

OKEE

Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofielering

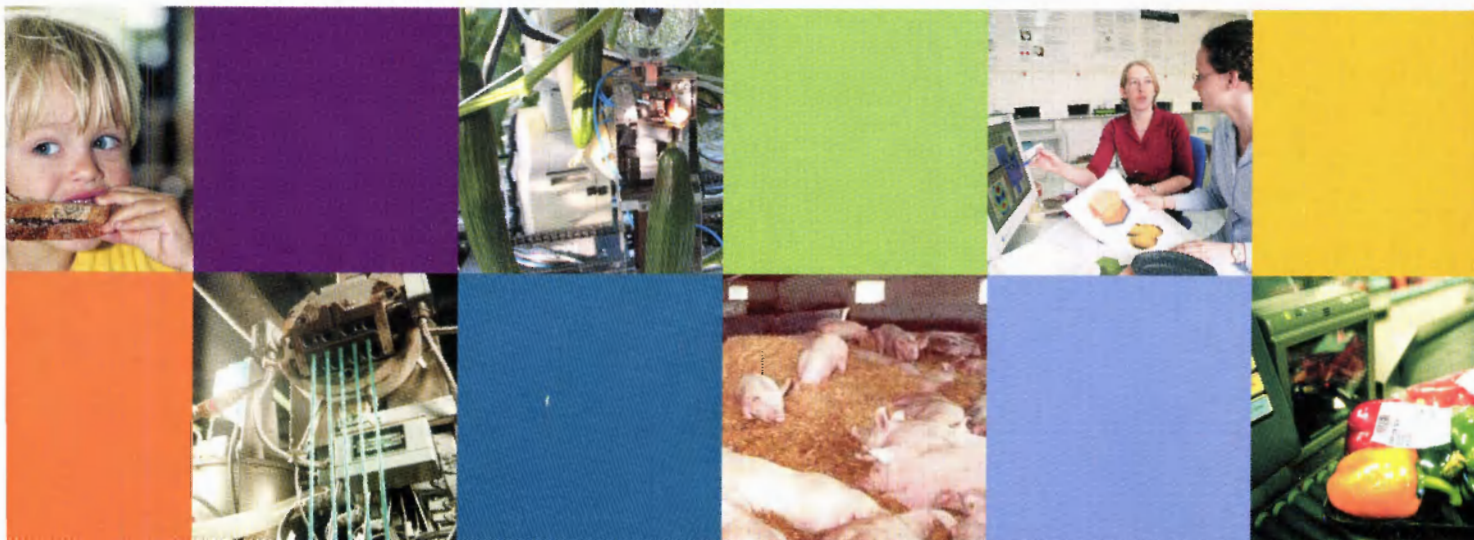
Voortgangsrapportage
Juli 2003 – Januari 2004

Ref.nr. 2003T1269 / 30 juni 2004

Consortium

Agrotechnology & Food Innovations BV
Plant Research International BV
KeyGene NV
Productschap 'Tuinbouw

Report 192



OKEE

Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofielering

Voortgangsrapportage
Juli 2003 – Januari 2004

Ref.nr. 2003T1269 / 30 juni 2004

Consortium

Agrotechnology & Food Innovations BV
Plant Research International BV
KeyGene NV
Productschap Tuinbouw

Report 192

2250877

Colofon



Titel	OKEE: Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofieling; Voortgangsrapportage Juli 2003 – Januari 2004
Auteur(s)	Consortium: Agrotechnology & Food Innovations BV, Plant Research International BV, KeyGene NV, Productschap Tuinbouw
A&F nummer	192
Publicatiedatum	Juni 2004
Vertrouwelijk	
Project code	2003T1269

Agrotechnology & Food Innovations B.V.
P.O. Box 17
NL-6700 AA Wageningen
Tel: +31 (0)317 475 024
E-mail: info.agrotechnologyandfood@wur.nl
Internet: www.agrotechnologyandfood.wur.nl

© Agrotechnology & Food Innovations B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeleelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, hetzij mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. De uitgever aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten of onvolkomenheden.

All right reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system of any nature, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publisher. The publisher does not accept any liability for the inaccuracies in this report.



Het kwaliteitsmanagementsysteem van Agrotechnology & Food Innovations B.V. is gecertificeerd door SGS International Certification Services EESV op basis van ISO 9001:2000.

Projectgegevens

Projectcategorie: **EET project**
Titel: **Optimalisatie van Keten Efficiëntie via Expressieprofilering (OKEE)**
Reductie van energieverbruik en uitval in de distributieketens van verse producten door innovatieve toepassing van genomics technologie
Projectnummer: EETK01122
Verslagperiode: 1 juli 2003 tot 1 januari 2004
Penvoerder: Dr. J.J. Mes, Agrotechnology & Food Innovations BV

Content

Projectgegevens	3
1 Voortgang in relatie tot de planning	5
1.1 Voortgang per taak over het afgelopen halfjaar	5
1.1.1 Ketenanalyse	7
1.1.2 Ontwikkelen kwaliteitsverloopmodellen	7
1.1.3 Analyse en definitie expressieprofielen	8
1.1.4 Ontwikkeling multiplex toetsmethode	8
1.1.5 Integratie en validatie	9
1.2 Kostenoverzicht	9
1.3 Mijlpalen komend halfjaar	9
2 Resultaten	11
2.1 Overzicht onderzoeksresultaten	11
2.2 Knelpunten en oplossingen	17
2.3 Octrooiaanvragen	18
2.4 Interne rapportages	18
2.5 Openbare publicaties	18
3 Conclusies	19
Bijlage 1 Deliverables OKEE	20

1 Voortgang in relatie tot de planning

Het doel in de drie jaar van het project is het leveren van een ‘proof of principle’ voor het concept dat complexe genexpressie profielen te koppelen zijn aan mathematische kwaliteitsverloop-modellen en dat deze methodiek resulteert in een beslissingsondersteunend instrument. Dit instrument zal de keten helpen in optimalisatie van de efficiëntie en het verbeteren van de duurzaamheid van verse producten in de distributieketens. Om dit te realiseren zal een analyse worden gemaakt van de meest voorkomende distributieketens voor de voorbeeldproducten roos en tomaat. De daaruit voortkomende knelpunten op het gebied van efficiëntie, kwaliteit en duurzaamheid zullen dienen als uitgangspunt voor het verder onderzoek. Voor elk product zal een kernknelpunt worden geselecteerd. Voor die knelpunten worden ketensimulatie experimenten opgezet, waarbij de effecten van diverse condities worden bekeken op producten van variabele kwaliteit. Gekeken zal worden naar regulier geteelde producten met variabel kwaliteitsverloop. Deze experimenten zullen zowel gebruikt worden voor het opstellen van kwaliteitsverloop modellen, als voor het in kaart brengen van de genexpressie. Ten behoeve van de genexpressie analyse zullen voor elk van de modelproducten cDNA banken worden gemaakt die verrijkt zijn voor genen die differentieel tot expressie komen tussen een goede en slechte herkomst (subtractie banken). Uit de cDNA banken zal een selectie worden gemaakt van ca. 1000 genen per product die de basis zullen vormen voor de specifieke microarrays. De gecombineerde data van fysiologische metingen en genexpressie profilering zullen worden gebruikt voor de selectie van een subset van sleutelgenen (ca. 50–200) die een goede indicator zijn voor de ontwikkeling van de productkwaliteit. Andersom zal de genexpressie van deze kandidaat indicatorgenen (met behulp van statistische programma’s) gebruikt worden voor het bepalen van betrouwbaarheidsintervallen van het kwaliteitsverloop. Bij het koppelen van genexpressie aan kwaliteitsverloop modellen zal uitgegaan worden van deze subset van geselecteerde genen. Er zal een toets ontwikkeld worden, gebaseerd op kwantitatieve RNA detectie, waarmee het expressieniveau van de gehele subset in één keer snel en betrouwbaar gemeten kan worden. Een verder inzoomen op genen met de beste indicatieve waarde zal resulteren in een selectie van een tiental genen die geïmplementeerd kunnen worden in een snelle toets.

Aan het eind van het project zullen de indicator genen set getoetst worden, gebruikmakend van de ontwikkelde multiplex toets methode, en zal de betrouwbaarheid en succes-rate van de hele toetsopzet beoordeeld worden. Deze ontwikkeling en marktpotentie die onderzocht zal worden zal een duidelijk beeld gaan opleveren over de haalbaarheid, economisch en ecologisch voordeel van een kwaliteittoets op basis van genexpressie.

1.1 Voortgang per taak over het afgelopen halfjaar

De uitvoering van dit project valt in een aantal taken uiteen die deels parallel uitgevoerd worden. Sommige van deze taken worden uitgevoerd over een langer tijdbestek (zie timechart, figuur 1).

TAAK 1 - Ketenanalyse

Een constante interactie met de praktijk zal onderhouden worden om mogelijke veranderingen in de knelpunten en logistieke problemen die invloed hebben op dit project in een vroegtijdig stadium op te merken en mee te kunnen nemen in besluitvorming en richting geven van het onderzoek. Resultaten van de kwaliteitsverloop-proeven zullen worden teruggekoppeld met de praktijk om de knelpunten te evalueren en te toetsen of we op het goede spoor blijven.

TAAK 2 - Ontwikkelen kwaliteitsverloop modellen (KVM)

Kwaliteitsverloop-proeven zullen (statistisch) geanalyseerd worden met als doel de producten te groeperen in kwaliteitsklassen die met elkaar vergeleken kunnen worden. Deze klassenindeling zal gebruikt worden om tot een keuze van de monsters voor genexpressie analyse te komen. Voor beide producten roos en tomaat zijn hiervoor velen partijen bemonsterd en tevens is van deze partijen de kwaliteit gemeten. Dit heeft informatie opgeleverd over seizoensinvloeden en herkomstinvloeden, naast minder voorspelbare invloeden, op de kwaliteit van een product. Deze resultaten zullen worden teruggekoppeld met de praktijk en meegenomen worden bij de ketenanalyse en modelvorming.

TAAK 3 - Analyse en definitie expressieprofielen

Het afgelopen halfjaar zijn de gensequenties van de roos en de tomaten cDNA en subtractie banken bepaald en zijn de genen geselecteerd die gebruikt gaan worden om op de microarray te spotten. Op het ogenblik worden de geselecteerde genen van zowel roos als tomaat vermenigvuldigd en gezuiverd om voldoende materiaal te verkrijgen om op de microarray glaasjes te spotten. Tevens worden controles gemaakt die op de microarray mee gespot dienen te worden ter controle en correctie van de genexpressie analyse.

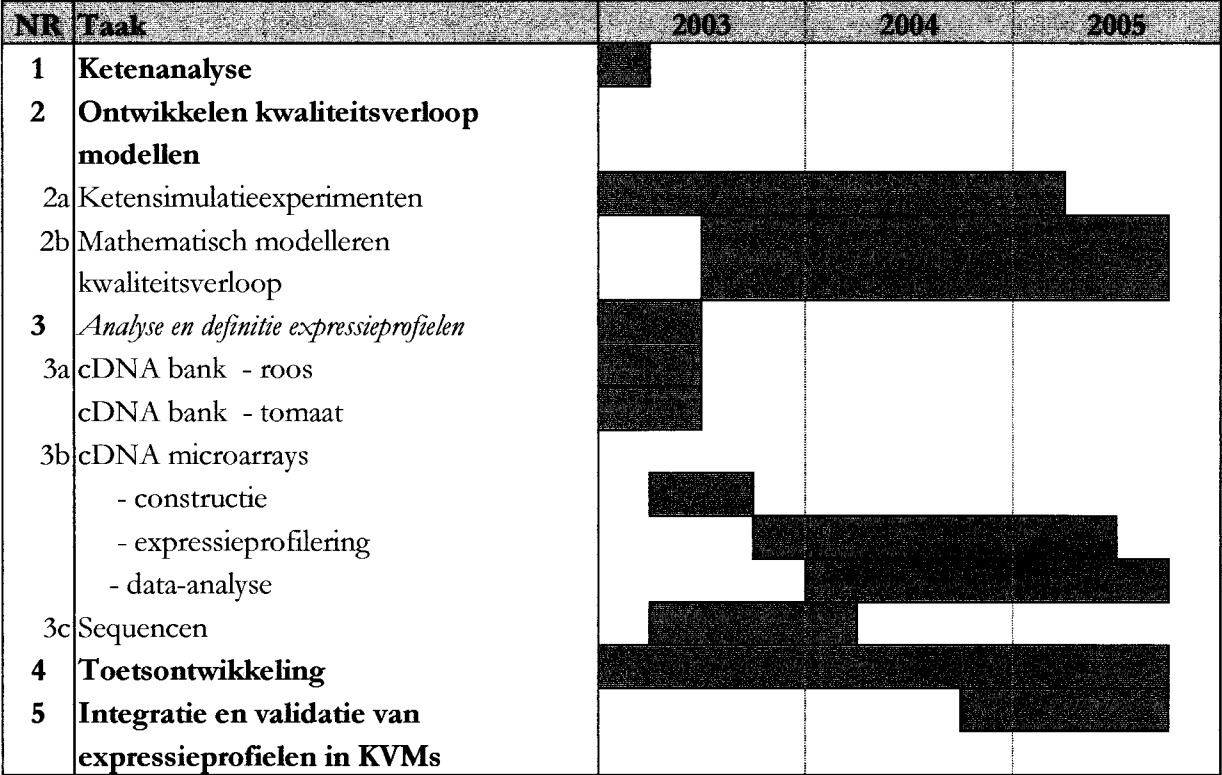
TAAK 4 - Ontwikkeling multiplex toetsmethode

De eerder geselecteerde constitutief tot expressie komende tomaat genen zijn gebruikt voor doorontwikkeling en optimalisatie van de QualityQuantifier (QQ) technologie voor gebruik op cDNA, mRNA en/of totaal RNA. QQ detectie direct vanuit RNA wordt vergeleken met QQ assays vanuit cDNA. Zodra sequenties van “indicatorgenen” van tomaat en roos beschikbaar komen zullen deze gebruikt worden in nieuwe QQ-assays.

TAAK 5 - Integratie en validatie van KVMs en genexpressie-profielen voor roos en tomaat

Nog niet van toepassing in de afgelopen periode.

Een gedetailleerde fasering per taak met tijdsplanning is weergegeven in de Gantt-chart. De voortgang per taak zal hieronder besproken worden.



Figuur 1 Timechart van het project verdeeld over de taken

1.1.1 Ketenanalyse

Door een constante interactie met de praktijk zullen veranderingen in de knelpunten en logistieke problemen die invloed hebben op dit project worden meegenomen bij het bepalen van de richting van onderzoek. Tot op heden hebben zich geen veranderingen in de ketens zoals opgesteld in een eerdere fase van het project voorgedaan en is er dus geen aanleiding het project zoals ingeslagen bij te sturen.

1.1.2 Ontwikkelen kwaliteitsverloopmodellen

Op basis van kennis en expertise van het product zijn er proeven gedaan waarin het kwaliteitsverloop efficiënt was te bepalen en te meten. Voor zowel roos als tomaat zijn de proeven uitgevoerd volgens het protocol dat in het eerste halfjaar van dit project was ontwikkeld. Bij roos zijn meerdere herkomsten en verschillende periodes in het jaar gebruikt om batches rozen te analyseren op het ontwikkelen van Botrytis aantasting op de bloemblaadjes. Deze analyses hebben een goed beeld opgeleverd van de variatie aan kwaliteitsverschillen die men kan aantreffen bij een dergelijk product. Met de 18 batches die nu geanalyseerd zijn en de statistische verwerking daarvan zijn we tot de conclusie gekomen dat er een redelijk indeling in kwaliteitsklassen te maken is op basis van Botrytis aantasting en we dus een eerste selectie kunnen maken voor monsters die we gaan analyseren met behulp van de microarray technologie. Om voldoende partijen in de verschillende klassen te krijgen voor een statistische betrouwbare

analyse zullen nog wel extra vervolgprouwen voor roos gedaan moeten worden. Voor tomaat zijn ook meerdere partijen op dezelfde manier geanalyseerd op verlies van stevigheid. Dit bleek een succesvolle proefopzet die een zeer duidelijk beeld van de invloeden op kwaliteit hebben aangetoond. De uitgevoerde bemonstering en analyses hebben voldoende resultaten en variabele partijen opgeleverd dat een eerste genexpressie analyse met deze monsters uitgevoerd kan worden. De voortgang voldoet hiermee aan de planning.

1.1.3 Analyse en definitie expressieprofielen

Een eerste basisbenodigheid voor de genexpressie analyse is een cDNA bank met DNA fragmenten van genen die op dat moment en in dat weefsel van het product aanstaan waar het kwaliteitsverlies optreedt of gaat optreden. Voor het product roos met als kwaliteitskenmerk Botrytis is gekozen voor de buitenste blaadjes van de bloem. In het eerste halfjaar van dit project is een bank gemaakt met daarin random genen uit roos petalen of verrijkt voor specifieke genen die aanstaan in besmette bloemblaadjes. De banken zijn inmiddels gesequenced (DNA volgorde bepalen) en dit levert de nodige informatie over wat voor verschillende type genen je allemaal kan vinden in roos petalen en welke genen ‘hard’ aanstaan. Na het uitfilteren van dezelfde genen en genen waarvan geen invloed op de kwaliteit verwacht kan worden zijn er 1205 geselecteerd om op de rozenarray te spotten.

Ook voor tomaat zijn de gemaakt subtractie banken die verrijkt zijn voor relevante genen in het afgelopen halfjaar gemaakt en gesequenced. Er zijn uit totaal 5 verschillende banken 1924 elementen gesequenced, waarvan er 1639 een bruikbare sequentie opleverden. Na onderlinge vergelijking bleek er sprake van 910 unieke, verschillende sequenties. Al deze, inclusief enkele duplicaties van sequenties die meerdere keren voorkwamen (totaal: 974) en controle-elementen voor kwaliteitsanalyse, zijn opgewerkt voor het maken van de microarray. Inmiddels zijn 50 objectglaasjes met elk twee kopieën van deze array geprint en klaar voor verder gebruik in de expressieprofilering.

Door wat ontwikkeltijd die nodig was voor de ondersteunende software voor data handeling heeft roos enige vertraging opgelopen maar heeft tomaat kunnen profiteren van die ontwikkeling zodat beide onderdelen roos en tomaat weer gelijk opgaan en op schema liggen.

1.1.4 Ontwikkeling multiplex toetsmethode

Basis voor de te ontwikkelen multiplex toets is de door KeyGene geïntroduceerde QQ technologie. Hierbij wordt gebruik gemaakt van hoogspecifieke DNA target herkenning op basis van oligo ligatie assays (OLA) en daaropvolgende amplificatie mbv PCR, gecombineerd met detectie van vooraf bepaalde lengtes van de specifieke ligatie producten. Met behulp van BLAST analyse zijn referentie tomaat genen geselecteerd, waarvan met cDNA-AFLP© is geverifieerd dat ze in diverse weefsels (vrucht, blad, wortel) constitutief tot expressie komen. Deze gensequenties zijn gebruikt voor doorontwikkeling van de QQ methode voor routine gebruik op direct geïsoleerd RNA, mRNA en cDNA. De eerste resultaten laten zien dat RNA als target gebruikt

kan worden in een aangepast QQ assay protocol maar dat de efficiency lager is dan bij een assay uitgevoerd op (c)DNA targets en dat verdere optimalisatie noodzakelijk is.

1.1.5 Integratie en validatie

Integratie en validatie van genexpressie analyses en kwaliteitsverloop modellen komen pas later in dit project aan bod.

1.2 Kostenoverzicht

De financiering en realisatie van het project loopt zoals begroot. In dit eerste jaar was relatief gezien de meeste uitputting begroot vanwege de inspanningen voor het maken van de microarrays en het sampelen van monsters. Dit is ook terug te vinden in de declaraties. Na dit eerste jaar heeft A&F 40% van het toegekende subsidie bedrag reeds besteed wat is gebruikt voor het maken van de rozenarray en het bemonsteren van rozen en tomaten uit de praktijk. Bij Plant Research International is de realisatie van het toegekende subsidie bedrag opgelopen tot 48%. Dit klopt met de planning aangezien PRI een belangrijk deel van de kosten in het sequencen en spotten van de rozen- en tomatenarrays heeft zitten. KeyGene heeft voor het opzetten van de basistechniek nu 33% gerealiseerd. Productschap Tuinbouw is nog niet aan declaratie toegekomen en zullen dit in een later stadium van het project doen.

1.3 Mijlpalen komend halfjaar

TAAK 1 - Ketenanalyse

Resultaten van de kwaliteitsverloop-proeven zullen worden teruggekoppeld met de praktijk om de knelpunten te evalueren en te toetsen of we op het goede spoor blijven.

TAAK 2 - Ontwikkelen kwaliteitsverloop modellen (KVM)

Voor zowel roos als tomaat zullen ook weer dit jaar vele partijen geanalyseerd worden om het kwaliteitverloop per partij was te stellen. Na gezamenlijke analyse van de partijen zal een selectie gemaakt worden welke partijen gebruikt zullen worden voor microarray analyse. In eerste geval om de bioindicatoren te vinden en in de tweede geval om de geselecteerde genen te toetsen op meer partijen uit verschillende seizoensperiode en telerherkomsten.

TAAK 3 - Analyse en definitie expressieprofielen

Komend half jaar zullen de eerste genexpressie profielen gemaakt worden voor roos en tomaat. Daarvoor zullen eerst nog RNA isolatie methoden, RNA labellings methoden en microarray hybridisatie protocollen geoptimaliseerd worden waarna begonnen kan worden met de eerste microarray hybridisaties van de in kwaliteit verschillende batches roos en tomaat.

TAAK 4 - Ontwikkeling multiplex toetsmethode

De QualityQuantifier technologie wordt getest en geoptimaliseerd voor gebruik op cDNA, mRNA en/of totaal RNA. QQ detectie uitgaande van RNA wordt vergeleken met QQ assays

uitgevoerd op cDNA. Een snel, gevoelig en robuust protocol wordt ontwikkeld voor routine toepassing. Zodra sequenties van indicatorgenen van tomaat en roos beschikbaar komen zullen hiervoor QQ assays ontwikkeld gaan worden evenals voor genen die in de onderzochte monsters een constante expressie vertonen. Deze laatste zullen mogelijk gebruikt kunnen worden voor normalisatie doeleinden.

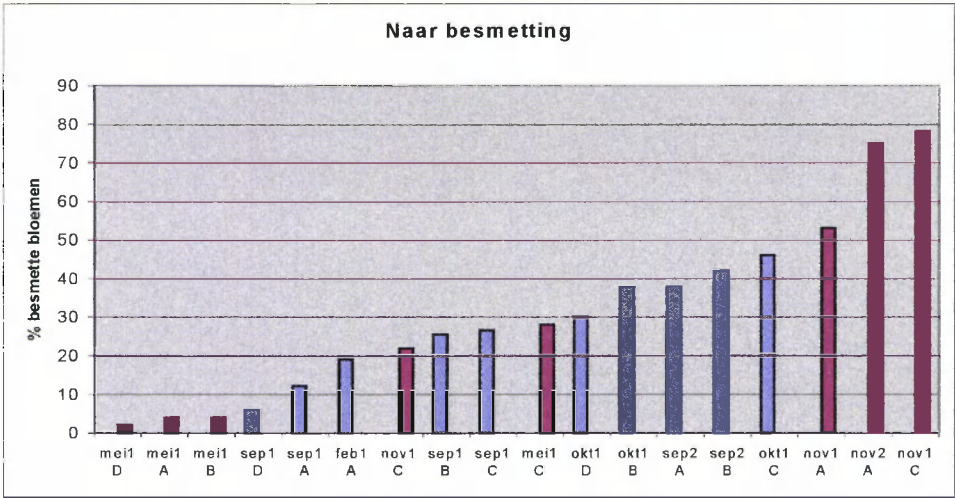
TAAK 5 - Integratie en validatie van KVMs en genexpressieprofielen voor roos en tomaat
Nog niet van toepassing in de komende periode.

2 Resultaten

2.1 Overzicht onderzoeksresultaten

De rozencultivar ‘Bianca’ blijkt in de praktijk gevoelig te zijn voor Botrytis aantasting. Zonder duidelijke symptomen tijdens de oogst blijkt dat in sommige partijen toch zeer snel Botrytis aantasting ontwikkelt, wat de visuele kwaliteit ernstig beïnvloedt. De proeven zijn daarom uitgevoerd met de witte rozencultivar ‘Bianca’ die direct geleverd zijn door een teler en vervolgens een standaard behandeling ondergaan. Deze rozen worden op vaas gezet bij een standaard luchtvochtigheid en kamertemperatuur, vergelijkbaar met de situatie bij de consument. Vervolgens wordt van deze bloemen het bloemstadium (verschillende fases van bloemknop tot complete verwelking) en Botrytis infectiestadium (0: geen tot 4: bruine vlekken, afhankelijk van het aantal Botrytis laesies en laesie oppervlak) bepaald.

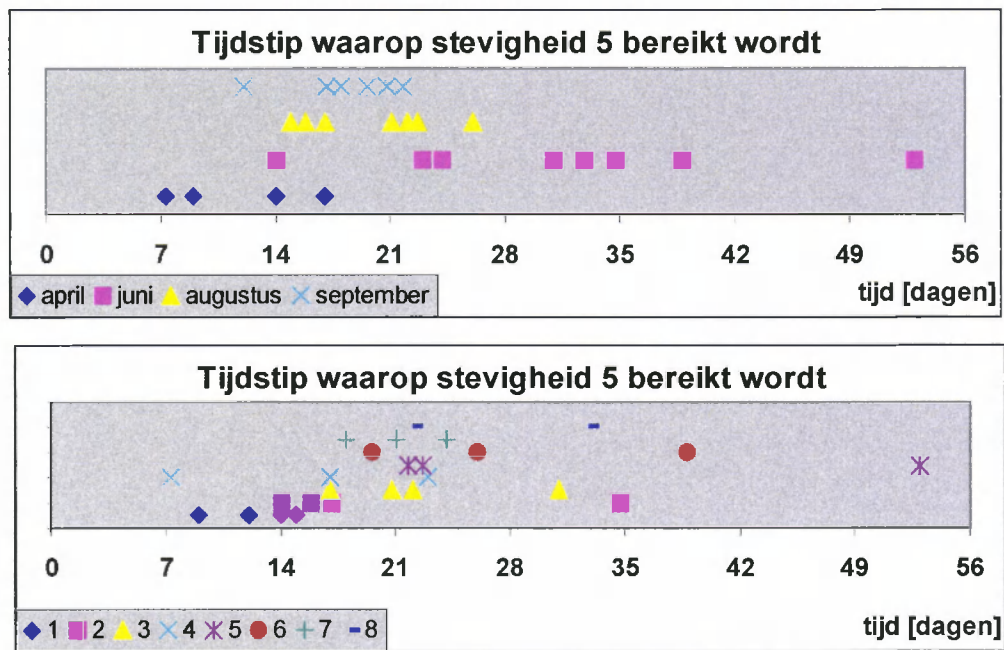
Op identieke wijze zijn ‘Bianca’ rozen geanalyseerd afkomstig van verschillende kwekers en op verschillende momenten in het jaar. De resultaten van deze experimenten staan in figuur 2. Daarin is te zien dat er veel verschillen zijn gevonden tussen de partijen, het percentage bloemen die aantasting van Botrytis laten zien varieert tussen de 2% en 78%. Het effect van de herkomst (teler) is niet heel duidelijk waarneembaar, daarentegen is wel een duidelijke seizoensinvloed te zien. De rozen die aan het eind van het jaar zijn geoogst (oktober-november) hebben meer problemen met Botrytis infectie. Voor de microarray analyse zullen de partijen opgedeeld moeten worden in kwaliteitsklassen. Daarvoor zouden verschillende grenzen gehanteerd kunnen worden. Een drie-klassen-indeling (goed, matig, slecht) zou gemaakt kunnen worden door de grens te leggen bij 20% en 40% besmette bloemen.



Figuur 2 Botrytis besmetting van 18 partijen ‘Bianca’ rozen geordend naar toename in % besmetting. De proeven zijn uitgevoerd verspreid over het jaar. De label A tot D geeft de teler, waar de bloemen vandaan komen, aan.

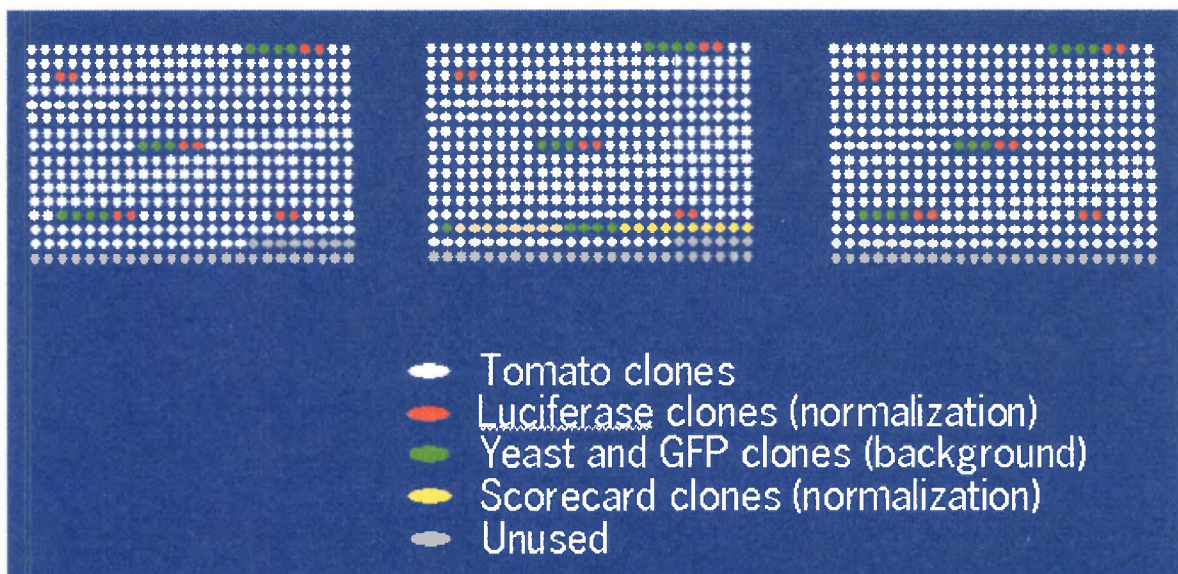
Ook zouden analyses gedaan kunnen worden waarbij de partijen opgedeeld worden in vier kleinere klassen. Voor de microarray analyse zullen we partijen kiezen die in deze klassen vallen om te zien of er indicatoren gevonden kunnen worden waarmee deze klassenindeling te voorspellen is.

De kwaliteitsverloop proeven bij tomaat hebben ook de nodige interessante gegevens opgeleverd. De proeven zijn uitgevoerd met de cultivar ‘Aromata’, een ras dat bekend staat om zijn problemen met stevigheid. De proeven zijn uitgevoerd in verschillende perioden in het jaar (april, juni, augustus en september) en de tomaten zijn afkomstig van 8 verschillende telers. De tomaten werden na aankomst bij A&F in een 18°C bewaarcel geplaatst en de initiële stevigheid en kleur bepaald, die van alle partijen nagenoeg gelijk waren. Vervolgens werd om de 2 tot 3 dagen de stevigheid gemeten totdat de grensstevigheid van 5 gehaald werd. Deze grenswaarde komt overeen met het moment dat ook een consument de tomaat als ‘te zacht’ zal beoordelen. In grafiek 3 zijn de gegevens weergegeven. In het bovenste panel staan de resultaten weergegeven naar de periode dat ze zijn uitgevoerd. Te zien is dat er veel verschillen ontstaan door het groeiseizoen. De tomaten uit april hebben een duidelijke korte houdbaarheid, terwijl die in juni het beste presteren. Dit komt overeen met het optimale groeiseizoen van tomaten. In het onderste panel staan de resultaten uitgezet naar teler. Ook hier zijn effecten van te herkennen, teler 1 doet het bijvoorbeeld gemiddeld slechter dan teler 6. Waar deze verschillen precies vandaan komen is onbekend en dat maakt het voor de praktijk zo moeilijk de houdbaarheid van een product in te schatten waardoor uitval in de keten ontstaat.



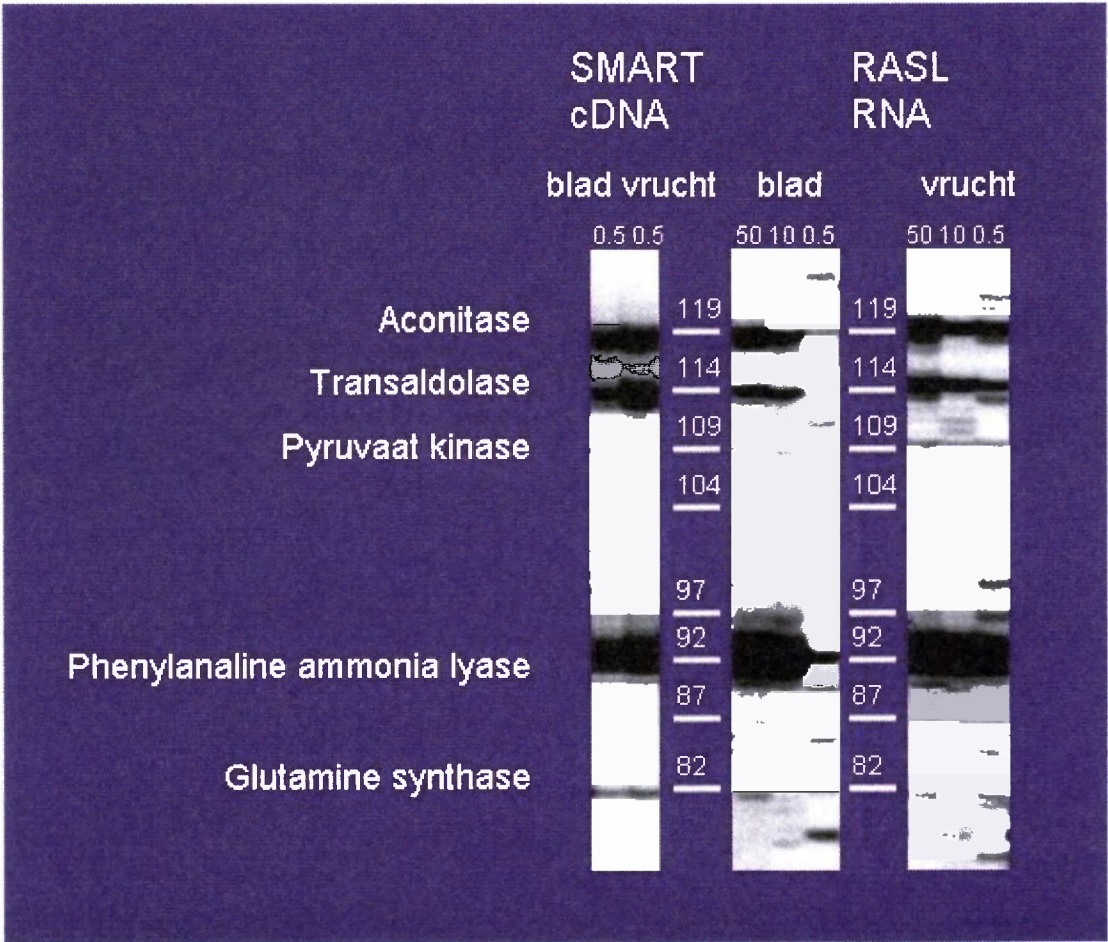
Figuur 3 Stevigheid van ‘Aromata’ tomaten uitgezet naar maand van de proef en naar teler. Uitgezet zijn het aantal dagen dat het product er over doet om de stevigheidsgrens van 5 te bereiken

Voor de microarray analyse worden deze partijen in 4 klassen verdeeld, de grens leggend bij 14, 21 en 28 dagen waardoor respectievelijk de klassen slecht, matig, goed en zeer goed ontstaan. De microarrays van tomaat zijn zo goed als klaar. De subtractie banken, harde min zachte vruchten (en omgekeerd) en groene delen van tomatomaat min rode vrucht, zijn met succes gemaakt en gesequenced. Na contig analyse (het analyseren van het voorkomen van dezelfde sequentie) van de sequenties zijn fragmenten geselecteerd die vervolgens vermenigvuldigd en gezuiverd worden waarna ze op de array gespot kunnen worden. De layout van de microarray zal er uit zien als weergegeven in figuur 4. Naast de tomaten spots zullen ook vele controle spot op de array gezet worden die het analyseren van de microarray data zullen vergemakkelijken.



Figuur 4 Layout van de tomaten microarray

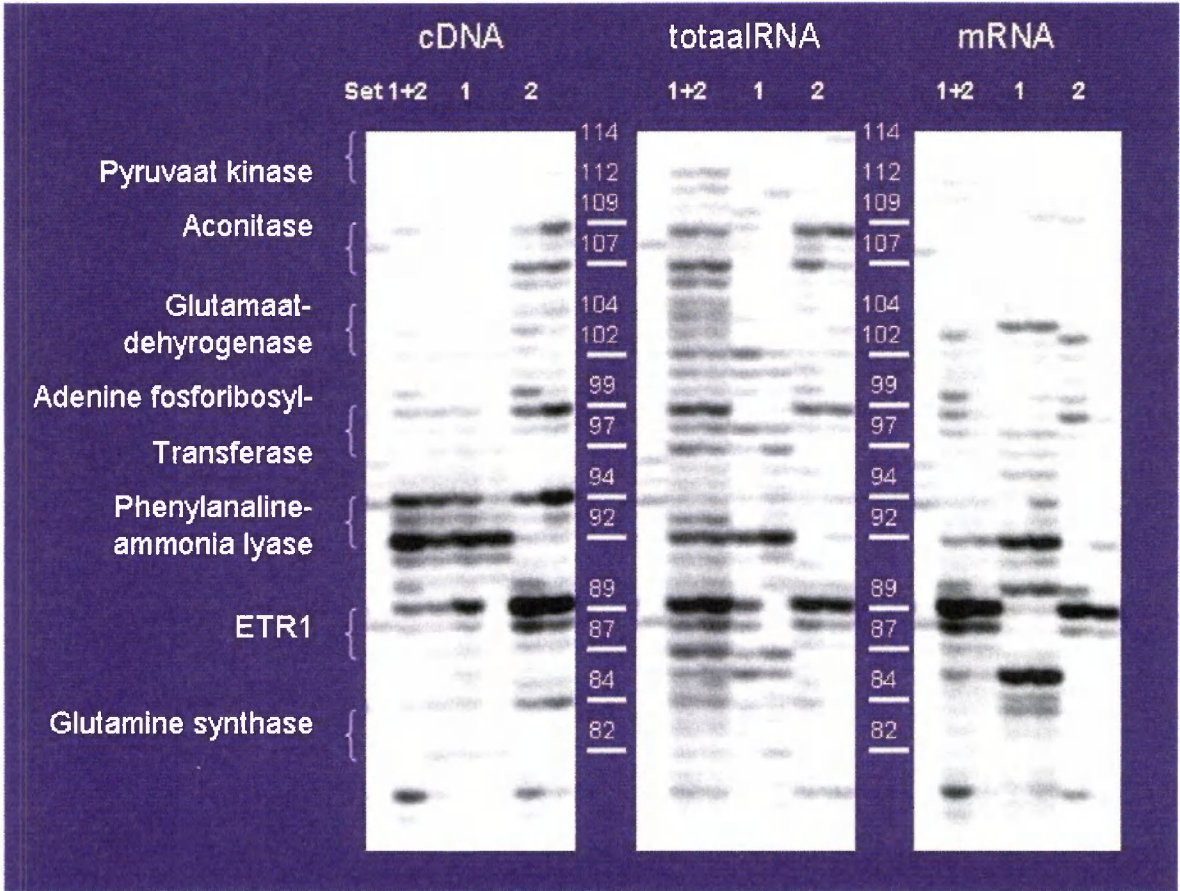
Basis voor de te ontwikkelen multiplex toets is de door KeyGene geïntroduceerde QualityQuantifier (QQ) technologie. Hierbij wordt gebruik gemaakt van hoogspecifieke DNA target sequentie herkenning op basis van oligo ligatie assays (OLA) en daaropvolgende PCR, gecombineerd met detectie van vooraf bepaalde lengtes van specifieke ligatie producten. In de afgelopen periode zijn zowel multiplex OLA assays op cDNA (DNA-DNA hybriden) als op RNA (RNA-DNA hybriden) getest. Omdat niet bekend was of het standaard bij de QQ assay gebruikte thermostabiele Taq ligase actief is op RNA-DNA hybriden is ook gebruik gemaakt van T4 DNA ligase, een ligase waarvan beschreven is dat het onder deze omstandigheden wel actief is. Als basis voor de aangepaste assays is de RASL (RNA mediated Annealing, Selection and Ligation) methodiek gebruikt waarbij gen specifieke OLA probes en gebiotinyleerde oligo-dT in één stap aan totaal target RNA gehybridiseerd worden waarna de gevormde hybriden gezuiverd en geconcentreerd worden van resterende vrije oligonucleotiden met behulp van streptavidine gecoate magnetische beads. De gehybridiseerde OLA probes worden met Taq of T4 DNA ligase aan elkaar geligeerd, gevolgd door amplificatie en detectie van de lengtespecifieke producten. Een voorbeeld van een aangepaste QQ assay is getoond in figuur 5. In deze assays zijn de OLA probes gebruikt waarvan al aangetoond is dat een deel op cDNA werkt.



Figuur 5 Voorbeeld van een QQ assay (8 genen) op tomaat blad en vrucht cDNA of RNA. De OLA probe hoeveelheid wordt gevarieerd en is aangegeven in fmol per assay. Specifieke producten zijn aangegeven met hun annotatie en bijbehorende lengtes.

Tomaat cDNA en totaal RNA targets zijn volgens respectievelijk het standaard QQ assay en het RASL-QQ assay protocol gehybridiseerd, geligeerd, geamplificeerd en gedetecteerd. Het eerste panel in figuur 5 laat de OLA-PCR producten zien die met de probes volgens het standaard QQ protocol gedetecteerd kunnen worden. In vergelijking hiermee laten het tweede en derde panel de corresponderende producten zien uitgaande van een RNA monster en gebruik makend van het RASL-QQ protocol. Duidelijk is te zien dat de RASL-QQ assay, ook zonder eerst mRNA te hoeven isoleren, werkt en dat zelfs de zwakkere fragmenten (pyruvaat kinase, glutamine synthase) goed gedetecteerd kunnen worden.

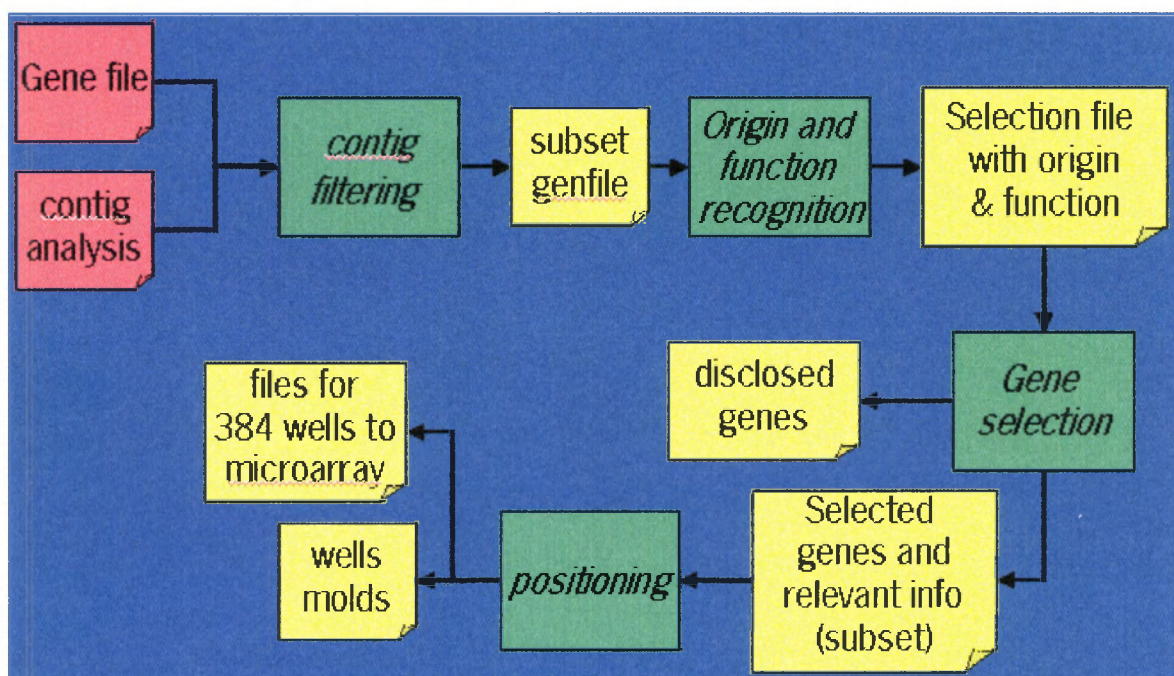
Omdat een aantal van de eerste OLA probes geen signaal gaven is een nieuwe set probes voor 7 genen ontworpen en gesynthetiseerd. Ook deze OLA probes zijn getest op cDNA en RNA. Een resultaat van dit assay is te zien in figuur 6.



Figuur 6 Voorbeeld van een QQ assay op cDNA en RNA. De probes zijn opgedeeld in twee sets (1 en 2) en gecombineerd (1+2). Genspecifieke producten zijn aangegeven met hun annotatie en bijbehorende lengtes.

Op tomaat cDNA, totaal RNA en mRNA is de RASL-QQ assay uitgevoerd. Daar waarbij uitgegaan werd van RNA, werd de isolatie van mRNA en de OLA probe hybridisatie in één stap uitgevoerd. Figuur 6 laat resultaten zien die vergelijkbaar zijn met die in figuur 5. In de totaal-RNA monsters konden producten voor alle 7 genen aangetoond worden. De resultaten zijn nog niet optimaal, er worden wisselende bandintensiteiten waargenomen en niet alle OLA fragmenten zijn zichtbaar in de verschillende targets. Verder zijn nog veel storende achtergrondbanden aanwezig die interpretatie van de assays bemoeilijken. Uit een reeks vervolggexperimenten is gebleken dat het toepassen van T4 DNA ligase voor de ligatie van RNA-DNA hybriden zeker werkt, maar met een lagere efficiëntie en slechtere reproduceerbaarheid. Het gebruik van RNA (met de RASL methode) is gezien de gevoeligheid voor afbraak minder geschikt voor routinematige analyses. Daarom wordt nu eerst een procedure getest waarbij eerst enkelstrengs cDNA wordt gemaakt waarna OLA (DNA-DNA) hybridisatie en ligatie plaatsvindt.

Ter ondersteuning van de sequence data (bepalen DNA volgorde), de contig analyse (het groeperen van fragmenten die van hetzelfde gen afkomstig zijn) en blast analyse (het zoeken naar homologe sequenties in de database met als doel het bepalen van een mogelijke biologische functie) heeft de bioinformatica ondersteuningsgroep enkele software programma's geschreven zodat dit minder arbeidsintensief werd en er minder fouten gemaakt konden worden, er wordt immers met grote data sets gewerkt. Naast deze programma's zijn er ook nog hulpmalletjes geproduceerd waarbij het selecteren van kloons en het overbrengen van de geselecteerd kloon naar een nieuwe plaat vereenvoudigd werd en fouten in dit proces konden worden uitgesloten. Figuur 7 geeft een overzicht van het proces.



Figuur 7 Overzicht van het proces van gensequenties tot het maken van de microarray dit gespot wordt uit 384 wells platen.

2.2 Knelpunten en oplossingen

Tot op heden hebben zich nog geen knelpunten voor gedaan. Ook voor het komende halfjaar verwachten we geen onoverkomelijke hindernissen op de weg te vinden.

2.3 Octrooiaanvragen

Nog niet van toepassing.

2.4 Interne rapportages

Interne verslagen, notulen en presentaties zijn opvraagbaar bij de projectleider J. Mes (A&F).

Notulen:

- OKEE vergadering met begeleidingscommissie, 26 september 2003

Documenten:

- Eerste Halfjaarverslag EET
- Eerste halfjaarverslag PT

Presentaties:

- Bijeenkomst met begeleidingscommissie, 26 september 2003:
 - OKEE algemeen
 - Voortgang Tomaat
 - Voortgang Roos
 - Data management
 - Voortgang multiplex toetsmethode
- OKEE bijeenkomst zonder begeleidingscommissie, 17 december 2003
 - Deliverables (presentaties toegevoegd als bijlage van dit verslag)
 - Voortgang Roos
 - Voortgang kwaliteit tomaat
 - Voortgang tomaat moleculair
 - Voortgang multiplex toetsmethode
 - OKEE algemeen

2.5 Openbare publicaties

Nieuwsbrief DLO 391, oktober 2003, jaargang 2, nummer 4. Genomicstechnieken helpen bij ketenoptimalisatie

3 Conclusies

De kwaliteitsverloop-proeven bij roos en tomaat hebben duidelijk gemaakt waar de problemen voor de praktijk vandaan komen. De kwaliteit van deze producten was ook in onze proeven zeer wisselvallig. Soms zijn de verschillen te verklaren door seizoensinvloeden en/of telerherkomsten maar deze verklaren lang niet alle variatie die we waarnemen. Het lijkt dan ook niet mogelijk om op basis van productkennis, expertise, kennis van seizoensinvloeden en telerachtergronden het kwaliteitsverloop van een product nauwkeurig te voorspellen. De toetsmethode waar we hier aan werken heeft dus, bij kans van slagen, duidelijke meerwaarde in het bepalen van intrinsieke kwaliteit om daarmee een basis te leggen voor een productgerichte keten. Deze ‘product-based’ keten moet dan als uitgangspunt hebben een keten die zo economisch mogelijk is en ecologische motieven zwaar laat meewegen.

Alle partners maken progressie en volgen daarmee nagenoeg de planning zoals eerder beschreven. De begeleidingscommissie die aanwezig was op de vergadering van 26 september 2003 was zeer tevreden met de voortgang die gemaakt is en was het eens met de keuzes zoals hier geformuleerd. Ondanks het voorspoedig lopen van het project moet toch niet het uiteindelijk doel vergeten worden. Daarom is in overleg met de leden van het consortium een lijst met ‘deliverables’ opgesteld zoals wij denken dat haalbaar is binnen de tijd en budget van dit EET project. Deze lijst is ook voorgelegd aan de begeleidingscommissie die geen aanmerkingen op deze lijst had. Voor alle duidelijkheid hebben we deze dan ook als bijlage toegevoegd aan dit verslag.



AGROTECHNOLOGY &
FOOD INNOVATIONS
WAGENINGEN UR

Deliverables OKEE

Consortium
26 januari 2004



Deliverables EET - OKEE

- Aanleiding
 - Verzoek EET
 - Verminderd budget
 - Geen vervolg COGITO project
- Waar willen we zijn aan eind van project

'Proof of principle', producten waarmee we verder kunnen acquireren (bij voorkeur gezamenlijk maar ook als losse componenten)

 - Kwaliteit kennis Roos en Tomaat
 - Indicatoren Roos en Tomaat
 - Tools
 - Multiplex toetsmethode
 - Informatie van en naar praktijk
 - Kennis overdracht
 - Economie en ecologie



AGROTECHNOLOGY &
FOOD INNOVATIONS
WAGENINGEN UR



Eisen voor een toets

- Indicatoren set
 - Niet te veel genen
 - Hoge mate van betrouwbaarheid
 - (Niet te cultivar specifiek)
- Toets methode
 - Robuust
 - Snel
 - Goedkoop
 - (Makkelijk te gebruiken)
- Economische en Ecologische winst door toepassen van toets



Kwaliteitskennis Roos en Tomaat

- Kwaliteitsbeoordeling Roos
 - Kenmerk toegespitst op 'Bianca' - Botrytis
 - Kwaliteit 'Bianca' rozen naar Herkomst en Seizoen
 - Kwaliteitsverloop model opstellen
- Kwaliteitsbeoordeling Tomaat
 - Kenmerk toegespitst op 'Aromata' - Stevigheid
 - Kwaliteit 'Aromata' tomaten naar Herkomst en Seizoen
 - Kwaliteitsverloop model opstellen



Indicatoren Roos en Tomaat

- Gen sequenties van >1000 unique cDNAs
- Gen expressie gecorreleerd aan Botrytis of stevigheid
- Gen expressie gecorreleerd aan batch kwaliteit
- Indicatorgenen set (< 100 genen) die kwaliteitsklasse kunnen voorspellen
- Voorspelling moet betrouwbaarder zijn dan inschatting nu op basis van algemene product kennis
- Validatie van indicator genen mbv ander genexpressie kwantificering methode
- Beslis moment
- Testen van indicatoren set op meer praktijk monsters



Tools

- Prototype Monsterregistratie systeem
- Prototype Software voor genomics activiteiten rond maken van microarray
- Software koppelen product data (herkomst, groei seizoen, kwaliteits data ect) met gen expressie data



Multiplex toetsmethode

- Toetsmethode uitvoerbaar door getrainde mensen op lab
- Toetsmethode uitvoerbaar voor >5 genen in multiplex
- Toetsmethode uitvoerbaar binnen 24 uur
- Toetsmethode gevalideerd met bekende gen expressie kwantificering methode
- Toetsmethode getest met aantal indicator genen voor minimaal één van de twee producten
- Kosten indicatie van toetsmethode (inclusief licenties)
 - aanschaf en onderhoud
 - mankracht
 - assay kosten(gerelateerd aan markt onderzoek over gebruik)



Informatie van en naar praktijk

- Publicatie in vakbladen
- Presentatie op een 'op de praktijk gerichte' bijeenkomst
 - bv PAC groente, sierteelt, fruit
- Marktonderzoek
 - voor welke andere producten, welke eigenschappen
 - wie willen het gebruiken
 - wat mag het kosten
 - hoe snel uitvoerbaar moet het zijn
 - om hoeveel monster zou het gaan



Kennis overdracht

- Presentaties op (inter-)nationale symposia (3 of meer)
- Poster presentaties (inter-)nationale symposia (3 of meer)
- Publicatie in internationaal tijdschrift (1 of meer)
- Publicatie in vakbladen (2 of meer)

