

Transformation von *E. coli* mit dem pGLO-Plasmid & Expression des GFP-Proteins

Transformation^{1,2}

In diesem Versuch werden *E. coli*-Zellen mit dem Plasmid pGLO transformiert. Unter **Transformation** versteht man die Aufnahme von DNA in Bakterienzellen. Da auf diese Weise kann das Genom gezielt verändert werden kann, wird diese Methode in der Gentechnik angewandt.

Zunächst müssen die Bakterienzellen in einen Zustand überführt werden, der es ihnen ermöglicht, von außen zugeführte DNA (hier: Plasmid-DNA) in die Zelle aufzunehmen. In diesem Fall spricht man von **Kompetenz der Zellen**. Diese Kompetenz kommt zum einen natürlich vor, zum anderen kann sie künstlich hergestellt werden, z.B. über die CaCl₂-Methode.

Das Calcium-Ion ist zweifach positiv geladen und kann **zwei Phospholipide über Ionenkräfte** miteinander verbinden. Dadurch und durch die Abkühlung auf Eis wird die Membran unbeweglicher. Außerdem ist die CaCl₂-Lösung **hypertonisch**, d.h. die Zellen schrumpfen, weil sie Wasser verlieren. Da Plasmid-DNA (wie jegliche DNA) wegen der Phosphat-Gruppen negativ geladen ist, verbinden die positiv geladenen Ca-Ionen diese negativen Phosphat-Gruppen, und die **Ausmaße des Plasmids verringern sich** erheblich, sodass das Plasmid wesentlich leichter aufgenommen werden kann.

Der anschließende Hitzeschock ist für die Bakterien lebensbedrohend, und der Temperaturunterschied lässt sie anschwellen. Dadurch gibt es Löcher in der Membran, sodass ihr Unterdruck Wasser inklusive Plasmid einsaugt. Die Transformation ist erfolgt, und einige Bakterien überleben diese Prozedur.

Da das Plasmid ein Gen enthält, das die Bakterien gegen das Antibiotikum Ampicillin resistent werden lässt, spricht man auch von einem Markergen: nur die Bakterien, die transformiert wurden, können auf dem Nährstoffmedium mit Ampicillin wachsen.

Plasmid

Die Gene und Marker, die man in das Bakterium einschleusen will, müssen in **Vektoren** vorliegen. Vektoren sind sogenannte „Gentaxis“ oder „Genfähren“, z.B. **Plasmide**. Sie dienen als Transportmittel zur Übertragung von Fremd-DNA in eine Wirtszelle.

Plasmide sind ringförmig geschlossene, extrachromosomale DNA-Moleküle bei Prokaryoten (Bakterien). Alle Plasmide enthalten einige gemeinsame Strukturen: den **ori** = origin of replication, verschiedene Schnittstellen für Restriktionsenzyme = multiple cloning sites und Antibiotikaresistenzgene.

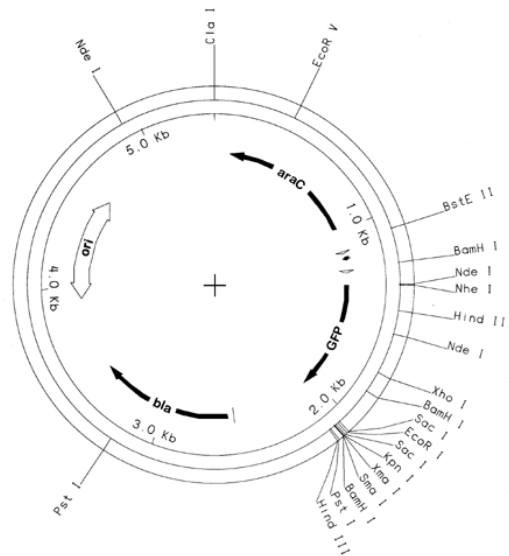


Abb. 1: Struktur des Plasmids pGLO

Im Versuch arbeiten wir mit dem Plasmid pGLO. Das „p“ steht hier für Plasmid, das „GLO“ für den Entdecker des Plasmids. Auf dem Plasmid gibt es codierende Bereiche für folgendes:

- ◆ ori: Replikationsstartpunkt
- ◆ araC: Arabinose Operon
- ◆ bla: beta Lactamase-Gen
- ◆ GFP: green fluorescence protein-Gen.

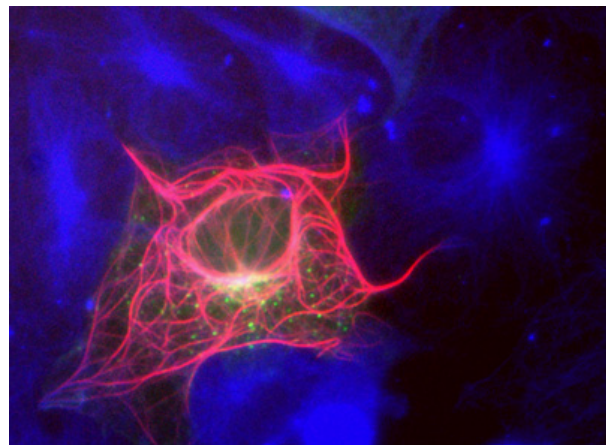
Expression

In unserem Versuch wird ein Gen in *E. coli* eingeführt, durch dessen Expression das grün fluoreszierende Protein, GFP (green fluorescent protein), entsteht, das unter UV-Licht leuchtet. Es stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*, und weil ein artfremdes Gen in *E. coli* transformiert wird, muss dieser Versuch in einem S1-Labor (Gentechnische Arbeiten, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft bei Menschen und Umwelt von keinem Risiko auszugehen ist) stattfinden.



Die Qualle *Aequorea victoria*,
Bild von: Claudia Mills, Washington

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) scheint in der Qualle als Elektronenüberträger zu dienen. Russische Wissenschaftler³ konnten damit die bislang rätselhafte biologische Funktion des Proteins aufklären, das weltweit in zahlreichen biochemischen Labors als Marker eingesetzt wird. Biochemische Vorgänge konnten mit GFP sichtbar gemacht werden. Der Japaner Osamu Shimomura und die US-Amerikaner Martin Chalfie und Roger Tsien erhielten für diese weltweit etablierte Technik den [Chemie-Nobelpreis 2008](#). So kann mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen die Bewegung bestimmter Proteine verfolgt werden.



COS7-Zelle mit DCX DsRed and MPR GFP und mit Beta-Tubulin/Marina Blau. [Robert S. McNeil](#), Pediatric Neurology and Developmental Neuroscience, Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine, aus [a movie of neuroscience images and classical music](#)

In unserem Versuch ist das eingeschleuste Gen ein **Marker-gen** zur Kontrolle der Expression: Die transformierten Bakterien leuchten unter UV-Licht, wenn das GFP-Gen exprimiert wurde. Das modifizierte Arabinose-Operon auf pGLO enthält anstelle der drei Gene zum Abbau von Arabinose das Gen für GFP. GFP wird jetzt also genauso reguliert wie die Arabinose-Abbau-Gene im natürlichen Operon: Wird den transformierten Zellen Arabinose gegeben, findet die GFP-Expression statt, ohne Arabinose wird das GFP-Gen nicht transkribiert. Dazu werden die transformierten Bakterien auf einer Platte mit und einer ohne Arabinose ausplattiert.

1 <http://www.die-leys.de/downloads/MobO%2004%20Transformation.pdf>

2 <http://www.canyons.edu/host/BioTechOutreach/podcasts/Transformation%20CaCl2.doc>

3 Bogdanov, A. M. et al.: Green fluorescent proteins are light-induced electron donors. In: Nature Chemical Biology 10.1038/nchembio.174, 2009

Regina Helde

St. Ursula Gymnasium Freiburg
Eisenbahnstraße 45
79098 Freiburg
regina.helde@bnv-gz.de

Versuchsanleitung: Transformation von *E. coli* mit pGLO (Dauer ca. 2 h + ½ h)

1. **Eis möglichst klein und sorgfältig (Rutschgefahr!) zerstoßen.**
2. Geben Sie zuerst in das Gefäß mit
– pGLO und dann in das mit
+ pGLO je 200 µl Transformationslösung (T).
In dieser Reihenfolge können Sie die gleiche Pipettenspitze nehmen.
Geben Sie die Gefäße wieder auf Eis.
3. Nehmen Sie mit einer sterilen Impföse eine Einzelkolonie von der Starterplatte und bringen Sie die Bakterien in die Transformationslösung (– pGLO) ein, indem Sie die Impföse hin und her bewegen, bis die Bakterien suspendiert sind.
Stellen Sie das Gefäß wieder auf Eis.
4. Verfahren Sie mit einer neuen sterilen Impföse ebenso für das zweite Gefäß (+ pGLO).
Stellen Sie das Gefäß wieder auf Eis.
5. Lassen Sie die Gefäße 10 min auf Eis stehen. Die Gefäße müssen genügend in das Eis eintauchen.
6. Während die Gefäße auf Eis stehen,
kennzeichnen Sie die Nährstoffplatten **gruppenspezifisch**,
klein, **an den Rand der Platten**, damit man später noch die Bakterien sieht,
und mit:

Die mit **LB** erhält ein – **pGLO**,
eine mit **LB/Amp** erhält ein – **pGLO**, die andere ein + **pGLO**,
die mit **LB/Amp/Ara** erhält ein + **pGLO**.
7. Nach den 10 min auf Eis geben Sie die Gefäße im Styroporbehälter für genau 50 Sekunden in ein Wasserbad von 42 °C (Hitzeschock).
Die Gefäße müssen genügend tief eintauchen.
Die besten Transformations-Ergebnisse erhält man, wenn die Gefäße direkt vom Eis ins Wasserbad und vom Wasserbad direkt ins Eis gebracht werden.
8. Inkubieren Sie 2 min auf Eis.
9. Nehmen Sie die Gefäße jetzt aus dem Eis und stellen Sie sie bei RT auf den Tisch. Geben Sie mit jeweils einer neuen Pipettenspitze 200 µl LB-Nährstofflösung (N) in jedes der Gefäße. Mischen Sie durch sanftes Fingerschnippen, inkubieren Sie 10 min bei RT, mischen Sie wieder.
10. Verteilen Sie je 100 µl der Bakteriensuspension auf die entsprechenden Platten.
11. Verteilen Sie die Bakterien mit einem sterilen Drigalski-Spatel. Sterilisieren Sie den Spatel mit Isopropanol in der Flamme nach jedem Verteilen. Auch nach dem letzten Verteilen.
12. Stapeln Sie die Platten übereinander und inkubieren Sie sie über Nacht bei 37 °C.

Versuchsanleitung nach Bio-Rad Laboratories, Inc.

Regina Helde

St. Ursula Gymnasium Freiburg - Eisenbahnstraße 45 - 79098 Freiburg
regina.helde@bnv-gz.de