

Transformation bei *Escherichia coli*

Verfasst von: Gioia Sirena, Pirmin Scheuber, Nadja Morf

Betreuerin: Munti Yuhana

1 Einleitung

1.1 Ziel

Die Durchführung und das Verständnis eines Transformationsexperimentes, indem das GFP (Green Fluorescent Protein)-Gen mit Hilfe des pGlo-Plasmids in einen Stamm *E. coli* (K-12: HB101) eingeschleust werden soll.

1.2 Theorie zum Experiment

Das Gen für das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) wurde ursprünglich aus der leuchtenden Qualle *Aequorea victoria* isoliert. Die dreidimensionale Konformation des Proteins, wird bei UV-Bestrahlung zu Resonanz angeregt, was durch grünes Licht sichtbar wird.

Das Gen für GFP wurde nun in einem weiteren Schritt in das pGlo-Plasmid (Abb. 2) eingefügt. Auf diesem Plasmid befinden sich zusätzlich ein Gen für Ampicillin-Resistenz (durch beta-Lactamase-Produktion, Details siehe BBOM 10th: 20.8) sowie ein modifiziertes Arabinose-Operon. Mit diesem kann die Expression des fluoreszierenden Proteins in den transformierten Zellen kontrolliert werden. Dieses Operon ist dem GFP-Gen vorgeschaltet und die Transkription läuft nur in Anwesenheit von Arabinose im Nährmedium (siehe Kursanleitung Appendix 1).

Wenn also die Transformation des Plasmids erfolgreich gelungen ist, können diese dank Ampicillin-Resistenz und Fluoreszenz (nur wenn Arabinose Zucker zugegeben, sonst leuchten die Bakterien nicht) selektioniert werden.

Um eine Transformation durchführen zu können, müssen die Zellen kompetent, d.h. gemacht werden, DNA durch ihre Zellwand und ihre Membrane aufzunehmen. Dies wird im Versuch durch Zugabe von CaCl_2 erreicht.

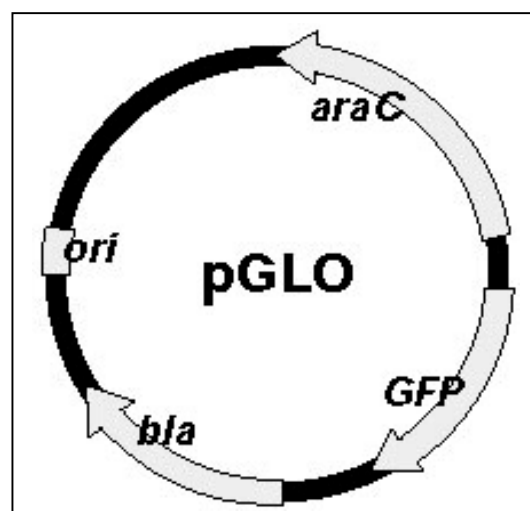


Abb. 1: Schema eines pGlo-Plasmids: *araC*: Gen für Regulator-Protein für GFP-Expression, *GFP*: Gen für Green Fluorescent Protein, *bla*: Gen für beta-Lactamase (Ampicillin-Resistenz).

2 Vorgehen

Um kompetente Zellen zu erhalten, werden 2 Ansätze von einer „über Nacht Kultur“ *E. coli* (HB:101) zentrifugiert, vom Überstand getrennt, mit CaCl_2 versetzt, dann 15 Min. auf Eis gekühlt, wieder zentrifugiert und nochmals während 10 Min. auf Eis gelegt.

In den einen Ansatz (mit „+DNA“ angeschrieben) wird pGlo-Lösung gegeben und auf Eis gekühlt. Der andere Ansatz („- DNA“) wird ohne Plasmid-Zugabe auf Eis gelegt. Die Zellen aus diesem Ansatz sind für die Negativkontrolle.

Als nächster Schritt werden vier Agarplatten wie folgt gekennzeichnet:

- LB+Amp (*E. coli* Zellen mit DNA pGlo Plasmid)
- LB+Amp+Ara (*E. coli* Zellen mit DNA pGlo Plasmid)

- LB+Amp (*E. coli* Zellen ohne DNA pGlo Plasmid)
- LB (*E. coli* Zellen ohne DNA pGlo Plasmid)

Nun werden die 2 Ansätze während kurzer Zeit in ein 42°C heisses Wasserbad getaucht, schnell inkubiert und dann während 2 Min. auf Eis gestellt. Diese schnelle Wechsel sind wichtig für das Gelingen einer Transformation.

Zu den beiden Ansätzen wird nun noch flüssiges LB-Medium gegeben und dann für 10 Min. bei RT inkubiert. Danach werden sie auf die entsprechenden Medien ausgeplattet. Über Nacht wird nochmals bei 37°C inkubiert.

Details zum Versuch siehe Kursanleitung zum Experiment 11.

3 Ergebnisse

	+DNA (mit pGlo-Plasmid)	-DNA (ohne pGlo)
LB		Starkes Wachstum (Bakterienrasen), keine Fluoreszenz bei Bestrahlung
LB+Amp	Erkennbares Wachstum nur einzelne Kolonien sichtbar, da nicht alle Zellen pGlo-Plasmid aufgenommen haben, keine Fluoreszenz	Kein Wachstum, da keine Resistenz
LB+Amp+Ara	Erkennbares Wachstum (selber Grund wie oben), bei Bestrahlung Fluoreszenz	

4 Diskussion

Ansatz „-DNA“:

Die Agarplatte ohne Ampicillin (LB) wird von einem dichten Bakterienrasen bedeckt. Die nicht transformierten *E. coli* sind unter optimalen Bedingungen gewachsen. Sie leuchten nicht, da sie kein GFP-Gen enthalten.

Auf der Agarplatte mit Ampicillin (LB+Amp) wachsen die nicht transformierten Bakterienzellen nicht, da sie ohne das pGlo-Plasmid nicht gegen Ampicillin resistent sind.

Ansatz „+DNA“:

Auf der Agarplatte mit Ampicillin (LB+Amp) sind nur die transformierten *E. coli*-Zellen gewachsen, da sie aufgrund des aufgenommenen Plasmids eine Ampicillin-Resistenz besitzen. Die Transformation ist jedoch nicht bei allen Zellen gelungen, deshalb sieht man nur vereinzelte Kolonien, die Dichte ist geringer, als unter optimalen Bedingungen. Die Zellen zeigen unter UV-Bestrahlung keine Fluoreszenz, da dem Medium kein Ampicillin beigegeben wurde.

Mit ähnlicher Dichte wie auf LB+Amp sind die *E. coli*-Zellen gewachsen, die auf das Medium LB+Amp+Arabinose ausgeplattet wurden. Sie leuchten unter UV-Bestrahlung grünlich, da sie GFP exprimieren.

Alle Ergebnisse stimmen mit den Erwartungen überein.

5 Anhang

5.1.1 Quellen

- BBOM 9th Edition: 9.6, 10.16, 7.2
- BBOM 10th Edition: 10.6, 31.1, 8.5, 20.8
- www.gunn.palo-alto.ca.us/~ghorsma/rainforest/pGLO.JPG (Abb. 2)
- www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_03/pdf/11transfo02.pdf

5.1.2 Weiterführende Fragen

Man könnte sich überlegen, welcher Anteil an Zellen des Ansatzes "mit DNA" erfolgreich transformiert wurde. Dazu würde man mittels einer Verdünnungsreihe von Bakterien, an denen die Transformation durchgeführt wurde, die Konzentration an transformierten Zellen im Ansatz berechnen und diese mit der Gesamtkonzentration an Zellen im Ansatz "ohne DNA" vergleichen, welche gleich ermittelt würde.

Voraussetzung ist allerdings, dass die Zellen der beiden Ansätze aus der gleichen Ursprungskultur stammen und gleich verdünnt sind.