

**Biochemisches Praktikum 2  
(Fortgeschrittenenpraktikum)**

**2017**

**Regulation der Genexpression und Aufreinigung  
von Proteinkomplexen**

**Methoden**

***Präparation von RNA***

***RT-PCR/ qRT-PCR***

***Reportergen- *ura4+* Assays***

***Reinigung von Proteinkomplexen***



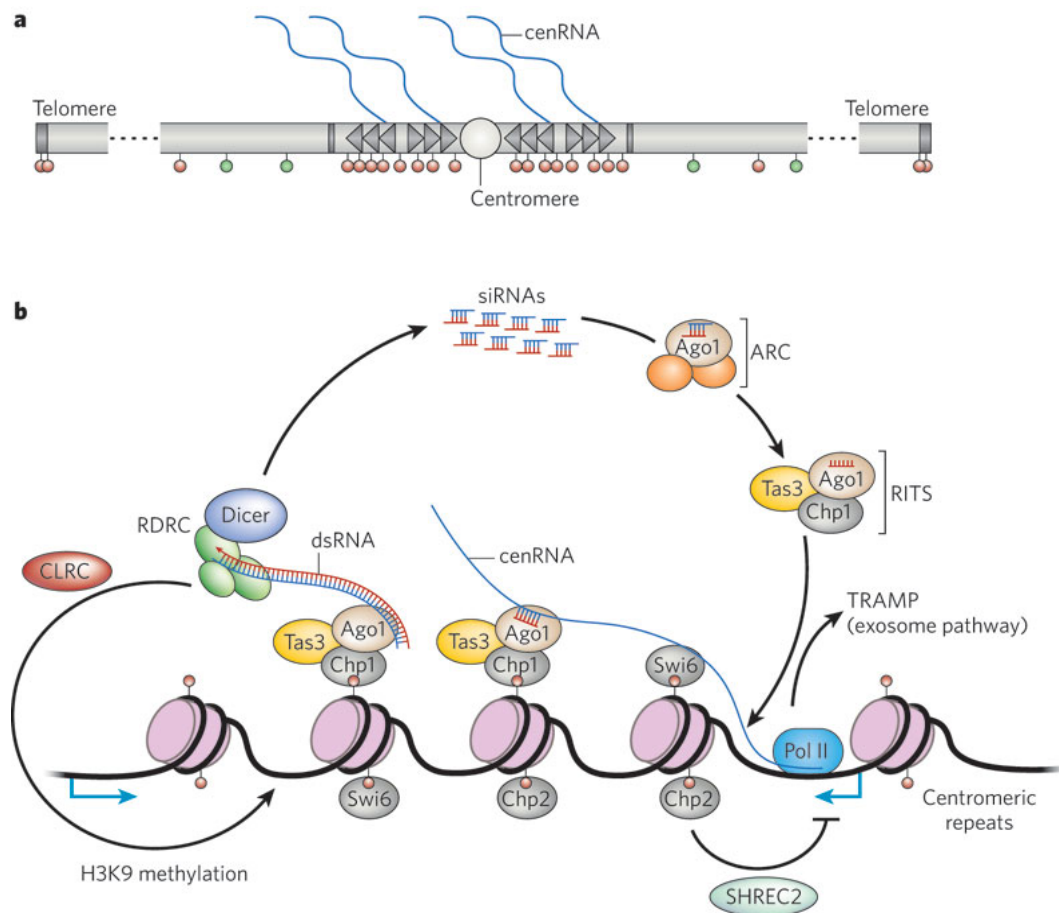
**Prof. Dr. Mario Halic**

Genzentrum der LMU , Feodor-Lynen-Str. 25, 81377 München

Email: [halic@genzentrum.lmu.de](mailto:halic@genzentrum.lmu.de)

**Versuch 1: Regulation der Genexpression in Heterochromatin des Pericentromers der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe***

**Einleitung**



**Abbildung 1:** Heterochromatin Bildung an den Zentromeren von *S. pombe* mittels RNAi. Ago1 bindet durch siRNA an komplementäre, neu transkribierte RNA. Der RDRC Komplex wird rekrutiert und synthetisiert den zweiten Strang der RNA. Diese wird von Dicer in ca. 21 nt große siRNAs geschnitten, die wiederum als einzelsträngige RNA auf Ago1 geladen werden. Außerdem wird CLRC rekrutiert, der die Methylierung von H3K9 bewirkt. Daran können HP1 Proteine binden, die durch Dimerisierung die Verdichtung der Nucleosomen vermitteln. (Moazed 2009 *Nature*)

“RNA Silencing Pathways” sind involviert in der zellulären Regulation der Genexpression und vermitteln zudem Schutz gegenüber mobilen repetitiven DNA-Elementen (Retroelemente und Transposons). In der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* sind “small interfering RNAs” (siRNAs), welche die Bildung von Heterochromatin vermitteln, involviert in der Deposition von Nucleosomen an Centromeren und an korrekter Chromosomen-Teilung.

siRNAs, welche das Silencing an centromeren Regionen bewirken, werden von dem Enzym "Dicer", ausgehend von doppelsträngiger RNA, synthetisiert und binden an sogenannte "Argonaut"-Proteine. Die siRNAs bewirken hierbei die Bindung von "Argonaut"-Proteinen an komplementäre centromere Zielsequenzen und somit die Inaktivierung dieser RNAs.

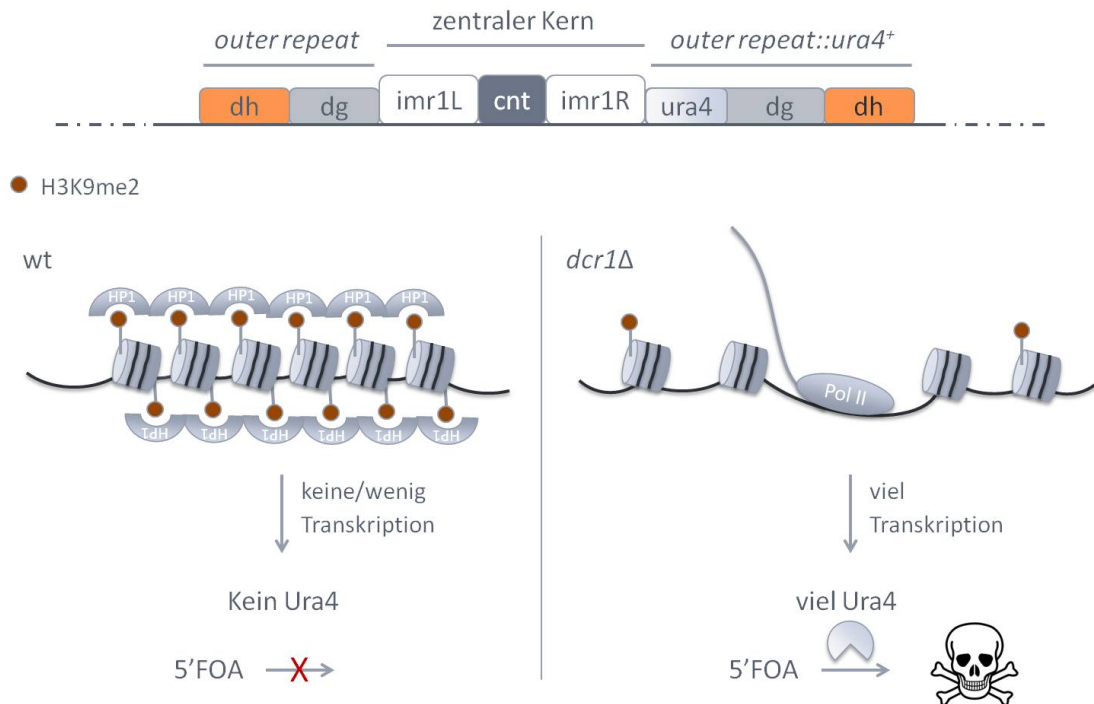
In der Spaltheife sind die Zielsequenzen der RNA-Interferenz zentromere "Repeats" (= DNA Sequenzen die mehr als 1x im Genom vorkommen). Defekte im "RNAi Pathway" führen zu einem Verlust des centromeren "Silencing" durch Verlust des dortigen Heterochromatins. (Abbildung 1)

In diesem Praktikum werden Sie zwei Methoden kennenlernen mit denen Sie den Verlust des centromeren "Silencing" analysieren werden.

Erstens werden Sie das centromere "Silencing" mittels eines *ura4*-Reportergens, welches in den centromeren "Repeats" integriert wurde, analysieren. Das *ura4*-Reporter gen wurde hierzu an die "*dg*-Repeats" der Centromere in einem *Schizosaccharomyces pombe* Reporterstamm fusioniert. Falls das centromere "Silencing" aufgehoben ist, wird das *ura4*-Gen in solchen Zellen exprimiert. Das Protein Ura4 ist toxisch für Zellen die auf "5-Fluoroorotic acid" (5-FOA)-haltigem Medium wachsen. *ura4* kodiert das Enzym Orotidin-5'-Phosphat (OMP)-Decarboxylase, ein Enzym welches 5-FOA in ein für die Zellen toxisches Produkt umwandelt.

Dieses Reporter gen-Experiment ist eine einfache Methode um den Verlust des centromeren "Silencings" mittels Wachstumsunterschiede verschiedener Mutanten auf 5-FOA-haltigen Agarplatten zu visualisieren.

Zweitens werden Sie die Transkription an den Centromeren in Wildtyp (wt) und *dicer1* Deletionsstämmen (*dcr1Δ*) quantifizieren. Hierzu werden Sie Gesamt-RNA aus wt und *dcr1Δ* Zellen isolieren und mittels semiquantitativer RT (Reverse Transkriptase)-PCR bzw. quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) die relativen Unterschiede an centromeren Transkripten in den zwei verschiedenen Zelltypen bestimmen.



**Abbildung 2:** Transkription der *ura4*-Selektionskassette in verschiedenen *S. pombe* Stämmen. *ura4* wurde in den "outer repeats" eines Zentromers integriert. A) In einem Wildtyp Stamm wird dort Heterochromatin gebildet. Die *ura4*-Kassette ist somit stillgelegt und wird wenig transkribiert. B) In *dcr1Δ* Zellen, wird kein Heterochromatin an den Zentromeren gebildet, *ura4* wird exprimiert und translatiert. Das Enzym Ura4 wandelt 5'FOA in ein toxisches Produkt um, wodurch die Zellen sterben.

## Herstellung von Puffern und Medien

### 1. Herstellung von 10 ml DEPC-behandeltem ddH<sub>2</sub>O:

Geben Sie hierzu DEPC (Diethylpyrocarbonat) 1:1000 in ddH<sub>2</sub>O. Schließen Sie die Flasche sorgfältig, schütteln Sie diese und stellen Sie die Flasche für eine Stunde auf die Laborbank. Autoklavieren Sie anschließend die Flasche zusammen mit den anderen Medien.

**DEPC ist toxisch!!! Bitte seien Sie vorsichtig beim Pipettieren!!!**

### 2. Herstellung von 100 ml YE-medium (in einer 250 ml-Flasche):

0.5 g Yeast extract  
3 g Glucose  
Auffüllen auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O

Autoklavieren Sie dieses Medium.

### 3. Herstellung von YE-5'FOA- und YE-Agarplatten (in einer 250 ml-Flasche):

1 g Yeast extract  
6 g Glucose  
4 g Bacto Agar  
Auffüllen auf 200 ml mit H<sub>2</sub>O

Autoklavieren Sie dieses Medium (wenn möglich mit Rührfisch) und lassen Sie dann das Medium auf 50°C abkühlen! Öffnen Sie die Flasche nun nur

noch neben einer rauschenden Flamme!!! Beschriften Sie je 2 Petriplatten pro Agar (2 für YE, 2 für YE-5'FOA). Gießen Sie je ~30 ml AgaroseLösung in die 2 YE Platten. (gießen Sie entweder aus der Flasche, oder benutzen Sie serologische Pipetten zum Wegwerfen!!)

Fügen Sie der verbleibenden Agarlösung 5'-Fluorouridic Acid zu einer finalen Konzentration von 1 g/l zu. Lassen Sie die Flasche auf einer Heizplatte, damit der Agar nicht polymerisiert bevor alles gelöst ist. Oder stellen Sie ihn kurz in die Mikrowelle. Gießen Sie dann die Platten. Lassen Sie die Platten verschlossen auf Ihrem Platz trocknen. Verschließen Sie die Platten zusätzlich mit Parafilm, um ein Austrocknen der Platten zu verhindern.

4. Autoklavieren Sie 20 ml ddH<sub>2</sub>O

5. Herstellung von **250 ml** 10x TAE Puffer:

10x TAE (Rezept für 1 l):

~800 ml	destilliertes H <sub>2</sub> O in ein großes Becherglas füllen
48.4 g	Tris-Base
7.4 g	EDTA
11.4 ml	Essigsäure (unter dem Abzug!)

Volumen mit destillierten H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen und in Flasche abfüllen.

6. Herstellung von Stammlösungen:

- 10 ml 3 M Na-Acetat-Lösung (NaOAc), pH 5.2. Stellen Sie den pH-Wert mit Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH) ein. Benutzen Sie einen 50 ml Falcon.

- 2 ml von 1 M HEPES

7. Herstellung von 5 ml REB Puffer für die RNA-Präparation. Ihre Stammlösungen sind 1 M HEPES, 3 M NaOAc, 0.5 M EDTA, 10 % SDS. (EDTA und SDS werden gestellt und befinden sich vermutlich im Abzug)

REB Puffer:

20 mM HEPES  
300 mM NaOAc  
10 mM EDTA  
2% SDS

8. Sobald das Autoklavieren beendet ist: Überprüfen Sie, dass das YE-Medium Raumtemperatur besitzt bevor Sie die Zellen inokulieren. Arbeiten Sie neben einer rauschenden Flamme. Inokulieren Sie die wt und *dcr1Δ* Stämme in separaten Erlenmeyerkolben. Nehmen Sie hierzu eine kleine Menge an Zellen mit einer 1 ml Pipettenspitze von einer Agarplatte und resuspendieren Sie die Zellen in 20 ml YE-Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben. Die optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) der Kultur sollte ungefähr 0.05 bis 0.1 betragen. Stellen Sie die Kulturen bei 30-32°C (optimale Wachstumstemperatur von *S. pombe*) in den Schüttel-Inkubator und lassen Sie die Kultur UN wachsen.

## Expression des centromeren *ura4* Reportergens

1. Bestimmen Sie die OD für die Wildtyp (wt) und *dcr1Δ* Zellkulturen welche Sie am Vortag inokuliert haben. Verwenden Sie hierzu zwei Plastikküvetten und markieren Sie diese mit wt und *dcr1Δ*. Geben Sie je 800 µl steriles YE-Medium in beide Küvetten. Pipettieren Sie 200 µl der jeweiligen Kultur dazu und mischen Sie sorgfältig durch mehrmaliges auf- und abpipettieren.

Am Spektrophotometer: Geben Sie einen "Blank" (nur YE-Medium) als "Nullwert" (Referenz) in eine weitere Küvette und messen Sie diese bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer. Messen Sie anschließend die OD-Werte der wt und *dcr1Δ* - Küvetten. Die Messwerte sollten 0.1 bis 0.7 betragen. Ist die OD höher, verdünnen Sie bitte und messen erneut.

2. Notieren Sie die gemessenen OD-Werte und berechnen Sie die OD der beiden Kulturen anhand des verwendeten Verdünnungsfaktors.

3. **Nehmen Sie die Menge ab, die Sie für den Silencing Assay benötigen (s.u. 1).**

4. Überführen Sie den Rest in einen 50 ml Falcon und zentrifugieren Sie für 30s bei Raumtemperatur (RT) oder besser 4°C. Nehmen Sie den Überstand ab und resuspendieren Sie die Pellets mit 1 ml H<sub>2</sub>O. Überführen Sie die Suspension in ein 2 ml Schraubverschlussgefäß. Zentrifugieren Sie erneut bei 4°C für 30s und nehmen Sie den Überstand ab. Dieser Schritt entfernt restliche Mengen an YE-Medium, welches auf die RNA-Präparation störend wirkt. Schockfrieren Sie die Zellpellets/Tubes bei -80°C und starten Sie mit dem Silencing Assay.

### Silencing Assay:

Das *ura4* Gen ist in den *Schizosaccharomyces pombe* Reporter-gen-Stämmen an den äußersten Enden der centromeren "Repeats" integriert.

In Wildtyp-Zellen sind die Centromere "silent" (transkriptionell inaktiv) da diese als Heterochromatin vorliegen. In *dcr1Δ* Stämmen ist das "Silencing" aufgehoben, da die RNA-Interferenz eine fundamentale Bedeutung in der Bildung des centromeren Heterochromatins hat.

### Protokoll:

1) Für den Silencing-Assay wird eine Menge von **1 ml Hefekultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0.7** benötigt (ca. 10<sup>7</sup> Zellen). Falls die OD höher ist, verdünnen Sie Ihre Kultur mit YE-Medium auf eine OD von 0.7 in 2 ml und messen Sie die OD erneut. **(Sie benötigen IMMER eine Flamme!!!)**

Beispiel (1):

Sie haben eine OD<sub>600</sub> der Kultur von 1.4 gemessen. Das bedeutet ihre Probe ist doppelt so konzentriert als vorgesehen. Durch Zugabe von 1 Volumen YE-Medium wird die OD<sub>600</sub> auf 0.7 eingestellt. Dies bedeutet, daß Sie zu ihrer Kultur (z.B. 1 ml) ein gleiches Volumen (1 ml) hinzugeben und die OD<sub>600</sub> erneut messen.

Beispiel (2):

Sie haben eine OD der Kultur geringer als 0.7 gemessen  
Sie messen z.B. eine OD von 0.35, d.h. die Kultur ist halb so  
konzentriert wie benötigt. Anstatt 1 ml Zellen nehmen Sie daher 2 ml,  
die doppelte Menge also.

Zentrifugieren Sie die entsprechende Menge an Zellen (**entsprechend  
1 ml einer Kultur mit OD 0.7**) in einem 1.5ml Reagiergefäß für 30s in  
einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit ab.

2) Entfernen Sie den Überstand.

3) Waschen Sie die Zellpellets einmal mit autoklaviertem Wasser. Fügen Sie  
hierzu 500 µl Wasser hinzu und resuspendieren Sie die Zellen bis eine  
homogene Suspension entstanden ist. Zentrifugieren Sie erneut.

4) Entfernen Sie den Überstand und geben Sie 300 µl autoklaviertes Wasser  
hinzu. Resuspendieren Sie die Zellpellets komplett.

5) Stellen Sie jeweils vier 1.5 ml Reagiergefäße die je 90 µl steriles Wasser  
enthalten bereit. Vier für wt and vier für *dcr1Δ*. Insgesamt also 8 Cups.

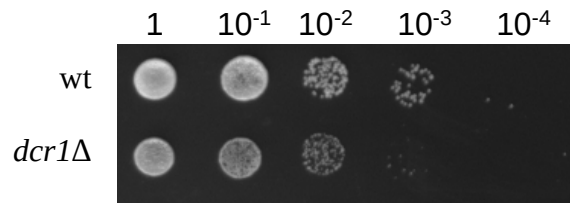
6) Stellen Sie jeweils vier serielle Verdünnungen für die beiden Stämme her:  
Pipettieren Sie hierzu jeweils 10 µl Zellen (Startmaterial sind die 300 µl  
an Zellen) in die 90 µl Wasser des ersten Tubes (Tube1), mischen Sie  
sorgfältig.

Ausgehend von Tube1 nehmen Sie 10 µl dieser Suspension und  
pipettieren diese in die 90 µl Wasser von Tube2, mischen Sie  
sorgfältig. Nehmen Sie wiederum 10 µl dieser Suspension und  
pipettieren diese in Tube3, erneut sorgfältig mischen. Von Tube3  
pipettieren Sie wiederum 10 µl in Tube4 und mischen sorgfältig.

Sie sollten also am Schluss eine unverdünnte und vier verdünnte Proben  
besitzen, jeweils vom wt und *dcr1Δ*. Bei dieser Prozedur haben Sie 1:10-  
verdünnte Proben für die Spot Verdünnungen hergestellt. Insgesamt haben  
Sie also 10 Proben für die Analyse, 5 Proben für wt und 5 Proben für *dcr1Δ*.

7) Sie benötigen jeweils zwei YE-Agarplatten und zwei YE-5-FOA-  
Agarplatten. Es wird auf jeder Platte wt und *dcr1Δ* aufgetragen.  
Es werden also technische Duplikate des Experiments angefertigt um die  
spätere Auswertung zu unterstützen.

8) Pipettieren Sie die vier Verdünnungen und die unverdünnte nebeneinander  
auf die YE-Agarplatte und die YE-5-FOA-Agarplatte wie in Abbildung 3  
beschrieben (je 3 µl pro Spot):



**Abbildung 3:** Die Abbildung zeigt das Wachstum des wt (obere Reihe) und *dcr1Δ* (untere Reihe) auf einer YE-Agarplatte.

Das "Wachstumsmuster" entsteht durch die seriellen 1:10-Verdünnungen, welche jeweils separat in der gleichen Reihe aufgetragen wurden. **Starten Sie immer mit der höchsten Verdünnung und enden Sie mit der unverdünnten Probe!** Besprechen Sie mit dem Betreuer warum.

9) Lassen Sie die "Spots" auf den Platten trocknen.

10) Inkubieren Sie die Platten bei 32°C für 2 bis 3 Tage. Fotografieren Sie die Platten um die Resultate zu dokumentieren. (Sie können das *Eagle Eye System* hierfür verwenden)

### Fragen:

**1) Warum pipettieren Sie die Zellen in der Reihenfolge von der höchsten Verdünnung bis zur unverdünnten Probe und nicht in der umgekehrten Reihenfolge?**

**2) Wie viele Zellen sind in jedem "Spot"?**

**3) Was sind ihre Erwartungen an das Wachstum der Zellen nach 2-3 Tagen auf den Agarplatten mit / ohne 5-FOA?**

**4) Was würden Sie erwarten wenn das *ura4*-Gen an einem euchromatischen genomischen Locus inseriert wäre?**



## Präparation zellulärer RNAs

### **I. Präparation von Gesamt-RNA aus Hefe**

Im Vergleich zu DNA ist RNA sehr viel empfindlicher. RNA hydrolysiert spontan bei alkalischen pH (>10) und wird endonucleolytisch und exonucleolytisch von RNasen abgebaut. Die meisten RNasen (speziell RNase A) benötigen im Gegensatz zu DNasen keine Cofaktoren, die sich wie zum Beispiel  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  chemisch binden lassen. Außerdem besitzen sie die Eigenschaft einer – wenn auch nicht vollständigen – Rückfaltung nach thermischer Denaturierung, so dass nach Autoklavierung von Lösungen immer noch RNasen aktiv sein können. RNA aus Zellen und Gewebe zu extrahieren und intakt zu erhalten, erfordert daher a) die Inaktivierung der zellulären RNasen und b) die „Säuberung“ aller verwendeten Lösungen von RNasen, sowie c) das Vermeiden einer Kontamination durch exogene RNasen (Fingerspitzen des Experimentators!). a) wird meist durch Verwendung organischer Lösungsmittel wie Phenol (meist in Kombination mit hochkonzentrierten chaotropen Salzen wie Guanidiniumisothiocyanat) erreicht, die zelluläre Proteine vollständig und irreversibel denaturieren. b) erreicht man durch Behandlung aller Lösungen mit DEPC (Diethylpyrocarbonat), das die Aminogruppen vorhandener Proteine carboxyliert und die Proteine (darunter RNasen) inaktiviert.

#### **Vorbereitung:**

#### **Unter dem Abzug sollten sich bei Beginn des Experiments befinden:**

- I. saugfähiges Papier (zum Auffangen von Phenol-Kontaminationen)
- II. Abfallflasche für Phenolabfall (halogenfrei)
- III. Abfallflasche für Phenol-Chloroformabfall (halogenhaltig)
- IV. Abfallbehälter für Phenol-verunreinigtes Plastikmaterial
- V. Vortex
- VI. Parafilm-Spender / Schere
- VII. Pipettenspitzen mit Filter

Durchführung :

**Verwenden Sie immer Spitzen mit Filter, wenn Sie RNA pipettieren!!**

1. Nehmen Sie ihre gefrorenen Zellpellets aus dem Tiefkühlschrank
2. Pipettieren Sie 500 µl REB-Puffer zu den Zellpellets (**in Schraubverschluss Tubes**). Resuspendieren Sie die Zellen durch sorgfältiges auf- und abpipettieren.
3. **Unter dem Abzug:** 500 µl äquilibriertes, saures Phenol-Chloroform (für RNA Extraktion) hinzugeben (untere Phase abnehmen! oben ist nur H<sub>2</sub>O). **Vorsicht: Phenol ist ätzend! Handschuhe tragen und immer unter dem Abzug arbeiten! Phenoldämpfe lassen sich vermeiden, indem Röhrchen so lang wie möglich verschlossen gehalten werden!**
4. Verschließen Sie die Tubes gut. Sie können zur Sicherheit Parafilm über die Verschlusskappe wickeln.
5. **Unter dem Abzug:** Vortexen Sie die Suspensionen 10 s bei voller Geschwindigkeit. Inkubation bei 65°C für 1 min. 10x wiederholen.
6. Zentrifugation in einer Minizentrifuge bei 18°C für 10 min bei 15000 Upm um die Phasen zu entmischen. (Gelkammern können bereits gereinigt werden)
7. Tubes vorsichtig entnehmen. Unter dem Abzug 400 µl der **oberen** Phase abnehmen (enthält RNA und REB-Puffer). Die Phase kann noch ein wenig trüb sein. Transferieren Sie die obere Phase in ein neues 1.5 ml Cup. Cups müssen autoklaviert sein und dürfen **nur mit Handschuhen** angefasst werden! Beim Überführen des Überstands **unbedingt** vermeiden, die weiße Interphase mit zu überführen!
8. Zur wässrigen Phase 2.5x Vol von 100% EtOH zugeben. RNA mind. 60 min (oder ÜN) bei -80°C präzipitieren.
9. Cups für 15 min in der Mikrozentrifuge zentrifugieren (4°C bei 14000 Upm), Überstand mit Pipette komplett abziehen ohne das Pellet zu beschädigen. (Zentrifugieren Sie zusammen mit den anderen Gruppen!!)
10. Zum RNA Pellet nun vorsichtig 500 µl 100% EtOH (für RNA) dazugeben. Kurz zentrifugieren (ca. 1-2 min), Überstand vorsichtig entfernen. Zentrifugieren sie erneut für 10 s und entnehmen restliche Flüssigkeit. Pellet bei Raumtemperatur trocknen (3-10min).
11. RNA in 100 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-behandelt) **vollständig lösen**. Vorsichtig vortexen oder auf- und ab-pipettieren falls sich das Pellet nicht sofort löst! Bei Unklarheiten Betreuer konsultieren. Lagerung der RNA-Cups auf Eis.
12. Zur Bestimmung der Ausbeute messen Sie die Absorption bei 260 nm. Hierzu 2 µl RNA-Lösung + 198 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gut mischen, im UV-Photometer OD<sub>260nm</sub> bestimmen, dabei **UV-Mikro-Küvetten verwenden!** Eine

Doppelbestimmung ist Pflicht! Eventuell eine dritte Messung durchführen. **Ganz entscheidend für den weiteren Verlauf des Experimentes ist es, dass Sie die RNA-Konzentrations-Messungen genau durchführen.**

## **II. Qualitätsuntersuchung der Gesamt-RNA im TAE-Gel:**

*Wir trennen RNA in TAE-Agarosegelen auf.*

*Es wird pro Gruppe ein 1.5% Agarosegel mit einem Kamm mit 8 Taschen benötigt. Jede Gruppe macht ihr eigenes Gel!!*

- Herstellen des Agarosegels (wie besprochen):
    - Säubern Sie alle Gelwannen, Schlitten und Kämmen mit 5% SDS
    - Benötigtes Gelvolumen bestimmen (aus Maßen des Geltrays, benötigte Geldicke ca. 6 mm).
    - ddH<sub>2</sub>O (berechnetes Volumen) in Weithals-Erlenmeyer vorlegen
    - Agarose abwägen für eine Endkonzentration von 1.5% Agarose, im Wasser suspendieren. Rührfisch in den Kolben geben (verringert Gefahr des Siedeverzugs). Vorsicht: Siedeverzug möglich. Deshalb: Schutzbrille tragen und langsam aufheizen.
    - In Mikrowelle 2 x aufkochen lassen
    - **1/10 des Volumens an 10 x TAE zugeben.**
    - Agarose-Lösung unter Schwenken auf ca. 50°C abkühlen lassen.
    - Agarose-Lösung in Gelkammer gießen, Luftblasen vermeiden (falls vorhanden mit Pipette an den Rand bringen); Kamm (8 Taschen) einsetzen
    - Gel ca. 30 min lang aushärten lassen.
    - Kamm vorsichtig entfernen und Gelträger in Apparatur einsetzen, Gel mit 1xTAE überschichten.
  
  - Falls Ihre Konzentration höher ist als 500 ng/µl, verdünnen Sie Ihre RNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 500 ng/µl in 20 µl. Messen Sie anschließend noch einmal die Konzentration mit einer 1:100 Verdünnung mit DEPC-H<sub>2</sub>O (200 µl).
  
  - 1 µg der Gesamt-RNA werden mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 7.5 µl aufgefüllt. Bei geringerer Konzentration der RNA höchstens 7.5 µl nehmen, allerdings von der zweiten RNA dieselbe Masse nehmen!
  
  - Zugabe von 7.5 µl 2x RNA Gelladepuffer (Formamide + Sybr Green II)
  
  - Mischen Sie auch 5 µl Marker mit 7.5 µl Gelladepuffer
  
  - Laden von 15 µl auf das Gel, auch eine positiv Kontrolle falls vorhanden
  
  - Lauf des Gels bei 100 V konst. Spannung für 25 Minuten
  
  - Dokumentation des Ergebnisses:
    - o Transportwanne für Agarosegel mit Küchentüchern auslegen.
    - o Gelwanne mit Agarosegel entnehmen und in Transportwanne legen. Gel zum Eagle Eye-System tragen.
    - o Gel auf Transilluminator legen und justieren.
    - o Kammer schließen und UV-Licht anschalten
- Achtung: Jede Bestrahlung von Haut oder Augen mit UV-Licht vermeiden.**

o Beleuchtung und Blende einstellen, Bild erstellen und speichern

- **Laufpuffer und Gel entsorgen (Flüssig-/Festabfall)**
- **Transilluminator (365 nm) mit Wasser reinigen**

Fragen:

1. Was haben Sie erwartet?
2. Welche Banden können Sie beobachten?
3. Um welche RNA(s) kann es sich handeln? Begründung?

### **III. Reverse Transkription und PCR (RT-PCR) zum Nachweis spezifischer mRNAs**

Um spezifische mRNAs in komplexen RNA-Gemischen qualitativ, semi-quantitativ oder quantitativ nachweisen und so die Promotorstärke eines Gens analysieren zu können, gibt es im Prinzip 4 Methoden, **Northern Blotting** (Lottspeich/Zorbas: *Bioanalytik* (1. Auflage), S. 628 u. 886), **Nuclease S1 Analyse** (*Bioanalytik*, S. 878), **RNase Protection Assays** (*Bioanalytik*, S. 882), und **RT-PCR** (reverse Transkription, gekoppelt mit PCR, S.888). Die ersten beiden Methoden geben generell eine gute quantitative Aussage über die Menge einer bestimmten mRNA, haben aber den Nachteil, dass sie sich nicht für Hochdurchsatz-Screenings eignen und den Umgang mit radioaktiven Isotopen (markierte Sonden zum Nachweis der mRNAs) erfordern. Bei der reversen Transkription (RT) wird zunächst RNA in cDNA umgeschrieben, die dann mittels PCR amplifiziert werden kann. RT-PCR hat den Vorteil, dass mit ihrer Hilfe selbst kleinste Mengen an spezifischen RNAs nachgewiesen werden können. Allerdings ist die PCR-Reaktion nur dann (semi-) quantitativ, wenn sich die Amplifikation noch in der exponentiellen Phase befindet und die „Plateauphase“ (Sättigung der Reaktion, Verbrauch von Nukleotiden/Primern) nicht erreicht ist. Um zu vermeiden, dass die Plateauphase bereits erreicht wurde, bevor die Analyse (mittels Gelelektrophorese) durchgeführt wird, werden Aliquots nach verschiedenen Zyklen entnommen. In molekulargenetischen Labors wird häufiger die quantitative *real time* RT-PCR eingesetzt, bei der die Menge der amplifizierten DNA nach jedem (!) Amplifikationsschritt mittels Fluoreszenz gemessen wird und so Daten während der gesamten exponentiellen Amplifikationsphase erhoben werden können. Über den Vergleich mit einer Probe, die in allen Zellen in sehr ähnlichen Mengen transkribiert wird (hier *fbp1* = Fructose-1,6-bisphosphatase), lassen sich Aussagen über die relative Menge an cDNA/RNA im Ausgangsmaterial machen (Normalisierung). Diese relative Menge kann nun wiederum zwischen verschiedenen Stämmen verglichen werden.

#### **III.I DNase Behandlung:**

- Verwenden Sie 500 ng RNA: jeweils wt und *dcr1Δ* in ein PCR-tube
  - Justieren Sie das Volumen auf 17 µl.
  - Fügen Sie hinzu: 2 µl an 10x DNase I buffer und 1 µl an DNase I
- Mischen Sie vorsichtig durch pipettieren (DNase I ist sensitiv)

- Inkubieren Sie 30 min bei 37°C in einer PCR-Maschine
- Deaktivieren Sie die DNase I für 10 min bei 70°C, 4°C ÜN

### **III.II Reverse Transkription (cDNA-Synthese):**

***PCR-Maschine einstellen – in PCR-tubes vorbereiten – alle Gruppen benutzen gleichzeitig die Maschine***

#### **- Reverse Transcription Reaktionen:**

- Verwenden Sie 4 µl ihrer (DNase behandelten) RNA (100 ng)

4 µl 100 ng RNA (DNase behandelt)  
 1 µl dg Primer (4 pmol/µl)  
 1 µl fbp1 Primer (4 pmol/µl)  
 1 µl Annealing Buffer  
1 µl DEPC-H<sub>2</sub>O  
 8 µl

Inkubieren Sie bei 65°C für 5 Minuten für das Annealing der Primer.  
 Stellen Sie die Tubes daraufhin sofort auf Eis für mindestens 1 Minute.

Zugabe von:

10 µl 2x First-Strand Reaction Mix  
2 µl SuperScript III /RNaseOUT Enzyme Mix  
 20µl

mit Pipette 2x auf und ab pipettieren, Luftblasen vermeiden

- 50 min Inkubation bei 50°C (-RT nicht vergessen s.u.)
- 5 min Inkubation bei 85°C (Inaktivierung des Enzyms)

#### **- Reverse Transcriptions (-RT) Kontrolle (Negativkontrolle):**

- Verwenden Sie 4 µl ihrer RNA (100 ng), Justieren Sie das Volumen durch Wasserzugabe auf 20 µl. 50 min Inkubation bei 50°C, 5 min 85°C

### **IV. A) Semiquantitative PCR:**

*Der Betreuer bestimmt welche Gruppen semiquantitative PCR, und welche quantitative Real-Time PCR durchführen!*

***Es sollen pro Gruppe 18 (22) PCR Reaktionen vorbereitet werden:***

**6 Tubes für wt und 3 Tubes für -RT Kontrolle von wt**

**6 Tubes für dcr1Δ und 3 Tubes für -RT Kontrolle von dcr1Δ**

- pro Reaktionsansatz benötigen Sie:

1x GC buffer (5x)  
 0.2 µM dg primer (4 pmol/µl)  
 0.2 µM fbp1 primer (4 pmol/µl)  
 0.2 mM dNTPs (10 mM)  
 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (50 mM)  
 0.2 µl Phusion  
 xx µl H<sub>2</sub>O  
5 ng **cDNA oder -RT Kontrolle**  
 20 µl Gesamtvolumen pro Reaktion

Überlegen Sie, wie Sie durch Herstellen eines „**Master-Mix**“ sich die Pipettierarbeit vereinfachen können (Welche Komponente(n) sind in allen Reaktionen enthalten?)! Rechnen Sie bei der Herstellung eines Mastermixes mit 22 statt 18 Reaktionen um Verlust beim Pipettieren einzukalkulieren. Wenn Sie den Mastermix herstellen und verteilen, bitte Mastermix-Cup und PCR-Cups auf Eis halten, da die Polymerase ansonsten ihre Aktivität verliert!

**1. Reaktionen mit cDNA – Amplifikation mit 16, 20, 24, 28, 32 und 36 Zyklen**

**2. Reaktionen mit -RT - Amplifikationen mit 24, 32 und 36 Zyklen**

**PCR-Programm:**

• Reaktions Schritte:

- 1) 98°C 30 s initialer Denaturierungsschritt
- 2) 98°C 10 s
- 3) 64°C 20 s } 36x Zyklen (1 Zyklus ~ 1'20")
- 4) 72°C 20 s }
- 5) 72°C 1' finaler Elongationsschritt
- 6) 4°C on hold

Die PCR-Maschine wird von den Assistenten programmiert. Nach dem Einsetzen aller in einen Block passenden PCR Cups wird die Maschine gestartet. Während der Amplifikation der Proben im PCR-Gerät, entnehmen Sie nach den angegebenen Zyklenzahlen (**16, 20, 24, 28, 32 und 36**) ein PCR Tube. Sie können hierbei das Gerät auf Pause stellen.

**B) quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)**

**Es sollen pro Gruppe 12 qRT-PCR Reaktionen vorbereitet werden:**

**6 (9) Reaktionen mit dg-spezifischen Primern**

**6 (9) Reaktionen mit fbp1-spezifischen Primern**

Für alle Primer benötigen Sie Duplikate für je wt und *dcr1Δ* und je eine Reaktion für jede -RT Kontrolle.

Beachten Sie, dass Sie spezielle Tubes für die qRT-PCR benötigen! **Nicht** auf den Deckel schreiben oder ohne Handschuhe anfassen.

	finale Konzentration
H <sub>2</sub> O	xx µl
2x DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Mix	1x
Primer Mix dg oder fbp1 (4 µM)	0.4 µM
<b>cDNA oder -RT Kontrolle</b>	<u>5 ng</u>
	10 µl pro Reaktionsansatz

Überlegen Sie, wie Sie sich durch Herstellen eines oder zweier „**Master-Mixe**“ die Pipettierarbeit vereinfachen können (Welche Komponente(n) sind in auf jeden Fall enthalten?)! Rechnen Sie bei der Herstellung eines Mastermixes mit 9 statt 6 Reaktionen um Verlust beim Pipettieren

einzukalkulieren. Wenn Sie den Mastermix herstellen und verteilen, bitte Mastermix-Cup und qPCR-Cups auf Eis halten, da die Polymerase ansonsten ihre Aktivität verliert! Fügen Sie die cDNA/RNA zuletzt dazu.

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgt mittels der  $\Delta\Delta C_t$  Methode. Diese wurde in der „Methoden“ Vorlesung ausführlich besprochen. Berechnen Sie dementsprechend das Verhältnis der *dg* Expression des *dcr1Δ* Stamms zu der im wt. Beachten Sie dabei auch die Rolle des internen Standards *fbp1*.

### PCR Konditionen:

95°C 6'  
95°C 10s } 46x  
64°C 20s }  
72°C 15s }  
72°C 2'  
Schmelzkurve 60°C-98°C

Die qPCR-Maschine wird von den Assistenten programmiert. Nach dem Einsetzen aller in einen Block passenden qPCR Cups wird die Maschine gestartet. (8 Gruppen können eine qPCR-Maschine füllen)

## V. Analyse der PCR und qRT-PCR im 2% TAE-Agarosegel:

### •Herstellen des Agarosegels:

- Benötigtes Gelvolumen bestimmen (aus Maßen des Geltrays, benötigte Geldicke ca. 8 mm). ACHTUNG! Es werden große Gele benötigt, die 2x 20er Kämmen aufnehmen können!
- ddH<sub>2</sub>O in Weithals-Erlenmeyer vorlegen: 90% des benötigten Endvolumens.
- Agarose abwägen für eine Endkonzentration von 2% (bezogen auf 100% Volumen).
- Agarose im Wasser suspendieren. Rührfisch in den Kolben geben (verringert Gefahr des Siedeverzugs); Kolben abwägen und in der Mikrowelle aufheizen.  
Vorsicht: Siedeverzug möglich. Deshalb: Schutzbrille tragen und langsam aufheizen.
- Im Mikrowelle 2x aufkochen lassen: Wiederholt nur kurz erwärmen, dann Kolben entnehmen und schütteln, 1/10 des Volumens an 10x TAE zugeben
- Lösung unter Schwenken auf ca. 50-60°C abkühlen lassen.
- Schütten Sie die Agaroselösung in den Gelschlitten
- Luftblasen vermeiden (falls vorhanden mit Pipette an den Rand bringen); Kämmen (20 Taschen) einsetzen
- Gel ca. 30 min lang aushärten lassen.
- Kamm vorsichtig entfernen und Gelträger in Apparatur einsetzen, Gel mit

1xTAE überschichten.

### **Gelelektrophorese:**

- Zugabe von 5 µl Agarosegelladepuffer (5x Stocklösung) pro PCR-Cup (2,5 µl pro qPCR-tube).
- Laden Sie 5 µl des Markers (0.5 µg) mit 3 µl Ladepuffer
- Laden von je 15 µl (oder des gesamten Inhalts) in Geltaschen
- Lauf des Gels bei 100 V konst. Spannung bis ca. 50% der Gellänge.

*dg* Primer amplifizieren ein Produkt der Länge 169 bp

*fbp1* Primer amplifizieren ein Produkt der Länge 294 bp

#### •Dokumentation des Ergebnisses:

oTransportwanne für Agarosegel mit Küchentüchern auslegen.

oGelwanne mit Agarosegel entnehmen und in Transportwanne legen. Gel zum Eagle Eye-System tragen.

oTransilluminator (365 nm) mit Wasser reinigen.

oGel auf Transilluminator legen und justieren.

oKammer schließen und UV-Licht anschalten

**Achtung: Jede Bestrahlung von Haut oder Augen mit UV-Licht vermeiden.**

oBeleuchtung und Blende einstellen, Bild erstellen und ausdrucken. Gel fotografieren

#### •Laufpuffer und Gel entsorgen (Flüssig-/Festabfall)

### **Fragen:**

Falls die semiquantitative PCR nicht funktioniert hat, machen Sie die Auswertung anhand des Gelbilds im Anhang (S. 26)

**1.Welche Funktion hat das DNaseI-Enzym im Experiment? Warum wird eine Kontrolle ohne Reverse Transcriptase (-RT) durchgeführt?**

**2.Was erwarten Sie bezüglich der RT-PCR-Resultate in *dcr1Δ* and in wt Zellen? In welchen Stamm wird die *dg* RNA-Expression höher sein?**

**3.Geben Sie das Verhältnis der *dg/fbp1* Expression in wt und *dcr1Δ* als Balkendiagramm in Ihrem Protokoll an. (Setzen Sie wt = 1 ) Vergleichen Sie dabei das Ergebnis der qRT-PCR mit der Semiquantitativen PCR.**



## Versuch 2:

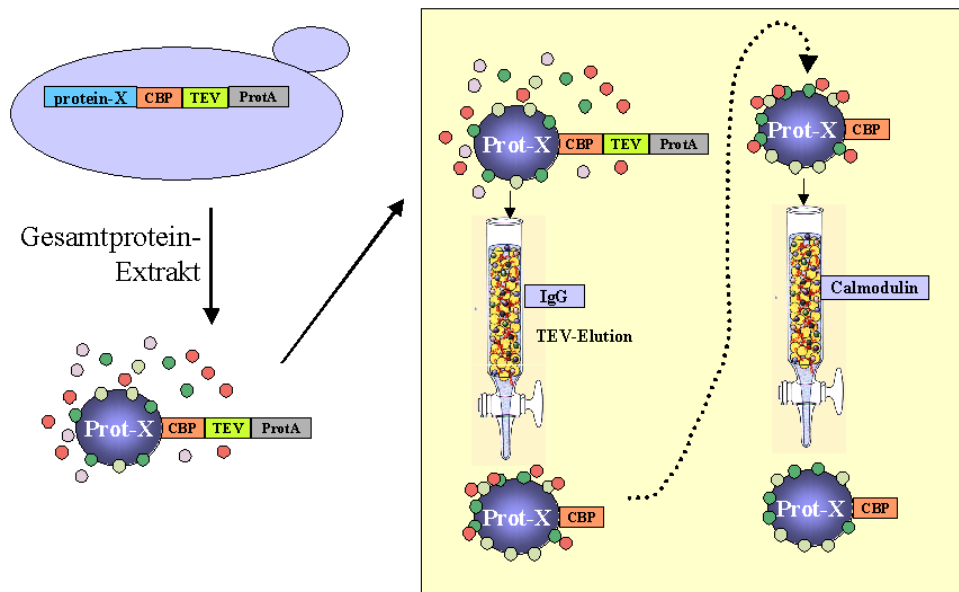
### **Aufreinigung des nativen Proteinkomplexes RNA-Polymerase II mittels Affinitätschromatographie**

Der enorme Fortschritt in der Isolierung and Charakterisierung von Proteinkomplexen aus eukaryontischen Zellen während der letzten Jahre beruht wesentlich darauf, daß sehr effiziente biochemische Reinigungsverfahren entwickelt werden konnten. Diese basieren oftmals auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie. Die Reinigung von komplizierten Proteinkomplexen aus Zellen wird immer wichtiger für die Grundlagenforschung und die biomedizinische Forschung, da viele biochemische/ zellbiologische Vorgänge innerhalb komplexer molekularer Maschinen abläuft. Ziel dieses Praktikums ist es, moderne und effiziente Methoden der Reinigung von Protein-Komplexen aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* anzuwenden. Dazu soll der erste Schritt der Methode der Tandem-Affinitäts-Reinigung (TAP) zum Einsatz kommen. Bei der TAP-Aufreinigung wird ein "Bait"-Protein, das mit dem TAP-Anker versehen wurde, in zwei aufeinanderfolgenden Affinitätsreinigungsschritten bis zu einem > 1000-fachen Anreicherungsfaktor aus einem Hefe-Gesamtproteinlysats gereinigt. Falls Proteine mit dem gereinigten Protein stabil interagieren, reichern sie sich ebenfalls an und können anschließend durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung nachgewiesen werden. Um die Effektivität des ersten Schrittes der TAP-Reinigung zu zeigen, soll ein durch gentechnologische Methoden mit TAP fusioniertes Protein (**Rpb3, eine Untereinheit der RNA-Polymerase II**) isoliert und das Proteinmuster der ko-reinigenden Banden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bestimmt werden.

#### **Die "Tandem Affinity Purification" Methode (TAP)**

*Um ein Protein durch Affinitätschromatographie aufzureinigen, wird dieses Protein durch gentechnologische Methoden an ein kleines Protein oder einen Protein-"tag" fusioniert. Durch diesen „Tag“ kann das Fusionsprotein aus einem komplexen, zellulären Proteinextrakt bis zu relativ hoher Reinheit in nur einem Reinigungsschritt mit hoher Selektivität „herausgezogen“ werden. Beispiele für solche „tags“ sind His6, Protein A, Calmodulin-Bindeprotein (CBP) und GST. Diese Reinigungsmethode ermöglicht die Identifizierung von interagierenden Proteinen unter nativen Bedingungen. Da jedoch die Aufreinigung durch nur einen Affinitätsreinigungsschritt nicht alle Kontaminationen vollständig entfernt, entwickelte Séraphin und Mitarbeiter (Rigaut et al., 1999, Nat. Biotechnol., 17: 1030-1032) die sogenannte TAP-Methode, deren erster Schritt im Praktikum durchgeführt werden soll. Für die TAP-Methode wird das zu reinigende Protein durch genomische Integration mit dem TAP-tag fusioniert (siehe Versuch 1). Dies hat den Vorteil, daß das Protein unter seinem nativen Promotor und damit in physiologischen Menge exprimiert wird. Die TAP-Methode bedient sich einer Folge zweier einzelner „tags“: dem Protein A und dem CBP tag. Dazwischen liegt eine „TEV-Schnittstelle, eine Aminosäuresequenz, die spezifische von einer Protease des Tabacco Etch Virus (TEV) erkannt und geschnitten wird.*

# Tandem-Affinity Purification (TAP)



**Abbildung 4:** Hefestamm und Schema der TAP-Aufreinigung

Bei der TAP-Aufreinigung wird ein Proteinextrakt von Hefezellen, die das aufzureinigende Protein als TAP-Fusionsprotein exprimieren, mit IgGs, die an Sepharose als Trägermaterial gekoppelt wurden, inkubiert. In diesem Schritt bindet die Protein A-Domäne des Fusionsproteins an das IgG. Protein A ist ein sehr stabiler Oberflächenrezeptor von *Staphylococcus aureus*, der an die Fc-Domäne von Immunoglobulinen bindet. Die Sepharose-Kügelchen werden mit Puffer gewaschen und das gebundene Protein (einschließlich der an dieses Protein gebundenen Proteine) durch Schneiden mit der TEV Protease eluiert. Der eluierte Proteinkomplex wird im zweiten Aufreinigungsschritt mit Calmodulin-gekoppelten Kügelchen und  $\text{CaCl}_2$  inkubiert. Der CBP-tag bindet an die Calmodulin-Matrix in Anwesenheit geringer Konzentrationen Kalzium. Diese Säule wird mit Puffer gewaschen und der gebundene Proteinkomplex mit EGTA eluiert. EGTA cheliert die  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen, die damit für die Bindung von CBP an Calmodulin nicht mehr zur Verfügung stehen. Da der eluierte Proteinkomplex meist nur eine recht geringe Proteinkonzentration aufweist, werden die Proteine konzentriert (z.B. gefällt) und anschließend mittels SDS/PAGE und Coomassie- oder Silber-Färbung analysiert. Die Identität der einzelnen Komponenten des gereinigten Proteinkomplexes kann z.B. durch Massenspektrometrie bestimmt werden.

## **1.2 Praktische Durchführung**

### **Material:**

IgG-Sepharose

LB Lyse Puffer: (50 ml)    100 mM NaCl  
   50 mM TrisHCl, pH 7.5  
   1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
   0.15% NP40            (von 1 ml stock mit 10%)

1 M DTT

100 mM PMSF in Isopropanol (wird zur Verfügung gestellt) (= 200x stock)

Glasskugeln

50% Glycerin

1x und 4x Laemmli Sample Buffer (SB)

Protein-Marker

IgG-beads (50 µl pro Gruppe)

TEV Protease

zwei 50 ml-Falcons

zwei 15 ml-Falcons

1,5 ml Reagiergefäße („Eppendorf-Cup“)

SimplyBlue™ SafeStain

### **10x SDS-Laufpuffer:**

250 mM Tris

2 M Glycin

1% SDS

pH-Wert nicht einstellen

## 10% SDS-Gel

Saubere Glasplatten nach Anweisung der Assistenten in BioRad MiniProtean Gießständer einspannen.

Folgende Lösungen mischen:

10% Trenngel (7,5 ml für 1 Gel):

3.0 ml H<sub>2</sub>O

2,5 ml 30% Acrylamid Stammlösung

2,0 ml 1,5 M TrisHCl; pH 8,8

75 µl 10% SDS

75 µl 10% APS

Polymerisation starten durch Zugabe von 20 µl TEMED, mischen, blasenfrei in vorbereiteten Gelaufbau gießen, bis ca. 1,5 cm unterhalb der niedrigeren Glaskante. **Wichtig:** verwenden Sie serologische Pipetten zum wegwerfen oder eine 1 ml Pipette, sonst polymerisiert das Gel in der Pipette!!!

Mit ca. 0,5 ml Wasser-gesättigten n-Butanol überschichten. Nach vollständiger Polymerisation n-Butanol abgießen und restlos entfernen.

5% Sammelgel:

2,7 ml H<sub>2</sub>O

750 µl 30% Acrylamid

975 µl 0,5 M TrisHCl, pH 6,8

45 µl 10% SDS

45 µl 10% APS

5 µl TEMED

gut mischen, blasenfrei auf Trenngel gießen, Teflon-Kamm (10 Taschen) blasenfrei einschieben.

## Herstellung des YPD-Mediums und Animpfen der Zellkulturen

**YPD-Medium (500 ml pro Gruppe; Autoklavieren in 1l Erlenmeyerkolben):**

10 g/l Yeast Extract; 20g/l Bacto-Peptide; 20g/l Glucose.

Für die Aufreinigung, werden pro Experiment 500 ml YPD (Medium für die Hefe *S. cerevisiae*) mit *S. cerevisiae* Zellen inokuliert. Dieser Hefestamm exprimiert ein an TAP fusioniertes Protein (Rpb3). Lassen Sie die Kultur in einem Erlenmeyerkolben (1 or 2l Volumen) auf einem Schüttler bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 3.5 bis 5.0 ÜN wachsen.

## Zellernte

- Die Zellen werden durch Zentrifugation (5min bei 4000 rpm, RT) in 2x 200 ml koninischen Gefäßen geerntet. Der Überstand wird in den alten Erlenmeyer Kolben (zum Autoklavieren) geben.
  - Fügen Sie zu einem Pellet 100 ml Wasser und überführen Sie alles in das 2. Tube. Zentrifugieren Sie erneut und tariieren Sie mit einer anderen Gruppe aus.
  - Waschen Sie das Pellet danach mit 10 ml LB Puffer und überführen Sie es somit in einen 50 ml Falcon, erneute Zentrifugation.
  - Verwerfen Sie den Überstand und lagern Sie das Zellpellet bei -20°C.
- Die Plastikgefäße für die Zentrifugation werden ausgewaschen und getrocknet zur Wiederverwendung.

## Lyse der Hefezellen

### Protein IMMER auf Eis lassen!

1. Stellen Sie 10 ml LB Lyse-Puffer mit 1 mM DTT und 2.5 mM PMSF (Proteaseinhibitor-Mix) her (auf Eis lassen!).  
Das DTT schafft ein reduzierendes Milieu, so dass die Proteine keine Disulfidbrücken ausbilden. Während der Lyse werden viele Proteasen frei, ohne Disulfidbrücken sind diese nicht funktionsfähig.
2. Ein Pelletvolumen (ca. 5-10ml) LB Puffer + 1 mM DTT + PMSF zum Zellpellet (im 50 ml Falcon) geben.
3. Zellpellet bei RT auftauen (öfter umschwenken, nicht schütteln, damit die Zellen nicht warm werden); sobald kein Eis mehr vorhanden ist, Falcon auf Eis stellen.
4. Ein Gesamtvolumen Glasperlen hinzufügen (also:  $V(\text{Pellet}+\text{Puffer}) = V(\text{Glaskugeln})$ )
5. 6x 2 Minuten vortexen (darauf achten, daß Glaskugeln in der Flüssigkeit aufgewirbelt werden und sich weder oben noch unten absetzen) mit je 2 Minuten Pause auf Eis. (IgG beads können nebenbei gewaschen werden s.u. A1 falls heute noch Affinitätschromatographie mgl.)
6. Glaskugeln absetzen lassen (2 min) und Überstand in neues 50 ml Falcon überführen.
7. Mit dem restlichen LB Puffer + PMSF + DTT die Glaskugeln durch vortexen waschen, die Glaskugeln absetzen lassen und den Überstand in einen neuen Falcon pipettieren.
8. Beide Falcons bei 4.000 rpm, 4°C, 10 Minuten zentrifugieren (Falcons beschriften; mit anderen Gruppen zusammen zentrifugieren; tariieren). Dies dient zur Entfernung von Glaskugeln, Zelldebris und anderen größeren Partikeln.
9. Beide Überstände in **einen** Falcon überführen – durch Umschütten des Lysates – Vorsicht, daß dabei das Pellet im Falcon verbleibt. Mit einer zweiten

Gruppe die beiden Röhren austarieren, so daß die Differenz zwischen den Röhren weniger als 0.5 g beträgt – durch Zugabe von zusätzlichem Puffer.

10. Für 15 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugieren, um kleinere Partikel zu entfernen.

11. Lysat größtenteils mit blauer Spitze abnehmen = trüber Überstand ohne unteres Pellet (darauf achten, daß nicht zu viel Lysat verloren geht) und in ein neues 15 ml Falcon überführen (Vorsicht, nicht Teil des losen Pellets mit aufsaugen!).

**Optional: Falls heute nicht mehr weiter gemacht wird: (sonst A1. Bzw. A4)**

12. Glycerin zu einer Endkonzentration von 5% hinzufügen. Das Glycerin verhindert beim Einfrieren die Proteinpräzipitation.

13. Mischen (umschwenken, nicht schütteln)

14. In flüssigem Stickstoff einfrieren.

15. Bis zum nächsten Tag bei –20°C lagern.

## **Aufreinigung des Fusionsproteins**

### **A. Affinitätschromatographie „IgG-beads“**

1. IgG-Sepharose gut resuspendieren (durch Vortexen); 50 µl „IgG-bead“ Suspension mit einer abgeschnittenen gelben Spitze in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettieren.

2. Drei Mal mit 1 ml kaltem LB Puffer waschen (Puffer hinzufügen, mischen - nicht vortexen!), bei 1800 rpm, 2 min, 4°C abzentrifugieren (mit anderen Gruppen absprechen). Überstand aber keine Beads abnehmen! – zuletzt in 1 ml LB resuspendieren.

**[Optional (s.o):** Das Lysat vom Vortag im Wasserbad bei 37°C auftauen (ab und zu umschwenken, nicht schütteln; Falcon auf Eis, sobald das Lysat vollständig aufgetaut ist).]

3. Nehmen Sie ein 60 µl Aliquot des löslichen Gesamtzellextraktes -> in 1,5 ml Reagiergefäß pipettieren. Das Tube mit **(T) (Total Protein)** beschriften und bei -80°C lagern

4. Gewaschene „IgG-beads“ zum Lysat (im 15ml Falcon tube) **hinzufügen**.

5. Für mindestens 1 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubieren. In diesem Schritt bindet die ProtA-Domäne des Fusionproteins an die IgG-beads.

6. Bereiten Sie 7 ml LB-Puffer + 0.5 mM DTT vor.

7. Lysat mit beads bei 1.800 rpm, 4°C, 10 min zentrifugieren (mit anderen Gruppen absprechen).
8. Vom Überstand (= Durchfluss / ungebundene Fraktion) ein 60 µl Aliquot nehmen -> in 1,5 ml Reagiergefäß pipettieren (**FT**) (**Flow Through**). -80°C
9. Rest des Überstandes (bis auf ca. 1 ml Gesamtvolumen; siehe Skalierung am Falcon) mit 10 ml Pipette abnehmen und verwerfen.
10. Überführen der Beads (der restliche 1 ml) mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 1,5 ml Reagiergefäß. Zentrifugation 1 min, 4000rpm, 4°C zur Kollektion der Beads. Überstand abnehmen und verwerfen.
11. Mit 1.5 ml LB-Puffer + 0.5 mM DTT waschen (**4x!**) mischen durch Invertieren des Tubes.: jeweils Zentrifugation 1 min, 4000 rpm, 4°C zur Kollektion der beads im 1,5 ml Tube. Aliquot (60 µl) zu Beginn (nach dem ersten Waschen) und am Ende (nach dem vierten Waschen) entnehmen (keine Beads) und in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführen) (**W1** und **W2**) (**Wash1 und Wash2** → -80°C). Sonst Überstände abnehmen und verwerfen.
12. **Zuletzt beads in 200 µl LB-Puffer + 0.5 mM DTT** (Schritt 7) **resuspendieren.** -> Lagerung auf Eis -> TEV-Elution

## **B. TEV-Elution**

1. **Hinzufügen von 1 µl (10 U) TEV Protease zu den 200 µl aus der Affinitätschromatographie.**
2. Durch Umschwenken oder auf- und ab-pipettieren vollkommen mischen.
3. 1 h oder über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubieren. Die TEV-Protease schneidet ihre Erkennungssequenz zwischen der ProtA-Domäne und dem zu reinigenden Protein. So kann das Protein - und alle daran gebundenen Proteine – nativ eluiert werden.
4. Gießen Sie ein Gel während der Inkubation mit der TEV-Protease.
5. Zentrifugation der Beads für 1 min, 4000 rpm bei RT; Überstand abpipettieren (sehr vorsichtig, keine Beads mitpipettieren) und in neues 1,5 ml Reagiergefäß pipettieren -> (**Eluat**) (**E**), Tube auf Eis stellen
6. Zu den Beads 80 µl 1x SB (sample buffer) hinzufügen, durch Vortexen mischen, 3 min im Heizblock bei 95°C inkubieren, kurz abkühlen lassen und 1 min bei 4000 rpm, RT zentrifugieren -> (**B**) (**matrix bound material**).

## C. Probenvorbereitung und SDS-Gel

1. Zu den 60 µl Aliquots (T, FT, W1, W2, und E) 20 µl 4x SB (darf nicht zu kalt sein, da sonst nicht pipettierbar) hinzufügen, vortexen und 3 Minuten im Heizblock bei 95°C inkubieren; vortexen.

2. Alle Proben 3 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugieren.

3. Gel nach folgendem Schema beladen:

Achtung: Falls nicht alles in ein Well geht, laden Sie weniger! Überlaufen verhindern!!! Laden Sie eine positiv-Kontrolle, falls vorhanden.

Schreiben Sie sich die Firma und den Namen des Markers auf, damit Sie die Größen der Banden später identifizieren können.

Well	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Sample</b>	T	FT	W1	W2	E	leer	B	Marker
<b>Menge</b>	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	20 µl		10 µl	5 µl

T: „Total“ = lösliches Gesamtprotein

FT: „Flow Through“ / Durchfluß = nicht gebundene Proteine

W1 und W2: „wash“ = beim Waschen der Affinitätsmatrix weggewaschene Proteine

E: TEV-Eluat = durch Schneiden mit der TEV-Protease eluiertes Protein

B: an der Matrix verbliebene, d.h. nicht eluierte Proteine

+: positive Kontrolle

4. Gel bei 220 V und 60 mA mit 1x SDS-Laufpuffer laufen lassen bis der Ladepuffer rausläuft

5. Sammelgel abtrennen (in den Acrylamidmüll)

6. 2x Gel in frischem ddH<sub>2</sub>O in der Mikrowelle aufkochen

7. Gel in SimplyBlue in der Mikrowelle aufkochen lassen

8. Gel auf dem Schüttler färben 5'

9. SimplyBlue im Abzug in einer Flasche sammeln (wiederverwendbar)

10. mit ddH<sub>2</sub>O waschen und auf dem Schüttler inkubieren zum entfärben

→ ein Foto machen

### Frage:

**Warum ist beim Eluat nicht nur eine Bande zu sehen? Beschriften Sie alle vorhandenen Banden im Eluat.**

**Wie viele Banden sollten sichtbar sein? Suchen Sie in einer Publikation nach Beispielen einer Pol2 Aufreinigung und vergleichen Sie diese mit Ihrer Aufreinigung.**



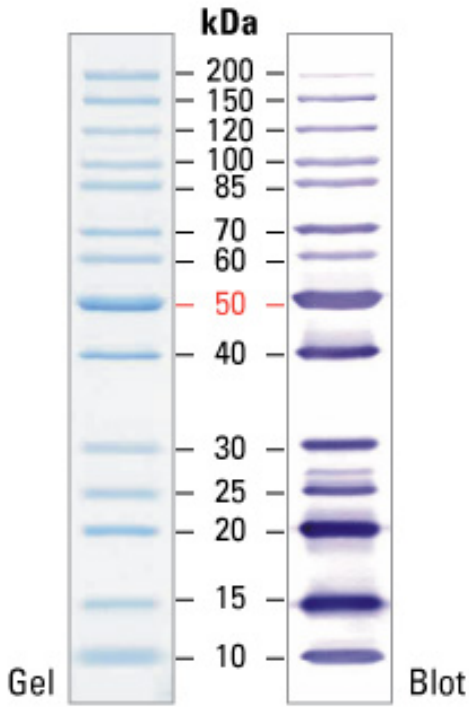
**Die Protokolle für beide Versuchsteile sollten beinhalten:**

- Eine Einleitung zum Experiment / eine kurze Versuchsbeschreibung.
- Die Durchführung in Kurzfassung (mit etwaigen Abweichungen vom Skript) mit allen Originalmesswerten und Umrechnungen, Gelphotos mit Beschriftungen, übersichtliche Tabellen
- Eine Diskussion der Ergebnisse. Was haben Sie erwartet? Was ist eingetreten? Wie können Sie die Resultate erklären?
- Zudem sollten die Fragen im Skript beantwortet werden.

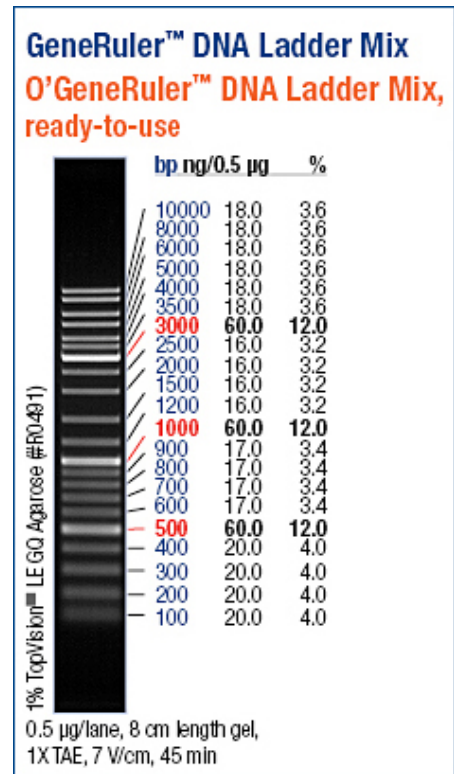
Schreiben Sie nicht mehr als 15 Seiten (ab der 15. Seite wird nicht mehr weitergelesen und somit auch als nicht vorhanden gewertet)

Jeder muss ein eigenes Protokoll schreiben. Abschreiben wird negativ bewertet!

Markers:

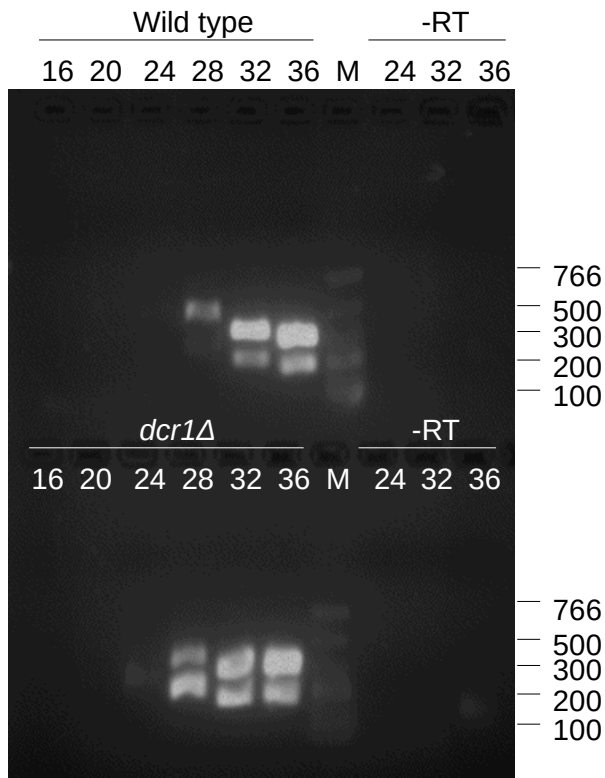


#26614



#SM0333

Semiquantitative PCR gel:



Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag
<p><b>Vorbereitung aller Lösungen:</b></p> <p>DEPC H<sub>2</sub>O  YE Medium,  YE-FOA Agarplatten  ddH<sub>2</sub>O  YPD-Medium S. 20  → zum Autoklavieren  10x TAE Puffer  3 M NaOAc  1 M HEPES  REB Puffer  1 ml 10% NP40  LB Puffer (50 ml) S. 19  1 M DTT (einer 5 ml für die ganze Gruppe) → -20°C in 1 ml Aliquots  SDS Laufpuffer (100 ml) S. 19  5% SDS (1 l für alle → RNA Gel)</p> <p><b>- Mittagspause -</b></p> <p>1 SDS Gel</p> <p>Platten gießen</p> <p>Animpfen von wt &amp; <i>dcr1Δ</i></p> <p>Animpfen von <i>S. cerevisiae</i></p>	<p>Zellernte von <i>S. cerevisiae</i>  S. 21</p> <p>Ab S. 6:  Silencing Assay  Pelletieren von <i>S. pombe</i></p> <p>RNA Isolierung bis 1h -80°C</p> <p><b>- Mittagspause -</b></p> <p>RNA Isolierung fertig</p> <p>Agarosegel + Foto</p> <p>DNase-Verdau (ÜN in PCR-Maschine)</p>	<p>Lyse von <i>S. cerevisiae</i>  Ab S. 21</p> <p>Affinitätschromatographie  bis 1h Inkubation bei 4°C</p> <p>Reverse Transkription  S. 13</p> <p><b>- Mittagspause -</b></p> <p>semiqu. PCR (Gruppe 1)  S. 13/14  qRT-PCR (Gruppe 2)</p> <p>Weiter Affinitätschrom. S.22</p> <p>TEV-Elution bis ÜN-Schritt</p> <p>Agarosegel gießen S.15</p> <p>(Reihenfolge der PCRs bestimmt der Betreuer, da nur eine qPCR-Maschine vorhanden!)</p>	<p>qRT-PCR (Gruppe 1)  S. 13/14  semiqu. PCR (Gruppe 2)</p> <p>TEV-Elution fertig (S.23 / 5.)</p> <p>Fotos Silencing Assay</p> <p>SDS Gel (S.24)</p> <p><b>- Mittagspause -</b></p> <p>Agarosegel der PCR</p> <p>Foto von SDS Gel</p> <p>Foto von Agarosegel PCR</p> <p>Auswertung qRT-PCR</p> <p><b>Aufräumen:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Chemikalien</li> <li>- Benches</li> <li>- Mülleimer</li> <li>- Tubes aus -80°C</li> </ul>	<p>Jede Gruppe sammelt ihre Daten in einer Powerpoint Präsentation</p> <p>Slides aller Gruppen, zu einer Präsentation zusammenfügen (Gruppen durchmischen, nicht immer die niedrigsten am Anfang)</p> <p>→ Diskussion</p> <p><b>Inhalt der Präsentation:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Silencing Assay</li> <li>- Agarosegelbild der RNA</li> <li>- Agarosegelbild der PCR+ qPCR +</li> <li>Quantifizierung der qPCR</li> <li>- Protein-SDS Gel</li> </ul>