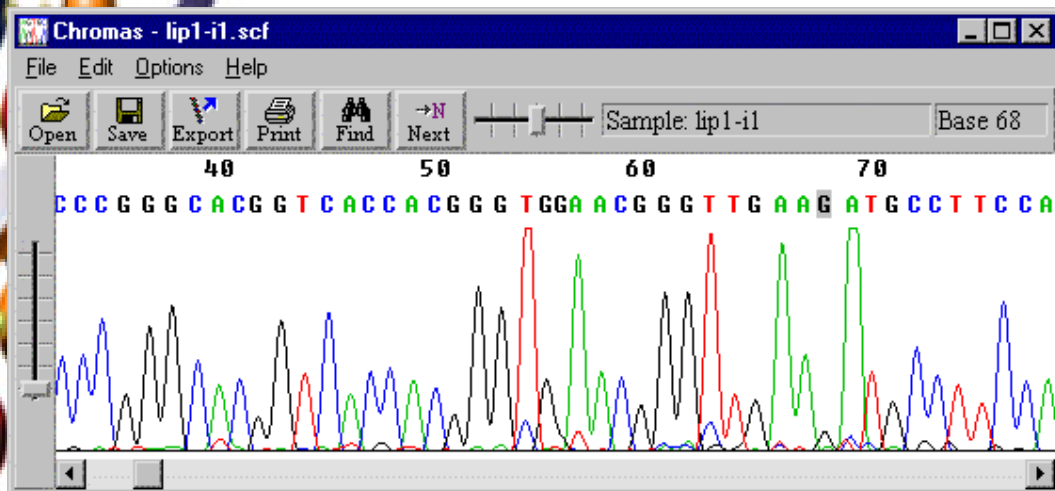


Technische Universität Dresden
Institut für Genetik



Blockpraktikum G5:

DNA-Sequenzierung

21.01.2008 – 01.02.2008

Wintersemester 2007/2008

Prof. Dr. G. Rödel

Mitarbeiter: Dr. U. Krause-Buchholz, R. Linke,
Dr. K. Ostermann, A. Tauche

Versuch	Montag, 21.01.	Dienstag, 22.01.	Mittwoch, 23.01.	Donnerstag, 24.01.	Freitag, 25.01.
Amplifikation und Klonierung und der hoch variablen Region (HVR2) im D-loop der humanen mt DNA	DNA-Isolierung aus Speichel, je 4 PCR-Ansätze, präparatives Mini-Gel, Aufreinigung PCR Produkt	Verdau von pUC18 Vektor und PCR <i>EcoRI/ HindIII</i>	Aufreinigung Verdau aus dem Gel, Ligation und Transformation in <i>E. coli</i> ,	Picken der Klone, Animpfen 5 ml LB ^{amp}	Plasmid-Mini-Präparation, Kontrollverdau und Kontrollgel
Cycle-Sequencing-PCR / Sequenzierung	Gel gießen, PCR-Proben, HVR forward Primer	Probenauftrag	Auswertung, Gel gießen, PCR-Proben, HVR reverse Primer	Auswertung	Auswertung

(Die Theorie zum Praktikum wird während des Kurses in kurzen Vorträgen vermittelt! Die Arbeiten an den Computerarbeitsplätzen erfolgen in Absprache mit den Betreuern.)

Jede Gruppe hält in der zweiten Praktikumswoche einen Seminarvortrag zu ausgewählten Themen!

Versuch	Montag, 28.01.	Dienstag, 29.01.	Mittwoch, 30.01.	Donnerstag, 31.01.	Freitag, 01.02.
Klonierung und Sequenzierung einer hoch variablen Region (HVR2) im D-loop der humanen mt DNA	Plasmid-Sequenzierungen, Auswertungen, Alignments	Plasmid-Sequenzierungen, Auswertungen, Alignments	Plasmid-Sequenzierungen, Auswertungen, Alignments	Auswertungen, Alignments	Vorstellung der Ergebnisse (theoretischer Hintergrund, Literatur, eigene Ergebnisse) Leistungskontrolle

Blockpraktikum G5 „DNA-Sequenzierung“ WS 2007/2008

vom 21.01.2008 bis zum 01.02.2008

Prof. Dr. G. Rödel

Mitarbeiter: Dr. U. Krause-Buchholz, R. Linke, Dr. K. Ostermann, A. Tauche

Inhaltsverzeichnis

Arbeitsschutzregeln	2
Versuch 1: Sequenzierung und Klonierung einer hoch variablen Region (HVR2) im D-loop der humanen mitochondrialen DNA	4
Versuch 2: Datenbanken und Sequenzanalysen	9
Anhang: Protokolle für die Experimente	11
Präparation von DNA aus Mundschleimhautzellen im Speichel	11
PCR zur Amplifikation des mitochondrialen D-Loop	12
Agarose-Mini-Gelelektrophorese	13
Restriktion des Plasmides und des PCR-Produktes	14
Ligation von Fragment und Plasmid	14
Elektroporation von <i>E. coli</i>	15
Aufreinigung von DNA-Fragmenten	18
Aufreinigung von PCR-Produkten (Promega Wizard™-Kit)	16
DNA Präparation aus <i>E. coli</i> mit dem JETQUICK™-Kit Macherey	18
Sequenzierungen	19
Herstellung des Polyacrylamid-Gels	19
Sequenzierreaktion	20
Automatische Sequenzierung mit dem LI-COR 4000 System	21
Plasmidkarte des Vektors pUC18/19	15

Arbeitsschutzregeln

- 1.) Die im Praktikum verwendeten Mikroorganismen sind potentiell pathogen, daher sind alle Versuche mit entsprechender Vorsicht durchzuführen.
- 2.) Das Tragen eines kochfesten Labormantels ist Pflicht. Bis zum Abschluß des Praktikums verbleiben die Labormäntel an den vorgesehenen Ablagestellen im Kursraum.
- 3.) Im Praktikumsraum ist es verboten, zu essen, zu trinken, zu rauchen oder sich zu schminken.
- 4.) Vor Verlassen des Raumes sind die Hände gründlich zu waschen, ggf. nach Desinfektion.
- 5.) Mikroorganismen sind in verschlossenen Gefäßen zu halten. Impfösen sind nach jeder Benutzung auszuglühen.
- 6.) Mikroorganismen dürfen weder den Arbeitsplatz noch die Kleidung kontaminieren. Verschüttetes Material ist mit in Desinfektionsmittel getränktem Zellstoff abzudecken. Kontaminierte Flächen sind mit Desinfektionsmittel zu reinigen.
- 7.) Zum Pipettieren von mikroorganismenhaltigen Flüssigkeiten sind Pipettierhilfen zu verwenden. Benutzte Pipetten sind in den dafür vorgesehenen Gefäßen abzulegen.

Verletzungen und sonstige Zwischenfälle sind unmittelbar dem Praktikumsleiter oder dessen Stellvertreter zu melden.

Versuch 1: Sequenzierung und Klonierung einer hoch variablen Region (HVR2) im D-loop der humanen mitochondrialen DNA

1.1 Die mitochondriale DNA in der Forensik

Die Untersuchung der extrachromosomalen DNA hat im Laufe der letzten Jahre zunehmende forensische Relevanz erlangt. Die mtDNA-Analyse ist mit Abstand das sensitivste Verfahren in der forensischen DNA-Analytik und kommt in schwierigsten Identifikationsfällen zum Einsatz, z.B. für die Analyse von exhumierten Leichenmaterial, mumifizierten oder skelettierten Körpern.

Von besonderer Bedeutung ist der uniparentale Erbgang von mtDNA, die ausschließlich in maternaler Linie vererbt wird. Es lassen sich damit auch entfernte Verwandte in mütterlicher Linie zur Feststellung der Identität eines unbekanntes Toten heranziehen.

MtDNA ist forensisch aus folgenden Gründen wertvoll:

1. hohe Kopienanzahl der DNA pro Zelle
2. mütterliche Vererbung (wahrscheinlich keine Rekombinationen in Meiose)
3. hoch-polymorpher Charakter
4. 1981 vollständig sequenziert
5. ein Individuum hat gewöhnlich (es gibt Ausnahmen) eine einheitliche mt-DNA-Population

(Infolge dessen ist die mtDNA zwischen Mutter und Kind und zwischen Geschwistern identisch.)

Wenn nur noch geringe Mengen von Kern-DNA vorhanden ist oder die Kern-DNA so weit degradiert ist, dass die Kern-DNA-Typisierung erfolglos ist, kann die mtDNA Analyse noch erfolgreich durchgeführt werden (Lutz et al., 1996). Die Analyse der mtDNA ist meist sinnvoll, wenn die extrahierte DNA sehr degradiert oder in der Menge von unter 1 ng vorliegt (Brinkmann et al., 1997). Die Sequenzanalyse der mtDNA wird in zunehmendem Maße eine populäre Methode bei der Identifikation der sterblichen Überreste von Menschen. Aufgrund dessen, dass ein Individuum gewöhnlich identisch in Bezug auf sein mtDNA-Genom ist, sind die gewonnenen Sequenzen aus verschiedenen Körperteilen einer Person ebenfalls gleich (Wilson et al., 1995).

Ein Problem bei der Nutzung der mtDNA für forensische Zwecke ist die potentielle Heterogenität innerhalb eines Individuums (*Heteroplasmie*). Es wurde jedoch ein hoher Grad der Sequenzhomogenität in somatischen Zellen bewiesen. Heteroplasmie (die Mischung der Mutante und des ursprünglichen Typs der mtDNA in derselben Zelle) konnte bei Menschen festgestellt werden, die bestimmte neuromuskulären Krankheiten haben, wobei sich die Heterogenität nicht in der nicht-kodierenden Region beobachten lässt (Piercy et al., 1993).

1.2 D-Loop - Region und Polymorphismus der mtDNA

Obwohl im Prinzip doppelsträngig, hat die mtDNA doch in einem kleinen Teil eine Dreifachstrangstruktur. An dieser Stelle befindet sich ein zusätzlich synthetisierter Abschnitt, ein kurzes Stück vom H-Strang der mtDNA, die 7S-DNA (D-Loop-Displacement). Der einzige nichtkodierende mtDNA-Bereich ist der D-Loop (Displacement).

D-Loop-Region umfasst 1122 Bp und ist zwischen den tRNA-Genen für Prolin und Phenylalanin lokalisiert. Der D-Loop nimmt einen besonderen Platz bei der Replikation der mtDNA ein:

Die Replikation startet beim H-Strang im D-Loop, wobei der L-Strang als Matrize dient. Erst wenn zwei Drittel des H-Tochterstrangs synthetisiert sind, wird der Startpunkt für die L-Strang-Synthese zugänglich. Dann wird der L-Strang mit dem H-Strang als Matrize in Gegenrichtung repliziert.

Der nicht-kodierende D-Loop ist der polymorphste Teil der mtDNA und kann genutzt werden, um unverwandte Individuen zu unterscheiden (Holland, 1994). Die D-Loop-Region menschlicher mt-DNA hat eine relativ hohe evolutionäre Rate (Kurosaki et al., 1993).

Die größte Sequenzvariabilität ist in zwei je ca. 400 Bp langen hypervariablen Segmenten (HV1 bzw. HV2) des D-Loops vorhanden (Stoneking et al., 1991). Die Mehrheit der Polymorphismen liegt zwischen den Positionen 16024 und 16365 des HV1 Segments (Abb.1, Segment A) (26 %) und zwischen den Positionen 73 und 340 des HV2 Segments (Abb. 1, Segment B) (24 %) (Holland et al., 1994).

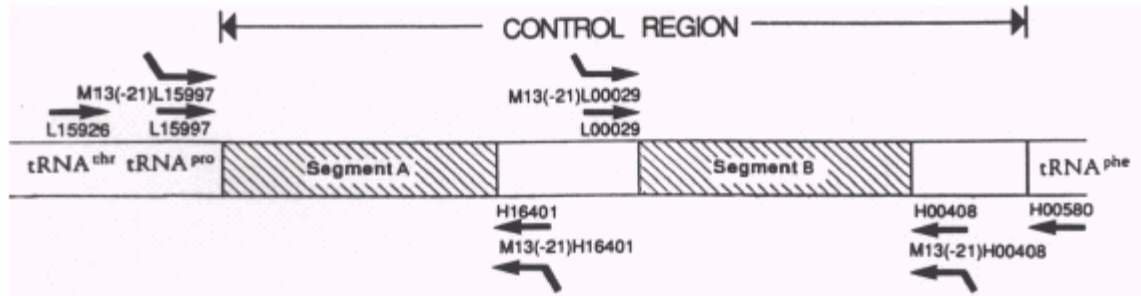


Abb.1 Schematische Darstellung der D-loop Region der mitochondrialen DNA

(Einzelheiten siehe Text!)

HV1 ist am variablesten im D-Loop aller tierischen mt-DNA-s (Savolainen et al., 1997). Die Mutationsrate der D-Loop-Region ist vermutlich 1 Polymorphismus jede 200 – 400 Generationen. Unpublizierte Daten suggerieren höhere Mutationsraten. Der Polymorphismus wurde zwischen Individuen beobachtet, welche nur 18 Generationen getrennt waren (Holland et al., 1994).

Die Rate der Sequenzdifferenz der HV1-Region bei Menschen wird auf höchstens 33 % per eine Million Jahre geschätzt. HV1 und HV2 zeigen ein ungewöhnliches Muster der Evolution, welches eine extensive Bildung von Insertionen, Deletionen und Erzeugung der kurzen Repeats enthält (Savolainen et al., 1997). Für die Mehrheit der polymorphen Stellen trifft nur ein Mutationstyp zu. Nur in 14 von 202 Positionen (7%) wurden zwei oder mehr unterschiedliche Mutationstypen beobachtet.

Unter den Transitionen, sind die Pyrimidin-Substitutionen überwiegend, C–T Transitionen kommen ebenfalls oft vor. Unter den Transversionen wurde keine eindeutige Präferenz beobachtet. Die Längenvariationen (Deletionen, Insertionen) kommen nur selten und gewöhnlich nur in sehr begrenzter Größe im D-Loop der mtDNA vor.

Insgesamt finden sich über 120 polymorphe Substitutionsstellen im D-Loop-Bereich (Anderson et al., 1981; Stoneking et al., 1991).

1.3 Mutationen der mtDNA

Die mt DNA weist eine sehr hohe Mutationsrate auf, die mit folgenden Umständen erklärt werden können:

- Der hohe Fluss von Sauerstoffradikalen in der Atmungskette könnte zu erheblichen oxidativen Schäden in der mtDNA führen, die nicht durch Histone geschützt ist.

- Die mtDNA durchläuft wesentlich mehr Replikationszyklen als die chromosomale DNA, die meisten Mutationen entstehen während der DNA-Replikation.

- Die Replikation der mtDNA verläuft relativ langsam und hochgradig asymmetrisch. Die Replikationsursprünge für den H- und den L-Strang liegen in verschiedenen DNA-Abschnitten. Während der Replikation der mtDNA verdrängt der neu synthetisierte H-Strang den ursprünglichen H-Strang, der danach solange einzelsträngig bleibt, bis der neue Tochter-L-Strang synthetisiert worden ist. Einzelsträngige DNA ist jedoch besonders anfällig für spontan auftretende Mutationen. So kommt es 200mal häufiger zu einer spontanen Desaminierung von Cytosin zu Uracil als bei doppelsträngiger DNA. Zum Beispiel treten G/A Transitionen im L-Strang neunmal häufiger auf als im H-Strang, vermutlich aufgrund der großen Häufigkeit von spontanen Desaminierungen von C zu U auf dem H-Strang (Tanaka und Ozawa, 1994). Die Mitochondrien in tierischen Zellen verfügen zwar über die sehr genau arbeitende DNA-Polymerase, die in 3'-5'-Richtung eine hoch aktive exonucleolytische Korrekturlesefunktion besitzt, andererseits gibt es in Mitochondrien (im Gegensatz zum Zellkern) kein Reparatursystem, das einzelne Nukleotide herausschneiden und ersetzen kann.

(Quelle: Zeller, M., Molekularbiologische Geschlechts- und Verwandtschafts-Bestimmung in historischen Skelettresten, Dissertation, Uni Tübingen, 2000)

1.4 Praktikumsaufgabe

Isolieren Sie die DNA aus den von Ihnen gewonnenen Speichelproben und amplifizieren Sie die HVR2 des D-loops mittels einer PCR (zwei Ansätze) unter Verwendung der Amplifizierungsprimer.

Zum einen klonieren Sie das entstehende Fragment einer der Reaktionen in den Vektor pUC18 und sequenzieren die resultierenden Plasmide. Hierfür wird das Fragment aufgereinigt und sowohl der Vektor als auch das Fragment mit den Restriktionsendonucleasen *HindIII* und *EcoRI* geschnitten. Nach dem Verdau erfolgt eine Auftrennung der Restriktionsansätze im Agarosegel und die Extraktion und Aufreinigung der entsprechenden DNA-Fragmente (geschnittener Vektor und PCR-Fragment). Es erfolgt eine Ligation mit anschließender Transformation in *E. coli*. Von entsprechenden Transformanden wird Plasmid-DNA isoliert und rekombinante Klone mittels Restriktionsanalyse identifiziert. Rekombinante Plasmide werden sequenziert.

Zum Zweiten sequenzieren Sie die PCR-Fragmente direkt (mittels der Sequenzierungsprimer) nach einer Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung aus dem Gel.

Vergleichen Sie anschließend die ermittelten DNA-Sequenzen dieser Region und vergleichen diese mit den Sequenzen aus der Literatur/den Datenbanken.

Diskutieren Sie die beiden genutzten Methoden zur Sequenzierung.

Primersequenzen

Amplifizierungsprimer

(Die Primer enthalten für die Klonierung in den pUC18 eine *Hind*III-Schnittstelle (HVR2for-06) bzw. eine *Eco*RI-Schnittstelle (HVR2rev-06). Die Schnittstellen sind kursiv gezeigt.

HVR2for-06: tattataagcttctatcacccctattaaccactcacggg

HVR2rev-06: tattatgaattcggtgactgttaaaagtgcataccgcc

Sequenzierprimer

SeqHVR2for-06: atttggatatttcgtctggggg

SeqHVR2rev-06: ggtaggctgggttaggg

1	gatcacaggt	ctatcacccct	attaaccact	cacgggagct	ctccatgcat	ttggatatttt
		Primer HVRIIfor				
61	cgtctggggg	gtgtgcacgc	gatagcattg	cgagacgctg	gagccggagc	accctatgtc
		Seq-HVRIIfor				
121	gcagtatctg	tctttgattc	ctgcctcatt	ctattattta	tgcacactac	gttcaatatt
181	acaggcgaac	atacctacta	aagtgtgtta	attaattaat	gcttgttagga	cataataata
241	acaattgaat	gtctgcacag	ccgctttcca	cacagacatc	ataacaaaaa	atttccacca
301	aacccccccc	tcccccgct	tctggccaca	gcacttaaac	acatctctgc	caaaccccaa
361	aaacaaagaa	ccctaacacc	agcctaacca	gatttcaaat	tttatcttta	ggcggtatgc
		Seq-HVRIIrev				
421	acttttaaca	gtcacc	cccc	aactaacaca	ttattttccc	ctcccactcc
		Primer HVRIIrev				
481	atctcatcaa	tacaaccccc	gcccatccta	ccagcacac	acacaccgct	gctaacccca
541	tacccccgaac	caaccaaacc	ccaaagacac	ccccacag		

Abb. 2 Sequenzausschnitt der humanen mitochondrialen DNA (Nukleotide 1 bis 579).

Die Positionen der Primer für die Amplifikation (grau unterlegt) und für die Sequenzierung (graue Schrift) der HVRII Region sind angegeben.

Versuch 2: Datenbanken und Sequenzanalysen

Um die von Ihnen gewonnenen Sequenzdaten auszuwerten, bedient man sich der computergestützten Analyse. Sie sollen zum einen Ihre Daten direkt am Arbeitsplatz mit Hilfe von Sequenzauswertungssoftware analysieren, zum anderen sich im Internet Informationen über die von Ihnen bearbeiteten Sequenzen beschaffen.

Aufgabenstellung

Ziel dieses Versuchsteils ist es, einen Einblick in die Möglichkeiten der Informationsbeschaffung zu wissenschaftlichen Fragestellungen im Internet zu bekommen, gleichzeitig eine ausführliche Analyse der gewonnen Sequenzdaten selbst vorzunehmen. Die gewonnenen Ergebnisse sollen von Ihnen im Rahmen einer Abschlussbesprechung vor den Kursteilnehmern kurz präsentiert und erläutert werden. Laden Sie sich die Originaldaten der Wildtyp-DNA aus der entsprechenden Datenbank. Tragen Sie außerdem Informationen zum entsprechenden Sequenzbereich zusammen.

Material

PC mit Internet-Zugang

PC mit molekularbiologischer Software

MacIntosh mit molekularbiologischer Software

Durchführung

- a) Analyse der Sequenzen an den Rechnern mit spezieller Software nach Einweisung
- b) Internet-Suchen nach Einweisung. Einige wichtige Adressen und Suchprogramme sind im folgenden angegeben:
 - (<http://www.metacrawler.com>) Suchmaschine – Was gibt's denn in der Welt so zu meinem Suchbegriff?
 - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ/>) Gute Suchmaschine, die sich in einzelne Felder unterteilt. Immer ein guter Anfang für eine Recherche.

(<http://www-ncbi.nlm.nih.gov/>) Das „US National Center for Biotechnology Information“ ist eine gute Adresse, um Zugriff auf verschiedene Datenbanken zu bekommen . Von hier aus ist nahezu alles möglich.

(<http://www.sanger.ac.uk/>) Das Sanger-Center ist eines der Labore, die sich an vielen Sequenzierprojekten beteiligen (u.a. HUGO). Man hat hier die Möglichkeit, über die entsprechenden BLAST-server (siehe unten!) die neuesten und zum Teil noch nicht offiziell freigegebenen Sequenzdaten abzurufen.

(<http://genome-www.stanford.edu/cgi.bin/SGD/>) Unter dieser Adresse haben Sie Zugriff auf die im Rahmen der Sequenzierung des Genoms der Bäckerhefe gewonnenen Daten (SGD = *Saccharomyces* Genome Database)

Um DNA-und/oder Proteindaten zu analysieren, stehen Ihnen häufig sogenannte BLAST-Server zur Verfügung. Dies sind Rechner, die mit Hilfe des Programms „Basic Local Alignment Tool“ Ihre Daten zu analysieren versuchen. Man kann grob fünf verschiedene Programmarten unterscheiden:

blastn: vergleicht eine von Ihnen einzugebene Nukleotidsequenz mit den bereits bekannten DNA-Sequenzen

blastp: vergleicht eine von Ihnen einzugebene Aminosäuresequenz mit den bereits bekannten Proteindaten

blastx: vergleicht alle sechs möglichen Übersetzungen der Leserahmen einer von Ihnen einzugebenen DNA-Sequenz mit bereits bekannten Proteinen

tblastn: hier wird eine von Ihnen vorgegebene Proteinsequenz mit den Übersetzungen aller sechs Leserahmen der bekannten DNA-Sequenzen verglichen

tblastx: vergleicht alle möglichen Übersetzungen der sechs Leserahmen einer von Ihnen einzugebenen DNA-Sequenz mit den Übersetzungen der sechs Leserahmen der bekannten DNA-Daten

Anhang

Protokolle für die Experimente

Präparation von DNA aus Mundschleimhautzellen im Speichel

Aufgabenstellung

Isolieren Sie aus den in Ihrem Speichel befindlichen Mundschleimhautzellen DNA.

Material:

2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße
DNA-Miniplasmid-Präparationskit
Holzspatel
steriles Wasser
Tischzentrifuge

Durchführung:

Vor der Gewinnung von Mundschleimhautzellen sollte der Mund gut gespült, d.h. weitestgehend frei von Essensresten sein. Es ist ein mechanisches Bearbeiten der Wangentaschen zur Gewinnung von Mundschleimhautzellen erforderlich (Holzspatel).

1. Gewinnung von 2 ml Speichel (Eppendorfgefäß)
2. 5 min bei 13.000 g zentrifugieren
3. Überstand verwerfen
4. 250 µl Lösung A1 zugeben, stark vortexen (homogen, Zellyse)
250 µl Lösung A2 zugeben, 6-8 mal schwenken, 5 min bei RT inkubieren
5. 300 µl Lösung A3 zugeben, 6-8 mal schwenken
6. 10 min bei 13.000 g zentrifugieren (Pellettierung der Zelltrümmer)
7. Säule in 2 ml Sammel-Tube stellen und 400 µl des Überstandes aus Schritt 6 auf die Säule geben, 1 min bei 13.000 g zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
8. 600 µl Lösung AQ auf die Säule geben, 1 min bei 13.000 g zentrifugieren (Waschen)
9. Durchfluss Verwerfen und 1 min bei 13.000 g (trocken) zentrifugieren (Trocknen der Säulenmatrix)
10. Säule in ein steriles 1,5 ml Eppi stellen und 50 µl steriles Wasser (auf 70°C vorgewärmt) auf die Säule pipettieren, 1 min bei RT inkubieren
11. 1 min bei 13.000 g zentrifugieren, Eluat bis zur Verwendung auf Eis lagern oder einfrieren.

PCR zur Amplifikation des mitochondrialen D-Loop:

Material:

Thermocycler, steriles Wasser, *Phusion*-Polymerase, Primer, DNA-Template, dNTP-Lösung, PCR-Puffer, 0,2 ml PCR-Gefäße

Durchführung:

Jeder setzt 4 Reaktionen an, um ausreichend Material zu generieren.

In ein 0,2 ml PCR-Gefäß werden die folgenden Komponenten pipettiert:

	Komponente	Volumen (μ l)
1.	Steriles dd H ₂ O	65
2.	5x <i>Phusion</i> HF PCR Puffer (incl. MgCl ₂)	20
3.	Primer for	1
4.	Primer rev	1
5.	10 mM dNTPs	2
6.	Template	10
7.	<i>Phusion</i> Polymerase	1

In einen Thermocycler wird folgendes Programm eingegeben:

Denaturierung	95 °C 5 min	
Denaturierung	95 °C 1 min	} 30 Cyclen
Annealing	55 °C 30 sec	
Elongation	72 °C 1 min	
Elongation	72 °C 5min	

Das PCR-Gefäß wird in den Thermocycler gestellt und das Programm gestartet.

Agarose-Mini-Gelelektrophorese

Material:

10x TBE

1%ige Agarose in 1x TBE (mit Ethidiumbromid)

Mini-Gelelektrophoresekammer (z.B. MWG)

***** ACHTUNG! Beim Umgang mit Ethidiumbromid immer mit Handschuhen arbeiten!*****

Durchführung:

Eine 1%ige Agaroselösung (in 1x TBE, ca. 200 ml) schmelzen und in einen abgedichteten Gelträger (geeigneten Kamm einsetzen! Für präparative Gele: Kamm mit großen Taschen) gießen und polymerisieren lassen. 5-10 µl Probe in die Slots pipettieren (Größenstandard ,z.B. λ DNA *HindIII/EcoRI* geschnitten, nicht vergessen).
Elektrophoresebedingungen: ca. 20 min bei 100 V

Visualisierung:

Gel auf den UV-Leuchttisch des Gel-Dokumentationssystems (MWG BioTech) legen.
Unter UV-Licht durch ein Bild dokumentieren

Restriktion des Plasmides und des PCR-Produktes

Material:

*Hind*III, *Eco*RI 10 u/μl (Gibco-BRL)

10x Restriktionspuffer2

Durchführung:

Pipettieren Sie die Restriktion wie folgt zusammen:

DNA	20 μl PCR-Produkt bzw. 5 μl Vektor pUC18
10 u <i>Eco</i> RI	1 μl
10 u <i>Hind</i> III	1 μl
10x Puffer 2	3 μl
dd H ₂ O ad 30 μl	x μl

Inkubation bei 37°C für 3-5 h.

Ligation von Fragment und Plasmid

folgende Komponenten werden zusammenpipettiert:

PCR-Produkt	x μl
Vektor pUC18, geschnitten:	1 μl
Ligase-Puffer	2 μl
ddH ₂ O	y μl
T4-DNA Ligase	1 μl
Gesamtvolumen	20 μl

bei Raumtemperatur 2-4 h oder über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubieren

Elektroporation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* sind zahlreiche Methoden bekannt. Die vermutlich am häufigsten in molekularbiologischen Labors verwendeten Methoden sind die CaCl₂-Methode und die Elektroporation. Die Elektroporation zeichnet sich durch ihre hohe Effizienz und extreme Einfachheit aus. Die Zellen werden in sterilem 10%igem Glycerol aufgenommen, die DNA wird zugegeben und es erfolgt ein elektrischer Puls. Danach wird ein Regenerationsmedium zugegeben und nach 1 h Inkubation bei 37°C wird der Transformationsansatz auf Selektionsplatten ausplattiert.

Material (ausreichend für 3 Transformationen)

E. coli Stamm *DH5α*

150 ml LB-Medium

200 ml steriles, eiskaltes H₂O

5 ml 10% Glycerin

2 Zentrifugenröhrchen

1 Erlenmeyerkolben 1 l

3 Elektroporationsküvetten, gekühlt

Eppendorfgefäße

Plastikküvetten

5 ml SOC Medium

3 LB-Platten mit Antibiotikum

Herstellung kompetenter Zellen (nur zur Information)

Tag 1

- 5 ml Vorkultur mit *E. coli* animpfen und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubieren

Tag 2

- 100 ml LB-Medium im 1 l Erlenmeyerkolben mit 100 µl der Vorkultur animpfen und bis zu einer OD₆₀₀=0,6 wachsen lassen
- Kultur für 15 min auf Eis stellen
- je Gruppe 15 ml in ein Falconröhrchen und 10 min bei 4.200 Upm und 4°C in der Kühlzentrifuge abzentrifugieren (Schritt 3 zweimal durchführen)

- Zellpellet in 15 ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendieren und wie unter 3. angegeben abzentrifugieren
 - Schritt 4 zweimal wiederholen
 - Pellet in 100 µl eiskaltem sterilen 10%igem Glycerin aufnehmen, mit je 40 µl Aliquots in 1,5 ml Eppendorfgefäßen weiterarbeiten (auf Eis!)
- (Die Zellen können jetzt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.)*

Transformation (2 Ansätze)

(Möglichst auf Eis arbeiten!)

- 4 µl Ligationsansatz dialysieren
- 40 µl Zellen (aufgetaut auf Eis) mit 4 µl DNA-Lösung bzw. als **Kontrolle** mit 4 µl Wasser vorsichtig mischen und in vorgekühlte Küvetten (0,2 cm) geben
- Elektroporation bei: 25 µF, 200Ω und 2,5 kV (Die Zellsuspension muss am Boden der Küvette sein. Die Küvetten abtrocknen und erst dann in die Halterung stellen!!);
- Küvetten zügig aus der Halterung entnehmen und sofort 1 ml SOC-Medium zusetzen
- Ansatz in steriles Eppendorfgefäß überführen und bei 37°C 60 min unter leichtem Schütteln inkubieren
- Zellen durch Zentrifugation (4 min, 3.000 Upm) pelletieren, Überstand abkippen,
- Zellpellet in restlichem Medium resuspendieren und auf LB-Platten mit Antibiotikum ausbringen
- Inkubation bei 37°C über Nacht

SOC-Medium

0,5 % Hefeextrakt

2 % Trypton

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glucose

Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Material:

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), Tischzentrifuge, ggf. Thermoblock, 1,5 ml Reaktionsgefäße

Durchführung:

• aus Agarosegelen:

- Gelstück mit DNA-Fragment ausschneiden und in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- je 100 mg Gelstück 100 µl Membrane Binding Solution zugeben
- Ansatz vortexen und bei 65°C inkubieren, bis das Gelstück vollständig gelöst ist

• aus Reaktionsgemischen:

- zu einem Reaktionsansatz wird das gleiche Volumen Membrane Binding Solution gegeben
- eine SV-Mini-Säule wird in ein Sammel-Röhrchen eingesetzt
- Säule und Röhrchen werden in die Zentrifuge eingesetzt (auf Gegengewicht achten!) und der Ansatz (wie oben vorbereitet) auf die Säule gegeben
- 1 min bei RT und 14.000 Upm zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- 700 µl Membrane Wash Solution zugeben, 1 min bei RT und 14.000 Upm zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- 500 µl Membrane Wash Solution zugeben, 5 min bei RT und 14.000 Upm zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- Säule in ein neues steriles Reaktionsgefäß stellen
- zur Elution 50 µl steriles Wasser zugeben, 1 min einwirken lassen
- 1 min bei RT und 14.000 Upm zentrifugieren
- 3 µl des Eluats auf ein Mini-Gel auftragen (Prüfung der Aufreinigung)

Plasmid Präparation aus *E. coli* mit dem NucleoSpin™Plasmid QuickPure-Kit

Material:

NucleoSpin™Plasmid QuickPure-Kit (Macherey-Nagel), Tischzentrifuge
1,5 ml Reaktionsgefäße

Durchführung:

- 1,5 ml einer *E. coli*-Übernightkultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- 30 sec bei 14.000 Upm zentrifugieren, Überstand verwerfen, Restmedium mit einer Pipette entfernen
- zu dem Zellpellet werden 250 µl Lösung **A1** gegeben und die Zellen vollständig suspendiert
- 250 µl Lösung **A2** werden zur Zellyse zugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt (nicht vortexen!)
- 5 min bei RT inkubieren (Lösung sollte aufgrund der Zellyse klar werden!)
- 300 µl Lösung **A3** zugeben und mischen, bis eine homogene Lösung erreicht ist
- 5 min bei RT und 14.000 Upm zentrifugieren
- eine NucleoSpin™Plasmid QuickPure wird in ein 2 ml Sammelgefäß und dann in die Zentrifuge eingesetzt (Gegengewicht!) und der Ansatz auf die Säule gegeben
- 1 min bei RT und 14.000 Upm zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- zum Waschen 450 µl Lösung **AQ** zugeben
- 4 min bei RT und 14.000 Upm zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- Säule in ein neues steriles Eppendorfgefäß stellen
- zur Elution 50 µl Lösung **AE** oder steriles Wasser zugeben, 1 min einwirken lassen
- 1 min bei RT und 14.000 Upm zentrifugieren, DNA-Eluat einfrieren

Sequenzierungen

Herstellung des Polyacrylamid-Gels

Material

SequagelXR (Biozym)	Sequagel-Puffer (Biozym)
Sequenzgelplatten	Spacer, Haifischzahn-Kamm (48)
Zubehöerteile LI-COR	Faltenfilter
10% (APS) Ammoniumperoxodisulfat (frisch angesetzt)	
Bechergläser	Plastikspritze
1% Essigsäure	1% SDS
98% Ethanol	

Durchführung

(ACHTUNG! Handschuhe tragen!)

- Gelplatten mit 1% Essigsäure waschen
- Platten unter Wasser spülen und mit 1% SDS gründlich abbürsten und einwirken lassen (zwischenzeitlich Gel vorbereiten)
- 30 ml SequagelXR mit 7,5 ml Sequagel-Puffer in einem Becherglas mischen
- Lösung durch einen Falten-Filter in ein neues Becherglas überführen
- Becherglas mit Aluminiumfolie abdecken und für 10 min im Eppendorf-Vakuum-Konzentrator Gellösung entgasen
- Gelplatten gründlich mit Wasser, nochmals mit destilliertem und schließlich mit bidestilliertem Wasser spülen, mit Küchentuch trockenreiben und Platten mit Ethanol abreiben
- Platten und Spacer gemäß Anweisung zusammenbauen
- 2 ml der entgasten Gellösung in 2 ml Eppendorfgefäß geben und 20 µl 10% APS zugeben, kurz mischen und mit 1 ml Gilson-Pipette den Gelsockel gießen
- Sockel 10 min polymerisieren lassen
- Utensilien zum Gießen des Gels bereitlegen
- Gellösung mit 250 µl 10% APS mischen und mit einer Spritze blasenfrei aufziehen
- Lösung vorsichtig blasenfrei zwischen die Gelplatten gießen
- Kamm sofort vorsichtig ca. 5 mm tief in das Gel einsetzen
- Gel mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur polymerisieren lassen

Sequenzierreaktion

Material

Thermosequenase fluorescent labelled primer 7-deaza cycle sequencing kit (Amersham-Pharmacia Biotech)

fluoreszenzmarkierte Primer (IRD 800, MWG)

Thermocycler

DNA-Template

Durchführung

- Folgende Komponenten auf Eis auftauen und in einem 1,5 ml Gefäß zum Premix zusammenpipettiert. Verwenden Sie hierfür die Sequenzierprotokollvorlagen:

2 µl markierter Primer (2 pmol)

x µl DNA template (130 ng/kb Templatelänge)

mit H₂O auf 21 µl auffüllen

- am Primus96-Thermocycler (MWG) wird das Programm M13-56 aufgerufen:

Step1: Denaturierung 95°C, 1 min

Step2: Denaturierung 95°C, 30 sec

Step3: Annealing 55°C, 30 sec

Step4: Extension 70°C

Step5: zurück zu Step2 29mal

Step6: Kühlen 4°C, unendlich

- in eine Mikrotiterplatte werden pro Ansatz je 1 µl der Terminationsmische A, C, G, T aufgetragen (enthält auch Polymerase und Reaktionspuffer etc.)

- 5 µl des Premix werden zu jedem der vier Terminationsansätze gegeben und alle Ansätze mit 15 µl Mineralöl überschichtet

- die Mikrotiterplatte wird in den Thermocycler eingesetzt und das Programm gestartet

- nach Beendigung des Programms 3 µl Stop-Puffer zu jeder Reaktion geben

- jeweils 5 µl Reaktionsmischung unter dem Mineralöl abziehen und im gleichen Pipettierschema/Probenraster in eine weitere Mikrotiterplatte füllen und bis zum Auftragen auf Eis aufbewahren

Automatische Sequenzierung mit dem LI-COR 4000 (MWG Biotech) System

Material

Automatisches Sequenziersystem LI-COR 4000 (MWG Biotech) mit Zubehör

1 l 1x TBE-Puffer

vorbereitetes Polyacrylamidgel

Plastik-Spritze

Durchführung

- Kamm aus dem Gel entfernen und säubern
- vorbereitetes Gel vorsichtig in die Sequenzierapparatur einbauen
- 1x TBE Puffer einfüllen und Apparatur auf Dichtigkeit überprüfen
- Parameter für die Elektrophorese einstellen:
 - Spannung: 1,5 kV Stromstärke: 37 mA Leistung: 50 W
 - Temperatur: 50 °C Frames: 17
- Gel 30 min vorlaufen lassen
- Gelschlitz für Haifischzahn-Kamm gründlich mit Plastikspritze und TBE-Puffer aus dem Tank reinigen
- Spitzen, Pipette und Mikrotiter Platte mit Sequenzreaktionen bereitstellen
- Haifischzahn-Kamm **vorsichtig** einsetzen, bis die Zahnspitzen ca. 1 mm in der Gelmatrixkante stecken
- jeweils 1,5 µl Reaktionsmischung sofort auftragen: Raster A,C,G,T
- obere Tankabdeckung mit Elektrode einsetzen, Sequenzapparatur schließen und Elektrophorese starten
- nach Beendigung des Laufes Auswertung der gesammelten Daten

Lösungen:

10x TBE: 162 g Tris, 27,5 g Borat, 7,3 g EDTA (freie Säure) in 1 l Wasser lösen (pH 8,3 bis 8,7 bei 50°C); autoklavieren

Sequenzierung von PCR-Produkten

Sequenzierprotokoll Licor 1

Datum:

File:

Directory:

Probe	Gruppe	Probe	Primer
1.	1		
2.	1		
3.	1		
4.	1		
5.	1		
6.	1		
7.	2		
8.	2		
9.	2		
10.	2		
11.	2		
12.	2		

Pipettierschema:

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
μ l DNA												
μ l Primer	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
μ l Wasser												
Summe	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21

DNA-Primermix gut mischen!

je 1 μ l Sequenziermix (A; C; G bzw. T fertig, enthalten dNTP, ddNTP, Polymerase, Puffer) in die Mikrotiterplattenvertiefungen pipettieren

5 μ l DNA-Primermix dazupipettieren, darauf achten, dass in allen Vertiefungen die 6 μ l Sequenzierreaktion vorliegen

mit 15 μ l Öl überschichten

Sequenzierreaktion im PCR-Cycler starten.

Probenauftrag Sequenziergel: ACGT

Sequenzierung von PCR-Produkten

Sequenzierprotokoll Licor 2

Datum:

File:

Directory:

Probe	Gruppe	Probe	Primer
1	3		
2	3		
3	3		
4	3		
5	3		
6	3		
7	4		
8	4		
9	4		
10	4		
11	4		
12	4		

Pipettierschema:

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
μl DNA												
μl Primer	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
μl Wasser												
Summe	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21

DNA-Primermix gut mischen!

je 1 μl Sequenziermix (A; C; G bzw. T fertig, enthalten dNTP, ddNTP, Polymerase, Puffer) in die Mikrotiterplattenvertiefungen pipettieren

5 μl DNA-Primermix dazupipettieren, darauf achten, dass in allen Vertiefungen die 6 μl Sequenzierreaktion vorliegen

mit 15 μl Öl überschichten

Sequenzierreaktion im PCR-Cycler starten.

Probenauftrag Sequenziergel: ACGT

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Sequenzierprotokoll Licor

Datum:

File:

Directory:

Probe	Gruppe	Probe	Konzentration	Primer
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				

Pipettierschema:

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
μ l DNA												
μ l Primer	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
μ l Wasser												
Summe	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21

DNA-Primermix gut mischen!

je 1 μ l Sequenziermix (A; C; G bzw. T fertig, enthalten dNTP, ddNTP, Polymerase, Puffer) in die Mikrotiterplattenvertiefungen pipettieren

5 μ l DNA-Primermix dazupipettieren, darauf achten, dass in allen Vertiefungen die 6 μ l Sequenzierreaktion vorliegen

mit 15 μ l Öl überschichten

Sequenzierreaktion im PCR-Cycler starten.

Probenauftrag Sequenziergel: ACGT

