

RIVM rapport 340200001/2006

**Genomics: Implementatie, toepassing en toekomst**

J.L.A. Pennings, B. Hoebee

Contact: Dr. J.L.A. Pennings

Laboratorium voor Toxicologie, Pathologie  
en Genetica (TOX)

E-mail: [Jeroen.Pennings@rivm.nl](mailto:Jeroen.Pennings@rivm.nl)

Dit technische rapport werd geschreven in het kader van project S/340200: Genomics.

RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, telefoon: 030 - 274 91 11; fax: 030 – 274 29 71

## Rapport in het kort

### Genomics: Implementatie, toepassing en toekomst

Het RIVM heeft binnen de organisatie genomics opgezet. Genomics houdt zich bezig met grootschalig onderzoek aan DNA en genen. Inmiddels past het RIVM deze technologie toe in een groot aantal projecten, waarbij voornamelijk gebruik wordt gemaakt van transcriptomics. Hiermee wordt de expressie (activiteit) van duizenden genen tegelijkertijd gemeten. De verandering in de genexpressie van cellen of weefsels (bijvoorbeeld na blootstelling aan stoffen of micro-organismen) geeft aan welke biologische routes (in)actief worden. Dit leidt tot een beter begrip over het ontstaan van ziektes of toxicologische effecten. Het geeft mogelijkheden tot preventie, behandeling of interventie. Daarnaast kan het RIVM deze kennis inzetten om beter te adviseren over stoffen en geneesmiddelen. Het RIVM maakt ook gebruik van genomhybridisaties om te bepalen hoeveel kopieën van een gen in het DNA van een soort aanwezig zijn. Deze techniek wordt toegepast bij de typering van kinkhoeststammen. Voor het grootschalig typeren van de genetische variatie in de bevolking schaft het RIVM geen apparatuur aan. Dit type onderzoek zal het instituut samen met externe partners uitvoeren middels de Illumina-techniek. Met deze technologie kan het RIVM de rol van genetische variatie op het ontstaan en verloop van het metabool syndroom (een combinatie van overgewicht, hoge bloeddruk, hoge cholesterolwaarden en suikerziekte) en bepaalde infectieziekten bestuderen om risicogroepen vast te stellen. Ook kunnen gevoelige groepen geïdentificeerd worden ten behoeve van risicobeoordeling van stoffen en geneesmiddelen. Het RIVM verwacht genomics in een steeds groter aantal projecten toe te passen. Daarnaast is het van belang aanvullende technologieën zoals proteomics (het grootschalig bestuderen van eiwitten) RIVM-breed op te zetten. Proteomics zal een grote rol gaan spelen bij bevolkingsonderzoeken en in screeningsprogramma's van micro-organismen.

Trefwoorden: genomics, microarray, polymorfismes, omics

## **Abstract**

### **Genomics: Implementation, application, and future**

Genomics – the large scale analysis of hereditary information encoded in the DNA – has been implemented at the National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) in the Netherlands. In the near future other large-scale technologies will become important for the RIVM, including proteomics (the large-scale study of proteins), which will play a large role in screening applications on micro-organisms and for population screening programmes. Currently, mainly transcriptomics – the simultaneous measurement of gene expression changes in thousands of genes – is used. By comparing gene expression changes between cells/tissues treated with compounds or micro-organisms, for example, the biological pathways that become active (or inactive) can be determined. This leads to a better understanding of the origins of diseases or toxic effects and therefore to possibilities for prevention, treatment or intervention. This knowledge is also important for legislation on chemical substances and drugs. Additionally, genomic hybridisations were performed to determine the copy number of a gene in a genome. This technique is used for typing whooping cough strains. For large-scale typing of genetic variation it was decided not to invest in equipment, but to cooperate with external partners. This type of measurement applies to the study of the role of genetic variation in the origin and cause of the metabolic syndrome and certain infectious diseases so as to determine risk groups in the Dutch population. This application can also be used to identify risk groups for risk assessment of chemical substances and drugs. Genomics is currently used in an increasing number of projects. It is also important that additional technologies such as proteomics (and later possibly also metabolomics) are set up RIVM-wide.

Key words: genomics, microarray, polymorphisms, omics

## Samenvatting

Genomics omvat diverse methoden voor grootschalig onderzoek aan het genoom van een organisme. Binnen het RIVM-project Genomics (S/340200) zijn de microarray- en andere genomicsstechnologiën opgezet en beschikbaar gemaakt voor RIVM toepassingen. De hiervoor benodigde microarrayapparatuur is aangeschaft en operationeel gemaakt, de benodigde protocollen zijn ontwikkeld en er is een gebruikersoverleg opgezet. De arraytechniek is in het lopende moleculair biologische onderzoek geïntegreerd.

Binnen het RIVM wordt op dit moment in verschillende projecten gebruik gemaakt van transcriptomics, waarmee de verandering in de genexpressie van duizenden genen tegelijkertijd kan worden gemeten. Door genexpressie te vergelijken van controlecellen of -weefsels met die aan stoffen of micro-organismen blootgestelde cellen of weefsels kan bepaald worden hoe de cel/het weefsel reageert en welke biologische routes ge(in)activeerd worden. Dit geeft inzicht in de onderliggende mechanismen van ziektes of toxicologische effecten waarmee aangrijpingspunten voor preventie of behandeling in kaart kunnen worden gebracht. In de toxicologie kan deze kennis ingezet worden voor betere stoffen- en geneesmiddelenadviesing.

Naast transcriptomics wordt ook gebruik gemaakt van genoomhybridisaties om te bepalen hoeveel kopieën van een gen in een genoom aanwezig zijn. Deze techniek wordt toegepast bij de typering van kinkhoeststammen.

Voor het grootschalig onderzoek naar de rol van de genetische variatie (polymorfismes) in de Nederlandse bevolking op het ontstaan en verloop van ziekten, is onderzocht welke techniek het meest geschikt is voor de RIVM-vraagstellingen. Detectie van kleinere aantallen polymorfismes (1 – 10) is mogelijk met op het RIVM aanwezige apparatuur. Voor de detectie van grote aantallen polymorfismes wordt via een samenwerkingsverband gebruik gemaakt van de Illumina-techniek waarvoor de apparatuur aanwezig is op het UMC.

High-throughput bepalingen op eiwitexpressie (proteomics) zullen de komende jaren een nuttige aanvulling gaan vormen op het huidige RIVM-onderzoek. Aangeraden wordt hierin te investeren, bijvoorbeeld via een SOR-project.

# Inhoud

<b>SAMENVATTING .....</b>	<b>4</b>
<b>1. INLEIDING .....</b>	<b>7</b>
<b>2. TRANSCRIPTOMICS.....</b>	<b>9</b>
2.1 PRAKTISCHE UITVOERING .....	10
2.2 ANDERE ASPECTEN .....	15
2.3 ONTWIKKELINGEN .....	17
<b>3. ANDERE SOORTEN GENOMICS.....</b>	<b>21</b>
3.1 STRUCTURAL GENOMICS .....	21
3.2 GENOOMHYBRIDISATIES .....	21
3.3 POLYMORFISMEBEPALINGEN .....	22
3.4 ANDERE GENOMICSTECHNIEKEN .....	23
<b>4. ANDERE VORMEN VAN OMICS .....</b>	<b>25</b>
4.1 PROTEOMICS .....	25
4.2 METABOLOMICS .....	28
<b>5. INFORMATIE-UITWISSELING.....</b>	<b>33</b>
<b>6. CONCLUSIES .....</b>	<b>35</b>
<b>LITERATUUR .....</b>	<b>37</b>
<b>BIJLAGE I: PUBLICATIES.....</b>	<b>39</b>
<b>BIJLAGE II: SAMENWERKINGSVERBANDEN .....</b>	<b>41</b>
<b>BIJLAGE III: PROTOCOLLEN.....</b>	<b>44</b>



# 1. Inleiding

Onderzoek op het gebied van de moleculaire biologie heeft de laatste tien jaar een sterke ontwikkeling doorgemaakt door de opkomst van genomics-technieken. Genomics omvat diverse methoden voor grootschalig onderzoek aan het genoom van een organisme. Dit omvat zowel het analyseren van de genoomsequentie en -structuur, de manier waarop deze genen functioneren en tot expressie komen, als bepalingen van genetische variaties binnen een soort of populatie. In het verlengde van genomics liggen technieken met soortgelijke doelstellingen op eiwit- en metaboliëtniveau (“proteomics” en “metabolomics”).

Deze nieuwe ontwikkelingen en de daarbij gebruikte “high throughput” technieken zoals met name DNA-microarrays zijn van groot belang voor het RIVM-onderzoek. Dit geldt zowel voor het meer basale biomedische onderzoek, de toxicologie, als voor de toekomstige risicobeoordeling van stoffen en geneesmiddelen. Veranderingen in genexpressieprofielen van relevante targetorganen na blootstelling of infectie kunnen leiden tot een beter inzicht in het werkingsmechanisme van een stof dan wel tot een beter begrip van het ontstaan van infectie- en andere ziekten. Deze inzichten kunnen leiden tot nieuwe mogelijkheden voor preventie en daaraan gerelateerde beleidsadviezen.

Het belang van een inspanning op het gebied van genomics is eerder verwoord in de RIVM notitie “De betekenis van genetica en genomics voor het volksgezondheids-onderzoek van het RIVM” die in het voorjaar van 2001 door de Instituutsraad is aangenomen. Daarin werd aandacht besteed aan het afronden van het Human Genome Project en de kennis die dit zal opleveren over genen en genetische variatie, evenals de nieuwe technologische ontwikkelingen die hier uit voort kwamen zoals micro-arrays, proteomics, metabolomics, en de bijbehorende bioinformatica. De conclusie was dat op het RIVM behoefte is aan de integratie van deze kennis en technieken. Enerzijds omdat de toekomstige stoffen- en geneesmiddelenadviesing gebruik zal gaan maken van genomics-technologie en -kennis en anderzijds de implementatie hiervan in RIVM-onderzoek nieuwe mogelijkheden geeft om de invloed van onder andere stoffen, infecties, genetische variaties op een genoom-brede manier in een species/weefsel te bestuderen. Daarnaast ontstaan nieuwe mogelijkheden om genetische variatie op soortniveau te bestuderen. Aanbevolen werd onder meer om het genomicsonderzoek te richten op “... genetische aspecten van hartvaatziekten, kanker, obesitas en infectieziekten...” en de inspanningen op het genomicsgebied te richten op de adviesfunctie van het RIVM. Verder werd aanbevolen de activiteiten zoveel mogelijk te bundelen in één overkoepelende activiteit, en ten behoeve van deze activiteit ‘een inzet van 6-8 fte ondersteuning en 600 kf materieel krediet per jaar ter beschikking te stellen’.

Deze nota vormde onder meer de basis voor het SOR-project Genomics (S/340200), ondergebracht in het speerpunt Vernieuwing Meetmethoden. Binnen dit project is

invulling gegeven aan de in de nota genoemde conclusies en aanbevelingen door middel van het opzetten en implementeren van de genomicstechniek voor het RIVM. Hoewel in de oorspronkelijke opzet van dit project de projecten die gebruik maken van genomics voor een deel van hun capaciteit in dit project op waren genomen als blijk van onderlinge synergie, was het uiteindelijk toegekende budget slechts toereikend voor het operationeel maken en implementeren van de genomics-technologie.

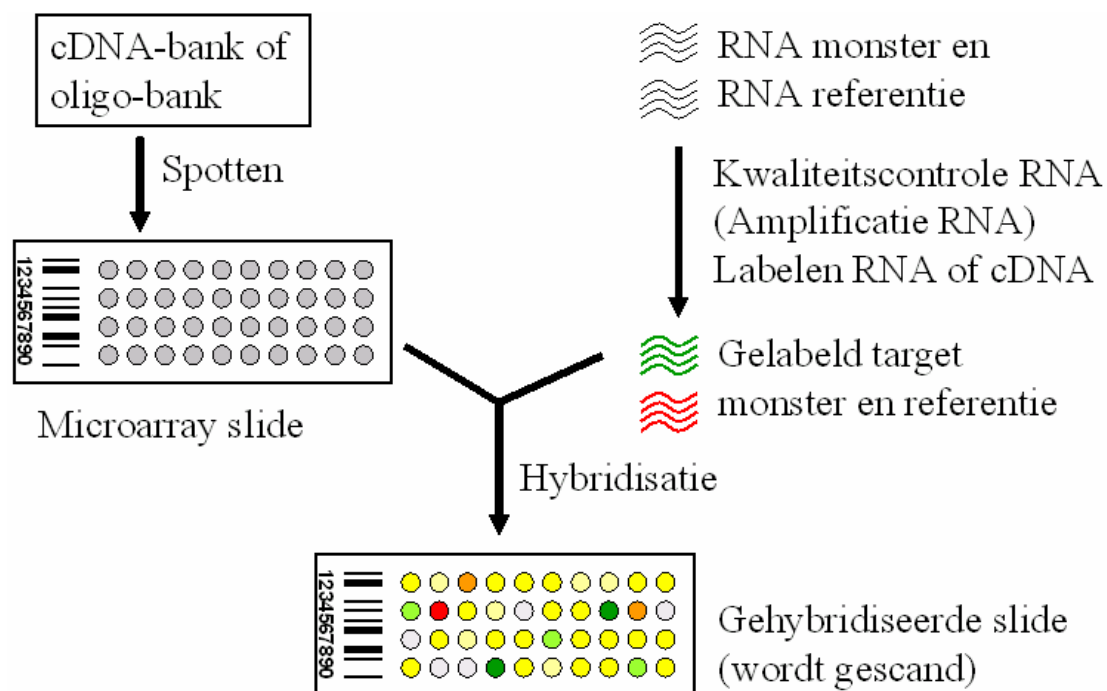
Binnen het project Genomics zijn twee deelprojecten ondergebracht. Het eerste deelproject "Microarray-unit" was gericht op het spotten van arrays en het uitvoeren van transcriptomics- of genexpressie-experimenten. In dit rapport zal een overzicht worden gegeven van wat er in dit deelproject is bereikt. Het andere deelproject betrof de "Bioinformatica-unit", die zich toelegde op de data-analyse van de verkregen resultaten. De resultaten die binnen dit project zijn bereikt zullen behandeld worden in een ander rapport (RIVM-rapport 340200002, Bio-informatica ten behoeve van genomics, in voorbereiding).

In hoofdstuk 2 wordt een overzicht gegeven van methoden en apparatuur die binnen de microarray-unit gebruikt worden en zoals ze worden ingezet in de meest gebruikte toepassing van genomics, namelijk transcriptomics. Naast transcriptomics worden op het RIVM ook andere vormen van genomics toegepast. Hierop zal nader worden ingegaan in hoofdstuk 3. Hoofdstuk 4 behandelt twee opkomende vormen van -omics, namelijk proteomics en metabolomics. In hoofdstuk 5 wordt besproken hoe genomicskennis uitgewisseld wordt binnen en buiten het instituut. Hoofdstuk 6 bevat de conclusies. Daarnaast wordt in Bijlage I een overzicht gegeven van publicaties waaraan vanuit het genomics-project een bijdrage is geleverd en geeft Bijlage II een overzicht van diverse samenwerkingsverbanden. Bijlage III bevat de momenteel gebruikte protocollen.



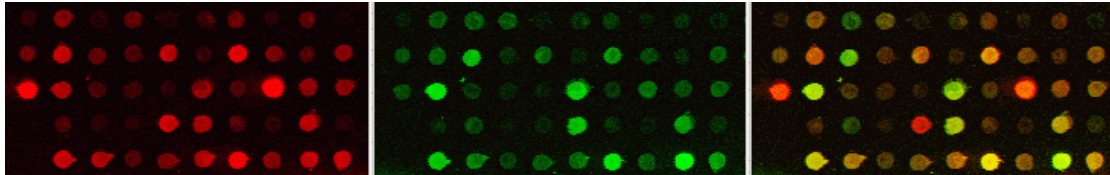
## 2. Transcriptomics

Binnen het genomicsonderzoek op het RIVM wordt voornamelijk gebruik gemaakt van transcriptomics. Deze techniek behelst het grootschalig bepalen hoe verschillende genen tot expressie komen en staat schematisch weergegeven in Figuur 1. Hiertoe wordt gebruik gemaakt van een microarray waarop van duizenden verschillende genen een kleine hoeveelheid DNA (cDNA of oligo) wordt aangebracht, elk op een specifieke positie van een objectglaasje (een “slide”). De genexpressie in een bepaald weefsel kan vervolgens worden bestudeerd door RNA uit de te bestuderen cellen of organen te isoleren en na omzetting tot cDNA of cRNA te labelen met een fluorescerende dye. Tevens wordt referentie-RNA met een andere fluorescerende dye gelabeld. De expressie van de op de array aanwezige genen kan daarna worden bestudeerd door de microarrays te hybridiseren met het gelabelde cDNA van zowel het analysemonster als het referentiemonster. Binding van de gelabelde cDNAs aan een complementair gen op de array geeft een fluorescerend signaal op de microarray (Figuur 2). Door de microarray na hybridisatie met behulp van een confocale laser te scannen wordt er een beeld gegenereerd met de fluorescentie signalen van de verschillende dyes. Computerprogramma’s analyseren deze signalen, visualiseren dit in spotvormige patronen en berekenen het signaal per dye voor iedere individuele spot. De intensiteiten van de dyes in de spots zijn een maat voor de expressieniveaus van de desbetreffende genen in de bestudeerde cellen of weefsels. Deze expressie-niveaus worden vervolgens verder verwerkt met data-analytische technieken.



Figuur 1: Workflow van een transcriptomics-experiment.

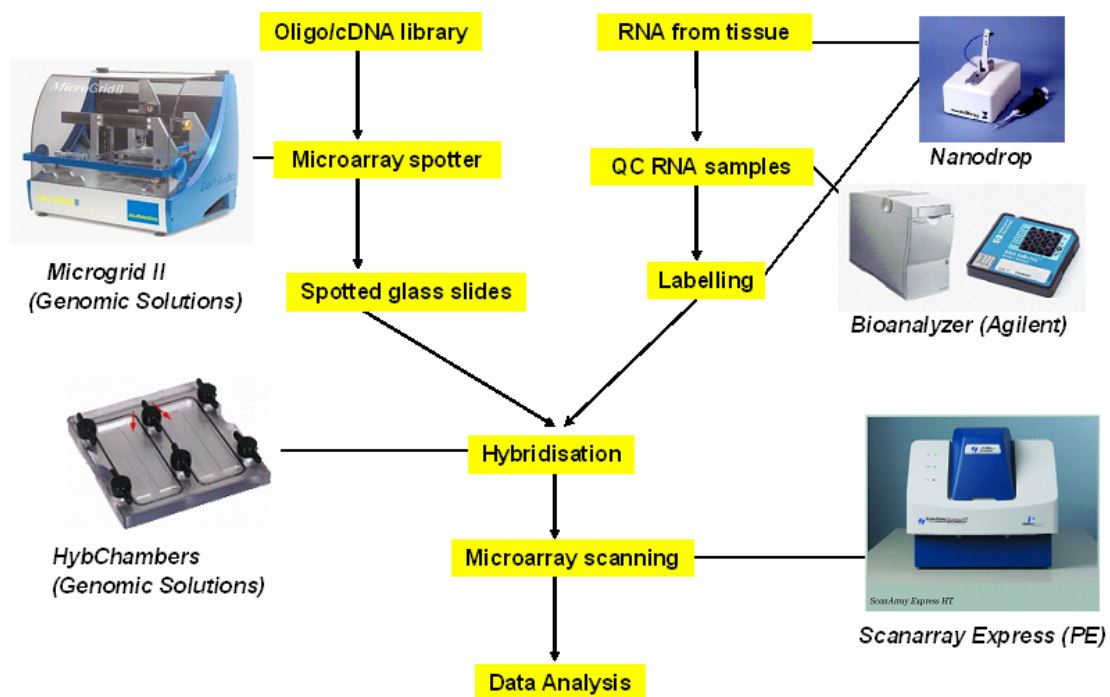
Voor transcriptomics-experimenten zijn er protocollen en data-analyse algoritmes ontwikkeld (zie Bijlage III). Tevens worden ervaringen uitgewisseld met andere arrayunits in Nederland en met enkele daarvan wordt intensief samengewerkt, zoals de MicroArray Department van de Universiteit van Amsterdam (UvA) en de arrayunits van het RIKILT, de Universiteit Maastricht (UM) en TNO Voeding.



Figuur 2: Fragment van een microarray-scan. V.l.n.r.: Cy5-scan, Cy3-scan en het gecombineerde beeld. Te zien is hoe sommige spotjes een verschillend signaal geven tussen Cy5 en Cy3. Deze geven in het gecombineerde beeld een rood of groen signaal.

## 2.1 Praktische uitvoering

Het RIVM heeft de beschikking over gespecialiseerde apparatuur voor het uitvoeren van genomics-experimenten (Figuur 3). Het meeste hiervan is ondergebracht in de microarray-unit. Deze is te vinden binnen het Laboratorium voor Toxicologie, Pathologie en Genetica (TOX) in ruimte A3.111 en A4.117. De meeste praktische werkzaamheden vinden plaats in A4.117. De verschillende stappen zullen hieronder worden besproken.



Figuur 3: Workflow van een microarray-experiment met daarin de aanwezige apparatuur aangegeven.

### ***Proefopzet***

Binnen het genomicsproject is veel aandacht besteed aan het adviseren van gebruikers over een goede proefopzet. Het is van belang een microarrayproef voldoende groot op te zetten zodat er achteraf duidelijke statistisch onderbouwde conclusies getrokken kunnen worden. Dit houdt onder andere in dat er binnen elke behandelingsgroep voldoende replica's moeten zijn zodat de statistische analyse voldoende power heeft. Om financiële redenen is dit meestal één van de eerste stappen waar gebruikers op willen bezuinigen en ook bij andere arrayunits wordt dit probleem onderkend. Het vereiste aantal replica's hangt af van het soort experiment. Grofweg kan men stellen dat voor een dierexperiment met congene stammen ("knaagdierstudie") vijf tot zeven dieren per groep voldoende zijn. In geval van patiëntenmateriaal is de onderlinge variatie meestal dermate groot dat men moet streven naar minimaal tien patiënten per groep. Voor micro-organismen of cellijnen geldt dat wanneer deze reproduceerbaar gekweekt kunnen worden er minder onderlinge variatie optreedt zodat vier tot vijf replica's voldoende zijn.

Naast een voldoende groot aantal replica's per groep is het van belang om hybridisaties uit te voeren met één individueel monster per array. Het poolen van RNA tot één of slechts enkele monsters per groep leidt tot verlies aan informatie over expressieverschillen tussen monsters onderling. Dit maakt het meestal onmogelijk om een verantwoorde statistische analyse uit te voeren. Slechts incidenteel kan het nodig zijn van deze regel af te wijken, bijvoorbeeld wanneer de hoeveelheid uitgangsmateriaal dermate beperkend is dat anders een analyse onmogelijk wordt. Aangezien de laatste jaren RNA-amplificatie een gangbare techniek is geworden doet deze situatie zich in de praktijk niet voor. De RNA-amplificatietechniek zal verderop worden besproken.

Bij microarrays wordt naast het te analyseren monster ook een referentiemonster gelabeld en gehybridiseerd op dezelfde slide. Door eenzelfde monster op alle slides te hybridiseren kan een vergelijking worden gemaakt tussen elk monster en de referentie op dezelfde slide. Zo kunnen indirect monsters op verschillende slides met elkaar worden vergeleken. Van dit principe wordt bij de normalisatie gebruik gemaakt om data van verschillende slides zo goed mogelijk vergelijkbaar te maken. De normalisatie zal verder worden uitgelegd in RIVM-rapport 340200002, Bioinformatica ten behoeve van genomics (in voorbereiding). Een goed referentiemonster dient vergelijkbaar te zijn met een doorsnee analysemonster. Hoe beter deze vergelijking opgaat, hoe beter monsters op verschillende slides na normalisatie kunnen worden vergeleken. In de praktijk wordt een goed referentiemonster meestal verkregen door het samen te stellen uit een mengsel van de te analyseren monsters.

Tot slot moet de hybridisatie van de verschillende monsters verspreid worden over verschillende uitvoeringsdagen, enerzijds om risico's op mislukte hybridisaties te spreiden en anderzijds om de invloed van dag-tot-dag effecten op de resultaten te

minimaliseren. Bij de experimenten is daarvoor een zekere mate van randomisatie in de uitvoering noodzakelijk.

### ***Spotten***

Voor het zelf produceren van microarrays heeft de arrayunit de beschikking over een MicroGrid II spotter van de firma Genomic Solutions (voorheen BioRobotics). Een van de redenen om zelf een spotter aan te schaffen was om niet afhankelijk te zijn van één specifieke firma, maar flexibel te kunnen zijn in zowel het soort gebruikte arrays als in het te spotten materiaal. Voor het spotten van cDNA-banken en de kwaliteitscontrole hierop zijn protocollen voorhanden. Omdat dit proces bijzonder gevoelig is voor omgevingsfactoren zoals stof, temperatuur en luchtvochtigheid is de betrokken apparatuurruimte (A3.111) voorzien van overdruk en klimaatcontrole, en is de toegang beperkt.

Enkele projectleiders hebben de beschikking over collecties met weefsel-specifieke cDNA-clones (onder andere vetweefsel, T-cellen) die voor de bijbehorende projecten werden gespot en gebruikt. Daarnaast heeft de arrayunit gezamenlijk met andere instituten (UM, RIKILT, TNO) een oligoset van de firma Operon aangeschaft die bestaat uit oligonucleotiden coderend voor 5704 rattengenomen.

De algemene trend op microarraygebied is om gebruik te maken van arrays waarop grote oligobanken (5000 – 40.000 oligo's) zijn gespot. Het spotten hiervan is dermate arbeidsintensief en specialistisch dat het financieel niet rendabel is om deze zelf te produceren. Dergelijke slides worden daarom ingekocht bij andere microarray-units. Kleine oligosets worden op verzoek van gebruikers wel op de arrayunit gespot.

### ***RNA-isolatie en controle***

Voor RNA isolatie wordt gebruik gemaakt van protocollen die ook voor andere moleculair biologische toepassingen worden gebruikt. Daarbij worden onder andere Qiagen-kits gebruikt. Hierbij worden organen of weefsels na sectie of monsternamen opgevangen in een zogeheten RNAlater-buffer en vervolgens maximaal een maand bewaard bij 4 °C of voor langere tijd bij -80 °C. Ook is het mogelijk om weefsels bij sectie meteen in te vriezen in vloeibare stikstof en vervolgens te bewaren bij -80 °C, daarna kan bij de RNA-isolatie hetzelfde protocol worden gebruikt als bij RNAlater. Voor bepalingen van de hoeveelheid RNA of DNA is een Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies) spectrofotometer aangeschaft. In tegenstelling tot andere spectrofotometers wordt hierbij geen gebruik gemaakt van een cuvet, maar wordt een druppel van het monster direct op het meetgedeelte gepipetteerd. Deze wordt vervolgens uitgetrokken tot een vloeistofkolom van 1 mm waarin de meting plaatsvindt. Op deze manier kan een spectrum worden bepaald in een volume van 1 à 2 µl met een detectielimiet van 2 ng/µl. Naast RNA- of DNA-kwantificering wordt de Nanodrop ook gebruikt voor meting van inbouw van fluorescerende labels als controle op de labeling (zie volgende paragraaf).

Voor transcriptomicsexperimenten is het daarnaast van groot belang dat het gebruikte RNA van goede kwaliteit is, dat wil zeggen niet verontreinigd en niet gedegeerd.

Voor de benodigde kwaliteitscontrole is een BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies) aangeschaft. Deze maakt gebruik van capillaire electroforese om een chromatogram van het gebruikte RNA-monster te genereren. Dit wordt vervolgens softwarematig geïnterpreteerd zodat een kwaliteitsscore (de zogeheten RIN-waarde) wordt verkregen. Gezien de goede ervaringen die gebruikers met deze apparatuur hebben, wordt deze ook voor andere projecten gebruikt waar opbrengst en/of kwaliteit kritische factoren zijn.

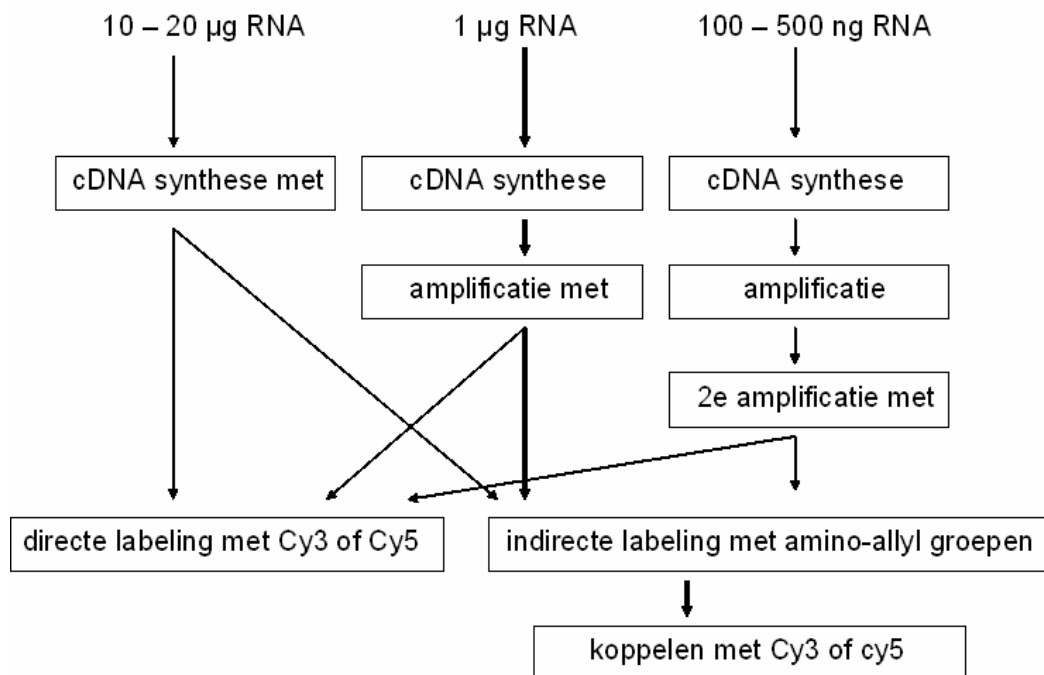
### ***Amplificatie en labeling***

Voor een gangbaar microarray-experiment wordt ongeveer 1 µg RNA gebruikt. Hierbij wordt allereerst het RNA gebruikt om dubbelstrengs cDNA te maken (Figuur 4). Bij de reverse transcriptiestap wordt een oligo-dT primer gebruikt die tevens een T7-promotorsequentie bevat zodat deze promotor ook in het uiteindelijke cDNA terecht komt. Dit cDNA wordt vervolgens geamplificeerd door middel van een in vitro transcriptiestap met T7-polymerase. Op deze manier wordt vanuit een kleine hoeveelheid totaal RNA (meestal 1 µg) een grotere hoeveelheid aminoallyl-RNA verkregen (meestal 30 à 100 µg). Tijdens deze amplificatie wordt aminoallyl-bevattend UTP ingebouwd. Aan het aminoallyl-RNA wordt daarna in een volgende reactie de N-hydroxy-succinimidyl-ester van de fluorescerende labels Cy3 of Cy5 gekoppeld. Het gelabelde materiaal wordt vervolgens gehybridiseerd op een array. Omdat de labeling in twee stappen plaatsvindt wordt deze manier van koppelen aangeduid als een indirecte labelingsmethode. Het is echter ook mogelijk om Cy3- of Cy5-gekoppelde basen in te bouwen tijdens de vorming van geamplificeerd RNA (aRNA). Deze methode wordt een directe labeling genoemd. De indirecte labeling leidt echter tot een hogere inbouw van Cy3 en Cy5, omdat een aminoallyl-groep kleiner is zodat er minder sterische hindering optreedt. Bij transcriptomics-experimenten op het RIVM wordt momenteel alleen nog maar indirecte labeling toegepast.

Wanneer de hoeveelheid uitgangsmateriaal voldoende groot is (meer dan 10 µg) is het mogelijk de amplificatiestap weg te laten en alleen een reverse transcriptiestap uit te voeren. Daarbij heeft men de mogelijkheid om naar keuze een directe (vroeger veel gebruikt) of indirecte (nu meest gangbaar) labeling uit te voeren door inbouw van een aminoallyl- dan wel Cy3- of Cy5-gekoppelde base. Een voordeel van RNA-amplificatie is echter dat een grotere hoeveelheid RNA gebruikt kan worden voor de uiteindelijke labeling, wat de signaal-ruis verhouding op de array ten goede komt, en daarmee ook de data-analyse. Dit heeft ertoe geleid dat RNA amplificatie bij de transcriptomicsexperimenten ook wordt toegepast wanneer dit gezien de hoeveelheid beschikbaar RNA niet direct noodzakelijk is. Een uitzondering hierop vormen transcriptomicsexperimenten op micro-organismen. Enerzijds zijn deze vaak op zodanig grote schaal te kweken dat de hoeveelheid RNA geen praktisch probleem vormt, anderzijds leent het mRNA van micro-organismen zich niet voor de amplificatie omdat het geen poly-A staart bevat. Om deze redenen wordt voor

genexpressie-arrays van bijvoorbeeld kinkhoest gebruik gemaakt van reverse transcriptie met indirecte labeling.

Wanneer gebruik gemaakt wordt van amplificatie ligt de ondergrens voor een bruikbare labeling op 300 à 500 ng totaal RNA. Wanneer de hoeveelheid materiaal nog beperkter is, is het mogelijk om na de amplificatie een tweede amplificatiestap uit te voeren. In dat geval ligt de ondergrens voor een bruikbare labeling op 100 ng totaal RNA. Een tweede amplificatiestap wordt op het RIVM toegepast voor RNA afkomstig uit humane biopten, aangezien in dergelijke gevallen de hoeveelheid materiaal zeer beperkt is.



Figuur 4: Workflow voor amplificatie en labeling van RNA, uitgaande van verschillende hoeveelheden uitgangsmateriaal. De meest gebruikelijke aanpak uitgaande van 1 µg RNA is vet aangegeven.

### Hybridisatie

Voordat de hybridisatie kan worden uitgevoerd is het in sommige gevallen nodig de slides voor te behandelen. Bij deze voorbehandeling wordt het oppervlak van de slide chemisch geïnactiveerd waardoor er minder specifieke binding zal optreden en minder achtergrondsignaal wordt verkregen. Of deze stap nodig is ligt aan het gebruikte type slide. De voorbehandeling wordt uitgevoerd voor ratten- en kinkhoest-arrays maar niet voor muizen- en humane arrays (zie Bijlage III).

Bij de hybridisatie wordt het gelabelde monster handmatig opgebracht op de slide en afgedekt met een dekglasje. Vervolgens wordt het geïncubeerd in een afgesloten kamertje waarbij de slides onder constante luchtvochtigheid gedurende een nacht geïncubeerd kunnen worden zonder opdrogen. Op het RIVM zijn hiervoor Dual HybChambers (Genomic Solutions, voorheen GeneMachines) aanwezig.

Na gedurende een nacht hybridiseren worden de slides gewassen en gedroogd volgens een standaardprotocol (zie Bijlage III).

Diverse arrayunits in Nederland hebben de laatste jaren een hybridisatiestation aangeschaft voor het uitvoeren van hybridisaties. Bij dit soort apparatuur wordt een aantal microarrays in het apparaat geplaatst, waarna de hybridisatie-, was- en droogstappen verder (semi-)geautomatiseerd verlopen. Er is bij arraygebruikers nagevraagd in hoeverre er behoefte was aan een dergelijke aanschaf voor het RIVM. Een betrekkelijk nadeel van een hybridisatiestation is dat het onderhoud en de experimentele uitvoering door gespecialiseerde medewerkers moeten gebeuren. Enerzijds zou hiervoor capaciteit moeten worden vrijgemaakt, anderzijds gaat dit bij het plannen van experimenten ten koste van de flexibiliteit. Daarnaast zijn de ervaringen met dit soort apparatuur in Nederland niet altijd beter dan met handmatige uitvoering. Tot slot is de schaal waarop binnen het RIVM microarray-experimenten worden uitgevoerd niet zodanig dat een hybridisatiestation tot een efficiëntere uitvoering zal leiden. Om deze redenen is besloten dat er voorlopig niet wordt geïnvesteerd in een hybridisatiestation.

### ***Scannen***

Het scannen van microarrays vindt plaats in A3.111. Deze ruimte is voorzien van overdruk en klimaatbeheersing aangezien de fluorescerende labels gevoelig zijn voor temperatuur en luchtvochtigheid. Dit geldt met name voor Cy5, deze wordt aangetast door ozon in de lucht en de afbraak vindt beduidend sneller plaats in een vochtige omgeving. Door de genoemde aanpassingen aan de ruimte is dit aspect onder controle.

Als microarrayscanner is een ScanArray 4000XL (Perkin-Elmer) aanwezig. Deze scanner is voorzien van drie lasers (654, 594, 633 nm) en heeft een barcodereader en autoloader. Deze laatste optie biedt de mogelijkheid meerdere slides tegelijkertijd in te zetten zodat men niet constant bij het apparaat aanwezig hoeft te zijn. Voor het gebruik van de scanner is een gebruikersprotocol geschreven.

De verkregen microarrayscans worden vervolgens verder verwerkt met daarop gerichte software. Dit zal verder worden behandeld in het bioinformatica-rapport (RIVM-rapport 340200002, Bioinformatica ten behoeve van genomics, in voorbereiding).

## **2.2 Andere aspecten**

### ***Validatie van microarray-experimenten***

Naast een goede proefopzet is ook een vorm van bevestiging of validatie van de resultaten noodzakelijk. In het transcriptomicsonderzoek kan men grofweg drie vormen van validatie onderscheiden.

1. Valideren van metingen aan individuele genen. Hiervoor wordt met name realtime-PCR gebruikt, in mindere mate Northern blots of in situ hybridisatie.

Validatie middels realtime-PCR kan worden gezien als een controle op de technische betrouwbaarheid van de microarraymetingen. De realtime-PCR techniek heeft zichzelf inmiddels bewezen als een nuttige manier om gevonden verschillen in genexpressie te bevestigen. In toenemende mate gaat de belangstelling echter uit naar de volgende twee soorten validatie.

2. Het meten van veranderingen op een ander biologisch niveau dan genexpressie. Onder deze vorm van validatie vallen aspecten als eiwitexpressie en metabolietconcentraties. Deze data kunnen worden gezien als aanvullend op de transcriptomicsdata, wat in bepaalde gevallen een meerwaarde kan opleveren. Deze experimenten kunnen bestaan uit enkelvoudige metingen zoals Western blots of enzymatische assays, maar de laatste jaren is er een toenemende interesse in grootschalige analyses aan eiwitten (proteomics) en metabolieten (metabolomics). De principes achter proteomics en metabolomics zullen verderop in dit rapport nader worden besproken.
3. Validatie gericht op de consistentie van de data met andere bekende (literatuur)data. Dit kan zowel gebeuren met genexpressieveranderingen van individuele genen, maar ook door te kijken in welke metabole routes of functionele categorie ("pathways") deze veranderingen plaatsvinden. Deze pathway-analyse is tegenwoordig een gangbaar onderdeel van de data-analyse, en dient niet alleen voor de validatie maar vooral voor het interpreteren van de resultaten. Wanneer arraydata op pathwayniveau worden vergeleken zijn eventuele verschillen tussen de gebruikte arrays of technische variatie minder bezwaarlijk dan wanneer op individueel genniveau wordt vergeleken, zodat de vergelijking robuustere resultaten op zal leveren. Deze methode wordt verder uitgewerkt in het bioinformaticarapport.

### ***Kosten***

Met name bij projecten waarbij voor het eerst microarrays worden gebruikt speelt de vraag wat de kosten voor een dergelijk experiment zullen zijn. Een standaardprijs kan hiervoor niet worden gegeven omdat dit afhangt van het type experiment en de proefopzet. Zaken als RNA-isolatie en disposables zijn relatief goedkoop en hiervoor moet men ongeveer 5 euro per monster rekenen. Voor een oligonucleotide-array zoals deze momenteel gebruikt worden bedragen de kosten 100 tot 200 euro per slide, dit is onder meer afhankelijk van het aantal oligo's en de hoeveelheid slides die gekocht worden. Wanneer gebruik gemaakt wordt van labeling van een RNA- en een referentiemonster bedragen de kosten voor de labeling 80 euro per slide. Wanneer daarnaast ook gebruik wordt gemaakt van RNA amplificatie wordt dit bedrag 130 euro per slide. In totaal zijn de materiaalkosten voor een doorsnee transcriptomics-experiment 300 euro per microarray slide.



## 2.3 Ontwikkelingen

### *Achtergrond*

In 2001 is vanuit centrale RIVM-gelden 600 kf beschikbaar gesteld voor de aanschaf van (een deel van de) benodigde apparatuur voor genomicsexperimenten. Hierbij moest een keuze worden gemaakt tussen enerzijds een Affymetrix-systeem, dat gebruik maakt van kant-en-klare arrays in combinatie met eigen apparatuur, of spotted arrays waarbij arrays die in huis of elders zijn gespot kunnen worden gebruikt. Mede met het oog op de diversiteit van het RIVM onderzoek werd het noodzakelijk geacht flexibel te kunnen zijn in de keuze voor een type array of organisme, vandaar dat er gekozen is voor een spotted-array systeem. Daarnaast speelde een rol dat het gebruik van Affymetrix op dat moment dermate duur was dat voor veel projecten dit niet kon worden opgebracht.

### *Beschikbare arrays voor diverse organismen*

Op dit moment wordt er voor het genomicsonderzoek op het RIVM gebruik gemaakt van oligoslides voor de muis, rat, mens en Bordetella pertussis (kinkhoestbacterie). In de loop van dit jaar zullen ook arrays gericht op Neisseria meningitidis (meningococ, type B) in gebruik worden genomen. Voor de komende paar jaar wordt het gebruik voorzien van arrays gericht op andere pathogenen en de zebravis.

Naarmate van meer organismen de complete genomsequentie beschikbaar komt zal met name het aantal micro-organismen waarmee transcriptomicsexperimenten gedaan kan worden toenemen. Daarbij kan worden opgemerkt dat dergelijke arrays ook bruikbaar zijn voor CGH-experimenten (zie paragraaf 3.2).

Voor mens, muis en rat (en zebravis) zijn oligocollecties of kant-en-klare slides verkrijgbaar via diverse leveranciers en fabrikanten. Met name voor micro-organismen is dit echter niet het geval, omdat de markt voor dergelijk onderzoek klein is. In dergelijke gevallen geldt dat het zelf (laten) ontwikkelen en spotten van oligo-arrays de meest voor de hand liggende optie is.

### *Beschikbare microarray systemen*

Op dit moment maakt de arrayunit gebruik van gespotte cDNA- en oligo-arrays waarop twee monsters worden gehybridiseerd. De huidige microarrayscanner is dan ook gericht op het gebruik van gespotte cDNA- en oligo-arrays. De huidige microarrayhardware is grotendeels in de periode 2001-2002 aangeschaft en over enkele jaren zal de scanner aan vervanging toe zijn. Op dat moment kan de scanner worden vervangen door een nieuwe scanner die eveneens bedoeld is voor spotted arrays, al dan niet van een nieuwer type. De laatste jaren maken arrayunits in Nederland en daarbuiten in toenemende mate gebruik van andere systemen, met name dat van Affymetrix. Ook vanuit het RIVM wordt via enkele samenwerkingsverbanden inmiddels ook gebruik gemaakt van de Affymetrix- en Agilent-systemen. Wanneer de scanner aan vervanging toe is valt het dan ook te overwegen om over te schakelen op

een ander systeem gebaseerd op een ander type microarrays. Hiervan zijn verschillende vormen in omloop, maar het achterliggende principe is in al deze gevallen gelijk, namelijk hybridisatie van gelabeld cDNA of RNA aan DNA dat gebonden is aan een vaste drager. Er zijn echter technische verschillen die ervoor zorgen dat in de meeste gevallen specifieke apparatuur is vereist.

- De bekendste van deze systemen is het Affymetrixsysteem. Het principe hierachter bestaat uit verschillende korte oligo's per gen die op een glaasje chemisch worden gesynthetiseerd. Hierbij worden door de gebruikers kant-en-klare arrays gekocht die met specifieke Affymetrix-apparatuur worden gehybridiseerd en gescand. Hierbij wordt één monster per chip gebruikt. Via enkele samenwerkingsprojecten met andere instituten werd en wordt er vanuit enkele RIVM-projecten al incidenteel gebruik gemaakt van Affymetrixarrays. De uitvoering vindt dan echter plaats in arrayunits die over deze apparatuur beschikken. Dit is onder andere het geval voor projecten die onder het Nederlands Toxicogenomics Centrum (NTC) vallen. Voor deze projecten vindt de technische uitvoering plaats op de Universiteit van Maastricht. Er zijn daarnaast diverse andere arrayunits in Nederland waar dit mogelijk is, namelijk de Universiteit van Amsterdam, het Leids Universitair Medisch Centrum, de Erasmus Universiteit Rotterdam en de Radboud Universiteit Nijmegen. De kosten per chip zijn bij Affymetrix afhankelijk van de schaal waarop gewerkt wordt, maar men moet denken aan zo'n 600 euro per chip. Dit is beduidend hoger dan de  $\pm$  300 euro voor de momenteel gebruikte spotted arrays.
- Een ander gangbaar systeem is het Agilent-systeem, daarbij worden eveneens kant-en-klare arrays gekocht. Het principe hierachter is chemische synthese van één (langere) oligo per gen op een glaasje. Hierop kunnen per array één of twee monsters gehybridiseerd worden. Daarmee lijkt dit systeem sterk op de spotted arrays zoals die nu reeds gebruikt worden. Voor de uitvoering en het scannen hiervan is specifieke Agilent-apparatuur beschikbaar, waarvan de firma claimt dat daarmee een optimaal resultaat wordt behaald. Deze apparatuur is aanwezig op het RIKILT en de Universiteit van Maastricht. Men kan hiervoor echter ook gebruik maken van algemene apparatuur voor spotted arrays, zoals de apparatuur die momenteel op het RIVM aanwezig is. De kosten per array liggen enigszins hoger dan voor de momenteel gebruikte spotted arrays, afhankelijk van de schaal waarop gewerkt wordt bedraagt dit zo'n 350 euro per array.
- Een derde alternatief is het Illumina-systeem, dit maakt gebruik van eigen kant-en-klare arrays waarop één monster per array kan worden gehybridiseerd. Ook dit systeem vereist geheel eigen apparatuur aangezien het gebruik maakt van oligo's die aan beads zijn gekoppeld en dan ook op een andere manier moeten worden afgelezen. Op dit moment wordt er van het Illumina-systeem gebruik gemaakt voor genotypering, de uitvoering vindt dan plaats op het UMC. Er is echter in Nederland nog geen ervaring met genexpressiebepalingen via het Illumina-systeem. Het systeem heeft echter de potentie om een belangrijke rol te gaan spelen

in transcriptomics-bepalingen. Afhankelijk van de schaal waarop een experiment wordt uitgevoerd bedragen de kosten zo'n 300 euro per array.

- Een vierde optie is het systeem van Applied Biosystems, met eveneens eigen kant-en-klare arrays. Hierop wordt één monster per array gehybridiseerd op een array waarop door de fabrikant oligo's gespot zijn. Dit systeem maakt in tegenstelling tot de andere geen gebruik van fluorescentie, maar van chemoluminescentie, zodat hiervoor een speciale scanner (van de firma) is vereist. Deze apparatuur is in Nederland aanwezig op het Leiden/Amsterdam Centre for Drug Research (LACDR).
- Tot slot zijn er wat kleinere systemen, zoals onder andere het Febit-systeem. Bij dit systeem vindt het gehele proces plaats met eigen apparatuur. Dit begint bij het maken van de arrays via in situ oligosynthese tot en met het hybridiseren en scannen. Dit systeem werkt eveneens op basis van één monster per array.

Van deze laatste drie systemen is niet genoeg bekend om een goede inschatting te kunnen maken hoe de kosten zullen zijn voor experimenten op een schaal zoals die op het RIVM plaatsvinden.

Gezien het toenemende gebruik van Affymetrix wereldwijd en in Nederland geldt dit momenteel als het belangrijkste alternatief voor de momenteel gebruikte spotted arraysysteem. Gezien de ontwikkelingen wereldwijd zijn echter Agilent en Illumina ook belangrijke alternatieven. Indien het RIVM zelfstandig over de volledige Affymetrix-apparatuur wil beschikken zullen hiervoor de nodige apparatuur-investeringen noodzakelijk zijn. Een alternatief is om de praktische uitvoering uit te (laten) voeren op een arrayunit waar deze apparatuur reeds aanwezig is.

Bij een eventuele overschakeling naar Affymetrix zal de hogere prijs van Affymetrix-arrays voor sommige projecten een belemmering vormen. Ook is bij spotted arrays de flexibiliteit groter wanneer het gaat om het gebruik van arrays gericht op andere organismen, met name pathogenen. Zoals hierboven al is genoemd zijn dergelijke arrays met name voor kant-en-klare systemen vaak niet beschikbaar. Daarnaast geldt vanuit praktisch oogpunt dat het overschakelen op een ander systeem voor lopende projecten problemen zal opleveren met betrekking tot de continuïteit.

Wanneer besloten wordt om van het huidige systeem over te schakelen naar Affymetrix, zullen daarom beide systemen enige tijd naast elkaar moeten blijven bestaan. Dit zou ondervangen kunnen worden door Affymetrix-experimenten uit te voeren op een arrayunit die over de benodigde apparatuur beschikt en de uitvoering van spotted (of custom) arrays binnen het RIVM te blijven doen.

Het verdient aanbeveling om over enkele jaren een beslissing te nemen of overstap naar een ander systeem wel of niet wenselijk is en een investeringsplan daarvoor op te stellen. Wanneer deze beslissing moet worden overwogen is het van belang bijtijds bij de verschillende arraygebruikers te informeren aan welk systeem zij de voorkeur geven en in hoeverre zij aan het huidige systeem gebonden zijn. Zo kan zowel vanuit de arrayunit als de gebruikers tijdig rekening worden gehouden met een eventuele omschakeling.

***Andere aspecten***

De behoefte en noodzaak om zelf microarrays te kunnen spotten is de laatste jaren duidelijk verminderd. Wanneer de spotter is afgeschreven of versleten zal vervanging waarschijnlijk niet nodig zijn. Voor de toekomst kan het spotten van arrays worden uitbesteed of kan eventueel gebruik worden gemaakt van kant-en-klare slides.

Voor wat betreft amplificatie en labeling zijn de komende jaren geen grote veranderingen te verwachten. Op het gebied van RNA-amplificatie heeft de lineaire T7-methode die momenteel gangbaar is zich inmiddels (onder andere in de literatuur) bewezen als robuuster dan andere bekende systemen en het valt niet te verwachten dat nieuwe systemen op de markt komen. Hoewel mogelijk de ondergrens voor RNA-amplificatie nog wat lager kan komen te liggen zal dit hooguit een verdere verbetering zijn van de huidige kits. Ook voor de labeling vallen bij spotted arrays geen nieuwe principes te verwachten. Het gebruik van Cy3 en Cy5 is de internationale standaard, mede omdat de meeste scanners inmiddels op deze labels zijn toegespitst. Andere dyes zijn er nog niet in geslaagd een behoorlijk marktaandeel te verwerven. Voor spotted arrays wordt daarnaast ook niet verwacht dat het gebruik van één of drie labels het huidige gebruik van twee labels zal vervangen.

Voor zowel amplificatie als labeling geldt wel dat andere systemen zoals Affymetrix gebruik maken van eigen kits, meestal gebaseerd op het gebruik van één fluorescerende dye. Mocht een dergelijke overstap worden gemaakt dan zijn voor de meeste systemen de noodzakelijke kits verkrijgbaar waardoor er vanuit de arrayunit weinig tijd geïnvesteerd hoeft te worden in het opzetten van deze stappen. Ook kan via de aanwezige samenwerkingsverbanden gebruik worden gemaakt van kennis over deze systemen die bij andere instituten beschikbaar is.

### **3. Andere soorten genomics**

#### **3.1 Structural genomics**

De historische basis van het genomicsonderzoek wordt gevormd door wat structural genomics wordt genoemd. Hieronder verstaat men het in kaart brengen van het complete genoom van een organisme (mens, dier, plant, bacterie, etcetera.), waarbij de nadruk ligt op aspecten als genetische structuur (bijvoorbeeld chromosoomindeling en de positie van genen op het chromosoom) en nucleotidensequentie, en de vergelijking hiervan tussen organismen onderling. Door de kennis die op dit gebied de laatste tien jaar beschikbaar is gekomen (onder andere door het Human Genome Project) is het mogelijk geworden PCR-primers of oligonucleotiden te ontwerpen voor duizenden genen binnen een enkele soort. Dit heeft de basis gevormd voor de microarraytechnologie en het onderzoek aan genexpressie middels bepaling van mRNA-profielen, het zogenaamde transcriptomics.

Onderzoek op het gebied van structural genomics vindt niet plaats op instituten als het RIVM, maar is geconcentreerd op daartoe gespecialiseerde instituten (bijvoorbeeld het Sanger Instituut of The Institute for Genomic Research) vanwege de apparatuur-infrastructuur die hiervoor is vereist. Het RIVM maakt echter wel gebruik van structural genomicsdata uit publieke databanken. Dit is met name het geval binnen het infectieziektenonderzoek (LIS, LTR, NVI), onder andere op het gebied van kinkhoest. Daarnaast is binnen het project aandacht besteed aan het ontsluiten van publieke (onder andere GenBank) en commerciële (Celera) databanken met onder andere humane en muizen-genoomsequenties.

#### **3.2 Genoomhybridisaties**

Naast de genoemde genexpressiestudies wordt op het RIVM door LTR ook gebruik gemaakt van Comparative Genomic Hybridization (CGH). Hierbij wordt gekeken naar het aantal kopieën van een gen dat in een genoom aanwezig is. Hiervoor wordt het te onderzoeken genomisch DNA gelabeld met een fluorofoor en gehybridiseerd op een microarray samen met controle genomisch DNA dat met een andere fluorofoor gelabeld is. De gebruikte microarrays zijn hierbij in principe vergelijkbaar met arrays die gebruikt worden voor genexpressiestudies, maar de uitvoering van genoomhybridisatie-experimenten volgt een andere benadering. Bij de labeling wordt uitgegaan van genomisch DNA in plaats van RNA, waardoor een ander labelingsprotocol moet worden gevolgd. Ook worden enigszins andere eisen gesteld aan onder andere stringentie en gevoeligheid, waardoor ook een ander hybridisatieprotocol gebruikt wordt.

Genoomhybridisatie-experimenten vinden voornamelijk plaats binnen het kinkhoest-project (S/240056), waarbij gekeken wordt naar de aan- of afwezigheid van potentiële virulentiegenen. Daarnaast is er interesse in deze techniek voor bacteriële typering (LIS), bioterrorisme (MGB) en het kankeronderzoek (TOX). Voor CGH-toepassingen zijn protocollen voorhanden en zijn er data-analyse algoritmes ontwikkeld.

### 3.3 Polymorfisiebepalingen

Bij verschillende studies binnen het RIVM (TOX, CVG, LTR en CIE) bestudeert men de invloed van genetische variatie in de Nederlandse bevolking op het ontstaan en/of verloop van infectie- en chronische ziekten teneinde risicogroepen te identificeren. Bij dit soort genetische studies wordt gebruik gemaakt van het detecteren van polymorfismes. Polymorfismes zijn variaties in het DNA die een allelfrequentie hebben van meer dan 1% (bij lagere frequenties spreekt men van mutaties). Wanneer deze variaties uit één basenpaar bestaan noemt men dit een Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Binnen het RIVM worden voor een aantal projecten genetische studies uitgevoerd waarbij gebruik wordt gemaakt van SNP-bepalingen, onder andere Gen-voedingsinteracties (S/350600) en Van gen naar functie (S/340210). In deze studies werd tot voor enkele jaren een beperkt aantal polymorfismes (ongeveer 10) bepaald in 1000 – 2000 monsters, voornamelijk met pyrosequencing of het gebruik van PCR en gelelectroforese (RFLP). Ontwikkelingen in dit type studies hebben er toe geleid dat SNP's niet langer in enkele individuele genen bepaald worden, maar dat SNP's in groepen genen uit een zelfde biologische route tegelijkertijd worden onderzocht. Daarnaast worden ook steeds grotere populaties onderzocht en meerdere SNP's per gen. Ten behoeve van dit type onderzoek is middels een literatuurstudie bekeken hoe een dergelijke schaalvergroting binnen het RIVM kan worden verkregen. De conclusie daarvan luidt dat het meten van 1 - 10 SNP's in tot ongeveer 1000 - 2000 monsters nog steeds goed uitgevoerd kan worden op de al op het RIVM aanwezige pyrosequencer of met RFLP. Een aanvulling op deze technieken en ook beter geschikt voor meer monsters is de TaqMan-technologie, die ondertussen ook bij TOX uitgevoerd wordt. Deze technologie heeft bovendien als voordeel dat een arbeidsintensief onderdeel, namelijk het ontwerp van de assay, door de firma wordt verzorgd. Hiervoor is inmiddels het ABI 7500 FAST realtime PCR systeem aanwezig, dat ook ten behoeve van genexpressiestudies wordt gebruikt. De huidige data-analyse capaciteit is voldoende voor het verwerken van grotere aantallen TaqMan-analyses. Het aanschaffen van apparatuur voor de grootschalige detectie van SNP's is voor het RIVM niet opportuun. Daarvoor is het aantal SNP's dat op het RIVM bepaald wordt te klein. Via de samenwerking met andere groepen in Nederland zijn dergelijke technieken wel voor RIVM-ers beschikbaar. Voor de detectie van vele SNP's (300 – 1500) in een groot aantal monsters is de Illumina techniek het meest geschikt. Deze techniek is beschikbaar aan het Universitair Medisch Centrum Utrecht (Cisca Wijmenga, Genomics Centrum) en vanuit de projecten Gen-voedingsinteracties

(S/350600) en Van gen naar functie (S/340210) is hiermee inmiddels een samenwerking opgezet.

### **3.4 Andere genomicstechnieken**

Naast de genoemde vormen van genomics zijn er nog enkele andere vormen van grootschalige bepalingen mogelijk op nucleïnezuurniveau. Deze richten zich op de processen die bij de regulatie van genexpressie zijn betrokken. De verschillende soorten omics-onderzoek op deze gebieden worden aangeduid met termen als epigenomics, regulomics en methylomics. Hiervoor worden diverse technieken gebruikt, een overzicht daarvan valt te vinden in een reviewartikel door Van Steensel [1].

#### ***Epigenomics***

Epigenetica richt zich op erfelijke veranderingen in genexpressie die optreden zonder wijzigingen in de betrokken DNA-sequentie. Dit veld staat de laatste jaren in de belangstelling vanwege de rol ervan op het gebied van de ontwikkelingsbiologie en het ontstaan van chronische ziekten en is daarom ook voor het RIVM interessant. Analog aan de term genomics wordt de term epigenomics gebruikt voor grootschalige studies aan het genoom voor epigenetische vraagstellingen. Naast de eerder behandelde transcriptomics voor expressiebepalingen aan bijvoorbeeld micro-RNA's en hun targetgenen wordt hierbij ook gebruik gemaakt van technieken op het gebied van regulomics en methylomics. Deze zullen hieronder worden besproken.

#### ***Regulomics***

Bij regulomics wordt niet zozeer gekeken naar het coderende deel van het genoom, maar naar regulatoire sequenties en het binden van eiwitten hieraan. De meest gebruikte techniek hiervoor betreft ChIP-on-chip, waarin chromatine-immunoprecipitatie (ChIP) gecombineerd wordt met microarraydetectie. Hiervoor worden cellen behandeld met een crosslinkende verbinding, zodat DNA aan de daaraan gebonden eiwitten wordt gekoppeld. Dit DNA-eiwitcomplex wordt gefragmenteerd waarna via immunoprecipitatie een specifieke eiwitfractie met daaraan gekoppeld DNA wordt opgezuiverd. Daarna volgt labeling van dit DNA, dat vervolgens wordt gehybridiseerd op een microarray die relevante genomische regulatoire sequenties bevat. Zo wordt een indruk verkregen aan welke sequenties het onderzochte eiwit bindt. Deze methode kan onder andere worden toegepast voor het analyseren van DNA-bindende eiwitten zoals transcriptiefactoren, maar is ook bruikbaar voor epigeneticatoepassingen zoals bijvoorbeeld histonmodificaties of nucleosome-remodelling [1]. Binnen het RIVM kunnen dergelijke technieken toegepast worden bij het onderzoek naar chronische ziekten als kanker en obesitas.

### ***Methylomics***

Naast eiwitbinding wordt genregulatie ook door genommodificaties door methylering van cytidines gereguleerd. Voor toepassingen op dit gebied (methylomics) wordt genomisch DNA behandeld met natriumbisulfiet. Hierdoor wordt cytosine omgezet in uridine, terwijl dit niet reageert met methylcytosine. Door deze behandeling ontstaat er een sequentieverschil in het DNA dat met methoden als pyrosequencing, realtime-PCR of arrays gedetecteerd kan worden.

Een alternatief is om genomisch DNA te digesteren met methyleringsafhankelijke enzymen, gevolgd door een zuiveringsstap om kleine digestieproducten kwijt te raken. Zo raakt een gemethyleerd genoomfragment ondervetegenwoordigd ten opzichte van de bijbehorende controle. Ook dit kan via methoden als microarrays of realtime-PCR bepaald worden.

Onderzoekstoepassingen voor methylomics liggen op het vlak van de epigenetica, maar ook kan worden bepaald welke genen actief zijn in bepaalde ontwikkelingsfasen. Binnen het lopende RIVM-onderzoek zal dit het beste aansluiten bij het onderzoek naar chronische ziekten als kanker en obesitas, maar ook binnen het onderzoek aan veroudering en ontwikkelings- en reproductietoxicologie bestaan mogelijke toepassingen voor methyleringsanalyses.

### ***Toepassingen op het RIVM***

Op dit moment wordt op het RIVM nog geen gebruik gemaakt van regulomics en aanverwante omics. Deze technieken kunnen echter een bruikbare aanvulling vormen op het DNA-onderzoek op met name het gebied van chronische ziekten als obesitas en kanker. De technische mogelijkheden zijn momenteel nog in ontwikkeling maar het laat zich aanzien dat deze of soortgelijke technieken over enkele jaren binnen lopend RIVM-onderzoek kunnen worden toegepast.

De hierboven genoemde toepassingen vereisen meestal arrays met specifieke ontworpen sequenties aangezien ze uitgaan van genoomanalyses en niet van transcriptiesequenties. Dergelijke arrays zijn momenteel nog niet of nauwelijks beschikbaar. Arrays voor deze toepassingen zullen dus speciaal ontworpen moeten worden. De apparatuur van de arrayunit is wel geschikt om deze arrays in de toekomst te kunnen gaan gebruiken wanneer hier behoefte aan ontstaat.



## 4. Andere vormen van omics

Naast grootschalige bepalingen op RNA- (of DNA-)niveau is het ook mogelijk grootschalige analyses uit te voeren op andere soorten biologisch materiaal. Zoals eerder genoemd kan dit worden gebruikt ter validatie van of als aanvulling op transcriptomicsexperimenten, maar deze bepalingen kunnen ook als onderzoeksvraag op zichzelf staan. De technologieën die hierbij met name in de belangstelling staan zijn proteomics en metabolomics.

### 4.1 Proteomics

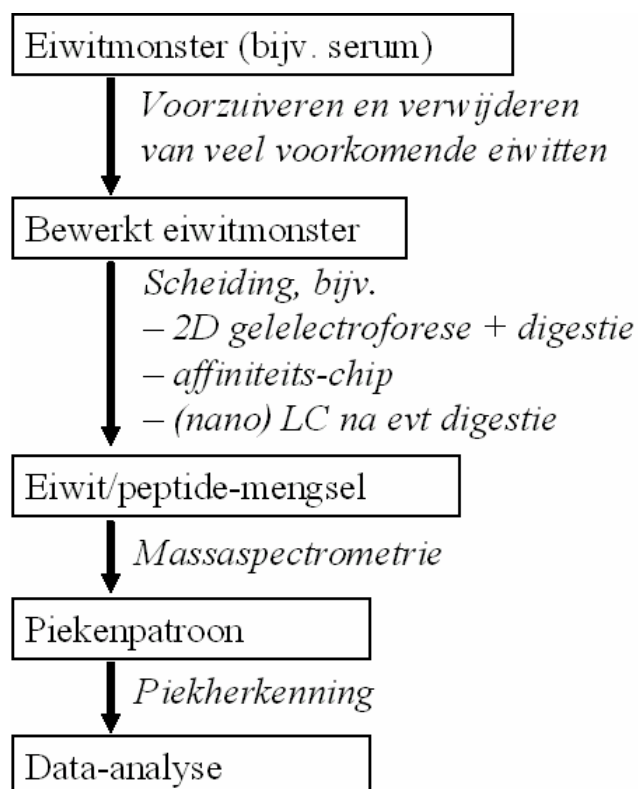
De term proteomics wordt gebruikt voor een verzameling aan technieken die alle gericht zijn op grootschalige metingen aan en karakterisatie van eiwitten. Grofweg kan men twee deelgebieden onderscheiden. Ten eerste is er de “structural proteomics”, gericht op het bepalen van eiwitsequentie en -modificatie, eiwit-eiwit interacties, en andere vormen van eiwitkarakterisatie. Hierbij wordt vooral gebruikt gemaakt van bestaande technieken zoals genomsequentie-analyse, yeast-two-hybrid assays en driedimensionale structuurbepaling op basis van kristallisatie en Röntgendiffractie en/of structuurmodelleringen.

De belangstelling vanuit onderzoeksgroepen en beleidsmakers gaat echter met name uit naar de “quantitative proteomics” ofwel “expression proteomics”. Dit terrein is de laatste jaren tot ontwikkeling gekomen en omvat het grootschalig analyseren van eiwithoeveelheden in weefsels, met name bloed, plasma of serum. Bepalingen van eiwitexpressie kunnen een nuttige aanvulling zijn op RNA-expressiebepalingen (transcriptomics) omdat de mate van mRNA-expressie niet volledig overeenkomt met de mate (en vorm) waarin een eiwit tot expressie komt. Hierin spelen zaken als alternatieve splicing en posttranscriptionele regulatie een rol, maar ook posttranslationele regulatie en modificaties als fosforylering en glycosylering hebben invloed op de mate of de vorm waarin een eiwit voor kan komen. Aangezien de cellulaire reacties worden uitgevoerd door eiwitten heeft proteomics het potentieel om een vollediger beeld te kunnen geven van het cellulaire metabolisme dan transcriptomicsdata.

Het proteomicsonderzoek maakt momenteel een snelle ontwikkeling door. De belangrijkste kinderziekten op het gebied van bijvoorbeeld monsterbewerking zijn overwonnen, en ook bij andere aspecten als reproduceerbaarheid wordt vooruitgang geboekt. Hoewel het veld nog steeds in ontwikkeling is heeft het de afgelopen jaren al geleid tot een duidelijke toename van het aantal onderzoeksactiviteiten en publicaties op dit gebied. Daarnaast is in Nederland het afgelopen jaar het Nederlands Proteomics Centrum (NPC) opgericht wat heeft geleid tot nieuw onderzoek.

Vanwege de rol die proteomics zal gaan spelen in het onderzoek op onder andere kanker- en infectieziektengebied is het voor het RIVM van belang hier niet achterop te gaan lopen. Op dit moment is er een aantal concrete onderzoeksvragen waarin proteomics een (internationale) rol zal gaan spelen en die nauw aansluiten op RIVM-taken. Dit betreft met name grootschalige (toekomstige) serologische screeningsprogramma's zoals die lopen bij pre- en perinatale diagnostiek (downsyndroom, hielprikjes), bevolkingsonderzoek (kanker, diabetes) en de identificatie van (pathogene) micro-organismen. Ook in het biomedische onderzoek op het gebied van kanker, diabetes, hartvaatziekten, veroudering en infectieziekten kan een proteomics-aanpak aanvullend worden gebruikt op de huidige eiwit- en mRNA- analyses, waarbij vooral de grootschaligheid een winstpunt kan zijn omdat zo naar meerdere eiwitmarkers kan worden gekeken.

Binnen quantitative proteomics wordt gebruik gemaakt van massaspectrometrie voor karakterisatie van eiwitten. Omdat dit soort analyses op complexe eiwitmengsels te gecompliceerd zijn vindt een aantal voorbereidingsstappen plaats (Figuur 5). De gebruikelijke experimentele aanpak is dat een eiwitmengsel eerst wordt ontdaan van de meest voorkomende structurele eiwitten, aangezien hierin weinig regulatie-effecten worden verwacht en deze in zodanig grote hoeveelheid voorkomen dat ze een nadelige invloed hebben op de detectie van de zeldzaamste eiwitten. In geval van serum betekent deze stap dat immunoglobulines en albumines verwijderd worden.



Figuur 5: Schematische weergave proteomics-experiment. De weergave is algemeen van aard, bij sommige experimenten worden bepaalde stappen overgeslagen.

In de tweede stap vindt een scheiding plaats tussen de verschillende eiwitten in het monster. Hiervoor zijn verschillende technieken beschikbaar, elk met eigen voor- en nadelen. De oudste is tweedimensionale gel-electroforese, waarna spotjes die overeenkomen met eiwitsubunits uit de gel worden geïsoleerd. Een andere optie is affiniteitszuivering op een chip. Hierbij wordt een eiwitmengsel gebonden aan een chip met een specifieke oppervlaktechemie, waarna verschillende wascondities worden toegepast. Dit levert een gebonden eiwitfractie op die zal bestaan uit meerdere eiwitten. Een derde optie is om eiwitten te scheiden via vloeistofchromatografie (LC), eventueel als aanvulling op andere voorzuiveringen. Een uitgebreidere inleiding van deze methodiek valt te vinden in [2]. Deze aanpak heeft recentelijk sterk aan belangstelling gewonnen, mede dankzij de flexibiliteit van de methode [3]. Zo kan de scheiding verder worden verbeterd via tweedimensionale LC, al is dit arbeidsintensief.

Een derde stap in een proteomicsexperiment is een (eventuele) digestie van eiwitten tot peptiden. Deze stap heeft als voordeel dat bij de massaspectrometrische detectie ieder eiwit niet één maar meerdere karakteristieke pieken zal opleveren, wat de detectie ten goede komt. De digestie vindt meestal plaats met behulp van trypsine, maar ook pepsine of cyanogeenbromide zijn hiervoor gangbaar. In het geval van tweedimensionale gel-electroforese vindt deze digestie plaats op de individuele spotjes. In geval van (nano)LC gebeurt deze stap op het eiwitmonster voordat de vloeistofchromatografiestap plaatsvindt.

In de vierde stap wordt het mengsel van peptiden geanalyseerd met behulp van massaspectrometrie (MS), waarna eventueel individuele pieken nader worden gekarakteriseerd met behulp van een tweede MS-ronde (tandem-MS). Het verkregen piekenpatroon wordt daarna softwarematig herleid tot de aminozuursequentie van iedere peptide en vergeleken met een database zodat het oorspronkelijke eiwit geïdentificeerd kan worden en modificaties kunnen worden herkend [2]. Er bestaan verschillende vormen van massaspectrometrie, waaronder Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI), Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization (SELDI) en electrospray ionisatie (ESI). De keuze voor een van deze technieken wordt bepaald door de manier waarop het monster kan worden aangeleverd. Dit geldt ook voor de gevoeligheid, als indicatie voor de hoeveelheid materiaal die nodig is worden hoeveelheden genoemd van enkele nmol of  $\mu\text{g}$  eiwit, enkele duizenden cellen of enkele  $\mu\text{l}$  serum.

Naast de genoemde methodes zijn er ook eiwitarrays. Deze kunnen worden gezien als een grootschalige variant op de meer traditionele ELISA. Binnen eiwitarrays worden eiwitten, peptiden, of antilichamen gespot op een vaste drager (bijvoorbeeld een glaasje), waarna detectie plaats vindt met behulp van gelabelde eiwitten of gelabelde antilichamen (afhankelijk van wat er op het glaasje gespot is).

Er zijn relatief weinig studies met eiwitarrays beschreven en deze zijn vaak klein van opzet. Gedeeltelijk komt dit doordat het spotten en hybridiseren van eiwitarrays

technische moeilijker is dan het voor cDNA- of DNA-oligo-arrays is. DNA-oligo's kunnen bijvoorbeeld ontworpen en chemisch gesynthetiseerd worden zodat ze vergelijkbare bindingscondities hebben. Dit is niet het geval voor eiwitten, die daarnaast ook hogere eisen aan hun omgeving stellen voor het behoud van hun structuur.

Een andere grootschalige vorm van ELISA-achtige eiwitmetingen is het Luminex-systeem. In dit systeem worden beads met een unieke kleur gekoppeld met een specifiek antilichaam, peptide of eiwit. Door meerdere kleuren beads te gebruiken kunnen maximaal 100 verschillende eiwitten gelijktijdig gemeten worden. De beads worden geïncubeerd met een monster (bijvoorbeeld serum) en de aan de beads gebonden fractie wordt gelabeld met een antilichaam waaraan een reporter-dye gekoppeld is. Met behulp van flow cytometrie wordt vervolgens van iedere bead de kleurcodering en het reporter-dye signaal gemeten.

De hiervoor benodigde apparatuur is binnen het RIVM beschikbaar bij LTR en wordt routinematig gebruikt voor immunologische bepalingen, maar door andere eiwitten te koppelen kan dit uitgebreid worden naar andere werkgebieden.

Proteomics is voor het RIVM een belangrijke aanvulling voor zowel het experimentele werk ten behoeve van de RIVM-taken als het onderzoek. Het verdient dan ook aanbeveling om in materieel en capaciteit te investeren voor zowel methodeontwikkeling als de bijbehorende bioinformatica. Op het NVI en bij ARO is reeds ervaring en apparatuur aanwezig, en ook bij andere laboratoria bestaat interesse in proteomics. Bij het LIS wordt een massaspectrometer aangeschaft ten behoeve van proteomicsanalyses binnen de hiepriekjesscreening. Daarnaast zijn er extern contacten gelegd met onder andere het Nederlands Proteomics Centrum, het UMC Utrecht en het UMC Nijmegen. Het NPC heeft voor Nederland een hotelfunctie, waardoor het voor onderzoekers van buiten het NPC mogelijk is om gebruik te maken van de aanwezige apparatuur en expertise.

## 4.2 Metabolomics

Naast transcriptomics en proteomics is er een derde niveau waarop grootschalige analyses kunnen plaatsvinden, namelijk dat van de metabolomics. Dit omvat het grootschalige onderzoek aan metabolieten. De term metabolieten wordt daarbij vooral gebruikt voor moleculen kleiner dan 1000 Da, [4]. Macromoleculen als DNA en glycogeen worden hierbij buiten beschouwing gelaten.

Grootschalig metaboliet-onderzoek geeft een beeld van de metabole processen op het niveau waarop ze daadwerkelijk plaatsvinden, namelijk dat van de betrokken metabolieten. Daarmee heeft het de potentie om naast transcriptomics en proteomics uit te groeien tot een derde belangrijke vorm van omics. Op dit moment staat dit veld

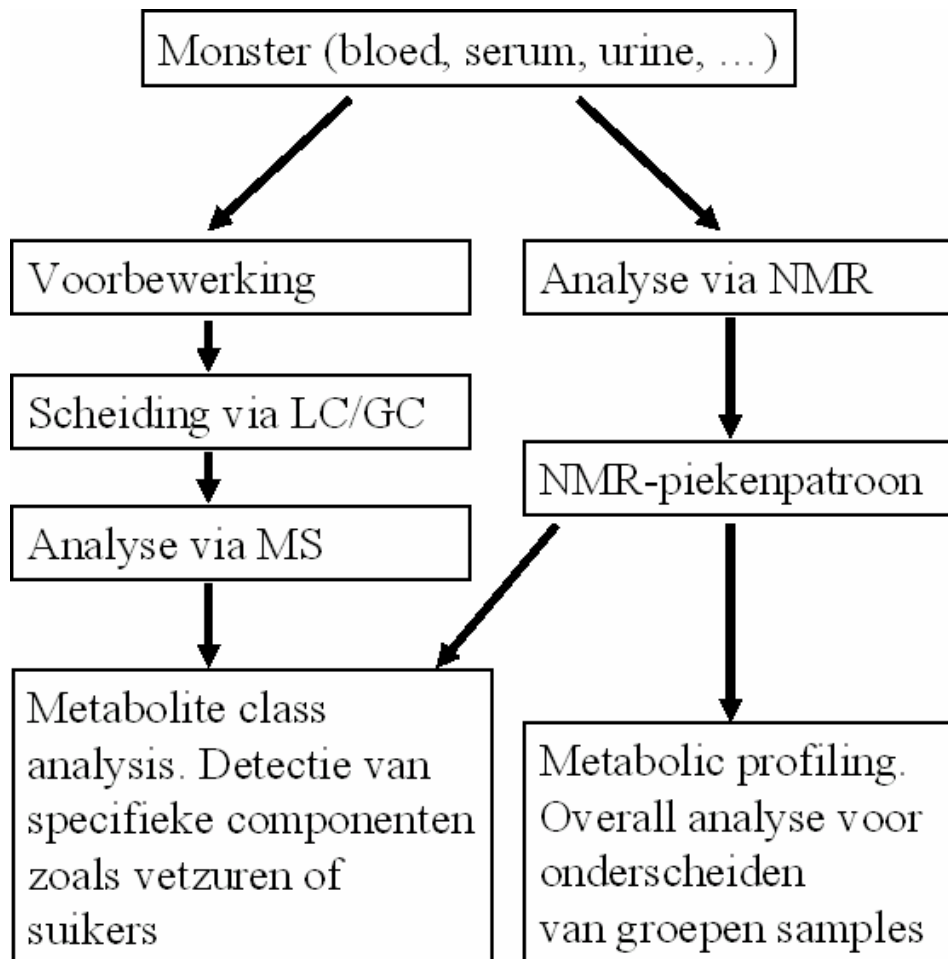
echter nog duidelijk in de kinderschoenen en de komende jaren zal blijken of het voldoende tot ontwikkeling komt om deze potentie ook waar te maken. Binnen de metabolomics kan men meerdere deelgebieden en werkwijzen onderscheiden.

Het eerste deelterrein dat onder de noemer metabolomics valt, kan worden gezien als de metabole analoog van structural genomics. Dit terrein richt zich op het in kaart brengen van metabolieten, hun onderlinge omzettingen, en hun fysiologische rol. Hiervoor wordt een breed scala aan technieken gebruikt afhankelijk van de onderliggende vraag. Het voornaamste doel hiervan is om metabole pathways binnen een organisme in kaart te brengen. Dit soort onderzoeksvragen speelt vooral binnen het microbiologische onderzoek, aangezien tussen micro-organismen grotere verschillen in metabole routes bestaan dan tussen bijvoorbeeld zoogdieren. Dergelijk microbiologisch onderzoek is soms fundamenteel van aard, maar heeft meestal een vraagstelling die is gericht op een (industriële) toepassing. De verkregen gegevens worden uiteindelijk verwerkt in publieke databases. De aard van dit werk sluit minder direct aan bij het huidige RIVM-onderzoek, maar de gegevens uit deze databanken zullen wel gebruikt worden voor het interpreteren van gegevens die via de andere technieken worden vergaard.

Voor het tweede terrein is de term “metabolic profiling” gangbaar. Vaak wordt hiervoor ook de term metabonomics gebruikt om het te onderscheiden van de term metabolomics, die het hele veld van de grootschalige analyse van metabolieten omvat. Aangezien de termen metabolomics en metabonomics vaak door elkaar worden gebruikt zal dit deelterrein in dit rapport verder worden aangeduid als metabolic profiling. Binnen dit deelterrein genereert men meetgegevens op basis van grote aantallen metabolieten en wordt meestal NMR gebruikt. Op deze gegevens vindt vervolgens patroonanalyse plaats met behulp van multivariate statistische analyses. Het doel is daarbij niet kwantificering van individuele metabolieten, maar het statistisch onderscheiden van groepen monsters. Hierbij kan men denken aan het onderscheid tussen urine van gezonde en zieke mensen zonder daarbij naar concentraties van specifieke verbindingen te kijken. Dit werkterrein ligt daarmee in het verlengde van de chemometrie. In Figuur 6 staat deze stroming aangegeven aan de rechterkant.

Het derde deelgebied wordt meestal aangeduid als “metabolite class analysis” en betreft studies aan een specifieke klasse metabolieten zoals bijvoorbeeld vetten (lipidomics) of sacchariden (glycomics). Hierbij worden bijvoorbeeld – in het geval van lipidomics - de hoeveelheden van verschillende vetzuren in een monster individueel en kwantitatief gemeten. Dit deelgebied staat in Figuur 6 aangegeven aan de linkerkant. Dit terrein ligt daarmee in het verlengde van gangbare analytische toepassingen, zij het dat men hierbij streeft naar een hogere mate van grootschaligheid. Hierbij wordt gebruik gemaakt van GC-MS, LC-MS of NMR. Dit soort analyses sluit aan bij het gebruik van metabole gegevens zoals dat nu reeds op het RIVM plaatsvindt. Binnen het project Gen-voedingsinteracties (S/350600) vinden

bijvoorbeeld glucose-, vetzuur- en steroïde-bepalingen in bloed plaats [5]. Te verwachten valt dat dit terrein in de toekomst zal groeien, vooral op het gebied van voeding en gezondheid. Het gebruik van een enkele biomarker zoals dat momenteel gangbaar is, zoals bijvoorbeeld glucose voor diabetes of HDL- en LDL- cholesterol voor hartvaatziekten, kan daardoor uiteindelijk worden vervangen door een vollediger profiel van relevante metabolieten [6]. Dit kan voor het RIVM nieuwe mogelijkheden bieden op het gebied van bevolkingsonderzoek.



Figuur 6: Schematische weergave metabolomicsexperiment.

Voorbeelden van hoe metabolomics momenteel al toegepast wordt vallen te vinden in Nicholls et al. [7] en Lenz et al. [8], beide studies maken gebruik van NMR-analyse op urine. In Nicholls et al [7] wordt beschreven hoe kiemvrije ratten worden geacclimatiseerd aan een normale laboratoriumomgeving. Hierbij ontwikkelen zij een darmflora, die invloed heeft op hun metabolisme en dit valt te detecteren in de metabolietenamenstelling van de urine. Lenz et al. [8] vergelijken urinemonsters van Britten en Zweden, daarbij zijn enkele verschillen aan te tonen zoals hogere concentraties TMAO (trimethylammoniumoxide) in de urine van Zweden tengevolge van een hogere visconsumptie. Daarnaast bleek in de urine het gebruik van alcohol en paracetamol aantoonbaar.

Bovenstaande voorbeelden geven al aan dat de scheiding tussen metabolite class analysis en metabolic profiling niet altijd even scherp is. Van een NMR-spectrum vallen pieken immers vaak tot individuele metabolieten te herleiden en voor een meer biologische interpretatie gebeurt dit ook vaak.

Metabolomics, met name metabolite class analysis kan voor het RIVM een aanvulling vormen op de momenteel gangbare technieken. Voor een goede interpretatie van de resultaten zal het nodig zijn deze analyses te integreren in andere grootschalige (bijvoorbeeld transcriptomics) studies. De voornaamste toepassingen zullen waarschijnlijk liggen op het gebied van voeding en gezondheid aangezien op dit gebied nu al de meeste vraag is naar metabole bepalingen. Te denken valt hier hierbij aan analyses op specifieke groepen van nutriënten zoals lipiden. Daarnaast kan men denken aan het opsporen van verontreinigingen in voedsel of het gebruik van geneesmiddelen via het aantonen van dergelijke verbindingen of daarvan afgeleide metabolieten. Dit kan leiden tot toepassingen binnen de toxicologie. Ook detectie van genetisch gemodificeerde organismen op basis van specifieke metabolieten behoort tot de mogelijkheden. Daarnaast kan de invloed van individuele genetische variatie alsmede de darmflora op het metabolisme een aandachtspunt zijn.

Zoals genoemd wordt er binnen metabolomics gebruik gemaakt van GC-MS of LC-MS en (proton-)NMR. Deze technieken hebben elk hun eigen voordelen [9]. NMR is niet-destructief, vereist geen of weinig voorbereiding van het monster en kan zelfs worden toegepast op intacte weefsels. Deze techniek is echter minder gevoelig dan massaspectrometrie. Bij GC- en LC-MS ligt de detectiegrens een orde van grootte lager [6] maar dit vereist zowel voorbereiding van de monsters als een chromatografische stap. Afhankelijk van de vraagstelling en de beschikbare monsters kan eventueel ook gebruik worden gemaakt van GC of LC in combinatie met andere detectiemethoden zoals UV, FID (Flame Ionization Detection) of NPD (Nitrogen-Phosphorous Detection). De keuze voor een bepaalde techniek wordt in de praktijk vaak bepaald door zowel de achterliggende vraagstelling als de beschikbare mogelijkheden.

De benodigde apparatuur voor metabolomicsonderzoek is reeds op de locatie Bilthoven aanwezig. GC-MS en LC-MS apparatuur is te vinden bij onder andere ARO, NMR bij het NVI, en bij verschillende afdelingen (onder andere TOX) is GC- en LC-apparatuur aanwezig. Ter vergelijking kan worden vermeld dat gangbare vetzuurbepalingen zoals bijvoorbeeld in [5] met gangbare GC-of LC-apparatuur kunnen plaatsvinden, maar voor bepalingen op bijvoorbeeld prostaglandines een GC-MS-systeem noodzakelijk is.

Praktische kennis over metabolietanalyse is eveneens binnen het RIVM in voldoende mate aanwezig. Specifieke kennis over de analyse van metabolomicsdata moet nog worden opgebouwd, maar vanuit de arrayunit is er regelmatig contact met het RIKILT, waar vooral dr. Arjen Lommen expertise op dit gebied heeft. Wel is het terrein van de metabolomics momenteel nog in ontwikkeling en er zal nog een aantal

technische moeilijkheden moeten worden overwonnen. Zo is monsterbewerking een lastige factor aangezien sommige metabolieten erg instabiel zijn (bijvoorbeeld ATP) of specifiek intra- of extra-cellulair voorkomen en hiervoor zal de manier van opwerken invloed hebben op het resultaat. Een meer praktisch aspect is bovendien dat in regulatieprocessen vaak secundaire metabolieten een rol spelen. Deze komen vaak in dermate lage concentraties voor dat detectie niet altijd nauwkeurig mogelijk is. Ook de benodigde bioinformatica is momenteel internationaal in ontwikkeling, waarbij onder andere het optimaal verwerken en combineren van chromatografie- en MS-data een aandachtspunt is, evenals het ontwikkelen van standaarden voor data-uitwisseling. Daarnaast zijn de mogelijkheden om metabolieten te identificeren vanuit MS- of NMR-spectra afhankelijk van de beschikbaarheid van (uitgebreidere) databanken op dit gebied. Voor een ontwikkelingstraject dient dan ook capaciteit gepland te worden om de uitvoering en bioinformatica voldoende te ontwikkelen en projecten hierin te kunnen ondersteunen.



## 5. Informatie-uitwisseling

### Overleg binnen het RIVM

Er is een vier-wekelijks overleg opgezet voor microarraygebruikers. Hierin worden zaken besproken als de proefopzet van komende experimenten, resultaten, en het plannen van vervolggexperimenten. Ook is er aandacht voor technische aanpassingen en ontwikkelingen en het signaleren van praktische problemen. De doelgroep van dit overleg bestaat uit arraygebruikers die zelf direct betrokken zijn bij de experimenten. Deelnemers aan dit overleg zijn afkomstig van de afdelingen TOX, LTR, MGO, LIS en BMT, alsmede van het NVI. Projecten die bij dit overleg betrokken zijn staan vermeld in Bijlage II.

Daarnaast is er een regelmatig overleg voor risicobeoordelaars waarin de toepassing van genomics technieken in de risicobeoordeling aan de orde komt. Dit overleg richt zich op onderwerpen als geneesmiddelenbeoordeling (werkzaamheid, voorwaarden waaraan dossiers moeten voldoen), risicobeoordeling in het stoffendomein (onder andere dossiers en REACH), en nutrigenomics (werkzaamheid, riskbenefit-beoordeling). Bij dit overleg zijn deelnemers van BMT, TOX, CVG, SIR en SEC betrokken.

Voor gebruikers en andere geïnteresseerden is een Intranet-site opgezet waarop informatie, protocollen en publicaties van de arrayunit zijn te vinden. Deze site is te vinden op <http://tox/array/>.

### Externe overleg-organen

De arrayunit van het RIVM participeert in het MicroArray Operators Platform (MAOP). In dit platform zijn 11 microarray-units uit Nederlands vertegenwoordigd via de coördinator(en) van de desbetreffende arrayunit. Zij komen ongeveer twee keer per jaar bijeen en bespreken technische ontwikkelingen en voorkomende problemen op het gebied van apparatuur en protocollen. De bijeenkomsten worden iedere keer op een van de deelnemende arrayunits gehouden, waarbij de locatie steeds wisselt, met als doel dat men ook een “kijkje in elkaars keuken” kan nemen. Het RIVM heeft deze bijeenkomst tot nu toe twee keer georganiseerd. Tevens wordt vanuit de RIVM arrayunit de bijbehorende mailinglist beheerd.

Daarnaast is er nog een aantal andere samenwerkingsverbanden, deze staan genoemd in Bijlage II.



## 6. Conclusies

- Het MAP-SOR project Genomics is januari 2003 van start gegaan met als doel het opzetten van microarraytechnologie en de bijbehorende bioinformatica.
- De vanaf 2001 tot 2003 aangeschafte apparatuur (spotter, scanner, bioanalyser, spectrofotometer) ten behoeve het uitvoeren van microarraytechnieken op het RIVM is operationeel en wordt voornamelijk gebruikt voor de genomics-toepassingen transcriptomics en in mindere mate voor CGH.
- Het spotten van kleine sets oligo's of cDNA's wordt op het RIVM gedaan, maar het spotten van arrays met grote oligosets (vooral voor de muis, rat en de mens) wordt uitbesteed of deze arrays worden ingekocht. Arrays voor andere species (zoals bijvoorbeeld verschillende micro-organismen) zijn commercieel niet of nauwelijks te verkrijgen.
- Er zijn verschillende protocollen ontwikkeld voor het optimaal amplificeren en labelen van het uitgangsmateriaal (voornamelijk RNA) waarbij steeds minder uitgangsmateriaal nodig is (ondergrens 100 ng RNA).
- De kosten voor het uitvoeren van een micro-arrayexperiment bedragen ongeveer 300 euro per microarray-slide. Hierin zitten de kosten voor amplificatie, labeling en de inkoop van de microarray-slide. De arbeidstijd voor het uitvoeren van het experiment is niet in dit bedrag opgenomen.
- In de toekomst zal het steeds gangbaarder worden een commercieel microarray - systeem te gebruiken. In de meeste gevallen is daar specifieke apparatuur voor nodig. Het meest optimale systeem kan verschillend zijn voor de diverse toepassingen en onderzoeksvelden, waardoor de keuze voor één systeem voor het hele RIVM lastig zal zijn. Bij vervanging van de huidige apparatuur zal opnieuw bekeken moeten worden welk systeem (of systemen) voor het RIVM het meest optimaal is en zal een investeringsplan moeten worden opgesteld. Binnen Nederland is op de verschillende microarray-units verschillende apparatuur aanwezig zodat er ook via samenwerkingsverbanden verschillende mogelijkheden zijn.
- Voor het op een grootschalige wijze meten van polymorfismen zijn er binnen het RIVM momenteel te weinig projecten die de aanschaf van de benodigde apparatuur rechtvaardigen. Via samenwerkingsverbanden zijn deze grootschalige technieken (zoals Illumina) wel voor RIVM-ers beschikbaar. Kleinere studies kunnen goed op het RIVM worden uitgevoerd met de daarvoor aanwezige apparatuur.
- Toekomstige 'omics' velden die voor het RIVM van belang zijn, zijn epigenomics, proteomics en metabolomics.
- Epigenomics omvat grootschalige studies van erfelijke veranderingen zonder wijzigingen in de betrokken DNA-sequentie. Dit veld is technisch in ontwikkeling maar zal samen met verwante disciplines als regulomics en methylomics en rol

gaan spelen binnen het onderzoek naar het ontstaan van chronische ziekten. De aanwezige apparatuur is voor dit werk geschikt en aanvullende investeringen zijn nu nog niet nodig.

- Proteomics is het grootschalig onderzoek aan eiwitten en heeft de laatste paar jaar een snelle ontwikkeling doorgemaakt, waardoor toepassing op het gebied van screeningen van zowel micro-organismen als in bevolkingsonderzoeken nu beginnen te komen. Het RIVM speelt op deze gebieden een belangrijke rol en zou daarom moeten investeren in proteomics. Veel van de benodigde apparatuur is al bij het RIVM of het NVI aanwezig. De kennis op dit gebied op het RIVM zou via een geïntegreerd project gebundeld moeten worden waarin voor het RIVM relevante toepassingen moeten worden ontwikkeld en geïmplementeerd.
- Metabolomics is het grootschalig onderzoek naar metabolieten en is nog niet zover ontwikkeld als proteomics. Wanneer de techniek iets verder ontwikkeld is, heeft het voor het RIVM belangrijke potenties vooral op het gebied van voeding en gezondheid, maar mogelijk ook op andere onderzoeksgebieden.

## Literatuur

1. Van Steensel B. Mapping of genetic and epigenetic regulatory networks using microarrays. *Nat Genet* 2005; 37 Suppl:S18-S24.
2. Meiring HD, ten Hove GJ, de Jong APJM. Identification and Characterization of Proteins based on Mass Spectrometric Mapping of Tryptic Peptides and On-line Internet Database Searching. 1997. RIVM rapport 502501059.
3. Meiring HD, van der Heeft E, ten Hove GJ, de Jong APJM. Nanoscale LC-MS: technical design and applications to peptide and protein analysis. *J.Sep.Sci.* 2002; 25, 557-568.
4. Van der Werf MJ, Jellema RH, Hankemeier T. Microbial metabolomics: replacing trial-and-error by the unbiased selection and ranking of targets. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005; 32(6):234-252.
5. Van Schothorst EM, Franssen-van Hal N, Schaap MM, Pennings J, Hoebee B, Keijer J. Adipose gene expression patterns of weight gain suggest counteracting steroid hormone synthesis. *Obes Res* 2005; 13(6):1031-1041.
6. German JB, Watkins SM, Fay LB. Metabolomics in practice: emerging knowledge to guide future dietetic advice toward individualized health. *J Am Diet Assoc* 2005; 105(9):1425-1432.
7. Nicholls AW, Mortishire-Smith RJ, Nicholson JK. NMR spectroscopic-based metabonomic studies of urinary metabolite variation in acclimatizing germ-free rats. *Chem Res Toxicol* 2003; 16(11):1395-1404.
8. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Hughes A, Morrisson J, Lindberg H et al. Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a <sup>1</sup>H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 36(4):841-849.
9. Robertson DG. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci* 2005; 85(2):809-822.



## Bijlage I: Publicaties

Vanuit het genomicsproject is een bijdrage geleverd aan de volgende publicaties:

Ezendam J, Staedtler F, Pennings J, Vandebriel RJ, Pieters R, Harleman JH, Vos JG. Toxicogenomics of subchronic hexachlorobenzene exposure in Brown Norway rats. *Environ Health Perspect.* 2004; 112:782-791.

Heisterkamp SH, Pennings JLA. The Use of a Finite Mixture of Beta Distributions in the Analysis of Microarray Data. *Kwantitatieve Methoden.* 2004; 71:1-24.

Pennings JLA, Heisterkamp SH. Normal Probability Plots for Quality Assessment of Microarray Experiments. *Abstr 12th Int Conf Intell Syst Mol Biol and 3rd Eur Conf Comput Biol.* 2004; 143, #F-106.

De Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest.* 2005; 85:154-159.

Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, Mooi FR. *Bordetella pertussis*, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human-Associated Lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog.* 2005; 1:e45.

Kooter IM, Pennings J, Opperhuizen A, Cassee FR. Gene Expression Pattern in Spontaneously Hypertensive Rats Exposed to Urban Particulate Matter (EHC-93). *Inhalation Toxicology.* 2005; 17:53-65

Van Schothorst EM, Franssen-van Hal N, Schaap MM, Pennings J, Hoebee B, Keijer J. Adipose gene expression patterns of weight gain suggest counteracting steroid hormone synthesis. *Obes Res.* 2005; 13:1031-41.

Viebahn M. Field release of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r. Molecular analysis of effects on microbial communities in the rhizosphere of wheat. Proefschrift UU, 2005

Baken KA, Ezendam J, Gremmer ER, De Klerk A, Pennings JLA, Matthee B, Peijnenburg AACM, Van Loveren H. Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* Shirota: immune function, autoimmunity and gene expression. *Int. J. Food Microbiol.* 2006; 112:8-18

Baken KA, Pennings J, Van Steeg H, Van Loveren H. Microarray analysis of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) induced immunotoxicity. *The Toxicologist.* 2006; 90:387-388

Baken KA, Pennings JLA, Breit TM, de Vries A, Van Steeg H, Van Loveren H. Gene Expression Profiling of Bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO)-Induced Immunotoxicity in Mice and Rats. *J. Immunotox*, 2006. In Press

Baken KA, Vandebriel RJ, Pennings JLA, Kleinjans JC, Van Loveren H. Toxicogenomics in the assessment of immunotoxicity. *Methods*. 2006. In Press

Diavatopoulos, D. Evolution and host-adaptation of the mammalian Bordetellae Proefschrift UU, 2006

Van Schothorst EM, Keijer J, Pennings JLA, Opperhuizen A, van den Brom CE, Kohl T, Franssen-van Hal NLW, Hoebee B. Adipose gene expression response of lean and obese mice to short term dietary restriction. *Obesity*. 2006; 14: 974-979

Wijnhoven SWP, van Steeg H, Vermeire TG, Brouwer C, Hoebee B. Toxicogenomics in risicobeoordeling-toepassingen en behoeftes. 2006. RIVM-rapport 340200003 (in voorbereiding)



## Bijlage II: Samenwerkingsverbanden

Binnen het RIVM is aan de volgende projecten een bijdrage geleverd:

- Dr. M. Dollé, Dr. E.M. van Schothorst, Ing. S. Imholz, Ing. H. M. Hodemaekers, Dr. B. Hoebee (TOX), Dr. Ir. E.J.M. Feskens, Dr. JMA Boer (CVG), Prof. R. Gemke (Kindergeneeskunde VUMC): SOR project S/350600: Voeding en risico voor coronaire hartziekten en het metabole syndroom: de rol van genetische gevoeligheid
- Dr. B. Hoebee, dr. R. Janssen, Ing. H. M. Hodemaekers (TOX) en Dr. T. Kimman, Ing. S. Banus (LTR): SOR project S/340210: Van gen naar functie, deelproject genetische gevoeligheid voor RSV infecties, deelproject Genetische gevoeligheid voor Bordetella pertussis infecties, deelproject genetische gevoeligheid voor Salmonella infecties
- Prof. Dr. M.P.G. Koopmans en Ing. J. Reimerink (LIS): SOR project S/249924: Invloed van infecties maag-darm kanaal
- Prof. Dr. M.P.G. Koopmans (LIS): ZON-MW 014-12-028, Molecular detection and viability screening of non-cultivable food borne viruses
- Dr. Ir. I.M. Kooter (MGO): SOR project S/630111: Vermindering van onzekerheden in causale relaties tussen inhalatoire blootstelling en gezondheidseffecten
- Prof. Dr. H. van Loveren, Dr. Ir. R.J. Vandebriel, K. Baken, Ing. E.M. Gremmer (TOX): V/340320: Ontwikkeling model om de effectiviteit en werkzaamheid van probiotica te testen
- Prof. Dr. H. van Loveren, dr. W.H. de Jong, drs. S.C. Wijering (TOX): NTC/ROG-project Immunotoxicogenomics van sensibiliserende stoffen
- Prof. Dr. H. van Loveren (TOX, UM): Samenwerkingsproject met Universiteit van Maastricht: Immunotoxiciteit
- Dr. M. Luijten en dr. A. Piersma (TOX): SOR project S/261753: Phytoprevent
- Prof. dr. F.R. Mooi, dr. A.J. King (LTR): SOR-project S/240056: Identificatie van B.pertussis en N.meningitidis vaccin-escape varianten met DNA microarrays.
- Dr. M. van Oosten (LTR): SOR project S/246500: Immunogenetica respiratoire infecties
- Dr. A.H. Piersma (TOX): V/340700: Kennisbasis en onderzoek carcinogenese, mutagenese en reproductietoxicologie
- Dr. A.H. Piersma (TOX), drs. J. van Meeuwen, Prof. Dr. M. van den Berg (IRAS), Dr. A. Peijnenburg, Dr. M. Heneweer (RIKILT): Effecten xenoestrogenen op de Nederlandse bevolking
- Dr. A.H. Piersma, Dr. M. Luijten, drs.ir. M.F.J. Renkens (TOX): NTC/ROG-project Reproductietoxicogenomics van embryotoxische stoffen
- Prof. Dr. H. van Steeg (TOX, RUL) en Dr. H. Vrieling (RUL): Cefic/IRI project: Gene expression profiling in DNA repair-deficient XPA transgenic

mice following treatment with benzo(a)pyrene and cyclosporin A:  
lymphomagens with different modes of action

- Prof. Dr. H. van Steeg (TOX) en Dr. T. Breit (UvA): NWO/MW/PAD-project: Toepassing van micro-array technologieën bij het identificeren van (kanker) biomarkers voor toxicologische screening van stoffen
- Prof. Dr. H. van Steeg (TOX): SOR project S/340100: Antioxidanten, veroudering en chronische ziekten
- Prof. Dr. H. van Steeg (TOX) en dr. J. Vijg (UTHSCSA): Externe projecten E/340100/01: DNA repair, mutations, and cellular ageing (NIH/NIA) en S/650090/04: Models for human DNA repair and cell cycle control variants in ageing and environmental disease (NIH/NIEHS)
- Prof. Dr. H. van Steeg (TOX) en Prof. Dr. L.H.F. Mullenders (LUMC): NTC/STW-project: Mechanism based toxicogenomics
- Dr. M. Streefland (NVI) EX/000067: Parametrische Release van Biofarmaceutica
- Dr. R. Vandebriel (TOX): SOR project S/240096: Effect van infecties en vaccinaties op de ontwikkeling van allergie op lange termijn
- Drs. M. Viebahn, Dr. Ir. K. Wernars (MGB): Project M/283951: Onderbouwing risicobeoordeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (GGO's)
- Prof. Dr. J.G. Vos, Drs. J. Ezendam, Dr. Ir. R.J. Vandebriel (TOX/IRAS/UU): Voormalig SOR-project S/640070: Hexachloorbenzeen
- Dr. A. de Vries, Prof. Dr. H. van Steeg (TOX), Prof. Dr. J. Hoeijmakers (EUR): KWF/NKB project S/650090: The effect of point mutations in the tumor suppressor gene p53 on the development of cancer
- Dr. A. de Vries, drs. P.C.E. van Kesteren (TOX): NTC/STW-project Carcinogenomics
- Dr. W.J.B. Wannet en drs. X.W. Huijsdens (LIS): V/230051: Moleculaire biologie van resistentie

De arrayunit is vertegenwoordigd in de volgende nationale samenwerkingsverbanden:

- ArrayNL (platform voor microarray-onderzoek in Nederland)
- MicroArray Operators Platform (MAOP), hierin worden technische ontwikkelingen op microarray-gebied besproken.
- NVBMB Werkgroep Bioinformatica
- Nederlands Toxicogenomics Centrum (NTC) (UM, RIVM, RIKILT, TNO)
- Biomax-platform, gericht op het uitwisselen van ervaring betreffende de interpretatie van arraydata.
- Gebruikersoverleg NBIC (Nederlands BioInformatica Centrum), voorheen BioASP (Nationale Bioinformatica Applicatie Service Provider).

Daarnaast is regelmatig overleg met andere arrayunits, met name die van de UvA (MAD, Dr. T. Breit), RIKILT (Afdeling VGV, Dr. J. Keijer), TNO Zeist (Dr. R. Stierum) en Universiteit Maastricht (Dr. T. Ayoubi).

Tevens participeert zij in de volgende internationale verbanden:

- ILSI/HESI (International Life Sciences Institute, / Health and Environmental Sciences Institute, Washington DC, USA)
- NUGO (European Nutrigenomics Organisation).

## **Bijlage III: Protocollen**

Op de volgende pagina's zijn de momenteel gebruikte protocollen verzameld die zijn ontwikkeld in het kader van het genomics-project. Bij het opzetten van de technologie is zoveel mogelijk gebruik gemaakt van bestaande kennis en protocollen van andere arrayunits (UMC, MAD, RIKILT). Deze protocollen zijn vervolgens aangepast voor gebruik op het RIVM.

De protocollen worden actueel gehouden door de microarray-unit. Aangezien sommige protocollen in de toekomst aangepast dan wel verbeterd zullen worden wordt erop gewezen dat de actuele protocollen te vinden zijn op Intranet via <http://tox/array/>.

## Protocol “Kwaliteitscontrole gespotte slides”

Dit protocol wordt gebruikt om na het spotten de kwaliteit van cDNA- of oligo-gespotte glaasjes te kunnen beoordelen voordat ze gebruikt worden voor hybridisatie. Daarvoor is er een aantal mogelijkheden waarvan de volgende worden beschreven:

- Red Reflection
- Sybr Green kleuring
- Cy3 9-mer hybridisatie.

Door middel van deze methoden kun je de spotjes zichtbaar maken om ze te kunnen beoordelen op vorm, grootte en onderlinge afstand.

### Red Reflection

Dit is een snelle en eenvoudige methode om te kijken of alle spotjes gespot zijn. De vorm en grootte van de spots is niet altijd even goed te beoordelen, dit gaat beter met Sybr Green kleuring of Cy3 9-mer hybridisatie, waarbij de laatste methode toch wel de voorkeur heeft, wat het resultaat betreft.

De methode is gebaseerd op het vangen van laserlicht dat wordt gereflecteerd door de zoutkristallen die in elke spot achterblijven nadat de DNA-oplossing is opgedroogd op het glaasje. Dit kan dus alleen indien je spotoplossing zout bevat (dus bijvoorbeeld 5x SSC-oplossing), en op niet-voorbehandelde glaasjes.

#### **Werkwijze:**

- Scan de glaasjes op Red Reflection bij een golflengte van 633 nm (= laser 1). Aangeraden instellingen voor de laserpower (LP) en de photomultiplier tube (PMT) zijn respectievelijk 100% en 80%. Voor nadere instructies voor het scannen zie Protocol “Microarrays scannen”.

### Sybr Green kleuring

Hiermee kun je een kwaliteitscontrole uitvoeren door middel van het aankleuren van DNA. Sybr Green I kleurt dubbelstrengs DNA aan, dus wordt gebruikt voor het aankleuren van cDNA spots. Sybr Green II kleurt enkelstrengs DNA of RNA aan, dus wordt gebruikt voor oligo-spots.

#### **Benodigheden (locatie):**

- Sybr Green I of II, 10.000x concentrate in DMSO (A4.117, -20°C)  
Fabrikant: Molecular Probes, Leverancier: Molecular Probes, Bestelnummer: S-7563, Verpakkings eenheid: 0.5 ml.  
**Let op: Sybr Green is mogelijk mutageen!**  
Afval van Sybr Green in vat met carcinogenen, aanwezig op A4.117.
- TBE buffer (45 mM Tris-Borate, 1 mM EDTA, pH 8) (A4.117, KT)

#### **Werkwijze:**

- Verdun de Sybr Green stock 1000 keer in TBE buffer.
- Pipetteer 100 µl op het glaasje, dek af met een dekglasje.
- Incubeer 2-3 minuten bij kamertemperatuur.
- Was de glaasjes 4 keer met TBE buffer in 50-ml buizen.
- Droog de glaasjes door middel van centrifugeren, 2 min 1000 rpm.
- Scan de glaasjes op Cy3 bij een golflengte van 543 nm (= laser 3). Aangeraden instellingen voor de LP en de PMT zijn respectievelijk 90% en 75%. Voor nadere instructies voor het scannen zie “Protocol Microarrays scannen”.

**Opmerkingen:**

- De groene laser (laser 3) is niet ideaal voor het meten van Sybr Green. Beter is de Alexa Fluor 488 laser of FITC laser, maar die hebben we niet beschikbaar. Daarom gebruiken we een 10x in plaats van de aanbevolen 1x Sybr Green oplossing om de glaasjes mee te kleuren.
- Let op of je Sybr Green I of II gebruikt, respectievelijk voor gespotte glaasjes met cDNA of oligo's.

**Cy3 9-mer hybridisatie**

Met deze methode voer je een kwaliteitscontrole uit door middel van het hybridiseren van een Cy3-gelabeld random 9-mer sequentie.

Indien je deze controle uitvoert op cDNA-gespotte slides, dan moet je de glaasjes eerst 1 min. opkoken in milliQ om het cDNA enkelstrengs te maken.

Het voorbehandelen van de gespotte glaasjes is niet direct nodig, het geeft alleen wel een mooier resultaat omdat je achtergrond lager is. Maar indien je alleen de spotjes wilt kunnen beoordelen, kun je het achterwege laten, scheelt een hoop tijd.

**Benodigheden (locatie):**

- Cy3-gelabeld random 9-mer (A4.117, -20°C)  
Fabrikant: Operon, Leverancier: Westburg, Bestelnummer: SP210, Verpakkings eenheid: 3000pmol.
- 20x SSC (A4.117, KT)
- Poly-dA 10 mg/ml (A4.117, -20°C)  
Fabrikant: Amersham, Leverancier: Amersham, Bestelnummer: 27-7836-02, Verpakkings eenheid: 25 A260 units.
- Hepes 1M, pH 7 (A4.117, KT)
- SDS 1% en 10% (A4.117, KT)
- MilliQ

**Werkwijze:**

- Zet drie bakjes klaar om de glaasjes in te wassen:
  - Bakje 1: 2x SSC + 0,2% SDS oplossing:  
20 ml 20x SSC, 4 ml 10% SDS, vervolgens aanvullen tot 200 ml met milliQ.
  - Bakje 2: 0,2x SSC oplossing:  
2 ml 20x SSC, vervolgens aanvullen tot 200 ml met milliQ.
  - Bakje 3: 0,05x SSC oplossing:  
0,5 ml 20x SSC, vervolgens aanvullen tot 200 ml met milliQ.
- Resuspendeer de Cy3-gelabelde 9-mer (3000 pmol) met 100 µl milliQ.  
Indien dit al gebeurd is, zijn er amberkleurige epjes in de -20°C met 30 µM Cy3 9-mer.
- Maak in een PCR-epje een 20 µl oplossing met de volgende componenten:  
(Dit is voor 1 glaasje!)

<b>Stock</b>	<b>Hoeveelheid</b>	<b>Eindconcentratie</b>
20x SSC	4 $\mu$ l	4x SSC
10 mg/ml poly-dA	2 $\mu$ l	1 mg/ml poly-dA
1 M Hepes, pH 7	1 $\mu$ l	50 mM Hepes, pH 7
1% SDS	4 $\mu$ l	0,2% SDS
30 $\mu$ M Cy3 random 9-mer	5 $\mu$ l	7,5 $\mu$ M Cy3 random 9-mer
milliQ	4 $\mu$ l	milliQ

- Verwarm de oplossing 5 minuten bij 95°C mbv PCR-apparaat.
- Koel het epje af door 1 minuut bij 10000 rpm af te draaien.
- Pipetteer de oplossing op het gespotte glaasje en leg er een dekglasje overheen. Vermijdt luchtballen!
- Incubeer 5 minuten in het donker bij kamertemperatuur.
- Was het glaasje in 2xSSC + 0,2% SDS oplossing totdat het glaasje eraf valt (is ongeveer 1 minuut) (bakje 1).
- Was het glaasje vervolgens 1 minuut in 0,2x SSC oplossing (bakje 2).
- Was het glaasje daarna 1 minuut in 0,05x SSC oplossing (bakje 3).
- Droog het glaasje door het 2 minuten af te draaien bij 1000 rpm.
- Scan het glaasje op Cy3 bij een golflengte van 543 nm (= laser 3). Aangeraden instellingen voor de LP en de PMT zijn respectievelijk 90% en 75%. Voor nadere instructies voor het scannen zie "Protocol Microarrays scannen".

## Protocol “Voorbehandeling gesilyleerde glaasjes”

Dit protocol wordt gebruikt vóór de hybridisatiestap op slides met ratten- en Bordetella-oligo's. Het wordt niet toegepast op slides met muizen- en humane oligo's. Het protocol beschrijft de voorbehandeling van gespotte aldehyde-gecoate (silylated) glaasjes met behulp van een natriumboorhydridebehandeling. Hierbij worden de vrije aldehydegroepen aanwezig op het glasoppervlak geïnactiveerd en in het geval van cDNA wordt door middel van opkoken het DNA enkelstrengs gemaakt.

### Benodigheden:

- 10% SDS, locatie A4.117
- natriumboorhydride ( $\text{NaBH}_4$ ), Sigma, bestelnummer S-9125, locatie A4.117
- ethanol absoluut
- PBS

### Werkwijze:

- Laat de gespotte glaasjes minimaal 1 nacht drogen in spotter of in een opbergdoos voor microscoopglaasjes.
- Voorbehandelde glaasjes zijn ½ tot 1 jaar houdbaar tot aan de hybridisatie. Indien je ze langer bewaard neemt het door de voorbehandeling weggenomen achtergrondsignaal toe.
- Zorg dat alle glaasjes genummerd en gedateerd zijn. Doe dit met een glasschrijver aan de onderzijde van de array. Geef tevens aan de onderzijde van de glaasjes de hoeken van de array aan met een glasschrijver. Na de aldehyde-inactivering zijn de DNA-spots namelijk niet meer zichtbaar.
- Zet 9 kleurbakjes klaar met daarin:
  1. 200 ml 0,2% SDS (4 ml 10% SDS + 196 ml milliQ)
  2. 200 ml 0,2% SDS
  3. 200 ml milliQ
  4. 200 ml milliQ
  5. leeg (voor de  $\text{NaBH}_4$ -oplossing)
  6. 200 ml 0,2% SDS
  7. 200 ml 0,2% SDS
  8. 200 ml 0,2% SDS
  9. 200 ml milliQ
- Weeg 0,25 gram  $\text{NaBH}_4$  af in een erlenmeijer (**TOXISCH!**).
- Zet een maatcilinder met 75 ml PBS klaar.
- Zet 25 ml 100% ethanol klaar.  
De hoeveelheden  $\text{NaBH}_4$ , PBS en ethanol zijn voor 100 ml, heb je een groter bakje, zet dan twee keer zo veel klaar.
- Zet een bekeerglas milliQ te koken.
- Was de glaasjes onder rustig zwenken op een schudplateau als volgt:
  - 2 min 0,2% SDS
  - 2 min 0,2% SDS
  - 2 min milliQ
  - 2 min milliQ
  - 2 min kokend milliQ (DNA denaturatie)
  - glaasjes op tafel volledig laten drogen (ca. 5 min).

### ondertussen:

- zet een bekeerglas met nieuw schoon milliQ te koken.
- los de 0,25 gram  $\text{NaBH}_4$  op in 75 ml PBS en voeg 25 ml ethanol toe tegen het bruisen (deze oplossing moet vlak voor gebruik gemaakt worden!).



- 5 min NaBH<sub>4</sub>-oplossing (reduceren vrije aldehydegroepen)
  - 1 min 0,2% SDS
  - 1 min 0,2% SDS
  - 1 min 0,2% SDS
  - 1 min milliQ
  - 30 sec in nieuw schoon kokend milliQ
  - laat de glaasjes op tafel volledig drogen.
- 
- Bewaar de glaasjes in een opbergdoos voor microscoopglaasjes tot de hybridisatie. Dit kan het beste in een exsiccator (A3.111).

## Protocol “Indirecte CyDye labelling RNA”

Dit protocol werd gebruikt voor de labelling van eukaryoot RNA met aminoallyl-gelabelde nucleotides via first strand cDNA synthese, waarna koppeling aan de aminoallylgroepen plaatsvindt van Cyanine 3 of 5 (Cy3/Cy5) fluorescerende moleculen. Momenteel wordt vrijwel altijd gebruik gemaakt van RNA-amplificatie en een daarop aangepaste labeling, deze staat beschreven in het protocol “RNA amplificatie en CyDye labelling”: kit II

### Benodigheden:

- Cyscribe Post Labelling kit met Cyscribe GFX Purification kit, Amersham Biosciences, bestelnummer RPN5660X.  
Deze kit bevat de benodigheden voor 24 reacties, inclusief 12x Cy3 en 12x Cy5, en 50 opzuiveringskolommetjes.

De beide onderdelen zijn ook los te bestellen:

- Cyscribe Post Labelling kit, Amersham Biosciences, bestelnummer RPN5660  
Deze kit bevat de benodigheden voor 24 reacties, inclusief 12x Cy3 en 12x Cy5.
- Cyscribe Purification kit, Amersham Biosciences, bestelnummer 27-9606-01 voor
- 25 opzuiveringskolommetjes, of 27-9606-02 voor 50 kolommetjes.

### Overige oplossingen:

Deze zitten niet bij de kit, en moet je zelf maken. Indien deze al gemaakt zijn, staan ze op het array-lab (A4.117) en mag je ze gebruiken. De oplossingen zijn 3 maanden houdbaar, indien ze over datum zijn, maak dan nieuwe.

- NaOH 2,5 M; locatie: chemicaliënkamer (A4.112).  
1 gram NaOH in 10 ml milliQ (mQ), steriliseren door over een 0,45 micron filter te halen en autoclaveren. Bewaren bij kamertemperatuur (KT).
- HEPES free acid 2 M; ICN Biomedicals bestelnummer 194827, locatie: A4.117.  
2,38 gram HEPES in 5 ml mQ, steriliseren door over een 0,45 micron filter te halen en autoclaveren. Bewaren bij KT.
- Natriumbicarbonaat 0,1 M pH 9,0; ICN Biomedicals, bestelnummer 194847, locatie: A4.117.  
0,84 gram Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 100 ml mQ, stel de pH op 9,0 met behulp van NaOH 5M, steriliseren door over een 0,45 micron filter te halen. Bewaren in porties bij -20°C.
- Hydroxylamine Hydrochloride 4 M; Sigma, bestelnummer H-9876, locatie: A4.117.  
2,78 gram Hydroxylamine in 10 ml mQ, steriliseren door over een 0,45 micron filter te halen en autoclaveren. Bewaren bij KT.
- Ethanol absoluut.

### Verkort protocol CyScribe Post-Labelling Kit

Voor een uitgebreide beschrijving van dit protocol: zie handleiding die bij de CyScribe Post-Labelling kit zit.

Het hele protocol wordt uitgevoerd op drie dagen, waarvan de laatste twee opeenvolgende dagen moeten zijn. Op dag 1 maak je het aminoallyl-gelabelde cDNA tot aan of tot en met de degradatie van het mRNA. Hierna bewaar je het monster bij -20°C. Op dag 2 begin je met het degraderen van het mRNA of met het opzuiveren van het aminoallyl-gelabelde cDNA.

Vervolgens voer je op dag 2 de CyDye labelling en de hybridisatie uit. Op dag 3 was en scan je je glaasjes.

Het is mogelijk om dag 1 en 2 te combineren, maar indien je veel monsters hebt niet aan te raden.

**Labelling met amino-allyl-dUTP**

Zet een waterbad op 70°C en één op 42°C.

Alle reagentia ontdooien op ijs en mixen, behalve enzym.

Draai een epje AA-dUTP 15 sec af en voeg 30 µl MQ toe. 1 maand houdbaar.

Primer annealing:

Voeg het volgende toe aan een 1,5 ml epje op ijs:

Indien totaal RNA:

Totaal RNA, 20 µg	x µl
Anchored oligo	3 µl
mQ	<u>y µl</u>
Totaal	11 µl

Indien mRNA:

mRNA, 500 ng	x µl
Random nanomers	1 µl
Anchored oligo(dT)	1 µl
mQ	<u>y µl</u>
Totaal	<u>11 µl</u>

Mengen met pipet, 5 min incuberen bij 70°C.

10 min KT

15 sec afdraaien.

Extension reaction:

Ep op ijs, voeg het volgende toe: (als laatste enzym toevoegen, enzym uit de vriezer pipetteren, niet op ijs zetten)

5x CyScript buffer	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
nucleotide mix	1 µl
AA-dUTP	1 µl
CyScript reverse transcriptase	<u>1 µl</u>
Totaal	20 µl

Rustig op en neer pipetteren, 15 sec afdraaien, 1,5 uur bij 42°C incuberen.

Hierna eventueel stoppen: monster bewaren bij -15 tot -30°C.

**Opzuivering amino-allyl-gelabelde cDNA**Degradatie van mRNA:

Zet een waterbad op 37°C.

Voeg 2 µl 2,5 M NaOH toe.

Vortexen, 15 sec. afdraaien.

15 min 37°C incuberen.

Voeg 10 µl 2 M HEPES toe.

Vortexen, 15 sec. afdraaien.

Hierna eventueel stoppen: monster bewaren bij -15 tot -30°C.

Zuivering m.b.v. CyScribe GFX Purification kit

**Let op: gebruik 80% ethanol in plaats van de bijgeleverde wasbuffer**

Ontdooi een epje 0,1M natriumbicarbonaat.

Zet een kolommetje in een schone collection tube, één voor iedere 20-100 µl cDNA.

Voeg 500 µl capture buffer toe aan iedere kolom.

Amino-allyl-gelabelde cDNA in capture buffer, 5 keer op en neer pipetteren.

30 sec 13000 rpm afdraaien.  
Gooi vloeistof in collection tube weg.  
Voeg 600 µl 80% ethanol toe aan ieder kolom.  
30 sec 13000 rpm afdraaien.  
Gooi vloeistof in collection tube weg.  
Herhaal deze wasstap 2 keer.  
10 sec 13000 rpm afdraaien om laatste vloeistof eruit te krijgen.  
Zet de kolommetjes over in schone epjes.  
Pipetteer 60 µl 0.1 M natriumbicarbonaat direct op de membraan in de kolommetjes.  
Zorg dat de buffer volledig over de membraan ligt.  
1-5 min. incuberen KT.  
1 min 13000 rpm afdraaien.

### **Labeling met CyDye**

Werk in amberkleurige epjes. Zoveel mogelijk in donker.  
Voeg de amino-allyl-gelabelde DNA (in 0,1 M natriumbicarbonaat) direct toe aan 1 epje CyDye per monster in een epje.  
Een aantal keer op en neer pipetteren.  
1 min 13000 rpm.  
60-90 min incuberen KT in het donker.  
Voeg 15 µl 4 M hydroxylamine toe.  
Op en neer pipetteren.  
15 min in donker bij KT.  
Direct doorgaan met opzuivering.  
**Let op: Tijdens labelen glaasjes prehybridiseren: zie protocol “Hybridisatie gen-arrays”**

### **Opzuivering CyDye-gelabelde cDNA**

#### Zuivering met behulp van CyScribe GFX Purification kit

Verwarm de elutiebuffer tot 65 °C in een waterbad.  
Indien je de kit voor het eerst gebruikt: Voeg 40 ml 100% ethanol toe aan het flesje wasbuffer en merk het label zodat je kan zien dat de ethanol is toegevoegd.

Zet een kolommetje in een schone collection tube, één voor iedere 20-100 µl cDNA.  
Voeg 500 µl capture buffer toe aan iedere kolom.  
CyDye-gelabelde DNA in capture buffer, 5 keer op en neer pipetteren.  
30 sec 13000 rpm afdraaien.  
Gooi vloeistof in collection tube weg.  
Voeg 600 µl wasbuffer toe aan ieder kolom.  
30 sec 13000 rpm afdraaien.  
Gooi vloeistof in collection tube weg.  
Herhaal deze wasstap 2 keer.  
10 sec 13000 rpm afdraaien om laatste vloeistof eruit te krijgen.  
Zet de kolommetjes over in schone epjes.  
Pipetteer 60 µl verwarmde elutiebuffer direct op de membraan in de kolommetjes.  
Zorg dat de buffer volledig over de membraan ligt.  
1-5 min. incuberen KT.  
1 min 13000 rpm afdraaien.

Voer hierna de hybridisatie uit: zie Protocol “Hybridisatie gen-arrays”.

## Protocol “RNA amplificatie en CyDye labelling”: kit II

Dit protocol wordt gebruikt voor de amplificatie en CyDye labelling van eukaryoot RNA. De procedure bestaat uit de reverse transcriptie van RNA met behulp van een oligo(dT) primer met een T7 promotor, en de in vitro transcriptie van het resulterende cDNA met T7 RNA polymerase zodat anti-sense RNA (aRNA) kopieën ontstaan van elk mRNA in het monster. Het ontstane aRNA bevat ingebouwde aminoallylgroepen waaraan Cyanine 3 of 5 (Cy3/Cy5) fluorescerende moleculen gekoppeld kunnen worden.

### Benodigheden:

- Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA kit, Ambion, bestelnummer 1753.  
Deze kit bevat de benodigheden voor de amplificatie en labelling van 20 monsters wanneer 1 amplificatieronde wordt uitgevoerd, of van 10 monsters wanneer twee amplificatierondes worden toegepast. De kit komt in twee delen binnen, zet de Purification kit bij KT, de rest in de -20°C.
- CyDye Post Labelling Reactive Dye Pack, Amersham Biosciences, bestelnummer RPN5661.  
Deze kit bevat 12x Cy3 en 12x Cy5 label. In de -20°C bewaren.  
Deze onderdelen kunnen ook los worden besteld, onder bestelnummer 25-8010-79 (12 x Cy3) en 25-8010-80 (12x Cy5).
- Ethanol absoluut.

### Verkort protocol Amino Allyl MessageAmp™ aRNA Kit

Voor een uitgebreide beschrijving van dit protocol: zie handleiding die bij de Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA kit zit.

Het hele protocol wordt uitgevoerd op drie opeenvolgende dagen. Op dag 1 maak je dubbelstrengs cDNA en zet je overnacht de in vitro transcriptie in. Op dag 2 begin je met het opzuiveren en kwantificeren van het aRNA. Vervolgens voer je op dag 2 de CyDye labelling en de hybridisatie uit. Op dag 3 was en scan je de glaasjes. Er zijn mogelijkheden om je monsters tussentijds in te vriezen zodat je het over meerdere dagen kunt spreiden: zie handleiding.

Dit verkorte protocol beschrijft de procedure voor één amplificatieronde, aangezien dit genoeg is om voldoende gelabeld aRNA te krijgen voor een aantal microarrays. Normaal gesproken wordt hiervoor 1 µg totaal RNA gebruikt, deze hoeveelheid wordt aanbevolen. Amplificatie met minder RNA is ook mogelijk, de ondergrens waarmee nog een hybridisatie kan worden uitgevoerd ligt bij ongeveer 300 ng. Bij nog lagere hoeveelheden is een tweede amplificatieronde noodzakelijk.

Indien je twee amplificatierondes wilt uitvoeren, zie dan de uitgebreide beschrijving die bij de kit hoort.

Binnen het RIVM is het overigens gebruikelijk om je monster met Cy3 te labelen en je referentie(pool) met Cy5.

Als je de kit voor het eerst gebruikt: aanmaken wasbuffer uit de Purification kit

- Maak de wasbuffer: Voeg 32 ml 100% ethanol toe aan het flesje “Wash buffer”, en merk het label zodat je kan zien dat de ethanol is toegevoegd.

### First strand cDNA synthese

- cDNA Bindingsbuffer al bij 37°C in waterbad verwarmen en tussendoor goed vortexen in verband met het oplossen van kristallen.
- Pipetteer 1 µg (maximaal 5 µg) totaal RNA in een steriel RNase-vrij PCR-epje.  
Voeg 1 µl T7 Oligo(dT) Primer toe.

Voeg nuclease-vrij water toe tot een totaal volume van 12 µl. Vortex kort en draai de epjes kort af (5 sec).

Incubeer 10 minuten bij 70°C in het PCR-apparaat.

Draai de epjes kort af (5 sec).

Plaats de epjes op ijs.

- Maak de Reverse Transcription Master Mix bij KT met de volgende componenten (voor 1 RNA monster):
  - 2 µl 10x First Strand Buffer
  - 1 µl RNase inhibitor
  - 4 µl dNTP mixLet op: maak altijd 5% meer indien je voor >2 monsters maakt in verband met pipetteerfout!

Mix door rustig op en neer te pipetteren of het zwenken van het epje. Draai de ep met master mix kort (5 sec) af en plaats de master mix op ijs.

- Voeg 7 µl Reverse Transcription Master Mix toe aan ieder RNA monster.
  - Mix door rustig op en neer te pipetteren of het zwenken van het epje.
  - Voeg 1 µl Arrayscript toe aan ieder RNA monster, en mix. (Haal de RT pas uit de diepvries als je het nodig hebt en zet het direct weer terug; niet op ijs laten staan!)
  - Mix door rustig op en neer te pipetteren of het zwenken van het epje. Draai de ep kort (5 sec) af.
  - Incubeer 2 uur bij 42°C in de stoof
  - Draai de epjes kort (5 sec) af en plaats ze op ijs.
  - Ga direct door met de volgende stap.

### **Second Strand cDNA synthese**

- Maak een master mix op ijs met de volgende componenten (voor 1 monster):
  - 63 µl Nuclease-vrij water
  - 10 µl 10x Second Strand Buffer
  - 4 µl dNTP Mix
  - 2 µl DNA Polymerase
  - 1 µl RNase HLet op: maak altijd 5% meer indien je voor >2 monsters maakt ivm pipetteerfout!
  - Mix door rustig op en neer te pipetteren of het zwenken van het epje.
  - Draai de ep met master mix kort (5 sec) af en zet de mix op ijs.
  - Voeg 80 µl master mix toe aan de 20 µl cDNA monster.
  - Mix door rustig op en neer te pipetteren of het zwenken van het epje.
  - Draai de monsters kort (5 sec) af.
  - Incubeer 2 uur bij 16°C in het PCR-apparaat.
  - Waterbad met flesje nuclease-vrij water op 50-55°C zetten. Plaats de epjes op ijs.
  - Ga direct door met de volgende stap.

### **cDNA opzuivering**

- Zet een cDNA kolommetje (cDNA Filter Cartridge) in een 2 ml Wash Tube, één voor ieder monster.
- Voeg 250 µl cDNA binding buffer toe aan ieder cDNA monster en mix grondig door pipetteren.
  - Pipetteer dit mengsel op het kolommetje.
  - Centrifugeer 1 min 10.000 rpm
  - Gooi vloeistof in Wash Tube weg.
  - Voeg 500 µl Wash Buffer toe aan elk kolommetje.

Centrifugeer 1 min 10.000 rpm.  
Gooi vloeistof in Wash Tube weg.  
Centrifugeer 1 min 10.000 rpm om de laatste vloeistof eruit te krijgen.  
Zet de kolommetjes over in een 1,5 ml cDNA Elution Tube.  
Pipetteer 9 µl voorverwarmd nuclease-vrij water op het filter van elk kolommetje.  
Incubeer 2 minuten bij KT.  
Centrifugeer 1,5 min 10.000 rpm.  
Elueer nog een keer door deze laatste drie stappen te herhalen. Het dubbelstrengs cDNA zit nu in het eluaat (± 14 µl). Zet ep op ijs. Ga door met de volgende stap.

*Eventueel kunnen de monsters hier ingevroren worden bij -20°C*

### **In vitro transcriptie om aRNA te maken**

Dit verkorte protocol beschrijft het amplificeren van RNA middels één amplificatieronde. Indien je twee amplificatierondes wilt uitvoeren, voer deze stap dan uit zoals beschreven in de uitgebreide beschrijving die bij de kit hoort.

- Maak een IVT master mix op KT met de volgende componenten (voor 1 monster):
  - 3 µl aaUTP Solution (50 mM)
  - 12 µl ATP, CTP, GTP Mix (25mM)
  - 3 µl UTP Solution (50 mM)
  - 4 µl T7 10x Reaction Buffer
  - 4 µl T7 Enzyme MixLet op: maak altijd 10% meer indien je voor >2 monsters maakt ivm pipetteerfout!

Mix door rustig op en neer te pipetteren of het zwenken van het epje.  
Draai de ep met master mix kort (5 sec) af. Zet de ep op ijs.  
Voeg 26 µl master mix toe aan de 14-16 µl cDNA monster.  
Mix door rustig op en neer te pipetteren of het zwenken van het epje.  
Draai de monsters kort (5 sec) af.  
Incubeer overnacht bij 37°C (4-14 uur) in de stoof.

*De volgende dag:*

Stop de reactie door 60 µl Nuclease-vrij water toe te voegen en om het totale volume op 100 µl te brengen. Mix grondig door pipetteren of vortexen

*Eventueel kunnen de monsters hier ingevroren worden bij -20°C*

### **aRNA opzuivering**

- Zet een waterbad op 50°C.  
Verwarm het 10-ml flesje Nuclease-vrij water tot 50°C voor tenminste 10 min.  
Zet 100% ethanol klaar.
- Zet een aRNA kolommetje (aRNA Filter Cartridge) in een aRNA Collection Tube, één voor ieder monster.
- Voeg 350 µl aRNA Binding Buffer toe aan ieder aRNA monster  
Voeg direct 250 µl 100% ethanol toe aan ieder aRNA monster en mix door 3 x op en neer te pipetteren (niet vortexen en centrifugeren)  
Pipetteer dit mengsel direct op het kolommetje.  
Centrifugeer 1 min 10.000 rpm  
Gooi vloeistof in Collection Tube weg.  
Voeg 650 µl Wash Buffer toe aan elk kolommetje.  
Centrifugeer 1 min 10.000 rpm.  
Gooi vloeistof in Wash Tube weg.  
Centrifugeer 1 min 10.000 rpm om de laatste vloeistof eruit te krijgen.

Zet de kolommetjes over in een nieuw aRNA Collection Tube.  
Pipetteer 100 µl voorverwarmd nuclease-vrij water op het filter van elk kolommetje.  
Incubeer 2 minuten bij KT.  
Centrifugeer 1.5 min 10.000 rpm.  
Het aRNA zit nu in het eluaat ( $\pm$  100 µl).

Eventueel kunnen de monsters hier ingevroren worden bij  $-20^{\circ}\text{C}$  overnacht of bij  $-80^{\circ}\text{C}$  voor langere tijd

#### **aRNA kwantificering en concentreren**

- Meet de concentratie van elk aRNA monster met behulp van de Nanodrop Spectrophotometer (Nucleic acid measurements).  
Uit 1 µg totaal RNA haal je na amplificatie ongeveer 20-25 keer zoveel aRNA.  
Voor 1 hybridisatie is het voldoende om nu verder te gaan met 5 µg aRNA.
- Pipetteer 5 µg aRNA in een epje en damp het monster compleet in met behulp van de Speedvac. Controleer elke 5-10 min om overdrying te voorkomen.

#### **Klaarmaken van CyDyes**

Deze procedure geldt voor de CyDyes uit het CyDye Post Labelling Reactive Dye Pack van Amersham Biosciences. Indien je andere kits gebruikt, zie uitgebreide beschrijving die bij de kit hoort.

*Binnen het RIVM is het gebruikelijk om je monster met Cy3 te labelen en je referentie(pool) met Cy5.*

- Resuspendeer 1 epje CyDye per monster met 11 µl DMSO. Bewaar het epje in het donker bij kamertemperatuur, maximaal 1 uur tot je het gaat gebruiken.

#### **Koppelingsreactie aRNA-CyDye**

- Voeg 9 µl Coupling Buffer toe aan je monster (5 µg aRNA in 0 µl), en mix goed.  
Voeg de 11 µl CyDye opgelost in DMSO toe aan je monster, en mix goed.  
Incubeer 30-45 min in het donker bij KT.  
Voeg 4,5 µl 4M Hydroxylamine toe om de reactie te stoppen en mix goed.  
Incubeer 15 min in het donker bij KT.

Voeg 5,5 µl nuclease-vrij water aan elk sample, om het totale volume op 30 µl te brengen.  
Mix grondig door pipetteren of vortexen.

**Let op: Tijdens labelen glaasjes prehybridiseren: zie protocol “Hybridisatie gen-arrays”**

#### **CyDye gelabelde aRNA opzuivering**

- Zet een waterbad op  $50^{\circ}\text{C}$ .  
Verwarm het 10-ml flesje Nuclease-vrij water tot  $50^{\circ}\text{C}$  voor tenminste 10 min.  
Zet 100% ethanol klaar.
- Zet een aRNA kolommetje (Labeled aRNA Filter Cartridge) in een aRNA Collection Tube, één voor ieder monster.
- Voeg 105 µl aRNA Binding Buffer toe aan ieder aRNA monster.
- Voeg direct 75 µl 100% ethanol toe aan ieder aRNA monster en mix door 3x op en neer te pipetteren. Pipetteer dit mengsel direct op het kolommetje.  
Centrifugeer 1 min 10.000 rpm  
Gooi vloeistof in Collection Tube weg.  
Voeg 500 µl Wash Buffer toe aan elk kolommetje.  
Centrifugeer 1 min 10.000 rpm.  
Gooi vloeistof in Wash Tube weg.  
Centrifugeer 1 min 10.000 rpm om de laatste vloeistof eruit te krijgen.



Zet de kolommetjes over in een nieuw aRNA Elution Tube.  
Pipetteer 10  $\mu$ l voorverwarmd nuclease-vrij water op het filter van elk kolommetje.  
Incubeer 2 minuten bij KT.  
Centrifugeer 1.5 min 10.000 rpm.  
Elueer nog een keer door deze laatste drie stappen te herhalen. Het CyDye gelabelde aRNA zit nu in het eluaat ( $\pm$  20  $\mu$ l).  
Let op: Zet dit eluaat niet meer op ijs, anders vlokt het uit!

#### **CyDye kwantificering**

- Meet het volume van elk CyDye gelabeld aRNA monster.
- Meet de concentratie CyDye van elk CyDye gelabeld aRNA monster met behulp van de Nanodrop Spectrophotometer (Microarray measurements).

**Opmerking:** Het is handig om voordat je gaat meten 1-2  $\mu$ l apart te zetten voor de meting op de Nanodrop, en vervolgens je monsters alvast in de Speedvac te zetten, aangezien je veel moet indampen wat veel tijd vergt.

#### **Hybridisatie**

Voer hierna de hybridisatie uit: zie Protocol “Hybridisatie gen-arrays”.

## Protocol “Hybridisatie gen-arrays”

Dit protocol wordt gebruikt voor prehybridisatie van cDNA- en oligo-gespotte glaasjes, alsmede de hybridisatie van Cy3- en Cy5-gelabelde monsters met de glaasjes. Het wordt toegepast na de labeling zoals deze vermeld staat in Protocol “Indirecte CyDye labelling RNA” en Protocol “RNA amplificatie en CyDye labelling”: kit II

### Benodigheden:

- 20x SSC (Invitrogen cat no 15557-044)
- 10% SDS (Ambion cat#no 9822)
- bovine serum albumin fractie V  $\geq$  96 % (Sigma A9647, 4°C)
- Isopropanol (Merck 1.09634)
- Formamide (Sigma F-9037) (4°C)
- Salmon sperm DNA, (-20°C, Fabrikant: Gibco BRL, Leverancier: Invitrogen, Bestelnummer: 15632-011, Verpakkings eenheid: 5x1 ml; uitvullen in gestickerde epjes, 6  $\mu$ l/ep.
- Poly(dA) (-20°C): alleen bij cDNA-arrays. Fabrikant: Amersham, Leverancier: Amersham, Bestelnummer: 27-7836-02, Verpakkings eenheid: 25 A260 units.
- Fragmentation Reagents kit (Ambion, bestelnummer 8740)

### Te bereiden oplossingen:

- Prehybridisatie-mix (5x SSC, 0.1% SDS, 1% BSA) *Zie ook appendix*

Voor 50 ml prehyb-mix: 12,5 ml 20x SSC  
0,5 ml 10% SDS  
0,5 gram BSA  
37 ml milliQ (mQ)

Nadat de BSA is opgelost filtreren over een 0.22 micron filter GSWP04700. De oplossing is een jaar houdbaar in de -20°C.

- 2x Hybridisatie-mix (50% formamide, 10x SSC, 0.2% SDS)  
Voor 5,1 ml 2x hyb-mix: 2,55 ml formamide (TERATOGEEN!!)  
2,55 ml 20x SSC  
0,1 ml 10% SDS

Onmiddellijk filtreren over een 0,22  $\mu$ m Millex GP filter (voordat SDS uitvlokt). De oplossing kan op KT bewaard worden, zonedig bij 42°C voorverwarmen om SDS in oplossing te krijgen. Indien langer bewaren, uitvullen in epjes en bewaren bij -20°C

### Inzetten hybridisatie

Voordat je de pre- en hybridisatie in kan zetten, zullen je glaasjes voorbehandeld moeten zijn. Dit dient om actieve groepen aanwezig op het oppervlak van het glaasje die DNA kunnen binden te blokkeren en daarnaast dubbelstrengs cDNA enkelstrengs te maken. Voer de voorbehandeling van de glaasjes uit volgens de protocollen die bij de desbetreffende glaasjes geleverd zijn, of hier binnen de array-unit voorhanden zijn.

### Prehybridisatie

Indien bevroren, ontdooi de prehybridisatie-mix en doe deze in een glazen bakje. Je hebt 50 ml nodig voor 5 glaasjes of 10 glaasjes, wanneer je de rugkanten van de glaasjes tegen elkaar zet.

Verwarm de prehyb-mix voor tot 42°C in de stoof.

Plaats de te gebruiken glaasjes in de prehyb-mix voor 30-60 min bij 42°C.

Plaats de glaasjes in een metalen rekje, was de glaasjes door ze 2 keer te dopen in mQ, 3 keer in nieuwe mQ, en 5 keer in isopropanol. Zorg dat de glaasjes helemaal in de vloeistof onder gaan en dat je ze goed wast. Droog de glaasjes door 2 minuten bij 1000 rpm te centrifugeren. Zorg ervoor dat de tijd tussen het drogen en de actuele hybridisatie niet langer is dan 20 minuten!

#### Alternatief prehybridisatie protocol

Bij gebruik van MAD 22K muizen-oligoslides kan ook een ander prehybridisatie protocol gebruikt worden:

Prehybridisatiemix:     5 ml 20x SSPE  
                              1 ml 10% SDS  
                              44 ml milliQ

Verwarm de prehyb-mix voor tot 52 °C in een schudwaterbad.

Plaats de te gebruiken glaasjes in de prehyb-mix voor 2 uur bij 52 °C.

Plaats de glaasjes in een metalen rekje, was de glaasjes door ze 2 keer te dopen in mQ en 3 keer in nieuwe mQ. Zorg dat de glaasjes helemaal in de vloeistof onder gaan. Droog de glaasjes door 2 minuten bij 1000 rpm te centrifugeren. Zorg ervoor dat de tijd tussen het drogen en de actuele hybridisatie bij voorkeur niet langer is dan 20 minuten!

## **Hybridisatie**

**Let op, de eerste stappen van het inzetten van de hybridisatie kunnen al uitgevoerd worden tijdens de prehybridisatie.**

Voor de hybridisatie gebruik je na amplificatie 150 pmol Cy3 en 150 pmol Cy5 per glaasje. Indien je minder opbrengst hebt (of als je niet hebt geamplificeerd), houd dan de verhoudingen tussen Cy3 en Cy5 gelijk, zodat je van beide evenveel op een glaasje brengt. Indien je geamplificeerd RNA gebruikt moet je je RNA na labelling fragmenteren (zie werkwijze hieronder).

#### *Werkwijze:*

Het hybridisatievolume voor een hele slide (25x60 mm) is 45 µl.

Gebruik 150 pmol per monster (of minder indien van toepassing)

Concentreer je monsters (dus 150 pmol of minder) na opzuivering tot 12,5 µl met de speedvac (in het donker!) of tot 9 µl indien je moet fragmenteren.

Indien je geamplificeerd RNA hebt moet je nu fragmenteren:

Pipetteer je 9 µl monster in een PCR-epje.

Voeg 1 µl 10X Fragmentation Buffer toe uit de Fragmentation Reagents kit.

Mix en incubeer 15 minuten bij 70 °C in het PCR-apparaat.

Draai de ep kort af.

Voeg 1 µl Stop solution uit dezelfde kit toe.

Voeg 1,5 µl mQ toe zodat het volume per monster 12,5 µl wordt.

**Als je voldoende geamplificeerd materiaal hebt kun je de volumina's vergroten (bijvoorbeeld voor de referentie pool): 12,6 µl monster, 1,4 µl 10x fragmentation buffer, 1,4 µl stop solution en 2,1 µl mQ**

De monsters zijn nu gefragmenteerd en je kunt dit eventueel controleren op de bioanalyser.

Combineer de Cy5-gelabelde referentiepool (12,5 µl) met het Cy3-gelabelde monster (12,5 µl) tot 25 µl in een PCR-epje.

Voeg bij 250 µl 2x hyb-mix 5 µl salmonsperm DNA (10 mg/ml) toe.

Indien er cDNA arrays ipv oligo-arrays worden gebruikt ook 2 µl poly(dA) (10 mg/ml) toevoegen.

Voorverwarmen bij 42°C om te voorkomen dat het SDS neerslaat.

Pipetteer 25 µl 2x hyb-mix bij 25 µl gelabeld RNA (dus je gecombineerde Cy5-gelabelde referentiepool en Cy3-gelabelde monster).

5 min 95°C in PCR-apparaat (intussen de glaasjes wassen en drogen).

2 min afdraaien 10000 rpm.

Bij KT plaatsen.

Pipetteer 20 µl water in elk van de zes gleuven van de hybridisatiekamer (GeneMachines) om de lucht vochtig te houden.

Plaats de glaasjes in de hybridisatiekamer.

Pipetteer 45 µl monster op een glaasje op het gespotte gebied.

Leg er een dekglasje (60mm) overheen, vermijd luchtbelletjes!

Draai de hybridisatiekamer dicht en incubeer 16-20 uur bij 42°C.

De volgende dag:

#### Wassen

*Voor je aan het wassen begint kun je vast de lasers van de scanner aanzetten (zie protocol "Microarrays scannen"). Dat scheelt tijd.*

Zet 5 bakjes à 200 ml klaar met de volgende oplossingen en bij de volgende temperatuur:

- 1:     **2x SSC, 0,1 % SDS**  
      20 ml 20x SCC           42°C (in schuddend waterbad)  
      2 ml 10% SDS  
      178 ml mQ
- 2:     idem 1                   42°C (in schuddend waterbad)
- 3:     **0,1x SSC, 0,1 % SDS**  
      1 ml 20x SCC           KT (op schudplateau)  
      2 ml 10% SDS  
      197 ml mQ
- 4:     **0,1x SSC**  
      1 ml 20x SCC           KT (op schudplateau)  
      199 ml mQ
- 5:     **0,1x SSC**  
      idem 4                   KT (op schudplateau)

Haal de glaasjes uit de hybridisatiekamers. Zorg ervoor dat je het dekglasje niet teveel verschuift.

Werk zoveel mogelijk in het donker om uitdoving te voorkomen (bakjes die bij KT staan in aluminiumfolie verpakken)

Doop de glaasjes in bakje 1 tot de dekglasjes er afglijden.  
5 min in bakje 2 (glaasjes in een metalen rekje)  
5 min in bakje 3,  
1 min in bakje 4,  
1 min in bakje 5.

Droog de glaasjes door het rekje 2 min bij 1000 rpm te centrifugeren Zet het rekje hierbij in de platenhouder op een tissue.

De glaasjes zijn nu klaar om te scannen (zie protocol "Microarrays scannen").  
Let er op dat als je meerdere glaasje gaat scannen je de glaasjes in het exsiccator-kastje houdt zodat het signaal van die glaasjes niet achteruit gaat.

## Protocol “Microarrays scannen”

Dit protocol wordt gebruikt voor het scannen van microarrays, na de voorafgaande labeling en hybridisatie. Het scannen wordt uitgevoerd op de apparatuur in A3.111. Omdat het hier kostbare apparatuur betreft, mag dit alleen gebeuren door mensen die door een ervaren medewerker zijn ingewerkt. Enige ervaring met het werk wordt dan ook verondersteld, logische details zullen dan ook niet genoemd worden.

### Algemeen:

- Cy5 is gevoelig voor afbraak onder invloed van ozon in combinatie met vocht. Na het hybridiseren, wassen en drogen van de slides worden deze meteen opgeslagen in een lichtdicht plastic doosje in de exsiccator bij de scanner. Om het signaal van de slides zo goed mogelijk te houden scannen we meestal maar één glaasje tegelijkertijd, de rest wordt tot het scannen bewaard in het doosje in de exsiccator.
- Vaak hebben slides een label met barcode. Het is handig deze mee te scannen, en automatisch de barcode in de filenaam te laten plaatsen. Zo kan een image file altijd via de barcode gekoppeld worden aan het bijbehorende monster. Dit werkt makkelijker dan aantekeningen maken, zeker voor grotere experimenten.
- De meeste slides worden gescand door TOX-ers die 150 pmol Cy3 en Cy5 gebruiken op MAD 22K muizenslides. Daarvoor is een standaard scan-protocol aanwezig (TOX 150 pmol) met de aanbevolen settings. Ook is er een standaard batch-protocol (TOX-standaard), waarbij één glaasje op deze manier wordt gescand met gebruik van de barcode.

### Beginnen:

- Zet eerst de scanner aan, de knop zit rechts opzij bij de achterkant.
- Zet dan pas de computer aan. Log in met “workstation only”, met als username gast en als password gast2.
- Start de ScanArrayExpress software (icoontje zit op de desktop).
- Wacht tot de computer verbinding heeft met de scanner, dat zie je rechts in beeld onder Connection to Instrument: Connected (kleur verandert dan van rood naar lichtgroen).
- Controleer onder de log-optie (linksboven naast Help) of alles goed werkt. Scroll onder deze optie helemaal naar beneden in de lijst. Als het goed is zie je daar staan: “Client Software Started” en daarna “Connected To Instrument”. Als daartussen “ScanArray instrument initialized with warning(s)” of een andere error-melding staat moet je het ScanArrayExpress programma afsluiten en na 10 seconden opnieuw opstarten. Dan is het probleem meestal verholpen. Meestal is het niet nodig de computer en/of de scanner opnieuw op te starten, alleen het ScanArrayExpress programma is voldoende.
- Start rechts boven in beeld de lasers 1 (633 nm, voor Cy5) en 3 (543 nm, voor Cy3) en laat ze 15 minuten opwarmen, er verschijnt een timer in beeld. Mocht je een driekleuren-labeling gebruiken, start dan ook de tweede laser (594 nm).
- Wacht tot de laser opgewarmd is. Maak vast aantekeningen in welke volgorde je de slides wilt gaan scannen (vooral indien de slides geen barcode hebben).
- Haal de autoloader voorzichtig uit de scanner en stop de eerste slide in de autoloader, bijvoorbeeld bij positie #1. De slides kunnen maar van één kant erin, zorg dat de spotjes bovenaan zitten en het label naar binnen toe (tegen het balkje aan). Duw de slides aan tot ze met de achterkant (label) tegen het balkje komen. Zet de loader in het apparaat met de pijl naar binnen wijzend. Duw door tot de autoloader vastklikt.
- Je kunt nu gaan scannen. Als je voor het eerst (in een experiment) gaat scannen moet je geschikte settings bepalen. Dat kan met Easyscan of (voor gevorderden) met een custom batch scan. Als je binnen een experiment al vaker gescand hebt, heb je al een protocol met goede instellingen en kun je meestal meteen door gaan met batch scannen.

**Uitvoeren Easyscan.**

- Deze stap is alleen *de eerste keer* nodig als je nog geen settings hebt bepaald, anders kun je meteen doorgaan met batch scannen.
- Kies in het linkermenu onder Configure --> Application settings --> stel de PMT in. Voor ongeamplificeerd materiaal is 70 meestal wel een handig beginpunt, voor geamplificeerd materiaal op de MAD 22K muizeslides is Cy5 55 en Cy3 65 een goed begin, voor de Operon ratte-15K slides respectievelijk 40 en 50. *Wanneer je de opbrengst op de NanoDrop hebt gecontroleerd en 150 pmol Cy3 en Cy5 gebruikt is Laserpower 90 en PMT Cy5 55 en Cy3 60 de aanbevolen instelling, maar je kunt dan meteen het TOX 150 pmol protocol gebruiken.*
- Kies in het linkermenu Easyscan. Stel het gebied in dat je wilt scannen (liefst iets groter dan nodig), neem als resolutie voor de eerste scan 20  $\mu\text{m}$ , als slot nummer 1, fluorophore Cy3 en Cy5, en als laserpower 90.
- Scan nu de slide. Tijdens het scannen kun je de laserpower nog bijstellen als je dat wilt.
- Bekijk het resultaat. Je hebt rechtsonder in beeld twee schuifjes, voor de Filter threshold (staat normaal links) en de Saturation threshold (staat normaal rechts). Verder is er een Base palette, deze is voor Cy3 groen en voor Cy5 rood. Eventueel kun je deze op rainbow zetten, dat oogt wat makkelijker.
- Als je nu op de scan spotjes ziet, die in rode/groene intensiteit verschillen van de achtergrond, maar niet verzadigd zijn (wit gekleurd) zijn je instellingen in orde. Dit geldt zowel voor Cy3 als Cy5.
- Zijn je instellingen niet naar tevredenheid kies dan andere instellingen voor de PMT voor Cy3 en/of Cy5. Bij te zwak signaal een hogere PMT nemen, bij een te sterk signaal een lagere PMT. Verhoog/verlaag hiertoe de PMT met bv 10.
- Herhaal de procedure tot je voor Cy3 en Cy5 een goede scan hebt (typische instellingen: cDNA laser 90 PMT 75, oligo's laser 90 PMT 50 à 70). Voer de PMT liever niet op boven de 90. Als dat nodig mocht zijn verhoog dan eerst de laserpower naar 100. Dat voorkomt ruis. Meestal heb je binnen drie keer scannen wel een goed beeld. Te vaak scannen kan namelijk tot signaalverlies leiden.
- Ga via de desktop naar de directory Images en verwijder de prescan-tiff-files die je net hebt gemaakt.

**Instellen batch scannen:**

- Als je klaar bent met Easyscan of al vrij precies weet wat voor settings je nodig hebt (zie hierboven) kun je je Batch settings gaan instellen. Je kunt een compleet nieuw protocol maken (zoals hier staat beschreven), maar als je ervaren bent kun je ook een van je eigen oude protocollen aanpassen.
- Kies in het linkermenu Configure --> Scan protocol. Als je hier al eens eerder hebt gewerkt heb je een eigen protocol. Selecteer deze. Je krijgt nu zes stappen.
  1. Basic: Hier staan je naam en omschrijving. Kies verder voor een 10  $\mu\text{m}$  resolutie op full speed. Die 10  $\mu\text{m}$  is dus nauwkeuriger dan de 20  $\mu\text{m}$  van hiervoor, want dit is de echte scan.
  2. Scan area. Selecteer het te scannen gebied op de aangegeven slide waarbij de eerdere scans zichtbaar zijn. Als je het niet goed kunt zien kun je via Show zoom window nauwkeuriger kijken. Tip: scan ook de barcode mee.
  3. Fluorophores. Je hebt Cy3 en Cy5, kies voor elk de laser en PMT settings die je eerder hebt bepaald.
  4. Sensitivity calibration area. Hier doen we niks mee.
  5. Automatically calibrate sensitivity. Deze moet uit staan. Het gebruik van deze optie geeft namelijk grote kans op artefacten.
  6. Tools. Hier doen we ook niks mee.Klik op Finish en vervolgens op Close.

- Kies nu Configure --> Batch sets. Ook hier heb je al je eigen protocol. Selecteer deze.
- Stel de slidepositie die je gebruikt (meestal #1) in op (links) full, (midden) je eigen scanprotocol, (rechts) standaard (date-time-fluor, tiff). Mocht je automatisch de barcodes willen gebruiken dan moet je rechts voor barcode kiezen. Kies nu OK.
- Stel op dezelfde manier de rest van de slots in op empty (daarvoor is geen scan of image protocol nodig). Kies OK en Close.

**Batch scannen:**

- Als je al eens eerder hebt gescand heb je een eigen protocol en meestal zijn de settings nog geschikt. Je kunt de settings dan nog even controleren, maar het is vrijwel nooit nodig daar iets aan te veranderen.
- Kies in het linkermenu Custom Scan, selecteer je batch set en start. De optie Use barcode for all microarrays hoeft niet aangevinkt te worden.
- Nu worden de files gescand. Je hoeft hier niet bij te blijven, kijk hooguit af en toe hoe ver de zaak is. Als er gevraagd wordt om iets op te slaan duw je op "No", want dat gaat toch al automatisch.
- Wanneer de slide gescand is haal je deze uit de autoloader en je doet de volgende erin. Kies in het linkermenu Custom Scan, selecteer je batch set en start. Herhaal deze procedure voor iedere slide.
- Na afloop ga je via de desktop naar de directory images. Maak een nieuwe map aan met een logische naam, bijvoorbeeld 20020923\_zieke\_muis. Verplaats de scanfiles naar deze directory.
- Aangezien de files op tijd staan gesorteerd weet je welke files bij welke slide hoorden. Dat heb je immers eerder opgeschreven. Maak in notepad (of zo) een filetje waarin deze gegevens ook staan en zet daar ook andere gegevens in zoals de laserpower, de PMT settings, barcodes en eventuele praktische details over het scannen. Bewaar dit bestandje bij je data in dezelfde directory.

**Snelle weergave resultaat:**

- Deze stap is optioneel en vooral nuttig voor het maken van een PowerPoint weergave van de scans.
- Start Quantarray op via het icoontje op de desktop.
- Kies onder File --> open image. Vervolgens moet je twee files aanklikken, Cy3 als eerste want deze wordt groen weergegeven.
- Vul een naam voor het experiment in, bv ZiekeMuis.
- Als je goed gescand hebt, heb je nu al een mooi plaatje via de standaardinstellingen. Je kunt via de windows voor Cy3 en Cy5 ook de kleurinstellingen veranderen, en daarmee het totaalbeeld.
- Voordat je nieuwe slides laadt eerst de oude afsluiten via File --> Close.

**Opslag scandata:**

- Voordat je kunt analyseren moet je de tiff-files eerst op een andere computer krijgen. Hiervoor zijn meerdere mogelijkheden:
- Via een memory stick.
- Het is mogelijk de image directory te sharen. In dat geval maak je op een andere computer een netwerkschijf aan (de M-schijf) die rechtstreeks de data van de scannercomputer kan lezen en verwerken. Op de computer voor de data-analyse is dit standaard aanwezig. Informeer bij Jeroen naar de mogelijkheden voor andere computers.



- Je kunt zelf files opslaan op je eigen N- of Q-schijf. Om bij deze schijven te komen moet je met de rechtermuisknop klikken op het Novell-icoontje rechtsonder op de taakbalk en vervolgens inloggen onder je eigen naam. Ook deze schijven zijn echter niet bedoeld voor lange termijn opslag van deze grote files. Om te voorkomen dat de server volloopt wordt er dan ook op gewezen dat deze files ook een keer moeten worden gewist, bijvoorbeeld nadat ze zijn gebrand.
- Door de data op CD te branden. Dit is vooral handig voor grotere experimenten.
- Voor de langere termijn worden de scanfiles op CD gebrand. Jeroen regelt dit en bewaart de CD's. Wanneer de files gebrand zijn worden ze na verloop van tijd van de harde schijf gewist (door Jeroen) om te voorkomen dat de schijf volloopt. Overleg met Jeroen als je data langer wilt laten staan.