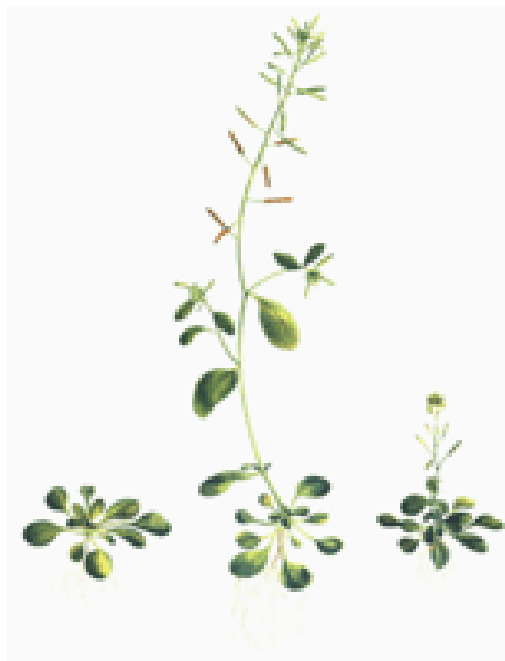


Entwicklungsbiologie der Pflanzen biol 130

WS 2017/2018



Prof. Dr. Margret Sauter
und Mitarbeiter

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Versuchsplan der einzelnen Kurstage	3
 Versuch	
1 Auftrennung von Proteinen über SDS-PAGE	4
2 Analyse der Homozygotie von T-DNA-Insertionsmutanten über PCR	7
3 Expressionsanalyse mittels RT-PCR	9
4 Analyse von Wurzelwachstum bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
5 Analyse der auxininduzierten Genexpression	13
6 Analyse des Ethylensignalweges über Mutantanalysen	14
7 Reproduktion und Zelltod bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	15

Versuchsplan

	Versuch
Kurstag 1	1
Kurstag 2	1 + 2
Kurstag 3	1 + 2 + 4
Kurstag 4	3 + 5
Kurstag 5	3 + 5 + 6
Kurstag 6	3 + 7

Bitte mitbringen:

Kittel
Pinzette
Rasierklingen
Lineal
Taschenrechner
Schutzbrille
Millimeterpapier

Versuch 1

Auftrennung von Proteinen über SDS-PAGE

👁 **Unbedingt Schutzbrille und Handschuhe tragen!**

Ziel des Versuchs

In diesem Experiment sollen Proteine aus Spross und Wurzel von *Arabidopsis thaliana* isoliert und anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt werden.

Proteinextraktion

Gesamtproteinextrakt wird aus Blatt- bzw. Wurzelmaterial von zwei Wochen alten Pflanzen isoliert.

1. Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver mörsern. Anschließend das Pulver in ein vorgekühltes 2 ml Reaktionsgefäß überführen.
2. Das Pulver in 1 ml kalten Extraktionspuffer auftauen lassen und kurz vortexen.
3. Die Proben für 20 min auf Eis inkubieren.
4. 3 min bei 4°C und 200 g zentrifugieren.
5. Überstand in neues, vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.
6. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.

Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Erstellung einer Eichreihe werden aus einer 1 mg/ml BSA-Stammlösung sechs 800 µl Ansätze hergestellt, die entsprechend 0 µg; 2,5 µg; 5 µg; 7,5 µg; 10 µg bzw. 15 µg BSA enthalten. Von den zu messenden Proteinproben werden 5 µl auf 800 µl aufgefüllt.

Anschließend wird zu jedem Ansatz 200 µl Bradford Reagenz gegeben und sofort gevortext. Nach 20 Minuten Inkubation wird die A_{595} bestimmt und anhand der Eichreihe die Proteinkonzentration der Proben ermittelt. Die Proteinproben werden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

	Eichreihe						3xWurzel 3xSpross
BSA	0 µg	2,5 µg	5 µg	7,5 µg	10 µg	15 µg	--
H ₂ O	800 µl	797,5 µl	795 µl	792,5 µl	790 µl	785 µl	795 µl
Proben	--	--	--	--	--	--	5 µl
Bradford	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Am folgenden Kurstag

1. Die Glasplatten gründlich mit Ethanol reinigen.
2. Das Trenngel gießen und anschließend vorsichtig mit Wasser überschichten.
3. Nach dem Auspolymerisieren (ca. 20 Minuten) das Wasser abgießen, den Kamm einsetzen und das Sammelgel gießen.
4. Die Gelkammer vorbereiten. Als Laufpuffer wird 1x Laemmli-Puffer verwendet. Beim Einsetzen des Gels in die Kammer Luftblasen unter dem Gel vermeiden!
5. 10 µg Protein mit 2,5 µl Proteinladepuffer versetzen und für 2-3 Minuten bei 95°C denaturieren.
6. Die Proben kurz zentrifugieren, dann die gesamten 10 µg auf das Proteingel auftragen.
7. Bis die Proben in das Trenngel gelaufen sind, werden die Gele bei 10 mA, danach bei 25 mA pro Gel laufen gelassen.
8. Nach dem Ende des Laufs untere linke Ecke markieren.

Trenngel	H ₂ O	1,67 ml
	1,5 M Tris, pH 8,8	1,25 ml
	30% (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	2,10 ml
	10% (w/v) APS	20 µl
	TEMED	6,1 µl

Sammelgel	H ₂ O	1,93 ml
	0,5 M Tris, pH 6,6	0,83 ml
	30% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	0,53 ml
	10% (w/v) APS	50 µl
	TEMED	5 µl

Extraktionspuffer	50 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 % Triton X-100 1 mM EDTA
4x Proteinladepuffer	40 % (v/v) Glycerin 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol 9 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat 250 mM Tris, pH 6,8 1 Spatelspitze Bromphenolblau
1x Laemmli Laufpuffer	0,25 M Tris 1,92 % Glycin 1 % (w/v) SDS

Färben der Gele mit Coomassie-Färbelösung

Die Gele werden aus der Apparatur entnommen und 15 Minuten in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend werden die Gele mindestens 30 Minuten in Entfärbelösung inkubiert. Bis zum folgenden Kurstag werden die Gele in Wasser gelagert.

Färbelösung	50 % Methanol 7 % Essigsäure 0,25 % Coomassie R250
--------------------	--

Entfärbelösung	40 % Methanol 7 % Essigsäure 3 % Glycerin
-----------------------	---

Versuch 2

Analyse der Homozygotie von T-DNA-Insertionsmutanten über PCR

Ziel des Versuchs

In diesem Versuch sollen über PCR und anschließende Gelelektrophorese homozygote T-DNA-Insertionsmutanten identifiziert werden.

Dazu wird zunächst DNA aus Wildtyp und T-DNA-Insertionsmutanten von *Arabidopsis thaliana* isoliert.

1. Es wird jeweils ein Blatt in ein Reaktionsgefäß gegeben und sofort mit 400 µl Extraktionspuffer versetzt.
2. Das Blattmaterial wird mit einem Mikropistill so lange zerkleinert, bis die Probe möglichst homogen ist.
3. Es wird bei maximaler Geschwindigkeit fünf Minuten zentrifugiert und dann 300 µl Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.
4. Dazu werden 300 µl Isopropanol gegeben und durch Invertieren gemischt.
5. Anschließend wird bei maximaler Geschwindigkeit fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.
6. Das Pellet wird mit 500 µl 70%igem Ethanol überschichtet, fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet.
7. Abschließend wird das Pellet in 50 µl Wasser eluiert.
8. Im Anschluss werden Polymerasekettenreaktionen (PCRs) angesetzt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Ansatz auf Eis pipettieren!

PCR-Ansatz

10xPCR-Puffer	2 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10 µM Vorwärtsprimer	1 µl
10 µM Rückwärtsprimer	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
DNA	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	1 min	} 35 Zyklen
Primeranlagerung	55 °C	1 min	
Strangverlängerung	72°C	1 min	
Abschließende Elongation	72°C	5 min	

DNA-Gelelektrophorese

Am kommenden Kurstag wird die über PCR amplifizierte DNA über 1% (w/v) Agarosegele in 1xTris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) mit dem DNA-/RNA-Farbstoff Midori Green elektrophoretisch aufgetrennt (**Dabei bitte Handschuhe tragen!**). Als Laufpuffer wird 1xTAE verwendet. Pro Geltasche werden 20 µl aufgetragen. Als Größenstandard wird *Smart Ladder* mit einem Größenbereich von 200 bp bis 5000 bp verwendet.

Versuch 3

Expressionsanalyse mittels RT-PCR

- 👁️ Unbedingt Schutzbrille und Handschuhe tragen!**
- Das TRI Reagenz enthält Phenol!**

Ziel des Versuchs

In diesem Versuch soll mittels reverser Transkription und anschließender PCR und Gelelektrophorese die An- bzw. Abwesenheit von Transkripten (mRNAs) verschiedener Gene in Wildtyppflanzen und T-DNA-Insertionsmutanten analysiert werden.

RNA wird aus jeweils zwei Blättern Wildtyppflanzen beziehungsweise T-DNA-Insertions-mutanten isoliert.

1. Zu den Blättern werden jeweils 500 µl TRI Reagenz hinzugefügt und das Blattmaterial mit einem Mikropistill so lange zerkleinert, bis die Probe möglichst homogen ist.
2. 5 min bei RT inkubieren.
3. 100 µl Chloroform zufügen, kurz auf dem Vortex mischen und 3 min bei RT inkubieren.
4. 15 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugieren.
5. Obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen. 125 µl Isopropanol und 125 µl „High-Salt Solution“ hinzufügen und mischen.
6. 10 min bei RT inkubieren.
7. 10 min bei 12.000 x g zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
8. Pellet mit 500 µl 70% Ethanol überschichten, 5 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugieren.
9. Überstand vollständig abnehmen und das Pellet ungefähr 5 bis 10 min bei RT trocknen lassen.
10. Anschließend in 20 µl autoklaviertem H₂O auf dem Vortexer resuspendieren und durch 10 min Inkubation bei 60°C vollständig lösen. Proben auf Eis lagern.

Photometrische Konzentrationsbestimmung

- 3 µl der RNA Probe mit autoklaviertem H₂O auf 300 µl auffüllen und in eine Quarzküvette pipettieren.
- Absorptionen bei E₂₆₀, E₂₈₀ und E₃₂₀ bestimmen und notieren.
- Der Quotient E₂₆₀/E₂₈₀ ist ein Maß für die Sauberkeit der isolierten RNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Absorption bei 320 nm gibt den Hintergrund an.
- Aus der Absorption bei 260 nm errechnet sich die RNA-Konzentration nach folgender Formel:

$$\mu\text{g RNA/}\mu\text{l} = (E_{260} - E_{320}) \times 0.04 \text{ (Konstante)} \times 100 \text{ (Verdünnung)}$$

- 1µg RNA werden revers in cDNA umgeschrieben.

Reverse Transkription:

1 µg RNA
4 µl 5xRT-Puffer
1 µl dNTPs
0,5 µl oligo dT
0,5 µl Reverse Transkriptase
ad 20 µl H₂O

60 min bei 42°C inkubieren, dann für 10 min auf 70°C erhitzen.

Anschließend werden die PCRs mit je 1 µl cDNA durchgeführt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Ansatz auf Eis pipettieren!

PCR-Ansatz

10 x PCR-Puffer	2 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10 µM Vorwärtsprimer	1 µl
10 µM Rückwärtsprimer	1 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl
cDNA	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	1 min	} 35 Zyklen
Primeranlagerung	55 °C	1 mi	
Strangverlängerung	72°C	1 min	
Abschließende Elongation	72°C	5 min	

DNA-Gelelektrophorese

Am kommenden Kurstag wird die über PCR amplifizierte DNA über 1% (w/v) Agarosegele in 1xTris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) mit dem DNA-/RNA-Farbstoff Midori Green elektrophoretisch aufgetrennt (**Dabei bitte Handschuhe tragen!**). Als Laufpuffer wird 1xTAE verwendet. Pro Geltasche werden 20 µl aufgetragen. Als Größenstandard wird *Smart Ladder* mit einem Größenbereich von 200 bp bis 5000 bp verwendet.

Versuch 4

Analyse von Wurzelwachstum bei *Arabidopsis thaliana*

Ziel des Versuchs

Es soll das Wurzelwachstum bei *Arabidopsis thaliana* nach Behandlung mit verschiedenen Phytohormonen analysiert werden.

Dazu werden Keimlinge, die das *Cyca1;1:GUS*-Konstrukt tragen, mit verschiedenen Behandlungen angezogen:

1. Kontrolle
2. 10 μ M ACC
3. 1 μ M NAA

Cyca1;1:GUS-Samen werden auf entsprechendem $\frac{1}{2}$ MS-Medium ausgelegt und zwei Tage bei 4°C stratifiziert und anschließend 5 Tage unter Langtagbedingungen (16 h Licht und 8 h Dunkel) bzw. ausschließlich im Dunkeln bei 22°C angezogen.

Die GUS-Färbung wird wie in Versuch 5 beschrieben von den Kursleitern durchgeführt und die Proben am folgenden Kurstag mikroskopiert und analysiert.

Versuch 5

Analyse der auxininduzierten Genexpression über Promotor:GUS-Analysen

Ziel des Versuchs

Es soll die Induktion der Genexpression durch Auxin über das Reportergenkonstrukt *DR5:GUS* analysiert werden.

Anzucht und Behandlung der Keimlinge

Saatgut der *DR5:GUS* Mutanten wird auf feuchtem Filterpapier in Petrischalen ausgelegt. Die Petrischalen werden für zwei Tage stratifiziert und anschließend 5 Tage unter Langtagbedingungen (16 h Licht und 8 h Dunkel) bei 22°C gehalten.

Die Keimlinge werden 24 h vor dem Kurstag mit 10 µM 1-NAA, 10 µM NPA bzw. Wasser behandelt.

GUS-Färbung

Zunächst wird das Pflanzenmaterial in ein 2ml-Reaktionsgefäß gegeben und 5 min in 1,5 ml 90 %igem (v/v) Aceton geschüttelt. Danach wird das Aceton entfernt und die Keimlinge 5 min in 1,5 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 geschüttelt. Anschließend wird der Puffer entfernt und die Pflanzen mit 1 ml X-Gluc-Färbelösung versetzt. **Dabei bitte Handschuhe tragen!** Die Proben werden so lange vakuumfiltriert, bis keine Blasen mehr aus dem Reaktionsgefäß aufsteigen (ungefähr 5 bis 10 Minuten). Die Ansätze werden für 30 bis 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird überprüft, ob eine Blaufärbung zu beobachten ist, ansonsten wird die Inkubationszeit verlängert. Nach der Färbung werden die Keimlinge zwei Mal mit Wasser gespült und dann unter dem Binokular betrachtet.

Färbepuffer	0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2
	0,2% (v/v) Triton X-100
	2 mM Kaliumeisen(III)cyanid
	2 mM Kaliumeisen(II)cyanid
	2 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronsäure-Färbelösung

Versuch 6

Analyse des Ethylensignalweges

Ziel des Versuchs

In diesem Versuch soll die Wirkung des Phytohormons Ethylen auf etiolierte Arabidopsiskeimlinge untersucht werden.

Durchführung:

Dazu werden Keimlinge verschiedener Arabidopsismutanten mit verschiedenen Behandlungen angezogen:

1. Kontrolle
2. 10 μ M ACC
3. 5 ppm MCP

Die Samen werden auf entsprechendem $\frac{1}{2}$ MS-Medium ausgelegt und zwei Tage bei 4°C stratifiziert und anschließend 4 Tage im Dunkeln bei 22°C angezogen.

Dazu werden die folgenden Genotypen verwendet:

1. Wildtyp
2. *eto3*
3. *ein2*
4. *ctr1*

Die Keimlinge werden unter einem Binokular und Mikroskop phänotypisch charakterisiert.

Versuch 7

Reproduktion und Zelltod bei *Arabidopsis thaliana*

👁 **Unbedingt Handschuhe tragen!**

Evans-Blau ist giftig!

Ziel des Versuchs

Es sollen verschiedene Stadien der reproduktiven Phase einer Pflanze analysiert und Zelltodprozesse visualisiert werden.

Analyse verschiedener Blütenstadien

Der Aufbau der Arabidopsisblüte wird in der Vorbesprechung des Kurses besprochen und die verschiedenen Stadien der Blütenentwicklung vorgestellt. Dies soll an Hand von Blüten unterschiedlicher Stadien untersucht werden. Darüber hinaus werden Schoten unterschiedlicher Entwicklungsstufen mit einer Rasierklinge längs geschnitten und befruchtete und unbefruchtete Ovulen untersucht.

Evans-Blau-Färbung

Um Zelltod während der Blütenentwicklung vor und nach der Befruchtung zu analysieren, werden Blüten für drei Minuten in einer 2%-igen (w/v) Evans-Blau-Lösung gefärbt und danach 2 Mal in Leitungswasser gewaschen. **Dabei bitte Handschuhe tragen!**

Evans-Blau ist ein Totfarbstoff, durch welchen Zellen ohne intakte Plasmamembran blau angefärbt werden.