

## Translation of lab protocols

### Transformation Protocol

---

- 1) Stellen Sie die kompetenten Zellen auf Eis
- 2) Mischen Sie daraufhin das Ligationsprodukt zusammen. Dazu werden 50  $\mu$ L Zellen und 2  $\mu$ L Plasmid zusammengegeben
- 3) Inkubieren Sie die Zellen 30 Minuten auf Eis
- 4) Daraufhin folgt der Heat Schock: Für  $\text{CaCl}_2$  beträgt dieser 55 Sekunden, für  $\text{RuCl}_2$  75 Sekunden, danach werden 900 ml LB Medium zugegeben
- 5) Inkubieren Sie daraufhin die Zellen bei 37 Grad Celcius für 80 Minuten
- 6) Zentrifugieren Sie daraufhin bei 3000 rpm für 10 Minuten
- 7) Verwerfen Sie den Überstand
- 8) Resuspendieren Sie das Pellet in 100ml LB Medium
- 9) Verteilen Sie die Zellen (z.B. auf Agarplatten) und inkubieren Sie diese für 14-16 Stunden in einem geeigneten Inkubator

### LB Medium Protokoll:

---

- 1) 10 Gramm Peptone
- 2) 5 Gramm Hefeextrakt
- 3) 10 Gramm Natriumchlorid
- 4) Bei einem Liter Medium werden bis zu 1000 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  (einfach destilliertes Wasser) zugegeben
- 5) Danach folgt die Autoklavierung des Mediums

### LB-Agar Protokoll:

---

- 1) 10 Gramm Peptone
- 2) 5 Gramm Hefeextrakt
- 3) 10 Gramm Natriumchlorid
- 4) 15 Gramm Agar

- 5) Bei einem Liter Medium werden bis zu 1000 ml dH<sub>2</sub>O (einfach destilliertes Wasser) zugegeben
- 6) Benutzen Sie 20 Gramm Agar für 1 Liter dH<sub>2</sub>O (einfach destilliertes Wasser)

### Protokoll für Übernachtskulturen:

---

- 1) Füllen Sie 5ml LB Medium in ein Röhrchen
- 2) Füllen Sie etwas Zellmaterial von E.coli dH5a unter sterilen Bedingungen in das Röhrchen
- 3) Verschließen Sie das Röhrchen mit Hilfe von Parafilm
- 4) Platzieren Sie das Röhrchen in einen Schüttler für 14-18 Stunden (Optimum 14h)

### Herstellung kompetenter Zellen durch das Calcium Chloride Protokoll:

---

- 1) Impfen Sie 1 ml Übernachtskulturen mit 100 ml LB Medium in einem Kolben an
- 2) Inkubieren sie diesen Kolben für 2-4 Stunden bei 37 Grad Celsius. Testen Sie in einem Spektrometer bei 600nm, ob Sie eine OD von 0,300 erreicht haben
- 3) Verteilen Sie die Lösung in 2 Falkons (50 ml)
- 4) Zentrifugieren Sie diese bei 4 Grad Celsius und 5000g für 5min
- 5) Verwerfen Sie den Überstand
- 6) Resuspendieren Sie die Zellen in 10ml kaltem CaCl<sub>2</sub>
- 7) Dies wird daraufhin 10 Minuten auf Eis gestellt
- 8) Zentrifugieren Sie die Suspension bei 4 Grad Celsius und 5000g für 5 Minuten
- 9) Verwerfen Sie den Überstand
- 10) Fügen Sie 10 ml kaltes CaCl<sub>2</sub> hinzu und resuspendieren Sie die Zellen darin
- 11) Stellen Sie daraufhin die Zellen erneut auf Eis, diesmal für 30 Minuten
- 12) Zentrifugieren Sie nun bei 5000 rpm und 4 Grads Celsius für 5 Minuten.
- 13) Verwerfen Sie erneut den Überstand
- 14) Fügen Sie 1ml CaCl<sub>2</sub> hinzu und lösen Sie darin das vorhandene Pellet.
- 15) Stellen Sie das Gemisch für 5 Minuten auf Eis und lagern Sie es bei 4 Grad Celsius

### Die DNA aus dem iGEM Kit Plate bekommen:

---

- 1) Fügen Sie 10 µL ddH<sub>2</sub>O (2-fach destilliertes Wasser) in den gewünschten Teil der Platte
- 2) Warten Sie etwas bis die DNA sich im Wasser gelöst hat. Holen Sie daraufhin die DNA mit einer Pipette heraus
- 3) Achten Sie darauf, dass Reste der DNA aufbewahrt werden, da von ihnen so wenig vorhanden ist
- 4) Falls zu wenig Probe vorhanden sein sollte, ist eine Verdünnung der Vorräte im Verhältnis 10:1 mit ddH<sub>2</sub>O möglich (doppelt destilliertes Wasser)

## Midi Prep Plasmid Isolations Protokoll:

---

### A) Bakterien Kultur, Zellernte, und Lyse

- 1) Herstellung eines Zellpellets mit 25ml (High Copy) oder 100ml (low copy) einer Übernacht LB Kultur durch zentrifugieren bei 6000 xg und 4 Grad Celsius für 15 Minuten.
- 2) Daraufhin sollte das bakterielle Zellpellet homogen in 4ml Puffer P1 resuspendiert werden
- 3) Fügen Sie 4ml Puffer P2 hinzu. Durchmischen Sie alles, indem Sie das Eppi 4-6 mal vorsichtig drehen. Daraufhin inkubieren Sie das Eppi bei Raumtemperatur für 5min
- 4) Fügen Sie 4ml Puffer P3 hinzu. Durchmischen Sie alles, indem Sie das Eppi 4-6 mal vorsichtig drehen. Daraufhin inkubieren Sie das Eppi auf Eis für 15 Minuten

### B) Reinigung des bakteriellen Zelllysates

- 5) Zentrifugieren Sie bei  $>/ 20.000xg$  und 4 Grad Celsius für 30 Minuten. Zentrifugieren Sie den Überstand erneut bei  $>/ 20.000 xg$  und 4 Grad Celsius für 15 Minuten.

### C) Binden, Waschen, und eluieren von Plasmid DNA durch QIAGEN- Röhrcchen (Spitzen)

- 6) Nutzen Sie eine QIAGEN-Spitze 100, indem Sie 4ml Puffer QBT hinzufügen. Erlauben Sie es der Säulen sich durch Gravitationsfluss zu entleeren
- 7) Fügen Sie den Überstand (Schritt 5) zu der QIAGEN Spitze hinzu und erlauben Sie es dem Überstand in das Granulat/ die Trennsäule durch Gravitationsfluss einzutreten.
- 8) Waschen Sie die QIAGEN-Spitze mit 2x 10ml Puffer QC. Erlauben Sie es dem Puffer durch die QIAGEN Spitze hindurchzutreten mithilfe des Gravitationsflusses.
- 9) Eluieren sie die DNA mit 5ml Puffer QC in saubere 2ml, 15ml oder 50ml Röhrcchen

### D) Ausfällen, waschen und erneutes Lösen der Plasmid DNA

- 10) Füllen sie die DNA aus, indem Sie 3.5 ml auf Raumtemperatur erwärmtes Isopropanol zu der eluierten DNA geben. Mischen Sie alles gut. Zentrifugieren Sie daraufhin bei  $>/ 15.000 xg$  und 4 Grad Celsius für 30 Minuten. Entfernen Sie vorsichtig den Überstand

- 11) Waschen sie das DNA Pellet mit 2ml 70% Ethanol. Dieser sollte auf Raumtemperatur erwärmt werden. Zentrifugieren Sie daraufhin bei  $>/ 15.000 \text{ xg}$  für 10 Minuten. Entfernen Sie erneut vorsichtig den Überstand.
- 12) Lassen Sie das Pellet für 5-10 Minuten raumtrocknen und lösen Sie die dann das Pellet in einem geeigneten Volumen eines Puffer.

Lösen sie das Zellpellet erneut in 250  $\mu\text{L}$  des Lösungsmittel. Transferieren Sie die Zellsuspension in ein Mikrozentrifugen Eppi. Die Bakterien sollten komplett gelöst sein. Dieser Vorgang kann durch vortexen oder durch auf- und abpipettieren beschleunigt werden. Es sollten keine Zellklumpen verbleiben.

Fügen Sie 250 $\mu\text{L}$  des Lyse Mittels hinzu und mischen sie alles, indem Sie das Tube 4-6 Mal drehen. Dies sollte solange durchgeführt werden, bis die Lösung viskos und klar zugleich erscheint.

Fügen Sie erneut 250  $\mu\text{L}$  Lyse Mittel hinzu und mischen Sie die Lösung sofort, indem Sie das Eppi 4-6 Mal drehen.

Zentrifugieren Sie 5 Minuten, um ein Pellet von Zelltrümmern und chromosomaler DNA zu erzeugen.

Transferieren Sie den Überstand in die beigefügten GeneJET Spin Säulen. Dies kann durch dekantieren oder durch pipettieren geschehen. Vermeiden Sie es dabei unbedingt den weißen Ausfall zu transferieren, beziehungsweise diesen mit dem Überstand zu vermischen.

Zentrifugieren Sie für 1 Minute. Entfernen Sie den Durchfluss und platzieren Sie die Säule wieder in das gleiche "Sammeltube"

Fügen Sie 500  $\mu\text{L}$  Wasch-Lösung zu der GeneJET-Spin Säule hinzu. Zentrifugieren Sie für 30-60 Sekunden und entfernen Sie den Durchfluss. Platzieren Sie die Säule wieder in das gleiche „Sammeltube“

Wiederholen Sie diesen Waschschrift, indem Sie 500 $\mu\text{L}$  der Wasch-Lösung erneut hinzufügen.

Entfernen Sie daraufhin erneut den Durchfluss und zentrifugieren Sie erneut für 1 Minute um den Rest der Wasch-Lösung zu entfernen. Dieser Schritt ist wichtig um Reste von Ethanol bei den aufgereinigten Plasmiden zu vermeiden.

Transferieren Sie nun die GeneJET Säule in ein neues 1,5ml Mikrozentrifugationstube. Fügen Sie 50 $\mu\text{L}$  der Elutions-Lösung in die Mitte der GeneJET Säulenmembran hinzu, um die Plasmid Dann zu eluieren. Passen Sie auf, dass Sie mit Ihrer Pipettenspitze nicht die Membran berühren. Inkubieren Sie 2 Minuten bei Raumtemperatur und zentrifugieren Sie für 2 Minuten.

Verwerfen Sie nun die Säule und lagern Sie die isolierte bei  $-20 \text{ Grad Celsius}$ .

## Herstellung eines 80% Glycerol Lösung- Protokoll:

---

Fügen Sie 80ml 99,7% glycerol zu 20ml demineralisiertem Wasser  
Autoklavieren Sie daraufhin diese Lösung

[READ MORE](#)