

## 3 Methoden

### 3.1 Stammhaltung

#### 3.1.1 Zellkultur

Die Zell-Linien Jurkat und NKL werden in Suspension kultiviert. Jurkat wird in RPMI1640-Medium mit Glutamax-1 (Invitrogen, enthält L-Alanyl-L-Glutamin als ein stabilisiertes Dipeptid von Glutamin), 5% FCS, 100  $\mu$ M Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, NKL in RPMI1640 mit Glutamax-1, 10% Humanserum, 100  $\mu$ M Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml humanes, rekombinantes IL2 inkubiert. Die Inkubation erfolgt in Kulturflaschen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% relativer Luftfeuchte in einem Inkubator (BBD 6220, Heraeus Instruments). Die Kultur wird angesetzt mit einer Zelldichte von ca. 2.5 - 5x 10<sup>5</sup>/ml und nach einer Verdopplungszeit von etwa 48 h bei einer ungefähren Zelldichte von 1x 10<sup>6</sup>/ml bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird dann in frischem Medium aufgenommen und resuspendiert.

#### 3.1.2 Kryokonservierung von Zell-Linien

Die Zellen werden aus der logarithmischen Phase durch Zentrifugation pelletiert und mit einer Zellzahl von 1 - 2x 10<sup>7</sup> in 2 ml Kryomedium (entsprechendes RPMI1640-Medium unter Zusatz von 10% DMSO) resuspendiert. Diese Suspension wird sofort auf Trockeneis mit ca. 1°C/min eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Langzeitlagerung wird die Zellsuspension in Flüssig-Stickstoff eingefroren.

#### 3.1.3 Kultur und Kryokonservierung der Bibliotheken

Bibliotheken werden im Allgemeinen als Suspensionen in 384-well Microtiterplatten, befüllt mit 2YT-Medium, Ampicillin (100  $\mu$ g/ml), Kanamycin (15  $\mu$ g/ml), Glucose (2%) und Glycerin (10%) oder HMFM (*freezing mix*, 10%) kultiviert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C. Anschließend können die Bibliotheken für einen längeren Zeitraum bei -80°C eingefroren werden. Glucose wird dem Medium zugesetzt, um eine möglichst vollständige Repression des T5-Promoters des Vektors pQE30NST zu erreichen. HMFM und Glycerin ermöglichen aufgrund der

---

Verminderung der Eiskristallbildung ein mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Kulturen, wobei Glycerin den Originalen der Bibliotheken und HMFM allen Kopien zugegeben wird.

### **3.1.4 Kryokonservierung von Bakterienstämmen**

Zur Konservierung verschiedener Stämme werden diese ÜN in 3 - 5 ml 2YT-Medium unter selektiven Bedingungen angezogen. Die Zellen werden dann durch Zentrifugieren pelletiert und in 2 ml Antibiotika-freiem Medium mit 15% Glycerin resuspendiert. Die Lagerung der Stämme erfolgt bei -20 oder -70°C.

## 3.2 Konstruktion einer Bibliothek

### 3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

#### 3.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA mit TRIzol® Reagent

Das TRIzol® Reagent -eine monophasische Lösung von Phenol und Guanidinisothiocyanat- ist eine Weiterentwicklung der *single step* RNA-Isolationsmethode von Chomczynski und Sacci (Chomczynski, P. *et al.*, 1987). Während der Homogenisation bzw. Lyse erhält TRIzol® die Integrität der RNA. Die Zellen werden lysiert und Zellbestandteile aufgelöst. Durch die Zugabe von Chloroform und die folgende Zentrifugation wird die Lösung in 3 Phasen separiert: eine wäßrige, die RNA enthaltende, eine Interphase und eine organische (Phenol/Chloroform) Phase. Die RNA wird aus der wäßrigen Phase durch Zugabe von Isopropanol und erneute Zentrifugation isoliert. Bei Bedarf kann durch Präzipitation mit Ethanol die DNA aus der Interphase isoliert oder durch die Zugabe von Isopropylalkohol das Protein aus der organischen Phase präzipitiert werden (Chomczynski, P., 1993).

##### Homogenisation:

Die in einer Suspension gewachsenen Zellen werden durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wird in TRIzol® (1 ml TRIzol® je 5 - 10x 10<sup>6</sup> Zellen) durch repetitives Pipettieren lysiert.

##### Phasen-Separation:

Das homogenisierte Pellet wird für 5 min bei 15 - 30°C inkubiert (komplette Dissoziation der Nucleoproteinkomplexe). Per 1 ml eingesetztem TRIzol® werden 0.2 ml Chloroform zugegeben. Die Suspension wird etwa 15 sec kräftig geschüttelt und für 2 - 3 min bei 15 - 30°C inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 15 min bei 12.000xg bei 2 - 8°C zur Phasenseparation. Dabei entstehen eine untere, rote Phenol/Chloroform-Phase, eine Interphase sowie eine obere, farblose wäßrige Phase).

##### RNA-Präzipitation:

Die wäßrige Phase, die die RNA enthält, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wird Isopropanol (0.5 ml / 1 ml TRIzol® eingesetztes Anfangsvolumen) zugegeben, gemischt und für 10 min bei 15 - 30°C inkubiert. Anschließend wird die Lösung für 10 min bei nicht mehr als 12.000xg bei 2 - 8°C zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat wird als gelähnliches Pellet sichtbar.

##### RNA Wasch-Schritt:

Der Überstand nach der Zentrifugation wird verworfen. Das Pellet wird mit 1 ml 75%-igem Ethanol je anfangs eingesetztem TRIzol® gewaschen und anschließend für 5 min bei 7.500xg bei 2 - 8°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

Lösen der RNA:

Das RNA-Pellet wird kurz an der Luft getrocknet (kein vollständiges Trocknen) und in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zum Lösen des Pellets folgt eine Inkubation für 10 min bei 55 - 65°C.

### 3.2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen)

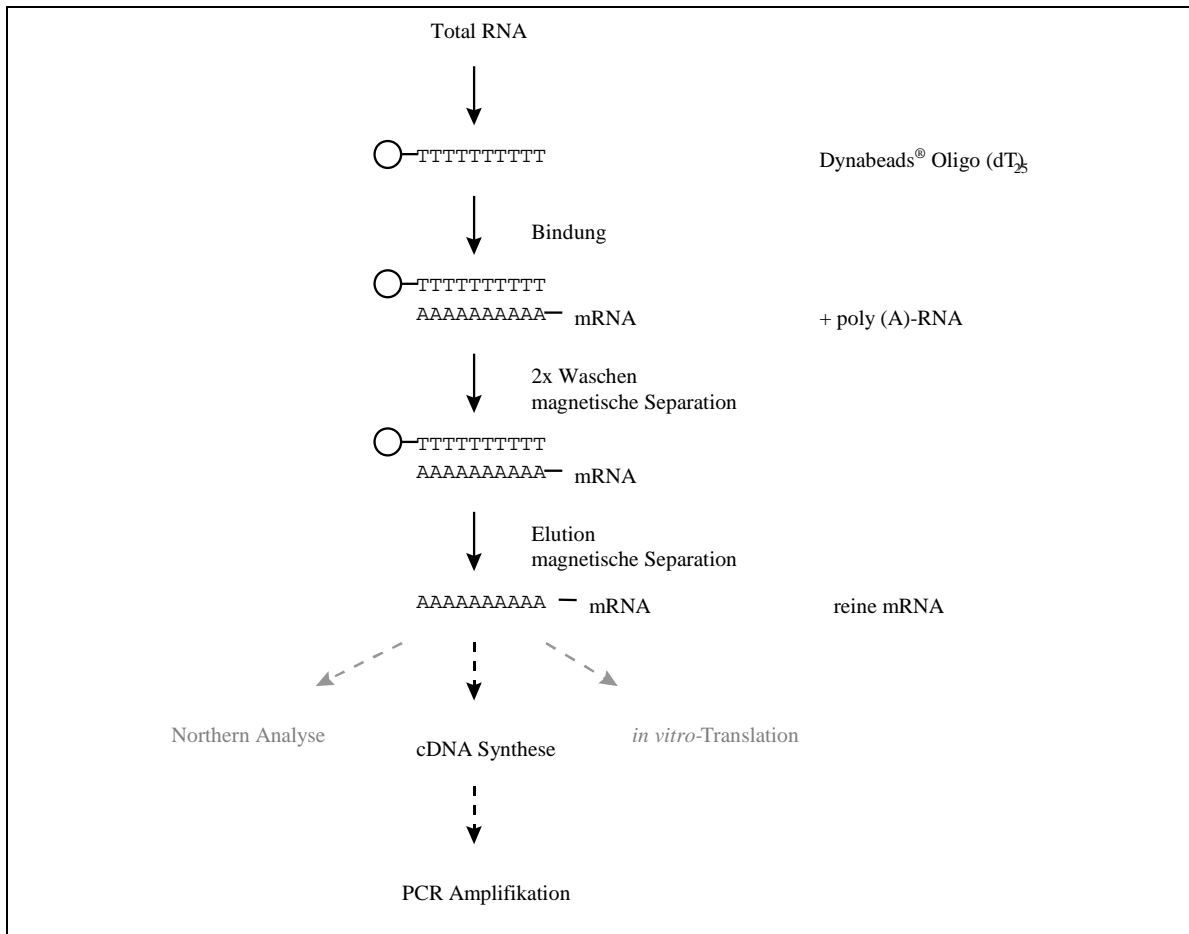
Die Gesamt-RNA wird mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) isoliert. Die Zellen werden aus einer Suspensionskultur durch Zentrifugation von je  $1 \times 10^7$  Zellen für 5 min bei 1.000 rpm isoliert. Das Medium wird verworfen. Die Zellen werden nicht gewaschen, um eine mögliche Degradation der RNA zu vermeiden. Das Pellet wird in 600 µl RLT-Puffer (enthält  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert und lysiert. Das Lysat wird auf eine QIAshredder<sup>™</sup>-Säule (Qiagen) in einem 2 ml Eppendorfgefäß pipettiert und für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zu dem homogenisierten Lysat werden 600 µl 70%-iger Ethanol zugegeben und durch repetitives Pipettieren gemischt. 700 µl dieses Gemisches werden auf die RNeasy Mini Spin Column gegeben und für 15 sec bei mindestens 8.000xg zentrifugiert (besser  $\geq 10.000$  rpm). Zum Waschen werden 700 µl des Puffers RW1 auf die Säule pipettiert, für 15 sec w.s.o. zentrifugiert und die Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt. 500 µl des zweiten Waschpuffers RPE werden auf die Säule pipettiert und zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird wiederholt, diesmal wird jedoch für 2 min zentrifugiert. Um die Säule vollständig von RPE-Puffer-Resten zu trocknen, wird nochmals für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Zur Elution werden 35 µl RNase-freies Wasser auf das Säulenmaterial pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und abschließend für 1 min bei  $\geq 8.000$ xg zentrifugiert. Die Analyse der RNA-Konzentration erfolgt mit dem RNA 6000 LabChip<sup>®</sup> am BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies).

### 3.2.2 Isolierung von mRNA

#### 3.2.2.1 Isolierung von mRNA mit dem Dynabeads<sup>®</sup> mRNA Purification Kit (Dyna)

Die Aufreinigung polyadenylierter mRNA beruht auf der Basenpaarung zwischen dem Poly(A)-Tail am 3`-Ende der mRNA und der oligo(dT)-Strecke, die kovalent an die Oberfläche der magnetischen Dynabeads<sup>®</sup> Oligo(dT)<sub>25</sub> gekoppelt sind. Die an die Dynabeads<sup>®</sup> gebundene mRNA wird mit Hilfe des magnetischen Partikel-Konzentrators, DYNAL MPC<sup>®</sup>-E-1, gewaschen und mit einem salzlosen Puffer (Destabilisierung des dT:rA Hybrids) eluiert.

Das Volumen der RNA-Lösung (75 µg) wird auf 100 µl mit RNase-freiem A. bidest. (DEPC-Wasser) eingestellt. 1 Volumen 2x Binding Buffer wird zugegeben und für 2 min bei 65°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA zu denaturieren. 200 µl (1 mg) der resuspendierten Dynabeads<sup>®</sup> Oligo(dT)<sub>25</sub> werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß im magnetischen Partikel-Konzentrator überführt. Nach 30 sec wird der Überstand abpipettiert und verworfen und die Beads mit 100 µl 2x Binding Buffer gewaschen. Das Eppendorfgefäß wird aus dem Konzentrator entnommen. 100 µl 2x Binding Buffer und die RNA-Lösung werden zu den Dynabeads<sup>®</sup> pipettiert. Zur Hybridisierung wird dieser Mix für 3 - 5 min bei RT inkubiert, anschließend für 30 sec in den Konzentrator gestellt. Der Überstand wird abpipettiert. Anschließend wird das Pellet mit 200 µl Washing Buffer gewaschen und im Elution Buffer resuspendiert, für 2 min bei 65°C gelöst und sofort wieder in den Konzentrator gestellt. Die Dynabeads<sup>®</sup> Oligo (dT)<sub>25</sub> bleiben am Magneten gebunden, die mRNA bleibt in Lösung. Die eluierte mRNA-Lösung wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann bei -80°C aufbewahrt werden. Die mRNA-Konzentration wird mittels UV-Spektrometer bei 260 nm bestimmt.



**Abb. 3-1 mRNA Aufreinigung mit Dynabeads®**

Schematische Darstellung der mRNA Purifikation mit Dynabeads®.

### 3.2.2.2 Isolierung von mRNA mit Oligotex™ (Qiagen)

Das Prinzip dieser Methode beruht ebenfalls auf der Hybridisierung des Poly(A)-Tails an ein dT-Oligomer, welches an eine Matrix gebunden ist (Oligotex™: Polysterene-Latex-Partikel, dC<sub>10</sub>T<sub>30</sub>).

Zu einer Gesamt-RNA-Lösung wird die auf 37°C temperierte Oligotex™-Suspension pipettiert und für 3 min bei 70°C (Denaturierung der Sekundärstruktur der RNA) in einem Thermomixer und anschließend für 10 min bei RT (Hybridisierung der mRNA an Oligotex™) inkubiert. Der mRNA-Oligotex™-Komplex wird durch Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm pelletiert. Der Überstand wird verworfen. Nun wird das Pellet in 400 µl OW2-Puffer resuspendiert und auf eine Säule pipettiert. Es folgt eine Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm. Die Säule wird in ein neues Reaktionsgefäß gestellt, 400 µl OW2-Puffer daraufgegeben und wiederum für 1 min zentrifugiert.

Der Durchfluß wird verworfen und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Durch Zugabe von 20 - 100 µl OEB-Puffer (70°C) wird die mRNA eluiert.

**OW2-Puffer**

10 mM Tris/HCl, pH 7.5

150 mM NaCl

1 mM EDTA

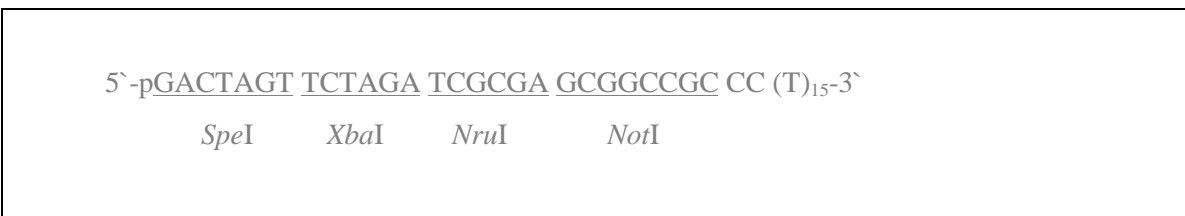
**OEB-Puffer**

5 mM Tris/HCl, pH 7.5

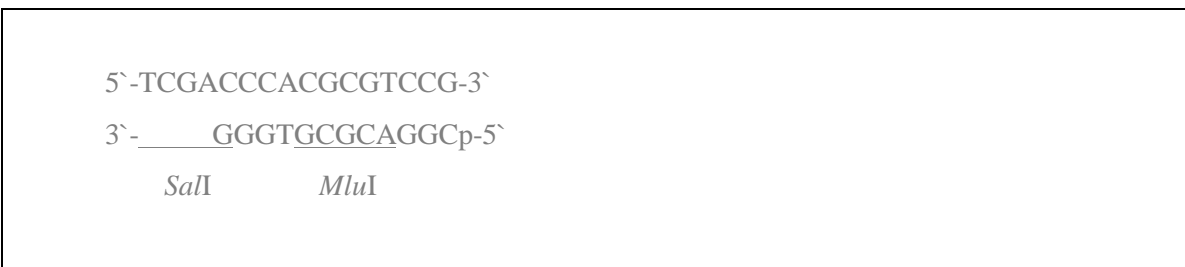
**3.2.3 Reverse Transkription – cDNA-Synthese**

(SuperScript™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning, Invitrogen)

Die reverse Transkription der mRNA in cDNA wird mit Hilfe des SuperScript™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning Kits durchgeführt. Als Enzym für die reverse Transkription dient die Superscript II reverse Transkriptase. Um die cDNA-Fragmente richtungsorientiert (direktional) klonieren zu können, werden *NotI*-Primer-Adapter (gekoppelt an (dT)<sub>15</sub> zur Hybridbildung mit dem Poly(A)-Tail der mRNA) bzw. zur Erhöhung der Effizienz der Ligation *SalI*-Adapter verwendet.



**Abb. 3-2**     Sequenz des *NotI*-Primer-Adapters



**Abb. 3-3**     Sequenz des *SalI*-Adapters

### 3.2.3.1 Erststrang-Synthese

Die Initiation der Erststrang-Synthese (*first strand synthesis*) ist abhängig von der Hybridisierung des Primers (oligo (dT)) an die mRNA (Poly(A)-Tail). Dieses entstehende DNA-RNA-Hybrid dient als Substrat für die Polymerase-Aktivität der reversen Transkriptase (RT), aber auch für die RNase H, die die RNA des Hybrids abbaut, also das Template für die RT zerstört (*second strand synthesis*).

Zu 2 µl *NotI*-Primer-Adapter (0.5 µg/µl) wird 1 µg (9 µl) mRNA pipettiert und für 10 min bei 70°C denaturiert. Anschließend wird der Mix auf Eis abgekühlt, und folgende Komponenten werden zugefügt: 4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl [ $\alpha^{32}$ P]dCTP (1 µCi/µl) sowie nach einer 2-minütigen Inkubation bei 37°C zur Equilibrierung 1 µl SuperScript II RT. Dieser Ansatz wird für 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend auf Eis terminiert. Ein 2 µl Aliquot wird für die Bestimmung der Ausbeute abgenommen und zu 43 µl 20 mM EDTA (pH 7.5) und 5 µl Yeast tRNA pipettiert. Der verbleibende 18 µl Reaktionsansatz wird sofort für die Zweitstrang-Synthese (*second strand synthesis*) verwendet.

10 µl des verdünnten Aliquots werden auf 2 Glasfaser-Filterplättchen (Filter I und II) gespottet. Filter I wird bei RT getrocknet (Bestimmung der spezifischen Aktivität (SA) der dCTP-Reaktion), Filter II wird 3x für je 5 min in frischem, kaltem 10% TCA, 1% Natriumpyrophosphat und anschließend für 2 min bei RT mit 95%-igem Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet (Bestimmung der Ausbeute an Erststrang-cDNA).

Die verbleibenden 30 µl werden durch Zugabe von 15 µl 7.5 M NH<sub>4</sub>OAc und 90 µl absolutem Ethanol (gekühlt auf -20°C) und anschließender Zentrifugation für 20 min bei 14.000xg gefällt. Das Pellet wird dann mit 0.5 ml 70%-igem Ethanol (-20°C) durch Zentrifugation für 2 min, wiederum bei 14.000xg, gewaschen und für 10 min bei 37°C getrocknet.

$$SA \text{ (cpm/pmol dCTP)} = \frac{\text{cpm}/10 \mu\text{l}}{200 \text{ pmol dCTP}/10 \mu\text{l}}$$

**Abb. 3-4 Berechnung der spezifischen Aktivität des [ $\alpha^{32}$ P]dCTP**

$$\text{Menge an cDNA } (\mu\text{g}) = \frac{(\text{cpm}) \times (50 \mu\text{l}/10 \mu\text{l}) \times (20 \mu\text{l}/2 \mu\text{l}) \times (4 \text{ pmol dNTP}/\text{pmol dCTP})}{(\text{cpm}/\text{pmol dCTP}) \times (3.030 \text{ pmol dNTP}/\mu\text{g cDNA})}$$

**Abb. 3-5 Berechnung der Ausbeute an Erststrang-cDNA**



### 3.2.3.2 Zweitstrang-Synthese

Die primäre Sequenz der mRNA wird als Zweitstrang (*second strand*) cDNA aus der Erststrang (*first strand*) cDNA als Template erstellt. Das SuperScript™ Plasmid System nutzt dafür die Nick-Translation. Die Synthese der Zweitstrang-cDNA wird katalysiert durch das Enzym *E. coli* DNA-Polymerase I in Kombination mit *E. coli* RNase H sowie *E. coli* DNA-Ligase.

Zum Ansatz der Erststrang-Synthese werden auf Eis folgende Komponenten zugefügt: 93 µl DEPC-A. bidest., 30 µl 5x Second Strand Buffer, 3 µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl *E. coli* DNA-Ligase (10 Units/µl), 4 µl *E. coli* DNA-Polymerase (10 Units/µl), 1 µl *E. coli* RNase H (2 Units/µl). Der Ansatz wird für 2 h bei 16°C inkubiert. Anschließend werden 2 µl (10 Units) T4 DNA-Polymerase zugegeben und für weitere 5 min bei 16°C inkubiert. Durch die Zugabe von 10 µl 0.5 M EDTA auf Eis wird die Reaktion terminiert.

Danach werden 150 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zum Ansatz pipettiert und für 5 min bei RT bei 14.000xg zentrifugiert. 140 µl der entstehenden oberen Phase werden vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 70 µl 7.5 M NH<sub>4</sub>OAc und 0.5 ml absolutem Ethanol (-20°C) wird der Ansatz gemischt für 20 min bei RT bei 14.000xg zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 0.5 ml 70%-igem Ethanol (-20°C) durch Zentrifugation für 2 min bei RT bei 14.000xg gewaschen und anschließend für 10 min bei 37°C getrocknet.

### 3.2.3.3 *SalI*-Adapter-Addition

Zur cDNA werden 25 µl DEPC-A. bidest., 10 µl 5x T4 DNA-Ligase Buffer, 10 µl *SalI*-Adapter sowie 5 µl T4 DNA-Ligase pipettiert und ÜN bei 16°C inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und Zentrifugation für 5 min bei RT bei 14.000xg wird die cDNA extrahiert. 45 µl der oberen Phase werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 25 µl 7.5 M NH<sub>4</sub>OAc und 150 µl absolutem Ethanol (-20°C) gemischt und für 20 min bei RT bei 14.000xg zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 0.5 ml 70%-igem Ethanol (-20°C) durch Zentrifugation für 2 min bei RT bei 14.000xg gewaschen und anschließend für 10 min bei 37°C getrocknet.

### 3.2.3.4 *NotI*-Restriktionsverdau

41 µl DEPC-A. bidest., 5 µl REACT 3 Buffer, 4 µl *NotI* werden zum cDNA-Pellet pipettiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion der *NotI*-verdauten cDNA werden 50 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben für 5 min bei RT und 14.000xg zentrifugiert. 45 µl der oberen Phase werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 25 µl 7.5 M NH<sub>4</sub>OAc und 150 µl absolutem Ethanol (-20°C) gemischt und für 20 min bei RT und 14.000xg zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 0.5 ml 70%-igem Ethanol (-20°C) durch Zentrifugation für 2 min bei RT bei 14.000xg gewaschen und für 10 min bei 37°C getrocknet.

### 3.2.3.5 Säulen-Chromatographie - *Size Fractionation* -

Dieser Schritt wird durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit des Klonierens größerer Inserts zu erhöhen und die Tendenz zu verringern, Verunreinigungen durch Fragmente einer Größe unter 500 bp zu erhalten. Auch werden nicht eingebaute Adapter, die im Überschuß eingesetzt wurden und die Vektor-Ligation behindern würden, sowie die durch die *NotI*-Restriktion entstehenden Fragmente abgereichert und können so nicht die cDNA Bibliothek verunreinigen.

Die cDNA wird in 100 µl TEN Puffer aufgenommen und auf Eis hydriert. Währenddessen wird das überschüssige Ethanol der Säulen (cDNA Size Fractionation Columns, Invitrogen) komplett eluiert. Das Säulenmaterial wird insgesamt 4x mit je 800 µl TEN gespült, um das restliche Ethanol zu entfernen. Anschließend werden 100 µl der cDNA-Lösung auf die Säule gegeben und mit je 100 µl TEN tropfenweise (in Fraktionen zu je ca. 35 µl) in je ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Das Volumen der einzelnen Tropfen wird gemessen und die Radioaktivität durch Scintillation (Liquid Scintillation Counter, LKB Wallac) bestimmt.

### 3.2.4 Radioaktive Markierung eines Größenstandards

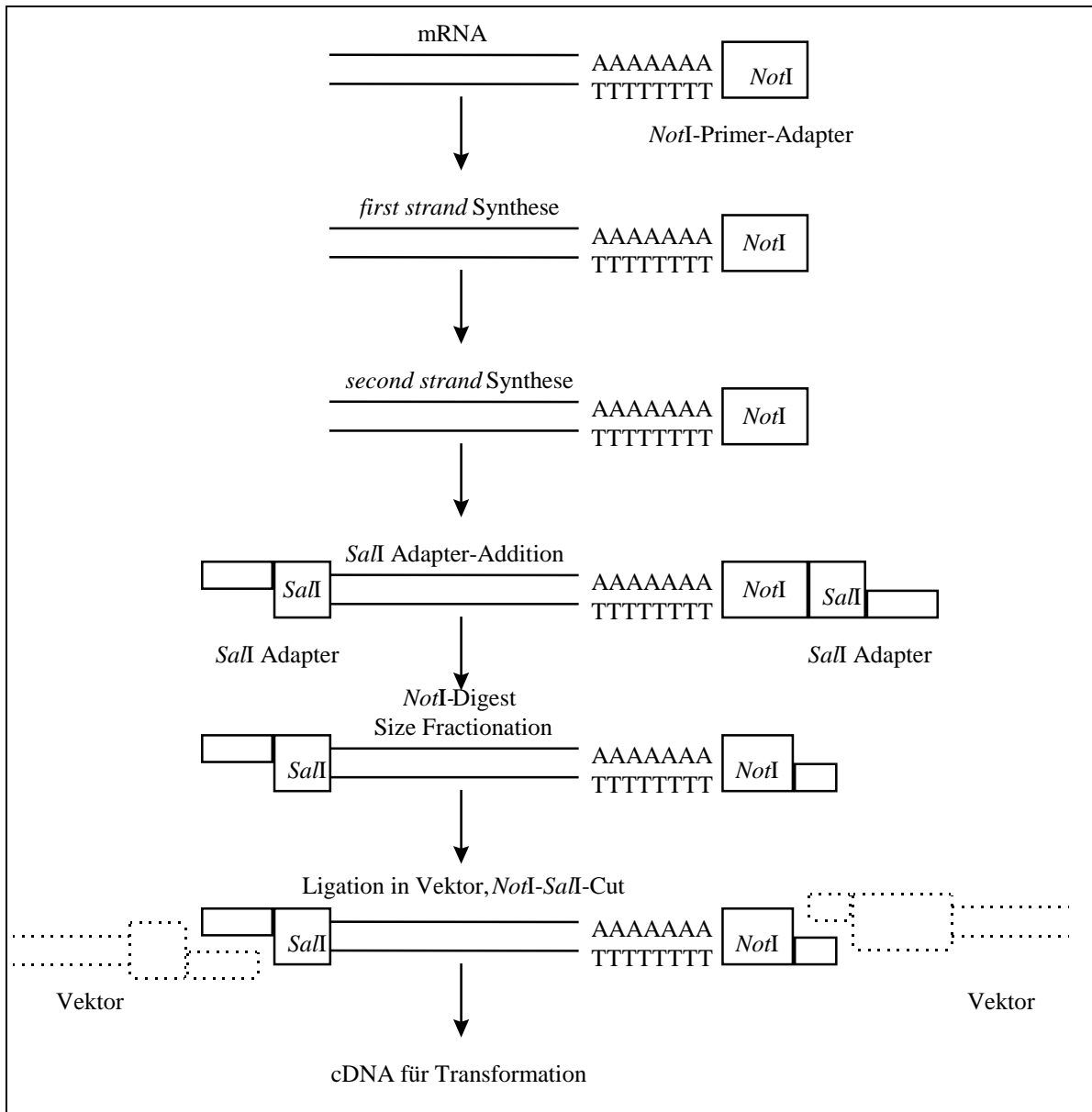
Um einen Größenstandard für eine Gelelektrophorese radioaktiv zu markieren, werden für einen 20 µl Ansatz folgende Reagenzien pipettiert: 1 µl Größenstandard (1 µg/µl), 1 µl dATP, 1 µl dGTP, 1 µl dTTP (je 100 µM), 2 µl *Filling in* Klenow-Puffer (10x), 12.5 µl A. bidest., 1 µl Klenow-Enzym (1 U/µl), sowie 0.5 µl [ $\alpha^{32}$ P]dCTP (= 1 µCi) und anschließend für 1 h bei 37°C inkubiert.

---

### 3.2.5 Alkalische Gel-Analyse der Erststrang-cDNA

Die Erststrang-cDNA kann aufgrund der radioaktiven Markierung in einer alkalischen Gelelektrophorese analysiert werden, um die Fragmentgrößen der synthetisierten cDNAs zu bestimmen.

Die ethanolpräzipitierte Erststrang-cDNA wird in 10 µl 1x alkalischem Sample Buffer (30 mM NaOH, 1 mM EDTA, 10% Glycerin, 0.01% Bromphenolblau) gelöst. Das 1.4%-ige Agarosegel wird in einem nicht denaturierenden Puffer (30 mM NaCl, 2 mM EDTA) gelöst und nach Polymerisation für 2 - 3 h im alkalischen Elektrophorese-Puffer (30 mM NaOH, 2 mM EDTA) equilibriert, bevor die Probe aufgetragen und die Elektrophorese (16 - 18 h bei 15 V) gestartet wird. Anschließend wird das Gel unter Vacuum dehydriert und getrocknet und auf einem PhosphorImager-Screen  $\bar{U}N$  exponiert. Die Auswertung erfolgt am PhosphorImager 445 SI, Version 4.0 (Molecular Dynamics).



**Abb. 3-6 Strategie der cDNA-Synthese**

Übersicht über die einzelnen Schritte der cDNA-Synthese.

### 3.2.6 Plasmid-Konstrukte

Zur Konstruktion der Bibliothek wurde zur Klonierung der cDNA-Fragmente der Vektor pQE30NST verwendet (Büssow, K. *et al.*, 1998). Dieser Vektor wurde in mehreren Schritten aus pQE30 konstruiert. Zuerst wurde in die unikale *Pst*I-Schnittstelle des Vektors pQE30 ein synthetisches Oligonucleotid, das eine *Bgl*II- sowie eine *Not*I-Restriktionsstelle enthält, inseriert (pQE30N). Weiterhin wurde eine den SP6 Promoter enthaltende Sequenz zwischen die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I des Vektors pQE30N inseriert, sowie eine den T7 Promoter enthaltende Sequenz zwischen *Hin*DIII und *Not*I (pQE30NST). Der so entstandene Vektor kann nun zur gerichteten Klonierung von cDNA-Fragmenten mit *Not*I-*Sal*I-Enden genutzt werden.

### 3.2.7 Ligation der cDNA in den Vektor

Zur Ligation werden der linearisierte Vektor pQE30NST (*Not*I-*Sal*I-Cut) (Büssow, K. *et al.*, 1998) und die zuvor gefällten cDNA-Fragmente in einem Verhältnis von 50 ng : 10 ng (cDNA Konzentration  $\geq 0.7$  ng/ $\mu$ l) in einem 20  $\mu$ l Ansatz mit 1 U (1 U/ $\mu$ l) T4 DNA-Ligase in 1x T4 DNA-Ligase-Puffer ÜN bei 4°C inkubiert.

## 3.3 Fällung von DNA

Die DNA-Lösung wird mit 2.5 Vol. 100%-igem Ethanol und 1/10 Vol. 7.5 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  versetzt, 20 min bei 13.000 rpm pelletiert, in 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend in A. bidest. aufgenommen.

## 3.4 Fällung von RNA

100  $\mu$ l RNA-Lösung werden mit 1  $\mu$ l 20 mg/ml Glycogen als Carrier für die RNA (besonders bei geringen RNA-Mengen), 11  $\mu$ l 3 M NaOAc, pH 5.0 (1/10 Vol.) und 300  $\mu$ l kaltem Ethanol (2 - 2.5 Vol.) gevortext und bei -20°C für 1 h (oder auch ÜN) präzipitiert. Anschließend wird die RNA 20 min bei 13.000 rpm pelletiert und mit 100  $\mu$ l 70%-igem Ethanol (verdünnt mit DEPC-Wasser) 20 min bei 13.000 rpm und 4°C gewaschen, danach bei RT getrocknet und in DEPC-Wasser aufgenommen.

### 3.5 Herstellung elektrokompenter Zellen

Eine 1 ml *E. coli* ÜN-Kultur wird in 1 l SOB-Medium inokuliert und bis zu einer OD von 0.6 - 0.8 inkubiert und anschließend bis zu einer Temperatur von 0 - 4°C auf Eis abgekühlt. Die Kultur wird auf 6 Zentrifugationsflaschen (à 250 ml) aufgeteilt und 10 min bei 4°C und 2.500 - 4.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 l eiskaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert. Es folgt eine weitere Zentrifugation 10 min bei 8.000 rpm, das Pellet wird erneut in 1 l 10%-igem Glycerin aufgenommen. Der Zentrifugationsschritt wird wiederholt und das Pellet nun in 50 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 8.000 rpm wird das Zellpellet in einem geringen Volumen (etwa 0.5 - 1 ml) 10%-igem Glycerin resuspendiert und in Eppendorfröhrchen aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 3.6 Transformation / Elektroporation

Zum Einbringen der ligierten cDNA in *E. coli* wurde die Methode der Elektroporation gewählt. Im Gegensatz zur Transformation (CaCl<sub>2</sub> kompetenter Zellen) kann bei einer Elektroporation eine größere Anzahl an Transformanten erhalten werden. Hierfür ist es jedoch notwendig, die DNA zu fällen, da noch vorhandene Salze und Pufferbestandteile die Elektroporation inhibieren können. Die DNA des Ligationsansatzes wird dazu vor der Elektroporation mit Ethanol präzipitiert, in A. bidest. aufgenommen und resuspendiert.

Dazu werden zum Ligationsansatz (20 µl) 5 µl Yeast tRNA als Carrier, 12.5 µl 7.5 M NH<sub>4</sub>OAc und 70 µl absolutes Ethanol (-20°C) pipettiert, kräftig gemischt (gevortext) und für 20 min bei RT und 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird mit 0.5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen, 10 min bei 37°C getrocknet und in 3 - 5 µl A. bidest. resuspendiert.

1 µl dieser DNA-Lösung wird zu 20 - 25 µl elektrokompenten Zellen luftblasenfrei pipettiert und in auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvetten (Gene Pulser Cuvette, 0.2 cm, BIORAD) bei 2.5 kV, 25 µF, 200 Ω im Elektroporator (Gene Pulser II, BIORAD) elektroporiert und sofort in 1 ml SOC-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert.

Die Zellen werden zur Bestimmung der Transfereffizienz 1:10 bzw. 1:100 verdünnt und 200 µl der Verdünnungen sowie 200 µl der unverdünnten Suspension auf 2YT Ampicillin (100 mg/ml) plattiert und bei 37°C ÜN inkubiert.

### 3.7 Transfer von Kolonien

Um die transformierten Zellen, die bis jetzt in Suspension vorliegen, also ein Gemisch aus vielen verschiedenen cDNA-tragenden Einzelkolonien sind, zu separieren, müssen diese erst auf Agar ausplattiert und dann von dort in Flüssigmedium transferiert werden (*picking*). Da der Aufwand, Zehntausende von Klonen zu picken, per Hand nicht zu bewältigen wäre (Zeit, Kontaminationen), erfolgt der Transfer der Kolonien in die 384-well Microtiterplatten mit Hilfe eines Picking-Roboters.

Dazu werden die transformierten Zellen unter Verwendung von sterilen Glasperlen auf Agarplatten (22.4 x 22.4 cm, Genetix), die die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (15 µg/ml) und 2% Glucose enthalten, plattiert. Die Platten werden ÜN, nicht länger als 16 h, bei 37°C inkubiert. Um ein Ineinanderwachsen der Kolonien zu vermeiden, sollte die Dichte der Klone nicht mehr als ca. 3.000 - 4.000 Klone per Platte und die Größe der Kolonien nicht mehr als 0.5 - 1 mm betragen.

Durch eine im Picking-Roboter installierte CCD-Kamera wird ein Bild der Klone auf der Agarplatte erstellt, aus dem die Positionen der Klone berechnet werden. Die Auswahl der Kolonien erfolgt aufgrund verschiedener Parameter, wie z.B. Form (Grad der Rundheit), Größe der Kolonien (0.5 - 1 mm), Kontrast (Grauwerte) und Abstand der Kolonien zueinander. Die Kolonien werden mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 3.000 - 4.000 Kolonien in der Stunde gepickt. Gepickt wird mit einem 96-Pintool (*gadget*), bei dem jeder einzelne Pin pneumatisch ansteuerbar ist.

Nacheinander werden 96 Kolonien gepickt und in den ersten Quadranten der 384-well Microtiterplatte inokuliert, das Gadget anschließend im Ethanol-Bad sterilisiert. Die nächsten 96 Klone werden gepickt und in den zweiten Quadranten der Microtiterplatte inokuliert. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis alle vier Quadranten und damit die gesamte Platte mit Klonen beimpft sind.

Die Microtiterplatten enthalten 2YT-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Amp, Km) sowie Glycerin bzw. 10% HMFM, einer Salzlösung, die Glycerin enthält, so daß die Kulturen mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren werden können.

Die gepickten Klone in den Microtiterplatten (Original) werden ÜN (ca. 16 h) bei 37°C inkubiert. Bei längerer Inkubation kann es zu einem zu dichten Wachstum der Kulturen und somit zu Verklebungen der Zellen kommen, welche dann in Kontaminationen oder schlechterem Wachstum der Kopienplatten (Tochterplatten) resultieren können.

Von den Originalplatten werden 3 - 4 Arbeitskopien repliziert, d.h. von den Originalplatten wird mit 384-Pin Plastikreplikatoren in frische, mit Medium gefüllte Microtiterplatten inokuliert. Spotting, PCR, Rearranging u.a. Arbeitsschritte werden nur von den Kopienplatten durchgeführt,

die Originalplatten bleiben bis auf weiteres unangetastet. Die Platten werden in Stapeln verpackt, in Folie eingeschweißt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Besser ist ein Schockgefrieren auf Trockeneis, wodurch die Bildung von Kondenswasser, welches zu Kontaminationen führen kann, verhindert wird.

### 3.8 PCR in großem Maßstab

Um die Bibliothek spotten zu können und für die Hybridisierungen hochreine DNA zur Verfügung zu stellen, ist es notwendig, zuvor die Inserts der Klone zu amplifizieren. Dies geschieht -anstelle von aufwendigeren Plasmidpräparationen- durch die sogenannte *large scale* PCR. Dazu werden die Klone aus der Zellsuspension mittels eines 384-Pin Replikators direkt in den PCR-Mix (Tab. 3-2) in 384-well PCR-Microtiterplatten (ABgene) inokuliert. Die PCR erfolgt in PTC 225 PCR-Maschinen (MJ Research).

	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	für 500 ml PCR-Puffer
KCl	2.5 M	0.5 M	100 ml
Tween20	10 %	1%	50 ml
MgCl <sub>2</sub>	1 M	15 mM	7.5 ml
Tris Base	1 M	350 mM	175 ml
Tris/HCl	1 M	150 mM, pH 8.3	75 ml
A. bidest.			92.5 ml

**Tab. 3-1 PCR-Puffer**

	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	1 Reaktion á 30 µl
Primer (forward)	100 µM	5 pmol	0.05 µl
Primer (revers)	100 µM	5 pmol	0.05 µl
dNTPs	100 mM	0.1 mM	0.03 µl
Betain	5 M	1.5 M	9 µl
PCR-Puffer	10x	1x	3 µl
Kresol Rot	0.1 M	0.1 mM	0.03 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	30 U/µl	1 U/30 µl	0.03 µl
A. bidest.			17.81 µl

**Tab. 3-2 PCR-Mix**



Kresol Rot wird dem PCR-Mix zum Anfärben des PCR-Ansatzes (spätere Visualisierung der PCR-Produkte auf dem cDNA-Filter) zugesetzt. Betain dient dem Herabsetzen der Annealing-Temperatur, besonders GC-reiche DNA-Sequenzen werden während der PCR besser denaturiert.

Die PCR wurde in einem 2-Schritt-Zyklus durchgeführt, der die initiale Denaturierung 2 min bei 94°C, Denaturierung 45 sec bei 94°C, Annealing und Amplifikation 4 min bei 65°C umfaßt.

initiale Denaturierung	94°C	2 min		
Denaturierung	94°C	45 sec	□	30 Zyklen
Annealing und Amplifikation	65°C	4 min		
Ende	15°C			

### 3.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

#### 3.9.1 Aufreinigung der PCR-Produkte (High Pure PCR Product Purification Kit; Roche)

Zu einem 100 µl PCR-Ansatz wird die fünffache Menge an Bindepuffer, der Guanidin-Thiocyanat enthält, gegeben und gemischt. In Gegenwart dieses chaotropen Salzes werden Nucleinsäuren spezifisch an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen gebunden. Diese Bindungsreaktion, die innerhalb weniger Sekunden abläuft, wird durch die Zerstörung der geordneten Struktur der Wassermoleküle und ihrer Wechselwirkungen mit den gelösten Nucleinsäuren verursacht und somit die Bindung an die Glasfaser-Oberfläche gefördert. Da nur Nucleinsäuren spezifisch an die Glasfaser-Oberfläche binden können, kann sie durch einfache Waschschriffe von Primern, freien Nucleotiden, kleinen DNA-Fragmenten (<100 bp), Proteinen und Salzen gereinigt werden.

Das High Pure Filtrationsgefäß wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingesetzt und die Probe in das obere Reservoir pipettiert. Es folgt eine Zentrifugation für 30 sec bei 13.000xg, der Durchlauf wird verworfen. Auf das in ein neues Reaktionsgefäß eingesetzte Filtrationsgefäß werden nun 500 µl Waschpuffer pipettiert und 30 sec bei 13.000xg zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen, 200 µl Waschpuffer auf das Filtrationsgefäß pipettiert und w.s.o. zentrifugiert. Durch diesen zusätzlichen Waschschriff in einem geringeren Puffervolumen erfolgt eine optimale Reinigung, und eventuelle Waschpuffer-Reste werden entfernt. Das Filtrationsgefäß wird in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt und zur Elution 50 - 100 µl Elutionspuffer (pH 8.0 - 8.5) oder A. bidest. in das Filtrationsgefäß pipettiert, kurz inkubiert und abschließend für 30 sec bei

13.000xg zentrifugiert. Zur Erhöhung der Ausbeute kann das Eluat erneut auf das Filtrationsgefäß gegeben und zentrifugiert werden.

**Bindungspuffer**

Guanidin-Thiocyanat	3 M	
Tris/HCl	10 mM	pH 6.6
Ethanol	5% (v/v)	

**Waschpuffer**

NaCl	20 mM	
Tris/HCl	2 mM	pH 7.5
in Ethanol		

**Elutionspuffer**

Tris/HCl	10 mM	pH 8.5
EDTA	1 mM	

**3.9.2 Aufreinigung der PCR-Produkte (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen)**

Dieser Kit funktioniert nach dem gleichem Prinzip wie der High Pure PCR Product Purification Kit der Fa. Roche. Zum PCR-Ansatz wird das fünffache Volumen an Bindungspuffer PB pipettiert, gemischt und auf eine QIAquick® Säule in einem 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Bindekapazität der Säule liegt bei 10 µg. Es folgt eine Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm. Der Durchlauf wird verworfen, die Säule in dasselbe Reaktionsgefäß eingesetzt, mit 750 µl Waschpuffer PE überschichtet und wiederum zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen, die Säule nochmals zentrifugiert, um auch das restliche noch verbliebene Ethanol zu entfernen. Die Säule wird in ein neues Reaktionsgefäß eingesetzt und mit 30 - 50 µl A. bidest. oder Elutionspuffer EB (10 mM Tris/HCl, pH 8.5) durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm eluiert.

### 3.10 DNA/RNA-Konzentrations- und Qualitätsbestimmung

#### 3.10.1 Spektrophotometrische Bestimmung von DNA und RNA

Um die Konzentration und die Qualität der DNA bzw. RNA festzustellen, wird am Spektrophotometer (Shimadzu) ein Spektrum verschiedener Verdünnungsstufen aufgenommen und die Absorption bei den Wellenlängen von  $\lambda=260$  nm und  $\lambda=280$  nm gemessen. Anhand der Absorptionswerte können die Konzentrationen für die verschiedenen Nucleinsäuren wie folgt berechnet werden:

$$\text{dsDNA : } A_{260} = 1 \text{ OD} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$\text{ssDNA : } A_{260} = 1 \text{ OD} = 33 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$\text{ssRNA : } A_{260} = 1 \text{ OD} = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Für die Messung wird eine UVette<sup>®</sup> (Eppendorf), einer Küvette mit einem Lichtweg von 0.2 cm, verwendet. Daraus ergibt sich die Formel für die Berechnung der ssRNA-Konzentration:

$$\text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Faktor für Verdünnung} \times 5 \text{ (Faktor für Küvette)} = \text{ng}/\mu\text{l}$$

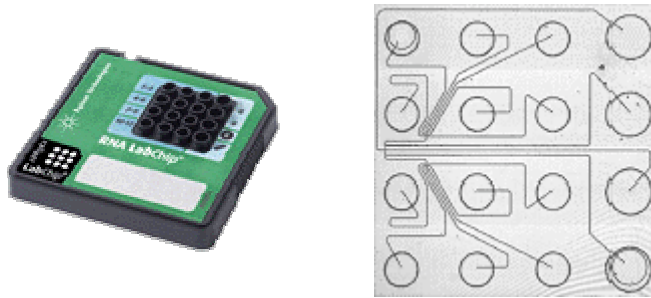
Um eventuelle Proteinverunreinigungen auszuschließen, wird der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  errechnet. Er sollte bei einer nahezu proteinfreien Präparation im Bereich von 1.8 - 2 liegen.

#### 3.10.2 Bestimmung der RNA-Qualität und Quantität mittels LabChip<sup>®</sup> (Agilent)

Eine weitere Möglichkeit zur Qualitäts- und Quantitätsbestimmung besteht in der Nutzung des RNA 6000 LabChip<sup>®</sup> Kits und dem BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies). Dieser, auf einem Chip basierenden Methode der Nucleinsäure-Analyse liegt das Prinzip der Kapillarelektrophorese zugrunde, wobei die Detektion der RNA-Fragmente anhand eines in die RNA eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt. Hierfür wird ein sehr geringes Probenvolumen von 1  $\mu\text{l}$  bzw. eine Probenmenge von etwa 25 ng benötigt.

Der Chip wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff-Gel-Gemisch geladen. Die Proben werden in die Proben-Wells pipettiert und bewegen sich dann aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes durch Mikrokapillar-Kanäle aus dem Probenwell und werden nacheinander in einen Separationskanal injiziert. Die RNA-Fragmente (ribosomale RNA und RNA-Transkripte verschiedener Größe) werden ihrer Masse entsprechend separiert und anhand der Fluoreszenz detektiert. Die Ergebnisse werden aufgezeichnet und mit der Agilent 2100 BioAnalyzer Software

analysiert. Nach der Detektion gelangt die Probe in ein Abfall/Puffer-Well. Zum Vergleich wird ein Größenstandard einer bestimmten Menge (50 ng) mit injiziert. So kann nicht nur die Qualität anhand eines Gelbildes detektiert und visualisiert, sondern auch die Quantität der Probe bestimmt werden. In der Abb. 3-7 ist ein solcher Chip und eine Detailansicht zur Veranschaulichung dargestellt.



**Abb. 3-7 RNA 6000 LabChip®**

In der Abbildung links ist der RNA 6000 LabChip® (Agilent Technologies) dargestellt, rechts die Detailansicht der Kapillaren, in denen die Trennung der Fragmente erfolgt.

### 3.11 Gelelektrophorese

Zu untersuchende DNA-Fragmente lassen sich aufgrund ihrer Größenunterschiede im elektrischen Feld durch Gelelektrophorese trennen. In wässriger Lösung tragen Nucleinsäuren durch die Ionisation ihrer Phosphatreste eine negative Nettoladung und wandern daher im elektrischen Feld von der Katode zur Anode, wobei sich größere Fragmente langsamer durch die Gelporen bewegen als kleinere. Üblicherweise werden die DNA-Gemische in Agarosegelen voneinander getrennt. Agarose wird in einer Konzentration von 1%, bei der Auftrennung kleinerer Fragmente bis zu 2%, gelöst in 1x TAE-Puffer, eingesetzt. Das Gel wird nach der Polymerisation gemeinsam mit dem Gelträger in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer transferiert und die Kämme werden entfernt.

Nach Zugabe von ca. 1/10 bis 1/5 Volumen Ladepuffer werden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Der Ladepuffer enthält Bromphenolblau zum Visualisieren der Lauffront bei einer Fragmentgröße von etwa 400 bp sowie Glycerin, wodurch die Viskosität der Probe erhöht wird, die sich so besser in die Probetaschen pipettieren läßt.

Parallel zu den Proben werden Marker-Lösungen mit DNA-Fragmenten bekannter Größe und Masse geladen. Für eine Zeit von wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden -je nach dem Grad der gewünschten Auftrennung- wird eine Spannung von 6 V/cm<sup>2</sup> angelegt. Danach folgt für 20 min die Färbung der DNA im Ethidiumbromidbad (Ethidiumbromid (10 mg/ml) 1:10.000 in A. bidest.

oder 1x TAE-Puffer). Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und wird unter UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt, wodurch die DNA sichtbar gemacht werden kann.

Das Gel wird zur Dokumentation der Ergebnisse unter UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm visualisiert und fotografiert (Gel-Dokumentations-System, Herolab). Alternativ kann das Ethidiumbromid auch dem Gel und/oder dem Laufpuffer zugegeben werden, wodurch das Färben im Ethidiumbromidbad entfällt.

### 3.12 Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde der ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Fa. Applied verwendet. Zu 1 - 7 µl DNA (10 ng per 100 bp zu sequenzierender DNA) werden 1 µl eines geeigneten Primers (10 µM) (pQE65, 5'-Ende bzw. pQE276, 3'-Ende) und 2 µl Big Dye Terminator Mix pipettiert und der Ansatz mit A. bidest. auf 10 µl aufgefüllt. Dieser Big Dye Terminator Mix enthält zum Kettenabbruch mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynucleosidtriphosphate, die anstelle der „normalen“ Desoxynucleosidtriphosphate eingebaut werden und aufgrund des Fehlens des freien 3'-OH-Endes den Abbruch der Polymerisation des DNA-Stranges bewirken.

Nucleotid	Fluoreszenzfarbstoff	E <sub>max</sub>	Farbe
ddATP	6-FAM (6-Carboxyfluoreszein)	518 nm	Blau
ddCTP	HEX (6-Carboxy-2',4',7',2,4,7-hexachlorofluoreszein)	556 nm	Grün
ddGTP	TAMRA (N,N,N,N-Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin)	580 nm	Gelb
ddTTP	Rox (6-Carboxy-X-rhodamin)	605 nm	Rot

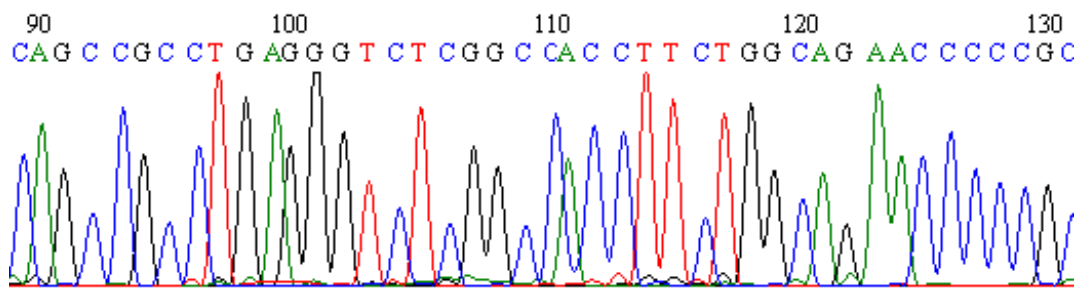
**Tab. 3-3** Eigenschaften verschiedener für die Sequenzierung eingesetzter Fluoreszenzfarbstoffe

In der folgenden PCR-Reaktion des Reaktionsansatzes wird das Fragment amplifiziert. Dabei werden die Strangbrüche eingeführt. Das PCR-Programm zur Amplifizierung des zu sequenzierenden Fragmentes setzt sich aus den folgenden Schritten zusammen:

initiale Denaturierung	96°C	5min	
Denaturierung	96°C	10s	} 25 Zyklen
Annealing	50 - 60°C*	5s	
Polymerisation	60°C	4min	
Ende	4°C		

\* Die Wahl der Annealing-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur des verwendeten Primers. Im Allgemeinen liegt sie in einem Bereich von 50 – 60°C. In dieser Arbeit wurden auch Primer verwendet, die einen höheren Schmelzpunkt aufwiesen, so daß die Annealing-Temperatur auf 65°C erhöht wurde.

Bevor die Probe elektrophoretisch aufgetrennt werden kann, muß sie durch Präzipitation aufgereinigt werden, um die Primer und überschüssigen Nucleotide zu entfernen. Zur Präzipitation der amplifizierten DNA-Sequenz werden 50 µl kaltes 100%-iges Ethanol zum PCR-Ansatz pipettiert, gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird für 1 h bei 4.000 rpm zentrifugiert (5810R, Eppendorf), um die DNA zu pelletieren. Das Pellet wird in 200 µl kaltem 70%-igen Ethanol gewaschen (Zentrifugation für 30 min bei 4.000 rpm) und lichtgeschützt getrocknet. Das Pellet wird gelöst, in einer Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und anhand der 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe, die bei unterschiedlichen Wellenlängen ihr Emissionsmaximum haben, detektiert (Arbeitsgruppe der Serviceabteilung Richard Reinhard im Hause).



**Abb. 3-8 Darstellung einer Sequenz**

In dieser Abbildung ist ein Bereich einer Sequenz gezeigt, wie er nach Sequenzierung mit den an vier verschiedene Farbstoffe gebundenen Didesoxynucleotiden dargestellt wird.

### 3.13 Erstellen der cDNA-Filter

#### 3.13.1 Transfer der PCR-Produkte auf Nylon-Membranen

Um die Klone in den späteren Hybridisierungen analysieren zu können, ist es notwendig, diese nach der Amplifikation auf Membranen zu übertragen und zu immobilisieren. Auch dieser Schritt wird mit Hilfe von Robotern durchgeführt.

Gel-Blotting-Papier (GB004, Schleicher&Schuell) wird in 0.4 M NaOH getränkt und mittig auf Kunststoffplatten (*slabs*) im Roboter aufgelegt. Um eventuelle Falten und Luftblasen zu entfernen, werden die Blottingpapiere mit einer 10 ml Glaspipette glattgerollt. Die Nylon-Membranen werden ebenfalls in NaOH getränkt, falten- und luftblasenfrei auf die Blottingpapiere gelegt. Besonderer Wert sollte hierbei auch auf das Entfernen überschüssiger Flüssigkeit (durch das Glattrollen mit einer Glaspipette) gelegt werden, da es sonst zum Verlaufen der PCR-Spots auf der Membran und somit nach der Hybridisierung zu diffusen Signalen kommen kann.

Die PCR-Produkte werden in einem Pattern von 5x5 in Duplikaten gespottet. Das bedeutet, daß jeder Klon zweimal auf der Membran vorhanden ist und bei der Hybridisierung ein positives Signal durch das Aufleuchten beider Duplikate bestätigt wird. Ein falsch positives Signal kann durch das Fehlen des zweiten Duplikatsignals erkannt werden. Dieser Klon wird dann nicht in die Analyse einbezogen.

Aufgrund der Größe der Microtiterplatten läßt sich bei der Verwendung einer 22.2 x 22.2 cm Membran diese in sechs Felder einteilen. Jedes dieser Felder besteht bei einem Standard-Spottingpattern von 5x5 aus 16x24 Blöcken (entsprechend der Anzahl an Wells in einer Microtiterplatte) zu je 25 Spots. Daraus ergibt sich eine mögliche Anzahl an Spots von 57.600 Positionen. Als Markierungspunkte für die spätere Analyse der Filter werden in die Mitte eines jeden Blockes sogenannte *guide dots*, bestehend aus Lachsspermien-DNA (*salmon sperm* DNA, SS-DNA), gespottet. Abzüglich der Spots für diese Guide Dots (2.304) ergibt sich eine Gesamtzahl an zu spottenden Klonen von 55.296 je Membran. Da in Duplikaten gespottet wird, halbiert sich die Anzahl der Klone auf 27.648 per Membran, entsprechend 12 Microtiterplatten je Feld. Der Abstand der Pins zueinander beträgt 4500 µm, was dem Abstand der Mittelpunkte der Wells der Microtiterplatten entspricht. So beträgt bei einem Spotting-Pattern von 5x5, welches hier verwendet wurde, der Abstand der Spots auf der Membran (*dot pitch*) 900 µm.

Die PCR-Produkte werden mittels eines Spotting-Roboters (MPI) mit einer Dichte von 27.648 Klonen je Filter (*high density filter*) direkt aus PCR-Platten (ABgene) auf 22.2 x 22.2 cm Nylon-Membranen (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech Europe) transferiert. Gespottet wird mit einem 400 µm bzw. 250 µm (Spitzendurchmesser) 384-Pin Gadget, wobei jedes Produkt 10x per Spot übertragen wird, um genügend DNA für die Hybridisierungen zu transferieren. Als

Markierungspunkte für die spätere Analyse der Filter werden die sogenannten Guide Dots gespottet.

Die einzelnen Microtiterplatten werden nach einem bestimmten Schema auf dem Filter angeordnet. So wird bei dem hier angewandten 5x5-Pattern die erste Platte einer Bibliothek auf Feld 1 im Pattern 1 gespottet, die zweite Platte auf Feld 2 im Pattern 1 usw., die Platte 7 wiederum im Feld 1 jedoch im Pattern 2 usw. So wird gewährleistet, daß die Platten, und somit die Feuchtigkeit, gleichmäßig auf dem Filter verteilt werden. Die Abb. 3-9 zeigt den Zusammenhang zwischen der Pinorder, der Pinposition und dem verwendeten 5x5-Pattern.

Pinorder bei einem 5x5-Pattern in Duplikaten:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Pattern
1,16	21,24	9,25	4,18	2,19	12,22	6,14	5,7	3,11	15,17	8,10	20,23	Pin-Position

Pin-Position im 5x5-Block:

21	22	23	24	25
16	17	18	19	20
11	12	13	14	15
6	7	8	9	10
1	2	3	4	5

5x5-Pattern:

2	6	12	2	3
1	10	4	5	12
9	6	gd	7	10
7	8	11	3	11
1	5	9	4	8

gd=guide dot

**Abb. 3-9 Pinorder, Pinposition und 5x5-Pattern**

Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Pinorder, der Pinposition und dem verwendeten Pattern.

### 3.13.2 Prozessieren der cDNA-Filter

Das Prozessieren der Filter umfaßt das Denaturieren der DNA, das Neutralisieren sowie das kovalente Binden der DNA an die Membran durch UV-Crosslinken. Die Filter werden zur Denaturierung der DNA für 2 min auf 0.4 M NaOH in 22.4 x 22.4 cm Agarplatten von der Unterseite befeuchtet. Dabei ist darauf zu achten, daß die Filteroberseite nicht benetzt wird. Anschließend werden die Filter für 2 min in 5x SSC gewaschen, auf Whatmanpapier getrocknet und für 30 min bei 80°C gebacken. Um die DNA kovalent an die Filter zu binden, erfolgt abschließend das UV-Crosslinken (UV Stratalinker 2400, Stratagene, Programm: *auto cross link*).



### 3.14 Erstellen der Kolonie-Filter

#### 3.14.1 Transfer der Kolonien auf Nylon-Membranen

Für bestimmte Anwendungen ist es sinnvoll, die in der Herstellung einfacheren, vor allem aber preiswerteren Kolonie-Filter („*in situ*“-Filter) zu verwenden. Diese erfordern allerdings zum Aufschluß der Bakterien ein aufwendigeres Prozessieren als das der PCR-Filter. Auch kann mit dieser Art von Filtern keine so hohe Ausbeute und Reinheit der DNA erzielt werden. In dieser Arbeit wurden die Kolonie-Filter für Longprobe-Hybridisierungen verwendet, um einen groben Überblick über die Expression einiger in jeder Zelle exprimierter Gene zu bekommen. Gleichzeitig dienen Hybridisierungen mit den Kolonie-Filtern der Kontrolle, da sie einen Vergleich zwischen den Kolonie-Platten und PCR-Platten ermöglichen. Als Guide Dots werden Tintenspots verwendet, die Hybridisierungen der Filter werden nicht-radioaktiv mit dem DIG-System durchgeführt.

Das Prinzip des Kolonie-Filter-Spottens ist im Wesentlichen gleich dem Spotten der PCR-Filter. Nur werden hier das Gel-Blotting-Papier und die Filter nicht in NaOH-Lösung sondern in 2YT-Medium getränkt. Diese werden, auf den Slabs liegend, vorher unter UV-Licht für 20 min sterilisiert. Gespottet wird direkt aus einer Kulturplatte, jeder Klon nur 3x per Spot. Die Guide Dots werden mit Tinte (1:10 verdünnt) gespottet. Anschließend werden die Filter auf 2YT-Agarplatten mit Antibiotika aufgelegt und für ca. 16 h bei 37°C inkubiert. Es ist darauf zu achten, daß die Filter luftblasenfrei auf dem Nähragar aufliegen, damit die Versorgung der Bakterien durch den Filter hindurch gesichert ist.

#### 3.14.2 Prozessieren der Kolonie-Filter

Das Prozessieren der *in situ*-Filter erfolgt nach einem Protokoll von Hoheisel et al. (Hoheisel, J. D. et al., 1991). Die gespotteten und über Nacht inkubierten Kolonie-Filter werden für 4 min auf mit Denaturierungspuffer getränkte Whatmanpapiere gelegt. Dieser Schritt wird wiederholt. Anschließend werden die Filter, mit dem Whatmanpapier auf einer Glasscheibe über dem Wasserlevel eines Wasserbades liegend, im Wasserdampf für 4 min bei 95°C inkubiert. Anschließend folgt die Neutralisierung auf in Neutralisierungslösung getränktem Whatmanpapier und die Inkubation in Proteinase K-Puffer (3 ml Proteinase K-Lösung (1 g/18 ml Wasser) in 600 ml Proteinase K-Puffer) für 30 min bei 37°C. Die Filter werden auf Whatmanpapier ÜN getrocknet und abschließend mit UV-Licht behandelt, so daß die DNA kovalent an die Membran gebunden wird (UV Stratalinker 2400, Stratagene, Programm: *auto cross link*).

**Denaturierungs-Lösung (2 l)**

NaOH	0.5 M	40 g
NaCl	1.5 M	175.32 g

**Neutralisierungs-Lösung (2 l)**

Tris	1 M	242.28 g	pH 7.5
NaCl	1.5 M	175.32 g	

**Proteinase K-Puffer (2 l)**

EDTA	50 mM	37.2 g	
NaCl	100 mM	11.68 g	
Tris	50 mM	12.114 g	pH 8.5
N-Lauroyl- Sarcosin	1%	200 g	

## 3.15 Hybridisierungen

### 3.15.1 Background-Hybridisierung

Um die Qualität der gespotteten Filter überprüfen zu können, wird eine sogenannte Background-Hybridisierung durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgt mit einem Primer, der auch zur Amplifikation der Bibliothek verwendet wurde. So ist sichergestellt, daß jeder Klon auf dem Filter sichtbar gemacht werden kann, da alle Klone (PCR-Produkte) die komplementäre Zielsequenz dieses Primers enthalten. Zuerst wird der Filter mit Lachsspermien-DNA (*salmon sperm* DNA, SS-DNA) hybridisiert, um auch die Guide Dots (ebenfalls Lachsspermien-DNA) für die Filterauswertung sichtbar zu machen.

SS-DNA-Hybridisierung:

Zum Labeln (*random primed labelling*) werden 12 µl einer SS-DNA Lösung (10 ng/µl) und 18 µl A. bidest. gemischt, für 10 min bei 100°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

Weiterhin werden

- 18 µl LS-Puffer
- 3 µl BSA (5 mg/ml)
- 3 µl CTG (je 100 µM)
- 1 µl Klenow-Polymerase
- 5 µl [ $\alpha^{33}\text{P}$ ]dATP

zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl 5 M NaOH wird die Probe denaturiert und in 10 ml CHURCH-Puffer aufgenommen.

In eine Pizzabox (Pizza Storer, Stewart) werden 150 ml CHURCH-Puffer gefüllt und die Filter (max. 10) mit der DNA-Seite nach unten in die Lösung gelegt. Die SS-DNA-Probe wird zugegeben, die Lösung gut gemischt. Die Inkubation erfolgt in einem Schüttelinkubator ÜN bei 65°C. Im Anschluß wird die Hybridisierungslösung in den radioaktiven Abfall verworfen und die Filter für 20 min bei RT in 1 l Waschpuffer auf einem Schüttler (Rocky) gewaschen.

Background-Hybridisierung

Zum Labeln (Endmarkierung) der Probe werden für eine Hybridisierung von 10 Filtern

- 2 µl Primer (20 pmol/µl)
- 2 µl T4 Kinase
- 3 µl T4 Puffer
- 5 µl [ $\gamma^{33}\text{P}$ ]dATP (10 µCi/µl; 3.000 Ci/mmol)
- 18 µl A. bidest.

pipettiert und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Enzym für 20 min bei 65°C inaktiviert, der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt und in 10 ml SSarc-Puffer (vortemperiert auf 4°C) aufgenommen.

In eine Pizzabox werden 150 ml SSarc-Puffer gefüllt, die Filter (max. 10) mit der DNA-Seite nach unten in die Lösung gelegt. Der markierte Primer wird zugegeben und die Lösung gut gemischt. Die Inkubation erfolgt wiederum in einem Schüttelinkubator ÜN bei 4°C. Die Hybridisierungslösung wird dann in den radioaktiven Abfall verworfen und die Filter für 20 min bei RT in 1 l SSarc-Puffer auf einem Schüttler gewaschen. Die Filter werden auf Whatmanpapier gelegt und die überschüssige Feuchtigkeit entfernt. Anschließend werden die Filter auf eine Kunststoffunterlage (23 x 23 cm) gelegt und luftblasenfrei in Saran-Folie verpackt. Die Aktivität der Filter wird mit einem Handmonitor bestimmt und die Filter ÜN auf PhosphorImager-Screens (Molecular Dynamics) exponiert.

### **3.15.2 Oligonucleotid-Hybridisierung in Rollerflaschen**

Für die spätere Auswertung der Signale ist es notwendig, Filter zu verwenden, die mit Guide Dots gespottet wurden. Diese hybridisieren in jeder Oligo-Hybridisierung mit und geben so Signale, die zur Orientierung erforderlich sind. Eine zusätzliche Guide Dot-Hybridisierung ist nicht notwendig.

Für das Labeln der Oligos werden 10 µl Oligo (10 pmol/µl), 10 µl A. bidest., 3 µl 10x T4 Kinase-Puffer, 5 µl [ $\gamma^{33}\text{P}$ ]dATP (10 µCi/µl; 3.000 Ci/mmol) sowie 2 µl T4 Polynucleotid-Kinase pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Labeln wird das Enzym für 20 min bei 65°C inaktiviert. Der fertige Ansatz wird sofort auf 4°C abgekühlt.

Die zu hybridisierenden Filter (max. vier Filter und Nylon-Netze zwischen den Filtern) werden eingerollt und in die Flaschen gegeben. Die Filter werden für 15 min in vorgekühltem SSarc bei 4°C prähybridisiert. Die Prähybridisierungslösung wird anschließend verworfen. Der gelabelte Ansatz (30 µl) wird in 10 ml vorgekühltes SSarc pipettiert und zu den Filtern in den Rollerflaschen (MPI-eigene Produktion) gegeben. Die Hybridisierung erfolgt auf einem Rollgerät (MPI-eigene Produktion) ÜN bei 4°C.

Nach der Hybridisierung wird die Hybridisierungslösung verworfen, die Filter werden aus den Flaschen genommen und in einer Pizzabox (max. 10 Filter pro Box) mit 1 l gekühltem SSarc für 20 min bei 4°C auf einem Rocky-Schüttler gewaschen.

Die Filter werden auf Whatmanpapier gelegt, um die überschüssige Flüssigkeit zu entfernen (die Filter dürfen nicht austrocknen), anschließend auf eine Kunststoffunterlage aufgelegt und faltenfrei in Saran-Folie eingepackt. Die Aktivität der Filter in Counts per Second (cps) wird gemessen und die Filter ÜN (bei entsprechender Signalintensität gegebenenfalls auch kürzer,

jedoch mindestens 4 h) auf einem PhosphorImager-Screen exponiert. Nach Ende der Expositionszeit werden die Screens am PhosphorImager 445 SI, Version 4.0 gescannt und ausgewertet. Die Filter können bis zum Strippen (eingepackt) bei 4°C aufbewahrt werden.

### 3.15.3 Radioaktive Longprobe-Hybridisierung

Die Longprobe-Hybridisierung (auch Backhybridisierung) ermöglicht es, alle Klone einer cDNA-Bibliothek zu identifizieren, die ein bestimmtes Gen repräsentieren oder eine sehr ähnliche Sequenz aufweisen. Als Probe wird das aufgereinigte PCR-Produkt (Kits der Fa. Roche oder Qiagen) eines interessierenden Klones verwendet. Auch für diese Hybridisierung ist es notwendig, zuerst die Guide Dots durch eine SS-DNA-Hybridisierung (w.s.o.) sichtbar zu machen. Dazu werden die Filter zunächst mit Lachsspermien-DNA (*salmon sperm* DNA, SS-DNA) bei 65°C und anschließend mit der radioaktiv markierten "Longprobe" (PCR-Produkt eines zu hybridisierenden Klones) bei 65°C hybridisiert. Die Reihenfolge muß unbedingt eingehalten werden. Das PCR-Produkt wird wie die SS-DNA durch "random primed labelling" mit [ $\alpha^{33}$ P]dATP markiert und anschließend nach Protokoll des High Pure<sup>TM</sup> PCR Purification Kits (Roche Molec. Biochemicals) aufgereinigt.

Markierung der Proben:

SS-DNA ( <i>salmon sperm</i> DNA):	Longprobe (PCR-Produkt):
12 $\mu$ l SS-DNA (10 ng/ $\mu$ l)	12 $\mu$ l PCR-Produkt (100 - 200 ng)
18 $\mu$ l A. bidest.	
<hr/>	
$\Sigma$ 30 $\mu$ l	$\Sigma$ 12 $\mu$ l
Diese Ansätze werden für 10 min bei 95 - 100°C im Thermomixer denaturiert, anschließend sofort auf Eis abgekühlt und jeweils folgende Reagenzien hinzugefügt:	
18 $\mu$ l LS-Puffer	
3 $\mu$ l BSA	
3 $\mu$ l CTG	
1 $\mu$ l Klenow-Polymerase	
5 $\mu$ l [ $\alpha^{33}$ P]dATP	
<hr/>	
$\Sigma$ 60 $\mu$ l	$\Sigma$ 42 $\mu$ l

Die Ansätze werden für 1 h bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 2 µl 5 M NaOH denaturiert. Um in der folgenden Hybridisierung spezifische Signale zu erhalten, müssen die nicht eingebauten Nucleotide und Radioaktivität entfernt werden. Dazu wird das PCR-Produkt durch Gelfiltration mit einer Sephadex G-50-Säule (ProbeQuant G-50 Micro Columns, Amersham Pharmacia) gereinigt. Die Säule wird für 1 min bei max. 735xg (3.000 rpm in der Eppendorffzentrifuge) zentrifugiert. Danach wird die Probe auf die Säule pipettiert und erneut für 2 min bei max. 735xg zentrifugiert. Die gereinigte Probe befindet sich dann im Durchlauf (s. Kapitel 3.17 Aufreinigung radioaktiv markierter DNA-Sonden). Die Aktivität der Probe wird mit einem Handmonitor überprüft. Die nun folgenden Hybridisierungen werden in Hybridisierungsflaschen durchgeführt, wobei in jeder Flasche max. 4 Filter (mit Nylon-Netzen zwischen den einzelnen Filtern) hybridisiert werden. Die zu hybridisierenden Filter werden in CHURCH-Puffer angefeuchtet, aufgerollt und in die Flaschen gesteckt. In jede Flasche werden nun 10 ml auf 65°C temperierter CHURCH-Puffer (Hybridisierungslösung) gegeben und für mindestens 30 min bei 65°C prähybridisiert. Anschließend erfolgt die Hybridisierung der Guide Dots mit SS-DNA. Dazu wird die SS-DNA-Probe in die Hybridisierungslösung gegeben (nicht direkt auf die Filter pipettieren) und ÜN, mindestens jedoch für 3 h, bei 65°C rotierend hybridisiert. Die Hybridisierungslösung wird dann in den radioaktiven Abfall verworfen und die Filter in 200 ml Waschpuffer für 20 min bei RT gewaschen. Nun folgt die eigentliche Longprobe-Hybridisierung. Die markierte Longprobe wird in 10 ml temperiertem CHURCH-Puffer aufgenommen, in die Flasche mit den Filtern pipettiert und ÜN bei 65°C rotierend hybridisiert. Die Hybridisierungslösung wird anschließend verworfen. Die Filter werden in 200 ml Waschpuffer für 5 - 20 min bei RT gewaschen, um den Überschuss an radioaktiver Probe zu entfernen. Nun werden die Filter aus den Flaschen genommen und in Pizzaboxen mit je 500 ml Waschpuffer (max. 10 Filter je Box; mit der DNA-Seite nach unten) zweimal für 20 min bei 65°C im Schüttelinkubator gewaschen (Entfernung der unspezifisch gebundenen DNA). Die Filter werden dann kurz auf Whatmanpapier gelegt, um die überschüssige Lösung zu entfernen, anschließend auf Kunststoffunterlagen gelegt, in Saran-Folie verpackt und ÜN auf PhosphorImager-Screens exponiert. Nach Ende der Expositionszeit werden die Screens gescannt und die Filter anschließend wieder gestrippt.

#### **3.15.4 Strippen der mit radioaktiven Proben hybridisierten Filter**

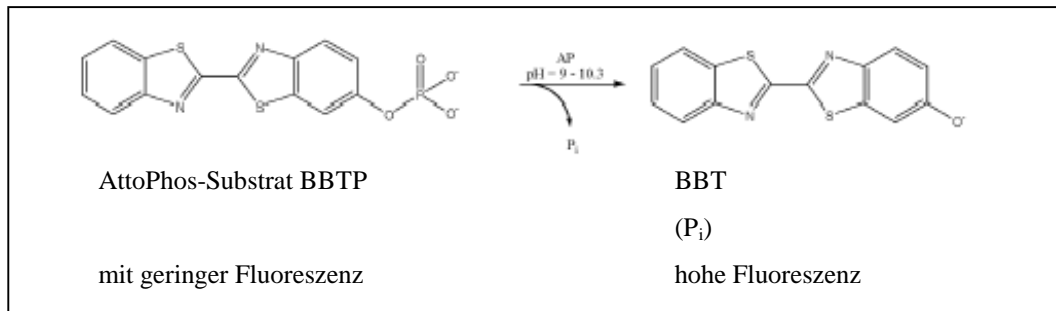
Um die Filter nochmals verwenden und hybridisieren zu können, wird die hybridisierte Probe nach dem Exponieren wieder vom Filter entfernt (*stripping*). Dazu werden die Filter in Pizzaboxen (max. 10 Filter je Box; mit der DNA-Seite nach unten) in 1 l einer bei 80°C temperierten Lösung

aus 1:10 SSarc + 2 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 zweimal 20 min bei 65°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die Aktivität der Filter wird mit einem Handmonitor bestimmt, es sollten weniger als 10 cps auf der gesamten Fläche meßbar sein. Bei höherer Aktivität wird mit kochender SSarc-Lösung nochmals gestrippt. Gestrippte Filter können für längere Zeit in 1x TE in Pizzaboxen gelagert werden. Für eine Langzeitlagerung der Filter werden diese bei RT getrocknet und in Pizzaboxen bei -20°C gelagert.

### 3.15.5 Nichtradioaktive Longprobe-Hybridisierung -DIG-System-

Hybridisierungen mit Digoxigenin wurden mit den Kolonie-Filtern durchgeführt. Die Guide Dots auf diesen Filtern sind mit Tinte gespottet, dadurch sind diese auch unter einer CCD-Kamera ohne eine extra Guide Dot-Hybridisierung sichtbar. Die Longprobe-Hybridisierungen werden nicht-radioaktiv durchgeführt. Die Markierung der Proben erfolgt mit Digoxigenin. Das Prinzip des nicht-radioaktiven DIG-Systems zur Markierung von DNA basiert auf dem Nachweis von Digoxigenin, einem Steroid-Hapten, das über eine alkalilabile Esterbindung an dUTP gekoppelt ist. Die so markierten Sonden können zur Hybridisierung eingesetzt und das Digoxigenin über einen anti-DIG-alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper in einer Fluoreszenzreaktion detektiert werden.

Als Substrat für diese Reaktion wird AttoPhos (2'-[2-benzothiazoyl]-6'-hydroxybenzothiazole phosphate [BBTP]) verwendet, ein fluoreszierendes Substrat der alkalischen Phosphatase. AttoPhos bindet an das gegen DIG-dUTP gerichtete AK-Konjugat. Das AttoPhos-Substrat wird durch die alkalische Phosphatase gespalten. Dabei entsteht anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) und der Alkohol 2'-[2-benzothiazoyl]-6'-hydroxybenzothiazole (BBT). Diese Enzym-katalysierte Reaktion des AttoPhos-Substrates wird begleitet von einer Erhöhung der Fluoreszenz und einer Verschiebung in den sichtbaren Bereich. Dabei wird das Emissionsmaximum um 120 nm verschoben, einem größeren Schritt als bei anderen Fluoreszenz-Immunoassay-Substraten, was zu einer geringeren Background-Fluoreszenz und zu höherer Detektions-Sensitivität führt.



**Abb. 3-10**      **Reaktion des AttoPhos-Substrates mit der alkalischen Phosphatase**

Bei dieser Reaktion entstehen BBT und anorganisches Phosphat (P<sub>i</sub>). Die Erhöhung der Fluoreszenz kann mit einer CCD-Kamera detektiert werden.

Die zu hybridisierende Probe wird in einer PCR amplifiziert, wobei anstatt 2 mM dTTP einer gewöhnlichen PCR auch das DIG-gekoppelte dUTP (1.9 mM dTTP + 0.1 mM DIG-dUTP) verwendet wird.

Die Filter werden für 1 - 2 h in CHURCH-Puffer bei 65°C in Rollerflaschen prähybridisiert. Die PCR-Produkte werden in 180 µl 1x TE, pH 8.0 aufgenommen, für 10 min bei 100°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Die denaturierten Proben werden dann in 10 ml vortemperiertem CHURCH-Puffer aufgenommen und nach Verwerfen der Prähybridisierungslösung zu den Filtern gegeben. Die Hybridisierung erfolgt ÜN bei 65°C.

Um den Überschuss an markierter Probe zu entfernen, werden die Filter in 100 ml Waschlösung für 15 min bei RT, anschließend stringent für 20 min bei 65°C gewaschen. Dann wird mit einer Lösung aus 1x PBS und 15% Magermilchpulver für 45 min bei RT inkubiert, um den Background zu blockieren. 5 ml der Magermilch-Lösung werden (für 1 Hybridisierung) für 15 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand mit 1:5000 anti-DIG-Antikörper-alkalische-Phosphatase-Konjugat gemischt. Das AK-Konjugat wird zu den Filtern gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wird zweimal für 30 min bei RT gewaschen, um den Überschuss an Antikörpern zu entfernen und anschließend zweimal für 10 min in 0.1 M Tris, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5 equilibriert. Als Substrat wird AttoPhos, ein fluoreszierendes Substrat der alkalischen Phosphatase (wesentlich geringere Background-Signale, höhere Sensitivität als andere Fluoreszenz-Immunoassay-Substrate) verwendet. AttoPhos bindet an das gegen DIG-dUTP gerichtete AK-Konjugat.

Nun wird die Substratlösung, bestehend aus 4 ml 0.1 M Tris / 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5 und 2 ml 5 mM AttoPhos-Substratlösung (gelöst in 2.4 M DEA-Puffer) auf die Filter gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert, so daß die Lumineszenz-Reaktion ablaufen kann. Die Filter werden auf Kunststoffunterlagen aufgelegt und in Saran-Folie verpackt. Die *in situ* AttoPhos-Lumineszenz wird an einer CCD-Kamera (Photometrix) detektiert.

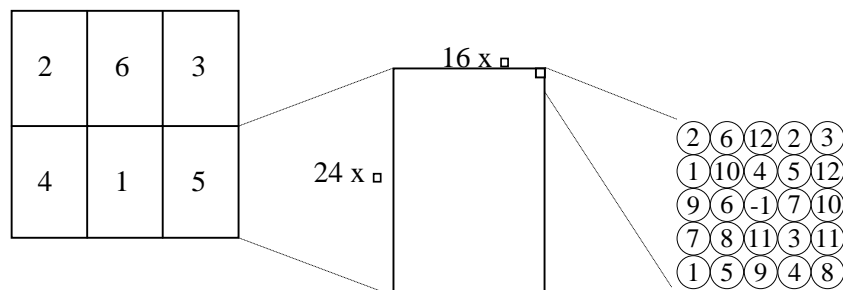


Die Alkalilabilität des DIG-dUTP-Komplexes ermöglicht das einfache Entfernen der Hybridisierungssignale, so daß nach der ersten Hybridisierung, durch Entfernen des Signals und der Sonde mit NaOH, eine zweite Hybridisierung mit einer anderen Sonde durchführbar ist. Die Filter werden dazu in einer temperierten Lösung aus 0.4 M NaOH / 0.1% SDS bei 65°C inkubiert. Dabei sollte sich durch das Ablösen des AttoPhos der Puffer gelb verfärben. Dann werden die Filter zweimal für 15 min in 0.1 M Tris, pH 7.4 / 2x SSC / 0.1% SDS zur Neutralisation gespült. Dabei wird auch das restliche AttoPhos entfernt. Um nun auch die hybridisierte Probe zu entfernen, werden die Filter in CHURCH-Puffer ÜN bei 65°C gestrippt.

### 3.16 Bildanalyse

Die Detektion der Signale der hochdichten Arrays an Klonen auf den Filtern erfordert eine spezielle Bildanalyse, um solch große Datenmengen verarbeiten zu können. Auch müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein, die diese Analysen ermöglichen bzw. erleichtern.

So sind die Filter beispielsweise nach einem ganz bestimmten Muster gespottet. Ein Filter ist eingeteilt in 6 Felder. Je Feld können mit einem Pattern von 5x5, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, bis zu 12 Microtiterplatten gespottet werden, was 4.608 Klonen in Duplikaten je Feld entspricht, also einer Gesamtzahl von 9.216 Spots je Feld. 16x24, also 384 solcher Blöcke zu 5x5 Spots ergeben je ein Feld (entsprechend der Anzahl an Wells in einer Microtiterplatte). Jedem Klon einer Bibliothek kann so ein bestimmter Punkt auf dem Filter zugeordnet werden. Diese Einteilung der Filter ist in der Abb. 3-11 veranschaulicht. Im Mittelpunkt eines jeden 5x5-Blockes wird für die Orientierung ein sogenannter Guide Dot aus Lachsspermien-DNA gespottet. Dieser hybridisiert in jeder Oligonucleotid-Hybridisierung mit und dient der Orientierung bei der Datenanalyse.



**Abb. 3-11 Schema der Einteilung eines Filters**

Darstellung eines Filters, eingeteilt in Felder und Blöcke. Ein Filter wird unterteilt in 6 Felder. Ein jedes dieser Felder besteht aus 24x16 Blöcken, die sich jeweils wiederum aus 5x5 Spots zusammensetzen.

Die hybridisierten Filter werden auf Screens (Phosphor Storage Screen, Molecular Dynamics oder Image Plate BAS-IP MS 2325, Raytest) für 16 h inkubiert, die Screens anschließend am PhosphorImager 445 SI, Version 4.0 (Molecular Dynamics) mit 176 µm/Pixel bzw. am BAS-1800 (Raytest) mit der Ansteuersoftware Scanner Control (Version 4.0 build 15, Molecular Dynamics) bzw. dem BASReader, Version 2.13h (Raytest) gescannt.

Die Auswertung der Oligonucleotid-Hybridisierungen erfolgt nun mit Programmen, die es ermöglichen, ein Gitternetz über den Filter zu legen und die Intensität eines jeden einzelnen Signals zu quantifizieren. Solche Software stellen die Programme Xdigitise (MPI) oder Visual Grid<sup>®</sup>, Version 2.01 (GPC Biotech AG) dar.

### 3.17 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung der DNA-Sonden wird nach dem Prinzip der *random primed labeling* Methode durchgeführt (Prime-It<sup>®</sup> II Random Primer Labeling Kit, Stratagene), bei der sich Nonamere aller möglichen Sequenzkombinationen, die als Primer für die *in vitro* Polymerisation durch eine 3` - 5` Exonuclease-defiziente Mutante des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I dienen, an verschiedene Stellen entlang des denaturierten DNA-Templates anlagern. Das Enzym inkorporiert Nucleosid-Monophosphate an das freie 3`-OH-Ende der Primer und synthetisiert so den neuen DNA-Strang. Durch den Einbau eines radioaktiven Nucleotides anstelle eines nicht-radioaktiven aus dem Reaktions-Mix wird die DNA radioaktiv markiert. Die so markierten Sonden können eine spezifische Aktivität von mehr als  $1 \times 10^9$  erreichen.

25 ng (1 - 23 µl) des DNA-Templates (mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt (PCR Purification Kit, Qiagen)), 0 - 23 µl A. bidest. sowie 10 µl der *random primer* (27 OD Units/ml) werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, für 5 min bei 100°C denaturiert und anschließend kurz bei RT zentrifugiert. 10 µl 5x dCTP-Primer-Puffer (enthält jeweils 0.1 mM dATP, dGTP und dTTP), 5 µl des radioaktiv markierten Nucleotides [ $\alpha^{33}\text{P}$ ]dCTP (3000 Ci/mmol) sowie 1 µl Exo(-) Klenow-Enzym (5 U/µl) werden zugegeben, gemischt und für 2 - 10 min bei 37 - 40°C inkubiert. Anschließend an die Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 2 µl Stop Mix (0.5 M EDTA, pH 8.0) beendet.

### 3.18 Aufreinigung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Bei Hybridisierungen von Southern- und Northern-Blots mit aufgereinigten Proben kann im Vergleich zu nicht aufgereinigten Proben ein höheres Signal:Background-Verhältnis erzielt werden. Die Aufreinigung der Proben (Abreicherung der nicht eingebauten Nucleotide) erfolgte mittels ProbeQuant<sup>TM</sup> G-50 Micro Columns, die als Matrix Sephadex<sup>TM</sup> G-50 DNA Grade F enthalten.

Als erstes wird der auf der Säule befindliche Puffer (Pre-Equilibrierung mit 150 mM STE Puffer, 0.15% Kathon<sup>TM</sup> CG/ICP Biocide als Konservierungsmittel) durch Vortexen resuspendiert. Die Kappe wird gelöst und der untere Verschuß entfernt. Die Säule wird in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt und für 1 min bei 735xg zentrifugiert. Der Durchfluß wird verworfen und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß eingesetzt. Die gelabelte Probe wird langsam auf die Säulenmatrix pipettiert und die Säule für 2 min bei 735xg zentrifugiert. Die aufgereinigte Probe befindet sich nun im Reaktionsgefäß, die nicht eingebauten Nucleotide bleiben in der Säulenmatrix.

### 3.19 Northern-Hybridisierung

Die Northern-Hybridisierungen wurden nach Vorschrift der Current Protocols in Molecular Biology (Kapitel 4.9.1 - 4.9.16) (Ausubel, M. *et al.*, 2001) durchgeführt. Sie dienen dem Nachweis spezifischer Sequenzen in einer RNA-Population eines bestimmten Gewebes und in dieser Arbeit der Validierung des Oligonucleotid Fingerprintings.

#### 3.19.1 Northern-Gelelektrophorese – Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese

In ein auf 60°C abgekühltes Agarosegel-Gemisch (1 g Agarose / 72 ml DEPC-Wasser) werden 10 ml 10x MOPS-Laufpuffer und 18 ml 12.3 M Formaldehyd gegeben und das Gel gegossen. Dies ergibt in der Endkonzentration ein 1% Agarosegel, 2.2 M Formaldehyd, 1x MOPS. Als Laufpuffer dient 1x MOPS.

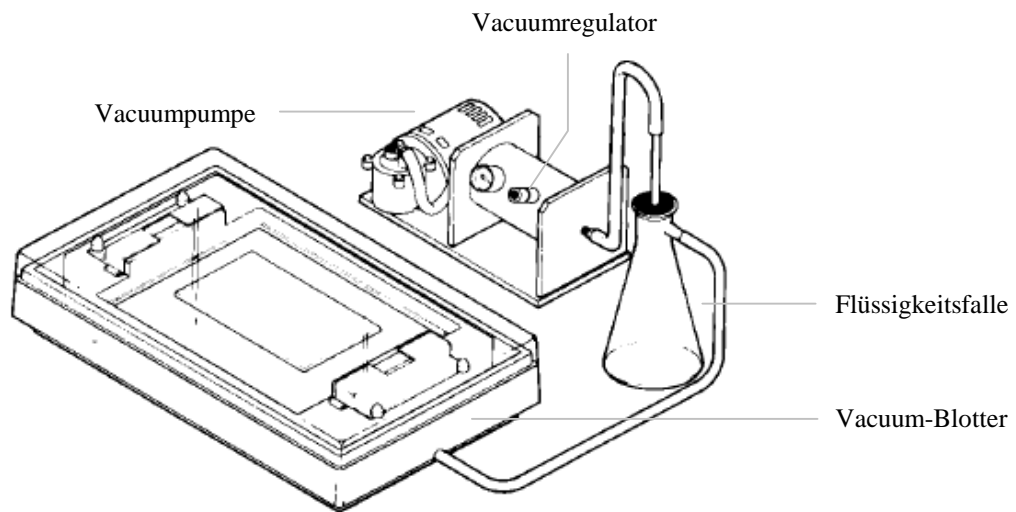
Die optimale RNA-Menge, die per Bahn geladen werden soll, liegt in einem Bereich von 0.5 - 10 µg/Bahn. Das Probenvolumen wird auf 11 µl eingestellt. Dazu werden 5 µl 10x MOPS-Laufpuffer, 9 µl 12.3 M Formaldehyd sowie 25 µl Formamid zugegeben, gemischt und für 5 - 10 sec zentrifugiert. Der Reaktions-Mix wird für 15 min bei 55°C inkubiert, um die Probe zu denaturieren. Der Mix wird nun mit 10 µl Formaldehyd-Ladepuffer gemischt. Das Gel wird beladen und bei 5 V/cm<sup>2</sup> für die Dauer von ca. 3 h laufen gelassen.

Um ein Anfärben der RNA mit Ethidiumbromid zu ermöglichen, ist es notwendig, das Formaldehyd aus dem Gel zu entfernen. Dazu wird das Gel zweimal für 20 min gewässert und anschließend für 30 min im Ethidiumbromidbad (0.5 µg/ml Ethidiumbromid) gefärbt. Nun kann die RNA am Transilluminator (Gel-Dokumentations-System, Herolab) visualisiert werden. Um nach der Hybridisierung die Banden auf der Membran identifizieren und Rückschlüsse auf deren Größe ziehen zu können, wird das Gel mit 2 Linealen im UV-Transilluminator fotografiert.

#### 3.19.2 Northern-Blotting - Vacuum Blotting

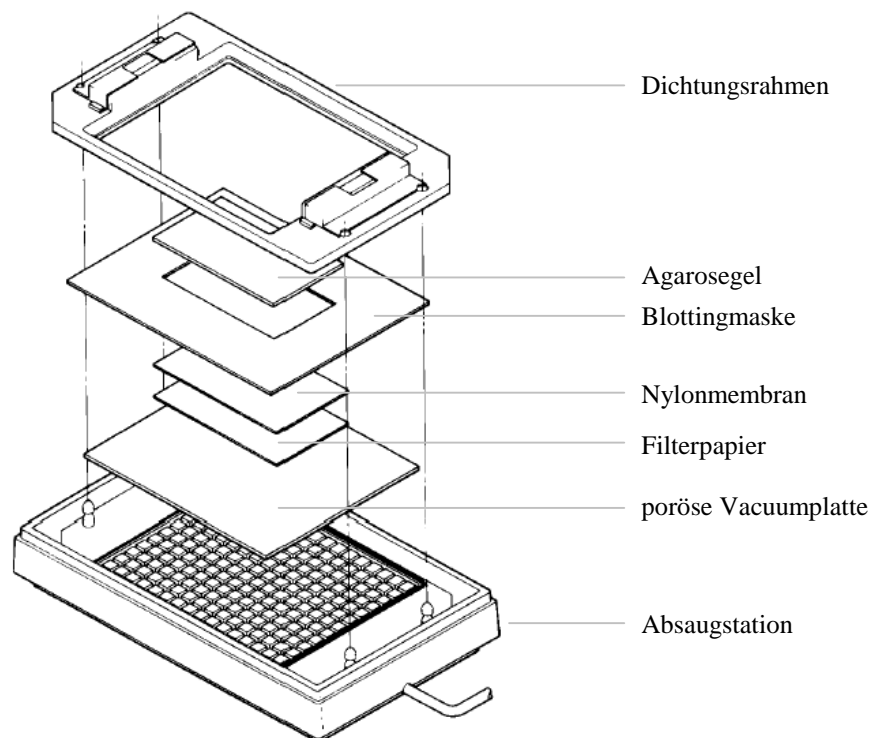
Der Transfer der RNA aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup> Transfer Membrane, Amersham) erfolgt mit Hilfe eines Vacuum-Blotters (Modell 785 VacuumBlotter, Bio-Rad), wodurch die RNA aufgrund des angelegten Unterdruckes aus dem Gel auf die Membran transferiert (geblottet) wird. Diese Methode des Transfers von Nucleinsäuren ist weniger zeitaufwendig als der Kapillarblot (daher gerade für RNA-Blots geeignet), der Transfer ist

gleichmäßiger und es kann eine höhere Transferausbeute erzielt werden (Kroczek, R. A. *et al.*, 1990).



**Abb. 3-12 Vacuum-Blotter**

Vacuum-Blotter mit Flüssigkeitsfalle, Vacuumregulator und Vacuumpumpe.



**Abb. 3-13 Aufbau des Blotting-„Sandwiches“**

Schema des Aufbaus des Blotting-„Sandwiches“ für das Vacuum-Blotten.

Zum Denaturieren der größeren Fragmente wird das Gel für 30 min in 10 Gel-Volumen 0.05 M NaOH / 1.5 M NaCl auf einem Schaukeltisch (Rocky) geschwenkt. Dies führt zur partiellen Hydrolyse der RNA, wodurch Strangbrüche erzeugt werden. Diese Längenreduktion erleichtert den Transfer größerer Fragmente durch das Gel auf die Membran. Anschließend wird kurz mit DEPC-Wasser gespült und das Gel für 30 min in 10 Gel-Volumen Tris/HCl, pH 7.4 / 1.5 M NaCl neutralisiert. Um das Gel zu equilibrieren und die Transfereffizienz zu verbessern, wird das Gel nun für ca. 45 min in 10x SSC geschwenkt. Auf die Vacuumplatte werden nun das in 10x SSC getränkte Whatman-Filterpapier und darauf die Nylon-Membran gelegt und mit einer Blottingmaske entsprechender Größe (die Membran sollte ca. 5 mm größer sein als der Ausschnitt in der Blottingmaske) abgedeckt. Das Gel wird luftblasenfrei auf die Membran gelegt und während des gesamten Blotvorganges mit 10x SSC überdeckt. Der Dichtungsring wird eingelegt und die Apparatur mit dem Dichtungsrahmen verschlossen. Das Blotten erfolgt für 90 min bei 5 inches Hg. Der abgesaugte Transferpuffer wird über eine Flüssigkeitsfalle aufgefangen.

Nach Beenden des Blotting-Vorganges wird die Transfereffizienz (Quantität des Transfers der RNA aus dem Gel auf die Membran) überprüft, indem das Gel im Ethidiumbromidbad nachgefärbt und unter UV-Licht auf noch eventuell vorhandene RNA untersucht wird.

Nun wird die Membran kurz in 2x SSC gespült, zwischen Whatman-Filterpapier luftgetrocknet, für 30 min bei 80°C gebacken und die RNA durch UV *cross linking* (UV Stratalinker 2400, Stratagene, Programm: *auto cross link*) kovalent an die Membran gebunden. Die Membran kann jetzt direkt zur Hybridisierung verwendet oder auch für längere Zeit bei -20°C aufbewahrt werden.

### 3.19.3 Northern-Hybridisierung

Die durch PCR amplifizierte und aufgereinigte DNA-Probe wird radioaktiv markiert (s. Kapitel 3.16 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden).

Die Membran mit der immobilisierten RNA wird in 6x SSC getränkt und in eine Hybridisierungsflasche eingelegt und in Formamid-Prähybridisierungs-/ Hybridisierungslösung (1 ml/10 cm<sup>2</sup> Membran) für 3 h bei 42°C in einem Hybridisierungsofen rotierend prähybridisiert. Die markierte Probe wird für 10 min bei 100°C denaturiert, kurz auf Eis gekühlt und in die Formamid-Prähybridisierungs-/ Hybridisierungslösung in der Hybridisierungsflasche pipettiert. Die Inkubation erfolgt ÜN bei 42°C.

### 3.19.4 Waschen der Membranen und Autoradiographie

Die Hybridisierungslösung wird in den radioaktiven Abfall verworfen, die Membran im gleichen Volumen 2x SSC / 0.1% SDS rotierend für 5 min bei RT gewaschen. Dieser Schritt wird wiederholt. Es folgen zwei weitere Waschungen für je 5 min bei RT in 0.2x SSC / 0.1% SDS, sowie je ein Waschschrift für 15 min bei 42°C in 0.2x SSC / 0.1% SDS bzw. für 15 min bei 68°C in 0.1x SSC / 0.1% SDS. Um das Signal:Background-Verhältnis zu reduzieren, können die einzelnen Waschschriffe in einem doppelten Volumen an Waschlösung durchgeführt werden. Die Membran wird kurz bei RT in 2x SSC gespült, die überschüssige Flüssigkeit zwischen Whatman-Filterpapieren entfernt (Membran nicht trocknen lassen, da sonst die Probe an die Membran binden kann und so das Strippen der Membran -Entfernen der Probe vom Filter- unmöglich werden kann). Die Membran wird nun luftblasen- und faltenfrei in Saran-Folie (Saran, Dow) verpackt und auf einem Fuji-Screen (Image Plate, BAS-IP MS 2325, Raytest) in einer Kassette (BAS 2325, Raytest) für 1 h, 3 h und 16 h exponiert und gescannt (BAS 1800, Raytest). Die Auswertung der erhaltenen Signale erfolgt mit Hilfe der BASReader-Software (Version 2.13h, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) und der Bildanalyse-Software TINA (Version 2.10g, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH).

### 3.19.5 Strippen der RNA-Membranen

Um die Membran mit einer anderen Probe hybridisieren zu können, muß zuvor die erste Probe von der Membran entfernt werden (*stripping*). Dies geschieht durch Inkubation viermal für 5 min bei 100°C in einer kochenden Lösung aus 0.1 M SSC / 1% SDS / 40 mM Tris/HCl, pH 7 - 7.8. Der Erfolg wird durch eine erneute Autoradiographie überprüft.

### 3.20 Komplex-Hybridisierung

Die Komplex-Hybridisierung ist eine Art der Hybridisierung, bei der keine spezifischen Nucleinsäuren, sondern ein Gemisch aus vielen, nicht definierten Gesamt-RNA- oder mRNA-Fragmenten (in cDNA revers transkribiert) auf Filter hybridisiert wird (daher komplex). Diese Art der Hybridisierung verwendet man, um komplexe Hybridisierungsmuster der gespotteten z.B. DNA zu erhalten und so beispielsweise verschiedene Entwicklungsstadien eines Organismus, gesunde oder erkrankte Gewebe miteinander vergleichen zu können. Dabei erwartet man nicht nur einzelne positive Signale, sondern Signale in fast jedem, ein Gen repräsentierenden Spot auf dem Filter, jedoch beim Vergleich der Hybridisierungsmuster der einzelnen Gewebe unterschiedlich starke Signalintensitäten.

Als erstes werden die Filter für 1 h bei 65 °C in 15 ml Hybridisierungslösung (1 M NaCl / 1% SDS / 10 mM Tris/HCl, pH 7.5) prähybridisiert, also an die Bedingungen während der eigentlichen Hybridisierung equilibriert.

Bis zu 9.5 µl (1 µg) mRNA werden mit 0.5 µl *random primer* (OD260-290) gemischt (totales Volumen 10 µl), für 10 min bei 70°C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Zu dieser Probe wird nun der AMV-RT-Mix (15 µl), bestehend aus

- 5 µl AMV-RT-Puffer,
- 1.25 µl dNTP-Mix (10 mM dATP, dGTP, dTTP),
- 1 µl dCTP (12.5 µM), Endkonzentration 500 nM,
- 0.12 µl A. bidest,
- 0.63 µl RNAsin (36 U/µl),
- 5 µl [ $\alpha^{33}\text{P}$ ]dCTP,
- 2 µl AMV-RT (20 U/µl)

pipettiert und wie folgt inkubiert: für 10 min bei 30°C, 40 min bei 42°C, 10 min bei 51°C und anschließend auf Eis abgekühlt. Gereinigt werden die Proben mittels G-50 Säulen. Die Probe, die sich im Durchlauf befindet, wird mit 50 µl SS-DNA (10 mg/µl) und 1 µl humaner c<sub>0</sub>t-DNA gemischt, für 10 min bei 95°C denaturiert, in 10 ml Hybridisierungslösung pipettiert und nachdem die Prähybridisierungslösung verworfen wurde, zu den Filtern gegeben und ÜN bei 65°C hybridisiert. Danach erfolgt das zweimalige Waschen der Filter für 20 min bei 65°C in einer Lösung aus 0.1% SDS / 0.1x SSC. Die überschüssige Flüssigkeit wird mit Whatmanpapier entfernt, die Filter in Saran-Folie verpackt und anschließend für 3 h auf einem Fuji-Screen exponiert.