

Teilversuch I: Extrahieren der Plasmide

Biologische/chemische Materialien:

- **5 ml** flüssiges Kulturmedium
- Ampicillin (**5µl auf 5 ml**)
- **250 µl** resuspension solution 250 µl
- **250 µl** lysis solution
- **10 µl** Protease
- **350 µl** neutralization solution
- **1000 µl** Waschpuffer
- **30 – 100 µl**

Materialien:

- Sterile Zahnstocher
- Pinzette
- LB Platten
- Reagenzgefäß zum Zuschrauben
- 2 ml und 1,5 ml Eppis
- Aufreinigungssäule
- Heiz-Vortexer
- Zentrifuge
- Inkubationskasten
- Pipette

Durchführung:

Plasmide präparieren:

1. **1,8 ml Bakteriensuspension** → Eppi 2 ml → 4 min bei 5000 rpm pelletieren → Überstand verwerfen
2. + **250 µl resuspension solution** → Zellpellet darin lösen → kräftig schütteln
3. + **250 µl lysis solution** → 3 mal invertieren und mischen (nicht vortexen)
4. + **10 µl Protease** → 3 mal invertieren und mischen (nicht vortexen)
5. 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
6. + **350 µl neutralization solution** → 3 mal invertieren und mischen
7. **10 min bei 13000 rpm** zentrifugieren

Binden an die Säule:

8. Überstand auf Aufreinigungssäule → Rest verwerfen
9. Säule **1 min bei 13000 rpm** zentrifugieren

Waschen der Säule:

10. +**750 µl Waschpuffer** → **1 min bei 13000 rpm** zentrifugieren → Durchfluss verwerfen
11. +**250 µl Waschpuffer** → (10.) wiederholen
12. Aufreinigungssäule **2 min bei 13000 rpm** trocken zentrifugieren

Elution von der Säule:

13. Säule in 1,5 ml Eppi stellen → + **30 – 100 µl Wasser**

Teilversuch 2: Transformation

Materialien:

- Inkubationskasten (thermoblock)
- Eppis
- Zentrifuge
- Vortexer
- Pipette
- Platte mit passendem SC-medium

Biologische/chemische Materialien:

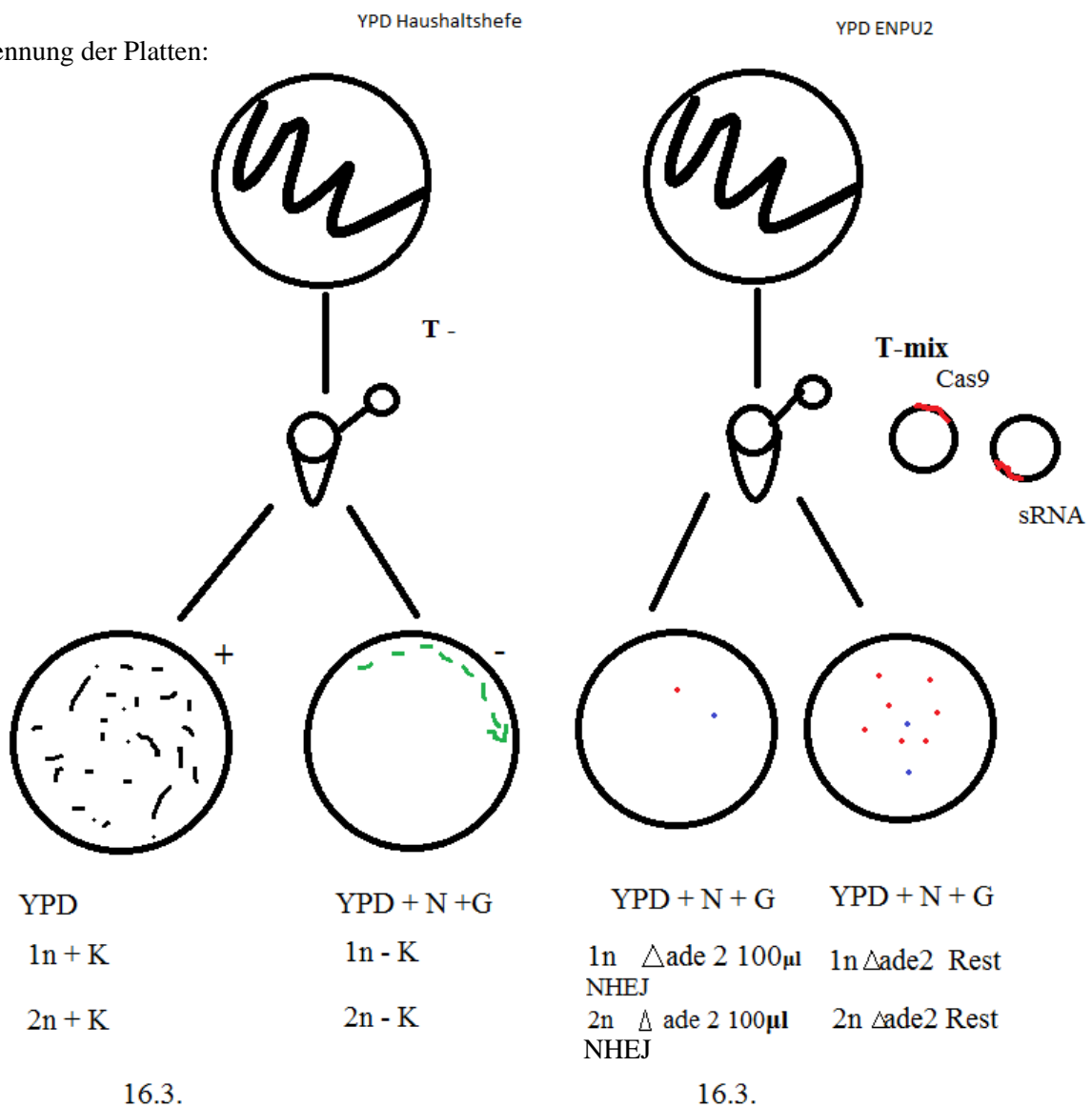
- **Hefe**
 - **1 mal** Haushaltshefestamm (Schon auf einer LB Platte angewachsen)
 - **1 mal** ENPU2 Laborhefestamm (Schon auf einer LB Platte angewachsen)
- Steriles Wasser
- **T-Mix**
 - PEG + **240 µl**
 - LiAc + **36 µl**
 - Plasmid DNA 11 + **6 µl**
 - Plasmid DNA 12 + **6 µl**
 - Steriles Wasser + **72 µl**
 - gesamt Volumen = **360 µl**
- **T-**
 - PEG + **240 µl**
 - LiAc + **36 µl**
 - Steriles Wasser + **84 µl**
 - gesamt Volumen = **360 µl**

Durchführung:

Achtung! Die ganze Zeit Steril Arbeiten!

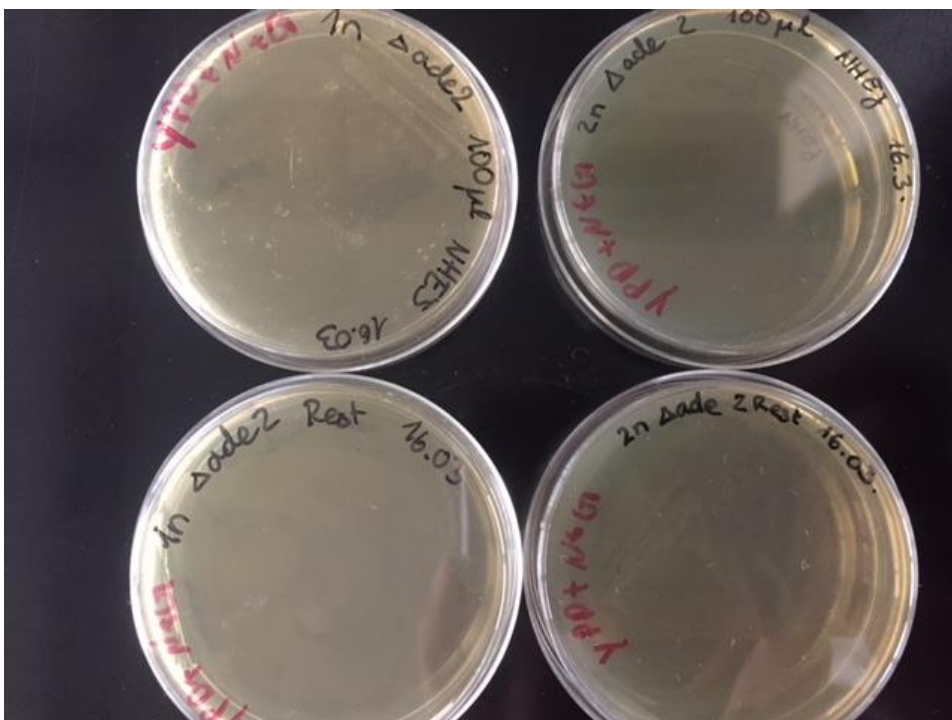
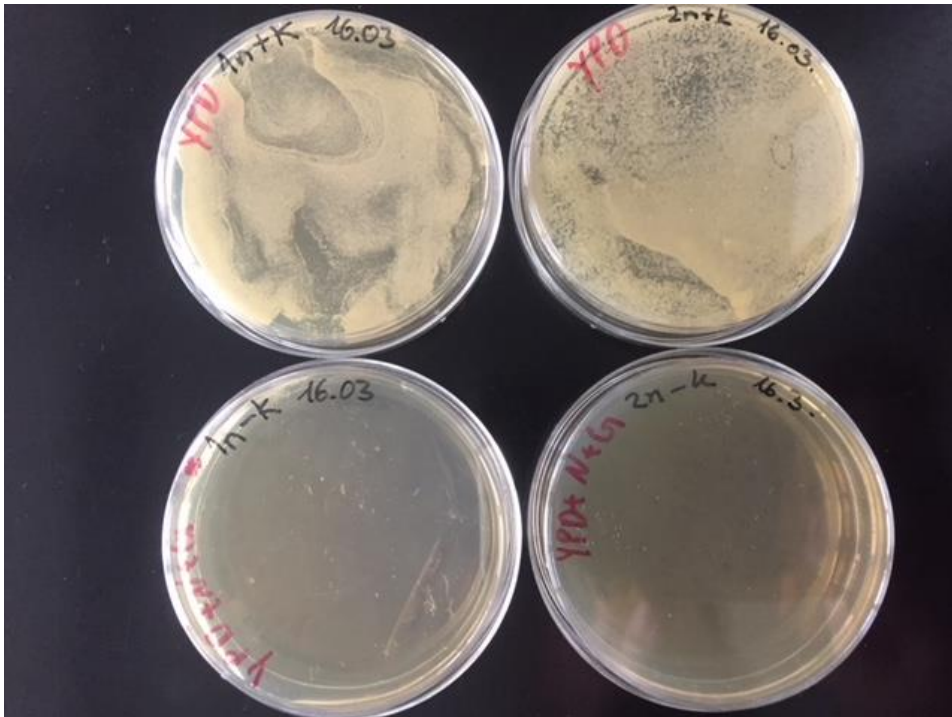
1. **50 µl Hefe Kecks** von YPED Platte → in 1 ml sterilem Wasser Lösen → 1,5 ml Eppi
2. Zellen bei **13000 rpm 30s** pelletieren
3. **T-Mix/T-** hinzugeben → **kurz vortexen**
4. **20 min bis 180 min** bei **42°** Inkubieren (Bei uns 80 min)
5. Zellen bei **13000 rpm 30s** zentrifugieren → Überstand entfernen
6. **1,0 ml Steriles Wasser** zum Pellet → Lösen → vortexen
7. **10 µl** und **100 µl** pipettieren → auf SC medium → **10 µl nochmal + 100 µl steriles Wasser**
8. **3-4d** stehen lassen bei **30°**

Benennung der Platten:



Beobachtung:

Es lag keine Rotfärbung bei den Hefeansätzen vor. Die positiven Kontrollen sind gewachsen die anderen nicht.



Auswertung:

Mögliche Gründe für das Scheitern des Versuchs:

- Ungenau gearbeitet (etwas daneben gegossen)
- Nicht steril gearbeitet