



**Universität Hamburg**  
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Fachbereich Chemie

Institut für Biochemie und  
Molekularbiologie



# **Praktikum Zellbiologie**

**Teil II: Zell-SELEX und Aptamere**

**Teil III: *In-Vitro*-Toxizitätsprüfungen**

BSc Studiengang

Molecular Life Sciences

**INHALT**

ZEITPLAN .....	3
THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....	4
Das Zytokin Interleukin-6 .....	4
Der Interleukin-6-Rezeptor.....	4
IL-6 und der sIL-6R im Kontext von Erkrankungen.....	5
Aptamere .....	6
Aptamere als Therapeutika.....	7
Das Zell-SELEX-Verfahren .....	8
DURCHFÜHRUNG.....	10
Versuchswoche 1: Nachweis des IL-6R und gp130 auf Baf/gp130/IL-6R/TNF- Zellen und Bindung IL-6R-spezifischer Aptamere .....	10
Tag 1: Fluoreszenzmarkierung von RNA an deren 5'-Ende .....	10
Tag 2: Reinigung der fluoreszenzmarkierten RNA.....	13
Tag 3: Durchflusszytometrischer Nachweis des IL-6R und gp130 auf Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen und Bindung IL-6R-spezifischer Aptamere .....	16
Versuchswoche 2: MTT- und LDH-Assay zur Messung der Lebens-fähigkeit und des Zellwachstums .....	21
Assay zur Bestimmung der Sensitivität von Zellen: MTT-Assay .....	21
Tag 1: MTT-Assay: Vorbereitung der Zellen .....	21
Tag 2: MTT-Assay: Weiterkultivierung der Zellen .....	24
Tag 3: MTT-Assay: Durchführung des MTT-Assays.....	25
Tag 1: LDH-Assay: Vorbereitung der Zellen .....	27
Tag 2: LDH-Assay: Zugabe der Proben/Toxen zu den ausplattierten Zellen des LDH-Assays .....	29
Tag 3: LDH-Assay: Durchführung des LDH-Assays .....	31
Beide Versuchswochen: Selektion BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zell-spezifischer DNA- Aptamere mittels Zell-SELEX .....	33
Reagenzien .....	33
Ansetzen von Puffern und Lösungen .....	34
Schritt 1: Zellen für die SELEX-Runde vorbereiten .....	36
Schritt 2: 1. SELEX-Runde durchführen.....	37
Schritt 3: PCR.....	37
Schritt 4: Strangtrennung .....	40
Schritt 5: Übergang zu Schritt 1 .....	41

## ZEITPLAN

### Woche 1: Aptamere: Anwendung molekularer Werkzeuge als Alternative zu Antikörpern

**Dienstag:** 11.00 Uhr Seminarraum BC

- Einführungsseminar
- Ansetzen von Puffern
- Fluoreszenzmarkierung der Nukleinsäuren ü. N.

**Mittwoch:** 9.00 Uhr Praktikumslabor

- Ethanol-fällung, Gelreinigung, Diffusionselution

**Donnerstag:** 9.00 Uhr Praktikumslabor

- Konzentrationsbestimmung
- Durchflusszytometrie

### Woche 2: Methoden zur *in-Vitro*-Toxizitätsprüfung

**Dienstag:** 9.00 Uhr Praktikumslabor

- Zellkultur zur Vorbereitung der Zellen für MTT-Assay (inkl. Tox-Zugabe)
- Zellkultur zur Vorbereitung der Zellen für LDH-Assay

**Mittwoch:** 9.00 Uhr Praktikumslabor

- Zugabe der Toxine zu den Zellen für den LDH-Assay
- Kultivierung der Zellen des MTT-Assays

**Donnerstag:** 9.00 Uhr Praktikumslabor

- Durchführung des LDH-Assays
- Durchführung des MTT-Assays

### Beide Wochen: Zell-SELEX

## THEORETISCHE GRUNDLAGEN

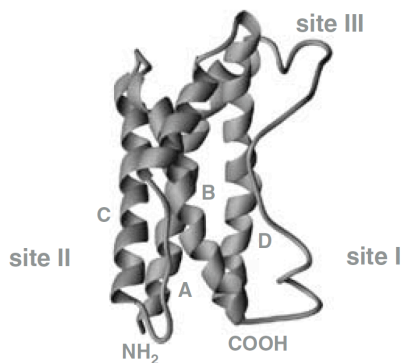
### Das Zytokin Interleukin-6

Zytokine sind körpereigene Botenstoffe, denen wichtige regulatorische Funktionen innerhalb vieler biologischer Vorgänge, z. B. die Steuerung der körpereigenen Immunabwehr, die Regulation von Wachstumsvorgängen und Zellproliferation, zugeschrieben werden. Zytokine werden ihrer Wirkung entsprechend in pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Vertreter unterteilt. Das Interleukin-6 (IL-6) wurde sowohl als pro-inflammatorisches, als auch als anti-inflammatorisches Zytokin beschrieben. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Funktionen des IL-6.

**Tab. 1: Auswahl wichtiger Funktionen des Interleukin-6 (IL-6)**

Zielzellen	Funktion/Wirkung
B-Zellen	Wachstum, Stimulation, Differenzierung
T-Zellen	Wachstum, Differenzierung in zytotoxische T-Zellen
Hepatozyten	Induktion von Akut-Phase-Reaktionen
Makrophagen	Differenzierung
Neuronen	Wachstum und Differenzierung

IL-6 besteht aus 184 Aminosäuren, gehört zu der 4-Helix-Bündel-Familie (Abb. 1).



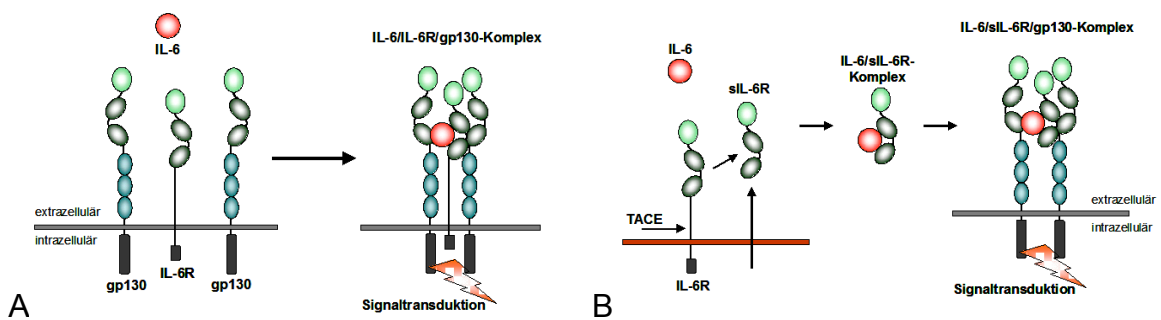
**Abb. 1: Humanes Interleukin-6 (IL-6).** IL-6 (hier schematisch dargestellt) besitzt drei potentielle Bindungsstellen (*site I, II und III*) zum Rezeptor. Der N- und C-Terminus sowie die vier  $\alpha$ -Helices (A, B, C und D) sind gekennzeichnet.

### Der Interleukin-6-Rezeptor

Die Initiation einer biologischen Signalkaskade in Zielzellen als Folge einer IL-6-bedingten Stimulation erfordert die Anwesenheit zweier Rezeptoruntereinheiten: den IL-6-Rezeptor (IL-6R,  $\alpha$ -Kette) und das Glykoprotein gp130 ( $\beta$ -Kette).

Der IL-6-Rezeptor (IL-6R) ist für die IL-6-Bindung verantwortlich. Nach Bindung des IL-6 an die erste Rezeptoruntereinheit (IL-6R) erfolgt die Weiterleitung des Signals in die Zelle über das Glykoprotein gp130 ( $\beta$ -Kette), die zweite Rezeptor-

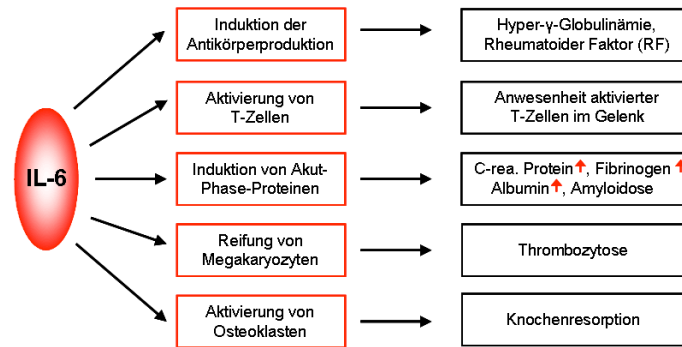
untereinheit (Abb. 2). Während gp130 von fast allen Körperzellen exprimiert wird, beschränkt sich die Expression des IL-6R auf Hepatozyten, Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und einige Lymphozyten. Diese Zellen können durch Bindung des IL-6 an den IL-6R stimuliert werden. Der sich bildende Komplex interagiert mit zwei Molekülen gp130, wodurch eine IL-6-spezifische intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wird. (klassisches IL-6-Signaling Abb. 2, A). Zellen, die keinen membrangebundenen IL-6-Rezeptor besitzen, können nicht auf dem Wege des klassischen IL-6-Signaling stimuliert werden. Es existiert ein alternativer Mechanismus, der es Zellen ohne membrangebundenen IL-6-Rezeptor ermöglicht, auf eine IL-6-Stimulation zu reagieren, das sogenannte IL-6-Trans-Signaling (Abb. 2, B). Die Wirkungsweise beruht auf einer natürlich vorkommenden, löslichen Form des IL-6R (sIL-6R).



**Abb. 2: Klassisches IL-6-Signaling und IL-6-Trans-Signaling (verändert nach [17]).** **A)** Klassisches IL-6-Signaling: IL-6 bindet den membrangebundenen IL-6R. Der IL-6/IL-6R-Komplex interagiert mit einem gp130-Dimer, wodurch die IL-6-vermittelte Signalkaskade ausgelöst wird. **B)** IL-6-Trans-Signaling: Durch alternatives Spleißen oder die TACE-vermittelte limitierte Proteolyse wird eine lösliche Form des IL-6R erzeugt. Nach Bindung des sIL-6R an IL-6 kommt es zur Interaktion mit gp130. Eine Stimulation von Zellen, welche gp130, jedoch keinen IL-6R tragen, wird ermöglicht.

## IL-6 und der sIL-6R im Kontext von Erkrankungen

Deutlich von der Norm abweichende Konzentrationen an IL-6 und löslichem IL-6R wurden bei einer Vielzahl von Krankheiten nachgewiesen. Am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis (RA) wurde die Rolle des IL-6 bzw. IL-6R und die biologische Aktivität des IL-6/IL-6R-Komplexes im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf der Patienten untersucht. RA ist eine inflammatorische Krankheit, die von entzündlichen Erosionen der Gelenke und der Anwesenheit eines Anti-Immunglobulin-Autoantikörpers (Rheumatoider Faktor, RF) begleitet wird (Abb. 3). Die Erkrankung ist ebenfalls mit hohen Konzentrationen an Akut-Phase-Proteinen assoziiert.



**Abb. 3: Funktionen und Wirkungen des IL-6 am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis (nach [5]).** C-rea. Protein steht für C-reaktives Protein. Die roten Pfeile deuten eine erhöhte Konzentration der entsprechenden Komponente an.

Eine mögliche Therapie von RA-Patienten stellt die gezielte Unterdrückung der IL-6-Produktion oder Inhibition der IL-6-Funktionen dar, beispielsweise durch Anwendung neutralisierender Anti-IL-6-AK oder Anti-IL-6R-AK oder Aptamere, welche den IL-6R hoch affin und spezifisch binden.

## Aptamere

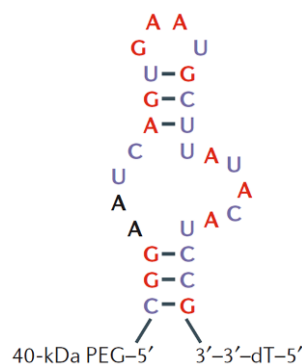
Aptamere sind kurze einzelsträngige Nukleinsäuren (ssDNA oder ssRNA), welche ausgewählte Zielmoleküle mit hoher Affinität und Spezifität binden können. Erstmals geprägt wurde der Begriff des Aptamers 1990 durch die Arbeitsgruppe von Andrew D. Ellington und Jack W. Szostak. Die Isolation dieser RNA-Spezies erfolgt durch *in vitro* Selektion aus einer komplexen, randomisierten Bibliothek (Abb. 5). Seither wurden mehr als 2.000 wissenschaftliche Berichte über Aptamere und deren Herstellung veröffentlicht. Aufgrund der dreidimensionalen Faltung können verschiedenartige Zielstrukturen erkannt und gebunden werden, wie z. B. Aminosäuren, Antibiotika, Peptide, Proteine, Viren oder sogar ganze Zellen.

**Tab. 2: Ausgewählte Aptamere spezifisch für Zielmoleküle verschiedener Substanzklassen**

Substanzklasse	Target	Aptamertyp	$K_d$ -Wert [M]
Ionen	$Zn^{2+}$	DNA	$1,5 \times 10^{-5}$
Nukleotide	Adenosintriphosphat (ATP)	DNA	$6,0 \times 10^{-6}$
Zytokine	<i>Vascular Epithelial Growth Factor</i>	RNA	$0,5-1,5 \times 10^{-10}$
Peptide	Neuropeptid Y (NPY)	DNA	$0,3-1,0 \times 10^{-6}$
Proteine	HIV Tat-Protein	RNA	$1,2 \times 10^{-10}$
Zellen	Burkitt Lymphoma B Zellen	DNA	$4,9 \times 10^{-8}$

## Aptamere als Therapeutika

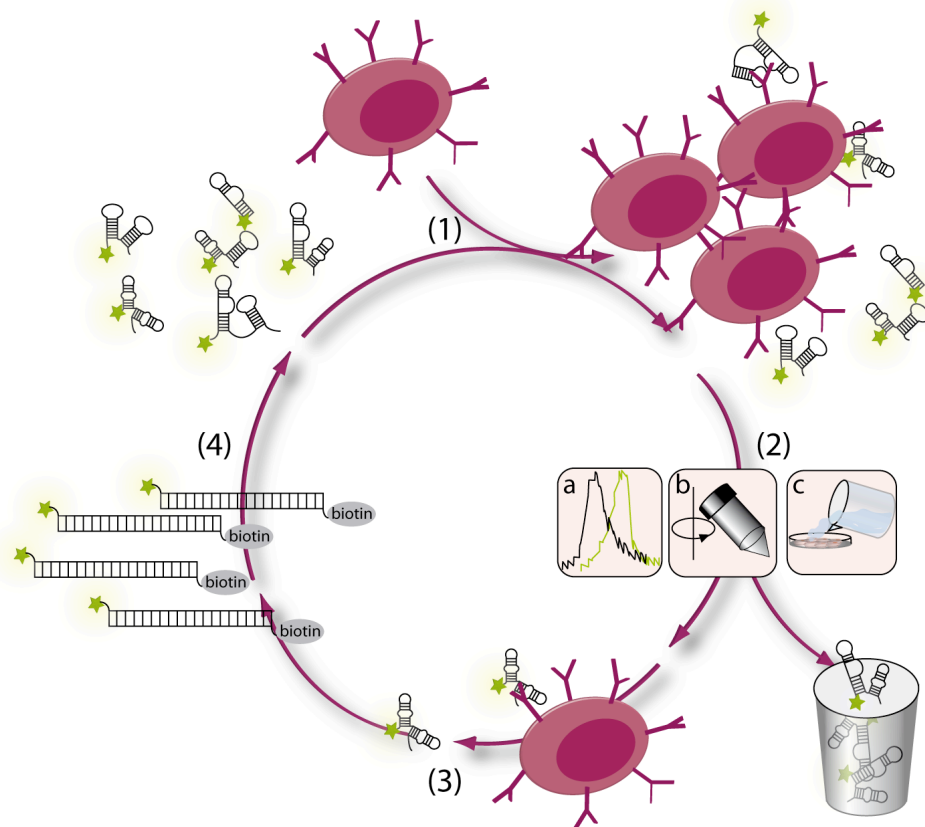
Aptamere haben in der Biologie und Medizin während der letzten Jahre einen immer größeren Einfluss erlangt und bilden eine vielversprechende Molekülklasse neuartiger Therapeutika und Diagnostika. Im Jahre 2004 wurde erstmals eine Aptamer-basierte Verbindung für eine klinische Anwendung zugelassen: das *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-spezifische Aptamer Macugen® (Abb. 4). Der medizinische Einsatz von Aptameren als Therapeutikum ist derzeit auf das unter dem Namen Macugen® oder Pegaptanib bekannte, chemisch stark modifizierte RNA-Aptamer beschränkt.



**Abb. 4: Das Aptamer-basierte Therapeutikum Macugen®.** Gezeigt ist die Sequenz und vorhergesagte Sekundärstruktur des VEGF-spezifischen Aptamers. In rot sind 2'-Methoxypurine und in blau 2'-Desoxy-2'-fluoro-modifizierte Pyrimidinbasen dargestellt. Am 5'-Ende des Aptamers wurde ein 40 kDa großer Polyethylenglykolrest (PEG) angefügt. Zum Schutz gegenüber Exonukleasen wurde das 3'-Ende um eine 3'-3'-dT-Kappe erweitert. Post-selektiv wurden alle 2'-OH-Gruppen der Purine durch 2'-Methoxygruppen ersetzt mit Ausnahme der Nukleotide an den Positionen 4 und 5. Somit blieben lediglich zwei der 27 Nukleotide unverändert.

Es wird zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) eingesetzt. Das Anti-VEGF-Aptamer Macugen® bindet hoch spezifisch an die pathogene Isoform VEGF165 und blockiert die Interaktion dieses Wachstumsfaktors mit dessen VEGF-Rezeptor. Dies führt zur Inhibition der VEGF-Aktivität, zur Verringerung der Neovaskularisierung des Auges und zur Verzögerung des Verlustes der Sehfähigkeit. Mit der fortschreitenden Aufklärung einer Vielzahl zellulärer biologischer Prozesse nimmt die Bedeutung und Anwendung von Aptameren einen immer größeren Stellenwert ein.

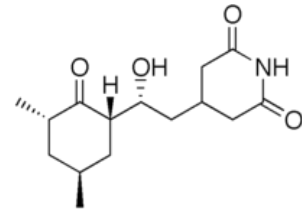
## Das Zell-SELEX-Verfahren



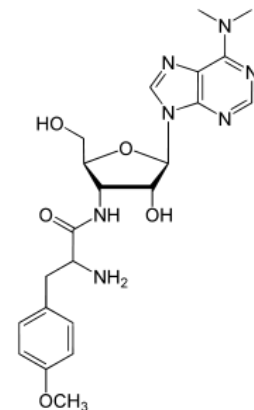
**Abb. 5: Zell-SELEX-Selektionszyklus zur Anreicherung zellspezifischer DNA-Aptamere.** Ein Zyklus beinhaltet folgende Schritte: **(1)** Inkubation einer einzelsträngigen DNA-Bibliothek mit den Zielzellen. **(2)** Trennung der an Zellen gebundenen von nicht-bindenden Nucleinsäuren mittels FACS **(2a)**, Zentrifugation **(2b)** oder in Waschschrritten **(2c)**. **(3)** Bindende ssDNA-Moleküle werden eluiert und **(4)** mittels PCR amplifiziert, wobei der *Reverse-Primer* am 5'-Ende biotinyliert ist. Bei Trennung mittels FACS wird neben dem Biotin-modifizierten *Reverse-Primer* ein am 5'-Ende Fluoreszenz-markierter *Forward-Primer* eingesetzt. Nach Strangtrennung kann die angereicherte ssDNA-Bibliothek in einen neuen SELEX-Zyklus eingehen (Quelle: Meyer, Hahn, Rentmeister; Biospektrum 04, 2011).

**Testsubstanzen dieses Praktikums:**1) IL-6R-spezifische Aptamere2) Cycloheximid:

- Antibiotikum aus Streptomyceten
- fungiert als Translationshemmer bei Eukaryoten
- hemmt Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Ribosomen, den Transfer von Aminosäuren von der Aminoacyl-tRNA auf entstehende Peptide und die Freisetzung der deacylierten tRNA von Ribosomen
- giftig für Menschen

3) Puromycin:

- Nucleosid-Antibiotikum aus Streptomyceten (*Streptomyces alboniger*)
- hemmt Protein-Biosynthese (Translation) durch verfrühte Termination
- giftig für Menschen
- leitet sich strukturell von Adenosin ab



## DURCHFÜHRUNG

### Versuchswoche 1: Nachweis des IL-6R und gp130 auf Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen und Bindung IL-6R-spezifischer Aptamere

Spezifische Oberflächenproteine auf Zellen lassen sich mit Hilfe geeigneter Antikörper, die gegen diese Moleküle gerichtet sind, nachweisen. Durch Markierung des Antikörpers mit einem Fluorophor, beispielsweise FITC, sollen im folgenden Versuch sowohl der Interleukin-6-Rezeptor als auch gp130 auf der Oberfläche von Baf/gp130/IL6R/TNF-Zellen identifiziert werden.

Eine zu den Antikörpern alternative Möglichkeit, den IL-6R auf den Baf/gp130/IL6R/TNF-Zellen durchflusszytometrisch nachzuweisen, bietet die Anwendung Fluoreszenzmarkierter IL-6R-spezifischer Aptamere.

#### Tag 1: Fluoreszenzmarkierung von RNA an deren 5'-Ende

##### Materialien:

- GTPS-markierte RNAs (siehe Tabelle FACS)
- Atto647N-Maleimid (Gruppen 1-5)
- Alexa Fluor 647 C<sub>2</sub>-Maleimid (Gruppen 6-10)

##### Zu verwendende Lösungen:

Puffer	Komponente	Menge	Endkonzentration
TAE (50x) (Tris-Acetat-EDTA)	Tris-Base	121 g	2 M
	Essigsäure	28,6 ml	1 M
	EDTA (0,5 M)	50 ml	50 mM
	Ad. H <sub>2</sub> O	500 ml	
APS-Lösung	Ammoniumpersulfat	100 mg	10%
	ad H <sub>2</sub> O	1 ml	

Die Analyse und Reinigung von RNA-Molekülen erfolgt mit Hilfe denaturierender Polyacrylamid (PAA)-Gele. Je nach Länge der zu trennenden Nukleinsäurefragmente werden 8 – 20%ige PAA-Gele verwendet.

Da RNA-Moleküle zur Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen befähigt sind, müssen diese denaturiert werden, damit während der Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(PAGE) eine Trennung ihrer Länge nach möglich wird. Die denaturierende Wirkung wird dabei beispielsweise durch Zugabe von Harnstoff erreicht. Die Zusammensetzung für einen Gel-Gießstand (5 Gele) ist in folgender Tabelle aufgelistet. Vor Zusammenmischen der Gellösung muss der Gießstand mit Hilfe des Assistenten vorbereitet werden.

**Tab.: Zusammensetzung denaturierender 10%-iger PAA-Gele**

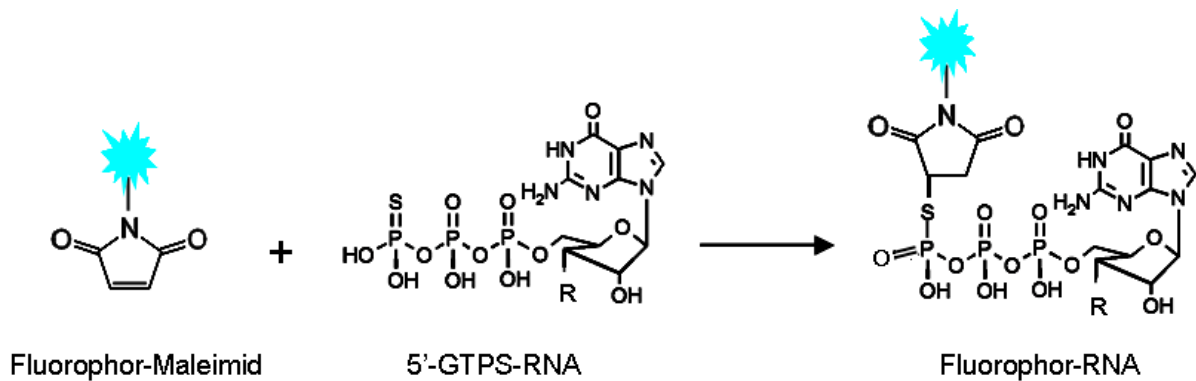
Komponente	Menge	Endkonzentration
TAE (50x)	1 ml	1x
Acrylamid:Bisacrylamid (40%ig)	12,5 ml	10%
Harnstoff	24 g	8 M
Aqua dest.	Ad 50 ml	

Das Anmischen der Lösung erfolgt in einem Becherglas! Der Harnstoff sollte unter leichtem Erwärmen gelöst werden. Nach Abkühlen der Lösung folgt die Zugabe von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumpersulfat):

Komponente	Menge	Endkonzentration
PAA-Harnstoff-Lösung	50 ml	
TEMED	50 µl	0,1%ig
APS-Lösung (10%)	500 µl	0,1%ig

Nach Zugabe von TEMED und APS sollte die Lösung vorsichtig, jedoch zügig gemischt und in den Gelgießstand gefüllt werden. Die Kämme werden in das noch flüssige Gel luftblasen-frei eingesetzt. Nach etwa 1 h sind die Gele vollständig polymerisiert.

Für die jeweiligen Gruppen werden vom Assistenten RNA-Lösungen ausgeteilt, die an ihrem 5'-Ende bereits mit GTPS (Guanosin-5'-(3-O-thio)triphosphat) markiert wurden. Die GTPS-Markierung bietet die Möglichkeit, die RNA folgend einer Markierung mit den fluoreszierenden Verbindungen Atto647N-Maleimid bzw. Alexa Fluor® 647 C<sub>2</sub>-Maleimid zu unterziehen (Abb. 5), wobei die GTPS-RNA mit einem 500fachen molaren Überschuss des Fluorophor-Maleimids über Nacht bei RT reagieren soll.



**Abb. 5: Kopplung eines Fluorophor-tragenden Maleimids an 5'-thiomodifizierte RNA.** Die Thiolgruppe der 5'-GTPS-modifizierten RNA wird in einer Additionsreaktion mit dem Maleimid, welches einen fluoreszierenden Farbstoff (■) trägt, unter Ausbildung eines Thioethers verknüpft.

**Es ist zu beachten, dass jede Gruppe die richtigen RNAs markiert (siehe auch Tab. FACS-Analyse von Tag 3) und den dafür vorgesehenen Fluorophor verwendet!**

#### GTPS-markierte RNAs:

- Gruppen 1 und 6:** RNA-Apt. X und RNA-Apt. Y  
**Gruppen 2 und 7:** RNA-Apt. X und RNA-Apt. Z  
**Gruppen 3 und 8:** F'-mod. RNA-Pool und F'-mod. RNA-Apt. 1  
**Gruppen 4 und 9:** F'-mod. RNA-Pool und F'-mod. RNA-Apt. 2  
**Gruppen 5 und 10:** RNA-Apt. Y und RNA-Apt. Z

#### Fluorophore:

- Gruppen 1-5:** Atto-647N-Maleimid  
**Gruppen 6-10:** Alexa Fluor 647 C<sub>2</sub>-Maleimid

Pro Gruppe werden 2 der folgenden Reaktionsansätze in 1,5-ml-Eppendorfgefäßen am Ende des Praktikumstages zusammenpipettiert:

Komponente	Menge	Finale Konzentration
GTPS-RNA	100 pmol	5 µM
Fluorophor-Maleimid (10 mM)	5,0 µl	2,5 mM
1x DPBS (steril!, Woche 1)	Ad. 20 µl	

Die Inkubation erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur, wobei die Reaktionsansätze vor Licht zu schützen sind (Alufolie, Schrank,...)!

## Tag 2: Reinigung der fluoreszenzmarkierten RNA

### Materialien:

- Reaktionsansätze der ü. N. Fluoreszenz-markierten RNAs (je 20 µl)

### Zu verwendende Lösungen:

Puffer	Komponente	Menge	Endkonzentration
Natriumacetat, 3 M, pH 5.2	Natriumacetat (Trihydrat)	2,4 g	3 M
Steril filtrieren!	ad H <sub>2</sub> O	5 ml	
Natriumacetat, 0,3 M, pH 5.2	Natriumacetat (3 M)	1 ml	0,3 M
Steril filtrieren!	ad H <sub>2</sub> O	10 ml	
2x-RNA-Probenpuffer	Harnstoff	4,8 g	8 M
	Bromphenolblau	Spatelspitze	
	ad H <sub>2</sub> O	10 ml	
1x TAE	50x TAE	20 ml	1x
	ad H <sub>2</sub> O	1000 ml	
Ethanol (70%)	Ethanol (100%)	35 ml	70%
Eiskalt lagern!	ad H <sub>2</sub> O	50 ml	

Zur Abtrennung von überschüssigem, nicht gebundenem Fluorophor wird die markierte RNA einer Ethanolpräzipitation und Gelreinigung unterzogen.

### Ethanolfällung:

Die Ansätze der Fluoreszenzmarkierung (je 20 µl) werden zur Ethanolpräzipitation jeweils mit 1/10 Volumen (2 µl) NaOAc-Lösung (3 M, pH 5,2, steril filtriert!) versetzt, so dass eine Endkonzentration von 0,3 M NaOAc entsteht. Die Fällung erfolgt durch Zugabe von 2,5 Volumen (50 µl) eiskaltem 100%igem Ethanol und anschließender Inkubation für 30 min bei -20°C. Die gefällte RNA wird folgend 30 min bei 4°C und 15.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge austarieren!), der Überstand wird verworfen, auf das Pellet 50 µl eiskalter 70%iger Ethanol gegeben und erneut für nun 5 min bei 4°C und 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 10 µl Wasser gelöst.

### **Gelreinigung**

Die denaturierenden PAA-Gele werden in eine Laufkammer eingesetzt, wobei sich 2 Gruppen ein Gel teilen. (Gruppeneinteilung bitte mit dem Assistenten absprechen!) Als Laufpuffer dient 1x TAE. Zu Beginn der denaturierenden PAGE und vor Auftragung der Proben wird ein 15 minütiger Vorlauf des Gels bei 8 Watt durchgeführt. Währenddessen werden die gelösten RNA-Proben (10 µl) mit dem gleichen Volumen an 2x denaturierendem RNA-Probenpuffer versetzt und für 2 min bei 80°C erhitzt. Der Vorlauf des Gels wird beendet, die Geltaschen gründlich mit Puffer gespült und anschließend die bereits denaturierten Proben auf das Gel beladen. Die Elektrophorese der Proben erfolgt bei 8 Watt. Die Elektrophorese wird nach etwa 15-20 min beendet, wenn sich der zugesetzte Farbstoff Bromphenolblau etwa 1 cm vor dem unteren Ende des Gels befindet! (Bitte mit den Assistenten Rücksprache halten!) Die Laufkammer wird nun auseinander gebaut, die Platten vorsichtig voneinander getrennt und das Gel in Klarsichtfolie eingeschlagen.

### **UV-Shadowing**

Nukleinsäuren weisen ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm auf. Diese Eigenschaft macht man sich bei der präparativen Reinigung von Nukleinsäuren aus PAA-Gele zu Nutze, um diese ohne weitere Färbung identifizieren zu können. Dazu wird das PAA-Gel in zwei Klarsichtfolien eingeschlagen und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte transferiert, welcher mit einem bei 254 nm anregbaren Fluoreszenzfarbstoff beschichtet ist. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit entsprechendem UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) werden die Nukleinsäuren durch Fluoreszenzlöschung als dunkle Schattenbanden sichtbar. Die Nukleinsäure-Banden können auf der Folie mit einem Folienmarker gekennzeichnet werden. Die jeweiligen Gelstücke werden ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und einer Diffusionselution unterzogen.

### **Diffusionselution**

Die in den Gelstücken enthaltenen RNAs werden durch Diffusionselution aus dem Gel extrahiert. Es werden zu den Gelstücken 500 µl 0,3 M NaOAc-Elutionspuffer gegeben und eine Stunde bei 50°C unter ständigem Schütteln (1000 rpm) im Thermomixer eluiert. Anschließend werden die Gelstücke kurz abzentrifugiert, der Überstand (ohne Gelstücke!) in ein neues 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und die gereinigte RNA erneut einer

Ethanolpräzipitation (s. o.) unterzogen. Das Pellet wird in 10  $\mu\text{l}$  Wasser suspendiert. Die kurzfristige Lagerung erfolgt lichtgeschützt auf Eis, längerfristig bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

1  $\mu\text{l}$  der gereinigten Nukleinsäurelösung werden mit 9  $\mu\text{l}$  Wasser gemischt. Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgt am NanoDrop ND-1000 durch photometrische Messung der Optischen Dichte bei 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ). Es gilt dabei folgender Zusammenhang:

$$\text{OD}_{260} = 1 \quad \rightarrow \quad 33 \text{ ng RNA}/\mu\text{l}.$$

Das Verhältnis  $\text{OD}_{260}$  zu  $\text{OD}_{280}$  ist ein Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren, da Proteine bei 280 nm ein Absorptionsmaximum besitzen. Ein Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  von 1,8 – 2,0 weist auf eine Reinheit der Nukleinsäuren von 70 – 95% hin. Die Berechnung der molaren Konzentrationen der Nukleinsäurelösung erfolgt unter der Annahme eines durchschnittlichen Molekulargewichts von 327 g/mol pro Nukleotid. Berechnen Sie somit die molare Konzentration der gereinigten, fluoreszenzmarkierten RNA (Anzahl der Nukleotide pro RNA beim Assistenten erfragen)!

Die Tubes mit den restlichen 9  $\mu\text{l}$  der verdünnten RNA-Lösung werden ausreichend beschriftet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. (Für ein Kontrollgel der Assistenten!)

### Tag 3: Durchflusszytometrischer Nachweis des IL-6R und gp130 auf Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen und Bindung IL-6R-spezifischer Aptamere

Im folgenden Versuch sollen sowohl der Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) als auch gp130 auf der Oberfläche von Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen und die Bindung diverser fluoreszenzmarkierter Nukleinsäuren an den membranständigen IL-6R nachgewiesen werden. Die murine Prä-B-Zelllinie BAF/3 ist eine immortalisierte, dem Knochenmark entstammende Pro-B-Zelllinie, deren Wachstum und Proliferation von der Anwesenheit des Zytokins IL-3 abhängt. Das Wachstum der BAF/3-Zellen, welche in diesem Praktikum verwendet werden, ist von IL-6 abhängig. Begründet wird dies durch eine stabile Transfektion dieser Zellen mit den cDNAs für gp130, IL-6R und TNF (BAF/gp130/IL-6R/TNF).

#### Materialien:

- Gereinigte, Fluoreszenz-markierte RNAs
- Primärer Maus-Anti-IL-6R-AK
- Primärer Maus-Anti-gp130-AK
- Sekundärer Ziege-anti-Maus-AK (FITC-markiert)
- Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen

#### Zu verwendende Lösungen:

Puffer	Komponente	Menge	Endkonzentration
DPBS (5x)	Bereits in der ersten Praktikumswoche hergestellt!		
MgCl <sub>2</sub> (1 M)	MgCl <sub>2</sub> (wasserfrei)	4,76 g	1 M
<b>Puffer steril filtrieren!</b>	Ad. H <sub>2</sub> O	50 ml	
1x DPBS / 3 mM MgCl <sub>2</sub>	DPBS (5x)	10 ml	1x
	MgCl <sub>2</sub> (1 M)	150 µl	3 mM
<b>Puffer steril filtrieren!</b>	Ad. H <sub>2</sub> O	50 ml	
DMEM-Medium			

**Tab. FACS: Verwendete Antikörper und Nukleinsäuren zum Nachweis des IL-6R und gp130 mittels FACS-Analyse**

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Maus-Anti-IL-6R-AK</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Maus-Anti-gp130-AK</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>RNA-Apt. A</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Kontroll-RNA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>RNA-Apt. X</b>	+	+				+	+			
<b>RNA-Apt. Y</b>	+				+	+				+
<b>RNA-Apt. Z</b>		+			+		+			+
<b>F-mod.-RNA-Pool</b>			+	+				+	+	
<b>F-mod'-RNA-Aptamer_1</b>			+					+		
<b>F-mod'-RNA-Aptamer_2</b>				+					+	

Primärer AK      Nukleinsäure (NS; bereits markiert käuflich erworben)      Nukleinsäure (NS, während des Praktikums markiert)

**Gruppen 1-5:**      - Nukleinsäuren 3 und 4 wurden selbst mit **Atto647N-Maleimid** Fluoreszenz-markiert

**Gruppen 6-10:**      - Nukleinsäuren 3 und 4 wurden selbst mit **Alexa Fluor® 647 C<sub>2</sub>-Maleimid** Fluoreszenz-markiert

→ jede Gruppe soll insgesamt 8 Ansätze am FACS vermessen:

- 1) Baf/gp130/IL6R/TNF
- 2) Baf/gp130/IL6R/TNF + primärer AK1      + sekundärer Ziege-Anti-Maus-AK
- 3) Baf/gp130/IL6R/TNF + primärer AK2      + sekundärer Ziege-Anti-Maus-AK
- 4) Baf/gp130/IL6R/TNF      + sekundärer Ziege-Anti-Maus-AK
- 5) Baf/gp130/IL6R/TNF + RNA-Aptamer A      (bereits Fluoreszenz-markierte NS wird vom Assistent ausgegeben)
- 6) Baf/gp130/IL6R/TNF + Kontroll-RNA      (bereits Fluoreszenz-markierte NS wird vom Assistent ausgegeben)
- 7) Baf/gp130/IL6R/TNF + Nukleinsäure 3      (im Praktikum Fluoreszenz-markiert)
- 8) Baf/gp130/IL6R/TNF + Nukleinsäure 4      (im Praktikum Fluoreszenz-markiert)

### **Bestimmung der Zellzahl**

Vom Praktikumsbetreuer wird eine Zellsuspension der Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen zur Verfügung gestellt. Die Zellzahl wird durch Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt (analog der Versuchswoche 1).

### **Durchflusszytometrischer Nachweis des IL-6R und gp130 auf Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen**

Zum Nachweis des IL-6R und gp130 auf der Zelloberfläche werden die Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen mit spezifischen primären Antikörpern gegen die beiden Rezeptoren inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert. Um die Bindung der Aptamere an den IL-6R auf der Zelloberfläche nachzuweisen, werden die Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen mit spezifischen Aptameren inkubiert.

#### 1.) Nachweis des IL-6R und gp130 auf Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen mit spezifischen primären Antikörpern

- Es werden vier 2-ml-Eppendorf-Gefäße vorbereitet und jeweils X  $\mu$ l Zellsuspension ( $5 \times 10^5$  Zellen) vorgelegt.
- Die Zellsuspensionen ( $5 \times 10^5$  Zellen) werden 5 min bei 500 g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen, verworfen und das Pellet vorsichtig in 500  $\mu$ l 1x DPBS-Puffer (3 mM  $MgCl_2$ ) suspendiert (lediglich 4x auf- und abpipettieren).
- Die Zellsuspension wird erneut zentrifugiert (5 min, 500 g), der Überstand abgenommen, verworfen und das Pellet nun in 500  $\mu$ l 1x DPBS-Puffer (3 mM  $MgCl_2$ ) suspendiert.
- Zunächst werden die vier Eppendorf-Tubes beschriftet und anschließend die Antikörper-Lösungen nach folgendem Pipettierschema hinzupipettiert:
  - 1)  $5 \times 10^5$  Zellen/500  $\mu$ l
  - 2)  $5 \times 10^5$  Zellen/500  $\mu$ l + 1  $\mu$ l primärer AK1 (Maus-anti-IL6R-AK)
  - 3)  $5 \times 10^5$  Zellen/500  $\mu$ l + 1  $\mu$ l primärer AK2 (Maus-anti-gp130-AK)
  - 4)  $5 \times 10^5$  Zellen/500  $\mu$ l
- Es wird anschließend für 30 min im Eisbad inkubiert.
- Die Zellen werden 5 min bei 500 g zentrifugiert.

- Die Überstände werden verworfen, die Zellpellets sofort in 500  $\mu\text{l}$  1x DPBS-Puffer (3 mM  $\text{MgCl}_2$ ) vorsichtig suspendiert und erneut zentrifugiert.
- Nach Resuspension der Zellen in 500  $\mu\text{l}$  1x DPBS-Puffer (3 mM  $\text{MgCl}_2$ ) erfolgt die Zugabe des FITC-markierten, sekundären Antikörpers
  - 1) ohne weitere Zugabe
  - 2) + 1  $\mu\text{l}$  Ziege-anti-Maus-AK (FITC-markiert)
  - 3) + 1  $\mu\text{l}$  Ziege-anti-Maus-AK (FITC-markiert)
  - 4) + 1  $\mu\text{l}$  Ziege-anti-Maus-AK (FITC-markiert)

und eine Inkubation für 30 min bei 4 °C.

- Die Zellen werden 5 min bei 500 g zentrifugiert.
- Die Überstände werden verworfen, die Zellpellets sofort in 500  $\mu\text{l}$  1x DPBS-Puffer (3 mM  $\text{MgCl}_2$ ) vorsichtig suspendiert und weiterhin bis zur Analyse am Durchflusszytometer auf Eis gelagert.

## 2.) Nachweis der Aptamerbindung an IL-6R auf Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen

- Es werden vier 2-ml-Eppendorf-Gefäße vorbereitet, gründlich beschriftet und jeweils X  $\mu\text{l}$  Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellsuspension ( $5 \times 10^5$  Zellen) vorgelegt.
- Die Zellsuspensionen werden 5 min bei 500 g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen, verworfen und das Pellet vorsichtig in 500  $\mu\text{l}$  1x DPBS-Puffer (3 mM  $\text{MgCl}_2$ ) suspendiert (lediglich 4x auf- und abpipettieren).
- Waschschrift: Die Zellsuspension wird erneut zentrifugiert (5 min, 500 g), der Überstand erneut abgenommen, verworfen und das Pellet nun in 500  $\mu\text{l}$  1x DPBS-Puffer (3 mM  $\text{MgCl}_2$ ) suspendiert.
- Nach folgendem Pipettierschema werden nun die Aptamer-Lösungen hinzu pipettiert:

→ Welche Nukleinsäuren verwendet werden, ist der Tabelle FACS zu entnehmen!

- 
- 5)  $5 \times 10^5$  Zellen/500  $\mu$ l + 10 pmol Aptamer A
  - 6)  $5 \times 10^5$  Zellen/500  $\mu$ l + 10 pmol Kontroll-RNA
  - 7)  $5 \times 10^5$  Zellen/500  $\mu$ l + 10 pmol Nukleinsäure 3
  - 8)  $5 \times 10^5$  Zellen/500  $\mu$ l + 10 pmol Nukleinsäure 4
- Es wird anschließend für 10 min bei RT möglichst unter Lichtausschluss inkubiert.
  - Die Zellen werden 5 min bei 500 g zentrifugiert.
  - Die Überstände werden verworfen und die Zellpellets sofort in 500  $\mu$ l 1x DPBS-Puffer (3 mM  $MgCl_2$ ) vorsichtig suspendiert.
  - Die Analyse erfolgt zusammen mit den ersten 4 Testansätzen am Durchflusszytometer.

## Versuchswoche 2: MTT- und LDH-Assay zur Messung der Lebensfähigkeit und des Zellwachstums

### Assay zur Bestimmung der Sensitivität von Zellen: **MTT-Assay**

Ein erster Versuch, die Proliferation von Zellen bzw. deren Lebensfähigkeit und die Zytotoxizität von Testsubstanzen zu untersuchen, stellt der sogenannte MTT-Assay dar. Mit Hilfe dieses Assays lassen sich Einflüsse von Wirkstoffen auf das Wachstum von Zellen untersuchen.

Die Zellen werden dabei dem MTT-Reagenz (3-(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-Bromid) ausgesetzt, einem schwach gelben Tetrazoliumsalz, welches in die Zellen eindringt, von mitochondrialen Enzymen (Succinat-Dehydrogenase) gespalten wird und folgend wasserunlösliche, blaue Formazane bildet. Diese Umwandlung findet nur in lebenden, stoffwechselaktiven Zellen statt. Die Menge des gebildeten Formazan-Farbstoffes, generiert durch die Aktivität der Enzyme, ist direkt proportional zu der Anzahl lebender Zellen.

Durch Zellyse wird das Formazan freigesetzt. Das unlösliche Formazan wird durch Zusatz organischer Lösungsmittel (bspw. DMSO) aus den Zellen herausgelöst. Die Absorption des gebildeten Formazans kann bei etwa 550 nm photometrisch bestimmt werden. Der Vorteil liegt dabei in dem geringen Zeitaufwand des Tests und der Vermeidung teurer Radioisotope.

Anhand dieses Versuchs soll nun der Einfluss verschiedener Testsubstanzen auf das Zellwachstum und die Lebensfähigkeit der Baf/gp130/IL6R/TNF-Zellen untersucht werden. Die Quantifizierung und Intensität der alkoholischen Formazanlösung wird photometrisch mit einem Spektrometer (*ELISA plate reader*) bei 550 nm bestimmt.

### Tag 1: MTT-Assay: Vorbereitung der Zellen

#### Materialien:

- Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen
- Testsubstanzen (Aptamere, Cycloheximid, Puromycin)

#### Zu verwendende Lösungen:

Puffer	Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>DMEM ohne Phenolrot</b>			
Zellkulturmedium	<b>DMEM ohne Phenolrot</b>	450 ml	
	100x Pen/Strep	5 ml	1x
<b>Sterilbank!</b>	FKS (100%)	50 ml	10%
IL-6 in DMEM	IL-6 (1 mg/ml)	1 µl	200 ng/µl
<b>Sterilbank!</b>	<b>DMEM ohne Phenolrot</b>	5 ml	
Cycloheximid (200 µg/ml)	Cycloheximid (10 mg/ml)	20 µl	200 µg/ml
	<b>DMEM ohne Phenolrot</b>	1 ml	
Cycloheximid (20 µg/ml)	Cycloheximid (200 µg/ml)	100 µl	20 µg/ml
	<b>DMEM ohne Phenolrot</b>	1 ml	
Cycloheximid (2 µg/ml)	Cycloheximid (20 µg/ml)	100 µl	2 µg/ml
	<b>DMEM ohne Phenolrot</b>	1 ml	
Puromycin (200 µg/ml)	Puromycin (10 mg/ml)	20 µl	200 µg/ml
	<b>DMEM ohne Phenolrot</b>	1 ml	
Puromycin (20 µg/ml)	Puromycin (200 µg/ml)	100 µl	20 µg/ml
	<b>DMEM ohne Phenolrot</b>	1 ml	
Puromycin (2 µg/ml)	Puromycin (20 µg/ml)	100 µl	2 µg/ml
	<b>DMEM ohne Phenolrot</b>	1 ml	
ssDNA-Aptamer (100 µM)	ssDNA-Aptamer	40 µl	20 pmol/µl
	<b>DMEM ohne Phenolrot</b>	160 µl	
ssDNA-Kontrolle (100 µM)	ssDNA-Kontrolle	40 µl	20 pmol/µl
	<b>DMEM ohne Phenolrot</b>	160 µl	

→ Von Beginn an muss steril gearbeitet werden!

Zunächst stellt eine Gruppe unter der Sterilbank die zu verwendenden Lösungen her (IL-6, Puromycin, Cycloheximid, ssDNA-Aptamer in DMEM).

Vom Assistenten werden kultivierte Baf/gp130/IL6R/TNF-Zellen ausgegeben, deren Zellzahl zunächst bestimmt und folgend auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in frischem Zellkulturmedium (DMEM inkl. PenStrep und 10% FKS) eingestellt werden soll.

Zur Durchführung des MTT-Assays sollen die folgenden 11 verschiedenen Reaktionsansätze getestet werden, wobei jeweils Dreifachbestimmungen notwendig sind, d. h. jeder Ansatz wird dreimal pipettiert!

Ansatznummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
IL-6 (10 ng/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ssDNA-Aptamer (1 pmol/ $\mu$ l)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ssDNA-Kontrolle (1 pmol/ $\mu$ l)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
10 $\mu$ g/ml Cycloheximid	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1 $\mu$ g/ml Cycloheximid	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
0,1 $\mu$ g/ml Cycloheximid	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
10 $\mu$ g/ml Puromycin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1 $\mu$ g/ml Puromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
0,1 $\mu$ g/ml Puromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

+: wird zum Ansatz zugegeben

-: wird **nicht** zum Ansatz zugegeben

Pro Gruppe wird eine Mikrotiterplatte beschriftet und nach folgendem Schema befüllt, wobei die Zahlen die Ansatznummern bedeuten:

X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
X	X	X	1	1	1	6	6	6	X	X	X
X	X	X	2	2	2	7	7	7	X	X	X
X	X	X	3	3	3	8	8	8	X	X	X
X	X	X	4	4	4	9	9	9	X	X	X
X	X	X	5	5	5	10	10	10	X	X	X
X	X	X	X	X	X	11	11	11	X	X	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Jeweils 100 µl der Baf/gp130/IL6R/TNF-Zellsuspension (10.000 Zellen in DMEM/ 10% FKS und Pen/Strep) werden in die benötigten Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. In Ansatz 11 wird lediglich Medium pipettiert. Die äußeren Reihen der Mikrotiterplatte werden wegen größerer Verdunstung freigelassen oder mit Medium befüllt. Folgend werden zusätzlich 80 µl DMEM-Medium (inkl. FKS und PenStrep), 10 µl der IL-6-Lösung und 10 µl der jeweiligen Prüfsubstanzen zu den entsprechenden Wells hinzu pipettiert, so dass sich ein Gesamtvolumen von 200 µl ergibt. Die Zellen werden für 24 h bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% rel. Luftfeuchtigkeit inkubiert.

## Tag 2: MTT-Assay: Weiterkultivierung der Zellen

### Materialien:

- Mikrotiterplatte mit Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen

Zunächst wird der Zustand der Zellen dokumentiert, indem die Zellen von einem der drei Wells jedes Ansatzes am Lichtmikroskop (40fache Vergrößerung) fotografiert werden. Die in der Mikrotiterplatte über Nacht unter Anwesenheit der Wirkstoffe kultivierten Zellen werden für 5 min zentrifugiert (Plattenrotor bei 200 g), die Überstände vorsichtig mit der Mehrkanalpipette abgenommen und verworfen. Zu jedem Well werden zügig 200 µl frisches DMEM-Medium (inkl. 10% FKS, PenStrep und IL-6 [außer Ansatz 1]) pipettiert und die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

**Tag 3: MTT-Assay: Durchführung des MTT-Assays****Materialien:**

- Mikrotiterplatte mit den kultivierten Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen
- Mikrotiterplattenphotometer (*ELISA plate reader*, Absorptionsfilter: 550 nm)

Zunächst wird der Zustand der Zellen dokumentiert, indem die Zellen von einem der drei Wells jedes Ansatzes am Lichtmikroskop (40fache Vergrößerung) fotografiert werden.

Puffer	Komponente	Menge	Endkonzentration
1xDPBS	5xDPBS	10 ml	1x
<b>Steril filtrieren!</b>	Ad. H <sub>2</sub> O	50 ml	
Glycin-Puffer	Glycin (75,07 g/mol)	0,75 g	0,1 M
pH 10,5 (mit NaOH einstellen)	NaCl (58,44 g/mol)	0,58 g	0,1 M
	Ad. H <sub>2</sub> O	100 ml	
DMSO			
MTT-Reagenz	MTT	25 mg	5 mg/ml
<b>GIFTIG! Steril filtrieren!</b>	1xDPBS	5 ml	

Das MTT-Reagenz wird frisch in DPBS angesetzt und sollte hell gelb sein. Die Lösung wird steril filtriert, wobei gleichzeitig bereits reduziertes MTT entfernt wird. Die Lagerung erfolgt bei 4°C im Dunkeln. In jede zu untersuchende Vertiefung der Mikrotiterplatte werden 20 µl sterile MTT-Lösung (Endkonzentration: 0,5 mg/ml) pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Platten werden in Aluminiumfolie eingeschlagen und die Zellen für weitere 3 h bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% rel. Luftfeuchtigkeit im Inkubator bebrütet.

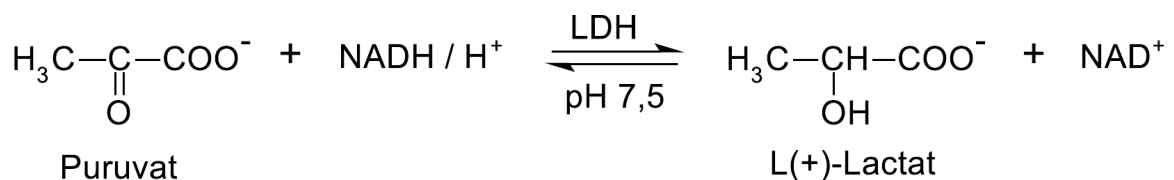
**→ Von nun an muss nicht mehr steril gearbeitet werden!**

Die Mikrotiterplatte mit den Baf/gp130/IL6R/TNF-Zellen wird vorsichtig für 5 min zentrifugiert (Plattenrotor bei 200 g), die Überstände zügig, jedoch vorsichtig mit der Mehrkanalpipette abgenommen und verworfen. Anschließend werden je 200 µl DMSO und 25 µl Glycin-Puffer in die Wells pipettiert, durch Schwenken gleichmäßig verteilt und 5 min bei RT inkubiert. Es folgt das Schütteln der Platten auf dem Schwenkbrett für 5 min. Die Auswertung des MTT-Assays erfolgt durch Photometrie bei 550 nm am Mikrotiterplattenphotometer (*ELISA plate reader*).

## LDH-Assay zur Messung der Lebensfähigkeit und des Zellwachstums

Die Zerstörung der Cytoplasmamembran der Zellen ist ein morphologisches Charakteristikum der Zellnekrose. Sie führt zu einer Freisetzung von cytoplasmatischen Bestandteilen, wie z.B. Enzymen, in das Zellkulturmedium, von denen die meisten schnell abgebaut werden. Eine Ausnahme bildet die Laktatdehydrogenase (LDH), die auch außerhalb der Zelle sehr stabil ist.

Die LDH ist ein intrazelluläres Enzym, das den letzten Schritt der anaeroben Glykolyse katalysiert und praktisch in allen Geweben vorkommt. In vitalen Zellen befindet sich diese im Cytoplasma. Die LDH ist ein hochmolekulares, tetrameres Enzym (140 kDa). Dies bedeutet, dass die Membran einer Zelle stark geschädigt sein muss, bevor man das Enzym außerhalb der Zelle messen kann. Beispielsweise kann die Aufnahme eines zu testenden Toxins in die Zelle zur Zerstörung der Zellmembran führen und infolge dessen entlässt die Zelle u. a. die Laktatdehydrogenase. Der Nachweis der LDH kann einfach bei Zugabe des Substrates Pyruvat als photometrische Bestimmung der Konzentrationsabnahme von NADH erfolgen. Das Reaktionsgleichgewicht liegt dabei auf Seiten der Bildung von Laktat.



**Tag 1: LDH-Assay: Vorbereitung der Zellen****Materialien**

- 37°C warmes Kulturmedium
- Transparente 96-Well Platte

**Zu verwendende Lösungen:**

Puffer	Komponente	Menge	Endkonzentration
Zellkulturmedium	DMEM (mit Phenolrot)	450 ml	
	Pen/Strep (100x)	5 ml	1x
<b>Sterilbank!</b>	FKS (100%)	50 ml	10%
IL-6 in DMEM	IL-6 (1 mg/ml)	1 µl	200 ng/ml
<b>Sterilbank!</b>	DMEM (mit Phenolrot)	5 ml	

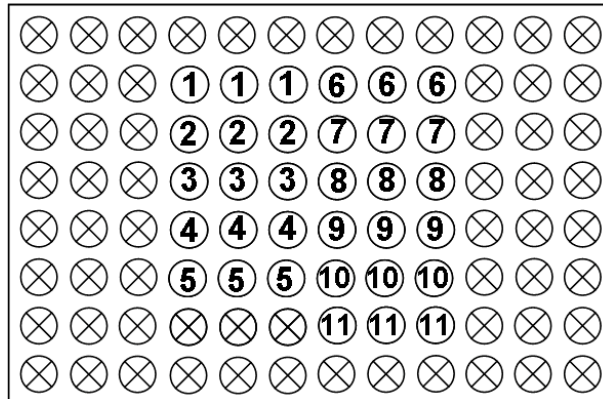
Vom Assistenten werden kultivierte Baf/gp130/IL6R/TNF-Zellen ausgegeben, deren Zellzahl bestimmt werden soll. Es folgt das Einstellen der Zellsuspension auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml DMEM/PenStrep (10% FKS).

In den folgenden 2 Versuchstagen sollen die folgenden 11 Reaktionsansätze jeweils einer Dreifachbestimmung des LDH-Assays unterzogen werden:

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Baf/gp130/IL-6R/TNF-Zellen	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-6 (10 ng/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cycloheximid (10 µg/ml)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Cycloheximid (1 µg/ml)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ssDNA-Aptamer (1 µM)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ssDNA-Kontrolle (1 µM)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
F'-mod-RNA-Apt. (100 nM)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
F'-mod-RNA-Kontrolle (100 nM)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

(Die in Klammern angegebenen Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen pro Well)

**Am ersten Tag** werden die Zellen in einer Mikrotiterplatte vorbereitet. Dazu wird pro Gruppe eine Mikrotiterplatte beschriftet:



Für die Ansätze 2 – 11 werden pro benötigtem Well einer transparenten 96-Well-Platte 10.000 Zellen (100  $\mu$ l Zellsuspension in DMEM/PenStrep/FKS) ausplattiert. Zu den Ansätzen 3 – 11 werden jeweils 10  $\mu$ l IL-6 (Endkonzentration: 10 ng/ml) und weitere 90  $\mu$ l Zellkulturmedium zugegeben (Gesamtvolumen pro Well: 200  $\mu$ l). Zum Ansatz 2 werden lediglich weitere 100  $\mu$ l Zellkulturmedium gegeben. Die Platte sollte vor Durchführung des LDH-Assays mindestens 20 h im Zellinkubator stehen, damit sich die Zellen vom Stress des Umsetzens und Ausplattierens erholen können. Die Wells mit der Nummer 1 bleiben leer.

## Tag 2: LDH-Assay: Zugabe der Proben/Toxen zu den ausplattierten Zellen des LDH-Assays

### Materialien

- Baf/gp130/IL6R/TNF-Zellen in 96-Well Platte (vom Vortag)

### Zu verwendende Lösungen:

Puffer	Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>DMEM (ohne Phenolrot)</b>			
Zellkulturmedium	DMEM (ohne Phenolrot)	450 ml	
	Pen/Strep (100x)	5 ml	1x
<b>Sterilbank!</b>	FKS (100%)	50 ml	10%
IL-6 in DMEM	IL-6 (1 mg/ml)	1 µl	200 ng/µl
<b>Sterilbank!</b>	DMEM (ohne Phenolrot)	5 ml	
Cycloheximid (200 µg/ml)	Cycloheximid (10 mg/ml)	20 µl	200 µg/ml
	DMEM (ohne Phenolrot)	1 ml	
Cycloheximid (20 µg/ml)	Cycloheximid (200 µg/ml)	100 µl	20 µg/ml
	DMEM (ohne Phenolrot)	1 ml	
ssDNA-Aptamer (100 µM)	ssDNA-Aptamer	40 µl	20 pmol/µl
	DMEM (ohne Phenolrot)	160 µl	
ssDNA-Kontrolle (100 µM)	ssDNA-Kontrolle	40 µl	20 pmol/µl
	DMEM (ohne Phenolrot)	160 µl	
F'-mod. RNA-Aptamer	F'-mod. RNA-Aptamer	???	2 pmol/µl
	Ad. DMEM (ohne Phenolrot)	175 µl	
F'-mod. RNA-Kontrolle	F'-mod. RNA-Kontrolle	???	2 pmol/µl
	Ad. DMEM (ohne Phenolrot)	175 µl	

Die erste Gruppe stellt zunächst die angegebenen Verdünnungen der Testsubstanzen in DMEM (ohne Phenolrot) unter der Sterilbank her. Für Cycloheximid werden 2 verschiedene Verdünnungen angesetzt.

Die 96-Well-Platte mit den Zellsuspensionen vom Vortag wird für 5 min bei 200 g (Plattenrotor) zentrifugiert. Das alte Medium wird aus allen Wells der 96-Well-Platte vorsichtig mit einer Mehrkanalpipette abgenommen und 180 µl frisches, farbloses Zellkulturmedium (DMEM (ohne Phenolrot) /PenStrep/FKS) zugegeben.

In die Wells mit den Nummern 1 und 2 werden lediglich 200 µl farbloses Zellkulturmedium pipettiert (Kontroll-Wells).

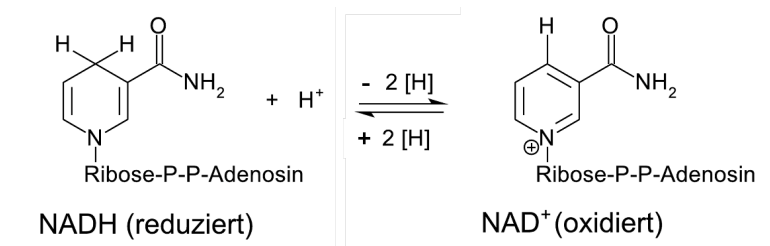
Zu den Wells mit den Nummern 3 bis 11 werden nun die zu testenden Substanzen in verschiedenen Verdünnungen hinzu pipettiert, indem, wie folgend aufgelistet, je 10 µl der jeweiligen Proben in die vorgesehenen 3 Wells gegeben werden (Triplikate):

- 1: ohne Zugabe weiterer Substanzen (Keine Zellen enthalten!)
- 2: ohne Zugabe weiterer Substanzen
- 3: + 10 µl IL-6 + 10 µl Zellkulturmedium
- 4: + 10 µl IL-6 + 10 µl Cycloheximid (200 µg/ml)
- 5: + 10 µl IL-6 + 10 µl Cycloheximid (20 µg/ml)
- 6: + 10 µl IL-6 + 10 µl ssDNA-Aptamer (20 pmol/µl)
- 7: + 10 µl IL-6 + 10 µl ssDNA-Kontrolle (20 pmol/µl)
- 8: + 10 µl IL-6 + 10 µl F'-mod. RNA-Aptamer (2 pmol/µl)
- 9: + 10 µl IL-6 + 10 µl F'-mod. RNA-Kontrolle (2 pmol/µl)
- 10: + 10 µl IL-6 + 10 µl Zellkulturmedium (Dienen später der Positivkontrolle A!)
- 11: + 10 µl IL-6 + 10 µl Zellkulturmedium (Dienen später der Positivkontrolle B!)

Die 96-Well-Platte wird über Nacht im Brutschrank (37 °C) inkubiert.

### Tag 3: LDH-Assay: Durchführung des LDH-Assays

Die Aktivitätsbestimmung der LDH erfolgt durch Anwendung des einfachen optischen Tests. Die LDH katalysiert die reversible Wasserstoff-Übertragung von NADH auf Pyruvat. Dabei wird NADH zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert und Pyruvat zu Laktat reduziert. Der Übergang von NADH zu  $\text{NAD}^+$  ist aufgrund einer Extinktionsabnahme bei 340 nm messbar.



### Materialien

- 96-Well Platte mit den Zellen des LDH-Assays
- Frische 96-Well Platte
- Laktat-Dehydrogenase (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

### Zu verwendende Lösungen (für mind. 5 Gruppen):

Puffer	Komponente	Menge	Endkonzentration
10x LDH-Puffer (pH 7,4)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (136,1 g/mol)	4,53 g	0,33 M
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (174,2 g/mol)	11,61 g	0,66 M
	Ad. $\text{H}_2\text{O}$	100 ml	
1x LDH-Puffer (pH 7,4)	10x LDH-Puffer (pH 7,4)	10 ml	1x
	Ad. $\text{H}_2\text{O}$	100 ml	
NADH-Lösung <b>(Auf Eis lagern!)</b>	NADH (red., 709,4 g/mol)	6 mg	1,7 mM
	Ad. 1x LDH-Puffer	5 ml	
Pyruvat-Lösung <b>(Auf Eis lagern!)</b>	Na-Pyruvat (110 g/mol)	4,4 mg	4 mM
	Ad. 1x LDH-Puffer	10 ml	
Triton-X-100			

Die 96-Well Platte wird aus dem Inkubator geholt. Für ein Well jedes Ansatzes wird zur morphologischen Analyse am Mikroskop je ein Bild bei 40facher Vergrößerung

aufgenommen. Auffälligkeiten, wie z. B. Agglomerate, Bakterien oder Ähnliches sollten notiert werden.

In die Wells der Nummer 10 werden je 2  $\mu\text{l}$  Triton-X-100 (1% (v/v)) pipettiert, gut resuspendiert und die Platte 15 min bei RT stehen gelassen. Diese Wells dienen als Positivkontrolle im Assay. Die 96-Well-Platte wird anschließend für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Mit der Multikanal-Pipette werden vorsichtig aus jedem Well 25  $\mu\text{l}$  Überstand in eine neue transparente 96-Well-Platte pipettiert. Die Plattenbelegung bleibt dabei erhalten.

Jeder Vertiefung der Platte werden anschließend 125  $\mu\text{l}$  1x LDH-Puffer zugefügt. In die Wells mit der Nummer 11 wird anschließend je 1  $\mu\text{l}$  Laktat-Dehydrogenase (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) pipettiert. Diese Wells dienen als Positivkontrolle B und somit als Kontrolle der Funktionalität aller Testreagenzien.

In jedes Well werden nun 25  $\mu\text{l}$  NADH-Lösung, die frisch hergestellt wurde, pipettiert. Den Vertiefungen werden weiterhin 25  $\mu\text{l}$  Pyruvatlösung zugefügt.

Die Platte wird für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird der Verbrauch an NADH durch Abnahme der Extinktion bei 340 nm am ELISA-Reader (TECAN) vermessen und ausgewertet.

## Beide Versuchswochen: Selektion BAF/gp130/IL-6R/TNF-Zell-spezifischer DNA-Aptamere mittels Zell-SELEX

### Reagenzien

- FirePol DNA-Polymerase (SolisBiodyne)
- FirePol-Reaktionspuffer B (10×),
- MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 25 mM
- dNTPs (25 mM each; Roth)
- Synthetische Oligodeoxynukleotide:
  - ssDNA-Bibliothek**  
(D1: 5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC-N50-CATGCTTATTCTTGTCTCCC-3'),
  - 5'-D1-Fw-Primer** (5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTAAC-3'),
  - 3'-D1-RT-Primer** (5'-bio-GGGAGACA AGAATAAGCATG-3')
- Streptavidin-beschichtete magnetische Dynabeads (M-270, GE Healthcare)
- BSA, Nuklease-frei (*Bovine serum albumin*; Calbiochem)
- Lachssperma-DNA (*Salmon sperm DNA*, Invitrogen)
- Target-Zelllinie (BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen)
- Trypan-Blau
- Calcein AM-Reagenz (MW: 994,86 g/mol; 4 mg/mL bzw. 4 mM)
  - eine 1:10-Verdünnung davon ansetzen und diese Lösung verwenden!
- 7-AAD-Reagenz (MW: 1270,43 g/mol; 0,5 mg/mL bzw. 0,4 mM)

**Ansetzen von Puffern und Lösungen**

→ je nur einmal pro Kurs ansetzen!

**2x Bindungs- und Waschpuffer (B&W-Puffer; 2x):**

2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA

→ Volumen von 500 mL pro Kurs ist ausreichend

→ pro Gruppe 50 mL STERIL FILTRIEREN!

→ Lagerung bei RT

**SELEX-Puffer:**

1x PBS inkl. 3 mM MgCl<sub>2</sub>, BSA (1 µg/µL)

→ Volumen von 500 mL pro Kurs ist ausreichend

→ PBS-Puffer inkl. 3 mM MgCl<sub>2</sub> und BSA bitte bei 4 °C lagern

→ pro Gruppe 50 mL STERIL FILTRIEREN!

**Wasch-Puffer:**

1x PBS inkl. 3 mM MgCl<sub>2</sub>

→ Volumen von 500 mL pro Kurs ist ausreichend

→ PBS-Puffer inkl. 3 mM MgCl<sub>2</sub> kann bei RT gelagert werden

→ pro Gruppe 50 mL STERIL FILTRIEREN!

**NaOH:** 150 mM

**HCl:** 200 mM

**Ablauf eines Selektionszyklus (Siehe auch: Abb. 5):**

- 1) Zellen für den 1. SELEX-Zyklus vorbereiten:
  - Qualität der Zellen mittels Trypanblau-Färbung beurteilen
  - Zellzahl bestimmen
  - Calcein-AM- und 7-AAD-Färbung
- 2) SELEX
  - Zellen und Bibliothek inkubieren
  - Waschen
  - Elution
- 3) PCR + Gel
- 4) Strangtrennung + Gel + Konzentrationsbestimmung
- 5) Überleitung zu 2. SELEX-Zyklus

## **Schritt 1: Zellen für die SELEX-Runde vorbereiten**

### S1.1: Bestimmung der Zellvitalität mittels Trypan-Blau-Färbung

→ Die BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen werden vom Betreuer ausgegeben. Die Zellvitalität der BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen sollte für Zell-SELEX bei > 95% liegen. Um dies zu untersuchen, werden 10 µL der Zellsuspension mit 10 µL Trypan-Blau-Lösung gemischt und am Mikroskop analysiert.

### S1.2: Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl der BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen wird mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt (analog Praktikumswoche 1).

### S1.3: Zellen waschen

- 2 x 10<sup>6</sup> Zellen in 15-ml-Falcon geben
- Zentrifugation: 150 g, 3 min, 4 °C
- Überstand entfernen, vorsichtig 3 ml Waschpuffer zugeben und sanft resuspendieren
- Zentrifugation: 150 g, 3 min, 4 °C
- Waschschrift wiederholen und Pellet in 1050 µL Waschpuffer resuspendieren
- Zellsuspension auf 3 Ansätze aufteilen:

Ansatz 1: 350 µL Zellsuspension

Ansatz 2: 350 µL Zellsuspension + 2,5 µL CalceinAM-Lösung (0,4 mM) zur Färbung lebender Zellen

Ansatz 3: 350 µL Zellsuspension + 5 µL 7-AAD-Lösung zur Färbung toter Zellen

Die drei Ansätze werden für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend jeweils einmal mit 350 µl Waschpuffer gewaschen.

Die Resuspension der Zellen erfolgt in 350 µL Waschpuffer! Analyse der Zellen am FACS (FL-3 für 7-AAD und FL-2 für CalceinAM)

→ **Zellvitalität beurteilen**

**Schritt 2: 1. SELEX-Runde durchführen**S2.1: Inkubation der DNA-Bibliothek mit den Zielzellen

- $1 \times 10^6$  Zielzellen (Zellzahl und Zellvitalität bestimmt!) werden zweimal mit 500  $\mu\text{L}$  SELEX-Puffer gewaschen
- Zellen in 700  $\mu\text{L}$  SELEX-Puffer resuspendieren
- Zellsuspension mit 500 pmol ssDNA-Bibliothek in 1 mL SELEX-Puffer bei 37 °C für 30 min und 300 rpm inkubieren
- dazu bitte folgenden Ansatz zusammenpipettieren:

Komponente	Konzentration	Volumen
BAF/gp130/IL6R/TNF-Zellen	1 Mio in 1xPBS (3 mM $\text{MgCl}_2$ , BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ))	700 $\mu\text{L}$
BSA	10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
Lachs-Sperma-DNA	10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
$\text{MgCl}_2$	25 mM	36 $\mu\text{L}$
PBS	10 $\times$	30 $\mu\text{L}$
ssDNA-Bibliothek	100 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$		Ad. 1000 $\mu\text{L}$

Wichtig: alle 5 min Zellen vorsichtig resuspendieren  $\rightarrow$  Sedimentation vermeiden!

S2.2: Entfernen nicht bindender DNA-Moleküle

- nach Inkubation bei 37°C: Zentrifugation der Zellen: 150 g, 3 min, 37 °C
- Überstand entfernen, vorsichtig 1 ml Waschpuffer zugeben und sanft resuspendieren
- Zentrifugation: 150 g, 3 min, 37°C
- Pellet in 100  $\mu\text{L}$  Wasser resuspendieren

S2.3: Elution

- Zellsuspension für 10 min bei 95 °C inkubieren
- Zentrifugation: 13.000 g für 5 min
- Überstand (100  $\mu\text{L}$ ) in 2 PCR-Reaktionen als Template einsetzen

**Schritt 3: PCR**

Es werden insgesamt 4 100- $\mu\text{L}$ -PCR-Reaktionen angesetzt:

2x 100 µL PCR zur Amplifikation der ssDNA

1x 100 µL PCR als Negativkontrolle ohne Template

1x 100 µL PCR als Positivkontrolle mit Template (1 µL einer 1:10-Verdünnung des Pools)

Ein typischer PCR-Ansatz zur Amplifikation der eluierten ssDNA unter Verwendung der FIREPol<sup>®</sup> ist in folgender Tabelle dargestellt.

#### Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
ssDNA-Bibliothek (Eluat)	50 µL	
10x PCR-Reaktionspuffer B	10 µL	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6,0 µL	1,5 mM
dNTP-Mix (25 mM)	2,0 µL	500 µM
RT-Primer (100 µM)	1,0 µL	1,0 µM
T7-Primer (100 µM)	1,0 µL	1,0 µM
FIREPol <sup>®</sup> (5 U/µl)	1,0 µL	0,05 U/µl
Aqua dest.	Ad. 100 µL	

Zur Durchführung der PCR wird folgendes Temperaturprogramm gewählt:

#### Temperaturprogramm zur Durchführung der PCR-Reaktion

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 15 – 20 (Bitte mit Betreuer absprechen!)
Primeranlagerung	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
	4 °C	∞	1

Als Negativkontrolle dient ein Ansatz ohne DNA-Template. Zur Kontrolle der PCR-Reaktion wird eine 10%ige, native PAGE mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung durchgeführt.

Die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgt mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele (PAA-Gele) ist in folgender Tabelle dargestellt ist.

#### **Zusammensetzung 10%iger, nativer Polyacrylamidgele**

Komponente	Volumen	Endkonzentration
TAE (50x)	1 mL	1x
Acrylamid:Bisacrylamid 19:1 (w/v) (40%ig)	12,5 mL	10%
TEMED (100%ig)	50 $\mu$ L	0,1%
APS (10%ig)	500 $\mu$ L	0,1%
Aqua dest.	Ad 50 mL	

Die Polymerisation wird durch Zugabe APS gestartet und ist nach ca. 30 min abgeschlossen.

Die zu analysierenden DNA-Proben (je 5  $\mu$ L) werden mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels überführt. Die Elektrophorese erfolgt bei 200 V. Nach Beendigung der PAGE werden die Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid gefärbt.

#### Schritt 4: Strangtrennung

- 50  $\mu\text{L}$  Streptavidin-beschichtete magnetische Beads dreimal vorsichtig mit je 50  $\mu\text{L}$  1x B&W-Puffer waschen (es sollte nicht schäumen!)
- Streptavidin-beschichtete magnetische Beads in 50  $\mu\text{L}$  1x B&W-Puffer aufnehmen
- 50  $\mu\text{L}$  PCR-Produkt mit 50  $\mu\text{L}$  2x B&W-Puffer mischen  $\rightarrow \Sigma$  100  $\mu\text{L}$
- 100  $\mu\text{L}$  Lösung mit den 50  $\mu\text{L}$  Streptavidin-beschichteten magnetischen Beads versetzen und 15 min bei RT inkubieren (alle 5 min vorsichtig auf- und abpipettieren!).
- Überstand entfernen
- Streptavidin-beschichtete magnetische Beads 2x mit je 50  $\mu\text{L}$  1x B&W-Puffer waschen
- Streptavidin-beschichtete magnetische Beads in 20  $\mu\text{L}$  150 mM NaOH aufnehmen und 3 min bei RT inkubieren.
- Überstand (soll Einzelstrang beinhalten) abnehmen und aufbewahren!
- Streptavidin-beschichtete magnetische Beads erneut in 20  $\mu\text{L}$  150 mM NaOH aufnehmen und 3 min bei RT inkubieren.
- Überstand erneut abnehmen und mit den vorherigen 20  $\mu\text{L}$  Überstand vereinigen
- Die 2 Überstände mit 50  $\mu\text{L}$  100 mM HCl neutralisieren (1  $\mu\text{L}$  zur pH-Kontrolle mit pH-Papier testen)
- Präparation der einzelstängigen DNA-Bibliothek (ssDNA) beendet
- 1  $\mu\text{L}$  zur Konzentrationsbestimmung am Nanodrop vermessen
- 10 %iges, natives PAA-Kontroll-Gel (5  $\mu\text{L}$ )

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgt am NanoDrop ND-1000 durch photometrische Messung der Optischen Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ). Es gilt dabei folgender Zusammenhang:

$$OD_{260} = 1 \quad \rightarrow \quad 33 \text{ ng RNA}/\mu\text{L}$$

Das Verhältnis  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  ist ein Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren, da Proteine bei 280 nm ein Absorptionsmaximum besitzen. Ein Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  von

1,8 – 2,0 weist auf eine Reinheit der Nukleinsäuren von 70 – 95% hin. Die Berechnung der molaren Konzentrationen der Nukleinsäurelösung erfolgt unter der Annahme eines durchschnittlichen Molekulargewichts von 327 g/mol pro Nukleotid.

**Schritt 5: Übergang zu Schritt 1**