

3 Methoden

3.1 Herstellung von Oligonukleotid-Chips

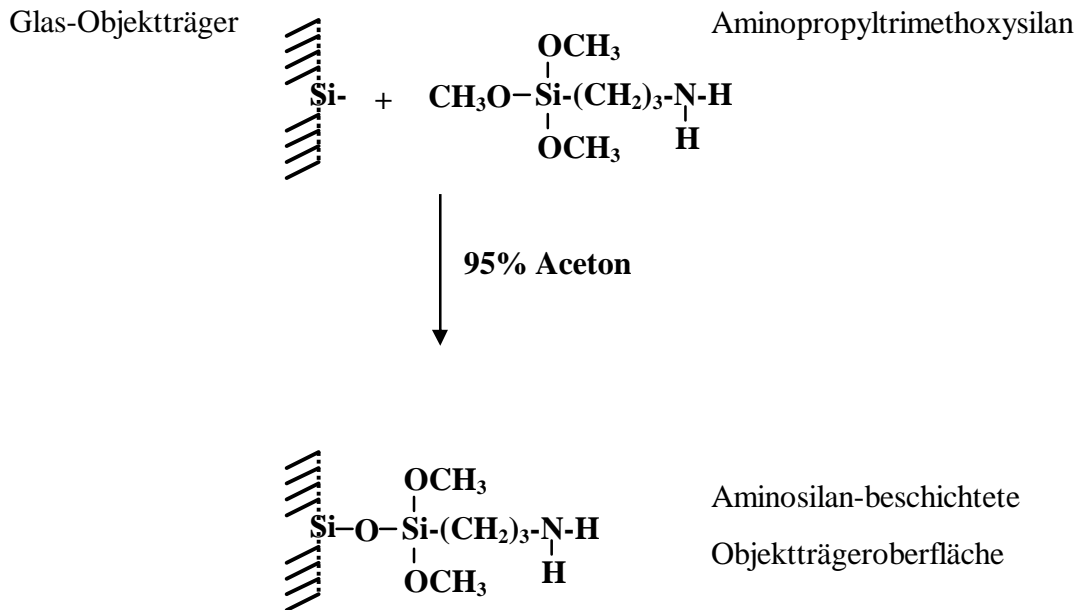
3.1.1 Silanisierung von Glas-Objektträgern

Vor der Silanisierung von Objektträgern müssen diese von Schmutz und Fett befreit werden. Nicht ausreichend gereinigte Objektträger zeigten gemäß der in der vorliegenden Arbeit gemachten Erfahrung einen hohen Fluoreszenzhintergrund. Zur Reinigung wurden konventionelle Glas-Objektträger in 1M NaOH-Lösung gelegt und über Nacht auf einen Schüttler gestellt. Anschließend wurden die Objektträger mit Millipore-Wasser (deionisiertes Wasser) gespült. Zum Neutralisieren wurden sie in 1% HCl getaucht und mehrmals mit Wasser gewaschen. Schließlich wurden die Objektträger mit Aceton gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Die vorgereinigten Glas-Objektträger wurden zum Silanisieren der Oberfläche in einer 1% Amino-propyltrimethoxysilan-Lösung in 95% Aceton für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mehrmals mit absolutem Aceton gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Objektträger wurden dann für 45 min bei 110°C im Trockenschrank gebacken (Guo et al., 1994; Beier et al., 2000).

Die zu Beginn der Arbeit verwendeten Aminosilan-Objektträger von Sigma und die In Situ PCR Objektträger von Perkin Elmer, die bereits aminosilanisiert waren, wurden für 10 min in Aceton bei Raumtemperatur auf einen Schüttler gestellt und im Anschluß daran zum Trocknen für 2 Stunden in einen Exsikkator gestellt.

Abb. 3.1: Silanisierung von Glas-Objektträgern



Ziel der Silanisierung ist es, Amino-propyltrimethoxysilan kovalent an die Glasoberfläche zu binden. Durch diese Prozedur erhält man eine freie Aminogruppe, die für die Aktivierung der Glasoberfläche von essentieller Bedeutung ist.

3.1.2 Aktivierung von Aminosilan-Glas-Objektträgern

Die Aktivierung der Aminosilan-beschichteten Objektträger dient als Vorstufe für die kovalente Bindung der 5'-aminomodifizierten Oligonukleotide. Zum Aktivieren der Glasoberfläche wurde N,N Phenylendiisothiocyanat (PDITC) nach dem Protokoll von

Guo et al. verwendet. Hierzu wurden die silanisierten Objektträger für 2 Stunden in einer Aktivierungslösung bei Raumtemperatur inkubiert.

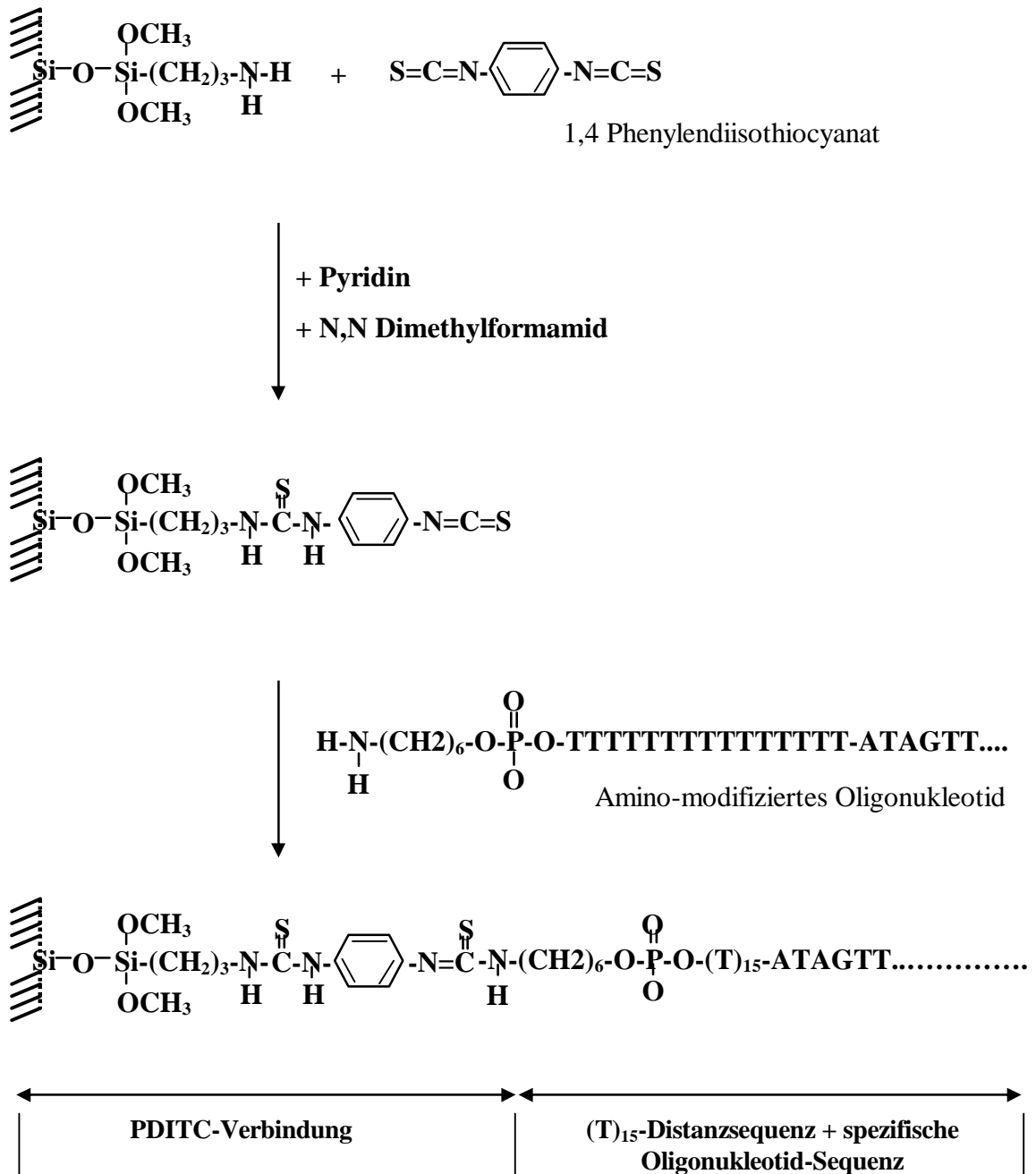
Das Ziel der Aktivierung der silanisierten Oberfläche von Objektträgern war es, eine Isothiocyanat-Gruppe des bi-funktionellen Moleküls PDITC kovalent zu binden (siehe Abb. 3.2) Dieser Reaktion liegt folgender Mechanismus zugrunde. Das Kohlenstoffatom der einen Isothiocyanat-Gruppe wird nukleophil von der auf der Glasoberfläche fixierten freien Aminogruppe (des Amino-propyltrimethoxysilans) angegriffen, dabei kommt es zur kovalenten Bindung des PDITC an die Glasoberfläche. Dieselbe Reaktion findet später beim Aufbringen der Allel-spezifischen Oligonukleotide zwischen der zweiten (noch freien) Isothiocyanat-Gruppe des PDITC und der Aminogruppe des Oligonukleotids statt.

Aktivierungslösung:

0,2% 1,4 Phenylendiisothiocyanat (PDITC)	0,3g
10% Pyridin (> 99,8%)	15ml
N,N-Dimethylformamid (> 99,8 %)	<u>135ml</u>
	150ml

Darstellung der Aktivierung von Glas-Objektträgern, welche Voraussetzung ist für eine anschließende kovalente Bindung der aminomodifizierten Oligonukleotide an die Glasoberfläche.

Abb. 3.2: Aktivierung von silaniserten Glas-Objektträgern



Im Anschluß daran wurden die Objektträger durch mehrmaliges Eintauchen in Methanol und anschließend in Aceton gewaschen. Die Objektträger wurden 5min bei Raumtemperatur inkubiert und über Nacht im Exsikkator unter Vakuum getrocknet.

3.1.3 Lösen und Anordnen der Oligonukleotide in Mikrotiterplatten

Alle Oligonukleotide wurden in lyophilisiertem Zustand geliefert. Konventionelle Oligonukleotide für PCR-Ansätze wurden in einer Endkonzentration von 100µM in Ampullen-Wasser gelöst. Von dieser Stammlösung wurde eine 10µM Verdünnung als Arbeitslösung hergestellt. Allel-spezifische Oligonukleotide, die auf Glas-Objektträger immobilisiert wurden, wurden je nach Zielsetzung, z.B. zur Optimierung der Methode und den anschließenden eigentlichen Experimenten in verschiedenen Konzentrationen, beginnend von 6,25 bis 100µM in Ampullen-Wasser oder in 100 bis 400 mM Natriumcarbonat pH 9.0 gelöst.

Für das Herstellen von einzelsträngigen DNS-Targets durch den Exonuklease-Verdau von PCR-Produkten, wurden Phosphothioat (PTO)-modifizierte Oligonukleotide verwendet. Bei diesen Oligonukleotiden sind die ersten drei 5`Basen PTO-modifiziert, um einen Schutz gegen Exonuklease-Verdau zu gewährleisten. Die 47 ausgewählten Allel-spezifischen Oligonukleotide wurden in einer Mikrotiterplatte angeordnet (siehe Tabelle 3.1). Die Oligonukleotide wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Tab. 3.1: Anordnung der Oligonukleotide in einer Mikrotiterplatte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3196 G	A	3460 G	A	4917 A	G	11332 C	T	12612 A	G	14960 G	A
B	3243 A	G	4136 A	G	7028 C	T	11467 A	G	12634 A	T	15043 G	A
C	3252 A	G	4160 T	C	8344 A	G	11778 G	A	12705 C	T	15205 C	T
D	3290 T	C	4216 T	C	8851 T	C	12246 G	C	13368 G	A	15257 G	A
E	3302 A	G	4317 A	G	8993 A	C	G	T	13708 G	A	15326 G	A
F	3394 T	C	4336 T	C	10398 A	G	12308 A	G	14233 A	G	15452 C	A
G	3397 A	G	4529 A	T	10463 T	C	12311 T	C	14484 T	C	15607 A	G
H	3447 A	G	4646 T	C	11251 A	G	12372 G	A	14709 T	G	15924 G	A

3.1.4 Vorbereiten von Oligonukleotidlösungen

Oligonukleotid-Lösungen wurden in Mikrotiterplatten bei -20°C gelagert und vor dem Aufbringen auf Glas-Objektträger bei Raumtemperatur aufgetaut. Durch zehnmündige Inkubation der Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler wurde eine gleichmäßige Verteilung der Oligonukleotide erreicht. Da die Platten mehrmals benutzt wurden, mußte jedes Mal überprüft werden, ob das gewünschte Ausgangsvolumen und somit auch die gewünschte Endkonzentration der Oligonukleotide in der Mikrotiterplatte

unverändert war und gegebenenfalls das Volumen durch Millipore-H₂O ergänzt werden. Das Volumen in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte sollte 5µl nicht unterschreiten, um eine regelrechte Aufnahme von DNS-Lösungen durch den Roboter zu gewährleisten. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt, 1min bei 3000rpm, um die Probe am tiefsten Punkt der einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte zu sammeln.

3.1.5 Aufbringen der Oligonukleotide auf aktivierte Objektträger

Das Aufbringen der Oligonukleotide auf aktivierte Objektträger erfolgte mit Hilfe eines Roboters (Beecher Instruments, Silver Springs, MD). Am Roboterarm können bis zu 16 Nadeln angebracht werden, die in die Mikrotiterplatte eintauchen, dabei ein Volumen von 0,25µl aufnehmen und davon anschließend ca. 5nl auf jeden Objektträger aufbringen ("spotten"). Für den Oligonukleotid-Chip wurde nur eine Nadel verwendet. Jeder Punkt (Spot), der auf die Oberfläche aufgebracht wurde, besteht aus Oligonukleotiden, die sich jeweils in einer Vertiefung der Mikrotiterplatte befindet. Der Punkt (Spot) hat einen durchschnittlichen Durchmesser von 200µm. Zwischen jedem Plattenpositionswechsel wurden die Nadeln in einer Waschstation mit Milliporewasser gewaschen (2s) und durch Vakuum getrocknet (5s). So wurde eine Verschleppung von Oligonukleotid-Lösungen vermieden. Der Roboter stand in einer abgeschlossenen Kammer, damit keine Verunreinigungen durch die Umgebungsluft möglich sind und die Luftfeuchtigkeit in dieser Kammer wurde während des Laufes auf 70% gehalten.

Die fertigen Oligonukleotid-Chips wurden vor Gebrauch für weitere 2h bei dieser Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach konnten sie mehrere Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Qualität der Oligonukleotid-Chips mit der Zeit abnimmt, so daß die Primer-Elongationsreaktion auf möglichst frisch hergestellten Oligonukleotid-Chips durchgeführt werden sollte. Um festzustellen, ob die Amino-modifizierten Oligonukleotide eine feste Bindung mit der aktivierten Oberfläche der Objektträger eingehen, wurde ein Fluoreszenz-markiertes Oligonukleotid

aufgebracht. Dieses modifizierte Oligonukleotid enthält am 5'-Ende eine Aminogruppe und am 3'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (5'-A-12308G-Cy3, NH₂-cttggggcctaagaccaatg-Cy3-3'). Die auf diese Weise hergestellten DNS-Chips wurden hoch-stringenten Waschbedingungen ausgesetzt, um zu überprüfen, ob die immobilisierten Oligonukleotide auf der Glasoberfläche haften blieben.

3.1.6 Deaktivieren der Objektträger-Oberfläche

Um nach dem Aufbringen der Oligonukleotide die noch aktiven Oberflächengruppen zu deaktivieren, wurden drei verschiedene Deaktivierungsprozeduren getestet. Die Deaktivierung sollte verhindern, daß die während der Primer-Elongation zugesetzten Fluoreszenz-markierten Nukleotide (Cy3-dUTP) an die aktiven Oberflächengruppen binden, und somit den Fluoreszenzhintergrund minimieren und das Signal zu Hintergrundverhältnis erhöhen.

Zur Deaktivierung wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Verfahren angewendet. Entsprechend Guo et al. wurden die Objektträger zunächst für 2 Stunden bei einer Luftfeuchtigkeit von 70% inkubiert und anschließend für 30 min in einer 10% Ammoniumhydroxid-Lösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Ammoniumhydroxid-Lösung wurde verworfen und die deaktivierten Objektträger wurden mehrmals (mindestens 3x) mit Millipore-Wasser gewaschen und durch Zentrifugieren bei 900rpm getrocknet. Die Objektträger wurden bis zur weiteren Verwendung für Primer-Elongationsreaktionen bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Gemäß dem Verfahren nach Beier et al., wurden die Objektträger für 2 Stunden in einer Lösung von 6-Amino-1-Hexanol (50mM) und Diisopropylethylamin (150mM) in N,N-Dimethylformamid bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Objektträger zunächst mit N,N-Dimethylformamid, dann mit Aceton und

schließlich mit Millipore-Wasser gewaschen. Zum Trocknen der Objektträger schloß sich ein Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur für 5min und 900rpm an.

3.1.7 Prähybridisierung von DNS-Chips

Zur Prähybridisierung von DNS-Chips wurden diese für 40min in einer bereits auf 42°C vorgewärmten Prähybridisierungs-Lösung (1% BSA, 0,5% SDS in 6xSSC) im Brutschrank inkubiert. Die Objektträger wurden dann durch mehrmaliges Eintauchen in Millipore-H₂O bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger für 2min bei 95°C in Millipore-H₂O getaucht. Die Objektträger wurden für 10min bei Raumtemperatur getrocknet. Bis zur Primer-Elongationsreaktion sollten die Objektträger im Dunkeln gelagert werden. Diese Prähybridisierungslösung sollte immer frisch angesetzt und am gleichen Tag verwendet werden.

3.2 Präparation gesamt-genomischer DNS aus Vollblut

Lösungen:

50 mM HCl (autoklavieren)

Lysepuffer :

10 mM Tris-HCl

400 mM NaCl

2 mM Na₂EDTA pH 8,0 (autoklavieren)

10 % SDS

Proteinkinase K (20 mg/ml Lysepuffer)

Phenol (äquilibriert mit Tris-HCl) pH 8,0

Chloroform

10 ml gefrorenes Zitratblut wurde bei 37°C aufgetaut, mit 4-fachem Volumen (40 ml) 50 mM KCl versetzt und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde 10min bei 4°C und 3000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet wenn nötig mehrmals mit KCl zur Entfernung von Erythrozyten gewaschen, so daß sich nur noch kernhaltige Zellen im Pellet befanden. Das erhaltene Lymphozytenpellet wurde in 3ml Lysepuffer, 200µl 10% SDS und 50µl Proteinkinase K resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde 2½ Stunden bei 55°C oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde eine Extraktion mit einem Volumenteil Phenol vorgenommen. Das Plastikröhrchen wurde 5min per Hand geschwenkt und danach 15min bei 5000rpm zentrifugiert. Die obere Phase, welche die gewünschte DNS enthält, wurde in ein neues Plastikröhrchen überführt, mit einem Volumenteil Chloroform versetzt und vorsichtig per Hand geschwenkt. Um die gewünschte Phasentrennung zu erhalten wurde erneut 10 min. bei 5000rpm zentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Falls nach der Chloroform-Extraktion noch eine ausgeprägte Interphase vorhanden war, wurde eine zweite Chloroform-Extraktion angeschlossen. Die in der wäßrigen Oberphase enthaltene DNS wurde durch Zugabe von zwei Volumenteilen 100% Ethanol ausgefällt. Die ausgefällte DNS wurde an einem Glasstab aufgewickelt und mit kaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurde die DNS luftgetrocknet und in Aqua bidest gelöst.

Eine weitere Methode zur Isolierung von gesamt-genomischer DNS bestand in der Verwendung des QIAmp DNS Blood Mini Extraction Kit von QIAgen. Die nach diesen Methoden isolierte gesamt-genomische DNS wurde als Matrize für die PCR-Amplifikation verwendet.

3.3 Bestimmung der DNS-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von gelösten DNS-Proben wurde bei 260nm am Spektralphotometer vorgenommen. Um Verunreinigungen mit Proteinen auszuschließen, wurde auch die Extinktion (E) bei 280nm gemessen. Hierzu wurden geeignete Verdünnungen der DNS-Proben (1:10; 1:100; 1:200) hergestellt. Eine E_{260} von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50µg/ml Doppelstrang-DNS. Bei DNS von hoher Qualität und Reinheit beträgt der Quotient E_{260}/E_{280} etwa 1,8. Liegt der Wert des Quotienten unter 1,8, so deutet dies auf eine Proteinverunreinigung hin. Ist der Wert größer als 1,8, muß man davon ausgehen, daß die DNS-Probe mit RNS verunreinigt ist, oder aber die DNS stark degradiert ist und in Form von Einzelsträngen vorliegt. Die DNS-Proben wurden für weitere Untersuchungen bei -20°C gelagert.

3.4 Prinzip der PCR

Die PCR (polymerase chain reaction, Saiki et al, 1985) ist eine Methode, welche zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren dient. Mit Hilfe dieser *in vitro*-Methode können in einem Reaktionszyklus spezifische DNS-Sequenzen mit hoher Ausbeute amplifiziert werden. Die PCR entspricht dem Reaktionsprinzip der Replikation der DNS *in vivo*. Für die Amplifikation einer spezifischen DNS-Sequenz benötigt man eine DNS-Polymerase, welche die schrittweise Addition von Desoxyribonukleinsäuren an das 3'-Ende einer DNS-Starterkette (Primer) katalysiert. *In vivo* benötigt die DNS-Polymerase für den Beginn der Replikation einen (RNS)-Primer, ein Nukleinsäuremolekül, welches mit dem Matrizenstrang hybridisiert und von der Polymerase als Starter benutzt wird. *In vitro* wurden künstlich synthetisierte Oligonukleotide verwendet. Diese Oligonukleotide sind so gewählt, daß sie zu beiden Seiten der Zielsequenz an die komplementären Stränge der „Matrizen“-DNS binden und somit den gewünschten Bereich amplifizieren.

Für die Vervielfältigung *in vitro* mittels PCR wurden somit folgende Komponenten benötigt:

- eine DNS-Matrize,
- DNS-Polymerase,
- alle vier Desoxyribonukleotide,
- Oligonukleotid-Primer,
- ein geeignetes Puffersystem.

Die PCR besteht aus drei wichtigen Teilschritten, die sich zyklisch wiederholen :

1. Denaturierung der DNS-Matrize (90-95°C),
2. Abkühlen auf die gewünschte Annealing-Temperatur (45°C-65°C), hierbei hybridisieren die Oligonukleotiden mit den jeweiligen komplementären DNS-Strängen
3. Hochheizen auf eine Temperatur von 72-75°C (optimale Temperatur für die Taq-DNS-Polymerase), bei welcher die Verlängerung (Extension), d.h. das Kopieren der beiden Matrizenstränge, abläuft.

Das ständige Wiederholen dieser drei Teilschritte führt zur exponentiellen Vervielfältigung der durch die beiden Oligonukleotide definierten DNS-Sequenz. Die heutzutage verwendete thermostabile Taq-Polymerase hat gegenüber dem ehemals verwendeten Klenow-Fragment der E.coli DNS-Polymerase den Vorteil, daß eine Inaktivierung durch den sich wiederholenden Denaturierungsschritt vermieden wird und nach jeder Denaturierung neue Polymerase zugegeben werden muss.

3.5 Amplifikation von Sequenzabschnitten mitochondrialer DNS mittels PCR

Die Amplifikation von spezifischen Bereichen der mtDNS wurde aus Präparationen gesamt-genomischer DNS in Thermocyclern (TC9700 oder TC2400) der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Für die Amplifikation der gewünschten Bereiche in der mtDNS sind die verwendeten Oligonukleotide in der Tabelle 3.2 aufgeführt. In einem Ansatz von 50µl Gesamtvolumen wurden 100ng Matrizen-DNS eingesetzt.

Pipettierschema :

1 µl	gesamt-genomische DNS (100ng/µl)
5 µl	dNTP-Mix (1mM)
5 µl	10 x PCR-Puffer I
2 µl	10 µM Oligonukleotid
2 µl	10 µM Oligonukleotid
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
34,8 µl	Aqua bidest
<hr/>	
50 µl	Gesamtvolumen

Thermoprofil:

Denaturierung	94°C	5 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C	45 sec	
Annealing	56°C	1 min	
Elongation	72°C	2 min	
Elongation	72°C	10 min	
Inkubation	4°C		

Tab. 3.2: Primer zur PCR-Amplifikation mitochondrialer DNS-Abschnitte

Name	Sequenz	PCR-Produkt (bp)
A 3153 L	5`-tcacaaagcgccttcccc-3`	426
I 3579 H	5`-tatggggaggggggttcatagtagaa-3`	
J 4094 L	5`-ccctacttctaacctccctgttcttat-3`	882
J 4976 H	5`-tccacctcaactgcctgctatgatgg-3`	
S 8301 L	5`-aaagctaacttagcattaac-3`	779
O 9080 H	5`-ttaatggtgatattgctag-3`	
C 9964 L	5`-atgtctccatctattgatgagggttactct-3`	664
C 10628 H	5`-ggagtgggtgttgagggttatgagagt-3`	
D 11158 L	5`-cacccgatgaggcaaccagc-3`	859
D 12017 H	5`-tgagtgagccccattgtgttg-3`	
E 12210 L	5`-aaagtcacaagaactgctaactcatgc-3`	578
E 12788 H	5`-gatataattcctacgccctcagecc-3`	
F 13324 L	5`-tgtaccacgccttctcaaac-3`	1023
F 14347 H	5`-tgatgggggtggtggttg-3`	
P 14456 L	5`-atcgctgtagtatatccaaa-3`	705
R-15161	5`-atattggcctcacgggaggacat-3`	
H 15149 L	5`-tgaggccaaatatcattctgaggggc-3`	903
H 16052 H	5`-atgggtgagtcaatactgggtg-3`	

Die "Annealing"-Temperatur wurde der Schmelztemperatur der Oligonukleotide und die Elongationszeit der Länge der zu amplifizierten PCR-Produkte angepaßt. Im Anschluß an die PCR wurde die Qualität der Amplifikate mittels analytischen Agarosegelen überprüft.

3.6 Amplifikation von langen PCR Produkten mit Hilfe des “Expand Long Template PCR Systems”

Zur Amplifikation von DNS-Fragmenten einer Länge von bis zu 5 kbp wurde das “Expand Long Template PCR System“ von Roche-Boehringer verwendet. Dieses System besteht aus einem Enzym-Gemisch, einer thermostabilen Taq-Polymerase und der thermostabilen Pwo DNS Polymerase. Das Zusammenarbeiten dieser beiden Polymerasen führt zu einem hohen Ertrag an PCR-Produkt und durch die Fähigkeit des Korrekturlesens der thermostabilen Pwo-DNS-Polymerase wird die Fehlerrate minimiert. Mit diesem “Expand Long Template PCR System“ können PCR Produkte bis zu 27 kbp aus genomischer DNS amplifiziert werden.

Pipettierschema :

2	µl	genomische DNS (100ng/µl)
17,5	µl	dNTP-Mix (1mM)
5	µl	10 x PCR-Puffer I (Boehringer/Roche)
2	µl	10 µM Oligonukleotid I
2	µl	10 µM Oligonukleotid II
0,5	µl	DNS Polymerase Mix (3,5 U/µl) (Boehringer/Roche)
21,0	µl	Aqua bidest
<hr/>		
50	µl	Gesamtvolumen

Thermoprofil:

Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	} 10 Zyklen
Annealing	56°C	30 sec	
Elongation	68°C	5 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	} 20 Zyklen
Annealing	56°C	30 sec	
Elongation	68°C	5 min +20 sec	
Elongation	68°C	7 min	
Inkubation	4°C		

Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten für die PCR sind dem Pipettierschema zu entnehmen. Das Thermoprofil des “Expand Long Template PCR Systems“ weicht von dem der normalen PCR etwas ab. Das oben angegebene Thermoprofil hat sich für die Amplifikation von PCR-Produkten der Länge von ca. 5 kbp am geeignetsten herausgestellt.

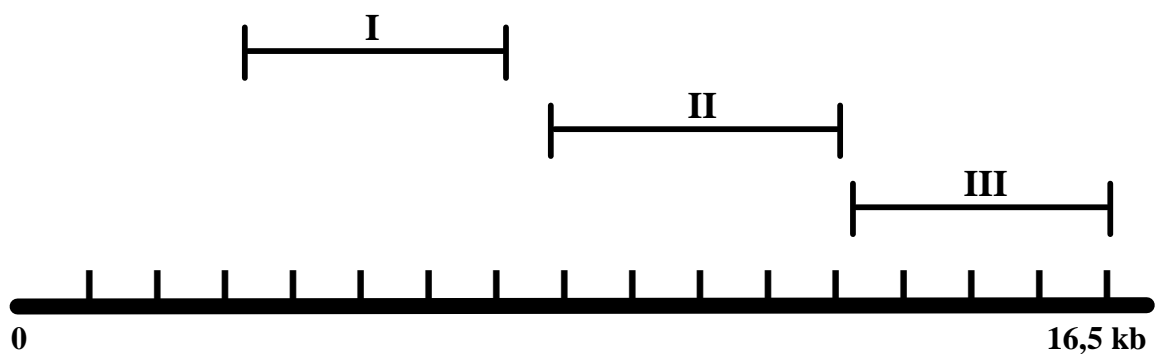
Die auf diese Weise amplifizierten langen PCR-Produkte wurden als Matrize für die asymmetrische-multiplex-PCR, als auch für den Exonuklease-Verdau verwendet.

Für die Amplifikation von langen PCR-Produkten, die als Matrize für die asymmetrische-multiplex-PCR zum Einsatz kamen, wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt:

Tab. 3.3: Primer zur PCR-Amplifikation langer mitochondrialer DNS-Abschnitte

Name	Sequenz	PCR-Produkt (bp)
A 3153 L	5`-ttcacaagcgccttccccc-3`	I 3964 bp
L 7117 H	5`-agggtgtagcctgagaataggggaaa-3`	
L-7925	5`-ggcggactaatcttcaactcctacat-3`	II 4190 bp
R-12115	5`-gtcgggggttgagggataggaggaga-3`	
E 12210 L	5`-aaagctcacaagaactgctaactcatgc-3`	III 3842 bp
H 16052 H	5`-atgggtgagtcaatacttgggtgg-3`	

Abb. 3.3: Abdeckung mitochondrialer DNS mit drei langen PCR-Produkten, welche als Ausgangsmaterial für die asymmetrische-multiplex-PCR Reaktion eingesetzt wurden.

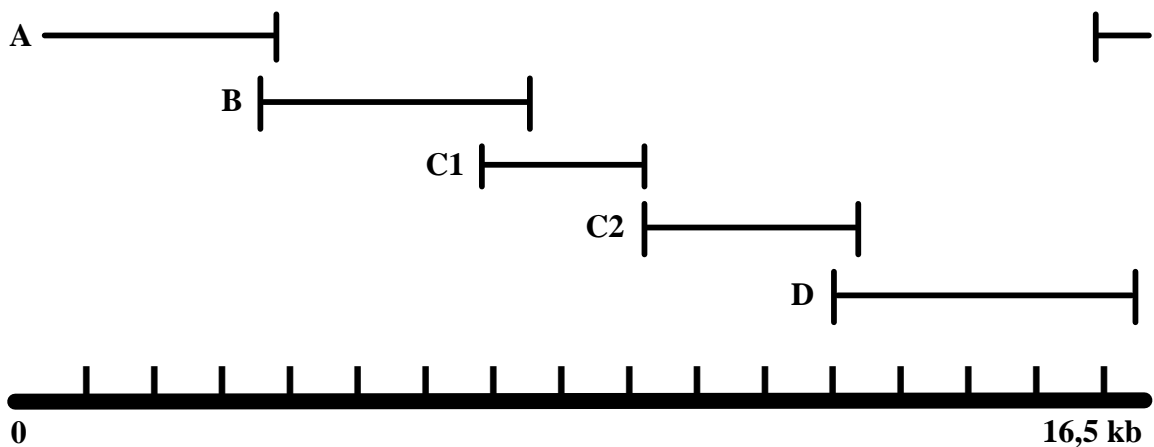


Oligonukleotide für die Amplifikation von langen PCR-Produkten, welche anschließend mit Exonuklease verdaut wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tab. 3.4: Primer zur PCR-Amplifikation langer mitochondrialer PTO-modifizierter DNS-Abschnitte

Name	Sequenz	PCR-Produkt (bp)
15421 L	5`-aatcaaagacgcctcggct-3`	A 4422
PTO mtDNS R-3343	5`- tggt tacaatgaggagtaggag-3`	
A 3153 L	5`-ttcaciaaagcgccttcccc-3`	B 3964
PTO mtDNS R-7117	5`- gtg tagcctgagaataggggaaa-3`	
L 6325 L	5`-cctccgtagacctaaccatcttctct-3`	C1 2485
PTO mtDNS R-8810	5`- gtt ggtgtaaagagtgaggca-3`	
N 8821 L	5`-tctataaacctagccatggc-3`	C2 3196
PTO(5x) mt R-12017	5`- tgagt gagccccattgtgttg-3`	
T 11741 L	5`-tgcctagcaaaactcaaacta-3`	D 4311
PTO(5x) mt R-16052	5`- atgggt gagtcaatactgggtgg-3`	

Abb. 3.4: Abdeckung mitochondrialer DNS mit PTO-modifizierten PCR-Produkten



3.7 Herstellung einzelsträngiger DNS-Sequenzen

3.7.1 Synthetische 50mer Oligonukleotid-Targets

Primer-Elongationsreaktionen wurden mit einzelsträngigen DNS-Targets durchgeführt. Zu Beginn der Arbeit dienten synthetische Oligonukleotide (siehe Tabelle 3.5) der Validierung der Methode (siehe Abb. 4.9).

Tab. 3.5: Synthetische Oligonukleotid-Targets und entsprechende Allel-spezifische Oligonukleotid-Sonden

Name	Sequenz
Oligo 50mer A Hin	5`-tgtattagcaaactcatcactaga a atcgactacacgacacgtactacg-3`
Oligo 50mer C Hin	5`-tgtattagcaaactcatcactaga c atcgactacacgacacgtactacg-3`
Oligo 50mer G Hin	5`-tgtattagcaaactcatcactaga g atcgactacacgacacgtactacg-3`
Oligo 50mer T Hin	5`-tgtattagcaaactcatcactaga t atcgactacacgacacgtactacg-3`
Amino-mt-6995 A	NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTcgtagtagctgtcgtgtagtacgata
Amino-mt-6995 C	NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTcgtagtagctgtcgtgtagtacgac
Amino-mt-6995 G	NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTcgtagtagctgtcgtgtagtacgatg
Amino-mt-6995 T	NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTcgtagtagctgtcgtgtagtacgatt

3.7.2 Herstellung von asymmetrischen-PCR-Produkten

Um einzelsträngige Produkte zu erhalten wurde eine asymmetrische-PCR durchgeführt. Hierzu wurden doppelsträngige-PCR-Produkte als Matrize verwendet. Da bei der asymmetrischen-PCR die Amplifikation nicht wie bei der konventionellen PCR

exponentiell verläuft, mußte als Ausgangsmaterial eine größere Menge (ca.1µg) an Matrize eingesetzt werden. Der Unterschied zur normalen PCR besteht darin, dass bei der asymmetrischen-PCR nur ein Primer eingesetzt wird und die Elongation in eine Richtung verläuft. Für die asymmetrische-PCR galten die gleichen Bedingungen wie bei der konventionellen PCR, nur die Anzahl der Zyklen wurde auf bis zu 50 erhöht.

3.7.3 Herstellung von asymmetrischen-multiplex-PCR-Produkten

Die Amplifikation von asymmetrischen-multiplex-PCR-Produkten verläuft im Grunde genau so wie die asymmetrische-PCR. Der einzige Unterschied liegt darin, daß mehrere DNS-Abschnitte gleichzeitig in einer Reaktion amplifiziert werden. Für jeden SNP-enthaltenden Sequenzabschnitt wurde in der Regel ein Primer verwendet. Falls SNPs in kurzem Abstand (10-20 bp) in der DNS Sequenz auftraten, wurden nicht zwei einzelne, sondern nur ein Primer für die Amplifikationen solcher Abschnitte eingesetzt. Diese Primer waren ca. 50 Nukleotide vom SNP entfernt, da Experimente mit synthetischen Oligonukleotide gezeigt hatten, daß ein Überhang von 25 Nukleotide für die Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion ausreichend ist. Zur Etablierung der Methode wurde ein 426 bp langes PCR-Produkt mitochondrialer DNS als Matrize verwendet, in dem 9 SNPs enthalten waren. Für die asymmetrische Amplifikation von SNP-enthaltenden Sequenzabschnitten dieser Matrize wurden zunächst 6 Primer (R-3235, R-3288, R-3339, R-3433, R-3495 und I3579H, siehe Tabelle 2.5) in derselben Reaktion eingesetzt.

3.7.4 Herstellung von asymmetrischen-multiplex-PCR-Produkten ausgehend von langen Doppelstrang-PCR-Matrizen

Drei „long-range“ PCR-Produkte von 3842 bp, 3947 bp und 4472 bp dienen in drei unabhängigen asymmetrischen-multiplex Reaktionen als Matrize. Die in den drei separat durchgeführten Reaktionen verwendeten Primer sind unten aufgeführt.

Tab. 3.6: Primer zur Herstellung asymmetrischer-PCR-Produkte

“Long-range” Produkt I (3153 - 7117)

Primer : R-3235, R-3288, R-3339, R-3433, R-3495 und I3579H, R-4185, R-4254, R-4373, R-4392, R-4563, R-4678, R-4685, J4976H, R-7028

“Long-range” Produkt II (7925 - 12115)

Primer : R-8400, R-8900, R-8980, O9080H, R-10450, R-10520, R-11310, R-11390, R-11502, R-11520, R-11830, T11860H, D12017H

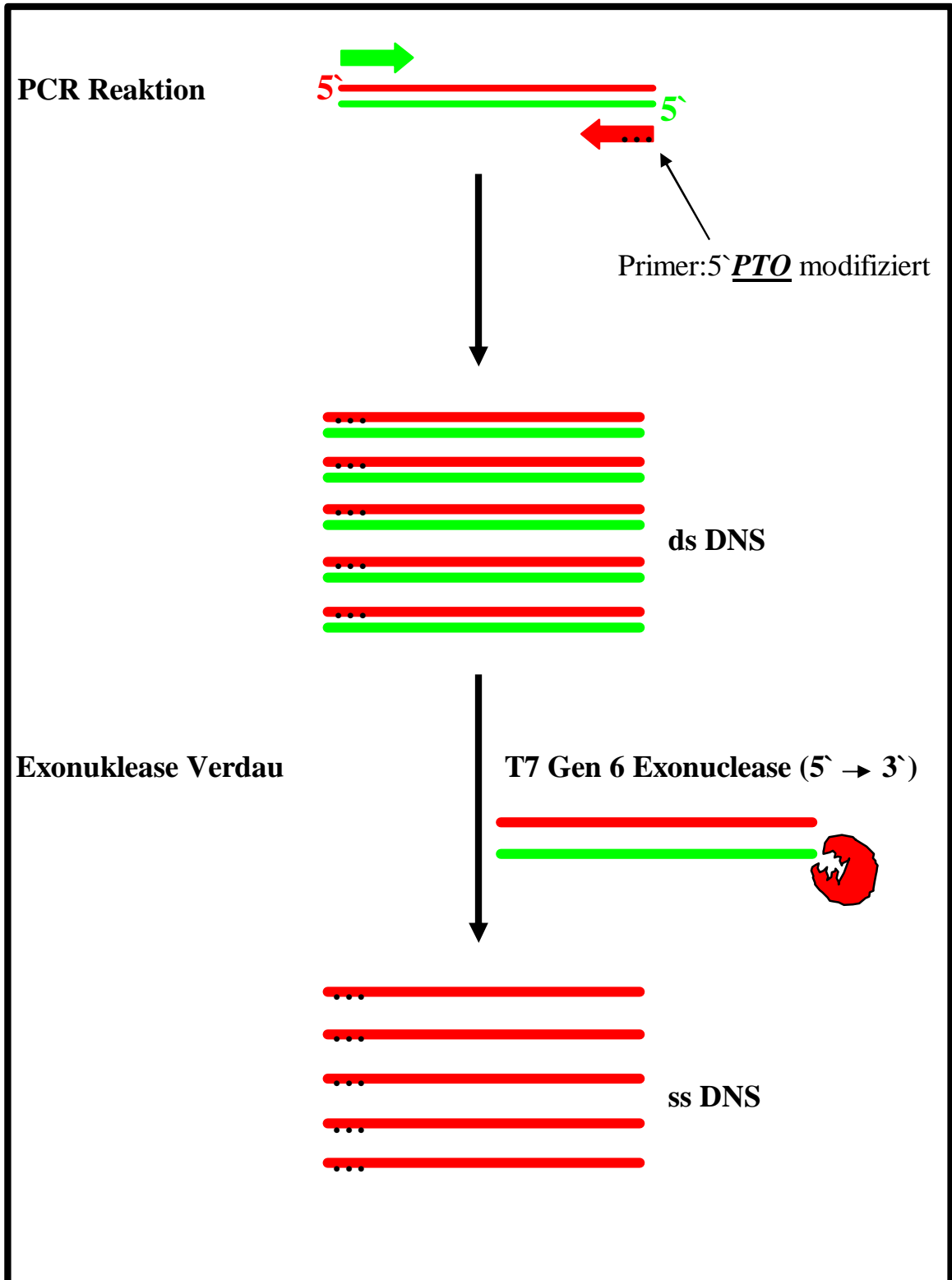
“Long-range” Produkt III (12210 - 16052)

Primer : R-12300, R-12360, R-12430, R-12670, E12788H, R-13415, R-13755, R-14290, F14347H, R-14533, R-14760, R-14960, R-15100, R-15161, R-15260, R-15396, R-15510, R-15650, R-15980, H16052H

3.7.5 Exonuklease-Verdau von PTO-modifizierten PCR-Produkten

Neben der Durchführung einer asymmetrischen-PCR wurde als weitere Möglichkeit Einzelstrang-DNS zu erhalten, eine konventionelle PCR mit einem PTO-modifizierten Primer durchgeführt. Die PTO-Modifikation eines der zwei eingesetzten Primer schützt einen Strang des PCR-Produktes gegen den Verdau mit einer 5'-3' Exonuklease. Nach der PCR wurde das erhaltene Produkt mit T7 gene 6 Exonuklease inkubiert und der unmodifizierte Strang auf diese Weise degradiert. Der Verdau wurde in einem Volumen von 15µl angesetzt. Hierzu wurden 2µg PCR-Produkt, 3µl 5xT7 gene 6 Puffer und 20 U T7 gene 6 Exonuclease (50 U/µl), für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15min bei 85°C inaktiviert. Die Qualität der verdauten PCR- Produkte wurden mit Hilfe von analytischen Agarosegelen überprüft.

Abb. 3.5: Darstellung der PCR-Amplifikation und des anschliessenden Exonuklease-Verdau von PTO-modifizierten Targets



3.7.6 In-vitro-Transkription

Eine weitere Methode zur Herstellung von Einzelstrang-Nukleinsäuren ist die in vitro Transkription. Bei der in vitro-Transkription wurde je nach Fragestellung ein Strang der DNS in RNS umgeschrieben (transkribiert). Es wurde zunächst eine PCR-Reaktion durchgeführt, bei der ein Oligonukleotid, T7-R-3339 (5'-aaacgacggccagtgaattgtaatac-gactcactataggectacaatgaggagtaggaggt-3'), am 5'-Ende eine Promotorsequenz für die T7-RNS-Polymerase enthielt. Das zweite in der PCR eingesetzte Oligonukleotid A 3153 L entsprach der Sequenz 5'-ttcacaagcgccttcccc-3'. Das erhaltene PCR-Produkt mit der Promotorsequenz für die T7-RNS-Polymerase, wurde in einer Transkriptionsreaktion mit unmarkierten Ribonukleosidtriphosphaten eingesetzt. Der Transkriptionsansatz enthielt folgende Komponenten: 3µl PCR-Produkt (100 ng/µl), je 2µl von allen vier Ribonukleosidtriphosphaten (10mM), 2µl 10xPuffer und 1,5µl T7-RNS-Polymerase (10 U/µl) in einem Volumen von 20µl. Dieser Transkriptionsansatz wurde für 60min bei 37°C inkubiert und anschließend wurde die T7-RNS-Polymerase für 10min bei 65°C inaktiviert. Die Transkriptionsprodukte wurden aufgereinigt und mittels analytischen Agarosegelen überprüft.

3.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion wurden alle eingesetzten konventionellen als auch symmetrischen PCR-Produkte gereinigt, da die Salzkonzentration und vor allem die dNTPs die Primer-Elongationsreaktion entscheidend beeinflussen. Für die Reinigung von PCR-Produkten wurde das QIAquick PCR-Purifikation-Kit (Qiagen) verwendet. Hierzu wurden zu einem Volumen PCR-Produkt 5 Volumen PB-Puffer zugegeben und gut gemischt. QIAquick spin columns (Säule mit Filter) wurden in die mitgelieferten 2ml Röhrchen gestellt und das gesamte Volumen

(PCR-Produkt + PB-Puffer) auf die Säule gegeben. Anschließend wurde in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Filtrat wurde verworfen. Gewaschen wurde die Säule durch Zugabe von 0,75 ml PE-Puffer und Zentrifugation für eine Minute und 13.000 rpm. Das Filtrat wurde erneut verworfen. Es wurde nochmals ohne Zugabe von Lösungen zentrifugiert, um die letzten Reste des PE-Puffers zu entfernen. Anschließend wurden 50µl Ampullen-Wasser auf die Säule gegeben und erneut für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat enthielt die gewünschte DNS. Die Qualität der DNS wurde mit Hilfe von analytischen Agarosegelen überprüft.

3.9 Ethanolfällung zur Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Ethanol/Natriumacetat –Fällung ist eine weitere Methode, um verdünnte PCR-Produkte zu konzentrieren bzw. nach der PCR oder nach einem Exonuklease-Verdau den Puffer zu wechseln. Zu PCR-Produkten wurde das 2,5 fache Volumen Ethanol, 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5 und 1µl Glykogen (20 µg/µl) zugegeben und für eine Stunde bei –80°C gefällt. Im Anschluß daran wurden die Fällungsansätze 30min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum Waschen 70% Ethanol zugestzt. Es erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt für 30min bei 4°C und 14000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in Ampullen-H₂O aufgenommen. Die Konzentration der PCR-Produkte wurde photometrisch bestimmt. Die gereinigten Produkte wurden bis zur Verwendung bei –20°C gelagert.

3.10 Agarose-Gel-Elektrophorese

10x TBE-Puffer:

Tris	1,34 M
Borsäure	45 mM
EDTA	25 mM

Auftragspuffer:

15 %	Ficoll
0,25 %	BPB
in 1x TBE	

Je nach Größe der zu analysierenden DNS-Fragmente wurde 1-2% Agarose in 1 x TBE unter Kochen gelöst. Während des Abkühlens auf 60°C wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzu gesetzt und die Gellösung anschliessend in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1 x TBE-Puffer aufgefüllt, die in Auftragungspuffer vorbereiteten Proben auf das Gel geladen und die DNS elektrophoretisch getrennt. Ein parallel geladener DNS-Längenstandard diente zur Interpretation des Ergebnisses. Nach dem Lauf wurde die DNS auf einem UV-Transilluminator (305 nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis photographisch dokumentiert.

3.11 Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion

3.11.1 Prinzip der Primer-Elongationsreaktion in Lösung

Als einer der ersten Versuche wurde die Allel-spezifische Primer-Elongationsreaktion in Lösung durchgeführt. Hierzu wurde eine DNS-Polymerase benötigt, die zwischen korrekter Basenpaarung und Basenfehlpaarung am 3'-Ende unterscheiden konnte. D.h.

es wurden jeweils zwei parallele PCR-Reaktionen durchgeführt, bei dem das eine Oligonukleotid vollständig mit seinem 3'-Ende paart und im anderen Fall keine vollständige Paarung am 3'-Ende stattfindet. Es konnte gezeigt werden, daß ein PCR-Produkt in der Reaktion nur erhalten wurde, in welcher das 3'-Ende des Primers zur Matrize vollständig komplementär war. Das Funktionieren der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion in Lösung war die Voraussetzung für die Entwicklung einer Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion auf einer festen Phase.

3.11.2 Prinzip der Primer-Elongationsreaktion auf einer festen Phase

In dieser Arbeit sollte das Prinzip der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion zum Nachweis von Einzelbasenaustauschen (SNPs) in der DNS eingesetzt werden (siehe Abb. 4.1). Hierzu wurden 5'-aminomodifizierte Oligonukleotide auf die Oberfläche von aktivierten Objektträgern immobilisiert. Es wurden zur Detektion von einem Basenaustausch zwei Oligonukleotide immobilisiert, welche zwar die identische Sequenz besitzen, sich aber in der letzten 3'-Base unterscheiden. Durch Hybridisierung eines Targets, welche die komplementäre Sequenz enthält, sollte anhand einer enzymatischen Reaktion eine Verlängerung des Oligonukleotides durch das Anknüpfen von markierten und nicht markierten Desoxynukleotiden stattfinden. Im Fall einer Komplementarität der gesamten Sequenz der Targets zum immobilisierten Oligonukleotides abgesehen von der terminalen 3'-Oligonukleotid-Base, sollte keine Verlängerung des Oligonukleotides erfolgen. Da während der Verlängerung des Oligonukleotides Fluoreszenzfarbstoff eingebaut werden sollte, würde man nur dort ein Signal erwarten, wo die gesamte Sequenz des Oligonukleotides mit der Matrize, einschließlich des 3'-Endes, komplementär ist. D.h. die Diskriminierung des Allelzustandes findet über die 3'-Base statt.

3.11.3 Durchführung der Primer-Elongationsreaktion

Um eine enzymatische Reaktion auf der Objektträger-Oberfläche durchzuführen, bedarf es hierfür eines geschlossenen Systems. Die auf der Glasoberfläche immobilisierten Oligonukleotide wurden von einer Kammer (Frame Seal Hybridisation Chambers, Biozym) umschlossen. In diese Kammer wurde der gesamte Reaktionsansatz zugegeben und mit einer Folie verschlossen.

Reaktionsansatz

X	µl	Target
5,0	µl	10xPuffer (ohne MgCl ₂),
1,8	µl	MgCl ₂ (25mM),
2,0	µl	dNPT-Mix (1mM) ohne dTTP
1,0	µl	TMA-Chlorid (300mM)
0,8	µl	Cy3-dUTP
1,0	µl	Red Taq Polymerase
X	µl	Ampullen-H ₂ O
<hr/>		
27	µl	Gesamtvolumen

Die Objektträger wurden zur Durchführung der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion in einen Thermo-Cycler der Firma MJ-Research, welcher speziell für die Verwendung von Objektträgern konzipiert sind, gestellt und das eingestellte Thermoprofil aufgerufen.

Thermoprofil

3	min	90°C	} 15 Zyklen
30	sec.	90°C	
30	sec.	56°C	
20	sec.	90°C	
		4°C	

3.11.4 Waschen der Objektträger

Das Waschen der Objektträger nach der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion ist notwendig, um die nicht eingebauten Fluoreszenz-markierten Nukleotide vollständig von der Glasoberfläche zu entfernen. Hierzu wurden verschiedene Protokolle getestet. Die Objektträger wurden nach Guo et al. 15min in 1% Ammoniumhydroxid gestellt und anschließend mehrmals mit Millipore-Wasser gewaschen. Ein weiterer Waschschrift nach Beier et al. bestand darin, die Objektträger für 2min in einer Lösung von 2,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat und 1% (v/v) SDS bei 95°C zu inkubieren und anschließend mehrmals mit Millipore-Wasser zu waschen, um die Salze zu entfernen. Die Objektträger wurden zum Trocknen bei Raumtemperatur für 5min bei 900rpm zentrifugiert.

3.11.5 Messung der Fluoreszenzintensitäten mittels Laser-Scanner

Um die Auswertung der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion vorzunehmen, wurden die Fluoreszenz-Signale mit Hilfe eines Laser-Scanners erfaßt. Die Anregung des eingebauten Farbstoffes (Cy3-dUTP) erfolgte bei einer Wellenlänge von 532nm. Bei dieser Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum des Farbstoffes. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird an einer Mikroskoplinse gebündelt und mittels eines Photomultipliers detektiert und das erhaltene Bild als monochromes 16-bit TIFF-Format gespeichert.

3.11.6 Bildanalyse mit IP Lab Spectrum

Zur Bildanalyse wurde das Programm IPLab Spectrum (Scanalytics) mit Mikroarray-spezifischen Erweiterungen (Y.Cheng) verwendet. Die Bilder mußten zunächst in Adobe Photoshop® um 50% verkleinert werden, da das Programm für Bilder des Beecher Instruments Scanners geschrieben wurde, der eine halb so hohe Auflösung hat, wie der GMS 418 Laserscanner. In IPLab wurde ein der Größe des Arrays entsprechendes Gitter über das Bild gelegt, so daß jeder Punkt (Spot), an dem eine Oligonukleotid-Sonde aufgebracht wurde und nach der Allel-spezifischen Primer-Elongationsreaktion ein Signal zeigte, in einem Kästchen lag. Das Programm berechnet nach einem Algorithmus die Größe des Spots (in Pixeln), seine Gesamt- und Durchschnittsintensität, festgehalten in der Pixelskalierung 1 = schwarz, 65535 = weiß, und den lokalen (pro Kästchen) Durchschnittshintergrundanteil („Hintergrund-Rauschen“). Ein Schwellenwert einer Mindestgröße von 30 Pixeln pro Spot erlaubte eine teilweise Unterdrückung von Fehlsignalen, wie z.B. durch Staubverunreinigungen auf dem Objektträger verursacht. Durch die Koordinaten im Gitter wird die Zuordnung der einzelnen Spots zu den Daten mit Hilfe der GIPO-Datei (Genes In Plate Order, Ermolaeva et al. 1998) möglich. Alle berechneten Werte, z.B. Spotgröße, Intensität und Hintergrund, wurden in einer Tabelle („IPLab-Tabelle“) gespeichert.

3.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Service-Abteilung (Leitung: Dr. Richard Reinhard) des Max-Planck-Institutes für Molekulare Genetik durchgeführt. Hierzu wurden die zu untersuchenden PCR-Produkte vorher mit dem QIAquick PCR-Purification-Kit der Firma Qiagen gereinigt und mit den entsprechenden Oligonukleotiden bei der Service-Abteilung abgegeben. Für die Sequenzierung wurden die automatischen Sequenziermaschinen ABI Prism 373 und 377 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems verwendet. Die Sequenzierreaktionen wurden mit Dye-Terminatoren (direkt

an die Didesoxynukleotide dekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch eine von Perkin Elmer gelieferte Systemsoftware.

3.13 Inter-Alu SNP-Projekt

3.13.1 Herstellen von Inter-Alu-PCR-Produkten

Um Einzelnukleotid-Austausche (SNPs) in Inter-Alu-Abschnitten gesamtgenomischer DNS zu untersuchen, wurden Inter-Alu-PCR-Produkte ausgehend von YAC-Klonen als Matrize hergestellt. In Agaroseblöckchen befindliche YAC-Klone wurden in einer PCR, unter Verwendung eines Inter-Alu XhoI-CI-2 Primers (siehe Tabelle 2.7) eingesetzt. Diese Agaroseblöckchen wurden mehrmals mit ddH₂O gewaschen, auf 57°C erhitzt und 2µl für eine Inter-Alu-PCR entnommen.

PCR-Reaktionsansatz

2 µl	YAC-Klon
10 µl	dNTP-Mix (jedes dNTP 1mM)
5 µl	10 x PCR-Puffer I (Boehringer/Roche)
3 µl	10 µM Inter-Alu XhoI-CI-2 Oligonukleotid
0,5 µl	2 U Taq-DNS-Polymerase PE
29,5 µl	Aqua bidest
<hr/>	
50 µl	Gesamtvolumen

PCR-Thermoprofil

Denaturierung	94°C	3 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	50°C	30 sec	
Elongation	72°C	90 sec	
Elongation	72°C	7 min	
Inkubation	4°C		

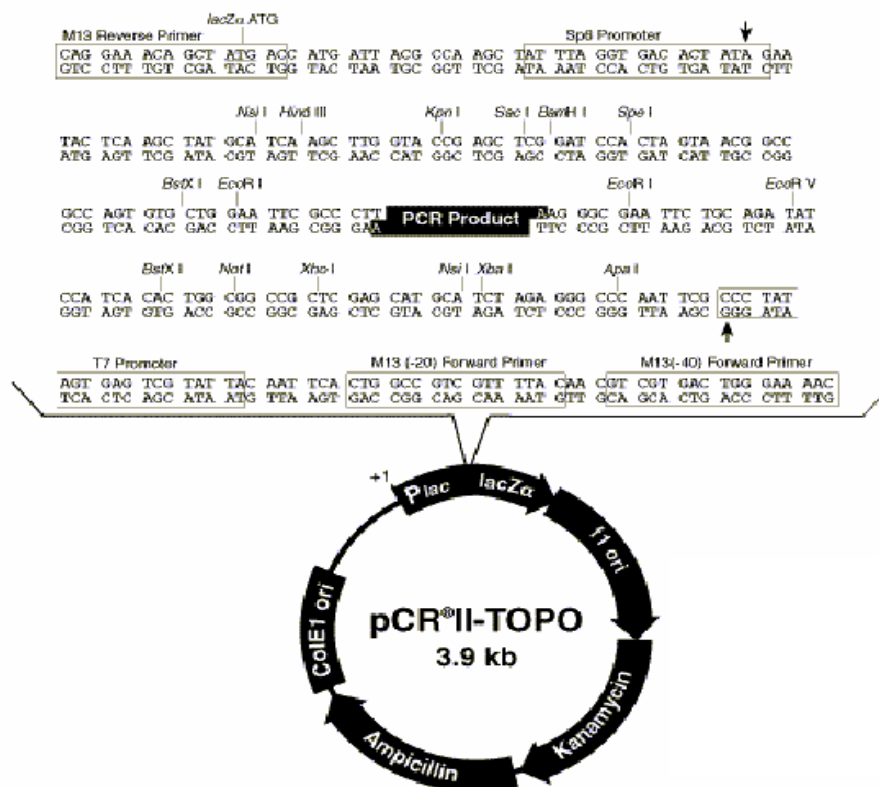
Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf ein 6%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das Gel wurde für 2min in 100ml 0,1% AgNO₃ gefärbt. Anschließend erfolgte ein kurzer Waschschrift mit Wasser. Danach wurde das Gel in 100ml 280mM NaOH/0,02% Formaldehyd-Lösung inkubiert, bis die DNS-Banden sichtbar wurden. Die Entwicklerlösung wurde verworfen und die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser gestoppt. Das Gel wurde nochmals gewaschen und mittels einer Tischlampe wurden die erhaltenen Produkte im Gel sichtbar gemacht und das Ergebnis photographisch dokumentiert.

3.13.2 Ligation von Inter-Alu-PCR-Produkten

Für die Ligation von DNS-Fragmenten ist die T4-DNS-Ligase besonders geeignet, da sowohl komplementäre "sticky ends" als auch "blunt ends" ligiert werden können. Bei der Ligation eines Vektors mit einer Insert-DNS sollte das molare Verhältnis 1 : 3 betragen. Für die Ligation und anschließende Transformation wurde der TOPO-TA Cloning-Kit verwendet. Der pCR II-Vektor enthält an beiden 5`Enden einen T-Überhang. Die Taq DNS Polymerase ist in der Lage, am Ende der Amplifikation ein

dATP an das 3`Ende anzuhängen. D.h. diese DNS-Fragmente wurden mit Hilfe dieser überstehenden Enden durch Wiederherstellung der Phosphat-Zucker-Bindung mittels der T4-DNS-Ligase enzymatisch verbunden. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur in einem Endvolumen von 5µl. Der TOPO-TA Kit enthielt den Reaktionspuffer, den pCR-TOPO-Vektor und die T4-DNS-Ligase. Zu diesem Ansatz wurde 1,5 µl Inter-Alu-PCR-Produkt hinzugefügt, 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur Verwendung für den Transformationschritt auf Eis gestellt.

Abb. 3.6: Schematische Darstellung des pCRII-TOPO Vektors (die Positionen der Restriktionsschnittstellen sind in der Sequenz wiedergegeben).



3.13.3 Transformation von Top 10 F⁻ kompetenten Zellen

Die aus der Ligation enthaltenen Vektoren wurden in Bakterienzellen eingebracht, um so zahlreiche Zellen in einer Kolonie anzuzüchten, die alle das identische Stück Fremd-DNS (DNS-Klon) in ihrem Vektor-Plasmid enthalten. Diese Übertragung genetischer Information durch Vektor-DNS in einen Zellstamm bezeichnet man als Transformation. Für die Transformation des pCR II Vektors (+Insert) wurden TOP10F⁻ kompetente Zellen der Firma Invitrogen verwendet. Die kompetenten Zellen wurden von -80°C auf Eis aufgetaut, 2µl 0,5 M β-Mercaptoethanol, 2µl Ligationsansatz zugegeben, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 sec. bei 42°C (Hitzeschock) inkubiert, sofort auf Eis gestellt und 250µl SOC-Medium hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation des Ansatzes für 60 min bei 37°C auf dem Schüttler. Die vorbereiteten LB-Amp.-Platten wurden mit 4µl 4% X-Gal und 40µl 0,1M IPTG versetzt, ausplattiert und zum Trocknen in einen Brutschrank gestellt. Vom Transformationsansatz wurden 100µl auf die LB-Amp-Platten gegeben, ausplattiert und über Nacht in einen Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurden pro YAC 12 Klone gepickt, in LB-Amp Medium überführt und für 5 Stunden bei 37°C geschüttelt.

3.13.4 Überprüfung der Klone mittels PCR

Zur Überprüfung des ligierten DNS-Fragmentes wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, d.h. es wurde die Bakterienkultur, ohne die Plasmide zu isolieren, einer PCR unterworfen. Da es sich um einen hohen Durchsatz handelte, wurden die PCR-Reaktionen in Mikrotiterplatten durchgeführt. Für die Amplifikation wurden universelle M13 Oligonukleotide verwendet, die in der Vektorsequenz enthalten sind. Die Länge der Amplifikate lag zwischen 500 und 2000 bp.

Reaktionsansatz

1	μl	Bakterienkultur
2	μl	dNTP-Mix (jedes dNTP 1mM)
1	μl	10 x PCR-Puffer, PE
0,4	μl	10μM M13 Oligonukleotid (for.)
0,4	μl	10μM M13 Oligonukleotid (rev.)
0,5	μl	1 U Taq-DNS-Polymerase PE
5,7	μl	Aqua bidest
<hr/>		
10	μl	Gesamtvolumen

Thermoprofil

Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	45 sec	} 30 Zyklen
Annealing	54°C	90 sec	
Elongation	72°C	2 min	
Elongation	72°C	7 min	
Inkubation	4°C		

Die Qualität der Kolonie-PCR-Produkte wurde mit Hilfe von 6%igen Polyacrylamid-Gelen überprüft. Von den positiven Klonen wurden pro YAC 2-4 Klone ausgewählt, gereinigt (Ethanol-fällung in Mikrotiterplatten) und sequenziert.