

4 PCR-Analytik

Die Polymerasekettenreaktion oder PCR (*polymerase chain reaction*) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von definierten Nukleinsäurebereichen aus einem Nukleinsäuregemisch. Man benötigt dazu lediglich Sequenzinformation, um zwei Oligonukleotidprimer von je ca. 20 nt Länge zu synthetisieren, die an den Enden des zu amplifizierenden Fragments liegen. Das PCR-Verfahren basiert auf der Nutzung thermoresistenter DNA-Polymerasen, die ausgehend von Oligonukleotidprimern in mehreren Zyklen DNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen polymerisieren können. Die Anwendung der PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde 1985 erstmals publiziert, damals allerdings noch unter Verwendung einer nicht hitzestabilen DNA-Polymerase. Die Einführung thermostabiler DNA-Polymerasen für die PCR-Reaktion im Jahr 1988 hat das Verfahren wesentlich vereinfacht und zu seiner weiten Verbreitung beigetragen. Die PCR ist sicherlich eine der vielseitigsten Methoden der Molekularbiologie, und ihr Erfinder Kary B. Mullis wurde bereits 1993 mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet.

4.1 Das Prinzip der PCR

Das Prinzip einer Standard-PCR-Reaktion ist in Abb. 4.1.1 dargestellt. Der Reaktionsansatz enthält das *Template* (Matrizen-DNA), z. B. doppelsträngige genomische DNA, die beiden Oligonukleotid-Primer, alle vier Desoxynukleotide (dNTPs) und eine hitzestabile DNA-Polymerase, z. B. Taq-Polymerase, in einem Puffer, der Mg^{2+} -Ionen als Kofaktor enthält. Zuerst wird das *Template* bei Temperaturen von 92–96 °C denaturiert, so dass die *Template*-DNA als Einzelstrang vorliegt. Danach erfolgt das *Annealing* (Anlagerung), worunter man die Hybridisierung der beiden Oligonukleotid-Primer an komplementäre Sequenzen innerhalb des *Templates* versteht. Zu diesem Zweck wird die Temperatur in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer gesenkt. Als Faustregel gilt, dass eine Temperatur, die um 5 °C niedriger liegt als die

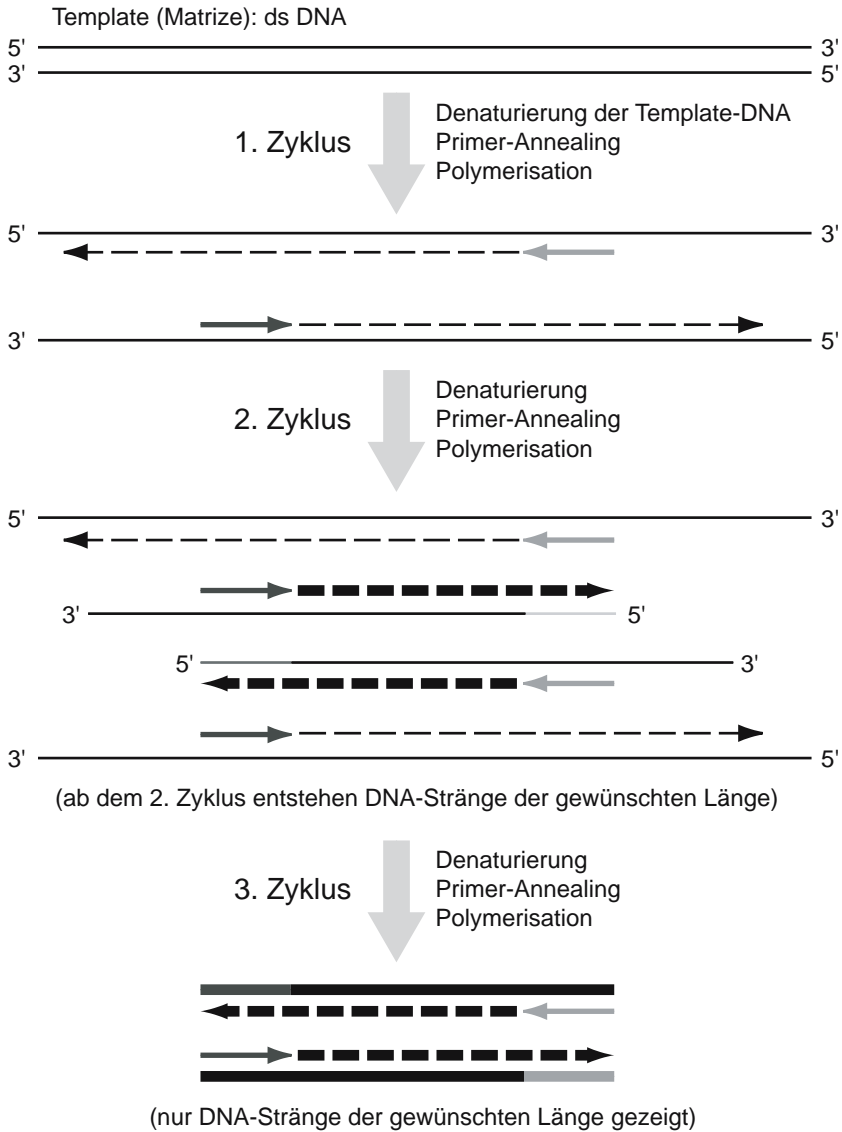


Abb. 4.1.1. Prinzip einer Standard-PCR. Die eingesetzten Oligonukleotid-Primer sind als hell- bzw. dunkelgrauer waagrechter Pfeil dargestellt. DNA-Stränge, die während eines Polymerisationsschrittes neu entstehen, sind als gestrichelte Pfeile gezeichnet. Stränge gewünschter Länge sind als dicke gestrichelte Pfeile bzw. als dicke Balken dargestellt

Schmelztemperatur der Primer, oftmals gute Resultate ergibt. Typische Hybridisierungstemperaturen für Primer von 20–25 nt liegen bei 50–65 °C. Im dritten Schritt, der Polymerisation, wird die Temperatur auf 68–72 °C erhöht, da dies das Temperaturoptimum der meisten verwendeten hitzestabilen Polymerasen ist. In diesem Schritt erzeugt die Polymerase ausgehend von den freien 3'-OH-Enden der Primer einen komplementären Strang zu dem jeweiligen *Template*-Strang. Die Dauer des Polymerisationsschrittes ist abhängig von der Länge des zu erzeugenden Fragments. Für Fragmente von bis zu 1 kb sind 30–60 s Polymerisationszeit meist ausreichend, für längere Fragmente muss die Zeit manchmal verlängert werden, um optimale Ergebnisse zu erhalten. Als Faustregel gilt hier, dass der Polymerisationsschritt um ca. 1 min für jede zu synthetisierende Kilobase verlängert wird.

Die beschriebenen drei Schritte werden als PCR-Zyklus bezeichnet und nachfolgend ca. 25- bis 40-mal wiederholt, wobei nun die jeweils im vorherigen Schritt neu entstandenen DNA-Stränge ebenfalls als *Template* dienen. Wie in Abb. 4.1.1 zu erkennen ist, werden im ersten Zyklus durch Primerverlängerung DNA-Stränge erzeugt, die länger sein können als das gewünschte Fragment. Erst ab dem zweiten Zyklus entstehen dann Fragmente gewünschter Länge, da die vorher erzeugten DNA-Stränge nun ebenfalls als *Template* dienen und die Reaktion am 5'-Ende dieser *Templates* abbricht. Danach verdoppelt sich die Zahl der DNA-Stränge gewünschter Länge in jedem Zyklus, es erfolgt eine exponentielle Zunahme der DNA-Menge des gewünschten Fragments. Es entstehen zwar weiterhin auch längere Fragmente, da auch die Ausgangs-DNA noch als *Template* dienen kann, aber deren Zahl vermehrt sich nur linear, nicht exponentiell, so dass am Ende das gewünschte Produkt überwiegt. Durch PCR ist eine Amplifikation des gewünschten Fragmentes um die Größenordnung 10^6 bis 10^7 möglich. Die PCR ist damit die empfindlichste Nachweismethode für Nukleinsäuren.

Die Sensitivität der PCR kann aber auch zu Problemen führen, da bei Kontamination der benutzten Puffer und Lösungen mit Fremd-DNA falsche Fragmente amplifiziert werden können. Die exponentielle Vermehrungsrate der Amplifikate führt dabei zu einer sehr empfindlichen Detektion auch geringster Spuren von kontaminierender DNA. Es ist daher nötig, bei jedem PCR-Versuch Kontrollansätze ohne DNA durchzuführen, um sicherzustellen, dass keine DNA unbekannter Herkunft unbemerkt in den PCR-Ansatz gelangt ist.

Von großer Bedeutung für die Effizienz und Verlässlichkeit einer PCR-Reaktion sind weiterhin die Auswahl der Oligonukleotidprimer, die Reaktionstemperaturen und -zeiten sowie die Pufferzusammensetzung (Mg²⁺-Konzentration).

4.2 Bedeutung der PCR

Die PCR als sensitivste Methode zum Nukleinsäurenachweis hat sich seit ihrer Entstehung in kürzester Zeit in allen Bereichen der biologischen Forschung verbreitet und findet auch darüber hinaus breite Anwendung. Eine Beschreibung der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten der PCR in der Grundlagenforschung würde den Rahmen dieses Kapitels sprengen, hier sei auf weiterführende Literatur verwiesen. Zwei häufige Anwendungen, nämlich der Nachweis von Fremd-DNA in der genomischen DNA eines Organismus nach einer Transformation und der Nachweis eines prozessierten Transkripts mittels RT-PCR, werden im Experimentalteil dieses Kapitels beschrieben.

Eines wichtigen Anwendungsgebietes der PCR stellt die medizinische Diagnostik dar. So kann die PCR dazu genutzt werden, die Infektion eines Patienten mit einem bestimmten Virus, wie z. B. HIV, nachzuweisen. Auch der schnelle Nachweis des Erregers der Lungenkrankheit SARS (*severe acute respiratory syndrome*) in den betroffenen Patienten im Frühjahr 2003 erfolgte mittels eines PCR-Tests. Weiterhin können amplifizierte Fragmente verwendet werden, um nachfolgende Untersuchungen (z. B. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analysen) durchzuführen, die dazu dienen, verschiedene Allele eines Gens zu unterscheiden. Auf diese Weise kann die DNA einzelner Individuen identifiziert werden, was auch in der Forensik von erheblicher Bedeutung ist.

4.3 Polymerasen für die PCR

Thermostabile DNA-Polymerasen konnten z. B. aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) oder dem hyperthermophilen *Pyrococcus furiosus* (Pfu-Polymerase) isoliert werden. Diese Polymerasen sind auch bei 92 bzw. 95 °C noch für kurze Zeit stabil und bleiben damit während des gesamten Reaktionsablaufes etwa gleich aktiv. Nachteile entstehen durch die fehlende Fehlerkorrektur-Aktivität (*proofreading activity*) der Taq-Polymerase, so dass vor allem bei hoher Zykluszahl vermehrt falsch eingebaute Nukleotide in den PCR-Produkten auftreten. Die Entwicklung alternativer Polymerasen, wie z. B. der Pfu-Polymerase, hat dieses Problem gelöst, da diese Polymerase eine Fehlerkorrektur-Aktivität aufweist. Neben der Taq-Polymerase werden mittlerweile noch mehrere andere hitzestabile Polymerasen mit verschiedenen Eigenschaften für die PCR eingesetzt. Durch Verwendung von „Enzym-Cocktails“ aus mehreren Polymerasen ist es möglich, DNA-Fragmente von bis zu 40 kb erfolgreich zu amplifizieren.

4.4 PCR-Varianten

4.4.1 *Nested* PCR, lineare PCR, RAPD-PCR

Es gibt eine Vielzahl von Abwandlungen der in Kap. 4.1 beschriebenen Standard-PCR. So kann zur Erhöhung der Spezifität eine *nested* PCR (verschachtelte PCR) durchgeführt werden. Hierbei werden nur einige Amplifikationszyklen mit dem ersten Primerpaar durchgeführt und dann die Primer von den amplifizierten Produkten abgetrennt. Es werden neue Primer zugegeben, die komplementär zu DNA-Bereichen innerhalb des zuerst amplifizierten Fragments sind. Eine Amplifikation mit den neuen Primern ist nur möglich, wenn in der ersten PCR tatsächlich das richtige Fragment amplifiziert wurde. Auf diese Weise wird die Wahrscheinlichkeit reduziert, dass ein unerwünschtes Fragment amplifiziert wird, das zufällig von zwei DNA-Abschnitten mit gleicher oder ähnlicher Sequenz flankiert wird wie das gewünschte Fragment.

Eine PCR kann auch nur mit einem statt mit zwei verschiedenen Oligonukleotid-Primern durchgeführt werden. Dabei erhält man dann keine exponentielle, sondern nur eine lineare Vermehrung eines DNA-Stranges (lineare PCR). Dies wird bei der Cycle-Sequenzierung eingesetzt, einer Abwandlung der Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger. Im Unterschied zur herkömmlichen Sanger-Sequenzierung wird eine thermostabile Polymerase eingesetzt und die Reaktion in einem PCR-Gerät durchgeführt. Durch die Wiederholung von Denaturierung und Neusynthese können an einem *Template*-Molekül mehrere neue Stränge synthetisiert werden, wodurch man die eingesetzte *Template*-Menge deutlich verringern kann.

Eine weitere Variation der PCR ist die RAPD (*random amplified polymorphic DNA*)-PCR. Dies ist eine Methode zur Detektion von Genom-Polymorphismen und damit zur Unterscheidung von genetisch nicht identischen Organismen. Die Methode beruht darauf, dass eine PCR unter wenig stringenten Bedingungen mit kurzen Primern (ca. 10 nt) und der genomischen DNA der zu untersuchenden Organismen durchgeführt wird. Unter solchen Bedingungen (z. B. bei relativ niedrigen *Annealing*-Temperaturen) können die Primer auch an Sequenzen binden, zu denen sie nicht vollständig homolog sind. In folgenden Zyklen können dann die amplifizierten Fragmente, die an ihren Enden die spezifischen Primer-Sequenzen aufweisen, bevorzugt amplifiziert werden. Bei einer anschließenden Gelelektrophorese bilden diese Fragmente dann deutliche Banden. Das Bandenmuster ist dabei charakteristisch für ein Individuum. Diese Methode kann z. B. zur Unterscheidung von morphologisch identischen, aber genetisch verschiedenen Stämmen dienen.

4.4.2 Die RT (reverse Transkription)-PCR

Eine spezielle Anwendung der PCR ist die RT-PCR-Methode, mit der RNA-Transkripte nachgewiesen werden können. Als Ausgangsmaterial für die PCR dient dabei ein cDNA-Gemisch, welches zuvor mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert wurde. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die RNA als Matrize für die Synthese eines DNA-Stranges benutzt. Als Primer zur cDNA-Synthese werden meist kurze Oligonukleotide aus sechs Basenpaaren (Hexamere) verwendet, die aus vielen möglichen Sequenzen bestehen und an zufälligen Stellen der RNA hybridisieren. Der Start der cDNA-Synthese erfolgt somit an vielen Stellen der RNA. Zur Untersuchung der Transkripte proteinkodierender Gene im Kern von Eukaryoten können auch Oligo-dT-Primer eingesetzt werden, die komplementär zu den poly(A)-Enden der reifen Transkripte sind. Sie ermöglichen die reverse Transkription vom 3'-Ende der Transkripte. Die gewonnene cDNA dient dann als Matrize für die PCR-Reaktion, in der mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotidprimern das gewünschte Fragment amplifiziert wird. Werden die PCR-Primer so gewählt, dass sie ein Intron eingrenzen, so weist das aus der cDNA amplifizierte PCR-Fragment im Vergleich zur DNA-Kontrolle eine kleinere Fragmentgröße auf, da die cDNA aus der intronfreien RNA synthetisiert wurde. Anhand der Größenunterschiede können so mögliche DNA-Kontaminationen identifiziert und das gewünschte Transkript nachgewiesen werden.

Viele Methoden zur Erforschung bestimmter Aspekte der Transkription enthalten RT-PCR-Schritte. Auf RT-PCR basiert unter anderem RACE (*rapid amplification of cDNA ends*), eine Methode zur Bestimmung des 5'- oder 3'-Endes von Transkripten. Ebenfalls auf RT-PCR basierend sind verschiedene Methoden zur Quantifizierung von Transkriptmengen bzw. zur Identifikation differentiell exprimierter Gene. Hierzu gehören unter anderem Differential Display, SAGE (*serial analysis of gene expression*) und SSH (*suppression subtractive hybridization*). Für weiterführende Informationen sei auf die vielfältige Fachliteratur zu diesem Thema verwiesen.

4.4.3 Die Real-Time-PCR

Bei der *Real-Time*-PCR handelt sich um eine recht neue Methode der quantitativen PCR, bei der die Menge des entstehenden PCR-Produkts nach jedem PCR-Zyklus gemessen wird, daher der Name. (Teilweise wird diese PCR-Methode auch als RT-qPCR für *Real-Time*-quantitative-PCR oder, in

Verbindung mit einem reversen Transkriptions-Schritt, auch als reverse-Transkriptions-quantitative-PCR bezeichnet.)

Das Prinzip der *Real-Time-PCR* beruht darauf, die Menge des amplifizierten Fragments im Verlauf der PCR nach jedem Zyklus zu bestimmen. Dies wird durch bestimmte Farbstoffmoleküle ermöglicht, deren Fluoreszenz abhängig von der Menge des amplifizierten Fragments zunimmt. Dadurch lässt sich die Menge des amplifizierten Fragments als Kurve abhängig von der PCR-Zyklus-Anzahl darstellen (Abb. 4.4.1). Eine Quantifizierung ist nur innerhalb desjenigen Bereichs der PCR möglich, in welchem die Menge des PCR-Produkts exponentiell zunimmt, nicht hingegen in späteren Phasen (lineare Phase und Plateauphase). Aus dem Kurvenverlauf lässt sich direkt ersehen, in welchem Bereich eine Quantifizierung möglich ist. Die *Real-Time-PCR* hat die quantitative PCR revolutioniert, da es nun nicht mehr nötig ist, aufwändige Endpunkt-Mengenbestimmungen nach verschiedenen Zyklus-

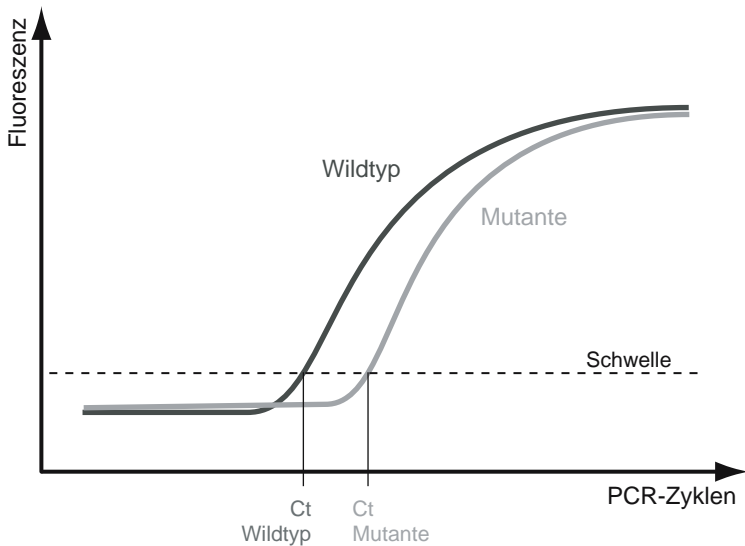


Abb. 4.4.1. Prinzip der *Real-Time-PCR*. Im hier exemplarisch gezeigten Experiment wurde die Expression eines Gens im Wildtyp im Vergleich zu einem Mutantenstamm untersucht. Die gemessene Fluoreszenz (y-Achse) ist gegen die Anzahl der PCR-Zyklen (x-Achse) aufgetragen. Die Fluoreszenz im Ansatz mit Wildtyp-Template ist als dunkle Kurve, die Fluoreszenz im Mutanten-Ansatz als helle Kurve dargestellt. Der Wert, bei dem die Fluoreszenz sich vom Hintergrund abhebt und eine exponentielle Vermehrung des PCR-Produkts einsetzt, ist als Schwelle (*threshold*) durch eine gestrichelte Linie markiert. Der PCR-Zyklus, bei dem dies für Wildtyp bzw. Mutante eintritt, kann als Ct-Wert oder *threshold cycle* von der x-Achse abgelesen werden. Weitere Erläuterungen im Text

zahlen durchzuführen, sondern der Zyklus, bei dem die exponentielle Vermehrung des Produkts einsetzt, direkt aus der Kurve als Ct-Wert (*threshold cycle*) abgelesen werden kann. Die *Real-Time*-PCR kann sowohl als RT-PCR zur Quantifizierung von Transkriptmengen als auch zur Alleldiskriminierung auf DNA-Ebene eingesetzt werden.

Wie lässt sich nun die Menge des erhaltenen Produkts nach jedem PCR-Zyklus ermitteln? Eine Möglichkeit ist der Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs SybrGreen. Der Farbstoff fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist; mit zunehmender Menge an PCR-Produkt nimmt also die Fluoreszenz zu. Sie kann nach jedem Zyklus nach Anregung mittels blauem Licht durch den PCR-Gefäß-Deckel hindurch gemessen werden. Neben der Methode mit SybrGreen gibt es noch mehrere weitere *Real-Time*-PCR-Techniken. Viele beruhen auf dem Einsatz eines dritten Oligonukleotids (neben den beiden Primern, die das zu amplifizierende Fragment flankieren). Dieses zusätzliche Oligonukleotid bindet zwischen den beiden Primern an die *Template*-DNA und kann z. B. an einem Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff und am anderen Ende mit einem *Quencher*, einem Molekül, das die Fluoreszenz des Farbstoffs unterdrückt, markiert sein. Solange Farbstoff und *Quencher* an den beiden Enden des Oligonukleotids und damit in räumlicher Nähe zueinander sind, wird die Fluoreszenz des Farbstoffs durch den *Quencher* absorbiert. Während des Polymerisationsschrittes baut aber die Polymerase ausgehend vom 5'-Ende des Oligonukleotids dieses ab, so dass der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird und das abgegebene Licht nicht mehr vom *Quencher* absorbiert wird. Je mehr PCR-Produkt gebildet worden ist, desto mehr Farbstoff wurde also freigesetzt und desto stärker die Fluoreszenz.

4.5 Experimentaltteil

In den im Folgenden beschriebenen Experimenten werden typische Anwendungsmöglichkeiten der PCR-Methode vorgestellt. Dabei handelt es sich zum einen um den Einsatz der PCR beim Nachweis von Fremd-DNA in transgenen Organismen, während im zweiten Teil die RT-PCR zum Nachweis eines intronfreien Transkriptes verwendet wird. Die Methoden können als Ersatz bzw. Ergänzung zu Southern und Northern Blots verwendet werden. Alle Reaktionen werden in PCR-Automaten durchgeführt. Die Syntheseprodukte werden anschließend durch eine Gelelektrophorese überprüft.

Die hier vorgestellten Experimente sind für die Verwendung mit den angegebenen Enzymen (Reverse Transkriptase, Taq-Polymerase) und PCR-Geräten

optimiert. Bei Verwendung anderer Reagenzien oder Geräte müssen eventuell Anpassungen der Reaktionsparameter vorgenommen werden. In den Versuchen werden exemplarisch der Hyphenpilz *S. macrospora*, die Blütenpflanze *A. thaliana* und die Taufliege *D. melanogaster* untersucht, die vorgestellten Experimente lassen sich aber problemlos auch auf andere Organismen und Fragestellungen übertragen.

4.5.1 PCR-Analyse von transgenen Pilz-Stämmen

In diesem Versuch soll die PCR dazu dienen, transgene Organismen zu untersuchen. Exemplarisch wird die Integration von Fremd-DNA in das Genom des Hyphenpilzes *Sordaria macrospora* nachgewiesen. Es soll nach Transformanten gesucht werden, bei denen das *ura3*-Gen von *S. macrospora* mittels homologer Rekombination durch eine inaktivierte Kopie ersetzt wurde. Grundsätzlich dienen derartige Transformationen zur Erzeugung von definierten „Gene-Disruption“- oder „Gene-Knockout“-Mutanten, die für die Analyse von Genfunktionen von großer Bedeutung sind.

Die PCR-Methode kann hier eine Überprüfung der transgenen Organismen durch Southern-Hybridisierung ersetzen. Ein Nachteil ist zwar, dass man keine weiteren Informationen über die Art der Plasmid-Integration wie Anzahl und Verteilung der integrierten Kopien erhält; ein Vorteil ist jedoch die Effizienz, mit der eine Überprüfung erfolgen kann. Diese Methode ist besonders schnell und wenig arbeitsaufwändig, da sie nicht die Isolation großer DNA-Mengen notwendig macht. Für die PCR-Analytik ist die aus einer Schnellisolierung erhaltene DNA-Menge in der Regel ausreichend.

Der *S.-macrospora*-Wildtyp-Stamm wurde mit einem Plasmid transformiert, welches das *ura3*-Gen von *S. macrospora* enthält. Dieses Gen kodiert für die Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase, ein Enzym der Uracil-Biosynthese. Auf dem Plasmid ist der offene Leserahmen von *ura3* durch die Insertion einer *hph*-Kassette unterbrochen, die für das Enzym Hygromycin-B-Phosphotransferase kodiert und als Selektionsmarker dient. Bei homologer Integration wird das native *ura3*-Gen des Rezipienten durch das eingebrachte Konstrukt ersetzt (Abb. 4.5.1); der Pilz wird die Hygromycin-B-Resistenz zeigen, aber auf Selektionsmedium ohne Uracil nicht wachsen können. Das Plasmid kann aber auch ektopisch, d. h. an beliebiger Stelle, in das Genom integrieren. Die Transformanten sind dann auch Hygromycin-B-resistent, aber immer noch Uracil-prototroph, da sie noch den intakten *ura3*-Locus besitzen (Abb. 4.5.1).

Im Wildtyp sowie im Falle der ektopischen Integration können die Primer *ura3*-a und *ura3*-b im intakten *ura3*-Locus des Rezipientenstammes binden,

wodurch ein ca. 300 bp großes Fragment amplifiziert wird (Abb. 4.5.1). Bei homologer Integration grenzen die Primer *ura3-a* und *ura3-b* dagegen ein ca. 1,75 kb großes Fragment ein, welches sich aus einem Anteil von 300 bp aus dem *ura3*-Gen und der 1,45 kb großen *hph*-Kassette zusammensetzt. Im

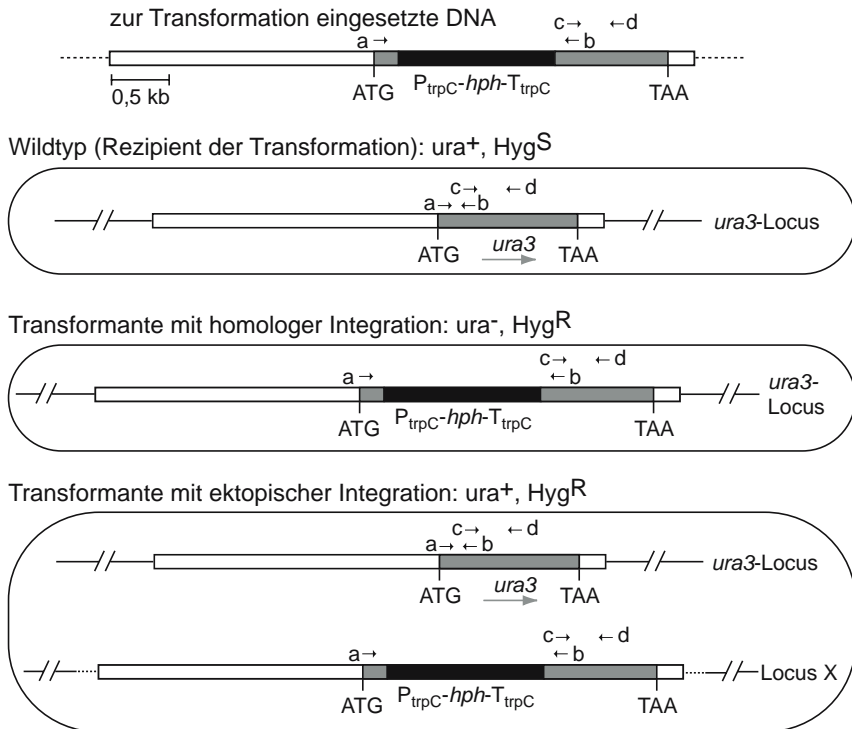


Abb. 4.5.1. Genomische Struktur von *S.-macrospora*-Transformanten, die mit einem *ura3::hph*-Konstrukt transformiert worden sind. Die zur Transformation eingesetzte DNA ist oben dargestellt, darunter ist die genomische Struktur des *ura3*-Locus des Rezipienten und darunter Transformanten mit homologer bzw. ektopischer Integration abgebildet. Der offene Leserahmen des *ura3*-Gens ist als grauer Balken dargestellt (graue Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an), die benachbarten genomischen Sequenzen, welche Teil der transformierenden DNA sind, als weiße Balken. Die *hph*-Kassette inklusive des *trpC*-Promotors und des *trpC*-Terminators ist als schwarzer Balken dargestellt. Durchgezogene Linien kennzeichnen genomische DNA von *S. macrospora*, gestrichelte Linien kennzeichnen Sequenzen aus dem transformierenden Konstrukt, die nicht aus *S. macrospora* stammen. Schwarze Pfeile geben die Lage der Oligonukleotide *ura3-a*, *ura3-b*, *ura3-c* und *ura3-d* an. *ATG* Startcodon, *TAA* Stoppcodon des *ura3*-Gens, *ura3*⁺/*ura3*⁻ Stamm ist Uracil-prototroph/-auxotroph, Hyg^{S/R} Stamm ist Hygromycin-sensitiv/-resistent

Fall der ektopischen Integration existieren weitere Bindestellen für *ura3-a* und *ura3-b* in dem ektopisch integrierten *ura3::hph*-Konstrukt, die auch hier ein 1,75 kb großes Fragment einschließen (Abb. 4.5.1). Im Idealfall können also in Transformanten mit ektopischer Integration zwei Fragmente von 0,3 und 1,75 kb amplifiziert werden, in Transformanten mit homologer Integration nur ein Fragment von 1,75 kb und im Wildtyp nur ein Fragment von 0,3 kb.

Das 1,75 kb-Fragment ist aber für eine Amplifikation von Gesamt-DNA bereits ein relativ großes Fragment, so dass es meist nur unter speziellen Amplifikationsbedingungen (z. B. Verwendung von insbesondere an lange Fragmente angepassten Polymerasen sowie besonders aufgereinigter *Template*-DNA) erhalten wird. Unter Standard-PCR-Bedingungen oder ohne speziell gereinigte *Templates* lässt sich oft nur das kleine Fragment von 0,3 kb amplifizieren, das man im Wildtyp und den Transformanten mit ektopischer Integration erhält. Von Transformanten mit homologer Integration kann man unter Standard-Bedingungen meist kein amplifiziertes Fragment erhalten.

Da aber das Fehlen eines Fragments auch durch Experimentalfehler zu Stande gekommen sein könnte und daher nicht eindeutig auf homologe Integration schließen lässt, sind geeignete Kontrollen nötig: Die Oligonukleotide *ura3-c* und *ura3-d* liegen stromabwärts von der *hph*-Insertionsstelle im offenen Leserahmen von *ura3*. Mit ihrer Hilfe wird sowohl aus dem unveränderten als auch aus dem durch die *hph*-Kassette unterbrochenen *ura3*-Gen ein 520 bp großes Fragment amplifiziert, das in allen Transformanten sowie im Wildtyp auftreten sollte (Abb. 4.5.1).

Es werden zwei Transformanten untersucht (Tr7 und Tr9), für die eine „Myzel-PCR“ durchgeführt wird. Dafür wird Pilzmyzel kurz in Wasser aufgekocht und der wässrige Überstand als *Template* zur PCR eingesetzt. Diese Methode eignet sich zum Screening einer großen Zahl an Transformanten. Dies ist bei der Suche nach Transformanten mit homologer Rekombination häufig nötig, da bei den meisten Hyphenpilzen (und vielen anderen Organismen) die homologe Rekombination ein im Vergleich zur ektopischen Integration eher seltenes Ereignis ist.

Als Kontrolle dient DNA aus dem nicht transformierten *S.-macrospora*-Wildtyp. Außerdem wird aufgereinigte DNA der Transformanten Tr7 und Tr9 eingesetzt. Weiterhin wird (wie bei jeder PCR) auch eine Nullkontrolle ohne DNA-Zugabe durchgeführt. Sie dient zur Kontrolle der verwendeten Lösungen auf DNA-Kontaminationen.

Material

- Pilzstämme
 - Sordaria macrospora* Wildtyp
 - Sordaria macrospora* Transformante Tr7
 - Sordaria macrospora* Transformante Tr9
- Genomische DNA (je 100 ng/μL)
 - Sordaria macrospora* Wildtyp
 - Sordaria macrospora* Transformante Tr7
 - Sordaria macrospora* Transformante Tr9
- Oligonukleotide (je 10 μM)
 - ura3-a: 5' ATG TCG ACA ACA CAA CAG CCAC 3'
 - ura3-b: 5' AGA TGAGGAAGC CGT GCT TGC 3'
 - ura3-c: 5' CAC GGC TTC CTC ATC TTC GAG G 3'
 - ura3-d: 5' TGT GTA CTT GCC GTC CATAAG G 3'
- Taq-Polymerase (Eppendorf-Taq-Polymerase, 1 U/μL)
- Amplifizierungspuffer mit MgCl₂ (10×)
- Nukleotide (dNTP-Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP jeweils 10 mM)
- steriles H₂O
- PCR-Gefäße

Methode

A. DNA-SCHNELLISOLIERUNG AUS *S. macrospora*

1. Etwas Pilzmyzel (Spitze einer gelben Pipettenspitze) in ein Eppendorfgefäß mit 30 μL sterilem H₂O überführen.
2. 5 min aufkochen (Lochdeckel!).
3. Zentrifugation 5 min, 15 000 rpm, 4 °C.
4. 20 μL des Überstands in frisches Eppendorfgefäß überführen, auf Eis aufbewahren.

B. PCR

Beim Ansetzen einer PCR bietet es sich an, einen Mix aller nicht variablen Komponenten (oftmals sämtliche Komponenten außer der *Template*-DNA) für alle geplanten Ansätze herzustellen und diesen dann in die PCR-Gefäße zu aliquotieren. Die *Template*-DNA wird zuletzt dazugegeben. Hierdurch vermeidet man Durchmischungsprobleme beim Pipettieren kleiner Mengen und die Kontamination einzelner Ansätze, ohne dass man es in der Nullkontrolle wahrnimmt. Idealerweise setzt man etwas mehr Mix an, als für die Ansätze benötigt (z. B. Mix für 6,5 Ansätze, wenn man sechs Ansätze pipettieren möchte).

5. Mix 1 und Mix 2 herstellen für jeweils 6,5 Ansätze.

Bestandteil	Mix 1	Mix 2
H ₂ O	255,0 µL	255,0 µL
10×-Puffer mit MgCl ₂	32,5 µL	32,5 µL
dNTPs (10 mM)	6,5 µL	6,5 µL
Oligonukleotide	6,5 µL ura3-a	6,5 µL ura3-c
	6,5 µL ura3-b	6,5 µL ura3-d
Taq-Polymerase (1 U/µL)	6,5 µL	6,5 µL

Komponenten in angegebener Reihenfolge pipettieren, kurz vortexen, anzentrifugieren.

6. Pipettieren der PCR-Ansätze.

Aus jedem Mix werden sechs Ansätze entsprechend der folgenden Tabelle pipettiert (12 Ansätze insgesamt).

Ansatz	Mix	Template	Template-Menge
1	48 µL	Tr 7 (Myzel)	2 µL
2	48 µL	Tr 7 (DNA)	2 µL
3	48 µL	Tr 9 (Myzel)	2 µL
4	48 µL	Tr 9 (DNA)	2 µL
5	48 µL	wt (DNA)	2 µL
6	48 µL	–	–

Zuerst Mix in PCR-Gefäße aliquotieren, dann *Templates* hinzufügen. Gefäße auf Eis halten.

7. Die Inkubation der Ansätze erfolgt in einem PCR-Gerät. Programm bei Verwendung des PerkinElmer GeneAmp 9600 (für andere Geräte sind evtl. Anpassungen der Programmparameter nötig):

Phase	Dauer	Temperatur
a. Denaturierung der dsDNA	2 min	94 °C
b. Amplifizierungszyklen (40×)		
Denaturierung	20 s	94 °C
Hybridisierung	20 s	55 °C
Polymerisation	2 min	72 °C
c. terminale Elongation	10 min	72 °C
d. langsame Abkühlung auf 4 °C		

Hinweise zur Auswertung

Nach Ablauf der PCR-Reaktionen werden je 10–20 μL der Ansätze mit 3–5 μL Ladepuffer versetzt und auf einem Agarosegel (1 %) aufgetrennt. Das Ergebnis einer solchen PCR ist in Abb. 4.5.2 dargestellt: Bei Verwendung der Oligos *ura3-c* und *ura3-d* wird entsprechend den Erwartungen von allen Pilz-DNAs ein Fragment von ca. 520 bp amplifiziert. Mit den Oligos *ura3-a* und *ura3-b* wird ein Fragment von ca. 300 bp von DNA der Transformante Tr9 und vom Wildtyp amplifiziert, aber nicht von DNA der Transformante Tr7. Dies deutet darauf hin, dass in der Transformante Tr7 das *ura3*-Gen durch homologe Rekombination durch das *hph*-Konstrukt ersetzt wurde. Im Laboralltag würden sich nun weitere Untersuchungen anschließen, um die Art des Rekombinationsereignisses in der Transformante Tr7 mittels Southern Blot genauer zu analysieren.

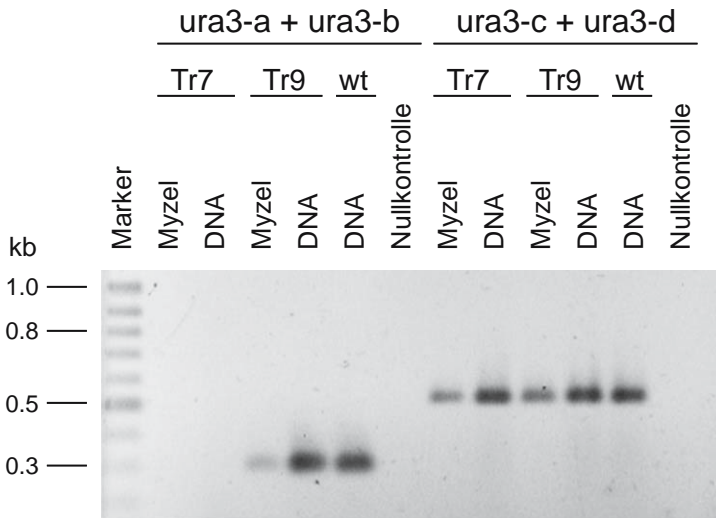


Abb. 4.5.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten aus der PCR-Analyse von transgenen Pilzstämmen. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer sind ganz oben über den jeweiligen Spuren angegeben, darunter die eingesetzten *Template*-DNAs. Die Markergrößen in kb sind auf der linken Seite angezeigt

4.5.2 PCR zum Integrationsnachweis eines Transgens in *Arabidopsis thaliana*

Amplifikation eines Neomycin-Phosphotransferase-Genabschnittes (nptII) in transgenen Arabidopsis-thaliana-Pflanzen

Ein einfacher und sicherer Nachweis für die stabile Integration der durch Agrobakterien übertragenen DNA in das Genom von *Arabidopsis thaliana* (Kap. 3.5) ist die Amplifikation eines T-DNA-spezifischen Genabschnittes mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Die hier angegebene PCR kann der Vervielfältigung eines Teils des Kanamycin-Resistenzgens (Neomycin-Phosphotransferase, *nptII*) dienen und ist ein Beispiel für eine T-DNA-spezifische PCR-Reaktion.

Material

- genomische DNA aus transgenen Reporterger-Pflanzen (*Arabidopsis thaliana* [*pBI121*]) und *A. thaliana*-Wildtyp-Pflanzen (Kap. 3.5.2)
- *nptII*-spezifische Primer
 - nptII*sense 5' CAT CAC CGAATA CGG CGT G 3'
 - nptII*antisense 5' AGT TCA TGC CAG TCC AGC G 3'
- HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Hilden)
- steriles A. dest.
- Mikroliterpipette mit sterilen Spitzen
- Thermocycler mit 0,2 mL-Reaktionsgefäßen

Methode

1. In zwei 0,2 mL-Reaktionsgefäße wird jeweils 1 µL genomische DNA einer transgenen Pflanze oder einer WT-Pflanze als Matrize gegeben. Aus 6 µL A. dest., 2 µL Primer-Mix (5 µM jedes spezifischen Primers) und 10 µL HotStarTaq Master Mix (2× konzentriert) wird ein PCR-Mix bereitet, von dem anschließend je 9 µL in die vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt werden.

Die Parameter der Amplifizierung sind:

Phase	Dauer	Temperatur
a. Aktivierung der Polymerase	15 min	95 °C
b. Amplifizierungszyklen (39×)		
Denaturierung	10 s	94 °C
Hybridisierung	30 s	58 °C
Polymerisation	1 min	72 °C
c. terminale Elongation	5 min	72 °C
d. langsame Abkühlung auf 4 °C		

2. Von beiden PCR-Ansätzen werden 3 µL mit Ladepuffer versetzt und über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Hinweise zur Auswertung:

Das gewünschte Fragment hat eine Länge von 676 bp und entsteht nur, wenn DNA der transgenen Pflanze als Matrize eingesetzt wurde.

4.5.3 Inverse PCR zur molekularen Kartierung einer P-Element-Insertion bei *Drosophila*

Mit der Methode der „inversen PCR“ lassen sich unbekannte DNA-Sequenzen, die benachbart zu einer bekannten Sequenz liegen, amplifizieren. In einer Standard-PCR wird ein DNA-Bereich, der von zwei Primern eingerahmt wird, amplifiziert (Kap. 4.1.). Bei der inversen PCR wird DNA, die flankierend zu beiden Primern liegt, amplifiziert (Abb. 4.5.3). Dazu wird die DNA zunächst mit einem häufig schneidenden Restriktionsenzym hydrolysiert (Enzyme mit einer 4 bp-langen Erkennungssequenz), von dem bekannt ist, dass es in der bekannten Sequenz des amplifizierten Fragmentes eine Schnittstelle besitzt. Anschließend werden die DNA-Moleküle in stark verdünnter Konzentration ligiert. Hierdurch erreicht man bei einer monomolekularen Reaktion die Bildung von einfachen DNA-Ringen. Diese zirkulären DNA-Moleküle werden anschließend als *Template* in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die in der bekannten Region bindenden Primer werden so gewählt, dass sie mit ihren 5'-Enden (statt, wie bei konventioneller PCR, mit ihren 3'-Enden) aufeinander weisen. Im resultierenden Fragment wird die gesuchte unbekannte Sequenz an beiden Enden von Sequenzen der bekannten Region flankiert. Das Amplifikat kann dann isoliert und entweder konventionell kloniert oder direkt mit den PCR-Primern sequenziert werden.

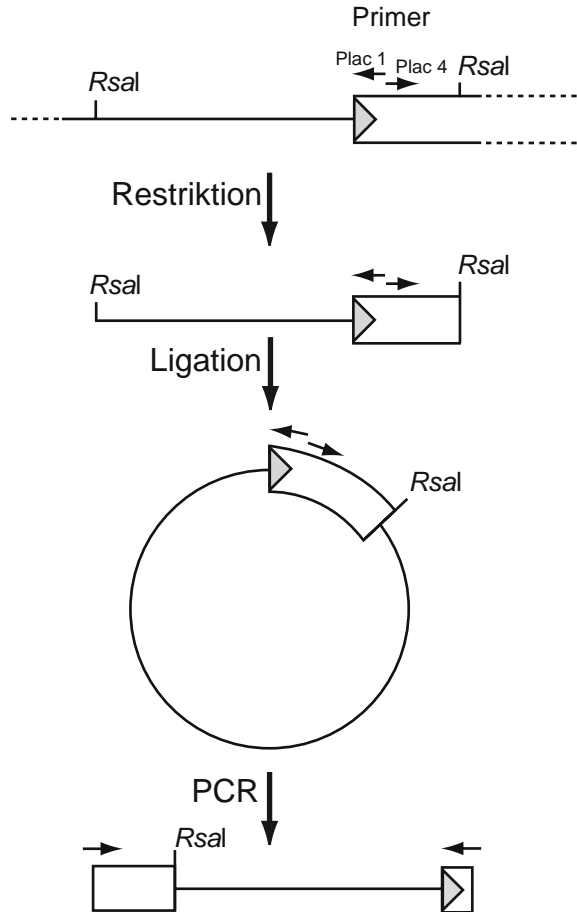


Abb. 4.5.3. Prinzip der inversen PCR. Weitere Erläuterungen im Text

Material

Die folgenden *Drosophila*-Stämme werden verwendet:

- *w/w*
- P[*white*⁺, *lacZ*] / P[*white*⁺, *lacZ*] (ca. 40 Fliegen des Enhancer-trap-Stammes, s. Kap. 8.4)

Da sich die 5'- und 3'-Sequenzen des P-Elements unterscheiden, kann man die beiden Enden flankierender DNA-Sequenzen mit Hilfe geeigneter Primer getrennt klonieren.

Primer für die Klonierung des 5'-Endes eines P-Elements

- Plac1 bindet im 5'-Ende des P-Elements, weist nach „außen“
- Plac4 bindet im 5'-Ende des P-Elements, weist in das P-Element

Primer für die Klonierung des 3'-Endes eines P-Elements

- P_{ry}1 bindet im 3'-Ende des P-Elements, weist in das P-Element
- P_{ry}2 bindet im 3'-*Inverted-Repeat*, zeigt nach „außen“

Primer	Primersequenz (5'–3')
Plac1	CAC CCA AGG CTCTGC TCC CACAAT
Plac4	CAA TCA TAT CGC TGT CTC ACT CA
P _{ry} 1	CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGAAT
P _{ry} 2	CTT GCC GAC GGG ACC ACC TTA TGT TAT T

- Taq-Polymerase
- PCR-Gerät
- Restriktionsenzyme
- Ligase
- Agarosegel
- Pipetten
- 37 °C Wasserbad
- 3–4 Liter A. dest. (kalt stellen)
- 200 mL 10 % Glycerin (wasserfrei, höchste Qualität nur für Bakterien)
- flüssiger Stickstoff oder Trockeneis

Methode

Für die Durchführung der inversen PCR sind folgende Schritte notwendig:

- Hydrolyse der genomischen DNA durch Restriktionsendonukleasen
- Ligation der hydrolysierten DNA über Nacht
- Inverse PCR, Gelanalyse der Produkte
- Reamplifikation ausgewählter Amplifikate, Gelanalyse der Produkte
- Aufreinigen: entweder direkt über Säulen oder über Gelelektion

A. HYDROLYSE DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

1. Für jede Linie werden zwei Hydrolysen angesetzt, eine mit dem Enzym *MspI*, eine mit dem Enzym *RsaI*.
2. 0,5–1 µg genomische DNA werden nach den Angaben des Herstellers in 50 µL Reaktionsvolumen mit 10 Units Enzym verdaut. Nach 2 h werden 5 µL des Ansatzes gelelektrophoretisch auf Vollständigkeit der Reaktion getestet (Kap. 10.4).
3. Bei vollständiger Hydrolyse ist ein „Schmier“ von Fragmenten im Agarosegel zu sehen. Anschließend Restriktionsenzyme für 10 min bei 70 °C inaktivieren, Ansatz kurz zentrifugieren.

B. LIGATION

4. 10–20 μL der hydrolysierten DNA (finale DNA-Konzentration sollte ca. 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ betragen), 10 μL 10 \times Ligase-Puffer, 2 μL T4-DNA-Ligase ad 100 μL H_2O .
5. Über Nacht bei 16 $^\circ\text{C}$ inkubieren. Die Aufkonzentrierung durch Fällung ist für die inverse PCR nicht nötig.

C. INVERSE PCR

Die PCR Reaktionen erfolgen im 50 μL -Maßstab in 0,5 mL-Gefäßen. Wegen der Sensitivität der PCR-Methode ist gesteigerte Aufmerksamkeit auf die Vermeidung von Kontaminationen zu richten. Das heißt:

! *Nur mit Handschuhen arbeiten und ausschließlich frische Spitzen nur einmal benutzen. Separates Gefäß mit zweimal destilliertem H_2O nur für die PCR verwenden und die Reaktionsgefäße verschlossen halten. Vorsichtig pipettieren, um Aerosolbildung zu vermeiden.*

Auf jeden Fall sollten eine Negativkontrolle (Wasser statt DNA) und eine Positivkontrolle angesetzt werden. Für alle PCR-Reaktionen sollte ein gemeinsamer „Mastermix“ angesetzt werden, in dem alle Komponenten außer dem DNA-*Template* enthalten sind. Es werden dann nur noch 40 μL Mastermix zum vorgelegten *Template* pipettiert. Der Mastermix sollte für 2–4 Ansätze mehr angesetzt werden als notwendig.

6. Reaktionsansatz für die inverse PCR:

Bestandteil	Endkonzentration	Volumen [μL]
<i>Template</i>	0,1 mg/mL	10
10 \times Puffer	1 \times	5
dNTPs (10 mM)	200 μM	1
Primer 1 (2 μM)	400 nM	10
Primer 2 (2 μM)	400 nM	10
Taq-DNA-Polymerase	1–2U	0,5
steriles H_2O	ad 50 μL	13,5

7. Die Inkubation der PCR-Ansätze erfolgt in einem PCR-Gerät unter Verwendung folgender Parameter:

Phase	Dauer [min:s]	Temperatur [°C]
a. Denaturierung der dsDNA	3:00	94
b. Amplifizierungszyklen (35×)		
Denaturierung	0:30	94
Hybridisierung	1:00	56 bzw. 60
Polymerisation	2:30	72
c. terminale Elongation	10:00	72
d. Kühlen	unbegrenzt	4

8. 10 µL der PCRs werden auf einem 1,5 %igen Agarosegel getestet.
9. a) Ist eine einzige Bande sichtbar, so wird das restliche Produkt mit dem Qiagen PCR Purification Kit gemäß beiliegendem Protokoll aufgereinigt.
b) Bei mehreren Banden erfolgt die Aufreinigung über Gelelution mit dem Qiagen Gel Extraction Kit.

D. KLONIERUNG DES PCR-PRODUKTS

Die konventionelle Klonierung von PCR-Produkten gestaltet sich schwierig, da die Taq-DNA-Polymerase eine 3'-Nukleotidtransferase-Aktivität aufweist. Zum größten Teil entstehen daher Amplifikate mit 3'-Adenin-Überhängen, die sich nur schwer in konventionell geöffnete Vektoren klonieren lassen. Verschiedene Hersteller bieten daher Vektoren an, die bereits geöffnet und mit 5'-Thymin-Überhängen versehen sind. Die Klonierung von PCR-Produkten kann z. B. über das T/A Cloning Kit der Firma Invitrogen gemäß Herstellerprotokoll erfolgen.

Wenn die Möglichkeit besteht, sollten die entstandenen Fragmente sequenziert werden, um anschließend eine Datenbanksuche durchführen zu können (s. Kap. 9).

Hinweise zur Auswertung

Die inverse PCR führt möglicherweise zu mehreren Banden. Dies kann bedeuten, dass die Reaktionsbedingungen nicht stringent genug angesetzt worden sind, oder es zeigt, dass mehr als eine P-Element-Insertion im Genom vorliegt. Über eine Sequenzanalyse lässt sich dies in der Regel ermitteln, da in korrekten Amplifikaten neben der genomischen Sequenz auch P-Element-Sequenzen nachweisbar sein sollten.

4.5.4 Nachweis eines Transkriptes mittels RT-PCR

In diesem Versuch soll ein reifes und somit intronfreies Transkript mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Exemplarisch wird hier das *gpd*-Gen aus *S. macrospora* untersucht. *gpd* kodiert für das Enzym Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Der offene Leserahmen des *S.-macrospora-gpd* hat eine Gesamtlänge von ca. 1,1 kb und besteht aus zwei Exons und einem Intron (Abb. 4.5.4).

Im ersten Schritt wird aus der Gesamt-RNA des Pilzes mittels reverser Transkription (RT) cDNA synthetisiert. Im zweiten Schritt wird die *gpd*-cDNA durch eine PCR mit den spezifischen Oligonukleotiden N-*gpd* und C-*gpd* amplifiziert. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie stromaufwärts bzw. stromabwärts des Introns binden (Abb. 4.5.4). Das Intron hat eine Länge von 74 nt, so dass das Fragment, welches von Gesamt-DNA amplifiziert wird, 520 bp groß ist, während das entsprechende cDNA-Fragment eine Größe von 446 bp hat.

Die zur reversen Transkription eingesetzte RNA wurde mit DNase behandelt, um eventuell mitisolierte DNA-Reste zu entfernen. DNA-Kontaminationen in der RNA führen bei einer PCR zur Amplifikation des intronhaltigen langen Fragments. Um zu überprüfen, ob die RNA durch die DNase-Behandlung tatsächlich DNA-frei ist, wird bei der reversen Transkription auch ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase durchgeführt, der anschließend zur PCR eingesetzt wird (Kontrolle ohne RT). Ein PCR-Produkt tritt dann nur im Fall einer DNA-Kontamination auf. Als Positivkontrolle für das Funktionieren der PCR dienen Ansätze mit dem Plasmid p165.3 (genomische DNA des *gpd*-Gens) oder mit Wildtyp-DNA als *Template*. Als Nullkontrolle dient ein PCR-Ansatz ohne Nukleinsäure-Zugabe.

Es wird zuerst eine reverse Transkription durchgeführt. Anschließend wird je ein PCR-Ansatz mit der cDNA sowie der Kontrolle ohne RT und der Null-

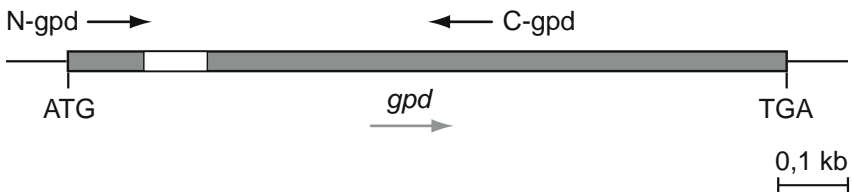


Abb. 4.5.4. Schematische Darstellung des *gpd*-Gens von *S. macrospora*. Die Exons sind grau unterlegt, das Intron weiß, und die Transkriptionsrichtung ist durch einen grauen Pfeil dargestellt. Die schwarzen Pfeile bezeichnen die Position der Oligonukleotide N-*gpd* und C-*gpd*. *ATG* Startcodon, *TGA* Stoppcodon

kontrolle ohne Nukleinsäuren angesetzt. Weiterhin werden zwei PCR-Ansätze mit Wildtyp-Gesamt-DNA bzw. dem Plasmid p165.3, welches das *gpd*-Gen aus der genomischen DNA von *S. macrospora* enthält, durchgeführt. Diese beiden DNAs dienen als Kontrollen, da von ihnen jeweils ein Fragment von 520 bp (genomische DNA, mit Intron) amplifiziert wird.

Material

A. REVERSE TRANSKRIPTION

- Gesamt-RNA (DNase-behandelt)
 - 100 ng/μL *Sordaria macrospora* Wildtyp-Stamm (wt)
- 5× RT-Puffer
- 0,1 M DTT (Dithiothreitol)
- Nukleotide (dNTP-Mix)
 - jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
- Oligonukleotid-Mix
 - 0,5 μg/μL Hexamere
 - 0,25 μg/μL Oligo-dT₁₂₋₁₈
- Reverse Transkriptase
 - 200 U/μL Invitrogen Superscript II
- steriles H₂O (2× autoklaviert)
- 2× autoklavierte Spitzen und Eppendorfgefäße

B. PCR

- 10 ng/μL Plasmid-DNA p165.3
- 100 ng/μL *S. macrospora* Wildtyp-Gesamt-DNA
- Oligonukleotidprimer
 - 10 μM N-*gpd* 5' GGCATCAACGGT TTCGGCCG 3'
 - 10 μM C-*gpd* 5' TTGGTG GTG CAA GAGGCG TTG 3'
- 10× Puffer mit MgCl₂ für PCR
- Nukleotide (dNTP-Mix)
 - jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Taq-Polymerase
 - 1 U/μL Eppendorf-Taq-Polymerase
- steriles H₂O
- PCR-Gefäße

Methode

A. REVERSE TRANSKRIPTION

- ! *Sämtliche RNA-Proben immer auf Eis lagern und mit Handschuhen arbeiten.*

1. Zwei Wasserbäder auf 70 °C bzw. 42 °C einstellen, mit Thermometer im Wasser kontrollieren!
2. Zu 10 µL RNA (1 µg) ins Eppendorfgefäß pipettieren: 17 µL Wasser (2× autoklaviert) und 4 µL Oligonukleotid-Mix (Hexamere + Oligo-dT).
3. 10 min bei 70 °C im Wasserbad inkubieren (Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen).
4. 10 min in Eiswasser abkühlen lassen.
5. Während der Inkubationszeiten von Punkt 3 und 4: Premix für Reverse Transkription herstellen:

Bestandteil	Premix mit RTase	Premix ohne RTase
5× RT-Puffer	6,0 µL	6,0 µL
dNTPs (10 mM)	1,5 µL	1,5 µL
DTT (0,1 M)	3,0 µL	3,0 µL
RTase (200 U/µL)	2,0 µ	–
H ₂ O	2,0 µL	4,0 µL

6. Jeweils 15,5 µL von RNA+Oligonukleotiden (aus Punkt 4) zum Premix mit bzw. ohne RTase geben.
7. 1 h bei 42 °C im Wasserbad inkubieren (Temperatur zwischendurch kontrollieren!)
8. 15 min bei 70 °C im Wasserbad inkubieren (Hitzeinaktivierung).
9. Anzentrifugieren, auf Eis halten.

B. PCR

10. Pipettieren des Mixes für 5,5 Ansätze (Mix auf Eis halten!):

Bestandteil	Menge
H ₂ O	211,0 µL
10× Puffer mit MgCl ₂	27,5 µL
dNTPs (10 mM)	5,5 µL
Oligo N-gpd	5,5 µL
Oligo C-gpd	5,5 µL
Taq-Polymerase (1 U/µL)	5,5 µL

Komponenten in angegebener Reihenfolge pipettieren, kurz vortexen, anzentrifugieren.

11. Pipettieren der PCR-Ansätze: Zuerst Mix in die PCR-Gefäße aliquotieren, dann *Templates* hinzufügen (Gefäße auf Eis halten):

Ansatz	Mix	Template	Template-Menge
1	48 µL	p165.3	2 µL
2	48 µL	cDNA (+RT)	2 µL
3	48 µL	cDNA (-RT)	2 µL
4	48 µL	wt-DNA	2 µL
5	48 µL	-	-

12. Die Inkubation der Ansätze erfolgt in einem PCR-Gerät. Programm bei Verwendung des PerkinElmer GeneAmp 9600 (für andere Geräte sind evtl. Anpassungen der Programmparameter nötig):

Phase	Dauer	Temperatur
a. Denaturierung der dsDNA	2 min	94 °C
b. Amplifizierungszyklen (40×)		
Denaturierung	20 s	94 °C
Hybridisierung	20 s	55 °C
Polymerisation	1 min	72 °C
c. terminale Elongation	10 min	72 °C
d. langsame Abkühlung auf 4 °C		

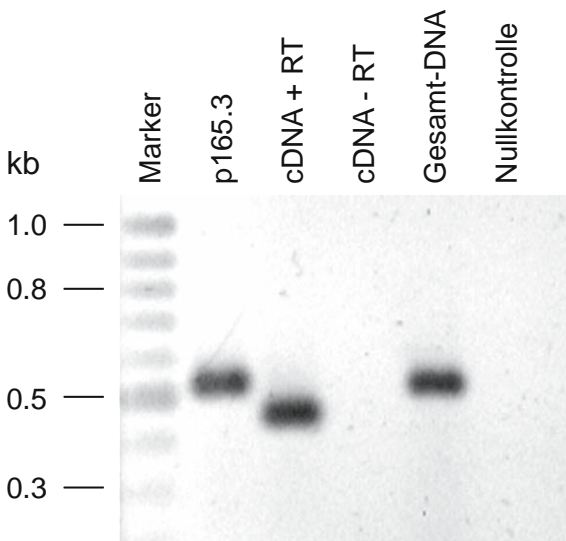


Abb. 4.5.5. Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten aus der RT-PCR. Die eingesetzte *Template*-DNA ist oberhalb jeder Spur angegeben, die Markergrößen in kb sind auf der linken Seite angezeigt

Hinweise zur Auswertung

Nach Ablauf der PCR-Reaktionen werden je 10 μL der Ansätze mit 3 μL Ladepuffer versetzt und auf einem Agarosegel (1 %) aufgetrennt. Abb. 4.5.5 zeigt das Ergebnis dieser RT-PCR: Von den Kontroll-DNAs (Wildtyp und p165.3) wird wie erwartet ein Fragment in der Größe der genomischen DNA (ca. 520 bp) amplifiziert. Von dem Ansatz mit Reverser Transkriptase wird ebenfalls erwartungsgemäß ein cDNA-Fragment von ca. 440 bp amplifiziert, während von der Kontrolle ohne Reverse Transkriptase sowie von der Kontrolle ohne Nukleinsäuren kein Amplifikat erhalten wird. Eine genaue Bestimmung der Intron Grenzen wäre in weiteren Versuchen durch Klonierung und Sequenzierung des cDNA-Fragments möglich.