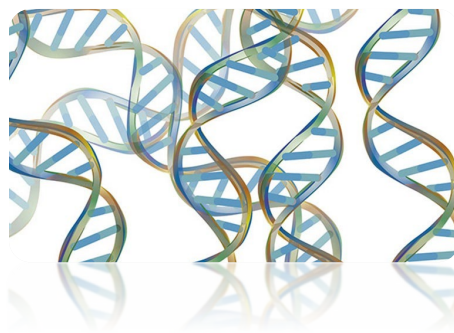




Het burgerwetenschappen  
project: Bodemleven  
*Hoe gezond is jouw bodem?*

# Practicum: Bodemleven karakterisatie met DNA sequencing



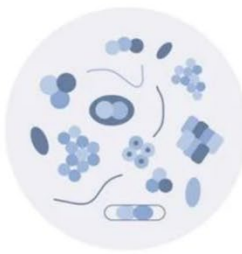
Handleiding



Bacteriën



Schimmels



Algen



Protisten



Nematoden

## INHOUDSTAFEL

### Deel 1: Biotechnologie: DNA-extractie, DNA-amplificatie en visualisatie

Pagina	Inhoud
<b>4</b>	<b>Overzicht</b>
<b>5</b>	<b>Inleiding</b>
	Wat is DNA & DNA-structuur
	DNA in cellen
	Bodemleven en bodemvoedselweb
	Next-generation-sequencing
	Het bodemleven project
<b>13</b>	<b>Doelstellingen</b>
<b>14</b>	<b>Onderzoeksvragen</b>
<b>15</b>	<b>Pre-staalname vragen</b>
<b>21</b>	<b>Technisch overzicht DNA-extractie</b>
	Pipeteer oefening
	Pre-labo vragen
	DNA extractie bench protocol
	Post-labo vragen
<b>28</b>	<b>Technisch overzicht PCR</b>
	Pre-labo vragen
	PCR reactie bench protocol
	Post-labo vragen
<b>35</b>	<b>Technisch overzicht gel-electroforese</b>
	Pre-labo vragen
	Gel loading bench procedure
	Post-labo vragen

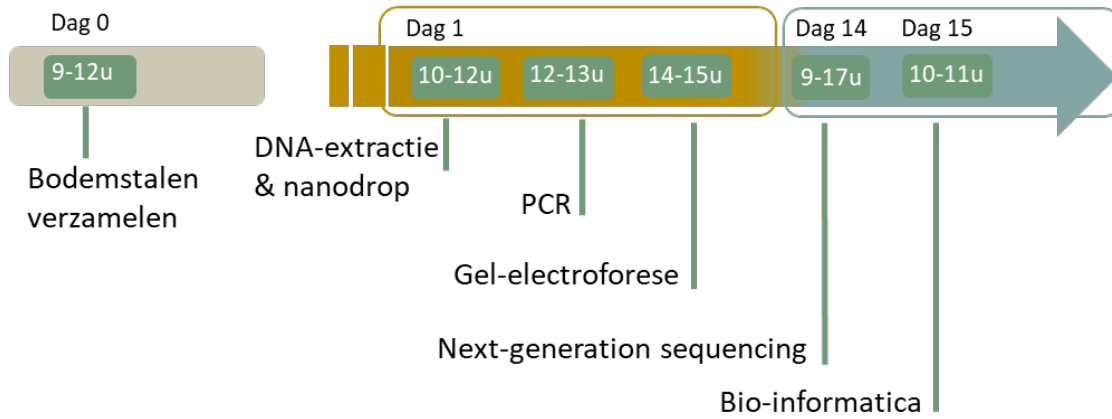
## Deel 2: Sequencing en bio-informatica

Pagina	Inhoud
<b>42</b>	<b>Technisch overzicht next generation sequencing</b>
	Pre-labo vragen
	Sequencing virtueel labo
	Post-labo vragen
<b>49</b>	<b>Technisch overzicht bio-informatica</b>
	Bio-informatica analyse
	Post-labo vragen
<b>52</b>	<b>Bodemstaal rapport</b>
<b>53</b>	<b>Databank aanvullen</b>



Het burgerwetenschappen project 'Bodemleven': hoe gezond is jouw bodem? is een samenwerkingsproject tussen het Onderzoekscentrum RegioAnalyse (ORA) van UHasselt, het Centrum voor MilieuKunde (CMK), Het Belang van Limburg (HBvL), Departement Omgeving en ORANGE. Het project wordt geleid door postdoc onderzoeker S. Thijs van het CMK. Het project loopt van 18 juni 2023 tot 24 maart 2024. Het doel van het project is samen met duizend Limburgers, 20 scholen, en een team van internationale onderzoekers het bodemleven in 1000 Limburgse tuinen in kaart te brengen, te analyseren, op te volgen en zo mogelijk te verbeteren.  
<https://www.bodemleven.be>

## OVERZICHT

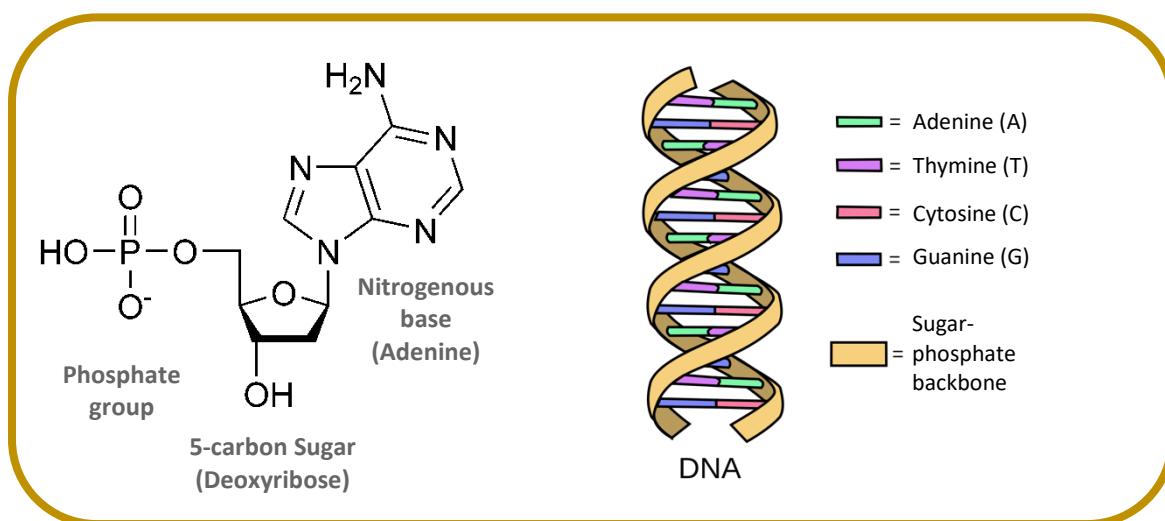


**Figuur 1: Overzicht practicum modules.**

## INLEIDING

### Wat is DNA

Desoxyribonucleïnezuur, of DNA, is een zelfreplicerend molecule dat de genetische informatie draagt voor bijna alle levende organismen. DNA bestaat uit monomeren, genaamd nucleotiden. Elk nucleotide bestaat uit (i) een vijfkoolstofsuiker (deoxyribose), (ii) een fosfaatgroep en (iii) een stikstofhoudende base (**Figuur 2**). Nucleotiden worden onderscheiden door hun gekoppelde stikstofhoudende base: adenine (A), thymine (T), guanine (G) of cytosine (C). Adenine en guanine worden geclassificeerd als purines; cytosine en thymine worden geclassificeerd als pyrimidines. De nucleotiden zijn verbonden via fosfodiësterbindingen om lange strengen DNA te vormen, waarbij de volgorde van nucleotiden langs de suiker-fosfaatruggegraat de DNA-sequentie bepaalt.



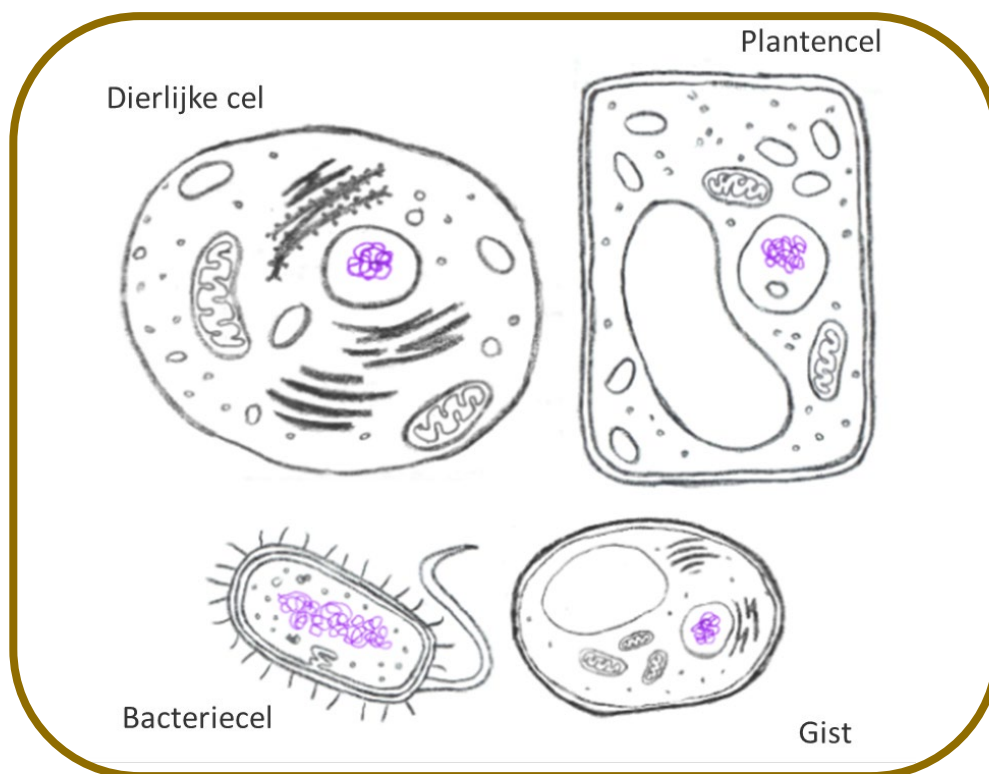
**Figuur 2:** links: Nucleotide structuur bestaande uit een fosfaat groep, suiker (deoxyribose) en N-base. Rechts: DNA dubbel helix structuur bestaande uit een hydrofiel suiker-fosfaat ruggengraat en hydrofobe N-base paren. Figuren van Wikimedia Commons.

### DNA structuur

Een enkele streng DNA is asymmetrisch en heeft daarom een specifieke methode om te combineren met een tweede DNA-streng. De suiker- en fosfaatgroep zijn beide hydrofiel en zullen gemakkelijk in contact komen met watermoleculen binnen een cel, terwijl de stikstofhoudende basen hydrofoob zijn en samen zullen groeperen. De twee

DNA-strengen kunnen hun hydrofiele en hydrofobe kant verzoenen door hun stikstofhoudende basen naar binnen te richten en hun hydrofiele suikers en fosfaatgroepen naar buiten. De stikstofhoudende basen worden bijeengehouden door waterstofbruggen, die de vorm van de DNA-ladder hebben. Deze basenparen worden gevormd wanneer een pyrimidine bindt met een purine. Specifiek vormt adenine een basenpaar alleen met thymine via twee waterstofbruggen, en cytosine vormt een basenpaar alleen met guanine via drie waterstofbruggen (**Figuur 2**). Een scheefstand en een twist van de strengen DNA laten zo min mogelijk water toe tussen de stikstofhoudende basen, wat resulteert in de bekende dubbele helixvorm van het dubbelstrengs DNA (dsDNA)-molecule.

## DNA in cellen



**Figuur 3: Schetsen van een dierlijke cel, plantencel, bacteriecel en gistcel met DNA gehighlight in het paars.** Van: <https://www.collectedny.org/frameworkposts/comparing-four-cells-animal-plant-bacteria-yeast/>

DNA zit meestal niet 'los' in de bodem maar zit vervat in cellen. Cellen zijn de microscopische bouwstenen van eencellige of meercellige levende organismen zoals

de eukaryoten: planten, dieren, algen, schimmels, en eencellige prokaryoten zoals bacteriën en oerbacteriën.

Dierlijke, schimmel- en plantencellen bevatten allemaal structuren die organellen worden genoemd. Deze zijn gespecialiseerd voor specifieke functies. De bovenstaande diagrammen in **Figuur 3** tonen de overeenkomsten en verschillen tussen de ultrastructuur van dierlijke cellen, plantencellen, bacteriën en gist. Basiskenmerken zoals kernen, cytoplasma, DNA, celmembranen, celwanden, enzovoort, zijn niet allemaal aanwezig in elk celtype. Via deze link (<https://icell.hudsonalpha.org/icell.html>) kan je de cellen ook in 3D bekijken en zoeken/klikken waar het DNA is gelokaliseerd en de andere organellen. Duidt dan de organellen zoals celwand, celmembraan, mitochondriën, chloroplast verder aan op de figuur.

Bacteriële cellen hebben een eenvoudigere structuur vergeleken met dierlijke, plantaardige en schimmelcellen, en zijn meestal veel kleiner (micrometers). Ze hebben nog steeds een celmembraan en ribosomen, maar ze missen organellen zoals de kern. Hun celwand is gemaakt van een ander materiaal en heeft een andere structuur dan die van planten- en schimmelcellen. Bacteriën hebben meestal 1 of meerdere circulaire supercoiled DNA-moleculen, en 1 of meerdere kleinere stukken DNA die plasmiden (mobiele DNA-fragmenten) worden genoemd.

## Bodemleven en bodemvoedselweb

Wanneer je buiten wandelt en je voeten de grond raken, realiseer je je misschien niet dat je staat op het dichtstbevolkte habitat op aarde. De bodem herbergt een enorme hoeveelheid en diversiteit aan organismen. Er leven meer organismen in één gram bodem dan er mensen zijn op deze planeet. Deze drukbevolkte gram wordt bewoond door tot wel 10 miljard bacteriën, meters schimmelhyfen, en een grote verscheidenheid aan nematoden, regenwormen, protisten en geleedpotigen (**Tabel 2**) (Bardgett en van der Putten 2014; Raynaud en Nunan 2014). Lange tijd beschouwden mensen de bodem als een black box, omdat we niet in staat waren om het exacte leven dat erin aanwezig was, te karakteriseren. De voornaamste reden voor deze onwetendheid is dat slechts 1-5% van de bodembacteriële populatie cultiveerbaar is, en dit percentage wordt zelfs lager geschat voor schimmels (Bakken 1997; Janssen et al. 2002; van Elsas et al. 2000).

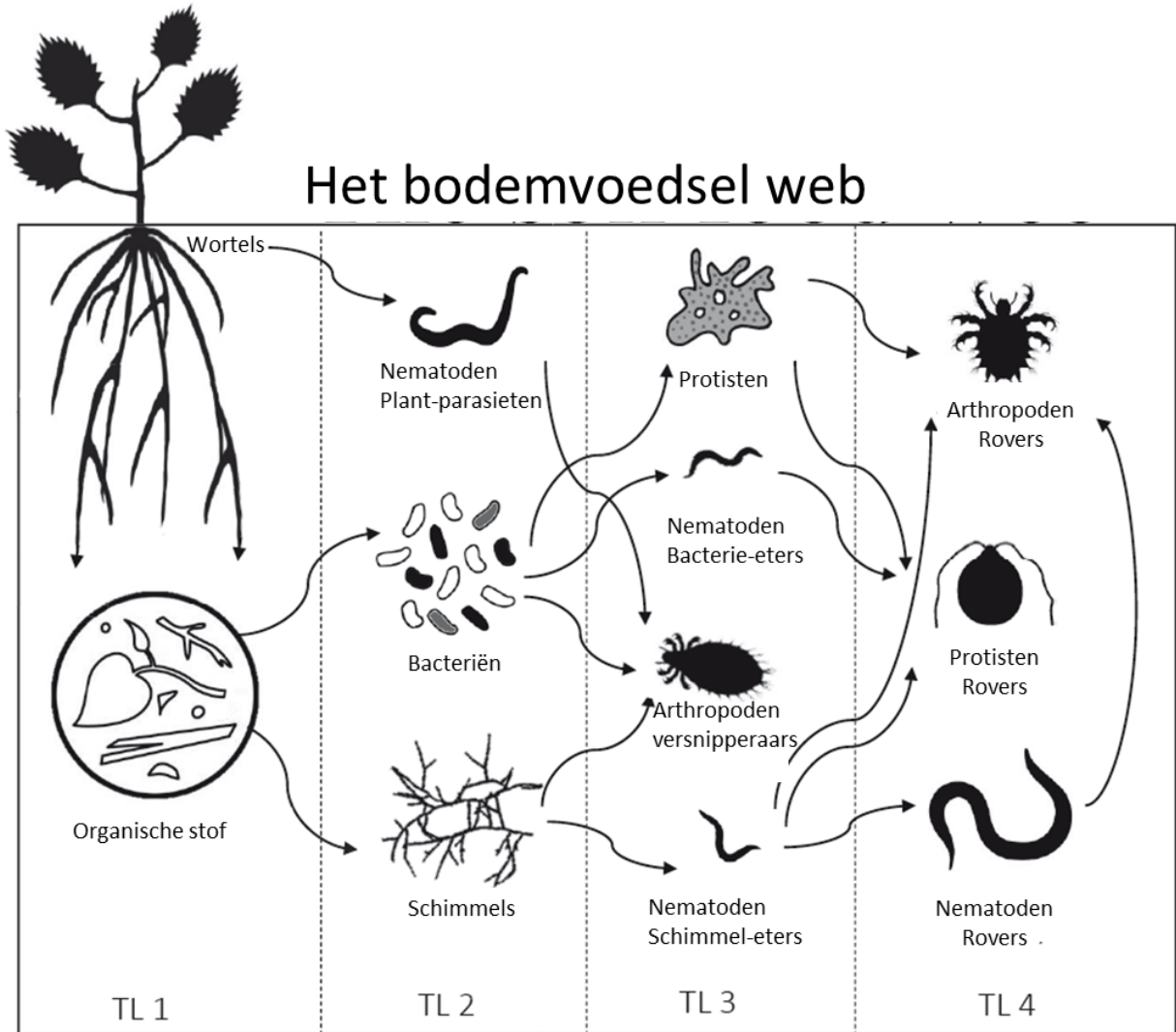
**Tabel 1** geeft een idee van de aantallen en groepen bodemleven, verdeeld op basis van grootte, die men kan aantreffen onder 1 voetstap op een gezonde landbouwgrond. De meeste van deze bodemorganismen leven in de micro- en macroporiën van de bodem. Het volume van minerale bodems kan voor wel 50% uit poriën bestaan in kleigrond en neemt af met een toenemende hoeveelheid silt en zand.

**Tabel 2: Het bodemleven onder één voetstap op een gezonde landbouwgrond.**

Groep	Aantal	Biomassa (gram per vierkante meter)
<b>Microfauna/flora</b>		
Bacteriën	10 – 1000 biljoen	100 - 700
Schimmels	10 miljard – 10 biljoen	100 - 500
Protozoën	100 miljoen – 10 miljard	6 - 30
Nematoden	100 duizend – 10 miljoen	5 - 50
<b>Mesofauna</b>		
Mijten	2.100 – 41.000	0.2 – 4
Springstaartjes	2.100 - 41.000	0.2 - 4
<b>Macrofauna</b>		
Insectenlarven	Tot 50	< 4.5
Regenwormen	Tot 50	30 - 200

Alle organismen in de bodem zijn op verschillende manieren aan elkaar gerelateerd. Die onderlinge samenhang heet een voedselweb. Net als boven de grond is het onder de grond een kwestie van eten en gegeten worden. Grofweg heeft het bodemvoedselweb een trapsgewijze opbouw (**Figuur 4**). Bacteriën en schimmels vormen vaak een eerste stap bij de afbraak van organisch materiaal. Protisten, schimmel- en bacterie-etende nematoden, potwormen en schimmeletende mijten en springstaarten zetten de volgende stap. Vervolgens worden deze organismen gegeten door carnivore nematoden, mijten en springstaarten. Duizendpoten, mollen en muizen zijn de laatste ondergrondse trap. Regenwormen, pissebedden, potwormen en plantenetende nematoden eten (ook) rechtstreeks organisch materiaal.



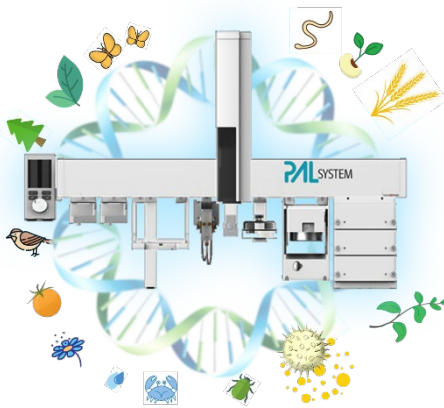


**Figuur 4: het bodemvoedselweb.** Bron: Bodembreed Interreg.

Bodemorganismen spelen een cruciale rol in talrijke functies waar we afhankelijk van zijn voor voedsel, vezels, menselijke gezondheid en de gezondheid van de omgeving. Een goed functionerend bodemvoedselweb vervult namelijk verschillende functies bijvoorbeeld voedingsstoffencycli, bevordering van plantproductiviteit, ziekte weerbaarheid, koolstofopslag, waterhoudend vermogen (Neher 1999). Ondanks het belang van bodemleven hebben we nog maar weinig tot geen inzicht in de biodiversiteit in Limburgse bodems en bij uitbreiding heel Vlaanderen en België. Recente moleculaire technieken, zoals DNA-isolatie en high-throughput sequencing hebben laten zien dat de bodem waarschijnlijk de thuisbasis is van meer dan 59% van het leven, met andere woorden het is het meest biodiverse habitat op aarde. De identificatie van bodemleven wordt daarom beschouwd als een belangrijke uitdaging

voor vele wetenschappers. Onze en jullie inzet hieraan, kan belanghebbenden in staat stellen om kwantitatief te pleiten voor het behoudt van de gezondheid van bodems, te midden van de biodiversiteitscrisis.

## Next-generation sequencing



DNA-sequencing heeft sinds de dagen van tweedimensionale chromatografie in de jaren 1970 grote vooruitgang geboekt. Met de komst van de Sanger-methode in 1977 kregen wetenschappers de mogelijkheid om DNA op een betrouwbare en reproduceerbare manier te sequencen. Een decennium later introduceerde Applied Biosystems de eerste geautomatiseerde, op capillaire elektroforese (CE) gebaseerde sequencers die gebruikt werden om het menselijk genoom te sequencen (Human Genome Projects). Terwijl deze "eerste generatie" instrumenten als hoog doorvoer werden beschouwd voor hun tijd, kwam de Genome Analyzer in 2005 op de markt en verhoogde de sequentieruns van 84 kilobase (kb) per run naar 1 gigabase (Gb) per run. Deze short-read, massive-parallel sequencingstechniek was een fundamenteel andere benadering die de sequentiemogelijkheden revolutioneerde. Vanaf dat moment is de gegevensoutput van **next-generation sequencing (NGS)** meer dan verdubbeld per jaar.

### De basisprincipes van NGS-chemie van Illumina

In principe is het concept achter NGS-technologie vergelijkbaar met capillaire elektroforese-sequentiebepaling. DNA-polymerase katalyseert de incorporatie van fluorescent gelabelde deoxyribonucleotidetrifosfaten (dNTP's) in een DNA-template tijdens opeenvolgende cycli van DNA-synthese. Tijdens elke cyclus worden de nucleotiden geïdentificeerd door fluorofoor-excitatie op het punt van incorporatie. Het kritische verschil is dat NGS, in plaats van een enkel DNA-fragment te sequencen, dit proces uitbreidt over **miljoenen fragmenten op een massaal parallelle manier**.

Meer dan 90% van de sequencing-gegevens ter wereld worden gegenereerd door Illumina-sequentiebepaling via synthesesetchnologie (SBS). Het levert hoge nauwkeurigheid, een hoog rendement van foutvrije lezingen en een hoog percentage basen-calls boven Q30.

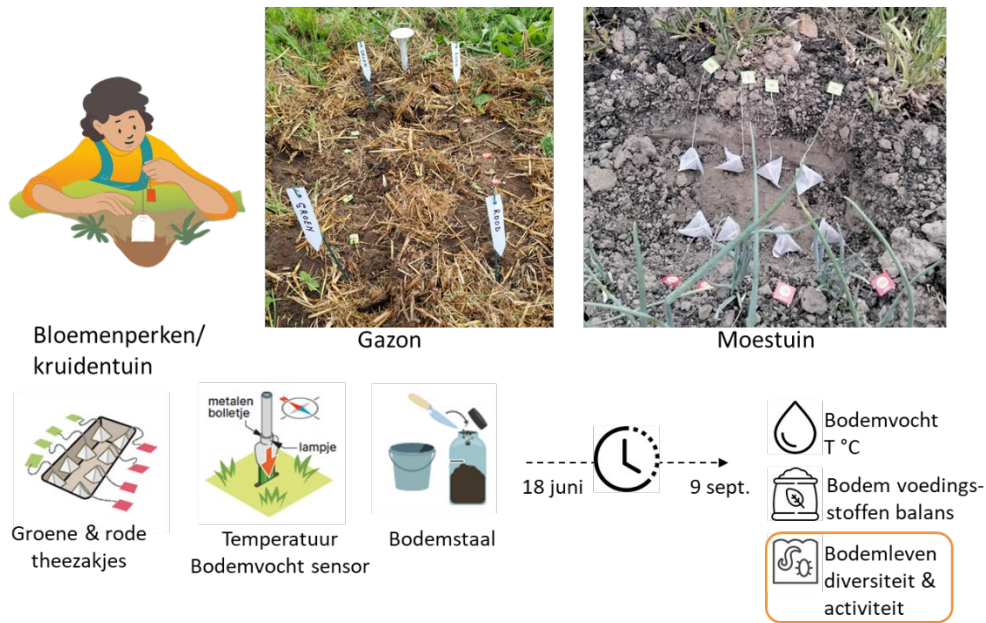
## Het Bodemleven project

Hoe gezond is jouw bodem? Dat is de centrale vraag van het burgerwetenschappen project Bodemleven (2023-2024) die samen met 1000 burgers wordt onderzocht. De bodem onder onze voeten is letterlijk nog te veel een 'black box', wie leeft er, wat doen ze, waarom komen ze er voor. Wij zijn als mens heel erg afhankelijk van de bodem voor onze voedselvoorziening, vezels en materialen, kortom onze algehele gezondheid en welzijn. Klimaatverandering met langere periodes van droogte, hittegolven, bodemverontreiniging, verzouting, en grotere druk door ziekteverwekkers zijn 'stress' factoren die plantengroei en kwaliteit negatief beïnvloeden. Als we duurzame tuinen, landbouw, akkers, gazons willen in de toekomst moeten we goed begrijpen welke invloeden deze externe factoren hebben op de plant, maar ook op de bodem, en het bodemleven.

In dit project willen we voor het eerst inzichten verwerven in het bodemleven op grote schaal. Dit wordt uitgevoerd met een heel eenvoudig hulpmiddel, theezakjes. Op 18 juni werden 1000 bodemkits uitgedeeld en 8000 theezakjes, 4000 rode en 4000 groene theezakjes in een plekje in de tuin onder de grond begraven. Daarnaast werd er een tuindolk/sensor in de grond geplaatst die de bodemtemperatuur, vocht, en luchttemperatuur elke 15 min meet. Gedurende 3 maanden (juli-aug-september) konden bodem-microben zich te goed doen aan de thee, en slinkt de inhoud. Op het einde van de meetcampagne (9/9/2023), werden de theezakjes terug opgegraven en naar het labo gestuurd voor het eind gewicht te bepalen. Hoe minder er van de thee overblijft, hoe actiever je bodemleven. Van elke plek waar de thee was opgegraven werd ook een bodemstaal genomen voor voedingsstoffen analyse. De data van de dolken werd uitgelezen.

Waar wij specifiek in geïnteresseerd zijn is welke bacteriën en schimmels uit de bodem de thee hebben aangetast, welke organismen zijn actief in het omzetten van organische stof naar bruikbare voedingsstoffen voor de plant. Hoe is het gesteld met de biodiversiteit van de bodem op jouw school? Op welk plekje verwacht je het rijkste

bodemleven terug. Op welke plekken het minst, en kan je factoren aangeven die daar de oorzaak van kunnen zijn?



**Figuur 5: Schets van de staalname plekken en gebruikte meetinstrumenten voor bodemleven.**

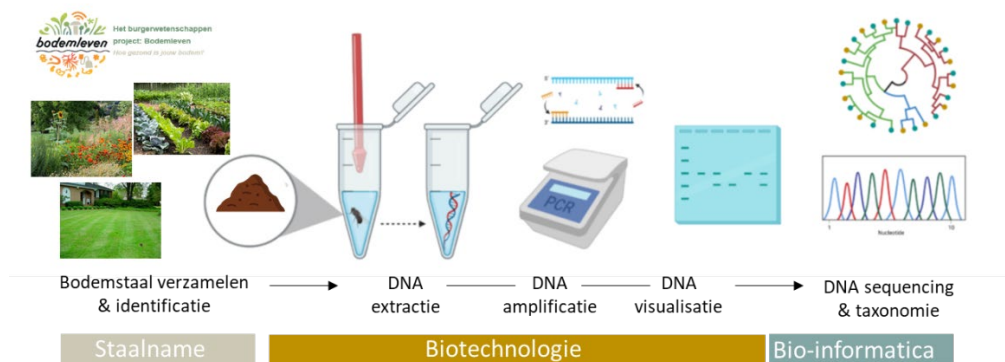
## DOELSTELLINGEN

Bodemleven brengt wetenschappelijk onderzoek op een toegankelijke manier naar de klas, via gerichte onderzoeksvragen, ontdekkingen, DNA-technologie en bio-informatica. Samen met je leerkracht en klasgenoten draag je door hands-on onderzoek bij aan het verzamelen van wetenschappelijke data binnen het bodemleven project.

In deze reeks practica ontdek je het bodemleven op jouw school door te leren hoe je DNA uit bodemmonsters haalt, het DNA vermenigvuldigt met de polymerasekettingreactie (PCR), visualiseert, sequeneert en hoe je de resultaten van de sequentieanalyse kunt interpreteren. Je kunt DNA-sequenties verkrijgen van nieuwe bacterie- en schimmelsoorten en je bestudeert hun fylogenetische verwantschap en vergelijkt deze met sequenties die door andere (inter)nationale onderzoekers zijn gepubliceerd in de NCBI genetische databank. Een DNA-barcode of amplicon is een kort stukje DNA-sequentie dat wordt gebruikt om levende organismen te identificeren. Voor taxonomische identificatie is het meestal een specifieke regio van het genoom dat wordt geamplificeerd en geanalyseerd. DNA-barcoding kan worden toegepast om de biodiversiteit in de bodem te bepalen, maar ook om menselijke invloeden op het milieu te onderzoeken, evenals ecologie, voedselveiligheid, en nog veel meer.

De vier hoofddoelen zijn:

- Engageer studenten in biologie, fundamenteel en toegepast onderzoek
- Stimuleer een participatief effort in de verzameling van nieuwe wetenschappelijke gegevens over bodemleven in Limburgse school-bodems.
- Vergroot de interesse van de studenten in wetenschap door geïntegreerde series van labo's over biodiversiteit en moleculaire biologie aan te bieden
- Geef studenten een idee was het is om een moleculair bioloog, geneticus te zijn.



**Figuur 6: Gebruikte methodes**

## ONDERZOEKSVRAGEN

1. Hoe rijk is het bodemleven in jouw schoolbodem?
2. Op welk plekje verwacht je de meeste biodiversiteit, en waar minder?
3. Is er een verschil tussen bodemstalen genomen in het grasveld vs een bloemenperk/  
moestuin op school?
4. Misschien heb je wel een experiment gedaan op school waarbij in 1 bak aardbeien  
worden geteeld met compost, en in een andere bak, aardbeien zonder compost. Wat  
effect zou de compost toevoeging hebben op het bodemleven?
5. Welke soorten, genera, families van bacteriën, schimmels, protisten, rondwormen  
gaan we vinden in de bodem en wat is hun mogelijke rol?
6. Komen de soorten altijd voor, of zijn sommige er enkel in de winter, lente, herfst of  
zomer
7. Wat kan het effect zijn van langdurige droogte op het bodemleven?
8. Wat zijn de gevolgen van een verstoord bodemleven op de bodemkwaliteit,  
vruchtbaarheid, en groei van de planten?

## PRE-STAAALNAME VRAGEN

**Lees door de hele handleiding en beantwoord de volgende vragen:**

1. Bekijk deze video over de rol van het plant-microbioom: "<https://www.youtube.com/watch?v=-dhdUoK7s2s>". Nadat je het helemaal hebt uitgekeken, haal 1 of 2 quotes uit de video die voor jou eruit sprongen. Schrijf dan een verklaring of extra uitleg waarom je de quote hebt gekozen. Discussieer in groep.

- QUOTE 1:
- Uitleg:

- QUOTE 2:
- Uitleg

2. Welke specifieke onderzoeksvragen over bodemleven in jouw school wil jij graag beantwoorden?

➤ Onderzoeksvraag 1:

➤ Onderzoeksvraag 2:

➤ Onderzoeksvraag 3:

3. Welke bodemstalen ga je nemen om je onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden. Denk hierbij ook aan herhalingen. Neem je ook controle-stalen mee? Gebruik de ruimte hieronder om je staalname te schetsen.



4. Wat zijn je verwachtingen? Voorspel op basis van wat je kan lezen in deze practicumhandleiding, de leerstof, en andere achtergrondinformatie die je kan opzoeken over bodemleven, welke groepen van organismen verwacht je terug te vinden. Eventueel ook al welke soorten? Komen dezelfde bacteriesoorten voor in de bodem als bv in onze darmen?

➤ Hypothese 1:

➤ Hypothese 2:

➤ Hypothese 3:

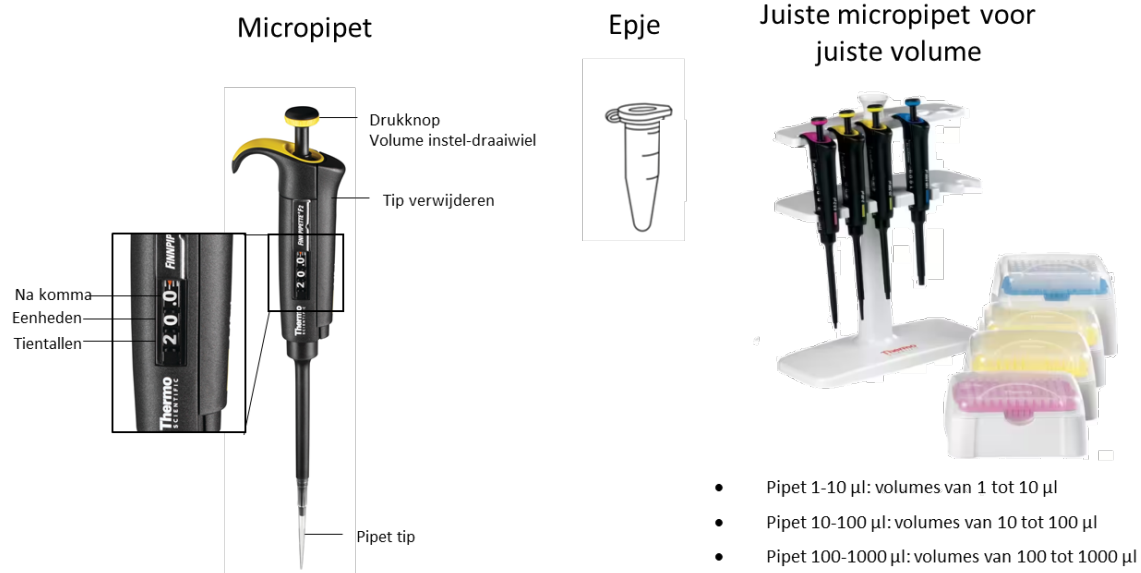
5. Waar ga je op letten bij het nemen van de bodemstalen? Mag je bijvoorbeeld voor elk staal dezelfde schep gebruiken, of ga je de schep kuisen tussenin? Hoe vermijd je DNA-contaminatie? Hoe diep ga je staal nemen? Hoe ga je de stalen labelen? Schrijf hieronder enkele aandachtspunten op waar je op gaat letten bij het staalnemen.



## Pipetteer oefening

We zullen met kleine hoeveelheden vloeistoffen werken in dit practicum in de grootteorde van enkele  $\mu\text{l}$ . Vandaar dat we ook pipetten gebruiken waarmee we dergelijke kleine hoeveelheden kunnen afmeten: "**micropipetten**" genaamd. Deze gebruiken **pipettips**. We starten met het leren hanteren van de micropipet.

### Hoe de micropipet gebruiken?



### Neem vloeistof op:

1. Stel het juiste volume in op de pipet door aan het volume-instel draaiwiel te draaien
2. Zet een nieuw tipje op de pipet.
3. Duw de drukknop bovenaan tot de EERSTE STOP
4. Dompel de tip van de pipet in de vloeistof
5. Laat draag de drukknop los om de vloeistof op te zuigen

### Loslaten van de vloeistof:

1. Breng de vloeistof over naar de gewenste bestemming, bijvoorbeeld een epje.
2. Plaats de tip zo dicht mogelijk bij de bodem van het epje, enigszins schuin ten opzichte van de wand van het epje
3. Druk nu de knop bovenaan de pipet volledig in tot de TWEEDE STOP
4. Om het tipje te verwijderen druk je de schuifknop opzij van de pipet naar beneden

### Pipetteer een specifiek volume

- Neem het epje met vermelding 'water'
- Stel je pipet in op 40  $\mu\text{l}$
- Zuig dit volume op
- Kijk hoe de vloeistof zich in het tipje bevindt, zo krijg je een idee van de te pipetteren hoeveelheid. Let op: er mag geen lucht zijn op het einde van je pipet tip
- Pipetteer dit volume terug in het epje 'water'. Leer daarbij het tipje tegen de rand, net boven de aanwezige vloeistof te plaatsen

Er mag geen  
lucht zijn op  
het einde van  
de pipet tip



### Volume challenge

Het doel van deze oefening is om het correct volume te pipetteren op een stukje parafilm, en de juiste pipet te nemen.

1. Schrijf nummer A tot D op het stukje parafilm

Parafilm

Spot	A	B	C	D
Volume	10 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	4.5 $\mu\text{l}$

2. Voeg 10  $\mu\text{l}$  water vanuit het epje 'water' toe aan spot A
3. Voeg 20  $\mu\text{l}$  water vanuit het epje 'water' toe aan spot B
4. Van spot A, neem 2  $\mu\text{l}$  en breng over naar spot C
5. Van spot B, neem 4.5  $\mu\text{l}$  water en plaats op spot D
6. Van spot B, neem 5  $\mu\text{l}$  op en meng dit met het volume van spot A. Als je goed mengt mogen er geen bubbels in je staal zijn.

Elke keer je een druppel opneemt, kijk dan of er geen vloeistof is achtergebleven.

Zie je het verschil in grootte/volume van de druppels op de parafilm?

Was er lucht op het einde in de tip?

Gebaseerd op deze antwoorden, omcirkel hoe jij je pipetteer skills zou beoordelen:

A Amateur

B. Matig goed

C. Pro

D. pipetteer master!

## TECHNISCH OVERZICHT DNA-EXTRACTIE

Het DNA-extractie protocol is gebaseerd op de DNeasy PowerSoil Pro Kit (Product # 47014).

### Staal voorbereiding

Elk bodemstaal wordt gezeefd over een 2 mm zeef om grote partikels te verwijderen. Daarna wordt 250 mg van het bodemstaal afgewogen in een 2 ml epje en na snapfreezen in vloeibare stikstof, bewaard bij  $-80^{\circ}\text{C}$  in de diepvries tot de DNA-extractie stap.

### Cel lysis

Elk staal wordt geshred op een hoge snelheid in een bead-beater/vortex. Het vortexen/schudden is cruciaal voor volledige homogenisatie en cellysis. Willekeurig schudden van de beads in aanwezigheid van celwand openbrekende stoffen, veroorzaakt dat de beads botsen met microbiële cellen en leidt tot het openbreken van de cellen. De powerbead Pro Tube bevat ook een buffer die (a) zal helpen bij het verspreiden van de bodemdeeltjes, (b) zal beginnen met het oplossen van humuszuren, en (c) zal nucleïnezuren beschermen tegen degradatie.

### Inhibitor verwijderingsstap & DNA-precipitatie

Als de stalen zijn geschred wordt door centrifugatie het supernatans met DNA gescheiden van de rest. Aan het supernatans met DNA wordt een inhibitor verwijdering oplossing toegevoegd wat niet-DNA organisch en anorganisch materiaal, waaronder humusstoffen, celresten en eiwitten verwijderd. Het is belangrijk om organische en anorganische stoffen te verwijderen die de zuiverheid van het DNA kunnen verminderen. Daarna wordt er een oplossing met hoog zout gehalte toegevoegd, om DNA uit oplossing te doen gaan, en omdat DNA op silica bindt bij heel hoge zout-concentraties. Verontreinigende stoffen passeren het filter membraan, wat enkel DNA achterlaat.

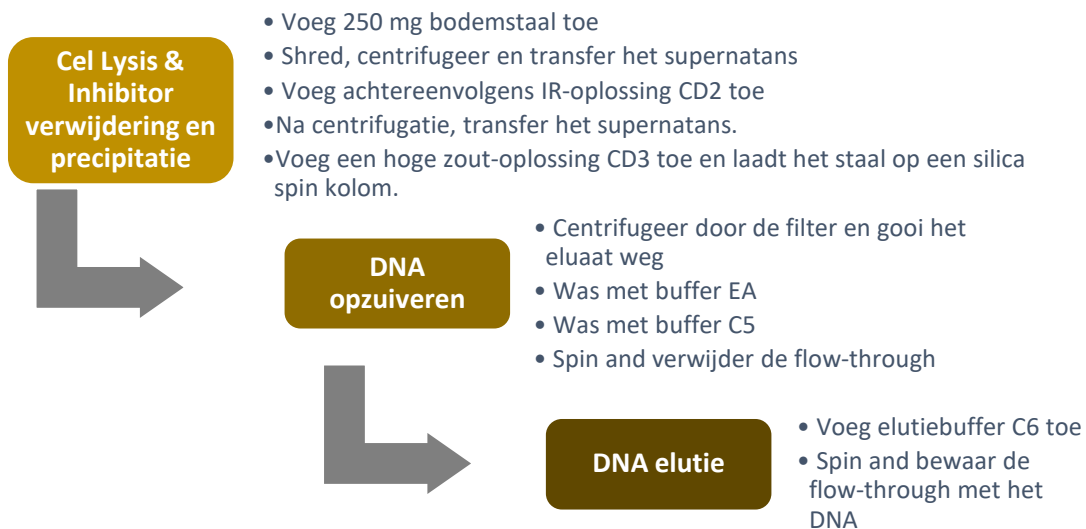
### DNA opzuivering

Eens het DNA is geprecipiteerd op het silica membraan, moet het DNA worden opgezuiverd. De eerste wasbuffer verwijderd proteïne en andere niet-wateroplosbare

contaminanten van de silica spin kolommen. Was nog een tweede keer met een andere buffer, C5.

### **DNA elutie**

De activiteit wordt voltooid door het DNA van de filter te verwijderen. Dit staat bekend als het elueren van het DNA en wordt gedaan door de elutiebuffer C6 toe te voegen. DNA wordt sterker aangetrokken tot de elutiebuffer dan tot de filter en passeert uiteindelijk erdoor. Het centrifugeren van de epp met het in het filter ingebedde DNA trekt de elutiebuffer door de matrix, waardoor het DNA wordt verzameld in de 1.5 ml epp.



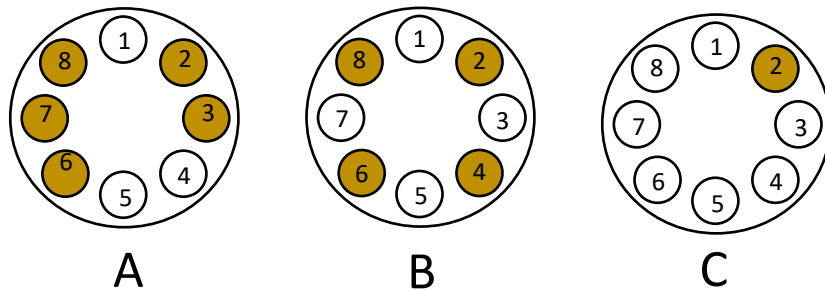
## PRE-LAB VRAGEN

Lees door de hele handleiding en beantwoord de volgende vragen:

- Op basis van je kennis van de DNA-structuur, wat is de complementaire streng van deze DNA-sequentie?

**5' – ATG CCG GAA TCG TTA GCA – 3'**

- Is het mogelijk voor je DNA-extractie om enkel bacterie DNA uit de bodem te halen. Verklaar waarom of waarom niet.
- Lijst de 2 controles op die gebruikt worden in dit experiment. Waarom hebben we controles nodig in dit stadium van het onderzoek?
- Welke centrifuge rotor is goed gebalanceerd?



- Hoe zou jij de rotor(s) goed balanceren?
- Wat zou er gebeuren als je dezelfde pipet tip gebruikt bij het hele protocol?

## PRE-LAB VRAGEN, deel 2

1. Gebaseerd op achtergrond data van je bodemstaal (pH, textuur, organische stof gehalte..), **formuleer een hypothese** over de frequentie/dominantie van sommige groepen van bacteriën/schimmels/protisten in jouw stalen?
2. Lees door het volledige protocol. Wat is de functie van elk reagens?

Oplossing	Functie
Bead oplossing CD1: (181 mM NaPO <sub>4</sub> , 121 mM guanidinium isothiocyanate, 150 mM NaCl, 4% SDS, pH 10)	
Inhibitor verwijderaar CD2: (133 mM Ammonium acetate)	
Inhibitor verwijderaar CD3: (120 mM aluminum ammonium sulfate dodecahydrate)	
Was buffer EA: (5 M GuHCL, 30 mM Tris, 9% isopropanol, pH 7.5)	
Was buffer C5: (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 50% EtOH, pH 7.5)	
Elutie buffer C6: (10 mM Tris, pH 8.0)	

9. Welke centrifugatie stap transfereert het DNA naar de spin column (membraan)?
10. Welke centrifugatie stap verwijdert of elueert het DNA van de spin kolom?



## DNA-EXTRACTIE BENCH PROTOCOL

### Klas materialen

- Vortex mixer
- Mini-centrifuge

### Materialen per groep

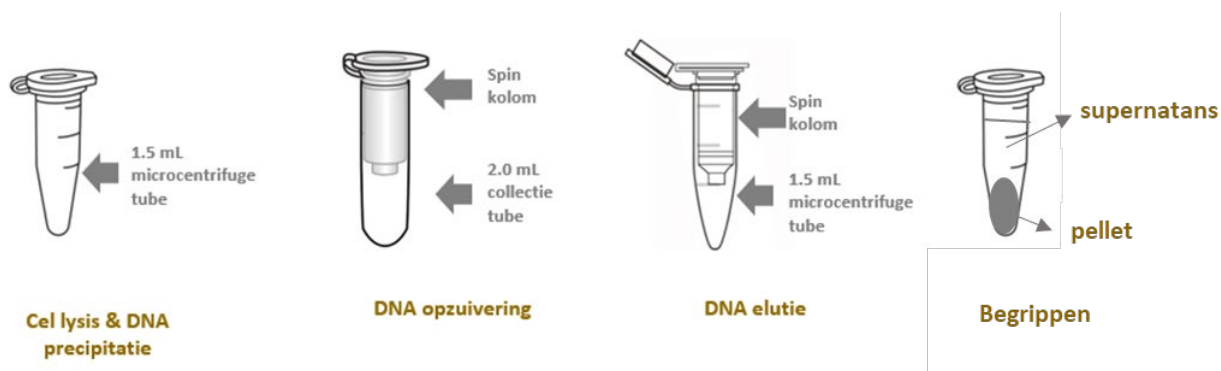
- Bodemstalen
- Handschoenen
- Water
- epjes
- Qiagen DNeasy Kit aliquots
  - Buffer CD1 (800  $\mu$ l)
  - Buffer CD2 (200  $\mu$ l)
  - Buffer CD3 (600  $\mu$ l)
  - Buffer EA (500  $\mu$ l)
  - Buffer C5 (500  $\mu$ l)
- Spin kolommen
- Collectie tubes
- P10, P100 and P1000 pipetten
- Idem tips
- Afvalbeker voor tips en vloeistoffen
- Kimwipes
- rekje

*Zorg ervoor dat je alle epjes labelt en de pipettips wisselt tussen stalen*

### **Staal voorbereiding**

- Noteer de staalnaam, inhoud, en andere metadata in onderstaande tabel
- Breng 250 mg bodemstaal over naar de gelabelde 2 ml centrifuge buis

Tube #	Inhoud
1	
2	
3	Positieve (+) controle
4	Negatieve (-) controle
5	



### ***Cel-lysis & DNA-precipitatie***

1. Voeg 800  $\mu$ l Buffer CD1 aan het staal met bodem en vortex kort om te mixen.
2. Zet de epjes in de Retsch mixer mill en schud voor 10 min
3. Centrifugeer de buisjes aan de maximum snelheid 13,000 g voor 1 min
4. Breng het supernatans over naar een nieuw epje (verwacht tussen de 500-600  $\mu$ l vloeistof)
5. Voeg 200  $\mu$ l CD2 toe en vortex voor 5 sec
6. Centrifugeer aan 13,000 g voor 1 min. Zonder het pellet te verstoren, breng nu tot maximum 700  $\mu$ l supernatans over naar een nieuw epje. Verwacht 500-600  $\mu$ l
7. Voeg 600  $\mu$ l CD3 toe een vortex voor 5 sec

### ***8. DNA opzuiveren***

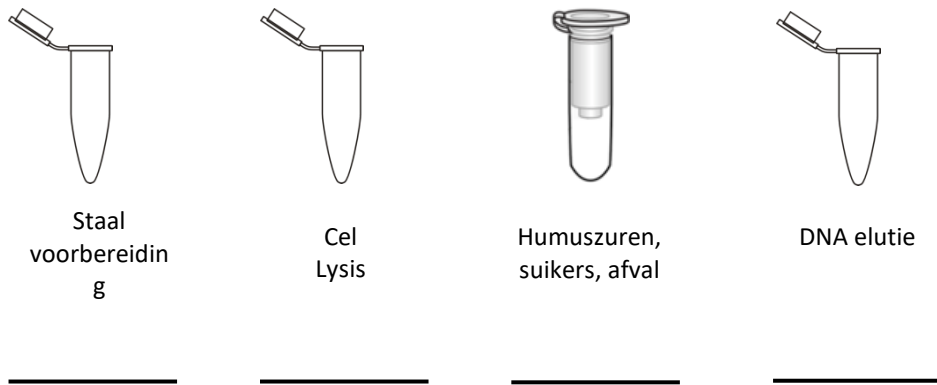
9. Laad 650  $\mu$ l op de spin kolom (zie tekening hierboven). Centrifugeer aan 13,000 g voor 1 min.
10. Giet de flow-through weg en herhaal de vorige stap
11. Voeg 500  $\mu$ l EA oplossing toe aan de spin kolom. Centrifugeer 13,000 g voor 1 min.
12. Giet de flow-through weg en voeg 500  $\mu$ l C5 oplossing toe. Centrifugeer 13,000 g voor 2 min.
13. Breng de spin kolom over en plaats het in een nieuw epje

### ***14. DNA elutie***

15. Voeg 100  $\mu$ l C6 oplossing toe op het midden van het filter membraan.
16. Centrifugeer aan 13,000 g voor 1 min. Het DNA zit nu in je epje, je mag de spin kolom weggooien
17. Zet je epje met DNA-staal op ijs. Vergeet niet je epje te labelen.

## POST-LABO VRAGEN

1. Illustreer de inhoud van elk epje na voltooiing van de volgende stappen. Label waar het DNA zich bevindt hieronder.



2. Na het vervolledigen van de DNA-extractie, wat was de concentratie en zuiverheid van het DNA?
3. Wat is het doel van het isoleren van het bodem DNA? Wat is de volgende stap in het bepalen van de bodemleven biodiversiteit?
4. Stel je voor dat er een ziekte outbreak is in je school, en je wil graag de sla die in het cafetaria lag testen voor bacteriën. Hoe zou jij het DNA-extractie protocol aanpassen om DNA te extraheren van sla, om te checken voor de aan- of afwezigheid van *E. coli*? Hou er rekening mee dat plant cellen zowel een cel membraan als celwand hebben.

## TECHNISCH OVERZICHT PCR

**Polymerasekettingreactie, of PCR**, is een techniek om veel kopieën van een specifieke DNA-regio te maken. PCR maakt gebruik van een thermostabiele DNA-polymerase, Taq-polymerase genaamd, en vereist DNA-primers die specifiek zijn ontworpen voor een specifiek doel-gen te amplificeren. Bij PCR wordt de reactie herhaald door een reeks temperatuurveranderingen, wat het mogelijk maakt om veel kopieën van het doel-DNA te produceren.

We gaan hier PCR gebruiken om het **16S rRNA gen van bacteriën** en het **ITS-gen van schimmels** te vermeerderen. Het 16S rRNA-gen codeert voor een onderdeel van het ribosomaal RNA (rRNA), een essentieel onderdeel van de ribosomen (eiwit bouwende celstructuren) in bacteriële cellen. Het 16S rRNA-gen is relatief conservatief in bacteriën, wat betekent dat het bepaalde regio's heeft die sterk geconserveerd zijn en andere regio's die meer variabel zijn. We gebruiken de sequentieverschillen in het 16S rRNA-gen om bacteriën te identificeren en te classificeren, omdat deze sequentie uniek is voor verschillende bacteriesoorten. Het ITS-gen (Internal Transcribed Spacer-gen) wordt bij schimmels gebruikt om soorten te identificeren. Het ligt tussen de 18S, 5.8S, en 28S rRNA genen, en varieert tussen schimmelsoorten en daarom kunnen we dit gebruiken om schimmels te identificeren en classificeren.

### Begrippen

#### PCR

Polymerasekettingreactie (PCR) is een veelvoorkomende laboratoriumtechniek die wordt gebruikt om veel kopieën (miljoenen of miljarden!) van een specifiek gedeelte van DNA te maken. Dit DNA-gebied kan alles zijn waar de onderzoeker in geïnteresseerd is. Bijvoorbeeld een gen waarvan een onderzoeker de functie wil begrijpen, de identificatie van soorten (zoals in dit practicum) of om DNA op de plaats van een misdaad te vergelijken met DNA van verdachten (forensisch onderzoek).

Doorgaans is het doel van PCR om voldoende kopieën van het doel-DNA te maken, zodat het geanalyseerd kan worden, bijvoorbeeld voor sequentiebepaling door sequencing.

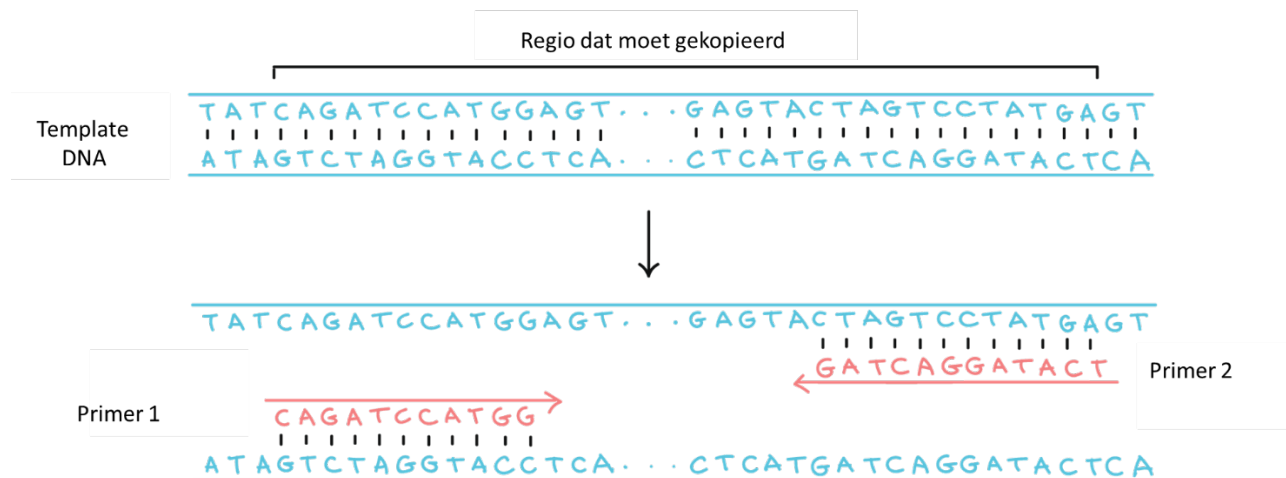
## Taq-polymerase

Net als bij DNA-vermeerdering in een organisme, heeft PCR een DNA-polymerase-enzym nodig dat nieuwe strengen DNA maakt, gebruikmakend van bestaande DNA-strengen als sjablonen. Het DNA-polymerase dat typisch wordt gebruikt in PCR wordt Taq-polymerase genoemd, naar de hittebestendige bacterie waaruit het is geïsoleerd (*Thermus aquaticus*). Tas polymerase hangt nieuwe, complementaire nucleotiden aan een nieuwe DNA-streng en gebruikt daarvoor de primers als startlocatie.

## PCR-primers

Net als andere DNA-polymerasen kan Taq-polymerase alleen DNA synthetiseren als het een primer krijgt, een kort stuk nucleotidensequenties dat een startpunt biedt voor DNA-synthese. In een PCR-reactie bepaalt de onderzoeker het gebied van DNA dat zal worden gekopieerd, of geamplificeerd, door de gekozen primers (16S en ITS in dit geval).

PCR-primers zijn korte stukjes enkelstrengs DNA, meestal ongeveer 20 nucleotiden lang. Er worden twee primers gebruikt in elke PCR-reactie, en ze zijn ontworpen zodat ze het doel DNA-gebied omringen. Dat wil zeggen, ze krijgen sequenties die ervoor zorgen dat ze binden aan tegenovergestelde strengen van het template-DNA, net aan de randen van het te kopiëren gebied. De primers binden aan de template door complementaire basenparing.

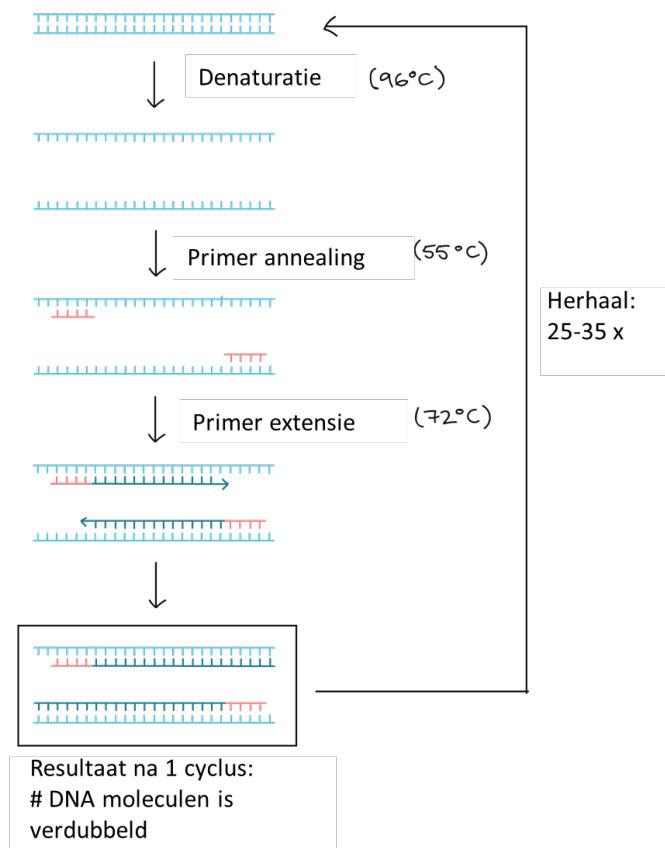


## **Stappen van een PCR**

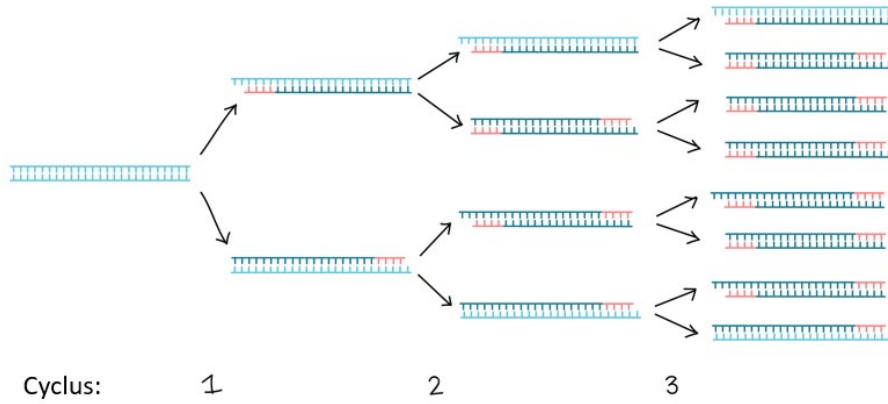
De belangrijkste ingrediënten van een PCR-reactie zijn Taq-polymerase, primers, DNA en nucleotiden (DNA-bouwstenen). De ingrediënten worden samengevoegd in een epje, samen met de buffers die nodig zijn voor het enzym, en worden onderworpen aan herhaalde cycli van verwarming en koeling die DNA-synthese mogelijk maken.

De basisstappen zijn:

- Denaturatie (98°C): Verhit de reactie om de DNA-strengen te scheiden, of denatureren, wat zorgt voor enkelstrengs template voor de volgende stap.
- Annealing (55°C – 65°C; primer specifiek): Koel de reactie af zodat de primers zich kunnen binden aan hun complementaire sequenties op het enkelstrengse template-DNA.
- Extensie (72°C): Verhoog de reactietemperatuur zodat Taq-polymerase de primers verlengt, nieuwe strengen DNA synthetiserend.



Deze cyclus herhaalt zich 25-35 keer in een typische PCR-reactie, die doorgaans 2u uur duurt, afhankelijk van de lengte van het te kopiëren DNA-gebied. Als de reactie efficiënt is, kan het doel-DNA van slechts één of een paar kopieën, naar miljarden gaan.



Het resultaat van de PCR-reactie kan worden gevisualiseerd door een gel-electroforese, alvorens het te gebruiken voor sequencing.

## PRE-LAB VRAGEN

**Lees door de hele handleiding en beantwoord de volgende vragen:**

1. Is het mogelijk om enkel bacterie-specifiek DNA te vermenigvuldigen uit de bodem. Verklaar waarom of waarom niet.

2. Lees door het volledige PCR-protocol. Wat is de functie van elk reagens?

2 x Mastermix:

Q5 high-fidelity Taq polymerase:

FW-primer en RV-primer:

4. Wat verwacht je dat er gebeurt met de controle stalen tijdens de PCR?

5. Stel het juiste PCR-programma in, door de tabel hieronder aan te vullen voor:

a) 16S rRNA gen amplificatie.

	Temp	# cycli
Initiële denaturatie		
Denaturatie		
Annealing		
Extensie		
Finale extensie		

3. Hoe zou jij het protocol aanpassen om schimmels te amplificeren?



## PCR BENCH PROTOCOL

### Klas materialen

- PCR machine
- Vortex mixer
- Mini-centrifuge

### Materialen per groep

- Box met ijs
- Handschoenen
- Transfer pipette P10, P100, P1000
- Microcentrifuge rek
- PCR tube rek
- Permanente marker
- NEB Taq 2x PCR mix (50 µl)
- Primer FW
- Primer RV
- DNA-staal
- 

*Zorg ervoor dat je alle epjes labelt en de pipettips wisselt tussen stalen*

### **Staal voorbereiding**

- Noteer de staalnaam, inhoud, en andere metadata in onderstaande tabel

Tube #	Inhoud	Primer
1		
2		
3	Positieve (+) controle	
4	Negatieve (-) controle	
5		

### PCR set-up

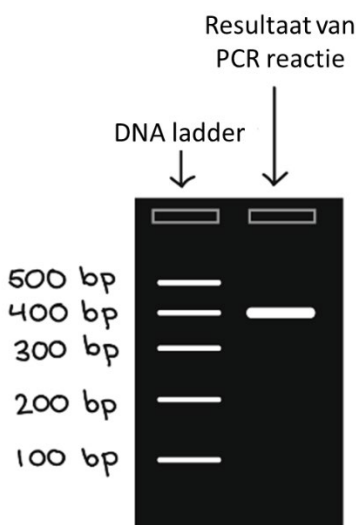
- ❑ Je krijgt een epje met Q5 High-Fidelity 2X Master mix (NEB) met Taq-polymerase, nucleotiden, buffer en water. Label het epje met jouw identificatienummer.
- ❑ Gebruik een micropipet met een nieuwe tip om aan elk epje, 1 µl primer toe te voegen. Gebruik een nieuw micropipet om de andere primer toe te voegen!
- ❑ Breng nu 1.5 µL van je DNA over in de PCR-ep met primer- en mastermix. Zorg ervoor dat er geen DNA achterblijft in de tip na het pipetteren.
- ❑ Bewaar je monster op ijs totdat je klaar bent om de PCR te starten.
- ❑ Plaats je PCR-epje samen met die van andere studenten in de thermocycler die is geprogrammeerd met het geschikte PCR-protocol.
- ❑ Na de PCR, bewaar dan het geamplificeerde DNA op ijs of -20°C tot de gel-electroforese.

Primers	PCR-programma
Bacterie 16S primer set (515f/806r)	Initiële stap: 98°C voor 3 min 35 cycli van: Denaturatie stap: 98°C 10 sec Annealing stap: 56°C 30 sec Extensie step: 72°C 30 sec Finale extensie: 72°C voor 7 min Een finale stap om je staal te bewaren: 4°C
Schimmels ITS primer set (ITS1f/ITS2r)	Initiële stap: 98°C voor 3 min 35 cycli van: Denaturatie stap: 98°C 10 sec Annealing stap: 57°C 30 sec Extensie step: 72°C 30 sec Finale extensie: 72°C voor 7 min Een finale stap om je staal te bewaren: 4°C
Protisten (Protozoa_1391F/Protozoa_Eukbr)	Initiële stap: 98°C voor 3 min 35 cycli van: Denaturatie stap: 98°C 10 sec Annealing stap: 55°C 30 sec Extensie step: 72°C 30 sec Finale extensie: 72°C voor 7 min Een finale stap om je staal te bewaren: 4°C

## TECHNISCH OVERZICHT GEL ELECTROFORESE

**Gel-elektroforese** is een techniek waarbij DNA-fragmenten door een gelmatrix worden getrokken onder invloed een elektrische stroom, en het scheidt DNA-fragmenten op basis van grootte. Doorgaans wordt een standaard, of DNA-ladder, toegevoegd zodat de grootte van de fragmenten in het PCR-staal kan worden bepaald.

DNA-fragmenten van dezelfde lengte vormen een "band" op de gel, die met het blote oog zichtbaar kan worden als de gel is gekleurd met een DNA-bindende kleurstof. Bijvoorbeeld, een PCR-reactie die een fragment van 400 baseparen (bp) produceert, zou er op een gel zo uitzien:

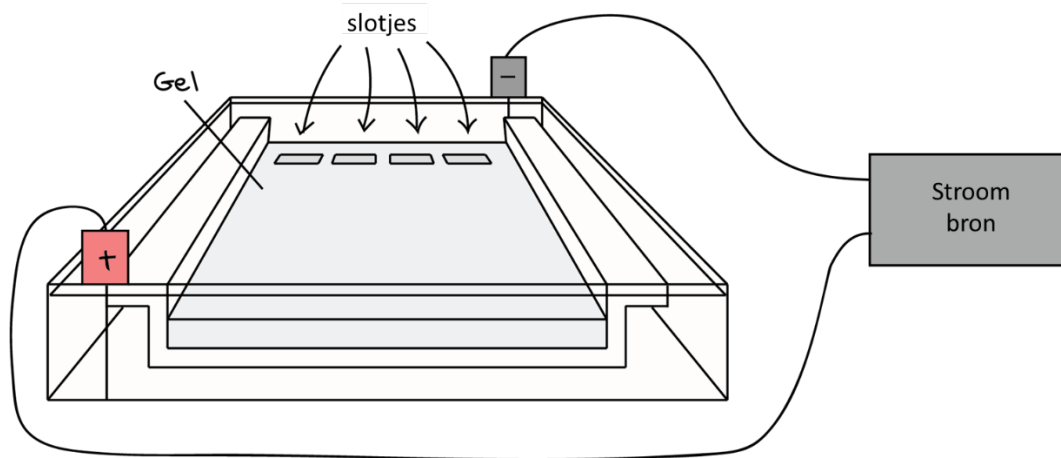


Een DNA-band bevat vele, vele kopieën van het doel-DNA, niet slechts één of een paar kopieën. Omdat DNA microscopisch klein is, moeten er veel kopieën van aanwezig zijn voordat we het met het blote oog kunnen zien. Dit is een belangrijk aspect van waarom PCR een belangrijk instrument is: het produceert voldoende kopieën van een DNA-sequentie zodat we dat gebied van DNA kunnen zien of manipuleren.

### Stappen van een gel-electroforese

Gel-elektroforese is een techniek die wordt gebruikt om DNA-fragmenten te scheiden op basis van hun grootte. Eerst wordt hiervoor een gel geprepareerd, gemaakt van

een polysaccharide, genaamd agarose, die verkrijgbaar is in de vorm van droge, poederachtige stof. Wanneer de agarose wordt verwarmd in een buffer (water met wat zouten erin) en mag afkoelen, zal het een vaste, licht kneedbare gel vormen. Op moleculair niveau is de gel een matrix van agarosemoleculen die bij elkaar worden gehouden door waterstofbruggen en kleine poriën vormen. Aan één uiteinde heeft de gel inkepingen, zogenaamde slotjes of wells, waar de DNA-stalen in worden geplaatst.



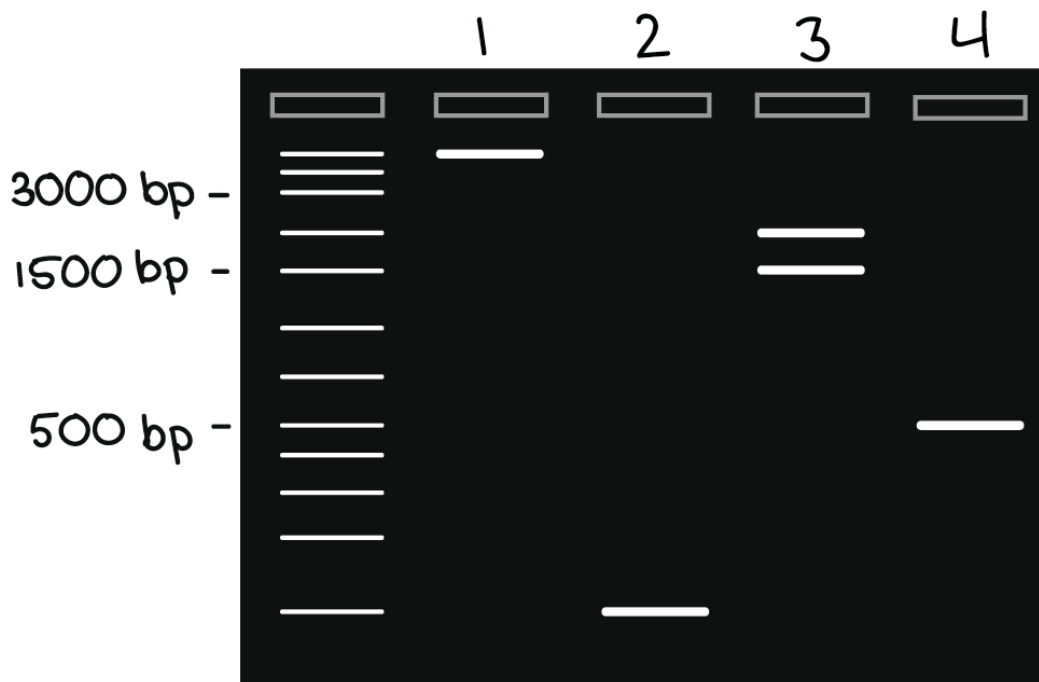
DNA-stalen laden en scheiden:

- DNA-stalen worden in slotjes aan het uiteinde van de gel geladen, en er wordt een elektrische stroom aangelegd om ze door de gel te trekken. De tank waar de gel in ligt, is gevuld met een bufferoplossing die zout bevat en elektriciteit kan geleiden.
- DNA-fragmenten zijn negatief geladen, dus ze bewegen naar de positieve elektrode toe. Omdat alle DNA-fragmenten dezelfde lading per massa hebben, bewegen kleine fragmenten sneller door de gel dan grote fragmenten.
- Wanneer een gel is gekleurd met een DNA-bindende kleurstof, kunnen de DNA-fragmenten worden gezien als banden, elk vertegenwoordigt een groep DNA-fragmenten van dezelfde grootte.

## PRE-LAB VRAGEN

Lees door de hele handleiding en beantwoord de volgende vragen:

1. Een kleine oefening om te testen of je het principe van gel electroforese begrijpt:



4 stalen/lanen zijn genummerd op de gel hierboven. Welke laan past bij de beschrijving beneden:

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Deze laan bevat het langste DNA-fragment	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Deze laan bevat het kortste DNA-fragment	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Deze laan bevat een DNA-fragment van 1500 bp	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

## GEL ELECTROFORESE BENCH PROTOCOL

### Klas materialen

- Gel electoforese: Mini-Sub Cell GT Biorad
- Vortex mixer
- Mini-centrifuge

### Materialen per groep

- Box met ijs
- Handschoenen
- Transfer pipette P10, P100, P1000
- Microcentrifuge rek
- PCR tube rek
- Permanente marker
- Loading dye
- gelred
- DNA-staal
- TAE-buffer

*Zorg ervoor dat je alle epjes labelt en de pipettips wisselt tussen stalen*

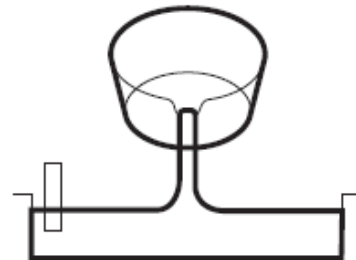
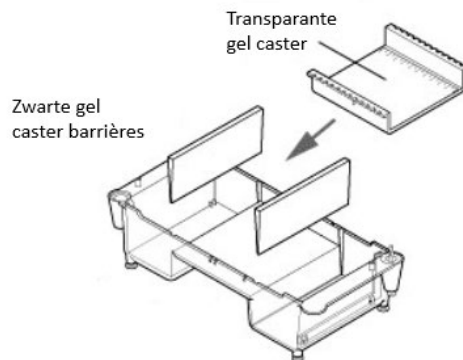
### **Staal voorbereiding**

- Noteer de staalnaam, inhoud, en andere metadata in onderstaande tabel

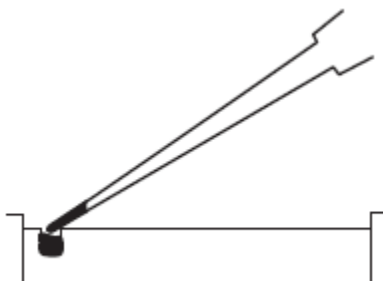
Tube #	Inhoud
1	
2	
3	Positieve (+) controle
4	Negatieve (-) controle
5	

### Gel-electroforese set-up

- ❑ Zet de zwarte gel caster blokjes in de gelelektroforese-kamer, plaats de transparante gelcaster ertussen, en plaats een kam die slotjes vormt.
- ❑ Giet de 1.5 % warme agarose-oplossing in de bak tot een diepte die ongeveer een derde van de hoogte van de tanden van de kam bedekt.
- ❑ Laat de agarose-gel volledig stollen; dit duurt ongeveer 20 minuten.

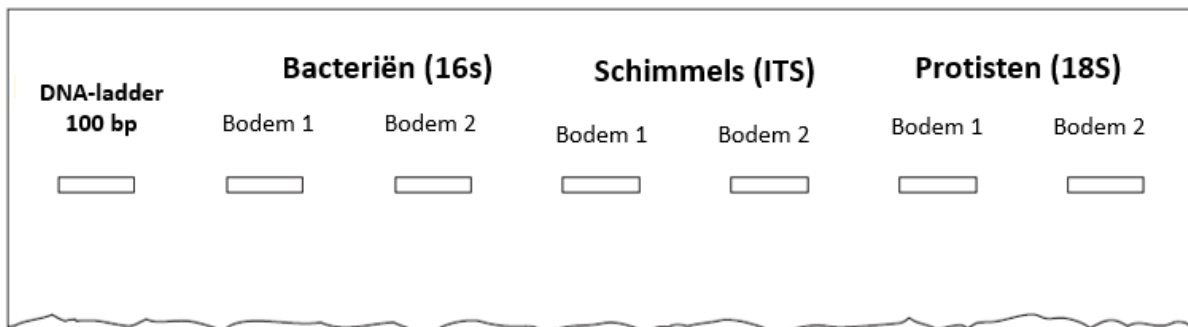


- ❑ Als de gel gestold is (hard en ziet er troebeliger uit), verwijder dan voorzichtig de kam.
- ❑ Voeg dan genoeg 1× TAE-buffer met 10 µl gelred (DNA-kleurstof) toe om het oppervlak van de gel te bedekken. Voeg niet meer buffer toe dan nodig is, dit verlengt de run-tijd.
- ❑ Gebruik een micropipet met een nieuwe tip om 5 µL van elk PCR-product over te brengen naar een nieuw microcentrifuge epje. Voeg 2 µL laadkleurstof toe aan elk epje met 5 µL PCR-product.
- ❑ Plaats de gelcaster voor je volgens het onderstaande diagram, zodat de slotjes zich aan de bovenkant van de gel bevinden. Gebruik een micropipet met een nieuwe tip om 3 µl 100-bp-ladder in het meest linkse slotje te laden.

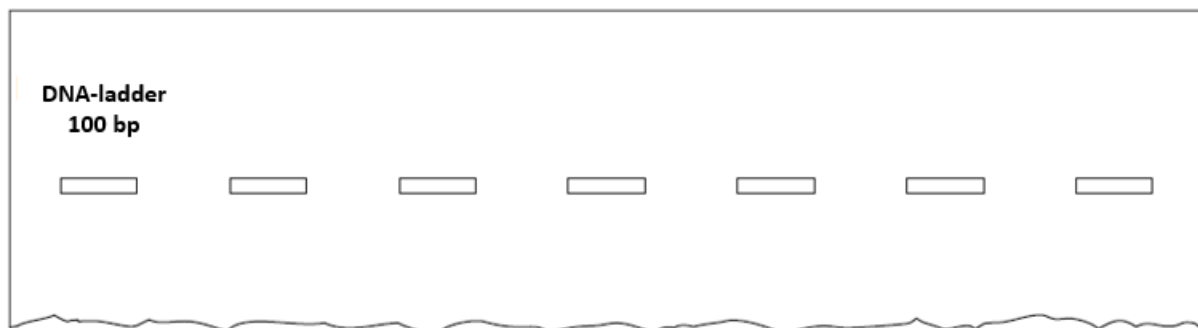


Druk de lucht uit de pipettip voor het laden, en duw de tip van de pipet ook niet door de bodem van de gel.

- Gebruik een micropipet met een nieuwe tip om elk monster uit de vorige stappen in jouw toegewezen slotjes te laden, vergelijkbaar met het volgende diagram:



- De monsters die je laadt, kunnen niet exact hetzelfde zijn als die hierboven getoond. Indien je volgorde afwijkt van bovenstaand schema, duidt dan hieronder aan hoe de stalen in jouw gel zijn geladen:

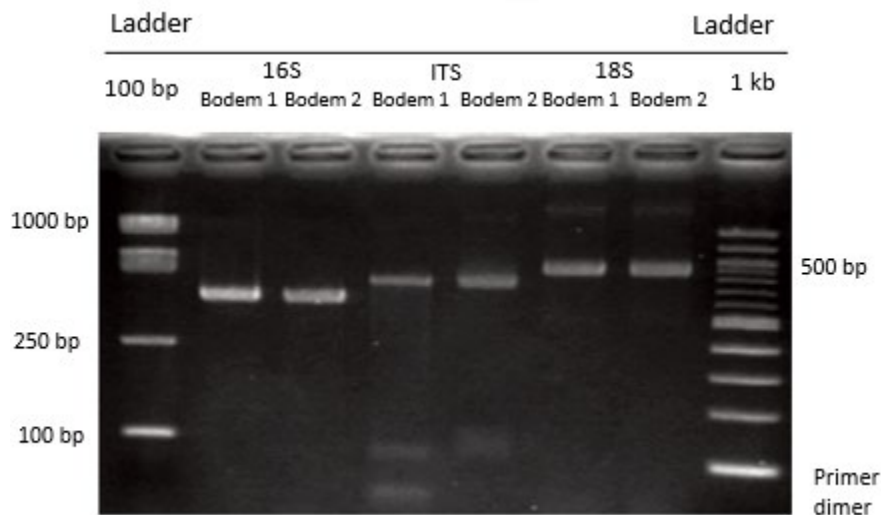


- Bewaar de overgebleven 20  $\mu$ L van je PCR-product op ijs of bij  $-20$  °C totdat je klaar bent om je monsters in te dienen voor sequencing.
- Laat de gel gedurende ongeveer 30 minuten lopen bij 100V. Voldoende scheiding heeft plaatsgevonden wanneer het kleurstofffront minstens 5 cm van de putten is verplaatst.
- Bekijk de gel met UV- of LED-transilluminator. Fotografeer de gel met een digitale camera of fotodocumentatiesysteem.



## POST-LABO VRAGEN

- Bekijk de foto van de gekleurde gel met jouw PCR-monsters en die van andere studenten. Oriënteer de foto met de monsterputten aan de bovenkant. Gebruik de voorbeeldgel om de band(en) in elke baan van de gel te interpreteren.
- Zoek de baan met de 100 bp marker aan de linkerkant van de gel. Vertrekkend vanaf dat slotje, zoek de banden die overeenkomen met elk PCR-amplicon: 16S (291 bp), ITS (340 bp), 18S (480 bp). Kijkend over de gel naar de PCR-producten, lijken de fragmenten dezelfde bp-grootte en intensiteit te hebben?



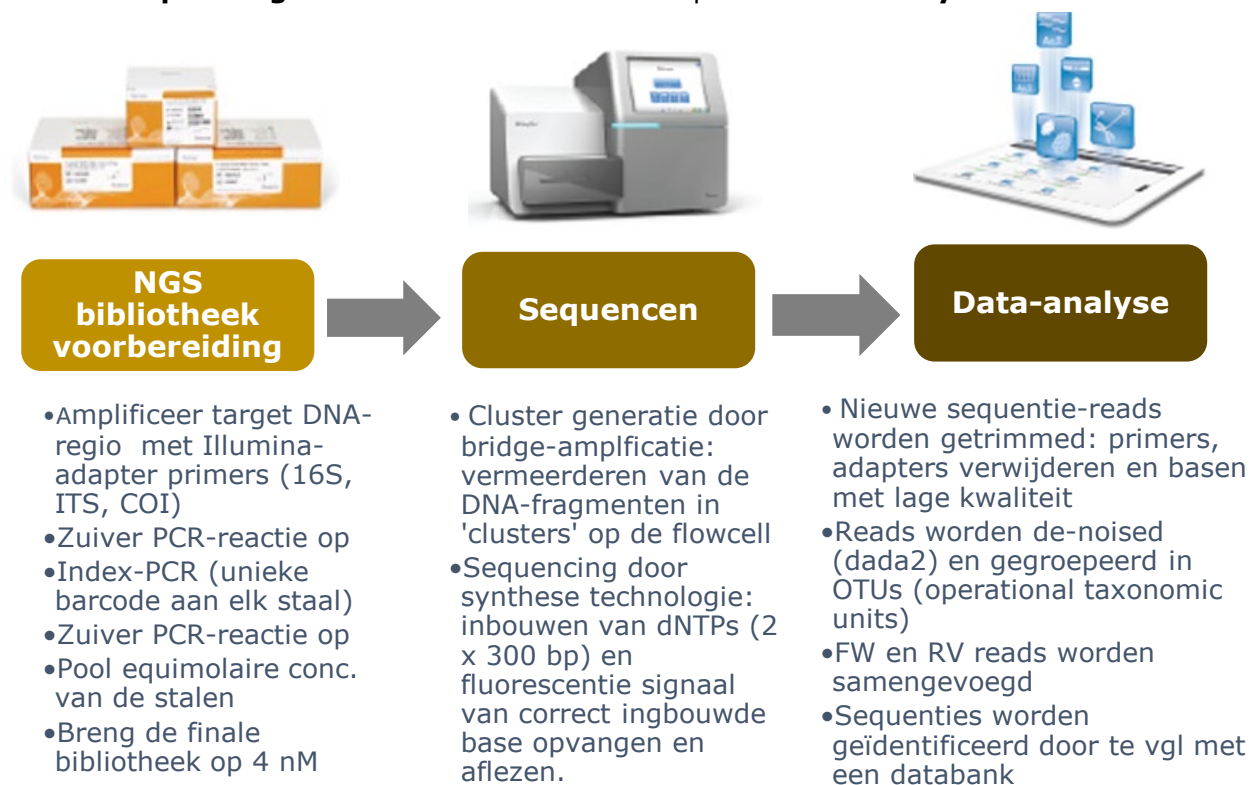
- Het is gebruikelijk om een diffuse (vage) band te zien die voorloopt op de 100-bp-marker. Dit is "primer-dimer," een artefact van de PCR dat ontstaat doordat de primers elkaar overlappen en zichzelf vermenigvuldigen.
- Welke stalen zijn goed geamplificeerd en welke niet? Geef verschillende redenen waarom sommige stalen mogelijk niet zijn geamplificeerd; sommige hiervan kunnen fouten in de procedure zijn.

## TECHNISCH OVERZICHT NGS-SEQUENCING

Voor next-generation sequencing (NGS) wordt gebruik gemaakt van de Illumina nextera XT kit en MiSeq sequencer.

### De Illumina NGS-workflow

De NGS-workflow om van DNA naar data te gaan bestaat uit 3 grote stappen. De eerste stap omvat de **DNA sequencing bibliotheek** voorbereiden, daarna de **sequencing** zelf en als laatste de DNA-sequentie **data-analyse**.



### Bibliotheekvoorbereiding

De sequencing-bibliotheek wordt voorbereid door de willekeurige fragmentatie van het DNA of cDNA-monster, gevolgd door ligatie van adapters aan de 5'- en 3'-uiteinden (**Figuur 6A**). Als alternatief combineert "tagmentatie" de fragmentatie- en ligatiereacties in één stap, wat de efficiëntie van het bibliotheekvoorbereidingsproces aanzienlijk verhoogt. De met adapters geligeerde fragmenten worden vervolgens geamplificeerd met PCR en gezuiverd via gelelektroforese. Als derde optie kan ook targeted amplicon sequencing worden gedaan, dan wordt een subset van genen of

regio's van het genoom geïsoleerd en sequenced (dit is wat in dit practicum wordt gedaan). Targeted sequencing heeft als voordeel dat het kosten, tijd en gegevensanalyse duur verminderd door enkel op specifieke interessegebieden van het DNA te focussen. Een veelvoorkomende toepassing van amplicon-sequencing is het sequencen van het bacteriële 16S ribosomaal RNA-gen (16S rRNA), of het ITS-gen voor schimmels, en protisten 18S-gen voor fylogenie- en taxonomiestudies.

### Cluster-generatie

Voor cluster-generatie wordt de bibliotheek geladen in een flowcell waar fragmenten worden vastgelegd op een chip van oppervlakte-gebonden oligo's die complementair zijn aan de bibliotheekadapters. Elk fragment wordt vervolgens versterkt tot afzonderlijke, klonale clusters door middel van brug-amplificatie (**Figuur 6B**). Wanneer de cluster-generatie is voltooid, zijn de klonen klaar voor sequencing.

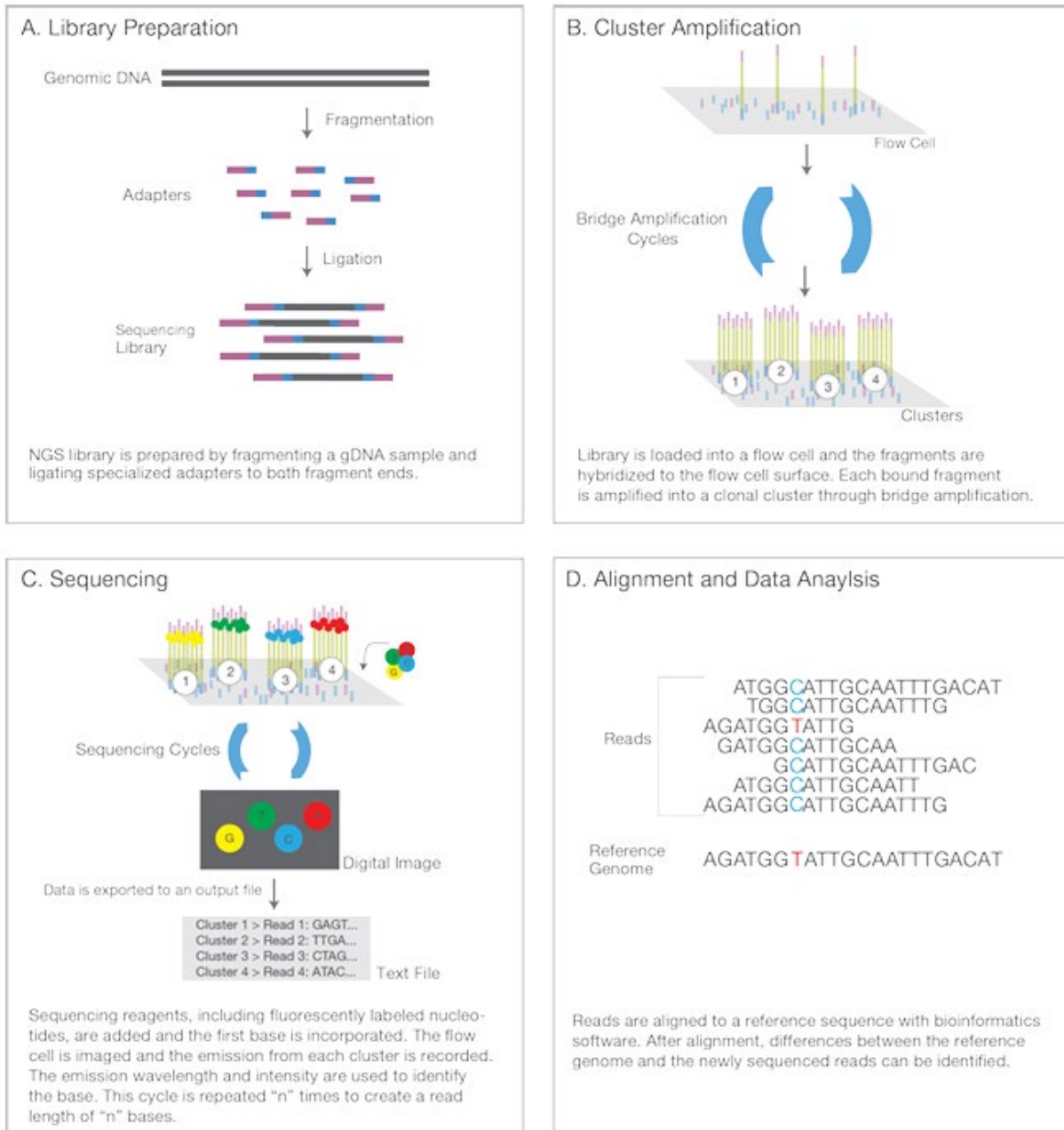
### Sequencing

Illumina's SBS-technologie maakt gebruik van een gepatenteerde methode op basis van omkeerbare terminators die enkele basen detecteert terwijl ze worden opgenomen in DNA-templates (**Figuur 6C**). Aangezien alle vier omkeerbare terminators gebonden dNTP's aanwezig zijn tijdens elke sequentiecycle, minimaliseert natuurlijke concurrentie de insluitingsbias en vermindert dit aanzienlijk de foutenpercentages in vergelijking met andere technologieën. Het resultaat is zeer nauwkeurige basisequencing die vrijwel fouten elimineert die specifiek zijn voor de sequentiecontext, zelfs binnen repetitieve sequentiegebieden en homopolymeren.

### Data-analyse

Tijdens data-analyse en alignering worden de nieuw geïdentificeerde sequentiereads uitgelijnd met een referentiegenoom (**Figuur 6D**). Na uitlijning zijn veel variaties van analyse mogelijk, zoals identificatie van enkel nucleotide polymorfismen (SNP's) of insertie-deletie (indel), fylogenetische of metagenomische analyse, en meer.

Een gedetailleerde animatie van de SBS-chemie is ook beschikbaar op [www.illumina.com/SBSvideo](http://www.illumina.com/SBSvideo).



**Figuur 6: NGS-sequencing overzicht:**(A) bibliotheek voorbereiding, (B) cluster-vorming, (C)sequencing en (D) data-analyse.

## PRE-LAB VRAGEN

**Lees door de hele handleiding en beantwoord de volgende vragen:**

1. Op basis van je kennis van sequencing, wat zijn de voordelen van Next Generation Sequencing over de vorige sequencing methodes?
  
2. Bekijk deze video: [https://www.youtube.com/watch?v=ToKUGz\\_YhC4](https://www.youtube.com/watch?v=ToKUGz_YhC4), en neem notities over het proces van Next Generation Sequencing.

Vat elke stap samen met tekst en/of diagrammen:

- a. Bibliotheek voorbereiding — wat is PCR?
- b. Cluster vorming
- c. Sequencing — waarom zijn de nucleotiden fluorescent gelabeld in deze stap?
- d. Data analyse — Waarom heb je een referentie databank nodig?

## NGS VIRTUEEL LABO

### Klas materialen

- ❑ Ipad, laptop of computer

### NGS-sequencing

- ❑ Ga naar de virtuele labo-omgeving en leer zelf sequenzen: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apps/dnaday/index.html>
- ❑ Klik op skip als je de inleiding wil overslaan en klik op de blauwe progress bar vanonder op 'next protocol' tot je het gedeelte sequence hebt: 'part sequence'.
- ❑ 'Wandel' dan met de pijltjes op je toetsenbord naar de groen gehighlighte stoel en volg dan de instructies om de sequencer te laden.



1. Klik op de progress list bar, en klik next protocol tot je deel: 'sequence' hebt.

Tip 1: Je moet met de pijltjes naar de stoel wandelen en dan 'sit down' klikken en de instructies volgen.

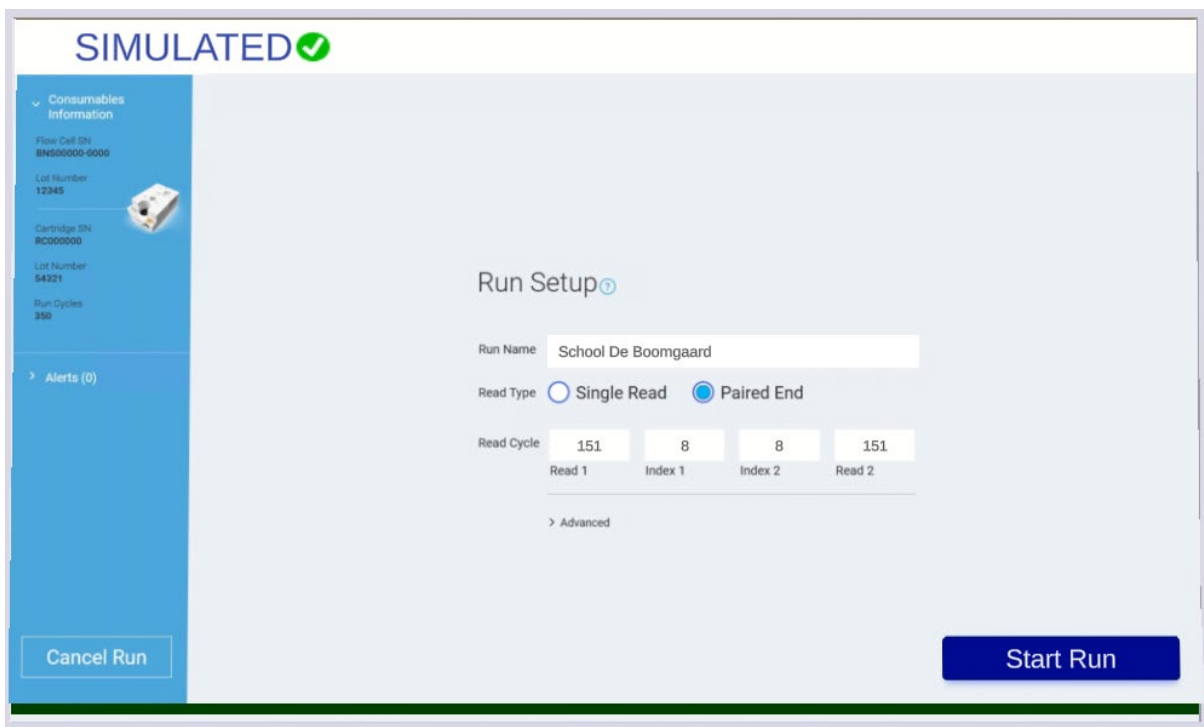


Tip 2: De iseq100 stel je als volgt in om een 2 x 150 bp run te starten:

Geef je schoolnaam in

Zet read 1 op: 151 bp; index 1: 8; index 2: 8; read 2: 151

Klik 'start run'



Tip3: Als je klaar bent met sequencen, kan je ook de andere sequencing toestellen bekijken. Je kan al eens kijken hoe zulke toestellen eruitzien als je later een echte laborant wil worden! Bij UHasselt worden je stalen gesequenced met de Miseq; zoek dit instrument in de virtuele module. Op het VIRGA JESSA ziekenhuis in Hasselt worden humane stalen gesequenced met de Novoseq of Miseq, bijvoorbeeld voor erfelijke ziektes op te sporen of kankeronderzoek.



## POST-LABO VRAGEN

1. Het staal is gesequenced en dan krijg je de ruwe DNA-sequentie data in het fastq. formaat. Oefen hier alvast met een test-dataset hoe je deze kan openen en bekijken: [<https://github.com/Sofie8/Bodemleven-NGS/tree/main>]
2. Waarvoor kan je sequencen en toepassingen van genomics nog gebruiken? Je hoort het allemaal in deze Illumina discovery video (20 min): [https://dnadecoded.discoveryeducation.com/pages/8ac909d0-65cb-4adf-a082-  
ea843430772b](https://dnadecoded.discoveryeducation.com/pages/8ac909d0-65cb-4adf-a082-<br/>ea843430772b). Je kan ook enkele delen bekijken, bv chapter 6: Environmental genomics, duurt 6.34 min.



## TECHNISCH OVERZICHT BIO-INFORMATICA

Het identificeren van organismen is steeds belangrijker geworden, te meer om inzichten te krijgen in de diversiteit van soorten en hoe deze te behouden te midden van versnelde vernietiging van leefgebieden, bodemverstoring of klimaatverandering. We weten nog maar weinig over de diversiteit van micro-organismen die leven in bodems op aarde, onze eigen tuinen of schooltuinen. Geschat wordt dat de bodem een thuis is voor ongeveer 59 % van de soorten op aarde (Anthony et al., 2024). Het is daarbij het rijkste habitat. Er komen nieuwe soorten bij maar er verdwijnen ook elk jaar soorten, waarvan de meeste nog niet zijn geïdentificeerd. Klassieke taxonomie schiet tekort in deze race om biologische diversiteit te catalogiseren voordat het verdwijnt. Daarom zijn eDNA technieken en next-generation sequencing wel zeer nuttige tools om bodemleven te karakteriseren.

Wij gebruiken in dit practicum DNA-barcoding om bacteriën, schimmels, protozoa en andere organismen te identificeren. DNA werd geëxtraheerd uit de bodemstalen, en het barcode-gedeelte van het 16S rRNA of ITS-gen werd vermeerderd met PCR. De vermeerderde sequenties (amplicons) werden ingediend voor sequentiebepaling in één of beide richtingen.

De sequentieresultaten worden vervolgens gebruikt om een DNA-database te doorzoeken (blast). Een nauwe overeenkomst identificeert snel een soort die al vertegenwoordigd is in de database. Sommige barcodes zullen echter volledig nieuw zijn, en identificatie kan afhangen van het plaatsen van de onbekende soort in een fylogenetische boom met nauwe verwanten. Nieuwe DNA-barcodes kunnen worden ingediend bij GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

# BIO-INFORMATICA ANALYSE

## Klas materialen

- Ipad, laptop of computer
- Sequence data: fastq

### Stap 1: Genereren van opgekuiste reads.

- Het bodemstaal van je school is sequenced om te ontdekken welke bodemmicroben er leven. Jouw eerste taak is om de ruwe reads te bekijken en te onderwerpen aan kwaliteitscontrole. Wat zijn reads?
- Reads: Bij NGS worden geavanceerde instrumenten gebruikt om de nucleotidevolgorde van een DNA-monster te bepalen. In algemene termen verwijst een "sequence read" naar de datarij van A, T, C en G basen die overeenkomen met het DNA-monster. Met Illumina-technologie worden miljoenen reads gegenereerd in één sequentie-run.
- Klik op de link: [www.bodemleven.be/school](http://www.bodemleven.be/school) en download je ruwe reads.
- Die ga je nu leren opkuisen/trimmen en bekijken:  
<https://github.com/Sofie8/Bodemleven-NGS/tree/main>

### Stap 2: Data-analyse met BLAST

- Op jouw ipad, computer of laptop, ga naar: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Klik op "Nucleotide BLAST" In het vak waar staat: Voer toegangsnummer(s), gi(s) of FASTA-sequentie(s) in, typ zorgvuldig de sequentie in die je hebt bepaald in de vorige stap. Controleer of het correct is ingetypt zonder spaties tussen de basen, scroll naar beneden en klik op de knop die zegt "BLAST".

### Stap 3: Karakterisatie van je bodemstaal

- Zodra je BLAST is voltooid (het kan enkele minuten duren), scroll naar beneden totdat je de sectie "BESCHRIJVINGEN" ziet die zegt: Sequenties die significante overeenkomsten produceren: Zoek de eerste vermelding, de wetenschappelijke naam van het organisme zal meestal de eerste twee woorden van de vermelde overeenkomst zijn. Als je niet zeker weet wat dit is, kopieer en plak het dan in je browser en ontdek met welk organisme jouw DNA-sequentie overeenkomt! Dit is wat er in jouw bodemstaal leeft.

## BODEMSTAAL RAPPORT

### Bodemstaal rapport: beschrijving en advies

Proficiat! Je hebt ontdekt welke (micro)organismen er leven in je schoolbodem, nu gaan we nog 1 stapje verder. Op basis van deze gegevens, zoek op het internet adviezen om je bodemleven te stimuleren. Vervolledig de tabel hieronder en maak zo je eigen plan voor een betere bodem!

Bodemstaal _____	Informatie; beoordeling:
Meest dominante bacteriën, schimmels, protisten	
Zijn er ziekteverwekkende microben gevonden (vb. Fusarium, Pythium..)	
Zijn er problemen met de plant/bodem (vb. mager gazon, engerlingen, mos, onkruid, vergeeld gazon, dor, slechte bodemstructuur, te lage pH..)	
Hebben naburige plekje dit ook? Maw verspreidt het probleem zich?	
Stel acties voor om je bodemleven in balans te brengen en/of als het al goed is, hoe ga je het verder onderhouden/verbeteren	
Foto's van de staalname plek	
Internationale websites, adviezen, producten, die kunnen worden toegepast om de bodem te verbeteren	

## DATABANK AANVULLEN

Na het vervolledigen van dit practicum, vul dan je gegevens aan in de BODEMLEVEN project databank en vermeld stalen, methodes, protocol notities.

<https://www.bodemleven.be/scholen>

### Databank met jouw bodemstaal gegevens

#### Methodes

- Stalen en informatie
- DNA extractie resultaten
- DNA extractie locatie
- Update protocol notities
- Sequence data

### Referenties:

- <https://www.bbc.co.uk/bitesize/guides/zyhrng8/revision/3>
- <https://serpmedia.org/scigen/l7.2.html>
- 3D: <https://icell.hudsonalpha.org/icell.html>
- <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- <https://www.collectedny.org/frameworkposts/comparing-four-cells-animal-plant-bacteria-yeast/>

### Auteur:

Deze practicum handleiding is samengesteld door Sofie Thijs, post-doc, CMK-UHasselt.