

PCR rha_{BAD}; rhaSR_{BAD}; lsrR für OneT-1

- mit neuem Primern

3x Maskenmix (Sich 2; Seite 174)

10x KOD HS Buffer	15 µl
25 mM MgSO ₄	9 µl
2 mM dNTPs (aus kit)	15 µl
50 µg E.coli DNA	6 µl
KOD Hotstart Poly.	3 µl
	93 µl H ₂ O

Ausatze: je 47 µl Misch +

(1) je 1,5 µl p-rha-fw2
p-rha-rv2

(2) je 1,5 µl p-rhaSR-fw2
p-rha-rv2

(3) 1,5 µl p-lsrR-Nal-fw3
lsrR-Seal-rv3

PCR-Programm

(1) 95°C 2 min
95°C 20 s [30 x] 57°C 10 s
70°C 7 s]

(2) 2 min
20 s] 70 x 60°C 10 s [70 x] 22 s

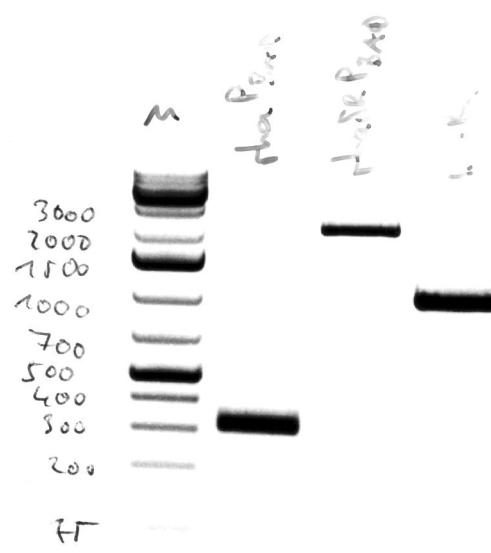
(3) 2 min
20 s] 70 x 4°C ∞ []

→ 1,5% Agarosegel

(1) (2) (3)

- PCR cleanup mit MN - Kit
- 2 x gewaschen
- mit 15 µl ddH₂O elutet

	<u>cly (µl)</u>
(1)	57,5
(2)	27
(3)	62,4



→ Verdunnen von (1) + (2) mit XbaI / NcoI

2 µl Buffer R

1 µl Xba I

2 µl Nco I

15 µl cleanup PCR ($\textcircled{1} = 862,5 \mu\text{g}$)
 $\textcircled{2} = 330 \mu\text{g}$)

→ 3h @ 37°C; 10 min @ 75°C

Verdunnen (3) mit SacI & NcoI

2 µl Buffer SacI

1 µl Sac I

2 µl Nco I

15 µl cleanup PCR ($\approx 937,5 \mu\text{g}$)

Laborbuch Nr./ Notebook no.	Fortsetzung von Seite/ Continued from page no.	Seite Nr./ Page number
3	Continued from page no.	3

- mit Tagf & Nach verdecktes Plasmid (20.11.12)

- 1) pCDT Not 1 (32,3 µl) 17µl
- 2) pAEC Not 1 (22,7 µl) 13µl

→ mit alkohol. Rehydratoren behandelt

→ 3µl FastAP buffer
 17/13 µl plasmid
 1µl FastAP
 und zu 30 µl H₂O } PCR cleanup in 25µl H₂O 23% / 60 µl

<u>PCR cleanup der Reaktionen</u> <u>G-B</u>	pCDT	13,5	6,03
- in 15µl H ₂ O elutet	pAEC	96,1	0,88
	(i)	22,8	1,1
<u>Cyberlink</u> : 1µl 74 Buffer	(ii)	73,0	0,7
2µl 74 Buffer	(iii)	30,5	1,74
2µl H ₂ O			

Reaktionen der PCR = oblate:

<u>pCDT (+)</u>	<u>pCDT (-)</u>	<u>pAEC (+)</u>	<u>pAEC (-)</u>
an 7,5µl	7,5µl	7,5µl	7,5µl
abzug 1µl	0µl	0µl	3µl
abzug 1µl	0µl	0µl	0µl
abzug 1µl	0µl	0µl	0µl
abzug 1µl	0µl	0µl	0µl
abzug 1µl	0µl	0µl	0µl

- 1h @ 22°C inkubiert; dann →
 ↳ 5 µl transformiert, Zelle in 500 µl SOC
 → 1h @ 37°C → 50 µl ausplattet
 → Platte in N. @ 37°C
 → auf alle Platte > 50 Kolonie (and be
 Negativkontrolle)

P

Einzeldaten von pCDF & pACYC mit Xgal
NcoI, dann Xgal

② Reaktion mit NcoI

pCDF

5 µl pCDF (@ 553 µg) = 2,77 µg
 2 µl Salki Tago
 2 µl NcoI
 add to 20 µl ddH₂O

pACYC

16 µl pACYC = 7,95 µg
 2 µl Salki Tago
 2 µl NcoI
 add

→ 3h @ 37°C; 15 min @ 65°C

→ über 97% transformiert und Reaktion
 abgeschlossen

→ über MN gel Clean up gereinigt (add in 75 µl eluent)

→ Eluat für 2 te Reaktion

	ng/µl	230 / 260
pACYC	31,9	97
pCDF	46,7	1,08

② Reaktion mit XgF

→ Erneut die erste Reaktion mit XgF verdaut

pCOF

25 µl Eluat
28 µl Buffer R
1 µl XgF E

pACFC

25 µl Eluat
2,3 µl Buffer R
1 µl XgF E

→ 3 h @ 37 °C, dann @ 65 °C

- über 0,7% Agarosegel getrennt und Blöte ausgedickt
- über IN GL Cleanup reinigt und mit 85 µl ddH₂O eluiert (mit stark Eluat nochmal eluiert)

	11,1	260/230
pACFC XgF, XgE	11,1	0,47
pCOF XgF, XgE	19,8	0,6

Vorarbeiten pACYC & pCDF mit Fast digest EnzymeMischung

18 µl dH₂O
 7 µl Fast XP
 1 µl NcoI FD
 1 µl EcoNI FD
 4 µl FD Buffer freen

pCDF

14 µl MM
 2 µl pCDF Ø^R
 (E^E/P^P)
 4 µl N₂O

pACYC

14 µl MM
 6 µl pACYC
 (E^E/P^P)

→ 15 min @ 37°C,
 20 min @ 70°C

- ~~the MN PCR cleanup gereinigt~~
- ant 0,7% Agarose mit auftrage
- beide ausgeschmolche und ~~the MN gell~~
 cleanup gereinigt (2x gewaschen, je 2 µl eluent)

7 µl 260/280

pACYC
 NcoI, EcoNI FD

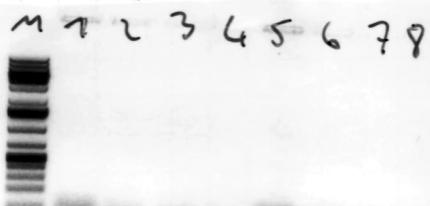
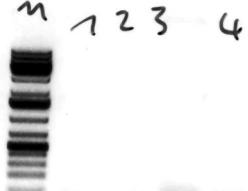
20,4

0,6

pCDF
 NcoI, EcoNI FD

28,9

0,1 (Sag!)

pACYCpCDF

21.12.2012 12:57:51

Cultivation of the BAC in FD Schwartz Reiter

pCDF rlaBAD

LB media
(28,9 ml)

1 ml

pCDF (-)

1 ml

lactose (38 mg/ml)

1 ml

0 ml

T4 lytic bacter

3 ml

2 ml

T4 lysine (5U/ml)

0,3 ml (1 Weinschl.)

0,3 ml

H₂O add to 20 ml

20 ml

pACYC rlaBAD

LB media
(20,4 ml)

1,3 ml

pACYC (-)

1,3 ml

Segment

1 ml

0 ml

T4 lytic bacter

2 ml

3 ml

T4 lysine

0,3 ml

0,3 ml

H₂O add to 20 ml

20 ml

- 1h @ 22°C | u.N. @ 4°C → über Nacht bei @ -20°C
- in DNA & transformant (in 500 µl SØC anpronieren)
- 1h @ 37°C, 250 rpm
- 50 µl ausplattet → u. N. @ 37°C

Konturen:

	Colonies	Colony PCR result
PCR	4	60S/2, p. 181
pCDF (+)	4	
pCDF (-)	8	extensio time 1 min
pACYC (+)	2	→ nur negativ in
pACYC (-)		

Durchgeführt von/
Performed by

21.11.17

Datum/
Date

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

Fest Agar Agitationsansatz vom 20.12.12 aufgezüchtet und
4h @ 4°C plaziert.

→ Spur Ansatz in 50ml DHTx transferriert
~~34 - 15 min jenseit~~

- Spur Agitation zur Zelle gegeben
- 15 min eindurchmischen
- 375 @ 42°C
- + 500µl SOC

→ 1h @ 37°C / 250 rpm

→ 100 µl ausplattieren

- i.N. @ 37°C → am nächsten Morgen keine Kolonie auf Platte mit Negativkontrolle

pCDF rhabD → 8 Kolonien

pACYC vln PEP → 5 Kolonien

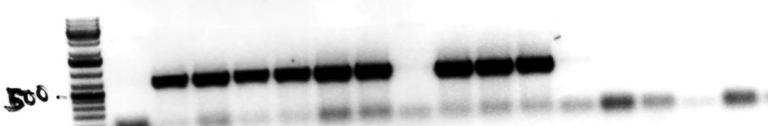
→ Colony PCR; Band 2 S187

FD →

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130104_colopcr
_fdrraduets.TIF

pACYC pCDF

1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 6



→ 3 positive Klone!



→ Einige & Segmente

04.01.2013 11:39:41

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	02.01.13			

Ligation pCDF/pACYC (2x über sel) mit blaBTA

5x Maskurin

10 µl TE ligation buffer
1 µl TE ligation
72,75 µl H₂O

	pCDF (+)	pCDF (-)	pACYC (+)	pACYC (-)
Maskurin	16,75 µl	16,75 µl	16,75 µl	16,75 µl
zucker (Klaros.)	1,26 µl (1,38 µl)	1,26 µl	2,25 µl (2,15 µl)	2,15 µl
Fragment chaP _{BAO} (9,8 µl/µl)	1 µl	0 µl	1 µl	0 µl
H ₂ O	1 µl	2 µl	-	1 µl

- 1h @ 22°C; Lüft. @ 4°C → @ -20°C

- 5 µl in 8H5 + trans Kornzel (S. 8)

• rote SDC; weiß plakett

• n. v. @ 37°C → Negativkontrolle & 2xpt gemauserte Kolonie,
wie erwartete Agarose

→ alle gepunktet
Kolonie negativ

→ Colony PCR
↓ 33x MM:

6 µl	Taq buffer
1,5 µl	dNTPs (10 mM)
"	T7 term
"	p-chaP _{BAO}
3,3 µl	Taq DreamTaq
8 µl	H ₂ O

→ 10 Kolonie
pCDF chaP_{BAO}
+ 11 Kolonie
vor PCR abt. 55,7 µl H₂O

Separierung der positiven Klone:

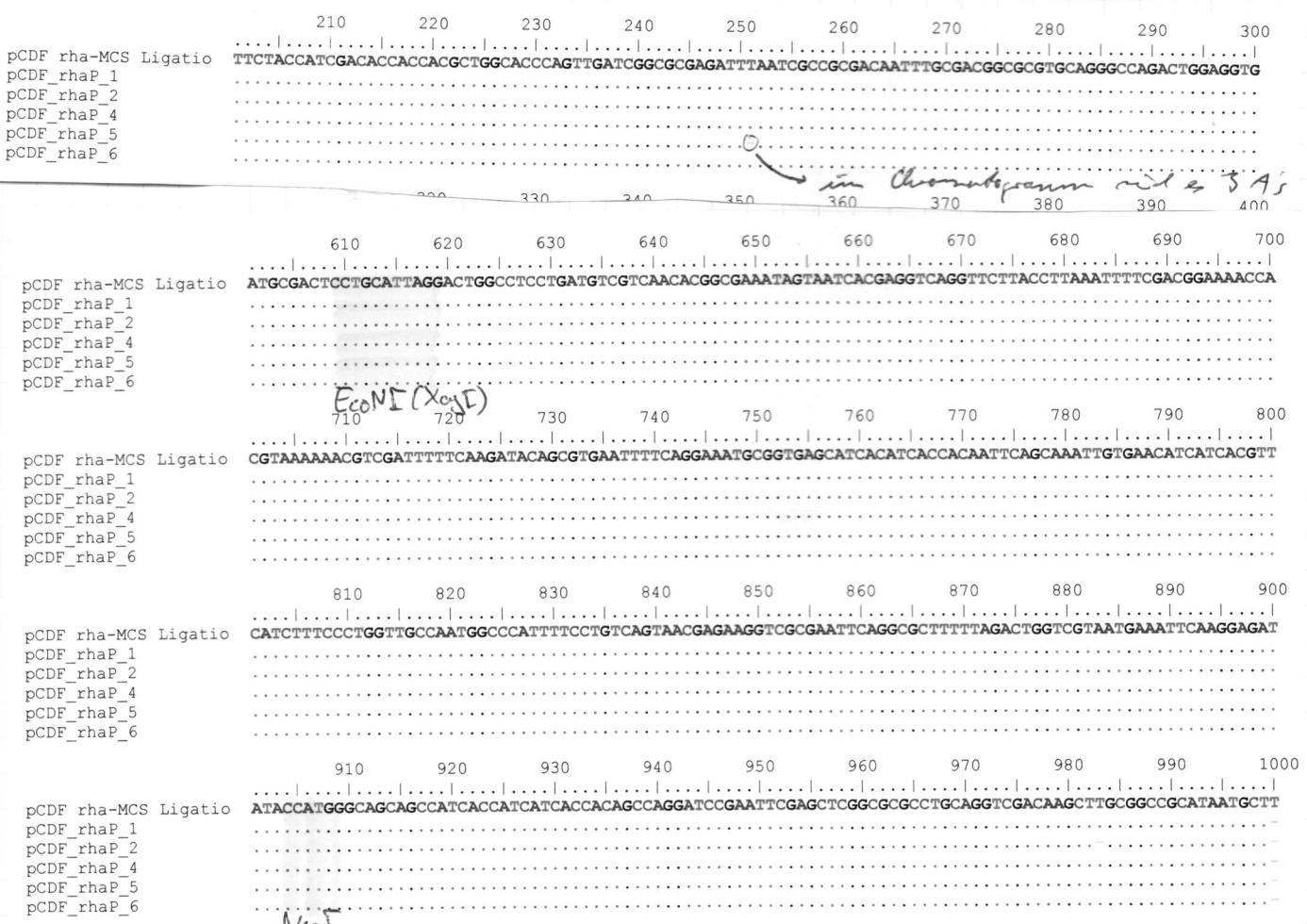
Miniprep von 3 ml K.N.-Kultur:

Klon	cLug/ml
2	33,3
3	107,4
4	111,1
5	106,6

CDF	cLug/ml
1	124,6
2	148,8
4	150,8
5	138,9
6	141,8

→ für Separierung mit Prime Duct DOWA 1

→ Order 2882530



Chromatogramm schließt → nicht aus wir ZA's

210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
.....									
AGGCTTGACGCCGCTTCGTT-CFACCATCGACACCACCCAGCTGGCACCCAGTTGATCGCCGCAGATTAAATGCCGGACAATTGCGACGCCGCT									
.....									
G. TAA. T. TTA. AGGA. AG. CTTGAA. T. TGCG. CG. T. AAGG. TA. AC. AA. A. A. T. GG. GA. T. CTCC. CCAA. C. A. T-TAC									
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
.....									
CGGGATCTCGACGCCTCCCTTATGGCACT CCTGCATTAGGACTGGCCTCTGATGTCGTCAACACGGCGAAATAGTAATCAGGAGGTCAAGGTTCTTAC									
.....									
A. C. GT. AATGAG. A. CTA. T. A. EconE (KojI)									
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
.....									
CTAAATTTCGACGGAAAACACGTTAAAAACGTCGATTTCAAGATAACAGCGTGAATTTCAGGAAATGCGGTGAGCATCACATACACAAATTAG									
.....									
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
.....									
CAAATTGTGAAACATCATCACGTCATCTTCCCTGGTTGCCAATGGCCATTTCCTGTCAGTAACGAGAAGGTGGCAATTAGGCCTTTAGACTG									
.....									
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
.....									
GTCGTAATGAAATTCAAGGAGATATACCATGGCAGCCATACACAGCCAGGATCGAATCGAGCTCGCCGCCTGCAGGTCGAC									
.....									
NcoI									
.....									

alle Klone, bis auf pACYC-rha P-4 sind positiv
und tragen Insert

→ neue Verkörnerungen:
ODAN mit SacI & NcoI FD

1µl ddH ₂ O	}	maskmix	pACYC Duet1 rha P _{BAD}
2µl FastAP			↳ pMM pMM 001(a)
2µl NcoI FD			pCDF Duet1 rha P _{BAD}
2µl SacI FD			↳ pMM 001(b)
6µl FQ Buffer Green			

pMM 001 (a)
 10µl MM
 10µl pMM001a (3)
 (207,4 µl/ml)

pMM 001(b)
 10µl MM
 10µl pMM001b (1)
 (124,6 µl/ml)

→ 15 min @ 30°C
 → 20 min @ 45°C

Ligation von rhaSR P_{BAD} in FD pACYC & pCDF

5x Maskenmix

10 µl T4 ligase buffer 10x) → Reaction
 1µl T4 ligase
 5 + 7,75 µl ddH₂O

<u>pCDF rhaSR P_{BAD}</u>	<u>pCDF (-)</u>	<u>pACYC rhaSR P_{BAD}</u>	<u>pACYC (-)</u>
73,75 µl MM	"	"	"
plasmid (diluted) (2,8 µg/µl)	0,9 µl	0,9 µl	1,2 µl
rhaSR P _{BAD} fragment (13 µg)	5,3 µl	-	5 µl
ddH ₂ O	-	5,3 µl	5 µl

→ Ligiert für 1h @ 22°C, danach 4°C i. V.

→ 5 µl in DH5α chemok. transformiert
(+ 500 µl SOC; 100 µl platter)

→ i. V. @ 31°C

→ Kolonien

Kolonien

pCDF - rhaSR P _{BAD}	12
pACYC - rhaSR P _{BAD}	12

→ Kolonien PCR

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	07.01.13			

→ Colony PCR:

24 x 1 μl

2 Tag buffer	48 μl
2 μM dNTPs	3,6 μl
T7 term	3,6 μl
SR-fw	3,6 μl
DreamTaq	2,4 μl
H ₂ O	400,8 μl

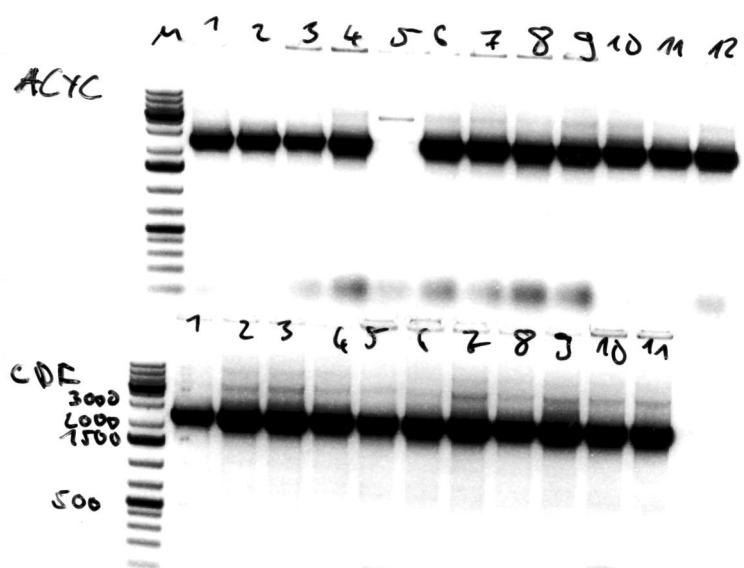
Programm:

wie Buch 2, S. 181 (Colony PCR)
→ unter Elongationszeit 3 min!

→ Bohr und 1% Agarosegel

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130109_colopcr
_rhaSRpbad_acyc_cdf.TIF

→ alle Klone, bis auf eine gehe PCR-Bande der erwartete Größe (2454 bp)



09.01.2013 17:25:53

ACYC	μl/μl
rhaSR PBAD	
1	99,2
2	125,5
3	110,8
4	36,7
CDF	
rhaSR PBAD	
1	209,1
2	209,3
3	196,2
4	174,8

→ Sequenzierung Ord
2785706

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
M. M.				

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 pACYC_rhaSRPbad_rhaS CGCAGGGGTTCAGGTATCGCTGAGG CGTCAGTCCCCTTGCTGCTTAAGCTGCCATGTAGCGTACGCACTGAAAGAGAAAATTGATCCGCCACGGCA
 pACYC_rhaSRP_1G.
 pACYC_rhaSRP_4C.
 pACYC_rhaSRP_8G.
 pACYC_rhaSRP_12T.A.

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 pACYC_rhaSRPbad_rhaS TCCCCATTACCTCATCGGAAAATGGCTCCAGGCCAGAAGCAAGTTGAGACGTGCGCTGTTTCCAGGTTCTCTGCAAAGTGTCTTAC
 pACYC_rhaSRP_1A.
 pACYC_rhaSRP_4A.
 pACYC_rhaSRP_8A.
 pACYC_rhaSRP_12G.
 pACYC_rhaSRPbad_rhaS GCAGCAAGAGCACTAATTGCATAAACAAAGATCTCGCAGCTGGGGTCGAGGGTAATCATTTTCCCCTCTGCTGTTCCATCTGTGCAACCAGCTGTCG
 pACYC_rhaSRP_1
 pACYC_rhaSRP_4
 pACYC_rhaSRP_8
 pACYC_rhaSRP_12
 pACYC_rhaSRPbad_rhaS 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 CACCTGCTGCAATACGCTGGTTAACGCCAGTGAGACGGATACTGCCCATCCAGCTCTGTTGAGCAACTGATTCAAGGCCGGCGAGAAACTGAAAT
 pACYC_rhaSRP_1
 pACYC_rhaSRP_4
 pACYC_rhaSRP_8
 pACYC_rhaSRP_12
 pACYC_rhaSRPbad_rhaS 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 CGATCGGCGAGCGATACAGCACATTGGTCAGCACAGATTACGGTATGTTACAGATGCCATCATGCGTACGAAACAGACCGTGCACCG
 pACYC_rhaSRP_1
 pACYC_rhaSRP_4
 pACYC_rhaSRP_8
 pACYC_rhaSRP_12
 pACYC_rhaSRPbad_rhaS 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 TGATGGTATAGGGCTGCCATTAAACACATGAATACCGTGCATGTTGACAATCACAAATTGATGAAATCATGATGATGTTAGGAAAAATCCGCTG
 pACYC_rhaSRP_1
 pACYC_rhaSRP_4
 pACYC_rhaSRP_8
 pACYC_rhaSRP_12
 pACYC_rhaSRPbad_rhaS 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 CGGGAGCCGGGGTTCTATGCCACGGACGCCGTTACAGACGGAAAAAAATCCACACTATGTAATACGGTCAACTGCCCTCTGATGTCGTCACACGGC
 pACYC_rhaSRP_1
 pACYC_rhaSRP_4
 pACYC_rhaSRP_8
 pACYC_rhaSRP_12
 pACYC_rhaSRPbad_rhaS 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 GAAATAGTAATCACGAGGTCAAGGTTCTACCTAAATTTCGACGGAAAACACGTAAAAACGTCGATTTCAAGATAACGCGTAATTTCAGGAAA
 pACYC_rhaSRP_1
 pACYC_rhaSRP_4
 pACYC_rhaSRP_8
 pACYC_rhaSRP_12
 pACYC_rhaSRPbad_rhaS 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 TGGGTGAGCATCACATCACACAAATTGTAACATCATCACGTTCATTTCCCTGGTTGCCATGGCCATTTCCTGTCAGTAACGAGA
 pACYC_rhaSRP_1
 pACYC_rhaSRP_4
 pACYC_rhaSRP_8
 pACYC_rhaSRP_12
 pACYC_rhaSRPbad_rhaS 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 AGGTCGCGAATTCAAGGCCTTTAGACTGGTCGATGAAATTCAAGGAGATAACATGGCAGCAGCCATCACCATCACACAGCCAGGATCCG
 pACYC_rhaSRP_1
 pACYC_rhaSRP_4
 pACYC_rhaSRP_8
 pACYC_rhaSRP_12
 pACYC_rhaSRPbad_rhaS 1010 1020 1030 1040 1050 1060
 AATTGAGCTCGGGCGCCCTGAGGTGACAAAGCTTGCGGCCATAATGTTAAGTCGAACAGAAAAGT
 CG. ATGGCC
 AG. CG. TGCCC.
 AG. CGCATGC.
 AG. CAGATCCCC

Durchgeführt von/
Performed byDatum/
DateBestätigt durch/
Approved byDatum/
DateFortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 pCDF_rhaR/S-MCS Liga TCGCTGAGGCCTCAGTCCCGTTGCTGCTTAAGCTGCCATGTACGCAGTGAAAGAGAAAATTGATCCGCCACGGCATCCAAATTCACCTCATCG
 pCDF_rhaSRP_1 A.
 pCDF_rhaSRP_4
 pCDF_rhaSRP_8 CGCTGAG.
 pCDF_rhaSRP_11 CGCTGAG.....

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 pCDF_rhaR/S-MCS Liga GCAAAATGGCTCCGCCAGGCAGAAGCAAGTTGAGACGTGATGCCGTGTTTCAGGTTCTCTGCAAACATGCTTTACGCAGCAAGAGCAGTAATT
 pCDF_rhaSRP_1
 pCDF_rhaSRP_4
 pCDF_rhaSRP_8
 pCDF_rhaSRP_11 A.
 A.
 A. G.

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 pCDF_rhaR/S-MCS Liga GCATAAACAGATCTCGCACTGGCGGTGAGGGTAAATCATTTCCTCCCTGCTGTTCCATCTGTGCAACCAGCTGTCGCACCTGCTGCAATACGCT
 pCDF_rhaSRP_1
 pCDF_rhaSRP_4
 pCDF_rhaSRP_8
 pCDF_rhaSRP_11
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 pCDF_rhaR/S-MCS Liga GTGGTTAACCGCCAGTGAGACGGATACTGCCATCCAGCTTGTGGCAGCAACTGATTCAAGCCGGCGAGAAACTGAATCAGATCCGGCGAGCGATAC
 pCDF_rhaSRP_1
 pCDF_rhaSRP_4
 pCDF_rhaSRP_8
 pCDF_rhaSRP_11
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 pCDF_rhaR/S-MCS Liga AGCACATTGGTCAGACACAGATTATCGTATTTACAGATGCCATGATGCGTACGAAACAGACCGTGCCACCGGTGATGGTATAGGGCTGCC
 pCDF_rhaSRP_1
 pCDF_rhaSRP_4
 pCDF_rhaSRP_8
 pCDF_rhaSRP_11
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 pCDF_rhaR/S-MCS Liga CATAAACACATGAATACCGTGCATGTTGACAATCACAAATTCTGAAAATCATGATGATGTCAGGAAAATCCGCTGCCGGAGCCGGGTTCTAT
 pCDF_rhaSRP_1
 pCDF_rhaSRP_4
 pCDF_rhaSRP_8
 pCDF_rhaSRP_11
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 pCDF_rhaR/S-MCS Liga CGCACCGGACCGTACCAAGCGAAAAATCCACACTATGTAATACGGTCAACTGCCCTCTGATGCGTCAACACGGGAAATGTAATCAGGAG
 pCDF_rhaSRP_1
 pCDF_rhaSRP_4
 pCDF_rhaSRP_8
 pCDF_rhaSRP_11
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 pCDF_rhaR/S-MCS Liga TCAGGTTCTTACCTAAATTTGACGGAAAACACGTAAAAACGTCGATTTCAAGATAACAGCGTGAATTTCAGGAATGCCGTGAGCATCACATC
 pCDF_rhaSRP_1
 pCDF_rhaSRP_4
 pCDF_rhaSRP_8
 pCDF_rhaSRP_11
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 pCDF_rhaR/S-MCS Liga ACCACAATTCAAGAAATTGTAACATCACGTTCATTTCCCTGGTGCCAATGCCATTTCTGTCAGTAACGAGAAGGTGCGAATTCAAGGG
 pCDF_rhaSRP_1
 pCDF_rhaSRP_4
 pCDF_rhaSRP_8
 pCDF_rhaSRP_11
 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 pCDF_rhaR/S-MCS Liga CTTTTAGACTGGTCGTAATGAAATTCAAGGAGATATACCAATGGCAGGCCATACCATCATCACACAGCCAGGATCGAATTGAGCTCGGCGC
 pCDF_rhaSRP_1
 pCDF_rhaSRP_4
 pCDF_rhaSRP_8
 pCDF_rhaSRP_11
 1010 1020 1030 1040 1050
 pCDF_rhaR/S-MCS Liga CTGCAGGTGACAAGCTTGGCCGCTAAATGCTTAA-GTCGAACAGAAA
 pCDF_rhaSRP_1 A.G.C.A.-TGCC--
 pCDF_rhaSRP_4 A.G.C.A...TGCGG-
 pCDF_rhaSRP_8 A.G.C.A...TGCG-
 pCDF_rhaSRP_11 A.G.C.A.AG.TGCC-

Durchgeführt
Performed byDurchgeführt
DateBestätigt durch
Approved byDatum/
DateFortsetzung auf Seite
Continued on page number

13.04.17

- Klonierung scheint erfolgreich
- komplette Sequenzierung notwendig

Klonierung von ISR in pMM001 a + b (SacI & NotI)

nach Verlust der Rektoren mit SacI & NotI

↳ auf 1% Agarosegel aufgetragen

→ ausgewählter & über "MN PCR & gel clean up" nach Konservierung freigegeben

	ng/ml	260/230
① pMM 001 a (pACYC rhaBAD)	70,4	9,14
② pMM 001 b (pCDF rhaBAD)	27	9,75

7

Klonation:

MM (5x)

10 µl T4 lysozyme blank

10 µl T4 lysozyme (\approx 5U)

72 µl H₂O

Mastomix	pMM001a ISR	pMM001a (-)	pMM001b ISR	pMM001b (-)
linearized vector	16,5 µl	-	-	-
	2,4 µl ①	2,4 µl ①	0,9 µl ②	0,9 µl ②
ISR Fragment (S. 3; 50 µg/ml)	1 µl	-	1,05 µl	-
H ₂ O	-	1 µl	1,8 µl	2,8 µl

→ inkubiert 1h @ 22°C, dann über Nacht @ 4°C
 → 5µl in VHTx Zellen transformiert (in 500µl SOC aufgewogen + 10µl ausgetragen)

→ über Nacht @ 37°C

→ keine Kolonie bei ~~pMM001(b)~~ IsrR

→ ~ 50 Kolonie bei pMM001a IsrR

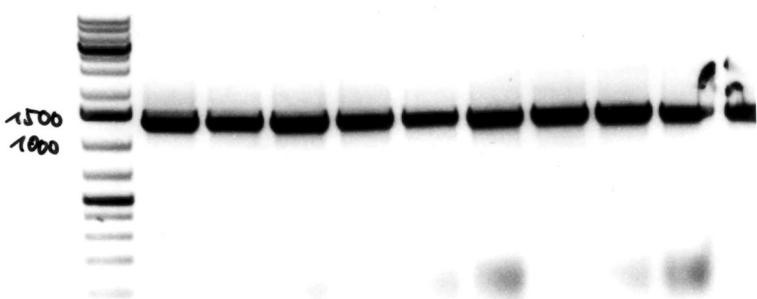
→ Colony PCR

~~21~~ ~~MM~~

* 22µl ~~Taq~~ Barnag buffer
 4,4 0,5µl 10mM dNTPs
 4,4 8,5µl 77 mM
 4,4 88µl IsrR-Ncol-LwL
 1,1µl Barnag
 183,7µl ddH₂O

→ Colony PCR Programm
 mit Elongationszeit
 1:30 min : 5
 (1331 bps)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



16.01.2013 10:44:45

→ zum Sequenzieren (2890719) premixed
 mit Prime Duet DNA 1

	µg/µl
1	37,5
3	30,1
7	38,7
9	101,7

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

```
pBEW1a_lsrR lsrR lig TTCAACAAATTGTGAAACATCAGTTCATCTTCCTGGTGCCCATGGCCATTTCCTGT CAGTAACGAGAAGGTGGCGAATTCAAGGCCTTTT
pBEW1a_lsrR_1 .....T.....A.....
pBEW1a_lsrR_3 .....G.....C.....
pBEW1a_lsrR_7 .....A.....TCA.....
pBEW1a_lsrR_9 .....CGC.....
  


110 120 130 140 150 160 170 180 190 200



```
pBEW1a_lsrR lsrR lig AGACTGOTCGATAIGAAATTCAAGGAGATAATGCCATGCCAATCACCGATTGGCCTAGAACACGGGAATGTGTGAGAGAACAGTCGGCGGATC
pBEW1a_lsrR_1G.....T.....
pBEW1a_lsrR_3TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_7TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_9G.....T.....

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300


```
pBEW1a_lsrR lsrR lig GCGTGGTTTACTATACAGCGGGTACGCCAGAACGGAGTACGGATCGCTCGGCCCTGACACGTTGAAAGTGCGCGATGCTGGAGAAAGGGGATC
pBEW1a_lsrR_1 .....G.....T.....
pBEW1a_lsrR_3 .....TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_7 .....TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_9 .....G.....T.....
  


310 320 330 340 350 360 370 380 390 400



```
pBEW1a_lsrR lsrR lig AGTCGGCATTTACGAGTACAGATAATTCGCTTGGCTAGCGTGGGATGAGCTGGAATATGAACTCTAGTCAGTTTCGCTGACACAGTCGGCGGT
pBEW1a_lsrR_1G.....T.....
pBEW1a_lsrR_3TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_7TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_9G.....T.....

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500


```
pBEW1a_lsrR lsrR lig GATCCCAGGCTGGATGCGGGATGGTAGCGCTGGGATAGCGGCGGGCGATAGTGTGATGAGTTACTCTAACACACAACAGATGCTGGCGATT
pBEW1a_lsrR_1 .....G.....T.....
pBEW1a_lsrR_3 .....TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_7 .....TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_9 .....G.....T.....
  


510 520 530 540 550 560 570 580 590 600



```
pBEW1a_lsrR lsrR lig GGTTCGCGAGGCAACCATGAACTACGGTACAGCTTAAGTGGTTTATTCGTCACACGAAATTCGGCTGGTACAGCTCTCGCGTGGCGTCTGCTCTC
pBEW1a_lsrR_1G.....T.....
pBEW1a_lsrR_3TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_7TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_9G.....T.....

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700


```
pBEW1a_lsrR lsrR lig ATATGACGGGATCGCGCGCTAACGGCGTGCAGTGTGGATATATTCCGGCGCTGCTGGGCACTCCCGTGGCAGTGGCTGGTACGGTAAAAAA
pBEW1a_lsrR_1 .....G.....T.....
pBEW1a_lsrR_3 .....TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_7 .....TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_9 .....G.....T.....
  


710 720 730 740 750 760 770 780 790 800



```
pBEW1a_lsrR lsrR lig TGAAAATTGCGTCAAGATGTTCTGTTAGCGCGCAGCGACGGATGTGGCGATGTGGCGATGCTGGTGTGGTGGAGTCACAGAGCGATGCCGCAATCATT
pBEW1a_lsrR_1G.....T.....
pBEW1a_lsrR_3TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_7TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_9G.....T.....

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900


```
pBEW1a_lsrR lsrR lig CGCTCCGGTATATACGCAGGGGAGCAGTTAAATGTTGGCGAGAAGGGGGGGTGGCAGCATTTAACGCAACTTTGGAGTCACAAAGCTGAGCTG
pBEW1a_lsrR_1 .....G.....T.....
pBEW1a_lsrR_3 .....TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_7 .....TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_9 .....G.....T.....
  


910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000



```
pBEW1a_lsrR lsrR lig TCAGAAATACAAATACATAACGAACTGATGGCTACCTTAAAGCGCGCTGAGAGCCATACCGCGTGGCGTGGCGAGTGGTGGCGAGGAGAAATTAAGC
pBEW1a_lsrR_1G.....T.....
pBEW1a_lsrR_3TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_7TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_9G.....T.....

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100


```
pBEW1a_lsrR lsrR lig CGAACCAATTGGCGCTGCAAATGAGCGGGTTATATCAACGCACTGGTACGATCAGGACACAGACGGCGATTTACGTAAGTAAATTTGATGACC
pBEW1a_lsrR_1 .....G.....T.....
pBEW1a_lsrR_3 .....TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_7 .....TGA.....T.....
pBEW1a_lsrR_9 .....G.....T.....
  


1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180



```
pBEW1a_lsrR lsrR lig TTATTACCCGGATGAGCTGGCTGGCGCGCTGCAAGGTGCAAGCTTGCGCGCATATGCTTAAGTGCAACAGAAAGTAATCG
pBEW1a_lsrR_1TGCCT...T...
pBEW1a_lsrR_3CC.T....
pBEW1a_lsrR_7GGGCC...
pBEW1a_lsrR_9C.A.CAG.T.GGGCA.T...
```



Snef



LSR


```


```


```


```


```


```


```


```


```


```


```

Durchgeführt von/
Performed byDatum/
DateBestätigt durch/
Approved byDatum/
DateFortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

20.01.13

Ligation Brk in pACYC, pCDF & pBEW1bUrdan pCDF & pACYC Aut 15x Maskmix

~~10µl T4 ligase buffer
1µl T4 ligase (5U/µl)
57,7 µl H₂O~~

2x Maskmix

~~2µl SceI FD
2µl NcoI FD
2µl FastAP
4µl FD Buffer focus~~

pCDFpACYC

~~3µl pCDF Aut 1
10µl pACYC Aut 1
10µl Maskmix 10µl Maskmix~~

~~7µl H₂O~~~~→ 75 min @ 37 °C; 20 min @ 65 °C~~~~→ aut 1% agarosegel~~~~→ ausgewählte & mit MN PCR & gel cleanup geprüft~~

c(µg/µl)	E260/E280
----------	-----------

~~pACYC Aut 1
SceI/NcoI~~

~~80,1~~~~0,6~~

~~pCDF Aut 1
SceI/NcoI~~

~~30,9~~~~0,46~~→ Ligation5x Maskmix

~~10µl T4 ligase buffer
1µl T4 ligase (5U/µl)~~

~~77,5 - 57,75 µl H₂O~~

<u>pCDF IsrR</u>	<u>pCDF (-)</u>	<u>pACYC IsrR</u>	<u>pACYC (-)</u>
Mastenix 17,7 μ l	17,7 μ l	17,7 μ l	17,7 μ l
lin. vector 0,81 μ l (30,9 μ l)	0,81 μ l	1,24 μ l (20 μ l)	1,24 μ l
IsrR lysate 1,11 μ l (30,5 μ l)	—	1,05 μ l	—
H ₂ O —	1,11 μ l	—	1,05 μ l

pBEW1b IsrR

17,7 μ l Mastenix
 0,93 μ l plasmid (27 μ l)
 (lin.)
 1 μ l IsrR lysate (30,5 μ l)

- 1h @ 22°C; über Nachzüchtung @ 4°C
- 5 μ l mix in DTSx chemostat formiert
- 500 μ l SOC; ~~200 μ l~~ ausgetauscht
- 100 μ l
- Kolonie gescreent mit Colony-PCR (siehe S. 17)
 (Primer T7 prim & IsrR Fw NacL - Rv L

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
-----------------------------------	----------------	---------------------------------	----------------	--

PFOMT Nutzente i pET28a (+)Mutagenese ansetzen

1.5 μl Mastermix

3 μl Prime Mix

PCR

95 °C	1 min	30 s	
95 °C	30 s	30 s	4
55 °C	1 min		17+
68 °C	7:00		
68 °C	7:00		
4 °C	∞		

Mastermix

5 μl Am Ultra Buffer

1 μl pET28a (+) PFOMT (50 μg/ml)

1 μl Am Polym.

1 μl ~~10 mM~~ dNTP Mix

(vom Anilchape Kit)

30 μl H₂OPrimer - mix(es)

+ 7.5 μl Prime

Mix 1 → PFOMT_F103W-D-rv
Mix 2 → PFOMT_F103V-D-rv
Mix 3 → PFOMT_F103P-D-rv
Mix 4 → PFOMT_F103W-D-rv+ 9 μl H₂O

→ nach PCR

↳ + 5 μl FD Buffer
+ 1 μl OpmI FD
+ 31.5 μl H₂O

→ 75 min @ 37 °C verarbeitet; 20 min @ 65 °C OpmI inaktiviert

→ 1 μl Mix i ANS & transformiert
+ 500 μl SOC, 200 μl plakkiert→ Coloniengesicht & Minigap gemacht
Mutante

	ng/μl
pET28a (+)	107,3
PFOMT	111,1
F103P	146,9
F103V	114,8
F103W	

→ Separation (28.9.07.19)

pET28a(+) PFOMT, Nde	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 GTGAGCGATAAACAACTCCCTCTAGAANATATTGTTAACCTTACAGAGATATACAGGGCAGGCCATCATCATCACAGCAGGG F103I A.TTT.A.CG.TC.A.T..... F103P A.AC.G.A.AC.T---A..... F103V T.A.CG.A.C.T..... F103W CA-AA.A.CCTTC.T.....
	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 CCGGGCGCCGCGCCGCAACCTATGAAATTGATGATGAAGCAGTCAAATACAGGATTGTCAGAGTGAGGAGTATACCCAGTAATCTCCGA F103I L V P R G S H M D F A V M K Q V K N T G L L Q S E E L C Q Y I L R F103P L V P R G S H M D F A V M K Q V K N T G L L Q S E E L C Q Y I L R F103V L V P R G S H M D F A V M K Q V K N T G L L Q S E E L C Q Y I L R F103W L V P R G S H M D F A V M K Q V K N T G L L Q S E E L C Q Y I L R
	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 ACTAGGGCAACCCGCGAGANGCAAGGGTCCCTAGGGAACTCAGGGAGCCATGAAGGCAACCGAGACTCTTAATGTCAGTCACCAACTGCAGAC F103I T S V Y P R E A G F L K E L R E A N E S H P D S Y M S T S P L A G F103P T S V Y P R E A G F L K E L R E A N E S H P D S Y M S T S P L A G F103V T S V Y P R E A G F L K E L R E A N E S H P D S Y M S T S P L A G F103W T S V Y P R E A G F L K E L R E A N E S H P D S Y M S T S P L A G
	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 AATGAGGTCATGGTCATAAATTAGTGAATCAGAAGAGACTATGAGGTTGAGRCCTACAGGATACTCCCTTACTCACNGCTTTCAATCC F103I Q L M S F V L K L V N A K K T I E V G V F T G Y S L L L T A L S I P F103P Q L M S F V L K L V N A K K T I E V G V F T G Y S L L L T A L S I P F103V Q L M S F V L K L V N A K K T I E V G V F T G Y S L L L T A L S I P F103W Q L M S F V L K L V N A K K T I E V G V F T G Y S L L L T A L S I P
	410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 TGATGAGGAAAGATTAACGCATGATTCAGCGAACTGATTCAGCAGAGGCTATGAGATTTGGCTTCATTAACAGAAACCTGGGAGCACAAAATCAACTC F103I D D G K I T A X D F D R E A Y E I G L P F I R K A G V E H K I N F F103P D D G K I T A X D I D R E A Y E I G L P F I R K A G V E H K I N F F103V D D G K I T A X D P D R E A Y E I G L P F I R K A G V E H K I N F F103W D D G K I T A X D W D R E A Y E I G L P F I R K A G V E H K I N F
	510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 ATGAACTCGAGAGCTTCAGTCAGCTCTGGACAACCTTCAGCAAGGACAGANGAGCAGGGAGTACAGACTTGGCTTGAGTCGGACACAACTCAACT F103I I E S D A M L A L D N L L Q G Q E S E G S Y D F G F V D A D K P N F103P I E S D A M L A L D N L L Q G Q E S E G S Y D F G F V D A D K P N F103V I E S D A M L A L D N L L Q G Q E S E G S Y D F G F V D A D K P N F103W I E S D A M L A L D N L L Q G Q E S E G S Y D F G F V D A D K P N
	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 ACATCAAGCTACAGAGAGGTGATGAAACTATGTCAGGGTGGCATAGCCTTACACACATACTGGGGTGGACCTGAGCCAGCGCTGAACTC F103I Y I K Y H E R L M K L V K V G G I V A Y D N T L W G G T V A Q P E S F103P Y I K Y H E R L M K L V K V G G I V A Y D N T L W G G T V A Q P E S F103V Y I K Y H E R L M K L V K V G G I V A Y D N T L W G G T V A Q P E S F103W Y I K Y H E R L M K L V K V G G I V A Y D N T L W G G T V A Q P E S

F103W Y I K Y H E R L M K L V K V G G I V A Y D N T L W G G T V A Q P E S
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 pET28a(+) PFOMT, Nde CGAATTCAGATTTCAAGGAAAACAGAGANGCTTATGACTCACACAGTGCTCGCTGATGCCATCGAGATGTAACATCTCCCTTG
 F103I E V P D F M K E N R E A V I E L N K L L A A D P R I E I V H L P L
 F103P E V P D F M K E N R E A V I E L N K L L A A D P R I E I V H L P L
 F103V E V P D F M K E N R E A V I E L N K L L A A D P R I E I V H L P L
 F103W E V P D F M K E N R E A V I E L N K L L A A D P R I E I V H L P L
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 pET28a(+) PFOMT, Nde GGATGGATACCTTTCTCAGGGCTCTTATTGAATTGACTCGAACAGCTCGCGCCACACTCGGACACCAACCCACCACTGGAGATCC
 F103I GDG I T F C R R L Y * I R A P S T S L R P H S S T T T T T T E I
 F103P GDG I T F C R R L Y * I R A P S T S L R P H S S T T T T T T E I
 F103V GDG I T F C R R L Y * I R A P S T S L R P H S S T T T T T T E I
 F103W VMVSLSAGVFIEEELRROADGRTRPPPPPLRS
 L Showngram oben statt wahlweise 3x5
 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 pET28a(+) PFOMT, Nde RLLTKPERKLSWLLPFLSNNS*HNPLGLNGS*GV
 F103I RLLTKPERKLSWLLPFLSNNS*HNPLGLNGS*GV
 F103P RLLTKPERKLSWLLPFLSNNS*HNPLGLNGS*GV
 F103V RLLTKPERKLSWLLPFLSNNS*HNPLGLNGS*GV
 F103W GC*QSPKGSVGCCCHR*AITSITPWGL*TGLEG
 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 pET28a(+) PFOMT, Nde TTTTGCTGAGGGAGACTATCCGGAT
 F103I F C * K E E L Y P D T A T C ... T G G C G A T G
 F103P F C * K E E L Y P D W R M G R G P V A A H * A A A G
 F103V F F A E R R N Y I P D W R M G R R P V A A H * A
 F103W F F A E R R T I S R I G E W D A P C S G A L S R A

→ 8 Mutationen erfasst
 → Plasmide in BL21(DE3) transformiert

→ bei allen geprüften
Kulturen Fragmente
mit rechtiger Größe
(~1330 bp) amplifiziert

→ Mumpop

c (μg/ml)

pACYC Duet	1	33	90,4
lsrR	2	77,7	150 *
	3	80,7	
	4	90,9	

pCDF Duet

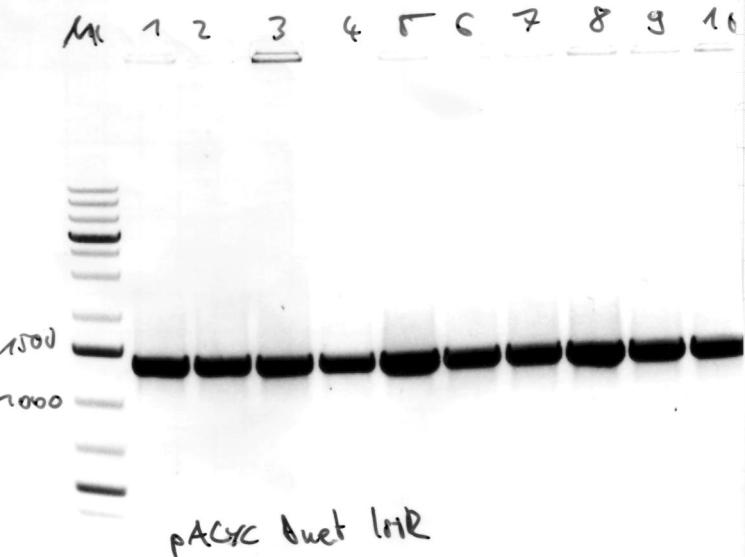
1	162,3	
lsrR	2	108
	3	130,3
	4	117,8

pBEW1b

lsrR	1	102,8
	2	96,7
	3	115,5
	4	124,5

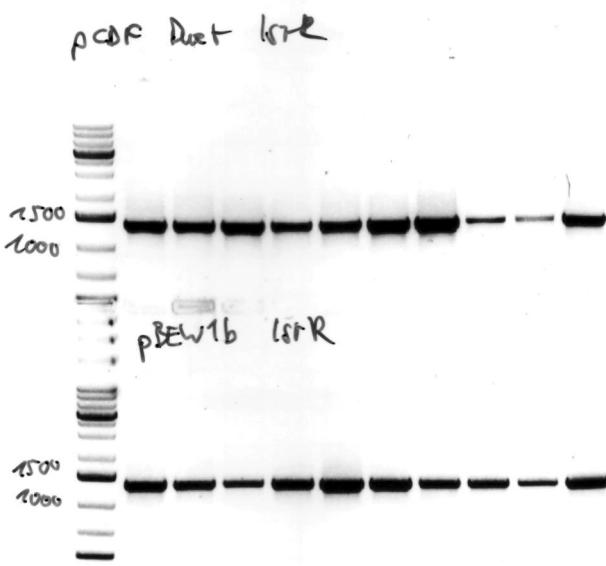
* auf Sali-E@ 230 nm

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130123_colopcr
_pacyc_lsrR.TIF



23.01.2013 14:00:06

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130123_colopcr
_pcdf_pbew1b_lsrR.TIF



23.01.2013 14:45:15

Durchgeführt von/
Performed by

Datum/
Date

23.01.13

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite
Continued on page

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

→ lsrR

pACYC Duet-1 lsrR Li TAGAAATAATTTGTTAACCTTAATAGGGAGATACCAAGGCAATCACAGATTGGCAATTTCAGAACAGGGAAATGTGTGAGAAGAACAGGCAGCGCC
 pACYC_lsrR_1 TA.
 pACYC_lsrR_2
 pACYC_lsrR_3
 pACYC_lsrR_4 TA.

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

NLS

pACYC Duet-1 lsrR Li GGATCCGTTGGTTTACTATCACGACGCCGACGGAGATCAGCGATCGCTCGCTGACAGTTGAAAGTGICGGATTGCTGGAGAAAG
 pACYC_lsrR_1
 pACYC_lsrR_2
 pACYC_lsrR_3
 pACYC_lsrR_4

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

Lysat (siehe oben)

pACYC Duet-1 lsrR Li GCATCAGTCGGCATTATCCGCAAGATAATCTCGCTTGAGGCTGTCTGAAATATGAAACTCAATTACGTGTCAGTTTCGCTGCAACAGTC
 pACYC_lsrR_1
 pACYC_lsrR_2
 pACYC_lsrR_3
 pACYC_lsrR_4

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

pACYC Duet-1 lsrR Li CGGGTGATCCCCTGGCTTCGGATGCTGAGTCGGCGACTGGGATGGCGCGCCATATGTTGAGGTTACTCAACCAACAGATGCTGG
 pACYC_lsrR_1
 pACYC_lsrR_2
 pACYC_lsrR_3
 pACYC_lsrR_4

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

pACYC Duet-1 lsrR Li CGATTGGTTTGGCGAGGCANCCATGAACTCCGCACTTGGTGGTTATTTCACGCAATTCCCTGGTCAGGTTCGCTGGTGGCTGG
 pACYC_lsrR_1
 pACYC_lsrR_2
 pACYC_lsrR_3
 pACYC_lsrR_4

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

pACYC Duet-1 lsrR Li TTCTTAATATACGGGAATGGGCACCTTACCCCGCGTCMGGTGAAATATTCGGCTCCGCTGGCGCATCCGTCACATTGGCGTACCTTA
 pACYC_lsrR_1
 pACYC_lsrR_2
 pACYC_lsrR_3
 pACYC_lsrR_4

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

pACYC Duet-1 lsrR Li AAAATGAAATTGCGTCAGAATGTCCTGTCGCCCGCAGCAGTGCGCAATTGCGCATTTGGTCAGTCAACGAGCAGCGACAA
 pACYC_lsrR_1
 pACYC_lsrR_2
 pACYC_lsrR_3
 pACYC_lsrR_4

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

pACYC Duet-1 lsrR Li TCAATTGGTCGGTTAATACGCGCAAGGGGAGCAGTTAATGATTGGCGAAAAGGGCGGTTGGCAATTTTAGGTTACTTTTTGATGCAAAGGTGA
 pACYC_lsrR_1
 pACYC_lsrR_2
 pACYC_lsrR_3
 pACYC_lsrR_4

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

pACYC Duet-1 lsrR Li CTTTGACGAATATCAAAATACATAACGAACTGATTGGCTTACCTTACGGGCTGAAGACCATACCCCTGGGTGGCTGGCAAGGGGAAGAAAT
 pACYC_lsrR_1
 pACYC_lsrR_2
 pACYC_lsrR_3
 pACYC_lsrR_4

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

pACYC Duet-1 lsrR Li AAAGCGAACAAATGCCCGCTGCAATGAAGGCGTTATACACGACTGGTTACCGATCAGGACACGACCGACCGCATTTACGTAGTTAAATTGCA
 pACYC_lsrR_1
 pACYC_lsrR_2
 pACYC_lsrR_3
 pACYC_lsrR_4

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080

→ lsrR

pACYC Duet-1 lsrR Li TGACCTTAAACGGGAAATGAGCTCGGGGCGCTGCGGTGACAACCTTGCGCCGCAATTAGCTTAAAGTCACAGAAAGTAA
 pACYC_lsrR_1 T_GCGC
 pACYC_lsrR_2 G_CCC
 pACYC_lsrR_3 G_CCC
 pACYC_lsrR_4 GGGCC

DeC

pACYC
lsrR

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	20.01.19			

MQF
lsrR

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

pCDF Duet-1 lsrR Lig ATTTTGTTAACCTAATAGGAGATAACCATGCCAATCACGATTCGGCAATTTCAGAACAGGAATGTGAGAGAGACAGTCGCCGGATCCG

pCDF_lsrR_1 ... G ... T ...
pCDF_lsrR_2 ... T ...
pCDF_lsrR_3 ... T ...
pCDF_lsrR_4 ... T ...

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

pCDF Duet-1 lsrR Lig TGTTTTACTATCACAGCGGCTGACCCAGGGATCAGGATGCTCGGCCTGACACGTTGAAGTGTGCGATGCTGGAAAAGGCACTCAGT

pCDF_lsrR_1 ...
pCDF_lsrR_2 ...
pCDF_lsrR_3 ...
pCDF_lsrR_4 ...

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

pCDF Duet-1 lsrR Lig CC GGCAATTTCGGCTACGATTAATCTGGTTGAAGCTGCTCGAACTAACTACGTCGACGTTTCGTCAGAACATGCGGGGGA

pCDF_lsrR_1 ...
pCDF_lsrR_2 ... C ...
pCDF_lsrR_3 ...
pCDF_lsrR_4 ...

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

pCDF Duet-1 lsrR Lig TCCCCTGGCTGGGAGCAGAACTACGTCAACGCTTAAGTGTGTTTCTCAGCACGAAATTCGGCTCCGGTGGCTCGGATTTGG

pCDF_lsrR_1 ...
pCDF_lsrR_2 ...
pCDF_lsrR_3 ...
pCDF_lsrR_4 ...

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

pCDF Duet-1 lsrR Lig TTGGCGAGGCCAACCAAGAACATACGTCAACGCTTAAGTGTGTTTCTCAGCACGAAATTCGGCTCCGGTGGCTCGGATTTGG

pCDF_lsrR_1 ...
pCDF_lsrR_2 ...
pCDF_lsrR_3 ...
pCDF_lsrR_4 ...

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

pCDF Duet-1 lsrR Lig ATGACGGGAAATCGGCAGCTAACGGCCGCTCAGTCAGTCAGTGTGAAATTAATCCGGCTCCGGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGATTTGG

pCDF_lsrR_1 ...
pCDF_lsrR_2 ...
pCDF_lsrR_3 ...
pCDF_lsrR_4 ...

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

pCDF Duet-1 lsrR Lig AAAATTGCTCAALAGTAGTGTGTTAGCCOCCTAACGAGCGATGTGGCAATTGTGGCATGCTGGCTGGGAGATGCGTAAAGGAAATTTGG

pCDF_lsrR_1 ...
pCDF_lsrR_2 ...
pCDF_lsrR_3 ...
pCDF_lsrR_4 ...

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

pCDF Duet-1 lsrR Lig CTCCGGTTATATCACCGGGCAAGCTGATGGCTTATGGCGAAGGGGGCGGTGGCGACATTGGCTTGGGAGATGGTGGCTGGGAGATGGCTGG

pCDF_lsrR_1 ...
pCDF_lsrR_2 ...
pCDF_lsrR_3 ...
pCDF_lsrR_4 ...

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

pCDF Duet-1 lsrR Lig AGGAATATCACAAATCACACGAACTGATGGCTTACCTTGGCGCTGAAGACCATACCGCCGGTGGCTGGCGAGGGAGAAATAACCG

pCDF_lsrR_1 ...
pCDF_lsrR_2 ...
pCDF_lsrR_3 ...
pCDF_lsrR_4 ...

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

pCDF Duet-1 lsrR Lig AAGCAGTTGCCGCTGCAATGAAGGCGGTTATCACCGACATGTGGTACGATCAGGACACGAGGGGATTTAGTGGTTAATTTGCTGAGACCTT

pCDF_lsrR_1 ...
pCDF_lsrR_2 ...
pCDF_lsrR_3 ...
pCDF_lsrR_4 ...

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070

pCDF Duet-1 lsrR Lig ATTACCGGGAAATGAGCTGGCTGGGGCTGAGGTGAGACAGCTGGCGCCATAATGTTAGTCGAACAGAAAGTA

pCDF_lsrR_1 ... G ... TGCC
pCDF_lsrR_2 ... T ... TTCC
pCDF_lsrR_3 ... T ... GC
pCDF_lsrR_4 ... C ... CG

Scribble

Scribble

10TR

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	26.01.11			

pBEW 1b
lsrR

NcoI → lsrR

pBEW1b_lsrR Ligation	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
pBEW1b_lsrR_1	GTGAGTAAACGAG	AAAGGCCGAATTCA	GCGCTTTTAGACTGG	TCAATGAAATC	ANGGAGATAAACCAT	GCAATCAGGATTC	CAGG	ATTCAG	GCATTC	CGCAATTTCAG
pBEW1b_lsrR_3
pBEW1b_lsrR_4
pBEW1b_lsrR_2
A.										
pBEW1b_lsrR Ligation	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
pBEW1b_lsrR_1	AAACGGAAATG	TGTGAGAAGAAC	AGGCGCCGGATCG	TGGTTTACATAC	AGCACGGTGACCCAG	AGGAGTCACCGAT	GATCGCTCG	CCGCTGAC
pBEW1b_lsrR_3
pBEW1b_lsrR_4
pBEW1b_lsrR_2
B. siehe unten rechts										
pBEW1b_lsrR Ligation	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
pBEW1b_lsrR_1	ACGTTGAAAGTGT	CGGATTCGAGAA	AGGCACTAGTCG	CATTATCGCCTAC	AGGATTATCTCG	GTTGAAGGCTGT	CGGAAATAAG	AACT
pBEW1b_lsrR_3
pBEW1b_lsrR_4
pBEW1b_lsrR_2
pBEW1b_lsrR Ligation	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
pBEW1b_lsrR_1	CAATTAGTCGAG	TTTCGCTGAC	AGTCGGGATCTCC	TGGCTTCCG	CTTCCGATG	GATGCTG	GGCGACT	CGGGGATAG	GGCGG	CGATAG
pBEW1b_lsrR_3
pBEW1b_lsrR_4
pBEW1b_lsrR_2
pBEW1b_lsrR Ligation	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
pBEW1b_lsrR_1	TGATGAGTTACT	CAACCAACAGATG	CTGGCGATTG	GGTTTGGC	CGAGGAAACCATG	AACTGCAACGTTA	AGTGGTTTAT	TGCTCACAGCA
pBEW1b_lsrR_3
pBEW1b_lsrR_4
pBEW1b_lsrR_2
pBEW1b_lsrR Ligation	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
pBEW1b_lsrR_1	AAATGCCCTGGTC	ACGGCTTCGCG	CGCTCGGTCGG	TCTTATA	AGCGGGAACTGG	CGGAGCTAAC	CGGGGTGCA	GTGAAATAATT	TCCGGCTCCTTG	TCCTTG
pBEW1b_lsrR_3
pBEW1b_lsrR_4
pBEW1b_lsrR_2
pBEW1b_lsrR Ligation	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
pBEW1b_lsrR_1	CGGGCATCCCTCG	CGTCACATTC	CCCGTAGCTG	AAAAAATGAA	ATGCTAGAGATG	TCTCTAGCG	CCCGAACG	AGTGGCGAATG	CGCGCA	CGCGCA
pBEW1b_lsrR_3
pBEW1b_lsrR_4
pBEW1b_lsrR_2
pBEW1b_lsrR Ligation	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
pBEW1b_lsrR_1	TGCGCTGTGAGT	CAACAGGACATG	GGCGACATCATG	CTCCGGTTATAT	CAGCCAGGGAAACGTTAATG	GGCCGAAAGGGC	CGGTGG	CGGCGATG	CGGCGA	CGGCGA
pBEW1b_lsrR_3
pBEW1b_lsrR_4
pBEW1b_lsrR_2
pBEW1b_lsrR Ligation	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
pBEW1b_lsrR_1	CATTTTAGCTACT	TTTTGACAAAAGGT	GACGTTGACGAA	ATACAACTACGAACTG	ATGTTGGCTTACCTTAA	CGCCCTG	CGACATA	CGGCGATGACGACA	CGGCGA	CGGCGA
pBEW1b_lsrR_3
pBEW1b_lsrR_4
pBEW1b_lsrR_2
pBEW1b_lsrR Ligation	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
pBEW1b_lsrR_1	CCCCTCCGGGTG	TGGCGTGG	CGAGGGGAGAAA	AAACGCGAACTGG	CGCGCTCAGATG	AAAGGGGTTATAC	CAACGCACTGG	TACCGATGAGGACA	CGGCGAT	CGGCGA
pBEW1b_lsrR_3
pBEW1b_lsrR_4
pBEW1b_lsrR_2

→ Sie

lsrR

→ Prime zum Sequenzierer, vom rho - Operator
 pBEW-rhalUP 5'- G A A G G T C G C G G A T T T C A G - 3'
 → nochmal alles vor vom Sequenzierer
 Order: 2901814

Expression von PFOMT Varianten & CTPS1

- 2ml ZY - 0.8G medium mit Einzel rohrie (BLU1 DE) angemischt (mit endo. AB)

→ 7h @ 37°C und 200 rpm inkubiert

→ OD⁶⁰⁰ gemessen ; 500µl abgenommen & pelletiert

Kultur	OD ⁶⁰⁰	↳ VK Probe für gel
pET28 PFOMT F103I	2	
pET28 PFOMT F103P	1,38	
— — F103V	1,22	
— — F103W	3,36	
CTPS11	6,12	

- 250 ml ZYP-SOSZ und entsprechend AB und 100 µl VK (1:2500) angemischt.

→ 17h @ 28°C / 200 rpm inkubiert

Kultur	OD ⁶⁰⁰
F103I	5,7
F103P	5,97
F103V	5,38
F103W	4,9
CTPS11	4,4

↳ je 500µl abgenommen & pelletiert für gel

- Zellen gerichtet bei $10.000 \times g$ / $4^\circ C$ für 10 min

↳ pfromt Variante @ $-20^\circ C$ eingefroren

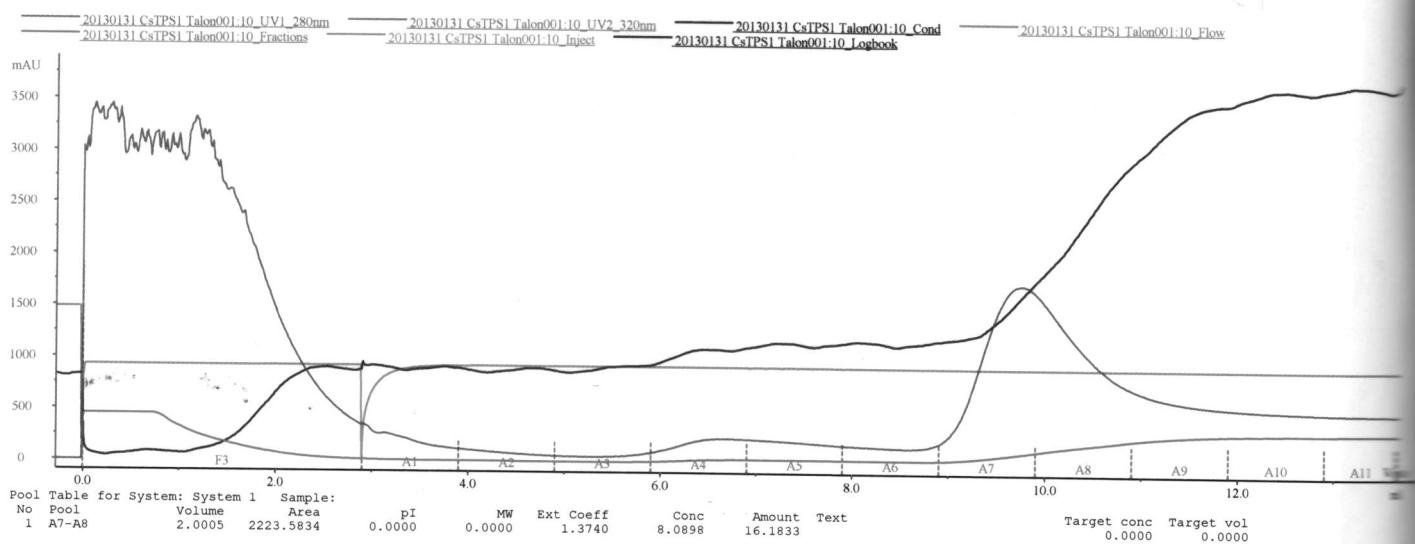
Kultur	gewicht des Zellpellets (g)
F103I	2,2
F103P	2,38
F103V	2,68
F103W	2,52
GTPS1	2,4

Centrifugierung

- Pellet in 20 ml Hypersalzbuffer aufgetragen und suspendiert
 - + 250 ~~100~~ µl Hypozymon (20 mg/ml)
- 1h @ $4^\circ C$ schüttelnd inkubiert
- 3x sonderweise 70% Amphiphall (für 30 s) [Lowloff 15]
- 2,5 µg DNase I zugegeben und 10 min @ $4^\circ C$ inkubiert
- 20 min Zentrifugiert @ $4^\circ C$ / $10.000 \times g$
 - ↳ lösliche Fraktion durch 0,23 µm ~~RE~~ Celluloseacetat (CA) Filter filtriert
- mit Hypert auf AKTA (HiTrep Talon FF, 1ml)
 - (A) Bindungslösung: 50 mM bis 500 mM NaCl, 10% Glycerin, 2,5 mM Imidazol pH 7
 - (B) Elutionslösung: → wie (A), aber 250 mM Imidazol

UNICORN 5.31 (Build 743)

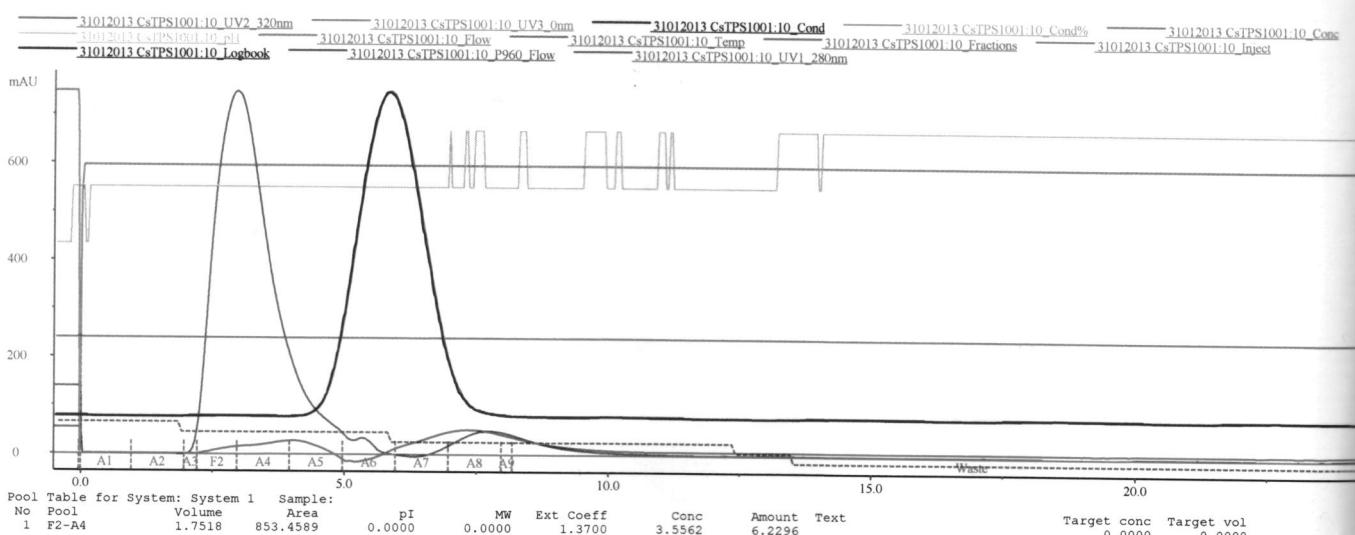
Result file: c:\...\WEB\20130131 CsTPS1 Talon001



→ Fraktion A7 & A8 gesammelt und 1ml auf Nitrap
 Desalting (5ml) sauber entzweit und ungepuffert
 in Puffer: 20mM Tris-HCl, 10mM DTT,
 pH 7

UNICORN 5.31 (Build 743)

Result file: c:\...\WEB\Desalting\31012013 CsTPS1001



↪ A3 + A4 vereinigt und mit Bradford gemessen ~ 508 µg/ml

Durchgeführt von
Performed by

Datum/
Date

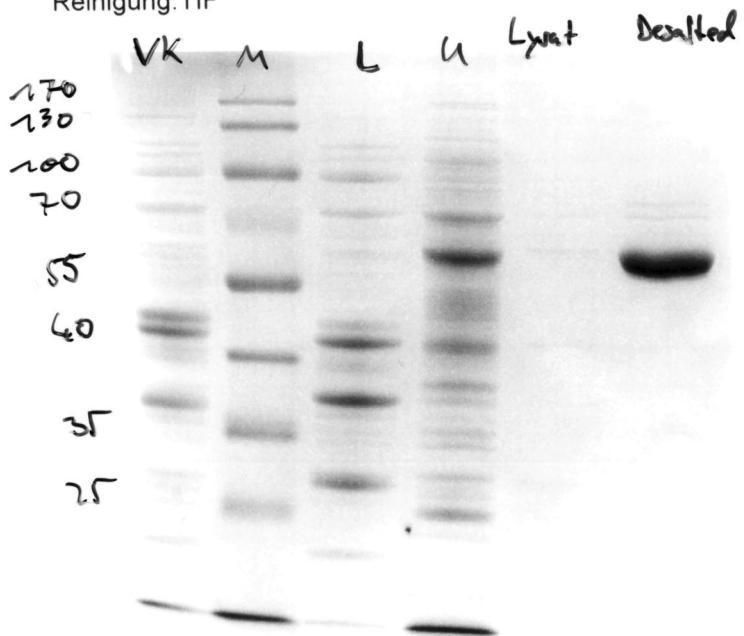
41.01.13

Bestätigt durch/
Approved byDatum/
DateFortsetzung auf Seite Nr.
Continued on page number

→ A5 + A4 gepoolt und mit Bradford
Protein Konzentration bestimmt (1:100 VD)

$$\hookrightarrow E^{595} = 0,249 \rightarrow \underline{\sim 508 \text{ } \mu\text{g/ml}}$$

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130201_CsTPS1_
Reinigung.TIF



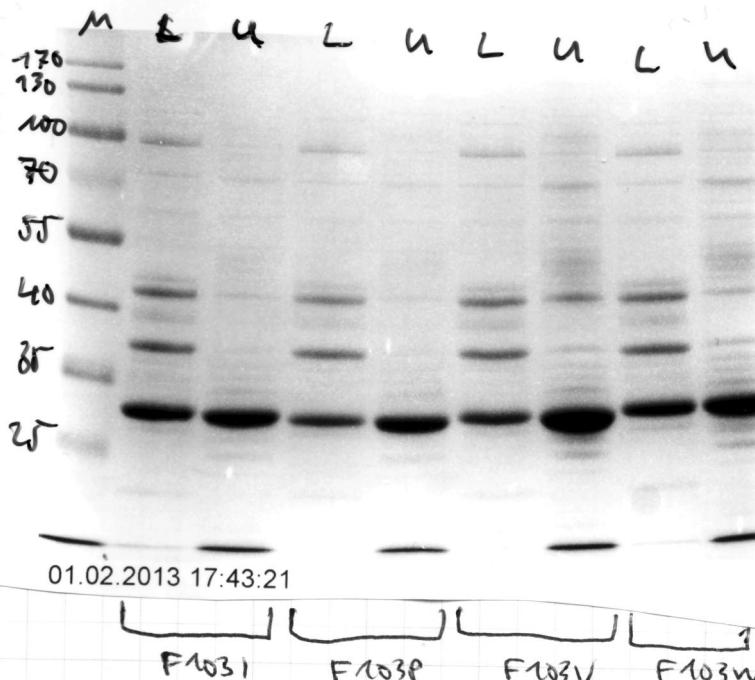
01.02.2013 17:45:07

VK - Vorläufer (nicht iodiniert)
L - lösliche Fraktion
U - unlösliche Fraktion

PFOMT Variante
Expressionstest

Zellgewicht Pellets (g)	Variante
2,78	F103P
2,68	F103V
2,55	F103W
2,2	F103I

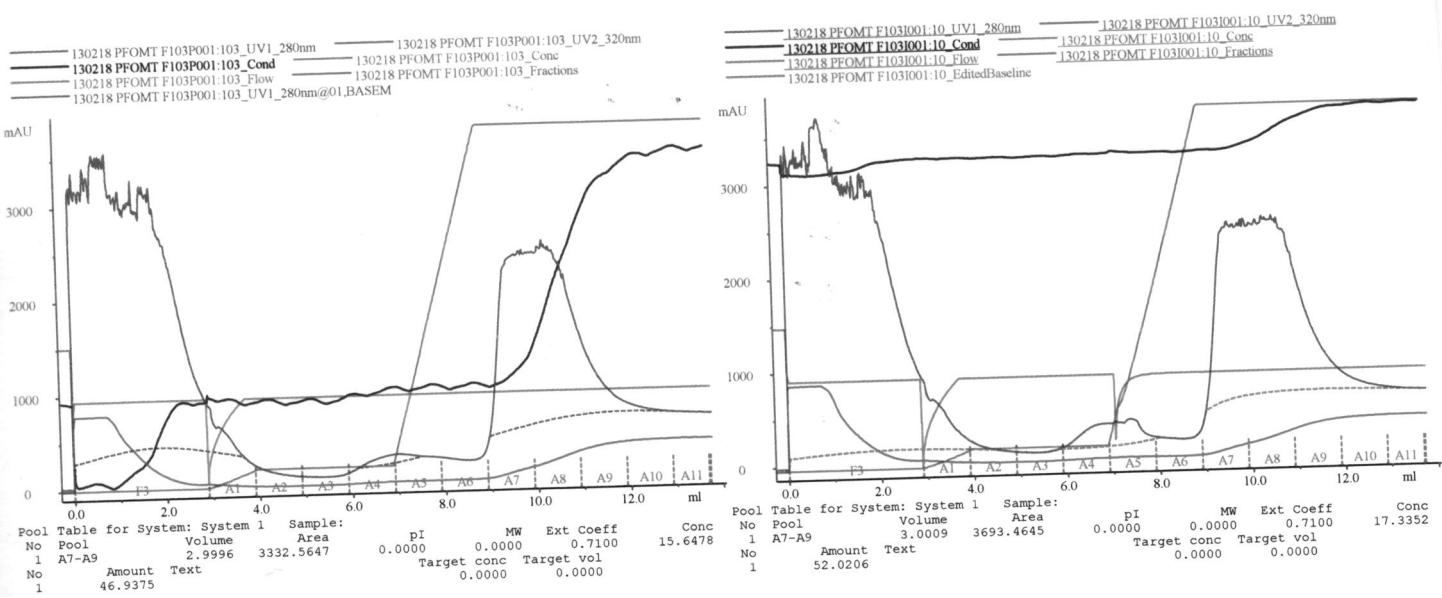
O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130201_PFOMT_V
arianten.TIF



Reinigung der Variante mit AKTA

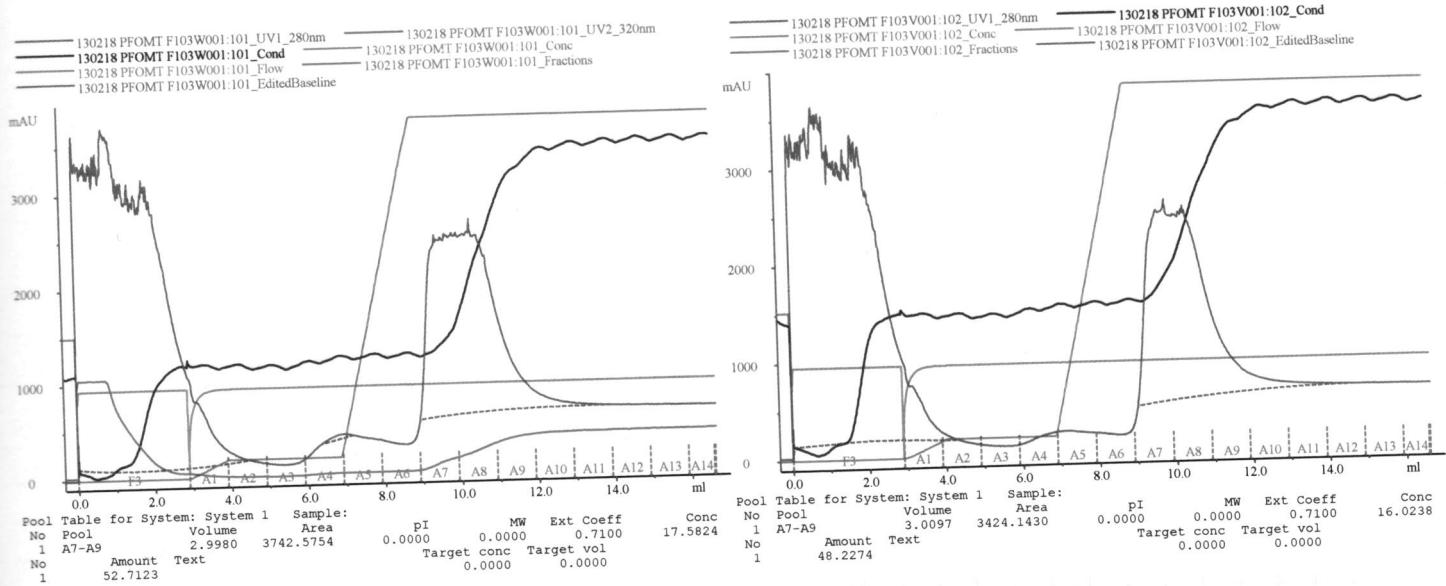
- Zellpellet in Cuprospurtr (~70ml) aufgenommen
- * - Hypoton (ca 2mg) zugegeben & bei 4°C inkubiert (SlowFreeze)
- 3x sonisiert (70% Amp, 30s, 1s on-off)
- # 3 mg DNaseI zugeben und 15 min @ 4°C ink.
- Suprat zur Klärung zentrifugiert (20min, 4°C, 10000xg)
- Suprat durch 0,23µm CA-Filtrat
- AKTA → auf ~~Slow~~ HiTrap Polox 1ml Säule aufgelegt

Puffer (Body): 50 mM Tris/HCl, 10% glycer, 500 mM NaCl
2,5 mM Imdarozol pH 7
- Flüssig (Eluate): wie Body, aber 300 mM Imdarozol



→ p Fraktionen A7 - A9 gepoolt und (3x) mit 25 mM HEPES, 5% Glyzerin, 150 mM NaCl, pH 7.5 dialysiert (je 1 h @ RT)

UNICORN 5.31 (Build 743) Result file: c:\...\WEB\130218 PFOMT F103I001

Durchgeführt von/
Performed byDatum/
DateBestätigt durch/
Approved byDatum/
DateFortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

NcoI

pBEW1b_lsrR Ligation pBEW1b_lsrR_1 pBEW1b_lsrR_2 pACYC_lsrR_3 pBEW1b_lsrR_4	CTGGTCGTAAATGAAATTCAAGGGATAATACCAAGGCAATCAACGATTCCGGAAATTTCAGAACAGGGAAATGTTGAGAAGAACAGTCGGCGGATGCG ...A.....TC ...A.....TC AT..AT...TC ...A.....TC
pBEW1b_lsrR Ligation pBEW1b_lsrR_1 pBEW1b_lsrR_2 pACYC_lsrR_3 pBEW1b_lsrR_4	TGGTTTACTATCACGACGGCTGACCCAGGAGTCAGCAGGAACTCGGCTTGACAGTTGAAGTGCGCATTTCTGGAGAAGAGGGCATAGT
pBEW1b_lsrR Ligation pBEW1b_lsrR_1 pBEW1b_lsrR_2 pACYC_lsrR_3 pBEW1b_lsrR_4	CCGGCATTTACCGCATACGATAATTCTCGCTTGAGGCTGAAATGAAACTCAATTAGTGTCAAGTTTCGCTGCACAGTCGGGTGAT
pBEW1b_lsrR Ligation pBEW1b_lsrR_1 pBEW1b_lsrR_2 pACYC_lsrR_3 pBEW1b_lsrR_4	CCCTGGCTTCGGAGCTGAGTGCGGTGGCGACTCGGGTAAAGCGGGCATATGTCGAGTAACTCAACACACAGTCGGCATTTGG
pBEW1b_lsrR Ligation pBEW1b_lsrR_1 pBEW1b_lsrR_2 pACYC_lsrR_3 pBEW1b_lsrR_4	TTTGGCGAGGCACCCATGAATACGTGCAACCGCTAAGTGGTTTATTCGTCAGCAGAAATTCCCTGGTCACGCTTCGGCTCGCTCGTTTATA
pBEW1b_lsrR Ligation pBEW1b_lsrR_1 pBEW1b_lsrR_2 pACYC_lsrR_3 pBEW1b_lsrR_4	TGACGGGAACTCGGGACGCTTAACCGGGCTGCAAGTGGAAATATTACCGGCTCCTGGCGATTCGGCATCCGGTGCACATTGCCGATACGGCTAA
pBEW1b_lsrR Ligation pBEW1b_lsrR_1 pBEW1b_lsrR_2 pACYC_lsrR_3 pBEW1b_lsrR_4	AAATTGGCGAAAGATGTCGTGAGCCGGCAAGCAGGTTGGCGATTGTCGGAATTGGTGTCGACTGACAGGACATGGGACACATTGCGTCA
pBEW1b_lsrR Ligation pBEW1b_lsrR_1 pBEW1b_lsrR_2 pACYC_lsrR_3 pBEW1b_lsrR_4	TCGGTTATAACGCCAGGGCAACAGTTAATGATTTGGCGAAGAAGGGCGTTGGCGACATTTCGGCTACTTTGGCAGCTTTGAGCAGAAAGTGCA
pBEW1b_lsrR Ligation pBEW1b_lsrR_1 pBEW1b_lsrR_2 pACYC_lsrR_3 pBEW1b_lsrR_4	CGAAATACAAAACATACAGCACTGATGGCTTACCTTAAAGCGCCATGAGAACCCATACCGTCGGCTGGCGTGGCGTGGCGTGGCGTGGCGTGGCG
pBEW1b_lsrR Ligation pBEW1b_lsrR_1 pBEW1b_lsrR_2 pACYC_lsrR_3 pBEW1b_lsrR_4	ACCAATTCGGCTGCAAATGAAGGCGGTATAATCACCCACTGGTACCGATCAGGACACACAGCAGCGGATTTACGTACTTAATTTCGATGACCTTA
pBEW1b_lsrR Ligation pBEW1b_lsrR_1 pBEW1b_lsrR_2 pACYC_lsrR_3 pBEW1b_lsrR_4	TTACCGGAGAGGCTGGCGGCCCTGCGAGGTGCGACAAGCTTGGCGCCCATATGCTTAAGTGCAGACAGGAAAGTAATCGTATTGACACCGCGCATTA

SacI

CsTPS1 - Kinetic analysis Pyrophosphat-Assay

Pyrophosphatassay

- Every substrate concentration in triplicates and once with denatured enzyme
- $50\text{ }\mu\text{l}$ Gesamtvolume \rightarrow Stop und Work Biomed

Typical plate layout:

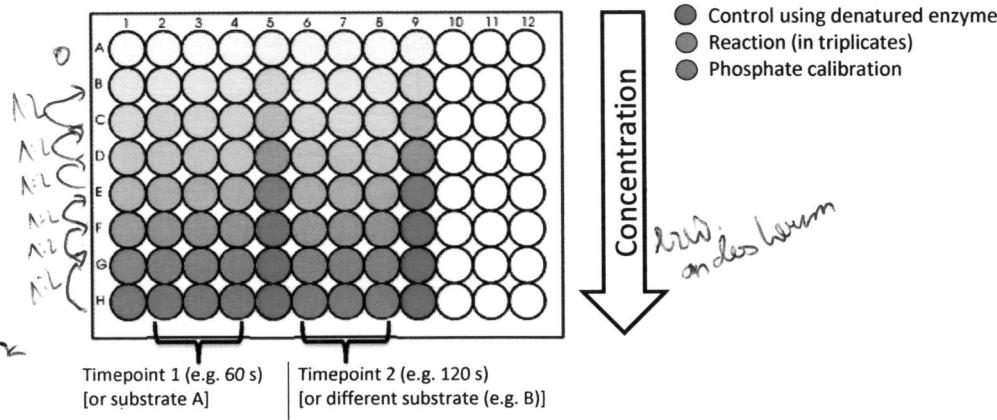


Figure out how many timepoints or substrates you want to screen:

You need 8×4 (triplicates+control) \times [number of timepoints] = ($\quad \times 25 \text{ }\mu\text{l}$) $\times 1.1 = \quad \mu\text{l Solution B}$
e.g. you have 7 timepoints, so you need $8 \times 4 \times 7 = (224 \times 25) \times 1.15 = 6,44 \text{ ml}$ of Solution B

Reagents:

Phosphate standard for calibration:

80 μM KPi stock solution
make 1:2 dilutions in assay buffer

Assay buffer:

For CsTPS1:
10 mM MOPS, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT at pH 7, 5% Glycerin

Substrate solutions:

- 5 mM GPP stock solution in 25mM NH₄HCO₃
- from that prepare 320 μM GPP stock solution in Assaybuffer (2x substrate solution)
- make 6 dilutions of stock solution using a 1:2 dilution each time
- using assaybuffer to make the dilutions
- this should come out to dilutions of 160, 80, 40, 20, 10 and 5 μM GPP in assay buffer

Solution B (enzyme-mix):

- 2 μM CsTPS1 (or X μM [needs to be tested prior] other PPI-producing enzyme)
- for CsTPS1 (73331 Da) 2 μM ≈ 147 μg/ml
- 16 U/ml PPase (inorganic phosphatase, yeast) (stock solution is 800 U/ml)
- in Assaybuffer

Also prepare a denatured version of solution B (do not denature B, but use denatured CsTPS1 to make a solution B)

Inorganic
Pyrophosphate
from E. coli, R
→ Sigma-Aldrich
T5907-1kg

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
-----------------------------------	----------------	---------------------------------	----------------	--

Reaction:

- Step 1: pipet 25 µl of the substrate solutions into the wells as displayed above
 Step 2: add 25 µl of **solution B** (or denatured solution B) to each well
 Step 3: incubate for the desired time
 Step 4: stop the reaction by adding 100 µl of Biomol Green reagent incubate for 20 minutes and measure the OD⁶¹⁰

measurement	Addition of solution B at (min:s)	STOP (Biomol reagent) at (min:s)	Measure OD at (min:s)
60 s	5	6	26
120 s	4:30	6:30	26:30
180 s	4	7	27
360 s	3	8	28
600 s	2	12	32
900 s	1	16	36
1200 s	0	20	40

$320 \mu\text{M GPP}$ aus 5 ml K^+ $\rightarrow 1:15,6 \text{ VD}$
 $\hookrightarrow 1,872 \text{ ml Puffer + } 128 \mu\text{l (5 ml GPP)}$
 $\equiv 2 \text{ ml } 320 \mu\text{M GPP}$

Anak: z.B. für 5,5 ml Solution B

110 µl 800 U/ml IP
500 µl (80 µg) GPPS1
4,39 ml Puffer
5 ml Solution B

Laborbuch Nr./Notebook no.	Fortsetzung von Seite/ Continued from page no.	Seite Nr./ Page number 38
----------------------------	---	-------------------------------------

GNTM Wurzeln

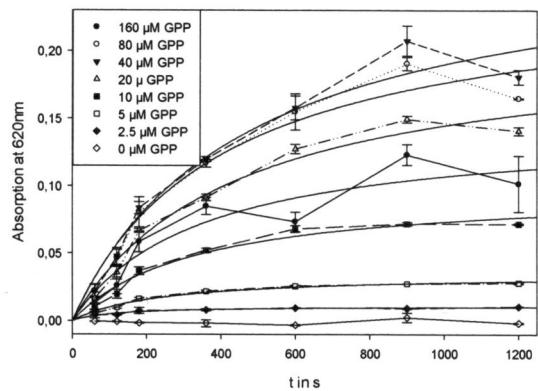
WS 132: 1 µM GNTM im Ansatz
generieren noch 60, 120, 180, 360, 600, 900, 1200 s

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
-----------------------------------	----------------	---------------------------------	----------------	--

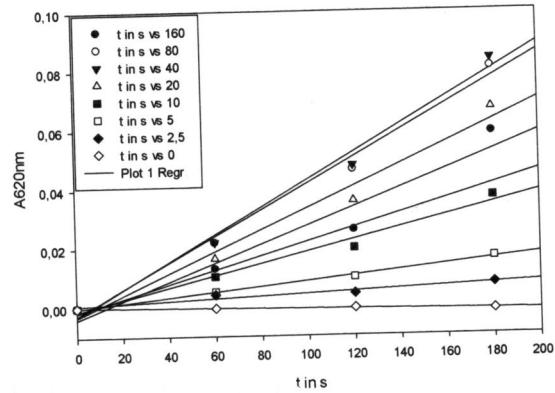
WE 8138

$$\text{Hill-Fit: } v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{(S_{0.5})^x + [S]}$$

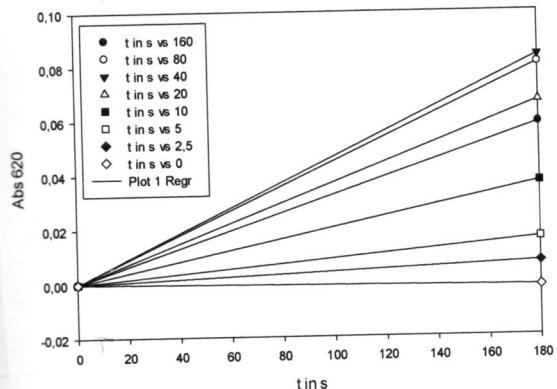
progress curves



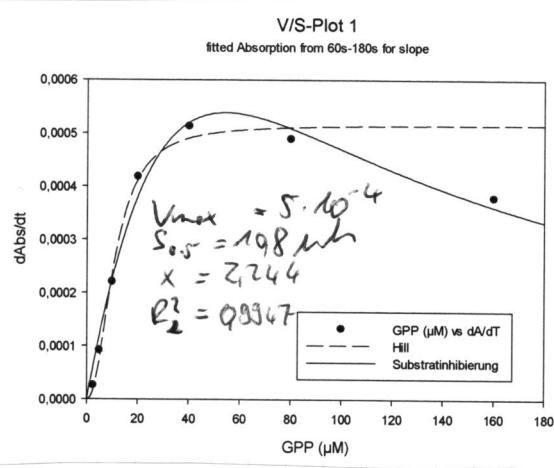
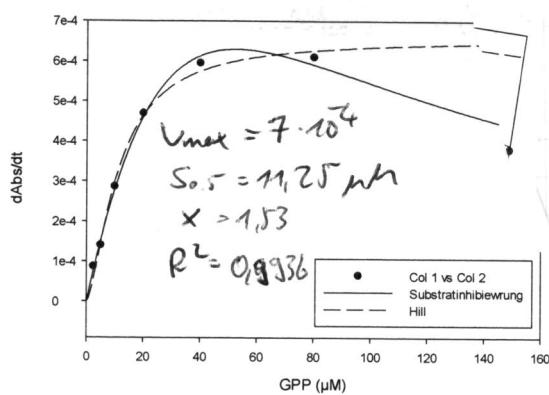
Progress Curves



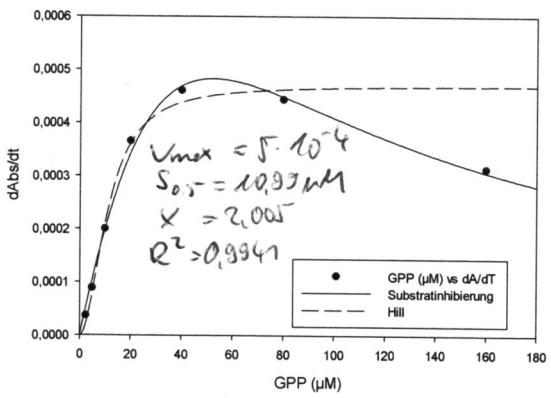
Progress Curve



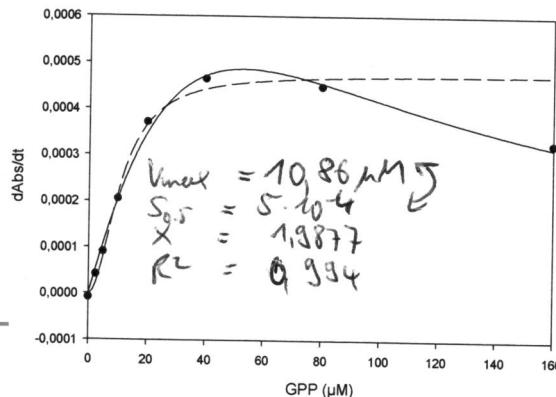
V/S-Plot 3
slopes by fitting progress curves hyperbolically [f(x)=ax/(b+x)], then dividing a by b



V/S-Plot 2
Fitted Absorption of 60, 120 and 180s through origin (0, 0) for slope



V/S-Plot



PFOMT-Assay mit SAM & Kaffeesäure

Reaktion (80 µl Gesamtvolumen):

- 8 µl Kaffeesäure (10 mM stock in 20% DMSO)
- 2 µl Glutathion (0.1 M in ddH₂O)
- 8 µl 10X Ringerbuffer (1 M Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.5)
- 1 mM SAM (1 mM loses auf biologische Aktivität.
5 mM stock solution)

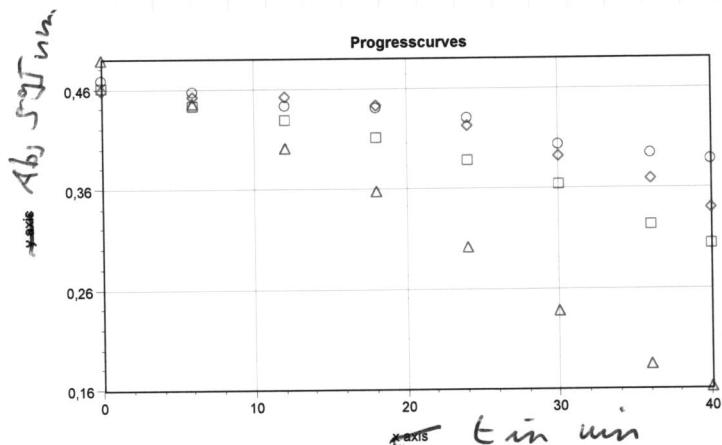
→ Start: durch Zugeben von 20 µg PFOMT

Incubation für 0, 6, 12, 18... min bei 30°C / 100 rpm (im
Schwinger)

Stop: Reaktionsstop durch Zugeben von 40 µl Stop-Lösung
Catechol-Reagenz

Catechol reagent: 1,5 mM FeCl₃
(immer frisch 1 mM Triton zubereiten)

→ nach Stop für
10 min inkubieren
und Absorption bei 535 nm
messen



- F103I (F103I: Time vs Values)
- F103P (F103P: Time vs Values)
- △ F103V (F103V: Time vs Values)
- ◊ F103W (F103W: Time vs Values)

Durchgeführt von/
Performed by

Datum/
Date
25.02.13

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

Klonierung von sfGFP, SspB2x MH

10x KOD HF Buffer	10µl
25mM MgSO ₄	6µl
2mM dNTPs (Kits)	10µl
KOD HF Polym.	2µl
ddH ₂ O	62µl

Ansatz:

je 45µl MH
 + je 1,5µl Primer
 + je 2µl template

sfGFP (755 bp)

template: von heraus 1µl 130^{ng} sfGFP
 → 1:10 VD und 1% agarose

Premier:

Nr.	Oligoname	Sequenz (5' > 3')	OD	µg	nmol
1	pUC_mut_BgII_f	GCGTATTGGGAGATCTTC	9.7	295	35,8
	_fw	CGCTTCCTC (27)			
2	pUC_mut_BgII_r	GAGGAAGCGGAAGATCT	8.0	213	25,6
	_rv	CCCAATACGC (27)			
3	sfGFP_BamHI_f	GCCATGGGATCCAAAGG	15.5	424	42,9
	_fw	CGAAGAGCTGTTCATG (32)			
4	sfGFP_ssra_X_hol	CTGTTTCTGAGTCCTT	10.4	316	29,8
	(35)	TATACAGCTCGTCCATG			
5	SspB_Ncol_f	TAATCACCATGGATTGT	8.2	225	26,3
		CACAGCTAAC (28)			
6	SspB_SacI_rv	GCCTGTGAGCTCTTACTT	14.9	428	43,8
		CACAACCGCGTAATG (32)			

} puc-mut.
 } sfGFP
 } SspB

SspB (~500 bp)
 - CpxP protease specificity-enhancing factor

(McGinnis et.al.;
 Molecular Cell (2006),
 22, 701-707)

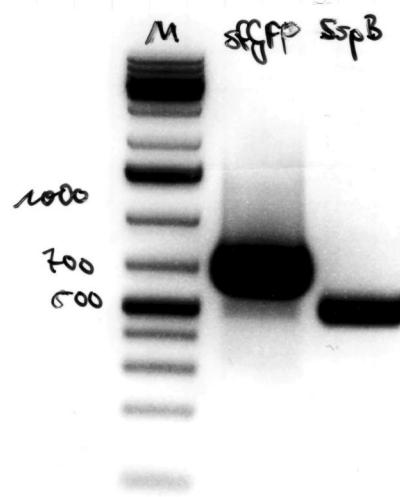
- template E. coli
 genomic DNA

45µl MH
 je 1,5 µl Primer
 2µl 13^{ng} sfGFP (plasmid)

45µl MH
 je 1,5 µl Primer
 2µl 50 µg/ml E. coli gen. DNA

PCR - Programm $\rightarrow 1,5' \cdot$ Agarosegel (10 µl PCR)

denat.	95°C	2 min	
	95°C	20 s	30x
anneal	57°C	10 s	
elong.	70°C	15 s	
elong.	70°C	2 min	
pause	4°C	∞	



27.02.2013 13:30:40

\rightarrow ~~ß~~ amplifizierte Fragmente mit
korrekter Größe \rightarrow Cleanup über
MN_n PCR & gel Cleanup Kitⁿ

M SfGFP SspB

SfGFP - eluiert mit 30 µl ddH₂O
SspB - - - 25 µl ddH₂O

	c (ng/µl)
SfGFP	242
SspB	60

Hutagenose: β gII-Schattstelle in pUC18

Reaktion

20 x PCR Ultra Buffer (Q5 Kit)	2,5 μ l
pUC18 (0,1 ng/ μ l)	1 μ l $\rightarrow \sim 7700$ bp
pUC-mint- β gII-fw	} β g 0,7 μ l
pUC-mint- β gII-rv	
Quichcage dNTPs	0,25 μ l
Pfu Ultra	0,5 μ l
ddH ₂ O	19,25 μ l

PCR

95°C	1 min
95°C	30 s
55°C	1 min
68°C	3 min
68°C	7 min
4°C	∞

\rightarrow nach PCR: 1 μ l Δ pn I - Verdun

+ 2,5 μ l FD ~~+~~ Buffer
+ 1 μ l Δ pn I FD
+ 19 μ l H₂O

\rightarrow 15 min @ 37°C ; 20 min @ 65°C

Transformation:

- \rightarrow Sph I
- \rightarrow T & Sph I in DNA transform.
- \rightarrow 1500 μ l SOC
- \rightarrow 200 μ l ausplattiert
- \rightarrow @ 37°C i. N.
- \rightarrow > 100 Kolos pro platte
- \rightarrow 5 Kolos geplattet & 2 ml Kultur
- \rightarrow Plasmide geprepp.

1 (+) 2 (-) 3 (-) 4 (-) 5 M 1 2 7

(only vector)

Verdau der pUC-Mutante

Ex MM

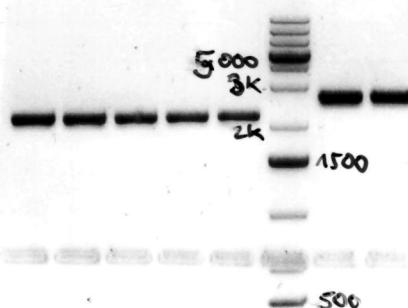
6 µl Buffer 0

→ p_Euc MM

+ 3 µl plasmid

3 µl BglII / NdeI

30 µl H₂O



↪ Positive Kontrolle (+)

(sollte 2 Fragmente

der Größen 498 bp & 2188 bp
ergeben)

BglII & NdeI NdeI ur

15:49:25

Negative Kontrolle (-)

1 µl Buffer 0 → sollte nur linearisierte

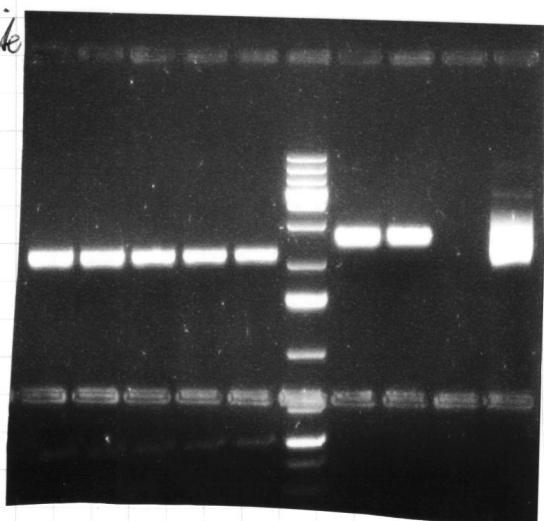
0,5 µl NdeI vektor (2686 bp)

seen

3 µl plasmid

55 µl H₂O

→ auf 1,5% Agarosegel



Plasmidprep:

pUC18 BglII	µg/ml
1	79,6
2	78
3	76,6
4	85
5	77,5

→ alle Plasmide tragen
BglII - Schnittstelle

→ zur Sequenzierung mit M3 prim.
Order ID: 2933425

→ in Klon 4
ist ein extra
Inset (Primer)

→ verwehe

gi|209210|gb|L09136.
pUC18_BglII_1
pUC18_BglII_2
pUC18_BglII_3
pUC18_BglII_4
pUC18_BglII_5

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....
CATGCCCTCGAGTCGACTCTAGAGGCACCCGGTACCGGAGCTCGAATTGCTATGCTACAGCTGTTCTCGTGIGAAATTGTATCCGGTCACAA

.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200.....
TTCCACACACACATACAGCCCGAGCATTAAGTGTAAAGCCTGGGTCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTATGGCTTGCGCTACTGCCCGTT

.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....
CCAGTCGGAAACCGTCGGTGCCTCGACCTCGATTATGAACTGGGTCACCCACCGGGAGAGGGTTTGGCTATTCGGCTCTCCGGCTTC

.....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400.....
GCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTGCGCTGGCTGCGGAGGCTATCAGCTACTCAAAGGGGTAACTACGGTTTCCAC

.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490.....500.....
AGAACTCAGGGATAACCCGGAGAACATGAGACAAAAGGCCAGCAGAACCGTAAAGGCGCCGTTGCGCTTTCATAGCTACGGCTCC

.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600.....
CGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATGAGCTCAACTCAGAGGTGGCGAACCGCAGGACTATAAGATAACAGGGTTTCCCTGGAGCTCC

.....610.....620.....630.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....
TCGTCGGCTCTCCGTTCGACCCCTGCCCTACCGATACTTCGGCTTCCCTTCGGAGCGTGGGTTTCTCATAGCTACGGCTAGGGTA

.....710.....720.....730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800.....
TCTCAGTCGGTAGGTGGCTCGCTCAACGCGCTGCGACGACCCCCTGACCCGACCGTGCGCTTACCGTACACTACGGCTCTGGAG

.....810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880.....890.....900.....
TCCACCCCGTAAAGCACGACTTATGCCACTGGTACAGGATTAGAGGCGAGGTATGAGGCTGCTACAGNGTCTGGAG

.....910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990.....1000.....
GGTGGCTTACACTACGGTACACTAGAAGGCGAGTATGGTACGCTGGCTCTGGAGCCAGTTACCTGGAAAAGAGTGGAACCTTGTATCCGG

Klonierung von SspB (ClpXP protease specificity-enhancing factor)

Verdau SspB

15 µl PCR - cleanup ($\approx 300 \mu\text{g}$)
 1 µl FD NcoI
 1 µl FD SacI
 3 µl FD buffer (~~H2O~~)
 10 µl H₂O

} 37°C für 15 min inkubiert
 } 20 min @ 75°C Enzyme inaktiviert
 → MN PCR & gel cleanup eluiert in 30 µl
 C = 26,2 $\frac{\mu\text{g}}{\text{µl}}$

Ligation SspB in pETYC, pCDF, pEW1a, pEW1b

5x MMs

10 µl T4 Ligase Buffer
 1 µl T4 Ligase (50 U/µl)
 77 µl ddH₂O

→ p Reaktion 16,6 µl MM
 + 1 µl SspB Fragment ($\approx 26 \mu\text{g}$)

① + 1,3 µl pETYC (\approx) + 1 µl H₂O

② + 1 µl pCDF (\approx) + 1,4 µl H₂O

③ + 2,4 µl pEW1a (\approx)

④ + 1 µl pEW1b (\approx) + 1,4 µl H₂O

→ Ligation 1h @ 22°C, danach über Nacht @ 4°C

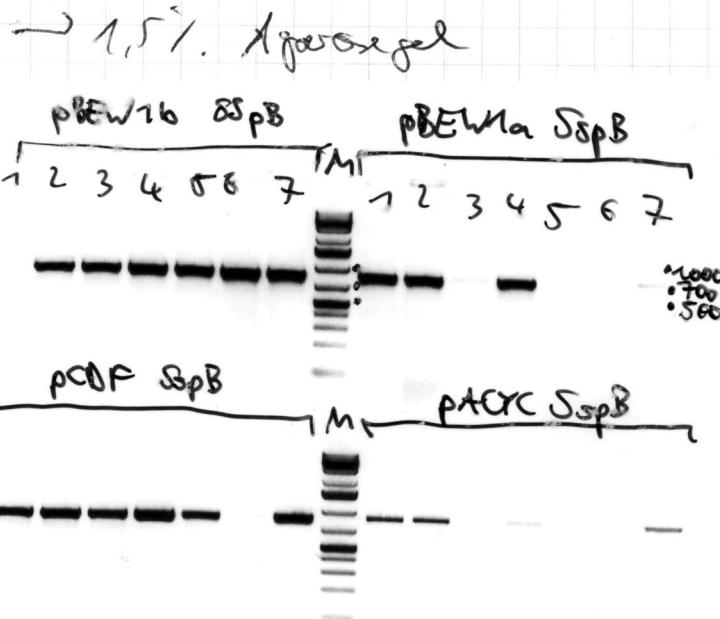
→ 8 µl stock in 0H5α transformiert (500 µl SOC, 100 µl plattiert)

→ ^{Platte} über Wollenecke @ RT inkubiert

- nach dem Wochenende alle Platten mit Kolonien,
jedoch waren die meiste sehr klein (Satelliten) (wie Satellitenkol.)
- Colony-PCR von alle großen, und paar kleinen Kolonien
30x M1

60µl Tag Buffer
 12µl dNTPs
 je 12µl Prime (T7 Korn & SspB-Fw)
 3µl Dream Tag Poly.
 50µl H₂O

PCR



11.03.2013 14:35:48

Konstrukt	Nr	c (ng/ml)	Zusammen
pBEW1a SspB	1	70	
	2	73,8	
pBEW1b SspB	2	149,9	
	3	170,2	
pCDF SspB	1	146,5	
	2	129,3	3 138
pATC SspB	1	84,2	
	2	87,7	3 85,8

Expressions test IsrR

- ① pACYC Duet-1 IsrR } in BL21 (DE3)
 ② pCDF Duet-1 IsrR } in BL21 (DE3)
 ③ pBEW1a IsrR }
 ④ pBEW1b IsrR } in DH5α

~~in~~ in 4 verschiedene Medien je 1ml Kultur exprimiert

- ① ZYP-T052 mit 0,2% L-Rhamnose / 0,05% Glucose
 ② ZYP-T052 mit 0,2% Rhamnose / 0,15% Glucose
 ③ ZYP-T052 mit Lactose
 ④ ZYP-0.8G

medium ZYP-T052:

~ 928 ml ZY-Medium
 1 ml 1M MgSO₄
 200 µl Trace metal mix
 50 ml ~~NBS~~ 20x NBS
 + 20 ml 50 x T052:

- ① 2% Glyceri ③ 2% Glyceri ⑤ 2% Glyceri
 2,5% Glucose 7,5% Glucose 2,5% Glucose
 10% Rhamnose 10% Rhamnose 10% Lactose

→ 1ml Medium (mit entsprechendem AB) und ein zelllobmi angeimpft und über Nacht (16-18h) bei 37°C / 200 rpm inkubiert

am nächsten Morgen → OD⁶⁰⁰ bestimmt
 dafür Kultur 1:20 verdünnt
 → 10 µl Probe + 190 µl ZY-Medium
 ZY-Medium als blank

OD ⁶⁰⁰	① pACYC	② pCDF	③ pBEW1a	④ pBEW1b
Ⓐ 0,05	11,7	11,9	11,4	14
Ⓑ 0,15	18,52	14,9	11,2	15,9
Ⓒ Lac	13,95	11,4	10,1	15,8
Ⓓ ZYP-083	12,03	8,3	13,3	13,9

→ je 1 ml Zellsuspension pelletiert (5 min @ 10kxg)
 → pellet in 600 µl B-PER II aufgesonne & Zellabdrücken
 gemacht



B-PER II Protein extraction

- Determine OD⁶⁰⁰ of bacterial cell culture
- Harvest 1.5 ml bacterial culture by centrifugation
- Resuspend cell pellet in X µl B-PER II-solution
 - o 150 µl if OD⁶⁰⁰ = 1-3
 - o 300 µl if OD⁶⁰⁰ = 3-6
 - o 500 µl if OD⁶⁰⁰ > 6
- Vortex for 1 minute
- Optional: Add 20 µg/ml Lysozyme and incubate at RT for 10 min ← nicht gemacht
- Flash-freeze in liquid N₂, thaw and vortex
- Repeat freeze-thaw-vortex (2x) → 1x gemacht
- Add 20 µg/ml DNaseI and centrifuge at 10.000xg for separation of soluble and insoluble fraction
- Pipet supernatant into new tube
 - o Dilute 10 µl supernatant 1:4 in water
 - determine protein concentration using Bradford
- Resuspend insoluble fraction in X µl B-PER II (see above)
- Use ~15 µg of soluble protein on gel
 - o use the same volume for insoluble fraction
 - for purified protein use ~ 10 µg on gel

Amb gel aufgezogen:

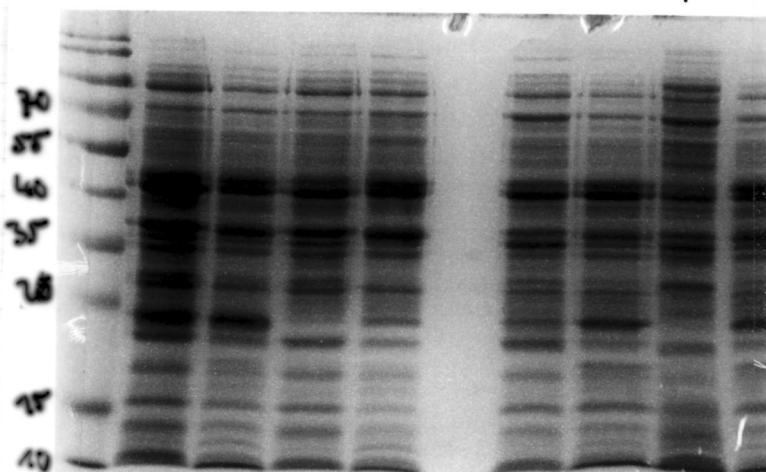
- ① - 20 µl
- ② - 15 µl
- ③ - 7 µl
- 4 - 10 µl
- 5 - 20 µl
- 6 - 11 µl
- 7 - 20 µl
- 8 - 13 µl

- 9 - 16 µl
- 10 - 15 µl
- 11 - 17 µl
- 12 - 14 µl
- 13 - 15 µl
- 14 - 20 µl
- 15 - 11 µl
- 16 - 19 µl

- 12% SDS-PAGE

⑨ ⑩ ⑪ ⑫
— rha 0.15 —

⑬ ⑭ ⑮ ⑯
— ZYP 0.85 —

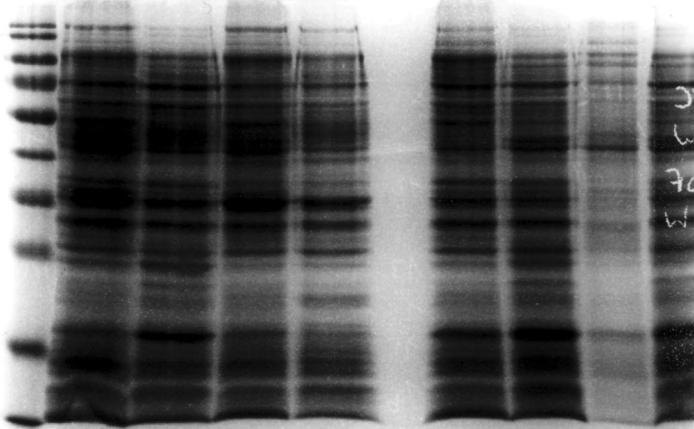


15.03.2013 10:01:26

9 10 11 12 13 14 15 16

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130315_Express
ionstest_lsrR_insoluble_2.TIF

M — rha 0.15 — — ZYP 0.85 —



15.03.2013 17:03:23

Durchgeführt von/
Performed by

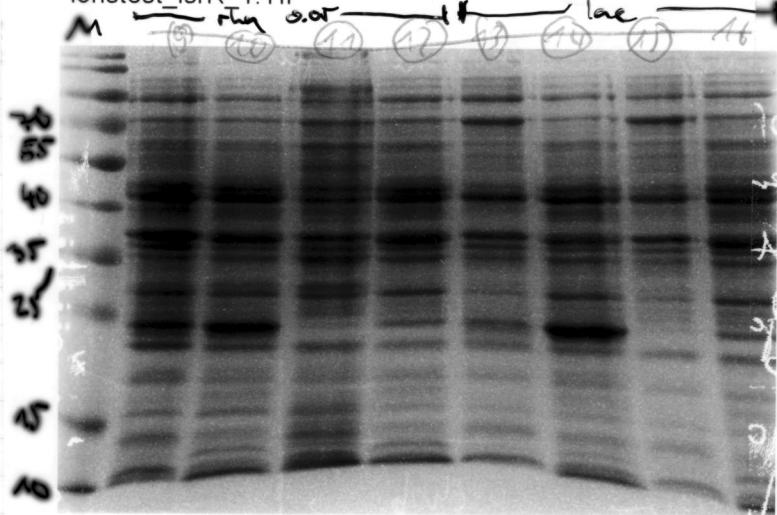
Datum/
Date

Beschriftungen/
Approved by

Datum/
Date

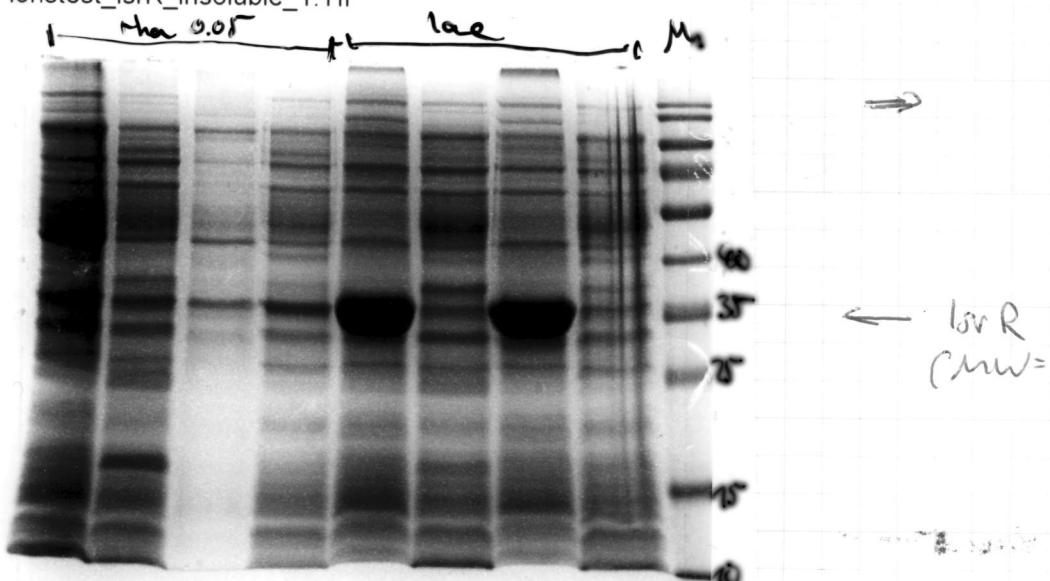
Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

1 2 3 4 5 6 7 8

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130314_Express
ionstest_IsrR_1.TIF

15.03.2013 10:02:53

1 2 3 4 5 6 7 8

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130315_Express
ionstest_IsrR_insoluble_1.TIF

15.03.2013 17:05:29

- keine richtige Expression mit pBEW Vektoren
- Protein in unlösbar Fraktion → Expression mit pCDF / pACYC-Duet Vektoren

Expressions test IsrR - ②

- Expressionstest pBEW1a/b IsrR mit C + Rhamnose *
- 2ml Medium (+AS) je mit Einzelblöcke angeimpft
- über Nacht bei 37°C 100 rpm induziert
→ OD über Induktionsplatten bestimmt

- 500µl Kultur pelliert (5 min 20Kg)
- in 300µl B-PEF aufgetragen (siehe S. 52; Anschluss)
- entsprechende Menge auf 10% SDS-PAGE aufgetragen

	DH5α	OD ₆₀₀	SL21
pBEW1a IsrR	A	6	5.4
	B	10	6.5
	C	10	8.8
pBEW1b IsrR	A	6	5.9
	B	7.8	8.7
	C	9.5	8.1

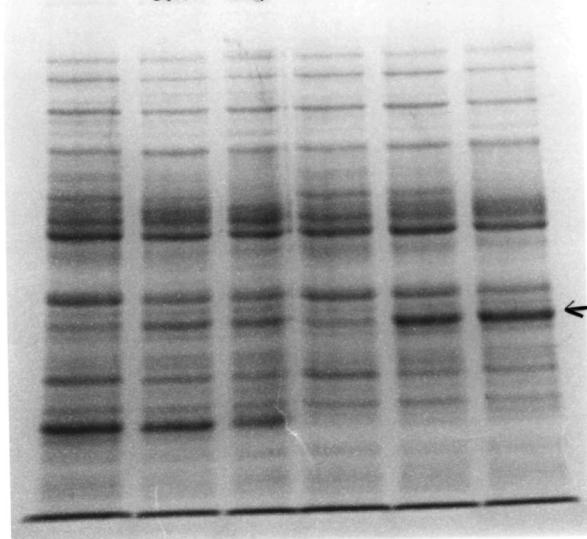
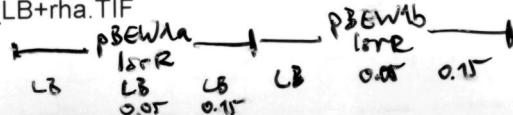
* A - LB-Medium

B - LB-Medium + 0.05% Glucose + 0.2% L-Rhamnose

C - LB-Medium + 0.15% —

Stamm:

DH5α * +

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130319_Express
ionstest_LB+rha.TIF

19.03.2013 18:04:32

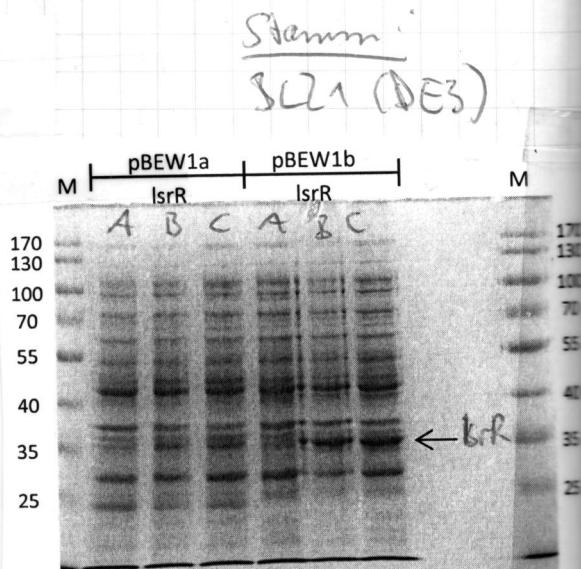


Abbildung 1. Expressionstest pBEW1a/b IsrR in E. coli

NS 07.17

† S. 56

- DHFR

→ auf gel pBEW1a

A	10 µl
B	6 µl
C	6 µl

pBEW1b

A	10 µl
B	8 µl
C	6 µl

BCI (DE3) → ~~auf gel~~OD₆₀₀in B-PER II entnommen: auf gel:

pBEW1a

A	5.4	275 µl
B	6.5	330 µl
C	8.9	450 µl

→ je 10 µl
auf gel

pBEW1b

A	5.9	300 µl
B	8.7	660 µl
C	8.1	410 µl



- ⇒ überexpression von lsrR ehembar
- Unterschied von low-copy (pBEW1a) und high-copy vector (pBEW1b) ehembar (pBEW1b macht mehr Proteine)

→ ABER: trotzdem zu wenig Protein

↳ RBS verantwortlich?

- ⇒ mit RBS calculator (reverse engineering) Translation Initiation Rate berechnet ⇒ liegt bei 6080 an
- ↳ pCDF lsrR (NT) liegt bei 81972 an
- RBS neu berechnen & klauen? → optimieren

Klonierung des bestellten DNA-Fragmentes
Isr-MCS-DAS+4 in pUC18

Vorstan pUC18 mit NdeI & SphII

13 µl pUC18 SphII (\approx 975 µg)

2 µl Buffer Green FD

1 µl FastAP

1 µl NdeI FD

1 µl SphII FD

2 µl ddH₂O

→ 15 min @ 37°C, 20 min @ 75°C

→ auf 1% Agarosegel + Bande aus schriftk

→ mit MN PCR & gel Purification Kit zweig
(in 25 µl ddH₂O elutet)

$$\rightarrow \underline{c = 14 \frac{\mu g}{\mu l}} \quad E^{\frac{260}{230}} = 0,64$$

Vorstan Fragment

10 µl 40 µg Isr-MCS-DAS+4 Fragment

2 µl FD buffer

1 µl NdeI FD

1 µl SphII FD

6 µl ddH₂O

→ 15 min @ 37°C, 20 min @ 75°C

→ PCR - cleanup (in 25 µl ddH₂O elutet)

$$\underline{c = 14,6 \frac{\mu g}{\mu l}} \quad E^{\frac{260}{230}} = 2,3$$

Ligation

MM 0.5 µl T4 Ligase (5 units/µl)
 2 µl T4 Buffer
 10 µl ddH₂O

→ 6.25 µl MM
 + 1.8 µl plasmid (@ 14 µg/ml)
 + 2 µl Fragment (@ 14.6 µg/ml)

→ Inkubation 1L @ 27°C, 4°C über Nacht

→ E. coli ist DH5α transformiert

- in 300 µl SOC
- 1L @ 37°C

→ 100 µl ausplättet auf LB+Amp

→ Über Nacht @ 37°C

→ viele Kolonie (> 100)

→ Colony PCR
1x MM + Masterplate

4,4 µl dNTPs
 ± 4,4 µl Primer (T7 term & pMGB 1034-1 fw)
 22 µl Taq Buffer
 1,1 µl DreamTaq
 183,7 µl H₂O

→ 3 ml Kultur gemacht von Klonen 1-6

→ Plasmid prep.

pUCB1	μg/ml
1	215.8
2	238.8
3	204.4
4	235.7
5	230.6
6	297.1

→ Sequencing mit pQE für
Prime (Order ID: 2950445)

→ Fragment erfolgreich blontet in
Klonen 1-5

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 pUCB1 Ligation of ls TCGCGCTTCCGATGAGCCTGAAACCTCTGACCATGCAAGCTCCGGAGACGGTCACAGCTTGCTGTAAGCGATGCCGGAGCAGACAAAGCCG
 pUCB1_1 G.A...A.G .G AG A...
 pUCB1_2 GT CA. C .G AGAC GTG
 pUCB1_4 GT .G .GGAG .GTG
 pUCB1_3 GTG. GGCG .GGAG ...
 pUCB1_5 .G...GCGG...
 Note! →

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 pUCB1 Ligation of ls TCAGGGCGCTAGCGGTGTTGGCGGTGCGGGCTGACTATGGGCACTAGACAGATGACTGAGAGTCACCAAAAGGAGCTAGCTGA
 pUCB1_1
 pUCB1_2
 pUCB1_4
 pUCB1_3
 pUCB1_5
 .0

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 pUCB1 Ligation of ls CCTGCAGTTAGGGTGAATTGCAATACTTATCTTACTTGAACATAATTAAATTTAAATGCAATTGTTCAAGTTCTGCTCATTTATCTGATGGC
 pUCB1_1
 pUCB1_2
 pUCB1_4
 pUCB1_3
 pUCB1_5
 .0

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 pUCB1 Ligation of ls AACACAGTTGACTACAGACATGACAAACGCAACCGTGAAAGTCAAATAGCATATAATTGTGATCATTGCTCGGAAATATGCAATGTCACCT
 pUCB1_1
 pUCB1_2
 pUCB1_4
 pUCB1_3
 pUCB1_5
 .0

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 pUCB1 Ligation of ls AAGGTAAAGCAAAATTAAAGCAGAAATCACATTGTCAAACTACCCCTGAAAGACTAACGCGGGGAAATATGGATCCGAAATTCTTAAGCCTGACA
 pUCB1_1
 pUCB1_2
 pUCB1_4
 pUCB1_3
 pUCB1_5
 .0

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 pUCB1 Ligation of ls AACTTGCGCCGACTCGAGAGGGCGAACAGACAAACTACTCTGAAACTACGGGAGCGCTTAACTAACGGCGAAAGAGACTGAGTTGGCTGC
 pUCB1_1
 pUCB1_2
 pUCB1_4
 pUCB1_3
 pUCB1_5
 .0

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 pUCB1 Ligation of ls TCCACCGCTGAGCATAACTGCAATACCCTTGCGGCTCTAACCGGTCTTGAGGGTTTTGCTGAAAGGAGGAATAGAGCTCCGCTTCCTCG
 pUCB1_1
 pUCB1_2
 pUCB1_4
 pUCB1_3
 pUCB1_5
 .0

Fragmet → 3' II

Verdun von sfGFP & pUCB1 für Ligation

mit XbaI, BamHI

sfGFP4 µl PCR-Reaktion ($\approx \sim 100\mu\text{g}$) [S. 41 f.]

2 µl FD Buffer

1 µl BamHI FD

1 µl XbaI FD

12 µl ddH₂OVerdun pUCB1 (Klonen 1-6)7x MM

7 ml Fast AP

14 µl FD Buffer

7 µl XbaI FD

7 µl BamHI FD

77 µl ddH₂O↳ für

16 µl MM

4 µl pUCB1 - Klon

Ligation7x MM

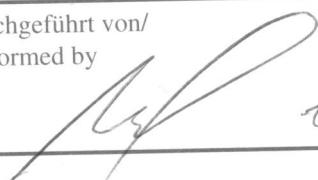
1,4 µl T4 Ligase

7 µl T4 Buffer

5,4 µl sfGFP ($\approx 237\mu\text{g}$)4,93 µl ddH₂O→ Reagenzien:

9,1 µl MM + 0,9 µl Verkreuzungsfragment

→ Ligation 1h @ 22°C
→ 4°C über Nacht

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	20.03.13			

- Sph der Aggregationsreaktion in DTS-a transformiert
- Sph Aggregationen zu 80 μl -thiget Zelle gebe
 - 15 min auf Eis
 - 30s @ 4°C
 - 1 min auf Eis
 - + 500 SOC-Medium
- 1h @ 37°C / 200 rpm
- 100μl Zellsuspension ausplattet auf LB +amp
- über Nacht @ 37°C
- gelb Fluoreszenz Kolonie geprägt für Kimpmp-Kultur
- ~~→~~ 2ml Kultur
- Kimpmp

pUCB1 sfGFP-DAS+4	c (ng/ml)
①	104.2
②	159.4
③	33
④	54.9

→ zum Sequenzierungsschritt arch 1D: 2955.068
mit T7 Klon primer

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 pUCB1 sfGFP
 pUCB1 sfGFP 1 ~~ATTCGACTTATTCGTGAAATACTGCACCTAACGGTTAGACAAATTAAAAGCAGAAATCACATTGTCAAAACCTCACCTCAAAACCTGA~~
 pUCB1 sfGFP 2
 pUCB1 sfGFP 3
 pUCB1 sfGFP 4
 210 ~~Bsp 1~~ 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 pUCB1 sfGFP
 pUCB1 sfGFP 1 ~~ACGGGGGAAATATGGGATCCAAAGCGAGAACCTGGTCACTGCCTGTGTCGATCTGGTGCGACCTGGATGGATGATGTTAACGCCACAAATTAGGGT~~
 pUCB1 sfGFP 2
 pUCB1 sfGFP 3
 pUCB1 sfGFP 4
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 pUCB1 sfGFP
 pUCB1 sfGFP 1 ~~CCGGGGGAAAGCGAGGGTAGCTACAAATGGCAACTGACCTGAAATCATCGTACCCACGGAACTGCCTGTGCGCTTGCGCTACACTGGTTAC~~
 pUCB1 sfGFP 2
 pUCB1 sfGFP 3
 pUCB1 sfGFP 4
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 pUCB1 sfGFP
 pUCB1 sfGFP 1 ~~ACTCTGACCTATGGCTGCATATGTTAGCCCTACCTGATCACATGAAACAGACGATTCTTCAAAACGCTATGCGTAAGGTTATGTCAGAGC~~
 pUCB1 sfGFP 2
 pUCB1 sfGFP 3
 pUCB1 sfGFP 4
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 pUCB1 sfGFP
 pUCB1 sfGFP 1 ~~GTAACATCAGCTTTAAAGCGATGGCACCTATAAAACCGTGCCAGGTAATGAAAGGTACCTGGTCACCGTATGACTGAAAGGTTATGTCAGAGC~~
 pUCB1 sfGFP 2
 pUCB1 sfGFP 3
 pUCB1 sfGFP 4
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 pUCB1 sfGFP
 pUCB1 sfGFP 1 ~~TTTCAGAAGGAGCGCACATCTGGCCATATACTGGAGTATACCTCACACGCCATAACGTTACATTACCGGCCACAAACGAAAAACGGGATCAA~~
 pUCB1 sfGFP 2
 pUCB1 sfGFP 3
 pUCB1 sfGFP 4
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 pUCB1 sfGFP
 pUCB1 sfGFP 1 ~~GCGAACTTCAAAATCGCCACACGCTGGAGATGGTCCGTCACTGGCAGATCATTCAGCAGAACACCCGATTTGGAGATGGTCCGTACTGTC~~
 pUCB1 sfGFP 2
 pUCB1 sfGFP 3
 pUCB1 sfGFP 4
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 pUCB1 sfGFP
 pUCB1 sfGFP 1 ~~CGGACAACTCACTATCTGAGCACCCAGTCAGTCGAGTAAAGACCCGACAAAAACGTGACCAACATGGTCGTGGAGTTGTTACACGGCCGGTAT~~
 pUCB1 sfGFP 2
 pUCB1 sfGFP 3
 pUCB1 sfGFP 4
 910 920 930 ~~XL~~ 940 950 960 970 980 990 1000
 pUCB1 sfGFP
 pUCB1 sfGFP 1 ~~TACACATGGCATGGAGCAGCTGATATAAGGGACCTCGAGAGGGCGCGAACGAAACTACTCTGAAACATACGGGACGGCTTAAACAAACCGCAGA~~
 pUCB1 sfGFP 2
 pUCB1 sfGFP 3
 pUCB1 sfGFP 4
 SFP
 Delte? ?

Co-
 → Transformation von:

0,5 μl pUCB1 sfGFP-DAS+4 ① (@ 104 μl)

b) ② 0,5 μl pβEW1b ISR ①

③ 0,5 μl pβEW1b Ssp ②

④ 0,5 μl pβEW1b amplif vector

in E. coli DH5α → auf LB mit 100 μg/ml Amp b,
 50 μg/ml Streptomycin

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	05.04.13			

Colony PCR um Anwesenheit beider Plasmide zu überprüfen

Colony PCR - mix I

2,4 µl dNTPs
 2,4 µl sfGFP-fw
 2,4 µl sfGFP-rv
 8 µl Puffer (Dream Tag)
 0,4 µl DreamTag
 64,4 µl H₂O

Colony PCR mix II

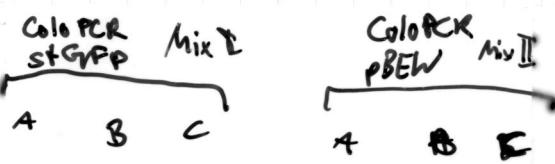
wie Mix I, aber mit anderen Primern
 → ThaIP & T7Km

→ Colony-PCR-Programm (siehe Buch 2. S. 181)

Elongation Phase 1:30 min

→ erwartete Fragmentgröße

- | |
|--|
| sfGFP (Mix I) → 736 bp
SspB (Mix II) → 907 bp
pBEW
lsrL (Mix II) → 1389 bp
♂ (Mix II) → 456 bp |
|--|



05.04.2013 14:25:01

Enhancement: 1
 Exposure Time: 500

Brightness: 50
 Contrast: 50
 Gamma: 25

A - pUC81 sfGFP + pBEWb
 B - + pBEW1b SspB
 C - + pBEW1b lsrL

Durchgeführt von/
Performed by

Datum/
Date
05.04.13

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

PFOmt - Amplification für Klonierung in MCS II
von pBETw

Groß 773 bps

Reaktion:

5 µl KOD HS Buffer

3 µl 25 mM MgSO₄

5 µl 2 mM dNTPs

je 1,5 µl PFOmt-BglII-fw
PFOmt-XbaI-rev

0,5 µl (= 35 µg) pET28a(+) PFOmt

1 µl KOD HotStart Polymerase
32,5 µl ddH₂O

Programm

95°C 2 min

95°C 20 s

62°C 10 s

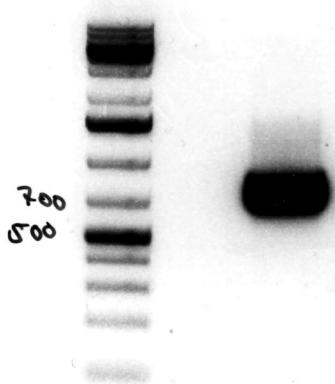
70°C 15 s

70°C 2 min

4°C ∞

~ 1,5% Agarose von PCR

M PCR



→ MN PCR Cleanup

→ in 30 µl ddH₂O eluted

⇒ 216 µg / µl

Urethan von pBETw 1b Urk, 816 bp & PFOmt

① PFOmt

5 µl PCR Cleanup (= 1080 µg)

1 µl FD XbaI

1 µl FD BglII

1 µl FD DntB

1 µl ddH₂O

(2+3)

2x mix

2 µl FD XbaI

2 µl FD BglII

2 µl FastAP

4 µl FD DntB

+ 16 µl H₂O

Durchgeführt von/
Performed by

[Signature]

Datum/
Date

11.06.18

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

(2) + (3)

18 μl MM + je 7 μl pBEW1b ISR & pBEW1b SSpb

→ 15 min @ 37°C verdaut

→ 20 min @ 70°C inaktiviert

→ PCR cleanup mit MN Kit

	c (μg/ml)	E 280/230
(1)	32,7	1,97
(2)	18,6	0,78
(3)	20,3	1,31

Umlauf

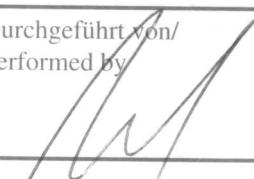
Ex MM
 5 μl T4 Lyse Buffer
 1 μl T4 Lyse
 35,5 μl H₂O

8,3 μl MM
 + 1,2 μl plasmid (p~~BE~~(2) oder (3))
 + 0,5 μl Fragment (2)
 oder H₂O
 für Konkurrenz

Reaktion

- (1) pBEW1b SSpb + pFO10T
- (2) pBEW1b ISR + pFO10R
- (3) pBEW1b SSpb + H₂O
- (4) pBEW1b ISR + H₂O

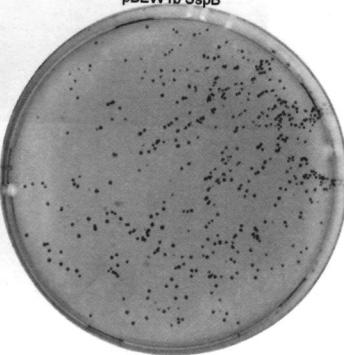
→ 1h @ 22°C inkubiert, danach 4°C über Nacht
 & 2 Worte @ -20°C

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	11.04.19			

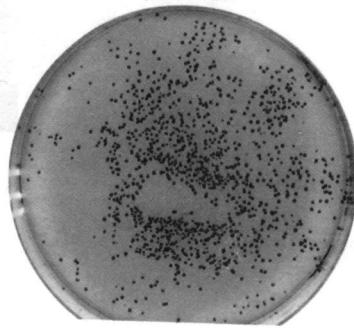
pBEW1b empty vector



pBEW1b SspB



pBEW1b IsrR

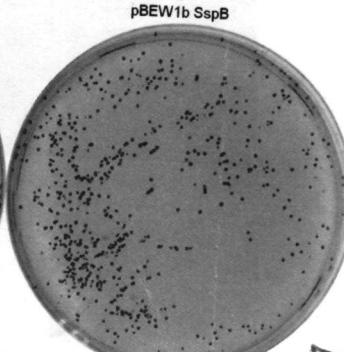
after transformation incubated
at 37°C for ~24hLB-agar + 100 µg/ml Amp
+ 50 µg/ml Streptomycin

- Bildet ~~entstehet~~ b
Farbe unverändert
- ohne Induktivs der
IsrR oder SspB (Rhamnose)
↳ Fluoreszenz in allen
Kolonien

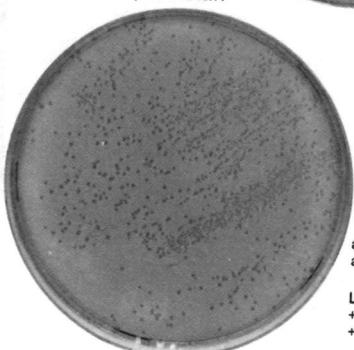
pBEW1b empty vector



pBEW1b SspB



pBEW1b IsrR

after transformation incubated
at 37°C for ~24hLB-agar + 100 µg/ml Amp
+ 50 µg/ml Streptomycin
+ 1% L-Rhamnose

- bei Zusage von Rhamnose
im Medium wird die
Transkription von pIsr- GFP
verhindert → keine (bzw.
wenig) fluoreszente Kolonien
- Induktivs von SspB für
die Abbau von GFP
ist nicht hier Erfolg
zu haben

- Agarose transformiert in DH5α

- 5 µl Cognition transformed
- 500 µl SOC
- 100 µl plattiert auf LB + Streptomycin

→ in N. @ 36°C inkubiert

- ① → > 20 Kolos
- ② → 3 Kolos
- ③ → 20 Kolos
- ④ → 5 Kolos

→ Colony PCR

28 x 1 h

8,8 µl dNTPS

8,8 µl Taq Korn

8,8 µl pFOmt-B/PfO mt

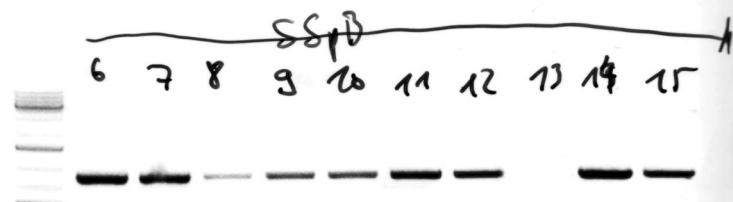
4,4 µl Taq Buffer

2,2 µl Dream Taq

367,4 µl ddH₂O

→ Programm → Colony PCR
 → Colony PCR (1:30)

C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pflanzenbio\Desktop\WEB\130606_colopcr_pbew1b_X+pfo mt.TIF



- Colony-PCR auch mit
Kontrolle von Blatte (3)

→ Wellektrophorese mit
mit Negativkontrolle?

→ positive auf PFOMT - Fragment

\Dokumente und Einstellungen\Institut Pfl
zenbio\Desktop\WEB\130606_colopcr_pbew1b_lsrR+
omt.TIF

M 1 2 3 4 5 6 7 8



→ vermutlich pbew1b-krk. Abstr.
→ Blatte (3)

9 10 11



→ Miniprep von

DHS + pbew1b lsrR - PFOMT (vermutlich)

& pbew1b SspB - PFOMT (vermutlich)

	c (μ g/ μ l)
pbew1b	
lsrR - PFOMT	
1	156,4
2	179,5
3	141,3
4	225
pbew1b SspB -	
PFOMT	
1	198
2	176,9
3	201
4	203,2

→ zum Sequenzieren mit β T terminativer form

lonish → Ssp7?

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 pBEW1b lsrR/PFOMT AGTTAAATTGGATGACCTTATACCGGGATGAGCTC GGC C GCCTGCAGGTGACAMCTTG GCCC GCAATAATGCTTAAGTCGACAG G AAGCT
 pBEW1b lsrR_PFOMT_1 CA. A. GAGC . G. GAA. T. GA. C.
 pBEW1b lsrR_PFOMT_2 GGGCA. A. GCGG . G. GAA. T. GA. C.
 pBEW1b lsrR_PFOMT_3 CCCGGCA. A. GCGG . G. GAA. T. GA. C.
 pBEW1b lsrR_PFOMT_4 A. G CG . G. GAA. T. GA.
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 pBEW1b lsrR/PFOMT AAT-CGATTGTCACACGG CGCGATATCGAAATTAGACTCACTAAGGGAAATT GTGAGCGGATAACAAATCCCATCTTAGTATAATTAGTTAA
 pBEW1b lsrR_PFOMT_1 . T. C.
 pBEW1b lsrR_PFOMT_2 C.
 pBEW1b lsrR_PFOMT_3 C.
 pBEW1b lsrR_PFOMT_4 C.
 210 220 → ORF PFOMT 230 240 250 260 270 280 290 300
 pBEW1b lsrR/PFOMT GATAAGAAGGAGATACABAATGGAGATCTTCTGCTGTAGGAACGCGTCAAATACAGGATTGCTACAGGTGAGGAGTATGCCAGTATAATC
 pBEW1b lsrR_PFOMT_1
 pBEW1b lsrR_PFOMT_2
 pBEW1b lsrR_PFOMT_3
 pBEW1b lsrR_PFOMT_4
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 pBEW1b lsrR/PFOMT TCCGACTAGTGCTATCCCGAGAACAGGGGTCCTCAGGAACTCAGGANGCAGTGAAGTCACTCCAGACTCTTATATGCACTTACCACTTC
 pBEW1b lsrR_PFOMT_1
 pBEW1b lsrR_PFOMT_2
 pBEW1b lsrR_PFOMT_3
 pBEW1b lsrR_PFOMT_4
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 pBEW1b lsrR/PFOMT TGAAATTGAGTCATTGCTTAAATATGAGTGAATGCAAGAGACTTATGAGTTGGAGCTTACAGATACTCCCTTACTCACTGCTTCA
 pBEW1b lsrR_PFOMT_1
 pBEW1b lsrR_PFOMT_2
 pBEW1b lsrR_PFOMT_3
 pBEW1b lsrR_PFOMT_4
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 pBEW1b lsrR/PFOMT ATTCCTGATGATGGAAAGATTAGGGCAATTGATTTGAGTGCAGAGAGCCTATGAGATTGGCTTGCATTTCAGAAAAGCTGGTGGAGCACAAAATCA
 pBEW1b lsrR_PFOMT_1
 pBEW1b lsrR_PFOMT_2
 pBEW1b lsrR_PFOMT_3
 pBEW1b lsrR_PFOMT_4
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 pBEW1b lsrR/PFOMT ACTTCAATTGAGTCGGATGCTATGCTGTGCAATCTTCGCAAGGCAAGAGACGAGGGGAGTTAGACTTTGGCTTGTGAGCGGACAAACC
 pBEW1b lsrR_PFOMT_1
 pBEW1b lsrR_PFOMT_2
 pBEW1b lsrR_PFOMT_3
 pBEW1b lsrR_PFOMT_4
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 pBEW1b lsrR/PFOMT TAATCACATCAAGTACCATGAGAGGTGATGAAACTAGTCAGAGTGGGAGCATAGTCGCTTATGAAACACATTATGGGGGGAACTGTAGCCAGCCT
 pBEW1b lsrR_PFOMT_1
 pBEW1b lsrR_PFOMT_2
 pBEW1b lsrR_PFOMT_3
 pBEW1b lsrR_PFOMT_4
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 pBEW1b lsrR/PFOMT GAAATCCGAAGTACCCAGATTTCATGAAGGAAACAGAGAGCTGTTATTGAACTCAACAGTGTCTGCCTGAGTCGAGATGTACATCTC
 pBEW1b lsrR_PFOMT_1
 pBEW1b lsrR_PFOMT_2
 pBEW1b lsrR_PFOMT_3
 pBEW1b lsrR_PFOMT_4
 910 920 930 → 940 950 960 970 980 990 1000
 pBEW1b lsrR/PFOMT CTGGGGTAGGGATACCTCTCGAGCGCTTATTGAGTTGAGCTCCGTCGACAACTTCGGCGCAGTCAGTCGGTAAGAAACCGCTCTC
 pBEW1b lsrR_PFOMT_1
 pBEW1b lsrR_PFOMT_2
 pBEW1b lsrR_PFOMT_3
 pBEW1b lsrR_PFOMT_4
 1010 1020 1030 1040 1050 1060
 pBEW1b lsrR/PFOMT GCGAAATTGAAAGCCACATGGACTGCTACTAGCCAGCTTAATTAACTAGGCTC
 pBEW1b lsrR_PFOMT_1 AT. GCC. A. GTC.
 pBEW1b lsrR_PFOMT_2 . A. . C. ATGC.
 pBEW1b lsrR_PFOMT_3 . T. A. . C. C. CAT
 pBEW1b lsrR_PFOMT_4 . AT. GC. . T. GTC.

→ pointe auf PFOMT Fragment, aber messt sehr
 wahrscheinlich Isrf aus → Colony PCR und
 Isrf & Ssp7 ⇒ in Wahrheit auch pBEW1b-Ssp7-PFOMT

!!!

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
-----------------------------------	----------------	---------------------------------	----------------	--

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

pBEW1b_SspB_PFOMT ... TTGGAAGTAAGAGCTGGCGC G... CCGCAGGGCACACGCTGGCGC CATATGTTAAGTCGAAACAGAAA GTAAACGTTATGTACAGGCC G
pBEW1b_SspB_PFOMT_1 G..GA.GTA.GA..... GGC.G.T..... GC.T..... G..... A..... C..... C.
pBEW1b_SspB_PFOMT_2
pBEW1b_SspB_PFOMT_3
pBEW1b_SspB_PFOMT_4

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

pBEW1b_SspB_PFOMT ... CATAACTGAAATTATACTACTAATACGGGAAAT GTGACCCGTTAACAAAT CCCAACTTAGTAAATTAGTTAAGTATAAGGAGATAACAT
pBEW1b_SspB_PFOMT_1
pBEW1b_SspB_PFOMT_2
pBEW1b_SspB_PFOMT_3
pBEW1b_SspB_PFOMT_4

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

ORF PFOMT

pBEW1b_SspB_PFOMT ... ATGGCAGAGTCCTTCCTGAGAGCAGTCAAATAACAGGATTGTCACAGAGTGAGGNGTATGCCAGTATATCTCGAACAGTAGTGTCATCCCG
pBEW1b_SspB_PFOMT_1
pBEW1b_SspB_PFOMT_2
pBEW1b_SspB_PFOMT_3
pBEW1b_SspB_PFOMT_4

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

single Mutation

pBEW1b_SspB_PFOMT ... GAGAGACAGGGTCCTCAAGAACCTCAAGGAGCCAAATGAAAGTCACCAAGACTCTATAATGTCAGTCACCACCTGCTGACAAATTGAGTCAATTG
pBEW1b_SspB_PFOMT_1
pBEW1b_SspB_PFOMT_2
pBEW1b_SspB_PFOMT_3
pBEW1b_SspB_PFOMT_4

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

pBEW1b_SspB_PFOMT ... TCAAAATTAGTGAATGCAAGAGACTATGAGTTGGAGTCCTTACAGGAACTCCCCTTACTACYGCTCTTCAATTCTGAGAATGAAAGATT
pBEW1b_SspB_PFOMT_1
pBEW1b_SspB_PFOMT_2
pBEW1b_SspB_PFOMT_3
pBEW1b_SspB_PFOMT_4

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

pBEW1b_SspB_PFOMT ... ACGGCAATTGATTTCGACAGAGAGGCTAGGCTAGGCTTGCCTTACGAAAGTCGTTGGAGCACAATCACTCATGATGGAGTGA
pBEW1b_SspB_PFOMT_1
pBEW1b_SspB_PFOMT_2
pBEW1b_SspB_PFOMT_3
pBEW1b_SspB_PFOMT_4

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

pBEW1b_SspB_PFOMT ... TGCTAGCTTTGACAACTTCGCAAGGACAAAGGAGCAGGGAGTTACGACTTTGGCTTTGATGGGACAAACCTAACATCAAGTACACAGA
pBEW1b_SspB_PFOMT_1
pBEW1b_SspB_PFOMT_2
pBEW1b_SspB_PFOMT_3
pBEW1b_SspB_PFOMT_4

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

pBEW1b_SspB_PFOMT ... GAGGTTGAGAAACTAGCAAGGGGGGCGATAGTCGTTATGACACACATTAGGGGGGAACTGAGCTTGGCCACCTGAATCGAGATACAGATTC
pBEW1b_SspB_PFOMT_1
pBEW1b_SspB_PFOMT_2
pBEW1b_SspB_PFOMT_3
pBEW1b_SspB_PFOMT_4

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

pBEW1b_SspB_PFOMT ... ATGAGGAAACGAGAACCTGTTATGAACTCAACAGTTGCTTGCTGCTGATCGACAGGATGACATCTTCCCTGGGAGGGATACACTT
pBEW1b_SspB_PFOMT_1
pBEW1b_SspB_PFOMT_2
pBEW1b_SspB_PFOMT_3
pBEW1b_SspB_PFOMT_4

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

pBEW1b_SspB_PFOMT ... TCAGCAGCGCTTTATGAAATTGAGCTCCCTGACAGCTGGGCCGCACTCGAGCTGGTAAGAAACCGCTCGCAAAATTGACCCAGAC
pBEW1b_SspB_PFOMT_1
pBEW1b_SspB_PFOMT_2
pBEW1b_SspB_PFOMT_3
pBEW1b_SspB_PFOMT_4

1010 1020 1030

pBEW1b_SspB_PFOMT ... ATGGACTGCTACTAGCGCAGCTTAACCTAGGCT
pBEW1b_SspB_PFOMT_1 AT.GC.TGGC
pBEW1b_SspB_PFOMT_2 AT.GC.T.G
pBEW1b_SspB_PFOMT_3 AT.GC.TGGG
pBEW1b_SspB_PFOMT_4 AT.GC.TT.C

→ 2 & 4 enthalten Punktumtione ~~sind~~ sonst
sich alles in Ordnung aus.

Colony PCR mit spez. Primern für lsrR & SspB

lsrR10x MM

4 µl dNPs

4 µl pBEW_Rba-UP

4 µl lsrR-SceI-mm2

20 µl Dream Tag Buffer

1 µl Dream Tag

167 µl ddH₂OSspB20x MM

4 µl dNPs

4 µl pBEW-KbaUP

4 µl SspB-SceI-mm2



→ Colony PCR Programm und -1:30 Elongation Zeit

→ ~~pBEW1b-SspB~~ pBEW1b-SspB
PFOMT

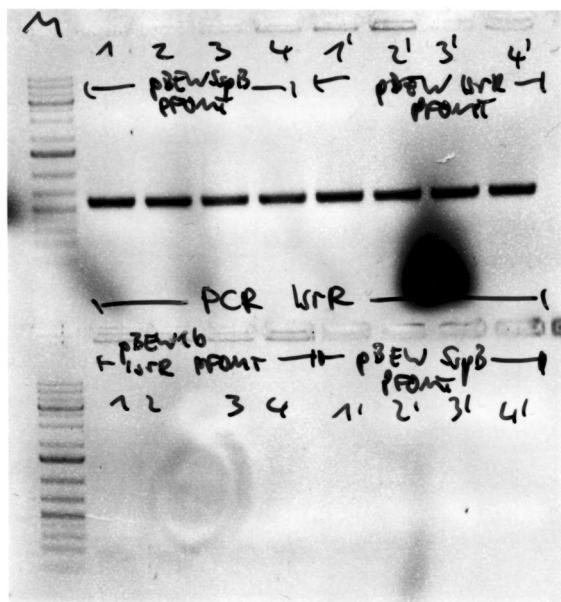
enthält auch SspB ✓

→ pBEW1b-lsrR-PFOMT

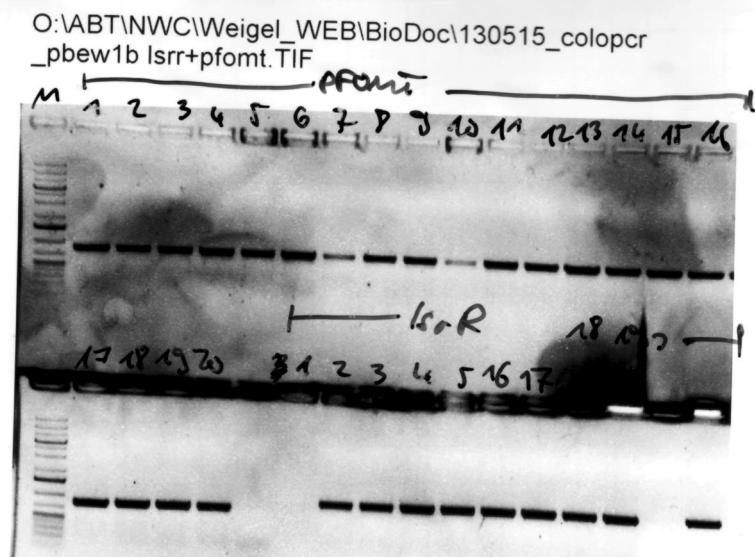
enthält kein lsrR, ✗
aber SspB!

→ Siehe S. 70

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130513_colopcr_pbew+pfomt.TIF PCR SspB



13.05.2013 15:38:40



15.05.2013 16:14:22

Enhancement: 102

Exposure Time: 750

Brightness: 50

Contrast: 50

Gamma: 25

~~PFO~~ SspB

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
pBEW1b_SspB_PFORMAT ..AAATCAAGGAGATAACCATGGATTCTCACACCTAACCCACAGTCGTCCATTATCGCTCGGCATCTATGAGTGTTGCTGGATTACCGCTCACG
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh TG..A.TC..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh TG...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh TG...TC..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh TG...TC..

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
pBEW1b_SspB_PFORMAT CGCGACTCTGGCTGGATGATGAGCTGCCCTGGCCTGCCAGTCCCTAGGAATATGCCGCGTGACGGCAATCGTACTCAAATTCGCCGGGCGTCG
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh TG...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh TG...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh TG...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh TG...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
pBEW1b_SspB_PFORMAT GCAATTGGAACTGGCGAAATGGATAGGGGGCTTAACGCCCTTGGCATTCGGCGTGAGGGTTCTGTGCGCCCTGCCCTGGCTAATCTA
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
pBEW1b_SspB_PFORMAT CGCCCTGAAAATGGCCAGGCAAGGTTTGAGCTGGCCTAGCTAGAAGATAACAGCATCAAGATGAGTAGAGAGGATCGGAGAACGAA
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
pBEW1b_SspB_PFORMAT ACCGTTAATCGCGTATGAGGCAACAGGCAAGTCAAGAAGTACAGCACTCTGAGAAACCGTCGAGGCGAACCGGTTGGCGAATGGCAT
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
pBEW1b_SspB_PFORMAT TAGCGCTTGGAATAGAGCTCGGCCCTCGAGCTGACAGCTTCGGCGGCAATAAGCTGTTAGCTACAGCAAAAGTATGAGAGGATACCGGC
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
pBEW1b_SspB_PFORMAT GCATAATGAAATTAATAGCACTACATAATAGGGAAATGAGGGGATAACAATTCCCCTATAGTATATTAGTTAAAGTATATAAGAGGATATACTA
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..

PFORMAT

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
pBEW1b_SspB_PFORMAT TGGCGATCCTTCGGTGAATGAGCAGGTCAAAATACAGGTTCAGCTCAAGCTGAGCTTATGCGCTAACTGCTATCCGGC
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
pBEW1b_SspB_PFORMAT AGAACAGGGCTCTCAMGGACTCAGGGAGCATAAGTACCCCACTCTTAACTGCAACTCCAGGACATTGATGCAATTGTT
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
pBEW1b_SspB_PFORMAT CTAATAATAGTGAAATCAAGGAGACTATTGAGTTGGAGCTCTACGCCACTACTACTCTCTTCAAACTCTGGATGATGG AAGATT
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
pBEW1b_SspB_PFORMAT ACGGCAATTGATTGACAGAGAGCTAGATGATGCG TTGCAATTCTAGAGAAAA GTGGGGTGGACCAAAATCAACTCTT GAAATGGAG
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh T...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh C...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh A...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh G...

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
pBEW1b_SspB_PFORMAT CTAGCTAGCTCTGACAATCTCTGCAAGGAGANG AGCGAGGGGAGTTAGCATTGGCTTGGATGGGG CAACACTAACATCAAGTAC
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh AG...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh TC...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh G...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh AG...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh .GAG...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..CA...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..TA.CTA...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..TA...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..T..CTA...
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..G...

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
pBEW1b_SspB_PFORMAT CATGAGA
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..CAGA
pBEW1b_SspB_PFORMAT_rh ..GA..

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
-----------------------------------	----------------	---------------------------------	----------------	--

lsrR

pBEW1b lsrR PFOMT	TTAGACTGGCTGTAATGAAATTCAAGGAGATAACCAAGGCATCARCOATGGCANTTCGAACAGGGATGTGAGAGAAGAACAGGTCGGCGGA
pBEW1b lsrR PFOMT rh	C.G.A.C.T.G.A.TC.
pBEW1b lsrR PFOMT	CTG.A.C.T.G.
pBEW1b lsrR PFOMT rh	T.C.A.T.G.T.C.
pBEW1b lsrR PFOMT rh	CT.GGCT.CT.T.G.T.C.
pBEW1b lsrR PFOMT rh	AAT.C.T.G.
pBEW1b lsrR PFOMT	TCGGCTGGTTTACATACAGACGGCTGACCCAGGGCATGGCGATAGCGATGTCGCGCCGACAGTTGAAAGTGCGATTTGAGAGAGGGCA
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT	TCAGTCGGCATATTTCGGTACAGATAATTCTGCTTGAGGCCTGCGATGAAACTCAATTACGTCAGTTTCGCTGCAACATGGCCG
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT	GIGATCCCAGGGCTGCGAGCTGATGTCGGTGGGAACTGGGATGGCCATAGTGGAGGTTACTCAACACACAGATCTGGCA
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT	TGGGTTTGGGAGGCCACCATGAATACGCTAACCGCTTAACTGGCTGCGATTCAGTTTCGCTCACAGCAGATCTCGCTGGCTGGCTGGCTTC
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT	TTATAGACGGAAATCGGCGCTTACGGCGCGCTCAGTGTGAAATTATTCGGCTCGCTTGCGGATCCCGCTGACATTCGGTAGCTAA
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT	ATAGAAATTCGGCTAAAGTGTGCTGGCGAACCGCGATGCGGATGCGCATGGCTGCTGAGTCAACAGGAGATGCAACATCA
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT	TTGGCCCGGTTATACGCCAGGCGCARACGTTTACGTCGGAAGGGGGCGTGGCGCACATTGGACTTTGGACTTTTGATGCAAAGGAGCT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT	TGTCACGAATTCAAAATCAACGACTGATTGGCTAACCTTAAAGGGCTGAGAACCATACCGCTCGGGTAGCGAGGGGAAATAATA
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT rh
 <i>im Druck firm schrift der alle ordnen</i>	
pBEW1b lsrR PFOMT	910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
pBEW1b lsrR PFOMT rh	GGCAACGCAATTGCGCTGCAAGAAGGGCGTTATCACACGACTGGTACGATCGGACACAGCGCGCAATTACGCTAGTAAATTCGATG
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT	1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
pBEW1b lsrR PFOMT	CC TTATACCGGAATGACTGGCGCCCGAGGTGACAAAGCTGGCGCGCATACGCTTACGTCGACAGAAATCTGATGCAACGAAATATCATCGCC
pBEW1b lsrR PFOMT rh	..C.
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT	1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
pBEW1b lsrR PFOMT	GCTATACTGAAATTAAACGACTTACGAAATGGGAATGGCTGAGCGGATAACAACTCCCGATCTTACGATAGGATAGAGGATATACATA
pBEW1b lsrR PFOMT rh	A.T.
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT	1210 1220 1230 1240 1250
pBEW1b lsrR PFOMT	GCGCAGACCTCTGCTGAGTGAAGCAGGCTGAAATTCAGGATGGCTAC
pBEW1b lsrR PFOMT rh	G.C.
pBEW1b lsrR PFOMT	GTGCGTATGAGCA.
pBEW1b lsrR PFOMT rh
pBEW1b lsrR PFOMT	G.C.
pBEW1b lsrR PFOMT rh	GTGCGTATGAGCA.
pBEW1b lsrR PFOMT	G.CAG.
pBEW1b lsrR PFOMT rh	GTGCGTATGAGCA.
pBEW1b lsrR PFOMT	G.CAG.
pBEW1b lsrR PFOMT rh	GTGCGTATGAGCA.
 <i>Prakt</i>	

lsrR →

```

          10   20   30   40   50   60   70   80   90   100
pBEW1b_lsrR_PFOMT AGCAATTGCGCTGCATGAAAGGGGTTATATCACACGACTGGTTACCGATCAGGACA CAGCAGCGCGATTTACGTGTAATTTGATGACT
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 TTA...T.....CACT.....A..C.....G..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....A.....G..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....CA.....T..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 GCA.TGA..G.CG.T..AT.T.....A.....G.T
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....G..-
          110  120  130  140  150  160  170  180  190  200
pBEW1b_lsrR_PFOMT TATTACCGGAAAGTCGGCGGCCCGACGTCGACAGCTTGCGGCC GCATAATCTTAAAGTCGACAGAAGTATTCGATTTGACACGCC GC
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 AT.....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 AT.....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 AT.....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 AT.AC.....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 A.....C..-
          210  220  230  240  250  260  270  280  290  300
pBEW1b_lsrR_PFOMT ATAATCGAAATTAAACGACTCACTATAGGGAAATTGAGCGATAAACATTCCCATCTTAGTATATTAGTAGTATAGAAGGGATAATACATAG
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
          320  330  340  350  360  370  380  390  400
pBEW1b_lsrR_PFOMT GCGAGCTCTTGCTGAGAAGCAGGTCAAAAATACAGGATTGCTACAGAGTGAGGAGTTAGCCAGTATATTCGAACTAGTGCTATCCGGAG
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
          410  420  430  440  450  460  470  480  490  500
pBEW1b_lsrR_PFOMT ANGCGGGCTTCAGGAACTCAGGAGGCCATGAAGTCACCCAGACTCTTAAAGTCGACTTCACCCACTTGACAAATTGAGTCATTGCTCT
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
          510  520  530  540  550  560  570  580  590  600
pBEW1b_lsrR_PFOMT AAAATTAGTGATGCAAGAGAACTTGAAGTGGAGCTTTACAGGAACTCCCTCTTACTCACIIGCTCTTCAAATTCTGTGATGAAAGATTAG
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
          610  620  630  640  650  660  670  680  690  700
pBEW1b_lsrR_PFOMT GCAATTGATTGACACAGAGGGCTATGAGATGGCTTGCCATTATCAGAALLMCTGGTGTGGAGCACAATCAACTCATGAAATGGAGCTAAGC
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
          710  720  730  740  750  760  770  780  790  800
pBEW1b_lsrR_PFOMT TAGCTCTTGACAMCTCTGCAAGACACAGAGAGCGAGGGAGTTACGACTTGGCTTGCTGATGCGACAAACCTAACATCAAGTACCAAGAG
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
          810  820  830  840  850  860  870  880  890  900
pBEW1b_lsrR_PFOMT GTGTAAGAACTAGTCAGGTGGCTGGCATAGTCGCTTATGACACACATTATGGCTTGACTGTGCCAGCCCTGATTCGAGTACCCAGATTTCATG
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
          910  920  930  940  950  960  970  980  990  1000
pBEW1b_lsrR_PFOMT AGGAAACAGAGAGCTGTTATGAACTAACACAGTGCTTGCTGCTGATCCCTGATGAGATTGACACCTTCCTTGGTGTAGCTACCTCTC
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
          1010  1020  1030  1040  1050  1060  1070  1080  1090  1100
pBEW1b_lsrR_PFOMT GCAGCGCCTCTTATGAAATTGAGCTCCGTGACRAGCTTCGGCGCACTCGAGCTGCTGTAAGAAACGGCTGCGAAATTGAGCCAGCACAG
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-
pBEW1b_lsrR_PFOMT_T7 .....C..-

```

Durchgeführt von/
Performed byDatum/
DateBestätigt durch/
Approved byDatum/
DateFortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

Klonierung PFOMT in pACYC Duet-1

- pACYC Duet-1 und λ gI λ II & XbaI verdant
- über T₁ fil gereinigt, ausgetrocknet
über MN fil cleanup aufgetrocknet
- in 75 μ l ddH₂O eluiert → c = 7.8 μ g/ μ l
- Cryptic is ~~not~~ vor PFOMT fragment ($c=37.7 \mu$ g)
in pACYC

→ 3,21 μ l plasmid
 0,62 μ l fragment
 7 μ l T₄ Lysate
 0,25 μ l T₄ Lyase
 ad to 20 μ l

→ 1 h @ 22°C
 → über WE @ 4°C
 → Frak. (Sal Run)
 in 50 μ l DNA2
 → > 20 Kolonien am nächsten Tag

Colo-PCR

0,4 μ l T7 Korn
 0,4 μ l PFOMT fw
 0,4 μ l dNTPs
 0,1 μ l DreamTag
 2 μ l Tag Buffer
 ad to 20 μ l H₂O

→ Elangatosephor 1:30 min

→ 1,5% Agarosegel
 siehe unten

Laborbuch Nr./Notebook no.	Fortsetzung von Seite/ Continued from page no.	Seite Nr./ Page number 78
----------------------------	---	------------------------------

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130625_colopcr
_pacyc pfomt.TIF



25.06.2013 14:20:40

- pUC81 sfGFP-ΔAS+4
in JMA110 & JW1593
Chemical transformation
(siehe unten)
- in 500µl SOC; 50µl
phletz1 (auf Amp-Platte)
- Colony -PCR und
primers 57 vom & sfGPF

Kompetente Zellen hergestellt von E.coli JMA110 &

JW1593 sfGPF

- nach Protokoll von Sambrook et al.
- in "molecular cloning" a laboratory manual
- ~~Low~~ High - Methode
- ca. 50 Aliquots pro Stamm

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	25.6.13			

Klonierung PFOMT in pSEMa

Vektor von pSEMa & pSEMa SgpB mit λ hol & β gII

→ $1\mu\text{g}$ pSEW ~ $1\mu\text{g}$ plasmid
 1x FD Buffer freen → 15 min @ 37°C
 1ul λ hol FD → 20 min @ 65°C (Anschl.)
 1ul β gII AD
 1ul FastAP
in 20ul
 add to 20ul ddH₂O

→ Fragmente über Agarose gel getrennt & gemessen (Schmitz 11.0)
 pSEMa (λ hol, β gII) → $2.19 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
 pSEMa SgpB (λ hol, β gII) → $8.18 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Ligation

1x T4 ligase Buffer

20 μg plasmid (6 μl pSEMa + 3 μl pSEMa SgpB)

PFOMT Fragment (0.6 μl (~27.4 μg) + 0.55 μl (~20.3 μg))

1U T4 ligase (Kemabios)

add to 20ul ddH₂O

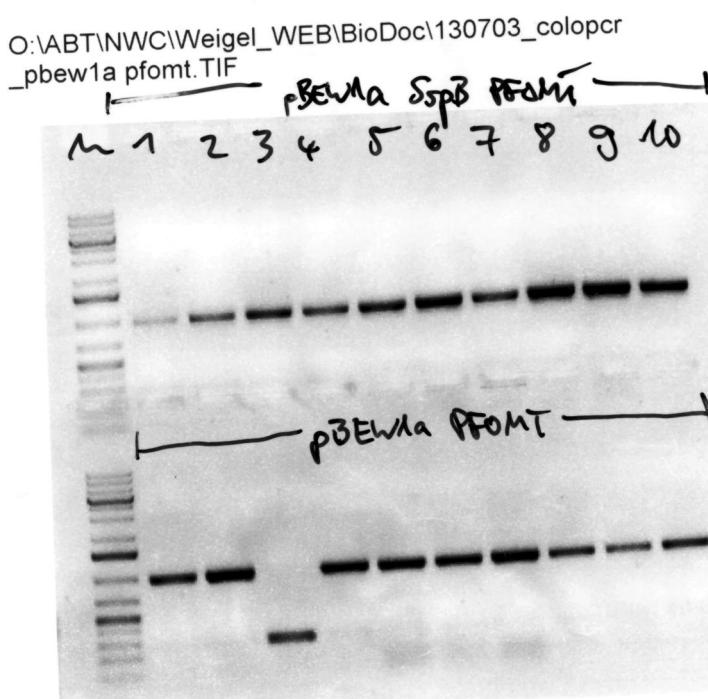
→ 1h @ 27°C; i.N. @ 4°C liquid

→ 10ul ein DNAx transformiert (~50 μl SOC, 100ul plattiert)

→ i.N. @ 37°C → Kolony-PKR mit Kolone

Colony PCR

Primer Duet-UPR & T7 Prom
 → Elongationszeit 1:15 min
 → auf 1% Agarosegel



03.07.2013 13:32:35

→ Klone 1, 2, 4, 5
 geprept & sequenziert

→ Klone 1, 2, 4
 geprept und zum
 Sequenzieren freigegeben

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	03.07.13			

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 pBEWla_SspB PFOMT AGCAGTCACTATAGGGAAATTGAGCGATAACAACTCCCATCTAGTATAATTAGTAGTATAAGAGAGATAACATAGCGAGATCTCTTGCT
 pBEW la_SspB PFOMT 1 GACGAA.TAC.
 pBEW la_SspB PFOMT 2 C.T. ACTTA.
 pBEW la_SspB PFOMT 4 CAC ACT...TAG.
 pBEW la_SspB PFOMT 5 GG. GA.T.

 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 pBEWla_SspB PFOMT GIGATGAAGCAGGTAAAGAACAGGAACTCTACAGAGTGAGGAGTTAGCCAGTATACTCCGAACTAGTGCTACCCGGAGANGCAAGGTTCCCA
 pBEW la_SspB PFOMT 1 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 2 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 4 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 5 ..

 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 pBEWla_SspB PFOMT AGGAACCTCAGGGAGCCTAATGAAAGTCACCCAGACTCTATAGTGACTTACCAACTTGCTGGCAATTGATCTTGTCTAAATTAGTGAAAGC
 pBEW la_SspB PFOMT 1 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 2 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 4 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 5 ..

 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 pBEWla_SspB PFOMT AAAGAGACTATTGAAAGTGAGCTTACAGGATACTCCCTCTACTCAGTCCTCAATTGATGGAAAGATAACGGCATTTGAC
 pBEW la_SspB PFOMT 1 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 2 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 4 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 5 ..

 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 pBEWla_SspB PFOMT 2AGAGAGCCTATGAGATGGCTTACAGGATACTCCCTCTACTCAGTCCTCAATTGATGGAAAGATAACGGCATTTGAC
 pBEW la_SspB PFOMT 1 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 2 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 4 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 5 ..

 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 pBEWla_SspB PFOMT TTCTCGAAGGACAAAGAGCGAGGGAGTTAGACTGTTGGCTTGTATGCCGACANACCTAACATCAGTACCATGAGNGTTGAGAGACTAG
 pBEW la_SspB PFOMT 1 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 2 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 4 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 5 ..

 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 pBEWla_SspB PFOMT CAAGCTGGCTGCATAGTCCTTACACACACATTATGGGGTGAACTGTAGCCCACCTGAAATCCGAGTACCMGATTCATGAMGGAAACAGAAA
 pBEW la_SspB PFOMT 1 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 2 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 4 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 5 ..

 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 pBEWla_SspB PFOMT GCTGTTATTGAACTCACAGTCGCTGCTGCTGATCGATGAGTTACAGATCTCCCTGATGGTTGATCCTTCGAGGGCTTTTAT
 pBEW la_SspB PFOMT 1 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 2 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 4 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 5 ..

 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 pBEWla_SspB PFOMT GATTCGAGCTCCCGTGCACAGCTTCGGCGCACTCGAGCTGGTAAGAAACGGCTCGCAAATTGAGCCACATGGACTCGTACTAGC
 pBEW la_SspB PFOMT 1 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 2 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 4 ..
 pBEW la_SspB PFOMT 5 ..

 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 pBEWla_PFOMT TAATACGACTCACTATAGGGAAATTGAGCGATAACAACTCCCATCTAGTATAATTAGTAGTATAAGAGAGATAACATAGCGAGATCTCTT
 pBEWla_PFOMT 1 .CG.GA..G.
 pBEWla_PFOMT 2 G.A.AT.GA.T.
 pBEWla_PFOMT 4 GC.AAC.G..C.TA..G.

 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 pBEWla_PFOMT TCGCTGATGAGMCAAGGTCAAAAAAATACAGGATTGCTACAGAGTGAGGAGTTATGCCGACATAGTGCTCATCGCGAGAGCGAGTT
 pBEWla_PFOMT 1 ..
 pBEWla_PFOMT 2 ..
 pBEWla_PFOMT 4 ..
 pBEWla_PFOMT 5 ..

 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 pBEWla_PFOMT CTCAAGAGACTCAGGGAAAGCTAACCCAGACTCTTATAGTCGACTTCACCAACTCTGACAACTGATGTTGATCTGCTCAATTAGTG
 pBEWla_PFOMT 1 ..
 pBEWla_PFOMT 2 ..
 pBEWla_PFOMT 4 ..
 pBEWla_PFOMT 5 ..

 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 pBEWla_PFOMT ATGCAAGAAGACTATTGAACTGGCTTACAGGAACTCCCTCTACTCAGTCCTTCAATTGATGAGTGGAAAGATTACGGCAATTGATT
 pBEWla_PFOMT 1 ..
 pBEWla_PFOMT 2 ..
 pBEWla_PFOMT 4 ..
 pBEWla_PFOMT 5 ..

 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 pBEWla_PFOMT CGACAGAGGGCTTACAGATGGCTTGCATTATCAGAAAGCTGGTGAGGACAAACCTAACCTCATGAACTGGAGCTAGCTCTTGAC
 pBEWla_PFOMT 1 ..
 pBEWla_PFOMT 2 ..
 pBEWla_PFOMT 4 ..
 pBEWla_PFOMT 5 ..

 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 pBEWla_PFOMT AATCTCTGCAAGGACAAGMAGGGAGGGAGTTACAGCTTGGCTTGTGAGTACACATCACATCAGTACCATGAGAGGTGATGAAAC
 pBEWla_PFOMT 1 ..
 pBEWla_PFOMT 2 ..
 pBEWla_PFOMT 4 ..
 pBEWla_PFOMT 5 ..

 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 pBEWla_PFOMT TAGTCAGCTGGCTGCCTGCTTATGACACACATTAGGGTGAACTGTAGCCCGCCCTGAACTCGAGTACCTTCTGGTGATGGTAC
 pBEWla_PFOMT 1 ..
 pBEWla_PFOMT 2 ..
 pBEWla_PFOMT 4 ..
 pBEWla_PFOMT 5 ..

 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 pBEWla_PFOMT AGAGCTGTTATTGAACTCACAGTCGCTGCTGATCGAGTATGACACTCTCCCTGATGGTGATGGTACCTTCTGAGGGCTT
 pBEWla_PFOMT 1 ..
 pBEWla_PFOMT 2 ..
 pBEWla_PFOMT 4 ..
 pBEWla_PFOMT 5 ..

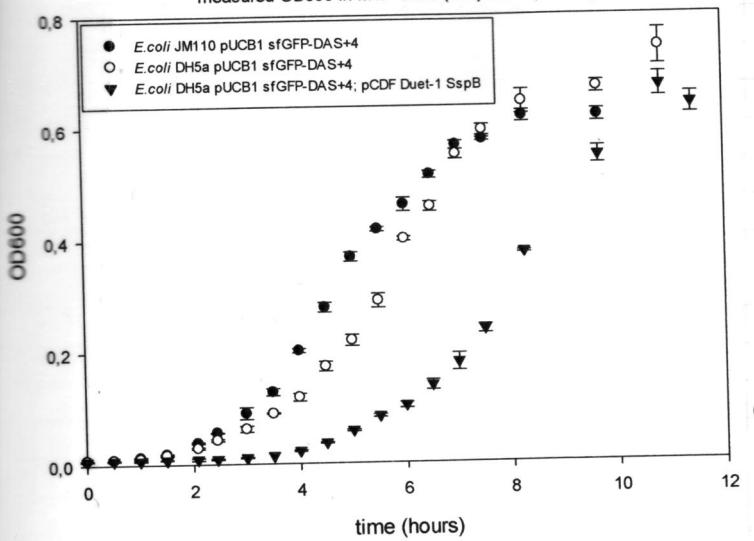
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 pBEWla_PFOMT TATGTTATCGAGCTCCCGTGCACAGCTTCGGGGCACTCGACTCTGTTAAGAAACGGCTCGCAAATTGAGCCACATGGACTCGTACT
 pBEWla_PFOMT 1 ..
 pBEWla_PFOMT 2 ..
 pBEWla_PFOMT 4 ..
 pBEWla_PFOMT 5 ..

Wachstumsraten

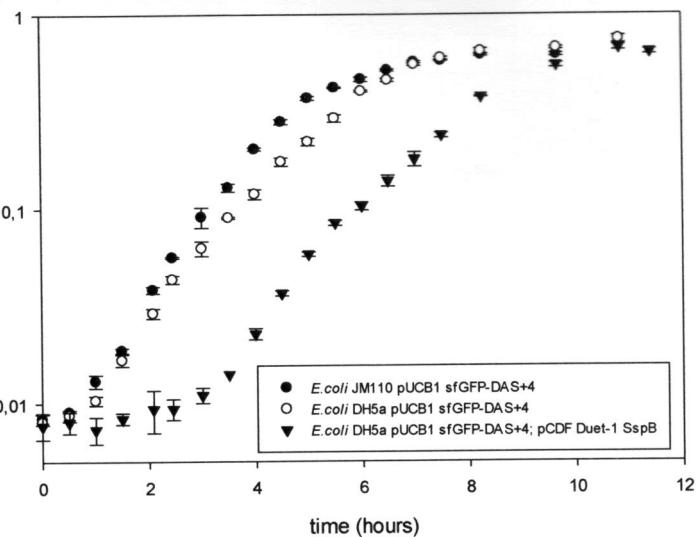
WEß212

- 2 ml starke Kultur von E.coli Kultur in entsprechendem Medium (@34°C 1200 rpm über Nacht)
- Entfernen durch Zentrifugation (5 min @5000xg, 4°C)
- Pellet 2x in 15 ml PBS waschen
(Rezept nach Sambrook et.al.)
- Pellet in 2 ml ~~LB~~ LB + AB resuspendieren
→ OD⁶⁰⁰ messen (1:10 verdünnt)
- 50 ml Kultur in LB + AB ansetzen um OD⁶⁰⁰ = 0,05 mit Dose abdecken
- OD⁶⁰⁰ & Fluoresenz (GFP) alle 0,5 h - 1 h messen
(λ 470 nm, em 510 nm)
 - ↳ 500 µl Brotsa abnehmen & auf Eis legen
 - alle Brotsa zusammen in MTP vereinen
 - danach 100 µl Brotsa in A) klar MTP (OD)
 - B) schwärz. MTP (Fluoresenz)
geben

Growth Curve Measurement in LB-Medium containing AB
measured OD600 in MTP-wells (100 μ L sample/well)

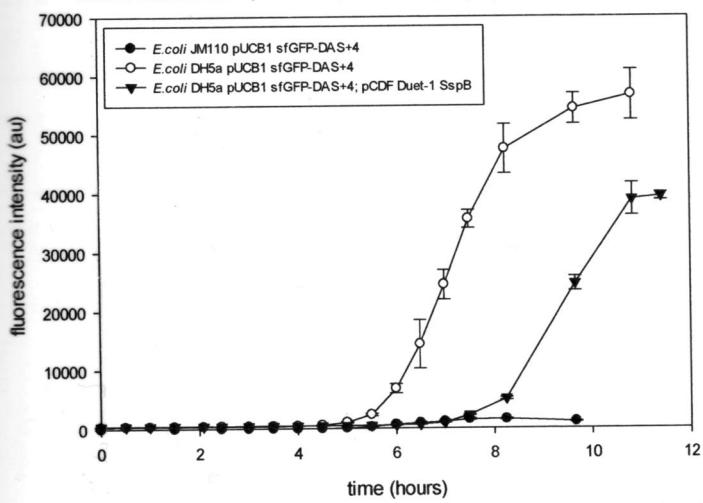


Growth Curve Measurement in LB-Medium containing AB
measured OD600 in MTP-wells (100 μ L sample/well)



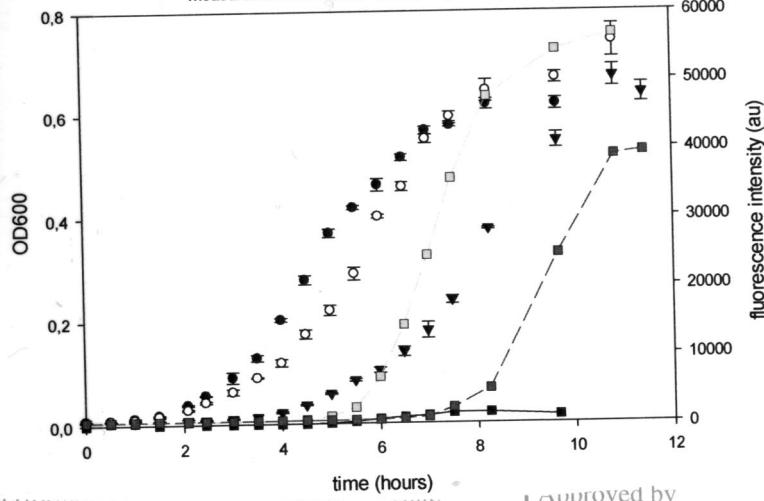
Fluorescence of GFP during *E. coli* growth in LB-Medium containing AB

measured fluorescence (λ^{ex} =470 nm, λ^{em} =510 nm) in opaque MTPs (100 μ L sample/well)



Growth Curve Measurement in LB-Medium containing AB

measured OD600 in MTP-wells (100 μ L sample/well)



→ ~~JM110~~ Zelle
mit pUCB1 sfGFP-DAS+4
zeigt nur eine geringe
Fluoreszenz
→ war erwartet, da
JM110 dom-/dom-
→ keine WT-Lanthyrin
⇒ bei SAH → bei A1-2

● <i>E. coli</i> JM110 pUCB1 sfGFP-DAS+4
○ <i>E. coli</i> DH5a pUCB1 sfGFP-DAS+4
▼ <i>E. coli</i> DH5a pUCB1 sfGFP-DAS+4; pCDF Duet-1 SspB
■ <i>E. coli</i> JM110 pUCB1 sfGFP-DAS+4
□ <i>E. coli</i> DH5a pUCB1 sfGFP-DAS+4
- - - <i>E. coli</i> DH5a pUCB1 sfGFP-DAS+4; pCDF Duet-1 SspB

Datum/
Date

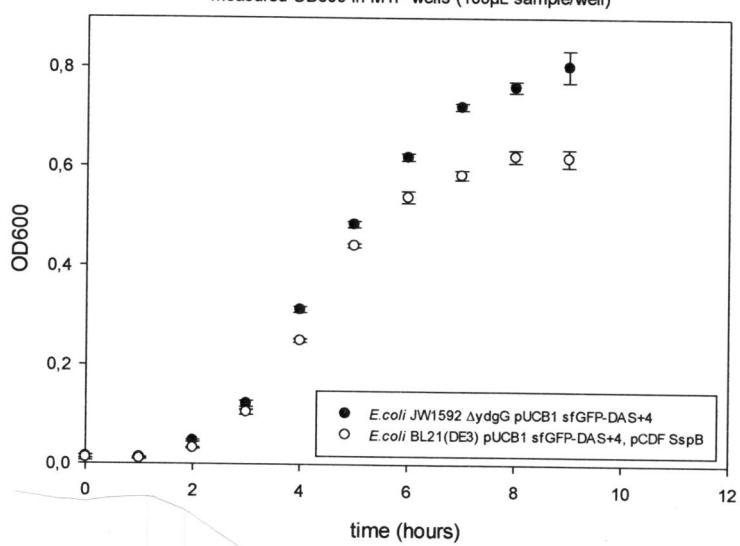
Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

Approved by

18.06.03

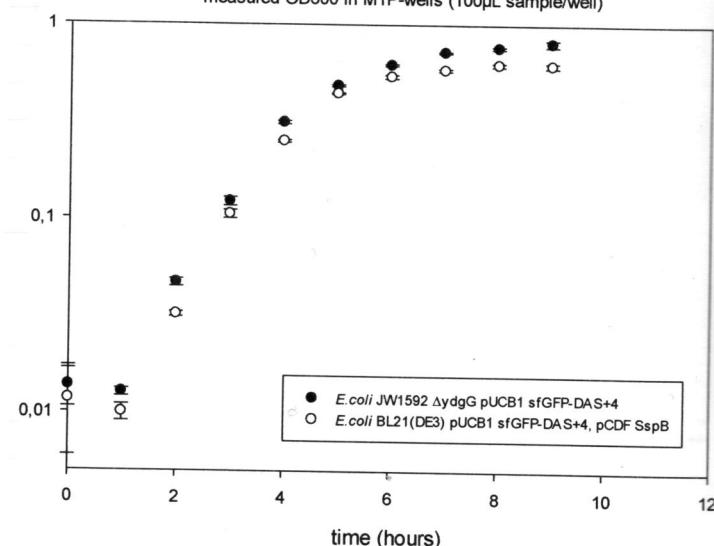
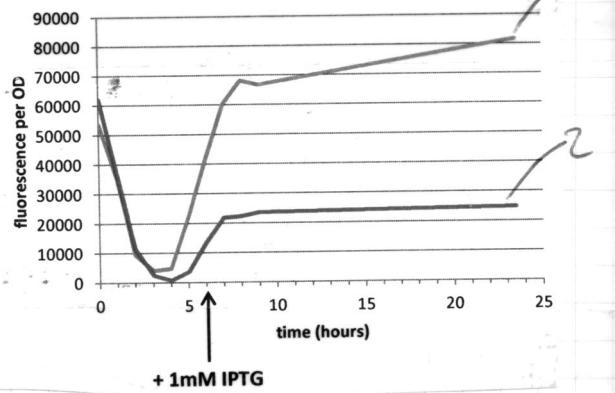
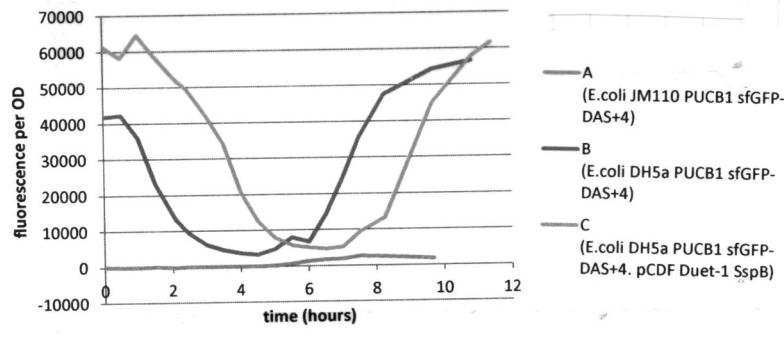
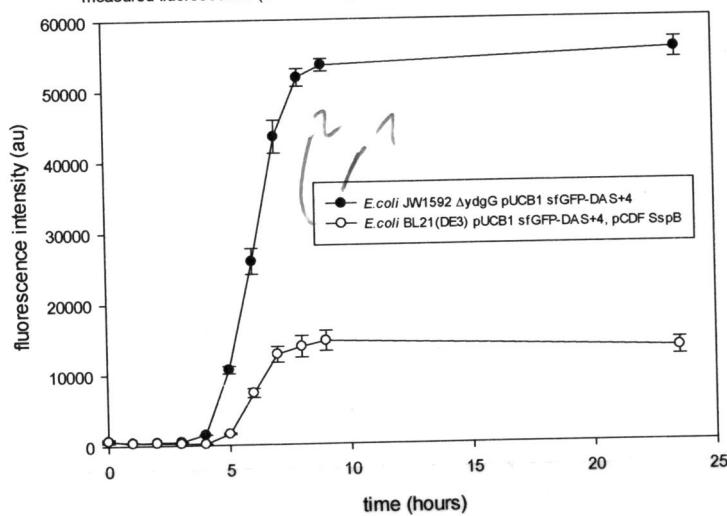
Growth Curve Measurement in LB-Medium containing AB

measured OD600 in MTP-wells (100µL sample/well)



Growth Curve Measurement in LB-Medium containing AB

measured OD600 in MTP-wells (100µL sample/well)

Fluorescence of GFP during *E.coli* growth in LB-Medium containing ABmeasured fluorescence ($\lambda^{ex}=470$ nm, $\lambda^{em}=510$ nm) in opaque MTPs (100µL sample/well)

→ mit SspB überexprimiert kann
GFP-Level nicht phalte wieder

Durchgeführt von/
Performed byDatum/
DateBestätigt durch/
Approved byDatum/
DateForts. auf Seite Nr.
Continued on page num.

04.12.13

~~Strabo pte~~Transformation in JW1593 & JM110

Transformation von

je ~100 µg transformiert

~~→ 100µl SOC~~

200µl ausplattet

(A) pucB1 sfGFP-DAS+4 & pETW1a Pflant
in JM110

(B) pucB1 sfGFP-DAS+4 & pETW1b ^{lrr} Sfp Pflant
in JW1593

(C) pucB1 sfGFP-DAS+4 & pETW1b SfpB Pflant
in JW1593

↳ weniger Kolonie, bei A (~10); viele bei B+C

→ Colony PCR: Prime-mix I

sfGFP-fwd
sfGFP-rev

Prime-mix II

T7 Forn
pRHA NP

↓
Große PCR

1154 bp
2087 bp
1605 bp

→ Elongationszeit → 2-10

→ Agarosegel 1%

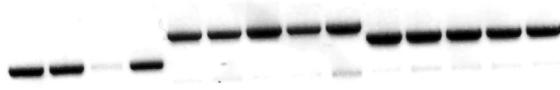
→ Kolonie besteht alle
Werke (eltern
Canfer A-1)

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130709_colopcr
doppeltrafos JM110&JW1593.TIF

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

A B C

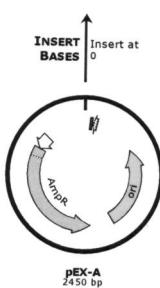
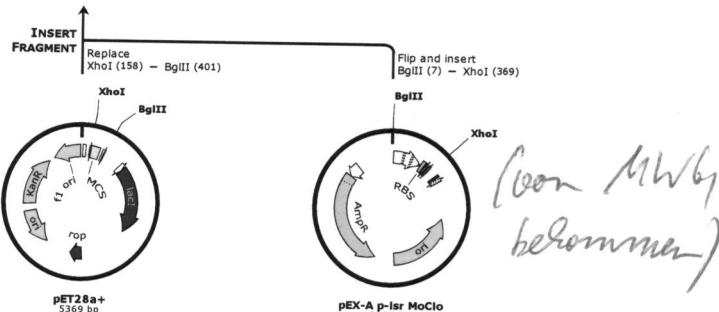
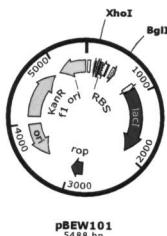
pucB1a Pflant
(lrr Pflant)
pucB1b Sfp
Pflant



Klonen von Autoregulationsrechten pBEW101

- fan bestellt bei MWG - Europa
- p-lsr-MoClo → krt. promoter für schlechte Autoregulation
- synthesetische RBS (Salis Lab) berechnet auf
Translation Initiation von 266535 AU
- von MWG in pEX-A Rektor bekommen

Sequence: pBEW101.dna (Circular / 5488 bp)
Enzymes: 14 unique (13 of 646 total)
Features: 15 visible, 15 total
Primers: 1 visible, 1 total
Unique Cutters Bold



Klonen:

pEX-A p-lsr-MoClo in ddH₂O aufgenommen,
sodan 200 µg/ml

Vorlagen von p-EX-A-MoClo
& pET28a(+)(XbaI, BglII)

4 µl FD Buffer freien
Bsal FD BglII
7 µl FD XbaI
10 µl ddH₂O

pEX-A-MoClo

3 µl Markermix
5 µl Rektor (~1000 µg)
6 µl H₂O

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	09.07.13			

pET 28a(+)

gel MM

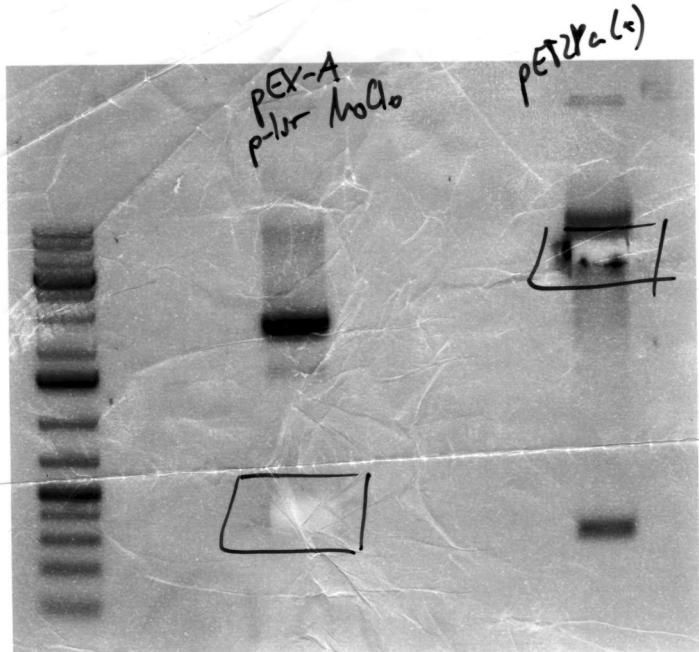
1 µl fastAP

10 µl pET 28a(+) (-1100 ng)

→ 1% gel zur Reinigung der Fragmente

→ Redukt für 10 min @ 37°C

→ Sargen in abhängig bei 67°C / 20 min



09.07.2013 13:44:52

→ Schmelze mit gereinigt
über MN gel Cleanupμ gel

→ pET28a(+)

24.9

PE
p-BS-holo

2.24

Ligation

1 µl pET28 cut (-125 ng)

2 4,1 µl Fragment (-19,24 µg)

2 µl T4 lyse buffer

2 1U (0,20 µl) T4 lyse (Som.)
ad to 20 µl ddH₂O

→ Ligation @ 22°C / 1L

@ 4°C / über Nacht

→ 10 µl in DH5⁺ transformiert+ 50 µl SOC → 500 µl aus und ausplattet
@ 37°C→ Koloni gewachsen → 3 Klone gepickt & mini prep
parallel → sequenziert mit 5'2 kmer

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 pBEW101 TCCAGCGTAGTTAATGATCAGCCCCACTGA CGGGGT GGGCGAGG ATTGTGACCCGCCCTTAAGGCTCGAGCAGCCCTTGTCACCATC
 pBEW101_1 G.....A.....G.....AG AG.....C.....G C.....CTA.....
 pBEW101_3 G.....T.....GA.....G.....G.....G.....CTA.....
 pBEW101_2

 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 pBEW101 GACACCAACAGCTGGCACCCAGTGTAGCGGCCAGATTAAATGCCGCCGACAATTGCCAGGCGCTCGAGGCCAGACTGGGGCAACGCCA
 pBEW101_1
 pBEW101_3
 pBEW101_2

 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 pBEW101 TCAGCAGACACTGTTGCGGCCAGTTGTGCCAGCGTTGGGAATGTAATTCACTCGCCATCGCCGTT CAACATTTCGGCGTTCCCG
 pBEW101_1
 pBEW101_3
 pBEW101_2 T.....

 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 pBEW101 AACAGTGGCTGGCTGGTACACACCGGGAAACGGCTGATAAGAGAACCCGATACTCTGCCACATCGTAACTGTTACATTGTTACATTACAC
 pBEW101_1
 pBEW101_3
 pBEW101_2

 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 pBEW101 CCTGAAATTGATCTCTCTTCCCAGGCTATCATGCCATAACCCGAAAGGTTTGCGCATTCGATGTTGCGGGATCTCGACGCTCCCTATGCCACTC
 pBEW101_1
 pBEW101_3
 pBEW101_2

 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 pBEW101 CTGCAATTAGGGAGCAGCCAGTAGTAGTTGAGCCGTAGAGCCACCCGCCAGAGGAAAGGTTTGCGCATCGGATCTCCCATCGGAGATGCGGCCAACAGTCCCCGGC
 pBEW101_1
 pBEW101_3
 pBEW101_2

 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 pBEW101 ACGGGGCTGCCACATACCCAGGCCAGAACAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCAAGGCCGATCTCCCATCGGAGATGCGCATATGGCCCGAG
 pBEW101_1
 pBEW101_3
 pBEW101_2

 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 pBEW101 CAAACGCCCTGTGGCGCCGATGCTGCGGCAAGATACTGGCCGGATGGGATGCGATCTGATGATACTCATATTCACCTTTGACATA
 pBEW101_1
 pBEW101_3
 pBEW101_2 C.....C.C.G. GAAA. T. T. CG

 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 pBEW101 TTAAATCTTAAATGAAATTGTCAGTCCTGGTCAATTATATCTGCAAGGCCAAACAGTTGACTCTAGAGCATGAAACAAACGCCAACCGTAAAAAT
 pBEW101_1
 pBEW101_3
 pBEW101_2 AC. C.A. GG. G.G. CGGA. AACA. CCC. AGA. AT. TTT.A. T. A. A.G. G.

 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 pBEW101 CAAAATGCATAAACTGAGTCATTCGCGAAATATGTCAGTGTCACTAACTGTTATGAAACAAATTAAAAGCAAAATCATTGTTCAAACTCA
 pBEW101_1
 pBEW101_3
 pBEW101_2 C. GGGCA. CGC. A. A. ATC. TC. . CA. CGAG. GG. . GGT. CGG. CG.CC. TG. G

 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 pBEW101 CCTGAAAACCTGAAAGAAACACATAATAAGGAGGTACATTAGGGGACATCATCATCATACAGAGCGGCCGTTGGTCGGCGGCCAGCCATAT
 pBEW101_1
 pBEW101_3
 pBEW101_2 TA. TG. . GTG. . CAG. A. GGGTC. CG. A. C. GAT. C.A. CT. G. GA.A. T. CG.A.

 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180
 pBEW101 GGAGACCCAAGCTTGTCTCCCTGAGAGCACACCCACACACTGAGATCCTGGTCTAAACAAAGCCGAAAGGAACTGAGTT
 pBEW101_1 A. G.TTCC
 pBEW101_3 A. GA. . ATT.
 pBEW101_2 A. G. . ATCAA

→ pBEW101

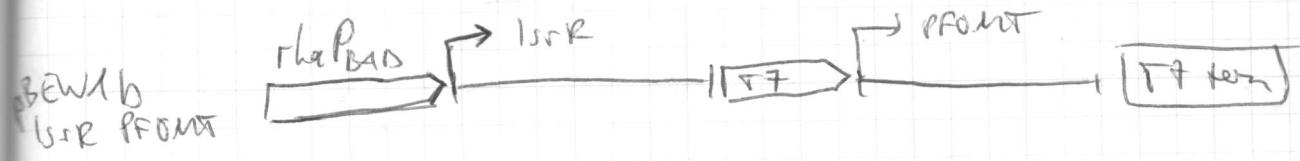
Klon 1&3

mit Sorekdom
Insel

→ Klon 2
mehr

Expressions test pBEW

Testen, ob beide gene exprimiert werden, da nur wenn man mit Rhamnose induziert wird.



pBEW1b
lrrR PFOMT



pBEW1a
SspB PFOMT



pBEW1a
SspB
PFOMT



- 3 ml Volvultar DHT & + β Plasmid; int. @ 31°C/200 rpm mit entsprechenden AB

↳ nächste Tage: OD⁶⁰⁰ bestimmt

Probe	#	OD ⁶⁰⁰	VF für 0.05	OD ⁶⁰⁰ auf 3 ml Kultur
1a PFOMT	1	4.715	94.3	31.8
1a SspB PFOMT	2	4.803	96.2	31.7
1b lrrR PFOMT	3	4.493	89.9	33.4
1b SspB PFOMT	4	4.779	83.6	35.9

Antimischung und Rhamnose

(A) (B-medium + 0.05%), glucose + 0.2% Rhamnose

(B) — — — ohne Rhamnose→ in 3 ml kalter Anschiffung und auf $OD^{600} = 0.05$ stellen→ @ 37°C / 200 nm @ 1232 → @ 22°C 1ml Probe abgenommen OD^{600} bestimmt
& pelletiert

Probe	OD^{600}	Probe	OD^{600}
1A	8.293	1B	4.777
2A	7.102	2B	5.109
3A	5.176	3B	4.661
4A	6.979	4B	4.976

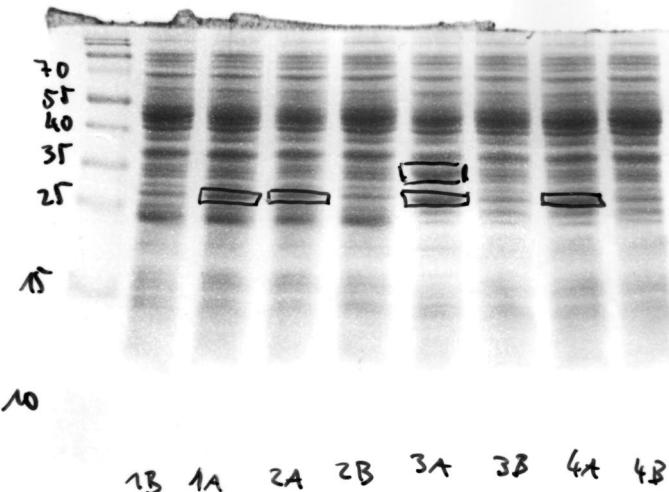
Bei $OD^{600} = 2 \rightarrow$ in 100 µl B-PER II anstreuen

n	$V(B\text{-PER}) \mu\text{l}$	$V(B\text{-PER}) \mu\text{l}$	
1A	415 μl	1B	238
2A	305 μl	2B	255
3A	208 μl	3B	233
4A	246 μl	4B	248

→ Läuft durch 3x gefrierf. Tan Zügler

→ 10 µl der Brühe ent. 10% SDS-fl

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130711_Expressionstest_pBEWs.TIF



11.07.2013 17:50:04

→ PDS wird aufgrund des schlechten Separations zwischen HES1 & HES2 auch mit Chamomile inkubiert!

Klonierung von ScOYE2 in pBEW101

ScOYE2 PCR-Fragment von Maize (Nl)

↳ aus amplifiziert mit Primern ScOYE2-fw & ScOYE2-rv

Klonierung:

100 µg pBEW101 ①

1x T4-DNA-Ligase Buffer (Fermentas)

2.5 µl BsaI (NEB)

11.1 µg OYE2-PCR-Fragment (van DLM)

5µl T4-DNA-Ligase (Fermentas)

Fragment: Plasmid →

Programm:

2 min @ 37°C ↗ [30x - 50x]

5 min @ 16°C ↗

5 min @ 50°C

50 sec @ 80°C (Inaktivierung)

0.55µl pBEW101 (0.3µg/µl)
 2µl T4 Ligase Buffer
 0.25µl BsaI (@10U/µl)
 0.3µl OYE2-Fragment
 1µl T4 Ligase (5U/µl)
 ad 20µl H₂O

↳ 10µl in DH5α transformiert

→ in 500µl SOC aufgenommen, 100µl plattiert

→ @ 37°C inkubiert

→ >100 Kolonien, nach 14h Lysiszeit

→ Colony PCR mit 10 Klonen

→ Colony-PCR

- Ringer T7 Korn & pMCB1034-fw 2
- Elongationszeit 2:10 min/sec
- 1% Agarose gel

erwartete Ergebnisse
~7000 bp

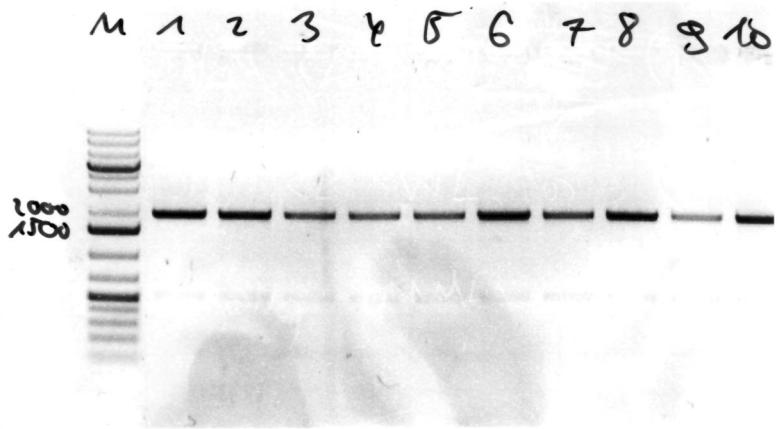
O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130716_colopcr
_pbew101_ScOYE2.TIF

→ Klon 1-5

3 ml Kultur von

Klon 1-5

→ Kloneprep von
Klon 1+2



16.07.2013 11:16:55

Klon | by/pel

→ Separiert mit T7 Korn Ringer

pBEW101_SCOYE2 (667)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
pBEW101_SCOYE2_1	ACTCACTTTCCGGCTTCTTCAGCAGCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTCTCGACTTAATTTGTCCCAAACCGAGTTTAGAGCTCTTC									
pBEW101_SCOYE2_2	G.CAT.AC.T.									
pBEW101_SCOYE2 (667)	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200									
pBEW101_SCOYE2_1	GTACGTAGGGTAGTCATGTATCCCTCAGCTGACATTGTGAAAGTGCTCTGTCATAATTGTGTTAATGGTAACCCCTTTCAAAAGATCAAACAA									
pBEW101_SCOYE2_2										
pBEW101_SCOYE2 (667)	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300									
pBEW101_SCOYE2_1	TCTGGATTAGAGATAAAAAATCTACCGTAAACCGATCAATGTTCTAGATCCCTCACCCTCTCTGACAACATTCTGGTGCAAGCAAAAGTTACAGCTC									
pBEW101_SCOYE2_2										
pBEW101_SCOYE2 (667)	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400									
pBEW101_SCOYE2_1	TAATAATGGGCCCTCCAQATAGATAACCAAATTGTTGCTAACCTCCATGTATTACCTCACCTTCAAGTAAATAATGGTTGGTGAACAGGGTCAAC									
pBEW101_SCOYE2_2										
pBEW101_SCOYE2 (667)	410 420 430 440 450 460 470 480 490 500									
pBEW101_SCOYE2_1	AACATGATGGAAGAAAACCGTTGGCAGCTTACCTCTTCTAGTTCACTTAQACATAACGTTATGAGCAAAATACCGGTTCAAGCACA									
pBEW101_SCOYE2_2										
pBEW101_SCOYE2 (667)	510 520 530 540 550 560 570 580 590 600									
pBEW101_SCOYE2_1	CCAGACATACTGTGAGAACCAATAGGAGAACATTCTAACCCAGCTTTTCAAGGGCAATAGCATGCAACTGCATCAACCACTTCCAGGTAAC									
pBEW101_SCOYE2_2										
pBEW101_SCOYE2 (667)	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700									
pBEW101_SCOYE2_1	GGGGCTCTTTCGATGGATCACCATACTCATCGTTCTGTATTGGAGTGTGGGTCAGAACCTGGTCACAAAGTAAACCTTACGGCTGTGGATTTC									
pBEW101_SCOYE2_2										
pBEW101_SCOYE2 (667)	710 720 730 740 750 760 770 780 790 800									
pBEW101_SCOYE2_1	AAACACATCGGACCGACGCAATGGATTTGGACCTTGGAGCTATCTTACGCTATTGCTTAATTCATCTTGTATACGTGTGTTGGTT									
pBEW101_SCOYE2_2										
pBEW101_SCOYE2 (667)	810 820 830 840 850 860 870 880 890 900									
pBEW101_SCOYE2_1	GTTACCCCTCTTACGCTTTCTCTTGTCTGCAATCATAACGTTGTCAGAGCGGATCTCGTAACGCAACCATCCCAGCAAGGGTCTGGCAA									
pBEW101_SCOYE2_2										
pBEW101_SCOYE2 (667)	910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000									
pBEW101_SCOYE2_1	GGACCCCAACCTGAGCCCATATTGGACCCATGGAGCAATTCTCTCATGATACCTTCAAGAATACTTGTGTCATCTTAAATTGCTCTGGCA									
pBEW101_SCOYE2_2										
pBEW101_SCOYE2 (667)	1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100									
pBEW101_SCOYE2_1	CAGTACCTGGAGCAATTGGCTAACCCCCGAGTTGGCGAGAGGGAAAAGTACCTTCAAGTATACTGAGTAACTGAGCTTGTGAGCTT									
pBEW101_SCOYE2_2										

→ Domäne hat Funktion

→ Separation mit Ringer prim
aber noch nicht,
für Doppelgelenk zu stark

→ stimmt laut
Chromatogramm nicht
aus

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

WEB200 Screening test

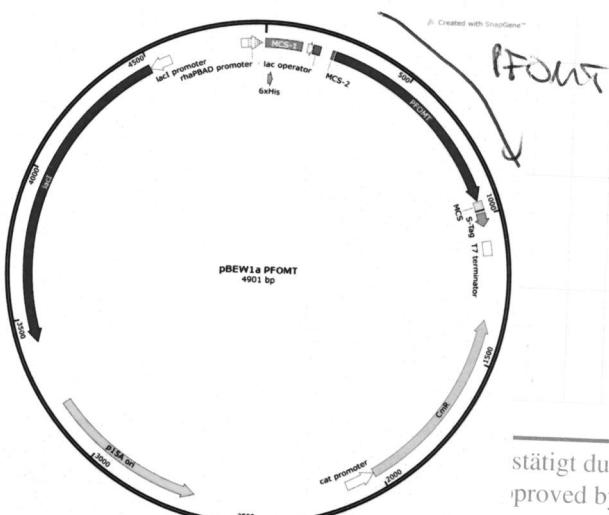
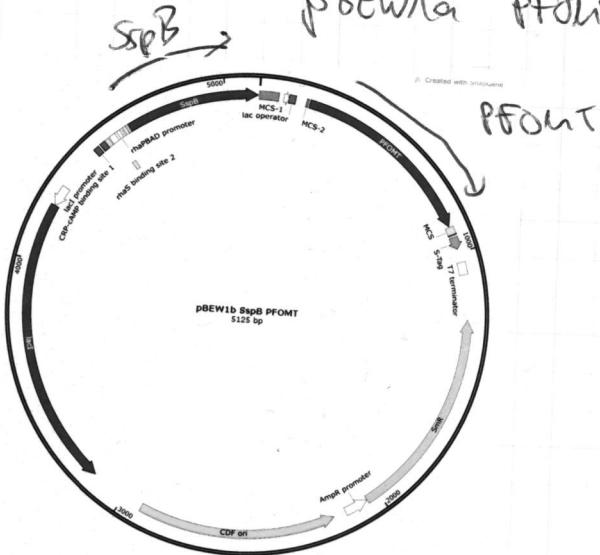
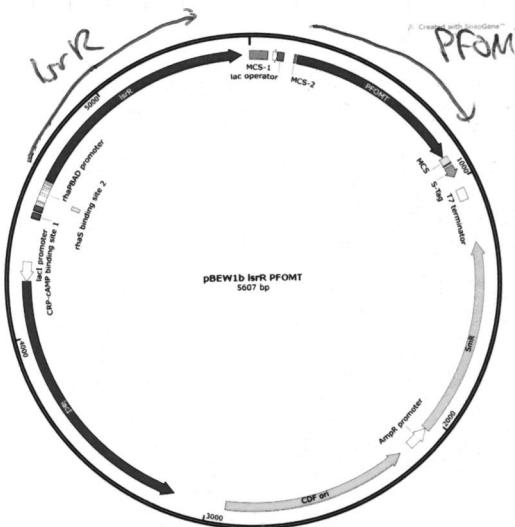
- mit JW1593 & JM110 Zelle

8^{er} phoB1 sfGFP + P_{PROMT} expression

getestete Konstrukte:

E.coli:

- A) ~~JW1593~~ JW1593 phoB1 sfGFP-DAS+4 & pBEW1b LsrR PFOMT
- B) E.coli JW1593 phoB1 sfGFP-DAS+4 & pBEW1b SpB PFOMT
- C) E.coli JM110 phoB1 sfGFP-DAS+4 & pBEW1a PFOMT



→ beide gene durch Plasmide übertragen (siehe S. 89-91)

stätigt durch/
proved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

16.07.13

Durch/
Perf

M

- Extrahieren (ml) mit EtOAc
→ 1ml abnehmbar & 250µl AC-9 zugeben
→ mit EtOAc extrahieren

- Botha wine → zum Start
→ zum Ende

~~250 ml~~ Kultivierung & Toulousan ~~B~~
in DMso gelöst / 10ml AC-9
in DMSO

$$2 \text{ ml} \times 250 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} = 500 \mu\text{mol}$$

$$\times 180 \frac{\mu\text{mol}}{\text{pmol}} = 90 \text{ mg CT}$$

$$1 \text{ ml} \times 10 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \times 222.24 \frac{\mu\text{mol}}{\text{pmol}} = 2.22 \text{ mg}$$

1	Aurora CA	7	A	lac	CA
2	B-Block CA	8	B	~	
3	C " n	9	C	~	
4	A shaft	10	A	lac	FT
5	D "	11	B	~	
6	C "	12	C	~	

3 ml Volulture

WEB200

14.07.13

- ~~JM109~~ pNEB1 of GFP; pETM1a PFONT
- JW1593 — ; pETM1b IsrR PFONT
- — , pETM1b SypB PFONT

→ \bar{v} . N. @ 37°C / 200 rpm

→ ernte @ 5000 x g / 5 min

→ 2x mit 1 ml PBS gewaschen
— in 2 ml LB-Medium aufgesetzt

	OD^{600}
A	5.621
B	4.534
C	3.730

15.07.13 Über-Nacht

- 3ml Kultur ($\text{OD}^{600} = 0.04$ angesetzt)

a) ~~LB + 0.2% L-Rhamnose + 0.05% Glucose~~

b) ~~LB + 0.2% L-Rhamnose + 0.01% Glucose~~

1) ~~250 μM KGS, 250 μM CA~~

2) ~~xx, 250 μM FA~~

V (ml)

A) JW1593 pNEB1 of GFP, pETM1b IsrR PFONT 5.3

B) — ; pETM1b SypB PFONT 6.6

C) JM109 — ; pETM1a PFONT 8 ml

Inhibitor

+ 10μl 10mM 9-AC

→ 2x mit 1 ml EtOAc extrakt (≈ 30 s)

Wässrige Phase nach 2x im 50ml EtOAc + 1% EtOH (WEB 201)

• 3 ml Verdauflumen über Nacht 37°C / 1200 rpm)
in LB mit 150 µg/ml Amp ^{50 µl}
& 100 µg/ml Streptoz. bzw. Chloramph.

- Zellen gesammelt @ 5000xg / 5 min 4°C
- 2x mit 15 ml gekühltem PBS gewaschen
- in 2 ml LB Medium aufgenommen &
& OD⁶⁰⁰ gemessen

A	0.600
B	5.621
C	4.534
	3.730

• 3 ml Kultur mit Osmalater angezüchtet, sodass OD⁶⁰⁰ = 0.01
Konditions:

1) LB + 0.2% Rhamnose + 0.05% glucose
+ 250 µM Caffeic Acid

Indikation	Subst.
------------	--------

+ +

2) LB + 0.2% Rhamnose + 0.05% glucose
+ 250 µM Folic Acid

+ -

3) LB + 0.2% Lactose + 0.05% glucose
+ 250 µM Caffeic Acid

- +

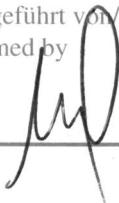
4) LB + 0.2% Lactose + 0.05% glucose

- -

+ 250 µM Folic Acid

250 µM Stammlösung
von Caffeic & Folic acid in DMSO !

Durchgeführt von/
Performed by



Datum/
Date

Bestätigt durch/
Approved by

16.07.13

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

• 1ml Broe der Kultur abgenommen (für Zeit = 0) (HPLC)
 ↳ Kultur ~~ab~~ inkubiert über Nacht @ 37°C / 200 rpm
 Rest (2ml)

wässrige Phase (ew Kultur) getrennt
 in 1ml Fraktionen

1ml
Teil 1 & Rest t=0
(1ml) + $100\mu M$ g-Aktive
 carboxylic
 zugeben
 für HPLC

1ml
Teil 2
(1ml)

für gel &
 OD / Fluoreszenz

extrahiert mit 1ml ETOAc
 & 500µl ETOAc
 (30 sec powermix, 5 min
 centrifugiert @ 10000xg)

200µl
 100µl
 für OD600
 in NIP
 100µl
 für Fluoresc.
 in NIP

✓ 800µl
 pelletiert in
 Zentrifuge

Pellet in BPER II

antifroren
 & Lyophil
 $N(\mu l)$

organ. Phase abgenommen
 & eingedampft

Rückstand in 200µl
 Acetonitril aufgenommen
 (15 s vortoxen)
 - 10 min zentrifugiert

50µl BPER II
 pro 1ml Broe
 und $OD^{600}=1$

180µl in HPLC
 frische Flasche für
 HPLC



17.07.2013 18:26:03

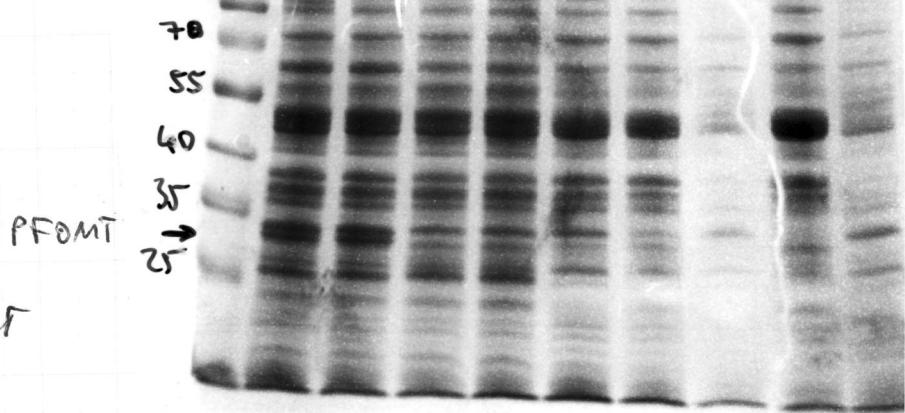
↓
 10 µl aus in lysat
 für SDS-PAGE
 (10%)

IsrR / GFP?
 PFOMT

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\130717_sdspage
 _WEB199_B.TIF

OYER OYER

M OYER OYER



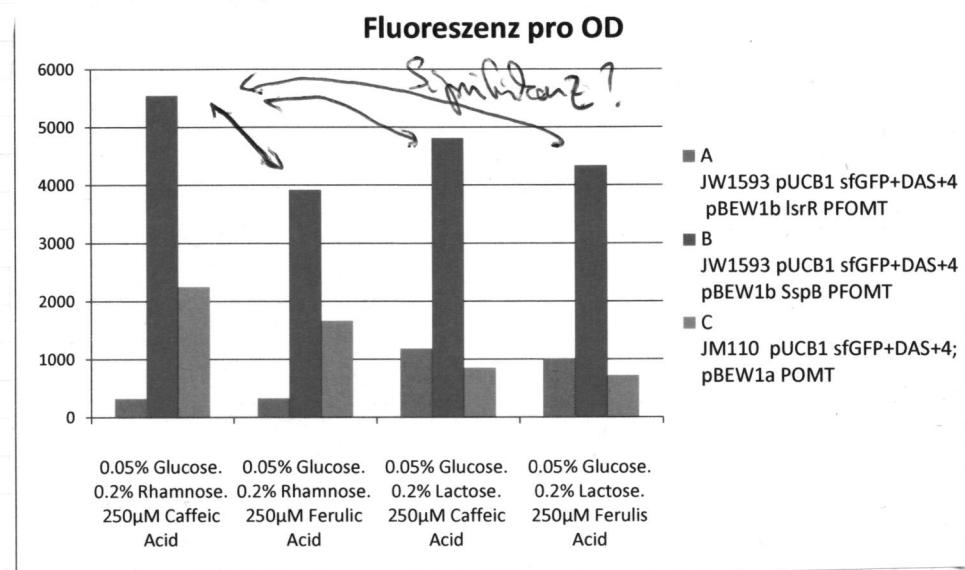
⇒ Expression von PFOMT
 in allen Zellen!

17.07.2013 18:27:12

Nummerierung der Proben: #.1 & #.0 \rightarrow 0 \Rightarrow time = 0
 \rightarrow 1 \Rightarrow nach inkubation über Nacht

1 -	A 1	(Siehe S. 94-95)	7 -	A 3
2 -	B 1		8 -	B 3
3 -	C 1		9 -	C 3
4 -	A 2		10 -	A 4
5 -	B 2		11 -	B 4
6 -	C 2		12 -	C 4

A - Coinduktion von
IsrR Inhibition
Isr SFGFP stark
~ kein Unterschied
von Substrat &
nicht Substrat



Induktion	+	+	-	-
Substrate	+	-	+	-