

## Analyse der Genexpression

### *RNA Isolierung aus Pflanzen*

#### 1) Einleitung

In der Forschung ist es oft nicht von alleinigem Interesse, welche Gene in einem Genom vorhanden sind, sondern auch, wann – während der Entwicklung eines Organismus, oder unter welchen Umweltbedingungen – selbige exprimiert werden. Wird ein Gen exprimiert, so liegt es zunächst immer als mRNA in der Zelle vor, die aber bei den meisten eukaryontischen Genen noch durch das „Aussplicen“ der Intronstrukturen fertig prozessiert werden muss.

Isoliert man nun die mRNA zu einem bestimmten Zeitpunkt, so lassen sich Rückschlüsse über die Regulation des Gens auf der Transkriptionsebene ziehen.

Die mRNA kann dann durch eine Reverse-Transkriptase-Reaktion in cDNA umgewandelt und durch eine PCR zur weiteren Untersuchung vervielfältigt werden. Durch die Auswertung der so erhaltenen Ergebnisse können sowohl Aussagen über die Intron-Exon-Struktur, als auch – allerdings durch andere Analyseverfahren – über die Genexpression gemacht werden.

In unserem Fall untersuchen wir die Intron-Exon-Struktur des Gens PmSUC3, welches in *Plantago major* für einen Saccharosetransporter codiert.

#### 2) Material

s. Skript, S.51, S.52 und S.54

#### 3) Methode

s. Skript, S.50ff

*Änderungen* des Skripts, S.53:

Anstelle der *drei* dort angegebenen Ansätze werden folgende *vier* zusammenpipettiert, mit denen aber dann wie im Skript beschrieben, weiter fortgefahren wird:

<b>RT-Ansatz</b>	<b>Kontrolle genomische DNA</b>	<b>Kontrolle cDNA</b>	<b>Kontrolle PCR (Mix: cDNA &amp; chrom. DNA)</b>
2µl <b>RT-Reaktion</b> 5µl PmSUC3-Primer-3' 5µl PmSUC3-Primer-5'	2µl <b>Plantago DNA</b> 5µl PmSUC3-Primer-3' 5µl PmSUC3-Primer-5'	2µl <b>SUC3-Plasmid</b> 5µl PmSUC3-Primer-3' 5µl PmSUC3-Primer-5'	2µl <b>Kontroll-Ansatz</b> 5µl PmSUC3-Primer-3' 5µl PmSUC3-Primer-5'
<i>Bahn 1-12</i>	<i>Bahn 2-12</i>	<i>Bahn 3-12</i>	<i>Bahn 4-12</i>

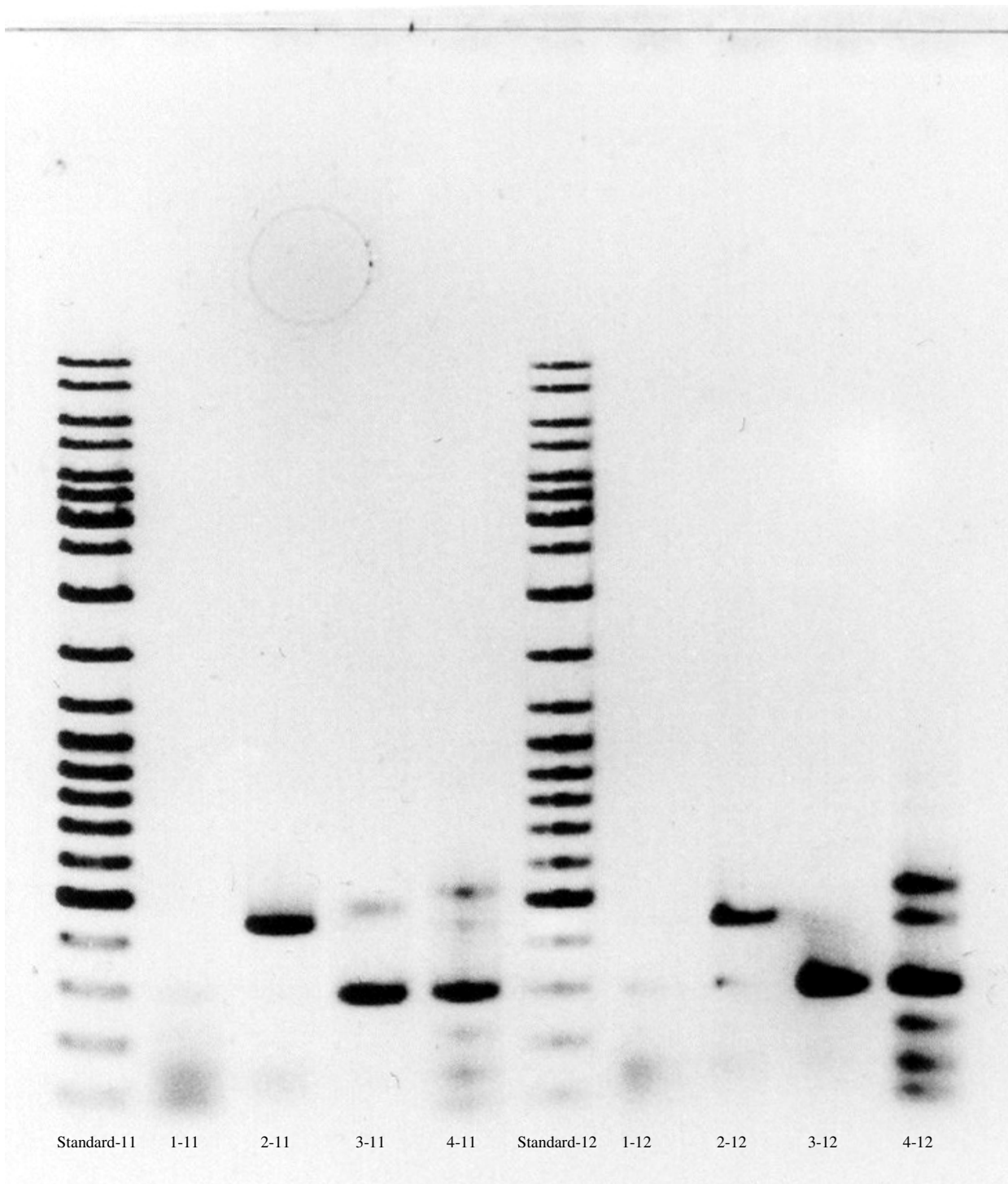
#### 4) Ergebnisse und Diskussion

Da das originale Photo des Agarose-Gels recht klein ist und somit beim Messen der Laufweiten eher Ungenauigkeiten auftreten, haben wir das Photo etwas vergrößert und die Bahnen beschriftet. Auf diese Vergrößerung (s. S.2) beziehen sich all unsere, im Folgenden verwendeten Messdaten aller Bahnen. Das originale Photo liegt diesem Protokoll auf Seite 4 bei.

*Anmerkung: Auf das Gel sind die Ansätze der Gruppen A11 und A12 (wir) aufgetragen worden. In diesem Protokoll werden lediglich die Bahnen behandelt und diskutiert, die die Gruppe 12 betreffen; das sind die rechten 4 Bahnen und der nächstliegende Längenstandard; alles bezeichnet mit X-12.*

Für die Größenbestimmung der Fragmente wurde zunächst der Logarithmus der Basenpaarzahlen der Banden des DNA-Standards gegen die Wanderungsstrecke der jeweiligen Banden im Gel graphisch aufgetragen, um eine Eichgerade für dieses Gel zu erhalten. Mit der Geradengleichung der Eichgeraden lassen sich dann aus den gemessenen Laufweiten der Banden der anderen Bahnen letztlich deren Basenpaarzahlen ermitteln.

#### 4.1) Photo des Agarose-Gels



#### 4.2) Laufweiten der Banden des DNA-Längenstandards

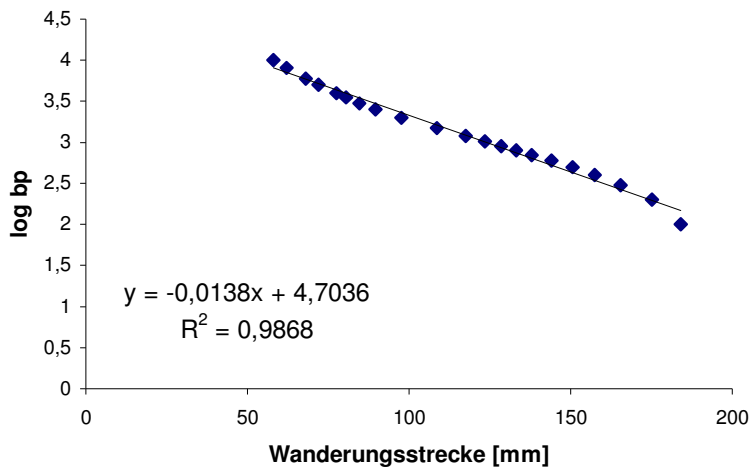
Bande in bp	log der bp	Laufweite [mm]
10000	4	58
8000	3,903	62
6000	3,778	68
5000	3,698	72
4000	3,602	77,5
3500	3,544	80,5
3000	3,477	84,5

2500	3,398	89,5
2000	3,301	97,5
1500	3,176	108,5
1200	3,079	117,5
1031	3,013	123,5
900	2,954	128,5
800	2,903	133
700	2,845	138
600	2,778	144
500	2,699	150,5
400	2,602	157,5
300	2,477	165,5
200	2,301	175
100	2	184

Aus diesen Laufweiten und den Logarithmen der Basenpaarzahlen ergibt sich dann folgender Graph. Die Geradengleichung der Regressionsgeraden  $y = -0,0138x + 4,7036$  kann nun zur Bestimmung der Fragmentgrößen aus den Laufweiten verwendet werden.

#### 4.3) Eichgerade

Wanderungsstrecke des DNA-Standards im Agarose-Gel



#### 4.4) Errechnete Fragmentgrößen

Bahn-Nr.	Wanderungsstrecke [mm]	Berechneter Logarithmus der bp	Fragmentgröße in bp
1-12	165,5	2,4191	<u>262,482</u>
	179,5 (aber recht verschmiert)	2,2259	<u>168,229</u>
2-12	153,5	2,5916	<u>390,481</u>
	165 (undeutlich)	2,4260	<u>266,686</u>
	179 (auch recht verschmiert)	2,2328	<u>170,923</u>
3-12	165,5	2,4191	<u>262,482</u>
4-12	147,5	2,6675	<u>465,050</u>
	153	2,5916	<u>390,481</u>
	165,5	2,4191	<u>262,482</u>
	171,5	2,3363	<u>216,920</u>
	178,5	2,2397	<u>173,660</u>
	183	2,1776	<u>150,522</u>

Für die fertig prozessierte mRNA ergibt sich ein Mittelwert von 263bp (aus den Bahnen 1-12, 3-12 und 4-12), der Literaturwert hierfür beträgt 292bp. Für die genomische DNA ergibt sich ein Wert von 391bp (aus den Bahnen 2-12 und 4-12), der Literaturwert liegt hier bei 439bp.

Mit unseren Messwerten ergibt sich eine Introngröße von  $(391\text{bp}-263\text{bp}) = 128\text{bp}$ . Aus den Literaturwerten ergibt sich eine Introngröße von **147bp**.

#### **4.5) Diskussion**

##### Bahn 1-12 (RT-Ansatz):

Normalerweise sollte hier nur eine Bande sein, nämlich die der intronfreien, durch RT-PCR aus der isolierten mRNA entstandenen cDNA des SUC3-Gens. Die untere, zudem ziemlich verschmierte Bande rührt wohl von Verunreinigungen mit in der Probe verbliebener chromosomaler DNA (durch unsauberes Arbeiten) her.

##### Bahn 2-12 (Kontrolle genomische DNA):

Die deutliche Bande (391bp) wird von dem SUC3-Gen mit Intron gebildet. Die darunter liegenden, aber sehr schwachen Banden sind wahrscheinlich ebenfalls auf Verunreinigungen zurückzuführen.

##### Bahn 3-12 (Kontrolle cDNA):

Die eine, sehr deutliche Bande wird von dem intronfreien Gen SUC3 gebildet.

##### Bahn 4-12 (Kontrolle PCR):

Die zweite Bande von oben wird von dem Gen SUC3 mit Intron gebildet, die dritte Bande von oben dagegen wird von dem SUC3-Gen ohne Intron gebildet. Die anderen Banden dieser Bahn sind wahrscheinlich Bruchteile oder Verunreinigungen.

### **5) Originales Photo des Agarose-Gels der Gruppen A11 und A12**

### **6) Molekularbiologische Denkaufgaben**

Die bearbeiteten Fragen sind auf den folgenden Seiten zu sehen.