

# **ZELLBIOLOGISCHES PRAKTIKUM**

durchgeführt am Department für Angewandte Genetik und  
Zellbiologie

Betreuer: Dr. Lukas Mach  
Dr. Georg Seifert

# ZIELSETZUNG DES PRAKTIKUMS

Liebe Praktikumsteilnehmer/innen!

In diesem Praktikum werden wir das Expressionsverhalten des Hitzeschockproteins hsp70 studieren. Hitzeschockproteine werden in Säugetierzellen nicht nur als Antwort auf eine Temperaturerhöhung, sondern in vielerlei Stresssituationen produziert. Diese schädlichen Umwelteinflüsse können zum Beispiel UV-Bestrahlung, Virusinfektionen, Sauerstoffmangel wie auch die Belastung mit Schwermetallen sein.

Heat Shock Protein 70 (hsp70) ist ein vorwiegend zytosolisches Protein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa, welches zur Familie der molekularen Chaperone gehört. Molekulare Chaperone sind für die korrekte Faltung neugebildeter zelleigener Proteine von entscheidender Bedeutung. Deswegen ist auch eine basale Expression von hsp70 in allen Säugetierzellen nachzuweisen. Nach einer Stressbehandlung kommt es allerdings sehr rasch zu einer stark erhöhten Transkriptionsrate des hsp70-Gens.

Eure Aufgaben umfassen:

- Kultur von Maus-Bindegewebszellen (LTK-Zellen)
- Behandlung von LTK-Zellen mit Kadmiumchlorid
- Nachweis der neugebildeten hsp70-mRNA mittels RT-PCR
- Nachweis des neusynthetisierten hsp70-Proteins mittels Western Blotting
- Nachweis der Induzierbarkeit des hsp70-Promotors durch Expression des Reporterproteins Green Fluorescent Protein (GFP)

Viel Vergnügen!

Lukas Mach und Georg Seifert

## ***Zellkultur***

Die Maus-Zelllinie LTK ist eine Thymidinkinase (TK)-negative Variante von L-Zellen, eine der ältesten etablierten Säugetierzelllinien. Der TK<sup>-</sup>-Phänotyp der Zellen ist für dieses Praktikum von keiner Relevanz.

Kulturmedium:      500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; enthält Glutamax als Glutamin-Quelle)  
                                 50 ml FKS (Fötale Kälber-Serum; 30 min bei 56°C hitze-inaktiviert)  
                                 5 ml Penicillin/Streptomycin (je 10 mg/ml)

Die Kulturen sind täglich mikroskopisch auf Konfluenz, Morphologie und etwaige mikrobielle Kontaminationen zu überprüfen.

## ***Passagieren von Zellen***

Die Zellkulturen werden in Zellkulturschalen (100 mm Durchmesser) mit 10 ml Kulturmedium bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit einer Kohlendioxidkonzentration von 5% gezüchtet.

- Kulturmedium absaugen, dann Zellrasen einmal mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) waschen
- 1 ml 0.25% Trypsin (in PBS) auf die Kulturen träufeln
- 5-10 Minuten bei 37°C inkubieren (bis zum Ablösen der adhärennten Zellen)
- Reaktion mit 9 ml Kulturmedium stoppen (FKS inhibiert Trypsin)
- je 7 ml Kulturmedium in zwei frische Zellkulturschalen vorlegen, dann je 3 ml Zellsuspension zugeben
- Zellen bei 37°C züchten

## ***Behandlung von LTK-Zellen mit CdCl<sub>2</sub>***

- Zellkulturen auf eine Endkonzentration von 100 µM CdCl<sub>2</sub> einstellen  
Stammlösung (steril): 10 mM CdCl<sub>2</sub> in doppelt-destilliertem Wasser (ddW)
- 3 Stunden (RNA) bzw. 4 Stunden (Protein) bei 37°C inkubieren
- Zellen für die jeweiligen Versuche einsetzen



## ***Quantifizierung von Proteinen***

Der Proteingehalt der zytosolischen Proteinextrakte wird nach der Methode von Bradford ermittelt, welche auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 durch Bindung an Proteine beruht. Der Proteingehalt der Proben wird mittels einer mit Rinderserumalbumin (BSA) generierten Standardkurve bestimmt.

- Eine BSA-Verdünnungsreihe herstellen: 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml BSA in ddW
- Das konzentrierte Farbreagenz (Bio-Rad) unmittelbar vor Verwendung mit ddW 1:5 verdünnen
- je 2 µl Probe bzw. Standardlösung mit 1 ml verdünntem Farbreagenz in einem Hütchen vereinen und sofort mittels Vortex mischen
- Proteinextraktionspuffer mit 0.1% NP-40 versetzen und als Blindwert für die Proben mitführen
- mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- in Kunststoff-Küvetten überführen (keine Quarzküvetten verwenden!)
- Die optische Dichte (OD) bei 595 nm im Spektralphotometer ermitteln
- Standardkurve (0 bis 5 mg/ml BSA) mittels MS-Excel erstellen
- Proteingehalt der Extrakte berechnen

## ***Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen***

Proteine können durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in Gegenwart des denaturierenden Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Zur Spaltung etwaiger Disulfidbrücken zwischen Protein-Untereinheiten werden die Proben unmittelbar vor Durchführung der SDS-PAGE Analyse mit Dithioerythrit (DTE) reduziert. Zur Fokussierung der Proteinbanden wird ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet, das auf einem pH-Unterschied zwischen Sammelgel und Elektrophorese-Puffer basiert.

- Trenngel (12.5% Acrylamid)-Komponenten mischen:
  - 3.5 ml 30% Acrylamid
  - 1.1 ml 1% Bisacrylamid
  - 2.1 ml 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8
  - 1.6 ml ddW
- 5 Minuten unter Wasserstrahlvakuum entgasen

- 84  $\mu\text{l}$  10% SDS, 5  $\mu\text{l}$  TEMED und 50  $\mu\text{l}$  10% Ammoniumpersulfat (APS) in der angeführten Reihenfolge zugeben, jeweils kurz zwecks Durchmischung schwenken
- Gel mit 1.5-mm Abstandshaltern gießen
- Mit einer dünnen Schicht Isopropanol (1-2 mm) abdecken, dann 30 Minuten polymerisieren lassen
- Sammelgel (4% Acrylamid)-Komponenten mischen:
  - 650  $\mu\text{l}$  30% Acrylamid
  - 445  $\mu\text{l}$  1% Bisacrylamid
  - 850  $\mu\text{l}$  0.5 M Tris/HCl, pH 6.8
  - 1435  $\mu\text{l}$  ddW
- 5 Minuten unter Wasserstrahlvakuum entgasen
- 35  $\mu\text{l}$  10% SDS, 2.5  $\mu\text{l}$  TEMED und 25  $\mu\text{l}$  10% APS in dieser Reihenfolge zusetzen und vorsichtig mischen
- Probenkamm (1.5 mm) einsetzen und Sammelgel gießen
- 30 Minuten polymerisieren lassen
- Proteinelektrophoresepuffer bereiten (1 Liter pro Apparatur):
  - 3 g/l Tris
  - 14.4 g/l Glycin
  - 1 g/l SDS
- Probenkamm entfernen, Probenaschen mit Proteinelektrophoresepuffer auswaschen
- Proben und Kontrollen (werden von den Betreuern ausgegeben) auftauen und für 5 Minuten bei 95°C reduzieren
- Molekulargewichtsmarker (5  $\mu\text{l}$ ) mit 1  $\times$  SDS-PAGE Probenpuffer (35  $\mu\text{l}$ ) verdünnen (nicht erhitzen!)
- Molekulargewichtsmarker und Proben in Probenaschen überführen
- Alle Leerbahnen mit 40  $\mu\text{l}$  1  $\times$  SDS-PAGE Probenpuffer beschicken
- Elektrophorese bei konstant 200 V durchführen, bis die Bromphenolblaufront den unteren Gelrand erreicht (ungefähr 1 Stunde)

## *Nachweis von Proteinen mittels Western blotting*

Zur weiteren Analyse werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. In unserem Fall wird diese Membran dann zuerst mit einem Antikörper gegen hsp70, und danach mit einem Antikörper gegen Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) inkubiert. Die Bindung dieser Antikörper an die jeweiligen Antigene (hsp70 bzw. GAPDH) wird jeweils mit Hilfe eines geeigneten zweiten Antikörpers, welcher mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, nachgewiesen. HRP katalysiert in der Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol. Dabei kommt es zur Entstehung von Lichtblitzen, was mit Hilfe eines photographischen Films erfasst werden kann. Die Molekülmasse von hsp70 beträgt 70 kDa, jene von GAPDH 36 kDa.

- Western blotting-Puffer zubereiten (1 Liter pro Apparatur):

14.4 g/l Glycin  
3.03 g/l Tris  
0.37 g/l SDS  
200 ml Methanol

- Trenngel für 5 Minuten in Western blotting-Puffer äquilibrieren
- Membran und Filterpapier in Western blotting-Puffer tränken (eine separate Wanne verwenden)
- Sandwich aus Schwamm, 3 Lagen Filterpapier, Gel, Membran, 3 Lagen Filterpapier und Schwamm gemäß den Instruktionen durch die Betreuer anfertigen
- erst Sandwich, dann Kühlbox in die Blot-Apparatur einhängen
- Mit Western blotting-Puffer auffüllen
- Transfer bei konstant 100 V für 1 Stunde durchführen
- Sandwich entnehmen und zerlegen; Gel und Filterpapier verwerfen, Schwämme aufbewahren
- Membran für 5 Minuten mit 0.2% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure (TCA) färben
- mit ddW entfärben
- gefärbte Membran photographieren oder scannen
- Membran zweimal für 5 Minuten mit PBS waschen (Färbung verschwindet)
- Membran über Nacht bei Raumtemperatur unter Schwenken mit Blockierungslösung absättigen

Blockierungslösung: 3% BSA in PBS

## ***Immunochemischer Nachweis des Hitzeschockproteins hsp70***

- abgesättigte Membran zweimal für 5 Minuten mit PBS/0.05% Tween 20 (PBST) waschen
- Primär-Antikörperlösung (1 mg/ml monoklonaler Maus-Antikörper gegen hsp70) für 10 Minuten bei 10000 x g (13000 rpm) zentrifugieren
- 1 µl aus dem Überstand entnehmen
- mit 10 ml 3% BSA in PBST verdünnen (1:10 000 Verdünnung)
- Membran für mindestens 1.5 Stunden bei Raumtemperatur unter Schwenken in der Primär-Antikörperlösung inkubieren
- Membran fünfmal für je 5 Minuten mit PBST waschen
- Sekundär-Antikörper (Ziegenantikörper gegen Maus-Immunglobulin G, mit HRP gekoppelt) wie oben zentrifugieren
- 0.5 µl aus dem Überstand entnehmen
- mit 10 ml PBST verdünnen (1:20 000 Verdünnung)
- Membran für mindestens 1.5 Stunden bei Raumtemperatur unter Schwenken in der Sekundär-Antikörperlösung inkubieren
- Membran fünfmal für je 5 Minuten mit PBST waschen
- Membran zweimal kurz mit PBS spülen
- Membran mit frisch zubereitetem Nachweis-Reagenz (je 1.5 ml Luminol/Enhancer und Peroxidlösung mischen) flächendeckend beträufeln und für 5 Minuten inkubieren
- Membran mit einer stumpfen Pinzette der Lösung entnehmen; überschüssiges Reagenz abtropfen lassen
- Membran in einen Plastikbeutel einschweißen
- Membran mit einem photographischen Film in einer Kassette exponieren (Exponierzeiten: normalerweise zwischen 10 Sekunden und 1 Minute)
- Film in der Dunkelkammer für 1 Minute in photographische Entwickler-Lösung einlegen
- Film für 30 Sekunden mit ddW waschen
- Film für 1 Minute in photographische Fixierlösung einlegen
- Film gründlich mit Leitungswasser spülen



## ***Immunchemischer Nachweis von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)***

- Membran nach Abschluss des hsp70-Nachweises zweimal für 5 Minuten mit PBS waschen
- Membran über Nacht bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung absättigen (Schüttler)
- abgesättigte Membran zweimal für 5 Minuten mit PBST waschen
- Primär-Antikörperlösung (0.2 mg/ml polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen GAPDH) für 10 Minuten bei 10000 x g (13000 rpm) zentrifugieren
- 5 µl aus dem Überstand entnehmen
- mit 10 ml 3% BSA in PBST verdünnen (1:2000 Verdünnung)
- Membran für mindestens 1.5 Stunden bei Raumtemperatur unter Schwenken in der Primär-Antikörperlösung inkubieren
- Membran fünfmal für je 5 Minuten mit PBST waschen
- Sekundär-Antikörper (Ziegenantikörper gegen Kaninchen-Immunoglobulin G, mit HRP gekoppelt) wie oben zentrifugieren
- 0.5 µl aus dem Überstand entnehmen
- mit 10 ml PBST verdünnen (1:20 000 Verdünnung)
- Membran für mindestens 1.5 Stunden bei Raumtemperatur unter Schwenken in der Sekundär-Antikörperlösung inkubieren
- Membran fünfmal für je 5 Minuten mit PBST waschen
- Membran zweimal kurz mit PBS spülen
- Membran mit frisch zubereitetem Nachweis-Reagenz (je 1.5 ml Luminol/Enhancer und Peroxidlösung mischen) flächendeckend beträufeln und für 5 Minuten inkubieren
- Membran mit einer stumpfen Pinzette der Lösung entnehmen; überschüssiges Reagenz abtropfen lassen
- Membran in einen Plastikbeutel einschweißen
- Membran mit einem photographischen Film in einer Kassette exponieren (Exponierzeiten: normalerweise zwischen 10 Sekunden und 1 Minute)
- Film wie oben beschrieben entwickeln

## ***Isolierung von RNA aus Säugetierzellen***

Die Isolierung von intakter RNA aus Geweben und kultivierten Zellen wird durch die Gegenwart von Ribonukleasen (RNAsen) erschwert. Körpersekrete, wie zum Beispiel Schweiß, sind auch sehr reich an diesen Enzymen. Deswegen müssen bei allen Arbeitsschritten Handschuhe getragen und RNase-freie Plastikwaren verwendet werden. Weiters werden alle Lösungen, soweit wie möglich, mit Diäthylpyrokarbonat (DEPC), einem RNase-Inaktivator, vorbehandelt. Die Extraktionslösung („RNA-Lysepuffer“) enthält Guanidinisothiocyanat (GTC) zur Inaktivierung zelleigener RNAsen. Allen Reaktionen wird RiboLock, eine rekombinante Version eines RNase-hemmenden Proteins aus menschlicher Plazenta, zugesetzt.

1. Zellkulturmedium absaugen
2. Zellrasen tropfenweise mit 400 µl RNA-Lysepuffer (enthält GTC) versetzen, dann Zellen mithilfe eines Zellschabers ablösen
3. Zellysat mit einer Spritze (1 ml) zur Reduktion der Viskosität (Fragmentierung der genomischen DNA) durch eine Nadel (20-Gauge) aufsaugen und wieder ausstossen; diesen Schritt 4 × wiederholen
4. Lysat in ein Eppendorf-Hütchen transferieren und auf Eis lagern
5. 175 µl Lysat entnehmen und dieses Aliquot in ein frisches Eppendorf-Hütchen transferieren
6. 350 µl RNA-Verdünnungspuffer (blau) zusetzen; durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren der gesamten Probe mischen
7. 3 min bei 70°C (Heizblock) inkubieren
8. 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
9. Überstand in ein frisches Eppendorf-Hütchen transferieren
10. 200 µl Ethanol zusetzen; durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren der gesamten Probe mischen
11. Probe auf ein Säulchen (enthält eine Silikagematrix) auftragen
12. 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
13. Puffersammelgefäß (unterer Teil des Säulchens) entleeren
14. Säulchen mit 600 µl RNA-Waschlösung versetzen
15. 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
16. Puffersammelgefäß (unterer Teil des Säulchens) entleeren

17. In einem Eppendorf-Hütchen 40  $\mu$ l DNase-Puffer (gelb), 5  $\mu$ l 0.09 M  $MnCl_2$  und 5  $\mu$ l DNase-Lösung durch vorsichtiges Pipettieren mischen
18. Gemisch auf Säulchen tropfenweise auftragen (gleichmäßig verteilen)
19. 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
20. Säulchen mit 200  $\mu$ l DNase-Stopplösung versetzen
21. 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
22. Säulchen mit 600  $\mu$ l RNA-Waschlösung versetzen
23. 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
24. Puffersammelgefäß (unterer Teil des Säulchens) entleeren
25. Säulchen mit 250  $\mu$ l RNA-Waschlösung versetzen
26. 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
27. Säulchen auf frisches Eppendorf-Hütchen setzen
28. Säulchen mit 100  $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser versetzen (gleichmäßig verteilen)
29. 2 min bei Raumtemperatur inkubieren
30. 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
31. Eluat auf Eis aufbewahren

### ***Quantifizierung der isolierten RNA***

Die RNA-Konzentration wird durch Ermittlung der UV-Absorption der Proben bei 260 nm ermittelt. Eine OD von 1.0 bei dieser Wellenlänge entspricht einem RNA-Gehalt von 40  $\mu$ g/ml. Das  $OD_{260}/OD_{280}$ -Verhältnis von RNA, die mit dieser Prozedur isoliert wurde, sollte 2.1 bis 2.3 betragen.

- UV-Lampe mindestens 10 min vor Benützung des Photometers einschalten
- 5  $\mu$ l Probe mit 120  $\mu$ l TE-Puffer versetzen (Verdünnung 1:25)
- $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  gegen TE-Puffer als Blindwert ermitteln (in einer Quarz-Mikroküvette)
- RNA-Konzentration der unverdünnten Probe berechnen: 1.0  $OD_{260}$  (der 1:25 Verdünnung) = 1.0  $\mu$ g RNA/ $\mu$ l Probe
- $OD_{260}/OD_{280}$ -Verhältnis berechnen
- Die für die Analyse mittels Gelelektrophorese und RT-PCR benötigten Aliquote (je 1.0  $\mu$ g RNA) entnehmen; dann diese Proben wie auch den Rest bei  $-20^\circ C$  lagern

## ***Elektrophoretische Analyse von RNA***

Die elektrophoretische Analyse der gereinigten RNA-Proben erlaubt (a) eine Überprüfung des photometrisch ermittelten RNA-Gehalts und (b) eine Aussage über die Qualität der RNA. Es sollten zwei Hauptbanden nachweisbar sein, 28S rRNA (4.7 kb) und 18S rRNA (1.9 kb). Das Intensitätsverhältnis dieser Banden sollte rund 2:1 betragen. Banden mit >10 kb sind ein Hinweis auf Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA.

1. Gelträger mit Klebeband verkleben (ein Gel reicht für die Proben aller Gruppen aus)
2. Gel aus 1.0% Agarose bereiten: 1.0 g Agarose in 98 ml ddW auflösen (Mikrowellenherd), dann 2 ml  $50 \times$  TAE-Puffer und 5  $\mu$ l Ethidiumbromid-Stammlösung (5 mg/ml) zugeben
3. Gel gießen und mindestens 30 min bei Raumtemperatur fest werden lassen
4. 1 Liter  $1 \times$  TAE-Puffer (Elektrophoresepuffer) herstellen, Elektrophoresetank damit füllen
5. Gelträger in Elektrophoresetank einsetzen
6. RNA-Proben (je 1.0  $\mu$ g RNA) mit Nuklease-freiem Wasser auf 10  $\mu$ l ergänzen und dann mit je 2  $\mu$ l  $6 \times$  DNA-Ladepuffer versetzen
7. Proben (10  $\mu$ l) und Marker (10  $\mu$ l einer 1 kbp DNA-Leiter) auf das Gel auftragen
8. Gel bei 80 V in  $1 \times$  TAE-Puffer laufen lassen (ca. 1 Stunde)
9. Banden am Transilluminator (Geldokumentationssystem) mit UV-Licht sichtbar machen; Bild als TIF-File abspeichern

## ***Reverse Transkription von RNA***

Messenger-RNA (mRNA) kann durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) in der Gegenwart von einem geeigneten Primer (in unserem Fall ein Oligo(dT)-Primer, der an alle polyadenylierten mRNAs bindet) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für die cDNA-Synthese ist auch ein Zusatz der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP erforderlich. Die solcherart hergestellte cDNA kann dann mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf das Vorliegen ausgewählter Transkripte analysiert werden.

1. Ein Aliquot der RNA-Lösung, das 1.0  $\mu$ g RNA enthält, mit Nuklease-freiem Wasser auf 11  $\mu$ l verdünnen
2. 1  $\mu$ l (dT)<sub>18</sub>-Primer (0.5 mg/ml) zusetzen
3. 5 min bei 65°C inkubieren
4. sofort für 5 min auf Eis stellen
5. Kondenswasser für 10 sec abzentrifugieren

6. folgende Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge zusetzen:

4 $\mu$ l	5 $\times$ Reaktionspuffer
1 $\mu$ l	RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)
2 $\mu$ l	dNTP-Mischung (je 10 mM)
1 $\mu$ l	RevertAid H Minus M-MuLV RT (200 U/ $\mu$ l)

7. durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mischen, dann kurz abzentrifugieren
8. 60 min bei 42°C inkubieren, dann das Kondenswasser für 10 sec abzentrifugieren
9. Reaktion durch Erhitzen im Heizblock (5 min, 70°C) beenden
10. cDNA bei -20°C lagern

### ***Polymerase-Kettenreaktion (PCR)***

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt den spezifischen Nachweis eines 520 bp-Fragmentes der hsp70-cDNA unter Mithilfe der thermostabilen *Taq* DNA-Polymerase und spezifischer Oligonukleotid-Primer. Parallel dazu wird die Qualität der eingesetzten cDNA-Proben durch Amplifikation eines für GAPDH kodierenden Fragmentes (980 bp) überprüft. GAPDH, ein Glykolyse-Enzym, wird in den meisten Säugerzellen konstitutiv exprimiert.

1. Alle Arbeitsschritte auf Eis durchführen; Komponenten in folgender Reihenfolge (je zweimal für GAPDH und hsp70) in 0.2-ml Hütchen zusammenpipettieren, vor Zugabe der *Taq* DNA-Polymerase kurz vortexen:

10 $\mu$ l	Nuklease-freies Wasser
5 $\mu$ l	5 $\times$ PCR-Puffer
2.5 $\mu$ l	forward primer (10 pmol/ $\mu$ l)
2.5 $\mu$ l	reverse primer (10 pmol/ $\mu$ l)
2.5 $\mu$ l	dNTP-Mischung (je 2.5 mM)
0.5 $\mu$ l	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

2. 2  $\mu$ l cDNA-Lösung zugeben
3. Ansätze durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mischen
4. für 10 sec zentrifugieren
5. Hütchen in den PCR-Thermocycler einsetzen und folgendes Programm (Dauer: ca. 3 Stunden) starten:

3 min 94°C

1 min 94°C/1 min 55°C/1 min 72°C (30 Zyklen)

4 min 72°C

6. Gelträger mit Klebeband verkleben (zwei Gele reichen für die Proben aller Gruppen aus)
7. Gel aus 2.0% Agarose bereiten: 2.0 g Agarose in 98 ml ddW auflösen (Mikrowellenherd), dann 2 ml 50 × TAE-Puffer und 5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (5 mg/ml) zugeben
8. Gel gießen und mindestens 30 min bei Raumtemperatur fest werden lassen
9. 1 Liter 1 × TAE-Puffer (Elektrophoresepuffer) herstellen, Elektrophoresetank damit füllen
10. Gelträger in Elektrophoresetank einsetzen
11. PCR-Ansätze (10 µl) und Marker (10 µl einer 100 bp DNA-Leiter) auf das Gel auftragen
12. Gel bei 80 V in 1 × TAE-Puffer laufen lassen (ca. 1 Stunde)
13. Banden am Transilluminator (Geldokumentationssystem) mit UV-Licht sichtbar machen; Bild als TIF-File abspeichern

## ***Nachweis der Aktivität des hsp70-Promotors mittels des Reporterproteins Green Fluorescent Protein (GFP)***

Die Zelllinie LHG8 wurde durch stabile Transfektion von LTK-Zellen mit dem Plasmid p<sub>hsp70</sub>-GFP erzeugt. Dieses Plasmid enthält eine Expressionskassette aus dem hsp70-Promotor und der kodierenden Region des Green Fluorescent Protein (GFP)-Gens sowie das bakterielle Neomycinresistenz-Gen (*neo<sup>r</sup>*) als Selektionsmarker. Das *neo<sup>r</sup>*-Gen kodiert für eine Phosphotransferase, die sowohl Neomycin wie auch sein für Säugetierzellen toxisches Derivat Geneticin (G418) zu entgiften vermag. Dies kann für die Selektion von Zelllinien, die *neo<sup>r</sup>* exprimieren, ausgenutzt werden. Daher werden LHG8-Zellen im Routine-Kulturmedium (siehe Abschnitt *Zellkultur*) plus 0.3 mg/ml G418 gezüchtet. Wenn LHG8-Zellen gestresst werden, kommt es zur Synthese von GFP, das mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden kann.

- 1 Schale LHG8-Zellen (siehe *Zellkultur*) mittels Trypsinisierung ernten (gibt 10 ml Zellsuspension)
- 3 ml Zellsuspension mit 6 ml Kulturmedium verdünnen
- je 2 runde Deckgläser in drei 35-mm Gewebekulturschalen transferieren
- jede Schale mit 2 ml vorverdünnter Zellsuspension versetzen
- über Nacht bei 37°C inkubieren
- 5 bzw. 10 µl 10 mM CdCl<sub>2</sub> zu je einer Schale zugeben (Endkonzentration: 25 bzw. 50 µM CdCl<sub>2</sub>)
- 18 Stunden bei 37°C inkubieren
- am nächsten Tag Kulturmedium absaugen
- Zellen dreimal mit 2 ml PBS + 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> + 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> (PBS + Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) waschen
- Zellen vorsichtig mit 2 ml Fixierlösung (4% Paraformaldehyd in PBS + Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) überschichten und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Zellen dreimal mit 2 ml PBS + Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> waschen
- Zellen mit 2 ml PBS + Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> versetzen, dann 20 µl einer Lösung von 10 µg/ml 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) in ddW zugeben und vorsichtig mischen
- 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Zellen dreimal mit 2 ml PBS + Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> waschen

- je 5  $\mu$ l Einbettungsmedium (Citifluor) auf drei Objektträger (jeweils in der Mitte) vorlegen
- Aus jeder Schale ein Deckglas entnehmen und in ddW tauchen (5  $\times$  wiederholen)
- Überschüssiges ddW entfernen
- Jedes Deckglas mit der trüben Seite (Zellen) nach unten auf einen Objektträger transferieren
- Überschüssiges Einbettungsmedium entfernen
- Deckgläser mit Nagellack versiegeln
- im Fluoreszenzmikroskop betrachten (grüne Fluoreszenz: GFP; blaue Fluoreszenz: DAPI)





3. Wie kann die Expression eines Gens mittels RT-PCR nachgewiesen werden?

4. Wie wird bei Protein-Elektrophoresen eine Auftrennung nach der Molekülgröße erreicht?  
Worauf beruht das Grundprinzip der diskontinuierlichen Elektrophorese?

Alles Gute!

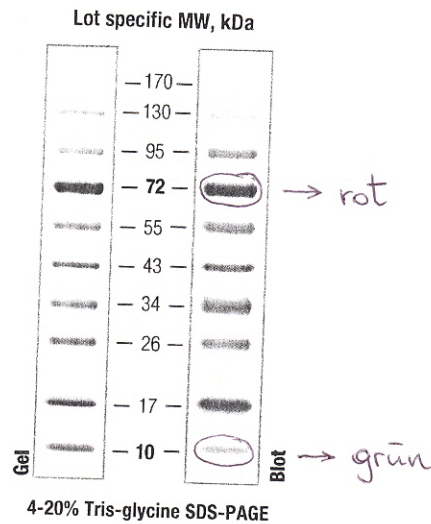
Lukas MACH und Georg SEIFERT

### Instruction for Use

- 1 Thaw the ladder at room temperature for a few minutes to dissolve precipitated solids. **DO NOT BOIL!**
- 2 Mix gently, but thoroughly, to ensure the solution is homogeneous.
- 3 Load the following volumes of the ladder on an SDS-polyacrylamide gel:
  - 5  $\mu$ l per well for mini gel,
  - 10  $\mu$ l per well for large gel.Use the same volumes for Western blotting.
- 4 After the run is complete, stain the gel or perform Western transfer procedure as desired.

### Note

- Each lot of the PageRuler™ Prestained Protein Ladder is calibrated against a precisely sized, PageRuler™ Unstained Protein Ladder and calculated apparent molecular weights are reported in the picture.
- For precise molecular weight determinations use PageRuler™ Unstained Protein Ladder, #SM0661, see [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com).
- In 8 or 10% gels low molecular weight proteins may migrate with the dye front.
- Loading volumes are intended for use in gels with a thickness of 0.75 mm. For thicker gels, the recommended loading volume should be increased.
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder could be used in Western blotting with all common membranes: PVDF, nylon and nitrocellulose.
- Longer transfer times or higher transfer voltages may be required for Western blotting of large (>100 kDa) proteins.



### IMPROVEMENT

Green 10 kDa reference band for easier orientation.

continued on back page

### RECOMMENDATIONS FOR USE

- Prepare GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus before loading as following:
  - 1 µl (0.5 µg) of GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus
  - 1 µl of 6x Loading Dye Solution
  - 4 µl of deionised water
- Vortex gently just prior to use.
- Do not heat before loading.
- Apply 0.1 µg (0.2 µl) of DNA Ladder per 1mm of agarose gel lane width.
- Following electrophoretic separation on agarose gel the DNA bands can be visualised by ethidium bromide staining.
- 1 µg of the GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus contains 102ng (10%) of the 500bp fragment.

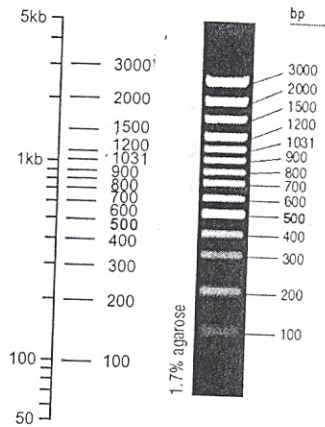
#### PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only. The product was not tested for use in diagnosis or for drug development, nor it is suitable for administration to humans or animals.

Updated March 11, 2000

### GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus

Fragment Sizes



### RECOMMENDATIONS FOR USE

- Vortex gently just prior to use.
- Do not heat before loading.
- Apply 0.1 µg (1 µl) of DNA Ladder per 1mm of agarose gel lane width.
- Following electrophoretic separation on agarose gel the DNA bands can be visualized by ethidium bromide staining.
- 1 µg of the GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, ready-to-use, contains ≈310ng (≈31%) of the 3000bp fragment.

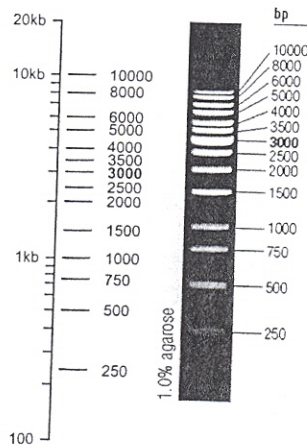
#### PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only. The product was not tested for use in diagnosis or for drug development, nor it is suitable for administration to humans or animals.

Updated March 11, 2000.

### GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, ready-to-use

Fragment Sizes



# ***ZEITPLAN FÜR ZELLBIOLOGISCHES PRAKTIKUM***

**MONTAG**

Zellkultur (1 h)  
Vorbesprechung (1 h)  
Proteinextraktion (2 h)  
Proteinbestimmung (2 h)

**DIENSTAG**

SDS-PAGE: Gele giessen (3 h)  
SDS-PAGE: Durchführung (2 h)  
Westernlot (2 h)  
Ponceau-Färbung

**MITTWOCH**

Zellkultur (2 h)  
RNA-Extraktion (2 h)  
RNA-Quantifizierung (1 h)  
Immunchemischer Nachweis (1. Teil)

**DONNERSTAG**

RNA-Elektrophorese (2 h)  
Reverse Transkription (3 h)  
PCR und DNA-Elektrophorese (2 h)  
Immunchemischer Nachweis (2. Teil)

**FREITAG**

Mikroskopie (2 h)