

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Die in den Versuchen verwendeten Sorten von *Vicia faba*

ssp. *fab*a var. *equina* cv. Albatross

ssp. *minor* var. *minor* cv. Mythos

wurden von der Norddeutschen Pflanzenzucht (NPZ), H.-G. Lemke KG, Hohenlieth bezogen. Die Sorte Albatross gilt als tanninarm; beide Sorten hatten sich in vorangegangenen Versuchen als besonders geeignet für die Gewebekultur erwiesen.

2.1.2 Bakterien

Escherichia coli:

DH5 α Genotyp Φ 80dlacZ Δ M15 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 deoR Δ lacU169 (one shot DH5 competent cells, Invitrogen/Karlsruhe)

Agrobacterium tumefaciens:

EHA101 Agropin/Succinamopin-Typ, L, L-Succinamopin *vir*-Region, *disarmed*, hypervirulent, *kan*^r (Hood *et al.* 1986)

EHA105 Agropin/Succinamopin-Typ, L, L-Succinamopin *vir*-Region (pTiBo542 Δ T, A281), *disarmed*, hypervirulent, *kan*^s (Hood *et al.* 1993)

2.1.3 Chemikalien und Medienzusätze

Die verwendeten Chemikalien und Kits wurden – wenn nicht anders vermerkt - von den Firmen Bio-Rad (München), Boehringer/Roche (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Medienzusätze für Bakterienanzucht und pflanzliche Gewebekultur: Bacto-Tryptone, Bacto-Peptone und Yeast-Extrakt (Difco Laboratories, Detroit/USA), MS- und KM-Fertigmedien (Sigma, Deisenhofen), Gelrite (Roth, Karlsruhe), Agar (Merck, Darmstadt), Caseinhydrolysat (Duchefa, NL), Kokoswasser (aus frischen Kokosnüssen/Berliner Fruchtmarkt, bei -20°C eingefroren und vor der Verwendung sterilfiltriert)

Wachstumsregulatoren: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), 6-Benzylaminopurin (BAP), Indol-3-buttersäure (IBA), 1-Naphtylessigsäure (NAA), 4-Amino-Trichloropicolinsäure (Picloram), Zeatin: alle Duchefa/NL; 1-Phenyl-3-(thiadiazol-5-yl)-urea (Thidiazuron), Riedel de Haen

Antibiotika: Betabactyl (Smith-Kline-Beecham, UK), Claforan (Hoechst AG, Frankfurt), Carbenicillin (Serva, Heidelberg), G418 (Boehringer, Mannheim), Kanamycin (Sigma, Deisenhofen), Phosphinotricin (Hoechst AG, Frankfurt)

2.1.4 Plasmide

Das Plasmid **pGSGluc1** (Plant Genetic Systems, Belgien) ist 14,2 kb groß. Seine T-DNA enthält das Selektionsmarkergen Neomycin Phosphotransferase II (*nptII*) und das β -Glucuronidase Gen (*uidA*) aus *E.coli* (Jefferson 1987) unter der Kontrolle des bidirektionalen TR1/2-Promoters des Ti-Plasmids pTiAch5 vom Octopintyp (Velten & Schell 1985).

Plasmid **pIBGusInt** (14,9 kb) trägt ebenfalls eine NPTII-Resistenz und das *uidA*-Gen mit dem *st-ls1*-Intron aus der Kartoffel (Vancanneyt *et al.* 1990) unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors.

Das Plasmid **pI19** ist ein Derivat des pBIN19 (Bevan 1984) mit Selektionsmarker *nptII* und *uidA*-Intron unter Kontrolle des samenspezifischen Phaseolin Promotors (Bustos *et al.* 1989, Sen *et al.* 1993).

Das Plasmid **pAN109** ist ein 15,2 kb großes Derivat von pGA492 (An 1988) mit einer *BamHI/SacI* Insertion eines mutierten *lysC*-gens aus *E.coli* (codierend für eine *feedback*-insensitive Aspartatkinase III, Shaul & Galili 1992) unter Kontrolle des Phaseolin-Promotors und des Octopinsynthese Terminators (Tocs). Die NPTII-Resistenz (von *Tn5*) wird von *nos* Promotor (Shaw *et al.* 1984) und Terminator kontrolliert. Die Plasmide pI19 und pAN109 wurden freundlicherweise von Dr. G. Galili, Weizman Institut, Rehovot (Israel) zur Verfügung gestellt.

Die Plasmide **pBIOU** und **pGPOU** sind Derivate des ClonTech-Vektors pBI101, jeweils 13,8 kb groß und wurden von Dr. M. Meixner (ehem. Institut für Angewandte Genetik, FU Berlin) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Beide Plasmide tragen die codierende Sequenz für das Sonnenblumen 2S-Albumin 8-Gen (*sfa8*, Kortt *et al.* 1991) einschließlich eines Introns unter der Kontrolle des samenspezifischen USP-Promotors aus *Vicia faba* (Bäumlein *et al.* 1991). Sie unterscheiden sich in der Gensequenz für den Selektionsmarker: pBiou ist mit dem *nptII*-Gen unter Kontrolle des Nopalin-Synthase-promotors (*Pnos*) und –Terminators ausgestattet, pGPOU enthält das *bar*-Gen für die Selektion mit der Bialaphos-Resistenz aus *Streptomyces hygrosopicus* (White *et al.* 1990) in Verbindung mit dem *nos*-Promotor und dem Ag7-Terminator.

Von pGPOU wurde ebenfalls ein Derivat (**pPSM2**) mit verändertem (Doppel)-Promotor (IeB4 und Phaseolin) für das *sfa8*-Gen eingesetzt.

Plasmid **pHP23** (4570 bp) trägt die codierende Sequenz für *nptII* unter Kontrolle des 19S + 35S CaMV- Fusionspromotors in pUC19 (Paszowski *et al.* 1988).

Tabelle 2.1: Liste der Binärvektoren

Agrobakterien-stamm/Plasmid	codierende Sequenz	Promotor	Resistenz-marker	Referenz
EHA101 - pGSGluc1	<i>uidA</i>	CaMV35S	<i>nptII</i>	PGS, Gent/Belgien
EHA101 - pIBGusInt	<i>uidA</i> -Intron	CaMV35S	<i>nptII</i>	Broer, Univ. Bielefeld
EHA101 - pI19	<i>uidA</i> -Intron	P-phaseolin	<i>nptII</i>	Shaul & Galili, Weizmann Institut/Israel
EHA101 - pAN109	<i>lysC</i>	P-phaseolin	<i>nptII</i>	Shaul & Galili, Weizmann Institut/Israel
EHA105 - pBIOU	<i>sfa8</i>	P- <i>usp</i>	<i>nptII</i>	Meixner, IAG Berlin
EHA105 - pGPOU	<i>sfa8</i>	P- <i>usp</i>	<i>bar</i>	Meixner, IAG Berlin
EHA105 - pPSM2	<i>sfa8</i>	P- <i>usp</i> /IeB4-Doppelpromotor	<i>bar</i>	Meixner, IAG Berlin

2.1.5 PCR-Primer

Die in der Arbeit verwendeten Primer, deren Sequenz und Verwendung sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 2.2: Verzeichnis der PCR Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendung / Länge des amplifizierten DNA-Fragments	Annealing Temperatur
HAP1	TACATCAAACACATTCTACA	Sunflower Albumin 8 (<i>sfa8</i>)	58°C
HAP2	AGACAAGTCCGATTTTATTA	892 bp	
LysC31	GATTTTGACGCCATGAACCGCA	Bakterielle Aspartatkinase (<i>lysC</i>)	57°C
LysC95	TGTCAGCAACGTATCGCCAGTGG	1056 bp	
NPTII _{fwd}	TCATCTCACCTTGCTCCTG	Neomycin-Phosphotransferase (<i>nptII</i>)	52°C
NPTII _{rev}	AGCCAACGCTATGTCCTG	373 bp	
USP _{fwd}	GAATCACTGCGACATCATCC	Unknown Seed Protein (<i>usp</i>)	55°C
USP _{rev}	CCTCCCACAAAACATGAGAG	1071 bp	

Alle in der Tabelle aufgeführten Primer wurden bei MWG Biotech GmbH (München) synthetisiert.

2.1.6 Antikörper für die Immunodetektion

Der für die Erkennung des Sonnenblumenproteins (SFA8) verwendete polyklonale Peptid-Antikörper aus Kaninchen wurde von Eurogentec (Seraing/Belgien) bezogen.

Der in dieser Arbeit verwendete Aspartatkinase Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Dr. G. Galili, Weizman Institut, Rehovot/Israel zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebekultur und Transformation

2.2.1.1 Anzucht der Pflanzen zur Explantatgewinnung

Reife Samen von *Vicia faba* wurden 2 Minuten in 70% Ethanol, danach 10 Minuten in einer 15%igen Natriumhypochloridlösung sterilisiert. Nach mehrmaligem Waschen der Samen mit sterilem, destilliertem Wasser wurden diese über Nacht in sterilem Leitungswasser gequollen. Zur Keimung wurden die gequollenen Samen in Gläser mit Leitungswasser-Agar (0,8%, Merck) überführt und für 3-4 Tage bei 4°C im Dunkeln gehalten, die weitere Kultivierung erfolgte im Dunkeln bei 22°C.

Die Samen wurden nach der Entnahme des primären Epicotyls unter den genannten Bedingungen weiterkultiviert, da pro Samen noch 3-5 weitere, aus den Cotyledonarnodien nachwachsende Sekundärsprosse geerntet werden konnten. Außerdem wurden die bei älteren Kulturen erscheinenden etiolierten Fiederblättchen - getrennt in Petiolen und Spreite - ebenfalls als Explantate für die Gewebekultur verwendet.

2.2.1.2 Medien und Kulturbedingungen

Als Basismedium der Pflanzengewebekultur wurde MS nach Murashige und Skoog (1962) oder KM (Kao und Michayluk 1975) verwendet; zur Verfestigung wurde 0,3% Gelrite zugegeben. Dem Basismedium wurden Zucker, Hormone in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen lt. Tabellen 2.3, 2.4 bzw. 2.5 zugesetzt, der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf 5,7 eingestellt.

Einem Teil dieser Medien wurden komplexe organische Zusätze (Caseinhydrolysat, Kokoswasser) in der Konzentration von 50 oder 100 mg/l bzw. 100 ml/l beigegeben (s. Tabellen 2.3, 2.4, 2.5). Die Zugabe von sterilfiltriertem Kokosnußendosperm erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlung des Mediums auf ca. 55°C. Zur Reduzierung der phenolischen Oxidation wurde z. T. das Adsorptionsmittel Polyvinylpyrrolidon (PVP) in Konzentrationen von 2 - 5 mg/l den Kulturmedien zugegeben.

Verwendet wurden verschiedene Explantate steril angezogener Keimlinge von *Vicia faba* cv. Mythos bzw. cv. Albatross. Alle in den Tabellen 2.3 - 2.5 aufgeführten Medien wurden mit mindestens 30 Kallussen je Ansatz über einen Zeitraum von mehreren Monaten und 1 - 3 Wiederholungen getestet. Im Rahmen der Systemoptimierung wurden ein Teil der verwendeten Medien aus Tabelle 2.5 nochmals mit transgenen Kallussen getestet.

Die Temperatur für die Kalluskultur betrug 21°C ± 1°C, alle 3 Wochen wurde auf frisches Medium umgesetzt.

Tabelle 2.3: Medien zur direkten Sproßregeneration

Bezeichnung	Basis-medium	Zusätze	Phytohormone
T-A	MS		Je 0,1 mg/l TDZ, Picloram, Zeatin
T-B	MS		Je 0,5 mg/l TDZ, Picloram, Zeatin
T-C	MS		Je 1,0 mg/l TDZ, Picloram, Zeatin
T-D	MS		Je 5 mg/l TDZ, Picloram, Zeatin
T-E	MS		0,5 mg/l TDZ 0,1 mg/l Picloram
T-F	MS		1,0 mg/l TDZ 0,5 mg/l Picloram
T-G	MS		5 mg/l TDZ 1 mg/l Picloram
T-H	MS		20 mg/l TDZ 5 mg/l Picloram
T-J	MS		Je 0,5 mg/l TDZ, Picloram
T-K	MS		Je 1,0 mg/l TDZ, Picloram
T-L	MS		Je 5 mg/l TDZ, Picloram
T-M	MS		Je 10 mg/l TDZ, Picloram
T-N	MS		0,5 mg/l TDZ 0,1 mg/l Zeatin
T-O	MS		1,0 mg/l TDZ 0,2 mg/l Zeatin
T-P	MS		5 mg/l TDZ 1 mg/l Zeatin
T-Q	MS		10 mg/l TDZ 2 mg/l Zeatin
T-R	MS		Je 0,5 mg/l TDZ, Zeatin
T-S	MS		je 1,0 mg/l TDZ, Zeatin
T-T	MS		Je 5 mg/l TDZ, Zeatin
T-U	MS		Je 10 mg/l TDZ, Zeatin
MST 0,5	MS	50 mg/l Caseinh.	0,5 mg/l TDZ
MST 1	MS	50 mg/l Caseinh.	1,0 mg/l TDZ
MST 2	MS	50 mg/l Caseinh.	2,0 mg/l TDZ
MST 5	MS	50 mg/l Caseinh.	5,0 mg/l TDZ
MSTN 1	MS	50 mg/l Caseinh.	0,5 mg/l NAA 1,0 mg/l TDZ
MSTN 2	MS	50 mg/l Caseinh.	0,5 mg/l NAA 2,0 mg/l TDZ
MSTN 5	MS	50 mg/l Caseinh.	0,5 mg/l NAA 5,0 mg/l TDZ
MSTN 7	MS	50 mg/l Caseinh.	0,5 mg/l NAA 7,5 mg/l TDZ
KMTN 2	KM	50 mg/l Caseinh.	0,5 mg/l NAA 2,0 mg/l TDZ
KMTN 5	KM	50 mg/l Caseinh.	0,5 mg/l NAA 5,0 mg/l TDZ

Als Kohlenstoffquelle wurde durchgängig 30 g/l Saccharose benutzt.

Tabelle 2.4: Medien zur Kallusinduktion (Kohlenstoffquelle Saccharose, 30 g/l)

Bezeichnung	Basismedium	Phytohormone	Sonstiges
BNZ 0,5	MS oder KM	Je 0,5 mg/l BAP, NAA, 2,4-D	
TNZ 0,5	MS oder KM	Je 0,5 mg/l TDZ, NAA, 2,4-D	
TNZ 2	MS oder KM	Je 2,0 mg/l TDZ, NAA, 2,4-D	
TNZ-C	MS	Je 0,5 mg/l TDZ, NAA, 2,4-D	100 mg/l Caseinhydrolysat
TNZ-K	MS	Je 0,5 mg/l TDZ, NAA, 2,4-D	100 ml/l Kokoswasser
TNZ CK	MS	Je 0,5 mg/l TDZ, NAA, 2,4-D	Je 100 mg/l Caseinhydrolysat und 100 ml/l Kokoswasser

Tabelle 2.5: Kulturmedien zur Sproßinduktion nach einer Kallusphase

Bez.	Basismedium	Zusätze	Kohlenstoffquelle	Phytohormone	Sonstiges
MTN 2	MS	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,5 mg/l NAA 2,0 mg/l TDZ	+/-100 ml/l Kokoswasser
MTN 5	MS	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,5 mg/l NAA 5,0 mg/l TDZ	+/-100 ml/l Kokoswasser
MTN 7	MS	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,75 mg/l NAA 7,5 mg/l TDZ	+/-100 ml/l Kokoswasser
KMTN 7	KM	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,75 mg/l NAA 7,5 mg/l TDZ	
KMBT	KM	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,75 mg/l NAA 5 mg/l BAP 2,5 mg/l TDZ	
MBT	MS	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,75 mg/l NAA 5 mg/l BAP 2,5 mg/l TDZ	
MS 7G	MS	100 mg/l Caseinh.	20 g/l Saccharose, 10 g/l Glucose	0,75 mg/l NAA 7,5 mg/l TDZ	
MS ^{1/2} S	MS	100 mg/l Caseinh.	15 g/l Saccharose	0,75 mg/l NAA 7,5 mg/l TDZ	
MST 0,5++	MS	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,5 mg/l NAA 0,5 mg/l TDZ	Steigerung der TDZ-Konzentration 0,5→2→5 mg/l
MST 0,5+	MS	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,5 mg/l NAA 0,5 mg/l TDZ	Steigerung der TDZ-Konz. nach 3 Wo. 0,5→ 5,0 mg/l
MST 5-	MS	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,5 mg/l NAA 5,0 mg/l TDZ	Senkung der TDZ-Konz. 5→2→1→0,5 mg/l
MST 2-	MS	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,5 mg/l NAA 2,0 mg/l TDZ	Senkung der TDZ-Konz. 2→1→0,5 mg/l
S-Med 2	MS	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,75 mg/l NAA 10,0 mg/l TDZ	Transfer nach 3 Wochen auf 0,5 mg/l NAA+5,0 mg/l BAP
S-Med 3	Ms	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,75 mg/l NAA 20,0 mg/l TDZ	Transfer nach 3 Wochen auf 0,5 mg/l NAA+5,0 mg/l BAP
S-Med 4	MS	100 mg/l Caseinh.	30 g/l Saccharose	0,75 mg/l NAA 30,0 mg/l TDZ	Transfer nach 3 Wochen auf 0,5 mg/l NAA+5,0 mg/l BAP

2.2.1.3 Inokulation und Kokultur

Die Agrobakterien wurden über Nacht bei 28°C und 180 Upm in YEB Medium (van Larebeke *et al.* 1977) mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen angezogen. Aliquots von 20 ml wurden entnommen, abzentrifugiert (Swing out-Rotor, 3000 xg, 10 min) und im gleichen Volumen Pflanzenkulturmedium (TNZ) resuspendiert. Die Keimlinge wurden zusammen mit 5 ml der Bakteriensuspension in eine Petrischale gebracht und mit einer scharfen Rasierklinge in ca. 2-3 mm dicke Segmente geschnitten. Zur Kokultur wurden die Segmente anschließend in 250 ml Glassgefäße mit festem TNZ-Medium überführt. Die Kokultur erfolgte bei 20°C im Dunkeln, i. d. R. über einen Zeitraum von zwei bis vier Tagen.

2.2.1.4 Selektion und Pflanzenregeneration

Kulturphase I: Selektion und Kallusentwicklung

Zur Bakterieneliminierung wurden die kokultivierten Epicotylsegmente mit sterilem Wasser aufgeschwemmt, in eine Schottflasche überführt und unter Zugabe von Betabactyl (1000 mg/l) eine Stunde geschüttelt. Danach wurden die gewaschenen Explantate auf festem TNZ-Medium, versehen mit Betabactyl bzw. Claforan (500 mg/l), in Plastikpetrischalen ausgelegt. Nach einer Woche wurde mit der Selektion begonnen: die mit dem Selektionsmarker NPTII transformierten Explantate wurden auf TNZ Medium mit 100 mg/l Kanamycin transferiert, die Kultur erfolgte bei 20°C im Dunkeln. Bei Verwendung von PPT (2 mg/l) zur Selektion erfolgte die Kultur bei Licht (16 h Photoperiode). Über einen Zeitraum von 3-4 Monaten wurden die Explantate zur Kallusbildung alle 2-3 Wochen auf frisches Medium umgesetzt. Zur Kontrolle des Bakterienwachstums wurden dem Medium in dieser Phase Claforan oder Betabactyl zugesetzt (500 mg/l), allein oder in Kombination mit Carbenicillin (je 250 mg/l).

Kulturphase II: Initiation von Sproßanlagen

Kallus, der in Phase I einen Durchmesser von ca. 2-5 mm erreicht hatte, wurde auf Sproßinitiationsmedium (MTN) in 250 ml Glassgefäßen überführt. Die Subkultur erfolgte hier alle 3-4 Wochen, bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$ und einem 16h Licht-Tag; ohne Selektion. Antibiotika zur *Agrobacterium*-Kontrolle wurden jetzt nur noch bei Bedarf eingesetzt.

Kulturphase III: Sproßentwicklung und -vermehrung auf selektivem Medium

Sproßanlagen wurden vom Kallus abgenommen und auf Sproßelongationsmedium (MB) mit 2 mg/l BAP gebracht. In dieser Phase wurde eine Temperaturabsenkung auf 15°C vorgenommen, die 16 h Lichtperiode wurde beibehalten. Alle 3 Wochen wurde auf frisches Medium umgesetzt; die Selektion erfolgte mit 25 mg/l G418 bzw. 2 mg/l PPT.

Kulturphase IV: Regeneration von Pflanzen

Sprosse mit einer Länge von mindestens 5 mm wurden abgeschnitten und auf steril angezogene, etiolierte Wildtypkeimlinge *in vitro* gepfropft (Pickardt *et al.* 1995). Längere

Sprosse von ca. 10 mm Länge wurden auf MS-Medium mit IBA (2 mg/l) innerhalb von 2 Wochen bewurzelt.

2.2.1.5 Gewächshausbedingungen und „Trippen“

Pflanzen mit guter Bewurzelung wurden in ein Erde/Sand-Gemisch (3:1) getopft und für 10-14 Tage mit erhöhter Luftfeuchtigkeit weiter kultiviert, gutwüchsige Pflanzen wurden anschliessend in das Gewächshaus gebracht. Die dortigen Umweltbedingungen waren nur in groben Maßstäben kontrollierbar, d.h. Temperatur- und Lichtschwankungen und Unterschiede in der Luftfeuchtigkeit traten in einem weiten Bereich auf.

Vicia faba ist ein partieller, insektenbestäubter Fremdbefruchter; aber auch für die fakultative Selbstbestäubung ist Insektenbesuch notwendig. Um die Selbstung der erzeugten Linien zu erreichen, muss dies im Gewächshaus durch mechanische, manuelle Stimulation der Blüte („Trippen“) künstlich bewirkt werden.

2.2.2 Cytologische Untersuchungen

2.2.2.1 Materialgewinnung

Ausgangsmaterial für die Anfertigung von Chromosomenpräparaten waren ca. 1 cm lange Wurzelspitzen junger, 2-3 Wochen alter Pflanzen. Zur Metaphasenarretierung wurden die Wurzelspitzen 2 h in 0,05% Colchizininlösung (w/v) bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einer weiteren Stunde bei 4°C. Nach Waschen mit *A. bidest.* wurden die Wurzelspitzen mit Ethanol/Eisessig (3:1, v/v) fixiert und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C aufbewahrt. Da bei gepfropften T₀-Pflanzen keine transgenen Wurzelspitzen verfügbar waren, wurden die benötigten Metaphasen-Stadien aus jungen Griffeln gewonnen (Wu *et al.* 1997), die Verarbeitung erfolgte wie bei Wurzelpräparaten.

2.2.2.2 Chromosomenpräparation für die Lichtmikroskopie

Die fixierten Wurzelspitzen wurden 3 Stunden in 2% Orcein/HCl-Lösung gefärbt, gefolgt von einer einstündigen Behandlung mit 0,25% Karminessigsäure (KES). Die Wurzelspitze wurden auf einem Glasobjektträger vom Rest der Wurzel abgetrennt, in einen Tropfen verdünnte KES gegeben, für wenige Sekunden auf offener Flamme erhitzt und mit Hilfe eines Deckgläschens vorsichtig gequetscht, um die Chromosomen zu spreiten.

Die Auswertung erfolgte mit Zeiss Standard 14, Leitz Ortho SW oder mit Leitz Dialux 20, NPL Fluotar 40/0.70 ICT; Photoautomat Leitz Orthomat EPY, Kodak Ektachrome V64T.

2.2.2.3 Chromosomenaufbereitung für die *in situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung wurde mit Pflanzen der Linien 12-1 und 12-2 durchgeführt. Die Fixierung der Wurzeln erfolgte wie unter 2.2.2.1. beschrieben. Die abgetrennten meristemhaltigen Spitzen der fixierten Wurzeln wurden enzymatisch protoplastiert, in Citratpuffer aufgenommen, von Geweberesten befreit und in 60%ige Essigsäure überführt. Von dieser Suspension wurden je ca. 10-20 μ l auf einen vorgekühlten Objektträger („super frost“) aufgetropft, mit Ethanol/Eisessig (3:1) gespreitet und luftgetrocknet („*droplet*“-Methode s. Schwarzacher & Heslop-Harrison 2000).

Die Präparate wurden vor der Weiterbearbeitung im Phasenkontrast auf ihre Eignung für die *in situ*-Hybridisierung, d.h. auf gute Spreitung der Chromosomen, wenig Cytoplasmareste, möglichst voll-ständige Chromosomenzahl, überprüft.

2.2.2.4 Sondenherstellung und - markierung

Zur Sondenherstellung wurde der Binärvektor pAN109, der zur Herstellung der Linien 12-1 und 12-2 verwendet worden war, aus dem Agrobakterienstamm isoliert und mit der *heat shock*-Methode in kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert und dort vermehrt (Manual Invitrogen). Die aus DH5 α isolierte Plasmid-DNA wurde über eine Nucleobond AX 500 Säule (Clontech/USA) aufgereinigt. Durch Restriktionsverdau mit *SalI* wurde der 7,8 kb große T-DNA-Bereich vom restlichen Plasmid (der *back-bone*-Sequenz) getrennt, danach wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und die T-DNA mittels Quiaquick Gel-Extraktionskit (Qiagen) aus dem Agarosegel eluiert und die Konzentration der DNA bestimmt.

Vor der Markierung wurde die Sonden-DNA durch Autoklavieren geschert. Die Markierung der T-DNA-Sonde wurde mit einem Kit der Fa. Boehringer/Roche mit Fluorescein 12-dUTP (FITC) oder CY3 Fluorochrom über *nick translation* durchgeführt. Die markierte Sonde wurde in Hybridisierungslösung aufgenommen und mit genomischer WT-DNA zur kompetitiven Blockierung von unspezifischen Signalen gemischt.

2.2.2.5 Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurde gemäß Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000) durchgeführt. Nach Schritten der Prähybridisierung, Dehydratation in einer Alkoholreihe und Denaturierung, erfolgte über Nacht die Hybridisierung mit der FITC- bzw. Cy3-markierten Sonde. Dafür wurden 20 μ l der denaturierten Sonde auf das ebenfalls denaturierte Präparat gegeben, die Abdeckung mit Fixogum abgedichtet und der Objektträger bei 37°C in der Feuchtkammer inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit SSC (2x, 0,1, 2x, 4x + 0,5% TWEEN) wurden die Präparate mit 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, 2 μ g/ml) gegengefärbt. Die luftgetrockneten Objektträger wurden mit einem Tropfen Vectashield® (Vector Laboratories) zum Schutz gegen

das Ausbleichen der Fluoreszenz überschichtet und mit einem Deckgläschen versehen bei 4°C aufbewahrt.

Als Positivkontrolle wurde bei einem Teil der Präparationen eine mit rotem Fluorochrom CY3-markierte Sonde für die 25S rDNA Untereinheit aus *Beta vulgaris* verwendet (Snowdon *et al.* 2000).

Die Auswertung erfolgte mit einem Leica DMR Fluoreszenzmikroskop in Verbindung mit einer CCD-Kamera Cohu 4912 und der entsprechenden Software Leica QFISH. Zur Anregung der Fluoreszenz unterschiedlicher Wellenlängen wurden verschiedene Filter eingesetzt (FITC 494nm/523nm; CY3 552nm/565nm; DAPI 355nm/460nm Abs./Em.); die entsprechenden Bilder wurden digital verarbeitet.

Alle diesbezüglichen Arbeiten wurden im Labor von Rod Snowdon/Justus Liebig-Universität Gießen, mit dessen freundlicher Unterstützung durchgeführt.

2.2.2.6 Flow Cytometry

Der Ploidiegrad in Blättern transgener Pflanzen in der T₀ und T₁ wurde von Partec (Münster, Dr. M. Steinberg) mittels Durchflusszytometrie bestimmt und in Form von DNA-Indices angegeben. Als diploide Referenzwerte wurden 2 Wildtypproben verwendet.

Zur Freisetzung der Zellkerne wurde das Blattmaterial zerkleinert und in Nucleus-Isolationspuffer (0,1 M Citronensäure + 0,5% TWEEN 20) aufgenommen. Die Suspension wurde durch einen 56 µm Porenfilter passiert und mit Ethanol/Eisessig fixiert, anschliessend erfolgte die Anfärbung mit DAPI (2 µg/ml) in einem Puffer aus 0,1M Citronensäure und 0,2M Natrium-Hydrogenphosphat (<http://www.partec.de>). Zur Bestimmung des Ploidiegrades wurden aus jeder Probe 1.000 Zellkerne gemessen, die Analyse tetraploider Proben wurde zweimal wiederholt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

Molekularbiologische Standardmethoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook *et al.* (1989) bzw. entsprechend den Herstellerprotokollen durchgeführt.

2.2.3.1 Isolierung von DNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus Blättern erfolgte nach einer Methode von Sul & Korban (1996). Junge Blätter wurden in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen mit 500 µl auf 65°C vorgewärmten Extraktionspuffer (2%CTAB, 10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl (pH8), 1%PVP, 4 M LiCl) homogenisiert. Nach 3 min Zentrifugation bei 14.000 Upm wurde der Überstand zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, anschließend mit 96% EtOH und 7,5 M Ammoniumacetat gefällt. Die gewaschenen Pellets wurden in 50 µl *A. bidest.* gelöst und der DNA-Gehalt im Photometer bestimmt.

2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur PCR-Amplifikation wurden 200-500 ng DNA-Template mit 80 pMol der entsprechenden Primer, 250 μ M dNTPs, 2,5 mM $MgCl_2$, 3 U Taq-Polymerase und PCR-Reaktionspuffer (10x, Appligene) in einem Endvolumen von 100 μ l eingesetzt. Nach 3 Minuten Denaturierung bei 94°C folgten 30 Zyklen von je 60 sec. Denaturieren, 60 sec Annealing (Annelingtemperatur lt. Primer-Tabelle), 90 sec. Polymerisation bei 72°C und ein finaler Elongationsschritt von 10 min. bei 72°C. 10 μ l der Ansätze wurden in einem 0,8 - 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf das Vorhandensein des gesuchten Amplifikats geprüft. Für PCR wurde ein Wasserbad-Thermo-Cycler (Thermocycler 60/2) der Firma Biomed benutzt.

2.2.3.3 Southern Blot Analyse

Für die Southern Blot Analyse wurde die genomische DNA aus Blättern über DNeasy Maxiprep-Säulen (Qiagen) isoliert und gereinigt. Die enzymatische Spaltung der Gesamt-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III bzw. *Eco*RV durchgeführt. Von jeder Probe wurden ca. 20 μ g verdaute DNA in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und mittels alkalischem Vakuumblot auf eine Boehringer Nylon-Membran übertragen. Für den Nachweis der gesuchten DNA-Fragmente wurde das nicht-radioaktive Digoxigenin-System von Boehringer verwendet (DIG DNA Labeling and Detection Kit). Als Sonde wurde ein 850 bp langes *nptII*-Fragment aus pHP23 (Paszkowski *et al.* 1988) isoliert und mit Hilfe der *random primed* - Methode (Feinberg & Vogelstein 1983) mit Digoxigenin-11-dUTP markiert. Für die Hybridisierung wurde die Sondenkonzentration auf 80 ng/ml mit Hybridisierungspuffer eingestellt, die Hybridisierung erfolgte übernacht bei 42°C im Wasserbad. Die folgenden Waschschrte und die Detektion mittels Chemilumineszenz (PPD) wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus unreifen Samen

Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt, alle Arbeitsschritte wurden auf Eis, Zentrifugationen in einer Kühlzentrifuge bei 4°C durchgeführt.

Unreife Samen wurden 25 Tage nach der Befruchtung geerntet, die Samenschale mit einem Skalpell entfernt und der Embryo in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Material wurde mit einem Mörser zu feinem Pulver zermahlen, unter Zugabe von 700 μ l Extraktionspuffer (1M Tris/HCl, 1%SDS, 10 mM Na_2 -EDTA, 10 mM β -Mercapto-Ethanol) und 700 μ l PCI (25:24:1) homogenisiert, in ein Eppendorfreaktionsgefäß (ET, 2ml) überführt und gut durchmischt bis keine Phasentrennung mehr sichtbar war. Es folgte eine 2minütige Zentrifugation bei 14.000 Upm. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml ET überführt, nach erneuter Zugabe von 700 μ l PCI auf einem Vortex-Genie durchmischt und 5 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert, die obere Phase

abgenommen und nochmals 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem frischen 1,5 ml ET mit 0,05 Vol 3 M Natriumacetat und 0,8 Vol Isopropanol versetzt und durch Umschütteln vermischt. Die Nukleinsäuren wurden im Eisbad gefällt (30 min) und anschließend durch 10 min Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70% Alkohol gewaschen und die Nukleinsäuren in 500 µl DEPC-Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 1 Vol 4 M Lithiumchlorid versetzt zur differentiellen Fällung von RNA und über Nacht im Eisbad inkubiert. Die gefällte RNA wurde durch 30 min Zentrifugation sedimentiert und der Überstand verworfen. Es folgten zwei Waschschriffe mit 1 ml 2 M LiCl und 70% Ethanol, das Pellet wurde 3 min. in der „SpeedVac“ getrocknet und schließlich in 300 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und gelöst. Der RNA Gehalt der Lösung wurde im Photometer bestimmt.

2.2.3.5 Reverse Transkription und RT-PCR

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde der Erststrang-Synthese Kit der Fa. MBI Fermentas verwendet. Für die Reverse Transkription wurden 1 µg Gesamt-RNA und die Oligo(dT)₁₈-Primer nach Angaben des Herstellers eingesetzt. 2 µl des cDNA Reaktionsansatzes konnten direkt als Template in der PCR zum Nachweis des Transkripts verwendet werden, Primer und PCR-Bedingungen waren dieselben wie bei der bereits beschriebenen genomischen PCR.

2.2.4 Proteinanalysen und Enzymassays

2.2.4.1 Proteinextraktion aus Samen und Proteinbestimmung nach Bradford

Reife Einzelsamen transgener Linien wurden in einem Mörser zu feinem Mehl vermahlen, ein Aliquot von 20-40 mg Samenmehl in 200 bzw. 400 µl Extraktionspuffer (56 mM Na₂CO₃, 2% SDS, 12% Saccharose, 2 mM Na₂EDTA, 50 mM DTT) homogenisiert, 10 min bei 65°C inkubiert, 20 min. abzentrifugiert und der Proteingehalt des Überstandes gemessen. Die Proteinbestimmung der Proben nach Bradford (1976) wurde mit Hilfe des BioRad Protein Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Verfahren der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) wurde für Minigele (10x10 cm, BioRad) angewandt. Je 50-70 µg Proteinextrakt wurden mit 1 Vol 2x-konz. Probenpuffer (0,25 M Tris pH 6,8; 6% SDS; 20% Glycerin; 0,2 M DTT) versetzt, 5 min bei 100°C inkubiert und in einem 10 (bzw. 15)%igen Acrylamid-Gel bei 10°C und 20 mA aufgetrennt. Die Abschätzung der Molekulargewichte erfolgte durch Vergleich mit einem Proteinstandardmarker (New England BioLabs). Die Übertragung der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte mittels Nass-Blot

(Transferpuffer: 20 mM Tris-HCl; 150 mM Glycin; 20% Methanol; 0,1% SDS) in einem Puffertank (Mini Trans Blot Cell, BioRad) bei 100 V für 1 h.

2.2.4.3 Analyse von Proteinmustern durch Immunodetektion (Western Blot)

Für die Immunodetektion wurde das Biotin/Avidin-System des ABC-Kits von Vectastain (Vector Laboratories) verwendet. Alle Schritte wurden bei RT in TTBS-Puffer (0,1 M Tris pH 7,4; 0,1% TWEEN 20; 0,155 M NaCl) durchgeführt. Die Inkubation mit dem 1:1000 in TTBS verdünnten primären Antikörper erfolgte über Nacht, die anschließende Inkubation mit dem sekundären Antikörper (*goat/anti-rabbit* IgG) betrug 1 h. Die Farbreaktion zur Detektion der gesuchten Banden wurde mit der Substrat/Entwicklerlösung (0,1 M Tris (pH7,4); 0,3% H₂O₂; 1,6 mM NiCl₂; 0,4 mg/ml DAB) erzeugt, die Reaktion durch Spülen mit H₂O gestoppt.

2.2.4.4 AK-Assay zum Nachweis der Aspartatkinase-Aktivität

Die Aktivität der Aspartatkinase in reifen Samen der transgenen Linien 12-1, 12-2, 12-40 wurde nach einer Methode von Shaul & Galili (1992) bestimmt. Je Probe wurden 10-20 mg Samenkornmehl in einem 20fachen Volumen Extraktionspuffer (20 mM Kaliumphosphat, 30 mM Mercaptoethanol, 1 mM L-Lysin, 1 mM L-Threonin, 1 mM PMSF in H₂O) homogenisiert, alle Proben auf Eis gesammelt und anschließend 20 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Kühlzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden jeweils 45 µl zu 30 µl vorgelegtem Reaktionspuffer (TM/TMA 1:1) gegeben.

TM 0,1 M Tris, 10 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 0,2M Hydroxylamin

TMA 0,1 M Tris, 10 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 0,2 M Hydroxylamin, 45 mM Aspartat

Die Proben wurden in einer Mikrotiterplatte bei 37°C 1-4 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Volumens Stop-Mix, bestehend aus TCA/HCl/FeCl₃ (1:1:1) beendet. Positive Proben zeigten einen Farbumschlag von gelb nach rot und konnten im Photometer bei 495 nm quantifiziert werden. Die Angabe der Aktivität erfolgt als Unit pro mg Protein, wobei ein Unit der Bildung von 1 nMol β-Aspartylhydroxamat pro Minute entspricht.

2.2.4.5 Histochemischer GUS-Assay

Das Substrat X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Glucuronsäure-Cyclohexyl-Ammoniumsalz) wird von den Zellen aufgenommen und in den *uidA*-transformierten Zellen durch Wirkung der β-Glucuronidase gespalten. Es entsteht ein Indoxylderivat, das nach Oxidation blau wird. Der Test pflanzlichen Gewebes auf Aktivität der β-Glucuronidase (GUS) wurde nach Jefferson *et al.* (1987) durchgeführt.

Zur Durchführung des Assays wurden 50 µl X-Gluc-Stammlösung (100 mg X-Gluc in 1 ml DMSO) in 10 ml 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst, das pflanzliche Gewebe bei Raumtemperatur bis zu 24 h in der Pufferlösung inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Überführen des Gewebes in Puffer ohne X-Gluc. Die Auswertung erfolgte visuell und wurde durch Fotografie festgehalten.

2.2.4.6 PAT-Assay zum Nachweis der Phosphinotricin-Acetyltransferase

Phosphinotricin (PPT) blockiert als Strukturanalogon der Glutaminsäure die Glutaminsynthetase, ein Schlüsselenzym der Stickstoff-Fixierung. Die Akkumulation toxischer Mengen an Ammoniak führt zum Absterben der Zelle bzw. des Organismus. Das Produkt des *bar*-Gens, das Enzym Phosphinotricin-Acetyl-Transferase, inaktiviert das Substrat PPT durch Acetylierung.

Für den ¹⁴C-Phosphinotricin-Acetyltransferase-Test wurden 20-30 mg Kallus-Gewebe in einer adäquaten Menge Extraktionspuffer (50 mM Tris, 2 mM Na-EDTA, 300 mg/l fettsäurefreies BSA, 300 mg/l Dithiothreitol, 1 mM PMSF) homogenisiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 14.000 Upm wurden 15 µl des Überstands mit 2 µl PPT (1 mg/ml) und 2 µl radioaktiv markiertem ¹⁴C-Acetyl-CoenzymA (Amersham Biosciences/Freiburg, 60 mCi/mmol) für 1 h bei 37°C inkubiert. Je 4 µl jedes Ansatzes wurden auf eine DC-Platte (Merck 5748) aufgetragen und die Reaktionsprodukte über einen Zeitraum von 2-3 h aufgetrennt (Laufmittel 1-Propanol 3:2 Ammoniaklösung 25%). Nach dem Trocknen der DC-Platte bei Raumtemperatur wurde das Ergebnis als Autoradiographie dokumentiert.

2.2.5 Aminosäuren-Analysen

2.2.5.1 Analyse freier Aminosäuren

Die quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung in Samen transgener Linien im Vergleich zum *Vicia faba* Wildtyp erfolgte über Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC).

Die HPLC-Analysen der freien Aminosäuren wurden von Dr. Kämpfer und Dr. Schaller (Universität Bern, ARS, Dept. für Biochemie, Bern) durchgeführt.

2.2.5.1.1 Extraktion freier Aminosäuren aus reifen Samen von *Vicia faba*

Reife Samen wurden ohne Samenschale gemörsert, 100 - 150 mg des Samenmehls in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 400 µl MCW (Methanol:Chloroform:Wasser, 12:5:3) aufgefüllt und 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei 14.000 Upm in der Kühlzentrifuge (4°C) wurde der Überstand in ein frisches ET (2 ml) pipettiert. Mit dem verbliebenen Pellet wurde eine zweite Extraktion durchgeführt und der zweite Überstand mit dem ersten vereinigt. Nach Zugabe von 400

µl Chloroform und 600 µl Wasser erfolgte eine Durchmischung („vortex“) mit anschließender Phasentrennung in der Zentrifuge bei Raumtemperatur (5 min bei 6000 Upm). Die oberste Phase wurde abgenommen, das ET kurz in flüssigem Stickstoff gefroren und in der geheizten „SpeedVac“ eingedampft (ca. 2-3 h), der verbleibende Rückstand in 100 µl Wasser gelöst.

2.2.5.1.2 Photometrische Bestimmung des Gehalts an freien Aminosäuren

Die Bestimmung des freien Aminosäuregehalts erfolgte nach der colorimetrischen Ninhydrin Methode. Ninhydrin reagiert mit der α -Aminogruppe der Aminosäuren bei Erhitzen auf 95°C unter Farbänderung von gelb zu Purpurviolett, der Farbumschlag kann im Photometer gemessen werden. Die Farbreaktion findet nur mit freien Aminosäuren, nicht mit den Aminogruppen der Proteine und Polypeptide statt und kann so als spezifischer Nachweis freier Aminosäuren verwendet werden.

Zur Herstellung der Ninhydrin-Reagenz wurden 500 mg Ninhydrin in 20 ml *A. bidest* gelöst. Zu jeweils 10 µl der Aminosäuren-Proben wurden 290 µl Wasser und Ninhydrin-Reagenz im gleichen Volumen gegeben, die Proben für 10 min auf 95°C erhitzt, danach auf 37°C temperiert. Vor Messung der Proben im Photometer wurde eine Eichkurve mit einem Standard von 10-100 µg/µl Glutamin erstellt.

2.2.5.1.3 Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Nach Bestimmung der Gesamtgehaltes der Aminosäuren wurden Aliquots mit jeweils ca. 130 nmol (20 µg) in der „SpeedVac“ eingedampft und zur HPLC-Bestimmung zum ARS/Bern gesendet. Nach Angaben von Dr. Schaller erfolgte die Bestimmung unter Verwendung einer HPLC C18 Säule von Novapak (C18, 60A, 4µm, 3.9*150mm). Eine Vorsäulenderivatisierung wurde durch Kopplung der Aminosäuren mit Phenyl-Isothiocyanat (PITC) durchgeführt. Die PITC-Derivate der Aminosäuren wurden über ihre Absorption bei 254 nm bestimmt.

Technische Daten: Puffer A: 0.14 M Ammoniumacetat pH 6.4, 4% Acetonitril, 2mg DTT/l; Lösungsmittel B: 60% Acetonitril in Wasser; Gradient 0-3 Min. 2% L, 3-13 Min. 2-45%; Fluß 1 ml/Min.

2.2.5.2 Analyse proteingebundener Aminosäuren

Hierfür wurden reife Samen ohne Samenschale in einem Mörser zu feinem Mehl vermahlen und je drei Samen einer Linie bzw. des Wildtyps vereinigt, so dass ca. 5 g Samenmehl zur Verfügung standen. Die Analyse des Gesamtgehaltes der Aminosäuren in den Samen wurde bei Degussa-Hüls AG durchgeführt.

Es wurde der Rohproteingehalt und der prozentuale Anteil der einzelnen Aminosäuren nach Hydrolyse (mit halbkonzentrierter Salzsäure) bestimmt. Tryptophan wird bei diesem Aufschluß zerstört und kann nicht gemessen werden, Asparagin und Glutamin werden

vollständig zu Asparagin- bzw. Glutaminsäure umgesetzt und mit diesen zusammen erfaßt.

Da Methionin und Cystein durch Hydrolyse zersetzt werden, müssen diese zuvor mit Perameisensäure zu Methioninsulfon und Cysteinsäure oxidiert und als Derivate analysiert werden. Durch den zusätzlichen Oxidationsschritt wird jedoch Tyrosin abgebaut und geht der Erfassung verloren.

Als interner Standard wird das Proteinhydrolysat mit einer Norleucin-Standardlösung versetzt und mit Natronlauge auf pH 2,2 eingestellt. Die chromatographische Auftrennung des Hydrolysats erfolgte im Aminosäureanalysator (Amersham Pharmacia Biotech/USA) auf einem Kationenaustauscherharz. Die einzelnen, getrennten Aminosäuren wurden anschließend mit Ninhydrin gemischt (Nachsäulenderivatisierung), die Mischung wird in eine beheizte Reaktionsschleife geleitet und reagiert zu einem spezifischen violetten Farbstoff. Die photometrische Detektion der Reaktion wurde bei 570 nm durchgeführt und in Form von Aminogrammen dokumentiert. Die einzelnen Aminosäuren können entsprechend ihrer Retentionszeit identifiziert werden.