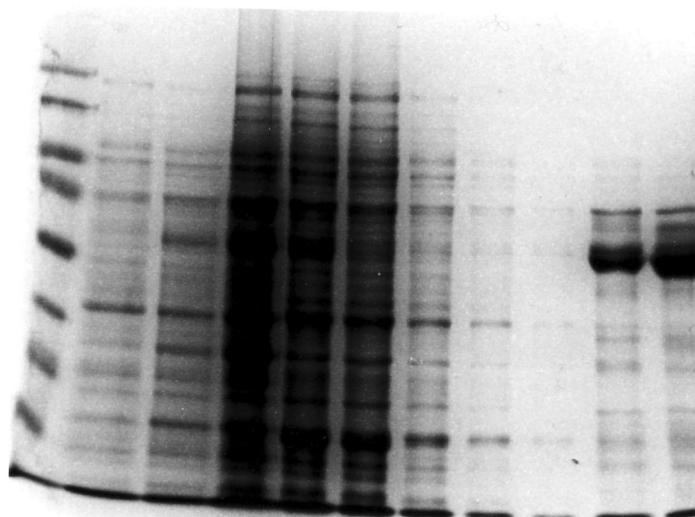


24.09.2012 11:12:41

Enhancement: 1 Brightness: 65
Exposure Time: 1774 Contrast: 52
Gamma: 36

Colony PCR
pET28a (P)ERT + phoB
Doppeltransformante

O:\ABT\NWC\Weigel_WEB\BioDoc\120828_Luxs&SA
HH.TIF



06.12.2012 09:37:47

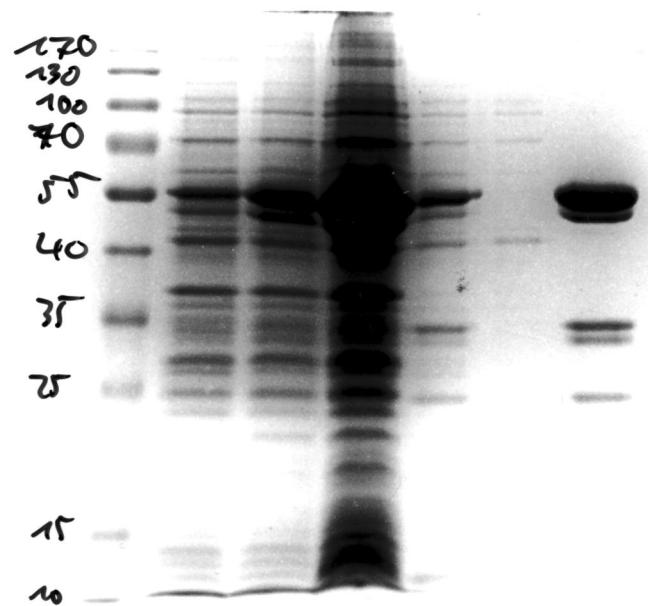
Enhancement: 1
Exposure Time: 45

Brightness: 50
Contrast: 50
Gamma: 25

Gamma: 25

Muscle - stiffness
Contractant
Contractile
Contractile tissue
Post-tend.

C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pflanzenbio\Desktop\WEB\120727 SDSGEL MTAN.TIF



28.08.2012 16:30:40

Enhancement: 27 Brightness: 50
Exposure Time: 50 Contrast: 50
Gamma: 25

27.07.2012 14:24:25

Enhancement: 5 Brightness: 57
Exposure Time: 40 Contrast: 74
Gamma: 25

54H14

170
130
100 vof
70 85v
55 60
40 85
35 ET
25

27.07.2012 14:20:30

Enhancement: 0
Exposure Time: 40

MAN

Brightness: 50
Contrast: 62
Gamma: 25

25.05.2012 18:39:31

Enhancement: 43
Exposure Time: 581

Brightness: 67
Contrast: 72
Gamma: 25

MAN

27.07.2012 14:20:30

Enhancement: 0
Exposure Time: 40

Brightness: 50
Contrast: 62
Gamma: 25

E. coli MTA /SAH Nucleosidase

- in pET28a (+)表达。
- Expression vector und kon. Reinstanz und Name His
- schon publiziert von Heuer
- NdeI, EcoRI

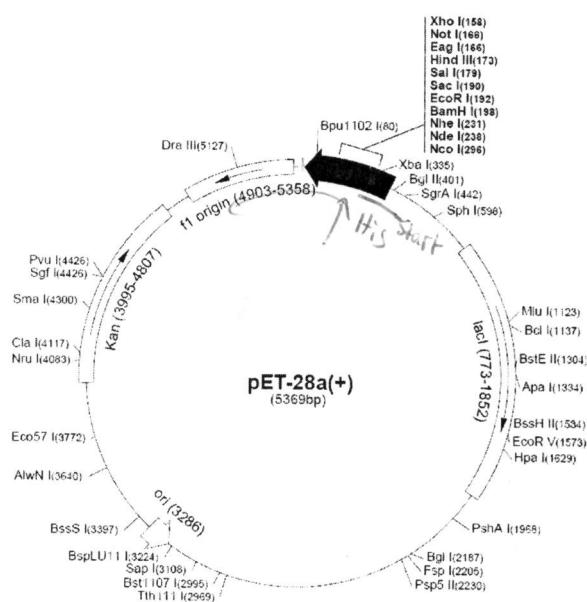
LuxS wird unter
normalen Bedingungen
in aktiviert. (mit Fe^{2+})
Chemistry, 42 (2003), 4717)

↓ kann die LuxS weg
mit β -Diketone abstrahieren
nicht anwachsen.

	ATG	AAA	ATC	GGC	ATC	ATT	GGT	GCA	ATG	GAA	GAA	GAA	GTT	ACG	CTG	
1	M	K	I	G	I	I	G	A	M	E	E	E	V	T	L	15
16	CTG	CGT	GAC	AAA	ATC	GAA	AAC	CGT	CAA	ACT	ATC	AGT	CTC	GGC	GGT	
	L	R	D	K	I	E	N	R	Q	T	I	S	L	G	G	30
31	TGC	GAA	ATC	TAT	ACC	GGC	CAA	CTG	AAT	GGA	ACC	GAG	GTT	GCG	CTT	
	C	E	I	Y	T	G	Q	L	N	G	T	E	V	A	L	45
46	CTG	AAA	TCG	GGC	ATC	GGT	AAA	GTC	GCT	GCG	GCG	CTG	GGT	GCC	ACT	
	L	K	S	G	I	G	K	V	A	A	A	A	L	G	A	60
61	TTG	CTG	TTG	GAA	CAC	TGC	AAG	CCA	GAT	GTG	ATT	ATT	AAC	ACC	GGT	
	L	L	L	E	H	C	K	P	D	V	I	I	N	T	G	75
76	TCT	GCC	GGT	GGC	CTG	GCA	CCA	ACG	TTG	AAA	GTG	GGC	GAT	ATC	GTT	
	S	A	G	G	L	A	P	T	L	K	V	G	D	I	V	90
91	GTC	TCG	GAC	GAA	GCA	CGT	TAT	CAC	GAC	GCG	GAT	GTC	ACG	GCA	TTT	
	V	S	D	E	A	R	Y	H	D	A	D	V	T	A	F	105
106	GGT	TAT	GAA	TAC	GGT	CAG	TTA	CCA	GGC	TGT	CCG	GCA	GGC	TTT	AAA	
	G	Y	E	Y	G	Q	L	P	G	C	P	A	G	F	K	120
121	GCT	GAC	GAT	AAA	CTG	ATC	GCT	GCC	GCT	GAG	GCC	TGC	ATT	GCC	GAA	
	A	D	D	K	L	I	A	A	A	E	A	C	I	A	E	135
136	CTG	AAT	CTT	AAC	GCT	GTA	CGT	GGC	CTG	ATT	GTT	AGC	GGC	GAC	GCT	
	L	N	L	N	A	V	R	G	L	I	V	S	G	D	A	150
151	TTC	ATC	AAC	GGT	TCT	GTT	GGT	CTG	GCG	AAA	ATC	CGC	CAC	AAC	TTC	
	F	I	N	G	S	V	G	L	A	K	I	R	H	N	F	165
166	CCA	CAG	GCC	ATT	GCT	GTA	GAG	ATG	GAA	GCG	ACG	GCA	ATC	GCC	CAT	
	P	Q	A	I	A	V	E	M	E	A	T	A	I	A	H	180
181	GTC	TGC	CAC	AAT	TTC	AAC	GTC	CCG	TTT	GTT	GTC	GTA	CGC	GCC	ATC	
	V	C	H	N	F	N	V	P	F	V	V	V	R	A	I	195
196	TCC	GAC	GTG	GCC	GAT	CAA	CAG	TCT	CAT	CTT	AGC	TTC	GAT	GAG	TTC	
	S	D	V	A	D	Q	Q	S	H	L	S	F	D	E	F	210
211	CTG	GCT	GTT	GCC	GCT	AAA	CAG	TCC	AGC	CTG	ATG	GTT	GAG	TCA	CTG	
	L	A	V	A	A	K	Q	S	S	L	M	V	E	S	L	225
226	GTG	CAG	AAA	CTT	GCA	CAT	GGC	TAA	GTCA	TGTCAGGGCGCTGGTCGCC						
	V	Q	K	L	A	H	G	*								
ATGTCTTTCTTGCGCCACTGTGGCTCAACGCCGCCGCCGCGTCAAGCTTCTCCGC CAACACTGAACCTTGCCCTTGCCGCCGGATCACGCCGGTTGGGGTCAGCAGCTATTCCG ACTATCCTCACAGCGAAAAGATTGAGCAGGTTCCACCTGGCAGGGATGAATCTG -GAACGCATTGCGCTGAACCCGATCTGGTGATTGCCCTGGC																

Fig. 1. The nucleotide sequence of *E. coli* MTA /SAH nucleosidase annotated with the deduced amino acids. The open reading frame was amplified as an *EcoRI/NotI* fragment using the primer set: 5'-CTC **CAA** **TTC** TCT ATG AAA ATC GGC ATC ATT GGT GCA ATG G-3' (forward) and 5'-CTC **GCG** **GCC** **GCC** AGG CAA TCA CCA GAT CGG G-3' (reverse). Individual nucleotides that differed from the initial reported sequence of *pfs* are printed in bold. The nucleotide sequence has been submitted to the GenBank database (accession no. U24438).

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



His-Tag → 270-287

270

G⁺T G A T G A T G · A T G · A T G

287

A T G

EcoRI - 5'-GAT T T C - 3'

~~NdeI~~ → 5'-CAT ATG - 3'

3'-GTA TAC - 5'

270

5' - G T G A T G A T G A T G
3' - C A C T A C T A C T A C

280

A T G A T G G C T - 3'
T A C T A C C G A - 5'

287

↳ coding sense strand

→ Double sequence → Reverse complement
→ down at stelle 5071

Met g s s H H s s g
5'-ATG GGC AGC AGC (CAT)₅ CAC AGC AGC ggc
L V P R G S H M
5'-CAT GAG ccg CGC GGC AGC CAT ATG - 3'

ATG

ATA

CAT CAC
CAU CAC

Laborbuch Nr./Notebook no.

Fortsetzung von Seite/
Continued from page no.

Seite Nr./ Page number

3

E.coli MTA/SAH Nucleosidase 3.2.2.9

His-Tag Sequenz im Vektor (forward):

Thrombin recognition *NdeI*
 M G S₂ H₅ H S₂ G L V P | R G S H M
 5'-ATG GGC (AGC)₂ (CAT)₅ CAC (AGC)₂ GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC CAT ATG-3'

Forward primer (ohne His-tag):

EcoMTAN_NcoI_fw

NcoI G K I G I I G A M
 5'-CC ATG GGA AAA ATC GGC ATC ATT GGT GCA ATG G-3'

bei MW g berülf (24.01.12)

Forward primer (mit His-tag):

EcoMTAN_NdeI_fw

NdeI K I G I I G A M
 5'-CAT ATG AAA ATC GGC ATC ATT GGT GCA ATG G-3'

AS-Sequenz EcoMTAN:

10	20	30	40	50	60
MKIGIIGAME	EEVTLLRDKI	ENRQTISLGG	CEIYTGQLNG	TEVALLKSGI	GKVAALGAT
70	80	90	100	110	120
LLLEHCKPDV	IINTGSAGGL	APTLKVGDIV	VSDEARYHDA	DVTAFGYEYD	QLPGCPAGFK
130	140	150	160	170	180
ADDKLIAAAE	ACIAELNLNA	VRGLIVSGDA	FINGSVGLAK	IRHNFPQAIA	VEMEATAIAH
190	200	210	220	230	
VCHNFPVPFV	VVRAISDVAD	QQSHLSFDEF	LAVAQAKSSL	MVESLVQKLA	HG

Einfügen einer Thrombin-Schnittstelle zur Abspaltung des N-terminalen His-Tags:

Erkennungssequenz Thrombin → P₄-P₃-Pro-Arg/Lys-cut-P₁'-P₂' where P₃ and P₄ are hydrophobic and P₁' and P₂' are non-acidic

L V Q K L A H G *
 5'-CTG GTG CAG AAA CTT GCA CAT GGC TAA GTC ACT-3'
 3'-GAC CAC GTC TTT GAA CGT GTA CCG ATT
CTT AAG-5'
 Primer mit 5'-Überhang

Reverse primer:

EcoMTAN_EcoRI_rev

EcoRI
 5'-GAA TTC TTA GCC ATG TGC AAG TTT CTG CAC CAG-3'

Protease Schnittstellen:

Name of enzyme	No. of cleavages
Arg-C proteinase	6
Asp-N endopeptidase	12
Asp-N endopeptidase + N-terminal Glu	27
CNBr	4
Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P)	11
Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYVML], not before P)	43
Clostrypain	6
Formic acid	12
Glutamyl endopeptidase	15
Hydroxylamine	2
LysC	11
LysN	11
NTCB (2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid)	5
Pepsin (pH 1.3)	60
Pepsin (pH > 2)	53
Proline-endopeptidase [*]	1
Proteinase K	115
Staphylococcal peptidase I	13
Thermolysin	86
Trypsin	16

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

Laborbuch Nr./Notebook no.	Fortsetzung von Seite/ Continued from page no.	Seite Nr./ Page number 4
----------------------------	---	------------------------------------

Assay Aufbau

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

WEBOPO

E. coli MTAN

25.01.12

- aus E. coli: DH5 α ohne Plasmid
- DH5 α chem. hom. Zellen in LB-Medium (5 ml) übernacht
- über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert
- 2 ml der Bakterienkultur in 2 ml-Eppi überfallt und Zellen zerstört (15 kg / 15 min)
- 26.01.12
- Extraktion der genetischen DNA nach CTAB-Protokoll nach: Wilson, K (1987) Preparation of genomic DNA from bacteria; In: Carr. Prot. in Mol Biol p 267-265

Protocol I - CTAB protocol for the extraction of bacterial genomic DNA

This protocol is derived from the "miniprep" method described by Wilson (Wilson, K (1987) Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, (eds) Current Protocols in Molecular Biology, pp. 2.4.1-2.4.5. John Wiley & Sons, New York). Broth cultures (2-5 ml) grown to mid-log growth phase are harvested in 2.0 ml Eppendorf tubes by centrifugation in a microfuge at 10,000-15,000 x g for 10-15 minutes. In general, late log growth phase cultures should not be used for preparing DNA, as nucleases tend to accumulate in older cultures. Alternatively, bacterial colonies grown on agar media may be washed off the agar and collected in an Eppendorf tube. The Bacteria Washing Buffer should not contain EDTA, as some bacteria (e.g., some Gram-negative species) will begin lysing upon exposure to chelating agents. After pelleting the cells, the medium is poured off and the rim of the tube is blotted with a paper towel to get rid of residual liquid. The bacterial pellet should weigh approximately 0.1 g (wet weight), which should provide 40-200 mg of DNA, depending upon the species of bacteria and the growth conditions. If there is more than 0.1 g per tube, the cell pellet should be resuspended with Bacteria Washing Buffer and redistributed accordingly into additional Eppendorf tubes. This is not unimportant, since the efficiency of the extraction decreases with increasing cell material. With experience, one can estimate reliably the mass of the cell pellet from its size.

0.5ml TN-Kultur $\xrightarrow{\text{Vor}}$ 2ml Zellpellet abfiltern
Steps in the protocol

1. Resuspend the cell pellet (approximately 0.1 g) completely with 564 μ l TE buffer (use a sterile ~~sterile~~ ^{sterile} pipette tip to mix the pellet and ensure complete resuspension).

(nur Kinnel)

2. Add approximately 10 μ g lysozyme (crystalline) to the cell suspension (from this point, do not vortex!). Mix thoroughly by inverting the Eppendorf tube several times. Incubate 10-60 minutes at 37°C. Add 6 μ l Proteinase K (10 mg/ml), and 30 μ l SDS (10-20%). Mix thoroughly (do not vortex!). Incubate at 37°C until the suspension becomes relatively clear and viscous.

3. Add 100 μ l NaCl (5 M) and mix thoroughly (do not vortex!). Incubate suspension at 65°C, 2 minutes. Add 80 μ l CTAB/NaCl solution (preheated at 65°C, use a pipette tip with the tip cut off to pipette the viscous CTAB/NaCl solution) and mix thoroughly (do not vortex!). Incubate suspension at 65°C, 10 minutes.

4. Extract suspension with an equal volume (approximately 800 μ l) chloroform:isoamyl alcohol (24:1) solution. Centrifuge (10,000 x g, 5 minutes). Transfer the upper (aqueous) phase (Supernatant 1), containing the nucleic acids, into a separate 2.0 ml Eppendorf tube.

5. Extract Supernatant 1 with an equal volume (approximately 800 μ l) of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) solution. Centrifuge (15,000 x g, 5 minutes). Transfer the upper (aqueous) phase (Supernatant 2), containing the nucleic acids, into a separate 2.0 ml Eppendorf tube.

6. Extract Supernatant 2 with an equal volume (approximately 800 μ l) chloroform : isoamyl alcohol (24:1) solution. Centrifuge (10,000 x g, 5 minutes). Transfer the upper (aqueous) phase (Supernatant 3), containing the nucleic acids, into a separate 2.0 ml Eppendorf tube.

7. Add 0.7 volumes (approximately 560) isopropanol to precipitate nucleic acids. Mix gently by inverting the tube several times - the DNA should appear as a white, viscous, precipitate. Let sit at room temperature for 5 minutes to 1 hour. Centrifuge (12,000-15,000 x g, 15-30 minutes) at room temperature. The DNA should be visible as a pellet on the side of the Eppendorf tube. Remove the isopropanol carefully, so as to avoid disturbing the pellet.

8. Wash the pellet with 500 μ l EtOH (70%) by inverting the tube several times. Centrifuge 12,000-15,000 x g, 15-30 minutes at room temperature. Carefully remove the EtOH and blot the rim of the tube with a paper towel to get rid of excess liquid.

9. Briefly (not more than 5 minutes) dry pellet in a speed-vac. $5\text{ min ab in Kühlschrank}$

10. Resuspend each pellet in 50-60 μ l TE Buffer. Let sit at 37°C to allow the DNA to be resuspended completely.

11. Estimate the concentration of DNA in suspension by spectrophotometric measurement at 260 nm. For double-stranded DNA suspensions, at a wavelength of 260 nm and using a cuvette with a 1 cm light path, an OD of 1.0 is equal to a concentration of 50 mg/ml. The quality of the DNA can be estimated by measurements of the A260/A280 and the A260/A230 ratios. The size of the DNA can be estimated by agarose gel (0.5%, w/v) electrophoresis, subsequent staining with ethidium bromide and visualization by U.V. illumination. DNA of uniform size (approximately 20 kb) indicates that the DNA has been extracted without excessive shearing. DNA which has been sheared or degraded by nucleases will appear as a broad smear, or smaller molecular weight products.

$271.70 \text{ OD in TE-Buffer}$

Solutions

- Bacteria Washing Buffer 0.4 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM MgSO₄, in sterile H₂O

- TE Buffer 10mMTris-HCl (pH 8.0), 1mM NaEDTA, in sterile H₂O

- NaCl 0.7 M NaCl in sterile H₂O

- CTAB/NaCl 10% (w/v) hexadecyltrimethyl ammonium bromide in sterile 0.7 M NaCl solution. [Heat solution to 65°C before bringing to final volume]

50ml TE

$\rightarrow 60.57 \text{ mg NaCl}$

0.05 mmol EDTA $\rightarrow 1.901 \text{ mg EDTA-Na}_2$

50ml Wash Buffer

1.16 g NaCl

3.01,3 mg NaEDTA

75 mmol MgSO₄ $\rightarrow 6162 \text{ mg MgSO}_4 \cdot 7H_2O$

$$A_{260} = 0.711$$

$$A_{280} = 0.366$$

$$\rightarrow 38.6 \mu\text{g/ml} \times 70 = 2,66 \mu\text{g/ml}$$

Friederike

genomic DNA - prep Konzentration der DNA

- DNA Pellet nach Trocknen in 50 µl TE-Puffer resuspendiert
- geleerte DNA 1:70 in TE-Puffer verdünnt und bei 260 nm im Photometer bestimmt

$$\rightarrow E^{260} = 0,771 \rightarrow = 2,66 \text{ mg/ml}$$

$$E^{280} = 0,366$$

↪ nicht besonders gut (erwartet)
sehr

⇒ Amplifizierung des MTAN-Gens durch PCR

Primer:

EcoMTAN-NdeI-fw → 0,2 µM je Primer ein Ansatz

EcoMTAN-NcoI-fw S'-CCA TGG GAA *** ATC

EcoMTAN-EcoRI-rev

template ~ 0,2 µg genomic DNA

3x Mastermix:

10 x Pfu buffer (+ MgSO₄)

18 µl

→ negativ Kontrolle
ohne template

10 mM dNTPs

3 µl

20 pmol/µl EcoMTAN-EcoRI-rev

3 µl

template (0,1 µg/µl)

6 µl

Pfu Polymerase (2,5 u/µl)

8 1,5 µl

+ 118,5 µl ddH₂O

2 Reaktionen

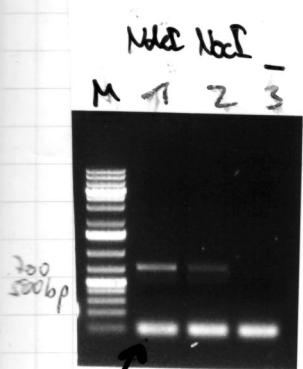
~~(1)~~ friner: EcoM~~X~~N-EcoR Γ _rev +
unel ~~(2)~~ EcoM~~X~~N-NdeI_FW

~~(2)~~ EcoM~~X~~N-NcoI_FW

→ PCR-Programm: Amplifikatlänge ~ 700 bp

Denat.	95°C	3 min
Denat.	95°C	30s
Anneal.	55°C	30s
Elong.	72°C	1 min
	72°C	10 min

↳ ~~PC~~ 1. Agarosegel (10 µl aufgetragen)



3 - Negativkontrolle (kein template; alle 3 Proben)

M - Geneoder 1 kb Plus Ladder

1 - PCR mit EcoM~~X~~N-EcoR Γ _rev
+ n - NcoI_FW als friner

2 - PCR mit n - NcoI_FW
+ EcoR Γ _rev als friner

→ erwartete Größe des Fragments ~ 700 bp

Primodimere?

→ nochmal PCR (27.1.12)

20.01.12

PCR-Reaktionen vom Vortag 1:100 verdünnt und dies als ~~Template~~ eingesetzt.

PCR - Anzahl:

Pfu Puffer 5 µl
 10 mM dNTPs, 1 µl }
template 1 µl }
 (PCR - Run von Vater
 amal NoteP und NoteD)

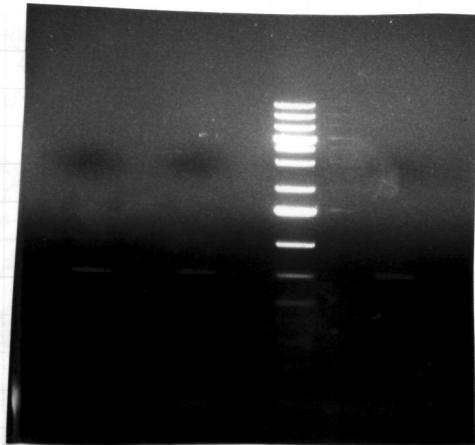
EcoMIN_Ecoll-rev
+ n - NodeI_fv
(rev) - NodeI_Fw

Drau Polymerase β , gel dann Polymerase zugeben

Hot stage

PCR-Programm:

Denat 95°C 3 min
 + Pfu Pol
 Denat 95°C 3 min ←
 (-0,2°C/cycle) 60°C (-0,2°C/cycle) 30 s } 19x
 Elag 72°C 30 s
 72°C 10 s
 4°C 00



~~prep. fol for 1st PCR~~
1 - 2 > M - ① ②

- - - - - ePdu

ausgezählt
und *erhalten* 25 µl 25 µl 5 µl 10 µl

* mit 20 µl Elutionszuliefer Santa Cruz
 → 1:35 VI in Wasser photodokumentiert
NdeI → ? < 1 µg/ml } → Template für neue RR
NcoI → ~ 14 µg/ml

WE 8082

Nochmals PCR → als Template die aus dem Gel eluierte Fragmente benutzt

Veränderung an RR - Konditionen:

- Zusatz von 2% (v/v) Formamid (p.a.)
- Verringerung der Primer-Konzentration (0,5 µM)
↳ c halbiert
- Reduzierung der Annealingzeit (25 s)

6 x Mastermix

Rn Buffer + MgSO ₄	30 µl	→ Negativ Kontroll
10 mM dNTPs	6 µl	→ 3,8 ohne Template aber mit Reck
Primer (rev.)		PR Primer
Eco MNase - EcoRI - rev	3 µl	
Rn Polymerase	3 µl	
Formamid (p.a.)	12 µl ≈ 4% (v/v)	
ddH ₂ O	223 µl	

→ dann je 1 µl Template (1,4 → NdeI)
 und forward Primer (2,5 → NcoI)

Reaktion	Template	für horne COMTAN_NdeI-fw --- NcoI-fw	Annealing Tempack
1	NdeI		
2	NcoI		
3	/	bath	
4	NdeI	s. o.	
5	NcoI	s. o	
6	/	beidell	
			55°C
			60°C

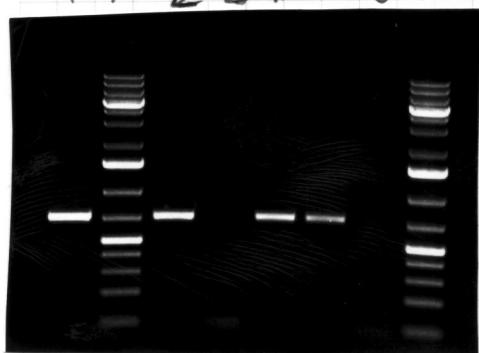
PCR Programm

Oncal.	95°C	3 min	
"	95°C	30 s	
Anneal	55/60°C	25 s]
elongate	72°C	1 min	26x
"	72°C	10 min	
end	4°C	∞	

→ 1% Agarosegel → 10 µl aufgetragen

1 M 2 3 * 5 6 M

M → 1kb Ladder Plus



← ~700bp

← horne deiner
Frau gebildet

Restriktionsverdau

- PCR-Produkte werden gereinigt mit "Invisorb Fragment Cleanup Kit" von Stratagene
- die Reaktionen 1,4 sowie 2,5 wurde vereinigt in 500µl Reaktionsrühr abgenommen und auf eine Spin-Tacle aufgetragen
 - danach 2x Zentrifugiert (1 min @ 14000 rpm)
 - 15 µl ddH₂O auf Saub gegeben und >1 min bei RT inkubiert
 - eluiert und Zentrifugiert (1 min @ 14000 rpm)

Verdau:

	NdeI	NcoI
≈* DNA-Fragment	~17 µl (1,4)	~17 µl (2,5)
Puffer	2 µl Puffer 0	4 µl Puffer Tonger
Restriktionszym	je 1 µl NdeI EcoRI	je 1 µl NcoI EcoRI

ad 20 µl ddH₂O

- über Nacht bei 37°C verdaul
- nächsten Tag: Aktivierung der Enzyme durch Inkubation @ 37°C für 20 min

Aufarbeitung des Bodaus:

Fällung der DNA durch Propanol

 $(\sim 0,11 \text{ Volumen})$

- ① Zugabe von $2,2 \mu\text{l}$ 3M KOAc-Lsg (pH 5,2)
- ② Zugabe von $15,6 \mu\text{l}$ ($0,16 - 0,7$ Volumen) R iso-Propanol
→ mischen Da 15 min @ Rf inubiz.
- ③ Pelletieren der DNA durch Zentrifugation bei 10k-15k x g für 15 min
- ④ Überstand abgenommen und erweichen
- ⑤ 2x Waschen mit $200 \mu\text{l}$ 70% EtOH per E²⁶⁰-Bestimmung:
→ Überstand erwerfen
- ⑥ Pellet gehobnet bei 55°C für 5 min
 $NdeI = 42 \frac{\mu\text{l}}{\mu\text{g}}$
 $NcoI = 14 \frac{\mu\text{l}}{\mu\text{g}}$
- ⑦ Pellet in $10 \mu\text{l}$ ddH₂O aufgenommen
→ Ligation

Ligation:MW p_n bp

Dektor \rightarrow pET28a (+) $\rightarrow 5369 \text{ bp} \times 660 = 3,5 \times 10^6 \text{ bp}$
 Fragment $\sim 700 \text{ bp} \times 660 = 4,6 \times 10^5 \text{ bp}$

Ansatz: Dektor ($100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)1:20 v
von T4-ligase ($5 \mu\text{l}/\mu\text{l}$) Insert (5-fach-
Überschuss)10x T4-ligase Buffer
T4 ligase ($0,25 \mu\text{l}/\mu\text{l}$)1 μl
 $\frac{1 \mu\text{l}}{42 \mu\text{l}} (\frac{NdeI}{NcoI})$ bzw. $3,3 \frac{(\frac{NdeI}{NcoI})}{14 \mu\text{l}/\mu\text{g}}$ 2 μl
 $5 \mu\text{l}$ 2 μl
 $5 \mu\text{l}$, ad 10 μl H₂O

- für 10ml bei 22°C transformiert liquet
- Transformation von T₄ Ligationssatz
in chem. DH5 α Ecoli Zelle (siehe Buch 1) S.84
 - 5ml auf Eis
 - 30S @ 42°C
 - Eis
 - + 200µl SOC
- 1h @ 37°C
- 200µl ausplättet auf LB + Kanamycin
- über Nacht bei 37°C wachsen lassen

01.07.12

- keine Kolonien auf der Platte mit ~~LB~~ EcoM13N-NdeI-Ecoli liegenden
- > 100 schöne Kolonien, ohne Satelliten auf der Platte mit EcoM13N-NdeI-Ecoli liegenden
- ↪ 10 Kolonien gepickt und übernacht kultiviert (Sphärolithen angeimpft → außerdem Markplatte gemacht)

02.07.12

- Minipreps mit Übernachtkulturen EcoM13N-NdeI (QUIAGEN)

eluiert in 50 µl ddH₂O

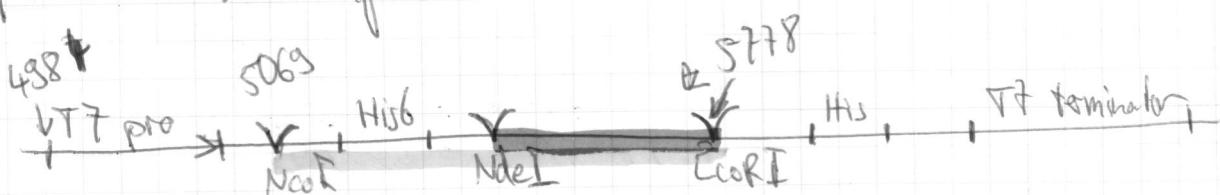
Konzentrationsbestimmung

1:35 VD in ddH₂O

Nummer	E260	C	$\xrightarrow{VD \times 35}$	C (µg/ml)
1	?	1,2		42
2	0,026	1,3		45,5
3	0,059	2,9		101,5
4	0,025	1,3		45,5
5	0,047	2,4		84
6	0,019	0,9		31,5
7	0,027	1,3		45,5
8	0,036	1,8		63
9	0,021	1,1		38,5
10	0,031	1,6		56

PCR zur Überprüfung der Ligations

pET28a (+) - Map



PCR mit T7 Promoter Primer und EcoRI/HindIII-rev Primer
 → Amplifikatlänge bei NcoI-Fragment → 791 bp

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

PCR-MM (11x) → "Ansätze mit je 20 µl Volume"

Dream Tag Buffer	23 µl	?
MMLV dNTP	4,4 µl	
T7 prom. prim	4,4 µl	
EcoHAN-Ecoli RV	4,4 µl	
Dream Tag Rd.	1,1 µl	

+ 178,7 µl ddH₂O

je 0,5 µl der Miniprep als
Template

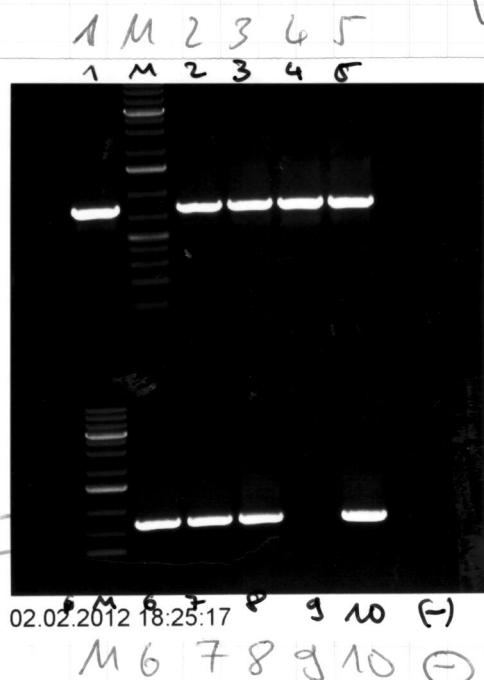
Programm (Abony PCR Programm, Buch 11/S.85)

94 °C	2 min
94 °C	1 min
55 °C	1 min
72 °C	1 min
72 °C	7 min
4 °C	∞

1kb Ladder Plus

- alle Klone tragen das Inset schreinbar an ob nicht je Richtung

1 kb
700 bp



↳ No Plasmidprep 3, 5, 8, 10 zur Sequenzierung

Sequenzierung

AJK0021-	Template	Primer
484	EcoMAN_NdeI_S-T7	T7
485	-n--3-T7kern	T7 Kern
486	n 5-T7	T7
487	n 5-T7kern	T7 Kern
488	n 8-T7	T7
489	n 8-T7kern	T7 Kern
490	n 10-T7	T7
491	n 10-T7kern	T7 Kern

02.02.12 EcoMAN_NdeI_Ecoli

→ Fragment nochmals liget in pET28a(+)

Ansaat - Ligation

-2 Ansätze → einmal 5x Wiederholung der Fragmente /
 einmal 7,5x W.S. als Fragmente /
 beide

1µl Reaktion (100 µl)

0,5 µl Inakt
Bsp. 1µl

2 µl T4 Ligase Buffer

5 µl T4 Ligase (0,25U/µl)

ad 20µl ddH₂O

T4 Ligase verdünnen
1:20 in ddH₂O

Ich ligiert bei RT → danach transformiert, ausplattet (auch und über Nacht bei 37°C inkubiert (C8+dan.)

- am nächsten Morgen
- 10 Kolonien auf Platte, wo Ligation von S + U7 ausplattiert wurde
- Kolony-PCR und Markerplate

Colony-PCR11 x 11 M

DreamTaq Buffer

22 µl

10 µl dNTPs,

4,4 µl

T7 term prime

4,4 µl

EcoM174N-NdeI fw

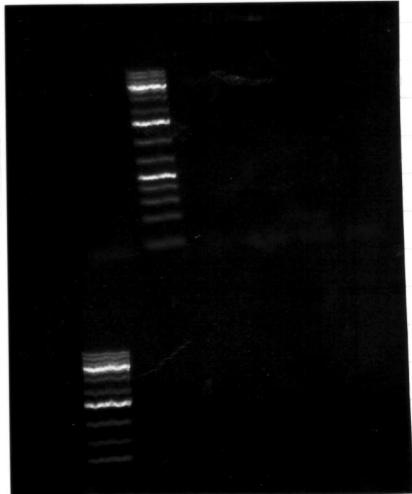
4,4 µl

DreamTaq Polymerase

1,1 µl

add ddH₂O to 220 µl

1 M 2 3 4 5



n 6 7 8 9 10

↓



negativ

→ Markerplate verworfen

II Ligation nach 1h Inkubation @ 37°C über Nacht weiter ligiert bei 16°C

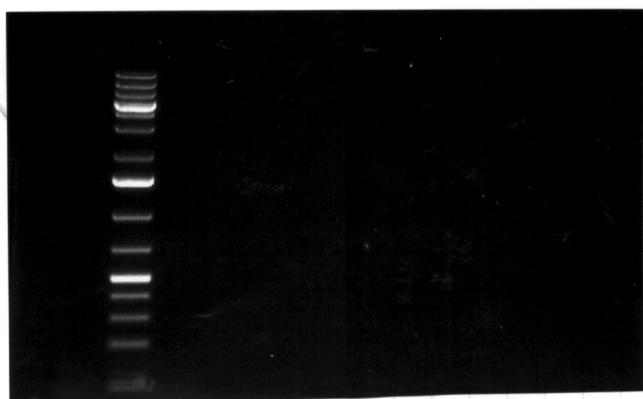
03.02.12

- Ligationsreaktionen nochmals transformiert
(Nach Inkubation über Nacht @ 16°C)
- Ratten mit Transformanden über das Wochenende bei RT inkubiert

06.02.12

- kleine Kolonien gewachsen bei T-Sabor von 1h Ligation mit 2,5x Überschuss an Insert
- Colony PCR und Masterplate (TT forward & EcoRI-N-NotI-fwd)

(WT8083)



→ beide keine
primären Klone

→ Ligation abg. von Anfang an wiederholt

WEB085/084- Amplifikation des Fragments EcoMTANmit NdeI und EcoR I
Schmittkelle

als Template sollte je

① 2 µl genom. DNA (38 µg/µl)

② 2 µl des Gelektrolytes (S. 8-9)

③ 2 µl des Verdaueten Fragments (S. 11-12) ③
dienen.

Formamide

für PCRs wurden mit 2% bzw. 6% (8%) Formamid durchgeführt.

Mischmix für PCR (Bx)Pfu Buffer (+MgSO₄)

15 µl

15 µl

10 mM dNTPs

3 µl

3 µl

Prime EcoMTAN-EcoR I

1,8 µl

1,5 µl

EcoMTAN-NdeI-Pfu

1,5 µl

1,5 µl

Formamide

3 µl

6 µl

Pfu DNA Polymerase

15 µl

15 µl

ddH₂O

127,5 µl

113,5 µl

→ + 2 µl Template je Rn

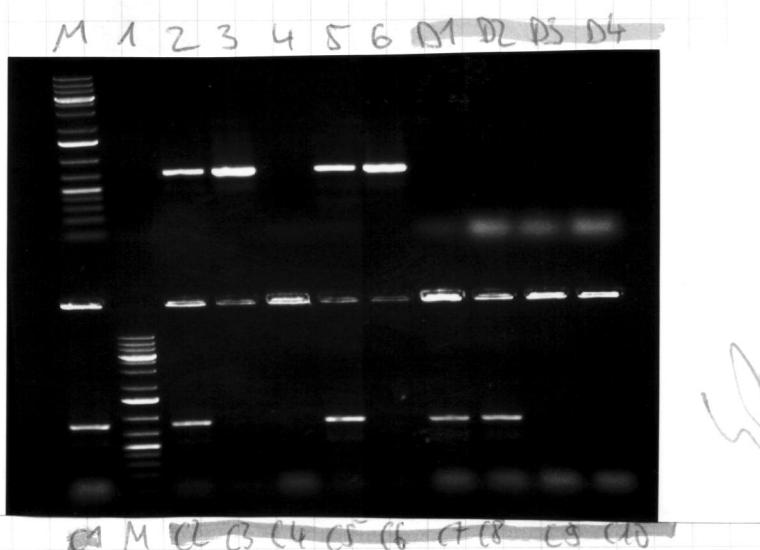
PCR-Programm wie S. 10 → Annealing Temperatur 55°C

07.02.12

- auf Platte und Transformante der übernachtligation und Kolonien gewachsene → nach über 3 Tagen!
- viele Kolonien auf Platte mit 5x Überschuss & Kolos auf Platte mit 2,5x ÜS.
- Colony-PCR und Master-plate (mit Sf7 und EcoMN-EcoR^I-rev) (als Primer)

Nummerierung

- ~~C1-C10~~ → 10 Kolonien gepickt von Platte der Ligations über Nacht @ 16°C und 5x ÜS
- ~~D1-D4~~ → 4 Kolonie von 2,5x ÜS



1-6 → siehe S. 19
→ PCR (10µl abgegr.)

Master-1kb Ladder Plus

Wip → positive clone

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

- ~~D~~ 5 positive Kolonnen, welche auf der Insel liegt, mit der richtigen Orientierung!
- Größe des Fragments ist zwischen 700 und 1000bp
- erwartete Größe ist 836 bp
- Klone C1, C2, C5, C7, C8 in 18-Amp über Nacht
- dann Mini-Seq (QUASGEN)
- mit Wasser eluiert → 1:10 in ddH₂O und wird zur Sequenzierung

Klon	E260	C (Pur) $\xrightarrow{X35}$	C (Pyrim)
C1	0,039	2	70
C2	0,050	2,5	87,5
C5	0,027	1,4	49
C7	0,044	2,2	77
C8	0,033	1,7	59,5

→ zum Sequenzieren geschickt

#JK 0021-	name	hme
479	EcomB1N-NdeI-C1	T7 term
480	- - C2	"
481	- - C5	"
482	- - C7	"
483	- - C8	"

- Amplifikation vom Fragment (C5, 19) mit gen. DNA als Template geht sehr schlecht. → ~~an~~ "anständig" Template geht besser

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

Sequenzierungsergebnisse (siehe S. 16)

pet28a_NcoI_EcoMTAN_EcoRI NcoI_5_t7term NcoI_8_t7term NcoI_10_t7term	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 T A T A C C G G G A A A A T C G C C A T A T G G T G C A A T G G A A G A A G T T A C G C T G C T G G G / G A C A A A A T G A A A C C G T A A A C T A T C A G T C T G C C G G T M G K I G I I I G A M E E E V T L L R D K I E N R Q T I S L G G . M G K I G I I I G A M E E E V T L L R D K I E N R Q T I S L G G . M G K I G I I I G A M E E E V T L L R D K I E N R Q T I S L G G .
pet28a_NcoI_EcoMTAN_EcoRI NcoI_5_t7term NcoI_8_t7term NcoI_10_t7term	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 G G G A A T C T A T A C C G C C A A C T G A A T G G A A C C G A G G T T C G G C T T C T G A A A T C G G C A T C G G T A A T C G C T G C G G G T G G G T G C A C T T G C T G T G G A C E I Y T G Q L N G T E V A L L K S G I G K V A A A L G A T L L L E . C E I Y T G Q L N G T E V A L L K S G I G K V A A A L G A T L L L E . C E I Y T G Q L N G T E V A L L K S G I G K V A A A L G A T L L L E .
pet28a_NcoI_EcoMTAN_EcoRI NcoI_5_t7term NcoI_8_t7term NcoI_10_t7term	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 A A C T G C A A G C C A G A T G C A G T T A T T A C A C C G T T C T G C G G G / G C C C T G C C A C C A A C G T / G A A A G T G G G G G A T A T C G T G T C T C G G A C G A A G C A G T T A T H C K P D V I I N T G S A G G L A P T L K V G D I V V S D E A R Y . H C K P D V I I N T G S A G G L A P T L K V G D I V V S D E A R Y . H C K P D V I I N T G S A G G L A P T L K V G D I V V S D E A R Y .
pet28a_NcoI_EcoMTAN_EcoRI NcoI_5_t7term NcoI_8_t7term NcoI_10_t7term	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 C A C G A C G C G G A T G T A C C G C A T T T G G T T A G A A T A C C G T C A G T T A C C A G G C T G T C C G C A C G G C T T T A A A G C T G A C G A T A A A C T G A T C G C G C G T G A G G H D A D V T A F G Y E Y G Q L P G C P A G F K A D D K L I A A A E . H D A D V T A F G Y E Y G Q L P G C P A G F K A D D K L I A A A E . H D A D V T A F G Y E Y G Q L P G C P A G F K A D D K L I A A A E .
pet28a_NcoI_EcoMTAN_EcoRI NcoI_5_t7term NcoI_8_t7term NcoI_10_t7term	410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 C C T G C A A T G C C G A A C T G A A T C T T A C G C T G T A C G T G C C G C T / G A T T G T T A C G C G G G A C G C T T C T G C C A A A T T C A A C G T C C C G T T G T T G T C T G G C G A A A T C C G C C A C C A A C I A E L N L N A V R G L I V S G D A F I N G S V G L A K I R H N . A C I A E L N L N A V R G L I V S G D A F I N G S V G L A K I R H N . A C I A E L N L N A V R G L I V S G D A F I N G S V G L A K I R H N .
pet28a_NcoI_EcoMTAN_EcoRI NcoI_5_t7term NcoI_8_t7term NcoI_10_t7term	510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 C T T C C A C A C G G C A T T G C T G T G A G A G A T G G A A G G A C C G G C A A T C G C C C A T T G C C A C A A T T C A A C G T C C C G T T G T T G T C T G G C G C A T C T C C G A C F P Q A I A V E M E A T A I A H V C H N F N V P F V V V R A I S D . F P Q A I A V E M E A T A I A H V C H N F N V P F V V V R A I S D . F P Q A I A V E M E A T A I A H V C H N F N V P F V V V R A I S D . F P Q A I A V E M E A T A I A H V C H N F N V P F V V V R A I S D .
pet28a_NcoI_EcoMTAN_EcoRI NcoI_5_t7term NcoI_8_t7term NcoI_10_t7term	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 G T G C C G A T C A A C A G T C T C A T C T T A G C T C G A T G A G T T C T G G C G T T A A A C A G T C C C A G C T G A T G G T T G A G T C A T C T G G T C G C A A A C T G C A C V A D Q Q S H L S F D E F L A V A A K Q S S L M V E S L V Q K L A . V A D Q Q S H L S F D E F L A V A A K Q S S L M V E S L V Q K L A . V A D Q Q S H L S F D E F L A V A A K Q S S L M V E S L V Q K L A . V A D Q Q S H L S F D E F L A V A A K Q S S L M V E S L V Q K L A .
pet28a_NcoI_EcoMTAN_EcoRI NcoI_5_t7term NcoI_8_t7term NcoI_10_t7term	710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 A T G G T T A G G A T T C G A G C T C G C G A A G C T T G G G C C G A C T C G A G C A C C A C C A C C A C C A T G A G A G T C C G G T G C T A A C A A G C C C G A A A G G A A G H G * E F E L R R Q A C G R T R A P P P P P P P L R S G C * Q S P K G S . H G * E F E L R R Q A C G R T R A P P P P P P P L R S G C * Q S P K G . H G * E F E L R R Q A C G R T R A P P P P P P L R S G C * Q S P K E . H G * E F E L R R Q A C G R T R A P P P P P P L R S G C * Q S P K E .
pet28a_NcoI_EcoMTAN_EcoRI NcoI_5_t7term NcoI_8_t7term NcoI_10_t7term	810 C T G A G T T G G C * V G . A T C C A A . . A T C C A A . . A T C C A A . . G A G T C A A . A S L

→ Sequenzen passen von NcoI, 3,5 und 8,10

Sicherheitsergebnisse (S 21)

Start ORF His

Thompson

END ORF

→ Ligation erfolgreich bei Stufen C1, C2 und C5.
Frameshift bei C7 - Punktmutation bei ♂ → verweisen

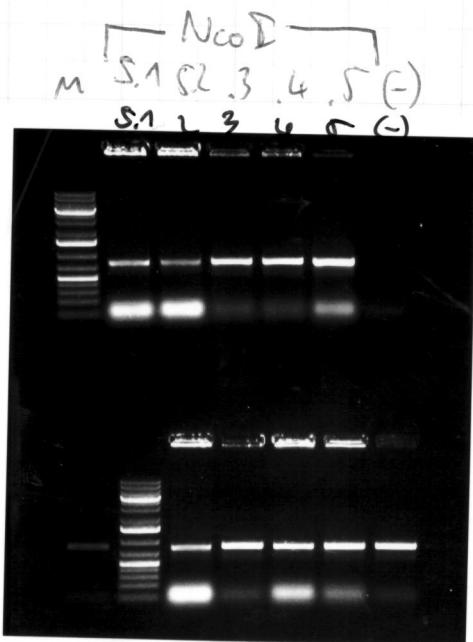
Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
-----------------------------------	----------------	---------------------------------	----------------	--

10.02.12

NdeI

Transformation von C₂, C₅ und NcoI-S in
BL21(DE3) chemisch kompetente Zellen.

- Inkubation @ RT über Wochenende → einige Klonen pro Platte
- Masterplates & Colony-PCR (Primer T7)



13.02.2012 16:09:28

C2,1 M C5.
1 2 3 4 5
NdeI

Negative control = no template

→ alle Klonen sind positiv
(mit Inset)

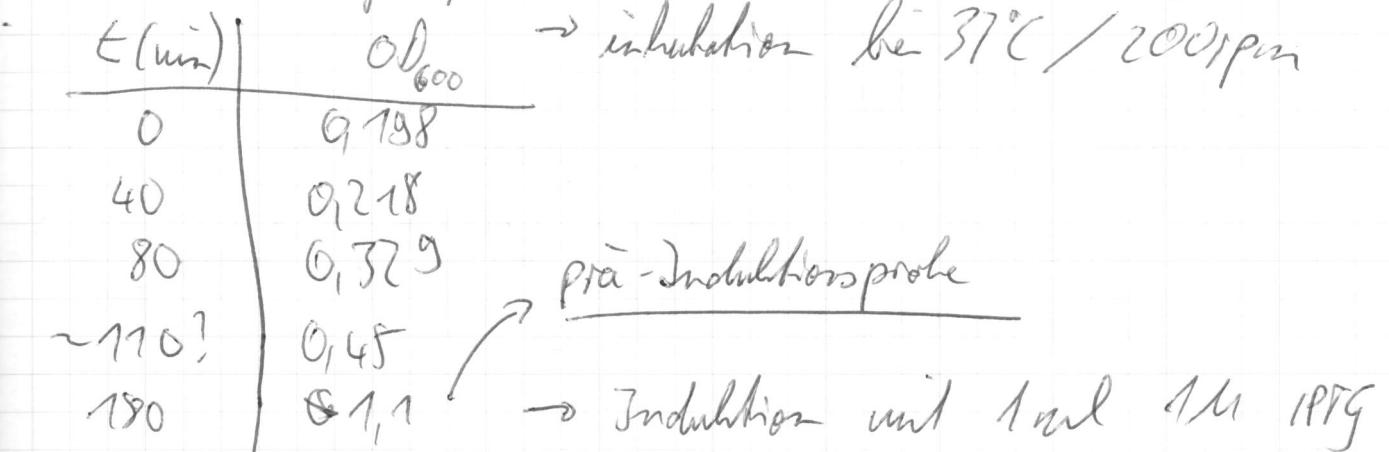
15.02.12

WEB085

- 50 ml Verdauhu vom C5.5 und S.5 (CB+kan.) (nach Blaend His-EcoMTAN und EcoMTAN)
- Inkubation über Nacht @ 37°C (200rpm)

16.02.12

- 1l Kultur angeimpft mit H₆-EcoMTAN (CB+5% fetal Kan.)



→ weiter Inkubiert bei 37°C / 200rpm für 3h

→ Zellente in Beckman Rotor 34-70 / 10000rpm 16°C

→ Pellet eingehoben → post-Induktions - probe 30min

17.02.12

- Zellpellet H₆-EcMRA in 20 ml Cytospin fix expandiert
(Handbuch 1 S. 1)

- ~1 Spatelspitze Cytospin expandieren und 1h bei 4°C zentrifugieren
- ~~Zellabtrennung durch Sonifikation (70). Anwendung 15 min/10000 rpm, 30s) → 3x wiederholen (ant Ei)~~
- Zelldebris pelletiert durch Zentrifugation für 30 min / 4°C bei ~14.000 g
- * - Überstand abtrennen (soluble Fraktion - Probe) und ~~1h mit ~2ml Talon (H₆-EcMRA) ant Ei zentrifugieren und inkubieren (S. 27 Handbuch 1)~~
- ~~Zellpellet → insoluble Fraktion~~
- * - Talon gewaschen mit Washbuffer (Book 1 / p. 1)
 - 2x mit 10 ml nach Bindung des His-Tags
- Elution mit 5 ml Elutionspuffer
- Umpufferung über PD-10-Säule (Jecti) → in 50 ml Tris-Puffer, 10% Glycerin, pH 7
- in 8 Fraktionen aufgetragen

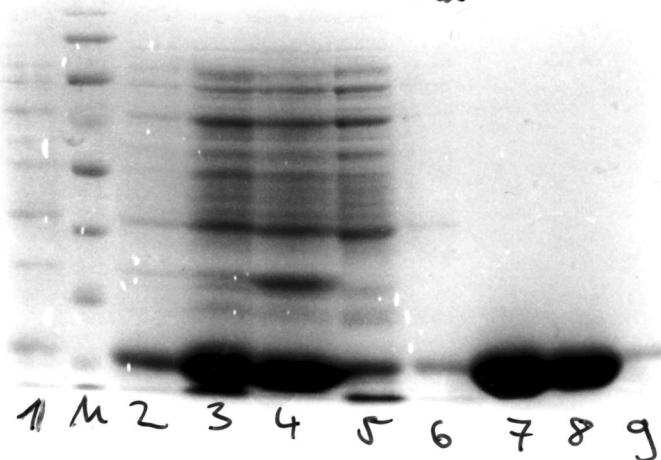
Enzymkonzentration bestimmt mitte Brad tool (Zotiquard)

- 10 µl Probe, 790 µl Puffer, 200 µl Brad tool reagenz
 $\rightarrow 1:100 \text{ VD}$

Faktion	ES95	c (ug/ml)
2	0	
3	1,073	2,04
4	1,049 (1:200 VD)	4,28
5	1,341 (")	5,147
6	1,263 (")	5,15
7	0,545	7,72
8	0	

SDS-gel \rightarrow 10% acrylamide

Pro M Post Sol: 1B Talon 1st wash FG F7 F8



17.02.2012 18:05:07

Brightness: 38

- 1 - Vor Inokulation
- 2 - Nach Inokulation
- 3 - leistungsfähige Fraktion
- 4 - unzureichende Fraktion
- 5 - Talon Überstand
- 6 - Talon 1st wash
- 7 - FG
- 8 - F7
- 9 - F8

\rightarrow hohe Expressions- und Treicherumrate
 \rightarrow Proteinparameter (His_6 -MPTN): $A_{280} = 260$
 $MW = 27438,1$
 $pI = 5,45$

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

WE 8086Xanthin Oxidase Assay: (25U)

- microbial XAO $\xrightarrow[3,1 \text{ mg XAO in } 2,5 \text{ ml } 50 \text{ mM KPi}]{(\text{pH } 7) \text{ gelöst}} \underline{\underline{10 \text{ U/ml}}}$
- Adenine as Substrate
- Milbokultivierungsplatten-Assay:

- o 200µl Granulatcolumns (50mM KPi, pH 7)
- o 0,2 U XAO (20µl)
- o Adenin Konzentration 5µM bis 1mM

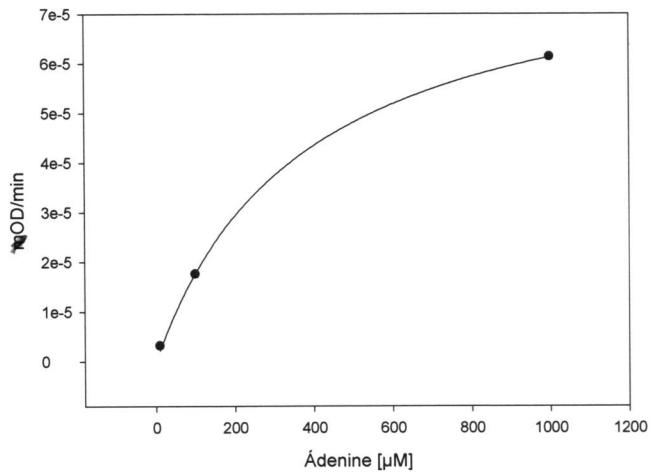
Adenin in 50mM KPi (pH 7) gelöst und 2mM Stammlösung hergestellt.

erster Test:

	1	Buffer	Adenin	XAO (10 U/ml)
A	0mM Aden	180 µl	10 µl	20 µl
B	1mM Aden	80 µl	100 µl (2mM)	20 µl
C	100µM Aden	170 µl	10 µl (200 µM)	-
D	10µM Aden	80 µl	100 µl (20 µM)	-

- Messung der Extinktionsänderung bei 305 nm (2',8'-dihydroxyadenin)
- Messung über 1h @ 305 nm
- ✓ → Anfangspunkt bestimmt und gegen Substanzkonzentration abgetragen

- war Einzelbestimmung
- ließ sich beschreiben ~~pietzweise~~ → ~~sehr~~ lange Reaktionszeit



→ hyperbolisch

$$f(x) = \frac{a \cdot x}{b+x}$$

$$\rightarrow K_m \approx 377 \mu M$$

$$V_{max} \approx 8,4 \cdot 10^{-5} \frac{\text{OD}}{\text{min}}$$

$$= 0,84 \frac{\text{mod}}{\text{min}}$$

→ K_m für Adenin aus Literatur und 35 μM
(für bovine XA0); Phytochemical Analysis
(1994), 5(6), 286-290

→ K_m zehnfach höher bestimmt

→ liegt dies an "microbial" XA0

WEB088

Bestimmung der XAO Aktivität

- in Nitroblue platten
- durch Formazanbildung (@ 470 nm; 1840 $\frac{1}{\text{mL}\cdot\text{cm}}$)
- p-Iodonitrosochalcone violet ist OM und wird reduziert (INT)

Array:

- 200 μl Granulatösung
- 1 mM INT
- 0,2 U XAO
- 5 - 1000 μl Amin

in 50 mM K₂HPO₄ pH 7 @ RT

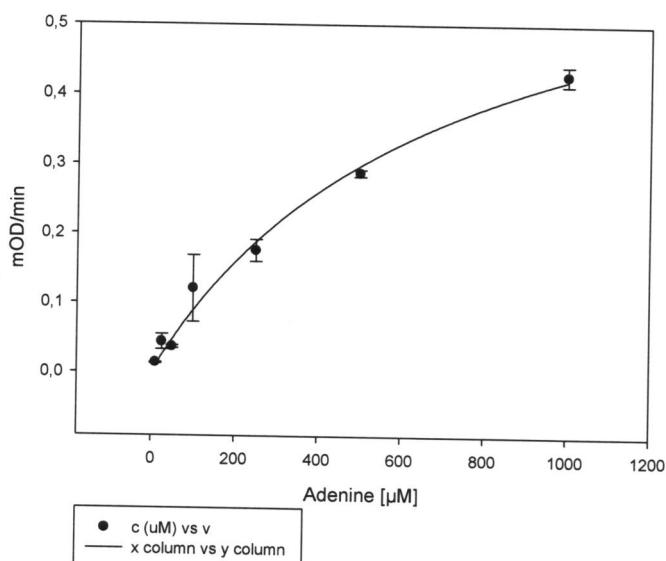
	1	2	3	4	5	6	7
A	blank	6	6	6	6	6	6
	1000 μM Na	500 μM	250 μM	100 μM	50 μM	25 μM	10 μM
B	Sample	S1	S1	S1	S1	S1	S1
	1000-1	500	250	100	50	25	10
C	S	S2	S2	S2	S2	S2	S2
	1000-2	800	850	100	50	25	10
D	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S3
	1000	500	250	100	50	25	10

Rückfertigschema:

	Amin	Puffer B/C10	Puffer (A)	2 mM INT	10% v/v XAO
1	100 μl	60 μl	80	20 μl	20 μl
2	50 μl	110 μl	130	"	"
3	25 μl	155 μl	155	"	"
4	10 μl	180 μl	170	"	"
5	50 μl	110 μl	130	"	"
6	25 μl	155 μl	155	"	"
7	10 μl	150 μl	170	"	"

mit
Reicht

- Puffer Adenin und INT gewählt und bei RT präzisiert
- XAO mit Nüchtern zugesetzt und Anstieg der Absorption bei 470 nm beobachtet
- Blank wurde von jeweiliger Reihe abgezogen (z.B. blank 1000 µM von allen Samples 1000 µM)
- Anfangssteigung wurde mittels Soft hat Pro Software automatisch berechnet (die erste 70 Punkte)
- Dreifachbestimmung:



hyperbolisch:

$$K_m = 638 \mu M$$

$$V_{max} = 0.716 \frac{mOD}{min}$$

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

Spezifische Aktivität für Adeninumsatz mit XAO/Formazan:

$$E = \epsilon \cdot d \cdot c$$

$$\frac{E}{t} = \epsilon \cdot d \cdot \frac{c}{t} \quad v = \frac{c}{t}$$

$$0,7161 \frac{mOD}{min} = 15400 \frac{l}{mol} \cdot v_{max}$$

$$v_{max} = \frac{0,7161 mOD \cdot min^{-1}}{15400 l \cdot mol^{-1}} = 4,65 \cdot 10^{-5} mol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$$

$$A_s = \frac{v_{max} \cdot V}{m_{XAO}} = \frac{4,65 \cdot 10^{-5} mol l^{-1} min^{-1} \cdot 0,0002 l}{1,24 \frac{mg}{ml} \cdot 0,02 ml} = 3,75 \cdot 10^{-7} \frac{mol}{min \cdot mg} = \underline{\underline{0,375 U/mg}}$$

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E_0]} = \frac{4,65 \cdot 10^{-5} mol l^{-1} min^{-1}}{[E_0]} =$$

für Adenin

EcoMTAN Aktivitätsassay

- mit SAT → Bestimmung des reduzierenden Kohlenstoffenden Zuckers über Dimikrosäure?

Assay reduzierender Zucker mit 55-Dimikrosäure (DNS)

- Reagenz: 0,5% (w/v) DNS, 0,1M NaOH

Assay: • 1 Volumen Probe + 5 Volumen Reagenz

• 5 min @ 100 °C

• abkühlen auf RT

• photometrisch @ 500-520 nm (500-570 nm?)

Eichgerade und Glucose

- 1 μM, 5 μM, 10 μM, 50 μM, 100 μM, 250 μM, 500 μM Glucose (in blauer Phosphatpuffer)

- 5 ml 10 mM Glucoselösung (MW = 180 g/mol)
 ↳ Spülung → 9 mg

Messung:

- 50 μl Probe + 250 μl Reagenz (0,5% (w/v) DNS, 0,1M NaOH)

- 5 min @ 99 °C

- abkühle auf RT

- in Mikrotiterplatte messen → Absorption zu groß → kein Unterschied von 0,1 mM

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

- wieviele Menge lassen sich nicht mit INT detektieren?
- Detektion mit INT?
- Microchimica Acta, (1957), 45, 769-

Assay: - 1 Teil Reagenz (2 mM INT, 0,2 M NaOH) } meine
 - 1 Teil Probe, dann wie \textcircled{B} } Methode

→ Reagenz ist blau-grünlich → irgendetwas fällt aus

\textcircled{B} Microchimica Methode (abgewandelt)

- 2 Teile Probe
- 1 Teil 0,4 M NaOH
- 1 Teil 4 mM INT

- 5 min bei 35°C } 2 - dunkelblaue Verfärbung
 → abkühlen in H₂O auf RT } (ähnliche Farbe wie Brodard)
 → vortoxen mit 20 mL EtOAc 1 Stun zu Phasentrennung
 ↳ extrahieren der Farbe in organ. Phase
 → Farbe ist jetzt orange bis rot (H₂O-Phase ist farlos)
 → Problem: · keine EtOAc tauglichen Mikroskopplatten
 · besser ohne EtOAc Extraktion

WEB 080Assayparameter verändern:

- 100µl Probenlösung
 - + 50µl 0,4N NaOH
 - + 50µl 100mM Triton X-100
 - + 50µl 4mM INT
- Menge der Moleküle d. Probelsg \uparrow
- \uparrow } 5min @ 95°C

abkühlen auf RT
im Wasserbad

↓

+ 50µl 0,4N HCl

→ Messen der Extinktion
bei 470 nm

→ Problem: * Farbstoff sedimentiert bei hohen Konzentrationen

\hookrightarrow ($> 250 \mu\text{M}$) nach wenigen Minuten

$\approx 250 \mu\text{M}$ Ansatz
 $\approx 500 \mu\text{M}$ in Probe

* geringe Konzentrationen sedimentieren nach mehreren Stunden

Festb

(A) 100 µl 1mM Glucose
 + 50 µl 0,4N NaOH
 + 50 µl DMSO
 + 50 µl 4mM INT
 → 95°C / 5 min → RT
 + 50 µl 0,4N HCl

↓
 keine Reaktion
 → Hemmung der Reaktion durch DMSO?

(B) 100 µl 1mM Glucose
 + wie (A)
 → 95°C / 5 min → RT
 + 50 µl 0,4N HCl in ETOH

(C) 100 µl 1mM Glu
 + 100 µl 0,2N NaOH
 50 mM Tris-HCl X100
 + 50 µl 4mM INT
 → 95°C / 5 min → RT
 + 50 µl 0,4N HCl

↓
 so lala
 (Sediment nach wenige Minuten)

(D) 100 µl 1mM Glu
 - wie (C)
 → 95°C / 5 min → RT
 + 50 µl 0,4N HCl in ETOH

↓
 sofort
 ausfallende
 bei
 ETOH-Lösung

(E) wie (C)

→ 95°C 15 min → RT
 + 50 µl i-Propanol
 $0,4\text{N HCl}$

Trüb

(F) wie (C)

→ 95°C 15 min → RT
 + 50 µl 0,4N HCl
 in DMSO



(G) 100 µl 1mM Glucose

+ 50 µl 0,4N NaOH
 + 50 µl H₂O
 + 50 µl 4mM INT
 → 95°C 15 min → RT
 + 50 µl 0,4N HCl

Fornarao ist unlöslich
 → rekt. sil an Stab-
 wird ab

(H)

wie (G)

- 95°C 5 min → RT
 + 50 µl HCl (0,4N) in
 EtOH

→ fällt aus



WEB098

- 100 µl Probe

+ 50 µl 0,4N NaOH

+ 50 µl 100mM Triton

+ 50 µl 4mM UTP

→ 35°C / 5 min

→ auf RT kühle

+ 50 µl 0,4N HCl in Triton

→ fällt aus

WEBOGO

Primärdesign - Klonierung Cory effi sahtt

~ 1,400 bp großes Gen

~ 478 Aminosäuren

Biotechnol. Prog., 2008, 24(1), S. 120-127

für Prime

```

1 ATGGCAAAGTCACGGACTTCAAGGTGCGGGATCTGTCCTCGCTGAAGCCGGTCGCCACCAGATCCGTCGCGGAATACGAGATGCCGGTCTGATGC
 M A K V T D F K V A D L S L A E A G R H Q I R L A E Y E M P G L M

101 AGCTGCGCAGGGAGTATGCAAGGGACGCCATTGAAGGGTGCCGCATCGGGGTCATTACATGACGGTGCAGACCCGGCTCGATCGAGACCC
 Q L R R E Y A E E Q P L K G A R I A G S I H M T V Q T A V L I E T L

201 GACCGCTCTCGGTGCCGAGGTCCGCTGGGCTTCTGCAACATCTTCTCCACCCAGGACGAGGCCGCTGCCGCATCGTCGTCGGTGACGGCACCCGGAG
 T A L G A E V R W A S C N I F S T Q D E A A A A I V V G D G T P E

301 GACCCCAGGGTGTCCGGTGTCCGCTGAAGGGTAGACCCCTGGATGAGTACTGGGGTGCATCAACAGATCTCGACTGGGAGGGTGAAC TGCGA
 D P Q G V P V F A W K G E T L D E Y W W C I N Q I F S W E G E L P

401 ACATGATCCTCGATGACGGAGGTGACGCCACCATGGCCATTCCGTGGACGTGAGTATGAGAAGGCGGCCGTACCGCAGCCGAGGCCAATGACTC
 N M I L D D G G D A T M A V I R G R E Y E K A G V V P Q P E A N D S

501 CGATGAGTACATCGCCTCTGGCATGCTCCGAGGTCTGGCCAGGACAGCCGACTCCATCAAGGGTGTACCGAG
 D E Y I A F L G M L R E V L A E E P D K W T R L A D S I K G V T E

601 GAGACCACCCGGTGTCCACCGCTGTGACCACTTCGCGAGGAGGGCGTGTGCCCTCCCCGCATGAATGTCATGATGCCGTGACCAAGTCCAAGT
 E T T T G V H R L Y H F A E E G V L P F P A M N V N D A V T K S K

701 TCGACAACAAGTACGGTACCCGCACTCCCTGATCGATGGCATCACCGTCCACGGACATGCTCATGGGTGTAAGAACGTGCTGGTCTGGTACCG
 F D N K Y G T R H S L I D G I N R A T D M L M G G K N V L V C G Y G

801 TGATGTGGCAAGGGCTGCCGAGGCCATCGACGGCAGGGTGACGTGTCCGGTCACCGAGGCCATCCATCAATGCGCTGCAGGGACTGATGGAT
 D V G K G C A E A F D G Q G A R V R V T E A D P I N A L Q A L M D

901 GGATACTCCGTGGTCACCGTCGACGAGGCCATGCCAGCGACATCGTCATCACGGGACCGCAACAAGGACATCATCTCTATGAGCAGATGCTCA
 G Y S V V T V D E A I A D A D I V I T A T G N K D I I S Y E Q M L

1001 AGATGAAGGATCACGCCGTGCTGGCAACATTGGTCACTTCGACATGAGATCGACATCGATCCCTGTCACCGCGATGATGTCATCCGACCAACCAT
 K M K D H A L L G N I G H F D N E I D M H S L L H R D D V I R T T I

1101 CAAGCCGAGGTGGATGAGTTCACCTCCCAACGGCAAGTCCATCATCGTGTCCAGGGACGTCTGCTCAACCTGGCAACGCCACGGCCACCC
 K P Q V D E F T F P N G K S I I V L S E G R L L N L G N A T G H P

1201 AGCTTCGTCTGTCACCTCCCTGCCGACCAAGACCGATGCCGACATCGAACTGTTCCAGAACGAGGCCAGTACGAGAACCCAGGTCTACCGTCTGCCCA
 S F V M S T S F A D Q T I A Q I E L F Q N E G Q Y E N Q V Y R L P

1301 AGATCCTCGATGAGAAGGTGCCCGCATCACGTTGGAGGCCCTGGTGGCAAGTCACCGAGCTGACCAAGGAACAGGCCAGTACATCGGTGTGGATGT
 K I L D E K V A R I H V E A L G G K L T E L T K E Q A E Y I G V D V

1401 CGCCGGTCCGTTCAAGCCGGAGCACTACCGCTACTGA
 A G P F K P E H Y R Y *

```

Cory effi SAH Hydrolase 3.3.1.1

His-Tag Sequenz im Vektor (forward):

Thrombin recognition *NdeI*
 M G S₂ H₅ H S₂ G L V P | R G S H M
 5'-ATG GGC (AGC)₂ (CAT)₅ CAC (AGC)₂ GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC CAT ATG -3'
 5'-CAT ATG GCA AAG GTC ACG GAC TTC AAG GTC GCG G-3'

Forward primer (mit His-tag): **CeffiSAHH_NdeI_fw**

62-63°C

NdeI A K V T D F K V A
 5'-CAT ATG GCA AAG GTC ACG GAC TTC AAG GTC GCG G-3'

T_M = 67,4°C - 69,8°CAS-Sequenz EcoMTAN:

10	20	30	40	50	60
MAKVTDKFVA	DLSLAEAGRH	QIRLALEYEMP	GLMQLRREYA	EEQPLKGARI	AGSIHMTVQT
70	80	90	100	110	120
AVLIETLTAL	GAEVRWASCN	IFSTQDEAAA	AIVVGDGTP	DPQGPVFAW	KGETLDEYWW
130	140	150	160	170	180
CINQIFSWEG	ELPNMILDDG	GDATMAVIRG	REYEKAGVVP	QPEANDSDEY	IAFLGMLREV
190	200	210	220	230	240
LAEERPDKWTR	LADSIKGVTE	ETTTGVHRLY	HFAEEGVLPF	PAMVNDAVT	KSKFDNKYGT
250	260	270	280	290	300
RHSLIDGINR	ATDMLMGGKN	VLVCGYGDVG	KGCAEAFDGQ	GARVRVTEAD	PINALQALMD
310	320	330	340	350	360
GYSVVTVDEA	IADADIVITA	TGNKDIISYE	QMLKMDHAL	LGNIGHFDNE	IDMHSSLHRD
370	380	390	400	410	420
DVIRTTIKPQ	VDEFTFPNGK	SIIVLSEGRL	LNIGNATGHP	SFVMSTSFA	QTIAQIELFQ
430	440	450	460	470	
NEGQYENQVY	RLPKILDEKV	ARIHVEALGG	KLTELTKEQQA	EYIGVDVAGP	FKPEHYRY

F K P E H Y R Y *

5'-CG TTC AAG CCG GAG CAC TAC CGC TAC TGA GTC ACT-3'

3'-GC AAG TTC GGC CTC GTG ATG GCG ATG ACT

CTT AAG-5'

Primer mit 5'-Überhang

Reverse primer:

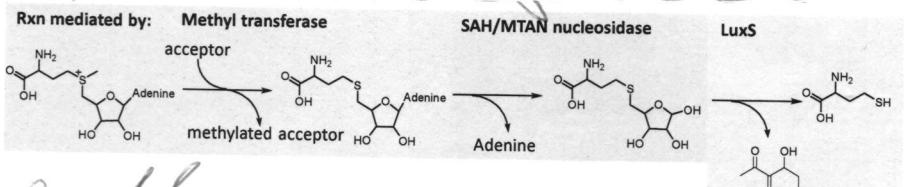
CeffiSAHH_EcoRI_revT_M = 66,4-69,1°C

EcoRI

5'-GAA TTC TCA GTA GCG GTC GTG CTC CGG CTT GAA CG-3'

63,9-65,5°C

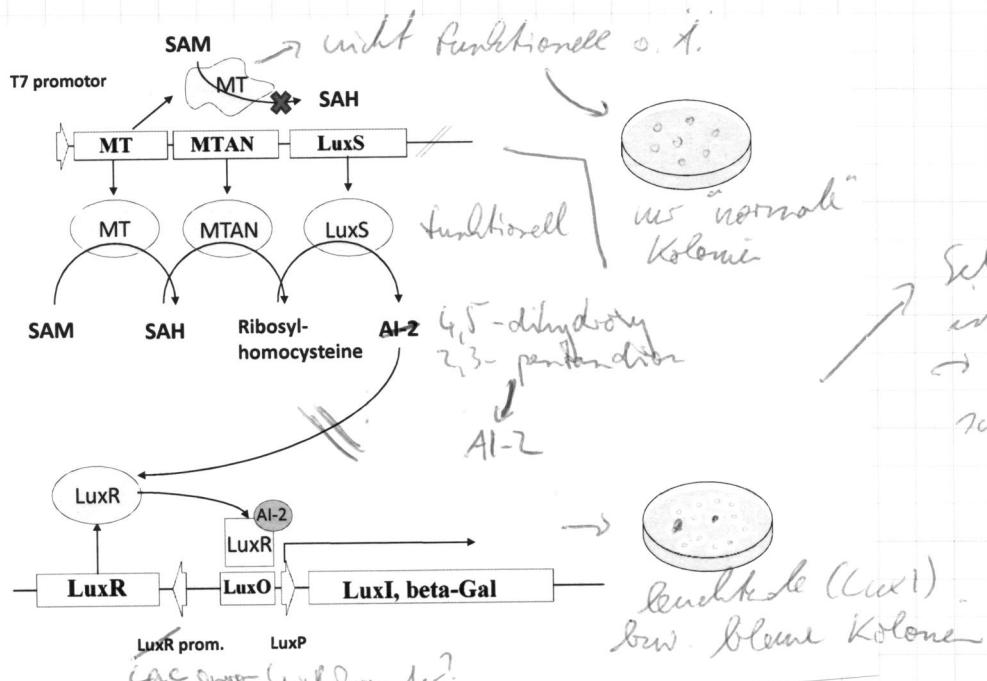
Primer bestellt

ON-PLATE Assay für MT

Quorum sensing
→ Lux Operon

Grundlage

AI-2
(Autoinducer-2)

Überlegung (Grob):

Theorie:

LuxI: SAM → N-acylhomoserine lactone (AHL) + MTA
 methyl thioserine

LuxR → bindet AHL → dann LuxO
 ↳ aktiviert Transkription

WE 309D

14.03.12

Corynebacterium efficiens DNA erhalten am 13.03.12.→ Konzentrationsbestimmung \rightarrow 1.70 in ddH₂O bestimmt

$$\rightarrow \text{C} = 7,3 \mu\text{g/ml} \xrightarrow{\times 70} \underline{\underline{161 \mu\text{g/ml}}}$$

PCR-Ausatz zur Amplifizierung des SAHH-gens

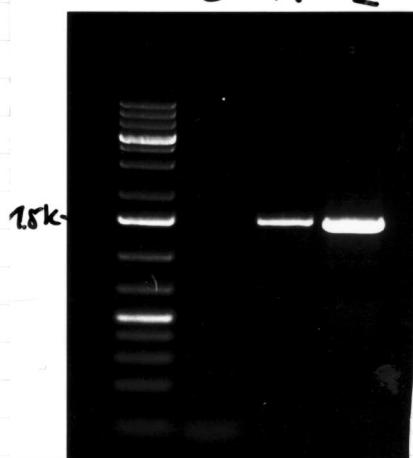
10X Pfu Puffe + 250 ₄	5 µl	Template
10mM dNTPs	1 µl	\rightarrow Ansätze
Ceff-SAHH-fw Prim	1 µl	(-) - ohne Template
Ceff-SAHH-rev Prim	1 µl	1 - template mit
Template	1 µl	$c = 7,3 \mu\text{g/ml}$
Pfu Polymerase	0,5 µl	2 - template mit
ddH ₂ O	49,5 µl	$161 \mu\text{g/ml}$

PCR-Programm:

Denature	95°C	3min	
"	95°C	30s	
Anneal	55°C	25s]
Elongate	72°C	3min	30x
"	72°C	15min	
	4°C	∞	

15.03.12

1% Agarosegel mit 7,5 µl ETBr / 10 µl aufgetragen
 - 1 2 5 µl GeneRuler DNA Ladder
 1 kb Plus



WEBO30

- ~1,4 kB

↳ entspricht erwarteter
 Fragmentgröße

→ PCR wiederum im doppelten
 Volume

→ PCR-Programm siehe S.43 ✓

→ PCR-Ausak siehe S.43

↳ außer! template
 ↳ doppelt Volume
 Nur allein

Nr.

1

2 - 2 µl WEBO30-1 als Temp.

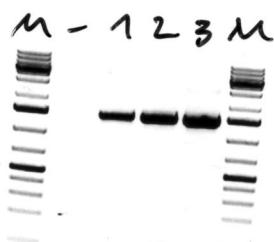
3 - 2 µl WEBO30-2 als Temp.

(+) kein template

2) wurde 1:1000 in ddH₂O
 verdünnt und diente als
 Template

- 1% Agarosegel + 1 µl ETBr / 5 µl aufgetragen

Ladd.: GeneRuler 1kb Plus



→ klarer unerwünschte Bande

→ Hauptsbande entspricht der erwartete
 Größe (1,4 kB)

27.03.12

WEB091

PCR-Reaktionen (1, 2, 3) je mit "Invitrol Fragment Clean up Kit" gereinigt. (siehe S.17)

- mit 15 µl ddH₂O eluiert und Konzentration bestimmt (E260; 1:70 VS)
- | Ansatz | # | c (µg/ml) |
|--------|---|-----------|
| | 1 | 35 µg/ml |
| | 2 | 42 µg/ml |
| | 3 | 168 µg/ml |

DNA Verdant (PCR-Ansätze & pET28a(+))

Apploiden mit NdeI & EcoRI (heute wieder Schrankkeller in Jena)

10 µl DNA (92 bzw. 3)
 2 µl Buffer 0
 je 1 µl NdeI & EcoRI
 6 µl ddH₂O

→ über Nacht bei 37°C verdant

pET28a(+)

1 µl pET28a (+)	(10 µg/µl)
150 µl ddH ₂ O	
20 µl Buffer 0	
5 µl NdeI/EcoRI	
ad 200 µl H ₂ O	

pET28a(+) Kultivator in E.coli DH5α transformiert

- 1 µl Oktok. (0,1 µg/µl) in 50 µl Zelle transformiert

28.03.12

Dordan

· Enzyme inaktiviert durch 20min Inkubation @ 65°C

Fällung der DNA aus dem Dordan S. 72

- Fällung mit Propanol

① + 0,7 Volume 3M KOH (5,2 µl)

② + 0,6-0,7 Volume iso-Propanol
→ 15 min @ RT inkubate

③ pelletieren durch Zentrifugation (10K rcf / 15 min)

④ pellet 2x mit 200µl 70% EtOH waschen

⑤ Pellet trocknen

⑥ nur 12 µl ddH₂O aufgenommen

→ Konzentration bestimmt (1:20 VD)

No.	c (µg/ml)
1	14 µg/ml
2	42 µg/ml
3	203 µg/ml
pET28a(+)	7 µg/ml

Ligation der DNA in den Vektor

$$\text{7 } \mu\text{g}/\text{ml} \text{ Vektor} \stackrel{?}{=} 2 \cdot 10^{-6} \frac{\text{nmol}}{\text{ml}} \stackrel{?}{=} 0,002 \frac{\text{pmol}}{\text{ml}}$$

$$203 \mu\text{g}/\text{ml} \text{ Zwest 3} \stackrel{?}{=} 2,15 \cdot 10^{-4} \frac{\text{nmol}}{\text{ml}} \stackrel{?}{=} 0,21 \frac{\text{pmol}}{\text{ml}}$$

$$\hookrightarrow 1:100 \text{ VE} \rightarrow 2,15 \cdot 10^{-6} \frac{\text{pmol}}{\text{ml}}$$

- ligation \rightarrow Gehaltsverhältnis Vektor/Zwest variiert von 1:1 bis 1:5

Ligation

1:1

T4 Ligase \rightarrow 1:5 VE
(0,6 μl Ligase + 3,4 μl H₂O)

3 μl Vektor (2 μg/ml)

3 μl Zwest 3 (1:100)

2 μl T4 Puffer

1 μl T4 Ligase (1:5 VE)

1 μl ddH₂O

1:2

3 μl Vektor

6 μl Zwest 3

2 μl Puffer

1 μl Ligase

ad 7 μl H₂O

1:5

\rightarrow =

\rightarrow 15 μl

\rightarrow 2 μl

\rightarrow 1 μl

\rightarrow 1 μl

- bei RT für 1h inkubiert und (ohne Kultivierung)
5 μl je Ansatz in 50 μl E.coli DH5α chemot.
transformiert
- \rightarrow Träger ausplättet auf LB + Amp (20 μl Ausplättung)
- restliche Ligationsmischung über Nacht bei 16°C
inkubiert
- \rightarrow am nächsten Tag nochmal 5 μl transformiert
- \rightarrow Keine Kolonien nach ~ 24h @ 37°C (2)

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

29.03.12

(WEB092)

Inset 3 nochmal ligat in neuer Vektor
von vector pET28a(+) mit Newf (BrokI) geschnitten

$$\text{ng (Vektor DNA)} \rightarrow 100 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \times 1\mu\text{l} = 100 \text{ng} = 2,86 \cdot 10^{-5} \text{ nmol}$$

$$\text{ng (Inset) bei 1:1, } \Rightarrow 2,86 \cdot 10^{-5} \text{ nmol} + 9,24 \cdot 10^{-5} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$$

$$= \underline{\underline{2,64 \text{ ng Inset}}}$$

Inset 3 - Konzentration \rightarrow 203 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$

\hookrightarrow 1.78 Verdünnung \rightarrow dann \approx 26 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
 $(7,5 \mu\text{l} + 77,5 \mu\text{l})$

Ligation ansätze

1:1

1 μl Vektor (100 ng μl)
 1 μl Inset 3 (26 ng μl)

2 μl T4 Ligase

1 μl T4 Ligase (1:5 VD) \rightarrow [0 μl Ligase + 3,4 μl H₂O]

10 μl ddH₂O

1:2.5

wie 1:1
 außer Inset 2,5 μl
 ddH₂O ~~1,5 μl~~
 7,5 μl

1:5

wie 1:1
 außer 5 μl Inset
 11 μl ddH₂O

- liquet für 1h @ RT
 - Trafo von allen Ansatz (je 5µl transformiert in 50µl DTTx Zelle)
 - + 150µl SOC-Lösung; 1h @ 37°C
 - 200µl auf LB + Kan ausplattet
 - Blatte bei 37°C inkubiert
 - weiss liquet ~~bei~~ bei 16°C i. N. 30.03.12
- am nächsten Tag wieder je 5µl Sägationsansatz in 50µl DTTx transformiert
- ausplattet und bei RT über WT inkubiert

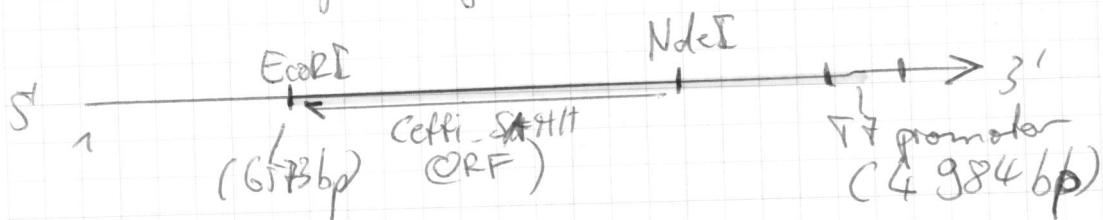
02.04.12

- ~30 Kolonie gewachst auf Blatte vor Sägation bei
 - 16°C i. N. 1:5 Verhältnis 1 Blatte
 - > 100 Kolonie in Kolonie bei 16°C i. N. 1:3,5
- 1 Kolonie bei 1:1
- Colony PCR von Kolonie und ausplattet (je 10 Kolonie)
 - Ansatz (21x 1µl) Programm
 - DreamTaq Buffer 4,2µl Denat 94°C 2 min
 - 10mM dNTPs 0,4µl n 1 min
 - T7 promoter prime 0,4µl Anneal 55°C 1 min
 - CoffTAH_rev 0,4µl Elong. 72°C 2 min } 25x (1 kb/min)
 - DreamTaq Polym. 2,1µl n 72°C 7 min
 - ad 620µl ddH₂O n 4°C ∞

WEB093

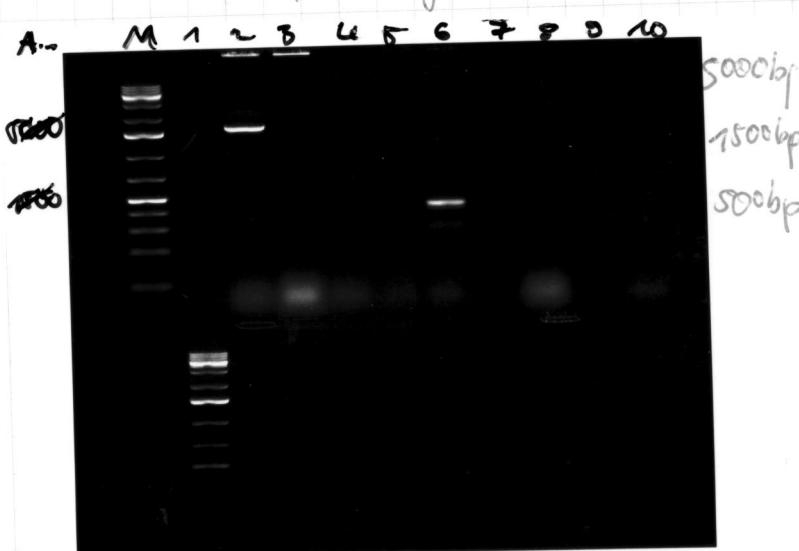
Durchgeführt von/ Performed by	Datum/ Date	Bestätigt durch/ Approved by	Datum/ Date	Fortsetzung auf Seite Nr./ Continued on page number
-----------------------------------	----------------	---------------------------------	----------------	--

Erwartete Fragmentlängen:



→ 1589 bp sollte PCR-Amplifikat sein

1.5% Agarosegel; 10 µl Rose aufgetragen



02.04.2012 16:32:09

WEB093

Brightness: 50

Contrast: 50

Gamma: 25

Enhancement: 0

Exposure Time: 807

Marker: GeneRuler 1 kb
Ladder Plus

Lanes:

M A1 - A10 ($1:5$)
(-) M B1 - B8 ($1:2,5$)

D. Huf

→ A2 hat die richtige Fragmentgröße
→ Miniprep und Sanger wie?

- 5 ml Kultur von WEBO93-A2
in LB + Amp → 37°C in b.
- Minipoop → $c = 146 \mu\text{g}/\text{ml}$

WEB094

zum Sequenzieren gebracht:

AJK0021 -	Name	Ringe
- 577	CeffiSANTH-pET28a(+)	7.7
- 577	CeffiSANTH-pET28a(+)	77 Kern

Sequenzierungsergebnis:

siehe S. 54/55

→ Klontierung erfolgreich von CeffiSANTH

- pET28a (+) CeffiSANTH Klon (093-A2)
→ 5 ml Kultur LB+kan → über Nacht weiterzulassen
- Glycolshock Rx) angekettet
→ 500 µl 30% Glycol + 500 µl Kultur
- in Tatenbank pET28a(+) CeffiSANTH 093-A2
 - in R003. g. 01. A1-B3
 - in R002 . g. 10 . A1 -B3

08.04.12

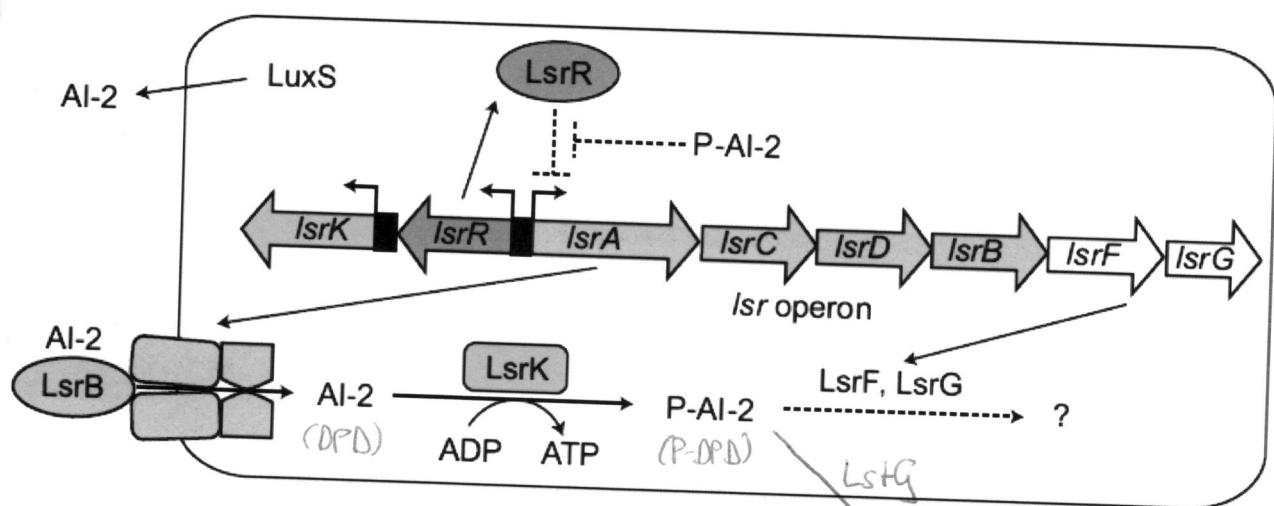
WEB095

- Metroplak d. 5 ml Kulturen von verbliebenen Kolonien aus WEB092 16°C ü.N. 1:5 und 16°C ü.N. 1:1

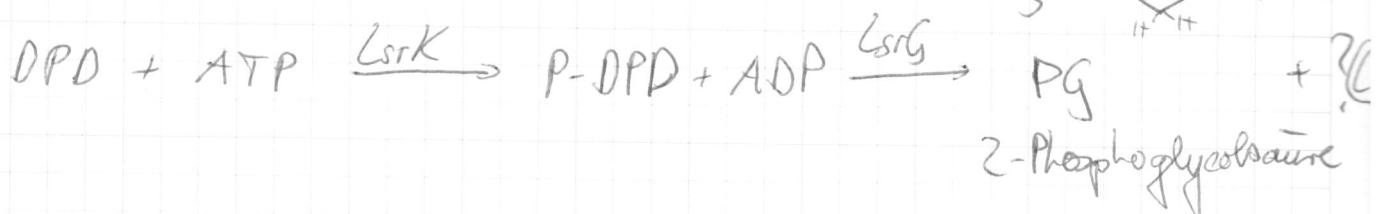
16°C ü.N. 1:5: A11 - A2516°C ü.N. 1:1 C1 - C5

- Müniprops von A11-A25 und C1-C5

No.	c/g/ml)	No.	c/g/ml)
A11	145,8	A25	78
A12	140	C1	95
A13	99,2	C2	797
A14	136,8	C3	106,3
A15	133,3	C4	78,7
A16	163,9	C5	69,6
A17	108,7		
A18	123,9		
A19	131,7		
A20	81,2		
A21	95,3		
A22	37,9		
A23	81,1		
A24	100		



Lsr *LsrG* = Funktion:



Sequenzierungsergebnisse von WEB093 A2:

- positive Ergebnisse
- SHH Gen in doppelter Länge im Vektor

U

AJK 0021 - 517

X 518

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
pET28a(+) CeffiSAHH	GAGATATACCATGGGCAGCACCCATCATCATCATCATCACACGCCGGCTGGTGCAGCGGCAAGCCATATGGAAAGGTACGGACTTCAGGTCGG									
T7 (prime)	M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M A K V T D F K V A									
	M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M A K V T D F K V A									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
pET28a(+) CeffiSAHH	GATCTGTCCTCGCTGAAGCGGGTCGCCACCAAGATCGCTGGGAATACGAGATGCCGGCTGATCAGCTGCCAGGGACTATCGAGGAGCAGC									
T7	D L S L A E A G R H Q I R L A E Y E M P G L M Q L R R E Y A E E Q									
	D L S L A E A G R H Q I R L A E Y E M P G L M Q L R R E Y A E E Q									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
pET28a(+) CeffiSAHH	CATTGAAGGGTGCCTGCATCGCGGGTCCATTACATGACGGTGACAGCCGGCTGATCGCAGGCCCTGCGGAGGCTCCGGTCCGAGGTCGGCTGGC									
T7	P L K G A R I A G S I H M T V Q T A V L I E T L T A L G A E V R W A									
	P L K G A R I A G S I H M T V Q T A V L I E T L T A L G A E V R W A									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
pET28a(+) CeffiSAHH	TTCCCTGCAACATCTTCCACCCAGGACGAGGCCGCTGCCGCATCGCTCGGTGACGGCACCCGGAGGACCCCCAGGGTGTCCGGTGTTCGGCTGG									
T7	S C N I F S T Q D E A A A A I V V G D G T P E D P Q G V P V F A W									
	S C N I F S T Q D E A A A A I V V G D G T P E D P Q G V P V F A W									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
pET28a(+) CeffiSAHH	AAGGGTGAAGCCCTGGATGAGTACTGGTGGTCATCAACCAAGATCTTCAGCTGGAGGGTGAATGCCAACATGATCCT CGATGACGGAGGTGACGCC									
T7	K G E T L D E Y W W C I N Q I F S W E G E L P N M I L D D G G D A									
	K G E T L D E Y W W C I N Q I F S W E G E L P N M I L D D G G D A									
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
pET28a(+) CeffiSAHH	ACCATGGCGCTTATCCGTGGACGTGAGTATGAGAAGGCCGGCTCGTACCGCAGCGAGGCCATGACTCCGATGAGTACATGCCCTGGCATGC									
T7	T M A V I R G R E Y E K A G V V P Q P E A N D S D E Y I A F L G M									
	T M A V I R G R E Y E K A G V V P Q P E A N D S D E Y I A F L G M									
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
pET28a(+) CeffiSAHH	TCCCGAGGCTCTGGCCGAGGAGCCGACAAGTGGACCCGCTCGCGACTCCATCAAGGGTGTACCGAGGAGACCAACCCGGTGTCCACCGCTGTGA									
T7	L R E V L A E E P D K W T R L A D S I K G V T E E T T T G V H R L Y									
	L R E V L A E E P D K W T R L A D S I K G V T E E T T T G V H R L Y									
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
pET28a(+) CeffiSAHH	CCACTTCGCCAGGAGGGCTGCTGCCCTCCCGCCATGAATGCAATGATGCGGTGACCAAGTCCAAGTTCGACAACAGTACGGTACCCGCACTCC									
T7	H F A E E G V L P F P A M N V N D A V T K S K F D N K Y G T R H S									
	H F A E E G V L P F P A M N V N D A V T K S K F D N K Y G T R H S									
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
pET28a(+) CeffiSAHH	CTGATCGATGGCATCACCGTGCCACGGACATGGTCATGGGTGGTAAGAACCTGCTGCTGTGGCTACGGTATGTTGGCAAGGGCTGCCAGGGCT									
T7	L I D G I N R A T D M L M G G K N V L V C G Y G D V G K G C A E A									
	L I D G I N R A T D M L M G G K N V L V C G Y G D V G K G C A E A									

- volgendende Beziehe vor Sequenzierung und
77 / 77 km

	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
pET28a(+) CeffiSAHH
t7 term (prime)	TCCCGGAGGTCTGGCCGAGGAGCCGGACAAGTGGACCCGCTGGCGACTCCATCAAGGGTGTACCGAGGAGACCAACCCGGTGTCCACCGTCTGTA	L R E V L A E E P D K W T R L A D S I K G V T E E T T T G V H R L Y								
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
pET28a(+) CeffiSAHH
t7 term	CCACTTCGCCAGGGAGGGCTGCTGCCCTTCCCAGCATGAATGTCATGATGCGGTGACCAAGTCAAGTGTACGGTACCCGCACACTCC	H F A E E G V L P F P A M N V N D A V T K S K F D N K Y G T R H S								
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
pET28a(+) CeffiSAHH
t7 term	CTGATCGATGGCATCACCGTGCCACGGACATGCTCATGGGTGTTAAGAACGTGCTGGCTACGGTGTATGGGGCAAGGGTGTGGCCGAGGCCT	L I D G I N R A T D M L M G G K N V L C G Y G D V G K G C A E A								
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
pET28a(+) CeffiSAHH
t7 term	TCGACGGCCAGGGTGCACGTGTCGGGTACCGAGGGGATCCCATCAATGGCTGCAAGGACTGATGGATGGATACTCCGTGGTCAACCGTCAGCAGAGGC	F D G Q Q A R V R V T E A D P I N A L Q A L M D G Y S V V T V D E A								
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
pET28a(+) CeffiSAHH
t7 term	CATGCCGAGCCGACATCGTACAGCCACCGGCAACAGGACATCATTCCTATG AGCAGATGC TCAAGATGAAGGATCACGGCCTGCTGGCA	I A D A D I V I T A T G N K D I I S Y E Q M L K M K D H A L L G								
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
pET28a(+) CeffiSAHH
t7 term	ACATTGGTCACTTCGACAAATGAGATGACATGCTCATCCCTGCTGCACCCGGATGATGTCATCCGACCCACATCAAGCCGAGGTGGATGAGTCAACCTT	N I G H F D N E I D M H S L L H R D D V I R T T I K P Q V D E F T F								
	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
pET28a(+) CeffiSAHH
t7 term	CCCCAACGGCAAGTCCATCATCGTGTCCGAGGGACGTCTGCTCACCTGGCACGCCACCGGCCACCCAGCTTCGTATGTCCACCTCTTCGCC	P N G K S I I V L S E G R L L N L G N A T G H P S F V M S T S F A								
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
pET28a(+) CeffiSAHH
t7 term	GACCAAGCATCGCAGATCGAACACTGTCCAGAGAACGAGGGCAGTACAGAGAACCGAGCTACCGAGAACCGAGTACCTGGCTGCTGGATGAGAAGGTGGCCGCA	D Q T I A Q I E L F Q N E G Q Y E N Q V Y R L P K I L D E K V A R								
	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
pET28a(+) CeffiSAHH
t7 term	TCCACGTGGAGGCCCTCGGTGGCAAGCTCACCGAGCTGACCAAGAACAGGGCGAGTACATCGGTGTGGATGTGGCCGCTGGTCAAGCCGAGACTA	I H V E A L G G K L T E L T K E Q A Y I G V D V A G P F K P E H Y								
	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700
pET28a(+) CeffiSAHH
t7 term	CCGCTACTGAGAAATTGAGCTCGTCGACAAGCTTGGGGCGCAGTCAAGCCACCCACCAACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGA	R Y * E F E L R R Q A C G R T R A P P P P L R S G C * Q S P K G								
	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
pET28a(+) CeffiSAHH
t7 term	AGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAAATACAGCATAAACCCCTGGGCCCTAAACGGGTCTGAGGGTTTGTGAAGAGGAACTATA	S * V G C C H R * A I T S I T P W G L * T G L E G F F A E R R N Y								

pET28a(+) CeffiSAHH	TCGGAT	I R								
t7 term										

WEB093

10.04.12

- Transformation von OG3 A2 (pET28a(+)) Ceftriaxon in BL21 (DE3) chemokompetente Zellen

pET28a(+) Ceftriaxon \rightarrow c = 146 µg/ml

\rightarrow 1:3 verdünnt auf \sim 50 µg/ml

- 1 µl (50 µg/ml) DNA in 50 µl chemob. Zellen transformiert
- ~~und~~ 100 µl SOC
- 200 µl ausplattet auf LB + Kan
- \rightarrow bei 37°C über Nacht wachsen glänzen \rightarrow >500 Kolonien
- Colony PCR am nächste Tag (11.04.)

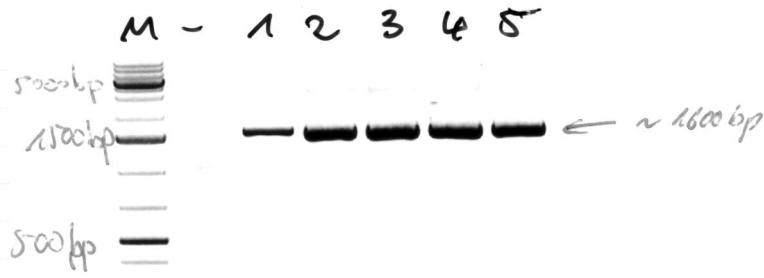
Ausarz \sim 7x 11 µl:

Tag buffer	14 µl
dNTPs	2,8 µl
T7 prime	2,8 µl
Ceftriaxon rev. prim	2,8 µl
reamplif. Pcr	9,8 µl
ad 140 µl ddH ₂ O	

Colony PCR Programm siehe
S. 49. (WEB093)

\rightarrow PCR mit 5 Colonies
& Negativ Kontrolle ohne
Template

\rightarrow gleichzeitig Masterplate
angelegt



bisher \rightarrow feinerer
1kb DNA Ladder
Plus

11.04.2012 16:24:49
Enhancement: 1
Exposure Time: 750

modo
pET28a(+)
Ceftriaxone
in BL21(DE3)

Brightness: 50
Contrast: 50
Gamma: 25

- von Markerplate von Klon 1 einen OD-Austrieb angefertigt aus LB+Kan \rightarrow in N. @ 37°C
- \rightarrow ein Zellklone gepickt und 5 ml LB+Kan angeimpft \rightarrow in N. @ 37°C/200 rpm
- \rightarrow Glycerolstock angefertigt
- \rightarrow pET28a (+) Ceftriaxone BL21 (DE3) \rightarrow R002. G.10.AZ - 35 \times R003. G.01.AZ - 35 \rightarrow Schälplatte M (-)(+)
- \rightarrow Colony PCR von belakten Zellen \rightarrow Kulturfarben (Pf7 & Ceftriaxone)
- \rightarrow aber keine Farbe bei schwächer Größe
- \rightarrow Plasmid prep & Sequenzierung

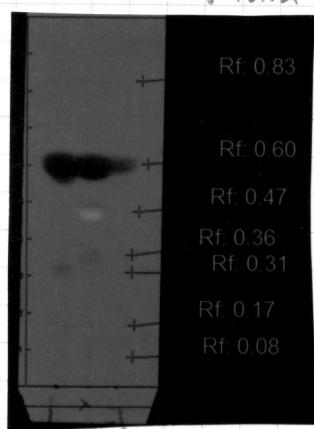
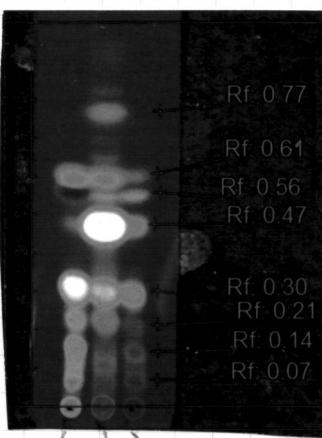
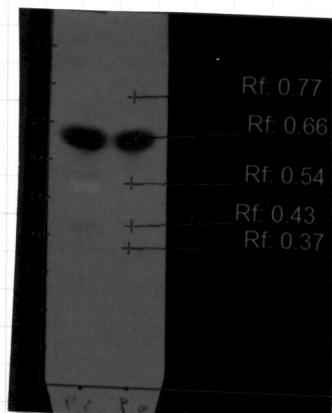
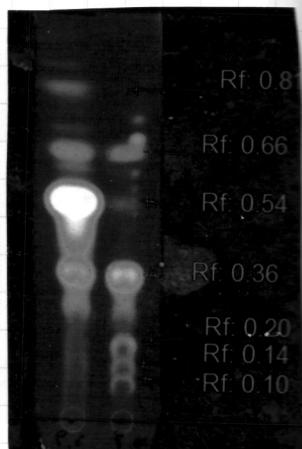
WE BOG7

→ sowie Blätter

Blätter von *Primula auricula* mit Methanol abgepresst und eingesetzt.Lauftankel: Hexan /EE 2:1 & 0,5% (v/v) AcOH

DC: 254 nm

366 nm

leaf ↓ flower
P. auricula
l.leaf ↓ flower
*P. e.**P. auricula* vs. *P. e.*Primula ↓ Primula
l. auricula*P. e.* ↓ *P. a.*

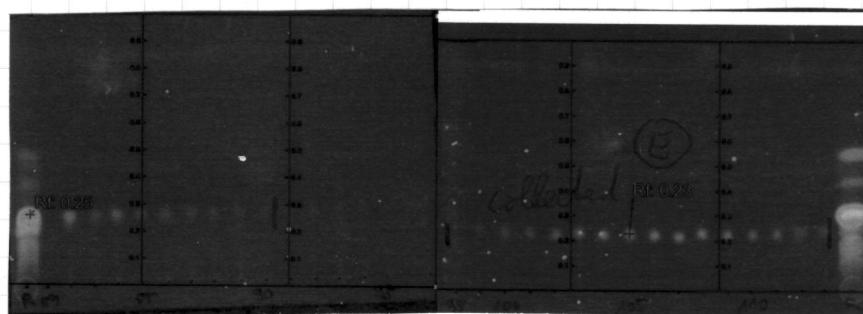
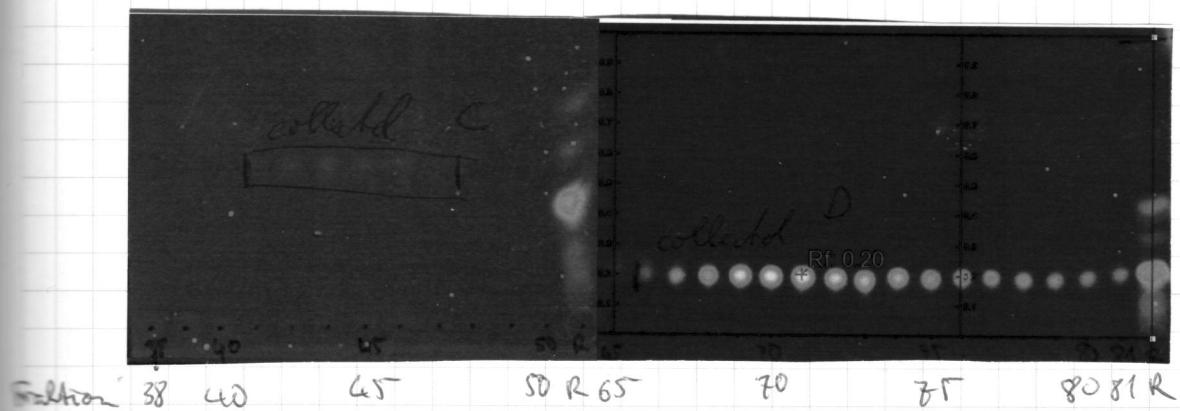
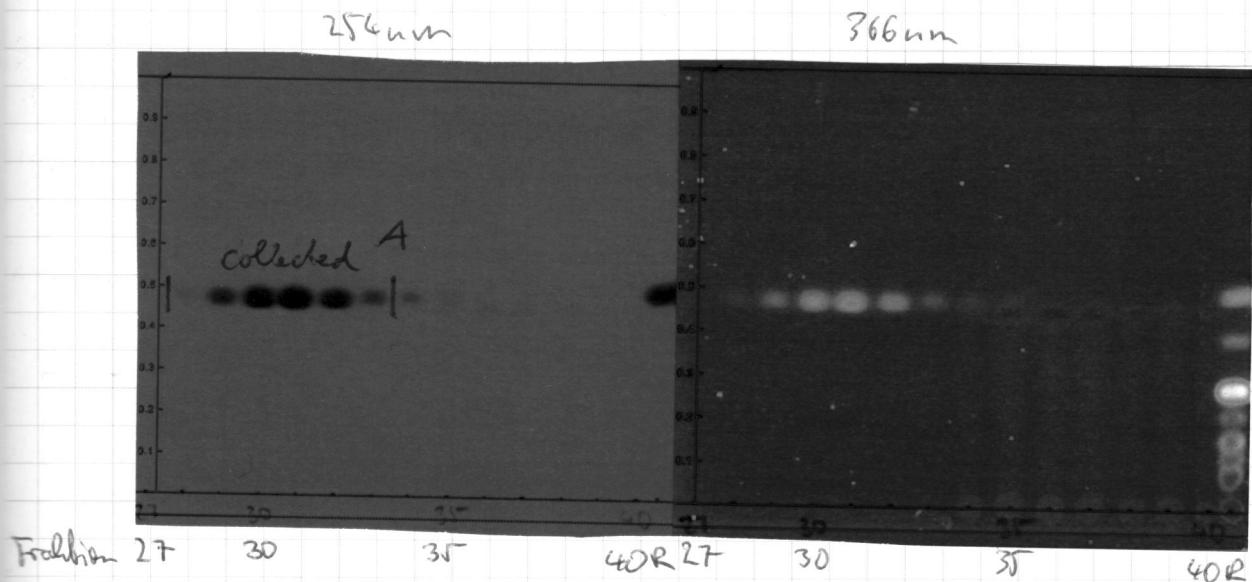
→ sehr viele fluoreszierende Verbindungen, nur eine Verbindung zeigt große Absorption bei 254 nm

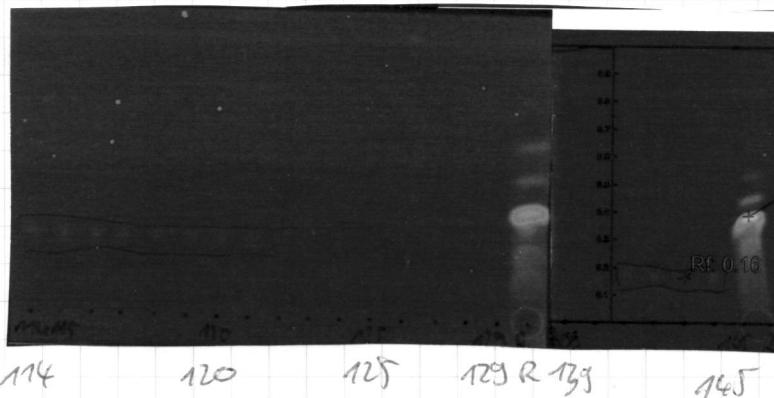
→ Der Blütenextrakt war nach dem eingesetzten zur Trockne $\underline{30 \text{ mg}}$ (siehe Sept. notiz)

→ Der Extrakt wurde über Kieselgel getrennt (Hexan /EE 2:1, 0,5% AcOH als LM)

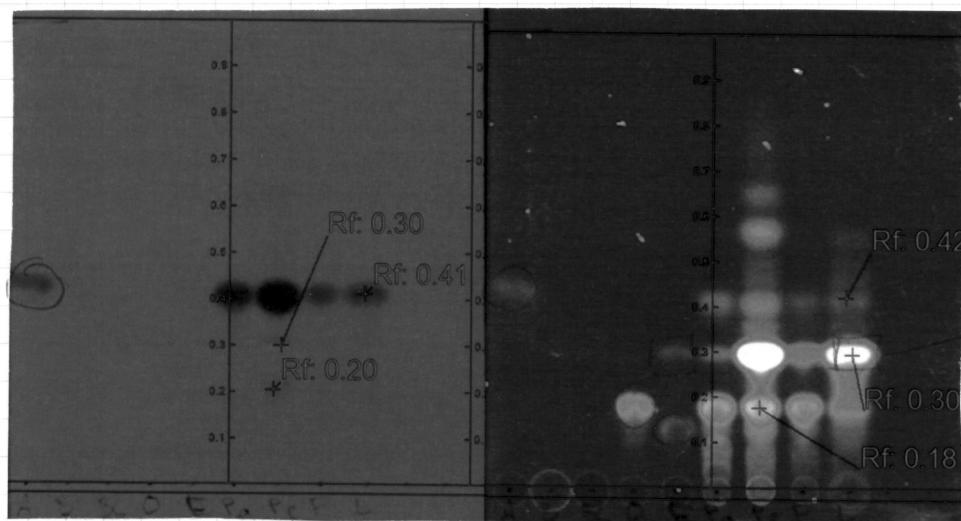
- 5 Substanz "spots" isoliert:
 - A) $R_f = 0,61$ $m = 25 \text{ mg}$ (Fraktion 27-33) (weiße/blaue Kristalle)
 - B) $R_f = 0,56$ $m =$
 - C) $R_f = 0,47$ $m = 2 \text{ mg}$ (Fr. 41-47) (gelber Farbstoff)

D) $R_f = 0,3$ $m = 4 \mu g$ (Fr. 65-90) (gelblich-farblos)
 E) $R_f = 0,27$ $m = 2 \mu g$ (Fr. 95-113) (gelbliche Farbstoff)





Fraktion 114 114 120 125 129 R 139 145



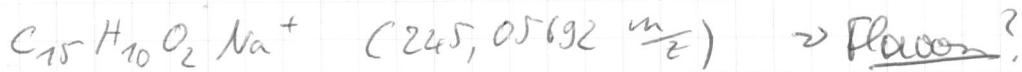
WES0057 A B B2 D E ↑ ↑ P. pr.
flow P. pub.
Primula aur. leert
P. pubesc.

↑ ↑ ↑ ↑
P. aust. flow
P. pub. leert

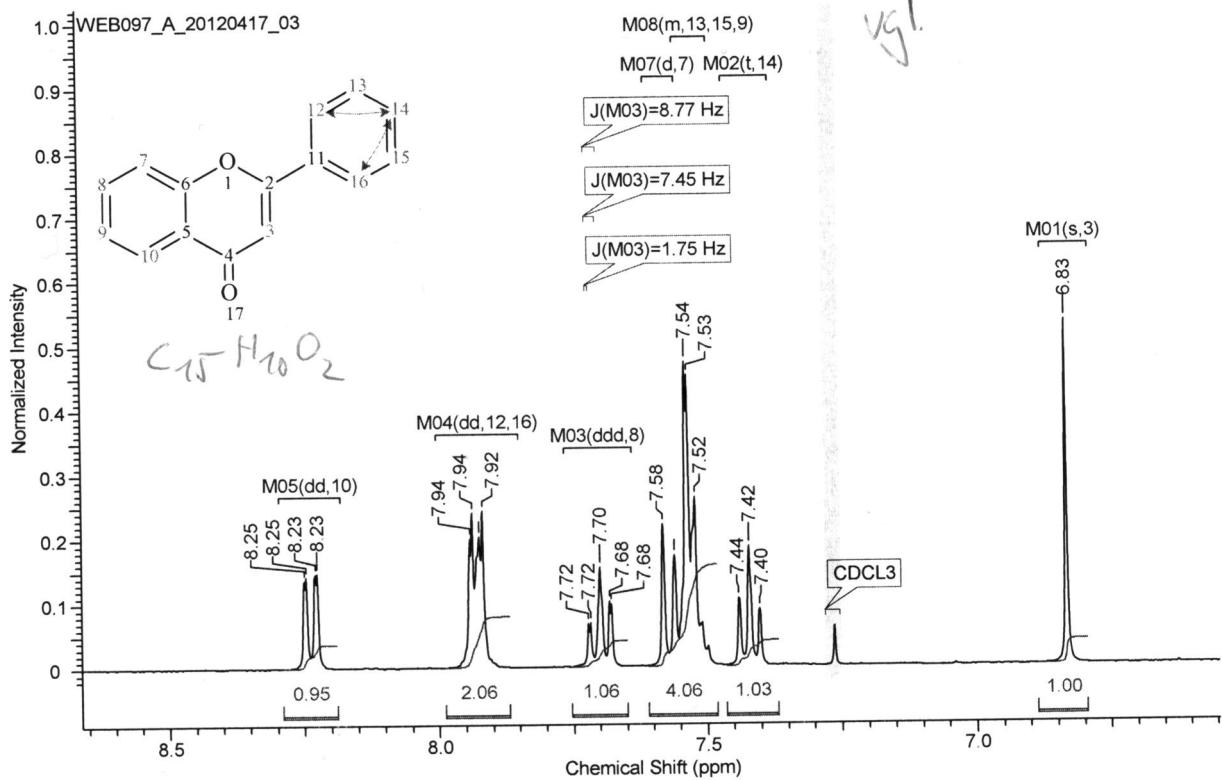
→ Spots bei B/B2 nicht zu sehr ?

WEB097_A

Inhaltslose Lösung (FT-ICR) ergab:

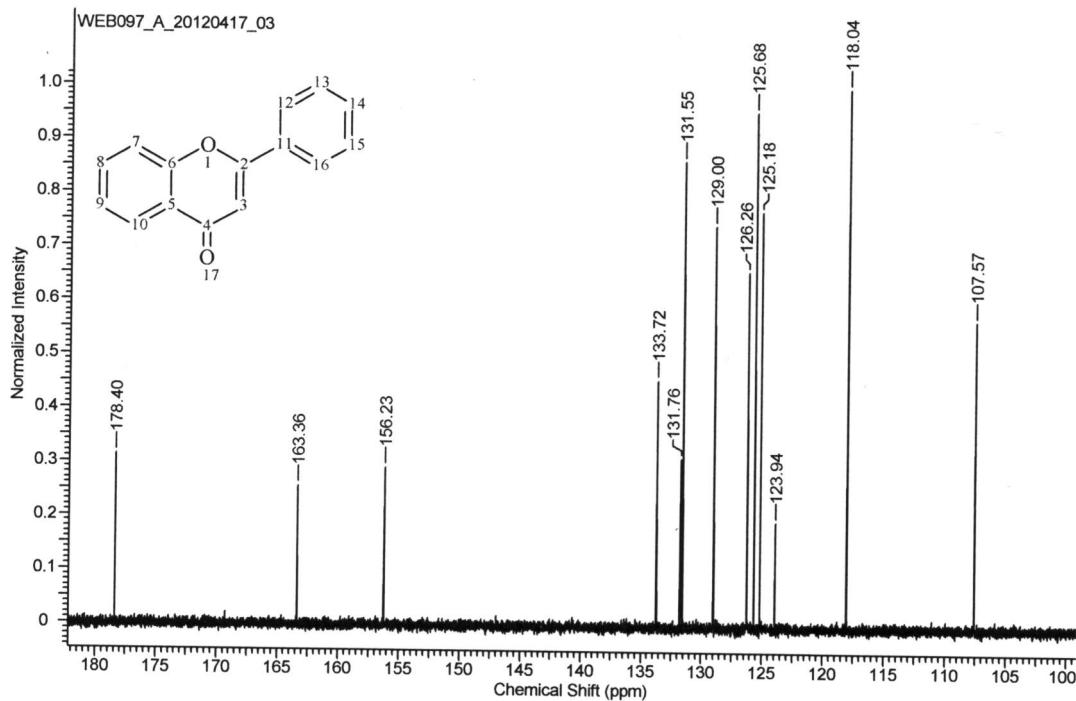
NMR:

→ laut Wolke Weber
sind die unzähligen
Flavon-Hauptstrukturen für Primel exzakt



¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 6.83 (s, 1 H) 7.42 (t, $J=7.67 \text{ Hz}$, 1 H) 7.49 - 7.55 (m, 3 H) 7.57 (d, $J=8.33 \text{ Hz}$, 1 H) 7.70 (ddd, $J=8.77, 7.45, 1.75 \text{ Hz}$, 1 H) 7.93 (dd, $J=7.45, 2.19 \text{ Hz}$, 2 H) 8.24 (dd, $J=7.89, 1.32 \text{ Hz}$, 1 H)

Literatur: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.09 (dd, 1H, $J=8.8 \text{ & } 1.6 \text{ Hz}$)
7.76 (d, 1H, 1.6 Hz), 7.74 (d, 1H, 2 Hz), 7.56 - 7.52 (m, 1H),
7.41 - 7.34 (m, 4H), 7.28 - 7.24 (m, 1H), 6.66 (s, 1H)

Überoder:

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 177.9, 162.9, 155.8, 153.4, 131.3, 128.7, 125.9, 124.8, 123.6, 117.8, 107.1, 105.2

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

WEB oggSAH H

18.04.12

- 25 ml VK (LB+Kan) von Cefis SAHA_B221 (OE3)

→ über Nacht bei 37°C wachsen gelassen (200 rpm)

- 500 ml LB+kan mit 25 ml VK angewippt und bei 37°C / 200 rpm inkubiert

→ bei $OD_{600} = 1,007$

OD_{600}	t
0,232	OL
1,007	~3L

→ 5 min auf Eis gekühlt um abtrennen

- danach mit 1ml IPF gelöst und bei 31°C / 1200 rpm für 4h zentrifugiert

→ Pelletiert bei 10000 rpm 4°C für 15 Minuten

- Bakterienpellet in 20 ml Cupapuffer resuspendiert (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10% glycerin, 1% Tween 20 pH 7) (10 mM β-ME)
- Cupapuffer zugegeben und 1h auf Eis geschwenkt
- 3x für 30S Sonifiziert (Amplivibe 70), 15 on-off
- 15 min @ 10.000 g 4°C pelletiert und Überstand abgenommen
- Überstand Cupat mit 500 ml Phasen I (Phyml) behandelt und 10 min inkubiert (am Eis)
- Cupat durch eine mit Washbuffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol, 10% glycerin, 10 mM β-ME, pH 7) konditionierte Talsandsäule gegeben (am Eis)
- Nach Bindung mit 5 Säule volume Washbuffer gewaschen
- mit 3 Säule volume Elutionspuffer eluiert (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM β-ME, 250 mM Imidazol, 10% glycerin pH 7)

- Glycolstocks von EcoMAN-N6 MSA
 Cefti SANH - DAT
 Cefti SANH BLN (OES)
 - ausdehnen auf Platte mit den jeweiligen Anzuchtmitteln
 - ~~Eco~~ bei 37°C inkubiert
 - Enzykholomie geprüft, SanL LB+AB Kultur gemacht
 - Kultuprep von SanL-Kultur und zum Separieren geschichtet

AJK

Name

Prüfer

*EcoMTAN-H6**→ flywheel tool
not fast,**→ Squeezing
Point*

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>pet28a_NdeI_EcoMTAN_</i>
	A T A C A A T T C C C T C T G A A A T A T T T G T T T A A C T T A A G R A G G A G A T A T C C A T G G G C A G C A G C A T C A T C A G C A G C G C T G G C									
<i>MTAN_H6_DH5a_T7</i>	.	A . C G T . C . T							
	M U S S H H H H R S S S L V									
	M A S S H H H H F H S S G L V									
	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200									
<i>pet28a_NdeI_EcoMTAN_</i>
	G G G G G G C A G C C A T A T G A A A T C G G C A T C A T T G G T C A A T G G A A G A Q A G T T A C G G T C G C T C G T G A C A A A T C G A A A A C C G T C A A A T C A G T C T G G									
<i>MTAN_H6_DH5a_T7</i>	.	P R G E H M K I N I I G A M E E E V T L L R D K I E S R Q T I S L C							
	P R G S H M K I N I I G A M E E E V T L L R D K I E S R Q T I S L S									
	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300									
<i>pet28a_NdeI_EcoMTAN_</i>
	C G G T T G C G A A A T C T A T A C C G G C C A A C T G A A T G A A C C G A G G T T C G C T C T G A A A T C G G G C A T C G G T A A A G T C G C T C T C G G G C T G G G T A C C A T T G C T G									
<i>MTAN_H6_DH5a_T7</i>	.	C C E I Y T G Q D N G T E V A L L K S P G T S K V A A A L G A T L L							
	C C E I Y T G Q D N G T E V A L L K S P G T S K V A A A L G A T L L									
	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400									
<i>pet28a_NdeI_EcoMTAN_</i>
	T T G G R A C A C T G C A A G C C A G T G T G A T T T A A C C G G T T C T G C C G T G G C T G C A C C A C G T T G A A G T G G G C G A T A T C G T G T G T C T C G A C G A G C A C									
<i>MTAN_H6_DH5a_T7</i>	.	L E H C K P D V I I N T G S A G G L A P T L K V G D I V V S D E A							
	L E H C K P D V I I N T G S A G G L A P T L K V G D I V V S D E A									
	410 420 430 440 450 460 470 480 490 500									
<i>pet28a_NdeI_EcoMTAN_</i>
	G T T A T C A C G A C C G Q A T G T C A C G G C A T T T G G T T A T G A A T C C G G T C A G G T T A C C G G T C A G G C T G T C C G C A G G C T T T A A A G C T G A C G A T A A A C T G A T C G C T G C C C									
<i>MTAN_H6_DH5a_T7</i>	.	R Y H D A D V T A P G Y E V Q Q L P J C P A G F K A D D K L I A A A							
	R Y H D A D V T A P G Y E V Q Q L P J C P A G F K A D D K L I A A A									
	510 520 530 540 550 560 570 580 590 600									
<i>pet28a_NdeI_EcoMTAN_</i>
	T T G A G G C C T G C A T T G C C Q A A C T G A A T C T T A A C C G G T C T G A C T G T G G C C T G A T T G T A G C G G C G A C C G T T T C A T C A A C C G G T T C T G I T G G T C T G G C G A A A A C C G C									
<i>MTAN_H6_DH5a_T7</i>	.	B A C I A E L N L N A V R G L I V S O D F I N G S V E V L R K I R							
	B A C I A E L N L N A V R G L I V S O D F I N G S V E V L R K I R									
	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700									
<i>pet28a_NdeI_EcoMTAN_</i>
	C A C A C T T C C C A C A G G C C A T T G C T G T A G A G A T G G A A C C G A C G G C A T A C G G C A T G T C C C A T A T T C A C A C G T C C C G T T T G T G C T G A C C G C C A T C T									
<i>MTAN_H6_DH5a_T7</i>	.	H M F P Q A T A V E M B A T A I A H V C H N E N V F F V V V R A T							
	H M F P Q A T A V E M B A T A I A H V C H N E N V F F V V V R A T									
	710 720 730 740 750 760 770 780 790 800									
<i>pet28a_NdeI_EcoMTAN_</i>
	C C G A C T G G C C G A T C A C A G T C T C A T C T T A G C T T C G A T G A G T C C T G C T G T T G C C G C T A A A C G T C C A G C T G A T G T G A T C A T G T G C A G A A C T									
<i>MTAN_H6_DH5a_T7</i>	.	S D V A D Q C S H L S F D E P L A V E A K Q S S L M V E S L V Q K L							
	S D V A D Q C S H L S F D E P L A V E A K Q S S L M V E S L V Q K L									
	810 820 830 840 850 860 870 880 890 900									
<i>pet28a_NdeI_EcoMTAN_</i>
	T G C A C A T T G C T G A A G A T T C G A G C T C C G T C G A C A G C T T G G G G C G A C T C G A C A C C A C C A C C A C T Q A G A T C C G G C T G C T A A C A A G C C C G A A A									
<i>MTAN_H6_DH5a_T7</i>	.	A H V * B F E L R R Q S C C R T R A P T P P F L R S S C * Q S P K							
	A H V * B F E L R R Q S C C R T R A P T P P F L R S S C * Q S P K									

Ceffis GHT
DAS 2

flygolstad,
M gel.

Segen-Neugbauer
und Partner

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

Laborbuch Nr./Notebook no.	Fortsetzung von Seite/ Continued from page no.	Seite Nr./ Page number 67
----------------------------	---	-------------------------------------

Coffi SAH IT
B271 (E3)
glywysoldeb
diol gal

font be Segoe -
eyebrow

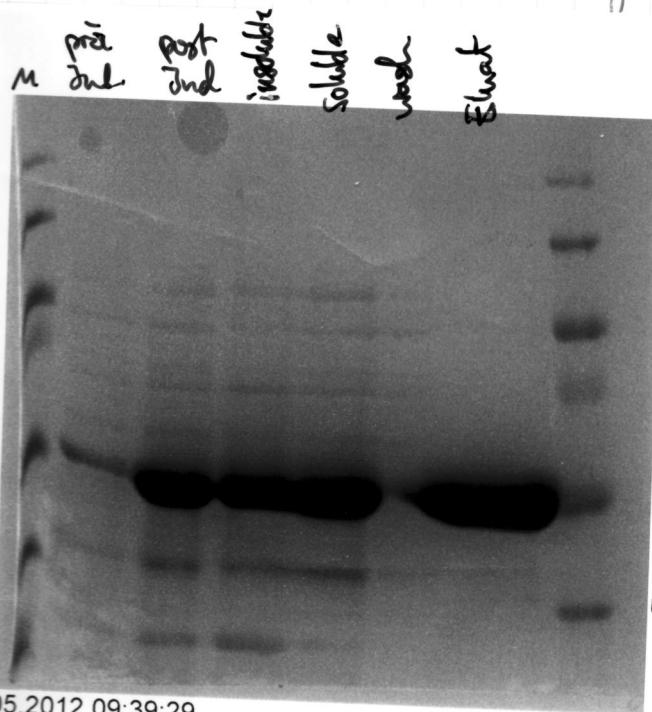
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 pet28a(+) mit Ceffi_ AAGAAGGGAGTATAACCATGGCGACGCCATCTACATCAGTCAGCAAGCCGCGCCGTGATGCCACCGGAGCAGCATATGGCAAAGGTCAGGACTTCAG
 SAHH_T7_BL21 MGSBSSHHHHHRSOLVPRGSHMAKVIDAK
 MGSBSSHHHHHRSOLVPRGSHMAKVIDAK
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 pet28a(+) mit Ceffi_ GTCACGGAGTCTGTCCTCGCTGAAACCGGAGCACCACCAAGATCGGCTCTGCAGGAAATAGATGCGGCTCTGATGCAAGCTGGCAAGGAGTATGCCAG
 SAHH_T7_BL21 VADLSFLABEYRHLGIRLAEYEMPULMQLRRELAZ
 VADLSFLABEYRHLGIRLAEYEMPULMQLRRELAZ
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 pet28a(+) mit Ceffi_ AGCAAGCATTGAAAGGTGGCCGATCGCGGGTCATCTAACATGAAGGTGAAAGCACCGGGCTGATGAGACCTCTGGATGCCAGGTTCTGGATGCCAGG
 SAHH_T7_BL21 EQLPLKGARIAGSIIHMIVQOTAVDIEETLFLALGAEVR
 EQLPLKGARIAGSIIHMIVQOTAVDIEETLFLALGAEVR
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 pet28a(+) mit Ceffi_ CTGGCGCTTCCTGCACATCTCTCCACCCAGAACGAGCGCCGCTCTGCCTGCGTACGGCACCCCGAGGAGCCCGAGGGTGTCCGGTTCTC
 SAHH_T7_BL21 HASCNIFPSTQDEPAAAKIAIVVSDGTPEDFQGVPPF
 HASCNIFPSTQDEPAAAKIAIVVSDGTPEDFQGVPPF
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 pet28a(+) mit Ceffi_ GGCCTGGAAAGGTGTAACCTGGTGTAACTGACTGGTGTGCAACAGATCTCACTGGGAGGGTGAACTGGCAACATGATCTCTGAGCAQGGTGA
 SAHH_T7_BL21 AWKGETLDEYNNWCINQITFSWEGELDPNRMILDNGS
 AWKGETLDEYNNWCINQITFSWEGELDPNRMILDNGS
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 pet28a(+) mit Ceffi_ ACGGCCCATGGCGCTTATCCCTGAGCATGAGTAAAGGCGGCCGCTGATACCGAACGCCGAGCAATGACTCCGATGAGTACATGCCCTCTGGG
 SAHH_T7_BL21 DATTMIVIRRREYERKIVVYDPEVAFYIIFLD
 DATTMIVIRRREYERKIVVYDPEVAFYIIFLD
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 pet28a(+) mit Ceffi_ CATGGTACCGGAGGCTCTGGCGCAAGGCGGCGAAAGGAGCCCGCTCCGAGCTCCATGAGGTGTCACCGAGGAGCAACCCACCGGTGTCACCGGT
 SAHH_T7_BL21 MLDREVLAEEPDWKTRLADSIKIVTBEITTTAYHR
 MLDREVLAEEPDWKTRLADSIKIVTBEITTTAYHR
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 pet28a(+) mit Ceffi_ CTGGTACCGGAGGCTCTGGCGCAAGGCGGCGAAAGGAGCCCGCTCCGAGCTCCATGAGGTGTCACCGAGGAGCAACCCACCGGTGTCACCGGT
 SAHH_T7_BL21 LYHFAEEBVLPLFPSPMKVRAVTKSKIDRKYHMR
 LYHFAEEBVLPLFPSPMKVRAVTKSKIDRKYHMR
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 pet28a(+) mit Ceffi_ ACTCCCTGATGATGGCATCACCGTGGCCAGCGCATGCTGATGGTGGTAAAGACGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTC
 SAHH_T7_BL21 RSLIDGGINRATDMLMGSKKNVLYCAGYQDVCKGCGC
 RSLIDGGINRATDMLMGSKKNVLYCAGYQDVCKGCGC

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 pet28a(+) mit Ceffi_ ACTCCCGTATGATGGCATCACACCGTCGCCA CGAGCATCTGTATGGGTGGTAAAGCA CGTGCTGCTGTTCTGTTGCGTACCGATGATGGCAA GGGCTGCCCGA
 SAHH T7term BL21 H S L I D G I N R A T D M M L M G C K N V L V C H I G D V K C E
 H S L I D G I N R A T D M M L M G C K N V L V C H I G D V K C E
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 pet28a(+) mit Ceffi_ GGCCTCTGACGGCCAGGGTCAAGCTGTGGCTCGGTCACCGCA CGCCGA TGCCATCAA TGCGCTGCAGGCA CTGAGATGATCTCCGTCGTCACCGCTGAC
 SAHH T7term BL21 A P D Q G J S R V R V T E A D P I N A L Q A L M D G C Y S V V T V D
 A P D Q G J S R V R V T E A D P I N A L Q A L M D G C Y S V V T V D
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 pet28a(+) mit Ceffi_ GAGGCCATCAGCGCAAGGCCAACATCGTCATCACGCCAACCGCAACAGGAACTATACTCCATGAGAGATGCTCAA GATAGAGATCACCCGCTACTGG
 SAHH T7term BL21 E A I A D A D A I V I T A T G N K D I I S T E Q M L K M K D H A L L
 E A I A D A D A I V I T A T G N K D I I S T E Q M L K M K D H A L L
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 pet28a(+) mit Ceffi_ GCGAACATTTGGTCACTTCGCAAACTGAGATTCGACATGCTGATTCCTGCTGCCACCGCACTGATGATCTGCACTCCACCACTTACCGCCGAGGTGGTAGCTTCAC
 SAHH T7term BL21 G N I H G I D R E B I D M H M S L L H R D D V I R T T I K P Q V D E F T
 G N I H G I D R E B I D M H M S L L H R D D V I R T T I K P Q V D E F T
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 pet28a(+) mit Ceffi_ CCTCCCCAACGGCAAGTCATCATCTGCTGTCGAGGGAGCTGCTGCTCAACTGGCAACGCCACCCAGCTGCTGATGTCACCTCCCTTC
 SAHH T7term BL21 F P N G K S T I V L S E G R L L N D G N A T G H P S F V M S T S F
 F P N G K S T I V L S E G R L L N D G N A T G H P S F V M S T S F
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 pet28a(+) mit Ceffi_ GCGCAACAGCGATCGCCAGAATGTCGACTGTTCGAGACCGCCAGTA CGA GAACCA GGTCTCCCGTCCGCAAGATCTCTGCTGATGAGAGGTGGCGCC
 SAHH T7term BL21 A D Q T I A M Q I E L T C A T G C O V V R L P K I L D E K V A
 A D Q T I A M Q I E L T C A T G C O V V R L P K I L D E K V A
 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 pet28a(+) mit Ceffi_ GCTACCCGATGGAGCCCTGGTGGCAAGCTCCAGCACTGACCCAGAAGCA CGGCGGAGTACATCGTGTGGATGATGCTGCCGCTGGTCTGAGCGGGAGCA
 SAHH T7term BL21 R I H V E A L G G K L T B L T K B Q A B Y T I S V D V A S F P K F E H
 R I H V E A L G G K L T B L T K B Q A B Y T I S V D V A S F P K F E H
 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 pet28a(+) mit Ceffi_ CTACCCGCTACTGAGATTCGAGCTCCGTCAGAACGTTGGGGCGGAGCTCGAGCA CGACCAACCCACCACTGAGATGCGCTGCTGATCAAAGCCGAAA
 SAHH T7term BL21 Y R Y * E F E L R R Q A C A R T R A F F P D F L R S C G C * Q S P K
 Y R Y * E F E L R R Q A C A R T R A F F P D F L R S C G C * Q S P K

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

WEB 099

- Eluat von Tafelzähne dialysiert gegen 1,5 l (Wmth MOPS, w% glycer) \Rightarrow A
- nochmals gegen 800 ml AT und 1 mM DTT
- dialysiert (2 h @ 4°C)
- ! \rightarrow gemerkt, dass gegen die falsche Puffer dialysiert wurde
- ~ wiederum gegen 1,5 l und 800 ml KPi-Puffer & dialysiert @ 4°C (in, N, i) (3 L) (Wmth, w% glycer pH 7,6)
- \rightarrow Konzentration bestimmt mit Bradford (Blank = Dialyse-überstand)
- $\rightarrow E^{555} = 1,194$ (1:100 Verdunnt)
- ~ $c = 2,4 \frac{mg}{ml}$ 1-35 mg gesamt Protei



09.05.2012 09:39:29

Enhancement: 86
Exposure Time: 19Brightness: 56
Contrast: 75
Gamma: 25

- schon nach Induktion ist sehr viel SARTH verblieben
- mehr löslich als unlösliche Protein

$$MW = 54\,937,08 \text{ Da} \\ (498 \text{ AT})$$

SAHH-Assay

$$\text{MW(DTNB)} = 336,35 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}$$

$$\text{MW(SAH)} = 384,41 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}$$

WEB103

- 57°C, 100 µM DTNB (Ellman's Reagenz), 150 µl Anzahl, 50 µl Eiweiß
- Stammlösung: 3 mM DTNB (in Assaybuffer) (3 mM = 1,183 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$)
- Assaybuffer (SAHH):
 - 50 mM KPi
 - 10% (v/v) glycerin
 - pH 7,6
- 4 mM SAH-Lösung ($= 1,538 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) in 0,05 N HCl lösen
 → in Puffer verdünnen

zu messende Konzentrationen für Kinetik:

0,5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 µM SAH

c (µM)	DTNB (0,6 mM SL)	SAH	Puffer	
0	25 µl	0 µl	75 µl	(hier wurde
5		7,5 µl	67,5 µl	SAH & DTNB
10		15 µl	60 µl	in 30% MeOH
25		37,5 µl	37,5 µl	/ H ₂ O gelöst)
50		75 µl	0 µl	↓
100		75 µl	60 µl	die 3 Bew.
200		75 µl	95 µl	1 mM Stammlsg.
500	n	75 µl	0 µl	

$\approx 100 \mu\text{M}$ DTNB
im Ansatz

+ 50 µl
frisch
SAHH
(2,3 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$)

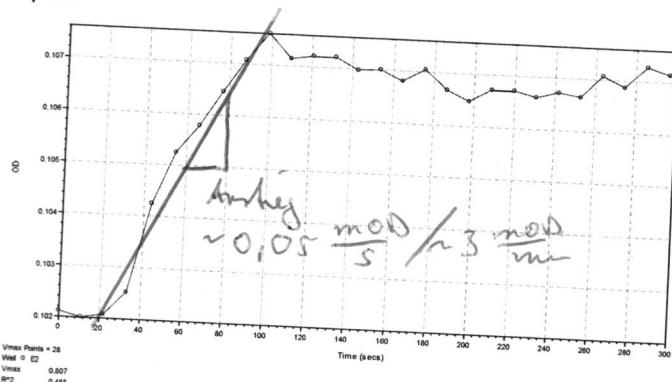
- Die Reaktion wurde durch Enzymzuge geben und
- * bei 37°C inhibiert die Katalyse. Die Inhibition bei 612 nm (gelb) wurde gemessen

Layout d. Microplate:

SALT $c(\mu\text{M})$	0	5	10	...
Replicates	1	1	1	
	2	2	2	
	3	3	3	
Denatured Enzyme)	0	0		
15 min @ 95°C				

Pogresskurven:

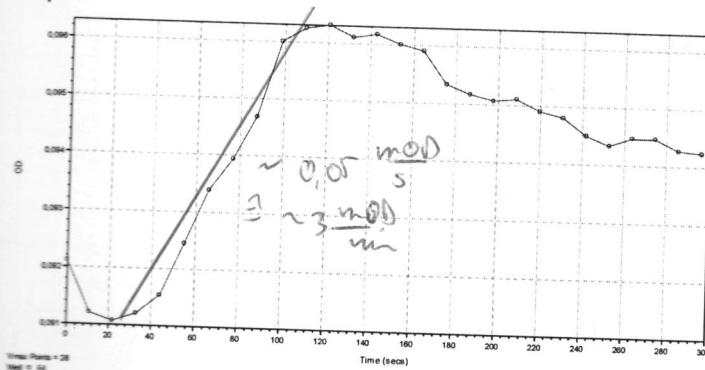
0 μM



- 0 μM SALT, 50 μl natives SALT

10 μM SALT, 50 μl inhibitorhaltiges SALT:

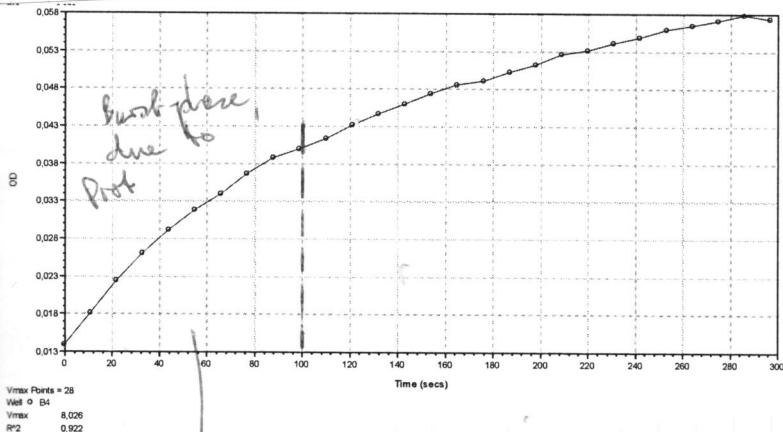
10 μM



Softmax Pro:

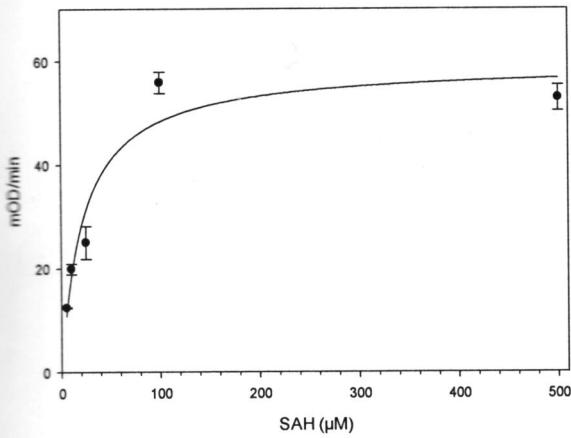
vorliegt in mol/min

10 μM SAH, 50 μl native SAH:



Burstphase, die durch Kon von DTNB und Enzym-SAH-Sorgen kommt?

→ Reaktionsrate durch Substratrate?



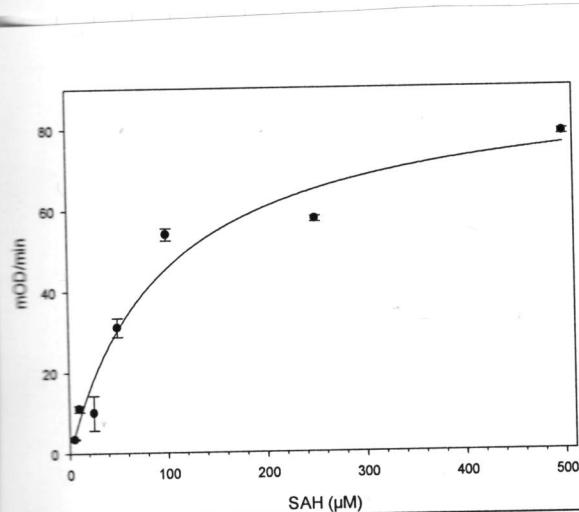
$$f = V_{\text{max}} \cdot x / (K_m + x)$$

R	Rsq	Adj Rsq	Coefficient	Std. Error
0,9631	0,9275	0,9034		
V _{max}	59,1778	6,0962		
K _m	22,3719	8,2877		

Reaktion bei 34°C

WEB 2015

→ sehr kurzel.
- SAH & DTNB in
30% Melitt Puffer
gelöst
(09.05.12)



$$f = V_{\text{max}} \cdot x / (K_m + x)$$

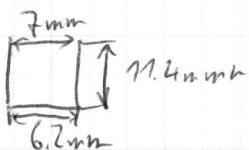
R	Rsq	Adj Rsq	Coefficient	Std. Error
0,9787	0,9579	0,9495		
V _{max}	90,7905	10,1829		
K _m	99,3805	31,1753		

bei 37°C

(09.05.12)

→ zweite Mikrotiter
Kunstik

- durch SAH in 0,05N HCl gelöst
- DTNB in Puffer
- durch Enzymreakt
getestet

Mikrotitplatte

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot h$$

$$150 \mu\text{l} = \pi \cdot 3,2^2 \cdot h$$

$$\underline{h = 4,275 \text{ mm}} \quad \text{füllhöhe (in stava)} \\ \text{bei } 150 \mu\text{l}$$

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$$\underline{\epsilon_{\text{Element}} = 13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (DINB red.)}}$$

$$\frac{dE}{dt} = \epsilon \cdot \frac{dc}{dt} \cdot d$$

$$\frac{dE}{dt} \rightarrow V_{\text{max}}$$

$$\frac{dc}{dt} = \frac{\frac{dE}{dt}}{\epsilon \cdot d} = \frac{V_{\text{max}}}{\epsilon \cdot 0,4275 \text{ cm}} = \frac{(\text{mol}/1000)}{\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{cm}} \approx \frac{0}{\text{min}}$$

$$\frac{dc}{dt} = \frac{(90,7905 \text{ mol}/1000)}{13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 0,4275 \text{ cm}} = 1,55 \cdot 10^{-5} \frac{\text{M}}{\text{min}}$$

$$1,55 \cdot 10^{-5} \frac{\text{M}}{\text{min}} \cdot 0,0001 \text{ l} = 2,33 \cdot 10^{-9} \frac{\text{mol}}{\text{min}} \\ (\checkmark) \quad = 2,33 \cdot 10^{-3} \frac{\text{nmol}}{\text{min}}$$

$$\text{m (Enzym)} \rightarrow 50 \mu\text{l} \times 2,33 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 116,5 \mu\text{g}$$

$$\frac{2,33 \cdot 10^{-3} \frac{\text{nmol}}{\text{min}}}{0,1165 \mu\text{g}} = 0,02 \frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \mu\text{g}} = 0,02 \frac{\text{U}}{\mu\text{g}}$$

→ grob angehoben, da Schichtdicke in Mikrotitplatte unbekannt

SAHH-Assay in der flüssigkeitszelle

11.05.12

(WEB 105)

Serie: JASCO V-560

- DTNB + Enzym verinkubieren bei RT für 10 min
- Assay volume ~~150 µl~~ in KPi Gesamtvolume Assay 300 µl
- 225 µM DTNB
 - 3mM DTNB-hog in Assaybuffer hergestellt ($1.183 \frac{\mu M}{\text{ml}}$)
 - 4mM SAHH-hog in 50mM HCl hergestellt ($1.531 \frac{\mu M}{\text{ml}}$)
 - DTNB-hog auf 450 µM in Buffer verdünnt
 - 5µl ~~650 µM~~ DTNB
- $50 \mu\text{l } 3\text{mM DTNB-hog} + 50 \mu\text{l SAHH} \Rightarrow 10 \text{ min bei RT inkubiert}$
- $\rightarrow 100 \mu\text{l Buffer (50mM KPi, pH 7.6, 1\% glycol) zugegeben}$
- $\rightarrow 10 \text{ min bei RT inkubiert}$
- Reaktion durch Substratzugabe gestoppt ($50 \mu\text{l SAHH-hog}$)
 - Anfangswert der ersten 10 s gemessen

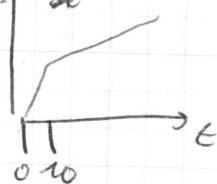
- SAHH-hog (4mM) in 0.05N HCl hergestellt, dann verdünnt auf $1.5 \text{mM} - 5 \mu\text{M}$ durch Zugabe von Buffer bzw. 0.05N HCl

C(End)	V0	SAHH(Gesamt)	OD260 HCl	V(Buffer)
1.5 mM	1:4.6	37.5 µl	-	62.5 µl
750 µM	1:5.3	187.5 µl	187.5	
300 µM	1:1.83	75 µl	300	
150 µM	1:2.66	37.5 µl	333.3	
<hr/>				
400 µM	1:5.7	187.5 µl	187.5	
30 µM	1:1.73	7.5 µl	300	
15 µM	1:2.66	3.75 µl	333.3	
5 µM	1:8.0	1.25 µl	367.5	

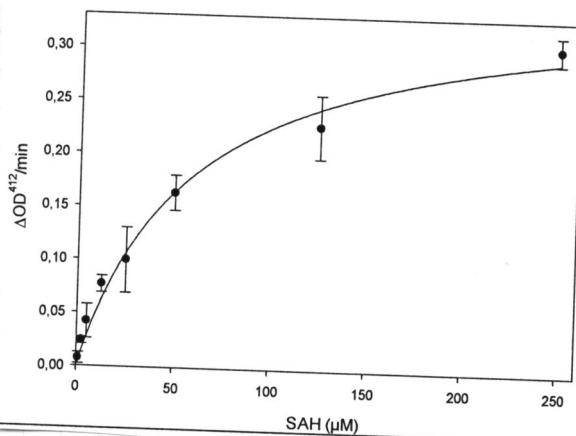
→ Zugabe von $50 \mu\text{l } 5\text{mM}-7.5\text{mM}$
 SAHH
 → dann 300S Probenkarte
 abgeronnen

Progressionen sehen eigentlich aus

- steile Anfangsphase für die ersten 20-50s (linearer Anstieg)
- danach Verzögerung der Geschwindigkeit $A_p \neq \text{konst}$
- Anstieg für die erste 10 sekunde berechnet und Kinetic erstellt



2D Graph 1
 $f = a \cdot x / (b + x)$



Menü bei L5

$$f = V_{\max} \cdot x / (K_m + x)$$

R	Rsqr	Adj Rsqr
0,9937	0,9875	0,9854

Coefficient	Std. Error
Vmax	0,3613
Km	60,0113

$$V_{\max} =$$

$$\frac{0,3673 \text{ OD/min}}{73700 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}^{-1}} = 2,637 \cdot 10^{-5} \frac{\text{M}}{\text{min}}$$

$$2,637 \cdot 10^{-5} \frac{\text{M}}{\text{min}} \cdot 0,00032 = 7,9 \cdot 10^{-9} \frac{\text{mol}}{\text{m}} = 7,9 \cdot 10^{-3} \frac{\text{pmol}}{\text{m}}$$

$$A_{sp} = \frac{7,9 \cdot 10^{-3} \frac{\text{pmol}}{\text{m}}}{50 \mu\text{l} \cdot 2,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}} = 0,069 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$$

Klonierung der lsr-Gene region

WEB 101

pMLB1034 plasmid Ausschnitt (LacZ ORF und MCS):

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
.....[....].....[....].....[....].....[....].....[....].....[....].....[....].....[....]
aagaatcccgggatccgtcgtttacaacgtcgactggaaaaccctggcgtaaccaaacttaatcgccctgcagcacatcccccttcgcccac
D E V V L Q R R D W E N F T V Q L H R D A A H P P I A S
110     120     130
.....[....].....[....].....[....].....[....]
tgccgttaatcgcaagaggccgcaccatcgcccttc
W R N S E H A R T D R P

```

LacZ Ecoli

```

1 [mttslavvl qrrdwenpgv tqlnrlaahp pfaswrnsee artnrpsql rslngewrfa
61 wfpapeavpe swlecdlpea dtvvvpnsnq mhgydapiyt nvttypitvp pfvpaeptg
121 cysltfnide cwlgqeqtri ifdfgvnsafh lwcngrwvgy gqdsrlpsef dlsaflrage
181 nrlavmvlrw sdgsyleddq mwrmsgifrd vsllhkpttq isdfhvatrff nddfsrasvle
241 aevqmcgeir delrvtslw qgetqvasgt tpfggeiide rggyadrvtl rlnvenpalw
301 saeipniyra vvelhtadgt lieaeacdvg frevriengl llngkplli rgvnrehhp
361 lhgqvmdqet mwqdlmmq nfnnavrcsh ypnphplwykl cdryglyvvd eaniethgmv
421 pmnrltddp wlpamservt rmvqrdrnh sviwsllgne sghganhdal yrwiksvdps
481 rpvyegggaa ttatdiicp myarvdedgp fpavpkwsik kwlspgelr plilceyaha
541 mgnsllggfak ywgafrygpr lqggfvwdwv dqslikyden gnpwsayggd fgdtppndrqf
601 cmnglvfad rphpalteak hqqqffqfrl sgrtievst ylfrhsndel lhwtvaldgk
661 plasgevpld vapqgkqvie lpelpgesa gqlwlvhvv qpntawsea ghisawqqwr
721 laenlsvtlp saphaipqlt tsetdfciel gnkrwqfnrq sgflsqmwig dekqltlpr
781 dgftrapldn digvseatri dpnaawverwk aaghqyaeaa llqctantla davlittaha
841 wqhqqktlf1 srktyrids gqmaitydvve vtsdtpphpar igtclqlaqv aervnwlgig
901 pqenypdrlt aacfdrwdlp lsdmytpyvvf psenglrcgt relnygphqw rgdfqfnisr
961 ysqqqlmets hrhllhaeeg twlnidgfhm giggddswsp svsaefqlsa gryhyqlvwc
1021 qk

```

Primerdesign:

Ausschnitt pMLB1034 plasmid: 5'-a ag'a att ccc ggg gtt ccc gtc gtt t-3'

D	P	V	V..
EcoRI	BamHI		

\rightarrow p-lsr-fw

5'-GAATTCTTCACTTGAACTAT-3' (forward primer, 49-58°C)

5'-AATTCTTCACTTGAAACATATTAAATTTAAATGCAATTGTCAGTTCTGCTCATTTATATCTGTGATGGCAACCACAGTTGACTCTACGAGC-3'

5'-ATGAACAAACGCAACCGTGAATAAGCATAAAATTGTGATCTATTGTCGGAAATATGTGCAATGCCACCTAACGTTATGAACAAATTAAAAGC-3'

Aminosäuresequenz Start codon

M DPVVL...

ATG...

5'-AGAAATACATTGTTCAAACCTCACCTGAAACACTGAACGGGGAAAT-3'

3'-GTTTGACTTGCCTCTTATACCTAGG-5' (reverse primer, Tm = 50-56°C or 60-68°C)

5'-CAAAACTGAAACGGGAAATATGCAAC-3' \rightarrow p-lsr-rv

3'-GTTTGACTTGCCTCTTATACCTAGG-5' 5'-GGATCCATTTCCCCGTTCAAGTTTG-3'

Ohne Schnulli:

ATTCATTCTTCACTTGAAACATATTAAATCTTAATGCAATTGTCAGTTCTGCTCATTTATATCTGTGATGGCAACCACAGTTGACTCTACGAGC
ATGAACAAACGCAACCGTGAATAAGCATAAAATTGTGATCTATTGTCGGAAATATGTGCAATGCCACCTAACGTTATGAACAAATTAAAAGC
AGAAATACTTGTCAAACACTGCAACGGGGAAAT

Isolierung von E.coli genomischer DNA:

- 5 ml UN-Kultur (ohne AB)
- Pelletiert und DNA gepumpt wurde → 5,5 (WEB 080)
- 4410 µg/ml DNA $\frac{E_{260}}{E_{280}}$

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

PCR (von Sandra machen lassen):

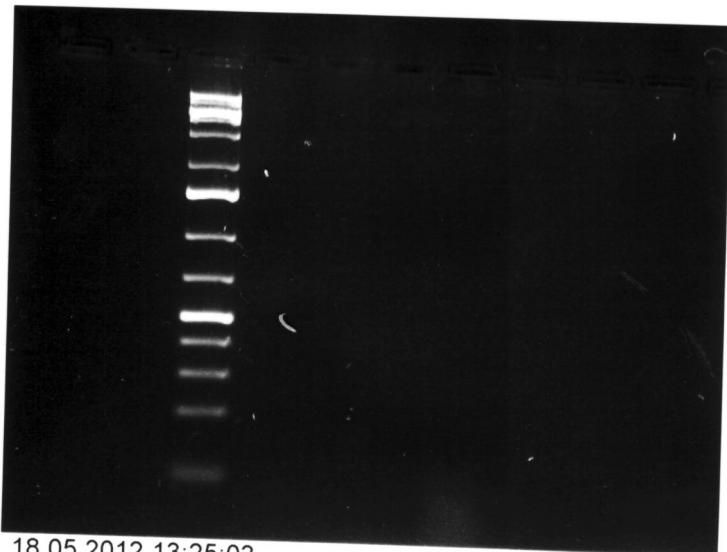
20x Pfu Buffer + MgSO ₄	8 µl
dNTPs (20 mM)	1 µl
p-lsr-fw primer	1 µl
p-lsr-rev primer	1 µl
template (gen. DNA)	je 1x 5 µg 150 ng (1 µl)
ad ddH ₂ O	50 µl
Pfu Pol	0,5 µl
ad ddH ₂ O	50 µl

PCR-Programm:

Denature	98°C	3 min
"	95°C	30 s
Anneal	55°C	30 s
Elongate	72°C	1 min
"	72°C	15 min
	4°C	∞

→ auf \approx 2%iges Agarosegel aufgetragen (je 10 µl)
 → Glycerol marker (1 µl)

→ keine Bande \rightarrow \approx



18.05.2012 13:25:03

Enhancement: 1
Exposure Time: 904Brightness: 50
Contrast: 50
Gamma: 25

→ nochmal ne neue PCR → template bzw. what's poly
- Touchdown PCR, um evtl. Bande zu bekommen

Ansatz: → wie S. 76

PCR-Programm:

Denaturer	95°C	3min	
"	95°C	30s	7 → -0,5 K/cycles
Anneal	60°C	30s	30s
Elongate	72°C	1min	
"	72°C	15min	
	4°C	∞	

→ leider wieder keine Bande

→ Primer neu bestellen:

- forward primer p-lsr-fw ist suboptimal,
da GC-content gering, geringe Tm, evtl.
hindernde Bildung

Neuer forward-Primer mit höherem GC Gehalt

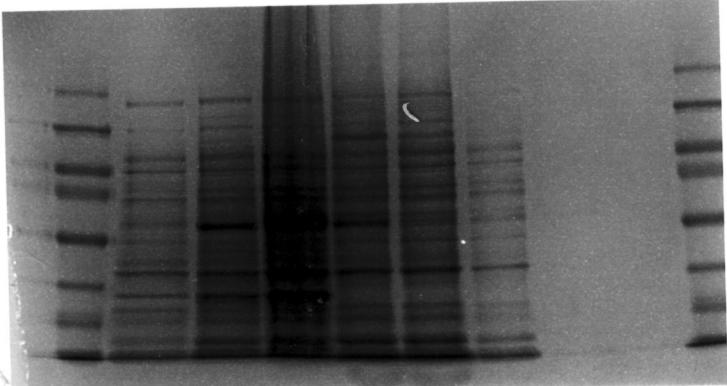
E.coli K12 genome	CTTTCTTCTTCACACATTCCCTGTTCTGAATTGCCGAATCGTTGATTGTCATAATTCAATTCTTCACTTTGAACATATTAAATCTTTATGCAATTGT
lsr promoter	AATTCAATTCTTCACTTTGAACATATTAAATCTTTATGCAATTGT
lsrR ORF	CTTTCTTCTTCACACATTCCCTGTTCTGAATTGCCGAATCGTTGATTGTCAT GAATTCTGAATTGCCGAATCGTTGATTGTC
ECORI	<-----ORF-----
5' -GAATTCTGAAATTGCCGAATCGTTGATTGTC-3'	31bp, CG=38,71%, Tm=58,7°C
BamHI	neu: p-lsr-fw2
5' -CAAAACTGAACGGGGAAATATGGATCC-3'	28bp, CG=46,43%, Tm=59,9°C

→ neue Primer evtl. besser?

CsTPS1-Reinigung durch Claudia:

14.08.12

C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pfl
anzenbio\Desktop\HLC\Reinigung_CsTPS1_Gel1_16.05
.12.TIF



18.05.2012 12:48:01

Enhancement: 1

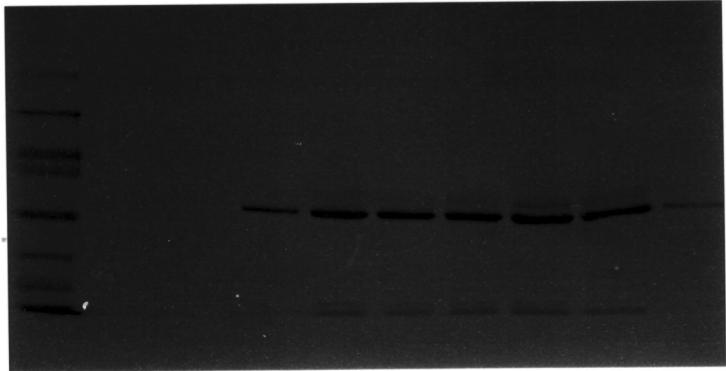
Exposure Time: 40

Brightness: 50

Contrast: 50

Gamma: 25

C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pfl
anzenbio\Desktop\HLC\Reinigung_CsTPS1_Gel2_16.05
.12.TIF



18.05.2012 12:44:31

Enhancement: 1

Exposure Time: 20

Brightness: 50

Contrast: 50

Gamma: 25

Proteinkontamination mittels Bradford:

	OD595	c (µg/ml)
B	0	0
F1	0,003	6,12244898
F2	0,007	14,2857143
F3	0,005	10,2040816
F4	0,052	106,122449
F5	0,147	300
F6	0,151	308,163265
F7	0,136	277,55102
F8	0,139	283,673469
F9	0,151	308,163265
F10	0,006	12,244898

→ schlechte Proteinaustritt

WEB108PCR zur Amplifizierung des lsr-Operons

- mit neuem Prime p-lsr-fw2 durchgeführt

4x MM

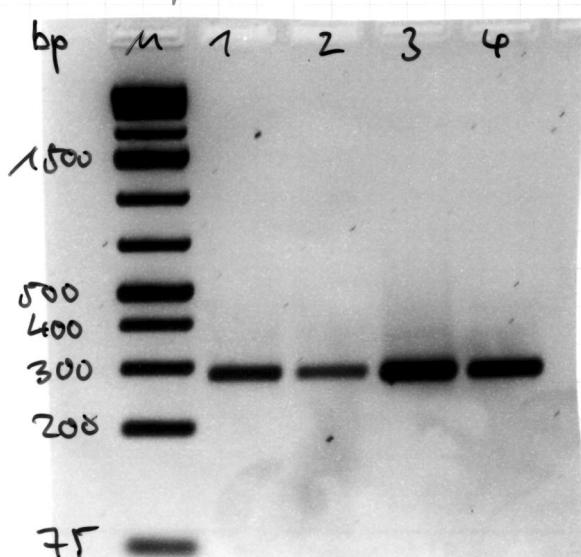
10x Pfu buffer (+MgSO₄) 20µl
 10mM dNTPs 4µl
 p-lsr-fw2 (10 pmol) 4µl
 p-lsr-rev (10 pmol) 4µl
 Pfu Polynsorase 2µl
 ad. + 20µl mit ddH₂O

PCR-Programm

Denature	95°C	3s
-	95°C	30s
Anneal	60°C	30s
Elay	72°C	7m
-	72°C	7s
	4°C	OD

→ 4x PCR

- 1 - 50ng genom. DNA (E.coli) vom (WEB101-Rp)
 2 - 5ng —
 3 - 50ng genom. DNA (vom 28.07 (WEB080))
 4 - 5ng —
 → je 10µl auf Gel ansetzen



→ Marker: GeneRuler 1kb plus

→ Zielgröße 272 bp

→ Bande etwas kleiner als 300 bp → punkt



Amplifiziertes Fragment:

GAATTCTGAAATTGCCGAATCGTTGATTGTATAATTCAATTCTTCACTTGAAACATATTAAATCTTAATGCAATTGTTCAGTTGCTCATTATATCTGTGATGG
 CAACCACAGTTGACTCTACGAGCATGAAACAAACGCAACCGTGAAATCAAATAGCATAAATTGTGATCTATTGTCGAAATATGTGCAATGTCCACCTAACGGTTAT
 GAACAAATTAAAAGCAGAAATACATTGTTCAAAACTCACCTGCAAAACTGAACGGGGAAATATGGATCC → LacZ

→ 272 bp

start codon

→ 1,2,3,4 vereinigt und Konzentration gemessen

$$E^{260} = 0,461$$

$$c = 22,1 \mu\text{g/ml}$$

$$\times 35 \rightarrow \underline{773,5 \mu\text{g/ml}}$$

(≈ 150 µl)

29.05.12

- vom erhaltenen Stamm mit pMC81034 transformiert
- 5 ml Kultur (LB) mit Amp; (31°C, 300 rpm)
- auswachsen auf Platte vereinzelt

30.05.12

- Miniprep mit 5 ml -Kultur (komplett)
- ~~Kultur~~ mit 50 µl $\text{SDS-H}_2\text{O}$ diluiert
- Konzentration: $37 \mu\text{g/ml}$
und $7 \mu\text{g/ml}$
- nochmal im Halbprep Kultur (50 ml) mit Cetyltrimonium oxigiert

WE B 10g

31.05.12

- 50 ml Übernachtkultur vom Vortag
pelletiert für 10 min @ 4°C / 10.000 rpm*

Lösung A:

- 50 mM Glucose
 - 25 mM ^{D(+)}EDTA
 - 10 mM

Lösung B: 0,2 N NaOH
 1% (w/v) SDS

Lösung C:

- 3 M KOAc pH 5,2 $3M \text{ NaOAc} = 0,246 \frac{g}{ml}$

- ① Pellet in 2 ml Lösung A suspendiert (Vortexen)
 - 250 µg/ml RNase A und 1,25 mg/ml Lysozyme zugeben
 - 10 min @ RT inkubiert
- ② 10 ml Lösung B zugeben und durch invertieren mischen
 - 10 min @ RT inkubieren
- ③ 7,5 ml Lösung C und 1 ml Chloroform zugeben und durch invertieren mischen
 - 15 min @ 10.000 rpm / 4°C zentrifugieren
- ④ Überstand durch groben Filter (Faltenfilter) filtrieren in ein neues Gefäß
- ⑤ 0,6 Volumen (11 ml) Isopropanol zugeben und mischen
 - 10 min @ RT! / 10.000 g zentrifugieren
 - Überstand丢弃en wenn nicht RT
 - Salz fällt aus

(6) Pellet mit 1ml 70% Ethanol waschen

- zentrifugieren
- Überstand verwirfen
- Pellet trocken (nicht zu lange sonst löst es sich schlecht wieder lösen)

(7) Pellet in 500µl TE-Puffer aufnehmen

- 500µl 5M LiCl zugeben und 10 min auf Eis inkubieren
- 10 min @ RT / 10000x_g zentrifugieren
- Überstand in ein neues 2ml Eppi

(8) 1 Volumen (1 ml) Isopropanol zugeben, mischen und 10 min @ RT inkubieren

- 10 min @ RT / 10000x_g zentrifugieren
- Überstand verwirfen und Pellet mit 100µl 70% Ethanol waschen
- 10 min @ RT / 10000x_g zentrifugieren
- Pellet bei 5 min @ 55°C trocknen

(9) Pellet in 375µl TE-Puffer aufnehmen

(10) 700µl Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) zugeben und durch Invertiereln mischen

- 2 min @ 10k_g zentrifugieren und abziehen
- die obere (wässrige) Phase in neues Eppi überführen

(11) wässrige Phase mit 700µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) mischen (durch rütteln)

- 2 min @ 10000x_g zentrifugieren
- ~~abziehen~~ obere, wässrige Phase in ein neues Eppi geben

- (12) - 750 µl Ethanol (absolut) und 725 µl 3 M NaOAc zugeben, mischen und 30 min @ -80°C (Proteineis) inkubieren
- (13) 10 min @ RT / 10000 × g Zentrifugieren
- (14) Pellet mit 100 µl 70% Ethanol waschen
 - zentrifugieren 10 min @ RT / 10000 × g
 - Pellet trocknen (5 min @ STC)
- (15) Pellet in 200 µl TE-Puffer aufnehmen

→ 1:1000 in TE-Puffer verdünnt um Konzentration zu bestimmen

$$E^{260} = 0,268 \quad E^{260}_{280} = 2,04 \rightarrow \begin{matrix} \text{jede Qualität} \\ \text{hohe Qualität} \end{matrix}$$

$$\hookrightarrow \underline{\underline{13,4 \text{ mg/ml}}}$$

→ 1:13,4 verdünnt auf 1/10 und zu je 500 µl aliquotiert

WEB110Verdau von plasmid und Operon (WEB108)

- Isr-Operon (PCR-Reaktion WEB108) und pMLB1034 verdaut mit BamHI und EcoRI
- Double digest → empfiehlt 2x Tugger buffer und 2x Wäsche von BamHI

Verdau PCR-Ren:

10 µl PCR-Ren (10x)
 4 µl Tugger buffer (10x)
 1 µl EcoRI
 2 µl BamHI
 3 µl ddH₂O

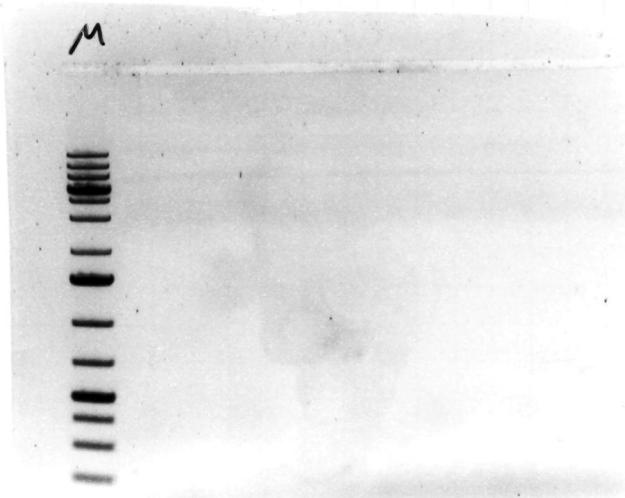
Verdau pMLB1034

10 µg pMLB1034 10 µl (at 1 µg/µl)
 40 µl 10x Tugger buffer
 2.5 µl EcoRI
 5 µl BamHI
 142 µl ddH₂O

- über Nacht @ 37°C inkubiert
- Hitzekühlung bei 80°C für 20 min

- Plasmid verdau (alle 200 µl) auf Agarosegel auftragen und @ 100V dienten laufen

M — Jordan —

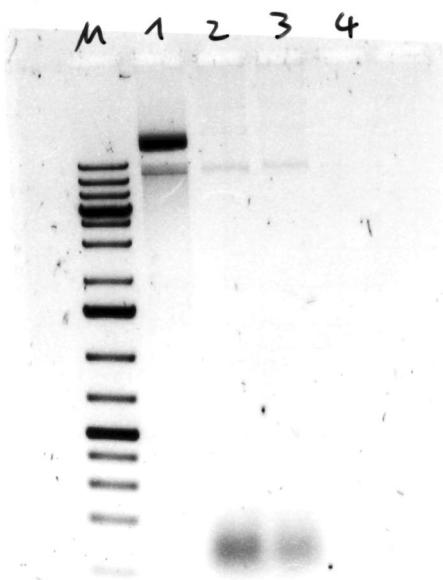


M - ~~As~~ GeneRuler 1KB Ladder plus

→ leider keine ausreichende Bande

01.06.2012 11:22:58

→ Plasmid mal unverdünnt aufgezogen



M - GeneRuler 1KB Ladder plus
1 - pMLB 1034 von Miniprep
(30.05.12) → 10µl angetragen
(35 µg / µl)

2 - 1µl pMLB 1034 von Maxiprep
(1 µg / µl)

3 - 10 µl pMLB 1034 — —
(0,134 µg / µl)

4 - — — —
(0,0134 µg / µl)

01.06.2012 14:00:27

→ ~ wo ist das Plasmid?

→ Warum ist die Konzentrationsbestimmung per Photometer so hoch?

WEB107Autoinduktions-Test expression

nach Studier 2005

Medianwww.microbiology.emory.edu/altman/jdawebSite-v3/p-tet-autolinduction.shtml

ZY

- 10 g N-Z-mine AS (or my tryptic digest of casein, e.g. tryptone)
Sigma cat# N8317
- 5 g yeast extract
- We use the powdered extract from EM Sciences, available from TWR
TWR cat# E11 03733.0500
- 925 ml water

20x NPS

Component	100 ml	1 liter	seed liter
40 H ₂ O	90 ml	900 ml	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.6 g	66 g	0.5 M
KH ₂ PO ₄	13.6 g	136 g	1 M
Na ₂ HPO ₄	14.2 g	142 g	1 M

- Add in sequence in beaker, stir until all dissolved
- pH of 20-fold dilution in water should be ~6.75

50x502: (5052 = 0.5 % glycerol, 0.05% glucose, 0.2% α -lactose)

Component	100 ml	1 liter
Glycerol (weigh in beaker)	25 g	250 g
H ₂ O	73 ml	730 ml
Glucose (Fisher FLBP254-1)	2.5 g	25 g
α -lactose (Sigma cat# L2425)	10 g	100 g

- Add in sequence in beaker, stir until all dissolved

- Lactose is slow to dissolve — may take two hours or more of stirring. Brief heating in a microwave can speed up dissolution of the lactose

1 M MgSO₄

- 24.65 g MgSO₄·7H₂O
- Water to make 100 ml

40% glucose (w/v)

Component	100 ml	200 ml
Glucose (Fisher FLBP254-1)	40 g	120 g
H ₂ O	74 ml	222 ml

- Add glucose to stirring water in beaker; DO NOT ATTEMPT TO ADD WATER TO GLUCOSE!
- Stir until all dissolved — may take 45 minutes or more of stirring.

80% glycerol (v/v) (= 100% w/v)

- 100 g glycerol (weigh in beaker)
- 20 ml water

20% α -lactose (w/v)

Component	100 ml	400 ml
α -lactose (Sigma cat# L2425)	20 g	120 g
H ₂ O	87.5 ml	525 ml

- add lactose to stirring water in beaker
- stir until all dissolved — may take 2 hours or more

1000x trace metals mixture (100 ml in ~50 mM HCl)

Prepare all metal stock solutions in dH₂O, except for FeCl₃, which is dissolved in ~0.1M HCl, as noted in the table below. Combine the metal solutions as in the table below.

Component	Vol	MW	1x conc
H ₂ O	36 ml	-	-
8.1 M FeCl ₃ ·6H ₂ O (dissolve in ~0.1 M HCl + 100 fold dil of cone HCl)	50 ml	270.30	50 μ M Fe
1M CuCl ₂	2 ml	110.99	20 μ M Cu
1M MnCl ₂ ·4H ₂ O	1 ml	197.91	10 μ M Mn
1M ZnCl ₂ ·H ₂ O	1 ml	287.56	10 μ M Zn
0.2 M CuCl ₂ ·2H ₂ O	1 ml	237.95	2 μ M Cu
0.1 M CuCl ₂ ·2H ₂ O	2 ml	170.486	2 μ M Cu
0.2 M NiCl ₂ ·6H ₂ O	1 ml	237.72	2 μ M Ni
0.1 M Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2 ml	241.98	2 μ M Mo
0.1 M Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	2 ml	263.03	2 μ M Se
0.1 M H ₃ BO ₃	2 ml	61.83	2 μ M H ₃ BO ₃

Autoclave the stock solutions of the individual metals, except 0.1 M FeCl₃ in 1/100 volume cone HCl.A brief precipitate appeared upon addition of Na₂SeO₃, which redissolved rapidly.

Store at room temperature

When making growth media, add the metals mix before NPS. If NPS is already present when 1000x metals mix is added, a precipitate forms which disperses but retains a light turbidity. If the metals are diluted to near their final concentration before NPS is added, the medium remains clear. The metals also precipitate and disperse or redissolve when added to ZY; a precipitate caused by yeast extract. Although apparently not a problem, the precipitate could be avoided by diluting the metals in the water before dissolving the yeast extract in making ZY.

Antibiotics

- Kanamycin (25 mg/ml in water, filter sterilize)
- Chloramphenicol (25 mg/ml in 95% ethanol, filter sterilize)
- Ampicillin (50 mg/ml in water, filter sterilize)

P-0.5G defined medium for growth to saturation with little or no induction

- grow log-phase or saturated cultures for making feeder stocks and working stocks
- For all media, add 1 M MgSO₄ and 1000x metals mix before adding 20xNPS to avoid precipitate

Component	50 ml	100 ml	200 ml	Final concentration
40 H ₂ O (sterile)	-46.8 ml	-93.6 ml	-187.3 ml	-
1 M MgSO ₄	50 μ l	100 μ l	200 μ l	1 mM
10000x metals mix	5 μ l	10 μ l	20 μ l	1
40% glucose	0.625 ml	1.25 ml	2.5 ml	0.5%
20x NPS	2.5 ml	5 ml	10 ml	1 x
antibiotics	Choose only 1 from the list below			
kanamycin (25 mg/ml)	0.2 ml	0.4 ml	0.8 ml	100 μ g/ml
chloramphenicol (25 mg/ml)	50 μ l	100 μ l	200 μ l	25 μ g/ml

amp (50 mg/ml) 50 ml 100 ml 200 ml 50 mg/ml

ZYP-0.8G

- Rich medium for growth with little or no induction
- Cultures should go somewhat acid at saturation (slightly below pH 6)
- Collect cultures for freeze stocks well before saturation
- For all media, add 1 M MgSO₄ before adding 20nPS to avoid precipitate
- Kanamycin is used at significantly higher concentrations (100 µg/ml) than is normally the case (25-40 µg/ml). Shuler has found that in the T7 expression strains in these rich media, it does not provide adequate selection at the lower concentrations

Component	50 ml	100 ml	200 ml	400 ml	Concentration
ZY	-46.5 ml	-93 ml	-186 ml	-372 ml	-
1 M MgSO ₄	50 µl	100 µl	0.2 ml	0.4 ml	1 mM
40% glucose	1 ml	2 ml	4 ml	8 ml	0.8%
20nPS	2.5 ml	5 ml	10 ml	20 ml	1x
Antibiotics, as needed					
Choose only 1 from the list below					
kanamycin (25 µg/ml)	200 µl	0.4 ml	0.8 ml	1.6 ml	100 µg/ml
chloramphenicol (25 µg/ml)	50 µl	100 µl	0.2 ml	0.4 ml	25 µg/ml
ampicillin (50 µg/ml)	50 µl	100 µl	0.2 ml	0.4 ml	50 µg/ml

+ 0.2x
Trace
Metals

ZYP-5052 rich medium for auto-induction

- For all media, add 1 M MgSO₄ before adding 20nPS to avoid precipitate
- Kanamycin is used at significantly higher concentrations (100 µg/ml) than is normally the case (25-40 µg/ml). Shuler has found that in the T7 expression strains in these rich media, it does not provide adequate selection at the lower concentrations
- We use 400 ml in a 2 liter baffled flask

Adequate aeration is essential to the performance of this media. Don't even think about using more than 20% of the nominal volume of the flask. Baffled flasks will give significantly better performance. You might obtain adequate results with non-baffled flasks, but I don't recommend it.

Component	200 ml	400 ml	500 ml	1 liter	Concentration
ZY	-186 ml	-372 ml	-464 ml	-928 ml	-
1 M MgSO ₄	0.2 ml	0.4 ml	0.5 ml	1 ml	1 mM
Sta's 5452	4 ml	8 ml	10 ml	20 ml	1x
20nPS	10 ml	20 ml	25 ml	50 ml	1x
Antibiotics					
Choose only 1 from the list below					
kanamycin (25 µg/ml)	0.8 ml	1.6 ml	2 ml	4 ml	100 µg/ml
chloramphenicol (25 µg/ml)	0.2 ml	0.4 ml	0.5 ml	1 ml	25 µg/ml
ampicillin (50 µg/ml)	0.2 ml	0.2 ml	0.5 ml	1 ml	50 µg/ml

+ 0.2x
Trace
Metals

LB Agar plates + 1% glucose

- Sterile LB agar as usual for pouring plates. Allow agar to cool to 55-60 °C, usually in a 56 °C water bath.
 - Add 1/40 volume of 40% glucose (e.g. for 400 ml, add 1 ml glucose)
 - Add antibiotic to an appropriate concentration
 - Pour the plate

Resuspension Buffer

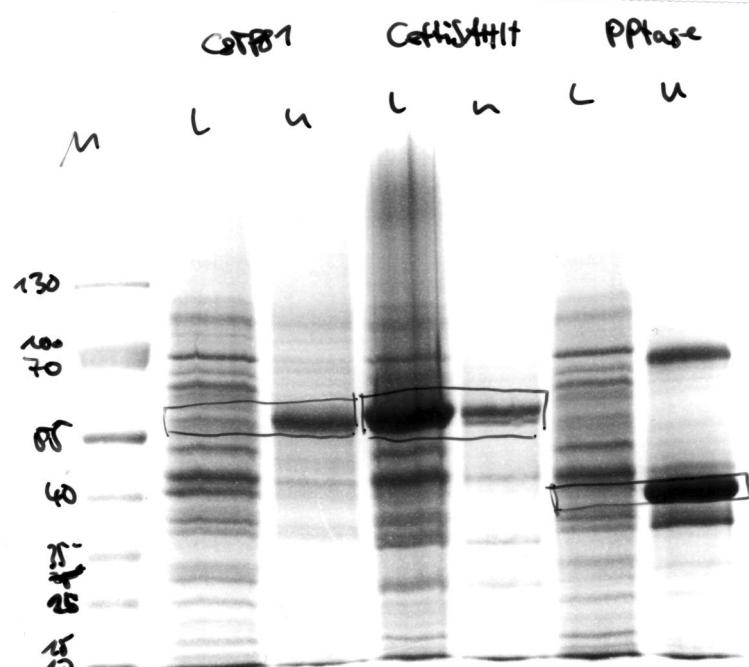
- 50 mM Tris-HCl
- 25% (W/V) sucrose
- 1 mM EDTA
- 0.1% (w/v) NaDode
- 10 mM DTT (add fresh)

Vorgehen:

- 2ml Vorbultur (ZYP-0.8G / nicht-induziert) mit Einzelholome angewippt
- 6h bei 37°C und 300rpm schütteln lassen
- 1:2000 in 2ml Kultur (ZYP5052 / induziert) ansetzen
Überwippt (1µl)
- über Nacht (ca. 16h) bei 37°C / 300rpm inkubiert
low. 20h @ 20°C / 300 rpm
- 1ml Zellsuspension entnommen und pelletiert (10000 rpm / 10 min)
- Zellpellet in N₂(g) eingetauchen → Vakuum 00° C sterilisiert

Lypse (abgewandelter S-PER II Prototyp):

- gehobene Zellen in x^{pl} S-PER II - Lösung resuspendiert
 - $x =$
 - 150 μ l bei $OD^{600} = 1-3$
 - 300 μ l bei $OD^{600} = 3-6$
 - 500 μ l bei $OD^{600} > 6$
- für 1 minute geooctet; 20 μ g/ml Lysozyme zugebe und 10 min @ RT inkubiert
- \oplus in Flüssig N₂ eingefroren
- aufgetaut, kurz geooctet
- für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert um lösliche und unlösliche Fraktion zu trennen
- lösliche Fraktion abgesaugt → und je 10 μ l für SDS-PAGE
- unlösliche Fraktion in x^{pl} (zwei ohe) S-PER II resuspendiert
→ 10 μ l auf gel (SDS-PAGE)



30.05.2012 16:33:31

Enhancement: 1
Exposure Time: 100Brightness: 50
Contrast: 50

-GTPS1 @ 37°C

→ meist Protein in unlöslicher Fraktion

-SATH @ 37°C

→ Protein in löslicher Fraktion (das meiste)

-PPhase @ 37° f₄₈KDa)

→ Protein unlöslich

l → lösliche Fraktion

u → unlösliche Fraktion

gl GIPS1 20°C /20L:

- pML31034 von Miniprep → in DHS & trans Röntgen (~5 µg) und ausplakatet (am 1 (8-1 Amp))
- Über Nacht @ 37°C
- > 500 Kolome

Nochmal Maxiprep:

- 2 x 50 ml LB + Amp mit E.coli DH5 α pMCB1034
- Erreihbaren angeimpft
- über Nacht bei 37°C / 300 rpm inkubiert
- 1x Plasmidprep nach Sambrook (molecular cloning); 1x wie VEB109

Lysis of Cells

9. Allow the frozen bacterial cell pellet from Step 7 to thaw at room temperature for 5–10 minutes. Resuspend the pellet in 18 ml (10 ml) of Alkaline lysis solution I.

The volumes given in parentheses in the remainder of this protocol should be used only with cultures that have been treated with chloramphenicol at Step 4.

10. Add 2 ml (1 ml) of a freshly prepared solution of 10 mg/ml lysozyme.

11. Add 40 ml (20 ml) of freshly prepared Alkaline lysis solution II. Close the top of the centrifuge bottle and mix the contents thoroughly by gently inverting the bottle several times. Incubate the bottle for 5–10 minutes at room temperature.

Protocol note: Some of the superheated alkali results in reversible denaturation (Vinegar and Lebowitz 1986). The resulting cyclic coiled DNA cannot be cleaved with restriction enzymes, and it migrates through agarose gels about twice the rate of superhelical DNA and stains poorly with ethidium bromide. Traces of this form of DNA can be seen in plasmids prepared by alkaline lysis of bacteria.

12. Add 20 ml (15 ml) of ice-cold Alkaline lysis solution III. Close the top of the centrifuge bottle and mix the contents gently but well by swirling the bottle several times (there should no longer be two distinguishable liquid phases). Place the bottle on ice for 10 minutes.

A flocculent white precipitate consisting of chromosomal DNA, high-molecular-weight RNA, and potassium (S1)3/protein/cell wall complexes will form during this incubation.

Potassium acetate is used in preference to sodium acetate in Alkaline lysis solution III because the potassium salt of dodecyl sulfate is far less soluble than the sodium salt.

13. Centrifuge the bacterial lysate at ≥20,000g (11,000 rpm in a Sorvall GSA rotor) for 30 minutes at 4°C in a medium-speed centrifuge. Allow the rotor to stop without braking. At the end of the centrifugation step, decant the clear supernatant into a graduated cylinder. Discard the pellet remaining in the centrifuge bottle.

The failure to form a compact pellet after centrifugation is usually a consequence of inadequate mixing of the bacterial lysate with Alkaline lysis solution II (Step 11). If the bacterial debris does not form a tightly packed pellet, centrifuge again at 20,000g (11,000 rpm in a Sorvall GSA rotor) for a further 15 minutes, and then transfer as much of the supernatant as possible to a fresh tube. Decanting the supernatant through four-ply gauze at this step helps to remove traces of viscous genomic DNA and protein precipitate.

Recovery of Plasmid DNA

14. Measure the volume of the supernatant. Transfer the supernatant together with 0.6 volume of isopropanol to a fresh centrifuge bottle. Mix the contents well and store the bottle for 10 minutes at room temperature.

15. Recover the precipitated nucleic acids by centrifugation at 12,000g (8000 rpm in a Sorvall GSA rotor) for 15 minutes at room temperature.

Salt may precipitate if centrifugation is carried out at 4°C.

16. Decant the supernatant carefully, and invert the open bottle on a paper towel to allow the last drops of supernatant to drain away. Rinse the pellet and the walls of the bottle with 70% ethanol at room temperature. Drain off the ethanol, and use a Pasteur pipette attached to a

- 2ml Buffer A
 → 20µl/ml Lysozyme
 → 4ml Buffer B
 → 3ml Buffer C
- Anmerkung:
 keine RNase
 in Schritt ①
 aber es reicht
 in Schritt ③
 bei 4°C gelagert
 bei ④
 + 10µl 1Moy/l/ml
 RNase A in ⑤
- supenant ~ 7ml
 → 4,2ml Isopropanol
 - in 100µl TE
 aufbewahren
 → Konservatior
 bestimmt
 → 1,1mg/ml

dilute
 Pellets

Wesentlich
 kompaktere
 Pellets

Protocol 3: Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Maxipreparation 1.41

vacuum line to remove any beads of liquid that adhere to the walls of the bottle. Place the inverted, open bottle on a pad of paper towels for a few minutes at room temperature to allow the ethanol to evaporate.

If the pellet of DNA is dried in a desiccator or under vacuum, it becomes difficult to dissolve under some circumstances and may denature (Swane et al. 1987). Drying the pellet for 10–15 minutes at room temperature is usually sufficient for the ethanol to evaporate without DNA becoming dehydrated.

17. Dissolve the damp pellet of nucleic acid in 3 ml of TE (pH 8.0).

18. Purify the crude plasmid DNA either by column chromatography (Protocol 9), precipitation with polyethylene glycol (Protocol 8), or equilibrium centrifugation in CsCl-ethidium bromide gradients (Protocols 10 and 11).

19. Check the structure of the plasmid by restriction enzyme digestion followed by gel electrophoresis.

For recommendations on troubleshooting, please see Table 1-5.

The typical yield of high-copy-number plasmid vectors or of amplified low-copy-number vectors prepared by this method is ~3–5 µg of DNA/g of original bacterial culture. The yield of recombinant plasmid DNA is usually lower than the yield of the original vector because of the loss of the cloned DNA fragment. Yields of <10 µg/ml indicate that the plasmid DNA is toxic to *E. coli*; the complete absence of DNA indicates that the plasmid DNA is toxic to *E. coli* during extraction and purification. The first problem can often be solved by switching to a low-copy-number vector or to a vector that carries prokaryotic transcriptional termination signals. The second problem is often the result of accidental loss of the plasmid DNA pellet after ethanol precipitation. It also occurs when the recombinant plasmid is large enough to be precipitated together with the chromosomal DNA after addition of potassium acetate. Such a large plasmid will also be susceptible to breakage during extraction and purification. This difficulty can be solved by using a more gentle procedure of cell lysis, such as that described in Protocol 7.

Plasmid DNA durch PEG-Fällung

METHOD

- Transfer 3 ml of the crude large-scale plasmid preparation to a 15-ml Corex tube and chill the solution to 0°C in an ice bath.
- Add 3 ml of an ice-cold solution of 5 M LiCl to the crude plasmid preparation, mix well, and centrifuge the solution at 12,000g (10,000 rpm in a Sorvall SS-34 rotor) for 10 minutes at 4°C.
- Transfer the supernatant to a fresh 30-ml Corex tube. Add an equal volume of isopropanol. Mix well. Recover the precipitated nucleic acids by centrifugation at 12,000g (10,000 rpm in a Sorvall SS-34 rotor) for 10 minutes at room temperature.
- Decant the supernatant carefully, and invert the open tube to allow the last drops of supernatant to drain away. Rinse the pellet and the walls of the tube with 70% ethanol at room temperature. Carefully discard the bulk of the ethanol, and then use a vacuum aspirator to remove any beads of liquid that adhere to the walls of the tube. Place the inverted, open tube on a pad of paper towels for a few minutes until no trace of ethanol is visible. At this stage, the pellet should still be damp.
- Dissolve the damp pellet of nucleic acid in 500 µl of TE (pH 8.0) containing RNase A. Transfer the solution to a microfuge tube and store it for 30 minutes at room temperature.

Protocol 8: Purification of Plasmid DNA by Precipitation with Polyethylene Glycol 1.61

- Extract the plasmid-RNase mixture once with phenol:chloroform and once with chloroform.
- Recover the DNA by standard ethanol precipitation.
- Dissolve the pellet of plasmid DNA in 1 ml of sterile H₂O, and then add 0.5 ml of PEG-MgCl₂.
- Store the solution for ≥10 minutes at room temperature, and then collect the precipitated plasmid DNA by centrifugation at maximum speed for 20 minutes at room temperature in a microfuge.
- Remove traces of PEG by resuspending the pellet of nucleic acid in 0.5 ml of 70% ethanol. Collect the nucleic acid by centrifugation at maximum speed for 5 minutes in a microfuge.
- Remove the ethanol by aspiration and repeat Step 10. Following the second rinse, store the open tube on the bench for 10–20 minutes to allow the ethanol to evaporate.
- Dissolve the damp pellet in 500 µl of TE (pH 8.0). Measure the OD₂₆₀ of a 1:100 dilution in TE (pH 8.0) of the solution, and calculate the concentration of the plasmid DNA assuming that 1 OD₂₆₀ = 50 µg of plasmid DNA/ml.
- For information on absorption spectroscopy of DNA, please see Appendix 8.
- Store the DNA in aliquots at ~20°C.

→ 100µl H₂O, 50µl PEG-lysate

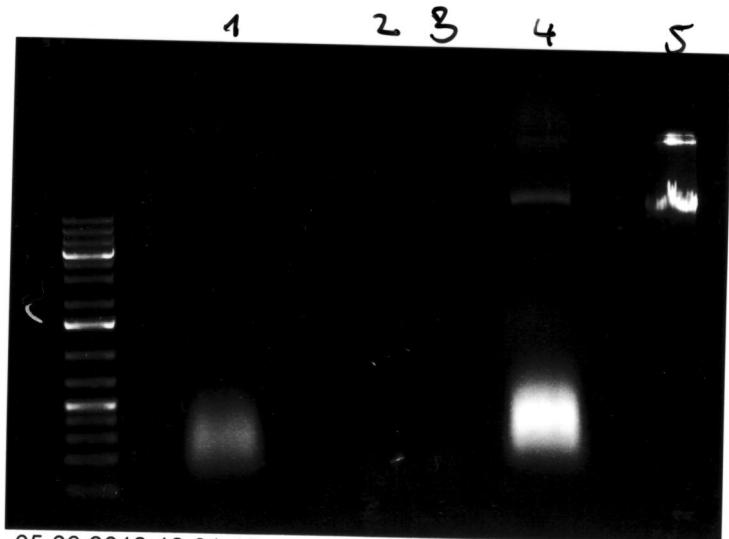
- in 100µl TE eluiert und Konzentration bestimmt

$$E^{260} = 9117 \quad E^{260}_{\text{so}} = 81,2$$

$$\underline{C = 590 \mu\text{g/ml}}$$

11. Agarose gel:

- m- 1kb Plus Genomic
- ~~10µl 1:30~~ nach alkohol. lyse (~~100~~)
- 10µl 1:100 (siehe S. 91)
- 1µl 1 µg/ml (siehe S. 91)
- crude lysate (nach alkohol. lysis) PEG
- PEG Fällung



05.06.2012 12:01:40

Enhancement: 110
Exposure Time: 323Brightness: 50
Contrast: 50
Gamma: 25

→ warum kein
Blasenband in
1, 2, 3?

→ 5 → PEG nach
PEG-Fällung schöne
Bande

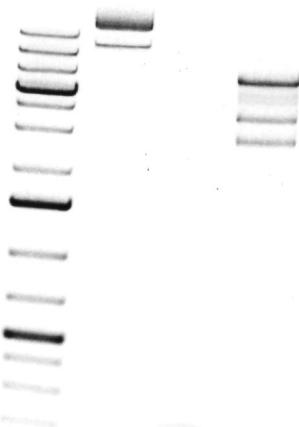
Verdunnen von pMCB 1034 mit BamHI & EcoRI

WED

- 10 µl pMCB 1034 (500 µg/ml von PEG-Fällung)
- 20 µl Puffer Tango
- 2,5 µl EcoRI
- 1 µl BamHI
- 67,5 µl ddH₂O

- über Nacht @ 27°C inkubiert
- Reaktion wird Enzymaktivierung wird 80°C / 20 min und danach Züchtung von 0,5 M EDTA zur Endkonzentration von 20 mM
- ab 1% f. fol aufgezogene (Ost)

M 1 2 3



- M - Gelruler 1 kb Ladder Plus
 1 - pMC81034 prep (PEG) (10⁻² µl)
 2 - pMC81034 prep (Subs unk) * 10⁻² µl
 3 - Verdarbs Alpha (5 µl)

- Zusätzliche Banden
 → Starke Abfärbung durch zu lange Inkubationszeit?
 → normal verlaufen, aber nur 2L
 →

06.06.2012 11:47:04
 Enhancement: 54
 Exposure Time: 1000

Brightness: 85
 Contrast: 90
 Gamma: 25

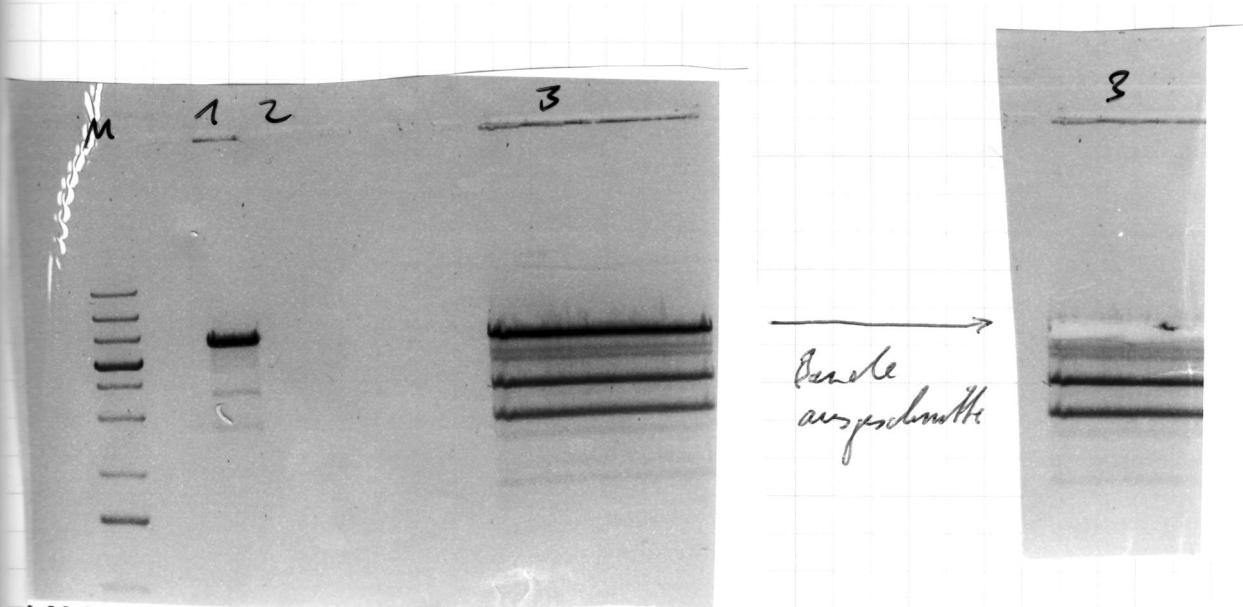
* pMC81034 → von WE8103

- normal mit Isopropan getaucht
- 2x mit 70% EtOH gewasch
- in 1ml H₂O aufgenommen und mit 50µl MgCl₂-PEG gefüllt
- Pellet mit 70% EtOH gewasch
- in 100µl TE aufgespolut

pMC81034 Order

- 10µl pMC81034 (500µg/ml)
- 20µl Buffer Txyo
- 4,5µl Ecoll
- 5µl Saam AD
- 67,5µl ddH₂O

- für 2h @ 37°C inkubiert
 → gestoppt durch Zugabe von 20µl EtOH
 → auf 1% Agarosegel (5µl)



M - Gesamt MKB Plus

1 - pMLB1034 Verdun 2 (5 µl)

2 - PEG-Fällung von WED103 (100 µl)

3 - pMLB1034 Verdun vom vte Mal (ab Nacht)

Band mit der größte Name aus
geschnittener Rechte pMLB1034

- große Bande aus dem Gel ausgeschnitten
- $m = 217 \text{ ng}$
- mit „Nucleopin“ PCR und Gel Clean-up von MN
gezogen
- Elution
 - 15 µl Elutionspuffer auf Säule
 - 5 min @ 70°C inkubiert
 - getauft
 - mit 20 µl Elutionspuffer wiederholt

$\approx 1.70 \text{ OD}$ und Konzentration bekannt $\rightarrow c = 21 \text{ µg/ml}$ in 35 µl

Ligation pMC81034 & p-lsr

$$1\text{ bp} \approx 660 \text{ fmol}$$

Insert: $272 \text{ bp} \times 660 \text{ fmol} = 1,79 \cdot 10^5 \text{ fmol}$
 $\rightarrow c = 70 \mu\text{g/ml} = 3,3 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}}$

Vector: $6249 \text{ bp} \times 660 \text{ fmol} = 4,12 \cdot 10^6 \text{ fmol} =$
 $\rightarrow c = 21 \mu\text{g/ml} = \cancel{5,1 \mu\text{mole}} \underline{5,1 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{ml}}} = 21$

Ligation:

5 µl Vector (pMC81034, linearized) $\hat{=} 100 \text{ ng} \hat{=} 2,55 \cdot 10^{-8} \text{ µmole}$
 $0,3 \mu\text{l} \text{ Insert DNA (p-lsr)} \rightarrow 1,27 \cdot 10^{-7} \text{ µmole} \hat{=} 22,7 \mu\text{g}$

$\hookrightarrow 1:15 \text{ V:D in H}_2\text{O}$

$\rightarrow 5 \mu\text{l} \text{ einzahlen (für 1:5 überschüssig)}$

1 µl T4 Ligase

2 µl 10x T4 Ligase Buffer

ad to 20 µl H₂O $\rightarrow 25 \mu\text{l}$

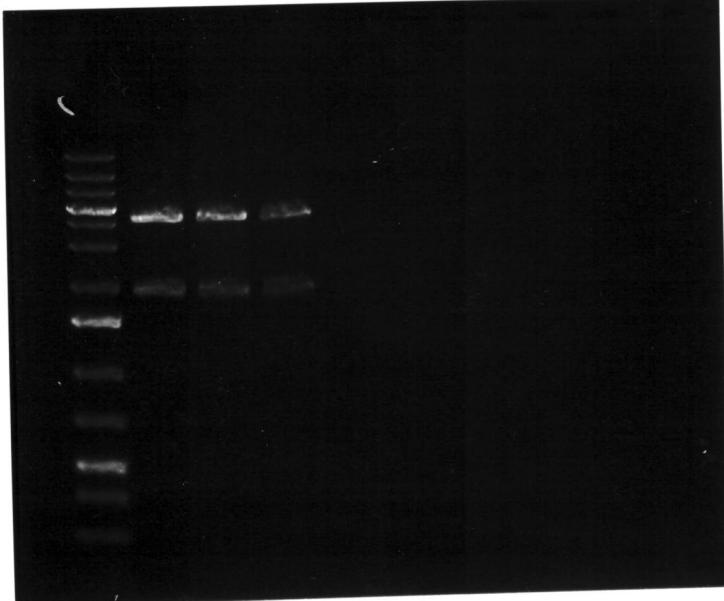
\rightarrow alles scherfe, mit gewachsen

\rightarrow wahrscheinlich dead

Mult-Substrukturen von DNA

→ noch >2 Tagen mit Kolonne gewalzt, aber negativ
noch Testwerten mit SacD & EcORR

C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pflanzenbio\Desktop\HLC\11.06.2012_ben.TIF



11.06.2012 13:43:45

Enhancement: 1

Exposure Time: 2032

Brightness: 59

Contrast: 46

Gamma: 25

1 - Miniprep 1

2 - " 2

3 - pHLB 2032 leerwalzt
mit SacD & EcORR

M - Mabs

- 1 - Miniprep von Kolonne 1
- 2 - " " "
- 3 - pHLB 1034 leerwalzt

~~Home in~~

15.06.12

Laborbuch Nr./Notebook no.

Fortsetzung von Seite/
Continued from page no.

94

Seite Nr./ Page number

98

- Primer besteht für Kolony-PCR & Sequenzierung

→ pMLB1034-1 (fw) 5'-gacatkaatcataaaaataggcg -3'

PCR ~

- Amplifizierung von p-lsr

15 µl Dream Day Bulk

3 µl Primer p-lsr-fwL

3 µl p-lsr-rev

3 µl dNTP₅ (20 mM)

1 µl Template (1-p-lsr geschnitten (< 10 µl))
 2-p-lsr geschnitten (nicht geschnitten)
 3-p-lsr ungeschnitten

0,75 µl Dreamday

~ Colony PCR-Programm

95°C

95°C

55°C

72°C

72°C

4°C



pMLB1034 Verdant:

pMLB1034
 Eco RI + Bam HI
 verdant

M



1

2

3

4

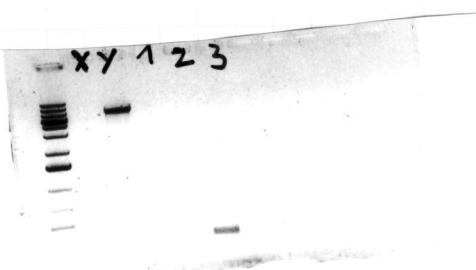
→ PCR Ben verdant pMLB1034 verdant mit Eco RI + Bam HI

- siehe S. 94 unten

→ Gel auf S. 98

→ Bande ausgeschnitten & mit MN "PCR & Gel Cleanup" gereinigt (Y)

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



15.06.2012 18:25:19

Enhancement: 680

Exposure Time: 1162

Brightness: 50
Contrast: 50
Gamma: 25

X - Fällung WEB108
Y - gel aus dem Verdau pMC81034

X - Fällung von WEB108 (100 μ l aufgetragen von Verdau 11,2 μ l/ml)

Y } reicht 5.98
Z } 3

WEB108 → 6 PCR zw
Amplifizierung von pTsr
→ Ethanolfällung von
PCR
→ Pellet gesche
→ laut Photometer
392 µl/ml DNA
→ auf gel → mit (2)
→ daher nochmal
angefüllt (siehe unten)

pMC81034 → mit EcoRI + BamHI geschnitten ist schon
· sauber

- PCR-Ringen 1,2,3 vereinigt und im Agarosegel gebrannt (120618_1)
- ✓ → beide ausgeschnitten und mit MW PCR & gel-Clamp gereinigt
- 2x mit 10 μ l Elutionspuffer eluiert
- c = 31,5 μ l/ml → verdant mit EcoRI + BamHI

pTsr
geschnitten

Performed by

tätig durch/
proved byDatum/
DateFortsetzung auf Seite Nr./
Continued on page number

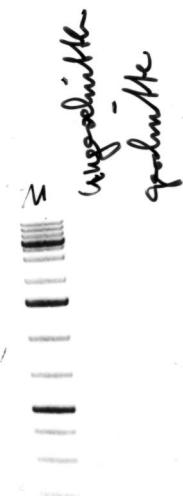
Vervol van p-lsr

Wol p-lsr (325 µg/ml)

4 µl Tgyo Buffer

2 µl BamHI

1 µl EcoRI

3 µl H₂O $\xrightarrow{\text{p-lsr ingebroekt}}$
 $\xrightarrow{\text{p-gelbroekt}}$ \rightarrow 2 h @ 37°C \rightarrow stoppend 0,8 µl 0,5 M EDTA \rightarrow uit MN PCR & Gel Clean up Kit aufgetankt \rightarrow 2 x uit 15 µl Pcr eluent \rightarrow c = 105 µg/ml \rightarrow uit fcp (M.T.)Ligatior van p-lsr & pMCB1034 (19.8.12)

pMCB1034 (28 µg/ml) 4 µl

p-lsr (10,5 µg/ml) 3,4 µl

T4 ligase (5 µl/ml) 0,5 µl

Ligase Buffer 2 µl

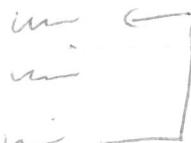
H₂O 10,6 µl \rightarrow 10 min @ 22°C inkubet \rightarrow 3 µl in QIAxtract formel \rightarrow ü.N. @ 37°C \rightarrow ~25 kolonien \rightarrow von W Stiel
Colony PCR

Colony PCR (MM-178)

24 µl DreamTag Buffer
 4,8 µl dNTPs
 ~ pMCB1034-1
 ~ p-BS-rev
 1,2 µl DreamTag
 add to 24 µl (ddH₂O)

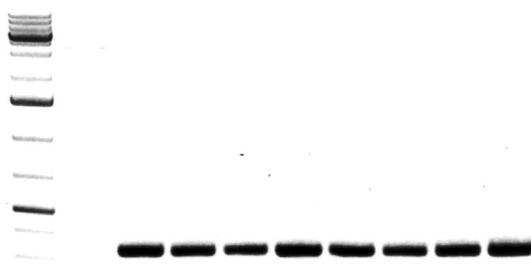
PCR - Programm

95°C	in
35°C	in
55°C	in
72°C	in
72°C	in
4°C	in



• pMCB1034 herewelten als Negativkontrolle (-)

M - 1 3 5 6 7 8 9 10



→ Partielle
vor Kolos 1-10

→ alle Kolos auf
Gel sind positiv

→ Heiçprep von 1+3

→ 3 mit Primer pMCB1034
zum Sequenzieren

20.06.2012 14:48:19

Enhancement: 257

Exposure Time: 1000

Brightness: 50

Contrast: 50

Gamma: 25

- 3 ml U.N.-Kultur von 13, 5, 9 mit FB + (40 µl/1ml Amp)
- 200 rpm 13°C → viele Zellen
- Miniprep von allen Kulturen
- in 50 µl H₂O elutet

4 Pölle Menge
(1:250VOD)

$$\begin{aligned}
 c(1) &= 119 \mu\text{g/ml} & c(3) &= 101,5 \mu\text{g/ml} \\
 c(5) &= 77 \mu\text{g/ml} & c(9) &= 122,5 \mu\text{g/ml}
 \end{aligned}$$

WEB M2AKTA-Det

- CTPS1 Ruining
- Zellen lysiert → Zelle (Zellel \approx 3,2, lösbar)
- nach sonderung Phasenzypte und für 15 min @ 4°C inkubiert

Bindepuffer: ①

- 50 mM Tris/HCl
 - 500 mM NaCl
 - 10 mM Imidazol
 - 10 mM β -ME
 - 10% glycerin (v/v)
- pH 7.4

Elutionspuffer ②

- 50 mM Tris/HCl
 - 500 mM NaCl
 - 300 mM Imidazol
 - 10 mM β -ME
 - 10% glycerin
- pH 7.4

Cyrispuffer:

- wie Bi-Opfer
- + 1% Tween 20

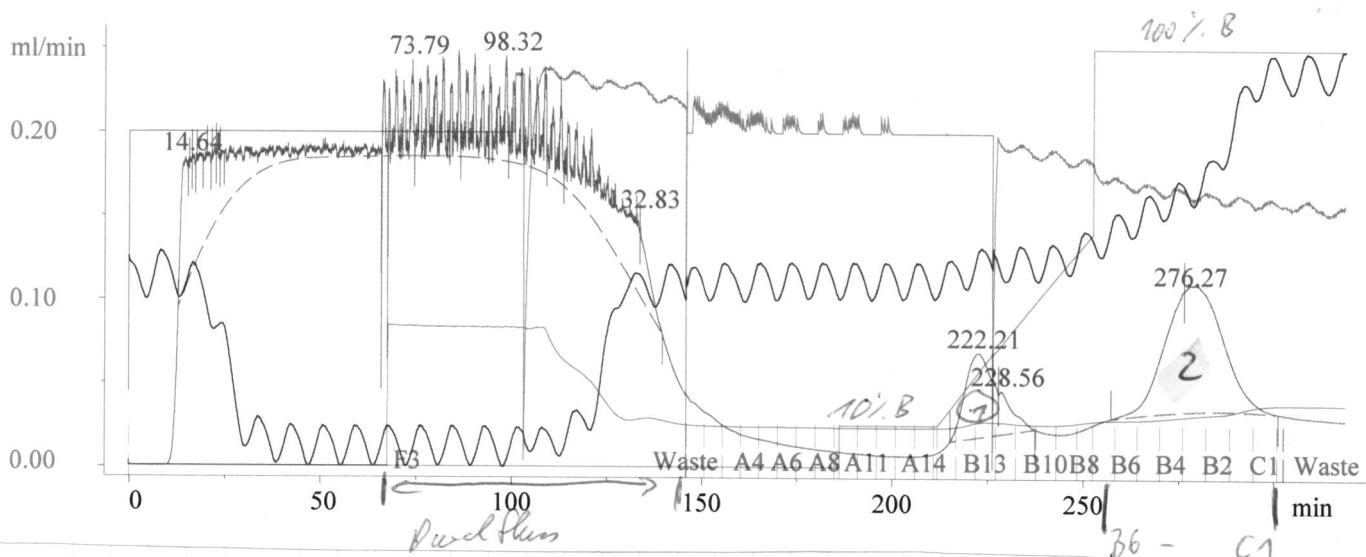
Säule

- HiTrap IMAC FF mit H₂O (75 ml) geputzt
- CoCl₂-Lsg hergestellt (0,1M)
 - durch Spülflüssigkeit gefiltert
- Säule mit 5 ml 0,1M CoCl₂ beladen
- an AKTA angeschlossen & mit H₂O geputzt
- Druck sehr hoch (1 ml/min \rightarrow 0,28 MPa)

AKTA-Cart:

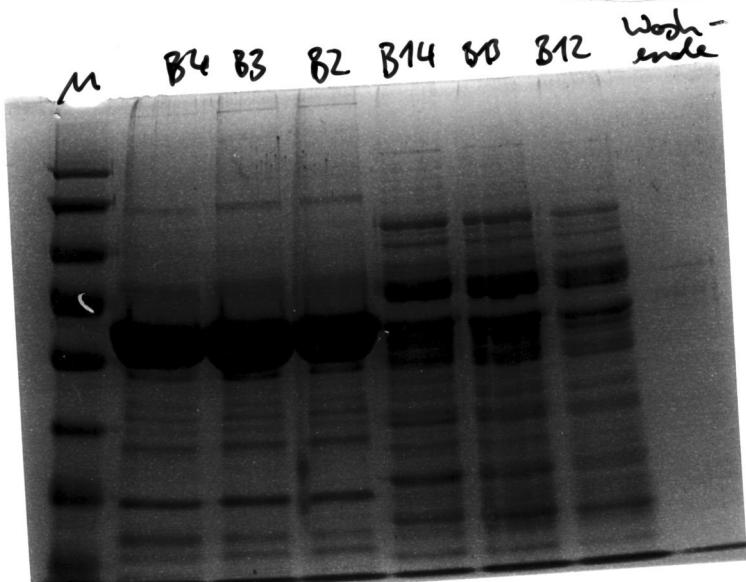
c:\UNICORN\Local\fil\Default\result\120622 HiTrap IMAC FF Cobalt crude Flexflow002.res

120622 HiTrap IMAC FF Cobalt crude Flexflow002:10 UV1 280nm
 120622 HiTrap IMAC FF Cobalt crude Flexflow002:10 UV3 320nm
120622 HiTrap IMAC FF Cobalt crude Flexflow002:10 Cond
 120622 HiTrap IMAC FF Cobalt crude Flexflow002:10 Conc
 120622 HiTrap IMAC FF Cobalt crude Flexflow002:10 Flow
 120622 HiTrap IMAC FF Cobalt crude Flexflow002:10 Fractions

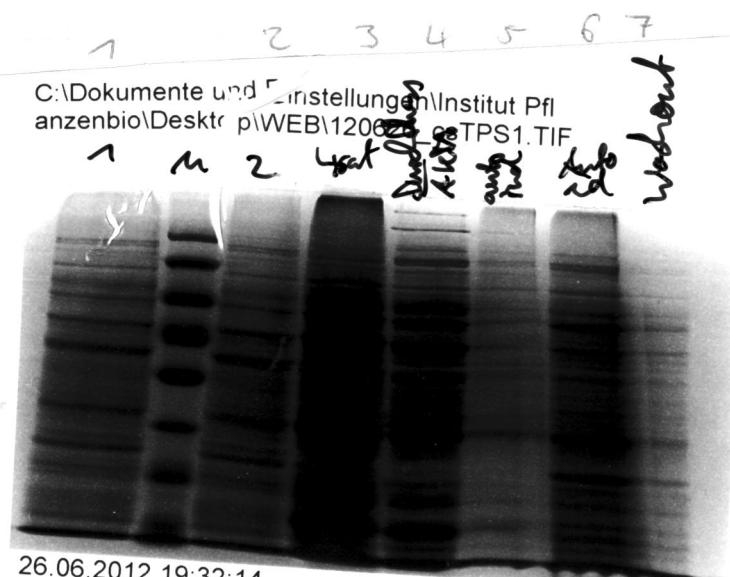


- Probleme mit Staubvernebler → daher langsamer Flus
- Peak 2 → wahrscheinlich GTRS1
- Peak ② ist Wash out

- Zellen nach Lyse 30 min @ 13kg (4°C) zentrifugiert
 - Überstand mittels Roberpumpe auf Säule angesaugt



26.06.2012 19:31:18

Enhancement: 80
Exposure Time: 500Brightness: 69
Contrast: 68
Gamma: 2526.06.2012 19:32:14
Enhancement: 80
Exposure Time: 50020°C
test 20°C
sol.
Brightness: 76
Contrast: 82

m - Page Buch Bertrand Pöhl
(spule) (alle)

B4-B2 → Fraktionen vom
(20µl) Elutions peak (S104)

B14-B12 → Elutions peak Fraktion
(20µl) (S.104)

Washende → Spülpeaks, bei
Wasche mit Pumpe ③

- ① nach Induktion (GSTPS1-Prep)
- ② nach Induktion (GSTPS1-Prep)
- 1+2 vereinigt und lysiert
(danach mit DNase I behandelt
und am 1. Saüle)
- ③ lysat (1+2) (3) 10µl
- ④ Durchfluss ÄKTA (F3) (S.104)
- ⑤ Autoreindiffusion GSTPS1 (20°C/10h)
(unlösliche Fraktion)
- ⑥ lösliche Fraktion (Autoreindiffusion)
- ⑦ Washout ÄKTA

Sequenzierung p-kr'-Lact⁺-3- mit pMLB1034-1 (Fw) Prime premixed Sequenator- lsr-operon ist
richtig eingebaut

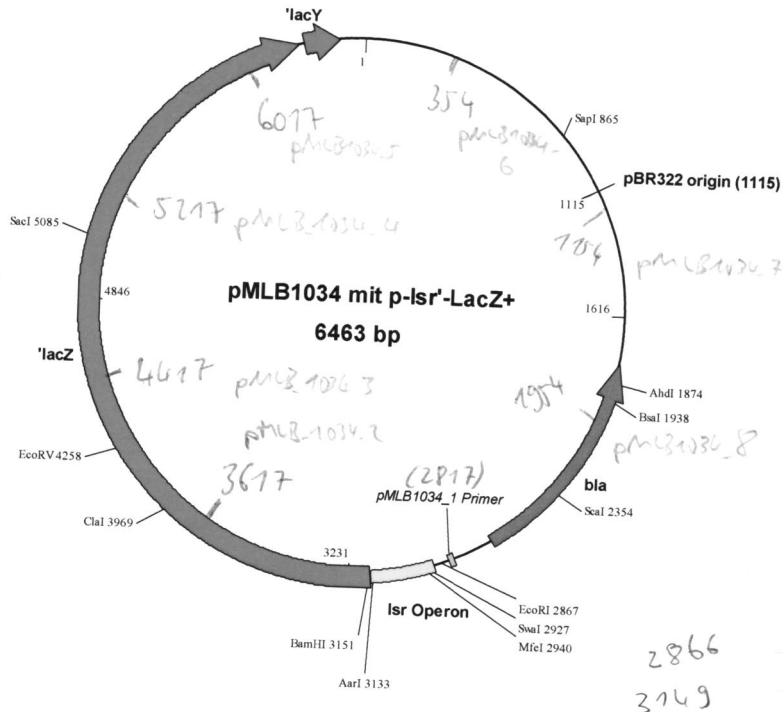
lsr-operon

pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100								
ATAGCGTATCACAGGGCCCTTCGCTTCAGAATCTGAATAATGCCAATCGTTGATTGCCATTAATTCATTCCTCACTTGACACATATTAAATCTT										
CT.CA.T.C...T.....G										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200								
TAATGCATTTGTCACTTCTTGTCACTTAACTCTGATGGCACCACAGTTGACTCTACGAGCATGACAACOCAACCGTGAAATCAAATAGCGA										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300								
TAATGCTGAACTATTCGCGAAATAGCGAAATAGCGAACTTCACCTTGTAGGTTAGACAAATTAAAGCAGAAATACATTGTCACAGTCACCTGCACAC										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400								
TGACGGGGAAATGGGATCGCGTGTTCACAACTGCTGACTGGAAAACCCCTGGCTTACCCACTTAACTGTCCTCAGCACATCCCCCTTCG										
LM (lact ⁺)										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	410 420 430 440 450 460 470 480 490 500								
CAGCTGGCTATAGCGAGAGCGAACGATGCCCTTCCCACAGTGGCAGCCGAATGGCCTTGGCTGGCTTACGGTACAGCGACACAGA										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	510 520 530 540 550 560 570 580 590 600								
CGCGGCGCGAAGCGCGATCGGATCTTCGAGGGATACTGTCGCTGCTCCACAACTGCAATGCAATGCGCTGCCCCATCTACAA										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700								
CCAACTGTAACCTATCCATTAGGTCAAATCGCGTTGTTCCACGGAAATCGACGGTTGTTACTGCTCACATTAAAGTGATGAAAGCTGGT										
G										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	710 720 730 740 750 760 770 780 790 800								
ACAGGAGGCGAACCGAAATTATTTGATGGCTTAACTCGGGCTTCACTGTCGAGCAGCGCTGGTGGTACGGCAGCTGGTACGGT										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	810 820 830 840 850 860 870 880 890 900								
CGCTCTGAAATTGACCTGAGCGCATTTAACCGCCCGAGAAAAACGGCTCGCGTGAATGGTACGGTGGAGTGACGGCTTACCTGGAGATCAGG										
C										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000								
ATATGCGCGGAGGCGCATTTTCGCTGAGCTCGTGTGCTGAAACCGACTACACAAATCACGCAATTTCAGTGGCACTGTTAAAGTGAGA										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100								
TTTCAGCGCGCTGACTTGAGGCTGAGNTGAGCTGAGCTGCGGAGTGCGTACTACCGTAACGTTCTTATGGCGGGTGAAACGCAAGTC										
C A										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170								
GCCAGCGCACCGCGCTTGGCGGTAAATTATCGA-TGAGC-TGGTGTGCGCAGCGTACACTA										
A G C G A T C G T T										

- stillle Mutation
im Lact⁺-Gen- Mutation und
AS-Austausch!

pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100								
GGGGAAATAGGATCCGTCGATCAAAGCTCGTGGGATACCTGCTACCTGCTTCAGCACATCCCCCTGGCCAC										
M D P V V L Q R R D W E N P G V T Q L N R L A A H P P F A S										
M D P V V L Q R R D W E N P G V T Q L N R L A A H P P F A S										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200								
GGCGTAAATAGCGAGAGCGAACCGCATCCGCTCCACAGTTGGCAGCCGAATGCGCTTCCGCTTCCGACAGACCGTACACCCAC										
W R N S E E A R T D R P S Q Q L R S L N G E W R F A W F P A P E A V										
W R N S E E A R T D R P S Q Q L R S L N G E W R F A W F P A P E A V										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300								
PESWLECDLPEADT VVVVPSPSNWQMHDGYDAPITYTN										
PESWLECDLPEADT VVVVPSPSNWQMHDGYDAPITYTN										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400								
GTAACTCTCCATTAAGGCAATCGCGCTGGTTGCTCCACCGGAAATCCGAGCGTTACTCGTCACATTAAGTGTGAGAAACCTGGCTACGG										
V T Y P I T V N P P F V P T E N P T G C Y S L T F N V D E S W L Q										
G										
pMLB1034, 6189 bp	A-83264_G11	410 420 430 440 450 460 470 480 490 500								
AAGGCCAGACCGAAATTATTTGAGGCGTAACTCGCGCTTCACTGCGGCTACAGGCTACGGCTACGGCCAGACGCTGGCTACGG										
E G Q T R I I F D G V N S A F H L W C N G R W V G Y G Q D S R L P S										
E G Q T R I I F D G V N S A F H L W C N G R W V G Y G Q D S R L P S										

→ relative viele Mutationen → komplett plausible Sequenz



→ 8 Abschulthe

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

WES 113

Laborbuch Nr./Notebook no.

Fortsetzung von Seite/
Continued from page no.

Seite Nr./ Page number

108

LuxS - Klonierung

LuxS cds Ausschnitt:

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
.....
ATGCCGTTGTTAGATAGCTCACAGTCGATCATACCGGATGGAAAGCGCTGCAGTCGGGTGGCGAAAACAATGAACACCCGCATGGCGACGCCATCA									
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 T P H G D A I									

LuxS_Ecoli

>P45578|S-ribosylhomocysteine lyase|EC 4.4.1.21|Escherichia coli (strain K12)|Swiss-Prot

1 MPILDSFTVD HTRMEAPAVR VAKTMNTPHG DAITVFDLRF CVPNKEVMPE RGIHTLEHLF
 61 AGFMNRHNLNG NGVEIIDISP MGCRGFYMS LIGTPDEQRV ADAWKAAMED VLKVQDQNQI
 121 PELNVYQCGT YQMHSLQEAQ DIARSILERD VRINSNEELA LPKEKLQELH I

Primerdesign:

<u>NcoI</u>	<u>His-Tag</u>		<u>NdeI</u>	<u>NheI</u>	<u>T7-Tag</u>				
TATACCATGGCAGCAGCACTCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCGCGGCAAGCATAATGGCTAGCAAGACTGGTGGACAGCAA									
MetGlySerSerHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHisMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGln									
<u>BamHI</u>	<u>EcoRI</u>	<u>SacI</u>	<u>SalI</u>	<u>HindIII</u>	<u>EagI</u>	<u>XbaI</u>	<u>NheI</u>	<u>thrombin</u>	<u>His-Tag</u>
ATGGGTCGGGATCCGAATTGGAGCTCGTGCACAGCTGGCGGACTCGAGCACCACACCAACACEACTGGCTGGCTAACAAAGCC									
Ausschnitt pET28a plasmid: 5'- <u>c cat atg cog ttg</u> -3'	H	M	P	L...					5'- <u>gga tcc gaa ttc</u> -3'
	NdeI								EcoRI

NdeI
 5'-CCATATGCCGTTGTTAGATAGCTTC-3' (forward primer; 25 bases; Tm = 55,7-58,9°C)
 5'-ATGCCGTTGTTAGATAGCTTCACAGTCGATCATACCGGATGGAAAGCGCTG-3'
 M P L L D... LuxS -

Ecluxs_NdeI_Fw

- LuxS Q E L H I *

5'-AAGAACTGGCACTGCCGAAAGAGAAAGTTGAGGAACCTGACATCTAG-3'
 3'-CGTCTTGACGTGATAGCTTAAG-5' (reverse primer, 24 bases, Tm = 54,9-58,7°C)
 EcoRI

Ecluxs_EcoRI_Rv

Ohne Schnulli:

CCATATGCCGTTGTTAGATAGCTTCACAGTCGATCATACCGGATGGAAAGCGCTGCAGTCGGGGCGGAAACAAATGAACACCCGCATGGCGACGCAATCACCGGT
 TTGCGATCTCGCTTCGCGAACAAAGAAGTGAATGGCGAACAGGGATCATACCCCTGGACACCTGTTGCTGTTTATGAGCTGATTGGTAGCAGCGCTGTTGCTGATGCTGGAAAGCGGCAAT
 GTGTAGAGATTATCGATATCGGCAATGGGCTGCCGACCGGTTTATATGAGCTGATTGGTAGCAGCGCTGTTGCTGATGCTGGAAAGCGGCAAT
 GGAAGACGTGCTGAAGTGCAGGATCAGAATCAGATCCCCGAACTGAACGCTTACCAAGTGTGCACTTACCAAGATGCACTCGTTGCAGGAAGCGCAGGATATTGGCGCT
 AGCATTCTGGAACCTGACGTACGCATCAACAGCAACGAAGAATGGCACTGCCGAAGAAGTTGCAAGGAACTGCAACATGCACTAGAATTC

→ Klonierung in pET28a(+) mit N-terminalen His-Tag

Primer 1:

Primer 2:

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

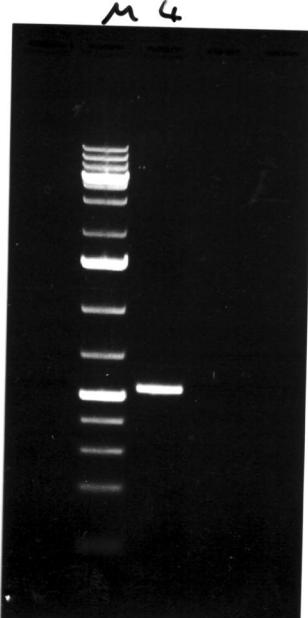
PCR: ~~Pfu~~ ^{4x Mt} = Pfu Polymerase (1-3) DreamTag Polymerase (4)

10x Buffer	20 µl	(+MgCl ₂)	20 µl
10mM dNTPs	4 µl		4 µl
LuxS forward/reverse	je 4 µl		je 4 µl
Template (50 ng/lnd genomic DNA)	1 µl je Run		1 µl
Pfu Polymerase	20 µl Pfu		1 µl DreamTag
H ₂ O	162 µl		104 µl

PCR-Programm

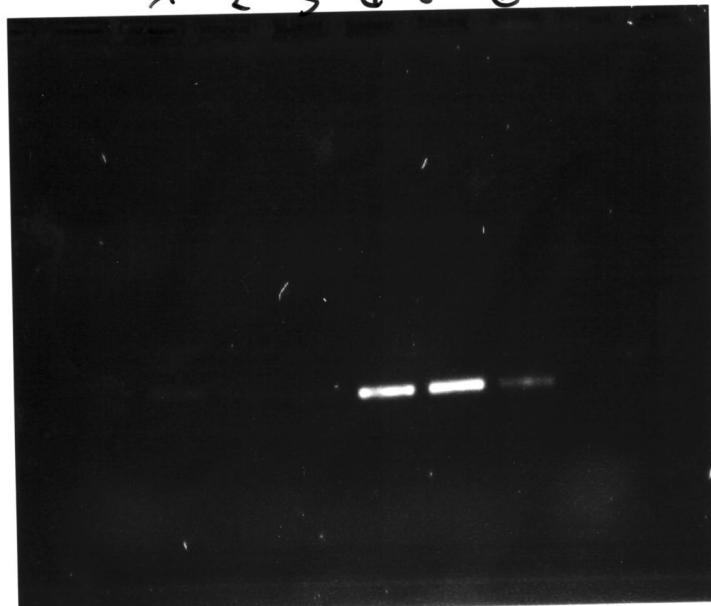
1 23/4 - DNA Rep von 26.07.
2 15 - " 15.08.
3 16 - " 29.08.

und Einstellungen\Institut Pfl
top\HLC\20120703_LuxS_PCR4.TIF



C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pfl
anzenbio\Desktop\HLC\20120702_luxS.TIF

1 2 3 4 5 6



WEB114

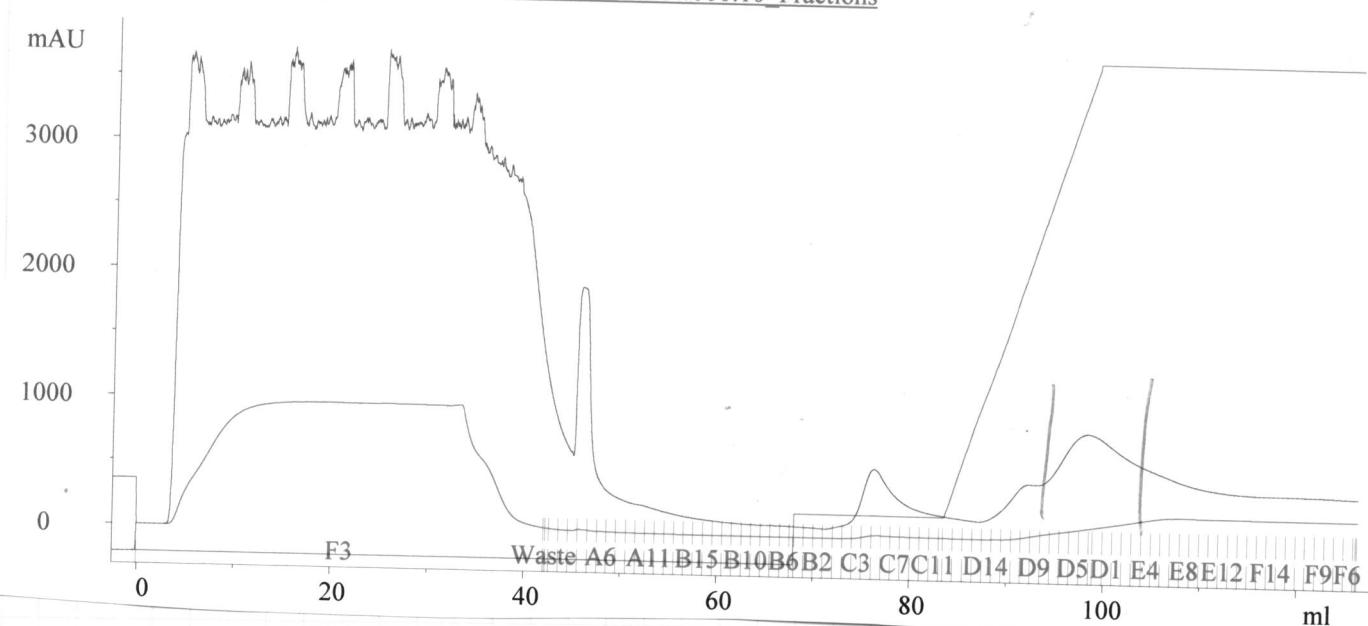
- GTPS1 - Reinigung mit AKTA
- 2 Pellets von der Kultur mit Ultraschall aufgedlossen
- 32 ml Lysat durch Spinne Filter filtriert und aufgezogene mit Probe pumpe
- Puffer A + 3 wie WEB113 → aber ohne β -ME!
- ohne β -mercaptoethanol keine Draw Baby vom Sanktinselal

120622 HiTrap IMAC FF Cobalt crude Flexflow001:10 UV1 280nm

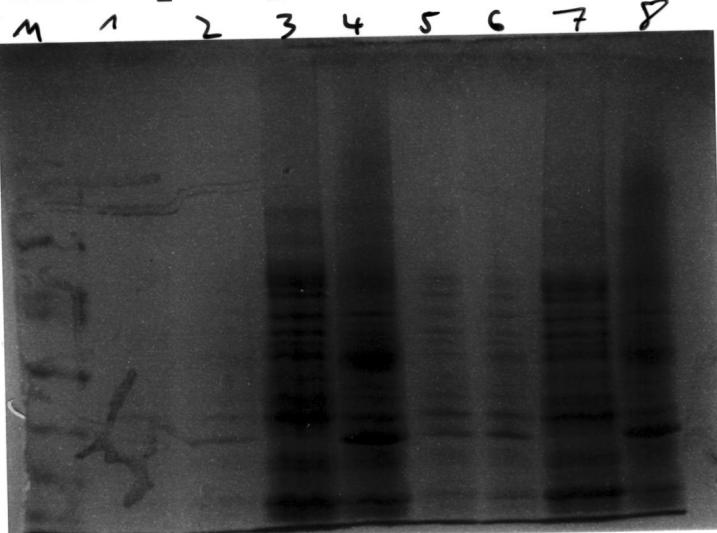
120622 HiTrap IMAC FF Cobalt crude Flexflow001:10 UV2 320nm

120622 HiTrap IMAC FF Cobalt crude Flexflow001:10 Conc

120622 HiTrap IMAC FF Cobalt crude Flexflow001:10 Fractions



E:\20120702_CsTPs1_Gel1.TIF



02.07.2012 16:40:16

Enhancement: 21

Exposure Time: 21

Brightness: 49

Contrast: 43

Gamma: 25

1 - vor Ind. 1

2 - nach Ind. 1

3 - tötl. Fr. 1

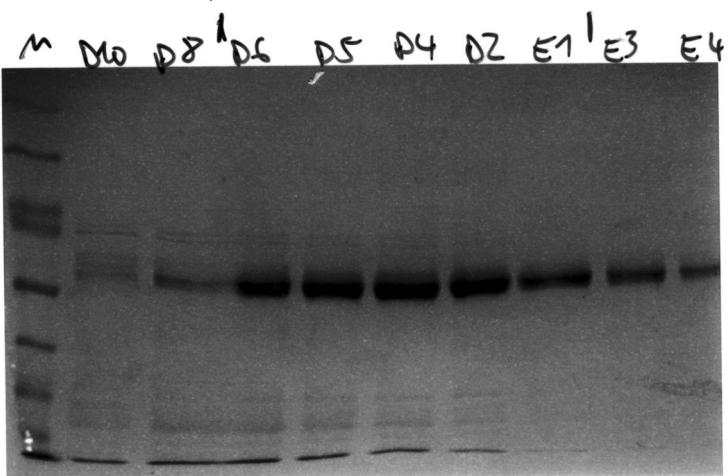
4 - unlösliche Fr. 1

5 - vor Ind. 2

6 - nach Ind. 2

7 - tötl. 2

8 - unlöslich?

C:\Dokumente und Einstellungen\Institut Pfl
anzenbio\Desktop\HLC\20120702_CsTPs1_Gel2.TIF

02.07.2012 16:41:39

Enhancement: 21

Exposure Time: 21

Brightness: 50

Contrast: 63

Gamma: 25

von WEB 112 B1-B5 & von WEB 114

E1-E2 & D3-D7 vereinigt (gef. 5ml) und

- 2x gegen 2x Assaypuffer (@ 10°C) dialysiert
Assay buffer → ohne Phosphat!

(A) E1 E2 E3 D2 D1 (WEB 114)

(B) D3 D4 D5 D6 D7 (n)

(C) B1 B2 B3 B4 B5 (WEB 112)

→ Mit Bradford Konzentration bestimmt:

	E595	c (μg/ml)
(A)	0,065	157
(B)	0,148	323
(C)	0,508	643

Plattenansatz:WEB 115

- Agar - Selektionsplatte herstellt

Mac Conkey - Agar (Applichem A3750)

- 15 g/l Agar
- 1,5 g/l Gallersalze
- 1 mg/l Kristallviolett
- 10 g/l Lactose
- 5 g/l NaCl
- 30 mg/l Neutralrot
- 20 mg/l Pepton

→ zu Hiztu in 5 l
in dest. Wasser lösen
und autoklavieren

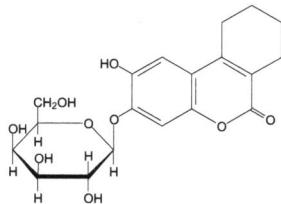
→ vor dem Gießen mit 1 ml
Amp reagieren

- Gallersalze & Kristallviolett inhibieren gram-positive Bakterien
- Neutralrot wird in sauren Milieu (ab $pH = 6,8$) rot ($pK_s = 5,89$)
- Lactose fermentiert zu sauer → Kolonie Farbe rot rot
- nicht Lactose verarbeitende Bakterien → weiß, farblos, gelb oder bräunlich

S-Gal - Agar



S-Gal™

Product Code S 9811
Store at Room Temperature

Product Information

Precautions and Disclaimer

Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Preparation Instructions

When dry-blended with isopropyl β -D-thiogalactoside in agar medium, S-Gal is autoclavable. There's no waiting time for media to cool before adding the substrate. Additionally, since it can be blended with growth medium prior to autoclaving, making up stock solutions in dimethylformamide (DMF) or dimethyl sulfoxide (DMSO) is not necessary. Should you desire to work from a concentrated solution, S-Gal is soluble in DMSO at 50 mg/ml.

S-Gal is added to the medium prior to autoclaving at a recommended concentration of 300 mg/l of medium, along with 500 mg/l of ferrous ammonium citrate.

Note: The iron(III) (feric or Fe^{3+}) ion is required for color development and must be added to any S-Gal formulation. Pre-formulated products such as C 4478, S-Gal™/LB Agar Blend contain ferrous ammonium citrate (F 5879). A medium prepared with S-Gal is moderately dark due to the presence of ferrous ammonium citrate. This darker background often provides enhanced contrast for automated colony counting or isolation.

Storage/Stability

The product as supplied is stored at room temperature. In prepared medium, it is stable for two weeks when stored at 4 °C.

References

- U.S. Patent #6,008,008.
- Heuermann, K. and Cosgrove, J., S-Gal™: A superior dye to X-gal for clonal selection. LifeScience Quarterly, 2(2), 2-4 (2001).
- Heuermann, K. and Cosgrove, J., An autoclavable dye for color selection of cloned DNA inserts. BioTechniques, 30(5), 1142-1147 (2001).

GWS/MAM 11/01

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

2x 100 ml L-agar:

10 g/l Trypton / (Pepton)

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

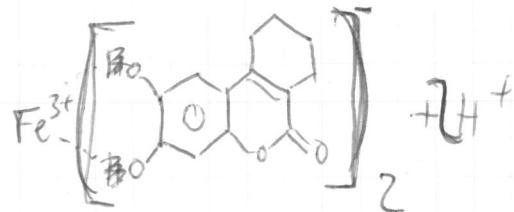
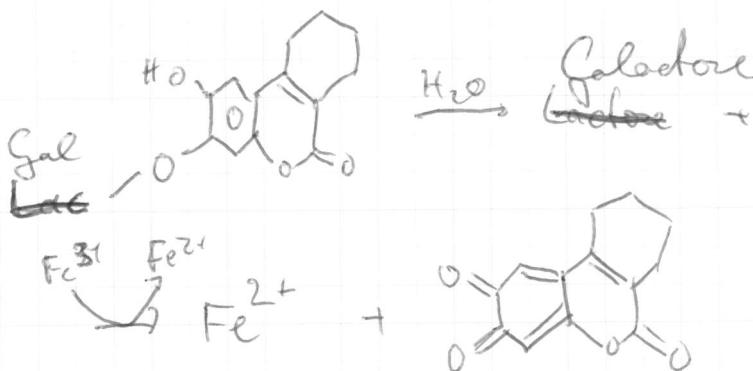
1,5% (w/v) Agar

500 mg/l Ammonium eisen(II)-citrat

300 mg/l S-gal

zugeben und unterkochen.

→ 00 den Füllbe 100 ml
Amplizelle zugeben



Bacto - XTT - Agar

- last experiment in molecular genetics

Difco Antibiotic medium #2:

Beef Extract
Yeast Extract
Pepton
Agar

15g/l
3g/l
6g/l
15g/l

} 25,5g medium + 950ml
ddH₂O (TCC)
- 50mg 2,3,5-triphenyltetrazolium
- 50ml 20% Bactose

→ autoclave

Eckmechan:

- 1) 1,5g Bacto beef extract, 3g yeast extract, 6g Pepton, 15g agar
- 2) 23g Difco nutrient agar, 8g NaCl
pro Liter

Änderung

- 6g Pepton Trypton

- 3g Hefeextrakt

- 8,5g Agar

- 50ml 20% (w/v) Bactose

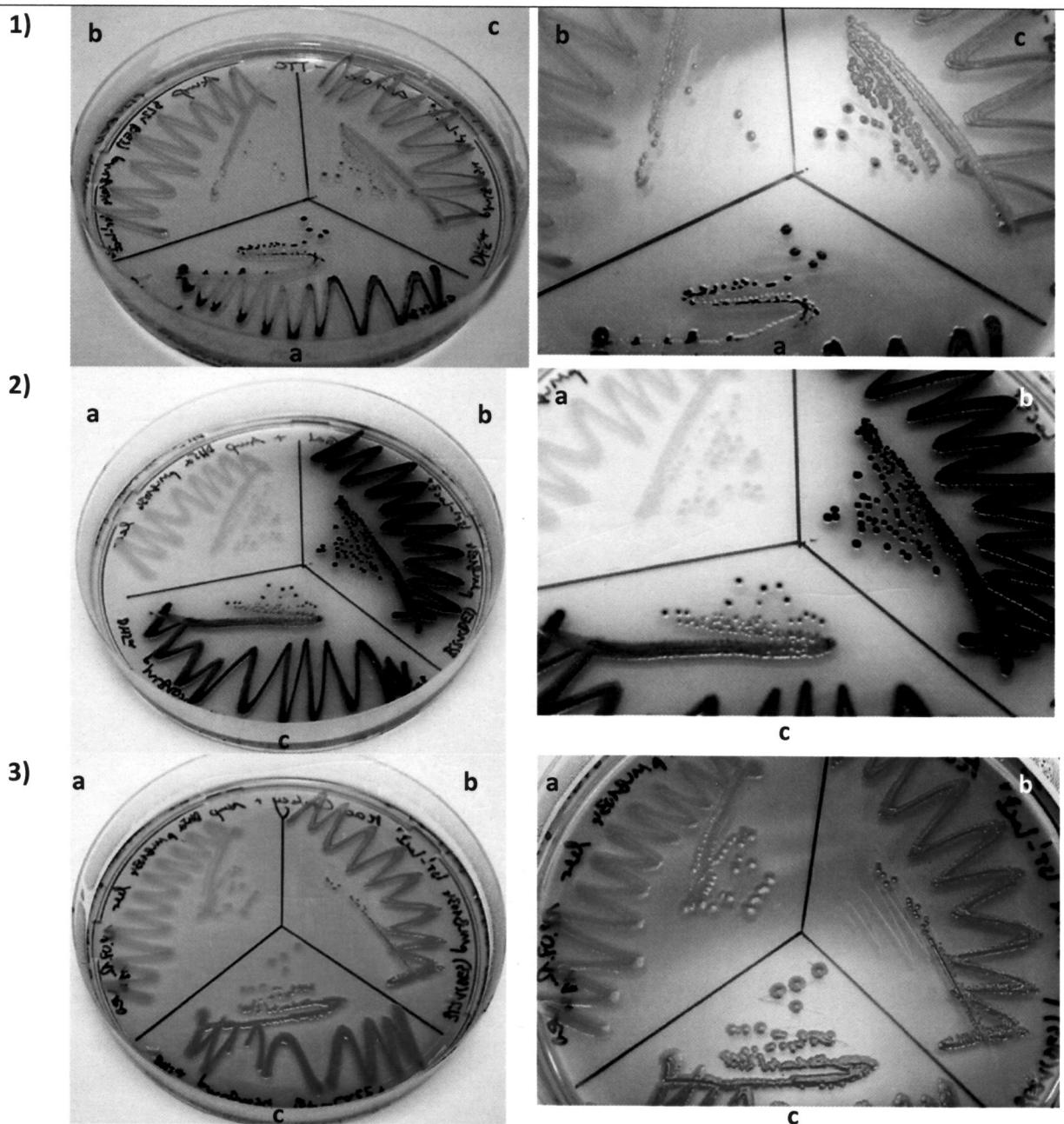
- 50mg XTT (2,3,5-triphenyl-tetrazolium-5-sulfophenyl)

↳ funktioniert nicht → add TCC

- alles bis auf die Bactose raushe und auflocke!
(wichtig!) → danach autoclaven & Locke raushe
→ gießen

WEBMPlatten - Test

Honda - Agar - Selektionsplatte
 drei - 1/3 zwiegeteilt und auf einer Seite VD-Ausstrich von DH5 α + pMLB1034, anderer Seite DH5 α mit p-Isr'-LacZ $^+$ (pMLB1034), BL21 mit Isr'-LacZ $^+$
 → über Nacht bei 37°C inkubiert 2h



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

Lux - AmplificationRestriktionsverdau:

4+5 (500) vereinigt und ^{und} "Quigil PCK Cleanup" - kit genutzt
 → in 20µl TE Elution puffer elutet
 → $c = \underline{24,5} \mu\text{g/ml}$

Vorgebaut Quigil & MN gel-Cleanup LabMidiprep von p-lsr'-lacZ⁺ Ø (Der Experimentator Hobis / Janomar S. 30)

- 25 ml LB-Kultur + 400µg/ml Amp
 → mit E. coli DH5α pMC8134 p-lsr'-lacZ⁺ Ø angeimpft
 → 37°C / 200 rpm / über Nacht
 → Zellen pelletiert und alkalisch lysiert (S. 82)
 - Überstand mit Isopropanol gefällt → "crude plasmid"
 → Pellet in 1ml TE aufgenommen
 - 3 Volume Guanidinium Isothiocyanat zugegeben
 - auf Quigil Spin Column gegeben
 - 60s Zentrifugiert → ~~Wasser~~ Durchfluss sowohl
 - + 500µl Buffer PB
 - 60s Zentrifugiert → DF verwärmt
 - + 750 µl Buffer PE
 - 60s Zentrifugiert → DF verwärmt → 60s Zentrifugiert
 - + 50µl ddH₂O → 5 min @ 65°C → 60s Zentrifugiert um abseien
 → $c = \underline{17} \mu\text{g/ml}$ $C_1 = 59,5 \mu\text{g/ml}$ $C_2 = 150,7 \mu\text{g/ml}$

10.07.12

- 25 ml TB + 400 µg/ml Amp Kultur mit DH5α pMC8034 β -br-lact⁻ (7) angeimpft
- conde plasmid gemacht (Protocol 3, Sambrook et al)
- Preparation of Plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: Maxipreparation
- 8 Start bei "Lysis of Cells"
- Produkt "conde plasmid" → bis Schritt 17

Protocol 3

Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Maxipreparation

PLASMID DNA MAY BE ISOLATED FROM LARGE-SCALE (500 ml) bacterial cultures by treatment with alkali and SDS. The resulting DNA preparation may be further purified by column chromatography or centrifugation through CsCl-ethidium bromide gradients.

MATERIALS

CAUTION: Please see Appendix 12 for appropriate handling of materials marked with <1>.

Buffers and Solutions

Please see Appendix 1 for components of stock solutions, buffers, and reagents.

Alkaline lysis solution I

For preparations of plasmid DNA that are to be subjected to further purification by chromatography (please see Protocol 9), sterile Alkaline lysis solution I may be supplemented just before use with the appropriate volume of 20 mg/ml case-free RNase A (pancreatic RNase) to give a final concentration of 100 µg/ml. Addition of RNase is not recommended at this stage if the DNA is to be further purified by other methods (please see Protocols 10 and 11).

Alkaline lysis solution II

Solution II should be freshly prepared and used at room temperature.

Alkaline lysis solution III

Antibiotic for plasmid selection

Chloramphenicol (34 mg/ml) <1>

Optional, please see Step 4.

Ethanol

Isopropanol

STE

TE (pH 8.0)

Enzymes and Buffers

Lysozyme (10 mg/ml)

Please see the information panel on LYSOZYMES.

Restriction endonucleases

Gels

Agarose gels

Please see Steps 8 and 19.

Protocol 3: Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Maxipreparation 1.39

Media

LB, YT, or Terrific Broth

Centrifuges and Rotors

Sorvall CSA rotor or equivalent

Sorvall SS-34 rotor or equivalent

Additional Reagents

Steps 8 and 19 of this protocol require reagents listed in Chapter 5, Protocol 1.

Step 18 of this protocol requires reagents listed in Protocol 8, 9, 10, or 11 of this chapter.

METHOD

Preparation of Cell Culture

- Inoculate 30 ml of rich medium (LB, YT, or Terrific Broth) containing the appropriate antibiotic either with a single colony of transformed bacteria or with 0.1–1.0 ml of a small-scale liquid culture grown from a single colony.

To ensure that the culture is adequately aerated:

- The volume of the culture flask should be at least four times greater than the volume of the bacterial culture.
- The culture flask should be loosely capped.
- The culture should be incubated with vigorous agitation.

- Incubate the culture at the appropriate temperature with vigorous shaking until the bacteria reach late log phase ($OD_{600} = -0.6$).

- Inoculate 500 ml of LB, YT, or Terrific Broth medium (prewarmed to 37°C) containing the appropriate antibiotic in a 2-liter flask with 25 ml of the late-log-phase culture. Incubate the culture for ~2.5 hours at 37°C with vigorous shaking (300 cycles/minute on a rotary shaker).

The OD_{600} of the resulting culture should be ~0.4. Because the growth rates of different bacterial strains will vary, the culture may have to be incubated slightly longer or shorter than 2.5 hours to reach an OD of 0.4.

- For relaxed plasmids with low or moderate copy numbers, add 2.5 ml of 34 mg/ml chloramphenicol solution. The final concentration of chloramphenicol in the culture should be 170 µg/ml.

▲ IMPORTANT For high-copy-number plasmids, do not add chloramphenicol.

- Incubate the culture for a further 12–16 hours at 37°C with vigorous shaking (300 cycles/minute on a rotary shaker).

- Remove an aliquot (1–2 ml) of the bacterial culture to a fresh microfuge tube and store it at 4°C. Harvest the remainder of the bacterial cells from the 500-ml culture by centrifugation at 2700g (4100 rpm in a Sorvall GSA rotor) for 15 minutes at 4°C. Discard the supernatant. Stand the open centrifuge bottle in an inverted position to allow all of the supernatant to drain away.

- Resuspend the bacterial pellet in 200 ml of ice-cold STE. Collect the bacterial cells by centrifugation as described in Step 6. Store the pellet of bacteria in the centrifuge bottle at ~20°C.

- Use one of the methods described in Protocol 1 or Protocol 4 to prepare plasmid DNA from the 1–2-ml aliquot of bacterial culture set aside in Step 6. Analyze the minipreparation plas-

Lysis of Cells

mid DNA by digestion with the appropriate restriction enzyme(s) and agarose gel electrophoresis to ensure that the correct plasmid has been propagated in the large-scale culture. This kind of control may seem a little overly compulsive. However, it provides valuable insurance against errors that may be difficult to retrieve and may cause considerable loss of time.

9. Allow the frozen bacterial cell pellet from Step 7 to thaw at room temperature for 5–10 minutes. Resuspend the pellet in 18 ml (10 ml) of Alkaline lysis solution I. The volumes given in parentheses in the remainder of this protocol should be used only with cultures that have been treated with chloramphenicol at Step 4.
10. Add 2 ml (1 ml) of a freshly prepared solution of 10 mg/ml lysozyme.
11. Add 40 ml (20 ml) of freshly prepared Alkaline lysis solution II. Close the top of the centrifuge bottle and mix the contents thoroughly by gently inverting the bottle several times. Incubate the bottle for 5–10 minutes at room temperature. Prolonged exposure of superhelical DNA to alkali results in irreversible denaturation (Vingrad and Linn 1966). The resulting cyclic coiled DNA cannot be cleaved with restriction enzymes, and it migrates through agarose gels at about twice the rate of superhelical DNA and stains poorly with ethidium bromide. Traces of this form of DNA can be seen in plasmids prepared by alkaline lysis of bacteria.
12. Add 20 ml (15 ml) of ice-cold Alkaline lysis solution III. Close the top of the centrifuge bottle and mix the contents gently but well by swirling the bottle several times (there should be two distinguishable liquid phases). Place the bottle on ice for 10 minutes. A flocculent white precipitate consisting of chromosomal DNA, high-molecular-weight RNA, and potassium/S1/protein/cell wall complexes will form during this incubation. Potassium acetate is used in preference to sodium acetate in Alkaline lysis solution III because the potassium salt of dodecyl sulfate is far less soluble than the sodium salt.
13. Centrifuge the bacterial lysate at $\geq 20,000g$ (11,000 rpm in a Sorvall GSA rotor) for 30 minutes at 4°C in a medium-speed centrifuge. Allow the rotor to stop without braking. At the end of the centrifugation step, decant the clear supernatant into a graduated cylinder. Discard the pellet remaining in the centrifuge bottle. The failure to form a compact pellet after centrifugation is usually a consequence of inadequate mixing of the bacterial lysate with Alkaline lysis solution II (Step 11). If the bacterial debris does not form a tightly packed pellet, centrifuge again at 20,000g (11,000 rpm in a Sorvall GSA rotor) for a further 15 minutes, and then transfer as much of the supernatant as possible to a fresh tube. Decanting the supernatant through four-ply gauze at this step helps to remove traces of viscous genomic DNA and protein precipitate.

Recovery of Plasmid DNA

14. Measure the volume of the supernatant. Transfer the supernatant together with 0.6 volume of isopropanol to a fresh centrifuge bottle. Mix the contents well and store the bottle for 10 minutes at room temperature.
15. Recover the precipitated nucleic acids by centrifugation at 12,000g (8000 rpm in a Sorvall GSA rotor) for 15 minutes at room temperature. Salt may precipitate if centrifugation is carried out at 4°C.
16. Decant the supernatant carefully, and invert the open bottle on a paper towel to allow the last drops of supernatant to drain away. Rinse the pellet and the walls of the bottle with 70% ethanol at room temperature. Drain off the ethanol, and use a Pasteur pipette attached to a

vacuum line to remove any beads of liquid that adhere to the walls of the bottle. Place the inverted, open bottle on a pad of paper towels for a few minutes at room temperature to allow the ethanol to evaporate.

17. Dissolve the damp pellet of nucleic acid in 3 ml of TE (pH 8.0).
18. Purify the crude plasmid DNA either by column chromatography (Protocol 9), precipitation with polyethylene glycol (Protocol 8), or equilibrium centrifugation in CsCl-ethidium bromide gradients (Protocols 10 and 11).
19. Check the structure of the plasmid by restriction enzyme digestion followed by gel electrophoresis.

For recommendations or troubleshooting, please see Table 1-5.

The typical yield of high-copy-number plasmid vectors or of amplified low-copy-number vectors prepared by alkaline lysis is 3–5 µg of DNA/ml of original bacterial culture. The yield of recombinant plasmids containing inserted foreign DNA is usually slightly lower, depending on the size and nature of the cloned DNA fragment. Yields of < 10 µg/ml indicate that the plasmid DNA is toxic to *E. coli*; the complete absence of DNA indicates that the plasmid has been lost during extraction and purification. The first problem can often be solved by switching to a lower-copy-number vector and/or to a vector that carries prokaryotic transcriptional termination signals. The second problem is often the result of accidental loss of the plasmid DNA pellet after ethanol precipitation. It also occurs when the recombinant plasmid is large enough to be precipitated together with the chromosomal DNA after addition of potassium acetate. Such a large plasmid will also be susceptible to breakage during extraction and purification. This difficulty can be solved by using a more gentle procedure of cell lysis, such as that described in Protocol 7.

- R crude Plasmid in 300µl TE aufgenommen

+ 3 Volume GuSCN

auf Säule gegeben (Amagard Spi Column)

+ 3 Volume Gu HCl (Rugor Kit)

DF aewake

- 75µl Puffer PE abgezett (1x mitbewält)

mit 50µl ddH₂O dilut

Konzentration

$E_{260}^{280} = 1,68$

$E_{260}^{230} = 1,54$

$C = 535 \mu\text{g/ml}$

Konzentration

$1,69$

$1,88$

$C = 196 \mu\text{g/ml}$

LuxS-Amplification

- Amplification als Fragment schlecht mit Pfu polymerase,
aber gut mit Tag Phusion HF ausprobieren

Ausarbeiten50 µl \rightarrow 5x MM

5x Phusion HF Buffer

50 µl

40

dNTPs

1 µl

4

Primer (rev, fw) je

1 µl

4

Template

1 µl (50 µg)

je 1 µl

Phusion

0,5 µl

2 µl

add to 50 µl ddH₂O142 µl H₂O \rightarrow 4 Ansätze

1-2

Tag-Polymerase siehe S. 109 mit 50 µg DNA vom 26.01.

3-4

14.08.

5-6

Phusion (oben) 50 µg DNA vom 26.01.

7-8

14.08

Programm (Phusion) (Tag)

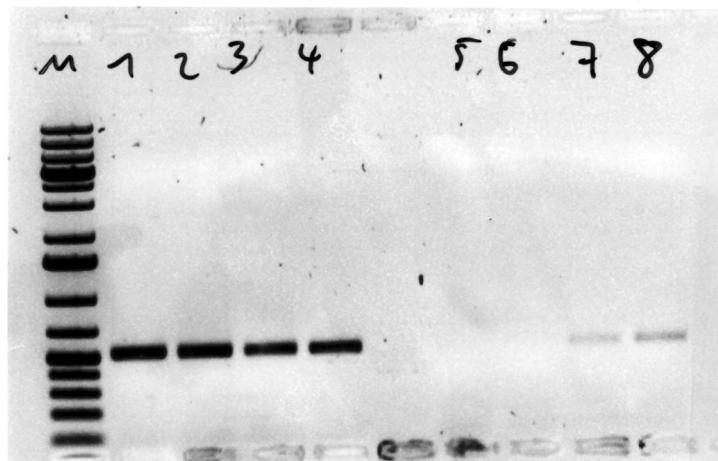
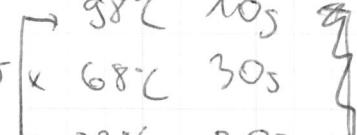
98°C 30s

98°C 3min

1 2 3 4 5 6 7 8

98°C 10s

98°C 30s



09.07.2012 15:15:16

Enhancement: 193

Exposure Time: 600

Brightness: 50

Contrast: 50

→ mit Plasmid ist PCR auch schlecht → doots Empfehlung?

→ PCR von PCR-Reaktion 8 nochmals in neuer PCR eingetragen ($M:1000$ verdünnt)

4 Reaktionen:

mit Plasmid (siehe S. 120)

- 1% Agarosegel → PCR-Längen aufgetragen



1,2 - 1 μ l aus Gelabstrakt (Max)

3,4 - 1:1000 PCR-Ran (P) (1 μ l)

→ Plasmid amplifiziert sauberes

Fragment → amplifizierung komplett abläuft

→ Gel ist schlecht gleich, da PCR unzureichend wurde

pMCB1034 p-lsr'-lacZ⁺ ② in BL21(DE3) transformiert

50 ng pMCB1034 p-lsr'-lacZ⁺ ② in E. coli BL21 (DE3) transformiert

→ v. d. @ 37°C inkubiert

→ Colony PCR von Kolonie (siehe S. 17)

Amnstag Buffer 3 μ l

rank dNTP 0,4 μ l

Promer (pMCB1034-1) 0,4 μ l

Promer pLSR-rev 0,4 μ l

DreamTag 0,1 μ l

ad 10 μ l

1) ~~1% Agarose~~ 1% Agarose

Colony PCR CB21 Lsr⁺

M - + 1 2 3 4 5 6 7 8



12.07.12

LuxS → von Amplifikat (0,70) 1+2 verarbeitet
 und PCR Cleanup mit Qiaquick PCR Purification Kit
 → mit H₂O eluiert → c = 89,6 µg/ml

LuxS - Verdunnen

10 µl der gereinigte PCR-Reaktion mit NdeI & EcoRI verdunnen

10µl PCR-Ran (89,6 µg/ml) ≈ 800 ng
 2µl Buffer 0
 6µl H₂O
 1µl NdeI
 1µl EcoRI

- 2 h @ 37°C verdunnen → 20 min @ 65°C w-w zentrifugieren
- nochmals PCR Cleanup gemacht

→ c = 26,7 µg/ml

pET28a (+) Verdunnen

- pET28a (+) verdunnen mit NdeI & EcoRI

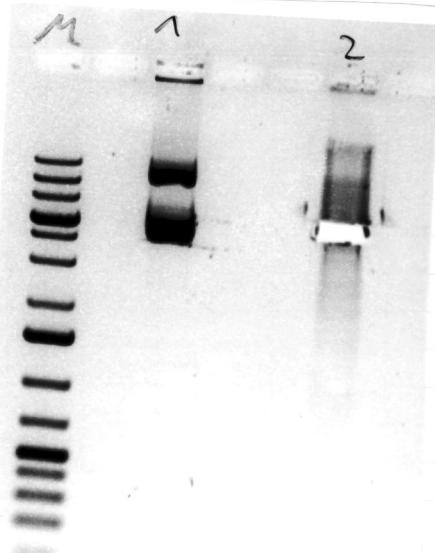
10µl pET28a(+) (133 µg/ml) ≈ 73 µg
 2µl Buffer 0
 4µl Eco RI
 1µl ~~NdeI~~ NdeI
 6µl H₂O

→ 2 L @ 37°C → 20 min @ 65°C → 1% fixiert

→ M = hohe 1kb Laddle Plus

1 - pMLB1034 lsr⁺-lacZ⁻ 1

2 - pET28a(+) NdeI, EcoRI



→ Fragment aus Gel ausgeschnitten und mit Gel Extrakt Kit von QiaGen aufgearbeitet

→ mit ~~20~~ 25 µl 70°C warme dH₂O abkühlt → c = 24,5 µg/ml

Ligation LuxS in pET28a(+)

pET28 → 35 · 10⁶ fmol

LuxS → 3,1 · 10⁵ fmol (516 bp)

Vektor (pET28) 100 µg (4 µl 24,5 µg/ml) (J. 173)

Inhalt (LuxS) 45 µg (5x Überstand) → 1,7 µl 26,7 µg/ml LuxS (SP2)

T4 Ligase Buffer 8 µl

T4 Ligase 0,5 µl

H₂O 11,8 µl

→ 10 min @ 22°C → 2 µl in DH5α transformiert → amplifiziert (i. N. @ 37°C) → 2 kolonie → Colony PCR (Prime F7 term & LuxS-Fw)

→ keine Bande auf Agarosegel (??)

→ ~~8 µl~~ Ligationsavant weiter @ 4°C i. N. ligiert

→ dann 5 µl in DH5α transformiert → @ 37°C inkubiert

WET 116

Sequenzierung pMB1034 p-lsr'-lacZ'-1

- Sequenz scheint in Ordnung zu sein
 - zwei stillen Mutationen im lacZ' Crossover
 - Frag 1 & Frag 2 Sequenzierung
 - bei anderen Basenaustauschen, wie die Chromatogramm so aus, als überlappende zil zwei Peaks
(→ File: order-2751397)

Neuer forward-Primer mit höherem GC Gehalt

E.coli K12 genome
lsr promoter
lsrR ORF

CTGTTCTTCAACATCCCTGTTCTGAAATTGCCGAATCGTTGATTGTCAAATTCAATTCTTCACTTGAAACATATTAAATCTTAATGCAATTGT
CTGTTCTTCAACATCCCTGTTCTGAAATTGCCGAATCGTTGATTGTCAAATTCTTCACTTGAAACATATTAAATCTTAATGCAATTGT
GAATTCTGAATTGCCGAATCGTTGATTGTC
<-----ORF-----|

neu: p-lsr-fw2

ECORI
5' -GAATTCTGAAATTGCCGAATCGTTGATTGTC-3'
BamHI
5' -CAAAACTGAACGGGGAAATATGGATCC-3'

31bp, CG=38,71%, Tm=58,7°C

28bp, CG=46,43%, Tm=59,9°C

Du
Per

Durchgeführt von/
Performed by

Datum/
Date

Bestätigt durch/
Approved by

Datum/
Date

Forts.
Contir