

2. Methoden

2.1 Methoden für die Zellanzucht

2.1.1 Anzucht von Mikroorganismen in Flüssigkulturen

Für die Aufzucht von Flüssigkulturen wurde die benötigte Menge an LB Medium in einen sterilen Erlenmeyerkolben mit Schikanen bzw. ein steriles Reagenzglas überführt. Um sterile Bedingungen zu erhalten, geschah das Überführen unter einer Sterilbank, welche 20 Minuten vor der Aufnahme der Arbeit eingeschaltet wurde. Es wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte mit einer zuvor abgeflamten Animpföse in die Flüssigkultur überführt. Die Flüssigkultur wurde anschließend bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Des Weiteren wurden Flüssigkulturen auch aus Stammkulturen angesetzt. Hierzu wurde der tausendste Teil der Flüssigkultur aus der Stammkultur entnommen und in die Flüssigkultur überführt.

LB Medium (Luria Bertani):

- 10 g/L NaCl
- 10 g/L Pepton 140
- 5 g/L Hefeextrakt

Nach dem Lösen der Reagenzien in sterilem Wasser wurde der pH Wert mit NaOH auf 7 eingestellt. Anschließend wurde das Medium unter Verwendung von feuchter Hitze sterilisiert (20 Minuten bei 121°C)

2.1.2 Herstellung von Agarplatten

Zur Herstellung von Agarplatten, die unter anderem für die Transformation benötigt wurden, wurden zu 500 mL LB Medium 10 g Agar gegeben. Um eine Selektion zu ermöglichen, folgte die Zugabe eines Antibiotikums, nachdem die Lösung auf etwas abgekühlt war. Bis auf wenige Ausnahmen wurde in der vorliegenden Arbeit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/mL verwendet. Es wurden etwa 20 mL Medium in eine Platte gegossen, diese blieben bis zum Erkalten unter der Sterilbank.

2.1.3 Herstellung von Glycerinkulturen

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden diese mit sterilem Glycerin in einer Endkonzentration von 10% (w/v) versetzt und sofort auf -80°C abgekühlt.

2.1.4 Herstellung von kompetenten Zellen

Es wurde eine Variante der Calciumchlorid Methode verwendet. Hierzu wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte gepickt und diese in 3 mL LB Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend folgte das Überimpfen der Übernachtskultur auf 500 mL LB Medium. Die Inkubation erfolgte, bis die Suspension eine OD von 0,5 bei 600 nm erreicht hat. Nachdem die Inkubation abgeschlossen war, wurde die Bakteriensuspension sofort auf Eis abgekühlt. Es folgte das Ernten der Zellen bei 3000 g, 4°C für 10 Minuten. Das erhaltene Pellet wird in 150 mL eiskaltem Puffer TFB I gelöst und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4°C und 3000 g an. Das Pellet wurde in 20 mL Puffer TFB II resuspendiert und zu je 200 µL aliquotiert. Die so erhaltenen Aliquots werden sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

Benötigte Puffer:

TFB I:

- CaCl₂ 10 mM
- RbCl₂ 100 mM
- KAc 30 mM
- MnCl₂ 50 mM
- Glycerine 15% (v/v)

TFB II:

- CaCl₂ 75 mM
- RbCl₂ 10 mM
- MOPS 10 mM
- Glycerin 15% (v/v)

2.2 Klonierung

2.2.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen und spalten Nukleinsäuren sequenzspezifisch. Bei diesen Sequenzen handelt es sich um palindromisch Sequenzen, die meistens eine Länge von vier bis sechs Basen haben. Das Vorhandensein dieser Enzyme wurde erstmals 1962 von Arber und Dussoix beschrieben (ARBER und DUSSOIX, 1962 Jul).

2. Methoden

Sie wurden für die verschiedenen Aufgaben verwendet. Zum Beispiel zur Herstellung von rekombinanten Vektoren, die als Template für die *in vitro* Expression dienten. Durch die Verwendung von Restriktionsendonukleasen war es möglich Rekombinationsversuche durchzuführen und sie zu überprüfen. Das Ergebnis eines Restriktionsverdau wurde mithilfe einer Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die Aktivität der Enzyme richtet sich stark nach dem verwendeten Puffer. Die für die Reaktion benötigten Puffer wurden vom Hersteller mitgeliefert. Bei einigen Enzymen ist der Zusatz von BSA notwendig um eine optimale Enzymaktivität zu erreichen.

Bei einem Doppelverdau, bei dem zwei Enzyme zur gleichen Zeit die vorhandene DNA zerschneiden, ist die Auswahl eines geeigneten Puffers notwendig. Bei der Verwendung von ungünstigen Pufferbedingungen kann es zur unspezifischen Spaltung der DNA kommen, was als Sternaktivität beschrieben wurde (Polisky *et al.*, 1975 Sep). Die Inkubation erfolgte meist bei 37°C. Die Zeiten der Inkubation richteten sich nach der Aktivität der verwendeten Enzyme und nach dem Zweck des Restriktionsverdau. Hier wurde zwischen einem analytischen Ansatz und einem präparativen Ansatz unterschieden. Es kamen Zeiten von 30 Minuten bis zu 16 Stunden vor. Bei einem präparativen Restriktionsverdau, welcher als Grundlage für die Rekombination diente, war eine Inaktivierung des Enzyms notwendig. Dies geschah durch Hitzedenaturierung. In einigen Fällen ist für die Folgereaktion, neben der Inaktivierung der Enzyme, ein anderer Puffer notwendig. In einem solchen Fall erfolgte die Aufreinigung über Silicatmembranen.

2.2.2 Dephosphorilierung

Bei dem Einführen von PCR Produkten in einen zuvor geschnittenen Vektor, muss eine Religation des Plasmides verhindert werden. Dies wurde dadurch erreicht, indem man die 5' Phosphatgruppe der Plasmid DNA entfernte. Hierzu wurde die alkalische Phosphatase aus Shrimps (Roche, Mannheim) verwendet. Für die Dephosphorilierung von 2 µg geschnittener DNA wurde 1 U alkalische Phosphatase eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Anschließend wurde das Enzym durch Hitzedenaturierung inaktiviert. Hierzu erfolgte eine Inkubation von 20 Minuten bei 60°C.

2.2.3 Phosphorilierung

Kommerziell erhältliche Oligonukleotide tragen aufgrund des Syntheseverfahrens keine 5' Phosphatgruppe. Die Phosphatgruppe ist für die Ligation in einen zuvor geschnittenen Vektor essenziell. Zur Anfügung der Phosphatgruppe wurde die T4 Polynucleotidkinase (New England Biolabs) verwendet. Dieses Enzym überträgt in der Anwesenheit von ATP das γ Phosphat des

2. Methoden

ATP's auf die 5'Hydroxylgruppe des Oligonukleotides. Als Puffer diente der 10 x Ligasepuffer, welcher dem Kinaspuffer entspricht, jedoch zusätzlich ATP (10 mM) enthält. Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Inaktivierung des Enzymes durch Denaturierung. Hierzu wurde der Ansatz 20 Minuten bei 65°C inkubiert.

Die Phosphorylierung wurde ebenfalls zur radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden verwendet. Hierbei wurde ausschließlich radioaktives ^{32}P γ ATP verwendet. Nach der Reaktion der Polynukleotidkinase ist es notwendig, das nicht umgesetzte radioaktive ATP von den markierten Oligonukleotiden zutrennen. Es wurde das QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) verwendet. Der Erfolg der Reaktion wurde durch die Messung der eingebauten Radioaktivität bestimmt. Abschließend folgte die Überprüfung mithilfe eines denaturierenden Polyacrylamid-Gels. Von diesem wurde eine Autoradiografie angefertigt, wodurch der Erfolg der Polynukleotidkinase Reaktion und der anschließenden Aufreinigung bewiesen werden konnte.

2.2.4 DNA Ligation

Bei der *in vitro* Rekombination wird ein neuer DNA-Abschnitt in einen Vektor eingeführt. Hierzu wird die einzuführende DNA und die Vektor DNA zur Reaktion gebracht. Bei der Reaktion kommt es zur Bildung neuer Phosphordiesterbindung unter Rezirkulierung der Vektor DNA. Diese Reaktion wird durch die T4 DNA Ligase unter ATP Verbrauch katalysiert. Die T4 DNA Ligase ist in der Lage sowohl stumpfe, als auch kohäsive Enden wieder zu schließen. Die Effektivität ist bei kohäsiven Enden wesentlich höher. Um eine Steigerung der Effektivität bei stumpfen Enden zu erreichen wurde der Reaktion 10% PEG 6000 zugesetzt (Harrison und Zimmerman, 1984).

Die Reaktion, der Rezirkulierung von kohäsiven Enden, erfolgt in 1 x Ligasepuffer (NEB) bei 16°C für 2 Stunden. Bei der Verwendung von stumpfen Enden wurde die Inkubationszeit auf 16 Stunden erhöht, wobei die Temperatur auf 4°C abgesenkt wurde. Bei der Insertion von Fremd-DNA in eine Vektor, wurde das molare Verhältnis zwischen Insert und Vektor-DNA auf 1 : 5 eingestellt und zum Start der Ligation 10- 100 U T4 DNA Ligase (NEB) hinzugesetzt.

Ein besonderer Fall der Ligation stellte die Anheftung von Linker, welche für die Polymerasekettenreaktion benötigt wurden, dar. Da nicht mit dephosphorylierter DNA gearbeitet werden konnte, wurde ein 50 facher molarer Überschuss an Linker DNA eingesetzt.

2.2.5 Transformation

Für die Transformation wurden chemisch kompetente Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Es folgt die Zugabe der zu transformierenden DNA. Hier wurde zwischen einem

2. Methoden

Ligationsansatz und einem fertigen Plasmid unterschieden. Von einem Ligationsansatz wurden 5 µL und von einem fertigen Plasmid 1 ng eingesetzt. Es schloss sich eine Inkubation von 30 Minuten auf Eis an, wobei die Proben alle 5 Minuten geschüttelt wurden. Nach der Lagerung auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden unterzogen und danach sofort für 3 Minuten auf Eis abgekühlt. Auf die erkalteten Zellen wurden 700 µL LB Medium gegeben und diese bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Agarplatten mit einem Selektionsmarker ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Plasmid DNA

Für die Isolierung von Plasmid DNA war es notwendig die Zellen aufzuschließen. Hierzu wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet. Hierbei werden die Bakterien mit einem Gemisch aus SDS und NaOH behandelt, was zur Denaturierung der Proteine und der Solubilisierung der Zellmembran führt. Darüber hinaus wird auch die enthaltene DNA denaturiert. Durch die Zugabe von Kaliumacetat wird der pH Wert gesenkt, was zur Renaturierung der DNA führt. Dabei verhalten sich chromosomale und Plasmid DNA unterschiedlich. Während die Plasmid DNA vollständig renaturiert, ist das aufgrund der Größe bei der chromosomalen DNA nicht möglich. Diese fällt zusammen mit den denaturierten Proteinen aus. Die Zugabe von Kaliumacetat führt auch zur Bildung des schwer löslichen Kaliumdodecylsulfats, welches ebenfalls ausfällt. Durch Zentrifugation ist es möglich, die ausgefallenen Bestandteile von der DNA-haltigen Lösung abzutrennen. Da für die nachfolgenden Reaktionen sehr saubere DNA benötigt wurde, schlossen sich weitere Reinigungsschritte an. Es wurde hier zwischen „Mini-Präp“ mit einem Kulturvolumen von ca. 3 mL und „Maxi-Präp“ mit einem Kulturvolumen 200 mL unterschieden. Bei den „Mini-Präps“ erfolgte die weitere Reinigung über Glasfasermembranen. Man macht sich hierbei die Eigenschaft der DNA zu nutze, das sie unter Hochsalzbedingungen an Glas bindet. Die Elution erfolgt mit sinkendem Salzgehalt.

Im Gegensatz dazu wird bei der „Maxi-Präp“ ein Anionenaustauscher verwendet, bei dem die Bindung der DNA bei geringer Salzkonzentration und die Elution bei hoher Salzkonzentration erfolgte. Darüber hinaus nutzt man bei der Elution noch die Verringerung der Affinität durch die Änderung des pH Wertes aus. Da unter den geschaffenen Hochsalzbedingungen die meisten Enzyme nicht arbeiten, schloss sich eine Fällung mit Isopropanol an.

2. Methoden

Diese beiden Systeme werden von verschiedenen Herstellern angeboten. In dieser Arbeit wurden Plasmidpräparationskits der Firmen Qiagen und Macherey & Nagel verwendet.

2.3.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäure aufzukonzentrieren bzw. diese von unerwünschten Salzen zu trennen wurden die Nukleinsäuren mit verschiedenen Alkoholen behandelt. In Gegenwart von monovalenten Salzen fällt die DNA aus und kann durch Zentrifugation pelletiert werden.

Die DNA-haltige Lösung wird mit einem Zehntel des Volumens an 3 M Natriumacetatlösung pH 5,5 und dem 2,5 fache Volumen an kaltem, absolutem Ethanol versetzt. Die Lösungen werden gut gemischt und für mindestens eine Stunde bei -20°C gelagert. Bei geringer DNA Konzentration wurde die Inkubation nicht bei -20°C sondern für 30 Minuten bei -70°C durchgeführt. Es folgte die Zentrifugation bei 4°C und 13000 g für 30 Minuten. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das erhaltene Pellet wird mit 70%igem, kaltem Ethanol gewaschen, wobei es zur Entfernung der störenden Salze kommt. Nach erneuter Zentrifugation von 15 Minuten bei 13000 g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet kurz in der Speed Vac getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in TE Puffer aufgenommen. Das Volumen richtete sich nach der gewünschten Konzentration.

Bei sehr geringen Ausgangskonzentrationen wurde der Fällung noch Glycogen (50 µg/mL) hinzugesetzt, welches die Fällung unterstützt.

Neben dem Ethanol wurde auch Isopropanol für die Fällung verwendet. Bei der Isopropanolfällung, wurde nicht das 2,5 fache Volumen sondern nur ein 0,7-faches Volumen verwendet. Nach dem Mischen der Reagenzien wurde das Gemisch sofort, ohne weitere Inkubation bei 13000 g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Die Entfernung von Isopropanol ist etwas schwieriger und bedarf eines gründlichen Waschens mit 70%igem Ethanol. Die Isopropanolfällung wurde hauptsächlich für die Aufkonzentrierung des Eluates der Plasmidisolierung (Maxi-Präp) verwendet.

2.3.3 Sequenzierung

Nach der erfolgten Rekombination wurde der Erfolg in einem ersten Schritt durch das Herausschneiden des eingefügten DNA Abschnittes mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kontrolliert. Um eine Gewissheit über die genaue Sequenz zu erhalten, wurde die eingefügte DNA sequenziert. Hierzu wurde die Methode des Kettenabbruchs nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) verwendet. Diese Reaktion wurde von der Firma Agowa durchgeführt und die erhaltenen

Sequenzen mithilfe des AlignX Moduls (Invitrogen) miteinander verglichen. Nur absolut korrekte Sequenzen wurden weiter verwendet.

2.3.4 Gelelektrophorese

Die Standardmethode zur Auftrennung von Nukleinsäuren ist die Elektrophorese. Sie wurde verwendet, um den Erfolg von Restriktions- und Polymerasekettenreaktionen nachzuweisen. Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Mobilität von Biomolekülen im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Größe und Ladung der Moleküle sowie der Porengröße des verwendeten Trägermaterials. Man spricht hier vom Molekularsiebeffekt. In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden Nukleinsäuren werden zwei verschiedene Arten der Elektrophorese eingesetzt. Hierbei handelt es sich um die Agarosegelelektrophorese, welche für Moleküle ab einer Größe von 100bp angewendet wurde. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde für kleinere Moleküle verwendet.

2.3.4.1 Agarosegelelektrophorese

DNA Abschnitte mit einer Größe von mehr als 100bp wurden mithilfe der Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt. In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden Nukleinsäure wurde die Konzentration der Agarose gewählt. Die Konzentrationen lagen zwischen 0,8 und 2%. Die entsprechende Menge an Agarose wurde abgewogen und mit TBE Puffer auf das zuvor berechnete Volumen aufgefüllt. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem vollständigen Schmelzen der Agarose wurde diese auf Schlierenbildung kontrolliert. Es folgte die Zugabe von Ethidiumbromid (1µg/mL) und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. In diesem wurde ein Taschenformer (Kamm) eingesetzt. Das Gel wurde für 30 Minuten erstarren gelassen und anschließend der Taschenformer entfernt. Das so vorbereitete Gel wurde in eine Gelkammer gelegt und mit TBE Puffer überschichtet. Den Proben wurde DNA Probenpuffer hinzugesetzt und diese in die vorgeformten Taschen gegeben. Die Kammer wurde geschlossen und eine Spannung von 110 V angelegt. Der DNA Probenpuffer enthielt ein Farbmärker (Bromphenolblau) wodurch die Lauffront während des Gellaufs sichtbar war.

Nachfolgend sind die Materialien für die Elektrophorese aufgelistet:

Tabelle 1: Lösung für die native Agarose-Gelelektrophorese

TBE Puffer	DNA Probenpuffer
100 mM Tris	30 % Glycerin
100 mM Borsäure	0,1 % Bromphenolblau
2 mM EDTA	0,1 % Xylenxanoblau

2. Methoden

Für die Dokumentation wurde eine BioRad Geddoc 2000 verwendet.

Radioaktiv markierte Proben, welche durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, wurden für die Autoradiografie eingesetzt. Hierzu wurden die Gele für 40 Minuten in 5%iger TCA Lösung geschwenkt und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Geltdrockner 4050 (UniEquip) getrocknet. Das getrocknete Gel wurde daraufhin in eine Phosphorimagerkassette gelegt und mit einem Phosphorscreen abgedeckt. Die Auswertung des Phosphorscreens erfolgte am Storm 840 (Molecular Dynamics) mittels ImageQuant (Molecular Dynamics).

2.3.4.2 Elution aus nativen Agarosegelen

Für die selektive Reinigung von zum Beispiel mittels Restriktionsenzymen geschnittene DNA wurden die Proben auf einem Agarosegel aufgetrennt. Bei der Agarose handelte es sich um Low Melting Agarose (Serva) welche einen sehr niedrigen Schmelzpunkt hat. Des Weiteren wurde für das Aufreinigen aus Agarosegelen kein TBE-Puffer sondern TAE (40mM Tris/Acetat, 2 mM EDTA). Nach der Auftrennung wurde die DNA durch das interkalierte Ethidiumbromid auf dem UV Tisch sichtbar gemacht. Es wurde darauf geachtet, dass die Zeit des Ausschneidens möglichst kurz war, um die Bildung von Thymindimeren zu verhindern. Aus diesem Grund wurde auch eine Wellenlänge von 302 nm gewählt.

Für die Aufreinigung wurde das Nukleosin Extrakt II Kit (Machery und Nagel) verwendet. Diese Kits enthalten einen Puffer, der hohe Konzentrationen an chaotropen Salzen enthält. In der Anwesenheit von diesen Salzen ist die DNA in der Lage an Glasphasermembranen zu binden (Vogelstein und Gillespie, 1979). Es folgt ein Waschvorgang mit sinkender Salzkonzentration. Die Elution erfolgte entweder mit dem beiliegenden Elutionspuffer oder mit ddH₂O. Die Elution mit Wasser ist immer dann notwendig, wenn die Probe im Anschluss durch die Verwendung von einer SpeedVac aufkonzentriert werden sollte.

2.3.4.3 Polyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamidgel Elektrophorese wurde verwendet, um DNA Moleküle unter 100 bp aufzutrennen. Hierbei ist zwischen der nativen und der denaturierten PAGE-Gele zu unterscheiden. Durch den Zusatz von 7 M Harnstoff ist es möglich die DNA im Gel vollständig zu denaturieren. Hierdurch werden auch eventuell vorhandene Sekundärstrukturen aufgetrennt, welche das Laufverhalten der DNA beeinflussen würde. Darüber hinaus ist die Kapazität eines Polyacrylamidgels deutlich höher als die eines Agarosegels. Es ist also möglich mehr DNA auf das Gel aufzutragen (Sambrook und Russell, 2001).

2. Methoden

Für die Herstellung eines Polyacrylamidgels wurden die Substanzen zusammengegeben, wobei das TEMED als letzte Substanz dazugegeben wurde. Dadurch wurde der Polymerisationsvorgang gestartet.

Tabelle 2 Zusammensetzung 10 % denaturiertes Polyacrylamidgel

Substanzen	Konzentration	
Acrylamid / Bisacrylamid (19:1)	10 %	4 mL
10 x TBE	1 x	2 mL
10 % APS	0,06 %	120 µL
TEMED	0,06 %	12 µL
Harnstoff	7 M	8,4 g
Wasser		Ad 20 mL

Nach dem die Lösung zusammen gegeben wurden, konnten sie zwischen zwei Glasplatten, die durch Abstandhalter von 1 mm getrennt waren, gegossen werden. Abschließend wurde ein Taschenformer eingesetzt. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur.

Zur Vorbereitung des Gellaufs, wurde ein Gel in eine horizontale Elektrophoresekammer (Renner) eingesetzt und diese mit TBE Puffer gefüllt. Vor dem Probenauftrag wurden die Taschen grünlich mit TBE Puffer gespült, um Reste des Harnstoffs zu entfernen. Die Proben wurden bis zur Trockne eingengt und in 1x DNA Probenpuffer (denaturierend) gelöst.

Der Gellauf erfolgte je nach Gelgröße zwischen 200 und 500 V. Die Elektrophorese wurde gestoppt, als die Bromphenolblau Bande des Probenpuffers am Ende des Gels angelangt war. Anschließend wurde die DNA in einem Färbebad (1x TBE, Ethidiumbromid 0,5 µg/mL) für 20 Minuten geschwenkt. Die Dokumentation erfolgte an der Geldoc 2000 (Biorad).

2.3.4.4 SDS Polyacrylamidgel Elektrophorese

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen in einem Polyacrylamidgel ist von mehreren Faktoren abhängig. Hier sind vor allem die Größe, die Form und die Ladung des Proteins zu nennen. Um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, muss der Einfluss der anderen beiden Faktoren minimiert werden. Hierzu verwendet man Natriumdodezylsulfat (SDS). SDS ist ein anionisches Detergens, welches mit den lipophilen Bereichen eines Proteins interagiert. Hiedurch wird das Protein denaturiert, nimmt eine globuläre Struktur ein und ist einheitlich mit negativen Ladungen überzogen. Dabei binden jeweils 1,4 g SDS mit 1 g Polypeptid. Um eine vollständige Denaturierung zu gewährleisten, werden auch alle enthaltenen Disulfidbrücken durch Reduktion aufgetrennt. Hierzu wird der Probe β Mercaptoethanol zugesetzt. Unter diesen Bedingungen

2. Methoden

besteht ein Zusammenhang, zwischen der relativen Mobilität des Proteins und dem Logarithmus des Molekulargewichtes (Weber und Osborn, 1969).

Für eine gute Auftrennung hat sich die Verwendung von diskontinuierlichen Gelen durchgesetzt. In einem solchen Gelsystem werden zwei Gele, das Sammelgel und das Trenngel, übereinander gegossen. Diese beiden Gele unterscheiden sich im pH Wert und in der Konzentration an Acrylamid. Es kommt zu einer lokalen Aufkonzentrierung der Probe am Ende des Sammelgels. Hierdurch haben die Proben alle den gleichen Ausgangspunkt und man erhält deutlich schärfere Banden.

Zur Herstellung des Gels werden die Glasplatten vorher mit Wasser und anschließend mit Ethanol gereinigt. Die Glasplatten werden zusammengesetzt und einen Gießstand (Biorad) gestellt, wodurch auch eine Abdichtung des Gels realisiert wird. Es wurden die Substanzen für das Trenngel zusammengegeben, wobei durch die Zugabe von TEMED die Polymerisation gestartet wurde. Die Lösung wurde zwischen die Glasplatten gegossen, sodass noch genügend Platz für das Sammelgel vorhanden war. Um eine glatte Kante des Trenngels zu erreichen, wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur und war nach 30 Minuten abgeschlossen. Nach dieser Zeit wurde das Isopropanol entfernt und über das Trenngel das Sammelgel gegossen und ein Kamm für die Formung der Taschen eingesetzt. Das gegossene Gel wurde anschließend in die Gelkammer Mini Protean III (Biorad) eingesetzt und diese mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) gefüllt. Die Taschen wurden vor dem Auftrag der Probe gründlich gespült. Die Proben wurden mit 2 x Laemmli Probenpuffer (62,5 mM Tris pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 5 % β Mercaptoethanol, 0,001 % Bromphenolblau) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 13000 rpm. Der Überstand der Zentrifugation wurde auf das Gel aufgetragen (Laemmli, 1970).

2. Methoden

Tabelle 3: Zusammensetzung Polyacrylamidgel für die Proteinauftrennung

Substanzen	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 4 %
Acylamid / Bisacrylamid 30 % (19:1)	6,0 mL	7,5 mL	0,83 mL
Sammelgelpuffer Tris 1 M pH 6,8	-	-	0,63 mL
Trenngelpuffer Tris 1,5 M pH 8,8	3,8 mL	3,8 mL	-
SDS 10 %	150 µL	150 µL	50 µL
Ammoniumpersulfat (10 %)	150 µL	150 µL	50 µL
TEMED	6 µL	6 µL	5 µL
Wasser	5 mL	3,5 mL	3,4 mL

Der Gellauf erfolgte bei 150 V und wurde beendet, nachdem der Farbmaler kurz vor dem Rauslaufen aus dem Gel war. Zur Bestimmung der Größe der Proteine wurde ein Größenstandard, der all Stain (Biorad) mit auf das Gel aufgetragen. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel aus der Kammer genommen und die enthaltenen Proteine angefärbt. Hierbei kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Bei der ersten Methode wurde zur Färbung das Coomassie R250 (Serva) verwendet. Das fertige Gel wurde für 20 Minuten in der Färbelösung geschwenkt und anschließend zur Entfärbung in Entfärbekbad (50 % Wasser, 40 % Methanol, 10 % Essigsäure) gelegt. Hierin verblieb das Gel, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Der Entfärber wurde während der Entfärbung einmal gewechselt.

Um die Sensitivität zu erhöhen, wurden teilweise kolloidale Färbungen eingesetzt. Bei dieser Methode soll es weniger Wechselwirkung zwischen Gelmatrix und Proteinen geben. Dadurch erhält man nach der Entfärbung weniger Hintergrund und ein besseres Signal zu Hintergrundverhältnis. Für diese Methode wurde Roti –Blue (Roth) verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Es schloss sich die Entfärbung (75 % Wasser, 25 % Methanol) an. Anschließend wurde das Gel getrocknet und für die Dokumentation eingescannt.

2.3.4.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Für die Aufreinigung aus einem Polyacrylamidgel soll die Interkalation eines Farbstoffes verhindert werden, da dieser eventuell auch auf spätere Reaktionen einen Einfluss haben könnte. Um die Nukleinsäuren ohne das Anfärben sichtbar zu machen, wurde die Methode des UV-Shadowing verwendet. Die Methode beruht auf der Absorption der Basen bei 260 nm. Ein präparatives Polyacrylamidgel wird auf eine Dünnschichtchromatografieplatte gelegt. Diese Platte enthält einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher durch UV Strahlung von 254 nm angeregt werden kann. Da die DNA in diesem Bereich die Energie absorbiert, entsteht an der Stelle, an der sich DNA befindet, ein Schatten. Dieser Schatten wird dann mit dem Skalpell ausgeschnitten. Das Gelstück zerkleinert wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 500 µL Wasser. Das Reaktionsgefäß wurde bei 55 °C in einem Thermoschüttler für eine Stunde geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Da das Volumen danach sehr groß war, wurde die so gewonnene DNA einer Ethanol-fällung unterzogen.

2.3.5 Gelfiltration

Die Gelfiltration, auch Größenausschlusschromatografie, trennt Moleküle nach ihrer Größe auf. Die stationäre Phase, welche aus verschiedenen quer vernetzten Polysacchariden, wie Dextran oder Agarose besteht, enthält unterschiedlich große Poren. Kleine Moleküle sind in der Lage in diese Poren einzudringen und werden dadurch in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit abgebremst. Größere Moleküle können nicht in die Poren eindringen und werden dadurch nicht abgebremst.

Diese Methode wurde zum Beispiel für die Abtrennung von nicht eingebauten Nukleotiden bei der *in vitro* Transkription verwendet. Eine weitere Anwendung bestand darin, den Puffer zu wechseln, bzw. Harnstoff bei der Elution aus Polyacrylamidgelen zu entfernen.

In Abhängigkeit von dem Volumen der zu trennenden Substanzen wurden entweder NAP 5 oder NAP 10 Säulen (GE Healthcare) verwendet. Bei dem Säulenmaterial handelt es sich um Sephadex G-25. Hier soll als Beispiel nur die Verwendung der NAP 5 Säule beschrieben werden. Die Säule wurde mit 0,5 mL Probe beladen und 10 mL Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Volumen von 1 mL Wasser. Zur Aufkonzentrierung wurde die so behandelte Probe anschließend einer Ethanol-fällung unterzogen.

2.3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA Fragmenten. Sie wurde von K. Mullis (Saiki *et al.*, 1985) entdeckt, der dafür 1993 den Nobelpreis erhielt. Die Polymerase Kettenreaktion beruht auf der komplementären Bindung von Oligonukleotiden am 3' und 5' Ende des zu synthetisierenden Strangs. Die hitzestabile DNA abhängige DNA Polymerase bindet dabei an den partiellen Doppelstrang und verlängert diesen durch Einbau der komplementären Base (Saiki *et al.*, 1988). Die PCR wird in drei Temperaturschritte unterteilt. Bei dem ersten Schritt wird die zu amplifizierende DNA durch Kurzzeitiges Erhitzen auf 94 °C in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Es folgt die Anlagerung der komplementären Oligonukleotide (Primer), was bei einer deutlich niedrigeren Temperatur geschieht. Die Anlagerungstemperatur ist dabei von der Länge und der Basenzusammensetzung des Primers abhängig. Nachdem die Hybridisierung abgeschlossen ist, folgt die Anlagerung der Polymerase. Diese verlängert den wachsenden Strang von 3' nach 5' unter Verbrauch der Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs). Die am häufigsten verwendete Polymerase ist die Taq Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Diese hat keine Korrekturlesefunktion (Eckert und Kunkel, 1990) und hängt an nach beendeter Synthese ein singuläres Adenosin an dem gebildeten Strang an. Es werden also keine vollständig glatten Enden erhalten, was man sich bei einigen Klonierungsstrategien zunutze macht. Wenn es um eine besonders fehlerfreie Amplifikation geht, wurden anstelle der Taq Polymerase auch andere Polymerasen, wie die Pfu aus *Pyrococcus furiosus* verwendet. Diese hat eine deutlich geringere Fehlerrate (Takagi *et al.*, 1997) und produziert keine überhängenden Enden, sodass die mit dieser Polymerase amplifizierten Fragmente, direkt in einen geschnittenen (blunt) Vektor eingefügt werden können. Sollten besonders lange DNA Fragmente amplifiziert werden, wurde eine Polymerasekettenreaktion mit deutlich höherer Prozessivität verwendet. Auch diese sollte eine Korrekturfunktion haben. Hierbei viel die Wahl auf die Phusion hot start (NEB) welche zusätzlich zu ihrer Polymeraseaktivität noch eine Doppelstrang bindende Domäne enthält. Dieses System wurde auch bei der Taq Polymerase angewendet (Yan Wang, 2004).

Durch geeignete Wahl der Primer ist es möglich, terminal überhängende Enden zu generieren. Diese können die Sequenzen von Restriktionsenzymen enthalten. Dadurch können flankierend zwei verschiedene Restriktionserkennungssequenzen angehängt werden, was eine gerichtete Klonierung ermöglicht. Hierbei ist darauf zu achten, dass nicht nur die Erkennungssequenz des Enzyms angehängt wird, sondern noch ein weiterer nicht spezifischer DNA-Abschnitt von 3 – 8 bp Länge. Dies ist für das Binden der Restriktionsenzyme essenziell. Darüber hinaus wurden überhängende Enden auch bei der E-PCR benötigt.

Die Zusammensetzung einer Standard PCR ist in Tabelle 4 aufgeführt. Bei den angegebenen Magnesiumkonzentrationen, sowie dem Temperaturprogramm handelt es sich um Beispiele, die je nach Ausgangsmaterial variiert und optimiert wurden.

2. Methoden

Tabelle 4 Zusammensetzung einer Standard PCR

Komponente	Endkonzentration für Taq Polymerase	Endkonzentration für Phusion Polymerase
10x Reaktionspuffer / 5x Reaktionspuffer HF (Phusion)	20 mM Tris pH 9 50 mM Kaliumchlorid 0,1 % Triton X-100	1x
Magnesiumchlorid 50 mM	2 mM	2 mM
dNTPs je 2,5 mM	0,2 mM	0,2 mM
Primer je 10 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M
DNA Matrize	0,1-0,5 ng/ μ L	0,1-0,5 ng/ μ L
DNA Polymerase	0,05 U/ μ L	0,03 U/ μ L

Diese Komponenten wurden je nach den Anforderungen variiert. Darüber hinaus wurden Zusätze wie Betaine, BSA und DMSO verwendet.

Standardtemperaturprogramm:

Denaturierung	95 °C	5 Minuten
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
Hybridisierung	50-65 °C	30 Sekunden
Elongation	72 °C	10-90 Sekunden
Endsynthese	72 °C	3 Minuten

Die Temperatur für die Hybridisierung richtete sich nach dem verwendeten Primer und wurde zuvor über OligoAnalyzer 3.0 (IDT SciTools) berechnet. Hierbei ist zu beachten, dass mit diesem Programm die Schmelztemperatur der Primer errechnet wurde, von welcher dann 3 °C abgezogen wurden. Die so errechnete Temperatur wurde als Startpunkt der Optimierung genommen. Das angegebene Programm wurde von der zweiten Denaturierung bis zur Elongation 20- 40-mal wiederholt. Die Anzahl der Zyklen ist dabei in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration zu sehen. Nachdem die Endsynthese beendet war, wurden die Proben auf 4 °C gekühlt. Für die Analyse der Proben wurde die Agarosegel Elektrophorese und die fotometrische Messung verwendet. Bei der fotometrischen Messung wirken die nicht verwendeten Primer und die dNTPs in der Lösung störend und mussten zuvor entfernt werden.

2.3.7 Reale Time PCR

Die real time PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von geringsten DNA-Mengen. Die Polymerasekettenreaktion ist eine exponentielle Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Der exponentielle Verlauf der PCR beschränkt sich aber nur auf eine bestimmte Anzahl von Zyklen. Je nach Ausgangskonzentration der DNA werden bestimmte Komponenten, wie z. B. dNTPs oder Primer, schneller verbraucht. Die Reaktion geht in eine Sättigungsphase über, bei der es nicht zu einer weiteren Zunahme der DNA-Menge kommt. Das heißt, zwei Nukleinsäurelösungen mit völlig unterschiedlichen Konzentrationen können nach dem Durchlauf einer Polymerasekettenreaktion absolut identische Banden auf einem Agarosegel ergeben. Aus diesem Grund ist eine Quantifizierung über eine Endpunktbestimmung nicht sehr aussagekräftig in Bezug auf die Ausgangskonzentration.

Eine Lösung dieses Problems stellt die kontinuierliche Beobachtung der Amplifikation während der PCR dar. Die ersten Versuche hierzu wurden mit Ethidiumbromid durchgeführt (Higuchi *et al.*, 1992). Bei der Einlagerung des Farbstoffes in den DNA-Doppelstrang verstärkte sich das fluoreszente Signal, sodass man den Verlauf der Reaktion beobachten konnte. Heute verwendet man anstelle des Ethidiumbromids, meist SYBR green (Zipper *et al.*, 2004). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass hierbei nicht zwischen spezifischen und unspezifischen Produkten unterschieden werden kann. Eine Möglichkeit dies herauszufinden, stellt die Schmelzpunktanalyse als letzten Schritt der quantitativen PCR dar (Nygren *et al.*, 1998, Ririe *et al.*, 1997). Weiter Möglichkeiten bestehen in der Verwendung von Fluoreszenz markierten Sonden (Holland *et al.*, 1991). Diese Tragen einen Reporterfarbstoff und einen Quencher. Bei diesem System wird der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) ausgenutzt. Da sich der Reporter in räumlicher Nähe zum Quencher befindet, wird die gesamte Energie, die vom Reporter abgegeben wird vom Quencher aufgenommen. Die räumliche Nähe ist dadurch gegeben, dass beide Farbstoffe auf dem gleichen Oligonukleotid liegen. Während der PCR lagern sich die für das Gen spezifischen Proben an die DNA an. In der Elongationsphase der PCR trifft die Taq Polymerase auf die Sonde und entfernt sie durch ihre Exonukleaseaktivität. Dabei werden Quencher und Reporter voneinander getrennt, was zur Aussendung von Fluoreszenz führt.

Hierdurch konnte der kontinuierliche Verlauf der PCR dargestellt werden. (Abbildung 2). Der Verlauf gliedert sich hier in mehrere Phasen. Die erste Phase, in der sehr wenige Ausgangsmoleküle vorhanden sind, sodass keine klare Detektion der Fluoreszenz erfolgen kann. Die zweite Phase ist gekennzeichnet durch eine exponentielle Zunahme der Nukleinsäuremoleküle und einen starken Anstieg der Fluoreszenz. Aus jedem Ausgangsmolekül werden zwei neue Moleküle gebildet, wodurch es zum Verbrauch der Reaktionskomponenten kommt. In der dritten Phase, die durch das Plateau in Abbildung 2 gekennzeichnet ist, kommt es zu keiner weiteren Anreicherung der Ausgangsmoleküle.

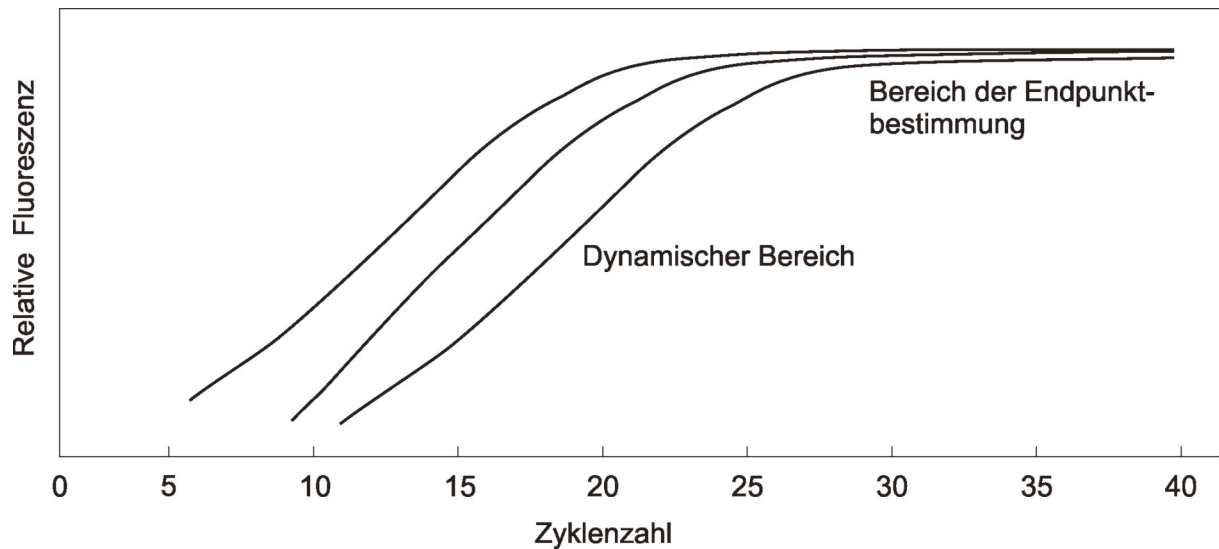


Abbildung 2: Darstellung der kontinuierlichen Detektion während einer PCR mittels SYBR green

Um Rückschlüsse auf die Ausgangskonzentration der DNA ziehen zu können, wird eine Eichgerade angefertigt. Hierbei handelt es sich um die gleichen Nukleinsäuren, die auch als Probe verwendet wurden, jedoch mit bekannter Konzentration. Diese wurden dekadisch verdünnt und ebenfalls in die quantitative PCR eingesetzt. Der Übergang der Phase eins zu zwei, also an dem Punkt, an dem man erstmals das Signal der Probe vom Hintergrundsignal unterscheiden kann, wird Cycle of Threshold (CT) bezeichnet. Bei der Eichgerade werden die Konzentrationen der dekadischen Verdünnung gegen die CT-Werte aufgetragen. Nach erfolgter Reaktion der Proben unterscheiden sich diese ebenfalls durch ihre CT-Werte und man kann dadurch auf die Ausgangskonzentration der Probe schließen.

Für die quantitative PCR wurde das Kit SensiMix dU der Firma Quantace verwendet. Der Ansatz folgte nach den Angaben des Herstellers. Für das Temperaturprofil wurden die Grundeinstellungen des ABI 7300 verwendet. Die Auswertung erfolgte über die von ABI gelieferte Software

2.3.8 Aufreinigung von PCR Produkten

Die Aufreinigung von PCR Produkten wurde über verschiedene Wege realisiert. Es erfolgte zu erst die Kontrolle über die Agarosegel Elektrophorese, ob es sich bei dem PCR-Produkt um ein definiertes Produkt oder um mehrere Produkte handelte. Waren mehrere Produkte zu erkennen und diese durch das Gel gut aufgetrennt, wurde das entsprechende Produkt aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter Elution aus Agarosegelen beschrieben weiter behandelt.

Handelte es sich um eine einzelne Bande, so wurde diese mit einem PCR Purification Kit (Macherey und Nagel) behandelt. Hier wurde das Prinzip ausgenutzt, dass DNA in Anwesenheit von chaotrophen Salzen an Glas bindet (Vogelstein und Gillespie, 1979). Es wurde wie im Handbuch des Kits beschrieben mit

2. Methoden

einer salzhaltigen ethanolischen Lösung gewaschen. Die Elution erfolgte entweder mit dem mitgelieferten Elutionspuffer oder gereinigtem Wasser.

Für eine besonders schnelle Aufreinigung wurde das ChargeSwitch PCR Clean-Up Kit (Invitrogen) verwendet. Hierbei handelte es sich um eine Matrix, die auf metallische kleine Kugeln aufgebracht wurde. Diese Matrix ist in der Lage durch Zugabe geeigneter Puffer die Ladung auf der Oberfläche zu verändern. In einem ersten Schritt wird das zu reinigende PCR-Produkt mit einem Bindepuffer versetzt. Die zu diesem Zeitpunkt positiv geladene Matrix bindet die DNA. Durch Anlegung eines Magnetfeldes werden die Metallkugeln an den Rand des Reaktionsgefäßes gezogen und dort festgehalten. Der Überstand wurde entfernt und durch einen Waschpuffer ersetzt, in welchen die Metallkugeln resuspendiert wurden. Durch stringente Bedingungen war es möglich andere negativ geladene Substanzen von der DNA zu trennen. Auch kürzere DNA Fragmente wie Oligonukleotide wurden hierbei entfernt. Nachdem erneut ein Magnetfeld angelegt, der Waschpuffer entfernt und Elutionspuffer hinzugesetzt wurde, änderte sich die Ladung auf der Oberfläche der Metallkugeln von positiv auf neutral, wodurch die DNA nicht mehr an die Kugeln gebunden war.

2.4 Konzentrationsbestimmung der DNA

2.4.1 Fotometrische Methode

Die Standardmethode zur Bestimmung der Konzentration an Nukleinsäuren ist die fotometrische Messung der optischen Dichte. Die Grundlage der Methode ist die Anhebung von delokalisierten π Elektronen, wie sie in Purin- und Pyrimidinringen der Nukleinsäuren vorkommen, auf ein höheres Energieniveau. Das Absorptionsmaximum der DNA befindet sich bei 260 nm. Eine fotometrische Messung bei dieser Wellenlänge erfolgt in einer Quarzküvette, die keine Eigenabsorption in diesem Wellenlängenbereich hat. Der Wert der Messung von 260 nm wird herangesogen, um die Konzentration zu berechnen. Hierbei ist zu beachten, dass die Werte der Messung zwischen 0,1 und 1 liegen sollten. Eine Linearität ist nur in diesem Bereich nach dem Gesetz von Lambert-Beer gegeben. Für die Berechnung wurden folgende Faktoren verwendet (Tabelle 5)

Tabelle 5 Umrechnung von Absorption in Konzentration von Nukleinsäuren

Nukleinsäure	1 A_{260} entspricht
Doppelsträngige DNA	50 $\mu\text{g/mL}$
Einzelsträngige DNA	33 $\mu\text{g/mL}$
Einzelsträngige RNA	40 $\mu\text{g/mL}$

Darüber hinaus wurde über die fotometrische Messung auch die Reinheit der Nukleinsäure bestimmt. Aromatische Aminosäuren absorbieren bei einer Wellenlänge von 280 nm. Misst man die auch die Absorption bei 280 nm und bildet den Quotienten aus der A_{260}/A_{280} kann man eine Aussage über die

2. Methoden

Reinheit der DNA erhalten. Dieser Wert sollte bei reiner DNA zwischen 1,7 und 1,9 liegen (Sambrook und Russell, 2001).

2.4.2 Bestimmung mittels Agarosegelelektrophorese

Da das Gesetz von Lambert-Beer nur zwischen einer Absorption von 0,1 und 1 genaue Aussagen macht, wird eine weitere Methode benötigt, um geringe Konzentrationen von DNA bestimmen zu können. Ein weiterer Nachteil bei der fotometrischen Messung ist, dass viele Substanzen die Messung beeinflussen können. Unspezifische Amplifikate bei einer Polymerasekettenreaktion, Reste an Nukleotiden oder Reste an Oligonukleotiden würden allen einen hohen Wert der Absorption bewirken ohne, dass man die gewünschte DNA gemessen hätte. Bei der Methode der Konzentrationsbestimmung über das Agarosegel wurde ein definiertes Volumen an Probe auf das Agarosegel aufgetragen und diese wie beschrieben laufen gelassen. Es wurde ein Bild an der Geldoc 2000 (Biorad) aufgenommen und die Quantifizierung erfolgt über die QuantityOne Software (Biorad). Hierbei macht man sich den DNA-Größenstandard zu Nutzen. Von diesem sind die Massen der einzelnen Banden bekannt und es ist möglich die Intensität in ein Verhältnis zu setzen. Daher ist es möglich, nach der Messung der Intensitäten der Proben, die Konzentrationen der Proben zu berechnen. Die Bestimmung von absoluten Konzentrationen ist auch bei dieser Methode schwierig, dennoch eignet sich die Methode gut, um Proben miteinander zu vergleichen.

2.4.3 Bestimmung mit Pico Green

Da das Gesetz von Lambert Beer nur zwischen Absorptionswerten von 0,1 und 1 seine Gültigkeit hat, war es notwendig bei sehr geringen Konzentrationen auf eine andere Methode auszuweichen. Hier wurde die Detektion mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes verwendet. Dieser Farbstoff ist in der Lage selektiv doppelsträngige DNA anzufärben (English *et al.*, 2006).

Pico Green (Molecular Probes) wird als Konzentrat geliefert und wird vor der Verwendung mit TE Puffer pH 7,5 1:100 verdünnt (Matsubara *et al.*, 2004). Für die Messung ist eine Kalibriergerade notwendig. Diese wurde aus unterschiedlichen Konzentrationen an Salmon Sperm DNA angefertigt. Die Salmon Sperm DNA wurde eingewogen und in TE Puffer gelöst. Anschließend wurde mit TE Puffer eine Verdünnungsreihe angelegt. Von der zu messenden Probe wurde 1 μL in 100 μL der Messlösung gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Messung bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 538 nm in einem Fluoroskan Ascent (Thermo).

Mit den erhaltenen Werten der Kalibriergerade und der gemessenen Proben wurde die Konzentration der Probe berechnet.

2.5 *In vitro*-Proteinsynthese

Die zellfreie Proteinsynthese in einem bakteriellem System geht auf die Arbeiten von Nirenberg und Lederman (Lederman und Zubay, 1967, Nirenberg und Matthaei, 1961) zurück.

Die *in vitro* Synthese, welche in dieser Arbeit verwendet wurde, beruht auf einem S 30 System aus *E. coli* D10. Dieses System wurde durch Dr Stiege in der Arbeitsgruppe von Prof Erdmann optimiert. Auf die genaue Herstellung der Lysate soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Es folgt eine methodische Übersicht zur Herstellung eines funktionstüchtigen Expressionssystems.

Die Herstellung des Lysates beginnt mit der Fermentation eines *E. coli* Stammes. Bei der Fermentation handelte es sich nicht um eine Hochzelldichte-Fermentation, sondern die Zellen wurden in der Mitte der logarithmischen Phase geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte unter hohem Druck in einer Zellpresse. Das so entstandene Lysat wird durch mehrfache Zentrifugation bei 30000 x g von nicht aufgeschlossenen Zellen, Zelltrümmern sowie von chromosomaler DNA befreit. Der hieraus resultierende Überstand wird als Rohextrakt bezeichnet. In diesem Extrakt befindet sich noch endogene mRNA, die bei der späteren Translation störend wirken würde (Nirenberg und Matthaei, 1961). Eine kurzzeitige Inkubation bei höherer Temperatur ermöglicht die Freisetzung der an das Ribosom gebundenen mRNA. Diese liegt nach der Freisetzung ungeschützt vor und wird sofort durch die im Lysat enthaltenen Ribonukleasen abgebaut. Das so erhaltene Lysat wird durch Zusatz von weiteren Komponenten zum S-Mix aufgearbeitet. Die Zusammensetzung des S-Mixes ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Zusammensetzung S-Mix

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Aprotinin	2 g/L	2 mg/L
Leupeptin	1 g/L	1 mg/L
Pepstatin	1 g/L	1 mg/L
RNase Inhibitor	40 U/ μ L	100 U/mL
Gesamt tRNA (<i>E.coli</i>)	20 g/L	100 mg/L
Pyrovatkinase	10 g/L	8 mg/L
S30 Lysat	100 %	30 %

Durch die Herstellung des S-Mixes wurden niedermolekulare Komponenten aus dem Lysat entfernt. Da diese für die Reaktion benötigt werden, müssen sie nachträglich wieder hinzugesetzt werden. Sie werden in den T-Mix, in dem hauptsächlich die tRNAs enthalten sind und den E-Mix unterteilt.

Der E-Mix enthält vor allem Komponenten, die für die Energieregeneration benötigt werden. Die Zugabe von reinem ATP wurde schon von anderen Arbeitsgruppen getestet und stellt keine aussichtsreiche

2. Methoden

Methode dar, da dieses sehr schnell abgebaut wird. Um dies zu umgehen, wurden sekundäre Energieregenerationssysteme entwickelt (Kim *et al.*, 2006).

Nachdem die beschriebenen Mixe (Tabelle 6, Tabelle 7, Tabelle 9) zusammengegeben wurden, folgt abschließend die Zugabe von einer mRNA bzw. einer DNA. In dem verwendeten System ist auch die Expression einer DNA-Matrix möglich, wenn diese unter der Kontrolle eines T7 Promotor steht. Um die Transkription zu gewährleisten, ist auch die Zugabe von T7 Polymerase notwendig. Da diese Polymerase mit den endogen vorhandenen Polymerasen in Konkurrenz steht, war es notwendig diese zu inhibieren. Diese Inhibierung erfolgte durch die Zugabe eines Antibiotikum, dem Rifampicin.

Nachfolgend werden die Zusammensetzungen der einzelnen Mixe angegeben.

Tabelle 7 Zusammensetzung des T-Mixes

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
TLM-Puffer	10x	0,7x
Magnesiumchlorid	2 M	4 mM
Dithiothreitol oder MESNA	1 M 2 M	5 mM 2 mM
Polyethylenglycol 2000	50 %	4 %
Rifampicin	20 g/L	20 mg/L
Folsäure	10 mM	100 µM
19 Aminosäuren ohne Leucin	5 mM	400 µM
Leucin	5 mM	150 µM

Der TLM-Puffer wurde in der Dialyse verwendet, welche sich an den Hochdruckaufschluss anschloss. Die Zusammensetzung ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8 Zusammensetzung des TLM-Puffers

Komponenten	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
HEPES pH 7,6	1 M	50 mM
Kaliumacetat	2 M	70 mM
Ammoniumchlorid	E M	30 mM
Magnesiumchlorid	2 M	100 µM
EDTA pH 8,0	0,5 M	50 mM
Natriumazid	10 %	0,02 %

2. Methoden

Tabelle 9 Zusammensetzung des E-Mixes

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
ATP	100 mM	1 mM
GTP	100 mM	1 mM
CTP	100 mM	0,5 mM
UTP	100 mM	0,5 mM
Phosphoenolpyruvat	1 M	30 mM
Acetylphosphat	1 M	10 mM

Diese drei Mixe werden zu einem vollständigen Reaktionsansatz zusammengefasst, der folgende Zusammensetzung hat:

Tabelle 10 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die zellfreie Proteinsynthese

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration in der Reaktion
S-Mix	3-3,2x	1x
T-Mix	3-3,2x	1x
E-Mix	12,5x	1x
DNA Matrize	Variabel	0,5-2 nM
mRNA Matrize	Variabel	50-1000 nM
¹⁴ C-Leucin	1 mM (100dpm/pmol)	50 µM
T7 RNA Polymerase	50000 U/mL	500 U/mL

Die Mixe wurden bei -70 °C gelagert und vor der Benutzung auf Eis aufgetaut. Ein mehrfaches Einfrieren und Auftauen sollte verhindert werden, da der S-Mix jedes Mal an Aktivität verliert. Die Komponenten für die Translationsreaktion lagen als Konzentrat in den drei Mixen vor und wurden jeweils durch Zugabe der anderen Mixe verdünnt. Der TLM-Puffer war sowohl im S-Mix als auch im T Mix vorhanden. Der größte Anteil des Puffers war im T Mix enthalten.

Die Zugabe der T7 RNA Polymerase erfolgte als vorletzter Schritt. Anschließend folgte nur die Zugabe der DNA oder RNA Matrize, wodurch die Reaktion gestartet wurde. Sie erfolgte bei 37 °C für 90 Minuten und wurde meistens in einem Volumen von 25 µL angesetzt. Bei Bedarf wurde die Temperatur auch auf 30 °C reduziert, um eine verlangsamte Reaktion zu erreichen, bei der die Faltung von Proteinen begünstigt wird.

Nach erfolgter Reaktion wurden die Proben aufgeteilt, sodass ein Teil des Ansatzes für die Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel zur Verfügung stand, während der ander für die Szintilationsmessung verwendet wurde.

2.6 Fällung von Proteinen

2.6.1 Fällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Um eine Quantifizierung der gebildeten Proteine vornehmen zu können, wurde die während der Translation eingebaute Radioaktivität mittels Szintillationsmessung bestimmt. Hierzu war es notwendig, die eingebaute Radioaktivität von der zu trennen, die in Form von freiem ^{14}C -Leucin vorlag. Hierzu wurde die TCA-Fällung verwendet. Durch Zugabe von TCA denaturieren die gebildeten Proteine und bilden Aggregate. Diese lassen sich durch Filtration über Glasfaserfilter abtrennen.

Die TCA-Fällung von Proteinen startete mit der Zugabe von 50 μL 0,5 %BSA zu der Probe, welche gefällt werden sollte. Es schloss sich die Zugabe von 3 mL 10 % TCA mit 2 % Pepton an. Nach der Zugabe der TCA-Lösung erfolgte eine Inkubation von 15 Minuten bei 90 °C, durch welche eine Kopräzipitation von radioaktiver Aminoacyl-tRNA verhindert werden sollte. Nach dieser Zeit wurden die Proben für 30 Minuten im Eiswasser abgekühlt. Nachfolgend wurden die Proben gut gemischt und über einen GFC-Filter (Whatman) abgesaugt. Dieser wurde zuvor mit 5 % TCA befeuchtet. Anschließend wurden die zur Fällung verwendeten Reagenzgläser noch zweimal mit 5 %TCA gespült und diese Lösung ebenfalls über den Filter gegeben. Abschließend wurde der Filter durch zweimalige Zugabe von 2 mL Aceton getrocknet und in ein Szintillationsröhrchen überführt. Dieses wurde mit 3,5 mL Radv Protein (Beckman) versetzt und für 30 Minuten leicht geschüttelt. Die Messung der Szintillation erfolgte in einem LS 6000 Szintillationszähler (Beckman).

2.6.2 Fällung mit Aceton

Für die Auftrennung mit Hilfe der SDS-PAGE wurden die Proben zuvor mit Aceton gefällt. Aceton ist ein organisches Lösungsmittel, welches die Löslichkeit der Proteine drastisch verringert. Löslichkeitsverringern ist dabei auf zwei Effekte zurückzuführen. Durch die Zugabe von Aceton wird die dielektrische Konstante herabgesetzt, was zu einer Verstärkung der Anziehungskräfte der geladenen Gruppen auf der Oberfläche der Proteine führt. Der zweite Grund ist die wasseranziehende Eigenschaft des Acetons. Es kommt zu einer Wechselwirkung zwischen Wasser und organischem Lösungsmittel, wodurch auch die Hydrathülle der Proteine empfindlich gestört wird.

Für die Fällung von Proteinen nach einer zellfreien Proteinsynthese wurden 15 μL der Probe mit 35 μL Wasser versetzt und anschließend 200 μL eiskaltes Aceton hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte auf Eis für 15 Minuten. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 13000 g an. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wurde in 20 μL 1x SDS Probenpuffer aufgenommen und in diesem resuspendiert. Zur vollständigen Lösung des Präzipitates wurde dieses für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 1 Minute bei 13000 g an, um sämtliche nicht gelöste Bestandteile zu entfernen. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde dann auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.7 Detektion von β -Strahlung

2.7.1 Szintillationszählung

Die verwendeten Isotope ^{14}C und ^{35}S haben eine relativ kurze Reichweite. Dies erschwert die Detektion, da die Strahlung nicht durch das verwendete Reaktionsgefäß durchdringen konnte. Um die Radioaktivität messen zu können, wurde ein Szintillationscocktail verwendet. Die in dem Cocktail enthaltenen Moleküle werden, durch die beim radioaktiven Zerfall frei werdende Energie, in den angeregten Zustand überführt. In diesem Zustand verweilen sie nur für kurze Zeit und fallen dann zurück in den Grundzustand. Die zuvor aufgenommene Energie wird in Form von Strahlung längerer Wellenlänge abgegeben (Lumineszenz). Die so entstandenen Lichtblitze können dann durch geeignete Reaktionsgefäße detektiert werden. Es bedarf hierzu nur einer Verstärkung, die durch einen Photoelektronenvervielfacher realisiert wird. Zwischen den gemessenen cpm (counts per minute) und den tatsächlichen Zerfällen (dpm) besteht ein direkt proportionaler Zusammenhang. Dieser ist durch die folgende mathematische Gleichung gegeben (Formel 1).

Formel 1 Zusammenhang zwischen radioaktivem Zerfall und gemessenen Lichtblitzen

$$cpm = ZA * dpm$$

ZA ist hierbei die Zählausbeute. Da dieses bei allen vermessenen Proben die gleiche ist, können die gemessenen Lichtblitze (cpm) für weitere Berechnungen verwendet werden.

Ein weiteres Isotop, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, ist das ^{32}P . Die Reichweite dieses Isotops ist wesentlich höher und die Strahlung kann direkt in dem Szintillationszähler LS 6000 (Beckman) gemessen werden. Auch hierbei gilt der in der Formel 1 dargestellte Zusammenhang.

2.7.2 Autoradiografie

Eine Auswertung von Gelen, auf welche radioaktive Proben aufgetragen wurden, konnte über ein Phosphorimager –System realisiert werden. Hierüber ist sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage möglich. Für die Autoradiografie, wurden die Gele nach dem Gellauf getrocknet die getrockneten Gele wurden auf einen Phosphorimagerplatte gelegt und dieser in den meisten Fällen über Nacht inkubiert. Der Phosphorscreen enthält Europium, welches durch die Strahlung in einen angeregten Zustand gehoben wird. Die Halbwertszeit dieses Zustandes ist bei Europium mit drei Tagen sehr lang. Die Phosphorimagerplatte wird nach der Inkubation, mit dem Gel, gescannt. Hierbei tastet ein Laser die Platte komplett ab, wodurch die Moleküle, welche sich im angeregten Zustand befanden, in den Grundzustand zurückfallen. Durch diesen Vorgang wird Energie frei, welche dann in Form von Licht ausgesandt wird. Dieses Licht wird vom Scanner orts- und intensitätsabhängig dargestellt. Es entsteht ein komplettes digitales Abbild des Gels. Für eine genaue quantitative Aussage ist es notwendig, eine Eichreihe mit bekannten Konzentrationen mit auf ein Gel aufzutragen. Hierdurch kann gewährleistet werden, dass man sich bei den Messungen noch im linearen Bereich des Scanners befindet.

2.8 Methoden für die Kompatibilitätsuntersuchungen

Als Voruntersuchungen zur Kompatibilität von Glasoberflächen mit der Polymerase wurden sowohl Glasobjektträger (Roth) als auch Glaskugeln mit einem Durchmesser von 0,25-0,5 mm (Roth) eingesetzt. Die Objektträger wurden zuvor einer Reinigung unterzogen, bei der sie mit gereinigtem Wasser und anschließend mit Ethanol gespült wurden. Die so behandelten Objektträger wurden unter einer Sterialbank getrocknet. Unter dieser wurde ein PCR-Kleberahmen (Eppendorf) auf den Objektträger aufgeklebt. Durch diesen entstand eine Reaktionskammer, in welcher die Polymerasekettenreaktion stattfinden konnte. Hierzu wurde ein normaler PCR-Ansatz in die Reaktionskammer gegeben, diese mit dem beiliegenden Deckel verschlossen und in der PCR-Maschine (Biometra) mit einem gesonderten Block dem Temperaturprogramm unterzogen. Nachdem die Proben das Temperaturprogramm durchlaufen hatten, konnte der Plastikdeckel entfernt werden und die Proben wiedergewonnen werden. Es folgte der Auftrag auf ein Agarosegel. Hierdurch sollte untersucht werden, wie sich verschiedenen Beschichtungen und Passivierung auf die PCR auswirkten.

Um das Oberfläche- zu Volumenverhältnis des Chips zu simulieren, musste die Oberfläche noch weiter vergrößert werden. Hierzu wurden Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,25-0,5 mm (Roth) benutzt. Auch diese wurden zuvor einer Reinigung unterzogen, welche der des Objektträgers ähnlich war. Die Glasperlen wurden mit gereinigtem Wasser gespült und anschließend mit Ethanol. Um zu gewährleisten, dass das Ethanol vollständig entfernt wurde, folgte die Trocknung für 30 Minuten in einer Speed Vac SC 110 (Savant). Für die PCR wurden jeweils 40 mg der Glasperlen abgewogen und diese mit einer fertigen PCR-Lösung überschichtet. Nach erfolgter PCR wurden die Reaktionsgefäße für 30 Sekunden bei 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand für die Analyse entnommen.

2.9 Methoden für die Silanisierungsreaktionen

2.9.1 Reinigung Glasoberflächen und Kapillararrays

Wie sich in dieser Arbeit zeigte und auch aus der Literatur bekannt ist, hat Glas einen negativen Einfluss auch die PCR. Dieser Einfluss sollte durch die Behandlung der Oberfläche mit verschiedenen Silanen reduziert werden. Für eine gleichmäßige Silanisierung ist es von entscheidender Bedeutung einen gesäuberten Glasträger zu verwenden. Das Gleiche gilt auch für die Kapillararrays.

Unbehandelte Glasträger wurden für 15 Minuten in eine Lösung aus einem Teil konzentrierter Salzsäure, einem Teil Wasserstoffperoxid (30%) und fünf Teilen Wasser geschwenkt. Die Lösung hatte eine Temperatur von 80°C. Anschließend wurden sie mehrfach mit gereinigtem Wasser gewaschen. Es folgte die Behandlung mit der alkalischen Lösung, welche aus einem Teil konzentrierter Ammoniaklösung, einem Teil Wasserstoffperoxid (30%) und fünf Teilen Wasser bestand. Auch diese Lösung wurde zuvor erhitzt. Es ist in beiden Fällen eine Gasbildung durch das Wasserstoffperoxid zu beobachten gewesen. Anschließend wurden die Träger mit gereinigtem Wasser gewaschen und für 30 Minuten in Ethanol (96%) geschwenkt. Durch diesen Schritt sollte das gesamte Wasser entfernt werden. Nach der Lagerung in Ethanol wurde dieser durch wasserfreies Aceton ausgetauscht. In dieser Lösung verblieben die Träger 30 Minuten. Das Aceton wurde abgegossen und die Träger unter einer Argonatmosphäre getrocknet und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Wurden die Träger zuvor schon für andere Beschichtungsversuche verwendet, wurde eine geringe Schicht des gesamten Glases abgetragen. Hierzu wurden die Arrays für 5 Minuten in Flusssäure (2%) gelagert und anschließend mehrfach mit ddH₂O gespült. Zur Überprüfung des Abtrags wurde an einigen Arrays der Kapillardurchmesser vor und nach der Behandlung am Mikroskop gemessen.

Nachdem die Objektträger, bzw. die Kapillararrays gereinigt waren, wurden diese mit einem Silan beschichtet. Dieses diente dazu, die inhibierende Wirkung des Glases auf die Polymerase Kettenreaktion zu reduzieren. Des Weiteren sollten auch unspezifische Bindung von Nukleinsäuren mit dem Gel vermindert werden. Darüber hinaus wurde die Silanisierung benutzt, um auf die Glasoberfläche funktionelle Gruppen aufzubringen, die anschließend mit einem Cross Linker umgesetzt werden konnten.

Die Silanisierung wurde in Petrischalen durchgeführt. Hierzu wurde wasserfreies Aceton mit der entsprechenden Menge an Silan versetzt und dieses für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die ersten Experimente der Silanisierung fanden unter Schutzgasatmosphäre (Argon) statt. Es wurde ein luftdicht abgeschlossener Ballon mit Argon gefüllt und in diesem das Silan angesetzt und auf die vorbereiteten Träger gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Träger aus dem Acetonbad mit dem Silan entnommen und mit reinem Aceton abgespült. Es folgte eine Trocknungsphase von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Träger für eine Stunde bei 110 °C gelagert.

2. Methoden

Die folgende Grafik (Abbildung 3) veranschaulicht die Silanisierung schematisch.

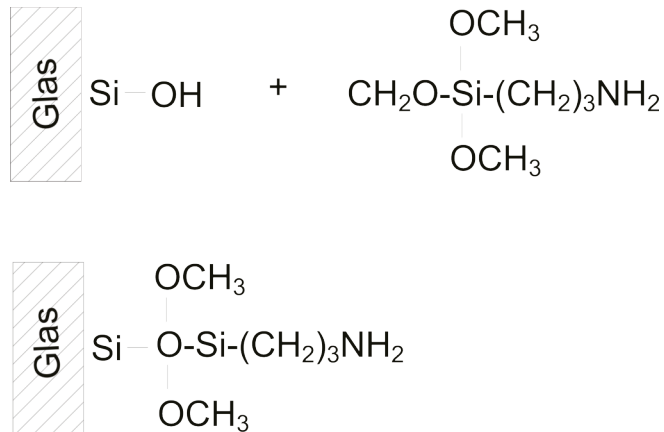


Abbildung 3 schematische Darstellung der Silanisierung

Durch die Silanisierung wurde eine einheitliche Oberfläche geschaffen. Zur Optimierung der Silanisierung konnte die Aminogruppe verwendet werden.

2.9.2 Bestimmung der Silanisierung

Um eine einheitlich und maximale Dichte der Aminogruppen auf der Oberfläche zu gewährleisten, musste die Silanisierung überprüft und optimiert werden. Da durch das Silan eine aktivierte Oberfläche entstand, konnte diese mit Hilfe von 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) umgesetzt werden. Das NBD-F ist in der Lage sowohl primäre als auch sekundäre Amine in Reaktion zu treten (Zhou *et al.*, 2007). Das primäre Amin des Silans geht mit dem NBD-F eine kovalente Bindung ein, wodurch es fest an die Glasoberfläche gebunden ist. Nach einem Waschschrift konnte das gebunden NBD-F mit dem Fluoreszenzmikroskop IX 50 (Olympus) analysiert werden. Für die Auswertung der Intensitäten wurde die Software Analysis D (SIS) eingesetzt. Zur Bestimmung der Oberflächensättigung wurde NBD-F in einer Konzentration von 2,7 mM

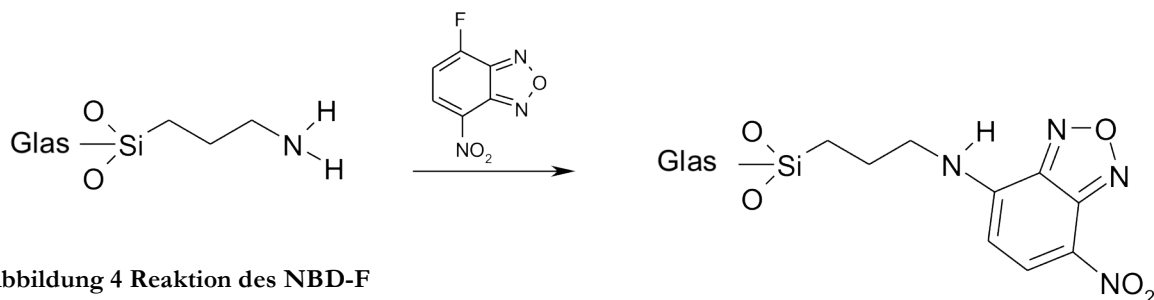


Abbildung 4 Reaktion des NBD-F

angesetzt. Dieses wurde zusammen mit N,N-Diisopropylethylamin (DIEA) (Sigma) in trockenem Dimethylformamid (DMF) (Roth) gelöst. Die Reaktion erfolgte für 40 Minuten bei Raumtemperatur. Es schloss sich die Detektion mithilfe des Mikroskops an. Hierbei wurde ein NIBA-Filter (Olympus) verwendet. Die Methode, so wie sie hier verwendet wurde, entsprach zum großen Teil der von Fedurco (Fedurco *et al.*, 2006). Das NBD-F für die Detektion von Aminogruppen gut geeignet ist, konnte an

2. Methoden

früherer Stelle schon gezeigt werden (Zhou *et al.*, 2007, Aoyama *et al.*, 2004). Hier wurde es zur Analyse von Aminosäuren bzw. Pestiziden eingesetzt.

Die Detektion von Aminogruppen auf einer Glasoberfläche wurde erstmals in Verbindung mit einem neuen Cross-Linker gezeigt (Fedurco *et al.*, 2006). Die Aminogruppe, welche an die Oberfläche gebracht wurde, war die Grundlage, für das Anbinden eines kurzen einzelsträngigen DNA Fragments.

2.10 Methoden für die Festphasen-PCR

2.10.1 Immobilisierung von DNA an eine Glasoberfläche

Bei der Anbindung von DNA war darauf zu achten, dass diese nicht nur für eine Hybridisierung verwendet werden sollte. Für die angestrebte Festphasen-PCR musste das 3' Ende des Oligonukleotides frei bleiben, damit es durch die Polymerase verlängert werden konnte. Es war also von großer Bedeutung eine gerichtete Immobilisierung zu erreichen. Darüber hinaus wurde auch der Stabilität der Bindung ein hoher Stellenwert beigemessen. Die Bindung sollte eine längere Polymerasekettenreaktion überstehen. Hierzu wurden verschiedene Cross-Linker getestet. Es wurde das N-Succinimidyl(4-iodoacetyl)-aminobenzoat zeigte sich als geeignet und wurde für alle folgenden Reaktionen verwendet. Um eine möglichst hohe Wasserlöslichkeit zu erreichen, konnte auf das Sulfoderivat des N-Succinimidyl (4-iodoacetyl)-aminobenzoat zurückgegriffen werden. Das ursprünglich Protokoll (Adessi *et al.*, 2000) wurde stark modifiziert. Hier wurden vor allem die pH Werte geändert, da unter den beschriebenen Bedingungen der Cross-Linker schnell lysiert. Der verwendete Cross-Linker wurde ursprünglich 1983 (Weltman Joel K. , 1983) erstmals beschrieben. Er wurde in einem Zweischnittprotokoll eingesetzt, bei dem zu erst die NHS-Gruppe abreagiert und damit fest an die Glasoberfläche binden konnte. Hierzu wurde der Cross-Linker in einem HEPES-Puffer pH 8 angesetzt. Bei diesem pH Wert ist die Hydrolyse sehr schnell (Staros *et al.*, 1987) und die Reaktion konnte nach einer Stunde beendet werden. Nachdem der erste Schritt der Immobilisierung abgeschlossen war, wurden die Glasträger mehrfach mit HEPES pH 8 gewaschen und anschließend getrocknet. Der erste Teil der Reaktion wird im Folgendem grafisch dargestellt (Abbildung 5).

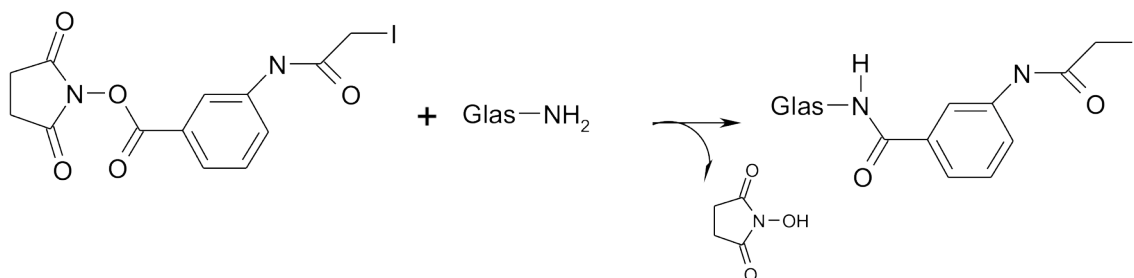


Abbildung 5 Reaktion SIAB mit Aminosilan behandeltem Glas

2. Methoden

Es folgte der zweite Teil der Reaktion, bei dem die Iodacetylgruppe des Cross-Linkers, mit der Thiolgruppe des Oligonukleotides reagieren konnte. Hierbei entstand eine stabile Thioetherbindung, welche auch gegen reduzierende Agenzien wie Mercaptoethanol resistent ist. Die Oligonukleotide wurden in Wasser gelöst in einer Konzentration von 20 μM auf eine Glasoberfläche gegeben.

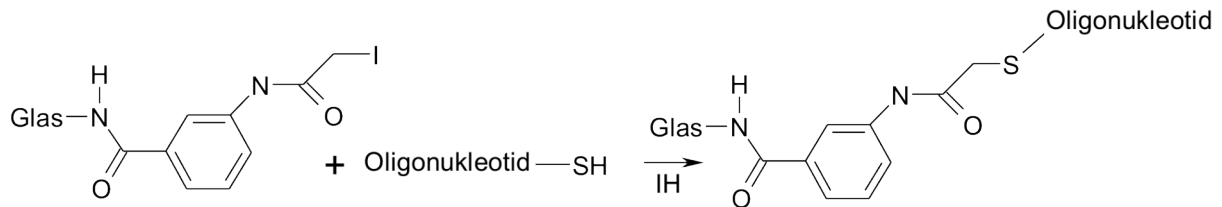


Abbildung 6 Reaktion SIAB mit modifiziertem Oligonukleotid

Die ersten Versuche zur Anbindung von DNA an Glasoberflächen wurde das 3' Ende der DNA mit Hilfe von radioaktiven Phosphor (^{32}P) markiert. Hierzu wurde die Phosphorylierungsreaktion verwendet. Da die Detektion über die Radioaktivität in dem Kapillararray nicht möglich war, wurde an dieser Stelle auf ein Fluorophor zurückgegriffen. Bei dem Fluorophor handelte es sich um das Alexa 488. Die modifizierten Oligonukleotide konnten über die Firma IBA bezogen werden. In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob die Oligonukleotide als Monomer oder als Dimer vorlagen. Um vollständig sicher zu gehen, dass alle vorhandenen Oligonukleotide als Monomer vorlagen, wurden sie mit einem reduzierendem Agens, dem Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) behandelt. Dieses spaltet hocheffektiv Disulfidbrücken, ohne mit den Thiolen eine Verbindung einzugehen (Kirley, 1989). Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 30 Minuten, wobei den Oligonukleotiden 20 mM TCEP zugesetzt wurden. Das TCEP wurde nach erfolgter Reaktion wieder abgetrennt. Hierfür wurde das QIAquick Nucleotide Removal Kit verwendet. Die Elution erfolgte mit dem gleichen Volumen, in dem die Oligonukleotide eingesetzt wurden, um einen Verdünnungseffekt zu vermeiden.

2.10.2 Ermittlung der spezifischen Bindung

Einer der wichtigsten Punkte bei der Polymerasekettenreaktion ist die Bindung der Oligonukleotide an den Einzelstrang, welcher neu synthetisiert werden soll. Bei der Immobilisierung von DNA Fragmenten an die Glaswand stellte sich die Frage, ob diese auch für eine Hybridisierung zugänglich waren. Sollte diese Grundvoraussetzung nicht erfüllt werden können, so hätte auch keine Amplifikation stattfinden können.

Für einen Hybridisierungstest wurden komplementäre Oligonukleotide radioaktiv markiert. Hierzu diente die Phosphorylierung mit einem γ -ATP. Für die Hybridisierung wurden die markierten Oligonukleotide auf 90 °C erhitzt und anschließend auf den Chip gegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde der Chip 2-mal mit einem Milliliter TE Puffer gewaschen. Anschließend wurde versucht die gebundenen Oligonukleotide wieder von der Glasoberfläche zu eluieren. Hierzu wurde 7 M Harnstoff auf 90 °C erhitzt und auf den Chip gegeben. Nach der Elution wurden die Proben am Szintillationszähler vermessen. Über diese Methode wurde die Menge an gebundener DNA berechnet.