

4 METHODEN

4.1 Isolierung von DNA

4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach der „Rapid-Boiling-Methode“ (nach Evans und Wahl 1987)

1,5 ml einer Übernachtskultur in LB-Medium/Antibiotikum werden bei 13.000 rpm 2 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 300 µl STET-Lösung aufgenommen und 2 min in einem Wasserbad gekocht. Die lysierten Bakterien werden nach kurzem Abkühlen 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit einem Zahnstocher entfernt. Aus dem Überstand wird die Plasmid-DNA mit 300 µl Isopropanol 2 min bei RT gefällt und für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das DNA Pellet wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl TE gelöst.

LB-Medium	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	5 g NaCl
	ad 1 l H ₂ O
	Antibiotikazugabe in Abhängigkeit des Vektors (30 µg/ml Kanamycin; 100 µg/ml Ampicillin; 12,5 µg/ml Chloramphenicol)
STET-Lösung	8 % Glucose
	5 % Triton X-100
	50 mM EDTA
	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA

4.1.2 Isolierung von DNA aus PAC-Klonen

Zur Isolierung der DNA aus PAC-Klonen werden diese über Nacht in LB-Medium/30 µg/ml Kanamycin kultiviert. 500 µl dieser Übernachtskultur werden in 15 ml frisches LB-Medium/30 µg/ml Kanamycin überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 bei 37°C inkubiert. Um ein LacZ abhängiges Replicon im PAC-Vektor zu aktivieren wird anschließend mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert und weitere 4 – 6 h bei 37°C geschüttelt. Die Präparation der DNA erfolgt nach dem Protokoll der alkalischen Lyse.

4.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA durch „Alkalische Lyse“ (nach Birnboim 1983)

15 ml einer Übernachtskultur werden bei 4000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 250 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl Lösung II und 375 µl Lösung III werden die ausgefällten Proteine 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) ausgeschüttelt. Aus der wässrigen Phase wird die DNA unter Zugabe von 800 µl Isopropanol 2 min bei RT gefällt und 15 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Nach Waschen mit 70 %igem Ethanol und Trocknen wird das DNA-Pellet in 50 µl TE-Puffer gelöst und mit 0,5 µl RNase (10 mg/ml) versetzt.

Lösung I	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl, pH 8 10 mM EDTA 5 mg/ml Lysozym
Lösung II	200 mM NaOH 1 % SDS
Lösung III	3 M KOAc, pH 4,9

4.1.4 Isolierung von DNA über Säulen

Zur Isolierung von PAC- oder Plasmid-DNA für eine spätere Sequenzierung oder Klonierung wurde eine Präparation über Säulen durchgeführt. Hierfür wurde ein Kit von Clontech bzw. Macherey und Nagel verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

4.1.5 Isolierung von YAC-DNA aus Hefezellen

100 ml einer 36 h-Kultur (AHC-Medium, 30°C) werden 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und das erhaltene Pellet in 10 ml 0,05 M EDTA-Lösung resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (10 min, 5000 rpm) wird das Pellet in 8 ml SCE/70 U YLE aufgenommen und 1 h inkubiert. Anschließend folgt eine Sedimentierung (5 min, 5000 rpm), das erhaltene Pellet wird in 6,4 ml TE-Puffer, 600 µl EDTA, 600 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,6) resuspendiert. Nach Zugabe von 160 µl 20 %igem SDS wird die Suspension 15 min bei 68°C inkubiert. Anschließend werden 2,7 ml einer 3 M KOAc-Lösung hinzugegeben und 20 min auf Eis stengelassen. Die so ausgefällten Proteine werden abzentrifugiert (20 min, 15000 rpm) und die DNA aus dem Überstand mit 1 Volumen Isopropanol gefällt. Die DNA wird abzentrifugiert (10 min, 10000 rpm) und das Pellet mit 96 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 1 ml TE/100 µg RNase 10 min bei 68°C gelöst.

Zur Aufreinigung wird zuerst mit 0,5 Volumen Phenol und anschließend mit 0,5 Volumen Chloroform extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit 67 µl 5 M NaCl und 1,23 ml 96 %igem Ethanol 2 h bei -20°C gefällt. Die abzentrifugierte DNA (20 min, 14000 rpm) wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl TE-Puffer aufgenommen.

AHC-Medium	1,7 g Nitrogenbase 5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 g Casaminosäuren 0,02 g Adenin 20 g Glucose ad 1 l H ₂ O
SCE	1 M Sorbitol 10 mM EDTA 100 mM C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2H ₂ O

4.1.6 Isolierung genomischer DNA aus Plazenta

Plazentagewebe wird mit einem Skalpell von der Nabelschnur befreit und unter Zugabe von Extraktionspuffer auf 1 l Gesamtvolumen in einem Mixer zerkleinert. Nach Hinzufügen von 50 mg Proteinase K und Auffüllen mit SDS zu einer Endkonzentration von 0,2 % wird die Suspension über Nacht bei 50°C inkubiert. Nach erneutem Verflüssigen im Mixer werden 1/3 Volumen einer 6 M NaCl Lösung hinzugefügt und gemischt. Zelltrümmer werden 15 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert und die DNA aus dem Überstand mit 1 Volumen Isopropanol gefällt. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wird die DNA sedimentiert (15 min, 10.000 rpm) und das Pellet in 200 ml TE-Puffer aufgenommen. Zur Aufreinigung wird die gelöste DNA mit 0,5 Volumen Phenol und einer Endkonzentration von 0,1 M NaCl ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wird so oft mit 0,5 Volumen Chloroform extrahiert, bis eine farblose Lösung entsteht. Anschließend wird die DNA mit 0,6 Volumen Isopropanol gefällt und auf einen Glashaken gewickelt. Nach kurzem Waschen in 70 %igem Ethanol und Trocknen an der Luft wird die DNA in 50 ml TE-Puffer gelöst. Mit Hilfe von Ultraschall wird die genomische DNA zerkleinert und auf eine Endkonzentration von ca. 5 mg/ml DNA und 5 x SSC (20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat, pH, 7,0) gebracht.

Extraktionspuffer 20 mM Tris-HCl, pH 8
 100 mM NaCl
 25 mM EDTA

4.1.7 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde ein Gelextraktions-Kit (Nucleobond; Macherey und Nagel) verwendet und gemäß den Angaben des Herstellers verfahren.

4.2 Isolierung von RNA (nach Chomczynski und Sacchi 1987)

4.2.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben

Das gefrorene Gewebe wird in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser zerkleinert und anschließend in 5-10 Volumen Lysislösung homogenisiert. Nach Hinzufügen von 0,1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) wird die Suspension 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 9.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren mit 1 Volumen Isopropanol bei -20°C etwa 30 min gefällt. Das abzentrifugierte RNA-Pellet wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in DEPC-H₂O gelöst.

Lysislösung 50 ml Guanidinisocyanat-Lösung aus:
 1,7 ml 0,75 M Natriumcitrat, pH 7,0
 23,6 g Guanidinisocyanat
 5 ml 2 M Natriumacetat, pH 4,0
 50 ml H₂O gesättigtes Phenol
 350 µl 2-Mercaptoethanol

DEPC-H₂O: 1 ml DEPC in H₂O aufschütteln, nach 1 d Inkubation autoklavieren

4.2.2 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

Zellen einer 6 cm Gewebekulturschale werden mit 2,8 ml TRIzol (Gibco BRL) überschichtet und 5 min bei RT inkubiert. Mit einem Gummischaber werden die Zellen von der Kulturschale abgelöst und zu je 900 µl in Reaktionsgefäße verteilt. Es werden 180 µl Chloroform hinzugefügt und 3 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wird der Ansatz 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wird die RNA mit 460 µl Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Nach Sedimentierung der RNA durch Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 10 min wird das Pellet mit 900 µl 75 %igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser gelöst.

4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Menge aus den einzelnen Präparationen wird mit Hilfe eines Spektralphotometers die optische Dichte gemessen. Folgende Werte liegen der Umrechnung in die jeweiligen Konzentrationen zugrunde.

DNA (doppelsträngig)	OD ₂₆₀ =1 entsprechen 50 µg/ml
RNA	OD ₂₆₀ =1 entsprechen 40 µg/ml

4.4 PCR-Techniken

4.4.1 Konventionelle PCR

Um zu testen, ob ein bestimmtes DNA-Fragment in einem PAC-Klon vorhanden ist oder nicht, werden für diese Region spezifische Oligonukleotide eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgt nach folgendem Schema:

Ansatz	5 µl 10 x PCR-Puffer 0,2 µl NTPs (je 25 mM) je 10 pmol Oligonukleotid (forward und reverse) 100 - 200ng DNA 2 U Taq-Polymerase ad 50 µl H ₂ O
Programm	5 min 94°C 1 min 94°C 1 min 55°C (M16, 282, D11S935) bzw. 60°C (CP5) 1 min 72°C 25 Zyklen

Für die Oligonukleotide D11S582 (forward und reverse) werden dem PCR-Ansatz MgCl₂ einer Endkonzentration von 2,5 mM zugefügt. Für die Amplifizierung wird folgendes Programm einer touch down-PCR gewählt:

5 min 94°C
30 sec 94°C
30 sec 65-55°C
30 sec 72°C
10 Zyklen, je 1°C weniger pro Zyklus
30 sec 94°C
30 sec 55°C
30 sec 72°C
20 Zyklen

4.4.2 Alu-PCR (nach Wilgenbus 1995)

Zur Amplifizierung menschlicher genomischer DNA aus YAC-Klonen werden Oligonukleotide verwendet, die repetitive Sequenzen (Alu-Sequenzen) erkennen. Die PCR-Ansätze werden mit folgenden Primer-Kombinationen durchgeführt:

AGK34 und LINE1; Ale1 und LINE1; Ale3 und LINE1; Ale1 und Ale3

Ansatz	4 µl 10 x PCR-Puffer je 10 pmol Oligonukleotid 100 – 200 ng DNA 0,2 µl dNTPs (je 25 mM) 1 U Taq-Polymerase 0,125 U Pwo-Polymerase ad 40 µl H ₂ O
Programm	5 min 94°C 30 sec 94°C 30 sec 55°C (für Kombinationen mit LINE1) 65°C (Ale1/Ale3) 2 min 30 sec 72°C 35 Zyklen

Alu-PCR-Proben wurden von Beate Gawin zur Verfügung gestellt.

4.4.3 Isolierung von Endproben

End-PCR (nach Kere et al. 1992)

Etwa 1 µg PAC-DNA oder YAC-DNA werden in einem 18 µl Ansatz für 1 h bei 37°C mit 2 U eines Restriktionsenzym, das glatte Enden produziert (RsaI, AluI, ScaI, PvuII, HincII), verdaut. Die Pufferbedingungen werden nach Angaben des Herstellers gewählt. Für die spätere PCR wird an die entstehenden Fragmente ein Linker angebracht, um neben dem Vektor-Primer einen zweiten spezifischen Primer zu Verfügung zu haben. Hierfür werden 1 µl eines Linker-Mixes (15ng LIS1, 7ng LIS2/µl bei 68°C denaturiert und auf RT abgekühlt) zum Restriktionsansatz zugegeben und mit Hilfe von 2 U T4-Ligase in 1 x Ligationspuffer ligiert.

Für die anschließend folgende PCR wird folgender Ansatz gewählt:

1 µl Ligationsansatz
4 µl 10 x PCR-Puffer
0,2 µl dNTPs (je 25 mM)
15 ng LIS1
150 ng vektorspezifisches Oligonukleotid
ad 40 µl H₂O

Für die Isolierung der Enden aus PAC-Inserts wird der pBsT7 bzw. sp6 Primer, für die YAC Inserts der UR bzw. UL Primer verwendet.

Programm 30 sec 94°C
 30 sec 55°C (sp6, pBsT7) bzw. 65°C (UR, UL, RA2, LS2)
 1 min 30 sec 72°C
 30 Zyklen

Für die End-PCR der YAC-Enden wird eine zweite PCR mit den weiter innen liegenden Primern RA2 bzw. LS2 durchgeführt, um die Spezifität des PCR-Produkts zu erhöhen.

DOP-Vektor PCR (nach Wu et al. 1996)

Für die DOP-Vektor-PCR wird im ersten Schritt ein degenerierter Primer bei niedriger Schmelztemperatur verlängert. Unter diesen Bedingungen bindet der Primer unspezifisch an verschiedenen Stellen des Vektors sowie des Inserts.

Ansatz 5 µl 10 x PCR-Puffer
 0,2 µl NTPs (je 25 mM)
 10 pmol DOP-Primer
 100-200 ng DNA
 2 U Taq-Polymerase
 ad 50 µl H₂O
Programm 5 min 95°C
 2 min 30°C
 10 min 72°C

Im Anschluß daran werden 30 pmol des für den PAC-Vektor spezifischen Oligonukleotids (pCYPAC2-01 bzw. pCYPAC2-02) zugegeben und die DNA amplifiziert. Da jetzt eine höhere Schmelztemperatur verwendet wird, kann auch der degenerierte DOP-Primer spezifisch binden. Die vektorspezifischen Primer liegen so, daß in der folgenden PCR nur die Insert-Enden amplifiziert werden können.

Programm 30 sec 94°C
 30 sec 58 °C
 2 min 72°C
 30 Zyklen

In einer zweiten PCR mit weiter innen gelegenen Oligonukleotiden (sp6 und pBsT7) wird das PCR-Produkt spezifiziert.

Ansatz	5 µl 10 x PCR-Puffer 0,2 µl NTPs (je 25 mM) 10 pmol DOP-Primer 1 µl einer 1:100 Verdünnung aus dem ersten PCR-Produkt 10 pmol vektorspezifisches Oligonukleotid (sp6 beim Produkt aus pCYPAC-02; pBsT7 beim Produkt aus pCYPAC-01) 2 U Taq-Polymerase ad 50 µl H ₂ O
Programm	30 sec 94°C 30 sec 55°C 2 min 72°C 30 Zyklen

4.5. Gelelektrophoresen

4.5.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente werden 0,8-2 %ige Agarosegele in 1 x TAE-Puffer eingesetzt. Zum Nachweis der DNA werden dem Gel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Vor dem Laden werden die Proben mit 2-3 µl 6 x GL-Puffer versetzt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente werden entsprechende Marker mit aufgetragen (pBS HaeIII, λ EcoRI/HindIII, λ HindIII). Für die Auftrennung wird eine Spannung von 6-8 V/cm für 1-3 h bzw. 2-3 V/cm für 12-14 h angelegt. Die DNA-Fragmente werden anschließend im UV-Licht (254 nm) analysiert.

Für DNA-Fragmente, die als Sonden für radioaktive Hybridisierungen benötigt werden, wird ein Gel mit LMP-Agarose verwendet, anschließend werden die aufgetrennten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und in 150 µl TE-Puffer gelöst.

50 x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat, pH 7,5-8,0 50 mM EDTA
6 x GL-Puffer	15 % Ficoll 0,25 % Bromphenolblau 6 mM EDTA, pH8

Zur Auftrennung größerer DNA-Fragmente ab etwa 40 kb dient eine Pulsfeld-Gelapparatur (Stratagene RAGE). Hierfür werden 1 %ige Agarosegele in 0,25 x TBE Puffer verwendet. Als Marker für Fragmente zwischen 10 und 250 kb dient der Mid Range PFG Marker I (NEB). Zur Auftrennung wird folgendes Programm verwendet:

Spannung:	2 V/cm
Pulszeit:	15-5 sec linear abnehmend
Laufzeit:	19 h
Temperatur:	9-12°C

Nach dem Lauf wird das Gel in 0,25 x TBE-Puffer/0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und im UV-Licht analysiert. Werden Agarosegele für eine spätere Hybridisierung benötigt, so werden sie auf Whatman-Papier im Vakuum 2 h bei 60 °C getrocknet.

10 x TBE	0,9 M Tris
	0,8 M H ₃ BO ₃
	25 mM EDTA

4.5.2 RNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung von Northern Blots werden je 15 µg RNA pro Spur elektrophoretisch in einem 1,3 %igem Agarosegel mit 1,1 % Formaldehyd und 1 x MOPS-Puffer aufgetrennt. Muß die RNA konzentriert werden, wird mit 1 Volumen 5 M Lithiumchlorid für 20 min auf Eis gefällt und anschließend abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wird zum Laden in 20 µl RNA-GL-Puffer aufgenommen und 15 min bei 68°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgt bei 8-9 V/cm für 3 h. Zum Färben der RNA wird das Gel 20 min in 1 x MOPS mit 1,0 µg/ml Ethidiumbromid inkubiert und danach für 30 min in H₂O entfärbt.

20 x MOPS-Puffer (pH7,0-7,5)	0,4 M MOPS
	0,1 M Na-Acetat
	10 mM EDTA
RNA-GL-Puffer	1 x MOPS
	0,7 % Formaldehyd
	50 % Formamid

4.6 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

4.6.1 Southern Blotting

Die in Agarosegelen aufgetrennten DNA-Fragmente werden in alkalischer Denaturierungslösung auf ungeladene Nylonmembranen übertragen. Der Transfer erfolgt etwa 6-12 h mit Hilfe der Kapillar-Blot-Technik nach Southern (Southern 1975). Anschließend wird die Membran 1 min in 40 mM Na-Phosphatpuffer (Church und Gilbert 1984) neutralisiert.

Denaturierungslösung	1,5 M NaCl
	0,5 M NaOH

4.6.2 Northern Blotting

Zum Transfer der auf Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennten Gesamt-RNA wird die Kapillar-Blot-Technik nach Southern angewandt. In 10 x SSC wird die RNA für 12-14 h auf ungeladene Nylonmembranen übertragen. Im Anschluß daran wird die Membran 1 min in 40 mM Na-Phosphatpuffer (Church und Gilbert 1984) gewaschen.

Zur Fixierung der DNA bzw. RNA wird die Membran mit UV-Licht (245 nm/150 mJ) bestrahlt (GS Gene linker, Biorad) und 30 min bei 80°C gebacken.

20 x SSC	3 M NaCl
	0,3 M Na-Citrat, pH 7,0

4.6.3 Herstellung von Koloniefiltern

Zur Übertragung von Plasmid-DNA auf Nylonmembranen werden Klone aus einer Mikrotiterplatte auf ungeladene Nylonmembranen gestempelt und 12-14 h auf Agar bei 37°C inkubiert. Die über Nacht gewachsenen Kolonien werden 10 min mit einer Denaturierungslösung, 10 min mit Neutralisationslösung und anschließend 10 min mit 50 mM Natrium-Phosphatpuffer behandelt. Um die DNA zu fixieren, werden die Membranen 30 min bei 80°C gebacken und danach mit UV-Licht (245 nm/50 mJ) bestrahlt (GS Gene linker, Biorad).

Denaturierungslösung	siehe unter 4.6.1
Neutralisationslösung	0,5 M Tris-HCl (pH7,5)
	0,5 M NaCl
Na-Phosphat-Puffer	0,5 M Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O
	0,34 % H ₃ PO ₄

4.7 Radioaktive Markierung von DNA

Für die Hybridisierung benötigte Proben werden nach der „random priming“-Methode (Feinberg und Vogelstein 1984) radioaktiv markiert. Hierfür werden etwa 200 ng der Sonde in einem Volumen von 35 µl durch Kochen (5 min) denaturiert. Nach kurzem Abkühlen werden 5 µl OLB-mix, 1 U DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) und 0,5 - 1,5 µCi αP³²-dCTP zugegeben. Der Ansatz wird für 3 h bei RT inkubiert.

OLB-mix	50 OD ₂₆₀ Hexanukleotide (Pharmacia)
	1 ml Tris 1M, pH 7,5
	200 µl 1 M MgCl ₂
	20 µl 1M DTT
	40 µl BSA (25mg/ml)
	je 10 µl 0,1M dATP, dGTP, dTTP
	ad 2 ml H ₂ O

4.8 Hybridisierung

4.8.1 Filterhybridisierung

Die zu hybridisierenden Filter werden in möglichst kleinem Volumen 5 % Church-Puffer und 50 µg/ml denaturierter Lachssperma-DNA luftblasenfrei in Plastiktüten eingeschweißt und bei 68°C für 30 min vorhybridisiert. Die zuvor radioaktiv markierte Sonde wird zur Kompetierung repetitiver Sequenzen mit 50 µl Plazenta-DNA in 5 x SSC versetzt, 10 min gekocht und etwa 30 min bei 68°C vorinkubiert. Die

so behandelte Probe wird zu den eingeschweißten Filtern gegeben und 12 -14 h bei 68°C inkubiert. Im Anschluß daran werden die Filter 3 x 15 min in einer Lösung mit 40 mM Natrium-Phosphatpuffer und 1 %igem SDS gewaschen. Zur Detektion der markierten DNA-Probe wird ein Röntgenfilm aufgelegt und in Abhängigkeit der zuvor gemessenen Strahlung 6 h –4 d bei -80°C exponiert.

Na-Phosphat-Puffer	0,5 M Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	0,34 % H ₃ PO ₄
5 % Church-Puffer	0,5 M Na-Phosphatpuffer
	5 % SDS
	1 mM EDTA

4.8.2 Hybridisierung von Agarosegelen (nach Luro und Laigret 1995)

Das getrocknete Gel wird 30 min in einer 0,5 M NaOH/0,15 M NaCl-Lösung bei RT denaturiert und anschließend 2 x 30 min in 0,5 M Tris (pH8)/0,15 M NaCl neutralisiert. Zur Vorhybridisierung wird das Gel in 5 % Church-Puffer in eine Plastiktüte eingeschweißt und 30 min bei 68°C inkubiert.

Die radioaktiv markierte Sonde wird nach Zugabe von 17 µl 1 N HCl und 15 µl TE-Puffer 60 min bei RT depurinert. Zur Neutralisation werden 17 µl 1 M NaOH zugegeben und anschließend 10 min gekocht. Die so behandelte Probe wird nun zum Gel pipettiert und bei 68°C für 12 -14 h hybridisiert. Die Waschschrte und Autoradiographie erfolgen wie zuvor bei der Filterhybridisierung beschrieben.

4.9 Klonierungstechniken

4.9.1 Restriktionsverdau

Die zu klonierende DNA sowie der benötigte Vektor werden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym gemäß den Angaben des Herstellers gespalten.

4.9.2 Ligation

Vom linearisierten Vektor werden zur Vermeidung von Religationen die 5'-Phosphatenden mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase („calf intestinal phosphatase“) abgespalten. Hierzu werden 1 U des Enzyms zum Restriktionsansatz gegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung des Enzyms wird der Ansatz entweder mit Phenol/Chloroform extrahiert oder, nach Auftrennung auf einem Agarosegel, die ausgeschnittene Bande aufgereinigt. Die Aufreinigung des Restriktionsansatzes der Insert-DNA erfolgt in gleicher Weise ohne die Behandlung mit Alkalischer Phosphatase.

Für die Ligation wird abhängig von der Größe des Vektors sowie des Inserts der Vektor im Verhältnis 1:1 bis 1:10 bei kleineren Insertfragmenten eingesetzt. Es werden zwischen 200-400 ng Vektor bzw. Insert-DNA in einem 10 µl-Ansatz mit 2 U des Enzyms T4-Ligase und 1 x Ligationspuffer 3 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

4.9.3. Transformation

Vom Ligationsansatz werden 3 µl zu 50 µl kompetenter Zellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 sec Hitzeschock bei 42°C werden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Transformationsansatz 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Transformation auf LB-Platten mit dem zur Selektion notwendigem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.9.4 Herstellung kompetenter Zellen

50 ml SOB-Medium werden mit 1 ml einer Übernachtskultur E.coli DH5α angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,7 bei 37°C geschüttelt. Die Zellen werden nun 5 min bei 3.500 rpm abzentrifugiert, mit 5 ml kaltem TFB gewaschen und in frischem TFB aufgenommen. Dabei errechnet sich die Menge des benötigten TFB-Mediums aus $1 \text{ OD}_{600} \times 6 = x \text{ ml}$. Die Suspension wird anschließend 15 - 30 min auf Eis inkubiert, 35 µl DnD/ml TFB-Medium zugegeben und weitere 10 - 20 min auf Eis belassen. Dieser Schritt wird einmal wiederholt, wonach die Bakterien zur Transformation verwendet werden können. Zur längeren Aufbewahrung werden diese aliquotiert und bei -80°C weggefroren.

SOB-Medium	20 g/l Bacto-Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	2,5 mM KCl
	10 mM NaCl
	pH 7,6 mit KOH eingestellt
	10 ml/l 1 M MgSO ₄ kurz vor Gebrauch zugeben
DnD	1 M DTT
	90 % DMSO
	10 mM KOAc, pH 7,5
TFB	100 mM KCl
	45 mM MnCl ₂ 4 H ₂ O
	3 mM Hexamin Co(III)Chlorid
	10 mM MES/KOH, pH 6,3

4.10 Zellkulturtechniken

4.10.1 Kultivierung

Die verwendeten COS7-Zellen werden in DMEM/GlutaMAX-I Medium mit 5 % fötalem Kälberserum (FCS), 10.000 U/ml Penicillin und 10.000 U/ml Streptomycin bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

4.10.2 Transfektion

COS-7 Zellen werden in einer 6 cm Schale bei einer Konfluenz von 70 –80 % transfiziert. 5 min vor Zugabe der Transfektionslösung wird das Medium auf eine Endkonzentration von 25 µM Chloroquin gebracht.

Transfektionslösung	5 µg DNA 61 µl CaCl ₂ (2M) ad 500 µl H ₂ O 500 µl 2 x HBS unter heftigem Mischen zupipettieren
2 x HBS	8 g NaCl 6,5 g HEPES 10 ml Na ₂ HPO ₄ , pH auf 7,00 einstellen

Die Transfektionslösung wird auf die Zellen getropft und die Platten werden 16 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wird das Transfektionsmedium gegen frisches DMEM-Medium mit 10 % FCS ausgetauscht.

4.11 Exontrapping

Über Säulen (Nucleobond) aufgereinigte PAC-DNA wird mit Sau3AI partiell und mit BglII, PstI, StuI komplett verdaut. Der Partialverdau mit Sau3AI wird auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Banden einer Größe von 2 – 6 kb ausgeschnitten und gereinigt. Die aufgereinigte DNA wird ebenso wie die restlichen Restriktionsansätze in den Exontrapvektor pSPL3-B kloniert. Von den erhaltenen Kolonien werden Stichproben auf Insertion des Vektors getestet. Die übrigen Klone werden mit einem Gummischaber von der Agarplatte gekratzt und die Gesamt-DNA über Säulen (Nucleobond) isoliert. Die DNA wird in COS-7-Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wird die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und revers transkribiert.

Ansatz	20 pmol SA2 5 µg RNA ad 12 µl DEPC-H ₂ O
--------	---

Nach einer Inkubation von 5 min bei 70°C werden folgende Komponenten zugegeben:

4 µl first strand buffer (Boehringer)
1 µl 0,1 M DTT
1 µl dNTP mix (10 mM)
3,5 U RNAGuard (Boehringer)

Der Ansatz wird für 2 min bei 42°C inkubiert und anschließend 1 µl SuperScript II (200 U/µl, GibcoBRL) hinzupipettiert und für 30 min bei 42°C inkubiert. Die Produkte aus der reversen Transkription werden folgendermaßen amplifiziert:

Ansatz	10 µl der reversen Transkription 10 µl 10 x PCR-Puffer 0,2 µl dNTPs (je 25mM) 10 pmol SA2 10 pmol SD6 1 U Taq-Polymerase ad 100 µl H ₂ O
--------	---

Programm 1 min 94°C
 1 min 55°C
 2 min 72°C
 30 Zyklen

Um Produkte ohne Insert auszuschließen wird das erhaltene PCR-Produkt mit BstXI verdaut und anschließend mit weiter innen liegenden Primern erneut amplifiziert.

Ansatz 2 µl des Restriktionsverdaus mit BstXI
 10 pmol SA4
 10 pmol SD2
 10 µl 10 x PCR-Puffer
 0,2 µl NTPs (25 mM)
 1 U Taq-Polymerase
 ad 100 µl H₂O

Programm 45 sec 94°C
 1 min 63°C
 2 min 72°C
 30 Zyklen

Nach Klonierung des PCR-Produkts in den pDK101-Vektor mit XcmI werden Einzelklone zur weiteren Analyse in Mikrotiterplatten gepickt.

4.12 Sequenzierung

Für die Sequenzierung eines DNA-Fragments aus einem Plasmid-Vektor werden entsprechende fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (sp6, pBsT7, T3L, M13) verwendet und mit Hilfe des Thermosequenzase fluorescent labelled primer sequencing-Kits (Amersham Pharmacia) entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren. Die fertigen Proben werden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit einem Laser detektiert (ALF, ALF-express, Pharmacia). Die Sequenzierungen wurden zu einem großen Teil von Cuong Kien und Kathrin Meyer durchgeführt.

4.13 Sequenzanalysen

Die erhaltenen Sequenzen werden über die Software des GCG mit GenBank und der EMBL Datenbank verglichen.

4.14 In situ Hybridisierung

4.14.1 Herstellung der RNA-Probe

Für die Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Proben werden 10 µg der aufgereinigten (Nucleobond minipräp-Kit) cDNA-Probe linearisiert. Für die Herstellung der sense-Probe wird am 3'-Ende, für die antisense-Probe am 5'-Ende des cDNA-Inserts geschnitten. Der Restriktionsansatz wird einmal mit je 0,5 Volumen Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und anschließend mit 1

Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Zum Fällern werden 1/10 Volumen 3 M NaOAc und 2,5 Volumen 100 %iges Ethanol zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei -80°C wird die DNA abzentrifugiert, das Pellet wird in 75 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 μl DEPC-Wasser gelöst. Für den Transkriptionsansatz werden folgende Komponenten zusammengegeben:

- 2 μg der linearisierten cDNA
- 2 μl Transkriptionspuffer (Boehringer Mannheim)
- 1,5 μl Dig labelling mix (Boehringer Mannheim)
- 0,8 μl RNAGuard (Boehringer Mannheim)
- 1,2 μl RNA-Polymerase (20 U/ μl T3,T7 oder SP6) (Boehringer Mannheim)
- ad 20 μl DEPC- H_2O

Der Ansatz wird für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 7 μl 7,5 M NH_4OAc und 75 μl 100 %igem Ethanol gefällt. Nach einem Waschschrift in 75 %igem Ethanol wird die RNA in 100 μl DEPC- H_2O gelöst. Die Probe wird 1:10 in Hybridisierungslösung verdünnt und kann bei -20°C gelagert werden.

4.14.2 In situ Hybridisierung auf Schnitte

In 4 % PFA/PBS fixierte Mausembryonen werden 2 x 10 min in PBS und 1 x 10 min in 0,9 % NaCl gewaschen und anschließend in einer ansteigenden Isopropanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 %, 2 x 100 %) je 2 h dehydriert. Nach Inkubation in Isopropanol/Chloroform 1:1 werden die Embryonen in Chloroform überführt. Für die Einbettung in Paraffin werden sie bei 60°C in Chloroform/Paraffin (1:1) in offenen Gefäßen so lange inkubiert, bis alles Chloroform verdunstet ist. Das flüssige Paraffinwachs wird 3 x gewechselt und die Embryonen dann in Blöcke eingebettet. Die Lagerung erfolgt bei 4°C .

Für die Hybridisierung werden mit dem Mikrotom Schnitte einer Stärke von 5 μm angefertigt, auf Objektträger mit Polylysin gelegt und über Nacht bei 37°C getrocknet. Die Schnitte werden 2 x 20 min in Xylol entwacht und in einer Serie von Ethanol/Wasser-Waschschriften rehydriert (2 x 5 min 100 % Ethanol, je 2 min 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %, 30 %). Es folgen mehrere Inkubationsschritte mit 2 x 5 min PBS, 30 min 4 % PFA in PBS, 2 x 5 min PBS, 10 min 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K in 20 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7,2), 5 min PBS, 30 min 4 % PFA in PBS, 2 x 5 min PBS, 2 x 2 min 2 x SSC und 2 x 15 min Tris/Glycin-Puffer.

Für die Hybridisierung werden die Schnitte aus dem Tris/Glycin-Puffer herausgenommen und verbleibende Flüssigkeit wird vom Objektträger entfernt. Anschließend werden die Schnitte in Haereus Quadriperm-Schalen in Hybridisierungslösung mit der 1:100 verdünnten Probe (Endkonzentration), die zuvor bei 95°C 4 min denaturiert worden war, und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tRNA versetzt. Die Hybridisierung erfolgt bei 70°C über Nacht in einer feuchten Kammer mit in 5 x SSC getränkten Tüchern. Es folgen mehrere Waschschrift:

- 3 x 20 min 5 x SSC bei RT
- 40 min 0,5 x SSC/20 % Formamid bei 60°C
- in frischem 0,5 x SSC/20 % Formamid auf 37°C abkühlen
- 15 min NTE bei 37°C
- 30 min NTE/RNase A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei 37°C

30 min 0,5 x SSC/20 % Formamid bei 60°C

30 min 2 x SSC bei RT

Nach dem Waschen werden die Objektträger 1 h bei RT in 1 % Blocking Reagens (Boehringer Mannheim)/MABT präinkubiert und anschließend mit dem anti-DIG-Antikörper 1:5000 verdünnt in 1 % Blocking Reagens/MABT über Nacht bei 4°C inkubiert.

Danach werden die Schnitte 4 x 10 min und 1 x 20 min in TBST, 2 x 10 min in NTMT und 1 x 10 min in NTMT/2 mM Levamisol gewaschen. Zur Vorbereitung der Färbelösung wird BM-Purple (Boehringer) 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und zum Überstand 2 mM Levamisol/0,1 % Tween 20 zugegeben. Die Lösung wird unter Lichtausschluß zu den Schnitten gegeben und mehrere Tage belassen, wobei die Färbelösung im Abstand von 1-3 d gewechselt wird. Nach dem Färben wird 2 x 15 min in NTMT und 1 x 10 min in PBS gewaschen. Die Objektträger werden mit bei 42°C geschmolzener Kaisers Glyzeringelatine eingedeckt.

10 x PBS	1,4 M NaCl 3 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
NTE	0,5 M NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7 5 mM EDTA
NTMT	10 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris pH 9,5
MABT	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl 1 % Tween 20 mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
Tris / Glycin-Puffer	0,1 M Tris-HCl 0,1 M Glycin
TBST	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 25 mM Tris, pH 7,5 0,1 % Tween-20
Hybridisierungslösung	50 % Formamid 1,3 x SSC, pH 5,5 5 mM EDTA 0,5 % CHAPS 100 µg/µl Heparin 0,2 % Tween 100µg/µl Hefe tRNA

Die in situ Hybridisierungen an Paraffinschnitten wurden von Nina Schumacher durchgeführt.

4.14.3 Whole mount in situ Hybridisierung (nach Henrique et al. 1995)

In PBS präparierte Mausembryonen werden über Nacht in 4 % PFA/PBS fixiert, anschließend 2 x 15 min mit PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (je 15 min 25 %, 50 %, 75 % Methanol/PBS, je 2 x 15 min 100 % Methanol). Die Embryonen können in 100 %igem Methanol bei -20°C gelagert werden.

Für die Hybridisierung werden die Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert (je 10 min 75 %, 50 % und 25 % Methanol in PBS), danach 2 x 10 min in PBT gewaschen und 1 h bei RT in 6 % H₂O₂/PBT gebleicht. Nach 3 x 10 min Waschen in PBT folgt eine Behandlung mit Proteinase K (20 µg/µl Proteinase K in PBT). Für die verschiedenen Embryonalstadien gelten folgende Inkubationszeiten:

E 8,5; E 9,5	1 min
E 10,5	3 min
E 12,5	5 min
E13,5	7 min

Es folgen weitere Waschschritte:

- 2 x 5 min mit PBT / Glycin (2 mg/ml)
- 3 x 5 min mit PBT
- 3 x 5 min mit RIPA-Puffer
- 3 x 5 min mit PBT

Anschließend werden die Embryonen für 20 min in 4 % PFA/PBT mit 0,2 % Glutaraldehyd fixiert. Nach dem Fixieren wird 10 min in Hybridisierungspuffer/PBT 1:1, danach 10 min in Hybridisierungspuffer gewaschen. Nach Zugabe von 100 µg/ml tRNA (Boehringer) werden die Embryonen 1-3 h bei 70°C vorhybridisiert. Für die Hybridisierung wird die RNA-Probe 3 min bei 80°C denaturiert und in einer Endkonzentration von 1:100 der Hybridisierungslösung zugegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 70°C.

Nach der Hybridisierung werden die Embryonen kurz mit vorgewärmter Hybridisierungslösung gewaschen. Es folgen weitere Waschschritte:

- 3 x 30 min Hybridisierungslösung bei 70°C
- 1 x 20 min Hybridisierungslösung /TBST 1:1 bei 70 °C
- 2 x TBST bei RT
- 2 x 30 min MABT bei RT

Zur Bindung des anti-DIG-Antikörper werden die Embryonen 1 h in MABT/2 % Blocking Reagens (Boehringer)/20 % Lammserum vorinkubiert. Zur Herstellung der Antikörperlösung wird der anti-DIG-Antikörper in MABT/1 % Blocking Reagens/20 % Lammserum 1:2000 verdünnt zugegeben und 1 h bei 4°C präabsorbiert. Nach Zentrifugation (10 min; 1500 rpm) wird der Überstand der Antikörperlösung auf die Embryonen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird überschüssiger Antikörper mit MABT abgewaschen. Die Waschschritte mit MABT werden 1-2 Tage lang jede Stunde durchgeführt.

Vor dem Färben wird 2 x 10 min mit NTMT und 1 x 10 min mit NTMT/2mM Levamisol gewaschen. Zur Vorbereitung der Färbelösung wird der Farbstoff BM-Purple (Boehringer) 5 min bei 2000 rpm

