

Praktikum Genetik für Lehramtsstudierende und
Studierende des Deutsch-Französischen
Bachelorstudiengangs SS2022

Universität des Saarlandes
FR 8.3 Biowissenschaften/Genetik
Gebäude A 2.4
Prof. Dr. Jörn Walter
Tel.: 302 2425
email: j.walter@mx.uni-saarland.de

Betreuer/in:

Beate Schmitt
Sascha Tierling

Kontakt:

Sascha Tierling, Tel.: 302 3295, email: s.tierling@mx.uni-saarland.de

Im Praktikum Genetik für Lehramtsstudierende und Studierende des Deutsch-Französischen Bachelor-Studiengangs werden anhand genetischer und molekulargenetischer Experimente Grundprinzipien und Basis-Techniken der Genetik vermittelt. Die Laborarbeiten werden unter Einhaltung der aktuellen Schutz- und Hygienemaßnahmen von den TeilnehmerInnen einzeln durchgeführt. Der Praktikumsbericht besteht aus einem der drei durchgeführten Versuche und wird von den Studierenden in Gruppenarbeit verfasst. Das Skript umfasst das einwöchige praktische Arbeitsprogramm, welches von den Studierenden selbst bearbeitet wird. Ergänzt werden die einzelnen Arbeitsschritte durch kurze theoretische (MS Teams) und praktische Erläuterungen (im Praktikumsraum unmittelbar vor Durchführung der praktischen Arbeiten).
Abgabetermin für Protokolle: 21. Oktober 2022, 16:00 Uhr.

Folgende Schwerpunkte werden bearbeitet:

I. Molekulargenetische Techniken der Klonierung:

Umklonierung des GFP-Gens in einen Expressionsvektor und Expression in einem Bakterienstamm unter bestimmten Umweltbedingungen

II. Molekulargenetische Techniken zur Genotypisierung:

Bestimmung von krebsrelevanten Mutationen im *KRAS*-Gen mittels PCR und Direkter Sequenzierung

III. Molekulargenetische Techniken der Genkartierung:

Analyse und Auswertung von Rückkreuzungen in der Maus (molekulare Kartierung rekombinanter Chromosomen durch Analyse von Mikrosatelliten-Polymorphismen mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR und Agarosegelelektrophorese)

Teil I: Molekulargenetische Techniken der Klonierung

Klonierung und Expression des GFP-Gens in einem Expressionsvektor

„Biologie“ der Plasmide

Alle Bakterien besitzen ein zirkuläres Chromosom; daneben können sie noch ein oder mehrere DNA-Moleküle enthalten, die Plasmide (können sich nicht ins Genom integrieren) oder Episome (können sich ins Genom integrieren) genannt werden. Episome/Plasmide können sich autonom, d.h. unabhängig vom Chromosom des Wirtes replizieren. Sie haben eine Größe von 3-50 Kilobasenpaare (kBp) und sind für das Überleben der Bakterienzelle nicht essentiell (außer es handelt sich um besondere selektive Bedingungen (s.u.)). Plasmide haben in der Gen- und Biotechnologie eine große Bedeutung als Träger (Vektoren) für fremdes genetisches Material. Alle künstlich hergestellten und im Labor benutzten Plasmide leiten sich von natürlichen Episomen ab und haben durch molekularbiologische Manipulationen eine Reihe von gewünschten Eigenschaften erhalten (s.u.). Im Labor werden Plasmide in Bakterien oder eukaryotischen Zellen über eine künstlich induzierte Aufnahme eingebracht (Transformation/Transfektion). In Bakterien wird dabei pro Zelle in der Regel nur ein Plasmid aufgenommen, da sich bei mehrfacher Aufnahme Plasmide mit gleichen Replikationsursprüngen (origins) aufgrund von Inkompatibilitäten gegenseitig ausschließen. Zwei Plasmide sind dann inkompatibel (und gehören dann zur gleichen Inkompatibilitätsklasse), wenn sie ohne selektiven Druck nicht in einer Bakterienzelle koexistieren können. Das ist immer dann der Fall, wenn beide Plasmide denselben *oriR* (Origin of Replication) enthalten.

Plasmide sind in der Regel wirtsspezifisch, d.h. eine Vermehrung ist nur in einem engen Bereich von Wirtsorganismen möglich. Im Labor eingesetzte bakterielle oder Hefe-spezifische Plasmide haben folgende Eigenschaften. Sie besitzen:

- Einen Origin (*ori*) für Replikation und damit die Fähigkeit zur autonomen Replikation
- Zur Selektion geeignete Marker-Gene, oft auch mehrere (z.B. Resistenzgen gegen bestimmte Antibiotika (Bakterien), oder Gene mit dem bestimmte Stoffwechseldefizienzen des Wirtes komplementiert werden können (Hefe))
- Geeignete Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen („Schnittstellen“) für die Verknüpfung mit fremder DNA bzw. zur Plasmidanalyse (s.u.)
- Promotoren und andere regulatorische Elemente für die Expression (Transkription) der fremden Gene

Mit Hilfe gentechnischer Methoden kann man beliebige DNA-Fragmente mit Plasmiden verknüpfen (in die Plasmide „einbauen“) und vermehren. Bei der Teilung der Zellen (Bakterien, Hefe) werden solche **rekombinanten Plasmide** repliziert und auf die beiden Tochterzellen verteilt. Somit wird die eingeschleuste Fremd-DNA vermehrt. Durch Selektion einzelner Zellen (Kolonien auf Agar-Platten) werden identische Kopien (Klone) eines Plasmids erzeugt. Im Laborjargon spricht man daher von der Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmiden. Plasmide werden in nahezu allen molekularbiologisch arbeitenden Laboren nicht nur zur Vermehrung der DNA benutzt, sondern auch um die „klonierte“ DNA zu exprimieren, d.h. die eingebrachte DNA wird transkribiert und ggf. in ein Protein translatiert (Beispiel: Herstellung von rekombinatem Insulin in einer Bakterienzelle). Plasmide sind somit Hilfsmittel, um Genbanken herzustellen und Proteine in ausreichenden Mengen zu produzieren.

Die Verknüpfung/Ligation von Plasmid-DNA und Fremd-DNA (Fragment) erfolgt *in vitro* im Reagenzglas. Nach der Ligation werden die rekombinanten Plasmide mittels **Transformation** in Wirtsorganismen (Bakterien, Hefen, Eukaryotische Zellen) zur Vermehrung eingeschleust. Über nahezu alle künstlich hergestellten Plasmide gibt es Sequenzinformationen, die wichtig für die Herstellung, Analyse und Bearbeitung der rekombinanten Plasmide sind. Mit Hilfe dieser Sequenzdaten kann man Karten dieser Plasmide erstellen (siehe Anhang). Die am häufigsten im Labor benutzten bakteriellen Plasmide sind pCR2. 1, pGEM-T, pBlueSkriptII, die alle eine hohe Kopienzahl von ungefähr 200 Kopien/Zelle aufweisen und Resistenzen gegen die Antibiotika Ampicillin und/oder Kanamycin vermitteln.

Wird in ein Bakterium durch Transformation ein Plasmid eingeschleust, vermittelt dies eine Antibiotika-Resistenz, die zur Selektion von Transformanten verwandt wird. Die transformierten Bakterien werden dazu auf einem Antibiotika-haltigen Nährboden ausplattiert. Es vermehren sich auf dem Nährboden nur solche Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, nicht transformierte Bakterien sterben oder werden im Wachstum gehemmt. Als Folge der Vermehrung bilden sich auf den Nährböden (Platten) aus einzelnen, resistenten Bakterien Kolonien von etwa 10^6 Bakterien mit identischem genetischen Material = **Klone**.

In diesem Praktikum soll die kodierende Sequenz des Grünen Fluoreszierenden Proteins (GFP) aus einem Plasmid (pET-28b) ausgeschnitten und in ein Plasmid mit einem durch Arabinose induzierbaren Promotor (Expressionsvektor pBAD) eingebracht („umkloniert“) werden.

Theorie: Grün Fluoreszierendes Protein

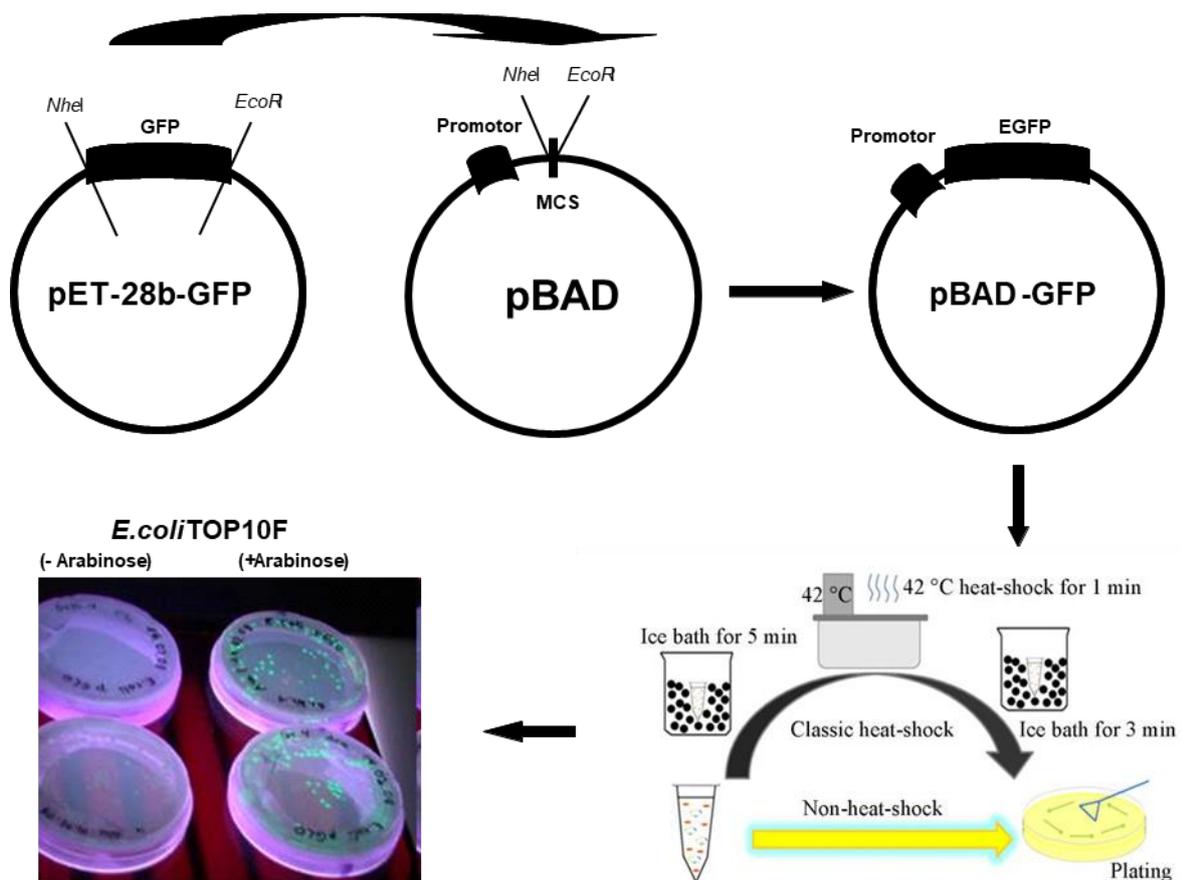
Das grün fluoreszierende Protein (Abkürzung GFP; engl. green fluorescent protein) wurde zum ersten Mal 1961 beschrieben. Es stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und emittiert grünes Licht bei Anregung mit blau oder ultraviolett. GFP dient in der Zellbiologie und Molekularbiologie häufig dazu, durch verschiedenste Klonierungsstrategien Fusionsproteine herzustellen, deren Expression in der Zelle sichtbar gemacht werden kann. Dadurch können das Vorhandensein und die Verteilung von Proteinen *in vivo* beobachtet werden. Die Primärstruktur besteht aus 238 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 26,9 kDa. Das natürlich vorkommende GFP kann bei zwei Wellenlängen angeregt werden, die erste liegt bei 395 nm, die zweite bei 475 nm. Die Wellenlänge des emittierten Lichts liegt im grünen Bereich bei 509 nm. Das Original-GFP wurde bereits im Labor vielfach modifiziert. So wurden bereits sog. Enhanced-Varianten hergestellt, die eine verstärkte Fluoreszenz aufweisen. Es existieren auch Formen, die bei anderen Wellenlängen Licht emittieren, wie z.B. das gelbe fluoreszierende Protein (Abkürzung YFP; engl. Yellow fluorescent protein).

Die rekombinanten Plasmide wurden aus einzelnen transformierten *E.coli* Zellen, die in flüssigem Selektions-Medium angezogen wurden, isoliert. Bei der Isolierung („Plasmid-Präparation“) trennt man die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA des Bakteriums und den Proteinen der Zelle durch verschiedene Fällungs- und Zentrifugationschritte ab. Die nach einer solchen Isolierung erhaltenen Plasmide liegen vornehmlich in einer zirkulären, überspiralisierten (ccc = closed covalent circular) - oft auch als „supercoiled“ bezeichneten-Form vor. Einige Moleküle sind durch Scherkräfte, die im Verlauf des Aufschlusses einwirken und Einzelstrangbrüche verursachen, in eine relaxierte „open-circular“ (oc) Form überführt worden. Die Analyse beider nativer Formen läßt keine Aussage über ihre Größe zu, da sie in einer Gelelektrophorese (s.u.) nicht nur größenabhängiges, sondern auch konformationsabhängiges Laufverhalten aufweisen. Durch Zerschneiden mit Restriktionsendonukleasen werden beide Formen in lineare Moleküle überführt, deren Größe man aufgrund ihrer Wanderung im Gel eindeutig bestimmen kann. Mit Hilfe einer solchen Restriktionsanalyse läßt sich daher bestimmen, ob die Plasmide tatsächlich das gewünschte Stück fremder DNA enthalten. Als alternative Methode zum Nachweis der „Insertion“ fremder DNA in dem Plasmid kann man eine Polymerase-Ketten-Reaktion durchführen. Man

benutzt dazu die Plasmid-DNA als Matrize, um ein PCR-Fragment der Insertion herzustellen.

Versuchsdurchführung:

Im Praktikum werden die beiden Plasmide pET-28b, welches das GFP enthält, und pBAD mit Restriktionsenzymen geschnitten, um zum einen das GFP aus pET-28b auszuschneiden und, zum anderen die Aufnahme des GFP in den Expressionsvektor unter Kontrolle eines durch Arabinose induzierbaren Promotors vorzubereiten. Der Erfolg der Restriktionen wird auf einem Agarosegel überprüft, das GFP-Fragment und das Fragment des linearisierten pBAD aus dem Gel isoliert und dann das GFP mit dem Expressionsvektor ligiert. Das fertige Plasmid wird in einen Bakterienstamm (*E.coli* TOP10F) eingebracht und auf Arabinosehaltigem Nährboden ausplattiert. Der dem GFP vorgeschaltete Promoter wird durch Arabinose induziert und das GFP wird abgelesen – die Bakterienkolonien leuchten grün. Als Kontrolle werden die rekombinanten *E.coli* TOP10F-Zellen auf einem Nährboden ohne Arabinose ausplattiert. Die Bakterienkolonien sollten hier keine Grünfärbung zeigen.



Die Abbildung zeigt schematisch den experimentellen Ablauf: nach Umklonierung des GFP-Leserahmens wird das rekombinante Plasmid in Bakterien eingebracht und auf Arabinosehaltigem bzw. -freiem Nährmedium ausplattiert. Somit leuchten die transformierten *E.coli* TOP10F-Kolonien auf ersterem Nährmedium grün, während die letztgenannten *E.coli* TOP10F-Kolonien weiss erscheinen.

Um die Restriktionen durchführen zu können, müssen Sie zunächst Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen gewinnen. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgt mit den Komponenten des Presto™ Mini Plasmid Kit von Geneaid.

1. Präparation der Plasmide aus Bakterienkulturen

Zunächst werden in 3 ml flüssiges LB-Medium 3 µl Ampicillin (für pBAD, 100 mg/ml) bzw. 3 µl Kanamycin (für pET-28b-GFP, 25 mg/ml) in ein steriles Reagenzröhrchen gegeben. Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers impfen Sie eine weiße Einzelkolonie von bewachsenen Agarplatten ab, überführen Sie in das Reagenzglas und inkubieren die Kulturen über Nacht bei 37° C im Schüttler.

Von jeder Kultur werden ca. 1,5 ml in zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 12.000 rpm 1 min zentrifugiert. Der Überstand wird in die zur Aufzucht benutzten Reagenzröhrchen überführt und vor der Entsorgung autoklaviert. Die Zellen werden dann jeweils in 100 µl Resuspensionlösung PD1 resuspendiert und in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Zur alkalischen Lyse werden 200 µl Lysepuffer PD2 zugegeben. Durch vorsichtiges 6-8-maliges Schwenken wird der Ansatz gemischt und danach 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Proteine und genomische DNA werden durch Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer PD3 gefällt. Der Ansatz wird durch sanftes 4-6-maliges Schwenken sorgfältig gemischt und dann für 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wird eine PDH-Bindesäule in ein Zentrifugationsgefäß gestellt. Der klare Zellyseüberstand wird auf die Säule pipettiert und 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses werden nun 600 µl Wasch-Lösung auf die Membran pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation wird der Durchfluss verworfen und die Säule 3 min bei 12.000 rpm „trockenzentrifugiert“. Überführen Sie die Säule in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Geben Sie 50 µl ddH₂O auf die Membran und zentrifugieren Sie zur Elution der Plasmid-DNA erneut 2 min bei 12.000 rpm.

2 µl des Eluats werden nun im NanoDrop ND-2200 (Thermo Scientific) spektralphotometrisch vermessen. Die Plasmid-DNA kann bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C aufbewahrt werden.

2. Restriktionsverdau der Plasmide pET-28b-GFP und pBAD mit Restriktionsendonukleasen

Theorie: Restriktions-Endonukleasen

Restriktionsendonukleasen (REs) spalten doppelsträngige DNA an bestimmten (in der Regel) symmetrischen 4-8 Basen langen Erkennungssequenzen (Basenabfolgen in der DNA) indem sie die Zucker-Phosphatrückgratbindung in beiden Strängen zwischen bestimmten Basen spalten. Sie benötigen dazu bestimmte Pufferbedingungen (Salze, pH) und Magnesium-Ionen. Ringförmige Plasmid-DNA-Moleküle werden durch Einwirkung der REs in lineare Moleküle (DNA-Fragmente) zerlegt. Einige dieser Enzyme erzeugen Fragmente mit stumpfen Enden (blunt ends), bei anderen steht ein Einzelstrang am Ende des Fragments etwas über (sticky ends). Je nach verwendetem Enzym ist die DNA-Sequenz des Überhanges unterschiedlich. Das R-Enzym *NheI* spaltet an der Sequenz 5'GCTAGC3' (zwischen G und C), *EcoRI* spaltet an der Sequenz 5'GAATTC3' (zwischen G und A). Beide Enzyme hinterlassen sticky ends, die für eine gerichtete Klonierung benutzt werden können.

Da die zu verwendenden Restriktionsenzyme *NheI* und *EcoRI* gleiche Reaktionsbedingungen bei der Restriktion benötigen, können die beiden Plasmide jeweils mit beiden Enzymen in einer Reaktion geschnitten werden („Doppelverdau“). Das korrekte Fragment, das durch den Doppelverdau entsteht, ist 718 bp groß (siehe Plasmidkarten im Anhang). Die entstandenen DNA-Fragmente sollen Sie mittels gelelektrophoretischer Auftrennung analysieren und das 718 bp große GFP-Fragment, sowie das linearisierte pBAD-Plasmid ausschneiden.

In vier 1,5 ml vorher beschriftete Reaktionsgefäße werden mit Hilfe einer Pipette (0-10µl) und aufgesteckter Spitze (weiß) folgende Volumen aus den präparierten Plasmiden und von den Betreuern zur Verfügung gestellten Enzymen und Puffer (stocks) (Plasmid pET-28b-GFP, Plasmid pBAD, Restriktionsenzym (*NheI*, *EcoRI* (je 10U/ µl), 10 x *EcoRI* (Fermentas), H₂O bidest) pipettiert (**Achtung: für jeden Schritt die Spitze wechseln !!!**). Die Mengen sind so klein, dass Sie diese am besten als Tropfen am Innenrand des Gefäßes nebeneinander getrennt absetzen und dann durch abzentrifugieren mischen. Die Reaktionen und die Stocklösungen bitte soweit als möglich auf Eis belassen (außer beim unmittelbaren Pipettieren). Bevor Sie mit dem Pipettieren der Reaktionsansätze beginnen, sollten Sie die Reaktionsgefäße mit einem wasserfesten Filzstift beschriften, mindestens mit Ihrer Gruppennummer und dem Inhalt der Reaktion (K1, K2, V1, V2). Die Ansätze werden durchgemischt, dann in einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert, und danach auf Eis gestellt.

K1: pET-28b-GFP unverdaute Kontrolle

x µl DNA (0.5 µg) **pET-28b-GFP**
2 µl 10 x Puffer *EcoRI* (Fermentas)
y µl ddH₂O (auf 20 µl auffüllen)

K2: pBAD unverdaute Kontrolle

x µl DNA (0.5 µg) **pBAD**
2 µl 10 x Puffer *EcoRI* (Fermentas)
y µl ddH₂O (auf 20 µl auffüllen)

V1: pET-28b-GFP *NheI/EcoRI*-Verdau

x µl DNA (0.5 µg) **pET-28b-GFP**
2 µl 10 x Puffer *EcoRI* (Fermentas)
1 µl *NheI* (10U/µl)
1 µl *EcoRI* (10U/µl)
y µl ddH₂O (auf 20 µl auffüllen)

V2: pBAD *NheI/EcoRI*-Verdau

x µl DNA (0.5 µg) **pBAD**
2 µl 10 x Puffer *EcoRI* (Fermentas)
1 µl *NheI* (10U/µl)
1 µl *EcoRI* (10U/µl)
y µl ddH₂O (auf 20 µl auffüllen)

Zur Elektrophorese wird anschließend jede der 20 µl Reaktionen mit 4 µl Probenpuffer versetzt, gemischt, kurz abzentrifugiert und separat in vier aufeinander folgende Geltaschen des Agarosegels, s.u., gefüllt. Der Probenpuffer enthält die zwei Farbstoffe Xylencyanol (Grünblau) und Bromphenolblau, die Aufschluss über die Wanderstrecke der DNA im Gel geben. Als Größenstandard wird eine 100 bp-DNA-Leiter von der Firma Solis Bio Dyne verwendet (siehe Anhang). Von diesem schon mit Probenpuffer versetzten Größenstandard werden stets **2 µl** (nicht mehr !!!!!) in die separate Tasche des Gels rechts neben die Proben 1-4 aufgetragen.

3. Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktions-Ansätze

Aus 150 ml 1%iger Agarose-Lösung in 1 x TAE wird ein Agarose-Gel gegossen: 1,5g Agarose wird in einem Erlenmeyerkolben trocken eingewogen, 150 ml TAE-Puffer und ein Magnetührstab hinzugegeben. **Beim Arbeiten mit TAE Handschuhe tragen !!!** Die Suspension wird in der Mikrowelle mehrmals zum Kochen gebracht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat (**Vorsicht heiß !!! Beim Schütteln ist Siedeverzug möglich - daher Schutzbrille und dicke Handschuhe tragen!!**). Die Agarose-Lösung wird auf einem Magnetrührer abgekühlt. Die Agarose ist kalt genug, wenn sich der Erlenmeyerkolben auf der Arminnenseite nicht mehr schmerzhaft heiss anfühlt (ca. 60-65°C). Dann wird die Agaroselösung in die abgedichtete Gelform gegossen und ein Kamm mit dicken Zähnen in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gesteckt. Das Gel sollte ca. 0,5 cm dick sein, der Schaft des Kammes soll vollständig oberhalb des Gels liegen. Nach Erstarrung des Gels wird dieses mit 1 x TAE (=Laufpuffer) bedeckt, der Kamm kann nun gezogen werden und die Proben in die

entstandenen Vertiefungen im Gel (Geltaschen) geladen werden: beim Aufziehen der Proben in die Pipettenspitze darauf achten, dass keine Luftblasen mitgezogen werden und beim „Herauspipettieren“ der Probe diese LANGSAM in die Tasche sinken lassen! Nicht die Probe mit Druck ausblasen, da sie sonst aus der Tasche wieder herausschwimmt.

Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht die physikalische Trennung von geladenen Molekülen, indem in einem flüssigen elektrolythaltigen Medium (Puffer, hier Borat-Salze) ein Stromfluß durch eine Gel-Matrix (Agarose) erzeugt wird. DNA-Fragmente (Restriktions- und PCR-Fragmente) wandern aufgrund ihrer negativen Ladung während der Elektrophorese durch die Poren des Agarose-Gels in Richtung Anode (positiv). Dabei hängt die Laufgeschwindigkeit von der Größe und Form der Moleküle und der Dichte der Gelmatrix ab. Dieses ermöglicht die Trennung verschieden großer Fragmente. Die Größenbestimmung der linearen Fragmente erfolgt durch Vergleich der Laufstrecken mit einer ebenfalls im Gel aufgetragenen DNA bekannter Größe (im vorliegenden Fall die 100 bp-DNA-Leiter). Um die DNA im Gel überhaupt sichtbar zu machen, wird das Gel nach der elektrophoretischen Auftrennung in ein Ethidiumbromid-haltiges Färbebad gelegt und ca. 20 min inkubiert. Ethidiumbromid lagert sich in den DNA-Doppelstrang ein, wird durch UV-Licht angeregt und ermöglicht so die Visualisierung der DNA-Fragmente im UV-Licht. Da viele DNA-Moleküle gleicher Größe sich in einem bestimmten Abschnitt eines Gels anreichern, sieht man die Fluoreszenz in diesen Bereichen als Strich — man bezeichnet diese Signale auch als „DNA-Banden“. Aufgrund seiner interkalierenden Eigenschaft ist Ethidiumbromid ein starkes Mutagen. Deshalb sollten beim Umgang mit diesem Farbstoff Nitrilhandschuhe getragen werden, um die Haut vor Aufnahme zu schützen.

Tasche 1-4 : 20 µl Restriktionsverdau mit Probenpuffer

Tasche 5 : 2 µl 100 bp-DNA-Leiter (Solis Bio Dyne)

Die DNA wird bei einer Spannung von 200 V aufgetrennt bis sich die (untere) Bromphenolblau-Front ca. 2 cm oberhalb des unteren Gelrandes befindet. Das Gel wird auf einem UV-Tisch (Wellenlänge: 254 nm) bildlich erfasst.

Beim Umgang mit nicht abgeschirmtem UV-Licht bitte Schutzbrille tragen!

Die über Agarosegel aufgetrennten und ausgeschnittenen DNA-Fragmente werden aus der Agarose isoliert und so für die Ligation vorbereitet. Für die Isolation der Fragmente aus den Agarose-Stückchen wird ein Glasmilch-basiertes Protokoll verwendet. Die Agarose wird durch die im Puffer QG enthaltenen chaotropen Ionen unter Erhitzen aufgelöst und die DNA durch Entfernen der Hydrathülle und „Binden“ an Silika(=Glas-)Partikel und anschließende Waschschrte isoliert und gereinigt. Die Bindung der DNA an die Glaspartikel erfolgt aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen.

Versuchsdurchführung:

- Gelstück wiegen, als Tara ein leeres 1,5 ml-Reaktionsgefäß nehmen
- 300 µl Puffer QG auf 100 mg Gel, **Glasmilch 30 s vortexen**, d.h. mischen, 10 µl gevortexte Glasmilch zugeben
- In einem **50° C Wasserbad** inkubieren bis die Gelstücke gelöst sind, zwischendurch vortexen.
- abzentrifugieren (30 sec, 13000 rpm)
- Puffer abnehmen und verwerfen
- 500 µl Puffer QG auf das Pellet geben, durch Vortexen resuspendieren, zentrifugieren
- Puffer abnehmen und verwerfen
- 500 µl Puffer PE zugeben (entfernt die Salze), durch Vortexen resuspendieren, zentrifugieren
- Puffer abnehmen und verwerfen
- 500 µl Puffer PE zugeben, durch vortexen resuspendieren, zentrifugieren
- Puffer abnehmen, verwerfen, nochmals zentrifugieren, restlichen Puffer abnehmen
- Pellet bei offenem Deckel 5 min bei 50° C im Heizblock trocknen; die Oberfläche und der Rand des Pellets sollten nun weiß erscheinen
- Pellet in 20 µl ddH₂O durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren
- 5 min bei 50° C inkubieren, zentrifugieren
- Überstand in frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- von der eluierten DNA werden 3 µl mit 2 µl Probenpuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarose-Gel (Kamm mit dünnen Zähnen) in 0,5xTBE aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Isolation der DNA aus dem Agarose-Gel erfolgreich war.
- Die eluierte DNA wird bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C aufbewahrt.

Ligation

Das Schneiden mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen ermöglicht die gerichtete Ligation des GFP-Inserts in den pBAD-Vektor. So wird erreicht, dass das 5'-Ende des GFP-Gens hinter den Promotor des Vektors geschaltet wird. Der Promotor kann so später durch Inaktivierung des Arabinose-Repressors die Expression des GFP-Gens steuern. Ausserdem verhindert die Restriktion mit zwei unterschiedlichen Endonukleasen, dass die Enden des geschnittenen pBAD-Plasmids wieder miteinander verknüpfen (religieren), ohne ein weiteres DNA-Stück aufzunehmen.

Die Ligation erfolgt bei 4 - 16° C, obwohl das Temperaturoptimum der Ligase bei ca. 37° C liegt, da sich bei niedrigen Temperaturen die überhängenden Enden des pBAD-Vektors und des GFP-Inserts besser aneinander legen können. Die Ligation benötigt ATP als Energielieferanten. ATP ist im Ligationspuffer enthalten.

Durchführung

Ligation des GFP-Inserts in den *NheI/EcoRI* geschnittenen Vektor pBAD:

2 µl pBAD-DNA (*NheI/EcoRI* geschnitten)

6 µl GFP-Gen-Fragment (*NheI/EcoRI* geschnitten)

10 µl 2x Ligationspuffer

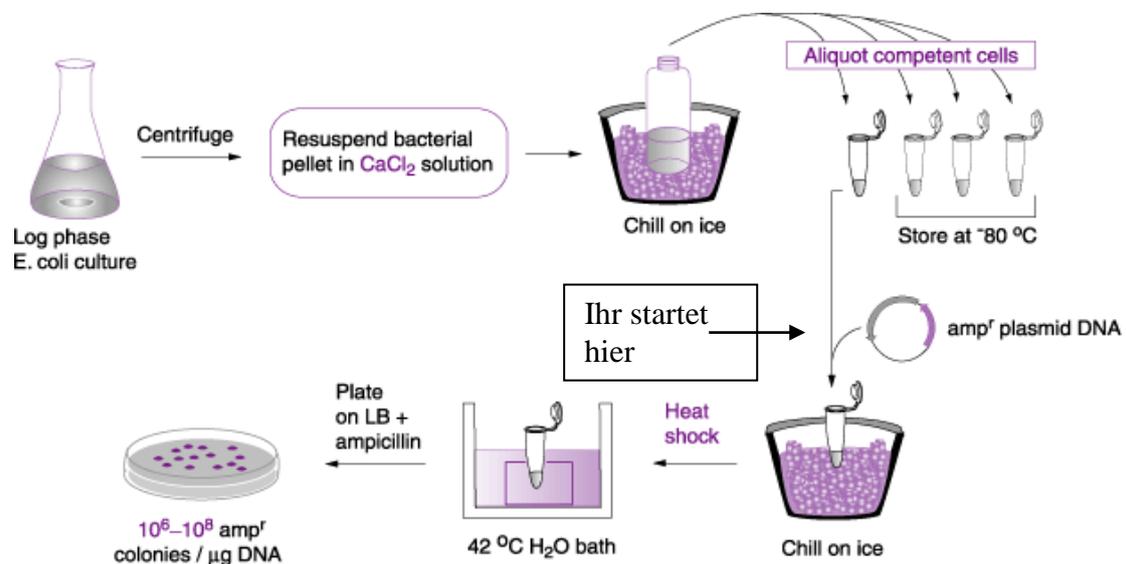
2 µl Ligase (1U/µl)

- Ansatz mischen, kurz abzentrifugieren
- Inkubation 2h auf der Bank bei RT oder bei 4° C über Nacht

Transformation

Mit dem Begriff Transformation bezeichnet man die stabile genetische Veränderung eines Organismus durch Einschleusen und Aufnahme von DNA in Form extrachromosomaler (Plasmide/Episomen) oder chromosomaler DNA. Assoziiert mit der Aufnahme ist häufig eine phänotypische Veränderung des Organismus (im vorliegenden Fall eine Antibiotikaresistenz). Der Laborstamm *E.coli* TOP10F, wie auch eine Reihe anderer gram-negativer Bakterien, sind sensitiv (empfindlich) gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin. Durch Aufnahme von Plasmiden können Gene in die Bakterien eingeschleust werden, die die Wirkung von Antibiotika auf das Wachstum der Bakterien ausschalten und somit ein Wachstum der Bakterien auf antibiotikahaltigem Medium ermöglichen. Diese Resistenzgene sind in die

Plasmide integriert und werden in der Bakterienzelle von dieser abgelesen (transkribiert). In dem Versuch werden *E.coli* TOP10F-Bakterien durch Einschleusen von ringförmiger Plasmid-DNA „transformiert“. Das im Praktikum benutzte Plasmid pBAD trägt ein Ampicillin-Resistenz-Gen, das den Bakterien nach Aufnahme Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin vermittelt. Desweiteren besitzt es das Arabinose-Repressor-Gen. Durch Expression dieses Repressors wird der pBAD-Promotor stillgelegt. Durch Zugabe von Arabinose ins Nährmedium wird der Repressor inaktiviert und der Promotor dadurch aktiviert. *E.coli* TOP10F-Bakterien gehören zu den gram-negativen Bakterien, die natürlicherweise keine DNA selbständig aufnehmen können. Die Aufnahme von DNA kann jedoch durch einen sogenannten Hitzeschock forciert werden: das Zell-Plasmid-Gemisch wird ca. 30 min. lang bei 4° C inkubiert, damit sich die Plasmid-DNA während dieser Zeit um die Zellen herum anlagern kann. Nun erfolgt die eigentliche Transformation, die per Hitzeschock durchgeführt wird. Dazu wird der Reaktionsansatz für 45 Sekunden in ein 42° C warmes Wasserbad gestellt. Durch diese abrupte Temperaturänderung wird die Zellwand so weit gedehnt bzw. durchlässig, daß die Plasmid-DNA ungehindert eindringen kann. Die Zellen werden auf Eis gestellt (1-2 min), damit die Zellwand sich erneut zusammenlagern kann.



Zubereitung von kompetenten Zellen und ihre anschließende Transformation (aus www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture4/Lecture4.html)

Protokoll Hitzeschock-Transformation:

Es werden 4 Transformationen durchgeführt:

- (1) der Ligationsansatz + *E.coli* TOP10F für den Nährboden mit Arabinose,
- (2) der Ligationsansatz + *E.coli* TOP10F für den Nährboden ohne Arabinose,
- (3) von den Betreuern vorbereitetes pBAD-GFP-Plasmid + *E.coli* TOP10F als Positivkontrolle und
- (4) als Negativkontrolle 2 µl des aufgearbeiteten, aber nicht ligierten pBAD-Plasmids, + *E.coli* TOP10F als Negativkontrolle.

Die zu transformierenden Zellen (4x50 µl *E.coli* TOP10F) werden zügig aufgetaut (Vorsicht! Nicht warm werden lassen! Auf Eis halten!). Zu 10 µl Ligation werden 50 µl *E.coli* TOP10F-Zellen pipettiert.

- gemischt wird durch vorsichtiges Schnippen an das Reaktionsgefäß
- Das Zell-Plasmid-Gemisch wird ca. 30 min. lang auf Eis inkubiert
- die Transformationsansätze werden für 45 Sekunden in einem Wasserbad bei 42° C inkubiert und danach umgehend auf Eis gestellt.
- Zugabe von 200 µl SOC- Medium
- Schütteln der Kulturen bei 37° C für mind. 1 Stunde
- 100 µl der Kulturen werden auf die LB/Agar-Platten pipettiert und mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert.

Zu verwendende Platten : LB- Platten 100 µg/ ml Ampicillin

+ 0,1% Arabinose

bzw. ohne Arabinose

- die Platten werden über Nacht bei 37° C inkubiert

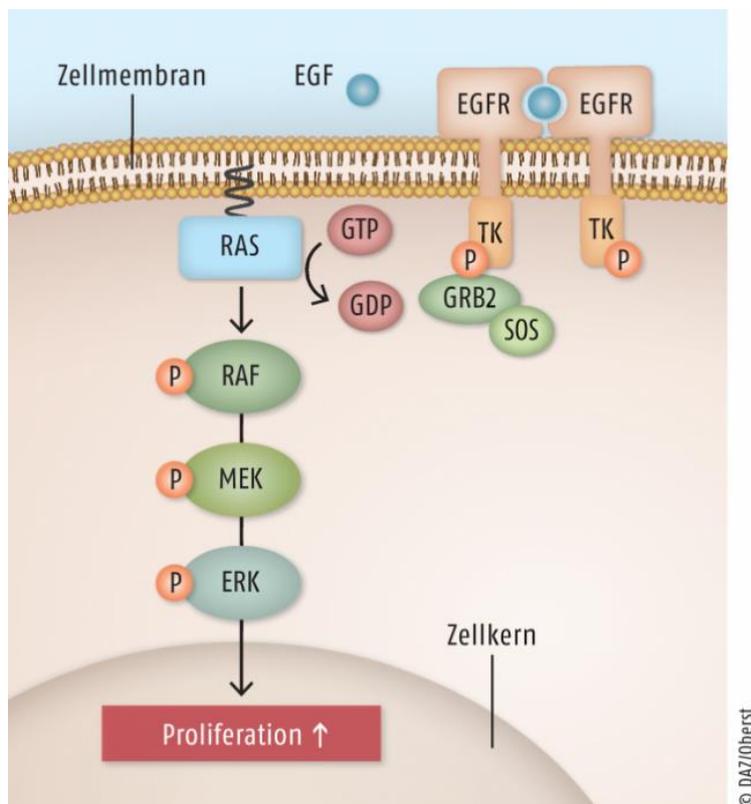
Die Platten werden qualitativ bewertet, unter UV-Licht betrachtet sowie die Kolonienzahl gezählt und im Protokoll vermerkt.

Teil II: Molekulargenetische Techniken zur Genotypisierung:

Bestimmung von krebsrelevanten Mutationen im *KRAS*-Gen mittels PCR und Direkter Sequenzierung

Krebstherapie und Rolle von *KRAS*

Eine grundlegende Eigenschaft von „entarteten“ Krebszellen besteht darin, dass sie sich der Zellzykluskontrolle entziehen und einem ungehemmten Zellteilungsprozeß anheim fallen. Dabei spielen Rezeptoren eine entscheidende Rolle, die durch Bindung eines bestimmten Liganden eine Signalkaskade zur Auslösung der Zellteilung in Gang setzen. Für den „Epidermal Growth Factor Receptor“ (deutsch: Epidermaler Wachstums-Faktoren Rezeptor) ist vor einigen Jahren eine solche Signalkaskade identifiziert worden. Der EGF-Rezeptor sitzt in der Zellmembran. An seinem unteren Ende ragt die sogenannte Tyrosin-Kinase ins Zellinnere. Binden EGF-Moleküle auf der Außenseite der Zelle an die EGF-Rezeptoren, so wird von der Tyrosin-Kinase des EGF-Rezeptors eine komplexe chemische Reaktion im Zellinneren ausgelöst, die zur Teilung der Krebszelle führt.



Vereinfachte Darstellung der Signalkaskade, die nach Ligandenbindung am epidermalen Wachstumsfaktor EGFR intrazellulär aktiviert wird und zur Zellproliferation führt; EGF=epidermal growth factor, TK=Tyrosinkinase, RAS=rat sarcoma G-Protein, RAF=rapid accelerated fibrosarcoma protein, MEK=mitogen-activated signal-regulated kinase, ERK=extracellular-signal regulated kinase, GRB2=growth factor receptor-bound protein 2, SOS=son of sevenless (Quelle: <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2016/daz-33-2016/wachstumsfaktor-rezeptoren-ausschalten>)

Ein Schlüsselprotein in dieser Signalkaskade ist KRAS. Es handelt sich dabei um einen An-/Aus-Schalter, der innerhalb der Signalkaskade durch einen Effektor aktiviert wird. In seiner aktiven Form ist KRAS eine GTPase und wird nach der Abspaltung eines Phosphatrestes wieder in seine inaktive Form überführt. Bestimmte Mutationen innerhalb des Leserahmens führen allerdings dazu, dass die Konformation des KRAS-Proteins verändert wird und dadurch KRAS dauerhaft aktiv bleibt. Seine permanente GTPase-Aktivität ist ein Schlüsselereignis zur dauerhaften, unkontrollierbaren Teilungsaktivität der Zelle und damit für die Entartung zur Krebszelle.

Eine wichtige Therapieform zur Behandlung von Darmkrebs stellen Antikörper dar, die gezielt den EGF-Rezeptor erkennen und so die Signaltransduktionskaskade für die Auslösung der Zellteilung unterbinden (EGFR-Inhibitoren). Dadurch bleibt KRAS dauerhaft im inaktiven Zustand und kann nicht als GTPase fungieren. Liegt allerdings eine kritische Mutation im *KRAS*-Leserahmen vor, entzieht sich das Protein der Kontrolle durch den EGF-Rezeptor und damit auch seiner Inhibitoren. In der Folge bleibt KRAS permanent aktiv und fördert so unkontrolliert die Zellteilungsaktivität. EGFR-Is haben somit keinen therapeutischen Nutzen mehr, da die Krebszellen auf diese Behandlung nicht mehr ansprechen. Es ist also von zentraler Bedeutung, vor der Entscheidung über eine Therapie die kritischen Mutationen innerhalb des *KRAS*-Gens zu kennen.

In diesem Praktikumsteil sollen Sie die Mutationen der Codons 12 und 13 im *KRAS*-Gen analysieren. Sie erhalten dazu DNA aus Zelllinien, die aus Primärtumoren isoliert und kultiviert wurden. Es wird Ihre Aufgabe sein, durch molekulargenetische Methoden wie PCR und Sequenzierung den Genotypen der Codons 12 und 13 zu ermitteln und zu entscheiden, ob wegen vorhandener Mutationen auf eine Therapie mit EGFR-Inhibitoren verzichtet werden muß. Die Wildtyp-Sequenz der Codons 12 und 13 lautet GGT GGC. Da nur Mutationen in den Positionen 1 und 2 der Codons das Potential haben, zu einer veränderten Aminosäure und damit zu einer alterierenden Sekundärstruktur des Proteins zu führen, kann man sich in der Auswertung auf diese Positionen konzentrieren.

```

TAG TGTATTAACCTTATGTGTGACATGTTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTTATT
ATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGG
CAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAAC
AATAGAGGTAATCTTGTTTTAATATGCATATTACTGGTGCAGGACCATTCTTTGATACA
GATAAAGGTTTCTCTGACCATTTTCATGAGTACTTATTACAAGATAATTATGCTGAAAGT

```

***KRAS* Exon 2-Sequenz (braun) mit Start-Codon (grün), PCR-Primer-Positionen (türkis) und den krebsrelevanten Codons 12 und 13 (violett)**

Versuchsdurchführung:

Sie erhalten zwei DNAs aus Zelllinien, die aus einer Gewebeentnahme bei einer Koloskopie stammen. Eine Praktikumsgruppe erhält statt einer Krebszelllinie DNA aus peripherem Blut eines gesunden Individuums als Wildtyp-Kontrolle. Mit diesen DNAs führen Sie eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit *KRAS*-spezifischen Primern durch und ermitteln den Genotyp des amplifizierten Abschnitts anschliessend mittels Sequenzierung.

AUF EIS PIPETTIEREN UND PCR- REAGENZIEN AUF EIS HALTEN

20 µl 10x Hot Fire Puffer

20 µl MgCl₂ (25 mM)

120 µl H₂O (zweifach deionisiert)

16 µl dNTP Mix (Nukleotid-Mix, 2,5 mM von jedem dNTP)

4 µl 10 µM *KRAS*-Primer forward (10 µM, 5'-tgtattaaccttatgtgtgacatgtt-3')

4 µl 10 µM *KRAS*-Primer reverse (10 µM, 5'-ctcatgaaaatggcagagaaac-3')

4 µl *HotFire-Polymerase* (5U/µl, Solis BioDyne, Tartu, Estland)

- Kurz mischen (durch "Finger schnippen" am Reaktionsgefäß) und abzentrifugieren.
- 47 µl dieser Mixe werden in 0,2 ml Reaktionsgefäße (3er Streifen) pipettiert.
- Zu diesen Ansätzen werden 3 µl der jeweiligen DNA (100 pg/µl) bzw. H₂O für die PCR-Negativkontrolle pipettiert
- Die 0,2 ml Reaktionsgefäße sorgfältig schließen und mischen.
- auf Eis stehen lassen bis alle Gruppen fertig sind.
- die 3er Streifen kurz zusammen mit den entsprechenden Reaktionen der anderen Gruppen abzentrifugieren, in die PCR-Maschine stellen und das bereits einprogrammierte Programm starten:

Programm:

15 min 95° C

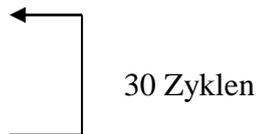
1 min 95° C

45 s 55° C

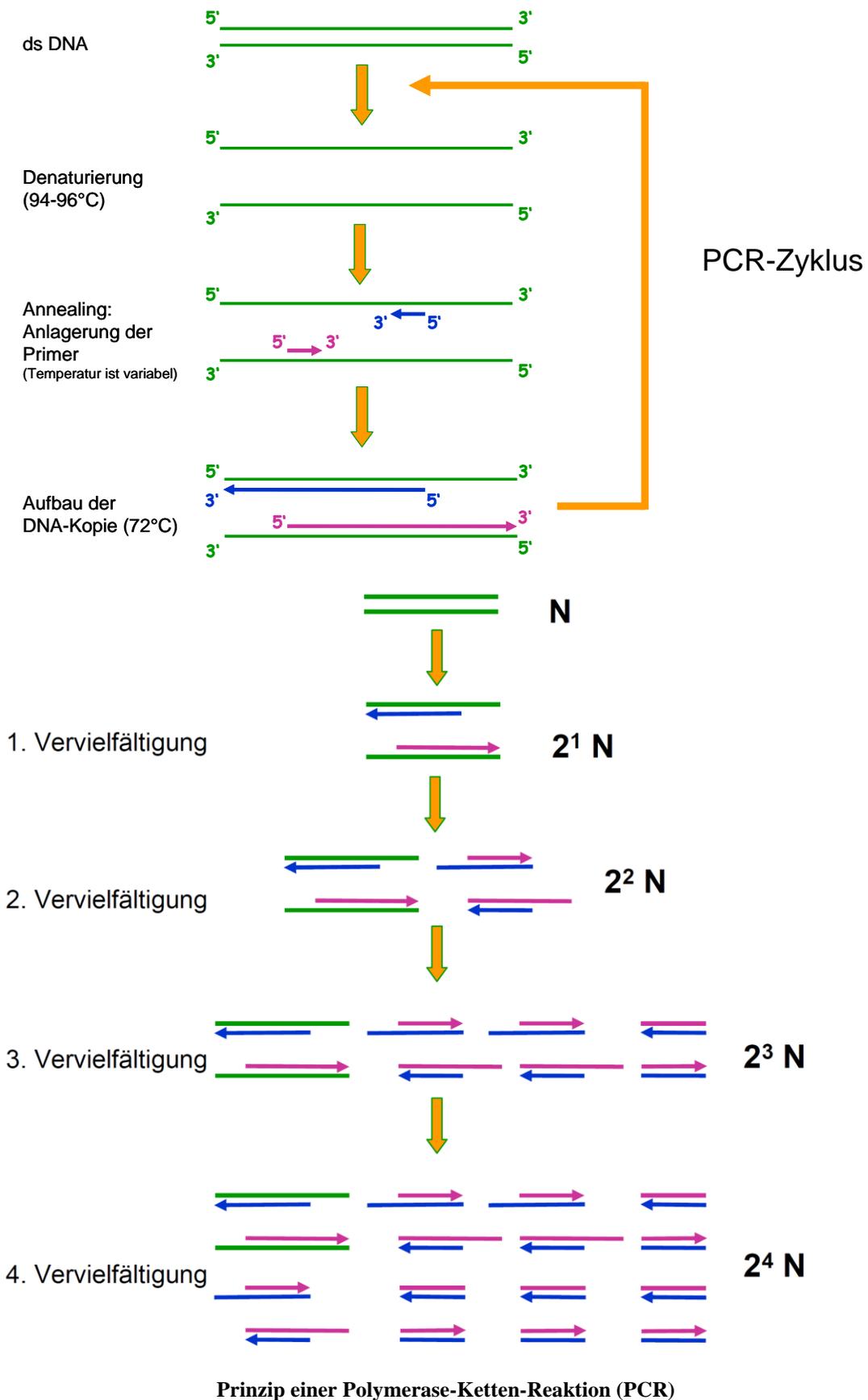
45 s 72° C

5 min 72° C

12° C unendlich



Zur Durchführung des kompletten Programms benötigt die Maschine ca. 2 h.



Gelelektrophoretische Analyse der PCR -Produkte:

- Für die Analyse der PCR-Produkte werden Agarose-Gele (1%) hergestellt durch Einwiegen von 1,5g normaler Agarose auf 150 ml 0,5 x TBE. **Beim Arbeiten mit TBE Handschuhe tragen !!!** Mehrfach in der Mikrowelle aufkochen, um die Agarose vollständig zu lösen (Achtung nicht überkochen lassen – öfter kontrollieren).
- Agarose bis ca. 60-65° C abkühlen lassen und in die Elektrophoresekammern gießen, Kämme mit schmalen Taschen einsetzen.
- Gel erstarren lassen und Tesafilm entfernen
- Gelkammern mit 0,5 x TBE füllen, die Elektroden anschliessen und die Kämme vorsichtig und gleichmäßig herausziehen.
- 5 µl der PCR-Reaktionen werden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 2 µl Probenpuffer versetzt und in die Taschen (10er-Pipette, weisse Spitze) einzeln eingefüllt.
- Als Längenstandard 2 µl 100 bp-DNA-Leiter (Solis Bio Dyne) auf das Gel auftragen.
- Die Gele werden bei 200 V eine halbe Stunde laufen gelassen, mit Handschuhen aus dem Tank genommen, in einem Ethidiumbromid-Färbebad ca. 20 min angefärbt und unter UV-Licht photographiert.

Aufreinigung des PCR-Produktes

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt über eine Affinitätschromatographie. Verwendet wird die Reagenziensammlung der Firma Stratec Molecular. Die Festphase der verwendeten Säule besteht aus einem Silikamaterial. Durch die Zugabe von chaotropen Ionen (Ionen mit großem Atomdurchmesser und großer Wasserhülle) werden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen DNA und Säulenmaterial ermöglicht. Proteine und freie Nukleotide und kurze Primer, die nur mit geringer Effizienz an das Säulenmaterial binden, werden in den anschließenden Waschschrinen mit alkoholhaltigem Nidrigsalz-Puffer von der Säule gewaschen. Das PCR-Produkt wird anschließend mit Wasser von der Säule eluiert. Die exakte Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist nicht bekannt.

Durchführung:

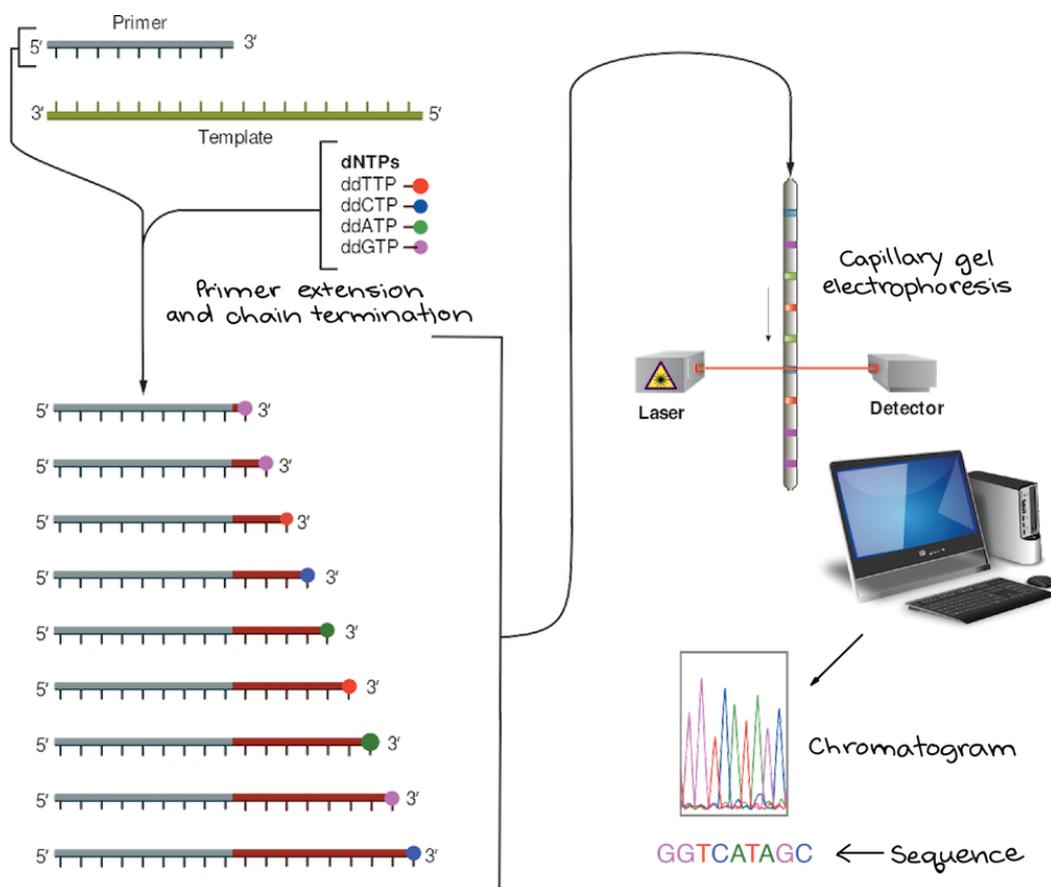
- jeweils 45 µl der PCR-Reaktionsansätze werden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und 250 µl Binding Buffer hinzugegeben

- Probe durch Vortexen mischen und auf Membran innerhalb der Kartusche (MSB Spin PCRapace, Stratec Molecular) laden
- 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 4 min bei 13000 rpm zentrifugieren → Durchfluss verwerfen
- 500 µl Waschpuffer PE in die Kartusche geben
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren → Durchfluss verwerfen
- Membran 4 min bei 13000 rpm trocken zentrifugieren
- Kartusche in frisches 1,5 ml Gefäß überführen
- 20 µl ddH₂O mittig auf die Membran geben
- 2 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 11000 rpm zentrifugieren

Zur Bestimmung der Menge an PCR-Produkt werden 3 µl des Eluats auf ein 1% Agarosegel in 0,5xTBE aufgetragen. Zusätzlich werden 2 µl des Eluats im Qubit-Fluorometer (Invitrogen) vermessen. Dieses Messsystem arbeitet mit einem interkalierenden Farbstoff, welcher lichtempfindlich und für die Analyse niedrigmolekularer und gering konzentrierter DNA optimiert ist (dsDNA High-Sensitive kit). Zunächst stellen Sie durch Zugabe von **1 µl Farbstoff zu 199 µl Puffer pro zu vermessender DNA** ein Farbstoff/Puffer-Gemisch her. Nun werden **2 µl des Eluats zu 198 µl des Farbstoff/Puffer-Gemisches** pipettiert. Nach kurzem Vortexen werden die Proben 5 min bei Raumtemperatur unter lichtabschirmender Alufolie inkubiert und anschließend gemessen.

Die nun durchzuführende Sequenzierreaktion beruht im wesentlichen auf den Prinzipien der Sanger-Sequenzierung. Das PCR-Produkt wird als Templat der Sequenzierreaktion eingesetzt, die in Bezug auf ihren zyklischen Ablauf einer PCR-Reaktion ähnelt, jedoch nur mit einem Primer durchgeführt wird. Die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase und die mehrfache Wiederholung von DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und DNA-Synthese, dienen der Effizienz-Steigerung der Reaktion und ermöglichen es, mit relativ kleinen Templat-Mengen auszukommen. Der Reaktionsmix enthält neben den konventionellen DNA-Bausteinen Di-desoxynukleotide (ddNTPs), die mit einer bestimmten Frequenz in den neuen DNA-Strang eingebaut werden und eine weitere Verlängerung des DNA-Strangs verhindern. Dies führt dazu, dass eine Population unterschiedlich langer Synthese-Produkte entsteht. Die Auftrennung der Syntheseprodukte nach ihrer Größe erfolgt in Kapillaren, in denen eine Gel-Matrix auf Polyacrylamidbasis eingegossen ist. Die Verwendung "moderner" ddNTPs, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, erlaubt es, die Verlängerungsprodukte mit

einem Laser-Detektor zu detektieren. Die unterschiedlich langen Syntheseprodukte passieren nach Größe separiert nacheinander den Detektor: Das kürzeste Produkt zuerst, das in seiner Länge der Primerlänge plus einem ddNTP entspricht, und die nachfolgenden mit jeweils einem Größenunterschied von einem dNTP. Da ddATPs, ddCTP, ddGTP und ddTTP mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, können Synthese-Produkte, an deren letzter Position ein ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP eingebaut wurde, unterschieden werden. Auf diese Weise kann den Syntheseprodukten ein bestimmtes Nukleotid in der Basenabfolge zugeordnet werden.



Prinzip der Sanger-Sequenzierung: Die moderne Form der Sanger-Sequenzierung nutzt ddNTPs, die mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. Dies ermöglicht eine Detektion mit Hilfe eines Laser-Dektors und die Zusammenfassung aller vier ddNTPs in einer Reaktion (Quelle: <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-biotechnology/a/dna-sequencing>)

Sequenzierungsreaktion:

Da unter Einsatz eines Oligonukleotids nur in eine Richtung sequenziert werden kann, werden pro PCR-Produkt zwei separate Sequenzierungsreaktionen angesetzt, eine mit dem *KRAS* Forward-Primer und eine mit dem *KRAS* Reverse-Primer. Das hat den Vorteil, dass der

Genotyp auf beiden DNA-Strängen bestimmt wird und somit die zu erhaltene Information doppelt abgedeckt vorliegt. Für die Sequenzierung wird eine Reagenziensammlung der Firma Beckman-Coulter eingesetzt. Der DTCS-Mix enthält dNTPs, markierte ddNTPs, Puffersubstanzen, MgCl₂ und eine hitzestabile DNA-Polymerase.

Durchführung:

Pipettieren Sie bitte den folgenden Mix in ein 0,2 ml PCR-Gefäß:

3-6 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (25 ng)

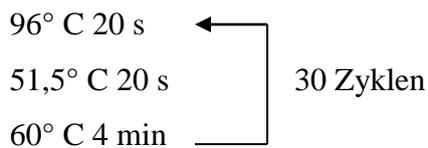
1,75 µl DTCS Quick Start Mastermix (Beckman/Coulter)

0,95 µl 10 x Sequencing Reaction Buffer (Beckman/Coulter)

0,5 µl *KRAS*-Forward- (bzw. Reverse-) Primer (10 µM)

mit ddH₂O auf 15 µl auffüllen

Temperaturprofil der Reaktion:



Die Produkte der Sequenzierreaktion werden nun anschließend mit Hilfe der bereits bei der Aufreinigung der PCR-Produkte verwandten Silicamembran-Kartuschen aufgereinigt. Dabei werden nicht eingebaute fluoreszierende Nukleotide entfernt. Das Protokoll muß den veränderten, nun einzelsträngigen Templaten allerdings angepasst werden:

- die kompletten 15 µl der Sequenzierreaktion werden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und 500 µl Binding Buffer hinzugegeben
- Probe durch Vortexen mischen und auf Membran innerhalb der Kartusche (MSB Spin PCRapace, Stratec Molecular) laden
- 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 4 min bei 13000 rpm zentrifugieren → Durchfluss verwerfen
- 500 µl Waschpuffer PE in die Kartusche geben
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren → Durchfluss verwerfen
- Membran 4 min bei 13000 rpm trocken zentrifugieren
- Kartusche in frisches 1,5 ml Gefäß überführen und darauf achten, dass sich kein Ethanol mehr an oder in dem Säulchen befindet

- 25 µl SLS (Sample Loading Solution, enthält Formamid) mittig auf die Membran geben
- 2 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 11000 rpm zentrifugieren

Die aufgereinigten Sequenzierreaktionen werden mit dem 8-Kapillarsequenzierer CEQ8000 (Beckman-Coulter) in einem harnstoffhaltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt, gemäß der Fluoreszenzmarkierung detektiert und zu Elektropherogrammen prozessiert. Diese sollen Sie mit dem frei erhältlichen Programm FinchTV (Installer wird von Betreuern bereit gestellt) auswerten, interpretieren und den Genotyp der verwandten DNA-Proben bestimmen.

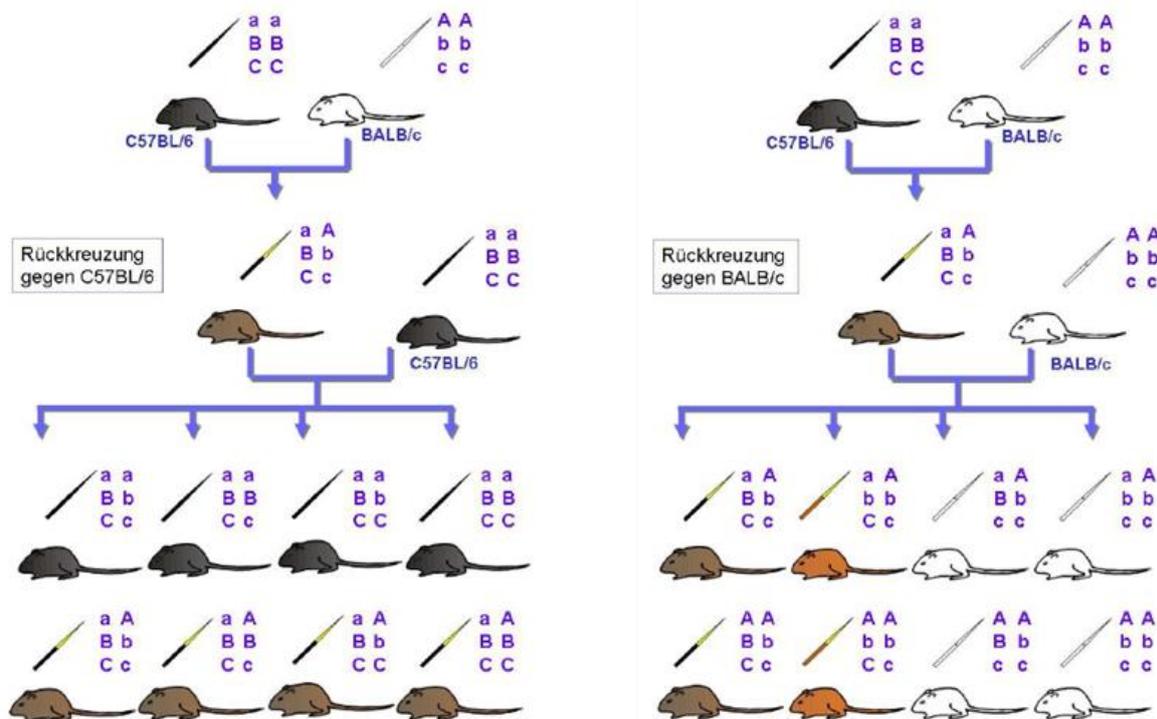
Teil III: Molekulargenetische Techniken der Genkartierung

Bestimmung von Fellfarbe und Vaterschaft anhand von Fellfarbloclen unter Verwendung von Rückkreuzungen in der Maus

In diesem Versuch werden moderne Methoden der genetischen Kreuzungsanalyse (hier am Modell einer Mäuserückkreuzung) erlernt. Ziel ist es, die Genetik der Fellfarbbestimmung der Maus durch DNA-Analysen zu ermitteln. Aus der Kenntnis der Verteilung der Fellfarballele (3 Gen-Loci: A, B, C) kann auf die Fellfarbe der Individuen zurückgeschlossen werden. Eine Ihrer Aufgaben in diesem Versuchsteil ist es, mit Hilfe von DNA-Analysen (Mikrosatelliten-Analysen) zu bestimmen, welche Fellfarbe die untersuchten Tiere hatten.

Zum Hintergrund: Zu den Genorten, die die Fellfarbe der Maus bestimmen, gehören Agouti (A), Brown (B) und Albino (C). Das „dominante“ **Agouti-Allel (A)** sorgt für eine gelbe Pigment-Bänderung der Haare, beim „rezessiven“ **Non-Agouti-Allel (a)** gibt es keine gelblichen Pigmentveränderungen am Rand und der Spitze der Haare. Das **Brown-Gen (B)** kodiert eine Tyrosinase und bestimmt das in die Haare eingelagerte Pigment Eumelanin. Unsere Mäuse unterscheiden sich in den Allelen indem sie entweder das „dominante“ Allel B = schwarzes Eumelanin oder das „rezessive“ Allel b = braunes Eumelanin besitzen. Ob allerdings die Tiere überhaupt Pigment produzieren können, hängt vom Albino-Gen ab. Das **Albino-Gen (C/c)** ist epistatisch zu A/a und B/b und essentiell für die Bildung von Pigmenten, d.h. Fell aber auch Augenpigmente. Mäuse mit einem „dominanten“ C-Allel können Pigment bilden. Besitzen Mäuse nur „rezessive“ c-Allele (homozygot cc) sind diese

nicht pigmentiert und somit Albinos. Für alle drei Loci gilt, dass die Allele A, B und C dominant, die Allele a, b und c rezessiv sind (siehe auch beiliegende Kopie). Im dem zu analysierenden Versuch wurden zunächst die zwei Mausstämme C57Black/6J (hier abgekürzt als B6 bezeichnet) und BALB/cJ (BA) gekreuzt. Es handelt sich bei diesen Mausstämmen um reinerbige, d.h. für alle Allele homozygote Linien. Die B6-Linie besitzt die Allele aaBBCC, die Linie BA den Genotyp AAbbcc (welche Farbe haben sie??). Um eine Durchmischung der reinerbigen Allele zu erzeugen, wurden die reinerbigen B6- und BA-Tiere zunächst miteinander gekreuzt. Die F1-Nachkommen der direkten Kreuzung (BA x B6 bzw. B6 x BA) wurden wahlweise mit einem der Elternstämme zurückgekreuzt (B6 oder BA). Die Fellfarbe der Nachkommen aus der F1-Rückkreuzung wurde bestimmt und chromosomale DNA dieser Tiere präpariert, die Ihnen vorliegt und untersucht werden soll.

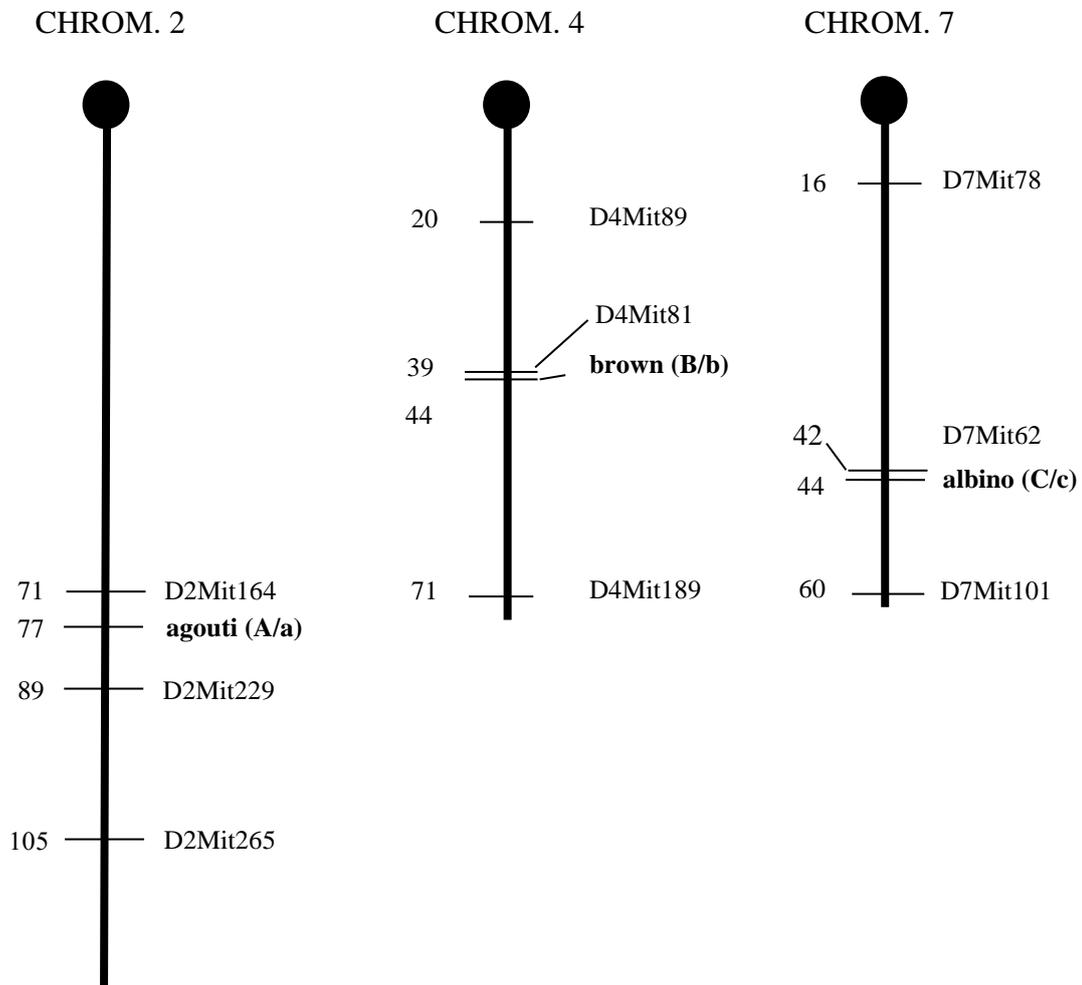


Kreuzungsschemata mit allen möglichen Genotypen und Phänotypen bei Rückkreuzung der F1-Generation gegen C57BL/6 (links) oder gegen BALB/c (rechts)

Ihre erste Aufgabe ist es, die Kreuzungsschemata theoretisch aufzuzeichnen und die zugehörigen Genotypen und Fell-Phänotypen zu ermitteln. Im praktischen Teil sollen Sie dann herausfinden, welche Allelverteilung in den individuellen Nachkommen der F1-Rückkreuzungen für die drei Genorte (Albino C, Brown B und Agouti A) in der Tat vorliegen.

Ihre zweite Aufgabe ist die molekulare DNA-Analyse: Die Ermittlung der Allelverteilung erfolgt mit Hilfe molekularer Analysen der Chromosomenabschnitte, die die Fellfarbene tragen. Hierzu benutzen wir die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), mit der man bestimmte Abschnitte der chromosomalen DNA vervielfältigen kann. Die dabei erzeugten PCR-Produkte unterscheiden sich in ihrer Größe/Länge abhängig davon von welchem Allel (B6) oder (BA) sie vervielfältigt wurden. Man bezeichnet solche Unterschiede als Längenpolymorphismen. Die vorliegenden Längenpolymorphismen basieren auf der allelspezifischen Variation kurzer sich wiederholender Sequenzabschnitte, die man als Mikrosatelliten bezeichnet. Die Sequenzwiederholungen in Mikrosatelliten bestehen aus repetitiven Di- oder Trinukleotidwiederholungen, z. B. $(5'-CA-3')_n$. Die Länge/Anzahl (n) dieser CA-Wiederholungen sind zwischen den parentalen Mausstämmen B6 und BA unterschiedlich (siehe Tabelle am Ende des Kapitels). Wenn man also DNA-Abschnitte mittels PCR amplifiziert, die den Bereich dieser variablen CA-Wiederholungen (Mikrosatelliten) umspannen, so erhält man je nach Allelkombination PCR-Produkte unterschiedlicher (heterozygot) oder gleicher (homozygot) Größe (Länge). Für die PCR macht man sich dabei zu Nutze, dass die Sequenzen, die die (CA)-Wiederholungen umgeben, in beiden Stämmen gleich (identisch) sind und man so an diesen Stellen „Ankerpunkte“ für eine Vervielfältigung findet. Die PCR wird mit synthetisch hergestellten Oligonukleotiden, sogenannten „Primern“, durchgeführt, deren Basenabfolge genau zu diesen „Anker“-Sequenzen passt und daher nur diesen einen Abschnitt amplifizieren. Die Größen der Mikrosatelliten-PCR-Produkte werden durch gelelektrophoretische Auftrennung in Agarose-Gelen bestimmt. Hierbei vergleicht man die PCR-Produktgrößen der Nachkommen aus der F1-Rückkreuzung mit denen der parentalen reinerbigen Linien (B6-bzw. BA-Eltern) und erhält so durch das „Banden-Muster“ Informationen über die Allelverteilung auf den drei relevanten Chromosomen in diesen Nachkommen. Nach Auswertung dieser chromosomalen Allelverteilungen lassen sich die Genotypen und Phänotypen festlegen und somit auch die Fellfarbe der Tiere: Analysieren werden Sie DNA-Abschnitte der Chromosomen 2 (agouti), 4 (brown) und 7 (albino). Etwa im zweiten Drittel des Chromosoms 2 befindet sich der agouti Locus (A/a) bei ca 77 cM, der brown Locus (B/b) ist in der Mitte des Chromosoms 4 (bei ca. 38 cM), der albino locus (C/c) liegt im unteren Drittel des Chromosom 7 bei ca. 49 cM. Für den brown Locus auf Chromosom 4 werden je 3 chromosomale Abschnitte, die variable Mikrosatelliten enthalten, mit PCR amplifiziert und untersucht. Die Rohdaten zu den Chromosomen 2 und 7 werden Ihnen nach Abschluss des experimentellen Teils ausgehändigt, so dass Sie vollständig den Genotyp, Fellfarbe und Vaterschaft der F1-Mäuse bestimmen können. Die Lage der

Mikrosatelliten auf den Chromosomen relativ zu den Fellfarbgenen ist in den folgenden Karten dargestellt.



Arbeitsschritte/Protokolle für die Mikrosatellitenanalyse:

Sie erhalten jeweils zwei chromosomale (genomische) DNAs von Tieren der F1-Rückkreuzung. Die DNAs liegen in einer Verdünnung von 10 ng/μl vor. Von diesen genomischen DNAs werden mit Hilfe einer PCR drei DNA-Amplifikate (kurze Abschnitte von ca. 90-220 Basenpaaren) des Chromosoms 7 hergestellt, die Mikrosatelliten variabler Länge enthalten und deren relative Positionen auf den Chromosomen bekannt sind. Folgende DNA-Abschnitte werden analysiert:

Name des Markers	Position	Größe des PCR-Produktes in bp		Temperatur*
		B6	BA	
D7Mit78	16	202	216	58
D7Mit62	42	148	134	52
D7Mit101	60	114	92	59

* Temperatur während der Annealing-Phase der PCR

Für jeden Mikrosatelliten wird eine 4er Reihe von 0,2 ml Reaktionsgefäßen benötigt. Bitte die Reihe gut beschriften, damit sie nach der PCR wieder der Gruppe und dem unten aufgeführten Pipettierschema zugeordnet werden kann: Mit Gruppennummer, Nummer des Mikrosatelliten beschriften und das linke Gefäß markieren. Die Beschriftung ist am haltbarsten am Rand der Gefäße, weil in diesem Bereich die Gefäßwand nicht so stark erhitzt wird und damit nicht die Gefahr besteht, dass die Beschriftung verläuft. Eine weitere "sichere" Position sind die Nippel an den Gefäßdeckeln.

Beispiel:

Position	1	2	3	4
	Mikrosatellit D7Mit78			
	DNA X	DNA Y	B6 Kontrolle	BA Kontrolle

Anschließend wird für jeden Mikrosatelliten separat in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß je ein Reaktionsmix (Mastermix für fünf Reaktionen à 20 µl) nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

!!!Auf Reihenfolge achten und jeden Pipettierschritt kontrollieren, d.h. abhaken!!!!:

AUF EIS PIPETTIEREN UND PCR- REAGENZIIEN AUF EIS HALTEN

10 µl 10x PCR Puffer

59,5 µl H₂O (zweifach deionisiert)

8 µl dNTP Mix (Nukleotid-Mix, 2,5 mM von jedem dNTP)

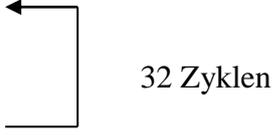
2 µl 10 µM Primer forward
2 µl 10 µM Primer reverse

jeweils spezifische Kombination pro Ansatz, z.B. D7Mit78 F und D7Mit78 R

2,5 µl *Taq* Polymerase (5U/µl)

- Kurz mischen (durch "Finger schnippen" am Reaktionsgefäß) und abzentrifugieren.
- 16 µl dieser Mixe werden entsprechend dem oben gezeigten Schema in die 0,2 ml Reaktionsgefäßen pipettiert.
- Zu diesen Ansätzen werden entsprechend dem Schema 4 µl der jeweiligen chromosomalen DNA (10 ng/µl) pipettiert
- Die 0,2 ml Reaktionsgefäße sorgfältig schließen und mischen.
- auf Eis stehen lassen bis alle Gruppen fertig sind.
- die 8er Streifen kurz zusammen mit den entsprechenden Reaktionen der anderen Gruppen abzentrifugieren, in die PCR-Maschine stellen und das bereits einprogrammierte Programm starten:¹

Programm:

5 min	95° C		
30 s	94° C		
30 s	Annealingphase		
30 s	72° C		
5 min	72° C		
12° C	unendlich		

Temperaturen während der Annealing-Phase der PCR:

52° C: D7Mit62

58° C: D7Mit78

59° C: D7Mit101

Zur Durchführung des kompletten Programms benötigt die Maschine ca. 2 h.

Gelelektrophoretische Analyse der PCR -Produkte:

- Für die Analyse der PCR-Produkte werden Agarose-Gele (2,5%) hergestellt durch Einwiegen von 3,75g normaler Agarose auf 150 ml 0,5 x TBE. **Beim Arbeiten mit TBE Handschuhe tragen !!!** Mehrfach in der Mikrowelle aufkochen, um die Agarose vollständig zu lösen (Achtung nicht überkochen lassen – öfter kontrollieren).

¹ die PCR-Programme gelten für die Applied Biosystems 2720-Maschinen

- Agarose bis ca. 60-65° C abkühlen lassen und in die Elektrophoresekammern gießen, Kämme einsetzen.
- Gel erstarren lassen
- Gelkammern mit 0,5 x TBE füllen, die Elektroden anschliessen und die Kämme vorsichtig und gleichmäßig herausziehen.
- In die Taschen je 10 µl der PCR Proben (die 20 µl PCR-Proben in den 0,2 ml Gefäßen wurden zuvor mit 4 µl Probenpuffer versetzt) mit Hilfe einer Pipette (20iger, gelbe Spitze) einzeln einfüllen
- Als Längenstandard 3 µl *MspI*-geschnittene pUC19 DNA (Marker 23, Fermentas) auf das Gel auftragen.
- Die Gele werden bei 200 V eine Stunde laufen gelassen, mit Handschuhen aus dem Tank genommen, ca. 20 min im Ethidiumbromid-Färbebad inkubiert unter UV Licht photographiert.

Schulversuch: Isolation von DNA aus Zwiebeln

(verändert nach https://www.chids.de/dachs/praktikumsprotokolle/PP0265dna_isolierung_gruppe10.pdf)

Aus einem Viertel einer Küchenzwiebel (*Allium cepa*) sollen Sie chromosomale DNA isolieren. Verwendet werden dabei Komponenten, die gewöhnlich in jedem Haushalt vorhanden sind.

Pro Präparation werden folgende Komponenten benötigt:

Extraktionspuffer:

5 g Kochsalz (NaCl)

5 ml Geschirrspülmittel

20 ml Ethanol

Wasserbad 60° C

Trichter

Kaffeefilter

Eiswasser

50ml Falcon-Röhrchen

Stabmixer

Spaghetti/Holzstab

Durchführung:

- ¼ einer Küchenzwiebel wird mit einem Stabmixer zerkleinert und in ein 50ml-Falcon-Röhrchen überführt. 40 ml Wasser und 5g Kochsalz werden hinzugegeben
- Zwiebelmus mit Wasser und Kochsalz sorgfältig mischen bis eine weitgehend homogene Lösung entsteht
- 5 ml handelsübliches Spülmittel („Lyselösung“) hinzugeben und sorgfältig mischen
- 15 min bei 60° C im Wasserbad inkubieren
- Falconröhrchen 10 min auf Eis stellen
- Suspension komplett durch einen Kaffeefilter in ein neues Falcon-Röhrchen filtrieren
- ca. 15 ml des Filtrats werden mit etwa gleichem Volumen an eisgekühltem Ethanol (ca. 20 ml) vorsichtig überschichten
- Fällung der DNA durch vorsichtiges Schwenken des Röhrchens
- Die DNA bildet einen fädigen großvolumigen Niederschlag

- Mit einem dünnen Holzstab oder einer Spaghetti wird die DNA aufgewickelt und zum Waschen der Holzstab/Spaghetti mit DNA in ein Falcon-Röhrchen mit 1 ml 70% Ethanol getaucht
- Nun kann die DNA in einer Petrischale zum Anschauen ausgebreitet werden

Optional: Bestimmung der Integrität und Quantität der DNA

- DNA-Faden in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführen, 10 min an der Luft bei RT trocken lassen
- DNA in 50 µl ddH₂O durch Auf- und Abpipettieren lösen

Die DNA wird photometrisch im NanoDrop-2000c (Thermo Scientific) gemessen und kann bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C gelagert werden.

Überprüfung der Integrität der DNA mittels Gelelektrophorese

- Je 1 µg DNA wird in zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße vorgelegt
- Zu einem Ansatz wird 1 µl RNaseA gegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert
- 5 µl Probenpuffer werden zu beiden Ansätzen pipettiert und kurz gemischt
- Für die Analyse der PCR-Produkte werden 1%ige Agarose-Gele hergestellt durch Einwiegen von 1,5g normaler Agarose auf 150 ml 0,5 x TBE. **Beim Arbeiten mit TBE Handschuhe tragen !!!** Mehrfach in der Mikrowelle aufkochen, um die Agarose vollständig zu lösen (Achtung nicht überkochen lassen – öfter kontrollieren). ODER: Agarose einmal in der Mikrowelle aufkochen und anschließend auf einem beheizten Rührer unter Rühren nochmals aufkochen und ca. 1-2 min "gut durchkochen".
- Agarose bis ca. 60-65° C abkühlen lassen und in die Elektrophoresekammern gießen, Kämme einsetzen.
- Wenn das Gel auspolymerisiert ist, Gelkammern mit 0,5 x TBE füllen und die Kämme vorsichtig und gleichmäßig herausziehen.
- In die Taschen werden die kompletten Ansätze pipettiert
- Als Längenstandard 2 µl 1kb-Leiter (Solis BioDyne) auf das Gel auftragen.
- Die Gele werden bei 150 V laufen gelassen bis sich die Blaufront ca. 1 cm oberhalb des unteren Gelrandes befindet, mit Handschuhen aus dem Tank genommen, ca. 20 min im Ethidiumbromid-Färbegrad inkubiert und unter UV Licht photographiert.

Anhang:

Puffer und Lösungen:

LB-Medium:

1% NaCl
1% Trypton
0,5% Hefeextrakt
pH 7,5

LB-Festmedium: 1,5% Agar vor dem Autoklavieren zugeben

SOC-Medium:

2% Trypton
0,5% Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl

Nach dem Autoklavieren zugeben:

10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glucose

1x PCR-Puffer

75 mM Tris-HCl, pH8,85
20 mM (NH₄)₂SO₄
2,0 mM MgCl₂
0,1% Tween 20

1 x TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

Probenpuffer:

40% Saccharose
0,05% Bromphenolblau
0,05% Xylencyanol

5 x TBE-Puffer

445 mM Tris
445 mM Borsäure
10 mM EDTA

1 x Puffer BD (Solis Bio Dyne)

80 mM Tris-HCl
20 mM (NH₄)₂SO₄

10xPuffer 2 (NEB) für *NheI/EcoRI*-Verdau

500 mM NaCl
100 mM Tris-HCl
100 mM MgCl₂
10 mM DTT
pH 7.9@25°C

Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Glasmilch (SiO₂:MilliQ 1:1)

Puffer QG

5,5 M Guanidinthiocyanat (GuSCN)
20 mM Tris-HCl
pH 6,6

Puffer PE

2 mM Tris-HCl, pH 7,5
80% Ethanol (finale Konzentration)

PCR-Primer

D7Mit78

Primer 1: ATGACACCCAAGGGCTAGC
Primer 2: ATAAAGCCCAGCATGCTTTG

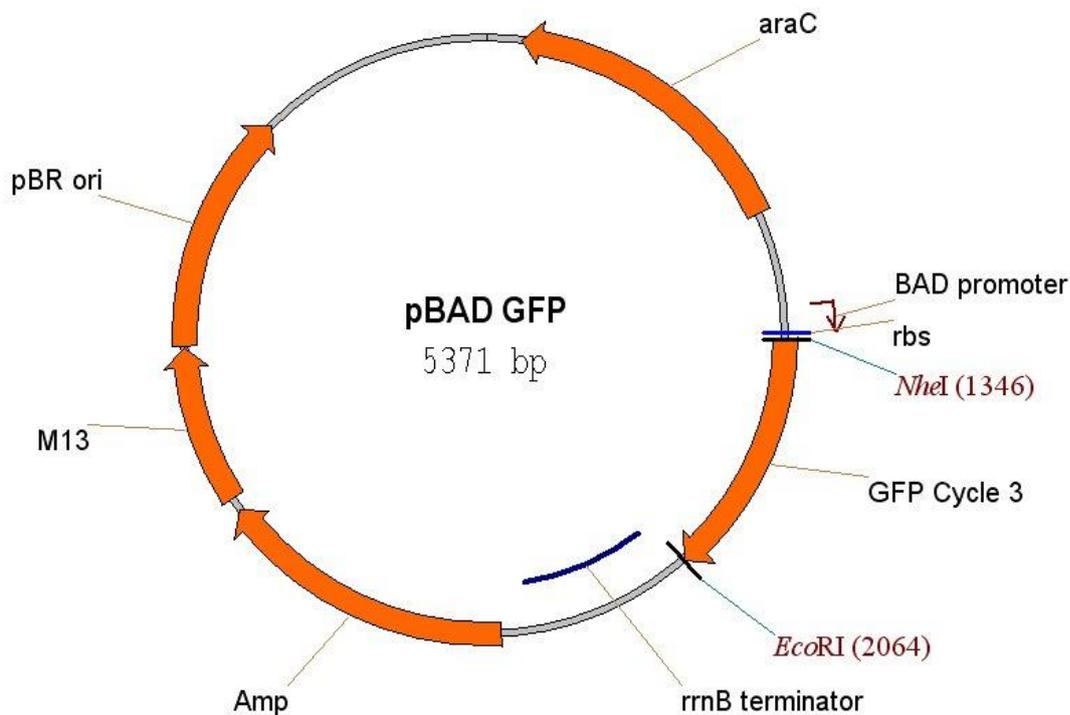
D7Mit101

Primer 1: CTG AGC CTG GCA TTT ACA GTG TGA
Primer 2: GAC CAA ATC CCA ACA TGG ATG TG

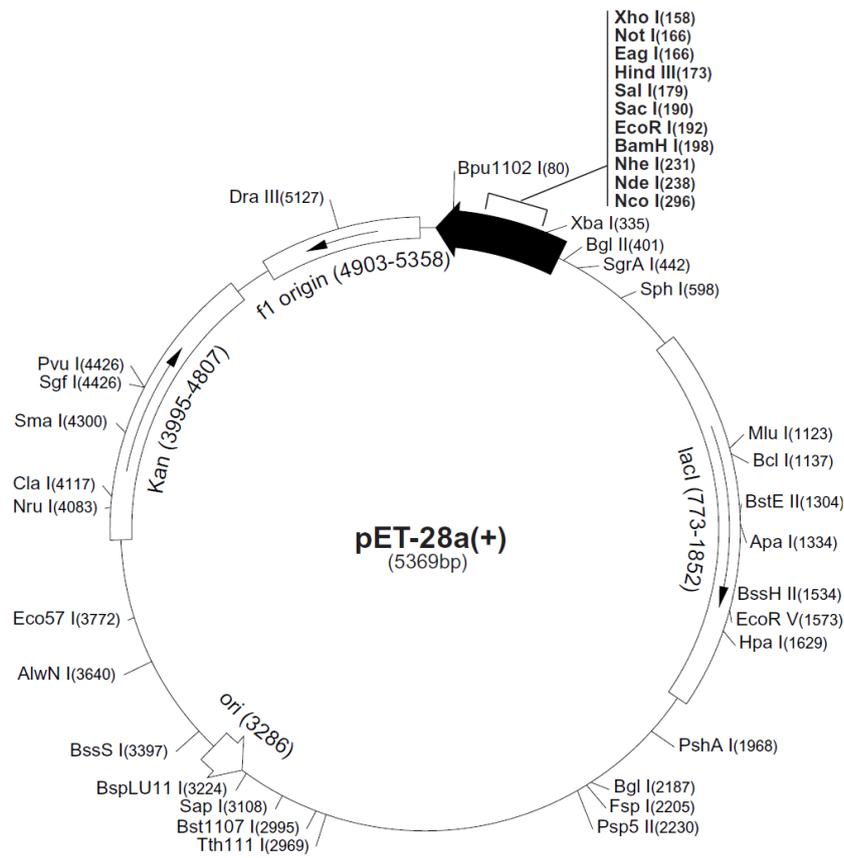
D7Mit62

Primer 1: TAGGATGACCTCTATATGTCTGCC
Primer 2: CACTGTATGCAAAATTCTCAAAGA

Plasmidkarten:

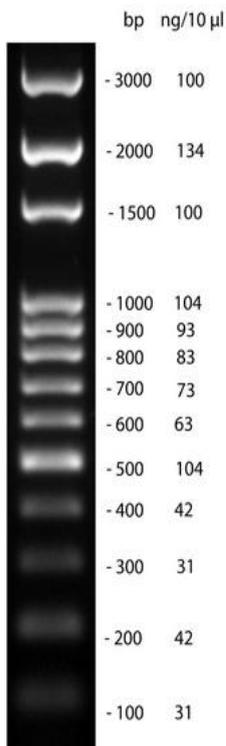


Schematische Darstellung des pBAD-Plasmids mit einkloniertem GFP Cycle 3, einer mutierten, stärker leuchtenden Form des GFP. Ampicillin-Resistenzgen (Amp) und Arabinose-Repressor-Gen (araC) sind ebenfalls eingezeichnet. *NheI* und *EcoRI* schneiden das 718 bp große GFP-Fragment aus. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Restriktionsenzyme dient der gerichteten Klonierung des GFP.

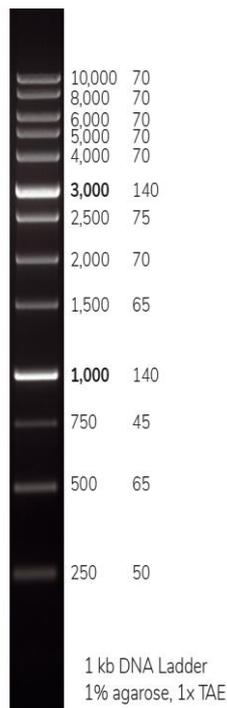


Größenstandards für Agarosegele:

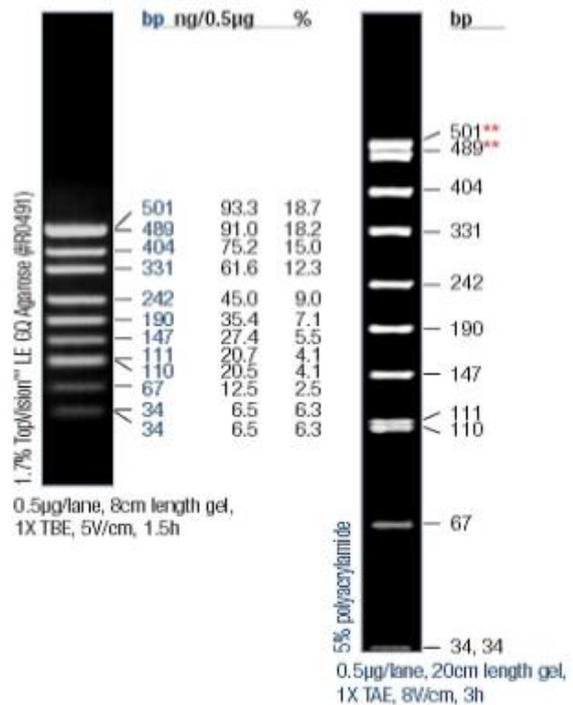
100 bp-DNA-Leiter



1 kb-DNA-Leiter



PUC19-Plasmid mit *MspI* verdaut



Melaninbiosynthese

Der Farbstoff von Haut und Haaren, ist das Melanin. Melanin wird von Melanocyten synthetisiert. In Haut und Haarfollikeln bilden die Melanocyten zahlreiche Zellfortsätze (= Dendriten) aus, über die sie das Melanin zu den Keratinocyten transportieren und diese damit versorgen (Abb. 1). Der Faktor, der die Haut- und Haarfarbe bestimmt, ist die Aktivität der Melanocyten, d.h. die Qualität und Quantität des gebildeten Farbstoffs Melanin. Innerhalb der Melanocyten erfolgt die Biosynthese und Speicherung von Melanin in spezialisierten Organellen, den Melanosomen, die Lysosomen (saurer pH, einige saure Hydrolasen u.a.) ähneln.

Es werden 2 Arten von Melanin synthetisiert. In den sog. Eumelanosomen wird das schwarzbraune

Eumelanin gebildet, in den sog. Phäomelanosomen das gelb-rote Phäomelanin.

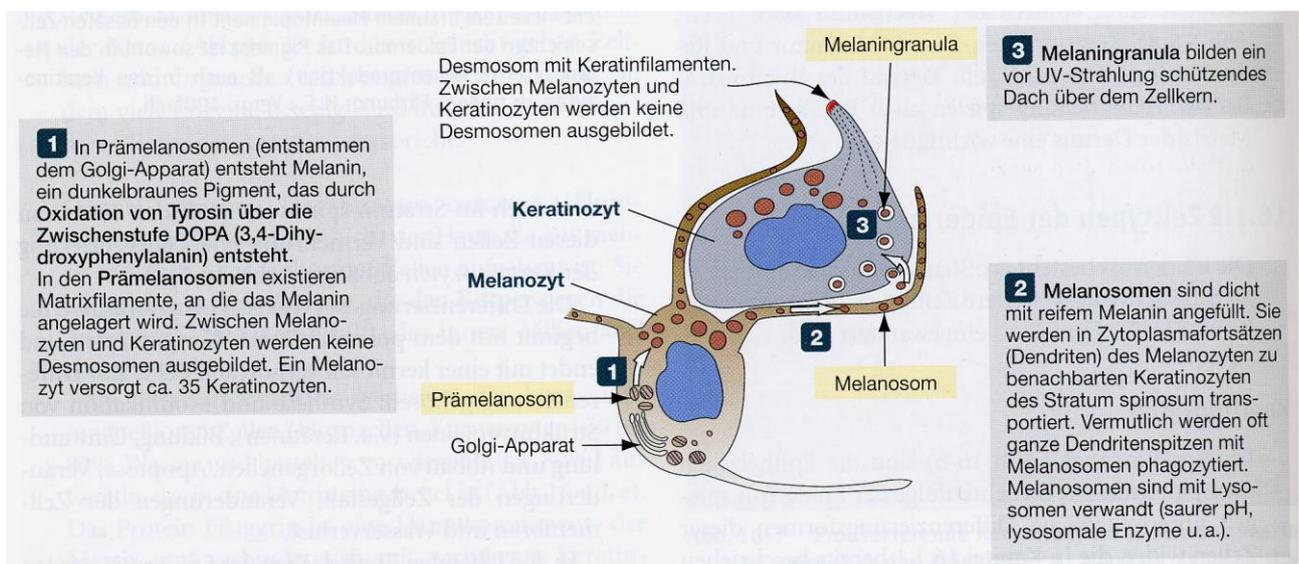


Abb. 1: Melaninsynthese und Transport der Melaningranula von Melanocyten zu Keratinocyten. [Aus Welsch, Lehrbuch Histologie, 2.Auflage]

Molekulargenetik der Fellfarbe

Die Fellfarbe der Maus unterliegt einer komplexen genetischen Regulation. Ca. 80 Gene sind identifiziert worden, die sich auf die Fellfarbe auswirken.

Im Praktikum sollen drei dieser Loci untersucht werden:

C- (colour) oder Albino-Locus

B- oder Brown-Locus

A- oder Agouti-Locus

Die Biosynthese von Eumelanin und Phäomelanin erfolgt über mehrere enzymatisch katalysierte Reaktionen (Abb. 2). Die Schritte, an denen die im Praktikum untersuchten Loci beteiligt sind, sind in Abbildung 2 dargestellt.

Albino-Locus / Synonym: Color-Locus (C-Locus): Chromosom 7

C/c verhält sich epistatisch gegenüber A/a und B/b; Epistasie bedeutet, dass ein Gen die Wirkung eines anderen Gens modifiziert oder maskiert, so wie es hier der Fall ist.

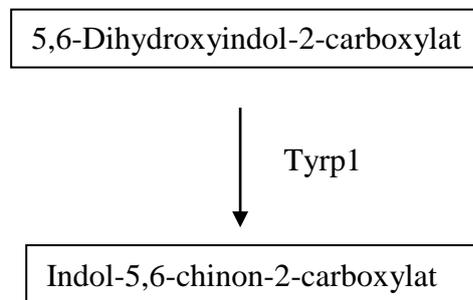
Dominantes Allel C: Genprodukt ist die Tyrosinase TYR, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Melanin-Biosynthese (siehe Abb. 2). Homo- und heterozygot führt C dazu, dass A und B zur Ausprägung kommen, d.h. eine Pigmentierung vermag sich überhaupt auszubilden.

Rezessives albino-Allel c: Genprodukt ist eine funktionslose TYR auf Grund einer loss-of-function-Mutation. Da TYR die Anfangsreaktionen sowohl der Eumelanin- als auch der Phäomelanin-Biosynthese katalysiert, kann bei einem TYR-Gen-Defekt keines der Farbpigmente gebildet werden, ungeachtet der Allel-Konstellation am A- oder B-Locus.

Homozygote Mäuse zeigen einen TYR-negativen oculocutaner Albinismus, d.h. helle Haut, weiße Haare, unpigmentierte Iris und Retina, was die Augen, bedingt durch die Blutgefäße der Retina (Häm), rot erscheinen lässt.

Brown-Locus (B-Locus): Chromosom 4

Dominantes Allel B: Genprodukt ist das tyrosinase-related protein 1 TYRP1=5,6-Dihydroxyindol-2-carboxylat-Oxidase (DHICA-Oxidase). Katalysierte Reaktion:



Man nimmt an, dass weitere Funktionen darin bestehen, mit der Tyrosinase in Wechselwirkung zu treten, wodurch deren enzymatische Aktivität stabilisiert wird, und die Melanosomenstruktur aufrecht zu erhalten. Es kommt homo- und heterozygot zur Schwarzfärbung der Haare.

Rezessives brown-Allel b: Genprodukt ist ein funktionsloses TYRP1. Homozygot kommt es zur Auflockerung des Eumelanins, was dazu führt, dass dieses nicht mehr schwarz, sondern braun erscheint.

Agouti-Locus (A-Locus): Chromosom 2

Dominantes Agouti-Allel A: Genprodukt ist das 131 Aminosäure-lange agouti signaling protein ASIP, das in den Haarfollikeln während des Haarwachstums temporär wirkt. ASIP inhibiert die Eumelanin-Synthese und bewirkt ein Umschalten auf Phäomelanin-Synthese. Da dieses Gen nur zeitweise aktiv ist, zeigen die Haare eine gelbe Bandierung oder gelbe Haarspitzen.

rezessives nonagouti-Allel a: Genprodukt ist ein funktionsloses ASIP auf Grund einer loss-of-function-Mutation. Homozygot gibt es keine gelbe Bänderung der Haare.

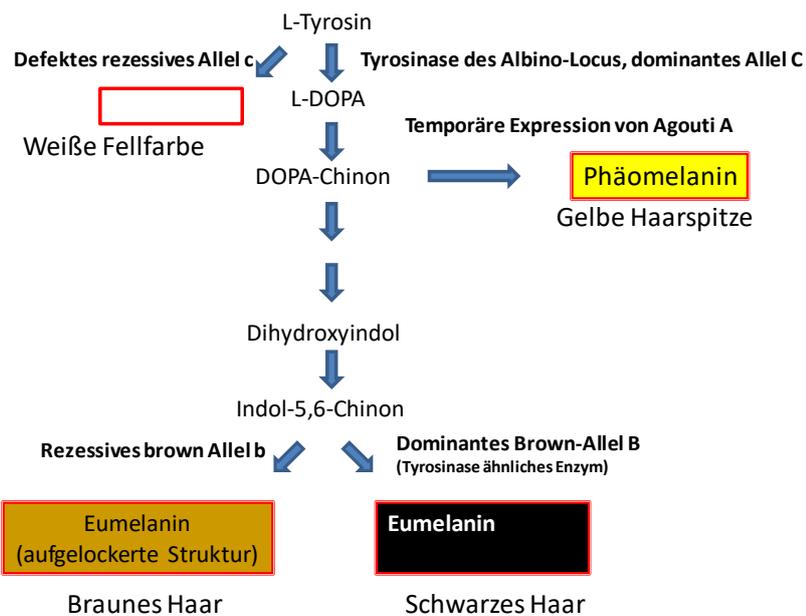


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Fellfarbbiosynthesewege
 Es sind nur die für das Praktikum wesentlichen Schritte dargestellt

Die Beschreibung der Melanin-Synthese und Fellfarbgenetik wurde von René Tinschert und Arzu Cebi als Einleitung ihres Praktikumsprotokolls im WS 2008/2009 verfasst und für das Skript von den Betreuern in gekürzter und leicht modifizierter Form übernommen.

Erläuterungen zum Protokoll

Zu den Versuchen verfasst jede Praktikumsgruppe ein Protokoll. Für das Protokoll empfiehlt sich die folgende Gliederung:

Teil I - Klonierung und Expression des GFP-Gens

1. Einleitung (halbe Seite bis drei Seiten)

In diesem Abschnitt wird der theoretische Hintergrund des Versuchs beschrieben. Die Einleitung soll zeigen, dass Sie den theoretischen Hintergrund der beschriebenen Projekte verstanden haben und in der Lage sind, diesen eigenständig zu beschreiben. Dieser Abschnitt lässt relativ viel inhaltliche Freiheit. Hier kann man beispielsweise etwas über die Technik der Klonierung (wie funktioniert die Technik und wo wird sie in der Praxis angewendet) und zur Herkunft und Funktion des GFP schreiben. Am Ende der Einleitung sollte kurz (2 Sätze) die Aufgabenstellung beschrieben werden.

2. Material und Methoden

Der Material und Methoden-Teil enthält technische Details zu den angewendeten Methoden in einer Form, die es erlaubt, die Methoden auch im Rahmen eines völlig anderen Projekts zur Anwendung kommen zu lassen. Außerdem sollten die Angaben zu den Methoden es einem externen Labor erlauben, die im Protokoll beschriebenen experimentellen Ergebnisse zu reproduzieren.

a) Material

Liste aller verwendeten Chemikalien und Puffer mit ihrer Zusammensetzung (s. Anhang des Skripts) – keine Volumina und keine allgemeine Laborausstattung

b) Methoden

In diesem Abschnitt werden alle in Teil 1 genutzten Methoden beschrieben. Dies beinhaltet die Durchführung der Methoden mit Details, wie z.B. verwendete Mengen von Enzymen, DNA etc., Inkubationstemperaturen und -zeiten. Das Erklären der physikalischen und chemischen Prinzipien der jeweiligen Methoden ist nicht nötig. Einige Versuche können hier zusammengefasst werden (z.B. die verschiedenen Restriktionen). Die Beschreibung soll allgemein gehalten werden (wie ein Kochrezept). Methodenbeschreibungen werden daher im Allgemeinen in der Gegenwartsform geschrieben. Da es sich in Publikationen oder dem Praktikumsbericht aber um konkrete und evtl. verändert durchgeführte Experimente handelt, sollte dieser Teil im Präteritum geschrieben werden.

Erläuterungen wie beispielsweise die Expression des GFP unter bestimmten Umweltbedingungen (unter Präsenz von Arabinose) gehören in den Ergebnisteil. Im

Methodenteil wird ausschließlich die Methode selbst, in diesem Fall das Ausplattieren der transformierten *E.coli* auf Arabinose-haltigen Nährböden, beschrieben.

3. Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Versuche dargestellt. Gleichzeitig werden die Teilschritte des Projekts kurz erläutert und begründet. Der Ergebnisteil sollte den logischen Aufbau des Projekts verständlich machen. Hier werden Details wie z.B. die Verwendung von bestimmten Restriktionsenzymen etc. erklärt. Die Ergebnisse werden in Form von Abbildungen (Gelbilder, Diagrammen, Tabellen) dargestellt und im Text erläutert. Bitte bei den Abbildungen auf eine ausreichende Beschriftung achten. Dieser Abschnitt wird in der Vergangenheitsform abgefasst.

4. Diskussion

In diesem Abschnitt werden die erzielten Ergebnisse interpretiert und diskutiert. Hier wird beispielsweise erläutert, ob es tatsächlich gelang das GFP zu klonieren und zu exprimieren und wo bei fehlgeschlagenen Versuchen mögliche Fehlerquellen liegen.

Die Abschnitte 3 und 4 (Ergebnisse und Diskussion) können auch zusammengefasst werden. Bei fehlgeschlagenen Versuchen kann dann beispielsweise direkt auf einen möglicherweise abgewandelten Ablauf der anschließenden Teilschritte verwiesen werden.

Teil II – Genotypisierung Krebs-relevanter Mutationen

Dieser Protokollteil wird ähnlich strukturiert wie Teil I.

Die Gestaltung der Einleitung gibt großen inhaltlichen Spielraum. Hier kann man beispielsweise etwas über die Inzidenz und Entwicklung von Darmkrebs, intra-zelluläre Signalkaskaden und die Wichtigkeit der Genotypisierung von *KRAS* für die Therapieentscheidung schreiben oder auf die Sensitivitätsproblematik bei der Diagnostik eingehen.

Bei der Diskussion der erzielten Ergebnisse soll auch die tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aller Studierenden berücksichtigt werden. Hier sollte auf die Häufigkeit und Allelspezifität von beobachteten Mutationsereignissen eingegangen werden. Was bedeuten die erzielten Ergebnisse für die Therapie ? Welche Vor- und Nachteile birgt die verwendete Methode ? Welche Alternativen kämen für eine sensitivere Detektion in Frage und welche Vorteile bietet dies für die Therapie und Prognose der Erkrankung ? Diskutieren Sie kritisch !

Teil III - Molekulargenetische Techniken der Genkartierung

Dieser Protokollteil wird ähnlich strukturiert wie Teil I und II.

Die Gestaltung der Einleitung gibt großen inhaltlichen Spielraum. Hier kann man beispielsweise etwas über die Anwendungsmöglichkeiten von Mikrosatelliten-Analysen oder die Genotypisierung von genetischen Polymorphismen schreiben oder auf die Genetik und Biochemie von Haar- und Hautpigmentierung eingehen.

Bei der Diskussion der erzielten Ergebnisse soll auch die tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aller Gruppen berücksichtigt werden. Hier sollte auf die Häufigkeit von beobachteten Rekombinationsereignissen eingegangen werden. Besteht beispielsweise ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Rekombinationsereignissen und der physikalischen Länge der betrachteten Chromosomensegmente? Bei wie vielen Mäusen konnte die Fellfarbe vorhergesagt werden? Bei wie vielen der Partner (das väterliche Tier) bei der Kreuzung der F1-Tiere? Diskutieren Sie kritisch die statistischen Probleme solcher Analysen.

Der Umgang mit Zitaten

Bitte achten Sie darauf, wörtliche oder nur leicht abgewandelte Zitate zu vermeiden. Wenn dennoch wörtliche Zitate verwendet werden, werden diese bitte in Anführungszeichen gesetzt und mit der betreffenden Quelle versehen. Damit gar nicht erst der Verdacht des geistigen Plagiatismus entsteht, sollte eine Abänderung von Textstellen, die sich auf eine Veränderung des Satzbaus beschränkt, unter allen Umständen vermieden werden. Wenn Abbildungen aus dem Skript oder anderen Quellen verwendet werden, bitte die Quelle angeben.

Beispiel - wörtliches Zitat:

"In den meisten Organismen, von Bakterien bis hin zum Menschen, findet man DNA-Methyltransferasen (MTasen)" (Praktikumsskript)

Zitate, die sich auf inhaltliche Aussagen beziehen: Für den Leser von wissenschaftlichen Publikationen, Bachelorarbeiten etc. ist es oft wichtig, die Quelle von Informationen zu kennen. Gleichzeitig ist der Verfasser eines Schriftstücks daran interessiert, seine Aussagen zu belegen oder durch Befunde aus der Literatur zu untermauern. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn er auf der Grundlage fremder Beobachtungen biologische Modelle oder Hypothesen entwirft. Es ist daher wichtig, dass auch in solchen Fällen Literaturstellen angegeben werden. Vorzugsweise werden dazu der Name des Autors und das Erscheinungsjahr in Klammern hinter das Zitat gesetzt. Bei zwei Autoren werden beide Autoren namentlich erwähnt. Bei mehreren Autoren wird die lateinische Abkürzung "*et al.*"

eingesetzt (steht für das lateinische *et alia* - und andere). Bei Quellen mit unbekanntem Autor kann auch der Titel der Publikation verwendet werden.

Beispiel - inhaltliches Zitat (Angabe der Literaturquelle).

Von der Methyltransferase M. BssHII, gibt es zwei Isoformen (Sethmann *et al.* 1999)

Genauere Angaben, die dem Leser ermöglichen die Quelle zu finden und zu lesen, führt man in einer Fußnote (im naturwissenschaftlichen Bereich eher unüblich) oder in einer Literaturliste am Ende des Protokolls auf. Hier sollten die folgenden Details aufgelistet werden: alle Autoren, der Titel und das Jahr der zitierten Publikation; bei Büchern: der Herausgeber und Verlag, bei Artikeln aus Zeitschriften: Name der Zeitschrift und Nummer der Ausgabe und Seite des Artikels. Bei Internet-Publikationen sollte die Internetadresse aufgeführt werden.

Beispiel - Literaturliste:

Sethmann S, Ceglowski P, Willert J, Iwanicka-Nowicka R, Trautner TA, Walter J. 1999. [M.\(phi\)BssHII, a novel cytosine-C5-DNA-methyltransferase with target-recognizing domains at separated locations of the enzyme.](#) EMBO J. 18:3502-3508.

Praktikumsskript zum Praktikum für Lehramtsstudenten, Sommersemester 2020, Fak.NT Genetik/Epigenetik, Universität des Saarlandes. (Internetadresse: http://epigenetik.uni-saarland.de/de/teaching/Praktikum_fuer_Lehramtsstudierende_und_Studierende_aus_Stra_burg/).

Air-displacement / Forward mode

In general, the precision of the forward mode relies on precise draining by air pressure (air-displacement pipettes) or internal wiping of the pipette barrel (positive-displacement pipettes).

1 Preparation
Hold the instrument in a nearly vertical position. Depress the plunger smoothly to the first stop position.

rest position
first stop
second stop or plunger

2 Aspiration
Immerse the pipette tip in the liquid*. Allow the plunger to move up smoothly to the rest position. Wait one second so that all the liquid has time to move up into the tip.

3 Distribution
Place the pipette tip at an angle (10 to 45°) against the inside wall of the receiving vessel. Depress the plunger smoothly to the first stop position.

4 Purge
Wait one second, then depress the plunger to the second stop position. This "blow-out" stroke removes any remaining sample from the tip. Remove pipette tip end from sidewall by sliding it up the wall.

5 Home
Allow the plunger to move up to the rest position.

* The immersion depth of your tip can have a significant effect on your results. If the tip is immersed too deeply, droplets will form on the outside of the tip and they will be deposited along with your sample. If the tip is not immersed deeply enough, vortexing will occur and your pipette will not aspirate the selected volume.

volume μl	immersion depth mm
0.1 - 1	1
1 - 100	2-3
101 - 1000	2-4
1001 μl - 10 ml	3-6

Pipetman P20

MIN.	INT.	MAX.
0	1	2
2	2	0
0	5	0
2 μl 12.5 μl 20 μl		

Pipetman P200

MIN.	INT.	MAX.
0	1	2
5	2	0
0	5	0
50 μl 125 μl 200 μl		

Pipetman P1000

MIN.	INT.	MAX.
0	0	1
2	7	0
0	5	0
200 μl 750 μl 1000 μl		

Fitting a disposable tip on Pipetman

Press down with rotation motion

Avoid stabbing the tip as though the pipette were a knife