

F1-Praktikum Genetik

Protokoll Versuch 2: Nachweis der Funktion von Promotor- und Enhancer-Sequenzen mittels Reporter-Gen-Assay

Gruppe 8, Manfred Depner & Susanne Duncker

Einführung

Um die Funktion von Promotor-Sequenzen zu verstehen, untersuchten wir mit Hilfe einer Reporter-Gen-Analyse die Transkriptionsstärke des lacZ-Gens in HEK 293T-Zellen bei Einbau eines Promotors in und entgegengesetzt der Leserichtung.

Der zweite Teil des Versuchs diente der Untersuchung der Transfektionseffizienz dreier verschiedener Transfektionsmethoden.

Material und Methoden

Die verwendeten Materialien sowie die angewandten Methoden sind detailgenau dem ausgegebenen Skript auf den Seiten 14 – 27 zu entnehmen.

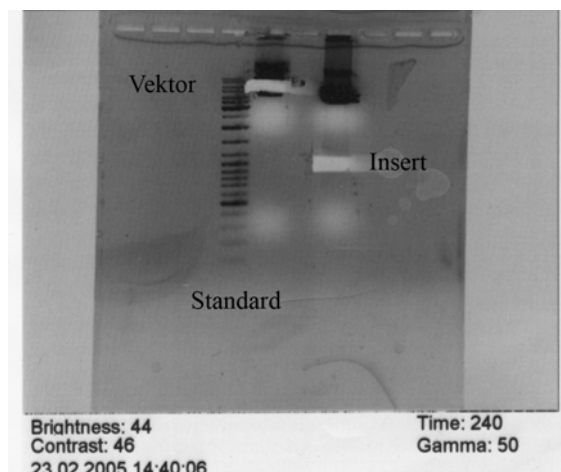
Herstellung der Reporterplasmide

Wir stellten aus pβgal-basic als Vektorplasmid mit dem lacZ-Gen und dem CMV-IE-Promotor aus pQCXIP durch Restriktionsverdaus zwei Plasmide her, einen, der den Promotor in Leserichtung des lacZ-Gens trug, einen zweiten, auf dem die Leserichtung des Promotors entgegen der Leserichtung des lacZ-Gens lag.

Hierzu öffneten wir pβgal-basic mit dem Restriktionsenzym BglII und schnitten mit BamHI und BglII den Promotor aus pQCXIP aus. Hierzu folgten wir der Anleitung auf S. 32 des ausgegebenen Skriptes, jedoch mit folgender Verdautabelle:

	Vektor	Insertdonor
DNA	2 µg pβgal-basic $\hat{=}$ 2 µl (Konzentration: 1 µg/µl)	4 µg pQCXIP $\hat{=}$ 4 µl (Konzentration: 1 µg/µl)
10 x Puffer	3 µl Puffer 3	3 µl Puffer 3
10 x BSA	3 µl	3 µl
Enzym I	1 µl BglII	1 µl BglII
Enzym II		1 µl BamHI
H₂O	21 µl H ₂ O → 30 µl Volumen	18 µl H ₂ O → 30 µl
Inkubation	2h @ 37°C	2h @ 37°C

Die Verdauprodukte trugen wir auf ein 1%-Agarosegel auf. Das Foto des fertigen Gels mit den bereits ausgeschnittenen Stellen befindet sich im Original im Anhang, ein Scan ist hier eingefügt:



Wir schnitten die Banden mit den gewünschten DNA-Stücken aus – beim Vektor war dies einfach, da wir ihn nur einmal geschnitten hatten und somit nur diese eine Bande in Frage kam. Die Restriktionskarte ließ uns für den Verdau des Insertplasmids zwei Banden von 699 kb und 6463 bp erwarten, wovon das kleinere Stück unser Insert darstellte.

Wir schnitten die gewünschten Banden aus dem Gel aus und reisolierten sie mit einem Kit der Firma Quiagen, dessen Gebrauchsanweisung als Anhang zu Versuch 3 im ausgegebenen Skript zu finden ist. Den optionalen Schritt 9 der Anleitung ließen wir aus, in Schritt 13 verwendeten wir 30 µl Wasser, nicht Elutionspuffer.

Nun ligierten wir die zwei Arten von DNA-Strängen zu neuen Plasmiden. Hierzu verwendeten wir folgende Ansätze:

	Ligationsansatz	Kontrollansatz
Vektor	7 µl Vektor pßgal-basic	7 µl Vektor pßgal-basic
Insert	10 µl Insert (mit CMV IE Promotor)	10 µl H ₂ O
10x Ligasepuffer	2 µl	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl	1 µl
Inkubation	30 min @ RT	30 min @ RT

Beim oben beschriebenen Ligationsansatz entstanden nun zwei Arten von Plasmiden: Im Ligationsansatz blieb es dank der kompatiblen Enden, die BamHI und BglII erzeugen, dem Zufall überlassen, ob ein Insert in oder gegen die Leserichtung des lacZ-Gens ins Plasmid eingefügt wurde – es entstanden daher zwei verschiedene Plasmide, Plasmid_{in} als Plasmid mit Promotor in Leserichtung des Gens und Plasmid_{gegen} als Plasmid mit entgegengesetztem Promotor.

Im Folgenden wurden die Plasmide in kompetente E. coli-Zellen elektroporiert, die so transfizierten Zellen auf ampicillinhaltige Agarplatten ausplattiert und über Nacht bebrütet. So wuchsen nur die transfizierten Zellen, die im Plasmid die Ampicillinresistenz trugen, zu Kolonien heran. Die Anzahl der jeweils gewachsenen Kolonien sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Gruppe	Kolonien bei Ligation	Kolonien bei Kontrolle
1	46	16
3	0	0
4	900	21
5	2	0
6	60	4
7	402	14
8	0	0

Tabelle 1

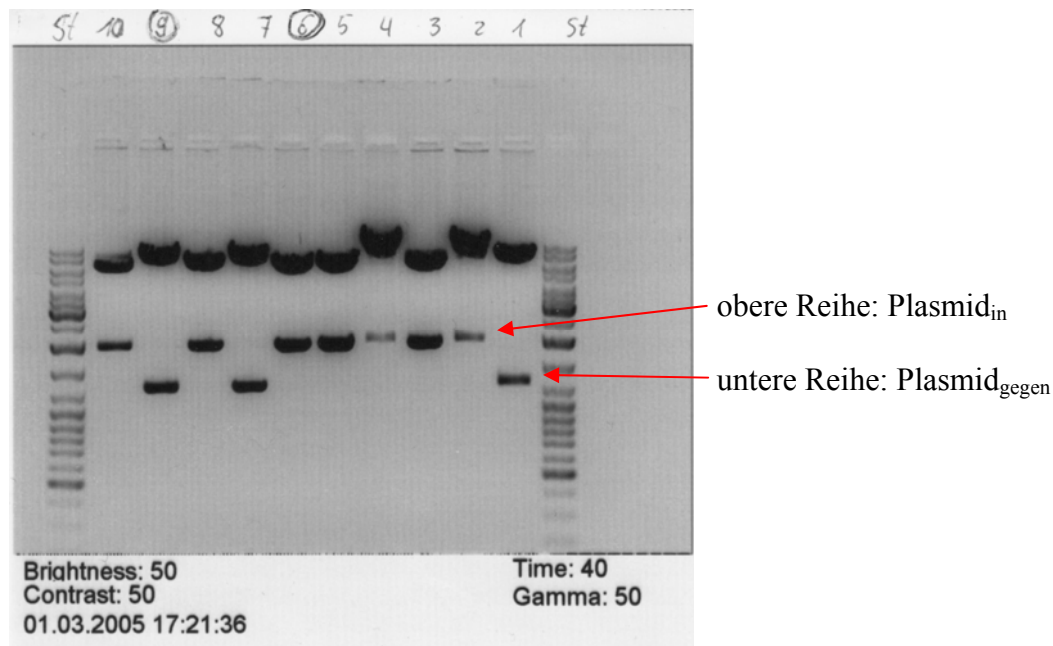
Unsere Gruppe hatte leider keine einzige Kolonie auf den Platten. Dies kann verschiedene Ursachen haben – uns könnten z.B. bei der Herstellung der Reporterplasmide Pipettier- und andere Fehler unterlaufen sein. Die Elektroporation könnte nicht geklappt haben, wodurch keine Zelle das Plasmid mit der Ampicillinresistenz aufgenommen hätte und somit auf der Platte nicht wachsen konnte.

Am nächsten Tag impften wir 10 Minipräps mit Kulturen der Gruppe 1 an und ließen sie bebrüten. Als die Kulturen – wiederum über Nacht – herangewachsen waren, legten wir eine Replikplatte der Kulturen an und zentrifugierten die Kulturen ab. Mit den resuspendierten Pellets führten wir einen Doppelverdau mit EcoRV und XbaI durch mit dem Ziel, anhand der Banden auf dem Gel, auf welches die Verdauprodukte danach aufgetragen wurden, entscheiden zu können, welche Kultur Plasmid_{in} und welche Plasmid_{gegen} exprimierte.

Für den Doppelverdau verwendeten wir folgenden Ansatz:

DNA	3 µl
Puffer NEB 3	2 µl
10x BSA	2 µl
Enzym EcoRV	0,5 µl
Enzym XbaI	0,5 µl
H ₂ O	12 µl
Inkubation	2 h @ 37 °C

Das Auftragen der Verdauungsprodukte auf ein Gel erbrachte folgendes, im Original im Anhang befindliche Bild:



Die unterschiedlich großen DNA-Stücke der beiden Plasmide lassen sich folgendermaßen erklären:

Die Schnittstelle für EcoRV liegt in pβgal-basic, ist also sowohl beim Plasmid_{in} als auch beim Plasmid_{gegen} an derselben Stelle. Die Schnittstelle für XbaI hingegen liegt am Anfang des CMV-IE-Promotors, liegt also, wie den unten eingefügten Restriktionskarten von pβgal-basic und pQCXIP zu entnehmen ist, beim Plasmid_{gegen} wesentlich näher an der Schnittstelle von EcoRV als beim Plasmid_{in}. Plasmid_{gegen} ergibt also beim Doppelverdau eine sehr viel kleinere Bande, die weiter läuft als die von Plasmid_{in}, wie im Gelbild zu sehen ist.

Da wir nun wussten, welche Kultur welches Plasmid enthielt, entnahmen wir der Replikaplatte Kulturen (Kultur 9 für Plasmid_{gegen}, Kultur 6 für Plasmid_{in}), die wir wieder in einem Flüssigmedium hochwachsen ließen. Aus diesen beiden Kulturen isolierten wir die Plasmide mit Hilfe von Ionenaustauscher-Säulchen nach der zum Kit gehörigen Anleitung, die im Skript abgedruckt ist.

Die isolierten Plasmide vermaßen wir im Photometer (s. Tabelle 2).

	Plasmid _{in}	Plasmid _{gegen}
oD₂₆₀	0,1	0,071
$c[\text{DNA}] = \text{oD}_{260} \cdot \text{Verdünnungsstufe} \cdot 50 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$	0,05 µg/µl	0,035 µg/µl
Verdünnungsstufe bei der Messung: 1:10		
oD₂₈₀	0,07	0,058

Saubere DNA: $\frac{oD_{260}}{oD_{280}} \approx 1,8 - 2,0$	1,43	1,224
---	------	-------

Tabelle 2

Bei einer Wellenlänge von 260 nm absorbiert nur DNA das Licht, nicht Proteine – darum wird dieser Wert zur Konzentrationsbestimmung der DNA verwendet.

Bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren Proteine das Licht, nicht die DNA, weswegen dieser Wert zur Bestimmung der Reinheit der isolierten DNA dient.

Die Werte aller Gruppen sind in Tabelle 3 zu sehen, wobei man erwähnen muss, dass unsere Gruppe zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Tabelle noch Fehler in der Berechnung hatte, die erst im Nachhinein ausgemerzt werden konnten – Tabelle 3 enthält die korrigierten sowie die ursprünglich angegebenen Werte.

Gruppe	Plasmid _{gegen} (c in µg / µl)	Plasmid _{in} (c in µg/µl)
1	0,145	0,011
3	0,043	0,061
4	0,132	0,165
5	0,305	0,154
6	0	0
7	0,138	0,43
8 ursprünglich	0,018	0,25
8 korrigiert	0,05	0,035

Tabelle 3

Um sicher zu gehen, dass die richtigen Kolonien von der Replikaplatte entnommen worden waren, wurde ein zweiter Kontrollverdau mit folgendem Ansatz durchgeführt:

DNA	0,5 µg
Puffer	2 µl
10x BSA	2 µl
Enzym Eco RV	0,5 µl
Enzym XbaI	0,5 µl
Gesamtvolumen	20 µl → noch 14,5 µl H ₂ O

Berechnung der einzusetzenden DNA-Menge : $0,5 \mu\text{g} / c(\text{DNA}) = \mu\text{l DNA}$

Das zu diesem Verdau gehörige Gelbild liegt diesem Protokoll leider nicht bei, da mehrere Gruppen ein Gel verwendeten und das Bild nur einmal ausgedruckt wurde – wir haben leider versäumt, es uns zu kopieren. Das Bild, das im Protokoll von Gruppe 1 zu sehen ist, zeigt leider, dass der Versuch bei uns nicht geklappt hat, da in unseren Gelspalten nichts zu sehen ist.

Transfektion in HEK 293T-Zellen mittels Lipofektion – Ergebnisse und Diskussion

Mit den isolierten Plasmiden (Hinweis: unsere Plasmide waren nicht in ausreichender Menge vorhanden, weswegen wir unsere Plasmide mit den Plasmiden anderer Gruppen mischten und so einen für jeden Well verwendbaren Mastermix herstellten) führten wir die Lipofektion laut Skript mit Stand vom 11.III.2005 durch. Hierbei verwendeten wir jedoch nur 1 µg statt 2 µg Plasmid für jeden Well-Ansatz, da die DNA nicht konzentriert genug war und bei 2 µg pro Well nicht ausgereicht hätte. Das verwendete µg entsprach bei Plasmid_{in} 6,49 µl, bei Plasmid_{gegen} 2,32 µl und beim Plasmid pβgal-basic 2 µl.

Einen Tag nach der Lipofektion führen wir mit dem Herstellen der Zelllysate wie auf S. 11 des Skripts beschrieben fort.

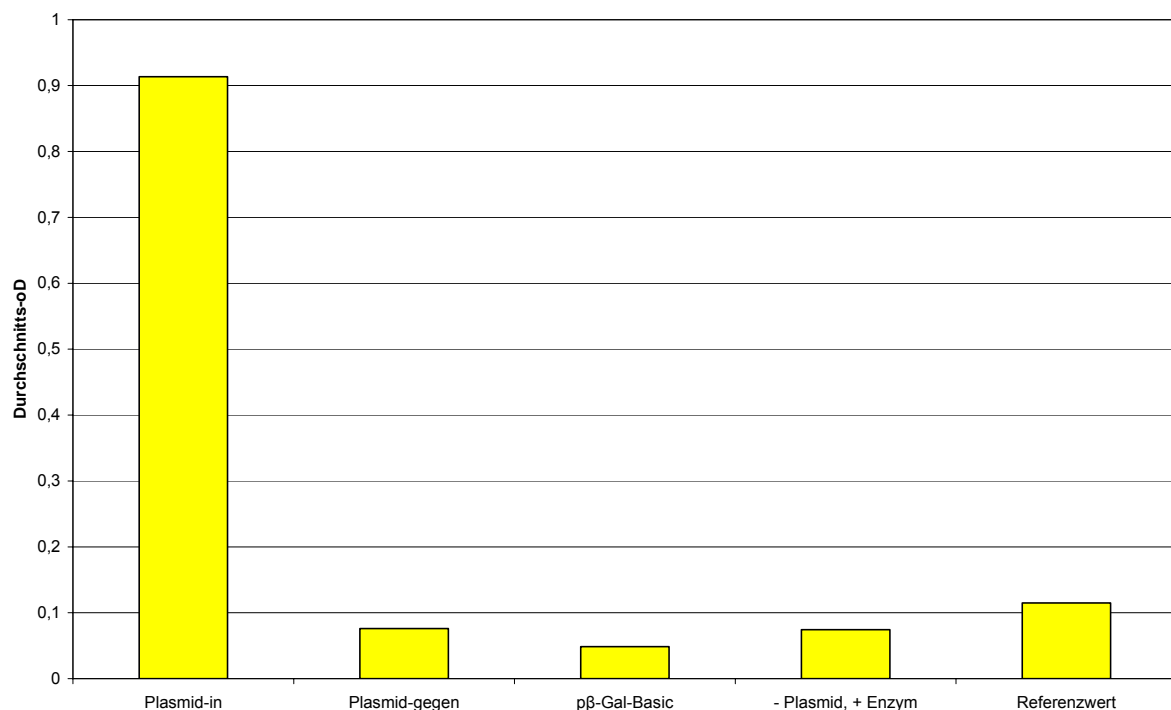
Am darauffolgenden Tag führten wir den β-Galaktosidase-Enzymassay laut Anleitung im Skript (S. 11f) durch. Hierbei wird ONPG zu den Ansätzen pipettiert, das von dem aus den

Plasmiden abgelesenen Enzym β -Galaktosidase in Galaktose und o-Nitrophenol gespalten wird, welches die Lösung gelb färbt. Unsere Gruppe erhielt folgende Ergebnisse:

- beide Ansätze mit p β gal-basic färbten sich nicht gelb, da dieses Plasmid keinen Promotor enthielt und somit das Enzym nicht abgelesen werden konnte
- beide Ansätze mit Plasmid_{in} färbten sich sehr schnell gelb, da die β -Galaktosidase abgelesen wird
- beide Ansätze mit Plasmid_{gegen} färbten sich nicht gelb, da der Promotor entgegen der Leserichtung der β -Galaktosidase eingebaut ist und die β -Galaktosidase somit nicht exprimiert werden kann
- beide Kontrollansätze ohne Plasmid, aber mit Enzym und ONPG, färbten sich langsam und schwächer gelb als die Ansätze mit Plasmid_{in} – dies war eigentlich nicht zu erwarten, es hätte sich im Gegenteil sogar noch stärker gelb färben sollen als bei Plasmid_{in}, aber das zugesetzte Enzym war wohl durch das häufige Auftauen und wieder Einfrieren nicht mehr aktiv genug, um die Gelbfärbung rasch umsetzen zu können

Die Ansätze der einzelnen Gruppen wurden wie im Schema auf S. 12 des Skripts (mit der Abweichung, dass es bei uns keine Gruppe 2 gab, also die darauffolgenden Gruppen je eine Position hoch rutschten) im ELISA-Photometer vermessen, um die optische Dichte (je gelber die Lösung desto optisch dichter) zu bestimmen. Die dabei gemessenen Werte des ganzen Kurses sind dem Ausdruck der ELISA-Ergebnisse im Anhang zu entnehmen. Da wir je zwei Ansätze pro Plasmid hatten, bildeten wir die Durchschnittswerte:

Ansatz	Plasmid _{in}		Plasmid _{gegen}		p β -Gal-Basic		- Plasmid, + Enzym		Referenzwert	
oD	0,841	0,986	0,079	0,073	0,051	0,046	0,096	0,053	0,109	0,121
\bar{oD}	0,9135		0,076		0,0485		0,0745		0,115	



Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass im Plasmid_{in}-Ansatz die β -Galaktosidase abgelesen wurde und das ONPG gespalten hat. Im Ansatz ohne Plasmid, aber mit zugesetztem Enzym sollte der Wert eigentlich ähnlich dem im Plasmid_{in}-Ansatz sein, doch, wie oben beschrieben, war das Enzym eventuell bereits degeneriert. Dass im Plasmid_{gegen}-Ansatz sowie im p β gal-Basic-Ansatz auch optische Dichte gemessen wurde, liegt daran, dass auch andere

Moleküle das Licht des Photometers streuen und so zu Daten führen. Der Referenzwert liegt überraschend hoch, was auf eine evtl. leicht verunreinigte Probe schließen lässt.

Transfektion eines GFP-Reporterplasmids in HEK 293T-Zellen mit verschiedenen Transfektionsmethoden

Einleitung

In diesem Versuch untersuchen wir die Effizienz verschiedener Transfektionsmethoden. Wir brachten ein GFP-Reporterplasmid durch Lipofektion, Elektroporation und Calciumphosphattransfektion in HEK 293T-Zellen ein und ermittelten danach unter dem Umkehrfluoreszenzmikroskop die Anzahl der transfizierten Zellen.

Durchführung der Transfektionen

Wir führten die drei Transfektionen nach der Anleitung im ausgegebenen Skript auf den Seiten 12f durch. Abweichend von dieser Anleitung verwendeten wir für die Elektroporation nur $1,25 \times 10^6$ Zellen, da sowohl unsere Gruppe als auch Gruppe 3 zu wenig Zellen in der Neubauer-Zählkammer zählten. Daher poolten wir unsere Zellen mit denen der Gruppe 3 und teilten, woraufhin wir auf die Zahl von $1,25 \times 10^6$ kamen.

Ergebnisse und Diskussion

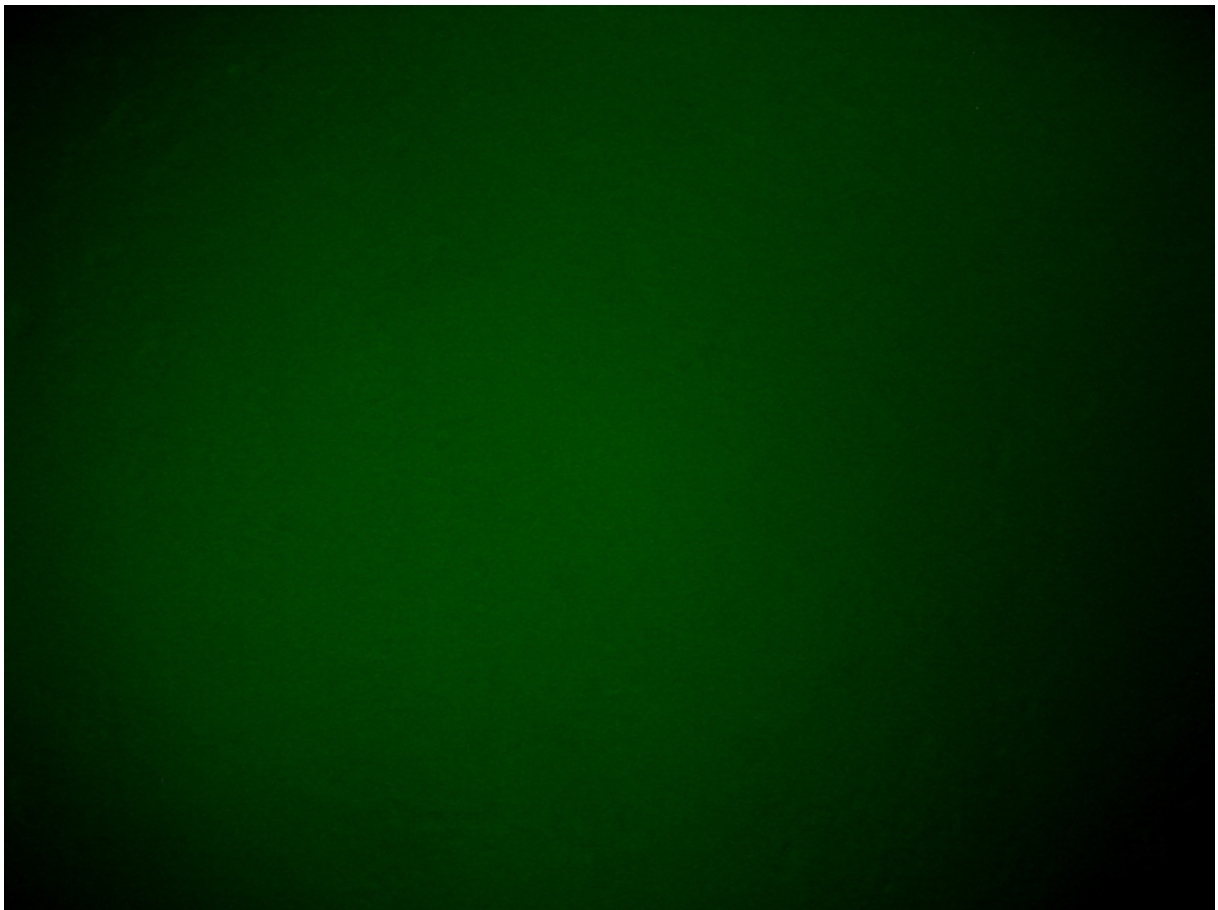
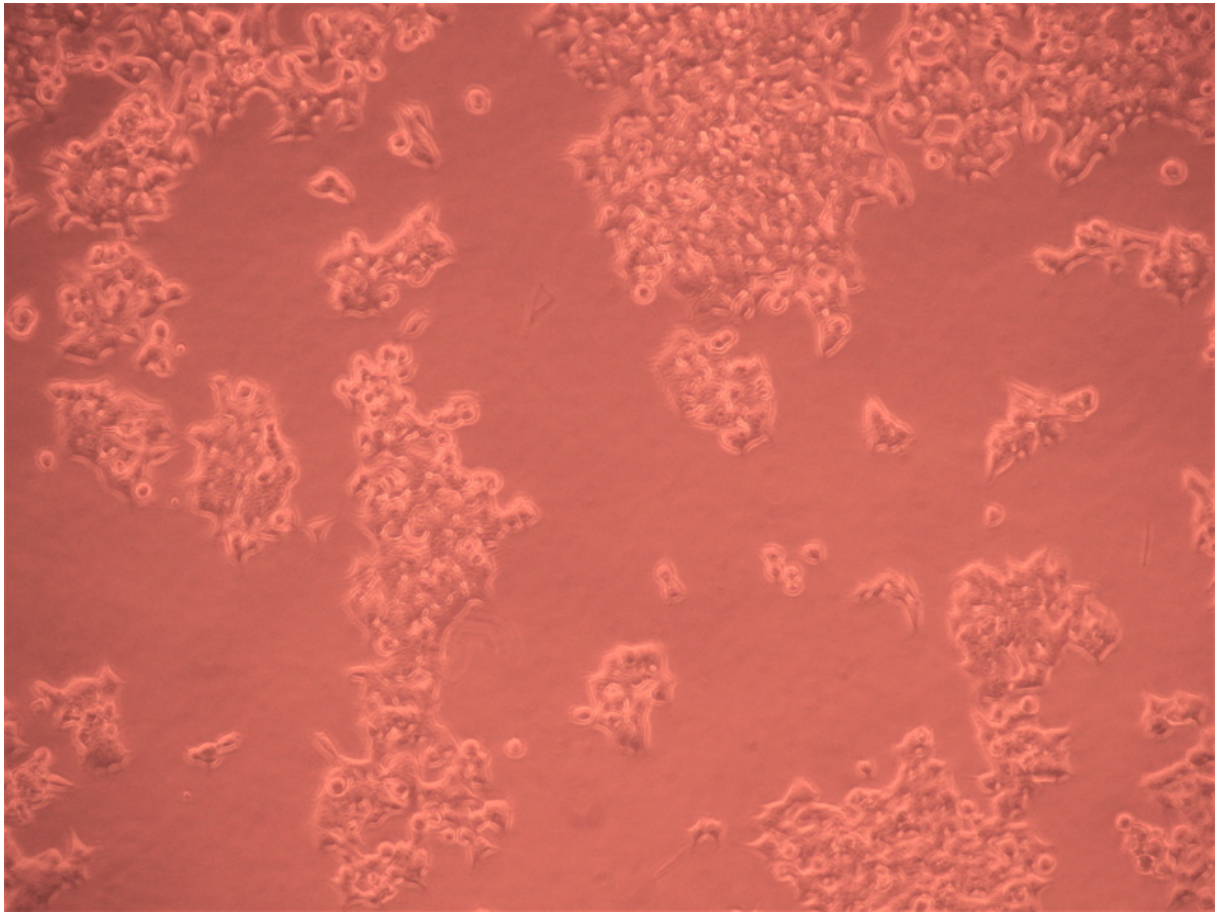
Wir erhielten beim Auszählen der Zellen folgende Ergebnisse:

Transfektionsmethode	Anzahl Zellen	transfizierte Zellen
Lipofektion	815	0
Elektroporation	47	0
Calciumphosphattransfektion	924	370

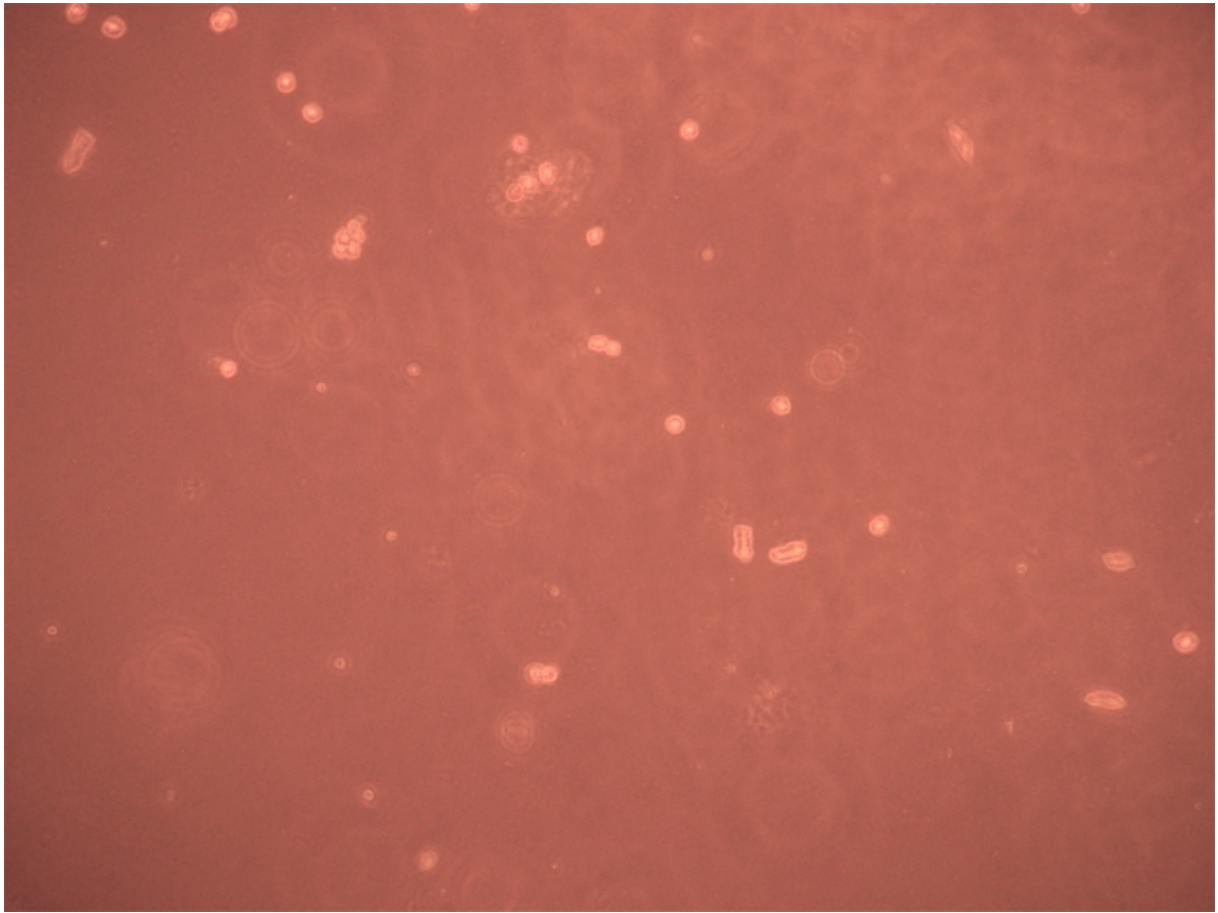
Unserer Gruppe gelang nur mithilfe der Calciumphosphatmethode eine erfolgreiche Transfektion in die HEK 293T-Zellen, wie auf den Bildern leicht zu erkennen ist – daher konnten wir keinen Vergleich der Effektivität der Methoden anstellen. Die meisten anderen Gruppen erzielten mit diesem Versuch das Ergebnis, dass die Lipofektion die Erfolgsversprechendste Methode zur Transfektion von Plasmiden in Säugerzellen darstellt, die Calciumphosphattransfektion die am wenigsten Erfolg versprechende.

Die Ursachen für den ausbleibenden Erfolg bei der Lipofektion und der Elektroporation können wir nur vermuten. Bei der Elektroporation lag es unter Umständen daran, dass wir zu wenige Zellen verwendeten (s. o.). Die Elektroporation an sich ist eine Methode, bei der nicht viele Zellen transfiziert werden – beim Ausspülen der Zellen aus der Elektroporationsküvette könnten wir die wenigen transfizierten Zellen verloren haben. Sowohl bei der Elektroporation als auch bei der Lipofektion pipettierten wir äußerst geringe Mengen Reporterplasmid (bei der Elektroporation $10 \mu\text{l}$, bei der Lipofektion sogar nur $2 \mu\text{l}$) zu den Ansätzen – ein Pipettierfehler unsererseits könnte die Ursache des Versagens darstellen.

Fotos der Lipofektion



Fotos der Elektroporation



Fotos der Calciumphosphattransfektion

