

8 SSt / 8 ECTS

MOL.601

Molekularbiologische Übungen II

Sommersemester 2025

Vom 24.03.2025 bis 11.04.2025

Institut für Molekulare Biotechnologie  
Technische Universität Graz

Arbeitsunterlagen

Lehrende: D. Kracher, A. Glieder, J. Spasic, J. Zuson, R. Leber, P. Heidinger

StuMAs: M Lucic, C. Wardell, C. Ruiz Valdez

Tech: M. Schabhüttl

## Übersicht Molekularbiologische Übungen II

Experiment	Kurzbeschreibung/ Einzelexperimente
<b>P1 Transduktion <i>E. coli</i></b> Herstellen neuer <i>E. coli</i> Stämme mit Antibiotikaresistenz und Fluoreszenz.	Phagenlysate, Phagentiter, Transduktion, Selektion Genotypische u. phänotypische Charakterisierung der hergestellten Stämme Kolonie-PCR
<b>Klonierung eines Esterase-Gens</b> aus <i>Rhodococcus ruber</i> in einen Expressionsvektor in <i>E. coli</i> .	PCR-Amplifizierung des Gens & Vektors / Synthese Gibson-Überhänge Assemblierung in einen Expressionsvektor Herstellung von elektrokompenten <i>E. coli</i> Zellen, Transformation, Selektion Identifizierung positiver Transformanten mittels Kolonie-PCR Transformation eines <i>E. coli</i> Expressionsstamms
Genexpression: Expression einer Esterase aus <i>Rhodococcus ruber</i>	Filter-Aktivitätsassay Expression, SDS-PAGE, Coomassie-Färbung Photometrischer Aktivitätsassay Gesamt RNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> . Bestimmen der RNA-Konzentration und -Qualität
Detektion von RNA	<u>Northern Blot</u> : Trennen der RNA auf Agarosegelen. Transfer der RNA auf Nylonmembran. Detektion spezifischer RNAs mittels Digoxigenin-markierter Sonde
Detektion von Proteinen	<u>Western Blot</u> : SDS-PAGE von Proteinen. Transfer und Immobilisierung auf Nitrocellulosemembranen. Detektion über His-Tag
<i>In silico</i> Klonierung	Verschiedene Gene sollen amplifiziert und in einen Expressionsvektor zur heterologen Expression in <i>E. coli</i> kloniert werden. Überprüfung der Expression auf RNA- und Protein-Ebene

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1 Lernziele der Übungen .....	5
1.2 Verhalten im Labor und Sicherheit .....	5
2. Bakteriophagen .....	8
2.1 Theoretischer Hintergrund.....	8
2.1.1 Allgemeines über Viren .....	8
2.1.2 Virusreplikation.....	10
2.1.3 Bakteriophagen .....	11
2.1.4 Allgemeine und spezielle Transduktion .....	12
2.1.5 Der Bakteriophage P1 .....	13
2.1.6 Ziel des Experiments.....	14
2.1.7 Weiterführende Literatur.....	14
2.2 Schema der P1 Transduktion .....	15
2.3 Durchführung - P1 Transduktion.....	16
2.3.1 Medien, Standardlösungen, Antibiotika und Puffer .....	25
2.3.1.1 Vollmedien .....	25
2.3.1.2 Salze.....	25
2.3.1.1 Puffer .....	26
2.3.1.2 Platten-Farbcode.....	26
3. Klonierung und Expression von Genen in <i>Escherichia coli</i> .....	27
3.1 Theoretischer Hintergrund.....	27
3.1.1 Expressionssysteme in <i>E. coli</i> – Das pET-System .....	27
3.1.2 Esterasen.....	29
3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion/Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	30
3.1.4 Gibson Assemblierung .....	30
3.1.5 Kompetenz.....	32
3.1.6 Transformation .....	32
3.1.7 SDS-PAGE .....	32

3.1.8	Immunodetektion – Western Blot.....	32
3.1.9	Immunodetektion – Northern Blot.....	33
3.1.10	RNA-Isolation.....	36
3.1.11	Ziel des Experiments.....	37
3.2	Klonierung und Genexpression der Esterase Ru1 aus <i>Rhodococcus ruber</i> .....	38
3.2.1	Klonierung des Esterase-Gens Ru1 aus <i>R. ruber</i> in einen Expressionsvektor.....	38
3.2.2	Überprüfung der PCR-Fragmente mittels Agarosegel .....	41
3.2.3	Herstellung von Agarosegelen .....	41
3.2.4	Aufreinigung der PCR mittels „Gene JET Gel Extraction Kit“ (Thermo Scientific) ...	42
3.2.5	Vorbereitung von ONCs .....	44
3.2.6	Isolation des Vektors pET28a(+) .....	44
3.2.7	Amplifikation des leeren Plasmids pET-28a(+) .....	46
3.2.8	Gibson Assemblierung von Vektor- und Insert-DNA.....	48
3.2.9	Entsalzen der Gibson Assemblierung.....	49
3.2.10	Herstellen kompetente Zellen.....	49
3.2.11	Transformation von elektro-kompetenten <i>E. coli</i> Zellen mit Plasmid-DNA .....	51
3.2.12	Kolonie-PCR zur Überprüfung der Gibson Assemblierung .....	53
3.2.13	Amplifikation und Isolation des <i>RrRu1</i> tragenden Vektors .....	55
3.2.14	Untersuchung der Expression des <i>RrRu1</i> -Fusionskonstrukts.....	57
3.2.15	SDS-PAGE .....	59
3.2.16	Aktivitätstest mit p-Nitrophenylbutyrat der BugBuster-Überstände von <i>RrRu1</i> .....	61
3.2.17	Western Blot .....	62
3.2.18	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>E. coli</i> mittels „SV Total RNA Isolation System“ (Promega) .....	66
3.2.19	Bestimmung der RNA-Konzentration mittels „Nanodrop“.....	68
3.2.20	Elektrophoretische Auftrennung der RNA in neutralem Agarosegelen.....	68
3.2.21	Northern Blot.....	70
4.	Appendix.....	75

# 1. Einleitung

## 1.1 Lernziele der Übungen

In der Lehrveranstaltung werden die Klonierung eines Gens über PCR („Gibson Assemblierung“), sowie die Überexpression und der Nachweis von Genprodukten auf RNA- und Proteinebene durchgeführt. Des Weiteren umfassen die Übungen die Übertragung eines Gens zwischen zwei Bakterienstämmen mittels Bakteriophagen. Die angewandten Methoden gehören zu den Standardtechniken der Molekularbiologie. Die Studierenden werden in die Planung der Experimente einbezogen, die sie dann selbstständig durchführen. Anschließend werden die Resultate zusammengefasst und sowohl in schriftlicher als auch in mündlicher Form präsentiert. Die Studenten\*innen sollten nach diesem Kurs in der Lage sein, grundlegende molekularbiologischen Techniken zu beherrschen, und Experimente selbstständig zu planen. Weiterhin sollen sie in der Lage sein, Ergebnisse zu interpretieren und sowohl in schriftlicher Form als auch als Vortrag zu präsentieren.

## 1.2 Verhalten im Labor und Sicherheit

### **Allgemeines**

Im Zuge der Mol.601 Laborübungen werden die Teilnehmer\*innen mit Mikroorganismen und Chemikalien arbeiten, die ein potenzielles Sicherheitsrisiko darstellen können. Die Sicherheit im Labor steht daher an erster Stelle. Die Hauptelemente für einen sicheren Umgang mit Mikroorganismen und Chemikalien sind gute Laborpraktiken und -techniken sowie die korrekte Sicherheitsausrüstung.

### ***In den Laborräumlichkeiten gelten folgende Verhaltens- und Sicherheitsregeln:***

- Arbeiten und Experimente dürfen ausschließlich in Anwesenheit der Betreuer\*innen durchgeführt werden
- Abwesenheiten sind den Betreuer\*innen rechtzeitig zu melden
- In allen Laboratorien ist das Rauchen, Essen, Trinken sowie die Verwendung von Kosmetika und Pflegemitteln (z.B. Handcreme) untersagt
- Unbefugten ist der Zutritt zum Laborbereich untersagt
- Laborräume sind aufgeräumt und sauber zu halten. Auf den Arbeitstischen sollen nur die tatsächlich benötigten Arbeitsmittel und Materialien stehen.
- Im gesamten Laborbereich ist ein Labormantel (geschlossen) zu tragen.

- Einmalhandschuhe sind bei Tätigkeiten zu tragen, bei denen Kontaminationsgefahr durch Chemikalien oder GVOs besteht (Ausnahme: gleichzeitige Benutzung von offenen Flammen (z.B. Bunsenbrenner, Abflammen mit Ethanol))
- Lange Haare müssen vor dem Arbeiten zurückgebunden werden.
- Zur Vermeidung von Kontaminationen darf Straßenkleidung (Mäntel, Jacken) nicht im Laborbereich aufbewahrt werden
- Experimente mit flüchtigen oder toxischen Substanzen (z.B. Mercaptoethanol) sind im Abzug durchzuführen
- Die Verwendung von Mobiltelefonen sollte im Laborbereich vermieden werden
- Wir bitten vorab um Meldung von relevanten Krankheiten oder Schwangerschaft

### ***Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVOs)***

Die Laborteilnehmer\*innen werden im Zuge der Laborübungen mit GVOs arbeiten, bzw. diese auch selbst herstellen.

Zu GVOs zählen "Laborstämme" (z.B. *Escherichia coli*) und alle Organismen, die mit rekombinanter DNA (z.B. Klonierungsvektoren) transformiert wurden. Das Labor ist dabei als geschlossenes System zu betrachten; GVOs dürfen daher nicht in Räume außerhalb des Übungslabors gebracht werden, die nicht als Laborbereiche gekennzeichnet sind (Büros, Lagerräume, Seminarräume).

Alle Laboreinrichtungen sind stets sauber und aufgeräumt zu halten. Arbeitsflächen sind vor dem Beginn und nach Beendigung der Arbeit selbstständig mit Ethanol (70%) zu reinigen. Um ein geschlossenes System zu gewährleisten, sind Türen und Fenster während des Arbeitens mit GVO geschlossen zu halten.

Die Lagerung von GVOs (Petrischalen, Flüssigmedien etc.) darf nur in dafür vorgesehenen Lagerstätten (z.B. Laborkühlschränke und Tiefkühlschränke) erfolgen. Gebinde, Flaschen, Behälter, Petrischalen oder Reaktionsgefäße mit GVO müssen unbedingt beschriftet sein (Datum, Name, Gruppe und eindeutige Zuordnung des Inhalts).

### ***Entsorgung von kontaminierten Materialien***

Einwegmaterialien, die mit biologischem Material kontaminiert sind (z.B. Petrischalen, Pipettenspitzen) sind ausschließlich in dafür vorgesehene kleine Autoklavierbeutel zu geben, die sich auf jedem Laborplatz befinden. Es liegt in der Verantwortlichkeit jeder Gruppe, diese in einem großen Abfallsack zu sammeln, der totautoklaviert und erst dann über den Hausmüll entsorgt wird. Alle anderen Materialien (Plastik und Papiermüll), die nicht

mit biologischem Material in Berührung gekommen sind, werden in einem separaten Müllbeutel gesammelt. Im Rahmen der Übungen ist täglich und für jedes Labor eine zugeteilte Gruppe für den ordnungsgemäßen Abschluss des Labortages verantwortlich („Labordienst“). Die zuständige Gruppe stellt sicher, dass das Labor sauber hinterlassen wird, der Waschdienst durchgeführt ist und anfallende Abfälle fachgerecht entsorgt werden.

### ***Verhalten im Gefahrenfall***

- Unfälle, Beinahe-Unfälle und Verletzungen müssen unverzüglich den Betreuer\*innen gemeldet werden
- Bei Austritt von biologischem Material muss der betroffene Bereich gesichert und biologische Kontaminanten deaktiviert werden.
- Verschüttetes Material mit Papiertüchern aufnehmen und autoklavieren; den kontaminierten Bereich anschließend gründlich desinfizieren
- Kontaminierte Schutz- oder Straßenkleidung ist mit Desinfektionsmittel zu behandeln und anschließend zu Waschen
- Kontaminierte Hautstellen sind zu desinfizieren und unter fließendem Wasser abzuspülen (mind. 5 min)
- Bei Augenkontakt sind die Augen mit den vorgesehenen Augenduschen für mind. 10 Minuten zu spülen
- Im Falle eines Feueralarms, ist das Gebäude zu evakuieren und den Anweisungen der Betreuer\*innen zu folgen.

## 2. Bakteriophagen

### 2.1 Theoretischer Hintergrund

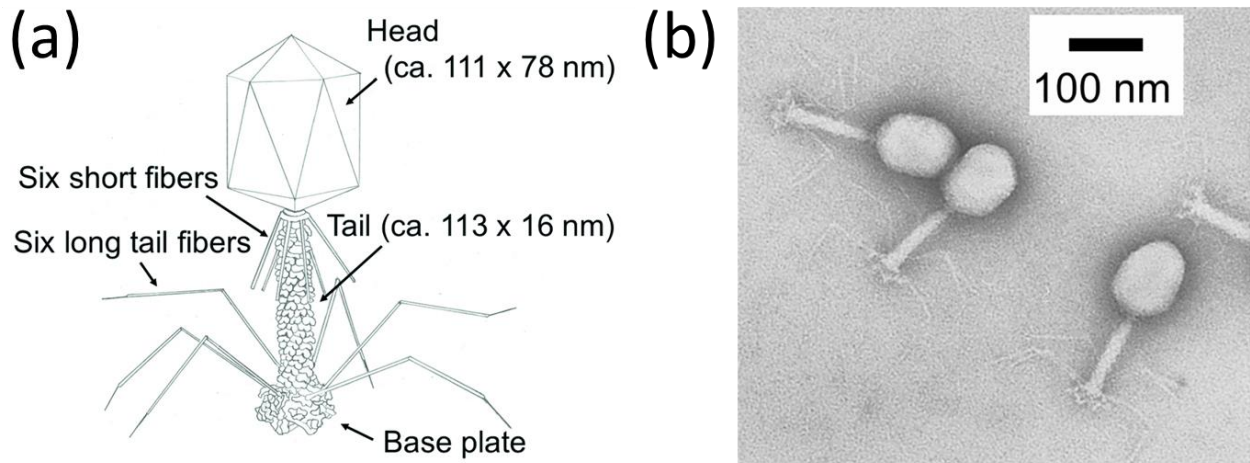
Bakteriophagen (meist nur Phagen genannt, abstammend vom griechischen Wort *phagein* – „essen“) sind Viren, die Bakterien infizieren.

#### 2.1.1 Allgemeines über Viren

Unter Viren versteht man infektiöse Partikel, die aus genetischem Material (entweder DNA oder RNA) und einer Proteinhülle bestehen. Viren vermehren sich unabhängig vom Wirtschromosom, aber nicht unabhängig vom Wirt. Die Vermehrung wird erst durch den Vorgang der Infektion möglich, worunter man das Eindringen des Virus in die Wirtszelle versteht. Da Viren keinen eigenen Stoffwechsel besitzen, sind sie per Definition keine Lebewesen, sondern genetische Elemente vergleichbar mit Plasmiden. Im Unterschied zu diesen besitzen sie jedoch auch eine extrazelluläre Form in der sie lange außerhalb des Wirts leben können und die einen Wirtswechsel möglich macht.

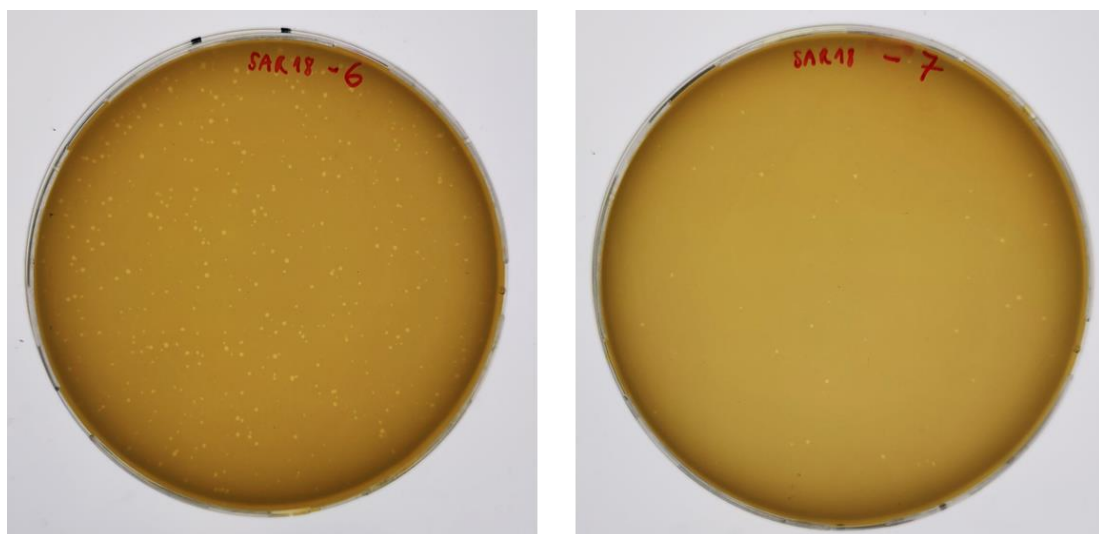
Die extrazelluläre Erscheinungsform (Virion), besteht aus einer Nukleinsäure, die von einer Proteinhülle (Kapsid) umgeben ist, und je nach Virus aus weiteren Makromolekülen, wie z.B. Enzymen, die bei der Infektion des Wirts entscheidende Rollen spielen. Die Anordnung und Information der richtigen Faltung der Hüllproteine ist in der Struktur der Proteine selbst enthalten und den Vorgang der Zusammensetzung des Virions bezeichnet man als *self assembly* (deutsch „Selbstassemblierung“). Viren können danach klassifiziert werden ob sie als Virion DNA oder RNA enthalten. Eine weitere Unterteilung kann danach getroffen werden, ob die Nukleinsäure einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt, linear oder ringförmig. Die strukturell kompliziertesten Viren sind Bakteriophagen, die ikosahedrale Köpfe (20 Flächen) und helikale Schwänze besitzen.





**Abbildung 1: Beispielhafter Aufbau von Bakteriophagen am Fall des T4-Phagen (a). Die Visualisierung von Viren ist durch die Anwendung der Transmissionselektronenmikroskopie möglich (b). Quelle: Sahiro et al., *Scientific Reports*, 2022, 12(1), 1-8.**

Erst wenn das Virion durch eine Infektion in die Zelle gelangt, wird das intrazelluläre Stadium, in dem die Replikation erfolgt, eingeleitet. Dabei werden neue Kopien des Virusgenoms gebildet und die nötigen Bestandteile für die Virushülle synthetisiert. Die Infektion einer Zelle mit einem Virus kann gleichzeitig mit der Verleihung neuer Eigenschaften einhergehen, die bei der Teilung der Wirtszelle weitervererbt werden. Diese Eigenschaften können einerseits nützlich sein, andererseits können Viren sich auf eine für die Zelle schädliche Weise vermehren, weswegen viele Viren Krankheitsüberträger sind. Wenn ein Virion eine Infektion auf einem Bakterienrasen einleitet, kann dies durch eine klare (=transparente) Stelle auf dem Bakterienrasen, einer sogenannten *Plaque*, erkannt werden.



**Abbildung 2 Durch Bakteriophagen verursachte Plaques auf einem Bakterienrasen.**

Der Prozess der Bildung einer Virenplaque beginnt mit der Infektion einer einzelnen Wirtszelle durch ein Virus. Das Virus repliziert sein genetisches Material innerhalb der infizierten Zelle und produziert neue Viruspartikel. Diese Partikel werden schließlich freigesetzt, wenn die Zelle platzt oder auf andere Weise zerstört wird. Die freigesetzten Viren infizieren dann benachbarte Zellen, setzen den Zyklus fort und verursachen eine Ausbreitung der Infektion.

Dies ist auch die Grundlage des Plaquetests, der eine einfache Möglichkeit der Quantifizierung von Viren erlaubt. Der Titer wird dabei als Maßeinheit der Virusmenge verwendet und ist definiert als Anzahl infektiöser Einheiten pro Volumen einer Flüssigkeit. Der Plaquetest wird am einfachsten mit Hilfe der Agarüberschichtungstechnik durchgeführt. Dabei wird eine Mischung aus geschmolzenem Weichagar, Bakterienzellen und verdünnter Phagensuspension auf eine Platte mit verfestigtem Agar-Nährboden gegossen. Durch Bebrütung beginnen die Wirtsbakterien, die gleichmäßig über die Agarschicht verteilt wurden, zu wachsen. Durch einzelne Virionen, die sich an Zellen heften, wird eine Zelllyse bewirkt. Die dadurch weiter freigesetzten Virionen greifen auf angrenzende Zellen über, nach neuerlicher Infektion und Replikation erfolgt wieder Lyse und Freisetzung neuer Virionen (genauer ausgeführt im nächsten Absatz). Die Größe der Plaques hängt vom Virus sowie den Kulturbedingungen ab.

### **2.1.2 Virusreplikation**

Ein Virus ist darauf angewiesen, dass alle für ihn notwendigen Bestandteile vom Wirt synthetisiert werden. Die zusammengesetzten Bestandteile werden dann von der Zelle freigesetzt, die freigesetzten Virionen können dann neue Zellen infizieren. Dieser Replikationsvorgang kann in folgende Phasen unterteilt werden:

- 1) Adsorption des Virions an eine Wirtszelle
- 2) Injektion des Virions oder seiner Nukleinsäure in die Zelle
- 3) Synthese der Nukleinsäure und Proteinen durch den Zellmetabolismus, der durch die Infektion umgeleitet wurde
- 4) Zusammenbau des Kapsomers, sowie Verpacken der Nukleinsäure
- 5) Freisetzung reifer Virionen mit einhergehender Lyse der Wirtszelle

Am Kompliziertesten tritt die Injektion bei Bakteriophagen in Erscheinung. Üblicherweise hat bei Phagen das Virion einen Kopf in dem die gefaltete Nukleinsäure vorliegt. Darüber hinaus verfügt es über einen Schwanz, an dessen Ende sich Fasern und Nadeln befinden. Zuerst müssen die Fasern durch Wechselwirkungen mit Polysacchariden der äußeren Membran

an die Zelle binden. Anschließend ziehen sich die Fasern zusammen und die Nadel tritt mit der Zellwand in Kontakt. Durch enzymatische Aktivität kommt es zu Bildung einer kleinen Pore. Daraufhin zieht sich die Schwanzumhüllung zusammen, und die virale DNA gleitet durch ein Loch in der Spitze des Phagenschwanzes ins Cytoplasma, wobei der größte Teil der Proteinhülle außen bleibt.

### **2.1.3 Bakteriophagen**

Bakterielle Viren sind sehr unterschiedlich. Am häufigsten kommen in der Natur allerdings Phagen mit doppelsträngigen DNA-Genomen vor. Nur wenige bakterielle Viren enthalten Lipidhüllen, die meisten liegen nackt in einer Vielzahl an komplexen Strukturen vor. Die Wirtszellen haben sich häufig gegen Phageninfektionen geschützt, was erklärt, dass bestimmte Phagenarten sich nur auf bestimmten Wirtsstämmen vermehren können. Eine entscheidende Rolle spielen dabei Oberflächenproteine und Polysaccharide, an die sich der Phage zu Beginn der Infektion anheften muss oder sich eben nicht anheften kann. Häufig liegt eine Wirtsrestriktion vor, die auf einem wirtsspezifischen Restriktionsendonuklease/Methylase System beruht. Die bakterielle DNA wird dabei an spezifischen Sequenzen methyliert und damit vor der wirtseigenen Restriktionsendonuklease, die dieselben Sequenzen nur in unmethyliertem Zustand erkennen und schneiden kann, geschützt. Nicht methylierte DNA aus der Neuinfektion durch Phagen wird erkannt und zerstört. Bakteriophagen unterscheiden sich außerdem hinsichtlich ihres Replikationszyklus: Es gibt virulente Phagen, die die Wirtszelle durch Lyse töten, nach der die neu zusammengesetzten Virionen freigesetzt werden. Im Gegensatz dazu können temperente Phagen einen weiteren Lebenskreislauf durchlaufen, der als Lysogenie bezeichnet wird. Dabei werden die Virusgene meist in das Wirtschromosom integriert, und das virale Genom, der so genannte Prophage, wird synchron mit dem Chromosom des Wirts repliziert. Dabei werden lytische Vorgänge meist durch ein phagen-kodiertes Repressorprotein unterdrückt, die erst durch bestimmte Umweltreize herbeigeführt werden (z.B. Änderung der Temperatur).

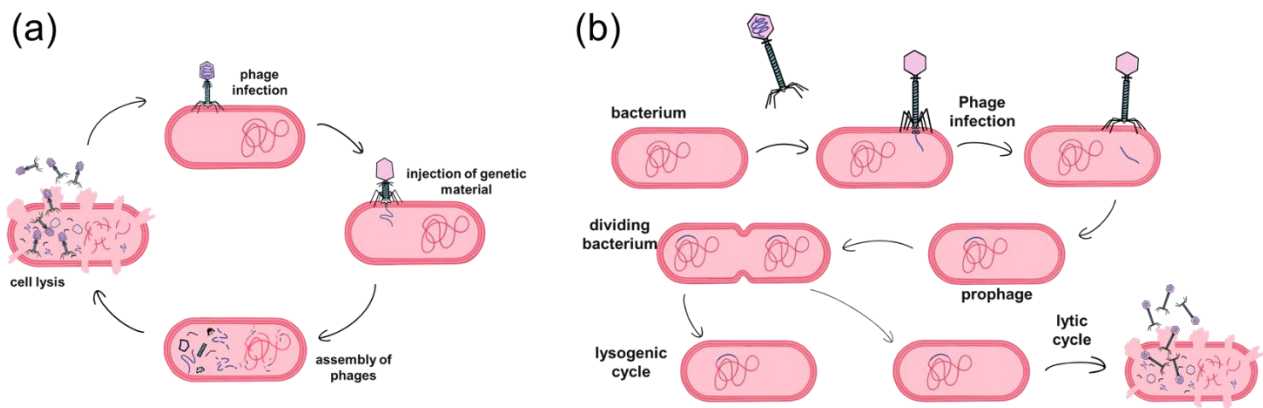


Abbildung 3: Lytischer (a) und lysogener Zyklus (b) von Bakteriophagen (Tina Lanzmaier).

### 2.1.4 Allgemeine und spezielle Transduktion

Unter **Transduktion** versteht man den Austausch von DNA zwischen Bakterienzellen vermittelt durch Bakteriophagen. Dies kann auf zwei Arten erfolgen: bei der allgemeinen Transduktion ist die Wirts-DNA anstelle des Virusgenoms Bestandteil des reifen Virions, die spezielle Transduktion kann hingegen nur von temperenten Viren durchgeführt werden. Dabei wird DNA aus einer spezifischen Region des Wirtschromosoms direkt in das Virusgenom integriert, wobei einige Virusgene ersetzt werden.

Bei der **allgemeinen Transduktion** nehmen defekte Virenpartikel während der Phagenvermehrung im lytischen Zyklus nach dem Zufallsprinzip Teilstücke der chromosomalen Wirts-DNA auf, die vorher, durch die Phagen-DNA gesteuert, in Bruchstücke zerlegt wurde. Die transduzierenden Phagen, also jene Phagen die Donor-DNA enthalten, werden nach der Lyse gemeinsam mit normalen Virionen freigesetzt. Wenn ein solches Lysat zur Infektion einer Empfängerpopulation benutzt wird, erhält ein kleiner Teil dieser Population durch die Transduktion Wirts-DNA, die mit der DNA des neuen Wirts rekombinieren kann. Wenn die Donorgene mit dem bakteriellen Chromosom des neu infizierten Wirts nicht homolog rekombinieren können, gehen diese wieder verloren. Sie können nicht unabhängig replizieren und sind nicht Bestandteil des viralen Genoms. Praktisch kann jedes Gen der Donor-DNA zum Empfänger transferiert werden. Da während der lytischen Infektion die Enzyme, die für das Verpacken viraler DNA in den Bakteriophagen verantwortlich sind, nur sehr selten versehentlich Wirts-DNA in den Bakteriophagen packen, ist die allgemeine Transduktion ein Zufallsprozess, weswegen die Transduktionsrate relativ gering ist. Bei der **speziellen Transduktion** wird die ins Wirtschromosom integrierte DNA eines temperenten Virus in seltenen Fällen falsch

ausgeschnitten und kann dabei angrenzende Wirtsgene mitnehmen. Da die bakterielle Donor-DNA in diesem Fall Bestandteil des Genoms des temperenten Phagen ist, gibt es zwei Möglichkeiten: (1) die DNA kann während der Lysogenisierung in das Wirtschromosom integriert werden und (2) die DNA kann im Empfänger als Teil einer lytischen Infektion repliziert werden. In der Gentechnik macht man sich diese Eigenschaft zu Nutze, um bestimmte DNA-Bereiche von einem Bakterium auf andere zu übertragen. Da der Bakteriophage bei der Exzision DNA-Abschnitte der Wirtszelle nicht gezielt, sondern nur mit statistischer Wahrscheinlichkeit mitnimmt, kann die anschließende homologe Rekombination folgendermaßen überprüft werden: Befindet sich auf dem DNA-Abschnitt, den man von einem Bakterium mittels Transduktion auf ein weiteres übertragen möchte, ein Selektionsmarker, wie z.B. ein Antibiotikum- Resistenzgen, überleben bei der Selektion nur die Bakterien, die den gewünschten DNA-Abschnitt erhalten und mittels homologer Rekombination eingebaut haben.

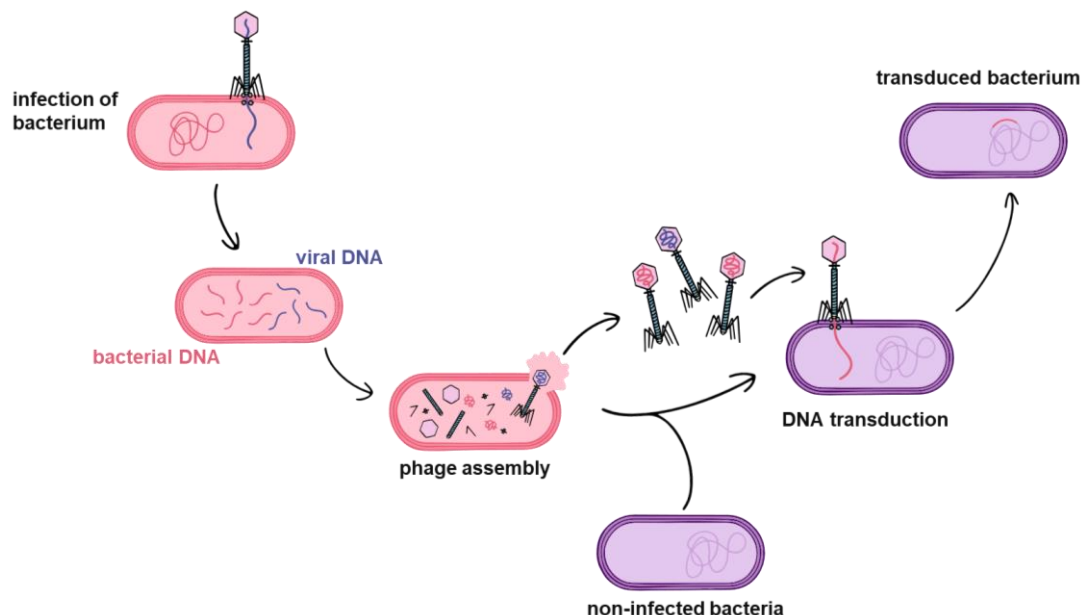


Abbildung 4 Allgemeines Schema der Transduktion (Tina Lanzmaier).

### **2.1.5 Der Bakteriophage P1**

Während der Laborübungen wird mit dem temperenten Phagen P1 gearbeitet. Temperente Phagen sind in der Lage, entweder den lytischen oder den lysogenen Zyklus durchzuführen, je nach den Bedingungen, unter denen sie eine Wirtszelle infizieren. Phage P1 wird während der lysogenen Phase nicht in das Wirtszellgenom integriert, sondern verbleibt als zirkuläres DNA-Molekül (91500 bp = 2% des Bakteriengenoms) im Zytoplasma. Seine Replikation ist an die des bakteriellen Chromosoms gekoppelt. Bei der Induktion des lytischen Zyklus

beginnt der P1 Phage seine Hüllproteine zu produzieren, vor allem aber produziert er eine Nuklease, die das Wirtszellgenom langsam zerschneidet. Der Phage beginnt anschließend die eigene DNA vermehrt zu replizieren und mit Hilfe der Hüllproteine zu verpacken. Gelegentlich (in ca. 0.1% der Fälle) wird dabei auch ein Stück der geschnittenen bakteriellen DNA verpackt, die zufällig die richtige Größe besitzt (etwa 100 kbp).

Diese DNA wird, genau wie das Phagengenom, bei einer Neuinfektion auf eine Wirtszelle übertragen. Die entstandene Duplikation kann nun durch einen homologen Rekombinationsvorgang in das bakterielle Chromosom integriert werden.

Die Fähigkeit des Phagen P1 zur Transduktion hat wesentlich zur Verfeinerung bei der Erstellung der Genkarte von *E. coli* beigetragen. Diese werden dabei mit kleinen Sequenzabschnitten des P1 Phagen kombiniert, die diese DNA-Abschnitte stabilisieren und zur extrachromosomalen Replikation befähigen. Durch Induktion des lytischen Zyklus kann eine solche DNA in guter Ausbeute erhalten werden.

### **2.1.6 Ziel des Experiments**

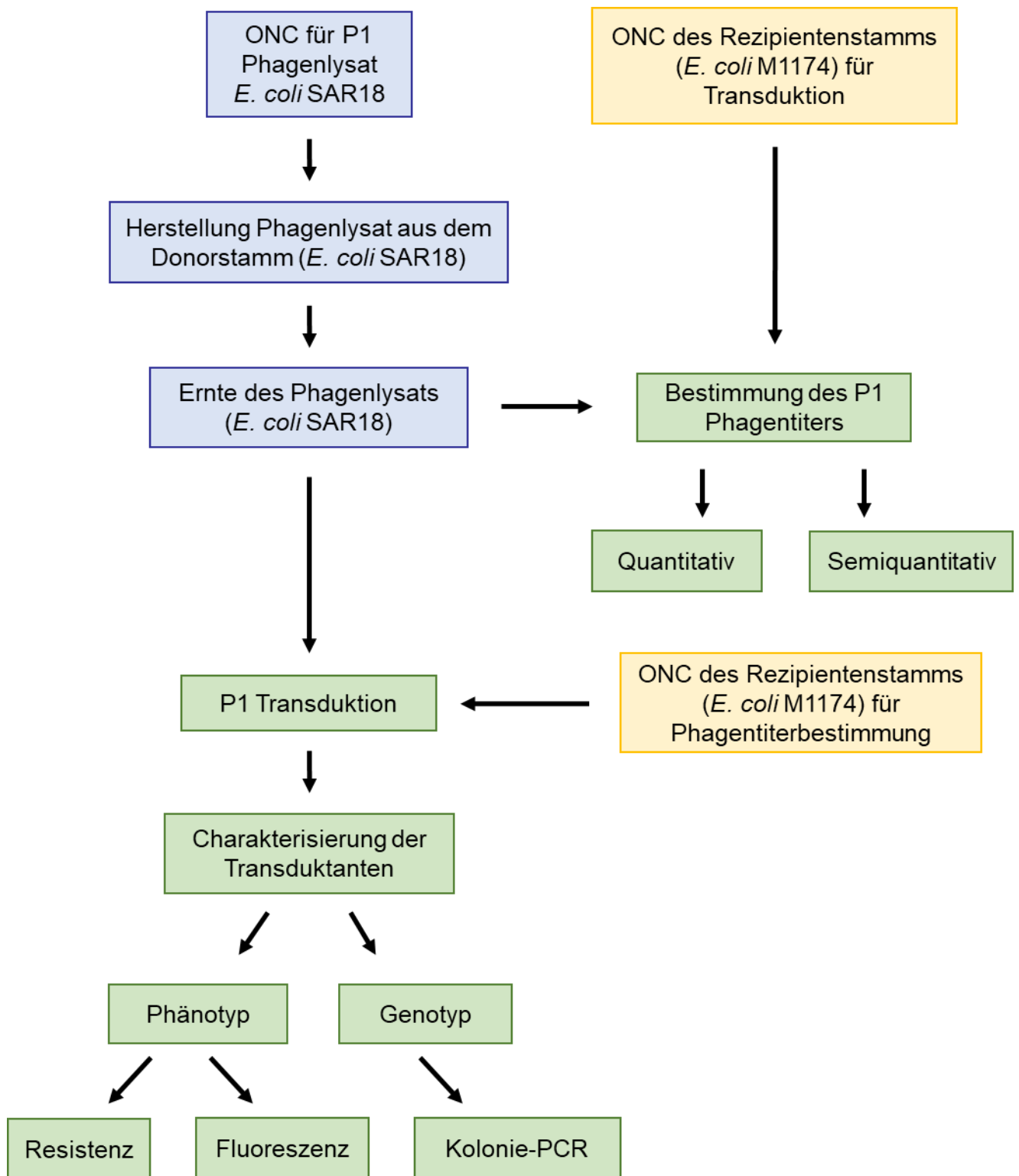
Eine kombinierte Expressionskassette aus *bla* (codiert für eine Ampicillinresistenz) und *gfp* (green fluorescent protein aus der Qualle *Aequorea victoria*) soll mit Hilfe des Bakteriophagen P1 aus dem Donorstamm *E. coli* SAR18 in den Rezipientenstamm *E. coli* M1174 übertragen werden.

Die Charakterisierung des Stammes erfolgt anschließend durch das Ausstreichen von möglichen Transduktanden phänotypisch auf Selektionsplatten und genotypisch mittels Kolonie-PCR.

### **2.1.7 Weiterführende Literatur**

- Madigan, M, Martinko, J: **Brock Mikrobiologie**. Pearson Studium 2020, 15. Auflage.

## 2.2 Schema der P1 Transduktion



## 2.3 Durchführung - P1 Transduktion

### ○ Teststämme für Transduktion

Teststamm	Beschreibung	Phänotyp
Donor	CSH26	Amp <sup>R</sup> , Lac <sup>-</sup>
<i>E. coli</i> SAR18	hat an der <i>attB</i> Stelle des Bakteriophagen Lambda eine kombinierte Kasette aus <i>bla</i> und <i>gfp</i> . <i>gfp</i> steht unter Kontrolle eines starken <i>lac</i> -Promoters (Größe ~3,5 kb), <i>ara</i> , $\Delta(lac-pro)$ , <i>thi</i>	fluoreszierend
Rezipient	sfrA <sup>+</sup> , P <sup>-</sup> , B1 <sup>-</sup> , Trp <sup>-</sup> , Lys <sup>-</sup> , Gal <sup>-</sup> , MalA <sup>-</sup> , Str <sup>R</sup> , Su <sup>-</sup> , <i>E. coli</i> M1174 delta(lac)X74	Str <sup>R</sup> , Lac <sup>-</sup>

### ○ ONCs für P1 Phagenlysats (*E. coli* SAR18)

Eine ONC (overnight culture) des Donorstamms *E. coli* SAR18 wird von den Betreuern bereitgestellt.

2 ml 2xTY Medium (+100 µg/ml Ampicillin) wird mit einer Einzelkolonie inokuliert. Die ONCs werden bei 37°C/ 130 rpm / ON (overnight, über Nacht) inkubiert. **(! Nicht vergessen das Antibiotikum zuzufügen !)**

### P1 Phagenlysats (*E. coli* SAR18)

Vorbereitung:

- Mischung 10 mM MgSO<sub>4</sub>/ 5 mM CaCl<sub>2</sub> aus 1 M Stammlösungen herstellen (**steril!**)
- 2xTY-Amp Platten auf 37°C vorwärmen
- 2xTY-Top Agar herstellen und auf ca. 50°C abkühlen
- TMG-Puffer auf 4°C stellen

Durchführung:

1. Die 2 ml ONC wird für 10 min bei 3.500 rpm / Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im halben Volumen (1 ml) einer Lösung aus 10 mM MgSO<sub>4</sub>/ 5 mM CaCl<sub>2</sub> in TMG-Puffer resuspendiert.



2. Herstellen folgender Verdünnungen des Phagenlysats von SAR18 (Phagenlysats von Betreuer bereitgestellt):  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  in TMG Puffer
3. Je 100 µl des resuspendierten Pellets werden in sterilen Reaktionsgefäßen (15 mL Greiner Röhrchen) mit je 100 µl Phagenlysats-Verdünnung vorsichtig, aber gut, gemischt (**nicht vortexen, nur invertieren!**) **Achtung:** Wichtig ist hier auch eine Wachstumskontrolle herzustellen, d.h. 100 µl Zellsuspension **ohne** Phagenzugabe.
4. 5 min bei RT inkubieren
5. Zugabe von 2,5 ml 2xTY-Medium + 100 µl 1 M  $\text{MgSO}_4$  + 50 µl 1 M  $\text{CaCl}_2$ . Zuletzt 3 ml 2xTY-Top Agar mittels einer Pasteur Pipette zugeben. **Achtung:** Top-Agar bei ca. 50°C halten, damit er nicht frühzeitig erstarrt
6. Unmittelbar nach Zugabe des Top Agars die Röhrchen durch invertieren mischen und unverzüglich auf die vorgewärmten 2xTY-Amp Platten gießen. **Achtung:** Wachstumskontrolle zuerst herstellen und plattieren, damit keine Kontaminationsmöglichkeit durch Phagen besteht. Die Platten **mit dem Deckel nach oben** bei 37°C inkubieren.
7. Nach ca. 6 Stunden sollten bereits **Einzelplaques** (auf Platten mit hohen Verdünnungen) bzw. **konfluente Lyse\*** (bei niedrigeren Verdünnungen) zu sehen sein. Bei Inkubation über Nacht können phagenresistente *E. coli* Zellen auch sichtbare Kolonien bilden. Eine Ernte des Phagenlysats ist trotzdem möglich.

**\*konfluente Lyse:** Bakterienrasen ist nahezu vollständig lysiert

#### ○ **ONCs für Phagentiterbestimmung (*E. coli* M1174)**

Eine ONC des Rezipientenstamms *E. coli* M1174 herstellen.

2 ml 2xTY Medium (+25 µg/ml Streptomycin) mit einer Einzelkolonie inokulieren (**+Sterilkontrolle!**). Die ONCs werden bei 37°C / 130 rpm / ON (*overnight*, über Nacht) inkubiert. (**! Nicht vergessen das Antibiotikum zuzufügen !**)

#### ○ **Ernte der P1 Phagenlysate von SAR18**

Durchführung:

1. Bei Erreichen der konfluenten Lyse wird die Top-Agarschicht mit einem sterilen Spatel zerkleinert, abgekratzt und in 50 ml Reaktionsgefäße (spitzer Boden) gegeben.

2. Die Plattenoberfläche wird mit 2 ml TMG-Puffer gespült und ebenfalls in das Reaktionsgefäß transferiert.
3. Nach Zugabe von 200 µl CHCl<sub>3</sub>, kräftig vortexen.
4. Der Inhalt wird in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und 10 min lang bei 4.000 rpm zentrifugiert.
5. Vorsichtiges Überführen des Überstands in ein frisches Reaktionsgefäß (15 ml)
6. Wieder 200 µl CHCl<sub>3</sub> dazugeben und vortexen. Bei 4°C aufbewahren

Bemerkungen:

- (a) P1 Phagen benötigen zur Adsorption an die Bakterienzellen Ca<sup>2+</sup>, daher wird dem Top-Agar Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> zugegeben.
- (b) P1 Lysate sind empfindlich gegen Chloroform, wenn Ca<sup>2+</sup> nicht vorhanden ist
- (c) P1 macht sehr kleine Plaques, daher immer eine Kontrolle ohne Phagen (Wachstumskontrolle) einplanen.

#### ○ **Bestimmung von P1 Phagentitern**

Vorbereitung:

- 2xTY-Platten (**10 Platten**)
- 2xTY-Top Agar (**flüssig!**)
- TMG-Puffer
- ONC von *E. coli* M1174 in 2xTY-Str
- Phagen: eigene P1-Lysate

Durchführung:

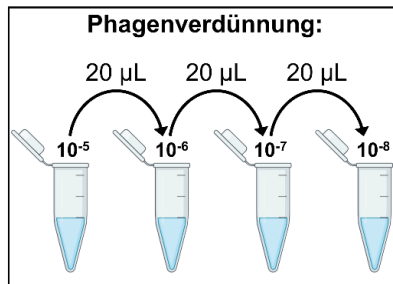
1. Herstellung von Phagenverdünnungen aus eigenem Phagenlysat:  
10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> in TMG-Puffer (je 200 µl)  
**Diese Verdünnungsreihe wird sowohl für die quantitative als auch für die semiquantitative Methode benötigt.**
2. 2 ml ONC von *E. coli* M1174 zentrifugieren (4.000 rpm, 5 min, RT), den Überstand verwerfen und in 1 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> / 5 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendieren

### Quantitative Methode

- *E. coli* M1174 + Phagenverd.
- Top-Agar / 10h @ 37°C



- Plaque forming units zählen



### Semiquantitative Methode

- 100 µL *E. coli* M1174 + 3 mL Top Agar
- Auftragen der Phagenverdünnung:

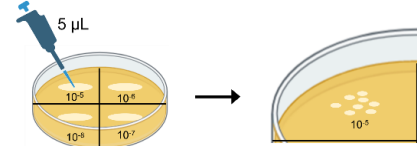


Abbildung 5. Schema der Phagentiterbestimmung (D. Kracher)

### ○ **Quantitative Methode**

1. 100 µl der Bakteriensuspension von *E. coli* M1174 werden mit 100 µl der jeweiligen Phagenverdünnung gemischt. **Sterilkontrolle (nur Zellen, keine Phagen) nicht vergessen!** Für dieses Experiment werden 5 Platten benötigt.
2. 5 Minuten bei RT inkubieren
3. Zugabe von 3 ml 2xTY-Top Agar (abgekühlt auf 50°C) + 100 µl 1 M MgSO<sub>4</sub> + 50 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>; vorsichtig mischen (durch invertieren) und den Inhalt auf eine 2xTY Agarplatte ausgießen.
4. Die Platten werden bei 37°C aufrecht bebrütet (maximal 10 Stunden, danach bei RT aufbewahren).
5. Auszählen der Plaques und Berechnung des Phagentiters unter Berücksichtigung des eingesetzten Volumens und der jeweiligen Phagenverdünnung (Formel 1).

**Formel 1: Formel zur Berechnung des Phagentiters. Einheit: „plaque forming unit/ml” = pfu/ml**

$$pfu/ml = \frac{\frac{\text{Anzahl Plaques}}{\text{Platte}} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{ml \text{ eingesetztes Lysat}}$$

○ **Semiquantitative Methode - „spot titer“**

1. 100 µl der Bakteriensuspension von *E. coli* M1174 werden in ein Reaktionsgefäß pipettiert
2. Zugabe von 3 ml 2xTY-Top Agar (abgekühlt auf 50°C) + 100 µl 1 M MgSO<sub>4</sub> + 50 µl 1 M CaCl<sub>2</sub> und vorsichtig mischen. **Sterilkontrolle (nur Zellen, keine Phagen) nicht vergessen!** Für dieses Experiment werden 5 Platten benötigt.
3. Der Inhalt wird zügig auf eine 2xTY-Agarplatte gegossen
4. Nach dem Erstarren des Top-Agars (ca. 15 min) werden pro Platte und Verdünnung je 4x 5 µl der Phagen auf die Agaroberfläche aufgespottet. Hierzu wird die Agarplatte auf der Rückseite (!) geviertelt. In jedes Viertel wird eine unterschiedliche Phagenverdünnung aufgebracht.
5. Die Lysate sollten in den Agar eindringen danach werden die Platten bei 37°C aufrecht bebrütet (maximal 10 Stunden, danach bei RT aufbewahren!).
6. Die Zahl der Plaques wird gezählt/ abgeschätzt und der **Phagentiter\*** unter Berücksichtigung des aufgetragenen Volumens und der Verdünnung berechnet (Formel 1).

\*Erfahrungsgemäß liegt der „wahre“ Titer um eine 10er Potenz höher.

○ **ONCs für P1 Transduktion (*E. coli* M1174)**

Eine ONC des Rezipientenstamms *E. coli* M1174 herstellen.

2 ml 2xTY (+25 µg/ml Streptomycin) mit einer Einzelkolonie inokulieren (**+ Sterilkontrolle!**); Die ONCs werden bei 37°C / 130 rpm / ON (overnight, über Nacht) inkubiert. (! Nicht vergessen das Antibiotikum zuzufügen !)

## ○ Transduktion

Vorbereitung:

- ONC des Rezipienten M1174
- Phagenlysate des Donors SAR18
- Selektionsplatten: 2xTY-Amp-Str (**8 Platten**)
- 1 M tri-Natriumcitrat

Durchführung:

1. 2 ml ONC des Rezipientenstamms *E. coli* M1174 zentrifugieren (3.500 rpm, 10 min, RT)
2. Resuspendieren des Bakterienpellets in 1 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> / 5 mM CaCl<sub>2</sub> (**Diese Bakteriensuspension wird anschließend auch für die Zellzahlbestimmung benötigt!**)
3. Transduktion:

Probe	Bakterienzellen [µl]	Phagenlysate [µl]
1	100	-
2	100	0,1
3	100	1
4	100	5
5	100	10
6	100	40
7	100	100
8	-	100

**Achtung:** 0,1 µl ist nicht pipettierbar; daher 1:10 Verdünnung des Phagenlysats herstellen und dann 1 µl einsetzen.

4. Inkubation 30 min bei 30°C ohne schütteln
5. Zugabe von je 100 µl 1 M Na-citrat (zur Komplexbildung der Ca<sup>2+</sup> Ionen; Verhinderung einer Neuinfektion)
6. Ausplattieren von je 100 µl des Gemischs auf 2xTY Selektionsplatten (Ampicillin 100 µg/ml und Streptomycin 25 µg/ml)

7. Bei 37°C bebrüten

○ **Zellzahlbestimmung des Rezipientenstammes (*E. coli* M1174)**

Vorbereitung:

- Re-suspendiertes Zellpellet des Rezipienten *E. coli* M1174
- Selektionsplatten: 2xTY (+25 µg/ml Streptomycin) (**4 Platten**)

Durchführung:

1. Herstellen einer Verdünnungsreihe des Rezipientenstamms *E. coli* M1174  
10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> in TMG Puffer
2. 50 µL auf 2xTY-Strep Platten uniform ausstreichen
3. Über Nacht bei 37°C bebrüten

○ **Auswertung der Transduktion**

Um zu überprüfen, ob die Ampicillinresistenz und das *gfp*- Protein (Fluoreszenz) des Donorstammes *E. coli* SAR18 tatsächlich auf die Transduktanden übertragen wurde, und sie außerdem die Streptomycinresistenz des Rezipientenstamms haben, werden die folgenden Versuche durchgeführt:

○ **Auswertung der Transduktionseffizienz**

Die Kolonien, die nach der Transduktion auf 2xTY-Amp-Str gewachsen sind, werden ausgezählt. Ebenso werden die Kolonien von auszählbaren Platten zur Zellzahlbestimmung des Rezipientenstammes erfasst. Mit diesen Werten kann die Transduktionseffizienz mittels untenstehender Formel berechnet werden.

**Formel 2: Formel zur Berechnung der Transduktionseffizienz cfu= „colony forming units“**

$$\text{Transduktionseffizienz [\%]} = \frac{\text{cfu} * 100}{\text{pfu}/\mu\text{l}}$$

### ○ Phänotypische Charakterisierung- Resistenz

Ausstreichen von 4 Kolonien möglicher Transduktanden und je eine Kolonie der Ausgangsstämme *E. coli* SAR18 bzw. M1174 (Kontrollen) auf **Selektionsplatten**:

2xTY-Amp, 2xTY-Str, 2xTY, 2xTY-Amp-Str

**Achtung:** Abnehmen einer Kolonie mit sterilem Zahnstocher. Mit dem selben Zahnstocher auf allen 4 Platten ausstreichen. Die Kolonie erst auf den Platten mit Antibiotika und zuletzt auf der Platte ohne Antibiotika nach folgendem Schema ausstreichen. Die Platten werden dazu in Viertel unterteilt, wobei zu beachten ist dass die Striche auf der Unterseite der Platte und nicht auf dem Deckel angebracht werden!

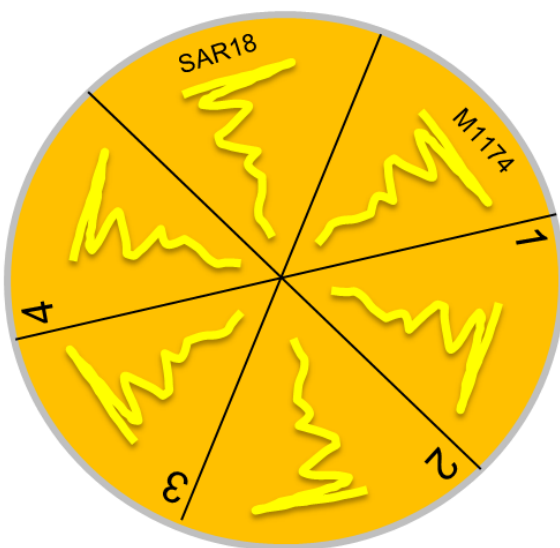


Abbildung 6. Schema der phänotypischen Charakterisierung. Vier Transduktanden und die *E. coli* Stämme SAR18 und M1174 werden auf unterschiedlichen Antibiotikaplaten ausgestrichen.

### ○ Phänotypische Charakterisierung- Fluoreszenz

Vorhandensein der Fluoreszenz (*gfp*) ist am besten im Vergleich zu *E. coli* SAR18 (fluoreszierend) bzw. *E. coli* M1174 (nicht fluoreszierend) auf den Platten ohne Antibiotikum mit freiem Auge bzw. unter UV-Licht sichtbar.

### ○ Genotypische Charakterisierung- PCR mit spezifischen *gfp*-Primern

- 3 fluoreszierende Transduktanden + Positivkontrolle (*E. coli* SAR18) + Negativkontrolle (ddH<sub>2</sub>O) werden mittels colony-PCR (cPCR) überprüft

## Vorbereitung der Matrizen-DNA für die cPCR

- Einzelkolonien werden in **20 µl ddH<sub>2</sub>O** resuspendiert, **10 min** bei **95°C** erhitzt und auf **Eis** gestellt.
- Danach das Zellmaterial kurz zentrifugieren bei 8.000 rpm, 3min.
- **2 µl** des Überstandes wird als Template für die PCR eingesetzt.
- Bei Vorhandensein des *gfp*-Gens in den Transduktanden wird mit den Primern **ar015** und **ar016** ein Produkt von **711 bp** amplifiziert
- Da sich die PCR Ansätze bis auf die Matrizen-DNA nicht unterscheiden, kann man einen **Mastermix** aus allen Komponenten ohne die DNA ansetzen. Bei der Berechnung sollte man einen zusätzlichen Ansatz einplanen um Pipettierungenauigkeiten zu berücksichtigen.

## Primersequenzen:

**Primer 5:** ar015    5'-ATATAGCATGCGTAAAGGAGAAGAACTTTTCA-3'

**Primer 6:** ar016    5'-CTCTCAAGCTTATTTGTATAGTTCATCCATGC-3'

## PCR-Ansatz

2 µl	DNA-Template
2,5 µl	10x DreamTaq Puffer
1,25 µl	Primer 5 (10 pmol/µl)
1,25 µl	Primer 6 (10 pmol/µl)
0,3 µl	DreamTaq Polymerase (5 U/µl)
2,0 µl	dNTPs (2,5 mM)
15,7 µl	ddH <sub>2</sub> O
<hr/>	
25 µl	gesamt

Die Amplifikation erfolgt im Thermocycler unter Verwendung folgenden Schemas:

35x	{	95°C	2 min	Initiale Denaturierung
		95°C	30 sec	Denaturierung
		60°C	30 sec	Annealing



72°C	30 sec	Elongation
72°C	7 min	Final Extension
4°C	∞	

Dauer: ca. 2h

Die PCR wird mit einem 1 % Agarosegel überprüft.

### **2.3.1 Medien, Standardlösungen, Antibiotika und Puffer**

#### **2.3.1.1 Vollmedien**

2xTY-Medium	[g/L]
Trypton/ Pepton aus Casein	16
Hefeextrakt	10
NaCl	5

2xTY-Agar	[g/L]
Wie 2xTY- Medium	
Agar-Agar	15

<u>Top Agar</u> (2xTY-Top Agar)	[g/L]
Wie 2xTY-Medium	
Agar-Agar	7

#### **2.3.1.2 Salze**

Salz		MG [g/mol]
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid	95,22
MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	Magnesiumsulfat-heptahydrat	246,48
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid	110,99
NaCl	Natriumchlorid	58,44
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> *2 H <sub>2</sub> O	tri-Natriumcitrat-dihydrat	294,1

$\text{NaPO}_4^* 12 \text{ H}_2\text{O}$	Natriumphosphat-dodecahydrat	380,12
$\text{NaH}_2\text{PO}_4^* 2 \text{ H}_2\text{O}$	Natriumdihydrogenphosphat- dihydrat	156,01
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7^* \text{ H}_2\text{O}$	Zitronensäure-monohydrat	210,14

### 2.3.1.1 Puffer

TMG-Puffer (pro Liter)    1,21 g Tris  
                                      1,2 g  $\text{MgSO}_4^* 7\text{H}_2\text{O}$   
                                      0,1 g Gelatine  
                                      Mit HCl auf pH 7,4  
                                      einstellen  
                                      Autoklavieren!

### 2.3.1.2 Platten-Farbcode

Falls keine farbigen Marker vorhanden sind, Platten mit den Kürzeln Kan, Amp, Str bzw Amp-Str **auf der Unterseite** beschriften.

2xTY		2x schwarz
2xTY-Kan	<span style="color: green;"> </span>	2x schwarz, 1x grün
2xTY-Amp	<span style="color: red;"> </span>	3x schwarz
2xTY-Str	<span style="color: red;"> </span>	2x schwarz, 1x rot
2xTY-Amp-Str	<span style="color: red;"> </span>	3x schwarz, 1x rot

# 3. Klonierung und Expression von Genen in *Escherichia coli*

## 3.1 Theoretischer Hintergrund

Zur funktionalen Untersuchung von Genen werden diese aus ihrem Organismus isoliert und in molekularbiologisch gut charakterisierte und modifizierte Vektoren kloniert. Diese Vektoren besitzen Eigenschaften mit denen man z.B. die Expression des Gens gezielt beeinflussen und somit die Eigenschaften des amplifizierten Produkts charakterisieren kann.

### 3.1.1 Expressionssysteme in *E. coli* – Das pET-System

Das sog. pET-System ist eines der gebräuchlichsten und leistungsstärksten Systeme, die zur Klonierung und Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* entwickelt wurden. Zielgene werden in pET-Plasmiden unter der Kontrolle von starken Transkriptions- und (optionalen) Translationssignalen des Bakteriophagen T7 geklont. Sowohl das Zielgen am Plasmid, als auch das Gen, welches für die T7 RNA Polymerase codiert und in die genomische DNA (DE3 Kassette) des *E. coli* Stammes integriert ist, werden von LacI reguliert. Die Expression wird durch die Zugabe einer Quelle von T7-RNA-Polymerase in der Wirtszelle induziert. In Anwesenheit von Laktose, Allolaktose oder Analoga (z.B. IPTG) dissoziiert LacI von der DNA, wodurch die Produktion der T7 RNA Polymerase induziert wird (Abbildung 7). Die T7-RNA-Polymerase ist so selektiv und aktiv, dass nahezu alle Ressourcen der Zelle in die Expression des Zielgens umgeleitet werden. Das gewünschte Produkt kann nach einigen Stunden Induktion mehr als 50% des gesamten Zellproteins ausmachen. Durch LacI regulierte Expressionssysteme neigen häufig zu einer basalen Expression, selbst in Abwesenheit eines Induktors. Dies führt zu einer geringen, kontinuierlichen Expression des Zielgens („Hintergrundexpression“).

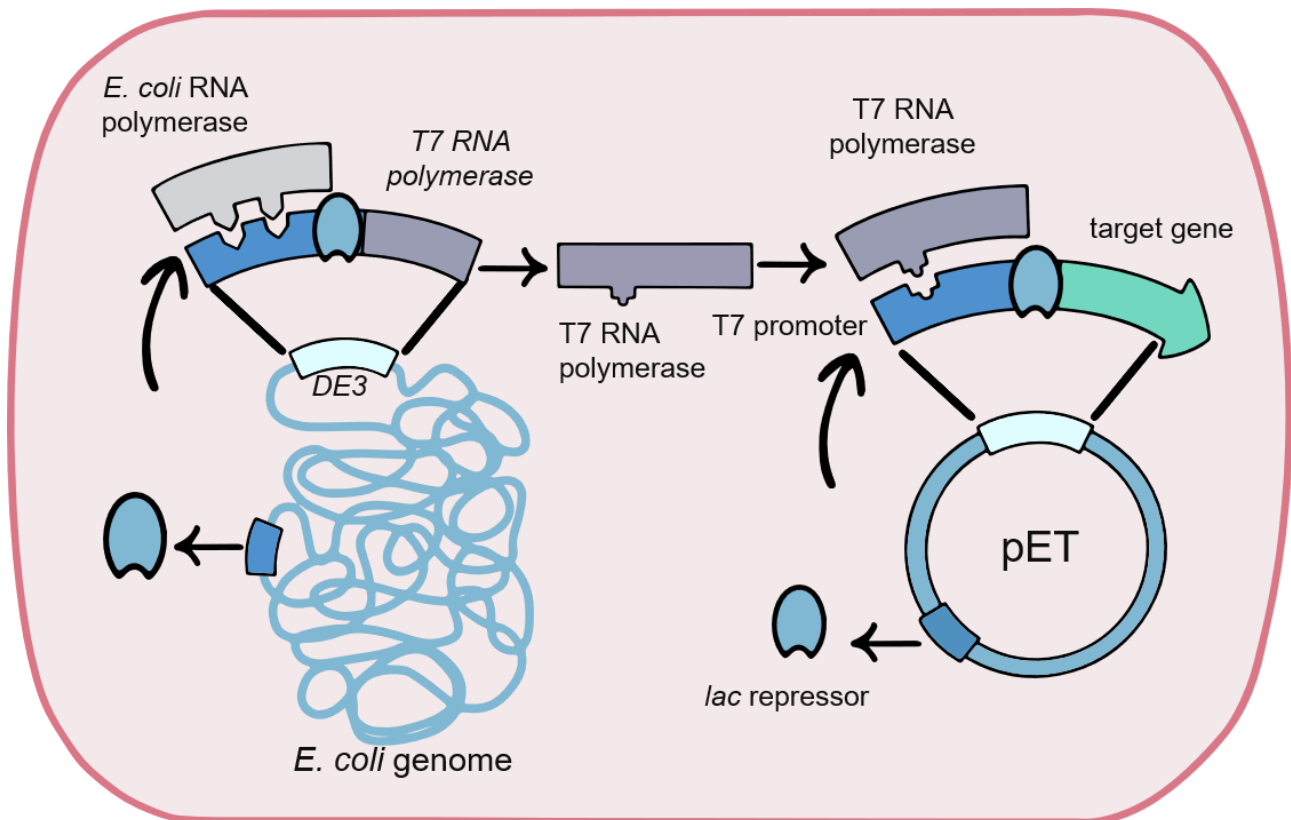


Abbildung 7: Kontrollelemente des pET Systems (Tina Lanzmaier).

Varianten des pET-Systems (z.B. pET-28a(+), pET-15b(+), ...) unterscheiden sich voneinander durch die verwendeten Genkassetten. Zum einen können die Plasmide verschiedene Selektionsmarker aufweisen, diverse Restriktionsschnittstellen oder zusätzliche Protein-Tags. Abbildung 8 zeigt den Aufbau des pET-28a/b/c(+) Systems.

#### pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites ( <i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.

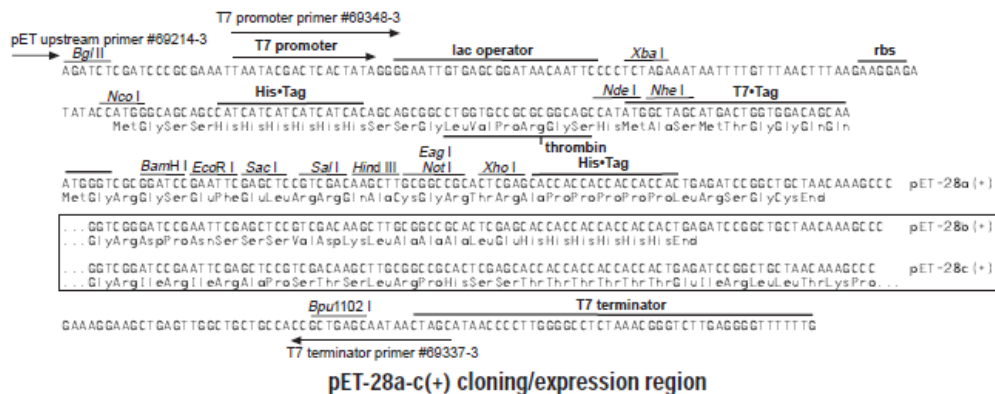
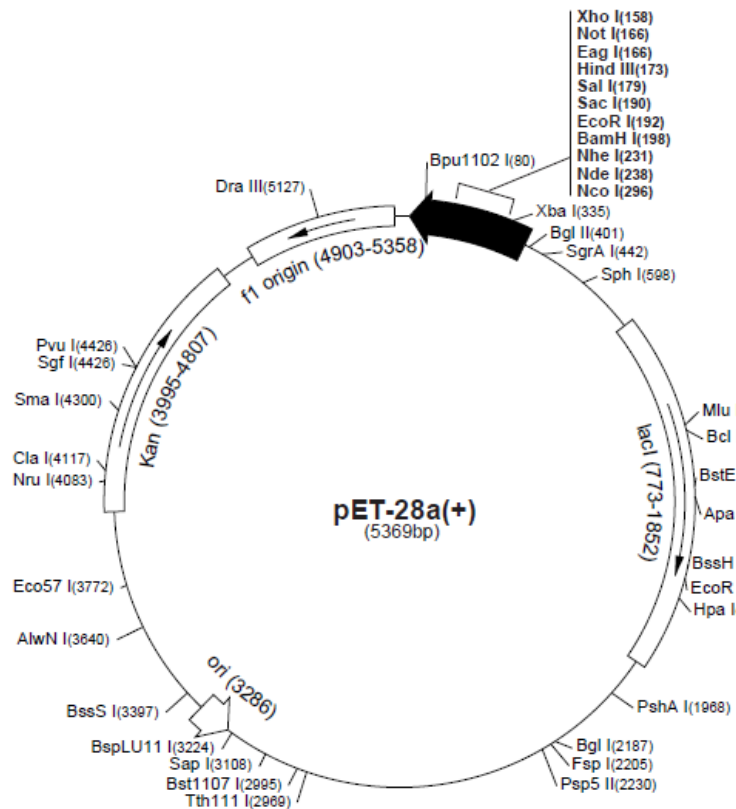


Abbildung 8: Expressionsvektor pET-28a(+) (5369 bp, Quelle: Novagen, Inc.)

### 3.1.2 Esterasen

Esterasen zählen zur Enzymklasse der Hydrolasen (EC 3.1.x.x.). In wässriger Umgebung bildet deren hydrolytisches Reaktionsprodukt einen Alkohol und eine Säure (Abbildung 9).

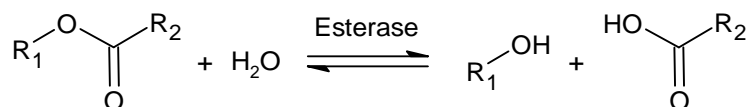
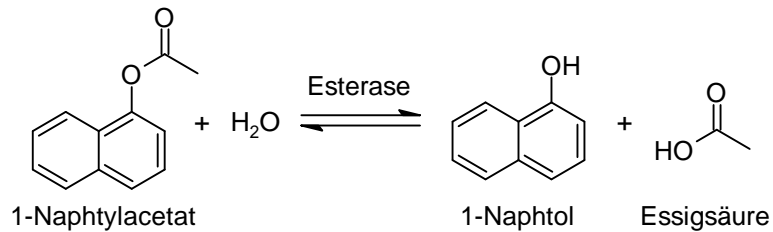
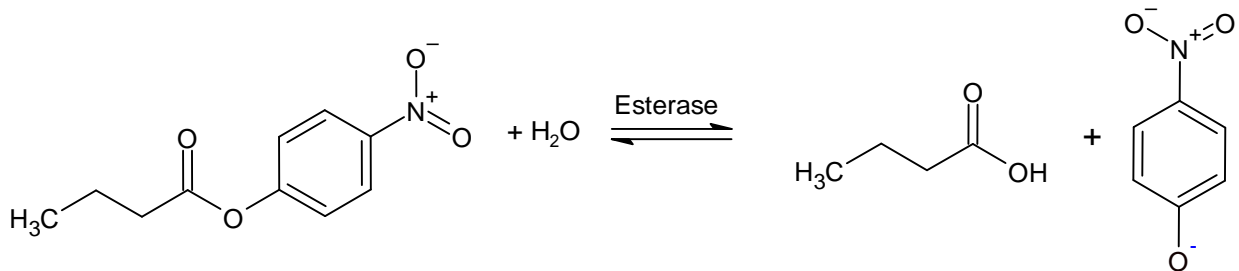


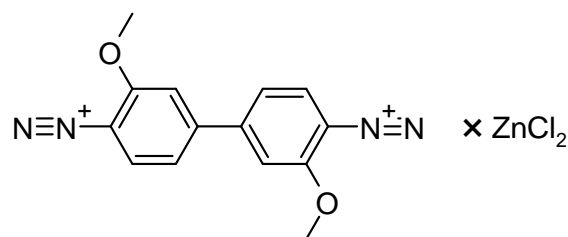
Abbildung 9: Allgemeines Reaktionsschema einer Esterase-katalysierten Reaktion



**Abbildung 10: Esterase-katalysierte Reaktion mit 1-Naphtylacetat als Substrat. 1-Naphtol bildet mit FastBlueB (Abbildung 12) einen gefärbten Komplex.**



**Abbildung 11: Esterase-katalysierte Reaktion mit p-Nitrophenylbutyrat als Substrat. Nitrophenyl wird abgespalten und führt zu einer gelb-Färbung.**



**Abbildung 12: FastBlueB Salz [1,1'-Biphenyl]-4,4'-bis(diazonium), 3,3'-dimethoxy-, (T-4)-tetrachlorozincate(2-) (1:1)**

### **3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion/Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Mit Hilfe der PCR-Reaktion können beliebige DNA-Stücke *in vitro* vermehrt (amplifiziert) werden. Bei einer Kolonie-PCR (cPCR) wird, im Unterschied zu einer normalen PCR, das gesamte Genmaterial einer Zelle eingesetzt. Daher ist diese Methode gut geeignet nach einem bestimmten DNA-Fragment in einer Kolonie zu suchen, vorausgesetzt man kennt die DNA-Sequenz und verfügt über die entsprechenden Primer.

### **3.1.4 Gibson Assemblierung**

Gibson Assembly wurde von Dr. Daniel Gibson und seinen Kollegen entwickelt. Es ermöglicht die erfolgreiche Assemblierung von mehreren DNA-Fragmenten, unabhängig von der Fragment Länge oder Endkompatibilität. Aufgrund seiner Benutzerfreundlichkeit,

Flexibilität und Eignung für große DNA-Konstrukte hat sich die Methode schnell in der modernen Molekularbiologie etabliert.

Gibson Assembly verbindet effizient mehrere überlappende DNA-Fragmente in einer isothermen „one-pot“-Reaktion. Der „Gibson Assembly Master Mix“ enthält drei verschiedene Enzyme, die in einem optimierten Puffer arbeiten:

- Die Exonuklease erzeugt einzelsträngige 3'-Überhänge, die das Aneinanderfügen (Annealing) von Fragmenten erleichtern, die an einem Ende komplementär sind (überlappende Regionen).
- Die DNA-Polymerase füllt die entstandenen Lücken zwischen den aneinandergelagerten Fragmenten durch das Einfügen fehlender Nukleotide auf.
- Die DNA-Ligase verknüpft die Zucker-Phosphat-Rückgrate der einzelnen DNA-Fragmente kovalent miteinander, wodurch ein kontinuierlicher DNA-Strang entsteht.

Das Endergebnis ist ein doppelsträngiges, vollständig versiegeltes DNA-Molekül, das als Vorlage für PCR, Transformation oder eine Vielzahl anderer molekularbiologischer Anwendungen dienen kann.

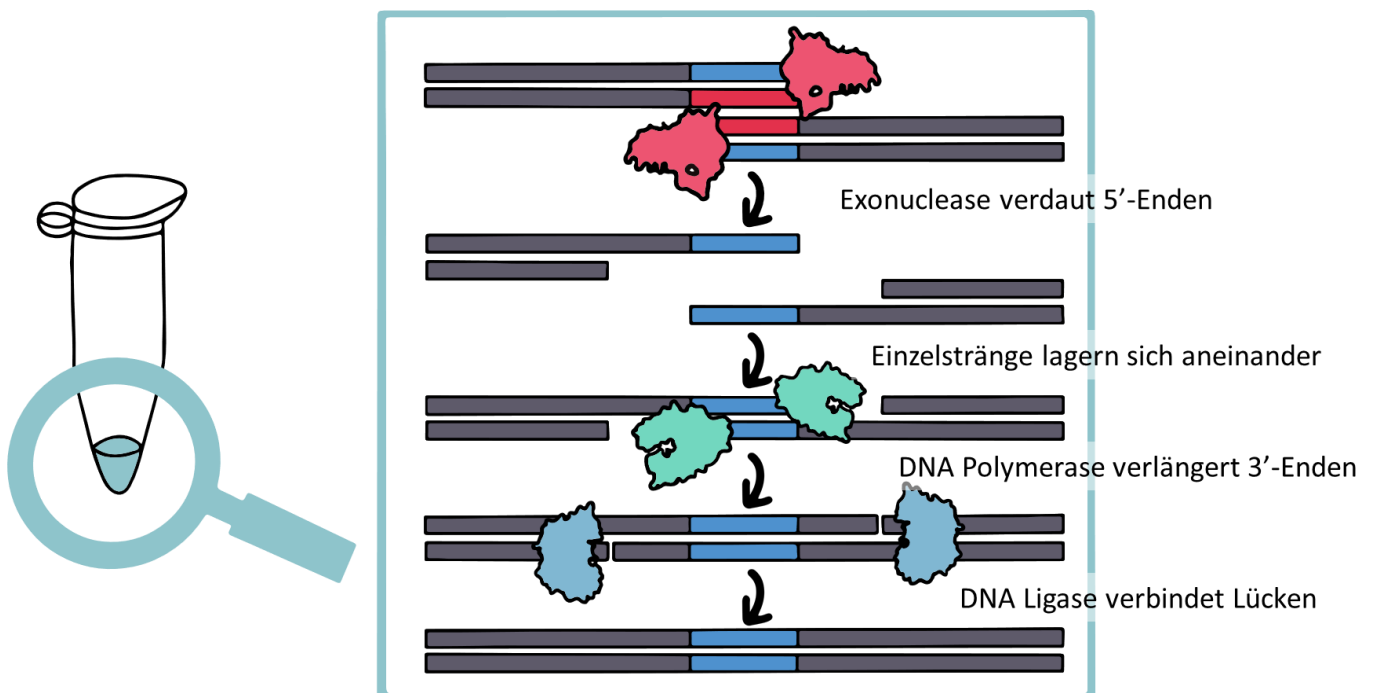


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Gibson Assemblierung. (Abbildung T. Lanzmaier)

### **3.1.5 Kompetenz**

„Kompetenz“ ist die Fähigkeit von Zellen, extern zugegebene DNA-Moleküle aufnehmen zu können. Diese Kompetenz kann natürlich vorhanden sein oder künstlich durch eine spezielle Behandlung der Zellen erreicht werden. Es gibt mehrere Möglichkeiten, kompetente Zellen herzustellen. In diesem Praktikum werden zwei *E. coli* Stämme für die Klonierung und für die Expression elektrokompotent gemacht.

### **3.1.6 Transformation**

Transformation ist die Veränderung einer Bakterienzelle durch Übertragung reiner DNA (die Übertragung in tierische und manchmal auch andere eukaryotische Zellen wird „Transfektion“ genannt).

### **3.1.7 SDS-PAGE**

SDS-PAGE ist eine Methode zur qualitativen oder semi-quantitativen Analyse von Proteinen. Denaturierte und von SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) maskierte Proteine wandern durch ein unter Spannung stehendes Polyacrylamid Gel auf Basis ihrer Größe. Durch die Maskierung mit SDS ist die Ladung der Proteine relativ zu ihrer Größe. Kleinere Proteine migrieren schneller durch das Gel.

Das Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die Schichten unterscheiden sich in ihrem Polymerisationsgrad, es wird unterschieden in grob- und feinmaschig. Der FSB („final sample buffer“) besteht u.a. aus SDS (maskiert Proteine), DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol (trennt S=S Brücken), Glycerol (erhöht die Dichte der Probe wodurch sie besser in die Probentaschen fließen) und einem Farbstoff um den Migrierungsgrad der Proben durch das Gel zu verfolgen.

### **3.1.8 Immunodetektion – Western Blot**

Nach der Auftrennung der Proteine in einem Gel werden die Proteine auf eine Blotting-Membran transferiert. Die an die Membran gebundenen Proteine werden in einem geeignetem Puffersystem mit dem gegen das zu untersuchende Protein gerichteten primären Antikörper inkubiert. Anschließend wird der überschüssige primäre Antikörper gewaschen und die Membran mit dem sekundären Antikörper (z.B. Goat Anti-Mouse AK) inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist kovalent mit einem Enzym verknüpft (z.B. alkaline Phosphatase oder Peroxidase) und erkennt spezifisch den primären Antikörper. Durch Zugabe chromogener oder luminogener Substrate für das kovalent gebundene



Enzym, kann aufgrund des gebildeten Farbniederschlags bzw. der Lumineszenz ein spezifisches Protein auf dem Western Blot identifiziert werden.

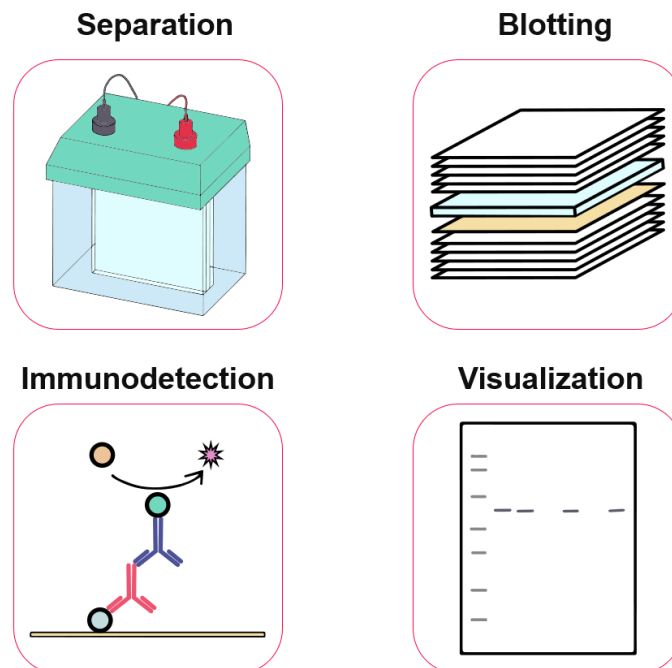


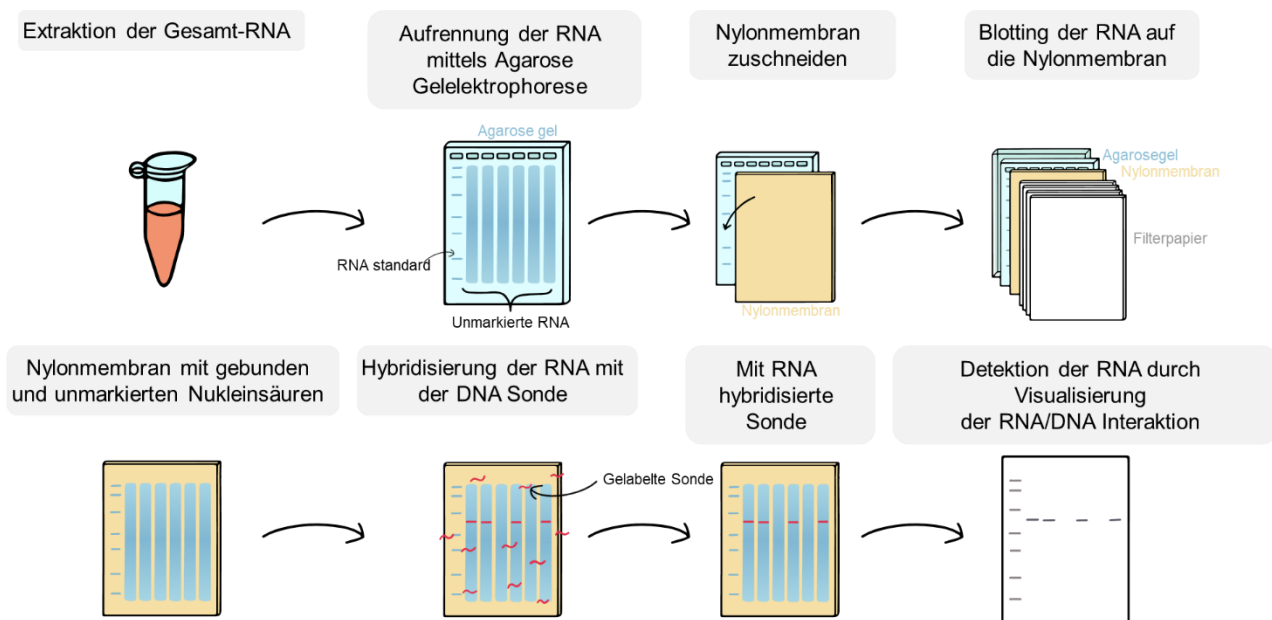
Abbildung 14: Prinzip des Western-Blot (T. Lanzmaier & J. Zuson)

### **3.1.9 Immunodetektion – Northern Blot**

Die erfolgreiche Genexpression wird auf **RNA-Ebene** mittels **Northern Blot** überprüft. Der Northern Blot ist eine molekularbiologische Methode zur Übertragung („Blotten“) der in der Gelelektrophorese aufgetrennten RNA auf eine Membran. Auf der Membran ist die spezifische Markierung von RNA-Sequenzen durch die Northern Hybridisierung mit komplementären Gensonden möglich. Eine schematische Darstellung des gesamten Versuchsablaufs ist in Abbildung 15 dargestellt. Mit Northern Hybridisierungsexperimenten werden Menge und Größe von intakter RNA bestimmt. Die Methode identifiziert homologe, auf einer Membran fixierte, RNA durch Hybridisierung mit einer markierten, denaturierten DNA-Probe. Die Basenpaarung zwischen markierter Probe und fixierter RNA wird durch **komplementäre Wasserstoffbrückenbindungen** zwischen den Nukleinsäuren gewährleistet. Diese bedingen die Kinetik für eine **Assoziation bzw. Dissoziation der RNA-DNA-Hybride**, wobei ein Anstieg der Länge von komplementären Nukleinsäuren die Stabilität erhöht und somit die **Assoziation begünstigt**. Die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur und eine niedrige Salzkonzentration im Hybridisierungsmix sowie im Waschvorgang nach der Hybridisierung **begünstigen die Dissoziation** der Doppelstrangform. Weitere Parameter für das Assoziation/ Dissoziationsgleichgewicht sind

Seite | 33

Unterschiede in der Sequenz (engl. mismatch), der prozentuelle Anteil von G-C / A-U Bindungen oder die Konzentration von Formamid im Hybridisierungsgemisch. Diese Bedingungen werden beim Wegwaschen von unspezifischen Bindungen berücksichtigt.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der Methode des Northern Blots- Vom RNA- Gel bis hin zur Detektion. (T. Lanzmaier)**

### Nicht-radioaktive Detektion von Nukleinsäuren

DNA kann durch den Einbau von Digoxigenin-konjugiertem Desoxyuridin-triphosphat markiert werden. Das dUTP ist über einen Spacer mit dem Steroid-Hapten Digoxigenin (Abbildung 16) verbunden (Dig-dUTP). Nach der Hybridisierung an die Ziel-RNA, werden die Hybride durch einen Enzym-gekoppelten-Immunoassay unter Verwendung eines Antikörper-Konjugats (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, Dig-AP) und einer nachfolgenden enzym-katalysierten Farbreaktion mit 5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) nachgewiesen (Abbildung 17).

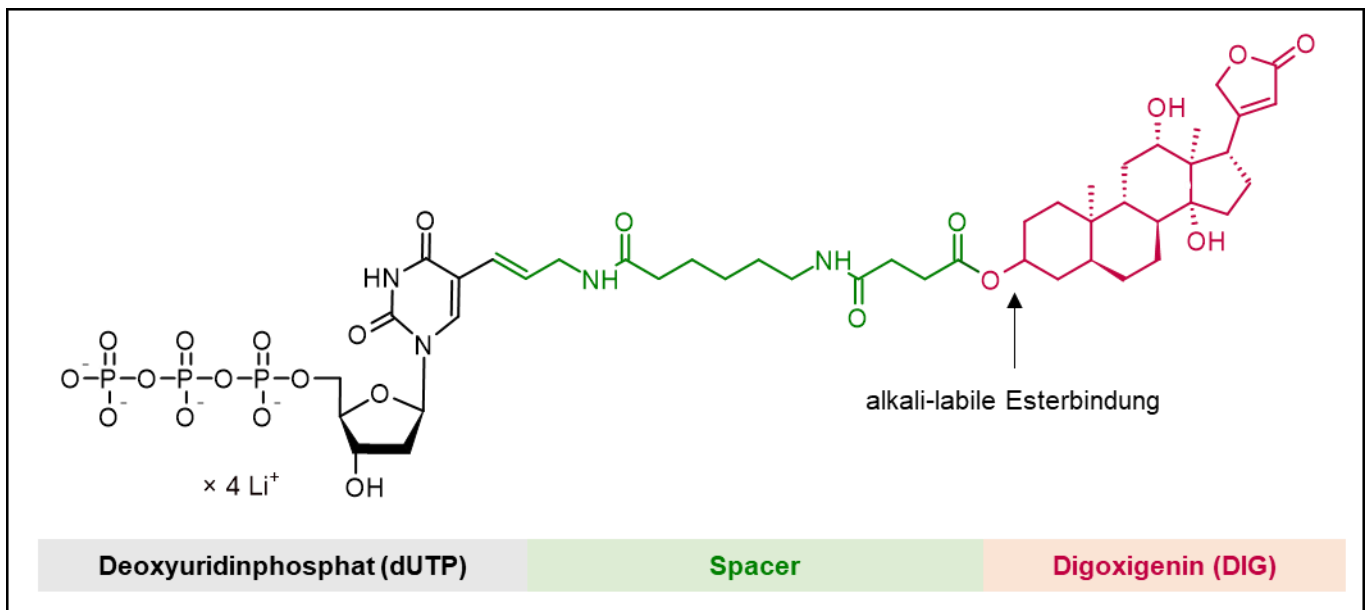


Abbildung 16: Über einen Abstandhalter („Spacer“) mit Digoxigenin verbundenes dUTP.

<https://www.sigmaaldrich.com/AT/en/technical-documents/technical-article/genomics/nucleic-acid-labeling-and-detection/dig-labeling-methods>

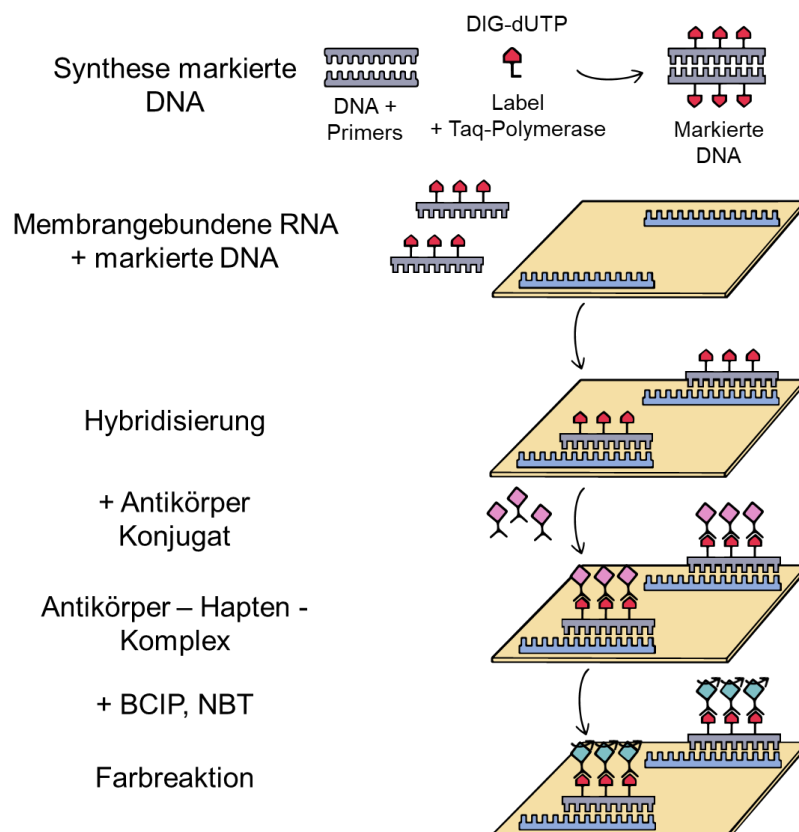
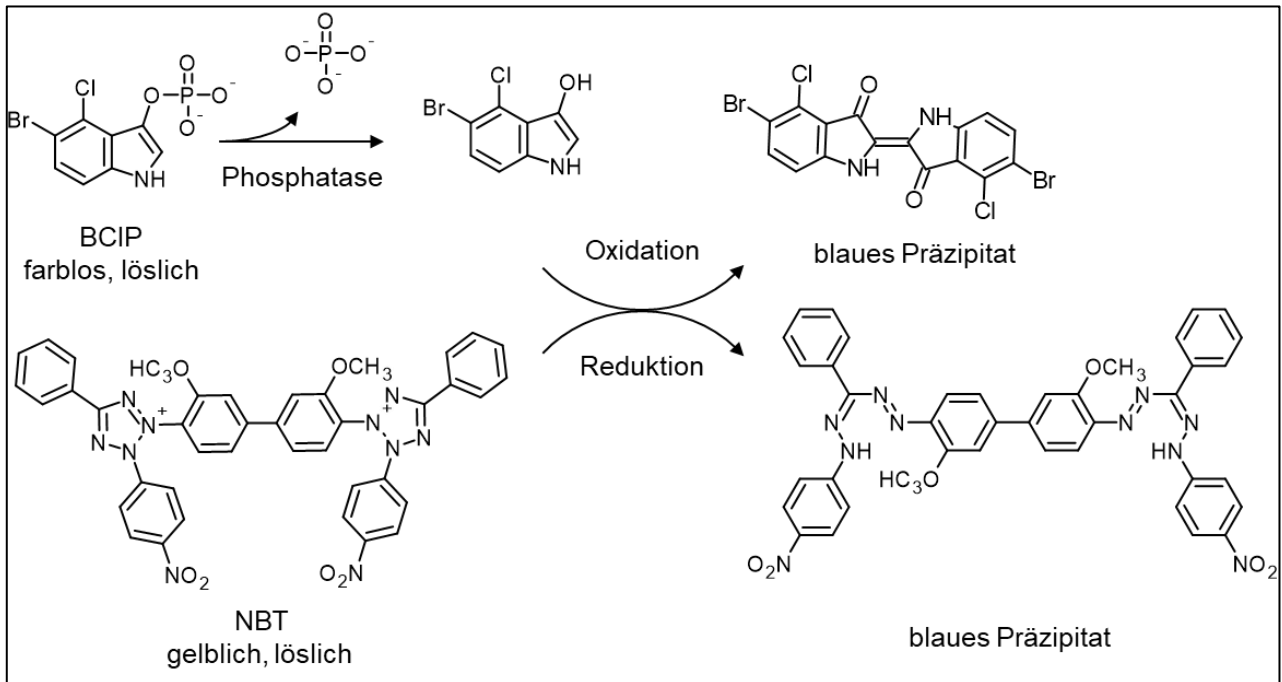


Abbildung 17: Prinzipieller Ablauf der nicht-radioaktiven Detektion von Nukleinsäuren. Hybridisierung mit komplementärer DNA in die Digoxigenin-markierte dUTPs eingebaut sind. Detektion der RNA über Farbreaktion mit BCIP und NBT. (T. Lanzmaier)



**Abbildung 18: Reaktionsschema der immunologischen Detektion der mRNA. BCIP wird von der Phosphatase dephosphoryliert und von NBT oxidiert, wobei ein blaues Präzipitat entsteht**

### Herstellen einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde mittels PCR

Um eine spezifische Sonde entsprechend der zu detektierenden mRNA zu generieren, können die gleichen Primer wie für die Klonierung oder die Kolonie-PCR verwendet werden. Auch der Ansatz der PCR-Reaktionen unterscheidet sich nur in geringem Ausmaß von den anderen PCR-Reaktionen.

Für dieses Experiment wurde die Sonde mit dem Template **pET28a(+)\_RrRu1HisTagC** hergestellt.  $\times 4 \text{ Li}^+$

Während der Reaktion werden Digoxigenin-11-dUTPs durch die thermostabile DNA-Polymerase in die neu synthetisierten DNA-Stränge eingebaut. Die Produkte der Amplifikation können dann zum **spezifischen Nachweis von mRNA** im Northern Blot Experiment verwendet werden.

Dafür ist keine weitere Aufreinigung notwendig. Die PCR-Produkte wurden vor der Verwendung als Sonde mittels Gelelektrophorese überprüft.

### 3.1.10 RNA-Isolation

Das Grundprinzip vieler RNA-Isolierungen aus verschiedenen biologischen Quellen besteht im Aufbrechen der Zellen, gefolgt vom Entfernen der DNA und von Proteinen.

Chromosomale DNA kann enzymatisch oder durch Fällen mit SDS und Salz entfernt werden. Proteine werden gewöhnlich mit einer Kombination aus enzymatischer Verdauung und organischer Extraktion beseitigt. Die Hauptfehlerquelle bei der RNA-Isolierung besteht in einer Kontamination mit **Ribonukleasen** (RNasen). RNasen sind sehr stabile Enzyme, die für ihre Wirkung generell keine Co-faktoren benötigen. Schon kleine Mengen an RNasen in einer RNA-Präparation kann die RNA degradieren und für weitere Experimente unbrauchbar machen. Um etwaige Probleme mit einer RNase-Kontamination zu vermeiden, können alle Lösungen, die für die RNA-Isolierung verwendet werden, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt werden. DEPC inaktiviert RNasen indem es diese kovalent modifiziert.

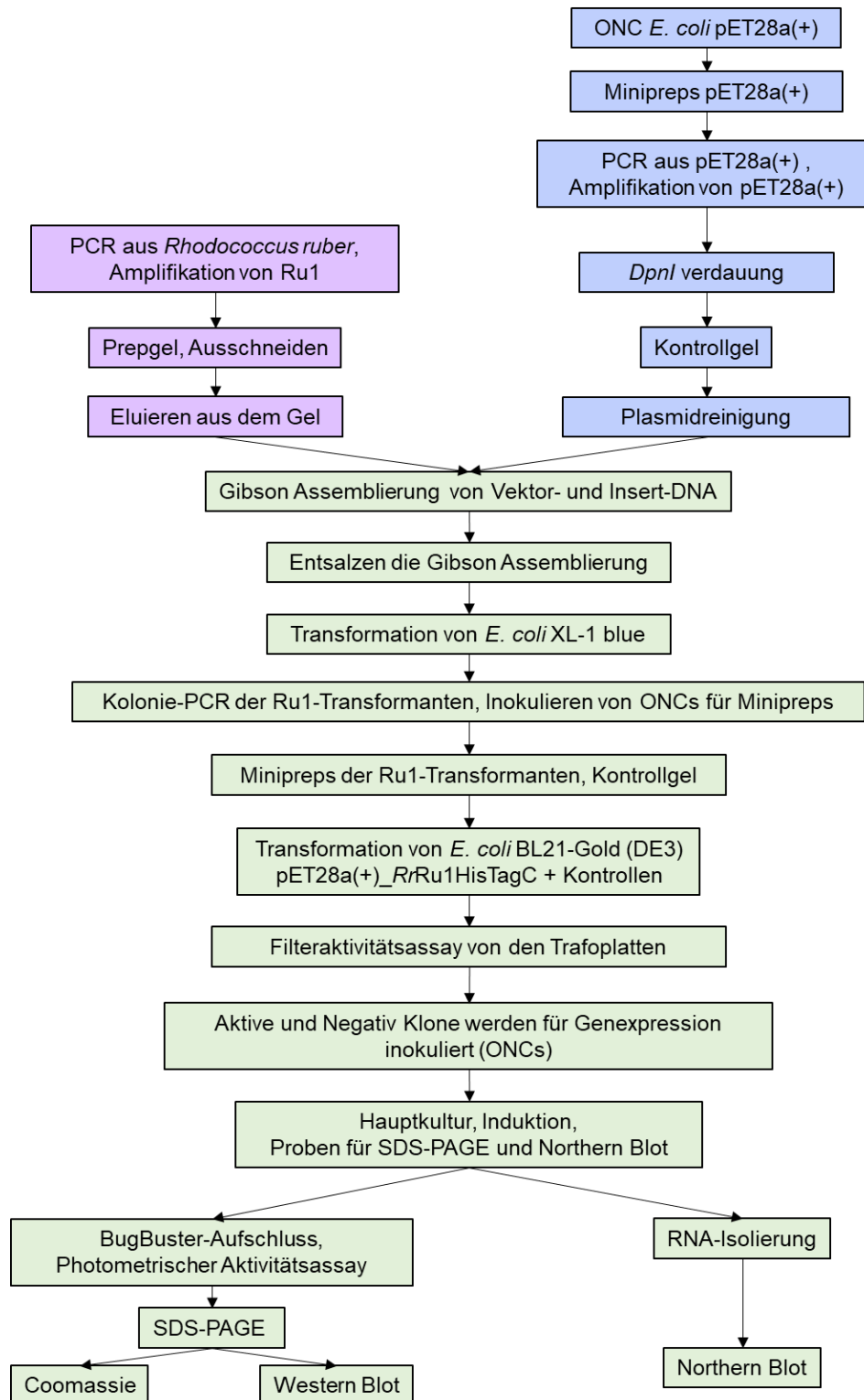
### **3.1.11 Ziel des Experiments**

Die Esterase Ru1 aus *Rhodococcus ruber* soll nach PCR-Amplifikation in den Expressionsvektor pET-28a(+) kloniert werden. Die PCR-Amplifikation und Gibson-Assemblierung führt zu einer Esterase mit His-Tag am C-Terminus unter der Kontrolle des T7-Promotors. Die Genexpression der *R. ruber* Esterase Ru1 soll mittels Northern Blot auf RNA-Ebene bzw. auf Protein-Ebene mittels SDS-PAGE, Western Blot und Aktivitätsassay überprüft werden.

Die Expression des Fusionskonstrukts soll sowohl auf mRNA (Northern Blot) als auch auf Proteinebene (Western Blot über His-Tag, Enzymaktivität) nachgewiesen werden. Die Bildung der mRNA und des Proteins werden uninduziert (Probe 0h), 1 Stunde nach der Induktion und 3 Stunden nach der Induktion untersucht. Der verwendete Bakterienstamm *E. coli* BL21-Gold (DE3) trägt einen im Chromosom integrierten  $\lambda$ -Prophagen (DE3). Dieser Phage kodiert für die T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors. Durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) kann die Expression des fusionierten Gens, welches unter der Kontrolle des T7 Promotors steht, induziert werden (Abbildung 7). Durch die basale Expression der T7 Polymerase kann die Aktivität der Esterase ebenfalls mittels Filteraktivitätstest direkt von den Trafoplaten ohne vorhergehende Induktion mit IPTG detektiert werden.

## 3.2 Durchführung - Klonierung und Genexpression der Esterase Ru1 aus *R. ruber*

### 3.2.1 Klonierung des Esterase-Gens Ru1 aus *R. ruber* in einen Expressionsvektor



## ○ **Kolonie-PCR (cPCR): Amplifikation der Esterase Ru1 aus *R. ruber***

Die **Primer** werden in einer Konzentration von 10 pmol/µl bereitgestellt. Sie dienen der Amplifikation des Gens und fügen dem amplifizierten Fragment die für Gibson erforderlichen Überhänge hinzu.

Nachdem Sie Ihre Primer für die Amplifikation entworfen und bestellt haben, werden diese normalerweise in trockener Form geliefert. Zuerst müssen Sie die Primer in ddH<sub>2</sub>O lösen, um eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mM herzustellen. Die benötigte Menge von Wasser, die Sie hinzufügen müssen, hängt von der Menge der Primer ab, die auf dem Röhrchen in nmol angegeben ist. Berechnen Sie die entsprechenden Volumina, um eine Arbeitslösung von 10 mM mit einem Gesamtvolumen von 100 µl herzustellen.

### Vorbereitung der Matrizen-DNA für die cPCR

1. Eine Einzelkolonie des von den Betreuern ausgestrichenen *Rhodococcus*-Stammes wird in **20 µl ddH<sub>2</sub>O** resuspendiert, **10 min** bei **95°C** erhitzt und auf **Eis** gestellt.
2. Danach das Zellmaterial kurz zentrifugieren bei 8.000 rpm, 3min.
3. **2 µl** des Überstandes wird als Template für die PCR eingesetzt.
4. Zusätzlich wird Plasmid-DNA pET28a(+)\_Ru1HisTagC (**10 ng/µl**) als Kontrolle (von Betreuern) für die PCR eingesetzt.

### Proben:

**2x cPCR einer Einzelkolonie**

**1x PCR des Plasmids pET28a(+)\_Ru1HisTagC (10 ng)**

**1x Sterilkontrolle mit ddH<sub>2</sub>O statt DNA**

### Ansetzen einer PCR

Da sich die PCR Ansätze bis auf die Matrizen-DNA nicht unterscheiden kann man einen **Mastermix** aus allen Komponenten ohne die DNA ansetzen. Bei der Berechnung sollte man einen zusätzlichen Ansatz einplanen, um Pipettierungenauigkeiten zu berücksichtigen. Es werden alle benötigten Komponenten der PCR in ein PCR-Gefäß pipettiert. Dabei werden erst die Primer, dNTPs und der Puffer zusammengegeben, dann kommt die Matrizen-DNA (die zuvor auf Eis stand) dazu und erst unmittelbar bevor man den Ansatz in den

Thermocycler stellt wird die Polymerase dazugegeben. **Das Ganze soll auf Eis gehalten werden.**

Für diese PCR werden Ihre selbst designten Primer benötigt. Sie benötigen Ihren FWD und REV Primer für die Ru1 Esterase (Bsp: **Primer 1** Ru1 FWD; **Primer 2** Ru1 REV). Sie benötigen ebenfalls die Werte ihrer berechneten Annealing Temperatur und länge des Amplikons.

PCR-Ansatz für die Ru1-Amplifikation

2 µl	DNA-Template
10 µl	5x Q5 Reaktionspuffer
10 µl	5x Q5 High GC Enhancer
2,5 µl	<b>Primer 1</b> (10 pmol/µl)
2,5 µl	<b>Primer 2</b> (10 pmol/µl)
0,5 µl	Q5 High-Fidelity DNA Polymerase
1 µl	dNTPs (2,5 mM)
21,5 µl	ddH <sub>2</sub> O
<hr/>	
50 µl	gesamt

Die Amplifikation erfolgt im Thermocycler unter Verwendung des folgenden Temperaturprofils:

35x	98°C	30 sec	Initiale Denaturierung
	98°C	10 sec	Denaturierung
	<b>XX°C</b>	30 sec	Annealing
	72°C	<b>X min</b>	Elongation
	72°C	4 min	Final Extension
	4°C	∞	

Dauer ca. 1,5h

Die Positivkontrollen aus der PCR-Präparation, werden mit dem Enzym DpnI inkubiert, um methylierte Plasmid DNA zu entfernen.



DpnI-Verdau:

- 1 µl DpnI zu 50 µL PCR-Reaktionsansätzen hinzufügen, bei 37 °C für 2h und dann 80 °C für 20min inkubieren/inaktivieren.

### **3.2.2 Überprüfung der PCR-Fragmente mittels Agarosegel**

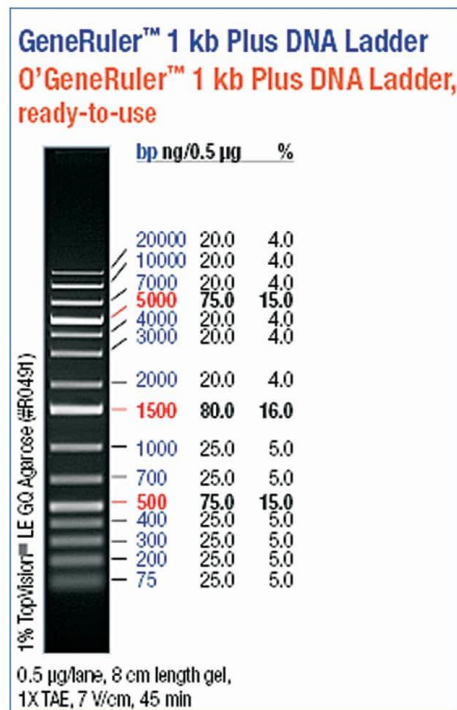
Die erfolgreiche cPCR Amplifizierung soll mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden. Dafür wird der PCR Reaktion mit **5x Loading Dye** (5xLD) gemischt und über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (50 µL PCR Produkt + 10 µl 5xLD). Denken Sie daran, 2 x cPCR aus dem Genom von *R. ruber* auf das Gel aufzutragen. Um die Amplifikation der Positivkontrolle zu überprüfen, laden Sie auf das gleiche Gel nur eine Probe davon (5 µl PCR (DpnI verdaut) + 2 µl 5xLD + 3 µl ddH<sub>2</sub>O).

Als Standard für die PCR Fragmente soll die GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder von Thermo Scientific™ verwendet werden (Abbildung 19). Die erwartete Größe des Amplikons beträgt etwa 1 kbp.

### **3.2.3 Herstellung von Agarosegelen**

1. Die entsprechende Menge an Agarose in einem Kolben einwiegen (1 % Agarosegel)
2. Agarose mit 250 ml 1x TAE-Puffer mischen
3. In der Mikrowelle vollständig aufschmelzen (**Achtung:** Siedeverzug!)
4. Kolben auf ca. 60°C abkühlen lassen.
5. 12.5 µL Atlas ClearSight DNA stain zusetzen (5 µL/100 mL Gel)
6. Durch Schwenken des Kolbens mischen und luftblasenfrei in die Gelkammer gießen
7. Kämme einstecken und Gel erstarren lassen
8. Nach dem Aushärten, Kämme entfernen
9. Gel in einer geeigneten Elektrophorese Kammer mit **1x TAE**-Puffer überschichten
10. Die aufzutragende DNA-Lösung wird mit Gelladepuffer versetzt und in die Taschen („slots“) pipettiert. Das Auftragsschema wird notiert.
11. Elektrophorese bei 7,5 V/cm. (80-120 V je nach Art des Gels) für 30-60 Minuten

12. Die Banden werden mit den Tutor\*innen unter UV Licht visualisiert (Atlas ClearSight:  $\lambda_{\text{Ex}} = 295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Em}} = 530 \text{ nm}$ ) und die Gele gescannt



**Abbildung 19: Agarosegel-Standard „GeneRuler DNA Ladder 1kb Plus“ von Fermentas.**  
<http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/generuler-dna-ladder-mix/>

### **3.2.4 Aufreinigung der PCR mittels „Gene JET Gel Extraction Kit“ (Thermo Scientific)**

Sind Amplikons der *Rhodococcus* cPCR der richtigen Größe vorhanden, werden diese aus dem Gel geschnitten und mit dem Gene JET Gel Extraction Kit gereinigt, um für die Gibson-Assemblierung verwendet zu werden. Der Rest der Plasmidpräparation (45 µL) werden ebenfalls aufgereinigt in dem sie **1:1 mit „Binding Buffer“** versetzt werden.

Danach erfolgt die Aufreinigung laut Protokoll.

- **Aufreinigung aus dem Gel**
  1. Vor dem Ausschneiden ein 2 ml Reaktionsgefäß abwiegen

2. Wenn beide PCR-Reaktionen für cPCR funktioniert haben, schneiden wir zwei Banden aus und vereinen sie in einem Röhrchen. Nach dem Ausschneiden, abwiegen des Reaktionsgefäßes mit dem Gelstück. Berechnung der Masse durch die Differenz.
3. Zugabe von 10 µL **Binding Buffer** pro 10 mg Gelstück.
4. Anschließend bei 50-60°C inkubieren und zwischendurch invertieren bis das Gelstück komplett gelöst ist.

Dann weiter mit **Punkt 5**.

### ***Aufreinigung einer PCR***

1. Auffüllen des PCR Ansatzes mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 µL
2. Zugabe gleiches Volumen (100 µL) **Binding Buffer**.
3. Dann weiter mit **Punkt 5**.

### ***Binden der DNA***

5. Einsetzen des Gene JET Reinigungssäulchen in den Sammelbehälter.
6. Überführen der DNA-Lösung auf das Säulchen (max. 800 µL) und **2 min bei RT inkubieren**.
7. Zentrifugation für **2 min bei max. Geschwindigkeit**. Den Durchfluss verwerfen und das Säulchen in den Sammelbehälter zurückstellen.

### ***Waschen der DNA***

8. Zugabe von 700 µl **Wash Buffer** (enthält EtOH).
9. Zentrifugation für **1 min bei max. Geschwindigkeit**. Den Durchfluss verwerfen und das Säulchen in den Sammelbehälter zurückstellen.
10. Zentrifugation für **2 min bei max. Geschwindigkeit**, um restliches EtOH zu verdampfen (Deckel offenlassen!).

### ***Elution***

11. Nach der letzten Zentrifugation, das Säulchen vorsichtig in ein neues (beschriftetes) Reaktionsgefäß stellen.

12. Wenn kein Geruch von EtOH mehr vorhanden ist, **30 µL ddH<sub>2</sub>O** zugeben
13. Inkubation für **5 min** bei **RT**
14. Danach die DNA durch Zentrifugation für **2 min** bei **max. Geschwindigkeit** vom Säulchen eluieren.
15. Die DNA auf Eis stellen und gleich weiterverwenden, oder bei -20°C einfrieren.

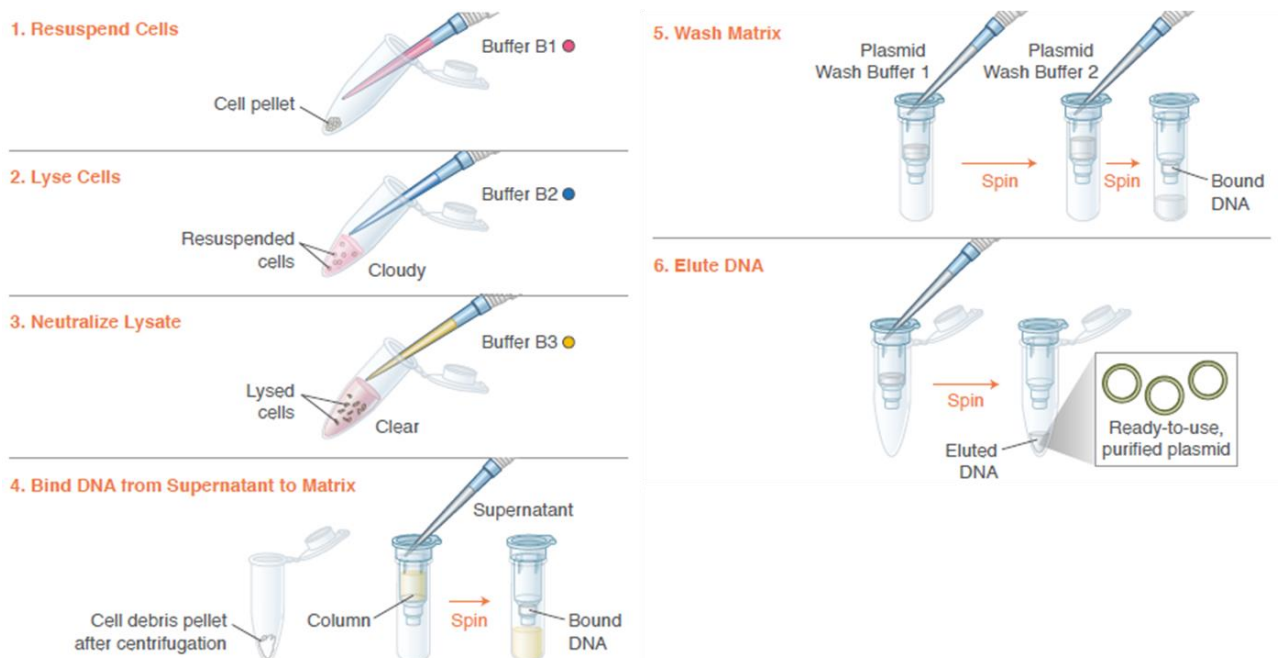
### **3.2.5 Vorbereitung von ONCs**

Zur Isolierung des Vektors müssen wir ONCs vorbereiten. Inokulieren Sie eine einzelne Kolonie von *E. coli* pET28a(+) in 5 ml 2xTY Kan 40 (Sterilkontrolle nicht vergessen!). Die ONCs werden bei 37°C/130 rpm/ON (overnight, über Nacht) inkubiert.

### **3.2.6 Isolation des Vektors pET28a(+)**

Der Leer-Vektor pET28a(+) wird mittels **Minilysatpräparation** (Miniprep) aus einer *E. coli* Flüssigkultur isoliert.

Nach der Isolierung des Plasmids wird die Konzentration mittels Nanodrop bestimmt.



**Abbildung 20. Monarch Plasmid Miniprep Kit Protokoll NEB.**

(<https://www.neb.com/en/products/t1110-monarch-spin-plasmid-miniprep-kit>)

Protokoll für die Plasmid-Minipräparation

## 1. Zentrifugation und Resuspension der Bakterienkultur:

2 ml Bakterienkultur für 30 Sekunden bei 13200 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren und den Überstand verwerfen. Das Pellet in 200 µl Monarch Puffer B1 (pink) resuspendieren. Vortexen oder pipettieren, um sicherzustellen, dass die Zellen vollständig resuspendiert sind. Sichtbare Klumpen vermeiden.

## 2. Lyse der Zellen:

200 µl Monarch Puffer B2 (blau) hinzufügen, das Röhrchen 5–6 Mal vorsichtig invertieren und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren. **Nicht vortexen!** Die Farbe sollte dunkelrosa werden, und die Lösung sollte klar und viskos erscheinen. Vorsichtig arbeiten, um das Zerschneiden chromosomaler DNA zu minimieren, die als Verunreinigung mitgereinigt werden kann. Längeres Inkubieren als 1 Minute sollte vermieden werden, um eine irreversible Denaturierung des Plasmids zu verhindern.

## 3. Neutralisation:

400 µl Monarch Puffer B3 (gelb) hinzufügen und vorsichtig invertieren, bis die Lösung neutralisiert ist. **Nicht vortexen!** Die Farbe sollte gleichmäßig gelb sein, und ein Präzipitat sollte sich bilden. Für 2 Minuten inkubieren. Das Lysat 5 Minuten bei 13200 rpm zentrifugieren. Das Pellet sollte kompakt sein; bei Bedarf länger zentrifugieren.

## 4. Übertragung des Überstands:

Den Überstand vorsichtig auf die Monarch Spin-Säule S2D übertragen und 1 Minute bei 13200 rpm zentrifugieren. Das Filtrat der Säule verwerfen.

## 5. Waschen der Plasmid DNA:

Die Monarch Spin-Säule S2D erneut in das Sammelröhrchen einsetzen und 200 µl Monarch Puffer BZ (Waschschritt 1) hinzufügen. 1 Minute zentrifugieren. Das Verwerfen des Durchflussprodukts ist optional. Dies ist ein Hochsalz-Waschschritt, der dabei hilft, verbleibende RNA, Proteine und andere Verunreinigungen zu entfernen.

Erneut mit 400 µl Monarch Puffer WZ (Waschschritt 2) waschen und 1 Minute zentrifugieren.

## 6. Elution der DNA:

Die Säule in ein sauberes 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführen. Darauf achten, dass die Spitze der Säule das Durchflussprodukt nicht berührt. Falls nötig, erneut 1 Minute zentrifugieren.  $\geq 30 \mu\text{l}$  nukleasefreies Wasser ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) auf  $50^\circ\text{C}$  erhitzen in die Mitte der Matrix geben. 1 Minute warten und dann 1 Minute zentrifugieren, um die DNA zu eluieren.

### **3.2.7 Amplifikation des leeren Plasmids pET-28a(+)**

Proben:

**2x** PCR pET-28a(+)

**1x** Sterilkontrolle mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  statt DNA

Nachdem Sie Ihre Primer für die Amplifikation entworfen und bestellt haben, werden diese normalerweise in trockener Form geliefert. Zuerst müssen Sie die Primer in  $\text{ddH}_2\text{O}$  lösen, um eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mM herzustellen. Die benötigte Menge von Wasser, die Sie hinzufügen müssen, hängt von der Menge der Primer ab, die auf dem Röhrchen in nmol angegeben ist. Berechnen Sie die entsprechenden Volumina, um eine Arbeitslösung von 10 mM mit einem Gesamtvolumen von  $100 \mu\text{l}$  herzustellen.

Für diese PCR werden Ihre selbst designten Primer benötigt. Sie benötigen Ihren FWD und REV Primer für die pET-28a(+) (Bsp: **Primer 3** pET28a(+) FWD; **Primer 4** pET28a(+) REV). Sie benötigen ebenfalls die Werte ihrer berechneten Annealing Temperatur und die Länge des Amplikons.

PCR-Ansatz für die pET28a(+)-Amplifikation

2 $\mu\text{l}$	pET28a(+) (10 ng)
10 $\mu\text{l}$	5x Q5 Reaktionspuffer
10 $\mu\text{l}$	5x Q5 High GC Enhancer
2,5 $\mu\text{l}$	<b>Primer 3</b> (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )
2,5 $\mu\text{l}$	<b>Primer 4</b> (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )
0,5 $\mu\text{l}$	Q5 High-Fidelity DNA Polymerase
2 $\mu\text{l}$	dNTPs (2,5 mM)
20,5 $\mu\text{l}$	$\text{ddH}_2\text{O}$
<hr/>	
50 $\mu\text{l}$	gesamt

Die Amplifikation erfolgt im Thermocycler unter Verwendung des folgenden Temperaturprofils:

35x	98°C	30 sec	Initiale Denaturierung
	98°C	10 sec	Denaturierung
	<b>XX°C</b>	30 sec	Annealing
	72°C	<b>X min</b>	Elongation
	72°C	4 min	Final Extension
	4°C	∞	

Dauer ca. 3h

Die Proben, werden mit dem Enzym DpnI inkubiert, um das ursprüngliche, methylierte Plasmid zu entfernen.

DpnI-Verdau:

- 1 µl DpnI zu 50 µL PCR-Reaktionsansätzen hinzufügen, bei 37 °C für 2h und dann 80 °C für 20min inkubieren/inaktivieren.

Die erfolgreiche PCR Amplifizierung soll mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden. Dafür werden 5µL der PCR Reaktionen mit **5x Loading Dye** (5xLD) gemischt (5 µl PCR (DpnI verdaut) + 2 µl 5xLD + 3 µl ddH<sub>2</sub>O) und über das Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Standard für die PCR Fragmente soll der „GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder von Thermo Scientific™ verwendet werden (Abb. 16). Die erwartete Größe des Amplikons beträgt etwa 5300 bp.

Der Rest der PCR-Probe der Plasmidamplifikation wird gepoolt und mit dem Gene JET Gel Extraction Kit für die anschließende Gibson-Assemblierung gereinigt (insgesamt 100 µl PCR-probe + 100 µl binding buffer - und dann weiter mit Punkt 5 der Plasmid-Minipräparation)

### **3.2.8 Gibson Assemblierung von Vektor- und Insert-DNA**

Um eine Gibson Assemblierung effizient durchführen zu können, müssen zuerst die **Konzentrationen** der Vektor-DNA und der Insert-DNA mittels **UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop™)** bestimmt werden.

Die Assemblierung wird nach folgendem Schema in einem **Gesamtvolumen von 20 µl** pipettiert und anschließend bei **50°C für 45 min** inkubiert:



**x** µl Vektor (x ng)  
**x** µl Insert (x ng)  
**15** µl Gibson mix  
**x** µl ddH<sub>2</sub>O

Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert sollte 1:3 betragen und der Vektor sollte in einer Menge von etwa 0,025 pmol vorliegen. Die Menge des Vektors und des Inserts kann anhand der folgenden Formel berechnet werden:

**Formel 3: Formel zur Berechnung der einzusetzenden Menge an Insert-DNA**

$$ng (vector) = \frac{0,025 \text{ pmol vector} * bp (vector) * 650 (\frac{g}{mol})}{1000}$$

$$ng (insert) = \frac{0,075 \text{ pmol insert} * bp (insert) * 650 (\frac{g}{mol})}{1000}$$

\*Größen können mit Hilfe der Angaben am Ende des Protokolls (Appendix) ermittelt werden.

### **3.2.9 Entsalzen der Gibson Assemblierung**

Für eine Transformation mittels Elektroporation muss die Plasmid-DNA entsalzt werden. Dazu wird der gesamte Gibson Assemblierung auf eine **Filtermembran** (Porengröße **0,025 µm**), welche auf sterilem, de-ionisiertem Wasser schwimmt, pipettiert und für **40 min** dialysiert.

### **3.2.10 Herstellen kompetente Zellen**

Genotypen:

- *E. coli* XL-1 blue (**für die Klonierung**)

*endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F[':Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)* (Firma: Stratagene)

- *E. coli* BL21-Gold (DE3) (**für die Expression**):

*[E coli B F- ompT hsdS (rb- Mb-) dcm+ tetR gal lambda DE3 endA Hte DE3): F- ompT hsdS (r- m-) gal dcm (DE3)]* (Firma: Stratagene)

**Labor 1** stellt *E. coli* XL-1 blue kompetente Zellen her

**Labor 2** stellt *E. coli* BL21-Gold (DE3) kompetente Zellen her

## ○ Herstellen elektro-kompetenter Zellen

Vorbereitung:

- 2xTY- Medium: 2x 2 ml ONC  
2x 50 ml in 300 ml Schikanekolben
- 10% Glyzerin (steril)
- 100 ml ddH<sub>2</sub>O (steril)

**Labor 1:** *E. coli* XL-1 Blue

**Labor 2:** *E. coli* BL21-Gold (DE)

Durchführung:

Inokulieren von zwei ONCs: 2 ml 2xTY mit je einer Einzelkolonie (Sterilkontrolle nicht vergessen!); Die ONCs werden bei 37°C/ 130 rpm / ON (overnight, über Nacht) inkubiert.

Nächster Tag

Vorbereitung:

- Eis
- Vorgekühlte 50 ml Reaktionsgefäße (spitz)
- Vorgekühlte Zentrifuge (4°C)
- ddH<sub>2</sub>O und 10% Glyzerin auf Eis

Durchführung:

**Achtung:** Nach der ersten Zentrifugation werden die Zellen **auf Eis** gehalten und nur mit **vorgekühlten Medien** gewaschen bzw. resuspendiert.

1. Hauptkulturen: zwei Kolben (je 50 ml 2xTY) mit je 1 ml ONC inokulieren
2. Inkubieren im Schüttelinkubator bei 37°C/ 130 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6–0,8
3. Ernte der Zellen durch Überführen in vorgekühlte 50 ml Zentrifugenröhrchen und 15 bis 30 min auf Eis ruhen lassen. (Zellen müssen vollständig abkühlen)
4. Zentrifugation: 4.500 rpm, 7 min, 4°C

5. Überstände verwerfen (vollständig!) und die Zellen vorsichtig in **je 50 ml ddH<sub>2</sub>O (eiskalt)** resuspendieren.
6. Zentrifugieren wie unter **Punkt 4**.
7. Überstände verwerfen (vollständig!) und die Zellen vorsichtig in **je 25 mL ddH<sub>2</sub>O (eiskalt)** resuspendieren .
8. Zentrifugieren wie unter **Punkt 4**
9. Überstände verwerfen (vollständig!) und die Zellen vorsichtig in **10 mL 10% Glyzerin (eiskalt)** resuspendieren. Überführen der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß.
10. Zentrifugation: 4.500 rpm, 5 min, 4°C.
11. Überstände verwerfen und die Zellen vorsichtig in **500µl 10% Glyzerin** resuspendieren.
12. Die Suspension wird nun zu je **40 µl** in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Zellen können bis zur Verwendung am gleichen Tag auf Eis aufbewahrt werden. Für längere Lagerung sofort in **flüssigem Stickstoff** (wird durch die Tutoren bereitgestellt) schockgefrieren und bei **-70°C** aufbewahren.

Nach dem Herstellen der kompetenten Zellen wird eine **Testtransformation** der Zellen mit einer definierten Menge an DNA (10 ng) durchgeführt (Transformationsprotokoll 3.2.10).

Die Transformationsansätze werden auf entsprechenden Selektionsplatten in folgenden Verdünnungen ausplattiert: je 100 µl von  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$

Die Effizienz der Transformation wird mittels Transformationsrate bestimmt (Formel 4, 3.2.11).

### **3.2.11 Transformation von elektro-kompetenten *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA**

**Achtung:** Die **Transformationsrate** muss berechnet werden. Zu diesem Zweck wird eine Testtransformation mit fertigem Plasmid **pET28a(+)\_RrRu1HisTagC** und frisch hergestellten elektrokompetenten Zellen durchgeführt.

**Formel 4: Formel zur Berechnung der Transformationsrate elektrokompetenter Zellen**

$$\text{Transformationsrate} = \frac{cfu}{\mu g (DNA) * \text{ausplattiertes Volumen } (\mu l)} * \text{Verdünnung}$$

#### Allgemeines Protokoll einer Elektrotransformation

1. Benötigte Agarplatten auf 37°C erwärmen
2. 2xTY Medium auf Raumtemperatur erwärmen
3. Zellen auf **Eis** auftauen
4. Elektroporationsküvetten auf **Eis** vorkühlen
5. **Salzfreie Plasmid-DNA** zu den **40 µL** elektrokompenten Zellen pipettieren und in die Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) pipettieren (vorsichtig und luftblasenfrei ausstoßen). Die Küvetten weiterhin auf **Eis** halten.
6. Küvette außen abtrocknen, in den Elektroporator einsetzen und Strompuls auslösen. (Einstellungen des Geräts: Programm Ec2, 2,5 kV, 25 µFD, 200 Ω). Die Zeitkonstante nach dem Puls sollte mindestens 4,8 ms betragen. Bei einem eventuellen Kurzschluss sinkt die Transformationsrate um mindestens eine Zehnerpotenz ab.
7. **Sofort** nach dem Pulsen **1 ml 2xTY** in die Küvette pipettieren, den Transformationsansatz im Medium suspendieren und in ein Reaktionsgefäß überführen.
8. Die Zellen werden für 50 min bei 37 °C und 450 rpm regeneriert.
9. Aliquot der Zellsuspension auf den jeweiligen Selektionsplatten ausplattieren.

#### Allgemeines Protokoll einer für die Transformation mit chemisch kompetenten Zellen

1. Benötigte Agarplatten auf 37°C erwärmen
2. Thermoshaker auf 42°C aufheizen
3. 2xTY Medium auf Raumtemperatur erwärmen
4. Zellen 5 min auf **Eis** auftauen
5. Plasmid DNA (1-50 ng) zugeben und durch leichtes Klopfen mischen
6. Die Zellen 30 min auf Eis inkubieren
7. Die Zellen für genau 30 Sekunden in den auf 42°C vorgeheizten Thermoshaker überführen
8. In jedes Tube **1 ml 2xTY** überführen und für 50 min bei 37 °C und 450 rpm regenerieren
9. Aliquot der Zellsuspension auf den jeweiligen Selektionsplatten ausplattieren.

Die Transformationsansätze sollen zum Ausplattieren so verdünnt werden, dass Einzelkolonien erhalten werden. **Achtung:** Kontrollen nicht vergessen!

Folgende Transformationen werden im Laufe des Praktikums durchgeführt

1. Transformation von *E. coli* XL-1 blue (zur Klonierung)
  - Testtransformation (Labor 1): 10 ng pET28a(+)\_RrRu1HisTagC
  - **5 µl** Gibson Assemblierung pET28a(+)\_RrRu1HisTagC (entsalzt)
  - **10 ng** pET28a(+)
2. Transformation von *E. coli* BL21-Gold (DE3) (zur Expression)
  - Testtransformation (Labor 2): 10 ng pET28a(+)\_RrRu1HisTagC
  - **1 µl** Miniprep DNA eines positiven *E. coli* XL-1 blue\_pET28a(+)\_RrRu1HisTagC Transformanten (von den Studenten hergestellt; durch Kolonie-PCR bestätigt)
  - **10 ng** pET28a(+)
  - **10 ng** pET28a(+)\_RrRu1HisTagC

Die Selektion erfolgt für diese Transformationen auf **2xTY-Platten** mit **40 µg/ml Kanamycin**.

### **3.2.12 Kolonie-PCR zur Überprüfung der Gibson Assemblierung**

Kolonien die nach der Transformation der Gibson Assemblierung in *E. coli* XL-1 blue auf den 2xTY-Kan Platten gewachsen sind, können das Fragment tragen oder nur leerer Vektor enthalten. Um dies zu überprüfen, wird direkt von den Platten eine Kolonie-PCR, ohne vorher DNA aus den Zellen zu isolieren, durchgeführt. Das PCR-Produkt wird mittels Gelelektrophorese überprüft.

Primer für die Kolonie-PCR

**Primer 5** cPCR FWD TAATACGACTCACTATAGGG

**Primer 6** cPCR REV TGCTAGTTATTGCTCAGCGG

Vorbereitung der Matrizen-DNA für die cPCR

1. Resuspendieren von je einer Einzelkolonie in **20 µl** ddH<sub>2</sub>O. **Mit 5 µl dieser Suspension** wird eine ONC in entsprechendem Medium angesetzt (Protokol **3.2.5**).

2. Aufbrechen der Zellen im **restlichen Ansatz** durch Aufkochen: **95°C, 10 min**
3. Ansätze auf **Eis** stellen, 8.000 rpm, 3min.
4. **2 µl** des Überstandes als Matrize für die PCR-Reaktion einsetzen.

Pro Gruppe wird je eine PCR von **3 unbekannten Klonen der Gibson Assemblierung**, eine Kolonie der **Positivkontrolle** (pET28a(+)\_RrRu1HisTagC) sowie eine **Negativkontrolle** (mit Wasser) angesetzt.

Übersicht:

- 3x** PCR Gibson Assemblierung
- 1x** PCR des Plasmids pET28a(+)\_Ru1HisTagC
- 1x** Sterilkontrolle mit ddH<sub>2</sub>O statt DNA

Da sich die PCR Ansätze bis auf die Matrizen-DNA nicht unterscheiden, kann man einen **Mastermix** aus allen Komponenten ohne die DNA ansetzen. Bei der Berechnung sollte man einen zusätzlichen Ansatz einplanen, um Pipettierungenauigkeiten zu berücksichtigen.

Kolonie-PCR der Transformanten

2 µl	DNA
2,5 µl	10x DreamTaq Puffer
1,25 µl	<b>Primer 5</b> (10 pmol/µl)
1,25 µl	<b>Primer 6</b> (10 pmol/µl)
0,3 µl	DreamTaq Polymerase (5 U/µl)
1 µl	DMSO
2,5 µl	dNTPs (2,5 mM)
14,2 µl	ddH <sub>2</sub> O
<hr/>	
25 µl	gesamt

Die Amplifikation erfolgt im Thermocycler unter Verwendung folgenden Schemas:

35x	{	95°C	5 min	Initiale Denaturierung
		95°C	1 min	Denaturierung
		52°C	30 sec	Annealing
		72°C	2 min	Elongation
		72°C	7 min	Final Extension
		4°C	∞	

Dauer: ca. 2h

Analyse der cPCR über Agarosegelelektrophorese (5 µl PCR + 2 µl 5xLD + 3 µl ddH<sub>2</sub>O).

### **3.2.13 Amplifikation und Isolation des *RrRu1* tragenden Vektors**

Die aufbewahrten **5 µl zweier positiv getesteter Kolonien** werden zum Inokulieren von **ONCs** verwendet (Sterilkontrolle!).

Am nächsten Tag wird mit einer **Minilysatpräparation** (siehe Monarch Miniprep Anleitung) das hochamplifizierte Plasmid aus den Zellen gereinigt und die DNA Konzentration der Miniprep mittels Nanodrop bestimmt.

Die Miniprep mittels Kontrollen überprüft (Kontrollen: Leer-Vektor, geschnittener Vektor, Vektor mit Insert).

Proben:

- ungeschnittener pET28a(+), linearisierter pET28a(+),
- linearisierter pET28a(+)-Ru1HisTagC (Mini 1),
- linearisierter pET28a(+)-Ru1HisTagC (Mini 2),
- ungeschnittener pET28a(+)-Ru1HisTagC.

1. Linearisierung von pET28a(+)-Ru1HisTagC & pET28a(+) mit *XhoI* zur Kontrolle

x µL 1.5 µg Plasmid DNA

3 µL FastDigest Puffer

1 µL FastDigest *SmaI*

y µL ddH<sub>2</sub>O

TV 30 µL

2. Inkubation 37°C für 1 Stunde

3. Kontroll-Agarosegel (5  $\mu$ L DNA + 2  $\mu$ L 5xLD + 3  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O)
4. Gelelektrophorese für 30 min bei 120 V

Mit diesem Schritt ist die Klonierung des Gens in den pET28a(+)-Vektor abgeschlossen.  
Das Fusionskonstrukt kann nun zur Funktionsanalyse des Gens verwendet werden.



### **3.2.14 Untersuchung der Expression des RrRu1-Fusionskonstrukts**

- **Transformation von *E. coli* BL21-Gold (DE3) mit dem gereinigten Fusionskonstrukt**

Es werden die hergestellten Zellen mit dem assemblierten Gibson Konstrukt (Studenten), dem Leervektor pET28a(+) (Betreuer) sowie der positiv Kontrolle pET28a(+)\_RrRu1HisTagC (Betreuer) transformiert.

Die Transformanten werden so auf Selektionsplatten ausplattiert, dass Einzelkolonien erhalten werden.

Durchführung der Transformation: (siehe 3.2.11).

- **Filter-Aktivitätstest**

Der Filteraktivitätstest wird mit Ausstrichen von mehreren Transformanten durchgeführt. (Alternativ kann der Filteraktivitätstest auch direkt mit Kolonien von der Trafoplatte durchgeführt werden.)

Durchführung:

- 1) Die **Färbelösung** wird wie folgt vorbereitet:
  - 5 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7
  - 375 µl α-Naphthylacetat (12 mg/ml in Aceton)
  - 125 µl FastBlueB (20 mg/ml)
- 2) **1 ml der Färbelösung** und einen „Whatman“-Rundfilter in eine Glaspetrischale geben, um den Filter mit der Lösung zu tränken
- 3) Der getränkte Rundfilter wird anschließend auf die Agarplatte mit den Kolonien gelegt. Bei Aktivität sollten sich die Kolonien nach ca. 2-3 min violett färben.

Jede Gruppe soll im Vergleich zur Trafoplatte den Filter-Aktivitätstest auch mit **negativen Kolonien** (Transformanten mit dem leeren pET28a(+)-Vektor) und mit **positiven Kolonien** (Transformanten mit pET28a(+)\_RrRu1HisTagC-Vektor) durchführen.

Anschließend werden von **einer aktiven Kolonie** und von **einer inaktiven Kolonie** (von der Platte der Negativkontrolle, Stamm mit dem leeren pET28a(+)-Vektor) **je eine ONC für die Genexpression** angesetzt.

- **ONCs als Vorbereitung für die Expression**

Der Stamm mit dem Gibson Assembly sowie mit dem Leer-Vektor (*E. coli* BL21-Gold (DE3)\_pET28a(+)) werden in **25 ml** 2xTY-Medium unter selektiven Bedingungen (mit 40 µg/ml Kanamycin) bei **37°C/ 130 rpm** über Nacht angezüchtet (**+ Sterilkontrolle!**). Pro ONC eine Kolonie zum inokulieren verwenden.

- **Genexpression im Schüttelkolben**

Am nächsten Tag werden **X ml** der ONC in **50 ml 2xTY-** Medium mit **40 µg/ml Kanamycin** überführt, so dass eine **Start-OD<sub>600</sub>** von **0,2** erreicht wird. Das benötigte Volumen ist abhängig von der OD<sub>600</sub> der ONC.

Die inokulierte Hauptkultur wird bei **37°C/ 130 rpm** bis zu einer OD<sub>600</sub> von **0,8-1** angezüchtet. Dies benötigt zwischen 1-2h.

Nach Erreichen dieser OD<sub>600</sub> werden folgende Proben entnommen:

**1) Probe für SDS-PAGE und Western Blot:**

**X ml** Zellsuspension, normalisiert auf einheitliche **OD<sub>600</sub> = 1**, werden in Reaktionsgefäße überführt und bei max. Geschwindigkeit für **2 min** zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet wird bei **-20°C** bis zur Aufreinigung eingefroren.

Hinweis: Bei einer OD<sub>600</sub> von 1 beträgt das Volumen 1 ml. Bei einer OD<sub>600</sub> von 2, 0.5 mL.

**2) Probe für RNA Extraktion:**

**X ml** Zellsuspension, normalisiert auf einheitliche **OD<sub>600</sub> = 1**, werden in Reaktionsgefäße überführt und bei max. Geschwindigkeit für **2 min** zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet wird **auf Eis** bis zur RNA-Isolation gehalten.

Hinweis: Bei einer OD<sub>600</sub> von 1 beträgt das Volumen 1 ml. Bei einer OD<sub>600</sub> von 2, 0.5 mL.

**Nach** der Entnahme dieser Proben wird zur restlichen Kultur **IPTG (0,1 M Stock)** zu einer Endkonzentration von **0,1 mM** zugesetzt (Volumen der OD<sub>600</sub>- Messungen und Probenahme berücksichtigen) und die Inkubation bei **28°C** fortgesetzt.

Nach **1 Stunde** sowie nach **3 Stunden** wird je die OD<sub>600</sub> im Kolben bestimmt und wie oben beschrieben Proben für SDS-PAGE und die RNA-Extraktion entnommen (auf OD<sub>600</sub> = 1 normiert).

Die Volumina der später zu verwendenden Proben werden über die OD<sub>600</sub> angepasst, damit sich in allen Proben die gleiche Gesamt-Proteinmenge befindet.

## ○ **Analyse der Proteinexpression**

### **3.2.15 SDS-PAGE**

Probenvorbereitung:

**Allgemeine Bemerkung:** Proteinproben werden, um Proteolyse zu vermeiden, immer auf **Eis** gehalten. Normalerweise sind für Coomassie gefärbte Gele 3 bis 30 µg Protein und für Western Blots 5 bis 50 µg Protein notwendig (je nachdem welches Protein nachgewiesen werden soll).

Aufschluss der Proteinproben mit BugBuster für SDS-PAGE und Aktivitätsassay:

1. Die Zellpellets werden mit **100 µl BugBuster** versetzt.
2. Das Pellet durch vortexen resuspendiert und **15 min bei RT (25°C) und 350 rpm** im Thermomixer inkubiert.
3. Anschließend werden die Proben bei **4°C und 13.200 rpm** für **20 min** zentrifugiert.
4. Der resultierende **Überstand** wird so sorgfältig wie möglich (ohne Pelletbestandteile!) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf **Eis** gestellt (**lösliche Proteine befinden sich im Überstand! Unlösliche im Pellet.**).
5. Das zurückbleibende **Pellet** wird in **100 µl 0,1 M Tris/HCl (pH 7,0)** Puffer resuspendiert und ebenfalls auf Eis gestellt.
6. Von den Proteinproben (**Überstand** und **Pellet**) werden **32,5 µl** mit 5 µL NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X) und 12,5 µL NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) gemischt, für **10 min** im Heizblock bei **95°C** inkubiert (Denaturierung der Proteine) und anschließend kurz bei **13.200 rpm** zentrifugiert.
7. Später werden zwei Gele, zusammen mit einer weiteren Gruppe nach dem gegebenen Schema (Tabelle 1) beladen. Auf das Gel werden **10 µl** jeder Probe aufgetragen. Außerdem werden pro Gel **5 µl** eines Markers- ThermoFisher „PageRuler Prestained Protein Ladder“- aufgetragen. (Abbildung 21)

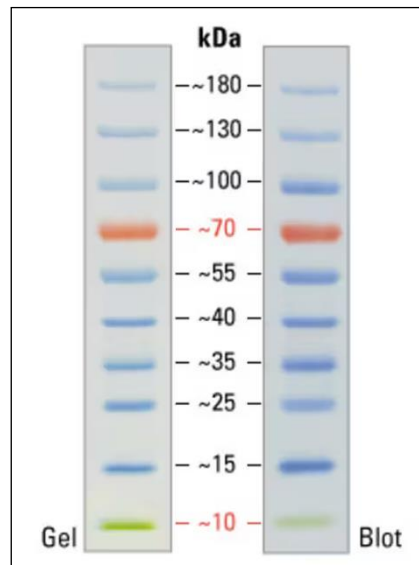


Abbildung 21: ThermoFisher „PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa“

### Elektrophorese (Apparatur: Thermofisher - XCell SureLock Mini-Cell)

1. Die Gele (NuPAGE™ Bis-Tris Mini Protein Gels, 4–12%, 1.0 mm) werden in die Apparatur eingespannt und die beiden Kammern mit **1x NuPAGE™ MES SDS Running Buffer** gefüllt. (Der Puffer kann 5-7 mal wiederverwendet werden bevor er getauscht werden sollte.)
2. **10µl** der Proben und **5 µl** des Thermofisher „Prestained Protein Ladder“ Marker werden nach Schema aufgetragen.
3. Die Elektrophorese-Apparatur wird geschlossen und die Proteine mit dem Programm NuPAGE-Gel (30 mA pro Gel) aufgetrennt.
4. Nach 35-60 min oder sobald die blaue Front die Gelgrenze erreicht, wird die Apparatur abgeschaltet und das Gel aus den Glasplatten wie demonstriert entnommen.

**Achtung:** Es werden **2 SDS-Gele** pro Gruppe benötigt (1x Coomassie Färbung + 1x Western Blot), 2 Gruppen teilen sich ein Gel!

Von allen Proben werden Überstand und Pellet aufgetragen, pro Gel tragen 2 Gruppen ihre Proben (2x 6 Proben = 12 Proben) auf. Eine Gruppe trägt zusätzlich Überstand- und Pellet-Fraktion der Leervektorkontrolle auf (2 Proben). Proteinstandard nicht vergessen! Insgesamt 15 Proben pro Gel.

**Tabelle 1 Auftragsschema SDS-PAGE.** t = Zeitpunkt; Ü = Überstand, P = Pellet, - = Negativkontrolle/Leervektor

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sample	L	t0		t1		t3		t3-		t0		t1		t3	
		Ü	P	Ü	P	Ü	P	Ü	P	Ü	P	Ü	P	Ü	P
Group		1. Gruppe								2. Gruppe					

### Protein-Färbung Coomassie – „Magic Staining Solution“

Proteingele können durch Coomassie-Färbung gefärbt und dadurch die Präsenz von Proteinen analysiert werden. Herkömmliche Färbeverfahren setzen sich aus einem initialen Färbungsschritt gefolgt von einem Entfärbungsschritt zusammen. „Magic Staining Solution“ vereinfacht das Verfahren und kombiniert Färbung mit Entfärbung.

Die Gele werden hierfür für mehrere Stunden oder über Nacht in der Lösung inkubiert unter **leichtem** Schütteln. Um den Hintergrund zu vermindern wird das Gel anschließend in Wasser inkubiert bis der gewünschte Grad an (Ent-)Färbung gegeben ist. Um die Entfärbung zu beschleunigen, kann statt Wasser 10% Eisessig verwendet werden.

### **3.2.16 Aktivitätstest mit p-Nitrophenylbutyrat der BugBuster-Überstände von RrRu1**

Vorbereitung:

- 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 7.5
- Substratlösung: 200 mM *p*-Nitrophenylbutyrat in DMSO
- Einwegküvetten
- Photometer (Kinetik)

Durchführung:

1. In einer Einwegküvette **980 µl** 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 7.5 und **10 µl** BugBuster-Überstand mischen (durch kurzes vortexen).

2. An die erste Position im Photometer immer einen Blank (**990 µl** 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 7,5) stellen.
3. Die Reaktion wird durch Zugabe von **10 µl** Substratlösung zur Probe sowie zum Blank gestartet.
4. Die Reaktion wird durch Messpunkte alle **20-30 sec** über einen Zeitraum von **5 Minuten** bei **405 nm** verfolgt.

**Achtung:** Sollte die Absorption über 2 steigen, so muss die Probe mit Puffer vorher entsprechend verdünnt werden.

Die errechnete Anfangssteigung  $\Delta A/\text{min}$  wird in die untenstehende Formel (Formel 5) eingesetzt und daraus die Proteinaktivität im BugBuster-Überstand (Einrechnung einer eventuellen **Verdünnung!**) bestimmt.

**Formel 5: Formel zur Berechnung der volumetrischen Proteinaktivität im Überstand**

$$\text{Volumetrische Aktivität} \left( \frac{\text{units}}{\text{mL}} \right) = \frac{\left( \frac{\Delta A}{\text{min}} \right) * V * D}{\epsilon * l * v}$$

$\Delta A/\text{min}$	Änderungsrate der Absorption/ min
V	Gesamtvolumen in der Küvette [µl]
v	Probenvolumen Überstand [µl]
D	Verdünnungsfaktor
l	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient, $18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
units	µmol/min

### **3.2.17 Western Blot**

Wichtige Parameter des Western Blots:

- Vollständige Absättigung unspezifischer Bindestellen auf der Membran (z.B. durch Milchpulver oder BSA)
- Spezifität und richtige Verdünnung des primären AK

- Vollständiges Wegwaschen überschüssigen Antikörpers

## Elektrotransfer

Das zweite Gel aus der SDS-PAGE wird für den Elektrotransfer verwendet!

In dem Laborkurs wird eine „semi-dry“-Blotting Methode für den Western Blot verwendet, diese unterscheidet sich zum „wet“-Blot durch die Dauer und einfacheren Aufbau.

Pro Gruppe werden 2 Stapel Filterpapier und 1 Membran benötigt. Vor dem Start des Experiments ist die Puffer-Lösung für den Western-Blot von einer Gruppe frisch herzustellen. Für 1 Liter 1x Trans-Blot Turbo Transfer Puffer, werden 200 mL Trans-Blot Turbo 5x Transfer Puffer, mit 200 mL reinem Ethanol und 600 mL dH<sub>2</sub>O gemischt (Vorsicht Schaum kann sich bilden!). Das Filterpapier und die Nitrocellulosemembran werden in 1x Trans-Blot Turbo Transfer Puffer gelegt und 2-3 min ziehen gelassen. Das Packen der Transferkassette wird von den Betreuern demonstriert (Abbildung 22). Wichtig: Luftblasen vermeiden.

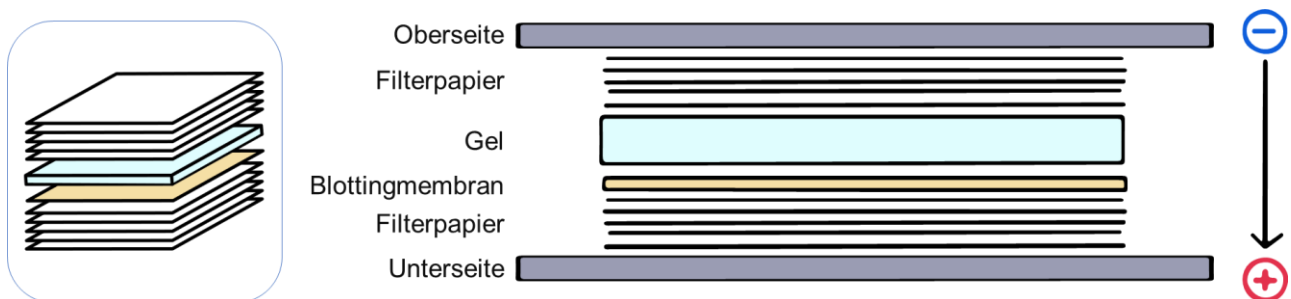


Abbildung 22: Aufbau des Western Blots für den Elektrotransfer der Proteine

Die Proteine wandern von der Kathode (-) zur Anode (+) hin. Die Proteine des Gels werden bei **25 V** und **100 mA** für **30 min** auf die Membran geblottet.

Nach dem **Elektrotransfer** sollten alle aufgetrennten Proteine auf die Membran transferiert worden sein. Ein erster Indikator hierfür ist die sichtbare Übertragung des Markers auf die Membran. Um auch die Übertragung unserer Proben zu überprüfen und um zu sehen, ob Luftblasen den Transfer beeinflusst haben, wird die Membran mit **Ponceau-S** gefärbt. Hierfür wird die Membran in eine Schale mit Ponceau S gelegt (leicht bedeckt).

Nach ein paar Minuten färben sich **die Membran und alle darauf befindlichen Proteine** Rot. Um ein Bandenmuster erkenntlich zu machen, muss die Membran wieder leicht entfärbt

werden. Hierfür wird nach der Färbung das Ponceau S zurückgeschüttet (**wiederverwendbar!**) und das restliche Ponceau S durch waschen mit **ddH<sub>2</sub>O** entfernt. Während diesem Prozess sollten Protein Banden erkenntlich werden. Anschließend kann die Membran komplett entfärbt und entweder trocken gelagert oder direkt zur Detektion weiterverwendet werden.

Lagerung: Membran trocknen und zwischen zwei Filterpapieren oder Tüchern bei 4 ° lagern.

### Immunodetektion

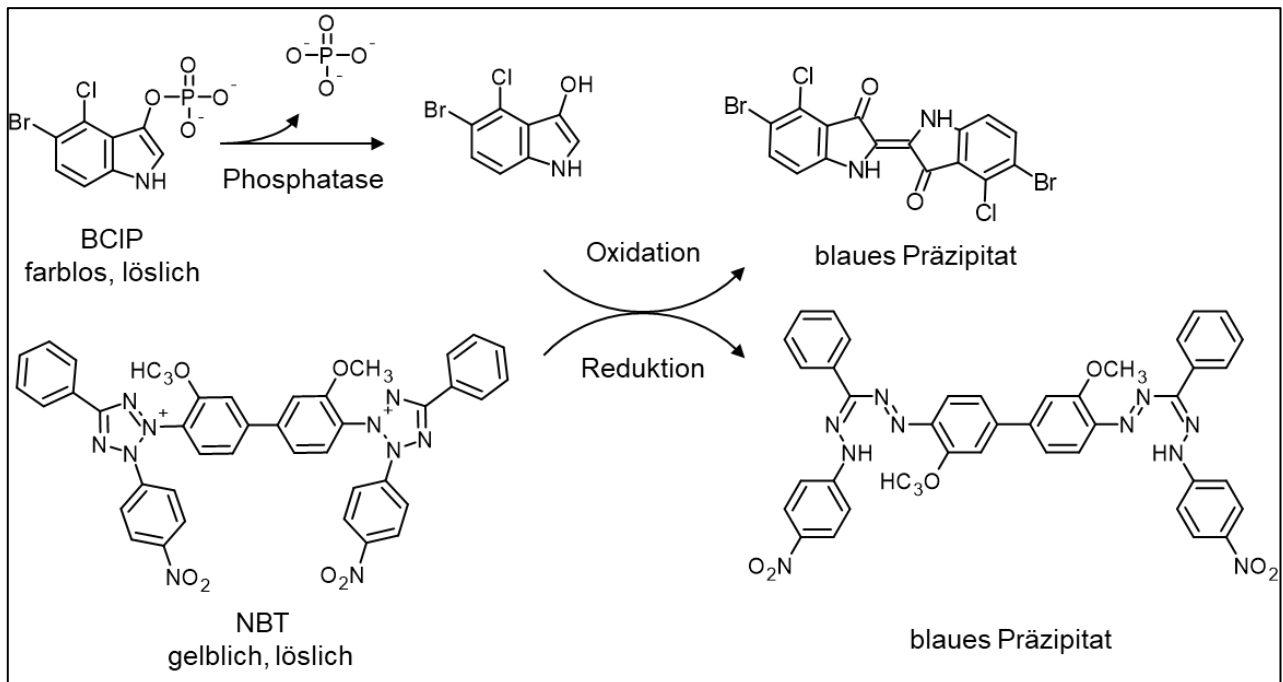
Alle Arbeitsschritte werden bei **RT** durchgeführt.

1. Die Membran wird **1 h** (oder über Nacht) bei **RT** mit ca. **20 ml** 1xTBST-milk geblockt (Absättigung unspezifischer Bindestellen)
2. Anschließend wird die Membran mit dem **primären Anti-His Antikörper** (6x-His Epitope Tag Antibody; monoclonal; *produced in mice*; in 15 ml 1xTBST-milk) für **1 h** auf einer Schüttelplattform (leichtes schütteln) inkubiert. Pro Membran sind ca. **15 ml** Antikörperlösung notwendig. **Achtung: Die AK-Lösung kann öfter verwendet werden und wird deshalb nicht weggeschüttet.**
3. Waschen der Membran: **3x 5 min** mit je ca. **20 ml 1xTBST**
4. Anschließend wird die Membran mit dem **sekundären Antikörper** (Anti-Mouse IgG-Alkaline Phosphatase antibody; *produced in goat*; 1:30.000 in 15 ml 1xTBST-milk verdünnt) für **1 h** auf der Schüttelplattform (leichtes schütteln) inkubiert. Pro Membran sind ca. **15 ml** Antikörperlösung notwendig. **Achtung: Die AK-Lösung kann öfter verwendet werden und wird deshalb nicht weggeschüttet.**
5. Waschen der Membran: **3x 5 min** mit je ca. **20 ml 1xTBST**
6. Die Membran wird mit ca. **2 ml BCIP/NBT** benetzt und unter **Lichtausschluss** für 10-15 min inkubiert. Proteinbanden mit His-Tag verfärben sich.
7. Die Membran wird zum Stoppen der Farbreaktion mit **ddH<sub>2</sub>O** gespült und anschließend fotografiert.

Die Antikörper werden in 1x TBST-milk verdünnt, da sie sich dann einfrieren und lagern lassen.



Benötigte Lösungen und deren Zusammensetzungen sind untenstehend zu finden. Das Reaktionsschema der Immunodetektion mit BCIP/NBT-Färbelösung wird in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23: Reaktionsschema der immunologischen Detektion. BCIP wird von der Phosphatase dephosphoryliert und von NBT oxidiert, wobei ein blaues Präzipitat entsteht.**

## Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

### „Magic“-Coomassie-Färbelösung

4.9% v/v Phosphorsäure

6.5% v/v EtOH

0.011% w/v Coomassie Blue G-250

1% w/v  $\beta$ -cyclodextrin

### Ponceau S Färbelösung

0,5% Ponceau S

1% Essigsäure

### 10x TBS- Puffer

30,3 g Tris (0,25 M)

87,6 g NaCl (1,5 M)

pH 7,5 (mit HCl einstellen)

Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

#### 1x TBST- Puffer

100 ml 10x TBS- Puffer

300 µl Tween-20 (0,003 %)

Mit dH<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

#### TBST-milk

5 g Milchpulver

Mit 1x TBST auf 100 ml auffüllen

### ○ Analyse der RNA Expression

#### **3.2.18 Isolierung von Gesamt-RNA aus *E. coli* mittels „SV Total RNA Isolation System“ (Promega)**

Wo nötig sollte gereinigtes Wasser verwendet werden, von dem man sicher weiß, dass es keine RNase enthält (z.B. Fresenius Wasser). Zum Reinigen der Arbeitsfläche wird eine **1% SDS-Lösung** verwendet werden.

**Wichtig:** Glaswaren und Plastik werden mit Geschirrspülmittel oder SDS-Lösung gereinigt und mit Fresenius Wasser gespült. Bei allen Arbeiten werden Latexhandschuhe getragen, da die Hände eine Quelle für RNasen sind.

Teststamm	Plasmid	Selektion
<i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3)	pET-28a(+)	40 mg/ml Kan
<i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3)	pET- 28a+RrRu1HisTagC	40 mg/ml Kan

#### **Proben zur Isolierung von RNA**

- 0h *E. coli* BL21-Gold (DE3) pET-28a(+) RrRu1HisTagC
- 1h *E. coli* BL21-Gold (DE3) pET-28a(+) RrRu1HisTagC
- 3h *E. coli* BL21-Gold (DE3) pET-28a(+) RrRu1HisTagC
- 3h *E. coli* BL21-Gold (DE3) pET-28a(+)

### Vorbereitung

- TE-Puffer, pH 8,0; mit 400 µg/ml Lysozym (unmittelbar vor Verwendung herstellen)
- Zugabe von 20 µl β-Mercaptoethanol pro ml RLA Puffer

### Vorbereitung der Proben zur RNA-Isolierung

1. Pellet in **100 µl TE-Puffer** mit **Lysozym** (400 µg/ml) lösen und **5 Minuten** bei **RT** inkubieren.
2. Weiter mit Protokoll der RNA Isolation

### Durchführung der RNA Isolation

1. 175 µl **RNA Lysis Buffer** (RLA) hinzufügen und durch Invertieren mischen
2. 350 µl **RNA Dilution Buffer** (RDA, blau) hinzufügen, 3-4 mal invertieren
3. 10 min, max. Geschw., RT zentrifugieren und Lysat in ein neues Reaktionsgefäß transferieren.
4. 200 µl **95 % EtOH** hinzufügen und durch Pipettieren mischen
5. In Spin Basket überführen, 1 min, max. Geschw. RT, zentrifugieren. Filtrat verwerfen
6. 600 µl **RNA Wash Solution** (RWA) hinzufügen, 1 min, max. Geschw. RT, zentrifugieren. Filtrat verwerfen
7. DNase mix herstellen
8. 50 µl **DNase mix** hinzufügen, 15 min bei RT inkubieren.

<b>Lösung</b>	<b>Volumen</b>
Yellow Core Buffer	40 µl
MnCl <sub>2</sub> , 0,09 M	5 µl
Dnase I	5 µl

Vorsichtig durch pipettieren mischen; **Nicht vortexen!**

9. 200 µl **DNase Stop Solution** (DSA) hinzufügen 1 min, max. Geschw. RT, zentrifugieren.
10. 600 µl **RNA Wash Solution** (RWA) hinzufügen, 1 min, max. Geschw. RT, zentrifugieren. Filtrat verwerfen
11. 250 µl **RNA Wash Solution** (RWA) hinzufügen, 2 min, max. Geschw. RT, zentrifugieren. Spin Basket in Elutions Tube transferieren.

12. RNA mit **60 µl ddH<sub>2</sub>O (RNase frei)** eluieren und im TK lagern.

### **3.2.19 Bestimmung der RNA-Konzentration mittels „Nanodrop“**

Die Bestimmung der RNA Konzentration (**1 µl Probe**) erfolgt spektrophotometrisch im Nanodrop (Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer).

Da Nucleotide, RNA, ssDNA und dsDNA alle bei 260 nm absorbieren, tragen sie zur Gesamtaborption der Probe bei. Das Verhältnis 260 zu 280 nm wird genutzt, um die Reinheit von DNA oder RNA photometrisch zu bestimmen. Ein Verhältnis **OD<sub>260/280</sub> von 2.0** entspricht „reiner“ RNA. Ist das Verhältnis signifikant niedriger, deutet es auf eine Kontamination der Probe mit Proteinen, Phenol oder andere Unreinheiten hin, welche stark bei 280 nm absorbieren. Das Verhältnis von 260 zu 230 nm wird als sekundäre Messung der Reinheit der Nukleinsäure ebenfalls gemessen. Bei "reiner" Nukleinsäure liegen die Absorptionswerte zwischen 2,0 und 2,2. Sind die Werte niedriger, deutet dies auf das Vorhandensein von Verunreinigungen hin, die bei 230 nm absorbieren.

Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht 40 µg/ml RNA, daher lässt sich die RNA-Konzentration mit folgender Formel berechnen:

Konzentration [µg/ml] = OD<sub>260</sub> × 40 µg/ml × Verdünnungsfaktor

### **3.2.20 Elektrophoretische Auftrennung der RNA in neutralem Agarosegelen**

#### **Vorbereitung des Agarosegels**

0,8 % Agarose in **1x MOPS-Laufpuffer** (200 ml). Die Gelapparatur und der Messzylinder sollten vorher gründlich mit Spülmittel, **1% SDS** und destilliertem Wasser gespült werden.

**Handschu<sup>50</sup>!**

#### **Vorbereitung der RNA Proben und Gelelektrophorese**

**Probenvorbereitung:** Von allen Proben soll die gleiche RNA-Menge aufgetragen werden (jedoch maximal 5 µl, circa 500 ng). **5 µl** isolierte RNA, **20 µl** Probenpuffer (**toxisch!**) und **5 µl** Gelladepuffer (**toxisch!**) mischen. Die Proben **15 min bei 65°C denaturieren**. Dann gleich (in zeitlicher Reihenfolge!) auf das vorbereitete Gel zusammen mit einem RNA Marker (Thermo Scientific™ RiboRuler High Range RNA Ladder) auftragen (Abbildung 24). Die Elektrophorese erfolgt in einem **1x MOPS-Laufpuffer** bei 80 V Spannung.

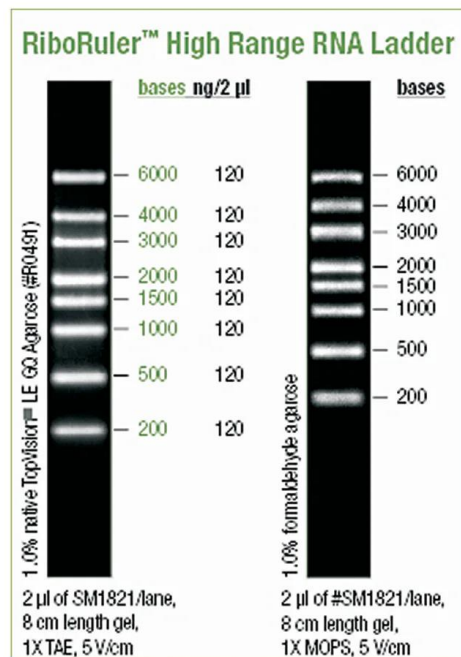


Abbildung 24. RNA Marker (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM1821>)

### Auswertung

Das Gel wird aus der Pufferkammer herausgenommen, die Auswertung erfolgt mittels Sichtbarmachen der RNA unter einem UV-Schirm und Ausdruck eines Gelfotos. Die sichtbaren RNA Banden sollen den ribosomalen RNAs (23S-rRNA, 16S-rRNA, 5S-rRNA) zugeordnet werden (Abbildung 25). Das Gel selbst wird für den Kapillarttransfer und Immobilisierung der RNA auf einer Nylonmembran weiterverwendet (**Northern Blot**).



a: genomische DNA  
b: 23S-rRNA  
c: 16S-rRNA

Abbildung 25: Typisches Bandenmuster eines RNA-Gels

### 3.2.21 Northern Blot

#### Transfer der RNA auf eine Nylonmembran

Der Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) erfolgt durch einen **Kapillarblot** (Abbildung 26).

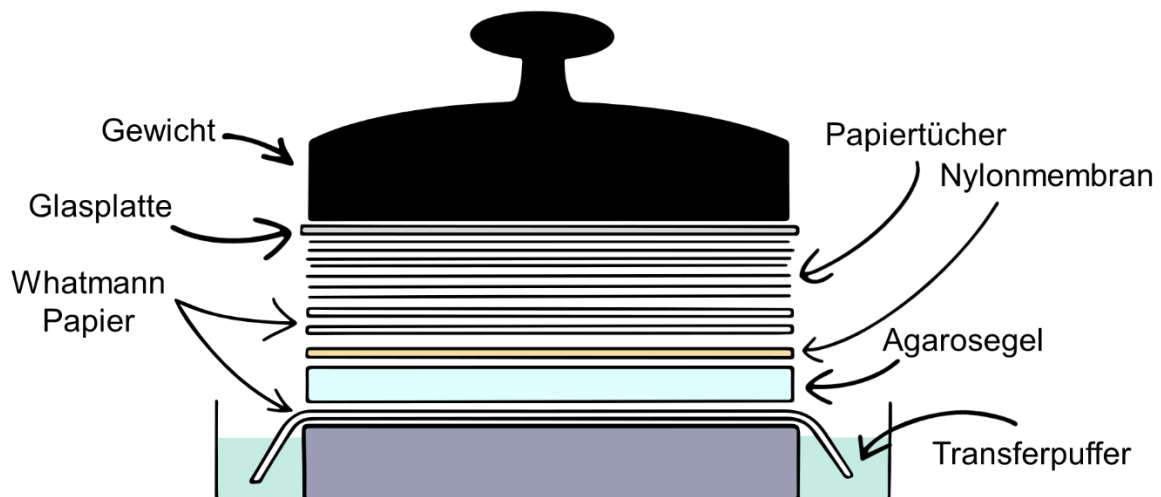


Abbildung 26: Northern Blot- Aufbau des Kapillartransfers (T. Lanzmaier)

#### Aufbau des Blots

1. Eine gut gereinigte Gelkammer (**RNasen!**) wird an beiden Enden mit **20x SSC** (Blottingpuffer) gefüllt.
2. Über den Steg in der Mitte der Kammer wird ein „Rotilabo®- Blottingpapier“ (0,35 mm) gelegt, dessen Enden in den Blottingpuffer hängen.
3. Das Gel wird mit der **Oberseite nach unten** auf das Filterpapier platziert
4. Auf das Gel wird die **Nylonmembran** (befeuchtet im Blottingpuffer) gelegt
5. Darüber kommen noch ein Filterpapier und ein Stapel von saugfähigen Papierhandtüchern
6. Eine Glasplatte oder ähnliches wird zur Beschwerung verwendet. Der Transfer läuft über Nacht.

Nach mindestens **12 h** Transfer, wird die Nylonmembran kurz in **2x SSC** gewaschen, um anhaftende Agarose zu entfernen.

## Northern Hybridisierung

**Achtung:** Durch den Einbau von Digoxigenin verändert sich das Molekulargewicht der PCR-Fragmente.

Aufspotten der Sonde auf die Membran

- Die Membranen werden zerschnitten und jede Gruppe erhält den Teil mit ihren Proben
- DIG-Sondenverdünnungen werden nach dem Kapillartransfer auf die Membran gespottet, um hinterher die mRNA-Konzentration abschätzen zu können.

Dazu werden **6 Verdünnungen** hergestellt:

1x 1:10 gefolgt von 5x 1:5 und auf die Membran pipettiert (je 5 µl).

**Achtung:** Die Membran muss trocken sein, ansonsten verläuft die Sonde

- Anschließend wird die Membran mit **UV** bestrahlt (3 min bei 302 nm oder **245nm**), um die RNA zu fixieren. **Alternative:** Backen der Membran für 2-3 Stunden bei 80°C.
- Falls notwendig wird die Membran in Plastikfolie verpackt und bei 4°C gelagert.

Hybridisierung der Digoxigenin-markierten DNA an die fixierte mRNA

1. Die Membran mit der fixierten RNA wird in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit mindestens 20 ml **Prähybridisierungslösung**/ 100 cm<sup>2</sup> Membranfläche **2 bis 4 h** in einem Hybridisierungssofen bei **50°C** prähybridisiert.
2. Die Prähybridisierungslösung verwerfen und durch **3,5 ml Hybridisierungslösung**/ 100 cm<sup>2</sup> ersetzen (**Keine Luftblasen!**).
3. Membran **über Nacht** bei **50°C** in einem Hybridisierungssofen inkubieren.
4. Membran **2x 5 min** bei **RT** mit mindestens **25 ml Waschlösung 1** und **2x 15 min** bei **68°C** mit **25 ml Waschlösung 2** (anwärmen) waschen.
5. Die Membran ist nun **bereit zur Detektion** der markierten DNA oder man bewahrt sie luftgetrocknet für einen späteren Nachweis auf.

## **Immunologischer Nachweis**

**Achtung:** Die Schritte 1 bis 7 werden bei **RT** unter **Schütteln** durchgeführt.

1. Membran kurz (ca. 2 min) in **25 ml Puffer 1** waschen.

2. 30 min mit **25 ml Puffer 2** inkubieren.
3. **Antikörper-Konjugat** (vor Gebrauch kurz zentrifugieren!) auf 150 mU/ml (1:5000) in **Puffer 2** verdünnen (verdünnte Antikörper-Konjugatlösungen sind nur ca. 12 h bei 4°C stabil).
4. Membran 30 min mit ca. **20 ml** verdünnter Antikörper-Konjugatlösung inkubieren (in einer Plastikschiene oder in der Röhre).
5. Ungebundenes Antikörper-Konjugat durch 2x 15 min waschen mit je **25 ml Puffer 1** entfernen.
6. Membran 5 min mit **20 ml Puffer 3** äquilibrieren.
7. Membran mit **3 ml Färbelösung** in einem verschlossenen Plastikbeutel im Dunkeln inkubieren. Die **Farbentwicklung** beginnt bereits innerhalb von **2-3 Minuten**. Gut verfolgen, damit der Blot nicht zu dunkel wird. **Nicht schütteln oder mischen** während sich das Farbpräzipitat bildet.
8. Wenn die gewünschten Banden klar erkennbar sind, Reaktion durch 5 min Waschen der Membran mit **50 ml Puffer 4** abstoppen.
9. Das Resultat kann durch Fotografieren oder Einscannen der nassen Membran dokumentiert werden.

### **Lösungen und Puffer des Northern Blots**

#### TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

1 mM EDTA

#### 10x MOPS-Laufpuffer [3-(N-morpholino)-propansulfonsäure] pH 7,0

0,4 M MOPS, pH 7,0

0,1 M Natriumacetat pH 7,0

0,01 M EDTA pH 8,0

#### 20x SSC-Puffer

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat



Zuerst in 800 ml Wasser lösen, dann pH mit einigen Tropfen 10 M NaOH auf pH 7,0 stellen dann auf 1000 ml auffüllen

Gelladepuffer (RNA- Agarosegele ohne Formaldehyd)

50 % Glycerin  
1 mM EDTA  
0,2 % Bromphenolblau  
1 mg/ml Atlas ClearSight DNA stain

Probenpuffer (RNA- Agarosegele ohne Formaldehyd)

10 ml de-ionisiertes Formamid  
3,5 ml Formaldehyd 37 %  
2 ml 10x MOPS- Laufpuffer

Prähybridisierungslösung für RNA (Church Puffer)

5x SSC  
50% (v/v) Formamid  
0,1% (w/v) N-Lauroylsarkosin, Na-Salz  
7% SDS- direkte Zugabe (als Pulver)  
2% Blocking Reagents (Roche)- direkte Zugabe  
50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2 (1-0,5 M Stammlösung wird benötigt)  
Lösung **ca. 1 h im Voraus** durch Lösen bei ca. 60- 65°C **herstellen** (Lösung bleibt trüb!)

Hybridisierungslösung

wie Prähybridisierungslösung

**plus** 40 ng/ml DIG-markierte Sonde, **frisch denaturiert!** (95°C für 10 min; Eis)

Waschlösung 1

2x SSC  
0,1% SDS

Waschlösung 2

0,1x SSC  
0,1% SDS

Puffer 1

10 mM Tris-HCl  
Seite | 73

Puffer 2

0,5% Blocking Reagents in **Puffer 1**

150 mM NaCl  
pH 7,5

unter Rühren auf ca. 60-65°C erhitzen, ca. **1 h**  
**rühren** lassen; Lösung wird milchig trüb

Puffer 3

100 mM Tris-HCl  
100 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
pH 9,5

Puffer 4 (1x TE-Puffer)

10 mM Tris-HCl  
1 mM EDTA  
pH 8,0

## 4. Appendix

Esterase gene

> CP038030.2:c4938068-4937121 *Rhodococcus ruber* strain R1 chromosome, complete genome

Plasmid

>pET28a+

[illegible]

GGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAAT  
GCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGCGGATATCTCGGTAGTGGGAT  
ACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCAAACAGG  
ATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCC  
AGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCC  
TGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGC  
TGGCACGACAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGT  
AAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCGGGATCTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAA  
CCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGA  
CTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTT  
CGGCGAGGACCGCTTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTGCTTGCGGTAT  
TCGGAATCTTGACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTT  
TCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGGCCCCACGGGTGCGCATGATC  
GTGCTCCTGTGCTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCA  
GAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGTCTGC  
GACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTCCGTGTTTCGTAAAGTCTGGAAACG  
CGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGG  
CTACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTG  
ATTTTTCTCTGGTCCCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCCA  
GTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTCAT  
CGGTATCATTACCCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAA  
ACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTT  
CTGGAGAAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTT  
CACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGG  
TGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGA  
TGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGG  
GGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATG  
CGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCAGAGTGCACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCA  
CAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGA  
CTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGG  
TAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG  
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG  
CTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA  
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTC

TCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAG  
CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCG  
CTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCAGCCGCTGCGCCTTAT  
CCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG  
CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT  
TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC  
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAA  
CCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAA  
AAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGA  
AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGT  
AATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGA  
TTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCTG  
GGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGT  
TTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACT  
AACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCT  
GATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTA  
GAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCC  
GGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTCTGTCTC  
GCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGAC  
GAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCAT  
TCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGAC  
GAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAC  
CAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAAC  
GGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGA  
TGCTCGATGAGTTTTTCTAAGAATTAATTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTA  
GAAAAATAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATT  
GTAAACGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTT  
AACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAG  
GGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAA  
CGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACC  
CTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGG  
GAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAG  
GGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCT

GCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATT  
CGCCA