

Übung 7

Übungsverantwortlicher

Adrian Köber adrian.koeber@tuwien.ac.at

GOLDEN GATE KLONIERUNG UND HEFETRANSFORMATION

Ziel dieser Übung ist es in der Bäckerhefe - *Saccharomyces cerevisiae* – ein Fusionsprotein aus LDH und GFP zu exprimieren. Dadurch ermöglicht man die Herstellung von Milchsäure in diesem Organismus.

Die **Laktatdehydrogenase** (LDH) ist für die Umwandlung von Pyruvat (auch Brenztraubensäure) in Laktat zuständig, während das **green fluorescent protein** (GFP) aus *Aequorea victoria* als gängiger Reporter in der molekularen Biologie eingesetzt wird.

Die Golden Gate Technik ermöglicht den Aufbau von Plasmiden aus standardisierten Komponenten, die dann in einem geeigneten Wirt, in der Regel *Escherichia coli*, vermehrt werden können.

Das Plasmid wird in *E. coli* vervielfältigt, aufgereinigt und in die Hefe eingebracht. Nach zwei Selektionsrunden werden die einzelnen Klone auf ihre Fluoreszenz untersucht, und der vielversprechendste wird in größerem Maßstab kultiviert. Die Zellen werden aufbereitet und der Gesamtproteingehalt, die Fluoreszenz und die LDH-Aktivität der Zellextrakte werden bestimmt.

Hinweise

Medien die mit einem **roten Punkt** auf dem Autoklavierband versehen sind werden nach dem Autoklavieren in ein 50 °C Wasserbad gestellt (**handwarm**)

Messung der optischen Dichte von Hefen bei 600 nm:

Proben in einem Reaktionsgefäß mischen und gut **vortexen** um Agglomeration zu verhindern; Der ideale Messbereich liegt zwischen 0,1 und 0,2; Verdünnung beachten

(A) befindet sich im Abzug für die Agarosegelelektrophorese

(B) befindet sich am Betreuer/innentisch

(E) befindet sich im allgemeinen Entnahmebereich auf RT

(G) befindet sich in der Gefrierlade

(K) befindet sich im Kühlschrank

Unter sterilen Bedingungen arbeiten: Bunsenbrenner oder Sterilbank

Abkürzungen

YP(D)	Yeast Peptone (D-Glukose)/Komplexes Medium für Hefen	(l)	Liquid/flüssiges Medium
YNB	Yeast nitrogen base/Definiertes Minimalmedium für Hefen	(s)	Solid/festes Medium
RT	Raumtemperatur	PEG 3350	Polyethylenglykol
rpm	rounds per minute/Umdrehungen pro Minute	LiAc	Lithium Acetat
Ura	Uracil	w/v	weight per volume [x g/100 mL]
ddH ₂ O	bi-destilliertes Wasser (autoklaviert) (B)	RO H ₂ O	Wasser aufbereitet mit Reverse Osmose
o.n.	over night/über Nacht	OD ₆₀₀	optical density/Absorption bei 600 nm
AK	Arbeitskonzentration	PBS	phosphate buffered saline

Materialien und Lösungen

Feststoffe (E)	Sonstiges	Medien und Lösungen
Agar	<i>E. coli</i> TOP10 (-80 °C)	ddH ₂ O (E)
Agarose	Marker (NEB 1kb Plus) (K)	SOC Medium (E)
Hefeextrakt	SS-carrier DNA (G)	RO H ₂ O steril (E)
NaCl	CutSmart (G)	Uracil [2 mg/ml] AK [20 µg/mL]
Pepton	ATP [20 mM] (G)	50% (w/v) Glukose (E)
Yeast Nitrogen Base (YNB)		40% (w/v) Galaktose (E)
Antibiotika		1 M Tris/HCl pH 6,5 (E)
Kanamycin [50 mg/mL] AK [50 µg/mL] (G)		1 M Tris/HCl pH 7,5 (E)
Geneticin [50 mg/mL] AK [200 µg/mL] (K)		10x PBS (E)
Enzyme		10x Pyruvat [3,6 mM] (K)
T4 DNA Ligase (K)		10x NADH [3,4 mM] (G)
Bsal (G)		
HindIII (G)		
Plasmide (G)		Hefe Stämme (-80 °C)
BB3_117: Leervektor; Kan ^R /Geneticin ^R , CEN/ARS		CEN.PK 113 5D
BB2_LDH:GFP: pGal1_LDH:GFP_tCyc, Amp ^R		Praktikum LDH:GFP; LDH:GFP Hefe
BB3_LDH:GFP: pGal1_LDH:GFP_tCyc, Kan ^R , CEN/ARS		Praktikum Leervektor; Leervektor Hefe

Material und Geräte			
Spektrophotometer GloMax (2. Stock)	Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel Eprouvetten	Plasmid-Kit (B) 96-well Platten	Multikanalpipette Reservoir
Glaskugeln 0,1 mm	250/500 mL Schraubdeckelflaschen	PCR Cycler	Thermoblock
Glaskugeln 1 mm	100 mL Kolben (steril)	Gelkammer (A)	Inkubator
Plattenleser (1. Stock)	250 mL Kolben (steril)	FastPrep (3. Stock)	

1. Herstellen der Medien und Lösungen

1.1. *E. coli* Kultivierung

- LB_(l): Feststoffe werden in RO H₂O gelöst; pro Person werden ca. 200 mL benötigt

	Chemikalie	g/L
	Hefeextrakt	5
	Pepton	10
	NaCl	10
Für Festmedien	Agar	10

- **6 x 5 mL** Medium in Eprouvetten aliquotieren, mit einer Alukappe (inkl. Feder) verschließen und **autoklavieren**
- Agar in eine Schottflasche (max. 500 mL) mit Schraubdeckel einwiegen, mit LB_(l) Medium auffüllen und **autoklavieren**
- Lagerung der Eprouvetten mit LB_(l)-Medium bei RT

- LB/Kan_(s) Platten gießen: Zugabe von Kanamycin (1000 µL/L Medium) zu handwarmen LB_(s) und durch Schwenken mischen
- Platten gießen ca. 20 mL pro Platte (zumindest 5 Stück erforderlich)

1.2. Hefetransformation, Screening und Expression

- Benötigte Volumina pro Person: ca. 300 mL 2xYPD_(l), 500 mL YPD_(s)
- Basis für flüssige Hefemedien (2xYP_(l)): Feststoffe werden in RO H₂O gelöst; Zucker werden **separat** (nach dem autoklavieren) hinzugegeben müssen aber im Volumen berücksichtigt werden!

	Chemikalie	g/L
	Hefeextrakt	20
	Pepton	40
Wird separat hinzugegeben	Glukose	40 (4%)

- Das Medium in eine Schraubdeckelflasche füllen und **autoklavieren**

- 4,6 mL 2xYP_(l) mit 400 µL 50% Glukose und 5 mL sterilem RO H₂O mischen (= YPD_(l) für die Heferegeneration)
- 2x 46 mL 2xYP_(l) mit je 4 mL 50% Glukose mischen (= 100 mL 2x YPD_(l), Hefetransformation)

- Festes Medium (YPD/Gen_(s)): Feststoffe werden in RO H₂O gelöst:

	Chemikalie	g/L
	Hefeextrakt	10
	Pepton	20
	Agar	15
Wird separat hinzugegeben	Glukose	20 (2%)

- Das Medium in eine 500 mL Schraubdeckelflasche füllen und **autoklavieren**

- 20 mL 50% Glukose + 2 mL Geneticin hinzugeben
- 20 YPD/Gen_(s) Platten gießen

Nach der zweiten Hefe-Vereinzlung

- Autoinduktionsmedium (100 mL; YPD/Gal/Gen₍₁₎):
- 2x 23 mL 2xYP₍₁₎ mit je 1 mL 50% Glukose, 2 mL 50% Galaktose, 200 µL Geneticin und 22,8 mL sterilem RO H₂O mischen
- Kulturmedium für Vor- und Hauptkultur (200 mL; YPD/Gen₍₁₎):
- 92 mL 2xYP₍₁₎ mit je 8 mL 50% Glukose, 800 µL Geneticin und 95,2 mL sterilem RO H₂O mischen
- Expressionsmedium (150 mL) YNB₍₁₎: Feststoffe werden in RO H₂O gelöst:

	Chemikalie	g/L
	YNB	1,71
	Ammonium Sulfat	5
Wird separat hinzugegeben	Galaktose	20 (2%)

- Das Medium in einer 500 mL Flasche mit Schraubdeckel **autoklavieren**
- 7,5 mL 40% Galaktose zu YNB₍₁₎
- 1,5 mL Uracil zu YNB₍₁₎
- 600 µL Geneticin zu YNB₍₁₎
- Für das Screening: 50 mL einer 1x PBS Lösung aus der 10x Stammlösung herstellen

1.3. Zellaufschluss und Protein Assays

- 150 mL einer 0,1 M Tris/HCl pH 6,5 Lösung aus der 1 M Stammlösung herstellen
- 50 mL einer 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 Lösung aus der 1 M Stammlösung herstellen

2. Klonierung mittels Golden Gate

2.1. Golden Gate Ansatz für die Plasmidkonstruktion

- Ansätze in 200 µl PCR Reaktionsgefäßen auf Eis (Herstellen eines Master Mix aus T4 Ligase, CutSmart Buffer, ATP, Bsal)

Reaktionsansatz	negativ Kontrolle
1 µl 40 nM Plasmid BB2_LDH:GFP	-
1 µl 40 nM Plasmid BB3_117	1 µl 40 nM Plasmid BB3_117
2,5 µl T4 Ligase	2,5 µl T4 Ligase
2 µl CutSmart Buffer	2 µl CutSmart Buffer
2 µl ATP	2 µl ATP
1 µl Bsal	1 µl Bsal
10,5 µl ddH ₂ O	11,5 µl ddH ₂ O

- Reaktion im PCR-Cycler (ca. 6,5 Stunden)

5 min	37 °C	45 Zyklen
2 min 30 s	16 °C	
5 min	50 °C	
10 min	80 °C	
hold	10 °C	

2.2. Transformation der TOP10

- Die chemisch kompetenten TOP10 Zellen auf **Eis** auftauen
- Den Vollständigen Golden Gate Ansatz zu **50 µL** Zellen geben und **15 min** auf **Eis** inkubieren
- Die Zellen für **90 s** bei **42 °C** einem Hitzeschock unterziehen

- Die Zellen für **5 min** auf **Eis** stellen
- **900 µL** des SOC_(l) hinzugeben, bei **37 °C** und Schütteln (Heizblock 800 rpm) für **1 h** inkubieren
- **100 µL einer 1:10 Verdünnung (in SOC)** und **100 µL** der regenerierten Zellen auf **LB_(s)-Kan** ausplattieren und über Nacht bei **37 °C** inkubieren
- Koloniezahl auf den Platten bestimmen (Verdünnung beachten)
- > 10 x mehr Kolonien sollten im Reaktionsansatz im Vergleich zur negativ Kontrolle vorliegen

2.3. Plasmidpräparation

- Benötigt: 6 LB_(l) Epprouvetten, Platte mit Reaktionsansatz und eine leere LB/Kan_(s) Platte
- Zugabe von 5 µL Kanamycin zu Epprouvetten mit LB Medium
- Transformanten von der Platte picken (Pipettenspitze), auf leere LB/Kan_(s) Platte transferieren (Abgabe: **Masterplate**) und in Epprouvette überführen
- Epprouvetten im Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 rpm o.n. inkubieren

Alle Schritte bei RT und Zentrifugation bei 16 000 rpm

- Transferieren sie je **1,5 mL** Kultur in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß
- **1 min** zentrifugieren; Überstand verwerfen
- Aus **derselben** Kultur erneut **1,5 mL** in dasselbe Reaktionsgefäß
- wiederholen des Zentrifugationsschritts
- Verarbeitung von 2 Zellpellets; Einfrieren von 4 Zellpellets bei -20 °C
- Zellpellet in **200 µL PD1 Buffer (enthält RNase A)** (K) resuspendieren
- **200 µL PD2 Buffer** hinzugeben (**alkalische Lyse**) und Reaktionsgefäß **10-mal** invertieren (**nicht Vortexen!**)
- **3 min** inkubieren
- **300 µL PD3 Buffer** hinzugeben und Reaktionsgefäß 10-mal invertieren (**Neutralisation, nicht Vortexen!**)
- **3 min** zentrifugieren
- **PD Säulchen** in **2 mL Sammelgefäß** geben und markieren
- Überstand auf die Säulchen geben
- **30 s** zentrifugieren
- **Durchfluss** aus Sammelgefäß verwerfen; PD Säulchen wiedereinsetzen
- **600 µL Wash Buffer** auf Säulchen geben
- **30 s** zentrifugieren (**Waschen**)
- **Durchfluss** aus Sammelgefäß verwerfen; PD Säulchen wiedereinsetzen
- **3 min** zentrifugieren (**Trocknen**)
- Sammelgefäß verwerfen und Säulchen in neues 1,5 mL Reaktionsgefäß geben
- **50 µL Elution Buffer** auf das Säulchen
- **2 min** inkubieren
- **1 min** zentrifugieren (**Elution**)

2.4. Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

- Ansatz je Plasmid in 1,5 mL Reaktionsgefäß:

Reaktionsansatz
5,6 µL ddH ₂ O
1 µL CutSmart Buffer
0,4 µL HindIII
3 µL Plasmid

- 1 h bei 37 °C inkubieren
- Agarosegel herstellen: **0,5 g** Agarose in 250 mL Kolben, 50 mL **1x TAE** Puffer Füllstand markieren (Menge für Kleines Gel, 8^{er} Kamm)
- Hälfte einer Petrischale als Deckel auf den Kolben platzieren und in der Mikrowelle erhitzen; Lösung sollte klar sein, ohne Schlieren (**Vorsicht Siedeverzug! Hitzehandschuhe benutzen!**)
- Flüssigkeit im Abzug 10 min abkühlen und Zugabe von **2 µL SybrSafe**
- Gelkammer zusammenbauen Gel gießen und ca. 30 min aushärten lassen
- Gel in die Laufkammer geben und mit **1x TAE** überschichten

Nach dem Restriktionsverdau:

- **2 µL** des **6x Loading Dye** zum Restriktionsansatz
- Gel beladen: 12 µL Restriktionsansätze und **5 µL DNA-Marker** (NEB 1kb Plus DNA Ladder) und **12 µL** Restriktionsansätze
- Kammer an die Stromquelle anschließen, (Laufrichtung beachten); Laufparameter: 120 V (konstant), 30 min
- Banden mit Gel-Imager evaluieren (Bandengröße bestimmen) und Bild abspeichern (Abgabe)
- (Kein korrektes Plasmid: Plasmidpräparation/Verdau der Ersatzkulturen)

2.5. Bestimmung der Plasmidkonzentration mittels Nanodrop

Nanodrop: Pipette, Spitzen, Elution Buffer und Plasmid

- 2 µL Elution buffer für das Blanken des Nanodrop verwenden
- 2 µL Plasmid zur Bestimmung der DNA-Konzentration am Nanodrop messen
- Konzentration [ng/µl], sowie $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ notieren (Abgabe)
- Plasmid bei -20 °C lagern

3. Transformation der Hefen

3.1. Transformation von CEN.PK 115D Hefen

Vorkultur des Ausgangshefestamms (CEN.PK 113 5D):

- Zu 2 x 15 mL 2xYPD_(l) in einem 100 mL Kolben (steril verschlossen mit Alufolie) je eine Einzelkolonie des Stammes CEN.PK 113 5D von der Platte mit Impföse picken (**Hefen haben keine Resistenz, besondere Vorsicht!**)
- Vorkultur bei 30 °C und 240 rpm 16 h inkubieren
- Bestimmung der OD₆₀₀ mittels Spektrophotometer, messen sie zumindest zwei Verdünnungen

Hauptkultur:

- 50 mL 2xYPD_(l) auf eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 inokulieren
- Hauptkultur bei 30 °C und 240 rpm für 4 h inkubieren

Zellernte:

- 25 mL der Kultur in ein 50 mL Tube ohne Stehrand überführen
- Zentrifugation (Rotor: 19776-H) bei 3000 x g und 4 °C für 5 min und den Überstand verwerfen
- Jetzt den Rest der Zellen dazugeben und erneut zentrifugieren

○ Parallel die ssDNA für 5 min bei 100 °C inkubieren und danach sofort auf Eise geben

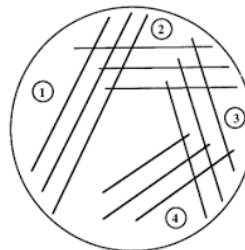
- Das Pellet in **25 mL** ddH₂O resuspendieren

- Zellen erneut zentrifugieren und in **1 mL** ddH₂O resuspendieren
- Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und mit 16000 rpm für 30 s zentrifugieren; den Überstand so gründlich wie möglich verwerfen
- Die Zellen erneut in **1 mL** ddH₂O resuspendieren und je 100 µl in separate Reaktionsgefäße aliquotieren; auf Eis stellen
- Transformationsansatz (3 Transformation: je 1x Plasmid, 1x negativ Kontrolle mit ddH₂O und 1x Leervektor (= BB3_117) Mastermix herstellen):

Chemikalie	Volumen in µL
PEG 3350 50 % (w/v)	240
LiAc 1 M	36
SS-carrier DNA	50
Plasmid + ddH ₂ O	34

Die Menge der eingesetzten Plasmid DNA sollte bei ca. **500 ng** liegen

- Transformationsansatz **vollständig** zu **100 µl Zellen** hinzugeben und gut vortexen
- Zellen bei **42 °C** für **40 min** mit 400 rpm inkubieren
- Transformationsansatz bei 16000 rpm für 30 s abzentrifugieren und vollständig abnehmen; Zellpellet in **1 mL** YPD_(l) resuspendieren
- Den Ansatz bei **30 °C** und 800 rpm für **2 h** inkubieren
- Je **20 µL** bzw. **200 µL** auf YPD_(s)-Geneticin ausplattieren und bei **30 °C** über **zwei bis drei Tage** inkubieren
- Wenn einzelne Kolonien sichtbar sind: (Pro Konstrukt; 1x ihr Konstrukt, 1x Leervektor) Je **drei** Klone von **einer** Platte picken und in **je 25 µL** YPD_(l) lösen und auf YPD/Gen_(s) vereinzeln (bei **30 °C** **zwei bis drei Tage** inkubieren):



- Die Vereinzlung wiederholen: Einen Klon von jeder Platten aussuchen und wieder austreichen

3.2. Screening von Hefestämmen mittels GFP- Fluoreszenzmessung

Von jeder Vereinzlungsplatte drei Klone; zwei positiv Kontrollen und eine Leervektor Kontrolle (beide bereitgestellt) in je 5 mL Autoinduktionsmedium kultivieren.

- Klone von Vereinzlungsplatten auf eine YPD/Gen_(s) übertragen (Abgabe: **Hefe-Masterplate**); Spitze in das YPD/Gen_(l) Epruvette geben
- Epruvetten bei 240 rpm und 30 °C 20 h inkubieren

Nach der Inkubation:

- **1 mL** der Kultur in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 16000 rpm für 1 min bei RT zentrifugieren; Überstand verwerfen (**2-mal**)
- Das Zellpellet in 1 mL **1x PBS** resuspendieren und erneut zentrifugieren (**2-mal**)

- OD_{600} bestimmen und 1 mL einer Lösung mit $OD_{600} = 3$ herstellen

Mikrotiterplatte (**siehe Ladeschema unten**) befüllen:

- Reihe B, C, E, F und H; Spalte 1-12 mit je **50 μ L** 1x PBS befüllen (Multikanalpipette)
- Reihe A und D; Spalte 1-12: Befüllen mit je **100 μ L** der entsprechenden Zelllösung ($OD_{600} = 3$)
- **50 μ L** aus Reihe A in B pipettieren und durch dreimaliges Auf- und Ab-pipettieren mischen (Vorsicht vor Luftblasen). Wiederholen sie das mit dem Pipettieren von B nach C etc.
- **Die überschüssigen 50 μ L aus Reihe C und F werfen**
- **200 μ L** 1x PBS in jedes befüllte well pipettieren

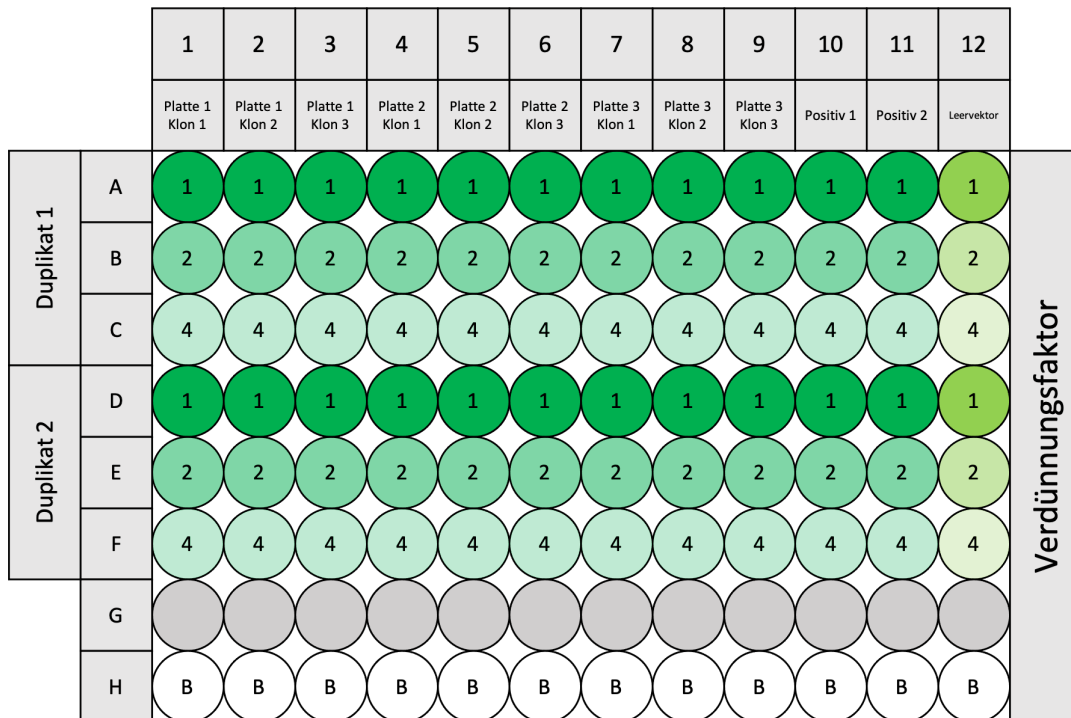


Abbildung 1: Plattenlayout für das Screening der Hefekonstrukte, B = Blank (= 250 μ L 1x PBS)

- Fluoreszenzmessung am **GloMax**
- Daten werden auf **TUWEL** hochgeladen

Auswertung der Daten:

- Messwerte um den gemittelten Blank korrigieren
- Fluoreszenz gegen OD_{600} als Balkendiagramm darstellen; Triplikate gruppieren; Verdünnung berücksichtigen
- Den Klon mit der höchsten Fluoreszenz/ OD_{600} auswählen

4. LDH Proteinexpression und Messung der LDH Aktivität

Kultivierung des ausgewählten Klons und der Kontrolle (Leervektor (=negative Kontrolle) im 50 mL Maßstab.

4.1. Hefeanzucht

Vorkultur:

- Pro Konstrukt 2x 15 mL YPD/Gen_(i) in 100 mL Kolben geben

- Mit einer Impföse Klone picken und vollständig im Medium abwerfen
- Kolben wieder mit der Aluminiumfolie verschließen; bei 30 °C und 240 rpm 16 h inkubieren
- Bestimmung der OD₆₀₀

Hauptkultur:

- Für jedes Konstrukt **50 mL** Gesamtvolumen auf **OD₆₀₀ = 0,2** in einem 250 mL Kolben mit der entsprechenden Menge an YPD/Gen_(i) einstellen
- Die Kolben bei **30 °C** und **240 rpm** für die kommenden Stunden inkubieren
- Jede Stunde eine **500 µL** Probe ziehen und OD₆₀₀ bestimmen (Abgabe: **Wachstumskurve** (OD₆₀₀/t [h]); Verdopplungszeit = $t = \frac{\ln 2}{k}$; k = Steigung der logarithmierten Messwerte im linearen Bereich)

Sobald OD₆₀₀ = 0,5-0,6:

- Die Kulturen auf Eis stellen und 25 ml in ein 50 mL Falcon füllen
- Die Zellen bei **3000 x g** und **4 °C** für **10 min** zentrifugieren; Überstand verwerfen (**Achtung: Hefezellen sind nur lose präzipitiert**)
- Jetzt den Rest der Zellen dazugeben und erneut zentrifugieren
- Die Zellen zweimal mit 10 mL Expressionsmedium waschen, nach jedem Waschschrift die Zellen bei **3000 x g** und **4 °C** für 5 min zentrifugieren
- Die Zellen in je **30 mL** Expressionsmedium resuspendieren
- Die OD₆₀₀ bestimmen und auf **0,5** in **50 mL** Expressionsmedium einstellen

- Die Zellen bei **30 °C** und **240 rpm** für **20 h** inkubieren

4.2. Zellaufschluss und Herstellung eines zellfreien Extraktes

- Die OD₆₀₀ nach 20 h Inkubation bestimmen und die gleiche Zellzahl in **50 mL** Gesamtvolumen mit 0,1 M Tris/HCl pH 6,5 einstellen
- Zentrifugieren sie 25 mL bei **3000 x g** und **4 °C** für **10 min**, die Zellen mit je 10 mL 0,1 M Tris/HCl pH 6,5 waschen, den Überstand verwerfen
- Jetzt den Rest der Zellen dazugeben und erneut zentrifugieren
- Den Zentrifugations und Waschschrift wiederholen
- Das Pellet in **2 mL** 0,1 M Tris/HCl pH 6,5 resuspendieren

- Pro Kultur je zwei Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel mit Glaskugeln (je 200 µL 1 mm. Und 0,1 mm Kugeln mit PCR Gefäß abmessen) befüllen und je 800 µL Kultur hineingeben

- Aufschluss via FastPrep (Benötigt: größere Eisbox):

Geschwindigkeit	4 m/s
Zeit pro Zyklus	10 s
Zyklen	6
Zeit auf Eis zwischen den Zyklen	1 min

- Die Proteinextrakte mit 16000 rpm für 1 min abzentrifugieren und Überstand sorgfältig in ein neues Reaktionsgefäß auf Eis überführen
- Diese Reaktionsgefäße erneut bei 16000 rpm für 1 min zentrifugieren; den Überstand in ein Reaktionsgefäß überführen (Minimierung der Mitnahme von Zellresten und Glaskugeln)
- Die zellfreien Extrakte auf Eis halten oder bei 4 °C lagern

5. Protein Assays

5.1. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im zellfreien Extrakt mittels Bradford-Assay

Frisch herzustellen:

- **300 µL** einer 1:5 Verdünnung der Proteinextrakte mittels 0,1 M Tris/HCl pH 6,5
- **500 µL** einer 1:10 Verdünnung des BSA Standards in 0,1 M Tris/HCl pH 6,5
- **20 mL** einer 1:5 Verdünnung des Bradford-Reagenz in ddH₂O

Mikrotiterplatte befüllen:

- Reihen B-H; mit je **50 µL** Tris pH 6,5 befüllen (Multikanalpipette)
- Reihe A; Je **100 µL** der zellfreien Extrakte bzw. BSA Standards
- Verdünnungen herstellen (wie bei 3.3.)
- **200 µL** der 1:5 verdünnten Bradfordlösung werden mit der Multikanalpipette zu jedem well zugegeben; mit Reihe H beginnen
- Die Platte für 5 min bei RT inkubieren (Farbkomplex ist max. 60 min stabil)
- Messung bei **595 nm** im Plattenleser mittels der Programmvorlage

Auswertung:

- Messwerte um den gemittelten Blank korrigieren
- **Kalibration** im linearen Bereich erstellen (= Kalibrationsbereich): $A_{595 \text{ nm}}$ des BSA Standard/Proteinkonzentration des BSA Standards [mg/mL], **Geradengleichung** ermitteln
- **Proteinkonzentration** [mg/mL] der zellfreien Extrakte ermitteln (Kalibrationsbereich beachten)
- Normieren der zellfreien Extrakte: je Konstrukt zumindest **600 µL** einer **0,4 mg/mL** zellfreien Extraktlösung durch Verdünnung in 0,1 M Tris/HCl **pH 7,5** herstellen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	BSA	BSA	BSA	Probe	Probe	Probe	Probe 5x verdünnt	Probe 5x verdünnt	Probe 5x verdünnt	Leervektor	Leervektor	Leervektor
A	1	1	1	1	1	1	5	5	5	1	1	1
B	2	2	2	2	2	2	10	10	10	2	2	2
C	4	4	4	4	4	4	20	20	20	4	4	4
D	8	8	8	8	8	8	40	40	40	8	8	8
E	16	16	16	16	16	16	80	80	80	16	16	16
F	32	32	32	32	32	32	160	160	160	32	32	32
G	64	64	64	64	64	64	320	320	320	64	64	64
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Verdünnungsfaktor

Abbildung 2: Plattenlayout für die Gesamtproteinbestimmung mittels Bradford Assay, B = Blank (= 50 µL 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 + 200 µL 1:5 Bradford Reagenz); unter Probe das unverdünnte Proteinextrakt einsetzen

5.2. Bestimmung der Fluoreszenz im zellfreien Extrakt

Mikrotiterplatte befüllen:

- Reihe B-H; Spalte 1-8 mit je **50 µL** 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 befüllen
- Reihe A; Spalte 1-8: Je **100 µL** Proteinextrakte [0,4 mg/mL]
- Verdünnungen bis Reihe **G**; H enthält Blank
- **200 µL** 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 zu jedem well hinzugeben
- Fluoreszenzmessung am **GloMax**
- Die Daten werden auf **TUWEL** hochgeladen

Auswertung:

- Messwerte um den gemittelten Blank korrigieren
- Fluoreszenz gegen Proteinmenge [µg] auftragen; Duplikate gruppieren

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Probe	Probe	Probe	Probe 5x verdünnt	Probe 5x verdünnt	Probe 5x verdünnt	Leervektor	Leervektor	Leervektor	Blank	Blank	Blank
A	1	1	1	5	5	5	1	1	1	B	B	B
B	2	2	2	10	10	10	2	2	2	B	B	B
C	4	4	4	20	20	20	4	4	4	B	B	B
D	8	8	8	40	40	40	8	8	8	B	B	B
E	16	16	16	80	80	80	16	16	16	B	B	B
F	32	32	32	160	160	160	32	32	32	B	B	B
G	64	64	64	320	320	320	64	64	64	B	B	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Verdünnungsfaktor

Abbildung 3: Plattenlayout für die Bestimmung der Fluoreszenz und der LDH-Aktivität der zellfreien Extrakte, B = Blank (= 250 µL 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 (Fluoreszenz), = 50 µL 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 + 200 µL Reaktionspuffer (LDH-Aktivitäts Assay))

5.3. Bestimmung der LDH-Aktivität

Reaktionspuffer frisch herstellen und auf Eis halten:

- **2,5 mL** 10x Pyruvat (3,6 mM in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5)
- **2,5 mL** 10x NADH (3,4 mM in 0,1 M Tris/HCl pH 7,5)
- **15 mL** 0,1 M Tris/HCl pH 7,5

Mikrotiterplatte befüllen (Layout siehe 5.2.):

- Reihe B-H; Spalte 1-8 mit je **50 µL** Tris pH 7,5 befüllen
- Reihe A; Spalte 1-8: **100 µL** der entsprechenden Proteinextrakte (Konzentration = 0,4 mg/mL = 40 µg Protein)
- Wie unter 3.3. verdünnen
- **Erst am Spektrophotometer: 200 µL** des Reaktionspuffers werden mit der Multikanalpipette zu jedem well zugegeben. Beginnen sie mit Reihe G.
- Im Reader **sofort** die Absorption bei **340 nm** über 10 Minuten alle 10 s aufzeichnen
- Die Daten werden auf **TUWEL** hochgeladen

Datenverarbeitung und Auswertung

- Absorptionsabnahme/t [min] und auf den linearen Bereich einschränken
- Den Absolutwert der Steigung ($|k|$) der Geraden bestimmen und die LDH Aktivität nach der Formel (1) berechnen:

$$\text{LDH}[\text{U mL}^{-1}] = \frac{k[\text{min}^{-1}]}{\epsilon_{\text{NADH}}[\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}] \cdot D[\text{cm}]} \cdot 1000 \quad (1)$$

U = Enzymaktivität [$\mu\text{mol min}^{-1}$]

k = Absolutwert der Steigung

D = Schichtdicke der Kuvette/der 96-well Platte (Berechnen sie diese aus dem Blank)

ϵ_{NADH} = Molarer Extinktionskoeffizient, 6230 [$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$], von NADH bei 340 nm

- Bestimmen sie die Aktivität der LDH in [U mL^{-1}]
- Bestimmen sie die Aktivität der LDH in [U mg^{-1}]

6. Abgabe

PDF der Ergebnisse; Bilder/Tabellen/Graphen mit Beschriftung/Legenden/kurze Beschreibung und Diskussion. **Keine Methodenbeschreibung oder theoretische Einleitung!**

- 2. Klonierung
 - Gelbild: Plasmidverdau
 - Tabelle: Konzentration und $A_{260/280}$; $A_{260/230}$
- 3.2. Screening
 - Tabelle und Graph: Fluoreszenz der Hefekonstrukte
- 4.1. Wachstumskurve der Hefeanzucht
 - Graph: Wachstumskurve
 - Berechnung der Generationszeit
- 5. Analyse der zellfreien Extrakte
 - 5.1. Tabelle: Bradford Gesamtproteinbestimmung
 - 5.2. Tabelle und Graph: Fluoreszenz
 - 5.3. Tabelle und Graph: LDH-Aktivität

Die Excel Datei mit den Rohdaten und Kalkulationen

An den Betreuer abzugeben:

- Masterplatte Bakterien und Hefen