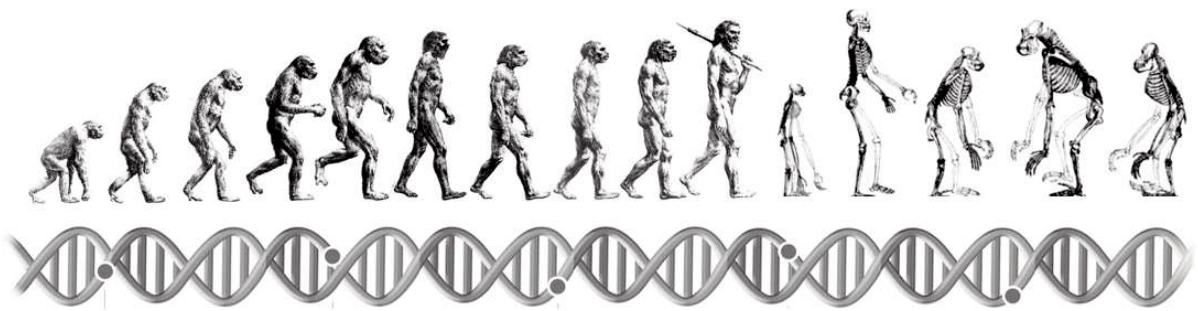


Modul 3:

Evolutionäre Anthropologie

Sommersemester 2017



Skript zum Laborteil: H. Zischler, D. Rosenkranz, K. Mengel

Dieses Skript ist keine 1:1-Mitschrift des Kurses. Es ist nur zum persönlichen Gebrauch der Mastermodul 3-Teilnehmerinnen/Teilnehmer und - auch in Teilen - nicht zur Distribution außerhalb des Kurses bzw. weiteren Veröffentlichung geeignet.

Übersicht

Inhalt	Seite
PCR und Gelelektrophorese	2
Versuch 1. <i>Phylogenie der Primaten 1: Hominoidea</i>	5
Versuch 2. <i>Phylogenie der Primaten 2: Monophylie der Haplorrhinen</i>	6
Versuch 3. <i>Extraktion und Darstellung von gesamt RNA im Acrylamid-Gel</i>	7
Versuch 4. <i>Erstellen einer small RNA sequencing (sRNA-seq) 'library'</i>	9
Versuch 5. <i>small RNA-sequencing (Sanger)</i>	11
Versuch 6. <i>Qualitativer Expressionsnachweis von SPAM1</i>	16

Ablauf der Versuche:

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6
18.04.17	16:00 Uhr Einführungsveranstaltung					
19.04.17			1. komplett	2. RNA im Gel einfrieren.		
20.04.17	2. PCR ansetzen 4. Elektrophorese, Auswertung			1. RNA eluieren 3. sRNA library		
25.04.17		2. komplett			1. Ligation ansetzen	
26.04.17					1. Aufreinigung, Transformation, Ausplattieren	
27.04.17					1. Kolonie PCR	2. komplett

Am **16.05.17, 9:15 Uhr** werden die Ergebnisse der Sanger Sequenzierung im CIP Pool der Anthropologie ausgewertet.

PCR (polymerase chain reaction)

Die für die Analyse genetischer Diversität vermutlich wichtigste Labortechnik ist die PCR. Machen Sie sich nochmals das Grundprinzip der PCR klar:

- **Denaturierung bei >90°C.** DNA-Doppelstränge lösen sich voneinander. Dies ermöglicht das Annealing spezifischer Oligonucleotide (Primer).
- **Annealing der Primer.** Die Primer lagern sich an ihren Ziel-Sequenzen an. Die Annealing-Temperatur (T_a , oft auch T_m für Melting-Temperatur) ist abhängig von der Primer Sequenz (s.u.)
- **Extension der Primer** (an deren 3' Ende) durch die Taq-Polymerase bei 72°C.

Die Stabilität eines Hybrids z.B. aus Primer-Oligonucleotiden und der Zielstruktur im Genom wird im Wesentlichen von 3 Parametern bestimmt:

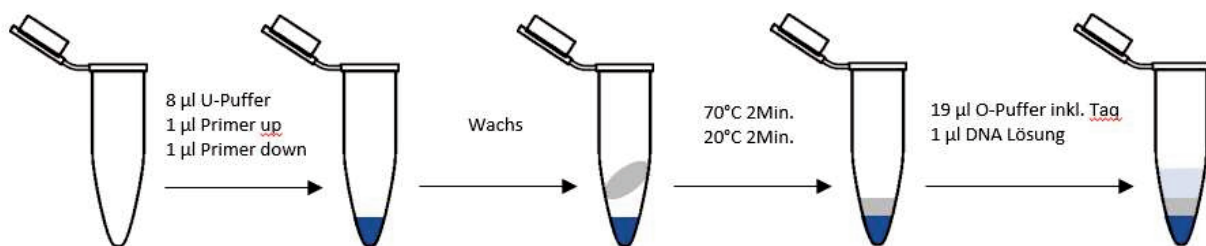
1. Temperatur.
2. Konzentration monovalenter Kationen (z.B. Na^+).
3. Anzahl und Lokalisation fehlgepaarter Basen.

Für kurze Oligonucleotide (bis ca. 25 nt, typische Länge von Primern: 18-25 nt) wird in Gegenwart von 1 M Na^+ die T_a näherungsweise nach folgender Formel berechnet (für genauere Verfahren siehe <http://www.chemie.de/lexikon/Primer.html>):

$$T_a = n(\text{AT}) \times 2^\circ\text{C} + n(\text{GC}) \times 4^\circ\text{C}$$

Die PCR wird im Praktikum als klassische „hot start“-PCR ausgeführt. In diesem Ansatz wird vermieden, dass alle Reaktionskomponenten bei Temperaturen unter der T_a reagieren können. Auf diese Weise wird die Menge unspezifischer Produkte minimiert. Die einzelnen Komponenten der Reaktion werden über eine Wachsbarrriere getrennt, die bei ca. 70°C, d.h. über der T_a der Primer, schmilzt.

Die Reaktion wird in einem 0,5ml Eppendorfgefäß angesetzt:



PCR Ansatz, Pipettier-Reihenfolge:

1. 8 µl Puffer U (unten)
2. 1 µl Primer up
3. 1 µl Primer down
4. Wachspellet
5. 18,7 µl Puffer O (oben)
6. 0,3 µl Taq Polymerase = ca. 1 unit*
7. 1 µl DNA Lösung (ca. 200 ng)

* "One unit is defined as the amount of enzyme that will incorporate 15 nmol of dNTP into acid-insoluble material in 30 minutes at 75°C". New England Biolabs.

Um Pipettierungenauigkeiten zu minimieren, setzen Sie bitte die Reaktion für die 6 DNA-Proben nicht separat sondern im 10-fach Ansatz an:

Lösung	1 x	10 x
Puffer U	8 µl	80 µl
Primer (je 10 pM/µl)	2 µl	20 µl
W A C H S		
Puffer O	18,7 µl	187 µl
Taq-Polymerase	0.3 µl	3 µl

Legen Sie diese Komponenten vor und geben Sie bitte je 1 µl DNA-Lösung in separate Ansätze. Gehen Sie davon aus, dass 3 Picogramm DNA ein haploides Genomäquivalent (bei typischen Säugergenomen) darstellen - Sie können somit die eingesetzte Kopienzahl abschätzen. Kommerziell erhältliche Taq-Präparationen werden mit den entsprechenden Puffern mitgeliefert. Daher hier nur einige grobe Angaben, welche Puffer im o.g. System eingesetzt werden:

Taq-Puffer:

Alle Taq-Puffer liegen vom pH her bei ca. 7,5 - 8,0 und enthalten Kaliumchlorid und Magnesium (variable Mengen). Als Zusätze werden häufig geringe Konzentrationen an Protein (BSA) und nicht-ionischen Detergentien zugegeben (Triton-X 100), um unspezifische Protein-Interaktionen zu verhindern (bitte bedenken Sie, dass die absolute Menge an eingesetztem Taq-Protein sehr gering ist). Die Primer werden hier in einer Endkonzentration von 0,333 pmoles/µl eingesetzt, die dNTP-Endkonzentration beträgt 125 µM für jedes Nukleotid.

Was jetzt mit den PCR Ansätzen passiert:

- Zentrifugieren Sie nach Zusatz der DNA nochmals den Reaktionsansatz bei ca. 500 rpm für 2 Sek. GANZ BEHUTSAM (Sie zerstören ansonsten die Wachsschicht)!
- Stellen Sie die PCR-Ansätze in den „Thermo-Cycler“ und schließen Sie den Deckel. Arretieren Sie den Deckel durch eine Umdrehung des Deckelknopfes (bitte nicht zu stark drehen!).
- Folgende Cycling-Programme werden benutzt:
 1. 2 Min. prä-Denaturierung bei 92°C (Denaturierung: ‚Öffnen‘ der hochmolekularen DNA).
 2. 40 Sek. 92°C
 3. 1 Min. Annealing der Primer
 4. 1 Min. Extension bei 72°C
 5. 5 Min. Extension bei 72°C (Doppelstränge)

Nach der PCR ist vor dem Gel:

- Entnehmen Sie dem Thermo-Cycler die PCR-Ansätze. Achtung: Die Deckel der Thermo-Cycler werden geheizt Aufarbeitung der PCR-Ansätze:
- Frieren Sie die fertigen PCR-Ansätze kurz ein und entnehmen Sie (Proben sind noch gefroren!) dann mit einem Zahnstocher die obere, gehärtete Wachsschicht.
- Pipettieren Sie 10 µl in separates Eppendorf Tube.
- Geben Sie 2,5 µl Loading-Puffer dazu.
- Trennen Sie die PCR-Produkte in 1%igen - 1,5%igen Agarose-Gelen (TBE-Puffer-basiert) bei 100 V für ca. 30 Min. auf.

Vorbereitung der Agarosegele:

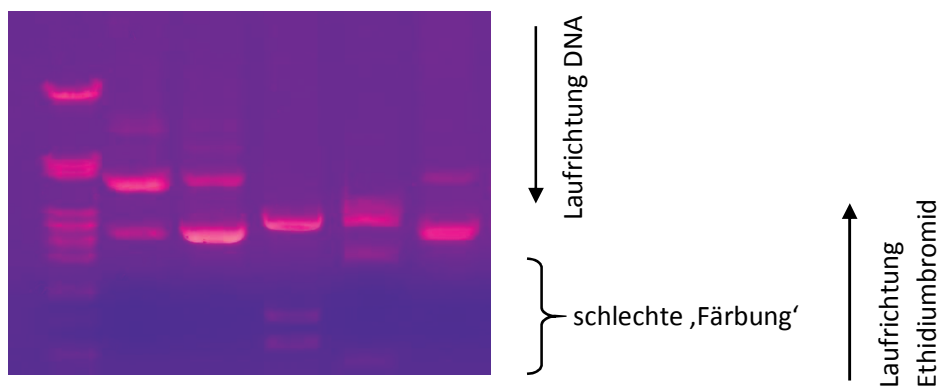
- 1% oder 1,5% w/v Agarose in 1 x TBE-Puffer aufnehmen (Gesamtvolumen: 500 ml).
- In der Mikrowelle aufkochen - herausnehmen (ACHTUNG HEIß! SCHUTZHANDSCHUH TRAGEN!).
- Kurz unter Rühren aufkochen (Magnetrührer) und abkühlen lassen.
- Elektrophorese-Kammern vorbereiten
- Für die Gellösung 30 ml Agarosegel und 1,5 µl Ethidiumbromid (1%ig) in ein leeres Falcon geben, schließen und mischen.
- Gellösung in vorbereitete Elektrophorese-Kammern geben und 15 Min. aushärten lassen.
- Gele mit 1 x TBE Puffer überschichten.
- Der PCR-Ansatz wird mit 2,5 µl Loading-Puffer versehen, gemischt und zentrifugiert.
- Aus dem gehärteten Gel werden Kamm und Gießblöcke entfernt, benachbarte Taschen werden mit
- Je 12,5 µl PCR-Ansatz (inkl. Loading-Puffer) beladen.
- Als Längenmarker bitte je 1,5 µl der 100 bp-Leiter verwenden.
- Es wird eine Spannung von 100 Volt für ca. 30 Min. angelegt.
- Photodokumentation unter dem Transilluminator nach Einweisung*.

ACHTUNG!

Ethidiumbromid ist giftig und erbgutverändernd.



*Ethidiumbromid wird zum Anfärben von Nukleinsäuren verwendet. Dabei lagert sich Ethidiumbromid zwischen den Basen der Nukleinsäuren an und verändert dadurch deren Anregungsspektrum. Unter ultraviolettem Licht fluoresziert die so angefärbte Nukleinsäure im sichtbaren Spektrum



Ethidiumbromid ist in Lösung positiv geladen, läuft während der Elektrophorese also zu den PCR-Ansätzen (DNA = negativ geladen) in entgegengesetzter Richtung. Dadurch entsteht im Gel ein Bereich in dem sich kein Ethidiumbromid mehr befindet. Die PCR-Ansätze laufen diesem Bereich zu!

Versuch 1. Phylogenie der Primaten - Hominoidea - Molekulare Kladistik

In diesem Versuch werden Sie spezifische ‚rare genomic changes‘ detektieren, anhand derer sich die Phylogenie der Hominoidea rekonstruieren lässt. Sie erhalten dazu DNA-Proben folgender Spezies: *Macaca mulatta*, *Hylobates lar*, *Pongo pygmaeus*, *Gorilla spec.*, *Pan troglodytes*, *Homo sapiens*.

Hintergrund:

Zufällige, ungerichtete und selten auftretende Integrationen von Alu-SINEs sind Paradebeispiele sogenannter „rare genomic changes“, die sich als Clade-markers hervorragend einsetzen lassen, weil sie...

1. quasi Homoplasie-frei und nicht exakt revertierbar sind (d.h. größere Deletionen um die Integrationsstelle können natürlich über evolutionäre Zeiträume auftreten, Sie amplifizieren aber dann kein Produkt („evidence of absence is absence of evidence“),
2. eine eindeutige Merkmalspolarität aufweisen, d.h. ursprünglicher Merkmalszustand = „leere Integrationsstelle“, abgeleiteter Merkmalszustand = „vorhandene Alu-Integration“,
3. die Integrationen relativ gut orthologisierbar sind, nämlich über „direct repeats“ in der Alu-Flank (stellen Sie sich vor, dass Integrationen in der Integration bzw. unabhängige Integrationen eng benachbart auftreten können).

Ca. 200 ng genomischer DNA verschiedener Primaten, die taxonomisch alle Infraordines abdecken, werden PCR-analysiert. Nachgewiesen werden SINEs in intronischen Abschnitten, die über exonisch lokalisierte PCR Primer amplifiziert werden. Die Anwesenheits-/Abwesenheitsmuster einzelner SINEs können als molekular-kladistische Information genutzt werden, um die phylogenetische Beziehung der Primaten-Infraordos zueinander abzuleiten.

Die Arbeits-Gruppen unterteilen sich nach Primerpaaren, d.h. jede Gruppe führt eine PCR mit einem Primerpaar in jeder Spezies durch (= 6 PCRs pro Gruppe).

PCR 1:	Primerpaar Ye5AH110	Annealing bei 60°C
PCR 2:	Primerpaar Ye5AH31	Annealing bei 60°C
PCR 3:	Primerpaar Ye5AH140	Annealing bei 55°C
PCR 4:	Primerpaar Ye5AH29	Annealing bei 55°C
PCR 5:	Primerpaar Ye5AH148	Annealing bei 55°C

Zeichnen Sie bitte die Taxa, presence/absence (+/-) und die Retropositionsintervalle der oben analysierten Alu-SINEs ein:

Species	PCR1	PCR2	PCR3	PCR4	PCR5

Versuch 2. Phylogenie der Primaten - Monophylie der Haplorrhinen (Tarsius + Anthropeoidea) - Molekulare Kladistik

Welche Alternative ist die wahre: Simiae/Prosimiae oder Haplorrhinen/Strepsirrhinen. Nach dem gleichen Prinzip wie in Versuch 1 werden Sie zeigen, ob Tarsier und Anthropeoidea einen jüngeren letzten gemeinsamen Vorfahren haben als Anthropeoidea und Strepsirrhini bzw. eine Primaten-Außengruppe (Tupaia). Entscheiden Sie sich nach dem Versuch für eine der drei in der Abbildung beschriebenen phylogenetischen Hypothesen. Sie erhalten dazu DNA-Proben folgender Spezies: *Macaca mulatta*, *Hylobates lar*, *Callithrix jacchus*, *Tarsius syrichta*, *Lemur catta*, *Homo sapiens*, *Tupaia belangeri*.

PCR 1:	Primerpaar AluC7	Annealing bei 57°C
PCR 2:	Primerpaar AluC9	Annealing bei 62°C
PCR 3:	Primerpaar AluC12	Annealing bei 52°C
PCR 4:	Primerpaar AluFLAM	Annealing bei 57°C

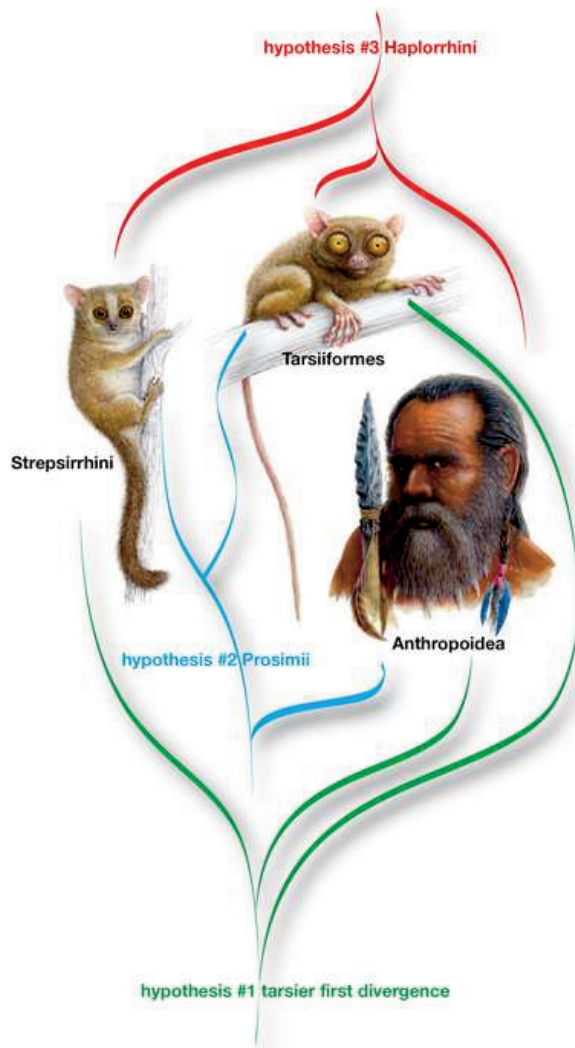


Abbildung aus Hartig et al. 2013, *Scientific Reports* 3:1756

Versuch 3. Extraktion und Darstellung von gesamt RNA im Acrylamid-Gel

Eine online-Version des Protokolls mit weiteren Erklärungen finden Sie hier:

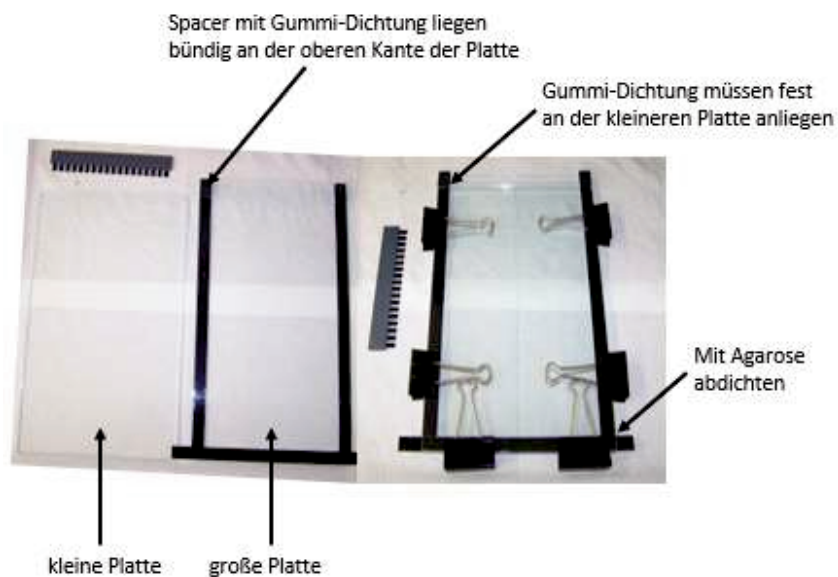
http://www.smallrnagroup.uni-mainz.de/RNAcourse_part1.html

Teil 1: RNA Extraktion

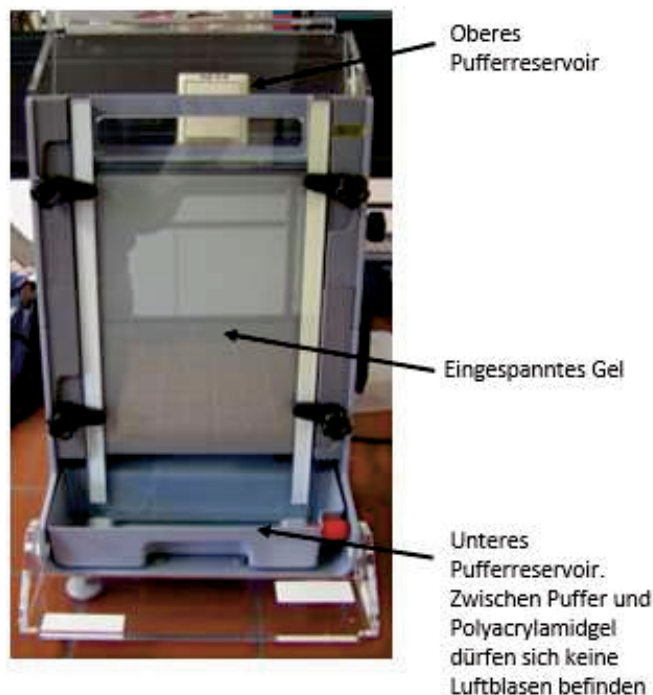
1. Auf 50-100 mg Gewebe in einer Petrischale 1 ml TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) pipettieren. Gewebe mit zwei Skalpellern zerkleinern.
2. Das Gewebe samt TRI Reagent® Lösung in ein 2 ml Tube überführen, 200 µl Chloroform hinzugeben und 30 Sek. vortexen.
3. 10 Min. bei RT inkubieren, anschließend 15 Min. bei 4 °C und 16000 g zentrifugieren.
4. Die obere, wässrige Phase in ein frisches 1.5 ml Tube überführen und 500 µl 100 %igen Isopropanol hinzugeben.
5. 5 Min bei RT inkubieren, anschließend 5 Min. bei 4 °C und 16000 g zentrifugieren.
6. Überstand verwerfen und 1 ml 75 %igen Ethanol hinzugeben. Kurz vortexen.
7. 5 Min. bei 4 °C und 7500 g zentrifugieren. Anschließend Überstand abpipettieren und RNA-Pellet bei RT 5 Min. trocknen lassen.
8. RNA-Pellet in 20 µl H₂O lösen (dazu 20 µl H₂O wiederholt über das Pellet pipettieren).
9. RNA für 5 Min. bei 55 °C lösen, **11 µl der RNA-Lösung in einem separaten Tube einfrieren (wird in Versuch 6 benötigt)**. Anschließend 9 µl Formamid Ladepuffer (enthält Bromphenolblau und Xylencyanol) zur verbleibenden Lösung hinzugeben und Probe auf das Acrylamidgel laden.

Teil 2: Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

1. Die PAGE Glasplatten werden zunächst mit Wasser, dann mit Isopropanol gründlich gereinigt (fusselfreies Papier!). An beide Längsseiten und die Unterseite der großen Platte werden die entsprechenden Spacer gelegt. Die kleine Platte wird passend auf die Spacer gelegt und die beiden Platten werden mit Klammern fixiert. Die Schaumstoff Dichtungen der Spacer müssen fest an der kleinen Platte anliegen. Die Stellen an denen der Spacer der Unterseite auf die Spacer der beiden Längsseiten stößt werden mit Agarose abgedichtet.



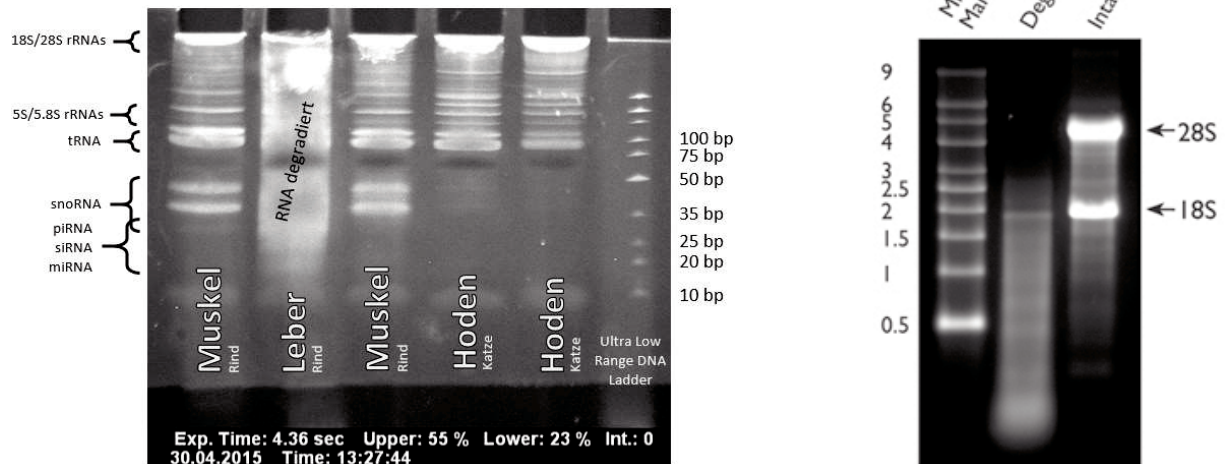
2. In ein Becherglas (100 ml oder größer) werden folgende Reagenzien gegeben:
 - 30 g Harnstoff (Urea)
 - 6 ml 10x TBE Puffer
 - 15 ml 40 %ige Acrylamid-Bisacrylamid Lösung (29:1 oder 19:1)
 - 10 ml H₂O
3. Die Lösung wird auf einer Heizplatte (200°C) unter ständigem Schwenken erhitzt bis sich der Harnstoff komplett gelöst hat. Anschließend wird die Lösung in einem 100 ml Messzylinder auf 60 ml mit H₂O aufgefüllt und wieder in das Becherglas überführt.
4. Sobald die Lösung auf RT abgekühlt ist, werden 60µl TEMED und 600µl 10 %iges APS hinzupipettiert. Durch kurzes Schwenken mischen und direkt zwischen die vorbereiteten Glasplatten gießen. Anschließend den Kamm an der noch freien Oberseite einfügen.
5. Nach ca. 20 Min. ist die Polymerisation abgeschlossen. Die Klammern, der untere Spacer sowie der Kamm können entfernt werden. Das untere Pufferreservoir der Gelapparatur wird mit 1x TBE Puffer aufgefüllt und das Gel in die Apparatur eingespannt. Nun kann auch das obere Reservoir mit 1x TBE Puffer aufgefüllt werden. Der Puffer sollte die Geltaschen um ca. 1 cm überlagern. Insgesamt werden etwa 800 ml 1x TBE Puffer benötigt. Das Gel muss ca. 45-60 Min. bei 60 W vorlaufen. Die elektrischen Eigenschaften der Polyacrylamidgele können variieren. Bei den verwendeten Spacern (Stärke ca. 1 mm) wird für eine Leistung von 60 W typischerweise eine Spannung von ca. 1200 V (bei 50mA) benötigt. Bei Anschluss mehrerer Gele ist die Wattzahl entsprechend zu erhöhen. Gele mit Spacern unterschiedlicher Stärke sollten nicht an dieselbe Spannungsquelle angeschlossen werden.



6. Nach ca. 20-30 Min. ist die RNA hinreichend aufgetrennt. Der zu untersuchende Gelausschnitt wird mit einem Keil aus dem Gel gestochen, für 1 Min. in einer Ethidiumbromid-Lösung (1:20000) gefärbt und anschließend für 30 Sek. in H₂O entfärbt. Die RNA kann nun unter einem Transilluminator sichtbar gemacht werden

Das könnte Ihr Gel sein (Beispiel aus dem Master Praktikum Sommersemester 2015)

Die Anwesenheit distinkter (z.B. rRNA-) Banden lässt auf die Integrität der RNA schließen (RNA wird typischerweise rasch durch ubiquitäre RNasen degradiert). Hochmolekulare 18S und 28S rRNAs werden sich in unserem 12 %igen Gel nicht auftrennen (vgl. Gel links: 12 %ig; Gel rechts: 1,5 %ig). Dafür lassen sich bei intakter RNA zwei tRNA Fraktionen unterscheiden. Je nach RNA-Konzentration sind auch Fraktionen kleiner nicht-kodierender RNAs erkennbar.



Versuch 4. Erstellen einer small RNA sequencing (sRNA-seq) 'library'

Eine online-Version des Protokolls mit weiteren Erklärungen finden Sie hier:

http://www.smallrnagroup.uni-mainz.de/RNAcourse_part3.html

Im vorigen Versuch haben Sie verschiedene RNA Fraktionen in einem Polyacrylamidgel sichtbar gemacht. Nun werden Sie aus verschiedenen RNA Fraktionen eine sequenzierfertige 'library' erstellen. Einige Moleküle aus dieser 'library' werden dann probeweise sequenziert werden (Versuch 5). Das folgende Protokoll beinhaltet viele Wartephasen (in Summe ca. 3,5 Std.), diese Zeit sollte sinnvoll genutzt werden!

Teil 1: Elution der RNA aus dem Gel

1. Unter UV Licht (Schutzvisier tragen!) werden mit einem Skalpel die gewünschten RNA Fraktionen aus dem Gel geschnitten und in ein 2 ml Tube überführt. Mithilfe einer Pipettenspitze wird das Acrylamidgel im Tube zerkleinert. Anschließend werden 300 µl H₂O hinzupipettiert.
2. 4 µl RNase-Inhibitor (RiboLock, 40 U/µl) hinzugeben und 1 Std. bei 37 °C auf einem Schüttler eluieren lassen.
3. Das Eluat wird zusammen mit den Gelfragmenten in eine Ultrafree-MC (Millipore) Säule (Porengröße der Filter: 0.45 µm) überführt und bei RT und 12000 g für 4 Min. zentrifugiert.
4. Zur weiteren Aufreinigung wird die RNA-Lösung in eine Amicon Ultra-0.5 3K Säule überführt und mit H₂O auf 500 µl aufgefüllt. Bei RT und 14000 g für 30 Min. zentrifugieren, anschließend wird der Durchfluss verwerfen und die Filtereinheit erneut mit H₂O auf 500 µl auffüllen. Bei RT und 14000 g für 30 Min. zentrifugieren. Filtereinheit umgekehrt in ein frisches Amicon Tube geben und bei RT und 1000 g 2 Min. zentrifugieren. Aus der eluierte RNA (~30-40 µl) wird nun in Teil 2 eine 'library' erstellt.

Teil 2: Erstellen einer cDNA ‚library‘

Die hier beschriebene Methode zur Herstellung einer sRNA-cDNA ‚library‘ stellt eine modifizierte und auf 4 Stunden verkürzte (quick-and-dirty) Version gängiger Laborprotokolle dar.

1. Zur 3' Polyadenylierung werden folgende Reagenzien in ein 1.5 ml Tube pipettiert:
 - 22 µl RNA-Lösung
 - 3 µl 10 x A-Plus Poly(A) Polymerase Puffer
 - 1,5 µl A-Plus Poly(A) Polymerase
 - 3 µl 10 mM ribo-ATP
 - 0,5 µl RiboLock (40 U/µl)

15 Min. bei 37 °C inkubieren.
2. Die Polyadenylierte RNA muss für die Ligation des 5' Linkers aufgereinigt (gefällt/präzipitiert) werden. Hierzu werden folgende Reagenzien zum Polyadenylierungs-Ansatz hinzupipettiert:
 - 90 µl 100 %iger Ethanol (-20 °C)
 - 8,5 µl 3 M Natriumacetat (200 mM Endkonzentration)
 - 1,5 µl Glycogen (10 µg/µl)

Nach kurzem vortexen wird die RNA für 15 Min. bei -20 °C präzipitiert und anschließend bei 4 °C und 16000 g für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wird sauber abpipettiert und das RNA Pellet in 34 µl H₂O aufgenommen.
3. Für die Ligation des RNA-Linkers werden folgende Reagenzien zur RNA-Lösung hinzu pipettiert:
 - 5 µl 10 mM ribo-ATP
 - 3 µl RNA-Linker
 - 2 µl T4 RNA Ligase
 - 5 µl 10 x T4 RNA Ligase Puffer

30 Min. bei 37 °C inkubieren.
4. Für die cDNA Synthese muss die RNA aufgereinigt (gefällt/präzipitiert) werden. Hierzu werden folgende Reagenzien zum Ligations-Ansatz hinzupipettiert:
 - 150 µl 100 %iger Ethanol (-20 °C)
 - 14,5 µl 3 M Natriumacetat (200 mM Endkonzentration)
 - 2 µl Glycogen (10 µg/µl)

Nach kurzem vortexen wird die RNA für 15 Min. bei -20°C präzipitiert und anschließend bei 4°C und 16000 g für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wird sauber abpipettiert und das RNA Pellet in 11 µl H₂O aufgenommen.
5. Für die cDNA Synthese (reverse Transkription, RT) werden zunächst folgende Reagenzien zur RNA-Lösung hinzu pipettiert:
 - 1µl RT-Primer (10 pmol/µl, hausinterne Oligo-Nr.: 893)
 - 1 µl dNTP Mix (jeweils 10 mM)
6. Für 5 Min. auf 65 °C erhitzen, dann auf Eis abkühlen lassen. Anschließend folgende Reagenzien hinzu pipettieren:
 - 4 µl 5x First-Strand-Buffer
 - 1 µl 0,1 M DTT
 - 1 µl RiboLock (RNase-Inhibitor)
 - 1 µl SuperScript IV Reverse Transkriptase (RT)
7. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen, den Reaktionsansatz in ein 0,5 ml Tube überführen und für folgendes Programm in den Thermocycler geben:
 - 50 °C für 10 Min.
 - 80 °C für 10 Min.
 - 4 °C bis zur weiteren Verwendung

8. Es wird eine PCR entsprechend des ausgeteilten Protokolls durchgeführt. Folgende Primer werden eingesetzt:

GACTGGAGCACGAGGACACTGA (hausinterne Oligo-Nr.: 894)

CGAATTCTAGAGCTCGAGGCAGG (hausinterne Oligo-Nr.: 895)

Programm für den Thermocycler: 3' 95 °C, (30'' 95 °C, 30'' 50 °C, 10'' 70°C)₃₅, 1' 70 °C.

Das resultierende PCR Produkt stellt eine cDNA ‚library‘ dar. Alle Moleküle besitzen identische 5' bzw. 3' Sequenzen. Sie unterscheiden sich jedoch durch den Abschnitt der der aus dem Polyacrylamidgel eluierten und eingesetzten RNA entspricht. Für eine Sanger-Sequenzierung müssen die Moleküle daher zunächst durch Ligation in ein Vektor-Plasmid und anschließende Transformation in *E.coli* Zellen (Klonierung) vereinzelt werden (Versuch 5).

Versuch 5. small RNA-sequencing: Vereinzlung durch Klonierung, Sanger Sequenzierung einzelner Klon-Kolonien

Aufreinigung des PCR-Produkts

Zur Aufreinigung der PCR Produktes (der cDNA ‚library‘) werden Silika Säulen (QIAquick PCR Purification Kit) verwendet (alternativ kann eine Ethanol Fällung durchgeführt werden).

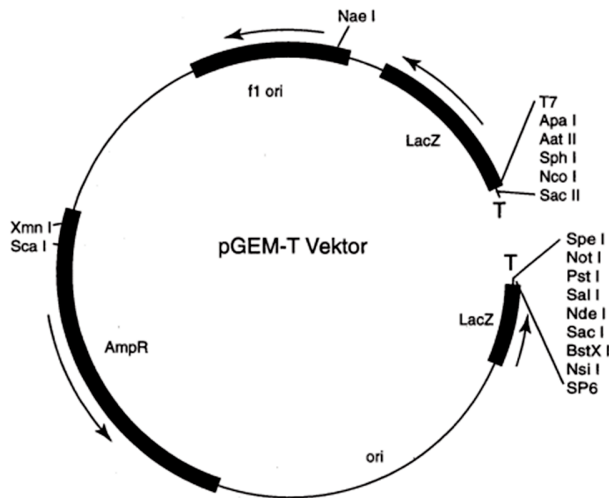
- Das 5-fache Volumen PB Puffer zum PCR Ansatz geben und kurz vortexen.
- Die vollständige Probe auf die QIAquick Säule auftragen.
- 1 Min. bei RT und 17900 g zentrifugieren.
- Durchfluss verwerfen und Säule zurück auf das Auffanggefäß setzen.
- Zum Waschen der Säule 750 µl Puffer PE auf die Säule auftragen.
- 1 Min. bei RT und 17900 g zentrifugieren.
- Durchfluss verwerfen und Säule zurück auf das Auffanggefäß setzen.
- Nochmals 1 Min. bei RT und 17900 g zentrifugieren um mögliche Rückstände des PE Puffers zu entfernen.
- Säule auf ein frisches 2 ml Tube setzen, Deckel vorher abschneiden.
- 50 µl H₂O auftragen und 1 Min. bei RT inkubieren.
- 1 Min. bei RT und 17900 g zentrifugieren. Das nun aufgereinigte PCR Produkt in ein frisches Tube umpipettieren.

Ligation in ein Plasmid (Vektor)

Das Aufgereinigte PCR Produkt kann nun in eine Vektor (Plasmid-DNA, pGEM-T von Promega) einligiert werden. Folgende Reagenzien werden hierzu in ein 1,5 ml Tube pipettiert:

- 5 µl 2x Ligationspuffer (enthält ATP)
- 3 µl aufgereinigtes PCR Produkt
- 1 µl pGEM-T Vektor Lösung (1:10 verdünnt)
- 1 µl T4-DNA Ligase

Über Nacht bei 4°C inkubieren.



Info:

Die bei der PCR eingesetzte Taq-Polymerase hängt template-unabhängig ein A and das 3' Ende des neu synthetisierten DNA Strangs (terminale Deoxynukleotidyltransferase-Aktivität). Die Ligations-Site des Vektors besitzt dazu komplementäre T-Überhänge (T-Vektor).

Aufreinigung des Ligationsansatzes

Nach erfolgter Ligation wird der Ligationsansatz aufgereinigt.

- Zum Ligationsansatz 90 µl TE Puffer und 100 µl PCI hinzupipettieren und 1 Min. vortexen.
- 10 Min. bei 4°C und 32000 g zentrifugieren.
- Untere (organische) Phase verwerfen, 100 µl Chloroform hinzupipettieren und 1 Min. vortexen.
- 10 Min. bei 4°C und 32000 g zentrifugieren.
- Untere (organische) Phase verwerfen.

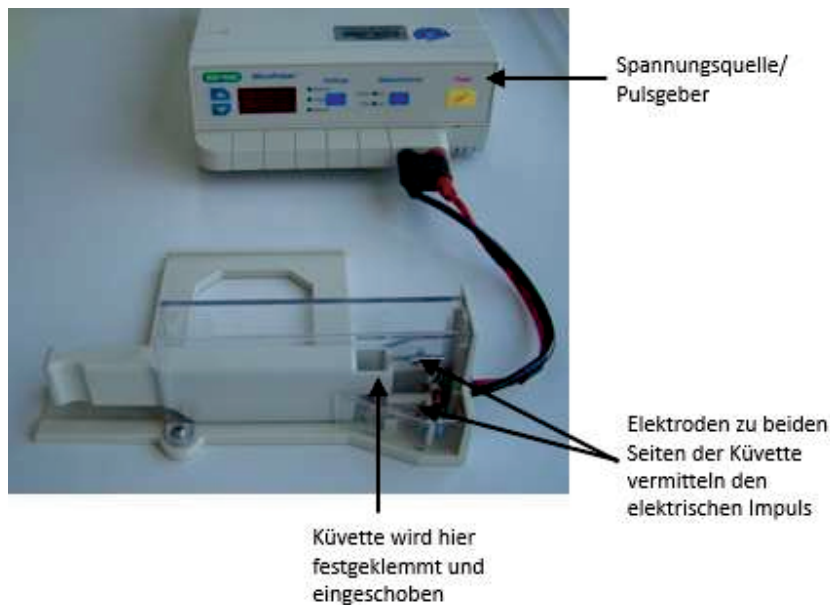
Zur verbleibenden Phase hinzupipettieren:

- 10 µl 3M Natriumacetat
- 2 µl Glycogen (10 µg/µl)
- 300 µl 100 %igen Ethanol
- Vortexen und 1 Std. bei -20 °C präzipitieren.
- 1 Std. bei 4°C und 32000 g zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und 300 µl 80 %igen Ethanol hinzupipettieren.
- 10 Min. bei 4°C und 32000 g zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und Pellet 5 Min. bei RT trocknen lassen.
- Pellet in 20 µl H₂O aufnehmen.

Transformation der Plasmide in *E. coli* Zellen (via Elektroporation)

Der Aufgereinigte Ligationsansatz (enthält jetzt ausschließlich Vektor) kann nun zur Transformation via Elektroporation in elektrokompente *E. coli* Zellen (TOP10) benutzt werden. Die nachfolgend aufgeführten Schritte erfolgen innerhalb eines S1 Labors.

- 50 µl *E. coli*-Suspension auf Eis auftauen und 6 µl Ligationsansatz hinzupipettieren.
- Ansatz in eine Elektroporationsküvette überführen.
- Elektroporationsküvette in den Elektroporator geben und Elektroporation starten.
- 1 ml Ampicillin haltiges LB-Medium zum Ansatz hinzupipettieren.
- Ansatz in ein 10 ml Kulturröhrchen geben und 1 Std. bei 37°C und 18000 rpm inkubieren lassen
- 50 µl des Ansatzes auf einer LB-Platte (beinhaltet Ampicillin, IPTG und X-Gal) ausstreichen.
- Platte ca. 12-18 Std. (über Nacht) bei 37°C inkubieren lassen.



Prinzip:

Durch einen elektrischen Impuls wird die Zellmembran elektrokompetenter *E. coli* Zellen kurzzeitig permeabilisiert. Dabei kommt es zur Aufnahme der in der Lösung befindlichen Vektor-Plasmide. Die Aufnahme eines Plasmids ist ein stochastisch seltenes Ereignis. Das Mengenverhältnis von Zellen und Vektormolekülen ist so gewählt, dass mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mehr als ein Plasmid pro Zelle aufgenommen wird. Dies führt letztlich dazu, dass die aus einer einzelnen Zelle hervorgehenden Zellkolonien nur ein bestimmtes Plasmid aufweisen.

„Kolonie-PCR“

Nachdem die einzelnen Bakterienzellen Kolonien gebildet haben, können diese Kolonien nun als Substrat für eine PCR (Taq PCR Core Kit von QIAGEN) eingesetzt werden. Pro Kolonie-PCR werden folgende Reagenzien in ein 0,5 ml PCR Tube pipettiert:

- 1 μ l 10x PCR Puffer
- 0,6 μ l dNTP Mix (jeweils 10 mM)
- 1 μ l Primer Uni40 (100 pmol/ μ l)
- 1 μ l Primer Rev48 (100 pmol/ μ l)
- 6,4 μ l H₂O

Auf den Ansatz wird ein Wachs-Pellet gegeben. Dieses bei 70°C komplett schmelzen und anschließend erstarren lassen. Dann folgende Komponenten hinzupipettieren:

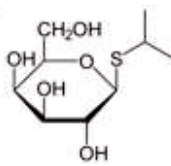
- 2 μ l 10x PCR Puffer
- 17,85 μ l H₂O
- 0,15 μ l Taq DNA Polymerase

Mit einem autoklavierten Zahnstocher eine ungefärbte Bakterienkolonie anstreichen und mit der Spitze des Zahnstochers die obere Phase des PCR Ansatzes verrühren. Dabei werden Bakterienzellen in den Ansatz überführt. Die Zellen werden bei hohen Temperaturen während der PCR aufgeschlossen und geben die Vektor-Plasmide frei die als DNA-Template für die PCR dienen. Die PCR wird entsprechend dem folgenden Programm in einem Thermo-Cycler durchgeführt: 3' 95°C, (30" 95°C, 30" 50°C, 10" 70°C)₃₅, 1' 70°C.

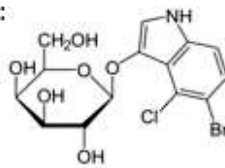
Hintergrund: **Blau Weiß** Selektion

Der verwendete T-Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Dadurch wird gewährleistet, dass ausschließlich solche Zellen auf der Ampicillin-haltigen Zellkulturplatte Kolonien bilden welche auch ein Plasmid aufgenommen haben. Geeignete Kolonien werden anhand der Blau-Weiß-Selektion ausgewählt. Ein einligiertes DNA-Molekül unterbricht im T-Vektor ein lacZ-Gen, welches dadurch seine Funktion verliert. Ein nicht-unterbrochenes lacZ-Gen (Vektor ohne Insert) wird durch das im Nährmedium enthaltene IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) aktiviert und die Zelle kann β -Galactosidase synthetisieren. β -Galactosidase spaltet den ebenfalls im Nährmedium enthaltenen Farbstoff X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) wobei sich das Spaltprodukt nach spontaner Oxidation und Dimerisierung (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) blau färbt wodurch die entsprechenden Zellkolonien auf der Zellkulturplatte blau erscheinen. Farblos erscheinende Kolonien weisen auf ein Plasmid mit einligiertem DNA-Molekül hin und können für die nachfolgende PCR eingesetzt werden.

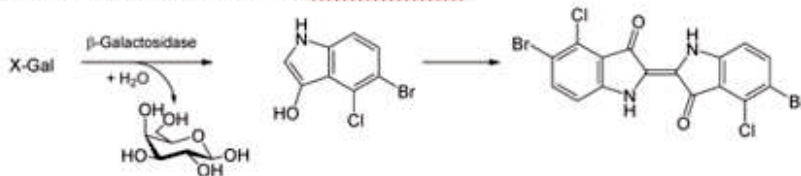
IPTG:



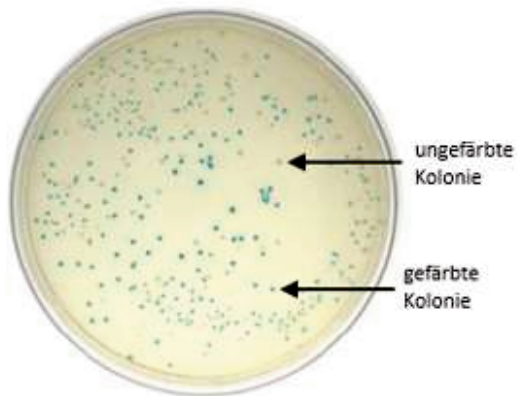
X-GAL:



Spaltung von X-GAL durch β -Galactosidase:



Blaue und weiße (farblose) Bakterien-Kolonien auf Zellkulturplatte:



Enzymatische Aufreinigung der Kolonie-PCR Produkte

Die gewonnenen PCR Produkte können nun für die Sequenzierreaktion nach Sanger eingesetzt werden. Zunächst erfolgen jedoch enzymatische Aufreinigungsschritte um überschüssige Primer sowie nicht verbrauchte dNTPs zu eliminieren.

Zum PCR Ansatz werden 1 μ l Alkaline Phosphatase 1 U/ μ l (z.B. SAP oder FAP von life technologies) und 0,5 μ l Exonuclease I 20 U/ μ l (z.B. ExoI von NEB). Der Ansatz wird für 30 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend für 15 Min. auf 80°C erhitzt.

Für die Sequenzierreaktion nach Sanger werden folgende Reagenzien in ein 0,5 ml PCR Tube pipettiert:

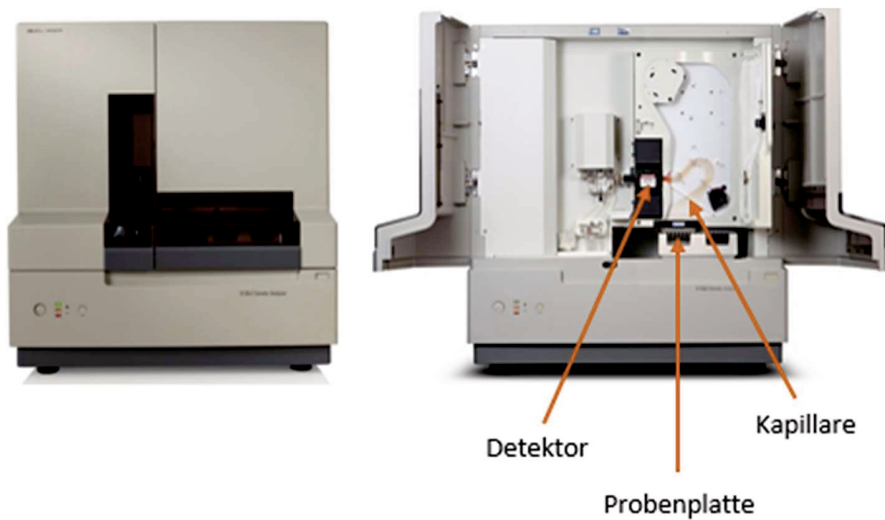
- 6 µl PCR Produkt
- 1 µl Primer (Uni40 ODER rev48)
- 1 µl H₂O
- 1,6 µl Sequenzierungs Puffer (BigDye Premix)
- 0,4 µl BigDye

Der Ansatz durchläuft im Thermocycler folgendes Program: (10'' 95°C, 4' 55°C)₃₀.

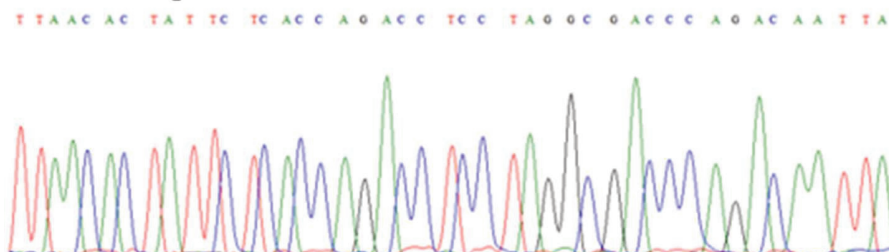
Nach erfolgter Sequenzierreaktion wird der Ansatz mit 1 µl 0,22 %igem SDS versetzt und für 5 Min. auf 98°C erhitzt. Anschließend erfolgt eine finale Aufreinigung mit Sephadex G-50 fine.

- Sephadex mithilfe einer Matrixplatte in eine Sequenzaufreinigungs (SA-) Platte geben.
- 300 µl H₂O auf die Säulchen pipettieren und 2.5 h bei 4°C quellen lassen.
- SA-Platte auf einer 96er Zellkultur Platte befestigen und 3 Min. bei 4°C und 1300 g zentrifugieren.
- 150 µl H₂O auf die Säulchen pipettieren und 3 Min. bei 4°C und 1300 g zentrifugieren.
- 96er Zellkultur Platte gegen eine 96er PCR Platte austauschen.
- Sequenzieransatz mittig auf die Säulchen pipettieren.
- 5 Min. bei 4°C und 1300 g zentrifugieren.
- 5 µl Hi-Di Formamid auf die aufgereinigten Proben pipettieren.
- PCR Platte mit Septum verschließen und 3 Min. bei 95°C im Thermocycler denaturieren.

Die Proben können nun in einem Kapillarsequenzierer (ABI 3130xl) sequenziert werden.



Elektro-Pherogramm:



Versuch 6. Qualitativer Expressionsnachweis von SPAM1

Aus Versuch 3. haben Sie 11 µl gesamt RNA behalten. Diese repräsentiert das gesamte Transkriptom des Gewebes, aus dem die RNA isoliert wurde. Die enthaltenen mRNAs geben Aufschluss darüber, welche Gene in diesem Gewebe aktiv sind (zumindest transkriptionell). Die Expression eines spezifischen Gens werden wir im Folgenden qualitativ überprüfen.

Hintergrund SPAM1:

UniProtKB entry: *“Involved in sperm-egg adhesion. Upon fertilization sperm must first penetrate a layer of cumulus cells that surrounds the egg before reaching the zona pellucida. The cumulus cells are embedded in a matrix containing hyaluronic acid which is formed prior to ovulation. This protein aids in penetrating the layer of cumulus cells by digesting hyaluronic acid.”*

Zu der RNA Probe (10 pg - 5 mg gesamt RNA) werden hinzugegeben:

- 1 µl Random Hexamere (N6)
- 1 µl dNTP Mix (je 10 mM)

Lösung für 5 Min. bei 65°C inkubieren, dann 1 Min. auf Eis abkühlen lassen und folgende Komponenten hinzugeben:

- 4 µl 5x First-Strand-Buffer
- 1 µl 0,1 M DTT
- 1 µl RiboLock (RNase-Inhibitor)
- 1 µl SuperScript IV Reverse Transkriptase (RT)

Lösung durch auf- und abpipettieren mischen. Dann folgen drei Inkubationsschritte:

- 5 Min. bei Raumtemperatur: Annealing und initiale Elongation der Random Hexamere.
- 10 Min. bei 50°C: Endelongation des cDNA-Strangs.
- 10 Min. 80°C: Thermische Inaktivierung der Reversen Transkriptase.

Die Probe kann nun bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Führen Sie nun drei PCRs mit jeweils 1/2/5 µl cDNA als Template durch. Welche Elongationszeit sollten Sie für das Programm im Thermo-Cycler einstellen unter der Annahme, dass eine Taq-Polymerase ca. 1 kb pro Minute synthetisiert?

- Primer up: AAGGAAAGCACAGCCCTTTT
- Primer down: TTGAGGCTTCCCCACATTAC
- T_a = 60°C

Zielsequenz (genomisch). Exon rot / Intron schwarz. Primer-Bindestellen unterstrichen:

```
[ . . . ] GCTTTGATATAGAACAGAGAAGAAATGATGAGATCAACTGGTTGTGGAAGGAAAG
CACAGCCCTTTTCCCATCCATTTATTTGAACAGCAAATTTAAATCTTCTCCATTCGCTGC
TCTTTATGTCCGCAATCGTGTTTTGGAGCCATTAGGGTTTCTAAAGTAAAAATGTTAA
ACATCCACTTCCGATCTTTGTATATGCCCGTCCAGTTTTACTGATGTGTTGTTGAATA
TCTTACAGAGGTGAGTAAATCAAGGCATGAGGCCTATGAACTAGTGTCCACAAAAGGTGT
TTAGTGGAAATCCAACATCATTTTCAAAGGGAGTGAGATTTAGCTTTTAAATATCCTTAGG
AATATTCACATTGGTGACTGTACTGTATACGCATATGAAAAAGAAATATATTTTCATTT
TAATGTAATCATATAATAATCTTAAGAACAATAAAAACTAGGTAGAGTAGACAATATAGT
AACTCAGTTCCTTTTTTGGCTTTCATGGGTTTTGCTCTTTTATCAATAGAAGCAATTAAT
ACAATAACAGAAAAATCTGTAATTTGTTATAGTAGCATAGTGGTGGCAACAAGGATAGAA
ATAAATAGTGGGAAGACTTAAATTTATTATTGTTGAGCCAGAATCTTAGCTTTGGTGT
ATTTGTTATGCATAGTATTTCTATTTTATTGTTAACTCTTTTGTGCACATTCGCCAGG
AGGATCTTGTGAATACAATCGGTGAATCAGTTTCTCTAGGTGCTCTGGAATGTAATGT
GGGAAGCCTCAATTTAACCCAAAATGTGGTAAGTTGAATTGATAGGAAATAGATGAAA
CATTCCACTTTTAAATGTGTTGAGGATTGTTGTGAGTACTGAATAATAAAATAA [ . . . ]
```