

II MATERIAL & METHODEN

1 Geräte

Autoklaven	CertoClav (Kelomat), Varioklav (H&P Labortechnik)
Brutschrank (CO ₂ -)	BT 5042 E (Heraeus) EG 120 IR (Jouan)
Computer	Green PC, Pentium 133MHz (Lion)
Destille	Destamat (Heraeus)
Elektroelutionskammer	Biotrap BT1000 mit Membranen BT1 und BT2 (Schleicher&Schüll), Umwälzpumpe Minipuls 2 (Gilson) und Netzgerät E554 (Consort)
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Optimax (Protec)
Geldokumentationssystem	BioDoc mit CCD-Kamera und Controller (Biometra), UV-Transilluminator TI 2 (Biometra), Drucker UP-890 CE (Sony) und Monitor WV-BM 900 (Panasonic)
Gelelektrophorese im rotierenden Feld (ROFE)	Rotaphor Typ V mit Netzgerät El.phor.-Powerpack P24 (Biometra) und Thermostat WK15 (Colora)
Gelelektrophoresekammer (horizontal)	Model H4 (BRL) und mini-sub-cell (BioRad) mit Netzgerät MBP 3000E (IBI)
Gelelektrophoresekammer (vertikal)	2001 (LKB) mit Netzgerät Desatronic 2000/300 (Desaga) und Thermostat 2219 Multitemp II (LKB)
Hybridisierungsinubatoren	400 HY-E und BE 400 (Bachofer)
Kühl-/Gefrierschränke (-80°C)	KG EE 34A (Bosch), KK34EO1 (Siemens) UF 85-360 T und E80 (Colora)
Laborwaagen	PC440 und PC4400 (Mettler)
Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank	CA/REV 4 (Clean Air)
Magnetrührer	IKAMAG REO und RET (Janke & Kunkel)
Mikroskop	HM-Lux (Leitz) mit Zählkammer (Neubauer)
Mixgeräte	Mixer 5432 (Eppendorf), Vortex-Genie (Bender & Hobein)
pH-Meßgerät	Digital-pH-Meter Typ 645 (Knick) mit Einstabmesskette (Ingold)
Photometer	Uvikon 820 (Kontron), LP1 560 nm (Dr Lange)
Rotlicht-Blitzgerät	Eigenbau (Volz)
Sequenzierer	Licor 4200 (MWG Biotech)
Schüttelgeräte	Typ LSR (Adolf Kühner), Typ TR mit Inkubationshaube ITE (Infors)
Strahlungsmeßgeräte	LB 122 (Berthold), 1217 Rackbeta (LKB)
Thermocycler	DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer)
Ultraschallhomogenisator	Cell Disruptor B15 (Branson)
Wasserbäder	B465 (Büchi), Typ 1083 (GFL)
Zentrifugen (Tisch-)	Centrifuge 5414 und 5417R (Eppendorf), Centra-7R (IEC)
(Stand-)	GS-6KR (Beckmann), RC 5C Plus (Sorvall)
(Vakuum-)	RH 40-11 (Savant)

2 Arbeitsmaterial & Hilfsmittel

Blöckchenformer	200 µl (Geiger Laborbedarf)
Blotting-Papier	GB 002 (Schleicher & Schüll)
Computer-Programme	Word 97 und Excel 97 (Microsoft), Draw 7 und Photo-Paint 7 (Corel)
DNA-absorbierendes Filterpapier	DE81 (Whatman)
Hybridisierungsröhren	250x35 mm (Bachofer)
Kopierfolie	Photocop Film (Staedtler)
Kühlbox	Continental Cooler (SLG)
Laborschalen	13x18 cm und 20x25 cm (Paterson Products Limited)

II MATERIAL & METHODEN

Mikrotiterpipetten	Reference 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf)
Nylonmembranen, positiv geladen	Qiabrane Nylon Plus membrane (Qiagen)
Reagiergefäß für Agaroseblöckchen	1,8 ml Schraubdeckelgefäß (Nunc)
Röntgenfilme	X-Omat AR und Biomax MS (Kodak)
Röntgenfilmkassetten mit Verstärkerfolie	24x30 cm (Philips, Siemens) Biomax MS Intensifying Screen (Kodak)
1 ml Spritze mit Filterfritte	Omnifix-F (B. Braun) Mobicol 90 µm pores (Mo Bi Tec)

3 Reagenzien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Adenin (Ade)	Merck, Darmstadt
Adenosin-5'-triphosphorsäure Dinatriumsalz (ATP-Na ₂)	Boehringer, Mannheim
Agar (Bacto-Agar)	Difco, Detroit
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose (InCert)	FMC-Bioproducts, Rockland
Agarose (SeaKem)	Biozym, Hess. Oldendorf
Aminosäuren (Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Tyr, Val)	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat (NH ₄ -acetat)	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	BTS, St. Leon-Rot
Bromphenolblau Natriumsalz (BPB-Na)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ •2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Desoxyribonucleotid-5'-triphosphate (dNTPs)	Boehringer, Mannheim
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
1,4-Dithioerythrit (DTE)	Serva, Heidelberg
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)	Serva, Heidelberg
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM)	Gibco-BRL, Paisley
Essigsäure (HOAc)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA-Na ₂ •2H ₂ O)	Serva, Heidelberg
Fötale Kälberserum (FCS, <i>fetal calf serum</i>)	Seromed, Berlin
Formamid	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose	Sigma, München
L-Glutamin (200 mM)	Seromed, Berlin
Glycerin	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt (Bacto-Yeast)	Difco, Detroit
Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren	Difco, Detroit
1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	BTS, St. Leon-Rot
Kaliumacetat (K-acetat)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
N-lauroylsarcosin Natriumsalz (N-lauroylsarcosin-Na)	Sigma, München
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ •6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat (MnCl ₂ •4H ₂ O)	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol (BME, β-Mercaptoethanol)	Sigma, München
N,N'-Methylendiacylamid (BIS)	Serva, Heidelberg
Mineralöl	Sigma, München
Mischbettionenaustauscher AG 501-X8(D)	BioRad, Richmond
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Serva, Heidelberg

Natriumacetat (Na-acetat)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
<i>tri</i> -Natriumcitrat-Dihydrat (Na ₃ -citrat•2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O)	Merck, Darmstadt
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ •2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat (100 mM)	Seromed, Berlin
Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)	Seromed, Berlin
Phenol, äquilibriert	USB, Cleveland
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, München
2-Propanol (<i>iso</i> -Propanol)	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA, <i>bovine serum albumin</i>)	Sigma, München
Rubidiumchlorid (RbCl)	Merck, Darmstadt
Saccharose	Serva, Heidelberg
Salzsäure (HCl) 32%	Merck, Darmstadt
Sephadex G-50 <i>Coarse</i>	Pharmacia, Uppsala
Spermidin Trihydrochlorid (Spermidin•3HCl)	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	ICN, Eschwege
Trypton (Bacto-Trypton)	Difco, Detroit
Wasser, deionisiert (dH ₂ O)	Institut für Immungenetik
Wasser, doppelt destilliert (ddH ₂ O)	Institut für Immungenetik
Xylencyanol	BioRad, Richmond

4 Enzyme

β-Agarase I (1 U/µl)	New England Biolabs, Beverly
Klenow-Enzym (1 U/µl)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Proteinase K (ca. 20 U/mg)	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme mit Reaktionspuffer (BglII, BsiWI, EcoRI, MboI, MluI, NotI, NruI, SallI, XbaI, XhoI)	Boehringer, Mannheim; Gibco-BRL, Paisley; New England Biolabs, Beverly; Pharmacia, Uppsala; Stratagene, Heidelberg
RNase A (ca. 50 U/mg)	Boehringer, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/µl) mit SAP-Puffer	USB, Cleveland
T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	Boehringer, Mannheim
Taq-Polymerase (4 U/µl)	Tib Molbiol, Berlin
Thermo Sequenase	Amersham-Buchler, Braunschweig
Zymolyase 20-T	Kirin Brewery, Tokio

5 Reagenziensets

Jetsorb Gel Extraction Kit (Genomed, Bad Oeynhausen)

Puffer A1

Puffer A2

Jetsorb-Suspension

Megaprime DNA labelling system für [α-³²P]dCTP (Amersham-Buchler, Braunschweig)

Oligonucleotid-Primer

Markierungspuffer

Klenow-Enzym

Desoxycytidin-5'-[α-³²P]triphosphat (9,25 MBq/25 µl)

Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham-Buchler, Braunschweig)

4xNucleotidreagenzien (A-Reagenz, C-Reagenz, G-Reagenz, T-Reagenz)

6 Nucleinsäuren

6.1 Vektoren

pGEM-11Zf

Promega, Mannheim

6.2 DNA-Sonden

Tabelle 3

Locus	Klon	DNA-Fragment	Restriktions-schnittstellen	Referenz ^a
<i>ADAR1</i>	1007n 1	1530 bp	EcoRI/XhoI	
<i>ANXA9</i>	1079n12	1547 bp	EcoRI/XhoI	
<i>CHRNA2</i>	U62437	819 bp	(PCR-Produkt)	Elliott <i>et al.</i> , 1996; Lueders <i>et al.</i> , 1999
<i>CRP</i>	pCRP1	1,8 kb	PstI	Whitehead <i>et al.</i> , 1983
<i>FLG</i>	λHF10	1248 bp	Sall	McKinley-Grant <i>et al.</i> , 1989
<i>HAX1</i>	3027d12	949 bp	EcoRI/XhoI	
<i>IVL</i>	pλI-3H6B	6,0 kb	BamHI/HindIII	Eckert & Green, 1986
<i>LAMRL6</i>	3038I 4	1030 bp	EcoRI/XhoI	
<i>LOR</i>	pL30.8-2	178 bp	KpnI	Hohl <i>et al.</i> , 1991b
<i>NICE1</i>	3042e22	728 bp	EcoRI/XhoI	
<i>NICE2</i>	1192j18	1587 bp	EcoRI/XhoI	
<i>NICE3</i>	3038m19	1586 bp	EcoRI/XhoI	
<i>NICE4</i>	3114f17	1820 bp	EcoRI/XhoI	
<i>NICE5</i>	1025p19	752 bp	EcoRI/XhoI	
<i>NICE6a</i>	1019b 8	1726 bp	EcoRI/XhoI	
<i>NICE6b</i>	1043I 5	1344 bp	EcoRI/XhoI	
<i>NICE7</i>	1096f20	3020 bp	EcoRI/XhoI	
<i>NICE8</i>	3009j22	1299 bp	EcoRI/XhoI	
<i>NICE9</i>	3189n16	1135 bp	EcoRI/XhoI	
<i>NICE10a</i>	1176b11	2285 bp	EcoRI/XhoI	
<i>NICE10b</i>	1027I 4	1703 bp	EcoRI/XhoI	
<i>PIAS3</i>	1199I 9	1031 bp	EcoRI/XhoI	
<i>PIP5K1A</i>	1025c14	2200 bp	EcoRI/XhoI	
<i>PSMB4</i>	3004e13	942 bp	EcoRI/XhoI	
<i>PSMD4</i>	1103I 7	1310 bp	EcoRI/XhoI	
<i>PSMD8L</i>	3017o23	923 bp	EcoRI/XhoI	
<i>RBM8</i>	3195c12	1342 bp	EcoRI/XhoI	
<i>RPTN</i>	p7hrep	0,5 kb	EcoRI/Scal	Huber <i>et al.</i> , in Vorbereitung
<i>S100A1</i>	pGem-S100α-hum	376 bp	NdeI/HindIII	E. Ilg, Zürich
<i>S100A2</i>	pGem-S100L-hum	355 bp	NdeI/HindIII	E. Ilg, Zürich
<i>S100A4</i>	1007n11	327 bp	EcoRI/XhoI	
<i>S100A6</i>	J02763	783 bp	(PCR-Produkt)	Ferrari <i>et al.</i> , 1987; Volz <i>et al.</i> , 1993
<i>S100A7</i>	1010b14	425 bp	EcoRI/XhoI	
<i>S100A8</i>	M21005	601 bp	(PCR-Produkt)	Lagasse & Clerc, 1988; Mischke <i>et al.</i> , 1996
<i>S100A9</i>	M21064	402 bp	(PCR-Produkt)	Lagasse & Clerc, 1988; Mischke <i>et al.</i> , 1996
<i>S100A10</i>	M77483	246 bp	(PCR-Produkt)	Harder <i>et al.</i> , 1992; Volz <i>et al.</i> , 1993
<i>S100A11</i>	S100C	0,7 kb	EcoRI/XhoI	Tanaka <i>et al.</i> , 1995
<i>S100A13</i>	S100A13-hum	427 bp	NdeI/BamHI	K. Ridinger, Zürich
<i>SPRR1B</i>	pIC-15B	470 bp	EcoRI	Kartasova & van de Putte, 1988
<i>SPRR2A</i>	pp930-1	680 bp	HindIII	Kartasova & van de Putte, 1988
<i>SPRR3</i>	pSPR3	320 bp	HindIII	Gibbs <i>et al.</i> , 1993
<i>THH</i>	λH-TRH-18	6,5 kb	SacI	Lee <i>et al.</i> , 1993
<i>TPM3</i>	3006f16	2108 bp	EcoRI/XhoI	
764_a_1	764_a_1#2	1,30 Mb	(YAC)	Cohen <i>et al.</i> , 1993

^a Wenn nichts anderes angegeben ist, stammen die Klone aus der vorliegenden Arbeit.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Locus	Klon	DNA-Fragment	Restriktions-schnittstellen	Referenz ^a
934_g_9	934_g_9	1,23 Mb	(YAC)	Cohen <i>et al.</i> , 1993
950_e_2	950_e_2#9	0,69 Mb	(YAC)	Cohen <i>et al.</i> , 1993
986_e_10	986_e_10	1,44 Mb	(YAC)	Cohen <i>et al.</i> , 1993
AJ243659	24f6	295 bp	XbaI/XhoI	
X94407	24f11 (D1S3619)	320 bp	XbaI/XhoI	
X95106	24f14 (D1S3626)	942 bp	XbaI/XhoI	
X94408	24f15	462 bp	XbaI/XhoI	
X95107	24f21 (D1S3628)	409 bp	XbaI/XhoI	
AJ243660	24f32	101 bp	XbaI/XhoI	
AJ243661	24f39	124 bp	XbaI/XhoI	
	24f41	487 bp	XbaI/XhoI	
X94409	24f46 (D1S3627)	508 bp	XbaI/XhoI	
X94410	24f57	810 bp	XbaI/XhoI	
X94411	24f59 (D1S3625)	498 bp	XbaI/XhoI	
X94412	37m2	161 bp	XbaI/XhoI	
X94413	37m5 (D1S3623)	308 bp	XbaI/XhoI	
AJ009641	37m6	477 bp	XbaI/XhoI	
X94414	37m8 (D1S3622)	447 bp	XbaI/XhoI	
X95102	37m14(D1S3624)	137 bp	XbaI/XhoI	
X95103	37m16	100 bp	XbaI/XhoI	
X95104	48-6 (D1S3621)	211 bp	XbaI/XhoI	
	48-9	400 bp	XbaI/XhoI	
X95105	48-11 (D1S3620)	198 bp	XbaI/XhoI	

^a Wenn nichts anderes erwähnt ist, stammen die Klone aus der vorliegenden Arbeit.

6.3 Oligonucleotid-Primer

Tabelle 4

Marker	Primersequenzen (5' – 3')	Produkt	annealing-Temperatur	Referenz
D1S305 (AFM220xf8)	CCAGNCTCGGTATGTTTTACTA CTGAAACCTCTGTCCAAGCC	156-176 bp	58°C, 56°C, 54°C	Weissenbach <i>et al.</i> , 1992
D1S442 (AFM234zd12)	GGTACTTAGCCTCGAAATGAGA GTGTACACAACTGGTTGGT	min. 236 bp	62°C, 60°C, 58°C	Gyapay <i>et al.</i> , 1994
D1S498 (AFM336xb1)	TTGCTGAAGGGACATAGTG TGCTGGGTTATATCCAATATC	min. 197 bp	58°C, 56°C, 54°C	Gyapay <i>et al.</i> , 1994
D1S1664 (GATA51H09)	GGTCTGAGAAAGACGGTGAG ACATCGCAGCTAAGTGTTC	min. 150 bp	62°C, 60°C, 58°C	Hudson <i>et al.</i> , 1995
D1S2345 (AFMc002wf5)	CAAGCTCCGTCTCAAAC CATCTTCCCAATCTACAGG	min. 149 bp	60°C, 58°C, 56°C	Dib <i>et al.</i> , 1996
D1S2346 (AFM207yh6)	TATCTTGCCTGCACC AAGTGGGTCTCCCCAG	min. 89 bp	60°C, 58°C, 56°C	Dib <i>et al.</i> , 1996
D1S2347 (AFM291xh1)	TTGAGAACTGCCTTAGACTGC CCCAAGTTGCTGGAACC	min. 272 bp	60°C, 58°C, 56°C	Dib <i>et al.</i> , 1996
TDRKH	AAAGGAAGGTTCCCTGGGAGA TCAATGATTAATGGGCTCCC	120 bp	56°C	Lamb <i>et al.</i> , 2000

6.4 Molekulargewichtsstandards

100 bp- bzw. 1 kb-Leiter (100 ng/µl)

20 µg Molekulargewichtsstandard (Gibco-BRL, Paisley)
40 µl 5xAuftragspuffer
ad 200 µl 10/10 TE

λ-Phagen-Concatemere
(Fragmentgrößen in kb)

(48,5; 97,0; 145,5; 194,0; 242,5; 291,0; 339,5; 388,0; 436,5;
485,0; 533,5; 582,0; 630,5; 679,0; 727,5; ...)

II MATERIAL & METHODEN

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> WAY5-4A (Chromosomengrößen in kb)	(245, 290, 370, 460, 610, 730, 800, 870, 945, 1000, 1125, 1560, 2500)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH149 (Chromosomengrößen in kb)	(95, 235, 300, 450, 480, 570, 620, 710, 780, 810, 840, 950, 1010, 1050, 1560, 2400)

7 DNA-Bibliotheken

CEPH-Mega-YAC-Bibliothek [Albertsen *et al.*, 1990; Chumakov *et al.*, 1995]

Wirt: *Saccharomyces cerevisiae* AB1380; Vektor: pYAC4;

durchschnittliche Insertgröße: 1 Mb; Komplexität: zehn haploide Genomäquivalente

Keratinocyten-cDNA-Bibliotheken (C. Backendorf, Leiden)

Wirt: *Escherichia coli* XL1-Blue MRF⁺; Vektor: Bluescript SK- (Stratagene, Heidelberg);

Primer für die erste Strangsynthese: Oligo(dT)-Primer;

KER1/2: durchschnittliche Insertgröße >2 kb, Komplexität $\sim 2 \times 10^6$ Klone, Titer 3,8 cfu/ml;

KER3/4: durchschnittliche Insertgröße <2 kb, Komplexität $\sim 2 \times 10^6$ Klone, Titer 3,1 cfu/ml

8 Lösungen

8.1 Stammlösungen

Tabelle 5

Lösung	Bestandteile	Herstellung/Lagerung
40% Acrylamid	193,2 g Acrylamid 6,8 g BIS ad 500 ml ddH ₂ O	mit 3 g Mischbettionenaustauscher AG 501-X8(D) 1 h rühren, filtrieren (0,45 µm), unter Lichtabschluß bei 4°C aufbewahren
10 M Ammoniumacetat	77,0 g NH ₄ -acetat ad 100 ml ddH ₂ O	
1000xAmpicillin (40 mg/ml)	2,0 g Ampicillin ad 50,0 ml 50% Ethanol	sterilfiltrieren (0,22 µm), aliquotiert bei -20°C aufbewahren bei 4°C aufbewahren
10% APS	0,50 g APS ad 5,0 ml ddH ₂ O	(wenige Wochen haltbar)
10xATP (10 mM)	60,0 mg ATP-Na ₂ ad 10,0 ml ddH ₂ O	pH 7,1 mit einstellen (1 M NaOH), aliquotiert bei -80°C aufbewahren
100xBSA (10 mg/ml)	0,10 g BSA ad 10,0 ml ddH ₂ O	aliquotiert bei -20°C aufbewahren
200 mM Dithioerythrit	0,62 g DTE 0,01 M Na-acetat (pH 5,2) ad 20,0 ml ddH ₂ O	filtrieren (0,45 µm), aliquotiert bei -20°C aufbewahren
0,5 M EDTA (pH 7,5 bzw. pH 9,0)	93,0 g EDTA-Na ₂ •2H ₂ O ad 500 ml ddH ₂ O	pH 7,5 bzw. 9,0 einstellen (NaOH), filtrieren (0,45 µm)
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	0,20 g Ethidiumbromid ad 20,0 ml ddH ₂ O	unter Lichtabschluß bei 4°C aufbewahren
30% Glycerin	30,0 ml Glycerin ad 100 ml ddH ₂ O	in Schraubdeckelgefäßen aliquotiert autoklavieren, bei 4°C aufbewahren
IPTG (200 mg/ml)	4,0 g IPTG ad 20,0 ml ddH ₂ O	sterilfiltrieren (0,22 µm), aliquotiert bei -20°C aufbewahren
4 M Magnesiumchlorid	40,7 g MgCl ₂ •6H ₂ O ad 50,0 ml ddH ₂ O	
1,5 M 2-Mercaptoethanol	10,5 µl BME (14,4 M) ad 100 µl ddH ₂ O	aliquotiert bei -20°C aufbewahren
3 M Natriumacetat (pH 5,2)	40,8 g Na-acetat ad 100 ml ddH ₂ O	pH 5,2 einstellen (Essigsäure)
5 M Natriumchlorid	29,2 g NaCl ad 100 ml ddH ₂ O	

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Lösung	Bestandteile	Herstellung/Lagerung
2 M Natriumhydroxid	29,2 g NaOH ad 500 ml ddH ₂ O	in Plastikflasche aufbewahren
10xdNTPs (2 mM/dNTP)	100 µl 100 mM/dNTP ad 5,0 ml ddH ₂ O	sterilfiltrieren (0,22 µm), aliquotiert bei -20°C aufbewahren
10 mM PMSF	17,4 mg PMSF ad 10,0 ml Isopropanol	aliquotiert bei -20°C aufbewahren
Proteinase K (20 mg/ml)	100 mg Proteinase K ad 5,0 ml ddH ₂ O	aliquotiert bei -20°C aufbewahren
RNase A (10 mg/ml)	50,0 mg RNase A 10 mM TRIS (pH 7,5) 15 mM NaCl ad 5,0 ml ddH ₂ O	15 min auf 95°C erhitzen, aliquotiert bei -20°C aufbewahren
2,5 M Salzsäure	142 ml HCl 32% ad 500 ml ddH ₂ O	
10% SDS	100 g SDS ad 1000 ml ddH ₂ O	
25xSpermidin (100 mM)	0,25 g Spermidin•3HCl ad 10,0 ml ddH ₂ O	pH 7,0 einstellen (2 M NaOH), aliquotiert bei -20°C aufbewahren
1 M TRIS (pH 7,5)	60,5 g TRIS ad 500 ml ddH ₂ O	pH 7,5 einstellen (HCl)
X-Gal (20 mg/ml)	0,40 g X-Gal ad 20,0 ml DMF	in Glas aliquotiert, unter Lichtabschluß bei -20°C aufbewahren
Zymolyase 20-T (50 mg/ml)	250 mg Zymolyase 20-T ad 5,0 ml 0,1 M TRIS (pH 7,5)	frisch herstellen

8.2 Puffer

Tabelle 6

Puffer	Bestandteile	Herstellung/Lagerung
5xAuftragspuffer für Gelelektrophorese	10 mg BPB-Na 10 mg Xylencyanol 2,5 g Saccharose ad 5,0 ml ddH ₂ O	bei 4°C aufbewahren
4xDenaturierungspuffer für Southern-Blotting	20,0 g NaOH (2 M) 232 g NaCl (4 M) ad 1000 ml ddH ₂ O	in Plastikflasche aufbewahren
Hybridisierungspuffer nach Church [Church & Gilbert, 1984] für radioaktive Hybridisierung	13,8 g NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O (0,5 M) 0,1 mM EDTA (pH 7,5) 2,0 g BSA (1%) 14,0 g SDS (7%) ad 200,0 ml ddH ₂ O	NaH ₂ PO ₄ und EDTA in ddH ₂ O lösen, pH 7,2 einstellen, BSA bei 68°C lösen und SDS zugeben, filtrieren (0,8 µm, 68°C), aliquotiert bei -20°C aufbewahren
Extraktionspuffer für DNA-Isolierung	100 mM EDTA 10 mM TRIS 0,5% SDS 10 µg/ml RNase A	bei 4°C aufbewahren
LET für DNA-Isolierung	500 mM EDTA (pH 7,5) 10 mM TRIS (pH 7,5) 7,5% BME	frisch herstellen
10xLigationspuffer für DNA-Klonierung	200 mM TRIS 50 mM MgCl ₂ 50 mM DTE 500 µg/ml BSA	aliquotiert bei -20°C aufbewahren
NDS für DNA-Isolierung	0,01 M TRIS 1% N-laurylsarcosin-Na 0,5 M EDTA (pH 9,0) 0,1% Proteinase K	frisch herstellen
P1 (Resuspension) für DNA-Isolierung	50 mg RNase A 50 mM TRIS (pH 7,5) 10 mM EDTA (pH 9,0) ad 500 ml ddH ₂ O	pH 8,0 einstellen, bei 4°C aufbewahren

Tabelle 6 (Fortsetzung)

Puffer	Bestandteile	Herstellung/Lagerung
P2 (Lyse) für DNA-Isolierung	200 mM NaOH 1% SDS ad 500 ml ddH ₂ O	
P3 (Neutralisation) für DNA-Isolierung	147,3 g KOAc ad 500 ml ddH ₂ O	pH 5,5 einstellen (Essigsäure), bei 4°C aufbewahren
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>) für DNA-Isolierung	8,0 g NaCl (138 mM) 0,2 g KCl (2,7 mM) 1,44 g Na ₂ HPO ₄ (8 mM) 0,24 g KH ₂ PO ₄ (1,5 mM) ad 1000 ml ddH ₂ O	pH 7,4 einstellen (HCl), autoklavieren, bei 4°C aufbewahren
10xPCR Puffer für PCR	100 mM TRIS 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 0,001% Gelatine	auf pH 8,3 einstellen, filtrieren, dann sterile Gelatine zugeben, aliquotiert bei -20°C aufbewahren
10xRestriktionspuffer H für Restriktionsanalyse	0,5 M TRIS 0,1 M MgCl ₂ 1 M NaCl 0,01 M DTE ad 50,0 ml ddH ₂ O	pH 7,5 bei 37°C einstellen (2 M NaOH), aliquotiert bei -20°C aufbewahren
10xRestriktionspuffer M für Restriktionsanalyse	0,1 M TRIS 0,1 M MgCl ₂ 0,5 M NaCl 0,01 M DTE ad 50,0 ml ddH ₂ O	pH 7,5 bei 37°C einstellen (2 M NaOH), aliquotiert bei -20°C aufbewahren
RF1 für DNA-Klonierung	1,8 g RbCl (100 mM) 1,5 g MnCl ₂ •2H ₂ O (50 mM) 0,44 g KOAc (30 mM) 0,22 g CaCl ₂ •2H ₂ O (10 mM) 22,5 ml Glycerin (15%) ad 150 ml ddH ₂ O	pH 5,8 einstellen (0,2 M HOAc), sterilfiltrieren (0,22 µm), bei 4°C aufbewahren
RF2 für DNA-Klonierung	0,12 g RbCl (10 mM) 0,42 g MOPS (20 mM) 1,1 g CaCl ₂ •2H ₂ O (75 mM) 15,0 ml Glycerin (15%) ad 100 ml ddH ₂ O	pH 6,8 einstellen (2 M NaOH), sterilfiltrieren (0,22 µm), bei 4°C aufbewahren
20xSSC (<i>sodium salt citrate</i>) für radioaktive Hybridisierung	876,5 g NaCl (3 M) 441 g Na ₃ -citrat•2 H ₂ O (0,3 M) ad 5000 ml ddH ₂ O	pH 7,0 einstellen (HCl), filtrieren (0,45 µm)
STE (<i>sodium TRIS EDTA</i>) für DNA-Isolierung	100 mM NaCl 10 mM TRIS (pH 7,5) 1 mM EDTA (pH 9,0) ad 500 ml ddH ₂ O	pH 8,0
Stop-/Auftragslösung für DNA-Sequenzierung	20 mM EDTA (pH 7,6) 9,5 ml Formamid 5 mg BPB-Na ad 10,0 ml ddH ₂ O	mit 1 g Mischbettionenaustauscher AG 501-X8(D) 1 h rühren, filtrieren (0,45 µm), bei 4°C aufbewahren
50xTAE (TRIS-Acetat-EDTA) für Gelelektrophorese	242 g TRIS 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1000 ml ddH ₂ O	
5xTBE (TRIS-Borat-EDTA) für Gelelektrophorese	54,0 g TRIS 27,5 g Borsäure 20,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1000 ml ddH ₂ O	
TE (TRIS-EDTA) für DNA-Isolierung	10 mM TRIS (pH 7,5) 1 mM EDTA (pH 7,5)	bei 4°C aufbewahren
10/10 TE für Restriktionsanalyse	10 mM TRIS (pH 7,5) 10 mM EDTA (pH 7,5)	bei 4°C aufbewahren

8.3 Nährmedien

Tabelle 7

Medium	Bestandteile	Herstellung/Lagerung
Zellkulturmedium (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> mit 10% FCS)	500 ml DMEM 50 ml FCS 5 ml L-Glutamin (200 mM) 5 ml Natriumpyruvat (100 mM) 10 ml Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10000µg/ml)	frisch herstellen
YMM (<i>yeast minimal medium</i>) für Hefekulturen	20 g Glucose 6,7 g Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren (15 g Agar) ad 1000 ml dH ₂ O (40 mg Ampicillin)	autoklavieren, Ampicillin bei Bedarf frisch zugeben
10xSupplement (ohne Trp und Ura) für Hefekulturen	Ade, Arg, His, Ile, Lys, Met je 20 mg Tyr 30 mg Phe 50 mg Leu 60 mg Val 150 mg ad 100 ml ddH ₂ O	sterilfiltrieren (0,22 µm), bei -20°C aufbewahren
LB (Luria-Bertani)-Medium für Bakterienkulturen	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl (15 g Agar) ad 1000 ml dH ₂ O (40 mg Ampicillin)	pH 7,5 einstellen (1 M NaOH), autoklavieren, Ampicillin bei Bedarf frisch zugeben

9 Zellen und ihre Aufzucht

Für die Gewinnung genomischer DNA des Menschen wurde die EBV (Epstein-Barr-Virus)-transformierte normale B-Zelllinie H2LCL [Heinrichs *et al.*, 1980] sowie die Hepatomzelllinie HepG2 [Povoa *et al.*, 1985] verwendet, *Escherichia coli*-DNA wurde aus HB101 [Bolivar & Backman, 1979] isoliert. Als YAC-Wirt diente *Saccharomyces cerevisiae* AB1380 [Albertsen *et al.*, 1990], Plasmide wurden in *Escherichia coli* XL1-Blue MRF^c [Bullock *et al.*, 1987] vermehrt. Zur Aufbewahrung der Hefe- und Bakterienklone wurden jeweils 0,7 ml einer Übernachtskultur in einem Schraubdeckelgefäß mit dem gleichen Volumen Glycerin 30% gemischt und bei -80°C eingefroren.

9.1 Zellkultur

Die verwendeten menschlichen Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen bei konstanten 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank vermehrt. Zum Wechsel des Mediums wurde die Zellsuspension in sterilen Zentrifugengefäßen 10 min bei 1600 rpm (Rotor: Sorvall SH-3000) und 4°C zentrifugiert. Nach dem Absaugen des klaren Überstands wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen, gezählt und mit einem Titer von 1×10^5 Zellen/ml in neue Gewebekulturflaschen überführt. Nachdem der Titer ca. 7×10^5 Zellen/ml in 600 ml Zellkulturmedium erreicht hatte, wurden die Zellen abzentrifugiert und zum Zählen in 50 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden sie in demjenigen Volumen PBS aufgenommen, welches einen Titer von 3×10^7 Zellen/ml ergab.

9.2 Hefekultur

Für die Aufzucht der YAC-transfizierten Hefen wurde ein supplementiertes Minimalmedium ohne Uracil (Ura) und Tryptophan (Trp) verwendet, das eine Selektion von Klonen mit YACs ermöglicht, da diese die Ura- und Trp-Defizienz des Hefewirts AB1380 komplementieren. Der Zusatz eines Antibiotikums sollte eine Kontamination mit Bakterien verhindern.

200 ml YMM mit Supplement und Ampicillin wurden mit 3 ml einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer $A_{560\text{nm}}$ von ca. 1,5 bei 30°C und 220 rpm im Erlenmeyerkolben (ohne Schikanen) geschüttelt. Die Hefezellen wurden 10 min bei 8000 rpm (Rotor: Sorvall SLA-3000) und 4°C abzentrifugiert und zweimal mit 20 ml 0,05 M EDTA (pH 7,5) gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet (ca. 800 µl) im gleichen Volumen 0,05 M EDTA (pH 7,5) resuspendiert und für die DNA-Präparation in Agaroseblöckchen verwendet.

9.3 Bakterienkultur

Bakterien können extrachromosomale Plasmide unabhängig von ihrem eigenen Genom vervielfältigen. Daher waren für die Gewinnung ausreichender DNA-Mengen lediglich kleine Ansätze notwendig. Da das Plasmid ein Antibiotikaresistenz-Gen enthielt, konnten durch Zugabe eines Antibiotikums transfizierter *E. coli*-Zellen selektiert werden.

4 ml LB-Medium mit Ampicillin wurden in einem Kulturröhrchen mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 160 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Kultur 10 min bei 6000 rpm (Rotor: Sorvall SH-3000) und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet für die Isolierung der Plasmid-DNA einmal in STE gewaschen.

10 DNA-Isolierung

Ausgangspunkt nahezu aller molekulargenetischen Analysen ist die Nucleinsäurepräparation, bei der die Zellen aufgeschlossen werden, die DNA oder RNA von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt und entsprechend ihrer späteren Verwendung gereinigt und konzentriert wird. Die dabei angewandten Methoden richten sich nach dem Ausgangsorganismus – Bakterienwände müssen anders aufgeschlossen werden als Zellwände von Hefen oder Zellmembranen von Säugerzellen – sowie nach Zusammensetzung, Größe und erforderlicher Reinheit der zu isolierenden Nucleinsäuren.

10.1 Genomische DNA des Menschen (hoch- bzw. niedermolekular)

Bei der DNA-Isolierung in Lösung entstehen aufgrund der einwirkenden Scherkräfte auch bei äußerst schonender Arbeitsweise durchschnittliche Fragmentgrößen von höchstens 150 kb. Da das Überbrücken größerer Entfernungen bei der Restriktionskartierung definierte Fragmente im Mb-Bereich und somit vollkommen intakte DNA erfordert, wurden die menschlichen Zellen vor der Freisetzung der

DNA in Agarose eingebettet. Die in PBS suspendierten Zellen (s. Abschnitt II 9.1) wurden bei 40°C milliliterweise mit dem gleichen Volumen 1,4%iger InCert Agarose (in 0,05 M EDTA pH 7,5 gelöst) versetzt, gemischt und in 200 µl-Blöckchenform pipettiert. Nachdem sich die Agarose verfestigt hatte, wurden die Blöckchen herausgelöst, halbiert und in 10 ml NDS aufgenommen. Die anschließende Inkubation für 24 h bei 50°C setzte die DNA durch Aufschluß der Zellen und Abbau der Proteine in der Agarose frei. Die Blöckchen wurden bei 4°C aufbewahrt.

Für alle anderen Anwendungen wurden die in PBS suspendierten Zellen in einem Erlenmeyerkolben mit 2 ml RNase A-haltigem Extraktionspuffer pro 10^7 Zellen versetzt, unter leichtem Schwenken lysiert und zum Entfernen der RNA 1 h auf 37°C erwärmt. Die Proteine wurden nach Zugabe von 100 µg Proteinase K/ml 3 h bei 50°C abgebaut. Um die Proteinase K wieder zu entfernen, wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen äquilibriertem Phenol vorsichtig aber gründlich vermischt. Durch 10 min Zentrifugation bei 3000 rpm (Rotor: Sorvall SH-3000) und 10°C wurden die Phasen wieder getrennt. Die wäßrige Phase, in der die DNA gelöst war, wurde mit Hilfe einer Pipette mit großem Spitzendurchmesser schonend in ein neues Gefäß überführt und nochmals mit Phenol extrahiert. Dann wurde das 0,2fache Volumen 10 M Ammoniumacetat und das doppelte Volumen Ethanol vorsichtig untergemischt, woraufhin die DNA in langen Fäden präzipitierte. Die DNA wurde auf eine Pasteurpipette aufgerollt, in Ethanol 70% gewaschen und in 6 ml TE pro 10^7 Zellen wieder gelöst. Nach Zugabe des 0,2fachen Volumens 3 M Natriumacetat (pH 5,2) wurde die DNA erneut mit Ethanol gefällt, gewaschen, behutsam an der Luft getrocknet und in 2 ml TE pro 10^7 Zellen aufgenommen.

Um die DNA zu fragmentieren, z.B. für die Maskierung repetitiver Sequenzen bei der Hybridisierung, wurde ein stabförmiger Ultraschallhomogenisator eingesetzt. In einem zur Hälfte mit DNA-Lösung gefüllten Gefäß wurde die DNA ca. 45 s durch gepulste Schallwellen mit einer Frequenz von 20 kHz zerkleinert.

10.2 DNA aus Hefezellen (hoch- bzw. niedermolekular)

Sowohl für die Restriktionskartierung als auch für die PCR-Analyse der YACs war keine Abtrennung der Hefe-DNA notwendig, da bei diesen Methoden durch den Einsatz humanspezifischer Marker eine Kreuzreaktion mit dem Hefegenom weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Die Restriktionsanalyse erforderte erneut die Isolierung intakter, hochmolekularer DNA. Dementsprechend wurden die in 0,05 M EDTA (pH 7,5) suspendierten Hefezellen (s. Abschnitt II 9.2) bei 40°C mit dem gleichen Volumen 1,4%iger InCert Agarose (in 0,05 M EDTA pH 7,5 gelöst) und 100 µl Zymolyase 20-T-Lösung vermischt und anschließend in 200 µl-Blöckchenform pipettiert. Die abgekühlten Blöckchen wurden aus der Form herausgelöst, halbiert und 24 h in 8 ml LET bei 37°C geschwenkt, um die Hefezellwände aufzuschließen. Die 100 µl-Blöckchen wurden dreimal mit ddH₂O gewaschen und in 10 ml NDS aufgenommen, was zur Lyse der Sphäroblasten und zur Freisetzung der hochmolekularen DNA führte. Nach Abbau der Proteine durch Inkubation bei 50°C für 24 h wurden die Blöckchen bei 4°C aufbewahrt.

Die PCR-Analyse der YACs hingegen setzte DNA in gelöster Form voraus. Ein 100 µl-Blöckchen wurde 45 min in 1 ml 100 µM PMSF (in TE) bei Raumtemperatur (RT) geschwenkt, um die Proteinaase K zu inaktivieren, und dann zweimal 30 min in je 1 ml TE, um das PMSF wieder zu entfernen. Nach Zugabe von 20 µl TE wurde das Agaroseblöckchen durch Erwärmen auf 65°C (30 min) verflüssigt und durch wiederholtes Aufziehen mit einer 100 µl-Pipettenspitze homogenisiert. Zum Abbau des Gelgerüsts wurde 1 U β -Agarase bei 40°C hinzugegeben und 1 h inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung durch eine Gelfiltration gereinigt. Hierbei handelt es sich um eine Gelausschlußchromatographie, bei der kleine Moleküle, wie Salze, Nucleotide, niedermolekulare Kohlenhydrate und Peptide, in die Poren der Gelmatrix eindringen und zurückgehalten werden, während große Moleküle im Ausschlußvolumen die Säule schnell durchlaufen. Als Säulenmaterial wurde Sephadex G-50, ein hochmolekulares Dextran, verwendet, das durch Aufstreuen auf TE (ca. 5 g auf 75 ml) zum Quellen gebracht und autoklaviert bei 4°C aufbewahrt wurde. Zur Herstellung der Säule wurde eine 1 ml-Plastikspritze am Auslauf mit einer Fritte (90 µm) verschlossen, mit Sephadex G-50-Suspension gefüllt und in einem Zentrifugationsröhrchen 2 min bei 2000 rpm (Rotor: Sorvall SH-3000) und RT zentrifugiert. Die Säule wurde mit der Suspension nochmals aufgefüllt und zur Äquilibrierung 10 min bei 2000 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung, mit einem zehntel Volumen 5 M NaCl versetzt, aufgetragen und erneut 10 min bei 2000 rpm und RT zentrifugiert. Das Eluat enthielt jetzt die in TE gelöste DNA.

10.3 YAC-DNA (Elektroelution)

Isolierte YAC-DNA wurde einerseits nach Restriktion und Subklonierung für die Herstellung neuer spezifischer Hybridisierungssonden benötigt, andererseits direkt als DNA-Sonde eingesetzt. Durch ROFE wurden die in Agarose eingebetteten Hefechromosomen aufgetrennt (s. Abschnitt II 13.3) und, um Beschädigungen der DNA zu vermeiden, durch möglichst kurze Färbung mit Ethidiumbromid und Anregung mit weniger energiereichem ultraviolettem (UV-) Licht (366 nm) sichtbar gemacht (s. Abschnitt II 13.4). Anschließend wurde die dem YAC entsprechende zusätzliche Bande im Hefegenom unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA isoliert. Um die Elution der Nucleinsäuren zu beschleunigen, wurde das Gelgerüst mechanisch zerstört, indem das ausgeschnittene Gelfragment mit einem Skalpell zerkleinert und durch eine 0,4 mm-Kanüle in den Gelraum der mit wenig 0,5xTAE gefüllten Elutionskammer gepreßt wurde. Von diesem war zur Anode hin ein Entnahmeraum mit einer für DNA durchlässigen Membran (BT1) abgetrennt. Die gesamte Kammer war an beiden Seiten mit für DNA undurchlässigen Membranen (BT2) begrenzt, die über den Laufpuffer (0,5xTAE) Kontakt zu je einer Elektrode hatten. Die Elution wurde bei 80 V über Nacht durchgeführt, wobei ein ständiges Umwälzen des Puffers gewährleistet war. Vor der Entnahme wurde die Spannung 20 min auf 150 V erhöht und dann 5 s umgepolt, damit die DNA, die an der für sie undurchlässigen Membran im Entnahmeraum haftete, wieder in Lösung ging. Die DNA wurde dann mit dem Puffervolumen des Entnahmeraums in

ein Reaktionsgefäß überführt, in einer Vakuumzentrifuge auf 100 µl eingengt und durch Gelfiltration (s. Abschnitt II 10.2) gereinigt.

10.4 Plasmid-DNA

Die Gewinnung von Plasmid-DNA war für die Sequenzierung und die weitere Charakterisierung der klonierten Plasmidinserts notwendig. Eine Abtrennung der niedermolekularen Plasmide von der chromosomalen DNA des Wirts war dabei nach dem Aufschluß der Zellen durch alkalische Lyse aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße möglich.

Das aus der 4 ml Übernachtskultur erhaltene Zellpellet (s. Abschnitt II 9.3) wurde in 0,3 ml EDTA- und RNase A-haltigem Puffer P1 resuspendiert, der durch Komplexbildung stabilisierender, zweiwertiger Kationen die Bakterienzellwände durchlässig macht und die RNA abbaut. Nach Zugabe des gleichen Volumens Puffer P2, der aus einem Detergenz in alkalischer Lösung bestand, wurde durchgemischt und 5 min bei RT inkubiert, wodurch die Zellen vollständig lysierten und die Proteine sowie die DNA denaturierten. Um ein irreversibles Denaturieren der Plasmide zu verhindern, wurde anschließend durch vorsichtiges Untermischen von 0,3 ml gekühltem Puffer P3 neutralisiert und 10 min auf Eis inkubiert. Dabei fällte die K-acetat-Lösung Proteine, hochmolekulare DNA und andere Zellbestandteile aus, die renaturierten Plasmide aber blieben gelöst. Durch Zentrifugation für 15 min bei 15000 rpm und RT wurden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Der Überstand wurde abpipettiert, zur Fällung der DNA mit dem gleichen Volumen *iso*-Propanol versetzt, 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend 30 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in Ethanol 70% gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl TE aufgenommen.

10.5 Plasmidinserts (Elution mit Glas-beads)

Für die Verwendung der klonierten DNA-Fragmente als Hybridisierungssonden wurden die Inserts mit Restriktionsenzymen aus dem Plasmidvektor herausgeschnitten. Durch eine Gelelektrophorese wurde das Fragmentgemisch aufgetrennt. Wie bei der YAC-DNA-Isolierung wurde das Gel kurz angefärbt und die gewünschte Bande ausgeschnitten. Die anschließende Gelelektion wurde mit dem *Jetsorb Gel Extraction Kit* durchgeführt, das für Fragmentgrößen bis zu 45 kb geeignet ist.

Pro 100 mg des Gelstücks wurde nach Zugabe von 300 µl Puffer A1, der Natriumperchlorat zum Aufbrechen des Gelgerüsts enthielt, und 10 µl der Glas-bead-Suspension, deren oberflächenbehandelte Glaskügelchen (*glass beads*) die DNA banden, 15 min bei 50°C inkubiert, wobei alle 3 min durchgemischt wurde. Nach Zentrifugation für 30 s bei 15000 rpm und RT wurde der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde noch einmal mit 300 µl Puffer A1 pro 100 mg Gel und zweimal mit dem gleichen Volumen ethanolhaltigem Puffer A2 gewaschen. Die Glas-beads wurden an der Luft getrocknet und dann in 20 µl TE pro 100 mg eingesetzten Gels resuspendiert. Durch Erwärmen auf 50°C für 5 min und einmaliges Schütteln wurde die DNA eluiert und nach erneutem Abzentrifugieren der Glas-beads in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

10.6 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren, in 1 ml ddH₂O in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Ein Absorptionwert von $A_{260\text{nm}}=1$ entspricht dabei einer Konzentration an doppelsträngiger DNA (dsDNA) von ca. 50 µg/ml. Da ungepaarte Nucleinsäuren eine höhere Absorption besitzen, entspricht der gleiche Wert bei einzelsträngiger DNA einer Konzentration von ca. 40 µg/ml, bei einzelsträngiger RNA einer Konzentration von ca. 33 µg/ml. Durch das Verhältnis der $A_{260\text{nm}}$ zur $A_{280\text{nm}}$, dem Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurereste der Proteine, ließ sich außerdem die Reinheit einer Nucleinsäurelösung abschätzen. Eine reine dsDNA-Lösung besitzt einen $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ -Wert von 1,8, eine 50%ige Verunreinigung mit Protein oder Phenol verringert den Wert auf ca. 1,5.

War die DNA-Konzentration in der Küvette geringer als 0,5 µg/ml, wurde in einer Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe von 3 ng bis 300 ng DNA in 10 µl TE hergestellt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurde die zu bestimmende Lösung unter UV-Licht mit den Konzentrationen der Verdünnungsreihe verglichen.

11 Restriktionsanalyse

Mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen läßt sich hochmolekulare DNA in definierte Fragmente spalten. Durch symmetrische Spaltung innerhalb der meist palindromischen Erkennungssequenz entstehen dabei für jedes Enzym spezifische Fragmentenden. Die Größe der entstehenden Fragmente hängt von der Häufigkeit der Erkennungssequenz im Genom ab. Sie variiert je nach Länge, Nucleotidzusammensetzung und Methylierungsgrad der Erkennungssequenz.

11.1 Restriktion von DNA in Lösung

Ein Restriktionsansatz enthielt pro Mikrogramm zu spaltender DNA ca. 2 U Restriktionsenzym in 20 µl des dazugehörigen Puffers. Nach Inkubation für ca. 4 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur, die in der Regel bei 37°C lag, wurde die Vollständigkeit der Restriktion durch Auftrennung der Fragmente über ein Agarosegel kontrolliert. Bei genomischer DNA wurden dem Restriktionsansatz zur Stabilisierung des Enzyms zusätzlich 4 mM Spermidin und 100 µg/ml BSA zugesetzt.

11.2 Restriktion von DNA in Agarose

Für die DNA-Analyse mit selten schneidenden Restriktionsenzymen, die Fragmente >150 kb erwarten ließen und zur Genkartierung eingesetzt wurden, mußte in Agarose eingebettete, hochmolekulare DNA verwendet werden. Zur Inaktivierung der Proteinase K (s. Abschnitt II 10) wurden die Agaroseblöckchen 2 h in 2 ml 50 µM PMSF (in 10/10 TE) pro Blöckchen bei 4°C unter gelegentlichem

Schwenken inkubiert. Nach Entfernen des Puffers wurden 100 µg RNase A in 2 ml 10/10 TE pro Blöckchen zugegeben und diese über Nacht bei 4°C so gelagert, daß sie möglichst einzeln am Boden lagen. Am nächsten Morgen wurde der Puffer gegen 10/10 TE ausgetauscht, und es wurde 4 h bei RT unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die 100 µl-Blöckchen geteilt, einzeln in Reaktionsgefäße mit möglichst flachem Boden überführt (um ein Zerschneiden zu verhindern), mit 350 µl Restriktionspuffer 3 h bei 4°C umgepuffert und nochmals mit 200 µl Puffer 2 h bei RT. Für den Restriktionsansatz wurde der Puffer nochmals gewechselt, mit 30 U des jeweiligen Enzyms versetzt und über Nacht bei der entsprechenden Temperatur inkubiert, wobei, um ein Schmelzen der Agarose zu verhindern, 50°C nicht überschritten werden durften. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 10/10 TE und 50 µl SDS 10% beendet; die DNA-Fragmente in den Agaroseblöckchen wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

12 DNA-Klonierung

Durch Klonierung in Bakterien wurden einzelne DNA-Sequenzen vervielfältigt, die anschließend als spezifische DNA-Sonden bei der Hybridisierung eingesetzt werden sollten. Die Klonierung läßt sich in drei Schritte unterteilen: die Ligation, durch die die Klonierungsfragmente mit dem Plasmidvektor verbunden werden; die Herstellung kompetenter Zellen, die eine erhöhte Aufnahmefähigkeit für Fremd-DNA besitzen; und die Transformation, bei der das Plasmid in die Bakterienzelle geschleust wird, um anschließend autonom repliziert zu werden.

12.1 Ligation

Die T4-DNA-Ligase verknüpft die 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen kompatibler DNA-Enden unter ATP-Verbrauch zu einer Phosphodiesterbrücke. Vor der Ligation wurde der zirkuläre Vektor (mit BamHI) und die zu analysierende DNA (mit BglII bzw. MboI) mit Restriktionsenzymen, die kompatible Enden erzeugen, in getrennten Ansätzen geschnitten. Die zu klonierende DNA wurde anschließend durch eine Gelfiltration gereinigt. Der linearisierte Vektor wurde mit Hilfe der Shrimp Alkaline Phosphatase in SAP-Puffer dephosphoryliert, um eine Selbstligation des Plasmids zu verhindern, und über ein präparatives Agarosegel isoliert. Zur Überprüfung der vollständigen Dephosphorylierung wurde eine Kontrolligation mit anschließender Auftrennung in einem Agarosegel durchgeführt.

Im Ligationsansatz wurden 100 ng Vektor und 20 ng DNA in 15 µl ddH₂O zuerst 5 min auf 56°C erwärmt, damit die kompatiblen Enden vollständig denaturierten, dann auf Eis mit 2 µl 10xLigationspuffer, 2 µl 10xATP und 1 U Ligase versetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Zwei parallel durchgeführte Kontrollreaktionen enthielten ausschließlich den Vektor bzw. die DNA-Fragmente. Die Hälfte jedes Ansatzes wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, wobei die Vektorbande

der kompletten Reaktion deutlich schwächer sein sollte als die der Kontrollreaktion mit dem Vektor allein.

12.2 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden unter Verwendung zweiwertiger Kationen hergestellt [Hanahan, 1983]. Bei dieser Methode werden die Bakterien durch Behandlung mit einer Kombination zweiwertiger Kationen in einen Zustand versetzt, der es ihnen ermöglicht, extrazelluläre DNA aufzunehmen.

Hierfür wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue MRF' in 5 ml LB-Medium angesetzt. Am nächsten Morgen wurden 300 ml LB-Medium mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine Absorption von $A_{560\text{nm}}=0,5$ erreicht war (ca. 5×10^8 Zellen/ml). Die Zellen wurden 10 min bei 3000 rpm (Rotor: Sorvall SH-3000) und 4°C abzentrifugiert, in 90 ml RF1 bei 4°C resuspendiert und 2 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 24 ml RF2 bei 4°C aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert, aliquotiert und sofort bei -80°C schockgefroren. Die Qualität der kompetenten Zellen wurde kontrolliert, indem eine Transformation mit 100 ng zirkulärem Vektor durchgeführt wurde, bei der ca. 10^6 Kolonien entstehen sollten.

12.3 Transformation

Ein Aliquot von 100 µl kompetenten Bakterienzellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 0,7 µl 1,5 M BME versetzt und 10 min inkubiert, dann mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und nochmals 30 min auf Eis inkubiert. Durch Erwärmen auf 42°C für 45 s wurde die Zellmembran für DNA durchlässig gemacht und danach 2 min auf Eis wieder stabilisiert. Die transformierten Zellen wurden dann in 1 ml LB-Medium 45 min bei 37°C leicht geschüttelt (ca. 180 rpm), um das vom Plasmid codierte Antibiotikaresistenz-Gen zu aktivieren. Das nachfolgende Ausbreiten der Klone auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten stellte sicher, daß ausschließlich transformierte Zellen wuchsen. Zur Kontrolle wurden Transformationen mit dem dephosphorylierten Vektor bzw. der Fremd-DNA allein durchgeführt.

Eine weitere Selektionsmethode ermöglichte das Erkennen von Kolonien, deren Plasmid kein kloniertes DNA-Insert enthielt. Die sogenannte α -Komplementation basiert auf der Tatsache, daß zwei von verschiedenen DNA-Sequenzen codierte Peptide der β -Galaktosidase, die einzeln keine Aktivität zeigen, einen funktionsfähigen Enzymkomplex bilden können. Dabei codieren die Wirtszellen den C-Terminus des Enzyms, die Vektorsequenz dagegen enthält den N-Terminus des Proteins. β -Galaktosidase-positive Klone erkennt man daran, daß sie das Substrat X-Gal in Anwesenheit des Induktors IPTG zu einem blauen Farbstoff umsetzen. Da die Klonierungsstelle des Vektors innerhalb der das Peptid codierenden Region lokalisiert ist, führt die Insertion eines DNA-Fragments zur Inaktivierung der β -Galaktosidase; Kolonien, deren Plasmide klonierte DNA enthalten, zeigen demnach keine Färbung. Für die α -Komplementation wurden vor dem Ausbreiten der transformierten Bakterien 40 µl X-Gal (20 mg/ml) und 10 µl IPTG (200 mg/ml) auf den Agarplatten verteilt.

13 Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren ermöglichte sowohl den Nachweis und die Größenbestimmung als auch die Isolierung einzelner DNA-Fragmente, die anschließend z.B. als spezifische Sonden eingesetzt werden konnten.

13.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamidgele eignen sich vor allem für die Auftrennung von DNA-Fragmenten bis zu 1000 bp. In diesem Bereich weisen sie eine wesentlich bessere Auflösung und eine höhere Sensitivität als Agarosegele auf.

Für ein 10%iges Gel (140x160x0,5 mm) wurden 5 ml Acrylamid-Lösung 40%, 4 ml 5xTBE, 11 ml ddH₂O und 150 µl APS 10% gemischt und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe 5 min entgast. Anschließend wurde durch Zugabe von 10 µl TEMED die Polymerisation initiiert, kurz durchgemischt und das Gel möglichst schnell in die vertikale Kammer gegossen. Nach ca. 45 min wurden die Taschen des vollständig polymerisierten Gels mit TBE gespült, und die mit Auftragspuffer versetzten Proben konnten aufgetragen werden. Als Größenstandard diente die 100 bp- bzw. 1 kb-Leiter. Die Elektrophorese wurde mit TBE als Laufpuffer bei konstanten 40 W (~580 V) und 20°C durchgeführt.

13.2 Agarosegelelektrophorese

Konventionelle Agarosegele zeichnen sich im Vergleich zu Polyacrylamidgelen durch einen größeren Auftrennungsbereich (bis ca. 50 kb), eine relativ kurze Laufzeit und geringen Aufwand aus. Die verwendeten Gele enthielten 0,7% bis 1% Agarose und wurden für die Trennung von DNA-Fragmenten bis zu 10 kb eingesetzt.

Zur Herstellung eines Gels (110x120x5 mm) wurde die Agarose durch kurzes Aufkochen in 120 ml TBE gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 50°C in die horizontale Gelkammer gegossen. Nachdem sich das Gel verfestigt hatte, wurde die Kammer mit TBE gefüllt, und die mit Auftragspuffer versetzten Proben wurden aufgetragen. Als Größenstandard diente die 1 kb-Leiter. Die Elektrophorese wurde abhängig von der zur Verfügung stehenden Zeit bei 80-120 V durchgeführt. Für präparative Gele wurde extra dafür vorgesehene Agarose (SeaKem) mit TAE als Puffer verwendet, wodurch die DNA-Elution begünstigt wurde.

13.3 Gelelektrophorese im rotierenden Feld (ROFE)

Für die Trennung hochmolekularer DNA-Fragmente (bis zu mehreren Mb) kam eine am Institut für Immunogenetik entwickelte Methode, die Gelelektrophorese im rotierenden Feld (ROFE) [Ziegler & Volz, 1992], zur Anwendung. Bei dieser wird wie bei der PFGE die Orientierung des elektrischen Feldes relativ zum Gel periodisch verändert, wodurch auch große DNA-Fragmente durch das Gelgerüst geschleust werden können, indem sie ihre Konformation und Richtung ständig ändern. Im Gegen-

satz zu den feststehenden Elektroden bei der PFGE ermöglichen die rotierenden Elektroden allerdings jede beliebige Einstellung des elektrischen Feldes; sie schaffen somit für jeden Trennbereich optimale Bedingungen.

Die Gele (200x200x8 mm) enthielten 0,7% bis 1% Agarose in 320 ml 0,25xTBE, die hochmolekularen DNA-Proben waren wie der Größenstandard in Agaroseblöckchen eingebettet (s. Abschnitt II 10), die mit einem abgeflachten Spatel in den Geltaschen in Laufrichtung durch Adhäsion befestigt wurden. Der verbliebene Teil der Taschen wurde luftblasenfrei mit flüssiger Agarose gefüllt. Nach dem Erkalten wurde die Oberseite des Gels durch das Abschneiden der Erhebungen an Rändern und Taschen begradigt. Als Laufpuffer dienten 2,4l 0,25xTBE, die während der Elektrophorese bei konstanten 13°C ständig umgewälzt wurden. Die unterschiedlichen Bedingungen für spezifische Anwendungen werden im folgenden aufgeführt.

YAC-Größenbestimmung: Dauer: 3x36 h, Intervall (Pulszeit): 120-300 s log, Winkel: 115-120° log, Spannung: 80-100 V log, Gel: 1% Agarose, Größenstandards: WAY5-4A und YPH149;

Restriktionskartierung (H2LCL-Zelllinie): Dauer: 3x25 h, Intervall (Pulszeit): 80-240 s log, Winkel: 115-130° log, Spannung: 110-130 V log, Gel: 0,7% Agarose, Größenstandards: WAY5-4A und YPH149;

Restriktionskartierung (YACs): Dauer: 1x20 h, Intervall (Pulszeit): 12-35 s lin, Winkel: 120-110° lin, Spannung: 220-240 V lin, Gel: 1% Agarose, Größenstandards: YPH149 und λ -Standard.

13.4 DNA-Nachweis mit Ethidiumbromid

Zur DNA-Färbung wurden die Gele unter leichtem Schütteln 20 min in Ethidiumbromidlösung (0,4 μ g/ml) inkubiert und anschließend 20 min in dH₂O gewaschen, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen. Anregung des Farbstoffs unter UV-Licht bei 300 nm führte zu einer Fluoreszenz der DNA-Banden bei 590 nm, die zur Auswertung fotografisch festgehalten wurden. Die Färbelösung konnte unter gelegentlicher Zugabe frischen Ethidiumbromids, das bei Lichtkontakt schnell inaktiviert wird, mehrfach verwendet werden.

14 Southern-Blotting

Zur weiteren Analyse der im Gel aufgetrennten DNA wurde diese auf positiv geladene Nylonmembranen übertragen und fixiert (Blotting). Dieser Vorgang, der unter Verwendung von Nitrocellulosemembranen erstmals von Southern (1975) beschrieben wurde, ist Voraussetzung für den DNA-Nachweis durch Hybridisierung (s. Abschnitt II 15). Da der DNA-Transfer durch interkalierendes Ethidiumbromid erschwert wird, wurde bereits beim Färben der zu blottenden Gele die Inkubationszeit auf 10-15 min reduziert.

Um die Transfereffizienz großer DNA-Fragmente zu erhöhen, wurde das Gel zuerst 8 min in 0,25 M Salzsäure bewegt, die durch Abspaltung von Purinen zu Strangbrüchen der DNA führt. Dem kurzen Abspülen der Säure mit dH₂O folgten 35 min Schwenken in Denaturierungspuffer, der nach 15 min einmal gewechselt wurde. In der Zwischenzeit wurde die Membran mit ddH₂O befeuchtet und für 20 min in 10xSSC aufbewahrt. Das Gel wurde nach der Denaturierung 10 min in 20xSSC geschwenkt und danach mit der Oberseite nach unten auf eine Glasplatte gelegt. Anschließend wurde die Membran auf die glatte Unterseite des Gels luftblasenfrei aufgelegt und mit einer Glaspipette angerollt. Auf die Membran wurden drei mit 20xSSC getränkte Blotting-Papiere, ca. 5 cm Papierhandtücher und als Abschluß eine zweite Glasplatte geschichtet. Zuletzt wurde der Aufbau umgedreht und mit einem Gewicht von ca. 300 g beschwert. Über Nacht sorgten Kapillarkräfte und die Schwerkraft dafür, daß die Flüssigkeit aus dem Gel durch die Membran in die Papierhandtücher gesogen wurde, wobei die gelöste, negativ geladene DNA an der positiv geladenen Membran adsorbierte. Am nächsten Morgen wurden die Papierhandtücher gegen trockene ausgetauscht, und nach vier weiteren Stunden, die den Transfer vervollständigten, wurde der Blot in 2xSSC neutralisiert und auf Blotting-Papier an der Luft getrocknet.

15 Radioaktive Hybridisierung

Die radioaktive Hybridisierung wird zum Nachweis eines bestimmten Nucleinsäuremoleküls innerhalb eines komplexen Gemisches eingesetzt. Dies geschieht durch sequenzspezifische Anlagerung einer denaturierten Sonde an die auf einer Membran fixierte, zu analysierende einzelsträngige DNA bzw. RNA. Nach der Hybridisierung wird die überschüssige Sonde abgewaschen und der an die Zielsequenz gebundene Anteil durch Autoradiographie nachgewiesen.

15.1 DNA-Sonden

Als Sonden wurden spezifische DNA-Fragmente eingesetzt, die aus der cDNA oder den nicht transkribierten Bereichen bestimmter Gene bzw. aus klonierten Sequenzabschnitten der chromosomalen Region 1q21 isoliert wurden. Sie sind in Tabelle 3 aufgeführt.

15.2 Markierung der Sonde

Die Markierung wurde mit dem *Megaprime DNA labelling system* unter Verwendung radioaktiver Nucleotide durchgeführt. Dabei lagern sich Oligonucleotide (Nonamere) zufälliger Sequenz an die Einzelstränge der denaturierten DNA-Sonde an (*random priming*). Anschließend werden diese Primer durch das große Fragment der *E. coli* Polymerase I (Klenow-Enzym) unter Einbau radioaktiver Nucleotide zu komplementären Strangabschnitten verlängert.

Für die radioaktive Markierung wurden 20 ng der einzusetzenden DNA-Sonde in 28 µl ddH₂O mit 5 µl Oligonucleotid-Primer versetzt und 8 min bei 95°C denaturiert. Um eine erneute Renaturierung zu verhindern, wurde die Lösung auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurden 10 µl Markierungspuffer, in dem die drei unmarkierten dNTPs enthalten sind, 5 µl [α -³²P]dCTP und 2 U Klenow-Enzym hinzugefügt, kurz gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Zum Beenden der Synthesereaktion wurden 5 µl 0,2 M EDTA (pH 7,5) hinzugegeben. Der Zusatz von 50 µl *E. coli*-DNA (1 µg/µl) sollte den Verlust der relativ geringen Menge markierter Sonde durch Adsorption an der Gefäßwand minimieren. Nach erneutem Mischen und Inkubation für 1 min bei RT wurden 0,8 µl der Lösung auf DNA-adsorbierendes Filterpapier (DE81-Papier) pipettiert. Der Rest wurde durch Gelfiltration (s. Abschnitt II 10.2) von den nicht in die Sonde eingebauten Nucleotiden gereinigt. Von dem erhaltenen Filtrat wurden abermals 0,8 µl auf DE81-Papier pipettiert. Es folgte die Bestimmung der Einbaurrate durch Radioaktivitätsbestimmung der beiden Filterpapiere im Szintillationsmeßgerät, wobei der Wert vor der Gelfiltration der eingesetzten Aktivität entsprach (ca. 300000 cpm bei frisch hergestellter Nucleotidlösung) und der Wert des Filtrats den in die DNA-Sonde eingebauten radioaktiven Nucleotiden. Lag der Wert des Filtrats über 70% des Vollwerts, wurde die Sonde verworfen, da ein derart hoher Nucleotidverbrauch mit Abbrüchen bei der Synthese der Sondenfragmente einhergeht, welche dann aufgrund ihrer geringen Fragmentlänge unspezifische Signale hervorrufen. Eine Einbaurrate unter 1000 cpm/ng eingesetzter DNA wies auf eine mißglückte Markierung hin; die Reaktion wurde wiederholt.

15.3 Hybridisierung

Für die Hybridisierungsreaktion mußte der durch Southern-Blotting hergestellte, die denaturierte DNA enthaltende Filter in eine Hybridisierungsröhre überführt werden. Zu diesem Zweck wurde die verschließbare Glasröhre mit 8 ml – zur Herabsetzung der Viskosität vorgewärmtem – Hybridisierungspuffer gefüllt, der Blot auf eine 10 ml Plastikpipette aufgewickelt und anschließend unter Verdrängung des Puffers luftblasenfrei an der Innenseite der horizontal gehaltenen Röhre entrollt. Nach 30 min Rotation im Hybridisierungsöfen bei 66°C hatte das System die Hybridisierungstemperatur erreicht. 100 µg sonifizierte menschliche DNA in 100 µl ddH₂O wurden 8 min bei 95°C denaturiert, hinzugegeben und 2 h vorhybridisiert. Ca. 30 min vor Ablauf dieser Zeit wurde die markierte Sonde mit 100 µg menschlicher DNA in 50 µl ddH₂O versetzt und ebenfalls 8 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde auf Eis abgeschreckt und nach Zugabe von 1 ml vorgewärmtem Hybridisierungspuffer bei 66°C vorhybridisiert. – Die Vorhybridisierung nutzt die Abhängigkeit der Renaturierungsgeschwindigkeit einzelsträngiger DNA von der Häufigkeit einer bestimmten Sequenz aus. Dabei hybridisieren komplementäre Sequenzen um so schneller, je höher ihre Konzentration in einer Lösung ist. Durch die Zugabe von Gesamt-DNA des Menschen, die einen hohen Anteil repetitiver Sequenzen aufweist, können im Genom häufig vorkommende, unspezifische Sequenzen blockiert werden [Sealey *et al.*, 1985]. Vor allem bei Sonden, die neben einem genspezifischen auch einen repetitiven Anteil aufweisen, führt die Vorhybridisierung zu verbesserten Ergebnissen, da die markierten repetitiven

Sequenzen maskiert werden, bevor sie auf den Blot gelangen. – Je nach Spezifität der Sonde variierte die Vorhybridisierungszeit zwischen 10 und 45 min; abweichend davon wurden die als DNA-Sonden verwendeten hochkomplexen YACs bis zu 1 h mit bis zu 1 µg menschlicher DNA in 1 ml Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Zuletzt wurde die Lösung in die Hybridisierungsröhre überführt, welche über Nacht bei 66°C rotierte.

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung mit der überschüssigen Sonde abgegossen und der Blot einmal 5 min und einmal 20 min mit ca. 30 ml 1xSSC/1% SDS bei 68°C im Hybridisierungsofen gewaschen, um unspezifisch gebundene Sondenfragmente zu entfernen. Weitere Waschschritte von jeweils 20 min folgten in einer Plastikschaale bei 68°C unter Schütteln im Wasserbad, bis die vom Blot abgegebene radioaktive Strahlung ungefähr dem doppelten der Umgebungsstrahlung entsprach, unter Abnahme der SSC-Konzentration in 0,5xSSC/0,1% SDS, 0,2xSSC/0,1% SDS und 0,1xSSC/0,1% SDS.

15.4 Autoradiographie

Der Nachweis der an die Zielsequenzen gebundenen, radioaktiv markierten spezifischen Sonde erfolgte durch Autoradiographie unter Verwendung von Röntgenfilmen, die zur Dokumentation aufbewahrt werden konnten. Da der Film bei direktem Kontakt mit Feuchtigkeit beschädigt wird, wurde der Filter nach dem Waschen verpackt. Der noch nasse Blot wurde auf Kopierfolie gelegt, die wiederum zum Aufsaugen überschüssiger Waschlösung auf einem Blotting-Papier gleicher Größe lag; anschließend wurde die gesamte Konstruktion in Frischhaltefolie eingepackt. In einer Dunkelkammer wurde der Röntgenfilm zur Aktivierung der enthaltenen Silbersalze mittels eines Rotlicht-Blitzgerätes vorbeleuchtet (nur Kodak XAR) und danach in einer Filmkassette zwischen dem eingepackten Blot und einer Verstärkerfolie (*intensifier screen*) bei -80°C belichtet. Die niedrige Temperatur sorgt dabei für eine Verlängerung des angeregten Zustands der Silberionen und erleichtert die Umsetzung zu elementarem Silber durch Photonen. In Verbindung mit der Verstärkerfolie, die nach dem Durchdringen des Films auftreffende β -Strahlung in Licht umwandelt, wird so eine intensivere Schwärzung erreicht. Die Expositionszeit betrug je nach Intensität der Signale zwischen 24 h und 3 Wochen, wobei nach 24 h zur Abschätzung der Signalstärke der Film entwickelt und durch einen neuen ersetzt wurde. Bei schwachen Signalen konnte die Sensitivität durch die Verwendung hochempfindlicher Filme (Kodak Bio-max MS) und der dazugehörigen Verstärkerfolien weiter erhöht werden. Nach der Exposition wurden die feuchten Blots bei -20°C aufbewahrt. Vor einer erneuten Hybridisierung wurden die Filter zur Entfernung der Sonde bis zu 8 min bei 95°C in 0,1xSSC/0,1% SDS denaturiert. Aufgrund der schwächeren DNA-Fixierung wurden die Filter der feingerasterten cDNA-Bibliothek bei höchstens 70°C bis zu 30 min inkubiert, um die Sonde abzulösen.

16 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht, ausgehend von einem komplexen DNA-Gemisch, die exponentielle Vervielfältigung einer bestimmten Sequenz von bis zu mehreren Kilobasen *in vitro*. Dabei wird die Eigenschaft des Enzyms DNA-Polymerase ausgenutzt, ein an denaturierte DNA gebundenes Oligonucleotid (Primer) zum komplementären Strang zu verlängern [Saiki *et al.*, 1985, 1988; Mullis & Faloona *et al.*, 1987]. Der Nachweis eines spezifischen DNA-Markers erfordert neben der zu analysierenden DNA zwei Oligonucleotid-Primer, die an den beiden Enden des gesuchten, denaturierten DNA-Abschnitts binden und dabei jeweils das 5'-Ende eines der gegenüberliegenden Stränge bilden, eine thermostabile DNA-Polymerase mit 5'-3'-Polymerisationsaktivität, z.B. die Taq-Polymerase, freie Nucleotide als Grundbausteine für die DNA-Synthese und einen magnesiumhaltigen Reaktionspuffer, der die Aktivität der Taq-Polymerase bestimmt. Die Reaktion findet in der Regel bei drei sich zyklisch wiederholenden Temperaturstufen statt. Bei 94°C denaturiert die DNA im Reaktionsansatz und präsentiert Zielsequenzen für die Hybridisierung der Primer. Wenn die komplementäre Sequenz eines Primers in der zu analysierenden DNA vorkommt, folgt im nächsten Schritt dessen Anlagerung (*annealing*). Hierfür muß die Reaktion auf die Primer-spezifische *annealing*-Temperatur abgekühlt werden, die u.a. von der Länge und vom G/C-Gehalt des Oligonucleotids abhängt. Der dabei entstehende kurze Abschnitt doppelsträngiger DNA wird anschließend von der Polymerase als Startpunkt benötigt, um bei 72°C, dem Aktivitätsoptimum des Enzyms, das 3'-Ende des Primers zum komplementären Strang zu verlängern. Das Syntheseprodukt des einen Primers dient nach erneuter Denaturierung dem anderen Primer als Matrix, so daß sich das Ausgangsprodukt mit jedem Zyklus verdoppelt. Abweichend hiervon kann die PCR mit einer höheren *annealing*-Temperatur begonnen werden, die dann schrittweise auf den optimalen Wert gesenkt wird (*touchdown* PCR [Don *et al.*, 1991]), wodurch die Bildung unspezifischer Produkte unterdrückt wird. Da es sich bei der PCR um eine äußerst empfindliche Methode handelt, bei der bereits ein einzelnes kontaminierendes DNA-Molekül zu einem falsch positiven Ergebnis führen kann, wurde ein separater Pipettensatz ausschließlich für die PCR genutzt.

Für einen Reaktionsansatz wurden auf Eis 1,5 µl 10xPCR Puffer, 1,5 µl 10xNucleotidlösung, 0,5 U Taq-Polymerase und 15 pmol je Primer in einem Reaktionsgefäß auf 14,2 µl mit ddH₂O aufgefüllt, mit 0,8 µl der zu analysierenden DNA versetzt und durchgemischt. Eine Kontrollreaktion wurde ohne DNA durchgeführt (positiv bei Kontamination), eine weitere mit 0,8 µl DNA der HepG2-Zelllinie (negativ bei ungeeigneten Reaktionsbedingungen). Damit das Wasser während der Reaktion nicht an der Gefäßwand kondensierte, wurde der Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die DNA-Amplifizierung im Thermocycler begann jeweils mit 3 min bei 94°C, um die hochmolekulare DNA vollständig zu denaturieren, und endete nach 30 bis 40 Zyklen mit einem letzten DNA-Syntheseschritt von 7 min bei 72°C und dem Abkühlen auf 4°C. Die Zyklen setzten sich aus einem Denaturierungsschritt (30 s bei 94°C), der Anlagerung der Primer (30 s bei den in Tabelle 4 angegebenen *annealing*-Temperaturen) und einem Syntheseschritt (Start mit 30 s bei 72°C, wurde mit jedem Zyklus um 2 s

verlängert) zusammen. In der Regel wurden 30 Zyklen durchgeführt. Bei der *touchdown* PCR wurden zweimal 5 Zyklen bei höheren Temperaturen vorangestellt. Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde ein Teil des mit Auftragspuffer versetzten Ansatzes über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (s. Abschnitt II 13).

17 DNA-Sequenzierung (Didesoxy-Verfahren)

Wie die PCR beruht auch die Sequenzierung unbekannter DNA-Abschnitte mit Hilfe des Didesoxy-Verfahrens [Sanger *et al.*, 1977] auf einer Primer-abhängigen DNA-Polymerasereaktion; allerdings werden die komplementären Stränge unabhängig voneinander in verschiedenen Ansätzen amplifiziert und sie werden unvollständig synthetisiert, da zusätzlich eingesetzte 2',3'-Didesoxyribonucleotide (ddNTPs), denen die 3'-OH-Gruppe zur Ausbildung einer weiteren Phosphodiesterbindung fehlt, einen Kettenabbruch verursachen. Die Produktkonzentration nimmt somit während der Durchführung mehrerer Zyklen linear zu. Für die Bestimmung der Sequenz eines Einzelstrangs werden vier Reaktionsansätze benötigt, die neben der zu sequenzierenden DNA den Primer, die DNA-Polymerase und ein Nucleotidgemisch enthalten, das aus allen vier dNTPs und jeweils einem zusätzlichen ddNTP besteht. Ausgehend vom gleichen Primer entstehen so bei der Sequenzierungsreaktion durch zufälligen Einbau der die Synthese abbrechenden ddNTPs unterschiedlich lange, einzelsträngige DNA-Fragmente, die in jeder der vier Teilreaktionen mit einer anderen Base enden. Um die Fragmente später nachweisen zu können, werden dazu radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Nucleotide bzw. Primer verwendet. Anschließend werden die Reaktionsprodukte der vier Ansätze in nebeneinanderliegenden Spuren eines denaturierenden Polyacrylamidgels der Größe nach aufgetrennt. Dabei kommt in der Regel jede Größe einmal in einer der vier Spuren vor, wodurch die Base an der entsprechenden Position festgelegt wird. Die Auswertung des Bandenmusters erfolgt nach Autoradiographie manuell oder automatisch per Computer.

17.1 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* durchgeführt, das als Enzym die Thermo Sequenase verwendet, eine modifizierte Taq-Polymerase, welche die Vorteile der T7-DNA-Polymerase – nahezu gleich guter Einbau von dNTPs und modifizierten Nucleotiden, wie ddNTPs und fluoreszenzmarkierten dNTPs – mit der Hitzestabilität der Taq-Polymerase verbindet. 7-Desaza-dGTP wird dabei als Nucleotidanalogon an Stelle von dGTP eingesetzt und verhindert durch die fehlende Azagruppe die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die in G/C-reichen Regionen zur Bildung von Sekundärstrukturen führen und eine Kompression im Sequenzgel verursachen können. Genomische DNA des Menschen wurde als Insert des Klonierungsvektors pGEM-11Zf sequenziert, cDNA-Sequenzen als Insert des

Bluescript SK- Phagemids. Als Primer wurden M13 (-20) und M13 reverse, mit den Fluoreszenzfarbstoffen IRD-700 oder IRD-800 markiert, eingesetzt, deren Sequenzen die Klonierungsstellen (*multiple cloning sites*) der meisten Vektoren einrahmen.

Nach Konzentrationsbestimmung der Plasmidpräparation und nach Bestimmung der Insertgröße durch Restriktionsanalyse wurden 200 ng/kb Plasmid-DNA, 4 pmol eines Sequenzprimers und 1 µl DMSO zur Unterstützung der Denaturierung G/C-reicher Regionen, auf 21 µl mit ddH₂O aufgefüllt. In getrennten Ansätzen wurden jeweils 2 µl einer der vier 4xNucleotidreagenzien, bestehend aus der Polymerase, den vier dNTPs und je einem ddNTP im magnesiumhaltigen Reaktionspuffer, mit 5 µl des DNA/Primer-Gemisches versetzt, durchgemischt und für die Sequenzierungsreaktion mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Nach 5 min Denaturierung bei 95°C wurde die Reaktion in 28 Zyklen mit jeweils 15 sec 95°C, 15 sec 56°C und 15 sec 70°C durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 7 µl EDTA-haltiger Stop-/Auftragslösung angehalten; das enthaltene Formamid sollte die vollständige Denaturierung der Probe bereits vor dem Auftragen auf das Gel sicherstellen.

17.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der aus der Kettenabbruchreaktion hervorgegangenen, einzelsträngigen DNA-Fragmente erfolgte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Dabei sorgen die polaren Gruppen des zugesetzten Harnstoffs dafür, daß die Wasserstoffbrückenbindungen bildenden Basen der DNA abgeschirmt werden und nicht für die Ausbildung von Sekundärstrukturen zur Verfügung stehen. Die Elektrophoreseapparatur war Bestandteil des automatischen Sequenzierers. Durch Verwendung eines 41 cm langen, 4%igen Gels wurde die Auftrennung optimiert. Abweichend von dem kleineren und höherprozentigen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel wurde das Sequenzierungsgel (410x200x0,25 mm) aus 4 ml Acrylamid 40%, 8 ml 5xTBE und 20 g Harnstoff, auf 40 ml aufgefüllt mit ddH₂O, 240 µl APS 10% und 16 µl TEMED hergestellt. Um die Homogenität des Gels zu erhöhen, wurde die Lösung beim Gießen durch einen 0,22 µm Filter von ungelösten Partikeln befreit. Nach vollständiger Polymerisation erfolgte ein Vorlauf von 30 min, um die gewünschte Betriebstemperatur einzustellen. Anschließend wurde von jedem der vier nucleotidspezifischen Ansätze einer Sequenz 1 µl auf eine Spur aufgetragen, und die Elektrophorese wurde mit TBE als Puffer bei 1500 V (37 mA, 50 W), 50°C und einer Scangeschwindigkeit von 3 gestartet. Die Laufzeit betrug ca. 4 h.

17.3 Detektion und Fehlerkorrektur

Die Auswertung des Bandenmusters erfolgte mit Hilfe des automatischen Sequenzierers, der aus der vertikalen Elektrophoreseapparatur, einem Laser zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs und einem Detektor mit angeschlossenem Computer zur Aufnahme der Daten bestand. Bei diesem Online-Detektionssystem wird die Lichtemission aller Spuren am unteren Ende des Gels während des Laufs kontinuierlich gemessen und als zeitlich aufgelöstes Bandenmuster an den Computer weitergegeben.

Mit Hilfe der ImageBase Software konnte die daraus resultierende Sequenz anschließend als Autoradiogramm oder Amplitudendiagramm dargestellt und bearbeitet werden.

18 Computergestützte Sequenzanalysen

Die Analyse der neugewonnenen Sequenzen wurde per Computer über das *world wide web* (WWW) durchgeführt, das die Nutzung der erforderlichen Sequenzdaten-Analyseprogramme, die an diversen Forschungsinstituten weltweit und unentgeltlich bereitgestellt werden, ermöglichte. Folgende Internet-Adressen, sogenannte URLs (*uniform resource locators*), kamen hierbei zum Einsatz:

<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html> (Multalin) [Corpet, 1988] lagert mehrere homologe Sequenzen optimal übereinander und ermittelt eine Konsensussequenz bzw. Abweichungen von dieser, die durch Polymorphismen, Mutationen oder auch Sequenzierungsfehler verursacht werden können (*alignment*);

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi> (BLAST) [Übersicht in Altschul *et al.*, 1997] vergleicht eine DNA- oder Protein-Sequenz mit allen in Datenbanken gespeicherten Sequenzen und bestimmt den Grad der Übereinstimmung;

<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher/> beinhaltet diverse Programme zur Bearbeitung und Charakterisierung einer DNA-Sequenz, z.B. zur Erstellung der umgekehrten komplementären DNA-Sequenz und zur Bestimmung des Polyadenylierungssignals;

<http://www.expasy.ch/tools/dna.html> übersetzt eine Nucleotidsequenz in Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung aller Leserahmen;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (*Conserved Domain Search* [Übersicht in Altschul *et al.*, 1997]) erkennt bekannte Proteinmotive und -domänen in einer Aminosäuresequenz;

<http://c3.biomath.mssm.edu/trf.html> (*Tandem Repeats Finder* [Benson, 1999]) untersucht eine Sequenz auf sich wiederholende Abschnitte;

<http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html> dient der Übermittlung von DNA-Sequenzdaten an die EMBL-Datenbank.

19 Herstellung einer feingerasterten (*gridded*) cDNA-Bibliothek

Eine DNA-Bibliothek besteht aus einer Vielzahl an Klonen, die eine bestimmte DNA-Population (z.B. die gesamte genomische DNA, einzelne Chromosomen oder die cDNA eines Gewebes bzw. eines Zelltyps), möglichst vollständig repräsentieren. Die Komplexität beschreibt dabei die Anzahl der unabhängig voneinander entstandenen DNA-Klone; auf eine cDNA-Bibliothek bezogen, die Anzahl der in cDNA umgeschriebenen RNA-Moleküle. Für das Auffinden selten vorkommender Sequenzen ist

somit eine hohe Komplexität erforderlich – und die Analyse entsprechend vieler Klone. Hilfe bieten hierbei feingerasterte DNA-Bibliotheken. Bei der Herstellung (Abb. 10) werden die Klone auf Agarplatten ausgebreitet und dann einzeln in Mikrotiterplatten übertragen (*picking*), so daß jeder Klon durch seine Koordinaten eindeutig festgelegt ist. Eine identische Kopie der Mikrotiterplatten (*replicating*) dient der Aufbewahrung der Bibliothek und ermöglicht später den gezielten Zugriff auf einzelne Klone. Es folgt die systematische und reproduzierbare Anordnung der Klone in hoher Dichte auf Membranen (*spotting*) sowie die Freisetzung und Fixierung der denaturierten DNA auf den Filtern (*processing*). Identische DNA-Filter können dann zur Hybridisierung an verschiedene Arbeitsgruppen weitergegeben werden. Die in unterschiedlichen Experimenten gewonnenen Informationen werden anschließend in einer zentralen und allgemein zugänglichen Datenbank gespeichert.

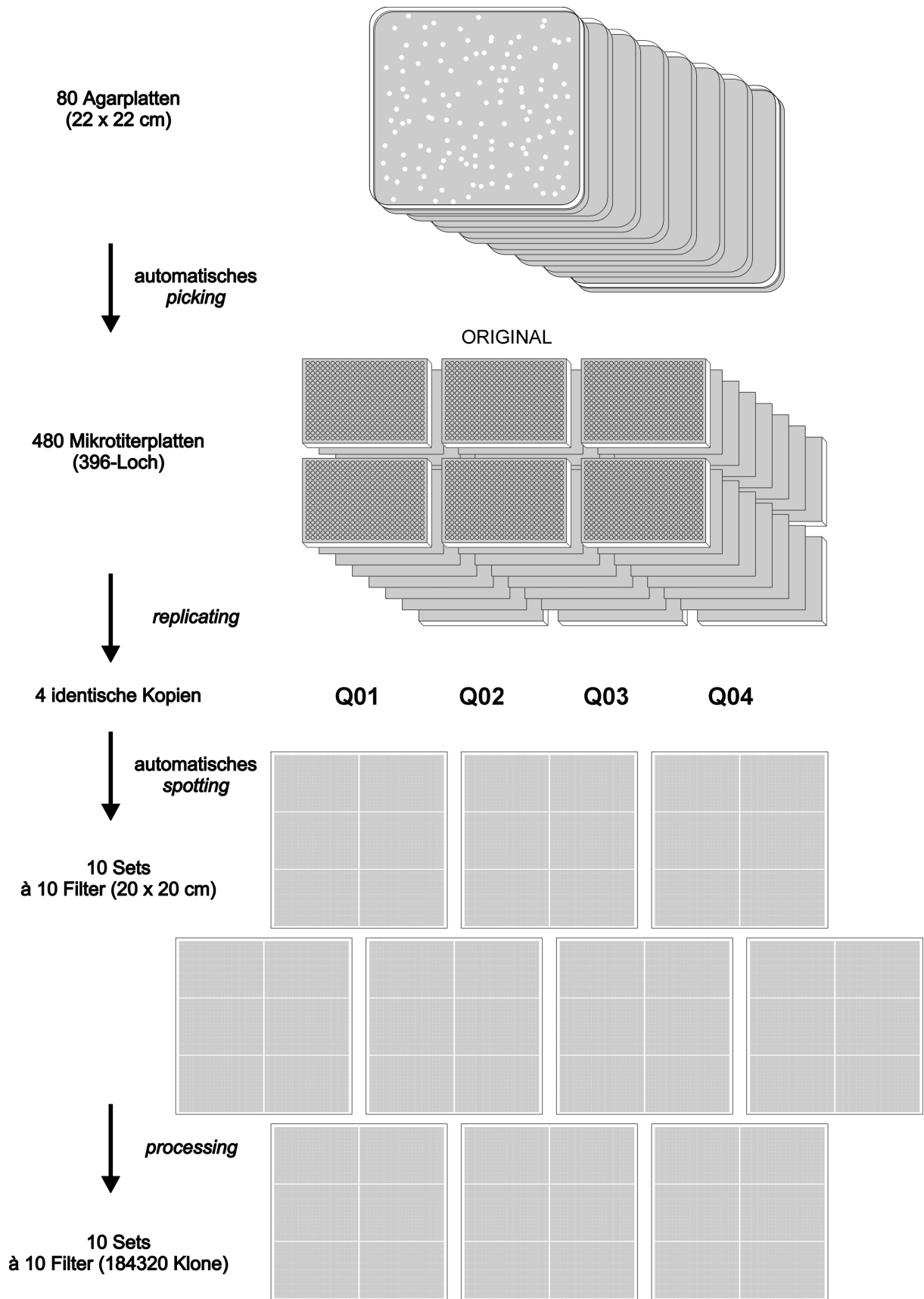
Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte feingerasterte cDNA-Bibliothek KER besteht aus zehn Filtern mit insgesamt 184320 doppelt aufgetragenen Klonen. Je fünf Filter stammen von den Unterpopulationen KER1/2 und KER3/4 (s. Abschnitt II 7), die sich in der Größe ihrer cDNA-Inserts unterscheiden und getrennt voneinander bearbeitet wurden. Da die Arbeitsschritte in beiden Fällen identisch waren, wird im folgenden auf eine Unterscheidung verzichtet. Alle Arbeiten wurden am Ressourcenzentrum in Berlin nach der Anleitung von Nizetic & Lehrach (1995) durchgeführt. Um unvermeidliche Kontaminationen zu minimieren, mußte stets unter sterilen bzw. möglichst keimarmen Bedingungen gearbeitet werden. Sowohl die Geräte als auch die benötigten Materialien für die Herstellung der insgesamt zehn Filtersets, die ausschließlich in diesem Kapitel aufgeführt sind, wurden vom Ressourcenzentrum unentgeltlich zur Verfügung gestellt.

19.1 Aufziehen der Klone

Zum Ausbreiten einzelner Klone auf Agarplatten wurde aus der in Lösung vorliegenden cDNA-Bibliothek (s. Abschnitt II 7) eine Verdünnung von ca. 60000 Klonen in 20 ml 2xYT (*yeast tryptone*)-Medium hergestellt. Da die optimale Koloniedichte für das Entnehmen der Klone etwa 3000 cfu/Platte betrug, wurde jeweils 1 ml der Lösung auf ampicillinhaltige 2xYT-Agarplatten (22x22 cm; Nunc) pipettiert und durch horizontales Schütteln mit sterilen Glasperlen verteilt. Die 20 Platten wurden ca. 6 h bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien auf einen Durchmesser von 1-2 mm angewachsen waren. Um ein Ineinanderwachsen der Kolonien zu verhindern, wurden die Agarplatten bis zu ihrer Weiterverarbeitung in Folie (Saran-Film; Dow) verpackt, bei 4°C gelagert. Nachdem alle Kolonien abgeerntet waren, wurde der Arbeitsgang wiederholt, bis eine Gesamtzahl von ungefähr 200000 Klonen erreicht war.

2xYT-Medium/-Agar: 16 g Trypton (Difco), 10 g Hefeextrakt (Difco), 5 g NaCl (Merck), für Agarplatten zusätzlich 15 g Agar (Difco), ad 1000 ml dH₂O (pH 7,0 einstellen und autoklavieren)
1000xAmpicillin: 50 mg/ml Ampicillin-Na (Sigma) in Ethanol 50% (sterilfiltrieren)

Abbildung 10: Herstellung der feingerasterten cDNA-Bibliothek. Die für die Herstellung der feingerasterten cDNA-Bibliothek erforderlichen Arbeitsschritte sind dargestellt. Q1, Q2, Q3 und Q4 repräsentieren die vier identischen Kopien, die aus dem ursprünglichen Mikrotiterplatten-Set hergestellt wurden, und bestehen ebenfalls aus je 480 Mikrotiterplatten. Ein einzelner Filter enthält 18432 verschiedene Klone, die jeweils doppelt aufgetragen sind.



19.2 Automatisches Auflesen der Klone (*picking*)

Das Überführen 184320 einzelner Klone (je die Hälfte aus KER1/2 und KER3/4) in 480 Mikrotiterplatten wurde mit dem Q Bot (Genetix) durchgeführt, einem multifunktionellen Roboter, der bis zu 3500 Klone/h umsetzen konnte. In einer mit Glastüren verschließbaren Kammer befanden sich dabei die Halterungen für die Agarplatten und die mit Medium vorgefüllten Mikrotiterplatten, eine CCD (*charge coupled devices*)-Kamera zum Lokalisieren der Klone sowie ein in drei Achsen beweglicher Arm, an dem der mit 96 ausfahrbaren Spitzen versehene *picking*-Arbeitskopf (*96 pin picking head*) befestigt war. Um diesen zu reinigen und anschließend zu trocknen, wurden nach jedem Eintauchen der 96 Spitzen in die Mikrotiterplatten ein Ethanolbad und ein Fön angesteuert. Eine UV-Lampe, die außerhalb der Betriebszeit eingeschaltet war, diente der Keimreduzierung in der Kammer. Gesteuert wurde der Roboter über die Q Soft-Software (Genetix).

Vor jeder Inbetriebnahme wurden das Ethanolbad und der Arbeitskopf mit H₂O₂ 0,3% (frisch hergestellt) desinfiziert, mit ddH₂O abgespült und in der Kammer 20 min mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurden die 384-Loch Mikrotiterplatten (384 Well Q Plates; Genetix), die vorher beschriftet und mit Medium befüllt worden waren (s. Abschnitt II 19.3), und die Agarplatten mit den Bakterienkulturen in die entsprechenden Halterungen gelegt und das Bad mit Ethanol 80% gefüllt. Bei optimalem Lauf mußten sowohl die Agarplatten als auch die Mikrotiterplatten etwa alle zwei Stunden ausgetauscht werden. Über das Bild der Kamera konnte die Treffergenauigkeit der Spitzen und die Form der ausgewählten Kolonien überprüft und gegebenenfalls neu eingestellt werden. Am Ende des Laufs wurde zur Überprüfung der Sterilität der Arbeitskopf in eine mit 2xYT-Medium (ohne Antibiotikum) gefüllte Mikrotiterplatte getaucht und etwas Ethanol aus dem Bad auf einer kleinen 2xYT-Agarplatte ausgestrichen. In beiden Fällen durfte nach Inkubation über Nacht bei 37°C keine Kolonie wachsen. Schließlich wurden das Ethanolbad und der Arbeitskopf erst mit dH₂O und dann mit Ethanol gründlich gereinigt. Die angeimpften Mikrotiterplatten wurden in Folie verpackt und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert, bis eine deutliche Trübung zu erkennen war.

19.3 Vervielfältigung der cDNA-Bibliothek (*replicating*)

Die 480 Mikrotiterplatten des Originals (ORI) wurden möglichst schnell in eine Originalkopie (Q01) überführt, bündelweise in Folie eingeschweißt und bei -80°C eingefroren, um als äußerste Reserve zur Verfügung zu stehen. Insgesamt wurden vier Kopien angefertigt: Q01 als Ausgangspunkt für alle weiteren Kopien, Q02 für die Entnahme einzelner Klone am Ressourcenzentrum, Q03 für die Herstellung der Filter und Q04, in der Regel ebenfalls für die Filterherstellung genutzt, zum Verwalten der cDNA-Bibliothek am Institut für Immungenetik (s. Abschnitt II 19.6). Für die Vervielfältigung wurde ein steriler Replikator mit 384 Spitzen (384 Pin Q Rep; Genetix) in der zu kopierenden Mikrotiterplatte kreisförmig bewegt und nacheinander in bis zu drei mit 2xYT-Medium gefüllte Platten eingetaucht. Die Kopien wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, und anschließend wurde das Wachstum

mittig aufgelegt und mit einer Pipette leicht angedrückt, um Luftblasen und überflüssiges Medium zu entfernen. Nach der Überführung der Platten in die dafür vorgesehenen Haltevorrichtungen des Roboters wurde die Kammer geschlossen und 20 min mit UV-Licht bestrahlt. Reinigung und Bestrahlung des Ethanolbads und der Arbeitsköpfe – und nach Abschluß eines Laufs die Sterilitätsprüfung – wurden wie beim *picking*-Roboter durchgeführt. Dann wurde das Magazin mit den die Klone enthaltenden Mikrotiterplatten bestückt und in die Kammer eingesetzt. Der *puncturing*-Arbeitskopf wurde befestigt, der die ID-Nummer als binären Code oben links in die Filter stanzte. Anschließend wurde er gegen den *spotting*-Arbeitskopf ausgetauscht, der die Klone im gewünschten Raster auf den Membranen anordnete. Nach Beendigung des Laufs wurden die angeimpften Filter mit sterilen Pinzetten luftblasenfrei auf ampicillinhaltige 2xYT-Agarplatten transferiert und ca. 16 h bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ungefähr 1 mm erreicht hatten. In Folie verpackt konnten die Filter auf den Agarplatten maximal eine Woche bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt werden.

19.5 Verarbeiten der Filter (*processing*)

Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Filter auf ungleichmäßiges oder ungewöhnliches Wachstum der Bakterienkolonien und Kontaminationen mit Pilzen überprüft; alle Auffälligkeiten wurden notiert. Das weitere Vorgehen kombiniert die DNA-Isolierung aus Bakterien mit der DNA-Fixierung auf Membranen beim Blotting.

Die 100 Filter wurden einzeln nacheinander und möglichst ohne Luftblasen vorsichtig auf zwei mit Denaturierungslösung getränkte Blotting-Papiere gelegt, auf das erste 4 min bei RT und auf das zweite 4 min im Dampf eines Wasserbads bei 95°C, wodurch die Bakterienzellen lysierten und die DNA denaturierte. Dann folgten 4 min bei RT auf einem mit Neutralisierungslösung getränkten Papier und schließlich 30-40 min bei 37°C in 600 ml vorgewärmter Pronase-Pufferlösung mit 250 µg/ml Pronase, einem Gemisch verschiedener Proteasen. Die Blotting-Papiere wurden dabei nach jedem Filter gewechselt, während die Pronase-Lösung nach fünf Filtern erneuert werden mußte. Danach wurden die Filter zwei Tage auf Blotting-Papier, zum Schutz abgedeckt mit einer 22x22 cm Plastikschiene, bei RT getrocknet. Durch Bestrahlung mit UV-Licht für 20 s (UV-Stratalinker 2400; Stratagene) wurde die DNA auf den Membranen fixiert. Die Filter konnten anschließend direkt für die Hybridisierung verwendet werden.

Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH (Merck), 1,5 M NaCl (Merck) in dH ₂ O
Neutralisierungslösung:	1 M TRIS (Sigma), 1 M TRIS•HCl (Sigma), 1,5 M NaCl in dH ₂ O (pH 7,4 einstellen)
Pronase-Pufferlösung:	50 mM EDTA (Titriplex), 100 mM NaCl, 50 mM TRIS, 50 mM TRIS•HCl, 1% N-lauroylsarcosin-Na (BDH) in ddH ₂ O
Pronase-Stammlösung:	50 mg/ml Pronase (Boehringer) in ddH ₂ O (frisch herstellen)

19.6 Verwalten der cDNA-Bibliothek

Die zehn Filtersets wurden für die Arbeitsgruppen des Biomed-Projekts angefertigt. Eine Kopie der cDNA-Bibliothek (Q04) wurde daher, im Gegensatz zur üblichen Praxis, im Institut für Immungenetik

aufbewahrt und für das Aufziehen der benötigten Klone genutzt. Zur besseren Handhabung wurden die Mikrotiterplatten einzeln in Frischhaltefolie verpackt, bei -80°C gelagert. Um einen Klon zu entnehmen, wurde die entsprechende Platte gemäß den Koordinaten herausgesucht, und noch in gefrorenem Zustand wurde ein Teil der Kultur mit einem ausgeglühten Spatel abgekratzt. Dabei wurde die restliche Mikrotiterplatte zum Schutz vor Kontaminationen mit einem autoklavierten Filterpapier abgedeckt – ein ausgestanztes Loch ermöglichte die Entnahme des Klons. Nach dem Animpfen einzelner mit LB-Agar gefüllter, autoklavierter Schraubdeckelgefäße bzw. bei größeren Anfragen steriler Mikrotiterplatten wurden die Klone zusammen mit den in der Datenbank gespeicherten Informationen verschickt.