

### 3. Methoden

#### 3.1 Isolierung hochmolekularer DNA (nach Blin & Stafford, 1976)

Das den nach Betäubung auf Eis dekapitierten Fischen frisch entnommene oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrte Fischgewebe (Gehirn, Kiemen, Niere, Leber, Milz, Hoden, Muskel, gesammelt von je einem Fisch) wird in fünffachem Volumen Lysispuffer aufgenommen und mit einem Glashomogenisator vorsichtig zerkleinert. Anschließend wird 3h bei  $80^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Suspension wird in SST-Röhrchen (Becton Dickinson, Rutherford, New Jersey) überführt und mit  $1/2$  Volumen Phenol (äquilibriert mit 0,1M Tris-Cl, pH 8,0) für 15 min auf einem Taumelschüttler geschwenkt. Nach Zugabe  $1/2$  Volumens Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und weiteren 15 min Inkubationszeit wird zur Phasentrennung 10 min mit 2000 rpm (Labofuge<sup>GL</sup>, Heraeus) bei RT zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird mit dem einfachen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und weitere 15 min gemischt. Nach erneuter Zentrifugation überführt man die wäßrige Phase in ein Reagenzglas und fällt die DNA durch Zugabe des 2,5fachen Volumens eiskaltem Ethanol p.a.. Die sichtbare hochmolekulare DNA kann direkt auf einen Glasstab gewickelt werden; sie wird durch Eintauchen des Stabes in 70% Ethanol kurz gewaschen und nach Verflüchtigung des Alkohols in ausreichendem Volumen TE pH 8,0 (ca. 50-500 ng/ $\mu\text{l}$ ) mindestens über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelöst.

Lysispuffer:	200 mM	NaCl
	100 mM	EDTA pH 8,0
	0,2%	SDS
	100 $\mu\text{g/ml}$	Proteinase K (jeweils frisch zusetzen)
TE:	10 mM	Tris-Cl pH 8,0
	1 mM	EDTA pH 8,0

#### 3.2 Präparation von Rückenflossen-DNA ("Fin Clip" Methode)

Eine rasche Methode zur DNA-Gewinnung aus kleinen Probenvolumen (Altschmied et al., 1997a) ermöglicht es, den Genotyp von Fischen festzustellen und sie anschließend gezielt weiterzukreuzen.

Dem Fisch wird die Rückenflosse abgeschnitten, die sich innerhalb von vier Wochen regeneriert. Diese wird in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in 100 µl einer Lösung aus 100 mM NaCl, 0,5% N-Laurylsarcosin mit einem Teflonpistill zermörsert und 15 min in einem Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen werden 100 µl einer 20%igen Chelexsuspension zugegeben und 15 min bei RT inkubiert, wobei ein Absetzen des Chelex durch mehrmaliges Schütteln verhindert wird. Die Mischung wird erneut für 15 min gekocht, anschließend wird das Chelex durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min (Eppendorf Tischzentrifuge) pelletiert. Die sich im Überstand befindende DNA ist einzelsträngig und daher nur für PCR-Experimente geeignet.

### 3.3 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem und mittlerem Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde nach der Methode von Del Sal et al. (1988) durchgeführt. 1,5 ml einer o/n Bakterienkultur werden durch Zentrifugieren bei 10000 rpm für 20 sec (Eppendorf Tischzentrifuge) sedimentiert und das Pellet in 200 µl STET-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 4 µl Lysozymlösung (50 mg/ml TE-Puffer) wird 5 min bei RT inkubiert, die lysierten Bakterien 90 sec im Wasserbad gekocht und Membranbruchstücke und anhaftende chromosomale DNA durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 10000 rpm (Tischzentrifuge) abgetrennt. Das viskose Präzipitat wird verworfen, 8 µl einer 5% CTAB-Lösung zugegeben und 5 min bei 13000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Das die DNA enthaltende Pellet wird in 1,2 M NaCl gelöst und Ethanol-präzipitiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol wird die DNA in 40 µl TE-Puffer gelöst.

STET-Puffer:	8%	Sucrose
	0,5%	Triton X-100
	50 mM	Tris-Cl pH 8,0
	50 mM	EDTA pH 8,0

Plasmid-DNA für die automatisierte Sequenzierung mit dem A.L.F.<sup>TM</sup> DNA Sequencer (Pharmacia) wurde aus 25 ml Bakterienkultur mit dem Midipräparationskit von QIAGEN gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert.

### 3.4 Präparation von Phagen-DNA in kleinem Maßstab

75 µl Phagenüberstand und 350 µl "plating" Bakterien (siehe 3.17) werden zusammengegeben und zur Infektion der Bakterien durch die Phagen 30 min bei 37°C inkubiert. Die infizierten

Bakterien werden in 7 ml LB-Medium, das 10 mM MgSO<sub>4</sub> enthält, für 12-14 h bei 37°C kultiviert. Nach Zufügen von 175 µl Chloroform wird erneut 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zelltrümmer der lysierten Bakterien werden durch 10 minütige Zentrifugation bei 4000 rpm (Minifuge RF, Heraeus) sedimentiert und der Überstand in ein frisches Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Aufeinanderfolgend werden zunächst 150 µl DNaseI (10 mg/ml) zugegeben, nach 30 min dieselbe Menge RNaseA (10 mg/ml) und jeweils bei 37°C inkubiert. Die Phagen werden durch Zugabe von 700 µl 1 M Tris pH 8,6, 3 M NaCl, 0,25 M EDTA lysiert und Proteine durch Hinzufügen von 150 µl Proteinase K (10 mg/ml) während mehrstündiger Inkubation bei 37°C entfernt. Nach Phenol/Chloroformextraktion mit 4-6 ml wird zur Phasentrennung 15 min bei 5000 rpm (Minifuge RF, Heraeus) zentrifugiert und die in der wäßrigen Oberphase befindliche Phagen-DNA durch Zugabe von 4,8 ml Isopropanol o/n bei -20°C gefällt. Nach Abzentrifugieren bei 5000 rpm für 20 min (Minifuge RF, Heraeus) wird das Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen und in 100 µl TE-Puffer gelöst.

### 3.5 DNA-Gelelektrophorese

#### 3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,8-1,6% verwendet. Die Agarose wird in 1xTBE-Puffer aufgenommen, in der Mikrowelle geschmolzen und nach Abkühlung unter 60°C in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach Erhärten wird das Gel in die mit 1xTBE gefüllte Gelkammer eingesetzt, die Proben mit 1/10 Volumen 10xProbenpuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wird ein Längenstandard bekannter Bandengrößen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei etwa 1 V/cm über Nacht, wenn genomische, durch Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA aufgetrennt werden soll, ansonsten bei bis zu 5 V/cm für 2-3 h. Anschließend wird das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für 20 min gefärbt und auf dem UV-Transilluminator (254 nm) photographiert. Zu klonierende DNA-Fragmente werden, um UV-induzierte Strangbrüche zu vermeiden, über langwelligem UV-Licht (366 nm) aus dem Gel ausgeschnitten.

10xTBE-Puffer:	0,9 M	Tris
	0,9 M	Borsäure
	20 mM	EDTA pH 8,0
10xProbenpuffer:	50%	Glycerin
	100 mM	EDTA pH 8,0
	1%	SDS
	0,25%	Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol

### 3.5.2 Native Polyacrylamidgele

Zur Untersuchung des Wanderungsverhaltens einzelsträngiger DNA-Fragmente wurden 50x20 cm große 6% nicht-denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 0,5xTBE als Laufpuffer.

Gellösung:	6%	Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
	0,5x	TBE
	0,024%	TEMED
	0,1%	APS

### 3.5.3 Denaturierende Polyacrylamidgele

Die Produkte von Sequenzreaktionen wurden auf 6% denaturierenden Polyacrylamidgelen, AFLP-Reaktionen auf 5% und AP-PCR-Reaktionen auf 4% denaturierenden 50x20 cm großen Gelen aufgetrennt, die neben unter 3.5.2 angegebenen Komponenten 7 M Harnstoff enthielten.

## 3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

### 3.6.1 Vergleichende Konzentrationsbestimmung im Agarosegel

Die DNA unbekannter Konzentration wird neben einer mit *SaI* geschnittenen  $\lambda$ -DNA bekannter Konzentration auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen, das Gel nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid (1  $\mu\text{g/ml}$ ) angefärbt und unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm photographiert. Da die Einlagerung des fluoreszierenden Farbstoffs in die DNA direkt proportional zur DNA-Menge erfolgt, kann die Konzentration der zu bestimmenden DNA unter Verwendung der Software Easy plus Rev 3.16 von Herolab (Wiesloch) ermittelt werden.

### 3.6.2 Spektralphotometrische Bestimmung

Die Konzentration einer DNA-Lösung läßt sich durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ermitteln. Dabei geben gemessene Werte bei Wellenlängen von 280 und 320 nm Aufschluß über etwaige Verunreinigungen durch Protein oder Phenolreste. Anhand

der Konstanten  $OD_{260} = 1$ , die einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}$  doppelsträngiger Nukleinsäuren pro ml entspricht, lässt sich die DNA-Konzentration unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnen. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  sollte etwa bei 1,8 liegen, kleinere Werte weisen auf Protein-, größere Werte auf RNA-Verunreinigungen hin.

### 3.7 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Hydrolyse von genomischer DNA werden pro  $\mu\text{g}$  DNA 5-10 U Enzym eingesetzt und über Nacht unter optimalen Pufferbedingungen bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Die Enzymmenge sollte nicht mehr als  $1/10$  des Reaktionsvolumens betragen, da das zur Lagerung des Enzyms benötigte Glycerin die Enzymaktivität verändern kann, wenn es in zu hoher Konzentration vorliegt. Plasmid-DNA wird mit 2-5 U Enzym für 2-4 h hydrolysiert. Werden Spaltprodukte erwartet, die kleiner als 700 bp sind, werden der Reaktion 0,5  $\mu\text{l}$  RNaseA (10mg/ml in 10 mM Tris-Cl pH 7,5) zugefügt, da RNA solch kurze Fragmente im Gel überdecken würde.

### 3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die im ausgeschnittenen Gelstück enthaltene DNA wird mit Hilfe des QIAEX Gelextraktionskits (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers aus der Agarose extrahiert. Das Funktionsprinzip beruht auf einer Glasmatrix, die DNA bei saurem pH-Wert absorbiert und in alkalischem Puffer wieder freisetzt.

### 3.9 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden am 5'-Ende

Die in der zweiten Amplifizierungsreaktion von AFLP-Analysen eingesetzten Oligonukleotide werden durch Anhängen einer Phosphatgruppe aus  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$  an das 5'-Ende radioaktiv markiert. Die Reaktion erfolgt in 1x Kinasepuffer in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  bei Verwendung von 500 ng Primer, 100  $\mu\text{Ci}$   $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$  und 10 U T4 Polynukleotidkinase für 30 min bei 37°C. Die Reaktionsprodukte werden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.10 Phenolextraktion

In einer DNA-Lösung vorhandene Enzyme werden entfernt, indem man das einfache Volumen Phenol zugibt, durch Vortexen mischt und zur Phasentrennung bei 13000 rpm für 10 min (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, das einfache Volumen Phenol/Chloroform (Chloroform:Isoamylalkohol 24:1) zugefügt und nach Mischen erneut zentrifugiert (Tischzentrifuge). Die in der wäßrigen Phase vorliegende DNA wird durch Zugabe von  $\frac{1}{10}$  Volumen 3M NaAc pH 5,5 und eiskaltem Ethanol p.a. gefällt und bei 4°C abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 13000 rpm). Nach Waschen mit 70% Ethanol wird die DNA in H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer gelöst.

### 3.11 Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion (PCR; Saiki et al., 1988)

Die hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, ermöglicht es, ein von Startsequenzen flankiertes DNA-Fragment in sich wiederholenden Zyklen exponentiell zu vervielfältigen.

Für die Amplifizierung eines genomischen DNA-Fragments, die in einem Volumen von 50 µl stattfindet, werden 100 ng DNA, bei Amplifizierung aus einem Phagen 1 ng Phagen-DNA als Matrize eingesetzt. Die Reaktion findet in 1xPCR-Puffer statt, der je 1 µM Primer, 200 µM der vier Nukleotide und 2,5 U Taq Polymerase enthält. Die Matrizen-DNA wird zunächst für 2 min bei 94°C denaturiert, die Denaturierungszeit in den folgenden 35 Zyklen beträgt 30 sec. Die Anlagerung der Primer erfolgt für 30 sec bei einer Temperatur, die 2°C unter der Schmelztemperatur der Primer liegt. Die DNA-Synthese findet bei 72°C statt, wobei die Extensionszeit je nach Länge des erwarteten Produkts variiert (1min pro 1000 nt). Im letzten Zyklus wird die Extensionszeit auf 5 min ausgedehnt. Sollen besonders lange DNA-Fragmente amplifiziert werden (>3 kb), wird 1 µl einer 84:1 Mischung aus Taq Polymerase (GIBCO, BRL) und Pwo DNA Polymerase (AGS, Heidelberg) in einem Taq Extender Puffer (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Die Amplifizierungen erfolgten im Thermo-Cycler Hybaid Omni Gene (MWG Biotech).

10xPCR-Puffer:	100 mM	Tris-Cl pH 8,85
	500 mM	KCl
	15 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1%	Triton X-100

### 3.12 Klonierung von PCR-Fragmenten

PCR-Produkte wurden "blunt end" mit Hilfe des SureClone™ Ligations Kits (Pharmacia) in den Vektor pUC18 gemäß dem Protokoll des Herstellers kloniert. Ein PCR-Fragment bekannter Konzentration wird einer Entfernung von 3'-Überhängen durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Klenow Polymerase und im gleichen Reaktionsschritt einer Phosphorylierung der 5'-Enden durch die T4 Polynukleotidkinase unterzogen. Nach Phenol/Chloroform Extraktion wird die wäßrige Phase über eine "Micro Spin" Säule gereinigt. Ein Aliquot davon wird in die Ligationsreaktion mit dem *Sma*I geschnittenen, dephosphorylierten Vektor eingesetzt.

### 3.13 Ligation

Für die effiziente Verknüpfung von DNA-Fragment und dephosphoryliertem Plasmid-Vektor werden äquimolare Mengen von beiden eingesetzt. Die Ligation erfolgt in 1xLigasepuffer mit 1 U T4-DNA Ligase in einem Volumen von 20 µl für 2-4 h bei 16°C.

### 3.14 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Die mit dieser Methode hergestellten Bakterien sind bei -80°C bis zu einem Jahr lagerbar, ohne ihre Transformationskompetenz einzubüßen.

5 ml MTB-Medium werden mit einer Bakterien-Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,3 bei 550 nm Wellenlänge inkubiert. Mit dieser Vorkultur werden 100 ml MTB-Medium angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,48 kultiviert. Die Bakteriensuspension wird auf Eis abgekühlt und bei 3000 rpm (Minifuge RF, Heraeus) für 5 min sedimentiert. Das Pellet wird in 30 ml TF1-Puffer durch Schwenken auf Eis resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach Resuspension in 4 ml TF2-Puffer auf Eis werden die Bakterien aliquotiert und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

TF1-Puffer:	0,1 M	RbCl	TF2-Puffer:	10 mM	RbCl
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>		75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	30 mM	KAc		10 mM	MOPS
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>		15%	Glycerin
	15%	Glycerin			
		pH 5,8			pH 7,0

Beide Puffer werden nach Ansetzen sterilfiltriert.

### 3.15 Transformation kompetenter Bakterien

Die eingefrorenen Bakterien werden auf Eis aufgetaut und ein Aliquot des Ligationsansatzes steril zugefügt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis werden die Bakterien für 2 min einem Hitzeschock im 37°C Wasserbad ausgesetzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Die Suspension wird mit MTB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und im Thermoblock bei 37°C unter mäßigem Schütteln 1 h inkubiert. Die Bakterien werden 5 min bei 3000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) sedimentiert, in 100 µl MTB-Medium resuspendiert und in verdünnter bzw. konzentrierter Form auf LB<sup>Amp</sup>-Platten ausgestrichen und o/n kultiviert.

### 3.16 Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen

Die Lagerung rekombinanter Bakterien über einen Zeitraum von mehreren Jahren kann bei -80°C in Medium erfolgen, das 16% Glycerin enthält. Dazu werden 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl 86% Glycerin versetzt, durch kurzes Vortexen gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 3.17 Herstellung von "plating" Bakterien

50 ml LB-Medium, das mit 0,2% Maltose ergänzt wurde, wird mit einer Bakterien-Einzelkolonie angeimpft und o/n bei 37°C kultiviert. Die Bakterien werden durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 4000 g (Minifuge RF, Heraeus) sedimentiert und das Zellpellet in sterilem 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert, dabei sollte sich eine optische Dichte von 2 bei der Wellenlänge 600 nm ergeben. Nach weiteren 60 min Inkubation unter Schütteln bei 37°C werden die Bakterien bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

### 3.18 Phagentiterbestimmung eines Plattenlysats und Phagenamplifizierung

Von dem zu testenden Plattenlysats wird in SM-Puffer eine Verdünnungsreihe beginnend mit einer 1:10 Verdünnung hergestellt. Diese Phagenverdünnungen werden mit je 100 µl "plating" Bakterien gemischt und 20 min bei 37°C inkubiert. Zu den infizierten Bakterien werden 3 ml Top Agar, der zuvor frisch angesetzt, autoklaviert und auf 47°C abgekühlt wurde, zugefügt, gemischt und auf vorgewärmte LB-Platten gegossen. Nach Kultivierung o/n bei 37°C können die sichtbaren Plaques, die durch lokale Lyse der Bakterien durch die Phagen entstehen, auf den einzelnen Platten ausgezählt werden. Der Phagentiter errechnet sich durch Multiplizierung der



gezählten Plaques mit dem Verdünnungsfaktor unter Berücksichtigung des für die Verdünnungsreihe eingesetzten Plattenlysatvolumens.

Zur Amplifizierung des Phagen werden "plating" Bakterien mit unverdünnter Phagenlösung infiziert wie beschrieben und auf die o/n kultivierte LB-Platte 3 ml SM-Puffer gegeben. Unter Schwenken o/n bei 4°C werden die freigesetzten Phagen im SM-Puffer gesammelt.

### **3.19 "Single Strand Conformation Polymorphism" (SSCP)**

Diese Methode dient dem Nachweis von Punktmutationen in DNA-Fragmenten, die idealerweise etwa 200 nt lang sind. Bei Auftrennung in einem nativen Polyacrylamidgel bilden die zuvor hitzedenaturierten PCR-Fragmente Sekundärstrukturen, die von der Basenabfolge bestimmt werden. Eine Mutation kann durch ein verändertes Laufverhalten des Fragments im Gel durch Vergleich mit der wildtypischen Sequenz detektiert werden.

Die zu untersuchenden Fragmente werden während der PCR, die in einem Volumen von 10 µl in 1xPCR-Puffer mit 50 ng DNA, 5 pmol jedes Primers, 20µM dATP, dGTP, dTTP, 2 µM dCTP und 0,75 U Taq DNA Polymerase durchgeführt wird, durch Einbau von [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP (1 µCi/Reaktion) radioaktiv markiert. Nach Beendigung der Reaktion (Temperaturprofil siehe 3.11) werden die Produkte 15-20fach mit Ladepuffer (98% Formamid, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol) verdünnt, hitzedenaturiert und auf Eis gekühlt. Die Gelelektrophorese findet unter zwei verschiedenen Bedingungen statt. Die Proben werden auf ein 6% Polyacrylamidgel geladen, das 10% Glycerin enthält. Die Elektrophorese findet bei RT für die Dauer von etwa 15 h mit 1.8 W konstanter Leistung statt. Ein zweites 6% Gel ohne Glycerin läuft bei 4°C mit 20 W für 2,5 h. Die Gele werden anschließend auf Whatman Papier getrocknet und autoradiographiert. DNA-Fragmente, die weit größer als 200 bp sind, werden vor dem Gellauf mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten.

### **3.20 Southern Analyse**

Bei der Southern Analyse wird mit Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran übertragen. Auf dieser können durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde komplementäre Sequenzen detektiert werden.

#### **3.20.1 Alkalischer Transfer von DNA auf eine Nylonmembran**

Der Transfer der DNA-Restriktionsfragmente aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgt durch Kapillarblot (modifiziert nach Southern 1975).

Nach Photographieren des Ethidiumbromid gefärbten Gels über UV-Licht wird das Gel für 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt; dies ermöglicht einen effizienten DNA-Transfer auf die Membran. Die Denaturierung der DNA im Gel erfolgt durch 30 minütige Inkubation in TS-Puffer (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl). Zwei in TS-Puffer getränkte Whatmanfilter, die mit beiden Enden in die mit TS gefüllte Blotkammer reichen, dienen als Pufferbrücke. Darauf wird luftblasenfrei das Gel gelegt. Die auf Gelgröße zurechtgeschnittene und mit TS angefeuchtete Nylonmembran wird auf dem Gel plaziert und mit einem feuchten und 3 trockenen Whatman Papieren bedeckt. Den Abschluß bildet ein Stapel saugfähigen Papiers, der mit einer Glasplatte beschwert wird. Es ist darauf zu achten, daß kein überstehendes Saugpapier in Kontakt mit der Pufferbrücke gerät. Der alkalische DNA-Transfer erfolgt über Nacht. Vor dem Trennen von Membran und Gel werden die Geltaschen mit einem Bleistift auf dem Filter markiert. Die Membran wird durch Schwenken für 15 min in NS-Puffer (0,5 M Tris-Cl pH 7,0, 1 M NaCl) neutralisiert und anschließend an der Luft getrocknet.

Um die DNA fester an den Filter zu binden, kann dieser mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (150mJ im GS Gene Linker™ von Bio-Rad) bestrahlt ("UV-Crosslinking") oder aber für 30 min bei 80°C gebacken werden.

### **3.20.2 Radioaktive Markierung eines DNA-Fragments (nach Feinberg & Vogelstein, 1983)**

Die radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde erfolgt mit einer Mischung aus Hexanukleotiden, die sich an die denaturierte DNA anlagern. Die Lücken zwischen den Hexanukleotiden werden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I unter Einbau von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP aufgefüllt.

50-100 ng der DNA-Probe in einem Volumen von 33  $\mu$ l werden im Wasserbad für 10 min bei 100°C denaturiert. Nach Abkühlung auf RT werden 10  $\mu$ l OLB-Mix, 2  $\mu$ l BSA (5 mg/ml), 3  $\mu$ l (30  $\mu$ Ci) [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP und 5 U Klenow-Polymerase hinzugefügt und der Ansatz für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 30  $\mu$ l "Blue Juice" gestoppt. Durch Gelfiltration über eine Sephadex G-50 Spin Säule werden nicht eingebaute Nukleotide von der radioaktiven Sonde abgetrennt. 1  $\mu$ l des Durchlaufs, der das markierte DNA-Fragment enthält, wird zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität nach Cherenkov im Szintillationszähler vermessen.

OLB-Mix: bestehend aus Lösungen A, B und C, die im Verhältnis 2 : 5 : 3 vorliegen

Lösung A:                      1 ml                      1,25 M Tris-Cl pH 8,0, 0,125 M MgCl<sub>2</sub>

	18 µl je 5 µl	β-Mercaptoethanol dATP, dGTP, dTTP (je 0,1 M in TE, GIBCO BRL)
Lösung B:	2 M	Hepes pH 6,6
Lösung C:	OD <sub>260</sub> <sup>90</sup> /ml	Hexanukleotide in TE (Pharmacia)
"Blue Juice":	0,1% 0,1% 10 mM	SDS Bromphenolblau EDTA
Sephadex G-50:	30 g Sephadex G-50 Fine werden in 400 ml TE eingerührt und unter Rühren über Nacht quellen gelassen. Der Überstand wird durch frisches TE ersetzt und die Suspension bei 4°C gelagert.	

### 3.20.3 Hybridisierung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wird diese zunächst mit 9 ml Hybridisierungslösung, die denaturierte Kalbsthymus-DNA enthält (100 µg/ml), bei 42°C über Nacht unter Rotation des Gefäßes vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt, je nach verwendetem Gefäß, mit 1-4 ml Hybridisierungsmix, der die hitzedenaturierte radioaktive Sonde (2-6x10<sup>6</sup> cpm/ml Hybridisierungsmix) enthält, für 16-24 h bei 42°C. Die Membran wird für 20 min bei 42°C, anschließend für 40 min bei 60-68°C mit 0,1xSSC, 1% SDS gewaschen und zur Entfernung von SDS in 0,1xSSC geschwenkt. Die Exposition erfolgt unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -80°C. Die Membran kann nach Abklingen der Sonde oder Entfernen durch Waschen bei 72-80°C mit 0,1xSSC, 1% SDS mit einer anderen Sonde rehybridisiert werden.

Hybridisierungsmix:	50%	deionisiertes Formamid
	5x	Denhardt's
	5x	SSC
	1%	SDS
	0,1%	Na-Pyrophosphat
	50 mM	Tris-Cl pH 7,5
50xDenhardt's:	1%	BSA

---

	1%	Ficoll
	1%	Polyvinylpyrrolidon
20xSSC:	3 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat pH 7,0

### 3.21 Methoden des DNA-Fingerabdrucks

#### 3.21.1 "Arbitrarily Primed PCR" (AP-PCR; Welsh & Mc Clelland, 1990)

Es handelt sich hier um eine modifizierte PCR mit nur einem Oligonukleotid als Startsequenz, dessen Basenzusammensetzung bei einem GC-Gehalt zwischen 40 und 80% beliebig wählbar ist. Es werden damit nur solche DNA-Abschnitte amplifiziert, die von entsprechenden, zum Oligonukleotid komplementären Sequenzen in einem Abstand eingerahmt werden, der eine Synthese des dazwischenliegenden Bereiches in der gewählten Zeit gestattet. Auf diese Weise wird ein für ein Individuum charakteristisches Bandenmuster, eine Art Fingerabdruck erhalten, anhand dessen sich genetische Studien verschiedener Art durchführen lassen.

Die radioaktive AP-PCR erfolgt in einem Volumen von 20 µl mit 20 ng DNA als Matrize. Gegenüber der Standard-PCR (siehe 3.11) ist die Konzentration der drei Nukleotide dATP, dGTP und dTTP auf 20 µM, die an dCTP auf 2 µM reduziert, da radioaktives [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP eingebaut werden soll, wovon 1 µCi pro Reaktionsansatz zugegeben wird. Um das Verdunsten der Probe zu verhindern, wird der Ansatz mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet.

Es wurde der PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research Inc., Massachusetts) verwendet, der mit einem Peltier-Element ausgestattet ist und deshalb für besonders niedrige Anlagerungstemperaturen geeignet ist, die bei Einsatz der nur 10 nt langen AP-PCR Primer nötig sind.

#### 3.21.2 "Amplified Fragment Length Polymorphism" (AFLP)

Diese 1995 von Vos et al. beschriebene Methode des DNA-Fingerabdrucks basiert auf der Vervielfältigung von Restriktionsfragmenten genomischer DNA durch PCR. Auf die Spaltung der DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen, einem selten und einem häufig schneidenden Enzym, üblicherweise *EcoRI* und *MseI*, folgt die Ligation von Adaptermolekülen, die zu den von *EcoRI* bzw. *MseI* generierten überhängenden Enden kompatibel sind. Mit Primern, die jeweils komplementär zu einem der Adaptermoleküle sind und mit einem zusätzlichen selektiven Nukleotid enden (+1-Primer), wird in einer ersten PCR aus der Gesamtheit vorhandener Restriktionsfragmente ein vom zusätzlichen Nukleotid abhängender Auszug von Fragmenten amplifiziert. Die zweite PCR mit Primern, die weitere

zwei selektive Nukleotide am 3'-Ende enthalten (+3-Primer), dient dazu, die Zahl der amplifizierten Fragmente, die von der Komplexität des zu untersuchenden Genoms abhängt, derart zu begrenzen, daß sie auf einem Polyacrylamidsequenzgel gut ausgewertet werden können.

Im ersten Schritt werden 500 ng genomische DNA mit je 5 U *EcoRI* und *MseI* für 1 h in 40 µl 10 mM Tris-HAc pH 7,5, 10 mM MgAc<sub>2</sub>, 50 mM KAc, 5 mM DTT und 50 ng/µl BSA gespalten. Anschließend wird in 10 µl desselben Puffers unter Zugabe von 1 mM ATP, 1U T4 DNA Ligase, 5 pMol *EcoRI*-Adapter und 50 pMol *MseI*-Adapter für 3 h bei 37 °C ligiert. 5 µl der mit 10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA pH 8,0 im Verhältnis 1:10 verdünnten Ligation werden als Matrize in der folgenden Präamplifizierung eingesetzt. Diese erfolgt in PCR-Puffer (siehe 3.11) mit je 30 ng der beiden +1-Primer, 200 µM der vier Nukleotide und 0,4 U Taq Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl.

<u>Präamplifizierung:</u>	94°C	120 sec	
	94°C	30 sec	
	20 Zyklen	56°C	60 sec
		72°C	60 sec
		72°C	120 sec

Nach erneuter 1:10 Verdünnung werden 5 µl als Matrize in die zweite PCR mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt, in der die Menge eines der beiden +3-Primer, auf 5ng reduziert ist. Dieser wird zuvor mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP radioaktiv markiert (siehe 3.9).

<u>Amplifizierung:</u>	94°C	120 sec	
	94°C	30 sec	
	12 Zyklen	65°C	30 sec
		72°C	60 sec

Die "Annealing"-Temperatur wird, mit 65°C beginnend, um 0,7°C je Zyklus reduziert.

24 Zyklen	94°C	30 sec
	56°C	30 sec
	72°C	60 sec
	72°C	120 sec

Vor dem Gellauf werden die Reaktionsprodukte mit demselben Volumen Ladepuffer (98% Formamid, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol) versetzt und 5 min hitzedenaturiert.

## **3.22 Enzymatische Sequenzanalyse von DNA**

### **3.22.1 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Die Sequenzierung klonierter Nukleotidsequenzen erfolgte nach dem enzymatischen Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977). Die alkalisch denaturierte und Ethanol-präzipitierte DNA wird unter Verwendung des Sequenase™ Kits (U.S.Biochemical) gemäß dem Protokoll des Herstellers sequenziert und durch den Einbau von [ $\alpha^{35}\text{S}$ ]dATP radioaktiv markiert. Die Reaktionsprodukte werden anschließend hitzedenaturiert und in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 3.5.3).

Größere DNA-Bereiche wurden mit Hilfe des A.L.F.™ DNA Sequencers (Pharmacia) sequenziert.

### **3.22.2 Sequenzierung von PCR-Produkten**

Durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden nach Isolierung aus einem Agarosegel und Bestimmung der Konzentration des Fragments durch modifizierte PCR sequenziert, wobei der Cycle Sequencing™ Kit (Pharmacia) verwendet wurde. Das genaue Vorgehen erfolgte nach Protokoll des Herstellers .

## **3.23 Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen**

Um Kontaminationen mit RNase zu vermeiden, werden die verwendeten Glaswaren 4 h bei 180°C gebacken, Spitzen werden autoklaviert und Lösungen mit DEPC-Wasser angesetzt.

Die RNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des TRIzol™-Reagenz (GIBCO BRL). Ca.  $5 \times 10^6$  Zellen werden mit Zellkulturmedium von der Kulturschale abgelöst, durch Zentrifugieren bei 1100 rpm für 7 min (Megafuge 1.0, Heraeus) pelletiert und in 1 ml TRIzol™ resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT werden 200  $\mu\text{l}$  Chloroform zugefügt, 15 sec von Hand geschüttelt und erneut 2-3 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wird 10 min bei 12000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert und die obere wäßrige Phase in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wird durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol gefällt und nach 10 minütiger Inkubation bei RT abzentrifugiert (10 min bei 10000 rpm, 4°C, Tischzentrifuge). Das Pellet wird mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und nach Antrocknen in geeignetem Volumen DEPC-Wasser durch Inkubation bei 60°C gelöst.

Soll die RNA in cDNA umgeschrieben und diese für PCR-Experimente eingesetzt werden, wird ein DNaseI-Verdau angeschlossen, um kontaminierende DNA zu entfernen.

### 3.24 Analyse der Genexpression durch RT-PCR

Die RT-PCR bietet aufgrund eines exponentiellen Vervielfältigungsschrittes gegenüber dem Northern Blot den Vorteil, daß auch nur schwach exprimierte Gene nachgewiesen werden können.

Im ersten Schritt wird die RNA in cDNA revers transkribiert. Dazu kann, je nach Untersuchungsziel, ein Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer, Hexanukleotide zufälliger Sequenz oder aber ein Gen-spezifischer Primer verwendet werden. 1 µg Gesamt-RNA und 1 pmol Primer werden zusammenpipettiert und 10 min auf 70°C erhitzt, dann auf Eis abgekühlt. Die Reaktion findet in 50 mM Tris-Cl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM DTT bei Einsetzen von je 500 µM der vier Nukleotide statt. Vor Zugabe von 100 U Superscript<sup>TM</sup> II RT (GIBCO BRL) wird die Reaktionsmischung zunächst auf 42°C erwärmt. Die reverse Transkription erfolgt für 1 h bei 42°C. 200 ng cDNA werden anschließend als Matrize für die PCR mit genspezifischen Primern verwendet. Zur Quantifizierung der Expression wird eine PCR mit Aktingen-spezifischen Primern durchgeführt. Hierfür werden aufgrund der starken Expression des Aktogens nur 10 ng cDNA eingesetzt.

### 3.25 Analyse von DNaseI hypersensitiven Chromosomenabschnitten

Für diese Methode werden Zellkerne benötigt, die intakte Chromosomen enthalten. Durch den kontrollierten Einsatz von DNaseI können Bereiche auf den Chromosomen aufgespürt werden, die an der Kontrolle der Expression bestimmter Gene beteiligt sind. Dies wird möglich, da genregulatorische Elemente von aktiv transkribierten Genen in Bereichen nur locker verpackter DNA liegen, die für DNasen leichter zugänglich sind als die im Vergleich dazu hochkondensierten inaktiven Chromosomenabschnitte.

Die Präparation der Zellkerne erfolgte aus Zellen der Fischzelllinien PSM und SdSr24. Die Zellen werden nach dem Ablösen zunächst mit PBS und anschließend mit Puffer H gewaschen. Das Zellpellet wird in 4 PCV ("packed cell volume") Puffer H resuspendiert und zum Anschwellen der Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellyse, deren Vollständigkeit unter dem Lichtmikroskop kontrolliert wird, erfolgt durch Zugabe desselben Volumens an Puffer L. Die intakten Kerne werden durch Zentrifugation für 7 min bei 7000 rpm und 4°C (Eppendorf Tischzentrifuge) sedimentiert und nacheinander mit Puffer W und mit DNase-Puffer gewaschen. Das Kernpellet wird unter Zuhilfenahme eines Glaspotters mit Teflonpistill in

DNase-Puffer ( $3 \times 10^7$  Zellen/ml) resuspendiert und auf 300  $\mu$ l Aliquots verteilt. Der DNaseI-Verdau erfolgt für 15 min auf Eis mit zunehmender Konzentration an Enzym (10-600 U/ml). Ein Aliquot ohne DNaseI dient als Kontrolle. Die Spaltung wird durch Zugabe von 1,7 ml Lysispuffer (siehe 3.1) gestoppt und die Reaktionen für 3 h bei 80°C im Wasserbad inkubiert. Die DNA wird einer Phenol/Chloroformextraktion unterzogen (siehe 3.1), mit Ethanol p.a. gefällt und durch Zentrifugation (11000 rpm, 4°C, Sorvall SS34) sedimentiert. Nach Lösen in 10 mM Tris-Cl pH 8,0, 0,1 mM EDTA erfolgt eine Restriktionsspaltung o/n (siehe 3.7). Die Detektion der DNaseI sensitiven Regionen wird nach Blotten der in einem Agarosegel aufgetrennten Fragmente und Hybridisierung der Membran mit einer geeigneten Sonde möglich.

Puffer H:	10 mM	HEPES-KOH pH 7,9
	0,1 mM	EDTA pH 8,0
	0,1 mM	EGTA
	0,75 mM	Spermidin
	0,15 mM	Spermin
	1 mM	DTT
	1 mM	Benzamidin
	0,5 mM	PMSF
Puffer L:	10 mM	Tris-Cl pH 7,5
	15 mM	NaCl
	60 mM	KCl
	0,15 mM	Spermin
	0,5 mM	Spermidin
	1 mM	EDTA
	0,1 mM	EGTA
	0,2%	Nonidet NP-40
	5%	Sucrose
Puffer W:	10 mM	Tris-Cl pH 7,5
	15 mM	NaCl
	60 mM	KCl
	0,15 mM	Spermin
	0,5 mM	Spermidin
	10%	Sucrose
	DNase-Puffer:	10 mM
	10 mM	NaCl



3 mM

MgCl<sub>2</sub>

### 3.26 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.26.1 Präparation von Proteinextrakten aus Fischgewebe

Der Nachweis von Esterase1-Isoformen bei Rückkreuzungsbastarden erfolgte aus Augen oder aber Flossengewebe, wenn der Fisch für die Zucht eingesetzt werden sollte. Die Proteine werden durch Homogenisieren des Gewebes in 60-80 µl eisgekühltem Millipore H<sub>2</sub>O in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Glaspistill gelöst und unlösliche Gewebereste durch Zentrifugieren (30 min, 13000 rpm, 4°C, Eppendorf Tischzentrifuge) abgetrennt. Der Proteinextrakt wird bis zur Weiterverwendung auf Eis gestellt.

#### 3.26.2 Stärkegelelektrophorese (modifiziert nach Siciliano & Shaw, 1976)

Zur Herstellung 13%iger Stärkegele werden 39 g hydrolysierte Kartoffelstärke (Sigma) mit 300 ml 0,1xTVB-Puffer in einer 1 l Saugflasche unter Rühren solange erhitzt, bis die zuerst zähe Lösung dünnflüssiger und klarer wird. Nach Entgasen mit der Wasserstrahlpumpe wird sie in die vorbereitete und mit einem Gelkamm versehene Gelform (20x26 cm, 6 mm dicke Spacer, Eigenkonstruktion) gegossen. Ist die Stärke fest geworden, wird das Gel auf 4°C vorgekühlt.

Die Proteinextrakte werden mit 1/4 Volumen Auftragspuffer versetzt, in die Taschen des Gels pipettiert und diese mit verflüssigtem Exsikkatorfett abgedichtet. Schwämme an den Enden des Gels ermöglichen den Fluß der Ionen durch das Gel von einer Pufferkammer zur anderen. Die Elektrophorese erfolgt für 4-5 h bei 200 V und 4°C mit 1xTVB als Laufpuffer. Eine Überhitzung des Gels wird durch Auflegen eines mit Eis gefüllten Beutels verhindert.

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel mit einer Nylonschnur in seiner Dicke halbiert, was zum einen den Diffusionsweg der Färbesubstanzen verkürzt, zum anderen eine Färbung mit verschiedenen Substraten erlauben würde.

1xTVB-Puffer:	0,5 M	Tris-Cl pH 8,0
	0,65 M	Borsäure
	16 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA

Auftragspuffer:	0,1 M	Tris-Cl pH 8,0
	10 mM	β-Mercaptoethanol

99%	Glycerin
0,25%	Bromphenolblau

### 3.26.3 Nachweis von Isoenzymen durch Substratfärbung (Shaw & Prasad, 1970)

Die Detektion von Esterase-Isoenzymen kann durch einen Nachweis ihrer Aktivität erfolgen. Dazu wird den Enzymen  $\alpha$ -Naphthylpropionat als Substrat angeboten, das in  $\alpha$ -Naphthol umgesetzt wird. Dieses bildet mit dem Farbstoff Fast Blue RR eine farbige Verbindung, die die Lokalisation der Esterasen sichtbar werden läßt.

150 mg des Farbstoffs werden in 150 ml 0,1 M Tris pH 7,0 gelöst, dieselbe Menge des in 3 ml Aceton aufgenommenen Substrats werden hinzugefügt und das Gel in dieser Lösung für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert.

## 3.27 Zellbiologische Methoden

### 3.27.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle verwendeten Zellkulturmedien werden als Pulvermedien bezogen, mit der auf der Verpackung angegebenen Menge  $\text{NaHCO}_3$  ergänzt und in Millipore- $\text{H}_2\text{O}$  angerührt. Nach Einstellen des pH-Werts auf 7,2-7,4 wird das Medium sterilfiltriert.

PSM-Zellen werden bei 28°C mit 5%  $\text{CO}_2$ -Gehalt der Luft in F12-Medium kultiviert, das vor Gebrauch mit 10% FCS und 1% einer Mischung aus Penicillin und Streptomycin ergänzt wird. Die Zellen werden bei konfluentem Wachstum 1:2 gesplittet. SdSr24-Zellen wachsen bei gleichen Bedingungen in DMEM-Medium, dem vor Gebrauch 10% FCS und  $\frac{1}{10}$  Volumen 10xSC zugesetzt wird. Bei konfluentem Wachstum werden die Zellen, die sich nicht durch einfaches Abspülen von der Kulturschale ablösen lassen, mit EDTA gewaschen, mit 1x Trypsin/EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:2 umgesetzt.

10xSC:	50%	FCS (GIBCO)
	10%	Penicillin/Streptomycin (GIBCO BRL)
	10%	Natriumpyruvat (GIBCO)
	10%	nicht essentielle Aminosäuren
	0,5%	$\beta$ -Mercaptoethanol (GIBCO)
EDTA:	0,5 mM	EDTA in 1xPBS
10x(Fisch) PBS:	100 mM	NaCl
	19,5 mM	KCl

---

59 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
11 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH 7,3 - 7,4	

### 3.27.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfriermedium wird vorbereitet, indem man das normalerweise verwendete Medium mit 10% fötalem Kälberserum und 10% DMSO ergänzt und auf 4°C vorkühlt. Die noch nicht konfluenten Zellen werden wie üblich von der Kulturschale abgelöst, pelletiert und durch einmaliges Hochziehen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen werden in die ebenfalls vorgekühlten Einfriervials pipettiert und diese o/n auf -80°C gestellt. Die Dauerlagerung erfolgt bei -180°C.

Das Auftauen der Zellen soll aufgrund der Toxizität von DMSO möglichst schnell erfolgen. Die im 37°C Wasserbad aufgetauten Zellen werden in 5 ml Medium pipettiert und die Zellen durch Zentrifugieren bei 1100 rpm für 7 min (Megafuge 1.0, Heraeus) pelletiert. Das Zellpellet wird in 10 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellen o/n kultiviert. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt, um restliche Spuren von DMSO zu entfernen.