



XELEX DNA SELEX CORE KIT



TEIL 1: START DER SELEKTIONSRUNDEN KIT VERSION 1.0, MÄRZ 2013. SIEHE AUCH DETAILLIERTE FASSUNG DES PROTOKOLLS.

A

GEGENSELEKTION (OPTIONAL)

1

1. Gegenselektion (optionaler Schritt)

- Ausgangsmaterial: 1 - 3 µg gereinigter dsDNA aus vorheriger Selektionsrunde oder 10-50 mg ssDNA Bibliothek (Runde 1)
- DNA mit 50 - 100 µl [10x] SELEX Puffer mischen (=1/10 Endvolumen) und mit nukleasefreiem Wasser auf 500 - 1000 µl Endvolumen auffüllen.
- DNA bei 94°C für 3 min denaturieren und anschließend sofort auf Eis stellen.
- DNA zu Magnetperlen ohne darauf immobilisierter Zielstruktur geben.
- Für 1 Std. (Runde 1) oder für 15-30 Min. (ab Runde 2) bei RT oder 37°C inkubieren.
- Magnetperlen mit einem Magneten immobilisieren.
- Überstand entnehmen und für den weiteren Selektionsprozess verwenden.

B

APTAMER + ZIELSTRUKTUR: BINDUNG

2

2. Bindung

- Zielstruktur auf Magnetperlen immobilisieren (siehe separates Protokoll)
- Ausgangsmaterial: 1 - 3 µg gereinigter dsDNA aus Gegenselektion oder aus vorheriger Selektionsrunde.
- DNA mit 50 - 100 µl [10x] SELEX Puffer mischen (=1/10 Endvolumen) und mit nukleasefreiem Wasser auf 500 µl Endvolumen auffüllen.
- DNA bei 94°C für 3 min denaturieren und anschließend sofort auf Eis stellen.
- DNA zu Magnetperlen mit darauf immobilisierter Zielstruktur geben.
- Menge an Magnetperlen: Runde 1: 10fache-, ab Runde 2 1fache Bindungskapazität.
- 500 µl [1x] SELEX Puffer zufügen.
- Für 1 Std. (Runde 1) oder für 15-30 Min. (ab Runde 2) bei RT oder 37°C inkubieren.
- Gelegentlich vorsichtig mischen, um einer Sedimentation der Beads entgegenzuwirken.
- Magnetperlen mit einem Magneten immobilisieren.
- Überstand entnehmen und für den weiteren Selektionsprozess verwenden.

C

APTAMER + ZIELSTRUKTUR: WASCHUNG

3

3. Waschung

- 1. Selektionsrunde: 1 x mit 1 ml SELEX Puffer
- 2. Selektionsrunde: 2 x mit 500 µl - 1 ml SELEX Puffer
- Folgerunden: Variabel, etwa ein zusätzlicher Waschschrift pro Selektionsrunde.
- Die Stringenz der Selektionsreaktion wird variiert und angepasst durch: die Mengen an DNA / RNA und an Magnetperlen, Bindungszeit, Anzahl der Waschschrte, Bindungstemperatur und Salzkonzentration.

D

APTAMER + ZIELSTRUKTUR: ELUTION

4

4. Elution (Endvolumen 100 µl, Auswahl einer der folgenden Methoden)

- Direkte PCR von Magnetperlen-gebundener DNA
 - Magnetperlen werden ohne Elution direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt.
 - Nur für 1 µM Magnetperlen.
- Hitze
 - Magnetperlen zur DNA-Denaturierung in H₂O + 2 mM EDTA auf 70 - 94°C erhitzen.
 - Magnetperlen mit einem Magneten immobilisieren. Überstand schnell (!) entnehmen.
 - DNA ausfällen oder über Zentrifugationssäulen reinigen.
- Hitze + SDS [2% w/v]
 - Magnetperlen zur DNA-Denaturierung in H₂O + 2% [w/v] SDS auf 70 - 94°C erhitzen.
 - Magnetperlen mit einem Magneten immobilisieren. Überstand schnell (!) entnehmen.
 - DNA ausfällen oder über Zentrifugationssäulen reinigen.
- DNA direkt mit Bindungspuffer eluieren
 - Bindungspuffer Orange-A für DNA-Säulen direkt zu Magnetperlen geben und auf DNA Bindungssäulen reinigen.
- Kompetitive Elution entweder mit freiem, natürlichem Liganden oder mit Überschuss an freier Zielstruktur.
- Der letztere Ansatz reichert möglicherweise keine hochaffinen Binder an.
- Von jeder Selektionsrunde 50% des (nicht amplifizierten) Eluates aufbewahren.

DIESE ANLEITUNG STEHT ONLINE BEREIT

WWW.ROBOKLON.DE



XELEX DNA SELEX CORE KIT



TEIL 2: EMULSION PCR PROTOKOLL

KIT VERSION 1.0, MÄRZ 2013. SIEHE AUCH DETAILLIERTE FASSUNG DES PROTOKOLLS.

E

EMULSION PCR - ÖLPHASE



5

5. Mischung der Ölphase

- Mischen von 300 µl Oil Surfactant Mixture pro Reaktion (50 µl wässrige Phase):
 - 220 µl Emulsion Component 1 (73 % [v/v])
 - 20 µl Emulsion Component 2 (7 % [v/v])
 - 60 µl Emulsion Component 3 (20 % [v/v])
- Durch Vortexen gründlich mischen.
- Auf gestoßenem Eis bis zur weiteren Verwendung aufbewahren.

F

EMULSION PCR - WÄSSRIGE PHASE



6

6. Nukleinsäure-Amplifikation von Bindern (eine der folgenden Alternativmethoden auswählen)

- - PCR / Taq DNA Polymerase (für DNA-Aptamer-Selektionen, siehe Protokoll in Schritt 6a, unten)
 - Mutagenesis PCR (siehe separates Protokoll) (für DNA-Aptamer-Selektionen, Schritt 6a ersetzt durch separates Protokoll)
 - NASBA / RNA Reinigung (siehe separates Protokoll) (für RNA-Aptamer-Selektionen, Schritte 6a - 14 ersetzt durch separate Protokolle)

6a. Emulsion - Ansetzen der wässrigen Phase (ePCR)

- SELEX PCR / Taq DNA Polymerase Protokoll:
Wässrige Phase: 50 µl PCR-Ansatz auf Eis mischen.
Vorlagen- (Template-) DNA: 50 - 130 pmol (= 1 - 3 µg) gereinigter dsDNA.

- | | | |
|---|---|--------------------|
| • 10 x PCR Puffer (mit oder ohne MgCl ₂) | 1 x | 5 µl |
| • MgCl ₂ [25 mM], wenn separat zugefügt | 1.5 mM (or 1-5 mM) | 3 µl (or 2- 10 µl) |
| • BSA, azetyliert [10 mg/ml] | 0.01 (or 0-1) mg/ml | 0-5 µl |
| • Bank40-5'-Primer [100 µM] | 4 µM (or 0.2 - 2 µM) | 2 µl |
| • Bank40-3'-Primer [100 µM] | 4 µM (or 0.2 - 2 µM) | 2 µl |
| • dNTP Mix [5 mM] | 400 µM | 4 µl |
| • Thermostabile DNA Polymerase | 2.5 U (or 1.25 - 2.5 U) | 0.25 - 0.5 µl |
| • Template DNA (Eluate, oder DNA + Magnetperlen direkt einsetzen) | 1 - 3 µg, up to 10 ¹³ Kopien | 1-25 µl |
| • Steriles, DNA-freies H ₂ O | | @50 µl |

G

EMULSION PCR - MISCHUNG DER PHASEN



7

7. Herstellung der Emulsions-Reaktion

- 300 µl Oil Surfactant Mixture (vorgekühlt, 4°C) und 50 µl wässrige Phase mischen.
- Vortexen für 5 Minuten bei 4°C (Vortexer mit Gefäßhalterung benutzen).
- Emulsion auf drei dünnwandige Reaktionsgefäße verteilen ("Triplikate"), Reaktion nach Protokoll durchführen.

8

8. Emulsion PCR - Parameter

- PCR-Reaktion mit folgenden Parametern durchführen:
95°C - 120 Sek - 15 - 20 x (95°C - 30 Sek, 55°C - 60 Sek, 72°C - 180 Sek) - 72°C - 300 Sek

DIESE ANLEITUNG STEHT ONLINE BEREIT

WWW.ROBOKLON.DE



XELEX DNA SELEX CORE KIT



TEIL 3: BEENDEN DER SELEKTIONSRUNDE KIT VERSION 1.0, MÄRZ 2013. SIEHE AUCH DETAILLIERTE FASSUNG DES PROTOKOLLSO..

H

BINDESCHRITT - DNA REINIGUNG

**9****9. Aufbrechen der Emulsion**

- 40 µl Activation Buffer SF auf die Membran der Säule pipettieren, nicht zentrifugieren.
- Optional: Elutionspuffer auf 80°C erhitzen (siehe Abschnitt D, Elution).
- Alle Triplikate einer Reaktion in einem 2 ml Plastik-Reaktionsgefäß zusammenführen.
- 1 ml 2-Butanol (oder Butanol) zugeben, Emulsion durch Vortexen öffnen.
- 500 µl Puffer Orange-SFB zufügen (10faches Volumen der wässrigen Phase).
- Probe und Puffer vollständig mischen.
- Zentrifugation für 1 min bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm).

10**10. DNA-Bindung an die Säulenmatrix**

- Obere, orange gefärbte organische Phase fast vollständig entnehmen und verwerfen.
- Wässrige Phase, Interphase und evtl. geringe verbliebene Reste der organischen Phase auf eine Zentrifugationssäule überführen.
- Zentrifugation für 1 min bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm).

I

WASCHSCHRITT - DNA REINIGUNG

**11****11. DNA - Waschung**

- Durchfluss abschütten und Säule auf das Sammelgefäß stecken.
- 600 µl Puffer Wash-SFX auf die Säule geben.
- Säule für 1 min bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm) zentrifugieren.

12**12. DNA - Waschung**

- Durchfluss abschütten und Säule auf das Sammelgefäß stecken.
- 350 µl Puffer Wash-SFX auf die Säule geben.
- Säule für 1 min bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm) zentrifugieren.

13**13. Entfernen von Resten des Waschpuffers**

- Durchfluss abschütten und Säule auf das Sammelgefäß stecken.
- Säule für 2 min bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm) trocken zentrifugieren.

J

ELUTIONSSCHRITT - DNA REINIGUNG

**14****14. DNA Elution**

- Zentrifugationssäule unverschlossen auf ein neues Sammelgefäß (1,5-2 ml) stecken.
- 50-150 µl Elutionspuffer (ggf. 80°C) oder Wasser auf die Mitte der Säulenmembran tropfen.
- Säule 2 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Säule bei 11 000 x g (etwa 12 000 rpm) für 1 Minute zentrifugieren.
- Säule vom Sammelgefäß entfernen und verwerfen. Sammelgefäß verschließen.
- DNA-Konzentration bestimmen (z.B. durch spektrophotometrische Messung).
- Wenn PCR-Ausbeute niedriger bzw. deutlich niedriger als 0.5 µg DNA ist:
Gereinigte DNA als Template für Scale-Up Emulsions-PCR verwenden
(20 Zyklen, größtmögliche Menge an Template-DNA verwenden, Beginn bei Schritt 5).
- Wenn PCR-Ausbeute höher als 0.5 µg DNA ist:
10 - 50% der DNA für neue Selektionsrunde verwenden, 50 - 90% als Backup lagern.
- Neue Selektionsrunde starten (insgesamt 3 - 15 Runden)
oder SELEX beenden und Bibliotheken / Aptamere analysieren.



XELEX DNA SELEX CORE KIT



TEIL 4: ANALYSE BIBLIOTHEK UND APTAMERE KIT VERSION 1.0, MÄRZ 2013. SIEHE AUCH DETAILLIERTE FASSUNG DES PROTOKOLLS.

K

DIVERSITÄTSSTANDARD - PCR

15

15. Diversitätsstandard PCR-Amplifikation (nicht emulsifizierte PCR)

- 10 x PCR Buffer B (mit 1.5 mM MgCl₂) 1 x 10 µl
- Bank40-5'-Primer [100 µM] 1 µM 1 µl
- Bank40-3'-Primer [100 µM] 1 µM 1 µl
- dNTP Mix [5 mM] 400 µM 8 µl
- Thermostabile DNA Polymerase [5U/µl] 2.5 U 0.5 µl
- Vorlagen-DNA 0.5 µg, bis zu 10¹³ Kopien
- Steriles, DNA-freies H₂O @100 µl



16

16. Diversitätsstandard PCR - Parameter

- PCR-Reaktion mit folgenden Parametern durchführen:
95°C - 120 Sek - 2 - 4 x (95°C - 30 Sek, 59°C - 30 Sek, 72°C - 90 Sek) - 72°C - 300 Sek

L

DiVE ANALYSE

17

17a. DiVE Assay (alternative Methode zu DiStRO Assay)

- 200 ng Aliquots von Standard oder Probe in getrennte Plastikreaktionsgefäße pipettieren. Duplikate: Je zwei Reaktionen Probe (S1 Nuklease-Verdau) und Kontrolle (unbehandelt).
- [5x] S1 Nuklease-Puffer in Reaktionsgefäße pipettieren (Endkonzentration: 1x).
- Gründlich mischen. Endvolumen aller Proben konstant und niedrig halten. Endvolumen: ____
- Proben und Kontrollen denaturieren und erneut aneinander anlagern lassen.
 - Denaturierung: 3 Min bei 98°C
 - Anlagerung: 5 Min bei 65°C
- 1 µl S1 Nuklease (1U / µl) zur Probe, aber nicht zur Kontrolle geben.
 - 30 Min bei 65°C inkubieren.
- ca. 2 µl EDTA [0.5 M, pH 8.0] zufügen (Endkonzentration: 2 mM)
- Zu 20 - 40 ng DNA entspr. Menge von Probe und Kontrolle auf 2-3% Agarose Gel auftragen.



M

DiStRO ANALYSE

17

17b. DiStRO Assay (alternative Methode zu DiVE Assay)

- Zusammenfügen der folgenden Komponenten:
300 ng von Diversitätsstandard oder Probe
+ 1 µl DA-Puffer (10x)
+ 1 µl SYBR Green (1:1000 in nukleasefreiem H₂O)
Auf 10 µl ergänzen mit nukleasefreiem H₂O
- qPCR Zyklus - Programm:
Denaturierung: 2 Min bei 95°C
AAnlagerung: 180 Min bei 76°C (bzw. geschätzte Schmelztemperatur minus 2°C)
Eine Messung pro Minute vornehmen
Erneutes Aufschmelzen: Auf 20°C abkühlen, dann inkrementell erhöhen:
+ 0.5°C alle 7 Sek. bis 98°C, eine Messung je Inkrement (alle 7 Sek).



N

FLAA ANALYSEN (BIBLIOTHEKEN UND KLONE)

18

18. FLAA Assay

- Binder-Proben: Biotinylierte Zielstruktur an Streptavidin-beschichtete Mikroplatten binden. 10-fachen Überschuss an Zielstruktur relativ zur Bindungskapazität der Platte einsetzen. 1 Std. bei Raumtemperatur inkubieren.
- Negativkontrolle: 2 µl [5 mM] Biotin in Platte geben, 10 Min bei RT inkubieren.
- Platten zwei Mal mit 250 µl [1x] SELEX Puffer waschen.
- Geeignete Menge an Binder DNA in 50 µl [1x] SELEX Puffer verdünnen. Menge: _____
- DNA-Lösung bei 95°C für 2 Min denaturieren und sofort auf Eis abkühlen. Gekühlte DNA Lösung auf beschichtete Mikroplatten überführen. Über Nacht bei 4°C oder für 2 Std bei Raumtemperatur inkubieren.
- DNA-Überstand verwerfen.
- Platte unmittelbar vor Messung mit 100 µl [1x] Bindungspuffer waschen.
- 50 µl Oligreen (oder Picogreen) [1:500 in Bindungspuffer] zufügen.
- Nach 9 Min. (oder nach 4 Min.) zwei Mal messen: Ex. 485 nm, Em. 527 nm.



DIESE ANLEITUNG STEHT ONLINE BEREIT

WWW.ROBOKLON.DE