



Jürgen Henrich (Autor)

**Erstellung segmentspezifischer molekularer Marker
mittels Mikrodissektion und physikalische Kartierung
der Resistenz gegen Schadinsekten (*Diatraea* spp.)
bei tropischem Mais (*Zea mays* L.)**

Jürgen Henrich

**Erstellung segmentspezifischer molekularer
Marker mittels Mikrodissektion
und physikalische Kartierung der Resistenz
gegen Schadinsekten (*Diatraea* spp.) bei
tropischem Mais (*Zea mays* L.)**

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/4021>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	v
1. Einleitung	1
2. Material	6
2.1. Pflanzenmaterial	6
2.2. Bakterienstämme	6
2.3. Chemikalien	7
2.4. Nukleinsäuren	8
2.5. Enzyme	9
2.6. Reaktionssysteme	9
2.7. Verbrauchsmaterial	10
2.8. Geräte	10
2.9. Fotomaterial	11
3. Methoden	12
3.1. Pflanzenanzucht	12
3.2. Fixierung von Ausgangsmaterial zur Chromosomenpräparation	13
3.2.1. Antherenfixierung	13
3.2.2. Wurzelfixierung	13
3.3. Präparation von Chromosomen	13
3.3.1. Pachytänchromosomen	13
3.3.2. Mitotische Metaphasechromosomen	14
3.4. Mikrodissektion	16
3.4.1. Vorbereitung von Glasnadeln und Objektträgern	16
3.4.2. Isolierung von Chromosomensegmenten	16
3.5. Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente	17
3.5.1. Mikroamplifikation mittels Linkeradapter-PCR (LA-PCR)	17
3.5.1.1. Proteinase K-Behandlung	17
3.5.1.2. Restriktionsverdau und Linkeradapter-Ligation	17
3.5.1.3. Linkeradapter-PCR (LA-PCR)	18
3.5.2. Mikroamplifikation mittels ' <i>degenerate-oligonucleotide-primed-PCR</i> '	18

3.5.3. Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen bei der PCR-Amplifikation	20
3.6. Standardtechniken	20
3.6.1. Restriktionsverdau	20
3.6.2. Agarosegelelektrophorese	20
3.6.3. DNA-Transfer nach SOUTHERN	20
3.6.4. Koloniefilter	21
3.6.5. Dot-Blot Filter	21
3.6.6. Markierung von DNA	21
3.6.6.1. Nicktranslation	21
3.6.6.2. PCR-Markierung	22
3.6.7. DNA-DNA Hybridisierung, nichtradioaktiv	22
3.6.8. DNA-DNA-Hybridisierung, radioaktiv	22
3.6.9. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	23
3.7. Klonierung von LA-PCR-Produkten	23
3.7.1. Linearisierung und Dephosphorylierung von Plasmidvektoren	23
3.7.2. Ligation	24
3.7.3. Transformation	24
3.8. Herstellung von Linkeradaptoren	24
3.9. DNA-Isolierung	25
3.9.1. Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA	25
3.9.2. Isolierung genomischer Mais-DNA	25
3.10. Southern-Hybridisierung und genetische Kartierung von Klonen aus der Mikroamplifikation	26
3.11. Physikalische Kartierung molekularer Sonden	26
3.11.1. Analyse einer Cosmidbibliothek aus genomischer Mais-DNA	26
3.11.1.1. Sondenvorbereitung	27
3.11.1.2. Isolierung spezifischer Cosmidklone	27
3.11.2. Herstellung von Kompetitor-DNA für die <i>CISS</i> -Hybridisierung	28
3.11.2.1. <i>DNaseI</i> -Behandlung genomischer DNA	28
3.11.2.2. Herstellung von C_0t -1 DNA	29
3.11.3. Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	30
3.11.3.1. Vorbereitung der Chromosomenpräparate	30

3.11.3.2. Vorbereitung der Sonden	30
3.11.3.3. Hybridisierung	31
3.11.3.4. Signaldetektion	31
4. Ergebnisse	33
4.1. Präparation und Identifikation von Chromosomen	33
4.1.1. Pachytänchromosomen	33
4.1.1.1. Ausgangsmaterial	33
4.1.1.2. Präparation	35
4.1.1.3. Identifikation	35
4.1.2. Mitotische Metaphasechromosomen	36
4.1.2.1. Ausgangsmaterial	36
4.1.2.2. Präparation	36
4.1.2.3. Identifikation	37
4.2. Optimierung der Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente .	38
4.2.1. Bestimmung der Herkunft von DNA-Kontaminationen in der LA-PCR .	38
4.2.1.1. Mikrodissektion und -amplifikation mittels LA-PCR	38
4.2.1.2. Klonierung des LA-PCR Produktes	40
4.2.1.3. Analyse der Amplifikationsprodukte und der rekombinanten Klone	40
4.2.2. Verminderung der Amplifikation von DNA-Kontaminationen	43
4.2.2.1. Modifizierung der Mikroamplifikation mittels LA-PCR	43
4.2.2.2. Mikroamplifikation mittels ' <i>degenerate-oligonucleotide-</i> <i>primed-PCR</i> '	45
4.3. Mikroamplifikation mit optimiertem LA-PCR Protokoll	47
4.4. Analyse und Klonierung der Mikroamplifikationsprodukte	50
4.4.1. Relokalisation mittels <i>CISS</i> -Hybridisierung	50
4.4.2. Klonierung von LA-PCR Produkten	52
4.4.2.1. Transformation der LA-PCR Produkte zu segmentspezifischen DNA-Bibliotheken	53
4.4.2.2. Analyse der segmentspezifischen DNA-Bibliotheken	53
4.4.2.3. Bestimmung des Anteils B-chromosomenspezifischer Sequenzen in den Bibliotheken	55
4.4.3. Southern-Hybridisierungen vorselektierter Klone	56
4.5. Physikalische Kartierung molekularer Marker	59

4.5.1. Isolierung spezifischer Cosmidklone	59
4.5.2. <i>CISS</i> -Hybridisierung von Cosmidklonen	60
4.5.3. Vergleich zwischen genetischer Distanz und physikalischer Position molekularer Marker auf Chromosomen	65
5. Diskussion	68
5.1. Präparation, Mikrodissektion und -amplifikation von Chromosomen	68
5.1.1. Chromosomenmikrodissektion	68
5.1.2. Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente	70
5.2. Analyse und Klonierung der Mikroamplifikationsprodukte	74
5.2.1. Relokalisation mittels <i>CISS</i> -Hybridisierung	74
5.2.2. Erzeugung und Analyse segmentspezifischer DNA-Bibliotheken	75
5.3. Physikalische Kartierung molekularer Marker	79
5.3.1. <i>CISS</i> -Hybridisierung von Cosmidklonen zur physikalischen Kartierung	80
5.3.2. Vergleich zwischen genetischer und physikalischer Distanz molekularer Marker	82
5.4. Erstellung segmentspezifischer molekularer Marker mittels Mikrodissektion und physikalische Kartierung durch <i>CISS</i> -Hybridisierung? ..	84
6. Zusammenfassung	85
7. Literatur	88
<i>Curriculum vitae</i>	99