

Protokoll Versuch 1: VDJ-Rekombination in humanen prä-B-Zellen

Gruppe 4 (Susanne Duncker, Kristin Hofmann)

Einleitung

Wir untersuchten in diesem Versuch die Effizienz der VDJ-Rekombination in Ligase IV-defizienten humanen prä-B-Zellen. Hierzu transfizierten wir zwei verschiedene Plasmide in Wildtyp-prä-B-Zellen (NALM-6) sowie mutierte Zellen (N114), ließen die Plasmide von den Zellen vervielfältigen und rekombinieren, extrahierten sie und analysierten die rekombinierten Plasmide auf ihre Häufigkeit sowie die Bruchpunkte der Rekombinationen.

Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und Methoden können im ausgeteilten Skript nachgelesen werden, Änderungen der Versuchsdurchführung wurden protokolliert und stehen bei den jeweiligen Versuchen.

Versuchsdurchführung

Zu Beginn des Versuchs brachten wir durch Elektroporation das Plasmid pGG49 in von den Betreuern ausgeteilte Nalm-6- sowie N114-Zellen ein. Nalm-6-Zellen sind prä-B-Zellen, die aus einer prä-B-Zell-Leukämie gewonnen wurden, N114-Zellen sind Nalm-6-Zellen, in denen beide Allele für eine funktionierende Ligase IV, die für die Verknüpfung von Nukleotiden notwendig ist, deletiert wurden.

Die ausgeteilten Zellen wurden abzentrifugiert, in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Wir zählten 22 Nalm-6-Zellen und 27 N114-Zellen, hatten also $4,4 \times 10^5$ Nalm-6-Zellen pro ml und $5,4 \times 10^5$ N114-Zellen pro ml. Wir zentrifugierten 9,1 ml Nalm-6- bzw. 7,4 ml N114-Zellsuspension erneut, um je 4×10^6 Zellen zu erhalten, die wir dann in je 1 ml RPKI ohne Phenolrot mit 5 µg/ml Plasmid pGG49 resuspendierten. 0,8 ml jeder Suspension wurden laut Skript elektroporiert, in RPMI-Vollmedium überführt und in eine 6-Well-Platte überführt, die bei 37 °C für 46 Stunden inkubiert wurde.

Während der Inkubation replizieren die eukaryotischen Zellen das aus *E. coli* stammende Plasmid. Beim Replikationsvorgang wird die *E. coli*-Methylierung entfernt, so dass von den Zellen replizierte Plasmide daran erkannt werden können, dass an höchstens einem der beiden Stränge noch die für *E. coli* typische Methylierung tragen.

Am zweiten Versuchstag führten wir eine RAP-Harvest durch, wodurch das Plasmid aus den Zellen isoliert wurde, und verdauten die nicht replizierten Plasmide mit dem Restriktionsenzym DpnI, das methylierte Doppelstränge schneidet. Die verbliebenen Plasmide brachten wir durch Hitzeschock in *E. coli*-Bakterien ein und plattierten diese aus, wobei wir nach Ampicillin- bzw. Ampicillin- und Chloramphenicol-Resistenz selektierten. Die Nalm-6-Zellen sind in der Lage, die VDJ-Rekombination durchzuführen, von ihnen replizierte Plasmide sollten also bei erfolgreicher VDJ-Rekombination auch eine Chloramphenicol-Resistenz exprimieren (s. Plasmidkarten, Skript S. 24f).

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 1200 rpm) geerntet und mit 5 ml eiskaltem PBS + 1 mM EDTA gewaschen. Das weitere Vorgehen der RAP-Harvest erfolgte wie im Skript beschrieben, wobei die Inkubationszeit nach der Zugabe von Lösung III 35 min betrug, die darauffolgende Zentrifugation wurde für 10 min durchgeführt.

Die Reinigung der Plasmid-DNA wurde wie im an die Tafel geschriebenen „Wizard“-Protokoll durchgeführt, das sich im Anhang befindet.

Der Verdau mit DpnI wurde wie im Skript beschrieben angesetzt und für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Transformation der Plasmide in Bakterien wurde durch Hitzeschock durchgeführt. Hierzu gaben wir je 50 µl Bakterien sowie einmal 5 µl unverdautes Nalm-6-Plasmid pGG49, einmal 5 µl verdautes Nalm-6-Plasmid pGG49 sowie einmal 5 µl unverdautes N114-Plasmid pGG49 in ein Eppendorfgefäß auf Eis, mischten und inkubierten für exakt 50 Sekunden bei 42 °C, um danach wieder für 2 min auf Eis zu inkubieren. Nach dieser kurzen Inkubation gaben wir 450 µl eiskaltes SOC-Medium in jedes Eppendorfgefäß und inkubierten alle drei Ansätze im Schüttler eine Stunde lang bei 37 °C.

Nach der Inkubation plattierten wir die transfizierten Bakterien aus. Hierbei wurden aus jedem der drei Ansätze 50 µl entnommen, mit 100 µ SOC-Medium vermischt und auf ampicillinhaltigen Platten ausplattiert. Die jeweils verbleibenden 450 µl Ansatz wurden 2 min bei 2000 rpm abzentrifugiert und das Volumen auf 200 µl eingeengt. Diese jeweils 200 µl wurden dann auf ampicillin- sowie chloramphenicolhaltigen Platten ausplattiert, alle Platten wurden bei 37 °C über Nacht bebrütet.

Am dritten Versuchstag zählten wir die bebrüteten Platten aus (s. Tabelle 1) und impften Übernachtkulturen an. Wir setzten drei Übernachtkulturen an und verwendeten dafür jeweils eine unserer beiden amp/cam-resistente, unverdaute, von Nalm-6-Zellen replizierte Plasmide enthaltenden Bakterienkolonien sowie eine unserer lediglich amp-resistente, unverdaute, von N114-Zellen replizierte Plasmide enthaltende Bakterienkolonie als Negativkontrolle. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttler bebrütet.

	<i>amp-Platte</i>	<i>amp/cam-Platte</i>
<i>Nalm-6 unverdaut</i>	43	2
<i>Nalm-6 verdaut</i>	12	0
<i>N114 unverdaut</i>	90	0

Tabelle 1: ausgezählte Kolonienzahlen

Am vierten und letzten Versuchstag verwendeten wir die Übernachtkulturen für eine Minipräp, um mit den so isolierten Plasmiden einen diagnostischen Verdau mit dem Restriktionsenzym ApaLI durchzuführen. Durch die VDJ-Rekombination erhält das pGG49-Plasmid eine dritte ApaLI-Schnittstelle, so dass auf einem Gel die rekombinierten Plasmide anhand der drei sichtbaren Banden gut von den nicht rekombinierten Plasmiden, die bei diesem Verdau nur zwei Banden ergeben, zu unterscheiden sein sollten.

Für die Minipräp setzten wir nicht wie im Skript angegeben Quiagen-Spinsäulchen ein, sondern verwendeten den Eppendorf Fast Plasmid Mini Kit, nach dessen Anleitung wir auch vorgingen (siehe Anhang).

Die ApaLI-Verdaus setzten wir nach folgendem Schema an:

- 2,0 µl Plasmid-DNA (ein amp-Ansatz, ein amp/cam-Ansatz)
- 1,5 µl 10 x BSA
- 1,5 µl NEB4
- 1,0 µl ApaLI
- 9,0 µl H₂O

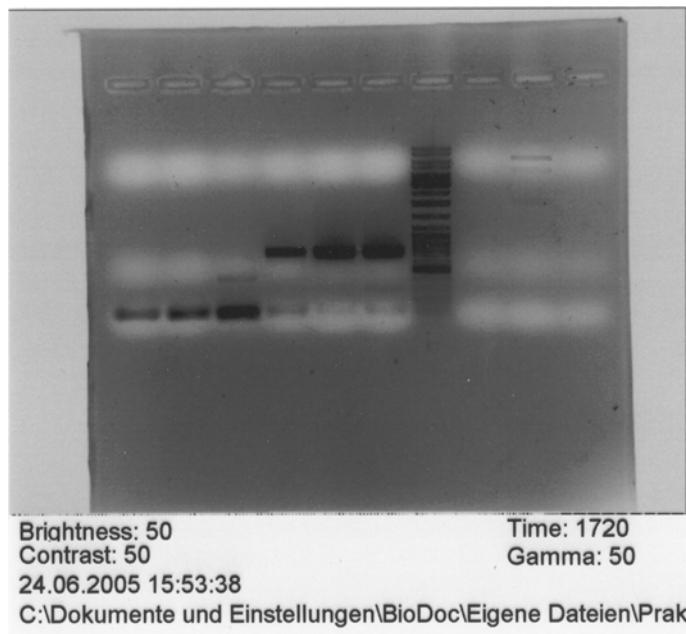
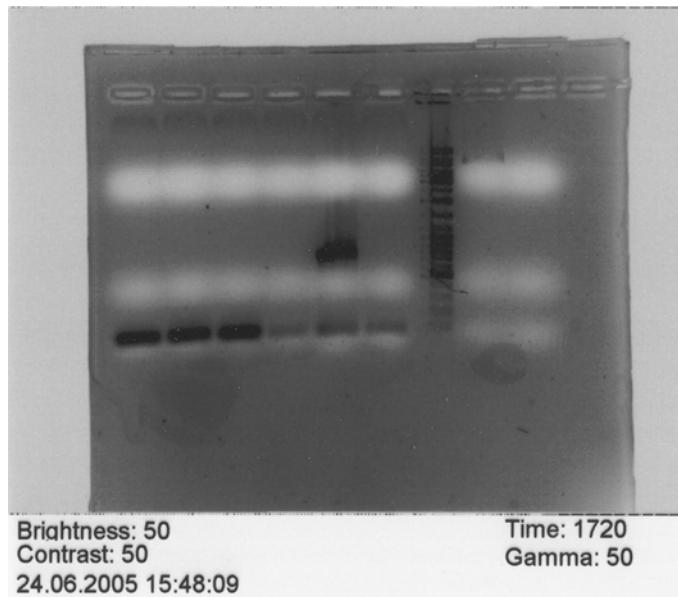
Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C. Danach wurden die beiden Ansätze auf ein Gel aufgetragen.

Ergebnisse

Beide unten zu sehende Gelbilder zeigen in den beiden Spalten rechts neben dem Standard die aufgetragenen Proben aus dem Verdau der Plasmide aus der Kolonie mit amp-Resistenz (amp-Verdau) und dem Verdau der Plasmide aus der Kolonie mit amp/cam-Resistenz (amp/cam-Verdau).

Unser Gelbild, das obere der beiden, zeigt lediglich beim amp-Verdau, der sich in der dem Standard näher befindlichen Spalte befindet (links), eine einzige Bande, in der Spalte des amp/cam-Verdaus (rechts) zeigt sich gar nichts. Der amp-Verdau hat offensichtlich nicht funktioniert, im amp/cam-Verdau war nicht einmal Plasmid enthalten, das hätte verdaut werden

können. Da eine Auswertung so nicht möglich ist, haben wir unter unserem Bild das Bild von Gruppe 3 (ebenfalls Plasmid pGG49), deren amp-Verdau (links) zwar auch nicht geklappt hat, bei denen im amp/cam-Verdau (rechts) jedoch drei deutliche Banden zu sehen sind.



Diskussion

Unser Versuch hat kein Ergebnis erbracht.

Die Elektroporation zu Beginn des Versuchs hat noch funktioniert, da das später aus den Zellen isolierte Plasmid einigen Bakterien zu einer amp-Resistenz verhalf.

Der Fehler muss bei der Isolation der amp/cam-Plasmide aus den auf den Platten wachsenden Bakterienkolonien direkt vor dem Verdau mit ApaL1 bzw. beim Verdau selbst liegen.

Beim amp-Verdau sieht man auf dem Gel eine einzige Bande, die relativ weit oben läuft, was den Schluss zulässt, dass es sich hierbei um das unverdaute Plasmid handelt. Der Grund dafür, dass das Plasmid nicht verdaut wurde, könnte z.B. an einem Pipettierfehler unsererseits (z.B. Enzym vergessen) oder an einem nicht mehr funktionstüchtigen Enzym liegen.

Beim amp/cam-Verdau sieht man gar keine Bande – hier liegt der Fehler vermutlich in der DNA-Isolation aus der Bakterienkolonie. Der Grund für den ausbleibenden Erfolg bei der DNA-

Isolation könnte wiederum an einem Pipettierfehler unsererseits (falscher Puffer zur falschen Zeit verwendet) bei der Verwendung des Kits liegen.

Das Gelbild von Gruppe 3 zeigt, wie unser amp/cam-Verdau hätte aussehen sollen – drei verschiedenen große Banden sind deutlich zu erkennen, die beweisen, dass das Plasmid drei Schnittstellen für ApaL1 besaß. Der amp-Ansatz hat leider auch bei Gruppe 3 nicht geklappt – er hätte gezeigt, dass bei nicht erfolgter VDJ-Rekombination lediglich zwei Schnittstellen für ApaL1 im Plasmid enthalten sind, also zwei Banden zu sehen sind.

“Wizard“-Protokoll (Wizard SV Gel and PCR Clean-up-Kit (Promega), leicht abgeändert)

- gleiches Volumen Membranbindelösung zur DNA
- ein Säulchen in Sammeleppi
- DNA/Membranbindelösung auf Säulchen, 1 min warten (binden lassen)
- Zentrifugieren (1 min @ 13.000 rpm)
- mit 700 µl Membranwaschlösung waschen, Sammeleppi leeren
- mit 500 µl Membranwaschlösung waschen, Sammeleppi leeren
- Zentrifugieren (1 min @ 13.000 rpm)
- Säulchen in Eppi überführen
- mit 20 µl Wasser eluieren

Eppendorf Fast Plasmid Mini Kit

- Bakterien abzentrifugieren (1,5 ml, 1 min @ 13.000 rpm)
- Überstand verwerfen
- Pellet in 400 µl eiskalter Lysis-Solution resuspendieren
- 30 s vortexen
- 3 min @ RT inkubieren
- Lysate auf Säulchen übertragen
- 1 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 400 µl Waschpuffer auf Säuclhen
- 1 min zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 1 min zentrifugieren
- Säulchen in neues Eppendorfgefäß überführen
- 50 µl Elutionspuffer auf die Membran, 1 min warten
- 1 min zentrifugieren