

Biologisches Methodenpraktikum (Modul 4B): Versuchsteil Funktionsanalyse

Funktion von Retinsäure bei der Differenzierung der anterior-posterior Achse des Zebrafischs (in-situ Hybridisierung für das Segmentierungsgen *krox-20* an whole-mount Embryonen)

Dieser Versuch besteht aus drei Abschnitten, in denen Sie (1) Stadien der frühen Zebrafisch-Entwicklung charakterisieren, (2) die Zebrafisch-Entwicklung durch Pharmaka manipulieren und (3) die Folgen dieser Eingriffe anhand molekularer Nachweismethoden analysieren werden.

Allgemeine Arbeitsanweisungen:

RNase-freies Arbeiten: RNasen sind ubiquitär. Bei der in-situ-Hybridisierung wird mRNA mit Hilfe einer markierten RNA-Sonde nachgewiesen. Sowohl Target, wie auch die Sonde sind also empfindlich gegen RNasen. Deshalb muss „RNase-frei“ gearbeitet werden. Das bedeutet:

- Glas und Metall: Bei 180°C 3h „backen“.
- Kunststoff: Verpackte Einmal-Instrumente sind RNase-frei. Eppis und Pipettenspitzen aus frischer Packung nehmen, autoklavieren.
- Chemikalien:

Festsubstanzen aus neuen Gebinden; gar nicht oder nur mit gebackenen Spateln berühren.

Lösungen soweit möglich mit 0.1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeln: DEPC zur Endkonz. von 0.1 % zugeben, 10 min bei RT rühren, autoklavieren. **Achtung: DEPC-Dämpfe sind kanzerogen!**

Nicht DEPC-behandelbare Lösungen (solche, die starke Nukleophile enthalten bzw. nicht autoklavierbar sind) mit DEPC-behandeltem H₂O ansetzen.

Infizierbare Lösungen steril halten.

- Hände: Alle Geräte nur mit Handschuhen berühren (Fingerabdrücke kontaminieren später Handschuhe), Handschuhe oft wechseln.
- Pipetten, Oberflächen: Mit RNase Away abwischen.

1. Versuchsteil: Frühe Zebrafischentwicklung - Stadien und deren Merkmale

Material:

- Kleine Petrischalen
- E3-Embryomedium
- Plastik-Pasteurpipetten
- Dumont Pinzetten Stärke 5 zum Positionieren (und evtl. Dechorionieren) der Embryonen
- Vorbereitete Embryonen verschiedener Stadien

Durchführung (Dieser Versuch läuft parallel zu den anderen Versuchsteilen):

Die Petrischalen zu etwa einem Drittel mit E3-Medium füllen und die ausgegebenen Embryonen in die Beobachtungsschale überführen, Mikroskopie mit dem Binokular.

1. Embryonen von allen Seiten (mit Pinzetten vorsichtig bewegen) betrachten.
2. Mit Hilfe der Stadien-tabelle des Anhangs Embryonen gemäß ihres Alters anordnen.
3. Identifizieren Sie für jedes Stadium charakteristische Strukturen („*Staging Pointers*“) und zeichnen Sie ausgewählte Stadien (mindestens 3, jedoch nicht nur die „einfachen“, frühen). Jede Versuchsgruppe sollte am Ende Zeichnungen der wichtigsten Stadien in guter Qualität, sauber beschriftet zusammenstellen können.

Auswertung:

- Zeichnungen, wie oben beschrieben
- Geben Sie *Staging Pointers* für die Furchungs-, Blastula-, Gastrula- und Segmentierungsphase an.

Literatur:

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995) *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Dev. Dyn. 203:253-310.

Auch unter: http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html

2. Versuchsteil: Einfluss von Retinsäure auf die anterior-posteriore Musterbildung während der Zebrafiscentwicklung

Material:

- Lebende Embryonen
- Handschuhe
- E3, Embryomedium (5mM NaCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 0.17 mM KCl, 10⁻⁵% Methylen-Blau, hergestellt aus einer 30x Stammlösung.)
- Pipetten
- 1,5ml Eppis
- mittlere Petrischalen
- Stammlösung all-*trans*-Retinsäure (10mM in DMSO, vor Licht schützen!)
- Stammlösung DEAB (4-Diethylaminobenzaldehyd, 10mM in DMSO)
- 4% PFA in PBS (Paraformaldehyd, Fixativ)
- 0,03% MS-222 (Fisch-Anästhetikum)

Durchführung:

Embryonen werden in E3-Embryomedium bei 28,5°C gehalten. In einer mittleren Petrischale, die 30ml fasst, sollten nicht mehr als 50 Embryonen gehalten werden, da sonst die Wasserqualität leidet.

In die Entwicklungsmechanismen kann auf zweierlei Art eingegriffen werden:

- 1) Unterdrückung aller ALDH-Aktivitäten und damit komplette „Ausschaltung“ der endogenen Retinsäure-Synthese durch DEAB.
- 2) Gabe eines Retinsäure (RA)-Überschusses, wodurch die Neuralplatte im Ganzen der RA ausgesetzt ist (zuzüglich der endogenen RA).

Beide Substanzen werden im Wasser gelöst und können somit auf den Embryo einwirken.

Folgende Konzentrationen werden angesetzt:

Jeweils 30ml (für eine Petrischale):

- a) 5×10^{-9} M RA
- b) 10 μ M DEAB
- c) 10 μ M DEAB und 5×10^{-9} M RA
- d) 0.1% DMSO (Kontrolle)

Je nach Menge an verfügbaren Embryonen werden 10-20 Exemplare im Alter von 4,5 hpf in jede Petrischale überführt. Um die Entwicklung etwas zu verzögern, wird die Hälfte der Embryonen über Nacht bei RT statt bei 28,5°C gehalten.

Im 20-Somiten-Stadium werden die verzögerten Embryonen in MS-222 anästhesiert, anschließend in 4% PFA überführt und über Nacht bei 4°C fixiert. Diese Embryonen werden einer *in-situ*-Hybridisierung unterzogen. Einige wenige Embryonen sollten vorher unter dem Binokular fotografiert werden (Digitalkamera), um morphologische Unterschiede nach den verschiedenen Behandlungen festzuhalten.

3. Versuchsteil: *in-situ*-Hybridisierung (ISH)

In diesem Versuch wird die mRNA des Gens Krox-20 nachgewiesen.

Aus Zeitgründen wird die ISH an vorbereiteten Embryonen bzw. an den Präparaten der vorangegangenen Gruppe durchgeführt.

Durchführung:

Alle Schritte erfolgen in 1,5ml Reaktionsgefäßen, alle Waschschrte in horizontaler Lage bei langsamer Bewegung auf dem Taumler. Alle Reagenzien und Materialien müssen RNase-frei sein.

Schritt	Lösung	Dauer	Temp.
Fixierung der Embryonen	4% PFA in PBS; waschen in DEPC-PBT	ON 3x 5min	4°C
Permeabilisierung I	DEPC-PBT entnehmen, 1,5ml MeOH zugeben, absaugen und nochmals frisch zugeben. (So für Monate lagerbar)	-	bei -20°C lagern
Erster Tag:			
Rehydrierung	-soviel DEPC-PBT zugeben, dass man ca. 50% Methanol drin hat, 2min mischen, abnehmen -2x mit DEPC-PBT waschen (~500µl)	1x2min 2x 5min	RT RT
Dechorionieren	Die Embryonen unter dem Binokular mit RNase-freien Pinzetten aus der Eihülle auspacken		
Postfixierung	-4%PFA in PBS -Spülen, 2x mit DEPC-PBT waschen (~500µl)	20min 2x 5min	RT
Permeabilisierung II	je 500µl Proteinase K (6µg/ml in DEPC-PBT): Die Dauer hängt vom Alter ab: -Gastrula -frühe Somitogenese -24h -36h -2 Tage und älter	- 1min 2min 5min 8min	RT
Waschen und Postfixierung	-Spülen und 2x mit DEPC-PBT waschen (~500µl) -Refixieren in 4% PFA (~500µl) -Spülen, 2x5 min, 1x 10 min, 1x 20 min in DEPC-PBT waschen (~500µl)	2x5min 20min 45min	RT
Prä-Hybridisierung	- in 250µl DEPC-PBT + 250µl Hyb-Minus-Puffer - in 250 µl Hyb-Minus-Puffer waschen - in 250 µl Hyb-Plus-Puffer	5min 5min 1h	RT RT 68°C
Hybridisierung	- Sonde zu je 30 µl Hyb-Plus-Puffer geben (Endkonz. 0,5-1ng/µl), auf 68°C bringen - Soviel Hyb-Plus-Puffer von den Embryonen abnehmen, daß sie gerade noch bedeckt sind. - Die Sondenlösung auf die Embryonen (bei 68°) pipettieren, aufwirbeln.	ON	68°C 68°C 68°C
Zweiter Tag:			
Waschen und Blockieren	- Spülen, 2x in 500 µl Hyb-Minus-Puffer waschen - 500 µl DEPC-PBT zugeben, mischen - Spülen, 2x in DEPC-PBT waschen - in DEPC-PBT + 0.5% Blockierlösung inkubieren	2x15min - 2x15min 30min	68°C RT RT RT
Inkubation mit anti-DIG-Antikörper	- anti-DIG-AK (Boehringer) 1:2000 in 0.5% Blockierlösung verdünnen, sanft bewegen (Taumler)	ON	4°C
Dritter Tag:			
Waschen	in Blockierlösung	3x5 min	RT
Farbentwicklung	- in frischem Reaktionspuffer äquilibrieren - 4.5 µl NBT und 3.5 µl BCIP (beides Roche) werden pro 1 ml Reaktionspuffer verwendet. - Die Farbentwicklung erfolgt im Dunkeln. Je nach Sonde dauert sie zwischen 20 min und 4 Stunden - Die Farbreaktion wird gestoppt durch zweimaliges waschen mit PBT. -Die Präparate werden mit PFA nachfixiert	1x5 min 20min-4h 2x5min 1h oder ON	RT, Eppi 24 well RT 4°C
Klärung	Für bessere mikroskopische Eigenschaften werden die Embryonen nacheinander in 30%, 50% und 70% Glycerin in PBS überführt	je 5min	RT
Aufbewahrung	im Dunkeln		4°C
Auswertung	Resultate auf dem Auswertungsbogen dokumentieren		

Benötigte Lösungen und Materialien:

<p><u>DEPC-H₂O /-PBS:</u> 1l ddH₂O + 1ml DEPC über Nacht rühren (Abzug, giftig!), autoklavieren. Genauso auch 1x oder 10x PBS herstellen</p>	
<p><u>4% PFA in PBS (250ml)</u> 10g PFA in ~180ml DEPC-H₂O + 0,5ml 1N NaOH lösen, dabei auf nicht über 60° erhitzen, 25ml 10xPBS (in DEPC-H₂O) zugeben, pH 7,4 kontrollieren, auf 250ml mit DEPC-H₂O auffüllen, filtrieren und bei -20°C aliquotiert lagern</p>	<p><u>DEPC-PBT(50ml):</u> (bei 4°C lagern) =0.1% Tween-20 in PBS (250µl 20%-iges Tween-20 in 50 ml 1 x DEPC-PBS).</p>
<p><u>20xSSC (1l):</u> 175,3g NaCl + 88,2g Na-Citrat-2-Hydrat + 1ml DEPC über Nacht rühren, autoklavieren</p>	<p><u>Proteinase K</u> von Roche, 14mg/ml, bei 4° lagern!</p>
<p><u>Hyb-Minus-Puffer (50ml):</u> 25ml Formamid + 12,5ml 20xSSC + 250µl 20% Tween-20 + 11,5ml DEPC-H₂O + 460µl 1M Zitronensäure, pH 6.0. Bei -20° lagern</p>	<p><u>Hyb-Plus-Puffer (50ml):</u> 25ml Formamid + 12,5ml 20xSSC + 250µl 20% Tween + 11ml DEPC-H₂O + 460µl 1M Zitronensäure + 1ml 50mg/ml t-RNA + 25µl 100mg/ml Heparin, pH 6.0. Bei -20° lagern</p>
<p><u>Blockierlösung:</u> Als Stammlösung von 2,5% nach Anleitung ansetzen (Blocking Reagent, Roche) Bei -20° lagern</p>	<p><u>Reaktionspuffer (50ml):</u> 5ml 1M Tris/HCl pH 9,5 + 2,5ml 1M MgCl₂ + 1,25ml 4M NaCl + 250µl 20% Tween auffüllen auf 50ml mit ddH₂O</p>