

Induceren van GFP expressie op een endogene locus in *C. elegans*



Linda Aalders

Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek
Moleculaire Biologie

Onder begeleiding van:
Evelien Kruisselbrink
Marcel Tijsterman

Begeleidend docente:
Belinda Baltens

Hubrecht Instituut
Genome Dynamics & Stability
Datum: november '07 – juni '08

Induceren van GFP expressie op een endogene locus in *C. elegans*

Door: Linda Aalders

Studentennummer: 1211153

Locatie: Hubrecht instituut, developmental biology and stem cell research.

Onderzoeksgroep: Genome Dynamics & Stability

Plaats: Utrecht

Begeleider Hubrecht Instituut: Evelien Kruisselbrink

Begeleider Hogeschool Utrecht: Belinda Baltens

Datum: november 2007/ juni 2008

Voorwoord

Tijdens mijn afstudeerstage heb ik op het Hubrecht instituut onderzoek gedaan naar de expressie van één kopie GFP onder een endogene promotor. In dit verslag wordt o.a. meer verteld over de *C. elegans*, hoe het onderzoek is uitgevoerd en wat de resultaten daarvan zijn.

Samenvatting

De *Caenorhabditis elegans* is een (± 1 mm) grondworm die vrijwel overal in de wereld voorkomt en zich voedt met microben, vooral bacteriën. Tegenwoordig wordt de *C. elegans* veel gebruikt bij verschillende soorten onderzoek zoals cel-biologie, neuroscience en genomics. Het voordeel van *C. elegans* is dat het een van de weinig meercellige organismen is waarvan het genoom geheel bekend is en overeenkomsten vertoont met meerdere humane genen.

Door gebruik te maken van het transposon regulatie mechanisme in de worm was gekeken naar de expressie van één kopie GFP onder een endogene promotor. Van de genen die waren gebruikt voor dit onderzoek was niet bekend waar deze in de worm tot expressie kwamen.

Wormen, geïnjecteerd met het construct met het C33B4.3 gen + GFP en het C14B9.8 gen + GFP, gaven al vroeg een sterke GFP expressie in de pharynx. Uit meerdere testen bleek dat het transposon in beide genen nog aanwezig was en dat GFP op een andere plek in het genoom geïntegreerd was. Waarschijnlijk zat deze op een wildtype plek in het genoom wat gevoelig is voor integratie van sequenties. Hierdoor zijn het aantal kopieën GFP onbekend.

De overige genen gaven wel transgene lijnen maar geen GFP expressie. Redenen hiervoor kunnen zijn; de promotor is niet sterk genoeg om GFP zichtbaar tot expressie te brengen, het transposon is nog niet gesprongen of de breuk is hersteld vanaf het homologe chromosoom en niet vanaf de multi-copy array.

Summary

The *Caenorhabditis elegans* is a small (approx. 1 mm) worm, which is found all around the world, and feeds on microbes, especially bacteria.

Nowadays, the *C. elegans* is used for various kinds of research, such as cell-biology, neuroscience and genomics. The advantage of *C. elegans* is that it is one of few multi-cellular organisms of which genome is completely known and which has similarities with several human genes. We've looked at the expression of one copy of GFP under an endogene promotor by using the transposon regulation mechanism in the worm. From the genes that were used in this research, the place of expression in the worm was unknown. Worms, injected with the construct with the C33B4.3 gene + GFP and the C14B9.8 gene + GFP rapidly gave a high expression of GFP in the pharynx. Several tests showed that the transposon was still present in both genes, which means that the GFP was integrated in another place in the genome. This was probably a wildtype place in the genome which is sensitive for integration of sequences. Therefore the number of copies of GFP are unknown.

The other genes did give a transgenic line but no expression of GFP. Reasons for this can be; the promotor is not strong enough to bring GFP visibly to expression, the transposon hasn't jumped yet or the fracture has been repaired from the homolog chromosome and not from the multi-copy array.

Afkortingenlijst

GFP	Green Fluorescent Protein
wT	Wildtype
MQ	MilliQ
HR	Homologe Recombinatie
SSA	Single-Strand Annealing
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
NGM	Nematode Growth Medium
DSB	Double Strand Break

Inhoudsopgave

Voorwoord

Samenvatting

Summary

Afkortingenlijst

Hoofdstuk 1: Theoretische achtergrond	8
1.1 Inleiding <i>C. elegans</i>	
1.2 Transposons	
1.2.1 Double strand break repair (DSB)	
1.3 Induceren van mutaties	
1.3.1 EMS	
Hoofdstuk 2: Het onderzoek	13
Hoofdstuk 3: Materiaal en Methode	15
3.1 Materiaal	
3.2 Methode	
Hoofdstuk 4: Resultaten	20
4.1 GFP expressie C33B4.3	
4.2 GFP expressie C14B9.8	
4.3 EMS screen	
Hoofdstuk 5: Conclusie en Discussie	27
Bronnenlijst	29
Bijlagen:	
Bijlage 1: Constructen	
Bijlage 2: Protocollen	

1. Theoretische achtergrond

1.1 Inleiding *C. elegans*

De *Caenorhabditis elegans* is een grondworm die vrijwel overal in de wereld voorkomt en zich voedt met microben, vooral bacteriën. Op het lab worden ze in kweek gehouden op NGM (Nematode Growth Medium) platen met OP50 voer. Door het kleine formaat van deze wormen (volwassen ± 1 mm), kunnen er meerdere op een plaat worden gekweekt. [14]

Tegenwoordig wordt dit organisme veel gebruikt als model voor onderzoek zoals neuroscience, cel biologie of genomics. Een voordeel van dit organisme als onderzoeksmodel is o.a. de makkelijke voortplanting. *C. elegans* bestaat uit twee seksen (Fig.1), waarvan het overgrote deel uit zelfbevruchtende hermafrodieten, waardoor er geen kruisingen nodig zijn om nageslacht te krijgen. Na drie dagen is er een nieuwe generatie.

Een ander voordeel van de *C. elegans* is dat het één van de weinig meercellige organismen is waarvan het genoom, dat bestaat uit ± 20.000 genen, geheel bekend is. Een groot deel van de humane genen heeft een homoloog in *C. elegans*.

Tijdens de gehele ontwikkeling is het organisme transparant waardoor deze op cellulair niveau met een differentiaal interference contrast (DIC) microscoop te volgen is. [14]

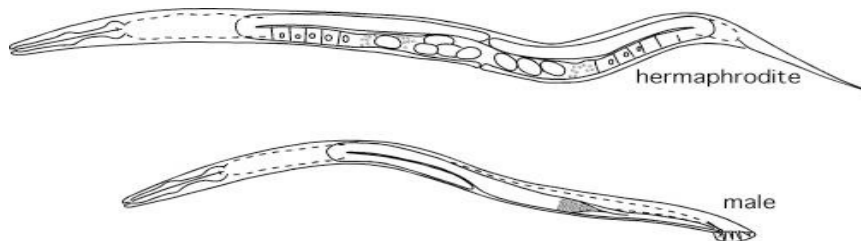


Fig.1. Mannetje en hermafrodit.

1.1.2 Germline

Bij *C. elegans* wordt er onderscheid gemaakt tussen de germline en somatische cellen. In de germline worden sperma en oöcyten geproduceerd die zorgen voor nageslacht. Deze cellen ondergaan een andere celcyclus dan somatische cellen. Wanneer er een mutatie in de germline optreedt zal deze aan het nageslacht doorgegeven worden. De somatische cellen kunnen verschillen per worm. Wanneer hierin mutaties optreden zullen deze niet worden doorgegeven aan het nageslacht. Tevens kunnen in somatische cellen mutaties tijdens verschillende stadia optreden, wat dan een early of een late event wordt genoemd. [15]

C. elegans ondergaat verschillende larvale ontwikkelings stadia; de L1-, L2-, L3-, L4, jong volwassen en volwassen (Fig. 2). Wanneer de groei condities niet optimaal zijn kunnen wormen aan het einde van het L2 stadium in een arrest gaan. Dit stadium wordt de dauer larf genoemd. Tijdens de dauer stage kan de worm zich

voor onbepaalde tijd niet voeden en wordt de beweging minder. Een praktisch voordeel hiervan is dat ze weken in kweek kunnen worden gehouden zonder over te zetten op een nieuwe plaat met voer. Het dauer stadium eindigt wanneer de condities weer voldoende zijn om te groeien. Morfologisch gezien is een dauer larf veel dunner dan een gewone L2 worm. [14]

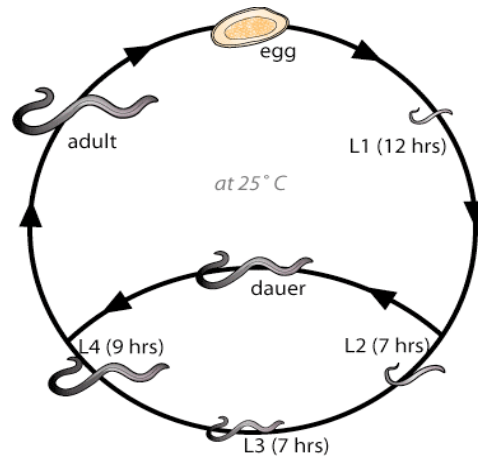


Fig. 2 *Stadia van de C. elegans.*

1.2 Transposons

In het DNA komen vaak meerdere kopieën van een sequentie voor, ook wel tandem repeats genoemd. Een transposon is een DNA sequentie dat in meerdere kopieën voorkomt en tevens van positie kan veranderen, een event genaamd transpositie. In *C. elegans* wordt transpositie in de germline onderdrukt, “gesilenced”. Dit voorkomt dat functionele genen onderbroken worden. Door zogenaamde mutatorgenen uit te schakelen wordt transpositie niet langer gesilenced en kan een transposon gaan springen. Hierbij bindt een transposase eiwit aan het transposon en knipt deze uit zijn originele plek. Het transposon kan vervolgens op een andere plek in het genoom integreren of uit het genoom verdwijnen. Om een stam te krijgen waarbij het transposon in een gen van interesse zit, wordt een mutatorlijn in kweek gehouden. In deze lijnen blijft het transposon steeds springen en in het genoom integreren. Wanneer het transposon in het gen van interesse zit kan er d.m.v. transpositie en homologe recombinatie een single-copy array gemaakt worden (zie hoofdstuk 2).

Een voorbeeld van een transposon dat veel voorkomt in *C. elegans* is het Tc1 transposon. Tc1 is het transposon dat het meest voorkomt in *C. elegans*, 1610 bp lang is en waarvan 30 kopieën in het wildtype genoom voorkomt. Transposons hebben een voorkeur om op plaatsen in het genoom te integreren die TA rijk zijn, en laten bovendien na het springen een TA sequentie achter. [4]

1.2.1 Double strand break-repair (DSB)

Wanneer een transposon van zijn originele plek uit het genoom springt ontstaat er een dubbelstrengs breuk in het DNA. De dubbelstrengs breuk kan op drie manieren worden hersteld: door homologe recombinatie (HR), non-homologe end-joining (NHEJ), en single-strand annealing (SSA).

Recombinatie is een template-afhankelijk herstel proces. De breuk wordt hersteld door middel van replicatie vanaf het homologe chromosoom (Fig. 3). Als het organisme heterozygoot is voor de Tc1 insertie kan er op de plaats van het transposon een wildtype sequentie komen. Wanneer het organisme homozygoot is voor de Tc1 insertie zal er een nieuwe Tc1 transposon in de plaats komen. [4][7]

Bij NHEJ wordt de breuk simpel “geplakt”. Het transposon laat een TA en een non-complementaire 5'-overhang achter van 2 basenparen. De uiteinden van het gen worden vervolgens meestal blunt gemaakt en door middel van ligatie aan elkaar gezet. Soms wordt er een deel van de sequentie weggehaald of nucleotiden toegevoegd zodat de uiteinden complementair aan elkaar zijn (Fig. 3). [4][7]

Bij SSA wordt er ook gebruik gemaakt van homologie, maar, in tegenstelling tot HR, op hetzelfde chromosoom. Aan beide uiteinden van de breuk worden een aantal nucleotiden weggehaald, waardoor deze complementair worden gemaakt en aan elkaar kunnen annealen (Fig.3). [13]

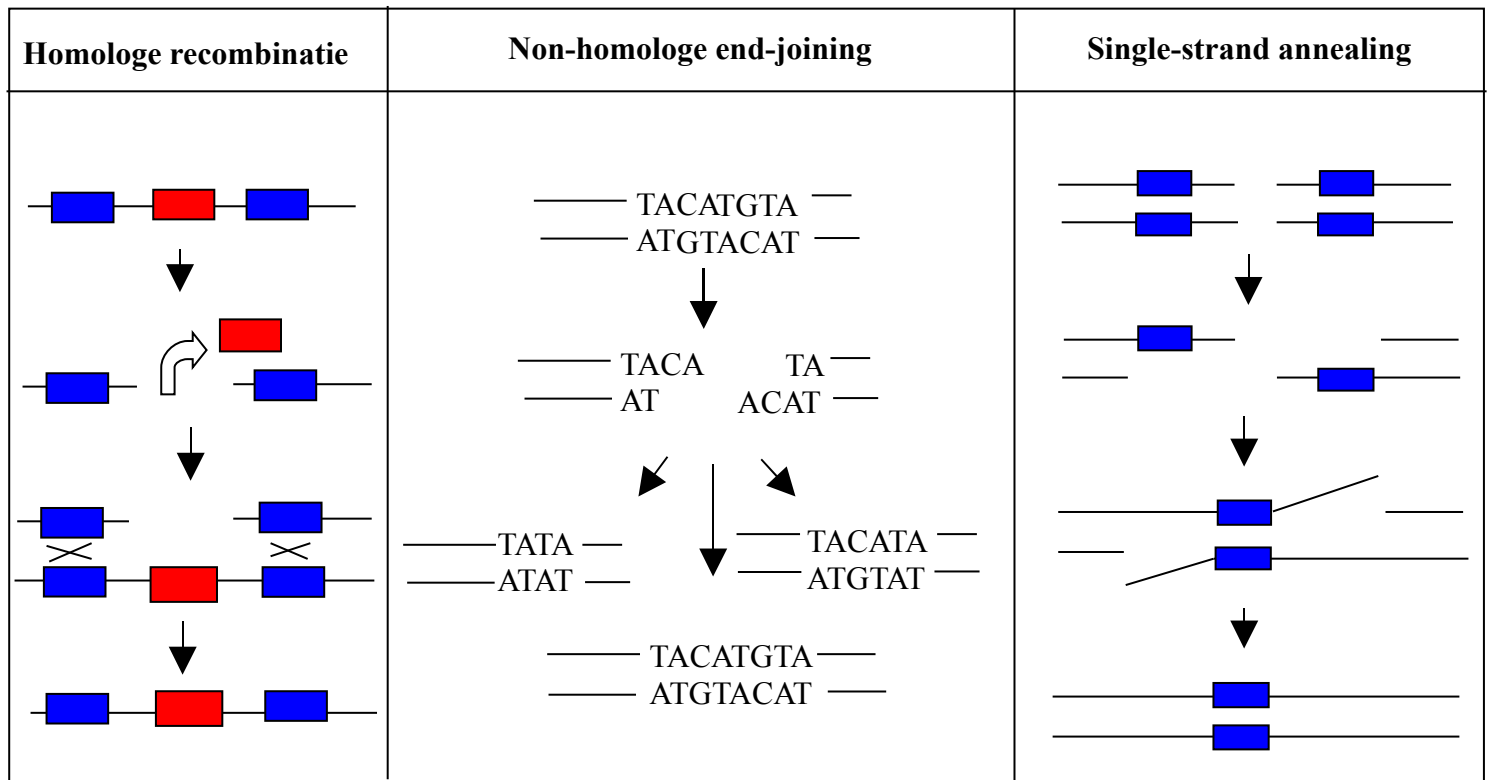


Fig. 3. Drie manieren voor DSB herstel. Bij homologe recombinitie wordt de DSB, na excisie van het transposon, hersteld vanaf het homologe chromosoom. Non-homologe end-joining kan op drie manieren worden uitgevoerd; directe ligatie, deletie of insertie van nucleotiden. Bij single-strand annealing worden de einden enkelstrengs complementair gemaakt, waarna deze aan elkaar geligeerd kunnen worden.

1.3 Induceren van mutaties

Mutagenese kan in drie klassen worden verdeeld; target-selected, spontaan of geïnduceerd. In de klasse van spontane mutaties ontstaan mutaties vaak onbedoeld en worden niet van buitenaf gestimuleerd met bijvoorbeeld mutagene middelen. De mutatie frequentie in de *C. elegans* is per lijn verschillend. In sommige lijnen, zoals een mutator lijn, zijn transposabele elementen de oorzaak van de grote hoeveelheid mutaties. In andere lijnen zijn de meeste mutaties vaak de oorzaak van replicatie fouten, DNA beschadiging door achtergrond straling of chemische mutagenese vanuit de omgeving.

In de klasse van geïnduceerde mutaties worden mutaties aangebracht met behulp van mutagene middelen. Voorbeelden van mutagene middelen zijn verschillende chemicaliën of UV-licht.

Voor het aanbrengen van mutaties in de *C. elegans* worden jong volwassen wormen gebruikt. Dit stadium is het beste hiervoor, omdat het aantal kernen in de germline dan op zijn maximum zit. Tevens hebben ze al hun oöcyten en sperma nog [5][6].

Wanneer een mutatie in *C. elegans* is opgetreden kan deze zich uiten als een zichtbaar fenotype, zoals een andere structuur of andere manier van bewegen. Een ander fenotype die kan optreden na een mutatie is letaliteit. Daarnaast kan er gebruik gemaakt worden van een assay om relevante genen op te sporen waar mutaties in zijn opgetreden. Bij het bekijken van de resultaten na een geïnduceerde mutatie moet rekening gehouden worden met eventuele achtergrond mutaties die opgetreden kunnen zijn.

1.3.1 EMS

Ethyl methaansulfaat (EMS) is een mutagenische stof met de formule $C_3H_8O_3S$ en is de sterkste en meest gebruikte mutageen bij *C. elegans*. De ethyl groep van EMS reageert met guanine in DNA wat een O-6-ethylguanine base vormt. Tijdens DNA replicatie zet de DNA polymerase een thymine, i.p.v. een cytosine, tegenover de O-6-ethylguanine. Na meerdere replicatie ronden kan de originele G:C basenpaar een A:T paar worden waardoor er een stop codon kan worden gevormd. Hierdoor zal het eiwit niet afgemaakt of niet functioneel worden. De frequentie van $G/C \rightarrow A/T$ overgangen is ongeveer 7×10^{-6} per gemutageniseerde G/C basenpaar. [8]

Wanneer een worm gemutageniseerd is, zullen meerdere genen mutaties oplopen. Om relevante genen op te sporen kan er gebruik gemaakt worden van een specifieke reporter. Hierdoor kunnen genen die betrokken zijn in dezelfde pathway een hoger of juist lager positief resultaat geven in de worm. Door deze te sequencen kunnen tevens nieuwe genen worden gevonden waarvan nog niet bekend was dat ze een rol spelen in die pathway.

2. Onderzoek

Het eerste onderzoek voor mijn afstudeerstage bestaat uit twee delen. Ten eerste wordt gekeken naar de expressie van één kopie van GFP of Cherry die in het genoom wordt gebracht bij verschillende genen in *C. elegans*. Dit is nog nooit eerder onderzocht, omdat er nog geen methode voor was en niet zeker is of één kopie van het transgen onder een endogene promotor voldoende expressie geeft. Tot nu toe kan in *C. elegans* alleen nog gebruik worden gemaakt van transgene arrays met meerdere kopieën.

Omdat bij verschillende arrays het aantal kopieën kan verschillen, zijn de verschillende stammen niet goed met elkaar te vergelijken. Bovendien is na integreren van het multi-copy transgen niet bekend waar deze zich in het genoom bevindt. Door gebruik te maken van één kopie kunnen de transgenen wel met elkaar vergeleken worden. Tevens kan door gebruik van het transposon-regulatie mechanisme in *C. elegans* de plaats van de integratie bepaald worden (Fig. 2.1).

Bij deze methode maakt het transgen gebruik van de promotor van het desbetreffende gen. Om achtergrond expressie te voorkomen wordt het start codon van de GFP weggelaten en is expressie afhankelijk van de endogene promotor. Omdat het expressie niveau per gen verschilt, wordt er gekeken naar verschillende genen.

Het tweede onderdeel is een toepassing van de methode hierboven. Hier wordt voor Cherry een G23 repeat geplaatst om bijvoorbeeld het mismatch repair mechanisme in *C. elegans* te kunnen bestuderen. G23 is een instabiele repeat waar makkelijk een mutatie kan optreden. De repeat wordt samen met het reporter-gen in frame in het unc-22 gen gebracht zodat de Cherry tot expressie komt. Wanneer er een frameshift ontstaat kan de G23 veranderen in een G22 repeat, waardoor deze uit frame komt en Cherry niet meer tot expressie wordt gebracht. Deze wormen kunnen gebruikt worden als reporter om frameshift gebeurtenissen uit te lezen. De mutatie frequentie kan verhoogd worden door mismatch repair genen uit te schakelen.

Wanneer beide onderdelen van het onderzoek zijn uitgevoerd kunnen er verschillende toepassingen met de bovenstaande methode worden gedaan. Een voorbeeld is het maken van assays voor GFP/Cherry die al op het lab gebruikt worden in multi-copy arrays. Het is dan immers mogelijk om genetisch verschillende type transgenen met elkaar te vergelijken.

Het tweede project is het mutageniseren van wormen om nieuwe genen op te sporen. Hierbij wordt er gebruik gemaakt van een specifieke reporter waardoor genen uit dezelfde pathway, na het aanbrengen van mutaties, een hoger of lager positief resultaat geven dan in de wT.

Doel onderzoek

Doel van het onderzoek is te bepalen of één kopie van het reporter-gen GFP voldoende is om detectbaar tot expressie te komen onder een endogene promotor. Daarnaast wordt onderzocht of m.b.v. deze methode de mutatiefrequentie van een instabiel repeat kan worden bepaald.

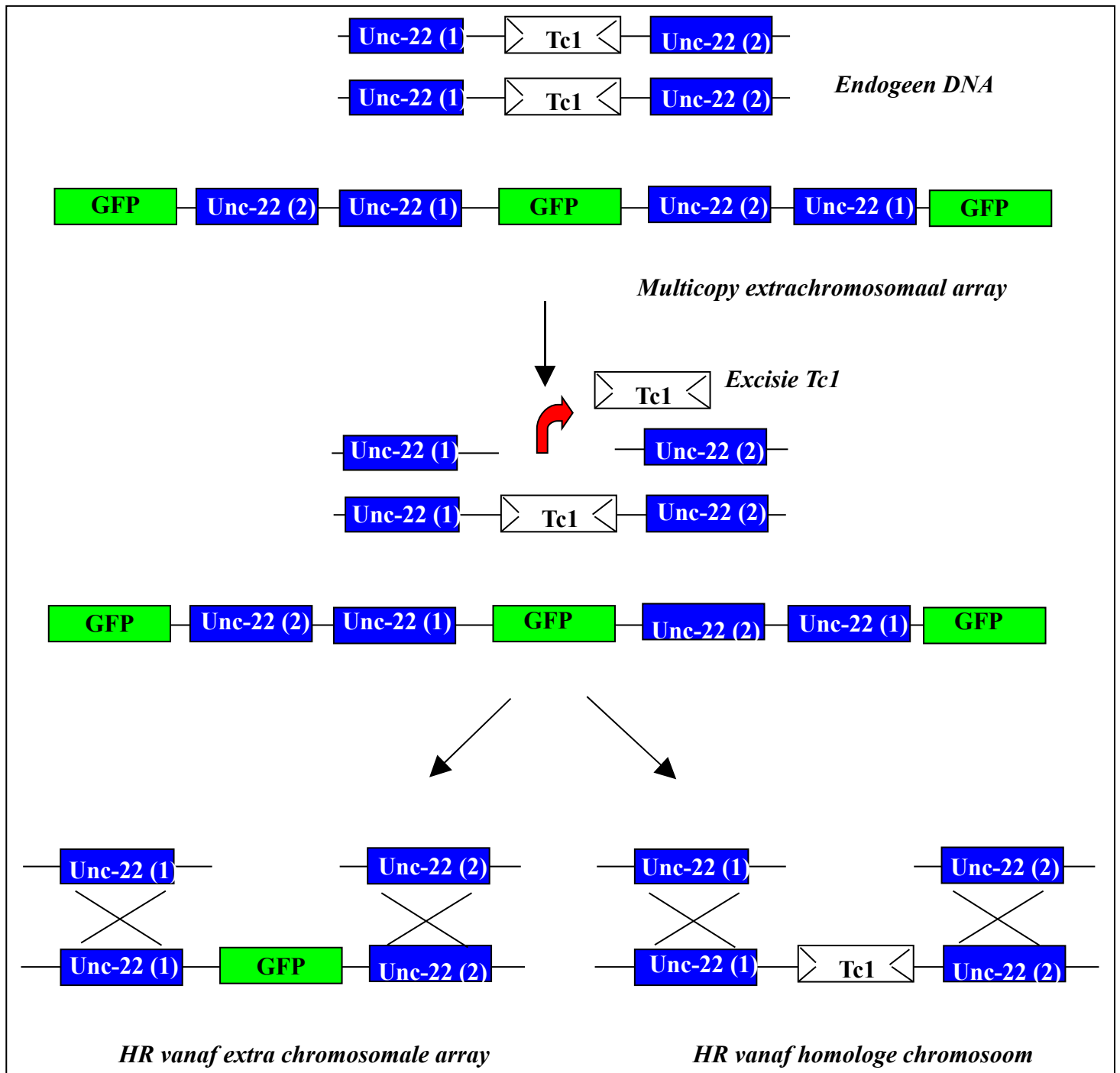


Fig. 2.1. DSB herstel na transposon excisie. Wanneer een transposon springt laat het een dubbelstrengs breuk achter. Door een extrachromosomale array toe te voegen kan de breuk hersteld worden vanaf de extrachromosomale array of vanaf het homologe chromosoom.

3. Materiaal en methode

3.1 Materiaal

PCR:

Fabrikant

1x Expand PCR mix:

- | | |
|------------------------------|-------------|
| - MQ | Hubrecht |
| - Taqbuffer | Invitrogen |
| - dNTP | Hubrecht |
| - Primers (Reversed/Forward) | Biolegio BV |
| - Expand Taq polymerase | Invitrogen |

Loadingbuffer:

- | | |
|--------------|----------|
| - Cresolrood | Hubrecht |
| - MQ | Hubrecht |

Injecteren:

DNA mix:

- 120 ng/μl marker (Rol-6)
- 25-30 ng/μl template DNA
- MQ

Kloneren:

- | | |
|-------------------------|-------|
| - Restrictie enzym SmaI | Omega |
| - Buffer J (10x) | Omega |
| - Restrictie enzym SphI | Omega |
| - Buffer K (10x) | Omega |
| - Ligatiebuffer (10x) | Omega |
| - Ligase | Omega |
| - MQ | |

EMS screen:

- | | |
|--|------------|
| - M9 | Hubrecht |
| - 2M NaOH | Hubrecht |
| - Ethyl methaansulfaat (EMS) | Invitrogen |
| - Nematode Growth Medium (NGM) platen met OP50 | Hubrecht |

3.2 Methode

Om te onderzoeken of één kopie van GFP voldoende is om expressie te geven was er gebruik gemaakt van verschillende methodes. De eerste methode, PCR, was bedoeld om de template te ontwerpen die nodig was voor het herstel na transposon excisie. Vervolgens werd deze template in de germline gebracht door middel van injecteren. [12]

3.2.1 PCR reacties [1][2]

Allereerst werden er drie producten gemaakt: de twee homologe onderdelen van het gen waar het transposon in zat, en het reporter gen GFP. Hiervoor zijn speciale primers ontworpen aan de hand van de volgende criteria:

- 1.) de primers moeten ongeveer 20 nt zijn
- 2.) er moet 50% aan GC inzitten

Per gen zijn er 8 primers ontworpen die de volgende producten vormen (Fig. 3.1.):

- 1.) Het eerste homologe fragment van het gen (primers 1 en 3 met behulp van wildtype genomisch DNA)
- 2.) Het tweede homologe fragment van het gen (primers 6 en 8 met behulp van wildtype genomisch DNA)
- 3.) Het reporter gen (primers 4 en 5 met behulp van plasmide DNA)

Primers 2 en 7 vormen de totale template aan de hand van een fusie PCR (zie 3.2.2)

De primers waren zodanig ontworpen dat het start codon ontbreekt en zonder integratie in het gen geen expressie van GFP mogelijk was.

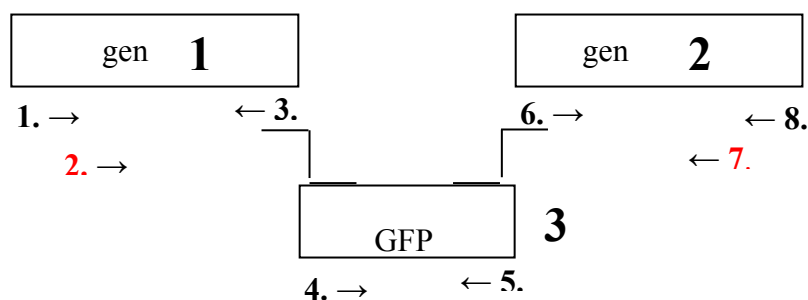


Fig. 3.1 Vorming van de drie aparte producten voor de template.

Standaard PCR

De eerste PCR reactie is uitgevoerd in 50 µl mix met: 5 µl TAQ buffer; 1,75 µl dNTP; 2 µl primer forward; 2 µl primer reversed; 0,75 µl Expand polymerase; 39,5 µl MQ; 1 µl DNA. Het programma hiervoor was 1:00 92°C, waarna 35 cycli van 20 sec 92°C, 40 sec X°C en XX min 72°C. De laatste stap was 3:00 bij 72°C.

X = annealing temperatuur. Deze hangt af van de T_m per primer. De temperatuur moet ongeveer 2°C onder de T_m zitten (zie bijlage 1).

XX = elongatie tijd. Deze hangt af van de grootte van het eindproduct, dit is 15-30 sec per kb (zie bijlage 1).

Niet alle producten werden goed gevormd, waarvoor er bij deze producten een mix gebruikt is met Phusion polymerase. Na de PCR reactie was 1 µl product op een 1% agarosegel gebracht met 9 µl loadingbuffer.

Fusie PCR

Voor de fusie PCR reactie is 0,5 µl DNA van elk product (zie boven) gebruikt met 50 µl Phusion mix (zie materiaal). Het PCR programma bestond uit 30 sec 98°C, waarna 35 cycli van 10 sec 98°C, 30 sec X°C en XX min 72°C. De laatste stap was 7:00 bij 72°C.

X = annealing temperatuur. Deze hangt af van de T_m per primer. De temperatuur moet ongeveer 2°C onder de T_m zitten. (Zie bijlage 1)

XX = elongatie tijd. Deze hangt af van de grootte van het eindproduct, dit is 15-30 sec per kb. (Zie bijlage 1)

Na de PCR reactie was 5 µl product met 10 µl loadingbuffer op een 1% agarosegel gebracht en bij 120V gerund.

Voor het injecteren werd het DNA gezuiverd met behulp van een DNA purification kit van GE healthcare.

3.2.2 Injecteren [8]

Ter voorbereiding werd er een dag van tevoren L4 wormen gepakt, zodat deze met het injecteren young adult waren.

Voor het injecteren werd er 15 µl mix gemaakt welke 25 – 30 ng/µl DNA en 120 ng/µl marker (Rol-6) bevat, aangevuld tot een eindvolume van 15 µl met M9. Hieruit werd 2 µl in de naald gebracht om in de wormen te injecteren. Voor het maken van de naald werd er gebruik gemaakt van een apparaat genaamd de Needle – Puller.

Voor de germline transformatie werd het DNA in het cytoplasma van de hermafrodiet gonaden geïnjecteerd. Hierbij werd de naald in een hoek van 45° in een van de gonaden gebracht. Vervolgens werd de DNA mix in het cytoplasma geïnjecteerd waardoor de gonade opzwelt. Hiermee kon gezien worden wanneer er genoeg mix in de gonade zat. Na de injectie werd de naald weer voorzichtig uit de worm gehaald en werd de worm op een nieuwe voedingsplaat gezet.

Door te kijken naar het Rol fenotype* in het F1 nageslacht kon worden bepaald of het DNA op de goede plek in de worm geïnjecteerd was.

** Rol-6 is één van de meest geschikte markers om getransformeerde dieren te identificeren. Rol-6 (su1006) is een gemuteerd collageen gen die de dieren die getransformeerd zijn doet rollen of in cirkels doet bewegen. Dit gemuteerde gen komt voor in een plasmide genaamd pRF4.*

*3.2.3 Maken van construct met *unc-22* G23 Cherry*

Voor het maken van het *unc-22* G23 Cherry construct, het tweede deel van mijn project, werd er gebruik gemaakt van een klonering.

Van tevoren was er door iemand anders op het lab een plasmide gemaakt met daarin het *unc-22* gen met daarachter de G23 stretch. Voor het maken van de Cherry is er een PCR uitgevoerd met een plasmide waar Cherry in zit. De PCR reactie is uitgevoerd in 25 µl mix met: 2,5 µl accutaq buffer; 1,25 µl dNTP; 0,5 µl DMSO; 1 µl primer forward; 1 µl primer reversed; 0,25 Accutaq polymerase; 18,5 µl MQ; 1 µl DNA. Het PCR programma bestond uit 30 sec 94°C, waarna 30 cycli van 10 sec 94°C, 20 sec 58°C en 1 min 64°C. De laatste stap was 10 min 4°C.

Vervolgens werd het PCR product op een 1% gel gezet en de Cherry band uitgesneden. Hieruit werd het DNA geïsoleerd d.m.v. een Gel Purification kit van GE healthcare.

Digestie

De vector en Cherry werden met twee verschillende restrictie-enzymen geknipt, Sma1 (CCC↓GGG) en Sph1 (GCATG↓C). De eerste digestie werd uitgevoerd in 10 µl mix met: 5 µg/µl DNA, 1 µl enzym (10U), 1 µl buffer (10x) en aangevuld tot 10 µl met MQ, en voor 3 uur bij 25°C geïncubeerd. Omdat de tweede digestie in een andere buffer moet worden opgelost is het DNA van de eerste digestie eerst opgezuiverd met een Purification kit van GE healthcare.

Voor de tweede digestie werden dezelfde hoeveelheden gebruikt als bij de eerste digestie, maar met het enzym Sph1 o/n bij 37°C.

Ligatie

Voor de ligatie werd de volgende formule gebruikt om de hoeveelheid vector en insert te berekenen: $(Ng \text{ vector} \times kb \text{ insert} / kb \text{ vector}) \times 1/3 = ng \text{ insert}$. De mix bestond verder uit: 1 µl ligase; 2 µl ligase buffer en aangevuld tot 20 µl met MQ.

Transformeren in chemisch competente cellen

Voor het transformeren van het construct werd 0,5 µl DNA bij 100 µl DH5α chemisch competente cellen gevoegd en voor 30 minuten op ijs geïncubeerd. Vervolgens werd er een heatshock gegeven van 2 minuten bij 42°C om het DNA in de cellen te krijgen. Om de getransformeerde cellen te laten herstellen werd 0,9 ml LB medium toegevoegd en voor 30 minuten bij 37°C geïncubeerd. Voor het vormen van kolonies werd vervolgens 300 µl cellen op een plaat met ampiciline uitgespateld en o/n opgegroeid bij 37°C.

De volgende dag kon het plasmide worden geïsoleerd aan de hand van een midiprep van Invitrogen (zie bijlage 2).

3.2.4 EMS

Voor mijn tweede project werd er een EMS screen uitgevoerd. Hierbij werden wT wormen behandeld met EMS waardoor mutaties ontstaan.

Voor de screen waren veel wormen nodig, dus werden meerdere platen in kweek gehouden. Wanneer de platen goed vol zaten werden de wormen met M9 van de plaat afgespoeld en in een 50 ml buis gepipetteerd.

Vervolgens werden deze afgedraaid en in 3 ml M9 gewassen. Hierbij werd 20 µl EMS gepipetteerd en voor 4 uur geïncubeerd.

De volgende stap was het bezinken van de wormen en het supernatant in 2M NaOH pipetteren om de EMS uit te schakelen. De pellet werd vervolgens op een 9 cm NGM plaat met OP50 gepipetteerd. Hier vanaf werden actief bewegende L4 wormen gepakt en 5 op een nieuwe plaat gezet.

Wanneer deze platen wormen bevatten met gemutageniseerde fenotypen kan de F2 L4 nageslacht gesingeld worden.

Lac-Z kleuring

Na het mutageniseren werd 20 µl wormen pellet gekleurd met een Lac-Z kleuring in een 96 well plaat. Voor de Lac-Z kleuring werd per well 200 µl mix gemaakt; 173,6 µl oplossing 1, 10 µl oplossing 2, 10 µl oplossing 3, 1,5 µl 10 mg/ml Kanamycine en 1,6 µl 5% X-gal (zie bijlage 2). De 96 wells plaat werd vervolgens afgedekt en o/n in het donker geïncubeerd bij kamertemperatuur.

4. Resultaten

In tabel 1 staat weergegeven welke genen zijn gebruikt voor het onderzoek naar de expressie van één kopie GFP. Van deze genen was alleen bekend dat ze geen letaliteit geven wanneer ze onderbroken worden. De plek in de worm waar ze tot expressie komen was, behalve van *unc-22*, onbekend.

Tabel 1.
Overzicht targetgenen

Stam	Target gen	Geïnjecteerd	F1 Rollers	F2 Rollers	GFP expressie
N2	C50H2.1	x	x	x	
	C31A11.	x	x	x	
NL4615	C33B4.3	x	x	x	x
NL4631	C14B9.8	x	x	x	x
Msh-2	<i>msh-2</i>	x	x		
XF63 (+N2)	<i>unc-22</i>	x	x	x	

Bijzonderheden	
<i>msh-2</i>	Injecteren in <i>msh-2</i> , later inkruizen met mut-7
<i>unc-22</i>	Injecteren in N2, later inkruizen met <i>unc-22</i>

Kolom 1 en 2 geven de stam en de bijbehorende genen weer. In de laatste vier kolommen staat aangegeven welke stammen geïnjecteerd waren, lijnen gaven en of ze GFP expressie vertoonden.

In figuur 4.1 staat het resultaat weergegeven van de PCR en fusie PCR voor het maken van het construct met het *unc-22* gen + GFP.

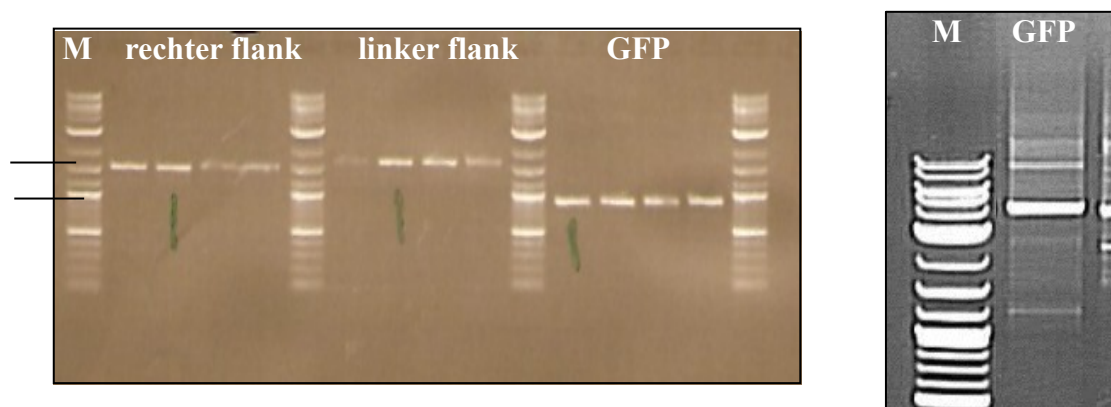


Fig. 4.1 *Maken van construct *unc-22* + GFP. A.) Resultaat van de drie aparte producten na PCR; rechter flank van *unc-22*, linker flank van *unc-22* en GFP. B.) Resultaat van de fusie PCR.*

Na het injecteren van de wormen met een van de constructen, werden deze opgekweekt tot ze F1 nageslacht gaven. De F1 wormen die het Rol-fenotype tot expressie brachten werden gesingeld op een nieuwe voedingsplaat en opgegroeid tot deze ook voldoende nageslacht had.

Vervolgens is er gekeken of het nageslacht ook weer rollers gaf. Wanneer dit het geval bleek te zijn konden we spreken van een transgene lijn waarbij de template extrachromosomaal is.

In deze transgene lijnen kon het DNA vervolgens gaan integreren in het genoom d.m.v. homologe recombinatie na transposon excisie [10].

Onder de fluorescentie microscoop werd elke week gekeken of de wormen GFP expressie gaven.

4.1 GFP expressie C33B4.3

Een transgene lijn met het C33B4.3 gen + GFP construct bevatte wormen die GFP expressie gaven in de pharynx (Fig. 4.2). Dit was in zowel wormen met het Rol-fenotype (zie 3.2.2) als wT wormen (Rol⁺/GFP⁺, Rol⁻/GFP⁺). Daarnaast waren er ook roller en wT wormen die geen GFP expressie gaven (Rol⁺/GFP⁻, Rol⁻/GFP⁻), maar dit was minder dan het aantal wormen met GFP. Dit zou kunnen betekenen dat één kopie GFP expressie geeft.

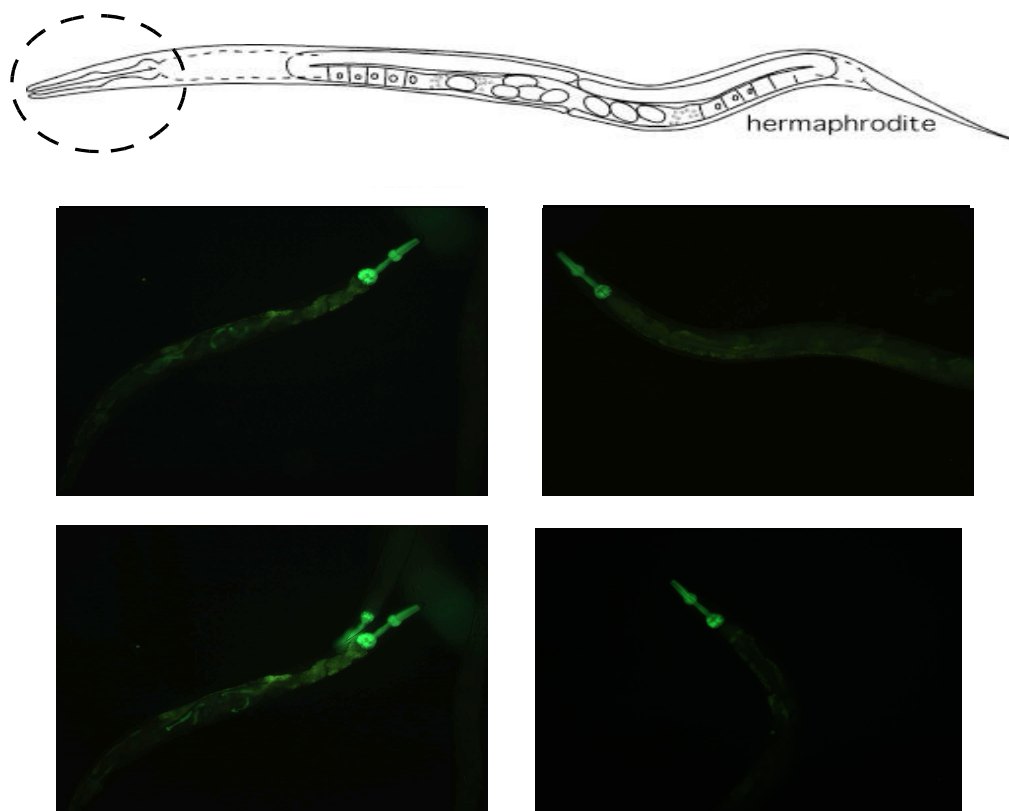


Fig 4.2 *C. elegans* met GFP expressie in de pharynx. (Boven) De stippellijn geeft de pharynx weer wat in de figuren (onder) groen opgelicht is.

De vraag die vervolgens gesteld kon worden was of het GFP gen op de juiste plek zat, namelijk in het C33B4.3 gen. Een andere mogelijkheid was dat het reporter gen op een andere plek in het genoom was geïntegreerd met een stabiele promotor die GFP tot expressie kon brengen.

Om te zien of GFP inderdaad ergens anders was geïntegreerd waren er 12 wT wormen met GFP expressie van de plaat gesingeld. Deze werden opgekweekt tot het F1 nageslacht had. Drie van de twaalf platen gaven geen

nageslacht. De andere negen platen gaven moeilijk en weinig nageslacht. Tevens lagen er onbevuchte oöcyten op deze platen. Hieruit kon de hypothese worden gesteld dat het GFP gen op een plek in het genoom was geïntegreerd dat zorgde voor een slechte groei of letaliteit in het nageslacht. Deze plek kon dan het C33B4.3 gen niet zijn omdat het geen belangrijke functie in de worm heeft en geen letaliteit hoort te geven.

Om dit te testen was er een PCR gedaan met:

- 1.) wT wormen met GFP expressie
- 2.) wT wormen zonder GFP expressie
- 3.) Rollers zonder GFP expressie
- 4.) Rollers met GFP expressie

Hiervoor zijn de primers 1 en 5 van het C33B4.3 gen gebruikt (Fig. 3.1). Primer 1 bind aan het C33B4.3 gen in het genoom, en primer 5 aan het reporter gen GFP. Wanneer GFP op deze plek in het genoom is geïntegreerd zou er na PCR een product moeten ontstaan.

Het resultaat liet bij de wormen $\text{Rol}^-/\text{GFP}^+$, $\text{Rol}^+/\text{GFP}^-$ en $\text{Rol}^+/\text{GFP}^+$ een product zien (Fig. 4.3). Bij de $\text{Rol}^+/\text{GFP}^-$ verwacht je dat er geen product ontstaat na deze PCR. Een reden waarom er toch een product is ontstaan, kan zijn dat primer 1 niet specifiek genoeg is waardoor er ook een product ontstaat als de template in de cel zit maar niet is geïntegreerd in het genoom of elders (Fig. 3.1). Daarnaast zijn er controles meegenomen waar het gen met transposon niet in zit (N2) en de stam met het gen waarin niet is geïnjecteerd en dus het construct niet bevat (C33B4.3). Van beide controles wordt geen product verwacht.

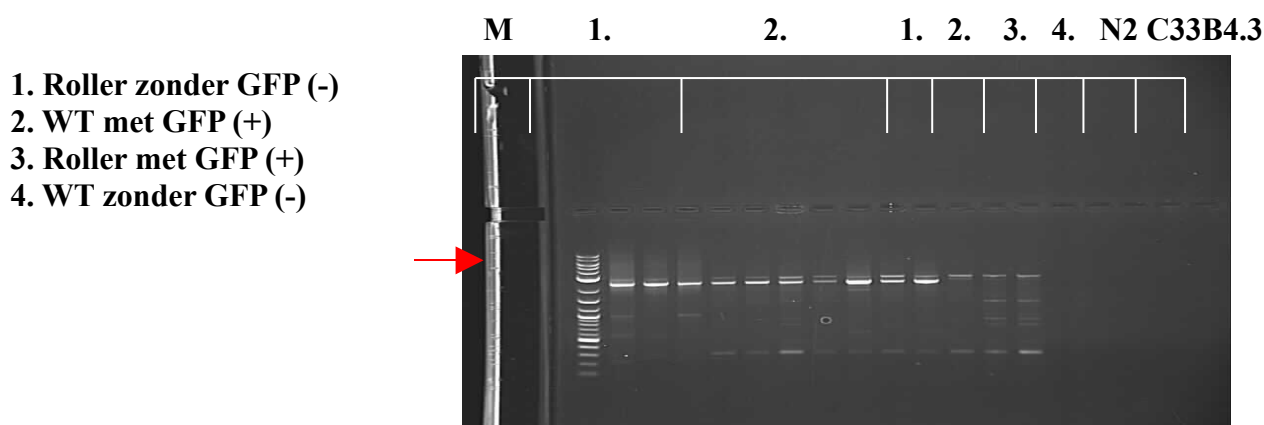


Fig 4.3 Resultaat PCR1 met primers 1 x 5 GFP. Alle wormen met en zonder GFP geven een product weer, behalve de controles. Dit geeft aan dat de template in de worm zit, maar niet of deze op de goede plek zit.

Als tweede test was er m.b.v. PCR gekeken of de Tc1 transposon nog in dit gen aanwezig was (Fig. 4.4). Hiervoor zijn primers gebruikt die specifiek binden aan het transposon in dit gen. Wanneer er een product ontstaat, zou de Tc1 er nog in moeten zitten. Het resultaat gaf bij alle wormen met GFP expressie een product, wat betekent dat het transposon er nog in zat, en GFP dus niet in het C33B4.3 gen was geïntegreerd.

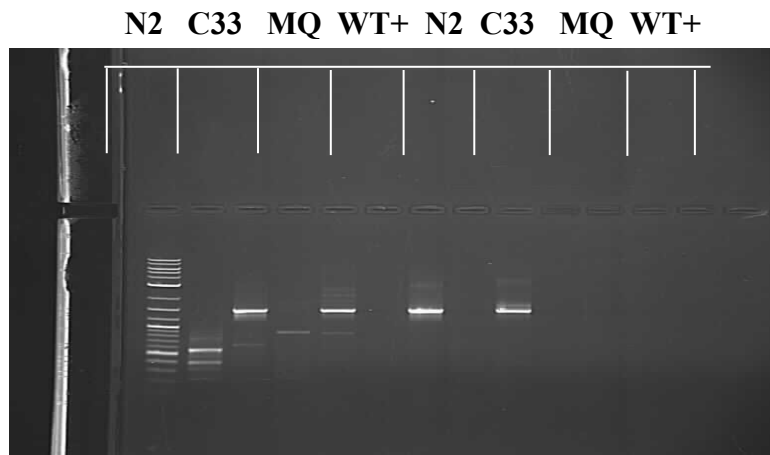


Fig 4.4 Resultaat PCR 2 op *Tc1* insertie. Als controle zijn N2 en niet-geïnjecteerde C33B4.3 wormen meegenomen. N2 bevat dit gen met daarin de transposon niet, wat geen product geeft. C33B4.3 bevat wel dit transposon en geeft tevens een product. De wT GFP wormen geven ook een product weer, wat betekend dat de *Tc1* er nog inzit.

Door te mappen kan de plaats van integratie van GFP worden achterhaald, maar er is voor gekozen om dit niet te doen.

4.2 GFP expressie C14B9.8

Een transgene lijn met het C14B9.8 construct met GFP gaf (net als C33B4.3) expressie in de pharynx. In tegenstelling tot het C33B4.3 gen, gaven alle roller wormen GFP expressie. Tevens viel het op dat sommige Rol⁻/GFP⁺ wormen Rol⁻/GFP⁻ wormen als nageslacht gaven. Alleen het roller nageslacht gaf GFP expressie.

Van de 12 gesingelde Rol⁻/GFP⁺ wormen, met Rol⁻/GFP⁻ wormen en Rol⁺/GFP⁺ als controle, werd er gekeken naar de plaats van integratie door:

- PCR 1 (met primers 1 en 5 GFP)
- PCR 2 (*Tc1* insertie)

De resultaten gaven hetzelfde weer als bij het C33B4.3 gen. Bij PCR 1 met primers 1 en 5 gaven alle Rol⁻/GFP⁺ een product, en de Rol⁻/GFP⁻ geen (Fig. 4.5). Maar de Rol⁺/GFP⁺ wormen gaven geen product. Hieruit kon niet geconcludeerd worden of GFP in het C14B9.8 gen zat.

Als extra test werd er gekeken naar de aanwezigheid van het transposon in dit gen. Dit resultaat liet zien dat het transposon nog in alle wormen met GFP expressie in het C14B9.8 gen zat (Fig. 4.5). Een van de wormen met GFP expressie gaf een lager product, net als de wormen zonder GFP expressie. Dit kan komen door PCR jumping. Tijdens DNA amplificatie kan het polymerase enzym stoppen door template fragmentatie of door schade. De gedeeltelijke sequentie kan vervolgens annealen aan een ander template fragment in de volgende cyclus. Dit kan zorgen voor verkeerde fragmenten die zo klein zijn dat de specificiteit verloren gaat. Hierdoor

kunnen resultaten verkeerd geïnterpreteerd worden.

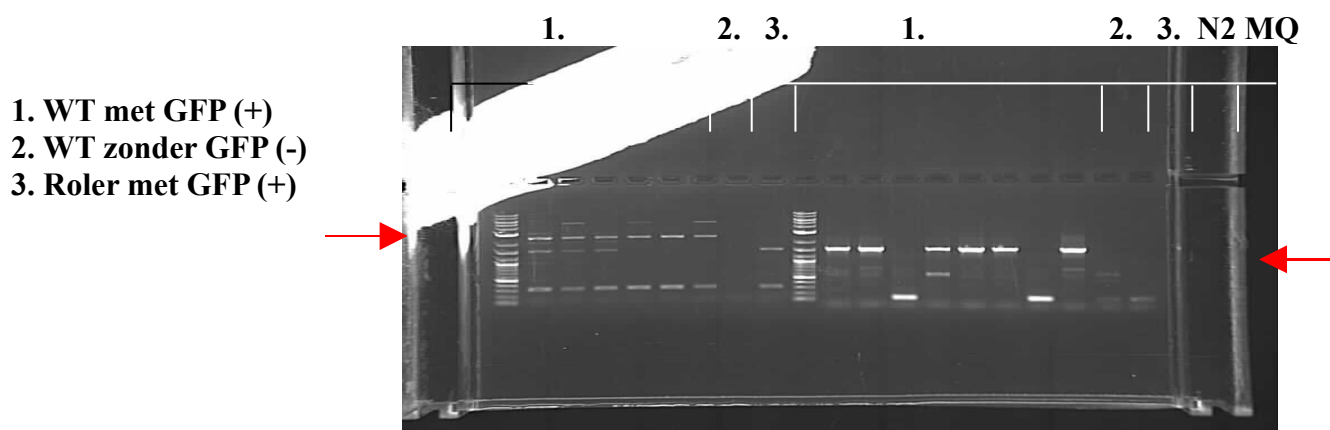


Fig. 4.5 Resultaat PCR1 (1 x 5) en PCR2 (Tc1 insertie). Bij alle wT wormen met GFP expressie is een product te zien bij PCR1 behalve bij de roller worm. De negatieve controle geeft geen product.. PCR2 geeft bij alle wormen een product wat erop wijst dat de Tc1 nog in dit gen zit.

De overige genen gaven wel transgene lijnen. Hierbij zijn veel wormen opgegroeid en was gekeken naar GFP expressie, maar er was geen expressie gevonden. Omdat er een protocol is verschenen (Erik Jorgensen, persoonlijk gesproken) die een soortgelijk onderzoek beschrijft, maar op een andere manier word uitgevoerd, is het onderzoek met deze lijnen stop gezet.

4.3 EMS Screen

Als tweede project was er een EMS screen uitgevoerd. De wormen die gebruikt zijn voor deze screen bevatten een reporter die specifiek is voor single-strand annealing (SSA). Deze reporter bevat een deel van het Lac-Z gen, een sequentie met daarin een knipsite I-SceI (die normaal gesproken niet in de worm voorkomt), en het hele Lac-Z gen (Fig. 4.6). Door de tussen liggende sequentie zit Lac-Z uit frame en zal deze niet tot expressie komen.

Naast deze reporter hebben de wormen ook een transgen met het I-SceI enzym die na stimulatie door heatshock in de reporter zal knippen en zo een breuk induceert. Wanneer er herstel optreed d.m.v. SSA zal het Lac-Z in frame komen te liggen en tot expressie komen.

Wanneer wormen met EMS zijn behandeld zullen er in meerdere genen mutaties optreden. Wanneer er een mutatie is opgetreden in een gen die betrokken is bij SSA zal de SSA minder goed verlopen. Hierdoor kunnen wormen een hoger of minder hoge blauw kleuring geven dan de wT wormen.

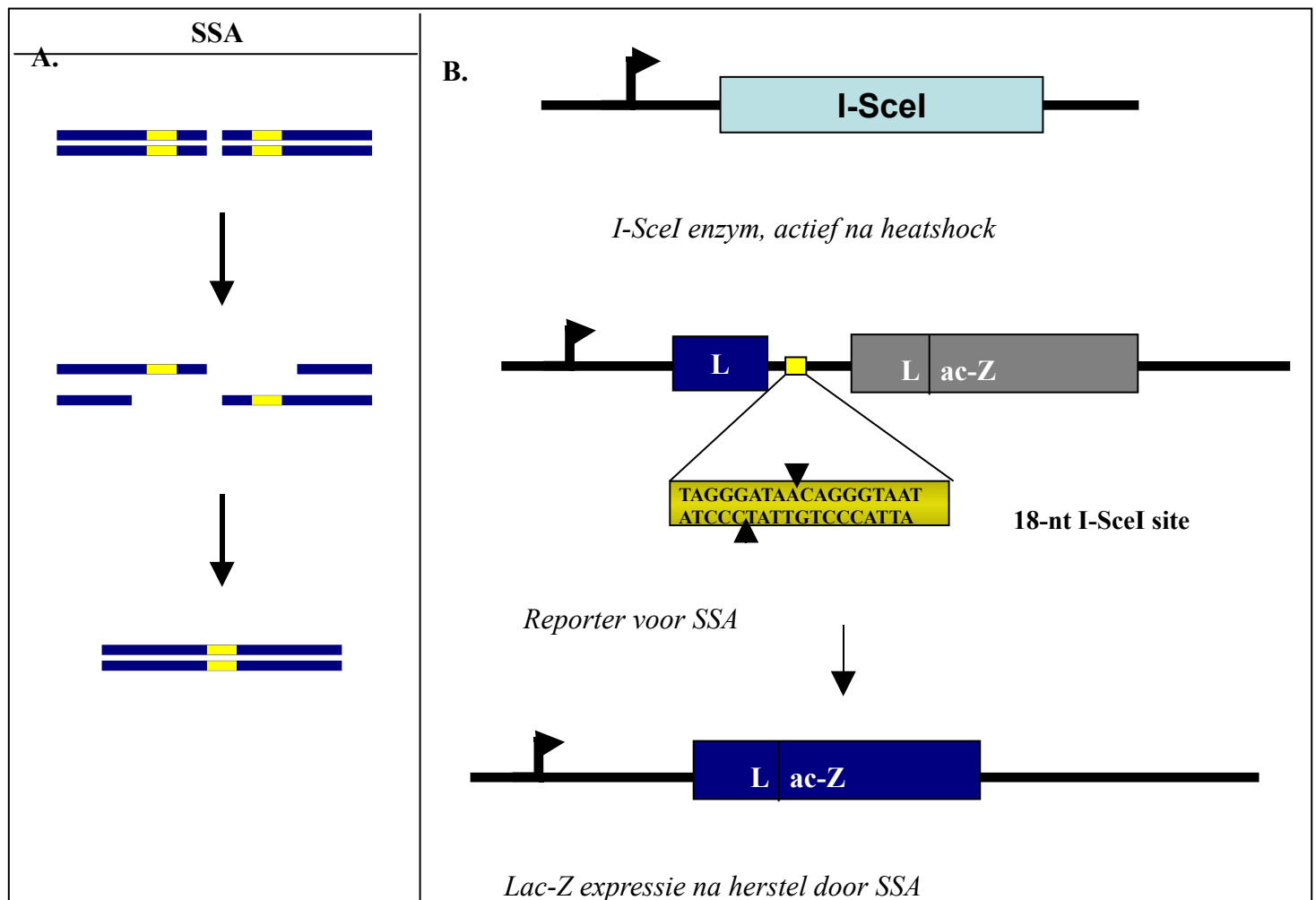
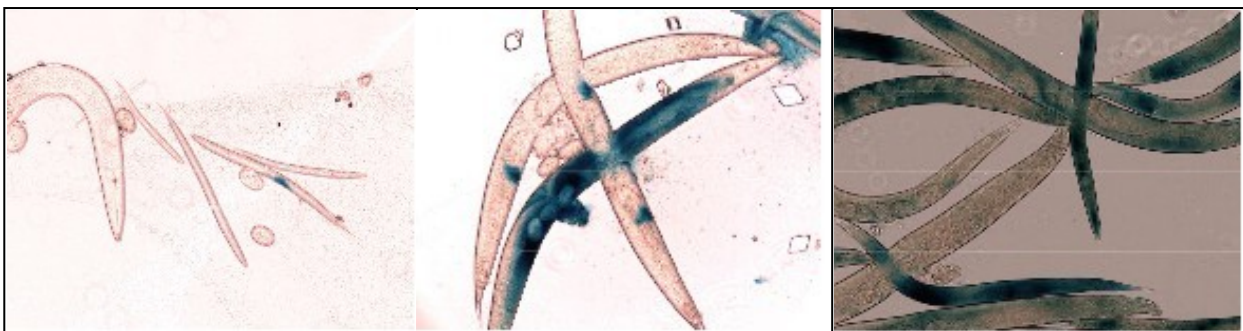


Fig. 4.6 SSA reporter. In figuur A zijn de geel gemarkeerde gedeeltes homoloog. Wanneer er na een dubbelstrengs breuk herstel optreedt door SSA vind er resectie van de enkelstrengs uiteinden plaats en zullen de geel gemarkeerde gedeeltes door homologie aan elkaar kunnen hechten. B.) Wanneer het *I-SceI* enzym tot expressie wordt gebracht door heatshock zal er een breuk ontstaan in de reporter in de *I-SceI* site. Na herstel door SSA zullen de homologe delen (*L*) aan elkaar hechten en komt *Lac-Z* tot expressie.

Na het mutageniseren van de wormen met EMS zijn er meerdere wormen uit het L4 stadium gesingeld. Het nageslacht zal vervolgens mutaties met zich meedragen. Door deze wormen te kleuren met een *Lac-Z* kleuring zullen er verschillende patronen blauwkleuring ontstaan. Door controles mee te nemen die een hoger (*brc-1*) en lager (*xpf-1*) aantal blauwkleuring geeft dan de wT wormen, kunnen deze patronen van elkaar worden onderscheiden. De controle genen spelen beide een rol in de SSA pathway.



xpf-1 (lager)

wT

brc-1 (hoger)

Omdat er bij deze screen gebruik werd gemaakt van meerdere wormen, moest ervoor gezorgd worden dat alle platen met de gemutageniseerde wormen hetzelfde werden behandeld. Hierbij moest vooral gelet worden op het steriel werken, en dat het aantal wormen die gekleurd werden per plaat hetzelfde was. Na meerdere keren de EMS te hebben uitgevoerd was het niet gelukt om de optimale condities te krijgen. Hierdoor kon niet duidelijk gezien worden of een plaat met wormen meer blauwkleuring gaf dan de ander. Vervolgens was er geprobeerd om de juiste condities te krijgen zonder behandeling met EMS, maar ook dit lijkt lastig te zijn.

Conclusie en Discussie

De fusie PCR werkt en lijkt een goede manier om een construct te maken.

C33B4.3 met GFP expressie

Een stam, geïnjecteerd met het C33B4.3 + GFP construct, gaf GFP expressie in de pharynx. Dit kon betekenen dat één kopie GFP in het genoom was geïntegreerd en zichtbaar tot expressie kan komen. Om zeker te weten dat GFP ook op de juiste locus zat, zijn verschillende onderzoeken uitgevoerd.

- 1.) De resultaten van het onderzoek met de primers 1 en 5 geven aan dat de template erin zit, maar het is niet zeker of deze ook op de juiste plaats geïntegreerd is. Bij een worm zonder GFP verwacht je dat er geen product ontstaat na de PCR en bij een worm met GFP wel wanneer deze op de juiste plek zit. Nu gaven de resultaten soms een product weer bij wormen zonder GFP. Een reden hiervoor kan zijn is dat primer 1 niet specifiek genoeg is, waardoor er ook een product ontstaat als de template in de cel zit maar niet is geïntegreerd in het genoom.
- 2.) De resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van het Tc1 transposon geven aan dat het transposon nog in het C33B4.3 gen zit, in zowel de wormen met als de wormen zonder GFP expressie.

Uit deze onderzoeken kan geconcludeerd worden dat GFP niet in het C33B4.3 gen zit. Tevens is het aantal kopieën in de wormen met GFP expressie onbekend. Eventueel kan nog verder onderzoek gedaan worden om te kijken op welke plek GFP wel is geïntegreerd. Dit kan gedaan worden door te mappen, maar is in dit stadium nog niet wenselijk.

C14B9.8 met GFP expressie

Vervolgens werd hetzelfde GFP expressie patroon gevonden in een stam die geïnjecteerd was met het construct met het C14B9.8 gen + GFP. De bovenstaande testen gaven hetzelfde resultaat als bij de wormen met het C33B4.3 + GFP construct. Ook bij dit gen lijkt GFP op een andere plek in het genoom te zijn geïntegreerd.

Ondanks dat beide genen afkomstig zijn van een andere stam kan GFP in beide gevallen op dezelfde plek zijn geïntegreerd in het genoom. Namelijk op een wT plek die zeer gevoelig is voor integratie van sequenties. De GFP expressie in de pharynx zou dan een achtergrond kleuring kunnen zijn.

De overige transgene lijnen gaven geen GFP expressie. Een reden hiervoor kon zijn dat de promotor van deze genen niet sterk genoeg zijn om één kopie GFP zichtbaar tot expressie te laten komen. Een andere reden was dat het transposon er nog niet is uitgesprongen of dat de breuk op een andere manier is hersteld dan vanaf de extrachromosomale array.

Naar aanleiding van een protocol (Erik Jorgensen, persoonlijk gesproken) waarin een soortgelijk onderzoek beschreven stond, maar op een andere manier uitgevoerd, was mijn onderzoek verder stop gezet. Aan de hand van dit protocol zal in de nabije toekomst verder onderzoek gedaan worden naar het induceren van één kopie GFP of Cherry onder een endogene promotor.

Bronnenlijst:

1. Hidekazu Kuwayama et al., *PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors*, Nucleic Acids Research **2**, vol. 30 (2002)
2. Peter L. Barrett, John T. Fleming, Verena Göbel, *Targeted gene alteration in Caenorhabditis elegans by gene conversion*, Nature Genetics **11**, vol. 36 (2004)
3. Valérie Robert, Jean-Louis Bessereau, *Targeted engineering of the Caenorhabditis elegans genome following Mos1-triggered chromosomal breaks*, The EMBO Journal **26**, 170-183 (2007)
4. Sylvia E.J. Fischer, Erno Wienholds, Ronald H.A. Plasterk, *Continuous Exchange of sequence information between dispersed Tc1 transposons in the Caenorhabditis elegans genome*, Genetics **164**, 127-134 (2003)
5. Joris Pothof et al., *Identification of genes that protect the C. elegans genome against mutations by genome-wide RNAi*, Genes & Development **17**, 443-448 (2003)
6. Marcel Tijsterman, Joris Pothof, Ronald H.A. Plasterk, *Frequent germline mutations and somatic repeat instability in DNA mismatch-repair-deficient Caenorhabditis elegans*, Genetics **161**, 651-660 (2002)
7. Bessereau, J.L., *Transposons in C. elegans*, Wormbook (2006)
8. *C. elegans a practical approach*, I.A. Hope, (1999)
9. Chun J. Tsai, David G. Mets, Michael R. Albrecht, Paola Nix, Annette Chan, and Barbara J. Meyer, *Meiotic crossover number and distribution are regulated by a dosage compensation protein that resembles a condensin subunit*, Genes & Development **22**, 194-211 (2008)
10. Vida Praitis, Elizabeth Casey, David Collar, Judith Austin, *Creation of Low-Copy Integrated Transgenic Lines in Caenorhabditis elegans*, Genetics **157** (3), 1217-26 (2001)
11. Robert K. Herman, *Introduction to sex determination*, Wormbook (2006)
12. Colin T. Dolphin, Ian A. Hope, *Caenorhabditis elegans reporter fusion genes generated by seamless modification of large genomic DNA clones*, Nucleic Acids Research **34** (9), 72 (2006)
13. Ali Z. Al-Minawi, Nasrollah Saleh-Gohari, Thomas Helleday, *The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells*, nucleic acids research **36**, 1-9 (2008)
14. D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer, J.R. Priess, *Introduction to C. elegans*, C. elegans II, (1997)
15. E. Jane Albert Hubbard, David Greenstein, *Introduction to the germline*, Wormbook (2005)

Bijlage 1: Constructen

1. PCR construct

Tabel 2.

Overzicht primers met Tm

Primers	Tm (Celsius)	Primers	Tm (Celsius)
Msh-2		C33B4.3	
1	68	1	60
2	62	2	64
7	60	7	60
8	60	8	62
<i>GFP</i>		<i>GFP</i>	
3	60	3	59
4	60	4	66
5	54	5	52
6	59	6	62
Unc-22		C50H2.1	
1	60	1	62
2	66	2	56
7	62	7	60
8	58	8	56
<i>GFP</i>		<i>GFP</i>	
3	59	3	60
4	56	4	51
5	66	5	52
6	61	6	62
C31A11.7		C14B9.8	
1	70	1	58
2	66	2	58
7	68	7	60
8	62	8	60
<i>GFP</i>		<i>GFP</i>	
3	58	3	62
4	70	4	70
5	48	5	56
6	63	6	63

Voor het maken van de drie aparte producten was er gebruik gemaakt van een PCR met Expand Taq polymerase. Het programma bestond uit 1:00 bij 92°C en vervolgens 35 cycli van 0:20 92°C, 0:40 58°C, 1:00

72°C en de laatste stap was 3:00 bij 72°C. Het resultaat van deze PCR was niet voor elk product optimaal. Vervolgens was er gekozen voor meerdere PCR programma's met verschillende annealing temperaturen (tabel 3.). Tevens was er gebruik gemaakt van Phusion taq polymerase wat een beter resultaat gaf.

Tabel 3.
Overzicht PCR programma's

50°C / 1:00	Programma 1.
GFP (4 x 5) Msh-2	98°C 0:30
GFP (4 x 5) Unc-22	98°C 0:10
GFP (1 x 3) C31A11.7	50°C 0:30
GFP (4 x 5) C50H2.1	72°C 1:00
	72°C 7:00

55°C / 2:00	Programma 2.
GFP (6 x 8) C50H2.1	98°C 0:30
	98°C 0:10
	55°C 0:30
	72°C 2:00
	72°C 7:00

55°C / 1:00	Programma 3.
GFP (4 x 5) C14B9.8	98°C 0:30
Fusie GFP (2 x 7) C50H2.1	98°C 0:10
Fusie GFP (2 x 7) C14B9.8	55°C 0:30
	72°C 1:00
	72°C 7:00

58°C / 2:00	Programma 4.
GFP (1 x 3) C50H2.1	98°C 0:30
GFP (1 x 3) C14B9.8	98°C 0:10
GFP (6 x 8) C14B9.8	58°C 0:30
Fusie GFP (2 x 7) Msh-2	72°C 2:00
Fusie GFP (2 x 7) C33B4.3	72°C 7:00

60°C / 1:00	Programma 5.
GFP (1 x 3) Msh-2	98°C 0:30
	98°C 0:10
	60°C 0:30
	72°C 1:00
	72°C 7:00

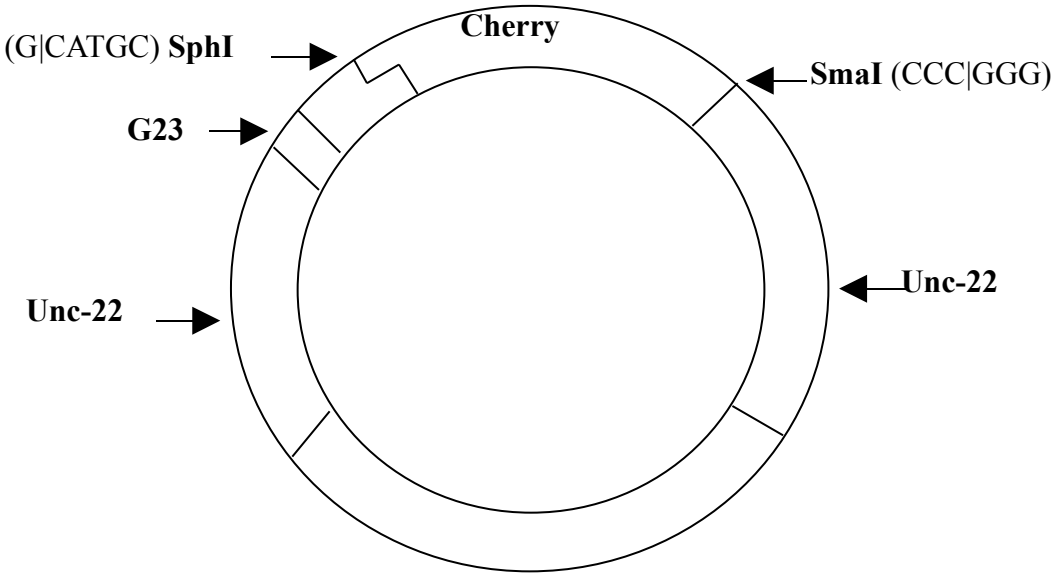
64°C / 1:00	Programma 5.
Fusie GFP (2 x 7) Unc-22	98°C 0:30

Fusie GFP (2 x 7) C31A11.7	98°C 0:10
	64°C 0:30
	72°C 1:00
	72°C 7:00

2. Primers klonering *unc-22* G23 Cherry

Start: ccctta **cccggg** gaattc GCGGTGAGCAAGGGCGAGG

Stop: ccctta **gcatgc** ttgacgtc CTTGTACAGCTCGTCCATGCC



Bijlage 2: protocollen

1. Midiprep

1. Voor multi-copy plasmiden, gebruik 15-25 ml van een overnacht LB cultuur per sample in een 50 ml buis. Voor laag kopie aantal plasmiden gebruik 25-100 ml van een overnachtede LB cultuur per sample in een 50 ml buis.
2. Precipiteer de cellen door de cultuur te centrifugeren bij 4000x g voor 10 minuten. Verwijder al het medium.
3. Voeg 4 ml Resuspensie Buffer (R3) met RNase A aan de cel pellet en resuspendeer de cellen tot het homogeen is. Breng de cel suspensie over in een 15 ml centrifuge buis.
4. Voeg 4 ml Lysis Buffer toe (L7). Mix voorzichtig door de buis 5 maal te draaien. NIET VORTEXEN. Incubeer 5 minuten bij kamertemperatuur.
5. Voeg 4 ml Precipitatie buffer (N3) toe en mix meteen door de buis te draaien tot de mix homogeen is. Niet vortexen!
6. Centrifugeer de mix bij 12.000 x g voor 10 minuten bij kamer temperatuur
note: als de pellet niet aan de bodem van de buis blijft plakken incubeer de buis dan bij kamertemperatuur voor 5 minuten om het lysaat de de pellet van elkaar te scheiden. Pipetteer het lysaat in een andere buis en centrifugeer 15000 x g bij kamer temperatuur voor 5 minuten om overgebleven cellulaire rommel te verwijderen.
7. Pipetteer het supernatant op een equilibratie kolom. Laat de oplossing door de kolom lopen.
8. Was de kolom 2x met 10 ml wasbuffer (W8). Laat de oplossing bij elke wasstap doorstromen
9. Plaats de steriele 15 ml buis onder de kolom
10. Voeg 5 ml Elutiebuffer (E4) toe aan de kolom om het DNA op te lossen. Laat de oplossing doorstromen door de kolom. De buis bevat nu purified DNA. Verwijder de kolom.
11. Voeg 3,5 ml isopropanol toe aan de oplossing. Goed mixen.
12. Centrifugeer de buis bij 15000 x g voor 30 minuten bij 4 graden. Verwijder voorzichtig het supernatant.

13. resuspendeer de pellet in 3 ml 70% ethanol.

14. Centrifugeer de buis bij 15000 x g voor 5 minuten bij 4 graden. Verwijder voorzichtig het supernatant.

15. Laat de pellet drogen aan de lucht voor 10 minuten.

16. Resuspendeer de DNA pellet in 200 µl TE buffer. Bewaar bij -20 graden. Om herhaaldelijk invriezen te voorkomen bewaar het DNA bij 4 graden voor direct gebruik.

2. PCR

	Invitrogen	Expand	Phusion
	<i>1x</i>	<i>1x</i>	<i>1x</i>
<i>MQ</i>	39,6	39,5	34,5
<i>Taqbuffer</i>	5	5	10
<i>dNTP's</i>	1	1,75	1
<i>Primer 1</i>	2	2	2
<i>Primer 2</i>	2	2	2
<i>Taq polymerase</i>	0,4	0,75	0,5
<i>Totaal volume:</i>	50	50	50
35 cycli	PCR programma	PCR programma	PCR programma
	92°C 1:00	92°C 1:00	98°C 0:30
	92°C 0:20	92°C 0:20	98°C 0:10
	x°C 0:40	x°C 0:40	x°C 0:30
	72°C xx	72°C xx	72°C xx
	72°C 3:00	72°C 3:00	72°C 7:00

X = annealing temp (meestal 58), xx= seconds of elongation (1:00)

3. Injecteren

mix:

25-30 ng/ µl DNA

120 ng/ µl marker (prf4)

H₂O

Totaal volume = 15 µl

Gen	GFP	Cherry
C33B4.3	133 ng/ ul	77 ng/ ul
C14B9.8	54,5 ng/ ul	42,8 ng/ ul
C31A11.7	49,2 ng/ ul	40,4 ng/ ul
Unc-22	40,7 ng/ ul	42 ng/ ul
C50H2.1	43 ng/ ul	34,8 ng/ ul
Msh-2	20 ng/ ul	34,7 ng/ ul

Tabel 1. Concentratie na DNA purification in ng/ ul.

4. Oplossingen lac-Z kleuring

Oplossing 1:

- 100 ml dH₂O
- 66,5 ml 0,5 M Na₂HPO₄
- 6,6 ml 1M NaH₂PO₄
- 400 µl 0,1 M MgCl₂
- 800 µl 10% SDS

Oplossing 2:

- 10 ml 100 mM Ferricyanide

Oplossing 3:

- 10 ml 100 mM Ferrocyanide

Oplossing 4:

- 5% X-Gal

Oplossing 5:

- 10 mg/ml Kanamycine