

Praktikum
Biologen F – Biochemie III
RNA-Biochemie

Nicolas Piganeau, Tijana Zivkovic, und Margot Binnewies

23.05.2007

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	3
1.1. Nicht kodierende RNA Moleküle (ncRNA)	3
1.2. RNA Interferenz.....	6
1.3. Ribozyme	8
Praktikumsversuch: Untersuchung der Ribozymaktivität des Hepatitis-δ-Virus	10
2.1. Herstellung des Templates mittels PCR.....	11
2.2. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung	12
2.3. <i>in vitro</i> - T7 - Transkription	12
2.4. UV-Shadowing.....	12
2.5. Elution von RNA aus Polyacrylamid-Gelen	13
2.6. Ribozymatische Spaltung.....	13
Praktikumsversuch: RNA-Interferenz	14
3.1. Herstellung von eigener siRNA	14
3.1.1. Herstellung des DNA Templates zur siRNA Herstellung mittels PCR	15
3.1.2. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung	16
3.1.3. <i>in vitro</i> - T7 - Transkription	16
3.1.4. Größen-Ausschluss-Chromatographie mit BioSpin P30	16
3.1.5. Hybridisierung der RNA.....	16
3.1.6. ShortCut RNase III Behandlung	16
3.1.7. Ethanol-fällung der siRNA.....	17
3.2. Zellkultur.....	18
3.2.1. Subkultivierung.....	18
3.2.2. Zellzahlbestimmung.....	18
3.3. Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	19
3.3.1. Transfektion und Stabilisierung von HeLa-Zellen mit dem GFP-kodierenden Plasmid	19
3.3.2. Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNA	20
3.3.3. Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.....	22
Praktikumsversuch: Nachweis der 6S RNA Expression in <i>E.coli</i> mittels Northern Blot und RT-PCR	24
4.1. Kultivierung von <i>E.coli</i> K12	25
4.2. RNA Präparation aus <i>E.coli</i>	25
4.2.1. Zellyse.....	25
4.2.2. heiße Phenol Extraktion	25
4.2.3. Chloroform Extraktion.....	26
4.2.4. Ethanol-fällung	26
4.3. Semiquantitative RT-PCR.....	26
4.3.1. Reverse Transkription	26
4.3.2. Semiquantitative PCR.....	27
4.4. Northern Blot	27
4.4.1. Elektrophorese.....	27
4.4.2. Membrantransfer	27
4.4.3. Herstellung und Markierung der Sonden	28

4.4.4.	Random Priming	29
4.4.5.	Hybridisierung	29
4.4.6.	Immunprinting	29
Allgemeine Arbeitsvorschriften		31
5.1.	Was ihr eigentlich schon wissen solltet!	31
5.1.1.	Sicherheit im Labor.....	31
5.1.2.	Nützliche Infos	31
5.2.	Allgemeine Arbeitshinweise beim Arbeiten mit RNA	31
5.2.1.	Herstellung von RNase-freien Lösungen	32
5.3.	Gel-Elektrophorese	32
5.3.1.	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	33
5.3.2.	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	33
5.3.3.	Native Acrylamid-Gel-Elektrophorese	34
5.3.4.	Denaturierende Acrylamid-Gel-Elektrophorese	35
5.3.5.	Nachweis von Nucleinsäuren in Gelen mittels Ethidiumbromidfärbung	36
5.4.	Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung von RNA oder DNA	36
5.4.1.	Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA oder DNA	36
5.4.2.	Ethanolfällung von Nucleinsäuren.....	36
5.5.	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	37
5.5.1.	Anleitung zum NanoDrop Photometer	37
5.6.	PCR	37
5.7.	Transkription	38
Puffer und Lösungen		40
Anhänge		43
7.1.	Sequenzen	43
7.1.1.	HDV Versuch.....	43
7.1.2.	siRNA Versuch	43
7.1.3.	6S RNA Versuch.....	44
7.2.	Größenstandard	46

Kapitel 1

Einleitung

Unser Verständnis über die Rolle der Ribonukleinsäure im zellulären Metabolismus hat sich in den letzten 20 Jahren stark geändert. Jahrelang war das Bild der RNA Funktion von ihrer passiven Rolle als messenger (Boten) RNA (mRNA) geprägt. Dabei standen die DNA als Erbgutspeichermolekül und die Proteine als eigentliche Effektoren viel mehr im Vordergrund. Nur langsam änderte sich dieses Bild und es wurde erkannt, dass RNA auch eine aktive Rolle in der Zelle spielt. Diese Entwicklung wurde durch mehrere Durchbrüche möglich.

Zuerst entdeckten Anfang der 80er Jahren die beiden späteren Nobelpreisträger Thomas R. Cech und Sidney Altman, dass RNA enzymatisch wirken kann¹. Diese Entdeckung führte schließlich im Jahr 2000 zu der Erkenntnis, dass die Translation, eine der komplexesten und wichtigsten zellulären Reaktionen, von der ribosomale RNA katalysiert wird². Eine entscheidende Eigenschaft von Ribonukleinsäuren ist hierbei die Fähigkeit komplexe dreidimensionale Strukturen auszubilden. Ähnlich wie bei Proteinen können so Bindungstaschen entstehen, die hochspezifische Interaktionen erlauben. RNA kann demnach als Rezeptor fungieren, der seine Struktur durch Bindung eines Substrats ändert. Solche RNA Moleküle werden als Riboswitch bezeichnet.

Weiterhin wurden nach und nach immer mehr RNA Moleküle mit regulatorischen Funktionen entdeckt. Der Nobelpreis 2006 für Medizin wurde für die Entdeckung der sogenannten RNA Interferenz³, einem RNA-basierten regulatorischen Mechanismus, verliehen⁴.

1.1. Nicht kodierende RNA Moleküle (ncRNA)

Die Bedeutung kleiner, nicht kodierender RNAs ist in den letzten Jahren immer deutlicher geworden. Neben den relativ bekannten tRNAs (transfer) und rRNAs (ribosomal) gibt es noch eine Vielzahl weiterer nicht kodierender RNA Moleküle. Zu ihnen gehören

¹ Zaug, A. J. and Cech, T. R. **1986** The intervening sequence rna of tetrahymena is an enzyme. *Science* **231**(4737): 470-475.

Cech T.R. **1990** Nobel lecture. Self-splicing and enzymatic activity of intervening sequence RNA from tetrahymena **10**(3):239-61

Altman S.**1990** Nobel lecture. Enzymatic cleavage of RNA by RNA. *Biosci Rep.* **10**(4):317-37

² Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P.B., Steitz T.A. **2000** The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science.* **289**(5481): 920-930.

Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P.B., Steitz T.A. **2000** The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**(5481): 905-920.

³ Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. **1998** Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669): 806-811.

⁴ Abbott A. **2006** Youthful duo snags a swift Nobel for RNA control of genes. *Nature* **443**(7111): 488.

Couzin J. **2006** Nobel Prize in Physiology or Medicine. Method to silence genes earns loud praise. *Science* **314**(5796): 34.

beispielsweise die snRNA (small nuclear), die verantwortlich für das Spleißen ist, und die snoRNA (small nucleolar), die als Cofaktor an der Prozessierung von RNAs beteiligt ist.

Meistens wird allerdings die Bezeichnung ncRNA für RNA Moleküle verwendet, die eine Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen. Diese weisen eine große Vielfalt in Sequenz, Struktur und Größe auf. So ist z.B. die siRNA mit ihren 17-23 Basenpaaren sehr klein im Vergleich zur über 100kb großen Air RNA, die am Silencing autosomal kodierter Gene beteiligt ist.

Ihr Wirkungsspektrum umfasst unter anderem die Regulation der Transkription und die Beeinflussung von Stabilität oder Translation einer Target-RNA (siehe **Abbildung 1.1**). Dabei lassen sich zwei generelle Mechanismen unterscheiden, über die regulatorische RNA-Moleküle wirken. Der verbreitetste Weg läuft über Basenpaarung mit der Target-RNA. Alternativ dazu können ncRNAs auch mit Proteinen interagieren und deren Aktivität beeinflussen.

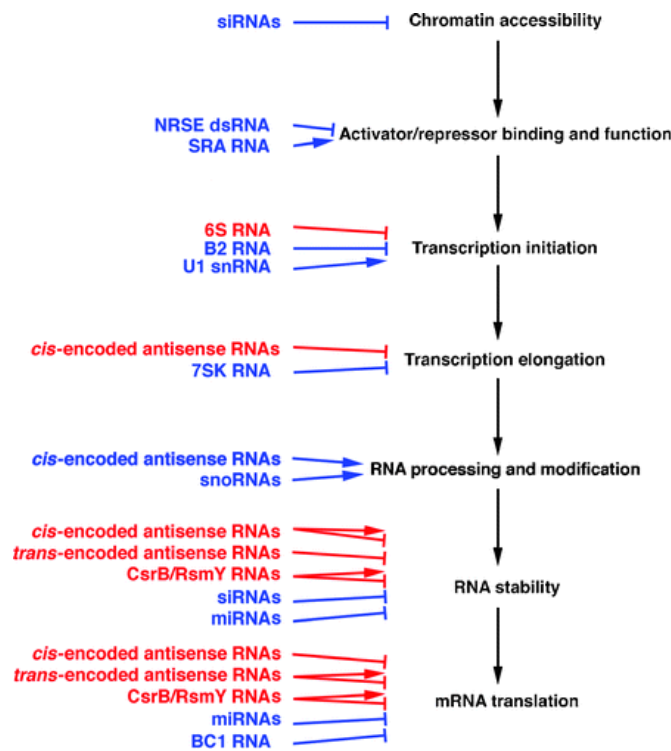


Abbildung 1.1 Schritte der Genexpression, die durch RNA beeinflusst werden können⁵. Bakterielle und Plasmid- (rot) und eukaryotische (blau) ncRNAs wirken als positive (Pfeil) oder negative (Balken) Regulatoren auf die einzelnen Schritte der Gen-Expression.

Regulatorische RNAs, die über Basenpaarung an ihre Zielstruktur binden, lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Sogenannte *cis* kodierte RNAs befinden sich an derselben Stelle wie ihr Target, jedoch auf dem gegenüberliegenden Strang. Sie sind daher perfekt

⁵ Storz G., Altuvia S., Wassarman K.M. 2005 An abundance of RNA regulators. *Annu. Rev. Biochem.* 74:199-217

komplementär zu ihrer Target-Sequenz. Im Gegensatz dazu sind *trans* kodierte RNAs an einer anderen Stelle lokalisiert.

Cis kodierte antisense RNAs wurden zuerst in bakteriellen Plasmiden entdeckt, wo sie unter anderem die Expression von Genen beeinflussen, die für die Replikation von Bedeutung sind. Sie können aber auch bei der Erhaltung des Plasmids im Wirt eine Rolle spielen. Das *hok-sok* System von Plasmid R1 basiert darauf, dass Bakterien, die das Plasmid nicht mehr enthalten, absterben⁶. Dieser Mechanismus beruht auf der Interaktion von zwei RNA-Molekülen mit unterschiedlicher Stabilität, die auf dem Plasmid lokalisiert sind. Das *hok* Gen (host killer) kodiert für ein kleines Protein, das die bakterielle Membran beschädigt und zum Zelltod führt. Die mRNA wird konstitutiv transkribiert und ist sehr stabil. Die Sok RNA (supressor of killing) ist eine instabile RNA, die mit der Hok mRNA hybridisiert. Dadurch wird die Translation von *hok* inhibiert und der Abbau der mRNA eingeleitet. Verliert der Wirt das Plasmid, kommt es durch den schnelleren Abbau der Sok RNA zur Translation des Hok Proteins und damit zum Zelltod (siehe **Abbildung 1.2**).

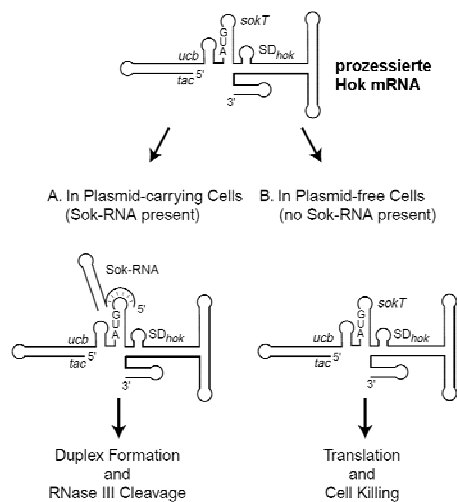


Abbildung 1.2 Modell des Hok-Sok Mechanismus⁶. Nähere Erläuterungen im Text

Trans kodierte RNAs zeichnen sich dadurch aus, dass sie in unabhängigen Transkriptionseinheiten exprimiert und durch spezifische Umweltbedingungen induziert werden können. Ein prominentes Beispiel ist hierfür die eukaryotische microRNA (siehe Abschnitt 1.2). In **Abbildung 1.3** sind weitere Beispiele dargestellt, wie ncRNAs durch Basenpaarung die Translation beeinflussen⁷.

Bei der Interaktion von nicht kodierenden RNA-Molekülen mit Proteinen ist die bakterielle 6S RNA der prominenteste Vertreter. Diese RNA wird unter Stressbedingungen transkribiert und inhibiert durch ihre Bindung die σ^{70} -RNA Polymerase und damit die Expression der „Housekeeping“ Gene. Im Praktikum soll die Transkription der 6S RNA aus *E. coli* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht werden.

⁶ Gerdes K., Alexander P., Gulyaev A.P., Franch T., Pedersen K., Mikkelsen N.D. **1997** Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu. Rev. Genet.* **31**:1-31

⁷ Storz G., Opdyke J.A., Zhang A. **2004** Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol.* **7**:140-144

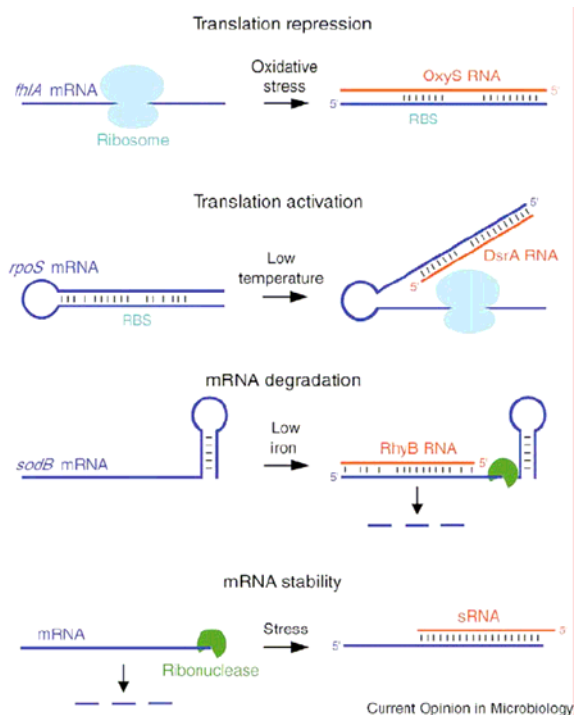


Abbildung 1.3 Übersicht über die bisher bekannten regulatorischen Mechanismen von ncRNAs über Basenpaarung⁸. ncRNAs (rot) können die Translation der mRNA (blau) durch Blockierung oder Freigabe der Ribosomen-bindestelle (RBS) reprimieren bzw. aktivieren. Sie können aber auch die mRNA-Stabilität positiv oder negativ beeinflussen.

1.2. RNA Interferenz

In eukaryotischen Zellen ist ein weiteres wichtiges Beispiel für nicht kodierende RNAs die RNA Interferenz (RNAi), die Ende der neunziger Jahre als Mechanismus zur selektiven Inhibition der Genexpression aufgeklärt wurde. Bei vielen Erkrankungen, wie z.B. Krebs, viralen Infektionen oder neurodegenerativen Erkrankungen, spielt eine veränderte oder gesteigerte Expression bestimmter Gene eine zentrale Rolle. Therapeutische Ansätze können demzufolge auf die Inhibition dieser als relevant erkannten Gene oder Genprodukte abzielen. Dabei kommen Strategien in Frage, die darauf abzielen, die Expression eines Targetgens ganz auszuschalten oder zumindest zu bremsen. Schnell wurde erkannt, dass RNAi hierfür eine besonders effiziente und - zumindest *in vitro* - einfach anzuwendende Methode ist. Entsprechend rasch hat vor allem *in vitro* die Verwendung von RNAi basierten Ansätzen, etwa in Genfunktionsstudien oder in High-Throughput-Analysen, zugenommen⁸.

RNAi ist ein sequenzspezifischer und posttranskriptionell ansetzender Mechanismus, der durch kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle initiiert wird (siehe **Abbildung 1.4**). RNAi beruht auf einem mehrere Schritte umfassenden intrazellulären Weg, der in zwei Phasen aufgeteilt werden kann. In der Initiationsphase werden doppelsträngige RNA-Moleküle endogenen (z.B. microRNAs) oder exogenen Ursprungs durch die Spaltungsaktivität eines

⁸ Aigner A. 2006 Einschleusung therapeutischer siRNA-Moleküle. *Laborwelt* Nr.6 Vol.7:6-10

Proteins vom Ribonuklease III-Typ (Dicer) in kleine, 17 bis 23 Basenpaare umfassende small interfering RNAs (siRNA) prozessiert. Diese siRNAs werden in den RNA-induced silencing complex (RISC) eingebaut und bringen so den RISC-Komplex mit seinen RNA-Helikase- und Nuklease-Aktivitäten in räumliche Nähe. Die Spaltung der Ziel-mRNA erfolgt in der Effektor-Phase durch das Argonaut-Protein im RISC-Komplex. Durch die Entwindung und Spaltung wird die Ziel-mRNA auf Grund ihrer jetzt ungeschützten Enden rasch von intrazellulären Nukleasen abgebaut. Der RISC-Komplex kann wiederum an eine neue Ziel-mRNA binden, entfaltet also eine katalytische Aktivität. Den zur Ziel-mRNA komplementären siRNAs kommt damit eine zentrale Rolle bei der Induktion von RNAi zu⁹. Zur Induktion der RNA-Interferenz können siRNAs entweder als DNA-basierte Expressionssysteme oder direkt als RNA-Oligonukleotide (siRNAs) in die Zelle gebracht werden.

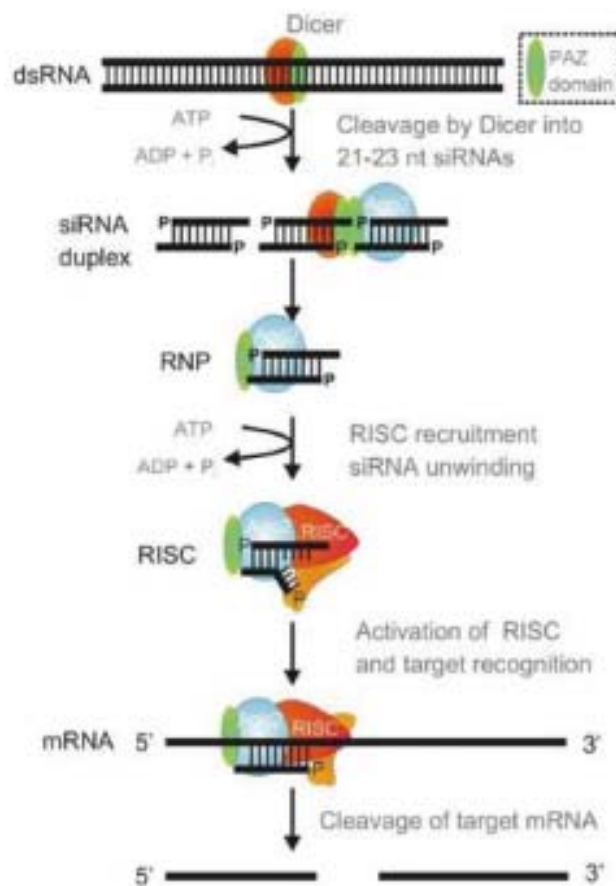


Abbildung 1.4 Vorgeschlagener Mechanismus von RNA-Interferenz. Nähere Erläuterungen im Text

Im Praktikum soll am Beispiel der Repression des Grün Fluoreszierenden Proteins die Wirkung von RNA-Interferenz demonstriert werden.

⁹ Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. **2001** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**(6836):494-8

1.3. Ribozyme

Katalytisch aktive RNA wurde erstmalig Ende der 80-er Jahre beschrieben. Der Gedanke, dass auch RNA katalytisch aktiv sein soll, war zunächst überraschend, da Nucleinsäuren die chemische Diversität von Proteinen fehlt. Trotzdem können RNA-Enzyme, ähnlich wie auch Proteine Reaktionen um den Faktor 10^5 bis 10^{11} beschleunigen. Erst in den letzten Jahren gab es große Fortschritte hinsichtlich Aufklärung und Verständnis von Struktur und Funktion katalytisch aktiver RNA-Moleküle. Vor allem Kristallstrukturen, die von einigen Ribozymen mittlerweile existieren, haben detaillierte Einblicke in die Ribozymwelt gestattet. Bisher konnten sieben Klassen natürlich vorkommender Ribozyme identifiziert werden. Die meisten katalysieren entweder die Spaltung oder Ligation von RNA-Molekülen¹⁰. Einzige Ausnahme bildet hier das Ribosom, das die Bildung von Peptidbindungen katalysiert und von dem auch gezeigt werden konnte, dass es als Ribozym wirkt¹¹.

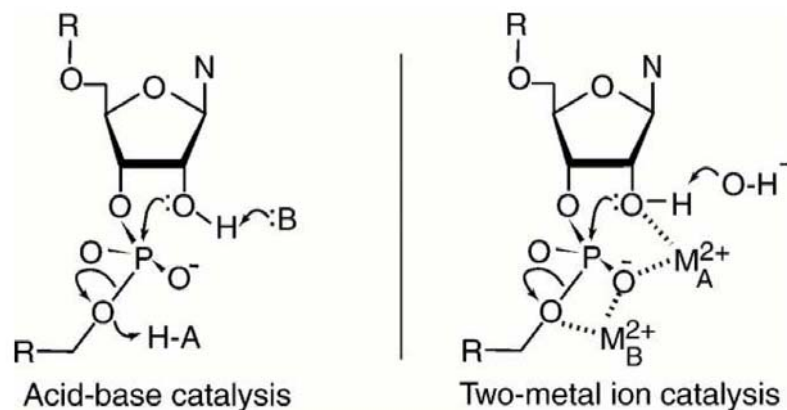


Abbildung 1.5 Mechanismus der RNA-Spaltung durch Säure-Base-Katalyse und Zwei-Metall-Ionen-Katalyse. :B ist die allgemeine Base und H-A die allgemeine Säure¹².

Eine Gruppe der natürlich vorkommende Ribozyme stellen die sogenannten kleinen Ribozyme dar. Zu ihnen zählen z.B. das Hammerhead-Ribozym, das hairpin-Ribozym oder das Hepatitis Delta Virus Ribozym. Diese Ribozyme findet man in viralen, virosoiden oder Satelliten- RNA-Genomen, wobei sie für die Prozessierung der Replikationsprodukte, die in einem rolling circle Mechanismus repliziert werden, verantwortlich sind. Der Reaktionsmechanismus dieser Ribozyme ähnelt dem der RNasen (siehe **Abbildung 1.5**), wobei ein 2',3'-Cyclophosphat und ein freies 5'-Hydroxylende entstehen.

Weitere Ribozymklassen sind bspw. die Gruppe I und II-Introns, die größer und komplexer aufgebaut sind als die kleinen Ribozyme. Des Weiteren unterscheiden sie sich auch

¹⁰ Doudna, J. A. and Cech, T. R. **2002** The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **418**(6894): 222-228.

¹¹ Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P.B., Steitz T.A. **2000** The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**(5481): 920-930.

Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P.B., Steitz T.A. **2000** The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**(5481): 905-920.

¹² Doudna, J. A. and Cech, T. R. **2002** The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **418**(6894): 222-228.

hinsichtlich des Reaktionsmechanismus. Das Nukeophil und die zu spaltende Phosphatgruppe liegen hier entweder auf verschiedenen Molekülen (Gruppe I-Introns - **Abbildung 1.6**) oder auf dem gleichen Strang, aber in der Primärsequenz weit voneinander entfernt (Gruppe II-Introns - **Abbildung 1.6**). Die komplexe Faltung dieser Ribozyme dient daher vor allem dazu, das Nukeophil und die zu spaltende Phosphatgruppe in die richtige Orientierung zueinander zu bringen.

Neben den natürlich vorkommenden Ribozymen können auch RNA-Moleküle selektiert werden, die bestimmte, auch nicht natürliche chemische Reaktionen katalysieren können. So konnten bspw. durch *in vitro* Selektion RNAs gefunden werden, welche die Knüpfung einer C-C-Bindung katalysieren¹³.

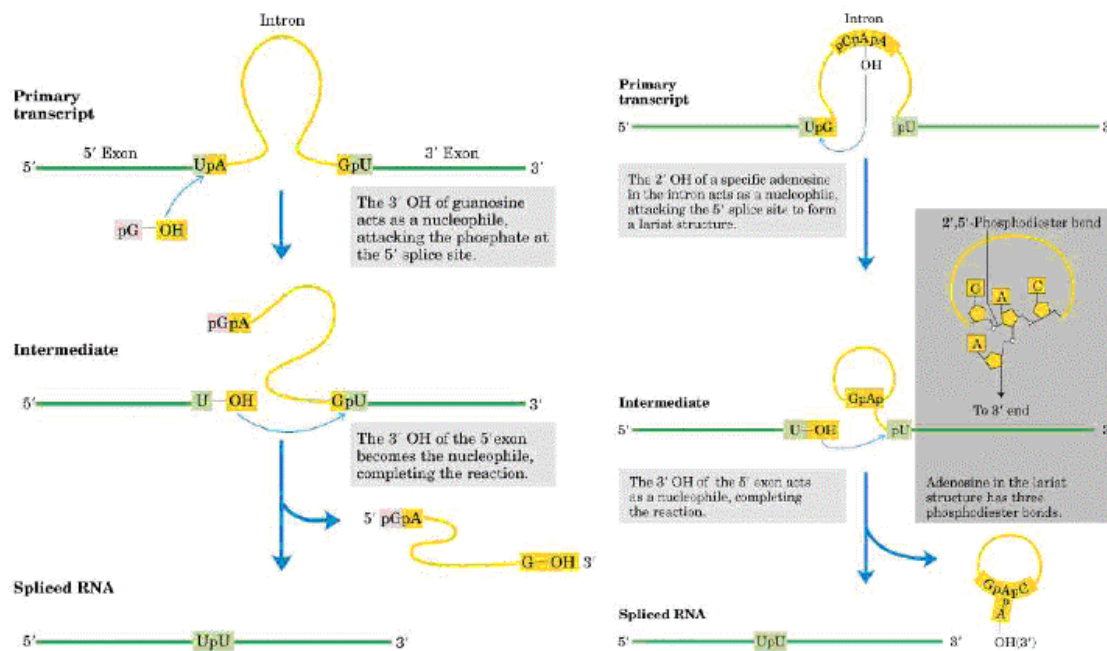


Abbildung 1.6 Splicing Mechanismus der Gruppe I-Introns (links) und der Gruppe II-Introns (rechts)

¹³ Jaschke, A. 2001 RNA-catalyzed carbon-carbon bond formation. *Biol Chem* **382**(9), 1321-5

Jaschke, A., Stuhlmann, F., Bebenroth, D., Keiper, S., and Wombacher, R. 2002 Ribozyme-catalysed carbon-carbon bond formation. *Biochem Soc Trans* **30**(6), 1137-40

Kapitel 2

Praktikumsversuch: Untersuchung der Ribozymaktivität des Hepatitis- δ -Virus

Als Hepatitis wird ein Krankheitsbild bezeichnet, das sich primär auf die Leber beschränkt und nur sekundär andere Organsysteme in Mitleidenschaft zieht. Die Hepatitis wird durch Viren verursacht, die der Erkrankung ihren Namen geben: Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis D (Delta-Hepatitis) und Hepatitis E.

Das Hepatitis- δ -Virus (HDV) wurde erstmals 1977 als ein neues Antigen (HDAG) auf Hepatozyten (Leberzellen) bei HBV-infizierten Patienten beschrieben. Anschließend konnte jedoch erfolgreich gezeigt werden, dass das HDAG von einem neuen Virus, dem HDV stammt. Das HDV ist ein defektes bzw. inkomplettes Virus, ein sogenanntes Virusoid oder Satelliten-Virus des HBV. Dieses Virus hat keine eigene Hülle und kann sich nur in Anwesenheit von HBV und mit Hilfe des vom HBV stammenden Oberflächenproteins (Hepatitis B surface Antigen HBsAg) vermehren.

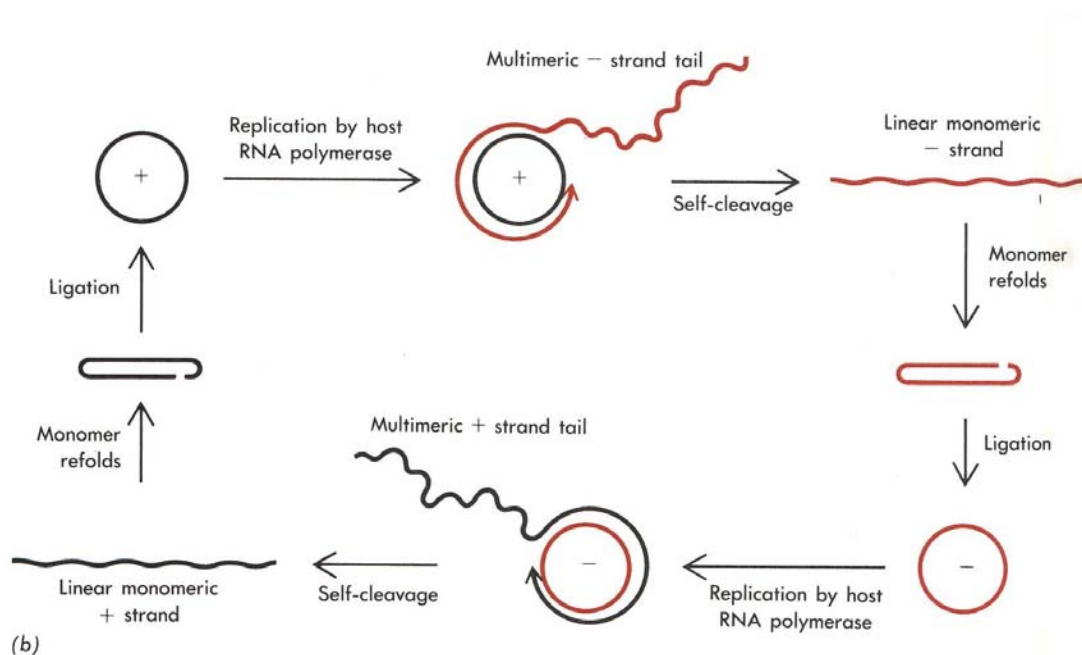


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des „double rolling circle“ Mechanismus. Erläuterungen im Text.

Das Hepatitis- δ -Virus, mit einem Durchmesser von ca. 36 nm, gehört zur Familie der Hapnaviridae. Die Partikel enthalten ein RNA-Genom und mehrere Kopien des delta Antigens (HDAG). Die RNA besteht aus etwa 1700 Nukleotiden, ist einzelsträngig und zirkulär mit einem hohen G-C-reichen Anteil (60 %) und einem hohen Grad an intramolekularen Basenpaarungen (fast 70 % der Nukleotide).

Wie schon in 1.3 erwähnt, zählt das Hepatitis Delta Virus Ribozym zur Gruppe der natürlich vorkommenden kleinen Ribozyme. Das Ribozym des HDV ist ein RNA-Oligomer, welches für die Selbstspaltung und Ligation der Replikationsprodukte, die über ein „double rolling circle“ (**Abbildung 2.1**) Mechanismus entstehen, verantwortlich ist. Etwa 85 Nukleotide des HDV RNA-Genoms tragen die Ribozym-Aktivität (siehe **Abbildung 2.2**).

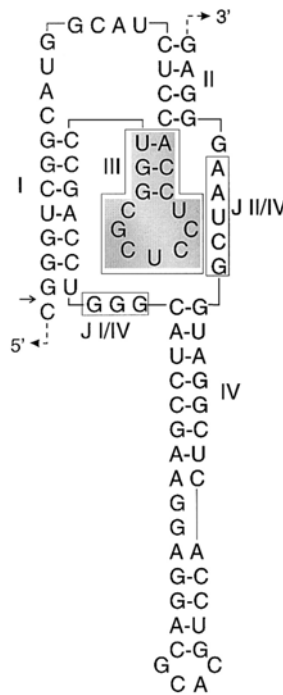


Abbildung 2.2 Sequenz und Sekundärstruktur des genomischen HDV Ribozyms. Der Pfeil zeigt auf die Selbstspaltungsstelle

Die zirkuläre genomische RNA dient als Template für den ersten Schritt der RNA-Replikation. Die Wirts RNA-Polymerase „rollt“ mehrmals um die zirkuläre genomische RNA und synthetisiert zunächst ein antigenomisches RNA Intermediat, welches hintereinander mehrere Kopien des Antigenoms enthält. Das HDV Ribozym spaltet das multimere Intermediat in monomere RNA Stücke und zirkularisiert diese anschließend durch Ligation. Die zirkuläre monomere-antigenomische RNA dient nun als Template, um in einer zweiten Replikationsrunde (**double rolling circle**), die genomische monomere HDV-RNA zu generieren (siehe **Abbildung 2.1**).

2.1. Herstellung des Templates mittels PCR

Die Herstellung von RNA erfolgt über *in vitro* Transkription. Hierfür werden virale Transkriptionssysteme verwendet, da diese Enzyme hoch aktiv sind, eine kurze Promotor Sequenz spezifisch erkennen, aus einer einzigen Einheit bestehen und somit einfach zu

reinigen sind. Gängige Vertreter sind vor allem die T7-, die T3- sowie die SP6-RNA-Polymerase aus den entsprechenden Bakteriophagen.

Als Template für die Polymerasen dient doppelsträngige lineare DNA. Das kann entweder ein linearisiertes Plasmid oder, wie in unserem Fall, ein PCR-Produkt sein. Die Darstellung des Templates über PCR hat den Vorteil, dass über die Primer ein nicht vorhandener Promotor eingeführt werden kann.

PCR Zusammensetzung (Vorschrift 5.6)

- Ansatz: 100 µl
- Template: pHDV
- Primer: M13/Puc18 seq rev, HDV_rev
- Annealing Temperatur: 55°C
- Anzahl der Zyklen: 25

Das zu erwartende PCR-Produkt hat eine Länge von 224 Basenpaaren. Der Erfolg der PCR wird mittels Gelelektrophorese (Vorschrift 5.3). untersucht.

2.2. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung

Der PCR-Ansatz wird wie in 5.4.1 beschrieben mit Phenol-Chloroform extrahiert. Anschließend findet eine Ethanolfällung gemäß Vorschrift 5.4.2 statt. Das Pellet wird in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und komplett für die T7-Transkription eingesetzt. Eventuell kann ein Aliquot (1µl) für eine Gelelektrophorese aufgehoben werden.

2.3. *in vitro* - T7 - Transkription

Bei der Ribozym-Transkription (siehe Kapitel 5.7) ist zu beachten, dass die RNA sich während des Transkriptionsprozesses selbst spalten kann, da der Transkriptionspuffer alle dafür nötigen Komponenten enthält. Die Transkription (100 µl) wird daher auf eine Stunde verkürzt und es wird auf den Verdau der DNA verzichtet. Weiterhin wird die Spaltung der RNA durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt. Anschließend erfolgt die Fällung der RNA (siehe 5.4.2). Das getrocknete Pellet wird in 10 µl 8 M Harnstoff gelöst und auf ein denaturierendes Acrylamid-Gel (siehe 5.3.4) aufgetragen. Die Banden werden mittels UV-Shadowing detektiert, ausgeschnitten und eluiert. Dabei soll die transkribierte RNA eine Länge von 175 nt aufweisen.

2.4. UV-Shadowing

Die Methode des UV-Shadowing bietet die Möglichkeit, Nukleinsäuren aufgrund ihres hohen Absorptionskoeffizienten bei UV Licht in Polyacrylamid-Gelen zu visualisieren ohne sie anfärben zu müssen. Dazu wird das in Klarsichtfolie eingeschlagene Gel auf eine Dünnschichtchromatographieplatte mit Fluoreszenzindikator gelegt. Nukleinsäurebanden können durch aufgestrahltes UV-Licht (254 nm) mit einer Handleuchte als Schatten auf der Kieselgelplatte sichtbar gemacht werden. Durch die geringe Empfindlichkeit ($\geq 0,3 \mu\text{g}$) eignet sich diese Art der Detektion vor allem für präparative Reinigung von

Nukleinsäuren. Um UV-induzierte Schäden an den Nukleinsäuren zu vermeiden, sollte das UV-Licht möglichst kurz eingestrahlt werden. Die Banden werden mit einem Folienmarker markiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke werden zerkleinert in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Anschließend folgt die Elution der RNA aus dem Gel.

2.5. Elution von RNA aus Polyacrylamid-Gelen

Die mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese gereinigte und durch UV-Shadowing detektierte RNA wird durch Diffusionselution aus dem Gel extrahiert. Dazu werden die zerkleinerten Gelstücke mit 500 µl RNA-Elutionspuffer versetzt und entweder eine Stunde bei 65°C oder über Nacht bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln eluiert. Anschließend werden die Gelstücke abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Tube überführt und die extrahierte RNA nach Anleitung 5.4.2 gefällt. Das Pellet wird in 50 µl 2 mM EDTA-Lösung aufgenommen.

1 µl der Lösung wird mit 9 µl Wasser verdünnt und zur Konzentrationsbestimmung photometrisch vermessen (siehe 5.5).

2.6. Ribozymatische Spaltung

Für die ribozymatische Spaltung werden 9 pmol Ribozym RNA in 2 mM EDTA-Lösung auf ein Volumen von 540 µl gebracht. Zur Molaritätsberechnung kann eine mittlere Molmasse von 340 g/mol pro Nukleotid verwendet werden.

Um eine möglichst gleichmäßige und native, das heißt aktive Faltung zu gewährleisten, wird der Ansatz zunächst für drei Minuten bei 94°C denaturiert, für zwei Minuten auf Eis gekühlt und anschließend für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Die Spaltung wird durch Zugabe von 60 µl Ribozym-spaltungspuffer eingeleitet.

Zur Kontrolle wird das gleiche Experiment mit Ribozym-spaltungspuffer OHNE Magnesiumchlorid durchgeführt.

Die Spaltungsansätze werden bei 37°C inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 sowie nach 30 und 120 min werden jeweils 200 µl abgenommen, die sofort mit NaAc und Ethanol (siehe 5.4.2) gefällt werden. Da die RNA-Konzentration sehr gering ist, wird zur Unterstützung der Fällung 2 µl Glykogen (10 µg/µl) als Carrier zugesetzt. Die Pellets werden jeweils in 10 µl 8 M Harnstofflösung aufgenommen und auf einem Polyacrylamid-Gel getrennt (siehe 5.3.2). Nach Spaltung des Ribozyms sollten 2 Fragmente im Gel sichtbar sein, die in Höhe von 109 und 66 nt laufen.

Kapitel 3

Praktikumsversuch: RNA-Interferenz

In diesem Praktikumsversuch wird die Expression des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP) mittels der Technik der RNA-Interferenz herunterreguliert. Der Effekt wird zum einen an HeLa Zellen untersucht, die mit einem GFP-kodierenden Plasmid transfiziert werden, sowie zum anderen an einer stabil mit GFP-transfizierten HeLa Zelllinie. Die Herunterregulierung der GFP Expression erfolgt durch siRNA (small interfering RNA). Hierbei wird im Rahmen des Praktikums sowohl eigene siRNA hergestellt als auch kommerziell gekaufte siRNA (von der Firma Qiagen), die mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin gelabelt ist, verwendet.

3.1. Herstellung von eigener siRNA

Bei siRNA handelt es sich um kurze (17-25 nt) doppelsträngige RNA mit zwei am 3'-Ende überhängenden Nukleotiden. Solche siRNA-Moleküle lassen sich mit ShortCut RNase III (von der Firma New England Biolabs) aus langer doppelsträngiger RNA generieren. Um RNA herzustellen, wird doppelsträngige lineare DNA als Template benötigt, die die RNA-Polymerase Promotersequenz trägt. Aus diesem Grund muß sich die RNA-Promotersequenz am DNA Template sowohl am sense als auch am antisense Strang jeweils am 5'-Ende befinden. In diesem Fall wird sie mittels überhängender Primer in der PCR eingebaut.

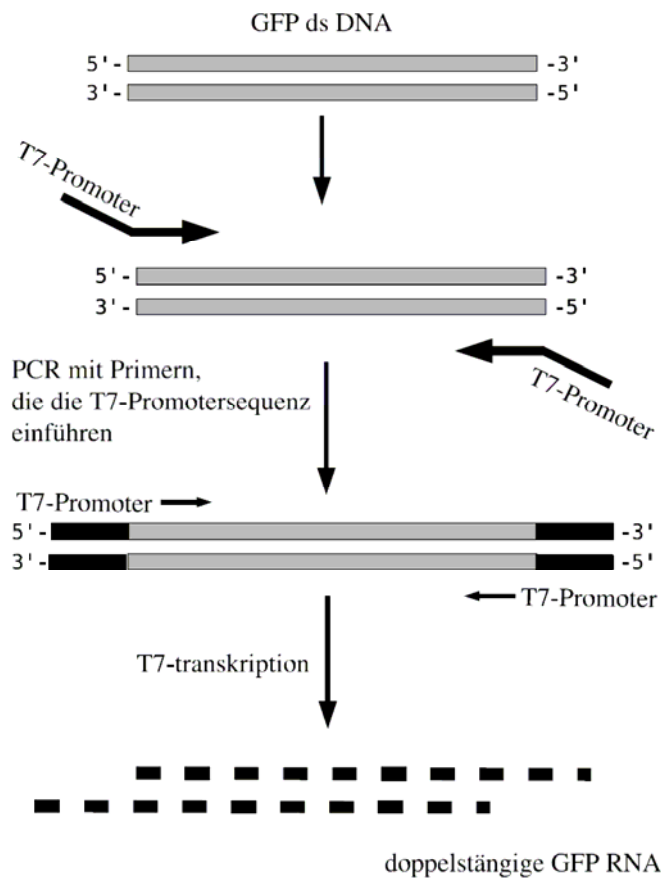


Abbildung 3.1 Schema zur Herstellung der dsRNA

3.1.1. Herstellung des DNA Templates zur siRNA Herstellung mittels PCR

Aus Kostengründen werden beide längere überhängende Primer (F1T7 und R4T7, Primer Mix) nur in geringer Menge eingesetzt (10 pmol). Ein T7 Primer, der auf die Überhänge greifen kann, wird zusätzlich in höherer Konzentration (200 pmol) zum Reaktionsansatz gegeben.

PCR Zusammensetzung (siehe Kapitel 5.6)

- Ansatz: 100 µl
- Template: pEGFP-N1 (*MlyI* verdaut)
- Primer: F1T7 und R4T7, T7 Primer
- Annealing Temperatur: 50°C
- Anzahl der Zyklen: 25

Das zu erwartende PCR-Produkt hat eine Länge von ca. 650 Basenpaaren.

3.1.2. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung

Der PCR-Ansatz wird wie in 5.4.1 beschrieben mit Phenol-Chloroform extrahiert. Anschließend findet eine Ethanol-fällung gemäß Vorschrift 5.4.2 statt. Das Pellet wird in 10 µl Wasser aufgenommen und zur T7-Transkription eingesetzt (Vorschrift 5.7).

3.1.3. *in vitro* - T7 - Transkription

Nach der Transkription (100 µl Ansatz) wird der Ansatz mit saurem Phenol-Chloroform extrahiert (siehe 5.4.1) und die wässrige Phase (maximal 75 µl) wird mit den BioSpin P30 Säulchen von BioRad mittels Größen-Ausschluss-Chromatographie aufgereinigt.

3.1.4. Größen-Ausschluss-Chromatographie mit BioSpin P30

Auszug aus dem Original Protokoll:

1. Invert the column sharply several times to resuspend the settled gel. Tap the column to remove all air bubbles. Snap off the tip and place the column in a 2.0 ml microcentrifuge tube (supplied). Remove the cap.

If buffer does not begin to flow from the column, push the cap back on the column and remove it again to start the flow. Allow the excess packing buffer to drain by gravity to the top of the gel bed (about 2 min). Discard the drained buffer and place the column back into the 2.0 ml tube.

2. Centrifuge for 2 min in a microcentrifuge at 1,000 x g (see Centrifugation Notes section) to remove the remaining packing buffer. Note: The speed is important to ensure proper performance of the columns. Discard the tube.
3. Place the column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (supplied with 25 and 100 packs). Carefully apply the sample (max 75 µl) directly onto the top center of the gel bed. Do not disturb the gel bed. Application of more or less than the recommended sample volume may decrease column performance.
4. After loading the sample, centrifuge the column for 4 min at 1,000 x g.
5. The purified sample is now in 10 mM Tris buffer.

3.1.5. Hybridisierung der RNA

Damit sich die RNA Einzelstränge passend zu den RNA Doppelsträngen finden, wird ein Hybridisierungsschritt durchgeführt. Hierzu wird die RNA-Probe zur Denaturierung der RNA 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die RNA Konzentration der eluierten Lösung wird photometrisch bestimmt (siehe 5.5.) und 10 µg, bzw. maximal 70 µl werden mit ShortCut RNase III von New England Biolabs behandelt. 2 bis 5 µl der Probe werden vorher als Kontrolle für ein Gel abgenommen (siehe 3.1.7).

3.1.6. ShortCut RNase III Behandlung

Die hergestellte doppelsträngige RNA wird nun mittels der ShortCut RNase III zu siRNA verdaut. Folgende Lösungen werden zum ShortCut RNase III Verdau gemischt:

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

	Konzentration im Ansatz	Pipettierschema
10x ShortCut reaction Puffer	1x	
ds RNA	10 µg	(maximal 70 µl)
10x MnCl ₂ (200 mM)	1x	
ShortCut RNase III 1300 u/ml	13u	
Wasser		ad 100 µl

Der Ansatz wird 20 min bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, erfolgt die Zugabe von 10 µl 250 mM EDTA Lösung. Zur Aufreinigung und Aufkonzentration der siRNA wird eine Ethanol-fällung durchgeführt (siehe 5.4.2 bzw. 3.1.7).

3.1.7. Ethanol-fällung der siRNA

Da in diesem Fall die zu fällenden RNA Moleküle sehr klein sind, wird die Ethanol-Probe-Mischung mindestens 2 Stunden bei -20°C inkubiert. Außerdem wird, um die Effizienz der Fällung zu erhöhen, vor der Ethanolzugabe Glykogen (1-2 µl einer 20mg/ml Lösung) als Träger zugesetzt. Nach Lufttrocknung wird das Pellet in 20 µl Wasser aufgenommen.

Um den Erfolg der siRNA Produktion zu dokumentieren, sollte RNA vor und nach RNaseIII Verdau auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden.

3.2. Zellkultur

Die hier verwendete Zelllinie HeLa liegt als normale und als mit pEGFP-N1 stabil transfizierte, adhärenzte Zellkultur vor. Die Zellen werden mit sogenanntem Vollmedium, bestehend aus RPMI 1640-Medium mit 2 mM Glutamin, 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS; zur Hitzeinaktivierung das FKS 30 min bei 56°C inkubieren), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (beide Antibiotika dienen zum Schutz vor bakterieller Kontamination), in Dauerkultur gehalten. Die stabil transfizierte Zellkultur bekommt zusätzlich das Selektions-Antibiotikum G418 (im Verhältnis 1:1000) zum Vollmedium.

Die Zelllinien wachsen als konfluente Monolayer-Kulturen in Polystyrol-Zellkulturflaschen im Inkubator unter konstanten Bedingungen:

- Temperatur: 37°C
- Luftfeuchtigkeit 95%
- CO₂-Gehalt: 5%

Alle Arbeitsschritte der Zellkultivierung werden an einer sterilen Werkbank durchgeführt.

3.2.1. Subkultivierung

Zur Subkultivierung konfluent gewachsener Zellen wird zunächst mittels einer Pumpe das überstehende Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit reinem Waschmedium (RPMI ohne Zusätze oder PBS) gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Dauer des Ablösevorgangs variiert zwischen den unterschiedlichen Zelllinien. HeLa-Zellen benötigen etwa 10-12 Minuten bei Raumtemperatur bzw. 5-10 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Der Ablösevorgang wird durch Zugabe von etwa 10 ml Vollmedium gestoppt und die Zellzahl wird bestimmt (siehe 3.2.2). Die Zellen werden wie vorgegeben verdünnt und in neue Kulturgefäße ausgesät.

3.2.2. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wird durch Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Durch Zugabe von Trypanblau lässt sich zusätzlich die Vitalität der Zellen abschätzen. Trypanblau ist ein Farbstoff, der die Plasmamembran lebender Zellen nicht durchqueren kann, jedoch das Cytoplasma toter Zellen blau färbt. Lebende Zellen erscheinen damit im Mikroskop hell mit blau kontrastiertem Rand, während tote Zellen sich durch ihre dunkelblaue Färbung deutlich von den lebenden abheben. Die Oberfläche der Zählkammer ist durch eingravierte Linien in ein feines Raster unterteilt (siehe **Abbildung 3.2**). Legt man auf diese zentrale Fläche ein Deckglas, so beträgt der Abstand zwischen der Unterseite dieses Glases und der Oberfläche des Objektträgers genau 0,1 mm. Jedes der fünf Quadrate (in den vier Ecken und im Zentrum des Rasters) hat eine Fläche von 1 mm². Es berechnet sich ein Volumen von 0,1 µl über jedem dieser Quadrate.

Durchführung

Es werden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl einer 0,5% (w/v) Trypanblaulösung gemischt und kurz bei Raumtemperatur inkubiert. 10 µl dieser Mischung werden mit einer Pipette vorsichtig am Rand des Deckglases auf den zentralen, die Zählkammer umfassenden Teil des Objektträgers aufgebracht. Kapillarkräfte ziehen dann die Probe sofort in den Spalt. Die Zellzahl wird in den vier Großquadraten (A-D) ermittelt und je Milliliter nach folgender Formel berechnet:

$$(\text{Zellzahl} : 4) \times 2 \text{ (bei Trypanblaufärbung)} \times 10^4$$

Der Anteil der blau gefärbten Zellen wird gesondert gezählt und der Prozentsatz der toten Zellen bestimmt.

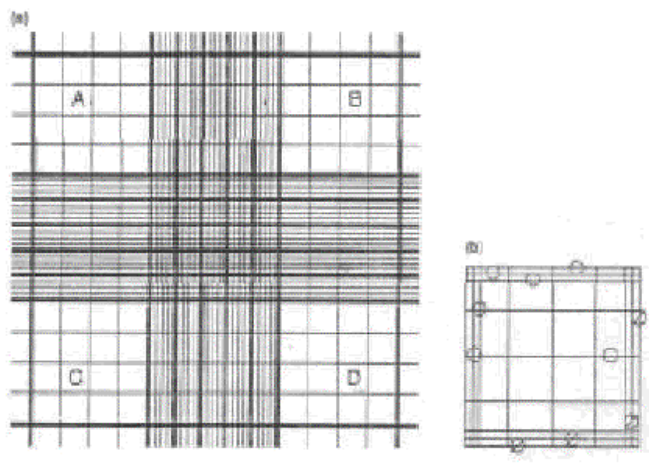


Abbildung 3.2 (a) Das Raster einer Zählkammer nach Neubauer. (b) Vergrößerung eines der 25 zentralen, kleinen Quadrate. Man erkennt, welche Zellen gezählt (O) und welche ignoriert (Ø) werden sollen. (aus Kultur tierischer Zellen, Spektrum-Verlag 1994).

3.3. Transfektion von eukaryotischen Zellen

Im Rahmen des Praktikums werden HeLa Zellen mit einem Expressionsplasmid, das das Grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert, transfiziert. Im Vergleich dazu wird eine stabil mit GFP transfizierte Zelllinie verwendet. Ein Teil der Zellen wird als Kontrolle zurück behalten. Der andere Teil wird mit siRNA gegen das Grün fluoreszierende Protein behandelt um eine Herunterregulierung der GFP Expression gegenüber den Kontrollzellen zu beobachten.

3.3.1. Transfektion und Stabilisierung von HeLa-Zellen mit dem GFP-kodierenden Plasmid

Für die Transfektion mit dem Expressionsplasmid für GFP werden 4 Wells der HeLa Zellen benötigt.

Die Transfektion erfolgt nach folgendem Protokoll:

1. Am Tag vor der Transfektion werden jeweils 60.000 - 75.000 Zellen pro Well einer 24-well Platte in 500 µl Medium mit Serum ausgesät. Die Zellen werden bis zum nächsten Tag bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, sodass sie am nächsten Tag 50-80% konfluent sind.
2. Am Tag der Transfektion werden pro Well 0,4 µg DNA (GPF-Plasmid) mit Transfektionsmedium (RPMI-Medium ohne Serum und Antibiotika) auf ein finales Volumen von 21 µl gebracht und durch Vortexen gut gemischt. Die DNA_Lösung mit 4 µl Plus-Reagenz pro Well versetzt und gut gemischt (entweder kurz vortexen oder mehrmals auf und ab pipettieren). Anschließend werden die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
3. In einem zweiten Tube werden pro well 1 µl Lipofectamin mit 24 µl Transfektions-Medium gemischt und nach der Inkubationszeit zu der prä-komplexierten DNA gegeben. Dieses Gemisch wird für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Während diesen Inkubationszeiten wird von den Zellen vorsichtig das Medium abgesaugt und durch 200 µl frisches Transfektionsmedium ersetzt. Bitte darauf achten, dass die Zellen nicht austrocknen!
5. Nach der Inkubationszeit kann der fertig gebildete DNA-Komplex langsam und tropfenweise auf die Zellen gegeben werden (50 µl pro well). Dabei sind die Platten leicht zu schwenken, um eine homogene Verteilung der DNA zu gewährleisten.
6. Die Zellen werden anschließend für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.
7. Nach den drei Stunden wird das Transfektionsmedium abgesaugt und die Zellen werden wie unter 3.3.2 beschrieben mit siRNA behandelt. Die Kontrollzellen werden mit 500 µl frischem Vollmedium versetzt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.3.2. Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNA

Zur Transfektion der HeLa Zelllinien mit siRNA sind 3 verschiedene Zelltypen mit 3 unterschiedlichen siRNA zu transfizieren. Als Zelltypen nutzen wir zum einen HeLa Zellen, die stabil mit GFP transfiziert sind (diese werden gestellt), HeLa Zellen, die im Rahmen des Praktikums selbst mit GFP transfiziert worden sind sowie als Kontrolle unbehandelte HeLa Zellen, die kein GFP exprimieren. Als siRNA stehen die im Rahmen des Praktikums selbst hergestellte siRNA gegen GFP und eine kommerziell erworbene siRNA gegen GFP, die mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin gelabelt ist, zur Verfügung. Zudem haben wir als Kontroll siRNA eine kommerziell erworbene siRNA, die ebenfalls mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin gelabelt ist und keine Funktionalität gegen GFP besitzt. Pro Transfektion wird ein Well benötigt. Außerdem wird pro Zelltyp ein Well benötigt, das nicht zur Transfektion eingesetzt wird und als unbehandelter Vergleich dient. Die Transfektion erfolgt nach folgendem Schema:

Zelltyp	Selbsthergestellte siRNA gegen GFP	siRNA gegen GFP, Rhodamin gelabelt	Kontroll-siRNA, Rhodamin gelabelt	Ohne siRNA
HeLa-GFP stabil transfiziert	x	x	x	x
HeLa-GFP selbst transfiziert	x	x	x	x
HeLa Kontrollzellen	x	x	x	x

Die Transfektion mit siRNA erfolgt nach folgendem Protokoll:

1. Am Tag vor der Transfektion werden jeweils 60.000 - 75.000 Zellen pro Well einer 24-well Platte in 500 µl Medium mit Serum und entsprechenden Antibiotika ausgesät. Die Zellen werden bis zum nächsten Tag bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.
2. Am Tag der Transfektion werden pro Well 1 µg siRNA (bei der kommerziellen siRNA von Qiagen entspricht das 3 µl der siRNA Lösung) mit Medium (+Serum und bei GFP-Zellen das Antibiotika G418) auf ein finales Volumen von 100 µl gebracht und durch Vortexen gut gemischt. Für die Komplexbildung werden 6 µl RNAiFect Transfektions-Reagenz zur RNA gegeben und gut gemischt (entweder kurz vortexen oder mehrmals auf und ab pipettieren). Die Proben werden anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur (15-25°C) inkubiert.
3. Währenddessen wird von den Zellen vorsichtig das Medium abgesaugt und durch 300 µl frisches Medium (+Serum und ggf. Antibiotika) ersetzt. Bitte darauf achten, dass die Zellen nicht austrocknen!
4. Nach der Inkubationszeit kann der fertig gebildete RNA-Komplex (106 µl pro well) langsam und tropfenweise auf die Zellen gegeben werden. Dabei sind die Platten leicht zu schwenken, um eine homogene Verteilung der RNA zu gewährleisten.
5. Die Zellen werden anschließend wieder bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.
6. Falls notwendig kann nach 24h des Medium erneuert werden

Nach 48 h findet die Analyse der Zellen am Durchflusszytometer (FACS) und am Mikroskop statt.

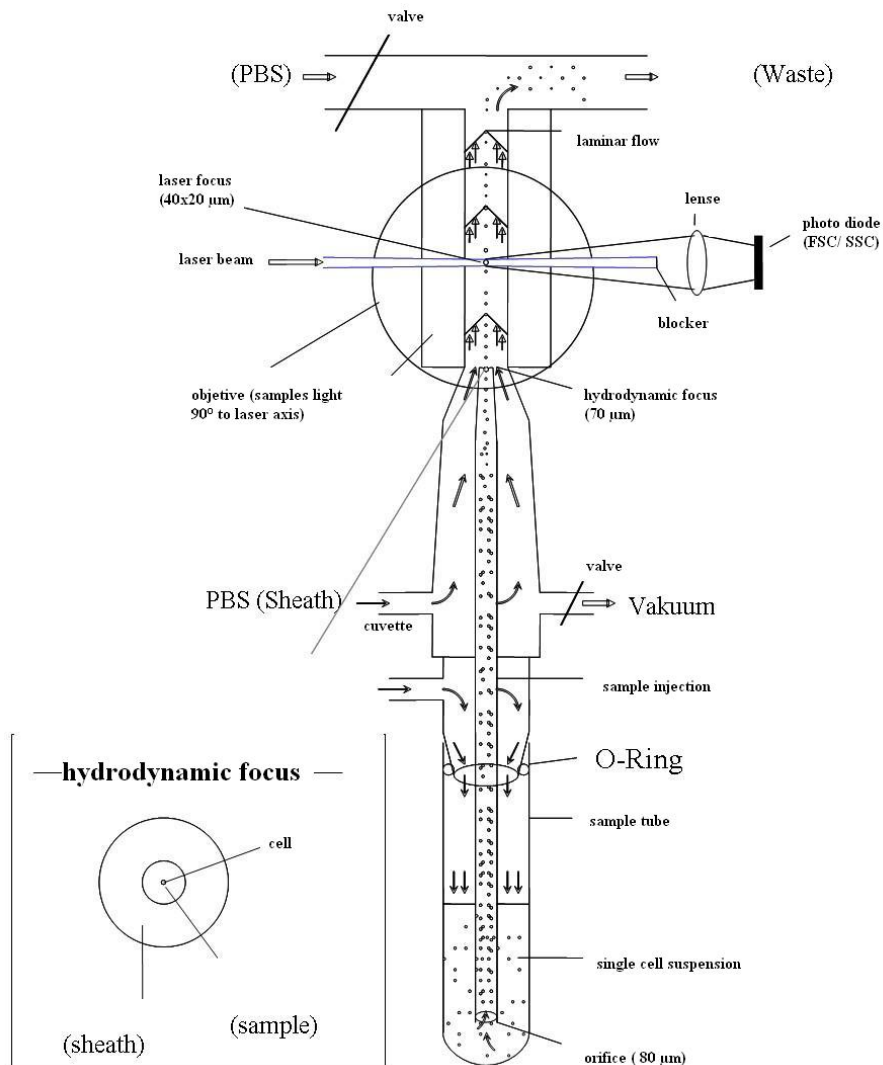


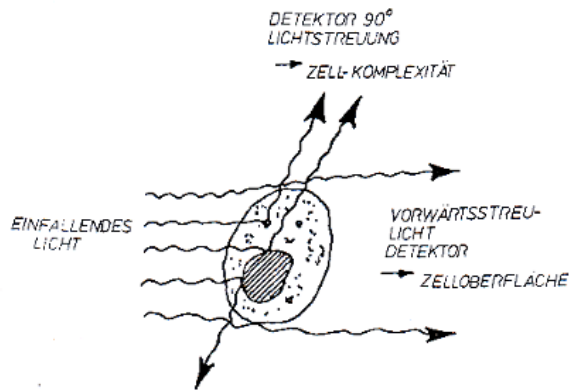
Abbildung 3.3 Aufbau des FACS

3.3.3. Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Ein Durchflusszytometer erlaubt die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität sowie zwei bis drei verschiedener Fluoreszenzfarben für mehrere tausend Einzelzellen in wenigen Sekunden. Zur Analyse wird die in einem Probenröhrchen vorgelegte Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit (isotone Salzlösung) stark beschleunigt. Es kommt zur Auftrennung von kleineren Zellaggregaten und zur Hintereinanderreihung der Zellen (hydrodynamische Fokussierung). Am Analysepunkt trifft der fokussierte Lichtstrahl (Laser) für den Bruchteil einer Sekunde auf die durchströmende Zelle, und die entstehenden Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden mittels Spiegel- und Filtersysteme auf die verschiedenen Fotoverstärker geleitet. Für die

Messungen steht ein FACScan der Firma Becton Dickinson zur Verfügung. Die Anregungswellenlänge des luftgekühlten Argon-Lasers beträgt 488 nm.

Die Lichtstreuungseigenschaften einer Zelle informieren uns über Oberflächenstruktur und Granularität



LICHT-BEUGUNG

- Proportional der Zelloberfläche
- Gemessen entlang der Achse des einfallenden Lichts

LICHT-BRECHUNG PLUS REFLEKTION

- Proportional der Zellgranularität
- Gemessen im 90°-Winkel zum einfallenden Licht

Abbildung 3.4 Funktionsprinzip des FACS

Durchführung:

Für die Analyse am FACS werden Zellen aus je einem Well einer 24-well-Platte verwendet. Dafür werden 250 µl Trypsinlösung auf den mit RPMI-Medium gewaschenen Zellrasen gegeben und bei 37°C inkubiert (Sichtkontrolle). Haben sich die Zellen vollständig vom Boden abgelöst, wird der Vorgang durch Zugabe von 500 µl Vollmedium abgestoppt. Nach Überführung der Zellen in Eppendorf-Tubes erfolgt die Pelletierung für 4 min bei 180 x g. Anschließend werden die Zellen mit 350 µl PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Proben können nun am Durchflusszytometer analysiert werden.

Kapitel 4

Praktikumsversuch: Nachweis der 6S RNA Expression in *E. coli* mittels Northern Blot und RT-PCR.

Die 6S RNA wurde als erste kleine ncRNA vor 40 Jahren in *Escherichia coli* entdeckt und ist auch die erste ncRNA, die im Jahre 1971 sequenziert wurde. Trotz dieser frühen Entdeckung dauerte es noch mehr als drei Jahrzehnte, bis dieser RNA eine Funktion zugeordnet werden konnte. Die 6S RNA wird unter Stressbedingungen, zum Beispiel in der stationären Phase, in Form eines 184 nt langen reifen Moleküls sehr stark exprimiert. Im Jahr 2000 konnte endlich die Funktion dieser RNA ermittelt werden. Wassarman und Storz fanden heraus, dass die 6S RNA einen Komplex mit der „Housekeeping“ RNA-Polymerase von *E. coli* bildet und diese unter Stressbedingungen inhibiert¹⁴. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivität der 6S RNA auf ihre strukturelle Ähnlichkeit mit bakteriellen Promotoren beruht¹⁵ (siehe **Abbildung 4.1**).

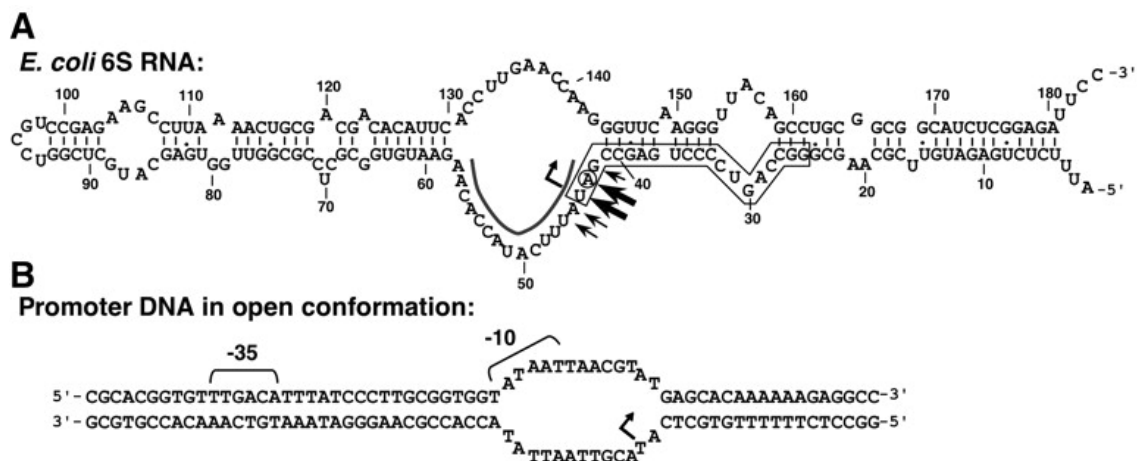


Abbildung 4.1 (A) Sequenz und Sekundärstruktur von *E. coli* 6S RNA. (B) Als Vergleich die Sequenz und Struktur eines *E. coli* Promotor in der offenen Konformation. Es wird vermutet, dass die 6S RNA diesem Promotor ähnelt und deshalb an die Polymerase bindet¹⁵.

In dem Praktikumsversuch wird ein Experiment des Artikels von Wassarman und Storz wiederholt. Es sollen die Expressionsänderungen der 6S RNA während der verschiedenen *E. coli* Wachstumsphasen sichtbar gemacht werden. Dafür werden zwei Techniken angewendet: der Northern Blot und die semiquantitativ RT-PCR.

¹⁴ Wassarman KM, Storz G. **2000** 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell* **101**(6):613-623.

¹⁵ Wassarman KM, Saecker RM. **2006** Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science* **314**(5805):1601-1603.

4.1. Kultivierung von *E. coli* K12

Eine Vorkultur (über Nacht) vom Wildtypstamm *E. coli* K12 wird am Morgen 1000fach in einem sterilen Erlenmeyer-Kolben in 50 ml LB verdünnt und in einem Schüttler bei 37°C kultiviert. Um das Wachstum der Bakterien zu verfolgen, wird jede halbe Stunde eine 1 ml Probe aus der Kultur abgenommen und die OD_{600nm} gemessen. Bei OD-Werten von 0.2 (logarithmische Phase), 1 (frühere stationäre Phase) und 4 (spätere stationäre Phase) werden Proben für die RNA Extrahierung entnommen.

OD _{600nm}	0.2	1	4
Volumen	5 ml	1 ml	1 ml

Die Proben werden mit 1/5 Vol einer eiskalten Stopplösung (5% wassergesättigtes Phenol in Ethanol) auf Eis gemischt und sofort bei 8000 rpm für 2 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen (enthält Phenol!) und das Pellet wird in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Stopplösung dient dazu die RNAsen sofort zu inaktivieren.

4.2. RNA Präparation aus *E. coli*

Das Prinzip der RNA Präparation beruht auf einer einfachen Phenolextrahierung. Wenn saueres Phenol verwendet wird, bleiben Proteine, Lipide und DNA in der organischen Phase bzw. fallen aus, während die RNA in der wässrigen Phase gelöst ist. Allerdings sind oft DNA Rückstände in der Präparation, was besonders bei der RT-PCR die Verwendung von DNasen erforderlich machen kann.

Alle Schritte sollten zügig durchgeführt werden um RNA Degradationen zu minimieren.

4.2.1. Zellyse

Das gefrorene Zellpellet wird zur Lyse in 800 µl einer frisch zubereiteten Lösung aus 0,5 mg/ml Lysozym in TE-Puffer, pH 8,0, resuspendiert. Nach Zugabe von 80 µl 10% SDS wird die Lösung gut gemischt und für 1-2 min im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Dabei sollte eine klare, zähe Lösung entstehen. Anschließend werden 88 µl 1 M NaOAc, pH 5,2 zugegeben und gemischt.

4.2.2. heiße Phenol Extraktion

Die Probe wird 1:1 mit warmem (65°C) wasser-gesättigtem Phenol (pH<7,0) in RNase-freien 2 ml Tubes versetzt, 10mal invertiert und für 6 min im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Währenddessen wird die Probe 6 bis 10mal etwa alle 40 sec invertiert. Anschließend wird der Ansatz auf Eis abgekühlt und bei höchster Geschwindigkeit (14.000 rpm) für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein neues Tube mit warmem Phenol (1:1) überführt und die Phenol Extraktion wird wiederholt.

4.2.3. Chloroform Extraktion

Die wässrige Phase der 2. Phenol Extraktion wird in ein neues Tube überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt. Nach 6-10fachem Invertieren wird die Probe bei maximaler Geschwindigkeit (14.000 rpm) für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wird erneut abgenommen und in ein neues Tube mit gleichem Volumen Chloroform überführt, um die Chloroform Extraktion zu wiederholen.

4.2.4. Ethanolfällung

Die wässrige Phase der Chloroform Extraktion wird auf zwei 1,5 ml Tubes verteilt und mit Ethanol gefällt (siehe 5.4.2). Das trockene Pellet kann in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst werden. 1 µl der Lösung wird mit 9 µl Wasser verdünnt und zur Konzentrationsbestimmung photometrisch vermessen (siehe 5.5).

4.3. Semiquantitative RT-PCR

Eine gängige Methode um die Expression eines Genes zu verfolgen ist die semiquantitative RT-PCR. Dabei wird die RNA zuerst in DNA umgewandelt und anschließend amplifiziert. Die relative Expression des Genes kann mittels Real-Time PCR quantifiziert werden. Eine grobe Einschätzung der RNA Menge kann man auch erhalten, wenn man die PCR nach unterschiedlichen Zykluszahlen unterbricht und die Produktmenge vergleicht (semiquantitative PCR).

Manche hitzestabilen Polymerasen können sowohl DNA wie RNA als Matrix verwenden. Allerdings kann man dann nicht zwischen RNA und DNA-Kontamination unterscheiden. Deshalb wird eine Zwei-Schritt Strategie bevorzugt. Zuerst wird die RNA in cDNA umgewandelt und dann in einem zweiten Schritt die cDNA amplifiziert. Dabei kann parallel eine PCR Reaktion als Kontrolle angesetzt werden, in der die RNA nicht revers-transkribiert wurde. Sollte die RNA Präparation mit DNA kontaminiert sein, wird auch in der Kontrolle ein PCR Produkt entstehen.

4.3.1. Reverse Transkription

100 ng Gesamt-RNA von *E. coli* wird mit 25 pmol 6Srev Primer in 15 µl Endvolumen für 5 min bei 70°C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt. Anschließend werden folgende Komponenten zugegeben:

	Konzentration im Ansatz	Pipettierschema
5x Reaktionspuffer für Reverse Transkriptase	1x	5 µl
dNTP Mix, 10mM each	1 mM	2.5 µl

Der Ansatz wird für 5 min bei 37°C inkubiert. 4,5 µl werden als Kontrolle aufbewahrt. Nach Zugabe von 40 Units Reverser Transkriptase wird der Reaktionsmix für weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wird dann durch Erhitzen inaktiviert (10 Minuten bei 70°C). Daraufhin werden die Proben auf Eis gekühlt.

Die entstandene cDNA kann nun für die PCR eingesetzt werden.

4.3.2. Semiquantitative PCR

PCR Zusammensetzung (siehe Kapitel 5.6)

- Template: 5 µl RT Reaktion – bzw. 4,5 µl Kontrolle
- Primer: 6Sfor und 6Srev
- Annealing Temperatur: 55°C
- Anzahl der Zyklen: 15 bis 21 Zyklen

Nach 15 Zyklen wird alle 3 Zyklen eine 5 µl Probe herausgenommen. Der Erfolg der RT-PCR wird auf einem Gel überprüft. Die zu erwartenden Produkte haben eine Länge von 180 bp.

4.4. Northern Blot

Der Northern Blot ist eine molekularbiologische Methode, die den separaten Nachweis und die Quantifizierung einzelner mRNA-Sequenzen erlaubt. Dabei wird die Gesamtheit aller RNA-Moleküle mittels Gelelektrophorese in ihre Komponenten aufgetrennt und durch „blotting“ auf eine spezielle Membran (meist Nitrozellulose oder Nylon) transferiert. Auf der Membran wird der spezifische Nachweis von RNA-Sequenzen durch die Hybridisierung mit markierten Sonden, deren Sequenz komplementär zu der RNA ist, erreicht.

4.4.1. Elektrophorese

5 bis 20 µg der jeweiligen RNA-Proben werden auf einem 8% denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetragen (Bromophenol Blau darf herauslaufen). Nach der Elektrophorese wird das Gel mit Ethidium Bromid gefärbt und fotografiert.

4.4.2. Membrantransfer

Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran erfolgt mit der „Semi-trocken“ Technik. Um die RNA zu immobilisieren, wird sie auf der Membran durch UV-Bestrahlung quervernetzt.

Die positiv geladene Nylon-Membran (der Fima Roche) sowie 6 Blätter von 3mm Whatman Chromatographie Filterpapier werden auf die Größe des Gels geschnitten und in 1x TBE-Puffer getränkt. Die feuchte Membran wird auf das Gel gelegt, so dass die Laufspuren abgedeckt sind. Überstehendes Gel wird entfernt. Auf die Membran werden 3 Blätter durchnässtes Whatman-Papier gelegt. Die Gel-Membran-Filterpapier-Konstruktion wird umgedreht und auf die untere Platte der Semidry Apparatur (Biorad – Transblot SD) gelegt (von unten nach oben: 3x Filterpapier, Membran, Gel). Die verbleibenden 3 Filterpapiere werden auf die Oberseite des Gels gelegt. Mit Hilfe einer großen Plastikpipette kann über das Gelsandwich gerollt werden um Luftblasen zu entfernen. Um sicher zu stellen, dass das Sandwich gut durchnässt ist, kann noch etwas 1x TBE Puffer zugegeben werden.

Der Deckel der Semidry Apparatur wird aufgesetzt und an ein Netzgerät, das hohe Stromstärken erlaubt, angeschlossen. Der Transfer findet bei einer konstanten Stromstärke von 80 mA für 2 Stunden statt. Die Spannung sollte bei 4-5 V liegen, kann jedoch zum

Ende des Transfers ansteigen. Die positive Elektrode befindet sich auf dem Boden, d.h. die Nukleinsäuren wandern nach unten auf die Membran.

Nach dem Transfer wird das Gelsandwich aus der Apparatur entnommen und gedreht, so dass sich die Membran über dem Gel befindet. Durch Abschneiden einer Ecke kann die Orientierung markiert werden. Alternativ kann mit der Spitze einer Nadel die Membran an einer Ecke durchgestochen werden. Das Gel wird erneut gefärbt und photographiert. Alle RNAs unter 200 nt sollten verschwunden sein.

Die noch feuchte Membran wird durch UV Strahlung quervernetzt (254 nm – 120 mJ/cm²), wobei die Seite mit der RNA zur Lampe zeigt.

4.4.3. Herstellung und Markierung der Sonden

Parallel werden die Hybridisierungsproben vorbereitet. Da pro Woche nur ein Northern Blot gemacht wird, werden auch pro Woche für alle Gruppen nur zwei Proben hergestellt und markiert. Eine Sonde soll die 6S RNA sichtbar machen, während die andere an der 5S RNA hybridisiert, die Bestandteil des Ribosoms ist und deshalb konstitutiv exprimiert wird. Die 5S RNA dient als Kontrolle.

PCR Zusammensetzung (siehe Kapitel 5.6)

- Template: 6Stemp bzw. 5Stemp
- Primer: 6Sfor-6Srev bzw. 5Sfor-5Srev
- Annealing Temperatur: 55°C
- Anzahl der Zyklen: 25

Der Erfolg der PCR wird auf einem Gel überprüft. Die zu erwartenden Produkte haben eine Länge von 180 bzw 120 nt.

Die PCR-Ansätze werden mit dem PeqLab Kit 'cycle-pure' aufgereinigt, und die Konzentration des PCR Produktes am Nanodrop gemessen (siehe 5.5.1).

PCR Aufreinigung

Auszug aus dem Originalprotokoll:

1. Laden und Binden

PCR Ansatz wird mit 2 Volumen XP1-Puffer versetzt und durch vortexen vermischt. Eine HiBind-Zentrifugensäule in ein 2 ml Sammeltube stecken und die Mischung aus PCR Ansatz und XP1-Puffer auf die Säule pipettieren. Sammeltube mit Säule für 1 Minute bei 10.000 x g und Raumtemperatur zentrifugieren. Säulendurchfluss verwerfen

2. Waschen

750 u/µl des komplettierten SPW-Waschpuffers auf die Säule pipettieren und für 1 Minute bei 10.000 x g durch die Säule zentrifugieren. Säulendurchfluss verwerfen und Waschschrift einmal wiederholen.

3. Trocknen

Zentrifugensäule in das geleerte 2 ml Sammel-Tube stecken und durch einminütiges Zentrifugieren bei 10.000 x g vollständig trocknen.

4. Elution

Zentrifugensäule in ein sauberes 1,5 ml Zentrifugenröhrchen stellen und die DNA mit 30 µl sterilem Wasser oder TE-Puffer eluieren. Dazu die Elutionslösung direkt auf die Säulenmatrix pipettieren und für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugieren.

4.4.4. Random Priming

Die Markierung des PCR Fragmentes mit Digoxigenin erfolgt mit dem ‚Random Primed DIG DNA Labeling Kit‘ der Firma Roche. Dabei wird die DNA durch Aufkochen denaturiert. Nach Anlagerung von unspezifischen Hexanukleotiden als Primer erfolgt die DNA Synthese und Einbau des DIG 11-dUTP mit dem Klenow Fragment.

200 ng bis 1 µg PCR Produkt werden in einem PCR Tube auf 15 µl mit Wasser aufgefüllt und 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wird die DNA schnell auf Eis gekühlt und mit folgenden Reagenzien gemischt:

- Hexanukleotid Mix: 2 µl
- dNTP Mix (enthält DIG 11-dUTP): 2 µl
- Klenow Fragment: 1 µl

Der Reaktionsansatz wird für mindestens 1 Stunde oder besser über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Abstopfung werden 2 µl 200 mM EDTA zugegeben und das Gemisch für 10 Minuten bei 65°C inkubiert.

4.4.5. Hybridisierung

Die Membran wird mit der RNA Seite nach innen für 20 Minuten bei 65°C mit 5 ml ‚Church and Gilbert‘ Puffer in einem 50 ml Falcontube prähybridisiert.

Währenddessen wird die DIG markierte Sonde für 3 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis gekühlt. Die Probe wird dann zu der Membran gegeben und über Nacht bei 65°C im Ofen hybridisiert.

Am nächsten Tag wird die Membran nacheinander für 10 Minuten bei 50°C mit folgenden Lösungen gewaschen:

- 2x SSC - 0.5% SDS
- 1x SSC - 0.5% SDS
- 0.5x SSC - 0.5% SDS

4.4.6. Immunprinting

Bei dem Immunprinting wird die DIG markierte Sonde mit einem monoklonalen anti DIG Antikörper, welcher mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, detektiert.

Sämtliche Inkubationsschritte erfolgen unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur.

Die Membran wird in eine Plastikschißel gelegt, wobei die RNA nach oben orientiert sein muss. Der Blot wird 1 min in 15 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend für 30 min in 15 ml Blockierungspuffer inkubiert. Nach Entfernung des Puffers erfolgt erneut die Zugabe von 15 ml Blockierungspuffer, der den anti Digoxigenin AP Antikörper 1:10.000 verdünnt enthält. Nach anschließender 30 minütiger Inkubation wird die Antikörperlösung entfernt und die Membran zweimal für 15 min in 15 ml Waschpuffer gewaschen. Die Äquibrierung der Membran erfolgt für 2 min in 15 ml Reaktionspuffer. Anschließend

wird die Substratlösung, bestehend aus 24,5 ml Reaktionspuffer, 250 µl NBT(10x) und 250 µL BCIP zugegeben.

Während der Farbreaktion sollte die Membran möglichst nicht bewegt werden. Wenn die Signale sichtbar werden, wird die Substratlösung abgegossen und die Membran kurz in H₂O gewaschen. Anschließend kann man die Membran mit Papierhandtüchern trocknen.

Die Substratlösung wird als halogenhaltiges Lösungsmittel entsorgt.

Kapitel 5

Allgemeine Arbeitsvorschriften

5.1. Was ihr eigentlich schon wissen solltet!

5.1.1. Sicherheit im Labor

Die Studenten sollten stets Kittel und Schutzbrille tragen. Beim Pipettieren von Gefahrstoffen müssen Handschuhe getragen werden.

Gefahrstoffe:

- Basen /Säuren
- Phenol / Chloroform (Abzug)
- Ethidium Bromid
- Acrylamid (Abzug)

5.1.2. Nützliche Infos

M = mol/L = Molar = Konzentration

mol = Mol = Menge

1 μ M = 1 μ mol/L = 1 nmol/mL = 1 pmol / μ L

$$vol = \frac{Konz_{End}}{Konz_{Stock}} vol_{tot}$$

5.2. Allgemeine Arbeitshinweise beim Arbeiten mit RNA

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die normalerweise auch ohne Cofaktoren ihre Funktion ausüben können. Da RNasen nur schwer zu inaktivieren sind und selbst kleinste Mengen ausreichen, um RNA zu zerstören, sind beim Arbeiten mit RNA besondere Maßnahmen zu beachten. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von RNasen sollten bei Arbeiten mit RNA-haltigen Lösungen Handschuhe getragen und auch regelmäßig gewechselt werden. RNA Lösungen sollten zwischen den Experimenten stets auf Eis gelagert werden. Sterile Polypropylen-Tubes sind für die Arbeit mit RNA am besten geeignet, da diese Tubes normalerweise auch RNase-frei sind und daher keine besondere Behandlung mehr benötigen. Anzusetzende Lösungen, auch Wasser, werden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) RNase-frei gemacht.

Achtung DEPC gilt als carcinogen und ist leicht flüchtig! Alle Arbeiten mit DEPC werden daher ausschließlich mit Handschuhen, sowie unter einem Abzug durchgeführt.

5.2.1. Herstellung von RNase-freien Lösungen

1. Zu 100 ml einer RNase-frei zu machenden Lösung werden 0,1 ml DEPC gegeben. Um das DEPC zu lösen, wird das Gemisch kräftig geschüttelt oder gerührt.
2. Die Lösung wird für 12 Stunden bei 37°C unter weiterem Rühren inkubiert.
3. Das DEPC wird danach durch 15-minütiges Autoklavieren zerstört.

Achtung

- DEPC reagiert mit primären Aminen und kann daher nicht direkt für Tris-Puffer verwendet werden. In Gegenwart von Tris zerfällt DEPC sehr schnell in Ethanol und CO₂.
- Reste von DEPC reagieren mit Purin-Basen in RNA und carboxymethylieren diese. Es ist daher sehr wichtig DEPC durch Autoklavieren vollständig aus den Lösungen zu entfernen.

5.3. Gel-Elektrophorese

Mittels Gel-Elektrophorese können Nukleinsäure-Moleküle nach ihrer Größe getrennt werden. Verschiedene Verfahren erlauben die Trennung von Fragmenten unterschiedlicher Größe. Dabei ist zu beachten, dass native Methoden für doppelsträngige DNA verwendet werden, während denaturierende Methoden bei einzelsträngiger DNA oder RNA zu empfehlen sind.

In den folgenden Tabellen wird der Trennungsbereich der drei Elektrophorese-Methoden dargestellt.

Agarose-Gel-Elektrophorese:

Agarose Konzentration im Gel	Bereich der Trennung von linearen DNA-Molekülen (kb)
0,6%	1 - 20
1%	0,5 - 6
1,5%	0,2 - 3
2%	0,1 - 2

Native Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese:

Acrylamide Konzentration im Gel	Bereich der Trennung (bp)	Lauffront	
		Xylencyanol	Bromophenolblau
3,5%	1000 - 2000	460	100
5%	80 - 500	260	65
8%	60 - 400	160	45
12%	40 - 200	70	20
15%	25 - 150	60	15
20%	6 - 100	45	12

Denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese:

Acrylamide Konzentration im Gel	Bereich der Trennung (nt)	Lauffront	
		Bromophenolblau	Xylencyanol
30%	2 - 8	6	20
20%	8 - 25	8	28
10%	25 - 35	12	55
8%	35 - 45	19	75
6%	45 - 70	26	105
5%	70 - 300	35	130

5.3.1. Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose wird in einer entsprechenden Menge 1xTAE-Puffer suspendiert und in einer Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wird die Agaroselösung in die Giesvorrichtung gegossen und der Kamm aufgesetzt. Aus dem erstarrten Gel wird der Kamm entfernt und die Laufkammer wird mit 1xTAE als Laufpuffer gefüllt bis das Gel bedeckt ist. Vor dem Auftragen werden die Proben mit der entsprechenden Menge 6xLoading-Dye versetzt. Die Elektrophorese findet bei 100 bis 150 V statt, bis die Orange G-Farbstoff-Front das Gel-Ende erreicht hat.

5.3.2. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Der Multi-Cast-Gießstand: In diesem Gießstand können mehrere Gele (maximal 6) derselben Konzentration in einer Dicke von 0,75mm gleichzeitig gegossen werden. Die drei roten Gummieinsätze (ein großer dreieckiger und zwei kleine halbrunde) müssen unten in die Kammer eingesetzt werden. Da durch den Spalt im großen Gummieinsatz eine Verbindung innerhalb der gesamten Kammer besteht, werden alle Gele gleichzeitig gefüllt.

Der Zusammenbau des Gießstandes: Bei allen folgenden Arbeitsschritten ist mit Handschuhen zu arbeiten! Die Glasplatten, Spacer und Aluminiumplatten werden mit 70% Ethanol entfettet. Die offene Gießkammer wird horizontal gelegt und zuerst mit den Platten zum Auffüllen des Restvolumens versehen. Anschließend werden die Sandwiches, bestehend aus einer Aluminium-Platte, zwei Spacern und einer Glasplatte, eingesetzt. Bei den Spacern ist darauf zu achten, dass die Noppen außen liegen. Zum Schluss wird der Deckel mit 2 Klammern seitlich fixiert. Stellt man den Gießstand auf den Kopf (vorsichtig! Hand darunter halten!), so sollten die Platten nicht verrutschen.

Das Gießen der Gele: Der Gießstand wird mit der Öffnung nach oben auf eine ebene Fläche gestellt. Jetzt werden die Lösungen für das Gel zusammenpipettiert.

Achtung!! Acrylamid-Lösung ist hochgiftig! Hautkontakt sollte unbedingt vermieden werden! Beim Arbeiten mit Acrylamid ist daher immer auf geeignete Kleidung und Handschuhe zu achten!

Achtung!! Elektrophoresen werden mit Gleichspannung durchgeführt, die noch gefährlicher ist als Wechselspannung. 100-400V Gleichstrom, die bei der Elektrophorese angelegt werden, sind absolut lebensgefährlich! Sind daher während

der Elektrophorese irgendwelche Arbeiten an der Apparatur notwendig, so ist unbedingt darauf zu achten, dass die Spannungsquelle abgeschaltet ist.

5.3.3. Native Acrylamid-Gel-Elektrophorese

Native Acrylamid-Gele werden zur Auftrennung von DNA oder nativer RNA eingesetzt. Die Acrylamid-Gele haben dabei im Vergleich zu Agarose-Gelen den Vorteil, dass sie bei kleinen Fragmentlängen (unter 500 bp) eine bessere und schärfere Auflösung der einzelnen Banden liefern.

Zusammensetzung eines nativen Acrylamid-Gels

Für einen komplett ausgefüllten Gießstand (5-6 Gele) sind 50 ml anzusetzen. Für die Lösung werden 50 ml Einmal-Plastik Röhrchen verwendet!

Zusammensetzung:

- 1x TBE (aus 5xTBE)
- Acrylamid/Bisacrylamid (40%; 19:1)
- 0,1 % (v/v) TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
- 0,7 % (v/v) APS (10%ig) (Ammoniumpersulfat)

Durch Zugabe von TEMED und APS beginnt die Polymerisation. Die Lösung daher schnell mischen und zügig in die Kammer füllen. Das Gel wird bis zum oberen Rand der Aluminiumoxidplatte gegossen und die entfetteten Kämme dann bis zum Anschlag in das noch flüssige Gel eingesetzt. Dabei sind Luftblasen zu vermeiden. Nach ca. 30-45 min ist das Gel auspolymerisiert und die Kämme können vorsichtig herausgezogen werden.

Die Elektrophorese von nativen Acrylamid-Gelen

Die Gele werden wie unter 5.3.2 beschrieben vorbereitet und in die Kammer gesetzt. Als Laufpuffer dient 1x TBE-Puffer.

Die Taschen der Gele werden mit Laufpuffer gespült. Jedes Sandwich wird mit 2 Klammern und der Aluminiumoxid-Platte nach hinten in der Pufferkammer befestigt. Pro Kammer können zwei Gele gleichzeitig laufengelassen werden; wird nur ein Gel benötigt, so wird auf der gegenüberliegenden Seite statt des Gels eine Glasplatte eingesetzt. Die Kammern werden nun mit 1x TBE-Puffer gefüllt, wobei die beiden oberen Kammern bis zum Rand der Sandwiches, die untere halbvoll gefüllt wird. Die Proben werden mit DNA-Ladepuffer versetzt und die Elektrophorese findet bei 100-120 V statt. Die Elektrophorese ist beendet, wenn das als Referenz zugesetzte Orange G das untere Ende des Gels erreicht hat (ca. 1,5 h). Wichtig ist, zum Beenden der Elektrophorese zuerst die Spannungsquelle abzuschalten! Erst wenn dies geschehen ist, kann die Elektrophoresekammer geöffnet werden. Nach Lösen der Klammern können die Sandwiches vorsichtig von dem Dichtungsgummi abgehoben werden. Um die Platten vorsichtig voneinander zu trennen, wird ein Spacer etwas herausgezogen und als „Hebel“ eingesetzt. Es empfiehlt sich, die Orientierung des Gels durch Abschneiden einer kleinen Ecke zu markieren.

5.3.4. Denaturierende Acrylamid-Gel-Elektrophorese

Denaturierende Acrylamid-Gele werden eingesetzt um RNA Stränge zu trennen. Da RNA in nativer Form gefaltet vorliegt, muss die RNA denaturiert werden, damit die RNA Moleküle nach ihrer Länge aufgetrennt werden können. Eine nicht-denaturierte RNA würde auf dem Gel weiter migrieren und somit einen RNA Strang kürzerer Länge vortäuschen. Zur Denaturierung der RNA werden Acrylamid-Gele mit Zusatz von Harnstoff verwendet.

Zusammensetzung eines denaturierenden 8%-igen Harnstoff-Gels

Für einen komplett ausgefüllten Gießstand (5-6 Gele) sind 50 ml anzusetzen. Für die Lösung werden 50 ml Einmal-Plastik Röhrchen verwendet!

Zusammensetzung:

- 8 M Harnstoff (60,06 g/mol)
- 1x TBE (aus 5x TBE)
- Acrylamid/Bisacrylamid (40%; 19:1)

Harnstoff unter Erwärmen in Lösung bringen. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur

- 0,1 % (v/v) TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
- 0,7 % (v/v) APS (10%) (Ammoniumpersulfat)

Nach Zugabe von TEMED und APS die Lösung schnell mischen und zügig in die Kammer füllen, bevor die Lösung polymerisiert. Das Gel wird bis zum oberen Rand der Aluminiumoxidplatte gegossen und die entfetteten Kämme dann bis zum Anschlag in das noch flüssige Gel eingesetzt. Dabei sind Luftblasen zu vermeiden. Nach ca. 30-45 min ist das Gel auspolymerisiert und die Kämme können vorsichtig herausgezogen werden.

Die Elektrophorese von denaturierenden Gelen

Die Gele werden wie unter 5.3.2 beschrieben vorbereitet und in die Kammer gesetzt. Als Laufpuffer dient 1x TBE-Puffer.

Zu Beginn der denaturierenden Gelektrophorese wird eine 15-30 minütige Präelektrophorese zur Äquilibration ohne Proben bei 12 Watt durchgeführt. Währenddessen werden die Proben mit dem 3-fachen Volumen an denaturierenden Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 70°C denaturiert. Die Trennung erfolgt bei einer Leistung von 12 Watt.

Wichtig ist, dass das Gel während der Elektrophorese eine Temperatur von etwa 50°C erreicht, um die vollständige Denaturierung der RNA zu erhalten. Die Elektrophorese ist beendet, wenn der als Referenz zugesetzte Farbstoff Xylencyanol (2. Farbstofffront) das

untere Ende des Gels erreicht hat (ca. 30 min). Um die Elektrophorese zu beenden, wird zunächst die Spannungsquelle abgeschaltet! Die Platten werden vorsichtig voneinander getrennt, indem ein Spacer etwas herausgezogen wird und als „Hebel“ eingesetzt wird. Es empfiehlt sich, die Orientierung des Gels durch Abschneiden einer kleinen Ecke zu markieren.

5.3.5. Nachweis von Nukleinsäuren in Gelen mittels Ethidiumbromidfärbung

Die Ethidiumbromidfärbung gehört zu den schnellsten und empfindlichsten Färbemethoden für kleine Nukleinsäuremengen (ab ca. 20 ng). Ethidiumbromid ist ein organischer Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur in Nukleinsäuren interkalieren kann. Die Gele werden in einer Lösung aus 4 µg/ml Ethidiumbromid in 1xTAE für 10 bis 15 min gefärbt. Nachdem der Gelhintergrund gegebenenfalls mit Wasser entfärbt wurde, kann es auf einem UV-Transilluminator (312 nm) dokumentiert werden.

Achtung! Ethidiumbromid ist ein starkes Mutagen und gilt als hoch krebserregend. Ethidiumbromid-Einbau in zelluläre DNA führt im natürlichen Licht zu DNA-Einzelstrangbrüchen. Handschuhe und Kittel sind unbedingt zu tragen!

5.4. Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung von RNA oder DNA

5.4.1. Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA oder DNA

Zur Phenol-Chloroform-Extraktion von RNA wird eine Mischung von Phenol:Chloroform (5:1, v:v) verwendet, wobei das Phenol auf pH = 4,3 gepuffert ist.

Bei DNA wird eine Mischung von Phenol:Chloroform (1:1, v:v) verwendet, mit Phenol das auf pH = 7,6 - 8,0 gepuffert ist.

Da das Phenol jeweils gepuffert ist, befindet sich über der Mischung eine wässrige Pufferlösung. Daher sollte die Flasche nicht geschüttelt werden und nur die Lösung aus der unteren Phase entnommen werden.

Die DNA- oder RNA-Lösung wird im Volumenverhältnis 1:1 mit der jeweiligen Phenol-Chloroform-Mischung gut gemischt (1 min vortexen) und 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird in ein neues Gefäß überführt und im Verhältnis 1:1 mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v:v) gegenextrahiert (30 sec vortexen). Zur Phasentrennung wird wieder 5 min zentrifugiert und die obere, wässrige Phase wird vorsichtig in ein neues Gefäß überführt.

5.4.2. Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Die nukleinsäurehaltige Lösung wird mit 1/10 Volumen Na-acetat-Lösung (3 M, pH 5,2) versetzt, so dass eine Endkonzentration von 0,3 M Na-acetat entsteht. Die Fällung erfolgt durch Zugabe von 2 Volumen eiskaltem 95 % -igem Ethanol und anschließender Inkubation für 60 min auf Eis. Die gefällte DNA bzw. RNA wird 20 min bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert, mit eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen und 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in dem gemäß der Vorschrift angegebenen Volumen TE-Puffer oder Wasser gelöst.

5.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von wässrigen Nukleinsäurelösungen kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Die aromatischen Ringe der Basen sind hierbei für die Absorption verantwortlich. Wenn der Extinktionskoeffizient der entsprechenden Nukleinsäure nicht bekannt ist, gilt folgender Zusammenhang:

1 OD₂₆₀ ≈ 50 µg/ml ds-DNA und ds-RNA

1 OD₂₆₀ ≈ 33 µg/ml ss-RNA

Bei kürzeren Nukleinsäuren mit bekannter Sequenz kann man sich auf der Internetseite <http://paris.chem.yale.edu/extinct.html> auch den Extinktionskoeffizienten berechnen lassen.

Um die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen zu können, insbesondere hinsichtlich Proteinkontamination, wird zusätzlich noch die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ bestimmt. Saubere Nukleinsäurelösungen zeigen einen Wert im Bereich von 1,8 bis 2.

5.5.1. Anleitung zum NanoDrop Photometer

Bei dem NanoDrop Photometer handelt es sich um ein Spezialphotometer zur Bestimmung der Lichtabsorption in sehr kleinen Volumina (1 bis 2 µl). Auf der Bedienungssoftware wird der Button Nukleinsäuren ausgewählt. Anschließend müssen zur Initialisierung des Gerätes 2 µl Wasser auf den Probenhalter pipettiert werden. Nach der Initialisierung wird der Wassertropfen vom Probenhalter mit dem dort vorhandenen Kleenextuch abgewischt. Danach erfolgt die Nullpunkteinstellung ebenfalls mit 2 µl Wasser, bzw. Puffer. Nach Abwischen des Wassers/Puffers werden 1 - 2 µl der Probe auf dem Probenhalter pipettiert und vermessen. Bei der Messung ist darauf zu achten, dass der Probentropfen während der Messung nicht abreißt. Nach der Messung sollte nochmals zur Kontrolle Wasser vermessen werden, damit sicher gestellt ist, dass der Probenhalter wieder sauber ist.

5.6. PCR

Für eine 50 µl PCR werden folgende Komponenten benötigt:

1x PCR Puffer

2,5 mM MgCl₂ (Vorsicht, manchmal ist das Magnesium schon in dem Puffer enthalten)

Template DNA (wenig)

75 pmol Primer 1

75 pmol Primer 2

200 µM dNTP (jeder)

0,25 µl Taq Polymerase

Das PCR Programm ist wie folgend:

CNTR	Tube
Lid	= 105°C
wait	auto
Initiale Denaturierung	2 min bei 94°C
Beginn Zyklus	für 15-30 Zyklen (je nach Anwendung)
Denaturierung	30 sec bei 94°C
Annealing	30 sec bei 50°C bis 60°C
Elongation	n min bei 72°C (n ist die Länge des Produktes in kb)
Ende Zyklus	
Finale Elongation	2-5 min bei 72°C
Hold	4°C

Wenn sehr wenig von dem DNA Template vorhanden ist, empfiehlt es sich eine Negativkontrolle ohne Template durchzuführen (trifft nicht in diesem Praktikum zu).

Der Erfolg der PCR kann mittels Gel-Elektrophorese ermittelt werden.

5.7. Transkription

Bei der T7 Transkription wird doppelsträngige DNA als Matrize genutzt und in RNA umgeschrieben. Hierbei dient als Transkriptionsstart eine spezifische Promotorsequenz, die von der RNA-Polymerase erkannt wird. Es werden von RNA-Polymerasen nur doppelsträngige DNA Promotersequenzen erkannt. Die T7-RNA-Polymerase erkennt folgende T7-Promotersequenz (siehe Abbildung 5.1) und transkribiert wie dargestellt die DNA in RNA.

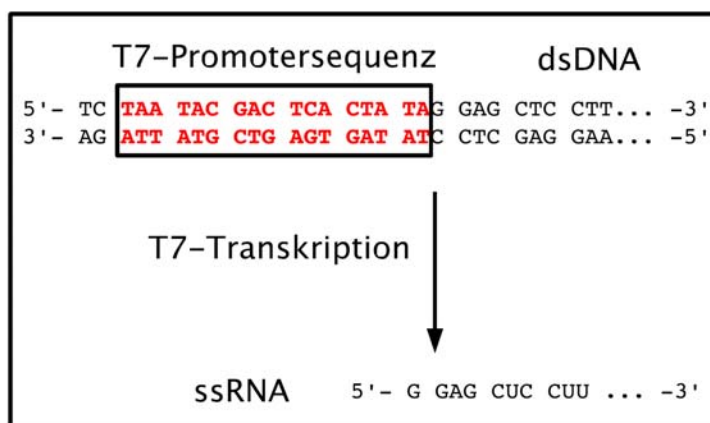


Abbildung 5.1 T7 Transkription

Zur T7-Transkription werden folgende Komponenten gemischt (Konzentration im Ansatz):

- 1x Transkriptionspuffer
- 2 mM von jedem NTP
- 10 ng/ μ l DNA Template
- 0,5 U/ μ l RNase Inhibitor
- 0,4 U/ μ l T7 RNA-Polymerase

Der T7-Transkription-Ansatz wird für 2-3 Stunden (oder über Nacht) bei 37°C inkubiert. Nach der Transkription wird das DNA-Template mit 5 U DNaseI pro 100 μ l für 30 min bei 37°C verdaut.

Je nach Verwendung kann die produzierte RNA mittels Gel-Elektrophorese, Phenol-Chloroform-Extraktion oder Größen-Ausschluss-Chromatographie gereinigt werden.

Kapitel 6

Puffer und Lösungen

5xTBE-Puffer, benötigte Menge: 1 l

- 54 g/l Tris-Base
- 22.5 g/l Borsäure
- 20 ml EDTA (0.5 M; pH 8.0)
- ad 1 l mit Wasser

50xTAE-Puffer, benötigte Menge: 500 ml

- 2 M Tris-Base (121 g/500 ml)
- Eisessig 28,6 ml / 500 ml
- 50 mM EDTA (0.5 M; pH 8.0) (50 ml / 500 ml)
- ad 500 ml mit Wasser

PBS (isotonischer Phosphatpuffer nach Dulbeco), benötigte Menge: 2 mal 500 ml

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 6,5 mM Na₂PO₄H
- 1,5 mM KH₂PO₄
- pH 7,4 (muss nicht eingestellt werden)

RNA-Elutionspuffer, benötigte Menge: 50 ml

Achtung: Diese Lösung muss RNase-frei sein, daher zum Ansetzen möglichst sterile Röhren und sauberes Wasser (frisches bidest oder DEPC Wasser) verwenden.

- 0,3 M Na-acetat
- 1 mM EDTA
- 0,1 % SDS (w/v)

TE-Puffer, benötigte Menge: 10 ml

- 10 mM Tris/HCl-Puffer
- 1 mM EDTA

- pH 7

3 M Na-acetat, benötigte Menge: 50 ml

- 3 M Na-acetat
- pH 5,2 mit Essigsäure

10xRibozymspaltungspuffer, benötigte Menge: 10 ml

Achtung: Diese Lösung muss RNase-frei sein, daher zum Ansetzen möglichst sterile Röhrrchen und sauberes Wasser (frisches bidest oder DEPC Wasser) verwenden.

- 500 mM Tris/HCl-Puffer
- 110 mM MgCl₂
- pH 7,5

10xRibozymspaltungspuffer ohne MgCl₂, benötigte Menge: 10 ml

Achtung: Diese Lösung muss RNase-frei sein, daher zum Ansetzen möglichst sterile Röhrrchen und sauberes Wasser (frisches bidest oder DEPC Wasser) verwenden.

- 500 mM Tris/HCl-Puffer
- pH 7,5

„Church and Gilbert“ Puffer, benötigte Menge: 100 ml

- 1% BSA
- 1 mM EDTA
- 7% SDS
- 0,5 M NaHPO₄, pH 7.2

1 M NaHPO₄, pH 7.2, benötigte Menge: 50 ml

- 34,2 ml 1M Na₂HPO₄/50 ml
- 15,8 ml NaH₂PO₄/50 ml

20 X SSC, benötigte Menge: 500 ml

- 3 M NaCl
- 0,3 M Natriumcitrat

Maleinsäurepuffer (Immunprinting): benötigte Menge: 500 ml

- 0,1 M Maleinsäure
- 0,15 M NaCl

Waschpuffer (Immunprinting), frisch ansetzen

- 0,3 % Tween-20, pH 7,5
- in Maleinsäurepuffer

Blockierungspuffer (Immunprinting), frisch ansetzen

- 1 % Blockierungsreagenz, pH 7,5
in Maleinsäurepuffer

Reaktionspuffer (Immunprinting), benötigte Menge: 100 ml

- 0,1 M Tris-HCl
- 4 mM MgCl₂, pH 9,5

NBT, wird gestellt

- 1 mg NBT/ml Reaktionspuffer

BCIP, wird gestellt

- 5 mg BCIP/ml DMF

6x DNA Ladepuffer, nativ, wird gestellt

- 50% Saccharose (w/v)
- 1% SDS (w/v)
- 0,1 % Orange G (w/v)

RNA Ladepuffer, denaturierend, wird gestellt

- 10 M Harnstoff
- 0,025% Bromphenolblau (w/v)
- 0,025 % Xylene Cyanol (w/v)

Kapitel 7

Anhänge

7.1. Sequenzen

7.1.1. HDV Versuch

M13/Puc18 seq rev: CAGGAAACAGCTATGAC

HDVrev: TTCTCCCTTAGCCTAC

pHDV (fragment):

TAACAATTTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTCTAATA
CGACTCACTA TAGGGAGAAT TCCGACCAGA AGCCTGCTCA GGGGTGGGTC
GTATAATTAG CGTAGGGAGG TAGTGGATGA GTAAGCCTGG GATGTCATAT
GTGCGTCTAC ATGGATCCTC **AGGGTCGGCA TGGCATCTCC ACCTCCTCGC**
GGTCCGACCT GGGCTACTTC GGTAGGCTAA GGGAGAAGGT ACCCGGGGA

Underlined: T7 Promoter

Underlined: amplification Primers

Bold: HDV Ribozyme (the cleavage site is located at the 5' end of the bold sequence)

7.1.2. siRNA Versuch

siRNA Versuch:

T7 Primer: 5'-TCTAATACGACTCACTATAG

F1T7: 5'-TCTAATACGACTCACTATAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGG

R4T7: 5'-TCTAATACGACTCACTATAGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCTG

siRNA-Kontrolle 5' -UUCUCCGAACGUGUCACG UdTdT
dTdTAAGAGGCTTGCACAGTGCA-5'

siRNA-GFP: 5' -GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU
GCCGUUCGACUGGGACUUCAAG-5'

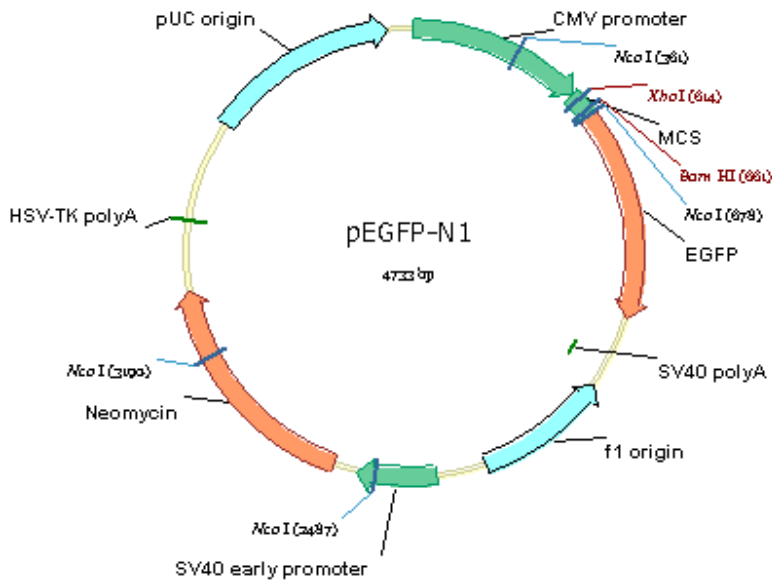


Abbildung 7.1 Karte des plasmids pEGFP-N1

eGFP cds:

```

ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTCCACC GGGGTGGTGC CCATCCTGGT
CGAGCTGGAC GGCGACGTAA ACGGCCACAA GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG
GCGAGGGCGA TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC
ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCCACC CTCGTGACCA CCCTGACCTA
CGGCGTGACG TGCTTCAGCC GCTACCCCGA CCACATGAAG CAGCACGACT
TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC
TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG
CGACACCCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG
ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC
GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCATCAAGG TGAACTTCAA
GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC GACCACTACC
AGCAGAACAC CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCAC
TACCTGAGCA CCCAGTCCGC CCTGAGCAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA
TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA
TGGACGAGCT GTACAAGTAA
  
```

Bold: Qiagen-siRNA substrate sequences

Underlined: amplification primers

7.1.3. 6S RNA Versuch

6S RNA:

```

ATTTCTCTGA GATGTTTCGCA AGCGGGCCAG TCCCCTGAGC CGATATTTCA
TACCACAAGA ATGTGGCGCT CCGCGGTTGG TGAGCATGCT CGGTCCGTCC
  
```

GAGAAGCCTT AAAACTGCGA CGACACATTC ACCTTGAACC AAGGGTTCAA
GGGTTACAGC CTGCGGCGGC ATCTCGGAGA TTC

Underlined: amplification primers

Primers:

6S-for ATTTCTCTGAGATGTTTCGCAAGC

6S-rev GGAATCTCCGAGATGCCGCC

5S RNA:

TGCCTGGCGG CAGTAGCGCG GTGGTCCCAC CTGACCCCAT GCCGAACTCA
GAAGTGAAAC GCCGTAGCGC CGATGGTAGT GTGGGGTCTC CTCATGCGAG
AGTAGGGAAC TGCCAGGCAT

Underlined: amplification primers

Primers:

5S RNA: Northern Blot RNA probe (142 bp)

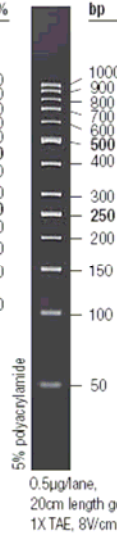
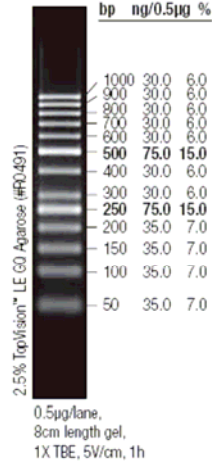
5S-for: TGCCTGGCGGCAGTAGCG

5S-rev ATGCCTGGCAGTTCCCTACTC

7.2. Größenstandard

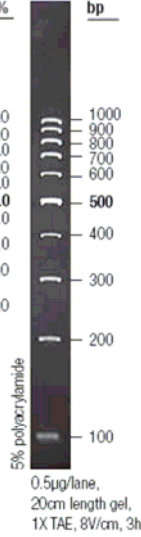
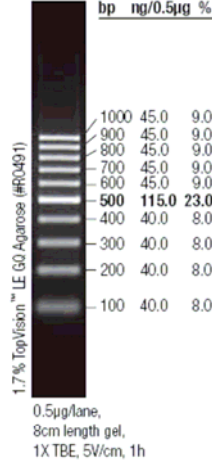
GeneRuler™ 50bp DNA Ladder

#SM0371/2/3



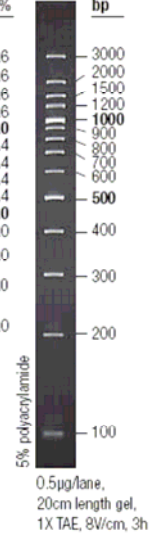
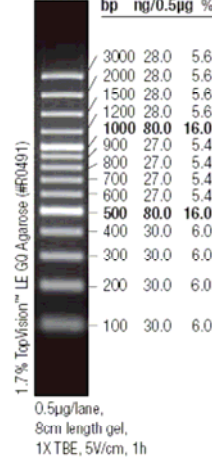
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder

#SM0241/2/3

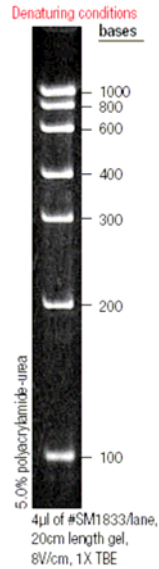
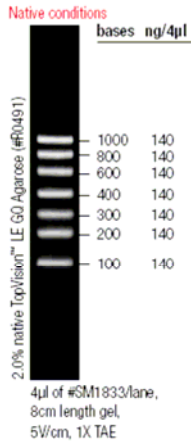


GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus

#SM0321/2/3



RiboRuler™ RNA Ladder, Low Range, #SM1831/3



Vorlagen:**In vitro T7 Transkription:**

	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Pipettierschema
Transkriptions-Puffer (von Fermentas)	5x	1x	
NTP-Mix	10 mM each	2.0 mM	
DNA-Template		1 µg	
Ribonuclease Inhibitor (RiboLock von Fermentas)	40 u/µl	50 u	
T7 RNA-Polymerase	20 u/µl	40 u	
Wasser		ad 50/ 100 µl	

	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Pipettierschema
Transkriptions-Puffer (von Fermentas)	5x	1x	
NTP-Mix	10 mM each	2.0 mM	
DNA-Template		1 µg	
Ribonuclease Inhibitor (RiboLock von Fermentas)	40 u/µl	50 u	
T7 RNA-Polymerase	20 u/µl	40 u	
Wasser		ad 50/ 100 µl	

	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Pipettierschema
Transkriptions-Puffer (von Fermentas)	5x	1x	
NTP-Mix	10 mM each	2.0 mM	
DNA-Template		1 µg	
Ribonuclease Inhibitor (RiboLock von Fermentas)	40 u/µl	50 u	
T7 RNA-Polymerase	20 u/µl	40 u	
Wasser		ad 50/ 100 µl	

	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Pipettierschema
Transkriptions-Puffer (von Fermentas)	5x	1x	
NTP-Mix	10 mM each	2.0 mM	
DNA-Template		1 µg	
Ribonuclease Inhibitor (RiboLock von Fermentas)	40 u/µl	50 u	
T7 RNA-Polymerase	20 u/µl	40 u	
Wasser		ad 50/ 100 µl	

PCR

	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Pipettierschema
PCR-Puffer (mit oder ohne MgCl ₂)	10x	1x	
Vorwärtsprimer	100 µM	1 µM	
Rückwärtsprimer	100 µM	1 µM	
dNTP-Mix	10 mM each	200 µM	
ggf. MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	
Template		500 pM	
Taq-DNA-Polymerase	1 U/µl	2 U	
Wasser		ad 100 µl	

	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Pipettierschema
PCR-Puffer (mit oder ohne MgCl ₂)	10x	1x	
Vorwärtsprimer	100 µM	1 µM	
Rückwärtsprimer	100 µM	1 µM	
dNTP-Mix	10 mM each	200 µM	
ggf. MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	
Template		500 pM	
Taq-DNA-Polymerase	1 U/µl	2 U	
Wasser		ad 100 µl	

	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Pipettierschema
PCR-Puffer (mit oder ohne MgCl ₂)	10x	1x	
Vorwärtsprimer	100 µM	1 µM	
Rückwärtsprimer	100 µM	1 µM	
dNTP-Mix	10 mM each	200 µM	
ggf. MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	
Template		500 pM	
Taq-DNA-Polymerase	1 U/µl	2 U	
Wasser		ad 100 µl	

	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Pipettierschema
PCR-Puffer (mit oder ohne MgCl ₂)	10x	1x	
Vorwärtsprimer	100 µM	1 µM	
Rückwärtsprimer	100 µM	1 µM	
dNTP-Mix	10 mM each	200 µM	
ggf. MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	
Template		500 pM	
Taq-DNA-Polymerase	1 U/µl	2 U	
Wasser		ad 100 µl	

	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Pipettierschema
PCR-Puffer (mit oder ohne MgCl ₂)	10x	1x	
Vorwärtsprimer	100 µM	1 µM	
Rückwärtsprimer	100 µM	1 µM	
dNTP-Mix	10 mM each	200 µM	
ggf. MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	
Template		500 pM	
Taq-DNA-Polymerase	1 U/µl	2 U	
Wasser		ad 100 µl	

