

3 Material

3.1 Mikroorganismen

Tab. 3.1: Bakterien.

Spezies	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac[F'proAB lacI^qZ ΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Bullock et al., 1987
	XL2-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac[F'proAB lacI^qZ ΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cm^R]</i>	Stratagene
	DH5α	<i>F' ΔlacU169 (σ80 lacZ) ΔM15 hsdR17 recA1 endA1 supE44 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
	M15 [pREP4]	M15 mit pREP4	Qiagen
	BL21	<i>B F' dcm ompT hsdS (rB' mB') gal</i>	Stratagene
	JB3034	<i>ΔrcsA26 lon-100 cpsB10::lac(imml) recA</i>	Brill et al., 1988
	SG1087	<i>lon-100 rcsA-40 lac Tet^R Tn10 in rcsA</i>	Trisler and Gottesman, 1984
<i>Lysobacter sp.</i>	ATCC 53042	Wildtyp, Lysobactin-Produzent	Squibb Institute
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 21332	Wildtyp, Surfactin-Produzent	
	R13 _{TD}	SrfA-A(ΔLeu)-Mutante	diese Arbeit
	R153 _{TD}	SrfA-A(Asp)-Mutante	diese Arbeit
	R13 _{CDM}	SrfA-A(ΔLeu)-Mutante	diese Arbeit
	R153 _{CDM}	SrfA-A(Asp)-Mutante	diese Arbeit
<i>B. licheniformis</i>		Wildtyp	Frank Bernhard

Tab. 3.2: Hefen.

Spezies	Genotyp	Referenz
<i>Pichia pastoris</i>	Wildtyp	Invitrogen

3.2 Plasmide

Tab. 3.3: Plasmide.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pACL113	4 kb <i>PstI</i> -Fragment eines 17 kb <i>BamHI</i> -Fragments von <i>Lysobacter sp.</i> ATCC 53042 in pBluescript KS ⁺	Frank Bernhard
pBluescript KS ⁺	Amp ^R , 2958 bp	Stratagene
pMAL TM -c2	Expressionsvektor, MBP-Expression, Cytoplasma, Amp ^R , 6721 bp	New England BioLabs
pQE-30	Expressionsvektor, N-terminaler Poly(His) ₆ -tag, Amp ^R , 3462 bp	Qiagen
pQE-60	Expressionsvektor, C-terminaler Poly(His) ₆ -tag, Amp ^R , 3429 bp	Qiagen
pREP4	Expression des lac-Repressor-Proteins, Kan ^R , 3740 bp	Qiagen
pREP4-groESL	Coexpression der Chaperone GroES/EL, 5885 bp	Cole, 1996
pMMN13	Integrationsplasmidvektor	Nakano et al., 1991
pM- <i>acsL</i>	<i>acsL</i> -Gen in pMAL TM -c2	diese Arbeit
pH- <i>acsL</i>	<i>acsL</i> -Gen in pQE-30	diese Arbeit
pM- <i>sfp</i>	<i>sfp</i> -Gen in pMAL TM -c2	Symmank et al., 1999
pH- <i>srf-M1</i>	Produktion des L-Glutaminsäure-Aktivierungsmoduls Srf-M1 aus SrfA-A AS ^a 1-982 in pQE-60	Symmank et al., 1999
pH- <i>srf-M1ΔC</i>	Produktion des C-terminal um 16 AS verkürzten M1-Moduls M1ΔC AS 1-966 in pQE-60	diese Arbeit
pH- <i>srf-NΔM1</i>	Produktion des N-terminal um 460 AS verkürzten M1-Moduls NΔM1 AS 461-982 in pQE-60	Symmank et al., 1999
pH- <i>srf-M4</i>	Produktion des L-Valin-Aktivierungsmoduls Srf-M4 aus SrfA-B AS 1-975 in pQE-30	Elsner et al., 1997
pH- <i>srf-M4ΔC</i>	Produktion des C-terminal um 16 AS verkürzten M4-Moduls M4ΔC AS 1-961 in pQE-30	Frank Bernhard/ diese Arbeit
pH- <i>srf-NΔM4</i>	Produktion des N-terminal um 469 AS verkürzten M4-Moduls NΔM4 AS 470-975 in pQE-30	Elsner et al., 1997
pH- <i>srfA-C</i>	Produktion des L-Leucin-Aktivierungsmoduls Srf-M7 = SrfA-C AS 1-1274 in pQE-30	Symmank et al., 1999
pH- <i>srfA-C</i> _{S1003A}	Produktion der Ser→Ala-Mutante SrfA-C _{S1003A} (M7 _{S1003A}) AS 1-1274 in pQE-30	diese Arbeit
pH- <i>srfAD-M4/7</i>	Produktion des monomodularen Hybrids Srf _{AD} -M4/7, bestehend aus 815 AS (M4) und 456 AS (M7 _{S1003A}) in pQE-30	Symmank et al., 1999
pH- <i>srfAD-M7/4</i>	Produktion des monomodularen Hybrids Srf _{AD} -M7/4, bestehend aus 805 AS (M7 _{S1003A}) und 173 AS (M4) in pQE-30	Symmank et al., 1999

Plasmid	Genotyp	Referenz
pH- <i>srf</i> _{ADH} -M4/7	Produktion des monomodularen Hybrids Srf _{ADH} -M4/7, bestehend aus 856 AS (M4) und 415 AS (M7 _{S1003A}) in pQE-30	Symmank et al., 1999
pH- <i>srf</i> _{ADH} -M7/4	Produktion des monomodularen Hybrids Srf _{ADH} -M7/4, bestehend aus 859 AS (M7 _{S1003A}) und 119 AS (M4) in pQE-30	Symmank et al., 1999
pH- <i>srf</i> _{CD} -M4/7	Produktion des monomodularen Hybrids Srf _{CD} -M4/7, bestehend aus 350 AS (M4) und 922 AS (M7 _{S1003A}) in pQE-30	Symmank et al., 1999
pH- <i>srf</i> _{CD} -M7/4	Produktion des monomodularen Hybrids Srf _{CD} -M7/4, bestehend aus 352 AS (M7 _{S1003A}) und 625 AS (M4) in pQE-30	Symmank et al., 1999
pH- <i>srfA</i> -A	Produktion der trimodularen Surfactin-Synthetase SrfA-A, Coexpression mit den <i>E. coli</i> -Chaperonen GroES/EL AS 1-3588 in pQE-30	Symmank et al., 1999
pH- <i>srf</i> _{ADH} -M1/2-3	Produktion der bimodularen Hybrid-Surfactin-Synthetase Srf _{ADH} -M1/2-3, Coexpression mit GroES/EL AS 1-858/1898-3588 in pQE-30	Symmank et al., 1999
pH- <i>srf</i> _{TD} -M1/2-3	Produktion der bimodularen Hybrid-Surfactin-Synthetase Srf _{TD} -M1/2-3, Coexpression mit GroES/EL AS 1-1003/2041-3588 in pQE-30	Symmank et al., 1999
pH- <i>srf</i> _{CDM} -M1-2/3	Produktion der bimodularen Hybrid-Surfactin-Synthetase Srf _{CDM} -M1-2/3, Coexpression mit GroES/EL AS 1-1194/2234-3588 in pQE-30	Symmank et al., 1999
pH- <i>srf</i> _{AD} -M1-2/3	Produktion der bimodularen Hybrid-Surfactin-Synthetase Srf _{AD} -M1-2/3, Coexpression mit GroES/EL AS 1-1500/2541-3588 in pQE-30	Symmank et al., 1999
pIP- <i>srfA</i> - Δ <i>Leu</i> _{TD}	Integrationsplasmid zur Konstruktion der <i>B. subtilis</i> -Mutante R13 _{TD} (in pMMN13)	diese Arbeit
pIP- <i>srfA</i> - <i>Asp</i> _{TD}	Integrationsplasmid zur Konstruktion der <i>B. subtilis</i> -Mutante R153 _{TD} (in pMMN13)	diese Arbeit
pIP- <i>srfA</i> - Δ <i>Leu</i> _{CDM}	Integrationsplasmid zur Konstruktion der <i>B. subtilis</i> -Mutante R13 _{CDM} (in pMMN13)	diese Arbeit
pIP- <i>srfA</i> - <i>Asp</i> _{CDM}	Integrationsplasmid zur Konstruktion der <i>B. subtilis</i> -Mutante R153 _{CDM} (in pMMN13)	diese Arbeit

^a AS, Aminosäuren

3.3 Primer für die Polymerasekettenreaktion

Bis auf T7_f (TIB MOLBiol, Berlin) wurden sämtliche Primer von Dr. Werner Schröder (FU Berlin) bezogen.

Tab. 3.4: PCR-Primer für die Amplifikation von Genen und Genabschnitten.

Oligonukleotid	Sequenz	Restriktionsstelle/ Referenz
AcsL _f	cgggatccat gcgttacgaggagtccaccgc	<i>Bam</i> HI
AcsL _r	ggaagcttt agccgccgcacgcggcgccgcg	<i>Hind</i> III
sfp _f	cgggatccat gaagatttacggaatttatggacc	<i>Bam</i> HI
sfp _r	cggtcgact tataaaaagctcttcgtacgagaccattg	<i>Sal</i> I
Srf-M1 _f	cggccatgg aaataactttttaccctttaacg	<i>Nco</i> I
Srf-M1 _r	gcggatcc ggctgcgattgcttttcagtctcatttcg	<i>Bam</i> HI
Srf-M1ΔC _r	gcggatcc ggcgtgacagccttcacctctagtgc	<i>Bam</i> HI
Srf-NΔM1 _f	cggccatgg cgataccagagctgttccaagaaaagg	<i>Nco</i> I
Srf-M4 _f (1S _f)	gcgggatccat gagcaaaaaatcgattcaaaagg	<i>Bam</i> HI (Elsner et al., 1997)
Srf-M4 _r (1S _r)	gcggatccct acgctaattctttcactctctg	<i>Kpn</i> I (Elsner et al., 1997)
Srf-M7 _f	cgggatccat gagcaattagcaaggatcaggttcaag	<i>Bam</i> HI
Srf-M7 _r	cgggtaccct atgaaaccgttacggtttggtattaag	<i>Kpn</i> I
Srf-M7-Ala	gccttgaaggccatgaccgccgc	Maxiprimer
SrfAA _f	cgggatccat ggaaataactttttaccctttaacg	<i>Bam</i> HI
SrfAA _r	cgggtaccct tagaaaatttcattaatttaccag	<i>Kpn</i> I
GC _f	gcggtagccc gggtcgacctgcagccaagc	<i>Kpn</i> I
GC _r	gcggatccct gatggtgatggtgatgcgatcc	<i>Bam</i> HI
Srf _{AD} -M7/4 _f	gcgagctct gcgtagccggaatcgggtg	<i>Sac</i> I
Srf _{AD} -M7/4 _r	gcagagctc accgaccgcccgaatggctggagctgg	<i>Sac</i> I
Srf _{AD} -M4/7 _f	cgcgtaaac cgctgctgacctcacgaaggaaaag	<i>Hpa</i> I
Srf _{AD} -M4/7 _r	cggttaac ataccacgcgctacaccgattccgcc	<i>Hpa</i> I
Srf _{ADH} -M7/4 _f	cgacgcgt cgacaaccaagtgaaggtgcgcggc	<i>Mlu</i> I
Srf _{ADH} -M7/4 _r	cgacgcgt ccggcgtattcaatcgttccatccgg	<i>Mlu</i> I
Srf _{ADH} -M4/7 _f	cgacgcgtt gacgaccaggtcaaaatcgcgg	<i>Mlu</i> I
Srf _{ADH} -M4/7 _r	cgacgcgt cctaaaattcgatattgccgtccgg	<i>Mlu</i> I
Srf _{CD} -M7/4 _f	cggactagt gtttgaaaattatccgcttgatc	<i>Spe</i> I
Srf _{CD} -M7/4 _r	ggcactagt atgtggtcaatcagttcggctg	<i>Spe</i> I
Srf _{CD} -M4/7 _f	cggactagt ttttgagaactatccgcttcagg	<i>Spe</i> I
Srf _{CD} -M4/7 _r	ggcactagt agatggttaagagattgccatc	<i>Spe</i> I
Srf _{CDM} -M1-2/3 _f	gccctagg tgtgctgattgaggagcttcaaaagc	<i>Avr</i> II
Srf _{CDM} -M1-2/3 _r	gccctagg gataccgcagaaatcaaatgg	<i>Avr</i> II
Srf _{TD} -M1/2-3 _f	cgctagg cgacattcattagcaggcatgaag	<i>Avr</i> II
Srf _{TD} -M1/2-3 _r	cgctagg tcaagaaattgtcaaagatccccg	<i>Avr</i> II
Srf _{AD} -M1-2/3 _f	cgctagg gacaaaacggttcatcagctatc	<i>Avr</i> II
Srf _{AD} -M1-2/3 _r	gccctagg ataaggtgttctgccggggttaaac	<i>Avr</i> II
Srf _{ADH} -M1/2-3 _f	gccctagg gcgaatcgaccatcaggtgaagattcg	<i>Avr</i> II
Srf _{ADH} -M1/2-3 _r	gccctagg tattcgattgttccatctggaagcc	<i>Avr</i> II
M5 _{CDM} -Insert _f	gccctagg cattctaactcgggtgatcttgcc	<i>Avr</i> II
M5 _{CDM} -Insert _r	ggcctagg gagacgccgtctcgatgatatg	<i>Avr</i> II
M5 _{TD} -Insert _f	gccctagg cgccattctttgaaagcgatg	<i>Avr</i> II
M5 _{TD} -Insert _r	cgctagg tgcaaaaattgtcatcaatgccg	<i>Avr</i> II
IP _{CDM} f	ggtctag aggtttgcgcatatgtgtgcag	<i>Xba</i> I
IP _{CDM} r	gcggfacc ggcagcgtttgcccttcaag	<i>Kpn</i> I

Oligonukleotid	Sequenz	Restriktionsstelle/ Referenz
IP _{TD f}	<i>gctctagatcagggcgattgaggaaggtgcag</i>	<i>XbaI</i>
IP _{TD r}	<i>ggggtaccgacgatgatatcgtcttgcccc</i>	<i>KpnI</i>

Die Indizes der Oligonukleotide stehen für „forward“ und „reverse“. Die Erkennungssequenzen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Fettdruck) wurden am 5'-Ende der Oligonukleotide eingefügt. Falls eine neutrale Mutagenese für die Konstruktion der Hybridenzyme nicht möglich war, wurden die betreffenden Aminosäuren homolog substituiert. Nukleotide, die nicht mit der Originalsequenz übereinstimmen, wurden kursiv dargestellt.

Tab. 3.5: PCR-Primer für die Identifizierung der *Bacillus subtilis*-Mutanten.

Oligonukleotid	Sequenz	Referenz
T7 _f	taatacagactcactatagg	(TIB MOLBIOL)
Ins 2 _r	ctggagacgaagatcaggaagctgttcgcc	
Ins 3 _r	ttgaatacggagcggctcaagggttctcc	
Rev 1 _f	cctgagaatgcagttcaatcagcgtatgtgc	
Rev 3 _r	cctcaaatgtttgaacggcaggccg	
Rev 5 _r	gctctccgcaaagctccgttcagctggccgctcg	

Die Indizes der Oligonukleotide stehen für „forward“ und „reverse“.

3.4 Chemikalien, Enzyme, Kits und Größenmarker

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien, Medien und Antibiotika wurden bezogen von: Amersham (Braunschweig), Biomol (Hamburg), Boehringer (Mannheim), BTS Biotech Trade & Service GmbH (St Leon.Rot), Difco (Detroit, USA), Gibco BRL (Grand Island, USA), ICN Biomedicals (Cleveland, USA), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (St Louis, USA), United States Biochemical Corp. (Cleveland, USA). Sie wurden in der Regel im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Die Radiochemikalien [α -³²P]-ATP, [γ -³²P]-ATP, [¹⁴C(U)]-L-Valin, [¹⁴C(U)]-L-Glutaminsäure sowie [¹⁴C(U)]-L-Leucin stammten von Hartmann (Braunschweig) und [³²P]-markiertes Na₄P₂O₇ von DuPont (Bad Homburg) und die gebrauchsfertigen Lösungen Roti[®]-Phenol (Redest., in TE-Puffer 10:1 equil. Phenol pH 7,5 -8,0), Rotiphorese[®] Gel 30 (30 % Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid) und Rotiszint[®] eco plus (Szintillationscocktail) von Roth (Karlsruhe).

Die zur Proteinreinigung verwendeten Säulenmaterialien waren: Dextrin von Merck (Darmstadt), POROS 20 MC und 20 HQ von PerSeptive Biosystems (Freiburg), Ni-NTA-Agarose von Qiagen (Hilden), Sephacryl[®] S-200 HR und S-400 HR von Pharmacia (Freiburg) und Ultrogel[®] AcA 34 von BioSeptra (Marlborough, USA).

Bezugsquellen für Enzyme und Kits waren: Restriktionsendonukleasen, Ligase, Alkalische Phosphatase (CIP), Vent[®]-DNA-Polymerase und die dazugehörigen Inkubationspuffer von New England BioLabs (Beverly, USA); Taq-Polymerase und deren Additive von Qiagen (Hilden), Klenow-DNA-Polymerase I von Amersham (Braunschweig) und Terminale Transferase von Boehringer (Mannheim); Epicurian Coli[®] XL2-Blue Ultrakompetente Zellen von Stratagene (Heidelberg); „DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive“ von

Boehringer (Mannheim); „Qiagen Plasmid Mini-, Midi- und Maxi-Kits“ und „DNeasy™ Tissue Kit“ von Qiagen (Hilden); „JetSorb® DNA-Extraction Kit“ von Genomed (Bad Oeynhausen).

Als Größenmarker wurden verwendet:

DNA-Größenmarker: 100-bp- und 1-kb-DNA-Leitern von Pharmacia (Freiburg) und MBI Fermentas sowie λ -DNA mit *HindIII* geschnitten: 125, 564, 2027, 2322, 4631, 6557, 9416 und 23000 bp-Fragmente

Protein-Größenmarker für SDS-Page (1): Proteinmarker High Range von BioRad (Richmond, USA): Myosin 200 kDa, β -Galactosidase 116 kDa, Phosphorylase b 97 kDa, BSA 66 kDa und Ovalbumin 45 kDa **(2):** Proteinmarker Broad Range von New England BioLabs (Beverly, USA): Myosin 212 kDa, MBP- β -Galactosidase 158 kDa, β -Galactosidase 116 kDa, Phosphorylase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Glutamindehydrogenase 55 kDa, MBP2 42 kDa, Lactatdehydrogenase M 36 kDa, Triosephosphatisomerase 26 kDa, Trypsininhibitor 20 kDa, Lysozym 14 kDa, Aprotinin 6,5 kDa, Insulin A,B 2,3-3,4 kDa

Kalibrationsproteine für die Gelfiltration von Pharmacia (Freiburg): BSA 67 kDa, Aldolase 158 kDa, Katalase 232 kDa, Ferritin 440 kDa und Thyroglobulin 669 kDa

3. 5 Apparative Ausstattung und sonstige Materialien

Es wurden folgende Geräte verwendet: Elektroporator von Invitrogen (Leek, NL), 8-l-Fermentor von Meredos, French® Pressure Cell Press von SLM Instruments, Inc., Gelperfusionschromatographie-Workstation BioCAD™ mit Software Version 1.24.3. von PerSeptive Biosystems (Freiburg), GeneQuant®-Photometer und HiLoad-System von Pharmacia (Freiburg), Hybridisierungsöfen Hybaid Micro-4 von MWG-Biotech (Ebersberg), Kühlzentrifugen Sorvall® RC5B und RC5C von DuPont (Bad Homburg), Mikroskop von Carl-Zeiss Jena, Rotationsverdampfer von Büchi (Schweiz), Schüttelinkubatoren G25 Incubator Shaker von New Brunswick Scientific (Edison, USA), sterile Werkbank Uniflow UVUB 1200 und SpeedVac von Uniequip (Martinsried), Spektrophotometer UV-120-02 von Shimadzu (Japan), Szintillationszähler Liquid Scintillation Counter 1209 Rackbeta von LKB Wallac (Turku, Finnland), Tischzentrifugen 5415 von Eppendorf (Hamburg) und Biofuge 13 von Heraeus (Osterode), Trio-Thermozykler von Biometra (Göttingen), Ultrazentrifuge L8-50M/E von Beckman ((Palo Alto, USA), UV-Transilluminator von K. Benda (Wiesloch) und Vertikalgelelektrophorese-Apparatur von Biometra (Göttingen). Sequenz- und Restriktionsanalysen sowie Alignments wurden mit der PC-Software PC/Gene Version 6.6 durchgeführt.

Ferner wurden folgende Materialien eingesetzt: Dialyseschläuche von Serva (Heidelberg), Dünnschichtplatten Kieselgel 60 Alufolien von Merck (Darmstadt), Elektroporationsküvetten von Invitrogen (Leek, NL), Glasfaservorfilter GF 92 Ø 25 mm von Schleicher und Schuell (Dassel), Nylonrundfilter Hybond™-N von Amersham, Polaroid-Filme Typ 667 von Kodak,

Replikplatten Accutran Replica plater von Schleicher und Schuell, Röntgenfilme A3 von Konica, Proteinkonzentratoren Centrex[®] UF 0,5 und 2 von Schleicher und Schuell bzw. Centriprep[®] von Amicon und Vivaspin 15 concentrator von Vivascience (UK), Spritzenfilter Porengrößen 0,22 und 0,45 µm von Roth (Karlsruhe) sowie Zellglas von Folia.

3. 6 Medien, Agarplatten und Antibiotika

LB-Medium (*Luria Broth*): 10 g Pepton aus Casein, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, mit H₂O ad 1 l

2x TY-Medium: 16 g Pepton aus Casein, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, mit H₂O ad 1 l

YPD-Medium: 20 g Pepton aus Casein, 10 g Hefeextrakt, mit H₂O ad 900 ml, nach dem Autoklavieren Zugabe von 100 ml 20 % Glucose (separat autoklaviert)

Landy-Medium (modifiziert; Vollenbroich et al., 1993): 1 g Hefeextrakt, 5 g Glutaminsäure, 2 mg Phenylalanin, 0,5 g MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g KCl, 5 mg MnSO₄, 0,16 mg CuSO₄ x 5 H₂O und 0,15 mg FeSO₄ x 7 H₂O wurden in deionisiertem H₂O gelöst, mit 10 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt und mit H₂O auf 940 ml aufgefüllt; nach dem Autoklavieren Zugabe von 40 ml 50 % Glucose sowie 20 ml 5 % KH₂PO₄ (beide Lösungen separat autoklaviert)

4x PAB-Medium: 70 g Antibiotic-Medium 3 (*Difco*), mit H₂O ad 1 l; 15 min autoklaviert

2x SMM-Lösung: 1 M Saccharose, 0,04 M Maleinsäure, 0,04 M MgCl₂ wurden in deionisiertem H₂O gelöst, mit 10 M NaOH auf einen pH-Wert von etwa 6,4 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt; 15 min autoklaviert

SMMP-Medium (vor Versuchsbeginn jeweils frisch angesetzt): 50 % 2x SMM-Lösung, 45 % 4x PAB-Medium und 5 % BSA (gelöst in 2x SMM und sterilfiltriert)

DM3-Chloramphenicol-Agar: 200 ml 5 % Agar-Agar, 500 ml 1 M Natriumsuccinat (pH 7,3), 100 ml 5 % Casein-Säurehydrolysat, 50 ml 10 % Hefeextrakt, 100 ml 3,5 % K₂HPO₄/1,5 % KH₂PO₄, 10 ml 50 % Glucose und 10 ml 5 % BSA (gelöst in H₂O). Außer der BSA-Lösung (sterilfiltriert) wurden alle Komponenten separat autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt. Zur Präparation der DM3-Chloramphenicol-Agarplatten wurde die Agar-Lösung aufgeschmolzen, auf 45 bis 55 °C abgekühlt, und mit den auf etwa 50 °C temperierten Komponenten versetzt (außer BSA und Chloramphenicol: Zugabe ohne Erwärmung). Die Chloramphenicol-Konzentration wurde auf 7,5 µg/ml eingestellt.

X-Gal-Agar: Zu autoklaviertem und auf 45 bis 55 °C abgekühltem LB-Agar wurden 60 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid, gelöst in DMSO) sowie 0,5 mM IPTG pipettiert.

Antibiotika-Testplatten: Es wurden Platten mit *E. coli DH5α*, *Bacillus licheniformis* und *Pichia pastoris* verwendet. Zunächst wurden dünne LB- bzw. YPD-Agarplatten gegossen. Anschließend wurde in autoklaviertem und auf 40 bis 45 °C abgekühlten Weichagar (LB-Weichagar bei Bakterien, YPD-Weichagar bei *P. pastoris*) eine bei 28 °C inkubierte

Vorkultur im Verhältnis 1:100 resuspendiert. Damit wurden die LB- bzw. YPD-Agarplatten überschichtet. Bei 4 °C waren die Platten etwa 1 Woche haltbar.

DB-Mix (zur Aufbewahrung von Mikroorganismen): 50 % Glycerin, 10 % $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, 4 % MgSO_4 , 4 % KCl

CaCl₂-Lösung (für Calcium-kompetente Zellen): 100 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 20 % Glycerin

Falls nicht anders angegeben wurden die Medien und Lösungen für 20 min bei 121 °C autoklaviert und nach der Abkühlung auf Raumtemperatur sofort verwendet oder bei 4 °C aufbewahrt. Zur Herstellung fester Nährmedien wurde dem Medium vor dem Autoklavieren Agar-Agar zugesetzt (1,6 % für „normale“ Agarplatten, 0,8 % für Weichagar), vor Gebrauch wurde die Agar-Lösung aufgeschmolzen, auf etwa 45 bis 55 °C abgekühlt und gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Falls nicht anders angegeben wurden den Medien folgende Antibiotika-Konzentrationen zugesetzt: 100 µg/ml Ampicillin, 20 µg/ml Kanamycin bzw. 20 µg/ml Chloramphenicol.

3. 7 Puffer und Lösungen

Bradford-Lösung: 0,04 % Coomassie Brilliant Blue G 250, 4,8 % Ethanol, 8,5 % Phosphorsäure, sterilfiltriert (0,45 µm)

10x DNA-Probenpuffer: 40 % Sucrose, 0,1 % Xylencyanol, 0,1 % Bromphenolblau

10x TBE-Puffer: 0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA

TE-Puffer (20:1): 20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 7,5

TE-Puffer (10:1): 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 7,5

25 mM dNTP-Mix: je 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

25 mM KP_i-Puffer pH 5,3: 25 mM KH₂PO₄ vorlegen, mit 25 mM K₂HPO₄ titrieren

Plasmidisolierung:

Resuspensionspuffer P1: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

Lysispuffer P2: 200 mM NaOH, 1 % SDS

Neutralisationspuffer P3: 3 M Kaliumacetat pH 5,5

QBT-Puffer: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol, 0,15 % Triton[®]X-100

QC-Puffer: 1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol

QF-Puffer: 1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 15 % Isopropanol

Koloniehybridisierung:

20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0

Hybridisierungslösung: 5x SSC, 0,1 % N-Lauroylsarcosin (Natriumsalz), 0,02 % SDS, 1 % Magermilchpulver (= Blocking-Reagenz)

Waschlösung 1: 2x SSC, 0,1 % SDS

Waschlösung 2: 0,5x SSC, 0,1 % SDS

Detektionslösung 1: 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

Detektionslösung 2: 0,5 % Magermilchpulver in Detektionslösung 1

Detektionslösung 3: 100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂

Färbelösung 4: 45 µl NBT-Lösung, 35 µl X-Phosphat in 10 ml Detektionslösung 3

NBT-Lösung: 75 mg/ml Nitroblue Tetrazolium-Salz in 70 % Dimethylformamid (DMF)

X-Phosphat: 50 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat in DMF

Stoplösung 5: 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

Aufschlußpuffer (1): 20 mM MES/HEPES pH 6,5

(2): 20 mM MES/HEPES pH 7,0

(3): 20 mM Tris/HCl pH 7,0

Puffer für die Affinitätschromatographie an Dextrin:

Dextrin-Säulenpuffer: 20 mM MES/HEPES pH 6,5, 200 mM NaCl

Dextrin-Elutionspuffer: 10 mM Maltose in Dextrin-Säulenpuffer

Puffer für die Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose:

Ni-NTA-Aufschlußpuffer (1): 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl

(2): 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,25 mg/ml Lysozym

Ni-NTA-Säulenpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol

Ni-NTA-Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol

Puffer für die Gelperfusionschromatographie:

Strippinglösung: 50 mM EDTA, 1 M NaCl

MC-Säulenpuffer (1): 15 mM MES/HEPES/Acetat pH 7,0

(2): 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl

HQ-Säulenpuffer: 15 mM Tris/bis-Tris-Propan pH 8,0

SDS-PAGE:

Coomassie-Färbelösung: 0,4 g Coomassie Brilliant Blue G 250, 50 ml Ethanol_{absolut}, 34 ml 70 % HClO₄, 800 ml Wasser

Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,3, 20 mM Glycin, 1 % SDS

SDS-Denaturierungspuffer: 10 % Glycerin, 1 % β-Mercaptoethanol, 1 % SDS, 50 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,01 % Bromphenolblau

Silberfärbung:

Fixierlösung: 50 % Methanol, 12 % Essigsäure

Waschlösung 1: 10 % Ethanol, 5 % Essigsäure

Färbelösung 1: 0,1 % $K_2Cr_2O_7$

Färbelösung 2: 0,2 % $AgNO_3$

Waschlösung 2: 8 % $Na_2CO_3 \cdot 10 H_2O$

Entwicklerlösung: 0,075 % Formaldehyd in Waschlösung 2

Stopplösung: 1 % Essigsäure

ATP-PP_i-Austausch sowie γ -ATP-Hydrolyse

Stopplösung: 1 % Aktivkohle (säuregewaschen) in 0,1 M $Na_4P_2O_7$, 14 % $HClO_4$

Dünnschichtchromatographie

Fließmittel 1: Isopropanol / Wasser = 70/30 (v/v)

Fließmittel 2: n-Butanol / Eisessig / Wasser = 4/1/1 (v/v/v)

Fließmittel 3: Isobuttersäure / Ammoniak / Wasser = 66/1/33 (v/v/v)

Fließmittel 4: Chloroform / Methanol / Wasser = 65/25/4 (v/v/v)