



**Institut für Zoologie
der
Universität Heidelberg**

**Hauptpraktikum E
Experimentelle Neurophysiologie**

- Lokalisierung von Proteinen in Sinneszellen -

im Sommersemester 2006

Gruppe A

Inhalt:

(A) Organisatorisches	2
(B) Theoretischer Hintergrund	3
- Allgemeines	3
- Fixation und Anfertigung von Gefrierschnitten	4
- Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie	4
- SDS-PAGE	5
- Western-Blot	6
(C) Versuchsplan	8
(D) Durchführung	10
- Präparation des Riechepithels der Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	10
- Fixation der Nase	10
- Herstellung des Gels für die SDS-PAGE	10
- Gelatinisieren von Objektträgern	11
- Einbetten der Nase	12
- Anfertigung von Gefrierschnitten	12
- Immunhistochemie der Kryostatschnitte	12
- Immunocytochemie der Odora-Zellen	13
- SDS-PAGE	14
- Western-Blot	15
- Bilddokumentation	17
(E) Lösungen	18
- Für die Immunhistochemie	18
- Für die SDS-PAGE	19
- Für den Western-Blot	20

(A) Organisatorisches

Das Praktikum beginnt um 10.00 Uhr, das Ende des Praktikumsstages ist variabel.

Während des gesamten Praktikumssteils muss Laborbekleidung (Labormantel, Handschuhe) getragen werden. Außerdem ist von jedem Studenten ein Taschenrechner mitzubringen.

Die Versuche werden von zwei Gruppen (A, B) zu je sechs Studenten durchgeführt. Jede dieser Gruppen unterteilt sich in drei Kleingruppen zu je zwei Studenten. Die Ergebnisse jeder Kleingruppe sind jeweils in einem Praktikumsprotokoll festzuhalten, welches spätestens eine Woche nach Beendigung des Praktikums beim Betreuer abzugeben ist. Weitere Informationen zum Praktikumsprotokoll sind dem gesonderten Blatt „Anforderungen an ein Praktikumsprotokoll in der Abteilung Molekulare Physiologie“ zu entnehmen.

(B) Theoretischer Hintergrund

Allgemeines

Über die Nasenöffnung gelangen Geruchsstoffe zum Riechepithel an der Dorsalseite der Nasenhöhle. Das Riechepithel enthält vier bis sechs Millionen Riechzellen (Abb. 1), die zu mehreren hundert Riechzelltypen gehören. Dabei spricht jeder Riechzelltyp nur auf genau einen Geruchsstoff an. Jede der Riechzellen erfährt durch apikale, dem Luftstrom exponierte Cilien eine starke Oberflächenvergrößerung. Rezeptoren in der Membran der Cilien vermitteln zwischen dem rezipierten Geruchsstoff und der im Zellinneren ablaufenden Signaltransduktionskaskade (Abb. 2). Teil dieser Kaskade ist ein olfaktorisches G-Protein (G_{olf}), das im Rahmen des Praktikums anhand von immunologischen Techniken an Gefrierschnitten des Riechepithels der Ratte (*Rattus norvegicus*), an Odora-Zellen und durch Western-Blot nachzuweisen ist.

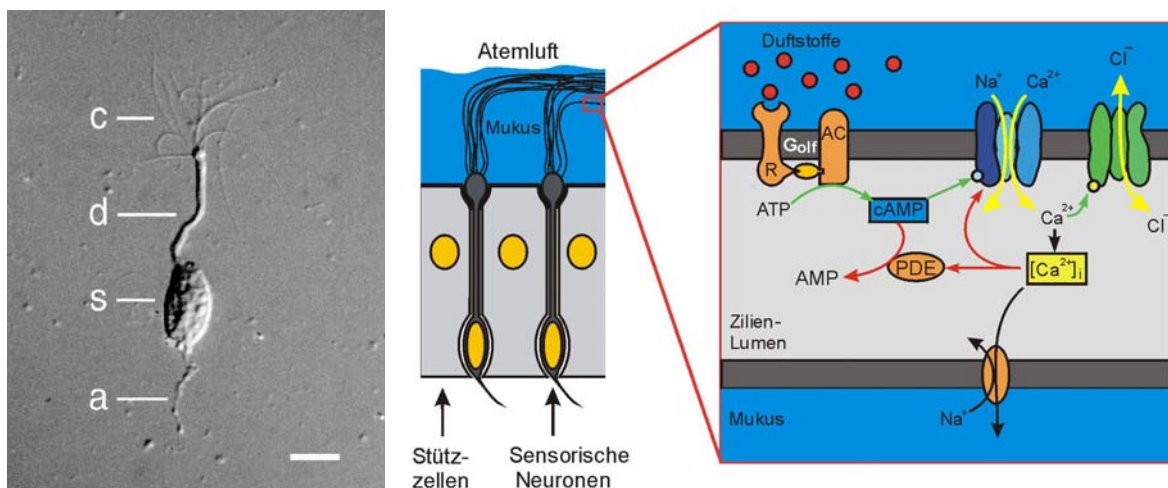


Abb. 1 (c: Cilium, d: Dendrit, s: Soma, a: Axon)

Abb. 2 Signaltransduktionskaskade in Riechzellen (R: Rezeptor, G: G-Protein, AC: Adenylatcyclase)

Gelangt ein Duftstoff zu seinem Rezeptor in der Cilienmembran, so wird in der Zelle ein GTP-abhängiges G-Protein aktiviert. Das G-Protein aktiviert seinerseits eine Adenylatcyclase, die ATP in den second messenger cAMP umwandelt. Durch den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration werden Kationenkanäle geöffnet, durch die Ca^{2+} und Na^+ aus dem umgebenden Mucus in die Riechzelle einströmen können. Der Ca^{2+} -Anstieg führt zur Öffnung von Cl^- -Kanälen, die Chlorid aus den Cilien leiten. Durch diese Ladungsströme findet eine Depolarisation der Cilienmembran statt, ein Sensorpotential entsteht. Ist die Depolarisation stark genug den Schwellenwert zu erreichen, werden Aktionspotentiale generiert, die über das Axon der Riechzelle fortgeleitet werden.

Teil der in Abbildung 2 dargestellten Signaltransduktionskaskade ist ein inhibitorisch wirkender Rückkopplungsmechanismus, der Riechzellen sehr bald nach ihrer Reizung adaptieren lässt. So hemmt Ca^{2+} den Ca^{2+}/Na^+ -Kanal und aktiviert zudem eine Phosphodiesterase (PDE), die cAMP zu AMP hydrolysiert. Der Ca^{2+} -Export aus den Cilien erfolgt durch einen Na^+/Ca^{2+} -Austauscher.

Fixation und Anfertigung von Gefrierschnitten

Um für die Immunhistochemie taugliche Präparate zu erhalten, muss das zu untersuchende Gewebe nach der Präparation fixiert und anschließend geschnitten werden.

Die Fixation des Gewebes erfolgt durch eine Behandlung mit Paraformaldehyd (PFA). PFA bewirkt die Quervernetzung von Proteinen und Deaktivierung von Enzymen, wodurch die Gewebestruktur erhalten bleibt. Zudem wird das Gewebe härter, was für den Schneidevorgang entscheidend ist.

Der beim Schneiden bei -20°C in Zellen und Geweben auftretenden Eiskristallbildung wird vorgebeugt, indem das intra- und extrazelluläre Wasser durch Behandlung mit Saccharoselösungen stufenweise entzogen wird.

Um das fixierte Gewebe im Kryostat schneiden zu können, wird es in TissueTek eingebettet und auf dem Probenhalter aufgefroren.

Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie

Die Immunhistochemie nutzt die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung ihrer Antigene, z.B. von G-Proteinen, im histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Werden die Antikörper so gewählt, dass sie an Antigene binden, die nur in ganz bestimmten Zellen und Geweben vorkommen, so können die Zellen und Gewebe hinsichtlich ihrer Proteinausstattung charakterisiert werden. Beispielsweise ist der Neurotransmitter Substance P ausschließlich in Schmerzzellen zu finden und kann dort mit einem entsprechenden Antikörper nachgewiesen werden.

Wird ein histologischer Gewebeschnitt mit Antikörpern inkubiert, so binden diese nur dort, wo sich die



Abb. 3 Schematische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung

passenden Antigene finden. Um diese Bindung nachzuweisen, müssen die Antikörper sichtbar gemacht werden. Hierfür werden sogenannte primäre und sekundäre Antikörper verwendet (Abb. 3). Die primären Antikörper richten sich gegen das in Zellen oder Geweben nachzuweisende Antigen, die sekundären Antikörper gegen die primären Antikörper. Die primären Antikörper sind bezüglich ihrer Herkunft und Spezifität so zu wählen, dass sie sich gegen eine andere als ihrer Herkunftsspezies richten (z.B. rabbit α rat G_{off}), die sekundären Antikörper so, dass sie sich gegen die Herkunftsspezies der primären Antikörper richten (z.B. goat α rabbit). Zudem sind die sekundären Antikörper mit einem Fluorochrom konjugiert, das bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (excitation wave length), Licht einer anderen Wellenlänge emittiert. Dieses Signal zeigt die Anwesenheit des gesuchten Antigens in den untersuchten Zellen und Geweben an.

Derartige Antikörper sind kommerziell erhältlich und können sich je nach dem Grad ihrer Spezifität preislich stark unterscheiden.

Um den Antikörpern das Eindringen ins Cytosol der Zellen zu ermöglichen, müssen die Zellmembranen zunächst mit einem Detergenz permeabilisiert werden. Ein geeignetes Detergenz ist Triton X-100, das Bestandteil der im Praktikum verwendeten Lösungen CT und CTA ist.

Um zu verhindern, dass es zwischen den Antikörpern und dem Präparat zu unspezifischen Bindungen kommt, werden die unspezifischen Bindestellen der Präparate mit Proteinen abgesättigt, man spricht von blocken. Häufig verwendete Blocker sind Gelatine, Milchpulver und Albumin. Die im Praktikum verwendete Substanz ist der kommerziell erhältliche Chemiblocker.

Die Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 4) erlaubt

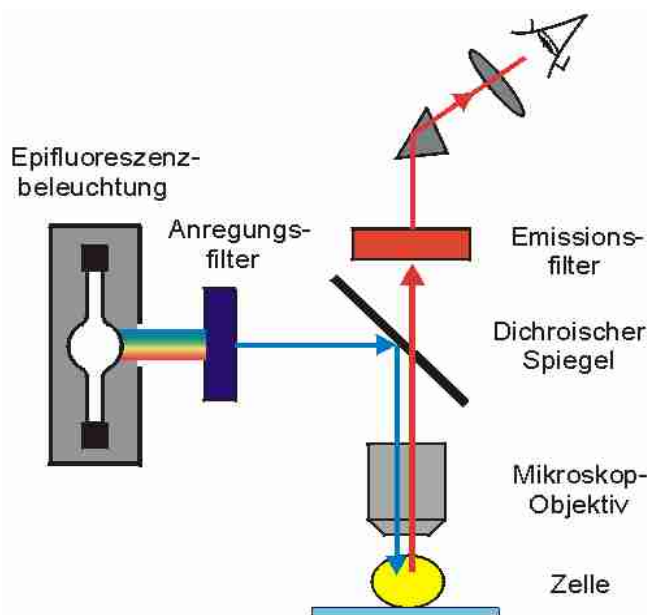


Abb. 4 Schematische Darstellung des optischen Systems eines Fluoreszenzmikroskops

die Untersuchung der Verteilung und Fluoreszenzintensität der markierten Zell- und Gewebestandteile. Hierfür ist das optische System so einzurichten, dass die Anregungs- und die Emissionswellenlänge für das jeweilige Fluorochrom gut voneinander getrennt sind.

Aus dem weißen Licht einer Xenon- oder Quecksilberdampf-Lampe wird durch ein Anregungsfilter die für die Anregung des Fluorochroms geeignete Wellenlänge (hier blau) herausgefiltert.

Im Innern des Mikroskops wird dieses Licht von einem dichroischen Spiegel (auch dichromatischer Spiegel) auf das Präparat reflektiert.

Dichroische Spiegel haben eine kritische Wellenlänge: Licht mit kleineren Wellenlängen wird reflektiert, Licht mit größeren Wellenlängen durchgelassen. Der Spiegel wird so gewählt, dass die kritische Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluorochroms liegt. So wird das Anregungslicht durch das Objektiv zum Präparat gelenkt, während das langwelligere Fluoreszenzlicht (hier rot) den Spiegel passiert und durch das Okular zum Auge gelangt.

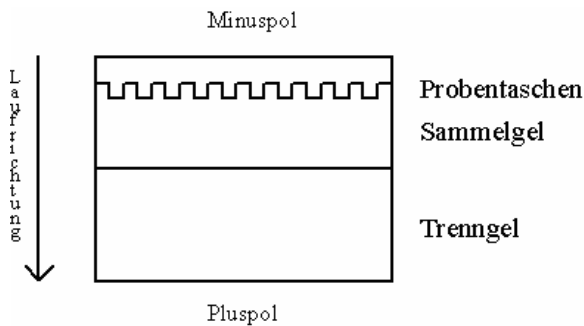
Eine möglichst vollständige Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht durch dieses optische System ist die Voraussetzung für eine gute Abbildung im Mikroskop. Filtersätze mit geeigneten Kombinationen von Filtern und dichroischen Spiegeln können für jeden gebräuchlichen Fluoreszenzfarbstoff erworben werden.

SDS-PAGE

Zur Untersuchung von Proteinen verwendet man die SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamid geoelectrophoresis). Sie ermöglicht es, die Reinheit einer Proteinprobe zu prüfen und das Molekulargewicht der Proteine abzuschätzen. Für die SDS-PAGE wird das zu untersuchende Proteingemisch mit SDS-Probenpuffer versetzt. SDS, ein anionisches Detergenz, lagert sich dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen der Kohlenstoffkette mit dem Protein an dessen

Aminosäurereste an und zerstört nichtkovalente Bindungen im Protein, wodurch dieses denaturiert wird. Die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur gehen verloren. Die negativ geladenen SO_4^{2-} -Gruppen des SDS werden hierbei nach außen exponiert. Dabei überdeckt die Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine. Die Ladung eines SDS-Proteinkomplexes steht in direkter Beziehung zur jeweiligen Proteingröße.

Die Proteinproben werden auf ein Gel aus Polyacrylamid geladen. Wird an das Gel eine Spannung



angelegt, so beginnen die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe zum Pluspol (Anode) zu wandern. Kleine Komplexe wandern hierbei schneller als große. Die Poren im Gel wirken als Molekularsieb. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Komplexe im Gel ist umgekehrt proportional zum Molekulargewicht des jeweiligen Proteins.

Soll das Molekulargewicht eines unbekanntes Proteins bestimmt werden, so wird eine Mischung

Abb. Schematische Darstellung der Elektrophorese

von SDS-denaturierten Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht (Molekulargewichtsmarker) mitaufgetragen.

Für die SDS-PAGE sind ein Sammelgel und ein Trenngel herzustellen. Das Sammelgel dient der Fokussierung, das Trenngel der Auftrennung der Proteine.

Die Proben werden in die vorbereiteten Taschen gegeben. Wird eine Spannung angelegt, so wandern die SDS-Proteinkomplexe zunächst ins großporige Sammelgel. Den Proteinen voraus wandern Cl^- -Ionen, die im Tris-Probenpuffer enthalten sind und aufgrund ihrer geringen Größe eine hohe Mobilität besitzen. Sie verhindern, dass einige der Proteine das Trenngel zu früh erreichen. Den Proteinen selbst folgt eine Front aus Glycinationen, die aus dem Elektrodenpuffer stammen. Bei pH 6,8 ist Glycin nur schwach negativ geladen. Die Glycinationen wandern folglich langsam, holen aber schließlich die SDS-Proteinkomplexe ein und sorgen dafür, dass alle Komplexe gleichzeitig das Trenngel erreichen. Man spricht daher von einer Fokussierung. Ist das Trenngel erreicht, so überholen die Glycinationen die SDS-Proteinkomplexe, da sie durch den plötzlichen pH-Unterschied zwischen Sammelgel (pH 6,8) und Trenngel (pH 8,8) stark negativ geladen werden und hierbei ihre Mobilität sprunghaft ansteigt. Zudem werden die Glycinationen durch die engeren Poren des Trenngels nicht so stark beeinflusst wie die SDS-Proteinkomplexe. Letztere werden dann aufgetrennt.

Western-Blot

Mit einem Western-Blot können Proteine, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf PVDF- oder Nitrocellulosemembranen transferiert worden sind, durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Immunoblot-Methode).

Im Praktikum werden die Antikörper mit der Odora-Zelllinie getestet. Diese Zelllinie leitet sich von olfaktorischen Stammzellen ab und exprimiert daher wesentliche Komponenten der Signal-

transduktionskaskade der Riechsinneszellen, wie zum Beispiel das olfaktorische G-Protein (G_{olf}) und eine Adenylatcyclase (AC3).

Abbildung 6 zeigt schematisch den Versuchsablauf beim Western-Blot. Das die Proteine enthaltende

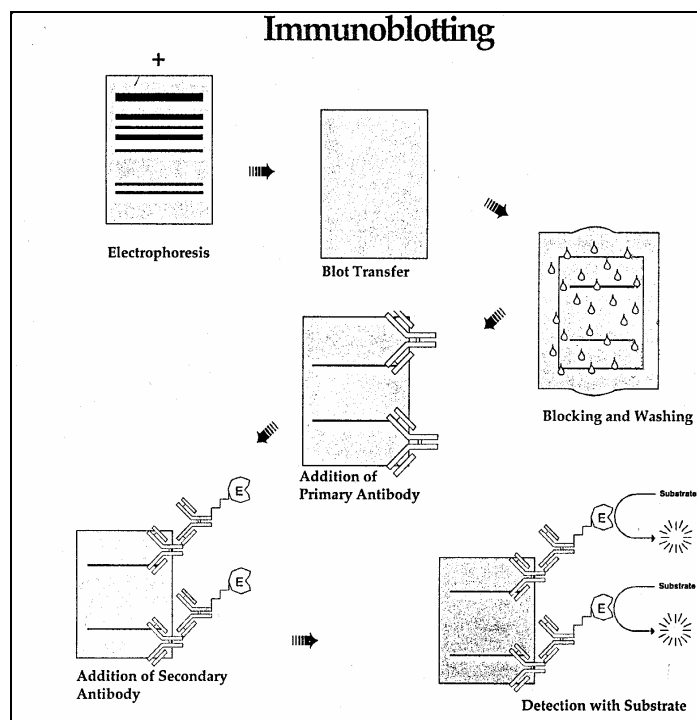


Abb. 6 Schematische Darstellung des Western-Blots

Polyacrylamidgel wird in Nachbarschaft zu einer PVDF-Membran gebracht, Vorder- und Rückseite des Gels mit je acht Whatman-Filterpapieren bedeckt und schließlich eine Spannung so angelegt, dass die durch das SDS negativ geladenen Proteine in die PVDF-Membran wandern.

Diesem Transfer folgt ein Blockschritt mit BSA, um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. Der Erstantikörper bindet auf dem Blot an diejenigen Proteine, die geeignete Epitope tragen. Der Zweitantikörper ist so zu wählen, dass er an den Erstantikörper bindet.

Um den Zweitantikörper auf der PVDF-Membran sichtbar zu machen, trägt er das Enzym alkalische Phosphatase, das von Substraten Phosphatgruppen abspaltet. Ein geeignetes Substrat enthält die im Praktikum verwendete NBT/BCIP-

Stammlösung. Das Reaktionsschema der Farbstoff erzeugenden Redoxreaktion ist in Abbildung 7 dargestellt.

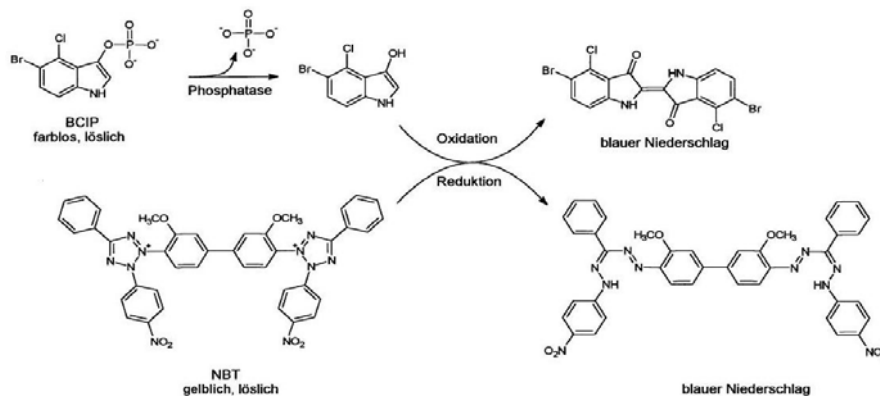


Abb. 7 Alkalische Phosphatase-NBT/BCIP-Farbreaktion

Die an den Zweitantikörper gekoppelte alkalische Phosphatase dephosphoryliert das BCIP. Das entstehende Produkt reagiert in einer Redoxreaktion mit NBT zu zwei unlöslichen, blauen Farbstoffen, die die Anwesenheit des Zweitantikörpers anzeigen. Als Versuchsergebnis ist eine für das G_{olf} -Protein charakteristische Bande bei 45kDa zu erwarten. Es lässt sich mit einem Flachbettscanner dokumentieren.

(C) Versuchsplan für Gruppe A

Montag

- 10.00 Uhr Einführung
- 10.15 Uhr Präparation des Riechepithels der Ratte (*Rattus norvegicus*)
- 11.00 Uhr Fixation der Nase
- 12.00 Uhr Pause
- 13.00 Uhr Fixation der Nase (Fortsetzung)
Ansetzen diverser Lösungen
Herstellung der Gele für die SDS-PAGE
- 17.00 Uhr Ende des Praktikumstages

Dienstag

- 10.00 Uhr Einführung
- 10.15 Uhr Einbetten der Nase
- 11.15 Uhr Anfertigung von Gefrierschnitten der Nase
- 12.15 Uhr Pause
- 13.00 Uhr Immunhistochemie der Kryostatschnitte (1. Antikörper, Richardson-Färbung)
Immuncytochemie der Odora-Zellen (1. + 2. Antikörper, DAPI-Färbung, Eindecken)
- 17.45 Uhr Ende des Praktikumstages

Mittwoch

- 10.00 Uhr Einführung
- 10.15 Uhr SDS-PAGE
- 11.30 Uhr Pause
- 12.30 Uhr Western Blot
- 14.45 Uhr BSA-Block
- 15.00 Uhr Immunhistochemie der Kryostatschnitte (2. Antikörper, DAPI-Färbung, Eindecken)
- 17.45 Uhr Ende des Praktikumstages

Donnerstag

- 10.00 Uhr Einführung
- 10.15 Uhr Western Blot (1. Antikörper)
- 11.30 Uhr Pause
- 12.30 Uhr Western Blot (2. Antikörper)
- 14.45 Uhr Farbreaktion mit NBT/BCIP
- 16.00 Uhr Ende des Praktikumstages

Freitag

10.00 Uhr Einführung

10.15 Uhr Bilddokumentation

17.00 Uhr Ende der Praktikumswoche

(D) Durchführung

Montag

Präparation des Riechepithels der Ratte (*Rattus norvegicus*)

Die Ratte wurde bereits vor Praktikumsbeginn mit CO₂ getötet. Die Präparation der Ratte wird von einem Studenten oder wahlweise vom Assistenten durchgeführt.

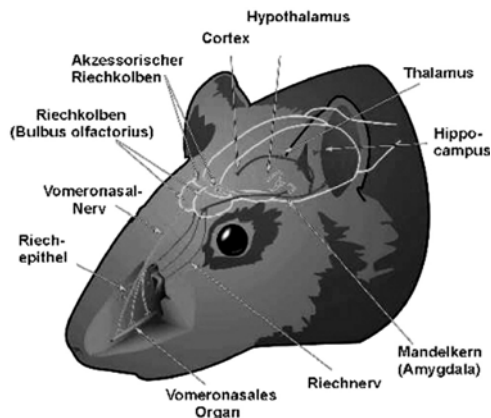


Abb. 8 Kopf der Ratte

- Abtrennen des Kopfes mit einer Schere
- Entfernung des Unterkiefers.
- Entfernung des Fells und der Ohren von dorsal mit der Schere.
- Entfernung des hinter den Augen liegenden Kopfteiles und der Nasenspitze.
- Spaltung des Schädels von dorsal mit einer Schere, so dass die Fixationsflüssigkeiten eindringen können.

Fixation der Nase

- Waschen des Gewebes in 1xPBS um das Blut zu entfernen.
- Gewebe mit 4% PFA überschichten. Restluft in Hohlräumen der Nase durch anlegen eines Unterdrucks für 2min. im Exsikkator entfernen. Inkubation insgesamt für 40min.
- 3x 2min. waschen in 1xPBS.
- Inkubation in 10% Saccharose für 3h.
- Zwischenzeitliche Herstellung des Gels für die SDS-PAGE.
- Inkubation in 30% Saccharose bei 4°C über Nacht.

Herstellung des Gels für die SDS-PAGE

Jede Zweiergruppe gießt 1 Gel. Dabei gießt jeweils der eine Gruppenpartner das Trenngel, der andere das Sammelgel.

- Glasplatten und Spacer mit 70% EtOH entfetten.
- Spacer mit 3mm Abstand zum äußeren Plattenrand zwischen zwei Platten platzieren, unteren Spacer rechts und links, seitliche Spacer oben überstehen lassen.
- Mit mindestens vier Klammern fixieren.

- Fugen um die Spacer mit Schlauch abdichten.
- Ansetzen der Gellösungen in 50ml Erlenmeyer-Kolben:

12,5% Trenngel: - 3,5ml bidestilliertes Wasser
 - 8,3ml Acrylamid
 - 7,5ml Tris pH 8,8
 - 0,4ml SDS
 - 0,2ml APS
 - 0,02ml TEMED

3,8% Sammelgel: - 7,1ml bidestilliertes Wasser
 - 1,3ml Acrylamid
 - 1,25ml Tris pH 6,8
 - 0,2ml SDS
 - 0,1ml APS
 - 0,01ml TEMED

Die Radikalstarter APS und der Katalysator TEMED sind erst kurz vor Gebrauch zuzugeben. Gut mischen!

Vorsicht: Acrylamid ist in unpolymerisiertem Zustand giftig! Reste auspolymerisieren lassen. Abfälle in die dafür vorgesehenen Abfallbehälter.

- Trenngel bis 3cm unter den oberen Rand in die vorbereiteten Platten gießen, vorsichtig mit wenig EtOH (absolut) überschichten und die radikalische Reaktion abwarten (~ 15min.).
- EtOH abgießen, 3,8%iges Sammelgel zwischen die Platten gießen.
- Probenkamm vorsichtig einsetzen.
- Nach der Polymerisation (~15min.) das Auftragsschema (siehe Abb. 9) auf die Außenseite der großen Glasplatte mit einem Permanent-Marker übertragen. Außerdem die späteren Schnittstellen der PVDF-Membran aufzeichnen.
- Abmessungen des Trenngels bestimmen.
- Gel in feuchte Tücher und Alufolie einschlagen und im Kühlschrank (4°C) lagern.

Gelatinisieren von Objektträgern

- Objektträger in Glashalter setzen.
- Waschen der Objektträger in 70% EtOH für 30min.
- Waschen der Objektträger in Aqua dest.
- 1g Gelatine in 200ml Aqua dest. unter Rühren bei 40-50°C lösen.
- Objektträger kurz in Gelatinelösung eintauchen.
- Überflüssige Gelatinelösung durch leichtes Aufstoßen der Objektträger auf Papier entfernen.
- Objektträger bei 65°C im Trockenschrank für 5h trocknen.
- Objektträger bis zu ihrer Verwendung in Alufolie aufbewahren.

Dienstag

Einbetten der Nase

- 20ml einer 30% Saccharose/TissueTek-Lösung im Verhältnis 1:1 in einem 50ml Falcon-Tube ansetzen.
- Einschnitt an der Oberseite des Kopfes mit einer Pinzette auseinanderhalten und den Spalt mit der Saccharose/TissueTek-Lösung füllen. Luftblasen sind zu vermeiden.
- Präparat in den Kryostat stellen und Saccharose/TissueTek-Lösung aushärten lassen.
- Gewebe mit unverdünntem TissueTek bedecken und im Kryostaten aushärten lassen.

Anfertigung von Gefrierschnitten

- Entriegeln des Kryostaten durch Drücken des Schlüsselsymbols, bis auf dem Display „Sperre“ erscheint.
- Einstellen der Objekttemperatur (OT). Hierfür durch Drücken des Kreissymbols den Menüpunkt für die Einstellung der OT aufrufen.
- Mit den Pfeiltasten die OT auf -20°C einstellen.
- Warten bis „Sperre“ auf dem Display erscheint.
- Einbetten und Auffrieren des fixierten Gewebes auf dem Probenhalter mittels TissueTek (wird vom Assistenten erklärt)
- Entriegeln der Handkurbel
- Mit der (+)- bzw. (-)-Taste Schnittdicke auf 10µm einstellen.
- Anschneiden des Präparats durch Betätigung der Handkurbel (das Präparat muss sichtbar sein).
- Schnittstrecker zum Messer klappen.
- Handkurbel gleichmäßig betätigen.
- Aufziehen von je zwei Schnitten auf die vorbereiteten Objektträger (siehe Abbildung 10).
- Nach Beendigung des Schneidens den Kryostaten gründlich reinigen. Objektkühlung deaktivieren. Kryostat nicht ausschalten!!!
- Aufbewahrung der Gefrierschnitte bei -20°C im Gefrierschrank.

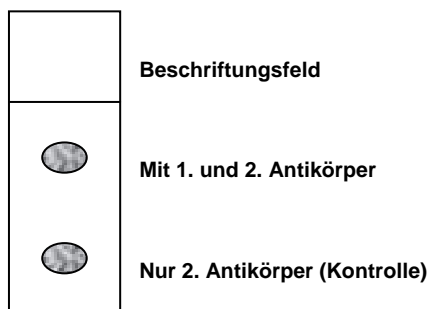


Abb. 10 Objektträger

Immunhistochemie der Kryostatschnitte

Pro Zweiergruppe werden zwei Objektträger, d.h. vier Schnitte bearbeitet.

- Jeden Schnitt mehrmals mit PapPen umranden.
- Inkubation mit 4% PFA für 5min.

- 3x 2min. waschen in 1xPBS.
- 1xPBS absaugen mit Papier.
- Präinkubation mit CT für 1h in feuchter Kammer bei Raumtemperatur.
- CT mit Papier absaugen.
- 1.-Antikörper (anti-Ratten-G_{olf} aus Kaninchen) in CTA zugeben, jedoch nicht auf die Kontrollschnitte (!!!). Der 1.-Antikörper ist 1:1000 zu verdünnen.
- Kontrollschnitte mit 1xPBS bedecken.
- Über Nacht in feuchter Kammer bei 4°C inkubieren.

Immuncytochemie der Odora-Zellen

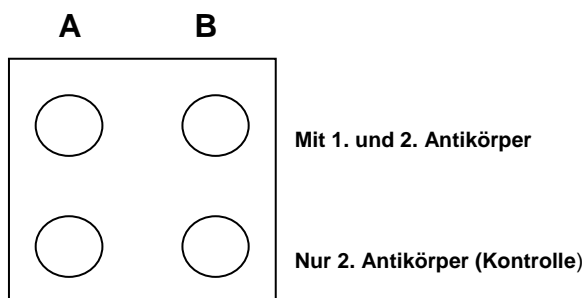


Abbildung 10 4-Well-Platte

Es werden die bereitgestellten Odora-Zellen verwendet.

- Medium mit Pasteurpipette absaugen.
- 2x 5min. waschen mit 1xPBS.
- Inkubation mit 4% PFA für 15min.
- PFA mit Pasteurpipette absaugen.
- 2x 5min. waschen in 1xPBS.
- Präinkubation mit 500µl CT pro Well für 20min. bei Raumtemperatur.
- CT mit Pasteurpipette absaugen.
- Je 300µl 1.-Antikörper (anti-Ratten-G_{olf} aus Kaninchen) in CT in die beiden oberen Wells geben, jedoch nicht auf die Kontrollzellen (!!!). Der 1.-Antikörper ist 1:1000 in CT zu verdünnen (siehe Abbildung 10).
- Kontrollzellen mit 300µl 1xPBS bedecken.
- 1h bei Raumtemperatur inkubieren.

Zwischenzeitlich: Richardson-Färbung mit den Kryostatschnitten

- 1 Tropfen 4% PFA für 1min. auftragen.
- 1x spülen mit 1xPBS
- 1 Tropfen Richardson-Blau-Lösung (1:5 verdünnt) auftragen; kurz einwirken lassen
- Spülen mit 1xPBS, bis sich keine Farbe mehr ablöst.
- Wenig 1xPBS auftragen.
- Großes Deckglas auflegen.

Fortsetzung: Immunhistochemie der Odora-Zellen

- Flüssigkeit absaugen.
- 3x 5min. waschen in 1xPBS.
- 1xPBS absaugen.
- 250µl 2.-Antikörper (Alexa Fluor 568 aus Ziege gegen Kaninchen) in C in jedes Well geben. Der 2.-Antikörper ist 1:1000 in C zu verdünnen.
- 30min. bei Raumtemperatur und Dunkelheit (!!!) inkubieren.
- 3x 5min. waschen in 1xPBS bei Dunkelheit.
- 1xPBS absaugen.
- 3µl DAPI (mutagen!!!) in 900µl 1xPBS lösen. 200µl in jedes Well geben. 10s inkubieren.
- 3x 5min. waschen in 1xPBS.
- 1xPBS absaugen mit Papier.
- 2 Tropfen Aqua PolyMount auf 1 Objektträger geben.
- Jedes Deckgläschen kopfüber auf einen Tropfen legen.
- Aqua PolyMount über Nacht bei Dunkelheit (!) trocknen lassen.

Mittwoch

SDS-PAGE

Es wird das bereitgestellte Odora-Zell-Lysat verwendet.

- Vorsichtig den Probenkamm herausziehen.
- Schlauch entfernen, Spacer nicht entfernen.
- Gel inclusive der Glasplatten einspannen.
- Tanks mit Elektrodenpuffer füllen. Taschen mit Elektrodenpuffer gut ausspülen. Das Gel muss blasenfrei an beiden Enden im Laufpuffer stehen. Hierfür eine Spritze benutzen.
- Molekulargewichtsstandard (prestained) langsam auftauen (nicht kochen auf Heizblock!).
- Odora-Zell-Lysat 3min. auf Heizblock bei 100°C kochen.
- Odora-Zell-Lysat zentrifugieren (3min., max. Geschwindigkeit).
- Ein Gel wie in Abbildung 9 beladen (aufwirbeln vermeiden!). Das zweite Gel dient als Reserve:
 - Erste und letzte Tasche des Gels freilassen!
 - 10µl des Lysat-Überstandes auftragen.
 - 10µl eines 1:5 verdünnten Molekulargewichtsstandards (prestained) mitauftragen.

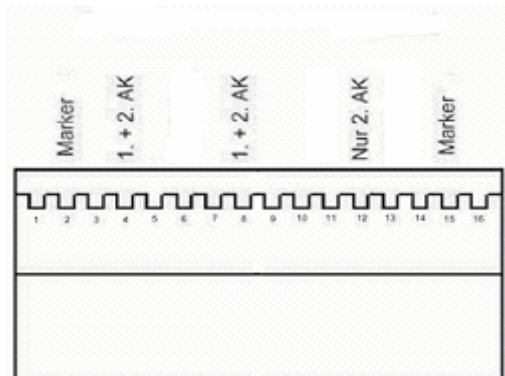


Abb. 9 Auftragungsschema

- Start der Elektrophorese mit maximaler Spannung bei 35mA (Diese Stromstärke bezieht sich auf ein Gel. Für mehr Gele ist eine entsprechend größere Stromstärke zu wählen). Die Elektrophorese dauert etwa 3h und wird durch Betätigung der SET-Taste gestoppt, sobald die Bromphenolblau-Front kurz vor dem Ende des Trenngels steht.

Western-Blot

Der Protein-Transfer erfolgt nach dem Semi-Dry-Verfahren.

Während dieses Versuchsteils sind unbedingt Handschuhe zu tragen!

- PVDF-Membran und 16 Whatman Nr. 3-Filterpapiere auf die Größe des Trenngels zuschneiden.
- Das zu transferierende Gel wird nach der Elektrophorese für 10min. in einer Kunststoffbox in Transferpuffer äquilibriert. Um eine Verwechslung der Auftragsbanden zu vermeiden, wird die linke obere Ecke des Trenngels mit einem Spatel abgetrennt.
- Filterpapiere in Transferpuffer legen.
- Zur Aktivierung die PVDF-Membran für 5min. in 100% Methanol legen
- PVDF-Membran für 5min. in Transferpuffer äquilibrieren. Membran nicht mehr trocknen lassen!
- 8 Lagen mit Transferpuffer getränkten Filterpapieres auf die untere Kohlenelektrodenplatte (Anode) einzeln aufeinander legen.
- Membran auflegen.
- Gel auflegen.
- Luftblasen durch leichtes Rollen mit einer Pasteurpipette herausdrücken, da Luftblasen den Proteintransfer behindern.
- Die restlichen 8 Lagen Filterpapier auflegen.
- Luftblasen durch leichtes Rollen einer Pasteurpipette herausdrücken.
- Anodenplatte um das „Sandwich“ herum mit Papier trocknen.
- „Sandwich“ mit Transferpuffer beträufeln.
- Zweite Kohlenelektrode (Kathode) auflegen und Apparatur verschließen.
- Die Stromstärke ist in Abhängigkeit von der Gelgröße zu wählen. Pro cm² werden 1,5mA angelegt. Die Dauer des Transfers beträgt 60min.
- Stromquelle abschalten und Apparatur öffnen.
- PVDF-Membran vorsichtig mit einer Pinzette entnehmen und auf der Glasplatte, die die Markierungen trägt, platzieren. Marker abtrennen und auf Papier lufttrocknen. Linke obere Ecke der restlichen Membran abschneiden.
- Membran in 5% BSA-Blocklösung in Petrischalen über Nacht im Kühlraum (5. Stock) inkubieren. 5% BSA-Blocklösung muss frisch angesetzt werden.
- Die Elektrophorese- und Western-Blot-Apparaturen sind nach Gebrauch gründlich mit Aqua dest. zu reinigen.

Fortsetzung: Immunhistochemie der Kryostatschnitte

- Flüssigkeit absaugen.
- 3x 2min. waschen in 1xPBS.
- 1xPBS absaugen mit Papier.

- 2.-Antikörper (Alexa Fluor 568 aus Ziege gegen Kaninchen) in C zugeben. Der 2.-Antikörper ist jeweils 1:1000 in C zu verdünnen.
- 90min. in feuchter Kammer bei Raumtemperatur und Dunkelheit (!!!) inkubieren.
- 3x 2min. waschen in 1xPBS.
- 1xPBS absaugen mit Papier.
- 600µl DAPI (mutagen!!!) in 1xPBS im Verhältnis 1:300 ansetzen. Schnitte darin 10s inkubieren.
- 3x 2min. waschen in 1xPBS.
- 1xPBS absaugen mit Papier.
- Eindecken der Schnitte in Aqua PolyMount. Deckglas auflegen.
- Aqua PolyMount über Nacht bei Dunkelheit (!) trocknen lassen.

Donnerstag

Fortsetzung: Western-Blot

- PVDF-Membran vorsichtig mit einer Pinzette aus der BSA-Blocklösung entnehmen und auf der markierten Glasplatte platzieren. Die PVDF-Membran ist dabei mit Aqua dest. immer gut feucht zu halten.
- Trennung der 5 Laufspuren pro Gruppe durch Zerschneiden der Membran mit dem Skalpell (vorher mit EtOH reinigen) auf der Glasplatte. Membran auf der Vorderseite oben mit einem Bleistift markieren.
- Verdünnungspuffer (0,5% BSA-Lösung in 1xPBS + 0,05% Tween 20) ansetzen.
- Inkubation mit dem 1. Antikörper (anti-Ratten-G₀IF aus Kaninchen bzw. anti-Ratten-AC3 aus Kaninchen) für 90min. bei Raumtemperatur in einem 15ml Falcon-Tube auf dem Schüttler. Der 1. Antikörper ist 1:1000 in 2ml Verdünnungspuffer zu verdünnen.
- Kontrollen nur in 4ml Verdünnungspuffer inkubieren.
- Waschpuffer (1xPBS + 0,1% Triton X-100) ansetzen.
- 3x 5min. waschen in 25ml Waschpuffer in Petrischale.
- 1x 5min. waschen in 25ml 1x PBS in Petrischale.
- Inkubation mit dem alkalische Phosphatase gekoppelten 2. Antikörper (gegen Kaninchen) für 60min. bei Raumtemperatur in 15ml Falco-Tubes. Der 2. Antikörper ist 1:2000 in 2ml Verdünnungspuffer zu verdünnen.
- 3x 5min. waschen in 25ml Waschpuffer.
- 1x 5min. waschen in 25ml bidestilliertem Wasser.
- Färbelösung herstellen aus 66µl NBT, 33µl BCIP, 10ml Farbentwicklungspuffer.
- Inkubation der PVDF-Membran bei Dunkelheit in der Färbelösung in einer Petrischale bis die Banden sichtbar werden (~2-10min). Hierbei zuerst die Kontrollen färben.
- Stoppen der Reaktion durch Waschen der Membran in bidestilliertem Wasser, um eine Überfärbung zu verhindern.
- PVDF-Membran lufttrocknen und auf ein DIN A4-Blatt aufkleben.

Freitag

Bilddokumentation

Die Dokumentation der gefärbten Gewebeschnitte und Odora-Zellen erfolgt am Fluoreszenzmikroskop, das Ergebnis des Western-Blots mit einem Flachbettscanner. Zuletzt werden sämtliche Bilder auf eine CD gebrannt.

Die Handhabung des Mikroskops und die Aufnahme der Bilder wird vom Assistenten erklärt.

A568:

- Excitation: 568nm (gelbgrün)
- Emission: 603nm (rotorange)

DAPI-Messungen:

- Excitation: 359nm (violett)
- Emission: 461nm (blau)

(E) Lösungen

Die im Folgenden mit ☺ gekennzeichneten Lösungen sind von den Praktikanten anzusetzen.
Die nicht gekennzeichneten Lösungen werden bereitgestellt.

Für die Immunhistochemie und Immuncytochemie

☺ 1000ml 10xPBS

- 81mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 19mM NaH₂PO₄ x H₂O
- 1,3M NaCl
- pH 7,4
- Ad 1000ml mit bidestilliertem Wasser

☺ 1000ml 1xPBS

- 100ml 10xPBS
- Ad 1000ml mit bidestilliertem Wasser

100ml 30% (w/v) Saccharose-Lösung

- 30% (w/v) Saccharose
- 0,05% (w/v) NaN₃
- Ad 100ml mit 1xPBS

100ml 10% (w/v) Saccharose-Lösung

- 10% (w/v) Saccharose
- 0,05% (w/v) NaN₃
- Ad 100ml mit 1xPBS

☺ 100ml 4% (w/v) Paraformaldehyd-Lösung (PFA)

- 4% (w/v) Paraformaldehyd
- Ad 100ml mit 1xPBS
- Unter Rühren bei 60°C im Abzug lösen
- Lagerung bei -20°C

20ml 30% (v/v) Saccharose-/TissueTek-Lösung (Verhältnis 1:1)

- 10ml 30% (v/v) Saccharose-Lösung
- 10ml TissueTek

☺ **50ml C**

- 5% (v/v) Chemiblocker (Chemicon, Cat#2170 - S)
- Ad 50ml mit 1xPBS
- Lagerung bei -20°C

☺ **50ml CT**

- 5% (v/v) Chemiblocker (Chemicon, Cat#2170 - S)
- 0,5% (v/v) Triton X-100
- Ad 50ml mit 1xPBS
- Lagerung bei -20°C

50ml CTA

- 5% (v/v) Chemiblocker (Chemicon, Cat#2170 - S)
- 0,5% (v/v) Triton X-100
- 0,05% (w/v) NaN_3
- Ad 50ml mit 1xPBS
- Lagerung bei -20°C

Für die SDS-PAGE

☺ **100ml Trenngel-Puffer (1M Tris-Puffer, pH 8,8)**

- 12,1g Tris in 75ml bidestilliertem Wasser lösen
- pH 8,8 einstellen (HCl benutzen)
- Ad 100ml mit bidestilliertem Wasser

☺ **100ml Sammelgel-Puffer (1M Tris-Puffer, pH 6,8)**

- 12,1g Tris in ~75ml bidestilliertem Wasser lösen
- pH 6,8 einstellen (HCl benutzen)
- Ad 100ml mit bidestilliertem Wasser

☺ **100ml 10% (w/v) SDS**

- 10g SDS
- Ad 100ml mit bidestilliertes Wasser

☺ **1000ml 1x Elektroden-Puffer**

- 3,02g Tris
- 14,2g Glycin
- In 800ml bidestilliertem Wasser lösen, pH 8,3-8,4 (pH kontrollieren)
- 2g SDS zugeben
- Auffüllen auf 1000ml

30% wässrige Acrylamid-Stammlösung mit 0,8% Bisacrylamid

TEMED (Tetramethyldiamin)

10ml 10% (w/v) APS (Ammoniumperoxodisulfat)

1g APS

Ad 10ml mit bidestilliertem Wasser

Für den Western-Blot

☺ 1000ml Transferpuffer (0,025M Tris, 0,192M Glycin, 20% (v/v) Methanol)

3g Tris und 14,2g Glycin in 700ml bidestilliertem Wasser lösen

200ml Methanol

pH 8,3-8,4 einstellen

Ad 1000ml mit bidestilliertem Wasser

1xPBS

Zusammensetzung siehe oben.

☺ 100ml BSA-Blocklösung

2% (w/v) BSA

Ad 100ml mit 1xPBS

Ist kurz vor Gebrauch anzusetzen.

☺ 100ml Verdünnungspuffer für die Antikörper

0,5% (w/v) BSA

0,05% (v/v) Tween 20

Ad 100ml mit 1xPBS

☺ 1000ml Waschpuffer

0,1% (v/v) Triton X-100

Ad 1000ml mit 1xPBS

☺ 100ml Farbentwicklungspuffer

0,1M Tris/HCl

0,1M NaCl

5mM MgCl₂*6H₂O

pH 9,5

Ad 100ml mit bidestilliertem Wasser

Substrate

50mg/ml NBT (= Nitrobluetetrazolium) in 70% (v/v) DMF

50mg/ml BCIP (= 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyphosphat-Na) in 100% (v/v) DMF

☺ 10ml Färbelösung

66µl NBT

33µl BCIP

Ad 10ml mit Farbentwicklungspuffer