

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Geräte

DNA-Sequenzautomat ABI 377A	ABI/Perkin Elmer
Elektrophoreseapparaturen	GIBCO BRL
Schlittenmikrotom	Reichardt / Jung
PCR Cycler 9600	Perkin Elmer
pH-Meter	Knick
Wasserbad	Köttermann
Thermoblock	Techne
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Transilluminator	Biometra
Brutschrank	Melag
Ultrospec 3000	Pharmacia

#### Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Perkin Elmer, Merck, Serva, Sigma, Roth, Bio-Rad und Difco in analytischer Qualität bezogen.

## Medien, Lösungen und Puffer

<u>10 mM dNTPs:</u>	Mischung	
	2,5mM	dATP
	2,5mM	dCTP
	2,5mM	dGTP
	2,5mM	dTTP
<u>10 x PCR-Puffer:</u>	100mM	Tris-HCl, pH 8,3 ( bei 42°C )
	500mM	KCl
	25mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,01 %	Gelatine
<u>50 x TAE-Puffer:</u>	242g	Tris-Base
	57,1ml	Essigsäure
	100ml 0,5M	EDTA, pH 8,0
	ad 1l	destilliertes H <sub>2</sub> O
<u>1,5 % Agarose:</u>	1,5g	Agarose
	ad 100ml	1 x TAE Puffer
	0,5µg/ml	Ethidiumbromid
<u>10 x TBE:</u>	108,0g	Tris-Base
	55,0g	Borsäure
	8,3g	Na <sub>4</sub> -EDTA
	ad 1l	destilliertes H <sub>2</sub> O
<u>4,5 % Polyacrylamid-Gellösung:</u>	18,0g	Harnstoff
	7,5ml	30 %ige Acrylamidlösung (s.u.)
	6,0ml	10 x TBE-Puffer
	23,0ml	destilliertes H <sub>2</sub> O
<u>Acrylamidlösung:</u>	Acrylamid:Bisacrylamid = 29:1	

<u>Auftragungspuffer für</u>	2,0µl	Formamid	
<u>Mikrosatelliten-Analyse:</u>	0,6µl	Dextranblau	
	0,6µl	Genescan 500 Rox	
<u>LB-Medium:</u>	10g	Bacto-Trypton	
	5g	Hefe-Extrakt	Medium
	10g	NaCl	anschließend
	ad 1l	destilliertes H <sub>2</sub> O	autoklavieren
<u>LB-Agar:</u>	LB-Medium +	15g Bacto-Agar	Agar danach
	ad 1l	destilliertes H <sub>2</sub> O	autoklavieren
<u>SOC-Medium:</u>	2,0 %	Trypton	
	0,5 %	Hefe-Extrakt	
	10,0mM	NaCl	
	2,5mM	KCl	
	10,0mM	MgSO <sub>4</sub>	
	20,0mM	Glukose	
<u>Lösung 1 ( oder QUIAGEN: P1 ):</u>	50mM	Glucose	
	25mM	Tris-HCl pH 8,0	
	10mM	EDTA	
<u>1 % SDS:</u>	1,0g	Natriumdodecylsulfat	
	ad 100 ml	destilliertes H <sub>2</sub> O	
<u>Lösung 2 ( oder QUIAGEN: P2 ):</u>	0,2N	NaOH	
	1%	SDS	
<u>Lösung 3 ( oder QUIAGEN: P3 ):</u>	3M	Kaliumacetat, pH 5,5	
		(einstellen mit Eisessig)	
<u>TE-Puffer:</u>	10mM	Tris-HCl, pH 7,4	
	1mM	EDTA, pH 8,0	

**Enzyme und Kits:**Enzyme:

AmpliTaq Gold™	Perkin Elmer
AmpliTaq™	Perkin Elmer
RNase A	Boehringer / Mannheim
Restriktionsendonuklease Eco RI und Puffer	Boehringer / Mannheim

Kits:

QIAamp Blood Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Probengewinnung**

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Tumor- und Normalgewebe von 40 Patienten gearbeitet. Aufgrund eines primären Prostatakarzinoms unterzogen sie sich einer Prostatektomie. Das bei der Operation gewonnene Material wurde in Paraffinblöcke gegossen und konserviert.

### **2.2.2 Mikrodissektion**

Die Paraffinblöcke wurden von einem Pathologen begutachtet. Tumor- und Normalgewebe ließen sich unter dem Mikroskop identifizieren, kennzeichnen und die äußeren Grenzen mit einem Skalpell vertikal markieren. Mit einem Schlittenmikrotom wurden Tumor- und Normalgewebe manuell getrennt und mehrere 30µm dicke, horizontale Schnitte für die DNA-Isolierung gewonnen.

### **2.2.3 Isolierung und Reinigung der DNA aus Geweben**

Für die Isolierung von DNA stehen verschiedene Methoden zur Auswahl, deren Anwendung von Zelltyp und späterer Verwendung der DNA abhängig ist. Hier wurden die Schnitte zunächst von Paraffinresten befreit und anschließend die DNA mit dem QIAamp Blood Kit isoliert.

Um das Gewebe von Paraffin zu befreien werden die Schnitte mit 800µl Xylol gemischt, bei 14000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Danach erfolgte eine zweimalige Waschung mit 90%igem Ethanol. Durch Einfrieren der Proben bei -80°C für 30 Minuten und einer anschließenden Vakuumgefrieretrocknung erhält man ein trockenes und paraffinfreies Zellpellet.

Die DNA-Extraktion wurde nach Protokoll mit dem QIAamp Blood Kit durchgeführt.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm und der Bildung des Quotienten von 260nm / 280nm. Der Quotient lag in der Regel zwischen 1,8 und 2,0. Für die Konzentrationsbestimmung der DNA gilt  $1OD_{260nm} = 50\mu g/ml$ .

Die DNA wurde auf eine Konzentration von 50ng/μl eingestellt.

#### 2.2.4 PCR für Mikrosatelliten - Analyse

Die PCR ist eine Methode zur Vermehrung von DNA *in vitro* mit Hilfe von zwei speziellen Oligonukleotid-Primern (ein Primerpaar) und der DNA-Polymerase I. Die beiden Oligonukleotide (15 bis 25 Nukleotide lang) werden so gewählt, daß sie antiparallel zueinander an die beiden Stränge der DNA hybridisieren und dadurch die enzymatische Synthese jeweils eines neuen DNA-Stranges zwischen ihnen ermöglichen. Die DNA und die Oligonukleotide (die auch als Primer bezeichnet werden), werden zusammen mit der hitzebeständigen Taq-DNA-Polymerase und den vier Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) in einer gepufferten Lösung gemischt. In einem ersten Zyklus wird die DNA denaturiert, so daß die Oligonukleotide beim Abkühlen während des zweiten Temperaturzyklus an die passenden komplementären Sequenzen binden können. Danach erfolgt die Synthese eines neuen DNA-Stranges beginnend an den jeweiligen Primern (in 5`3`-Richtung) während des dritten Temperaturzyklus. Bei vielfacher Zyklus-Wiederholung erhält man eine exponentiell anwachsende Kopienzahl der Matrizen-DNA ( $2^n$ ,  $n$  = Zahl der Zyklen). Für die Reaktion wird in der Regel eine hitzebeständige Taq-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* verwendet, die es durch ihre Stabilität ermöglicht, die Reaktion ohne Unterbrechung ablaufen zu lassen.

<b>Standardansatz für PCR :</b>	2,0μl 10 x PCR-Puffer
	1,2μl 25mM MgCl <sub>2</sub>
	1,6μl 10mM dNTP-Gemisch
	1,0μl DNA (50ng/μl)
	1,0μl 10μM Primer forward
	1,0μl 10μM Primer reverse
	0,2μl Taq-Polymerase (5U/μl)
	ad 20μl H <sub>2</sub> O

Die Primerpaare der PCR für die Mikrosatelliten-Analyse flankieren oder liegen im Bereich des Gen PTEN und wurden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

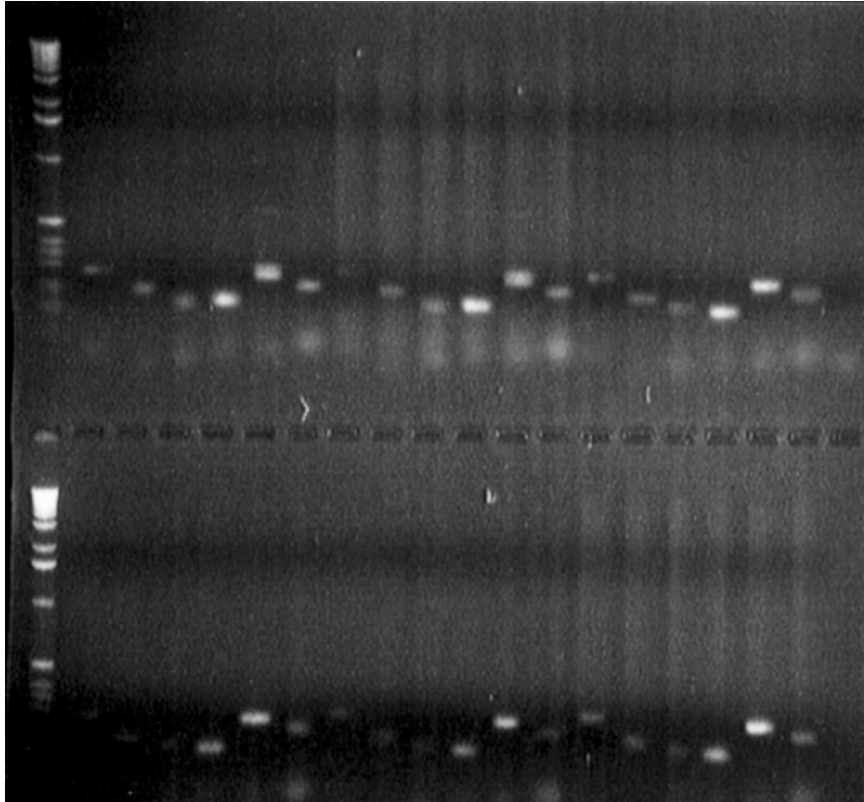
(5-FAM = 5-carboxy-fluorescein oder 6-HEX = 4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxy-fluorescein) markiert. Die folgende Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primerpaare, die von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert wurden:

D10S583	Forward Reverse	5'- HEX-TCT GAC CAA AAT ACC AAA AGA AC - 3' 5'-AGA GAC TCC AGA TGT TTG ATG A - 3'
AFMa086wg9	Forward Reverse	5'- FAM-AAA TGT ACG GTT CAT TGA CTT – 3 5'- GAC TGA CTA CAA ATG GGC A - 3'
D10S532	Forward Reverse	5'- FAM-TGG TCT CTA GAA AAA TTA ATG CAA T- 3' 5'- AAG TTG TTT GTG GGG AGT CA - 3'
D10S1687	Forward Reverse	5'- FAM-TGG CCG GCA GAG TAG G - 3' 5'- GGC CCT AAG ATG CGG G - 3'
D10S2491	Forward Reverse	5'- HEX-GTT AGA TAG AGT ACC TGC ACT C - 3' 5'- TTA TAA GGA CTG AGT GAG GGA - 3'

**Tab2.1:Primerpaare der PCR für Mikrosatelliten–Analyse**

Eine Standard-PCR-Reaktion lief über 35 Zyklen mit einer vorangestellten Denaturierungsphase bei 95°C für 10min (im Fall der Verwendung von AmpliTaq Gold™), einem Zyklus von 94°C für 60s, 55°C für 60s, 72°C für 60s und einer abschließenden Synthesephase bei 72°C für 7min. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler 9600 (Perkin Elmer) mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Die Überprüfung der PCR erfolgte durch die Auftrennung der PCR-Fragmente in einem 1,5%igem Agarosegel.

Die folgende Abbildung 2.1 veranschaulicht die Überprüfung der erfolgreichen PCR:



**Abb.2.1:**  
**Kontrolle der einzelnen**  
**PCR-Produkte der**  
**jeweiligen Normal- und**  
**Tumor-DNA .**  
**In den linken Bahnen**  
**(oben und unten)**  
**befinden sich die**  
**Kontrollen.**  
**Obere Reihe Bahn 2 bis**  
**Bahn 7 Primer des**  
**Normalgewebes 060:**  
**D10S532 0,5 ul,**  
**D10S1687 0,5 ul,**  
**D10S2491 0,5 ul,**  
**AFMa086wg9 0,5 ul,**  
**D10S532 1,0 ul und**  
**D10S583 0,5 ul.**  
**Es folgen die Primer( in**  
**der gleichen**  
**Reihenfolge) der Tumor-**  
**DNA 060, Normal- und**  
**Tumor-DNA 041 und**  
**Normal- und Tumor-**  
**DNA 184.**

Aus praktischen Gründen wurden für die anschließende Mikrosatelliten–Analyse die PCR–Produkte der jeweils fünf Mikrosatelliten–Paare zu gleichen Teilen gemischt und getrennt für Tumor– und Normalgewebe im DNA-Sequenzautomaten ABI 377 A analysiert. Dieses wurde möglich, da die PCR-Produkte mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern markiert wurden und gleichzeitig unterschiedliche Längen aufwiesen.

### **2.2.5 Mikrosatelliten - Analyse**

Die Mikrosatelliten-Analyse wurde mit dem DNA - Sequenzautomaten ABI 377 A durchgeführt. Das hierfür benötigte Polyacrylamidgel wurde wie folgt hergestellt:

Die Glasplatten wurden gründlich gesäubert und vorschriftsmäßig zusammengesetzt. Die Polyacrylamid-Gellösung wurde filtriert (0,2µm Filter), entgast und mit 15µl TEMED (N, N, N', N' –Tetra-methyl-ethylendiamin) und 350µl 10%igen APS-Lösung (Ammoniumpersulfatlösung) versetzt.



Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde ein sogenannter „plate-check“ durchgeführt, der eine unerwünschte Eigenfluoreszenz detektiert. Im Anschluß an einen Vorlauf des Gels für maximal eine Stunde, der eine konstante Geltemperatur von 51°C einstellt, wurden die Proben bei 90°C für zwei Minuten denaturiert, sofort auf Eis gestellt und anschließend aufgetragen. Hierfür wurden 0.5 µl der PCR-Fragment-Mischung zusammen mit 3 µl Auftragungspuffer auf das Polyacryamidgel gegeben. Jede Auftragstasche enthielt somit neben dem Auftragungspuffer PCR-Fragmente der fünf spezifischen Loci des Tumor- oder Normalgewebes der einzelnen Patienten.

Die Standardlaufzeit des Gels beträgt zwei Stunden bei 2700 Volt und 51°C. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Ein Laser tastet kontinuierlich ein horizontales Feld des Gels ab. Die fluoreszenzmarkierten Fragmente werden zur Sekundärstrahlung angeregt. Diese Signale werden in elektrische Impulse umgewandelt und von einem Computer registriert.

Durch den direkten Vergleich von Normal- mit Tumorgewebe kann der Verlust einzelner Banden direkt dem Verlust entsprechender Chromosomenregionen (spezifiziert durch das Mikrosatelliten-Paar) zugeordnet werden.

Die Rohdaten wurden zunächst mit der Software GeneScan 3.1.2 bearbeitet und dann mit Hilfe des Programms Genotyper<sup>®</sup> ausgewertet .

LOH wurde durch den Verlust von mehr als 2/3 der Intensität der Bande des betroffenen Allels definiert.

### **2.2.6 Sequenzierung**

Sequenziert wurde das Tumorgewebe von Patienten, deren DNA bei der Mikrosatelliten-Analyse LOH (engl. Loss of heterozygosity = Verlust von Heterozygotie) aufwies.

Für die Sequenzierung wurden neun PCR-Produkte, die den neun Exons des PTEN entsprechen an der betreffenden DNA amplifiziert (die Sequenzen der Primer wurden aus (26) entnommen). Der Standardansatz und die Konditionen dieser PCR entsprachen der PCR für Mikrosatelliten-Analyse (vgl. 2.2.4).

Die folgende Tabelle 2.2 zeigt eine Übersicht über die verwendeten neun Primerpaare:

exon1	Forward	5'- AGT CGC TGC AAC CAT CCA - 3'
	Reverse	5'- TCT AAG AGA GTG ACA GAA AGG TA - 3'
exon2	Forward	5'- TGA CCA CCT TTT ATT ACT CCA - 3'
	Reverse	5'- TAG TAT CTT TTT CTG TGG CTT A - 3'
exon3	Forward	5'- ATA GAA GGG GTA TTT GTT GGA - 3'
	Reverse	5'- TCC TCA CTC TAA CAA GCA GAT A - 3'
exon4	Forward	5'- TTC AGG CAA TGT TTG TTA - 3'
	Reverse	5'- TTC GAT AAT CTG GAT GAC TCA - 3'
exon5	Forward	5'- GCA ACA TTT CTA AAG TTA CCT A - 3'
	Reverse	5'- TCT GTT TTC CAA TAA ATT CTC A - 3'
exon6	Forward	5'- AGT TAC CAT AGC AAT TTA GTG A - 3'
	Reverse	5'- TAC ATT GGA ATA GTT TCA AAC A - 3'
exon7	Forward	5'- ATC GTT TTT GAC AGT TTG - 3'
	Reverse	5'- TTC CCA ATG AAA GTA AAG TAC A - 3'
exon8	Forward	5'- AGG TGA CAG ATT TTC TTT TTT A - 3'
	Reverse	5'- TAG CTG TAC TCC TAG AAT TA - 3'
exon9	Forward	5'- GTT CAT CTG CAA AAT GGA - 3'
	Reverse	5'- TGG TAA TCT GAC ACA ATG TCC TA - 3'

**Tab.2.2: Exonspezifische Primerpaare des Gen PTEN**

Zur erfolgreichen Sequenzierung der PCR-Produkte mußten zunächst „kontaminierende“ PCR-Primer durch Gelfiltration abgetrennt werden. Hierfür verwendeten wir den QIAquick PCR Purification Kit.

Vom PCR-Produkt wurden beide DNA-Stränge sequenziert. Hierfür wurden die PCR-Produkte so aufgeteilt, daß die nachfolgende Sequenzierungsreaktion mit der Hälfte der gereinigten DNA, ein exonspezifischer Primer (entweder 5'-3' -oder 3'-5'-lesend), Puffer, Nukleotide und farbmarkierte Didesoxynukleotide durchgeführt werden konnte. Farbmarkierte Didesoxynukleotide wirken als Terminatoren, die im statistischen Mittel an jeder entsprechenden Stelle der Sequenz in den neuen DNA-Strang eingebaut werden können. Durch diesen Einbau kommt es zum Kettenabbruch bei A, C, T oder G. Der Reaktionsansatz enthält außerdem das thermisch stabile Enzym AmpliTaq DNA-Polymerase FS. Das speziell für die Fluoreszenz-Sequenzierungsreaktion entwickelte Enzym besitzt keine 5'-3'-Nukleaseaktivität und eine spezifische Affinität für Didesoxynukleotide (ddNTPs). Bei der Sequenzierungsreaktion wird statt der für die Taq-Polymerase optimalen Reaktionstemperatur von 72°C eine Reaktionstemperatur von 60°C gewählt, um den sterisch behinderten Einbau der fluoreszenzmarkierten ddNTPs optimal zu ermöglichen. Die im Kit vorhandenen dITPs statt dGTPs bewirken eine Vergrößerung der Abstände der Banden, wodurch die Sequenz besser lesbar wird.

Als Sequenzierungsprimer wurden bei den gereinigten PCR-Produkten die PTEN-Primer für die jeweiligen Exons (entweder 5'-3' - oder 3'-5'-lesend) verwendet.

Sequenzierungsreaktion:	8,0µl Terminator-Ansatz
	1,0µl 10µM Sequenzierungsprimer
	11µl DNA

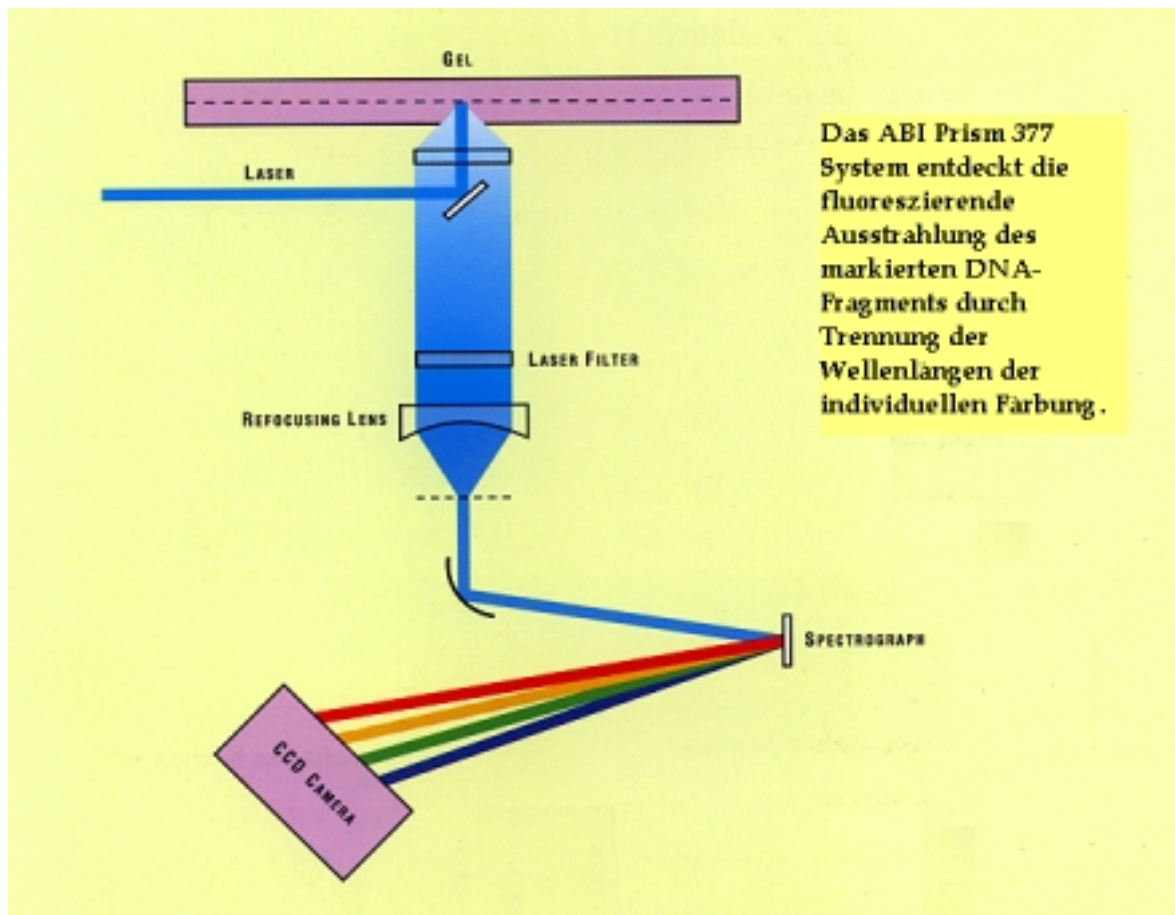
Die Reaktion erfolgt in einem Thermocycler über 25 Zyklen bei 96°C für 10s, 55°C für 5s und 60°C für 4min.

Nach Auffüllen der Proben mit einer Mischung von 80µl H<sub>2</sub>O und 10µl 3M Natriumacetat, pH 5,2, wurden sie mit 96%igen Ethanol gefällt, für 20 Minuten

zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 70%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 4µl deionisiertem Formamid/25mM EDTA, pH 8,0 (5:1) gelöst. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel (Herstellung vgl. 2.2.5) bei 90°C für 2min denaturiert und dann auf Eis gestellt.

Es wurde eine automatische Sequenzierung bei 2700 Volt, 51°C und einer Laufzeit von 3,5 Stunden auf dem DNA-Sequenzautomaten ABI 377 A durchgeführt.

Die 377 DNA-Sequenzierung stellt eine 'on-line' Detektion unter Einsatz eines Lasers dar, der zur Anregung von fluoreszenzmarkierten DNA Fragmenten benötigt wird. Der Laser tastet ein horizontales Fenster des Polyacrylamidgels ab. Erreicht ein am Ende farbmarkiertes DNA-Fragment den Bereich des Lasers, so wird dieses zur Sekundärstrahlung angeregt und detektiert. Ein Fotoverstärker wandelt das Lichtsignal in ein elektrisches, digitales Signal um, das auf den Computer übertragen wird. Die folgende Abbildung 2.2 veranschaulicht die Methode:



**Abb.2.2: Schematische Darstellung des DNA-Sequenzautomat ABI 377 A**

Der Nachweis von Mutationen erfolgte nach dem Vergleich der Sequenzen beider Richtungen (5'-3' – und 3'-5' – Richtung) mit der publizierten Wildtyp-Sequenz. Für die entsprechenden Sequenzvergleiche wurde das Programmpaket HUSAR (DKFZ Heidelberg) mit den Programmen „gap“ oder „bestfit“ online verwendet.

Aufgrund verminderter PCR-Effizienz und der damit verbundenen geringen DNA-Ausbeute konnten nicht alle PCR-Produkte direkt sequenziert werden. In diesen Fällen wurde eine Klonierung in einem sogenannten Sequenziervektor durchgeführt.

### 2.2.7 DNA-Klonierung

Die PCR-Produkte, die nicht direkt sequenzierbar waren (siehe oben) wurden mit den entsprechenden exonspezifischen Primerpaaren des PTEN amplifiziert (vgl. 2.2.6) und anschließend kloniert.

Die Klonierung der PCR-Produkte wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem TOPO™TA Cloning®-Kit (Invitrogen) durchgeführt. Diese Klonierungsmethode beruht auf der Ligation eines PCR-Produktes mit überhängenden Adenylsäureresten, die die Taq-Polymerase während der PCR am 3'-Ende hinterläßt. Der kommerziell erhältliche pCR® 2.1-TOPO-Vektor liegt als lineares Molekül mit überhängenden 3'T-Enden vor an denen Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Durch die Zugabe eines DNA-Produktes mit überhängenden 5'Ä-Enden wird eine effiziente Ligation des PCR-Produktes in den Vektor innerhalb von fünf Minuten bei Raumtemperatur möglich.

<b>Ligationsansatz:</b>	0,5µl-2,0µl PCR-Produkt ( je nach Stärke der Bande) 1,0µl pCR® 2.1-TOPO-Vektor ad 5,0µl steriles H <sub>2</sub> O
-------------------------	--

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte fünf Minuten bei Raumtemperatur.

<b>Transformationsansatz</b>	50,0µl One Shot Top 10F' Comp. Zellen 2,0µl 0,5M β-Mercaptoethanol 2,0µl Ligationsansatz 250µl SOC-Medium
------------------------------	--

Die kompetenten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen „One Shot Top 10F“ Zellen (modifizierte *E. coli* Bakterien) wurden vorsichtig aufgetaut,  $\beta$ -Mercaptoethanol und  $2\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes dazu pipettiert. Es folgten Inkubation für 30min auf Eis, Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 30s und eine weitere Inkubation für 2min auf Eis. Nach Zugabe von  $250\mu\text{l}$  SOC-Medium zum Transformationsansatz wurde unter Schütteln für 30min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurden  $150\mu\text{l}$  des Transformationsansatzes auf ampicillinhaltigen LB-Agar-Platten, die vorher mit X-Gal und IPTG bestrichen worden waren, ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht.

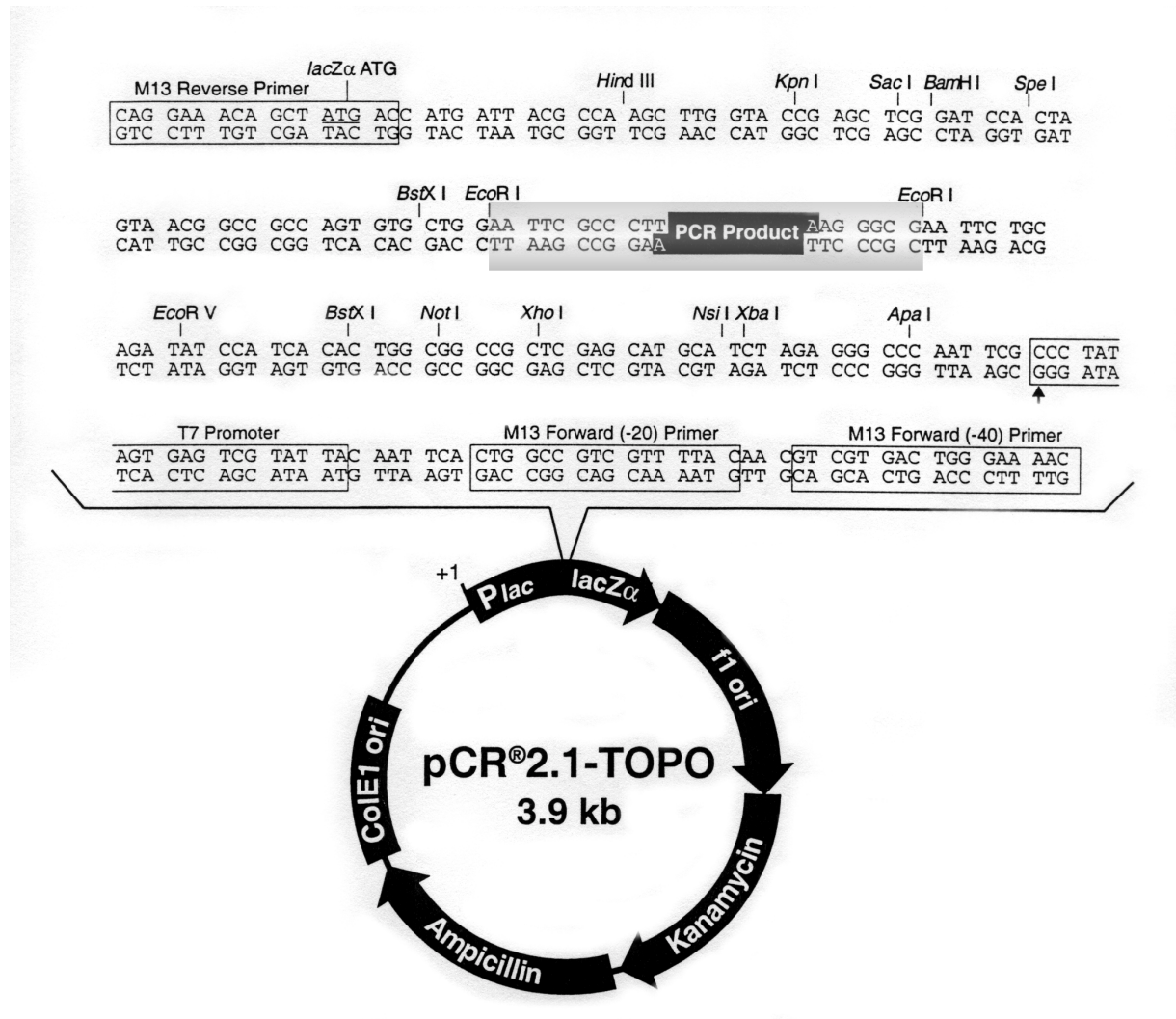
Mit Ampicillin werden die Zellen, die durch die Aufnahme des Plasmides resistent gegen das Antibiotikum sind, selektiert. Die inserttragenden Bakterienzellen können mit Hilfe des blauen Hydrolyseproduktes des X-Gal's (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-galactosid) und des IPTG's (Isopropylthio- $\beta$ -D-galactosid) von den insertfreien Bakterienzellen unterschieden werden. Das im pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektorplasmid enthaltene lacZ-Gen ist ohne Insertion in das Plasmid intakt und exprimiert die  $\beta$ -Galaktosidase, die das Galaktosid am X-Gal und IPTG abspaltet und diese Zellen blau verfärbt. Durch Insertion in das Plasmid wird der Leserahmen des lacZ-Gen unterbrochen, so daß keine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase produziert werden kann und die Kolonien ungefärbt bleiben.

Anschließend wurden Minikulturen der transformierten Bakterien hergestellt. Für eine Minikultur wurde das LB-Medium ( $2\text{ml} + 100\mu\text{g/ml}$  Ampicillin) mit einer weißen Kolonie beimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag konnte die Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen isoliert und gereinigt werden. Die Reinigungsmethode basiert auf einer Alkalilysemethode. Für die Lyse der Zellen wurden  $1,5\text{ml}$  aus der Bakterienminikultur abgenommen und für 20s bei  $14000\text{rpm}$  zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in  $200\mu\text{l}$  Lösung 1 mit RNase resuspendiert und nach Zugabe von  $400\mu\text{l}$  Lösung 2 folgte eine Inkubation für 5min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden  $300\mu\text{l}$  Lösung 3 zur Neutralisation zugegeben, gemischt und für 5min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation bei  $14000\text{rpm}$  für 15min wurde der klare Überstand (Klarlysat) zwecks DNA-Fällung mit  $750\mu\text{l}$  Isopropanol gemischt und für 15min auf Eis gefällt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei  $14000\text{rpm}$  für 15min. Das Pellet wurde vom

Überstand befreit und mit 85%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 30µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die folgende Abbildung 2.3 veranschaulicht die Klonierung (27):



**Abb.2.3: Schematische Darstellung der TA-Klonierungstechnik**

Die folgende Restriktasespaltung der Plasmide wird zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation und Transformation angewendet. Unter Verwendung der Restriktionsendonuklease EcoRI und des Puffers wird das Plasmid an den

spezifischen EcoRI Schnittstellen gespalten. Hierfür werden Plasmid, Restriktionsendonuklease EcoRI, Puffer und RNaseA eine Stunde bei 37°C inkubiert.

<b>Restriktasespaltung:</b>	2,0µl gereinigte Plasmid-DNA
	0,5µl EcoR I Restriktionsendonuklease
	1,0µl EcoR I Puffer
	0,2µl RNase A (10mg/ml)
	6,0µl H <sub>2</sub> O

Die Spaltprodukte wurden in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Dies wird in der folgenden Abbildung 2.4 veranschaulicht :



**Abb.2.4:**  
*In den linken Bahnen wurden (oben und unten) jeweils die Kontrollen aufgetragen. Ist ein Insert vorhanden erkennt man dies an den Spaltprodukten. Das größere Spaltprodukt (das restliche Plasmid) wandert im Agarosegel nicht so weit-liegt also weiter oben. Das gewünschte PCR-Produkt, welches im Vergleich zum übrigen Plasmid relativ klein ist, wandert im Agarosegel weiter und wird durch die untere Bande dargestellt.*

War ein Insert vorhanden, wurde die ungespaltene Plasmid-DNA (vgl. 2.2.6) sequenziert.



Der Unterschied bei der nachfolgenden Vorgehensweise bestand in der Auswahl der Sequenzierungsprimer. Es wurden die Standard-Sequenzierprimer der Firma Invitrogen verwendet:

M13 (-20)	Forward	5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3'
M13R	Reverse	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -5'

Die Verwendung von M13 (-20) Forward Primer oder M13 Reverse Primer war möglich, da das Plasmid die für die Primer kodierende Sequenzen enthält (s. Abb. 2.3).

Für die Sequenzierungsreaktion wurden zu den 8,0 µl Terminator-Ansatz 1,0 µl Plasmid-DNA und 1,5 µl Sequenzierungsprimer gegeben.

Die Konditionen der Sequenzierungsreaktion und der Sequenzierung (vgl. 2.2.6) blieben unverändert.