

2 MATERIALIEN

2.1 Plasmide

Tabelle 2.1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	relevanter Genotyp	Selektivmarker	Replikon	Referenz
pBS140	pJF119HEΔ[<i>HincII-SphI</i>]Ω[RP4 48,710-46,495 kb*]	<i>traG</i> ⁺	Ap	pMB1	(Waters <i>et al.</i> , 1992)
pDB126	pML123Ω[<i>BamHI</i> ; RP4 <i>BfaI</i> 45,893-53,462 kb*]	(<i>trbB-trbM</i>) ⁺ (<i>traF-traM</i>) ⁺	Cm	ColD	(Balzer <i>et al.</i> , 1994)
pDB127	pDB126Δ[RP4 <i>SfiI</i> - <i>SspI</i> 48,374-46,670 kb*]	(<i>trbB-trbM</i>) ⁺ (<i>traF-traM</i>) ⁺ <i>traG</i> ⁰	Cm	ColD	(Balzer <i>et al.</i> , 1994)
pDB179	pMS54Δ[<i>NdeI</i> - <i>HindIII</i>]Ω[pDB778 <i>NdeI</i> - <i>HindIII</i> , 0,4 kb]	<i>trbB</i> ⁺ , <i>trbC</i>	Ap	pMB1	(Haase <i>et al.</i> , 1995)
pGZ119EH/HE	Vektor, P _{lac} /lacI ^Q		Cm	ColD	(Lessl <i>et al.</i> , 1992)
pJF119EH	Vektor, P _{lac} /lacI ^Q		Ap	pMB1	(Fürste <i>et al.</i> , 1986)
pJF143	pBR329Ω[<i>BamHI</i> , RP4 <i>XmaII</i> - <i>AccI</i>]		Ap, Cm	pMB1	(Fürste <i>et al.</i> , 1989)
pML123	pGZ119EHΔ[<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i>]Ω[<i>EcoRI</i> - <i>XmnI</i> -Adaptor, RP4 <i>XmnI</i> - <i>NotI</i> , 18,841-30,042 kb*]		Cm	ColD	(Lessl <i>et al.</i> , 1993)
pMS119EH/HE	Vektor, P _{lac} /lacI ^Q		Ap	pMB1	(Strack <i>et al.</i> , 1992)
pMS470Δ8	Vektor, pMS119EHΔ[<i>XbaI</i> - <i>PstI</i>]Ω[pT7-7 <i>XbaI</i> - <i>NdeI</i> , 40bp-Fragment, R751 <i>traC Aval-SphI</i> , 1,4 kb], P _{lac} /lacI ^Q ,	<i>trbC</i> ⁺	Ap	pMB1	(Balzer <i>et al.</i> , 1992)
pMS54	pMS470Δ8Δ[<i>NdeI</i> - <i>HindIII</i>]Ω[RP4 18,825-19,931 kb*]	<i>trbB</i> ⁺	Ap	pMB1	(Motallebi-Veshareh <i>et al.</i> , 1992)
pSU4053	Tra _w ⁺		Ap	pMB8	(Rivas <i>et al.</i> , 1997)

Die Beschreibung der Plasmide entspricht der Nomenklatur nach Novick *et al.* (1976).

* RP4-Sequenzkoordinaten des insertierten Fragmentes (Pansegrau *et al.*, 1994)

Tabelle 2.2 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	relevanter Genotyp	Selektivmarker	Replikon
pDB179D186A	pDB179 Δ [<i>KpnI-SphI</i>] Ω [<i>KpnI-SphI</i> pMS54D186A]	<i>trbB</i> , <i>trbC</i> ⁺	Cm	ColD
pDB179K161A	pDB179 Δ [<i>KpnI-SphI</i>] Ω [<i>KpnI-SphI</i> pMS54K161A]	<i>trbB</i> , <i>trbC</i> ⁺	Cm	ColD
pDB179R217T	pDB179 Δ [<i>KpnI-SphI</i>] Ω [<i>KpnI-SphI</i> pMS54R217T]	<i>trbB</i> , <i>trbC</i> ⁺	Cm	ColD
pFS141	pMS470 Δ 8 Δ [<i>NdeI-HindIII</i>] Ω [RP4 48,495-46,588 kb*, sechs His-Codons],	<i>traG</i> ⁺	Ap	pMB1
pFS241	pMS470 Δ 8 Δ [<i>NdeI-HindIII</i>] Ω [sechs His-Codons, RP4 48,495-46,588 kb*]	<i>traG</i> ⁺	Ap	pMB1
pFS241K187T	pMS470 Δ 8 Δ [<i>NdeI-HindIII</i>] Ω [sechs His-Codons, RP4 48,495-46,588 kb*, Mutation, Codon 187]	<i>traG</i> ⁻	Ap	pMB1
pMS54D186A	pMS54 <i>trbB</i> Mutation, Codon 186	<i>trbB</i>	Ap	pMB1
pMS54K161A	pMS54 <i>trbB</i> Mutation, Codon 161	<i>trbB</i>	Ap	pMB1
pMS54R217T	pMS54 <i>trbB</i> Mutation, Codon 217	<i>trbB</i>	Ap	pMB1
pMS55.1	pMS470 Δ 8 Δ [<i>NdeI-HindIII</i>] Ω [pSU4053 8,353-9,465 kb]	<i>trwD</i> ⁺	Ap	pMB1
pMS55.2	pMS470 Δ 8 Δ [<i>NdeI-HindIII</i>] Ω [pSU4053 8,419-9,465 kb]	<i>trwD</i> ⁺	Ap	pMB1
pSK126	pDB126 Δ [RP4 18,830-19,910 kb*]	<i>trbB</i> ⁻ <i>trbC-trbM</i> ⁺	Cm	ColD1
pSK410	pMS470 Δ 8 Δ [<i>NdeI-HindIII</i>] Ω [F 23,779-25,937 kb [§]]	<i>traD</i> ⁺	Ap	pMB1
pSK410NH	pMS470 Δ 8 Δ [<i>NdeI-HindIII</i>] Ω [F 23,779-25,937 kb [§] , sechs His-Codons]	<i>traD</i>	Ap	pMB1
pSK410CH	pMS470 Δ 8 Δ [<i>NdeI-HindIII</i>] Ω [sechs His-Codons, F 23,779-25,937 kb [§]]	<i>traD</i> ⁺	Ap	pMB1
pSK470	pMS470 Δ 8 Δ [<i>NdeI-HindIII</i>] Ω [RP4 48,495-46,588 kb*]	<i>traG</i> ⁺	Ap	pMB1

Die Beschreibung der Plasmide entspricht der Nomenklatur nach Novick *et al.* (1976).

* RP4-Sequenzkoordinaten des insertierten Fragmentes (Pansegrau *et al.*, 1994)

§ F-Sequenzkoordinaten des insertierten Fragmentes (Frost *et al.*, 1994)

2.2 Bakterienstämme

Escherichia coli K12

HB101 *hsdS20, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, supE44*, (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969)

HB101 Nx^r Genotyp wie HB101, zusätzlich chromosomal kodierte Resistenz gegen Nalidixinsäure

SCS1 *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, relA1*. DH1-Variante mit hoher Transformationseffizienz, (Hanahan, 1983)

Die Genotypen wurden nach Bachmann (1972) beschrieben.

2.3 Bakteriophagen

mJF182 mp8Ω[T-Strang von pJF142]

M13mp18/19 F-Plasmid-spezifischer DNA-Einzelstrang-Phage, Lac⁺ in XI-1 Blue, (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

2.4 Medien

Zur Anzucht von Bakterienzellen wurde YT-Medium verwendet:

1% (w/v) Trypton
 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 0,5% (w/v) NaCl
 0,025 mg/ml Thiaminhydrochlorid[♦]
 0,1% (w/v) Glucose[♦]
 25 mM MOPS (pH 8,0) [♦]

♦ Diese Substanzen wurden getrennt autoklaviert.

Feste Anzuchtmedien enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Agar. Selektivmedien enthielten folgende Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen:

Ampicillin (Natriumsalz, Ap) 100 µg/ml
 Chloramphenicol (Cm) 10 µg/ml
 Nalidixinsäure (Natriumsalz, Nx) 30 µg/ml

2.5 Chemikalien, Proteine und Nucleinsäuren

Tabelle 2.3 In dieser Arbeit verwendete Oligodesoxyribonukleotide. Nucleotide, die der Originalsequenz entsprechen, sind kursiv geschrieben. Fett geschriebene Nucleotide sind mutiert. RP4-, F- bzw. pSU4053-Koordinaten sind in Klammern geschrieben.

Anwendung	Primer (codogener Strang)	Primer (anticodogener Strang)
<i>EcoRI-BsrI</i> -Linker	AATTCGTAGGGGTTACTGAAAAGTG AGC [18,825-18,831 kb]	TCACITTTTCAGTAACCCCTACG [18,825-18,829 kb]
<i>trbB</i> -Mutation K161A	GGTACTGGCTCGGGCGCGACCACGC TCGTC [19,290-19,320 kb]	GACGAGCGTGGTCGCGCCCGAGCCA GTACC [19,290-19,320 kb]
<i>trbB</i> -Mutation D186A	CGTCATCATCGAGGCCACCGGCGAAA TC [19,367-19,395 kb]	GGATTCGCCGGTGGCCTCGATGATG ACG [19,367-19,395 kb]
<i>trbB</i> -Mutation R217T	CAAGACAACGCTGACTATGCGCCCCG ACC [19,460-19,489 kb]	GGTCGGGGCGCATAGTCAGCGTTGTC TTG [19,460-19,489 kb]
<i>trwD</i> (ATG Start)	GGGAATTCATATGTCTACAGTCTCGA AAGC [8,363-8,393 kb]	GGGTTTAAGCTTCCCCGATACAGCCG [9,449-9,465 kb]
<i>trwD</i> (GTG Start)	GGGAATTCATATGGCGCAACTCCTG CG [8,420-8,436 kb]	GGGTTTAAGCTTCCCCGATACAGCCG [9,449-9,465 kb]
<i>traG</i>	CGACGACTCATATGAAGAACCGAAAC AAGC [48,495-48,476 kb]	GCCTACGAAGCTTGGTGAGGCGCTGG AAGC [46,565-46,584 kb]
<i>traG</i> - 6 His- Codons am 5'-Ende	GCATTCCCATATGCACCATCACCAT CACCATTAAGAACCGAAACAACG [48,495-48,476 kb]	GCCTACGAAGCTTGGTGAGGCGCTGG AAGC [46,565-46,584 kb]
<i>traG</i> - 6 His- Codons am 3'-Ende	CGACGACTCATATGAAGAACCGAAAC AAGC [48,495-48,476 kb]	CTAATAAGCTTGCTCAATGGTGATGG TGATGGTGATCGTGATCCCCTCCC [46,588-46,607]
<i>traD</i>	CGACGACTCATATGAGTTTTAACGC, [23,779-23,793 kb]	GCCTACGAAGCTTCATCAGAAATCAT C [25,925-25,937 kb]
<i>traD</i> - 6 His- Codons am 5'-Ende	GCATTCCCATATGCACCATCACCAT CACCATAGTTTTAACGCAAAGG [23,779-23,798]	GCCTACGAAGCTTCATCAGAAATCAT C [25,925-25,937 kb]
<i>traD</i> - 6 His- Codons am 3'-Ende	CGACGACTCATATGAGTTTTAACGC, [23,779-23,793 kb]	GCTAATAAGCTTCATCAATGGTGAT GGTGATGGTGAAATCATCTCCCGG [25919-25,937 kb]

Zur Herstellung von Medien wurden Substanzen der Firmen Difco oder Oxoid verwendet. Antibiotika und andere Medienzusätze wurden von Sigma (Ampicillin, Nalidixinsäure, Thiaminhydrochlorid), Serva (Tetracyclin) und Boehringer Mannheim (Chloramphenicol) eingesetzt. 30%ige Acrylamid- und 2%ige Bisacrylamid-Lösung stammten von Roth. Weitere Elektrophoresesubstanzen wurden von Biorad bezogen. Desweiteren wurden Chemikalien von

Sigma (Ethidiumbromid), LKB (Ficoll 400), Serva (Brij-58, PEG 6.000, PEG 20.000 und Coomassie Blue R250), United States Biochemical (USB) (Harnstoff) und Biomol (X-Gal [5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid], IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyrano-side) und MOPS [3-(N-Morpholino-)propansulfonsäure]) verwendet. Alle nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Merck (Reinheitsgrad p.A.) bezogen.

Verwendete Enzyme waren Erzeugnisse von New England Biolabs (NEB), Boehringer Mannheim, USB und BRL. Sie wurden, wenn nicht anders erwähnt, unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen eingesetzt. Als Größenstandard wurde der Protein-Marker (3-212 kDa) von NEB verwendet, als Referenzproteine Albumin aus Rinderserum (BSA), Ovalbumin, Aldolase und Katalase von Boehringer Mannheim. Für den Nachweis von Proteinen mit polyklonalen Antiseren wurden His₅-Antikörper von QIAGEN, BSA von Miles als Blockierungsreagenz und Dichlorotriazinylaminofluorescein-konjugierte Ziegen-anti-Kaninchen-IgGs von Dianova verwendet.

In NTPase-Tests kamen radioaktiv markierte Nukleotide von Amersham Corp. und nicht-markierte Nukleotide von Boehringer Mannheim zum Einsatz. Als Größenstandards dienten 1-kb und 123-bp Leitern von BRL. Die übrigen Oligonukleotide (Adaptoren, PCR-Primer, Sequenzierprimer) wurden im Servicelabor des Max-Planck-Institutes für Molekulare Genetik synthetisiert.

2.6 Puffer

TE-Puffer:

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

TAE-Puffer:

40 mM Tris-Base, pH 7,9
5 mM CH₃-COONa
1 mM EDTA

R-Puffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM NaCl
1 mM DTT
10% (w/v) Glycerin
0,1 mM EDTA

TBE-Puffer:

90 mM Tris-borat, pH 8,0
2 mM EDTA

TN-Puffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM NaCl

K-Puffer:

20 mM Kaliumphosphat, pH 6,9
100 mM NaCl
1 mM DTT
10% (w/v) Glycerin
0,1 mM EDTA

2.7 Sonstige Materialien

Tabelle 2.4 Chromatographiesäulen und Säulenmatrixes

Material	Hersteller
Chromatographiesäulen	Pharmacia
Superose 6	Pharmacia
Ni-NTA- <i>Superflow</i>	QIAGEN
Heparin-Sepharose Cl-6B	Pharmacia
Bio-Gel [®] HT, Hydroxylapatit	Bio-Rad

Tabelle 2.5 Kits

Material	Hersteller
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAprep <i>Spin Miniprep Kit</i>	QIAGEN
QIAGEN <i>Plasmid Maxi Kit</i>	QIAGEN
<i>QuikChange[™] Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene

Tabelle 2.6 Sonstige Materialien

Material	Hersteller
Cellulosenitrat BA85	Schleicher&Schuell
PVDF-Membran	Amersham Corp.
3MM-Chromatographie-Papier	Whatmann
Minisart-Filter (steril, 0,2 µm Porengröße)	Sartorius
HAWP-Filter (steril, 0,25 µm & 0,45 µm Porengröße)	Millipore
Polyethylenimin-imprägnierte Cellulose MN 300 Dünnschichtfolien	Machery-Nagel
Dialyseschläuche	Roth

Tabelle 2.7 Geräte

Gerät	Hersteller
Ultrazentrifuge Typ L7	Beckman
Rotoren (45 Ti, 50 Ti, SW60)	Beckman
Elektronenmikroskop CM 100	Philips
<i>Fast-Blot-Kammer</i> Typ B33	Biometra
<i>FluorImager 575</i>	Molecular Dynamics
<i>PhosphorImager</i>	Molecular Dynamics
Personal Densitometer	Molecular Dynamics