in verschillende stappen (zie figuur 1). Eerst worden de stalen of het sporenmateriaal beschreven en geïdentificeerd. Daarna volgt in de eerste stap van het proces een afzondering van het DNA uit het celmateriaal, de DNA-extractie genaamd. Vervolgens wordt het DNA-gekwantificeerd en hierop volgt een amplificatie met behulp van de PCR-techniek. Naderhand worden de PCR-fragmenten gescheiden en volgt een detectiemethode met in de laatste stap de opstelling van het DNA-profiel tot gevolg. Elke stap bezit een technologie die de laatste jaren sterk geëvolueerd is (UZ Leuven, 2013) (DNASOLUM, 2013).



**Figuur 1: Het DNA-analyseproces (gebaseerd op UZ Leuven, 2013)**

Deze masterproef zal de technologische vooruitgang uit stap 1 en 2 nagaan en hierin de belangrijke innovaties identificeren. Het is van belang dat deze identificatie volledig is. Om deze reden wordt in het eerste hoofdstuk een literatuurstudie gegeven, waarin de technologische principes achter de innovaties duidelijk worden. Dit geeft een eerste overzicht van de belangrijke beschikbare technieken die in dit technologisch veld mogelijk zijn. In het tweede hoofdstuk worden alle belangrijke contributies chronologisch nog eens weergegeven en zullen de belangrijke innovaties besproken worden aan de hand van het concept radicale innovatie. In deze masterproef voldoet een radicale innovatie aan drie criteria:

1. De innovatie dient origineel te zijn, waarbij de kennis en principes achter de innovaties niet eerder zijn toegepast;
2. De innovatie moet zorgen voor vernieuwing en een verbeterde functionaliteit ten opzichte van eerdere uitvindingen;
3. De innovatie behoort ook een impact uit te oefenen op toekomstige technologieën.

Deze drie criteria worden weergegeven in de vorm van een scoresheet, dat ontwikkeld werd door het onderzoekscentrum MSI van de KULeuven. Hierbij wordt voor elk criterium een score gegeven op de radicaliteit van de innovatie.

Tenslotte wordt getracht aan elke geïdentificeerde contributie een patent te linken en gebeurt een validatie van de patentgegevens om de technologische dimensies van radicale innovatie te identificeren.

# 1 DNA-analysetechnologie

## 1.1 Historie van de humane DNA-analysetechnologie

De eerste persoon die het DNA ontdekte en wist te isoleren was de Zwitserse dokter Friedrich Miescher in 1868. Het duurde echter tot 1953 vooraleer de bekende dubbele helixstructuur van DNA werd achterhaald door de wetenschappers Watson en Crick (Dahm, 2008). Ongeveer 30 jaar later, in 1985, was het de Engelse geneticus Dr. Jeffreys die de DNA-analysetechnologie wist toe te passen voor identificatieonderzoek. Hij ontdekte dat bepaalde regio's van het humane DNA repetitieve sequenties bevatten, ook wel microsatellieten genoemd. Tevens ontdekte hij dat deze repetitieve sequenties varieerden van persoon tot persoon. Door een techniek te ontwikkelen met behulp van restrictie-enzymen, de zogenaamde "restriction fragment length polymorphism"-methode (RFLP), maakte Dr. Jeffreys identificatieonderzoeken mogelijk. Deze RFLP-methode werd het eerst toegepast in een Engelse immigratiezaak en kort daarna hielp deze methode bij het oplossen van een dubbele moord (Butler, 2005); (Butler, 2011).

Sindsdien won de DNA-analysetechniek meer en meer aan populariteit en heeft deze technologie een grote evolutie ondergaan in zowel snelheid van uitvoering als in gevoeligheid. Vandaag de dag wordt deze techniek gebruikt in forensisch onderzoek, onderzoek naar erfelijke ziektes of kankers en vaderschapstesten.

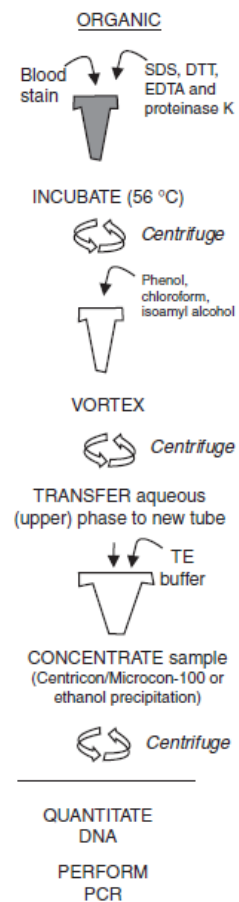
## 1.2 DNA-extractie

De DNA-analyse bestaat uit enkele opeenvolgende stappen, zoals reeds beschreven staat in de inleiding. Om onderzoek op DNA te kunnen uitvoeren, moet het eerst geïsoleerd worden van het overige celmateriaal. Deze stap wordt de DNA-extractie of DNA-isolatie genoemd. De DNA-extractie bestaat uit de volgende stappen. Eerst zal de celwand of het celmembraan worden opengemaakt, dit wordt de lysis van de cel genoemd. Hierna volgt een inactivatie van de nucleasen zoals DNase en RNase. Als laatste zal het DNA gescheiden moeten worden van het overige celmateriaal door een zuiveringstap. Deze laatste zuiveringsstap is zeer belangrijk voor het verdere verloop in het DNA-analyseproces. De reden hiervoor is dat sommige stoffen in de cel PCR-inhiberende eigenschappen bezitten en die zorgen er bijgevolg voor dat de amplificatie (stap 3) wordt tegengewerkt (Butler, 2005); (Chee Tan & Chin Yiap, 2009).

Verschillende technieken zijn beschikbaar om het DNA te isoleren en worden hieronder besproken. De toegepaste methode is afhankelijk van de vereiste zuiverheid nodig voor het verdere verloop van het onderzoek. Een hogere zuiverheidsgraad gaat uiteraard gepaard met meer complexe zuiveringsstappen. Tegenwoordig bieden bedrijven meestal commerciële kits aan onder een gepatenteerde naam. Deze commerciële kits maken gebruik van één van onderstaande methodes.

### 1.2.1 Organische DNA-extractie met behulp van Fenol-Chloroform

De organische extractie bestaat uit een seriële toevoeging van enkele chemicaliën. Eerst zal sodiumdodecylsulfaat (SDS) en proteïnase K toegevoegd worden. Deze chemische stoffen zorgen respectievelijk voor de lysis van de cel en voor de afbraak van de proteïnen. Vervolgens zal de toevoeging van het fenol-chloroform-mengsel ervoor zorgen dat het DNA gescheiden wordt van de proteïnen en het overige celmateriaal. Dit is te wijten aan het verschil in oplosbaarheid. Na toevoeging van het mengsel en centrifugatie vormt er zich een tweefasige oplossing. Het bovenste deel, de waterige fase, bevat het DNA opgelost in water, terwijl het onderste deel bestaat uit het organische solvent met het overige celmateriaal en de proteïnen. Nadien kan het DNA overgebracht worden in een ander buisje en volgt nog een nabehandeling om het DNA neer te slaan uit de waterige fase. Dit gebeurt door een ethanolprecipitatie (-20°C) of isopropanolprecipitatie (kamertemperatuur). Na deze stap wordt het DNA gewassen met ethanol om overtollig zout te verwijderen en terug opgelost met behulp van gedestilleerd water of TE-buffer. Nu is het DNA voldoende zuiver voor verder onderzoek (zie figuur 2). Voordelig aan deze methode is het feit dat het een goede opbrengst geeft voor DNA met hoogmoleculair gewicht. Het nadeel van deze methode is dat het tijdrovend en arbeidsintensief is. Ook maakt het gebruik van gevaarlijke chemicaliën, zoals fenol en chloroform en is het nodig om het staal over te brengen in verschillende buisjes, wat tot fouten of contaminatie kan leiden (Butler, 2005); (Chee Tan & Chin Yiap, 2009); (Carpi, *et al.*, 2011).



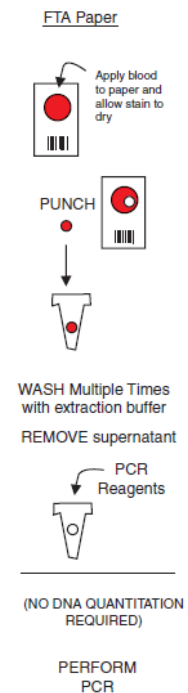
**Figuur 2: De organische extractie (Butler, 2005)**

### 1.2.2 DNA-extractiemethode via uitzouten

De methode via uitzouten is een soortgelijke variant van de organische extractiemethode, vooral gericht op de scheiding met proteïnen. Ook bij deze methode wordt eerst gebruik gemaakt van proteïnase K en SDS, zoals hierboven beschreven. Daarna volgt een proteïneprecipitatie door een gesatureerd zout (NaCl van  $\pm 6M$ ) aan het staal toe te voegen. Immers een lage zoutconcentratie zorgt voor een hogere oplosbaarheid van de proteïne, terwijl een hoge zoutconcentratie een lagere oplosbaarheid veroorzaakt. In dit geval zullen de proteïnen dus neerslaan en ontstaan opnieuw twee fasen na centrifugeren. De bovenste waterige fase bevat het DNA, dat kan overgebracht worden in een ander buisje. Als nabehandeling volgt weer een ethanolprecipitatie. (Miller, Dykes, & Polesky, 1988) (Carpi, *et al.*, 2011)

### 1.2.3 DNA-extractie door middel van gedroogde stalen (FTA™-Paper)

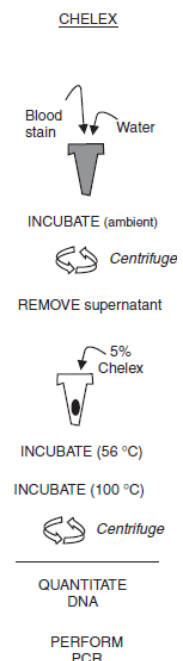
Een andere manier om de DNA-extractie uit te voeren, is door gebruik te maken van FTA™-papier (zie figuur 3). Deze methode kwam voor het eerst ter sprake in de tweede helft van het decennia 1980-1990 en werd ontwikkeld door Burgoyne en Fowler. FTA is een acronym voor “*Fast Technology for Analysis of nucleic acids*”. Het is een speciaal cellulose papier dat vier chemicaliën bevat met elk hun specifieke functie om de cel te lyseren, bacteriegroei tegen te gaan en de DNA-moleculen te beschermen. De vier chemische stoffen zijn een zwakke monovalente base (Tris), een chelerend agens (EDTA), een anionisch detergent (SDS) en een urinezuur of urinezout. Het DNA-staal zoals bijvoorbeeld een bloedstaal wordt aangebracht op dit speciale FTA-papier en aan de lucht gedroogd. Op deze manier kan het DNA gedurende enkele jaren bewaard worden, zelfs bij kamertemperatuur. De chemicaliën op het papier vervullen hun functie en een klein schijfje van het papier wordt eruit genomen. Dit wordt meerdere malen gewassen om het non-DNA-materiaal te verwijderen. Het DNA blijft vasthangen in het FTA-papier en is bijgevolg beschermd en voldoende zuiver voor verder analytisch onderzoek (National Forensic Science Technology Center, 2003); (Smith & Burgoyne, 2004); (Butler, 2005); (Carpi, *et al.*, 2011).



**Figuur 3: FTA Paper extractie (Butler, 2005)**

### 1.2.4 Chelex®100-extractie

Deze methode werd geïntroduceerd in 1991 (zie figuur 4). Hierbij wordt een 5% chelerende harssuspensie (Chelex®100) toegevoegd aan het staal. Daarna wordt de basische oplossing enkele minuten gekookt, waardoor de cellen openbreken, de proteïnen worden vernietigd en het DNA vrijkomt. Ook zal hierdoor het DNA al gedenatureerd zijn, dit wil zeggen dat de twee DNA-strengen in de dubbele helix elkaar loslaten. Door dit fenomeen zijn de DNA-moleculen direct klaar voor de volgende stap in de analyse, namelijk de PCR-amplificatie. Chelex®100 is een ionenuitwisselende hars die een chelerende binding aangaat met metaalionen, zoals magnesium. De magnesiumionen worden gebonden en de DNA vernietigende enzymen, de zogenaamde nucleases, kunnen hierdoor hun werk niet meer doen. Bijgevolg zijn de DNA-moleculen beschermd (Walsh, Metzger, & Higuchi, 1991); (National Forensic Science Technology Center, 2003); (Butler, 2005).



**Figuur 4: Chelex-extractie (Butler, 2005)**

### 1.2.5 DNA-extractie door middel van chromatografie

De extractie kan ook gebeuren door middel van een chromatografische methode. Deze methode bevat 4 stappen, namelijk eerst de lysis van de cel, gevolgd door DNA-adsorptie aan de hand van chromatografische eigenschappen, hierop volgt een wasprocedure en uiteindelijk worden de zuivere DNA-moleculen geëluëerd. In deze methode zijn vier verschillende methoden te onderscheiden.

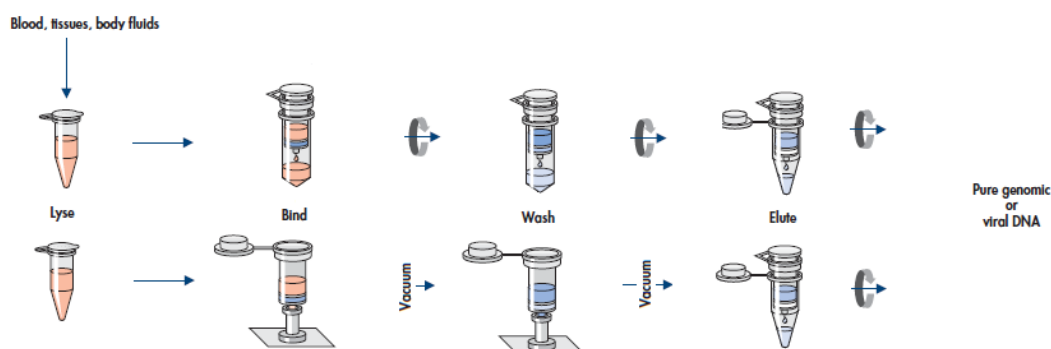
Ten eerste is het mogelijk DNA chromatografisch te extraheren door *Size Exclusion Chromatography* (SEC), ook wel gelchromatografie genoemd. In deze methode worden de moleculen gescheiden op basis van grootte. Meestal wordt gebruik gemaakt van een gelmatrix waar het staal wordt doorgestuurd. De matrix voor DNA-zuivering bestaat uit ofwel polyacrylamide (Sephacryl of Biogel), dextran (Sephadex), of agarose (Sephacrose). De grotere moleculen passeren sneller doorheen de matrix dan de kleine moleculen. De reden hiervoor is dat de kleine moleculen doorheen de kleine poreuze openingen van de matrix kunnen, waardoor ze er langer over doen om doorheen de matrix te komen (Chee Tan & Chin Yiap, 2009).

Als tweede manier kan ook beroep gedaan worden op de ionenuitwisselingschromatografie of *Ion-Exchange Chromatography* (IEC). Het DNA-staal wordt gezuiverd door anionuitwisselingsprincipe. Het is gebaseerd op de interactie tussen de positief geladen moleculen DEAE (diethylaminoethyl)-cellulose op het harsoppervlak en de negatief geladen fosfaatgroepen van de DNA-moleculen. De zoutconcentratie en de pH-condities van de buffers bepalen of de DNA-moleculen binden of geëluëerd worden. DNA-moleculen binden met de DEAE-groepen over een breed zoutconcentratiegebied. Het overig celmateriaal, zoals proteïnen, worden afgewassen door gebruik te maken van middelmatige zoutbuffers, terwijl de DNA-moleculen pas geëluëerd worden bij gebruik van buffers met hoge zoutconcentratie (Potter, Hanham, & Nestmann, 1985); (Chee Tan & Chin Yiap, 2009).

Ten derde is ook de methode voor *Affiniteitschromatografie* mogelijk om DNA te extraheren uit het staal. Bij deze methode is de zuivering gebaseerd op een combinatie van specifieke biochemische interacties en op grootte, zoals eerder in de SEC-methode werd besproken. In het geval van DNA worden de interacties met silicamatrices vaak toegepast, maar ook nitrocellulose en polyamidemembranen worden wel eens gebruikt om DNA-moleculen te binden (Chee Tan & Chin Yiap, 2009). Het principe van deze methode is als volgt. Eerst worden de cellen gelyseerd. Hierna wordt de oplossing gestuurd door een reactievat dat een DNA-drager (silica- of glasdeeltjes) bevat, waar de biochemische interactie plaatsvindt. Deze silicadeeltjes vormen dus onder chaotrope condities complexvormige bindingen met de DNA-moleculen en worden daarna gewassen en gedroogd. Vervolgens worden de DNA-moleculen geëluëerd door een waterige lage zoutbuffer in het oorspronkelijke reactievat, wat leidt tot een zuivere DNA-oplossing (Boom, *et al.*, 1990).

Ten laatste is de *Spin Column*-methode ook een chromatografische mogelijkheid, zoals zichtbaar in figuur 5. De *Spin Column*-methode is gebaseerd op een silica extractiemethode, zoals hierboven beschreven. Eerst worden de cellen gelyseerd, waarna ze in de *Spin Column* worden gebracht. Deze *Spin Column* bevat een silicamembraan met hoge porositeit, die de DNA-moleculen binden. Het overige celmateriaal gaat door deze poreuze laag en de *Spin Column* wordt geëluëerd, waardoor zuivere DNA-moleculen overblijven in het eluaat (Butler, 2005); (QIAGEN, 2008).

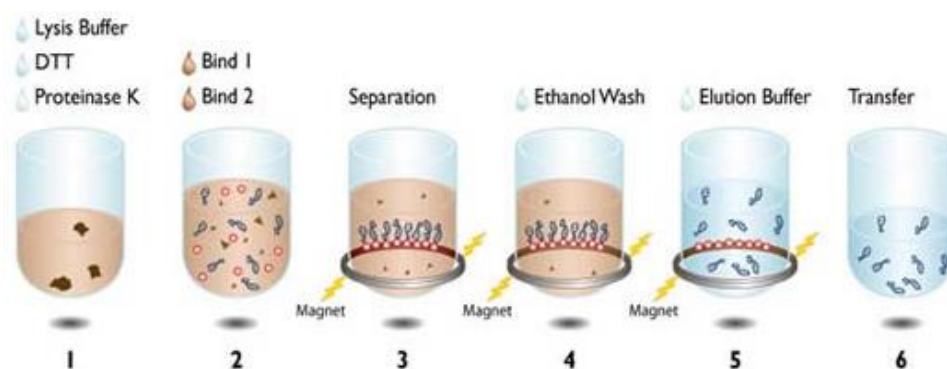
Deze extractie kan uitgevoerd worden met behulp van centrifugatie of vacuümverdeelstukken in aparte buisjes of geautomatiseerd met 96-well platen. Ook is het mogelijk met behulp van de silica eigenschappen om een extractie uit te voeren in een microchip (Wolfe, et al., 2002).



**Figuur 5: Het DNA-extractieproces met behulp van de *Spin Column* (QIAGEN, 2008)**

### 1.2.6 DNA-extractie met behulp van magnetische beads

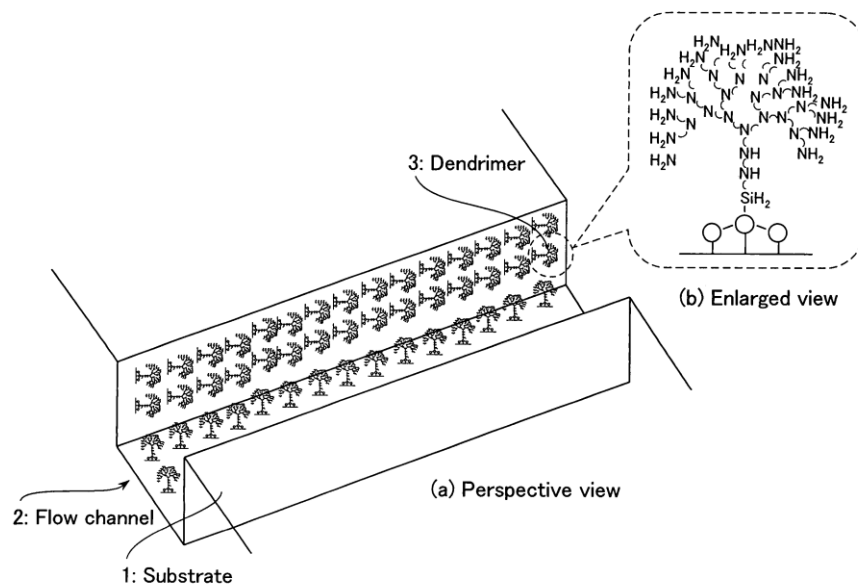
De laatste jaren is de techniek van de magnetische DNA-extractie sterk opgekomen. Vooral omwille van het grote voordeel van deze techniek ten opzichte van de vorige methoden, namelijk het gemak tot automatisatie door middel van robots. Dit leidt tot een veel lagere arbeidsintensiviteit en procestijd. De techniek wordt afgebeeld in onderstaande figuur 6. Ook in deze methode zullen de cellen eerst gelyseerd moeten worden. Hierna volgt een zuiveringstap door toevoeging van de magnetische beads. De magnetische beads binden met de DNA-moleculen en worden door een magneet aangetrokken. De oplossing wordt met ethanol gewassen om de overige moleculen te verwijderen. Daarna wordt de oplossing geëluëerd van de magnetische beads en overgebracht in een ander buisje, wat leidt tot een zuivere DNA-oplossing (Tereba, et al., 2004); (Butler, 2005); (Beckman Coulter, 2013).



**Figuur 6: Het DNA-extractieproces met behulp van magnetische beads (Beckman Coulter, 2013)**

### 1.2.7 Dendriemeer-gebaseerde extractiemethode

Dendrimeren zijn een nieuwe klasse van polymeren, die een bijzondere takachtige structuur bezitten (zie figuur 7). Op deze figuur is te zien dat Fukushima, *et al.* (2007) een extractiemethode ontwikkelde met behulp van deze dendrimeren. De dendrimeren worden bevestigd aan het oppervlak van een U-vormig kanaal van een biochip, waardoor het DNA-staal wordt doorgestuurd. Aan de toppen van deze dendriemeerstructuren worden DNA-probes bevestigd. Deze functioneren als sensoren en vangen de DNA-moleculen aanwezig in het staal dat door het kanaal wordt gestuurd. Bijgevolg wordt het DNA gebonden aan deze dendriemeerstructuren en zullen ze naderhand geëluëerd worden, zodat een zuivere DNA-oplossing wordt overgehouden (Fukushima, *et al.*, 2007).

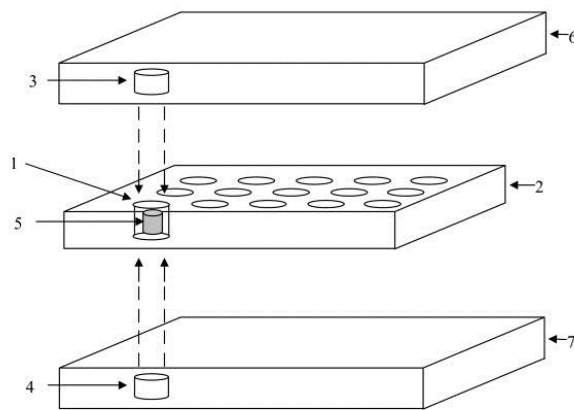


**Figuur 7: Voorbeeld van een dendriemeer-gebaseerde extractiemethode (Fukushima, Satou, Matsunaga, & Takeyama, 2007)**

### 1.2.8 DNA-extractie met behulp van een “Matrix Mill”

Deze innovatieve methode werd ontwikkeld door Weeden *et al.* (2000). Het berust op een mechanische extractiemethode en bestaat uit een elektromagnetisch apparaat dat toelaat om een groot aantal van kleine stalen DNA uit organisch weefsel te extraheren (zie figuur 8). De weefsels worden aangebracht in meerdere niet-ijzerhoudende buisjes (96-well-plaat) die elk een ijzerhoudende pin of micro-stamper bevatten (1). De plaat wordt dan geplaatst in de matrix mill met boven en onder een magnetische plaat (6,7), die spoelen bevatten (3,4). Een pulserend elektromagnetisch veld drijft de 96 afzonderlijke stampers aan, elk met ongeveer dezelfde kracht, waardoor 96 stalen tegelijk worden behandeld. De cellen worden vermaald, waardoor het DNA vrijkomt. Dit wordt nabehandeld en kan dan gebruikt worden voor verdere analyse (Weeden, Loomis, & Celeste, 2000); (Shaw, *et al.*, 2009); (Carpi, *et al.*, 2011).

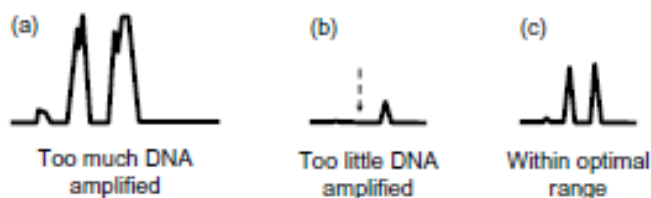




**Figuur 8: DNA-extractieproces door middel van een matrix mill (Shaw, *et al.*, 2009)**

### 1.3 DNA-kwantificatie

Nadat het DNA geïsoleerd is, volgt een kwantificatiestap. Hierbij kan de kwantiteit en de kwaliteit van het DNA-staal worden achterhaald, vooraleer dit DNA in stap 3 een amplificatie ondergaat. De DNA-kwantificatietechnologie kan op twee verschillende manieren benaderd worden, namelijk volgens een niet-specifieke of een specifiek methode (Nicklas & Buel, 2003b). Het doel van de DNA-kwantificatie is om de hoeveelheid DNA in een staal te bepalen. Deze stap is essentieel, omdat teveel en te weinig DNA in het staal zorgt voor verkeerde meetresultaten in de volgende stappen van de DNA-analyse. Te veel DNA kan resulteren in gespleten pieken of pieken die niet meer in proportie zijn op de meetapparatuur, terwijl te weinig DNA mogelijk resulteert in allel 'drop-out' of stochastische fluctuatie (zie figuur 9) (Butler, 2011).



**Figuur 9: DNA-kwantificatie met (a) teveel geamplificeerd DNA (b) te weinig DNA, waar de pijl wijst op allel drop-out vanwege stochastische effecten en (c) de juiste hoeveelheid DNA. (Butler, 2011)**

De principes van deze DNA-kwantificatietechnologieën worden hieronder weergegeven. Eerst wordt een overzicht gegeven van de niet-specifieke methodes, daarna volgt een voorstelling van de mogelijke specifieke methodes.

### 1.3.1 Niet-specifieke DNA-kwantificatie

In een eerste benadering werd het totale geïsoleerde DNA uit een staal onderzocht. De technieken in deze benadering zijn niet-soortselectief, waarbij humaan DNA niet onderscheiden kan worden van niet-humaan DNA. Deze technieken, die het totale DNA in een staal onderzoeken, werden ontwikkeld wanneer de RFLP-methode werd toegepast voor DNA-analyse. Aanvankelijk werden twee methoden voornamelijk toegepast, namelijk de ultraviolette en de fluorescentie spectroscopie. Na verloop van tijd kwamen er meer geavanceerde innovaties in omloop, zoals de analyse met behulp van de microtiterplaat en de gelelektroforese.

#### 1.3.1.1 Ultravioletspectroscopie

De ultravioletspectroscopie is een zeer eenvoudige methode, die gedurende lange tijd werd toegepast. Ze werd lang beschouwd als de referentiemethode voor andere technieken die op de markt kwamen. Deze methode is mogelijk voor het kwantificeren van DNA, omdat de purine (adenine en guanine) en pyrimidine (thymine en cytosine) basen van het DNA de eigenschap bezitten om UV-licht te absorberen op een golflengte van 260 nm. Het staal met het geëxtraheerde DNA wordt blootgesteld aan UV-licht met een golflengte van 260 nm. Een foto-detector meet het licht dat door het staal gaat en bijgevolg ook de hoeveelheid licht die wordt geabsorbeerd door het staal. Dit wordt uitgedrukt in de eenheid absorbantie. Hoe meer licht door het staal wordt geabsorbeerd, hoe hoger de absorbantie en dus hoe hoger de DNA-concentratie in het staal, dit kan omgerekend worden met behulp van de wet van Lambert Beer. Vaak is na de extractie het DNA-staal nog gecontamineerd met andere moleculen zoals proteïnen of andere organische verbindingen. Proteïnen absorberen UV-licht op een golflengte van 280 nm. En daarom wordt de absorptieverhouding van 260/280 nm (de 260/280-ratio) als maatstaf gebruikt om de zuiverheid van het DNA-staal aan te tonen. Voor zuiver DNA ligt deze ratio rond de 1,8 à 2. Stalen met een lagere waarde kunnen gecontamineerd zijn met proteïnen, fenol, of andere UV-absorberende extractiestoffen en dienen opnieuw geëxtraheerd te worden voor een betere kwantificatie. Stalen die niet gecontamineerd zijn met een absorptiewaarde van 1 in een padlengte van 1 cm en bij een golflengte van 260 nm, bevatten ongeveer 50 µg/ml dsDNA ofwel 40 µg/ml ssDNA of RNA (Nicklas & Buel, 2003b).

#### 1.3.1.2 Fluorescentiespectroscopie

Een alternatieve methode voor de niet-specifieke DNA-kwantificatie is de fluorescentiespectroscopie. Deze methode vraagt meer voorbehandeling dan nodig is bij de UV-spectroscopie. De reden hiervoor is dat een kleurstof wordt toegevoegd, bijvoorbeeld ethidiumbromide, dat reageert met de DNA-moleculen. Deze stof vormt in gebonden toestand een fluorescente verbinding. De keuze van deze merkerstof hangt af van de binding met DNA of RNA is vereist, en of ssDNA of dsDNA wordt verkozen. Ook de meetinstrumenten moeten aangepast worden aan de uitzending van de golflengte van deze stof. De meetmethode is relatief, wat wil zeggen dat meting aan de hand van een standaardcurve gebeurt.

Er zijn meerdere fluorescente stoffen mogelijk voor DNA-kwantificatie. De klassieke methode is aan de hand van de fluorescente stof ethidiumbromide in gels. Zo verhoogt de uitzending van fluorescentie met 50 tot 100 als ethidiumbromide bindt met DNA. Ook nog twee andere kleurstoffen worden regelmatig toegepast in de fluorescentie, namelijk aan de hand van DAPI (4',6'-diamindine-2-phenylindole) en Hoechst-kleuring. Daarnaast zijn ook artikels gepubliceerd met fluorescente DNA-kleurstoffen, zoals PicoGreen,

OliGreen, thiazol orange homodimer (TOTO) en oxazole yellow homodimer. Deze kleurstoffen hebben het voordeel van een groot meetbereik en de toepassing van fluorescente microplaatlezers, die zeer kleine hoeveelheden DNA kunnen detecteren. Twee van deze kleurstoffen worden hieronder verder besproken, namelijk Picogreen en Oligreen (Nicklas & Buel, 2003b); (Butler, 2005).

#### 1.3.1.3 *Picogreen en Oligreen microtiterplaatanalyse*

Picogreen en Oligreen zijn ontwikkeld voor de detectie van respectievelijk dsDNA en ssDNA. Picogreen is een fluorescente stof, die bindt met dsDNA. Na binding met DNA wordt de fluorescentie van Picogreen 1000-maal groter dan voorheen. Het grote voordeel is dus dat door middel van deze methode de concentratie aan dsDNA kan gemeten worden in aanwezigheid van ssDNA en RNA. Een ander voordeel aan deze methode is de mogelijkheid tot automatisatie met behulp van 96-wellplaten, hierbij kunnen 80 stalen en 16 calibratiestalen worden geanalyseerd (Hopwood, *et al.*, 1997). De DNA-stalen worden gekwantificeerd door een vergelijking met de standaardcurve. Oligreen daarentegen werd ontwikkeld voor de detectie van ssDNA en werkt op dezelfde wijze als de Picogreenmethode (Singer, *et al.*, 1997); (Nicklas & Buel, 2003b); (Butler, 2005).

#### 1.3.1.4 *Gelelektroforese*

Een andere techniek in de niet-specifieke DNA-kwantificatie is de op gel gebaseerde analyse. Deze methode was zeer populair toen de RFLP-methode de voorname methode was voor DNA-profilering. Het principe van gelelektroforese steunt op het feit dat DNA negatief geladen is dankzij de negatieve ladingen op de fosfaatgroepen in een DNA-molecule. Een DNA-fragment zal daarom in een elektrisch veld naar de positieve pool migreren. Als deze migratie nu plaatsgrijpt in een poreuze gel, dan worden de DNA-fragmenten gescheiden op basis van grootte. Hoe groter het DNA-fragment, hoe moeilijker het door de poriën van de gel geraakt, en bijgevolg hoe verder het fragment van de positieve pool verwijderd blijft. Om de DNA-moleculen zichtbaar te maken in de gels worden ook weer kleurstoffen toegevoegd. Ethidiumbromide is een stof die populair is om DNA-moleculen aan te tonen, maar ook DAPI wordt gebruikt. Wanneer echter een hogere gevoeligheid vereist is, wordt SYBR Green toegepast. De kwantiteit van het DNA-staal kan gevonden worden door DNA-fragmenten met gekende grootte toe te voegen. Bijgevolg kan het DNA-staal vergeleken worden met de gekende standaarden. De meest bekende gelelektroforese is deze aan de hand van agarosegel, deze gel bestaat uit 1 à 2% agarose, maar ook andere gelmedia's, zoals polyacrylamide kunnen gebruikt worden (Nicklas & Buel, 2003b).

### 1.3.2 **Specifieke DNA-kwantificatie**

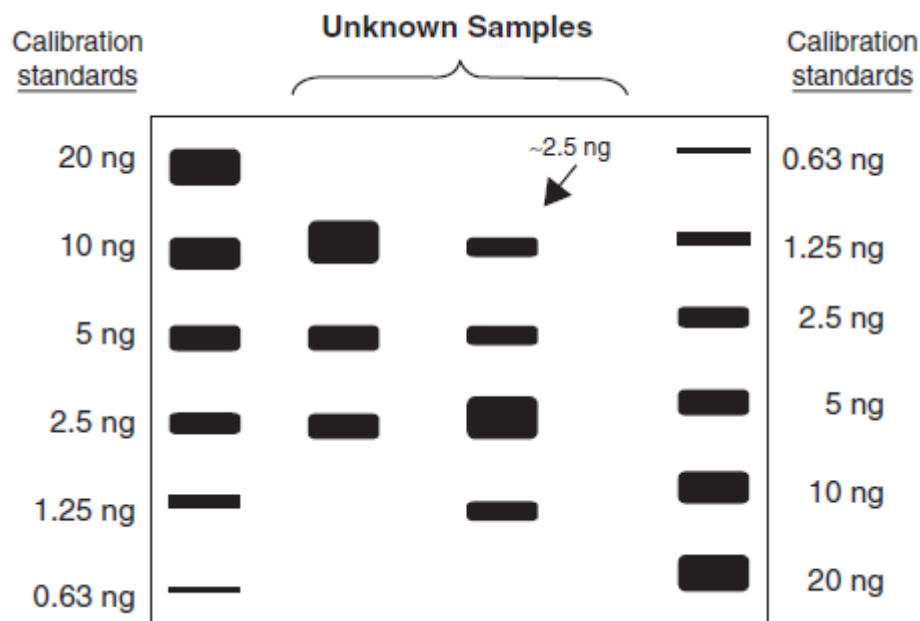
De ontwikkeling van de polymerase chain reaction (PCR) in 1984 door dr. Kary Mullis bracht een radicale verandering teweeg in de DNA-analysetechnologie. De PCR is een techniek waarbij specifieke regio's van het genoom geamplificeerd worden. De techniek is specifiek aangezien het gebruik van primers wordt gehanteerd. Deze primers hybridiseren met enkelstrengig DNA in de PCR, aangezien ze een complementaire basensequentie bezitten voor het te amplificeren DNA-fragment. Het principe van deze techniek steunt op 3 fasen. De eerste fase is de denaturatie van het dubbelstrengig DNA op een verhoogde temperatuur. Hierdoor breekt de DNA-dubbelstreng open en wordt enkelstrengig DNA verkregen. Dit enkelstrengig DNA is nodig voor de tweede fase. Hierin zullen de forward en reverse primers binden op het enkelstrengig DNA bij een lagere temperatuur. In de derde fase gebeurt dan de eigenlijke amplificatie van het DNA. Door

middel van een enzym, namelijk een polymerase, worden de primers verlengd. Hierdoor ontstaat een verdubbeling van het DNA. Door deze 3 stappen continu te herhalen gedurende een aantal cycli zal het gewenste DNA-fragment exponentieel geamplificeerd worden (Mullis, 2009).

Door deze radicale innovatie werden de technieken volgens de eerste benadering in de DNA-kwantificatietechnologie overbodig en was er nood aan een nieuwe aanpak in dit technologisch veld, namelijk de specifieke kwantificatie voor humaan DNA in een staal (Butler, 2005).

#### 1.3.2.1 Slot-blot kwantificatie

De eerste specifieke kwantificatieanalyse voor humaan DNA werd ontwikkeld door Waye, *et al.* (1989), de slot-blot kwantificatie genaamd. In 1992 werd de slot-blot kwantificatie verder ontwikkeld door Walsh, *et al.* (1992). Deze test is specifiek voor humaan DNA, vanwege een probe van 40 basenparen die complementair is met een humaan-specifieke DNA-sequentie (D17Z1) op chromosoom 17. Eerst werden de slot-blot testen uitgevoerd door middel van radioactief gemerkte probes. Naderhand werd de methode gewijzigd en gecommmercialiseerd door gebruik te maken van chemiluminescent of colorimetrische detectiemethoden. De slot-blot kwantificatie wordt uitgevoerd op een nylon membraan, waar de humaan-specifieke probes worden toegevoegd om het DNA te binden. Vervolgens wordt de intensiteit van het chemiluminescent of colorimetrisch signaal van het staal vergeleken met de vooropgestelde standaarden van gekende DNA-concentraties (zie figuur 10).

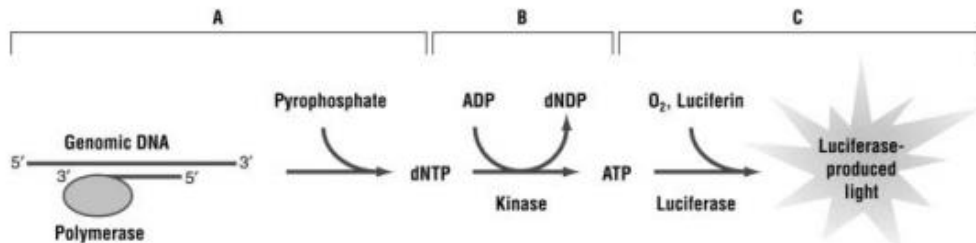


**Figuur 10: Voorstelling van een humaan DNA-kwantificatieresultaat via de slot-blot procedure.**

Eerst werden deze signalen op het slot-blot visueel met het blote oog waargenomen door de analist. Dit leidde tot een subjectieve invloed op de resultaten. Later werd deze methode uitgevoerd met behulp van een charged-coupled device (CCD)-camerasysteem voor een accuratere meetmethode

### 1.3.2.2 Aluquant™ humaan DNA-kwantificatiesysteem

Deze methode werd in 2001 ontwikkeld door het bedrijf Promega Corporation (Mandrekar, *et al.*, 2001). De techniek berust op twee incubatiestappen om de hoeveelheid DNA te kunnen meten, waarin een humaan specifieke probe, namelijk een *Alu*-sequentie, zorgt voor de reactie die leidt tot de productie van licht (zie figuur 11).



**Figuur 11: Aluquant™ humaan DNA-kwantificatiesysteem (Mandrekar, *et al.*, 2001)**

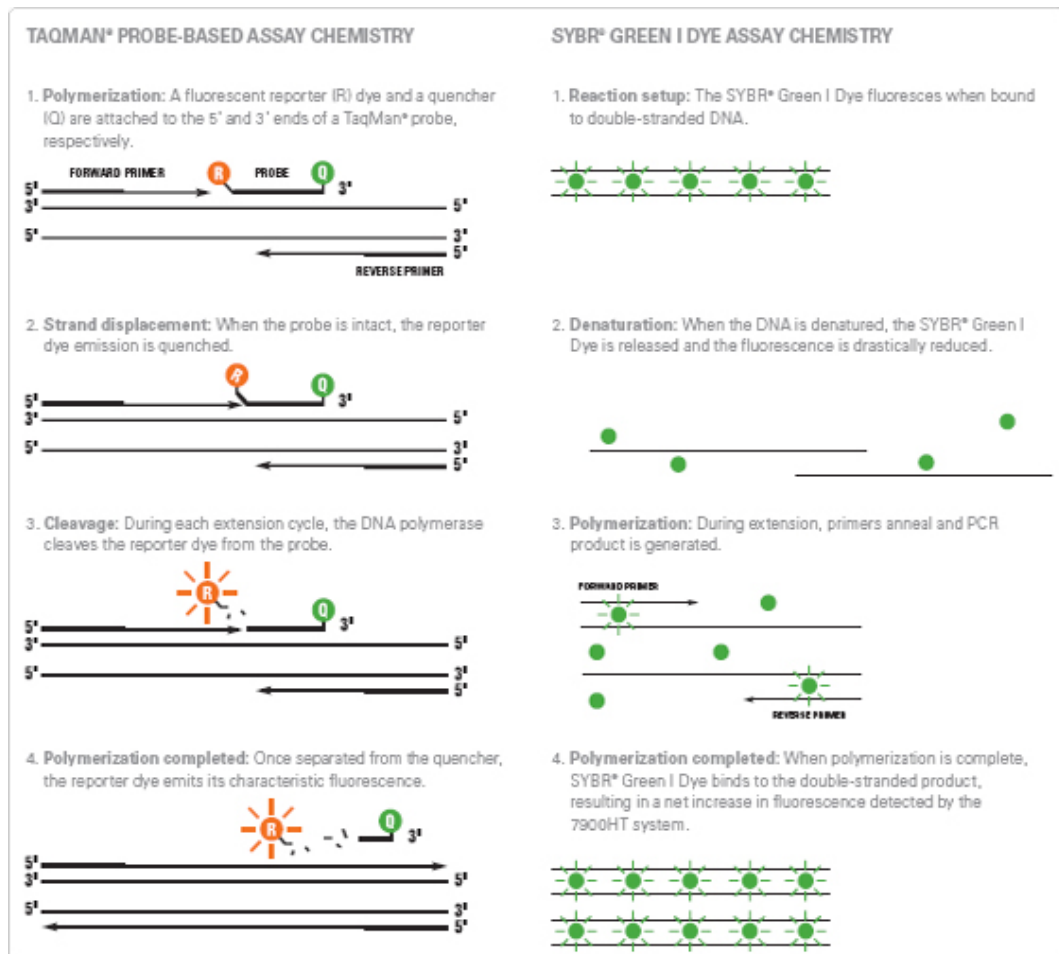
Eerst wordt het gezuiverde DNA gedenateerd om te kunnen binden met de humaan specifieke probe die wordt toegevoegd in de eerste incubatiestap. Bij de binding met het DNA wordt een reeks van twee gekoppelde enzymatische reacties gestart. De eerste reactie is een pyrofosforylatie, dit is de omgekeerde reactie van de DNA-polymerisatie. Bijgevolg wordt in de eerste incubatiestap ATP gevormd. In de tweede incubatiestap wordt dit ATP gebruikt door het enzym luciferase om een proportionele en meetbare hoeveelheid licht te produceren. Het uitgezonden licht wordt gemeten met behulp van een luminometer (Nicklas & Buel, 2003b); (Butler, 2005).

### 1.3.2.3 Real-Time PCR

Real-Time PCR geeft de mogelijkheid om accuraat zowel kwaliteit als kwantiteit van het DNA in het staal te analyseren. Deze methode kent enkele varianten.

De bekendste methode is waarschijnlijk de procedure met behulp van TaqMan probes (zie figuur 12). Deze probes zijn gelabeld met twee fluorescerende stoffen, namelijk de Reporter (R) en de Quencher (Q). De probe bindt met het complementaire target DNA en ook de primers worden gebonden, zodat door middel van de PCR-techniek de DNA-strengen geamplificeerd kunnen worden. De Reporter is verbonden aan het 5'-uiteinde en de Quencher aan het 3'-uiteinde van de probe. Wanneer de probe intact is en de Reporter zich nabij de Quencher bevindt dan zal zeer weinig tot geen fluorescentie uitgezonden worden. Door middel van de primers en de DNA-polymerase worden de strengen verlengd en bijgevolg geamplificeerd. Indien de DNA-polymerase met zijn 5'-exonucleaseactiviteit de TaqMan probe begint af te knippen, zal de Reporter verwijderd worden van de probe en bevindt deze zich niet meer in de buurt van de Quencher. Hieruit volgt dat de Reporter een fluorescerend licht zal uitzenden, dat op zijn beurt weer gemeten kan worden (Andreasson, Gyllensten, & Allen, 2002); (Butler, 2005).

Een andere procedure die de Real-Time PCR hanteert, maakt gebruik van de *Alu*-sequentie om de kwantificatie van het DNA mogelijk te maken. De detectie van het geamplificeerde DNA gebeurt door SYBR Green I-kleuring (zie figuur 12) (Nicklas & Buel, 2003c).



**Figuur 12: De TaqMan® probe en de SYBR® Green I kwantificatiemethode (Invitrogen, 2013)**

#### 1.3.2.4 End-point PCR

Een andere PCR-gebaseerde methode is de End-point PCR. Ten opzichte van de real-time PCR is dit een minder nauwkeurige en goedkopere aanpak om de hoeveelheid van een DNA-staal te bepalen. Het verschil met de real-time PCR is dat in deze PCR-methode eerst de target DNA-sequentie wordt geamplificeerd en daarna de hoeveelheid amplicon wordt gemeten. In deze methode wordt dus eerst een microsatelliet (klein stukje repeterend DNA) of een andere regio, zoals de *Alu*-sequentie, geamplificeerd samen met DNA-stalen van gekende concentraties. Aan de hand van deze gekende concentraties kan een standaardcurve worden opgemaakt. Hiermee worden vervolgens de stalen met ongekende hoeveelheden vergeleken. Ook in deze methode wordt SYBR Green gebruikt voor het fluorescente signaal (Nicklas & Buel, 2003a); (Nicklas & Buel, 2003b).

Een andere methode voor DNA-kwantificatie die end-point PCR toepast, werd ontwikkeld door Allen & Fuller in 2006. De methode wordt de Quantitative Template Amplification Technology (Q-TAT) genoemd. Deze techniek omvat de kwantificatie van humaan DNA door middel van amplificatie van het amelogenin gen, dat gelegen is op de geslachtschromosomen X en Y. Er wordt gebruik gemaakt van fluorescente PCR-primers. Eerst wordt ook in deze methode weer een standaardcurve opgesteld met kwantificatie van gekende hoeveelheden DNA. Daarna wordt het staal gekwantificeerd en kan de hoeveelheid vergeleken worden met de standaardcurve (Allen & Fuller, 2006); (Benson, 2007).

## **2      Identificatie van de innovaties in de DNA-analyse technologie**

In dit tweede hoofdstuk worden de belangrijke innovaties in de technologie van de DNA-extractie en DNA-kwantificatie geïdentificeerd. In het eerste deel wordt iets meer uitleg gegeven over wat juist wordt verondersteld onder een radicale innovatie. Het tweede en derde deel geven respectievelijk een overzicht van de technologische vooruitgang in de DNA-extractie- en de DNA-kwantificatietechnologie. Radicale innovaties dragen bij tot de technologische vooruitgang, wat een belangrijke rol speelt in de economie. Het heeft namelijk een sterke invloed op de economische groei. De radicaliteit van de innovaties worden daarom getest aan de hand van een scoresheet, dat werd ontwikkeld door het onderzoekscentrum MSI van de KULeuven. Dit scoresheet wordt weergegeven in bijlage. De scoresheet geeft aan hoe radicaal de innovatie is in het technologisch veld. Hoe hoger de score, hoe radicaler de innovatie.

### **2.1      Wat is een radicale innovatie?**

Een succesvolle radicale innovatie voldoet volgens Dahlin & Behrens (2005) aan drie criteria. Ten eerste moet de innovatie vernieuwend zijn. De innovatie moet in dit aspect zorgen voor een nieuwe sterk verbeterde functionaliteit. Ze mag niet al eerder zijn toegepast en heeft kenmerken die zich onderscheiden van de eerder bestaande uitvindingen. Als tweede dient de innovatie origineel te zijn. Ze moet verschillen van actuele innovaties en geeft een beeld van de innovatieve kennis van de uitvinders. De principes en de kennis die voor deze innovatie werden gehanteerd, mogen niet eerder gebruikt zijn in het technologische veld. Sterker nog, de principes mogen niet eerder zijn toegepast in andere ongerelateerde technologische velden. Het derde criteria handelt rond de impact op toekomstige technologische innovaties. De innovatie moet de toekomst in het technologische veld beïnvloeden. Ook creëert de innovatie een impact op technologieën die normaliter geen kennis uit dit vakgebied opdoen.

Ook voor de scoresheet wordt beroep gedaan op deze drie dimensies voor de identificatie van een radicale innovatie (zie bijlage). De scoresheet wordt bijgevolg onderverdeeld in drie kolommen.

De eerste kolom geeft een score op gebied van originaliteit. In dit aspect wordt de gebruiksfrequentie van de gehanteerde principes en kennis van deze innovatie geëvalueerd in de DNA-analysetechnologie. Daarnaast gebeurt ook nog een evaluatie in de ongerelateerde technologiedomeinen. Als derde in dit aspect wordt de innovatie ook getest op het 'out-of-the-box' denken van de uitvinders.

De tweede kolom beschrijft de vernieuwing van de innovatie. De innovatie wordt vergeleken met eerdere uitvindingen in het technologisch gebied, waarbij het aantal nieuwe componenten wordt nagegaan. Ook wordt nagegaan of deze componenten erg verschillen van de componenten die eerder in dit technologisch veld gebruikt werden en wordt besproken of de wijze waarop deze componenten gecombineerd worden gemakkelijk te implementeren is om het doel van de innovatie te verwezenlijken.

In de derde kolom wordt de impact van de innovatie besproken. Als eerste wordt de toename in technologische prestatie behandeld en worden de prestaties vergeleken met eerdere innovaties. Daarna wordt nagegaan of de innovatie tot verdere en belangrijke innovaties heeft geleid, waarbij de technologische prestatie wordt verbeterd. Ook wordt beschreven of de innovatie voor een technologische vooruitgang heeft gezorgd in een ander technologisch veld en wordt nagegaan of deze innovatie eerdere technologieën overbodig heeft gemaakt. Tenslotte wordt gecontroleerd of de innovatie een commerciële impact heeft gecreëerd.

## **2.2 DNA-extractie**

### **2.2.1 Organische DNA-extractie met behulp van Fenol-Chloroform**

De eerste conventionele methode om DNA te extraheren uit celmateriaal was de organische extractiemethode op basis van fenol-chloroform (zie 1.2.1). Het is een eenvoudige methode die tegenwoordig nog regelmatig wordt toegepast. Aan de hand van deze organische methode worden de andere methoden geëvalueerd op originaliteit, vernieuwing en impact in het technologisch veld. Hoewel deze procedure vaak wordt toegepast, beschikt ze toch over enkele nadelen:

- gebruik van chemische, toxische verbindingen;
- vele transfers tussen de buisjes in de extractieprocedure met contaminatie als gevolg;
- arbeidsintensief en tijdrovend;
- moeilijk te automatiseren.

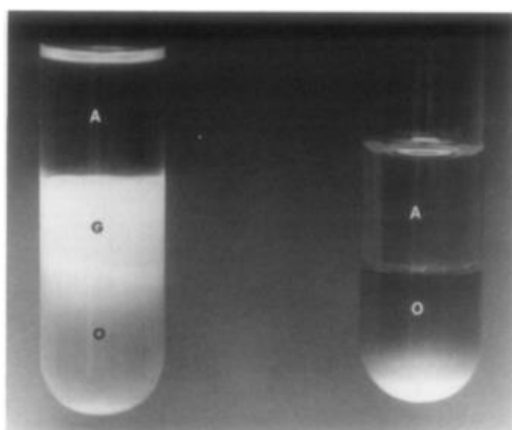
Een eerste aanpassing aan het organische extractieprotocol werd in 1977 gemaakt door Ullrich, *et al.* (1977) door het gebruik van guanidinium isothiocyanaat toe te voegen. Later werd deze methode verder ontwikkeld door Chomczynski & Sacchi (1987) en bekend als de guanidinium thiocyanaat-fenol-chloroform extractie. Guanidinium thiocyanaat is een chaotrope stof, die zorgt voor de degradatie van proteïnen. Door middel van deze methode kan het DNA gescheiden worden van het RNA. Het RNA blijft in de bovenste waterige fase, terwijl DNA en proteïnen in de interfase of onderste organische fase verblijven. In een volgende stap kan het DNA dan ook nog gescheiden worden van de proteïnen. Het innovatieve in deze uitvinding zit in de nieuwe chemische stof die wordt toegevoegd, namelijk guanidinium thiocyanaat. Dit leidt tot een extractiemethode, waarbij ook de RNA-moleculen gescheiden kunnen worden van de DNA-moleculen. Het gaat hier over een aanpassing aan de procedure, waardoor niet echt gesproken kan worden van een radicale innovatie. De methode steunt immers op de principes van de organische extractie en scoort bijgevolg qua vernieuwing en originaliteit niet erg hoog. Toch heeft deze nieuwe procedure wel een impact gehad op het technologisch veld. Het heeft aangezet tot een zoektocht naar andere chaotrope moleculen, waarbij naderhand ook vele nieuwe technieken deze moleculen hanteerden, voornamelijk dan chaotrope zouten. De tabel 1 hieronder geeft de scoresheet van deze innovatie weer.



**Tabel 1: Scoresheet voor de organische guanidinium thiocynaat-extractie**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>1</b>	<u>Number of new components:</u> <b>2</b>	<u>Technological performance:</u> <b>3</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>1</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>5</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>8</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>3</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>3</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>3</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>1</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>1</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>1</b>

Een andere methode om interferentie van de toxische chemicaliën te vermijden in de organische extractietechniek, is de toepassing van buisjes die silicagel polymeren bevatten. De techniek werd ontwikkeld door Tilzer, *et al* (1989). Omdat het moeilijk is om het DNA in de waterige fase te scheiden van de proteïnen in de organische fase, ontwikkelde ze een buisje dat een silicagel bevat. Deze silicagel werkt als een barrière tussen de waterige fase en de organische fase (zie figuur 13). Hierdoor wordt het eenvoudiger om het DNA van de proteïnen te scheiden. Het gevolg is dus een zuiverdere oplossing van het DNA-staal dan mogelijk was bij de conventionele organische extractiemethode. Ook in deze innovatie is het onmogelijk om te spreken van een radicale innovatie op gebied van vernieuwing en originaliteit. De enige vernieuwing is de toepassing van silica, want de extractiemethode steunt namelijk op hetzelfde principe als toegepast in de conventionele organische extractiemethode. Echter het gebruik van silica heeft wel een grote impact gehad op de technologie. De eigenschappen van silica hebben geleid tot vele nieuwe procedures, vooral in de chromatografische methoden. De tabel is identiek aan tabel 1.



**Figuur 13: De conventionele organische extractiemethode (rechts) versus de organische extractiemethode via silicagel bevattende buisjes (links) (Tilzer, et al. 1989).**

### 2.2.2 DNA-extractiemethode via uitzouten

De grootste nadelen aan de organische extractiemethode zijn het gebruik van gevaarlijke chemicaliën en de transfers tussen verschillende buisjes, wat tot contaminatie kan leiden. Dit zette Miller, *et al.* (1988) aan om op zoek te gaan naar een gelijkaardige methode zonder gebruik te maken van gevaarlijke chemicaliën. Een snellere en eenvoudige methode om proteïnen te verwijderen uit het staal werd ontwikkeld door middel van uitzouten (zie 1.2.2). Het nadeel is nog steeds dat verschillende transfers noodzakelijk zijn tussen verschillende buisjes, bijgevolg is het probleem wat betreft contaminatie niet opgelost. Ook hier is geen sprake van een radicale innovatie, want bij deze uitvinding zit het innovatieve enkel in de vernieuwing om proteïnen sneller en eenvoudiger uit de oplossing te verwijderen. Qua originaliteit en impact op de technologie scoort deze uitvinding bijgevolg niet al te hoog. De reden hiervoor is dat het principe van proteïneprecipitatie ook al eerder werd toegepast in de chemische laboratoria. De methode lag bijgevolg voor de hand en heeft ook niet gezorgd voor een radicale technologische en commerciële verbetering (zie tabel 2).

**Tabel 2: Scoresheet voor de extractiemethode via uitzouten**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>3</b>	<u>Number of new components:</u> <b>2</b>	<u>Technological performance:</u> <b>1</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>1</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>5</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>1</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>1</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>5</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>1</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>1</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>1</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>1</b>

### 2.2.3 DNA-extractie door middel van chromatografie

De eerste radicale vernieuwing in de DNA-extractietechnologie werd ontwikkeld door Porath & Flodin in 1959, waar de techniek van gelfiltratie geïntroduceerd werd als een scheidingstechniek. Het eerste gelfiltratiemedium dat werd toegepast was Sephadex® (zie 1.2.5) (Porath & Flodin, 1959). Deze techniek had een grote impact in het technologisch veld. De impact had de techniek te danken aan zijn eenvoud en snelheid in tegenstelling tot de reeds beschikbare technieken. De methode was zeer origineel, omdat de chromatografische methode nog niet eerder werd toegepast in de DNA-analysetechnologie. Het lag bijgevolg niet voor de hand om de techniek te ontwikkelen voor een DNA-zuivering. Deze techniek heeft de basis gelegd voor een hele resem chromatografische ontwikkelingen die nog zouden volgen in dit technologisch veld, zoals de andere chromatografische methoden hieronder beschreven. Maar ook in andere technologische domeinen wordt deze methode toegepast als scheidingsprocedure. In tabel 3 wordt de radicaliteit van de chromatografische methoden weergegeven in een scoresheet.

Ook Boom, *et al.* (1990) gebruikten chromatografie om DNA-moleculen zuiver te extraheren. In deze procedure werden de affiniteit van silicadeeltjes met DNA-moleculen toegepast om DNA te zuiveren van het overige celmateriaal. Het grote voordeel van deze methode is dat geen gebruik wordt gemaakt van toxische chemicaliën en dat op deze manier sneller resultaat kan behaald worden. Innovatief aan deze methode is dus de goedkope en snelle manier voor de DNA-zuivering, waarbij de chromatografische eigenschappen van silica worden toegepast. Silica heeft in de chromatografie een grote impact op de DNA-extractietechnologie gehad. Vele nieuwe technieken met behulp van de eigenschappen van silica werden ontwikkeld, waardoor de meeste chromatografische methoden beschreven in de literatuur gebruik maken van een silicagebaseerde extractie.

Greenspoon, *et al.* (1998) kwam ook met een innovatieve chromatografische uitvinding gebaseerd op de chromatografische eigenschappen van silica, namelijk de spin columns (zie 1.2.5). De spin columns bevatten een silicamembraan met specifieke eigenschappen om DNA-moleculen te binden onder chaotrope condities. Ook is het mogelijk om deze procedure te automatiseren met behulp van een robot (QIAcube), wat een groter aantal stalen per proces mogelijk maakt en de arbeidsintensiviteit sterk reduceert (Hanselle, *et al.*, 2003). Deze methode heeft dus het voordeel van weinig contaminatie, mogelijkheid tot automatisatie en er wordt ook geen beroep gedaan op gevaarlijke chemicaliën. Deze procedure heeft een grote impact gehad op de extractietechnologie omwille van de mogelijkheid tot automatisatie, wat geleid heeft tot het verwerken van meerder stalen in één run en dus een hogere technologische prestatie. Hierdoor worden de arbeidskosten en de werkdruk verlaagd. Daarenboven zorgt de automatisatie ook voor betere en reproduceerbare resultaten. En gaat er een commerciële impact gepaard met de automatisatie via spin columns. Er werden commerciële kits en analyse-instrumenten aangeboden, waar bedrijven meer waarde uit kunnen creëren. Maar ook kunnen door middel van deze geautomatiseerde extractietoepassing vele kosten gespaard worden, wat bijgevolg leidt tot goedkopere DNA-analyses.

Een andere chromatografische innovatie die zorgde voor een snellere methode om DNA te extraheren werd ontwikkeld door Potter, *et al.* (1985). Ze maakte gebruik van SDS voor cellysis en paste DEAE-cellulosechromatografie en ethanolprecipitatie toe om DNA te zuiveren van het overig celmateriaal (zie 1.2.5). Ook in deze procedure bestaat het voordeel zoals beschreven bij de andere chromatografische methoden dat toxische chemicaliën vermeden worden en een kortere procestijd nodig is om het DNA te extraheren.

Ten opzichte van de conventionele organische extractiemethodes, brachten de chromatografische extractiezuiveringen een radicale vernieuwing teweeg (zie tabel 3). De reden hiervoor is omwille van het feit dat de principes en de kennis origineel zijn. Hiervoor werden de principes niet eerder toegepast in het technologisch veld. Ook brachten de chromatografische principes vernieuwing, aangezien geen toxische chemicaliën en onnodige transfers meer moesten ingeschakeld worden. Bijgevolg werd op een geheel andere en nieuwe manier geëxtraheerd. Hierbij komt ook nog dat deze methode een grote impact heeft gehad, zowel technologisch als commercieel. Bedrijven bieden meestal voor chromatografische methoden commerciële kits en instrumenten aan om een zo goed mogelijke technologische prestatie te verwezenlijken op een goedkope, snelle en zuivere manier.

**Tabel 3: Scoresheet voor de extractie via de chromatografische methoden**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>10</b>	<u>Number of new components:</u> <b>8</b>	<u>Technological performance:</u> <b>10</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>8</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>8</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>10</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>5</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Breadth of impact:</u> <b>8</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>8</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>5</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>10</b>

#### 2.2.4 Mechanische DNA-extractiemethode

Een compleet andere en zeer klassieke techniek om DNA te extraheren is de uitvoering van een mechanische extractiemethode. Het is een methode die berust op het principe van vijzel en mortier, waarbij de cellen destructief worden vormalen en het DNA bijgevolg vrijkomt. Deze procedure wordt vaker toegepast bij plantaardige cellen, omdat deze een dikkere celwand bezitten. Ook in deze methode worden toxische chemicaliën vermeden. Een innovatie die een radicale vernieuwing bracht in de mechanische manier van extraheren werd gerealiseerd door Weeden, *et al.* (2000), namelijk een extractie via een “matrix mill” (zie 1.2.8). De vormalers worden in deze procedure elektromagnetisch aangestuurd om automatisatie mogelijk te maken. Het grote voordeel van deze methode is bijgevolg dat de procedure kan geautomatiseerd worden. Dit is een originele innovatie, omdat voorheen de elektronische automatisatie niet werd toegepast in dit technologisch veld. Het geeft de opportuniteit om meerdere stalen tegelijkertijd te behandelen, waardoor de arbeidsintensiviteit en de procestijd sterk worden gereduceerd, als ook de kosten. Ook heeft deze innovatie een sterke impact uitgeoefend op de automatisatie van andere methoden. Het heeft geleid tot automatisatie in vele andere technieken in niet enkel dit technologisch veld, maar ook in andere domeinen. In tabel 4 wordt de scoresheet voor de mechanische extractie via de “matrix mill” weergegeven.

**Tabel 4: Scoresheet voor de mechanische extractie via de “Matrix Mill”**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>10</b>	<u>Number of new components:</u> <b>8</b>	<u>Technological performance:</u> <b>10</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>5</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>3</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>10</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>8</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>8</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>3</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>1</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>5</b>

### 2.2.5 FTA™-paper extractie

Een zeer originele vernieuwing in de DNA-extractie met een grotere impact werd ontwikkeld in de late jaren van het decennia 1980-1990 door Burgoyne en Fowler (Smith & Burgoyne, 2004). Ze maakte een extractiemethode mogelijk door gebruik te maken van een speciaal behandeld cellulosepapier, namelijk de FTA™-paper extractie (zie 1.2.3). De grote originele vernieuwing in deze methode is dus dat het staal rechtstreeks op een behandeld papier wordt aangebracht en zo wordt gedroogd aan de lucht. Op deze manier kan het DNA gedurende enkele jaren bewaard worden zelfs bij kamertemperatuur. Hierdoor moet ook bij deze methode geen toxische chemicaliën gehanteerd worden en gebeurt de extractie in één buisje, wat de kans op contaminatie sterk verkleint. Het nadeel bij deze methode is echter dat enkel DNA-stalen, die op het speciale papier kunnen aangebracht worden, een extractie kunnen ondergaan. Niet alle DNA-stalen zijn bijgevolg geschikt voor een toepassing van de FTA™-paper extractie. Onderstaande tabel 5 geeft de score van de innovatie weer (Smith & Burgoyne, 2004).

**Tabel 5: Scoresheet voor de FTA™-paper extractie**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>10</b>	<u>Number of new components:</u> <b>8</b>	<u>Technological performance:</u> <b>10</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>10</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>5</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>5</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>10</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>1</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>3</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>5</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>5</b>

### 2.2.6 Chelex®100-extractie

Een andere unieke procedure die voor grote impact zorgde in de technologie van de DNA-extractie, was de CHELEX®100-extractie (zie 1.2.4). Deze methode werd geïntroduceerd in 1991 door Walsh, *et al.* (1991) en maakt gebruik van een chelerende hars, die ervoor zorgt dat de DNA-moleculen beschermd blijven. Het radicale van deze methode zit in het feit dat de principes en de kennis niet eerder werden toegepast en bijgevolg uniek zijn. Ook zijn de technologische prestaties van deze techniek veel efficiënter als de in de organische extractie en ook hier bestaat het voordeel dat er geen gebruik wordt gemaakt van gevaarlijke chemicaliën of onnodig veel transfers tussen buisjes. Dit verkleint de kans op contaminatie. Het is een eenvoudige en snelle manier om DNA te extraheren en wordt nog steeds toegepast in enkele laboratoria. Toch bleek de CHELEX®100-extractie niet in alle extracties de beste oplossing. Na lange bewaring van de stalen in aanwezigheid van niet-gebufferde CHELEX® en meerdere malen de stalen te laten ontdooien en terug in te vriezen werden resultaten bekomen met een verlies aan signaal. De score voor deze radicale innovatie wordt weergegeven in tabel 6.

**Tabel 6: Scoresheet voor de Chelex®100-extractie**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>10</b>	<u>Number of new components:</u> <b>8</b>	<u>Technological performance:</u> <b>10</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>10</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>8</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>5</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>10</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>3</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>5</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>8</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>8</b>

### 2.2.7 DNA-extractie met behulp van magnetische beads

Een innovatie die de laatste jaren steeds meer wint aan populariteit, is de extractie met behulp van magnetische beads (zie 1.2.6). Deze techniek werd ontwikkeld door Tereba, *et al.* (2004) en kan beschouwd worden als één van de meest radicale uitvindingen in deze technologie. De methode heeft het grote voordeel van hoge technologische prestaties doordat de DNA-extractie kan gebeuren in één enkel buisje door eenvoudige oplossingen toe te voegen en te verwijderen. Er is geen nood aan filtratie of centrifugatie tijdens de procedure en de methode kan zeer gemakkelijk geautomatiseerd worden met behulp van een robot, weergegeven in figuur 14 (Greenspoon, *et al.*, 2004). De ontwikkeling van nauwkeurig werkende robots heeft bijgevolg ook meegespeeld in de radicaliteit van deze innovatie. In deze techniek worden de DNA-moleculen gebonden aan de magnetische beads en met behulp van een magneet in de oplossing gehouden. Het overige celmateriaal wordt weggewassen en op het einde van de procedure worden de DNA-moleculen geëluëerd, wat leidt tot een zeer zuivere DNA-oplossing. Deze innovatie heeft dus een grote impact gehad op de automatisering van de DNA-extractie.

De arbeidsintensiviteit en procestijd zijn zeer sterk gereduceerd. Ook de kosten worden door deze extractieanalyse sterk gereduceerd. Zo maakt men vaak gebruik van 96-well-platen, waardoor vele stalen tegelijkertijd behandeld kunnen worden. De methode heeft bijgevolg gezorgd voor een grote commerciële impact, aangezien de magnetische beads aangeboden worden door bedrijven in de vorm van commerciële kits. Deze commerciële kits zijn aangepast om het werken met automatische robots te vergemakkelijken.



**Figuur 14: De BioMek®2000 robot voor geautomatiseerde DNA-extracties (Greenspoon, et al., 2004).**

**Tabel 7: Scoresheet voor de DNA-extractie met magnetische beads**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>10</b>	<u>Number of new components:</u> <b>8</b>	<u>Technological performance:</u> <b>10</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>10</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>10</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>10</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>10</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>8</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>5</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>8</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>10</b>

### 2.2.8 Dendriemeer-gebaseerde extractiemethode

De laatste jaren werd vooral gezocht naar verbeterde automatisatiemethoden en alternatieve innovaties die nog innoverender zijn dan de magnetische beads-extractie. Zo ontwikkelden Fukushima, *et al.* (2007) een extractiemethode met behulp van dendrimeren (zie 1.2.1.7). Dit is een speciaal soort van polymeren met een takachtige structuur, die binden met de DNA-moleculen. Deze dendrimeren kunnen bevestigd worden in biochips, waardoor het DNA-staal gestuurd wordt. Toepassen van dendrimeren heeft het voordeel dat deze structuren zeer efficiënte dichtheden kunnen bereiken. Het resultaat is bijgevolg een zeer efficiënte zuivering van de DNA-oplossing. De vernieuwing ten opzichte van de magnetische beads-methode is namelijk dat deze innovatie de nood aan mechanisch bewegende deeltjes elimineert. Er is geen behandelingsstap meer nodig om de DNA-moleculen te laten binden aan magnetische deeltjes, die daarna door een magneet in de oplossing worden gehouden. Op deze manier worden de voorbehandelingsstappen verminderd en kan op een goedkopere, eenvoudige en snellere manier zuiver DNA verkregen worden.

**Tabel 8: Scoresheet voor de DNA-extractie met behulp van dendrimeren**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>8</b>	<u>Number of new components:</u> <b>8</b>	<u>Technological performance:</u> <b>10</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>8</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>10</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>10</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>8</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>8</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>5</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>8</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>8</b>

### 2.2.9 Conclusie en toekomsperspectief

Ondanks het werk van de vele onderzoeksgroepen over de hele wereld wordt toch nog vaak teruggerepen naar de traditionele protocols voor DNA-extracties. In vele laboratoria wordt nog vaak beroep gedaan op de organische extracties, de FTA<sup>TM</sup>-paper-extractie en de CHELEX®100-methode. Desalniettemin heeft de snelle technologische groei in alle industriën de laatste jaren gezorgd voor een groter aandeel aan automatische DNA-extracties. Zo zouden de geautomatiseerde extracties nooit verwezenlijkt kunnen zijn zonder de ontwikkeling van nauwkeurige robots. Deze robots hebben ervoor gezorgd dat de laatste jaren de magnetische bead-extracties steeds meer aan populariteit hebben gewonnen. Automatisering van de DNA-extractiemethodes is voordelig in vele opzichten: het spaart procestijd uit, verlaagt de arbeidskosten, verhoogt de werkveiligheid en de mogelijkheid tot reproduceerbaarheid. Al deze factoren dragen bij tot een betere kwaliteit van de resultaten. In de toekomst zal dan ook veel onderzoek verricht worden naar de verbetering van de geautomatiseerde instrumenten en protocols, zowel in nauwkeurigheid en specificiteit als in snelheid van uitvoering.



Nochtans kan in de toekomst ook gestreeft worden naar een “all-in-one” biomoleculair extractiesysteem, waarbij alle celmaterialen apart van elkaar geëxtraheerd kunnen worden. Ook is het de komende jaren misschien mogelijk om innovaties zoals geminiaturizeerde en draagbare extractiesystemen te ontwikkelen.

## **2.3 DNA-kwantificatie**

Na de DNA-extractie volgt een tweede stap in de DNA-analyse, namelijk de DNA-kwantificatie. Deze stap is cruciaal om in de volgende stappen van de DNA-analyse een fatsoenlijke PCR-amplificatie uit te voeren en uiteindelijk een duidelijk DNA-profiel op te stellen. Teveel of te weinig DNA leidt uiteindelijk tot slechte meetresultaten in de opstelling van een DNA-profiel. De eerste technieken in deze technologie waren enkel in staat om het totale DNA in een staal te meten. De uitvinding van de PCR heeft geleid tot nieuwere technieken, waarbij de specifieke kwantiteit van humaan DNA kon gemeten worden zonder interferentie van het niet-humaan DNA in het staal. Hieronder volgt de technologische evolutie van de DNA-kwantificatietechnologie. Ook hier worden de methoden weer geëvalueerd volgens de scoresheet op originaliteit, vernieuwing en impact in het technologisch veld.

### **2.3.1 Niet-specifieke DNA-kwantificatie**

In eerste instantie was enkel sprake van niet-specifieke DNA-kwantificatiemethoden. Deze methoden gaven een kwantificatie weer van het totale DNA. Het was dus niet mogelijk om specifiek voor het humaan DNA in een staal te kwantificeren.

#### *2.3.1.1 Ultravioletspectroscopie*

De eerste methode die werd toegepast in de DNA-kwantificatietechnologie was de UV-spectroscopie (zie 1.3.1.1). Het is een snelle en eenvoudige methode, die gedurende lange tijd werd toegepast als de conventionele methode. Ook vandaag de dag wordt deze technologie nog aangewend. De UV-spectroscopie werd in de niet-specifieke DNA-kwantificatie beschouwd als de referentiemethode voor de nieuwere technieken die op de markt kwamen. Op basis van deze techniek worden de andere methoden geëvalueerd op originaliteit, vernieuwing en impact in het technologisch veld. Hoewel deze techniek vaak werd toegepast, beschikt deze methode toch over enkele nadelen. De grootste nadelen van deze techniek zijn:

- het onvermogen om onderscheid te maken tussen ssDNA en dsDNA;
- de interferentie van RNA en andere UV-absorberende contaminatie;
- de ongevoeligheid van de techniek;
- het onvermogen om de aanwezigheid van inhibitors te detecteren;
- de grote hoeveelheid staal die vereist is (microgrammen DNA zijn vereist).

#### *2.3.1.2 Fluorescentiespectroscopie*

Vanwege de vele nadelen van de UV-spectroscopie moest op zoek gegaan worden naar een alternatieve methode voor de niet-specifieke DNA-kwantificatie. Een andere spectroscopische methode werd ontwikkeld door Le Pecq & Paoletti (1966), namelijk de fluorescentiespectroscopie (zie 1.3.1.2). De methode vraagt meer voorbehandeling dan de UV-spectroscopie omwille van de toevoeging van een fluorescente stof zoals

bijvoorbeeld ethidiumbromide. In tegenstelling tot UV-spectroscopie is de fluorescente spectroscopie een relatieve methode, dit wil zeggen dat de DNA-kwantiteit via fluorescentiespectroscopie vergeleken wordt met een standaardcurve. Terwijl bij UV-spectroscopie de absorbantie direct kan afgelezen worden. Ook kan in deze methode contaminatie optreden wanneer het geëxtraheerde DNA-staal fluorescente componenten bevat. Het enige grote voordeel ten opzichte van UV-spectroscopie is echter dat lagere concentraties aan DNA worden vereist.

De radicaliteit van deze methode wordt weergegeven in onderstaande tabel 9. In dit geval kan niet gesproken worden van een radicale innovatie, want qua originaliteit scoort deze methode niet echt hoog ten opzichte van UV-spectroscopie. De reden hiervoor is dat ook deze methode steunt op het principe van de spectroscopie. De enige grote vernieuwing is het gebruik van fluorescente stoffen die fluorescent licht uitzenden om de kwantiteit van het DNA te bepalen, wat het voordeel van een lagere DNA-concentratie in het DNA-staal vereist. Toch had de introductie van ethidiumbromide een grote impact in de ontwikkeling van nieuwe technologieën, want deze fluorescente stof wordt in nieuwere technieken, zoals bijvoorbeeld gelelektroforese, ook nog toegepast. De methode was een goed alternatief voor de UV-spectroscopie, maar heeft deze niet overbodig gemaakt.

**Tabel 9: Scoresheet voor fluorescentiespectroscopie**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>3</b>	<u>Number of new components:</u> <b>3</b>	<u>Technological performance:</u> <b>5</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>1</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>3</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>8</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>1</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>5</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>5</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>3</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>1</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>1</b>

### 2.3.1.3 Picogreen en Oligreen microtiterplaat analyse

Picogreen en Oligreen zijn fluorescente stoffen die ontwikkeld zijn door Singer, *et al.* (1997) om respectievelijk te binden met dsDNA en ssDNA (zie 1.3.1.3). Hierdoor valt het nadeel van het onderscheid tussen dsDNA en ssDNA bij UV-spectroscopie weg. Ook kan bij deze methode een veel lagere concentratie (0.25 ng/ml) gedetecteerd worden. Het grote voordeel van deze methode werd ontwikkeld door Hopwood, *et al.* (1997). Ze zorgden voor een automatisatie van de Picogreenanalyse met behulp van een 96-well microtiterplaat. Hierdoor kunnen 80 DNA-stalen en 16 calibratiestalen worden geanalyseerd. Naderhand worden de stalen gekwantificeerd aan de hand van de standaardcurve. Deze methode heeft dus door middel van de beter technologische prestaties en de automatisatie gezorgd voor een grote technologische en commerciële impact in de DNA-kwantificatie. Ook heeft deze methode geleid tot de ontwikkeling van analyses met andere fluorescente stoffen. In tabel 10 wordt de scoresheet van deze

techniek weergegeven. Hierin is zichtbaar dat op gebied van originaliteit deze techniek matig scoort, namelijk omdat Picogreen of Oligreen voorheen niet werden toegepast in de DNA-kwantificatie. Toch volgt deze procedure hetzelfde principe als de fluorescentiespectroscopie, wat een lagere score voor vernieuwing levert. De grote innovatie in deze techniek is te wijten aan de mogelijkheid tot automatisatie van deze methode. Dit gaf een groot voordeel in snelheid van uitvoering, maar ook bezit de methode een veel hogere gevoeligheid.

**Tabel 10: Scoresheet voor Picogreen en Oligreen microtiterplaat analyse**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>8</b>	<u>Number of new components:</u> <b>3</b>	<u>Technological performance:</u> <b>8</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>5</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>5</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>5</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>3</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>3</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>1</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>1</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>3</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>5</b>

#### 2.3.1.4 Gelelektroforese

Een methode die een verbetering bracht in de DNA-kwantificatietechnologie was de techniek via gelelektroforese (zie 1.3.1.4). Professor Arne Tiselius kreeg in 1948 de Nobelprijs voor zijn werk aan elektroforese (Janson, 1987). De meest bekende gelelektroforese is deze aan de hand van agarosegel, maar ook polyacrylamide wordt toegepast. De methode won steeds meer aan populariteit, vooral omwille van zijn vele voordelen ten opzichte van de spectroscopische methoden. In tabel 11 wordt de scoresheet van gelelektroforese weergegeven. De gelgebaseerde methode heeft een grote impact in dit technologisch veld. Ook vandaag de dag wordt deze techniek nog in vele laboratoria gebruikt. Het voordeel van deze methode is de eenvoud en snelheid. Een grote vernieuwing in dit technologisch gebied bracht deze procedure doordat op deze manier ook informatie gewonnen kan worden over de hoeveelheid DNA dat gedegradeerd is. Zo wordt dus een beeld gegeven van de kwaliteit én kwantiteit van het DNA. Toch heeft deze methode nog een gebrek aan gevoeligheid en specificiteit. En het nadeel in deze methode blijft dat voor de detectie van de DNA-fragmenten additionele kleuring of radioactieve merkers nodig zijn. Een ander groot nadeel blijft het onvermogen tot automatiseren in deze methode. Hierdoor blijven variabelen aanwezig in de procedure en is het onmogelijk om de procedure te standaardiseren en sterk te commercialiseren.

**Tabel 11: Scoresheet voor gelelektroforese**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>10</b>	<u>Number of new components:</u> <b>10</b>	<u>Technological performance:</u> <b>5</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>10</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>10</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>8</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>5</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>3</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>5</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>8</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>5</b>

Een andere elektroforetische methode die een einde maakt aan deze nadelen is de capillaire gelelektroforese. Sinds de introductie van deze methode in het begin van de jaren tachtig heeft deze techniek een grote ontwikkeling doorgemaakt en gezorgd voor een grote impact in de DNA-kwantificatieanalyse. Vandaag de dag heeft deze techniek nog altijd een respectabele plaats in de DNA-kwantificatieanalyse. In onderstaande tabel 12 wordt de radicaliteit van deze innovatie weergegeven. De innovatie scoort niet hoog op originaliteit, omdat deze al gebaseerd is op eerdere elektroforetische methoden. De methode bracht wel vernieuwing op het gebied van automatisatie. Het is de basis geweest voor verdere ontwikkeling van automatisering in andere en nieuwere technieken. Ook werd het gebruik van kleurstoffen en radioactieve labels overbodig. Echter wanneer geen capillair elektroforetisch instrument met meerdere capillairen beschikbaar is, is het onmogelijk om meerdere stalen simultaan te analyseren. Hierdoor bestaat het nadeel dat een grote serie DNA-stalen veel tijd in beslag neemt, waardoor toch sneller wordt teruggespreng naar de gewone gelelektroforese. Een ander nadeel is de moeilijkheid voor de keuze van de optimale scheidingsgelmatrix, omdat de mobiliteit van de DNA-fragmenten ook afhankelijk is van andere factoren, zoals temperatuur, buffers, elektrisch veld,... Dit kan problemen veroorzaken in de praktische uitvoering van capillaire gelelektroforese (Heiger, Cohen, & Karger, 1990); (Smit, *et al.*, 2000).

**Tabel 12: Scoresheet voor capillaire gelelektroforese.**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>1</b>	<u>Number of new components:</u> <b>5</b>	<u>Technological performance:</u> <b>8</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>1</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>5</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>8</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>1</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>8</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>5</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>8</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>8</b>

### 2.3.2 Specifieke DNA-kwantificatie

De ontwikkeling van de polymerase chain reaction (PCR)-techniek in 1984 door dr. Kary Mullis bracht een radicale verandering teweeg in de DNA-analysetechnologie. Zo werden de meeste van de DNA-kwantificatietechnieken volgens de eerste benadering overbodig en was er nood aan een nieuwe aanpak in de DNA-kwantificatietechnologie, namelijk de specifieke kwantificatie voor humaan DNA in een staal (Butler, Forensic DNA Typing - Biology, Technology and Genetics of STR markers, 2005).

#### 2.3.2.1 Slot-blot kwantificatie

De eerste specifieke kwantificatieanalyse voor humaan DNA werd ontwikkeld door Waye, *et al.* (1989) en later verder uitgewerkt door Walsh, *et al.* (1992), de slot-blot kwantificatie genaamd (zie 1.3.2.1). Deze analyse maakt gebruik van een primate-specifieke probe die complementair bindt met een microsatellietsequentie op chromosoom 17 (D17Z1). Waye, *et al.* (1989) hanteerde radioactief gelabelde probes voor detectie, waar Walsh, *et al.* (1992) de methode wijzigde en commercialiseerde voor colorimetrische of chemiluminescente detectie. In het begin van deze kwantificatieanalyse was het de meest gebruikte methode voor kwantificatie in forensische laboratoria. Op dit moment wordt deze techniek nog altijd toegepast, hoewel real-time PCR de slot-blot-methode in populariteit overstijgt. Een veel gebruikte commerciële kit is de Quantiblot Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) die in 2004 werd ontwikkeld. Deze kit heeft een detectiebereik van 0.15 ng tot 10 ng humaan DNA.

In tabel 13 wordt de scoresheet weergegeven voor de radicaliteit van de innovatie. De slot-blot kwantificatie was een grote verbetering op het gebied van gevoeligheid en specificiteit ten opzichte van de UV-spectroscopie en de gelgebaseerde methodes. Toch heeft deze methode enkele nadelen. De procedure is arbeidsintensief, heeft een subjectieve interpretatie van de resultaten en de methode geeft geen goede indicatie voor de aanwezigheid van PCR-inhibitoren of degradatie van het DNA. Daarbij komt ook nog dat de methode niet vatbaar is voor automatisatie. De radicale vernieuwing van deze methode zit bijgevolg enkel in de gevoeligheid en specificiteit van de methode die op dat moment in het technologisch veld nodig was.

**Tabel 13: Scoresheet voor slot-blot kwantificatie**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>10</b>	<u>Number of new components:</u> <b>10</b>	<u>Technological performance:</u> <b>8</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>10</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>10</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>8</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>8</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>3</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>5</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>8</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>8</b>

### 2.3.2.2 Aluquant™ humaan DNA-kwantificatiesysteem

Een andere specifiek kwantificatiesysteem werd in 2001 ontwikkeld door het bedrijf Promega Corporation (Mandrekar, et al., 2001). De techniek berust op een gekoppelde enzymatische reactie om de hoeveelheid DNA te kunnen meten, waarin een humaan specifieke probe, namelijk een *Alu*-sequentie, zorgt voor de reactie die leidt tot de productie van licht (zie 1.3.2.2). In tabel 14 wordt de scoresheet van de Aluquant-methode weergegeven. De vernieuwing in de methode zit in het voordeel op de slot-blot-analyse omwille van het feit dat blotten of binden met het DNA op een vast oppervlak niet nodig is. Ook is de methode specifiek voor humaan DNA en treedt er bijgevolg geen interferentie op van niet-humaan DNA. Een ander groot voordeel is ook hier de mogelijkheid tot automatisatie door middel van een robotsysteem (Hayn, et al., 2004). Dit zorgt bijgevolg weer voor een hogere verwerkingssnelheid, een lagere arbeidsintensiviteit en lagere analysekosten. Nadelig bij het toepassen van deze methode is dat de analist steeds rekening moet houden met de stabiliteit van de enzymen. Zo kunnen mogelijke enzyminhibitoren aanwezig zijn in het staal, waardoor de enzymatische reactie niet kan opgaan en dit uiteindelijk tot foute resultaten leidt. Een ander nadeel is dat de procedure twee bemonsteringen vereist voor elk standaardstaal en elk DNA-staal. Dit heeft het gevolg dat meer werkingstijd en dubbel zoveel reagentia nodig zijn om deze analyse uit te voeren (Nicklas & Buel, 2003b).

**Tabel 14: Scoresheet voor het Aluquant™ humaan DNA-kwantificatiesysteem**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>8</b>	<u>Number of new components:</u> <b>8</b>	<u>Technological performance:</u> <b>5</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>8</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>8</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>8</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>8</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>3</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>8</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>5</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>8</b>

### 2.3.2.3 Real-Time PCR

De Real-Time PCR geeft de mogelijkheid om accuraat zowel kwaliteit als kwantiteit van het DNA in het staal te analyseren (zie 1.3.2.3). Deze kwantificatiemethode werd voor het eerst in 1992 beschreven door Higuchi en zijn medewerkers en wordt ook wel eens de kwantitatieve PCR (qPCR) genoemd (Higuchi, *et al.*, 1992); (Higuchi, *et al.*, 1993). De kwantitatieve PCR kan beschouwd worden als de meest radicale innovatie in de DNA-kwantificatietechnologie en heeft de laatste jaren sterk aan populariteit gewonnen. De methode steunt op het principe van de PCR dat al eerder werd uitgevonden in 1984 door Dr. Kary Mullis. In tabel 15 wordt de scoresheet voor deze techniek weergegeven. De populariteit van deze methode is vooral te danken aan de hoge technologische prestaties. Vooral het feit dat de kwantificatie gebeurt zonder de PCR-buisjes te moeten openen. De hoeveelheid DNA wordt cyclus per cyclus in “real-time” gemeten. Dit maakt de nood aan post-PCR analyse voor de kwantificatie van het DNA overbodig. Er kan dus geconcludeerd worden dat deze methode een originele vernieuwing bracht in de DNA-analysetechnologie met vele voordelen. De methode is accuraat, de hands-on tijd wordt gereduceerd en ook brengt deze procedure een lagere analysekost met zich mee. Het nadeel echter is dat de analyse-instrumenten voor de real-time PCR kostelijk zijn. De technologische en commerciële impact van de real-time PCR was bijgevolg groot in dit technologisch veld. Vele verschillende instrumenten kwamen op de markt voor het gebruik van real-time PCR met gebruik van commerciële kits. Ook zette deze technologie aan om steeds gevoeliger en snellere procedures te ontwikkelen om zoveel mogelijk stalen te verwerken op korte tijd voor een DNA-kwantificatie.

**Tabel 15: Scoresheet voor real-time PCR**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>10</b>	<u>Number of new components:</u> <b>10</b>	<u>Technological performance:</u> <b>10</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>1</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>10</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>10</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>10</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Broadness of impact:</u> <b>8</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>8</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>10</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>10</b>

#### 2.3.2.4 End-point PCR

Een andere PCR-methode die goedkoper, maar ook minder geraffineerd is, is de end-point PCR kwantificatieanalyse (zie 1.3.2.4). Deze PCR-gebaseerde techniek maakt gebruik van amplificatie van kleine stukjes repeterende DNA-sequenties. Zo maakte Sifis, *et al.* (2002) gebruik van de *Alu*-sequenties en later ontwikkelde Allen & Fuller (2006) een end-point PCR-methode aan de hand van het amelogenin gen. In tabel 16 wordt de scoresheet voor de end-point PCR weergegeven. De PCR-methode werd al vaker toegepast in de DNA-analyse en deze DNA-kwantificatietechniek was dus geen originele innovatie. De instrumenten die nodig zijn bij de uitvoering van dit kwantificatiesysteem zijn bijgevolg dezelfde als nodig in stap 3 voor de amplificatie. De aanschaffing van één soort machine reduceert bijgevolg de kosten. Ten opzichte van de eerdere kwantificatiemethoden, zoals de slot-blot analyse, bracht deze methode wel een vernieuwing teweeg. De techniek is zeer specifiek en het detectiebereik is zeer laag (100 pg – 2,5 ng DNA nodig). Ook was de verwerkingssnelheid hoger en bijgevolg was een snellere DNA-analyse mogelijk. In 2006 ontwikkelde Allen & Fuller (2006) een ander groot voordeel voor deze methode, namelijk de mogelijkheid om het geslacht van de DNA-donor te bepalen. Of wanneer een gemengd DNA-staal wordt geanalyseerd kunnen de relatieve proporties aan mannelijk of vrouwelijk DNA bepaald worden. Dit wordt vaak toegepast in analyses omtrent seksueel geweld.



**Tabel 16: Scoresheet voor end-point PCR**

Originality	Novelty	Impact
<u>Frequency of use in the technology field:</u> <b>3</b>	<u>Number of new components:</u> <b>8</b>	<u>Technological performance:</u> <b>8</b>
<u>Relatedness to technology domain:</u> <b>1</b>	<u>Degree of newness of components:</u> <b>10</b>	<u>Technological accumulation:</u> <b>8</b>
<u>Non-obviousness to domain expert:</u> <b>10</b>	<u>Newness of combinations of components:</u> <b>10</b>	<u>Breadth of impact:</u> <b>5</b>
	<u>Ease of recombination:</u> <b>8</b>	<u>Making obsolete of previous technology:</u> <b>5</b>
		<u>Commercial impact:</u> <b>8</b>

#### 2.3.2.5 Conclusie

Vele verschillende methoden voor DNA-kwantificatie werden beschreven. In eerste instantie waren deze analyses gericht op een eenvoudige kwantificatie van het totale DNA door gebruik te maken van UV-spectroscopie ofwel van kleurstoffen in zowel fluorescentiespectroscopie als gelelektroforese. Hierbij kon geen specifiek onderscheid gemaakt worden in de herkomst van het DNA. De introductie van de PCR-techniek heeft in deze technologie voor een radicale verandering gezorgd. Vanaf dat moment werden methoden gebruikt en ontwikkeld, die de PCR-techniek hanteerden. In dit geval kan wel humaan-specifiek en precies gewerkt worden, waarbij zowel kwantiteit als kwaliteit van het DNA, zelfs in “real-time”, gemeten kan worden. In de toekomst kan verder onderzoek gedaan worden naar nog specifiekere en gevoeligere methoden. Maar ook bestaat de mogelijkheid dat onderzoekers een methode ontwikkelen, waarbij DNA-isolatie en –kwantificatie naar één procedure wordt herleid. Dit zou zowel analysekosten als analysetijd kunnen besparen.

### 3 Conclusie

Deze masterproef heeft de belangrijke bijdragen in zowel de DNA-extractietechnologie als in de DNA-kwantificatietechnologie in kaart gebracht. Eerst werden de technieken en principes achter deze contributies besproken. Naderhand volgde een definitie voor een radicale innovatie, waarbij een radicale innovatie moet voldoen aan drie criteria. Aan de hand van deze drie criteria en het scoresheet werden de geïdentificeerde bijdragen geëvalueerd op de radicaliteit van de innovatie. Daaruit kan geconcludeerd worden dat de extractie met behulp van magnetische beads de meest radicale innovatie is geweest in de DNA-extractietechnologie. Voor de DNA-kwantificatietechnologie kan de real-time PCR beschouwd worden als de meest radicale innovatie. Bij deze methoden werd voldaan aan de drie criteria om tot een radicale innovatie te komen en werd bijgevolg de hoogste score teruggevonden.

Tenslotte wordt in tabel 17 nog een chronologisch overzicht gegeven van de belangrijke bijdragen in de DNA-isolatie- en DNA-kwantificatietechnologie. Ook worden deze contributies gelinkt aan hun overeenkomstige patentnummer, indien dit aanwezig is.

**Tabel 17: Chronologisch overzicht van DNA-isolatie- en DNA-kwantificatietechnologie**

Jaar	Technologische contributie	Grondlegger	Patentnummer of wetenschappelijk artikel
<b>1868</b>	De eerste DNA-isolatie	Miescher	(Dahm, 2008)
<b>1871-1894</b>	Miescher's ontwikkeling van protocols voor zuivere DNA-isolatie	Miescher & Schmiedeberg	(Dahm, 2008)
<b>1940</b>	Commerciële lancering UV-spectrofotometer	Beckman	EP0382343 A2
<b>1948</b>	Ontwikkeling van gelelektroforese, die later gebruikt werd voor DNA-kwantificatie	Tiselius	US3616457
<b>1951</b>	De eerste organische extractie met behulp van fenol-chloroform	Volkin & Carter	(Volkin & Carter, 1951)
<b>1959</b>	Introductie van de gelfiltratie met behulp van Sephadex®	Porath & Flodin	US3597350
<b>1966</b>	Ontwikkeling van de fluorescentiespectroscopie voor DNA-kwantificatie	Le Pecq & Paoletti	(Le Pecq & Paoletti, 1966)
<b>1985</b>	DEAE-cellulosechromatografie voor DNA-isolatie	Potter, Hanham & Nestmann	(Potter, Hanham, & Nestmann, 1985)
<b>1987</b>	Guanidinium thiocynaatfenol-chloroform extractie	Chomczynski & Sacchi	EP0554034 B1
<b>1988</b>	Uitzoutmethode voor DNA-isolatie	Miller, Dykes & Polesky	(Miller, Dykes, & Polesky, 1988)
<b>1989</b>	De eerste slot-blot DNA-kwantificatie met radioactief gelabelde probes	Waye, <i>et al.</i>	(Waye, <i>et al.</i> , 1989)

<b>1989</b>	Interfasescheiding door middel van silicagelbuisjes	Tilzer, Thomas & Moreno	US5175271 A
<b>1990</b>	Extractie met behulp van silicadeeltjes	Boom, <i>et al.</i>	EP0389063 A2
<b>1990</b>	FTA <sup>TM</sup> -paper extractie	Burgoyne & Fowler,	WO2002072870 A3
<b>1991</b>	CHELEX®100-extractie	Walsh, Metzger, & Higuchi	(Walsh, Metzger, & Higuchi, 1991)
<b>1992</b>	Wijziging van de slot-blot DNA-kwantificatie voor colorimetrische of chemiluminescente detectie	Walsh, <i>et al.</i>	(Walsh, Varlaro, & Reynolds, 1992)
<b>1992-1993</b>	Ontwikkeling van de Real-Time PCR (qPCR)	Higuchi, <i>et al.</i>	US6814934 B1
<b>1997</b>	Ontwikkeling van Picogreen en Oligreen voor DNA-kwantificatie	Singer, <i>et al.</i>	(Singer, <i>et al.</i> , 1997)
<b>1998</b>	Extractie met behulp van Spin Columns	Greenspoon, <i>et al.</i>	WO 2005045030 A1
<b>2000</b>	Extractie door middel van een matrix mill	Weeden, Loomis & Celeste	US6063616 A
<b>2001</b>	Aluquant <sup>TM</sup> humaan DNA-kwantificatiesysteem	Mandrekar, <i>et al.</i>	WO2000049182 A3
<b>2002</b>	End-point PCR met gebruik van <i>Alu</i> -sequenties	Sifis, <i>et al.</i>	US7537889 B2
<b>2003</b>	Automatisatie van de Spin Column extractie	Hanselle, <i>et al.</i>	WO2009144182 A1
<b>2004</b>	Magnetische bead-extractie	Tereba, <i>et al.</i>	US6673631 B1
<b>2004</b>	Automatisatie van de magnetische bead-extractie	Greenspoon, <i>et al.</i>	(Greenspoon, <i>et al.</i> , 2004)
<b>2004</b>	Automatisatie van het Aluquant <sup>TM</sup> kwantificatiesysteem	Hayn, <i>et al.</i>	(Hayn, <i>et al.</i> , 2004)
<b>2006</b>	End-point PCR met gebruik van amelogenin gen (Q-TAT)	Allen & Fuller	WO2012040326 A1
<b>2007</b>	Extractiemethode met behulp van dendrimeren	Fukushima, <i>et al.</i>	US7241624 B2

Legende:  Bijdragen in DNA-isolatie  
 Bijdragen in DNA-kwantificatie



## Bibliografie

- Allen, R. W., & Fuller, V. M. (2006). Quantitation of Human Genomic DNA Through Amplification of the Amelogenin Locus. *Journal of Forensic Sciences*, 76-81.
- Andreasson, H., Gyllensten, U., & Allen, M. (2002). Real-Time DNA Quantification of Nuclear and Mitochondrial DNA in Forensic Analysis. *BioTechniques*, 402-411.
- Beckman Coulter. (2013). *Agencourt DNAdvance - Nucleic Acid Isolation from Mammalian Tissue*. Opgeroepen op April 9, 2013, van Beckman Coulter: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/nucleic-acid-sample-preparation/agencourt-dnadvance-nucleic-acid-isolation-from-mammalian-tissue/index.htm>
- Benson, G. A. (2007). *Improved Quantitation of Human DNA Using Quantitative Template Amplification Technology*. Oklahoma: Oklahoma State University.
- Boom, R., Sol, C., Salimans, M., Jansen, C., Wertheim-van Dillen, P., & Van Der Noordaa, J. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 495-503.
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA Typing - Biology, Technology and Genetics of STR markers*. Burlington, USA: Elsevier.
- Butler, J. M. (2011). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. USA: Elsevier.
- Carpi, F. M., Di Pietro, F., Vincenzetti, S., Mignini, F., & Napolioni, V. (2011). Human DNA Extraction Methods: Patents and Applications. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 1-7.
- Chee Tan, S., & Chin Yiap, B. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-10.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, 156-159.
- Dahlin, K. B., & Behrens, D. M. (2005). When is an invention really radical? Defining and measuring technological radicalness. *Research Policy*, 717-737.
- Dahm, R. (2008). Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics*, 565-581.
- DNASOLUM. (2013). *Mogelijkheden van DNA-analyses*. Opgeroepen op Maart 3, 2013, van DNASOLUM: [http://www.dnasolum.nl/Mogelijkheden\\_van\\_DNA-analyses](http://www.dnasolum.nl/Mogelijkheden_van_DNA-analyses)

- Fukushima, K., Satou, S., Matsunaga, T., & Takeyama, H. (2007). *Patentnr. US 7,241,624 B2*. United States.
- Greenspoon, S., Ban, J., Sykes, K., Ballard, E., Edler, S., Baisden, M., et al. (2004). Application of the BioMek®2000 Laboratory Automation Workstation and the DNA IQ system to Extraction of Forensic Casework Samples. *Journal of Forensic Sciences*, 1-11.
- Greenspoon, S., Scarpetta, M., Drayton, M., & Turek, S. (1998). QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. *Journal of Forensic Sciences*, 1024-1030.
- Hanselle, T., Otte, M., Schnibbe, T., Smythe, E., & Krieg-Schneider, F. (2003). Isolation of genomic DNA from buccal swabs for forensic analysis, using fully automated silica-membrane purification technology. *Legal Medicine*, 145-149.
- Hayn, S., Wallace, M., Prinz, M., & Shaler, R. (2004). Evaluation of an automated liquid hybridization method for DNA quantitation. *Journal of Forensic Sciences*, 87-91.
- Heiger, D. N., Cohen, A. S., & Karger, B. L. (1990). Separation of DNA restriction fragments by high performance capillary electrophoresis with low and zero crosslinked polyacrylamide using continuous and pulsed electric field. *Journal of Chromatography*, 33-48.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Biotechnology*, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR: Real time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnology*, 1026-1030.
- Hopwood, A., Brookes, J., Shariff, A., Cage, P., Tatum, E., Mirza, R., et al. (1997). A Fully Integrated Robotic System for High Sample Throughput Within a DNA Databasing Unit. *BioTechniques*, 18-20.
- Invitrogen. (2013). *TaqMan® Chemistry vs. SYBR® Chemistry for Real-Time PCR*. Opgeroepen op mei 9, 2013, van Life Technologies: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/PCR/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>
- Janson, J.-C. (1987). On the History of the Development of Sephadex®. *Chromatographia*, 361-365.
- Le Pecq, J.-B., & Paoletti, C. (1966). A New Fluoremetric Method for RNA and DNA Determination. *Analytical Biochemistry*, 100-107.
- Mandrekar, M., Erickson, A., Kopp, K., Krenke, B., Mandrekar, P., Nelson, R., et al. (2001). Development of a Human DNA Quantitation System. *Croatian Medical Journal*, 336-339.

- Miller, S., Dykes, D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*, 1215.
- Mullis, D. K. (2009). *Polymerase Chain Reaction*. Opgeroepen op April 30, 2013, van Dr. Kary Banks Mullis: <http://www.karymullis.com/pcr.shtml>
- National Forensic Science Technology Center. (2003). *National Forensic Technology Center*. Opgeroepen op April 4, 2013, van DNA Extraction & Quantitation: [http://www.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi\\_s03.htm](http://www.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03.htm)
- Ness, J. V., Cimler, M., Meyer Jr., R. B., & Vermeulen, N. M. (1995). *Patentnr. 5393672*. USA.
- Nicklas, J., & Buel, E. (2003c). Development of an Alu-based Real-Time PCR Method for Quantitation of Human DNA in Forensic Samples. *Journal of Forensic Sciences*, 936-944.
- Nicklas, J. A., & Buel, E. (2003b). Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 1160-1167.
- Nicklas, J., & Buel, E. (2003a). Development of an Alu-based, QSY 7-labeled primer PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. *Journal of Forensic Science*, 282-291.
- Porath, J., & Flodin, P. (1959). Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. *Nature*, 1657-1659.
- Potter, A. A., Hanham, A. F., & Nestmann, E. R. (1985). A rapid method for the extraction and purification of DNA from human leukocytes. *Cancer Letters*, 335-341.
- QIAGEN. (2008). *QIAGEN Sample and Assay Technologies*. Opgeroepen op April 20, 2013, van QIAamp® genomic DNA kits: [www.qiagen.com/.../Download.aspx?id...lang...](http://www.qiagen.com/.../Download.aspx?id...lang...)
- Shaw, P.-C., Wong, K.-L., Chan, A. W., Wong, W.-C., & But, P. P. (2009). Patent applications for using DNA technologies to authenticate medicinal herbal material. *Chinese Medicine*, 4-21.
- Sifis, M., Both, K., & Burgoyne, L. (2002). A more sensitive method for the quantitation of genomic DNA by Alu amplification. *Journal of Forensic Sciences*, 589-592.
- Singer, V. L., Jones, L. J., Yue, S. T., & Haugland, R. P. (1997). Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation. *Analytical Biochemistry*, 228-238.
- Smit, M., Linssen, P., Giesendorf, B., Trijbels, J., Blom, H., & Kuypers, W. (2000). Capillaire Elektroforese en DNA-fragmentanalyse. *Klinische Chemie*, 239-243.
- Smith, L., & Burgoyne, L. (2004). Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. *BMC Ecology*, 4:4 1-11.

- Tereba, A. M., Bitner, R. M., Koller, S. C., Smith, C. E., & Ekenberg, S. J. (2004). *Patentnr. 6673631*. USA.
- Tilzer, L., Thomas, S., & Moreno, R. F. (1989). Use of Silica Gel Polymer for DNA Extraction with Organic Solvents. *Analytical Biochemistry*, 13-15.
- Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischler, E., Rutter, W., et al. (1977). Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science*, 1313-1319.
- UZ Leuven. (2013). *DNA-identificatieonderzoek*. Opgeroepen op Maart 3, 2013, van UZ Leuven Forensische Geneeskunde : <http://www.uzleuven.be/forensische-geneeskunde/dna-identificatieonderzoek>
- Volkin, E., & Carter, C. (1951). The Preparation and Properties of Mammalian Ribonucleic Acids. *Journal of The American Chemical Society*, 1516-1519.
- Walsh, P., Metzger, D., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 506-513.
- Walsh, S. P., Varlaro, J., & Reynolds, R. (1992). A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA. *Nucleic Acids Research*, 5061-5065.
- Waye, J., Presley, L., Budowle, B., Shutler, G., & Fournay, R. (1989). A simple and sensitive method for quantifying human genomic DNA in forensic specimen extracts. *BioTechniques*, 852-855.
- Weeden, N. F., Loomis, D., & Celeste, J. A. (2000). *Patentnr. 6063616*. New York, USA.
- Wolfe, K., Breadmore, M., Ferrance, J., Power, M., Conroy, J., Norris, P., et al. (2002). Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids. *Electrophoresis*, 727-733.



## Bijlage

Originality	Novelty	Impact
<p>The (scientific) principles which are used for this invention to serve its purpose, have not been used in this technological field before.</p> <p><u>Frequency of use in the technology field:</u> 1= have frequently been used in the field; 10= have never been used in the field</p>	<p>Compared to previous inventions in the field (having a similar purpose), a lot of new components were used for this invention</p> <p><u>Number of new components:</u> 1=no new components; 10=all components are new</p>	<p>Compared to the state-of-the-art previous technology, this technology drastically improves performance on existing performance attributes (features used to assess the extent to which technological goals are reached) or launches important new performance attributes</p> <p><u>Technological performance:</u> 1=no performance increase; 10=high performance increase</p>
<p>The (scientific) principles which are used for this invention to serve its purpose, have been used up to this moment in time, in unrelated technology domains or not at all</p> <p><u>Relatedness to technology domain:</u> 1= in technology domains close to the one at hand; 10= never used before in any domain</p>	<p>These new components (if there are new components) were previously not in the set of components considered for reaching the goal of this invention and are very different from components that are traditionally used in the field</p> <p><u>Degree of newness of components:</u> 1=are not different from those used before; 10=are very different from those used before)</p>	<p>This invention led to important further inventions in the same technological field which improved performance drastically</p> <p><u>Technological accumulation:</u> 1=it did not initiate any further inventions in the field which improved technological performance; 10=it initiated and made possible important further inventions in the technological field</p>
<p>The idea of using these (scientific) principles for this purpose is non-obvious, it testifies of 'out-of-the-box thinking' of the inventor(s)</p> <p><u>Non-obviousness to domain expert:</u> 1=the idea is a logical step from the state-of-the-art knowledge in the field; 10=it was very difficult to envision the use of this principle for domain experts.</p>	<p>The way in which the components of the invention interact to serve the goal are very different from the way they traditionally interact to serve the goals of technologies in the domain.</p> <p><u>Newness of combinations of components:</u> 1=the ways the components interact are not different from the ways they usually interact in technological field; 10=the ways the components interact are entirely new compared to the state-of-the-art in the field.</p>	<p>This invention yielded a lot of technological progress in technological fields different from its own technological field</p> <p><u>Broadness of impact:</u> 1=it did not make possible any technological progress outside its field; 10=it made possible a lot of technological progress in fields different from its own.</p>
	<p>The way in which the components are combined to serve the purpose of the invention is difficult to implement.</p> <p><u>Ease of recombination:</u> 1=not difficult to combine the components in this way; 10=very difficult to implement this combination).</p>	<p>This invention made obsolete a lot of previous technologies, these technologies were not used for this goal anymore.</p> <p>1=no previous technology was made obsolete; 10=a lot of previous technology was made obsolete.</p>
		<p>This invention triggered the production of applications that created a lot of value for the end user</p> <p><u>Commercial impact:</u> 1=no value created through application in (a) product(s); 10=a lot of value created through application in (a) product(s).</p>



**FACULTEIT ECONOMIE EN BEDRIJFSWETENSCHAPPEN**

Naamsestraat 69 bus 3500  
3000 LEUVEN, BELGIË  
tel. + 32 16 32 66 12  
fax + 32 16 32 67 91  
info@econ.kuleuven.be  
www.econ.kuleuven.be

