

EXPRESSIONSANALYSE - QUANTITATIVE PCR

In dieser Übung soll festgestellt werden, wie stark ein bestimmtes Gen in Stämmen des filamentösen Pilz *Trichoderma reesei* unter bestimmten Kultivierungsbedingungen transkribiert wird. Dazu wird *T. reesei* QM6a oder Rut-C30 zunächst auf neutraler, induzierender oder reprimierender Kohlenstoffquelle kultiviert. Anschließend wird eine entsprechende RNA-Extraktion aus dem Pilzmyzel und eine darauffolgende cDNA-Synthese („reverse Transkription“) vorgenommen.

Quantitative PCR (qPCR) ist eine sehr sensitive Methode, um eine spezifische (c)DNA-Menge zu detektieren. Während laufender Amplifikation wird die Produktmenge in homogener Lösung mittels Fluoreszenzzunahme gemessen. Konkret wird dabei als Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green verwendet, der nur in doppelsträngiger DNA interkaliert. Während der PCR wird die Ausgangs-DNA pro Zyklus verdoppelt (2^n , n ist die Zahl der Zyklen) und der Fluoreszenzfarbstoff lagert sich an die neu synthetisierten Kopien an. Je mehr doppelsträngige DNA entsteht, desto mehr Fluoreszenzfarbstoff wird in der DNA gebunden. Das emittierte Fluoreszenzsignal kann so detektiert werden und ist zur DNA-Menge proportional.

Das Ziel der Übung besteht darin, eine relative Quantifizierung der Transkriptmenge des *cbh1*-Gens (kodiert für die Cellobiohydrolase 1) in *T. reesei* Stämmen, die auf Kohlenstoffquellen, die die Zellulaseaktivität induzieren (zB Laktose) oder reprimieren (zB Glukose), oder als neutral betrachtet werden (zB Glycerin; Bezugsbedingung) angezüchtet wurden, vorzunehmen. Als Gen für die Datennormalisierung wird *act* (kodiert für Actin) verwendet.

Hinweise:

(B) befindet sich am Betreuer/innentisch
(E) befindet sich im allgemeinen Entnahmebereich auf RT
(G) befindet sich in der Gefrierlade
(K) befindet sich im Kühlschrank
alle weiteren Materialien/Lösungen sind selbst herzustellen oder am Hörer/innenplatz vorhanden

Gerahmte Teile: es ist unter sterilen Bedingungen zu arbeiten!

Doppelt gerahmte Teile: es ist unter RNase-freien Bedingungen zu arbeiten!

Abkürzungen:

G, Glukose
GY, Glycerin
KB, Kühlblock
L, Laktose
RG, Reaktionsgefäß
RT, Raumtemperatur
sb, steriles, (bi-)destilliertes Wasser (selbst herzustellen)

Reservierung des qPCR-Laufes erforderlich!

Zuordnung der Stämme und Kohlenstoffquellen (C-Quellen):

Gruppen Nr.	Stamm	C-Quellen
1	Rut-C30	GY, G
2	Rut-C30	GY, L
3	QM6a	GY, G
4	QM6a	GY, L
5	Rut-C30	GY, G
6	Rut-C30	GY, L
7	QM6a	GY, G
8	QM6a	GY, L
9	Rut-C30	GY, L
10	QM6a	GY, L

1. Herstellen der Sporensuspension

Lösungen: NaCl (0,8 %)-Tween80 (0,05 %)-Lösung (E)

Materialien: Säulchen mit Glaswolle (E)
Platten mit *T. reesei* QM6a oder Rut-C30 bewachsen (K)

Durchführung:

- Alle Sporen von einer Platte abschaben und in 1 mL NaCl-Tween80-Lösung resuspendieren
- Suspension über ein mit steriler Glaswolle gefülltes Säulchen filtrieren
- Sporensuspension in ein neues, steriles RG überführen

Die Sporensuspension kann bei +4 °C aufbewahrt werden.

2. Sporenzahlbestimmung

Materialien: Zählkammer (Mikroskop)
Zählei (Mikroskop)
Deckglas (Mikroskop)
Mikroskopietücher (Mikroskop)

Geräte: Mikroskop

Durchführung:

- Zählkammerglas und Deckglas mit Mikroskopiertuch reinigen
- Zählkammer auf die ebene Arbeitsfläche des Labortisches legen und mit dem Deckglas bedecken (die drei Stege der Zählkammer müssen in Längsrichtung überdeckt sein)
- 10 µL einer 1:50-Verdünnung der Sporensuspension auf den mittleren Steg der Zählkammer dicht am Deckglasrand auftragen und zwischen Stegoberfläche und Deckglas saugen lassen bis der Raum zwischen Mittelsteg und Querrinne gefüllt ist
- Zählkammer unter das Mikroskop legen und bei 100-facher Vergrößerung das Liniennetz des Mittelstegs scharf stellen
- auf 400-fache Vergrößerung umstellen, Schärfe nachjustieren und die Anzahl der Sporen in mindestens einem Großquadrat (16 kleine Quadrate entsprechen in dieser Kammer einem Großquadrat) mäanderförmig auszählen; werden mehrere Großquadrate ausgezählt ist der Mittelwert zu bestimmen
- Sporen innerhalb des Großquadrates (nicht jene auf den Begrenzungslinien) berücksichtigen
- Anzahl der Sporen berechnen
- Zählkammer mit EtOH, dann mit dest. H₂O reinigen und retournieren
- Deckglas entsorgen (Autoklaviermüll)

Formel für die Thoma Kammer:

$n = \text{Anzahl der gezählten Sporen pro Großquadrat}$

$\text{Sporen pro ml} = (n \times 10^3 \times \text{Verdünnung}) / (\text{Fläche des Kleinquadrates} \times \text{Kammertiefe} \times \text{Anzahl der Kleinquadrate})$

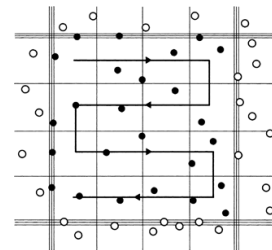
Kenndaten der Thoma Kammer:

Anzahl der Großquadrate: 4

Anzahl der Kleinquadrate: je 16

Kammertiefe: 0,01 mm

Fläche eines Kleinquadrates: 0,0025 mm²



3. Direktanzucht des Pilzes

Lösungen: 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer (E)
50x Spurenelemente-Lösung (E)
2x Mineralsalzlösung (E)
5 M Urea (E)
40 % Glukose (steril filtriert) (K)
20 % Laktose (steril filtriert) (K)
50 % Glyzerin (steril filtriert) (K)

Materialien: Wattehauben und Gummibänder (E)
Alufolie (E)

Geräte: Inkubationsschüttler

Durchführung:

Zusammensetzung von 1 L Mandels-Andreotti-(MA)-Medium:

250 mL 2x Mineralsalzlösung
500 mL 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer
20 mL 50x Spurenelemente-Lösung
1 mL 5 M Urea
1 g Pepton
mit dest. H₂O auf 1 L auffüllen

- In je einen 250-mL-Erlenmeyerkolben 50 mL MA-Medium geben
- Kolben mit Wattehaube und Gummiband verschließen und bedeckt mit Alufolie autoklavieren

- Medium mit der zugeordneten C-Quelle auf eine Endkonzentration von 1 % versetzen.
- Medium mit 10⁹ Sporen/L inokulieren

- Bei 30 °C und 180 rpm für die entsprechende Zeit kultivieren.

Kultivierungszeiten:

Laktose: 24h; Glukose: 24h; Glycerin: 48h

4. Ernte des Pilzmyzels

Materialien: flüssiger N₂ (E)
Kryogefäß (E)
Nadel (E)
Glastrichter (E)
Gummitrichter (E)
Miracloth (E)
Whatman Filterpapier (E)
Alufolie (E)

Durchführung:

- in ein Kryogefäß pro Kultivierung mit einer heißen Nadel ein Loch in den Deckel stechen
- Styroporbox mit flüssigem N₂ wenige cm hoch befüllen
- Glastrichter in einen Erlenmeyerkolben setzen (Gummitrichter zur Dämpfung dazwischen legen)
- Miracloth quadratisch zuschneiden und in den Glastrichter legen
- Myzel abfiltrieren, sorgfältig mit dest. H₂O waschen
- Myzel auf Whatman Filterpapier legen und trocken pressen
- in fingernagelgroßen Portionen in das vorbereitete Kryogefäß geben
- im flüssigen N₂ schockgefrieren

Das gefrorene Myzel kann im -196 °C-Tank bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden. Kontaktieren Sie dazu eine/n Betreuer/in.

5. Aufschluss des Pilzmyzels

Lösungen: peqGOLD TriFast (K)

Materialien: RG mit Schraubdeckel und rotem Dichtungsring (E)
Glaskugeln (0,01-0,1 mm Ø, 1 mm Ø, 5 mm Ø) (E)

2 Proben Pilzmyzel, gefroren in fl. N₂

Geräte: Teflon-Homogenisator (BIO 101/Savant FastPrep 120) (Abzug)

Durchführung: Jede Myzelprobe wird in **Duplikaten** aufgeschlossen und daraus die RNA isoliert.

- pro Myzelprobe in 2 Schraub-RG Glaskugeln einwiegen:

0,37 g	0,01-0,1 mm Ø
0,25 g	1 mm Ø
1 Stk.	5 mm Ø
- 1 mL peqGOLD TriFast Lösung in jedes RG vorlegen (Abzug, Nitrilhandschuhe)
- ein fingernagelgroßes Stück Myzel zugeben (Abzug)
- Schraub-RG sorgfältig verschließen (Abzug, Nitrilhandschuhe)
Hinweis: Optische Kontrolle, ob Dichtungsring und Deckel völlig plan sind; Dichtungsring ev. mit Hilfe einer Pinzette ausrichten.
- Betreuer/in zur Inbetriebnahme des Teflon-Homogenisators kontaktieren
- Aufschluss im Teflon-Homogenisator: Stufe 6, 30 s (Abzug, Nitrilhandschuhe)

6. Extraktion von RNA

Lösungen: Chloroform (E)
Isopropanol (E)
DEPC-behandelter 75%iger Ethanol (B)
DEPC-behandeltes sb Wasser (B)

Materialien: RNase-freie 1,5-mL-RG (B)
RNase-freie Filterspitzen (B)

Geräte: Thermoblock

Durchführung:

- 5 min bei RT stehenlassen
- 0,2 mL Chloroform zugeben
- 15 s am Vibrationsschüttler kräftig schütteln
- 10 min bei RT stehenlassen
- Zentrifugieren: 5 min bei 12000-g und RT

- wässrige Phase in ein RG überführen
- 0,2 mL Chloroform zugeben
- 15 s am Vibrationsschüttler kräftig schütteln
- 10 min bei RT stehenlassen
- Zentrifugieren: 5 min bei 12000-g und RT
- wässrige Phase in ein neues RG überführen
- 0,5 mL Isopropanol zugeben
- sanft mischen (4-6 mal invertieren)
- 10 - 15 min bei RT stehenlassen
- Zentrifugieren: 10 min bei 12000-g und 4 °C
- Isopropanolüberstand vorsichtig abnehmen und verwerfen
- 1 mL 75%igen Ethanol zugeben
- kurz am Vibrationsschüttler schütteln
- Zentrifugieren: 10 min, 12000-g, 4 °C
- EtOH verwerfen
- Pellet lufttrocknen; ev. kurz (5 min) am Thermoblock bei 50 °C fertig trocknen
Hinweis: Zu starkes Trocknen beeinträchtigt die Löslichkeit.
- Pellet in 50 µL sb Wasser lösen
Hinweis: Erhitzen der RNA-Lösung auf 50 °C sowie Schütteln verbessert die Löslichkeit.

- RNA auf Eis stellen
- weiter verwenden oder bei -80 °C lagern

7. Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der RNA

Materialien: RNase-freie Filterspitzen (B)

Geräte: NanoDrop ND1000 Spectrophotometer

Durchführung:

- Betreuer/in kontaktieren
- NanoDrop mit sb Wasser spülen

- ca. 2 μ L RNA-Lösung auftragen
- Quantität und Qualität ($A_{260/280}$, $A_{260/230}$) der RNA bestimmen
- für alle RNA-Proben wiederholen

- NanoDrop mit sb Wasser spülen

8. DNase Verdau

Lösungen: 10x Reaction Buffer mit $MgCl_2$ (G)
DEPC-behandeltes sb Wasser (B)
RNase-free Deoxyribonuclease I (1U/ μ L) (G)
RNase-free 50 mM EDTA (G)

Materialien: RNase-freie 1,5-mL RG oder PCR-RG (0,2 mL) (B)
RNase-freie Filterspitzen (B)

Geräte: Thermoblock oder PCR Gerät

Durchführung:

- Reagenzien auftauen, schütteln, kurz abzentrifugieren, auf Eis stellen
- auf KB in ein RG pipettieren:

RNA	1 μ g
10x Reaction Buffer mit $MgCl_2$	1 μ L
sb Wasser	auf 10 μ L Gesamtvol.
Deoxyribonuclease I	1 μ L
- kurz schütteln und abzentrifugieren
- 30 min bei 37 °C inkubieren
- 1 μ L 25 mM EDTA dazu mischen

- für weitere 10 min bei 65 °C inkubieren
- auf KB stellen
- sofort für die reverse Transkription verwenden oder bei -80 °C lagern (kontaktieren Sie dazu eine/n Betreuer/in)

9. Reverse Transkription

Lösungen: RNase-free RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) (G)
RNase-free Ribonuclease Inhibitor „Riboloc“ (20 U/ μ L) (G)

RNase-free 5x Reaction Buffer (G)
RNase-free 10 mM dNTP Mix (G)
RNase-free Oligo(dT)₁₈ Primer (0,5 µg/µL) (G)
RNase-free Random Hexamer Primer (0,2 µg/µL) (G)
DEPC-behandeltes sb Wasser (B)

Materialien: RNase-freie PCR-RG (0,2 mL) (B)
RNase-freie Filterspitzen (B)

Geräte: PCR-Gerät

Durchführung:

- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|----------------------|---------|--------------------------------|--------|-----------------------|--------|----------------------------------|------|--------------------|------|------------------------|--------|----------------|------|---|--------|
| <ul style="list-style-type: none">• Reagenzien auftauen, schütteln, kurz abzentrifugieren, auf Eis stellen• auf KB in ein PCR-RG pipettieren:<table><tr><td>DNase-behandelte RNA</td><td>0,45 µg</td></tr><tr><td>Oligo(dT)₁₈ Primer</td><td>0,5 µL</td></tr><tr><td>Random Hexamer Primer</td><td>0,5 µL</td></tr><tr><td>im Bedarfsfall mit sb Wasser auf</td><td>6 µL</td></tr></table>• vorsichtig mit Pipette durchmischen und abzentrifugieren• 5 min bei 65 °C inkubieren• auf KB abkühlen lassen und abzentrifugieren• auf KB folgendes dazu pipettieren:<table><tr><td>5x Reaction Buffer</td><td>2 µL</td></tr><tr><td>Ribonuclease inhibitor</td><td>0,5 µL</td></tr><tr><td>10 mM dNTP mix</td><td>1 µL</td></tr><tr><td>RevertAid H Minus M-MuLV Rev. Transcriptase</td><td>0,5 µL</td></tr></table>• vorsichtig durchmischen und abzentrifugieren | DNase-behandelte RNA | 0,45 µg | Oligo(dT) ₁₈ Primer | 0,5 µL | Random Hexamer Primer | 0,5 µL | im Bedarfsfall mit sb Wasser auf | 6 µL | 5x Reaction Buffer | 2 µL | Ribonuclease inhibitor | 0,5 µL | 10 mM dNTP mix | 1 µL | RevertAid H Minus M-MuLV Rev. Transcriptase | 0,5 µL |
| DNase-behandelte RNA | 0,45 µg | | | | | | | | | | | | | | | |
| Oligo(dT) ₁₈ Primer | 0,5 µL | | | | | | | | | | | | | | | |
| Random Hexamer Primer | 0,5 µL | | | | | | | | | | | | | | | |
| im Bedarfsfall mit sb Wasser auf | 6 µL | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5x Reaction Buffer | 2 µL | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ribonuclease inhibitor | 0,5 µL | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 mM dNTP mix | 1 µL | | | | | | | | | | | | | | | |
| RevertAid H Minus M-MuLV Rev. Transcriptase | 0,5 µL | | | | | | | | | | | | | | | |

- Starten von folgendem Programm: 5 min / 25 °C
60 min / 42 °C
5 min / 70 °C
- auf KB abkühlen lassen
- weiter verwenden oder im Gefrierfach lagern
- 1:10 und 1:100 Verdünnungen mit sb Wasser herstellen
- weiter verwenden oder im Gefrierfach lagern

10. quantitative PCR

Reservierung des qPCR-Laufes erforderlich!

Lösungen: Luna Universal qPCR Master Mix (beinhaltet dNTP's, Taq-Polymerase, MgCl₂, KCl, SybrGreen) (G)
6,25 µM Primerlösungen cbh1 f, cbh1 r, act f und act r (G)
0,5 % SDS-Lösung (K)

Materialien: DNase-freie 0,1-mL qPCR-RG und Kappen (Qiagen) (B)
sterile Filterspitzen (B)
sterile 1,5-mL RG

Geräte: Rotor Gene Q Cycler (Qiagen)

Berechnung des PCR-Ansatzes:

Es wird für jedes zu messende Transkript (d.h. jedes unterschiedliche Primerpaar) ein Mastermix hergestellt.

Anzahl der Proben je Mastermix:

Die beiden cDNA Duplikate (= biologische Duplikate) werden dreifach (= technische Triplikate) gemessen. Die Leerprobe (sb Wasser statt cDNA) und die Negativkontrolle (Zugabe von SDS verhindert Aktivität der DNA-Polymerase) werden nur einfach gemessen.

___ cDNA Proben	___
1 Leerprobe	1
1 Negativkontrolle	1
Aufschlag	2
Gesamtanzahl	___

Mastermix:

Hinweis: Die Zugabe des sb Wassers dient zum Erhalt des nötigen Volumens.

*Zielgen *cbh1*:*

Reagens	Konz.	Endkonz.	1 Probe [μ L]	___ Proben [μ L]
Luna Master Mix	2 x	1 x		
Primer <i>cbh1</i> f	6,25 μ M	0,25 μ M		
Primer <i>cbh1</i> r	6,25 μ M	0,25 μ M		
cDNA-Probe 1:100	-	-	2	
sb Wasser	-	-		
Gesamt	-	-	20	

*Referenzgen *act*:*

Reagens	Konz.	Endkonz.	1 Probe [μ L]	___ Proben [μ L]
Luna Master Mix	2 x	1 x		
Primer <i>act</i> f	6,25 μ M	0,25 μ M		
Primer <i>act</i> r	6,25 μ M	0,25 μ M		
cDNA-Probe 1:100	-	-	2	
sb Wasser	-	-		
Gesamt	-	-	20	

Durchführung:

- pro Mastermix ein 1,5-mL-RG auf Eis bereitstellen
- Reagenzien und gegebenenfalls die Proben auftauen, schütteln, kurz abzentrifugieren, auf Eis stellen
- Mastermix herstellen: die oben berechneten Mengen der Reagenzien (außer der Probe) in die RG pipettieren, gut schütteln und kurz abzentrifugieren
- 18 μ L Mastermix in die qPCR-RG vorlegen
- Proben: 2 μ L cDNA dazu mischen
- Leerproben: 2 μ L sb Wasser dazu mischen
- Negativkontrolle: 2 μ L beliebige cDNA und 0,5 μ L 0,5%iges SDS dazu mischen
- Die qPCR-RG mit den Kappen verschließen
- auf KB stellen
- Hinweis: Die qPCR Proben werden genau in der abgegebenen Reihenfolge (Probe 1 - 28) gemessen!
- beim/bei der Betreuer/in für den reservierten qPCR Lauf abgeben

Auswertung und Berechnung der Ergebnisse:

- Kontrollieren von Leerprobe und Negativkontrolle
- Kontrolle der Schmelzkurven
- Beurteilung der technischen Triplikate, ev. Ausscheiden von eindeutigen Ausreißern
- Berechnung der relativen Transkriptverhältnisse der Proben (normalisiert auf *act*)

$$\text{Relatives Transkriptverhältnis} = \frac{\text{Amp}_{cbh1 \text{ Probe}}^{(\text{TO}_{cbh1 \text{ Bezug}} - \text{TO}_{cbh1 \text{ Probe}})}}{\text{Amp}_{act \text{ Probe}}^{(\text{TO}_{act \text{ Bezug}} - \text{TO}_{act \text{ Probe}})}}$$

Mit Amp Amplification, entspricht der PCR-Effizienz
TO take off, entspricht dem Thresholdcycle
Bezug ... Bezugsprobe (Glyzerin)

11. Abgabe

- Abgabe der relativen Transkriptwerte inklusive einer nachvollziehbaren Berechnung und der Rohdaten, also der RNA-Konzentrationen, RNA-Reinheit, und der TO- und Amp-Werte der qPCR in elektronischer Form (xls-Datei per e-mail)