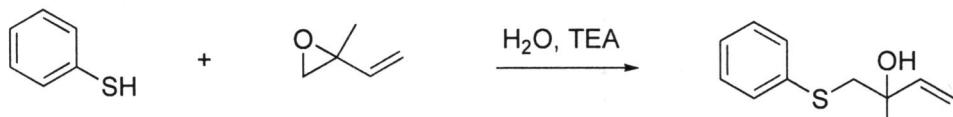


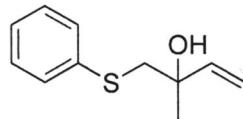
WE306305.10.17

11 mmol

Thiophenol

10 mmol

2-methyl-2-vinyl oxiran

 $\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}, \text{TEA}}$ 

WE3063

	M	n	m	V
Thiophenol	110,18 g/mol	8,5 mmol	605 µg	560 µl
2-methyl-2-vinyl oxiran	84,12 g/mol $\rightarrow$ NMR WE3063-isopropanoxid ~ ok.	5 mmol	420 mg	490 µl
Triethylamin	101 g/mol	50 mmol	5 g	6,9 ml

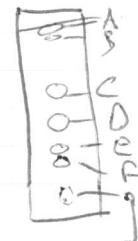
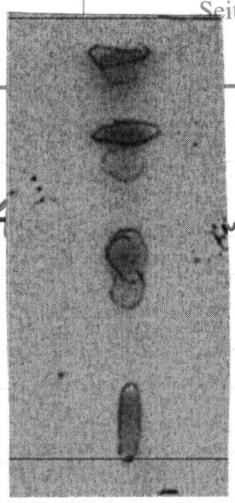
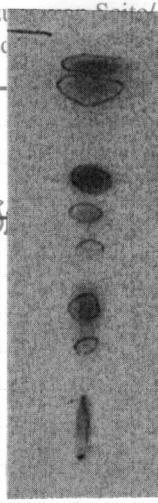
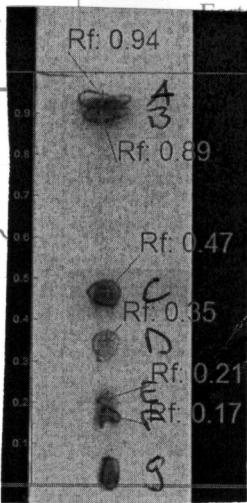
→ in 50 ml Wärme

- ① ~~2-methyl-2-vinyl oxiran lös~~
- ② Thiophenol rührte (unter Rührer)
- ③ TEA zugeben (~)

- Einröhren der Lösung nach Zugabe von TEA
- Rührer u. N.
- ESI nach 1h inbo den (Produkt nicht zu sehr)
- (WE3063-1h)

06.10.11

- DC in



- Extrahiere d. wässrige Phase mit  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $\text{Br}_x$  mit 50ml)
- vereinge d. org. Phase  
→ über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet

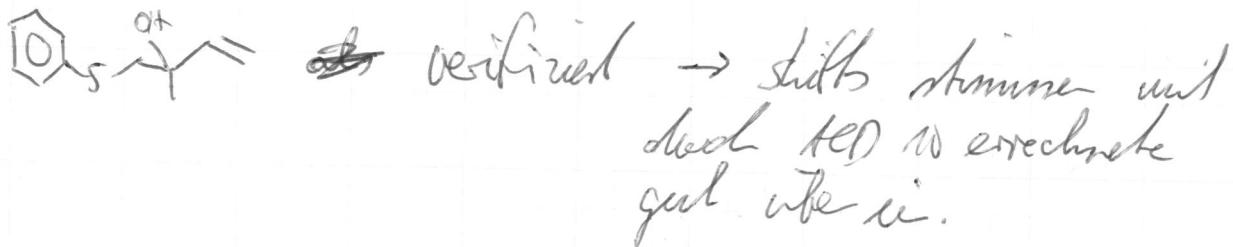
07.10.11

- Ether abgedampft ( $@30^\circ\text{C}$ )
- Säule und DCM als LM (10ml Fraktionen)
- Fraktion 20 - 30 → → per GC FR analysiert
- Fraktion 70 - 83 → Zählmolekül (rel. int.)  
F 84 - 97 → Zählmolekül und vereinigt  
F 100 - 115 → ?  
R

- Fraktion 60 - 83 vereinigt → WEB063-C
- Fraktion 140 - 165 vereinigt → WEB063-E / (F)
- Fraktion 100 - 115 vereinigt → WEB063-D

11  
~~10.~~ 11

- WEB063-C eingesetzt und  $^1\text{H-NMR}$  gemessen  
 $\rightarrow \text{CDCl}_3$  als LH



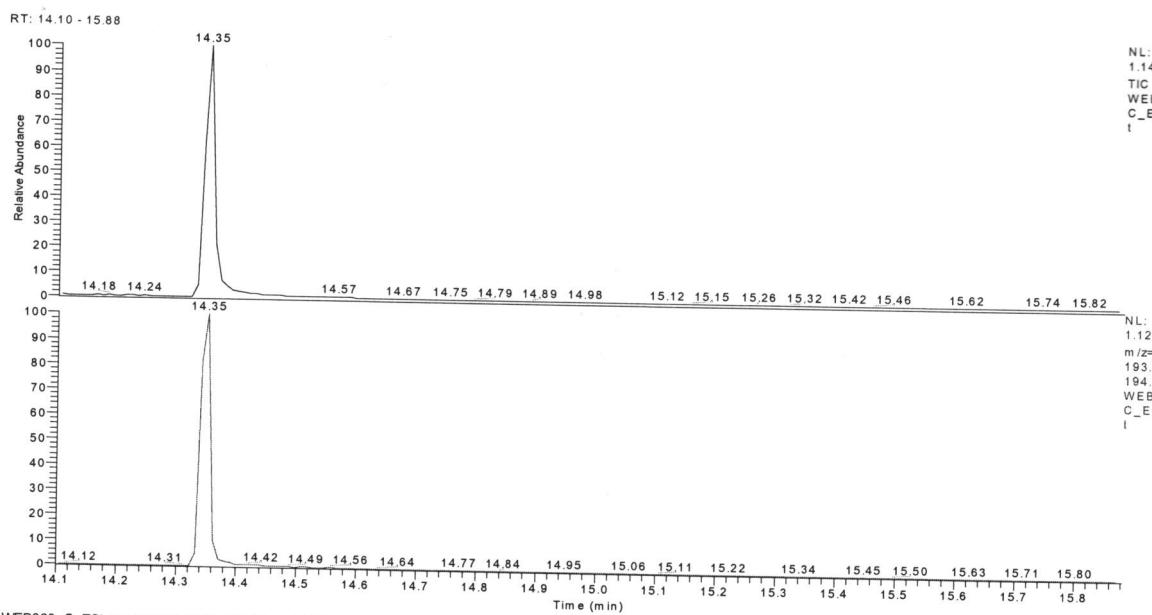
- WEB063-C

- Ausbeute
- klares bis leicht gelbbliches Öl, sehr viskos
  - 143 mg  $\rightarrow$  0,737 mmol  $\rightarrow$  7,37%
  - WEB063-C in  $\text{CHCl}_3$  aufgenommen  
 und durch Kohlal P(VDF) Filter filtriert  
 $\rightarrow$  Filtrat ~~ist~~ ein gräuliches (weiß)  
 $\rightarrow$  ~~und~~ Filte ruprecht (wie Kebstoff)  
 $\rightarrow$  nach wenige  $\rightarrow$  WEB063-C wie Kebstoff  
 löslich  
 so

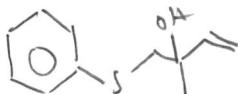
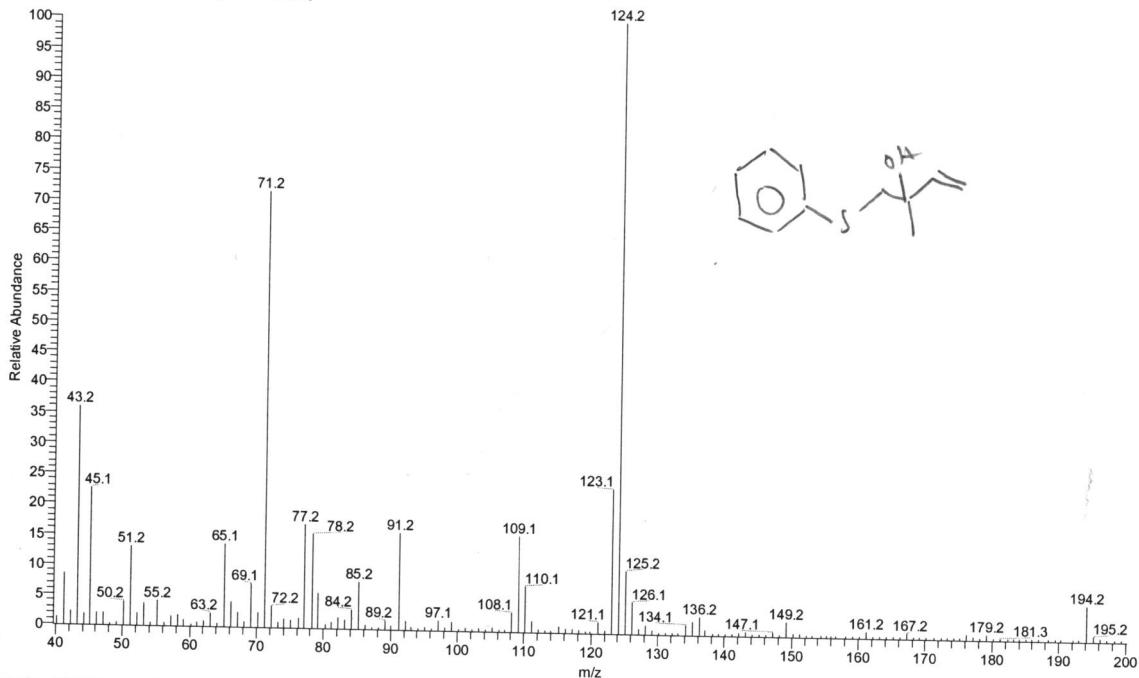
- ESI-MS von WEB063-C, D, E (F)

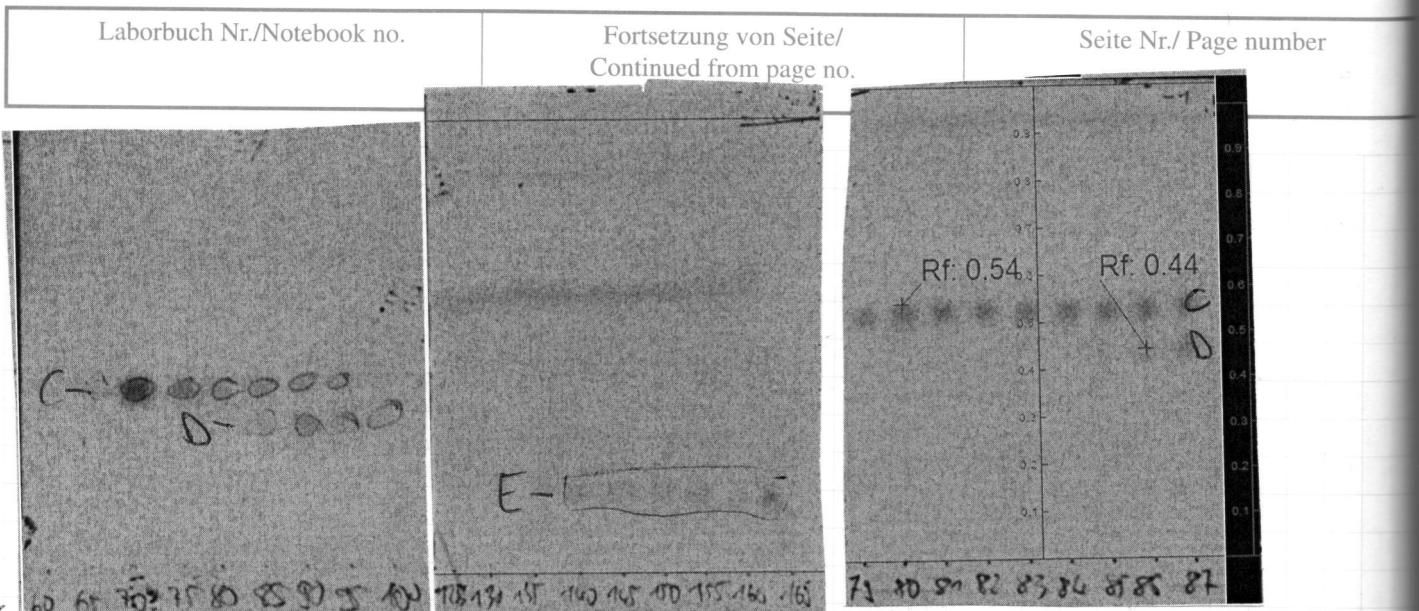
$\rightarrow$  Später reip Chrom mit je 140a abtard

063-C



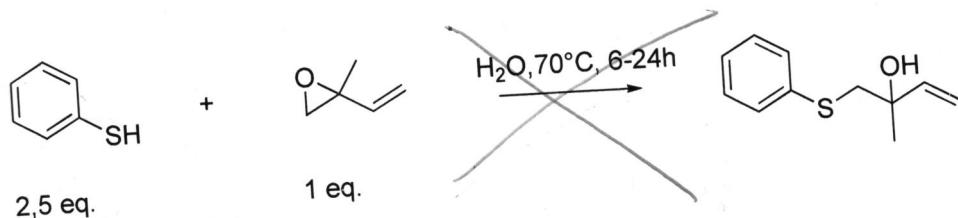
WEB063\_C\_ESI\_split#1004-1005 RT: 14.34-14.35 AV: 2 SB: 12 14.28-14.32, 14.37-14.43 NL: 1.82E6  
T: (0,0) + c El det=500.00 Full ms [40.00-600.00]





→ erste Säule (mit DCM)

Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite <u>  </u> Continued on page <u>  </u>
-----------------------------------	----------------	---------------------------------	----------------	--



2-methyl-2-vinyl  
benzaldehyde

MW n m v δ

84,12 1mmol 84,12 mg 98μl 0,857μl

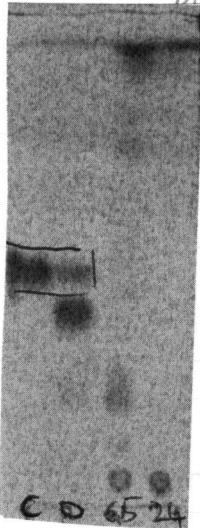
Thiophenol

110 2,5mmol 278mg 26μl 1,073

Wasser 3ml als LM

- Kolben mit  $\text{H}_2\text{O}$  security (unter Füßen ockern gege und aufschraubt mit  $\text{N}_2$  beladen)
- Dose abgedichtet und 2,5 eq. Thiophenol zugegeben
- Reaktion für 7h unter sterilen Füßen
- DC nach 6,7h

n weitaus und gleich  
in Niedrige



IC

ID

→ erwartet Produkt nicht

IE

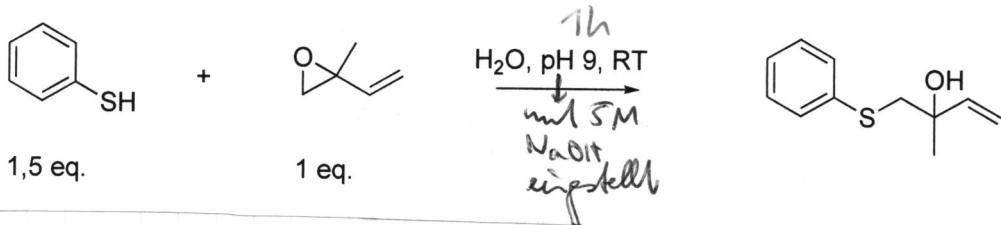
substanz

IG

→ ahr Nebenprodukt

100ml 5% NaOH ~ 20g

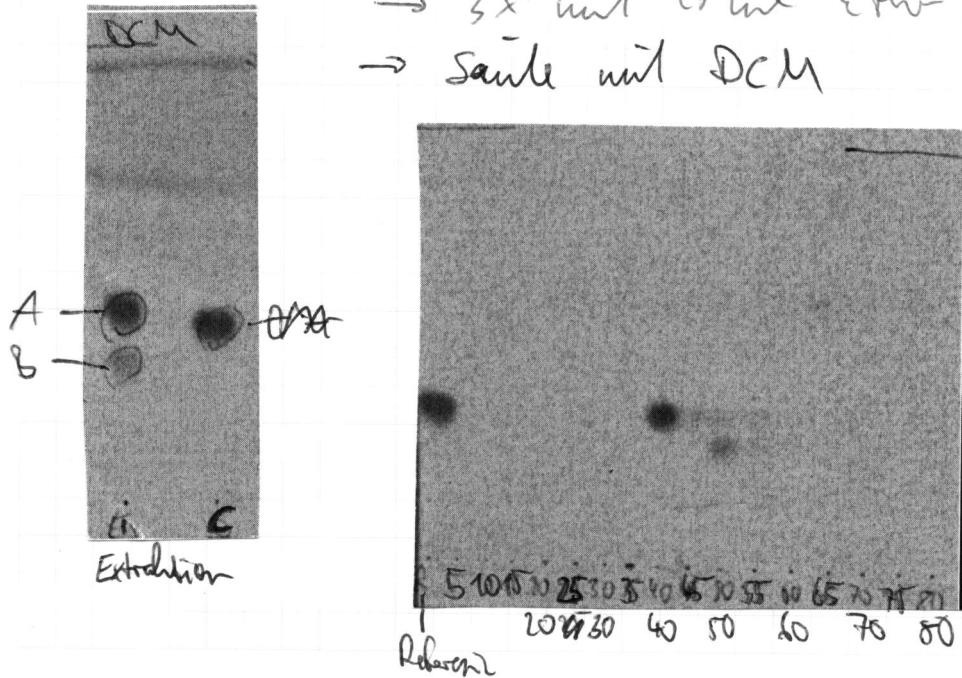
WEB065



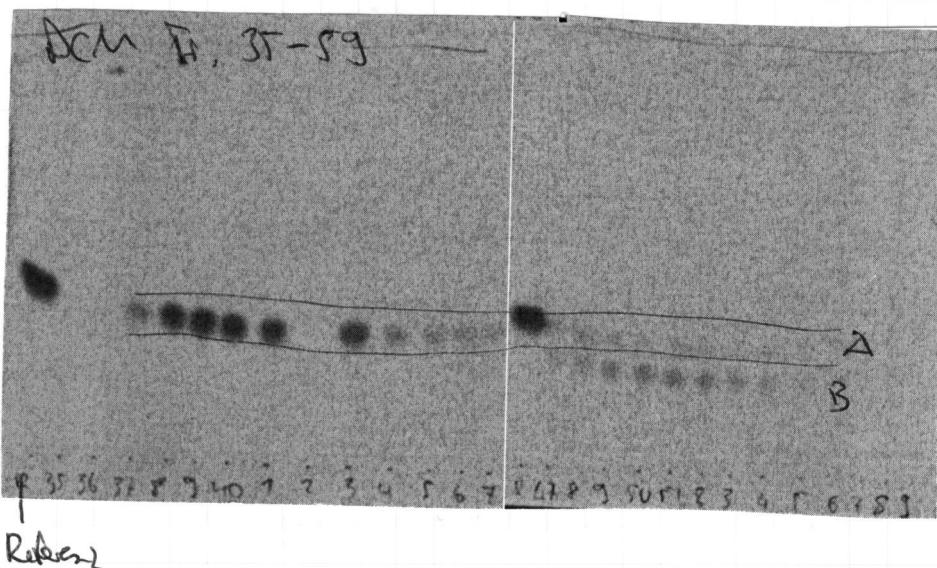
	MW	n	m	v
Thiopasol	910	1,5 mmol	165 mg	153,8 µl
2-methyl-2-vinylpropanoic acid	84	1 mmol	84 mg	98 µl

→ in 3 ml H<sub>2</sub>O → mit Thiphonal gelöst  
→ auf pH 9 mit 5 N NaOH eingestellt

- Start @ 10<sup>50</sup>
  - DC - Kontrolle um 10<sup>70</sup> → Produkt  
 → 3 x mit Ethyl Ester evaluiert (eigenzl)  
 → Saute mit DCM

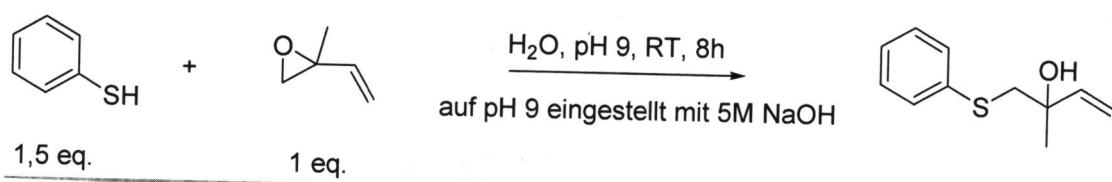


Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
-----------------------------------	----------------	---------------------------------	----------------	--



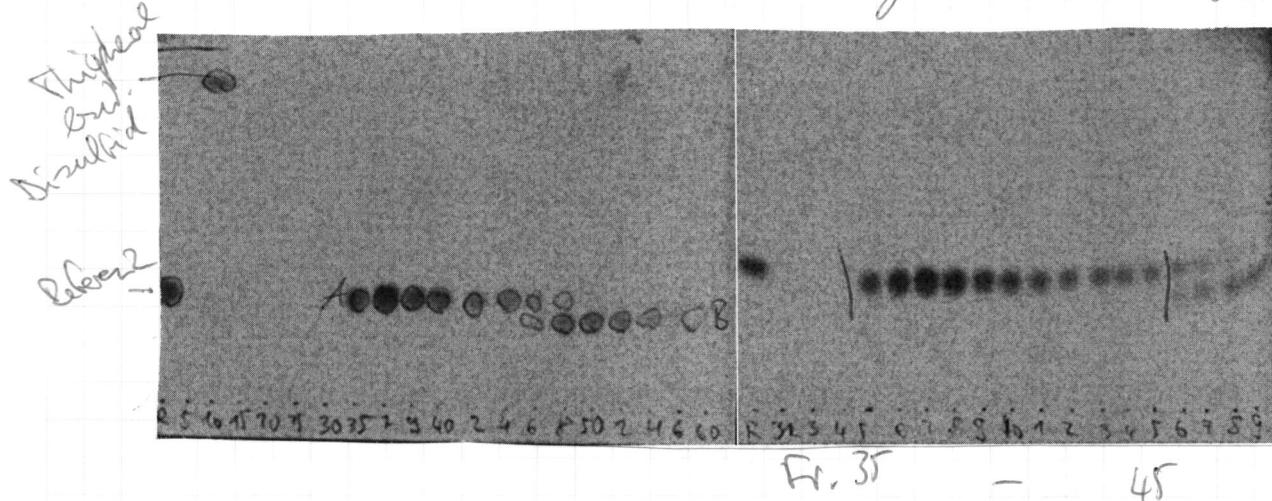
- Fraktion 35 - 46 vereinigt und eingespült
- Ausbeute 30 mg eines farblosen Ols mit charakteristischer  
↓  
15% yield

WEB off



- wie oben, nur 8h röhre lassen
- 3x mit 10 ml  $\text{Et}_2\text{O}$  extrahiert (Baril) → Produkt
- dann wässrig thoro angewaschen mit  $\text{NaHSO}_4$ -Lösung
- nochmal mit 3x 10ml  $\text{Et}_2\text{O}$  extrahiert
- kein Produkt → nur Thiphanol im DC

- den Extrakt des bändern Anaktes gesiebt mit DCM



- Fraktion 35 - 45 vereinigt und eingetragen

**WEB067/068**

Testung von Myxobakteriellen Terpensynthasen (**GeoA Soce 56** und **GeoA Soce 4636**) von Nils Günnewich (Saarbrücken) auf Umsatz der Prenyldiphosphate IPP, DMAPP, GPP, FPP, GGPP und GC/MS Untersuchung.

**Enzymassay:**

- 2 mM Prenyldiphosphat im Ansatz (IPP, DMAPP, GPP, FPP oder GGPP)
- ~1 mg Enzym **GeoA Soce 56** bzw. **GeoA Soce4636**
- 500 µl Assaybuffer für myxobakterielle TPS (50 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 2.5 mM DTT, 10% Glycerin)

**1) GeoA Soce 56 Umsätze**

Die GC/MS-Analyse erfolgte an einem Trace2000/Voyager GC/MS (Thermo Finnigan, USA): 70 eV EI, Quellentemperatur 200 °C, Säule ZB-5MS (Zebtron, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Schichtdicke), Injektortemperatur 220 °C, Interfacetemperatur 300 °C, Trägergas Helium, Fluss 1 ml/min, Injektion splitless, Injektionsvolumen 1 µl, Säulentemperaturprogramm: 40 °C für 1 min, auf 160 °C erhöht mit 10 K/min, auf 300 °C erhöht mit 25 K/min, isotherm bei 300 °C für 10 min.

Umsatz von GPP und FPP beobachtet. Kein Umsatz mit IPP, DMAPP, GGPP beobachtet.

WEB067/068 → Methode: Vakuum/T-40-300-30mcf

- FPP
- GPP
- IPP
- DMAPP
- GGPP - 1+2

→ 40 °C 1 min

→ 300 (10K/min) Hold 15 min

Mass spectrum: 40 - 700 amu

Werkstofftemp war 350 °C!

WEB068 - alle

& WEB067-IPP-1-wdh  
gpl-1-wdh

Methode: Vakuum/T-40-300-30mcf-Massendet.

→ 40 °C 1 min

→ 300 °C @ 10K/min Hold 15 min

Mass spectrum: 40-330 amu

dito

Hallo Benjamin,

erstmal vielen lieben Dank für die Große Unterstützung. Ich würde mich freuen wenn Du zwischendurch Zeit hast einige Umsätze zu machen.

GeoA Soce 56,

nochmal mit GPP, da wir Valencene vom vorherigen Lauf gesehen haben. FPP bei einer niedrigeren Endtemperatur, um wie Du bzw. Herr Prof. Wessjohann meinte eine Umlagerung auszuschliessen. GGPP da konnten wir nichts sehen. Da meintest Du, dass das Substrat unter Umständen zu alt ist.

#### Aminosäuresequenz:

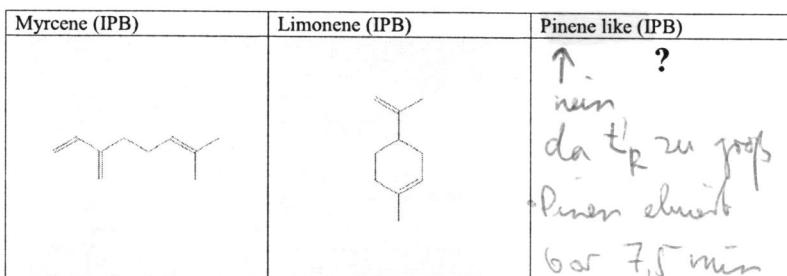
mssdrtsvvsvkrdaggsfeypfaaschpgrevteqrlawvrrllrvpdgrsrlkafnfhlaawllpsastqlqlasdtflfldaydegqlstdpesvelnckylgelfgyteadmsdpltrmgldmrvdrerirshphflnrllshfqyyeanlwceannrkqmrvphleeyyqsgavvtyelllerpllevvqhlpiqtvrdricndtyslglkeltngethnlivvrlnevctseleaidrlkdmhdrtvraevqgvkeklavalwadeirrlylvdaveiaimgnqrwaleagryvslegsivrag

## Gene sequence Sorangium cellulosum 'So ce 56' putative terpene cyclase :

ca. 38.073 KDa, 329 Aminosäuren

#### **Bisherige Ergebnisse:**

**In vitro conversion mit GPP:**  
Myrcene at RT ~ 7.05 min (IPB)  
Limonene at RT ~ 7.73 min (IPB)  
Pinene like at RT ~ 7.8 min (IPB)



### In vitro conversion mit FPP:

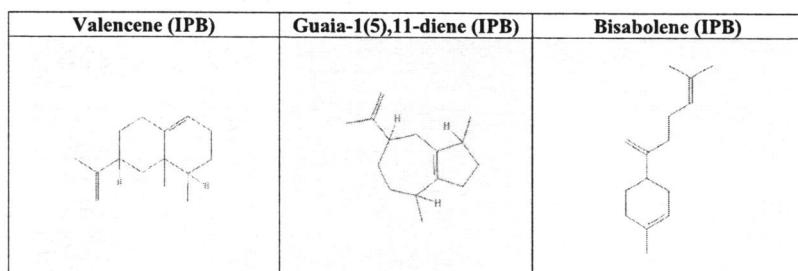
Valencene at RT ~ 19.583 min.

Valencene at RT ~12.45 min

Valencene at RT ~14.39 min. (IPB)

Guaia-1(5),11-diene at RT ~14.16 min. und 14.67 min.( IPB)

Bisabolene at RT ~14.56 (IPB)



Durchgeführt von/  
Performed by

Datum/  
Date

Bestätigt durch/  
Approved by

Datum/  
Dz.

Fortsetzung auf Seite Nr. /  
Continued on page number

**1) GeoA Soce 4636 Umsätze**

Keine Umsätze beobachtet.

**GeoA Soce 4636.**

hier hatten wir gar nichts gesehen. Aufgrund der Sequenzhomologie kann ich mir vorstellen, dass wir es hier entweder mit einer Squalen- oder Lycopin-synthase zu tun haben. Da könnte man Läufe von einer Stunde machen, um sicher zu sein. Ich würde mich freuen wenn Du die Terpensynthase noch mal mit FPP und GGPP überprüfst. Vielleicht hast Du ja Aufgrund der Sequenzhomologie noch eine andere Idee.

```
MNTSPHSSPSDHALAVRELVAELGRGGGLVSPSVDATVLMFDVFPGARASIVPW
LLDQQRSDDGGWGLSSVPRARDLPLTASLVALHPYRELTPQVRRACEGGLAFLRNQA
AHWETSLPDDIPVGLELLMPRLLDRASSLGLGVWDWGPYRALIALGERRRALIGKARP
AAGSAASHSWEGWGSGPSPDLDVSGGVGHSPAATAAWLHASRDVKVGLAAARAAA
REYLLRASDATEVGIPGVPTVWPIGRFQAWVLYALRAFDLDDHPRLGDVARPQLL
DLGAALRPEGIGMSDAFTQDGDTSTVIATLGELAAPRAIEALRRFERGGMFITYANEL
QPSLTNAHAMHALASRGEKASEPARYLLERQOPDGRWVGDKWHSSWLTTSQVIL
ALSHEGQLPAVKRGLEALLRAQRGDGGWGAGGAPTAACAYAVLALRAARRNREL
ESMARGAWRRGRDWLMSNHIDIGAGQEDLRWIGKELYCPARVDRAWVLGALLASQ
PSWES
```

ca 55 kDa, 511 Aminosäuren

Programme die wir benutzt haben.

The GC-MS measurements were performed on a Agilent 6890N (GC); Agilent 5973N (MS) instrument under the following conditions: EI 70 eV with a scan width of m/z 50-600, source temperature 250°C, column DB-5ms or HP-5-ms (both Agilent Technologies); injection temperature 250°C, interface temperature 250°C (200°C); carrier gas He, flow rate 1.2 ml/ min., constant flow mode; splitless injection, column temperature program: 50°C hold/for 0.5min, then raised to 320°C at a rate of 10°C/min and than hold 5min (which is in

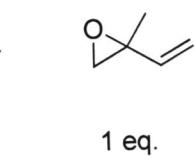
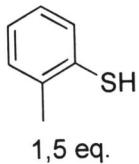
total 32.5 min.). All products were identified by comparison of their EI-MS spectra with those of the NIST MS search (V 2.0).

The GC-MS measurements were performed on a Agilent 6890N Network GC-System combined with a 5973 Network Mass Selective Detector and a DB-WAX column (0.25 mm x 0.25 mm x 30 m, J&W Scientific) under the following conditions: EI 70 eV, source temperature 200 °C; carrier gas He; injection temperature 250 °C, interface temperature 300 °C; flow rate 1.0 ml/min, constant flow mode; splitless injection, column temperature program: Start at 50°C, hold for 1 min, then ramp to 150°C, 4°C/min, ramp to 300°C, 15°C /min, hold for 5 min, then ramp to 50°C, 15°C/min. All products were identified by comparison of their EI-MS spectra with those of the National Institute of Standards and Technology (NIST MS Search 2.0).

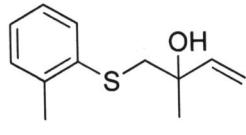
- Was ist WebOD-GGP-1-k?

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

WEBO 69



$\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}, \text{pH } 9, \text{ RT, 5h}}$



069

Detektion mit UV  
bei 254 nm

2-methyl-2-pentenoate  
ozone

MW	n	$\delta(\text{cm}^{-1})$	m	V
84,12	1 mmol	9857	84 mg	88 $\mu\text{l}$

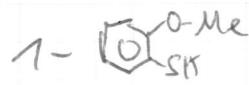
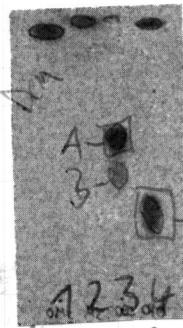
2-Methyl-thiophenol  
2-methyl-thiophenol

124,2	1,5 mmol	1054	1863 mg	177 $\mu\text{l}$
-------	----------	------	---------	-------------------

NaOH (5 N)

-250 $\mu\text{l}$	$\sim 1,5 \text{ mmol}$	250 $\mu\text{l}$
--------------------	-------------------------	-------------------

- 2-Methylthiophenol in  $\sim 3 \text{ ml}$  ddH<sub>2</sub>O gelöst und mit 250  $\mu\text{l}$  5 N NaOH auf ~pH 5 eingestellt
- Kolben und L. M. schütteln und mit N<sub>2</sub> begasst um Autoxidation des Thiols zu verhindern
- ca. 30 s nach Zugabe des Oxidans  $\rightarrow$  weiße Flockung
- DC-Kontrolle nach 2 h, 4 h in weiße Ölphase (schärfer als H<sub>2</sub>O-Phase (aber dass was bildet))

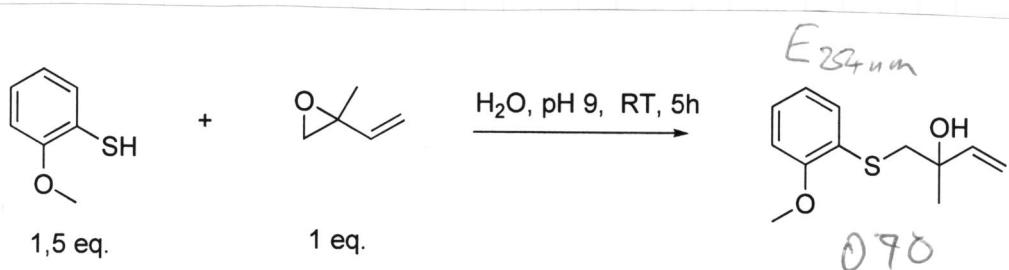


3-069 2h

4-678 2h

- nach 5 h  $\rightarrow$  Sizillation mit 3 x 10 ml Et<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  farblos  
wte Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $\rightarrow$  eingeschüttet  $\rightarrow$  klarer Öl

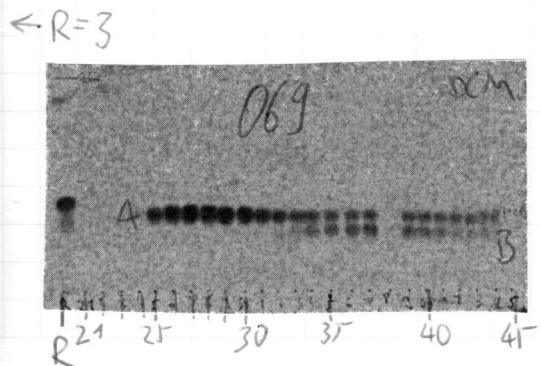
WEBO70



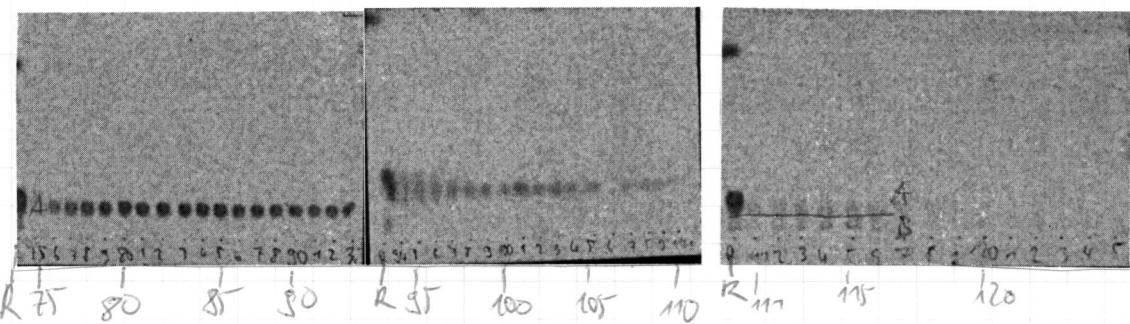
	MW	n	$\delta(\text{End})$	m	v
2-methyl-2-vinylol.	84,12	1mmol	0,857	84mg	58 $\mu$ l
2-methoxy-thiophenol	140,2	1,5mmol	1,152	210mg	183 $\mu$ l
NaOH (5N)		1,25mmol			250 $\mu$ l

- wie O69  
 ↗

- Beobachtung:
- gelblich-weiße Trübung nach Zugabe von  $\text{Pb}^{2+}$
  - ~~gelb~~ olföptische, weiß wie Milch
  - Extraktion 3x mit 15 ml  $\text{Et}_2\text{O}$  nach 5h
  - Hochvak. eingeengt → klar, gelbliches Öl
  - O69 und O70 gesäult mit DCM (Kieselgel) 09.11.11



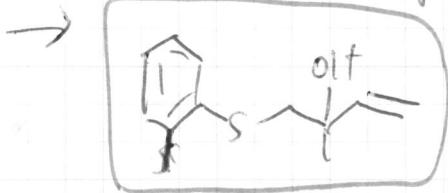
$\rightarrow$  36% yield       $\rightarrow$  phenolgruppe freud  
 $\rightarrow$  74 mg eines klaren Öls (WEBO69-A)  
 $\rightarrow$  MischBallkarten A + B  $\rightarrow$  WEBO69-AB  
 $\rightarrow$  B ist wahrscheinlich  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{OH}$   
 primär Alkohol

Säule WEB070

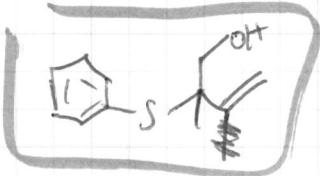
- nach Säulen Fraktion 70 - 109 bestimmt und ausgespielt
- 146 mg eines klaren Öles  
↳ 65% d. Theorie
- GC/MS-Analyse

WEB069-A

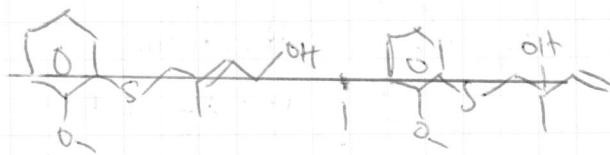
→ Struktur bestimmt durch NMR,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT

WEB063-D

→ Struktur durch NMR



## WEB071



Anschrift  
(WEB070)



WEB099-T

20% (w/w) Oxalsäure (anhyd.)  
in Hexan (~ 100 µl)



	m	n	
WEB069-T	20 mg	0,096 mmol	
Oxalsäure (20%) (anhydrous)	4 mg		
10 µl H <sub>2</sub> O			

→ Rühren bei RT ab 10 min für 3 L  
bei 120°C unter Rückfluss ab für 2 L

→ keine Kcr

→ + 50% (w/w) 85% Phosphorsäure (6 µl)

→ 1 h @ 120°C → roter Niederschlag am  
Kolben → DC

- rote NS wird in Hexan löslich
- bei Neutralisation mit NaHCO<sub>3</sub>-Lsg → Farbung N nach weiß
- NS in Hexan unlöslich, aber löslich in DCM
- jeder solldste Phasentrennung

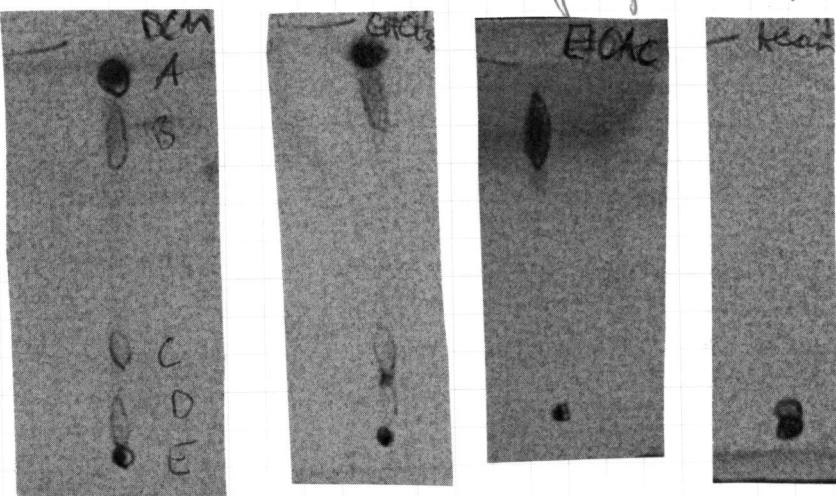
## WEB071\_1

- Hexan der Reaktion mit NaHCO<sub>3</sub>-Lsg gewaschen und abgetrennt

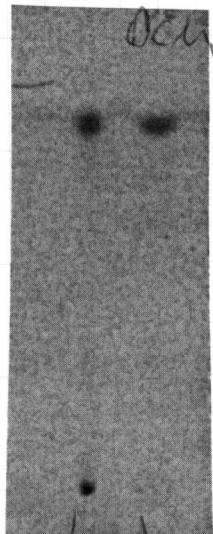
## WEB071\_2

- NS mit NaHCO<sub>3</sub>-Lsg neutralisiert und mit DCM getötet und in Scheidetriche wässrig Phase erhalten
- nur Phasentrennung BRINE ausgegeben
- ~~DCM~~ DCM-gehaltig abgetrennt → flüssiges Öl

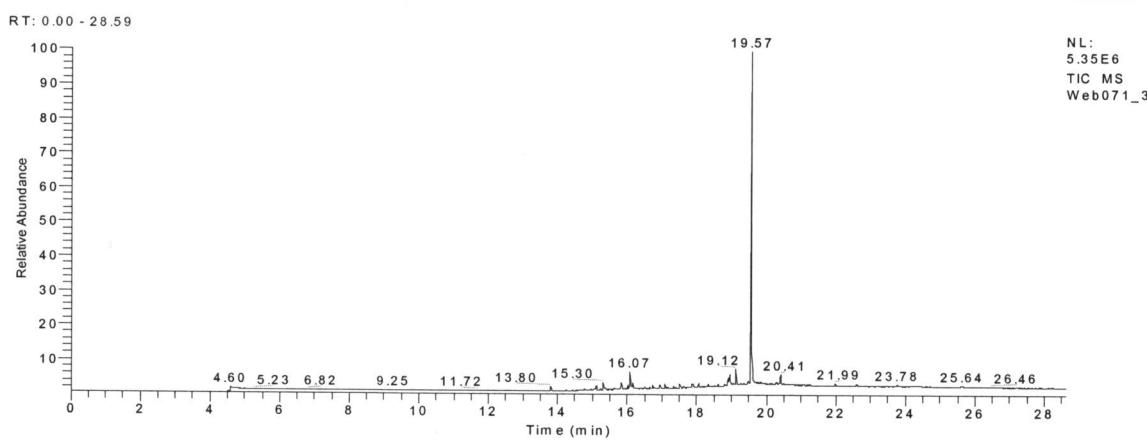
Carbontetrachlорid:



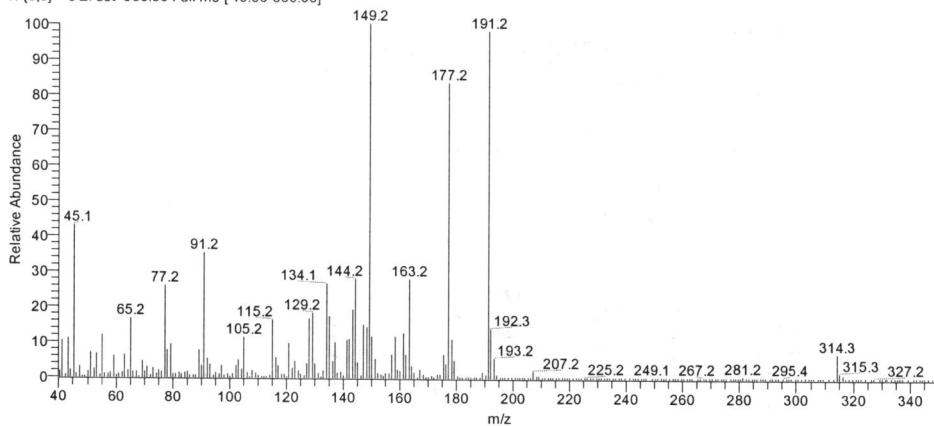
- versuch das Öl in MeOH  
unlöslich
- nicht löslich
- überstand → OC
- nur ein Produkt löst  
sich in MeOH
- GC/MS von Extrakt

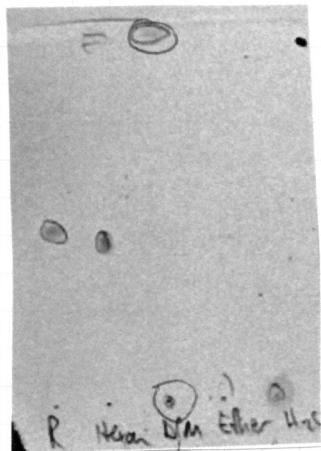
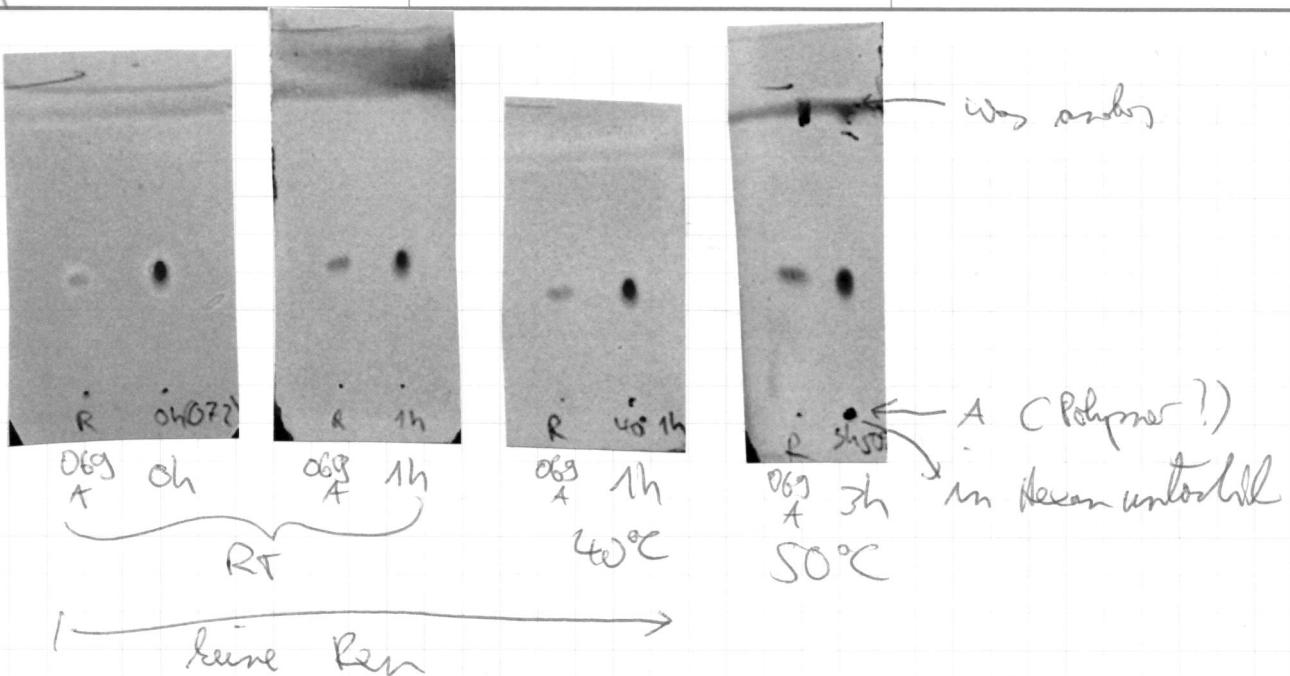


Eicheöl MeOH-Extrakt  
~~(OC)~~  
Web071-2



Web071\_3 #1535-1538 RT: 19.55-19.58 AV: 4 SB: 12 19.45-19.48, 19.69-19.76 NL: 2.38E5  
T: (0,0) + c El det=500.00 Full ms [40.00-600.00]

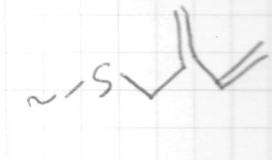
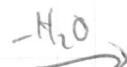
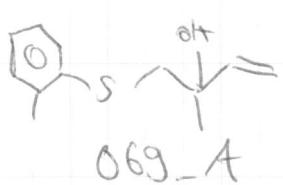




ur  
 Substanz  
 und wenn  
 Produkt C  
 löslich

- ~~DCM-Extrakt und Hexan extrahiert getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und eingepulpt~~
- ~~GCHS von DCM-Extrakt und Alkoholextrakt~~
- DCM-Extrakt nach eingepulpt  
 → weißer Feststoff  
 → lösen in MeOH → fällt als löslich) → zerfällt in Schälchen  
 ⚡ → überstand (MeOH-Lösung) abgesaugt  
 → gelb
- löslich in ~~CHCl<sub>3</sub>~~ CHCl<sub>3</sub> gelöst und ein rotgel.

WEB072

~~WEB~~

m

n

v

s

WEB069\_A

20mg

~20µl

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%)

10mg

5,5µl

in 10 ml Hexan

M, T End

→ bei RT röhren für 1h (bis 11<sup>30</sup>)

→ keine Produktbildung nach 1h

→ Erhöhung der Temperatur auf 40°C (ab 11<sup>30</sup>)

→ 1,5h Röhre bei 40°C → kein Produkt

→ erhöhen T auf 50°C → 3L Röhre

→ rote NS (Hexanunlöslich)

→ Hexan abgezogene und NS 2x mit 10ml Hexan gewaschen

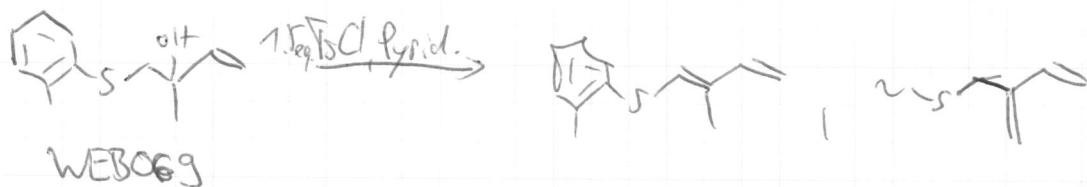
→ NS mit H<sub>2</sub>O gewaschen → Extraktiv fällt ein

→ NS löst sich mit H<sub>2</sub>O → neuextrahiert mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

→ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Phase 2x mit DCM & danach 2x mit Et<sub>2</sub>O  
10ml 10ml

extrahiert → DC von alle Phase





	n	m	v	M	f
WEB069	0,096 mmol	20 mg	18 µl	208	
Tosylchlorid	0,144 mmol	27,4 mg		190,6	
Pyridin			10 ml		

- WEB069 in Pyridin gelöst (trockne)
- TosCl zugegeben (in fester Form)
- Farbumschlag zu gelb
- 1L Röhren  $\xrightarrow{H_2O}$  entfärbung
- GC-MS von Reaktionsansatz
- 50 µl Ren + 100 µl Hexan + 100 µl  $N_2O$  2 Drüben
- verteilen, zentrifugieren
- UV abgesaugt → GC-MS WEB072-Ren
- Reaktionsmischung mit Petrol extrahiert → Petrol + Pyridin und wasserfrei
  - $H_2O$  zugegeben (restliches TosCl) hydrolysiert
  - Bildung von 2 Phasen (Pyridin/ $H_2O$  + Pyridin/Petrol)

- 3x und 15 ml Reagenz abholen  
↳ einreihen

~~H~~ ⇒ keine Bildung der gewünschte Produkte  
→

WEB074



070 a,b

Puffer für ADH-Assay

50 mM Natriumpyrophosphat

40 mM KCl

pH 8,9

$$c = \frac{b}{V}$$

WEB070\_AB

1 μl ≈ 1 mg ≈ 4,3 μmol

J005

Ansatz:

- 1 μl WEB070\_AB
- ~~500~~ μl Puffer ADH Sigma  
(340 U/mg) ≈ 1,5 mg
- ~500 U ADH
- ~~25~~ μmol (500 μl 0,025 M  $\text{NAD}^+$ ) MW = 663,432 μmol  
m = 8,3 mg
- 6,25 μmol  $\text{NAD}^+$   
↳ 270 μl eins 0,025 M SC 12,5 → 75,3 μl  
~~500 μl~~

→ Start mit Substratzugabe @ 14°

→ ADH fällt aus nach ~30 min → ☺

- weniger Substanz einsetzen → 1 μl Substanz in GC nach  
Etablieren → mit 20 Split  
→  $8 \cdot 10^7$  Signalintensität

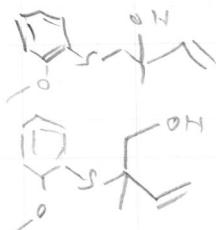
→ ~~0,01~~ 0,01 μl Substanz einsetzen (43 nmol)  
 $\sim \frac{43 \text{ nmol}}{750 \text{ ml}} = 57 \mu\text{l}$

- WEBO70 → 1:100 in EtOH dilution

### Ausatz 2

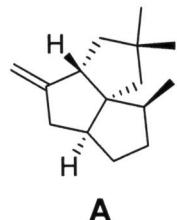
- 1 mg ADH
- 500 μl Buffer (50 mM NaPP, 40 mM KCl, 0,07 mM ZnCl<sub>2</sub>)
- 1 μl 1:100 WEBO70
- 250 μl 0,025 M NAD
- 2 h inkubiert
- GC MS - Analyse nach Etablierung
- keine Umsetzung!

995  
~~116~~ mg  
736 g/mol

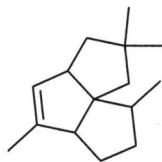
~~Stör~~Separation von WEB070-A+B

- keine Trennung bei DC (Silica) und CM DC M
- keine Trennung bei Flash-Chromatography
- Retentionsraten in GC unterscheiden sich wenig ( $< 0,05 \text{ min}$ )  
~~(DB-5MS)~~
- Verwertung (Oxidation mit  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  und Acetylierung mit Schlagschlägen)
- DC-Versuche mit Cellulose und PP-2
  - keine Trennung der Produkte (Cellulose Platte waren alt und schleife)

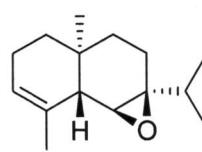
WEBOTS



ventricos-7(13)-en



pentalenan-Grundgerüst



eusedman-GG

**A** = Sesquiterpen aus *Lophozia ventricosa*, Ventricosan-GG**B** = dem Ventricaosan-Grundgerüst ähnelnde Struktur (Pentalenan-GG)**C** = Sesquiterpen aus *Lophozia ventricosa*

Ventricosan-Sesquiterpensynthasen → bisher noch nicht in der Literatur beschrieben

Alexander Otto fand Terpenoide mit Ventricosan-Grundgerüst in Extrakten von *Hygrophorus spec.*

Einzelne Kohlenstoffatome der Grundgerüste waren oxidiert zu Alkoholen und Säuren.

→ Frage: - Existieren Ventricosyl-Sesquiterpensynthasen in *Hygrophorus spec.*?  
 - Existieren (Cytochrome P450) Oxidasen in *Hygrophorus spec.*?

→ An AO: - wurden reduzierte Ventricosan-GG bei headspace GCMS-Messungen gefunden?  
 - Werden die neuartigen Terpenoide gewebsspezifisch hergestellt?

1. Gesamt-RNA Isolierung aus *Hygrophorus spec.* (*penarius*)

2. cDNA-Synthese mittels Oligo-dT-Primern  
 [RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)]

1. direkt mRNA Isolierung → Invitrogen DynaBeads?

2. cDNA-Synthese mittels  
**oligo-dT-Primern**  
 oder **Hexameren**  
 oder **degenerierten Primern**

3. Amplifizierung der cDNA mittels PCR und **degenerierten Primern**

3 Primer benötigt:

Hsp-TPS-fw1 5'-AGY CTI GAR AAR GTR gTR-3'

↳ 32-x degradiert

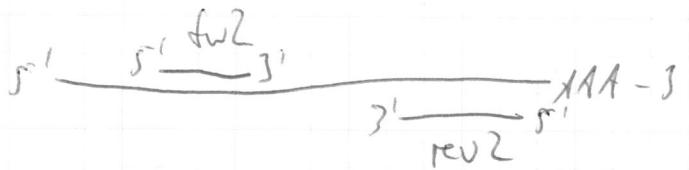
→ rev. → **oligo-dT** Prime

5' → AAA-3'  
 ← TTT-TT

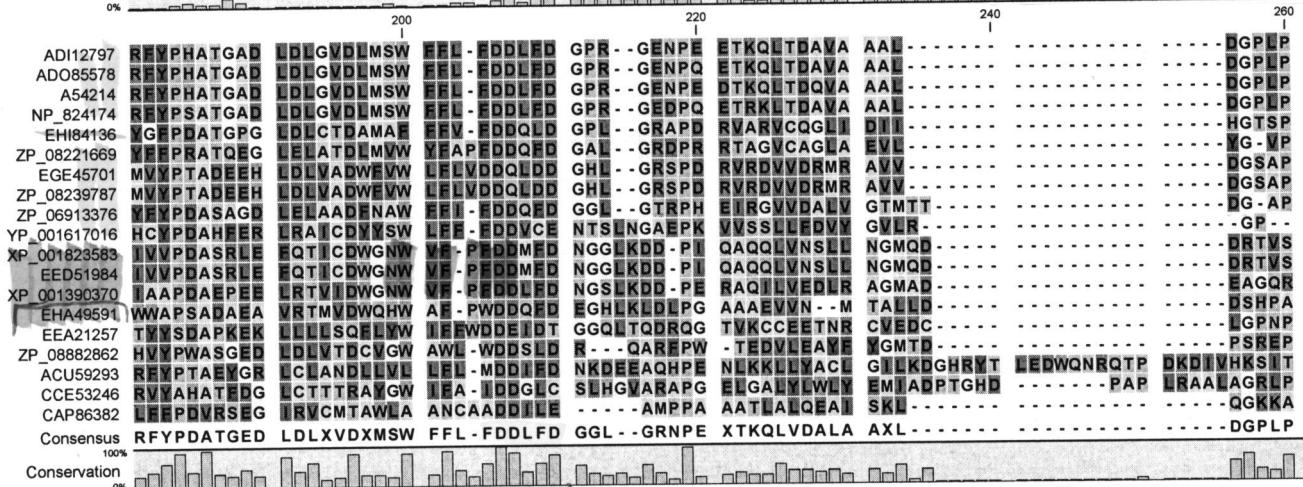
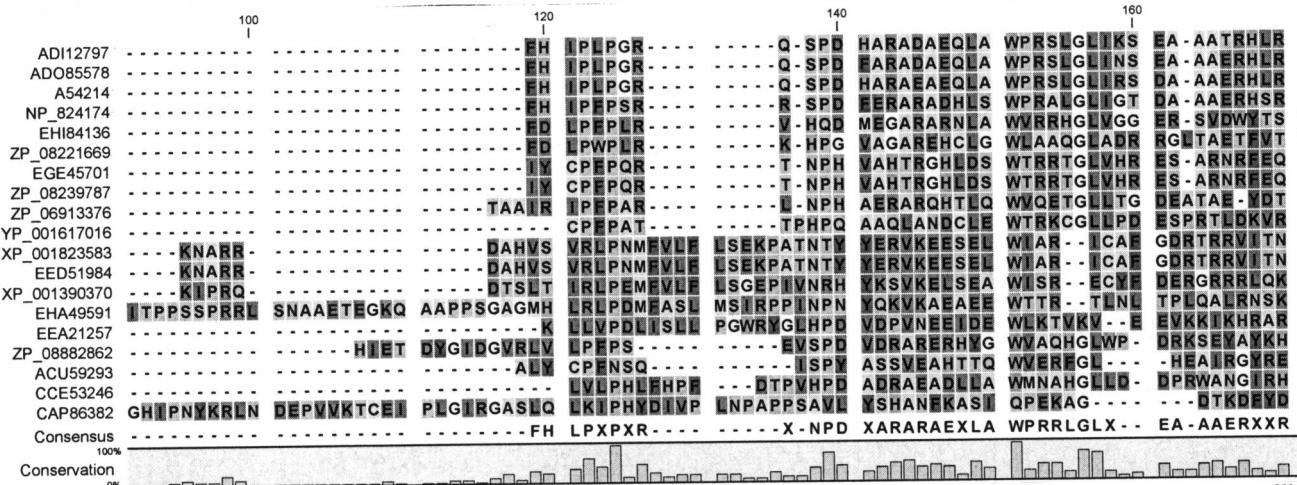
F    D    D    X    D    X

Hsp. TPS-fw2: 5'-TTT GAY GAY (wl) GAY G<sup>3'</sup> -3'

Hsp. TPS-rev2: 5'-YTC YTC YTC YTC NAG RCT -3'



Alignment von 19  
Pentalonen synthasen (partiel)  
→ für Rime design



- P keine Information in der Literatur über Centriolar-synthasen → Pentalonen synthase aligned Rime design

Aspergillus      Steptomyces

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



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

Primer Hsp. TPS-fw2 → failed designed  $\rightarrow$  bimimicaine response  
FDD $\times$ D $\times$  and half FDD $\times$ D $\times$

## Consensus Sequenz 1:

$$\rightarrow \text{WF} \cancel{\text{DD}} \times (\text{FL}) \text{ DD} \times (\text{DD} \times \text{DD} - \text{Metho})$$

$\downarrow$                        $\downarrow$   
 $(Q, L, M)$        $(S, N)$   
 $\downarrow$                        $\curvearrowright$   
 $L \approx Q > M$        $S \gg N$

Derner

~~FBI~~ D D QLM F  
TTY GAY GAY MWI TTY

$$\begin{array}{l} Q \rightarrow CAR \\ L \rightarrow CTN \\ M \rightarrow AT\cancel{T}g \end{array} \quad \left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} MW \quad 2 \times 2 \times$$

$f \rightarrow \text{██████}$

$$W \rightarrow TGG \quad \left. \begin{matrix} \\ F \rightarrow TTY \end{matrix} \right\} TKB \quad 3 \times 2 = 6$$

F,W D D QLM F D288  
5'-TKB gAT GAT MWI TBY gAT(7)-3'  
↳ Primer-fw 3 ↳ 192 fad

Primer fw #3:

AA-Seq (F,W) DD(C,Q,L,M) F D

→ 5'-T<sub>K</sub>B GAYGAY MWI TTY gAC(Y)-3'  
→ 192-x degenerate

F DD(C,Q,L,M) FD

5'- TTY GAYgAY MWI TTY gAC(Y)-3'  
→ 64-x

versus 2

→ NDILSY (res 38)

→ N D I L S Y

5'-AAY GAY ATH YTI TCI TAY-3'

$$2 \times 2 \times 3 + 2 \times 1 \times 2 = 18x$$

Primer rev 3:

5'- RTA IGA IAR DAT RTC RTT-3'

Primer-fw 4:

5'- AAY GAY ATH YTI TCI TAY-3'

codon       $5' \rightarrow 3'$  ATT mRNA       $\rightarrow$  AA-Sequenz  
 $3' \leftarrow 5'$  TTT cDNA

0869282890

modified oligos x,t mose

5' → 3' from A (cDNA)

3' - 5' Prime B (mRNA) (oligo-dT)

Bone A

$$g_i \leftarrow f$$

Conversus 1 (P) DD ~~X~~ F D<sub>x</sub> (§ 1, N) per (ago)

consensus 2  $w(F_1 Y) F$

$$\begin{array}{l} G \rightarrow ggN \\ A \rightarrow gcN \\ N \rightarrow AA[cc] \end{array}$$

RVN

Primer A-1: 5' GATC GAY CWN GAY GSN - 3'

$$Q \rightarrow \begin{array}{c} \text{CAT} \\ \text{CAG} \end{array} \quad \left. \begin{array}{c} \text{C} \\ \text{AUJ} \end{array} \right\} \text{N} = \text{CWN}$$

Primer A-2:  $2 \times 2 \times 8 \times 2 \times 8 = 512$   
5' - UGG GAGU UU

$$F \rightarrow \text{UN}(HC) \rightarrow \text{UN}Y$$

$$T \rightarrow \text{UN}(HC) \rightarrow \text{UN}Y$$

F D D x D (G4)  
HUY GAY SAY CWNH GAY GS

$$2 \times 2 \times 2 \times 8 \times 2 = 128$$

2      1      8      2

2 = 64

NDE / DATE

QX

Dinner 8

Answers 1      SLEKE (peri 250)  
100% 62 97 87

10

5' - A G Y C U N (1) S A R A A R G A R - 3'      3'

$$2 \times 4 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2 = 128$$

(1)

= 32

2

## Test 1:

Form A:

5'-AGT C~~T~~N GAR AAR GARGAR-3' → 128A  
 (1) Tm → 32-X

Issue 2

$\text{5}'$   $\text{5}'$  Prime A  $3'$   $3'$  Prime B  $5'$   $5'$  Prime C

Point A:

$S^1 - \text{ATGAYGAYGAYCWL GAYGS-3}' \rightarrow 64x$

Primer B: ~~5'-RAG RAG RAA RAG NTC(YGA-3')~~  
~~5'-NTC YTC YTT YTC NAG RCF-3'~~

R degenerative Primer Sequenzen (29.11.11)

29.11.11

① Hsp. TPS1-fw1 5'-AGY CTI GAR AAR GAR GAR-3'

AS → S L E K E E  
 ↳ rev. → Poly dT

② Hsp. TPS1-fw2 5'-TTY GAY GAY CWT GAY GS-3'

F D D (Q,C) D X

Achtung! ↳ Primer zu kurz, da eine Aminosäure fehlt → Brine für DDxD statt für DDxD

③ Hsp. TPS1-rev2 5'- YTC YTC YTT YTC IAG RCT-3'

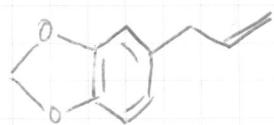
02.12.11

④ Hsp. TPS1-fw3 5'-TTY GAY GAY MWI TTY GAY-3'  $T_m =$

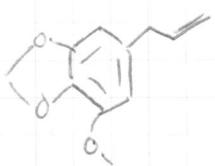
⑤ Hsp. TPS1-rev3 5'- RTA IGA IAR DAT RTC RCT-3'

⑥ Hsp. TPS1-fw4 5'- AAY GAY ATIT YT1 TCI TAY-3'

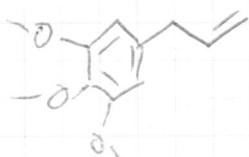
↪ revers ⇒ poly dT Primer



Sabinol

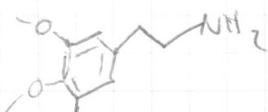
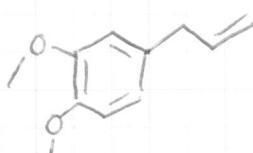


Myristicin



Clavanin

↳ para-Methylfet

Norephedrine  
(Kalkan)

Methyl-Eugenol

Vokonine: ~~Campherol~~ [Kamtsbaum  
Gans Holz (*Cinnamomum camphora*)]

↳ Sassafrasbaum (Früchte und Wurzelrinde)

↳ Muskatnuss → (*Sassafras albidum*)  
(*Myristica fragrans*)

↳ Echtes Robiniepfeffer (Filipendula ulmaria)  
→ gewöhnliche Robinie (*Robinia pseudoacacia*)  
Piperonal

→ weiche p-Menthylpropanoide

### Methyldiindolyl Sonnig CYPs

- CYP21Q1      }      (Sesamin - Lidocaine)

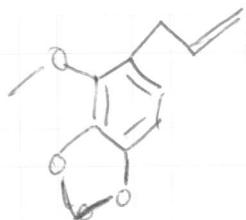
CYP21Q2

CYP21Q3

- CYP71A1-3      (Echinochloa californica)

- CYP80B719      (Coptis japonica) (Canaderidin Lidocaine)

- CYP719A14      → Stylopine Lidocaine



aus dem Äth. Öl der *Crociæ saligna*  
(Rote Wachsblume)

### Croscin

- *Piper auritum* → bis 80% des äth. Öls (Blätter) enthalten
- *Piper methysticum* → ~~Meritain~~ Methylsticin und analoge (Klonine)

RNA-Isolation aus *Hygrophorus penarius*

→ RNeasy Mini Kit von Qiagen

Tiefgefrorener (-20°C), circa 2 Monate alter, adulter *H. penarius* als Ausgangsmaterial.

- RNA-Extraktion aus:
1. Hut
  2. Stiel
  3. Lamellen/Sporen

Maximale Menge an Ausgangsmaterial für Kit → 100 mg bei filamentösen Pilzen

1. 50 mg Ausgangsmaterial von jedem Gewebe verwenden (**gefroren abwiegen, nicht auftauen!**)

*(+Lamelle)*  
*RNA-Extraktion aus Hut und Stiel*  
*von *H. penarius**

1. RNeasy Plant RNA Extraction Kit

1. Material in flüssigem N<sub>2</sub> mit Mörser und Pistill (**alles vorkühlen**) zermahlen  
→ in RNase-freies 2 ml Tube überführen und N<sub>2</sub> abdampfen lassen
2. 450 µl Lysispuffer (**RLC** für filam. Fungi empfohlen; RTL ausprobieren?) zugeben und vortexen
3. 1-3 Minuten @ 56°C inkubieren
4. **Homogenisierung:**
  - Lysat auf QIAshredder-Säule auftragen und Säule in 2-ml Tube setzen
  - Für 2 Minuten bei max. rpm zentrifugieren
  - Überstand des Durchflusses in neues 2-ml Tube überführen
5. 0.5 Volumen Ethanol (96-100%) zum klaren Lysat geben und durch Pipettieren mischen
6. Probe (und evtl. NS) auf RNeasy spin Säule geben und in 2-ml Tube stecken  
Deckel schließen und 15 s bei >8000 x g (>10.000 rpm) zentrifugieren  
Durchfluss verwerfen
  - **DNase Verdau**
  - a) 350 µl Puffer RW1 auf Säule geben, Deckel schließen und 15 s bei >8000 x g zentrifugieren (Waschen); Durchfluss verwerfen
  - b) 10 µl DNase I stock solution zu 70 µl RDD Puffer geben. Mischen durch invertieren.
  - c) 80 µl DNase I Mix auf RNeasy Säule geben und 15 min bei RT inkubieren
  - d) 350 µl Puffer RW1 auf Säule geben, Deckel schließen und für 15s bei >8000 x g zentrifugieren. Durchfluss verwerfen
7. 500 µl Puffer RPE auf Säule geben. Deckel schließen und für 15 s bei >8000 x g zentrifugieren.  
Durchfluss verwerfen.
8. 500 µl Puffer RPE auf Säule geben. Deckel schließen und für 2 Minuten bei >8000 x g zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.  
*Optional:* Säule in neues Tube stellen und für 1 min @ max. rpm zentrifugieren um Membran von Puffer und Ethanol zu befreien.
9. RNeasy Säule in neues 1.5 ml Tube stellen und 30-50 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O auf Säule geben.  
Deckel schließen und für 1 Minute @ > 8000 x g zentrifugieren um RNA zu eluieren
10. Wenn die erwartete RNA-Ausbeute >30 µg → Schritt 9 wiederholen (in ein neues Tube eluieren).

RNA-Konzentration ( $E_{260}$ ) - Quotienten 1:35

	Hut-RNA	Stiel-RNA
$E_{260}$	0,064	0,067
c ( $\mu\text{g/ml}$ )	91	94,5

RT-PCR → Synthesen Eppi

o Kit "Revert Aid Rnase Inhibitor 1st Strand cDNA Synthesis Kit"

o in Stielrn 1,5 ml Eppi auf Eis

## 1. Folgende Sachen in Tube geben:

		Zugefügt?
Template RNA	0.1 ng – 5 $\mu\text{g}$ Gesamt-RNA aus 1)	10 $\mu\text{l}$
Primer	Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer	1 $\mu\text{l}$
Wasser	ad 12 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$

Wasser

2900  $\mu\text{l}$ 

2. Optional. RNA welche GC-reich ist oder 2nd Strukturen ausbildet kurz invertieren, zentrifugieren und für 5 min bei 65°C inkubieren. Danach auf Eis, spin down, auf Eis.

3. Folgende Sachen in der angegebenen Reihenfolge zugeben:

a. 5x Reaction Buffer	RT Buffer	4 $\mu\text{l}$
b. RiboLock RNase Inhibitor (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )		1 $\mu\text{l}$
c. 10 mM dNTP Mix	Revert Aid Rnase Inhibitor Mix	2 $\mu\text{l}$
d. RevertAid H- M-MuLV Reverse Transcriptase (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )		1 $\mu\text{l}$
Total Volume		20 $\mu\text{l}$

4. Invertieren und zentrifugieren.

5. Für oligo (dT)<sub>18</sub>-Primer 60 min bei 42°C inkubieren

Bei GC-reichen RNAs Reaktion bei 45°C

6. Reaktion stoppen durch Inkubation bei 70°C für 5 Minuten

→ RT-PCR Reaktion mit flüssigem N<sub>2</sub> einfrieren und bei -80°C lagern

Beschriftung Eppi: RT-Rn H. pen Stiel Hut

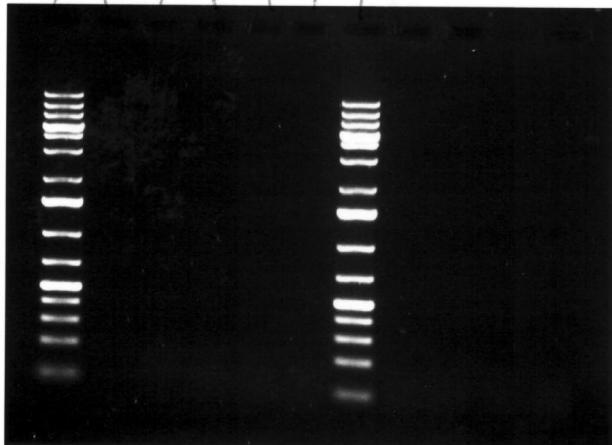
1 2 3 4  
Stiel / fw 1/dt fw 4/dt

Touch-Down PCR mit RT-Produkt Haut

template (RT-Rn) 2 µl ♂  
 dNTPs (20mM) 1 µl ✓  
 2x Puffer (Pfu + MgSO<sub>4</sub>) 5 µl ✓  
 100µM Prime (fw1) (fw2) 0,5 µl → 1 µl final ✓  
 100µM Irene (rev1)(odd) 0,5 µl  
 35U/ml Pfu Polymerase 0,25 µl ~ (1,25U / 150 µl)  
 ddH<sub>2</sub>O 40,5 µl

↓ Gel

M - H1 H2 H3 H4 M - S1 S2 S3 S4



M - H1 H2 H3 H4 M - S1 S2 S3 S4

12.12.2011 18:56:43

Enhancement: 1

Exposure Time: 613

Brightness  
Contrast  
Gamma

	template	Prime (siehe S.184)
H1 -	Haut	① ; (dT) <sub>18</sub>
H2 -	"	② ; ③
H3 -	"	④ + ⑤
H4 -	"	⑥ <sup>L</sup> (dT) <sub>18</sub>
S1	Skiel	⑦ ; (dT) <sub>18</sub>
S2	"	② + ③
S3	"	④ + ⑤
S4	"	⑥ + (dT) <sub>18</sub>

↳ 2te Touchdown PCR  
mit 1ste Reaktion  
als Template

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

Touch down PCR-Programm (Net Prot., 3(9), 1405 (2008))Phase 1

1. Denat	95°C	3 min	
2. u	95°C	30 s	
MS	60°C	53°C	45 s
3. Anneal			(-1K pro Zyklus)
4. Elong	72°C	1:30 min	

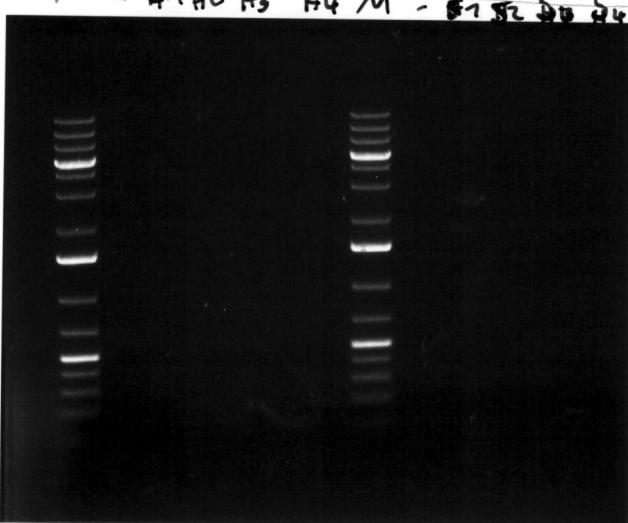
Phase 2

5. Denat	95°C	30 s	Primer ①, ②, ③
X20	95°C	40 s	Primer ④, ⑤, ⑥
6. Anneal		45 s	
7. Elong	72°C	1:30 min	
8. Elong	72°C	5 min	
9. Hold	4°C	15 min	
10. Hold	23°C	∞	

PCR auf PCR

50 µl Gesamt

Template (1ste PCR)	2 µl	Programm wie ob
10 mM dNTPs	1 µl	
10x Pfu Buffer	5 µl	
10 µM fw Primer	1 µl	
10 µM rev Primer	1 µl	
Pfu Polymerase + ddH <sub>2</sub> O	1 µl	
	39 µl	



13.12.2011 16:22:18

Enhancement: 0

Exposure Time: 613

C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pflanzenbio\Desktop\WEE

Brightness: 64

Contrast: 50

Gamma: 25

- kein Poly
- kein Amplifizierung
- ist DNA im Ansatz
- andere Polymerase (Taq → höhere Prozess)
- unspurtsche PCR versuche

- RNA-Hybrid
- cDNA als Template für normale PCR
  - ① Taq Dream) als Polymerase
  - ② Template Menge veränder (1, 2, 5 µl)

PCR Ansätze

	Volume
Template (cDNA)	1,2, 5 µl (Nur oder statt cDNA)
dNTPs (10 µM)	1 µl
10x Dream Taq Buffer	5 µl
DNA Polymerase (Pw) (rev)	je 1 µl
Taq (1 µl Taq Dream)	0,5 µl

10 Reaktionen

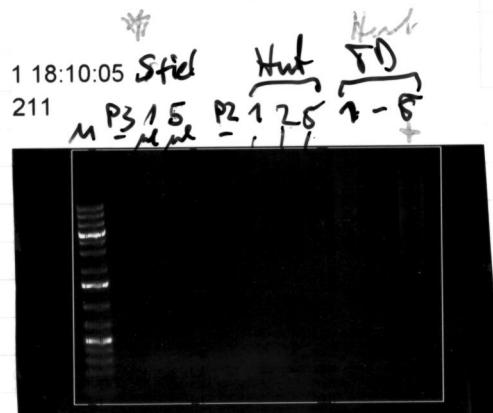
Reaktionen		cDNA	Primer	Template (μl)	cDNA	Primer	Template (μl)
1	Hut	② ③		1 μl	7	Stiel	④ ⑤
2	Hut	"		2	8	"	"
3	"	"		5	9	"	"
4	"	"		1	10	"	"
5	"	"		?	11	"	"
6	"	"		5	12	"	"

→ Negativkontrollen und OB; OD ohne Template

Gradient RT Touchdown PCR  
(S. 190)

PCR-Programm

	Temp	Zeit
①	94°C	3 min
②	94°C	30 s
35x	③ 40°C ④ 45°C	30 s
⑤	72°C	1:30 min
⑥	72°C	5 min
⑦	4°C	10 min
⑧	RT	∞



- nicht spezifisch
- nur Schlieren, welche sehr groß (> 5 kB) mit

→ nochmal RT PCR auf Produkte (TDSpl und SphI spl)

<u>26x Marker mix (ohne template)</u>	<u>+ Primer-Marker mix (6x)</u>
dNPs (10 mM)	26 µl
Dream Tag-buffer	123,2 µl
Dream Tag DNA Pol	13 µl
ddH <sub>2</sub> O	100 µl

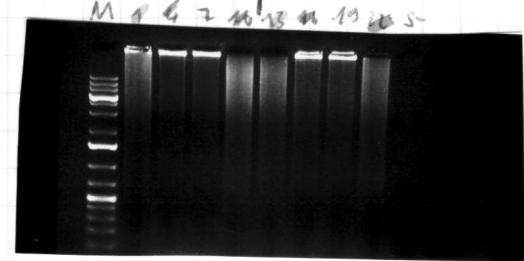
→ PCR-Anreih:

- 47 µl Prime-Marker mix
- + 3 µl Template

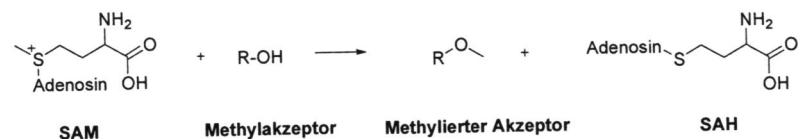
### Primer paar

- ① - Hsp.TPS1-fw2 / -rev2
- ② - Hsp.TPS1-fw2 / Olgo dTP<sub>3'</sub>
- ③ Hsp.TPS1-fw3 / -rev3
- ④ Hsp.TPS1-fw3 / Olgo dTP<sub>3'</sub>

$$\begin{aligned} 1-1L \rightarrow \text{Template} &= TDSpl + \\ 13-24 \rightarrow n &= SphI spl \end{aligned}$$

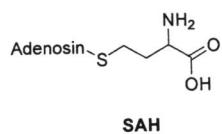


WEB077

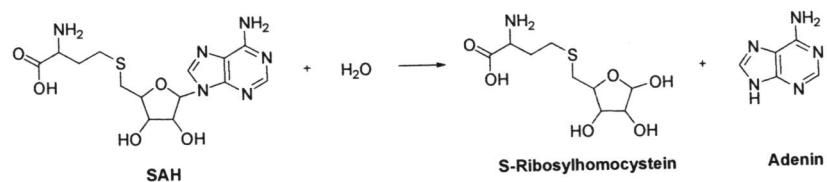
(Methyl)transferase-Assay

Universelles Produkt:

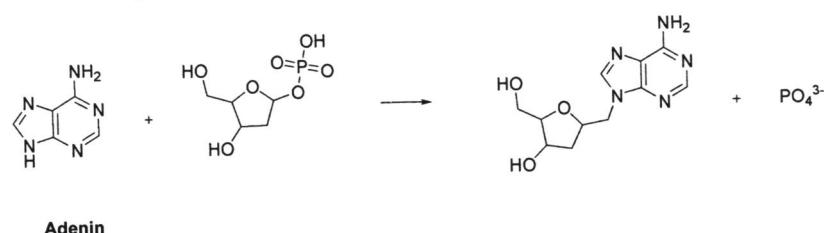
- S-Adenosylhomocysteine



SAH als Substrat von Enzymreaktionen:

**EC 3.2.2.16 - methylthioadenosine nucleosidase (aus E.coli)**

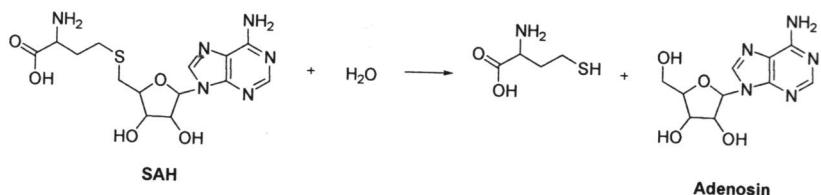
→ Adenin detektieren? (Xanthinhydrogenase, NAD abhängig, Fe/S-Enzym)

**EC 2.4.2.1 - purine-nucleoside phosphorylase (Bos taurus)**

Adenin

Deoxyribose-1-phosphat kostet ~180€/5mg (Aldrich)

→ Zuckerbestimmung?

**EC 3.3.1.1 – adenosylhomocysteinase (Eubakteria)**

Adenin:

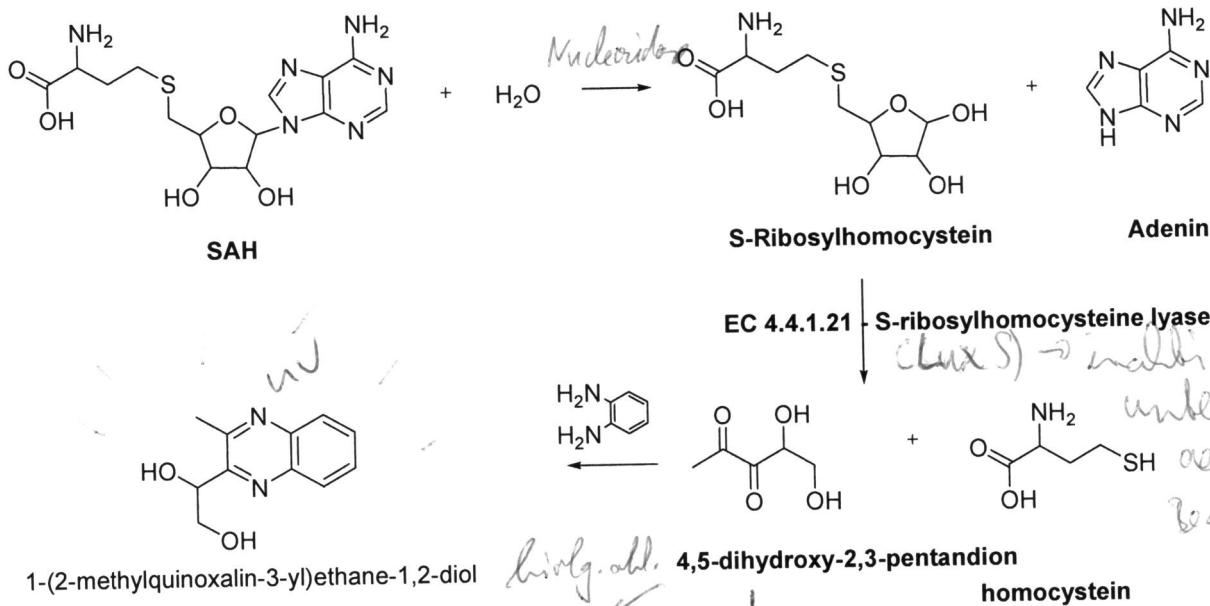
Substrat	Produkt	Enzym	Organismus
nicotinic acid mononucleotide + adenine	7-alpha-D-ribofuranosyladenine 5'-phosphate + nicotinate	EC 2.4.2.21 - nicotinate-nucleotide-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase	<u>Clostridium sticklandii</u>
adenine + NAD <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O	? + NADH	EC 1.17.1.4 - xanthine dehydrogenase	<u>Chlamydomonas reinhardtii</u>
adenine + H <sub>2</sub> O	hypoxanthine + NH <sub>3</sub>	EC 3.5.4.2 - adenine deaminase	E. coli, B. subtilis etc.

Xanthin dehydrogenase/oxidase:

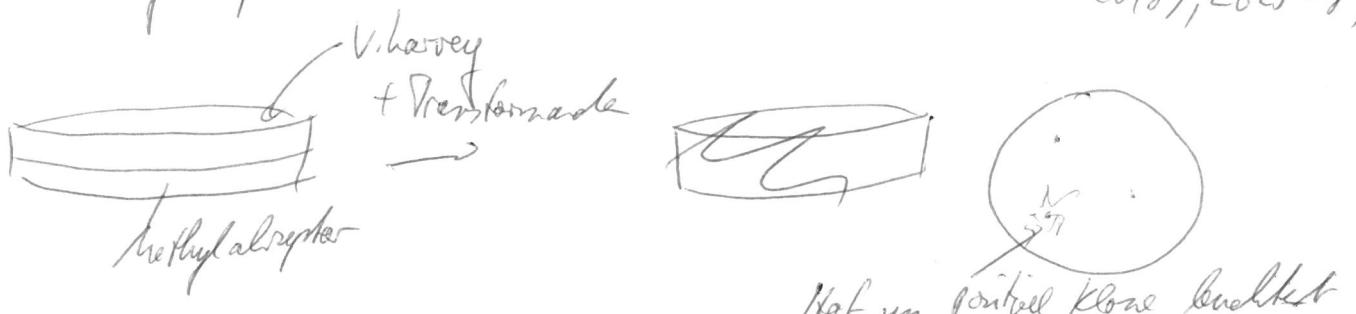
Xanthin dehydrogenase (XDH, NAD dependent) kann in Xanthin oxidase (XO, O<sub>2</sub> dependent) umgewandelt werden (*The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280, 24888-24894.).

Substrat	Produkt	Enzym	Organismus
hypoxanthine + NAD <sup>+</sup> + H <sup>+</sup> + O <sub>2</sub> -	xanthine + NADH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	EC 1.17.1.4 - xanthine dehydrogenase	B. subtilis

↳ HRP - gekoppelter assay mit XDH



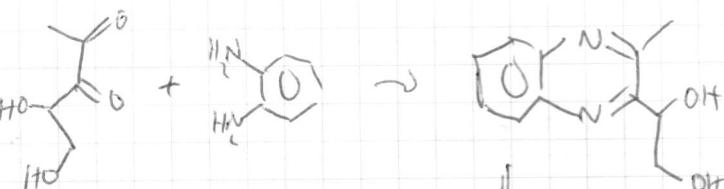
E. coli (ant Nucleoside, hydrolase und Metabolismus)  
auf Medium mit Methylalgeptor



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

## WEB OTT

- Modellreaktion für



↓  
UV-absorption bei

Versuchsdurchföhrung

1 µM Diacetyl - 10 mM Diacetyl (Beides in  
+ ~~10~~ mM Phenylendiamin 50 mM K-Phosphatpuffer pH 7)

- Reaktion in 1 ml Gesamtvolume

→ 800 µl Diacetyl - Lösung

+ 200 µl Phenylendiamin - Stammlsg. (10 mM)

↳ 2 mM Phenylendiamin in Ansatz

Diacetyl-Stammlsg

⇒ blank = kein Diacetyl!

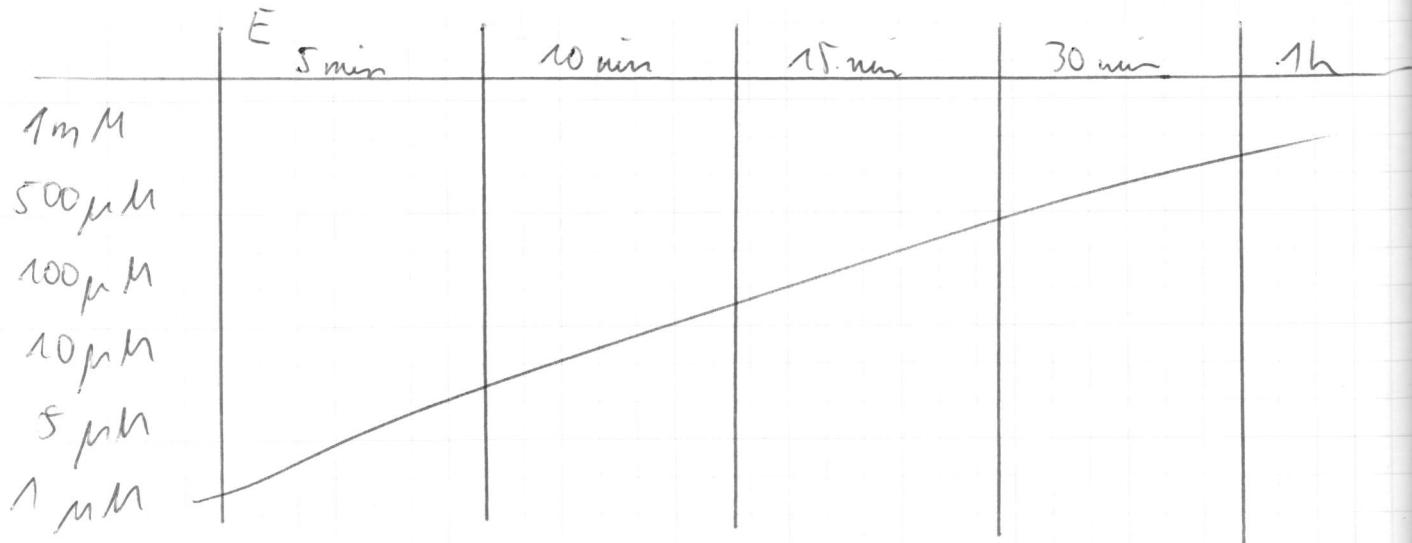
100 mM - Stammlsg

VD

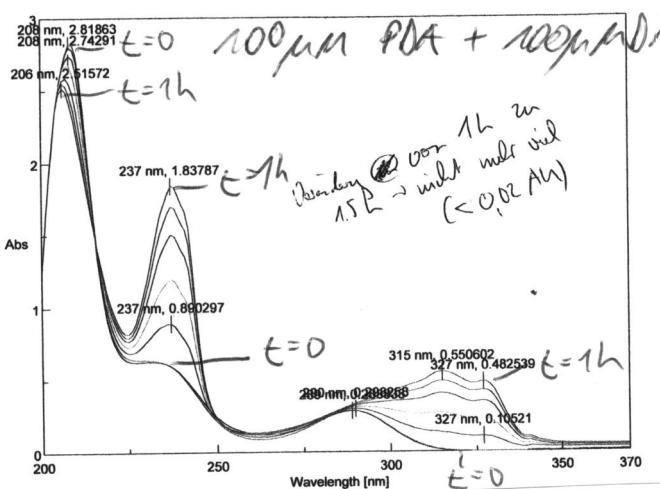
1 mM	(1:100)
500 µM	(1:2)
100 µM	(1:10)
10 µM	(1:10)
5 µM	(1:2)
1 nM	(1:10)

V(Diacetyl)	N(Puffer)
20 µl (100 mM)	1980 µl
500 µl (1 mM)	500 µl
200 µl (1 mM)	1800 µl
" (100 µM)	- "
500 µl (10 µM)	500 µl
200 µl (10 µM)	1800 µl

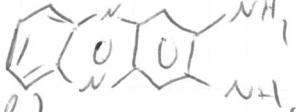
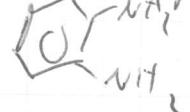
→ Diacetyl + Phenylendiamin zusammengebr.  
→ Extinktion messen ( $\lambda = \text{nm}$ )



- UV-VIS-Spektrum am Jasco (200 - 600 nm)
  - 1 mM Diacetyl in KPi-Puffer (10 mM, pH 7)
  - UV → gute Sichtbarkeit (hell)
- 1 mM Phenylendiamin in KPi-Puffer
  - zu große Absorption ( $\lambda > 300$ )
  - normal messen mit 100 μM
- auch 100 μM Phenylendiamin mit 100 μM Diacetyl



10.01.2012

- Ausfällen von ~~wollen~~ Nadeln aus wenig Phenylendiamin / Diacetylgly.
- abspült und mit dd H<sub>2</sub>O gewaschen
- schlecht löslich in Chloroform, Toluol und Wasser
- EI mass → 210 mn (sichtbar in positiven ( $M+H$ )<sup>+</sup> und negativen Modus ( $M-H$ )<sup>-</sup>)
- Nacharbeitung
  - ↳ Sammelformel C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>
  - NMR in ~~dd~~ MeOD gemessen
  - wahrscheinlich
  - starke Fluoreszenz (gelb)
- ↓
- hergestellt durch  
Oxidation von ~~ddt~~ mit HRP nach  
WITTENBERG et al., Anal. Biochem. 165 (1987), 28-33
- oxidationsprodukt von
- 
- 
- 1 g DDT
- 1,1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)
- in 50 ml H<sub>2</sub>O (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer 50 mM pH 7)
- + 1 Spatelspitze HRP (Chloophyllinest.)
- ↳ abgespult
- über Nacht geruht bei RT → braune Honig
- ↳ Säule doppelt → mit DCM / MeOH (15:1) gespült
- ~~abspült~~ - einwirkt → wie hergestellt geword?

- S-ribosylhomocysteine Lyase (Rxs) ist ~~stark empfindlich~~  
Fe-Enzym. (Pei Z, et al. Biochemistry 2003, 42, 4777-4786)
  - schlecht für Assay
  - anderes Assaysystem angebracht
  - besser gekoppeltes System mit Cobain Detektion  
Bryant JK, Phytochemical Analysis, 5 (1994), 286-290

