

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Der Laborbedarf an Enzymen und Chemikalien p.a. oder in höchster Reinheitsstufe wurde von folgenden Firmen bezogen:

Amicon, Bachofer, BIORAD, Boehringer Ingelheim, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Fluka, ICN Biomedicals GmbH, Merck, Pharmacia, Roth, Serva, Sigma.

2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.1 Quantitative Methoden

2.2.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford

(Bradford, 1976)

Coomassie-Lösung: 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G250, 50 ml EtOH (abs.), 100 ml H_3PO_4 (85 %), 850 ml ddH₂O

10 μl Proteinlösung werden mit 1000 μl Coomassie-Lösung gemischt und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wird anhand einer Eichkurve mit BSA bestimmt.

2.2.1.2 Phosphatbestimmung

Der Phosphatgehalt wird indirekt über den Na/K-Gehalt am Flammenphotometer PFP 7, Jenway bestimmt. Dazu wird die Probe 1:100 mit ddH₂O verdünnt und der Phosphatgehalt mit Hilfe einer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Eichkurve bestimmt.

2.2.2 Aufschlußtechniken für Gewebe und Zellen, Lagerung und Konzentrierung von Proteinen

2.2.2.1 Handhabung und Lagerung von Proteinen

Die Lagerung von Proteinen erfolgt in lyophilisierter Form bei 4°C und in wässriger Lösung bei – 20°C, die Puffer werden mit 0,01 % NaN₃ stabilisiert. Alle Arbeitsschritte erfolgen bei 4°C oder auf Eis.

2.2.2.2 Dialyse

Zur Entsalzung werden die Proteinlösungen gegen 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,8 in Servapor Dialyseschläuchen (Serva) dialysiert.

2.2.2.3 Konzentrierung von Proteinen

Die Proteinlösungen werden in Abhängigkeit des Volumens in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon) mit YM-30 Diaflo-Membran (*cut of* = 30 kDa; Amicon), in Centriprep-Konzentratoren (PM 10 *cut of* = 10 kDa und PM 30 *cut of* = 30 kDa; Amicon) und in Mikro-konzentratoren (Centricon-10, *cut of* = 10 kDa; Amicon) konzentriert.

2.2.2.4 Proteinfällung

- Ammoniumsulfatfällung: Die Proteinlösung wird unter Rühren mit Ammoniumsulfat bis zur gewünschten Endkonzentration versetzt, 60 min auf Eis gerührt und 30 min bei 4°C, 1400 x g (JA10-Rotor, Beckmann-Zentrifuge) abzentrifugiert.

2.2.2.5 Homogenisierung von Humanleber

Die Humanleber wird zuerst grob mit einer Schere zerkleinert und anschließend in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,8 mit der Ultraturrax IKA T-52 (Janke & Kunkel) 2 min bei 24000 rpm homogenisiert und 4 min ultrabeschallt (Sonifier 250, duty cycle 80%, Leistung 70%; Branson).

Die Zentrifugation erfolgt 30 min bei 4°C und 14000 x g (JA10-Rotor, Beckmann-Zentrifuge), das Pellet wird in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,8 resuspendiert und noch dreimal homogenisiert, beschallt und zentrifugiert. Anschließend werden die Überstände zum Rohextrakt vereinigt.

2.2.2.6 Subzelluläre Fraktionierung

(Mannaerts *et al.*, 1982; Watkins *et al.*, 1989)

- Subzelluläre Fraktionierung mittels gegenläufigem Nycodenz-Saccharose-Gradienten

Saccharoselösung: 8,5% Saccharose in 1 mM Tris/HCl, pH 7.0 mit 0,01% NaN₃

Gradient: aus je 5,5 ml 34% Nycodenz in 1 mM Tris/HCl, pH 7.0 mit 0,01% NaN₃ und
15% Nycodenz in 8,5% Saccharoselösung

Bis zu 100 mg/ml Gewebe wird im Potter-Elvehjem Homogenisator (B. Braun) in Saccharoselösung viermal bei 200 rpm auf Eis homogenisiert. Nach Zentrifugation von 3 min bei 400 x g wird der Überstand abgenommen (PNÜ) und auf den Nycodenz-Saccharose-Gradienten aufgetragen. Das Pellet wird in 1 ml Saccharoselösung resuspendiert, homogenisiert und zentrifugiert, der Überstand wird bis zum Rand auf das Gradientenröhrchen gefüllt. Die Ultrazentrifugation erfolgt für 1 h bei 3800 x g und 4°C im Vertikalrotor (Vti 65/1, Beckmann). Die Zentrifugenröhrchen werden anschließend von unten angestochen und Fraktionen à 35 Tropfen aufgefangen.

2.2.3 Gelelektrophorese

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Bei dem SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System handelt es sich um ein Trennsystem mit diskontinuierlichem pH-Verlauf (Disk-Elektrophorese). Im SDS-PAGE werden die denaturierten Proteine entsprechend ihrer Molmasse aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt in der Mini-Protean II 2D-Zelle (BIORAD) bei 200 V für 45 min. Für die jeweiligen Acryl-amidkonzentrationen werden die Lösungen entsprechend der nachfolgend aufgeführten Tabelle angesetzt, die Konzentration wird dabei anhand der Hierten-Nomenklatur ermittelt.

Stammlösungen	Sammelgel			
	4 %	8 %	10 %	12 %
Lösung A	0,4 ml	2,0 ml	2,5 ml	3,0 ml
Lösung B	-	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Lösung C	1,5 ml	-	-	-
ddH ₂ O	1,06 ml	1,613 ml	1,113 ml	0,613 ml
10% SDS (w/v)	30 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	10 µl	20 µl	20 µl	20 µl
10% APS (w/v)	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Tab. 2-1: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Die Angaben beziehen sich auf zwei Gele mit der Schichtdicke von 0,3 cm.

Lösung A: 30 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

Lösung B: 0,75 M Tris/HCl, pH 8.8

Lösung C: 0,5 M Tris/HCl, pH 6.8

Elektrophoresepuffer: 30 g Tris, 0,75 g Glycin, 5 g SDS, 4,8 l ddH₂O

SDS-Probenpuffer: 4,0 ml Lösung C, 0,3 g SDS, 0,75 g Glycerin (87%), 0,1 g Mercaptoethanol, 250 µl Bromphenolblau (1mg/ml)

Hierten-Nomenklatur: Acrylamidgehalt $T = [100 (A+B)] / V$

Vernetzungsgrad $C = (100 B) / (A+B)$

Die Lösungen werden entsprechen dem Pipettierschema gemischt und die Polymerisation mit Zugabe von APS gestartet. Die Gelkammer wird mit Trenngel bis etwa 4 cm unter den Rand gefüllt und das Gel dann vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wird das Wasser entfernt, die Gelkammer bis zum oberen Rand mit Sammelgel gefüllt und ein geeigneter Kamm eingesetzt.

Die Proteinproben werden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt und zu ihrer vollständigen Denaturierung 5 min auf ca. 100°C erhitzt.

2.2.3.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- Anodische diskontinuierliche PAGE

(Davis, 1964; Maurer, 1971)

Dieses System ist für saure oder neutrale Proteine geeignet, deren enzymatische Aktivität erhalten werden soll. Die Trennung erfolgt nach der gelelektrophoretischen Beweglichkeit der Proteine, so daß eine Größenzuordnung mittels Standard nur eingeschränkt möglich ist.

Stammlösungen	Sammelgel 4,5 %	Trenngel 7,5 %
Lösung A	0,72 ml	3,20 ml
Lösung B	-	8,00 ml
Lösung C	3,00 ml	-
ddH₂O	2,17 ml	4,58 ml
TEMED	10 µl	20 µl
10% APS (w/v)	50 µl	100 µl

Tab. 2-2: Native Polyacrylamidgelelektrophorese.

Lösung A: 30 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

Lösung B: 0,75 M Tris/HCl, pH 8.8

Lösung C: 0,5 M Tris/HCl, pH 6.8

Elektrophoresepuffer: 30 g Tris, 144 g Glycin, 4,8 l ddH₂O

Probenpuffer: 1ml Bromphenolblau in Ethanol (20 mg/ml), 1 ml 50% Saccharoselösung

Die Proben werden im Verhältnis 1:20 mit Probenpuffer gemischt, die weiteren Arbeitsschritte erfolgen analog der SDS-PAGE. Die Elektrophorese wird in der Mini-Protean II 2D-Zelle (BIORAD) bei 50 V für 4 h und 0°C durchgeführt.

2.2.3.3 Quantitative Elution von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen

Nach der Elektrophorese wird das native Polyacrylamid-Gel mit ddH₂O bzw. mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,8 im Potter homogenisiert. Anschließend wird das Gel abzentrifugiert, die eluierten Proteine befinden sich im Überstand.

2.2.3.4 Eichproteine für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine erfolgt durch einen Vergleich mit verschiedenen Proteinen bekannter Zusammensetzung und Größe. Voraussetzung für die Verwendung eines Proteins als Kalibrierungsmarker ist, daß es regulär, d.h. im SDS-Gel proportional zu seiner Molmasse wandert.

Protein	M _r [kD]	
	SDS-PAGE	natives PAGE
HSA	69	
BSA	66	
Ovalbumin	45	
Katalase	58	232
Triose-Phosphat-Isomerase	30	
Trypsin-Inhibitor	20,1	

Tab. 2-3: Größenstandards für Proteingele.

Für einen anschließenden Westernblot verwendet man einen *prestained* Marker (BIORAD), bei dem die Eichproteine schon vorgefärbt sind.

Protein	M _r [kD]
Phosphorylase B	104,0
BSA	80,0
Ovalbumin	46,9
Carbonanhydratase	33,5
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	28,3
Lysozym	19,8

Tab. 2-4: Low range prestained Marker (BIORAD).

2.2.3.5 Proteinfärbungen

- **Coomassie-Blue-Färbung:**

Färbelösung: 1,25 g Coomassie Brilliant Blue G250, 227 ml Methanol, 46 ml Essigsäure,
227 ml ddH₂O

Entfärber: 50 ml Essigsäure, 75 ml Ethanol, 875 ml ddH₂O

Nach Abschluß der Gelelektrophorese wird das Trenngel 60 min in Färbelösung geschwenkt und anschließend über mehrere Stunden entfärbt.

- **Silberfärbung:**

(Wray *et al.*, 1981)

Lösung A: 4 ml 25 % AgNO₃ werden unter ständigem Rühren zu einer Lösung aus 21 ml 0,36 % NaOH und 1,4 ml 25 % NH₄OH getropft und mit ddH₂O auf 100 ml aufgefüllt.

Lösung B: 2,5 ml 1%-ige Zitronensäure werden mit 0,25 ml 38%-igem Formaldehyd gemischt und mit H₂O auf 500 ml aufgefüllt.

Lösung C: 45 ml Methanol werden mit 10 ml Essigsäure gemischt und mit ddH₂O auf 100 ml aufgefüllt.

Gelvorbereitung: 3 x 60 min in 50% Methanol einweichen (zur Entfernung des Glycerins)

3 x 10 min in ddH₂O waschen (zur Entfernung des Glycins)

- Das Gel für 15 min unter ständigem Wiegen in Lösung A anfärben.
- 5 min mit ddH₂O waschen.
- Gel ca. 10 min in Lösung B wiegen bis Proteinbanden sichtbar werden.
- Gel mit ddH₂O waschen und mind. 30 min in Lösung C fixieren.

- **Kupferfärbung**

(Lee *et al.*, 1987)

Färbelösung: 0,3 M CuSO₄

Die Proteingele werden nach der Elektrophorese kurz mit ddH₂O gespült und 10 min unter Schütteln gefärbt. Anschließend werden die Gele zur Entfernung der Färbelösung nochmals kurz mit ddH₂O abgespült.

2.2.3.6 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

(O' Farrell, 1975)

Die isoelektrische Fokussierung stellt eine Methode zur Auftrennung eines Substanz-gemisches im elektrischen Feld dar, die eine Trennung aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte bewirkt. Für die IEF wird die präparative IEF Cell „Rotofor“ (BIORAD) eingesetzt.

Anodenpuffer: 0,1 M H₃PO₄

Kathodenpuffer: 0,1 M NaOH

Ampholyte: Biolyte (BIORAD), pH-Bereich: pH 2 –10

Zum Aufbau eines pH-Gradienten werden vor dem Probenauftrag zugegebene Ampholyte elektrophoretisch getrennt (Präfokussierung). Alle Fokussierungen werden bei 12 W, 20 mA und 570 V für 2,5 h durchgeführt. Die Elektrodenkammern werden mit dem jeweiligen Puffer gefüllt und zur Präfokussierung 1,5 ml Biolyte mit 50 ml H₂O in die Fokussierungskammer gegeben. Nachdem die Proteinprobe eingefüllt wurde, findet die eigentliche Isoelektrische Fokussierung statt. Nach Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgt eine Refokussierung der aktiven Fraktionen.

2.2.3.7 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose

- **Western Blot**

(Beisiegel, 1986; Khyse-Andersen, 1984)

Transfer-Puffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % Methanol

TBS: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl

Blocklösung: 2 % Milchpulver/ 1 % BSA in TBS, 0,3 % Tween

Amidoschwarz: 0,1 % (w/v) Amidoschwarz 10-B, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure

Entfärber: 1 Vol. Essigsäure, 1 Vol. Isopropanol, 1 Vol. ddH₂O

ALP-Puffer: 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂·6H₂O, 100 mM TrisHCl, pH 9.5

Detektionslösung: 1/300 Vol. NBT (75 mg/ml in 70 % DMF) und 1/400 Vol. BCIP
(50 mg/ml in 100 % DMF) werden vor Gebrauch zugesetzt.

Stopplösung: 20 mM EDTA/TBS-Lösung

Primärantikörper:	anti α -Methylacyl-CoA-Racemase 1:1000 in 3 % BSA/TBS, 0,3 % Tween
Sekundärantikörper:	Ziege-anti-Kaninchen IgG, ALP-gekoppelt in 3 % BSA/TBS, 0,3 % Tween

Der Elektrotransfer von Proteinen (Westernblot) dient der Übertragung elektrophoretisch getrennter Proteine auf proteinbindende Oberflächen, z.B. Nitrozellulose, auf denen sie für weitere Reaktionen besser zugänglich sind.

Eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll BA85) wird mit zwei Whatmanpapierfiltern und Transfermatten 5 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Danach wird zusammen mit dem SDS-Polyacrylamidgel ein „Sandwich“ hergestellt und dieses in eine mit Transfer-Puffer gefüllte Blotting-Apparatur (BIORAD) gestellt. Der Transfer der Proteine erfolgt für 1 h bei 100 V. Nach dem Transfer wird die Markerspür von der Nitrozellulosemembran abgeschnitten und 5 min in Amidoschwarz angefärbt, nichtgebundenes Amidoschwarz wird durch Schwenken in Entfärberlösung entfernt. Nach dem Abspülen mit ddH₂O wird der Marker getrocknet und in Folie verschweißt gelagert. Alternativ wird als Standard ein *prestained* Marker mit aufgetragen (2.2.3.4). Die Membran wird nach mehrmaligem Waschen mit TBS mindestens 1 h in Blocklösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, anschließend wird zweimal mit TBS/0,3 % Tween gewaschen. Der Blot wird für mind. 2 h mit dem Primärantikörper unter Wiegen inkubiert, danach viermal für je 5 min mit TBS/0,3 % Tween gewaschen, mit Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1500) versetzt und mind. 1 h inkubiert. Danach wird dreimal je 5 min mit TBS/0,3 % Tween und anschließend einmal mit ALP-Puffer gewaschen.

Bis Banden erscheinen wird der Blot nun in der Detektionslösung unter Wiegen inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von Stopplösung beendet. Der gebundene Antikörper wird über die Farbreaktion mit NBT/BCIP als Substrat für die alkalische Phosphatase nachgewiesen. Nach Trocknen an der Luft kann der Blot längere Zeit gelagert werden.

2.2.4 Chromatographie

2.2.4.1 Low pressure Chromatographie (LPC)

2.2.4.1.1 Reversed Phase Chromatographie (RPC)

Die Reversed Phase Chromatographie ist eine Technik, die Moleküle nach ihrer Hydrophobizität trennt. Als Trennmedium dient meist poröses Silika-Gel, mit verschiedenen Alkyl- oder Arylgruppen derivatisiert, wobei die Porengröße für Kapazität und Auflösung entscheidend ist. Dem Probenauftrag in polarer Phase folgt die Elution mit einem organischen Lösungsmittel.

Säulen: Pasteurpipetten
Säulenmaterial: RP-18-Silika-Gel, 32-63 mesh, 60 Å (ICN)
Säulenvolumen: 400 µl

800 µl (1:2 in Methanol suspendiert) RP-18-Silika-Gel wird in Pasteurpipetten gefüllt und mit 3 SV H₂O äquilibriert. Nach dem Probenauftrag in 1 % TCA wird mit 3 SV H₂O eluiert.

2.2.4.1.2 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

(Pharmacia-Fine-Chemicals, 1983)

Bei der Ionenaustauschchromatographie dient die Ladung von Makromolekülen als Trennkriterium. Die Auswahl der Trennmedien erfolgt nach dem pI des Moleküls (Kationenaustausch unterhalb des pI) und dem pH-Bereich (DEAE-Gruppe, pH 3-9). Die gebundenen Proteine werden durch Erhöhung der Ionenstärke eluiert.

Puffer A: 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8
Puffer B: 200 mM NaCl in Puffer A
Säulen/-material: Pharmazia, DEAE-Cellulose-52, (Serva)

Die Säule wird mit DEAE-Cellulose beladen und anschließend mit 3 SV Puffer A äquilibriert. Die Proteinlösung (10 mg Protein pro ml SV in Puffer A) wird bei 4°C mit einer Flußgeschwindigkeit von ca. 60 ml/h aufgetragen. Danach wird mit 3 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgt mit einem linearen Salzgradienten von 0 - 0,2 M NaCl durch Zumischen von Puffer B bei einer Flußrate von 60 ml/h.

Die Fraktionsgröße beträgt 19 ml. In den erhaltenen Fraktionen werden photometrisch der Proteingehalt, flammenphotometrisch die NaCl-Konzentration und die Enzymaktivitäten bestimmt.

2.2.4.1.3 Chromatographie an Hydroxylapatit

Die Auftrennung an Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)₂ stellt eine sehr spezifische Trennmethode dar, die nicht primär vom Molekulargewicht und dem Isoelektrischen Punkt abhängig ist. Interaktionen zwischen negativ geladenen Gruppen auf der Proteinoberfläche und den Ca^{2+} -Gruppen des Hydroxylapatits spielen für die Trennung eine wesentliche Rolle, weiterhin sind auch die Oberflächenladungsdichte und das Ladung/Masse-Verhältnis von Bedeutung.

Puffer A: 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8

Puffer B: 250 mM Phosphatpuffer, pH 6.8

Säulen/-material: Pharmacia, Bio Gel HT (Pharmacia)

Die Säule wird mit Bio Gel HT beladen und mit Puffer A äquilibriert. 10 mg Protein pro ml SV in Puffer A werden bei 4°C mit einer Flußgeschwindigkeit von ca. 60 ml/h aufgetragen, danach wird mit 2 SV Puffer A gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgt mit einem linearen Phosphatgradienten von 10 - 250 mM PO_4^{3-} bei einer Flußrate von 70 ml/h. Die Fraktionsgröße beträgt 5,0 ml. Die eluierten Fraktionen werden photometrisch zur Bestimmung der Proteinkonzentration vermessen, der Phosphatgehalt indirekt über die Kaliumkonzentration bestimmt und die enzymatische Aktivität gemessen.

2.2.4.1.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie nutzt als Trennkriterium die unterschiedliche Hydrophobizität von Proteinen aus. Die Hydrophobizität erhöht man durch Zugabe eines Salzes mit Aussalzeffekt, z.B. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bei der HIC erfolgt die Elution meist durch Erniedrigung der Ionenstärke. Weiteren Einfluß haben die Erhöhung des pH-Wertes und die Erniedrigung der Temperatur.

Puffer A: 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8

Puffer B: 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8

Säule: (Pharmacia)

Säulenmaterial: Octyl-Sepharose OS CL-4B (Serva)

Die mit Octyl-Sepharose beladene Säule wird mit Puffer A äquilibriert. Der Proteinauftrag (30 mg Protein pro ml SV in Puffer A) erfolgt bei 4°C mit einer Flußgeschwindigkeit von ca. 60 ml/h, anschließend wird mit 3 SV Puffer B ausgewaschen. Die Elution erfolgt durch Erniedrigung der Ionenstärke mit einem linearen Gradienten von 1 M – 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8 bei einer Flußrate von 60 ml/h (Fraktionsgröße = 5,0 ml). In den eluierten Fraktionen werden Proteinkonzentration, Ammoniumsulfatgehalt über den Brechungsindex und die enzymatische Aktivität gemessen.

2.2.4.1.5 Gelchromatographie

(Pharmacia-Fine-Chemicals, 1981)

Mit der Gelchromatographie (Gelfiltration) können Proteine nach ihrer Molekulargröße aufgetrennt werden, dazu wird ein Gel mit Poren definierter Größe verwendet. Anhand einer Eichkurve mit Substanzen bekannter Größe können die Molekulargewichte der Trennungsergebnisse einer Probe analysiert werden.

Puffer A: 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8

Säulen/-material: Pharmacia, Ultrogel AcA 34 (IBF Biotechnics)

Eichproteine: Triosephosphat-Isomerase (30 kDa), LDH (36 kDa), Ovalbumin (48 kDa), Katalase (58 kDa), BSA (66 kDa), Phosphofruktokinase (84 kDa), Cytochromoxidase (240 kD)

Die Säule wird mit einer geeigneten Menge Ultrogel AcA 34 beladen und mit Puffer A äquilibriert. Die Kalibrierung erfolgt mit verschiedenen Eichproteinen in getrennten Läufen bei einer Flußrate von 0,3 ml/min. Anschließend wird die Proteinprobe mit der gleichen Durchflußrate chromatographiert. Das Proteinauftragsvolumen beträgt maximal 1 % des Säulenvolumens. Zur Ermittlung des Ausschlußvolumens (V_0) wird Dextranblau und zur Feststellung des Salzvolumens (V_s) p-Nitrophenol mit aufgetragen. Die Elution erfolgt mit 0,5 M NaCl in 10 mM Phosphatpuffer.

In den erhaltenen Fraktionen (2,5 ml) werden die Eichproteine photometrisch bestimmt und die Enzymaktivität gemessen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts werden die R_f -Werte (relative Mobilität) der Eichproteine aus den charakteristischen Elutionsvolumina (V_e) und den bekannten Größen V_0 und V_t errechnet.

$$R_f = V_e - V_0 / V_s - V_0$$

2.2.4.1.6 Affinitätschromatographie an immobilisierten Farbstoffen

(Bohme *et al.*, 1972; Dean, 1985)

Die Affinitätschromatographie basiert auf den spezifischen Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen untereinander oder zu niedermolekularen Substanzen. Die Bindung der zu trennenden Moleküle an einen immobilisierten Partner soll zwar selektiv, aber nicht zu fest sein, damit die enzymatische Aktivität des Proteins nach der Elution erhalten bleibt.

Zur chromatographischen Auftrennung wurden neun verschiedene immobilisierte Farbstoff-säulen *Affinity Chromatography Media* (Sigma) unter unterschiedlichen Elutionsbedingungen eingesetzt.

Säulenmaterial: *Affinity Chromatography Media* (Sigma):

- (1) Cibacron Blue 36 A Agarose (CB 36A)
- (2) Reactive Blue 4 (RB 4)
- (3) Reactive Blue 72 (RB 72)
- (4) Reactive Brown 10 (RB 10)
- (5) Reactive Green 5 (RG 5)
- (6) Reactive Green 19 (RG 19)
- (7) Reactive Red 120 (RR 120)
- (8) Reactive Yellow 3 (RY 3)
- (9) Reactive Yellow 86 (RY 86)

Säulenvolumen: 2,5 ml

Puffer A: 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8

Elutionspuffer: (1) 50 μ M FAD in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8
(2) 50 μ M NADH in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8

- (3) 50 μ M NADP in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8
- (4) 10 mM Phosphatpuffer, pH 5.5
- (5) 10 mM Tris/HCl, pH 8.5
- (6) 1 M Phosphatpuffer, pH 6.8
- (7) 50 μ M AMP in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8

Nach Äquilibration der Säulen mit Puffer A erfolgt der Proteinauftrag (30 mg Protein pro ml SV in Puffer A) bei 4°C, anschließend wird mit 3 SV Puffer A ausgewaschen. Die Proteinelution wird mit je 6 SV der Elutionspuffer 1-7 durchgeführt, die für jede Säule nacheinander eingesetzt werden.

2.2.4.2 High pressure/performance liquid Chromatography (HPLC)

(Engelhardt, 1977)

Die HPLC ermöglicht chromatographisches Arbeiten unter sehr hohem Druck (bis $5,5 \cdot 10^7$ Pa), so daß Trennmaterialien mit sehr kleiner Teilchengröße verwendet werden können, die die Trennschärfe erhöhen.

HPLC-Anlage: Waters 625 LC-System (Waters Chromatography Div.),

ERMA ERC-3512 Entgaser

Waters Fraction Collector (Millipore Corp.)

Säulen: präparativ: •Fractogel EMD DEAE-650 (S), 20282 Superformance-Säule,

25-40 μ m, Länge 115 mm, ID 1,3 mm (Merck)

•Pentax HA, B54-Y390, Batch DGG 0410, 2 μ m,

Länge 120 mm, ID 4,6 mm (Knauer)

analytisch: •Euramid WAEX-DEAE 1000/7, B55-Y438, Batch 4780,

1 ml SV (Knauer)

Puffer A: 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8 in Millipore Wasser, filtriert (0,22 μ m)

Puffer B: 1000 mM Phosphatpuffer, pH 6.8 in Millipore Wasser, filtriert (0,22 μ m)

Puffer C: 1000 mM NaCl, pH 6.8 in Millipore Wasser, filtriert (0,22 μ m)

Puffer D: Millipore Wasser, filtriert (0,22 μ m)

	Fractogel EM-DEAE-650	Pentax HA	Euramid WAEX-DEAE
SV	15 ml	5 ml	1 ml
Äquilibrierungs- und Auftragspuffer	10 mM Phosphatpuffer	1 mM Phosphatpuffer	ddH ₂ O
Flußrate	0,5 ml/min	0,25 ml/min	0,5 ml/min
Elution	NaCl-Gradient: 0-300 mM Puffer C	[PO ₄] ³⁻ -Gradient: 1-200 mM Puffer B	[PO ₄] ³⁻ -Gradient: 0-20 mM Puffer B
Fraktionen	2,5 ml	1,25 ml	1 ml

Tab. 2-5: HPLC-Protokolle.

Die Elution wird an einem Durchflußphotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. In den erhaltenen Fraktionen werden der Proteingehalt photometrisch und die enzymatische Aktivität mit dem ³H-Standardassay bestimmt. Die Hauptfraktionen werden danach vereinigt.

2.2.5 Enzymatische Bestimmungen

2.2.5.1 Bildung von [³H]H₂O aus Carbonsäurederivaten

(³H-Standardassay)

(Rhead *et al.*, 1981; Schmitz, 1991)

Substratlösung: 50 µM [³H]AcyI-CoA, 108-185 bq/mol

Ansatz: 10 µl Substratlösung

10 µl ddH₂O

5 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8.5

5 µl Enzymquelle (0-Wert: ddH₂O)

Die Ansätze werden 45 min bei 37°C inkubiert und mit 500 µl 1 % TCA abgestoppt.

Nach der Applikation der Ansätze auf 0,3 ml RP-18 (*reversed phase* Silika Gel)-Säulen in Pasteurpipetten wird $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ mit 1,5 ml H_2O eluiert (2.2.4.1.1) und quantitativ im Szintillationsmeßgerät WALLAC 1410 (Pharmacia) bestimmt

2.2.5.2 Palmitoyl-CoA-Dehydrogenase

(Rhead *et al.*, 1981)

Substratlösung: [2,3- ^3H]Palmitoyl-CoA, 1kBq

Ansatz: 0,5 nmol Substratlösung

50 mM Tris/HCl, pH 8.0

0,2 % Nonidet P-40

20 μl Enzymquelle (0-Wert: dd H_2O)

Die Messung der Palmitoyl-CoA-Dehydrogenase erfolgt analog 2.2.5.1.

Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 μl wird für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 400 μl 1 % TCA abgestoppt. Entstandenes $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ wird mit *reversed phase*-Chromatographie eluiert (2.2.4.1.1) und mit dem Flüssig-Szintillationszähler bestimmt.

2.2.5.3 Racemisierung von (S)-und (R)-2-methyl-tetradecanoyl-CoA

(Schmitz *et al.*, 1994)

(S)- bzw. (R)-2-methyl-tetradecanoylsäure werden zum Coenzym A Thioester chemisch aktiviert. Nach Inkubation mit Racemase in 200 μl 50 mM Na/K/ P_i -Puffer, pH 7.2 bei 37°C für 30 min wird die Reaktion mit 400 μl 6 M HCL gestoppt. Die Hydrolyse des Thioesters, Extraktion der freien Fettsäuren und Konversion zum Amid mit (R)-1-Phenylethylamin erfolgt wie beschrieben. Die Diastereomere wurden gaschromatographisch auf einer 25-m SE-30 Kapillarsäule voneinander getrennt (Säuleninnendurchmesser: 0,32 mm, Trägergas: N_2 , isotherm bei 240°C, Messung im Flammen-Ionisierungsdetektor).

2.2.5.4 Katalase

(Hübl, 1964)

Substratlösung: 0,5 mM H₂O₂ in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.2

Titanoxidsulfatlösung: 4 g TiO(SO₄) in 1l H₂SO₄ (20 %)

Ansatz: 10 µl Enzymquelle

0,5 ml Substratlösung

Die Ansätze werden bei Raumtemperatur inkubiert, nach definierten Zeitabständen mit 0,5 ml Titanoxidsulfatlösung abgestoppt und die anschließend noch vorhandene H₂O₂-Konzentration gemessen. Für den 100 %-Wert wird vor Enzymzugabe Titanoxidsulfatlösung zugegeben. Die TiO(SO₄)-Konzentration wird bei 407 nm bestimmt. Aufgrund der hohen Wechselzahl der Katalase entspricht die Reaktion einem Zerfall 1.Ordnung. Die Aktivität wird daher nur als Zerfallskonstante angegeben:



Berechnung der Zerfallskonstanten k:

$$k = \frac{\ln [(E_{100\%} - E_{0\%}) / (E_{\text{Probe}} - E_{100\%})]}{t \text{ (sec)}}$$

2.2.5.5 Dihydroxyacetonphosphat-Acyl-Transferase

(Schutgens *et al.*, 1984)

Lösung 1: 40 mM MgCl₂, 80 mM KF, 10 mM AMP, 20 mM NaCN

Lösung 2: 0,6 mM [¹⁴C]Glycerin-3-Phosphat (0,74 KBq), 5 mM Pyruvat,
0,5 U Glycerin-3-Phosphat-DH in 25 mM Triethanolamin/HCl, pH 7.6

Lösung 3: 0,75 mM Palmitoyl-CoA und 0,2 mg BSA in H₂O

Ansatz: 10 µl Lsg. 1 werden mit 50 µl Lsg. 2, 20 µl Lsg. 3, 10 µl 250 mM MOPS-Puffer, pH 6.5, 1 µl DIPF in THF und 10 µl Enzymquelle für 30 min bei 37°C inkubiert.

Nach Schütteln und Zentrifugation mit 350 µl CHCl₃/MeOH (1:2) wird der Überstand mit je 100 ml CHCl₃ und 2 M KCl in 0,2 M H₃PO₄ versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Die Unterphase wird mit 350 ml synthetischer Oberphase gewaschen, mit 4 ml Szintillations-flüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

2.2.5.6 Succinatdehydrogenase

(Banerjee *et al.*, 1984)

Substratlösung: 100 mM Phosphat-Puffer, pH 7.5, 50 mM Saccharose, 2 mM KCN,
0,2 mg/ml Antimycin A, 100 mM Natriumsuccinat und 2µg INT

Ansatz: 50 µl Enzymquelle werden mit 50 µl Substratlösung 90 min bei 37°C inkubiert, mit 50 µl 10 %iger TCA und 600 µl EE versetzt und geschüttelt. Nach Zentrifugation werden 500 µl der Oberphase 60 min stehengelassen und anschließend die Extinktion bei 490 nm ermittelt.

2.2.5.7 β-Hexosaminidasen

(Sandhoff *et al.*, 1977)

Substratlösung: 1 mM 4-Muf-Glc-Nac in 50 mM Citrat/NaOH-Puffer, pH 4.5 mit 0,25 %
Triton X-100

Ansatz: 10 µl Enzymquelle und 90 µl H₂O werden mit 100 µl Substratlösung 15 min bei 37°C inkubiert und mit 1 ml 0,2 M Na₂CO₃ und 0,2 M Glycin abgestoppt. Die Fluoreszenz wird bei 440 nm (Anregung: 254 - 400 nm) gemessen.

2.2.6 Immunchemische Methoden

2.2.6.1 Antikörperherstellung (Kaninchen-anti-Rattenleber-Racemase-Antikörper)

(Catty, 1988)

Im Abstand von 10 Tagen wird einem Kaninchen je 140 µg gereinigte Rattenleber-Racemase in 500 µl FCA (1:2 in H₂O) i.m. injiziert. Das Boosten erfolgt nach 10 bzw. 20 Wochen nach der letzten Injektion, jeweils 100 µg Racemase in 600 µl FIA (1:2 in H₂O) werden, auf drei Stellen verteilt, s.c. injiziert. Vor der ersten Injektion und wöchentlich nach dem ersten Boosten wird dem Tier aus der Ohrvene jeweils bis zu 10 ml Blut entnommen. Das Kaninchen wird drei Wochen nach der letzten Boost-Injektion getötet und ausbluten gelassen (ergibt ca. 100 ml).

Für Kontrollzwecke wird das Präimmenserum aus 10 ml Blut des gleichen Tieres vor der Immunisierung gewonnen. Zur Reinigung des Präimmenserums bzw. des Immenserums wird das Blut 15 min bei 2000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und über Nacht gegen 10 mM Phosphatpuffer, 0,01 % NaN₃, pH 7.2 (1:1000) dialysiert. Das Dialysat wird mit dem vierfachen Volumen an DEAE-Zellulose (1:2 in 10 mM Phosphatpuffer, 0,01 % NaN₃, pH 7.2) geschüttelt, 60 min stehengelassen und 15 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand (gereinigtes Immenserum) wird abgenommen und bei 4°C gelagert.

2.2.6.2 Immunpräzipitation von α -Methylacyl-CoA-Racemase

(Catty, 1988)

50 μ l Enzymquelle wird 1:2 mit Kaninchen-anti-Racemase-Antiserum versetzt und bei 4°C über Nacht stehengelassen. Mit dem vierfachen Volumen an Protein A-Agarose (1:2 in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.8) wird 24 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Das Antigen-Antikörper-Protein A-Agarose Präzipitat wird bei 10000 x g 5 min abzentrifugiert und die Oberphase als Enzymquelle verwahrt. Nach der gleichen Methode wird das Präimmenserum als Kontrolle präpariert.

2.2.6.3 Immunchemischer Antigennachweis nach Elektrotransfer

Das transferierte Antigen wird in zwei Stufen nachgewiesen, wobei der mit dem Indikator-enzym gekoppelte zweite Antikörper über einen antigen-spezifischen ersten Antikörper mit dem Antigen reagiert. Als Indikatorenzym wird alkalische Phosphatase verwendet.

Primärantikörper: *anti* α -Methylacyl-CoA-Racemase 1:1000 in 3 % BSA/TBS, 0,3 % Tween

Sekundärantikörper: Ziege, *anti* Kaninchen IgG, ALP-gekoppelt in 3 % BSA/TBS;
0,3 % Tween

Durchführung: siehe 2.2.3.7

2.3 Mikrobiologische Methoden

Soweit nicht anders beschrieben, sind die mikrobiologischen Methoden *Molecular Cloning* (Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989) entnommen.

2.3.1 Sterilisationstechniken

- Trockensterilisation: Glasgefäße, Pipetten und weitere Glasartikel werden für 4 h bei 160°C im Heißluftschrank sterilisiert (Heraeus Trockenschrank Typ ST 5060).
- Dampfsterilisation: Kunststoffgefäße, sowie Medien und Pufferlösungen werden für 20 min bei 121°C und 1,1 bar autoklaviert (Sterico Vapoklav Dampfsterilisator).
- Sterilfiltration: Kleine Volumina thermolabiler Substanzen werden mit Spritzenfiltern (Schleicher & Schuell, 0,22 µm Porendurchmesser) filtriert.
- Druckfiltration: Kulturmedien werden im Druckgefäß (Schleicher & Schuell) bei 0,5 bar durch Membranfilter (0,2 µm Porendurchmesser, Ø 47 mm) sterilfiltriert.

2.3.2 Kulturmedien

2.3.2.1 Flüssigmedien

- LB-Medium (Sambrook, 1989)
10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Yeast Extrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0,
mit 1 M NaOH einstellen.
- TB-Medium (Sambrook, 1989)
13,3 g/l Bacto-Trypton, 26,6 g/l Bacto-Yeast Extrakt, 4,4 ml/l Glycerin;
zu 720 ml sterilem TB-Medium werden 80 ml steriler 10x Phosphat-Puffer
gegeben.
- SOB-Medium (Hanahan, 1983)
20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto Yeast Extrakt, 0,59 g/l NaCl, 0,85 g/l KCl;
vor Verwendung des Mediums wird 1 Vol.% 1 M MgCl₂/1M MgSO₄ zugesetzt.

- SOC-Medium (Hanahan, 1983)

SOB-Medium + 1 Vol.% 2 M Glucose

Nach pH-Kontrolle werden die Medien autoklaviert und nach Abkühlung auf ca. 50°C ggf. Supplemente zugesetzt.

2.3.2.2 Supplemente

- MgSO₄: Stammlösung: 1M MgSO₄, autoklaviert
Endkonzentration: 10 mM MgSO₄
- Antibiotika: vor Verwendung werden die Antibiotika aus einer sterilfiltrierten Stammlösung frisch verdünnt
- Ampicillin: Stammlösung: 50 mg/ml H₂O
Endkonzentration: 50 µg/ml
- Kanamycin: Stammlösung: 50 mg/ml H₂O
Endkonzentration: 50 µg/ml
- Tetracyclin: Stammlösung: 5 mg/ml Ethanol
Endkonzentration: 15 µg/ml (Platten)
Endkonzentration: 7,5 µg/ml (Flüssigmedium)

2.3.2.3 Puffer

- PBS
(Weast, 1986)
8,0 g/l NaCl, 0,34 g/l KH₂PO₄, 1,21 g/l K₂HPO₄, pH 7.3
- 10x Phosphat-Puffer
(Sambrook, 1989)
0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄
- TBS
(Weast, 1986)
12,11 g/l Tris, 2,05 g/l NaCl, 0,75 g/l Glycin, pH 7.5

- TE
(Weast, 1986)
10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)
- 5x TBE
(Weast, 1986)
54 g/l Tris, 27 g/l Borat, 9,3 g/l EDTA

2.3.2.4 Festmedien

- LB-Platten (Sambrook, 1989)

15 g/l Agarose in LB-Medium werden autoklaviert. Nachdem die Agarose auf etwa 45°C abgekühlt ist, werden ggf. Antibiotika mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt, gemischt und in Petrischalen verteilt. Nach Erstarren der Agarose werden die Platten bei RT getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert.

- Soft-Top (ST) -Agarose (Sambrook, 1989)

7,0 g/l Agarose in LB-Medium werden autoklaviert und anschließend auf 45-50°C abgekühlt, bevor sie auf den Platten verteilt werden: 4 ml / 90 mm Platten, 7 ml / 150 mm Platten.

2.3.3 Selektive Kulturmethode

- Verdünnungsausstrich: zur Isolierung einer Reinkultur (Klon): Aus einer Bakterien-suspension oder einer Glycerin-Stammkultur (2.5.6) wird mit einer Platinöse ein Ausstrich auf einer Agar-Platte angelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- Anreicherungskultur: Mit einer Einzelkolonie werden 2 ml bis 5 ml Medium angeimpft und bei 30°C bzw. 37°C unter Schütteln (Braun Certomat R, 200 rpm) inkubiert. Nach ca. 8 - 15 h kann eine „flüssig-flüssig-Überimpfung“ erfolgen oder es können, ausgehend von dieser Vorkultur, größere Kulturen angeimpft werden (Verdünnung 1:100).

2.3.4 Herstellung kompetenter Zellen

(Hanahan, 1983)

TFB: 10 mM MES, 100 mM RbCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂,
3 mM Hexamin-Cobalt(III)chlorid, pH 6.3 (sterilfiltriert)
DTT: 2,25 M DTT in 40 mM KOAc, pH 6.0

100 ml SOB-Medium werden mit 1 ml einer *E.coli*-ÜNK angeimpft. Diese Kultur läßt man unter Schütteln bis zu einer OD_{550nm} von 0,5 wachsen (logarithmische Wachstumsphase), so daß hohe Transformationsraten erreicht werden können. Nach 10 min bei 0°C werden die Zellen abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C), der Überstand dekantiert und das Pellet schließlich in 30 ml eiskaltem TFB vorsichtig mit einer Glaspipette resuspendiert. Nach 10 min bei 0°C wird erneut zentrifugiert (2500 rpm, 10 min, 4°C), das Zellpellet wird in 4 ml TFB aufgenommen und nach Zugabe von 140 µl DMSO für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 140 µl 2,25 M DTT und zehnmütiger Inkubation auf Eis werden zu der *E.coli*-Suspension nochmals 140 µl DMSO gegeben. Nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis sind die Zellen nun kompetent und können im Anschluß direkt transformiert oder bei -70°C gelagert werden.

2.3.5 Konservierung und Lagerung von Bakterienkulturen

- Kurzzeitige Konservierung

Die Bakterienkultur wird mit einem Glasspatel auf einer Agaroseplatte ausgestrichen und bei 37°C inkubiert bis Kolonien deutlich zu erkennen sind (12-18h). Die Bakterienplatten können so bei 4°C für vier bis sechs Wochen gelagert werden.

- Langfristige Konservierung (Glycerin-Stammkulturen)

Eine von einer Einzelkolonie abgeleitete Kultur eines *E. coli*-Stammes wird bis zu einer OD_{550nm} von ca. 1,5 kultiviert. Anschließend wird bei 1600 × g zentrifugiert (Heraeus-Baktifuge, 3000 rpm, 10 min). Das Zellpellet wird vorsichtig in 1 ml LB-Medium aufgenommen und mit 1 ml sterilem Glycerin (30 %) vermischt. Diese Stammkultur wird bei -20°C gelagert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 DNA-Banken

2.4.1.1 cDNA-Banken

- **λ GT11 cDNA** (CLONTECH Laboratories, Inc.)

Library of adaptor-ligated ds cDNA (Humanleber)

- **Marathon-Ready™ cDNA** (CLONTECH Laboratories, Inc.)

Library of adaptor-ligated ds cDNA (Humanleber)

CLONTECH's suppression PCR technology (Siebert *et al.*, 1995)

- **Uni-ZAP™ XR Library** (Stratagene)

- *cDNA-Library Präparation: ZAP-cDNA synthesis method*

Humanleber-cDNA (Short *et al.*, 1988)

- Vektor: Uni-ZAP XR-Vektor

- Bakterienstämme:

XL-1 Blue MRF': $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, *endA1*,

supE44, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac[F' proAB, lac^fZΔM15, Tn10 (tet^r)]*

SOLR™ Strain: $e14(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171$, *sbcC*, *recB*,

recJ, *umuC:Tn5 (kan^r)*, *uvrC*, *lac*, *gyrA96*,

relA1, *thi-1*, *endA1*, $\lambda^R[F' proAB, lac^fZΔM15]$ *Su⁻ (nonsuppressing)*

- f1- Helfer-Phage: VCSM 13 (f1): 1×10^{11} pfu/ml

- *ExAssist™ helper phage* (M13): 1×10^{10} pfu/ml

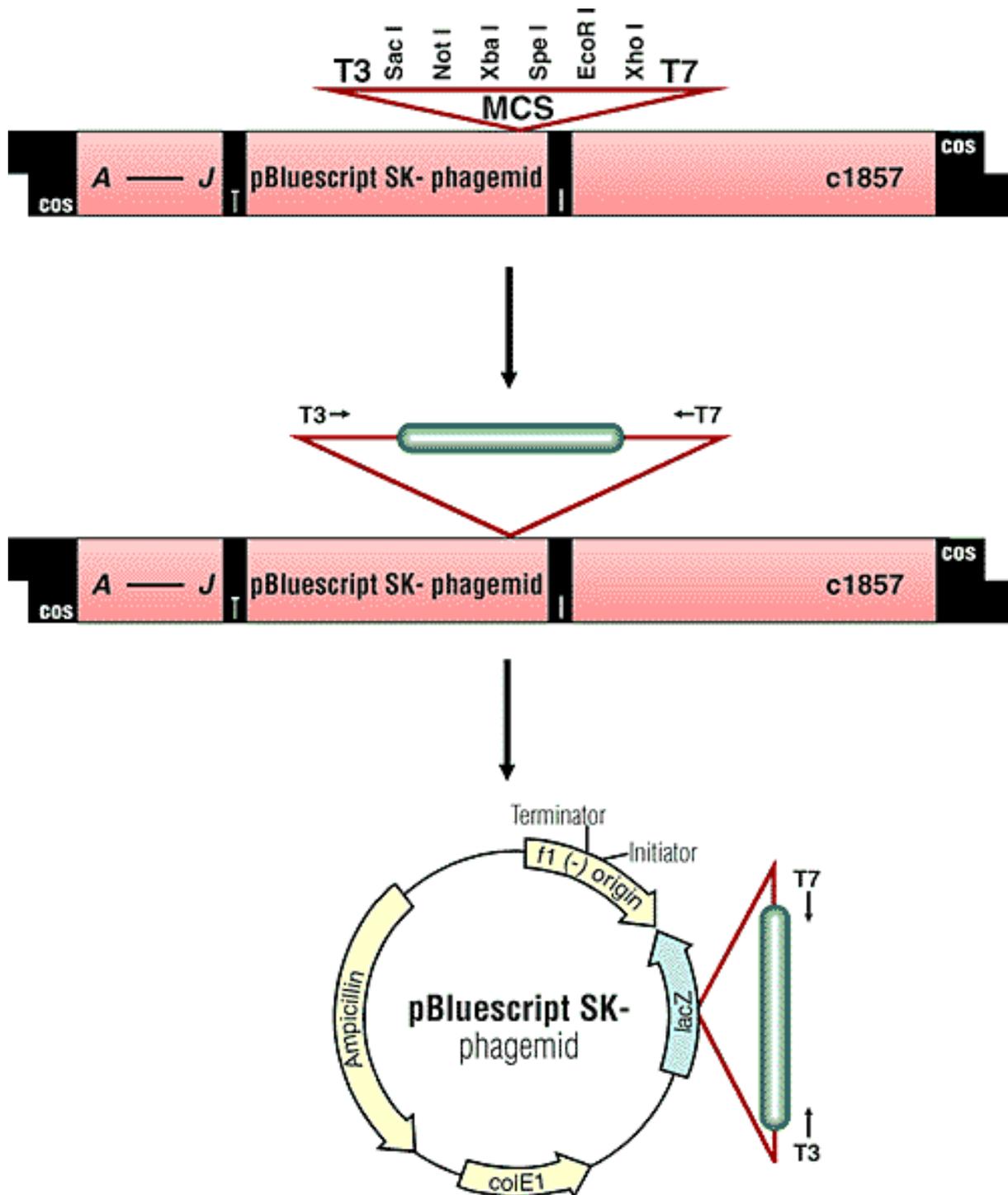


Abb. 2-1: pBluescript SK-Phagemid (Stratagene).

2.4.1.2 Genomische DNA-Bank

- **RPCI1, 3-5 Human PAC, Nr. 704 (RZPD)**

- | | | |
|-----------------------------------|--------------------------|------|
| - Quelle: Blut, human | Klone: RPCIP704O01181Q25 | (A1) |
| - Vektor: PCYPAC 2n | RPCIP704P01181Q25 | (A2) |
| - Bakterienstamm: E.coli DH 10B | RPCIP704B8394Q2 | (A4) |
| - Insertgröße: 140 Kb | RPCIP704H15649Q2 | (A6) |
| - Antibiotikaselektion: Kanamycin | RPCIP704M05720Q2 | (B1) |
| | RPCIP704L21804Q2 | (B2) |
| | RPCIP704K03969Q2 | (B4) |
| | RPCIP704M03969Q2 | (B5) |
| | RPCIP704F09982Q2 | (B6) |
| | RPCIP704N17985Q2 | (C1) |
| | RPCIP704B041122Q2 | (C3) |

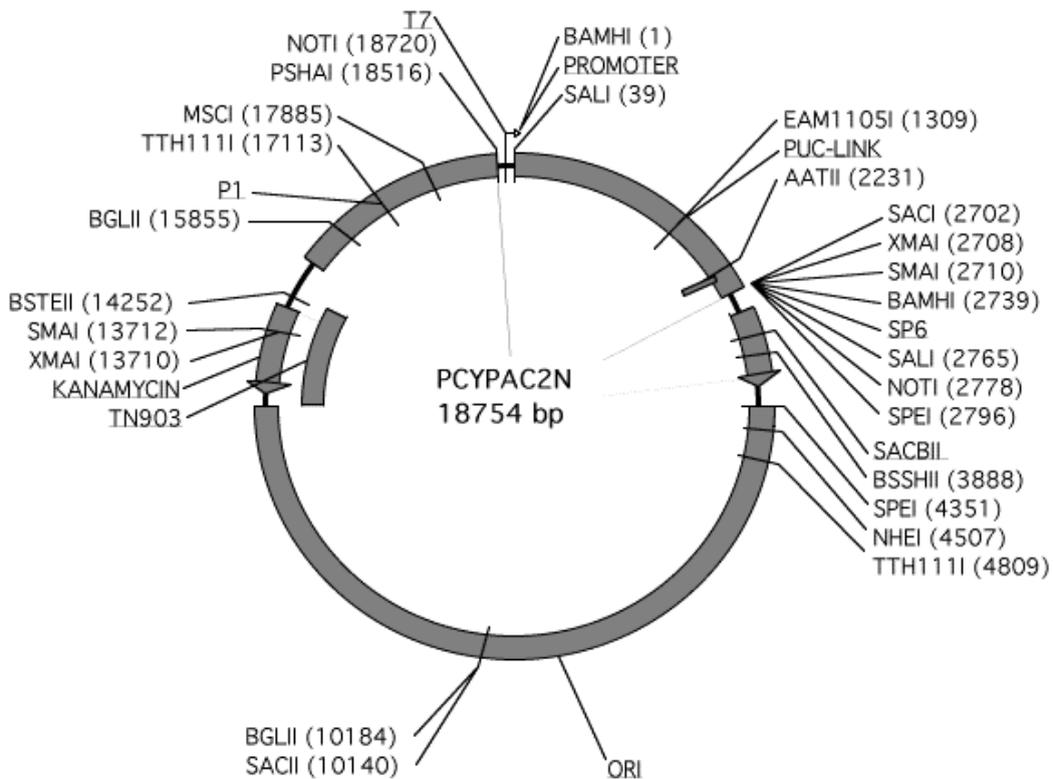


Abb. 2-2: PAC-Vektor PCYPAC 2n.

2.4.2 Oligonukleotide

Die für PCR und Sequenzierungen eingesetzten Oligonukleotide wurden bei Roth erworben.

2.4.2.1 Sequenzspezifische Primer

Bezeichnung	Position [bp]	Sequenz (5' → 3')	Smp.[°C] (2°+4°C)
H-18f	1- 18	GGCGCCGGGATTGGGAGG	64,0°C
H- 5f	6- 24	CGGGATTGGGAGGGCTTCT	62,0°C
H- 1f	21- 39	TCTTGCAGGCTGCTGGGC	60,0°C
H-20f	25- 42	TGCAGGCTGCTGGGCTGG	62,0°C
H-16f	68- 86	GCGGGGCACTGGGAAGCG	64,0°C
H-16r	87- 68	GCGCTTCCCAGTGCCCCGC	68,0°C
H- 6f	97- 114	GCAGGCATCTCGGTCGT	60,0°C
H-Int-1r	332- 315	GGCGGAAGGGCTCCAGCA	62,0°C
H-Int-1f	333- 352	GCGGTGTTCATGGAGAACTC	62,0°C
H-RacII-Int-IIr	476- 454	ACAAAGGCAAATAGTTGATATCG	62,0°C
H-RacII-Int-IIIf	477- 497	TCAGGTGTTCTCTCAAAAATTG	60,0°C
H-RacII-1f	548- 568	GCTGGTGGTGGCCTTATGTGT	66,0°C
H-RacII-1r	568- 548	ACACATAAGGCCACCACCAGC	66,0°C
H-RacII-2f	597- 617	ACCGCACACGCACTGACAAGG	68,0°C
H-RacII-2r	617- 597	CCTTGTTCAGTGCCTGTGCGGT	68,0°C
H-RacII-Int-IIIr1	640- 619	CATATCTGCATCAATGACCTGA	62,0°C
H-RacII-Int-IIIr2	640- 619	CATATTTGCGTCAATGACCTGA	62,0°C
H-RacII-Int-IIIf	641- 663	GTGGAAGGAACAGCATATTTAAG	64,0°C
H-RacII-Int-IVr	827- 817	CTTTGATCAGCAGCTCGTAGA	62,0°C
H-Int-4f	828- 848	GACTTGGACTAAAGTCTGATG	60,0°C
H-RacII-Stop-1f	1215-1237	ATAAGGTAAAAGCTAGTCTCTAA	60,0°C
H-RacII-Stop-1r	1237-1215	TTAGAGACTAGCTTTTACCTTAT	60,0°C
H-RacII-Stop-2r	1257-1238	TTGAGCCGTGGGCCTGGAAG	66,0°C
H-RacII-Stop-3f	1980-2002	GTTCTGGATCTTATAACCAACAC	66,0°C
H-RacII-Stop-3r	2041-2021	TTGGGGGGTCTCTGAGATCTTT	64,0°C

2.4.2.2 Vektorspezifische Primer

Bezeichnung	Position [bp]	Sequenz (5' → 3')	Smp.[°C] (2°+4°C)
T 3		AATTAACCCTCACTAAAGGG	56,0°C
T 7		GTAATACGACTCACTATAGGGC	64,0°C
M13f(-20)		GTAAAACGACGGCCAGT	52,0°C
M13rev		GGAAACAGCTATGACCATG	56,0°C
AP 1	Anker 1	CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC	80,0°C
AP 2	Anker 2	ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC	74,0°C

2.4.3 Klonierung mit TA Cloning Kit (Invitrogen)

(Clark, 1988)

2.4.3.1 Ligation

Ansatz: 1 μ l PCR-Produkt, gereinigt

1 μ l 10x Ligationspuffer

2 μ l Vektor C, PCR 2.1 (25 μ g/ μ l)

1 μ l T₄-DNA-Ligase, (4 U/ μ l)

5 μ l H₂O

Das PCR-Produkt wird 4-18 h bei 14°C ligiert und danach kurzfristig auf Eis gestellt. Das nicht benötigte Ligationsprodukt kann bei -20°C gelagert werden.

2.4.3.2 Transformation

Ansatz: 1 Vial kompetente Zellen, 2 μ l 0,5 M β -Mercaptoethanol, 2 μ l Ligationsrkt. \rightarrow 0°C,
+ 450 μ l SOC (RT) bei RT

Jeweils ein Vial kompetente Zellen (Invitrogen) oder 100 μ l Zellsuspension kompetenter *E.coli* (2.3.4) werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 2 μ l Mercaptoethanol vorsichtig gemischt, mit 2 μ l der zu transformierenden Plasmid-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wird dann für 30 Sekunden auf 42°C erhitzt (Hitzeschock) und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 450 μ l SOC-Medium wird für eine Stunde bei 37°C bei 225 rpm inkubiert. Je 50 - 200 μ l Bakteriensuspension werden zur Selektion auf LB/Amp-Platten (mit 40 μ l x-Gal (40 mg/ml) zur Farbselektion) ausgestrichen und ca. 18 Stunden bei 37°C inkubiert, bis die Bildung von Bakterienkolonien zu erkennen ist. Die Platten werden zur deutlicheren Farbentwicklung 1-2 h bei 4°C gelagert. Je 10 positive (weiße) Klone werden gepickt und in LB/Amp-Medium bei 37°C wachsen gelassen (2.3.3).

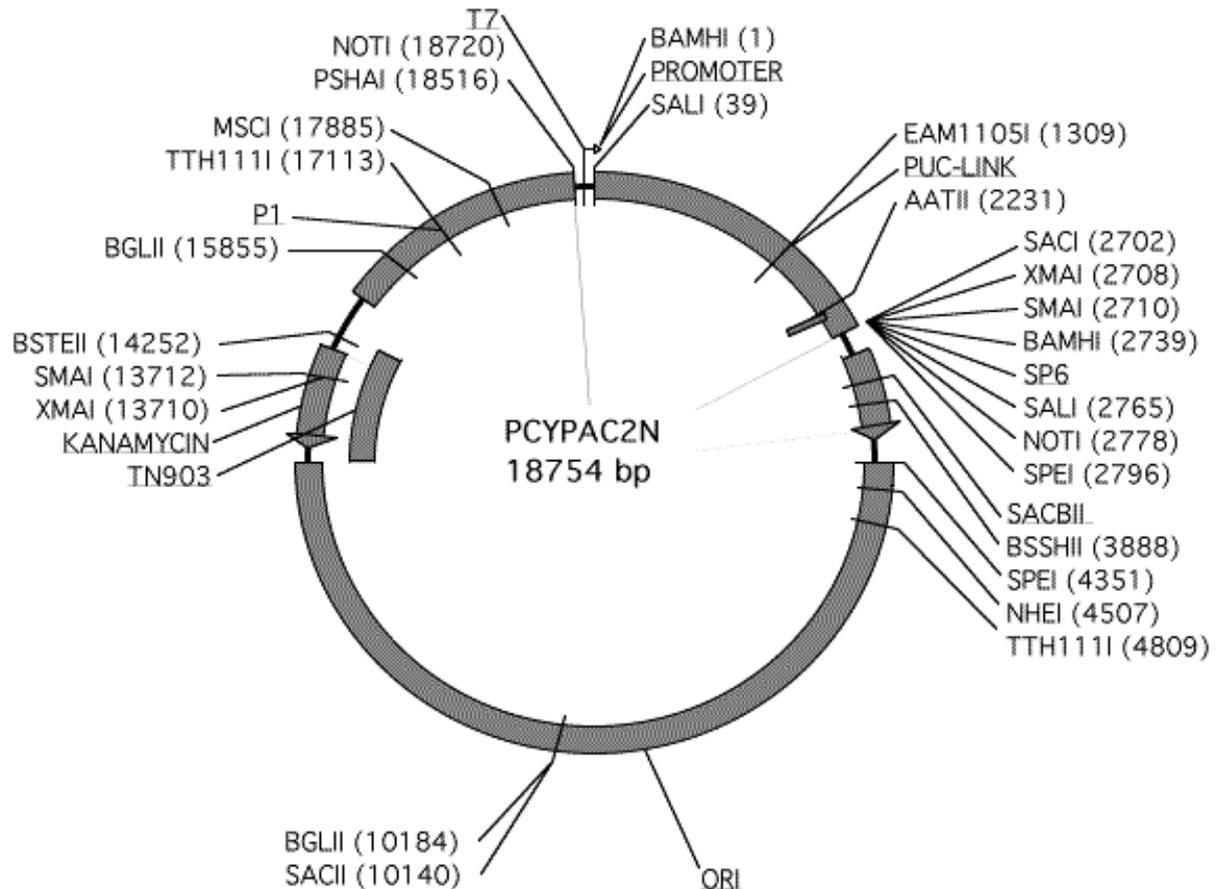


Abb. 2-3: Schematische Darstellung des pCR 2.1 Vektors (Invitrogen).

2.4.4 Präparation genomischer DNA

Lysepuffer: 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA

Chelex[®] 100 Resin, 100-200 mesh (BIORAD)

1 ml Leukozytenkonzentrat (human) wird 2x mit 10 ml PBS gewaschen (5 min, 2000 rpm), in 10 ml Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis stehen gelassen. Nach Zentrifugation bei 2000 rpm wird der Überstand abgesaugt, das Pellet in 500 μl ddH₂O aufgenommen und 20 min bei 95°C erhitzt. Nach kräftigem Schütteln werden 200 μl Chelex zugegeben und 20 min bei RT rotiert, anschließend wird nochmals für 10 min auf 95°C erhitzt. Nach 5 min bei 14000 rpm werden 500 μl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert und können dann bei -20°C gelagert werden.

2.4.5 Präparation von PAC-DNA

Alkalische Lyse mit Phenolextraktion

Lösung 1: 13,5 µl Glucose (20 %)	Lösung 2: 12,0 µl 10 M NaOH
7,5 µl 1 M Tris/Cl, pH 8.0	7,5 µl SDS (20 %)
6,0 µl 0,5 M EDTA	558,0 µl dd H ₂ O
273,0 µl dd H ₂ O	
1,5 mg Lysozym	Lösung 3: 3 M KOAc, pH 4.8

Von 3 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur (LB/Kan, 37°C, 200 rpm) werden 0,5 ml in 15 ml LB/Kan-Medium verdünnt und mit 1 mM IPTG (low copy → high copy) induziert (37°C, 200 rpm, 4h). Nach Zentrifugation (4000 rpm, 15 min) wird das Bakterienpellet zur Lyse in 250 ml Lsg. 1 resuspendiert und in Eppendorfcups überführt. Für die Denaturierung wird mit 500 µl Lsg. 2 vorsichtig invertiert und danach mit 375 µl Lsg. 3 neutralisiert. Das Zellpellet wird 15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Lysat in ein neues Eppendorfcup überführt. Für die Phenolextraktion wird mit ½ Vol. Phenol-Chloroform kräftig geschüttelt, 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und die Oberphase anschließend zur Entfernung von Phenolresten mit ½ Vol. Chloroform ausgeschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 10 min) wird der Überstand mit 1 Vol. Isopropanol versetzt, 2 min bei RT stehen gelassen und 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet noch zweimal mit je 100 µl 70 % und 95 % EtOH gewaschen. Die DNA wird dann in 50 ml TE-Puffer aufgenommen, mit 1 µl RNase (10 mg/ml) versetzt und zur besseren Resuspendierung 15 min bei 68°C gelöst. Die PAC-DNA kann bei 4°C gelagert werden.

2.4.6 Plasmidpräparation

2.4.6.1 Plasmid-Minipräparation

(Sambrook, 1989)

STET-Puffer: 0,1 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 % Triton X-100

1-2 ml einer ÜNK in LB-Medium werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (2 min, 14000 rpm). Das Zellsediment wird in 350 µl STET-Puffer resuspendiert und mit 25 µl Lysozym (10 mg/ml) zum Zellaufschluß versetzt (10x invertieren).

Proteine und genomische DNA werden durch 40“ Erhitzen bei 100°C, kurzem Abkühlen auf Eis und anschließendem Abzentrifugieren (5 min, 14000 rpm) abgetrennt. 350 µl Überstand werden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl Isopropanol und 30 µl 2,5 M NaOAc, pH 5.0 vermischt. Nach Zentrifugieren (14000 rpm, 10 min) wird der Überstand dekantiert und das Pellet mit 300 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wird zentrifugiert (14000 rpm, 10 min), das DNA-Pellet nach Trocknen in 30 µl ddH₂O gelöst und evtl. mit 1 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) für mindestens 15 min bei 37°C inkubiert.

2.4.6.2 Plasmidpräparation mit Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BIORAD)

(Ausubel, 1987)

- (1) Je 2 ml Bakteriensuspension werden in 2,0 ml Eppendorffgefäße überführt, 30“ mit 14000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen.
- (2) Nach der Lysierung der Zellen mit 250 µl Lysepuffer und der Zugabe von 250 µl Neutralisationspuffer (vorsichtig schütteln) wird 5 min mit 14000 rpm zentrifugiert.
- (3) Anschließend wird der Überstand mit 200 µl Gelsuspension versetzt, auf BIORAD-Säulchen aufgetragen und die DNA durch Zentrifugation (30“, 14000 rpm) an die Gelmatrix gebunden. Das Eluat wird verworfen, die Säulchen werden noch zweimal mit 500 µl Waschlösung gewaschen und danach in neue Eppendorffgefäße überführt.
- (4) Zur Plasmidelution werden die Säulchen 30“ mit 50-100 µl ddH₂O stengelassen und im Anschluß daran 2 min mit 14000 rpm zentrifugiert.

2.4.6.3 Plasmidpräparation mit Qiaprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)

- (1) Das Pellet von 1-5 ml ÜNK von E.coli in LB-Medium wird in 250 µl Resuspensionspuffer P1 mit RNase A aufgenommen und in 2,0 ml Eppendorffgefäße überführt.
- (2) Der Lyse der Zellen mit 250 µl Lysepuffer P2 (5x invertieren) folgt die Neutralisation mit 250 µl Neutralisationspuffer N3 (5x invertieren), danach wird 10 min mit 14000 rpm zentrifugiert.
- (3) Anschließend wird der Überstand auf *QIAPrep spin columns* aufgetragen und die DNA an die Silika-Gelmatrix gebunden (14000 rpm, 60“).

(4) Das Eluat wird verworfen und die Säulchen werden zuerst mit 500 µl Puffer PB und danach mit 750 µl Puffer PE gewaschen.

(5) Zur Plasmidelution werden die Säulchen in neue Eppendorffgefäße überführt, 1 min mit 30-50 µl ddH₂O stehengelassen und im Anschluß daran 2 min mit 14000 rpm zentrifugiert.

2.4.7 Reinigung, Fällung und Trocknung von DNA

- Ausfällung von Nukleinsäuren

Die DNA-Lösung wird mit 1/10 Vol. 2 M NaOAc pH 5.5 (Salzkonzentration von ca. 0,2 M) und mit 2,5 Vol. EtOH gemischt und bis zur vollständigen Fällung der DNA für 30 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugieren (15 min, 20000 g) wird das Pellet mit einer geeigneten Menge 70 %-igem Ethanol gewaschen und kurz bei 37°C getrocknet. Die DNA sollte hierbei nicht vollständig eintrocknen. Anschließend wird die DNA in einem geeigneten Puffer (TE-Puffer oder in ddH₂O) gelöst.

Zur Entfernung von Nukleotiden oder kurzer ssDNA wird die Salzkonzentration mit 4 M NH₄OAc auf 2 M eingestellt und die DNA, wie oben beschrieben, gefällt.

2.4.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

(Warburg, 1941)

Stehen größere DNA-Mengen zur Verfügung, so kann die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren spektralphotometrisch durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums (Kontron Uvikon 930 Spektrophotometer) bei 240 - 320 nm erfolgen. Bei einer Extinktion von 1 bei 258 nm und einer Schichtdicke von 1 cm ergeben sich folgende Nukleinsäurekonzentrationen:

Nukleinsäuren:	Konzentration
dsDNA	50 µg/ml
ssDNA	33 µg/ml
Oligonukleotide	20 µg/ml

Die Konzentration der DNA kann darüber hinaus auch über eine analytische Agarose-Gelelektrophorese bestimmt werden:

Bei DNA-Mengen unter 200 ng ist die durch Ethidiumbromid verursachte Fluoreszenz der DNA-Banden direkt proportional zur Menge an DNA. Ein Vergleich der gefärbten, fluoreszierenden Banden mit einem Standard bekannter Konzentration läßt auf die aufgetragene Menge an DNA schließen.

2.4.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Ansatz: 2 µl ds DNA (1-10 µg)
+ 1 µl Restriktionsenzym (1-10 U)¹
+ 1 µl (10x) Restriktionspuffer
+ 6 µl H₂O
- 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubieren.

Für die Spaltung von dsDNA mit Restriktionsendonucleasen werden die von den Herstellern empfohlenen Reaktionsbedingungen und die mitgelieferten 10-fachen Reaktionspuffer verwendet. Analytische Spaltungen mit 100 - 500 µg DNA werden bei 37°C für 1 h mit 1 - 10 U Restriktionsendonucleasen durchgeführt. Die Vollständigkeit der Spaltung wird durch Agarose-Gelelektrophorese eines geeigneten Aliquots überprüft.

2.4.10 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

(Rickwood, 1984)

Laufpuffer: 0,5 x TBE-Puffer
EtBr: 5 mg/ml
Agarose-Gel: 0,7 - 2 % Agarose in 0,5 x TBE mit 0,5 µg/ml

Die Agarosekonzentration des Gels richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente (Tab. 2-6). Bei präparativen DNA-Agarose-Gelen wird nach der Elektrophorese die entsprechende Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA im Anschluß aus dem von überflüssiger Agarose befreiten Gelstück eluiert.

¹ 1U Restriktionsendonuclease kann 1µg DNA in 1 h spalten.

Größe der linearen DNA [kbp]	Agarose-Konzentration [%]
5,0 – 60	0,3
1,0 – 20	0,6
0,8 – 10	0,7
0,4 – 7,0	1,0
0,2 – 4,0	1,5
0,1 – 3,0	2,0

Tab. 2-6: DNA-Agarose-Gelelektrophorese.

Die Agarose wird mit Laufpuffer aufgeköcht und im Wärmeschrank bei 50°C gelagert. Vor der Verwendung wird die Agarose mit 1/1000 Vol. EtBr (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt und in einen horizontalen Gelschlitten mit entsprechendem Gelkamm gegossen. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 1/6 Vol. 6x Gel loading solution (Sigma) vermischt. Die Auftrennung der DNA erfolgt in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer bei maximal 100 V. Die negativ geladenen DNA-Fragmente laufen unter der angelegten Spannung (3 V/cm) zur Anode und werden dabei durch die größenabhängige Laufgeschwindigkeit aufgetrennt. Die DNA wird aufgrund des eingelagerten EtBr unter UV-Licht sichtbar und kann fotografiert werden. Die Zuordnung der verschiedenen Banden erfolgt durch Vergleich mit DNA-Fragmenten bekannter Größe.

2.4.10.1 DNA-Größenstandards

Folgende DNA-Molekulargewichtsmarker von MBI Fermentas wurden verwendet:

HMS: λ-Phagen-DNA/*EcoRI* mit *HindIII* geschnitten (0,5 mg DNA/ml)

LMS: pBr322-Plasmid-DNA *AluI* geschnitten (0,5 mg DNA/ml)

DNA-Leiter: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (0,5 mg DNA/ml)

HMS [bp]	LMS [bp]	DNA-Leiter[bp]
21226	910	1000
5148/4973	656/643	900
4268	521	800
3530	403	700
2027/1904	281/257/226	600
1584	100/90/63	500
1375	57/49/46	400
947		300
831		200
564		100
125		80

Tab. 2-7: DNA-Größenstandards.

2.4.10.2 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das System *Qiaquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) eingesetzt. Das Verfahren beruht auf der Bindung von DNA an Silicagel-Partikel und Reinigung dieser Komplexe mit ethanolischer Lösung, die Elution erfolgt durch einen geeigneten Puffer (z.B. TE-Puffer). Um das gewünschte DNA-Fragment zu isolieren, wird das aus einem präparativen Agarose-Gel (2.4.10) ausgeschnittene Gelstück mit 3 Vol. QG-Puffer bei 50°C aufgelöst (ca. 10 min). Die DNA wird mit 1 Vol. Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation von 1 min bei 14000 rpm an *QIAquick spin columns* gebunden. Zur Entfernung von Agarose und Salzen wird mit 500 µl QG-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgt mit 30 – 50 µl dd H₂O und kann dann ohne weitere Reinigungsschritte direkt für weitere Klonierungen verwendet werden.

2.4.11 Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

(Innis, 1990)

Thermozykler:	Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400
10x PCR-Puffer:	100 mM Tris · HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 1 % Triton X-100, 2 mg/ml BSA
PCR-Ansatz:	3,0 µl 10x PCR-Puffer 2,0 µl 5' Primer (10 µM) 2,0 µl 3' Primer (10 µM) 4,0 µl dNTPs (2 mM) 1,0 µl DNA-Template (10 µg/ml) 17,8 µl ddH ₂ O 0,2 µl Taq-Polymerase/Pfu-Polymerase (4 U/µl) (Sigma)

Der PCR-Ansatz wird in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengegeben und nach folgendem Programm im Thermozykler inkubiert. Zusätzliche Variationen von Temperatur und Zeit, der Zyklenzahl bzw. dem Einsatz von *nested* PCR, bei der die PC-Reaktionen so angesetzt sind, daß die Primer ineinander verschachtelt sind oder *touch down* PCR, innerhalb der die Temperatur während der Reaktion abfällt, werden jeweils gesondert aufgeführt.

PCR-Programm

Denaturierung:	94°C, 5 min
Schmelzen:	94°C, 40 sec
Annealing:	x°C ² , 40-60 sec
Elongation:	72°C, 1-3 min
Zyklenzahl:	32

Nach Ablauf des PCR-Programms wird ein Teil des Reaktionsansatzes mit 1/5 Vol. 6x Stopp-Puffer versetzt und zur Analyse auf einem DNA-Agarose-Gel (2.4.10) aufgetrennt.

² spez. Annealing-Temperatur, s. 2.4.2

2.4.12 Automatisierte DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von Herrn Wolfgang Hädel an einem DNA-Sequenzer der Firma Applied Biosystems (Modell 373A) nach Angaben des Herstellers und von SEQLAB (Sequence Laboratories, Göttingen), durchgeführt.

Die Didesoxy-Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem basenspezifischen Abbruch der DNA-Kettenverlängerung durch den statistischen Einbau von Farbstoff beladenen ddNTPs in die von den Primern her anwachsende Kette.

Es werden hierzu vier voneinander unabhängige Reaktionen durchgeführt, die neben gleichem Template, Primer und dNTPs jeweils verschiedene kettenabbrechende ddNTPs enthalten. Durch den statistischen Einbau der ddNTPs in die sich verlängernden Fragmente kommt es zu einem Kettenabbruch. Nach Abschluß der Polymerase-Reaktion werden die Produkte vereinigt, nach Fällung mit Ethanol in Formamid / 50 mM EDTA, pH 8.0 (5:1) aufgenommen und anschließend auf einem 7 %-igem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die einzelnen DNA-Fragmente können aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz im Argon-Laserstrahl detektiert werden. Unter Berücksichtigung der Molekulargewichte der jeweiligen Fragmente kann schließlich ihre Basensequenz bestimmt werden.

2.4.13 ³²P-Markierung von DNA

(Sambrook, 1989)

DNA-Stücke geeigneter Größe (150-300 bp) wurden mit dem Prime-It[®] RmT Random Primer Labeling Kit (Stratagene) mit [α -³²P]dCTP nach Angaben des Herstellers markiert.

25 - 50 ng DNA werden im Reaktionsgefäß mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 42 μ l gelöst. Der Reaktionsansatz wird 5 min auf 100°C erhitzt und anschließend kurz abzentrifugiert. Nach Zugabe von 5 μ l [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) und 3 ml Magenta DNA Polymerase (4 U/ μ l) wird der Ansatz 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird anschließend mit 2 ml Stopp-Mix (0,5 M EDTA, pH 8.0) abgestoppt und die spezifische Aktivität der DNA-Probe wie folgt bestimmt.

$$S_A = \frac{(\mu\text{Ci}) (2,2 \times 10^9) (P)}{M_i + [(1,3 \times 10^3) (P) (\mu\text{Ci} / S_a)]}$$

S_A = Spezifische Aktivität [dpm/ μg]

μCi = Summe der radioaktiv markierten Nukleotide im Reaktionsansatz [μCi]

P = Verhältnis der aufgenommenen radioaktiv markierten Nukleotide in der DNA-Probe (cpm des gewaschenen Whatman DE81 Filter/ cpm des ungewaschenen Whatman DE81 Filter)

M_i = eingesetzte DNA-Menge [ng]

S_a = spezifische Aktivität der markierten DNA-Probe [Ci/mmol]

2.4.14 Northern Blot

(Sambrook, 1989)

Der Northern Blot wurde mittels des Human Multiple Tissue Northern (MTNTM) Blot (Clontech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Der Northern MTN Plot enthält pro Spur je 2 μg poly A⁺RNA aus acht verschiedenen menschlichen Geweben (Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas). Als Hybridisierungsprobe wurde ein [α -³²P] markiertes Oligonukleotid, wie in Abschnitt 2.4.13 beschrieben, eingesetzt.