

3. Methoden

3.1 Probennahme

3.1.1 Latex

Latexsammelpuffer: 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7, 23 mM Ascorbinsäure, 500 mM Mannitol,

Der Alkaloidgehalt des Schlafmohns wurde aus dem Kapsellatex bestimmt. Drei Tage nach dem Öffnen der Blüten wurden die inzwischen geschwollenen Kapseln mit einem Skalpell angeritzt und der austretende Milchsaft in 200 µl Latexsammelpuffer (Decker et al., 2000) überführt und gelöst (Frick et al., 2005b). Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.1.2 Pflanzenmaterial

Das für die Nukleinsäureextraktion aus *P. somniferum* benötigte Pflanzenmaterial wurde mit einem Skalpell von der Pflanze abgetrennt und zum Schutz vor nukleolytischem Abbau von RNS sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Durchführung der folgenden Standardmethoden richtete sich weitgehend nach den Protokollen der Hersteller von Enzymen oder Kits oder nach Sambrook et al., (1989):

- Aufreinigung von PCR- und Restriktionsprodukten
- Extraktion von DNS aus Agarosegelen
- Plasmidpräparation aus *E. coli* und *A. tumefaciens*
- Restriktionsverdaue
- Dephosphorylierung von Vektoren mit Phosphatasen
- Ligationen

3.3 Polymerasekettenreaktionen - PCR

Die PCR dient der exponentiellen Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte eines Templates (zu kopierender DNS-Abschnitt), die durch die Sequenz der eingesetzten Primer begrenzt werden (Mullis und Faloona, 1987). Die Sequenzverlängerung wurde durch die *Taq*-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) oder die *Pfu*-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) katalysiert.

Standard-PCR-Ansatz:

X µl Template- DNS
 5 µl 10xPuffer
 2,5 µl dNTPs (20 mM)
 2,5 µl 3'-Primer (20 µM)
 2,5 µl 5'-Primer (20 µM)
 0,5 µl Polymerase (2,5u)
 ad 50 µl Wasser

Standard-PCR-Programm:

	94°C	3 min
35 x	94°C	30 s
	primerspezifische <i>annealing</i> -Temperatur und -zeit	
	72°C	fragmentlängen- und polymeraseabhängige Elongationszeit
	72°C	7 min
		auf 4°C abkühlen

3.4 RACE – PCR

Um die Sequenz eines Gens, ausgehend von einem DNS-Fragment, dessen Sequenz weder ein Start- noch ein Stopkodon enthält, zu erhalten, bedient man sich einer RACE- (*rapid amplification of cDNA ends*)-PCR. Durch diese Methode ist es möglich, das 3'- sowie das 5'-Ende eines Gens zu ermitteln. In dieser Arbeit wurde der GeneRacer™ Kit von Invitrogen genutzt. Der Kit ermöglicht das Anhängen von 5'-Oligos an die mRNA und von 3'-Oligos während der reversen Transkription. Von dem bekannten DNS-Fragment werden spezifische Primer abgeleitet (Abb. 3.1: Pfeil = Primer 1, 2, 3, 4), die in PCRs gemeinsam mit Primern gegen die angehängten Oligos eingesetzt werden, so dass die fehlenden Sequenzen zwischen 5'- und 3'-Ende der mRNA und dem DNS-Fragment synthetisiert werden. Mit nested Primern (2, 4, 6, 8) kann das Ergebnis verbessert werden (Abb. 3.1). Durch Sequenzierung (3.11) der erhaltenen Fragmente ließen sich die Sequenz des Gens und der untranslatierten Regionen ermitteln.

3.5 Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNS wurden in dieser Arbeit 0,8-1,0 %ige Agarosegele verwendet (0,8-1,0 % w/v Agarose in 1 x TAE, mit 0,33 µg/ml Ethidiumbromid). Vor dem Auftragen mischte man die DNS mit einem adäquaten Ladepuffer. Die Auftrennung erfolgte in 1 x TAE. Zur Analyse von RNA wurden 1,2 %ige Formaldehyd-Agarosegele genutzt (1,2 % w/v Agarose in 1 x FA-Puffer (2.5) mit 1,8 % v/v Formaldehyd und 0,33 µg/ml Ethidiumbromid). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit RNS-Ladepuffer versetzt und denaturiert (5 min, 65°C). Als Laufpuffer fungierte 1 x FA-Puffer. Die Größenordnung der aufgetrennten Fragmente erfolgte anhand eines Längenstandards (Marker) (Sambrook et al., 1989).

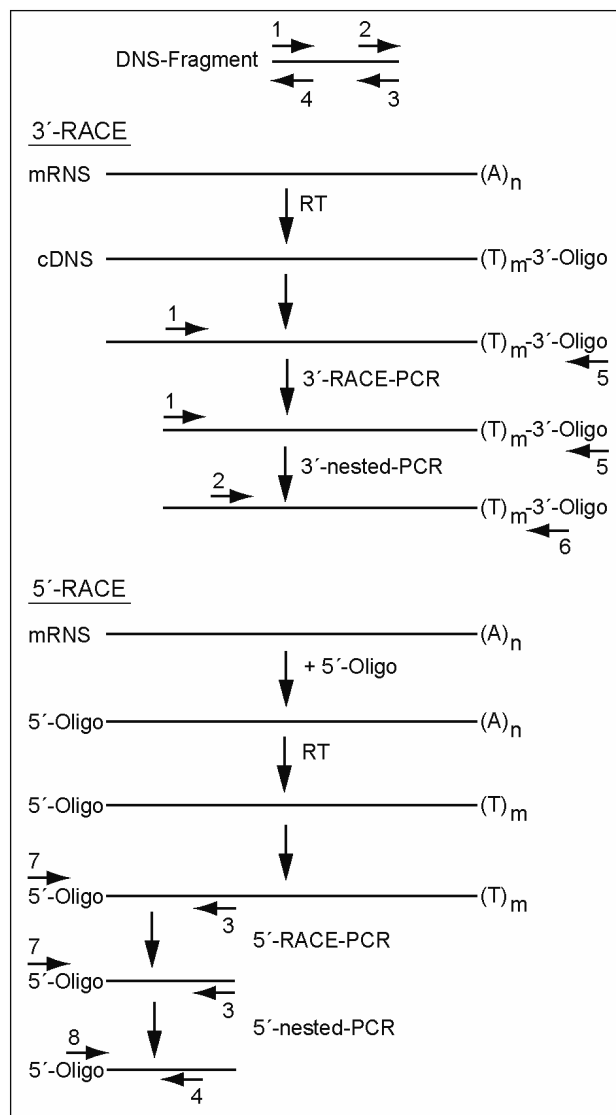


Abb. 3.1: schematische Darstellung der RACE-PCR; Die Reaktionen sind im Herstellerprotokoll des Kits detailliert beschrieben (GeneRacer™ Kit von Invitrogen).

3.6 Herstellung kompetenter Zellen

Um Fremd-DNS besser aufnehmen zu können, werden Mikroorganismen kompetent gemacht.

3.6.1 Chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen – Calciumchlorid-Methode

TfB I-Puffer: 30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl_2 , 100 mM KCl, 10 mM CaCl_2
15 % v/v Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure

TfB II-Puffer: 10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl_2 , 15 % v/v Glycerin,
pH 7 mit NaOH

200 ml LB-Medium wurden mit 2 ml einer DH5 α -Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{550} = 0,28$ wachsen gelassen. Je 25 ml der Kultur wurden bei 1200 x g und 4°C 5 min zentrifugiert. Jedes Pellet wurde in 25 ml TfB I-Puffer durch kräftiges Schütteln resuspendiert und 10 min auf Eis stehen gelassen. Nach einer weiteren Zentrifugation versah man die entstandenen Pellets mit 2 ml TfB II und resuspendierte sie durch vorsichtiges Schwenken im Eisbad. Je 200 μl -Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zum Verbrauch bei -80°C gelagert (Hanahan, 1983).

3.6.2 Elektrokompente Agrobakterien

MinA-Medium: 60 mM K_2HPO_4 , 33 mM KH_2PO_4 , 7,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
0,8 mM MgSO_4 , 2 mM Trinatriumcitrat

MG/L-Medium: 27,4 mM Mannitol, 6,8 mM Glutaminsäure, 0,25 % v/v Hefeextrakt,
0,5 % v/v Trypton, 1,7 mM NaCl, 0,4 mM MgSO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4 ,
pH 7 mit NaOH

25 ml MinA-Medium (Miller, 1972) wurden mit 250 μl Glukose (20 %), Rifampicin und Carbenicillin versetzt und mit 250 μl eines AGL1-Glycerinstocks angeimpft. Die Schüttelkultur wurde 1-2 d bei 28°C bis zum Erreichen der mittleren log-Phase inkubiert. Bei schlechtem Wachstum der Kulturen wurde statt des MinA-Mediums mit 2×10^{-2} mM Biotin, Rif und Carb versetztes MG/L-Medium (Garfinkel und Nester, 1980) genutzt. Je 1,5 ml der Kultur wurden in den entsprechenden Reaktionsgefäßen zentrifugiert (800 x g, 4°C, 5 min). Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen und die Pellets anschließend in 400 μl davon resuspendiert. Diese Agrobakteriensuspensionen vereinte man und lagerte sie als Aliquots zu je 40 μl bei -80°C.

3.7 Aufarbeitung und Analyse der Latexproben

3.7.1 Aufarbeitung des Latex

interner Standard: Dihydrocodein (Dhc); 1 μg Dhc-Tartrat/ μl \rightarrow 30 μl = 20,05 μg Dhc
 φ = Zentrifugation bei 16100 x g, 30 min, 4°C

Die im Latexsammelpuffer aufgenommenen Latexproben (3.1.1) wurden aufgetaut und mit 10 μl

Ascorbatlösung (1 g/25 ml) versetzt. Durch eine Zentrifugation (φ) der Lösung erhielt man ein Pellet (P1) und einen Überstand ($\ddot{U}1$), wobei sich hydrophile Komponenten im Sammelpuffer gelöst hatten und die hydrophoben Bestandteile im Pellet verblieben waren.

Für die quantitative Analyse war es notwendig, das Volumen von $\ddot{U}1$ ($V_{\ddot{U}1}$) zu ermitteln und den Gesamtproteingehalt zu bestimmen (3.16). Zur Bestimmung des Alkaloidgehaltes wurde ein Aliquot (50 μ l) entnommen, mit 30 μ l Standard und 320 μ l Ethanol (70 %) gemischt und zentrifugiert (φ). Der so erhaltene Überstand ($\ddot{U}2$) wurde mittels HPLC analysiert. Um die hydrophoben Bestandteile aus dem Pellet (P1) zu extrahieren, wurde dieses im Ultraschallbad in 970 μ l Ethanol (70 %) und 30 μ l Standard gelöst (6 min in Eiswasser). Eine Zentrifugation (φ) ergab Überstand ($\ddot{U}3$), der in der HPLC analysiert werden konnte. Bei zu hohen Alkaloidkonzentrationen war eine Verdünnung der Proben notwendig (Frick et al., 2005b).

3.7.2 Qualitative und quantitative Analyse des Latex

Lösung A: $H_2O + 2\% \text{ Acetonitril} + 0,001\% H_3PO_4$

Lösung B: $\text{Acetonitril} + 2\% H_2O + 0,001\% H_3PO_4$

Gradient: 0 min: 0 % B; 25 min: 46 % B; 26-33 min: 100 % B; ab 35 min: 0 % B

Die Analyse der Latexproben erfolgte mittels HPLC. Dieses Verfahren ermöglichte eine Auftrennung der Latexalkaloide anhand ihrer Größe und Hydrophobizität. Es wurde eine LiChrospher[®] 60 Rp select B-Säule (250-4 mm, Partikelgröße: 5 μ m) verwendet. Fließmittel waren die Lösungen A und B, die mit dem genannten Gradienten genutzt wurden. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Alkaloide wurden mit UV-Licht ($\lambda=210$ nm) detektiert. Ihre Identifikation erfolgte durch den Abgleich der Retentionszeit und des UV-Spektrums mit einem Standard. So konnten Morphin (Mor) Codein (Cod), Oripavin (Ori), Retikulin (Ret), Laudanin (Laud), Thebain (Theb) und Laudanosin (Laus) zweifelsfrei zugeordnet werden. Als MW328 wurde ein Gemisch der Alkaloide Scoulerin, Salutaridin und 1,2-Dehydroretikulin bezeichnet, die eine molare Masse von 328 g/mol besitzen und in der HPLC die gleiche Retentionszeit hatten. Ihre Identifikation wäre nur massenspektrometrisch möglich gewesen (Frick et al., 2005b).

Die quantitative Auswertung erfolgte über den internen Standard (Dhc) anhand der Peakfläche (A), des Gesamtgehaltes an löslichem Protein (P in μ g), des $V_{\ddot{U}1}$ (in μ l) und eines alkaloid-spezifischen Faktors (Mor = 49; Cod = 83; Ori = 80; Ret = 68; MW328 = 154; Laud = 125; Theb = 92; Laus = 128).

$$\ddot{U}3 = (A_{\text{Alkaloid}} * 20,05 * \text{Faktor}_{\text{Alkaloid}}) / (A_{\text{Dhc}} * P)$$

$$\ddot{U}2 = (A_{\text{Alkaloid}} * 20,05 * \text{Faktor}_{\text{Alkaloid}} * V_{\ddot{U}1}) / (A_{\text{Dhc}} * P * 50)$$

Die Summe $\ddot{U}2 + \ddot{U}3$ (unter Berücksichtigung der Verdünnung) gibt die Einzelalkaloidgehalte/100 μ g lösliches Protein an. Die Einzelwerte wurden zum Gesamtalkaloidgehalt addiert.

3.8 Transformationen

3.8.1 Transformation von *Escherichia coli* mit Hitzeschock

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden mittels Hitzeschock (45 s bei 42°C) mit 20 ng Plasmid-DNS oder einem Aliquot eines Ligationsansatzes transformiert. Zur Selektion positiver Transformanden wurden sie auf LB-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen, und etwa 12 h bei 37°C inkubiert (Hanahan et al., 1991; Sambrook et al., 1989).

3.8.2 Elektroporation von Agrobakterien (AGL1)

Zu elektrokompetenten AGL1-Zellen wurden 50 ng Plasmid pipettiert. Die Zellsuspension wurde luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte durch einen elektrischen Puls von 2 kV, bei 400 Ω und 50 μ F. Nach zweistündiger Inkubation in SOC-Medium bei 28°C (200 rpm) wurden die Zellen auf LB-Agarplatten + Spec (Resistenzgen auf dem eingebrachten Vektor), Rif und Carb ausplattiert.

3.8.3 Agrobakterienvermittelte Transformation von *Papaver somniferum*

Hypochloritlösung: 4 % v/v Hypochlorit, 2 % v/v Triton X 100, H₂O

Die Transformation von Schlafmohn beruht auf dem agrobakterienvermittelten Einbringen eines Vektors in die Pflanzenzellen. Dazu wurden zunächst sterile Hypokotyle von Keimlingen zur Transformation benötigt. Da es sich bei den Samen von *P. somniferum* um biologisches Material aus dem Gewächshaus handelte, mussten sie, bevor sie unter sterilen Bedingungen keimen und wachsen konnten, sterilisiert werden. Dadurch wurden Keime auf der Samenschale abgetötet, so dass eine Kontamination, Elicitierung und ungewollte Transformation ausgeschlossen werden konnten. Dazu wurden Mohnsamen, die in ihrer Menge einem Volumen von etwa 500 μ l entsprachen, 1 min in 70 % Ethanol inkubiert. Anschließend ersetzte man den Alkohol durch Hypochloritlösung, in der die Samen 20-30 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt wurden. Die sterilisierten Samen mussten vollständig von der Hypochloritlösung gereinigt werden, um ihre Keimungsfähigkeit nicht zu beeinträchtigen. Dies geschah durch mehrmaliges Spülen mit insgesamt 500 ml sterilem Mili-Q-Wasser. Nachdem sie kurz auf Filterpapier getrocknet worden waren, wurden je 30-40 Samen auf B5O-Agarplatten ausgelegt. Mohnsamen benötigen Kälteinduktion, um keimen zu können. Deshalb wurden die verschlossenen Platten über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am folgenden Tag in die Phytokammer überführt. Die sterilen Keimlinge konnten nach 6 Tagen zur Transformation verwendet werden (Larkin et al., 1999).

Der gewählte Agrobakterienstamm war AGL1. Die transgenen Agrobakterien wurden in 10 ml LB-Medium mit Antibiotikum (Rif, Spec, Carb) 1-2 d unter schütteln bei 28°C vermehrt. Die Kultur wurde anschließend bei 3100 x g zentrifugiert und das Zellpellet in LB-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ = 0,25 eingestellt.

Transformiert wurden die Hypokotyle steriler Keimlinge, deren Wurzeln und Keimblätter mit einem Skalpell entfernt worden waren. Um ein Austrocknen der Hypokotyle zu vermeiden, lagerten sie in sterilem Wasser, welches dann durch die Agrobakteriensuspension ersetzt wurde. Während der Inkubation in der AGL1-Kultur (15 min) lagerten sich die Agrobakterien auf der Oberfläche an. Nach dem Entfernen der Bakteriensuspension wurden die Hypokotyle in Linie auf 19D-Agarplatten ausgelegt und 3-5 d in der Phytokammer inkubiert. In dieser Zeit überwucherten die Bakterien die Hypokotyle und transformierten sie mit der T-DNS der vorher eingebrachten Plasmide. Es war notwendig, die Agrobakterien nach der Transformation möglichst vollständig zu entfernen. Dazu wurden die transformierten Hypokotyle mit 500 ml sterilem Wasser gewaschen und nach kurzem Trocknen mit etwas Abstand auf 19D-Platten mit Timentin und Paromomycin ausgelegt (Chitty et al., 2003; Larkin et al., 1999).

3.9 Isolation von Nukleinsäuren aus *Papaver somniferum*

Zur Isolation von DNS und RNS aus *P. somniferum* wurden je nach gewünschter Nukleinsäuremenge und deren Reinheitsgrad vier verschiedene Methoden verwendet.

Die DNS-Extraktion mit dem Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit bot sich an, um aus kleinen Mengen Pflanzenmaterial (50 mg) schnell genomische DNS zu isolieren. Der DNeasy[®] Plant Maxi Kit wurde verwendet, um sehr reine DNS zu erhalten. Die so gewonnene DNS war allerdings sehr gering konzentriert (0,025 µg/µl). Die mit Hilfe dieser Kits isolierte DNS wurde als Template in den PCRs zum Nachweis des Transgens und des Resistenzgens eingesetzt. Die Phenol-Chloroform-Methode bietet den Vorteil, dass neben der DNS auch RNS hoher Reinheit in größeren Mengen und isoliert werden kann. Diese eignen sich sowohl als Templates bei PCRs und RT-PCRs, als auch zur Southern und Northern Blot-Analyse. Um innerhalb kurzer Zeit und mit geringem Aufwand RNS zu isolieren, wurde die Trizolmethode verwendet. Die dabei gewonnene RNS wurde für die Northern Blot-Analysen der T2-Generation eingesetzt.

Zentrifugationsschritte:	φ1: 10 min, 3095 x g, RT	φ4: 10 min, 16100 x g, 4°C
	φ2: 20 min, 3095 x g, 4°C	φ5: 20 min, 16100 x g, 4°C
	φ3: 15 min, 16100 x g, 4°C	

3.9.1 Nukleinsäureextraktion mit Phenol/Chloroform

Lysispuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 % SDS, 1 mM EDTA pH 8,0,
4 % w/v PVPP, 14 mM β-Mercaptoethanol

Die Proben wurden, um ein Auftauen zu vermeiden, in flüssigem Stickstoff mit Seesand gemörsert. Bezogen auf 1 g Probenmaterial, wurden hydrophobe Komponenten und Proteine durch 30-minütiges Ausschütteln mit 3,5 ml Lysispuffer und 3,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) extrahiert [φ1]. Die Nukleinsäuren verblieben in der wässrigen Phase,

welche in zwei weiteren Extraktionsschritten mit 3,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) und 3 ml Chloroform ausgeschüttelt wurde [φ1]. Sowohl DNS, als auch RNS wurden mit 1/10 V Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 1 V Isopropanol 30 min bei -20°C ausgefällt [φ2]. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 500 µl TE resuspendiert. Mit 250 µl 6 M LiCl wurde die RNS über Nacht bei 4°C selektiv ausgefällt und zentrifugiert [φ3]. Das RNS-Pellet wurde mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, zentrifugiert [φ4], getrocknet und in 50 µl TE resuspendiert. Der nach dem Ausfällen der RNS verbleibende Überstand enthielt die DNS, welche, wie oben mit Natriumacetat und Isopropanol ausgefällt und pelletiert [φ3] wurde. Das DNS-Pellet wurde ebenfalls mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, [φ4], und nach dem Trocknen in 50-100 µl TE resuspendiert.

3.9.2 Isolation von RNS aus Pflanzengewebe (Trizol[®]-Methode)

RNS-Extraktionspuffer: 0,8 M Guanidiniumthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 0,1 M Natriumacetat pH 5,0, 5 % Glycerin, 38 % Phenol

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff mit etwas Seesand gemörsert und das entstandene Pulver in 10 V (1 ml/0,1g) RNS-Extraktionspuffer aufgenommen. Zur Extraktion wurde die Probe 1 min gemischt, 5 min bei RT inkubiert und nochmals 1 min gemischt. Es folgten ein Ausschütteln mit 0,2 ml Chloroform (20 s) und eine weitere Inkubation (5 min, RT; φ5). Durch die Zugabe von 0,5 ml Isopropanol kam es zum Ausfällen der RNS (10 min, RT). Diese wurde abzentrifugiert (φ3), das Pellet gewaschen und getrocknet. Die RNS wurde in 30 µl Wasser durch Erhitzen gelöst (10 min, 65°C).

3.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm am UV-Spektrometer bestimmt. Eine optische Dichte von 1 ($OD_{260}=1$) entspricht dabei für DNS einer Konzentration von 50 µg/ml und für RNS 40 µg/ml. Die Proben wurden vor der Messung fünfzigfach verdünnt.

3.11 Sequenzierung von DNS

Die Methode beruht auf dem durch den Einbau von Didesoxynukleotiden herbeigeführten Kettenabbruch in einer Polymerasekettenreaktion (Sanger et al., 1977). Die Detektion kann aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffmarkierungen der ddNTPs erfolgen. Die PCR-Produkte werden in einer Kapillargelelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und anhand ihrer Endmarkierung mit einem Laser detektiert.

Die Markierungsreaktion erfolgte nach dem BigDye V 1.1.-Protokoll der Firma Applied Biosystems wobei sowohl PCR-Produkte, als auch Plasmid-DNS als Template fungierten. Die

Produkte der Markierungs-PCR wurden über Sephadex G-50 Superfine-Säulchen aufgereinigt. Die eigentliche Sequenzierung, d.h. die Kapillarelektrophorese und Detektion der Fluoreszenz-Marker erfolgte mit einem der oben genannten Sequenzierer (2.11). Die Sequenzen wurden mit den Programmen Chromas und dem DNASTar-Softwarepaket ausgewertet und gegebenenfalls mit anderen Sequenzen verglichen (Internet-Blast: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.12 Southern Blot-Analyse

Mit Hilfe des Southern Blots (Southern, 1975) und anschließender Analyse lassen sich mit spezifischen Sonden Gene oder bestimmte Abschnitte davon in genomischer DNS nachweisen. Sie dient unter anderem der Bestimmung der Kopienzahl eines Genes im Genom.

3.12.1 Southern Blotting

Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl, 1 M Tris/HCl pH 7,4
Transferpuffer:	6-10 x SSC
Striplösung:	0,1 % SDS, 4 µM EDTA

5-10 µg der nach der Methode der Nukleinsäureextraktion aus Pflanzen mit Phenol/Chloroform (3.9.1) gewonnenen genomischen DNS wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen (je 50 u) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl mindestens 8 h verdaut. Die geschnittene DNS wurde durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und im Gel denaturiert, so dass sie einzelsträngig vorlag. Dazu wurde das Gel auf einem Plattformschüttler mehrmals in 0,2 N HCl inkubiert (20 min). Anschließend folgten Inkubationen in je 10 Gelvolumen Denaturierungslösung (45 min) und Neutralisierungslösung (3 x 15 min). Für die spätere Analyse musste die denaturierte DNS durch Kapillartransfer (Sambrook et al., 1989) mit Transferpuffer aus dem Gel auf eine Nylonmembran (2.3) übertragen und durch UV-Fixierung ($\lambda=254$ nm) daran gebunden werden.

3.12.2 Radioaktive Markierung der Sonden

Genspezifische radioaktive Sonden wurden mit willkürlich bindenden („random“) Primern an dem nachzuweisenden Gen mit verschiedenen DNS Labeling Systemen (2.2) synthetisiert und über ProbeQuant™ G-50 Mikrosäulen gereinigt. Die Markierung der Sonde für die Southern und Northern Blot Analyse erfolgte über den Einbau von α -³²P-dATP.

3.12.3 Hybridisierung und Analyse des Southern Blots

50 x Denhardt:	1 % w/v BSA, 1 % w/v lösliches PVP 25, 1 % v/v Ficoll 400
Hybridisierungslösung:	1 x Denhardt, 5 x SSC, 0,5 % SDS 100 µg/ml denaturierte Fischsperma-DNS

Bei der Southern Blot Analyse bildet die auf dem Blot gebundene, durch Denaturierung in Einzelstränge aufgespaltene DNS mit der ebenfalls denaturierten, radioaktiven Sonde Doppelstränge. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Membran 0,5-4 h mit

Express Hyb[®] Hybridization Solution (2.3) oder Denhardt-Hybridisierungslösung bei 60°C prähybridisiert. Nach Zugabe der denaturierten Sonde (5 min, 95°C) erfolgte die mindestens vierstündige Hybridisierung bei 60°C. Die Membran wurde durch mehrmalige Inkubation in zwei Waschlösungen von unstringent gebundener Sonde und Hybridisierungslösung gereinigt.

Waschlösung 1: 2 x SSC, 0,1 % SDS 3 x15 min, 60°C

Waschlösung 2: 0,2 x SSC, 0,1 % SDS 2 x15 min, 60°C

Der Nachweis der gebildeten Hybride erfolgte durch Detektion der von ³²P abgegebenen, radioaktiven Strahlung auf Phosphorimagerplatten. Diese wurden am Storm Scanner „gelesen“ und mit der zugehörigen Software entwickelt, so dass ein Bandenmuster erkennbar war. Die Identifizierung der Banden auf dem Blot erfolgte anhand der Laufstrecke des Markers durch Ausmessen. Die auf der Membran gebundene DNS konnte mehrfach markiert werden, wenn gebundene Sonden durch Waschen mit Striplösung entfernt worden waren (15 min, 95°C).

3.13 Northern Blots und ihre Analyse

Mit Hilfe der Northern Blot Analyse ist es möglich, die Stärke der Expression eines Genes auf RNS-Ebene zu quantifizieren. Im Gegensatz zur Southern Blot Analyse beruht die Markierung dabei auf der Bildung von RNS-DNS-Hybriden zwischen radioaktiver Sonde und der auf dem Blot gebundenen RNS.

Die denaturierten RNS-Proben wurden im Formaldehydagarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt (3.3), durch Kapillartransfer (Sambrook et al., 1989) auf eine Nylonmembran (2.3) übertragen und fixiert. Die Membran wurde wie bei der Southern Blot Analyse behandelt, allerdings betrug die Temperatur bei allen Schritten zwischen 63°C und 68°C. Die Auswertung erfolgte ebenfalls über die Detektion der gebundenen Radioaktivität.

3.14 Aufreinigung heterolog in *Escherichia coli* exprimierter His-tag-Proteine

His-tag-Lysispuffer (HLP): 50 mM Tris/HCl pH 7, 500 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10 % v/v Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 % v/v Tween 20, 750 µg/ml Lysozym

His-tag-Waschpuffer (HWP): 50 mM Tris/HCl pH 7, 500 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10 % v/v Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol

His-tag-Elutionspuffer (HEP): 50 mM Tris/HCl pH 7, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 10 % v/v Glycerin, 10 mM β-Mercaptoethanol

Enzymlagerungspuffer (ELP): 100 mM Tris/HCl pH 7,5

Durch die Klonierung in die Expressionsvektoren wurde an die zu exprimierenden Gensequenzen 5' oder 3' die Sequenz eines polyHis-tags angefügt, der aus sechs bis acht Histidinresten bestand. Die heterolog exprimierten polyHis-tag-Proteine wurden mittels Metall-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Das Prinzip der Reinigung beruht auf der Bindung der

negativ geladenen Histidine an immobilisierten Kationen. Das hier genutzte BD Talon Metal Affinity Resin nutzt dazu Cobaltionen. Der Zellaufschluss wurde mit dem Säulenmaterial inkubiert, so dass die Proteine gebunden werden konnten. Nach der Bindung wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen der Säule entfernt und das gereinigte Protein von der Säule eluiert. Um das sowohl im Waschpuffer, als auch im Elutionspuffer enthaltene Imidazol zu entfernen, ist die gereinigte Enzymfraktion zur Lagerung umgepuffert worden.

3.14.1 Heterologe Expression

Eine 50 ml Vorkultur aus einer Einzelkolonie wurde in LB-Medium, dem 1 % Glukose und Antibiotikum zugesetzt worden waren, bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0.6-1.0$ bei 28°C oder 37°C schüttelnd wachsen lassen. Die Kultur konnte bis zu ihrem Gebrauch bei 4°C gelagert werden. Der Startkultur wurden 950 ml auf 37°C erwärmtes LB-Medium + Antibiotikum zugeführt. Die Expressionskultur wurde dann bei 37°C geschüttelt, bis eine $OD_{600} = 0.6$ erreicht wurde. Nachdem die Kultur 5 min auf Eis abkühlte, wurde mit 1 mM IPTG die Expression des Proteins induziert. Bei einer optimierten Expressionstemperatur ($16-37^{\circ}\text{C}$) wurde die Kultur im Folgenden zwischen 4 und 16 h schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde in 4 x 250 ml portioniert und die Zellen 10 min bei 4°C und $10000 \times g$ pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen in 20 ml HLP/I Expressionskultur suspendiert.

3.14.2 Lyse der Bakterien

Die in HLP gelösten Zellen wurden 1 h auf Eis inkubiert, so dass das im Puffer enthaltene Lysozym die Zellen andauen konnte. Anschließend wurde die Zellsuspension 2×30 s mit Ultraschall behandelt. Durch Zentrifugieren (20 min, $12000 \times g$, 4°C) wurden die entstandenen Zelltrümmer vom Bakterienlysate abgetrennt. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine.

3.14.3 Proteinreinigung mit Talon Resin

2 ml der Talonsuspension (= 1 ml Talonmaterial) wurden bei $700 \times g$ 2 min zentrifugiert und 2 x mit 10 ml His-tag-Waschpuffer (HWP) gewaschen. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml des Bakterienlysates aufgenommen. Diese Suspension wurde 20-60 min vorsichtig auf einem Plattformschüttler bewegt, so dass der am Protein vorhandene His-tag durch die Ionen des Talon Resin gebunden werden konnte. Das Talonmaterial wurde abzentrifugiert ($700 \times g$, 5 min), 2 x in ~ 14 ml HWP resuspendiert und je 10 min auf dem Plattformschüttler gewaschen. Das gewaschene Talonmaterial wurde in 1 ml HWP resuspendiert und in eine 2 ml gravitationsgetriebene Durchflusssäule überführt. Nachdem sich das Säulenmaterial gesetzt hatte, wurde es nochmals mit 5 ml HWP gewaschen. Daraufhin konnte das Protein mit 5 ml HEP von der Säule eluiert und in 5×1 ml Fraktionen gesammelt werden. Der Proteingehalt in den einzelnen Fraktionen wurde mittels Proteinassay bestimmt (3.16).

3.14.4 Entsalzen und Umpuffern mit PD-10-Säulen

Die von der Talonsäule eluierten Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden vereint, und über eine Sephadex G-25-Säule (PD-10) laut Herstellerprotokoll entsalzt, wodurch das Enzym gleichzeitig zur Lagerung (ELP) umpuffert wurde.

3.15 Gewinnung von Bakterienrohextrakten

Für Rohextraktmessungen wurden die Bakterienrohextrakte aus 25-ml-Kulturen gewonnen, die mit 1 mM IPTG 1 d bei 16°C wuchsen. Die Zellen wurden pelletiert und in 1,5 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,5 aufgenommen. Der Aufschluss erfolgte durch Inkubation mit Lysozym (1 h auf Eis) und Ultraschall (2 x 30 s). Die Zelltrümmer und andere Bestandteile wurden 10 min bei 3095 x g (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand bildete den Rohextrakt.

3.16 Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Anlehnung an das von Bradford entwickelte Protokoll photometrisch bei 595 nm mit Bradford Reagenz oder BioRad Protein Assay Lösung nach Angaben des Herstellers. Als Eichstandard diente eine Rinderserumalbuminverdünnungsreihe von 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml (Bradford, 1976).

3.17 SDS-PAGE und Coomassie Blue Färbung

Um die Expression von Proteinen und ihre Aufreinigung visuell verfolgen zu können, wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie Blue Färbung verwendet (Laemmli, 1970; Sambrook et al., 1989).

3.18 Enzymtests

Der Enzymassay zur Charakterisierung der Coclaurin-*N*-Methyltransferase hatte die folgende Zusammensetzung (Choi et al., 2001):

- 100 mM K-Phosphatpuffer, pH 7,0
- 2,5 mM Natriumascorbat 0,5 M
- 100 µM Substrat
- 1 mM S-Adenosyl-L-Methionin; darin enthalten [Methyl-¹⁴C] S-Adenosyl-L-Methionin (20000cpm)

0,0125 µg gereinigtes Enzym/µl Reaktionsansatz; entsprechend 5 µl Enzym der Konzentration 0,125 µg/µl in einem 50 µl Reaktionsansatz

Die Reaktionszeit wurde auf 12,5 min bei einer Reaktionstemperatur von 30°C festgelegt. Einem 50 µl-Ansatz wurden 5 µl gereinigten Proteins der Konzentration 0,125 µg/µl zugesetzt. Die Reaktion wurde mit 70 µl 1 M NaHCO₃ gestoppt und die Alkaloide anschließend mit 200 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Während der Reaktion übertrug das Enzym die ¹⁴C- Methylgruppe

des SAM unter Bildung von SAH auf das Substrat. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Einbaurate der ^{14}C -Methylgruppe, die nach Messung im Szintillationszähler berechnet wurde.

Die Enzymtests mit der Stylopin-*N*-Methyltransferase wurden ebenfalls angelehnt an das von Choi et al. (2001) genutzte Protokoll durchgeführt. Es wurden aber keine gereinigten Enzyme, sondern Bakterienrohextrakte (3.15) verwendet. In einem 150 μl -Reaktionsansatz wurden als Puffer aber 100 mM Tris/HCl pH 8,0 genutzt und 100 μl Enzymrohextrakt eingesetzt.

3.19 LC-MS (TOF) - Massenspektrometrische Analysen

Zur Analyse von Substraten und Produkten in den Enzymreaktionsansätzen wurden die extrahierten Alkaloide massenspektrometrisch untersucht. Dadurch war es möglich, die Produkte und die Position der Methylierung im Molekül zu identifizieren.

Lösung A: $\text{H}_2\text{O} + 2\% \text{ Acetonitril} + 0,2\% \text{ HCOOH}$

Lösung B: $\text{Acetonitril} + 2\% \text{ H}_2\text{O} + 0,2\% \text{ HCOOH}$

Gradient: 0 min: 0 % B; 25 min: 46 % B; 26-33 min: 90 % B; ab 35 min: 0 % B

Die LC-MS (TOF)-Daten wurden mit einem Massenspektrometer, das mit einer Turbulon Spray Quelle in Kombination mit einer HPLC ausgerüstet war, erhalten. Die Fließmittel der HPLC waren die Lösungen A und B mit dem angegebenen Gradienten. Die Flussrate betrug 0,2 ml/min. Es wurde eine Superspher 60 RP- select B Säule mit einer Länge von 125 mm und einem Innendurchmesser von 2 mm genutzt. Die Partikel hatten eine Größe von 5 μm . Das Volumen der injizierten Probe betrug 2 μl .

Die Massenspektren wurden mittels Elektro-Spray-Ionisierung (ESI) und einem Time-of-Flight (TOF) Detektor generiert. Dabei arbeitete das Massenspektrometer im Positiv-Ionen Modus. Die Flussraten der Gas-Parameter waren wie folgt definiert: N_2 -Schutzgas: 1,5 l/min, N_2 -Spraygas: 0,5 l/min und N_2 -Heizgas: 7 l/min. Das Potential der Ionenquelle betrug 5,5 kV, der Einlass-Spannung 180 V und der Detektorspannung 1,95 kV. Die Temperaturen waren 140°C für den Quadrupol und 350°C für das Heizgas der Turbulon Spray Quelle.