

Laborpraktikum Medizinische Mikrobiologie

Arbeiten mit *Helicobacter pylori*

21.08.2000 bis 22.09.2000

Betreuerin: Susanne Friedrich

Sven Enterlein
108 097 236 174

Inhalt

I Ziel des Praktikums	1		
Aufgabenstellung.....	1		
II Helicobacter pylori	2		
Vorkommen	2		
Entdeckung	2		
Aufbau	2		
Extrazelluläre Produkte	2		
Epidemiologie	2		
Pathogenese	2		
Labordiagnose.....	3		
Therapie	3		
III Methoden	3		
Zentrifugation	3		
Agarose-Gelelektrophorese	3		
Gießen des Gels.....	3		
Probenauftragung	3		
Anfärben des Gels	4		
Präparatives Agarosegel	4		
Extraktion der DNA aus dem Gel	4		
Isolierung genomischer DNA	4		
Lyse der Zellen	4		
DNA-Isolierung	4		
Polymerasekettenreaktion, PCR	5		
Probenvorbereitung	5		
PCR-Profil.....	6		
Kontrolle der PCR.....	6		
Inverse PCR	6		
Durchführung	6		
Aufreinigung des PCR-Produktes	7		
Restriktion	7		
Durchführung	7		
Ligation	8		
Dephosphorylierung von Vektorenden .	8		
Durchführung	8		
Übernacht-Schüttelkultur.....	8		
Herstellung kompetenter Zellen (<i>E.coli</i>)	8		
Calciumchlorid-Methode	8		
Transformation	8		
Kompetente Zellen durch CaCl ₂	9		
Kompetente Zellen (aus Kit)	9		
Minipreps	9		
Alkalische Lyse	9		
Fällen der DNA	9		
Maxipreps	9		
Vorbereitungen	9		
Durchführung	9		
Lyse	10		
Isolierung und Fällen der DNA	10		
IV Isolierung des regulatorischen Gens HP0082, Ligation in die Vektoren pILL570 und pUC18 und Transformation in <i>E.coli</i>	10		
Einleitung.....	10		
Durchführung.....	10		
Isolierung der genomischen DNA und			
Amplifizierung des Gens 0082.....	10		
Neuansatz PCR	11		
Schneiden der DNA-Fragmente und			
Ligation	11		
Transformation.....	11		
V Einfügen einer <i>EcoR</i> I-Schnittstelle in das ligierte HP0082 und Transformation in <i>E.coli</i>	12		
Einleitung	12		
Durchführung	12		
Kontrolle der Ligation	12		
Isolierung größerer Mengen DNA aus			
positiven Klonen und Anfügen der			
Schnittstelle	13		
Restriktion und Schließen des Vektors ...	13		
Transformation	14		
Kontrolle der Transformation durch			
Restriktion mit <i>EcoR</i> I und <i>Pst</i> I	14		
VI Isolierung und Einbau der Kanamycin- Kassette in <i>pILL570</i>	14		
Einleitung	14		
Durchführung	15		
Isolierung der Vektoren und Restriktion mit			
<i>EcoR</i> I.....	15		
Ligation der Km-Kassette in <i>pILL570</i> mit			
HP0082	15		
Transformation	15		
Kontrolle der Orientierung der Km-Kassette			
.....	15		
VII Isolierung des mit Km in Leserichtung eingebauten Vektors	15		
Einleitung	15		
Durchführung	15		
VIII Sequenzierung des ligierten Gens HP0082 in <i>pUC18</i>	15		
Einleitung	15		
Durchführung	16		
PCR.....	16		
Sequenzierung	16		
IX Sonstige Arbeiten	17		
Untersuchung pathogener <i>E.coli</i>	17		
Ziel	17		
Durchführung.....	17		
TOPO-TA-Cloning Kit.....	18		
Klassifizierung von <i>Staphylococcus aureus</i> 18			
Pulsfeld-Gelelektrophorese	18		
X Literatur	18		
<i>pUC18/19</i>	1		
<i>pILL570</i>	1		
<i>pILL570</i>	2		

I Ziel des Praktikums

Primär soll durch das Praktikum genetisches Arbeiten erlernt werden. Dazu gehören Routinemethoden wie PCR, Restriktion, Ligation, Agarose-Gelelektrophorese usw., die im nächsten Kapitel beschrieben werden. Anhand eines eigenen Projektes soll die Lösung einer Problemstellung schrittweise angegangen und koordiniertes Arbeiten geübt werden.

Aufgabenstellung

Untersucht werden soll der Einfluss des regulatorischen Gens HP0082 von *Helicobacter pylori*, einem gramnegativen Bakterium. Es steht im Zusammenhang mit der Bildung der virulenten Flagellen, mit denen es sich in der Magenschleimhaut verankert.

Es soll eine *knock out* Mutante hergestellt werden, in der das Flagellin HP0082 ausgeschaltet ist. In einem weiteren Versuchsteil soll das HP0082-Gen in einen anderen Vektor für die Sequenzierung ligiert werden. Viele Schritte sind identisch bzw. verlaufen analog. Die Abläufe sind schematisch in Abb. 1 dargestellt.

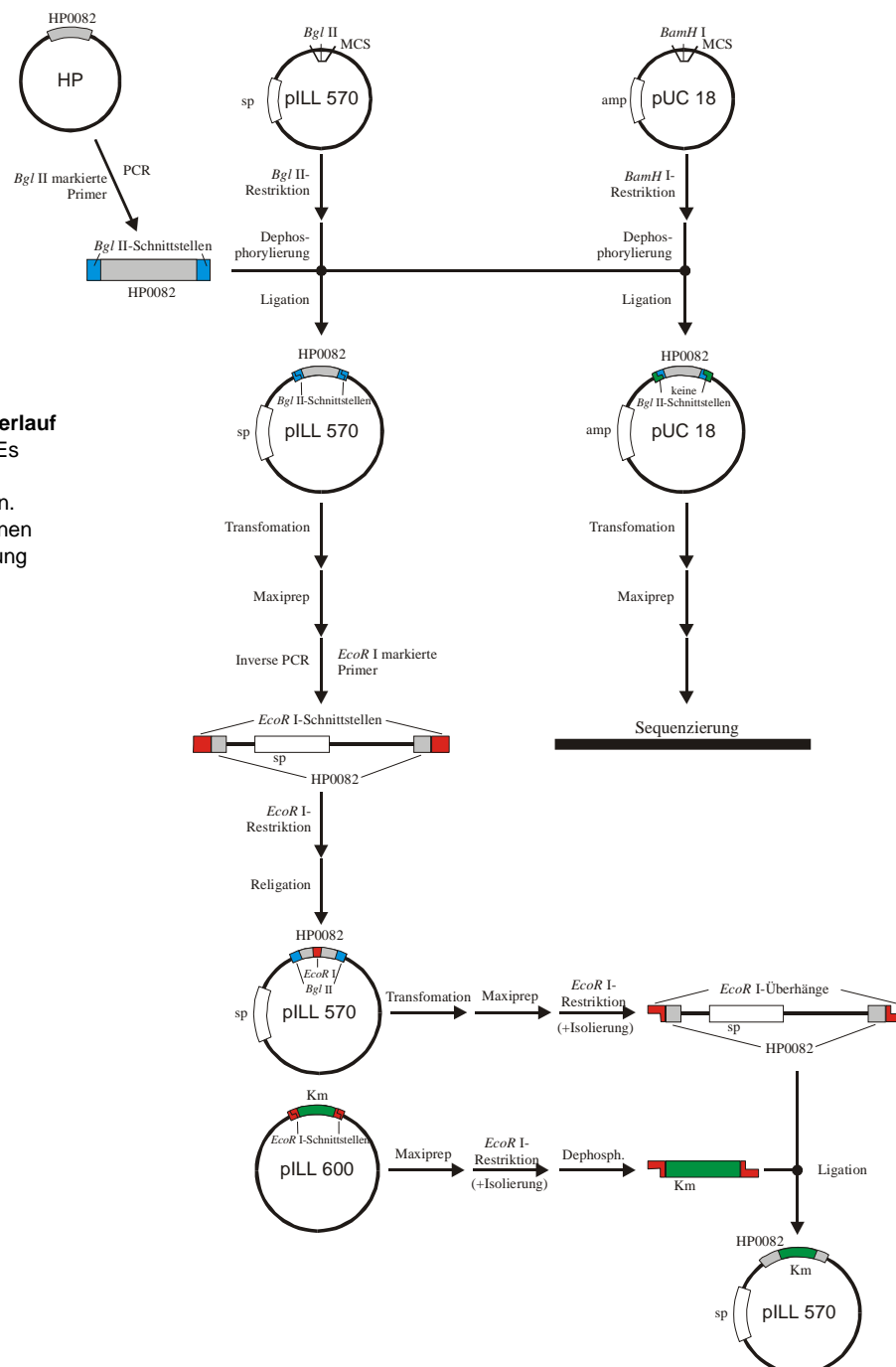


Abb. 1: Schematischer Verlauf der beiden Teilprojekte. Es sind nur die wichtigsten Zwischenstufen angegeben. Details sind bei den einzelnen Schritten in der Durchführung gezeigt.

II *Helicobacter pylori*

Vorkommen

Das Bakterium befällt hauptsächlich den Menschen, in seltenen Fällen wurden auch in Affenarten Erreger gefunden. Es setzt sich in der Schleimhaut des Magenepithels fest. Ein Umweltreservoir ist nicht bekannt.

Der Erreger ist empfindlich gegen Kälte, Austrocknung und Sauerstoffeinwirkung, kann aber kurzfristig auf med. Geräten wie dem Endoskop überleben und so übertragen werden.

Entdeckung

Die Spezies *H. pylori* wurde erstmals 1982 angezüchtet und 1983 als Auslöser akuter Gastritis in einem Selbstversuch nachgewiesen.

Aufbau

H. pylori gehört zu den mikroaeroben, gramnegativen Stäbchen. Seine Form ist gebogen oder spiralförmig und es besitzt an einem Pol vier bis sieben Geißeln. Unter ungünstigen Umwelt- oder Kulturbedingungen kann eine kokkoide Form angenommen werden.

Sein Genom mit 1.6 Mio. Basenpaaren ist vollständig bekannt. Vielen Stämmen, die für eine Erkrankung an Ulkus oder Malignomen verantwortlich sind, ist eine DNA-Region von ca. 40 kbp gemein; sie wird Pathogenitätsinsel genannt, weil sie wahrscheinlich für ein System zur Sekretion von Virulenzfaktoren kodiert. Ansonsten ist die genetische Variabilität sehr hoch, so dass durch genetische Analysen (wie der Pulsfeldgelelektrophorese) die unterschiedlichen Stämme unterscheiden lassen.

Das Chromosom enthält sämtliche Gene für die bekannten Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzen. Die vorkommenden Plasmide sind funktionell noch nicht charakterisiert.

Extrazelluläre Produkte

Wie die meisten *Helicobacter*-Spezies zeichnet sich auch *H. pylori* durch eine starke Ureaseproduktion aus. Diese kann sogar diagnostisch genutzt werden. Manche Stämme produzieren ein Cytotoxin (VacA-Toxin), das möglicherweise an der Ulkuserkrankung beteiligt ist. Hinweis dafür ist, dass Patienten mit toxinbildenden Stämmen häufiger an einer Ulkuserkrankung erkranken als solche mit nicht toxinbildenden Stämmen befallene.

Epidemiologie

Im Kindesalter wird nahezu die Hälfte aller Menschen infiziert, und die Erreger persistieren lebenslang. Während der größte Teil der Infektionen ohne Symptome verläuft, kommt es bei ca. 10% der Infizierten zu Folgeerkrankungen (gastroduodenale Ulkuserkrankung, Magenschleimhautatrophie, Magenmalignome). Ja nach Krankheit sind zwischen 100% (Ulcus duodeni) und 60% (Magenkarzinom) der Fälle auf eine Infektion mit *H. pylori* zurück zu führen.

Die Übertragung kann oral/oral oder oral/fäkal erfolgen. Einzelheiten des Übertragungsmechanismus sind allerdings noch nicht bekannt.

Pathogenese

Das stark saure Milieu des Magens wird von *H. pylori* durch seine Ureaseaktivität geschwächt, da das entstehende Ammoniak die Magensäure neutralisiert. Die Bakterien setzen sich im Magenschleim fest, in den sie aufgrund ihrer Spiralform und Beweglichkeit leicht eindringen können. Dort werden sie durch zahlreiche Adhäsine fest an die Magenepithelzellen gebunden. Wahrscheinlich ist die jahrelange Persistenz durch die Aufteilung der Bakterien in ein Reservoir im Magenschleim und eines an den Epithelzellen zurück zu führen.

Da es sich bei *H. pylori* um einen extrazellulären Krankheitserreger handelt, wandert er äußerst selten in Epithelzellen ein. Neben der chronischen Entzündungsreaktion, die die Infektion auslöst, sind toxisch wirkende bakterielle Produkte verantwortlich für die Schleimhautschädigung. Letztere sind die Urease, das VacA-Cytotoxin und andere Produkte wie z.B. Phospholipasen. Das Immunsystem reagiert mit erhöhter IL-8 (Interleukin 8) Produktion, was zum Einstrom von Granulozyten in die Lamina propria führt. Zudem forciert es die Bildung von TNF- α (Tumornekrosefaktor α) und IL-1, die weitere Entzündungsmediatoren darstellen. Oftmals werden im Laufe der humoralen Abwehr Autoantikörper gegen Parietalzellen gebildet, die die atrophische Gastritis (eine Vorstufe des Magenkarzinoms) auslösen können. Granulozyten und Monozyten scheinen außerdem direkt durch die Urease chemotaktisch angezogen zu werden.

Labordiagnose

Wie schon erwähnt, kann die starke Ureaseproduktion als Nachweis genutzt werden. Es gibt bei der Endoskopie einen Urease-Schnelltest, bei der eine Biopsie in das Urease-Testmedium eingebracht wird. Sind infektiöse Keime vorhanden, ist meist schon nach einer Stunde ein Farbumschlag des pH-Indikators zu erkennen.

Ebenfalls aus (Magen)Biopsien kann eine Kultur auf speziellen Medien angezchtet werden. Diese werden knapp eine Woche in mikroaerober Atmosphäre inkubiert. Die entstehenden Kolonien sind klein und glasig und zeigen positive Reaktionen auf Katalase- und Oxidasenachweis. Ausreichend zur Bestätigung sind das Grampräparat und der Ureasenachweis.

Um den Verlauf der Infektion zu kontrollieren, kann ^{13}C -markierter Harnstoff eingesetzt werden, der über ureaseumgesetztes und ausgeatmetes $^{13}\text{CO}_2$ nachgewiesen werden kann.

Therapie

Typischerweise wird zur Therapie eine Kombination aus zwei Antibiotika und Säuresekretionhemmern eingesetzt, z.B. Clarithromycin mit Metronidazol und Omeprazol als Protonenpumpenhemmer. Diese Tripeltherapie führt nach sieben bis zehn Tagen zu Elimination der Erreger; um von einer Eradikation sprechen zu können, muss bis zu vier Wochen nach Ende der Therapie gewartet werden. Dies gelingt in ca. 90% der Fälle. Gleichzeitig heilt die Gastritis ab und die Ulkusrezidive werden vermindert. Ein Zusammenhang mit der Minderung des Krebsrisikos ist noch nicht geklärt.

III Methoden

Im Verlauf des Praktikums wurden viele Methoden wiederholt durchgeführt. In diesem Abschnitt werden die häufigsten erklärt, um später nicht mehrfach wiederholt werden zu müssen.

Zentrifugation

Eine der wichtigsten Methoden zur Trennung von Substanzen in Flüssigkeiten ist die Zentrifugation. Sie dient dazu, eingeschränkt mischbare Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Dichte zu trennen (wie z.B. bei der Phenol/Chloroform-Extraktion) oder in Lösung befindliche Moleküle zu sedimentieren (z.B. zur DNA-Fällung). Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist von vielen Faktoren abhängig und kann unter definierten Bedingungen zur Charakterisierung von Molekülen herangezogen werden, wie es bei den Ribosomen (untereinheiten) der Fall ist.

Es gibt viele unterschiedliche Zentrifugen; abhängig von der Problemstellung werden Tischzentrifugen bis hin zu Ultrazentrifugen eingesetzt. In diesem Protokoll beziehen sich die Angaben auf die Tischzentrifuge, außer es ist etwas anderes angegeben.

Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode wird zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach Molekulargewicht, also auch der Größe bzw. Anzahl der Basen, verwendet. In einem elektrischen Feld wandern die aufgrund der vielen Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zur Größe, d.h. größere Moleküle bewegen sich langsamer als kleinere. Durch das dreidimensionale Netzwerk der Agarose werden die Moleküle zurück gehalten. Die Konzentration der Agarose bestimmt somit stark das Laufverhalten. Geringere Konzentrationen ermöglichen eine leichtere Migration, was für die Trennung großer Fragmente nützlich ist, wohingegen hohe Konzentrationen für kleine Moleküle besser geeignet sind. Allerdings sind gering konzentrierte Gele auch sehr weich und empfindlich. Für sehr kleine DNA-Fragmente gibt es spezielle *low-melting* Agarose.

Gießen des Gels

Eine frisch angesetzte Agaroselösung, die aus pulverförmiger Agarose in einem Puffer besteht, muss aufgekocht werden, damit sich das Polysaccharid vollständig und gleichmäßig löst. Nach dem Erkalten kann das Gel durch Erhitzen geschmolzen und wiederverwendet werden. Das flüssige Gel wird in eine Kammer gegossen, in der ein Kamm steckt. Ist das Gel erstarrt wird der Kamm vorsichtig entfernt, wodurch Taschen im Gel zurück bleiben. In diese werden die Proben aufgetragen.

Probenauftragung

Um die Bandenfront sichtbar zu machen, wird den Proben ein Farbstoff zugesetzt, der in dem sog. Stopp-Mix enthalten ist. Gewöhnlich werden 10 µl Probe aufgetragen, die sich unterschiedlich zusammensetzen können:

- Restriktionsansätze: 10 µl Restriktionsansatz werden mit 1 µl konzentriertem Stopp-Mix versetzt und vollständig aufgetragen.

- Gereinigte PCR-Produkte: Aufgrund der hohen Konzentration an DNA in PCR-Ansätzen wird eine 1:10 oder 1:100 Verdünnung eingesetzt. 5 µl der Verdünnung werden mit 5 µl 1:5 verdünntem Stopp-Mix versetzt und vollständig aufgetragen.
- Sonstige DNA-Proben: Für gewöhnliche DNA-Analysen ist es nicht nötig, eine Verdünnung herzustellen; stattdessen werden direkt 5 µl DNA-Lösung mit 5 µl des verdünnten Stopp-Mix versetzt und dann aufgetragen.

Zusätzlich zu den Proben muss ein Standard (oft die sog. Lambda-Leiter) aufgetragen werden, um den Probenbanden eine Größe zuweisen zu können. Im Standard sind Fragmente definierter Größe enthalten.

Anfärben des Gels

Die aufgetrennten Nukleinsäuren sind nicht direkt sichtbar. Deswegen wird das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (EtBr) eingelegt (3 bis 5 Minuten), wodurch sie unter UV-Licht als orange leuchtende Banden erscheinen. Das beruht auf der Interkalation des EtBr in die doppelsträngige DNA. **VORSICHT!** EtBr unterscheidet nicht zwischen DNA im Gel und in der Haut! Es wirkt mutagen, da es die Replikation der DNA unterbindet.

Präparatives Agarosegel

Um die DNA nach der elektrophoretischen Trennung weiter verwenden zu können, wird ein präparatives Agarosegel eingesetzt. Dieses weist hauptsächlich drei Unterschiede zu dem zuvor beschriebenen auf: Die verwendete Agarose ist sauberer, die Taschen sind größer, um quantitativ arbeiten zu können und im Gel ist bereits Ethidiumbromid enthalten. Die gewünschten Banden werden unter UV-Licht möglichst knapp ausgeschnitten; die DNA wird am einfachsten mit geeigneten Kits aus dem Gel extrahiert (s.u.).

Auf 50 µl der DNA-Probe werden 5 µl unverdünnter Stopp-Mix gegeben und dann 100 µl in die breiten Taschen pipettiert. In eine der schmalen Taschen werden 10 µl des Standards aufgetragen.

Extraktion der DNA aus dem Gel

Nach dem Ausschneiden der Banden aus dem Gel werden diese mit dem dreifachen Volumen (hier jeweils 900 µl) QC-Puffer versetzt und 10 min bei 50° C im Wasserbad erwärmt; es sollte alle drei Minuten kurz geschüttelt werden. Danach wird jeder Ansatz mit einem gleichen Volumen (300 µl) Isopropanol versetzt und gevortext. Die Lösungen werden auf je eine QIAquick-Säule aufgetragen und 1 min bei 13,000 rpm zentrifugiert; der Durchlauf wird verworfen. Bei den angegebenen Volumina kann nur die Hälfte auf einmal aufgetragen werden; der Rest wird nach dem ersten Zentrifugieren auf dieselbe Säule aufgetragen und der Vorgang wiederholt. Anschließend werden die Säulen zwei Mal gewaschen (750 µl PE-Puffer auftragen und 30 s bei 13,000 rpm zentrifugieren). Die Säulen werden durch Zentrifugation für 1 min bei 13,000 rpm ohne Durchlauf von restlichem Ethanol befreit. Dann werden die Säulen auf ein neues 1.5 ml Eppi gesteckt, und die DNA durch Auftragen von 45 µl 0.01 M Tris-Cl pH 8.0 und die folgende Zentrifugation für 1 min bei 13,000 rpm von der Säule eluiert.

Isolierung genomischer DNA

Hier wird beschrieben, wie DNA aus Bakterien isoliert werden kann. Wir benutzen dazu das QIAGEN® DNeasy Tissue Kit. Je nach Spezies der verwendeten Bakterien sind leichte Änderungen zu berücksichtigen; die Angaben beziehen sich auf *Helicobacter pylori*.

Lyse der Zellen

Die Hälfte eines Ausstrichs der Bakterien wird in 1 ml 0.9 M NaCl-Lösung eingerieben und 2 min bei 8,000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 180 µl ATL-Puffer durch mehrmaliges kurzes Vortexen resuspendiert und anschließend werden 18 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben. Die Lyse erfolgt durch halbstündige Inkubation im Wasserbad bei 55° C. Zum RNA-Verdau werden 40 µl RNase A (10 mg/ml) zupipettiert und nach kurzem Vortexen 2 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl AL-Puffer wird gevortext und 10 min bei 70° C inkubiert.

DNA-Isolierung

Dann werden 210 µl Ethanol abs. zugegeben und gevortext. Das Lysat wird auf eine Säule aufgetragen und 1 min bei 8,000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule auf ein neues Röhrchen gesteckt. Zum Waschen der Säule werden 500 µl AW1-Puffer aufgegeben und erneut 1 min bei 8,000 rpm zentrifugiert. Wieder wird der Durchlauf verworfen und die Säule auf ein neues Röhrchen gesteckt. Es folgt ein zweiter Waschgang mit 500 µl AW2-Puffer (1 min bei 8,000 rpm). Zum Trocknen der Säule, d.h. um das restliche Ethanol zu entfernen, wird die Säule auf dem leeren Röhrchen 2 min bei 13,000 rpm zentrifugiert. Für die Elution wird die Säule auf ein sauberes 1.5 ml

Eppendorfgefäß gesetzt und mit 200 µl auf 70° C temperiertem AE-Puffer 1 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde durch einminütiges Zentrifugieren bei 13,000 rpm eluiert.

Polymerasekettenreaktion, PCR

Zur Amplifizierung zumindest teilweise bekannter DNA-Sequenzen ist die PCR zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel geworden. Vor allem in Bereichen der Diagnostik, wo oft nur geringste Mengen an DNA (oder auch RNA, s.u.) hat die PCR neue Möglichkeiten eröffnet. So ist z.B. die Analyse der DNA aus nur einem einzigen Haar (wichtig für die Kriminalmedizin) möglich geworden. Durch die millionenfache Vervielfältigung theoretisch nur eines DNA-Moleküls steht genügend Ausgangsmaterial für unterschiedliche Untersuchungen zur Verfügung.

Als Durchbruch für die Automatisierung der PCR kann die Entdeckung der Taq-Polymerase angesehen werden. Dieses Enzym wird aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen und ist auch bei hohen Temperaturen stabil. Die hohen Temperaturen sind dazu notwendig, um die DNA-Doppelhelix für die Replikation zu schmelzen (s.a. PCR-Profil). Heutzutage gibt es vollautomatische Geräte, die PCRs durchführen.

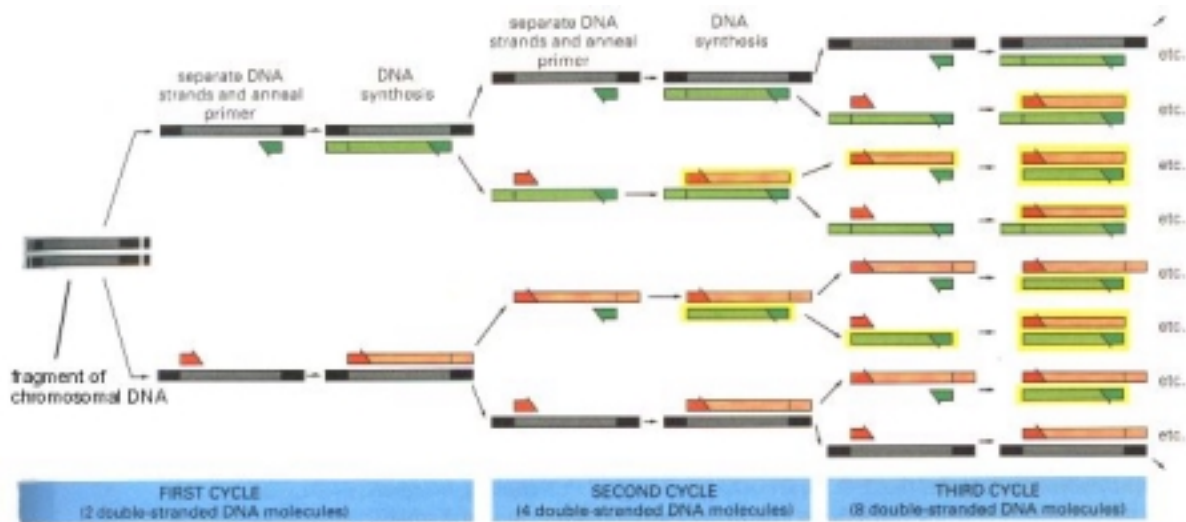


Abb. 2: Schematischer Ablauf einer PCR. Aus der isolierten DNA wird schrittweise eine Sequenz spezifisch amplifiziert. (Quelle: *Alberts, „Molecular Biology of the Cell“, p. 319, 3rd ed. 1994, Garland Pbl.*)

Wie eingangs erwähnt muss ein Teil der DNA-Sequenz bekannt sein, um eine Amplifizierung zu ermöglichen. Der Grund liegt ist, dass jede Replikation der DNA einen Primer als Startpunkt erfordert. Da beide Stränge repliziert werden, sind zwei bekannte Sequenzen erforderlich, die den gewünschten Abschnitt flankieren. An diese lagern sich die Primer an, und die Replikation beginnt (Abb. 2). Nach einer gewissen Zeit, die durch die Länge des zu replizierenden Stückes bestimmt wird, werden die Stränge geschmolzen, wodurch auch die Replikation endet. Es liegen nun die Template-DNA und zwei neue Einzelstränge vor. Dort lagern sich wiederum die Primer an, und das Template wird wie zuvor repliziert. Die im vorigen Zyklus synthetisierten Primer hingegen weisen einen wichtigen Unterschieden auf: sie beginnen je mit einer der beiden Primersequenzen. Weiter *upstream* gelegen befinden sich die Erkennungssequenzen für den jeweils anderen Primer, von wo aus die Replikation startet; sie endet nach Erreichen des ersten Primerendes. Demnach ist der erste Strang entstanden, der nur die gewünschte Sequenz enthält. In den folgenden Zyklen entstehen ausschließlich Kopien dieses Stranges, da das DNA-Template sowie die ersten beiden neusynthetisierten Stränge nur in zwei Kopien vorliegen. Gewöhnlich werden ca. 30 Zyklen durchlaufen, was theoretisch $2^{28} = 268,435,456$ Kopien entspricht.

Probenvorbereitung

Zwei Probenvolumina sind gängig: Für Nachweisreaktionen genügt ein 50 µl Ansatz, für PCRs, deren Produkte weiterverwendet werden sollen, werden 100 µl angesetzt.

Am einfachsten ist es, wenn man zunächst einen Mix aus den Lösungen ansetzt, die in allen Ansätzen, einschließlich der Negativkontrolle, benötigt werden. Durch den Einsatz größerer Mengen werden Pipettierfehler kleiner und die Ansätze leichter zu handhaben. Die Negativkontrolle soll Verunreinigungen aufzeigen, die z.B. durch kontaminierte Lösungen oder Pipetten in die PCR-Hütchen gekommen sein können. Aus diesem Grund arbeiten wir auch mit Filter-Tips und sterilfiltriertem a-

qua bidest. Der erwähnte Mix besteht aus den Primern, einem Desoxyribonukleotidmix, dem PCR-Puffer und der Taq-Polymerase. Die Mengen sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Mix		
10 µl	PCR-Puffer 1 (1.75 mM MgCl ₂)	Die Angaben beziehen sich auf einen 100 µl Ansatz; für 50 µl Ansätze ist die Hälfte einzusetzen. Es ist sinnvoll, immer einen Ansatz mehr als benötigt vorzubereiten, damit ausreichende Mengen vorhanden sind.
16 µl	350 µM dNTP-Mix	
5 µl	Primer 1 (20 pmol/µl)	
5 µl	Primer 2 (20 pmol/µl)	
0.5 µl	Taq-Polymerase (5,000 U/ml)	

In ein PCR-Hütchen werden 58.5 µl (26.8) H₂O, 36.5 µl (18.2) Mix und 5 µl DNA-Lösung bzw. H₂O für die Negativkontrolle pipettiert (die Angaben in Klammern gelten für 50 µl Ansätze). Die Hütchen werden in die PCR-Maschine gesetzt und das richtige Programm eingestellt.

PCR-Profil

Das Temperatur/Zeit-Profil auf der nächsten Seite gilt eigentlich für alle PCRs. Ein wichtiger Kontrollfaktor bei der PCR ist Schritt 3: die Anlagerung der Primer an das Template. Die eingestellte Temperatur ist für die Stringenz der Replikation entscheidend. Je höher die Temperatur eingestellt wird, desto besser muss der Primer zu der Sequenz passen, um stabil gebunden zu bleiben. Bei niedrigeren Temperaturen können auch ungenauere Primer sich ausreichend fest anlagern. Verläuft eine PCR ohne Produkt, so kann die Temperatur erniedrigt werden.

Schritt	Temperatur/° C	Zeit/min	Vorgang	Wiederholungen
1	92-94	5	Schmelzen der DNA	1
2	92-94	0.5	Schmelzen der DNA	
3	48-60	0.5	Anlagerung der Primer	25-35
4	72	1 min/kb	DNA-Synthese (Elongation)	
5	72	7	Fertigstellung angefangener DNA-Stücke	1
6	15	∞	Lagerung	

Kontrolle der PCR

Den Erfolg der PCR kann man mit einer Agarose-Gelelektrophorese überprüfen. Neben dem Template muss auch eine Bande in der Größe der amplifizierten Sequenz vorhanden sein. Zudem darf die Negativkontrolle keine Banden zeigen.

Inverse PCR

Die inverse PCR dient dazu, den kompletten Vektor zu amplifizieren und diesen gleichzeitig mit terminalen Schnittstellen (z.B. *EcoR* I) zu versehen. Diese können dann geschnitten und religiert werden, um ein vollständig geschlossenes Plasmid zu bekommen.

Da es sich häufig um recht große Vektoren handelt, sind einige Unterschiede zur „normalen“ PCR nötig. So wird nur wenig Primer zugegeben, dafür aber viel DNA-Template. Natürlich muss auch die größere Menge an dNTPs berücksichtigt werden. Besonders wichtig ist, dass nicht die Taq-Polymerase eingesetzt wird, sondern ein Mix aus verschiedenen Polymerasen. Aufgrund der hohen Kosten der Enzyme wird oft auf eine Negativkontrolle verzichtet. Das Profil der PCR enthält ebenfalls eine Besonderheit: Nach den ersten 10 Zyklen verlängert sich der schon zu Beginn sehr viel längere Elongationsschritt pro Zyklus um 20 Sekunden, um die langen Stränge vollständig aufbauen zu können.

Durchführung

Für einen Ansatz werden zwei Mixe auf Eis vorbereitet:

Mix 1	Mix 2
14 µl 350 µM dNTP-Mix	5 µl PCR-Puffer 1 (1.75 mM MgCl ₂)
1 µl HP82-3s Primer (20 pmol/µl)	0.75 µl Enzyme-Mix
1 µl HP82-5s Primer (20 pmol/µl)	19.25 µl aqua bidest.
5 µl DNA-Template	
5 µl aqua bidest.	

Pro Ansatz werden 25 µl Mix 1 mit 25 µl Mix 2 versetzt. Das Temperatur/Zeit Profil der PCR wird in etwa wie folgt eingestellt:

Schritt	Temperatur/° C	Zeit/min	Vorgang	Wiederholungen
1	94	2	Schmelzen der DNA	1
2a	94	0.5	Schmelzen der DNA	
3a	50	0.5	Anlagerung der Primer	10
4a	68	6	DNA-Synthese (Elongation)	
2b	94	0.5	Schmelzen der DNA	
3b	50	0.5	Anlagerung der Primer	20
4b	68	6+20 s/Zykl.	DNA-Synthese (Elongation)	
5	72	7	Fertigstellung angefangener DNA-Stücke	1
6	15	∞	Lagerung	

Aufreinigung des PCR-Produktes

Ist das gewünschte Fragment in den Proben enthalten, wird das PCR-Produkt aufgereinigt. Der Ablauf entspricht im wesentlichen dem der DNA-Extraktion aus Agarosegelen (s.o.). Da das PCR-Produkt weiter verwendet wird, beziehen sich die Angaben auf 100 µl Ansätze. Wir haben dazu ebenfalls das Kit QIAquick spin der Firma QIAGEN benutzt.

Ein PCR-Ansatz wird mit dem fünffachen Volumen (500 µl) PB-Puffer vermischt und auf die QIAquick-Säule aufgegeben. Diese wird 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säule wird zwei Mal gewaschen: 750 µl BE-Puffer werden aufgetragen und die Säule 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zum Trocknen wird ein weiteres Mal ohne Durchlauf zentrifugiert (1 min bei 13.000 rpm). Dadurch wird das restliche Ethanol entfernt, das nachfolgende enzymatische Reaktionen beeinträchtigen könnte. Die Säule wird danach auf ein sauberes 1.5 ml Eppi gesteckt, und 450 µl 0.01 M Tris-Cl pH 8.0 aufgetragen. Die DNA wurde durch einminütiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm eluiert.

Restriktion

Dies ist das wohl wichtigste Hilfsmittel der Gentechnik. Erst durch die Entdeckung der unterschiedlichsten Restriktionsenzyme (auch Restriktionsendonukleasen genannt), wurde der direkte und gezielte Eingriff in das Genom routinemäßig möglich. Restriktionsenzyme erkennen spezifische Sequenzen eines DNA-Doppelstranges, die meist palindromisch sind. Beispiele für die verwendeten Enzyme sind in untenstehender Tabelle zusammengefasst. Einige Enzyme schneiden in diesen Sequenzen, andere wiederum an weiter entfernten Stellen. Letztere sind für genomisches Arbeiten eher uninteressant, da sie nicht immer an definierten Stellen schneiden. Weiter unterscheidet man zwischen Enzymen, die beim Schneiden Überhänge (*overhangs*) erzeugen und solchen, die keine erzeugen. Da es sich im ersten Fall um ungepaarte Basen handelt, die sich mit komplementären Basen leicht zusammenlagern, spricht man von klebrigen Enden (*sticky ends*), im anderen Fall von stumpfen Enden (*blunt ends*). Die *sticky ends* sind sehr nützlich, wenn unterschiedliche Fragmente miteinander verknüpft werden sollen (s. Ligation).

Die zwei wichtigsten Anwendungen der Restriktion sind die „Genchirurgie“, bei der Fragmente geschnitten und verknüpft werden, und die Genomanalyse.

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	Enzym	Erkennungssequenz	Puffer
<i>BamH</i> I	5' -G↓GATC C-3' 3' -C CTAG↑G-5'	REact 3	<i>Pst</i> I	5' -C TGCA↓G-3' 3' -G↑ACGT T-5'	REact 2
<i>Bgl</i> II	5' -A↓GATC T-3' 3' -T CTAG↑A-5'	REact 2	<i>Sph</i> I	5' -G CATG↓C-3' 3' -C↑GTAC G-5'	REact 2, 6
<i>EcoR</i> I	5' -G↓AATT C-3' 3' -C TTAA↑G-5'	REact 2	<i>Xba</i> I	5' -T↓CTAG A-3' 3' -A GATC↑T-5'	REact 2
<i>Hind</i> III	5' -A↓AGCT T-3' 3' -T TCGA↑A-5'	REact 2			

Tabelle 1: Erkennungssequenzen einiger Restriktionsendonukleasen. Es wurden Enzyme der Firma GibcoBRL® mit den zugehörigen Puffern (REact®) verwendet.

Durchführung

Die Durchführung einer Restriktion ist sehr einfach. Präparative und analytische Restriktionen unterscheiden sich nur in der Größe der Restriktionsansätze. Es ist ausreichend, Puffer und eventuell aqua bidest. sowie das Restriktionsenzym zur DNA hinzu zu pipettieren. Allerdings muss auf den richti-

gen Puffer geachtet werden, da die Aktivität des Enzyms stark von ihm abhängt. Vor allem bei kombinierten Restriktionen mit zwei oder mehr verschiedenen Enzymen müssen manchmal Kompromisse eingegangen werden. Deshalb wird immer angegeben, welcher Puffer und welche(s) Enzym(e) verwendet wurde(n).

Ligation

Der präparativen Restriktion folgt fast immer eine Ligation. Hierbei werden zwei Enden eines oder zwei verschiedener DNA-Moleküle miteinander verknüpft, indem eine Phosphodiesterbindung unter Energieverbrauch gebildet wird. So können z.B. Resistenzfaktoren oder andere Gene in das Zellgenom eingebaut werden.

Dephosphorylierung von Vektorenden

Sollen ein Gen in einen Vektor ligiert werden, besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass sich der Vektor wieder schließt, ohne das Insert eingebaut zu haben. Aus diesem Grund dephosphoryliert man die beiden Enden des Vektors. Dann kann keine Phosphodiesterbindung mehr zwischen diesen geknüpft werden. Eine Verknüpfung zu dem Insert ist immer noch möglich, da dieses noch eine endständige Phosphatgruppe besitzt.

Für unsere Ligationen wird das Enzym *calf intestinal phosphatase* (CIP) benutzt. Zunächst wird von dem mitgelieferten 10x-Puffer (*one-phor-all*) eine 1:1 Verdünnung (2 µl Puffer auf 18 µl aqua bidest.) hergestellt. 20 µl der Verdünnung werden mit 1 µl CIP versetzt. Zu den Proben werden jeweils 5 µl der Puffer-Stammlösung und 2 µl der CIP-Verdünnung pipettiert. Die Ansätze werden 30 min bei 37° C im Wasserbad inkubiert und anschließend das Enzym durch fünfzehnminütiges Erhitzen auf 85° C im Thermoblock denaturiert, um zu verhindern, dass die in der folgenden Ligation zugefügten Inserts ebenfalls dephosphoryliert werden.

Durchführung

Die Ligation ist ebenfalls nicht aufwendig. Von dem (dephosphorylierten) Vektor werden 5 µl mit 11 µl des einzuligierenden Inserts versetzt, 5 min auf 65° C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Das am Reaktionsgefäßrand kondensierte Wasser wird kurz bei 13,000 rpm abzentrifugiert. Zu dem Ansatz werden je 2 µl 10x Ligase-Puffer und T4-Ligase gegeben. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 14-16° C im Wasserbad.

Übernacht-Schüttelkultur

Mit dieser Methode können Bakterien mit gleichem Genom in kurzer Zeit stark vermehrt werden. Dazu überimpft man eine Kolonie von einer antibiotikumhaltigen Platte in ein flüssiges Nährmedium mit gleichem Antibiotikum (1000:1, meist 5 µl Antibiotikum auf 5 ml Medium). Die Kulturen werden über Nacht bei 37° C im Schüttel-Wasserbad inkubiert.

Herstellung kompetenter Zellen (*E.coli*)

Nicht alle Bakterien sind in der Lage, in dem sie umgebenden Medium befindliche DNA (Plasmide) direkt aufzunehmen. Das „Haustier“ der Molekularbiologie, *Escherichia coli*, gehört dazu. Deshalb müssen spezielle Methoden angewandt werden, um die Zellen zur DNA-Aufnahme zu befähigen. Unter den vielen möglichen soll hier nur die

Calciumchlorid-Methode

beschrieben werden.

Von einer Übernacht (ÜN)-Schüttelkultur von DH5α, einem *E.coli* Stamm, in LB-Medium wird 1 ml in 50 ml LB-Bouillon für eine neue Schüttelkultur überimpft. Nach etwa 2-3 Stunden ist die logarithmische Phase erreicht, was durch eine OD₆₀₀ von etwa 0.5 angezeigt wird; die Bakterien zeigen dann ihr größtes Wachstum. Alle folgenden Schritte erfolgen unter Eiskühlung. Die Suspension wird in der Biofuge 23RS 10 min bei 4,000 rpm (~4,000 g) und 4° C zentrifugiert, der Überstand entsorgt und das Pellet in einem halben Volumen der Ausgangskultur (also 50/2=25 ml) 0.1 M CaCl₂ (kalt) resuspendiert. Nach 60 min Stehen auf Eis wird wie zuvor zentrifugiert (4,000 rpm, 4° C, 10 min). Das Pellet wird nun in entweder 1/25 oder 1/50 Volumen der Ausgangskultur (1 oder 2 ml) 0.1 M CaCl₂ gelöst und erneut 1 h auf Eis gestellt. Die so behandelten Zellen sind etwa 24 h kompetent.

Transformation

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie die kompetenten Zellen mit den Plasmiden transformiert werden. Neben den nach der eben beschriebenen Methode kompetent gemachten *E.coli* werden auch kommerziell erworbene verwendet (s. weiter unten).

Kompetente Zellen durch CaCl₂

200 µl der Zellen werden auf Eis mit max. 10 µl Ligationsansatz versetzt und mindestens 1 h stehen gelassen. Danach erfolgt ein Hitzeschock für max. 2 min bei 42° C und anschließend Kühlen auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl Medium (LB oder SOC) werden die Zellen 30 min bei 37° C im Wasserbad geschüttelt. Von der Kultur werden 100 µl auf eine Mediumplatte mit Antibiotikum ausgestrichen; der Rest wird abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 100 µl Medium resuspendiert und ebenfalls auf eine Platte aufgetragen.

Kompetente Zellen (aus Kit)

Ein Aliquot kompetenter TOP10-Zellen, das bei –80° C gelagert wird, wird langsam auf Eis aufgetaut. Dazu werden 2 µl Ligationsansatz gegeben und 30 min auf Eis gestellt. Der Hitzeschock wird 30 s bei 42° C durchgeführt (anschließend auf Eis). Nach Zugabe von 250 µl SOC wird 30 min bei 37° C inkubiert. Die Zellen werden wie oben beschrieben auf antibiotikumhaltige Platten ausgestrichen.

Minipreps

Hinter diesem Begriff versteckt sich die Isolierung von DNA aus ca. 1.5 ml einer ÜN-Schüttelkultur. Je nach Größe spricht man analog von Medipreps oder Maxipreps (s.u.). Die Reinheit ist nicht sehr hoch, da diese Methode meist nur für qualitative Zwecke verwendet wird. Für quantitative Präparationen wird meist die Maxiprep eingesetzt. Die hier beschriebene Methode bedient sich der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly.

Alkalische Lyse

1.5 ml einer ÜN-Schüttelkultur werden in einem Eppi 1 min bei 13,000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 100 µl Puffer I (s.u.) resuspendiert. Von der frisch angesetzten Lösung II werden 200 µl zugegeben und das Eppi zwei Mal invertiert. Nach genau 5 min Lyse werden 150 µl kalte Lösung III zugegeben und das Eppi auf dem Kopf gevortext. Anschließend wird die Probe für zehn Minuten auf Eis gestellt und 5 min bei 13,000 rpm zentrifugiert.

Puffer I	Puffer II	Puffer III
50 mM Glucose	0.2 M NaOH	3 M KAc
25 mM Tris·HCl pH 8.0	1% SDS	87% HOAc
10 mM EDTA		
	für 150 ml	für 100 ml
	2 ml 10 N NaOH	60 ml 5 M KAc
	10 ml 10% (w/v) SDS	11.5 ml HOAc
	ad 150 ml mit aqua dest.	ad 100 ml mit aqua dest.

Fällen der DNA

Der Überstand wird mit einer Eppendorfpipette in ein neues Eppi überführt und mit 400 µl Phenol/CHCl₃/Isoamylalkohol (25/24/1) extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wird 1 min bei 13,000 rpm zentrifugiert und dann von der oberen wässrigen Phase 300 µl abgenommen. Aus dieser wird mit 1 ml Ethanol abs. die DNA gefällt. Es wird 20 min bei 15,000 rpm in der Biofuge 15R bei 4° C zentrifugiert. Das Pellet wird an der Luft kurz getrocknet und dann mit 750 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wird bei 13,000 rpm für 5 min abzentrifugiert und im Exsikkator getrocknet. Durch Zugabe von 30 µl (*low copy* Vektor) bzw. 50 µl (*high copy* Vektor) 0.01 M Tris·Cl pH 8.0 wird die DNA resuspendiert. In dem Puffer ist zusätzlich RNase (10 mg/ml) 1:1000 verdünnt enthalten, um mitgefällte RNA zu verdauen.

Maxipreps**Vorbereitungen**

Nachdem die Transformation als erfolgreich nachgewiesen ist, kann die DNA der transformierten Bakterien in größerem Maßstab extrahiert werden. Dazu wird von den Ansätzen jeweils eine neue Platte ausgestrichen sowie eine Übernacht-Schüttelkultur angesetzt. Die Ansätze werden auf geeignete Mediumplatten mit Antibiotikum ausgestrichen. 50 ml (100 ml) LB-Medium werden mit 50 µl (100 µl) des entsprechenden Antibiotikums versetzt und mit Bakterien aus der Kultur für die ÜN-Schüttelkultur beimpft.

Durchführung

Die Extraktion der DNA aus den Bakterien erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Purification Kit.

Lyse

Die ÜN-Schüttelkulturen werden in der Megafuge 3.0 R für 10 min bei 4,000 rpm und 4° C abzentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Bakterienpellet wird in 2 ml kaltem P1-Puffer aufgenommen und in ein Serumröhrchen überführt. 2 ml P2-Puffer werden zugegeben und das Röhrchen invertiert. Nach knapp 5 min (nicht länger!) werden 2 ml P3-Puffer einpipettiert und das Röhrchen sofort mehrmals invertiert. Nach 20 min Lagern auf Eis wird 25 min in der Biofuge 23 RS bei 15,000 rpm (> 26,000 g) und 4° C zentrifugiert.

Isolierung und Fällern der DNA

Währenddessen wird eine Säule QIA-tip 100 pro Kultur mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Anschließend wird der Überstand der Zentrifugation vorsichtig auf die Säule gegossen und eluiert. Nachdem alles durchgelaufen ist, werden die Säulen zweimal mit je 10 ml QC-Puffer gewaschen. Dann kann die DNA durch Aufgabe von je 5 ml QF-Puffer auf die Säulen in sauberen Serumröhrchen als Eluat aufgefangen werden. Diese wird mit je 0.7 Volumen (3.5 ml) Isopropanol versetzt, geschüttelt und dann (je Ansatz) auf vier Eppis zu 2.0 ml verteilt. Nach 30 min Zentrifugieren bei 4° C und 15,000 rpm (Biofuge 15 R) wird der Überstand abgegossen. Das Pellet wird mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen und 10 min bei 4° C und 15,000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet im Exsikkator getrocknet. Die Proben werden in je 100 µl 0.01 M Tris·Cl pH 8.0 aufgenommen und vereinigt.

IV Isolierung des regulatorischen Gens HP0082, Ligation in die Vektoren pILL570 und pUC18 und Transformation in *E.coli*

Einleitung

Bei den Zielvektoren handelt es sich um Standardvektoren mit bestimmten Eigenschaften wie z.B. definierte Schnittstellen, die in einer sog. *poly cloning site* (PCS) zusammengefasst sind; weitere Schnittstellen befinden sich im übrigen Vektor. Sie weisen ein Antibiotikumresistenz auf und sind in *E.coli* reproduzierbar. Die Karten der beiden Vektoren sind in Abb. A 1 und Abb. A 2 im Anhang dargestellt.

Durchführung**Isolierung der genomischen DNA und Amplifizierung des Gens 0082**

Die genomische DNA wurde wie auf S. 4 beschrieben mit dem DNeasy tissue Kit der Firma QIAGEN aus *Helicobacter pylori* isoliert.

Mit dieser PCR sollte das interessierende Gen für die spätere Ligation amplifiziert werden. Als Primer wurden HP82-1s und HP82-2s eingesetzt, die beide eine *Bgl* II Schnittstelle (blau) aufweisen:

HP82-1s:

5' -TAA **AGA TCT** TCA GCT ACA AGG TTG AAA GT-3'

HP82-2s:

5' -AAT **AGA TCT** GAC TTG TAA AGA ATG ATT AGC-3'

Zur Vorbereitung wurde von den Stammlösungen der Primer je 8.33 µl in 100 µl autoklaviertem und sterilfiltriertem Wasser verdünnt, so dass man eine Konzentration von 20 pmol/µl erhielt. Als nächstes wurde der PCR-Mix für vier Proben angesetzt (vgl. S. 5).

Das Temperatur/Zeit Profil der PCR wurde wie folgt eingestellt:

Schritt	Temperatur/° C	Zeit/min	Vorgang	Wiederholungen
1	94	5	Schmelzen der DNA	1
2	94	0.5	Schmelzen der DNA	
3	52	0.5	Anlagerung der Primer	35
4	72	2	DNA-Synthese (Elongation)	
5	72	7	Fertigstellung angefangener DNA-Stücke	1
6	15	∞	Lagerung	

Die Kettenreaktion wurde allerdings schon nach 27 Zyklen abgebrochen und die übrigen beiden Schritte (5 und 6) ausgeführt. Der Erfolg der PCR wurde mittels eines Agarosegels überprüft.

Resultat

Wie aus dem Gel zu ersehen war, verlief die PCR erfolglos; es waren in beiden PCR-Ansätzen nur die Nukleotide schwach erkennbar (ohne Abbildung). Der Standard und die aufgetragene genomische DNA hingegen zeigten deutlich Banden.

Diskussion

Ursachen für das Scheitern der PCR können eine zu hohe Temperatur beim Anlagern der Primer (Schritt 3) oder zu wenig DNA-Template gewesen sein. Durch eine Erniedrigung der Temperatur wird die Stringenz der Hybridisierung herabgesetzt, wodurch auch nicht 100%ig passende Primer sich an die DNA stabil anlagern können. Bei einer höheren DNA-Konzentration wird auch eine bessere Ausbeute erwartet. Mit diesen Überlegungen wurde eine neue PCR angesetzt.

Neuansatz PCR

Der Mix wurde wie in der vorigen PCR angesetzt. Diesmal wurden zwei Ansätze mit unverdünnter DNA verwendet, die Negativkontrolle war gleich. Auch im Profil der PCR wurde nicht viel geändert; die Temperatur in Schritt 3, also der Anlagerung der Primer an die Template-DNA, wurde von 52 auf 50° C gesenkt. Auch wurden alle 35 Zyklen durchlaufen und über Nacht stehen gelassen (letzter Schritt). Ein neu angesetztes Gel wurde eine dreiviertel Stunde laufen gelassen und anschließend fotografiert (Abb. 3).

Resultat

Auf dem Foto erkennt man, dass die PCR dieses Mal erfolgreich verlaufen ist. Die Negativkontrolle enthält keine DNA-Banden (außen rechts), die beiden Ansätze mit DNA zeigen jeweils eine Bande bei etwa 1.9 kb (links).

Schneiden der DNA-Fragmente und Ligation

Für die geplante Transformation wurden *E.coli* wie oben beschrieben (S. 8) nach der CaCl₂-Methode kompetent gemacht. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit dem QIAquick spin Kit (S. 7). Um das Gen (PCR-Produkt) in die Vektoren ligieren zu können, mussten das PCR-Produkt und die beiden Vektoren mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten werden. Zu dem aufgereinigten PCR-Produkt wurden 5 µl 10x Puffer REact 3 und 3 µl *Bgl* II gegeben. Als Vektoren wurden zum einen *pUC18* eingesetzt (a), der zur Sequenzierung verwendet werden soll, sowie *pILL570* für die Expression (b). Für die Restriktion wurden je 20 µl DNA mit 20 µl aqua bidest und 5 µl 10x Puffer REact 3 gemischt. Zu Ansatz (a) wurden 5 µl *Bam*H I, zu (b) 5 µl *Bgl* II gegeben. Sämtliche Restriktionsansätze wurden gut 2 h bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Beim *pUC18* musste *Bam*H I eingesetzt werden, da im Vektor keine Schnittstellen für *Bgl* II vorhanden sind. Trotzdem sind die Überhänge komplementär (s. Tabelle 1, S. 7), so dass mit den beiden Enzymen geschnittene DNA-Fragmente ligiert werden können. Über ein präparatives Agarosegel (S. Seite 4) wurden die Restriktionsprodukte gereinigt und anschließend aus dem Gel extrahiert.

Um eine intramolekulare Religation der Vektoren zu verhindern, wurde die DNA aus der Extraktion einer terminalen Dephosphorylierung unterzogen (S. 3). Danach konnte das restringierte Insert (Gen HP0082) in die beiden Vektoren ligiert werden. Es wurden vier Ligationsansätze vorbereitet:

Nummer	Vektor	dephosph.	RE	Menge	Insert	RE	Menge
1	<i>pUC18</i>	✓	<i>Bam</i> H I	5 µl		---	11 µl H ₂ O
2	<i>pUC18</i>		<i>Bam</i> H I	5 µl	✓	<i>Bgl</i> II	11 µl
3	<i>pILL570</i>	✓	<i>Bgl</i> II	5 µl		---	11 µl H ₂ O
4	<i>pILL570</i>		<i>Bgl</i> II	5 µl	✓	<i>Bgl</i> II	11 µl

RE gibt an, mit welchem Restriktionsenzym die jeweilige DNA geschnitten wurde. Von der Vektor-DNA wurden jeweils 5 µl verwendet. Bei den Ansätzen 2 und 4 wurden je 11 µl der Insert-DNA zugegeben, bei den restlichen Kontrollansätzen (1 und 3) stattdessen 11 µl aqua bidest. Alle Ansätze wurden wie auf S. 8 beschrieben ligiert.

Transformation

In die vorbereiteten kompetenten *E.coli* wurden die Ligationsansätze transformiert (S. 8).

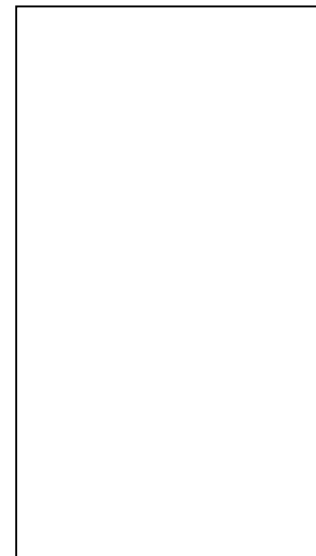


Abb. 3: Kontrollgel der PCR. Während die beiden Probenauftragungen rechts deutliche Banden zeigen, ist keine bei der Negativkontrolle (links neben dem Standard) sichtbar.

Für die Ansätze des *pUC18*-Vektors wurde Ampicillin, für *pILL570* Spectinomycin ins Medium gemischt.

Auswertung

Die folgende Tabelle enthält die Auswertung der beimpften Platten.

	1	2.1	2.2	3	4.1	4.2
Anzahl Plaques	keine	drei	30	zwei + Verunreinigungen	drei + Verunreinigungen	zwei + Verunreinigungen

Bei den Ansätzen 2.2 und 4.2 handelt es sich um die Restauftragungen der Schüttelkultur. Eigentlich sollten bei beiden Kontrollansätzen (1 und 3) keine Bakterienkolonien gewachsen sein. Ansatz 1 erfüllt diese Erwartung, Ansatz 3 jedoch nicht. Er weist neben Verunreinigungen auch noch zwei Kolonien (wahrscheinlich aufgrund spontaner Mutation) resistenter Bakterien auf.

V Einfügen einer *EcoR* I-Schnittstelle in das ligierte HPO082 und Transformation in *E.coli*

Einleitung

Das Ziel des Projekts ist eine *knock out* Mutante herzustellen. Um später ein Reportergen (in diesem Fall eine Kanamycin-Resistenz) einfügen zu können, wird in das Gen eine Restriktionssequenz eingeführt. Diese wird geschnitten, und dann kann das Reportergen, das mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten wurde, einligiert werden.

Durchführung

Kontrolle der Ligation

Von Platte 2.2 wurden sechs Klone gepickt und in je 5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin überimpft. Von den Platten 4.1 und 4.2 wurden insgesamt ebenfalls sechs Klone gepickt und in je 5 ml LB-Medium mit 5 µl Spectinomycin eingetragen. Die Kulturgefäße wurden über Nacht bei 37° C geschüttelt. Aus diesen UN-Schüttelkulturen wurden Minipreps angefertigt (S. 9) und die DNA durch Restriktionsanalyse auf den Einbau des Inserts hin untersucht. Positive Klone, die ein Fragment von ca. 1.9 kb Größe aufweisen, werden für eine Maxiprep benutzt. Da die beiden Vektoren unterschiedliche Schnittstellen aufweisen, mussten zwei Restriktionsmische angesetzt werden. Die Proben 1-6 (*pUC18*) mussten mit *EcoR* I und *Xba* I geschnitten werden, da durch die Ligation der *BamH* I- mit der *Bgl* II-Restriktionen kein Schneiden mit einem der beiden Enzyme mehr möglich ist. Bei den übrigen Proben (7-12) wurden zwei *Bgl* II-Restriktionsfragmente ligiert, weshalb die Schnittstelle erhalten blieb.

Mix 1 (<i>pUC18</i> , Proben 1-6)	Mix 2 (<i>pILL570</i> , Proben 7-12)
7 µl REact 2-Puffer	7 µl REact 3-Puffer
3.5 µl <i>EcoR</i> I	3.5 µl <i>Bgl</i> II
3.5 µl <i>Xba</i> I	
21 µl aqua bidest	24.5 µl aqua bidest

Zu 5 µl jeder DNA-Probe wurden 5 µl Mix gegeben und dann 2.5 Stunden bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Ansätze 1-5 und 7-11 auf Agarosegel aufgetragen.

Resultat

In beiden verwendeten Ligationsansätzen zeigten sich positive Klone: Eine Bande bei ca. 1.9 kb rührt vom einligierten HP0082 her. Ansätze 1, 2, 3 und 4 haben das Insert im *pUC*-Vektor eingebaut, beim *pILL*-Vektor zeigten zwei Proben (7 und 10) das Insert (Abb. 4). Die Bakterienstämme der ersten und zehnten Probe wurden für die Maxiprep vorbereitet.

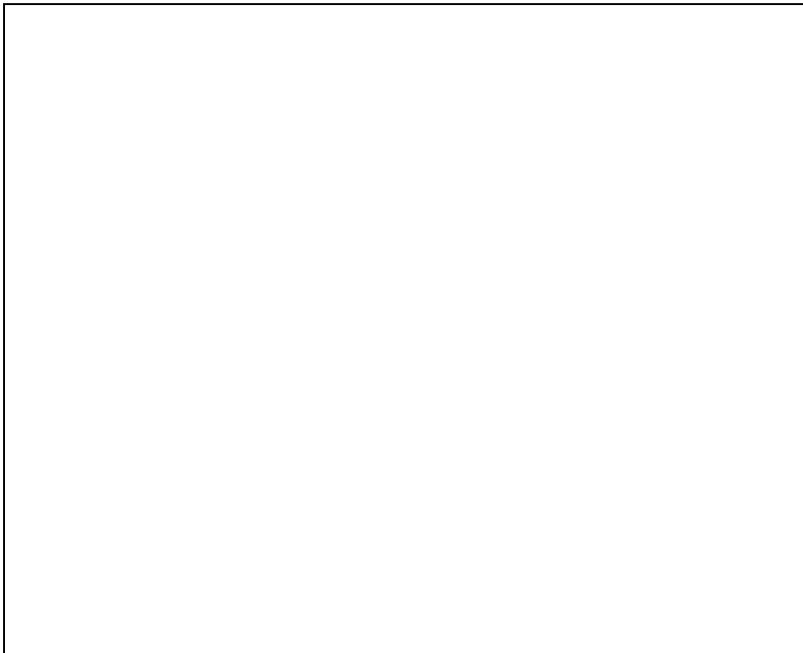


Abb. 4: Kontrollgel der Restriktionen nach der Transformation.

Isolierung größerer Mengen DNA aus positiven Klonen und Anfügen der Schnittstelle

Dazu wurde von den Ansätzen 1 und 10 jeweils eine neue Platte (LB-Platte mit Ampicillin bzw. Spectinomycin) ausgestrichen sowie eine ÜN-Schüttelkultur angesetzt. 50 ml LB-Medium wurden mit 50 µl Ampicillin versetzt und mit Bakterien aus Kultur 1 für die ÜN-Schüttelkultur beimpft. Im zweiten Fall wurden zu 100 ml LB-Medium 100 µl Spectinomycin pipettiert und mit Kultur 2 beimpft.

Die Isolierung der DNA erfolgte wie auf S. 9 beschrieben über die Maxiprep.

Um in das HP0082 Gen die gewünschte *EcoR* I Schnittstelle zu bekommen, wurde eine inverse PCR angesetzt (S. 6). Als Primer wurden HP82-3s und HP82-5s verwendet, die beide mit einer entsprechenden Schnittstelle (rot) versehen sind:

HP82-3s:

5' -ATA **GAA TTC** CAT CCA AAA TCC TAA AGC CAA C-3'

HP82-5s:

5' -ATA **GAA TTC** CTA AAC AAC GCC CTA GAG C-3'

Das PCR-Profil wurde genau wie auf S. 9 gezeigt eingestellt.

Resultat

Die PCR-Produkte wurden vereinigt und durch Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Da das Ergebnis positiv war (Bande bei ca. 7.2 kb, Abb. 5), wurde der Rest mit dem QIAquick spin Kit (S. 7) aufgereinigt.

Restriktion und Schließen des Vektors

Die DNA lag nach der inversen PCR als lineares, also nicht zyklisches Molekül vor. Deshalb wurde es mit *EcoR* I in Puffer 3 geschnitten (S. 7) und anschließend aufgereinigt (die Durchführung glich der auf S. 7 beschriebenen mit dem Unterschied, dass für die größeren DNA-Fragmente der Puffer PN benutzt wurde). Nun befanden sich an beiden Enden des Vektor *EcoR* I Überhänge; für die Zyklisierung musste also nur noch eine Ligation angesetzt werden. Diesmal wurde kein Insert eingesetzt, sondern nach dem Erhitzen der DNA (10 µl im Thermoblock für 5 min auf 65° C) wurden 2 µl 10x Ligase-Puffer, 2 µl T4-Ligase und 6 µl aqua bidest. zugegeben und über Nacht ligiert.

Am nächsten Tag war der Vektor wieder geschlossen und das Gen durch eine *EcoR* I Schnittstelle unterbrochen.

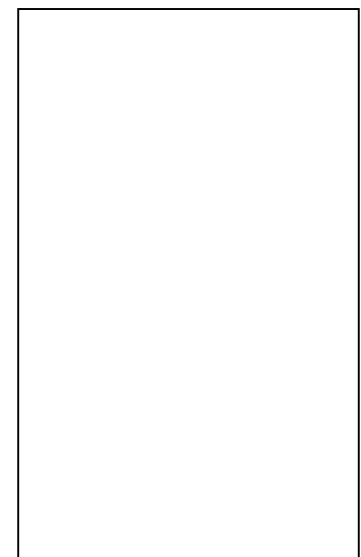


Abb. 5: Kontrolle der inversen PCR. Die Intensität der Bande bei ca. 7.2 kb lässt auf einen hohen DNA-Gehalt schließen, wie er nach einer PCR erwartet auch wird. Bei der Negativkontrolle (Spur zwischen Probe und Marker) ist keine DNA zu erkennen.

Transformation

Um den modifizierten Vektor zu replizieren, wurden kompetente Zellen (nach der CaCl₂-Methode) mit ihm transformiert. Es wurde aber der Hitzeschock zuerst vergessen, dann nach Zugabe des Mediums nachgeholt.

Auswertung

Die Platte, auf der 100 µl der ursprünglichen Bakteriensuspension aufgetragen worden waren, sind 12 Kolonien entstanden. Auf der zweiten (Rest) bildeten sich über 30 Kolonien aus.

Die Platten wurden übers Wochenende im Kühlschrank aufbewahrt.

Kontrolle der Transformation durch Restriktion mit *EcoR* I und *Pst* I



Abb. 6: Transformationskontrolle. Die ersten 8 Spuren sind von der *EcoR* I/*Pst* I Restriktion, die letzten beiden die Auftragung eines anderen Versuchs.

Aus den Ausstrichen wurden ÜN-Kulturen angesetzt, aus denen über eine Miniprep die DNA isoliert wurde (S. 9, aber mit 2 ml Bakteriensuspension). Diese wurde mit *EcoR* I und *Pst* I geschnitten und die restringierten Proben auf ein Agarosegel aufgetragen.

Resultat

Wie Abb. 6 zeigt, ist in allen Proben nur eine Bande bei etwa 7.2 kb zu erkennen. Dies entspricht dem *pILL570* Vektor mit dem Gen HP0082. Allerdings hätte ein Stück von ca. ?? kb herausgeschnitten werden sollen, dass eine zweite Bande ergeben hätte. Demnach hat der verspätete Hitzeschock die Transformationsrate zumindest vermindert.

Aus diesem Grund wurde eine Dauerkultur von bereits fertig transformierten *E.coli* für eine ÜN-Schüttelkultur angesetzt.

VI Isolierung und Einbau der Kanamycin-Kassette in *pILL570*

Einleitung

Die *knock out* Mutante soll in diesem Schritt eine Selektionsmöglichkeit erhalten. Dazu wird eine Kanamycin-Resistenz eingefügt. Auf Km-haltigem Nährmedium kann so eine Selektion – zunächst auf den Einbau der Resistenz – erfolgen. Spätere Untersuchungen müssen zeigen, dass die Kassette an der richtigen Stelle und in der richtigen Orientierung eingebaut wurde.

Die einzufügende Km-Kassette enthält *EcoR* I Schnittstellen an den Enden (für die Ligation), einen Promotor sowie einige andere Schnittstellen (Abb. 7).

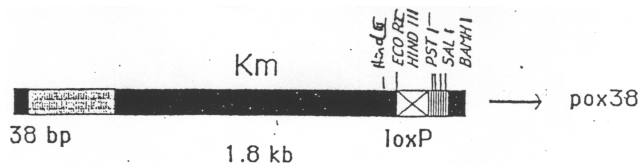


Abb. 7: Aufbau der Kanamycin-Kassette. In dem etwa 1.8 kb großen Fragment ist die Km-Resistenz samt Promoter enthalten. Die Schnittstellen dienen nachher zur Untersuchung der Einbaurichtung.

Durchführung

Isolierung der Vektoren und Restriktion mit *EcoR* I

Als Quelle der Km-Kassette wurde eine ÜN-Schüttelkultur von *pILL600* transformierten *E.coli* verwendet. Mit dieser und der *pILL570* Kultur wurde eine Maxiprep durchgeführt und die isolierte DNA mit *EcoR* I restringiert. Da beide Proben bereits vorher auf ihre Richtigkeit hin überprüft worden waren, und die Restriktion als erfolgreich angenommen wurde, wurde direkt ein präparatives Agarosegel angesetzt. Die Isolierung erfolgte wie zuvor, aber mit QX1-Puffer.

Ligation der Km-Kassette in *pILL570* mit HP0082

Nachdem die Enden des *pILL570* Vektors dephosphoryliert worden waren, wurden 6 µl davon mit 11 µl der Km-Restriktion als 20 µl Ansatz ligiert (S. 8).

Transformation

In gekaufte kompetente *E.coli* wurden die Ligationsansätze transformiert (S. 8) und anschließend auf drei Km-Dextrose-Platten ausgestrichen: einmal 100 µl, dann vom abzentrifugierten und in 100 µl Dextrose resuspendierten Rest jeweils 50 µl auf die beiden anderen Platten.

Auswertung

Auf allen drei Platten waren Kolonien entstanden. Von allen Platten wurden insgesamt 12 Kolonien zur Kontrolle der Einbaurichtung für Minipreps vorbereitet.

Kontrolle der Orientierung der Km-Kassette

Die 12 Kolonien wurden für eine ÜN-Schüttelkultur in 5 ml LB-Medium überimpft. Am nächsten Tag wurden Minipreps wie auf S. 9 beschrieben durchgeführt. Die eigentliche Kontrolle erfolgte durch Restriktionsanalyse. Die DNA wurde einer Restriktion mit *Hind* III unterzogen und davon die Proben 1 bis 10 auf ein Agarosegel aufgetragen.

Resultat

Bei den Auftragungen sind insgesamt drei unterschiedliche Restriktionsmuster zu erkennen, und zwar bei den Spuren 1, 4 und 6 (alle weiteren Spuren gleichen Spur 1). Das richtige Fragment hat eine Länge von ca. ?? kb, weshalb Probe xx die richtige Orientierung aufweist. Trotzdem wurden zunächst von den Proben 3, 4 und 6 Maxipreps angesetzt.

VII Isolierung des mit Km in Leserichtung eingebauten Vektors

Einleitung

Einem *knock out* folgt gewöhnlich die biochemische Analyse der Auswirkungen auf den Organismus. Dazu wird das entsprechende Gen in einen Vektor ligiert, der von *H.pylori* aufgenommen und transkribiert werden kann. Anschließend muss noch die Funktion des zerstörten Gens wieder hergestellt werden, um die Auswirkungen zu verifizieren. Aus Zeitgründen entfallen diese Schritte leider.

Durchführung

Die möglichen Kandidaten 3, 4 und 6 wurden für eine Maxiprep (S. 9) verwendet. Die isolierte DNA wird bei -20° C aufbewahrt.

VIII Sequenzierung des ligierten Gens HP0082 in *pUC18*

Einleitung

Die Sequenzierung eines Gens ist essentiell. Ist das Genom bekannt, können die Proteine rekonstruiert werden, falls kein Spleißen stattfindet. Zudem können Mutationen entdeckt und ausgewertet

werden. In den letzten Jahren hat sich viel auf dem Gebiet der automatisierten Genanalyse getan, so dass heute sogar das menschliche Genom entschlüsselt worden ist. Trotzdem ist es gebräuchlich, kleiner Fragmente zu sequenzieren und dann die Sequenzen der Fragmente durch Überlappung zu kombinieren. Eine hilfreiche Methode ist auch die Amplifizierung der gesuchten Sequenz mittels PCR, wofür zumindest die Sequenz der umgebenden Nukleinsäuren bekannt sein muss. Dadurch kann die Größe des Fragment reduziert werden.

Es gibt unterschiedliche Verfahren der Sequenzierung; während früher aufwendige chemische Methoden angewandt wurden, bedient man sich heute mikrobiologischer, d.h. enzymatischer Methoden. Eine davon ist die von Sanger entwickelte unterbrochene DNA-Synthese; sie verläuft analog einer PCR. Ein wesentlicher Unterschied besteht darin, dass die Nukleotide nicht als Mix zugegeben werden, sondern jedes in einem eigenen Ansatz. Zudem enthält die Desoxynukleotid-Lösung Didesoxynukleotide (ddNTPs) im Verhältnis 1:1000. Durch die fehlende 3'-OH-Gruppe kann keine Kettenverlängerung mehr erfolgen, und somit endet die Synthese. Die Menge an ddNTPs ist dabei so gewählt, dass statistisch nach jedem im Template vorhandenen Nukleotid ein Abbruch stattfindet. Als Resultat erhält man unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Als Marker kann man entweder markierte Primer oder markierte ddNTPs einsetzen, je nachdem, welches Gerät zur Verfügung steht. Unser Sequencer benötigt markierte Primer. Die Auswertung des Gels erfolgt über spezielle Computerprogramme, das die Lage der Banden der vier Nukleotide vergleicht. Dadurch, dass jede Bande einer Länge (= Anzahl Nukleotide) entspricht, kann aus der Abfolge der Banden die Zuordnung der Basen erfolgen.

Durchführung

PCR

Nachdem die DNA 1:100 verdünnt worden war, wurde eine PCR wie auf S. 5 durchgeführt, wobei die Temperatur bei Schritt 3 50° C betrug und 2 min bei Schritt 4 eingestellt wurde. Als Primer dienten M13 *fw* und M13 *rev*, die Standardprimer für *pILL570* sind. Insgesamt wurden 3 Ansätze benutzt. Wie gewöhnlich wurde die PCR mit einem Agarosegel überprüft.

Resultat

Bei keiner der vier Auftragungen war eine Bande zu sehen. Entweder wurde etwas falsch angesetzt oder die Primer passten nicht. Demnach musste doch mit dem gesamten Vektor die Sequenzierung durchgeführt werden.

Sequenzierung

Als Vorbereitung wurde ein großes Polyacrylamidgel gegossen. Alle nötigen Substanzen waren in einem Kit zusammengestellt.

Sämtliche Arbeiten für die Sequenzierung, d.h. die PCR, wurden unter der Lamina und mit Handschuhen durchgeführt, um Kontaminationen mit fremder DNA zu verhindern. Es wurden zwei Konzentrationen der *pUC18* DNA (S. 11) zur Sequenzierung eingesetzt, weshalb auch zwei Premixe benutzt wurden:

Mix 1	Mix 2
5 µl DNA	10 µl DNA
2 µl Primer (M13 <i>fw</i> + <i>rev</i>)	2 µl Primer (M13 <i>fw</i> + <i>rev</i>)
0.7 µl DMSO	0.7 µl DMSO
13.3 µl aqua bidest	8.3 µl aqua bidest

In 4 PCR-Tubes wurden 5 µl Premix 1 und in 4 weiteren 5 µl Premix 2 vorgelegt. Pro Tube wurde 1 µl eines der vier Nukleotide gegeben, so dass für beide DNA-Konzentrationen je ein Ansatz mit A, T, G und C vorlag. Diese wurden mit 10 µl Wachs überschichtet, um Verdunstungen zu vermeiden. In einer PCR-Maschine wurde ein voreingestelltes Programm gefahren.

Die Auftragung auf das Gel sowie das Einstellen wurde von der Assistentin durchgeführt.

Auswertung

Die PAGE ergab ein Gel mit gut erkennbaren und größtenteils scharfen Banden. Die Auswertung mit dem Computerprogramm ergab die auf der nächsten Seite abgebildete Sequenz.

```
GATCTGACTTGTAAGAATGATTAGCGATAATCAAATTATCCTGCACATC
TTGTTGCAAGGCGTTAATGGAGTTGTGGATGTTTTCTGTGCCCTTATTTT
GCATTTTGATAGACTCAGCGTTATCGGCAATGCTTTGAACTAAAATATTG
ATATTGGCTTCAATCTCGCTGAGCGATTTTTGCGTCCTTTCAGCGAGCTT
TCTTACCTCATCAGCCACCCTGCAAAGCCTCTGCCATGCTCGCCAGCCC
TTGCGGCTTCAATAGCGGCGTTTAGGGCTAATAGATTTCGTTTGATCAGCG
ATGTCTCTAATCATATCCACCACGCTTTAATGTCTTCGCCTTGAGAGAT
CATCTCTTGGCTTTTAGAATCAATTGTTGTGATGATATTAGTGATTTCTT
CTAAGGATTGAGTGGTGTTTTTTTCAGGCTCCTTTCTTGTATGAGCGGTT
TTGGTTAAGTTATCCACGCAAGTTTTTAAATCTTTGGATTTCATGATTGAG
TGCGTTCGCAAACCCATAAGAAGCTTTAAGCATGCTAGAAATTTCTTGCC
CTAAAGTGTGAGCGCTTTTTCCATGTTGGCTTTAGGATTTTGGATGTGG
TGGGTGAAATCCAGGTTTTTATAATGCTCTAGGGCGTTATTTAGGGATTC
AATATTGGTGCCAATTTGGTTGCGGAAATACTGGATAATGCTATTAATCG
TATTTCTTAAAGCTTGCAAATCTTTATTTTTAGGCACGCATGCGATTTCT
TGCGTGAAATCCCCATTTCCACATAATTYgTYACTTCAATGCTGTTTTG
AATAGCTTTGTtATCGGCTTGAATGCTTTCTTGGGTTTTAAgAATGTTTT
CATTGATAGAMGCTTGCATTTGCCCGATTTTCATCATAA
```

Abb. 8: Erhaltene Sequenz der Analyse von pUC18 mit M13 Primern. Einige Basen wurden nach "manueller" Korrektur eingegeben, andere waren nicht genau zuordenbar (g, M, t usw.).

Der Vergleich mit Datenbanken im WWW ergab eine Übereinstimmung mit dem eingeschleusten Gen HP0082.

IX Sonstige Arbeiten

Neben dem Hauptprojekt wurden von mir noch Arbeiten für andere Mitarbeiter durchgeführt. Da es sich hauptsächlich um Routinearbeiten wie PCR, Gele usw. handelte, sollen diese hier nicht ausführlich beschrieben werden; es wird nur kurz das Thema aufgelistet:

- div. Minipreps und PCRs für Susanne
- Restriktionskontrollen, ob GFP in Vektor eingebaut worden ist

Zwei zusätzliche Aufgaben sollen trotzdem näher beschrieben werden, da bei diesen bisher noch nicht erwähnte Methoden eingesetzt wurden. Bei dem einen handelte es sich um die Untersuchung pathogener *E.coli*, die aus Stuhlproben stammten, bei dem anderen um die Pulsfeld-Gelelektrophorese.

Untersuchung pathogener *E.coli*

Ziel

Neben bekannten pathogenen Bakterien wie *Staphylococcus aureus* können auch mutierte Bewohner der gesunden Darmflora Krankheiten hervorrufen. Verschiedene Stämme von *E.coli* sind dann für z.B. Durchfallerkrankungen verantwortlich. Ein Ziel sollte es sein, eine Nachweisgrenze zu finden bzw. zu überprüfen, ob eine differenzierte Analyse aus den Proben überhaupt möglich ist (Stuhl enthält viele Inhibitoren, die Analysen sehr schwer machen). Anschließend soll eine Sequenzierung erfolgen.

Durchführung

Zunächst wurden von einer Kultur von *E. aggr.* 2 ml abgenommen und daraus die DNA extrahiert (Isolierung genomischer DNA, S. 4). Mit der DNA wurde eine PCR durchgeführt. Als Primer wurden *pCVD432 fw* und *pCVD432 rev* verwendet. Es wurde eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung als 50 µl Ansatz sowie eine Negativkontrolle untersucht.

Resultat

In keinem der PCR-Ansätze war ein positiver Nachweis möglich. Eine Untersuchung der DNA-Isolierung zeigte allerdings, dass DNA in den Ansätzen enthalten war (Abb. 9). Eine mögliche Ursache können die

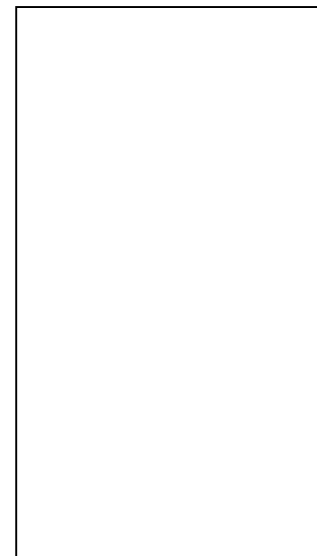


Abb. 9: Kontrolle der Ansätze auf DNA.

Primer gewesen sein. Ein neuer Versuch erfolgte mit dem TOPO-TA-Cloning Kit der Firma Invitrogen.

TOPO-TA-Cloning Kit

Um doch noch sequenzieren zu können, sollte das Insert in einen käuflichen Vektor (TOPO-Vektor) ligiert werden. Das Besondere dabei ist, dass sich an beiden Seiten des Vektors ein überhängendes T befindet, an das das PCR-Produkt mit einem überhängenden A binden kann. Dadurch entfällt das Anhängen einer Schnittstelle.

Ein anderes PCR-Produkt wurde mittels QUIAquick aufgereinigt. Davon wurden 4 µl mit 1 µl *Salt solution* (Puffer) versetzt und 1 µl TOPO-Vektor zugegeben. Die Ligation dauerte 5 min bei RT. Anschließend wurde das Plasmid in mitgelieferte kompetente Zellen transformiert (S. 9). Die Zellen wurden auf 3 Platten (LB-Medium mit amp) ausgestrichen und bei 37° C inkubiert.

Klassifizierung von *Staphylococcus aureus*

In dem Labor werden Routineuntersuchungen an Stuhlproben verschiedener Krankenhäuser durchgeführt. Eine Aufgabe ist die Klassifizierung von Bakterien, um z.B. die Verbreitung eines Typs verfolgen zu können. Dadurch kann es möglich sein, die Ursache einer Ausbreitung ausfindig zu machen: Sind z.B. Patienten einer Etage vom gleichen Typ befallen, so kann der Infektionsherd durch unzureichende Hygiene dort entstanden sein.

Um Bakterien zu klassifizieren werden gewöhnlich „DNA-Fingerabdrücke“ untersucht. Dazu werden die Bakterien lysiert und die DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten. Mit normaler Gelelektrophorese sind die Fragmente allerdings nicht zu trennen, da sie zu groß sind. Deshalb benutzt man die

Pulsfeld-Gelelektrophorese

für die Auftrennung sehr großer DNA-Fragmente. Unterwirft man Desoxyribonukleinsäuren der konventionellen Träger-Elektrophorese, z.B. in Agarose-Gelen, so erhält man eine Separation dieser Makromoleküle aufgrund eines Molekularsieb-Effekts: Die Polyanionen der DNA wandern unter dem Einfluss des elektrischen Felds desto langsamer durch die Poren des dreidimensional vernetzten Gels, je größer sie sind (vgl. S. 3). Allerdings findet die Trennschärfe dieser Methode bei Molekülgrößen von ca. 50 Kilo-Basenpaaren (kbp) ihre Grenze, und größere DNA-Moleküle zeigen im Wesentlichen dieselbe elektrophoretische Beweglichkeit. Dies liegt v.a. daran, dass man aus Stabilitätsgründen die Poren des Gels nicht beliebig vergrößern kann. Bei der PFGE alterniert das elektrische Feld zwischen zwei um einen gewissen Winkel verschiedenen Richtungen. Da sich DNA-Moleküle mit ihrer Längsachse in Feldrichtung orientieren, sind sie bei der PFGE zwischen den kurzen Wanderungen jeweils einer Umorientierung unterworfen, welche in ihrem Zeitbedarf stark von der Molekülgröße abhängt. Im Endeffekt ergibt sich eine Wanderung in einer mittleren Richtung, deren Geschwindigkeit nun auch bei größeren DNA-Molekülen durch das MG. bedingt ist. Mit der PFGE können ganze Hefe-Chromosomen (200 bis 3000 kbp) getrennt werden. Durch Weiterentwicklung sind aus der PFGE zahlreiche Verfahren entstanden, die sich außer durch wohlklingende Kürzel in der Anordnung der Elektroden auch im Puls-Modus unterscheiden.

Aus der Lage der Banden lassen sich Verwandtschaftsverhältnisse der Bakterien ermitteln. Ein Beispiel ist im Anhang (S. A3 und A3) aufgeführt. Da ich selber keine Arbeiten dazu durchgeführt habe entfällt die Durchführung.

X Literatur

Die meisten Versuchsvorschriften wurden in abgeänderter (angepasster) Form aus den Handbüchern entnommen. Als Literatur für die theoretischen Hintergründe wurden folgende Werke herangezogen:

1. Voet/Voet: "Biochemistry", 2nd ed. 1995, John Wiley
2. Stryer: „Biochemie“, 4. Aufl. 1995, Spektrum Verlag
3. Alberts: „Molecular Biology of the Cell“, 3rd ed. 1994, Garland Pbl.
4. Hahn/Falke: „Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie“, 3. Aufl. 1999, Springer Verlag
- 5.

pUC18/19

Abb. A 1: Genkarte des *pUC* Vektors.

pILL570

Abb. A 2: Genkarte des *pILL* Vektors.

Abb. A 3: Banden einer Pulsfeld-Gelelektrophorese (1).
Abb. A 4: Banden einer Pulsfeld-Gelelektrophorese (2).



Abb. A 6: Foto eines Pulsfeld-Gels. Die heller leuchtenden Banden in der Mitte und außen rechts stammen vom Marker (Referenzbakterium). Links ist der Standardmarker aufgetragen.