Hannah Jung, Clara Schwinn
Biologie G-Kurs
Frau Niklas

17.03.19

Projektbericht: Schülerpraktikum „Prostatakarzinom“

Ausflug ins Genlabor der Uniklinik Homburg

13.03.19

Durch ein Bewerbungsschreiben bekam unser Biologie Kurs die Möglichkeit einen Schülerversuch im DNA Labor der Uniklinik Homburg zu machen. Da wir im uns im letzten Halbjahr viel mit der Genetik beschäftigt hatten, war dies ein interessanter Nachmittag, der uns erlaubte das Gelernte auch einmal praktisch umzusetzen.

Zu Beginn wurden wir von Frau Dr. Gabriele Amoroso begrüßt und bekamen alle einen Laborkittel. Wir arbeiteten im Praktikumsraum, der normalerweise von Studenten benutzt wird. Die Biologin gab uns einen kurzen Überblick, was wir heute genau alles an molekularbiologischen Versuchen machen sollten.

Gegenstand des Praktikums war die Untersuchung des Sec62 Gens beim Prostatakarzinoms. In diesem Zusammenhang konnten Forscherinnen und Forscher der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universität des Saarlandes zeigen, dass das auf dem langen Arm von Chromosom 3 lokalisierte Sec62 Gen in Prostatakarzinomzellen häufig überexprimiert und amplifiziert vorliegt. In weiteren Studien wurde untersucht, ob die Überexpression oder eine Amplikation von Sec62, sich als diagnostischer Marker für das Prostatakarzinom eignet. Für diese umfangreichen Analysen wurden zahlreiche molekularbiologische und biochemische Methoden eingesetzt, von denen wir zwei genauer im Praktium kennen lernen durften.

Das Praktikum dauerte 4 Stunden und wir arbeiteten in zweier Gruppen zusammen. Ziel war es, mit Hilfe der PCR Reaktion das Sec62 Gen aus einer aus Prostatakarzinomzellen isolierten cDNA-Probe zu amplifizieren. Zur Kontrolle und Vergleich wurde die PCR Reaktion zusätzlich mit einem Plasmid durchgeführt in das Sec62 Gen einkloniert war. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen sollte das Gen aus dem Vektor herausgeschnitten werden. Damit ist es möglich in einer anschließenden Gelelektrophorese das in der PCR Reaktion aus den Tumorzellen amplifizierte Sec62 Gen mit seinem tatsächlichen Amplifikat mit zu vergleichen. Nach der theoretischen Einführung erklärte Frau Dr. Amoroso uns noch den Umgang mit den Pipetten. In diesem Zusammenhang wurden wir mit der sehr kleinen Maßeinheit für Flüssigkeiten Microliter vertraut gemacht. In fast allen Experimenten wurde diese Maßeinheit verwendet. Alle Versuche wurden mit Handschuhen durchgeführt, damit wir die Proben mit unserer eigenen DANN nicht verunreinigten.

Zunächst pipettierte jede Gruppe 2 Ansätze für die PCR Reaktion. Der erste Reaktionsansatz enthielt den Mastermix für die PCR (Primer, Puffer, Nukleotide) mit einer aus Tumorzellen isolierten cDNA Probe, welche auch das Gen Sec62 enthielt. Die in der PCR Reaktion eingesetzten Primer sind dabei spezfisch für das Sec62 Gen und amplifizieren dieses, wenn es

in der cDNA Probe vorhanden ist. Der zweite PCR Ansatz fungierte als Negativ Kontrolle. Es handelte sich dabei um den gleichen Mastermix, wobei aber keine cDNA zugesetzt wurde. Mit Hilfe dieser Kontrolle kann man Artefakte in der PCR Reatkion ausschließen, die durch eventuelle Verunreinigungen der Lösungen entstehen können.
Wir pipettierten die Ansätze in kleine Reaktionsgefäße und beschrifteten diese mit P1 bzw P2 sowie unserer Gruppennummer. Danach gaben wir in die Reaktionsgefäße jeweils 1µl Pfu-Polymerase, welche immer dann verwendet wird, wenn man blunt ends oder möglichst sequenzexakte DNA-Amplifikate benötigt. Schließlich wurden die Ansätze noch kurz abzentrifugiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße in das PCR-Gerät gestellt. Die PCR Reaktion lief wie folgt ab: Zuerst wurde die DNA initial für 2 Minuten bei ca. 94°C denaturiert und somit in ihre Einzelstränge getrennt. Dann erfolgte die eigentliche PCR Reaktion in drei Schritten. Im ersten Schritt wird dabei die DNA kurz denaturiert (30 Sekunden) Danach erfolgt die Primeranlagerung an die spezifische DNA Sequenz, das sogenannte Annealing für 30s. Die Annealingtemperatur lag bei 56°C. Im dritten Schritt erfolgte die eigentlich Polymerisation oder auch Kettenverlängerung bei 72°C für 90s. Bei dieser Temperatur verlängert das PCR Enzym die an das Gen spezifisch angelagerten Oligonunkleotidprimer an ihren freien Enden. Durch die 20fache Wiederholgung dieser drei Schritte erfolgt die eigentliche Vermehrung des PCR Produktes, welches dann mittels einer Agarosegelelektrophorese im Anschluss sichtbar gemacht werden kann. Insgesamt lief das PCR-Gerät eine gute Stunde.

Während der PCR Reaktion begangen wir auch gleich mit dem nächsten Versuch, dem sogenannten Restriktionsverdau. Hiefür erhielten wir zwei Plasmide. Eines dieser Plasmide enthielt die für das Sec62 Gen codierende cDNA. Bei dem zweiten Plasmid handelte sich dabei um einen Leervektor, d. h. nur das Plasmid ohne einklonierte Sequenz. Beide Plasmide wurden mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut, wobei jedes Enzym nur über eine einzige sequenzspezifische Schnittstelle verfügt. In diesem Versuch wird die DNA des Plasmids zerschnitten und eventuell einklonierte Sequenzen werden herausgeschnitten. In diesem Fall erscheinen im Agarosegel zwei Banden in der gleichen Spur. Eine Bande für das Plasmid und eine Bande für die einklonierte Sequenz, während der Leervektor nur eine Bande im Gel zeigt.

Wir verwendeten zu einem das Restriktionsenzym EcoRV, welches glatte Enden produziert und das Restriktionsenzym Xhol, mit klebrigen Enden. Wir pipetierten wieder zwei Ansätze, diesmal aber in größeren Reaktionsgefäßen. In beide Ansätze kamen jeweils 2µl der Restriktionsenzymlösung mit Xhol und EcoRV, 7,6µl Wasser und 1µl Tango-Puffer, wobei das Wasser zuerst pippetiert wurde. Danach mischten wir die Ansätze mit einem Vortex-Gerät gefolgt von einer kurzen Abzentrifugation. Anschließend erfolgte die eigentliche Reaktion in einem Wasserbad für 30 min bei 37°C.

Die Auswertung der Versuche erfolgte mit einer weiteren molekularbiologischen Methode, der sogenannten Gelelektophorese. Mit Hilfe dieser Technik ist möglich, in einem Gel (in unserem Fall einem Agarosegel) Nukleinsäure Proben nach ihre Größe aufzutrennen und mittels eines

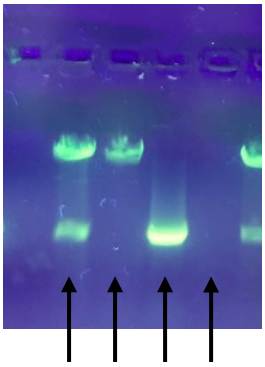
Farbstoffes sichtbar zu. Hierbei kann man je nach verwendetem Gel die Größe verschiedener Nukleinsäuren miteinander vergleichen.
Zuerst erklärte uns Frau Dr. Amoroso, dass sie um Zeit zu sparen schon die Lösung für ein 1%iges Agarosegel bereits vorbereitet hatte. Einer unserer Schüler musste nur noch die Gelkammer an den Rändern mit Klebeband abkleben und sogenannte Kämme einstecken, die später als Geltaschen im Gel dienten. Dann gab sie noch 4µl Roti-Safe-Farbstoff zur Agaroselösung. Dieser Farbstoff ermöglicht es später die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Wir mussten dann die in einer Mikrowelle aufgekochte Gellösung in die vorbereiteten Gelkammern gießen und abkühlen lassen. In dieser Zeit machten wir eine viertel Stunde Pause. Danach war das Gel fest geworden und die Kämme konnten entfernt werden. Sie wurden anschließend in die mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammern gelegt, wobei die Gele vollständig mit Puffer bedeckt sein mussten. Die Aussparungen wurden an der negativen Elektrode platziert, damit die negativ geladene DNA zur positiven Elektrode wandern kann. Zudem mussten wir unser PCR Proben und Restriktionsverdauansätze für die Agarosegelelektrophores vorbereiten. Hiefür wurden zu allen vier Ansätzen jeweils 2µl 6-fach konzentrierter DNA-Probepuffer mit einem türkis/lila Farbstoff dazugegeben und durchmischt. Der Farbstoff dient dabei als sichtbarer Marker für das Fortschreiten der Gelelektrophorese. Dann gaben wir unsere Proben gruppenweise in die zwei vorbereiteten Gele. Mit Hilfe einer Pipette wurden alle vier Proben sorgsam in die Taschen gefüllt. Die Reihenfolge wurde auf einem Blatt markiert, damit man nachher noch wusste, welche Probe wo war. Es wurde eine konstante elektrische Spannung von 120V angelegt. Anhand der Farbfront konnte man entscheiden, wann die Elektophorese beendet werden konnte und die DNA Fragmente genügend aufgetrennt sein sollten. Anschließend konnten wir die Gele unter UV-Licht betrachten und unsere Proben auswerten.

Bei unserer Gruppe hat alles gut geklappt und man konnte sehen, dass wir sauber gearbeitet hatten. Bei der PCR des Mastermix mit einer cDNA-Probe von Tumorzellen mit dem Gen Sec62 war eine Bande gut sichtbar. Im Gegensatz dazu war die Negativ-Kontrolle negativ, da im Gel keine Bande zu erkennen war. Auch der Restriktionsverdau zeigte das erwartete Ergebnis. Die Spur mit der Probe, die das Plasmid mit der für Sec62 kodierenden cDNA enthielt, ließ zwei Banden erkennen. Im Gegensatz dazu sahen wir bei dem linearisierten Leervektor nur eine Bande. Die Länge der DNA-Proben ließ sich nicht ermitteln, da kein Längenstandart aufgetragen wurde.

Das Schülerpraktikum war sehr interessant und spannender, als wir es erwartet hatten. Wir durften sehr viel selbst machen und dadurch, dass wir uns im Unterricht zuvor intensiv mit der Genetik auseinander gesetzt hatten waren alle Zusammenhänge leicht zu verstehen, da ein theoretisches Verständins der Methoden bei uns bereits vorhanden war. Schön war es die Theorie auch einmal selbst in der Praxis ausprobieren zu können um sie so besser zu verstehen und nachzuvollziehen. Frau Dr. Amoroso erklärte gedultig und man hat gemerkt wie viel ihr an ihrer Arbeit liegt. Wir finden die Idee auch Schülern schon einen kleinen Einblick in das

Laborgeschehen zu geben toll und hoffen, dass auch die kommenden 12er Kurse von diesem Projekt profitieren können.

Ergebnis:



V1, V2, P1, P2

V1: Plasmid mit isolierter cDNA aus der Tumorzelle

➔ Man sieht zwei Banden: eine des Plasmids und die andere für die einklonierte Sequenz

V2: Plasmid ohne isolierte cDNA aus der Tumorzelle

➔ Man sieht nur eine Bande des Plasmids

P1: Mastermix mit isolierter cDNA aus der Tumorzelle

➔ Bande gut schitbar

P2: Negativ-Kontrolle, Mastermix ohne isolierte cDNA aus der Tumorzelle

➔ Keine Bande sichtbar