

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die cytologischen Untersuchungen wurden Hanfpflanzen der diözischen Abstammung CAN 18 (Genbank, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben) sowie der diözischen ungarischen Faserhanfsorte `Kompolti` und Kreuzungen von `Kompolti` mit der diözischen Sorte `Skunk 1` verwendet.

Für die molekulare Markeranalyse sowie für die anderen molekularen Untersuchungen wurde DNA der diözischen Hanfpopulation A2 verwendet. Es handelt sich hierbei um 81 F₁-Nachkommen einer Kreuzung zweier Pflanzen der diözischen Abstammung CAN 18. Diese Population ist erstellt von **Flachowsky et al. (2001)**

2.1.2 Bakterien und Vektoren

Für Transformationen wurden kompetente One Shot[®] Chemically Competent *E. coli* Zellen des Stammes TOP10F⁺ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. DNA-Fragmente wurden in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

2.2.1.1 Pflanzliche Gesamt-DNA

Zur DNA-Isolierung wurde ein Protokoll nach **Saghai Maroof et al. (1984)** verwendet. Das Protokoll wurde wie bei **Flachowsky (2003)** modifiziert.

2.2.1.2 Bakterien Plasmid-DNA (Plasmid Mini-Prep.)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Einzelkolonien über Nacht (37°C, 200 rpm) in 2 ml LB-Medium mit 2 µl Amp₁₀₀ angezogen. Die Bakterien der Suspension wurden in einer

Zentrifuge 5 min bei 10000 rpm pelletiert und anschließend in 100 µl Plasmidlösung I resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation (auf Eis) zur Lyse der Bakterien wurden 200 µl Plasmidlösung II dazu gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, mit 150 µl Plasmidlösung III versetzt, 5 min auf Eis gelagert und 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml Ethanol bei -20°C gefällt und anschließend pelletiert. Die Plasmide wurden nach der Pelletierung 2 mal mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen, im Vakuum getrocknet, in 40 µl 1 x TE/RNase-Puffer gelöst und 15 min bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Hanfpollenisolierung

Mit einer Präpariernadel wurden getrocknete Hanfpollen auf einen Objektträger mit 20 – 40 µl destilliertem Wasser gegeben. Mit Hilfe einer Glaskapillare, deren Öffnung 20 µm betrug, wurden unter dem Mikroskop aus dieser Pollensuspension einzelne Pollen isoliert und in 0,2 µl Tubes mit 10 µl destilliertem Wasser überführt.

2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR) basierende Methoden

2.2.3.1 Standard PCR

Die Standard PCR wurde in 1x PCR-Puffer Y (mit 15 mM MgCl_2 , PeqLab, Erlangen) mit 0,2 mM dNTP's, 0,25 µM forward Primer, 0,25 µM reverse Primer und 1 U Taq Polymerase (PeqLab, Erlangen) in den Thermocyclern T-Gradient (Biometra) bzw. TC480 (Perkin Elmer) durchgeführt. Standard PCR-Bedingungen beinhalteten:

Zyklenzahl	Schritt
1	5 min bei 94°C , initiale Denaturierungsphase
25 bis 35	1 min bei 94°C , Denaturierung
	1 min bei $37 - 60^{\circ}\text{C}$, Annealingphase
	1 – 5 min bei 72°C , Synthesephase
1	10 min bei 72°C , finaler Elongationsschritt

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend auf 4°C gekühlt. Die Annealingtemperaturen und Länge der Synthesephase sind abhängig von PCR-Methode, Primereigenschaften und DNA-Fragmentgröße.

2.2.3.2 RAPD (random amplified polymorphic DNA)

Bei der RAPD-Technik wurden zur Amplifikation 0,25 µM Oligonucleotidprimer (10 Basenpaare) mit zufälligen Sequenzen verwendet. Es wurde eine Annealingtemperatur von 37°C und eine Synthesezeit von 2 min realisiert.

2.2.3.3 DOP-PCR (degenerated oligonucleotid primed-PCR)

DOP-PCR wurde mit dem DOP-PCR Master Kit (Roche, Mannheim) entsprechend der Anleitung durchgeführt. Amplifikationsbedingungen:

Zyklenzahl	Schritt
1	1 min bei 94°C, initiale Denaturierungsphase
5	1,5 min bei 30°C, Primerannealing
	3 min bei 30°C, Annealingphase mit Temperatursteigerung von 3,5°C/15 sec auf 72°C
	3 min bei 72°C, Synthesephase
35	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 62°C, Annealingphase
	2 min bei 72°C, Synthesephase (14 sec Synthesezeitverlängerung bei jedem folgenden Zyklus)
1	7 min bei 72°C finaler Elongationsschritt

2.2.3.4 I-PEP-PCR (improved primer extension preamplification-PCR)

Bei der I-PEP-PCR wurde der total degenerierte 15N Primer mit einer Sequenz von zufälligen 15 Nucleotiden verwendet. Amplifikationsbedingungen der I-PEP-PCR:

Zyklenzahl	Schritt
1	1 min bei 92°C Denaturierung
50	2 min bei 37°C Annealing, mit Temperatursteigerung von 0,1°C/sec auf 55°C und anschließenden 30 sec bei 68°C

Dabei wurden 16 μM 15N Primer, 0,1 mM dNTP, 2,5 mM MgCl_2 , 1 x High Fidelity PCR Puffer (Roche, Mannheim) und 3,6 U Expand High Fidelity Polymerase (Roche, Mannheim) eingesetzt.

2.2.3.5 PCR Walking

Beim PCR Walking wurden je 2,5 μg DNA mit verschiedenen blunt-ends produzierenden Restriktionsenzymen (je 80 U: *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *ScaI*, *SmaI* und *SspI*) geschnitten. An die Enden der entstandenen Fragmente wurde in einem Ansatz aus Ligationspuffer, 10 U T4 Ligase und 5 μM Adapter mit bekannter Sequenz (Adaptersequenz siehe **Tabelle 7.2** im Anhang) über Nacht bei 15°C ligiert.

Anschließend wurde eine PCR mit adapter- bzw. fragmentspezifischen Primerpaaren (je 10 μM , Länge: 27 bis 30 bp) unter Verwendung von 1 μl geschnittener DNA, 6 U Advantage Genomic Polymerase Mix (Clontech, Heidelberg), 1 x PCR-Puffer (Clontech, Heidelberg), 0,2 mM dNTP's sowie mit 5,5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ durchgeführt. Die PCR wurde als 2-Schritt-Amplifikation zuerst mit einem außen und anschließend mit einem innen liegenden Primerpaar (nested PCR) gestaltet.

1. Amplifikation:

Zyklenzahl	Schritt
7	25 sec bei 94°C, Denaturierung
	3 min bei 72°C, Annealing/Primer Extension
32	25 sec bei 94°C, Denaturierung
	3 min bei 67°C, Annealing/Primer Extension
1	7 min bei 67°C, finale Extension

Die Amplifikationsprodukte der ersten PCR wurden 1:50 verdünnt und in einer zweiten PCR mit dem innen liegenden adapter- bzw. fragmentspezifischen Primerpaar eingesetzt.

2. Amplifikation:

Zyklenzahl	Schritt
5	25 sec bei 94°C, Denaturierung
	3 min bei 72°C, Annealing/Primer Extension
20	25 sec bei 94°C, Denaturierung
	3 min bei 67°C, Annealing/Primer Extension
1	7 min bei 67°C, finale Extension

2.2.3.6 AFLP (amplified fragment length polymorphism)

Die AFLP-Technik wurde nach einem modifiziertem Protokoll von Vos et al. (1995) durchgeführt. Dabei wurden 2 µg Gesamt-DNA mit den Restriktionsenzymen *MseI* und *HindIII* geschnitten. An die Enden der entstandenen DNA-Fragmente wurden schnittstellen-spezifische Adapter ligiert. Der Ligationsansatz bestand aus 0,25 U T4 Ligase, 1 x RL Puffer, 1,2 mM ATP sowie je 2,5 mmol *MseI* und *HindIII*-Adapter. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 15°C.

In der sich daran anschließenden Preamplifikation wurden 5 µl Ligationsansatz zusammen mit 1 x PCR-Puffer Y (PeqLab, Erlangen), 1 x Enhancer-Solution (PeqLab, Erlangen), 200 µM dNTP's, 75 ng Preamplifikationsprimer (*HindIII*+A und *MseI*+A) und 5 U Taq Polymerase (PeqLab, Erlangen) in einem 50 µl Amplifikationsansatz unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Zyklenzahl	Schritt
20	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 60°C, Annealingphase
	2 min bei 72°C, Synthesephase
1	10 min bei 72°C, finale Elongation

Die Preamplifikationsprodukte wurden 1:20 mit Wasser verdünnt und 2,5 µl davon in einem weiteren Amplifikationsschritt mit Primern mit drei selektiven Basen eingesetzt. Der 20 µl Amplifikationsansatz bestand aus 1 x PCR-Puffer (PeqLab, Erlangen), 1 x Enhancer-Solution (PeqLab, Erlangen), 10 ng *HindIII*+ANN Primer (Cy3-markiert), 60 ng *MseI*+ANN Primer, 200 µM dNTP's und 0,1 U Taq Polymerase (PeqLab, Erlangen). Die Amplifikationsbedingungen waren folgendermaßen gestaltet:

Zyklenzahl	Schritt
9	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 65°C, Annealingphase
	1,5 min bei 72°C, Synthesephase, nach jedem Zyklus: Senkung der Annealingtemperatur um 1°C
23	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 56°C, Annealingphase
	1 min bei 72°C, Synthesephase

2.2.3.7 Touchdown-PCR

Zur Erhöhung der Produktspezifität wurde ein Touchdown Protokoll durchgeführt. Die Zusammensetzung der Ausgangsreagenzien entsprach der einer Standard PCR. Die Amplifikationsbedingungen gestalteten sich dabei folgendermaßen:

Zyklenzahl	Schritt
1	5 min bei 94°C, initiale Denaturierungsphase
7	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 64°C, Annealingphase, Reduzierung der Annealingtemperatur um 1°C je Zyklus
	1 min bei 72°C, Synthesephase
25	1 min bei 94°C, Denaturierung
	1 min bei 54°C, Annealingphase
	1 min bei 72°C, Synthesephase
1	10 min bei 72°C, finaler Elongationsschritt

2.2.4 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem Thermo Sequenase™ Cy™5 Dye Terminator Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) entsprechend der Anleitung durchgeführt und mit einem ALFexpress™ DNA-Sequencer (Amersham Biosciences, Freiburg) ausgewertet.

2.2.5 Elektrophorese

AFLP- und Sequenzierungsreaktionen wurden auf 0,5 mm dicken denaturierenden PAA-Gelen (7 M Urea, 6% PAA, 1 x TBE) mit 0,5 x TBE als Laufpuffer in einem ALFexpress™ DNA-Sequencer (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetrennt. Dabei wurden 3-6 µl Amplifikationsprodukte mit der gleichen Menge AFLP-Ladepuffer versetzt, denaturiert (90 sec bei 70-90°C) und für 540 min bei 1500 V, 38 mA, 34 W, 50°C und einem Samplingintervall von 2 sec elektrophoretisch getrennt.

Die Auswertung der Gele erfolgte mittels der Software: ALFwin™ Version 1.00, ALFwin™ Sequence Analyser 2.00 bzw. ALFwin™ Fragment Analyser (Amersham Biosciences, Freiburg).

Zur Durchführung der Agarosegelelektrophorese wurde Agarose in 1 x TAE auf eine Endkonzentration von 0,7 bis 1,5% gelöst und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid dazugegeben. Die DNA wurde mit 1 x Ladepuffer (B oder Y) versetzt und in 1 x TAE bei 10-100V 1-16 h lang aufgetrennt und unter UV-Licht mit einer Geldokumentationsanlage ausgewertet.

2.2.6 Fragmentisolierung aus Elektrophoresegelen

AFLP-Fragmente wurden nach **Flachowsky et al. (2001)** aus PAA-Gelen isoliert. Das Eluieren des Fragments aus dem Gel erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) gemäß der Anleitung.

PCR-Fragmente aus Agarosegelen wurden mit der freeze-squeeze Methode eluiert. Das Fragment wurde auf dem Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde das ausgeschnittene Gelstück in ein 0,5 ml Tube überführt, dessen Boden vorher mit einem Viskosewollestück und drei kleinen Löchern versehen wurde. Das Tube mit dem Gelstück wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend wieder aufgetaut, in ein 1,5 ml Tube gesetzt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform gereinigt, mit Ethanol gefällt, pelletiert und in 20 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

PCR-Fragmente wurden mit dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Kalsruhe) kloniert. Dazu wurden in einem Ligationsansatz 4 µl PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl,

0,06 M MgCl₂) und 1 µl pCR[®]2.1-TOPO[®] Vector vereinigt. In Abhängigkeit von der Größe der zu ligierenden Fragmente wurden nach 5 bis 30 min Inkubation bei Raumtemperatur 2 µl dieses Ligationsansatzes in ein 2 ml Tube mit 50 µl One Shot[®] Chemically Competent *E. coli* Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben und vorsichtig gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis, einem Hitzeschock von 30 Sekunden bei 42°C und einer weiteren Lagerung auf Eis wurden zu den Zellen 250 µl SOC-Medium gegeben und diese für 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden je 50 und 200 µl davon auf LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 0,1 mM IPTG, 40 µg/ml X-GAL) ausplattiert und im Inkubator über Nacht bei 37°C angezogen.

DNA-Fragmente ohne A-Überhänge (z. B. PCR Walking Fragmente) wurden vor der Ligation in einem 10 µl Ansatz mit 1 x PCR-Puffer (PeqLab, Erlangen), 0,1 mM dNTP's und 2-5 U Taq Polymerase (PeqLab, Erlangen) für 10 min bei 72°C inkubiert.

2.2.8 Bakterielle Dauerkulturen

Einzelne *E. coli* Kolonien wurden in 2 ml LB_{Amp100} Flüssigmedium bei 37°C und 200 rpm über Nacht angezogen. 800 µl dieser Bakteriensuspension wurden mit 800 µl Glycerin gemischt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.9 Sondenherstellung

DNA-Fragmente wurden durch Markierung mit Biotin, Digoxigenin (DIG) oder radioaktiven Isotopen (³²P) in Sonden umgewandelt.

Die Biotin-Markierung erfolgte mittels PCR. Dabei wurde ein Nukleotidmix eingesetzt, welcher Biotin-markiertes dUTP enthielt.

Die DIG-Markierung mittels PCR erfolgte analog durch den Einsatz des PCR DIG Labeling Mixes (Roche, Mannheim).

Große Fragmente (>1000 bp) und klonierte Fragmente, für die keine Primer zur Verfügung standen, wurden mit dem DIG-Nick Translation Mix (Roche, Mannheim) markiert. Dazu wurden in einem 16 µl Ansatz 1 µg DNA mit 4 µl DIG-Nick Translation Mix gemischt und bei 15°C für 90 min inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA und 10-minütiges Erhitzen auf 65°C wurde die Reaktion abgestoppt.

Radioaktiv markierte Sonden wurden für das Screening einer DNA-Bank eingesetzt. Die Sonden-DNA wurde dazu mit den Restriktionsenzymen *HindIII* geschnitten und anschließend mit dem Rediprime™II Random Prime Labellin System (Amersham Biosciences, Freiburg) radioaktiv (^{32}P) markiert. Dazu wurden 16 μl (25-45 ng) Sonden-DNA zusammen mit dem Labeling Mix und 50 μCi ^{32}P dCTP in ein Reaktionsgefäß gegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend bei 100°C gestoppt.

2.2.10 Southern Blot

Für das Southern Blotting wurden 10 mg Gesamt-DNA mit je 40 U Restriktionsenzym (*BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*) in 1 x Reaktionspuffer bei 37°C über Nacht verdaut. Der 200 μl Restriktionsansatz wurde mittels Ethanol gefällt, pelletiert und in 20 μl TE-Puffer gelöst. Die gelöste DNA wurde auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und bei 15 V aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel zum Denaturieren 2 mal 15 Minuten in Denaturierungspuffer und anschließend für 2 mal 15 Minuten in Neutralisierungspuffer geschwenkt. Die DNA wurden daraufhin auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences, Freiburg) geblottet (**Southern, 1975**), in 2 x SSC gewaschen und mittels UV-Licht 10 Minuten unter einem Crosslinker auf der Membran fixiert.

2.2.11 Blotten von Bakterienkolonien

In 384er Platten angezogene Bakterienkolonien wurden mit Hilfe eines 384er Stempels auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences, Freiburg) gestempelt. Jede Kolonie wurde auf der selben Membran diagonal zum ersten Stempelabdruck ein zweites Mal gestempelt, um Artefakte bei der Hybridisierung zu erkennen.

Die Membranen mit den aufgestempelten Kolonien wurden über Nacht bei 37°C zum Wachsen auf LB-Medium gelegt. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Auflegen für 3 min auf mit 10% SDS getränktes 3MM Whatmann Papier. Anschließend wurden die Membranen 3 min lang auf mit Denaturierungspuffer getränktem Whatmann Papier aufgelegt. Zur Neutralisierung wurden die Membranen 2 mal 3 min auf mit Neutralisierungspuffer getränktem Whatmann Papier gelegt. Anschließend wurden die Membranen in 2 x SSC gewaschen und 1 h bei 80°C gebacken. Nach einer einstündigen Behandlung mit 1 ml Proteinase K (1 mg/ml) bei 37°C wurden die Filter zwischen 2 Lagen H₂O getränktes 3MM Whatman Papier gelegt.

Zum Entfernen der Proteine wurde die obere Lage Whatmanpapier mit Druck auf die Membran gepresst. Dieser Vorgang wurde mit jeweils neuen Lagen Whatman Papier mehrfach wiederholt. Die von den Proteinen gereinigten Membranen wurden abschließend in 2 x SSC eingeschweißt und bei 7°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.12 DNA-DNA Hybridisierung

Nylon-Membranen mit geblotteter DNA wurden in einer Hybridisierungsröhre für eine Stunde in 15-20 ml Hybridisierungspuffer bei 65°C im Drehofen vorhybridisiert.

Die DIG-markierte Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis gelagert und zusammen mit 15-20 ml frischem Hybridisierungspuffer und 100 mg/ml Heringssperma-DNA in die Hybridisierungsröhre gegeben. Die Hybridisierung erfolgte dann bei 65°C über Nacht im Drehofen.

Anschließend folgten die stringenten Waschungen 2 x 15 min in 2 x SSC und 0,1% SDS bei Raumtemperatur bzw. in 0,1 x SSC und 0,1% SDS bei 65°C. Nach fünfminütigem Waschen in Waschpuffer folgte eine Inkubation in 1 x Blockierungspuffer bei 37°C für 30 Minuten. Danach wurde die Membran 30 min mit Anti-DIG AP und Blockierungspuffer (1:10000) behandelt. Nach 5 min im Waschpuffer wurden die Nylon-Membran 5 min mit Detektionspuffer behandelt. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei PE-Folien gelegt und 5 min in Detektionspuffer und CSPD (100:1) inkubiert. Die Membran wurde in eine neue Folie einschweißt und 15 min bei 37°C im Dunkeln gelagert. Ein Chemiluminiszenzfilm wurde anschließend zusammen mit der Membran in einer Belichtungsbox 2 bis 24 Stunden exponiert. Radioaktiv markierte Sonden wurden zusammen mit den Nylon-Membranen über Nacht in ³²P Hybridisierungspuffer bei 65°C hybridisiert. Nach den stringenten Waschungen (analog zur DIG-Detektion) erfolgte die Exposition auf Röntgenfilm oder K-Screen (BioRad).

2.2.13 Chromosomenpräparation

Zur Herstellung von Chromosomenpräparaten wurde meristematisches Gewebe von Hanfwurzelspitzen bzw. männlichen Hanfblüten verwendet.

Wurzelspitzenpräparate wurden hergestellt, indem Hanfsamen im Dunkeln bei 24°C auf mit destilliertem Wasser angefeuchtetem Filterpapier zum keimen gebracht wurden, bis die Keimwurzeln eine Länge von 1 bis 2 Zentimeter erreichten. Zur Synchronisation der Zellen wurden

die Wurzelspitzen 8 bis 17 Stunden auf mit 1,25 mM Hydroxyharnstofflösung getränkten Filterpapier inkubiert. Um die Meristemzellen der Wurzelspitzen im Stadium der mitotischen Metaphase anzureichern, wurden die vom Samen abgetrennten Keimwurzelspitzen einer 19- bis 21stündigen Eiswasserbehandlung unterzogen oder für vier bis sechs Stunden mit 0,05% iger Kolchizininlösung behandelt. Zur Fixierung der Wurzelspitzen wurde eine Lösung aus 3 Teilen 98% Ethanol und 1 Teil Eisessig verwendet. Diese Lösung wurde auch zur Fixierung und Aufbewahrung männlicher Hanfblütenstände verwendet.

Vor der Herstellung von Chromosomenpräparaten wurde das fixierte Gewebe einem enzymatischen Verdau unterzogen. Dazu wurde das Gewebe 3 x 10 min in 1 x Enzympuffer (40 mM Zitronensäure, 60 mM Natriumcitrat, pH 4,8) gewaschen, um den Alkohol aus dem Gewebe zu entfernen. Anschließend wurde das Pflanzengewebe in einem Enzymgemisch inkubiert, welches Zellwände und Proteine abbaut. Dazu wurde Wurzelspitzen Gewebe für 1 bis 2 Stunden bei 37°C in einem Gemisch aus 2% Cellulase, 20% Pektinase und 1% Pectolyase 1x Enzympuffer inkubiert. Beim enzymatischen Verdau von Hanfblüten wurde diesem Enzymgemisch 1%ige Cytohelikase beigefügt.

Von den Wurzelspitzen wurde anschließend der vorderste, das meristematische Gewebe enthaltende Teil entfernt, auf einen Objektträger überführt, in 60%iger Essigsäure zerkleinert und anschließend mit einem Deckgläschen gequetscht.

Einzelne Hanfblüten wurden nach der Enzymbehandlung in 60%iger Essigsäure auf dem Objektträger zerkleinert. Anschließend wurde der Objektträger auf eine 50°C heiße Heizplatte gelegt. Mit kreisenden Bewegungen einer Präpariernadel wurde diese Gewebesuspension ca. 60 Sekunden lang verteilt. Danach wurden die Objektträger mit 3:1 Fixierlösung überspült und getrocknet.

Fertiggestellte Präparate wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht, um Zellteilungsstadium und Präparatqualität festzustellen.

Geeignete Präparate wurden in einer Alkoholreihe (70%, 90% und 98% Ethanol) entwässert und anschließend luftgetrocknet. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei -20°C.

2.2.14 FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung)

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde als Multicolor FISH durchgeführt, dabei konnten gleichzeitig zwei unterschiedlich markierte DNA-Sonden (Biotin- bzw. Digoxigenin Markierung) für die Hybridisierung eingesetzt werden.

Die Auswertung der Hybridisierung erfolgte mit Auflicht-Fluoreszenzmikroskopen (Zeiss Axioskop).

Das Protokoll für die Durchführung der FISH ist in **Tabelle 2.1** angegeben

Tabelle 2.1

Präparatvorbehandlungen	- spülen der Chromosomenpräparate für 10 min in 2 x SSC
	- RNase-Behandlung (RNaseA 100 ng/μl für 40 min bei 37°C in der Feuchtekammer)
	- waschen für 3 x 5 min in 2 x SSC
	- Proteinverdau (Proteinase K 1 ng/μl) 15 min bei 37°C in der Feuchtekammer
	- waschen für 3 x 5 min in 2 x SSC
	- Nachfixierung der Präparate für 10 min bei Raumtemperatur in 4%iger Paraformaldehydlösung (in 2 x PBS gelöst)
	- waschen für 3 x 5 min in 2 x SSC
	- Dehydrierung der Präparate in Alkoholreihe (70%, 90% und 98% Ethanol)
	- Lufttrocknung der Präparate
Sondenvorbereitung	- 70-100 ng Sonden-DNA mit 9 μg Heringssperma-DNA mischen
	- Fällung der DNA mit 98% Ethanol und Pelletierung
	- pelletierte Sonden in 10-11 μl deionisiertem Formamid (Stringenz 77-80%) und 10 μl Hybridisierungsmix bei 200 rpm 45 min lang lösen
	- Denaturierung der Sonde für 7 min bei 80°C
Hybridisierung	- Auftropfen von 20 μl Hybridisierungsprobe auf den Objektträger des Chromosomenpräparates
	- abdecken mit Deckglas (21x26 mm) und Versiegelung mit Fixogum
	- Denaturierung für 7 min bei 80°C auf einer Heizplatte
	- Hybridisierung über Nacht bei 37°C in der Feuchtekammer
stringente Waschungen	- 3 x 5 min in 2 x SSC bei 37°C
	- 3 x 5 min in 0,1 x SSC bei 42°C
	- 2 x 5 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur
Blockierung unspezifischer Sondenbindstellen	- Zugabe von 30 μl Blockierungslösung und Inkubation für 30 min in der Feuchtekammer
Immunologische Detektion der Biotin-markierten Sonden mit Primärantikörpern	- auftropfen von 30 μl Detektionspuffer mit 198 ng Cy3-Streptavidin (Camon, Wiesbaden)
	- Inkubation für 40 min bei 37°C in der Feuchtekammer
	- 3 x 5 min Waschen in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei 42°C

Fortsetzung Tabelle 2.1

Amplifikation der Biotinmarkierten Sonden bzw. Detektion der DIG-markierten Sonden mit Primärantikörper	- auftropfen von 30 µl Detektionspuffer mit 6 ng/µl biotinyliertes Anti-Streptavidin (Camon, Wiesbaden) und 6 ng/µl Schaf Anti-DIG-FITC (Roche, Mannheim)
	- Inkubation für 40 min bei 37°C in der Feuchtekammer
	- 3 x 5 min Waschen in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei 42°C
Signalverstärkers mit sekundären Antikörpern	- auftropfen von 25 µl Detektionspuffer mit 6 ng/µl Cy3-Streptavidin (Camon, Wiesbaden) und 6 ng/µl Anti-Schaf-FITC (Dianova, Hamburg)
	- Inkubation für 30 min bei 37°C in der Feuchtekammer
	- 3 x 5 min Waschen in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei 42°C
Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI	- auftropfen von 25 µl Detektionspuffer (25 ng DAPI)
	- Inkubation für 4 min im Dunkeln
	- Färbungsabbruch durch kurzes Waschen in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei Raumtemperatur
	- Einbettung der Präparate in 15 µl Vectashield® (Vector Laboratories, Burlingham) sowie Abdeckung mit Deckgläschen
Entfernung der Sonden von den Objektträgern (für erneute Hybridisierungen)	- Erwärmung des Objektträgers bei 37°C für 10 min zur Reduzierung der Viskosität der Antifadinglösung (Vectashield®)
	- Entfernung des Deckglases
	- 5 min waschen der Objektträger in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei RT
	- 2 x 30 min waschen der Objektträger in 4 x SSC + 0,1% Tween 20 bei RT
	- 2 x 5 min Inkubation der Objektträger in 2 x SSC bei RT
	- Dehydrierung mit einer Alkoholreihe (70%, 90% und 98% Ethanol)