

# GEN—MANIPULATIONS—SET (PART I) ALEXANDER POPPER / KATRIN STOCKHAMMER



## GENTRANSFER IN PFLANZEN

### LIGATION VON GEN X IN DAS PLASMID

Ansatz:

Gen X — 20—5000ng

Plasmid DNA — 10—500 ng

10x Ligase Puffer — 1.5 ml

T4 DNA Ligase — 400units

H<sub>2</sub>O — auf 15 ml

Ansatz über Nacht bei 15°CÉ (sticky ends) oder 1—3h bei Raumtemperatur (blunt ends) inkubieren

### TRANSFORMATION

- 100 ml kompetente Bakterien (*Escherichia coli*) auf Eis auftauen und mit der Plasmid DNA versetzen
  - Nach 20 min. die Bakterien 90 sec. bei 42°C (Wärmeschock) belassen und erneut 2—3 min. auf Eis transferieren
  - Dem Ansatz 900 ml SOB—Medium zugeben und 1 h bei 37°C schütteln • 100—250 ml davon auf LBamp—Agar ausplattieren
- Selektion der transgenen Bakterien auf Ampicilin—Resistenz

### AMPLIFIKATION DER PLASMID DNA

- 2—3 ml Selektivmedium mit transgenen Bakterien inokulieren und über Nacht bei 37°C schütteln
- Abzentrifugieren bei 4000 rpm
- Den Überstand entfernen und das Pellet in 300 ml STETL (Saccharose—Tris EDTA TritonX—100® Lysozym) resuspendieren
- Nach 3 min. auf Eis wird 3 min, auf 95°C transferieren und anschließend 15 min. bei 14000 rpm abzentrifugieren
- Mit einem sterilen Zahnstocher das Pellet vorsichtig entfernen und den verbleibenden Überstand, der die Plasmid—DNA enthält, mit 1mg RNase A 15 min. bei Raumtemperatur inkubieren

- Die DNA mit Isopropanol präzipitieren und 15 min. abzentrifugieren
- Das gewaschene und getrocknete Pellet in 20 ml 1xTE (Tris EDTA) lösen

### **CHARAKTERISIERUNG DER PLASMID—DNA**

DNA—Spaltung mit Restriktionsendonucleasen:

Ansatz:

Plasmid—DNA — 0.2—1 mg

10x Restriktionspuffer — 2 ml

Restriktionsendonuclease — 2 units

H<sub>2</sub>O — auf 20 ml

Ansatz 2 h bei entsprechender Temperatur inkubieren

Auftrennung der DNA—Fragmente im elektrischen Feld:

- Agarose in 0.5x TPE (Tris Phosphat EDTA) aufkochen und nach dem Abkühlen mit 5 ml Ethidiumbromid / 100 ml versetzen

Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht DNA durch Absorption von UV—Strahlung sichtbar.

- Das noch flüssige Gel in einen tray gießen und nach dem Erhärten in eine mit 0.5 x TPE gefüllte Pufferkammer transferieren
- Die zu analysierenden DNA—Proben mit Auftragspuffer versetzen und in die slots pipettieren

Die DNA elektrophoretisch bei 1—5 eV/cm nach Größe auftrennen.

### **TRANSFORMATION VON UNDIFFERENZIIERTEN PFLANZENZELLEN MIT DER FREMD—DNA**

- Zellkern treffen

### **REGENERATION VON VOLLSTÄNDIGEN TRANSGENEN PFLANZEN AUS DER TRANSFORMIERTEN GEWEBEKULTUR**

- Kalli auf SIM (shoot inducing medium) transferieren

• SIM:

IPA (Isopentenyladenosine) — 4.0 mg/l

NAA (Naphthol acetic acid) —0.2 mg/l

MS (Murashige & Skoog) salts — 4.4g/l

Saccharose — 30g/l

Vitamix — 2 ml/l

Agar — 9g/l

pH — 5.8 (KOH)

Regenerierte Sprosse ausbilden lassen, dann kurzfristig in RIM (root inducing medium) inkubieren

RIM:

IAA (Indole acetic acid) — 1mg/l

IBA (Indole—3—butyrate) — 0.2mg/l

Kinetin — 0.2mg/l

Sprosse auf MS—Medium aufbringen, Ausbildung der Wurzeln abwarten

MS—Medium:

MS salts — 4,4g/l

Saccharose — 30g/l

Vitamix — 2ml/l

Agar — 9g/l

PH — 5.8 (KOH)

Abb. 1: Plasmid mit Fremd—DNA

**colEI**: Origin of replication. Ermöglicht Vermehrung des Plasmids in E. coli.

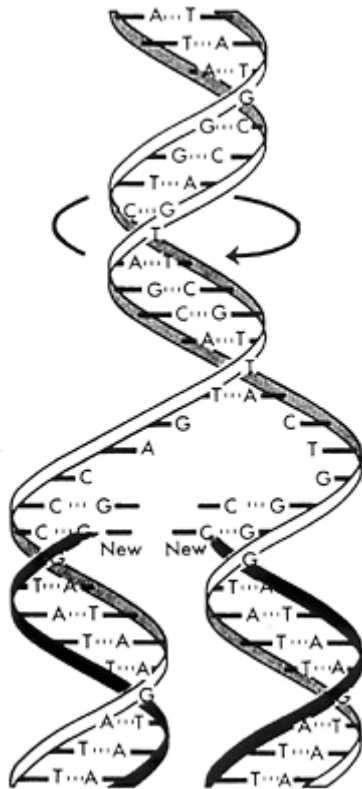
**amp<sup>r</sup>**: Gen codierend für Ampicillin—Resistenz. Transformierte Bakterien sind resistent gegen das Antibiotikum Ampicilin.

**CaMV35SP**: Starker konstitutiver Promoter des Cauliflower Mosaic Virus, der von der pflanzlichen Transkriptionsmaschinerie erkannt wird.

**GUS**: **b—Glucuronidase**. Ein Gen aus E. coli, das als Reportergen in pflanzlichen Systemen Anwendung findet (detaillierte Restriktionskarte: Abb. 1b; DNA Sequenz: Abb. 2). Durch Spaltung eines zugegebenen Substrates werden transformierte Gewebebereiche, die dieses Gen exprimieren, blau gefärbt. Blaue Zellen tragen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch das Fremdgen (Gen X).

**XbaI, EcoRI, ...**: Erkennungssequenzen von Restriktionsendonucleasen. Diese Enzyme sind im Handel erhältlich und spalten DNA in vielen Fällen an definierten Nucleotidabfolgen. Diese Eigenschaft erlaubt es DNA—Fragmente zu trennen und (mit Hilfe weiterer Enzyme) in veränderter Kombination zu verbinden.

**Gen X**: Ein beliebiges Gen (Fremdgen). Es kann aus Viren, Bakterien, Pflanzen oder animalischen Systemen stammen und soll der transformierten Pflanze die gewünschten Eigenschaften verleihen.



CTGCAGGTCA GTCCCTTATG TTACGTCCTG TAGAAACCCC AACCCGTGAA  
ATCAAAAAAC

TCGACGGCCT GTGGGCAITC AGTCTGGATC GCGAAACTG TGAATTGAT  
CAGCGTTGGT

GGGAAAGCGC GTTACAAGAA AGCCGGGCAA TTGCTGTGCC AGGCAGTTTT  
AACGATCAGT

TCGCCGATGC AGATATTCGT AATTATGCGG GCAACGTCTG GTATCAGCGC  
GAAGTCMA

TACCGAAAGG TTGGGCAGGC CAGCGTATCG TGCTGCGTTT CGATGCGGTC  
ACTCATTACG

GCAAAGTGTG GGTCAATAAT CAGGAAGTGA TGGAGCATCA GGGCGGCTAT  
ACGCCATTG

AAGCCGATGT CACGCCGTAT GrTATTGCCG GGAAAAGTGT ACGTATCACC  
GTTTGTGTGA

ACAACGAACT GAACTGGCAG ACTATCCCGC CGGGAATGGT GATTACCGAC  
GAAAACGGCA

AGAAAAAGCA GTCCTACTTC CATGATtTCT TTA ACTATGC CGGAATCCAT  
CGCAGCGTAA

TGCTCTACAC CACGCCGAAC ACCTGGGTGG ACGATATCAC CGTGGTGACG  
CATGTCGCGC

AAGACTGTAA CCACGCGTCT GTTGACTGGC AGGTGGTGGC CAATGGTGAT  
GTCAGCGTTG

AACTGCGTGA TGCGGATCAA CAGGTGGTTG CAACTGGACA AGGCACTAGC  
GGGACTITGC

AAGTGGTGAA TCCGCACCTC TGGCAACCGG GTGAAGGTTA TCTCTATGAA  
CTGTGCGTCA

CAGCCAAAAG CCAGACAGAG TGTGATATCT ACCCGCTTCG CGTCGGCATC  
CGGTCAGTGG

CAGTGAAGGG CGAACAGITC CTGATFAACC ACAAACCGTF CTACTIONACT  
GGCTTTGGTC

GTCATGAAGA TGCGGACTTA CGTGGCAAAG GATFCGATAA CGTGCTGATG  
GTGCACGACC

ACGCATTAAT GGACTGGATT GGGGCCAACT CCTACCGTAC CTCGCATTAC  
CCTTACGCTG

AAGAGATGCT CGACTGGGCA GATGAACATG GCATCGTGGT GATTGATGAA  
ACTGCTGCTG

TCGGCTTTAA CCTCTCTTTA GGCAITGGIT TCGAAGCGGG CAACAAGCCG  
AAAGAACTGT

ACAGCGAAGA AGCAGTCAAC GGGGAAACTC AGCAAGCGCA CTTACAGGCG  
ATFAAAGAGC

TGATAGCGCG TGACAAAAAC CACCCAAGCG TGGTGATGTG GAGTATTGCC  
AACGAACCGG

ATACCCGTCC GCAAGTGCAC GGAATATTT CGCCACTGGC GGAAGCAACG  
CGTAAACTCG

ACCCGACGCG TCCGATCACC TCGTCAATG TAATGTTCTG CGACGCTCAC  
ACCGATACCA

TCAGCGATCT CTITGATGTG CTGTGCCTGA ACCGTTATTA CGGATGGTAT  
GTCCAAAGCG

GCGATTTGGA AACGGCAGAG AAGGTACTGG AAAAAGAACT TCTGGCCTGG  
CAGGAGAAAC

TGCATCAGCC GATTATCATC ACCGAATACG GCGTGGATAC GTTAGCCGGG  
CTGCACTCAA

TGTACACCGA CATGTGGAGT GAAGAGTATC AGTGTGCATG GCTGGATATG  
TATCACCGCG

TCIITGATCG CGTCAGCGCC GTCGTCGGTG AACAGGTATG GAATTTGCGC  
GATTTTGC GA

CCTCGCAAGG CATATTGCGC GTTGGCGGTA ACAAGAAAGG GATCTTCACT  
CGCGACCGCA

AACCGAAGTC GGC GGCTTTT CTGCTGCAAA AACGCTGGAC TGGCATGAAC  
TTCGGTGAAA

AACCGCAGCA GGGAGGCAAA CAATGAATCA ACAACTCTCC TGGCGCACAC  
GTGGCTACAG

CCTCGGTGGG GAATTC

Nucleotidsequenz des GUS-Gens. A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, T=Thymin

Thanks & Kisses to:

Gregor Mendel

H. Kienesberger

Virus Like Particle

W. Prymas

W. Goedl

Whattochter & Sherman

H. Space

A. Baumgartner

Die Natur kann verbessert werden

Das Projekt wurde ermöglicht durch die freundliche Unterstützung der Fa. Olympus.