

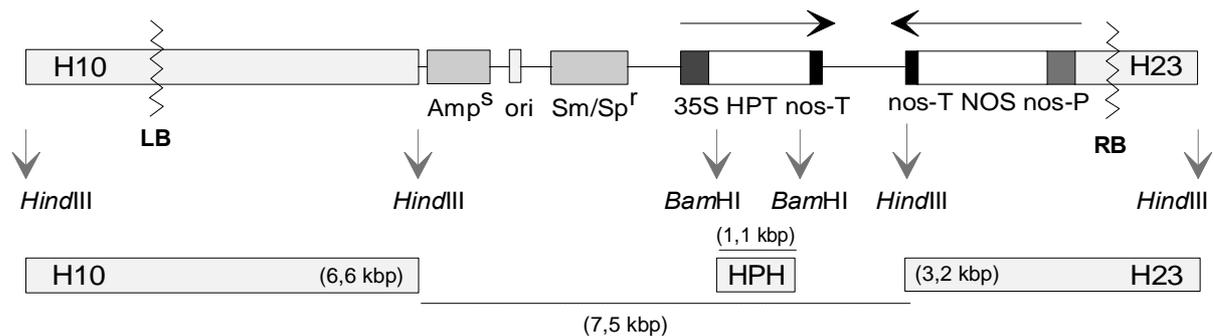
2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen zur Stabilität von Fremdgenen in mehreren aufeinanderfolgenden Selbstungsgenerationen wurden Samen von zwei unabhängigen transgenen Linien (Linie 4.1 und 9.1) der dritten Generation von *Vicia narbonensis* (Pickardt *et al.* 1991, Meixner *et al.* 1995) verwendet.

Die transgenen Linien wurden durch Agrobakterien vermittelte Transformation von *Vicia narbonensis* mit dem *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm C58CI, der das kointegrative Plasmid pGV3850Hygro enthielt (Kreuzaler und Kato, nicht publiziert), hergestellt. Das Plasmid trägt ein in höheren Pflanzen aktives Hygromycinphosphotransferasegen (HPT-Gen) mit dem CaMV 35S-Promotor und ein Nopalinsynthasegen (NOS-Gen) mit vorge-schaltetem NOS-Promotor (s. Abb.1). Beide Initialtransformanten enthielten jeweils eine Kopie der T-DNA (Pickardt *et al.* 1991).

Abb. 2 T-DNA Region des Plasmids pGV3850 (Zambryski *et al.* 1984) nach einem „double crossover“-Ereignis mit dem Plasmid pMPK-110-Hyg-Nos (Kreuzaler und Kato, unpubliziert).



LB, linke Border; H10, (*Hind*III 10, 6,6 kbp-Borderfragment); RB, rechte Border; H23 (*Hind*III 23, 3,2 kbp-Borderfragment); *Bam*HI (HPH), 1,1 kbp-Fragment der kodierenden Sequenz des HPT-Gens; *Amp*^r, Ampicillinresistenzgen; *Amp*^S, ca 350 bp-Fragment des Ampicillinresistenzgens; ori, („origin of DNA replication“) Replikationsursprung; Sm/Sp; Streptomycin/Spectinomycinresistenzgen; 35S, CaMV 35S-Promotor; HPT, Hygromycinphosphotransferasegen; nos-T, Nopalinsynthase-Terminator; NOS, Nopalinsynthase-Gen; nos-P, Nopalinsynthase-Promotor.

2.1.1 Samenkeimung und Kulturbedingungen

Die Keimung der Samen erfolgte *in vitro* auf Wasseragar (steriles Leitungswasser + 4% Agar/Merck) oder in kleinen Tontöpfen (Ø 6 cm) mit steriler Einheitserde P in Kulturgefäßen (0,5 l Weckgläser, Firma Weck). Nach der Keimung wuchsen die Pflanzen noch 3-4 Wochen unter sterilen Bedingungen im Kulturraum (Photoperiode Langtag 16/8 h; Lichtstärke von 10000-20000 Lux) bei 25°C. Danach wurden alle Pflanzen in Erde gebracht und ins Gewächshaus transferiert.

2.1.2 Gewächshausbedingungen

Ein Teil der analysierten Pflanzen wurde in Gewächshäusern unter klimatisierten Bedingungen mit einer Tagestemperatur von 18°C und einer Nachttemperatur von 16°C herangezogen. Bei einer Lichtintensivität von mehr als 25000 Lux wurde das klimatisierte Gewächshaus beschattet. Alle anderen Pflanzen wuchsen in Gewächshäusern unter nicht klimatisierten Bedingungen und waren starken Temperatur- und Lichtschwankungen ausgesetzt. Die Innentemperatur in den Gewächshäusern wurde täglich um 7⁰⁰, die Außentemperatur um 7⁰⁰, 12⁰⁰ und 15⁰⁰ Uhr von den Gärtnern dokumentiert. Ebenfalls wurden täglich die minimale und die maximale Tagestemperatur aufgeschrieben.

2.2 Untersuchungen auf Mutationen innerhalb des 35S-Promotors, des HPT-Gens, des NOS-Promotors und des NOS-Gens

Bei der Integration der T-DNA können Punktmutationen, Deletionen oder Sequenzumlagerungen in den Transgenen stattgefunden haben und somit möglicherweise die Expression der Gene beeinflussen. Deshalb wurden PCR-Amplifikate (DNA Thermal Cycler Perkin Elmer Cetus) der beiden oben genannten Promotoren und Gene des Ausgangsmaterials, sowohl hygromycinsensitiver als auch hygromycinresistenter transgener Pflanzen hergestellt. Die PCR-Produkte wurden anschließend von der Firma DMBC mit der Big Dye-Terminator-Chemie (Perkin-Elmer) unter Verwendung der PCR Primer sequenziert. Folgende Primer wurden verwendet:

- | | | |
|----|-------------------------------------|---------------------------------|
| a) | 5'- TAT TGT GAA GAT AGT GGA AAA -3' | 35S-Promotorregion (297 bp) und |
| | 5'- GAC ATA TCC ACG CCC TCC TA -3' | 141 bp des HPT-Gens |

-
- | | | |
|----|--|--|
| b) | 5'- GCG AAG AAT CTC GTG CTT -3'
5'- GGC GAG TAC TTC TAC ACA -3' | 887 bp des HPT-Gens |
| c) | 5'- CAT GAG CGG AGA ATT AAG GG -3'
5'- ATA ACT GCG GCA AGG TCA TC -3' | NOS-Promotorregion (297 bp) und
272 bp des NOS-Gens |
| d) | 5'- GAT GAC CTT GCC GCA GTT AT -3'
5'- TGT TTG AAC GAT CTG CTT CG -3' | 1023 bp des NOS-Gens |

PCR-Bedingungen:

94°C für 1 min; a) 58°C, b), c) und d) 55°C, für 1 min; 72°C für 1 min.

Die PCR wurde mit 32 Zyklen durchlaufen (DNA Thermal Cycler Perkin Elmer Cetus). Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine Inkubation bei 72°C für 15 min.

Als Vergleichsequenzen wurden aus der Genbank (EMBL, DDBJ) folgende homologe Sequenzen ausgewählt:

35S-Promotor	Genbank, Accession No V00141, Position 7161 bis 7434 (Franck <i>et al.</i> 1980) und Accession No K01193, Position 211 bis 351 (Gritz und Davies <i>et al.</i> 1983); Genbank, Accession No AB003142, Position 2883 bis 3320 (Sawasaki <i>et al.</i> 1998)
HPT-Gen	Genbank, Accession No K01193, Position 302 bis 1188 (Gritz und Davies <i>et al.</i> 1983); Genbank, Accession No AB003142, Position 3281 bis 4157 (Sawasaki <i>et al.</i> 1998)
NOS-Promotor	Genbank, Accession No V00087, Position 288 bis 856 (Depicker <i>et al.</i> 1982)
NOS-Gen	Genbank, Accession No V00087, Position 837 bis 1859 (Depicker <i>et al.</i> 1982)

2.3 Nachweis der Hygromycinresistenz und der Nopalinproduktion transgener *Vicia narbonensis*-Nachkommen nach Selbstungsexperimenten gemäß den Mendelschen Erbgängen

2.3.1 Test auf Hygromycinresistenz

Blatt-, Stengel- und Wurzelexplantate transgener Nachkommen von *Vicia narbonensis* und vom Wildtyp (Negativ-Kontrolle) wurden auf MS-Medium mit 25 mg/l (1055 u/mg) Hygromycin zur Selektion und 1 mg/l 2,4 D zur Kallusinduktion gegeben. Dieser Test wurde für jede Pflanze zwei bis dreimal durchgeführt. Im ersten Test wurden sterile Explantate von jungen Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur verwendet. Für die folgenden Tests wurden Explantate von Pflanzen, die bereits 2-3 Wochen im Gewächshaus wuchsen verwendet. Diese Explantate wurden zuvor mit 3% Natriumhypochlorid sterilisiert. Für eine Wachstumskontrolle wurden jeweils auch Explantate auf MS-Medium ohne Zusatz von Hygromycin gegeben. Die Kultivierung der Explantate fand bei 25°C im Dunkeln statt. In jedem Versuchsansatz wurden gleichzeitig Nachkommen von den beiden Linien 4.1 und 9.1 untersucht.

Nach etwa 21 Tagen sollte bei allen transgenen Explantaten eine deutliche Kallusbildung eintreten, während die Wildtyp-Kontrollen keine Kallusbildung zeigen, sich deren Explantate langsam schwarz färben und absterben. Tritt ein gleiches Phänomen bei transgenen Explantaten auf, so läßt dies auf ein inaktives Hygromycinresistenzgen schließen, welches nicht mehr exprimiert wird oder eine stark verminderte Expression aufweist und somit keine Resistenz vermittelt.

2.3.2 Nachweis der Nopalinsynthase-Aktivität

Der Nachweis der Nopalinsynthase-Aktivität erfolgte nach Reynaerts *et al.* (1988). Als Negativkontrolle diente der Wildtyp *Vicia narbonensis*, während ein synthetisch hergestellter Nopalin-Standard (Fa. Sigma) als Positiv-Kontrolle verwendet wurde. Dieser Test wurde für alle transgenen Pflanzen zwei- bis dreimal zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt. Der erste Test wurde parallel zum Explantattest auf Hygromycinhaltigem Medium durchgeführt. Ein zweiter Test folgte nachdem die Pflanzen etwa vier Wochen im Gewächshaus standen. Für einige Pflanzen wurde zusätzlich nach weiteren vier Wochen ein dritter Nachweis der Nopalinsynthase-Aktivität durchgeführt.

2.4. Southern Blot-Analysen von Nachkommen der beiden Initialtransformanten

2.4.1 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte nach einem Protokoll von Kobayashi *et al.* (1998). Diese Methode wurde speziell für Gehölze mit einem starken Polyphenolgehalt entwickelt. Bei der DNA-Isolation von *Vicia narbonensis* hat sich diese effiziente und schnelle Methode ebenfalls bewährt. Häufig auftretende starke Phenolbildungen, welche die Qualität der DNA beeinträchtigen, konnten hierdurch weitgehend vermieden werden.

2.4.2. Southern Blot-Analysen

Für die Southern Blot-Analysen der Nachkommen beider Initialtransformanten wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Hind*III verdaut. Nach einer Gelelektrophorese wurde die aufgetrennte DNA durch Vakuum-Blotting auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) übertragen. Die Hybridisierung der filtergebundenen DNA mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde erfolgte nach den Angaben von Maniatis *et al.* (1983). Als radioaktiv α -³²P-markierte Sonden wurden das H23 Fragment der rechten Border (3,2 kbp) und das *Bam*HI-Fragment (1,1 kbp) der kodierenden Region des HPT-Gens aus pGL2 (Pietrzak *et al.* 1986) verwendet.

2.5 Analysen zum Methylierungsstatus

2.5.1 Bisulfit-Modifikation der DNA

Eine Bisulfit-Behandlung der DNA erfolgte nach Rhaizis *et al.* (1995). Die Bisulfit-Modifikation zum Auffinden von 5-Methylcytosin besteht in der Desaminierung von Cytosin-Resten durch Behandlung mit Natrium-Bisulfit (NaHSO₃) zu Uracil-Resten. Natrium-Bisulfit reagiert leicht mit der 5,6-Doppelbindung von Cytosin, jedoch sehr selten mit methylierten Cytosinen, so daß generell nur nicht methylierte Cytosine zu Uracil umgewandelt werden. Cytosin reagiert mit dem Bisulfit-Ion, wodurch ein sulfoniertes Cytosin-Intermediat entsteht. Dieses bildet anschließend durch Desaminierung ein sulfoniertes Uracil. Unter alkalischen Bedingungen wird die Sulfongruppe abgespalten und es entsteht Uracil. Da das Kohlenstoffatom-6 des

Pyrimidinringes in doppelsträngiger DNA sterisch blockiert ist, kann diese Reaktion nur in einzelsträngiger DNA stattfinden. Wegen der Umwandlung von Cytosin zu Uracil sind nach dem Ablauf der Bisulfit-Modifikation die beiden Einzelstränge nicht mehr komplementär zueinander, so daß bei einer Amplifikation der DNA die PCR-Primer strangspezifisch ausgewählt werden müssen.

Bei der anschließenden Synthese eines komplementären Doppelstranges bewirkt der eingeführte Uracil-Rest den Einbau eines Adenins, so daß es zu einem Austausch eines GC-Basenpaares durch ein AT-Basenpaar kommt. Lediglich 5-Methylcytosin ist nach einer Sequenzierung noch als Cytosin zu identifizieren, während alle nicht methylierten Cytosine durch Thymin ersetzt sein sollten.

2.5.2. Durchgeführte Kontrollen zur Gewährleistung einer vollständigen Bisulfit-Modifikation der DNA

Die Bisulfit-Behandlung der DNA zur Identifizierung von 5-Methylcytosin ist nicht ganz unproblematisch. Die Acidität der Bedingungen (pH 5) und die hohen Temperaturen (50°C) führen zu einer Depurinierung der DNA, wodurch eine extrem starke Fragmentation der DNA verursacht werden kann. Diese Degradation kann dazu führen, daß die DNA in einer PCR nicht mehr amplifizierbar ist. Hinzu kommt, daß die hohe Salzkonzentration im Reaktionsansatz zu einer partiellen Reassoziaton der beiden Einzelstränge führen kann, als Folge davon könnten einige Cytosine nicht mit Bisulfit reagieren. Es sei denn, die Reaktion der Sulfonierung verläuft bevor eine Reassoziaton der Einzelstränge eintritt (Rhaizis *et al.* 1995).

Um einerseits einen vollständigen Stoffumsatz bei der Bisulfit-Modifikation zu gewährleisten, andererseits falsch positive Methylierungssignale auszuschließen wurden folgende Kontrollen durchgeführt.

2.5.2.1 Kontrolle der Bisulfit-Modifikation mit Hilfe von Plasmid-DNA

Für jeden Reaktionsansatz wurden 2 µg genomische DNA mit 0,8 pg Plasmid pBluescript II SK+ (Firma Stratagene) gemischt. Dies entspricht der Plasmid-DNA Menge bei der Integration einer Kopie des Plasmids ins Genom von *Vicia narbonensis*. Ein 320 bp-Fragment aus dem Ampicillinresistenzgen des Plasmids (Position 2125-2445, Genbank Accession

Ng X52328, Short *et al.* 1988, Alting-Mees und Short *et al.* 1989) diente als Kontrolle für den Ablauf einer vollständigen Modifikation der DNA. Cytosinmethylierungen innerhalb des Kontrollfragmentes konnten ausgeschlossen werden, da das Plasmid keine Erkennungssequenzen für *E. coli*-Methyltransferasen besitzt. Nach einer vollständigen Modifikation sollten alle Cytosine dieser Kontrollsequenz durch Uracil ersetzt worden sein, so daß sich nach einer einzelstrangspezifischen Amplifikation des primären „sense“ Stranges und nach anschließender Sequenzierung kein Cytosin im sekundären „sense“ Strang bzw. kein Guanin im „antisense“ Strang befinden sollte. Für die Amplifikation der Kontroll-DNA wurden die strangspezifischen Primer für den „sense“ Strang nach Frommer *et al.* (1992) verwendet. Diese Primer haben eine Länge von 30 bp und enthalten entweder 9 Cytosine, die durch Thyminde oder 4 Guanine, die durch Arginine ersetzt worden sind. Eine Amplifikation des Kontrollfragmentes aus dem Ampicillinresistenzgen mit diesen Primern ist nur möglich, wenn eine Modifikation der DNA stattgefunden hat (siehe Ergebnisteil Punkt 3.5.1.1).

Verwendete Primer für das 320bp-Fragment aus pBluescript II SK+:

Die unterstrichenen Nukleotide in den Primersequenzen wurden ersetzt (C durch T, bzw. G durch A)

5'- GTT TTA GAT TTA TTA GTA ATA AAT TAG TTA -3'

5'- ATA ACA CTA CAA CCA ACT TAC TTC TAA CAA-3'

PCR-Bedingungen:

94°C für 1min; 55°C für 1 min; 72°C für 1 min.

Die PCR wurde mit 32 Zyklen durchlaufen (DNA Thermal Cycler Perkin Elmer Cetus). Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine Inkubation bei 72°C für 15 min.

Bei einer Bisulfit-Modifikation der DNA verschiedener Organismen ist die Inkubationszeit in Na-Bisulfit für einen vollständigen Stoffumsatz mit möglichst geringer Degradation der DNA sehr unterschiedlich. So beträgt z.B. die Inkubationszeit in 2,5 M Na-Bisulfit für DNA von *Arabidopsis* 4 h (Rhaizis *et al.* 1995), während nach einer Inkubationszeit für DNA von Petunien, Tabak und Reis nach 20 h in 1,5 M Na-Bisulfit ein vollständiger Stoffumsatz erreicht wurde (Meyer *et al.* 1994, Park *et al.* 1996, Fu *et al.* 2000). Von Frommer *et al.* (1992) wurden für menschliche HeLa Zellkulturen Inkubationszeiten zwischen 16 und 48 Stunden bei einer Konzentration von 3,1 M Na-Bisulfit gewählt.

Um den Zeitpunkt für einen vollständigen Reaktionsumsatz von nicht methylierten Cytosinen zu ermitteln, wurde die Inkubationszeit bei 50°C in 2,5 M Na-Bisulfit variiert. Die ersten

Proben wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (6h, 12h, 24h, 30h, 36h, 40h und 42h) aufgereinigt, anschließend das Kontroll-Fragment aus pBluescript II SK+ amplifiziert und danach sequenziert (Firma DMBC mit der Big Dye-Terminator-Chemie, Perkin-Elmer). Die Amplifikate wurden teilweise unter Verwendung der PCR-Primer direkt sequenziert oder mit Hilfe des pGEM®-T Easy Vector Systems (Firma Promega) kloniert und anschließend einzelne Klone sequenziert.

2.5.2.2 Kontrolle der Bisulfit-Modifikation innerhalb einer bekannten Gensequenz aus dem Genom von *Vicia narbonensis*

Eine Sequenz aus dem Genom von *Vicia narbonensis* diente zusätzlich als interne Kontrolle eines vollständigen Reaktionsumsatzes. Für diese Kontrolle wurde die Sequenz eines 300 bp großen Fragments aus dem Narboningen (Position 162-481, Genbank Accession No Z25533, Nong *et al.* 1995) von *Vicia narbonensis* ausgewählt. Steffens *et al.* (1997) konnten zeigen, daß das 2S-Globulin Narbonin nicht wie zunächst angenommen, als Speicherprotein in Samen fungiert, sondern daß es sich hierbei um ein cytoplasmatisches Protein handelt. Die 300bp-Sequenz des Narboningens wurde in allen Bisulfit-behandelten Proben ebenfalls auf mC5-Methylierungen untersucht. Für die Amplifikation des primären „sense“ Stranges wurden die nachfolgend genannten degenerierten Primer verwendet, welche sowohl an nicht modifizierter als auch an modifizierter DNA binden.

Verwendete Primer für das 300 bp-Fragment aus dem Narboningen:

Die unterstrichenen Nukleotide in den Primersequenzen wurden ersetzt (C durch T, bzw. G durch A)

5'- TTT YGGA GGA ATY TTG GGA TG -3' Y = C oder T

5'- ARC AAT CRA CAC CA ATT RA -3' R = G oder A

PCR-Bedingungen:

94°C für 1min; 54°C für 1 min; 72°C für 1 min.

Die PCR wurde mit 32 Zyklen durchlaufen (DNA Thermal Cycler Perkin Elmer Cetus). Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine Inkubation bei 72°C für 15 min.

Die Amplifikate wurden entweder unter der Verwendung der PCR-Primer direkt sequenziert oder mit Hilfe des pGEM®-T Easy Vector Systems (Firma Promega) kloniert und

anschließend einzelne Klone sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma DMBC mit der Big Dye-Terminator-Chemie (Perkin-Elmer) durchgeführt.

2.5.3. Untersuchungen zum Methylierungsgrad der Transgene einzelner homozygoter Nachkommen der beiden transgenen *Vicia narbonensis*-Linien

Nach einer Bisulfit-Modifikation der DNA verschiedener homozygoter Nachkommen der unabhängigen transgenen Linien 4.1 und 9.1 von *Vicia narbonensis* wurden die beiden in höheren Pflanzen aktiven Fremdgene der T-DNA auf ihren Methylierungsstatus untersucht. Mit Hilfe von strangspezifischen Primern wurden die primären „sense“ Stränge beider Promotoren und jeweils die ersten ~200 bp der Strukturgene amplifiziert. Da nicht bekannt war, welche Cytosine in der Sequenz methyliert vorliegen würden, wurden für die PCR die Primer so ausgewählt, daß sie möglichst keine oder nur sehr wenige Cytosine enthalten. Wenn sich in der Primersequenz Cytosine nicht vermeiden ließen, wurden degenerierte Primer verwendet, die in ihrer Sequenz statt C entweder C oder T bzw. statt G entweder G oder A enthielten.

Primer für die Amplifikation des 35S-Promotors und der ersten 224 bp des HPT-Gens:

5'- TAT TGT GAA GAT AGT GGA AAA -3'

5'- TCC CCA ATR TCA ARC ACT TCC -3' R = G oder A

35S-Promotor	Genbank, Accession No V00141, (Franck <i>et al.</i> 1980)
u. HPT-Gen	Position 7161 bis 7434 und Accession No K01193 (Gritz und Davies <i>et al.</i> 1983) Position 211 bis 351; Genbank, Accession No AB003142 (Sawasaki <i>et al.</i> 1998), ausgewählte Position 2883 bis 3424

PCR-Bedingungen:

94°C für 1min; 56°C für 1 min; 72°C für 1 min.

Die PCR wurde mit 32 Zyklen durchlaufen (DNA Thermal Cycler Perkin Elmer Cetus). Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine Inkubation bei 72°C für 15 min.

Primer für die Amplifikation des NOS-Promotors und der ersten 200 bp des NOS-Gens:

5'- GGA GAA TTA AGG GAG TYA -3' Y = C oder T
 5'- ACC RTT AAT CAT TCC CTC -3' R = G oder A

NOS-Promotor Genbank, Accession No V00087, (Depicker *et al.* 1982)
 u. NOS-Gen ausgewählte Position 295 bis 815

PCR-Bedingungen:

94°C für 1min; 55°C für 1 min; 72°C für 1 min.

Die PCR wurde mit 32 Zyklen durchlaufen (DNA Thermal Cycler Perkin Elmer Cetus). Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine Inkubation bei 72°C für 15 min.

Lediglich die Amplifikate einer Probe wurden unter der Verwendung der entsprechenden PCR-Primer direkt sequenziert. Alle anderen Amplifikate der untersuchten Pflanzen wurden mit Hilfe des pGEM®-T Easy Vector Systems (Firma Promega) kloniert und anschließend einzelne Klone sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma DMBC mit der Big Dye-Terminator-Chemie (Perkin-Elmer) durchgeführt.

2.6. Northern Blot-Analysen homozygoter Nachkommen beider transgener *Vicia narbonensis*-Linien

2.6.1 RNA-Isolation und Northern Blot

Die RNA-Isolation erfolgte modifiziert nach Nagy *et al.* (1988). 2 g frisches Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert. Das Pulver wurde mit 6,5 ml REB verrührt und in Corex Röhrchen überführt. Anschließend wurde 6,5 ml Phenol/Chloroform-/Isoamylalkohol (25:24:1, Vol/Vol) hinzugefügt und gut gemischt. Nach einer Zentrifugation (4000 rpm, 4°C für 20 min) wurde die wässrige Phase abgenommen, das Volumen gemessen und in neue Corex Röhrchen überführt. Tropfenweise wurde 10 M LiCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 2M LiCl₂ unter leichtem Schütteln hinzugegeben. Eine Fällung erfolgte bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde nach einer Zentrifugation (4000 rpm, 4°C für 20 min) das Pellet in *A. dest* gelöst. Anschließend folgten eine Phenolextraktion und eine Ethanol-fällung. Das resultierende Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen,

getrocknet und danach in 100 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung wurde am Photometer durchgeführt.

Alle Lösungen wurden mit DEPC vorbehandeltem *A. dest* angesetzt.

REB (RNA-Extraktionspuffer):

25 mM Tris-HCL pH 8,0

25 mM EDTA

75 mM NaCl

1% SDS

300 mM Mercaptoethanol

Für den Northern Blot wurden 25 µg RNA mit *A. dest* auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und mit 36 µl Probenpuffer versetzt. Für die RNA-Fraktionierung wurde ein 1 %iges Agarosegel mit Formaldehyd verwendet. Als Laufpuffer diente 1x MEN. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V für 2-3 h. Anschließend wurde die RNA über einen Kapillarttransfer auf eine Hybond-N⁺ Membran (Amersham) übertragen. Für die Fixierung der RNA wurde die Membran 30 min im Ofen bei 120°C gebacken und anschließend in 2x SSC gespült.

Probenpuffer:	10x MEN:	20x SSC:
20 µl Formamid	200 mM MOPS	3 M NaCl ₂
4 µl 10x MEN	50 mM Na-Acetat	300 mM NaCitrat
6 µl Formaldehyd	10 mM EDTA pH 8	pH 7,0
6 µl 0,5% Bromphenol- blau mit Ethidiumbromid	pH 7,0	

Die Hybridisierung der RNA erfolgte nach Maniatis *et al.* (1983). Als Sonden wurde α³²P-markierte DNA des HPT- und des NOS-Gens verwendet. Die Autoradiographie erforderte 3-7 Tage bei -70°C.