

3 Methoden

3.1 Erstellung einer Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank in λ -Phagen

3.1.1 RNA-Isolierung aus Zellen

(RNeasy Mini, Qiagen)

Das Prinzip der RNA-Isolierung mit dem Qiagen-Kit basiert auf der Methode von Chomczynski et al. (1987). Die Probe wird unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert und homogenisiert. Der Lysispuffer enthält Guanidium Isothiocyanat und β -Mercaptoethanol, um RNasen zu inaktivieren. Durch Zugabe von Ethanol werden optimale Bedingungen geschaffen, um die RNA an eine Silicagel-Membran zu binden. In mehreren Waschschrritten werden Kontaminationen entfernt und die RNA nachfolgend mit DEPC-Wasser von der Membran eluiert.

Material

RNeasy Mini Kit, Qiagen

Qiagen Schredder-Säulen

β -Mercaptoethanol

70% Ethanol

Durchführung

- (1) Zu je 1 ml Lysispuffer werden 10 μ l β -Mercaptoethanol pipettiert
- (2) Lysis:
eingesetzte Menge Lysispuffer: 350 μ l für bis zu 10^7 Zellen/600 μ l für $> 10^7$ Zellen
Das Zellpellet (4×10^7 Zellen) wird in 2,4 ml Lysispuffer durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert.
- (3) Homogenisierung:
je 600 μ l des Lysates werden auf eine Qiagen-Schredder-Säule gegeben und diese 1 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert.
- (4) Das Reaktionsgemisch wird mit einem Vol. (2,4 ml) 70% Ethanol aufgefüllt und durch Auf und Abpipettieren gemischt, bis keine Schlieren mehr vorhanden sind.
- (5) Die Probe wird sukzessive auf 4 RNeasy-Säulen geladen und je 15 sec. bei 14.000 rpm zentrifugiert.
- (6) Die Säulen werden mit je 700 μ l Puffer RW1 gewaschen (auf Säule geben und zentrifugieren).

- (7) Die Säulen werden in 4 neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 2x mit 500 µl Waschpuffer RPE gewaschen. Der 2. Zentrifugationsschritt beträgt 2 min. statt 15 sec., um die Membran zu trocknen.
- (8) Elution:
Die Säulen werden in neuen 1,5 ml Reaktionsgefäßen plaziert und 50 µl DEPC-Wasser auf die Mitte der Membran pipettiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden die Proben 15 sec. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt.

3.1.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Der Nukleinsäuregehalt und die Reinheit einer Probe können durch eine spektralphotometrische Messung im UV-Bereich bestimmt werden. Hierbei wird die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die optische Dichte einer Nukleinsäurelösung bei 260 nm (OD_{260}) ist ein Maß für die Konzentration an Nukleotiden. Die OD_{280} gibt Aufschluß über die Verunreinigung mit Proteinen. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte bestimmte Grenzwerte nicht überschreiten, da sonst keine lineare Abhängigkeit der Absorption bei 260 nm zur Nukleinsäurekonzentration gegeben ist.

Eine optische Dichte von 1 entspricht bei 260 nm 50 µg/ml dsDNA und 40µg/ml ssRNA. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Die Messung wird in speziellen Quarzküvetten vorgenommen, da diese keine Eigenabsorption im UV-Bereich besitzen.

Formeln zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration

RNA: $40 \times OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA/ml}$

DNA: $50 \times OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g DNA/ml}$

3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Trennung von Nukleinsäuren werden horizontale Agarosegele verwendet. Abhängig von der Größe der DNA bzw. RNA und dem gewünschten Trennbereich werden unterschiedliche Agarosekonzentrationen verwendet. Es entstehen Gele mit verschiedenen Porengrößen, durch die die negativ geladene Nukleinsäure nach Anlegen einer Spannung im Laufpuffer zum positiven Pol wandert. Zur Anfärbung der DNA/RNA unter UV-Licht wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, welches in den Nukleinsäurestrang eingelagert wird. Durch gleichzeitiges Auftragen eines Größen- oder Mengenstandards können Größe und Konzentration der DNA bestimmt werden.

Agarosekonzentration (%[w/v])	Bereich der optimalen Auftrennung linearer DNA-Moleküle (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Tabelle 3.1.3 Agarosekonzentration und optimale Auftrennung der DNA im Gel.

Material

5x TBE-Puffer

Ladepuffer

Ethidiumbromid-Lösung

Agarose

Durchführung

- (1) Die entsprechende Menge Agarose wird nach den Richtlinien der Tabelle 3.1.3 in 50 ml oder 150 ml 0,5x TBE aufgenommen und in der Mikrowelle bis zur völligen Auflösung des Agarosepulvers erhitzt.
- (2) Die Lösung wird unter ständigem Rühren auf 40-50 °C abgekühlt und mit 1 µl (50 ml-Gel) bzw. 3 µl (150 ml-Gel) (0,2 µg/ml Endkonzentration) Ethidiumbromidlösung versetzt.
- (3) Das flüssige Gel wird in den Gelträger gegossen und der Gelkamm eingesteckt.
- (4) Nach Polymerisation wird das Gel in die mit 0,5x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und der Kamm sowie die Gelträgerdichtungen entfernt.
- (5) Die Nukleinsäureproben werden mit 20% (Endkonzentration) Ladepuffer aufgefüllt und in die Geltaschen pipettiert.
- (6) Die Elektrophoresekammer wird geschlossen und eine Spannung von nicht mehr als 5 Volt/cm Elektrodenabstand eingestellt.
- (7) Die Nukleinsäurebanden können unter einer UV-Lampe (245 nm) sichtbar gemacht und abfotografiert (Eagle EyeTM, Stratagene, La Jolla, CA) oder mit einem Skalpell ausgeschnitten werden.

3.1.4 cDNA-Synthese

Es wird das cDNA Synthesis Kit von Stratagene verwendet, welches bis auf die Lösungen zur Aufreinigung der Reaktionsansätze alle benötigten Reagenzien enthält.

(1) Erststrang-Synthese

Der zum RNA-Strang komplementäre cDNA-Strang wird mittels einer Reversen Transkriptase (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase - MMLV-RT) synthetisiert. Der Primer besitzt eine poly (dT)-Sequenz sowie eine XhoI-Konsensus-Sequenz. Hierdurch wird gewährleistet, daß er sich an den komplementären poly-A-Schwanz der mRNA anlagert und nur mRNA in komplementäre cDNA umgesetzt wird. Der im Kit enthaltene dNTP-Mix enthält Methyl dCTP, so daß der neu entstehende DNA-Strang teilweise methyliert ist. Diese Maßnahme soll die DNA vor dem Verdau durch Restriktionsenzyme schützen. In der Erststrang-Reaktion entsteht ein RNA-DNA-Hybrid.

(2) Zweitstrangsynthese

RNase H zerlegt den verbliebenen RNA-Strang in einzelne Fragmente, welche der DNA-Polymerase I als Primer dienen. Das Enzym synthetisiert den zum ersten Strang komplementären zweiten DNA-Strang. Die dNTPs enthalten in dieser Reaktion keine Methylgruppen mehr, damit die cDNA später mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten werden kann.

(3) Herstellung von glatten Enden (blunt ends)

Die überstehenden Enden der cDNA werden mittels Pfu DNA-Polymerase in glatte Enden umgewandelt, da die Ligation mit blunt-end-Adaptern erfolgt.

(4) Ligation der EcoR I-Adapter

Die verwendeten Adapter sind doppelsträngige Nukleotide, die eine EcoR 1-Schnittstelle enthalten und zudem ein blunt end und ein sticky end aufweisen. Nur das glatte Ende ist phosphoryliert, um eine Anlagerung an die cDNA zu gewährleisten. Alle anderen Enden sind dephosphoryliert, um eine Selbstligation der Adapter zu verhindern.

(5) Phosphorylierung der ligierten Adapter

Um eine Ligation in den Vektor zu ermöglichen, werden die ligierten Adapter im nachfolgenden Schritt phosphoryliert.

(6) Xho I-Verdau der cDNA

Da sich nur jeweils an einem Ende der cDNA-Stücke eine Xho I-Schnittstelle befindet, werden nur hier nach XhoI-Restriktion die EcoR 1-Adapter wieder freigesetzt. Am anderen Ende der cDNA bleibt der EcoR 1-Adapter erhalten. Man erhält also cDNA mit einem Xho I- und einem EcoR I-verdauten Ende. Da die ZAP® II -DNA mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten ist, erfolgt die Insertion der cDNA in der

richtigen Orientierung. Ein korrekter Leserahmen und damit ein funktionsfähiges Fusionsprotein ergibt sich jedoch nur in einem von drei Fällen.

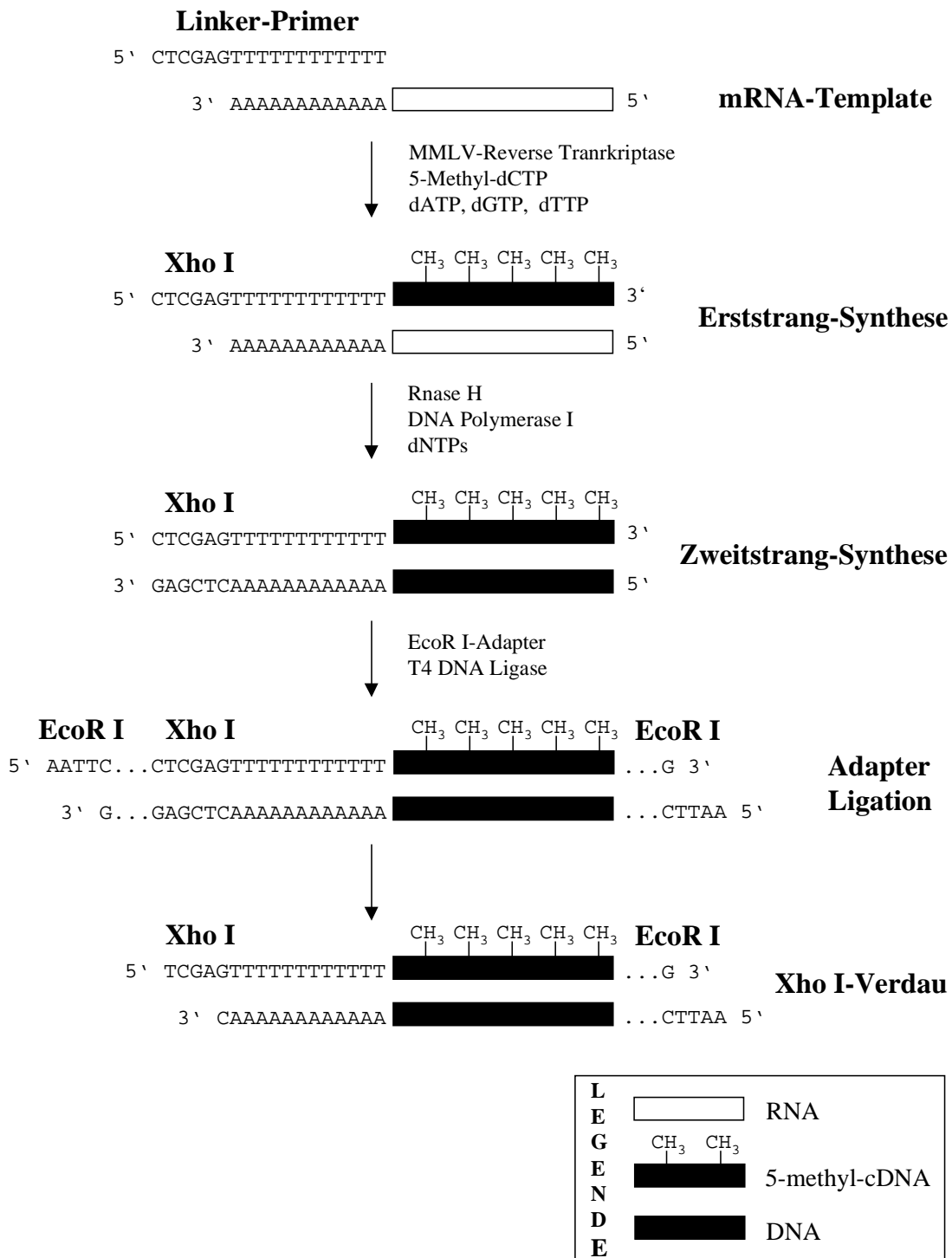


Abbildung 3.1.4 cDNA-Synthese zur gerichteten Insertion der Inserts in den λ -Phagen-Vektor ZAP® II. (Quelle: Stratagene cDNA Synthesis Kit Instruction Manual, Stratagene, 1999)

Material

cDNA Synthesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA)
 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
 Chloroform
 100% und 70% Ethanol
 3M Na-Azetat

Durchführung(1) Erststrang-Synthese

- (a) Das finale Volumen der Reaktion ist 50 μ l. Enzyme und Reagenzien betragen 12,5 μ l, daher werden DEPC- H₂O und RNA in einem Volumen von 37,5 μ l zum Ansatz gegeben. Hierbei hängt es von der RNA-Konzentration ab, welches Volumen Wasser und RNA einnehmen. Die RNA-Menge sollte ungefähr 5 μ g poly(A) RNA entsprechen.

Es werden in folgender Reihenfolge pipettiert:

5,0 μ l first strand buffer
 3,0 μ l first strand methyl nucleotide mixture
 2,0 μ l linker-primer
 x μ l DEPC-H₂O
 1,0 μ l RNase Block Ribonuclease Inhibitor

11,0 μ l

- (b) Die Reaktion wird durch Auf- und Abpipettieren gemischt und die entsprechende RNA-Menge zugegeben.
 (c) Die Probe wird 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Primeranlagerung zu gewährleisten.
 (d) Zum Ansatz wird 1,5 μ l MMLV-RT pipettiert und die cDNA-Synthese 1 Std. bei 37°C durchgeführt. Danach wird die Probe sofort auf Eis gestellt.

(2) Zweitstrang-Synthese

- (a) Es werden folgende Reagenzien zum Ansatz gegeben:

20,0 μ l second strand buffer
 6,0 μ l second strand dNTP mixture
 114,0 μ l dd H₂O

- (b) Vor dem Hinzufügen der Enzyme muß die Probe eine Temperatur von < 16°C aufweisen:
 2,0 μ l RNase H (1,5U/ μ l)
 11,0 μ l DNA polymerase I (9U/ μ l)
 (c) Der Ansatz wird vorsichtig gevortext und kurz herunterzentrifugiert.
 (d) Die Zweitstrang-Reaktion wird 2,5 Std. bei 16°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt.

(3) Herstellung von glatten Enden

(a) Es werden zum Reaktionsansatz pipettiert:

23,0 μ l blunting dNTP mix
2,0 μ l Pfu DNA polymerase (2,5U/ μ l)

(b) Die Probe wird gevortext, herunterzentrifugiert und 30 min. bei 72°C inkubiert.

(c) Phenol-Chloroform-Extraktion

- Die Reaktion wird mit 200 μ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gemischt und 2 min. bei Raumtemperatur und 14.000 rpm zentrifugiert
- Die obere, wässrige Phase, welche die DNA enthält, wird in ein neues 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, 1 VT Chloroform hinzupipettiert und der Ansatz gemischt
- Nach einem weiteren 2 minütigen Zentrifugationsschritt wird erneut die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt

(d) Ethanol-Fällung

- Die cDNA-Reaktion wird mit 2 VT 100% Ethanol und 1/10 VT Natrium-Azetat versetzt, gemischt und über Nacht bei -20°C gefällt
- Die DNA wird 30 min. durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C pelletiert
- Das Pellet wird mit 500 μ l 70% Ethanol gewaschen und 2 min. bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert
- Das Pellet wird getrocknet, in 9 μ l EcoR I-Adaptoren aufgenommen und mindestens 30 min. bei 4°C inkubiert, um die DNA zu resuspendieren

(4) Ligation EcoR I-Adapter

(a) Es wird folgendes zum Ansatz gegeben:

1,0 μ l 10x ligase buffer
1,0 μ l 10 mM rATP
1,0 μ l T4 DNA ligase (4U/ μ l)

(b) Die Reaktion wird herunterzentrifugiert und über Nacht bei 8°C inkubiert.

(c) Am nächsten Morgen erfolgt eine Hitzeinaktivierung der Ligase für 30 min. bei 70°C.

(d) Die Probe wird 2 sec. zentrifugiert und 5 min. auf Raumtemperatur abgekühlt.

(5) Phosphorylierung der ligierten Adapter

(a) Es wird in folgender Reihenfolge pipettiert:

1,0 μ l 10x ligase buffer
2,0 μ l 10 mM rATP
6,0 μ l ddH₂O
1,0 μ l T4 polynucleotide kinase (10U/ μ l)

(b) Die Phosphorylierung wird 30 min. bei 37°C durchgeführt und nachfolgend die Kinase für 30 min. bei 70°C hitzeinaktiviert.

- (c) Der Reaktionsansatz wird 2 sec. zentrifugiert und 5 min. auf Raumtemperatur abgekühlt.
- (6) Xho I-Verdau der cDNA
- (a) Es werden hinzugefügt:
- 28,0 µl Xho I buffer supplement
3,0 µl Xho I (40U/µl)
- (b) Die cDNA wird 1,5 Std. bei 37°C verdaut.
- (c) Um optimale Pufferbedingungen für die Größenfraktionierung zu schaffen, wird 5 µl 10x STE-Puffer zum Ansatz pipettiert.

3.1.5 Größenfraktionierung der cDNA mit Sepharose-Säulen

Um eine Klonierung zu kleiner und damit nur unvollständige Gene repräsentierender cDNA zu vermeiden, wird die cDNA über eine Sepharose-Säule aufgereinigt. In diesem Molekularsieb wird die DNA der Größe nach aufgetrennt. Größere, schwere cDNAs verdrängen die Gelpartikel durch ihr Gewicht schneller als kleine, leichte cDNAs. Daher werden nach Beladen der Säule große cDNA-Moleküle zuerst eluiert. Für die Klonierung werden nur die ersten eluierten Fraktionen verwendet, die die größten DNA-Stränge enthalten. Mit den hier eingesetzten Säulen erfolgt eine Anreicherung von cDNAs > 400 bp.

Material

Size Sep 400 Spun Columns (Pharmacia, Peapack, NJ)
STE-Puffer

Durchführung

- (1) Äquilibrierung der Säule
- (a) Die Säule wird mehrmals umgedreht, um das Gel zu resuspendieren.
- (b) Beide Verschlüsse werden abgenommen und der Puffer abgelassen. Hierbei ist darauf zu achten, daß die Säule nicht trocken läuft.
- (c) Die Säule wird mit 2 ml STE-Puffer beschickt, verschlossen und wieder mehrmals umgedreht, um das Gel zu resuspendieren. Der Puffer wird wieder entfernt.
- (d) Diese Waschschrte werden noch zweimal wiederholt. Das Abfließen des Puffers nach dem letzten Waschschrte wird gestoppt, bevor die Säule trocken läuft. Die Geloberfläche sollte von etwas Puffer bedeckt sein.
- (2) Größenfraktionierung
- (a) Die Verschlüsse werden entfernt, die Säule in einem 15 ml Falcon-Röhrchen festgeklebt und 2 min. bei 400 x g zentrifugiert.
- (b) Die cDNA wird auf die Mitte der Geloberfläche pipettiert, es sollte nichts neben die Säule laufen.

- (c) Die Säule wird in einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß festgeklebt, in ein 50 ml Röhrchen gesteckt und 2 min. bei nicht mehr als 400 x g zentrifugiert. In dieser ersten Fraktion sind die größten cDNA-Moleküle enthalten.
- (d) Die Säule wird noch zweimal mit je 60 µl STE-Puffer beschickt und es werden zwei weitere Fraktionen eluiert.

(3) Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung der cDNA

Die cDNA-Fraktionen werden wie bereits beschrieben Phenol-Chloroform-extrahiert und über Nacht gefällt (3.1.4 (3c + d)). Die Pellets werden in je 5 µl dd H₂O aufgenommen.

3.1.6 Mengenbestimmung der cDNA mittels Ethidium Bromide Plate

Assay

Eine genaue Bestimmung der cDNA-Menge ist notwendig, da das Verhältnis von Insert (cDNA) zu Vektor bei der Ligation eine wichtige Rolle spielt. Der Ethidium Bromide Plate Assay verwendet als Standards eine DNA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentration (200 ng/µl-10 ng/µl). Von jedem Standard werden 0,5 µl auf ein mit Ethidiumbromid versetztes Gel aufgetragen. Daneben wird 0,5 µl cDNA pipettiert. Unter UV-Licht kann die Konzentration der cDNA durch Vergleich mit der Fluoreszenz der Standard-DNA ermittelt werden.

Material

50x TAE-Puffer
 Ethidiumbromid-Lösung
 Salmon Sperm DNA (Stratagene, La Jolla, CA))
 100 mM EDTA-Lösung
 10 cm Petrischalen

Durchführung

- (1) Von der Salmon Sperm DNA (10 µg/µl) wird eine Verdünnungsreihe in 100 mM EDTA-Lösung hergestellt, so daß eine DNA-Standardreihe entsteht:

Standard-Verdünnung	Salmon Sperm DNA in EDTA
200 ng/µl	1 : 50
150 ng/µl	1 : 67
100 ng/µl	1 : 100
75 ng/µl	1 : 133
50 ng/µl	1 : 200
25 ng/µl	1 : 400
10 ng/µl	1 : 1000

- (2) 0,4 g Agarose werden durch Aufkochen in 50 ml 1x TAE gelöst (0,8%iges Gel). Das Gel wird auf 50°C abgekühlt und mit 10 µl Ethidiumbromidlösung versetzt. Je 10 ml Gel wird in eine 10 cm Petrischale gegossen.
- (3) Je 0,5 µl eines Mengenstandards wird vorsichtig (ohne Luftblasen) auf das Gel pipettiert, so daß eine Standardreihe mit den Konzentrationen 100 ng bis 5 ng DNA entsteht. Neben die Mengenstandards wird 0,5 µl cDNA aufgetragen.
- (4) Das Gel wird unter UV-Licht fotografiert und eine Mengenbestimmung durch Vergleich mit den DNA-Standards vorgenommen.

3.1.7 Ligation der cDNA in λ -Phagen-Vektor ZAP® II

Es können 50-150 ng cDNA/µg Vektor eingesetzt werden. Das optimale Vektor/Insert-Verhältnis wird durch Ligation unterschiedlicher cDNA-Mengen in 1 µg Vektor ermittelt.

Material

cDNA Synthesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA)

Vektor ZAP® II XR (Stratagene, La Jolla, CA)

Durchführung

- (1) Es werden in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert:

0,5 µl	cDNA~150 ng (Ligation 1) bzw. 0,3 µl cDNA~100 ng (Ligation 2)
0,5 µl	10x ligase buffer
0,5 µl	10 mM rATP
1,0 µl	ZAP® II (1µg/µl)
0,5 µl	T4 DNA ligase (4U/µl)
5 µl	
- (2) Die Reaktion wird über Nacht bei 12°C inkubiert.

3.1.8 Verpackungsreaktion

Nach der Ligation liegt die Phagen-DNA als rekombinante DNA vor. Es sollte möglichst nahezu jedes Phagen-DNA-Molekül ein cDNA-Insert enthalten. Die rekombinante DNA wird nun in Phagenpartikel verpackt und es entstehen infektiöse Phagen, welche ihr cDNA-Insert während der Vermehrung exprimieren. Die nach der Verpackung entstandene Expressionsbank wird auch als Primärbibliothek bezeichnet.

Material

Gigapack® III Gold Packaging Extract (Stratagene, La Jolla, CA)
 SM-Puffer
 Chloroform

Durchführung

- (1) Der Verpackungsextrakt wird in der Hand erwärmt, bis er beginnt zu tauen. 1-5 µl rekombinante DNA wird sofort hinzugegeben.
- (2) Der Ansatz wird durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Es dürfen keine Luftblasen entstehen. Die Reaktion wird kurz herunterzentrifugiert.
- (3) Die Inkubation erfolgt für 1,5 bis 2 Std. bei 22°C und sollte auf keinen Fall länger als 2 Std. dauern.
- (4) Die Verpackung wird durch Zugabe von 500 µl SM-Puffer beendet.
- (5) Es werden 20 µl Chloroform hinzugegeben, die Reaktion gemischt und durch kurzes zentrifugieren Zelltrümmer pelletiert.
- (6) Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.1.9 Titerbestimmung der Primärbibliothek mit Blau-Weiß-Selektion

Die „multiple cloning site“ des ZAP® II-Vektors befindet sich innerhalb des β -Galaktosidase Gens (*lacZ*-Gen). Die β -Galaktosidase setzt das Substrat x-gal zu einem blauen Farbstoff um. Befindet sich ein Insert im Vektor, so ist das Gen unterbrochen und es wird kein funktionsfähiges Enzym gebildet. Daher bilden Insert-tragende (rekombinante) Phagen weiße Plaques, nicht-rekombinante Phagen hingegen blaue Plaques.

A. Präparation der Wirtszellen XL1-Blue-MRF^c

Um eine Selektion Episom-tragender Bakterien zu erzielen, werden die Wirtszellen auf Tetrazyklin-haltigem LB-Medium ausgestrichen. Das Flüssigmedium zur Anzucht der Bakterien sollte mit Maltose und Magnesiumsulfat supplementiert werden, um die Infektion der Phagen zu ermöglichen. Diese binden über den Maltoserezeptor an die Bakterien und werden dabei durch $MgSO_4$ stabilisiert. Daher sollten alle Flüssig- und Festmedien, die für die Vermehrung von λ -Phagen in Bakterien verwendet werden, Maltose und $MgSO_4$ enthalten.

Material

Glycerolstamm XL1-Blue MRF^c
 LB-Tetrazyklin kleine Platten
 LB-Flüssigmedium + 0,2% Maltose/10mM $MgSO_4$
 10 mM $MgSO_4$

Durchführung

- (1) Je 10 µl einer 10^{-1} und 10^{-2} -Verdünnung des XL1-Blue MRF⁺ Glycerolstamms werden auf LB-Tetrazyklin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- (2) Es werden 5 x 3 ml LB + Maltose/MgSO₄ in 15 ml Bakterienröhrchen pipettiert und in jedes Röhrchen eine Kolonie XL1-Blue überführt.
- (3) Die Bakterien werden bei 37°C und ca. 200 rpm geschüttelt bis zu einer OD von 0,8-1,0 (4-6 Std.). Die Kulturen dürfen nicht überwachsen, da Phagen auch an tote Bakterien binden und somit der Titer verfälscht wird.
- (4) Die Wirtszellen werden 10 min. bei 2200 rpm pelletiert und das Pellet in der Hälfte des ursprünglichen Volumens (1,5 ml) in 10 mM MgSO₄ aufgenommen.
- (5) Die Bakterien können 2 Tage im Kühlschrank gelagert werden.

B. Titerbestimmung**Material**

SM-Puffer

LB + 0,2% Maltose/10 mM MgSO₄ kleine PlattenLB + 0,2% Maltose/10 mM MgSO₄ Top-Agar

IPTG 0,5 M

x-gal (40 mg/ml)

Durchführung

- (1) Von den Verpackungsreaktionen wird eine 1:10-Verdünnung in SM-Puffer erstellt. Hierzu wird 1 µl Verpackungsreaktion in 9 µl SM-Puffer transferiert.
- (2) Die Bakterien werden in 10 mM MgSO₄ bis zu einer OD von 0,5 verdünnt (1,5 ml auf 4 ml auffüllen).
- (3) In 1,5 ml Reaktionsgefäßen werden je 200 µl XL1-Blue mit 1 µl bzw. 1 µl der 10^{-1} -Verdünnung der Verpackungsreaktionen infiziert. Das Bakterien-Phagen-Gemisch wird 15 min. bei 37°C und 175 rpm inkubiert, um eine Anlagerung der Phagen zu ermöglichen.
- (4) Der Top-Agar wird währenddessen in der Mikrowelle erhitzt, bis er flüssig ist. Er sollte handwarm sein, wenn er zu der Bakterien-Phagen-Suspension gegeben wird.
- (5) In die entsprechende Zahl 15 ml Röhrchen (10 Stck. für 5 Verpackungsreaktionen) werden je 15 µl 0,5 M IPTG und 50 µl x-gal pipettiert.
- (6) Hierzu werden die Bakterien-Phagen-Mischung sowie je 3 ml Top-Agar gegeben. Die Reaktion wird gut gemischt und auf LB + Maltose/MgSO₄ ausplattiert.
- (7) Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag können blaue und weiße Plaques ausgezählt werden. Der Titer wird in pfu/ml angegeben. Formel zur Titerberechnung: Anzahl Plaques x Verdünnung x 1000 = pfu/ml

3.1.10 Amplifizierung der Primärbibliothek

Um eine stabile Bibliothek zu etablieren, werden die nach der Verpackung generierten Phagenklone noch einmal in Bakterien vermehrt.

A. Präparation der Wirtszellen XL1-Blue MRF⁶

Die Durchführung erfolgt wie bereits für die Titerbestimmung beschrieben. Da ein größeres Volumen Wirtszellen benötigt wird, werden 8 x 3 ml Nährmedium mit je einer Kolonie inkubiert.

B. Amplifizierung

Material

Verpackungsreaktionen
LB + 0,2% Maltose/10 mM MgSO₄ große Platten
LB + 0,2% Maltose/10 mM MgSO₄ Top-Agar
SM-Puffer
Chloroform

Durchführung

- (1) Die Bakterien werden in 10 mM MgSO₄ bis zu einer OD von 0,5 verdünnt (1,5 ml auf 4 ml auffüllen).
- (2) In 1,5 ml Reaktionsgefäße werden je 600 µl Bakterien und ca. 50.000 pfu der Verpackungsreaktionen pipettiert. Die Reaktionen werden 15 min. bei 37°C und 175 rpm inkubiert.
- (3) Die Bakterien-Phagen-Suspensionen werden mit 7,5 ml Top-Agar gemischt und auf große LB + Maltose/MgSO₄ Platten gegeben.
- (4) Die Platten werden 10-11 Std. bei 37°C inkubiert, bis die Plaques eine Größe von 1-2 mm erreicht haben.
- (5) Auf jede Platte wird 8-10 ml SM-Puffer pipettiert und die Schalen über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert.
- (6) Die Phagen diffundieren über Nacht in den Puffer. Am nächsten Morgen wird der Puffer von den Platten abgenommen und in ein steriles Gefäß überführt. Jede Platte wird nochmals mit 2 ml SM-Puffer gespült. Der gesammelte Puffer enthält die amplifizierte Bibliothek.
- (7) Die Bibliothek wird mit 5% Chloroform (finale Konzentration) versetzt, gemischt und 15 min. bei Raumtemperatur belassen.
- (8) Durch Zentrifugation bei 2200 rpm für 10 min. werden Zelltrümmer pelletiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Diese Aufreinigung (Mischen mit Chloroform und Zentrifugieren) wird so lange wiederholt, bis der Überstand klar ist (2-3 mal).

C. Titerbestimmung und Blau-Weiß-Selektion

Titer und Blau-Weiß-Selektion werden entsprechend den Vorgaben für die Verpackungsreaktionen durchgeführt. Da die amplifizierte Bank einen Titer von 10^8 - 10^{10} pfu/ml aufweist, müssen lediglich höhere Verdünnungen (10^{-3} - 10^{-7}) ausplattiert werden.

3.1.11 Lagerung der cDNA-Expressionsbank

λ -Phagen-Bibliotheken können ohne großen Titerverlust ca. ein Jahr im Kühlschrank aufbewahrt werden. Als Backups sollten jedoch Aliquots bei -80°C gelagert werden.

Material

Chloroform
DMSO

Durchführung

- (1) Die Hälfte der Bank (ca. 20-25 ml) wird in 1 ml Aliquots aufgeteilt und in jedes Gefäß 0,3% (finale Konzentration) Chloroform pipettiert, um ein Bakterienwachstum zu verhindern. Die Bank wird bei 4°C gelagert.
- (2) Die andere Hälfte der Bibliothek wird ebenfalls aliquotiert und mit 7% (finale Konzentration) DMSO gut gemischt. Die Bank wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.2 Immunisierung von Mäusen mit Membranfraktionen

Die Immunisierung der Mäuse ist Bestandteil einer anderen, im Rahmen des Mammakarzinom-Projektes angefertigten Doktorarbeit und wird daher nur kurz beschrieben.

3.2.1 Präparation der Membranfraktionen

Je 1×10^7 Zellen der Mammakarzinom-Zelllinien 870-BC und BT-474 werden gewaschen, herunterzentrifugiert und die Pellets in einem Sucrose-haltigen Lysispuffer resuspendiert. Die Zellen werden dreimal mit einer Ultraschallsonde sonifiziert und anschließend zentrifugiert, um ganze Zellen, Zellkerne und -trümmer abzutrennen. Der die Membranen enthaltende Überstand wird zweimal bei $100.000 \times g$ zentrifugiert und das Zellmembranpellet schließlich in 150 μl Puffer aufgenommen. Die Protein-Konzentration wird mit dem DC-Protein Assay Kit (Bio-Rad, München) bestimmt und beträgt 0,8-1,0 mg Protein/ml.

3.2.2 Immunisierung von Balb/c-Mäusen

Die Membranfraktionen der beiden Zelllinien werden 1:1 gemischt und mit einem Adjuvans subkutan verabfolgt. Die Immunisierung erfolgt in Woche 0, 3, 6 und 10. Es werden vor und nach der Vakzinierung wöchentlich Blutproben entnommen, um das Serum auf einen Anstieg des spezifischen Antikörpertiters zu untersuchen. Seren, welche den höchsten Antikörpergehalt aufweisen, werden zum Screening der Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank eingesetzt.

3.2.3 Kontrolle des Antikörpertiters mittels ELISA

Maxisorb-Platten werden mit Membranfraktionen der Zelllinie 870-BC beschichtet. In die einzelnen Vertiefungen wird je 100 µl einer steigenden Verdünnungsreihe des Mausserums pipettiert (1:100-1:100.000). Der Bindungsnachweis erfolgt mit einem Peroxidase gekoppelten Schaf anti-Maus IgG-Antikörper. Der Substratumsatz durch die Peroxidase in der Entwicklungsreaktion ergibt ein Produkt von gelb-brauner Farbe. Die Absorption jeder Vertiefung wird bei 450 nm im ELISA-Reader (MWG-Biotech, Ebersberg) gemessen. Der Titer ist definiert als der reziproke Wert der höchsten Serum-Verdünnung, die ein Signal ergibt, das mindestens doppelt so stark ist wie der Hintergrund.

3.3 Screening der Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank mit Serum immunisierter Mäuse (SEREX)

3.3.1 Absättigung des Serums gegen E.coli-Proteine durch Pseudoscreening

Da sich nahezu alle Lebewesen mit Coli-Keimen auseinandersetzen, enthält jedes Serum Antikörper, welche gegen E.coli-Proteine gerichtet sind. Diese Immunglobuline binden an die in den Plaques durch Phagenlyse entstandenen Bakterienproteine. Da jeder an den Filter gebundene Antikörper, ob spezifisch oder unspezifisch, durch den Sekundärantikörper nachgewiesen wird, verursachen anti-E.coli Antikörper eine starke Hintergrundfärbung sämtlicher Plaques. Um solche Antikörper vor dem Screening aus dem Serum zu entfernen, wird ein sogenanntes Pseudoscreening durchgeführt. Extrakte von Coli-Proteinen werden an Nitrozellulosefilter gebunden und diese mit dem Serum inkubiert. Anti-E.coli Antikörper binden an die Filter und werden so aus dem Serum entfernt. Das aufgereinigte Serum kann unter Zusatz von Natrium-Azid mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden, ohne seine Aktivität zu verlieren.

A. Herstellung von Coli-Lysat

Zur Herstellung des zur Absättigung verwendeten Coli-Lysats werden die Wirtsbakterien der Phagen eingesetzt (XL1-Blue MRF^c).

Material

LB-Tetrazyklin kleine Platten
LB-Flüssigmedium
Glycerolstamm XL1-Blue MRF^c
Lysispuffer

Durchführung

- (1) Die Bakterien werden wie bereits beschrieben (3.1.9) auf LB-Tetrazyklinplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- (2) Eine Kolonie von der Platte wird mit einer sterilen Öse in 100 ml LB-Flüssigmedium überführt und die Kultur über Nacht bei 37°C geschüttelt.
- (3) Die Bakterien werden 10 min. bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 3 ml Lysispuffer resuspendiert.
- (4) Die Lösung wird 4-6 mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut.
- (5) Das Lysat wird auf Eis 6 mal für 20 sec. mit einer Ultraschallsonde sonifiziert.
- (6) Zelltrümmer werden durch 10 minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm pelletiert und der die Proteine enthaltende Überstand in frische Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Das Coli-Lysat wird bei -20°C gelagert.

B. Absättigung des Serums

Material

TBS pH 7,5
TBST pH 7,5 (TBS + 0,05% Tween)
BSA
0,45 µm Nitrozellulosefilter
15 cm Glaspetrischalen
Coli-Lysat
Coli-Phage-Lysate (Stratagene, La Jolla, CA)
10% Na-Azid

Durchführung

- (1) Je 2 ml selbst hergestelltes Coli-Lysat und Coli-Phage-Lysate von Stratagene werden mit TBST 1:40 auf 80 ml verdünnt.
- (2) Jede Lysatverdünnung wird in 2 Glaspetrischalen gegeben (2 mal 40 ml) und in jede Schale werden zwei Nitrozellulosefilter gelegt (4 Filter pro Lysat).

- (3) Die Filter werden 30 min. bei Raumtemperatur langsam auf dem Rundschtüttler bewegt.
- (4) Die Filter werden auf Whatman-Papier getrocknet und danach 4 mal für je 5 min. in TBS gewaschen (20 ml pro Filter).
- (5) Die Blockierungsreaktion erfolgt 30 min. bei Raumtemperatur in TBS + 3% BSA.
- (6) Die Filter werden 3 mal für je 5 min. in TBST gewaschen.
- (7) 1 ml Serum wird in TBS auf 20 ml verdünnt und jeder Filter wird mit dem Serum 10 min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert.
- (8) Das Serum wird mit 0,5% Na-Azid versetzt, um Bakterienwachstum zu verhindern und bei 4°C gelagert.

3.3.2 Ausplattieren der cDNA-Expressionsbank und Übertragung der Phagenplaques auf Nitrozellulosefilter (Plaque Lift)

Pro 15 cm Agarplatte sollten nicht mehr als 40.000 pfu ausplattiert werden. Bei einer höheren Dichte gehen die einzelnen Plaques ineinander über und eine saubere Detektion des Proteins ist nicht möglich. Die Vermehrung der Phagen erfolgt zunächst ohne die Zugabe von IPTG. Durch den von den Bakterien gebildeten Repressor wird die Synthese von rekombinantem Fusionsprotein inhibiert. Da manche Fusionsproteine für die Bakterienzelle toxisch sind, wird die Synthese rekombinanten Proteins erst mit beginnender Plaquebildung induziert, um ein Hochwachsen aller Klone zu ermöglichen. Dies geschieht durch Auflegen IPTG getränkter Filter nach einer Inkubationszeit von ca. 4 Std. Die Phagen werden weitere 3,5 Std. vermehrt und bilden in dieser Zeit innerhalb der Bakterien Fusionsprotein, das nach Lyse der Wirtszellen in den Plaques vorliegt und auf Nitrozellulosefilter übertragen wird.

A. Präparation der Wirtszellen XL1-Blue MRF⁺

Siehe 3.1.9 A

B. Plaque Lift

Material

Die Angaben beziehen sich auf das Ausplattieren von 6 großen (15 cm) Agarplatten
 6 Stck. LB + 0,2% Maltose/10 mM MgSO₄ große Platten
 ~ 50 ml LB + 0,2% Maltose/10 mM MgSO₄ Top-Agar
 SM-Puffer
 cDNA-Expressionsbank
 3,6 ml XL1-Blue MRF⁺ OD 0,5 in 10 mM MgSO₄
 1,6 ml 0,5 M IPTG
 steriles dd H₂O
 6 Nitrozellulosefilter
 Kimwipe-Tücher

Stempelkissentinte
Tuberkulinspritze
Kanüle 0,7 mm
TBS pH 7,5
Magermilchpulver
Glaspetrischalen mit Deckel

Durchführung

- (1) Die cDNA-Expressionsbank wird 1:100 in SM-Puffer verdünnt.
- (2) 6 x 600 µl XL1-Blue OD 0,5 werden mit je einem Volumen der verdünnten Bank infiziert, das ca. 40.000 pfu entspricht.
- (3) Das Gemisch wird 15 min. bei 37°C und 175 rpm inkubiert.
- (4) In der Zwischenzeit wird der Top-Agar in der Mikrowelle erhitzt und kann anschließend abkühlen.
- (5) Die Bakterien-Phagen-Suspension wird in sterile 15 ml Röhrchen überführt, mit je 7,5 ml handwarmem Top-Agar gemischt und auf 15 cm Agarplatten gegossen.
- (6) Die Platten werden 20 min. bei Raumtemperatur belassen, damit der Agar aushärtet.
- (7) Die Platten werden für 3,5-4,5 Std. bei 42°C inkubiert, bis kleine Plaques gerade sichtbar werden.
- (8) Während dieser Inkubationsphase wird 1,6 ml 0,5 M IPTG-Lösung mit sterilem Wasser auf 80 ml verdünnt (10 mM Lösung) und je 40 ml in eine große Petrischale gefüllt.
- (9) Die Nitrozellulosefilter werden nummeriert, sukzessive in die IPTG-Lösung gelegt, bis die Oberfläche vollständig benetzt ist, 10-20 min. inkubiert und dann auf Kimwipetüchern getrocknet.
- (10) Sobald auf der gesamten Platte kleine Plaques zu sehen sind, werden die Filter auf den Agar gelegt.
- (11) Die Phagen werden weitere 3,5 Std. bei 37°C vermehrt. 20 min. vor Ende der Inkubationszeit werden die Deckel der Petrischalen geöffnet, um die Platten zu trocknen und somit das Abziehen der Filter zu erleichtern.
- (12) Die Platten werden auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lage der Filter muß markiert werden, um das Identifizieren positiver Klone auf den Platten sicherzustellen. Die Filter werden jeweils am Rand an drei asymmetrischen Punkten mit einer Kanüle durchstoßen und etwas Tinte in den Agar gespritzt.
- (13) Die Filter werden mit einer Pinzette abgezogen und in TBS überführt. Die Protein-tragende Seite sollte sich hierbei oben befinden. Jede Petrischale kann mit bis zu 4 Filtern bestückt werden. Das Puffervolumen pro Filter sollte mindestens 20 ml betragen, um ein Aneinanderkleben der Nitrozellulose zu verhindern.
- (14) Die Filter werden 2 mal 15 min. und abschließend noch einmal 30 min. in TBST gewaschen.
- (15) Die Absättigung freier Bindungsstellen erfolgt in TBS + 5% Magermilchpulver über Nacht bei 4°C.

3.3.3 Inkubation der Filter mit Serum

Material

TBS pH 7,5
TBST pH 7,5 (TBS + 0,05% Tween)
Mausserum
10% Na-Azid
Waschpuffer TBST pH 7,5 + 1% BSA
Magermilchpulver
Glaspetrischalen mit Deckel

Durchführung

- (1) Nach dem Blocken werden die Filter 2 mal 15 min. in TBS gewaschen.
- (2) Um 6 Blots zu screenen muß das Serum auf ein Volumen von mindestens 90 ml verdünnt werden (15 ml pro Blot). 8 µl Serum werden in 90 ml TBST aufgenommen (Verdünnung 1:11.250) und 90 µl 10%iges Na-Azid (Endkonzentration 0,1%) sowie 240 mg Magermilchpulver (Endkonzentration 0,2%) hinzugegeben.
- (3) Jeder Filter wird einzeln in einer Petrischale mit 15 ml des verdünnten Serums über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rundschüttler inkubiert.
- (4) Am nächsten Tag wird das Serum abpipettiert, mit 0,5% Na-Azid (finale Konzentration) versetzt und im Kühlschrank aufgehoben.
- (5) Die Blots werden 3 mal 10 min. in TBST + 1% BSA gewaschen.

3.3.4 Nachweis gebundener Antikörper im APAAP-Assay (Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase-Assay)

Gebundene Antikörper können auf den Blots durch enzymgekoppelte Sekundärantikörper (anti-Maus) nachgewiesen werden. Das Enzym setzt ein bestimmtes Substrat zu einem Farbstoff um. Auf dem Blot bildet sich an der Stelle, an die Antikörper gebunden haben, ein farbiger Niederschlag. Die Enzymreaktion mit Alkalischer Phosphatase ergibt eine rötliche Farb-reaktion.

Das APAAP-System basiert auf einer Verstärkung der AP-Wirkung durch Vernetzung AP-bindender-Antikörper über Brückenantikörper.

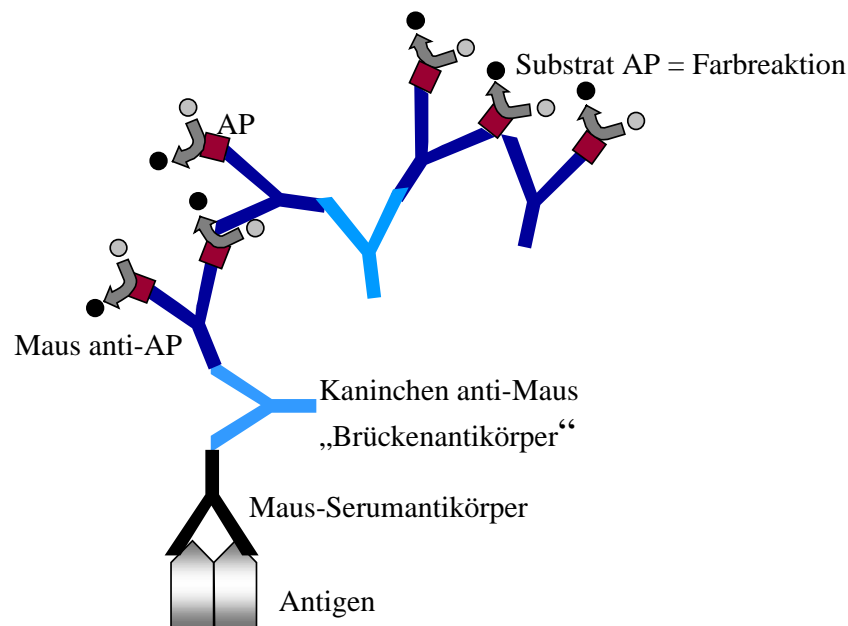


Abbildung 3.3.4 APAAP-Assay

Material

Waschpuffer TBST pH 7,5 + 1% BSA

20 mM Tris-Cl pH 8,2

Brücken-Antikörper: Kaninchen-anti-Maus

Überstand Maus anti-Alkalische Phosphatase Antikörper

Naphthol-AS-Bisphosphat

DMF

Levamisol

Fast Red

Faltenfilter 595 ½

Whatman-Papier

} Entwickler-Lösung

Durchführung

- (1) Der Brücken-Antikörper wird 1:30 in Waschpuffer verdünnt und die Blots 1 Std. mit je 15 ml Antikörper-Lösung unter Schütteln inkubiert.
- (2) Der Brücken-Antikörper wird abpipettiert und aufgehoben. Die Blots werden 3 mal 5 min. mit Waschpuffer gewaschen.
- (3) Danach werden die Filter 1 Std. mit je 15 ml des Maus anti-Alkalische Phosphatase-Überstandes inkubiert. Dieser wird ebenfalls abpipettiert und aufgehoben. Die Blots werden wie oben gewaschen.
- (4) Die Schritte (1)-(3) werden einmal wiederholt. Die Inkubationszeit der Antikörper beträgt 45 min.

- (5) Die Filter werden 2 mal mit Waschpuffer und abschließend 4 mal mit Tris-Cl pH 8,2 je für einige min. gewaschen.
- (6) Die Entwicklerlösung wird wie folgt angesetzt: 40 mg Naphthol-AS-Bisphosphat werden in 4 ml DMF aufgenommen. Das Naphthol, 20 mg Levamisol sowie 200 mg Fast Red werden in 200 ml Tris-Cl pH 8,2 gelöst. Der Entwickler wird durch Faltenfilter filtriert, um ungelöstes Fast Red zu entfernen.
- (7) Die Blots werden 2 Std. bei 37°C mit je 20 ml Entwickler unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wird mit Wasser abgestoppt und die Filter auf Whatman-Papier getrocknet.

3.3.5 Separation positiver Plaques von der Platte

Um positive Signale in einem 2. Screening zu bestätigen, werden positive Plaques aus dem Agar ausgestochen, die enthaltenen Phagen aufgereinigt und erneut ausplattiert.

Material

Kopierfolie
Kanüle 0,7 mm
SM-Puffer
gelbe Pipettenspitzen
Chloroform

Durchführung

- (1) Die Kopierfolie wird auf Form und Größe der Filter zugeschnitten. Positive Plaques sowie die Lagemarkierungen werden auf die Folie übertragen.
- (2) Die Folien werden von außen unten auf die Agarplatten gelegt und die Bereiche positiver Plaques durch Einstechen der Kanüle in die Petrischale markiert. Es entsteht ein kleines Loch im Kunststoff, das mit Folienstift farbig markiert wird.
- (3) Das spitze Ende einer gelben Pipettenspitze wird abgeschnitten. Mit der Pipettenspitze wird der Bereich um den markierten Plaque ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer + 20 µl Chloroform überführt.
- (4) Das Agarstück wird gevortext und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Phagen diffundieren in den Puffer.
- (5) Das Gemisch wird 4 min. bei 10.200 rpm zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorf-Gefäße übertragen.
- (6) Es werden 5% Chloroform (finale Konzentration) hinzupipettiert, die Lösung gemischt und 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert, um Bakterien und Zelltrümmer auszufällen.
- (7) Die Reaktion wird 10 min. bei 4400 rpm zentrifugiert und der Überstand in frische Eppendorf-Gefäße pipettiert. Der Phagenlösung wird 0,3% Chloroform (finale Konzentration) zugeetzt. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank.

3.3.6 Subklonierung positiver Phagen zur Vereinzelung positiver Plaques

Um für eine Insertsequenzierung einen einzelnen, positiven Plaque zu gewinnen, müssen die positiven Klone vereinzelt werden. Dies geschieht durch Ausplattieren steigender Verdünnungen der positiven Phagen. Eine Plaquedichte von 500-750 pfu pro 15 cm Agarplatte ermöglicht zumeist die Separation einzelner Klone.

Material

Siehe 3.3.2 bis 3.3.5

Durchführung

- (1) Titer positive Klone 1. Screening
Der Titer der aufgereinigten positiven Phagen des 1. Screenings wird bestimmt. Er beträgt erfahrungsgemäß 10^6 - 10^7 pfu/ml. Es wird je 1 μ l einer 5×10^{-2} und einer $2,5 \times 10^{-2}$ -Verdünnung ausgestrichen (siehe 3.1.9), auf eine Blau-Weiß-Selektion kann verzichtet werden.
- (2) 2. Screening
Es werden je 20.000 pfu der positiven Plaques des 1. Screens eingesetzt
siehe 3.3.2 bis 3.3.4
- (3) Separation positive Plaques 2. Screening
siehe 3.3.5
- (4) Titer positive Klone 2. Screening
siehe (1)
- (5) 3. Screening, Vereinzelung positiver Klone
Es werden 500-750 pfu der positiven Phagen des 2. Screenings ausplattiert
siehe 3.3.2 bis 3.3.4
- (6) Separation einzelne positive Plaques 3. Screening
siehe 3.3.5
- (7) Titer Klone 3. Screening
siehe (1)

3.3.7 Excision des p-Bluescript-Plasmids aus λ -Phagen mit ExAssist Helferphagen

A. Präparation der Wirtszellen

Material

LB-Tetrazyklin kleine Platten
 LB-Kanamycin kleine Platten
 Glycerolstamm XL1-Blue MRF^c
 Glycerolstamm SOLR
 LB + 0,2% Maltose/MgSO₄-Flüssigmedium

LB-Flüssigmedium
10 mM MgSO₄

Durchführung

Die Gewinnung der Wirtsbakterien erfolgt wie unter 3.1.9 A beschrieben. Die XL1-Blue-Zellen werden auf LB-Tetrazyklin ausgestrichen und in LB + 0,2% Maltose/MgSO₄ inkubiert. Der SOLR-Stamm wird auf LB-Kanamycin ausgestrichen und in LB kultiviert. Für die Flüssigkulturen wird je eine Bakterienkolonie in 4 ml Medium aufgenommen, bis zu einer OD von 0,8-1,0 vermehrt und 10 min. bei 2200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert und bei 4°C gelagert. Vor ihrer Verwendung werden die Bakterien mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD von 1,0 verdünnt.

B. Excision

Material

XL1-Blue MRF^c OD 1,0 in 10 mM MgSO₄
SOLR OD 1,0 in 10 mM MgSO₄
2 x YT Flüssigmedium
Positiver Phagenklon (> 50.000 pfu)
ExAssist (> 1 x 10⁶ pfu/μl)
LB-Ampicillin kleine Platten

Durchführung

- (1) 200 μl XL1-Blue MRF^c OD 1,0 werden mit 100 μl des λ-Phagen-Klons (> 50.000 pfu/ml) und 1 μl ExAssist-Helferphagen in einem 50 ml Röhrchen gemischt und 15 min. bei 37°C und 190 rpm geschüttelt.
- (2) Es werden 5 ml 2 x YT-Flüssigmedium hinzugegeben und die Kultur weitere 2,5 Std. bei 37°C unter Schütteln inkubiert.
- (3) Die Bakterien-Phagen-Suspension wird 20 min. auf 70°C erhitzt, um die Wirtszellen abzutöten.
- (4) Die Bakterien werden 15 min. bei 4000 x g pelletiert, der die Phagmide enthaltende Überstand wird in neue Röhrchen überführt und im Kühlschrank gelagert.
- (5) Je 200 μl SOLR-Zellen OD 1,0 werden mit 1 μl und 25 μl des Phagmid-Überstandes vermischt und 15 min. bei 37°C inkubiert.
- (6) Von dem 1 μl-Ansatz werden 15 μl, von dem 25 μl-Ansatz 5 μl auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

3.3.8 Plasmid-DNA-Minipräparation

Es wird das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dieses basiert auf der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim & Doly (1979). Die Bakterien werden in einem

NaOHSDS-Puffer (Puffer P2) unter Zusatz von RNase lysiert. SDS löst Phospholipide und Proteine aus der Zellwand, die alkalischen Bedingungen führen zur Denaturierung der Proteine sowie chromosomaler und Plasmid-DNA. Die optimale Lysisdauer ermöglicht maximale Freisetzung von Plasmid-DNA ohne gleichzeitige Fällung von chromosomaler DNA.

Durch Zugabe von Puffer N3 wird das Lysat neutralisiert und eine hohe Salzkonzentration eingestellt. Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration werden denaturiertes Protein, chromosomale DNA, Zelltrümmer und SDS präzipitiert. Plasmid-DNA wird renaturiert und bleibt in Lösung.

Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wird auf QIAprep-Säulen aufgetragen und die DNA an die Silica-Gel-Membran gebunden. In mehreren Waschschrritten werden Endonucleasen (Puffer PB) und Salze (Puffer PE) entfernt. Die DNA wird mit sterilem Aqua Dest. von der Säule eluiert.

Material

LB-Flüssigmedium
Ampicillin (50mg/ml)
QIAprep Spin Miniprep Kit
Autoklaviertes ddH₂O

Durchführung

- (1) 3 ml LB-Flüssigmedium werden mit 6 µl Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) versetzt und mit einer Bakterienkolonie inokuliert.
- (2) Die Kultur wird über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert.
- (3) 1,5 ml der Übernachtskultur werden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und die Bakterien für 5 min. bei 6000 rpm pelletiert.
- (4) Das Pellet wird in 250 µl Puffer P1 (Resuspendierungspuffer) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst.
- (5) Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 (Lysispuffer) werden die Bakterien durch fünfmaliges Invertieren lysiert.
- (6) Es werden 350 µl Puffer P3 (Neutralisierungspuffer) hinzugegeben, die Gefäße wieder fünfmal invertiert und das Präzipitat 10 min. bei 14.000 rpm abzentrifugiert.
- (7) Der Überstand wird auf QIAprep Spin-Säulen übertragen, die in ein 2 ml Sammelröhrchen gesteckt werden.
- (8) Nach einminütiger Zentrifugation (14.000 rpm) wird der Durchfluß verworfen, 500 µl Puffer PB auf die Säule gegeben und erneut wie zuvor zentrifugiert.
- (9) Der Durchfluß wird entfernt und die Matrix mit 750 µl Puffer PE gewaschen (Zentrifugation 1 min., 14.000 rpm).
- (10) Das Filtrat wird verworfen und die Säule noch einmal 1 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert, um die Matrix vollständig zu trocknen.
- (11) Die Säule wird in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesteckt und 50 µl ddH₂O in die Mitte der Membran pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 min. wird die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (1 min., 14.000 rpm) eluiert.

3.3.9 Anlegen von Bakterien-Glycerolstämmen

Von SOLR Bakterien, die das pBluescript-Plasmid positiver Klone tragen, werden als Backups Aliquots bei -80°C eingefroren.

Material

LB-Ampicillin Platten mit SOLR-Einzelkolonien (von Excision)
LB-Ampicillin Flüssigmedium
87% Glycerol, steril filtriert

Durchführung

- (1) Eine Bakterienkolonie wird von der Platte in 3 ml LB-Ampicillin überführt
- (2) Die Bakterien werden bis zu einer OD von 0,8-1,0 kultiviert.
- (3) Um eine Endkonzentration von 15% zu erreichen werden zu 3 VT Bakterienkultur 0,7 VT 87%iges Glycerol gegeben.
- (4) Die Lösung wird gut gemischt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.10 Restriktionsverdau des pBluescript-Plasmids und Größenbestimmung des Inserts im Gel

Um die Insertgröße zu ermitteln, werden die aus der λ -Phagen-DNA mittels Helferphagen amplifizierten Plasmide Xho I/EcoR I verdaut. Das Insert wird herausgeschnitten und die Größe kann durch Agarosegelelektrophorese bestimmt werden.

Material

Plasmid-DNA
Restriktionsenzym Xho I
Restriktionsenzym EcoR I
10x Restriktionsenzympuffer H
Autoklaviertes ddH₂O
Mineralöl

Durchführung

- (1) In ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß werden pipettiert:
4,0 μl Plasmid-DNA
4,0 μl ddH₂O

1,0 μ l 10x Puffer H
 0,5 μ l EcoR I
 0,5 μ l Xho I

10,0 μ l

Die Reaktion wird gemischt und mit einem Tropfen Öl überschichtet.

- (2) Die DNA wird über Nacht bei 37°C verdaut.
- (3) Jede Reaktion wird mit 3 μ l Ladepuffer aufgefüllt und in einem 1%igen Agarosegel analysiert (siehe 3.1.3). Durch Vergleich mit einem 100 bp-Größenstandard kann die Größe des Inserts bestimmt werden.

3.3.11 Plasmid-Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der enzymatischen Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Sie beruht auf dem Einbau eines 2',3'-Didesoxynukleotids (ddNTP), so daß die DNA-Polymerase aufgrund der fehlenden OH-Gruppe des ddNTP den neu zu synthetisierenden Strang nicht weiter verlängern kann. Es wurde das Big-Dye Terminator Sequenzierkit von PE Applied Biosystems verwendet. Hierbei sind die Desoxynukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert, die es ermöglichen, die entstehenden PCR-Fragmente in einer anschließenden Gelelektrophorese mittels Laser zu detektieren. Der Reaktionsmix des Kits enthält bereits Taq-Polymerase, Reaktionspuffer und die mit Farbstoffen markierte Nukleotidmischung. Zur Durchführung der PCR-Reaktion müssen nur noch Plasmid-DNA und die gewünschten Primer hinzugegeben werden. Die Herstellung des Polyacrylamid-Sequenzgels sowie die Gelelektrophorese auf dem ABI-PRISM 377 DNA-Sequencer erfolgten im Sequenzierlabor des SFB 502 und werden nicht näher beschrieben.

Material

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
 Plasmid-DNA
 Sequenzierprimer T3 und T7 (2,5 μ M)
 3M Na-Azetat mit Dextranblau
 100% und 70% Ethanol

Durchführung

- (1) In ein 0,5 ml PCR-Röhrchen werden pipettiert:
 - 10,7 μ l Plasmid-DNA
 - 1,3 μ l T3 bzw. T7 Primer (2,5 μ M)
 - 8,0 μ l Terminator Ready Reaction Mix

20,0 μ l

- (2) Die Reaktion wird durch Auf- und Abpipettieren gemischt und mit 40 μ l Mineralöl überschichtet.
- (3) Es werden 35 Zyklen des folgenden PCR-Programms ausgeführt:
 - 96°C 30 sec.
 - 50°C 15 sec.
 - 60°C 4 min.
 Danach wird die Lösung auf 4°C heruntergekühlt.
- (4) Die Reaktion wird ohne Öl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2 μ l 3M Na-Azetat sowie 50 μ l 100%igem Ethanol gemischt.
- (5) Die DNA wird 30 min. bei Raumtemperatur gefällt und anschließend bei 4°C und 15.000 rpm für 30 min. pelletiert.
- (6) Das Pellet wird mit 250 μ l 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 10 min. bei 4°C zentrifugiert.
- (7) Das PCR-Produkt wird 1 min. bei 90°C getrocknet und bis zur Auftragung auf das Gel bei -20°C aufbewahrt.

3.4 Genexpressionsanalysen

3.4.1 Polymerase chain reaction (PCR)

Das Prinzip der PCR beruht auf einer zyklischen Wiederholung dreier Reaktionsschritte, die bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen. Im ersten Schritt werden die zu amplifizierenden DNA-Moleküle durch Hitze denaturiert. Die DNA-Stränge lösen sich voneinander und ermöglichen so im nächsten Schritt eine Primer-Anlagerung (Denaturierung). Die Primer hybridisieren unter geeigneten Temperaturbedingungen mit je einem der beiden DNA-Einzelstränge. Hierbei lagert sich der sogenannte „For-Primer“ an den „Sense-Strang“ (+Strang) und der „Back-Primer“ an den Antisense-Strang (-Strang) (Annealing). Im letzten Teil der PCR-Reaktion erfolgt die Verlängerung dieser Startermoleküle entlang der einzelsträngigen Matrize durch eine hitzestabile Taq-DNA-Polymerase (Elongation).

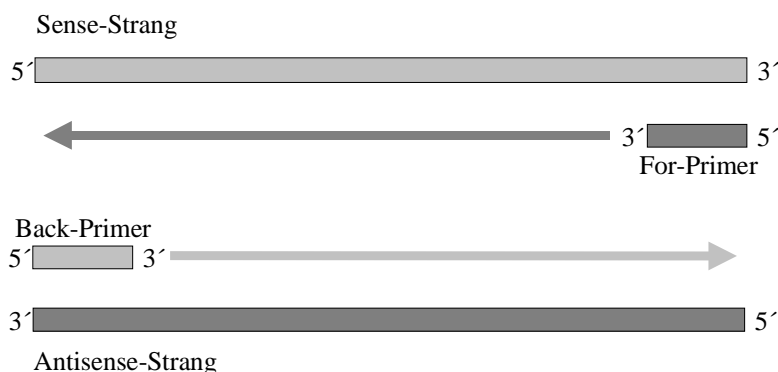


Abbildung 3.4.1 PCR

Polymerase-Ketten-Reaktionen werden in sogenannten programmierbaren „Thermal Cyclern“ durchgeführt. Diese enthalten entweder einen Heizblock, welcher innerhalb kurzer Zeit zwischen den erforderlichen Temperaturen hin- und herwechselt oder die Reaktionsgefäße werden über einen schwenkbaren Arm in Blöcken unterschiedlicher Temperatur plaziert („Robocycler“). Das PCR-Produkt kann anschließend durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert werden. Werden Primer verwendet, welche einen Abschnitt eines bestimmten Gens amplifizieren, so kann die Genexpression in der cDNA von Zellen oder Geweben evaluiert werden. Eine Quantifizierung durch anschließende Mengenbestimmung des PCR-Produkts im Gel oder im Photometer ist jedoch nur schwer möglich und mit vielen Fehlern behaftet.

Material

Matrizen-DNA
 10x Taq-Polymerase-Puffer
 dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
 For- und Back-Primer (100 ng/μl)
 Taq-DNA-Polymerase
 ddH₂O
 Mineralöl

Durchführung

- (1) Pro 50 μl PCR-Reaktion werden eingesetzt:
 - 36,5 μl ddH₂O
 - 5,0 μl 10x Taq-Polymerase-Puffer
 - 1,0 μl For-Primer
 - 1,0 μl Back-Primer
 - 1,0 μl dNTP-Mix
 - 5,0 μl Matrizen-DNA
 - 0,5 μl Taq-Polymerase
- (2) Der Ansatz wird mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und die DNA wird mit folgendem Programm amplifiziert:
 - 95°C 5 min. → initiale Denaturierung
 - 30-65°C 2 min. → initiale Primer-Anlagerung (Annealing)
 - 68°C 3 min. → initiale DNA-Synthese (Elongation)
 - 95°C 30 sec. → Denaturierung
 - 30-65°C 30 sec. → Annealing
 - 68°C 2 min. → Elongation
 - 68°C 10 min. → abschließende Elongation
 - 4°C Pause → Kühlung des PCR-Produktes

} 35 Zyklen
- (3) Die amplifizierte DNA wird auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert.

3.4.2 One Step RT-PCR

Die RT-PCR unter Verwendung einer normalen PCR-Maschine eignet sich zum Nachweis eines bestimmten Gens in einer RNA-Präparation. Die mRNA wird mit genspezifischen Primern unter Zusatz von dNTPs und einer Reversen Transkriptase zunächst in cDNA umgeschrieben. Nach Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase wird die cDNA in einer PCR-Reaktion vervielfältigt. Mittels einer solchen RT-PCR kann die Genexpression in der RNA von Zellen oder Geweben dokumentiert werden. Mit dem ProSTAR™-RT-PCR-System von Stratagene ist es möglich, cDNA-Synthese und anschließende PCR in einem Reaktionsgefäß unter Verwendung eines PCR-Programmes durchzuführen.

Material

Gesamt-RNA

ProSTAR™ HF Single-Tube RT-PCR System (High Fidelity) (Stratagene, La Jolla, CA)

Genspezifische Primer (100 ng/μl)

Durchführung

(1) Es werden in ein 0,5 ml PCR-Röhrchen pipettiert:

- 39,5 μl RNase-free water
- 5,0 μl 10x HF RT-PCR buffer
- 1,0 μl Genspezifischer Primer For
- 1,0 μl Genspezifischer Primer Back
- 1,0 μl dNTP Mix (40mM)
- 1,0 μl RNA

(2) Die MMLV-RT wird wie folgt verdünnt:

- 6,7 μl RNase-free water
- 0,8 μl 10x HF RT-PCR buffer
- 0,5 μl MMLV-RT

8,0 μl

(3) 1,0 μl der verdünnten MMLV-RT und 0,5 μl TaqPlus Precision DNA Polymerase Mixture werden zur Reaktion pipettiert.

(4) Der Ansatz wird gemischt und mit 40 μl Mineralöl bedeckt.

(5) Auf einem „Thermal Cycler“ wird folgendes Programm ausgeführt:

- 37°C 15 min. → cDNA Synthese
 - 95°C 1 min. → Hitzeinaktivierung RT
 - 95°C 30 sec. → Denaturierung
 - 60°C 30 sec. → Primer Annealing
 - 68°C 2 min. → Elongation
 - 68°C 10 min. → abschließende Elongation
 - 4°C Pause → Kühlung des PCR-Produktes
- } 40 Zyklen

(6) Die Analyse des PCR-Produktes erfolgt in 1%igem Agarosegel.

3.4.3 Quantifizierung der Genexpression mittels real time PCR auf dem LightCycler™

3.4.3.1 Besonderheiten der PCR-Reaktionskomponenten für die Quantifizierung

Die LightCycler™-Kits beinhalten ein fertiges Reaktionsmix sowie 25 mM MgCl₂-Lösung zum Einstellen der optimalen MgCl₂-Konzentration. Der DNA Master SYBR® Green I Mix enthält Reaktionspuffer, Taq-Polymerase, 10 mM MgCl₂, SYBR® Green I sowie einen dNTP-Mix, in welchem dTTP durch dUTP ersetzt ist. Durch den Einbau von dUTP können nach Zusatz von Uracil DNA Glycosylase (UNG) sogenannte „carry-over“ Kontaminationen vermieden werden. Durch Kontaminationen mit DNA vorheriger PCRs kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Die Uracil DNA Glycosylase setzt Uracil aus einzel- und doppelsträngiger DNA frei und bedingt eine Degradation. LightCycler™ PCR-Ansätze werden daher 5 min. mit hitzelabiler UNG inkubiert. Hierbei wird die dUTP enthaltende DNA früherer Reaktionen degradiert. Native DNA-Matrizen oder Primer, welche kein dUTP tragen, bleiben intakt. Zu Beginn des PCR-Laufes wird der Ansatz zunächst 2 min. auf 94°C erhitzt, um die UNG zu zerstören.

Um die Bildung von Primer-Dimeren, frühzeitige Elongationen sowie unspezifischen Primer-Anlagerungen zu verhindern, werden Quantifizierungs-PCRs auf dem LightCycler™ immer mit einem Hot Start durchgeführt. Hierfür wird der Reaktion ein anti-Taq DNA Polymerase Antikörper zugesetzt, der das Enzym bis zu einer Temperatur von 70°C inhibiert. Durch den ersten 94°C Temperaturschritt wird der Antikörper zerstört. Für den LightCycler™ eignet sich nur dieses Verfahren, da die manuelle oder Wachs Hot Start-Technik aufgrund der schmalen Kapillaren nicht möglich sind.

3.4.3.2 Quantifizierung eines Gens in Gewebeproben cDNA

Ermittelt werden soll die cDNA-Menge eines bestimmten Gens in mehreren Tumorproben im Vergleich zur Expression in einer Normalgewebe-Probe des gleichen Organs. Hiermit soll untersucht werden, ob das Gen im Tumorgewebe unter- oder überexprimiert ist.

A. Erstellung einer Standard-Verdünnungsreihe des zu amplifizierenden Gens

Material

- cDNA
- 10x Taq-Polymerase-Puffer
- dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- genspezifische For- und Back-Primer (100 ng/μl)
- Taq-DNA-Polymerase

ddH₂O
 Mineralöl
 QIAquick Gel Extraction Kit
 Skalpell
 Isopropanol

Durchführung

(1) PCR

(a) Pro 50 µl PCR-Reaktion werden pipettiert:

38,5 µl ddH₂O
 5,0 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer
 1,0 µl For-Primer
 1,0 µl Back-Primer
 2,0 µl dNTP-Mix
 2,0 µl cDNA
 0,5 µl Taq-Polymerase

(b) Der Ansatz wird mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und die DNA wird auf einem herkömmlichen „Thermal Cycler“ amplifiziert:

94°C	5 min.	→ initiale Denaturierung	
60°C	5 min.	→ initiale Primer-Anlagerung (Annealing)	
72°C	90 sec.	→ initiale DNA-Synthese (Elongation)	
94°C	45 sec.	→ Denaturierung	} 35 Zyklen
60°C	45 sec.	→ Annealing	
72°C	90 sec.	→ Elongation	
72°C	10 min.	→ abschließende Elongation	
4°C	Pause	→ Kühlung des PCR-Produktes	

(2) Gelextraktion mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit

Wie bei anderen Qiagen-Säulen auch wird die aufzureinigende DNA unter hohen Salzkonzentrationen an eine Silica-Membran gebunden. Es können DNA-Fragmente von 100 bp-10 kb aufgereinigt werden. Durch mehrere Waschschrte werden Primer, Enzyme, Salze, Nukleotide, Agarose und Öl entfernt. Die DNA wird mit ddH₂O eluiert und kann als Template für die LightCycler™-PCR eingesetzt werden.

- Die gesamte PCR-Reaktion wird ohne Öl auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, die Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt.
- Das Gelstück wird gewogen und 3 VT Puffer QX1 hinzugegeben (100 mg = 300 µl Puffer).
- Die Reaktion wird 10 min. bei 50°C unter leichtem Vortexen inkubiert und mit einem Gelvolumen Isopropanol versetzt.

- (d) Eine QIAquick-Säule wird in ein 2 ml-Sammelröhrchen gesteckt und mit der Probe beladen. Das maximale Ladevolumen beträgt 800 µl. Größere Volumina werden sukzessive auf die Säule pipettiert, für jeweils eine min. bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluß verworfen.
- (e) Die Säule wird mit 0,5 ml Puffer QX1 gewaschen, wieder 1 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluß entfernt.
- (f) Der nächste Waschschrift erfolgt mit 750 µl Puffer PE. Die Probe wird wie zuvor zentrifugiert.
- (g) Durch nochmalige Zentrifugation für 1 min. wird die Säule getrocknet und anschließend in einem neuen 1,5 ml Eppendorf-Gefäß plaziert.
- (h) 50 µl ddH₂O werden in die Mitte der Matrix pipettiert und die DNA 1 min. bei 14.000 rpm eluiert.

(3) Verdünnung der Standard –DNA

1 µl des aufgereinigten Templates werden in 99 µl ddH₂O überführt (1:100). Hierzu werden 100 µl ddH₂O pipettiert (Verdünnung 1:1 der Standardreihe). Von dieser Verdünnung werden 10 µl in 90 µl H₂O aufgenommen (Verdünnung 1:10). Auf diese Weise entsteht eine Standardreihe mit folgenden Verdünnungen: 1:1 / 1:10 / 1:100 / 1:1000 / 1:10.000 / 1:100.000. Diese wird bei –20°C gelagert.

B. Photometrische Bestimmung der cDNA-Konzentration

Material

Quarzküvetten

ddH₂O

Durchführung

Die cDNAs werden jeweils 1:500 oder 1:250 in ddH₂O verdünnt und im Photometer bei 260 nm gegen einen Leerwert (ddH₂O) gemessen.

C. Quantifizierungs-PCR auf dem LightCycler™

Die optimalen PCR-Bedingungen müssen für jede zu amplifizierende DNA-Sequenz durch Vorversuche ermittelt werden. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die MgCl₂-Konzentration. Diese kann von 1 mM bis 5 mM (finale Konzentration) variieren. Folgende Mengen der MgCl₂-Stammlösung müssen zur Reaktion gegeben werden, um die angegebene Konzentration zu erreichen:

Finale MgCl ₂ -Konzentration (mM)	1	2	3	4	5
µl MgCl ₂ -Stammlösung/Reaktion	0	0,8	1,6	2,4	3,2

Material

LightCycler™-DNA Master SYBR® Green I

genspezifische For-und Back-Primer (100 ng/µl)

anti-Taq Antikörper
 Uracil DNA Glycosylase (UNG) (1U/μl)
 cDNA
 Standardverdünnungen der DNA des zu amplifizierenden Gens
 LightCycler™-Kapillaren

Durchführung

- (1) Es wird ein Mastermix für alle Reaktionen angesetzt. Pro PCR-Reaktion werden benötigt:

0,16 μl	anti-Taq-Antikörper
1,00 μl	UNG
0,40 μl	For-Primer (Endkonz. 5μM)
0,40 μl	Back-Primer
0 - 3,20 μl	MgCl ₂ -Stammlösung (25mM)
14,04 - 10,84 μl	H ₂ O
2,00 μl	SYBR® Green I

18,00 μl

Die Mischung wird 5 min. bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert, um eine Anlagerung des anti-Taq Antikörpers zu ermöglichen.

- (2) 18 μl des Mastermixes werden in jede Glaskapillare pipettiert. Zum Schluß wird die Template DNA hinzugefügt, also je 2 μl der Verdünnungen des Standards sowie gleiche Mengen jeder cDNA-Probe (max. Volumen 2 μl).
- (3) Die Reaktion wird einige sec. bei 100 x g in den Kapillaren herunterzentrifugiert und diese mit Plastikstopfen verschlossen.
- (4) Auf dem LightCycler™ wird folgendes Programm ausgeführt:
- | | | | |
|------|---------|-------------------------|-------------|
| 95°C | 2 min. | → Hitzinaktivierung UNG | } 45 Zyklen |
| 95°C | peak | → Denaturierung | |
| 60°C | 15 sec. | → Annealing | |
| 72°C | 16 sec. | → Elongation | |
- Schmelzkurve
- (5) Mit dem Quantifizierungsprogramm des LightCyclers™ können die fiktiven Kopienzahlen des amplifizierten Gens bestimmt werden.

3.5 Klonierung des CD30-Antigens in λ -Phagen

3.5.1 Amplifizierung des CD30-Antigens aus dem Vector pcDNA 3

Um die CD30-Antigen-Sequenz in den λ -Phagen-Vektor ZAP® II klonieren zu können, werden für die PCR Primer verwendet, die eine EcoR I-Schnittstelle (For-Primer) und eine Not I-Schnittstelle (Back-Primer) enthalten.

Material

pcDNA 3-CD30-Antigen-Matrize
 10x Taq-Polymerase-Puffer
 dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
 CD30 For-Primer (100 μ M)
 CD30 Back-Primer (100 μ M)
 Taq-DNA-Polymerase
 ddH₂O
 Mineralöl
 QIAquick Gel Extraction Kit

Durchführung

(1) Es wird Folgendes in ein 0,5 ml PCR-Gefäß pipettiert:

0,5 μ l pcDNA 3
 5,0 μ l 10x Taq-Polymerase-Puffer
 2,0 μ l dNTP-Mix
 5,0 μ l MgCl₂ (25mM)
 2,0 μ l CD30 For-Primer
 2,0 μ l CD30 Back-Primer
 32,5 μ l ddH₂O
 1,0 μ l Taq-DNA-Polymerase

50,0 μ l

(2) Der Ansatz wird mit einem Tropfen Öl bedeckt und ein Standard-PCR-Programm mit einer Annealing-Temperatur von 56°C durchgeführt (siehe 3.4.3.2 A (1)).

(3) Die Reaktion wird über eine Gelextraktion mit dem QIAquick Kit aufgereinigt (siehe 3.4.3.2 A (2)).

3.5.2 Restriktionsverdau CD30-Antigen und λ -Phagen-DNA

Beide Nukleinsäuren werden EcoR I/Not I verdaut, um das CD30-Antigen in der korrekten Richtung in den Phagen-Vektor zu klonieren.

Material

Aufgereinigte CD30-Antigen-DNA
 Lambda ZAP® II Undigested Vector Kit
 Restriktionsenzym EcoR I
 Restriktionsenzym Not I
 10x Restriktionsenzym-puffer H
 ddH₂O
 Mineralöl

Durchführung

Die Verdauungen werden wie folgt angesetzt:

<u>CD30-Antigen</u>		<u>ZAP® II</u>		
1,0 µl	CD30-Antigen-DNA	0,2 µl	ZAP® II-DNA (200 ng)	} x 2
1,0 µl	10x Puffer H	1,0 µl	10x Puffer H	
0,5 µl	EcoR I	0,5 µl	EcoR I	
0,5 µl	Not I	0,5 µl	Not I	
7,0 µl	ddH ₂ O	7,8 µl	ddH ₂ O	
<hr/>		<hr/>		
10,0 µl		10,0 µl		

Die Reaktionen werden mit einem Tropfen Öl abgedeckt und 2,5 Std. bei 37°C inkubiert.

3.5.3 DNA-Gelextraktion

Um optimale Ligationsergebnisse zu erzielen, müssen die verdauten DNA-Stränge zunächst aufgereinigt werden. Für das 1147 bp große CD30 Antigen kann das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet werden (siehe 3.4.3.2 A (2)). Die ZAP® II-DNA kann mit einer Größe von 40 kb nur über das QIAEX II DNA Gel Extraction Kit gereinigt werden, da die QIAEX II-Partikel DNA bis zu einer Größe von 50 kb binden. Die Silicamatrix, an welche die DNA gebunden wird, befindet sich auf kleinen Kügelchen, welche zu dem gelösten Agarosestück gegeben werden. Unter hohen Salzkonzentrationen kommt es zur Adsorption der DNA an die Silicapartikel. Die Partikel werden durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand verworfen. Waschpuffer wird hinzugegeben und die Kügelchen mit der gebundenen DNA durch vortexen resuspendiert und gewaschen. Nach mehrmaligem Waschen werden die Partikel in ddH₂O gelöst, die DNA eluiert und die Kügelchen abzentrifugiert.

Material

QIAEX II DNA Gel Extraction Kit
ddH₂O
2 Verdaus ZAP® II-DNA

Durchführung

Sämtliche Zentrifugationsschritte werden bei 14.000 rpm durchgeführt.

- (1) Die verdaute Vektor-DNA wird ohne Öl auf ein 0,3%iges Agarosegel aufgetragen, die Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt.
- (2) Das Gelstück wird gewogen und bei DNA-Fragmenten > 4kb werden 3 VT Puffer QX1 sowie 2 VT ddH₂O hinzugefügt (z.B. 100 mg = 300 µl QX1 + 200 µl ddH₂O).
- (3) Die QIAEX II Partikel werden gevortext und 10 µl zum Ansatz pipettiert. Die Lösung wird 10 min. bei 50°C inkubiert. Alle 2 min. wird leicht mit dem Finger gegen das Gefäß geschnippt, um die Reaktion zu mischen. Aufgrund der Größe der DNA darf die Reaktion nicht gevortext werden, da dies ein Auseinanderschneiden der DNA-Stränge zur Folge hätte.
- (4) Die Partikel werden 30 sec. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 500 µl Puffer QX1 resuspendiert (mit dem Finger gegen das Gefäß schnippen) und zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pipette abgenommen und verworfen.
- (5) Auf die gleiche Weise wird der Ansatz zweimal mit Puffer PE gewaschen.
- (6) Das Pellet wird 10-15 min. getrocknet bis es eine weiße Farbe annimmt. Es werden 20 µl ddH₂O hinzugegeben und das Pellet resuspendiert. Um die DNA zu eluieren wird die Reaktion 10 min. bei 50°C inkubiert.
- (7) Die QIAEX-Kügelchen werden 30 sec. abzentrifugiert und der die DNA enthaltende Überstand wird in ein neues Gefäß überführt.
- (8) Ein zweiter Elutionsschritt kann angeschlossen werden. Er erhöht den DNA-Ertrag um 10-15%.

3.5.4 Dephosphorylierung und Ethanolpräzipitation der ZAP® II-DNA

Um eine Autoligation unvollständig verdauter Vektor-DNA zu verhindern, wird diese dephosphoryliert.

Material

3M Na-Azetat
70% und 100% Ethanol
10x Dephosphopuffer
Shrimps Alkalische Phosphatase
ddH₂O

Durchführung

- (1) Beide Verdau (Volumen/Verdau nach Gelextraktion ca. 17 μ l) werden in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und über Nacht gefällt (siehe 3.1.4 (3)).
- (2) Das Pellet wird getrocknet und in 15 μ l ddH₂O aufgenommen
- (3) Es wird Folgendes zum Ansatz pipettiert:

2,3 μ l	10x Dephosphopuffer
4,5 μ l	Shrimps Alkalische Phosphatase (1 U/ μ l)
1,2 μ l	ddH ₂ O

23,0 μ l

Die DNA wird 30 min. bei 37°C dephosphoryliert.

- (4) Es erfolgt eine abschließende Ethanol-fällung (siehe 3.1.4 (3)). Das Pellet wird in 1,3 μ l ddH₂O resuspendiert.

3.5.5 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration von Insert und Vektor mit DNA-Standards

Das Vektor : Insert-Verhältnis ist für Ligationen in λ -Vektoren von besonderer Relevanz. Zu große Mengen Insert führen zu einer schlechten Klonierungseffizienz. Daher ist es notwendig, die Konzentrationen der in die Ligation einzusetzenden DNA möglichst genau zu bestimmen. Dies geschieht mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.3). Die Quantifizierung erfolgt für das CD30-Antigen und die ZAP® II-DNA in getrennten Gelen, da diese aufgrund der DNA-Größe unterschiedlich konzentriert sein müssen. Auf das Gel wird ein bestimmtes Volumen der verdauten Nukleinsäure (CD30-Antigen 1 μ l, ZAP® II 0,2 μ l) aufgetragen. In die benachbarten Geltaschen wird je 6 μ l eines DNA-Standards (λ -DNA-Längen-Standards, Life Technologies, Rockville, MD) pipettiert. 6 μ l dieses Standards entsprechen 15 ng, 31 ng und 63 ng DNA. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der zu quantifizierenden Proben mit den Standards ist eine Mengenabschätzung möglich.

3.5.6 Ligation der CD30-Antigen-DNA in den λ -Phagen-Vektor ZAP® II

Material

cDNA Synthesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA)
 CD30-Antigen-DNA, EcoR I/Not I verdaut und gelextrahiert
 ZAP® II-DNA, EcoR I/Not I verdaut, gelextrahiert, dephosphoryliert und gefällt
 ddH₂O

Durchführung

- (1) Es werden in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert:

0,8 μ l	CD30-Antigen-DNA (~12 ng)
0,5 μ l	10x ligase buffer

0,5 μ l 10 mM rATP
 0,3 μ l ZAP® II-DNA (~4 ng)
 0,5 μ l T4 DNA ligase (4U/ μ l)

5,0 μ l

- (2) Die Reaktion wird über Nacht bei 12°C inkubiert.

3.5.7 Etablierung eines stabilen, CD30-Antigen exprimierenden λ -Phagen-Klons

Die Methoden stimmen bis auf kleine Änderungen mit denen der Erstellung einer cDNA-Expressionsbank (3.1) überein. Daher erfolgt lediglich eine Aufzählung der einzelnen Arbeitsschritte mit einem Verweis auf die bereits beschriebene Methode.

Material

Siehe 3.1.8-3.1.10 und 3.3.5-3.3.11

Durchführung

- (1) Verpackungsreaktion
 siehe 3.1.8
 Die gesamte Ligationsreaktion (5 μ l) wird mit einem Packaging Extract verpackt.
- (2) Titerbestimmung der Verpackungsreaktion mit Blau-Weiß-Selektion
 siehe 3.1.9
 Es werden 50 μ l der Verpackungsreaktion zur Titerbestimmung eingesetzt.
- (3) Separation rekombinanter Klone von den Titerplatten
 siehe 3.3.5
 Die Klone werden gepickt, um eine Excision mit anschließender Sequenzierung des Inserts durchzuführen. Hiermit soll sichergestellt werden, daß es sich bei dem Insert um das CD30-Antigen handelt. Weiterhin kann untersucht werden, ob das Insert im richtigen Leserahmen kloniert wurde und somit das Protein korrekt gebildet wird. Erst dann werden die zugehörigen λ -Phagen vermehrt, um einen stabilen Klon zu etablieren.
- (4) Titerbestimmung der gepickten rekombinanten Klone
 siehe 3.3.6
- (5) Excision der rekombinanten Klone
 siehe 3.3.7
- (6) Plasmid-DNA-Minipräparation
 siehe 3.3.8
- (7) Restriktionsverdau
 siehe 3.3.10

Es kann verifiziert werden, daß die Inserts der rekombinanten Klone die richtige Größe aufweisen (CD30-Antigen = 1147 bp)

- (8) Sequenzierung der Inserts
siehe 3.3.11
- (9) Amplifizierung der gepickten, rekombinanten λ -Phagen
siehe 3.1.10
- (10) Titerbestimmung
siehe 3.1.9

3.6 Screening eines Gemisches aus Mammakarzinom-spezifischer cDNA-Expressionsbank und CD30-Antigen-Phagen mit einem anti-CD30 scFv (Ki-4) auf filamentösen Phagen

3.6.1 Ausstreichen des Ki-4-Bakterienklons auf Minimalmedium

Bei der Gewinnung („rescue“) von filamentösen Phagen werden Phagmid-tragende Bakterien mit Helferphagen infiziert, die den Phagenreplikationsursprung des Phagmids aktivieren, Phagenhüllproteine synthetisieren und Phagmid-DNA in neue Phagenpartikel verpacken. Helferphagen können ihre Wirtszellen nur über den F'-Pilus infizieren. Daher ist es wichtig, daß die Bakterien das für den F'-Pilus kodierende Episom nicht im Verlaufe der Lagerung oder Kultivierung verlieren. Um das F'-Episom selektiv aufrechtzuerhalten, werden die Ki-4-Bakterien vor der Gewinnung von Phagen auf Minimalmedium ausgestrichen und Glycerolstämmen angelegt.

Material

Minimalmedium kleine Platten
Glycerolstamm TG-1-Bakterien mit Ki-4-Phagmid
2 x YT-Ampicillin-Flüssigmedium
Glycerol 87%

Durchführung

- (1) 50 μ l des Glycerolstamms wird auf einer Minimalmedium-Platte ausgestrichen und 2 Tage bei 37°C inkubiert.
- (2) Eine Kolonie wird von der Platte in 100 ml 2 x YT-Ampicillin überführt und die Kultur über Nacht bei 37°C geschüttelt.
- (3) Die Bakterien werden bei 3000 rpm 10 min. zentrifugiert und das Pellet in 500 μ l 2 x YT-Ampicillin resuspendiert.

- (4) Die Lösung wird mit 15% (finale Konzentration) Glycerol versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.6.2 Mischen und Ausplattieren der λ -Phagen

Die zuvor erstellte Mammakarzinom-spezifische cDNA-Expressionsbank wird mit dem CD30-Antigen exprimierenden λ -Phagen-Klon im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Phagen werden wie bereits unter 3.3.2 für das SEREX-System beschrieben ausplattiert. Als Wirtsbakterien werden statt XL1-Blue MRF⁺ XL1-Blue MR eingesetzt. Diese besitzen kein F'-Episom und müssen daher auf LB-Platten ausgestrichen werden.

3.6.3 Gewinnung der Ki-4 scFv-tragenden filamentösen Phagen (phage rescue)

Bei der Gewinnung von filamentösen Phagen aus phagmidtragenden Bakterien mittels Helferphagen müssen durch mehrere Präzipitationsschritte die Phagen von löslichen scFvs und Bakterien getrennt werden. Da die Suppression des Amber-Stop-Codons zwischen scFv und gp3-Protein in TG-1 Zellen nur zu 20% effektiv ist, wird auch lösliches scFv gebildet, welches Bindungsstellen für scFv-tragende Phagen blockiert. Zudem werden die Antikörperfragmente teilweise proteolytisch von den Phagen abgespalten und liegen ebenfalls frei vor. Vor einer Selektion müssen diese löslichen single chains entfernt werden, da es zu einer Konkurrenz mit den scFv-tragenden Phagen kommen könnte.

Material

Glycerolstamm TG-1 mit Ki-4-Phagmid
2 x YT-Ampicillin-Flüssigmedium
2 x YT-Ampicillin/Kanamycin-Flüssigmedium
Glukose 20%
PEG 20%
TBS pH 7,5
Helferphagen M13-KO7 (10^{11} pfu/ml)

Durchführung

- (1) 45 ml 2 x YT-Ampicillin werden in einem 250 ml Glaskolben mit 5 ml 20%iger Glukose versetzt (Endkonzentration 2%) und mit 10-20 μl des TG-1-Glycerolstamms inokuliert.
- (2) Die Bakterien werden bei 37°C und 250 rpm bis zu einer OD von 0,5 vermehrt.
- (3) Von der Bakterienkultur werden 5 ml abgenommen und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit 50 μl Helferphagen 30 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

- (4) Die Bakterien werden 10 min. bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 25 ml 2 x YT-Ampicillin/Kanamycin aufgenommen. Die Produktion scFv-tragender Phagen erfolgt über Nacht bei 30°C und 250 rpm.
- (5) Die Übernacht-Kultur wird in ein 50 ml-Röhrchen überführt und die Bakterien werden 20 min. bei 4000 rpm und Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand enthält Fusionsprotein-tragende Phagen, lösliche scFvs und Reste von Bakterien.
- (6) Der Überstand wird in ein neues Gefäß transferiert, mit 5 ml PEG-Lösung gut gemischt und 1 Std. auf Eis inkubiert.
- (7) Der Ansatz wird 15 min. bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mit diesem Schritt werden Bakterien und Phagen pelletiert, lösliche scFvs verbleiben im Überstand.
- (8) Das Pellet wird in 1 ml TBS gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. Durch 2 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm (RT) werden die restlichen Bakterien pelletiert.
- (9) Der phagenhaltige Überstand wird in einem neuen Gefäß mit 150 µl PEG versetzt, gemischt und 20 min. auf Eis gefällt.
- (10) Phagen und Bakterien werden erneut abzentrifugiert (14.000 rpm, 5 min., RT) und in 1 ml TBS resuspendiert. Abschließend werden die verbliebenen Bakterien durch Zentrifugation (14.000 rpm, 2 min., RT) entfernt und der Überstand abermals in ein frisches Gefäß überführt. Die scFv-tragenden filamentösen Phagen können sofort zur Selektion eingesetzt oder einige Tage bei 4°C gelagert werden.

3.6.4 Titerbestimmung phage rescue

Material

- 1,5 ml TG-1 OD 0,5, gepickt von Minimalplatte
- 1 ml phage rescue
- 2 x YT-Flüssigmedium
- 2 x YT-Ampicillin kleine Platten

Durchführung

- (1) Die gewonnenen Phagen werden in 10^{-2} er Schritten bis 10^{-13} verdünnt (je 5 µl rescue in 495 µl 2 x YT)
- (2) Je 500 µl von Verdünnung 10^{-9} , 10^{-11} und 10^{-13} werden mit 500 µl TG-1 OD 0,5 gemischt und 30 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert.
- (3) Die Bakterien-Phagen-Suspension wird 3 min. bei 6000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 100 µl 2 x YT resuspendiert und auf 2 x YT-Ampicillin ausgestrichen.
- (4) Die Platten werden über Nacht bei 30°C inkubiert.
- (5) Am nächsten Morgen können die Kolonien auf den Titerplatten ausgezählt und der Phagentiter bestimmt werden.
Formel zur Titerberechnung: Koloniezahl x Verdünnungsfaktor x 2 = pfu/ml rescue

3.6.5 Selektion der filamentösen Phagen auf Plaque Lifts

Material

Nitrozellulosefilter mit λ -Phagen-Fusionsprotein (Plaque Lifts)
scFv exprimierende filamentöse Phagen
TBST
Magermilchpulver
Waschpuffer TBST + 1% BSA

Durchführung

- (1) Das λ -Phagen-Fusionsprotein wird wie unter 3.3.3 beschrieben auf Nitrozellulosefilter übertragen, gewaschen und geblockt.
- (2) Die entsprechende Menge filamentöser Phagen (ca. 5×10^{13} pfu/ml rescue) pro Blot wird in 20 ml TBST + 2% Magermilchpulver gelöst und eine Std. bei Raumtemperatur geblockt. Die Phagen werden 1,5 Std. bei Raumtemperatur auf den Filtern selektio- niert.
- (3) Da M13-Phagen die Eigenschaft besitzen, unspezifisch an unterschiedlichste Proteine zu binden, müssen die Blots intensiv gewaschen werden. Dies erfolgt 4 mal für 2 min. und dann 4 mal für je 10 min. mit Waschpuffer.

3.6.6 Nachweis gebundener Phagen

Material

Maus anti-M13 Antikörper
Ziege anti-Maus Antikörper, gekoppelt an Alkalische Phosphatase
Waschpuffer TBST + 1% BSA
Tris-Cl pH 8,2
Entwickler-Lösung siehe 3.3.4

Durchführung

- (1) Der anti-M13-Antikörper wird 1:1000 in Waschpuffer verdünnt (20 ml/Filter) und 1,5 Std. mit den Blots inkubiert.
- (2) Nach drei 5 minütigen Waschrufen erfolgt die Inkubation mit dem Ziege anti-Maus-AP Antikörper (Verdünnung 1:7500 in Waschpuffer) für 1 Std.
- (3) Die Filter werden 2 mal mit Waschpuffer und abschließend 4 mal mit Tris-Cl pH 8,2 je für einige min. gewaschen.
- (4) Die Blots werden 1,5 Std. bei 37°C unter leichtem Schütteln entwickelt.