

Experiment 11: Bakterien Transformation

Author: Julie Zähringer

Members: Francesca Di Giallonardo, Sereina Stauffer, Jelena Bütler

Tutor: Munti Yuhana

1. Ziele

- Den interzellulären Genaustausch in Bakterien via Transformation zu verstehen
- Die Funktion der Gene welche die GFP (green fluorescent protein) Expression in *E.coli* Zellen mit einem pGlo plasmid regulieren, zu verstehen

2. Theorie zum Experiment

Wenn Bakterienzellen genetisches Material aus der Umgebung aufnehmen, wird dies als Transformation bezeichnet. In der Natur können Bakterien so Plasmide austauschen, auch Antibiotikaresistenzen können auf diese Weise weitergegeben werden. In diesem Experiment diente *Escherichia coli* als Empfänger für das pGlo plasmid.

Das Green Fluorescent Protein (GFP) reagiert aufgrund seiner einzigartigen dreidimensionalen Struktur auf UV-Strahlung, indem es Energie in Form von grünem Licht abgibt. Das GFP Gen wurde in das pGlo plasmid eingebaut, welches auch eine Ampizillin Resistenz enthält.

Um die Expression des GFP Gens in transformierten Zellen zu kontrollieren, enthält das pGlo Plasmid ein Regulationssystem, das Arabinose Operon. Das GFP Gen ist nur in Zellen aktiv, denen der Zucker Arabinose ins Nährmedium gegeben wurde.

3. Ausführung

Von einer über Nacht gewachsenen Kultur von *E. coli*, wurden je 1,5 ml in ein mit plus und in ein mit minus beschriftetes Eppendorf Röhrchen gegeben und dann 2 Minuten zentrifugiert. Wir entfernten die Überstände, gaben je 1 ml 50 mM CaCl_2 dazu (um die Poren in der Zellmembran zu öffnen) und inkubierten beide Ansätze auf Eis während 15 Minuten. Nach weiterer Zentrifugation wurden zu den Zellen wieder je 200 μl CaCl_2 gegeben und nochmals 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dann gaben wir nur in das mit plus beschriftete Röhrchen 10 μl des pGlo Plasmids in Lösung und inkubierten die beiden Ansätze erneut für 10 Minuten auf Eis. Dann wurden sie für 50 Sekunden in 42 °C heisses Wasser gestellt und ein letztes Mal für 2 Minuten auf Eis

inkubiert. In beide Ansätze gaben wir 250 µl des LB Mediums und inkubierten sie für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Schliesslich wurden aus dem plus-Röhrchen 100 µl Lösung auf einem Medium mit LB und Ampizillin ausplattiert und 100 µl auf einem Medium mit LB, Ampizillin und Arabinose. Aus dem minus-Röhrchen wurden ebenfalls 100 µl auf einem Medium mit LB und Ampizillin ausgestrichen und 100 µl auf einem Medium welches nur LB enthielt. Alle Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4. Resultat

Austriche von Bakterien aus dem minus-Röhrchen:

Auf der Platte die nur LB enthielt, war Wachstum sichtbar. Auf der Platte die LB und Ampizillin enthielt, war kein Wachstum sichtbar, da die Bakterien kein pGlo Plasmid und somit keine Ampizillin-Resistenz bekommen hatten. Da ihnen das pGlo Plasmid und somit das GFP Gen fehlten, konnte auf keiner der beiden Platten Fluoreszenz beobachtet werden.

Austriche von Bakterien aus dem plus-Röhrchen:

Da die Bakterien aus dem plus-Röhrchen mit dem pGlo Plasmid auch die Ampizillin-Resistenz erhielten, konnte sowohl auf der Platte mit LB und Ampizillin als auch auf der Platte mit LB, Ampizillin und Arabinose Wachstum erfolgen. Fluoreszenz wurde nur bei den Bakterien auf der Platte mit LB, Ampizillin und Arabinose beobachtet, da für die Expression des GFP Gens Arabinose notwendig ist.