

Transformation bei *Escherichia coli*

(Experiment 11, Gruppe D Donnerstag)

AutorInnen: Anna Kopps, annakopps@gmx.ch
Regina Strasser, reginastrasser@baden.ch
Joseph Marino, jo_ma@gmx.ch

Tutorin: Munti Yuhana, myuhana@botinst.unizh.ch

1. Zielsetzung

Während eines Praktikumnachmittags wurde eine Transformation, mit *E. coli* (K-12:HB101) als Empfänger und DNA-Plasmid (pGlo) durchgeführt. Da die Bakterienkulturen über Nacht inkubiert werden mussten, wurde am selben Tag mit den Kulturen einer Gruppe vom Vortag weitergearbeitet.

2. GFP, pGlo und AraC

Das Plasmid (pGlo), das vom Bakterium während der Transformation aufgenommen wird, enthielt ursprünglich ein vollständiges Arabinose Operon. Die drei Gene *araB*, *araA* und *araD* die für Arabinoseverdauungsenzyme codieren sind durch das GFP (Green Fluorescent Protein from luminescent jellyfish *Aequorea victoria*) ersetzt worden, der Promotor (p_{BAD}) ist derselbe. Der Promotor p_{BAD} wird durch das DNA-gebundene Protein AraC und Arabinose kontrolliert (Aktivierung/Deaktivierung), das Vorhandensein des Zuckers Arabinose bewirkt eine Konformationsänderung des AraC, das dann ein Andocken der RNA-Polymerase an die DNA ermöglicht. Das pGlo enthält ebenso das *bla*-Gen, das für eine beta-lactamase kodiert, was soviel wie eine Ampicillin-Resistenz ist.

3. Kompetenz

Damit die DNA vom Bakterium aufgenommen wird, sagt man, dass dieses kompetent sein muss. Viele Bakterienarten sind während ihres ganzen Lebenszyklus' nur für eine kurze Zeit kompetent und können nur dann durch ihre Membran Erbmaterial aufnehmen. Eine bessere Methode, als auf den idealen und oft sehr kurzen Zeitpunkt zu warten, sind Ca^{2+} -Ionen, die dem negativ geladenen Rückgrat der DNA (PO_4^-) eine neutrale Ladung geben. Auch haben Ca^{2+} -Ionen eine positive Wirkung auf die Phospholipide der Bakterienmembran.

4. Material

E. coli in LB-Medium (Nährmedium das von Luria & Bertani erfunden wurde), verschiedene Agarplatten mit LB, LB+Amp (Ampicillin) und LB+Amp+Ara, Eppendorfröhrchen, Pipetten, Eis, Wasserbad, etc.

5. Praktische Arbeit

In zwei Eppendorfröhrchen, die mit +DNA und -DNA (Negativkontrolle) beschriftet wurden, gab man je 1.5 ml *E. coli*-Kultur. Beide Röhrchen wurden zentrifugiert und das Pellet mit 1ml $CaCl_2$ (50mM) aufgespült. Danach wurden die Röhrchen 15 min. auf Eis gelegt, nochmals zentrifugiert und diesmal mit 200 μ l $CaCl_2$ aufgespült, dann wiederum 10 min. aufs Eis gelegt. Anschliessend wurde dem +DNA-Röhrchen 10 μ l Plasmidlösung beigemischt, anschliessend 10 min. auf Eis, 50

sek. im 42° C warmen Wasserbad und nochmals 2 min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250µl LB-Medium wurden die Röhren nochmals 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Je 100µl der *E. coli*-Lösungen wurden dann wie folgt auf die Agarplatten ausgeplattet:

LB + Amp: +DNA

LB + Amp + Ara: +DNA

LB + Amp: -DNA

LB: -DNA

Die Platten wurden über Nacht bei 37° C inkubiert.

6. Auswertung

Wie erwartet, konnte wir auf den Platten folgende Wachstumsresultate erkennen:

LB + Amp	+DNA	vereinzelte Bakterienstämme als Punkte erkennbar, leuchten nicht mit UV-Licht
LB + Amp + Ara	+DNA	vereinzelte Bakterienstämme, die unter dem UV-Licht stark grünlich leuchten
LB + Amp	-DNA	kein Wachstum
LB	-DNA	ein regelmässiger Bakterienteppich, also sehr starkes Wachstum

Auf den Platten mit +DNA entstehen nur einzelne Bakterienstämme, da bei weitem nicht alle das Plasmid während der Transformation aufnehmen konnten. Die maximale Aufnahme rate, die üblicherweise erzielt wird, liegt bei etwa 20%. Die +DNA-Bakterien auf LB + Amp leuchten im UV-Licht nicht, da der Promotor vor dem GFP-Gen nur durch das Vorhandensein von Arabinose aktiviert wird. Würde man nachträglich Arabinose zufügen, so würden auch diese Bakterien nach einiger Zeit im UV-Licht leuchten.