

Protokoll Versuch 2: Analyse des Rekombinationsstatus in B-Lymphozyten mittels PCR

Gruppe 4 (Susanne Duncker, Kristin Hofmann)

Einleitung

Wir reinigten mittels MACS B-Lymphozyten-Vorläufer aus dem Knochenmark vier verschiedener Mausmutanten auf, isolierten deren DNA und analysierten sie mittels PCR auf DJ-Rearrangements.

Material und Methoden

Das verwendete Material sowie die angewandten Methoden können im ausgeteilten Skript nachgelesen werden, Änderungen der Anleitung wurden protokolliert.

Versuchsdurchführung

Zunächst isolierten wir unter Anleitung von Professor Nitschke Knochenmarkszellen aus einer Wildtyp-Maus. Diese Zellen bereiteten wir dann mit CD-19-Beads auf die MACS-Sortierung vor.

Hierzu wuschen wir die Zellen entsprechend der Anleitung im Skript, gaben MACS CD19-Beads zu den Zellen und inkubierten diese Mischung, damit die Beads an die B-Zellen, die CD19 als einzige Zellart exprimieren, binden konnten. Danach wuschen wir die Zellen erneut laut Skript, wobei wir 2 ml MACS-Puffer verwendeten. Die darauf folgende MACS führten wir genau laut Skript durch und zählten danach die Zellen in der positiven wie der negativen Fraktion mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Unsere negative Fraktion enthielt $3,24 \times 10^6$ Zellen, die positive enthielt $9,6 \times 10^5$ Zellen.

Mit je einem Aliquot der positiven (1×10^5 Zellen) und der negativen Fraktion ($1,5 \times 10^6$ Zellen) wurde eine FACS-Färbung mit B220 FITC angesetzt und bis zur Vermessung im FACS-Gerät zusammen mit anderen Proben aus Versuch 4 im Kühlschrank aufbewahrt.

Aus der positiven wie der negativen Fraktion isolierten wir die DNA mit Hilfe eines Quiagen-Kits zur Isolation genomicscher DNA, wobei wir uns exakt an die ausgegebene Anleitung (s. Skript S. 20 f) hielten. Die eluierte DNA bewahrten wir bei -20°C auf.

Am zweiten Versuchstag führten wir eine PCR mit den Proben der verschiedenen Gruppen durch, um das VDJ-Rearrangement nachzuweisen. Hierzu verwendeten wir, wie aus der Schemazeichnung im Skript auf S. 9 zu sehen ist, zwei Vorwärts- und einen Rückwärts-Primer. So konnten also fünf verschieden lange PCR-Produkte erwartet werden, eins für jede Rekombination mit einem anderen J-Segment (D-J_H1 bis D-J_H4) und ein PCR-Produkt für die Keimbahnkonfiguration.

Für die PCR-Reaktion stellten wir einen Mastermix her, der pro Ansatz folgendes enthielt:

10 µl 2 x PCR-Master (fertig ausgeteilt, Zusammensetzung siehe Skript)
1 µl Primer 1
1 µl Primer 2
1 µl Primer 3
6 µl H₂O

Für die Positivkontrolle stellten wir einen anderen Mastermix her, der pro Ansatz folgendes enthielt:

10 µl 2 x Master (fertig ausgeteilt)
2 µl Primer 317

2 µl Primer 318
14 µl H₂O

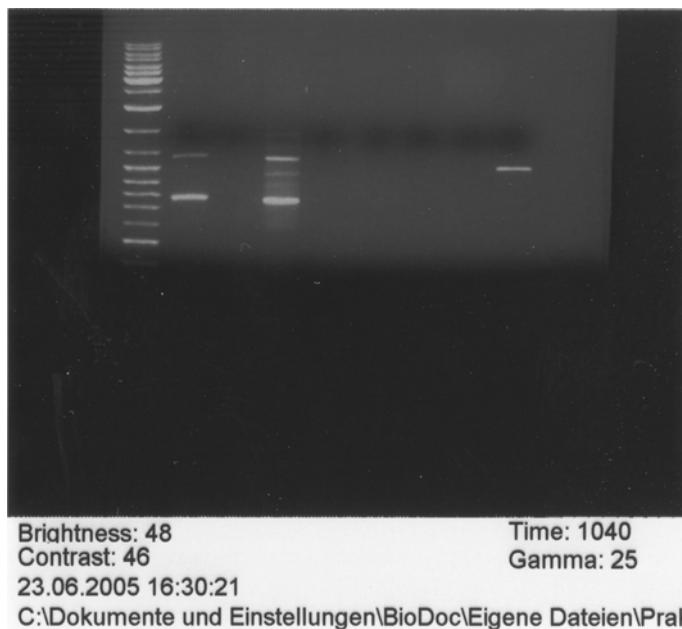
Wir beluden den PCR-Stripe nach folgendem Schema:

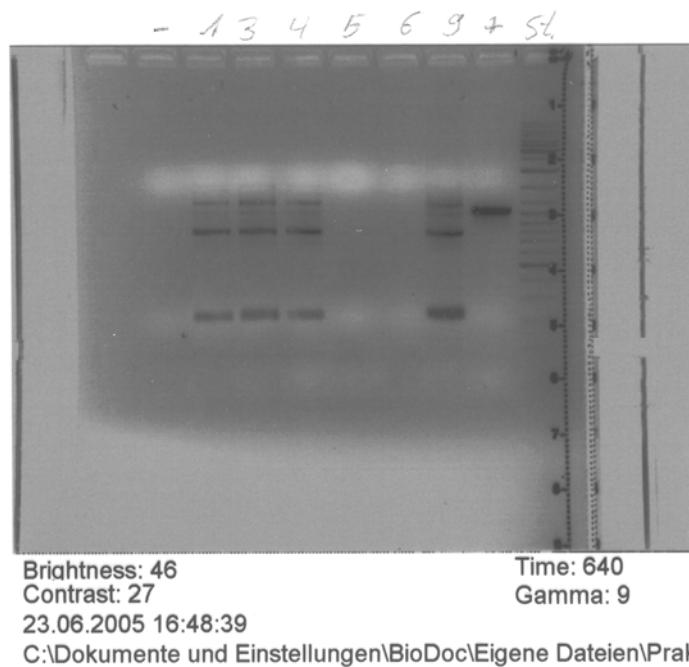
1 2 3 4 5 6 7 8

- 1: 19 µl Mastermix + 1 µl DNA von Gruppe 1
- 2: 19 µl Mastermix + 1 µl DNA von Gruppe 9
- 3: 19 µl Mastermix + 1 µl DNA von Gruppe 3
- 4: 19 µl Mastermix + 1 µl DNA von Gruppe 4
- 5: 19 µl Mastermix + 1 µl DNA von Gruppe 5
- 6: 19 µl Mastermix + 1 µl DNA von Gruppe 6
- 7: 19 µl Mastermix + 1 µl H₂O → Negativkontrolle
- 8: 19 µl Mastermix HPRV + 1 µl DNA → Positivkontrolle

Während die PCR lief, bereiteten wir ein 1,5 %-TAE-Gel mit 1x TAE-Laufpuffer vor.
Nachdem das im Skript vorgeschriebene PCR-Programm durchgelaufen war, trugen wir die Proben in der gleichen Reihenfolge wie im PCR-Stripe auf das Gel auf.

Ergebnis





Das obere der beiden Gelbilder ist unser Gelbild, das untere ist von Gruppe 3.

Auf unserem Gelbild haben nur die Proben von Gruppe 1 und 3 überhaupt Banden ergeben, die ganz rechts zu sehende Bande ist die Positivkontrolle. Die DNA von Gruppe 1 ergab lediglich eine wirklich deutliche Bande, die von Gruppe 3 zwei, bei genauem Hinsehen die erwarteten vier Banden, die jedoch recht verschmiert aussehen.

Das Gel von Gruppe 3 zeigt bessere Ergebnisse, das Beladungsschema ist über das Bild geschrieben. (- = Negativkontrolle, + = Positivkontrolle, St = Standard, Zahl = Gruppennr.) Bei Gruppe 3 ergaben die DNA-Proben aller Gruppen mit Ausnahme von Gruppe 5 und 6 jeweils vier deutlich sichtbare Banden, was zeigt, dass das VDJ-Rearrangement stattgefunden hat. Auf dem Originalgelbild sieht man bei Gruppe neun relativ weit oben noch eine sehr schwach erkennbare Bande, die die Keimbahnkonfiguration darstellt.

Diskussion

In unserem Experiment hat keine einzige Probe wirklich deutliche Ergebnisse erzeugt. Der Fehler muss, da die Proben bei den anderen Gruppen in der Regel funktioniert haben, an unserer Arbeitsweise liegen. Die Probe von Gruppe 1 zeigt nur zwei Banden, als ob das Rearrangement nur mit zwei der vier J_H-Segmente durchgeführt worden wäre, die Probe von Gruppe 3 zeigt alle vier zu erwartenden Banden. Die Proben der restlichen Gruppen inklusiv unserer eigenen zeigen gar keine Banden, was auf einen Pipettierfehler unsererseits zurückgeführt werden könnte – bei anderen Gruppen funktionierten diese Proben, so dass ein Fehler bei den einzelnen Proben eigentlich ausgeschlossen werden kann.