

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde Agarose der Firmen Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) und Gibco BRL (Paisley, Schottland) verwendet.

Alle weiteren Chemikalien wurden in p. a. Qualität von den folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Fluka (Buchs, Schweiz).

Für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurden radioaktiv markierte Nukleotide (Deoxycytidin 5'-[α - 32 P]-triphosphat) der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet.

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs Inc. (Schwalbach/Taunus) bezogen.

weitere Enzyme: Taq DNA-Polymerase (Appligene Oncor, Heidelberg)
 T4 DNA-Ligase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
 Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIAP) (Promega, Mannheim)

2.1.2 DNA- Längenstandards und Gelbeladungspuffer

- Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs Inc., Schwalbach/Taunus)
- High Molecular Weight Marker (Gibco BRL , Paisley, Schottland)
- Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Gene Ruler 1kb DNA Ladder, Lambda DNA *HindIII* Marker, Lambda DNA *EcoRI+HindIII* Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- 6 x Loading Dye Solution (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

2.1.3 Kits

- GeneClean DNA-Isolierungs-Kit (BIO 101/ Appligene Oncor, Heidelberg)
- pGEM-T/ -T Easy Vector Systems (Promega, Mannheim)
- Qiagen Plasmid-Midi/Mini-Kit, Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- High Pure PCR Product Purification Kit, ExpandTM Long Template PCR System, Random Primed DNA Labeling Kit, PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

2.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) in "ready to use"-Qualität (entschützt, entsalzt, lyophilisiert, vorgereinigt) bezogen. Die jeweiligen Primersequenzen sind im zugehörigen Kapitel des Methodenteils aufgeführt.

2.1.5 Gebrauchswaren und Geräte

Membranen:

- Nylon-Membran, positiv geladen (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), Hybond-N+, positively charged nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Nylon-Membran für Kolonie und Plaque Hybridisierung (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim), Hybond-N, neutral membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Petrischalen:

Alle Petrischalen (sterile Plastikscheiden: eckig/120 x 120 mm, rund/Ø 90 mm, rund/Ø 145 mm) wurden von der Firma Greiner Labortechnik (Kremsmünster, Österreich) bezogen.

Geräte:

Zentrifugen:	Kühlzentrifuge J2-MC (Beckman, Palo Alto, USA) Mikrokühlzentrifuge 202 MK (Sigma, Osterode/Harz) Mikrozentrifuge 5414 (Eppendorf, Hamburg) LZ-55 Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA)
Thermocycler:	DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, Überlingen)
Photometer:	6405 UV/Vis. Spectrophotometer (Jenway, Essex, England)

2.1.6 Stammlösungen

Alle Stammlösungen und ebenso alle daraus hergestellten Lösungen wurden mit *bidest.* H₂O angesetzt. Die Sterilisation erfolgte entweder durch Autoklavieren (15 min bei 121°C und 1,1 10⁵ Pa) oder durch Sterilfiltration (sterile Spritzenfilter, Porengröße: 0,22 µm, C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe).

5 x TBE:	270 g Tris-Base 137,5 g Borsäure 100 ml 0,5 M Na ₂ EDTA-Lsg. auf 5 Liter H ₂ O
----------	---

10 x TPE:	108 g Tris-Base 15,5 ml ortho-Phosphorsäure (85 %) 40 ml 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0) auf 1 Liter H ₂ O
-----------	--

10 % SDS:	10 g SDS auf 100 ml steriles <i>bideest.</i> H ₂ O, nicht autoklavieren
20 x SSC (pH 7,0):	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat-2-hydrat
TE-Puffer (pH 8,0):	1 mM Na ₂ EDTA 10 mM Tris
SM-Puffer:	5,8 g NaCl 2,0 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 50 ml 1 M Tris/HCl (pH 7,5) 5 ml 2 % (w/v) Gelatine auf 1 Liter H ₂ O, autoklavieren
EDTA-Stammlösung:	0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0)
IPTG:	100 mM IPTG, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
X-Gal:	40 mg/ml X-Gal gelöst in Dimethylformamid Lagerung bei -20°C (lichtgeschützt)
50 x Denhardt's:	1 % Ficoll 400 1 % Polyvinylpyrrolidon 1 % BSA sterilfiltriert
Antibiotika:	Lagerung bei -20°C, sterilfiltriert

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonz. im Medium
Ampicillin	50 mg/ml (in H ₂ O)	100 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml (in H ₂ O)	50 µg/ml
Tetracyclin	5 mg/ml (in Ethanol)	10 µg/ml

2.1.7 Nährmedien

Für die Herstellung der Bakterienmedien wurden Produkte der Firma Difco Laboratories (Detroit Michigan, USA) verwendet. Die Sterilisation aller Medien erfolgte durch Autoklavieren (15 min bei 121°C und 1,1·10⁵ Pa). Die Herstellung der Medien erfolgte mit *dest.* H₂O.

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden die folgenden Nährmedien verwendet.

LB-Medium (1 Liter):
 10 g Bacto-Tryptone
 5 g Bacto-Yeast-Extract
 10 g NaCl
 mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren

Für die Herstellung von LB-Platten wurden zu einem Liter LB-Medium 15 g Bacto-Agar gegeben und autoklaviert.

LB-Platten mit Antibiotikum: Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf ca. 55°C abgekühlt und dann das Antibiotikum (Stammlösungen und eingesetzte Konzentrationen siehe 2.1.6) zugegeben und in Plastikpetrischalen gegossen. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte bei 4°C für maximal 4 Wochen.

LB-Platten mit Ampicillin / IPTG / X-Gal:

30 µl einer X-Gal-Stammlösung (40 mg/ml) und 100 µl einer IPTG-Stammlösung (100 mM) wurden gleichmäßig über die Oberfläche der Platten (LB + Ampicillin) verteilt und die Platten zum Trocknen stehen gelassen. Diese Präparation der Platten erfolgte direkt vor dem Ausplattieren der Bakterien.

SOC-Medium (100 ml): 2,0 g Bacto-Tryptone
 0,5 g Bacto-Yeast-Extract
 1 ml 1M NaCl
 0,25 ml 1M KCl
 1 ml 2M Mg²⁺-Stammlsg.(1M MgCl₂/1M MgSO₄), sterilfiltriert
 1 ml 2M Glucose, sterilfiltriert

2.1.8 *Plasmodiophora brassicae* Isolat e_H

Bei dem *Plasmodiophora brassicae* Isolat e handelt es sich um ein Feldisolat, dessen Ursprungswirt die Stoppelrübe ist. Das Isolat wurde von M. Schoeller (Institut für Angewandte Genetik, Universität Hannover) bezogen. *Plasmodiophora brassicae* tritt im Freiland gewöhnlich als Gemisch verschiedener Pathotypen auf, so dass das Isolat e vermutlich keinen reinen Pathotyp darstellt. Das im Rahmen dieser Arbeit für die Resistenztests verwendete Isolat ist eine während einer Wirtspassage im Chinakohl im Sommer bei hohen Temperaturen zufällig selektierte Subpopulation des Isolats e und wurde als Isolat e_H bezeichnet. Es unterscheidet sich vom Ausgangsisolat in seiner Pathogenität gegenüber dem Ursprungswirt.

Zur Vermehrung des Isolats e_H wurde als Wirt Chinakohl (*Brassica campestris* ssp. *Pekinensis*, cv. "Cantoner Witkrop") verwendet. Nach der Ernte der Hernien wurden diese bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.1.9 *Arabidopsis thaliana* Ökotypen

Der Ökotyp Tsu (Tsu-0) hat seinen geografischen Ursprung in Japan und ist resistent gegen das *Plasmodiophora brassicae* Isolat e_H, wie von Fuchs und Sacristán (1996) gezeigt wurde. Der Ökotyp Cvi (Cvi-0) hat seinen Ursprung auf den Kapverdischen Inseln und ist empfindlich gegen das *Plasmodiophora brassicae* Isolat e_H. Die Krankheitssymptome sind hier sehr deutlich ausgebildet und es zeigen sich die typischen Kohlhernie-Symptome.

Beide Ökotypen wurden vom Arabidopsis Information Service (AIS, Frankfurt, Botanisches Institut, J.W. Goethe-Universität) bezogen.

Die Ökotypen RLD1 (N913) und Columbia (Col-3/N908) wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, Plant Science Division, University of Nottingham, Loughborough, UK) bezogen. RLD1 hat seinen Ursprung in Russland und ist resistent gegen das *Plasmodiophora brassicae* Isolat e_H. Auch diese Resistenz wird monogen vererbt und ist allelisch zur Resistenz des Ökotyps Tsu (Arbeiter *et al.* 2001). Der Ökotyp Col mit Ursprung in Columbia (USA) ist empfindlich gegen das *Plasmodiophora brassicae* Isolat e_H.

2.1.10 Kreuzungspopulation

Für den Aufbau einer Kartierungspopulation wurde der resistente Ökotyp Tsu mit dem anfälligen Ökotypen Cvi gekreuzt und die F₁-Generation mit dem anfälligen Elter rückgekreuzt (siehe Abb. 2-1). Eine Rückkreuzung wurde hier deshalb vorgenommen, damit in der zur Kartierung eingesetzten Generation nur heterozygot resistente Pflanzen auftreten, was die Kartierung auf molekularer Ebene erleichtert. Rekombinationsereignisse bei homozygot resistenten Pflanzen könnten aufgrund der Dominanz des Resistenzgens sonst bei der Vorselektion unerkant bleiben. Für die Suche nach Pflanzen mit Rekombinationsereignissen nahe am *RPB1*-Locus wurde diese erste Rückkreuzungsgeneration (BC₁) eingesetzt.

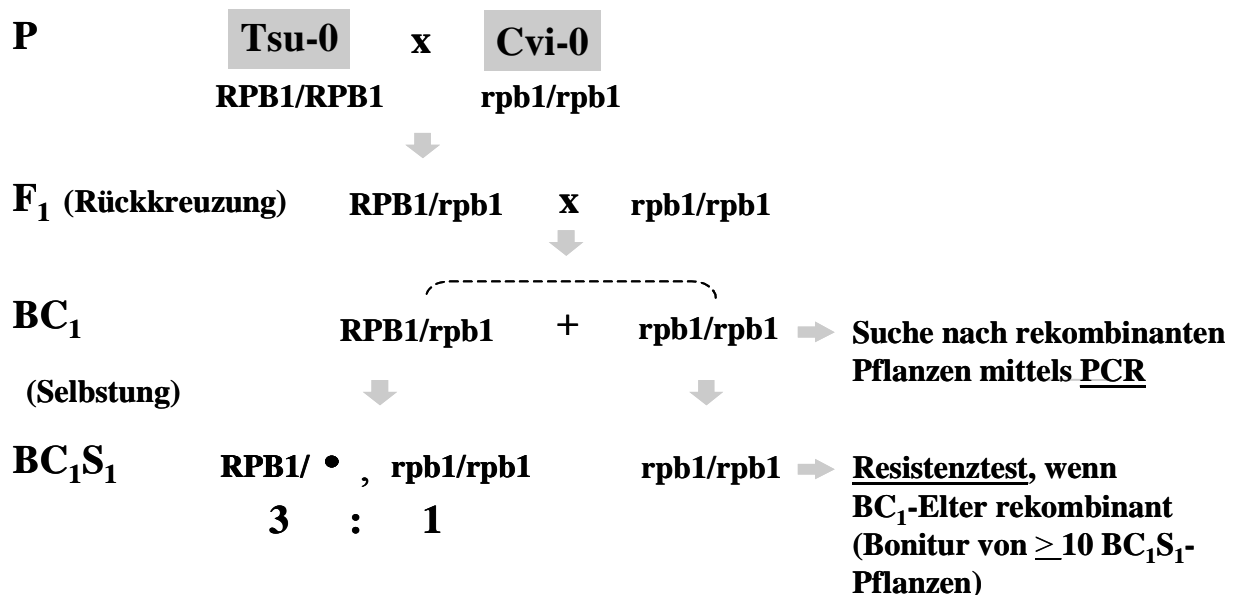


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Herstellung der Kartierungspopulation.

2.1.11 BAC-Klone

Die verwendeten BAC-Klone (siehe Tab. 2-1) stammen aus der IGF-BAC-Bibliothek des *Arabidopsis*-Ökotyps Col-0 (Mozo *et al.* 1998). Die BAC-Bibliothek-Filter (3x3 Duplikat-Filter) und die einzelnen BAC-Klone wurden vom Ressourcenzentrum im Deutschen Humangenomprojekt am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (RZPD), Berlin, bezogen.

Tab. 2-1: BAC-Klone mit zugehöriger Bezeichnung nach Filterposition und Klonname (RZPD)

Koordinaten	RZPD
F11O20	B122O2011
F23G7	B122G0723
F7F2	B122F027
F5D14	B122D145
F5P17	B122P175
F11F17	B122F1711
F5A5	B122A055
F18O20	B122O2018
F3C3	B122C033
F23H22	B122H2223
F9D2	B122D029
F14M12	B122M1214
F12P22	B122P2212
F25A9	B122A0925
F22P6	B122P0622

2.1.12 Cosmidbibliotheken

Für die Isolierung von Cosmid-Klonen wurde neben der selbst hergestellten Cosmidbibliothek des *Arabidopsis*-Ökotyps Tsu (siehe 2.2.25) eine bereits fertiggestellte und erfolgreich eingesetzte Bibliothek des Ökotyps RLD (Meyer *et al.* 1994) durchmustert. Für die Herstellung dieser RLD-Bibliothek wurde der binäre Cosmidvektor pBIC20 (28,5 kb) verwendet. Partiiell *HindIII*-verdaute genomische DNA wurde in die *HindIII*-Klonierungsstelle des Vektors ligiert. Die durchschnittliche Insertgröße der Klone beträgt ca. 14 kb und die Bibliothek enthält $4,7 \times 10^4$ Klone, was einer fünffachen Repräsentation des Genoms (ca. 130 Mb) entspricht. Der Vektor trägt zwei Selektionsmarker, eine Tetracyclinresistenz und eine Kanamycinresistenz im T-DNA-Abschnitt.

2.1.13 RFLP-Sonden

Bei dem RFLP-Marker m253 handelt es sich um einen Klon aus einer genomischen λ -Phagen-Bibliothek des *Arabidopsis*-Ökotyps Col-0. Der Marker rpHS-1 ist ein Cosmidklon. Beide Klone wurden vom ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, The Ohio State University, USA) bezogen.

2.1.14 Bakterienstämme

Die für die Klonierungen (BAC-Endfragmente, BAC-Subklone) und die Erstellung der Cosmid-Bibliothek verwendeten *Escherichia coli*-Stämme hatten den folgenden Genotyp:

Stamm	Eigenschaften
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_{k-},m_{k+}) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F',traD36 proAB lacI^qZΔM15]</i>
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI^qZΔM15 Tn 10 (Tet^r)]</i>
XL1-Blue MRF' Kan	<i>D(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI^qZΔM15 Tn5 (Kan^r)]^c</i>

2.1.15 Vektoren

Die Klonierung von PCR-Produkten (z. B. BAC-Endfragmente) erfolgte mit dem "pGEM-T bzw. T-easy Vector System" der Firma Promega (Mannheim). Für die Subklonierung der BACs wurde der Plasmidvektor pBluescript II KS verwendet.

Der binäre Cosmidvektor, pJJ1881 mit T-DNA 04541, zur Herstellung der Cosmidbibliothek des *Arabidopsis*-Ökotyps Tsu wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe M. Ganai (IPK Gatersleben) zur Verfügung gestellt. Der Vektor hat eine Größe ca. 29 kb, enthält im T-DNA-Abschnitt die Klonierungsstelle des pBluescript II KS-Vektors und trägt als Selektionsmarker eine Tetracyclinresistenz und eine Kanamycinresistenz in der T-DNA.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Pflanzen

Als Kultursubstrat für die Aussaat von *Arabidopsis thaliana* diente bei allen Versuchen ein Gemisch aus Einheitserde vom Typ P (bei Töpfen Typ T) mit einem 10%igen (v/v) Anteil an Kristallquarzsand. Die oberste Schicht wurde fein gesiebt (5 mm Maschenweite), um eine ebene Oberfläche zu erhalten und günstigere Aussaatbedingungen zu schaffen. Die Pflanzen wurden entweder in Aussaatschalen kultiviert (für Resistenztests) oder es wurden Einzelpflanzen in kleinen Tontöpfen (Ø 5 cm) angezogen (Rekombinantensuche). Vor der Aussaat wurden die Samen vier Tage in Petrischalen auf feuchtem Filterpapier bei 4°C stratifiziert, um die Keimung zu synchronisieren und die Keimungsrate zu erhöhen.

Um eine für die Keimung ausreichend hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten wurden die Schalen bzw. Töpfe mit Klarsichtfolie abgedeckt, welche nach etwa 5 - 7 Tagen bei Sichtbarwerden der ersten Keimlinge entfernt wurde. Die Pflanzen wurden im Kulturraum bei einer Tageslänge von 16 h ($70 - 80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, Philips TLD 50 W/83 HF), einer Temperatur von 22 - 26°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 - 80 % kultiviert. Die Samen der rekombinanten Pflanzen wurden durch Ernte reifer Einzelschoten gewonnen. Die trockenen Samen wurden bei 4°C in Eppendorfreaktionsgefäßen oder im Exsikkator in Pergamenttüten gelagert.

2.2.2 Herstellung des Inokulums

Zur Infektion der Pflanzen wurde eine aus Wurzeltumoren (Hernien) hergestellte Dauersporensuspension verwendet. Die Sporenisolierung erfolgte nach dem von Sacristán und Hoffmann (1979) beschriebenen Verfahren. Die Sporen wurden aus Hernien des Chinakohls (siehe 2.1.8) isoliert. Einzelne "clubs" wurden in lauwarmem Wasser aufgetaut, gewaschen, um Erdreste zu entfernen, und mit einem Mixer (ESGE-Stab) im Becherglas mit Wasser zerkleinert und anschließend mit einem Homogenisator (Ultra-Turax, Typ T25, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.) homogenisiert, bis keine größeren Stücke mehr sichtbar waren. Das Homogenat wurde dann durch Gaze (Porenweite 40 μm) filtriert, um alle groben Bestandteile zu entfernen, und anschließend für 10 min bei 2680 x g (Labofuge 6000, Heraeus-Christ GmbH, Osterode i. H.) zentrifugiert. Das die Sporen enthaltende Pellet wurde in *dest.* H₂O resuspendiert. Die Sporendichte wurde mit einer Zählkammer (Neubauer) bestimmt und die Konzentration der Suspension dann durch Verdünnung mit Wasser auf 5×10^6 Sporen ml⁻¹ eingestellt. Diese Sporensuspension wurde dann direkt zur Infektion eingesetzt (maximal 2 Tage bei 4°C aufbewahrt) oder bei -20°C gelagert (unverdünnte Sporensuspension).

2.2.3 Inokulation der Pflanzen

Die Pflanzen wurden ca. 14 Tage nach der Aussaat (etwa im Vier- bis Fünfblattstadium) infiziert. Hierbei wurde jede Einzelpflanze mit jeweils 2 ml der Dauersporensuspension (5×10^6 Sporen ml⁻¹) infiziert, indem diese mit einer Pipette an der Stengelbasis um die Pflanze herum appliziert wurde. Zum Zeitpunkt der Inokulation und der ersten folgenden Woche sollte die Erde immer ausreichend feucht gehalten werden, um optimale Infektionsbedingungen zu erreichen.

2.2.4 Bonitur der Pflanzen

Die kompatible und die inkompatible Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Plasmodiophora brassicae* (siehe Abb. 2-2) wurden von Fuchs und Sacristán (1996) beschrieben. Die Boniturstadien für die Resistenztests wurden wie folgt festgelegt. Die Bonitur der einzelnen Pflanzen erfolgte 4 Wochen nach der Infektion.

- Inkompatible Interaktion (r): Auftreten von Nekrosen, die unter dem Binokular von außen an der Wurzel oder im Längsschnitt der Wurzel bzw. des Hypokotyls sichtbar sind. Leichte Schwellungen der Haupt- oder Nebenwurzeln können bei eindeutigem Vorhandensein von Nekrosen vereinzelt auftreten.
- Kompatible Interaktion (a): Entwicklung typischer Kohlherniesymptome (starke Schwellungen der Haupt- und Nebenwurzeln und des Hypokotyls,) ohne dass Nekrosen in Wurzel, Hypokotyl oder Spross auftreten.

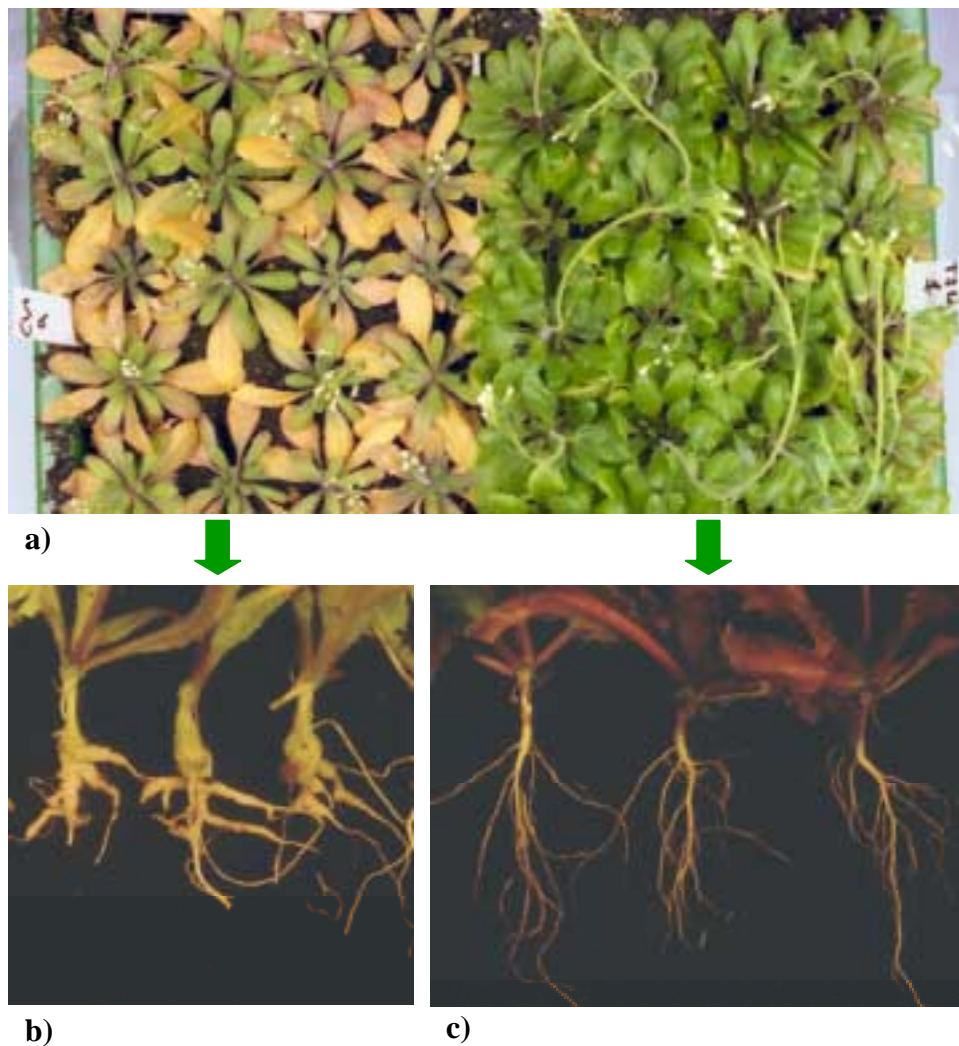


Abb. 2-2: Interaktion der *Arabidopsis*-Ökotypen Tsu und Cvi mit dem *P. brassicae* Isolat e_H.
a) Pflanzen 25 Tage nach Inokulation (25 dpi): links: Cvi, rechts: Tsu
b) typische Kohlhernie-Symptome an Wurzeln und Hypokotyl (Cvi)
c) Wurzelsystem des resistenten Ökotyps Tsu nach Infektion

2.2.5 DNA-Minipräparation (nach Edwards)

Edwards-Extraktionspuffer: (pH 7,5, eingestellt mit HCl)	200 mM Tris-Base 250 mM NaCl 25 mM Na ₂ EDTA 0,5 % (w/v) SDS
---	--

DNA-Mengen im Bereich von 1 - 5 µg wurden nach einem modifizierten Protokoll von Edwards *et al.* (1991) isoliert. Mit dieser Methode wurde DNA für die Rekombinantensuche mittels PCR gewonnen. Es handelt sich hierbei um eine schnell durchführbare Methode, bei der kleinere DNA-Mengen gewonnen werden, deren Reinheitsgrad für die PCR mit RAPD-Primern und auch spezifischen Primern ausreichend ist. Die Präparation wurde wie folgt durchgeführt:

Eine Probe frisches Blattmaterial (ca. 0,5 x 0,5 cm) wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben, mit 200 µl Extraktionspuffer versetzt und mit einem Teflonpistill (Eppendorf Micropistille Nr. 0030 120.973) möglichst kurz gemörsert, bis die Probe homogenisiert war. Anschließend wurden weitere 200 µl Extraktionspuffer hinzugefügt, 2 - 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 7 min bei 12200 x g zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurden dann in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 300 µl kaltem Isopropanol gemischt und anschließend mindestens 2 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um die DNA zu fällen. Diese wurde dann pellettiert, indem 7 min bei ca. 12200 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet einmal mit 70%igem, kaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und dann in 100 µl TE-Puffer (siehe 2.1.6) ü. N. im Kühlschrank gelöst. Nicht gelöste Reste wurden vor der Benutzung der DNA-Lösung abzentrifugiert. Für die PCR wurden jeweils 2,5 µl dieser Lösung eingesetzt.

2.2.6 Gesamt-DNA-Mikro-Präparation

Extraktions-Puffer: (pH 7,5)	0,35 M Sorbitol 0,1 M Tris-Base 0,005 M Na ₂ EDTA 0,02 M Natriumbisulfit
Lysis-Puffer:	200 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,0 200 ml 0,25 M Na ₂ EDTA, pH 8,0 400 ml 5 M NaCl 200 ml 20 % (w/v) CTAB
Mikro-Präp.-Puffer:	1 Vol. Extraktions-Puffer 1 Vol. Lysis-Puffer 0,4 Vol. 5 % (w/v) Sarkosyl

Von denjenigen Pflanzen der BC₁-Generation, die sich mittels PCR (siehe 2.2.12) als rekombinant erwiesen haben, wurde frisches grünes Blattmaterial entnommen. Mittels der im Folgenden beschriebenen Isolationsmethode wurde Gesamt-DNA präpariert, die qualitativ und quantitativ für einen Restriktionsansatz für die spätere Southern-Blot-Analyse (RFLP-Analyse) ausreichend war. Der Vorteil dieser Methode bestand darin, dass hier direkt von der rekombinanten BC₁-Pflanze DNA erhalten werden konnte. Für weitere RFLP-Analysen musste dann DNA von den direkten Selbstungsnachkommen (Pools von mindestens 10 Pflanzen) dieser Pflanze isoliert werden, was zum einen eine zeitliche Verzögerung (Abreifen der Samen der BC₁-Pflanze, Anzucht der BC₁S₁-Pflanzen), zum anderen auch einen größeren Arbeitsaufwand zur Folge hatte. Mit der hier beschriebenen Methode konnten erste RFLP-Untersuchungen zur genaueren Lokalisation des Rekombinationsereignisses im Genom dieser Pflanze gleich im Anschluss an die Vorselektion durchgeführt werden. Für weitere RFLP-Analysen wurde DNA in größeren Mengen isoliert (siehe 2.2.7).

Etwa 2 - 3 mittelgroße (ca. 50 - 80 mg) frische grüne Blätter wurden mit 250 µl Mikro-Präp.-Puffer in einem 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäß mittels eines Teflonpistills (Eppendorf Micropistille Nr. 0030 120.973) ca. 15 s homogenisiert. Anschließend wurden weitere 500 µl Mikro-Präp.-Puffer zugegeben und die Ansätze bei 65°C im Wasserbad für 20 - 60 min inkubiert. Im Anschluss wurde eine Extraktion der Proteine durchgeführt, indem 750 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, stark gemischt und anschließend bei RT für 10 min bei 9500 x g zentrifugiert wurde. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Isopropanol gemischt. So wurde die DNA ausgefällt und durch Zentrifugation (mindestens 10 min bei 4°C, 16060 x g) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde einmal mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, wie zuvor zentrifugiert, dann getrocknet und in 100 µl *bidest.* H₂O gelöst. Der gesamte Ansatz (ca. 3 - 5 µg DNA) wurde direkt (ohne Quantifizierung) für den Restriktionsansatz der RFLP-Analyse eingesetzt.

2.2.7 CTAB-Gesamt-DNA-Präparation

2 X CTAB-Puffer:	2 % (w/v) CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) 1,4 M NaCl 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 20 mM Na ₂ EDTA
5 X CTAB-Puffer:	5 % (w/v) CTAB 350 mM NaCl
Präzipitationspuffer:	1 % (w/v) CTAB 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM Na ₂ EDTA
HS-TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1 mM Na ₂ EDTA 1 M NaCl

Mit dieser DNA-Präparationsmethode (Rogers und Bendich 1985) wurde DNA der Elternpflanzen (Tsu, Cvi) sowie der BC₁S₁-Pflanzen gewonnen. Das Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) bildet unter hohen Salzkonzentrationen stabile lösliche Komplexe mit Nukleinsäuren. Durch eine Reduzierung der NaCl-Konzentration unter 0,4 M präzipitiert der CTAB/Nukleinsäurekomplex, während die Polysaccharide in Lösung bleiben.

Ca. 2 g frisches Pflanzenmaterial wurde in einem Mörser in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerkleinert. Das Pulver wurde in ein Polyallomerzentrifugenröhrchen überführt und mit 5 ml 2 x CTAB-Puffer versetzt, gründlich gemischt und für 20 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung wurde dann 1 Vol. eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) zugegeben, gründlich gemischt und anschließend bei RT 10 min bei 5640 x g (JS13.1) zentrifugiert. In diesem Schritt werden die denaturierten Proteine extrahiert und sammeln sich in der Interphase an. Der Überstand wurde dann in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 0,2 Vol. 5 x CTAB-Puffer versetzt und bei 65°C 10 min inkubiert, gefolgt von einer weiteren Extraktion mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) mit anschließender Zentrifugation (10 min bei 5640 x g). Wenn der Überstand hier noch trübe war, wurde ein weiterer Extraktionsschritt durchgeführt. War die obere Phase klar, wurde diese in ein Corex-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 - 2 Vol. Präzipitationspuffer versetzt, gut gemischt und bei RT ü. N. stehen gelassen. Die Fällung des CTAB/Nukleinsäurekomplexes ist hier deutlich an einer Trübung der Lösung erkennbar. Dieser Komplex wurde durch Zentrifugation (20 min bei RT, 5640 x g) pelletiert und in 2 ml HS-TE-Puffer bei 65°C gelöst (ca. 10 min). Durch Zugabe von 2 Vol. abs. Ethanol, 30-minütiger Inkubation bei -70°C und Zentrifugation bei (10 min bei 4°C, 5640 x g) erfolgte dann die Präzipitation der Nukleinsäuren. Das Pellet wurde in 0,3 ml *bideest.* H₂O gelöst (Überführung in ein Eppendorfreaktionsgefäß), mit 0,3 ml 5M Ammoniumacetat/pH 7,5 versetzt, 20 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C und 16060 x g zentrifugiert. In diesem Schritt wurde die RNA ausgefällt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2 Vol. kaltem abs. Ethanol gemischt und 30 min bei -70°C oder bei -20°C ü. N. inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 16060 x g wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 100 µl TE-Puffer ü. N. im Kühlschrank gelöst. Die DNA kann bei -20°C gelagert werden. Die DNA-Ausbeute bei ca. 2 g eingesetztem Pflanzenmaterial beträgt im Durchschnitt 10 - 20 µg.

2.2.8 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA wurde mit dem Plasmid-Midi-(Mini)-Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Durchführung der Präparation erfolgte nach Herstellerangaben, wobei Bakterienkulturen (LB mit jeweiligem Antibiotikum, siehe 2.1.6) von 40 ml oder 80 ml eingesetzt wurden. Die verwendeten Säulen (Anionen-Austauscher) haben eine DNA-Binde-Kapazität von 20 µg (Mini) bzw. 100 µg (Midi). Aufgrund der Größe der Cosmide (ca. 45 kb) erfolgte die Elution der DNA von der Säule mit auf 50°C erwärmtem

QF-Puffer. Die Konzentration der DNA wurde entweder über eine Gelelektrophorese oder mit dem Photometer (bei 260 nm) bestimmt. Aus einer 40 ml-Bakterienkultur konnten mindestens 10 µg Plasmid-DNA bzw. 5 - 10 µg Cosmid-DNA präpariert werden. Für schnelle Präparationen im kleinen Maßstab (z. B. für Restriktionsanalysen oder PCR) wurden 2 ml Bakteriensuspension unter Verwendung der Puffer aus dem "Qiagen Kit" (jeweils 300 µl) aufgearbeitet, und anstelle der Reinigung der DNA über die Säule wurde eine Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt. Diese Präparation konnte in 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäßen durchgeführt werden und die isolierte DNA war ausreichend für einen Restriktionsansatz oder mehrere PCR-Reaktionen.

2.2.9 BAC DNA-Isolierung

Lösung I:	25 mM Tris/ HCl pH 8,0 50 mM Glucose 10 mM EDTA RNase (100µg/ml)
Lösung II:	0,2 N NaOH 1 % (w/v) SDS Lösung immer frisch ansetzen
Lösung III:	3 M Kaliumacetat pH 4,8 (60ml 5 M KaAc + 11,5 ml Eisessig + 28,5 ml H ₂ O)

Die Präparation der BAC-DNA für die Insertgrößenbestimmung und die Restriktionsanalysen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. 100 ml LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) wurden mit einer Einzelkolonie des BAC-Klons angeimpft und ü. N. bei 37°C und ca. 125 upm geschüttelt. Die Flüssigkultur wurde auf zwei Zentrifugenröhrchen (jeweils ca. 40 ml) verteilt, der Rest wurde bei 4°C zum späteren Ansetzen von Glycerin-Dauerkulturen aufbewahrt. Die Zellen wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 2000 x g (JS13.1) pelletiert und das Pellet in 2,2 ml Lösung I vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden 4,4 ml Lösung II zugegeben, durch vorsichtiges Kippen gemischt und genau 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 3,3 ml kalter Lösung III und möglichst schnelles aber vorsichtiges Mischen wurden dann die genomische DNA, Proteine und Zellreste auf Eis ausgefällt und bei 4°C 20 min bei 22600 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Corex-Zentrifugenröhrchen überführt und die DNA durch Zugabe von 2,2 Vol. kaltem abs. Ethanol und Zentrifugation für 30 min bei 14200 x g und 4°C gefällt. Das Pellet wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und die DNA anschließend in 300 µl *bideest.* H₂O gelöst.

Die Präparation der BAC-DNA für die Sequenzierungen wurde mit dem "Plasmid-Midi-Kit" durchgeführt, da die so isolierte DNA durch eine zusätzliche Aufreinigung über eine Säule (Anionen-Austauscher) einen höheren Reinheitsgrad aufweist. Die DNA-Isolierung erfolgt

auch hier nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und wurde mit den folgenden leichten Modifikationen nach Herstellerangaben durchgeführt:

1. Erhöhung des Volumens von Puffer 1, 2 und 3 von 4 ml auf 10 ml.
2. Die DNA wurde mit 5 x 1 ml Puffer QF (auf 65°C erwärmt) von der Säule eluiert.

2.2.10 Identifizierung von BAC-Klonen auf 3x3 Duplikat-Filtern der IGF-BAC-Bibliothek

Zur Hybridisierung der BAC-Bibliothek-Filter wurden radioaktiv markierte Sonden (siehe 2.2.15) eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte wie unter 2.2.16 beschrieben. Die Einzelklone der Bibliothek sind auf Filtern im 3x3 Duplikat-Format fixiert. Auf dem Filter ist jeder Klon an zwei Positionen innerhalb eines Blocks mit 8 Klonen (3x3 Format) zu finden. Insgesamt sind auf dem Filter 48x48 solcher Blöcke vorhanden, was 9216 individuellen Klonen entspricht. Hybridisierte eine Sonde mit einem Klon, dann waren in einem Block immer zwei Signale erkennbar. Die Positionen bzw. Koordinaten dieser Signale auf dem Filter wurden dann mit einer Umrechnungsformel in neue Koordinaten umgerechnet (siehe Abb. 2-3). Anhand dieser neuen Koordinaten (\underline{x} , \underline{y}) konnten die BAC-Klone dann im Ressourcenzentrum bestellt werden.

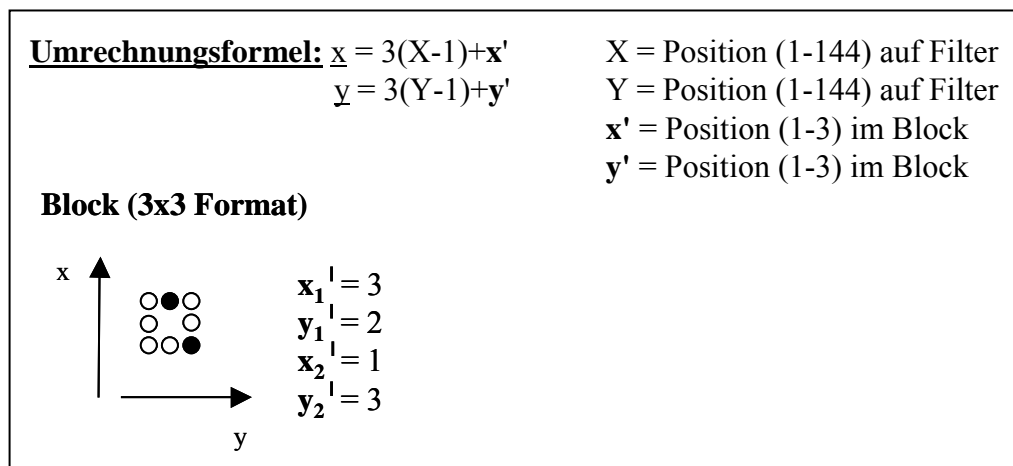


Abb. 2-3: Berechnung der Koordinaten von BAC-Klonen auf dem Filter der IGF-BAC-Bibliothek.

2.2.11 PCR mit dem RAPD-Primer L4

Der für die Vorselektion mit dem RAPD-Marker L4 verwendete Zufallsprimer hatte die folgende Nukleotidfolge: L4: 5' > GACTGCACA C < 3'

Die PCR wurde nach Williams *et al.* (1990) durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz (25 µl) enthielt ca. 25 ng DNA (entspricht der durchschnittlichen DNA-Menge in 2,5 µl der nach Edwards (siehe 2.2.5) präparierten DNA), 60 ng Primer, 1 unit Taq-Polymerase (Appligene), je 100 µM dNTPs, 3 mM Mg-Acetat, 2,5 µl 10 x Reaktionspuffer (1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, 0,02 % (w/v) Gelatine, 0,1 % (v/v) Triton X-100). Die Ansätze wurden mit je 30 µl sterilem Paraffinöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgte im DNA-Thermocycler unter Verwendung folgender Parameter:

1. 4 min 94 °C
2. 45 Zyklen mit 20 s 93 °C
1 min 36 °C
20 s 72 °C
3. 6 min 72 °C
4. 10 °C bis zur Entnahme der Proben aus dem Thermocycler

2.2.12 Allelspezifische Marker für die Vorselektion

2.2.12.1 Umwandlung des RFLP-Markers AIG1 in den allelspezifischen PCR-Marker (A3/B3)

Um den rechts vom Resistenzlocus gelegenen RFLP-Marker AIG1 in einen allelspezifischen PCR-Marker umzuwandeln, musste zuerst AIG1-spezifische DNA aus den beiden Ökotypen Tsu und Cvi isoliert und kloniert werden. Die AIG1-spezifischen DNA Bereiche wurden mit Hilfe der Primer AIG1-B1 und AIG1-B3 unter folgenden Bedingungen amplifiziert.

Der PCR-Ansatz (25µl) enthielt 25ng genomische DNA (Tsu bzw. Cvi), 10 pmol je Primer, 0,2 mM dNTP-Mix und 1 unit Taq-Polymerase. Jeder Ansatz wurde mit 30 µl Paraffin überschichtet. Die PCR erfolgte nach folgenden Parametern:

1. 4 min 94°C
2. 40 Zyklen mit 15 s 94°C
15 s 54°C
30 s 72°C
3. 6 min 72°C
4. 10°C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler

Sequenzen der verwendeten Primer:

AIG1-B1: 5' > CTA ACTCTAGCGGATGGA < 3'

AIG1-B3: 5' > CTTCCATTTCAGCACGCA < 3'

Die PCR-Produkte (929 bp) wurden über ein 1,5%iges TBE-Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des "GeneClean DNA-Isolierungs-Kit" aus dem Gel isoliert. Die isolierten PCR-Produkte wurden anschließend kloniert (siehe 2.2.24.1). Isolierte Klone wurden mittels PCR unter Verwendung von Standardprimern (M13 rev./forw., SK/ KS) auf eine erfolgreiche Klonierung überprüft (PCR siehe 2.2.24.1).

Nach der Klonierung der DNA-Abschnitte beider Ökotypen wurde Plasmid-DNA ("Quiagen Plasmid Midi Kit") präpariert und für die Sequenzierung der klonierten DNA eingesetzt. Als Startprimer für die Sequenzierungsreaktion wurden die Primer M13 forw. bzw. M13 rev. verwendet.

Die Sequenzen beider Ökotypen wurden miteinander verglichen und auf Unterschiede bezüglich einzelner Nukleotide hin untersucht. Solche Nukleotidabweichungen sollten zur Ableitung allelspezifischer Primer genutzt werden. Es sollten Primer abgeleitet werden, bei denen eine Nukleotid-Fehlpaarung am 3' Ende des Primers vorhanden ist, so dass dieser Primer immer nur an der DNA einer der zwei Ökotypen vollständig bindet und eine Amplifikation erfolgen kann. Es konnten insgesamt drei derartige Primer abgeleitet werden, die jeweils mit einem der oben genannten Primer AIG1-B1 bzw. AIG-B3 verschieden große PCR-Produkte liefern sollten (AIG-A1, AIG-A2, AIG-A3, siehe Tab. 2-2). Nach Prüfung der verschiedenen Primer-Kombinationen unter verschiedenen PCR-Bedingungen wurde schließlich eine Primerkombination (AIG1-B3 + AIG-A3) ausgewählt, die stabile Ergebnisse lieferte und immer nur bei Vorliegen Tsu-spezifischer DNA ein Amplifikationsprodukt (659 bp) lieferte. Dieser Marker wird im Folgenden immer mit A3/B3 bezeichnet.

Tab. 2-2: Aus dem AIG1-Fragment mittels Sequenzvergleich (Tsu/Cvi) abgeleitete Primer mit Fehlpaarungen am 3' Ende. Nur der Primer AIG-3 konnte für eine allelspezifische PCR eingesetzt werden.

Primer	Sequenz	Fehlpaarung	in Kombination mit Primer
AIG-A1	5' > GGGAGAGACCATTGA	L► (Tsu:A, Cvi:C)	AIG1-B1
AIG-A2	5' > CTCCTGCATTTCCAA	L► (Tsu:A, Cvi:T)	AIG1-B1
<u>AIG-A3</u>	5' > GCATCTTCTTTGGTA < 3'	L► (Tsu:A, Cvi:T)	AIG1-B3

Die allelspezifische PCR (PCR-Ansatz siehe oben) erfolgte unter den folgenden Bedingungen:

1. 4 min 94°C
2. 30 Zyklen mit 30 s 94°C
1 min 46°C
48 s 72°C
3. 6 min 72°C
4. 10°C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler

beschrieben auf eine Nylonmembran übertragen. Diese Membranen werden im Folgenden als RFLP-Blots bezeichnet.

2.2.14 Transfer der genomischen DNA aus dem Gel auf Membranfilter

Um in späteren Hybridisierungsexperimenten mit radioaktiv oder DIG-markierten Sonden hybridisieren zu können, muss die DNA im Gel zunächst denaturiert und dann aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (siehe 2.1.5) übertragen werden. Es wurden in beiden Fällen positiv geladene Membranen verwendet, weil hier eine stabilere Bindung der DNA an die Membran gewährleistet ist.

Vor der Übertragung der DNA wurde das Gel wie folgt behandelt:

- 15 min Depurinierung der chromosomalen DNA in 0,25 N HCl, was einem besseren Transfer großer DNA-Stücke dient
- 30 min Denaturierung in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH)
- 60 min Neutralisierung in Neutralisationslösung (1,5 M NaCl, 1M Tris, pH 7,0)

Die Übertragung der DNA auf die Membran erfolgte durch die Kapillartransfer-Methode (Southern 1975), auch "Southern-Blotting" genannt. Der Transfer erfolgte ü. N. mit 20 x SSC als Transferpuffer. Die Nylonmembran wurde in 2 x SSC voräquilibriert. Nach dem Transfer wurde die Membran nochmals für einige min in 2 x SSC gespült, dann luftgetrocknet und anschließend 2 h bei 80°C inkubiert, um die DNA auf der Membran zu fixieren.

2.2.15 Radioaktive Markierung von Doppelstrang-DNA:

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte nach der "random-primed labeling" Methode von Feinberg und Vogelstein (1983). Diese Methode beruht auf der Hybridisierung einer Mischung von Hexanukleotiden aller möglichen Basensequenzen an die zu markierende DNA. Der komplementäre Strang wird anschließend von den 3'-Enden der "random-primer" mit Hilfe des Klenow-Enzyms synthetisiert. Dabei werden die als Substrat angebotenen modifizierten Desoxyribonukleosidtriphosphate (z. B. [³²P]-markiert) in den neu synthetisierten komplementären Strang eingebaut. Die Markierung erfolgte mit dem "Random Primed DNA Labeling Kit" und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Es wurden ca. 50 ng der DNA zur Markierung eingesetzt. Nach der Markierungsreaktion (30 - 45 min bei 37 °C) wurde die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 100°C gestoppt und gleichzeitig wieder eine Denaturierung der DNA erreicht. Eine Abtrennung nicht-eingebauter Desoxyribonukleosidtriphosphate und eine Bestimmung der Markierungseffizienz erfolgte nicht. Der gesamte Markierungsansatz wurde zur Hybridisierung eingesetzt.

2.2.16 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden an membrangebundene DNA

Prähybridisierung der Membranen:

Vorhybridisierungslösung: 5 x SSC
 0,1 % (w/v) SDS
 1 ml Lachs-DNA (10 mg/ml)
 5 x Denhardt's (Koloniehybridisierungen) bzw.
 6 x Denhardt's (RFLP-Blots)

Die Hybridisierungslösung entspricht der Vorhybridisierungslösung unter Zugabe der markierten Sonde.

Um ein unspezifisches Binden der markierten Sonde auf der Nylonmembran zu vermeiden, wurde die Membran 2 h oder länger bei 68°C (6 upm) vorhybridisiert. Für die Vorhybridisierung wie auch für die Hybridisierung und die einzelnen Waschschrte wurden Hybridisierungsröhren (Länge 200 mm, Ø 65 mm, Bachhofer) verwendet. Pro Röhre wurden 25 ml Vorhybridisierungs- bzw. Hybridisierungslösung eingesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass die Seite der Membran, auf der die DNA gebunden war, innen lag, und dass die Membran luftblasenfrei an der Glaswand anlag.

Hybridisierung:

Die auf 100°C erhitzte Probe mit der markierten Sonde (siehe 2.2.15) wurde schnell in 25 ml frische Vorhybridisierungslösung pipettiert, wodurch die Renaturierung verhindert wurde. Anschließend wurde diese Hybridisierungslösung in die Hybridisierungsröhre mit der Membran überführt. Bei Verwendung kleinerer Filter, z. B. Rundfilter der Koloniehybridisierung, können auch mehrere überlappende Filter in einer Röhre hybridisiert werden. Die Hybridisierung erfolgte ü. N. (6 upm) bei 65°C (RFLP-Blots) bzw. 68°C (Koloniehybridisierung).

Waschen der hybridisierten Membranen:

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen in mehreren Schritten gewaschen:

- 20 - 30 min in 6 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS (65°C bzw. 68°C)
- 20 - 30 min in 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS (65°C bzw. 68°C)
- 5 - 10 min in 0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS (63°C bzw. 65°C)

Nach dem zweiten Waschschrte wurde bei schwachen Sonden mit einem Handmonitor kontrolliert, wie stark die Membran noch radioaktiv markiert war, und falls nötig wurde dann mit 0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS gewaschen.

Die Membranen wurden anschließend in Kunststoffolie eingeschweißt und in Röntgenfilmkassetten auf Röntgenfilmen (X-OMAT AR, Eastman Kodak Company, New York, USA) je nach Stärke der Markierung für die Dauer von einem Tag bis zu einer Woche exponiert.

2.2.17 Nichtradioaktive Markierung von Doppelstrang-DNA mittels Digoxigenin (DIG)

Die Kartierung (RFLP-Analysen) einiger BAC-/Cosmid-Enden erfolgte mit DIG-markierten PCR-Fragmenten. Die Markierung erfolgte mit dem "PCR DIG Probe Synthesis Kit", wobei die unter 2.2.22.2 beschriebenen Primer und Amplifikationsbedingungen verwendet wurden. Es handelt sich hierbei um eine direkte Markierung der Sonden mittels eingebautem DIG-11-dUTP. Die immunologische Detektion der hybridisierten Sonden erfolgte später mit Anti-Digoxigenin-AP (Anti-DIG konjugiert mit alkalischer Phosphatase).

2.2.18 Hybridisierung DIG-markierter Sonden an membrangebundene DNA

Zur Vorhybridisierung (2 h bei 68°C) und Hybridisierung (ü. N. bei 68°C) wurde die Membran mit der fixierten DNA in Plastikfolie (R&S Gefrier- und Kochfolie, Roth) eingeschweißt und unter ständigem Schütteln inkubiert. Zur Vorhybridisierung wurden 20 ml/100 cm², zur Hybridisierung 3,5 ml/100 cm² Hybridisierungspuffer (5 x SSC, 1 % (w/v) Blockingsolution, 0,1 % (w/v) N-Laurylsarcosin, 0,02 % (w/v) SDS, 50 µg/ml Lachs-DNA) verwendet. Die markierte Sonde wurde dem Hybridisierungspuffer in einer Endkonzentration von ca. 20 ng/ml zugesetzt und zuvor durch 10-minütiges Erhitzen auf 100°C und schnelles Abkühlen im Eiswasserbad denaturiert.

Waschen der hybridisierten Membranen:

Die Membranen wurden anschließend zweimal 15 min in 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei RT und zweimal 5 - 10 min in 0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei 65°C gewaschen.

2.2.18.1 Immunologische Detektion

Das verwendete Blockierungsreagenz, der Antikörper (Anti-DIG-AP Fab fragments) und das CSPD-Substrat (CSPD-ready-to-use) wurden von Roche Molecular Biochemicals bezogen. Die Detektion erfolgte nach Herstellerangaben des "DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit", wobei die Inkubationszeit in der Blockierungslösung auf 60 min verdoppelt wurde.

Die eingeschweißte Membran wurde in Röntgenfilmkassetten auf Röntgenfilmen (X-OMAT AR, Eastman Kodak Company, New York, USA) je nach Stärke der Markierung für die Dauer von 30 min bis 16 h exponiert.

2.2.19 Entfernung der markierten Sonde von der Membran

Die Entfernung hybridisierter, radioaktiv oder DIG-markierter Sonden erfolgte je nach Membrantyp durch die folgenden Waschschrirte:

Hybond N+-Membranen, Amersham (45°C):

- 30 min in 0,4 M NaOH
- 15 min in 0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS, 0,2 M Tris/HCl (pH 7,5)

Nylon-Membran/positiv geladen, Boehringer Mannheim/Roche (45°C):

- gründlich in *bidest.* H₂O spülen
- 30 min in 0,2 M NaOH, 0,1 % (w/v) SDS
- in 2 x SSC spülen

2.2.20 Bestimmung der BAC-Insertgröße mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE)

Um die Größe der BAC-Inserts abschätzen zu können, wurden ca. 2 µg der isolierten BAC-DNA (siehe 2.2.9) mit dem Restriktionsenzym *NotI* (20 units) ü. N. bei 37°C verdaut und die entstehenden Fragmente mit Hilfe der PFGE in einem 1%igen Agarosegel (Bio-Rad Pulsed-field Certified Agarose in 0,5 x TBE) unter den folgenden Bedingungen aufgetrennt:

Laufzeit: 16 h bei 6 V/cm, Puffer: 0,5 x TBE / 14°C,

Reorientierungswinkel: 120°, Pulslänge: 5 - 15 s.

Nicht beladene Geltaschen wurden mit 1%iger Agarose abgedichtet. Die DNA im Gel wurde anschließend im Ethidiumbromid-Färbepad (0,5 mg/l) ca. 30 min angefärbt. Zur Bestimmung der Größe der Fragmente wurden hochmolekulare Längenstandards (Hefechromosomen-, High Molecular Weight-, Lambda-Ladder-PFG-Marker) mit aufgetrennt. Die DNA wurde anschließend wie unter 2.2.14 beschrieben auf eine Nylonmembran transferiert, um für spätere Hybridisierungsexperimente (siehe 2.2.16) eingesetzt zu werden.

2.2.21 Restriktionsanalyse ("Fingerprinting") der BACs

Um zu bestimmen, wie groß die überlappenden Bereiche der einzelnen BAC-Klone sind, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde DNA der verschiedenen Klone jeweils mit einem der Enzyme *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* verdaut und das Restriktionsmuster der verschiedenen BACs für jeweils ein Enzym miteinander verglichen. Es wurden jeweils 1,5 – 2 µg DNA mit 80 units Enzym ü. N. bei 37°C verdaut. Der gesamte Restriktionsansatz wurde dann in einem 0,6%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt, wobei jeweils die mit dem gleichen Enzym verdauten BACs zum Vergleich direkt nebeneinander aufgetragen wurden. Zur Größenbestimmung der einzelnen Fragmente wurden verschiedene Längenstandards (siehe 2.1.2) mit aufgetragen. Die Größen der Fragmente, die identisch mit einem bzw. mehreren anderen BACs waren wurden am Computer mit der Software WINCAM 2.2 bestimmt, um so die Größe überlappender Abschnitte abschätzen zu können.

2.2.22 Isolierung von BAC-Endfragmenten

Für die Erstellung eines BAC-Contigs und zur Etablierung neuer Marker im Rahmen der hochauflösenden Kartierung war es notwendig, Endfragmente der untersuchten BAC-Klone zu isolieren. Diese DNA-Fragmente wurden auf zwei verschiedene Arten, mittels iPCR und direkt durch spezifische PCR-Amplifikation, isoliert. Die Erstellung des Contigs erfolgte anhand von Hybridisierungsexperimenten mit diesen Endfragmenten und PCR-Analysen mit den BAC-End-spezifischen Primern.

2.2.22.1 Isolierung von BAC-Endfragmenten mittels inverser PCR (iPCR)

Die BAC-Enden wurden zuerst mittels inverser PCR isoliert, bevor dazu übergegangen wurde, BAC-Enden durch PCR unter Anwendung spezifischer, selbst abgeleiteter Primer zu isolieren. Die beiden Enden werden im Folgenden als T7- und SP6-Ende bezeichnet. Diese Bezeichnungen beziehen sich auf die zwei Primerbindestellen, die die Klonierungsstelle beidseitig flankieren.

Für die Isolierung des SP6-Endes wurden die Enzyme *CfoI*, *HaeIII*, *XhoI* und *ClaI* und für die Isolierung des T7-Endes die Enzyme *CfoI*, *RsaI*, *SacI*, *HindII* und *AccI* eingesetzt (siehe Abb. 2-4).

Die verwendete BAC-DNA wurde wie unter 2.2.9 beschrieben isoliert. Es wurde hier jeweils eine 5 ml-Bakterienkultur aufgearbeitet und die DNA in 50 µl *bidest.* H₂O gelöst. Für den folgenden Restriktionsansatz wurden 7 µl dieser DNA-Lösung eingesetzt und in einem Volumen von 100 µl mit 10 units des jeweiligen Enzyms 3 h bei 37°C verdaut. Anschließend wurden zwei Extraktionen (1x Phenol, 1x Chloroform/Isoamylalkohol) durchgeführt und die DNA mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. kaltem abs. Ethanol ü. N. bei -20°C gefällt, dann für 30 min bei 16060 x g zentrifugiert und einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 90 µl *bidest.* H₂O aufgenommen. Für die folgende Ligationreaktion wurden 10 µl 10 x Ligationpuffer und 1 µl (1,5 units/µl) T4-DNA-Ligase hinzugefügt und 3 h bei RT inkubiert. Die Inaktivierung der Ligase wurde dann durch eine 15-minütige Inkubation bei 60°C erreicht. Die DNA wurde nochmals wie zuvor gefällt und das Pellet ü. N. in 8 µl sterilem *bidest.* H₂O gelöst. Die Ligationprodukte wurden anschließend in einem zweiten Restriktionsschritt wieder linearisiert, um so das Binden der Primer und den Ablauf der PCR zu optimieren. Es wurden hier als Enzyme für das SP6-Ende *BsrBI* und für das T7-Ende *PvuII* eingesetzt. Der Verdau erfolgte in einem Volumen von 10 µl für 1 h bei 37°C, es wurden 10 units Enzym eingesetzt. Nach einer 20-minütigen Inaktivierung der Enzyme bei 65°C wurden 5 µl dieses Restriktionsansatzes dann direkt in der folgenden PCR eingesetzt.

Der PCR-Ansatz (100 µl) enthielt jeweils 100 pmol der Primer BAC-1 und BAC-2 bzw. BAC-3 und BAC-4, 1 mM dNTP-Mix, 2,5 units Taq-Polymerase und den zugehörigen Reaktionspuffer (1x konz.). Jeder PCR-Ansatz wurde mit 60 µl Paraffin überschichtet.

Die Primer BAC-1 und BAC-2 wurden für die Isolierung des T7-Endes, die Primer BAC-3 und BAC-4 für die Isolierung des Sp6-Endes verwendet. In Abb. 2-4 sind die Primerpositionen und Schnittstellen der Enzyme für die iPCR schematisch dargestellt. Die PCR erfolgte nach folgenden Parametern:

1. 3 min 94°C
2. 35 Zyklen mit 1 min 94°C
1 min 30 s 56°C (für Amplifikation des Sp6-Endes)
bzw. 1 min 30 s 60°C (für Amplifikation des T7-Endes)
2 min 72°C
3. 5 min 72°C
4. 10°C bis zur Entnahme der Proben aus dem Thermocycler

Sequenzen der verwendeten Primer:

BAC-1: 5' > TTCCAACAGTTGCGCAG < 3'

BAC-2: 5' > TCTTCGCTATTACGCCAGCT < 3'

BAC-3: 5' > TCACACAGGAAACAGCTAT < 3'

BAC-4: 5' > ACACAACATACGAGCCGGAA < 3'

25 µl des PCR-Ansatzes wurden auf ein 1%iges TPE-Agarosegel aufgetragen und die PCR-Produkte gegebenenfalls aus dem Gel isoliert ("GeneClean DNA-Isolierungs-Kit"). Aus den restlichen 75 µl des Ansatzes wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des "High Pure PCR Product Purification Kits" direkt aufgereinigt.

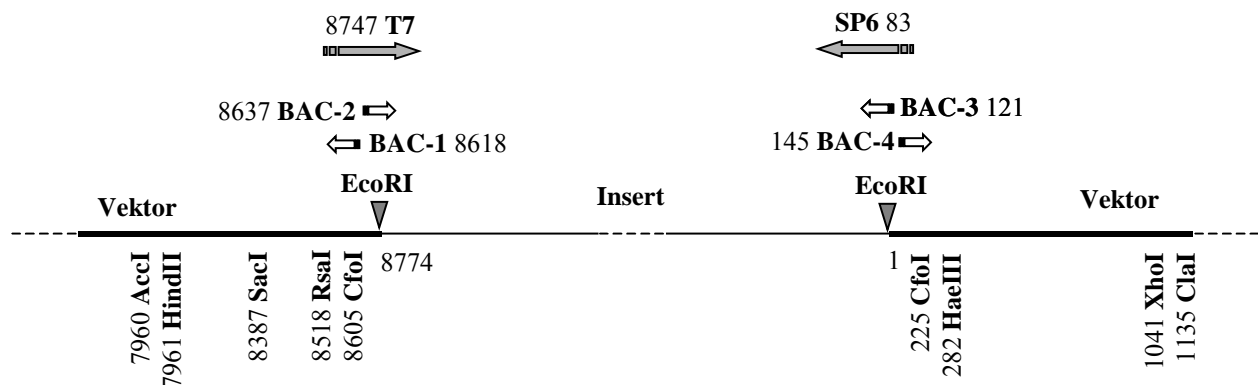


Abb. 2-4: Schematische Darstellung der Klonierungsstelle der BACs mit Bindungsstellen der BAC-Primer und Schnittstellen der Enzyme für die inverse PCR.

2.2.22.2 Amplifikation von BAC-Endfragmenten mittels spezifischer PCR

Diese Methode wurde direkt zur Isolierung von BAC-Endfragmenten eingesetzt, indem im Anschluss an die PCR der PCR-Ansatz in einem Agarosegel aufgetrennt und das PCR-Produkt mit dem "GeneClean DNA-Isolierungs-Kit" aus dem Gel isoliert wurde. Die so isolierten BAC-Endfragmente konnten dann als Sonden für Hybridisierungen mit anderen BACs oder als Sonden zur Durchmusterung der Cosmidbibliotheken eingesetzt werden. Außerdem wurden die spezifischen Primer auch bei der Erstellung des BAC-Contigs eingesetzt, um überlappende Bereiche der einzelnen BAC-Klone identifizieren zu können. Für diese PCR-Reaktionen wurde neben der BAC-DNA auch YAC-DNA eingesetzt, um die Position der einzelnen BACs auch in Bezug auf das YAC-Contig (siehe Abb. 1-1) zu fixieren.

Die beiden Enden der Inserts der BAC-Klone wurden auf eine Länge von ca. 500 bp sequenziert. Für die Sequenzierung wurden zwei der bereits bei der inversen PCR (siehe 2.2.22.1) verwendeten Primer (BAC-3, BAC-2) verwendet, die jeweils mit einem Abstand von 102 bp bzw. 118 bp flankierend zur Klonierungsstelle im BAC-Vektor binden. Die Sequenzen und die Lage der Primer sind in Abb. 2-4 dargestellt.

Die Isolierung der BAC-Enden erfolgte mit Hilfe von spezifischen Primern, die von diesen Sequenzen abgeleitet wurden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der zwischen den beiden Primern liegende DNA-Abschnitt (das zu amplifizierende BAC-Ende) möglichst groß war und die beiden Primer einen GC-Gehalt von 40 – 60 % und nahe beieinander liegende Annealing-Temperaturen hatten. Die einzelnen Primersequenzen mit den zugehörigen Annealing-Temperaturen und PCR Produkten sind in Tab. 2-3 zusammengefasst.

Bei zwei Primern mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen wurde bei der PCR die niedrigere Temperatur eingesetzt (siehe unten 1 min \underline{X} °C). Als Kontrolle wurde jeweils DNA des BACs eingesetzt, von dem die Primer abgeleitet wurden.

Jeder PCR-Ansatz (25 μ l) enthielt ca. 250-500 ng BAC-DNA, je 5 pmol Primer, 0,2 mM dNTP-Mix, 1,5 units Taq-Polymerase und den zugehörigen Reaktionspuffer (1x konz.). Der Ansatz wurde mit 30 μ l Paraffin überschichtet. Die PCR erfolgte nach folgenden Parametern:

1. 3 min 94°C
2. 35 Zyklen mit 1 min 94°C
1 min \underline{X} °C
1 min 72°C
3. 10 min 72°C
4. 10°C bis zur Entnahme der Proben aus dem Thermocycler

Tab. 2-3: Spezifische Primer zur Isolierung von BAC- und Cosmid-Endfragmenten. Angegeben sind die Nukleotidfolge und Annealing-Temperatur der einzelnen Primer und die Länge des jeweiligen PCR-Produkts. Ein PCR-Produkt wird jeweils von den Primerpaaren A+B, C+D, M+N, EE+FF gebildet.

Primer	Sequenz 5' > - < 3'	Ann.	PCR-Produkt
BAC 0925 A	GCTGAAACTCTCTGTGAATA	56°C	BAC F25A9 Sp6/RE [232]
BAC 0925 B	CACCACTATGAACTTTCCTG	58°C	
BAC 1214 A	CTCACTCTAAGTTTCATAGA	54°C	BAC F14M12 T7/RE [444]
BAC 1214 B	AAGGCTTATGTAGCTTAGC	54°C	
BAC 1214 C	TTGCGCCTGACGCTTATTCC	64°C	BAC F14M12 Sp6/LE [295]
BAC 1214 D	TTCTCACCTCACAGCCACC	64°C	
BAC 2212 A	ACTCATCACGCTTGGTAAT	54°C	BAC F12P22 T7/LE [389]
BAC 2212 B	CATACTCCGTCTATACTCG	56°C	
BAC 2212 C	CTTACACTTACGTTGTGGG	56°C	BAC F12P22 Sp6/RE [421]
BAC 2212 D	GAGGAAGTCTTGTGCAGC	56°C	
BAC 029 A	TACACTTACGTTGTGGGTGC	60°C	BAC F9D2 T7/RE [451]
BAC 029 B	CACTATTGCTTGGACTTACG	58°C	
BAC 029 C	GAGACCAGTCTTCAGTAACG	60°C	BAC F9D2 Sp6/LE [464]
BAC 029 D	TAGTCTAGCTTCAGCTTCAC	58°C	
BAC 033 A	CATTCACATGCTGATATCAT	54°C	BAC F3C3 Sp6/RE [381]
BAC 033 B	CCAAGACCAAGATAGGAC	54°C	
BAC 033 C	CTCAGCTTCAACCAATAC	54°C	BAC F3C3 T7/LE [373]
BAC 033 D	CTGATGCTCGGAATCTCA	54°C	
JO27 A*	CTAGCATACTCGAGCTACCG	62°C	BAC F7F2 Sp6/LE [370]
JO27 B*	CATGATGGACCATGACGGCG	64°C	
J021 C *	CTACCAAGCGGGAAGAACCG	64°C	BAC F7F2 T7/RE [297]
J017 D *	CATAGATCCAAGCCCGACCAG	66°C	
T12021A	CTCAGCTTCTGCTAATGGGA	60°C	BAC T12021 Sp6/RE [588]
T12021B	ACGGTACTCATGCTCCTCGT	62°C	
T12021EE	CGAGCTAATGACTCTATCTGG	62°C	BAC T12021 T7/LE [1004]
T12021FF	AGATGCTTCCTCCTGGAGCT	62°C	
F5M6A	TGGTTGCGATCCATCTGTTAC	62°C	BAC F5M6 Sp6/RE [566]
F5M6B	GCTCCTCGTAGCCATCTATC	62°C	
F5M6C	GATCGTTGTGTTTGGCTATCA	60°C	BAC F5M6 Sp6/RE [712]
F5M6D	ATGCCTCGTCGGTATCGCAA	62°C	
T315A	AATATCTTTGGCAGGAGGAAC	60°C	Cosmid T3152a T7/RE [393]
T315B	AGTTCCTGAGTAGGTCCCAGT	64°C	
T12021 M	CTGAACTTATATCTGTGGATC	58°C	Cosmid T3152a rev/LE [418]
T12021 N	AGCTTCCCAGTCAGCAAGCT	62°C	

*Diese Primer wurden im Rahmen einer Diplomarbeit (Jordan 1999) abgeleitet.

2.2.23 Isolierung interner BAC-Fragmente zur Etablierung neuer Marker

Neben der Kartierung der BAC-Endfragmente sollten zur Vervollständigung der Kartierungsdaten und zur weiteren Eingrenzung des *RPBI*-Abschnitts weitere Sequenzabschnitte kartiert werden. Da mit der Sequenzierung des kompletten *Arabidopsis*-Genoms im letzten Abschnitt dieses Projekts schließlich die vollständige Sequenz im untersuchten Bereich um *RPBI* zur Verfügung stand, konnten jetzt direkt spezifische Primer in selbstgewählten Abständen zu bereits kartierten Markern abgeleitet und die PCR-Produkte dann kartiert werden. Nach den Angaben der physikalischen Karte von Chromosom 1 liegt der BAC-Klon T12O21 (EMBL: AC074309) im untersuchten *RPBI*-Bereich, und die in Tab. 2-4 aufgelisteten Primer wurden von dieser Sequenz abgeleitet. Auch der bereits zuvor identifizierte BAC-Klon F3C3 ist mit der vollständigen Sequenz in der Datenbank (EMBL: AC084165) vertreten und zeigt eine Überlappung mit BAC T12O21. Es ist wichtig hier anzumerken, dass es sich bei allen veröffentlichten Daten um Sequenzen des *Arabidopsis*-Ökotyps Col-0 handelt.

Die Primer wurden zunächst getestet, indem eine PCR (siehe 2.2.22.2) mit genomischer DNA (30-150 ng) des Ökotyps Col durchgeführt wurde und DNA der drei Ökotypen Tsu, Cvi und RLD eingesetzt wurde, um Hinweise auf mögliche Polymorphismen bezüglich einzelner Basen bzw. Deletionen/Insertionen zwischen den Ökotypen zu erhalten.

Für die RFLP-Analysen wurden die PCR-Produkte entweder aus dem Agarose-Gel oder direkt aus dem PCR-Ansatz isoliert und anschließend radioaktiv markiert (siehe 2.2.15). Für die Herstellung DIG-markierter Sonden wurde das PCR-Produkt direkt während der PCR DIG-markiert. Hierfür wurde das "PCR DIG Probe Synthesis Kit" eingesetzt. Der PCR-Ansatz erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung der oben genannten Primer und PCR-Parameter.

Tab. 2-4: Spezifische Primer zur Isolierung von internen BAC-Fragmenten. Angegeben sind die Nukleotidfolge und Annealing-Temperatur der einzelnen Primer und die Länge des jeweiligen PCR-Produkts.

Primer	Sequenz 5' > - < 3'	Ann.	PCR-Produkt
BAC 033 E	GTATGCTTCAGGATCTGGACT	62°C	BAC F3C3 [899]
BAC 033 F	AACGATCCGAAGATTCCGGTA	62°C	
T12O21C	CTCGCATATGGTGAAGATGCA	62°C	BAC T12O21 [553]
T12O21D	GACGAGCATACATCAGGCTC	62°C	
T12O21E	TAGCCTCGAGCCACTTCGTT	62 °C	BAC T12O21 [638]
T12O21F	TGCCGCCTAGAGGGCAAATG	64°C	
T12O21G	CTGGACGAGGAGCATATATCG	64°C	BAC T12O21 [787]
T12O21H	CTGCACATGCAGAGGGTATAC	64°C	
T12O21I	CACACCATTGTTGCAGGTTTG	62°C	BAC T12O21 [584]
T12O21I2	CCAATGGAAGGTGTTAAGCTA	60°C	
T12O21J	CGTGCCATACCAATAAGCTTC	62°C	

T12021K	CACATTGAACGTAGTCTCCAC	62°C	BAC T12021 [571]
T12021L	CCATTTTACCGTTTGATGCGT	60°C	
T12021M	CTGAACTTATATCTGTGGATC	58°C	BAC T12021 [418]
T12021M2	AGGACGAAGAAATCGTCAATC	60°C	Cosmid T3152a LE
T12021N	AGCTTCCCAGTCAGCAAGCT	62°C	
T12021O	ACTGATCAAGCCGAATATGACA	62°C	BAC T12021
T12021O2	ACGTAAATCAGCTCGTCCAGT	62°C	Cosmid T3152a [668]
T12021P	CATGTCACTGGACTTCTTGAC	62°C	
T12021Q	TCGTAGGATCGCACCATCTTG	64°C	BAC T12021 [852]
T12021R	GCCAGCTACCCTCGATACTTA	64°C	
T12021S	GTCGTTACGAATTAGGGTGTT	60°C	BAC T12021 [573]
T12021T	GTAAACTCCAGATGCCAAGCG	64°C	
T12021U	GCACATGAGCATTTGTTTCAT	58°C	BAC T12021 [716]
T12021V	TCTAGAGCATGGATTGATTCG	60°C	
T12021W	TCACAAGCATGGAGTCTGCTA	62°C	BAC T12021 [771]
T12021X	ATGCTAAGATGCAGATGGATG	60°C	
T12021Y	CCTTCGCGGTCATTAATTCGA	62°C	BAC T12021 [736]
T12021Z	CACACCACCGATATTCATCGA	62°C	
F5M6E	TCGACAGTCTTTCGAGAGTA	58°C	BAC F5M6 [518]
F5M6F	GTAAGGTGTGCCTTGACGC	62°C	
T12021AA	CACTGAACGGGATTAGATGAT	60°C	BAC T12021 [794]
T12021BB	CAAATTGCATGCAAATGACGGT	62°C	
T12021CC	CGGATTTACGTTTATGGCGAG	62°C	BAC T12021 [2660]
T12021DD	GCCGAATTCATTGTCATAACG	60°C	
T12021GG	TGTCTTACTTTGACCAGGATG	60°C	BAC T12021 [524]
T12021HH	CATCCATTCTTAGATGTTACCG	62°C	
T12021II	TTGAGCAGGATCTCGTCGTG	62°C	BAC T12021 [783]
T12021JJ	CGCTGTGGTAGGTGCATGTA	62°C	
T12021KK	ATGGACGCGAAAGAGGACGT	62°C	BAC T12021 [513]
T12021LL	ATCTCCGTTTGTGCTCCTTGC	64°C	
T12021MM	CCGTGTATAGATACAGCTTTC	60°C	BAC T12021[631]
T12021NN	ATGTTCAAGTGCAACTTGGCCT	62°C	
T12021OO	ATGTCAGGTTCTCAGGTTCTCT	62°C	BAC T12021 [616]
T12021PP	TCTCGACGAGCTAGCCTCAT	62°C	
T12021QQ	TCTAGTCGCGTTCCTACTGTT	62°C	BAC T12021 [623]
T12021RR	TCAACCGAAGGATCCTCCACA	64°C	
T12021SS	ATGGAGTGCATAGAAATCAGC	62°C	BAC T12021 [515]
T12021TT	CAAGAGAAAGTCCCACATCGA	62°C	
T12021UU	TAGCGATCATGGAGTGCGATA	62°C	BAC T12021 [493]
T12021VV	TGTACTATAGACTGTCCTTGC	60°C	

2.2.24 Klonierung von PCR-Produkten und genomischen DNA-Fragmenten

Die Klonierung von PCR-Produkten (BAC-Enden/interne Fragmente) erfolgte nach dem Prinzip der T/A-Klonierung mit dem "pGEM-T easy Vector System" der Firma Promega. Das PCR-Produkt mit dem von der Taq-Polymerase gebildeten A-Überhang am 3'-Ende wird hier in einen Vektor mit einem T-Überhang am 3'-Ende kloniert. Für die Klonierung genomischer DNA-Fragmente (BAC-Subklone) wurde der Plasmidvektor pBluescript II KS verwendet. Das zu klonierende DNA-Fragment wurde mit dem jeweiligen Vektor ligiert und das Ligationsprodukt anschließend durch Hitzeschock-Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen eingebracht und mit diesen vermehrt.

Für eine Kontroll-PCR und zur Größenbestimmung der klonierten Fragmente wurden die Standard-Primer M13 forw./M13 rev. bzw. SK/KS eingesetzt.

2.2.24.1 Klonierung der BAC-Enden

Vom Hersteller des "pGEM-T easy-Klonierungs-Kits" wird ein 1:1 Verhältnis von Vektor und Insert empfohlen. Nach Herstellerangaben sollte aber auch ein Insert-Überschuss (1:3) die Ligationsreaktion nicht negativ beeinflussen. Der Ligationsansatz wurde wie folgt durchgeführt: 2-6 μl (je nach Stärke der isolierten DNA-Bande) des aus dem Gel isolierten PCR-Produktes wurden mit 1 μl 10 x Ligationspuffer, 1 μl pGEM-T-easy Vector (50 ng/ μl) und 1 μl T4-DNA-Ligase (3 units/ μl) versetzt und mit *bidest.* H₂O auf 10 μl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte ü. N. bei 14°C.

Für die Transformation wurden 50-100 μl kompetente *E. coli*-Zellen (JM109 bzw. XL1-Blue) auf Eis aufgetaut (bei XL1-Blue-Zellen wurde noch β -Mercaptoethanol mit einer Endkonzentration von 25 mM zugegeben) und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann mit $\frac{1}{5} - \frac{1}{4}$ des Ligationsansatzes vorsichtig auf Eis gemischt.

Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis folgte eine genau 45 s lange Inkubation bei 42°C im Wasserbad. Danach wurde der Ansatz sofort wieder auf Eis gestellt und dort weitere 5 min inkubiert. Während des Hitzeschocks können die Plasmide durch die Zellwand in die Bakterienzelle gelangen. Anschließend wurden 900 μl SOC-Medium (siehe 2.1.7) zugegeben und mit den Bakterien gemischt und 1 h bei 37°C auf dem Schüttler (ca. 150 upm) kultiviert. Anschließend wurden je 50 - 200 μl dieser Bakteriensuspension auf LB-Platten mit Ampicillin, X-Gal und IPTG (siehe 2.1.6) ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert.

Nach Herstellerangaben werden bei einer Insert-Größe von 400 - 700 bp ca. 50 Kolonien pro Platte erwartet, wovon etwa 80 % weiße Kolonien sein sollten und ca. 20 % blaue Kolonien. Weiße Kolonien enthalten Plasmide, die ein Insert eingebaut haben, blaue Kolonien enthalten dagegen Plasmide, die mit sich selbst ligiert sind und kein Insert eingebaut haben. Die Insertionsstelle im Plasmid liegt inmitten des *lacZ α* -Gens, welches die ersten 146 Aminosäuren der β -Galactosidase codiert. Wird dieses Gen durch Insertion des PCR-Produktes inaktiviert, kann keine funktionstüchtige β -Galactosidase synthetisiert werden und das im Medium vorhandene X-Gal wird nicht abgebaut. Die Kolonien bleiben weiß. Als weiterer Selektionsfaktor wird die Ampicillinresistenz eingesetzt, d. h. es können hier

grundsätzlich nur Bakterien wachsen, die das Vektorplasmid mit seinem Ampicillin-resistenzgen besitzen. Bakterien, die nicht transformiert wurden, d. h. kein Plasmid aufgenommen haben, können folglich nicht wachsen.

2.2.24.2 BAC-Subklonierung

Um zusätzlich zu den BAC-Endfragmenten auch interne Abschnitte eines BACs für Hybridisierungsexperimente als Sonden einsetzen zu können, wurde der BAC-Klon F3C3 subkloniert. Hierzu wurde die BAC-DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* vollständig geschnitten und die erhaltenen Fragmente wie im Folgenden beschrieben in einen Plasmidvektor (pBluescript II KS) kloniert.

Die Ligation erfolgte in einem 20 µl-Ansatz ü. N. bei 4°C. Es wurden ca. 500 ng Vector (*EcoRI*-geschnitten und dephosphoryliert), ≥ 500 ng BAC-DNA (*EcoRI*-geschnitten) und ≥ 2 units T4-DNA-Ligase eingesetzt. Von diesem Ligationsansatz wurden 5 µl in der folgenden Transformation eingesetzt. Als Wirtszellen wurden kompetente Zellen des *E. coli*-Stamms XL1-Blue verwendet. Die Transformation und anschließende Selektion positiver Klone erfolgte wie unter 2.2.24.1 beschrieben.

Um die Größe der subklonierten Fragmente festzustellen und identische Subklone identifizieren zu können, wurde anschließend Plasmid-DNA einzeln gepickter Klone isoliert und die Inserts mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* aus dem Plasmid wieder herausgeschnitten. Hierfür wurden ca. 500 - 1000 ng Plasmid-DNA mit 40 units *EcoRI* verdaut und anschließend in einem Gel aufgetrennt. Dieses Gel konnte dann für einen Southern-Blot verwendet werden, um diese Subklone mit spezifischen Sonden hybridisieren zu können, oder die Insert-Banden wurden direkt aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des "GeneClean DNA-Isolierungs-Kits" isoliert, um dann als Sonden zum Durchmustern der Cosmidbanken eingesetzt zu werden. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der Insertgrößen und die Isolierung von Inserts auch mittels PCR unter Verwendung der Standardprimer SK und KS. Die PCR-Produkte wurden mit dem "High Pure Produkt Purification Kit" isoliert.

2.2.25 Herstellung einer Cosmidbibliothek des *Arabidopsis*-Ökotyps Tsu

Die Arbeiten zur Erstellung der Cosmidbibliothek wurden extern im Labor der AG M. Ganai (IPK Gatersleben), von der auch der Binärvektor zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt.

Cosmidvektor-Präparation:

Der binäre Cosmidvektor (29 kb) trägt eine Tetracyclinresistenz und enthält eine 9,1 kb große T-DNA (04541) mit 35S-Promotor und Kanamycinresistenzgen zur Selektion der transformierten Pflanzen. Zur Herstellung der Tsu-Bibliothek wurde dieser Vektor durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *BamHI* linearisiert und anschließend dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern.

Partial-Verdau genomischer DNA:

Die zu klonierende genomische DNA des *Arabidopsis*-Ökotyps Tsu wurde mit der CTAB-Methode (siehe 2.2.7) isoliert und die Konzentration und Qualität der DNA wurde über eine Gelelektrophorese kontrolliert. 80 µg dieser DNA wurden dann für den folgenden Partial-Verdau mit dem entsprechenden Restriktionspuffer (300 µl 10 x Puffer) und *bidest.* H₂O in einem Volumen von 3 ml auf Eis 3 h vorinkubiert, um ein vollständiges Lösen und eine gleichmäßige Verteilung der DNA zu garantieren. Es wurde anschließend eine Testreihe für die Restriktion durchgeführt, um festzustellen, welche Enzymkonzentration eingesetzt werden muss, damit der Partial-Verdau Restriktionsfragmente der gewünschten Größe liefert. Der Cosmidvektor wurde mit dem Restriktionsenzym *BamHI* (G'GATC'C) geschnitten, die genomische DNA mit dem Enzym *Sau3A* ('GATC'). Beide Enzyme unterscheiden sich in der Länge ihrer Erkennungssequenz, liefern aber nach der Restriktion komplementäre überstehende DNA-Enden, so dass Vektor und genomische DNA miteinander ligiert werden können. Da die zu klonierende genomische DNA aufgrund der später folgenden Verpackung in λ-Phagenköpfe eine Größe von 9-23 kb haben musste, wurde hier das Enzym *Sau3A* verwendet, da es im Genom häufiger als *BamHI* schneidet und somit kleinere DNA-Fragmente liefert. Um die Bildung chimärer Cosmidklone zu vermeiden sollten erst Fragmente ab einer Größe von 12 kb isoliert werden. Der Testverdau wurde mit einer Konzentration von 0,8 - 0,0002 units/µg DNA durchgeführt, wobei die Enzymkonzentration jeweils halbiert wurde. Die Restriktionsansätze hatten ein Volumen von 60 µl und wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend wurde das Enzym durch Zugabe von 15 mM EDTA und 15-minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert. Für den präparativen Verdau (Hauptanteil der Fragmente sollte zwischen 12 bis 23 kb liegen) wurden dann die vier Konzentrationen 0,19 , 0,13 , 0,08 , 0,06 units/µg DNA eingesetzt und es wurden jeweils 8 µg DNA in einem Volumen von 600µl verdaut. Mit allen 4 Restriktionsansätzen wurde dann eine Phenol/Chloroform (1:1)-Extraktion und anschließende DNA-Fällung mit 2,5 Vol. Ethanol und ¹/₂₀ Vol. NaAc durchgeführt. Die gewaschene und getrocknete DNA wurde in 200 µl Beladungspuffer (200 mM KCl, 20 mM, Tris/HCl, pH 7,5) gelöst, 10 min auf 65°C erwärmt und auf einen Saccharosegradienten (10 % - 40 % (w/v) in Gradientenpuffer: 1 M NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA) aufgetragen und bei 10°C 18 h mit 139000 x g (SW40-Rotor, Beckman-Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Aus den einzelnen Fraktionen des Gradienten wurden dann diejenigen mit den gewünschten Fragmentgrößen ausgewählt, die DNA gefällt, gewaschen und anschließend in *bidest.* H₂O aufgenommen und für die Ligation verwendet. Parallel dazu wurde aus einem auf dem Gel aufgetrennten Restriktionsansatz der Bereich mit den gewünschten Fragmenten zwischen 12 - 23 kb ausgeschnitten. Die DNA wurde dann unter Verwendung von β-Agarase nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert.

Ligation und Verpackung in Phagenköpfe:

Die Ligation erfolgte in einem 5 µl-Ansatz ü. N. bei 4°C und enthielt ca. 1 µg Vektor (*BamHI*), ca. 500 ng genomische DNA (*Sau3A*) und 2,5 units Ligase. Zur Verpackung in Phagenköpfe wurde das Verpackungsextrakt Gigapack XL der Firma Stratagene verwendet. Es wurden 1 - 4 µl Ligationsansatz mit dem Verpackungsextrakt gemischt, 90 min bei RT inkubiert, dann mit 500 µl SM-Puffer (siehe 2.1.6) und 20 µl Chloroform versetzt, gründlich gemischt, zentrifugiert und die wässrige Phase abgenommen und bis zur Transduktion bei 4°C aufbewahrt.

Transduktion in *E. coli*:

Für die Transduktion wurden Bakterien des Stamms XL1Blue MRF⁺Kan (siehe 2.1.14) verwendet. Die Bakterien sollten sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und frisch präpariert sein. Hierfür wurden 30 ml LB-Medium mit Kanamycin mit einer Einzelkolonie angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 1,0 kultiviert (ca. 8 h). Die Bakterien wurden bei 1410 x g abzentrifugiert und das Pellet in 10 mM MgSO₄ gelöst und mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt.

Zur Titerbestimmung wurden 25 µl Verpackungsansatz mit 25 µl Bakterien (OD₆₀₀ 0,5) gemischt, 15 min bei RT und dann 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl LB-Medium wurde 1 h bei 37°C inkubiert und der Ansatz dann auf LB-Medium mit Tetracyclin (Ø145 mm Platten) ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert. Nach der Titerbestimmung wurden die restlichen 475 µl Verpackungsansatz mit 450 µl Bakterien (OD₆₀₀ 0,5) gemischt und wie zuvor beschrieben behandelt. Die Bakterien wurden mit einer Dichte von ca. 1000 Kolonien pro Platte ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden dann mit 3 x 4 ml LB-Medium von den Platten gespült, und es wurden sowohl Glycerindauerkulturen von den einzelnen Platten (Fraktionen) als auch von der Gesamtheit aller Platten (Gesamtbank) angelegt.

Die Insertgröße der Cosmidklone wurde mittels einer Restriktionsanalyse ermittelt. Es wurde hierzu DNA von zufällig ausgewählten 64 Klonen mit den zwei Restriktionsenzymen *XbaI* und *EcoRV* (oder *EcoRI*) verdaut und die Größe der Restriktionsfragmente (mit Ausnahme der Vektorbande) am Computer (Software WINCAM 2.2) bestimmt.

Die Bibliothek wurde anschließend mittels PCR und Hybridisierung mit dem Marker AIG1 auf das Vorhandensein bekannter, bereits kartierter DNA-Bereiche getestet. Hierzu wurden spezifische Primer des Markers AIG1 und spezifische Primer einiger BAC-Enden verwendet. Es wurden Bakterienstammuspensionen (5 - 10 µl Dauerkultur verdünnt in 100 µl LB-Medium) angesetzt, die in der PCR-Reaktion eingesetzt wurden. Der erste Denaturierungsschritt in der PCR (siehe 2.2.22.2) wurde von 3 min auf 5 min 94°C erhöht, um die Bakterienzellwand zu zerstören und die DNA freizusetzen.

2.2.26 Durchmusterung der Cosmidbibliotheken

Ausplattieren der Cosmidklone (Masterfilter):

Für die Durchmusterung der Cosmidbibliotheken bzw. einzelnen Fraktionen der Tsu-Bibliothek wurden zuerst Stammlösungen angesetzt, indem eine Spatelspitze (5-10 µl) aus der Glycerin-Dauerkultur entnommen und in 100 µl LB-Medium mit Tetracyclin (siehe 2.1.6) verdünnt wurde. Es musste dann durch Ausplattierung verschiedener Verdünnungen dieser Stammlösungen erst eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden, bevor die Cosmide mit einer Dichte von ca. 10000 Kolonien pro Platte (LB + Tetracyclin) direkt auf Nylonmembranfilter (rund / Ø 132 mm, eckig / ca. 115 x 115 mm) gleichmäßig ausplattiert wurden. Die Filter wurden einige Minuten vorher aufgelegt, so dass sie gut durchfeuchtet glatt auf dem Medium auflagen. Die Platten wurden dann ü. N. bei 37°C inkubiert.

Anfertigung von Filterkopien (Replika) und Koloniehybridisierung:

Von den angefertigten Masterfiltern wurden Filterkopien (Replika) in Form eines Abdruckes angefertigt. Hierzu wurden die Masterfilter auf steriles Filterpapier gelegt und ein neuer Filter deckungsgleich aufgelegt und die Kolonien durch leichten Druck übertragen. Zur späteren Zuordnung der genauen Position der Filter wurden mit einer sterilen Nadel drei Markierungspunkte durch die beiden Filter gestochen. Anschließend wurden die Filter wieder auf die alten bzw. die Abdrücke auf frische Tetracyclin-Agarplatten aufgelegt. Die Platten mit den Abdrücken wurden dann 5 – 8 h, die Platten mit den Masterfiltern ca. 2 – 3 h bei 37°C inkubiert, damit die Kolonien wachsen konnten. Die Masterplatten wurden zur späteren Isolierung von Klonen bei 4°C aufbewahrt. Die Replika-Filter wurden dann von den Platten entfernt und durch Auflegen auf getränktes Filterpapier wie folgt behandelt: 5 min 10 % (w/v) SDS, 5 min Dentaturierungslösung, 10 min Neutralisationslösung und 10 min 2 x SSC (Lösungen siehe 2.2.14). Hierbei wurden die Bakterienwände aufgeschlossen und die DNA denaturiert. Anschließend wurden die Filter getrocknet und bei 80°C für 2 h zur Fixierung der DNA gebacken. Bakterienreste wurden vor der Hybridisierung mit 2 x SSC von den Filtern abgewaschen. Als Sonden wurden sowohl einzelne BAC-Endfragmente (F7F2/LE, F3C3/RE, T12O21/RE) und ein Cosmid-Endfragment (T3152a/LE) als auch Subklon-Fragmente des BACs F3C3 eingesetzt.

Rescreening:

Da aufgrund der hohen Bakteriendichte auf den Masterfiltern ein Hybridisierungssignal nicht direkt einem einzelnen Klon auf der Platte zugeordnet werden konnte, wurde die Kolonien im Bereich um das positive Signal mit etwas LB-Medium von dem Masterfilter abgespült und in 100 µl LB-Medium aufgenommen. Nach einer Konzentrationsbestimmung wurden diese Klone dann mit einer Dichte von ca. 500 - 1000 Kolonien pro Platte erneut auf Nylonfilter ausplattiert, so dass die wachsenden Klone deutlich getrennt lagen. Auch von diesen Filtern wurden wieder Filterkopien hergestellt und eine zweite Hybridisierung mit der zuvor verwendeten Sonde durchgeführt. Positive Hybridisierungssignale konnten jetzt einzelnen

Kolonien zugeordnet werden, so dass mit Hilfe steriler Zahnstocher oder Pipettenspitzen Einzelklone gepickt werden konnten und eine Flüssigkultur damit angeimpft werden konnte. Mit diesen Flüssigkulturen wurde dann eine Cosmid-Mini-Präparation bzw. Cosmid-präparation mit Hilfe des "Plasmid-Midi-Kits" (siehe 2.2.8) durchgeführt, um die Cosmide näher untersuchen zu können (PCR, Restriktionsanalyse, Kontrollhybridisierung). In der Regel reichte ein Rescreening um positive Klone eindeutig identifizieren zu können.

Sequenzierung der Cosmidenden:

Die Sequenzierung der Cosmidenden der Tsu-Klone erfolgte mit dem T7- bzw. M13 rev. Primer. Für die Sequenzierung der Enden der RLD-Klone mussten zuerst die flankierenden Vektorabschnitte sequenziert werden, um dann Primer (*siehe unten) für die Sequenzierung der Cosmidenden ableiten zu können, da keine Informationen über die Vektorsequenz vorlagen. Bekannt war nur, dass die Klonierungsstelle von einem Kanamycinresistenzgen und einem GUS-Gen mit 35S Promotor flankiert wird. Die Vektorsequenzierung erfolgte mit Primern, die in diesen zwei Genen binden.

*AACos35: 5' > TTGCCCTTTGGTCTTCTGAG < 3'

*AACosKan2: 5' > GGTTTGCGCCAAGATAAATCA < 3'

2.2.27 DNA-Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungen wurden vom Sequenzierservice DLMBC (Dienstleistungen in der Molekularbiologie und Biochemie, M. Meixner) durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach dem Prinzip von Sanger *et al.* (1977) mit sog. Dye-Terminatoren (unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide, die mittels PCR eingebaut werden), wobei alle vier Terminationsreaktionen in einem Ansatz durchgeführt werden konnten. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software CHROMAS 1.4.

2.2.28 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte, Plasmid-/Cosmid-Verdau), verdauter genomischer DNA (RFLP-Analyse) und unverdauter genomischer DNA (Konzentrationsbestimmung) erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese in Gelkammern der Marke OWL (Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg). Es wurden Agarosegele verschiedener Größen (20 cm x 25 cm (450 ml), 13,5 cm x 12 cm (150 ml)) verwendet. Agaroseart und Agarosekonzentration variierten je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente (siehe Tab. 2-5). Außerdem wurden zwei unterschiedliche Puffer (TBE, TPE, siehe 2.1.6) für die Elektrophorese verwendet. Zur späteren Anfärbung der DNA wurde Ethidiumbromid (1%ige (w/v) wässrige Lösung) direkt ins Gel gegeben (0,05 µl/ml). Das Ethidiumbromid interkaliert hierbei in die DNA und wird unter UV-Bestrahlung auf einem UV-Transilluminator sichtbar. Die Elektrophorese erfolgte entweder tagsüber bei ca. 3,2 V/cm oder ü. N. bei ca. 1,5 V/cm. Die Elektrophorese erfolgte entweder tagsüber bei

ca. 80 Volt (3,2 V/cm) oder ü. N. bei 25 - 40 Volt (1,5 V/cm). Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage.

Tab. 2-5: Bedingungen bei der gelelektrophoretischen Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente.

Agarose-Konz.	Optimale Auftrennung [bp]	Agarose	Puffer	Verwendung
0,6 %	900-20000 bp	Ultra PURE (Gibco BRL)	1xTPE	- Restriktionsanalyse der BACs
0,8 %	700-11000 bp	Ultra PURE (Gibco BRL)	1xTPE	- Southern- Blots (RFLP-Analyse) - Konzentrationsbestimmung (genom. DNA) - Restriktionsanalyse der Cosmide
1,0 %	500-10000 bp	NEEO (Roth)	1xTBE	- PCR-Produkte - Plasmid-Verdau
1,5 %	200-4000 bp	NEEO (Roth)	1xTBE	- PCR-Produkte - RAPD-Analyse

2.2.29 Restriktionsansätze

Bei allen Restriktionsansätzen wurde stets der vom Hersteller empfohlene Restriktionspuffer verwendet und darauf geachtet, dass der Glycerinanteil, d.h. das zugegebene Enzymvolumen 10 % des Gesamtvolumens nicht überstieg. In der Regel wurden die Ansätze ü. N. in einem Wärmeschrank inkubiert. Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA wurde mindestens 3 h inkubiert. Mussten hochkonzentrierte Enzyme vor der Zugabe noch verdünnt werden, dann wurde dafür ein spezieller Verdünnungspuffer für Restriktionsenzyme (MBI Fermentas) verwendet. Es wurde bei allen Reaktionen immer Enzym im Überschuss zugegeben, um einen unvollständigen Verdau zu vermeiden sowie eine eventuelle Hemmung der Enzymaktivität durch andere Stoffe im Ansatz auszugleichen.

2.2.30 Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen

Für die langfristige Lagerung der BAC-Klone, der in *E. coli* klonierten BAC-Subklone und BAC-Endfragmente wurden Glycerin-Kulturen dieser Proben angelegt.

Hierzu wurden Bakterien-Flüssigkulturen (LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum, siehe 2.1.6) der BACs bzw. selbst klonierten Fragmente angesetzt. Die Bakterienkulturen wurden ü. N. bei 37°C (150 upm) kultiviert. Von diesen Flüssigkulturen wurden 750 µl mit 250 µl sterilem, wasserfreiem Glycerin (Merck, Darmstadt) versetzt, gründlich gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte dann bei -70°C. Die verwendeten Flüssigkulturen sollten nicht älter als 5 Tage sein.