

## 2. Material

### 2.1 Pflanzenmaterial

Wildtyp *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN (SNN), anti-ABA scFv transgene Tabakpflanzen (RA-Pflanzen, Linien 5/1, 16/7 und *in vitro*- Klon RA 27), anti-Oxazolone scFv transgene Tabakpflanzen (Linien UF 9/13 und 9/38)

### 2.2 Bakterienstämme und Phagen

#### E. coli- Stämme:

XL1- Blue MR (Stratagene)  $\Delta(\text{mrcA})183 \Delta(\text{mrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$ .

XL1- Blue MRF<sup>'</sup> (Stratagene)  $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\text{q}}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$ .

SOLR (Stratagene)  $e14^-(\text{McrA}^-) \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})171 \text{ sbcC recB recJ uvrC umuC}::\text{Tn5 (Kan}^{\text{r}}) \text{ lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 } \lambda^{\text{R}} [\text{F' proAB lacI}^{\text{q}}\Delta\text{M15}] \text{ Su}^-$ .

VCS 257 (Stratagene)

#### Phagen:

ExAssist<sup>TM</sup> - Helferphage (Stratagene)

### 2.3 Vektoren und Primer

Vektoren: SuperCos 1 Amp<sup>r</sup> (Stratagene)  
Uni- ZAP XR Amp<sup>r</sup> (Stratagene)

Primer für die Erststrangsynthese: Linker-Primer (Stratagene)  
Oligo (dT)<sub>25</sub> -Primer (Pharmacia)

### Sequenzierungsprimer:

"M13 universal" (Pharmacia)      5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'

"M13 reverse"(Pharmacia)      5' AAC AGC TAT GAC CAT G 3'

## **2.4 Enzyme**

Alkalische Phosphatase CIAP ("calf intestinal alkaline phosphatase", Gibco BRL),  
Reverse Transkriptase ("Expand Reverse Transcriptase", Boehringer Mannheim),  
Lysozym (Sigma), Pronase (Boehringer Mannheim), Proteinase K (Serva),  
Restriktionsendonukleasen (Gibco BRL), RNase A (Boehringer Mannheim),  
T4 DNA Ligase (Invitrogen)

## **2.5 Pflanzenhormone und Antibiotika**

(±)-*cis, trans*- Abscisinsäure (Sigma), Ampicillin (Duchefa), Kanamycin (Duchefa),  
Tetracyclin (Serva)

## **2.6 Antikörper und Konjugate**

anti-c-myc-Antikörper (monoklonal; Munroe und Pelham, 1986), anti-Maus-  
Immunglobulin-Peroxidase-Konjugat (Amersham), Kaninchen anti-Maus-Immunglobulin  
(monoklonal, Sigma), Maus anti-ABA-Antikörper 15-I-C5 (E.W.Weiler, Bochum), ABA-  
alkalische Phosphatase-Konjugat (Weiler, 1986)

## **2.7 DNA- und Proteinmarker**

100 bp-DNA-Leiter (Gibco BRL), 1 kb-DNA-Leiter (Gibco BRL),  $\lambda$  DNA / Hind III-  
Fragmente (Gibco BRL), "Kaleidoscope Prestained Standards" (BioRad)

## **2.8 Weitere Chemikalien und Kits**

Amersham: [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dATP, "ECL Western blotting analysis system", "Megaprime<sup>TM</sup> DNA  
Labelling System"

Biomol: p-Nitrophenylphosphat  
BioRad: "Bio-Rad-protein assay"  
Boehringer Mannheim: "AttoPhos™ Substrate Set", Blockierungsreagens, Heringssperma-DNA, IPTG, "DIG DNA Labelling and Detection Kit"  
Difco: Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Hefeextrakt  
DuPont: [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dATP, [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dCTP  
Gibco BRL: TEMED, Heringssperma-DNA  
National Diagnostics: 30 % Acrylamid / Bisacrylamid  
Pharmacia: "mRNA Purification Kit"  
Premier Beverages: Marvel (fettfreie Trockenmilch)  
Reanal (Ungarn): Acrylex P-30  
Roth: Phenol, Chloroform, Phenol / Chloroform- Lösung, n-Butanol, Isopropanol, Cäsiumchlorid, Ethidiumbromid  
Serva: BSA  
Sigma: DTT, DMSO, DEPC, Bromphenolblau, Lithiumacetat, N-laurylsarcosyl, Guanidiniumthiocyanat  
Stratagene: "SuperCos1 Cosmid Vector Kit", "Uni- ZAP XR Vector Kit", "Gigapack II XL Packaging Extract", "Gigapack III Gold Packaging Extract", "cDNA Synthesis Kit"  
Qiagen: "DNA Gel Extraction Kit", "Plasmid Mini Kit", "Plasmid Midi Kit"  
USB: SDS, Ammoniumpersulfat

## **2.9 Medien**

### Medien zur Anzucht von Bakterien und Phagen:

LB 1% NaCl, 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt (pH 7,0)

NZY 0,5% NaCl, 0,2%  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5% Hefeextrakt, 1% NZ Amin  
(Caseinhydrolysat) (pH 7,5)

2YT 1% NaCl, 1,6% Trypton, 1% Hefeextrakt (pH 7,5)

Für feste Medien wurde Agar zu 2%, für halbfeste Medien ("Top-Agar") zu 0,7% zugegeben.

### Medium zur Sterilkultur von Tabakpflanzen:

Murashige und Skoog (MS)-Vollmedium (Duchefa)

Alle Medien wurden 15 min bei 121°C autoklaviert.

## 2.10 Puffer und weitere Lösungen

1. Carbonatpuffer: 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,6.
2. Church-Puffer: 1 Volumen 10% SDS, 1 Volumen 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2), 0,25% 0,5 M EDTA.
3. Denaturierungspuffer: 1 M NaCl, 0,4 M NaOH.
4. Extraktionspuffer: 0,2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,2% SDS, 100 µg/ml Proteinase K.
5. 10 x HMF<sub>M</sub> ("Hogness Modified Freezing Medium"):  
Lösung A: 5 mM MgSO<sub>4</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, 20 mM Natriumcitrat, 85 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 45 % Glycerin.  
Lösung B: 0,66 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.  
4/5 Lösung A + 1/5 Lösung B = 10 x HMF<sub>M</sub>.
6. Neutralisierungspuffer: 1 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5).
7. PBST-Puffer: 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween, pH 7,5.
8. Pronase-Puffer: 50 mM Tris- HCl pH 8,5, 50 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 1% N-laurylsarcosyl.
9. SDS-Gel-Probenpuffer: 10 % Glycerin, 14% Trenngel- Puffer, 2% SDS, 5 % Mercaptoethanol, Bromphenolblau.
10. SM-Puffer: 0,58% NaCl, 0,2% MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,01% Gelatine.
11. 20 x SSC-Puffer: 17,53 % NaCl, 8,82% Natriumcitrat (pH 7,0).
12. TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA.

## 2.11 Geräte und Software

1. "Array Vision", "Spot"-Auswerteprogramm (Imaging Research Inc.)
2. "BioGrid", "Spotting"-Roboter (BioRobotics)
3. "BioPick", "Picking"-Roboter (BioRobotics)
4. Dynatech MR 7000
5. Pulsfeld-Gelelektrophorese Rotaphor (Biometra)
6. Schwingmühle Typ MM-2 (Retsch)

7. STORM 860, Software: "Scanner Control Version 4.1", "Image Quant Version 4.1"  
(Molecular Dynamics)
8. Ultrazentrifuge LE- 70 (Beckmann)
9. UV Stratalinker<sup>TM</sup> 2400 (Stratagene)
10. "Waring Blendor" (Standmixer, Waring Products Division Dynamics Corporation of  
America)
11. Weißlichtscanner (Pdi), TINA-Programm (Raytest)

## **2.12 Spezielle Materialien**

1. "Bio-Assay"-Schalen, 22 x 22 cm (Nunc)
2. Dialysierschlauch (Serva)
3. Filterpapier (Whatman)
4. Hybond N+ Nylonmembran (Amersham)
5. Mikrotiterplatten, 384er (Genetix, Nunc)
6. Nitrozellulosemembran BA 85 (Schleicher und Schüll)
7. Phosphor Screen (Imagefolie, Kassette) (Molecular Dynamics)
8. Röntgenfilme (Retina)
9. "SizeSep 400 Spun Columns" (Pharmacia Biotech)
10. Verstärkerfolien (Perlux)
11. Zeichentusche, schwarz (Pelikan)

## **3. Methoden**

### **3.1 Normalisierung von anti-ABA-scFv transgenen Pflanzen durch Behandlung mit Abscisinsäure**

#### **3.1.1 Anzucht der Pflanzen und Behandlung mit Abscisinsäure**

Anti-ABA scFv Immunglobulintransgene Pflanzen verschiedener Linien (RA 5/1, RA 16/7 und *in vitro*-Klon RA 27) sowie als Kontrollen anti-Oxazolone scFv transgene Pflanzen (Linien UF 9/13 und 9/38) und Wildtyppflanzen (SNN) wurden in verschiedene Behandlungsexperimente mit Abscisinsäure einbezogen.