

3 Methoden

3.1 cDNA-Synthese

3.1.1 Isolierung von RNA

In wenig PBS resuspendierte TÜ165-Zellen (10^6 - 10^7) wurden mit fünffachem Volumen GT-Puffer vermischt und durch eine Kanüle geschert. Das Homogenat wurde in einem SW40-Zentrifugenröhrchen auf einen Caesiumchloridgradienten geschichtet, der 2,5 ml 5,7 M CsCl, 1,5 ml 40% CsCl, 1,5 ml 30% CsCl und 1,5 ml 20 % CsCl enthielt. Zentrifugiert wurde 18 h bei 35000 U/min (Ultrazentrifuge, Beckman) und 15°C. Nach der Zentrifugation wurden die obere Phase des Gradienten und die darunterliegende viskose DNA verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl H₂O gelöst. Die RNA wurde durch Extraktion mit Phenol/Chloroform aufgereinigt und anschließend mit Ethanol präzipitiert (siehe 3.2). Die RNA wurde als Ethanolpräzipitat bei -80°C aufbewahrt.

GT-Puffer	Guanidiniumisothiocyanat	4 M
	Na-Citrat	0,025 M
	Na-Laurylsarcosin	0,5%
	β-Mercaptoethanol	0,1 M
	pH 7,0 wurde mit NaOH eingestellt.	

β-Mercaptoethanol wurde direkt vor der Verwendung dazugegeben.

3.1.2 Erststrangsynthese mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Übersetzung der mRNA in komplementäre cDNA wurden spezifische Primer verwendet. Der Primer für die schwere Kette (C_μ) kodiert für eine Ig-spezifische Sequenz im 5'-Bereich der konstanten Region, der Primer für die leichte Kette (C_κ) stammt aus dem 5'-Bereich der CH₁-Domäne.

8 µl RNA-Suspension wurden 15 min bei 12000 g abzentrifugiert, mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 5 µl H₂O aufgenommen. Die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. 1 µl RNA-Lösung, 1 µl H₂O und 1 µl C_μ- oder C_κ-Primer (15 µM) wurden in einem 500-µl-Röhrchen zusammenpipettiert und mit etwa 50 µl Mineralöl beschichtet. Nach kurzer Zentrifugation (30 s bei 15000 g) wurde die Mischung zuerst 5 min bei 65°C inkubiert und dann langsam (etwa 20 min) auf 42°C abgekühlt. Nach Zugabe von 17 µl der Lösung 1 und kurzem Zentrifugieren wurde der Ansatz weitere 30 min bei 42°C inkubiert, danach auf 95°C für 5 min erhitzt und auf Eis gestellt.

Lösung 1 (17 µl)	25 mM MgCl ₂	4 µl
	10xPCR-Puffer 1	2 µl
	dNTP (10 mM jeweils)	2 µl
	RNase-Inhibitor	1 µl
	Reverse Transkriptase	1 µl (200 Einheiten)
	H ₂ O	10 µl

10xPCR-Puffer 1	Tris-HCl (pH 8,3)	0,5 M
	KCl	0,75 M
	DTT	0,1 M

3.1.3 *in-vitro*-Vervielfältigung von DNA durch PCR

Die PCR wird verwendet, um einen DNA-Abschnitt *in vitro* zu amplifizieren, der zwischen zwei Regionen bekannter Sequenz liegt.

Nach der Synthese des ersten Stranges der cDNA wurden zum Ansatz 80 µl Lösung 2, jeweils 1 µl von 15 µM *forward*- und *backward*-Primer gegeben. Die Probe wurde gut vermischt, kurz abzentrifugiert und 5 min bei 94°C denaturiert. Ein Zyklus für eine Standard-PCR wurde wie folgt durchgeführt:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1. Denaturierung der DNA | 1 min bei 94°C |
| 2. Annealing der Primer an die ssDNA | 1 min bei der Primer-spezifischen Temperatur |
| 3. Zweitstrangsynthese | 30 s bei 72°C |

Dieser Zyklus wurde mindestens dreißigmal wiederholt. Am Ende wurde die Probe 10 min bei 72°C inkubiert. Danach wurde das PCR-Produkt auf einem Agarosegel getrennt.

Lösung 2 (80 µl)	25 mM MgCl ₂	5 µl
	10xPCR-Puffer 2	10 µl
	50 % Glyzerin	20 µl
	Formamid	3 µl
	Taq-Polymerase	2 µl (10 Einheiten)
	H ₂ O	40 µl
10xPCR-Puffer 2	Tris-HCl (pH 8,3)	100 mM
	KCl	500 mM

3.2 Reinigung von DNA

3.2.1 Ethanolpräzipitation von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol vermischt und 20 min bei -80°C oder 1 h bei -20°C aufbewahrt. Die so gefällte DNA wurde 15 min bei 15000 g pelletiert, mit 700 µl 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen läßt sich spektrophotometrisch bestimmen. Nukleinsäuren absorbieren Licht im ultravioletten Bereich. Mit der bei 260 nm gemessenen optischen Dichte kann die Konzentration wie folgt berechnet werden: OD = 1 mit 1 cm Schichtdicke entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml einsträngiger DNA oder mRNA. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm charakterisiert die Verunreinigung der Nukleinsäurelösung durch Proteine. Reine DNA-Lösungen weisen dabei einen Wert von 1,8 und reine RNA-Lösungen von 2,0 auf. Verunreinigungen führen zu einer Verkleinerung dieses Wertes.

3.2.3 Präparation von DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)

4 ml Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C mit 260 U/min (CH-4103, Infors AG) geschüttelt. 1,5 ml Bakterienkultur wurden 5 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert und in 100 µl kalten Suspensionspuffer durch Schütteln (Vortex) resuspendiert. Dann wurden 200 µl Lysispuffer hinzugegeben und vorsichtig gemischt, so daß die Bakterien lysierten. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurden 150 µl Kaliumacetat-Puffer dazugegeben, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert, wobei Proteine, Lipide und chromosomale DNA ausfallen. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 15000 g und 4°C wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand mit Ethanol gefällt, durch Zentrifugation (10 min bei 15000 g und 4°C) sedimentiert, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 20-30 µl H₂O oder TE-Puffer aufgenommen. Dann wurde 1 µl RNase-A-Lösung (1 mg/ml) dazugegeben. Bei normaler Ausbeute reicht 1/10 der aufgereinigten DNA für einen Restriktionsverdau.

Suspensionspuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
	Glucose	50 mM
	EDTA	10 mM
Lysispuffer	NaOH	0,2 M
	SDS	1 %
Kaliumacetat-Puffer	Kaliumacetat (pH 4,8)	3 M

3.2.4 Präparation von DNA im mittleren Maßstab (Midipräparation)

Die Isolierung der Plasmid-DNA wird mittels eines Reagenziensatzes (Jetstar, Genomed) durchgeführt. Die Bakterien aus 25 ml Übernachtskultur wurden 10 min bei 5000 g und 4°C pelletiert und der Überstand wurde sorgfältig entfernt. Das Pellet wurde in 4 ml Lösung 1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase) resuspendiert. Nach der Zugabe von 4 ml Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1,0 % SDS) wurde das Röhrchen fünfmal vorsichtig geschwenkt und 5 min bei RT inkubiert. 4 ml Lösung 3 (3,2 M Kaliumacetat pH 5,5) wurden dazugegeben, vorsichtig vermischt und alles wurde 20 min bei 15000 g (20°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit der Lösung 4 (600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, 0,15 % Triton X-100, pH 5,0) gewaschene Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 20 ml Lösung 5 (800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,0) gewaschen und die DNA wurde mit 5 ml Lösung 6 (1,25 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, PH 5,0) eluiert. Die Plasmid DNA wurde durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol bei RT präzipitiert, 30 min bei 15000 g (20°C) pelletiert, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 50 µl H₂O oder TE-Puffer gelöst. Bei normaler Ausbeute gewinnt man 45-100 µg DNA.

3.3 *in-vitro*-Rekombination von DNA

3.3.1 Restriktionsverdau

Zu der in ddH₂O aufgenommenen DNA wurden das jeweilige Restriktionsenzym und der vom Hersteller empfohlene Puffer gegeben. Der Verdauansatz wurde eine bis zwei Stunden bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

3.3.2 Gelelektion von DNA-Fragmenten definierter Größe mit Hilfe von DEAE-Zellulose (Modifiziert nach Sambrook *et al.* (1989))

Die Membran (NA45, Schleicher&Schuell) wurde zurechtgeschnitten, 10 min in 10 mM EDTA und 5 min in 0,5 M NaOH gewaschen und danach mehrmals mit Wasser gespült. DEAE-Zellulose wurde in 0,1 mM EDTA bei 4°C aufbewahrt.

Die DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt, und das gewünschte Fragment unter UV-Licht (302 nm) identifiziert. Direkt vor dem DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell eine Tasche geschnitten, in die ein Stück DEAE-Zellulose eingelegt wurde. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes (90 mV) wandert das DNA-Fragment auf die DEAE-Zellulose und wird dort ionisch gebunden. Nach diesem Schritt wurde die Membran herausgenommen und mit Wasser gespült, um Gelreste zu entfernen. Nach Überführung in ein 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen wurde die Membran 30 min bei 65°C in 150 µl Hochsalzpuffer inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Inkubation mit einer neuen Portion Puffer wiederholt. Zum vereinigten Überstand wurden 2 Volumen Ethanol gegeben. Die Fällung der DNA erfolgte 20 min bei -80°C oder 1 h bei -20°C.

Hochsalz-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	NaCl	1 M
	EDTA	10 mM
	bei +4°C aufzubewahren	

3.3.3 Ligation überstehender DNA-Enden (Modifiziert nach Sambrook *et al.* (1989))

1-2 µg dephosphorylierte Vektor-DNA, ein 2-facher molarer Überschuß an *insert*-DNA, 2 µl 10xLigase-Puffer, 2 Einheiten T4-Ligase (Boeringer Mannheim) und ddH₂O (das Ansatzvolumen beträgt 20 µl) wurden zusammenpipettiert. Für ein Kontrollexperiment wurde die *insert*-DNA durch ddH₂O ersetzt.

Die Inkubation in einem Wasserbad erfolgte 1 h bei 37°C und danach 1 h bei 16°C oder über Nacht bei 16°C. Die ligierte Plasmid-DNA wurde direkt für die Transformation verwendet.

10xLigasepuffer	Tris-HCl (pH 7,8)	500 mM
	MgCl ₂	100 mM
	DTT	200 mM
	ATP	10 mM

3.4 DNA-Gelelektrophorese

3.4.1 Agarosegele zur DNA-Auftrennung

1 % oder 2 % (w/v) Agarosegele in 1xTAE oder 0,5xTBE wurden für das Auftrennen von Fragmenten zwischen 0,5 und 4,0 kb verwendet. Für präparative Gele wurde spezielle SEAKEM-Agarose eingesetzt, für analytische Gele hingegen einfache Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf).

Die in 1xProbenpuffer gelöste DNA wurde aufgetragen. Das Gel wurde bei 100 mV laufen gelassen und anschließend in 300 ng/ml Ethidiumbromid (in Wasser) gefärbt. Zur Größenbestimmung wurde eine 1kb Leiter (Gibco-BRL, Karlsruhe) eingesetzt.

5xProbenpuffer	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Xylencyanol	0,2 % (w/v)
	Glycerol	30 % (w/v)

3.4.2 Polyacrylamid-Gele zur DNA-Auftrennung

Für ein 5 % Polyacrylamid-Gel wurden folgende Lösungen zusammenpipettiert (die angegebene Menge bezieht sich auf ein Gel von 16x15x0,04 cm):

5xTBE	5 ml
40 % Acrylamid	3,2 ml
ddH ₂ O	16,9 ml
10 % AMPS	168 µl
TEMED	20 µl

Das Gel polymerisierte in etwa 20 min. Es lief dann in 1xTBE bei ca. 40 Watt und 20°C in einer vertikalen Kammer (LKB 2001). Bei der Trennung von Fragmenten kürzer als 500 bp wurde das Gel so lange laufen gelassen, bis die Bromphenolfront noch etwa 2 cm vom unteren Rand entfernt war. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid oder mit Silberlösung gefärbt. Zur Größenbestimmung wurde eine 100 bp Leiter (Gibco-BRL, Karlsruhe) verwendet.

3.4.3 Silberfärbung

Nach dem Lauf wurde eine der Glasscheiben entfernt und die Glasplatte mit dem Gel 6 min in Ethanollösung (10 % Ethanol, 0,5 % Essigsäure) geschwenkt. Die Lösung wurde verworfen und das Gel 10 min in 0,1 % AgNO₃ inkubiert. Die AgNO₃-Lösung wird zurückbehalten und kann wieder verwendet werden. Das Gel wurde ganz kurz mit Wasser gespült und 10 min in Entwicklungslösung (7,5 g NaOH, 50 mg NaBH₄ und 2 ml Formaldehyd *ad* 500 ml Wasser) inkubiert. Die Lösung wurde weggeschüttet. Dann wurde das Gel 3-4 min mit Na₂CO₃-Lösung (9,8 g Na₂CO₃ in 500 ml H₂O) inkubiert und schließlich 45 min bei 80°C getrocknet.

3.5. Transformation von *E.coli* mit Plasmiden

3.5.1 Kompetenzinduktion von Bakterien

Von einer Einzelkolonie wurden 4 ml Übernachtskultur angesetzt. 1 ml davon wurde in 100 ml frisches LB-Medium überführt und weiter bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 geschüttelt (etwa 3 h).

Dann wurden die Bakterien 15 min bei 2700 g (4°C) abzentrifugiert. Nach dem Dekantieren wurden die Wände des Röhrchens mit saugfähigem Papier abgewischt. Die Zellen wurden in 30 ml Lösung I resuspendiert und für 2 h auf Eis gestellt. Danach wurden sie erneut 15 min bei 2700 g zentrifugiert, in 8 ml Lösung II aufgenommen und für 15 min im Eis inkubiert. Aliquots von 0,2 ml wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Lösung I	RbCl	100 mM
	MnCl ₂	50 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Kaliumacetat	30 mM
	Glycerol	15 % (w/v)
	pH 5,8 wurde mit 0,2 M Essigsäure eingestellt.	
Lösung II	RbCl	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	Na-MOPS	10 mM
	Glycerol	15 % (w/v)
	pH 6,8 wurde mit 2 M NaOH eingestellt.	

Die beiden Lösungen werden sterilfiltriert (nicht autoklaviert).

3.5.2 Transformation von kompetenten Bakterien

Die kompetenten Zellen (200 µl) wurden auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit der DNA (10-20 ng genügen) gemischt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Das Röhrchen wurde für 2 min in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt und abschließend etwa 5 min auf Eis abgekühlt. Der Inhalt des Röhrchens wurde schließlich in 1 ml LB-Medium überführt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Dann wurde ein Teil des Transformationsansatzes (oder der ganze Ansatz) auf Antibiotika-Platten ausplattiert.

3.6 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Das Prinzip der Sequenzierungsmethode von Sanger *et al.* (1977) beruht auf dem Abbruch der Polymerisationsreaktion durch den statistischen Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP). An diesen Stellen können keine weiteren Nucleosidtriphosphate angekoppelt werden, da den Didesoxytriphosphaten auch die 3'-OH-Gruppe fehlt. Verwendet wurde der USB-Sequenzierungssatz.

• Denaturieren von DNA

3-5 µg Plasmid-DNA wurden in 20 µl H₂O aufgenommen. Nach der Zugabe von 2,2 µl 2 M NaOH wurde die Lösung 30 min bei 37°C inkubiert und dann mit 2,4 µl 3 M Natriumacetat neutralisiert. Die DNA wurde mit 3 Volumen Ethanol präzipitiert (15 min bei -70°C) und 15 min bei 15000 g (4°C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 7 µl H₂O aufgenommen.

• Hybridisieren des Sequenzierprimers an das Template

1 µl (1 pmol) Sequenzierprimer wurde zur DNA gegeben. Danach wurde der Ansatz auf 95°C erhitzt (5 min), 3 min auf Eis abgekühlt und ganz kurz abzentrifugiert.

Dazu wurden 2 µl 5xSequenzierungspuffer gegeben. Dann wurde der Hybridisierungsmix 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

• *Markierungsreaktion*

Zum Hybridisierungsmix wurden zugegeben:

- 1 µl DTT (100 mM),
- 2 µl Markierungsmix 1:5 mit H₂O verdünnt,
- 0,5 µl 10mCi/ml α³⁵S-dATP (Amersham-Buchler, Braunschweig),
- 2 µl T7-DNA-Polymerase 1:8 in Enzympuffer verdünnt

Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert

• *Termination der Reaktion*

In einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 2,5 µl ddGTP-, ddATP-, ddTTP- und ddCTP-Terminationmix einpipettiert und 1 min bei 37°C vorgewärmt. Zu jedem ddNTP wurden 3,5 µl des vorbereiteten Markierungsmix gegeben und weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Stopplösung abgebrochen. In diesem Stadium können die Proben eingefroren und bis zu zwei Wochen aufbewahrt werden.

Vor dem Gelauftrag wurden die Proben 2 min bei 95°C erhitzt und sofort auf ein Sequenziergel überführt (1,5-2 µl pro Tasche).

5xSequenzierungspuffer	Tris-HCl pH 7,5	200 mM
	MgCl ₂	100 mM
	NaCl	250 mM
Enzympuffer	Tris-HCl pH 7,5	10 mM
	DTT	5 mM
	BSA	0,5 mg/ml
5xMarkierungsmix	dGTP	7,5µM
	dCTP	7,5µM
	dTTP	7,5µM
ddNTP-Terminationmix	dGTP	80 µM
	dATP	80 µM
	dCTP	80 µM
	dTTP	80 µM
	ddNTP	8 µM
	NaCl	50 mM
Stopplösung	Formamid	95 % (v/v)
	EDTA	20 mM
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
	Xylencyanol	0,05 % (w/v)

Sequenziergele

Die Auftrennung der Sequenzieransätze wurde auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (20x60 cm) durchgeführt. Das Gel wurde zuerst während eines zwanzigminütigen Vorlaufs bei 1800 V auf 55°C aufgewärmt. Die Proben wurden 2 min bei 95°C denaturiert, auf das Gel geladen und dann bei 2500 V aufgetrennt. Die Elektrophorese der

Plasmidsequenzierreaktionen wurde mit 6 % (w/v) Acrylamidgelen (8M Harnstoff, in 1xTBE) durchgeführt. Nach beendetem Lauf wurde das Gel auf ein Whatman-3M-Papier überführt und im Gelrockner bei 80°C getrocknet. Durch unterschiedliche Laufzeiten können mit einem Gel von einem Reaktionsansatz bis zu 400 Basen gelesen werden.

Gelmix (für 60 ml)	Harnstoff	8 M
	30 % Acrylamid	12 ml
	10xTBE	6 ml
	TEMED	30 µl
	10 % AMPS	300 µl
	H ₂ O	ad 60 ml

Laufpuffer: 1xTBE

3.7. Methoden zum Nachweis von Proteinen

3.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die beschriebene Methode bezieht sich auf das Minigel-System der Firma Biometra.

6 ml Trenngelmix wurde zwischen zwei Glasplatten pipettiert. Direkt nach dem Gießen wurde das Trenngel mit Butanol überschichtet und etwa 30 min bei RT gehalten. Das Butanol wurde abgegossen und das Gel mit H₂O gespült. Das Sammelgelmix wurde zusammenpipettiert, kurz gemischt und sofort gegossen. Anschließend wurde der Taschenkamm eingesetzt. Das Sammelgel war nach etwa 20-25 min bei RT polymerisiert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit einem Volumen 2xSDS-Puffer versetzt, bei 95°C 5 min erhitzt und nicht lösliche Bestandteile 2 min bei 15000 g (RT) abzentrifugiert. Zur Größenbestimmung wurde der Protein-Marker (LMW) von Pharmacia eingesetzt. Die Minigele ließ man bei 20 mA pro Gel 1,5 h in 1xGlycinpuffer laufen.

Nach Entfernen der Glasplatten wurde das Gel eine Stunde in 0,25% Coomassie-Blau (Serva)/10% Ethanol/7% Essigsäure geschwenkt und danach in 5% Essigsäure entfärbt.

Trenngelmix (ausreichend für 2 Gele von je 90x70x0,75 mm)

PAA-Konzentration	8 %	12 %
AA	3,2 ml	4,8 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	3,0 ml	3,0 ml
10 % SDS	120 µl	120 µl
H ₂ O	5,8 ml	4,2 ml
TEMED	6 µl	6 µl
10 % AMPS	40 µl	40 µl

Sammelgelmix	AA	1,35 ml
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 ml
	10 % SDS	100 µl
	H ₂ O	6,0 ml
	TEMED	10 µl
	10 % AMPS	100 µl
10xGlycinpuffer	Tris	30 g
	Glycin	144 g

	SDS (10 %)	10 ml
	H ₂ O	ad 1 l
2xSDS-Puffer	Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM
	Mercaptoethanol	10 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,025 % (w/v)
	Glycerol	10 % (v/v)
AA	Acrylamid	29 %
	Bisacrylamid	1 %

500 ml Lösung wurden mit 3 g Mischbett-Ionaustauscher (AG 501-X8D) 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ionaustauscher über ein Membranfilter (0,45 µm Porengröße) abfiltriert. Die fertige Lösung wurde in einer lichtgeschützten Flasche bei 4°C aufbewahrt.

3.7.2 Western-Blot-Analyse

Der Aufbau eines Blots verlief in folgender Reihenfolge: auf die Kathodengraphitplatte wurden 9 Schichten in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier (Whatman 1), das Gel, die Trägermembran (Nitrocellulose-Transfer-Membran BA 85, Schleicher&Schuell), 3 Schichten Papier mit Anodenpuffer II und anschließend 6 Schichten Papier mit dem Anodenpuffer I gelegt. Die Proteine wurden dann elektrophoretisch auf die Trägermembran übertragen (1 h bei 150 mA).

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran für 10 Sekunden in Ponceau-S-Lösung (Sigma, München) gefärbt. Die Lösung wurde abgegossen (sie kann erneut verwendet werden), und überschüssiges Ponceau S durch drei- bis viermaliges Spülen mit H₂O entfernt. Die Position der Molekulargewicht-Standards wurden mit einem Stift gekennzeichnet.

Danach wurde die Membran jeweils 10 min in TBS und in TBST gewaschen sowie zur Absättigung freier Bindungsstellen 30 min in einem Blockierungspuffer inkubiert. Die Membran wurde in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt und mit 5-10 ml in TBST verdünntem ersten Antikörper 1 h bei Raumtemperatur in einem Rollerschrank inkubiert und dann 10 min in TBST gewaschen. Nach der Inkubation mit dem in TBST verdünnten zweiten Antikörper wurde der Blot 10 min in TBST und anschließend 10 min in TBS gewaschen. Die Entwicklung des Blots erfolgte in frisch zubereiteter Färbelösung (nicht länger als 10 min). Danach wurde die Membran in H₂O gewaschen und getrocknet.

Kathodenpuffer	ε-Aminocaprinsäure	40 mM
	Methanol	20 %
Anodenpuffer I	Tris	0.3 M
	Methanol	20 %
Anodenpuffer II	Tris	25 mM
	Methanol	20 %
Färbelösung	4-Chloro-1-Naphthol	30 mg
	Methanol	10 ml

	1xTBS	ad 150 ml
	H ₂ O ₂ (30 %)	100 µl
10xTBS	NaCl	1.4 M
	Tris-HCl (pH 7,0)	100 mM

Blockierungspuffer: 1xTBST, 2 % Milchpulver

TBST: 1xTBS, 0,05 % Tween-20

3.7.3 Zellfraktionierung

Die Methode wird dazu verwendet, die Verteilung des Proteins in verschiedenen Zellfraktionen zu bestimmen. Die Vorgehensweise ist schematisch in Abb. 3-1 gezeigt. 1 ml mit IPTG induzierter *E. coli*-Kultur wurde 5 min bei 8000 g (RT) abzentrifugiert. Aus dem Überstand des Kulturmediums (Ü1) wurden die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt (siehe 3.7.4), pelletiert und in 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen. Das Bakterienpellet (P1) wurde durch Schütteln (Vortex) resuspendiert, in 100 µl kalten Lysispuffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren für 2 min bei 15000 g (4°C) wurde der Überstand (Ü2) (periplasmatische Fraktion) in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Das Pellet (P2) wurde in 100 µl Cytoplasmalösung aufgenommen und 5 Sekunden mit Ultraschall bei mittlerer Stärke resuspendiert. Zellreste wurden

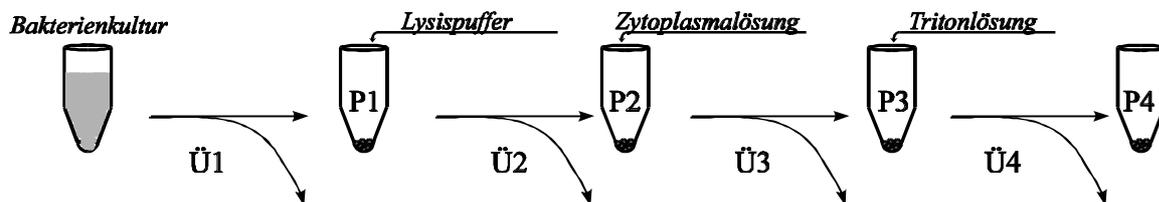


Abbildung 3-1. Schematische Darstellung der Zellfraktionierung. Abkürzungen siehe Text.

5 min bei 15000 g (4°C) abzentrifugiert und der Überstand (Ü3) (cytoplasmatische Fraktion) aufbewahrt. Das Pellet (P3) wurde in 100 µl 1 % (v/v) Tritonlösung gelöst und 10 min auf Eis inkubiert. Die nicht lösliche Fraktion wurde 5 min bei 15000 g (4°C) präzipitiert und der Überstand (Ü4) (Membranfraktion) wurde aufbewahrt.

Das Pellet (P4) ist die schwerlösliche Fraktion und enthält die *inclusion bodies*.

Für die Elektrophorese wurde das Pellet 4 in 200 µl 2xSDS-Puffer aufgenommen. 20 µl der Überstände 2-4 wurden abgenommen und jeweils mit 20 µl 2xSDS-Puffer versetzt. Danach wurden 20 µl von jeder Fraktion auf ein 12 %-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, getrennt und das Protein im Western-Blot nachgewiesen (siehe 3.7.2).

Lysispuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	30 mM
	Sucrose	20 % (w/v)
	EDTA	1 mM
	Lysozym	1 mg/ml
	Das Lysozym wurde kurz vor der Verwendung dazugegeben.	

Cytoplasmalösung	Tris-HCl (pH 8,0)	100 mM
------------------	-------------------	--------

3.7.4 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

1 ml Proteinlösung wurde mit 22 µl 0,5 % Natriumdesoxycholat und 220 µl 5 M TCA vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Das gefällte Protein wurde 15 min bei 15000 g pelletiert, in 2xSDS-Puffer aufgenommen, wobei sich die Farbe des enthaltenen Indikators von blau nach gelb ändert. Danach wird die Lösung bis zum Farbumschlag von gelb nach blau mit 1 M NaOH titriert. Die Probe wurde 5 min bei 95°C inkubiert und nichtlösliche Bestandteile wurden 2 min bei 15000 g (RT) abzentrifugiert. Wenn der Überstand danach noch immer gelb ist, titriert man ihn erneut bis zum Umschlag nach blau.

3.8 Expression und Reinigung von rekombinanten scFv-Fragmenten aus *inclusion bodies*

3.8.1 Expression von Tü165-scFv in *E.coli*

Plasmid-transformierte *E.coli*-Zellen wurden auf einer LB-Platte (+100 mM Glucose, 50 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

50 ml LB_{GAK}-Medium (1 % Glucose, 50 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin) wurden mit einem ausgesuchten Klon angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde 1:40 mit frischem LB_{GAK}-Medium (etwa 2 l) verdünnt, weiter bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 angezüchtet und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Induktion der scFv-Expression erfolgte durch die Zugabe von 100 mM IPTG bis zur Endkonzentration von 20 µM. Die Zellen wurden für weitere 3 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert und danach 15 min bei 4500 g (4°C) pelletiert.

3.8.2 Isolierung der *inclusion bodies*

Das Pellet wurde in Lysispuffer (1/50 des Mediumvolumens) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von MgCl₂, MnCl₂ und Desoxyribonuklease bis zur Endkonzentration von 10 mM, 1 mM bzw. 10 µg/ml wurden Bakterien weitere 10 min bei RT inkubiert und dann mit Ultraschall lysiert. Nach zwanzigminütigem Zentrifugieren bei 10000 g und 4°C wurde das Pellet in 20 ml Detergenzpuffer resuspendiert und erneut bei den gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet zweimal mit jeweils 10 ml Tritonpuffer gewaschen und anschließend abzentrifugiert. Die *inclusion bodies* wurden in 20 ml Startpuffer (siehe 3.8.3) aufgenommen und bei 4°C und Schütteln über Nacht gelöst. Die Lösung wurde durch Zentrifugieren bei 10000 g (4°C) geklärt.

Lysispuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	Sucrose	25 % (w/v)
	EDTA	1 mM

1 mM PMSF und 1 mg/ml Lysozym wurden direkt vor der Verwendung in den Puffer gegeben.

Detergenzpuffer	Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
	NaCl	0,2 M

	Natriumdesoxycholat	1 % (w/v)
	Nonidet P-40	1 % (v/v)
	EDTA	2 mM
Tritonpuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	1 mM
	Triton X-100	0,5 %

3.8.3 Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metall-Ionen (IMAC)

Für die Packung einer Säule wurden 5 ml *Chelating Sepharose Fast Flow* (Pharmacia) pro 1 l Bakterienkultur verwendet. Nach dem Waschen mit doppeltdestilliertem Wasser (3 Säulenvolumina) wurde die Säule mit 2 Säulenvolumina Ni²⁺-Lösung beladen (5 mg/ml NiCl₂ in doppelt destilliertem Wasser). Anschließend wurde mit 3 Säulenvolumina Wasser gespült und die Säule mit 3 Volumina Startpuffer äquilibriert.

Nach dem Aufladen der Probe (Flußrate etwa 0,5 ml/min) wurde die Säule mit 5-6 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 4 Säulenvolumina Elutionspuffer eluiert.

Startpuffer	Tris-HCl (pH 7,0)	0,1 M
	Guanidinhydrochlorid	6 M
Waschpuffer	Tris-HCl (pH 7,0)	50 mM
	Harnstoff	6 M
	Imidazol	50 mM
Elutionspuffer	Tris-HCl (pH 7,0)	50 mM
	Harnstoff	6 M
	Imidazol	250 mM

3.8.4 Rückfaltung von scFv-Fragmenten

Die Rückfaltung des Proteins erfolgt durch die Dialyse gegen TEA-Puffer. Zuerst wurde das Eluat in einem Centriprep-10-Konzentrator (Amicon) so konzentriert, daß die Proteinkonzentration nicht höher als 0,3 mg/ml war. Für eine langsame Entfernung des Harnstoffs wurde der Dialyseschlauch (Ausschlußgrenze 8000 Da) ohne Rühren in 1 l TEA-Puffer inkubiert. Danach wurde der Puffer zweimal gewechselt. Dann wurde die Probe gegen PBS dialysiert und anschließend in Microcon-10-Konzentratoren (Amicon) auf etwa 1 ml konzentriert. Alle Dialyseschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Proteinkonzentrationen wurden mittels der Bradford-Methode mit dem Protein-Assay-Kit (Biorad, München) bestimmt.

Das Protein wurde in PBS auf 1 mg/ml verdünnt und mit BSA (Endkonzentration 5 mg/ml) versetzt. Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt.

TEA-Puffer	Tris-HCl (pH 7,0)	0,1 M
	EDTA	2 mM
	L-Argininhydrochlorid	0,4 M

3.9. Zellkultur

3.9.1 Anzucht von Zellen

Die im Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis nur noch ein kleines Stück Eis im Röhrchen verblieb, in 20 ml kaltem FCS-RPMI-Medium aufgenommen und 10 min bei 800 U/min (EC-Zentrifuge, Beckmann) und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde in 2 ml FCS-RPMI-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in unterschiedlicher Menge auf 4-12 Löcher einer 24-well-Platte, die unterschiedliche Menge Medium enthielten, verteilt und im Feuchtbrutschrank (37°C, 5% CO₂) 1-2 Tage inkubiert. Danach wurden die gesunden Zellen in eine 50-ml-Kulturflasche überführt, mit Medium (das Medium wurde vor der Hinzugabe auf 37°C erwärmt) versorgt und weiter inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde mittels eines Mikroskops kontrolliert. Durch den Verbrauch des Mediums ändert sich der pH-Wert, was einen Farbumschlag des Mediums verursacht (von rot nach gelb im sauren Bereich).

3.9.2 Einfrieren der Zellen

Etwa 10⁷ Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 1200 U/min (EC-Zentrifuge, Beckmann) abzentrifugiert (bei 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1-1.5 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen und in ein Einfriereröhrchen überführt. Dieses wurde in einer Styropor-Schachtel 48 h bei -80°C gelagert und danach in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.9.3 Beladen von BM36.1-Zellen mit Peptiden

BM36.1 Zellen wurden im Brutschrank 24 h bei 26°C (5% CO₂) im FCS-RPMI-Medium inkubiert. Die Zellen wurden mittels einer Neubauer-Kammer gezählt, die benötigte Menge (3x10⁵ Zellen für eine Probe) wurde abzentrifugiert, in Medium resuspendiert (1,5-2 ml für eine Probe) und in eine 50-ml-Kulturflasche überführt. Ein Peptid wurde 100-fach konzentriert (5 mM) in DMSO aufgelöst und zu den Zellen gegeben, so daß die Endkonzentration 50 µM betrug. Die Zellkultur wurde weitere 18 h bei 26°C (5% CO₂) inkubiert. Direkt vor der Analyse wurden die Zellen für 2 h bei 37°C (5%CO₂) inkubiert, um instabile HLA-Moleküle zu dissoziieren.

3.9.4 Fixieren der Zellen mit Glutaraldehyd

Die Zellen wurden dreimal in PBS/NaN₃-Lösung (0,1 % NaN₃) gewaschen und im Puffer so resuspendiert, daß die Endkonzentration 10⁷ Zellen/ml betrug. Das gleiche Volumen von 0,25 % Glutaraldehyd in PBS/NaN₃ wurde dazugegeben, gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Pellet nimmt dabei eine gelbe Farbe an. Nach der Zugabe von 1/10 Volumen PBS/BSA-Lösung (0,1 % NaN₃, 10 % BSA) wurden die Zellen 5 min bei 2000 U/min (IEC-Zentrifuge) (4°C) abzentrifugiert und dann dreimal mit PBS/BSA (0,1 %

NaN₃, 0,1 % BSA) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet (1x10⁷ Zellen/ml) im selben Puffer resuspendiert. Aliquots von 1 ml wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.10 Durchflußzytometrie (nach Uchanska-Ziegler *et al.*, 1980)

Alle Inkubations- und Zentrifugierschritte wurden mit vorgekühlten Lösungen auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt, um Beschädigungen der Zellmembran sowie *capping* und *shedding* von Membranantigenen zu vermeiden. Das Zentrifugieren der Zellen in Mikrotiterplatten erfolgte etwa 30 Sekunden bei 1400 U/min (GPKP, Beckmann). Der Überstand wurde durch schnelles Ausschütteln entfernt.

Alle angesetzten Antikörperlösungen und Seren wurden vor der Verwendung 5 min bei 15000 g (4°C) abzentrifugiert; sie enthielten 0,1 % NaN₃. Nach der Zugabe der FITC-markierten Antikörpern wurden die Zellen im Dunkeln gehalten.

Die Messungen wurden auf dem Durchflußzytometer FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, USA) durchgeführt.

Für eine Probe wurden etwa 5x10⁵ Zellen verwendet. Die Zellen wurden 5 min bei 1400 U/min abzentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit normalem Ziegenserum (NGS, Seromed) und menschlichen Immunglobulinen (Intraglobin F, Biotest) 20 min auf Eis inkubiert. Für 5x10⁶ Zellen wurden 60 µl NGS und 40 µl Intraglobin F verwendet. Die Suspension wurde mit HBSS/NaN₃ (0,1 % NaN₃) verdünnt und in einer Mikrotiterplatte mit runden Böden (Nunc) verteilt. Danach wurden die Zellen dreimal in HBSS/NaN₃ gewaschen und schrittweise Reagenzien hinzugegeben. Dann wurde jeweils 30 min auf Eis inkubiert. Zwischen den einzelnen Zugaben wurden die Zellen jeweils dreimal mit HBSS/NaN₃/BSA (0,1 % BSA) gewaschen.

Mit monoklonalen Antikörpern, den TÜ165-scFv-Fragmenten, periplasmatischen scFv-Fragmenten aus der Bibliothek und Phagen wurde weiter unterschiedlich verfahren:

- *Analyse mit monoklonalen Antikörpern*

100 µl antikörperhaltiger Überstand einer Myelomhybridkultur und anschließend 20 µl FITC-markierte Ziege-anti-Maus-IgG (1:30 verdünnt in 10% humanem Serum) wurden hinzugegeben;

- *Analyse der TÜ165-scFv-Fragmente*

50-100 µl in (0,1 % NaN₃) verdünnte TÜ165-scFv-Fragmente (20-25 µg/ml) und danach 50 µl Ratte-anti-α-Tubulin-Antikörper YOL1/34 (1:50 verdünnt in HBSS/NaN₃) wurden hinzugegeben. Bindung wurde anschließend durch Zugabe von 20 µl FITC-markiertem Ziege-anti-Ratte-IgG nachgewiesen;

- *Analyse periplasmatischer scFv-Fragmente*

150 µl scFv-haltige periplasmatische Fraktion und dann 100 µl Myc1-9E10-haltiger Kulturüberstand wurden hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 20 µl FITC-markiertem Ziege-anti-Maus-IgG (1:30 verdünnt in 10% humanem Serum) inkubiert;

• *Analyse der Phagen*

Für diese Analyse wurden die Zellen nur mit Intraglobin F abgesättigt. 100 µl phagenhaltige Lösung (mindestens 10^{10} Partikel), danach 100 µl Schaf-anti-M13-Antiserum (1:1000 verdünnt in HBSS/NaN₃) und schließlich 20 µl FITC-markierte Esel-anti-Schaf-IgG (1:30 verdünnt in HBSS/NaN₃) wurden hinzugegeben.

Abschließend wurden die Zellen mit Meßflüssigkeit FACSFlow (Becton Dickinson) dreimal gewaschen und in Polystyren-Röhrchen (Nunc), die 300-500 µl FACSFlow enthielten, überführt und mit Alufolie abgedeckt auf Eis gestellt. Unmittelbar danach wurden die Zellen für die Fluoreszenzmessung verwendet. So vorbereitete Zellen können auch im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

3.11. Phagenbibliothek

3.11.1 Bestimmung des Phagentiters

Der Phagentiter einer Lösung kann als *plaque forming units* (pfu) bestimmt werden.

Der *E.coli*-Stamm TG1 wurde auf eine M9-Medium Platte ausgestrichen und bei 37°C etwa 30 Stunden wachsen gelassen. Aus einer Kolonie wurden 5 ml 2xYT Übernachtskultur angesetzt. Nach der Verdünnung 1:100 in frischem 2xYT-Medium wurden die Bakterien weiter bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 angezüchtet.

Die Phagenüberstände wurden in 10-ml-Röhrchen serienweise 1:10 mit 2xYT-Medium verdünnt. Jeweils 180 µl Bakterien wurden mit 20 µl von jeder Verdünnung infiziert und 30 Minuten bei 37°C (ohne Schütteln) inkubiert. In jedes Röhrchen wurden 3 ml geschmolzener, 42°C-warmer Top-Agar gegeben, kurz gemischt und sofort auf eine vorgewärmte (10 min bei 37°C) TYE-Platte gegossen. Die Platten wurden 5 min stehen gelassen, bis der Top-Agar erstarrt war. Danach wurden sie über Nacht bei 37°C inkubiert. Die trüben Plaques wurden ausgezählt.

3.11.2 Bestimmung des Phagemidtiters

Bakterien wurden mit verdünnten Phagemidüberständen, wie in 3.11.1 beschrieben, infiziert und 30 min bei 37°C inkubiert. Da die Phagemids einen Selektionsmarker (hier Ampicillin-Resistenz) exprimieren, wurden die infizierten Bakterien (10 µl) direkt auf einer TYE-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Ampicillin-resistenten Kolonien (*Ampicillin-resistance transducing units* oder Amp^Rtu) wurden gezählt.

3.11.3 Präparation der Helferphagen

Als Helferphagen wurden die M13K07-Phage (Pharmacia) verwendet, die eine Kanamycinresistenz und eine Verpackungsdefizienz aufweisen.

Die Helferphagen wurden in Serie 1:100 verdünnt. Mit 10 µl von jeder Verdünnung wurden jeweils 200 µl *E.coli* TG1 bei einer OD₆₀₀ von 0,2 infiziert. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C (ohne Schütteln) wurden jeweils 3 ml geschmolzener Top-Agar dazugegeben (42°C) und auf 37°C warme TYE-Platten ausgegossen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einem einzelnen Plaques wurden 3-4 ml Plating-Bakterien infiziert und weitere 2 h bei 37°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde in 500 ml frisches 2xYT-Medium überführt und noch 1 h inkubiert. Nach der Zugabe von Kanamycin bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml wurden die Bakterien 8-16 h weiter bei 37°C geschüttelt und dann 15 min bei 10800 g (4°C) pelletiert. Zum Überstand wurde 1/4 Volumen PEG/NaCl (20 % Polyethylenglycol 6000, 2,5 M NaCl) gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Phagen 15 min bei 10800 g pelletiert und in 2 ml TE aufgenommen. Die Lösung wurde durch einen 0,45-µm-Filter (Sartorius) filtriert, titriert und auf 10¹² pfu/ml verdünnt. Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.11.4 Anzucht der Phagen-Bibliothek

Mit 25 µl (etwa 5x10⁸ Klone) der Stammlösung wurden 50 ml 2xYT-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 1 % Glucose) angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 geschüttelt. 40 ml Kultur wurden für die Vorbereitung der sekundären Stammlösung verwendet. Mit den restlichen 10 ml wurden *E.coli* TG1 im Verhältnis 1:20 (Bakterienanzahl:Phagenanzahl) mit Helferphagen infiziert und 30 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden 10 min bei 3300 g (4°C) abzentrifugiert und in 30 ml 2xYT_{AK}-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) resuspendiert. Nach der Zugabe von 270 ml vorgewärmtem 2xYT_{AK}-Medium wurden die Bakterien über Nacht bei 30°C gezüchtet und danach 10 min bei 10800 g (4°C) pelletiert. Unmittelbar danach wurden die Phagemidpartikel mit PEG gefällt (siehe 3.11.5).

Sekundäre Stammlösung der Bibliothek. 40 ml Kultur (angezüchtete primäre Phagemidbibliothek) wurden 10 min bei 3300 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 2xYT-Medium resuspendiert, auf eine große (243 x 243 mm) TYE-Platte (Nunc) überführt und bei 30°C über Nacht inkubiert. Die Bakterien wurden mit 2 ml 2xYT-Medium (mit 15 % Glycerol) abgelöst. Diese Stammlösung wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.11.5 Präparation von Phagemidpartikeln

Der Phagenüberstand wurde mit 1/5 Volumen PEG/NaCl (20 % Polyethylenglycol 6000, 2,5 M NaCl) gut vermischt und 1 h auf Eis inkubiert. Die Phagemidpartikel wurden 30 min bei 10000 g (4°C) abzentrifugiert, in 40 ml sterilen Wassers resuspendiert und in ein 50-ml-Plastikröhrchen überführt. Nach der Zugabe von 8 ml PEG/NaCl wurden die Phagen nochmals

20 min auf Eis gefällt. Nach dreißigminütigem Zentrifugieren bei 3300 g (4°C) wurden die Phagemidpartikel in 2 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde erneut 10 min bei 3300 g (4°C) zentrifugiert, um Bakterienreste zu entfernen. Zum Überstand wurde bis zu 15 % Glycerin gegeben. Die Aliquots wurden bei -80°C aufbewahrt. Der Überstand kann nur kurze Zeit bei 4°C aufbewahrt werden. Nach diesem Verfahren kann man bis zu $1\text{-}5 \times 10^{13}$ Phagemidpartikel erhalten.

3.11.6 Selektion

Die Selektion wurde in einem Eppendorf-Röhrchen durchgeführt. 10^7 fixierte BM28.7-Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, 2 min bei 2000 g abzentrifugiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 1 ml 2 % MPBS 1,5 h bei RT in einem Rollerschrank inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Zu den Zellen wurden 1×10^{13} Phagen in 1 ml 2 % MPBS gegeben und alles wurde 1,5 h bei RT im Rollerschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen fünfmal mit PBST und fünfmal mit PBS gewaschen. Am Ende wurden die PBS-Reste sorgfältig entfernt. Gebundene Phagen wurden durch Zugabe von 1 ml frisch angesetztem 100 mM Triethylamin (70 μ l Triethylamin in 5 ml Wasser) eluiert. Dabei wurde das Röhrchen 10 min permanent gedreht. Die Zellen wurden 5 min bei 2000 g pelletiert. Der Überstand wurde in ein 10-ml-Röhrchen überführt und mit 0,5 ml von 1 M Tris-HCl (pH 7,4) neutralisiert. Mit den erhaltenen Phagen wurden 9 ml exponentiell wachsende TG1-Bakterien (OD_{600} etwa 0,5) infiziert und 30 min bei 37°C inkubiert. Um die Zahl der eluierten Phagenpartikel zu bestimmen, wurden 100 μ l infizierte TG1 abgenommen und verschiedene Verdünnungen in 2xYT auf TYE_{AGlu}-Platten (+100 μ g/ml Ampicillin, 1% Glukose) ausplattiert. Die restlichen Bakterien wurden 10 min bei 3300 g abzentrifugiert, in 1 ml 2xYT resuspendiert und auf eine große (243x243 mm, Nunc) TYE_{AGlu}-Platte überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30°C. Die Bakterienkolonien wurden mit 2-3 ml 2xYT (+15 % Glycerol) von der Platte abgelöst und weiter bei -80°C aufbewahrt.

Mit 10-20 μ l davon wurden 50 ml 2xYT-Medium (+100 μ g/ml, 1 % Glucose) angeimpft. Die Kultur wurde weiter angezüchtet und infiziert (siehe 3.11.4). Die Phagenpartikel wurden mit PEG/NaCl wie oben beschrieben gefällt, in 2 ml PBS aufgenommen und nach der Bestimmung des Phagentiters für weitere Runden der Selektion und für ELISA verwendet. Den Rest konnte man einige Tage bei +4°C oder mit 15 % Glycerol versetzt bei -80°C aufbewahren. Die Selektion wurde viermal wiederholt.

3.11.7 Untersuchung der Spezifität der isolierten Phagen mittels ELISA

Polyklonale Phagen

Für eine Probe wurden etwa 5×10^5 Zellen benötigt. Die Zellen wurden aufgetaut, 2 min bei 2000 g abzentrifugiert und dreimal in PBS gewaschen. Danach wurden sie in 1 ml 2 % MPBS 2 h bei RT inkubiert. Parallel wurde eine 96-well-Mikrotiterplatte mit runden Böden (Nunc) mit 200 μ l/well 2 % MPBS bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS

gewaschen und auf die Platte überführt. Nach zweiminütigem Zentrifugieren bei 2000 g wurde PBS vorsichtig ausgeschüttet. Der phagenenthaltende Bakterienüberstand oder ein Aliquot der Phagenpräparation wurde mit MPBS verdünnt (Endkonzentration des Milchpulvers: 2 %), abzentrifugiert und zu den Zellen (100 µl/well) gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurden die Zellen zweimal mit PBST und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Anti-M13-Serum wurde 1:1000 in PBS verdünnt, zu den Zellen 100 µl/well gegeben und 45 min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 1:2000 verdünnten HRP-anti-Schaf-Ig 45 min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurden 100 µl/well Substratlösung hinzugegeben. Die Platte wurde etwa 10 min stehen gelassen, bis die Lösung eine blaue Färbung annahm. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurden die Überstände auf eine neue Platte überführt. Die OD wurde bei 450 nm bestimmt.

Substratlösung	0,05 M Phosphat-Citratpuffer (pH 5)	10 ml
	TMB (Sigma)	1 Tablette
	30 % H ₂ O ₂	2 µl

Monoklonale Phagen

Mit polyklonalen Phagen infizierte TG1-Bakterien wurden ausplattiert. Mit einzelnen Klonen wurden jeweils 100 µl 2xYT_{AG}-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 1 % Glucose) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 2 µl von jeder Übernachtskultur wurden auf eine neue Mikrotiterplatte überführt, die 200 µl/well frisches 2xYT_{AG}-Medium enthielt. Die Zellen wurden 1 h gezüchtet und danach mit jeweils 10⁹ Phagen (in 25 µl 2xYT_{AG}-Medium) infiziert. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 37°C (ohne Schütteln) wurden die Bakterien 10 min bei 1800 g pelletiert, jeweils in 200 µl 2xYT-Medium (+100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) resuspendiert und unter Schütteln (30°C) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 10 min bei 1800 g abzentrifugiert. 50 µl vom Überstand wurden, wie oben für polyklonale Phagen beschrieben, für einen ELISA verwendet.

3.11.8 Produktion von löslichen scFv-Fragmenten

HB2151-Bakterien wurden mit einem monoklonalen Phagen infiziert und ein Aliquot auf einer TYE-Platte (100 µg/ml Ampicillin, 1 % Glucose) ausplattiert und über Nacht inkubiert. Mit einem einzelnen Klon wurden 10 ml 2xYT-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 0,1 % Glucose) angeimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 angezüchtet, mit 1 mM IPTG induziert und bei 22°C über Nacht inkubiert. Nach fünfzigminütigem Zentrifugieren bei 10800 g wurde das Pellet in 1/20 Volumen Puffer I resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut 10 min bei 10800 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt. Danach wurde das Pellet in 1/20 Volumen 5 mM MgSO₄ aufgenommen und

20 min auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wurden beide Überstände vereinigt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Puffer I	Tris-HCl (pH 7,0)	30 mM
	Sucrose	20 %
	EDTA	1 mM

3.11.9 *Fingerprinting* der Klone

Phagemidenthaltende TG1-Bakterien wurden auf einer TYE-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Jeder einzelne Klon wurde mit einem sterilem Holzstäbchen in 40 µl Wasser überführt, darin 10 min bei 95°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. PCR-Ansätze (30 µl) wurden wie folgt zusammenpipettiert:

5 µl gekochte Bakteriensuspension, 3 µl 10xPCR-Puffer (USB), 1,8 µl 25 mM MgCl₂ (USB), 0,6 µl 10 mM dNTP, 3 µl 10 µM LMB3-Primer, 3 µl 10 µM PCR-H-Link-Primer, 1 Einheit Taq-Polymerase (USB) und 13,4 µl H₂O.

Die PCR-Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und 2 min bei 94°C denaturiert. Die PCR verlief nach folgendem Schema:

1. 1 min bei 94°C
2. 1 min bei 58°C oder 55°C
3. 1 min bei 72°C.

Insgesamt wurden 5 Zyklen mit der Annealing-Temperatur von 58°C und 30 Zyklen bei 55°C durchgeführt. Am Ende wurden die Proben 10 min bei 72°C inkubiert.

Die PCR-Produkte wurden mit dem Restriktionsenzym Mva I verdaut. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl PCR-Produkte, 14 µl H₂O, 0,5 Einheiten Mva I (Fermentas, Vilnius), 2 µl 10xVerdaupuffer und 1 µl 2 mg/ml BSA. Der Verdau wurde 1,5 h bei 37°C durchgeführt. 5-10 µl wurden auf einem 5%-igem Polyacrylamid-Gel getrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid oder Silberlösung gefärbt.

10xVerdaupuffer	Tris-HCl (pH 8,5)	100 mM
	MgCl ₂	100 mM
	KCl	1 M