

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und Chemikalien

2.1.1. Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien im *pro analysi* Grad von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) beschafft. Radioisotope sowie die Nylonmembran HybondN⁺ wurden von Amersham (Braunschweig) gekauft. UltraPURE Agarose von GibcoBRL (Eggenstein) wurde für Agarosegele verwendet, Seaplaque GTG low melting point Agarose von FMC (vertrieben durch Biozym, Hessisch Oldendorf) wurde für präparative Gele sowie für das Einbetten von Zellen in Agaroseblöckchen benutzt. Trizol ist von GibcoBRL erhältlich.

2.1.2. Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (NEB, Schwalbach), Bethesda Research Laboratories (GibcoBRL, Eggenstein), Promega (Boehringer Ingelheim), Boehringer Mannheim, oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot), je nach Preis und Marktlage gekauft. Die Restriktionsverdauungen wurden entweder in den vom Hersteller mitgelieferten Puffer oder in den entsprechenden Boehringer Kompromißpuffern (A, B, L, M, H) angesetzt. Klenow Polymerase wurde von New England Biolabs oder Amersham verwendet. Taq Polymerase wurde von Perkin Elmer oder Promega bezogen, bzw. selbst isoliertes Enzym verwendet. T4 DNA Ligase und T4 Polynucleotid Kinase wurden von New England Biolabs gekauft. Die alkalische Phosphatase (calf intestinal phosphatase) wurde von Boehringer Mannheim beschafft, später wurde 'Shrimp alkaline Phosphatase' benutzt, die von Amersham geliefert wurde. RNase und DNase wurde von Sigma gekauft. ProteinaseK wurde von Sigma und Pronase von Boehringer Mannheim vertrieben. Lyticase und Agarase wurden von Sigma bezogen, und Gelase wurde von Calbiochem geliefert.

2.1.3. Molekulargewichts-Standards

Für normale Agarose Gele wurde als Molekulargewichtsmarker die 1Kb-Leiter von GibcoBRL oder mit *Hind*III geschnittene λ -DNA verwendet, die von NEB geliefert wurde. Um die Größe von PCR Fragmenten zu bestimmen, wurde mit *Hae*III geschnittene Φ X174-DNA von New England Biolabs oder MBI Fermentas verwendet. Für Pulsfeld-Gele wurden entweder selbst hergestellte *Saccharomyces cerevisiae* Chromosomen oder λ -Konkatemere von New England Biolabs genutzt.

2.1.4. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden nach der Posphoamidit-Festphasen Methode entweder von TIBmolbiol (Berlin), der hauseigenen Servicegruppe (MPI/Berlin), oder von MWGbiotech (München) synthetisiert. Siehe Tabelle 3 für Sequenzdetails.

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
<i>Olrep 1</i>	5'-ACCAGTGAAGATCACAAATCATTG-3'
<i>Olrep 2</i>	5'-AAGGCGCCGCAAACCAGCAC-3'
<i>Olrep 1-CUA</i>	5'-CUACUACUACUAAACCAGTGAAGATCACAAATCATTG-3'
<i>Olrep 2-CUA</i>	5'-CUACUACUACUA-AAGGCGCCGCAAACCAGCAC-3'
<i>MMA</i>	5'-AGAAAYRTGCAAACCTCCACCACACAGA-3'
<i>MMB</i>	5'-CCTGGAGTAAACCCACRCARACA-3'
<i>MMolC-bio</i>	5'-Bio-TGAGRNNAYRKTGCTRACCACT-3'
<i>Dana1</i>	5'-TGGCNNANTGGTYAGCARTN-3'
<i>Dana1rev</i>	5'-NAYTGCTRACCACTNNGCCA-3'
<i>AGA</i>	5'-AACCCCTCACTAAAGTACCGA-3'
<i>BGA</i>	5'-AACCCCTCACTAAAGATCCGA-3'
<i>adBam1=adAcc1</i>	5'-AACCCCTCACTAAA-3'
<i>adBam2</i>	5'-GATCTTTAGTGAGGGTT-3'
<i>adAcc2</i>	5'-GTACTTTAGTGAGGGTT-3'
<i>RHind-12</i>	5'-AGCTTGCGGTGA-3'
<i>RHind-24; RBgl-24</i>	5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'
<i>JHind-12</i>	5'-AGCTTGTTTCATG-3'
<i>JHind-24; JBgl-24</i>	5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3'
<i>NHind-12</i>	5'-AGCTTCTCCCTC-3'
<i>NHind-24</i>	5'-AGGCAGCTGTGGTATCGAGGGAGA-3'
<i>RBgl-12</i>	5'-GATCTTCCCTCG -3'
<i>JBgl-12</i>	5'-GATCTGTTTCATG-3'
<i>NBgl-24</i>	5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'
<i>NBgl-12</i>	5'-GATCTTCCCTCGG-3'
<i>MMACUA</i>	5'-CUACUACUACUACCTGGAGTAAACCCACRCARAC-3'
<i>MMBCUA</i>	5'-CUACUACUACUA CCTGGAGTAAACCCACRCARACA -3'
<i>Ops-2</i>	5'-TTTCAGTTTTGGGTGAACTATCC-3'
<i>Tbr-A</i>	5'-TCCATCAGACCACAGGACAT-3'
<i>FTC-12</i>	5'-TGTCAGGAGGAATGGGCCAAAATTC-3'
<i>M13fwd</i>	5'-GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAAGGGGGATGTG-3'
<i>M13rev</i>	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
<i>T7-PP</i>	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
<i>T3-PP</i>	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
<i>3/86</i>	5'-CCGGTCCGGAATCCCGGGT-3'
<i>5/86</i>	5'-GCACGCGTACGTAAGCTTGGATCCTCTAG-3'
<i>1A</i>	5'-CAGGCCCTTC-3'
<i>18A</i>	5'-AGGTGACCGT-3'
<i>1B</i>	5'-GTTTCGCTCC-3'
<i>12H</i>	5'-ACGCGCATGT-3'
<i>6P</i>	5'-GTGGGCTGAC-3'
<i>Amph-sense</i>	5'-AAGATGAGTCGAGTTGCTGTG-3'
<i>Amph-antisense</i>	5'-GAGCAAGGCCAGGTAGATTGGT-3'

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer

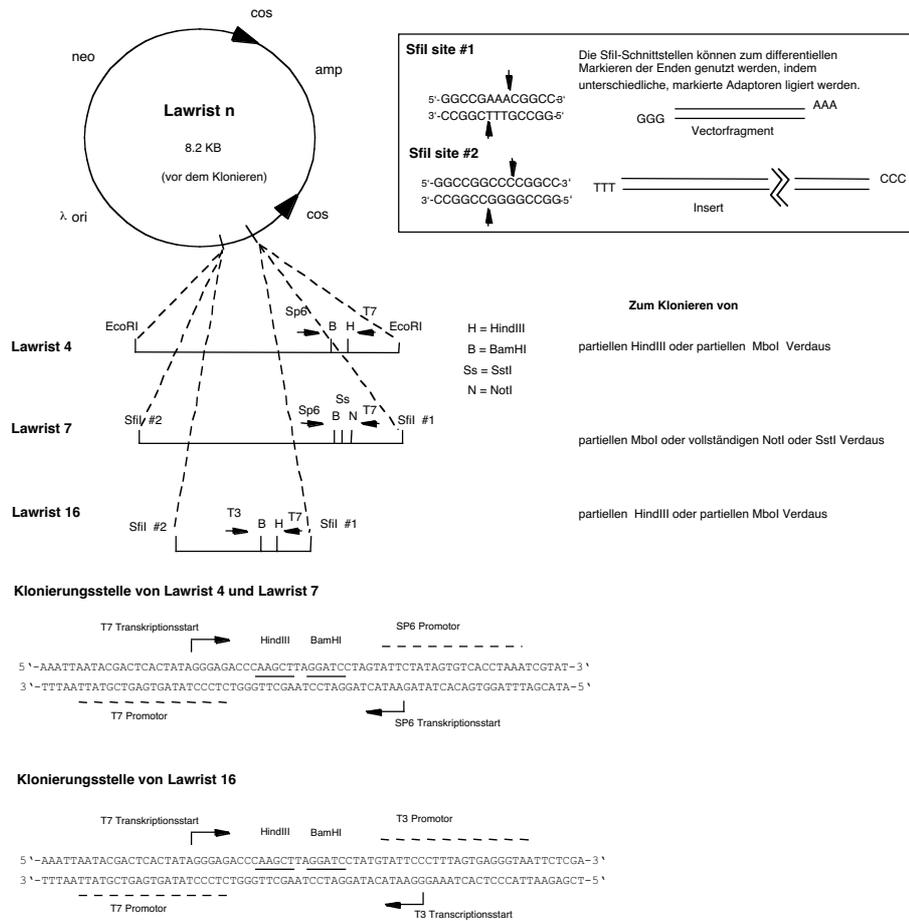


Abb. 14: Cosmidvektoren der Lawrist-Serie

2.1.6. E. coli-Stämme, Zelllinien und Fische

2.1.6.1. E. coli:

DH5α:

F⁻, mcr A, Δ(mrr-hsd RMS-mcr BC), φ80dlac ZΔM15, Δ(lac ZYA-arg F), U169, deo R, rec A1, end A1, sup E44, λ⁻, thi -1, gyr A96, rel A1.

Dieser Stamm wurde für Cosmidklonierung und für das Vermehren von kleinen Plasmiden genutzt.

DH10B:

F⁻, mcr A, Δ(mrr-hsd RMS-mcr BC), φ80dlac ZΔM15, Δlac X74, deo R, rec A1, end A1, araD139, Δ(ara, leu)7697, gal U, gal K, λ⁻, rsp L, nup G.

DH10B ist der Wirtstamm für PACs.

Pop 2136

F⁻, end A1, hsd R, mal T_{Pr}, cl857, mal PQ.

Dieser Stamm wurde zur Vermehrung der Lawrist-Vektoren genutzt.

2.1.6.3. Zebrafisch (*Danio rerio*) Zell-Linien

Die Zelllinien ZF4 AB9, SJD1, SJD2 und SJD5 wachsen fibroblastartig als 'monolayer'. ZF4 (W. Driever, 1994), entstammt aus regenerierenden Flossen des AB-Stamms, AB9 wurde von AB Embryonen isoliert und wurde zur Herstellung der 'Irradiationhybrids' (Ekker et al, 1999) verwendet. SJD 1, SJD 2 und SJD 5 sind unabhängige Isolate des Darjeeling-'Stamms' (S. Johnson, pers. Kommunikation).

2.1.6.4. Zebrafisch (*Danio rerio*)

Der Tü-Zebrafisch Wildstamm stammt aus einer örtlichen Zoohandlung, wurde für einige Generationen durch Geschwisterverpaarung vermehrt und war die Grundlage des Tübingen-Mutagenese-Screens.

Die AB Wildtyp-Linie wird seit vielen Generationen im Labor gezüchtet und eignet sich besonders gut für *in vitro*-Fertilisationen, da die Eier durch leichten Druck auf das Abdomen der Weibchen gewonnen werden können.

Die C32-Linie wurde von einer AB Embryos durch 'early pressure' gewonnen, ist also fast isogenisch.

Die Wik-Linie und die Ind-Linie sind ebenfalls Wildtyp Linien. Wik wird zusammen mit Tue für die Tübingen-CA-repeat-Karte verwendet, und Ind zusammen mit AB für die Boston 'CA-repeat'-Karte. (Knapik et al. 1997)

Bei der SJD-Linie handelt es sich um eine fast isogenische Linie, die aus einer Darjeeling-Population durch 'early pressure' erhalten wurde. Zusammen mit der C32-Linie bildet sie die Grundlage für die RAPD-Karte (Postlethwait et al. 1994).

2.1.6.5. Medakafisch (*Oryzias latipes*)

Im Medakafisch gibt es einige gut getrenne Linien. Die AA2- und Cab-Linie entstammen der südlichen Population, während die HNI- und Kaga-Linie von Populationen aus Nordjapan isoliert wurden. AA2 und HNI waren die Grundlage für die genetische Koppulngskarte, allerdings sind diese Stämme aus ungeklärten Gründen in Europa schwierig halten. Es wurde daher eine weitere Referenzkreuzung auf Grundlage von Cab und Kaga durchgeführt.

2.2. Häufig verwendete Lösungen

AL1	50 mM Glukose 10 mM EDTA 25 mM Tris/HCl pH 8,0
AL2	0,2 M NaOH 1% SDS
AL3	3M KOAc pH 5.5
Antibiotika (1000 x)	50 mg/ml Ampicillin in 50% Ethanol 30 mg/ml Kanamycin
CIA	96 % v/v Chloroform 4 % v/v Isoamylalkohol
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
100 x Denhardt's	2% Ficoll 2% Polyvinylpyrrolidon 2% BSA

Enzymverdünnungs-Puffer	50 % Glycerin 50 mM KCl 10 mM Tris/HCl pH 7.5 1 mM DTT 200 µg/ml BSA
Gelladepuffer	5 M Harnstoff 10 % w/v Saccharose 10 % w/v Ficoll 0,5 % w/v SDS 0,05 % w/v Xylencyanol 0,05 % w/v Bromphenol blue 0,1 % OrangeG 20 % v/v Glycerin
Hybridisierungspuffer	'Church'-Mix: 7 % w/v SDS 0,5 M Natrium Phosphat pH 7.4 (1 % BSA) Formamid-Hyb-Mix: 30-50 % v/v Formamid 8 % w/v Dextranulphat 4 x SSC 50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.2 (mit Phosphorsäure eingestellt) 1 mM EDTA 10 x Denhardt's 25 µg/ml sonifizierte Salmonsperm DNA 0,1 % SDS Ssarc-Puffer: 600 mM NaCl 60 mM NaCitrat 7,2 % Sarcosyl
Neutralisierungspuffer	1 M Tris/HCl pH 7.5 1,5 M NaCl
10 x PBS	1,37 M NaCl 2,7 mM KCl 100 mM NaPhosphat (pH7.4)
Phenol	Kristallines Phenol wurde durch Zugabe von 1M Tris/HCl pH8.0 verflüssigt. Es wurde 0,1 % w/v Hydroxychinolin hinzugefügt und gemischt. Nachdem sich die Phasen wieder getrennt hatten, wurde die obere, wässrige Phase durch Absaugen entfernt. Das Phenol wurde solange mit 0,1 M Tris/HCl, pH 8.0, äquilibriert, bis der pH-Wert des Überstandes > 7.8 blieb. Das Phenol wird unter 0,1 Volumen 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Selbst wenn fertig äquilibriertes Phenol (Roti-Phenol, Roth) verwendet wurde, war es dennoch häufig nötig, es einmal mit Tris/HCl, pH 8,0 zu äquilibrieren und 0,01 % β-Mercaptoethanol und Hydroxychinolin hinzuzufügen.
PCIA	50 % v/v Phenol 50 % v/v CIA

RNase	10 mg/ml werden in 10mM Tris/HCl, pH 8.0 und 15mM NaCl gelöst. Um mögliche DNase-Kontaminationen zu beseitigen, wird die Lösung für 15 min. auf 100°C erhitzt, langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und dann bei -20°C gelagert.
SCE	1 M Sorbitol 1 M Natriumcitrat (pH 5.8) 10 mM EDTA
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
50 x TAE	2 M Tris-Acetate (pH 8,0) 50 mM EDTA (pH 8,0)
10 x TBE	0.9 M Tris-Base 0.9 M Bor-Säure 20 mM EDTA (pH 8,0)
10 x TE	100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)

2.3. Medien und Zellkultur

2.3.1. Bakterienmedien und Zellkultur

L-Broth	1 % w/v bacto-Trypton (Difco, GibcoBRL) 1 % w/v bacto-Yeast extract (Difco) 0,5 % w/v NaCl
2YT	1,6 % w/v bacto-Trypton (Difco, GibcoBRL) 1 % w/v bacto-Yeast extract (Difco) 0,5 % w/v NaCl
Agar-Platten	15 g Agar (Difco) pro Liter Flüssigmedium
SOB ⁻	2% w/v bacto-Typton (Difco) 0,5 % w/v bacto-Yeast extract (Difco) 10 mM NaCl 2,5 mM KCl
SOC	SOB ⁻ 20 mM Glucose (getrennt autoklavieren und nach Abkühlen zusetzen) 10 mM MgSO ₄
10 x HMFM	0,45 % w/v NatiumCitrat 0,9 % w/v (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,8 % w/v KH ₂ PO ₄ 6,3 % w/v K ₂ HPO ₄ 44 % w/v Glyzerin 0,36 % v/v 1 M MgSO ₄ (getrennt autoklavieren, und erst nach Abkühlung auf Raumtemperatur zusetzen)

Alle Bakterienmedien werden durch Autoklavieren bei 121°C für 20 min. im Flüssigprogramm sterilisiert. Größere Mengen YT, 2YT oder LB-Medium werden aus fertig gemischtem Pulver von 101 corp. (Kalifornien), was von Dianova bezogen wurde, angesetzt.

Bakterien, die Plasmide, PACs oder Cosmide enthalten, werden in 2YT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum und 1xHMFM bei -70°C gelagert. Wird ein bestimmter Klon benötigt, wird ein Aliquot der gefrorenen Kultur auf Agar-Platten zu einzelnen Kolonien ausgestrichen.

2.3.2. Zebrafisch Zellkultur

Die verwendeten Zebrafisch-Zell-Linien wachsen fibroblastartig als 'monolayer' in beschichteten Plastik-Zellkulturflaschen (Falcon oder Corning) in DMEM, das mit 10% FCS (Gibco 10106-078) supplementiert wurde, bei 28°C. Temperaturen bis zu 30°C wurden toleriert. Wenn die Zellen konfluent sind, werden sie zweimal mit PBS gewaschen, mit 0.25% Trypsin ohne EDTA (Gibco 043-05090H) trypsinisiert und dann, 1:5 verdünnt, neu ausplatiert.

Die Zebrafisch/Maus-Somatic Hybrids (Ekker et al.,1999), wurden bei 37°C und 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit gezogen.

DMEM: 1 x DMEM (10 x Stock, Gibco 12501)
 0,375 % w/v NaHCO₃
 Der pH-Wert wird mit NaOH auf pH 7.3 eingestellt)
 10 % v/v FCS
 Zur Komplement-Inaktivierung zuvor für 20 Min. auf 55°C erhitzt)
 1 x Glutamax (100 x, Gibco 35050-38)
 1 mM Hepes, pH 7,2
 10 µg/ml Gentamycin (50 mg/ml, Gibco 043-05750D)

Um Zellen einzufrieren, wurden gut wachsende, ca. 70% konfluente Zellen trypsinisiert, einmal in Medium ohne Hepes gewaschen, in 'freezing medium' aufgenommen und mit einer Rate von ungefähr 1°C/min auf -80°C abgekühlt. Innerhalb einer Woche wurde mit einem Aliquot eine Auftaukontrolle durchgeführt. Konnten die Zellen erfolgreich ausplatiert werden, wurden die übrigen Aliquots zur Langzeitlagerung in den N₂-Tank überführt.

Einfriermedium: DMEM ohne Hepes
 20% FCS
 10 % DMSO

2.4. Experimentelle Methoden

2.4.1. Nukleinsäure-Extraktionsprotokolle

2.4.1.1. *DNA Extraktion aus Zellen, Geweben und kleinen Tieren*
 (W. Brown, pers. Mitteilung, bzw. modifiziert nach Blin und Stafford, 1976)

DNA von Geweben oder kleineren Tieren (0,5-2 g) wurde gewonnen, indem die Tiere unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerstoßen wurden. Nach Abdampfen des Stickstoffs wurde das

Pulver auf eine große Oberfläche Lyse-Puffer (je nach Menge des Ausgangsmaterials ca. 5-30 ml in einer Petri-Schale) ausgebracht.

Von adhäsiv wachsenden Zellen erhielt man die DNA, indem die trypsinisierten Zellen von zwei konfluenten, großen Flaschen einmal in PBS gewaschen, in 2 ml PBS aufgenommen wurden, und dann tropfenweise zu 30 ml Lyse-Puffer in einem Erlenmeyer-Kolben gegeben werden. Dieser wird dabei schnell rotierend bewegt, um ein gründliches Vermischen sicherzustellen.

Die Lösung wurde dann in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und für eine Stunde bei 60°C inkubiert, um den Aufschluß zu vervollständigen. Anschließend wird das Lysat in einen Erlenmeyer-Kolben überführt, mit etwa dem halben Volumen (5-15 ml) Phenol versetzt und für 30 sec. durch schnell rotierende Bewegung gründlich gemischt. Dann wird das gleiche Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt und die beiden Phasen werden für weitere 10 min. emulgiert.

Nach Zentrifugation (4000 rpm für 10 min) wird die wäßrige Phase abgenommen und noch zweimal mit PCIA extrahiert. Die DNA wird mit zwei Volumen Ethanol aus der wäßrigen Phase gefällt, das Präzipitat in 70% Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und wird dann, je nach Ausgangsmaterial in 1-3 ml TE gelöst. Anschließend wird RNase zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml hinzugefügt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Es folgt eine ProteinaseK-Behandlung. Dazu werden ProteinaseK zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml und SDS zu 0,1% hinzugefügt, und dann bei 50°C für eine Stunde verdaut. Es schließen sich eine PCIA- und eine CIA-Extraktion an.

Die DNA wird durch Hinzufügen von NaOAc zu einer Endkonzentration von 300 mM sowie zwei Vol. Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst.

Dieses Verfahren gewinnt man sehr saubere, hochmolekulare DNA, die sich gut mit Restriktionsenzymen verdauen läßt und in den meisten Fällen ausreichend für Cosmidklonierung ist.

Lyse-Puffer:	7 M Harnstoff
	150 mM NaCl
	10 mM Tris/HCl pH 8.0
	1 mM EDTA
	2% SDS

Anstelle des harnstoffhaltigen Lyse-Puffers, kann auch TEN30 (10 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl, pH 8.0; 30 mM NaCl) verwendet werden, um das Pulver zu dispergieren. SDS und Pronase werden dann zu einer Endkonzentration von 1% bzw. 100 µg /µl hinzugefügt und über Nacht bei 55°C inkubiert.

Nach zwei bis drei PCIA-Extraktionen wird die DNA durch Hinzufügen von 2 Vol. Ethanol gefällt und anschließend in TE aufgenommen. Die RNase- und ProteinaseK-Behandlungen folgen wie oben.

2.4.1.2. DNA Extraktion aus einzelnen Zebrafisch-Embryos (Laird et al., 1991)

Dieses Verfahren kann zum Extrahieren hochmolekularer, relativ gut verdaubarer DNA aus kleinsten Mengen Materials genutzt werden. Aus einem einzelnen Embryo werden etwa 2 µg DNA gewonnen: Larven, die bereits geschlüpft sind (Tag 5) werden betäubt, und in einzelne Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte mit 200 µl Lyse-Puffer überführt. Die Platte wird mit einer Klebefolie versiegelt, und dann bei 50°C für ein bis zwei Tage inkubiert. Die DNA wird mit 0.6 Vol. Isopropanol gefällt, und die Pellets zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. (Es empfiehlt sich, die Lysate in Eppendorf-Gefäße zu überführen, und die DNA darin zu fällen. Die Pellets werden kurz getrocknet und dann in 20 µl TE aufgenommen. Die DNA löst sich innerhalb mehrerer Stunden.

Lyse-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 8,5
	200 mM NaCl
	0,2 % SDS
	5 mM EDTA
	100 µg/ml ProteinaseK

sedimentiert. Der Überstand wird gefiltert (z.B. durch Schleicher und Schuell 311 651). Die DNA wird durch 0,6 v/v Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation bei Raumtemperatur bei 8000 rpm (GSA) für 15 min. pelletiert.

Anschließend wird die DNA in 3,8 ml TE aufgenommen und mit 4,4 g CsCl versetzt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (30 min. 10000 rpm) kann ein Teil der kontaminierenden RNA entfernt werden. Der klare Überstand wird in ein Polyallomer 'Quick-seal tube' (Beckmann 342412) überführt, 100 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt, das Röhrchen mit 1 g/ml (w/v) CsCl-Lösung aufgefüllt und anschließend zugeschweißt. Die Gleichgewichtszentrifugation erfolgt in einer Beckmann L8-M Ultra-Zentrifuge im VTi65.2 Rotor für 20 Stunden bei 25°C und 50.000 rpm durchgeführt, wobei die Deceleration=0 gesetzt wird. Nach Beendigung des Laufs ist die untere 'supercoiled' Bande meist schon bei normalem Tageslicht sichtbar und wird mit einer 22 Gauche Kanüle abgenommen. Das Ethidiumbromid wird durch vier aufeinanderfolgende Extraktionen mit einem gleichen Volumen NaCl gesättigtem Isopropanol entfernt und die DNA durch 3 Vol. 75% Ethanol und Zentrifugation bei 7000 rpm im Sorvall SS34-Rotor pelletiert. Die DNA wird noch zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend in 500 µl TE aufgenommen.

Zur schonenderen Vektorpräparation, wie es für die SacBII-haltigen Vektoren nötig ist, wurde eine Methode ('cleared lysat') verwendet, bei der keine Denaturierung der Plasmid-DNA erfolgt: Mit einer einzelnen Kolonie werden 10 ml LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin inokuliert und 8-10 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. 5 ml der Vorkultur werden benutzt, um 1 L LB mit dem entsprechenden Antibiotikum anzuimpfen und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die anderen 5 ml werden dazu benutzt, die Identität des Vektors durch Miniprep und Restriktionsverdau zu bestätigen.

Die Zellen der gesättigten Hauptkultur werden durch Zentrifugation im Sorvall GSA-Rotor bei 6000 rpm für 15 min. pelletiert und anschließend in 7 ml PufferA resuspendiert. Es werden 166 µl Lysozym (45 mg/ml) zugefügt und für 15 min. auf Eis unter gelegentlichem, vorsichtigem Mischen inkubiert. Anschließend werden 1,4 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung hinzugefügt und weitere 5 min. auf Eis inkubiert. Die Lösung wird mit 11,3 ml PufferB versetzt und die Zellen lysieren während einer 5 min. Inkubation bei Raumtemperatur. Zum Lysat werden 5,7 ml einer 5 M NaCl-Lösung hinzugefügt, gemischt, eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend eine Stunde bei 4°C und 18.000 rpm im Sorvall SS34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wird in ein sauberes Correx-Röhrchen überführt und mit 0,6 Vol. Isopropanol versetzt. Die DNA wird durch Zentrifugation bei 10.000 rpm im Sorvall SS34 Rotor pelletiert und anschließend in 19,5 ml TE aufgenommen. Zur weiteren Reinigung schließt sich eine isopyknische CsCl-Gleichgewichtszentrifugation wie oben beschrieben an.

PufferA: 25% w/v Saccharose
50 mM Tris/HCl pH 8.0

PufferB: 50 mM Tris/HCl pH 8.0
62 mM EDTA
2% w/v SDS

2.4.1.6. RNA-Extraktion

(nach Chomczynski und Sacchi, 1987)

Gesamt-RNA aus einem Amphioxus (0,5 g) wurde durch saure Phenol/Guanidinium-Isothiocyanat-Extraktion isoliert. Dazu wurde das Tier unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerstoßen und anschließend nach Abdampfen des Stickstoffs in 5ml Trizol (GibcoBRL) gelöst. Das Homogenat wird für 5-10 min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die Nukleinsäure-Proteinkomplexe vollständig zu dissoziieren. Die Phasentrennung erfolgt nach Zugabe von 1 ml Chloroform und gründlichem Mischen durch Zentrifugation bei 12000 g für 15 min. bei 4°C. Anschließend wird die wässrige Phase abgenommen und die RNA mit 2,5 ml Isopropanol gefällt. Die RNA wird durch Zentrifugation für 10 min. bei 12000g pelletiert, mit 75 %igem Ethanol gewaschen und in DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

DEPC-Wasser Wasser mit 0,1% DEPC wird über Nacht bei 37°C inkubiert, und anschließend autoklaviert.

2.4.2. DNA Manipulationen

2.4.2.1. Restriktionsverdau

Bis zu 5 µg DNA werden in einem Volumen von 20 µl verdaut. Dazu wird die DNA mit 5-10 Einheiten im 1 x-Reaktionspuffer des entsprechenden Restriktionsenzym für mindestens eine Stunde bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert.

Soll in Agarose eingebettete DNA verdaut werden, werden die Blöcken zuerst gründlich in TE gewaschen, um weitgehend die ProteinaseK sowie das EDTA zu entfernen. Die zurückbleibende ProteinaseK wird durch Inkubation in 0,1 mM PMSF-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur inaktiviert. Anschließend werden die Blöckchen noch mehrmals in TE gewaschen und dann für eine halbe Stunde in mindestens dem zwanzigfachen Volumen des Blöckchen in 1 x Restriktions-Puffer äquilibriert. Das Volumen für den Restriktionsverdau muß genügend groß sein, um das ganze Blöckchen zu bedecken. In einer typischen Reaktion wird 1/5 bis 1/3 eines Standard-Blöckchens (5-15 µg DNA in 100 µl) mit ca. 50 Einheiten des Restriktionsenzym in einer 200 µl Reaktion bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für mindestens vier Stunden inkubiert.

Typischer Ansatz:

- 30 µl 1/3 Agaroseblöckchen, auf 1 x Restriktionspuffer äquilibriert
- 17 µl 10 x Enzympuffer
- 5 µl 100 mM DTT
- 5 µl 100 mM Spermidin
- 5 µl 2 % Gelatine oder 1% BSA
- 40-60 units des entsprechenden Restriktionsenym
- ad 200 µl mit dH₂O

PMSF-Stocklösung: 100 mM PMSF in Isopropanol

2.4.2.2. Partieller Verdau für Cosmid-Klonierung

Partielle Restriktionsverdaus für die Herstellung von Cosmid und PACs werden hergestellt, indem die DNA mit einer limitierten Menge *MboI* oder *Sau3A* für eine definierte Zeit verdaut wird. Wird dazu in Agarose eingebettete DNA verwendet, werden die Blöckchen zunächst mit dem Enzym in einem Puffer ohne Mg²⁺ vorinkubiert, und die Reaktion wird dann durch Hinzufügen von MgSO₄ gestartet.

- 25 µl (=1/4 Block) Blöckchen, äquilibriert in 1 x A⁻-Puffer
- 17,5 µl 10 x A⁻-Puffer
- 4,0 µl BSA (10 mg/ml)
- 5,0 µl Spermidin (250 mM)
- 5,0 µl DTT (100 mM)
- 140,5 µl H₂O

werden für 30 min. auf Eis inkubiert; dann werden 1 µl einer *MboI* Verdünnung (0,5 U/µl, 0,25U/µl, 0,125 U/µl, 0,0625 U/µl, 0,03125 U/µl in EDB hinzugefügt, vorsichtig gemischt und weitere zwei Stunden auf Eis inkubiert.

Um die Restriktionsreaktion zu starten, werden 2 µl einer 1 M MgSO₄-Lösung hinzupipettiert und dann für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird abgestoppt, indem der Überstand gegen 500 µl kaltes TE ausgetauscht wird und auf Eis gestellt wird. Der Fortschritt der Verdaus wird durch PFG-Elektrophorese kontrolliert und für den präparativen Ansatz wird die Enzymmenge gewählt, die einen leicht unterverdauten Eindruck macht.

Für Partialverdaus von flüssiger DNA ist keine Präinkubation mit dem Enzym notwendig. Für eine Titrationsreihe werden 10 Eppendorf-Gefäße vorbereitet, die in 45 µl jeweils 1 µg genomischer DNA, 5 µl 10 x A⁻-Puffer und 2,5 µl 2 % Gelatine enthalten. Dann werden 9 verschiedene *MboI*-Verdünnungen in EDB von 0,5 U/µl bis 0,0016 U/µl hergestellt, und jeweils 5 µl der Verdünnung wird in das entsprechende Reaktionsgefäß gefügt und vorsichtig gemischt. Die Reaktion wird für 30 min. bei

37°C inkubiert und anschließend durch Hinzufügen von 10 µl 0,5 M EDTA und Inkubation bei 65°C für 15 min. abgestoppt.

Sobald die optimalen Bedingungen für den Partialverdau gefunden sind, wird ein präparativer Verdau mit 2 Blocks bzw. 5-10 µg flüssiger DNA durchgeführt, wobei genau die Bedingungen des Vorversuches wiederholt werden. Wurde DNA in Agarose-Blöckchen verwendet, wird anschließend die Agarose durch Verdau mit Gelase (Epicentre, Cambridge) entfernt. Dazu werden die Blöckchen in TEN30 äquilibriert, bei 70°C verflüssigt und dann auf 42°C abgekühlt. Pro 100 µl Agarose wird 1 U Gelase vorsichtig untergemischt und 4-10 Stunden bei 42 °C inkubiert. Anschließend erfolgt eine PCIA-Extraktion und die DNA wird durch Hinzufügen von NH₄OAc zu einer Endkonzentration von 2,5 M und 2 Vol. Ethanol gefällt.

10 x A ⁻ -Puffer:	330 mM Tris-Acetat, pH 7,8 660 mM K-Acetate
10 x A-Puffer:	330 mM Tris-Acetat, pH 7,8 660 mM K-Acetat 100 mM Mg-Acetat
EDB:	50 mM KCl 10 mM Tris/HCl pH 7,5 0.1 mM EDTA 1 mM DDT 200 mg/ml BSA 50 % Glycerin
10 x TEN30	100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0) 300 mM NaCl

2.4.2.3 Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden

Um die Selbstligation von Vektor-DNA oder von kleineren Inserts bei der Cosmidklonierung zu verhindern, werden die Phosphatgruppen an den 5'-Enden durch alkalische Phosphatase (CIP) entfernt. Dazu werden im Falle von überhängenden 5'-Enden 100 pmol und im Falle von 'blunt ends' 2 pmol DNA-Enden in einer 50-100 µl Reaktion mit jeweils 1 Unit Calf Intestinal Phosphatase (Boehringer, Mannheim) versetzt und für 30-60 min. bei 37°C inkubiert.

Der Erfolg der Reaktion wird durch eine Kontroll-Ligation mit und ohne Kinase überprüft.

Die Phosphatase wird durch Hinzufügen von 5 mM EGTA, 0,5% SDS, 100 µg/ml ProteinaseK und Inkubation bei 55°C für 30 min. inaktiviert.

10 x CIP-Puffer :	10 mM ZnCl ₂ 10 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCl pH 8,5
-------------------	--

Alternativ kann SAP (=Shrimp Alkaline Phosphatase), die von Amersham bezogen wird, verwendet werden. Dieses Enzym kann bereits durch Erhitzen vollständig inaktiviert werden.

2.4.2.4 Ligation

Inserts werden in einen Plasmid-Vektor ligiert, indem Vektor und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:3 unter Rezirkularisierungsbedingungen (2-10 ng/µl) mit 10 u/µl T4-DNA Ligase gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert werden. Vor einer Elektrottransformation muß die Reaktion noch durch Dialyse gegen 0,5 x TE entsalzt werden. Dies erfolgt am einfachsten mit einer Millipore 0.025 VS filter disc, die mit der glänzenden Seite nach oben auf der TE-Verdünnung schwimmt und auf den der gesamte Ligationsansatz pipettiert und für 30 min. dialysiert wird.

Für die Cosmid-Klonierung erfolgt die Ligation mit einem molaren Überschuß an Vektorarmen. In einem typischen Ansatz werden 1-2 µg genomische DNA mit 1 µg Vektorarmen in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 100 u T4-DNA Ligase gemischt und ebenfalls bei 16°C für 10-16 Stunden inkubiert. Diese Reaktion braucht vor einer *in vitro*-Verpackungsreaktion nicht weiter aufgereinigt zu werden. In jedem Falle empfiehlt es sich, parallel Kontroll-Ligationen ohne Insert-DNA durchzuführen.

10 x Ligase-Puffer	500 mM Tris/HCl, pH 7,8
	100 mM MgCl ₂
	10 mM DTT
	10 mM ATP
	0,5 mg/ml BSA

2.4.2.5. Ligation von Adaptern

Um die Komplexität eines Genoms um 2-3 Größenordnungen zu reduzieren, können Amplikons hergestellt werden. Dazu wird zunächst das Genom einem Restriktionsverdau unterzogen und anschließend werden zur Restriktionsstelle komplementäre Adapter ligiert.

Um Konkatemerbildung zu unterdrücken, ist keiner der Adapterstränge phosphoryliert, und sie werden im etwa 10fachen molaren Überschuß gegenüber den genomischen Restriktionsfragmenten eingesetzt. Die Adapter werden hergestellt, indem gleiche Mengen der beiden Stränge zunächst für 3 min. auf 95°C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt werden. 1 µg verdaute, genomische DNA wird mit 5 ng Adaptor gemischt und in 15 µl 1 x Ligasepuffer mit 400 u Ligase über Nacht bei 16°C ligiert.

Bei einer anschließenden PCR-Reaktion muß beachtet werden, daß der 3'-Strang nicht kovalent an das genomische Fragment gebunden ist und erst eine Auffüllreaktion durchgeführt werden muß.

2.4.2.6 Herstellung eines Vektors mit 'T-Überhang

Taq-Polymerase fügt an die 3'-Enden von PCR Produkten einen Adenosyl-Überhang an. Um PCR-Produkte zu klonieren, ohne die Enden glätten zu müssen, kann man einen Vektor verwenden, der einen komplementären T-Überhang hat. Solch ein Vektor kann einfach hergestellt werden, indem

10 µg Klonierungsvektor, mit einem Restriktionsenzym geschnitten, das stumpfe Enden erzeugt (z.B. pBluescript mit <i>EcoRV</i> geschnitten)
5 µl 10 x PCR-Puffer
1 µl dTTP (100 mM)
3 u Taq-Polymerase

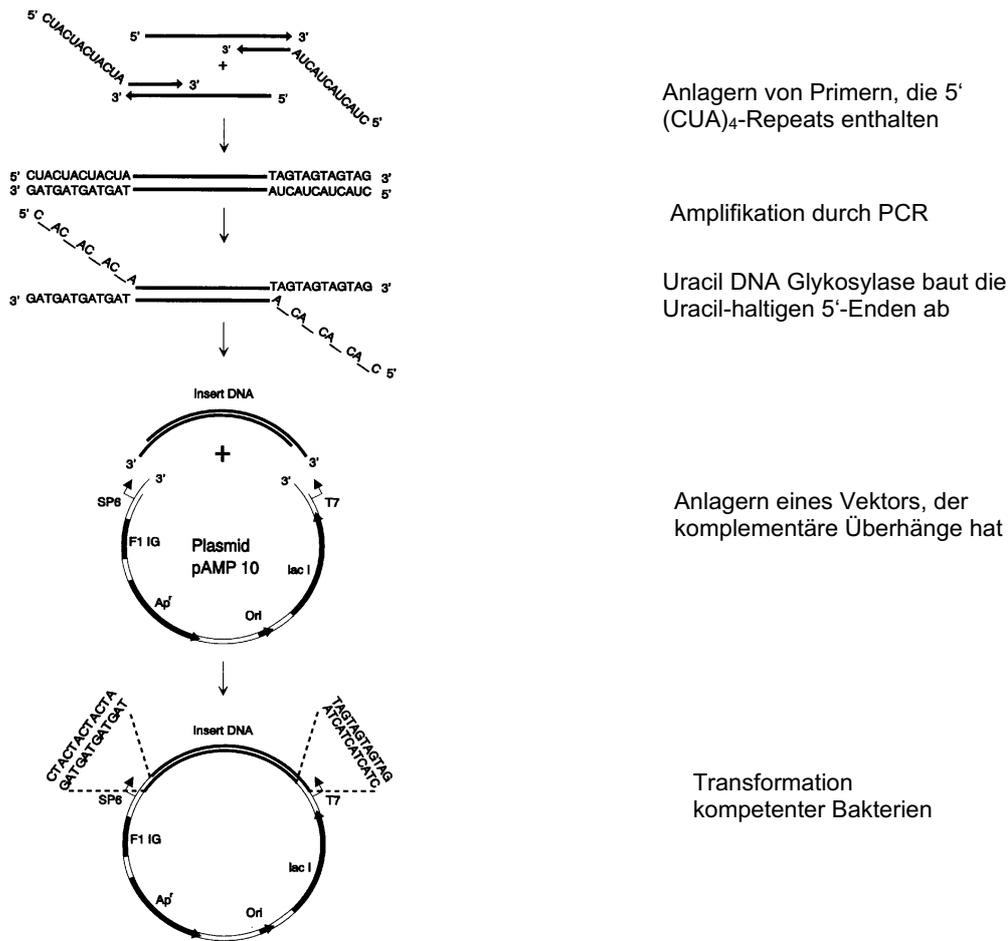
in einem Volumen von 50µl für 2 Stunden bei 72°C inkubiert werden. Nach Phenol-Extraktion und Ethanolfällung kann der Vektor in Ligationsreaktionen mit PCR-Produkten eingesetzt werden.

2.4.2.7. 'Annealing' an den pAMP10-Vektor

PCR-Produkte, die mittles eines Primers, der eine (CUA)₄-Wiederholung an seinem 5'-Ende enthält, können sehr effizient kloniert werden, indem sie an den von GibcoBRL erhältlichen pAMP10-Vector mit 3' CTA-Überhängen 'annealed' werden. 10-50 ng PCR Produkt werden dazu mit 25 ng Vektor und 1 u Uracil-DNA-Glycosylase in einem Gesamtvolumen von 20 µl Annealing-Puffer gemischt und anschließend für 30 min. bei 37°C inkubiert.

Vor einer Elektrottransformation wird der Annealing-Ansatz wie unter 2.4.2.4. beschrieben gegen 0,5 x TE dialysiert, wobei allerdings beachtet werden muß, daß die Reaktion ständig auf Eis gehalten wird.

10 x Annealing-Puffer	500 mM KCl
	200 mM Tris/HCl pH 8,4
	15 mM MgCl ₂



Anlagern von Primern, die 5' (CUA)₄-Repeats enthalten

Amplifikation durch PCR

Uracil DNA Glykosylase baut die Uracil-haltigen 5'-Enden ab

Anlagern eines Vektors, der komplementäre Überhänge hat

Transformation kompetenter Bakterien

Abb. 15: Schematische Darstellung der CUA-Klonierung im pAMP10-System.

2.4.2.8. Sonifizierung und Endreperatur

Zur Sequenzierung von Cosmid-Klonen werden 'shot-gun'-Bibliotheken hergestellt. Dazu werden 10 µg der durch CsCl-Gradient gereinigten Cosmid-DNA durch Ultraschall geschert. In jeweils 2 50 µl Aliquots wird die DNA für 20 sec. im B-30 'Cell Disrupter' (Branson Sonic Power Company) bei 'output' 5 und 40% 'duty cycle' sonifiziert.

Die Enden werden geglättet, indem 10 µg DNA in einem Volumen von 40 µl mit 2 µl dNTP (0,25 mM), 10 u Klenow-Enzym und 6 u T4 DNA-Polymerase für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Größenselektion (zwischen 1,5 und 2,5 kb) der DNA erfolgt auf einem präparativen LMP-Agarose-Gel. Die DNA wird nach Agarase-Verdau durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt.

2.4.3. Subtraktive Klonierung

2.4.3.1. RDA (Lisitsyn et al., 1993)

RDA (representational difference analysis) beruht auf einer subtraktiven und kinetischen Anreicherung von Restriktionsfragmenten, die in einer DNA-Population vorhanden sind, in einer anderen aber nicht (Abb. 16). Dazu wurden die DNAs von Tü- und AB-Fischen vollständig mit Bgl/II geschnitten, und mit R Adaptern versehen (RBgl24 und RBgl12). Nach Auffüllen der Enden mit Taq-Polymerase wird RBgl24-Primer hinzugefügt und in mehreren 100 µl Reaktionen genügendes Material für drei Subtraktionsrunden amplifiziert (20 Zyklen: 95°C für 30 sec. und 72°C für 3 min., mit einer abschließenden Verlängerung bei 72°C für weitere 5 min.). Die PCR-Produkte von Tester und Driver

werden mit 10 u *Bgl*II pro µg DNA behandelt, und um die Adaptern zu entfernen auf einem 2 % LMP-Agarose Gel aufgereinigt. Das Tester-Amplikon wird an neue Adapter ligiert (JBgl24, JBgl12). Anschließend werden 0,5 µg Tester DNA und 40 µg Driver DNA gemischt, mit Ethanol gefällt und in 4 µl 3 x EE-Puffer aufgenommen. Der Tropfen wird mit Mineralöl (Sigma) überschichtet, für 1 min. auf 95°C erhitzt, durch Hinzufügen von 1 µl 5 M NaCl auf 1 M NaCl eingestellt und für 20 Stunden bei 67°C hybridisiert. Anschließend wird der Ansatz auf 100 µl verdünnt, von denen 10 µl in 100 µl PCR-Mix (ohne Primer) zur Auffüllung der Enden für 5 min. inkubiert werden. Nach Hinzufügen des entsprechenden 24mers schließen sich 10 Zyklen PCR an (bei Verwendung des JBgl-Primers wird 'Annealing' und Verlängerung bei 70°C durchgeführt). Die DNA wird gefällt und in 30 µl aufgenommen; einzelsträngige DNA wird durch 30 minütige Inkubation mit 20 u Mung bean Nuklease in einem Volumen von 40 µl Reaktion abgebaut; 1:5 mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,7 verdünnt und 40 µl werden 20 Zyklen PCR-Reaktion unterworfen. Die Adapter werden abgebaut und entfernt, und an das dritte Set (NBgl 24, NBgl12) ligiert. Es schließt sich eine weitere Runde subtraktive PCR an.

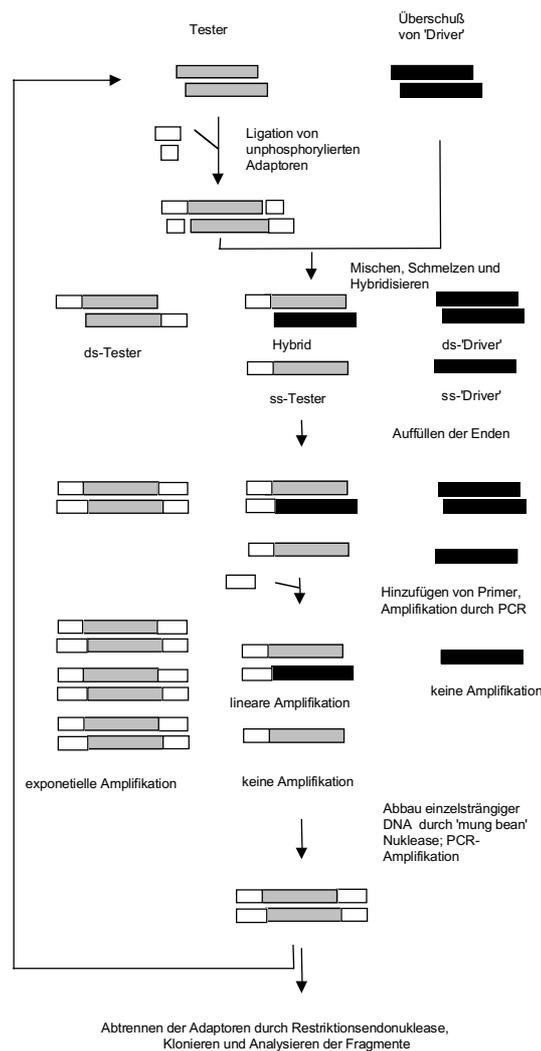


Abb. 16: Schematische Darstellung der RDA-Technik (representational difference analysis).

PCR-Reaktion: 20 ng adapterligierte DNA
 67 mM Tris-HCl, pH 8.8
 4 mM MgCl₂
 16 mM (NH₄)₂SO₄
 100 µg/ml BSA

300 μ M dNTPs
 1 μ M des entsprechenden Bgl24 Primers
 4 u *Taq*-Polymerase

10 x EE-Puffer: 100 mM EPPS (Sigma)
 10 mM EDTA

5 x Mung bean Nuklease-Puffer: 20 mM NaAcetat, pH 5,5
 50 mM NaCl
 1 mM ZnAcetat

2.4.3.2. Subtraktive Mermaid-Bank (Arielle)

Eine subtraktive Mermaid-Marker-Bank wurde erstellt, indem DNA eines Tue-Fisches mit dem MMCUA-Primer und die eines Wik-Fisches mit dem MMBio-Primer amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt des 'Drivers' wurde über eine G50 Sephadex-Säule aufgereinigt, um Reste des des biotinylierten Primers zu entfernen. Die beiden Amplikons wurden mit einem 10fachen Überschub an Wik-Amplikon gemischt, präzipitiert, das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich zu einer Konzentration von 300 ng/ μ l in 2,5 x EE resuspendiert werden. 4 μ l der DNA-Lösung werden mit Mineralöl überschichtet und in einer PCR-Maschine denaturiert. Es wird 1 μ l 1M NaCl hinzugefügt und für 20 Stunden bei 65°C hybridisiert.

Die Reaktion wird anschließend mit 15 μ l NTE verdünnt und zweimal mit jeweils 50 μ l, ebenfalls in NTE-äquilibrierten Streptavidin-beschichteten Dynal-beads für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diese Weise werden PCR-Produkte, die WIK-spezifisch sind entfernt.

Der Überstand wird gefällt, in 5 μ l TE aufgenommen und wie unter 2.4.2.7 beschrieben mittels des pAMP10-Systems kloniert.

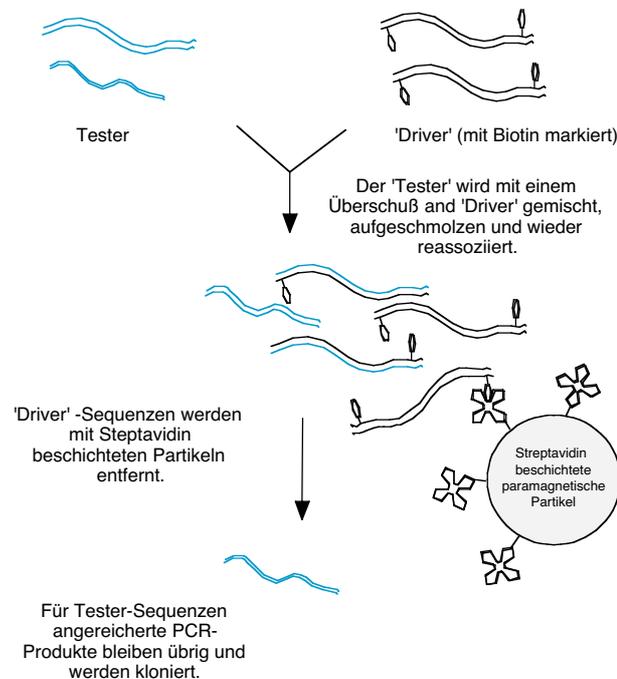


Abb. 17: Schematische Darstellung der Herstellung einer subtraktiven IRS-PCR-Bank.

2.4.4. Klonierungsverfahren

2.4.4.1. Elektrokompetente Bakterien

Elektrokompetente Bakterien werden hergestellt, indem in der logarithmischen Phase wachsende Bakterien dreimal mit WB gewaschen, und anschließend eingefroren werden:

Ein Milliliter einer Übernachtskultur wird in 1 L auf 37°C vorgewärmtes SOB⁻ verdünnt, und in 4-5 Stunden unter heftigem Schütteln bei 37°C wachsen gelassen. Sobald eine OD₅₀₀ von 0,6- 0,8 erreicht ist, wird die Kultur im Eiswasserbad abgekühlt und, verteilt auf 6 Zentrifugationsbechern, in einem vorgekühlten Sorvall GSA-Rotor bei 2000 rpm für 10 min. zentrifugiert. Die Zellen werden in insgesamt 1 L eiskaltem WB resuspendiert und erneut, bei 3500 rpm gesammelt. Die Zellen werden ein weiteres Mal in 1L WB gewaschen und bei 4500 rpm zentrifugiert. Danach werden die Zellen in 40 ml WB aufgenommen, in zwei 30 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und im Sorvall SS34-Rotor bei 7000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in einem kleinstmöglichen Volumen WB resuspendiert – normalerweise müssen 0,5-1 ml WB hinzugefügt werden. Aliquots werden in einer Trockeneis/Ethanol-Mischung schockgefrostet und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

WB: 10 % v/v Glycerin

2.4.4.2. Elektrotransformation

25 µl Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl der dialysierten Ligationsreaktion gemischt. Der gesamte Ansatz wird in eine Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand) von Biorad oder Euro-Gentech überführt und einem Spannungspuls von 1,68 kV, 25 µF und 200 Ω in dem Biorad Genepulser ausgesetzt. Die danach angezeigte Zeitkonstante τ sollte ungefähr 4,8 - 5 msec. betragen. Sollen größere Mengen der gleichen Ligationsreaktion transformiert werden, können auch 50 µl elektrokompetente Bakterien mit 2-3 µl Ligationsreaktion in einer 2 mm-Küvette mit 2,5 kV elektroporiert werden. Direkt nach dem Elektropuls wird 1ml SOC Medium hinzugefügt, die Reaktion in ein 12 ml Polypropylen-Röhrchen (z.B. Greiner 187261) überführt und für 30-60 min. unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Zur Titer-Bestimmung werden zwei verschiedene Aliquots (z.B. 0,5 und 5 µl) der Transformationsreaktion auf LB-Platten, die das jeweilige selektive Antibiotikum enthalten, platiert. Der Rest der Reaktion kann für mindestens 2 Tage mit geringem Titerverlust bei 4°C gelagert werden. Soll eine blau/weiß-Selektion erfolgen, werden zuvor 20 µl 5% Bluogal in DMF und 30 µl 1M IPTG gleichmäßig auf der Platte verteilt.

2.4.4.3. Cosmid-Klonierung

Cosmid-Vektorarme werden hergestellt, indem ein Vektor der Lawrist-Serie mit *ScaI* verdaut wird; die Enden werden dephosphoriliert und die Klonierungsstelle schließlich durch *BamHI*-Verdau geöffnet. Diese Arme werden an mit *MboI* partiell geschnittene genomische DNA ligiert und 5 µl der Ligationsreaktion werden mit dem GigapackIII Gold (Stratagene) *in vitro* verpackt. GigapackIII ist eine leicht zu handhabende 'single tube'-Reaktion, die sowohl die Phagenbestandteile (sonic extract) als auch die Verpackungsenzyme (freeze thaw extract) aus lysogenen *E. coli* enthält. Die Verpackungsreaktion wird für 90 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 500 µl PDB und ein Tropfen Chloroform hinzugefügt, vorsichtig gemischt und der Ansatz bei 4°C gelagert.

Als Wirt werden DH5α-Bakterien verwendet. Ein Milliliter einer Übernachtskultur wird in 100 ml LB-Medium, dem 10 mM MgSO₄ und 0,2% (w/v) Maltose hinzugefügt wurden, verdünnt und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₅₀₀ von 0,5 – 0,8 inkubiert. Anschließend werden Zellen durch Zentrifugation gesammelt und in 50 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Die 'Plating-Cells' sind bei 4 °C für einige Tage stabil.

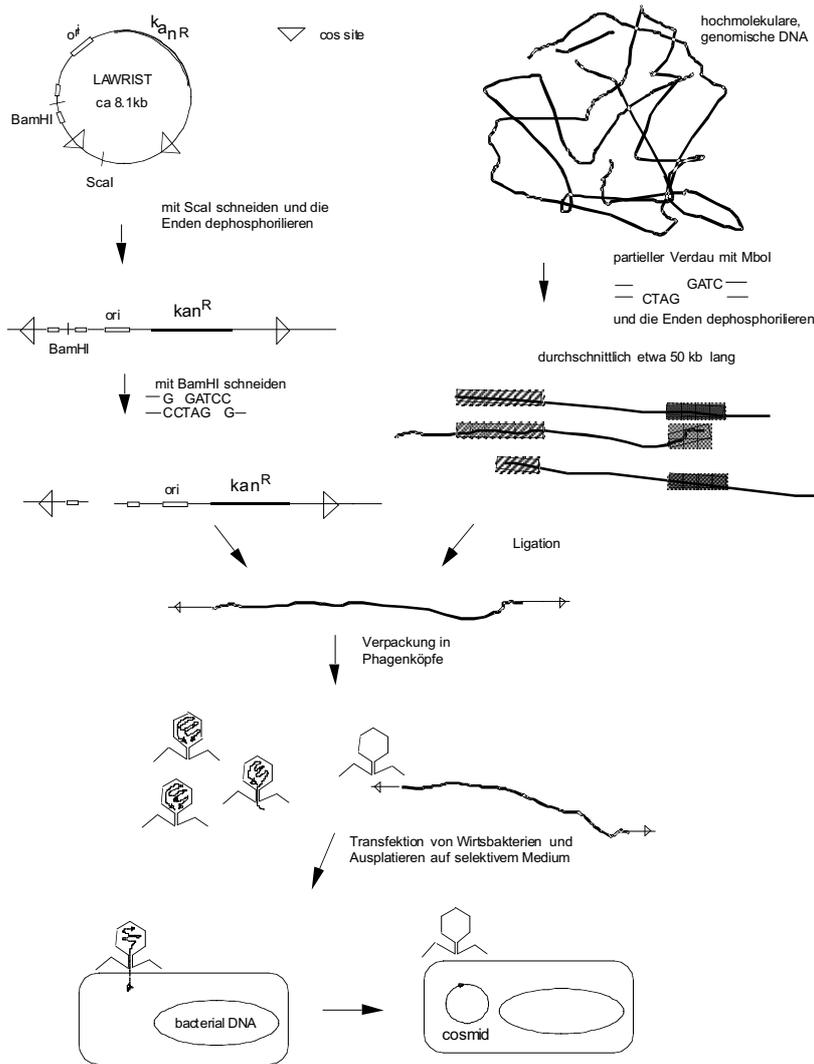


Abb. 18: Schematische Übersicht der Cosmidklonierung.

Der Titer der Cosmidbank wird bestimmt, indem 25 µl einer 1:5 und einer 1:50 Verdünnung in PDB ausplattiert werden. Dazu wird die Verdünnung mit 25 µl der 'Plating-Cells' gemischt, und bei Raumtemperatur für 30 min. inkubiert. Danach werden 200 µl LB-Medium hinzugefügt und für eine Stunde unter gelegentlichem Mixen bei 37°C invertiert. Der gesamte Ansatz wird auf einer LB +Kan-Platte plattiert und über Nacht bei 37°C belassen. Zum Ausplattieren der gesamten Bank wird jeweils in 25 µl PDB eine Verdünnung hergestellt, die 2000-3000 Klonen entspricht, und Wirtsbakterien wie oben beschrieben damit transfiziert.

Phagenverdünnungs-Puffer:
(PDB) 100 mM NaCl
 8 mM MgSO₄
 50 mM Tris/HCl pH 7,5
 0.01% Gelatine

2.4.4.4. *Picken und Handhabung von Genbibliotheken*

Genbanken sind potentiell wertvolle Ressourcen, die für Experimente - auch in anderen Laboratorien - zur Verfügung stehen sollten. Damit der Inhalt der Genbank möglichst unverzerrt repräsentiert bleibt, werden sie als primäre Klone, d. h. vor irgendwelchen Amplifikationsschritten, ausplattiert, einzeln gepickt und gelagert. Dazu werden auf eine 22 x 22 cm² große Agarplatte (Genetix) etwa 5000 primäre Klone plattiert, über Nacht bei 37°C zu Kolonien herangezogen und dann automatisch gepickt. Die CCD-Kamera des Picking-Roboters nimmt dazu von der Platte 48 Bilder auf, die digitalisiert

und mit Labview-Software analysiert werden. Um zu verhindern, daß schlecht getrennte Kolonien gepickt werden, werden nur Kolonien, innerhalb eines gewissen Größenlimits und mit einem definierten Verhältnis von horizontalem zu vertikalem Durchmesser gewählt. (In der Abbildung Sind nur Kolonien mit einem roten Kreuz durch die Bildanalyse ausgewählt worden – eine ist zu klein, bei zweien stimmt das Achsenverhältnis nicht, und eine Reihe kleinerer Kolonien wurde aufgrund ihres Grauwertes (blau/weiss-Selektion) ausgeschlossen.

Der durch einen XYZ-'Linear drive' (Cabee engenierring) kontrollierte 'Picking-head' kann mit einer Genauigkeit von 5 µm über der gesamten Arbeitsfläche gesteuert werden. Er ist mit 96 einzeln ansteuerbaren Nadeln bestückt, wird nun mit einer Nadel nach der andern über eine ausgewählte Kolonie positioniert und die Nadel wird ausgefahren. Sind auf diese Weise alle 96 Nadeln mit einem Klon beladen, wird eine 384-Mikrotiterplatte (Genetix), die pro Vertiefung mit 60 µl selektivem 2YT-Medium und 1x HMFM befüllt ist, angeimpft. Nachdem dieser Vorgang viermal für alle vier Quadranten wiederholt wurde, wird die Mikrotiter-Platte für 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Es können so etwa 2000 Klone pro Stunde gepickt werden. Bevor die Platten bei -80°C als Original-Kopie gelagert werden, werden noch weitere Kopien, durch Überimpfen in eine frische Mikrotiterplatte mit einem 384-Pin-Replikator, der zwischen den einzelnen Platten durch Abflammen sterilisiert wird, erstellt.

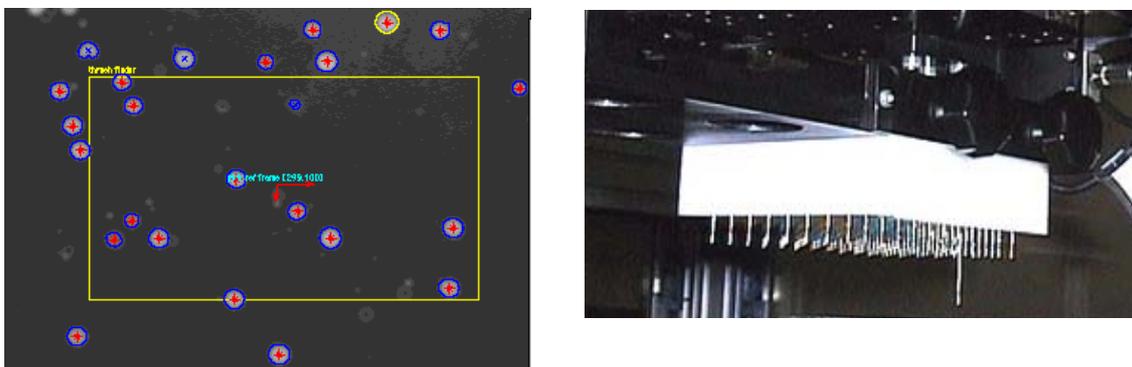


Abb. 19: Automatisches Picken mit dem Picking-Roboter. Links: Bildanalyse mit Labview-Software, rechts: 'Picking-head', der eine einzelne Nadel gerade ausgefahren hat.

2.4.5. Elektrophorese

2.4.5.1. Standard Agarose Elektrophorese

Standardmäßig werden 0,8%ige Agarose Gele für die Auftrennung von Cosmiden, die mit einem Restriktionsenzym mit einer 6 bp-Erkennungssequenz verdaut wurden, verwendet. Für die Auftrennung von PCR-Produkten bis 2 kb werden in der Regel 1,4%ige Gele verwendet. Die Gele werden in 0,5 x TBE hergestellt und in horizontalen Elektrophoresekammern, die von der hauseigenen Werkstatt konstruiert wurden, verwendet. Nach Auftrennung bei 0,5-5 V/cm werden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung (5µg/ml) gefärbt, die DNA wird unter kurzweiligem UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis entweder mittels Polaroid 667-Film oder des Herolab-Kamera-Systems dokumentiert.

2.4.5.2 Puls feld-Gel-Elektrophorese (PFGE)

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten über 25 kbp eignet sich die PFGE. Hier wurde ein CHEF-Apparat von Biorad (DRII) verwendet. Zur Überprüfung von partiellen Verdauungen für die Cosmidklonierung eignen sich besonders folgende Bedingungen:

1% Agarose in 0,5 x TBE, 6V/cm, 16°C, Pulszeit innerhalb von 16 Stunden linear ansteigend von 0,5-24 Sekunden. Zur Auftrennung größerer Fragmente wird die Pulszeit, sowie die Gesamtlaufzeit erhöht, und für kleinere Fragmente entsprechend erniedrigt.

2.4.6. Hybridisierungstechniken

2.4.6.1. 'Southern blotting' (Southern, 1975)

Durch Southern blotting werden DNA-Fragmente aus Agarosegelen auf Nylonmembranen transferiert. Sollen auch große Fragmente (>20 kb) übertragen werden, muß die DNA zuvor 'genickt' werden. Dazu wird das Gel, nachdem es gefärbt und fotografiert wurde, für 15 min. in 0,25 N HCl gelegt. Anschließend wird es kurz in dH₂O gespült und anschließend 30-40 min. in Denaturierungslösung inkubiert. Je nach Dicke des Gels, sollte diese während der Inkubationszeit einmal gewechselt werden. Es wird ein Kapillar-Transfer auf HybondN⁺ wie in Sambrook beschrieben aufgebaut. Als Transfer-Puffer wird ebenfalls Denaturierungslösung verwendet. Nach 10-16 Stunden wird die Membran in 2 x SSC oder 0,1 x Neutralisierungslösung neutralisiert, und die DNA wird im Stratalinker (Stratagen) im 'autocrosslink mode' an die noch feuchte Membran gebunden.

Für Gele mit PCR-Produkten wird der Depurinierungsschritt weggelassen; die Gele werden lediglich für etwa 30 min. in Denaturierungslösung und anschließend für 10 min. in Neutralisierungslösung geschwenkt. Als Transfer-Puffer wird in diesem Falle 20 x SSC verwendet. Nach dem Transfer wird die Membran kurz in 2 x SSC gespült und die DNA wie oben beschrieben fixiert.

2.4.6.2. Bakterienkolonie-Filter (Grunstein and Hogness, 1975; Nizetic et al., 1991)

18.000-27.000 verschiedene Bakterienkolonien werden auf eine 22 x 22 cm² Nylon Membranen (Hybond N⁺) gespottet, wobei zur einfacheren Identifizierung und Zuordnung die Klone einer Platte als Duplikate mit jeweils unterschiedlicher Anordnung zueinander auf die Membran aufgebracht werden. Der 'Spotting'-Roboter (cabe engineering) erlaubt die simultane Herstellung von bis zu 15 Filtern, die während des Spottingvorgangs auf einem mit LB-Medium befeuchteten Filterpapier liegen. Die Klone werden mit einem 384-Nadel-Kopf transferiert und die Nadeln werden vor jeder neuer Platte in 70%igem Ethanol gewaschen und durch Heißluft getrocknet. Sind die Klone aller Platten auf die Membran gespottet, wird diese vorsichtig auf eine 2YT-Agar-Platte mit dem entsprechenden selektiven Antibiotikum plziert und für 18-24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Bakterien werden *in situ* lysiert, und die DNA auf die folgende Weise fixiert: Zuerst wird die Membran für 3 min. auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Filterpapier gelegt. Dann werden Filterpapier und Membran auf eine Glasplatte, die über dem Wasserspiegel eines 95°C Wasserbades fixiert ist, transferiert und dort für 3 min. gedämpft. Anschließend wird die Membran auf ein mit Neutralisierungslösung getränktes Filterpapier gelegt und nach 3 min. für 20-40 min. in ProteinaseK-Puffer mit 150 µg/ml Pronase überführt. Die Membran darf bei allen Schritten nur an den äußersten Ecken hantiert werden, und es muß unbedingt darauf geachtet werden, daß die Kolonien nicht verwischen oder ineinander verlaufen. Nach dem Trocknen wird die DNA im Stratalinker im 'autocrosslink mode' fixiert.

ProteinaseK-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5
 50 mM EDTA
 100 mM NaCl
 1% N-Lauroylsarcosinate

2.4.6.3. Spotten von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte können direkt aus den 384-PCR-Platten (ABT) gespottet werden. Dazu müssen diese jedoch, um automatisch vom Roboter gehandhabt werden zu können, zur Versteifung in einen Metallrahmen eingefügt werden. Das Spotten selbst erfolgt mit dem gleichen Roboter, der auch zur Herstellung von Kolonie-Filtern dient. Die Hybond N⁺-Membranen liegen auf zwei Lagen, mit 0,4 N

Nicht eingebaute Nukleotide können vor der Hybridisierung durch Ethanol-fällung oder Gel-Chromatographie durch eine Sephadex G50-Säule entfernt werden. Um die DNA zu präzipitieren werden 8 µl einer 7,5 M NH₄OAc-Lösung sowie 100 µl Ethanol hinzugefügt, gemischt und für 15 min. bei maximaler Geschwindigkeit in einer Microfuge zentrifugiert.

2.4.6.5. Endmarkierung durch Kinasierung

Oligonukleotide können an ihrem 5'-Ende in einer Kinasierungsreaktion radioaktiv markiert werden. Dazu werden 30 pmol des Oligos in 20 µl für 3 min. auf 55 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Dann werden 3 µl 10 x Kinasepuffer (Ligasepuffer ohne ATP), 5 µl [γ -³³P] ATP und 2 µl T4-Polynukleotid Kinase (5 u/µl) hinzugefügt, gemischt und der Ansatz und bei 37°C für 30 –60 min. inkubiert. Der Einbau des Radiosotops kann mittels Dünnschichtchromatographie überprüft werden.

2.4.6.6. Hybridisation

Southern-Blots und Bakterienkoloniefilter werden meist in 'Church'-Puffer bei 65°C hybridisiert (Church and Gilbert, 1984). Dazu werden bis zu vier Filter in einer Glas-Hybridisierungsflaschen für etwa 30 min. mit 20 ml Church-Puffer vorhybridisiert. Dann wird die denaturierte Probe hinzugefügt und für 16 Stunden im Hybridisierungs-Ofen (Appligene) unter Rotieren inkubiert.

Nach der Hybridisierung werden die Filter in 2 - 0,1 x SSC mit 0,1% SDS, je nach gewünschter Stringenz, bei 65°C gewaschen. Der Puffer wird dabei innerhalb von zwei Stunden dreimal gewechselt. Die erste Waschung wird am einfachsten in der Hybridisierungsflasche durchgeführt.

Für Inter-Spezies-Hybridisierung werden die Filter in Formamid-Hybridisierungs-Puffer mit 30% Formamid bei 42°C hybridisiert und in 2-3 x SSC mit 0,1 % SDS gewaschen.

2.4.6.7. Hybridisierung von kurzen Oligonukleotiden

Die Membranen werden in Ssarc-Puffer für 10 min. vorhybridisiert Die markierte Oligo-Probe hinzugefügt und für wenigstens vier Stunden bei 4°C inkubiert. Die Filter befinden sich dazu in einer mit 5 rpm rotierenden Hybridisierungsflasche.

Bis zu 10 Filter können zusammen in 1 L Ssarc-Puffer gewaschen werden. Die Filter werden dazu in einer Pizza-Box bei 4°C auf einer wippenden Plattform (Rocky) für 20 min. inkubiert.

2.4.6.8. Detektion der Hybridisierungssignale durch Autoradiographie

Nachdem die Filter bei der erforderlichen Stringenz gewaschen wurden, werden sie in Saran Wrapp (Dow Chemicals) eingeschlagen und mit einer 'Intensifying screen' (Amersham) in einer lichtdichten Expositionskassette bei -70°C auf Hyperfilm-MP (Amersham) exponiert. Die Filme werden in einem Entwicklungsautomaten entwickelt.

Zur Detektion der Oligo-Fingerprinting Signale wird der in Saran-Wrapp eingeschlagene Filter auf Phosphoimager-Screens exponiert. Die Signale werden durch Einscannen mit dem Phosphoimager 445SI (Molecular Dynamics) sichtbar gemacht. Dieses System ist etwa 10 mal sensitiver als konventionelle Autoradiographie und erlaubt eine lineare Messung der Signale über einen größeren Intensitätsbereich. Die Bilder haben eine 16 bit Graustufenauflösung, werden zur weiteren Verarbeitung aber in ein 8 bit 1024x1024 Pixel Bild umgewandelt.

2.4.6.7. Entfernung der Hybridisierungsprobe

Damit die Hybridisierungsprobe erfolgreich entfernt werden kann, darf die Membran niemals ganz trocken fallen. Am einfachsten werden Proben entfernt, indem die Membranen mit kochender 0,5 %iger SDS-Lösung übergossen werden und dann auf Raumtemperatur abgekühlt werden. Im Bedarfsfalle ist dieser Vorgang zu wiederholen. Membranen, die lediglich mit kurzen Oligonukleotiden hybridisiert wurden, kann man 'strippen', indem sie bei 65°C für 20 min. in 0,1 x Ssarc inkubiert werden.

2.4.7. PCR Techniken

2.4.7.1. Amplifikation von Inserts aus Plasmiden

Inserts aus Plasmiden werden als Hybridisierungsprobe, zum Spotten oder zur Sequenzierung amplifiziert, indem eine PCR-Reaktion mit etwa 0,1 µl einer Bakteriensuspension 'angeimpft' wird. Für die Amplifikation im großen Maßstab wurden 30 µl Reaktionsgemisch in einer 384er PCR-Platte (AdvancedBioTechnologies) verwendet. Ansonsten werden 50 µl Reaktionsmischung in einer 96er PCR-Platte (AdvancedBioTechnologies) verwendet.

PCR-Ansatz:

- 0,5 pmol/µl 3/86-Primer
- 0,5 pmol/µl M13 fwd Primer
- 200 nM dNTPs
- 2-3 u Taq
- 1 x PCR-Puffer (siehe 2.4.6.2.)
- (1 M Betain)

Die Reaktion ist sehr robust und kann sowohl im Wasserbad-Cycler als auch in MJResearch Thermocyclern verwendet werden.

Für die PCR-Reaktion im Wasserbad werden die Platten mit einer 0,4 mm starken Plastikfolie mit Hilfe des Genetix-'Plate-sealers' verschweißt, für die Verwendung im Peltier-Cycler werden die Platten mit einer Silikon-Matte abgedeckt.

Die Wasserbäder werden auf 97°C, 50 °C und 73°C temperiert, und durch einen Temperaturfühler wird die jeweils aktuelle Temperatur in einer Platte gemessen. Das Programm ist 30 x (10 s bei 94°C, 1 s bei 73°C, 3,5 min. bei 72°C). Im Peltier-Cycler wird folgendes Temperaturprofil benutzt: 30 x (10 s bei 94°C, 1 min. bei 65°C, 2 min. bei 72°C). Es schließt sich eine 5 minütige Inkubation bei 72°C an.

2.4.7.2. Inter-Mermaid PCR

IRS-PCR für Southernblots wurde in einer 100 µl Reaktion durchgeführt.

Dazu wurden:

- 10 µl 10x PCR buffer
- 0,2 µl dNTPs (100mM)
- 2,0 µl MMA primer (100 pmol/µl)
- (bzw. je 0,6 µl MMA, Olrep1, Olrep2)
- 0,5 µl Taq-Polymerase (4-5 u/µl)
- 1 µl genomic DNA (ca. 50 ng/µl)

gemischt und in einer biometra Trioblock PCR-Maschine folgendem Temperatur-Regime ausgesetzt: 1 min. 95°C + 26 x (10 s 95°C, 15 s 55°C, 2 min. 72°C) + 8 min. 72°C.

Zur Herstellung von gespotteten Kartierungs-Filtern wurde der Reaktionsansatz halbiert und die PCR mit dem gleichen Temperaturprofil in einer 96 'well'-Platte in einer MJResearch Maschine durchgeführt.

10 x PCR-Puffer:

- 1,5 mM Cresolrot (optional)
- 200mM (NH₄)₂SO₄
- 750mM Tris/HCl pH 9,0
- 0.1% w/v Tween
- 15 mM MgCl₂

2.4.7.3. RT-PCR

Zuerst wird 1 µg der gesamt RNA durch reverse Transkription in 'first strand' cDNA überschrieben. Dazu wird die RNA zunächst für 5 min. auf 90°C erhitzt, auf Eis abgekühlt, und dann in einem Volumen von 20 µl mit 100 pmol 'random hexamers' pd(N)₆, 20 u RNasin, 1 mM dNTPs, 2 µl 10x RT-Puffer und 200 u Superscript II Reverse Transcriptase gemischt. Der Ansatz wird für 10 min. bei Raumtemperatur und weitere 60 min. bei 42°C inkubiert.

10 x RT-Puffer:	500 mM KCl
	200 mM Tris-HCl, pH 8.4
	25 mM MgCl ₂
	1 mg/ml BSA

In einem PCR-Volumen von 25 µl werden 3 µl des 'first strand'-Reaktionsansatzes eingesetzt und mit je 200 nM der genspezifischen Primer (Amph-sense und Amph-antsense), 1 x PerkinElmer PCR-Puffer, 120 nM dNTPs und 0,5 u Taq-Polymerase (Perkin Elmer) amplifiziert. Das Temperatur-Regime dafür ist 4 min. 94°C + 30 x (30 s 94°C, 30 s 57°C, 40 s 72°C) + 10 min. 72°C.

2.4.8. Haploide Zebrafisch Embryos

Haploide Zebrafisch-Embryos wurden von Eiern eines heterozygoten AB x TUE-Weibchen hergestellt. Etwa 30 min. bevor die helle Tagesperiode beginnt, werden zunächst einige Männchen in Tricain betäubt und durch vorsichtigen lateralen Druck auf ihren Körper ihr Sperma gewonnen. Dies kann mittels einer Mikrokapillare von der Genitalpore aufgenommen werden und wird zunächst zu 200 µl kalter Hanks's Salzlösung gegeben. Die Spermienlösung wird dann auf ein Urglas übertragen und für 2 min. in einem Abstand von etwa 40 cm mit einer UV-Röhre bestrahlt, wobei das Urglas ständig bewegt werden muß, um die vollständige Inaktivierung aller Spermien sicher zu stellen. Die Eier von 5-6 Weibchen werden gewonnen, indem sie zunächst in Tricain-Lösung anästhesiert werden, und dann die Eier durch Streichen über ihren Körper herausgedrückt werden. Die Eier werden in einer Petri-Schale mit 30-50 µl der Spermien-Suspension vermischt. Dann werden 0,5 ml Systemwasser hinzugegeben und nach etwa 2 min weitere 15 ml. Im Laufe der folgenden Tage werden in kurzen, regelmäßigen Abständen alle nicht befruchteten Eier und abgestorbenen Embryonen entfernt.

Tricain
(3-AminoBenzoessäureethylester) 160 µg/ml Wasser

Hanks' Salzlösung

0,137 mM NaCl
5,4 mM KCl
0,25 mM Na ₂ HPO ₄
0,44 mM KH ₂ PO ₄
1,3 mM CaCl ₂
1 mM Mg SO ₄
4,2 mM NaHCO ₃

2.5. Daten-Analyse

2.5.1. Sequenz-Analyse

Die DNAs werden mit einem ABI377-Sequenzierautomaten sequenziert. Dabei wurden in der Regel mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sequenzierungsprimer eingesetzt (dye primer chemistry). Die Sequenzierung wurde durch die Instituts-Service-Gruppe durchgeführt.

Das Editieren, Sammeln und Assemblieren der Sequenzen erfolgt mittels des Staden-Package (Dear et al., 1991 und Bonfield et al. 1995). Zur Vorhersage von Introns und Exons werden die Programme GRAIL (Überbacher et al., 1991), GeneScan (Burge und Karlin, 1997, 1998) und Mzef (Zhang, 1997) verwendet. Um Homologien zu anderen, bereits in GenBank deponierten Sequenzen zu ermitteln, wurden die Sequenzen mit BLASTN und BLASTX (Altschul et al., 1990) untersucht.

2.5.2. Kopplungs-Analyse

Das Kartieren der neu identifizierten polymorphen Marker erfolgt mittels Mapmanager, einem Computerprogramm mit graphischer Benutzeroberfläche, das ursprünglich für Macintosh-Computer geschrieben wurde, inzwischen aber auch für Windows-Rechner zur Verfügung steht. Die Kopplungsanalyse der identifizierten polymorphen IRS- und AFLP-Marker wird durchgeführt, indem die Segregationsmuster für jeden Marker und jedes Tier zweimal eingegeben werden und Diskrepanzen bei der Dateneingabe nochmals evaluiert werden. Der nächste gekoppelte Marker wird dann durch die 'Search Linkage'- Funktion ermittelt.