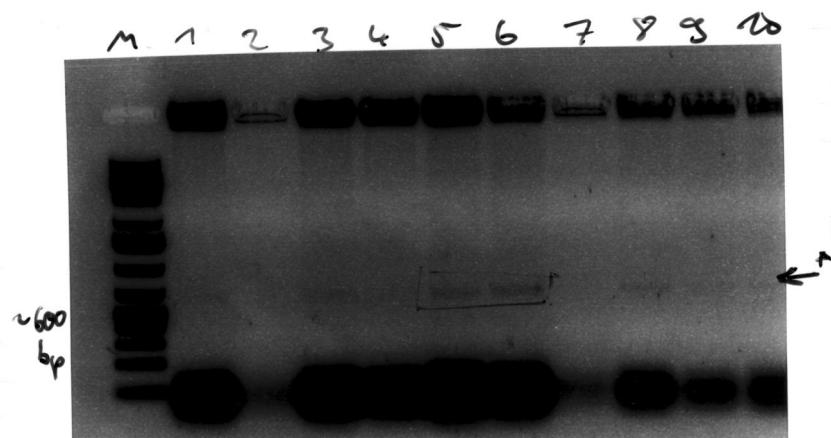


19.07.12

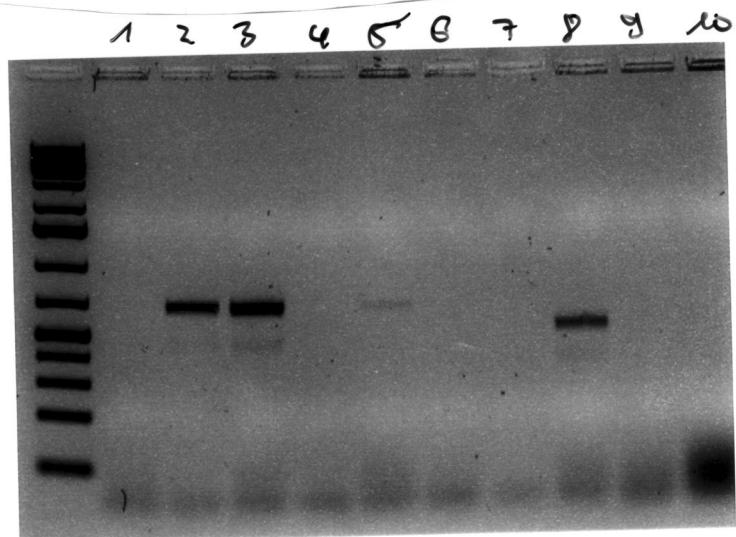
- luxS - pET28 ligation über Nacht
- Transformation lieferte ~ 50 Kolonien
- Colony PCR mit EcoRI-S-fwd & T7 term Primer lieferte nur Ringe-dünne → nur ganz schwache Bande bei der ~~gewünschten~~ gewünschte Größe (668 bp)
Ringe (Räumtag) ~~zurück~~

Mix

2 µl Raum Tag Buffer
 0,4 µl dNTPs/
 0,4 µl je Prime
 0,1 µl Tag
 → ad to 20 µl H₂O



→ Prime: LuxS-fwd & T7 term



→ Prime: LuxS-rev & T7

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

24.07.12

Sequenzung LueS

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
pet28a
	CACTATAGGGATTGTGAGCGATAACAATTCCCCCTCTAGAATAATTGTTAACCTTAAGAAGGAGATATACCATGGCAGCAGCCATCATCATCA									
2	-C.C.A.T.....G.....T.....TT--C.T.....								M G S S H H H H	
	M G G R I F F P L E * F C L T L R R R Y T M G S S H H H H									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
pet28a
	TCATCACAGCAGCGGCCCTGGTGCGCGCGACCCATATGCCGTGTTAGATAGCTCACAGTCGATCATACCGGATGGAAGCGCCTGCAGTCGGGTG									
2	H H S S G L V P R G S H M P L D S F T V D H T R M E A P A V R V									
	H H S S G L V P R G S H M P L D S F T V D H T R M E A P A V R V									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
pet28a
	GCGAAAACAAATGAAACACCCCGCATGGCAGCGAACATACCGTGTTCGATCTCGCTTCCTCGGTGCCGAACAAAGAAGTGTGCCAGAAAGAGGGATCCATA									
2	A K T M N T P H G D A I T V F D L R F C V P N K E V M P E R G I H									
	A K T M N T P H G D A I T V F D L R F C V P N K E V M P E R G I H									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
pet28a
	CCCTGGAGCACCTGGCTGGTTATCGCTAACATCTAACCGTAATGGCTAGAGATTATCGATACTGCCAATGGCTGCCACCGGTTTTA									
2	T L E H L F A G F M R N H L N G N G V E I I D I S P M G C R T G F Y									
	T L E H L F A G F M R N H L N G N G V E I I D I S P M G C R T G F Y									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
pet28a
	TATGAGTCTGATTGGTAGCCAGATGAGCAGCGCTGTGCTGATGCCCTGGAAAGGGCAATGGAAGACGTGCTGAAAGTGCAGGATCAGATCCCG									
2	M S L I G T P D E Q R V A D A W K A A M E D V L K V Q D Q N Q I P									
	M S L M V R Q M S S V L L M P G K R Q W K T C * K C R I R I R S R									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
pet28a
	GAATGAACTGCTACCAAGTGTGGCACTTACCAAGATGCACTCGTTGCAAGGAAGCGCAGGATATTGCGCTGAGCTGGAAACGTGACGTACGCATCAACA									
2	E L N V Y Q C G T Y Q M H S L Q E A Q D I A R S I L E R D V R I N									
	N * T S T S V A L T R C T R C R K R R I L R V A F W N V T Y A S T									
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
pet28a
	GCAACGAAGAACTGGACTGCCGAAGAGAAGTTGCAAGGAACCTGCACATCTAGAATTGCGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCACTCGAGCACCA									
2	S N E E L A L P K E K L Q E L H I * N S S S V D K L A A A L E H H H									
	A T K N W H C R K R S C R N C T S R I R A P S T S L R P H S S T T									

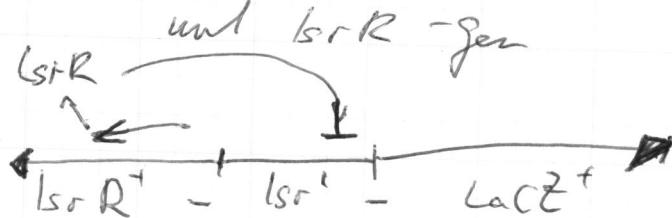
→ Frame shift durch Deletion → → andere Sequenz nicht bereit

→ Optionen:
 - Intragenet. und Exon inserieren
 - nochmal Sequenz (amplitude mit Tag → wenn möglich doppelt)

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

Platte-Assay:

- Es ergeben sich bereits unterschiedlich starke Verfärbung bei zwei unterschiedlichen Stämme → BL21 (DE3) mit starker Farbung (bei S-Gal & lacZonkey) bzw. m-Hatkey (C-TAC-lac-Zonkey) hervor
- ABER: eigentlich sollten alle ^{Zellen} Kolonne mit der ^{hier gleiche} Phänotyp wie der herrechtes ausprägen, da noch kein A1-2 vorhanden (heute M1)
- Gould: vermutlich wird in wenig lsrR - Reproduktion geblockt → nochmal Blotting des Gens mit lsrR - Gen



Laborbuch Nr./Notebook no.	Fortsetzung von Seite/ Continued from page no.	Seite Nr./ Page number 128
----------------------------	---	-------------------------------

27.07.12

PFOMT - Umbierung

- PFOMT war in pQE30 → mit Amp Resistenz
→ brauchte Kan Resistenz für Plattenansatz, da pNCB1034 bereits Amp hat
- ~ Klonierung in PET28a(+) mit NdeI, EcoRI, da noch geschmiedete Vektoren da sind

PFOMT pQE30 Ausschnitt:

```

CTCGAGAAATCATAAAAATTATTCGTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAG
CGGATAACAATTACACAGAATTCACTAAAGAGGAGAAATTAACATAGAGAGGATGCCATACCCATC
ACCATCACGGATCCATGGATTTCGCTGTGATGAAGCAGGTCAAAATACAGGATTGCTACAGAGTGAG
GAGTTATGCCAGTATTCCTCGAACACTAGTGTCTATCCGCGAGAAGCAGGTTCCCTCAAGGAACTCAG
GGAAGGCAATGAAAGTACCCAGACTCTTATATGTCGACTTCACCACTTGTGGACAATTGATGTCAT
TCGTTCTAAATTAGTGAATGCAAAGAACAGTATTGAAGTTGGAGTCTTACAGGATACTCCCTCTTA
CTCACTGCTCTTCAATTCTGATGATGAAAGATTACGCGAATTGATTGCTGACAGAGAGGCATATGA
GATTGGCTTGCATTTACGAAAAGCTGGTGTGGAGCACAAATCAACTTCAATTGAAATCGGATGCTA
TGCTAGCTCTGACAATCTTCGCAAGGACAAGAGAGCCAGGGAGTTACGACTTTGGCTTGTGAT
GCGGACAAACCTAACTACATCAAGTACCATGAGAGGTTGATGAAACTAGTCAAGGTGGTGGCATAGT
CGCTTATGACACACACATTGGGGTGGAAACTGTAGGCCAGCTGAATCCGAAGTACCAAGATTTCATGA
AGGAAAACAGAGAAGCTGTTATTGAACTCAACAAGTTGCTGCTGATCCTGATCGAGATTGTA
CATCTTCTTGGGTGATGGTACACTTCTGCAGGCGCTTTAT TGACACAAGCTTAATTAGCTGAG
CTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAAT

```

NdeI
 5'-CATATGGATTTGCTGTGATGAAGCAGGTC-3'
 → PFOMT_fw_NdeI

5'-...GTATCACTTCTGCAGGCGCTTTAT **TGAATTC-3'** (cds)
 3'-CATAGTGAAGACGTCCGCAGAAATACTTAAG-5'

EcoRI
 5'-GAATTCAATAAGACGCCGTCAGAAAGTG-3'
 → PFOMT_rev_EcoRI

Komplettsequenz:

```

CATATGGATTTGCTGTGATGAAGCAGGTCAAAATACAGGATTGCTACAGAGTGAGGAGTTATGCCAG
TATATTCTCGAACTAGTGTCTATCCGCGAGAAGCAGGGTTCTCAAGGAACCTAGGGAAAGCCAATGA
AACTCACCCAGACTCTTATATGTCGACTTCACCACTTGTGGACAATTGATGTCATTGTTCTAAAT
TAGTGAATGCAAAGAACAGACTATTGAAGTTGGAGTCTTACAGGATACTCCCTCTTACTGCTCTT
TCAATTCTGATGATGAAAGATTACGCGAATTGATTGCTGACAGAGAGGCATATGAGATTGGCTGCC
ATTATCAGAAAAGCTGGTGTGGAGCACAAATCAACTTCATTGAAATCGGATGCTATGCTAGCTCTG
ACAATCTCTGCAAGGACAAGAGAGCGAGGGAGTTACGACTTTGGCTTGTGATGGGACAAACCT
AACTACATCAAGTACCATGAGAGGTTGATGAAACTAGTCAAGGTTGGGATAGTCGCTTATGACAA
CACATTATGGGGTGGAACTGTAGCCCAGCCTGAATCCGAAGTACCAAGATTTCATGAAGAAAACAGAG
AAGCTGTTATTGAACTCAACAAGTTGCTGCTGATCCTGATCGAGATTGATACATCTCCTTG
GGTATGGTACACTTCTGCAGGCGCTTTATTGAATT

```

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

PCR

20 µl Phusion HF Buffer
 2 µl dNTPs
 2 µl PFOMT fw
 2 µl -rev
 5 µg template (pQE30)-PFOMT
 1 µl Phusion Pol.
 ad to 100 µl ddH₂O

← note: keine Bande im gel

→ Wiederholung mit Pfu Taq

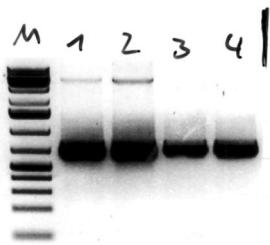
1) Taq Pol 5 µg pQE30-PFOMT
 2) Pfu Pol 50 µg pQE30-PFOMT
 3) Pfu Pol 5 µg pQE30-PFOMT
 4) Pfu Pol 50 µg pQE30-PFOMT

→ Rende

Programm (2720 bp)
Phusion (2-step)
 98°C 30s Denat.
 25x [98°C 10s
 72°C 15s (Anneal /
 72°C 5s Elong.)
 4°C ∞
]
 ↓

Programm (Pfu Taq)

80°C 3min
 95°C 30s
 25x [60°C 30s
 72°C 1/2 min (Taq/Pfu)
 72°C 5min
 4°C ∞
]

PFOMT

→ @ ~700 bp

→ PCR 3 & 4 vereinigt und
 PCR cleanup mit QiaGEN
 kit ($\approx 155 \mu\text{g}/\text{ml}$)

→ mit NdeI/EcoRI verarbeitet

Ansatz Verden

2 h @ 37°C
 inkubiert 20 min @ 65°C
 abgs stoppt

10 µl (155 µg/ml) PFOMT
 2 µl Pfu_{HF}
 1 µl NdeI & EcoRI
 ad to 20 µl

Vorlagen ~~PFOMT~~ mit NdeI/EcoRI

- aufgearbeitet mit Qiaquick PCR cleanup kit
- C = 57,7 µg/ml

Transformation PFOMT / pET28a (+)

Größe: 720 bp $\approx 4,37 \cdot 10^{-5}$ nmol

Vektor 200 ng (1 µl) pET28a (+) NdeI/EcoRI (24,5 µg/ml)

Insgesamt 67,2 ng (1,7 µl) PFOMT (57,7 µg/ml)

2 µl T4 lyse buffer

0,5 µl T4 Afase

72,4 µl H₂O \rightarrow 20 µl Ansatz

→ 2 h @ 22 °C inkubiert

→ 5 µl vom Ansatz in OHS + transformiert

→ über Nacht @ 37 °C

→ >50 Kolonien auf Platte

24.07.12

Colony PCR von Kolonie & Markplatte

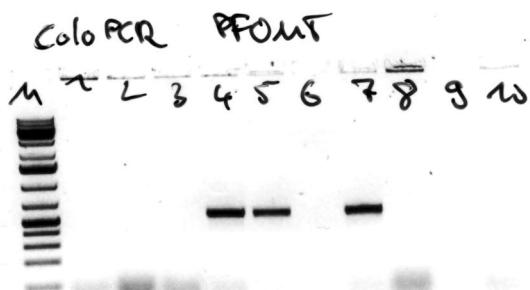
1x & 60x MM

PCR-Programm

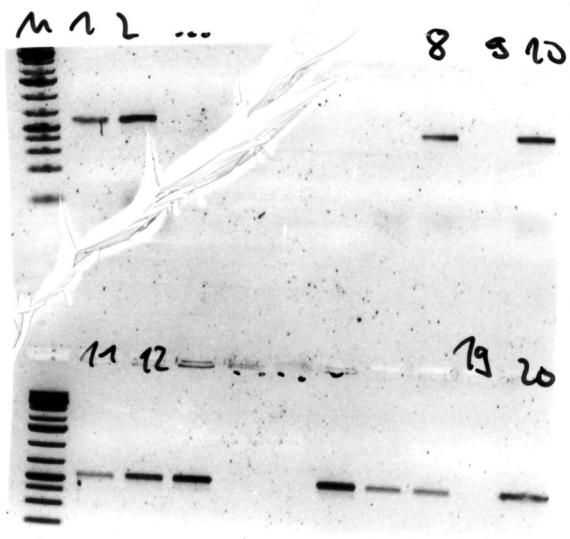
DreamTag Buffer	2 µl	95 °C	2 min
dNTPs	0,4 µl	95 °C	4 min
T7 prime	0,6 µl	55 °C	1 min
PFOMT_rev	0,4 µl	71 °C	1 min
Taq Pol	0,1 µl	71 °C	7 min
ad 60 20 µl		4 °C	∞

→ 1,5% Agarosegel

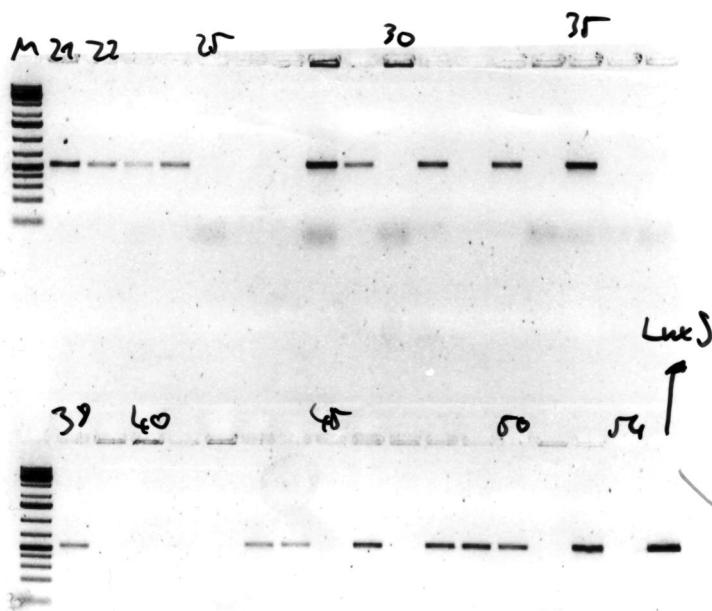
C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pfl
o\Desktop\WEB\120725_colopcrpfomt_lsrr-ls



C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pfl
o\Desktop\WEB\120726_colopcr_pfomt.TIF



C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pfl
anzenbio\Desktop\WEB\120726_colopcr_pfomt2.TIF



- Fragmente sind zu klein (~500 bp)
- Fragment wurde 864 bp Sie → ???
- nochmal in Sequenz gequellt → NdeI Schnittstelle in Ser
- (siehe S. 128 angeleitet)
- LueS synthetisierung

26.07.2012 15:06:10

n-TKB led der plus (Kontrol)

~~IsrR~~
Klonierung von IsrR'-IsrA:

- Klonierung von lsr-Promotor & lsrR Protein in pMLB1034

PCR IsrR'-lsrA (1245 bp)

① 10x PCR buffer (+MgSO₄) 1µl
 10mM dNTPs 1µl

lsrR'-lsrA-fw 1µl
 p-lsr-rev 1µl
 Pfu Polymerase 0,1µl
 add to 50µl H₂O

Template:

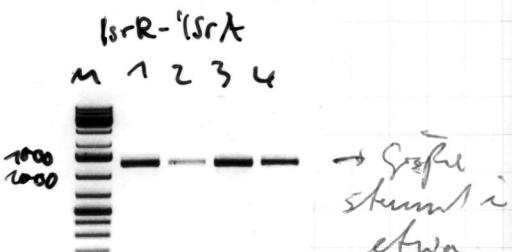
- ~~5~~ 5 bzw. 50 µg promische DNA (E. coli)

- 1 - 50 µg DNA (29.01.)
- 2 - 5 µg - - -
- 3 - 50 µg DNA (26.01.)
- 4 - 5 µg - - -

PCR Programm

Denat.	95°C	3min	30X
Denat	95°C	30s	
Anneal	60°C	30s	
Elng	72°C	2:30 min	
Pause	4°C	∞	

m - 1Kb Ladder Plus
 von Fermentas



25.07.2012 14:16:06

→ ABER:

- forward primer lsrR'-lsrA-fw startet mit

5' - GAA TCC ...

falsche Sequenz für EcoRI

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	24.07.12			

lsrR-lsr-'lsrA cds

ORF lsrR

ORF lsrA

lsr promoter

ttctccatcaTTCCCGTAATAAGGTATGCCAATTAACTACGTAATCGCCGCTGCTGTGCCTGATCGGTAA
 ACCAGTGCCTGATATAACCGCTTTCATTCAGCGCAATTGCTCGGTTTATTTCTCCCGTGCACCGCA
 ACCCGGACGGGTATGGTCTCAGCGCTAAAGGAAGCCAATCAGTTGTTATGTATTGATATTGACAGCA
 ACGTCACTTTTGCTCATAAAAAGTAGCCCTAAATGTCGCCAACCGCCCCTTTCGGCAATCATTAACGTC
 CCTGGCTGATATAACCGGAGGAATTTGCTGATCGCTGTGACTCACAGCACCAATGCCGACAATGCC
 ACATCCGCTGCTTCAGCGCTAACAGAACATTGACGCAATTTCATTAGCTGACGGCAATGTCAGCG
 GAGGATGCCGAAACGGAGCGGAATAATTACACTGACAGCGCTAAAGCTGCCGATTCGGTCAATAA
 GAACCGCACCCAGGAGAGCGTGAACCGGAATTGCTGACGAAATAAAACACTTAAGCGTTGAGCGTA
 TTCTATGGTTGCTCGCAAACCAATGCCAGCATCGCACAGCCAGGGATACCGGACATGTCAGCGAAAATCTGA
 CGACGTAATTGAGTTGATATTCCAGACAGCCTCAAAGCGAGAAATTAACTCTGACGCAATAATGCCGACTGA
 TGCCCTTCCAGCAATCCGGACACTTCAAACAGTGTGACGGCGAGAGCATGCTGATCTCGCTCGGTCA
 CGCTGCTGATAGTAAACCGGATCCGGCGACCTGTTCTTCACATTCCTGTTGAAATTGCCGAA
 TCCTGTTGATGTCATAATTCTTCACTTGAACATAATTAAATCTTAAATGCAATTGTCAGTTGCTCAT
 TTATATCTGTGATGCCAACACAGTTGACTCTAGAGCATGAACAAACGCAACCGTGAATAATCAAATACCAT
 ATTGTGATCTATTGTCGAAATATGTCATGCCACCTAACGGTTGAAACAAATTAAAGCAGAAATACATT
 TGTTCAAAACTCACCTGCAAACACTGAACGGGGAAATATGGATCG

EcoRI

5'-GAATcatcaTTCCCGTAATAAGGTATGC-3' 31bp, CG=45%, Tm=60.8-64°C

Name: lsrR-'lsrA_fw
→ Falsche restrictionssequenz -.-

→ Sequenz für EcoRI stimmt nicht

5'-GAATcatcaTTCCCGTAATAAGGTATGC-3' 31bp, CG=41,94%, Tm=59,2°C-62
Name: lsrR-'lsrA_fw2Amplifikat (1245bp):

756251,00 Da = 7.56*10^5 ng/nmol

GAAATcatcaTTCCCGTAATAAGGTATGCCAATTAACTACGTAATCGCCGCTGCTGTGCCTGATCGGTAA
 ACCAGTGCCTGATATAACCGCTTTCATTCAGCGCAATTGCTCGGTTTATTTCTCCCGTGCACCGCA
 ACCGGGACGGGTATGGTCTCAGCGCTAAAGGAAGCCAATCAGTTGTTATGTATTGATATTGACAGCA
 ACGTCACTTTGCTCATAAAAAGTAGCCCTAAATGTCGCCAACCGCCCCTTTCGGCAATCATTAACGTC
 CCTGGCTGATATAACCGGAGGAATTTGCTGCTGCTGTGACTCACAGCACCAATGCCGACAATGCC
 ACATCCGCTGCTGCGCGCTAACAGAACATCTTGAACGCAATTTCATTAGCTGACGGCAATGTCAGCG
 GAGGATGCCGAAACGGAGCGGAATAATTCAACTGACGACGGCGTTAACGCTGCCGATCCCGTCAATAA
 GAACCGACGCCACCGGAGAGCGTGAACCGGAATTGCTGACGAAATAAAACCACTTAAGCGTTGAGCGTA
 TTCTATGGTTGCTCGCAAACCAATGCCAGCATCTGTTGTTGAGTAACCTACACATATGCCGGCG
 CCTATCCCACTGCCCACCGACATCAGCATCCGAAGGCCAGGGATCACCCGACATGTTGACGGAAAATCTGA
 CGACGTAATTGAGTTGATATTCCAGACAGCCTCAAAGCGAGAAATTACGCTGACGCAATAATGCCGACTGA
 TGCCCTTCTCCAGCAATCGGACACTTCAAACGCGAGAGCATGCTGATCTCGCTCGGTCA
 CGCTGCTGATAGTAAACCGGATCCGGCGACCTGTTCTTCACACATCCCTGTTGAAATTGCCGAA
 TCCTGTTGATGTCATAATTCTTCACTTGAACATATTAAATCTTAAATGCAATTGTCAGTTGCTCAT
 TTATATCTGTGATGCCAACACAGTTGACTCTAGAGCATGAACAAACGCAACCGTGAATAATCAAATACCAT
 ATTGTGATCTATTGTCGAAATATGTCATGCCACCTAACGGTTGAAACAAATTAAAGCAGAAATACATT
 TGTTCAAAACTCACCTGCAAACACTGAACGGGGAAATATGGATCG

→ neuen Reime gemacht mit Hilfe Sequenz (EcoR-Seq-fw?)

→

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

24.5.21

24.01.12

PCR LsrR'-lsrA'

- wie WEB120, aber neue primär LsrR'-lsrA'-fw2

Reagenzien:

WxFn Buffer (+MgCl₂) 5 µl

10 mM dNTPs 1 µl

LsrR'-lsrA'-fw2 1 µl

p-Lsr-rev 1 µl

Template ~~50 ng~~ ~~PCR~~ DNA (E. coli) 50 µl (1:1000 PCR-Rxn
von WEB120)

Phn Polym. 0,5 µl

ad to 50 µl ddH₂O

PCR-Programm: - Siehe WEB120 (S. 132)

- PCR cleanup mit QIAGEN Kit

→ in 25 µl H₂O elutet (c = 120 ng/µl)

Verdunnen mit Sam HI & EcoRI:

8 µl lsrR'-lsrA' (120 ng/µl)

4 µl Taq Buffer

1 µl EcoRI

2 µl Sam HI

5 µl ddH₂O

→ 2 h @ 37 °C

• + 0,5 µl 0,5 M EDTA

• ~~PCR~~ PCR cleanup nach
Verdunnen (QIAGEN)

- in 25 µl H₂O elutet

→ c = 37,8 ng/µl

MWC Fragment) = 756700 Da

Fragment: MW = 756300 Da = $\frac{37,8 \text{ ng / \mu l}}{7,56 \cdot 10^6 \text{ nmol}} = 5 \cdot 10^{-5} \frac{\text{nmol}}{\mu \text{l}}$
 Vector (pMLB1034) \rightarrow MW = $4,12 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$

Vector (pMLB1034 BamHI & EcoRI plasmid):

$$\begin{aligned} & - \frac{28 \text{ ng / \mu l}}{4,12 \cdot 10^6 \text{ g/mol}} = 6,8 \cdot 10^{-6} \frac{\text{nmol}}{\mu \text{l}} \\ & \text{to } 4 \mu \text{l mixture} \rightarrow 100 \text{ ng} = \underline{\underline{3,72 \cdot 10^{-5} \text{ nmol}}} \\ & \rightarrow 5\text{-fold overexcess} \rightarrow \cancel{\times 5} = 7,36 \cdot 10^{-4} \text{ nmol BamHI} \\ & 7,36 \cdot 10^{-4} \text{ nmol} / 5 \cdot 10^{-5} \text{ nmol / \mu l} = \underline{\underline{1472 \mu \text{l}}} \end{aligned}$$

Ligation pMLB1034 & lsrR-lsrA'

- 4 μl pMLB1034 (28 ng / μl) $\stackrel{?}{=} 100 \text{ ng}$
 - 2,7 μl lsrR-lsrA' (37,8 ng / μl) $\stackrel{?}{=} 97 \text{ ng}$
 - 2 μl T4 Buffer
 0,5 μl T4 Cipgase
 20,1 μl ddH₂O

} 20 min @ RT
 → 1 μl in E.coli
 DNA transformant
 @ 37°C

- keine Kolonie in 4°C (über Nacht)
- nochmal 1 μl transformiert, von Ligation der Mischung
- keine Kolonie

PfOMT Mutagenese, um zweite EcoRI-Schnittstelle aus dem Gen zu bekommen:

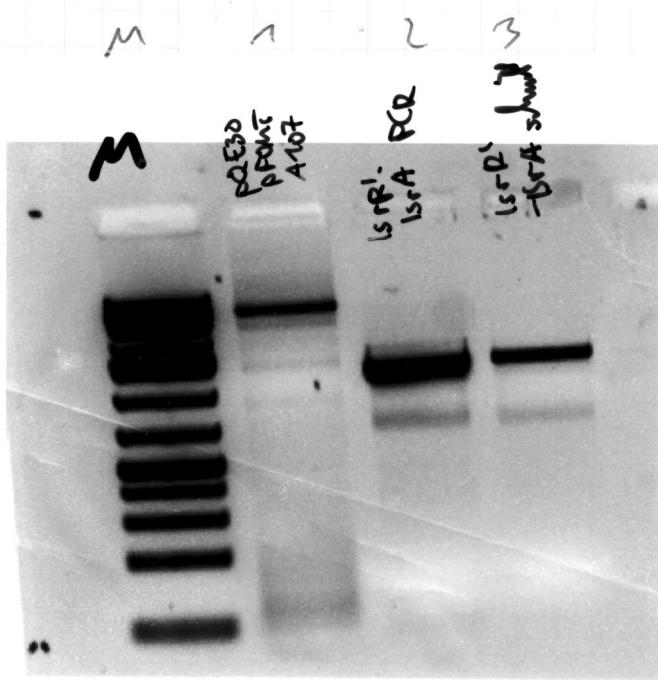
~~EcoRI~~
Noted

Mutagenese PfOMT:

50 µl Volume size: 414 bp

Pfu Buffer (+MgSO ₄)	5 µl
dNTP (2 mM)	1 µl
PfOMT-Aw7-fw	1 µl
PfOMT-Aw7-rev	1 µl
Template (pQE30) PfOMT	50 ng (1 µl)

pm Polynucleon 1 µl
add to 50 µl H₂O



02.08.2012 16:24:00

PCR-Programm:

95°C	2 min
95°C	30 sec ↘
60°C	30 s
72°C	9 min
72°C	15 min
4°C	∞

30x

M - 1KB Ladder Plus

- 1 - pQE30-PfOMT-Aw7 PCR
- 2 - Br R-BrA' PCR
- 3 - BrR-BrA' BamHI/EcoRI cut

→ Pcr cleanup (63 µl / el)
in 30 µl H₂O eluted

DpnI - Verdunnen der PCR

- 8 µl PCR-Reaction
- 1 µl FD Buffer
- 1 µl DpnI FD

→ 5 min @ 37°C

→ 5 min @ 80°C (inaktiv)

→ 1 μl in DH5α & TOP10 Zelle transformiert

Transfektion DH5α → TOP10

keine Kolonie



nur ein 1 μl transformiert

→ auch keine Kolonie

~7 Kolonie



Colony PCR

22 μl Taq Buffer

4,4 μl dNTPs

4,4 μl T7 Primer

4,4 μl PfdM5_AW7-rev

1,1 μl Fcg

183,7 μl H₂O

→ ~500 bp

PCR-Programm:

95°C 2 min

55°C 1 min

55°C 1 min

72°C 1 min

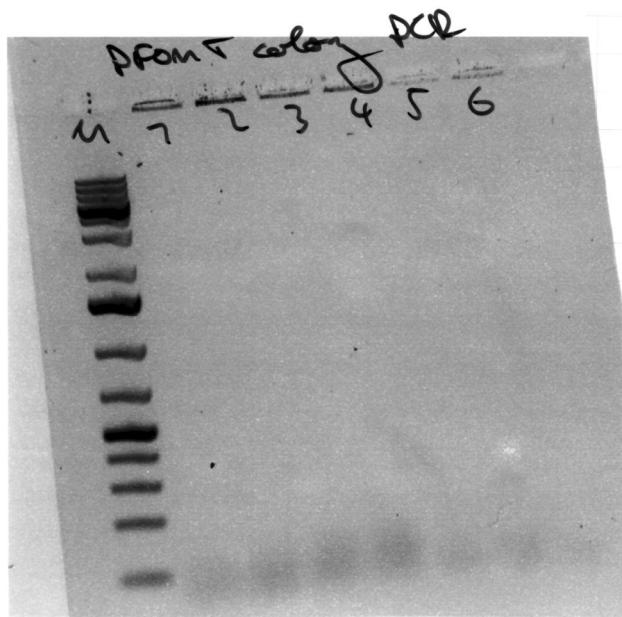
72°C 7 min

4°C ∞

15x

→ Wird hochgeladen:

PCR mit PfdM5-fw
& PfdM5-rev?



PfOMT Colony PCR mit PfOMT-fw & -rev

10x MM

20 µl Taq Buffer
 4 µl 10 mM dNPs
 4 µl PfOMT-fw
 4 µl PfOMT-rev
 1 µl Steam Taq Poly.
 76 µl H₂O

Programm

siehe S. 137

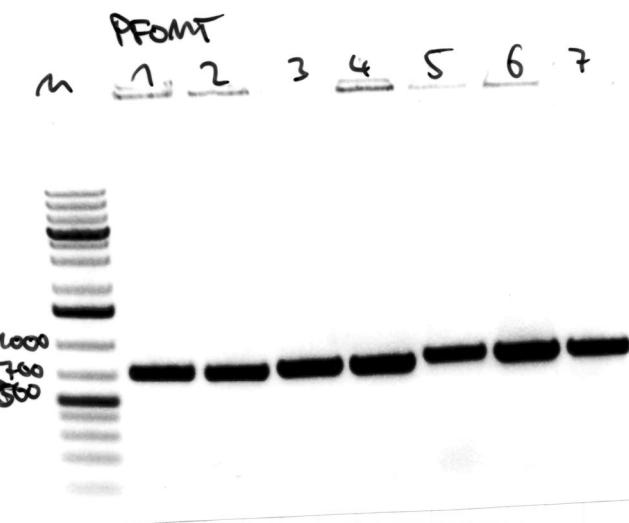
→ auf 1% Agarosegel

↑ alle Klone zeigen Bande
bei ~700 bp

⇒ warum kein PCR
Produkt mit T7?

→ 7x 3 ml VK in
LB + Amp angezüchtet

→ Klon�:



Klon #	c (ng/µl)	E 760 / 780
1	74,8	1,78
2	68,7	1,74
3	142,7	1,84 1,76
4	124	1,78
5	110,7	1,79
6	125,9	1,83
7	131,1	

- NdeI Verlust und alle Plasmide
- wenn zwei NdeI-Schnittstellen \geq 2 Fragmente (17800bp klein)
- eine NdeI Schnittstelle \geq ein Fragment

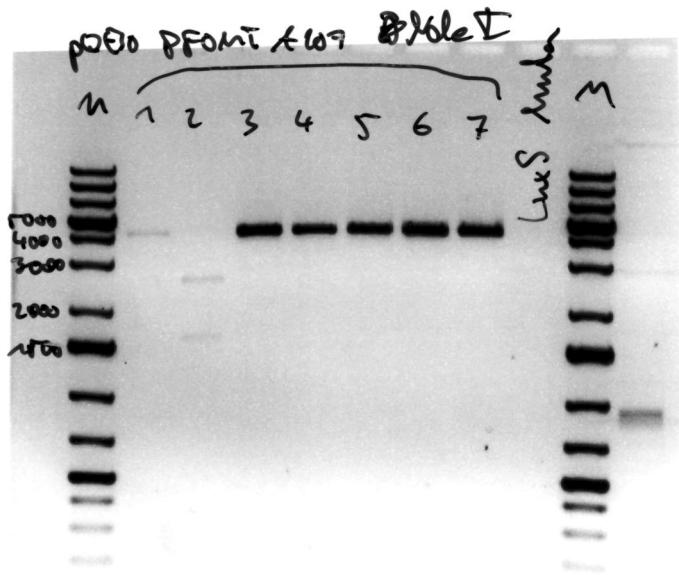
Aussch:

3x MM (gopl):

1 μl	Buffer 0
2 μl	NdeI
7 μl	H ₂ O

- je 1 μl MM + 1 μl der jeweilige Klonalprep
- 2h @ 37°C → 20m 0°C → auf gel

- Fragmentgröße
nach verlust stimmt
- Es wären beide
Schnittstellen drin,
so wie die Fragmente
1609 & 2533 bp
große (siehe 2)
- laddet
M - 1KB Genmarker Plus



↓
Keine
Unterdr.
→ 2te NdeI Schnittstelle nur drin

08.08.11

• Injektion vom 24.02.12 ($\text{pMLB1034-1sr-LacZ}^+$) nochmals transformiert

- 5 µl Injektionsansatz in E. coli One Shot TOP10 transformiert

→ i. N. @ 37°C

→ am nächsten Tag 3 Kolonne

→ Während PCR:

5x ml:

10 µl DreamTaq Buffer

Programm:

95°C 2 min

95°C 1 min 45 s

55°C 1 min] 25x

72°C 1:30 min

72°C 7 min

4°C ∞

2 µl dNTPs

2 µl pMLB1034-fw

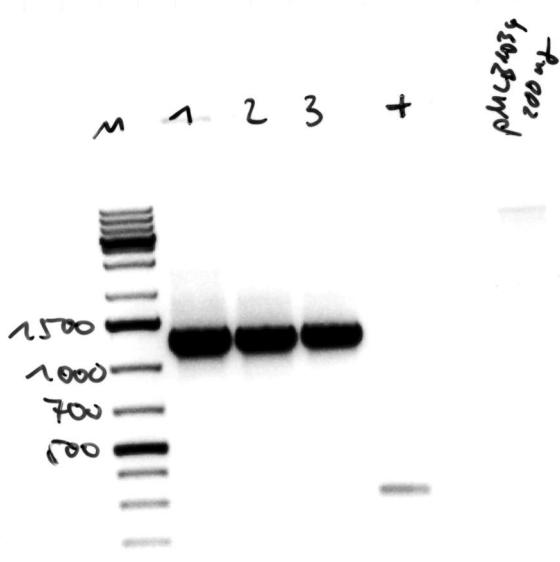
2 µl p-br-rev

0.5 µl DreamTaq

85 µl H₂O

→ 3 Kolonne und positive Kontrolle
(~0.1 µg pMLB1034-1sr-LacZ⁺)

M - GeneRuler 1 kb Ladder Plus



1-3 Klone

+ positive Kontrolle (Template p-br-LacZ⁺)

→ Miniprep von 1-3 (3 ml B_+ amp)

Klon	c (µg/ml)
1	121 *
2	76
3	117,3

1 zum Separieren auf
pMLB1034-fw(1) &
pMLB1034-rev:

5'-GGG AGG CAA GGC
SAT TAA G-3'

WEB 123

LuxS nochmal isoliert (da Deletion im hesswarks)PCR

50 µg DNA (gen. Erich) vom 16.08.12

1 µl dNTPs

jü 1 µl LuxS-fwd & LuxS-rev

10 µl Phusion HF Buffer

1 µl Phusion

ad to 50 µl H₂O

→ gel S131 (unten) → Amplification erfolgreich

Verdau NdeI & EcoRI

- 10 µl PCR-Ran mit NdeI & EcoRI verdaut

1 µl Buffer 0

1 µl NdeI | EcoRI

6 µl H₂O

→ 2h @ 37°C → 20 min @ 65°C

→ PCR-cleanup ⇒ 20,3 µg/µlLigation pET28a(+)

4 µl pET28a(+) (25 µg/µl)

2,5 µl LuxS (20,3 µg/µl)

2 µl T4 Puffer

1 µl H₂O

→ 20 min @ 22°C → Spur in DNA & Transformant

→ nichts gewachsen

Durchgeführt von/
Performed byDatum/
Date

16.09.12

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

- weiter liegt bei 4°C über Nacht

~ 5 µl in DHS & transformiert → @ 37°C inkubiert

→ viele Kolonien (>50)

→ Colony PCR (11x MM)

22 µl Dream Tag Buffer

4,4 µl dNTPs

4,4 µl LuxS-red

4,4 µl T+

1,1 µl Tag

183,7 µl H₂O

Programm

95°C 2 min

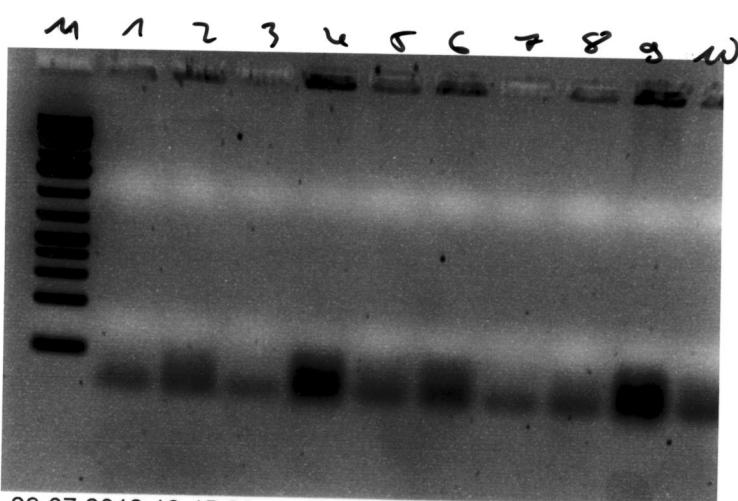
95°C 1 min

55°C 1 min] 25x

72°C 1 min

72°C 7 min

4°C ∞



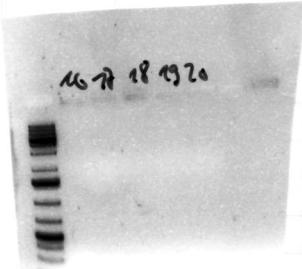
29.07.2012 18:45:02

→ Colony PCR negativ

→ weitere Colonies sammeln

~ negative

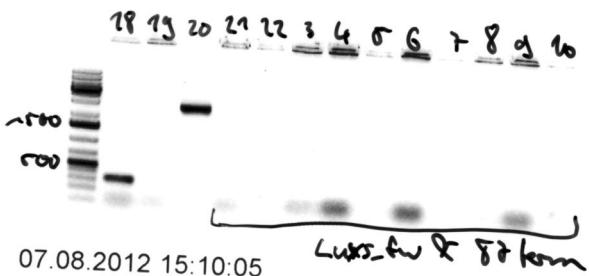
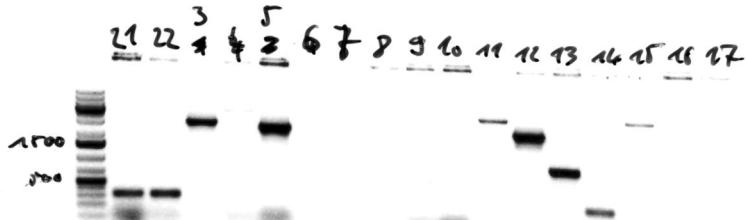
LuxS colony PCR
12 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



→ colony PCR mit arke primer
~~1x AAT~~: → mit $\overbrace{P7 \& T7}$ form primer
 720 bp

→ colony PCR zeigt
 wilde Bande, die
 nicht der erwartete
 Größe (720 bp) entspreche

C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pflanzenbio\Desktop\WEB\120807_pfomt_colopcr.TIF



07.08.2012 15:10:05

→ also LuxS_2 (Seite 126) mit Frameshift
 (Deletion @ 5406) mutiert

→ Inversion von einem T an 5406

Mutagenere - brak:

5 µl Phn Buffer (+1 µl P2)
 1 µl 10nm dNTPs
 1.5 µl LuxS_In5406_fw / rev
 1 µl ColuxS_2 (1:10) vom S.126
 1 µl Phn Ultra
 40 µl H₂O

GGTTTTTATATGAGTCTAATGGTACGCCAGATGAGC
 G F Y M S L I G T P D E Q

37bp GC=40%, Tm=60-64

5'-atattagtcataatggtagccagatg-3'

LuxS_In5406_fw

27bp, CG=40,74%, Tm=56,1°C-59,6°C

Linguistic Complexity=98%
 Primer's PCR Efficiency=89%

5'-catctggcgtaaccattagactcatat-3'

LuxS_In5406_rev

PCR-Programm (5942 bp)

95°C 30s
 55°C 30s
 55°C 1min] 2x
 68°C 9min
 68°C 15min
 4°C ∞

gel von PCR→ OpenF-Verdun von PCR

8µl PCR-mix
 1µl FD-Buffer
 1µl OpenF FD
 → 5min @ 37°C
 → 5min @ 80°C

→ 1µl transformed in DH5α
 und 1µl 1:10 und 1:100

→ nächste Fig: viele Kolonie bei 1:10 verloren, weniger bei 1:100

→ Colony PCR: siehe S. 142

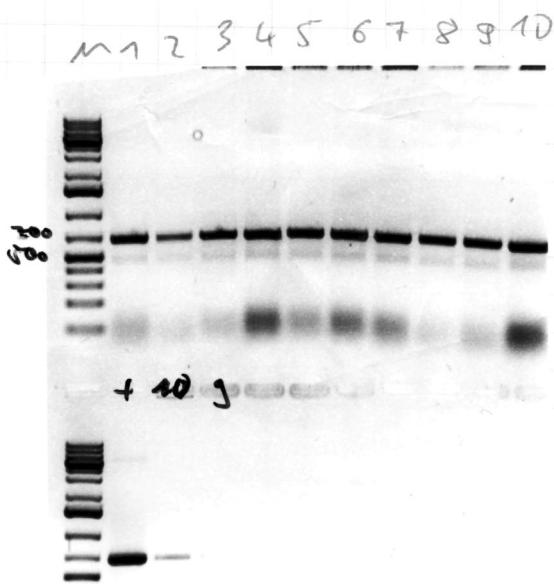
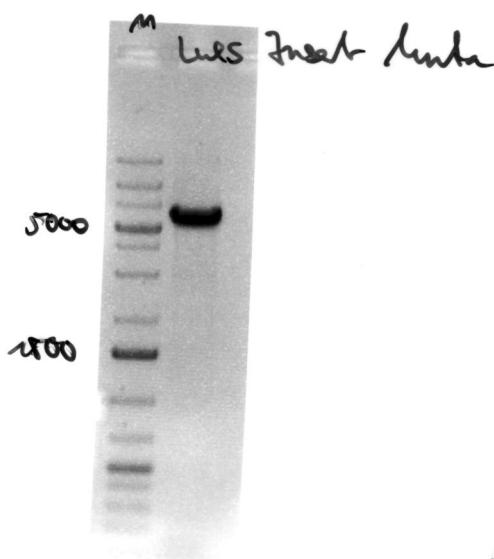
1-10 → Klone

+ → Kontrollkolle

(pET28a(+)) (res-L2 plasmid)

→ Klone ohne punkt zu sei

M:\Agarose_Gele\120809_Taraxacum PCR.TIF



08.2012 13:05:48

→ Miniprep Klone 1 & 10
~~C (µl)~~

1	98,7
10	120

→ zum Separieren mit 77 prime

Sequenzung lsrR-LacZ⁺ mit pMLB1034-fw & pMLB1034-rev

→ Sequenz aller 3 Klone stimmt mit der erwarteten Sequenz überein.

→ 13-Hit Platte
→ Tabe in BL21
→ Glycolaldehyde

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
pMLB1034 mit lsrR-1s
lsrR-LacZ 1 rev	AACCCAGGGTTTCCCAGTCACGACGTGAAACCGACGGGATCCATTCCCCCGTCAGTTTGCAAGGTAATTTGACACAGTATTCCTGCCTT										
lsrR LacZ 2 rev	GT..C..T										
lsrR LacZ 3 rev	GT..CC..GC..TT										
lsrR cds	GT..C..GATT										
<i>LacZ</i>											
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
pMLB1034 mit lsrR-1s	
lsrR-LacZ 1 rev	TAAATTGTCATACCTTAGGGTGCACATTGCACATAATTCCGACGAACTAGATCACAAATTAGCTATTTCAGCTTGCCTTGTCTCATGCCTG										
lsrR LacZ 2 rev										
lsrR LacZ 3 rev										
lsrR cds										
<i>lacZ</i>											
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
pMLB1034 mit lsrR-1s	
lsrR-LacZ 1 rev	TAGAGTCAAAAGCGGTGCGCATCACAGTAATAAGGAGAAGACTGAACANTGCATTAAGATTAATAAGTTCAAAAGTGAGAAATGAATATGAC										
lsrR LacZ 2 rev										
lsrR LacZ 3 rev										
lsrR cds										
<i>lacZ</i>											
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
pMLB1034 mit lsrR-1s	
lsrR-LacZ 1 rev	ATACCAACGATTGGCAATTTCGACACAGGGATGTTGAGAAGAACAGGCGCGCGTGGTTTACTATCACGACGGCTGACCCAGACGCG										
lsrR LacZ 2 rev										
lsrR LacZ 3 rev										
lsrR cds										
<i>lsp Operon</i>											
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
pMLB1034 mit lsrR-1s	
lsrR-LacZ 1 rev	ATCAGCGATCCTCGCGCTGACACATTGAGAGTGCGCATGGAGAAGGGCATCAGTCGGCATATTCCOTACACGTTAAATCTCGCTT										
lsrR LacZ 2 rev										
lsrR LacZ 3 rev										
lsrR cds										
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
pMLB1034 mit lsrR-1s	
lsrR-LacZ 1 rev	ANNGCTGTCTGAAATATGAAACTCAATTAGCTGTCAGTTTCGCGCAACAGTCGGGGGATCCCGGGCTGGCGATGCGAGCTCGGGGAGCT										
lsrR LacZ 2 rev										
lsrR LacZ 3 rev										
lsrR cds										
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
pMLB1034 mit lsrR-1s	
lsrR-LacZ 1 rev	GGGGATAGGGCGCGGCAATTGGTAGATGAGTTCAACCCACACAGAGCTGGCGATGGGTTGGCGAGAACCCATGAATAGCTCACAGCTTA										
lsrR LacZ 2 rev										
lsrR LacZ 3 rev										
lsrR cds										
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	
pMLB1034 mit lsrR-1s	
lsrR-LacZ 1 rev	AGTGGTTTATTTCGTCACACCAAATTGCCCTGGCTCACGCCCTCCCGCTGGCTCTTATAGACGGAACTCGGGCAGCTAACGCGCTCGAG										
lsrR LacZ 2 rev										
lsrR LacZ 3 rev										
lsrR cds										
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	
pMLB1034 mit lsrR-1s	
lsrR-LacZ 1 rev	TGAAATTATTCGGCTCCGGTCCGGCATCTGGACATGGACATTGGCGTACAGCTAAAGATGAAATGGCTTACAGAGGTTGCTTACGCCGCGAAC										
lsrR LacZ 2 rev										
lsrR LacZ 3 rev										
lsrR cds										
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	
pMLB1034 mit lsrR-1s	
lsrR-LacZ 1 rev	AGCGGATGTGGCGATTGTGGCATATTGGTAGCTGGAGTCACACAGACAGCGACAACTGGCTTCCGGCTGGCTACGTTATACACCGGGGAAACAGTTGAG										
lsrR LacZ 2 rev										
lsrR LacZ 3 rev										
lsrR cds										
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	
pMLB1034 mit lsrR-1s	
lsrR-LacZ 1 rev	TTGGCCAAAAAGGGCGCTTGGGACATTTCAGGCTACTTTTGATGCAAAAGCTGAC GTTGTACGAAATACAAATACTACAGACTGATGGC										
lsrR LacZ 2 rev										
lsrR LacZ 3 rev										
lsrR cds										

Sequenzung wird abgebrochen

lsr Open

pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

Sequence wird abblatt

pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

lsr OFF

pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

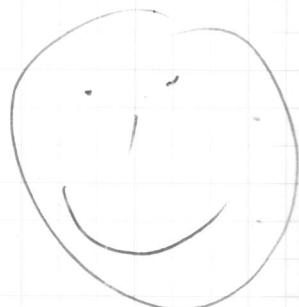
pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

pMLB1034 mit lsrR-ls
lsrR lacZ 1 fw
lsrR lacZ 2 fw
lsrR lacZ 3 fw
lsrR cds

End lsr OFF

EcoRE



PFOMT Klon 3&5 vom Separative (Order 2774492)

mit pQE forward & reverse sequenziert

PFOMT

pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100	CTCGAGAAATCATAAAAAAATTATTCGCTTGAGCGGATAACAAATTAAATAGATTCAAATTGGACGGATAACAATTCAACAGAAATTCAATTAAAG C.C.T.C. .CA.CG...CT.G.....T.T.C.
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200	AGGAGAAAATTAACTATGAAGGAGATCCATCACCATCACGATCCATGGATTTCGCTGTGAAGCAGGTCAAATTACAGATTGTACAGAGT.
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300	TGAGGAGTTATGCCAGTATTCGAGACTATCCGAGACTATCCGAGAGACAGGGTTCTCAAGGAACTCAAGGAGCCATGAAAGTACCCAGACTCT
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400	TATATGCACTTCAACACTTGCAGAACATTGATGCAATTGATGAAAGACTATTGAGTTGAGCAAGAGACTATTGAGTTGGAGCTTACAGGAACTCT
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	410 420 430 440 450 460 470 480 490 500	CCCATCTACTCACTGCTCTTCAATTCTGAGATGGAAAGATAACGGAAATTGATTTGACAGAGGCAATGAGTTGGCTTCAGAGGCTATGAGATTGGCTTGCCC. AGAGAGGCTATG AGAGAGGCTATG
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	510 520 530 540 550 560 570 580 590 600	ATTTACGAAAGTCGTTGGAGCACAAATCAA AGATGGCTTCAGAGAGGCTTATGAGATTGGCTTGCCAGAGGCTTATGAGATTGGCTTGCC
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700	CTTCATGAACTGGATGCTAGTCAGCTCTGACAACTCTCTGCAAGGCAAGAGAGCGAGGGAGTTACGATTGGCTTGGCTGAGACATTGGCTTGGCTGAGACCT
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	710 720 730 740 750 760 770 780 790 800	AACATACATCAAGTACCAAGAGAGTGATGAAACTAGTCAGGGGGCTGCAAGCTTACACACATTATGGGGTGAACTTGCCCAGCTGC.
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	810 820 830 840 850 860 870 880 890 900	AATCCGAGATACAGATTTCAGANGAAAACAGAGAAGCTTATTGAACTCAGCACTGCTCTGCTGATCCTATACGAGTTGACATCTCC
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000	TTGGGTGAGGGTACACTTCTGAGGGCTTTATTGACACAACTTATTAGCTGAGCTGGCTCTGGTAGAGATCCAGTAAAGCCAGACC.
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100	TCCATCTGGATTGTTAGAGACGCTCGGTGCGCCGGGTTTTATTGAGAGATCCAGCTTACGGCTGGCGAGATTTCAGCTGCTCAGTGACTCTTAC.T.C.G.T.C.A.G.
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200	AAATGGGAGAAAATCAGGATAATACACCGTTGATATCCCAAGGCTCGAAAGAACATTGAGGCAATTCAAGCTGCTCAGTGACTCTTAT.G.A.G.G.A.TAT.
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300	TAACAGACGCTTCAAGCTGGATAATACGGCTTTAAAGACCCTAAAGAAAATAGACACAGTTTACGGCTTATTCACATTCTGGCCGCTGA..AGA.
pQE30 with PFOMT (M. PFOMT 3 fw PFOMT_5 fw	1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400	ATGATGCTCATCCGAAATTGTATGGCAAGAAAGACGGTACGCTGGGATAGGGATAGTGTCACCCCTGTTACACCGTTTCATGAGCAACTG



3 Some multimers
in Sequenz

2 Spurfehler b
PCR obstrue

→ PFOMT Klon
1&4 geprägt

→ 56
4 | 72,3

→ verhältnis zum
sequenziellem
(pQE-fw)

4&2

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

Mutagenene PFOMTAnsatz ②:

Ph buffer (+MgSO₄) 2 µl
 dNTPs 0,4 µl
 PFOMT 107 - Enz 1 µl 0,6 µl
 PQE30 pfOMT 2 µl
 Pn Ultra 0,5 µl
 ad to 20 µl H₂O

Programm ②

95°C	30s
95°C	30s
62°C / 65°C	20s
68°C	6 min
68°C	10 min
4°C	∞

20x

Ansatz ③ (mit Formamid)Programm

Annealing bei 60°C!

③ wie oben, nur mit 5% Formamid - result

④ Pointed out that there is no Formamid

→ 10 µl and gel

→ viele unspezifische Bande; buffer bei Pn mit Formamid (Reaction slower!)

~~Ansatz~~ ④ Shaban Pn L

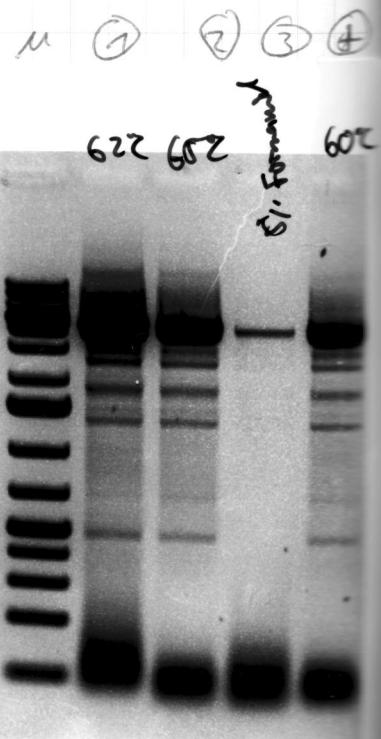
8 µl PCR-Rn ③
 1 µl FQ-buffer
 1 µl Pn L FQ

→ 5 min @ 37°C

→ 5 min @ 80°C

→ 1 µl is DNA transformed

→ aber nicht gewachsen!



13.08.2012 17:13:02

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

Sequenzierung von Klon 184:

Punktmuster

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
.....
pQE30 with PFOMT (M.)	CTCGGAAATCATAAAAAATTATTGCTTGAGCGATAACATTAAATAGATTCAATGTAGGGGATAACATTACACGAATTCATTAAG								
PFOMT_1_fw	A...CCCTCC.G.CT.....								
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
.....
pQE30 with PFOMT (M.)	AGGGAAAATTAACATGNGAGATCGCATCACCACATACGGATCAGGATTTGCCTGAGTAAAGTCAGGGAGCAGTCAGGATGCTACAGAG								
PFOMT_1_fw	M R G S H H H H H G S M D F A V M K Q V K N T G L L Q S								
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
.....
pQE30 with PFOMT (M.)	TGAGGAGTTAGCGAGTATCTCGAACACTAGTGCTATCCGGAGAGGTTCCCTAGGGAGCTACAGGAGCTAGGGAGCCATGAAGTACCCAGACTT								
PFOMT_1_fw	E E L C Q Y I L R T S V Y P R E A G F L K E L R E A N E S H P D S								
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
.....
pQE30 with PFOMT (M.)	TATAATGCACTTACCACTTGCTGACAAATTGAGTCATTGCTTAATTAGTGAATGCAAGAGAGCTATTGAGCTGGAGCTTACAGGATAT								
PFOMT_1_fw	Y M S T S P L A G Q L M S F V L K L V N A K K T I E V G V F T G Y								
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
.....
pQE30 with PFOMT (M.)	CCCTCTTACTCTGCTTTCAATTCTGATGAGTGAAGAGTTACGGCAATTGATTGACAGAGAGGATAGGATGGCTGGCAATTATCGAAA								
PFOMT_1_fw	S L L T A L S I P P D D G K I T A I D F D R E A Y E I G L P F I R K								
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
.....
pQE30 with PFOMT (M.)	AGCTGGTGGMGACAAATCAATTCTGATGAGTGAAGAGTTACGGCAATTGATTGACAGCTCTGCAAGGAAAGAGAGCAGGGGAGTTAGCAGCTT								
PFOMT_1_fw	A G V E H K I N F I E S D A M L A L D N L L Q G Q E S E G S Y D F								
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
.....
pQE30 with PFOMT (M.)	GGCTTGTGATGGGGACACCTTACTACATCAACGATGGAGGTGATGAACACTAGTCAGGTGGGGCCATAGTCGCTTAGACACACATTAT								
PFOMT_1_fw	G F V D A D K P N Y I K Y H E R L M K L V K V G G I V A Y D N T L								
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
.....
pQE30 with PFOMT (M.)	GGGGGGAAACTGTGACGCCACCGCGAATCCGAAGTACCGAGATTTCATGAAGGAAACAGAGAGCTTATTGAACTCACAGTCAGTCGCTGCTGAGTC								
PFOMT_1_fw	W G G T V A Q P E S E V P D F M K E N R E A V I E L N K L L A A D P								
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
.....
pQE30 with PFOMT (M.)	TGCTATCGAGATGATGACATCTCCCTTGGGTGATGAGTACACTTCAGGGCTCTTATTGACACAGCTAA TTAGCTGAGCTGGACTCTGGCTG								
PFOMT_1_fw	R I E I V H L P L G D G I T F C R R L Y * H K L N L A E L G L L L								

- Klon 1 ist positiv → sogar stinkt
- trägt Punktmuster (und hier zusätzliche Prime)
- jetzt kann neu klonen werden ...

hier wird
der Chromo-
somen-
struktur

schlecht.

Note: schwach
stelle aus-
genutzt

LuxS - Klonung:

- Sequenz LuxS 18' 10' ~ beide Sequenzen tragen T7-Est
- mit im Vorkommen
- aber: ATA Insert an der NodS-Schmelzstelle ??!

~~ATA~~

- warum?

→ aber sollte nicht so sein

?

Expression kann losgehen

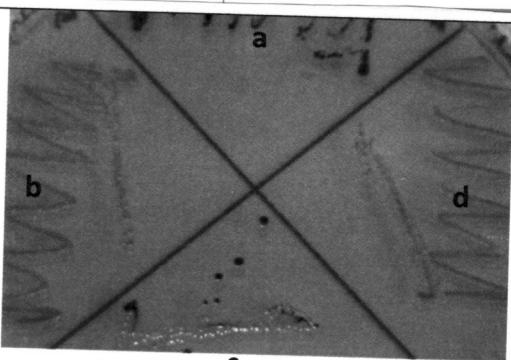
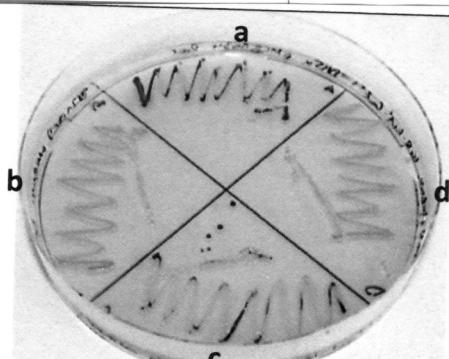
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
pet28a_LuxS	AGCGGATACAACTCCCTCTAGAATAATTGTTCACCTTGAAGAGGATATACCATGGCAGCACATCACATCACAGCAGGGCCT								
LUXS_10_T7	.C.G...C...C.T.....	M	G	S	H	H	H	H	S
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
pet28a_LuxS	TGCCGTTGTTAGATAGCTTACAGTCGATCATACCGGATGGAGGGCCGAGTGGGTGCAGCAAGAACATGAAC								
LUXS_10_T7	V P R G S H M P L L D S F T V D H T R M E A P A V R V A K T M N								
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
pet28a_LuxS	ACCCCGCAGGGCAGCGCATCACCGGTTTCGACCTGGCTCCGCGACAAAGAAGCTGGCATACCCCTGGAGCACCCTG								
LUXS_10_T7	T P H G D A I T V F D L R F C V P N K E V M P E R G I H T L E H L								
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
pet28a_LuxS	TTCGCTTTTATCGTAAACATCTAACGGTAATGGTGAAGATAATTATCGATATCTCCGCAATGGCTCCGCAACGGTTTTATAGAGCTGATGG								
LUXS_10_T7	F A G E M R N H L N G N G V E I I D I S P M G C R T G F Y M S L I G								
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
pet28a_LuxS	TAGCCAGATGAGCAGCCTTGCTGAGCGGAACTTGAGCATCGAGGATATTGGCTGAGATCGAGATCGAGATCGAGACTGAGCTAC								
LUXS_10_T7	T F D E Q R V A D A W K A A M E D V L K V Q D Q N Q I P E L N V Y								
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
pet28a_LuxS	CAGGGGGCACTACAGAGACTCGTCAAGGAGCCTGGAGACCTGGAGATTCGCGCTAGCATCTGGAAAGCTGAGCTACGCCATCACAGCAGACTGG								
LUXS_10_T7	Q C G T T Q M H S L Q C E A Q D I A R S I L E R D V R I N S N E E L								
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
pet28a_LuxS	CAC TG CG CA AA GG AG GA AC TG CG AA CT TG CA C AC TG CT TG CG AT CG CG CC AC TG CG AG C AC C ACC C ACC ACT CG AG A								
LUXS_10_T7	A L P K E K L Q E L H I * N S S S V D K L A A A L E H H H H H * D								
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
pet28a_LuxS	TCCGGCTGTACACGACCGGAGGAGCTGGCTCTGGCCACCGCTGAGCAATAGCATACCCCTGGGCCCTTAAGGGCTCTAAAGGGCTCTGGAG								
LUXS_10_T7	P A A N K A R K E A E L A A T A E Q * L A * P L G A S K R V L R								
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
pet28a_LuxS	GGTTTTTGCTGAAGGAGGAACATACCGAT								
LUXS_10_T7	G F L L K G T I S G L A N G T R E V A A H * A R R V W W L R A A								
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
pet28a_LuxS	TGGCGAATGGAGGACGCCCTGTAGGGCCGATTAAGCGCCGGGGTGCTGGCTACGGCGCTTCCCCGTCACTAACCGG								
LUXS_10_T7	* P L H L P A P * R F L L S L S S L P F S P R S F A P F V S S K S G								
1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
pet28a_LuxS	GGCTCCCTTAGGTTCCGATAGTAGCTACGGACTGACCCAAAATCTGATAGTAGGTGATGGTCACTGATGGCCATCGCTGATAGACGATTTC								
LUXS_10_T7	A P F R V P I S A Y G T R P K N L I R * W F T Y G P S P D R R F F								
1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170			
pet28a_LuxS	GCCCTGGACGAGTCACGCTTACTGACTCTGGCTGACTGACACACTCACGCCATCTCGGATCG								
LUXS_10_T7	A L G R E V T S L L T L G R L N T L K P I F G S								

Durchgeführt von/
Performed by

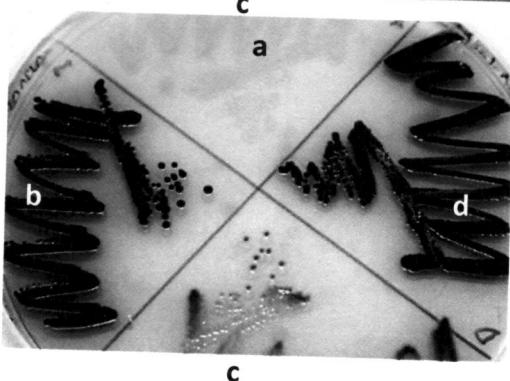
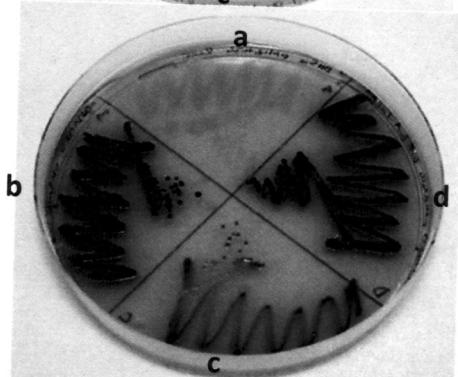
Abrial

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

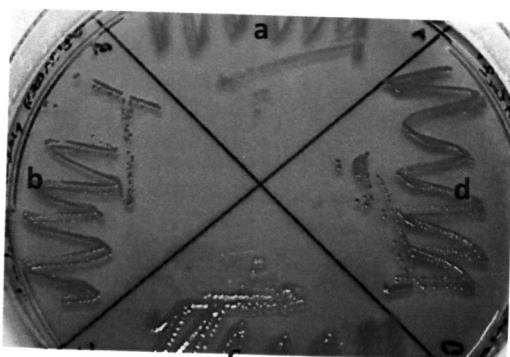
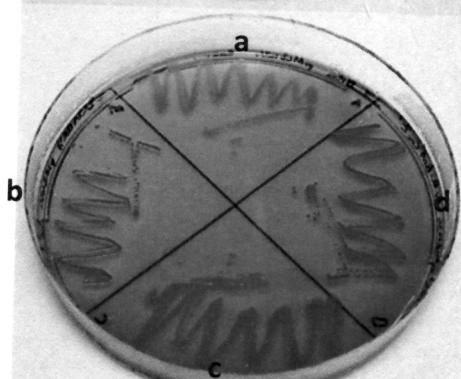
1)



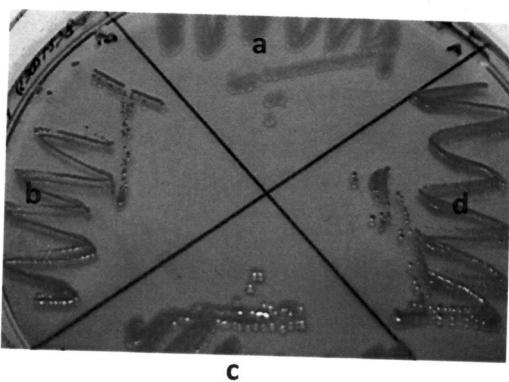
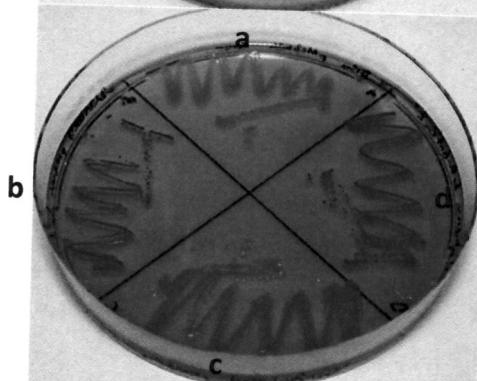
2)



3)



4)



After 24 hours at 37°C. **a** - *E. coli* DH5 α with pMLB1034 vector. **b** - *E. coli* BL21(DE3) with pMLB1034 *lslR*-*LacZ* $^+$ transcriptional fusion. **c** - *E. coli* TOP10 with pMLB1034 *lslR*-*lslA'*-*LacZ* $^+$ transcriptional fusion. **d** - *E. coli* BL21(DE3) with pMLB1034 *lslR*-*lslA'*-*LacZ* $^+$ transcriptional fusion. **24h @ 37°C inkubiert, danach 30 min @ 4°C → dann foto**

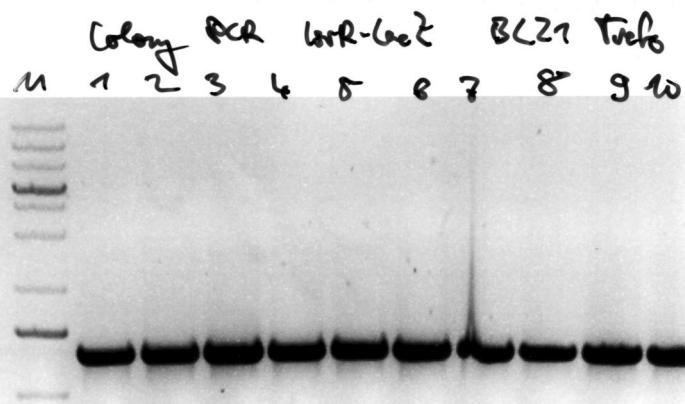
1) Lactose-TCC-Agar (Difco AB Medium #2). **2)** S-Gal-Agar. **3)** MacConkey-Agar. **4)** wie 3) stand aber zusätzlich 6h @ RT

Trefo lsr -lspA-LacZ in BL21(DE3)

→ kolonie - PCR mit
~~lspR~~-~~lspZ~~ & p-lsr-MW
 pUCB1034-fv

→ erwachsene Größe ~1300bp

→



14.08.2012 14:54:50

Enhancement: 178

Exposure Time: 162

Brightness: 50

Contrast: 50

Gamma: 25

LuxS Expression

WEB.124

- ① 1ml ZYP-0.8g (Siehe S. 87) → aufgetaut (es war noch
 ↳ obwohl schon mit 100 µl/ml kann direkt was bei -20°C
 nochmal 50 µl/ml kann zugegeben (→ Anthonomathia
 ~ 150 µg/ml)
- ZYP-0.8g mit Einzellösung 5221(OE3) pET2h (+) E luxS
 angemischt (von normaler Platte LB)
- 6 h @ 31°C und 250 rpm inkubiert
- + 0.2x Trace metals
- ② 500ml ZYP-5052 (zurückgeworfenes Medium) mit (Zhu et al.
 2003)
 100 µl/ml Kanamycin und 50 µM CoCl_2
 versetzt
 ↳ zu erhöhte Stabilität
 → mit 1:1666 (300 µl) der Doppelkultur (1) angemischt
 → über Nacht (16L) bei 37°C 1250 rpm inkubiert

Zellentele: - 1ml Probe genommen.- 20 min @ 10 000 × g zentrifugiert
 (Beckman, JA-10)

- ~ 3g Zellmassengewicht

- hyp: Pellet in Lyophilisator pH 7.4
 (50 ml Tris-HCl, 0.5 M NaCl)

10% glycerol, 10 mM Tris-HCl, 1% Tween 10) aufgenommen

→ Lyophilisat (~1g) zugegeben und 1h @ 4°C inkubiert (Schwenkbad)

→ Ze 3x mit 70% Am 15/15 sondert

- DNaseI zugegeben (100 µl) und 10 min @ 4°C inkubiert

Krept: (ZYP-5052)

- 464 ml ZY-Medium
45 ml 1M K_2SO_4
10 ml 50x 5052
25 ml 70x TES
1000 µl 50 µg/ml Kan
25 µl CoCl_2 (0.1 M)
100 µl 1000x Trace Metals

- 1h @ 4°C / 10000xg im fräne (Bowl) centrifugiert
- überstand durch 0,45 µm Filter filtriert und auf AKTA gebracht

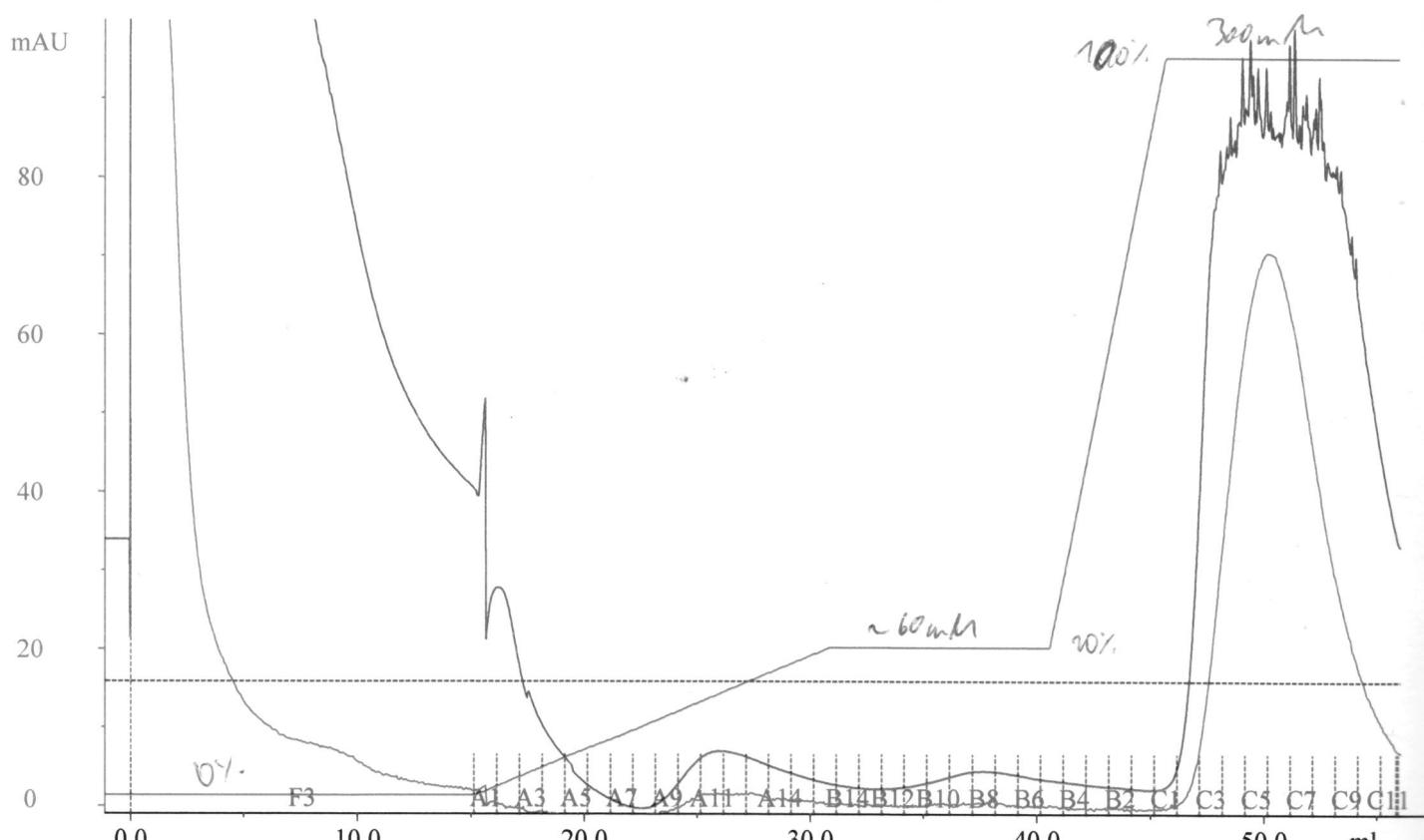
AKTA

Sample: HiPrep 1MLC FF (Co²⁺), 5ml

Bindepuffer: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol,
10% glycerol pH 7.4

Elutionspuffer: ~~50 mM Imidazol~~ aber 300 mM Imidazol

LuxS 120824 001:10 UV1 280nm LuxS 120824 001:10 UV3 530nm LuxS 120824 001:10 Inject
LuxS 120824 001:10 Conc LuxS 120824 001:10 Fractions LuxS 120824 001:10 Logbook LuxS 120824 001:10 P960 Flow



Pool Table for System: System 1 Sample:

No	Pool	Volume	Area	pI	MW	Ext Coeff	Conc
1	C3-C11	8.7177 ml	335.7553	0.0000	0.0000	0.0095	8.1082
No	Amount	Text		Target conc	Target vol		
1	70.6853	mg		0.0000	0.0000		mg/ml

Durchgeführt von/
Performed by

Datum/
Date

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

LuxS: Hexahistidin tagged (*N*-formally)

pI: 5,92 Mw: 21579 Da

$\text{Abs}^{280} = 0,462 \Rightarrow \text{lg/dl}$ (Lys reduced)

$\epsilon^{280} = 9970 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

$\rightarrow \epsilon^{520} \approx 195 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Zhu et al (2003); Biochemistry (42), 471)

$$\epsilon^{530} = 195 \frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{21579 \text{ g}}$$

$$\epsilon^{530} \approx 0,09 \frac{\text{l}}{\text{g cm}^{-1}} \Rightarrow \text{E-1 entspricht}$$

E=0,09 entspricht 1/2 Cys

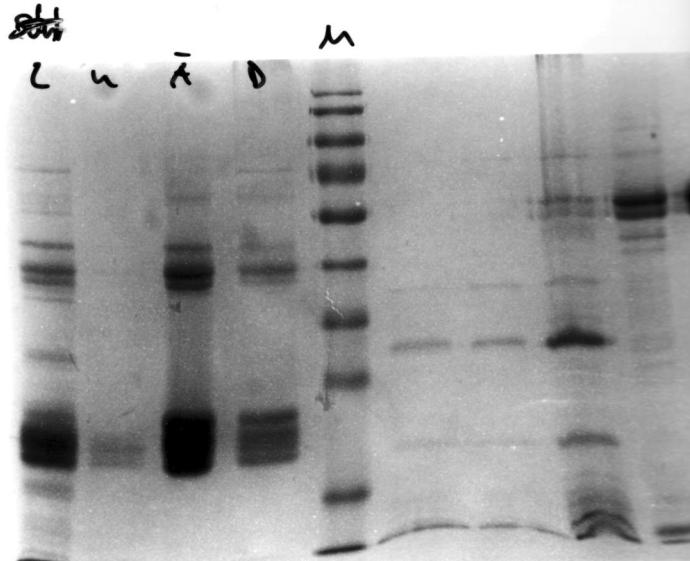
\rightarrow Fraktionen C3-C11 gezeigt (AKTA) $\hat{=} \sim 70 \mu\text{g}$ Eiweiß

\hookrightarrow pinker Lösung (rechts abweichend)

LuxS Expression

- L- lösliche Fraktion
- u- unlösliche Fraktion
- A- nach AKTA (IMAC)
- D- entbecktes Protein

\rightarrow verlust von 30% des Proteins bei Entbecken oder Eiweiß



28.08.2012 16:29:15

PFOMT Umbenennung

PCR → siehe S. 129 (Pfu)

5 µl Pfu Buffer (+MgSO₄)
 1 µl dNTPs
 1 µl PFOMT-Pw & rev
 5 µg template (PFOMT-M07 1)
 1 µl Pfu Polymerase
 → add 50 µl H₂O

Programm

95°C	3 min
95°C	30 s
60°C	30 s
72°C	2 min
72°C	5 min
6°C	∞

28x

→ PCR cleanup mit QIAquick Kit
 - in 30 µl H₂O elutet → c = 35,4 ng/µl

Verdau

- mit NdeI & EcoRI verdaut (S. 128)

740 µl Fragment (35,4 ng/µl)

1 µl Buffer 0
 1 µl NdeI & EcoRI

→ 2 h @ 37°C

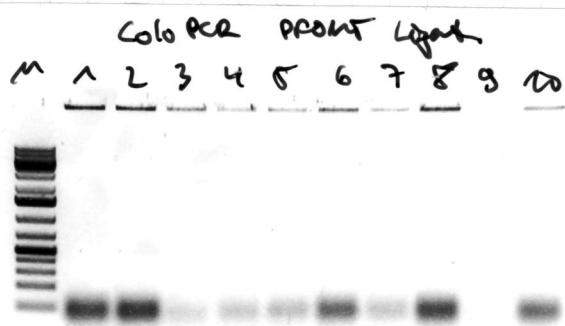
→ PCR cleanup → c = 7,8 µg/µl

Kopplung

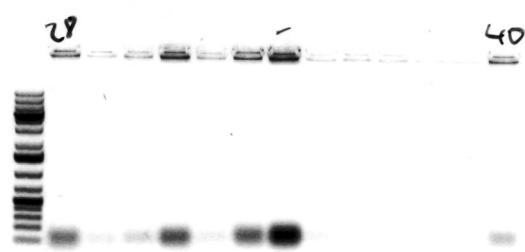
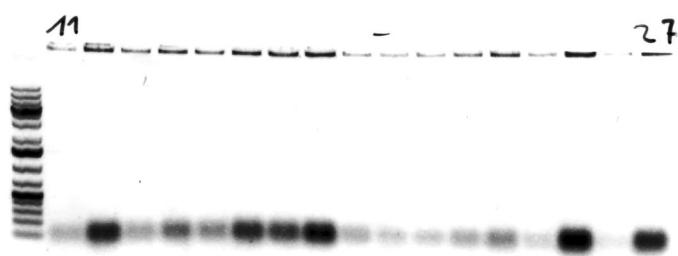
25 µg Vector
 100 µg Inset

1 µl	0,45 µg/µl) pET28a (+) NdeI & EcoRI
2 µl	7,8 µg/µl Inset
1 µl	T4 Ligase Buffer
0,5 µl	T4 Ligase
5,5 µl	H ₂ O

→ ~~Incubate~~ 2 h @ 22°C → ~~Incubate~~ until ~ DNA
 → in N. @ 37°C → ~~Incubate~~ >30 colonies
 → Colony PCR
 - mit T7 prime & PFM1T-rev Primer

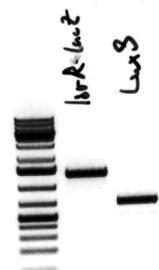


→ alle Kolonien negativ
auf Inset



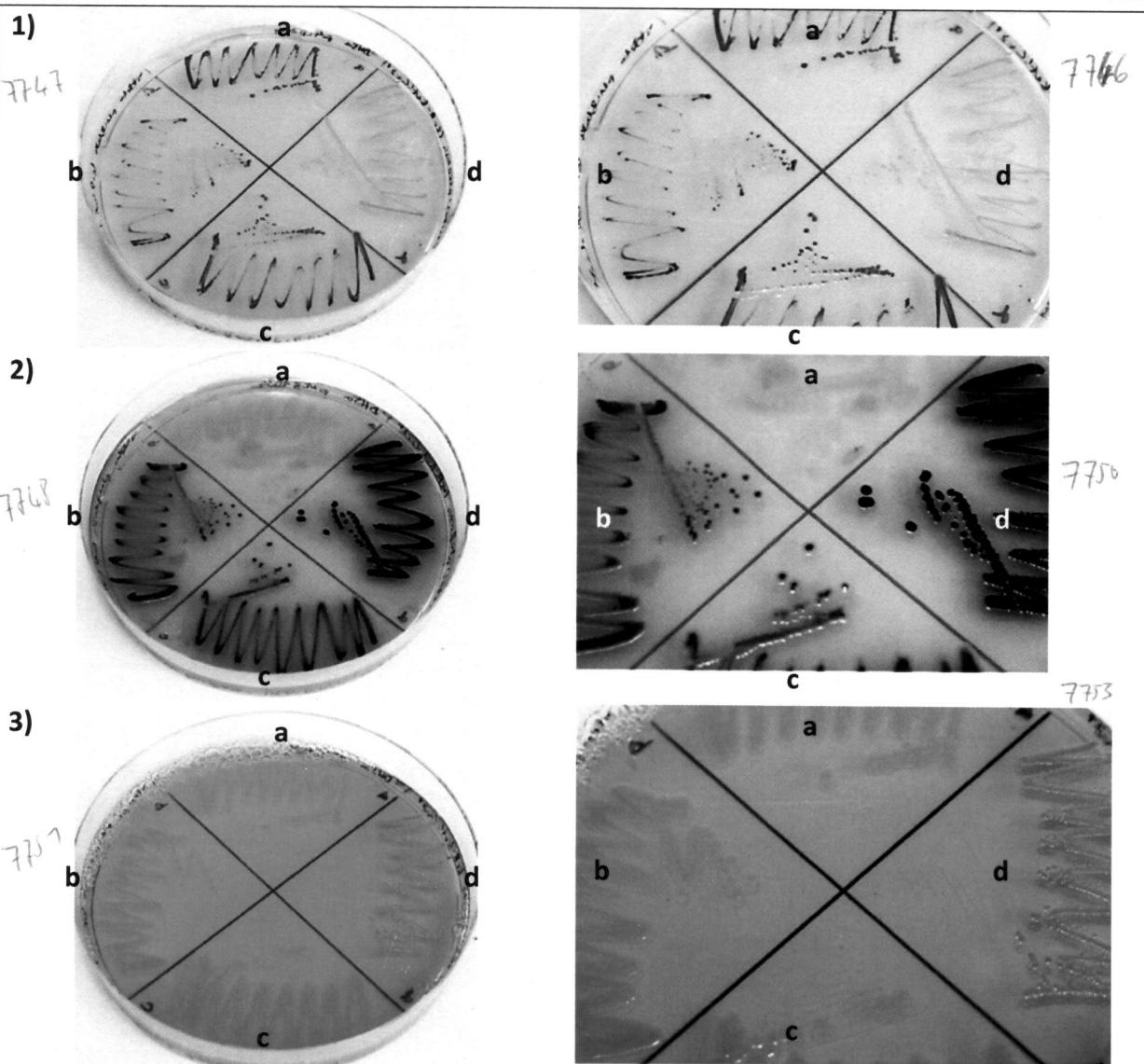
27.08.2012 15:27:02

Colony PCR
 LuxR(B21) Δ
 luxR-lacZ (B21)
 (nach Trafo)



23.08.2012 13:48:49

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



After 24 hours at 37°C. **a** - *E. coli* DH5 α with pMLB1034 vector. **b** - *E. coli* TOP10 with pMLB1034 *lsrR-lsrA'-LacZ⁺* transcriptional fusion. **c** - *E. coli* DH5 α with pMLB1034 *lsrR-lsrA'-LacZ⁺* transcriptional fusion. **d** - *E. coli* BL21(DE3) with pMLB1034 *lsrR-lsrA'-LacZ⁺* transcriptional fusion.

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

PFOMT

- PFOMT 1107 Agaroseansatz vom 26.08.11 nochmal transformiert (Sph) in E.coli DH5 α
- über Nacht @ 37°C → >50 Kolonie → Colony-PCR mit T7 & PFOMT-rev Primern
- Klon 2 & 11 ab Tage
gabe beide mit der
korrekten Größe (~900bp)
- Miniprep & Sequenzreihe

C = (2)

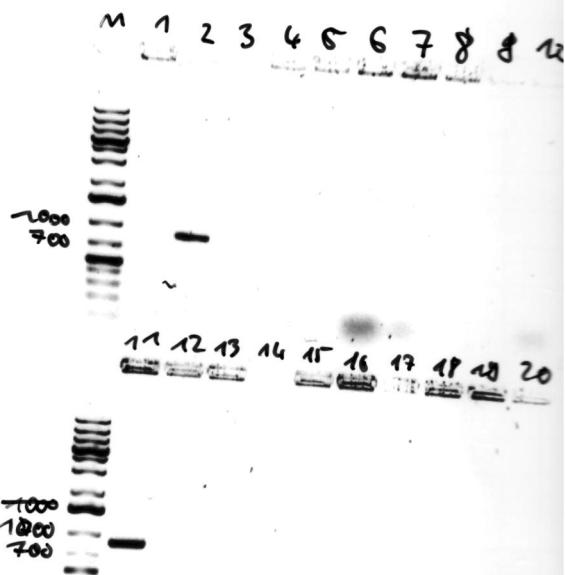
C = (11)

→ Sequencing mit (10.09.11)

T7 promoter primer

→ beide Klone positiv

→ röhre 7 mit etk &



07.09.2012 16:14:13

PFOMT pET28 colony

Durchgeführt von/
Performed by

07.09.11

Datum/
DateBestätigt durch/
Approved byDatum/
DateFortsatz auf Seite Nr./
Continued on page number

WEB 125

160

Colony formation PFOMT & pMB1034

(+PFOMT)

→ je 50 ng pET28a(+) PFOMT & pMB1034 (srR-IsrA'-LacZ⁺) bzw. pET28a(+) & - λ (-PFOMT)

in DNA (colonies formed)

→ i.N. @ 37°C → 200 kolonie auf Platte

→ Colony PCR

→ je 10 Klonen gepickt

3 µl Tris-HCl Buffer

0,4 µl dNTPs

je 0,4 µl p-lsr-rev; pMB1034-Rw & T7; 70 nm
(4 Prime pro Reaktion)

0,1 µl Taq

auf 20 µl mit H₂O→ Polyacrylamide

- 1 - pET28a(+) PFOMT (+PFOMT)
- 2 - pMB1034 IsrR-IsrA'-LacZ⁺ (srR-IsrA'-LacZ⁺)

+PFOMT

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

+ +



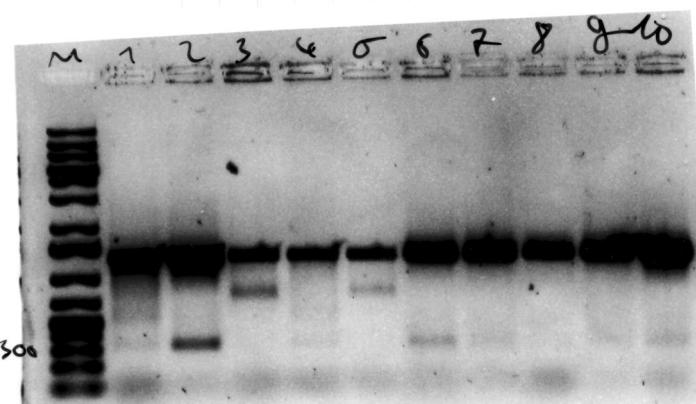
- PFOMT

pET28a(+); pMB1034 R-A'-LacZ⁺

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



11.09.2012 18:17:23

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

10.09.12

~~WB 126~~

13.09.11

Test Hcts - Kompetente Zelle

PUC19 30s @ 42°C

Kolone

$$\begin{aligned}1. Q &\rightarrow 224 \times 4 \rightarrow 896 \\2. Q &\rightarrow \sim 100 \\3. Q &\rightarrow \sim 100 \\4. Q &\rightarrow > 200\end{aligned}$$

42s @ 42°C

$$\begin{aligned}161 &\rightarrow 644 \\&\sim 100 \\&\vdots \\&\vdots\end{aligned}$$

Frobo:

- Zelle auf Eis aufgefroren
- 1μl ~~10^{pg}~~ ^{pg}/μl pUC18 dann → Wm auf Eis
- 30/42s @ 42°C → auf G
- +200μl SOC → 1h @ 37°C 1250rpm
- 100μl auf 18-Amp platziert

$$\frac{10\text{ pg}}{20\text{ μl}} \times 100\text{ μl} = 4\text{ pg} = 4 \cdot 10^{-6} \text{ g}$$

$$\frac{896 \text{ cftu}}{4 \cdot 10^{-6} \text{ g}} = \underline{\underline{2,24 \cdot 10^8 \text{ cftu/g}}}$$

$$\frac{644 \text{ cftu}}{4 \cdot 10^{-6} \text{ g}} = \underline{\underline{1.6 \cdot 10^9 \text{ cftu/g}}}$$

Protocol: Sambrook et al. → Lab Handbook of Molecular Cloning (Inoue)

WE8127

PVER 1- MCS Sequence base:

2 MCS_pVER1 gaattcTAGACCATGGGCTA 13.0 372 25,1 - 251 > 75 14794 60,4 % 0.01 µmol HPLC 015043818

3 MCS_pVER1_rev GGATCCGTGACAAGCT 10.8 314 21,3 - 213 > 75 14745 60,4 % 0.01 µmol HPLC 015043819

gaattcTAGACCATGGGCTAGCgCGGCCGcAAGCTTGTGACGGATCC
EcoRI-XbaI-NcoI-NheI-NotI(EagI)-HindIII-SalI-BamHI

in vector:

NcoI	0	5'... CCATGG ... 3' 3'... GGTACC ... 5'
NdeI	2	5'... GCGGCCGC ... 3' 3'... CGCCGGCG ... 5'
NotI	0	5'... AAGCTT ... 3' 3'... TTCAAA ... 5'
HindIII	0	5'... GTCGAC ... 3' 3'... CAGCTG ... 5'
SacI	1 (4810)	5'... GCTAGC ... 3' 3'... CGATCG ... 5'
SalI	0	5'... CGGGCG ... 3' 3'... GCCGGC ... 5'
NheI	0	5'... TCTAGA ... 3' 3'... AGATCT ... 5'
EagI	0	5'... CCCGGG ... 3' 3'... GGGCCC ... 5'
XbaI	0	
XmaI	1	

→ mittels EcoRI &
BamHI in MCS
von pVER1
abgeschnitten

2 MCS erweitert
→ vektorname: pVER1

• MCS-pVER1 in 502 µl & MCS-pVER1_rev in 421 µl
ddH₂O gibt \equiv 50 pmol/µl

• 10 µl MCS-pVER1 (dsDNA) und 10 µl MCS-pVER1_rev (dsDNA)
Zusammengebracht \rightarrow ergibt 10 µl
 \equiv 50 pmol/µl pVER1_MCS (dsDNA) \equiv 1,46 µg
mW = 29301 g/mol

Vorlau pVER1-mcs

1µl pVER1-mcs (= 1,46 µg)
 4µl Tays Buffer
 1µl EcoR I
 2µl Bam HI

→ add to 20µl H₂O
 → 7h @ 37°C in labelf → 0,8µl 0,5M EDTA run Stoppe

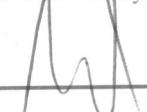
→ Runing the fragments over "GeneJET PCR clean-up"

PURIFICATION PROTOCOL

Note

- Read IMPORTANT NOTES on p. 3 before starting.
- All purification steps should be carried out at **room temperature**.
- All centrifugations should be carried out in a table-top microcentrifuge at >12000 x g (10 000-14 000 rpm, depending on the rotor type).

Step	Procedure
1	Add a 1:1 volume of Binding Buffer to completed PCR mixture (e.g. for every 100 µl of reaction mixture, add 100 µl of Binding Buffer). Mix thoroughly. Check the color of the solution. A yellow color indicates an optimal pH for DNA binding. If the color of the solution is orange or violet, add 10 µl of 3 M sodium acetate, pH 5.2 solution and mix. The color of the mix will become yellow.
2 for DNA ≤500 bp	Optional: if the DNA fragment is ≤500 bp, add a 1:2 volume of 100% isopropanol (e.g., 100 µl of isopropanol should be added to 100 µl of PCR mixture combined with 100 µl of Binding Buffer). Mix thoroughly. Note. If PCR mixture contains primer-dimers, purification without isopropanol is recommended. However, the yield of the target DNA fragment will be lower.
3	Transfer up to 800 µl of the solution from step 1 (or optional step 2) to the GeneJET purification column. Centrifuge for 30-60 s. Discard the flow-through. Note. If the total volume exceeds 800 µl, the solution can be added to the column in stages. After the addition of 800 µl of solution, centrifuge the column for 30-60 s and discard flow-through. Repeat until the entire solution has been added to the column membrane.
4	Add 700 µl of Wash Buffer (diluted with the ethanol as described on p. 3) to the GeneJET purification column. Centrifuge for 30-60 s. Discard the flow-through and place the purification column back into the collection tube.
5	Centrifuge the empty GeneJET purification column for an additional 1 min to completely remove any residual wash buffer. Note. This step is essential as the presence of residual ethanol in the DNA sample may inhibit subsequent reactions.
6	Transfer the GeneJET purification column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not included). Add 50 µl of Elution Buffer to the center of the GeneJET purification column membrane and centrifuge for 1 min. Note <ul style="list-style-type: none"> • For low DNA amounts the elution volumes can be reduced to increase DNA concentration. An elution volume between 20-50 µl does not significantly reduce the DNA yield. However, elution volumes less than 10 µl are not recommended. • If DNA fragment is >10 kb, prewarm Elution Buffer to 65°C before applying to column. • If the elution volume is 10 µl and DNA amount is ≥5 µg, incubate column for 1 min at room temperature before centrifugation.
7	Discard the GeneJET purification column and store the purified DNA at -20°C.



→ mit 30 µl ddH₂O eluiert → c = 32,4 µg/µl
 MW = 25635 g/mol \hookrightarrow 1,26 µM

→ 1:210 ND \Rightarrow 155 pg/µl mes

~~25 µg phIB1034~~

25 µg phIB1034 (BamHI & EcoRI cut) = $6 \cdot 10^{-3}$ pmol

$$6 \cdot 10^{-3} \text{ pmol} \times 25635 \text{ pg/pmol} = \underline{155 \text{ pg}}$$

Ligation:

1 µl phIB1034 (24,5 µg/ml)

1 µl MCS (155 pg/µl)

1 µl T4 Buffer

0,5 µl T4 Ligase

6,5 µl H₂O

→ 1h @ 22°C → über Woche oder @ 4°C transformiert

→ 5 µl in DH5α transformiert \sim 1 h. @ 37°C

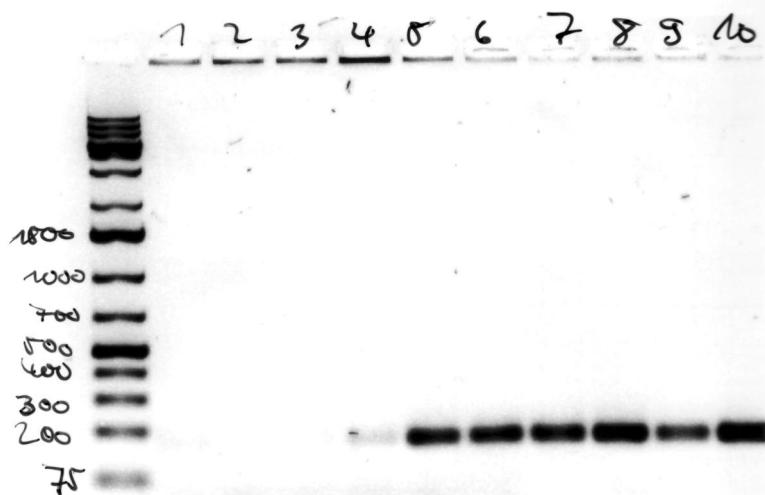
→ \sim 20 Klone \sim Colony PCR mit phIB1034_Fw & phIB1034_rev als Primer

→ 10 Klone gescreent

→ erwartete Größe: 2817 - 2978 = 161 bp

→ Bande entsprechen in
etwa erwarteter Größe
(~200 bp)

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\120911_colopcr
_cotransform.TIF



11.09.2012 18:22:11

→ Miniprep von 3ml LB + Amp Kultur von
Klon 5+6

$\text{C}(\mu\text{g}/\text{ml})$	5	6
	105,9	145,8

✓ Zum Sequenzieren (11.09.12)
mit pVER1034 - fw

punktmarkante Wiederholung der 5'-Sequenz

10 20 30 40 MCS 50 60 70 80 90 100
pVER1, 6189 bp CACGAGGCCCTTCGCTCAAGAATTCTAGACCATGGCTACCGCCCGCACACTTGCGAACGGATCCGGTGTCTTACACGTCGTGACTGGAAAA
pVER1_5 .C.CA.GT.....
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
pVER1, 6189 bp CCCGGCTAACCAACTTAATCGCTTCAGCACATCCCCCTTCCGAGCTGGCTAAATGGAGAGGCCACCGATCGCCCTTCCCACAGTTG
pVER1_5
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
pVER1, 6189 bp CGCAGCTGAATGGCAATGGCGTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAAGAGCGTGCAGAGCTGGATCTTCCTAGGGCGATACTGTCG
pVER1_5
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
pVER1, 6189 bp TCGTCCCCTCAAACTTGCAGATGGCAAGCTTACAGTGGCCATCTACACCAAGTGACTTATCCATTAGGTCAATCCGCGTTTGTCCACGGAAA
pVER1_5
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
pVER1, 6189 bp TCGCACGGTTGTTACTCGTCACATTAAAGTTGAGGAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGCAGTAATTGATGGCTTAACTCGGGTTTCAAT
pVER1_5
Chromatogramm wird selbst

10 20 30 40 MCS 50 60 70 80 90 100
pVER1, 6189 bp TCACGAGGCCCTTCGCTCAAGAATTCTAGACCATGGCTACCGCCCGCACACTTGCGAACGGATCCGGTGTCTTACACGTCGTGACTGGAAA
pVER1_6 A.G.A...A.T.....
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
pVER1, 6189 bp AACCCGGTACCCAACTTAATCGCTTCAGCACATCCCCCTTGGCGAGCTGGCTAAATGGAGAGGCCACCGATCGCCCTTCCCACAGT
pVER1_6
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
pVER1, 6189 bp TGCGCACGGCTGAATGGCAATGGCGTTTGCCTGGTTTCCGGCACAGGAGGGTGGCTGGAGTGCAATCTCCGTAGGCCAGATACTGT
pVER1_6
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
pVER1, 6189 bp CGTCGTCCCTCAAACTGGCAAGATGGCGTTACAGGAGCGCCCATCTACACCAAGTGACCTCCGATACGGTCATCCGGTTTGTCCACGGAG
pVER1_6
Chromatogramm wird selbst

Durchgetunnt von
Performed by
[Signature]

Date
410 420 430 440 450 460 470 480 490 400
Approved by

Datum/
Date

Fortssetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

WED 128

- 3ml üN-Kultur LB + Amp + Kan mit DH5 α

① pET28a(+) ; pMB1034 ~~für Isr-Isr'-Lact⁺~~

② pET28a(+) ; pMB1034 PFOM₁, pMB1034 Isr-Isr'-Lact

→ bei 37°C / 2500 rpm

- am morgen: → 5 min @ 5Kg 14°C geföhrt

→ Pellet in 1ml LB aufgenommen
 OD_{600} bestimmt: ① (-PFOM₁) 10,2

② (+PFOM₁) 12,3

→ VD auf OD-3 → ① 1:3,4
 ② 1:4,7

→ 10µl von Zellzüpfung mit OD=3 ausgetragen und

o LB + Amp/Kan (+200 µM Amidoxin G-Carboxylic acid, +750 µM Caffesic acid)

→ 48h @ 37°C wache Zelle

Agar platten garage	Platte	m (g)
	+PFOM ₁ 1	15,26
	+PFOM ₁ 2	11,09
	- PFOM ₁ 1	15,0
	- PFOM ₁ 2	15,6

→ mit EtOAc extrahiert und eingetragen

→ in MeOH aufgenommen

- DC und Chloroform / MeOH / Formic Acid (85:15:1)
- AC-g läuft auf gleicher Höhe wie Kollabsäure
- aber ~~Kin II~~ nicht im UV 254 nm unterscheidbar
- mit FeCl₃ ergebnell (^{Kollabsäure = blau}
^{Bromessäure = braun})
- kein Umwandl von Kollabsäure

Da da: DHM bei 87 System besteht!

DHMKOPF!

- pET21b(+) PFOMS ist S21(DE3) transformiert WEB 129
- Expressionsart: Autoinduktion S. 153

~~ZYP-1052 Schaltung:~~

- 3 ml ZYP-1052 Medium (S.113)
(Kanamycin + 250 µM AC-g, + 750 µM CA)
mit Escherichia coli K21(DE3) pET21
transformiert

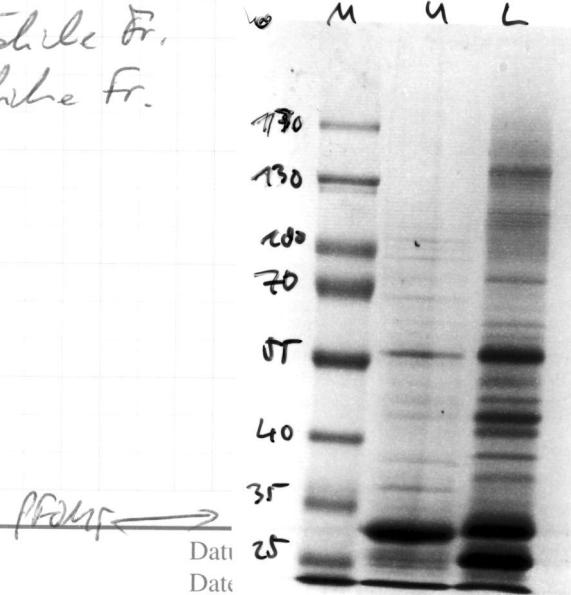
→ über Nacht bei 37 °C / 200 rpm geschüttelt

- 1 ml abgenommen und wie S.89 aufgearbeitet

PFOMS → 26,7 kDa

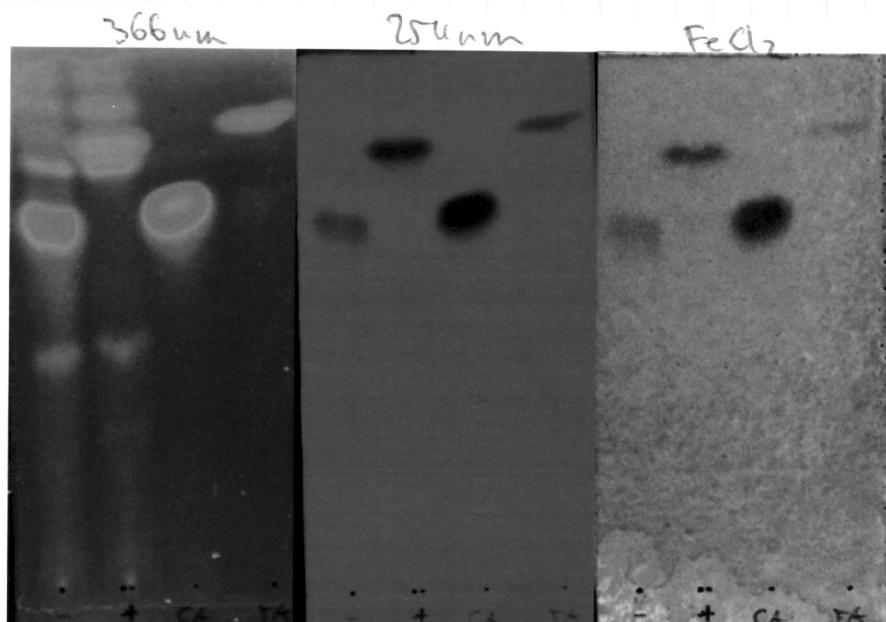
U - unlösliche Fr. M U L
L - lösliche Fr.

→ PFOMS schint löslich
exprimierbar zu sein



- 2 ml des Ansatzes mit 2 x 1 ml ETOAc extrahiert
(30s quirlen)
- 5 min Zentrifugiert zur Phasentrennung
 - organ. Phase abgetrennt und abgedampft
 - Rückstand in 500 µl MeOH aufgenommen und Ogemischt
(Chloroform / MeOH / Form. Ac. 85:15:1)
 - bei + PFOH quantitativ → - PFOH (Negative Kontrolle)
Umsatz Kaffeesäure zu Fumarsäure

~~Midi Prep pAEC Dr pCDF-Duet-1~~



- ⇒ - PFOH (pET28a Lys)
- + ⇒ + PFOH (pET28a PFOH)

CA - Kaffeesäure Std.
FA - Fumarsäure Std.

Toluol / ETO Formic acid

→ Fluorescenz

5/4/11

Midi-Loop pACYC & pCDF-Duet1
 - mit MN Midiloop Kit (Clontech)
 → pACYC-Duet1

$$\underline{C = 127 \text{ ng}/\mu\text{l}}$$

$$260/280 = 1,48$$

$$260/230 = 1,18$$

pCDF-Duet1

$$\underline{C = 533 \text{ ng}/\mu\text{l}}$$

$$260/280 = 1,53$$

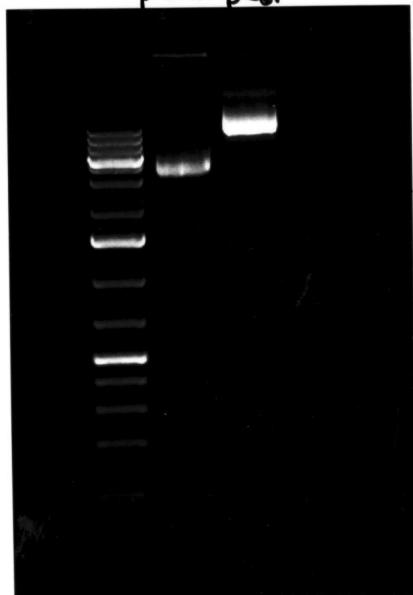
$$260/230 = 1,94$$

1% Agarosegel:

Oberlayer mit XbaI & NotI verdaut:

te und Einstellungen\Institut Pfl
sktop\HLC\120926_pACyC-Duet-1

m 1 2
pACYC pCDF



11:02:44

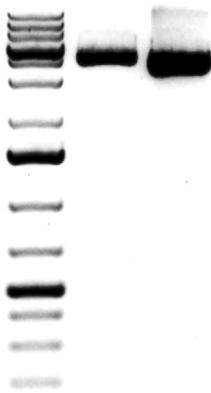
m - Generale
AKB Pls

- 1- pACYC-Duet1
- 2- pCDF-Duet1

→ pACYC
nicht sichtbar?

C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pf
anzenbio\Desktop\HLC20120926_pACyC-
Duet1_Verdau.1.TIF

m 1 2



Durchgeführt von/
Performed by

26.09.11

Datum/
Date

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

midiprep pET28a(+) PFOMT↓ Einstellungen\Institut Pfl
IHLCL20120927_PFOMT_

C =



→ aus BL21(DE3) → DNA-Prep similes - -

→ warum? ? ? nicht DNA

→ Prep verloren → normal mit DNA

21

Vorlagen von pCDF, pACYC & pET28a PFOMT:

- mit NdeI & XbaI

pCDF

Buffer 0 1 µl
NdeI 0,5 µl
XbaI 1 µl
Plasmid 2 µl

add to 10 µl

pACYC

1 µl
0,5 µl
1 µl
8 µl

pET28a

1 µl
0,5 µl
1 µl
8 µl

→ Inkubation: 2h @ 37°C → 20 min @ 80°C

→ pET28a(+) und T7E1. Banden

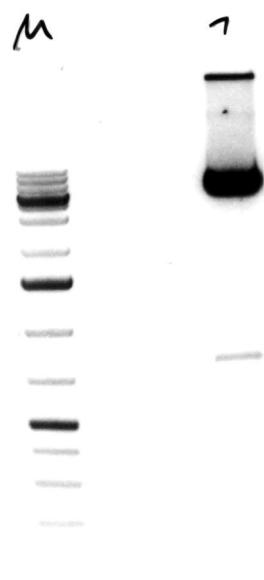
1)-pET28a (L) PFront
verdunnt und Nied/Rhot

→ verdunnt noch zu
nicht vollständig
→ über Nacht verdunnt?

→ es ist wahrcheinlich,
dass pATC/pCDF und
nicht vollständig verdunnt
sind → erweiter? → nochmal verdunnen?

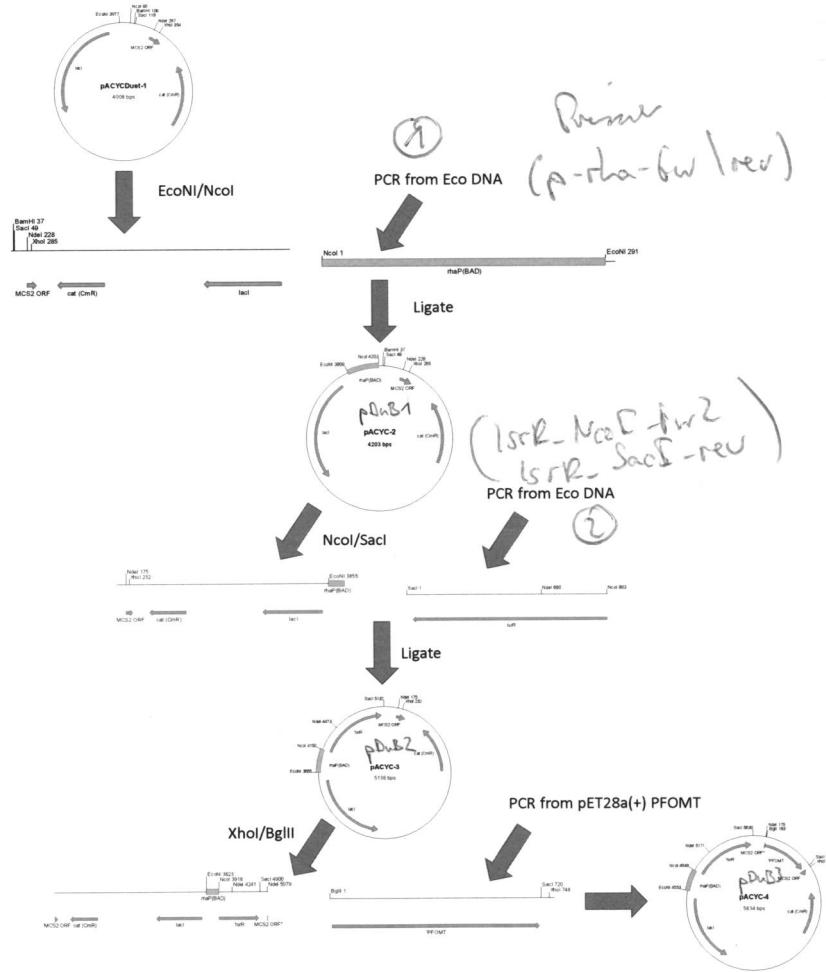
28.09.2012 15:08:57

pET28a (L) PFront
2h@37°C Nied/Rhot



Amplifikation von rhaP_{BAD} , bsrL für pACYC-Duet 1

Klonierumgebung:



Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	1.10.16			

PCR - Ansatz:

(WED 130)

① rhaP_{BAD} (300 bp)

5 µl 10x Phn + MgSO₄
 1 µl 10mM dNTPs
 1 µl p-rha-fw
 1 µl p-rha-rev
 50 µg E. coli DNA (29.05.)
 0,5 µl Phn He.
 ad to 50 µl H₂O

③ rhaSR P_{BAD} (2100 bp)

} → u
 → u
 } → u
 } → u

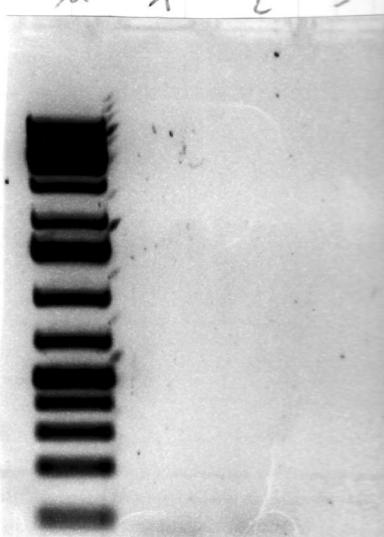
② brr

5 µl 10x Phn + MgSO₄
 1 µl dNTPs
 1 µl brr_NeoT_fw2
 1 µl brr_SacI_rev
 50 µg E. coli DNA
 0,5 µl Phn
 ad to 50 µl

PCR-Programm

Denat	95°C	3 min
u	u	30 s
Anneal	60°C / 55°C	45 s / 1:30 / 1:30
Ext.	72°C	① ②
u	72°C	30 s
Pause	4°C	15 min
		∞
	m n 1 2 3	

- kein Amplifikat nach PCR
 auf Agarosegel

Durchgeführt von/
Performed byDatum/
DateBestätigt durch/
Approved byDa
Da

1.10.12

Nachmal PCR mit Probenliste der ersten Reaktion
→ keine Bands

KOD Amplifikation und KOD

2 x 10 µl

10x Buffer KOD Hot Start

10µl

IsrR

phaPBD

25 mM MgSO₄

6 µl

47 µl H₂O mix

2 mM dNTPs (soilisoliert)

10 µl

1,5 µl IsrR-Nod.Sw2

1,5 µl p-Haf.fw

Template (50 ng/µl genom. DNA)
E. coli

4 µl

1,5 µl IsrR-Sod.rev

1,5 µl p-pha-rev

KOD Hot Start Pol

2 µl

~~add to 62~~

62 µl H₂O

PCR-Programm:

(1)

(2)

(3)

Denat.

95 °C

2 min

95 °C

2 min

n

n

20 s

95 °C

20 s

Anneal ~~57 °C~~

57 °C

10 s

30 x

60 °C

10 s

70 °C

70 °C

7 s

(50 s)

70 °C

22 s

70 °C

7 min

70 °C

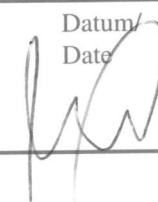
2 min

4 °C

∞

4 °C

∞



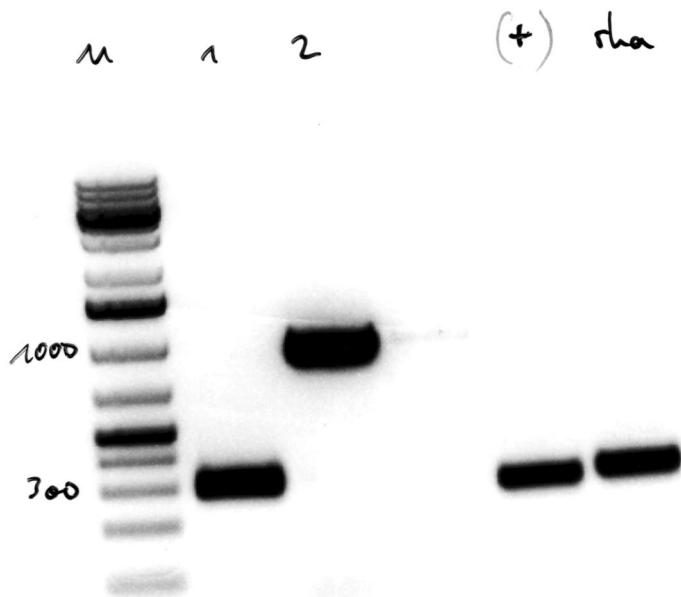
M - genauer 1KB Plus

1 - ISRL AmpL

2 - rha P_{BAD} AmpL

(+) - Positivekontrolle (S.80)

p-lsr-fw2 D p-lsr-rev

rha - rha P_{BAD} AmpL
Pka

02.10.2012 16:50:35

rha

PCR - Anek wie WEBBO (S. 173) → ABER! 100 µg Template

PCR-Programm:

(+) - anl

95°C	3 min
95°C	30 s
55°C	30 s
72°C	1 min
72°C	15 min
4°C	∞

30x

pCDF-Duet 1 & pACYC-Duet 1 vector

with EcoNI (XbaI) and NcoI

o Buffer R / 2 x excess of NcoI

- PCR (the pBAD) vom 02.10.12 (S. 174) and vector.

Ansatz:

	<u>pCDF</u>	<u>pACYC</u>	<u>PCR (7)</u>
Buffer R	1µl	1µl	2µl
XbaI	1 µl	1µl	1µl
NcoI	2 µl	2µl	2µl
Plasmid PCR	2µl (553 µg)	6µl (422 µg)	10µl
H ₂ O	4µl		5µl

→ 4h @ 37°C → 20 min @ 80°C

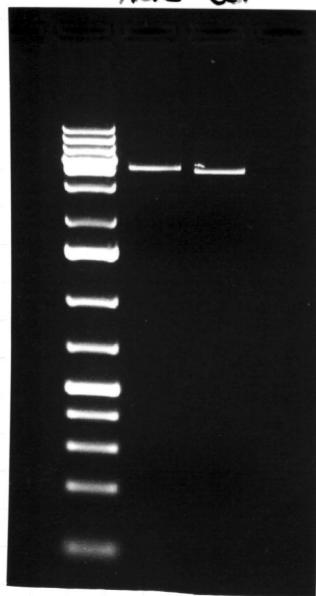
→ PCR & gel Cleanup (MN) (1:5稀释 Buffer NEB)

Wasserablass in Frigomate
Σ=100 bp

	C (ug/µl)	260/230	
pCDF	58,8	0,93	{ in 25µl H ₂ O elut
pACYC	33,5	0,57	
PCR (7)	18,0 µg		→ in 15µl H ₂ O elut

→ gel der se verdeckt
Fragmente

d Einstellungen\Institut Pfl
\HLC\20121008_pACY_pc
ACY OF



IsrR rha (1) M
rha rha (1) M

1000
1000
500
300

verdient
und Nod/EcoNL

• gel (1,5%) mit PCR (1) & (2) (S 474) → 30 µl Probe angebracht

→ Bande IsrR & rhaPBAD auszählen

→ mit MN Gel Partikular Kit angebracht

→ 25 µl H₂O eluiert

	(clap/l)	269/280
IsrR	348,5	0,066
rhaPBAD	29,2	0,97

PCR IsrR & rhaRS P3NS

10x Pfu Buffer + MgSO₄
10 mM dNTPs
50 µl Pfu Pol.
100 µg DNA (E. coli)
4 µl 10x PCR Buffer
79 µl H₂O

IsrR

10 µl Pfu

1 µl IsrR Nod/FNC

1 µl IsrR Sact/FNC

rhaRS P3NS

08.10.12

1 µl p-rhaS-Fw
1 µl p-rha-rv

PCR IsrK, rhaBAD & rhaSR Prome

- ① template:
- ① - 1µl der PCR-Reaktion rhaBAD (29 µl)
 - ② - 1µl IsrK (48 µl) [S. 777]
 - ③ - 100 µg Ecoli DNA (7 µl)

Ausatz

markiert 3x

10x Pfu Buffer

10mM dNTPs

Pfu Del.

1,5µl
6µl
1,5µl
117,5µl H₂O

Prinzip:

- ① - 1µl p-rha-fur & pRha-rev
- ② - 1µl IsrK-Nof fw2 & IsrK-SacI-rev
- ③ - 1µl pRhaSR-fur & p-rha-rev

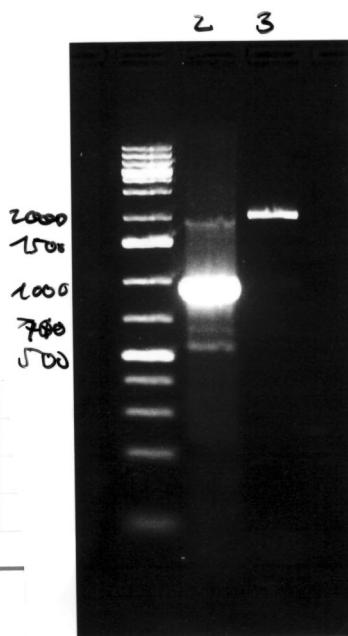
Programm: wie WEB30 (S. 173)

→ Abrege: 30 Zyklen

sofort Anheiz → alle 55°C

Elogeat: ① 1min
② 2:30 min
③ 5 min

→ Frage?



① → siehe S. 777 ohne rechts

→ große ob Fragmente durch abrei und erwärme große

PCR mit KOD

10µl 10x KOD Buffer
 6µl 25mM MgSO₄
 10µl
 10µl 2 mM dNTPs
 3µl KOD Hot Start
 64µl H₂O

Primer & template

IsrR: ~~42~~ ~500 bp PCR Fragment (S. 177)
 je 1.5µl IsrL_NeoI_fwr &
 IsrL_SacI_rvr

rhaR

1µl 1:100 vD PCR (3) (S. 178)
 je 1.5µl pRHA-avr & p-RHAK-B

Vorstan

② pCDF, ① pACYC & ③ IsrR
 → mit NcoI/SacI

• Buffer SacI; 2x excess of NcoI

Buffer SacI	1µl	1µl	2µl
	(CDF)	(ACYC)	(IsrR)

SacI	1µl	→ - - - -
------	-----	-----------

NcoI	2µl	→ - - - -
------	-----	-----------

Plasmid / Fragment	2µl	6µl	15µl
-----------------------	-----	-----	------

H ₂ O	4µl
------------------	-----

1 - pCDF (NcoI / SacI)

2 - pACYC (- - -)

3 - IsrR (- - -)

4 - rhaP_{BAD} (NcoI / EcoRI)

5 - rhaSRP_{BAD} (- - -)

IsrR - PCR

rhaSR - PCR

↑

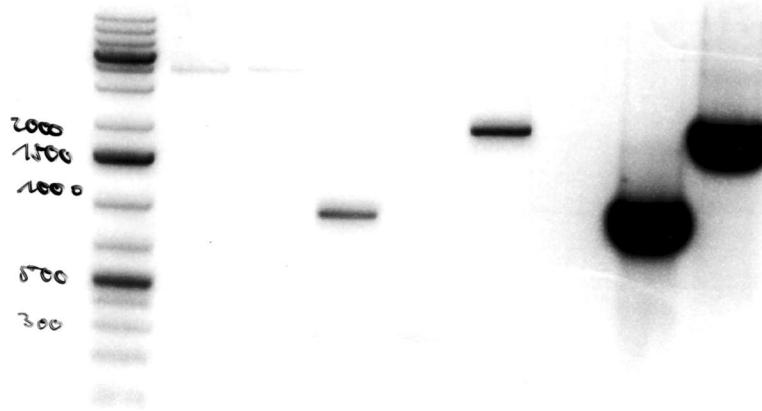
1 2 3 4 5 IsrR rhaSR

④ rhaP_{BAD} & ⑤ rhaSRP_{BAD}

→ EcoRI / NcoI

Buffer R	④	⑤
	3µl	7µl
XbaI	1µl	1µl
NcoI	2µl	2µl
Fragmet (PCR-Lan)	15µl	15µl

→ 6h @ 37°C → 20 min @ 80°C
 → den P gel



10.10.2012 11:19:22

PCR cleanup

→ pCDF & pACYC mit 1:6 Verdunsten NTT Rührer
(ausschliesslich kleine Fragmente bis 100bp)

→ pCDF & pACYC
mit 2µl H₂O

→ PCR-Fragmente
mit 2µl H₂O elutet

	c (ng / µl)	$\frac{260}{230}$
pCDF (NcoI, SacI)	37,4	0,84
pACYC (- - -)	21,3	0,59
lrrK (- - -)	145,7	7,49
rhaP _{BAD} (EcoNF)	32,4	0,67
rhaSRP _{BAD} (-)	115,6	7,42

Ligation

- pCDF & rhaP_{BAD} (NcoI, EcoNF) in pCDF & pACYC

rhaP_{BAD}: c = 18 μ g

Injektionsanzahl:pACYC

1,5 µl pACYC (Neot/EcoNI) Q:2
 $\approx 25 \mu\text{g}$

1 µl 1:10 λ -PAB ($\approx 9,4 \mu\text{g}$)

1 µl T4 Buffer

0,5 µl T4 ligase

6 µl H₂O

pCDF

1 µl pCDF(1:2) $\approx 29 \mu\text{g}$

1,5 µl 1:10 λ -PAB $\approx 11,8 \mu\text{g}$

1 µl T4 Buffer

0,5 µl T4 ligase

6,3 µl H₂O

\rightarrow 2h @ 22°C \rightarrow i. N. @ ~~37~~ 4°C

\rightarrow i. OHT & formal 1 µl Injektionsanzahl)

\rightarrow i. N. @ 37°C \rightarrow >200 Kolonnen und Platte

\rightarrow Colony PCR \rightarrow T7 km & p-tha-fw ($\approx 693\text{bp}$)
22x M13

4,4 µl Tag Buffer

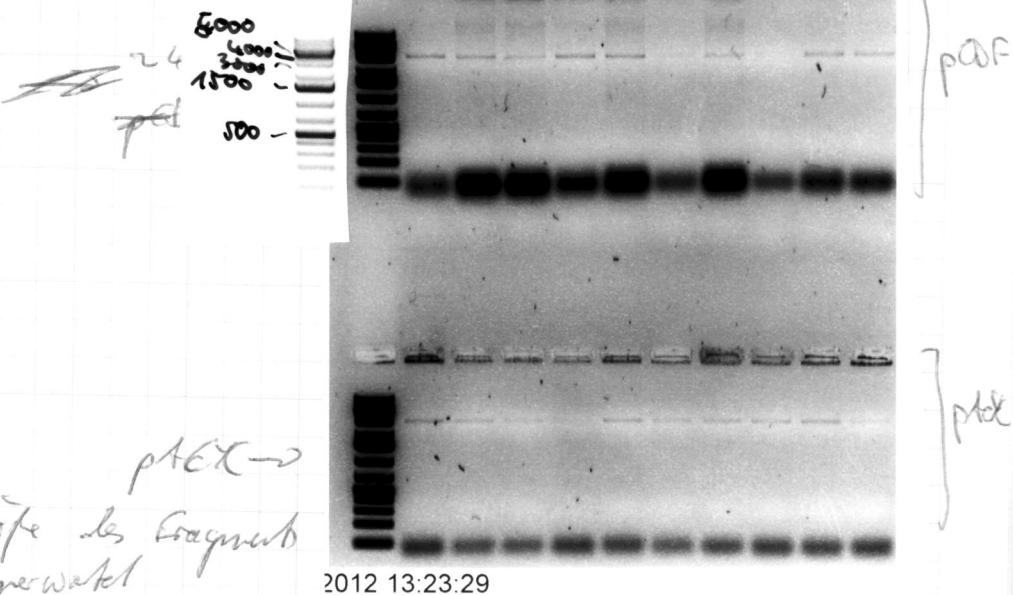
8,8 µl dNTPs

8,8 µl T7 km

8,1 µl p-tha-fw

2,2 µl Tag

367,4 µl H₂O



→ warum sind beide bei unterschiedl. Größe?

→ PCR mit Colon-PCR-Kultur als template

75 x M M (KOD-Polymerase)

30 µl KOD Hot Start Buffer

18 µl MgSO₄

70 µl 2 mM dNTPs

3 µl KOD Hot Start

20 µl H₂O

je 94 µl Wasser mit in Reaktor +

① 3 µl 77 & 17 km (253 bp)

② 3 µl 57 & p-rha-Teu
(404 bp)

③ 3 µl 57 Km & p-rha-Teu
(693 bp)

PCR-Programm

① bei pCDF-Duet? (ohne Zmech)
→ 2 Produkte 253 bp & 483 bp

95°C 2 min

②

25x [95°C 20 s

55°C 10 s

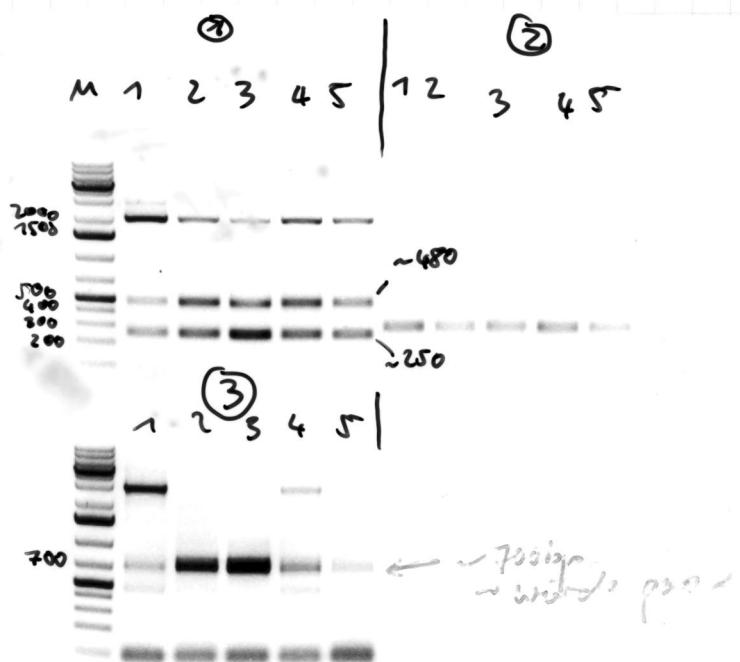
① + ③ = 10 s

② = 50 s

72°C 2 min

4°C ∞

1-5 µCDF pRhaB4D 1.5
je 1 µl PCR-Res.
in Colony-PCR



③ → es sind beide bei unterschiedl. Größe aber and. oder, die dann spreden (bei ① + ②) und

11.10.2012 16:37:49

→ 3ine Kulturr. von pACYC Duet 1 rha P_{BAD} 1-5 &
(mit AB) (50 µl) pCDF —— 1-5

→ L.N. @ 31°C

→ Miniprep:

	No.	c (ug/ml)
pCDF Duet 1 rha P _{BAD}	1	113,8
	2	149,4
	3	92,4
	4	132,7
	5	113
pACYC Duet 1 rha P _{BAD}	1	129,7
	2	119
	3	104
	4	157,3
	5	209,5

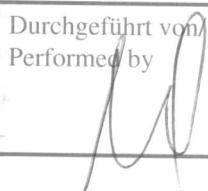
→ zum Separieren gedählt (Duet 10: 2820936)
mit Prime ACTC Duet 1:

pCDF Duet 1 rha P_{BAD} 2+3

pACYC —— 1-5

mit Prime Duet Down 1.

pCDF Duet 1 rha P_{BAD} 2+8

Durchgeführt von/
Performed by


Datum/
Date
11.10.11

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

Ligation IsrR in pACYC, pCDF & rhaSR_{BAD} in pCDF & pACYC

- ~~* IsrR (SacI & NcoI) + pCDF (SacI & NcoI) → pCDF IsrR~~
 u + pACYC (- - -) → pACYC IsrR
- rhaSR_{BAD} (EcoNI & NcoI) + pCDF (EcoNI / NcoI) → pCDF rhaSR_{BAD}
 pACYC (-) → pACYC rhaSR_{BAD}

Vestenmix (4x)

T4 ligase	4 µl
T4 ligase	2 µl
H ₂ O	24 µl

Ansetze

pACYC Duet 1 rhaSR_{BAD} (EcoNI & NcoI)

7,5 µl Harnstoff

75 µl plasmid (16,75 µg/µl) pACYC Duet NcoI, EcoNI

7,1 µl rhaSR_{BAD} NcoI, EcoNI (1:2VD; 57,8 µl)

pCDF Duet 1 rhaSR_{BAD}

7,5 µl Harnstoff

7 µl ~~pCDF NcoI~~ pCDF NcoI, EcoNI (29,4 µl)

74 µl rhaSR_{BAD} (1:2; 57,8 µl),
0,1 µl H₂O

pACYC IsrR (NcoI & SacI)

7,5 µl Harnstoff

1,2 µl pACYC (NcoI & SacI) (3,75 µl)

1 µl IsrR (1:5VD; 29,7 µl)

0,3 µl H₂O

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
M	M. NO. R			

pCDF-LsrK

7,5 μl Mastermix

1,3 μl Plasmid (1:2VD; 18,7 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)

0,1 μl LsrK Fragment (1:5VD)

0,1 μl H₂O

→ ligation für 2h @ 22°C, danach 4°C in Kühld.

→ → End Transformation auszak in DH5α transformiert

→ auf ausplattiell (nur entsprechendes AB; CDF → Streptomyces)
ACYC → Chloramp)

→ am nächsten Tag sehr viele Kolonie (>200 pro Platte)

Colony PCR

44 x MM



je 413,6 μl MM

88 μl KOD Hotstart Buffer
 88 μl 2mM dNTP
 52,8 μl MgSO₄
 8,8 μl KOD Hot Start Poly.
 58,96 μl H₂O

~~PBAD~~
PBAD

LsrK

zum MM
 je 13,7 μl
 pBAD-R-fw &
 T7 term

je 13,2 μl
 LsrK-NdeI-EcoRI
 87 term
 ab rein

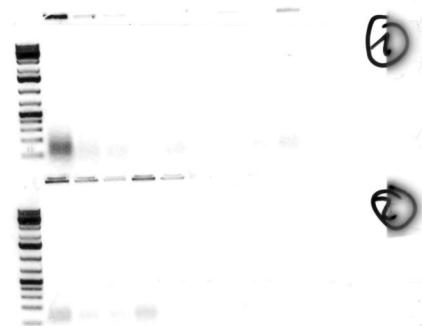
↓
 in PCR tubes und
 Colonie gepulst
 → PCR

Colo PCR Program

95°C 2 min
 ↗ 95°C 20 s
 55°C 10 s
 70°C 50 s (PBad) / 30 s (LsrK)
 70°C 2 min
 4°C ∞

O:/KRE/Nre/LED/BioLoc/
11012-colorbar-182/384

- Agarosegel → hier Dader
- Miniprep von je 5er Klonen
 - pCDF IsrR 1-5
 - pACYC IsrR 1-5
 - pCDF flashR_BA 1-5
 - pACYC —



Potentielle Konstrukte

	No.	c (ug / μl)
pACYC Dual1 IsrR	1	21
	2	24
	3	37,5
	4	28
	5	37,5
pACYC Dual1 + flashR P _{BAD}	1	35
	2	24
	3	28
	4	38,5
	5	28
pCDF Dual1 IsrR	1	98
	2	98
	3	108,5
	4	129,5
	5	87,5
pCDF flashR P _{BAD}	1	63
	2	101,5
	3	105,0
	4	35
	5	119,0

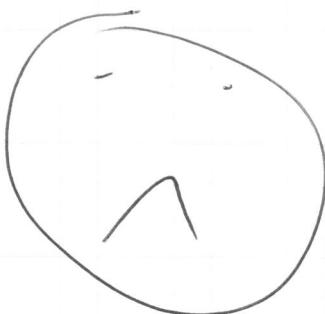
- ① pCDF IsrR
- ② pCDF IsrR
- ③ pACYC IsrR
- ④ pACYC IsrR

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	15.10.12			

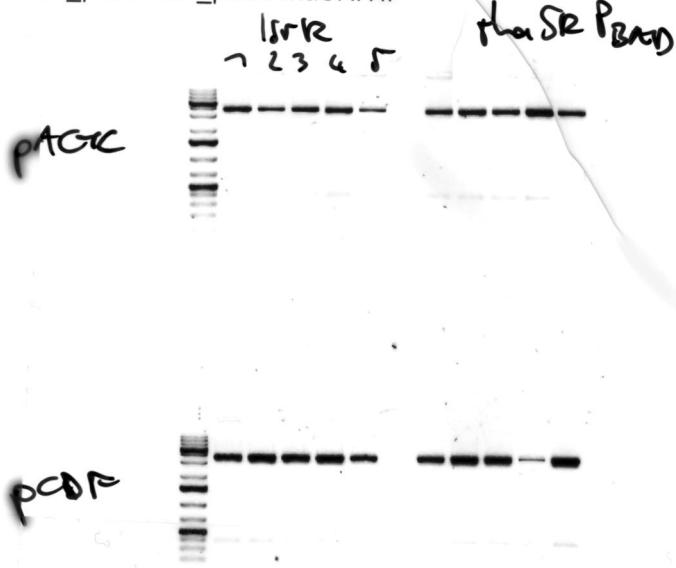
Testvorden mit XbaI / XbaI

- ohne Insetk sollte Fragment ~400 bp sei
- mit Inset erwartet großes rheiP_{BAD} ~ 580 bp
rheiSR P_{BAD} →
- alle gepreppete Probe reaktant
(siehe S. 183 / rheiP_{BAD})
IsrR →
- Mastermix 21 x
(10 µl je Run)
 - 1 µl Buffer R
 - 0.5 µl XbaI / XbaI
 - 1.8 µl H₂O
 - 8 µl NH + 2 µl Plasmid
 - 4 h @ 37°C ; 20 min @ 80°C
 - ausf. gel

- leicht i
keine Probe
Insetk
- gepreppete Blasen
verwerfen



C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pflanzenbio\Desktop\HLC\20121016_0,CYYIsrR_pACYCrhaSR_pCDFIsrR_pCDFRhaSR.TIF

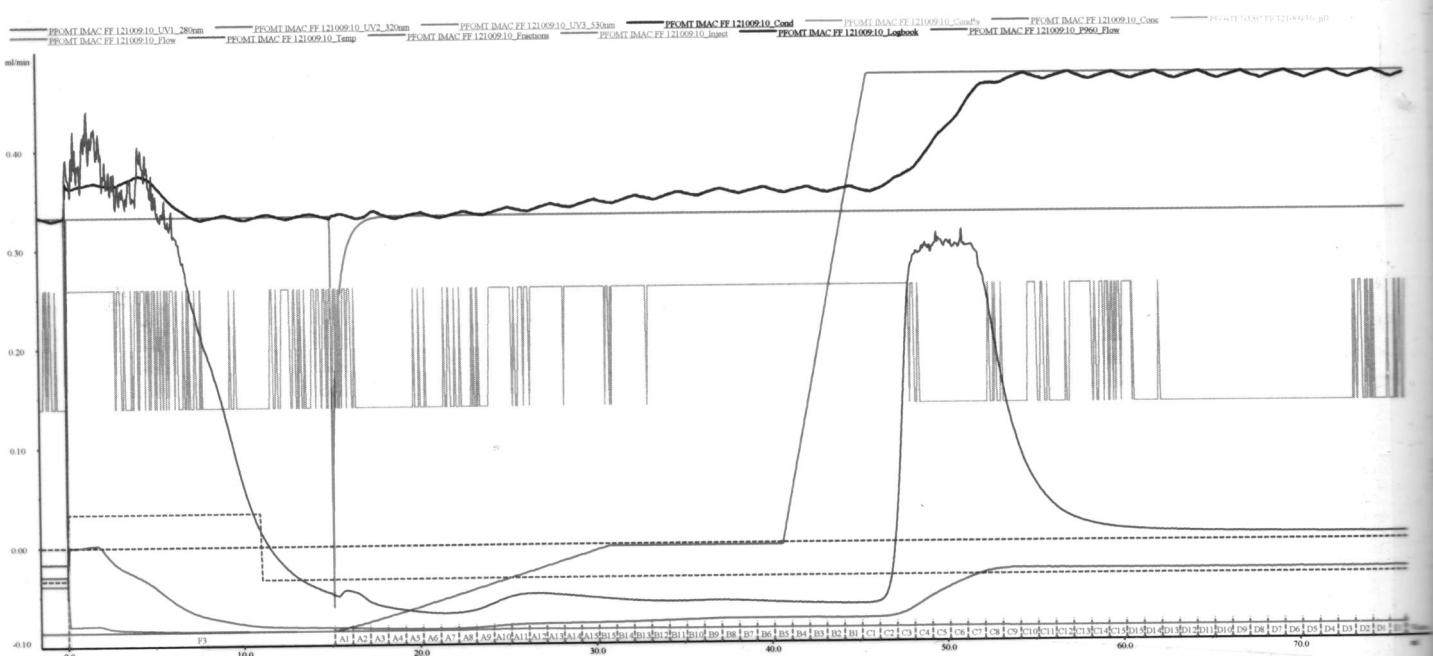


PFOMT Reinigung

- 2 ml VK (ZY-08S) mit Kanamycin (~100 µg/ml) und E. coli Kame BC 21 (DE3) pET 28c (+) PFOMT ansiedeln
- 6 h @ 37°C / 280 rpm
- 500 ml Kultur ZYP-S052 (~100 µg/ml Kan) mit 250 µl VK ansiedeln
- über Nacht @ 37°C, 280 rpm inkubiert
- Zellen gezersetzt, Cytofil und Rollipat aus über Jml HiTrap IMAC FF (+Co²⁺) gereinigt
- Programm: HLC / PFOMT IMAC FF 121009

UNICORN 5.31 (Build 743)

Result file: c:\...\HLC\PFOMT IMAC FF 121009

Durchgeführt von/
Performed by

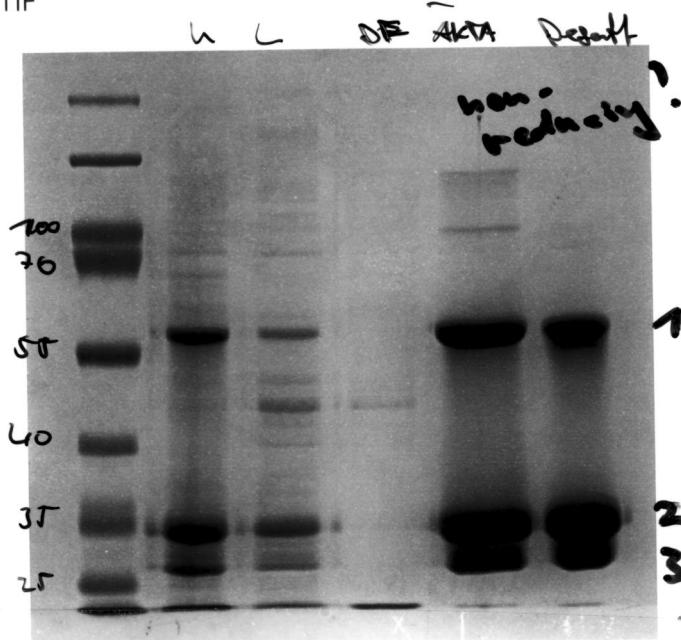
R.W. R

Datum/
Date

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

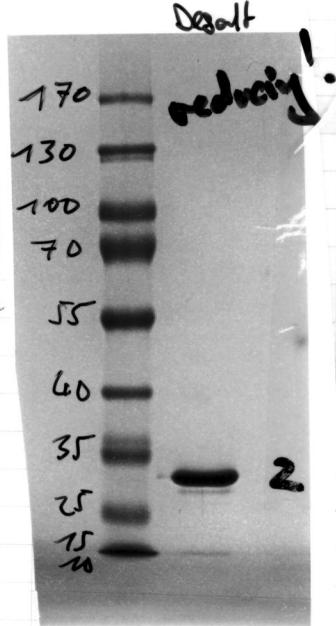
Puffer A (Bindig):Puffer B (Elektrolyt):→ SDS-PAGE: ~~no~~ für Fraktion -weiß → kovalente
mit BF

C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pflanzenbio\Desktop\HLC\20121010_PFOMT_Isolation_Äkta.TIF



10.10.2012 09:56:31

Einstellungen\Institut Pflanzenbio\Desktop\HLC\20121010_PFOMT.



M
Puffer A ↓ ↓ DF AKTA PPO
↓ ↓ ↓ ↓ b.w.
↓ ↓ ↓ ↓
mehrere Rauten
↓ ↓ ↓ ↓

2-Töpfel Rauten AKTA - mal 1x AC
DF-Durchfluss PPO - nach desalting

mehrere Rauten
↓ ↓ ↓ ↓

Durchgeführt von/
Performed by

Datum/
Date
17.10.11

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

Af4g 26220_wf

Af4g 26220_646Y

G PROMT

file

- es sieht erst so aus, als ob 3 Proteine (1, 2, 3) next
vor der 1/MAC eluted
 - aber: ob diese explizit rückwärts Reihenfolge wurde und
der Aufteilung reing
 - entnahm Probe nochmal auf gel, aber diesmal mit
einer hoch pHs, welche gering β-ME enthält
(anfordern war die Probe 1:10 verdünnt)
- 1 - Dimer (wahrscheinlich S-S-Domäne) ?
 - 2 - native PFOA !
 - 3 - oxidativ monomer ?

Desalting / Hager puffer:

Testreagenz 2 -DNA mit XbaI & NcoI
+ zugesetzte DNA (Inhibitor?)

① 1 µl Buffer R
 1 µl 2 DNA (0,3 µg/µl)
 1 µl NcoI
 7 µl H₂O

② 1 µl Buffer R
 1 µl 2 DNA (0,3 µg)
 1 µl pCDF plasmid (553 ng)
 1 µl NcoI
 6 µl H₂O

③ 1 µl Buffer R
 1 µl λ DNA
 0,5 µl XbaI
 7,5 µl H₂O

④ 1 µl Buffer R
 1 µl 2 DNA
 1 µl pCDF plasmid
 0,5 µl XbaI
 6,5 µl H₂O

→ ~~XbaI & NcoI~~
 sind beide aktiv in
 Buffer R.

- zugesetzte DNA inhibiert
 nicht die Schneide

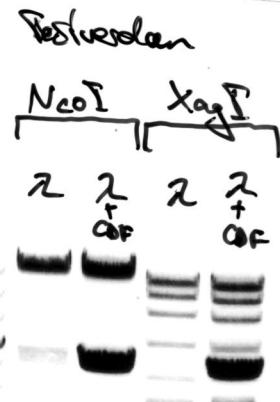
→ nochmal pACYC & pCDF plasmid
mit XbaI & NcoI verarbeitet

2 h @ 37°C verarbeiten (S. 179)

→ in 1% Agarosegel

→ Bande ausgeschnitten & mit
 MN-Gel & PCR cleanup
 gereinigt

→ in 25 µl H₂O eluiert



23.11.2012 14:49:13

	µl/µl	260/280
pACYC plasmid	6,3	0,8
pCDF plasmid	11,3	0,87

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
	23.11.12			

Ligation pCDF & pACYC mit dem PBAD

→ Ligation mit aus sel. elutierten plasmid

→ Negativkontrolle → unlinearized vector

Reagenzien:

pCDF
plasmid 2,2 μl (= 25 μg)
phage DNA (9 μg) 1,1 μl
fragment

pACYC
4 μl (= 25 μg)
1 μl (+/- control)

T4 Buffer 1 μl
T4 Cipase 0,8 μl
H₂O 5,2 μl

1 μl
0,5 μl
3,5 μl

→ 2h @ 22°C + 16h @ 4°C in Kultur

→ 5 μl in 0,08% chemolysis transformiert

→ wieder auch Negativkontrolle zeigt Kolonie

→ je Platte ~50 - 100 Kolos

→ Colony-PCR von Kolonie pro Platte

wie S. 181



XbaI / XbaI Oard:

1 μl Buffer R

0,5 μl XbaI & XbaI

1 μl p^CAF / pCDF + das PBAD

ad 10 μl H₂O

→ ein positiver Klon
(pCOT rhabP840 3)

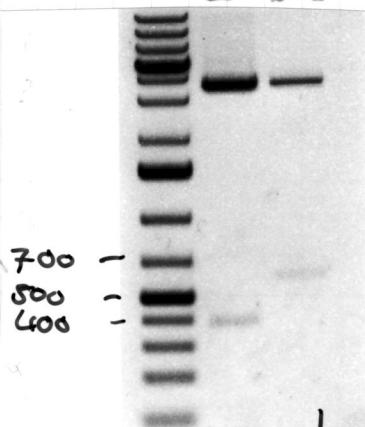
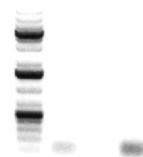
→ Miniprep & Osdan
mit XbaI & XbaI

M 4 5 6 7 8 9 10

Fragmentgröße
part

pACYC rhabP840

pCOT rhabP840



- 576 bp
erwartet

6 7 8 9 10 M

03.12.2012 15:20:13

XbaI Klon 1

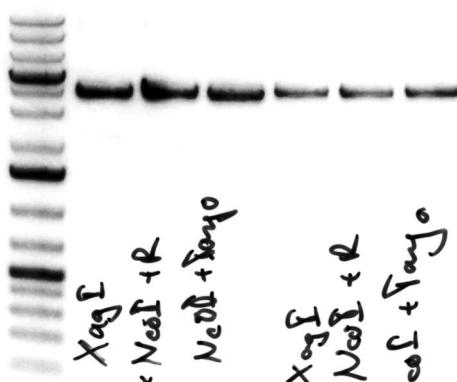
Testverdampf Velber

- ① XbaI & Buffer R
- ② 2x NcoI & - - -
- ③ NcoI & Tango
- ④ XbaI & Buffer R
- ⑤ 2x NcoI & Buffer R
- ⑥ NcoI & Tango

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\121202_colopcr
rhabbad.TIF

M 1 2 3 4 5 6

pCOT
pACYC



XbaI +
2x NcoI +
NcoI +
Tango

XbaI +
2x NcoI +
NcoI +
Tango

uncut

Rxn: ~1 µg Velber
1 µl Buffer R
1 µl XbaI (2 µl NcoI)
add to 10 µl H₂O

3.12.2012 15:28:56

je 1 µl aufgetragen

Durchgeführt von/
Performed by
[Signature]

Datum/
Date
03.12.11

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

1&4:

1µl Buffer R
~1µl plasmid
1µl Xba I
and 1µl H₂O

2&5:

1µl Buffer R
~1µl plasmid
2µl Nco I
and 1µl H₂O

3&6:

1µl Taqo
~1µl plasmid
1µl Nco I
and 1µl H₂O

→ 3h @ 37°C
→ 20 min @ 85°C

zu Reaktion 1&4 → je 1µl Buffer R

2µl Nco I
1µl H₂O zupfen

→ 3h @ 37°C inkubat

→ dann + 1µl Fast AP alkaline phosphatase (Kinetica)

→ 10 min @ 37°C, 5 min @ 75°C

→ wie PCR & gel cleanup (MN)
gezähnf

pACYC (Xba I / Nco I) AP	20,8
pCDF (Xba I / Nco I) AP	

Klonierung von rho BAD in dephosphorylierter Vektoren

MM:

5 µl T4 Lysate in RR
 2,4 µl T4 Cofac.
 >0,5 µl H₂O

RKM

pACTC (- Fragment) pACTC(ohne BAD)

plasmid	1,2 µl (10,8 µg)	1,2 µl
Fragment	0	1 µl (9,7 µl)
MM	7,6 µl	7,6 µl
H ₂ O	1,3 µl	0,3 µl

pCDF (- Fragment)

plasmid	1,5 µl (23,1 µg)
Fragment	0
MM	7,6 µl
H ₂ O	1,1 µl

pCDF (+ rho BAD)

1,3 µl
1,1 µl (9,7 µl)
7,6 µl
0 µl

- 2L @ 22°C & 4°C ü. N. f. i 200µl SOC aufg. b
- 5µl i DM + transformiert (250µl ausplakat)
- ü. N. @ 37°C
- wieder gleiche Anzahl Kolonie, bei linearisierter Vektor b mit Insert.



Quickchange PFGMT F103 zu I, P, V, W1/4 Reaktion:

10 µl Rn buffer 1,25 µl
 pQE30 PFGMT 0,17 µl (\approx 6,25 ng)
~~25 µl~~
 Primer fw/rev je 0,375 µl
 dNTP-mix 0,25 µl
 (Kit)
 Rn Ultra HF 0,25 µl
~~12,5 µl~~ ad 12,5 µl H₂O

MH

5 µl Buffer
 1 µl pQE30 PFGMT (25 µg)
 1 µl Rn
 1 µl dNTP mix
 30 µl H₂O

Rn

9,5 µl MH
 + 3 µl Prime-mix

Prime-mix:

+ 7,5 µl Rn
 + 1 µl H₂O

→ + 1 µl DMSO & 1 h @ 37°C inkub.
 → 5 µl in PNT & transkribiert
 & ausplattiert

→ > 200 Kolonie je Blatt

→ Miniprep für je 1 Kolonie
 x 15-stiel Platt

PCR

35°C 1 min
 35°C 50 s
 55°C 50 s
 68°C 4 min 20 s
 68°C 7 min
 4°C 20

Durchgeführt von/
Performed by


Datum/
Date

10.11.22

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Fortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

Min prep.

PFOMT F1031

ng/ml

110,1

→ zum Separat

F103P

7268

→ Mutter ist alle

F103V

119,6

Plasmalich nicht

F103W

118,2

Durchgeführt von/ Performed by 	Datum/ Date 11.12.11	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
--	----------------------------	---------------------------------	----------------	--

xysI → Fragment war mit Schleife *

810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
pCDF rha-MCS Ligatio
pCDF_DuetDOWN	CCCTTATCGCACTCGCA	TTAGGACTTGCCCTCGAATTCGTCAACACGGCGAAATAGTAATCAGAGGTCAAGGTCTTACCTTAAATTTCG							

910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
pCDF rha-MCS Ligatio
pCDF_DuetDOWN	ACGGAAAACCACGTTAAAAAACGTCATTTTCAAGATAACAGCTGAATTTTCAGGGAAATTCAGGAACTTCAGCGAACTCACACACAAATTCAGCAAATGTGACAC								

1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
pCDF rha-MCS Ligatio
pCDF_DuetDOWN	ATCATCACGTTCACTTTCCCTGGCTGCCAATTTCTGCAAGTAACGAGAAAGTCAGGCAATTAGGCTGGCCTTAAACTGGACTGGCTGAATGAAA								

1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
pCDF rha-MCS Ligatio
pCDF_DuetDOWN	TTCAGGAGAGTATAACATGGCAGCAGCAGCATCACATCACACACAGCAGGATCCGAAATTGAGACTGGCCCTGCAGGTGACAGCTTCGGCC								

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
pCDF rha-MCS Ligatio	ATGCGACTCCGCAATAGGACTTGCCCTCCCTGAGTCGGCAACACGGCGAAATAGTAATCACAGGTCAGGTCTTACCTTAAATTTCGACGGAAACCA								
pCDF_DuetUP	.G.GA.TA								

110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
pCDF rha-MCS Ligatio
pCDF_DuetUP	CGTCAAAAAGTCGATTTTCAGATACAGCGTGAATTTTCAGGAAATTCGGGATGAGCTCACATCACACAAATTGAGCATCATCACAGT								

210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
pCDF rha-MCS Ligatio	CATCTTTCCCTGGTGGCCAAATGGCCATTTCTGCAAGTAACGAGAAAGTCGCAATTTCAGGGCTTTTAGACTGGCTGTAATGAAATTCAAGGAGAT								
pCDF_DuetUP	N.S. T.....								

310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
pCDF rha-MCS Ligatio	ATACCAATGGCMAGGCCATCACATCACACAGCAGGATCCGAAATTGAGCTCGGGCGCCCTGCAGTGCACAGCTGGCCGCAATATGCTT								
pCDF_DuetUP									

rbs → aus Vellen
pCDF Duet
nicht normale



* Vellen (Geschr.)

Fragne (längs)



↓

von E. coli anfallt

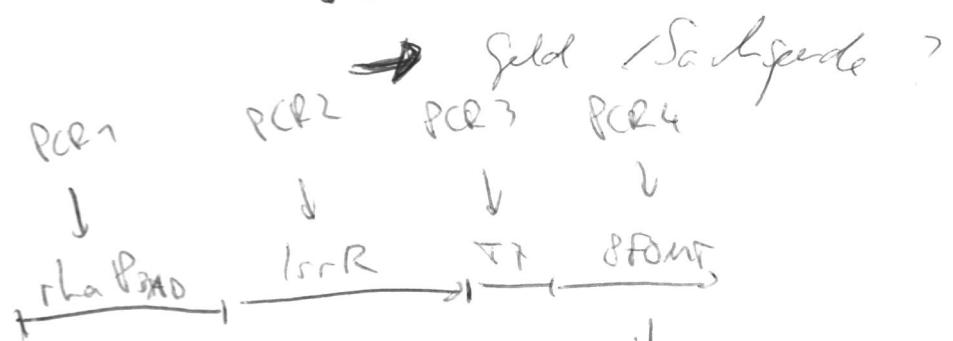


Klonierung:

"optimale" Ergebnisse mit pET28a (+)

- NdeI, EcoRI → 16°C über Nacht; 1:1 (1:1)
- NcoI, EcoRI → 1h @ RT; 1:5

Seminarow Seva → Baummeiste
6.6.13



ATA ATG CTT TAG TCG AAC
CTT AATC TCTG GAT
TAG TAA CT
ATG ATT GAG AGCC

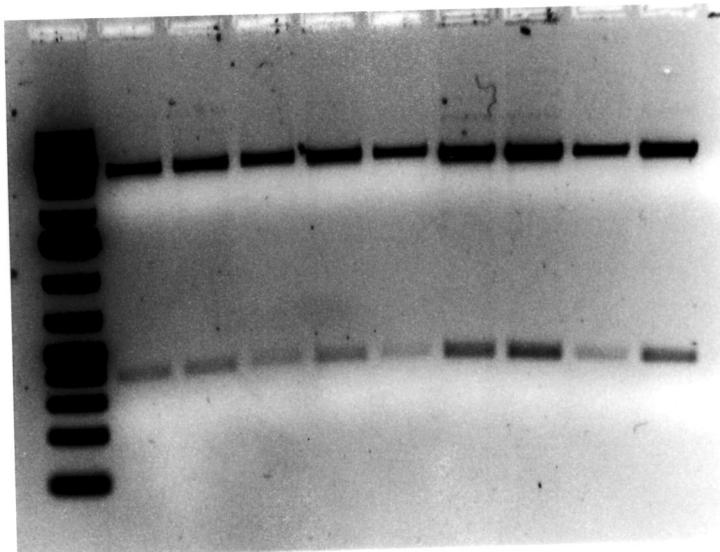
BsaI

ckATPgs

5' GGCCTC N
3' CCAGAG NUNNN

TTS

ATG GGT CCTC CTG CAT TAG
ATG CGA CTG CTG CAT TAG



15.10.2012 15:39:00

Enhancement: 107
Exposure Time: 1200

Brightness: 48
Contrast: 89
Gamma: 25

20.11.2012 14:21:50

Enhancement: 1
Exposure Time: 700

Brightness: 50
Contrast: 50
Gamma: 25

Umrühr
mit
Xag & NcoI



15.10.2012 15:38:07

Enhancement: 0
Exposure Time: 800

Brightness: 50
Contrast: 50
Gamma: 25