

## 2. Materialien

### 2.1 Chemikalien

Das Gros der im Labor benötigten hochreinen Chemikalien wurde durch Erzeugnisse der Firmen Roth, Serva, Merck und Sigma abgedeckt. Einige spezielle Chemikalien und Enzyme wurden bei anderen Firmen bezogen. Gesondert aufgeführt sind im Folgenden die genutzten Alkaloide:

<b>Aus dem Labor von</b>	( <i>R</i> )-Cocclaurin	<b>Sigma:</b>	$\beta$ -Alanin
<b>Prof. Dr. M. H. Zenk,</b>	( <i>S</i> )-Cocclaurin		( <i>S</i> )-Norcocclaurin
<b>Biozentrum Halle:</b>	L-Dopa		( <i>S</i> )- <i>N</i> -Methylcocclaurin
	Dopamin		Putrescin
	Morphin		Salsolinol
	( <i>S</i> )-Norretikulin		Spermidin
	Papaverin		Theobromin
	( <i>S</i> )-Retikulin		Theophyllin
	( <i>S</i> )-Scoulerin		Xanthosin
	( <i>S</i> )-Stylopin		7-Methylxanthin
<b>Fluka:</b>	Koffein		( <i>S</i> )-3'-Hydroxy- <i>N</i> -Methylcocclaurin

### 2.2 Enzyme und Kits

#### Enzyme:

Alkalische Phosphatase

Lysozym

*Pfu*-Polymerase

Restriktionsendonukleasen

RNase A

T4-DNA Ligase

#### Kits:

QIAquick PCR Purification Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit

verschiedene Topo cloning - Kits

pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems

Rapid DNA Ligation Kit

Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit

GeneRacer<sup>™</sup> Kit

Megaprime DNA Labeling System

HexaLabel<sup>™</sup> DNA Labeling Kit

Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit

DNeasy<sup>®</sup> Plant Maxi Kit

Roche

Sigma, Fluka

Promega, Fermentas

Fermentas, Invitrogen,

New England Biolabs

Serva

Invitrogen, Promega

Qiagen

Qiagen

Qiagen

Invitrogen

Promega

Roche

Invitrogen

Invitrogen

Amersham

Fermentas

Promega

Qiagen

## 2.3 Materialien und Reagenzien

<b>Steriles Verbrauchsmaterial:</b>	Eppendorf, Greiner, Nunc Sarstedt, Kisker
<b>Southern/Northern Blot Analyse:</b>	
Phosphoimagerscreen	Molecular Dynamics
Filterpapier/GB 004 Gel Blotting Papier	Schleicher und Schuell
Biodyne <sup>®</sup> B Membran, positiv geladene Nylon 6,6	Pall Corporation
Express Hyb <sup>™</sup> Hybridization Solution	BD Biosciences
ProbeQuant <sup>™</sup> G-50 Micro Columns	Amersham
<b>Sequenzierung:</b>	
BigDye Terminators Version 1.1 + Puffer	Applied Biosystems
<b>Phytokammer:</b>	
L36 W/840 LUMILUX COOL WHITE	OSRAM
<b>Gewächshaus:</b>	
Nützlinge: ( <i>Chrysoperla carnea</i> , <i>Steinernema feltiae</i> , <i>Amblyseius cucumeris</i> )	Hatto-Welte
Peters Professional	Scotts Deutschland
Flory 3 und Flory 10	Euflo GmbH
Baymat flüssig	Bayer
Schwefelverdampfer	Kammlot
SON-T PIA AGRO 400W	Philips
<b>Elektroporation:</b>	
Elektroporator und Elektroporationsküvetten	BioRad
<b>His-tag-Protein-Aufreinigung:</b>	
Talon und Gravity Flow Column	BD Biosciences
PD-10 Desalting column	Amersham Biosciences
<b>Proteinkonzentrationsbestimmung:</b>	
BioRad Protein Assay Lösung	BioRad
<b>Marker:</b>	
1 kb+ / 1 kb DNA Ladder	Invitrogen
1 kb DNA-Ladder / 1 kb DNA-Ladder-Mix	Fermentas
$\lambda$ DNA-EcoRI/HindIII / $\lambda$ -Pst-Marker	Fermentas
RNA Ladder High Range	Fermentas
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas
<b>Radioaktivität:</b>	
$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dATP (3000 Ci/mmol)	ICN Pharmaceuticals
Adenosyl-L-methionin, S-[methyl- <sup>14</sup> C]	ARC
<b>PCR:</b>	
Taq DNA Polymerase 10 x Reaktionspuffer mit MgCl <sub>2</sub>	Promega
dNTP-Mix 10 mM	Bioline
Oligo-Nukleotide (Primer)	MWG-Biotech

## 2.4 PCR-Primer

Die in dieser Arbeit in Polymerasekettenreaktionen und für Sequenzierungen (3.11) verwendeten Primer sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: die verwendeten PCR-Primer und ihre Sequenzen, sowie die Referenz (Ref.)

Primer	Sequenz in 5'→3'-Orientierung	Ref.
6OMTRNA <sub>is</sub>	CTCGAGTCTAGAAAGCGTTGGGGAAGAGTAT	1
6OMTRNA <sub>ias</sub>	AATTCATCGATAGGGTAAGCCTCAATTACAGA	1
7OMTRNA <sub>is</sub>	CTCGAGTCTAGATTGAGAGAGCTCATGGATGT	1
7OMTRNA <sub>ias</sub>	GAATTCGGATCCCTCGATGATGCAAGGAAAT	1
6OMT <sub>fls</sub>	GCGCGCTACGTAATGGAAACAGTAAGCAAGATTGAT	1
6OMT <sub>flas</sub>	GCGCGCTACGTATTAATAAGGGTAAGCCTCAATTAC	1
7OMT <sub>fls</sub>	GCGCGCTACGTAATGGATACTGCAGAAGAAAGGT	1
7OMT <sub>flas</sub>	GCGCGCTACGTATTATTCTGGAAAGGCCTCGAT	1
NMT-Facchini-start	ATGCAGCTAAAGGCAAAGGAAG	1
NMT-Facchini-stop	TCATTTTTTCTTGAAGAGAAGATGGG	1
NMT-Facch-start_Bam	GCGCGGATCCATGCAGCTAAAGGCAAAGG	1
NMT-Facch-stop_Hind	GCGCAAGCTTTCATTTTTTCTTGAAGAGAAGA	1
NMT5'RACE	TGTCTCAATCTCTCCTGACATTTCCA	1
NMT5'RACEnested	GAGATGATTTATAACCCCATTCGACACG	1
NMT3'RACE	ACGTCTGCAATGGGGTTATAAATCA	1
NMT5'RACEnested	TGGAAATGTCAGGAGAGATTGAGACA	1
NMTstart	ATGGGTTCAATAGATGA	1
NMTstop	TCACTACTTCTTCTTGAAAA	1
NMTstartBamHI	GCGCGGATCCATGGGTTCAATAGATGA	1
NMTstopNotI	GCGCGCGGCCGCTCACTACTTCTTCTTGAAAA	1
NPTII <sub>sense</sub>	CAGGCTATTCGGCTATGACTG	2
NPTII <sub>antisense</sub>	ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	2
S4S4 <sub>sense</sub>	TAAGCGTACTCAGTACGCTTC	3
Me13' <sub>antisense</sub>	GCATTACAACATGCATCTGAC	3
pHANs	ACAATCCCCTATCCTTCG	4
pHAN <sub>s</sub>	TACAACGTGCACAACAGAAT	4
pHAN <sub>Introns</sub>	GTCGAACATGAATAAACAAGG	4
pHAN <sub>Intronas</sub>	CACTTAACATTTTATACTAAAAGG'	4

Referenzen: 1 = diese Arbeit

2 = Le Flem-Bonhomme et al. (2004)

3 = Frick et al. (2004)

4 = Kempe (2003)

## 2.5 Standardpuffer

TE:	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
20 x SSC:	0,3 M Natriumcitrat/HCl, 3 M NaCl, pH 7,0
50 x TAE:	2 M Trisacetat, 50 mM EDTA
10 x MOPS-Puffer:	200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 6,5-7,0 mit NaOH
1 x FA-Puffer:	10 % v/v 10 x MOPS-Puffer, 2 % v/v Formaldehyd
5 x Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer:	125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5 % w/v SDS, pH 8,3

## 2.6 Ladepuffer

Ladepuffer dienen dem „Beschweren“ und der Stabilität der Proben. Das enthaltene Glycerin sorgt dafür, dass die Proben zur Elektrophorese gut in die Ladetaschen der Gele sinken. Substanzen wie EDTA und DTT stabilisieren die Proben. Um die Lauffront im Gel sichtbar zu machen, enthalten die Ladepuffer einen Farbstoff.

### DNS / RNS-Ladepuffer:

10 x Ladepuffer Orange G:	50 % v/v Glycerin, 200 mM EDTA, 1 Spatelspitze Orange G
2 x / 6 x RNS-Ladepuffer:	Fermentas

### Proteinladepuffer:

2 x SDS-PAGE-Ladepuffer: (Sambrook et al., 1989)	100 mM Tris/HCl pH 6,8, 20 % v/v Glycerin, 4 % w/v SDS, 200 mM DTT, 0,2 % w/v Bromphenolblau
5 x SDS-PAGE-Ladepuffer:	225 mM Tris/HCl pH 6,8, 50 % v/v Glycerin, 5 % w/v SDS, 250 mM DTT, 0,05 % w/v Bromphenolblau

## 2.7 Nährmedien

Nährmedien sind unverzichtbar für die Anzucht von Bakterien, Zellkulturen und Pflanzen.

Es ist notwendig, die Medien vor Gebrauch zu autoklavieren, da nur so steriles Arbeiten garantiert werden kann. Die meisten Medien können sowohl flüssig für Schüttelkulturen, als auch in fester Form (Zugabe von Agar vor dem Autoklavieren) als Platten zur Kultivierung eingesetzt werden. Durch das Einbringen von Antibiotikaresistenzgenen über Vektoren in den zu kultivierenden Organismus ist eine Selektion über Antibiotika in/auf dem Medium möglich.

### 2.7.1 LB-Medium

Als klassisches Nährmedium wurde LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) zur Anzucht von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* verwendet (Sambrook et al., 1989).

### 2.7.2 SOC-Medium

Nach der Transformation mittels Elektroporation (3.8.2) benötigten die Agrobakterien dieses besonders reichhaltige Medium (Sambrook et al., 1989).

### 2.7.3 B5O-Medium

B5O ist das so genannte Embryogenesemedium bei der Entwicklung von Schlafmohnpflanzen aus Kalluskulturen. Es induziert die Bildung von Embryonen aus Typ-II-Kalli und wird für die Keimlingsanzucht unter sterilen Bedingungen genutzt (Chitty et al., 2003; Larkin et al., 1999).

100 ml/l	Makronährstoffe	10 x
1 ml/l	B5 Mikronährstoffe	1000 x
10 ml/l	B5 Eisenlösung	100 x
10 ml/l	B5 Vitaminlösung	100 x
2 g/l	MES-Puffer	
20 g/l	Saccharose	
11,3 g/l	Pflanzenagar	
	pH 5,6 mit NaOH	

10 x B5 Makronährstoffe: 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 250 mM  $\text{KNO}_3$ , 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

1000 x B5 Mikronährstoffe: 60 mM  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 50 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 7 mM  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 4,5 mM KJ, 0,1 mM  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 mM  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ,

100 x B5 Vitaminlösung: 0,8 mM Nicotinsäure, 3 mM Thiamin x HCl, 0,5 mM Pyridoxin x HCl, 55 mM Inositol

100 x B5 Eisenlösung: 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 100 mM  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

### 2.7.4 19D-Medium

2,4-D-Lösung: 4,5 mM 2,4-D, pH 6 mit 1 M HCl

19D-Medium: B5O-Medium + 1 ml/l 2,4-D-Lösung

19D-Medium dient der Kallusinduktion. Die transformierten *P. somniferum*-Hypokotyle wurden auf diesem Medium ausgelegt und entwickelten sich zu Kalluskulturen. Aus den zunächst entstandenen Typ-I-Kalli wurden hier Typ-II-Kalli gebildet, aus denen sich nach Inkubation auf B5O-Medium Embryonen entwickelten. In seiner Zusammensetzung entspricht 19D dem B5O-Medium, beinhaltet aber zusätzlich das Phytohormon 2,4-D, ein synthetisches Auxin (Chitty et al., 2003; Larkin et al., 1999).

## 2.8 Antibiotika

Stammlösung		eingesetzte Endkonzentration
100 mg/ml	Ampicillin in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
50 mg/ml	Carbenicillin in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
34 mg/ml	Chloramphenicol in Ethanol	34 µg/ml
25 mg/ml	Kanamycin in H <sub>2</sub> O	25 µg/ml
7 mg/ml	Gentamicin in H <sub>2</sub> O	7 µg/ml
25 mg/ml	Paromomycin in H <sub>2</sub> O	25 µg/ml
20 mg/ml	Rifampicin in Methanol	20 µg/ml
50 mg/ml	Spectinomycin in H <sub>2</sub> O	10 µg/ml
	Timentin (fest)	150 µg/l

## 2.9 Plasmide

### Klonierungsvektoren:

pCR<sup>®</sup>2.1 , pCR<sup>®</sup>2.1 TOPO , pCR<sup>®</sup>4 TOPO<sup>®</sup> (www.invitrogen.com)

pGEM T, pGEM T Easy (www.promega.com)

pHannibal: 5,8 kb, zum Erstellen von RNAi-Konstrukten, 35S-Promotor/OCS-Terminator, Amp<sup>r</sup> (Wesley et al., 2001)

### Expressionsvektoren:

pQE30: 3,4 kb, N-terminaler 6 x His-tag, Amp<sup>r</sup>, T5-Promotor (www.qiagen.com)

pHis 8: 4,6 kb, modifizierter pET 28a-Vektor, T7-Promotor/Terminator, Amp<sup>r</sup>, N-terminaler 8 x His-tag, Thrombinschnittstelle (Jez et al., 2000)

pCRT7/NT-TOPO: 2,8 kb, T7-Promotor/Terminator, 3'-Thymidinüberhänge, Topoisomerase (kovalent gebunden), N-terminaler 6 x His-tag (www.Invitrogen.com)

pART27: 11,7 kb, Binärvektor zur Expression von RNAi-Konstrukten in Pflanzen, Spec<sup>r</sup>, *nptII* mit NOS-Promotor/Terminator (Gleave, 1992)

pPLEX X002: 13,1 kb, NotI-Kassette aus pPLEX 3002 (Schünmann et al., 2003) in pBS435 (Allen und Larkin, nicht publiziert) (Abb. 2.1)

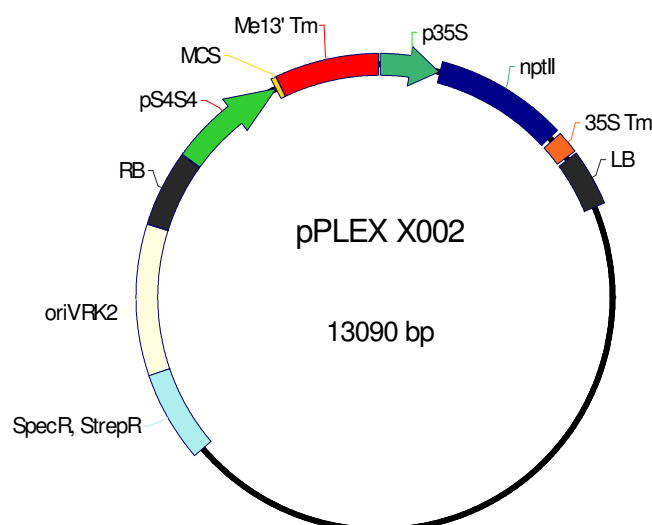


Abb. 2.1: pPLEX X002-Vektorkarte; SpecR, StrepR: Resistenzgen gegen Spectinomycin/Streptomycin; RB, LB: right und left border, Begrenzungen der übertragenen T-DNS; Expressionskassette: pS4S4: Doppelpromotor eines Kleevirus (*subterranean clover stunt virus*); Me13 Tm=Terminator aus *Flaveria bidentis* NADP-malic enzyme (Ali und Taylor, 2001a, b); MCS = multiple cloning site; Selektionskassette: *nptII* für Neomycinphosphotransferase II (Kanamycin-/Paromomycinresistenz) mit 35S-Promotor und -Terminator (Chitty et al., 2003; Frick et al., 2004)

## 2.10 Organismen und ihre Kultivierung

### Papaver somniferum

Samen des *P. somniferum*-Kultivars CO58-34 wurden bereitgestellt von Tasmanian Alkaloids Pty Ltd, Westbury, Australien.

Phytokammerbedingungen: (Frick et al., im Druck)	Temperatur: 22-24°C; Fluxrate: 160 µMol/m <sup>2</sup> s Belichtung: 16 h/d mit Standard-Tageslicht
Gewächshausbedingungen: (Frick et al., 2005b)	Temperatur tags: 22-24°C, nachts: 18-20°C Belichtung: 16 h/d mit Hochdrucknatriumdampfsystem Luftfeuchtigkeit: 50 %

Die Kalluskulturen von CO58-34 sind auf 19D- und B5O-Medium (2.7) mit den Antibiotika Paromomycin und Timentin in Phytokammern kultiviert worden. Paromomycin fungierte als Selektionsmarker, Timentin war zur Hemmung des Wachstums von Agrobakterien zugesetzt worden. Die Kalli wurden im Abstand von 21 d auf frisches Medium umgesetzt.

Die aus den Kalluskulturen generierten T0-Pflanzen und die ausgesäten Pflanzen der T1- und T2-Generation wurden ganzjährig im Gewächshaus in gedämpfter Komposterde mit Perlitt gezogen. Um sie optimal mit Nährstoffen und Spurenelementen zu versorgen, düngte man sie im Abstand von 7 bis 14 Tagen mit Flory 3 oder Peters Professional (2.3). Die transgenen Pflanzen zeigten in der T1- und T2-Generation Anzeichen von Eisen- und Magnesiummangel, die sich durch eine Weißfärbung der Blätter äußerten. Um diesen Mangel auszugleichen, wurde zusätzlich mit Flory 10 (10 % Mg) gedüngt und die Basisdüngung verstärkt.

Zum Schutz vor Schädlingen wie Tripslarven, Trauermückenlarven oder Roter Spinne setzte man Nützlinge auf den Pflanzen aus (*Chrysoperla carnea*, *Steinernema feltiae*, *Amblyseius cucumeris*; 2.3). Zur Bekämpfung von Mehltau, besprühte man die generierten T0-Pflanzen und die dazu ausgesäten CO58-34-Kontrollpflanzen mit Baymat. In der T1- und T2-Generation wurde der Mehltaubefall verhindert, indem die Gewächshauskammern mit Schwefelverdampfern ausgestattet wurden.

### Escherichia coli

Die verschiedenen Stämme von *E. coli* wurden zur Vervielfältigung von Plasmiden in Klonierungen und zur Expression von Proteinen genutzt. Sie wachsen in/auf LB-Medium. Bei einer optimalen Kultivierungstemperatur von 37°C beträgt ihre Generationszeit 20-30 Minuten.

DH5α	<a href="http://www.Clontech.com">www.Clontech.com</a>
TOP10, TOP10F'	<a href="http://www.Invitrogen.com">www.Invitrogen.com</a>
BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS	<a href="http://www.Invitrogen.com">www.Invitrogen.com</a>
BL21(DE3)RIL	<a href="http://www.Stratagene.com">www.Stratagene.com</a>
M15	<a href="http://www.Qiagen.com">www.Qiagen.com</a>

**Agrobacterium tumefaciens**

Der Agrobakterienstamm AGL1 war von CSIRO Plant Industry, Canberra, Australien zur Verfügung gestellt worden. Er wurde in/auf LB-Medium und SOC-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Rif, Carb) bei 28°C kultiviert (Hellens et al., 2000; Lazo et al., 1991).

**2.11 Spezielle Geräte**

<b>PCR-Thermocycler:</b>	PE Applied Biosystems	GenAmp® PCR System 9700
	MJ Research	200 Peltier Thermal Cycler
<b>Zentrifugen:</b>	Eppendorf	Mastercycler gradient
	Eppendorf	Centrifuge 5403
		Centrifuge 5415D
		Centrifuge 5810R
		Centrifuge 5815R
DuPont	Sorvall® RC 26 PLUS	
		Sorvall® RC 28 S
<b>Sequenzierer:</b>	Applied Biosystems	ABI 310 Avant Genetic Analyzer
		ABI 3100 Avant Genetic Analyzer
<b>Ultraschallgeräte:</b>	Bandelin Electronics	UH 60
		Sanopuls HD 60
		Ultraschallbad
<b>Szintillationszähler:</b>	Beckman	LS 6000 TA
<b>Phosphoimager:</b>	Molecular Dynamics	Image Eraser Model #810
		Storm 860
<b>Phytokammern:</b>	Heraeus Vötsch	
	Climatron	
	Tira Umweltsimulation GmbH	Typ: TBR 1203-700.5.4
<b>HPLC:</b>	Agilent Technologies	Agilent 1100
<b>LC-MS(TOF):</b>	Agilent Technologies	Agilent 1100 LC-Anlage
	Applied Biosystems	Mariner
	PE-Sciex	Turbulon Spray Quelle
<b>LC-ESI-MS:</b>	Finnigan	MAT TSQ 7000 system
	ThermoFinnigan	Surveyor micro-HPLC
	SepServ	Ultrasep ES RP18E-Säule