

Bacterial genetic exchange: Bacterial Transformation

VerfasserInnen: Debora Ledergerber debora.ledergerber.riniken@bluewin.ch, Christoph Leemann ch.leemann@bluewin.ch, Adrian Jäggi jaeggi_2000@yahoo.de, Christina Brandenberger cbrandenberger@hotmail.com, Stephanie Samartin stephanie.samartin@freesurf.ch

Betreuerin: M. Yuhana myuhana@botinst.unizh.ch

Ziel und Hintergrund des Experiments

Das Ziel dieses Experiments ist es, Plasmid-DNA (pGlo) in *E. coli* Bakterien einzuführen und die Expression der im Plasmid enthaltenen Gene zu beobachten. Diesen Vorgang nennt man Transformation. Es geht darum, einem Bakterium ein fremdes Plasmid (das pGlo-Plasmid) durch Transformation einzupflanzen:



Das pGlo-Plasmid mit seinen wichtigsten Gensequenzen

Die 4 wichtigsten Gensequenzen des pGlo sind:

- ori:** Der Startpunkt der Replikation
- araC:** Die Gensequenz, die normalerweise für AraC, ein Regulator Protein für Enzyme des Arabinose-Stoffwechsels, kodiert. AraC wird normalerweise nur produziert, wenn Arabinose vorhanden ist. Wenn keine Arabinose in die Zelle gelangt, können die folgenden Sequenzen durch die RNA-Polymerase nicht abgelesen werden.
- GFP:** Green fluorescent protein: Ein Gen, das in gewissen Quallen vorkommt, die grün leuchten. Dieses Leuchten wird erst durch Anregung mit UV-Licht sichtbar. Das GLO-Genprodukt wird als Indikator für erfolgreiche Transformation des GLO-Gens herangezogen.
- bla:** Diese Sequenz kodiert für eine β -Lactamase, ein Enzym, das den beta-Laktam Ring des Ampicillins spalten kann.

Das GFP wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert und dann ins Plasmid pGlo eingeführt. Das Genprodukt von pGlo ist ein Protein, das aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur durch UV-Licht angeregt werden kann und dann Energie in Form von grünem Licht abgibt.

In pGlo wurde das GFP-Gen in das Arabinose Operon eingeführt, so dass die Expression von GFP unter den gleichen Bedingungen abläuft wie die der Arabinose-Abbaugene: Am Anfang des Arabinose Operons sitzt die Repressorregion, die durch das DNA-bindende Regulator-Protein AraC blockiert oder freigegeben wird. Das Regulator-Protein hindert die RNA-Polymerase daran an die DNA zu binden und die zum Arabinose Abbau nötigen Gene zu transkribieren. Ist jedoch genügend Arabinose als Substrat vorhanden, interagiert Arabinose direkt mit dem AraC Repressor und ändert dessen Konformation, so dass die RNA-

Polymerase jetzt binden und transkribieren kann; Arabinose wird abgebaut. Ist keine Arabinose mehr vorhanden, kehrt der Repressor AraC zu seiner ursprünglichen Konformation zurück und die Transkription wird gestoppt.

Im Konstrukt mit pGlo reguliert AraC nicht mehr den Arabinose Abbau, sondern die Expression von GFP, da die ara-Gene durch das GFP-Gen ersetzt worden sind. Es braucht also Arabinose als Substrat, damit GFP exprimiert werden kann.

Durchführung und Auswertung

Es werden zwei Ansätze von *E. coli* Kulturen gemacht, die einen werden das Plasmid pGlo durch Translation erhalten, die anderen nicht.

Um die Bakterien für das Plasmid empfänglich (kompatibel) zu machen, werden sie mit CaCl₂-Lösung behandelt, da die Ca²⁺ Ionen die negativen Ladungen der Phosphat-Gruppen an der DNA ausgleichen.

Zu diesem Zweck wird die (einen Tag alte) Bakterien Suspension zweimal zentrifugiert und die reinen Zellen jeweils in 50mM CaCl₂-Lösung wieder suspendiert. Dazwischen wird auf Eis inkubiert.

Nun erhält der eine Ansatz 10µl der Plasmid enthaltenden Lösung, während der andere leer ausgeht. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis folgt ein 50sek. Hitzeschock, gefolgt von Inkubation auf Eis. Der Hitzeschock öffnet die Poren der Zellmembran und macht sie für das Plasmid durchlässiger.

Jetzt erhalten die arg mitgenommenen Bakterien LB-Lösung (Luria Bertani Medium), welche sie wieder aufpäppeln und zu fleissiger Transkription befähigen soll. Inkubation bei Raumtemperatur.

Nun werden die zwei Ansätze auf je zwei Agarplatten aufgetragen: Alle enthalten LB um optimales Wachstum zu gewährleisten. Der Ansatz mit Plasmid wird auf eine Platte mit Ampicillin (Nr.1) und auf eine Platte mit Ampicillin und Arabinose (Nr.2) aufgetragen. Der Ansatz ohne Plasmid wird auf eine Platte mit (Nr.3) und eine ohne Ampicillin (Nr.4) aufgetragen.

Es wird über Nacht bei 37° inkubiert und dann beobachtet.

Auf Nr.3 erwartet man sicher kein Wachstum, da die Bakterien aus diesem Ansatz die im Plasmid enthaltene Ampicillin-Resistenz nicht erhalten haben und somit alle sterben. Auf Nr.4 erwartet man einen dichten Bakterien-Rasen, da sie optimale Wachstums-Bedingungen ohne lebensfeindliche Antibiotica vorfinden.

Da wohl nicht sämtliche Bakterien aus dem ersten Ansatz das Plasmid aufgenommen haben wird man auf Nr. 1+2 keinen Rasen, sondern Kolonien beobachten. Auf Nr.1 werden diese farblos sein, da ihnen das Substrat (Arabinose) zur GFP-Transkription fehlt. Der AraC-Repressor bleibt aktiv. Auf Nr.2 hingegen wird Arabinose die Konformation des Repressors ändern und GFP wird transkribiert, man erwartet also in UV-Licht grün leuchtende Kolonien.

Diese Erwartungen wurden durch Beobachtung (u.a. mit UV-Licht in Dunkelkammer) bestätigt, das Experiment ist geglückt.