

Gentechnische Standardmethoden zum Kurs WS 2020/21

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Plasmid-DNA-Präparation aus <i>E. coli</i> (Birnboim-Doly-Lyse)	2
2. Plasmid-Minipräparation über Säulchen (NucleoSpin Plasmid EasyPure, MN)	3
3. Maxipräparation von Plasmiden mit Qiagen-Säulen	4
4. Isolation chromosomaler DNA aus Bakterien als PCR Template	5
5. Isolation chromosomaler DNA aus Pflanzen als PCR-Template	5
6. Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis</i> als PCR-Template (CTAB)	5
7. Phenol-Chloroformbehandlung von DNA	6
8. Fällung von DNA aus wässriger Lösung	6
9. Erhaltung von Bakterien bei -80°C	6
10. DNA-Gelelektrophorese	7
11. DNA/RNA Konzentrationsbestimmung	7
12. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	7
13. Restriktion von DNA	8
14. DNA-Fragmentisolation mit DNA Gel Extraktionskit NEB	9
15. Phosphatasebehandlung von DNA	9
16. DNA-Ligation (T4-DNA-Ligase)	10
17. DNA-Fragmentherstellung durch PCR	11
18. Überprüfung rekombinanter Klone mit Hilfe der PCR	12
19. Klonierung von PCR-Fragmenten in pGEM-T (Promega)	13
20. RNA-Isolation aus Pflanzen	13
21. RNA Trennung unter denaturierenden Bedingungen im Agarosegel	14
22. cDNA-Synthese	15
23. Proteinüberexpression in <i>E. coli</i> (pBAD-His-System; Invitrogen)	15
24. Herstellung von "blunt ends" mit Mung Bean Nuclease	18
25. Herstellung von "blunt ends" mit Klenow Enzyme	18
DNA-Größenstandards	19
Protein-Größenstandards	20

*Die Sammlung enthält Laborvorschriften, die nach den verschiedensten Originalquellen (z. B. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press Cold Spring Harbour, N.Y.) oder Originalvorschriften der Hersteller zusammengestellt wurden.

1. Plasmid-Minipräparation aus *E. coli*

modifiziert nach: Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523

1. 3,5 ml Selektionsmedium (LB oder NBY mit entsprechenden Antibiotika, z.B. 50 µg/ml Ampicillin, 12,5 µg/ml Tetracyclin o.ä.) mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpfen
2. über Nacht bei 37°C kräftig schütteln
3. etwa 1,5 ml der Bakterienkultur in Eppendorfbecher überführen (Rest der Bakterienkultur bei 4°C aufbewahren, etwa 1 Woche zur Wiederanzucht verwendbar)
4. 2 min abzentrifugieren
5. Überstand möglichst vollständig entfernen, Schritte 3 und 4 einmal wiederholen, Überstand abgießen, Rest absaugen, Pellet durch Vortex auflockern
6. Pellet in 100 µl Lsg. 1 schnell und vollständig resuspendieren (kräftig vortexen)
7. 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
8. + 200 µl Lsg. 2 (vorsichtig mischen) und 5 min im Eisbad inkubieren (Bakterienlyse)
9. 150 µl Lsg. 3 zugeben (durch invertieren mischen) und 5 min im Eisbad inkubieren (Renaturierung von Plasmiden, Fällung von hochmolekularer DNA, Proteinen und SDS)
10. 5 min zentrifugieren
11. Überstand in neues Röhrchen überführen, mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzen (5 min auf Eis lagern, gelegentlich schütteln)
12. 5 min zentrifugieren
13. obere, wässrige Phase durch Absaugen in neues Röhrchen überführen, mit gleichem Volumen Chloroform versetzen und durch kräftiges Schütteln mischen
14. 5 min zentrifugieren
15. obere, wässrige Phase durch Absaugen in neues Röhrchen überführen, Fällung der DNA durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol (ca. 1 ml), mischen
16. 15 min bei Raumtemperatur inkubieren, 5 min zentrifugieren
17. Überstand abgießen, Röhrchen abtropfen lassen
18. 0,5 ml 80 % Ethanol vorsichtig zugeben, kurz spülen, erneut zentrifugieren und Überstand abgießen, Rest absaugen
19. Pellet trocknen, 15 min im Exsikkator unter Vakuum
20. 50 µl Lösung 4 zugeben, kräftig schütteln, 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
21. Restriktion (5 µl) möglich, Kontrolle durch Agarosegelelektrophorese

Lösung 1:	50 mM Glucose	4,5 ml 20 % Glucose
	25 mM Tris/HCl (pH 8)	2,5 ml 1 M Tris/HCl (pH 8)
	15 mM EDTA	2,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8)
		91,0 ml A. bidest.
	4 mg/ml Lysozym (frisch zugeben)	

Lösung 2:	0,2 N NaOH	2,0 ml 10 N NaOH
	1 % SDS	10 ml 10 % SDS
		88 ml A. bidest.

Lösung 3: 3 M K/5 M Acetat (pH 4,8)

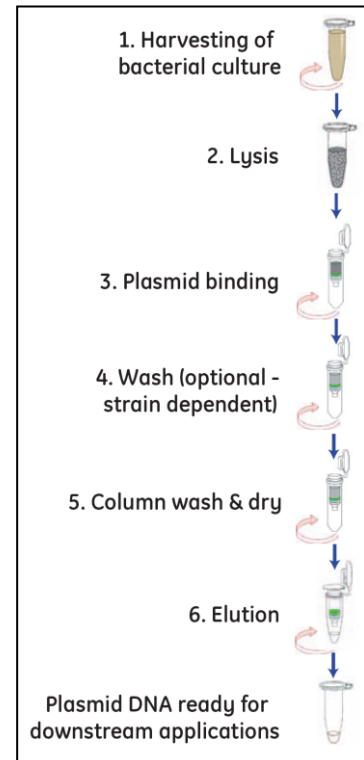
Lösung 4: 20 µg/ml RNase (DNase-frei) in TE-Puffer
(RNase-Stammlösung, 10 mg/ml, 5 min kochen)

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8)
1 mM EDTA

2. Plasmid-Minipräparation mit dem „NucleoSpin Plasmid EasyPure Kit“ (MN)

Vor Verwendung des Kits sicherstellen: Waschpuffer mit 4 ml Ethanol (HPLC-Grade) auffüllen!

1. Kultivierung des Stammes siehe Methode 1
2. 2-mal nacheinander 1,5 ml Bakterien abzentrifugieren (2 min 8,000 U/min), Überstand verwerfen
3. Pellet vollständig in 150 µl Puffer A1 resuspendieren
4. 250 µl Puffer A2 zusetzen und mischen (5-mal invertieren, nicht vortexen!!!, 2 min inkubieren)
5. 350 µl Puffer A3 zusetzen und mischen/invertieren, bis das Lysat farblos ist
6. 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugieren (12,500 U/min)
7. Pro Isolation eine Säule vorbereiten (Säule in 2 ml collecting tube)
8. Überstand auf ein Sälchen geben (ohne Präzipitat!); 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
9. 30 sec bei 1,000-2,000 U/min zentrifugieren; Durchfluss verwerfen
10. 450 µl Puffer AQ auf die Säule geben und für 60 sec bei 12,500 U/min zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
11. die Säule einmal leer zentrifugieren, um die Säule zu trocknen.
12. die Säule auf ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (entsprechend beschriftet) überführen und 50 µl Elutionspuffer AE direkt auf die Glasfitermatrix geben und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
13. 1 min bei 12.500 U/min zentrifugieren; Eluat (Durchfluss) im Eppi auffangen und aufheben!!!
14. Ausbeute (laut Hersteller): ca. 6-9 µg Plasmid-DNA; DNA für Sequenzierung oder Restriktionsanalyse verwendbar



3. Maxipräparation von Plasmiden über Qiagen-Säulen (TIP-100)

Ausgangspunkt 20 ml bei „high copy“ bzw. 50 ml *E. coli*-Kultur bei „low copy“ Plasmiden (Kultivierung erfolgte in LB mit entsprechendem Antibiotikazusatz über Nacht unter Schütteln aus einer Vorkultur, die 1 : 100 verdünnt wurde). Prinzipiell wie Mini-Prep (2.a.); Maxi-Prep wird eingesetzt, wenn größere Mengen DNA benötigt werden.

1. Bakterien abzentrifugieren (z.B. 5 min SLA-600TC-Rotor; Sorvall, 50 ml Röhrchen, 5000 U/min), Überstand abgießen und Restmedium absaugen, Pellet durch vortexen lösen
2. Bakterien bei Raumtemperatur in 4 ml Lösung P1 suspendieren
3. 4 ml Lösung P2 zusetzen, vorsichtig mischen, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
4. 4 ml Lösung P3 zusetzen, schnell aber vorsichtig mischen, 5 min auf Eis stellen
5. 15 min bei 4°C, bei 9.000 U/min im SLA-600TC-Rotor zentrifugieren
6. klaren Überstand (wenn nicht vollständig klar, noch einmal zentrifugieren) auf equilibrierte Qiagen-Säule geben
7. Equilibrieren der Säule: 4 ml Puffer QBT durch Säule tropfen lassen
8. wenn der Überstand von der Zentrifugation durchgetropft ist, wird die Säule zweimal mit je 5 ml Puffer QC gewaschen, Waschlösung verwerfen
9. DNA von der Säule mit 5 ml Puffer QF in steriles Zentrifugenglas (20 ml) eluieren
10. DNA durch Zugabe von 11 ml Ethanol bei RT für mind. 1 h fällen
11. DNA 30 min abzentrifugieren, Lage des Pellet markieren, Überstand verwerfen
12. Pellet vorsichtig mit 5 ml 80 % Ethanol waschen, erneut 5 min zentrifugieren
13. Pellet trocknen, 15 min im Vakuum
14. Pellet in 0,3 ml TE-Puffer lösen
15. Kontrollrestriktion und -elektrophorese

Lösungen:

- P1:** 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase
- P2:** 200 mM NaOH
1 % SDS
- P3:** 2,55 M K-Acetat, pH 4,8
- QBT:** 750 mM NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Ethanol
- QC:** 1 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Ethanol
- QF:** 1,2 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % Ethanol

4. Isolation chromosomaler DNA aus Bakterien als PCR-Template

Zum Einsatz als PCR-Template ist es nicht notwendig, große Mengen sauberer DNA zu haben. Vereinfacht kann die DNA wie folgt angereinigt werden:

aus Flüssigkultur

- 200 µl Flüssigkultur
- + 200 µl Phenol (Tris-gepuffert)
- 10 min bei 65°C im Heizblock, zwischendurch mixen
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- + 200 µl Chloroform, gut mixen
- zentrifugieren, 5 min, 13.000 U/min
- Überstand mit 200 µl Chloroform waschen
- 1 µl des Überstandes zur PCR einsetzen

aus Kolonien:

Kolonie mit Zahnstocher abnehmen, auf Masterplatte tippen und dann in Eppendorfgefäß mit 30 µl 1 x TE resuspendieren,
5-10 min bei 95°C kochen, 1 µl direkt zur PCR einsetzen

5. Isolation chromosomaler DNA aus Pflanzen als PCR-Template

- Ca. 1 cm² Blattmaterial (junge Blätter) abschneiden und in Eppi geben
- 100 µl Aufschlusspuffer (0,25 % SDS; 0,05 M NaOH) auf Eis hinzugeben
- Blattmaterial mit Eppimörser im Eppi zermörsern
(Mörser nach EtOH-Abspülung wieder verwendbar)
- 50 µl Phenol (Tris-gepuffert) zusetzen
- 10 min bei 95°C im Heizblock, mehrmals vortexen
- Eppi auf Eis
- 50 µl Chloroform zusetzen, gut vortexen
- 5 min abzentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppi überführen und mit 100 µl Chloroform ausschütteln
- Überstand abnehmen und aufbewahren
- 5 µl Überstand + 45 µl H₂O (15 µl zur Gelkontrolle)
- 0,5 - 1 µl der Verdünnung als Template zur PCR

6. Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis* als PCR-Template

- Pflanzenmaterial (Keimlinge oder Blattstücke) im Eppi unter flüssigem Stickstoff vorkühlen und mit Eppimörser zermörsern
- Zermörsertes Material kurz auftauen lassen
- 500 µl 2 x CTAB-Puffer hinzugeben und vortexen
- 30 min bei 68°C im Heizblock inkubieren, mehrfach zwischendurch mischen
- 5 µl RNase A-Lösung hinzugeben und 15 min bei 37°C inkubieren
- 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (CI) hinzugeben, 1 min durch Schütteln mischen
- 5 min abzentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit
- Obere wässrige Phase in ein frisches Eppi überführen
- 400 µl Isopropanol hinzugeben, mischen und 15 min auf Eis fallen
- 15 min abzentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit
- Überstand verwerfen und Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol überschichten
- 10 min abzentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit
- Überstand vollständig abpipettieren und Pellet ca. 10 min trocknen lassen
- Pellet in 50 µl 10 mM Tris (pH 8) lösen
- 2 min Inkubation bei 68°C
- 5 µl zur Gelkontrolle entnehmen und Rest aufbewahren

Lösungen

2 x CTAB:	2	%	Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
	1,4	M	NaCl
	100	mM	Tris-HCl (pH 8)
	20	mM	EDTA
CI	24	VT	Chloroform
	1	VT	Isoamylalkohol

7. Phenol-Chloroformbehandlung von DNA

Zur Entfernung von Proteinen oder Inaktivierung von Enzymen einer DNA-haltigen wässrigen Lösung, z.B. nach Restriktion, Phosphatase- oder Nuclease-Behandlung.

Zur Behandlung mind. 200 µl einsetzen, evtl. mit 1 x TE auf 200 µl auffüllen. Alle Schritte möglichst auf Eis durchführen.

- zu der wässrigen Lösung 200 µl Phenol/Chloroform (1:1) geben, mehrmals kräftig schütteln.
- 5 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
- wässrigen Überstand abnehmen und in ein neues Gefäß überführen
- erneut 200 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugeben und mehrmals kräftig schütteln.
- 5 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
- wässrigen Überstand abnehmen und in ein neues Gefäß überführen
- 200 µl Chloroform zugeben und mehrmals kräftig schütteln, um Phenolreste zu entfernen
- 5 min bei 14.000 U/min zentrifugieren
- Überstand absaugen

8. Fällung von DNA aus wässriger Lösung

DNA fällt in ethanolischer Lösung (> 60 %) aus. Der Niederschlag kann abzentrifugiert werden und in neuem Puffer resuspendiert werden. Damit kann DNA konzentriert und gleichzeitig umpuffert werden.

- der DNA-Lösung 0,5 µl Glycogen (fällt in ethanolischer Lösung ebenfalls aus und reißt DNA mit) und 2 Volumen Ethanol (96 %) zusetzen
- wenn kein Glycogen vorhanden ist, 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat und 2 Vol. Ethanol zusetzen
- mind. 1 h bei -20°C fällen (bei RT länger inkubieren)
- 15 min bei 13.000 U/min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Pellet mit 500 µl 80 % (4°C) Ethanol waschen
- 5 min bei 14.000 U/min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Pellet für 15 min lufttrocknen oder 5 min in einer Vakuumzentrifuge (Speed-Vac) trocknen
- DNA in H₂O oder 1 x TE resuspendieren und weiter verwenden.

9. Erhaltung von Bakterien bei -80°C

Zur Konservierung von *E. coli* Kulturen können diese in Glycerol-haltigem Medium eingefroren werden. Dazu werden zu 500 µl einer Flüssigkultur in LB-Medium 100 µl Glycerol (87 %) gegeben, dann gut mischen und bei -20°C (besser -80°C) einfrieren.

Agrobakterien (rekombinante Stämme von *A. tumefaciens*) können ebenfalls bei -80°C konserviert werden: 0,5 ml Kultur + 0,5 ml „Freezing-medium“; gut mischen und einfrieren.

„Freezing medium“:

6,3 g K₂HPO₄; 0,45 g Na-Citrat; 0,09 g MgSO₄ x 7H₂O; 50 ml Glycerol; mit H₂O auf 500 ml auffüllen.

10. DNA-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente werden 0,8 - 2%-ige Agarosegele hergestellt. Agarose in 0,5 x TBE-Puffer im Erlenmeyer-Kolben (mit Rührfisch) solange aufkochen, bis die gesamte Agarose gelöst ist. Anschließend auf dem Magnetrührer auskühlen lassen. Der handwarmen Agaroselösung 1/10.000-stel Volumen Ethidiumbromid zusetzen (giftig!!). Gel in entsprechend vorbereiteten Träger ca. 0,5 - 0,8 cm dick gießen und erkalten lassen. Nach ca. einer Stunde kann der Kamm vorsichtig aus dem verfestigten Gel gezogen werden.

Das Gel mit dem Träger in die Elektrophoresekammer legen. DNA wandert von (-, schwarz) nach (+, rot), also müssen die Geltaschen auf der Seite sein, wo der (-)-Pol angelegt wird.

Gel anschließend mit 0,5 x TBE-Puffer 2-3 mm überschichten.

Proben mit 1/5 Vol. einer 5fach konzentrierten Stopplösung versetzen, in die Taschen einfüllen und Spannung anlegen.

Richtwert für die maximale Spannung: 5 V/cm [Elektrodenabstand (cm)* 5 (V)].

Bei höheren Spannungen besteht die Gefahr der Überhitzung des Gels und damit der Beschädigung der DNA.

Gel abschalten, wenn die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Gels erreicht hat.

DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar machen und Gel fotografieren.

Gelreste und Puffer (kann mehrfach verwendet werden) sammeln, da diese Ethidiumbromid-haltig und damit Sondermüll sind. Puffer werden über Aktivkohle filtriert, Gele müssen gesondert entsorgt werden.

Lösungen:

Ethidiumbromid (giftig !!!): 10 mg/ml in TE, dunkel bei 4°C lagern

5 X TBE-Puffer: 54 g Tris
27,5 g Borsäure
20 ml EDTA (0,5 M pH 8,0)
mit H₂O auf 1 l auffüllen

5 x Stopplösung:

0,1 M EDTA
40 % Glycerol
0,1 % SDS
0,025 % BPP
(Bromphenolblau)

11. DNA/RNA Konzentrationsbestimmung

- 2-10 µl DNA (oder RNA) werden z.B. mit 600 µl H₂O verdünnt (5 µl RNA + 495 µl H₂O)

- Aufnahme eines Absorptionsspektrums von 300 bis 200 nm (gegen H₂O) in einer Quarzglasküvette!!

- Absorption des Peaks um 260 nm bestimmen

- 260 nm Peak sollte mind. 1,8mal größer sein, als die Absorption bei 280 nm, sonst zu hohe Proteinverunreinigungen

- Berechnung der Konzentration:

DNA/RNA-Konzentration (µg/ml) = A₂₆₀ x molaren Extinktionskoeffizienten x Verdünnung

molarer Extinktionskoeffizient für DNA = 50 µg/ml

molarer Extinktionskoeffizient für RNA = 40 µg/ml

12. Transformation von *E. coli*

12. a. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

(modifiziert nach: Hanahan, D., 1983, J. Mol. Biol 166, 557)

Kultivierung des Rezipientenstammes:

- Beimpfen von 3 ml φ-broth-Medium mit einer Einzelkolonie des Rezipientenstammes
- Inkubation über Nacht, schütteln bei 37°C
- mit 1 ml Übernachtskultur 100 ml φ-broth-Medium beimpfen.
- Inkubation: schütteln bei 37°C bis OD₅₅₀ = 0,48 erreicht ist

Erzeugen kompetenter Zellen:

- Zellen 10 min auf Eis lagern
- Zellen bei 4°C und 3000 U/min für 5 min abzentrifugieren
- Überstand gut entfernen, Zellpellet ab jetzt immer im Eisbad lagern
- Zellpellet in 30 ml eiskaltem TJB 1 resuspendieren, Suspension 5 min auf Eis lagern
- Zellen bei 4°C und 3000 U/min für 5 min abzentrifugieren und Überstand gut entfernen
- Zellpellet in 4 ml eiskaltem TJB 2 resuspendieren
- 100 µl Aliquots der Zellsuspension in Eppendorfröhrchen überführen, schnell bei -80°C einfrieren (Hinweis: zum Schockgefrieren die leeren Eppendorfröhrchen schon mindestens 1 Tag im -80°C Schrank lagern, Zellsuspension gefriert dann bereits beim Einfüllen)

12. b. Transformation von *E. coli*

- DNA zu 100 µl kompetenten Zellen (Eisbad!) geben, vorsichtig durchmischen
- mindestens 15 min auf Eis lagern
- 90 s bei 42°C inkubieren, vorsichtig bewegen
- 5 min auf Eis inkubieren
- 1 ml LB-Medium + 0,2% Glucose (oder SOC) zugeben und zur Regeneration 1 h bei 37°C schütteln
- ausplattieren von Aliquots der Zellen auf Selektionsplatten

Medien und Puffer:

φ-broth: für 500 ml	2 % Trypton	10 g	-80°C Bad:		
	0,5 % Hefeextrakt	2,5 g	Trockeneis + Ethanol		
	0,4 % MgSO ₄	2,0 g			
	10 mM KCl	0,37 g			
TJB 1: für 250 ml	100 mM RbCl	3,0 g	TJB 2: für 100 ml	10 mM MOPS	0,20 g
	50 mM MnCl ₂ ·4 H ₂ O	2,47 g		10 mM RbCl	0,12 g
	30 mM K-Acetat	0,74 g		75 mM CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,10 g
	10 mM CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,36 g		15 % Glycerol	15 ml
	15 % Glycerol	37,5 ml	pH 7,0 (mit NaOH), sterilfiltrieren, Lagerung bei + 4°C		
pH 5,8 (mit HCl), sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C					

13. Restriktion von DNA

1. Möglichst in H₂O gelöste DNA-Präparate verwenden.

x	µl	DNA (ca. 1-2 µg)
2	µl	10 x Restriktionspuffer ^{*1}
0,5	µl	Restriktionsenzym ^{*2}
x	µl	H ₂ O (steril)
20	µl	(Gesamtvolumen)

^{*1} Aus Katalog für Restriktionsenzym entsprechenden Puffer herausuchen

^{*2} für 1 µg DNA reichen 1-2 Units Restriktionsenzym

2. Ansatz mischen, kurz anzentrifugieren
3. mindestens 1 h bei 37°C inkubieren
4. Reaktionsabbruch für 10 min bei 65°C (!! nicht alle Enzyme sind bei 65°C inaktivierbar !!, diese Enzyme können durch Phenol/Chloroform-Behandlung inaktiviert werden oder Enzymfernung durch Gelelektrophorese und anschließende Elution)
5. Zusatz von 5 µl 5 x Stopplösung
6. Agarosegelelektrophorese (vgl. Methode 8.)

5 x Stopplösung: 0,1 M EDTA
40 % Glycerol
0,1 % SDS
0,025 % Bromphenolblau

14. DNA-Fragmentisolierung mit Gelextraktionskit (MN)

- 1.) DNA-Fragment aus dem Agarosegel ausschneiden, überschüssige (DNA-freie) Agarose entfernen, Gelstücke in 1,5 ml Eppi geben und auswiegen, nur kurz UV belichten!
- 2.) Zugabe von *gel dissolving buffer* (NTI) zum Gelstück (200 µl Puffer per 100 mg Agarose).
- 3.) Probe zwischen 37-55°C (Standard 50°C) inkubieren, ab und zu Mischen durch Vortex bis das Gelstück aufgelöst ist (5-10 min). Für große DNA Fragmente > 8kb, zusätzlich 1.5 Volume A. dest. nach Gelauflösung zusetzen. Um die DNA Bindung an die Säule zu verbessern (z.B. 100 µl Gel; 400 µl *gel dissolving buffer*; 150 µl Wasser).
- 4.) Säulchen in das Sammelgefäß stecken und Probe aufladen. Zentrifugation für 1 min (11000 g), Durchfluss verwerfen
- 5.) Dann 700 µl DNA Wash Buffer (NT3) auf die Säule geben. Zentrifugation für 1 min, Durchfluss verwerfen
- 6.) Schritt 5 einmal wiederholen.
- 7.) Säulchen trocknen, 1 min bei 11000 g zentrifugieren
- 8.) Säulchen auf steriles 1,5 ml Eppi stellen, Säulchen darf nicht mit dem Puffer in Berührung gekommen sein, im Zweifel kurz zentrifugieren und neues Eppi unterstellen
- 9.) Zugabe von 15-30 µl of DNA Elution Buffer (NE) auf das Zentrum der Säulenmatrix. 1 min inkubieren und dann DNA durch 1 min Zentrifugation eluieren (1 min bei 11000 g zentrifugieren). (Typische Elutionsvolumen sind 6-20 µl, Nuklease-freies Wasser (pH 7-8.5) kann auch benutzt werden, größere Volumen verbessern die Ausbeute aber verdünnen die DNA, erwärmen des Puffers auf 50°C verbessert die Elution)

15. Phosphatasebehandlung von DNA

Zur Dephosphorylierung der 5'-Phosphat-Enden von DNA vor Markierungsreaktionen oder zur Verhinderung der Selbstligation von Vektoren wird alkalische Phosphatase eingesetzt, die speziell gereinigt ist. Von besonderer Wichtigkeit ist eine zuverlässige Inaktivierung der Phosphatase, um nachfolgende Reaktionen zu ermöglichen.

1. Reaktionspuffer:

- 10 x Phosphatasepuffer (Boehringer-Katalog, 500 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) alternativ kann auch der Puffer NEB3 eingesetzt werden.

2. Reaktionsansatz:

- 1 U Phosphatase für 1 µg DNA (es genügen 0,1 U pro µg DNA)

Die Phosphatase kann direkt in den Restriktionsansatz gegeben werden.

Beispiel: 50 µl Restriktionsansatz (2 µg DNA)

1 µl Enzym (1 Unit)

11 µl 10 x Puffer

110 µl Gesamtvolumen

- Reaktion für 30 min bei 37°C inkubieren

3. Reaktionsstopp:

- + 100 µl TE-Puffer, + 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0, 10 min bei 70°C inkubieren
- zweimal Phenol/Chloroform-Behandlung des Ansatzes zur Entfernung und Inaktivierung der Phosphatase, einmal Chloroformbehandlung
- Fällung mit Ethanol (+ 20 µl 3 M Na-Acetat, + 500 µl Ethanol 96%), DNA abzentrifugieren
- einmal mit 0,5 ml 80 %-igem Ethanol waschen, erneut zentrifugieren
- getrocknetes Pellet in 20 µl TE-Puffer resuspendieren

Alternativ kann auch die hitzeinaktivierbare Antarktische Phosphatase (NEB) verwendet werden.

Reaktionsansatz:

- x µl Elution oder Restriktionsansatz
- x µl 10x Reaktionspuffer
- 1 µl Antarktische Phosphatase (5 units)

Inkubation.

30 min bei 37 °C

Inaktivierung:

5 min bei 65 °C

10x Reaktionspuffer:

- 500 mM Bis-Tris-Propan-HCl
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM ZnCl₂
- pH 6,0

16. DNA-Ligation (T4 DNA Ligase)

Ligation von durch Agarosegel-Elektrophorese abgetrennten DNA-Fragmenten mit einem entsprechend vorbereiteten Vektor (kompatible Enden!). Verwendet wird die T4 DNA Ligase von Fermentas!

- Reaktionsansatz:

- 2 µl 10x Ligationspuffer
- 1 µl Ligase (5 Weiss Units)
- x µl Insert-DNA
- x µl Vektor-DNA
- x µl H₂O

20 µl Gesamtvolumen

- Inkubation:

sticky ends: 1 – 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Ligator in der Kühlzelle
blunt ends: über Nacht auf der Fensterbank (16 °C)

- Inaktivierung:

10 min bei 65 °C inkubieren

- Tipps:

Möglichst kleines Volumen der eluierten Fragmente wählen.

1:1 bis 3:1 molares Verhältnis von Insert-DNA zur Vektor-DNA verwenden

Die Effizienz von blunt end Ligationen wird durch Polyethylenglycol (PEG) erhöht. Die empfohlene Konzentration beträgt 5% (w/v) PEG 4000, d.h. 2 µl PEG 4000 (50 %-Stammlsg.) für einen 20-µl-Ligationsansatz verwenden!

Ligase wirkt selbst-inhibierend, wenn sie in zu hohen Konzentrationen verwendet wird.

Empfohlene Mengen:

- sticky ends: 1 – 2 Weiss units
- blunt ends: 5 Weiss units

10x Ligationspuffer:

400 mM Tris-HCl
100 mM MgCl₂
100 mM DTT
5 mM ATP
pH 7,8

17. DNA-Fragmentherstellung durch PCR

Standard PCR-Ansatz: in dünnwandigem 0,2 ml bzw. 0,5 ml Eppendorfgefäß pipettieren:

	Konz. Stammlsg.	Endkonz. im Ansatz
13 µl H ₂ O.		
2 µl Polymerasepuffer	(10 x)	1 x
1 µl dNTP-Gemisch	(20 x)	200 µM pro Nucleotid
0,6 - 0,8 µl MgCl ₂	(50 mM)	1,5 - 2 mM
1 µl forward-Primer	(5 pmol/µl = 5 µM)	0,1 - 0,5 µM
1 µl reverse-Primer	(5 pmol/µl = 5 µM)	0,1 - 0,5 µM
0,2 µl Taq-Polymerase	(5 U/µl)	1 U
1 µl Template: Plasmide 1:500; chromosomale DNA 1:50; DNA aus Methoden 5 bzw. 17.		

Alternativ kann zur PCR der „Taq-Master-Mix“ der Firma „Qiagen“ eingesetzt werden. Dieser enthält bereits den notwendigen Puffer, die geeignete Mg²⁺-Konzentration von 1,5 mM, die dNTPs und die Taq-Polymerase.

Reaktionsansatz:

1 µl Template
1 µl Primer A
1 µl Primer B
2 µl H₂O
5 µl Mastermix

10 µl Gesamtvolumen

Das verwendete PCR-Programm richtet sich nach der Größe der erwarteten Fragmente. Daneben ist die konkrete Programmierung vom Typ des Thermocyclers und von anderen Reaktionsbedingungen (z.B. Mg²⁺-Gehalt des Puffers) abhängig!!

Bedienung des Biometra-Personal Cyclers:

Anschalten des Gerätes, warten auf Hauptmenü.

Zum Start eines Programms: Taste B („Block“) drücken.

Dann „Start Programm Nr.“; Nr. des gewünschten Programms eingeben und Enter drücken.

Zum Beenden: Erneut Taste B („Block“) drücken, dann Taste D („Stop“) drücken,

Im Display steht: „Block aus“, Gerät kann jetzt ausgeschaltet werden.

Im Hauptmenü kann mit B „Block“ oder C „Programme“ bei „Liste“ alle Programme angesehen werden.

Mit „C“- „Programme“ kann man ein Programm aufrufen und unter „ändern“ sich die einzelnen Schritte ansehen.

Beispiele für PCR Programme (Biometra Personal Cycler):

Programm 4 (1,5 kb-Fragmente):

- | | | | |
|----|--------|---------|--------|
| 1. | 2 min | 94°C | |
| 2. | 15 sec | 94°C |] 10 x |
| 3. | 30 sec | 52°C | |
| 4. | 1 min | 72°C | |
| 5. | 15 sec | 94°C |] 20 x |
| 6. | 30 sec | 52°C | |
| 7. | 1 min | 72°C *1 | |
| 8. | 7 min | 72°C | |
| 9. | Pause | 4°C | |
- (*1 + 20 sec pro Zyklus)

Programm 5 (3,0 kb-Fragmente):

- | | | | |
|----|--------|---------|--------|
| 1. | 2 min | 94°C | |
| 2. | 15 sec | 94°C |] 10 x |
| 3. | 30 sec | 52°C | |
| 4. | 2 min | 72°C | |
| 5. | 15 sec | 94°C |] 20 x |
| 6. | 30 sec | 52°C | |
| 7. | 2 min | 72°C *1 | |
| 8. | 7 min | 72°C | |
| 9. | Pause | 4°C | |
- (*1 + 20 sec pro Zyklus)

Heizdeckeltemperatur: 110°C

Heizdeckeltemperatur: 110°C

Sollen größere Fragmente amplifiziert werden (> 3,0 kb), kann der Elongase-Enzymmix (Invitrogen) eingesetzt werden. Dieser enthält neben der Standard-*Taq*-Polymerase eine weitere DNA-Polymerase aus *Pyrococcus* sp. mit „proof-reading-activity“. Mit diesem sind Amplifizierungen von Fragmenten > 12 kb möglich.

Reaktionsansatz:

- 2 µl Puffer A
- 2 µl Puffer B
- 2 µl 2 mM dNTP-Mix
- 1 µl Primer A
- 1 µl Primer B
- 0,3 µl Elongase-Mix
- 1 µl DNA-Template

20 µl Gesamtvolumen

Programmablauf: Programm 10

- | | | | |
|----|--------|----------|-------|
| 1. | 2 min | 94°C | |
| 2. | 15 sec | 94°C |] 10x |
| 3. | 30 sec | 52°C | |
| 4. | 6 min | 68°C*1 | |
| 5. | 15 sec | 94°C |] 20x |
| 6. | 30 sec | 52°C | |
| 7. | 6 min | 68°C*1*2 | |
| 8. | 12 min | 68°C | |
| 9. | Ende | 4°C | |

*1genaue Zeit hängt von der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes ab, Richtwert: ca. 1 kb pro Minute

*2pro Cyclus wird die Elongationszeit um 20 sec verlängert

18. Überprüfung rekombinanter Klone mit Hilfe der PCR

Die unten beschriebene Methode ist zur Selektion rekombinanter Klone bei Verwendung von pUC-Plasmiden (ebenso für alle Plasmidderivate mit einer multi-cloning-site innerhalb eines lacZ'-Gens) geeignet.

1. vermutlich rekombinante Klone (weiße Kolonien bei blau/weiß-screening) mit Zahnstocher von Selektionsplatte abnehmen
2. durch kurzes Aufsetzen Klon auf frische Platte animpfen (Nummernraster unterlegen!)
3. restliche Bakterien in 30 µl A. dest. vom Zahnstocher abspülen
4. Bakteriensuspension 5 min im Heizblock kochen (Lyse)
5. 1 µl davon zu PCR-Ansatz pipettieren (vgl. Punkt 17.)

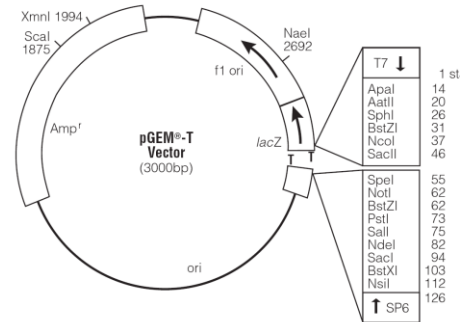
19. Klonierung von PCR-Fragmenten in pGEM-T (Promega)

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pGEM-T nutzt man die Tatsache, dass die *Taq*-Polymerase in der PCR immer ein überhängendes A an das 3'-Ende der amplifizierten DNA hängt. Der Vektor pGEM-T besitzt ein überhängendes T, über die Ligationseffizienz stark erhöht wird.

Reaktionsansatz:

1-3 µl PCR-Produkt
1 0 µl 2x Ligase Puffer
1 µl Ligase
0,5 µl pGEM-T
x µl H₂O

20 µl Gesamtvolumen



Ligation über Nacht im Ligator im Kühlraum.
Anschließend nach *E. coli* transformieren.

20. RNA-Isolation aus *Arabidopsis* mit dem „Total RNA Purification from Plant“ Kit (MN)

Um Kontamination mit RNasen zu vermeiden müssen immer Handschuhe getragen werden!!

ca. 100 mg Pflanzengewebe werden geerntet;
mit flüssigem Stickstoff im Mörser gut zerreiben.

Ernte

in 350 µl RA1-Puffer (3,5 µl β-Mercaptoethanol zusetzen)
suspendieren und möglichst quantitativ in ein Eppendorf-
Gefäß überführen,
durch Vortex gut mischen;
(alternativ kann RAP-Puffer verwendet werden)

Lyse

Lysat durch Nucleo-Spin-Filter (violett) filtrieren
dazu Filtereinheit auf Auffanggefäß stellen,
Lysat aufgeben und 1 min bei 11.000g zentrifugieren
(evtl. entstehendes Pellet nicht aufwirbeln!!)

Vorextraktion I

Zugabe von 350 µl 70%igen Ethanol zum
Filtrat, durch Vortex gut mischen

Puffer für RNA-
Bindung

Ethanol-versetztes Lysat auf NucleoSpin RNA Plant
Säulchen (hellblau) pipettieren,
Säulchen zuvor in ein 2 ml Auffanggefäß stellen
30 sec bei 8000g zentrifugieren, Säulchen in neues Auffanggefäß stellen

RNA-Bindung an
Säule

350 µl MDB (membrane desalting buffer) Puffer
auf die Säule pipettieren
1 min bei 11.000g zentrifugieren, Durchfluss werfen
(evtl. noch einmal zentrifugieren)

Vorextraktion II

pro Säule 90 µl DNase Reaktionspuffer (weißer Deckel) mit
10 µl DNase I in Eppendorfgesäß mischen;
DNase I-Lösung auf die Mitte der Säule pipettieren;
15 min bei Raumtemperatur inkubieren;

DNase-
behandlung

200 µl Waschpuffer RA2 auf die Säule geben;
30 sec bei 8.000g zentrifugieren;
Säulchen auf neues Sammelgefäß stellen

Waschschritt I

600 µl Waschpuffer RA3 auf die Säule geben;
30 sec bei 8.000g zentrifugieren;
Durchfluss verwerfen;

Waschschritt II

250 µl Waschpuffer RA3 auf die Säule geben;
2 min bei 11.000g Säulchen trocken zentrifugieren;
Säulchen auf neues, RNase-freies Gefäß stellen

Waschschritt III

60 µl RNase-freies Wasser auf Säulchen geben
1 min bei 11.000g zentrifugieren

Elution

21. Trennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen im Agarosegel:

Um RNA entsprechend ihrer Größe im Agarosegel aufzutrennen, muss ein denaturierendes Agens zugesetzt werden, das die Ausbildung von RNA-Sekundärstrukturen verhindert.

- 1,3 g Agarose in 73 ml H₂O und 10 ml 10 x MOPS-Puffer auflösen (Mikrowelle, Heizpilz),
- der abgekühlten Agarose 17 ml Formaldehyd zusetzen und sofort das Gel gießen.

10 x MOPS-Puffer

41,9 g MOPS (200 mM)

8,2 g Na-Acetat x 3H₂O (50 mM)

3,72 g EDTA (10 mM)

In 800 ml A. dest. Lösen und mit 10 N NaOH auf pH 7 einstellen

Auf 1 L auffüllen und autoklavieren

Stopplösung für RNA

95% Formamid mit 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol

Denaturierung der Proben: Denaturierungslösung:

	eine Probe (µl)	für 20 (µl)	für 30 (µl)	für 50 (µl)	für 60 (µl)
10 X MOPS	2,5	50	75	125	150
Formamid	12,5	250	375	625	750
Formaldehyd	4,0	80	120	200	240
Ethidiumbromid	0,5	10	15	25	30
Stopplösung	1,5	30	45	75	90

6 µl RNA (gewünschte RNA-Menge entsprechend in H₂O verdünnen, z.B. 10 µg) zu 21 µl Denaturierungslösung geben, 10 min bei 68°C denaturieren, auf Eis stellen, erst dann auf Gel auftragen.

Laufpuffer: 1 x MOPS-Puffer (ohne Formaldehyd): 160 ml 10 x MOPS + 1440 ml H₂O.
Gel bei 60 - 80 V für 3-4 h laufen lassen; abbrechen, wenn BPB-Front etwa 8-9 cm weit ist.

Gel vorsichtig vom Träger auf den Transilluminator legen, fotografieren (mit Lineal) und überstehende Teile mit dem Skalpell entfernen.

Für den Northern-Blot kann man das Gel direkt auf Filter blotten.

22. cDNA-Synthese

Erststrangsynthese:

1 µl Primer (z.B. oligo (dT) Primer oder genspezifischer Primer)

x µl Gesamt-RNA (2,5 µg RNA)

x µl RNase-freies Wasser (Gesamtvolumen soll 13 µl ergeben)

gut durch Vortex mixen

5 min bei 70°C inkubieren (RNA-Denaturierung)

danach sofort auf Eis stellen

Gemisch kurz anzentrifugieren

Zugabe von:

4 µl Erststrangsynthesepuffer (5x konzentriert)

2 µl dNTP-Gemisch (10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

→ am besten als Prämix für alle Proben vorbereiten!

vorsichtig mischen

5 min bei 37°C inkubieren

dann 1 µl M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse Transcriptase (200 Units, Fermentas) zusetzen

gut mischen

60 min bei 42°C inkubieren

Abstoppen der Reaktion durch 15 min Inkubation bei 70°C

1 min bei 13,000 Upm zentrifugieren, einfrieren

Für eine anschließende PCR-Reaktion kann die cDNA-Lösung verdünnt (z.B. 1:50) werden.

5x Erststrangpuffer:

250 mM Tris-HCl

250 mM KCl

20 mM MgCl₂

50 mM DTT

pH 8,3

23. Proteinüberexpression in *E. coli* (pBAD-His-System; Invitrogen)

Voraussetzung: Klonierung des codierenden Bereiches eines Proteins, das durch Überexpression gewonnen werden soll, in Plasmide der pBAD-His-Serie. Die Klonierung muss so erfolgen, dass das Insert „in frame“ mit dem His-Tag-Proteinfragment vorliegt. Für die vorausgegangenen Klonierungen ist vom Hersteller *E. coli* Stamm Top10 empfohlen.

A: Vortestung der Expressionsstämme:

- Transformation von Konstrukten, deren Richtigkeit überprüft worden ist, in den Überexpressionsstamm *E. coli* LMG194 oder BL21 gold (DE3)
- Einzelkolonien in 1 ml LB-Flüssigmedium (Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin) einimpfen
- über Nacht bei 37°C schütteln
- 50 µl Kultur in 1 ml LB-Flüssigmedium ohne Ampicillin überführen
- 2 h bei 37°C schütteln
- 100 µl Kultur abnehmen, auf Eis lagern – Proben für nichtinduzierte Zellen
- restliche Kultur mit Arabinose (Endkonzentration um 1 mM) versetzen, bei pET28a mit IPTG (Endkonz. 1mM)
- 2 h bei 37°C schütteln
- Kultur auf Eis lagern
- 20 µl der nichtinduzierten bzw. der induzierten Zellen in neues Eppendorfgefäß pipettieren
- mit 10 µl 3xSB Puffer mit SDS versetzen
- Proben für 5 min bei 95 °C kochen
- Proteintrennung im SDS-haltigen Polyacrylamidgel

B: Proteinreinigung - Zellkultivierung

1. zweimal 3,5 ml Selektionsmedium (LB, mit 0,2% Glucose, 50 µg/ml Ampicillin) mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpfen
2. über Nacht bei 30°C kräftig schütteln
3. 0,5 ml Übernachtskultur (1:100 verdünnt) in 50 ml Selektionsmedium (LB, 50 µg/ml Ampicillin; 0,2 % Glucose) in vorgewärmten Flaschen 37°C geben
4. schütteln bis OD₆₀₀ von ca. 0,5 (nach ca. 2 h) erreicht ist

1. Probenahme: 1ml Zellen entnehmen

1 min abzentrifugieren, 14000 U/min

Pellet bei -20°C einfrieren

5. Zugabe von 50 µl Arabinose (Stammlösung 0,2%, Endkonzentration 0,0002%)
6. Inkubation für 4 h Stunden bei 37°C

2. Probenahme: 1ml Zellen entnehmen

1 min abzentrifugieren

Pellet bei -20°C einfrieren

C: Proteinreinigung - Proteinextraktion durch Ultraschallbehandlung (alles auf Eis!!)

1. Bakterien abzentrifugieren (z.B. 10 min GSA- Rotor Sorvall, 6000 U/min, 4°C)
2. Überstand abgießen, Reste des Medium absaugen (auf Eis), Pellet vortexen
3. Zugabe von 5 ml Homogenisationspuffer pro Ansatz, Bakterien vollständig suspendieren (Unterbrechung über Nacht möglich, suspendierte Zellen auf Eis in 15 ml Rotdeckelröhrchen lagern)
4. Ultraschallbehandlung unter Eiskühlung in abgeschnittenem Zentrifugenbecher (dicke Ultraschallspitze, Stellung auf **high**, 6 mal 10 sec bei 90 W mit je ca. 30 s Pause)
5. Homogenat in 15 ml Rotdeckelröhrchen überführen
6. 30 min bei 14000 g und 4°C abzentrifugieren (Sigma Zentrifuge, Rotor vorgekühlt)

3. Probenahme: 100 µl Überstand entnehmen

bei -20°C einfrieren

D: Proteinreinigung - Affinitätschromatographie

(Prinzip der Chromatographie: IMAC - „immobilized metal affinity chromatography“, Ni²⁺-Ionen der Säule binden His-Schwanz des überexprimierten Proteins, Elution durch Imidazol)

1. mit 2 ml „ProBond Slurry“ die Säulenmatrix herstellen
2. Equilibrierung der ProBond-Säulchen mit 6 ml Homogenisationspuffer

3. Überstand der Zentrifugation auftragen
4. Probenahme: 100 µl Durchlauf entnehmen
 bei -20°C einfrieren
4. Säule mit 6 ml Homogenisationspuffer waschen
5. Säule mit 6 ml Waschpuffer waschen
5. Probenahme: 100 µl Überstand entnehmen
 bei -20°C einfrieren
6. Protein mit 3 mal 1 ml Elutionspuffer eluieren, zweite Elution enthält Hauptmenge des gewünschten Proteins
6.-8. Probenahme: je 20 µl Eluat 1, 2, bzw. 3
 je bei -20°C einfrieren
7. Rest portionieren und bei -20°C aufbewahren

E: Proteinreinigung - Lösungen und Puffer

Homogenisationsp.:	20 mM Phosphatpuffer 500 mM NaCl pH 7,8
Waschpuffer:	20 mM Phosphatpuffer 500 mM NaCl 75 mM Imidazol pH 7,8
Elutionspuffer:	20 mM Phosphatpuffer 500 mM NaCl 300 mM Imidazol pH 7,8
Arabinose:	0,2% in H ₂ O (steril)

F: Proteintrennungen durch Polyacrylamidgelelektrophorese – Handschuhe!!!

1. Gießen eines Polyacrylamidgeles zur Kontrollelektrophorese
 - Vorbereiten der kleinen Gelkammer, Einspannen der Platten in das Gießgestell
 - Gießen des Trenngeles: 2,5 ml TRIS-Puffer (pH 8,0)
3,5 ml A. dest.
4,0 ml Acrylamidlösung
0,1 ml SDS-Lösung
11 µl TEMED
50 µl APS

 ausreichend für 2 Gele
 - ein ca. 5 cm hohes Trenngel gießen, vorsichtig mit A. dest. überschichten (Polyacrylamid polymerisiert nur unter Luftabschluss)
 - ca. 1 h auspolymerisieren lassen (Wasser trennt sich als mittlere Phase ab)
 - Sammelgelgießen: 1,0 ml TRIS-Puffer (pH 6,8)
3,85 ml A. dest.
1,7 ml Acrylamidlösung
50 µl SDS-Stammlösung
12,5 µl TEMED
12,5 µl APS

 ausreichend für 2 Gele
 - Sammelgel bis zur Oberkante der Scheibe gießen, den Kamm einstecken, bis er auf den Spacern aufliegt und ca. 30 min auspolymerisieren lassen
 - Gel in die Kammer überführen und Puffer einfüllen
2. Probenvorbereitung
 - zu den Proben 1/3 Volumen 3x SB-Puffer zugeben, 5 min auf 100°C erhitzen
3. Proben auftragen und bei konstanter Spannung trennen
 - bis Bromphenolblaubande an den unteren Gelrand gelaufen ist

4. Gel aus den Trägern nehmen: 30 min fixieren
 30 min färben
 30 min entfärben (mind. zweimal wiederholen)
 alternativ: Zum Entfärben 10 min in A. dest. kochen
5. Gel auf Filterpapier bei 80°C im Vakuum trocknen oder in Folie einschweißen

24. Herstellung von „blunt ends“

Mung Bean Nuclease

Ansatz:

20µl:	2 µl	10xBuffer (special buffer or NEBuffers 1, 2 or 4)
	17 µl	eluted DNA (Macherey Nagel Kit)
	1 µl	Mung Bean Nuclease

- Inkubation 30-60 Minuten bei 30°C
- Aufreinigung des Ansatzes mittels Gelelektion oder Phenol/Chloroform-Behandlung (keine Hitze-Inaktivierung)

25. « blunt ends » mit Klenow-Fragment/ T4 DNA-polymerase

(Protocol for Fill-in Recessed 3`-termini of double-stranded DNA)

!! geht nur bei 3' Überhängen!!

20 µl:

Digested DNA	10-15 µl (0,1-4 µg)
10x reaction buffer	2 µl
Klenow Fragment	0,1-0,5 µl (1-5 U)
dNTP Mix, 2 mM each	0,5 µl (0,05 mM final concentration)
Water, nuclease free	to 20 µl

- Incubate the mixture at 15-37°C for 15-30 minutes
- Stop the reaction by heating at 75°C for 10 minutes

(Protocoll for Removal of 3`-overhangs by exonuclease reaction of T4 DNA-polymerase)

Digested DNA (aqueous sultion)	10-15 µl (0,1-4 µg)
10x reaction buffer	2 µl
T4 DNA-polymerase	0,1-0,5 µl (1-5 U)
dNTP Mix, 2 mM each	0,5 µl (0,05 mM final concentration)
Water, nuclease free	to 20 µl

- Incubate the mixture at 15-37°C for 15-30 minutes
- Stop the reaction by heating at 75°C for 10 minutes

Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I ist in der Lage, überstehende Enden von DNA-Fragmenten aufzufüllen oder sie zu polieren. Dies ist zurückzuführen auf eine 5`-3`-

Polymerase- bzw. 3`-5`-Exonuleaseaktivität. Ausgenutzt wird dies zur Ligation nicht kompatibler Enden von Vektor-und Insert-DNA.

Klenow „fillin“ direkt im Restriktionsansatz

20 µl Restriktionsansatz (inaktiviert)

+ 5 µl 10x Fermentas Klenow Puffer

+ 2 µl dNTPs

+ 0,5 µl Klenow

+ 22,5 µl A. bidest.

Inkubieren für

10 min 37°C

10 min 75°C

DNA- und Protein-Größenstandards

