

Fachkurs der Experimentellen Biophysik/Zellbiophysik

Einführung in Methoden der tierischen Zellkultur

Betreut von:

Dr. Yinth Andrea Bernal Sierra

Dr. Shatanik Mukherjee

Rodrigo Gaston Fernandez Lahore

Tharsana Tharmalingam

Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Biologie

Experimentelle Biophysik

Invalidenstraße 42, D-10115 Berlin

Tel: +49-30-2093 8897

Fax: +49-30-2093 8585

e-mail: besieray@hu-berlin.de

Wichtige Telefonnummern

Frau Bernal Sierra	2093-8897
Herr Mukherjee	2093-8160
Herr Fernandez Lahore	2093-8349
Frau Tharmalingam	2093-8629
Zellkultorraum (Zelluläre Biophysik, EG)	2093-8889
Mikroskopieraum (Biophysik, EG)	2093-8866
Erste Hilfe, Rettungsstelle	
Polizei Notruf	110
Feuerwehr	112
Ersthelfer im Hause Prof. Dr. Andreas Herrmann Verbandskasten befindet sich im Raum 411	2093-8660
zuständige Sicherheitskraft Dr. Udo Hartmann (Unfallmeldung)	2019-5316
Rettungsstelle Charite	450 53 1000
Durchgangsarzt der Rettungsstelle: Prof. Dr. Müller	450 53 1139
Augenärztin Dr. med. Eßmann, Chausseestr. 17 Mo-Fr 9-12 Uhr Mo,Di,Do 16-18 Uhr bei schweren Augenverletzungen schonender Transport in das Virchow Klinikum Augustenburger Platz 13353 Berlin	282 89 34 4505-0
Hautärztin Dr. med. H. Simon, Gartenstr. 9	28 39 01 83
Betriebsarzt Herr Dr. Weigel Universitätsklinikum Charité, Schumannstr. 20/21, 10117 Berlin HNO Poliklinik der Charite	450-570105 450 555 072
Hausmeister Invalidenstr.42, Herr Phillip	2093-9001

Inhalt

Einführung in die Kultur tierischer Zellen

Sicherheitsratschläge, Ausrüstung, sterile Arbeitstechnik, Medien, permanente Zelllinien, Primärkulturen, Zellzahlbestimmung, Kontaminationen, Kryokonservierung

Protokolle

Auftauen von eingefrorenen Zellen

Einfrieren von Zellen

Subkultivierung von Zellen

Beobachtungen zur Zellzykluszeit

Einfluss unterschiedlicher Zellkulturbedingungen auf das Zellwachstum

Mykoplasmenachweis

Transfektion von tierischen Zellsystemen mit Nachweis des exogenen Proteins

Einführung in die Kultur tierischer Zellen

Gefahren

Frisches menschliches Gewebe oder Lymphozyten können HIV/Hepatitis B-Viren enthalten
Krankheitserregende Keime können durch Aerosole inkorporiert werden

Größtes Gefahrenpotential: Zellkulturen, die zur Untersuchung humanpathogener Organismen eingesetzt werden (HIV, Trypanosoma cruzi)

Gefährliche Medienzusätze:

12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) zur Differenzierungsinduktion

Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kryoschutz

Methanol für die Färbung mit DAPI

Sicherheitsratschläge

Laborkleidung, Schutzbrille, Handschuhe

Bei kontaminierten Spitzen, Klingen und Injektionsnadeln ist besondere Vorsicht geboten

Abfallgefäße mit 10prozentiger Hypochlorit-Lösung füllen

AUSRÜSTUNG

Autoklav

Sterilisierung von Medien und Geräten durch Wasserdampf für 15 min bei 121°C. Trockenschritt am Schluß, da sonst Wasser in den Glasgefäßen/Medien kondensieren kann.

Nicht autoklavierbar: Trypsin, Glutamin, aromatische Aminosäuren, Kulturmedien, Plastikartikel aus Polystyrol (außer Falcon-Tubes).

Bei Autoklavierung von Flaschen oder anderen geschlossenen Behältnissen Deckel leicht lösen.
Autoklavierband dokumentiert die gelungene Autoklavierung.

Sterilbank

Schutz der Zellkultur vor Kontamination, Schutz des Arbeitenden vor Zellkultur.

Das Gerät ca. 30 min vor der Benutzung einschalten und einlaufen lassen.

Je nach Sterilbanktyp entweder nicht über oder nicht hinter der Zellkultur arbeiten

Ansaugöffnungen frei halten

Möglichst wenige Gegenstände in den laminaren Luftstrom bringen

Säuberung durch 70% Alkohol

Regelmäßige Wartung, Filterwechsel!

Brutschrank

37°C, pH-Wert des Mediums 7,0-7,2

Puffersystem: HCO_3^- ins Medium zugesetzt, CO_2 Begasung durch Brutschrank (5 %)

Wasserreservoir mit großer Oberfläche, um hohe Luftfeuchtigkeit zu erzeugen

Wenn Brutschrank nicht begast wird, dann andere Puffer zusetzen (z.B. Hepes)

Deckel der Zellkulturen leicht öffnen, um Kohlendioxid-Einstrom zu ermöglichen.

Bei trockenen Brutschränken: Deckel zu!

Vorteil trockener Schränke: Weniger Kontamination, Nachteil: Arbeit mit Petrischalen nicht möglich.

Gebrauch der Zentrifugen

Enorme Belastung für die Zellen, daher

-nicht mehr als 5-10 min bei 150-200 g zentrifugieren

-ist Rotation beendet, Überstand dekantieren und die Zellen rasch suspendieren

Sterile Arbeitstechniken

Sterilbank sauberhalten! Oft mit 70% Alkohol reinigen.

Vorausschauend arbeiten, um die Zeit zu minimieren, die Kulturen außerhalb des Brutschranks verbringen.
Medium vorwärmen.

Bei erfolgreichen Anwendern der Zellkultur herrscht auch während der Arbeit Ordnung in der Sterilbank.
Daher: Kleinen Rollwagen oder Tisch neben der Sterilbank mit allem, was nicht ständig für die Zellkultur benötigt wird.

Immer im sterilen Bereich arbeiten.

Medien für die Zellkultur

Allen gemeinsam: isotonisches, gepuffertes Grundnährmedium mit anorganischen Salzen, energieliefernden Nährstoffen, Aminosäuren, Vitaminen. Bei Medien für adhaerierende Kultur ist ein hoher Anteil an Calcium- und Magnesiumionen, weil diese mit den Adhäsionsproteinen auf der Zelloberfläche in Wechselwirkung treten und so die Anheftung der Zellen erst ermöglichen.

BME (Eagles Basalmedium)
für adhaerierende, d.h. in einem Monolayer wachsende Zellen
daraus entwickelt wurden:

DMEM (Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium)
mit höherem Gehalt an Vitaminen und Aminosäuren, auch für adhaerierende Monolayer

MEM (Minimal Essential Medium)
für primäre Säugerzelllinien

RPMI (Roswell Park Memorial Intitute)
häufig für Suspensionskulturen eingesetzt

Puffersysteme

CO₂/Bicarbonatsystem

Bicarbonat wird in einem Konzentrationsbereich von 4 bis 44 mM in Zellkulturmedien angewendet. Die Kohlensäure - und ihr korrespondierendes Mono-Natriumsalz (Natriumbicarbonat) ist als schwache Säure (pKa bei 37°C = 6,31) ein ideales Puffersystem in tierischen Organismen.

In Zellkulturmedien, die nicht mit Puffersubstanzen wie HEPES gepuffert sind, sondern mit Natriumbicarbonat, hängt der pH-Wert sehr wesentlich von der Kohlendioxid-Konzentration in der Umgebungsluft ab. Eine Erhöhung der CO₂-Konzentration oder eine Reduzierung des Bicarbonatgehaltes führen zu einer Senkung des pH-Wertes. Damit kann man in offenen Kulturbehältern den pH-Wert im Medium über die CO₂-Konzentration in der Umgebungsluft steuern. Die sich aus bestimmten NaHCO₃⁻ und CO₂-Konzentrationen ergebenden pH-Werte können entweder mit der sogenannten Henderson-Hasselbach-Gleichung berechnet oder, viel einfacher, aus einem Nomogramm direkt abgelesen werden. Diese Angaben gelten für pH 7,4. Sollen die Zellen bei anderen pH-Werten gehalten werden, muß der CO₂-Wert entsprechend geändert werden.

HEPES

Im Gegensatz dazu ist HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) keine flüchtige Puffersubstanz, so daß HEPES-gepufferte Kulturmedien an der Luft nicht alkalisch werden. Allerdings kann die Anwendungs- konzentration wegen einer gewissen Zelltoxizität nicht über 28 mM erhöht werden. HEPES und ähnliche organische Puffer stellen isoionische Ampholyte (amphotere Elektrolyte) dar, die in ihrem Aufbau sowohl eine schwach saure wie eine schwach basische Gruppe aufweisen.

Farbindikator

Phenolrot hat weiten Umschlagbereich von pH 6.4 bis pH 8.2; Farbumschlag von gelb (sauer) nach rot (alkalisch).

Den käuflichen Basalmedien wird zugesetzt:

Glutamin

Kohlenstoffquelle, Energielieferant und Ausgangsstoff für die Biosynthese von Biomolekülen und Proteinen

Serum (meistens FKS = Fetales Kälberserum ; in speziellen Fällen Pferdeserum)

verschiedenste wachstumsfördernde Substanzen wie Hormone, Polypeptide, Lipide, Spurenelemente,

Inaktivieren von Serum: Für die Verwendung von Serum zur Kultivierung besonders empfindlicher oder besonders wertvoller Zelllinien ist es eventuell notwendig, zur Inaktivierung bestimmter Bestandteile des Komplementsystems eine Wärmebehandlung durch Inkubation bei 56°C für ca. 30 min. durchzuführen.

Antibiotika

Gentamycin, Streptomycin, Penicillin

Die verschiedenen Arten etablierter Zelllinien

adhaerente, d.h. in Monolayern wachsende Zellen

Leiten sich von bestimmten Geweben oder Organen ab (Leber, Niere, Nerven, Muskulatur) und sind auch im intakten Organismus nicht beweglich

nichtadhaerente, die man als Suspensionen kultiviert

Leiten sich von Zellen des Immunsystems oder deren Vorläufern ab. In vivo zirkulieren diese Zellen im Blutstrom und neigen nicht dazu, sich an Substraten anzuheften.

Unabhängig davon, ob es sich um adhaerente oder nichtadhaerente Zellen handelt, bezeichnet man Zellen als primär (finit), transformiert oder immortalisiert.

Primärzellen sind Zellen, die erst kurz zuvor aus dem Gewebe oder Organ isoliert wurden und unter Kulturbedingungen nur eine begrenzte Lebenserwartung besitzen

Transformierte Zellen sind unsterblich. Sie stammen entweder von Tumorzellen ab, oder sie wurden durch künstliche Manipulation (Transfektion mit Onkogen, oder Behandlung durch Carcinogene) von "normalen" Zellen erzeugt und somit transformiert.

Transformierter Phänotyp: Adhaerente Zellen wachsen ohne Substratkontakt, Wachstum ohne Wachstumsfaktoren, Bildung von Kolonien in immunsupprimierten Mäusen.

Immortalisierte Zellen müssen nicht bösartig transformiert sein. Meistens sind sie nur derartig verändert, daß spontan aus einer Primärzelllinie eine permanent wachsende entsteht.

Kontaminationen

Wichtig: Korrekte Identifizierung der Kontamination, um Ursache abzustellen.

Bakterien: Runde oder stäbchenförmige Partikel, die eine der Brownschen Molekularbewegung ähnliche Aktivität zeigen. Später Gelbfärbung und Trübung des Mediums.

Pilze: Lange Hyphen. Watteähnliche Erscheinung.

Pilzsporen verbreiten sich durch die Luft.

Hefen: Größer als Bakterien, charakteristisches Aussehen durch Knospung.

Mycoplasmen: vermehren sich intrazellulär, Vakuolisierung, Wachstumsverhalten verändert.

Beseitigung der Kontamination

Entsprechende Kultur entfernen, bei Supergau: Desinfektion mit Formaldehyd

Zellkultur-Kurs vom 17.04.2018- 27.04.2018

2 Gruppen: A
B

1.Tag, Di		17.04.2018	
10:00-13:30		Gruppe A+B	
		Seminar: Grundlagen der Zellkultur Einweisung ins Labor, Arbeitsschutz (Praktikumsraum EG)	
14:00-18:00		Gruppe A+B	
		Praktische Einführung in die Zellkultur (Zellkulturraum EG)	
2.Tag, Mi		18.04.2018	
10:00-13:30	Arbeit in Gruppen	Gruppe A	Gruppe B
		Ansetzen von Zellen in Multiwellplatten für Proteinmessungsversuch (Zellkulturraum EG)	Ansetzen des Proliferationsversuchs: Flaschen ansetzen für das Einfrieren von Zellen (Zellkulturraum EG)
14:00-18:00	Tausch der Gruppen	Gruppe A	Gruppe B
		Ansetzen des Proliferationsversuchs: Flaschen ansetzen für das Einfrieren von Zellen (Zellkulturraum EG)	Ansetzen von Zellen in Multiwellplatten für Proteinmessungsversuch (Zellkulturraum EG)
3.Tag, Do		19. 04.2018	
10:00-13:30	Arbeit in Gruppen	Gruppe A	Gruppe B
		Proteinmessung am Reader (Praktikumsraum, EG)	Proliferationsversuch: Zellzahlbestimmung Mitose-Index (Zellkulturraum EG)
		Proben für den Mating-Assay ansetzen	
14:00-18:00	Tausch der Gruppen	Gruppe A	Gruppe B
		Proliferationsversuch: Zellzahlbestimmung Mitose-Index (Zellkulturraum EG)	Proteinmessung am Reader (Praktikumsraum, EG)
4. Tag, Fr		20.04.2018	
10:00-13:30		Gruppe A+B	
		Einfrieren von Zellen Proliferationsversuch: Zellzahlbestimmung, Mitose-Index	
14:00-16:00		Gruppe A+B	
		Mating-Assay und Auswertung am Flowcytometer	

5. Tag, Di	24.04.2018	
10:00-13:30		Gruppe A+B Seminar Transfektion von HEK-Zellen Vorbereitung SDS-PAGE/Blot (Zellkulturraum EG, Praktikumsraum EG)
14:00-18:00		Gruppe A+B Proliferationsversuch: Zellzahlbestimmung Mitose-Index (Zellkulturraum EG)
6. Tag, Mit	25.04.2018	
10:00-13:30		Gruppe A+B Passagieren transfizierter HEK-Zellen Zellen auftauen (Zellkulturraum EG, Praktikumsraum)
14:00-18:00		Gruppe A+ B DAPI – und Vybrantfärbung Mikroskopie (Zellkulturraum EG)
7. Tag, Do	26.04.2018	
10:00-13:30		Gruppe A+B Zellernte für SDS-PAGE SDS-PAGE Westernblot (Praktikumsraum EG)
14:00-18:00		Gruppe A+B Fluoreszenzmikroskopie transfizierter HEK-Zellen Proliferationsversuch Zellzahlbestimmung aufgetaueter Zellen (Praktikumsraum EG, 4. OG)
8. Tag, Fr	27.04.2018	
10:00-13:30		Gruppe A + B Transfizierte HEK-Zellen: Auswertung am Multiwellreader Westernblot (Praktikumsraum, EG)
14:00-16:00		Gruppe A + B Abschlussbesprechung und Vortrag (Praktikumsraum EG)

Präsentation: der Ergebnisse in Form eines Vortrags.
Termin erfolgt nach Absprache (Vorschlag: letzter Praktikumstag).

Protokolle: sind bis zum 16.05.2018 zu folgenden Versuchen abzugeben:

- 1. Proliferation und Zellzyklus (Versuch 1)
- 2. Transfektion von tierischen Zellen (Versuch 4)

Einfrieren von Zellen

(Tharsana Tharmalingam)

In vielen Bereichen der biologischen und medizinischen Forschung besteht Bedarf an tiefkühlkonservierten Zellen. Bei Temperaturen von -80°C bis -196°C kommen die Stoffwechselfvorgänge der Zelle praktisch zum Stillstand, so dass eine Langzeitlagerung bei Erhalt der Vitalität möglich ist. Dafür ist aber die genaue Kenntnis von Zellschädigungsmechanismen (osmotische Effekte, intrazelluläre Eisbildung) beim Einfrieren erforderlich. Eine isotone Salzlösung zum Beispiel bildet bei Abkühlung Eis in der Lösung, wobei das gelöste Salz nicht in die Eiskristalle eingebaut wird. Das führt zu einem Anstieg der Salzkonzentration vor den Eiskristallen außerhalb der Zelle. Dieser Konzentrationsgradient führt zu einer Schrumpfung der Zellen, weil Wasser aus der Zelle ausströmt. Da die Permeabilität der Zellmembran für Wasser begrenzt ist, hängt das Ausmaß der Zellschrumpfung vom zeitlichen Verlauf der Abkühlung ab. Bei zu langsamer Abkühlung führt starke Zellschrumpfung zu einem zellschädigenden Anstieg der Salzkonzentration im Inneren der Zelle, bei zu schneller Abkühlung bleibt zu wenig Zeit für eine osmotische Wasserabgabe. Außerdem besteht durch den hohen intrazellulären Wasseranteil die Gefahr, dass intrazellulär zellschädigendes Eis gebildet wird. Die optimalen Abkühlungsraten können bei unterschiedlichen Zellarten variieren, weil die Membranpermeabilität für Wasser zellartsspezifisch ist. Um dieses Problem zu umgehen und um zu maximalen Überlebensraten zu kommen, werden bei allen Kryokonservierungsmethoden Kryoprotektive (cryoprotective agents, CPA) zugegeben. Diese dringen aufgrund ihrer geringen Molekülgröße in die Zellen ein, ersetzen einen Teil des intrazellulären Wassers und bewirken außerdem eine Gefrierpunktniedrigung der Lösung. Auf diese Weise wird eine hohe Salzkonzentration erst bei tieferen Temperaturen erreicht und die Zellschrumpfung verringert.

Die Zelldichte in der Lösung hat ebenfalls einen Einfluß auf die Überlebensrate der Zellen, weil dadurch maßgeblich Zell-Zell- und Zell-Eis-Wechselwirkungen beeinflusst werden.

Material:

- Isoliergefäß mit Eis, oder eine Einfrierbox für Cryoröhrchen, die langsames schrittweises Abkühlen von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. gewährleistet
- beschriftete Kryoröhrchen
- Medium
- FKS
- DMSO

Durchführung:

- Herstellung des Gefriermediums: 70% Voll- Medium, 10% DMSO, 20% FKS
- Medium von den Zellen entfernen
- trypsinieren, 5 min. bei 37°C
- Reaktion durch Zugabe von Medium beenden
- Zellzahl bestimmen und Volumen berechnen, das 2×10^6 oder 1×10^7 Zellen/ml entspricht
- zentrifugieren - ca. 500 rpm, 3 min.
- Überstand abziehen
- berechnetes Volumen Einfriermedium hinzufügen
- in Portionen von 1,8 ml in Kryoröhrchen überführen und diese 5 -10 min später in die vorgekühlte Einfrierbox stellen über Nacht bei -20°C lagern
- danach können die Zellen in -80°C überführt werden - dort sind sie ca. 6 Monate haltbar, oder nach weiteren 24 h in flüssigem Stickstoff lagern.

Auftauen von eingefrorenen Zellen

(Tharsana Tharmalingam)

Zum Einfrieren von Zellen wird allgemein ein spezielles Gefriermedium verwendet, das eine kryoprotektive Substanz enthält. Vielfach wird dazu DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet, das besonders bei höheren Temperaturen eine zellschädigende Wirkung hat. Das bedeutet, dass diese Substanz nach dem Auftauen so schnell wie möglich entfernt werden muss.

Material:

- Wasserbad 37°C
- 1 neue Kulturflasche mit vorgewärmtem Medium im Brutschrank
- 1 Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Medium - Wasserbad 37°C

Durchführung

- Kryoröhrchen mit Zellen in das Wasserbad halten, bis kein Eis mehr zu sehen ist
- sofort unter der Laminarbox in das Zentrifugenröhrchen überführen, 5 min bei 550U/min zentrifugieren, Überstand verwerfen
- zum Zell-Pellet 5ml neues Medium geben und mit der Pipette vorsichtig Zellen und Medium mischen
- in die vorgewärmte Zellkulturflasche überführen
- unbedingt am nächsten Tag Mediumwechsel durchführen, um restliches DMSO zu entfernen

Subkultivierung von Zellen

(Tharsana Tharmalingam)

Wenn eine Monolayerkultur die zur Verfügung stehende Fläche der Zellkulturflasche vollständig bewachsen hat (konfluent ist), dann stellen adhärente Zellen das Wachstum ein (Kontaktinhibition). Tumorzellen und transformierte Zellen können zwar unter diesen Bedingungen noch wachsen, zeigen aber auch eine stark verminderte Proliferationsrate. Außerdem wird bei einer zu hohen Zelldichte das Medium zu schnell verbraucht. Das kann zum Absterben der Kultur führen. Deshalb ist es notwendig, die Zellzahl durch Umsetzen in ein neues Kulturgefäß zu reduzieren. Dabei empfiehlt es sich, im Interesse von möglichst reproduzierbaren Versuchsergebnissen, einen regelmäßigen Rhythmus einzuhalten und immer gleiche Zellzahlen beim Umsetzen zu verwenden. Bei den von uns verwendeten Zellen hat sich ein Passage-Rhythmus von 4 Tagen bewährt, wobei jeweils am 2. Tag nach Subkultivierung ein Mediumwechsel durchgeführt wird.

Material:

- Medium (500 ml Medium, 50ml FKS, 5 ml Penicillin/Streptomycin)
- PBS
- TrypLE-Lösung
- sterile Abfallflasche, sterile Pipetten

Durchführung:

- die Laminarbox ca. 30 min. vor Beginn anschalten und die Arbeitsfläche mit 70% Isopropanol reinigen
- Medium, PBS und TrypLE-Lsg. im Wasserbad auf 37°C erwärmen
- in der Zwischenzeit die vorhandene Zellkultur im Mikroskop begutachten (Sterilität, Zustand der Zellen, Farbe des Mediums)
- unter der Laminarbox das alte Medium abziehen
- 1 x mit PBS gut spülen
- 0,3 ml TrypLE- zugeben und gut in der Zellkulturflasche verteilen, nach 30sec. wieder abnehmen
- danach im Mikroskop die vollständige Ablösung der Zellen von der Unterlage kontrollieren
- unter der Laminarbox die Zellen mit 8ml Vollmedium mit einer Pipette von dem Boden T25-Flasche lösen, durch mehrmaliges Auf- und Abziehen gut vereinzeln (Luftblasen vermeiden!)
- Zellzahl bestimmen
- 2×10^5 Zellen/ml in eine neue Kulturflasche einbringen (Gesamtmenge: 5 ml)
- Beschriftung: Datum und Passagenanzahl (d.h. wie oft umgesetzt)
- die neue Zellkultur in den Brutschrank stellen, 37°C, 5% CO₂

Versuch 1: Einfluss unterschiedlicher Zellkulturbedingungen auf das Zellwachstum / Proliferationsversuch mit HEK-Zellen

(Tharsana Tharmalingam)

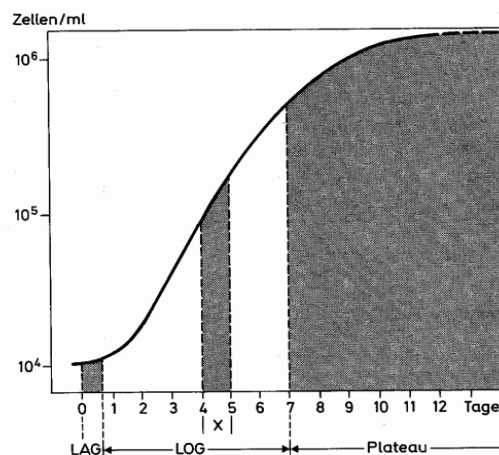
Ziel des Versuches:

Entscheidend für das Wachstum von Zellen in Zellkulturen sind optimales Medium, regelmäßiger Mediumwechsel, optimale Temperatur und ausreichende Versorgung mit CO₂ und Sauerstoff. Für die bei diesem Versuch zu verwendenden HEK-Zellen hat sich DMEM-Medium als erfolgreich erwiesen. Diesem Medium zugesetzt werden müssen noch Fetales Kälberserum (FKS), Amphotericin und Penicillin/Streptomycin. Letztere zur Vermeidung von Kontaminationen und FKS als wichtiger metabolischer Bestandteil des Mediums. Es liefert z.B. Hormone, Bindungsproteine und Adhäsionsfaktoren, zahlreiche wichtige Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente sowie Puffer- und Neutralisationssysteme.

Säugetierzellen reagieren darüber hinaus empfindlich auf Veränderungen der Temperatur. Die optimale Temperatur beträgt zwischen 37°C und 38.5°C, bei einem Temperaturanstieg auf 45°C sterben die Zellen innerhalb einer Stunde, bei Verringerung der Temperatur werden Stoffwechselprozesse verlangsamt. Die hier verwendeten Zellen werden bei 37°C kultiviert. Ebenfalls von großer Bedeutung für die Zellen ist der pH-Wert, der bei Säugetierzellen zwischen pH 6,6 und 7,8 liegen sollte. Um einen möglichst gleichbleibenden pH-Wert während der Zellkulturdauer zu gewährleisten, muß das Medium regelmäßig ausgetauscht werden, um Stoffwechselprodukte der Zelle, die den pH-Wert verändern könnten, zu entfernen.

Kohlendioxid ist für das längere Überleben von Zellen in Kultur notwendig. Es ist für die Atmung der Zellen erforderlich. Bei diesem Versuch soll die Wachstumskinetik der Zellen mit normalen und mit verringertem Gehalt an FKS und mit und ohne CO₂ beobachtet und miteinander verglichen werden. Die Wachstumsgeschwindigkeit kultivierter Zellen kann in Abhängigkeit von den Zellkulturbedingungen, aber auch bedingt durch häufiges Passagieren der Zellen variieren. Im Prinzip verläuft jedoch die Wachstumskinetik so, wie sie auch von Bakterien- oder Hefezellen bekannt ist. Nimmt man Zellen von einer „ruhenden Kultur“ (das kann z.B. auch das Passagieren und Verdünnen einer konfluenten Kultur sein (konfluent = dichter Zellrasen)), dann stellt man zunächst eine „Verzögerungsphase“ (lag phase) fest. Diese kann Zeiträume von Stunden bis hin zu mehreren Tagen umfassen. Das dann einsetzende Wachstum verläuft mit einer Zellverdopplungszeit von 15-30 Stunden (logarithmische Phase = log phase) bei schnell wachsenden Zellen und erreicht bei zunehmender Zelldichte (Konfluenz) ein Plateau.

Unter der Populationsverdopplungszeit versteht man die Zeitspanne, in der sich eine Zellpopulation während der logarithmischen Wachstumsphase von z. B. 1×10^6 auf 2×10^6 vermehrt.



Material:

- 1 Zellkulturflasche T25 mit Zellen
- Medium mit verschiedenem Gehalt an FKS, TrypLE, PBS
- Zählkammer
- Abfallflasche

Durchführung:

- je Variante A-D werden 5 Flaschen angesetzt = 20 Flaschen, weil an 5 Tagen die Zellen ausgezählt werden sollen (1. Woche: Donnerstag und Freitag; 2. Woche: Montag, Dienstag und Donnerstag)
- **Bitte setzen Sie von den restlichen Zellen eine zusätzliche Flasche für den Einfrierversuch an!**
- in die Flaschen wird das Medium mit dem variierten Gehalt an FKS vorgelegt
- pro T25 Flasche 2×10^5 Zellen einsäen - Volumen pro Flasche = 5ml
- die Variante ohne CO₂ wird mit Parafilm verschlossen
- an 5 Tagen werden die Zellen abtrypsiniert und ausgezählt
- dabei ist die Gesamtzellzahl und die Anzahl der toten Zellen (Trypanblaufärbung) zu bestimmen

Versuchsvarianten

	A	B	C	D
	mit 10%FKS mit CO ₂ Referenz	mit 10%FKS ohne CO ₂	mit 5%FKS mit CO ₂	mit 1%FKS mit CO ₂
Mittwoch	Für jede Variante werden 5 Flaschen angesetzt			

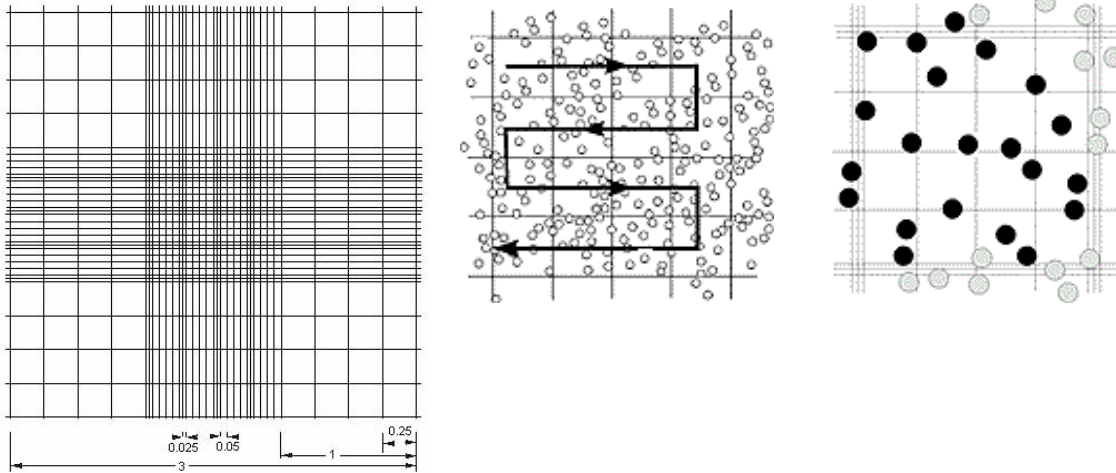
- Stellen Sie die Wachstumskurven grafisch dar, stellen Sie den Anteil der toten Zellen im Untersuchungszeitraum dar.
- Vergleichen Sie, wie sich die verschiedenen Bedingungen auf das Wachstum und die die Vitalität der Kulturen ausgewirkt haben

Zellzahlbestimmung

1. Neubauerzählkammer

- zunächst die Kammer mit 70%igem Alkohol gut reinigen
- das Deckglas, nachdem es ebenfalls gereinigt wurde auf die Zählkammer legen
- sogenannte „Newton'sche Ringe“ (in Regenbogenfarben) zeigen an, dass das Deckglas richtig positioniert ist
- eine Pipette mit einigen Tropfen Zellsuspension an die Kante der Zählkammer anlegen und diese auf diese Weise füllen - Kapillarkräfte saugen dabei die Suspension auch in die Zwischenräume zwischen Deckglas und Kammer (nicht zu viel Suspension einfüllen)

- die Zählkammer unter ein inverses Mikroskop legen und die Einteilungslinien (s.o.) suchen
- wichtig sind die 4 großen Eckquadrate, die ihrerseits noch einmal in je 16 kleine Quadrate unterteilt sind
- die großen Quadrate haben bei einer Fläche von 1 mm² und einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1µl
- nun systematisch alle Zellen, die sich in den 4 großen Eckquadraten befinden, zählen, wobei darauf zu achten ist, dass keine Zellen doppelt gezählt werden
- Berechnung der Zellzahl: der Mittelwert der Zellzahlen aus den 4 großen Eckquadraten mit 10 000 multipliziert ergibt die Zellzahl pro ml



Quellen: <http://www.mta-labor.info/fachbereiche/hama/methoden/neubauer.php> (Übersichtsbild),
<http://www.lo-laboroptik.de/deutsch/info/info.html> (Zähltheorie)

2. Trypanblau-Färbung – Lebende Zellen

Arbeitsanleitung:

- von den adhärennten Zellen wird das Medium (5ml) entfernt, da auch dort schon Zellen enthalten sind, wird das Medium in einem Falcontube aufgefangen.
- Die adhärennten Zellen werden mit 1x PBS (3ml) gewaschen, dann mit 0,3ml TrypLE abgelöst und anschließend in 5ml PBS aufgenommen und in das Falcontube überführt.

Zentrifugieren bei 500U/min, 3min

- Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet anfangs in 0,5 ml, bei höhere Zelldichte später in 1ml, 2ml oder 3 ml PBS resuspendiert
- davon werden 200µl entnommen und mit 200µl Trypanblaulösung gemischt
- die gefärbten Zellen werden zur Bestimmung der Zellzahl in die Neubauer-Zählkammer gebracht
- die toten Zellen erscheinen blau (Farbstoff dringt die nicht intakte Zellwand ein), lebende Zellen bleiben ungefärbt

ACHTUNG: Werden Zellen über einen längeren Zeitraum Trypanblau ausgesetzt, kann der Farbstoff auch in lebende Zellen eindringen. (Dies kann nach 7-10min der Fall sein)

3. Zellzählung mit LUNA-Zellmessgerät

- 20µl Zellsuspension werden mit 20µl 0,4%-iger Trypanblaulösung versetzt und sofort auf die LUNA-Zählkammer aufgetragen (10-14µl)
- Diese Zählkammer wird in das LUNA-Gerät seitlich eingesteckt und die Zellzahl (lebend und tote) wird automatisch bestimmt und angezeigt

FACS-Mating Assay an *Saccharomyces cerevisiae*

(Shatanik Mukherjee, Gabi Schneider)

Ziel des Versuchs: Es soll das Mating haploider Hefestämme mittels FACS-Analyse (Fluorescence-activated cell sorting) verfolgt werden.

Saccharomyces cerevisiae wird taxonomisch der Klasse der Ascomycetes zugeordnet. Pilze dieser Klasse sind zu einem heterophasischen Generationswechsel befähigt. Im vegetativen Zustand vermehrt sich die Hefezelle asexuell durch Sprossung (Abb.1A). Gegen Ende der G1-Phase bildet sich an der sogenannten „Mutterzelle“ ein Auswuchs, die Knospe. Während die Mutterzelle relativ konstant in ihrer Größe bleibt, vergrößert sich die Knospe, bis sie am Ende der M-Phase annähernd die Größe der Mutterzelle erreicht und sich dann als „Tochterzelle“ abschnürt. Jede Zellteilung hinterlässt in der Zellwand der Mutter eine Bildungsnarbe, während an der Tochterzelle eine Entstehungsnarbe zurückbleibt. Nach 32 Teilungen ist die Hefezelle nicht mehr weiter teilungsfähig. In der Natur kommt Hefe überwiegend in der diploiden Lebensphase vor.

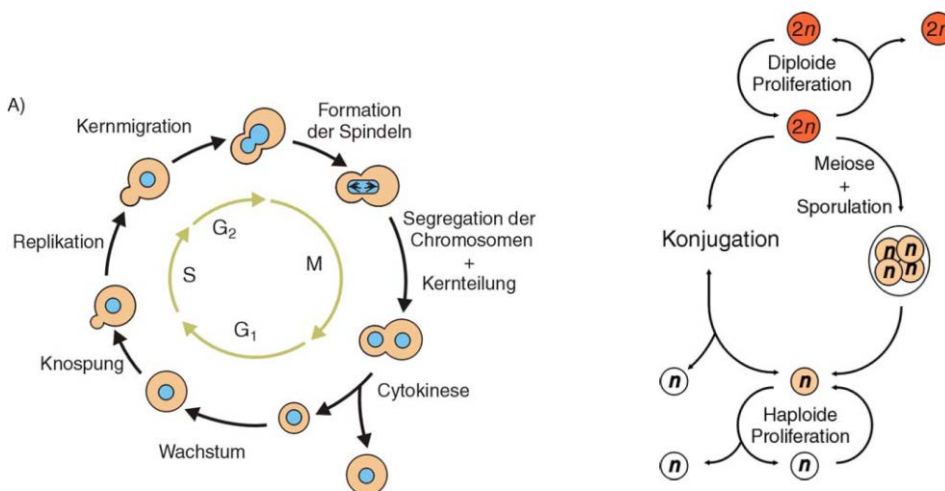


Abb. 1 A: Zellzyklus von *S. cerevisiae*. **B:** Lebenszyklus von *S. cerevisiae*.

Nahrungsmangel löst die Sporulation diploider Zellen aus. Hierbei durchläuft die Zelle eine Meiose (Abb.1B). Es entsteht eine Tetrade, die aus 4 haploiden Ascosporen besteht, je zwei vom Paarungstyp a und zwei vom Paarungstyp α . Nachdem der Ascus aufgebrochen ist, werden die haploiden Sporen freigesetzt. Sofern ausreichend Nahrung vorhanden ist, bilden die Sporen haploide Zellen, die sich dann vegetativ durch Knospung vermehren oder geschlechtlich miteinander konjugieren. Jede der beiden haploiden Zellen sezerniert ein spezifisches Pheromon, das an einen an der Zelloberfläche befindlichen Rezeptor des entgegengesetzten Paarungstyps bindet. Die Bindung löst eine Signalkaskade aus, die zur Fusion der beiden Zellen führt. Die diploide Zygote (a/α) ist dann in der Lage sich vegetativ durch Sprossung zu vermehren.

Nach Abknospung der Tochterzelle kann eine haploide Wildtyp-Hefezelle ihren Paarungstyp wechseln und ist dann in der Lage, sich mit Hefezellen des gegensätzlichen Paarungstyps zu paaren. Verursacht wird dies durch die asymmetrische Aktivierung der am Vorgang des **Paarungstypwechsels** beteiligten *HO*-Endonuklease. Am Paarungstypwechsel sind drei genetische Loci auf dem Hefe-chromosom III direkt beteiligt. Diese sind zum einen der exprimierte „Mating Type“ (*MAT*)-Locus und zum anderen die zwei stillen Loci *HML* und *HMR* (homothallische mating-type-Kopie links bzw. rechts). Es gibt zwei verschiedene Allele a und α . Haploide Zellen besitzen jeweils nur

ein Paarungs-typ-Allel (a oder α), wohingegen die diploide Zygote beide besitzt (a/ α). Die „mating-type“-Gene codieren für Proteine, die den Zellen Eigenschaften entweder des a oder α -Phänotypen verleihen. Zudem werden in beiden Zelltypen noch haploid-spezifische Gene exprimiert (Haber 1998). Der *Mat*-Locus ist außerdem in diploiden Zellen für die Regulation von sporulations-spezifischen Genen verantwortlich. Die vom *MAT*-Locus in α -Zellen exprimierten Gene α 1p und α 2p regulieren gemeinsam mit dem allgemeinen Transkriptionsfaktor Mcm1p eine Reihe von α -spezifischen Genen (Shore and Sharrocks 1995). Das Heterodimer α 1p/Mcm1p aktiviert α -spezifische Gene, während α 2p zusammen mit Mcm1p als Transkriptionsrepressor a-spezifischer Gene fungiert (Wolberger 1998). In Zellen des Paarungstyps a fehlen die beiden Faktoren α 1p und α 2p, weshalb es nicht zur Expression α -spezifischer Gene kommt. Ohne seinen Partner α 2p aktiviert Mcm1p in diesem Fall a-spezifische Gene (Goutte and Johnson 1988). Für den Transkriptionsfaktor α 1p konnte bislang nur eine Funktion in diploiden Zellen nachgewiesen werden. Gemeinsam mit α 2p inaktiviert er haploid-spezifische Gene (Li, Stark et al. 1995; Li, Jin et al. 1998).

Eine normale haploide Hefezelle wechselt in jeder Generation ihren Paarungstyp. Während des Paarungstypwechsels wird die DNA des aktiven *MAT*-Locus ersetzt. Der Sequenzwechsel erfolgt über direkte **Genkonversion**. Dabei werden beide DNA-Stränge am *MAT*-Locus sequenzspezifisch von der *HO*-Endonuclease geschnitten. Die Schnittenden paaren dann mit der DNA von *HMR* oder *HML* mit der entgegengesetzten Paarungstypinformation. Es handelt sich hierbei um stille Kopien des *MAT*-Locus, die durch die Proteine Sir1p-Sir4p (Silent information regulator) reprimiert werden und aus inaktivem, hypoacetylierten Heterochromatin bestehen.

Aufgrund einer Punktmutation im *HO*-Gen fehlt Laborstämmen die Fähigkeit zum Paarungstypwechsel. Sie werden als **heterothallisch** bezeichnet. Ein nicht funktionelles *HO* Allel führt zu der erwünschten stabilen haploiden Lebensphase, die genetische Manipulationen vereinfacht.

Durchführung:

Sie erhalten zwei haploide Hefestämme, die jeweils ein Fluoreszenzlabel tragen:

- **EKY119: MAT α** can1 Δ ::STE2pr-SpHIS5 lyp1 Δ ::STE3pr-LEU2 his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 ho Δ 0::TDH3pr-mCherry-NATMX4(Marker: **mCherry** unter pTDH3 Promotor)
- **EKY190: MATa** leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 (RPL9A-GFP::HIS3) (Marker: Rpl9a mit **GFP** Tag)

Beide Stämme werden in 10 ml SD Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Am nächsten Tag werden die Kulturen auf OD600= 0,4 verdünnt und noch ca. 1h geschüttelt, damit die stationären Kulturen sich wieder in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, da Hefezellen nur in der G1 Phase maten können.

Ansetzen des Mating Mix:

Jeweils 5 mL der Kulturen werden 1:1 gemischt und ohne Schütteln bei 30°C inkubiert. Schütteln verringert die Zellfusion erheblich. Nach 0 min, 10 min, 30 min, 1h, 1,5h und 3h werden 500 μ l Proben entnommen und bis zur FACS Messung auf Eis gelagert.

FACS Messung:

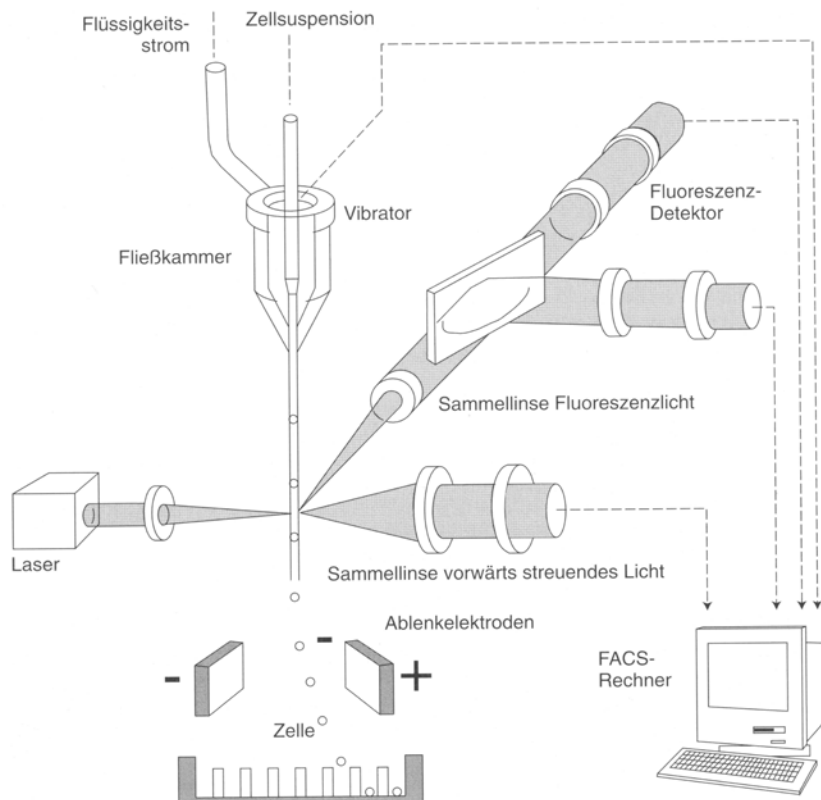
Die Reinkulturen sowie die Zeitproben werden mit 500 μ l PBS verdünnt, kräftig gevortexed und im FACS analysiert. Es werden jeweils 10000 Zellen gemessen.

Auswertung:

- Bestimmen Sie die Matingraten (%) der Kulturen und stellen Sie sie grafisch dar
- Stimmt das Ergebnis mit Ihren Erwartungen überein? Erstellen Sie eine Fehleranalyse.

Durchflusscytometrie

Das universelle Messprinzip der Durchflusscytometrie ist für die Beantwortung vieler qualitativ und quantitativ ausgerichteter Fragestellungen in der Zellbiologie und biomedizinischen Forschung geeignet. Nicht nur in der Grundlagenforschung, sondern auch in der Routinediagnostik hat sich die Durchflusscytometrie durch die Verwendung monoklonaler Antikörper z.B. in der Diagnostik peripherer Blutzellen oder in der Tumordiagnostik durchgesetzt.



Das Prinzip der Durchflusscytometrie beruht darauf, dass eine Zellsuspension durch ein Schlauchsystem in einen Messkopf gepresst wird, der eine oder zwei Öffnungen zwischen 50 – 100 μm besitzt. Die Zellen werden in dem laminaren Flüssigkeitsstrom so geführt, dass nur jeweils eine Zelle die Öffnungen passieren kann. In der Mitte des Flüssigkeitsstroms wird ein Laserstrahl fokussiert, der auf beim Auftreffen auf eine Zelle kleinwinklig (forward angle light scatter FALS) oder großwinklig (wide angle light scatter WALS) abgelenkt wird und dabei Fluoreszenz- oder Lumineszenzerscheinungen aktiviert. Nachgeschaltete Ablenkelektroden ermöglichen zudem eine Sortierung von Zellen nach unterschiedlichen Eigenschaften. Durch die Vibration des Durchflusskopfes wird der Flüssigkeitsstrom so zerlegt, dass jeweils ein Tropfen eine Zelle enthält. Das Lichtsignal, das durch den Laser induziert wurde, führt zur Aufladung des Tropfens, der dann

abgelenkt werden kann.

Parameter, die ermittelt werden können, sind u.a.:

- Größe, Volumen und Struktur von Zellen
- Rezeptorbindungen
- Quantitative DNA- und Protein-Messungen der lebenden Zelle
- Stadien der Proliferation
- Kinetik des Zellzyklus
- Klonierung von Zellen
- Messung und Sortierung von Chromosomen
- Mitochondriale Aktivitäten

Versuch 2: Mycoplasmenkontamination

(Tharsana Tharmalingam)

Mycoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryoten. Sie sind in ihrer Form variabel, wobei ihre Größe zwischen 0.22 – 2 µm schwankt. Damit können sie die üblichen Sterilisationsfilter aus Cellulose- und Polyvinylderivaten passieren, deren Porengröße um 0.2 µm liegt. Neuere anorganische Filtermembranen mit Porengrößen um 0.1 µm machen eine sichere Mycoplasmenabtrennung möglich.

Kontaminationen von Zellkulturen mit Mycoplasmen sind häufig, lang andauernd und meist schwierig zu behandeln. Da sie nicht immer dramatische Effekte hervorrufen, können sie lange unentdeckt bleiben, obwohl sie vielfältig in den Stoffwechsel der befallenen Zellen eingreifen.

Nachweismethoden

Anfärben der Mycoplasmen-DNA mit DAPI

Am schnellsten kann eine Mycoplasmenkontamination durch das Anfärben mit dem DNA-bindenden Fluorochrom DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid) festgestellt werden. Mycoplasmen erscheinen als gleichmäßig geformte, kleine, hell leuchtende Punkte oder Ansammlungen von Punkten. Kerntrümmer zerfallender Zellen sowie Pilze und Bakterien sind wesentlich größer und anders geformt.

Nachweis mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine exzellente Methode, um DNA innerhalb kurzer Zeit zu vervielfältigen. Die Methode basiert auf der identischen Replikation von DNA durch DNA-Polymerase, wie sie in Bakterien und Eukaryoten *in vivo* vorkommt.

In vitro benötigt die Reaktion die zu amplifizierende DNA, die einzelnen Desoxytrinucleotide (dNTPs), entsprechende Primer (hier für konservierte DNA-Abschnitte der 16S rRNA der Mycoplasmen) und eine Polymerase, die hitzeresistent ist.

Die Amplifizierung erfolgt in einem Thermocycler, der ein zyklisches thermisches Programm fährt, das definiert zwischen verschiedenen Temperaturen variieren kann. Dabei wird die DNA nacheinander denaturiert, mit den Primern hybridisiert, anschließend mit den dNTPs und der Polymerase amplifiziert und wieder denaturiert. Das zyklische Vorgehen kann über mehrere Runden erfolgen (mehr als 30) und ermöglicht bei theoretischem Vorliegen einer einzigen Kopie der DNA eine exponentielle Vervielfältigung dieser.

DAPI-Test

Materialien

- Zellkultur (auf Deckgläschen in Petrischale)
- DAPI Stammlösung (5 µg/ml)
- PBS
- Methanol

Durchführung

- 0.2 ml DAPI-Stammlösung auftauen und mit Methanol auf 10 ml auffüllen
- Medium von der Kultur pipettieren, einmal mit PBS waschen, einmal mit DAPI-Methanol

waschen

- mit DAPI-Methanol 15 min bei 37 °C im Brutschrank färben
- Färbemittel abgießen, mehrmals mit PBS waschen
- im Fluoreszenzmikroskop mit 100x Ölimmersionsobjektiv mikroskopieren

Markierung die Membrane adhärenter Zellen mit Vybrant

- Die adhärenenten Zellen auf sterilem Glas Deckgläschen wachsen lassen (Konfluente oder subkonfluente Monolagen)
- Deckgläschen vom Wachstumsmedium entfernen und vorsichtig abtropfen lassen. Überschüssiges Medium durch Berühren des Randes des Deckglases mit Blotting Papier. Legen Sie das Deckglas in eine Feuchtkammer.
- Färbemedium herstellen: 5 µL der Markierungslösung zu 1 ml normalem Wachstumsmedium oder PBS+Ca/Mg geben.
- 100 µL des Färbemediums auf eine Ecke des Deckgläschens geben und vorsichtig über die ganze Fläche durch Schwenken verteilen, bis alle Zellen bedeckt sind.
- Das Deckglas bei 37 ° C inkubieren. Die optimale Inkubationszeit variiert je nach Zelltyp. Optimale Inkubationszeiten austesten. Beginnend von max. 20 min an bis zur mindestens notwendigen Zeit, um eine einheitliche Markierung aller Zellen zu erhalten.
- Färbemedium absaugen und Deckgläschen 3x waschen. Für jeden Waschzyklus, bedecken Sie die Zellen mit frischen, erwärmten PBS+Mg/Ca und inkubieren für 10 Minuten.

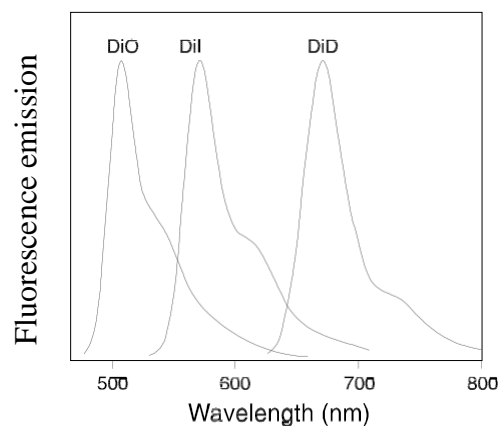


Figure 1. Normalized fluorescence emission spectra of DiO, DiI and DiD bound to phospholipid bilayer membranes. Abs/Em (nm) DiO 484/501, DiI 549/565; DiD 644/665

Vorhandene Filter Evos-Mikroskop: Ext//Em (nm)

Grün GFP:	470/22; 510/42
Gelb YFP:	500/24, 524/27
Rot Texred:	585/29, 624/40
Orange RFP:	531/40; 593/40
UV DAPI:	357/44; 447/60
Blau CFP:	445/45; 510/42

Ziel des Versuchs:

In Biologie und Medizin gibt es inzwischen in zunehmendem Maße Möglichkeiten Parameter des Zellstoffwechsels mit Hilfe von Absorptions-, Fluoreszenz- oder Lumineszenzmessungen zu bestimmen. Notwendig für eine Interpretation der Meßergebnisse sind aber Bezugsgrößen. Wenn man die genaue Zellzahl kennt, kann man Meßwert/Zelle angeben. Oftmals ist dies aber nicht möglich, weil Zellen einige Stunden vor Versuchsbeginn eingesät werden müssen und sich weiter teilen. In solchen Fällen können DNA- oder Proteingehalt als Bezugsgröße Verwendung finden. Um dies zu verdeutlichen, soll bei diesem Versuch der Proteingehalt bei unterschiedlichen Zellzahlen bestimmt und dabei die Bradford-Methode kennengelernt werden.

Material:

- eine Zellkulturflasche mit Zellen, PBS, Zellkulturmedium (und Trypsin)
- 0,1M HCl frisch, BSA-Standards (Bradford Kit), Coomassie-Reagenz (ZK Kühlschrank)
- Multipipetten, beschichtete Multiwellplatte, sterile Pipettenspitzen (für Multiwellplatte)
- sterile Flüssigkeitsreservoirs und 5 ml Eppendorf Tube
- Neubauer-Zählkammer, Cellometer
- großes Abfallbecherglas

Durchführung:**1. Tag:**Theoretische Vorarbeit:

In eine beschichtete 96-well Platte soll spaltenweises (1-5) eine aufsteigende Zahl an Zellen eingesät werden. In jedes Well einer Spalte soll die untenstehende Zellzahl ausgesät werden, jeweils 100 µl pro Well.

8 Wells der Spalte 1: je well 1×10^3

8 Wells der Spalte 2: je well 1×10^4

8 Wells der Spalte 3: je well 5×10^4

8 Wells der Spalte 4: je well 1×10^5

8 Wells der Spalte 5: je well 5×10^5

- überlegen Sie sich vorab, wie Sie die Zellzahlen einstellen. (Gesamtanzahl der benötigten Wells, inklusive Zusatzvolumen zum Pipettieren aus dem Reservoir (min 2 ml), Gesamtzahl der Zellen pro Spalte)

- Wieviel Zellen werden insgesamt für die Aussaat benötigt?

Praktische Durchführung

1. aus T75 Flasche Zellen ablösen wie zuvor erlernt (2x mit PBS spülen, 2. Mal länger inkubieren, abklopfen)
2. Zellzahl bestimmen
3. entsprechende Zellzahl (berechnet, siehe oben) in sterilen 5 ml Eppendorf tube einstellen und mischen. Gegebenenfalls Zentrifugieren, wenn Konzentration zu gering.
4. füllen Sie das Reservoir mit Medium und pipettieren Sie 100 µl/well mit der 8-Kanal Pipette in die beschichtete Zell Platte (Spalten 1-5), hierbei Plattenboden nicht berühren
5. leeren Sie das Reservoir und füllen nun die Spalte 1- Zellsuspension in das Reservoir und pipettieren Sie 100 µl Zell-Suspension pro well in Spalte 1 der Multiwell-Platte
6. verfahren Sie gleich mit den nächsten Zellzahlen
7. die Platten in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂) stellen

2.Tag:

1. Stellen Sie die Standard- BSA- Lösungen her (s.u.)
2. Fotografieren Sie die Platte, es müsste ein Gradient an verbrauchtem Medium bei größerer Zellzahl sichtbar sein
3. Medium aus der Multiwell-Platte vorsichtig entfernen (abziehen am Rand mit Multiwellpipette)
4. auf die Spalten mit Zellen (1-5) je 100 µl 0,1M HCl pro well geben, stark up/down pipettieren, fügen Sie in die leeren Spalten 7-9: 190 µl 0.1 M HCl zu (für Verdünnung)
5. inkubieren Sie die Platte 15 min zur Lysis der Zellen, im Brutschrank bei 37°C
6. in der Zwischenzeit Standards und Blanks (je 50 µl) in eine neue Multiwell-Platte pipettieren(siehe Tabelle) – 3 fach Bestimmung in die Spalten 10-12, füllen Sie die restlichen Spalten 1-11 mit 40 µl 0.1 N HCl, benutzen Sie den Deckel als Hilfe zum Pipettieren
7. nach Beendigung der Inkubationszeit pipettieren Sie die Zellen auf und ab mithilfe der Multipipette (Luftbläsen dürfen entstehen), Zellen sollen optimal aufgeschlossen sein
8. zur Verdünnung der Zelllysate aus Spalte 3-5, transferieren Sie 10 µl des Zelllysates in die Spalten 7-9 (zuvor je 190 µl HCl vorgelegt) und mixen Sie (Originalplatte)
9. transferieren Sie **10 µl unverdünntes Zell-Lysat** (Spalte 1-5 Originalplatte) in eine NEUE Multiwellplatte:Spalten 1-5 (gefüllt mit 40 µl 0.1 N HCl).
10. transferieren Sie 10 µl **verdünntes Zell-Lysat (Spalte 7-9** Originalplatte) in die neue Multiwellplatte Spalten 7-9 (gefüllt mit 40 µl 0.1 N HCl).
11. in alle wells je 50 µl Coomassie-Reagenz hinzufügen (Reservoir) und 1 min. inkubieren, (Platte dunkel lagern)
12. im Multiwell-Reader im Absorbance-Modus bei 595nm messen (Programm: Bradford)

Standards und Blanks:

in kleinen Eppendorfgefäße werden die folgenden Standard-lösungen angesetzt.

Entnahme aus 2mg/ml BSA (µl)	Entnahme aus 100 µg/ml BSA (µl)	0,1M HCL (µl)	Berechnen Sie die finale BSA-Konzentration (µg/ml)
50		950	
-	200	200	
-	167	500	
-	55.5	500	
-	26.3	500	
-	12.8	500	
-	5	500	
-	0	500	0= blank

Aufgabenstellung

- Erklären Sie das Prinzip von Bradford und das Prinzip zweier weiterer Nachweismethoden.
- Stellen Sie die Ergebnisse in Form einer Kalibriergerade dar und ermitteln Sie den Proteingehalt pro 10^3 Zellen aus den verschiedenen eingesäten Zelldichten. Diskutieren Sie das Ergebnis.
- Wie würden Sie vorgehen, wenn die Quantität eines spezifischen Proteins im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt der Zelle bestimmt werden soll? Diskutieren Sie Ihr Vorgehen.

Versuch 4: Transfektion tierischer Zellsysteme

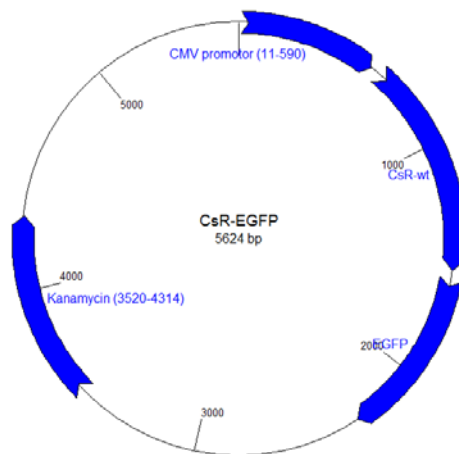
(Yinth Andrea Bernal Sierra, Rodrigo Gaston Fernandez Lahore)

Ziel des Versuches:

Eines der wichtigsten Anliegen im Arbeiten mit eukaryotischen Zellen ist es, fremde DNA in das Zellsystem einzubringen, um dann das kodierte Protein *in vivo* zu untersuchen. Durch die Entdeckung von siRNA ist auch das Einbringen von RNA in eukaryotische Zellen eine wichtige Untersuchungsmöglichkeit. Mittels der eingebrachten siRNA wird dann die komplementäre mRNA abgebaut und es kann dann das Fehlen des entsprechenden Proteins *in vivo* untersucht werden.

Der Prozess des Hineinbringens von DNA in eukaryotische Systeme wird als **Transfektion** bezeichnet. Die Fremd-DNA wird aber bei jeder Zellteilung statistisch auf die Tochterzellen übertragen und somit verlieren die Zellen nach mehreren Zellteilungen die DNA. Das bedeutet, dass im eukaryotischen System die eingebrachte DNA nicht amplifiziert wird. Es wird von einer **transienten Transfektion** gesprochen. Demgegenüber steht die **stabile Transfektion**, bei der sich die Fremd-DNA in das Genom der Zelllinie integriert.

In diesem Versuch wird ein Plasmid, welches in *Escherichia coli* vervielfältigt worden ist, in HEK293 Zellen (human embryonic kidney cells) transient transfiziert. Das Plasmid enthält eine Gensequenz, die für ein Fusionsprotein aus dem UV-Rezeptor einer arktischen Alge (CsR) und enhanced green fluorescent protein (eGFP) mit einer Größe von ca. 60,2 kDa kodiert, dessen Expression dann mittels Fluoreszenzmessung detektiert werden kann. Für die Expression des Proteins in den Zellen ist ein Cytomegalievirus (CMV)-Promoter entscheidend, der von vielen Zellen erkannt wird und die Transkription einleitet.



Vektorkarte des verwendeten Expressionsplasmids

Im Forschungsalltag mit Zellsystemen wird ein jeder einmal in die Situation kommen, optimale Transfektionsbedingungen für eine bestimmte Zelllinie ermitteln zu müssen. Wichtige Parameter zur Optimierung der Transfektion sollen in diesem Versuch vorgestellt werden.

Grundlagen der Transfektion:

Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten DNA in Zellen einzubringen:

Kalzium- / Lithiumchlorid Präzipitation:

Bei dieser Methode wird durch Zugabe von (~200mM) Ca^{2+} oder Li^{+} ein Kalziumphosphat-Präzipitat gebildet, an das die DNA bindet, sich auf die Zelle legt und dann von dieser aufgenommen wird. Diese Technik ist kostengünstig und weit verbreitet, aber es wird nur wenig DNA in die Zellen aufgenommen. Die Effizienz der Transfektion kann jedoch durch Linearisierung der DNA gesteigert werden. Aufgenommen wird die DNA durch Endozytose.

Elektroporation:

Bei dieser Methode wird die Membran durch kurzzeitiges Anlegen eines hochfrequenten elektrischen Feldes permeabilisiert. Dadurch kann die Zelle die ins Medium gegebene DNA aufnehmen. Diese Methode bietet die Möglichkeit, auch schwer transfizierbare Zellen mit Fremd-DNA zu beladen. Ein Nachteil sind die relativ hohen Anschaffungskosten.

Lipofektion:

Bei dieser Transfektionsmethode werden positiv geladene Liposomen zum Einbringen der DNA benutzt. Die Liposomen komplexieren aufgrund der Ladung sehr effektiv mit der Fremd-DNA. Dieser Komplex fusioniert mit der Zelloberfläche, gelangt so in das Zellinnere und anschließend findet die Expression im Zellkern bzw. im Cytoplasma statt.

Da Lipide recht empfindlich und teuer sind, werden auch häufig künstliche Detergenzien benutzt, um die Liposomen zu formen. Zur Formierung der Liposomen muss die kritische Mizellkonzentration (CMC) überschritten werden. Daher werden Liposomen in FKS-freien Medium ohne Zusatz von fötalem Kälberserum gebildet, weil hier der Anteil hydrophober Moleküle deutlich geringer ist.

Wichtige Parameter, die für die Transfektion optimiert werden müssen, sind:

- Konzentration der DNA
- Konzentration des Transfektionsreagenz
- Notwendige Zeit zur Bildung der Liposomen
- Zelldichte

Versuch 4.1: Um die Effizienz der Transfektion zu bestimmen wird die Anzahl fluoreszierender Zellen bestimmt und mit der Gesamtzellzahl verglichen. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist auch die Morphologie der Zellen, da zum Beispiel bei einer zu hohen DNA- oder Transfektionreagenz-konzentration, die Zellen absterben können.

Material:

- Zwei sterile 6Well-Platten (10 cm² je Well) wurden am Vortag mit HEK293 Zellen à $2.5 \cdot 10^5$ Zellen/Well ausgesät
- TrypLE-Lösung, PBS, Serum-freies DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), 10% FKS DMEM
- Transfektionsreagenz Fugene HD von Promega

- all-trans Retinal (1 mM)
- Plasmid (pCsR-EGFP, 1 µg/µL)
- 96er Multiwell – Platte, schwarz fürs Fluorimeter (Greiner bio-one, Ref 655986, advanced TC surface)
- 4x 6Well-Platten
- Unsteriles PBS

Durchführung:

1. Tag:

- Unter der Sterilbank in sechs Eppendorfgefäße je 250 µl serumfreies Medium pipettieren
- Nach dem folgenden Schema werden zunächst das aufgereinigte Plasmid und anschließend das Transfektionsreagenz Fugene HD dazugegeben.

Proben	Gruppe A			Gruppe B		
	Fugene HD (µl)	DNA (µg)	DNA (µl)	Fugene HD (µl)	DNA (µg)	DNA (µl)
1	-	-				
2	15	-				
3	1	1				
4	3	1				
5	5	1				
6	3	3				
7				-	-	
8				15	-	
9				9	3	
10				15	3	
11				5	5	
12				15	5	

- Nach dem Pipettieren wird durch mehrmaliges Schnipsen mit dem Finger gegen das Eppendorfgefäß die Lösung vermischt, kurz abzentrifugiert und mind. 15 min bei Raumtemperatur inkubiert
- Anschließend werden die ~250 µl auf die beschrifteten Petrischalen mit den Zellen tropfenweise pipettiert und vorsichtig durch Schwenken der Schälchen verteilt
- Die Zellen werden in den Inkubator zurückgestellt
- Zeit notieren

2. Tag:

- Das Medium der Zellen wird am Rand abgesaugt und die Zellen 1x vorsichtig (!!!) mit PBS gespült (vorgewärmt auf 37°C, über Wand des Wells zugeben)
- Durch Zugabe von 200 µl TrypLE und Inkubation von 3-5 min werden die Zellen abgelöst und die Reaktion wird durch Zugabe von 1ml 10% FKS DMEM gestoppt (Kalzium-Ionen inhibieren TrypLE)
- Mittels einer 1000er-Pipette werden die Zellen gelöst und in je ein Falcon überführt
- Die Zellen werden dann bei 500 rpm für 3 min in der Zentrifuge pelletiert

- Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt, 2 ml 10% FKS DMEM dazugegeben und das Pellet mit einer 1000er-Pipette vorsichtig resuspendiert
- Es werden jeweils 8 x 100 µl der transfizierten Zellsuspension in eine Vertiefung der Multi-Well-Platte pipettiert (für Fluoreszenzreader)
- Nun werden 3 ml des Vollmediums zu den restlichen 1,2 ml der Zellsuspension in das Falcon pipettiert und verdünnt
- Es werden dann je 2 ml jeder Suspension in eine 6-well Platte pipettiert für SDS-PAGE/Westernblot bzw. Fluoreszenzmikroskopie
- Gefäße mit frisch ausgesäten Zellen zurück in den Brutschrank stellen

3. Tag und 4. Tag:

Es erfolgen folgende Untersuchungen:

Fluoreszenz-Mikroskop AMG EVOS® FL

- Die Einweisung erfolgt am Gerät
- Zellen bei 10-40x Vergrößerung morphologisch begutachten. Von einem gleichmäßig und nicht zu dicht bewachsenen Bereich mit gut angehefteten Zellen je ein Foto von Transmission, GFP-Fluoreszenz und dem entsprechenden Overlay machen (Einstellung „Actual“) und auf dem USB-Stick speichern. Mit der Belichtung spielen, Auswirkung auf die Fluoreszenzintensität? Fotos jedoch alle bei derselben Belichtung aufnehmen, um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten!
- Bestimmung der Anzahl fluoreszierender Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl (Transfektionseffizienz) anhand repräsentativer Fotos. Insgesamt mind. 100 Zellen pro Ansatz zählen.

Multiwell-Fluorimeter:

- Die Einweisung erfolgt am Gerät (Programm: iconcontrol 1.9)
- Durch Aufnahme eines Emissionsspektrums (Fluorescence Intensity Scan) einer einzelnen Probe aus jedem Ansatz (z.B. A1-A10) werden die optimalen Parameter für die Bestimmung der Fluoreszenzintensität bestimmt, Emissionswellenlänge von 520-550 nm wählen (Anregungswellenlänge 470, Verstärkung (Gain), Detektion:from bottom)
- Mit den optimierten Parametern wird für alle Proben die Fluoreszenzintensität (Fluorescence Intensity) bestimmt. Die Werte um die Werte der Eigenfluoreszenz der Zellen korrigieren (Negativkontrollen 2 bzw. 8) und Standardabweichungen berechnen.

Aufgabenstellung/Fragen:

- Die Daten des Multiwell-Fluorimeters werden gegen den 2. bzw. 8. Transfektionsansatz (Negativkontrolle) korrigiert, der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet und als Säulendiagramm dargestellt
- Für jeden Ansatz sollte ein aussagekräftiges Übersichtsbild von Transmission (Morphologie) und Fluoreszenz (Lokalisation) gezeigt werden
- Die Transfektionseffizienz (Anteil fluoreszierender Zellen/Gesamtzellzahl in Prozent) wird berechnet und in einem Säulendiagramm dargestellt
- Im Protokoll sollen die Daten beider Gruppen berücksichtigt werden, da es sich um unterschiedliche Ansätze handelt

- Welche Transfektionsansätze eignen sich am besten für eine hohe CsR-Expression in HEK293-Zellen?
- Korrelieren durchschnittliche Fluoreszenzintensität und Transfektionseffizienz miteinander?
- Wie wirkt sich eine erfolgreiche Transfektion auf die Zellmorphologie aus?

Versuch 4.2: Proteinnachweis mittels SDS-PAGE und Westernblot

Aufgabe: Die Expressionsstärke des transfizierten Proteins (CsR-eGFP) wird über SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

Durchführung

Herstellung des Gesamtproteinlysats

Die Zellen werden chemisch lysiert und so ein Zellextrakt gewonnen, der alle Proteine der Zelle enthält (Gesamtproteinlysate). Um eine Proteindegradation zu vermeiden, wird auf Eis (4°C) gearbeitet. Auf den Zusatz von Proteaseinhibitoren wird verzichtet. Die Trennung nicht aufgeschlossener Zellen sowie von Zellschrott vom Lysat wird durch einen Zentrifugationsschritt erreicht. Die durch DNA verursachte Viskosität des Lysats wird durch Kochen reduziert. Das Kochen der Proben denaturiert die Proteine und bildet beim Abkühlen SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)-Protein-Micellen, die alle eine negative Ladung tragen, ungeachtet der tatsächlichen Nettoladung der einzelnen Proteine, und eine Analyse mittels SDS-PAGE erst möglich macht.

Zellernte:

- Lysepuffer mit Protease Inhibitor (1:50) und 10mM EDTA versetzen
- Zellen 1x vorsichtig mit PBS spülen (über die Seite des Wells zugeben!), auf Papier ausklopfen, um überschüssiges PBS zu entfernen
- Je 450 µL Lysepuffer pro Well auf die Zellen geben, 3 Minuten inkubieren und Zellen vom Well-Boden spülen und in Eppis überführen
- je 50 µL einer 10%igen DDM-Lösung dazu pipettieren, 10 Minuten inkubieren unter schwenken
- 3 min bei 13.400 rpm abzentrifugieren, Überstand in neues Eppi überführen
- Je 100 µL Gesamtprotein pro Spur und Probe vorbereiten (=4/5 Zielvolumen) + 1/5 Zielvolumen 5x Loading-Buffer dazugeben und mischen
- Lagerung bis zur SDS-PAGE bei RT

Gesamtlysate:

Puffer/Materialien:

Lysepuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl

5x Loading-Buffer: 50% Glycerol, 5 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, Mercaptoethanol

FRAGEN:

- 1) Wie erfolgt der Zellaufschluss mit SDS-Puffer, welche Aufgabe kommt den einzelnen Pufferkomponenten zu?
- 2) Welche Funktion kommt dem SDS in der SDS-PAGE zu?
- 3) Können Sie sich auch andere Methoden zum Zellaufschluss vorstellen? Wenn ja, welche Eigenschaften machen sich diese zunutze? Welche Rolle spielt dabei die Zellmembran/wand?

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot

Vorbereitung von SDS-PAGE und Westernblot

In diesem Versuchsteil werden die Proteine des Gesamtlysats mittels SDS-PAGE entsprechend ihrer

Größe getrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis des transfizierten Proteins CsR-eGFP erfolgt mittels eines Antikörpers gegen GFP. Dieser wird über einen Fluoreszenzmarker oder eine enzymatische Reaktion mit Alkalischer Phosphatase am Sekundärantikörper direkt auf der Membran chromogen (Farbstoff bildend) nachgewiesen. Dabei werden die Proteine in zwei identisch beladenen Gelen einmal vor dem Blotten und einmal danach mit Coomassie-Lösung gefärbt und verglichen.

Puffer/Materialien:

1M Trenngelpuffer (Tris-HCl-Puffer, pH **8,8**)

1M Sammelgelpuffer (Tris-HCl-Puffer, pH **6,8**)

SDS

Ammoniumpersulfat (APS) bei -20°C lagern

TEMED

Acrylamid – Bisacrylamid 30% Fertiglösung (Roth)

Bidest H₂O

Isopropanol

PageRuler Plus Prestained Protein Marker

Laufpuffer

Whatman-Papier, PVDF-Membran low fluorescence, Methanol

Blottingpuffer

Coomassie-Färbelösung (1g Coomassie Brilliant Blue G/R-250, 10% Essigsäure, 45% MeOH)

Milchpulver

PBS-T

Primär-Antikörper, Sekundär-Antikörper

1 MiniPROTEAN Tetra Cell (Biorad)-Apparatur: 1 Kammer, 2 Einsätze, 4 kurze/lange Glasplatten, 4x10er Kämmen 1.0mm

2 Gießstände inkl. Gummidichtungen und grüner Halterungen

Stromquelle und 2 Elektrokabel

Spritzen zum Spülen

2 Färbeschalen mit Deckel

Pinzette

Roller

Semi-dry-Blotkammer groß

4 Blotinkubationsgefäße

Gelzusammensetzung: Handschuhe und Schutzbrille tragen! Acrylamid ist bis zum Auspolymerisieren giftig!

Volumenangaben für je zwei Gele!

Stammlösung	12% Trenngel	5% Sammelgel
30% Acrylamide/0.8% Bisacrylamide	6.0 ml	1.68 ml
1M TrisHCl buffer (pH 8.8)	6.2 ml	-
1M TrisHCl buffer (pH 6.8)	-	1.2 ml
H ₂ O	2.6 ml	6.92 ml
SDS	150 µL	100µL
TEMED	17 µL	10 µL
25% APS	40 µL	30 µL
Endvolumen	15 ml	10 ml

Gelherstellung:

Handschuhe und Schutzbrille tragen!

- Glasplatten gründlich waschen, mit A. dest abspülen und mit Ethanol fusselfrei abwischen und trocknen lassen
- je eine Platte mit Spacern und eine kurze in grüne Halterung einspannen, schmale Platte zeigt nach vorne
- Herstellung des Trenngels:
 - in 15-50 ml Falcons werden die Puffer pipettiert (ohne APS und TEMED!), mischen
 - danach werden zum Trenngel APS und TEMED zugesetzt, erneut gut mischen
 - der Ansatz wird schnell und blasenfrei in die Gelkammer einpipettiert oder gegossen
 - anschließend mit Isopropanol vorsichtig überschichten
- nach Abschluss der Polymerisation (30 min) wird Isopropanol abgegossen und die vorher hergestellte Sammelgellösung darüber gegossen.
- Herstellung des Sammelgels:
 - wie beim Trenngel
 - der Ansatz wird über das Trenngel gefüllt und sofort der Kamm eingesetzt (Schutzbrille!)
 - Polymerisieren lassen (15 min)

Fragen:

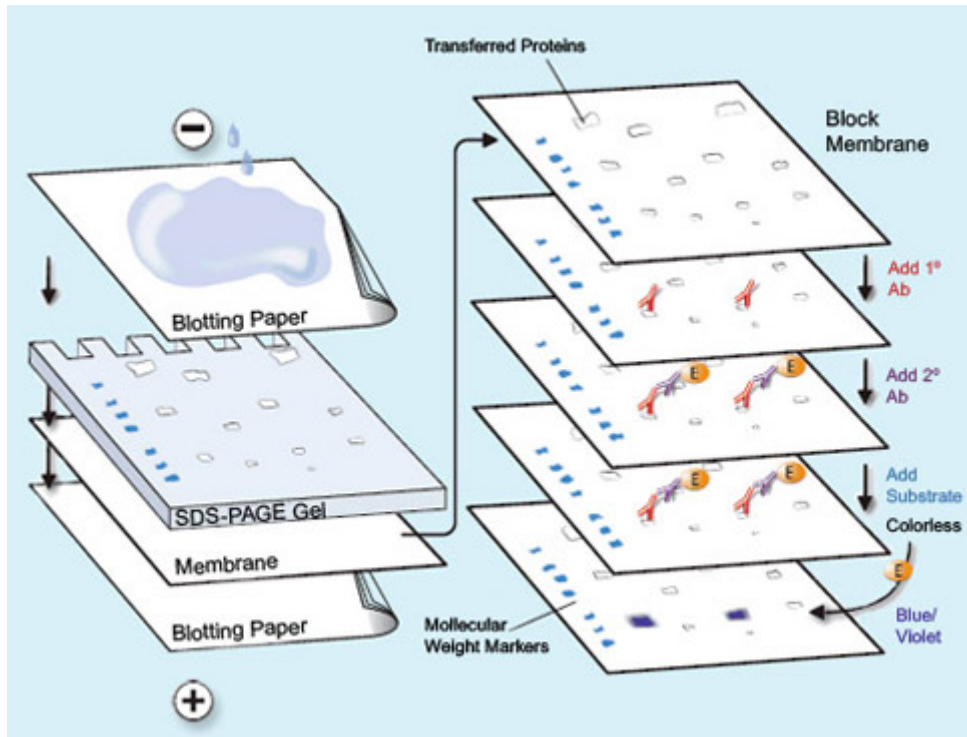
- Was ist Acrylamid und was sollte bei seiner Handhabung beachtet werden?
- Welche Eigenschaft/Funktion besitzen APS und TEMED?
- Welche Aussage wird mit der Angabe 12% Polyacrylamidgel getroffen?

Proteintrennung und Proteintransfer:

Handschuhe tragen!

- Je zwei Gele in eine Apparatur einsetzen (kurze Glasplatte zur Innenseite), Laufpuffer in beide Kammern geben, Luftblasen unter dem Gel entfernen
- Kämm vorsichtig herausziehen
- Taschen mit Laufpuffer spülen
- 5 µl Proteinladder in eine Tasche füllen
- vorbereitete Proben (je 10µl) auftragen (Reihenfolge notieren!)
- Apparatur schließen, an das Stromgerät anschließen
- Trennzeit: 25 mA/Gel , max. V; 40-60 min
- Blot vorbereiten:
- Whatman-Papier auf Gelgröße zuschneiden
- in Transferpuffer überführen (5xTurbo mit Wasser verdünnen)
- PVDF-Membran identisch zuschneiden und aktivieren in:
 - Nicht mit nackten Fingern berühren!**
 - Methanol 15 sec
 - dH₂O 2 min
 - in Transferpuffer überführen
- nach Ablauf der Trennzeit Apparatur vom Stromgerät entkabeln, öffnen und Gelkassetten entnehmen
- Glasplatten vorsichtig öffnen, Sammelgel vom Trenngel entfernen

- Färbung des einen Gels:
- Gel 15 min in Coomassie-Lösung schwenken
- Gel 3x in dH₂O 1 min in der Mikrowelle (800 W) erwärmen, Wasser zwischendurch wechseln, nach dem dritten Erhitzen mit Deckel auf dem Schüttler endgültig entfärben (über Nacht)
- Gele durch Scannen oder Fotografieren dokumentieren



Quelle: <http://www.komabiotech.co.kr/www/techniques/immunodetection/wbProtocol.html>

Transfer: Western Blotting (Semi-Dry-Verfahren)

Laufpuffer:

- 25 mM TrisHCl (pH 8.8)
- 200 mM Glycin
- 0.1% (w/v) SDS

Transfer Puffer:

- 3 g Tris
- 100 ml Methanol
- 11.3 g Glycin
- auf 1 L mit A. bidest auffüllen

PBS:

- 8 g NaCl
- 0.2 g KCl
- 1.78 g Na₂HPO₄* 2H₂O
- 0.24 g KH₂PO₄
- auf 1 L mit A. bidest auffüllen

PBS-T:

- 1x PBS + 0.1% Tween 20

Westernblot

Durchführung:

PVDF-Membran nicht mit Fingern berühren !

- wie in Skizze beschrieben vorgehen (Luftblasen können vorsichtig durch Überrollen entfernt werden)
- Kathode mit leichtem Druck auflegen
- Western Blotting für 7 min durchführen (Biorad)

Proteindetektion: Antikörperinkubation und Entwicklung

Handschuhe tragen !

Sofern nicht anders angegeben werden alle Inkubationsschritte bei RT in einem kleinen Inkubationsgefäß auf dem Schüttler durchgeführt:

- Nach Entfernen des Whatman-Papiers Membran für 1 h in **Blockingpuffer** blocken (für 2 Membranen: 30 ml PBS-T + 1.5 g Milchpulver)
- Über nacht mit primärem Antikörper inkubieren:
für 2 Membranen: 20 ml PBS-T + Antikörper
anti-GFP monoklonal aus Maus, Verdünnung 1:2.000
- 3 x waschen mit PBS-T jeweils für 5-10 min
- 60 min mit 2. Antikörper in einer Verdünnung 1:2000 inkubieren:
für 2 Membranen: 20 ml PBS-T + 10 µl Antikörper (Anti-Maus-HP-Konjugat)
- 3 x waschen mit PBS-T jeweils für 5-10 min
- Detektionslösung (lichtempfindlich!) mischen:
2 mL ECL Substrat + 2 mL Enhancer
- Westernblot im ChemiDoc positionieren und die Detektionslösung darauf giessen
- Imager: Multichannel, Colorimetrisch und Chemi high resolution, 10 images (5s bis 60 s) einstellen
- Fürs Protokoll fotografieren/speichern
- Größe der detektierten Proteine durch Vergleich mit der Proteinladder ermitteln!

Aufgabenstellung/Fragen:

- Stellen Sie den SDS-PAGE/Westernblot-Versuch anhand von Fotos der erhaltenen Gele und Blots dar
- Welche Transfektionsbedingung(en) führt zur stärksten Expression des Transgens?
- Wurde das Gel gleichmäßig beladen (Coomassie-Färbung)?
- Ermitteln Sie anhand der Laufstrecken und den in ihrer Größe bekannten Markerproteinen, wie groß die nachgewiesenen Proteine sind (kDa)? Entspricht das den Erwartungen?
- Wie viele Banden sehen Sie? Welche Ursachen kommen in Frage für das Auftreten von mehr als einer Bande?
- Vergleichen Sie das direkt gefärbte SDS-Gel mit dem Gel nach dem Blotten und mit dem Westernblot. Welche Unterschiede ergeben sich? Welche Aussagen können Sie treffen?
- Warum nutzen wir die Immundetektion zum Proteinnachweis und nicht z.B. Coomassie-Färbung?

Literatur

Toni Lindl, 6. Auflage 2008, Zell- und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

Sabine Schmitz, 2. Auflage 2009, Der Experimentator: Zellkultur. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

Hubert Rehm, 5. Auflage 2006, der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg