

Bio-Rad Explorer™

pGLO™ Bacterial Transformation Kit

Katalog-Nr. 1660003EDU

explorer.bio-rad.com

Hinsichtlich der Lagerungstemperatur sind die Angaben zu den einzelnen Komponenten zu beachten.

Die Vervielfältigung von Teilen dieses Dokuments ist nur für Lehrzwecke gestattet. Auf explorer.bio-rad.com sind Unterrichtsmaterialien im Zusammenhang mit dem Bio-Rad Explorer-Kit in mehreren Sprachen erhältlich.

BIO-RAD

Wie können Quallen Licht ins Dunkel bringen?

Viele der in der Biotechnologie oder Molekularbiologie untersuchten Prozesse und Ereignisse sind unsichtbar. Für Einsteiger ist diese Tatsache häufig eine große Schwierigkeit. Das Bio-Rad Explorer Programm hält eine Lösung dafür parat: ein Gen aus einer biolumineszierenden Qualle und deren grün fluoreszierendes Protein—GFP. GFP fluoresziert in einem brillanten Grün, wenn es mit langwelligem ultraviolettem Licht (wie z. B. einer Geologie-Taschenlampe) betrachtet wird.

Das Gen für GFP wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert. Der Wildtyp des Quallengens wurde von Maxygen Inc., einem Biotechnologieunternehmen in Santa Clara, Kalifornien, modifiziert, indem bestimmte Mutationen in die DNA-Sequenz eingeführt wurden, die Fluoreszenz des Proteins verstärken. Diese modifizierte Form des GFP-Gens wurde in das pGLO-Plasmid von Bio-Rad eingesetzt und ist nun exklusiv von Bio-Rad zu Lehrzwecken erhältlich.

GFP ist außerordentlich hell. Wenn pGLO zum Transformieren von Bakterien verwendet wird, ist die Genexpression tatsächlich in Echtzeit zu sehen. Nach der Transformation mit dem GFP-Aufreinigungskit wird das gentechnisch veränderte GFP mit einem einfachen Chromatographieverfahren aus den transformierten Bakterien isoliert. Der gesamte Prozess wird mit der tragbaren UV-Lampe sichtbar gemacht.

Wissenschaftliche Arbeit unter Anleitung

Dieses Lehrmaterial wurde entwickelt, um Kursteilnehmende durch den Denkprozess zu führen, der mit einem laborbasierten wissenschaftlichen Verfahren verbunden ist. Dabei steht nicht so sehr die Antwort oder das Ergebnis im Vordergrund, sondern vielmehr, wie das Ergebnis zustande gekommen ist und wie es durch sorgfältige Beobachtung und Analyse von Daten erhärtet werden kann. Bei dieser Vorgehensweise handelt es sich also um die Untersuchung einer bestimmten Fragestellung im Labor unter Anleitung.

Bei jedem dazu erforderlichen Schritt geht es darum, den Prozess und die Analyse der Daten für die Kursteilnehmenden verständlich zu machen. Anstelle von vorgegebenen Erklärungen oder Interpretationen enthält das Handbuch für Kursteilnehmende eine Reihe von Fragen zu allen Aspekten der Untersuchung, die zum zielgerichteten, selbständigen Denken anregen sollen. Die Antworten stehen in den Empfehlungen für Kursleitende zur Beantwortung von Fragen.

Indem die Kursteilnehmenden den Prozess selbst durchführen, haben sie die Möglichkeit, ein Verständnis für die wissenschaftliche Vorgehensweise und den Wert einer strukturierten und logischen Annäherung an eine Fragestellung zu entwickeln. Außerdem werden sie eventuell ihre Fähigkeit, die wissenschaftliche Methodik zu verstehen, verbessern können.

Die GFP-basierten Lehrmaterialien von Bio-Rad sind einzigartig und haben unter wissenschaftlichen Ausbildern für beispiellose Begeisterung gesorgt. Wir arbeiten daran, unsere Lehrmaterialien und unsere Produkte stetig zu verbessern. Daher legen wir auf Ihre Meinung großen Wert. Wir freuen uns über Ihre Geschichten, Kommentare und Vorschläge.

Bio-Rad Explorer Team
Bio-Rad Laboratories
6000 James Watson Drive
Hercules, CA 94547
bio-rad_explorer@bio-rad.com

Kontext erzeugen. Effektiver lernen. Auf dem Laufenden bleiben.

Neue wissenschaftliche Entdeckungen und Technologien bedeuten, dass immer mehr Lehrstoff in derselben Zeit vermittelt werden muss. Bio-Rad Explorer-Kits erhöhen die Effektivität im Unterricht, indem mehrere zentrale inhaltliche Themen in einer Laboraufgabe behandelt werden. Kombinieren Sie Konzepte mit Techniken und stellen Sie den Zusammenhang mit tatsächlichen Szenarien her.



Inhaltsverzeichnis

Hinweise für Kursleitende

Seite

Einführung in die Transformation.....	1
Das pGLO-System	1
Kit-Bestandteile, Checkliste	2
Zeitplanung	5
Sicherheitsaspekte	5
Wichtige Punkte für den Unterricht	6
Allgemeine Laborvorkenntnisse	6
Experimentelle Aspekte – Optimierung des pGLO-Laborversuchs	7
Konzeptionelle Punkte	8
Überblick über vorbereitende Maßnahmen für Kursleitende	11
Checkliste für Arbeitsplätze.....	11
Anleitung für vorbereitende Maßnahmen für Kursleitende	13
Kurzanleitung (schematische Darstellung des Laborprotokolls).....	18
Empfehlungen für Kursleitende zur Beantwortung von Fragen	20

Handbuch für Kursteilnehmende

Lerneinheit 1	Einführung in die Transformation	32
	Fragen zur Verdeutlichung	33
Lerneinheit 2	Transformationslabor	36
	Fragen zur Wissensüberprüfung	42
Lerneinheit 3	Erfassung und Analyse von Daten.....	43
	Ergebnisanalyse	44
	Fragen zur Wissensüberprüfung	45
Lerneinheit 4	Vertiefungsaktivität: Berechnung der Transformationseffizienz	47

Anhang

Anhang A	Links zur Geschichte der Biotechnologie	53
Anhang B	Begriffsglossar	57
Anhang C	Grundlegende Konzepte und Begriffe aus der Molekularbiologie	59
Anhang D	Genregulierung	64
Anhang E	Fotodokumentation von pGLO-Platten mit dem BlueView Transilluminator von Vernier	66
Anhang F	Literatur	67

Einführung in die Transformation

In dieser Labor-Lerneinheit werden die Kursteilnehmenden ein Verfahren anwenden, das als genetische Transformation bezeichnet wird. Genetische Transformation findet statt, wenn eine Zelle ein neues Stück genetisches Material – DNA – aufnimmt und exprimiert. Diese neue genetische Information verleiht dem Organismus oft ein neues Merkmal, das nach der Transformation identifizierbar ist. Genetische Transformation bedeutet wörtlich eine durch Gene verursachte Veränderung und beinhaltet das Einfügen eines oder mehrerer Gene in einen Organismus, um die Merkmale/Eigenschaften des Organismus zu verändern.

Genetische Transformation wird in vielen Bereichen der Biotechnologie eingesetzt. In der Landwirtschaft können Gene, die Eigenschaften wie Frost-, Schädlings- oder Dürre-resistenz codieren, genetisch in Pflanzen transformiert werden. Bei der biologischen Sanierung können Bakterien mit Genen transformiert werden, die es ihnen ermöglichen, Ölverschmutzungen abzubauen. In der Medizin beginnt man damit, Krankheiten, die durch defekte Gene verursacht werden, durch Gentherapie zu behandeln, das heißt durch genetische Transformation der Zellen einer kranken Person mit gesunden Kopien des defekten Gens, das ihre Krankheit verursacht.

Es ist möglich, Gene aus menschlicher, tierischer oder pflanzlicher DNA herauszuschneiden und in Bakterien einzusetzen, wie es beispielsweise mit dem menschlichen Gen für das Hormon Insulin der Fall ist. Unter den richtigen Bedingungen können diese Bakterien echtes menschliches Insulin herstellen, das dann zur Behandlung von Patienten mit der genetischen Krankheit Diabetes verwendet werden kann, da deren eigenes Insulingen nicht normal funktioniert.

Das pGLO-System

Mit dem pGLO-Transformationskit steht den Kursteilnehmenden ein einfaches Verfahren zur Verfügung, um Bakterien mit einem Gen zu transformieren, das das grün fluoreszierende Protein (GFP) codiert. Dieses Gen stammt ursprünglich aus der biolumineszierenden Qualle *Aequorea victoria*, die aufgrund von GFP im Dunkeln fluoresziert und leuchtet. Nach der Transformation exprimieren die Bakterien ihr neu erworbenes Quallengen und bilden das fluoreszierende Protein, das sie unter UV-Licht in brilliantem Grün leuchten lässt.

In dieser Lerneinheit lernen die Kursteilnehmenden den Vorgang der Übertragung von Genen von einem Organismus zu einem anderen mit Hilfe eines Plasmids kennen. Zusätzlich zu einem großen Chromosom enthalten Bakterien von Natur aus ein oder mehrere kleine ringförmige DNA-Stücke, so genannte Plasmide. Diese Plasmid-DNA enthält normalerweise Gene für ein oder mehrere Merkmale, die für das Überleben der Bakterien von Vorteil sein können. In der Natur können Bakterien Plasmide selbst übertragen und dadurch nützliche Gene an andere Bakterien weitergeben. Dieser natürliche Mechanismus ermöglicht es Bakterien, sich an eine neue Umgebung anzupassen. Das in letzter Zeit verstärkte Auftreten bakterieller Resistenzen gegen Antibiotika ist auf die Weitergabe von Plasmiden zurückzuführen.

Das pGLO-Plasmid von Bio-Rad enthält das Gen für GFP und ein Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin. pGLO enthält außerdem ein spezielles Genregulationssystem, das verwendet werden kann, um die Expression des fluoreszierenden Proteins in transformierten Zellen zu steuern. Das Gen für GFP lässt sich in transformierten Zellen einfach durch Zugabe des Zuckers Arabinose zum Nährmedium einschalten. Die Selektion auf Zellen, die mit pGLO-DNA transformiert wurden, erfolgt durch Anzucht auf Antibiotika-Platten. Auf Platten, die keine Arabinose enthalten, bilden transformierte Zellen weiße Kolonien (Wildtyp-Phänotyp). Wenn Arabinose im Nährstoffagar enthalten ist, fluoreszieren sie grün. Die besondere Konstruktion von pGLO ermöglicht es erstmals, Mechanismen der Genregulation (Anhang D) und der genetischen Selektion auf einfache Weise zu Lehrzwecken zu untersuchen. Zudem kann der gesamte Prozess mit langwelligem UV-Licht aus einer kostengünstigen Lampe oder mit der mitgelieferten stiftförmigen Leuchte sichtbar gemacht werden.

Für maximalen Lerneffekt aus diesem Versuch sollten die Kursteilnehmenden bereits wissen, was ein Gen ist, und den Zusammenhang zwischen Genen und Proteinen verstanden haben. Nehmen Sie zur ausführlicheren Diskussion dieser und anderer grundlegender Konzepte und Begriffe aus der Molekularbiologie Anhang B zur Hilfe.

Dieses pGLO-Transformationskit bietet die Möglichkeit für zusätzliche Laborarbeiten, insbesondere die Aufreinigung des rekombinanten fluoreszierenden Proteins aus transformierten Bakterien unter Verwendung des GFP-Chromatographie-Kits (Katalog-Nr. 166-0005EDU) und die Trennung von in *E. coli* exprimierten Proteinen, zum Beispiel des GFP-Proteins, mit dem pGLO SDS-PAGE Extension-Kit (Katalog-Nr. 166-0013EDU.)

Kit-Bestandteile, Checkliste (✓)

In diesem Abschnitt sind die Bestandteile des Bakterientransformationskits sowie die zusätzlich benötigten Zubehörartikel aufgeführt. Jedes Kit enthält ausreichend Material für 8 Arbeitsplätze. Verwenden Sie diese Liste als Checkliste für Ihren Bestand an Zubehörartikeln, bevor Sie mit der Versuchsdurchführung beginnen. Alle Kitbestandteile können bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert werden.

Kitbestandteile	Anzahl/Kit	(✓)
<i>E. coli</i> HB101 K-12, lyophilisiert	1 Fläschchen	<input type="checkbox"/>
Plasmid (pGLO), lyophilisiert, 20 µg	1 Fläschchen	<input type="checkbox"/>
Ampicillin, lyophilisiert, 30 mg	1 Fläschchen	<input type="checkbox"/>
L (+) Arabinose, lyophilisiert, 600 mg	1 Fläschchen	<input type="checkbox"/>
Transformationslösung (50 mM CaCl ₂ , pH 6,1), steril, 15 ml	1 Flasche	<input type="checkbox"/>
LB-Nährbouillon, steril, 10 ml	1 Flasche	<input type="checkbox"/>
LB-Nährstoffagar, pulverförmig, steril (für 500 ml), 20 g	1 Beutel	<input type="checkbox"/>
Sterile Pipetten, einzeln verpackt	50	<input type="checkbox"/>
Impfösen, steril, 10 µl, 10 Impfösen/Packung	8 Packungen	<input type="checkbox"/>
Petrischalen, 60 mm, steril, 20/Packung	2 Packungen	<input type="checkbox"/>
Mikrozentrifugenröhrchen, mehrere Farben, 2,0 ml	60	<input type="checkbox"/>
Schwimmständer aus Schaumstoff für Mikroteströhrchen	8	<input type="checkbox"/>
Stiftförmige UV-Leuchte	1	<input type="checkbox"/>
Anwendungshandbuch (online verfügbar oder gedrucktes Handbuch auf Anfrage erhältlich)	1	<input type="checkbox"/>

Zusätzlich erforderliche – Zubehörartikel	Anzahl/Kit	(✓)
Uhr/Armbanduhr zum Stoppen von 50 Sekunden	1	<input type="checkbox"/>
Mikrowelle	1	<input type="checkbox"/>
Wasserbad mit Temperaturregulierung, 1–6 Liter (Katalog-Nr. 166-0504EDU)*	1	<input type="checkbox"/>
Thermometer zum Ablesen von 42 °C	1	<input type="checkbox"/>
1-Liter-Kolben	1	<input type="checkbox"/>
500-ml-Messzylinder	1	<input type="checkbox"/>
Destilliertes Wasser, 500 ml	1	<input type="checkbox"/>
Zerstoßenes Eis (keine Eiswürfel) und Behälter (Styroporbecher sind gut geeignet)	1–8	<input type="checkbox"/>
10 ml Bleichlösung (haushaltsüblich), 10%ige Lösung	10 ml	<input type="checkbox"/>
Permanentmarker	4–8	<input type="checkbox"/>

* Wenn kein Wasserbad mit Temperaturregulierung verfügbar ist, besorgen Sie sich einen Behälter (am besten Styropor) für heißes Wasser und verwenden Sie eine Heizplatte oder heißes Leitungswasser, um das Wasser auf 42 °C zu erwärmen.

Optionales Zubehör	Anzahl/Kit	(✓)
Vortexmischer	1	<input type="checkbox"/>
Mikropipetten, verstellbar, 2–20 µl (Katalog-Nr. 166-0506EDU oder 166-0551EDU)	1	<input type="checkbox"/>
Parafilm zum Abdichten	1	<input type="checkbox"/>
2–20 µl Pipettenspitzen	1	<input type="checkbox"/>
37 °C Inkubator (Katalog-Nr. 166-0501EDU)**	1	<input type="checkbox"/>
Vernier Blue Digital Biolmaging System (BL-DBS)	1	<input type="checkbox"/>

** Wenn kein Inkubator verfügbar ist, versuchen Sie es mit einer Heizdecke oder bauen Sie sich selbst einen Inkubator mit einem Karton und einer Niedervolt-Glühbirne. Alternativ können Sie Agarplatten auch 48 bis 72 Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen (siehe Allgemeine Laborvorkenntnisse–Inkubation).

Katalog-Nr.	Produktbeschreibung
166-0555EDU	pGLO Bacterial Transformation Kit Refill Package
166-0405EDU	pGLO Plasmid , 20 µg, lyophilisiert
166-0406EDU	Arabinose , 600 mg, lyophilisiert
166-0407EDU	Ampicillin , 30 mg, lyophilisiert
166-0408EDU	E. coli strain HB101 K-12 , lyophilisiert
166-0409EDU	Transformation Solution , 15 ml
166-0421EDU	LB broth , 10 ml
166-0600EDU	LB Nutrient Agar Powder , 20 g, ergibt 40 Agarplatten mit 60 mm Durchmesser
166-0600EDU	LB Nutrient Agar Powder , 500 g, ergibt 1000 Agarplatten mit 60 mm Durchmesser
166-0479EDU	Jellyfish Foam Floating Racks , 8 Gestelle mit 12 Vertiefungen für Mikrozentrifugenröhrchen
166-0500EDU	Long-Wave UV Lamp , 1
166-0530EDU	UV Pen Light , 1
166-0470EDU	Petri Dishes , 60 mm steril, 500
166-0471EDU	Inoculation Loops , steril, 80
166-0474EDU	Disposable Plastic Transfer Pipets , steril, 500
166-0480EDU	Disposable Plastic Transfer Pipets , unsteril, 500
166-0473EDU	Colored 1.5 ml Micro Test Tubes , 6 Farben, 600
223-9480EDU	EZ Micro™ Test Tubes , 1,5 ml, ungefärbt, 500
223-9430EDU	EZ Micro Test Tubes , 2,0 ml, ungefärbt, 500
166-0033EDU	Anwendungshandbuch (online verfügbar oder gedrucktes Handbuch auf Anfrage erhältlich)

National Science Standards und pGLO-Transformation.

Wissenschaft als Fragestellung

- Formulierung und Untersuchung einer wissenschaftlichen Fragestellung.
Die Kursteilnehmenden lernen die Bedeutung von Kontrollen für das Experiment kennen.
- Verwendung von Technologie und Mathematik zur Verbesserung der Untersuchungen und Kommunikation.
Die Kursteilnehmenden verwenden Mathematik zur Berechnung der Transformationseffizienz. Ausgehend von den Effizienzwerten können sie Unterschiede zwischen Techniken beurteilen.

Biowissenschaftliche Grundlagen

Die Zelle

- Zellen haben eine bestimmte Struktur, die ihrer jeweiligen Funktion entspricht.
Die Kursteilnehmenden sollten verstehen, welche Rolle die Zellmembran spielt, welche Funktionen sie hat und wie das Plasmid mit der angewendeten Labortechnik durch die Zellmembran geschleust wird.
- Die meisten Zellfunktionen beinhalten chemische Reaktionen.
Die Transformationslösung enthält Calciumchlorid. Die Kursteilnehmenden sollten verstehen, wie sich dieses Salz in einer Lösung verteilt und um die geladenen DNA-Moleküle herum anlagert.
- Zellen speichern und verwenden Informationen, um ihre Funktionen zu regulieren.
Die Kursteilnehmenden stellen der Zelle neue Informationen zur Verfügung, die es ihr ermöglichen, neue Proteine herzustellen.
- Zellfunktionen sind reguliert.
Die Produktion des GFP-Proteins wird durch den Zucker Arabinose reguliert.
- In allen Organismen sind die Anweisungen für die Ausbildung der speziellen Charakteristika des jeweiligen Organismus in der DNA enthalten.
Das in die Zelle eingeführte Plasmid ist ein ringförmiges, sich selbst replizierendes Stück DNA.
- DNA-Veränderungen (Mutationen) treten spontan mit niedrigen Häufigkeiten auf.
Bakterien haben die Fähigkeit, sich zu verändern und trotz des Vorhandenseins von Antibiotika zu überleben.

Biologische Evolution

- Arten sind im Lauf der Zeit Entwicklungen unterworfen.
Bakterien haben sich mithilfe von Plasmiden weiterentwickelt und sich neue Gene und neue Proteine zum Überleben angeeignet.

Interdependenz von Organismen

- Lebende Organismen haben die Fähigkeit, Populationen von unendlicher Größe hervorzubringen, allerdings sind die Ressourcen endlich.
Das Bakterienwachstum kommt zum Erliegen, wenn die Nährstoffe erschöpft sind und sich Abfallstoffe in der Petrischale ansammeln.

Wissenschaft und Technik

- Prinzipien von Wissenschaft und Technologie verstehen
Die DNA-Rekombinationstechnologie ermöglicht es, Gene von einer Art in eine andere Art zu übertragen und diese Art ein neues Protein herstellen zu lassen.

Zeitplanung

Jede der drei Laboreinheiten ist so aufgebaut, dass sie in aufeinanderfolgenden 50-Minuten-Einheiten durchgeführt wird. Das ausführliche Laborprotokoll steht im Handbuch für Kursteilnehmende.

Vorgeschlagener Laborzeitplan für Kursteilnehmende

Tag 1	Vorbereitungen	Einführung und Diskussion Fragen der Kursteilnehmenden 1–4
Tag 2	Transformationslabor	Transformation der Zellen und Ausplattieren Fragen zur Verdeutlichung der Laboraktivität für die Kursteilnehmenden
Tag 3	Erfassung und Analyse der Daten	Beobachtung der transformierten Zellen und Kontrollen Analyse und Auswertung der Ergebnisse Fragen der Kursteilnehmenden
Tag 4	Vertiefungsaktivitäten	Berechnung der Transformationseffizienz GFP-Chromatographie-Kit (Katalog-Nr. 166-0005EDU) pGLO SDS-PAGE Extension-Kit (Katalog-Nr. 166-0013EDU)

Sicherheitsaspekte

In manchen Ländern außerhalb der USA ist zur Verwendung dieses Kits eventuell eine spezielle Erlaubnis erforderlich. Bitte erkundigen Sie sich beim Gesetzgeber Ihres Landes nach entsprechenden Vorgaben.

Der in diesem Kit enthaltene *Escherichia coli*-Bakterienstamm HB101 K-12 ist kein pathogener Organismus wie der *E. coli*-Stamm O157 H7, der manchmal mit Lebensmittelvergiftungen in Verbindung gebracht worden ist. HB101 K-12 wurde genetisch verändert, sodass diese Bakterien, außer in angereichertem Medium, nicht wachsen können. Dennoch erfordert der Umgang mit dem *E. coli*-Stamm K-12 die Anwendung mikrobiologischer Standardpraktiken, zum Beispiel der Folgenden: Arbeitsflächen müssen einmal täglich und nach jedem Verschütten von lebensfähigem Material dekontaminiert werden. Alle kontaminierten flüssigen oder festen Abfälle müssen vor der Entsorgung dekontaminiert werden. Alle Personen müssen sich die Hände waschen: (i) nach dem Umgang mit bakterienhaltigem Material und (ii) vor dem Verlassen des Labors. Alle Verfahren werden mit Sorgfalt durchgeführt, um die Bildung von Aerosolen zu minimieren. Es sind mechanische Pipettiervorrichtungen zu verwenden, Pipettieren mit dem Mund ist untersagt; Essen, Trinken, Rauchen und das Auftragen von Kosmetika sind im Arbeitsbereich nicht gestattet; das Tragen von Schutzbrille und Handschuhen wird dringend empfohlen.

Steht kein Autoklav zur Verfügung, können alle Lösungen und Komponenten (Impfösen und Pipetten), die mit Bakterien in Berührung gekommen sind, zur Sterilisation für mindestens 20 min in eine frische 10%ige Bleichelösung gelegt werden. An jedem Arbeitsplatz im Labor sollte sich eine flache Schale mit dieser Lösung befinden. Unabhängig davon, wofür Sie sich entscheiden, sollten alle benutzten Impfösen und Pipetten zum Sterilisieren eingesammelt werden. Petrischalen sind zu sterilisieren, indem der Agar mit 10%iger Bleichelösung überschichtet wird. Die Platte mindestens 1 Stunde stehen lassen und dann die Flüssigkeit in der Platte in den Abfluss spülen. Nach der Sterilisation können die Agarplatten doppelt verpackt und danach wie normaler Abfall behandelt werden. Bei der Verwendung von Bleichelösungen wird das Tragen einer Schutzbrille empfohlen.

Ampicillin kann allergische Reaktionen oder Reizungen der Augen, Atemwege und Haut hervorrufen. Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen. Ampicillin gehört zu den Penicillinen. Personen mit Allergien gegen Penicillin oder andere Antibiotika aus der Penicillin-Familie sollten den Kontakt mit Ampicillin vermeiden.

Die Sicherheitsdatenblätter (SDB) sind auf Anfrage von Bio-Rad erhältlich (Telefonnummer 800-424-6723 in den USA). Weitere Informationen zu Reagenzien in diesem Kit gibt es auch im Internet auf www.bio-rad.com. Bezüglich der ordnungsgemäßen Entsorgung sind die vor Ort geltenden Umwelt-, Gesundheits- und Sicherheitsvorschriften zu beachten.

UV(Ultraviolett)-Lampen

Ultraviolette Strahlung kann Augen und Haut schädigen. Kurzwelliges UV-Licht ist schädlicher als langwelliges UV-Licht. Die für dieses Modul empfohlene Lampe von Bio-Rad gibt langwelliges UV-Licht ab. Es sollte möglichst eine UV-Schutzbrille oder eine Laborschutzbrille getragen werden.

Wichtige Punkte für den Unterricht

In diesem Abschnitt sind Punkte im Zusammenhang mit den Versuchen und dem konzeptionellen Vorgehen beschrieben, die für die Kursteilnehmenden zunächst schwierig zu verstehen, für das Gesamtergebnis der Lerneinheit aber sehr wichtig sind. Kursleitende sollten die Kursteilnehmenden auf diese Punkte aufmerksam machen und, wenn möglich, die Technik zuerst vorführen, bevor die Kursteilnehmenden das Verfahren selbst ausprobieren.

Wichtig ist vor allem, dass die Kursteilnehmenden die richtigen Komponenten in die richtigen Röhrchen und auf die richtigen Platten geben. Daher sind eine eindeutige Beschriftung der Röhrchen sowie eine gute Vorbereitung und Organisation entscheidend für eine reibungslose Durchführung des Versuchs. Die Kurzanleitung hilft dabei, die Lerneinheit zu organisieren. Dieses grafische Laborprotokoll enthält eine schematische Darstellung aller bei der Transformation durchgeführten Arbeitsschritte im Labor.

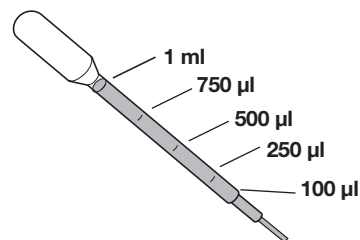
Allgemeine Laborvorkenntnisse

Steriles Arbeiten

Bei jeder mikrobiologischen Technik (z. B. beim Arbeiten mit und Kultivieren von Bakterien) muss darauf geachtet werden, dass keine kontaminierenden Bakterien in das Experiment gelangen. Da kontaminierende Bakterien allgegenwärtig sind und an den Fingerspitzen, auf Arbeitsflächen usw. vorkommen, ist es wichtig, solche kontaminierenden Oberflächen zu meiden. Wenn die Kursteilnehmenden mit den Impfösen, Pipetten und Agarplatten arbeiten, sollte darauf hingewiesen werden, dass die runde Schlaufe am Ende der Öse, die Spitze der Pipette und die Oberfläche der Agarplatte nicht berührt oder auf kontaminierenden Oberflächen abgelegt werden dürfen. Das Experiment selbst wäre bei einer geringfügigen Kontamination wahrscheinlich nicht ruiniert, aber dennoch ist es für die Kursteilnehmenden wichtig, das Konzept einer sterilen Arbeitsweise kennen zu lernen. Steriles Arbeiten ist auch eine Frage der Sauberkeit und Sicherheit.

Gebrauch von Pipetten

Die Kursteilnehmenden sind vor Beginn der Laborarbeiten auf die Einteilungen auf der Pipette hinzuweisen. Die 100- μ l- und 250- μ l- und 1-ml-Markierungen werden bei allen Laborarbeiten als Maßeinheiten verwendet.



Dekontamination und Entsorgung

Steht kein Autoklav zur Verfügung, können alle Lösungen und Komponenten (Impfösen und Pipetten), die mit Bakterien in Berührung gekommen sind, zur Sterilisation für mindestens 20 min in eine frische 10%ige Bleichelösung gelegt werden. An jedem Arbeitsplatz im Labor sollte sich eine flache Schale mit dieser Lösung befinden. Unabhängig davon, wofür Sie sich entscheiden, sollten alle benutzten Impfösen und Pipetten zum Sterilisieren eingesammelt werden. Petrischalen sind zu sterilisieren, indem der Agar mit 10%iger Bleichelösung überschichtet wird. Die Platte mindestens 1 Stunde stehen lassen und dann die Flüssigkeit in der Platte in den Abfluss spülen. Nach der Sterilisation können die Agarplatten doppelt verpackt und danach wie normaler Abfall behandelt werden. Bei der Verwendung von Bleichelösungen wird das Tragen einer Schutzbrille empfohlen. Bezüglich der ordnungsgemäßen Entsorgung sind die vor Ort geltenden Umwelt-, Gesundheits- und Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Inkubation

In dieser Anleitung ist die Verwendung eines auf 37 °C eingestellten Inkubators vorgesehen. Das Transformationsexperiment kann ohne Inkubator durchgeführt werden, jedoch hängt die Anzahl der Tage, die erforderlich sind, um Kolonien in optimaler Größe zu erhalten, von der Umgebungstemperatur ab. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Starterplatten-Kolonien frisch sind (24–36 Stunden Wachstum) und einen Durchmesser von etwa 1–1,5 mm haben. **Kühlagerung der Kulturplatten verringert die Transformationseffizienz erheblich.** Die optimale Temperatur für das Wachstum von *E. coli* beträgt 37 °C (98,6 °F), und niedrigere Temperaturen führen zu einer niedrigeren Wachstumsrate. Bei 28 °C (82 °F) ist eine zweitägige Inkubation erforderlich, um eine optimale Koloniegröße zu erreichen. Bei 21 °C (70 °F) ist eine dreitägige Inkubation erforderlich, um eine optimale Koloniegröße zu erreichen. Die Vorlaufzeiten für die Vorbereitung und der Zeitplan für die Laborarbeiten sind daher der jeweils verwendeten Inkubationstemperatur entsprechend anzupassen.

Experimentelle Aspekte – Optimierung des pGLO-Laborversuchs

Techniken üben

Manche Kursleitende verwenden einen Probelauf, um steriles Arbeiten zu erklären und den Gebrauch der Pipetten und Impfösen sowie das Ausstreichen und Verteilen von Bakterien auf der Agaroberfläche üben zu lassen. Sie entscheiden selbst, was für Ihren Kurs am besten ist, indem Sie die Laborvorkenntnisse der Kursteilnehmenden und ihre Vertrautheit mit diesen Techniken berücksichtigen. Wenn die folgenden experimentellen Punkte beachtet werden, sind die Transformationen in aller Regel erfolgreich.

Vorbereiten von *E. coli*-Starterplatten (Agarplatten)

Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn zur Herstellung des Agars ein Kolben anstelle eines Becherglases verwendet wird. Es ist darauf zu achten, dass sich der Agar vollständig auflöst, da ungleichmäßiges Mischen dazu führen kann, dass der Agar nicht fest wird. Befolgen Sie die Anweisungen in „Erweiterter Vorbereitungsschritt 1“ genau, um das Einbringen von Kontaminanten zu minimieren.

Nachdem die *E. coli*-Bakterien auf den Starterplatten ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert worden sind, sollten die Platten innerhalb von 24–36 Stunden verwendet werden. Eine Verzögerung von mehr als 36 Stunden wirkt sich ungünstig auf die Transformation aus.

Übertragung von Bakterienkolonien von Agarplatten auf Mikroröhrchen

Der Prozess des Abschabens einer einzelnen Kolonie von der Starterplatte liefert möglicherweise mehr Zellen als nötig. Bereits eine einzelne Kolonie mit einem Durchmesser von etwa 1 mm enthält Millionen von Bakterienzellen. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen, sollten die Kursteilnehmenden 2–4 „fette“ Kolonien mit einem Durchmesser von 1–1,5 mm auswählen. Die Auswahl von mehr als 4 Kolonien kann die Transformationseffizienz verringern. Es sind vorzugsweise vereinzelt wachsende Kolonien auszuwählen, anstatt eine Probe aus dem dicht gewachsenen Teil der Platte aufzunehmen. Für eine erfolgreiche Transformation müssen sich die Bakterien in der aktiven Wachstumsphase befinden.

DNA-Transfer

Der Transfer von Plasmid-DNA aus dem Röhrchen mit der Stammlösung in die Transformationssuspension ist ein entscheidender Schritt. Die Kursteilnehmenden müssen sich die Impföse genau ansehen, um festzustellen, ob sich ein Film aus Plasmidlösung an der Öse befindet, ähnlich wie ein Seifenfilm über einem Drahtling zum Herstellen von Seifenblasen. Optional können die Kursteilnehmenden 10 µl pGLO-Plasmid in das mit „+pGLO“ beschriftete Röhrchen pipettieren und gut mischen.

Hitzeschock

Das Verfahren zur Erhöhung der Aufnahme fremder DNA in Bakterien wird als **Hitzeschock** bezeichnet. Es ist wichtig, dass sich die Kursteilnehmenden an die zeitlichen Vorgaben halten. Wichtig sind auch der schnelle Temperaturwechsel und die Dauer des Hitzeschocks. Für optimale Ergebnisse müssen die Röhrchen mit den Zellsuspensionen direkt aus dem Eis genommen, für 50 Sekunden in das Wasserbad bei 42 °C gestellt und danach sofort wieder auf Eis gestellt werden. Ohne Hitzeschock verringert sich die Zahl der Transformanten um das 10-Fache. Ein 90 Sekunden langer Hitzeschock ergibt ungefähr halb so viele transformierte Zellen wie ein 50 Sekunden langer Hitzeschock. In beiden Fällen funktioniert das Experiment, aber es wurde auf 50 Sekunden Hitzeschock optimiert. Es ist darauf zu achten, zerstoßenes Eis anstelle von Eiswürfeln zu verwenden, um eine maximale Transformationseffizienz zu erzielen. Verwenden Sie der Genauigkeit halber zwei Thermometer, um die Temperatur des Inkubators zu überprüfen.

Ausplattieren von transformierten Zellen und Kontrollen

Das Aufbringen eines zu großen Volumens aus der transformierten Kultur auf die Platten mit der Einweg-Transferpipette ist kontraproduktiv, da die Platten die überschüssige Flüssigkeit möglicherweise nicht absorbieren können und die Verteilung ungleichmäßig wird. Das Übertragen von Bakteriensuspensionen aus den Mikroröhrchen in die Petrischalen erfordert eine gewisse Sorgfalt. Die Bakterien setzen sich am Boden ab. Daher können die Kursteilnehmenden ein geschlossenes Röhrchen am oberen Rand mit Zeigefinger und Daumen der einen Hand festhalten und mit dem Zeigefinger der anderen Hand an den Boden des Röhrchens schnippen. Weisen Sie darauf hin, dass die Kursteilnehmenden mit dem Finger an das Röhrchen klopfen oder die Suspension mit der Pipette umrühren müssen, bevor sie sie aufziehen. Außerdem müssen die Kursteilnehmenden unmittelbar nach dem Pipettieren der Transformationskultur und dem Ausstreichen der Zellen den jeweiligen Deckel wieder auf die Petrischalen legen. Die Suspensionen gleichmäßig auf der Oberfläche des Agars verteilen, indem die flache Seite einer neuen sterilen Impföse schnell auf der Plattenoberfläche hin und her bewegt wird.

GFP-Chromatographie-Kit

Wenn Sie das Experiment zur Transformation von Bakterien mit pGLO mit dem GFP-Aufreinigungskit (Katalog-Nr. 166-0005EDU) durchführen möchten, müssen Sie die auf den LB/Amp/Ara-Platten angezüchteten, pGLO-transformierten Bakterien aufheben. Die beste Möglichkeit, die Platten aufzubewahren, besteht darin, sie mit der Mediumseite nach oben an einen kühlen Ort, z. B. in einen Kühlschrank, zu stellen. Dadurch bleiben die Zellen am Leben, aber ihr aktives Wachstum ist eingeschränkt, bis Sie sie für den Start des nächsten Experiments benötigen. Wenn die Platten umgedreht gelagert werden, wird verhindert, dass herabtropfendes Kondenswasser die Kolonien auf dem Medium verschmiert.

Idealerweise sollten die Platten innerhalb von 2–4 Wochen verwendet werden. Für längere Aufbewahrung sollten die Platten mit Parafilm umwickelt werden, um einen Feuchtigkeitsverlust zu vermeiden.

Konzeptionelle Punkte

Medien

Die flüssigen und festen Nährmedien, die als LB-Nährbouillon (benannt nach Luria und Bertani) und LB-Nährstoffagar bezeichnet werden, werden aus einem Hefeextrakt und einem enzymatischen Verdau von Fleischnebenprodukten mit einer Mischung aus Kohlenhydraten, Aminosäuren, Nukleotiden, Salzen und Vitaminen als Nährstoffe für das Bakterienwachstum hergestellt. Agar wird aus Algen gewonnen. Er schmilzt beim Erwärmen, bildet beim Abkühlen ein festes Gel (eine Art Gelee) und dient dazu, eine feste Unterlage bereitzustellen, auf der Bakterien gezüchtet werden können.

Antibiotika-Selektion

Das pGLO-Plasmid, das das GFP-Gen enthält, enthält auch das Gen für Beta-Lactamase, das Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin, ein Mitglied der Penicillin-Familie, verleiht. Das Beta-Lactamase-Protein wird von Bakterien, die das Plasmid enthalten, produziert und abgegeben. Die Beta-Lactamase inaktiviert das im LB-Nährstoffagar vorhandene Ampicillin, um das Wachstum der Bakterien zu ermöglichen. Auf Ampicillin enthaltenden Platten können nur transformierte Bakterien wachsen, die das Plasmid enthalten und Beta-Lactamase exprimieren. Nur ein sehr kleiner Prozentsatz der Zellen nimmt die Plasmid-DNA auf und wird transformiert. Nicht transformierte Zellen können auf den Ampicillin-Selektionsplatten nicht wachsen.

Transformationslösung

Man geht davon aus, dass das Ca^{2+} -Kation in der Transformationslösung (50 mM CaCl_2 , pH 6,1) die abstoßenden negativen Ladungen des Phosphatgerüsts der DNA und der Phospholipide der Zellmembran neutralisiert, damit die DNA in die Zellen eindringen kann.

Hitzeschock

Der Hitzeschock erhöht die Durchlässigkeit der Zellmembran für DNA. Zwar ist der genaue Mechanismus nicht bekannt, aber die Dauer des Hitzeschocks ist von entscheidender Bedeutung und wurde für die Art der verwendeten Bakterien und die verwendeten Transformationsbedingungen optimiert.

Erholung

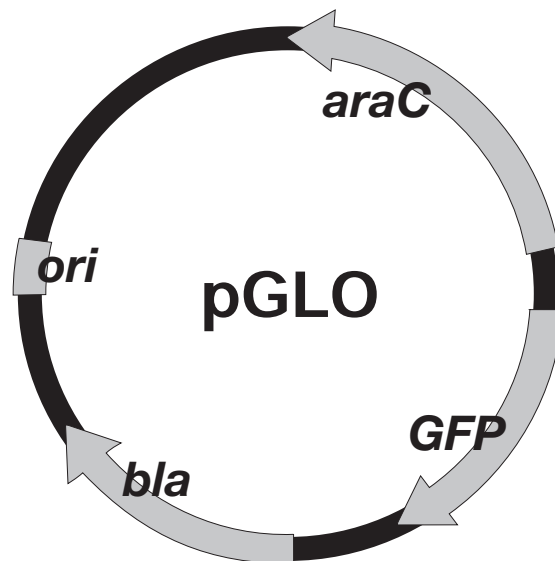
Die 10-minütige Inkubationszeit nach der Zugabe von LB-Nährbouillon gibt den Zellen die Möglichkeit, sich zu erholen und das Ampicillin-Resistenzprotein Beta-Lactamase zu exprimieren, so dass die transformierten Zellen auf den Ampicillin-Selektionsplatten überleben können.

Die Erholungskultur kann bei Raumtemperatur oder bei 37 °C mindestens 1 Stunde oder über Nacht inkubiert werden. Dadurch lässt sich die Transformationseffizienz um mehr als das 10-Fache steigern.

pGLO-Genregulierung

In allen Organismen ist die Genexpression sorgfältig reguliert, um eine Anpassung an unterschiedliche Bedingungen zu ermöglichen und eine Überproduktion von nicht benötigten Proteinen zu verhindern. Die am Abbau verschiedener Nahrungsquellen beteiligten Gene sind gute Beispiele für stark regulierte Gene. Beispielsweise ist der einfache Pflanzenzucker Arabinose sowohl eine Energie- als auch eine Kohlenstoffquelle für Bakterien. Die bakteriellen Gene, die Verdauungsenzyme zum Abbau von Arabinose als Nahrungsquelle herstellen, werden nicht exprimiert, wenn keine Arabinose im umgebenden Milieu vorhanden ist. Aber wenn Arabinose vorhanden ist, werden diese Gene eingeschaltet. Geht die Arabinose zur Neige, werden die Gene wieder abgeschaltet.

Arabinose initiiert die Transkription dieser Gene, indem sie die Bindung von RNA-Polymerase begünstigt. In der gentechnisch veränderten pGLO-Plasmid-DNA wurden einige der am Abbau von Arabinose beteiligten Gene durch das Quallagen ersetzt, das GFP codiert. Lässt man mit pGLO-Plasmid-DNA transformierte Bakterien in Gegenwart von Arabinose wachsen, wird das GFP-Gen eingeschaltet und die Bakterien leuchten unter UV-Licht hellgrün.



pGLO-Plasmid. Sequenz und Plasmidkarte sind verfügbar auf <http://explorer.bio-rad.com> unter „Teaching Resources“ (Lehrmaterial)

Dies ist ein hervorragendes Beispiel für das zentrale molekulare Dogma der Biologie: DNA⇒RNA⇒PROTEIN⇒MERKMAL. Wenn Arabinose im Wachstumsmedium fehlt, bleibt das GFP-Gen ausgeschaltet und es wachsen weiße Kolonien. Eine ausführlichere Beschreibung und Analyse der Genregulation und der Funktion des Arabinose-Promotors findet sich in Anhang A.

Überblick über vorbereitende Maßnahmen für Kursleitende

Dieser Abschnitt skizziert den empfohlenen Zeitplan für die Vorbereitungsschritte der Kursleitenden. Eine ausführliche Anleitung zur Vorbereitung befindet sich auf den Seiten 13–17.

Vorbereitungsschritte der Kursleitenden		Wann	Dauer
Schritt 1	Durchlesen des Transformationshandbuchs Kopien des Handbuchs für Kursteilnehmende und der Kurzanleitung für jeden Kursteilnehmenden anfertigen	Sofort	1 St.
Schritt 2	Vorbereitung der Agar-Nährstoffplatten	3–7 Tage vorher	1 St.
Schritt 3	Vorbereitung von Starterplatten, Aliquotieren von Lösungen	36–48 St. vorher	30 min
Schritt 4	Einrichtung der Arbeitsplätze	Unmittelbar vorher	10 min

Checkliste für die Arbeitsplätze (✓)

Arbeitsplätze der Kursteilnehmenden. Nachstehend sind das Material und die Zubehörtartikel aufgeführt, die vor Beginn der Laborexperimente an jedem Arbeitsplatz der Kursteilnehmenden vorhanden sein sollten. Die Bestandteile in diesem Kit sind ausreichend für 8 vollständige Arbeitsplätze.

Gemeinsam genutzter Arbeitsplatz. Eine Liste von Material, Zubehörtartikeln und Gerätschaften, die an einem gemeinsam genutzten Arbeitsplatz vorhanden sein sollten, der für alle teilnehmenden Gruppen zugänglich ist, ist ebenfalls unten aufgeführt. Es liegt im Ermessen des/der Kursleitenden, ob die Kursteilnehmenden auf gemeinsame Pufferlösungen und Gerätschaften zurückgreifen oder ob Lösungen in die bereitgestellten Mikroröhrchen aliquotiert werden.

Lerneinheit 2 Transformationslabor

Arbeitsplatz der Kursteilnehmenden

Material	Menge
<i>E. coli</i> -Starterplatte (LB)	1
Gegossene Agarplatten (1 LB, 2 LB/Amp, 1 LB/Amp/Ara)	4
Transformationslösung	1
LB-Nährstoffbouillon	1
Impfösen	7 (1 Packung mit 10 St.)
Pipetten	5
Schwimmständer für Mikroröhrchen	1
Behälter (zum Beispiel aus Styropor) mit zerstoßenem Eis (keine Eiswürfel)	1
Permanentmarker	1
Mikrozentrifugenröhrchen	2

Gemeinsam genutzter Arbeitsplatz

Material	Menge
Rehydratisierte pGLO-Plasmid-DNA	1 Fläschchen
Auf 42 °C eingestelltes Wasserbad und Thermometer	1
UV-Lampe	1
Auf 37 °C eingestellter Inkubator	1
(optional, siehe „Allgemeine Laborvorkenntnisse–Inkubation“)	1
Verstellbare Mikropipetten, 2–20 µl	1
Spitzen für Mikropipetten, 2–20 µl	1

Lerneinheit 3 Erfassung und Analyse von Daten

Arbeitsplatz der Kursteilnehmenden

Material	Menge
Inkubierte Transformations- und Kontrollplatten:	4er Set
LB/Amp/Ara	1
LB/Amp	2
LB	1

Gemeinsam genutzter Arbeitsplatz

Material	Menge
UV-Lampe	1-8

Anleitung für vorbereitende Maßnahmen für Kursleitende

Ziele	Zeitaufwand	Zeitpunkt
Schritt 1 Vorbereitung der Agarplatten	1 St.	3–7 Tage vorher
Schritt 2 Rehydratisierung von <i>E. coli</i>	2 min	36–48 St. vorher
Ausstreichen der Starterplatten	15 min	24–36 St. vorher
Rehydratisierung der pGLO-Plasmid-DNA	2 min	0–36 St. vorher
Schritt 3 Aliquotieren der Lösungen	10 min	Unmittelbar davor
Einrichten der Arbeitsplätze	10 min	

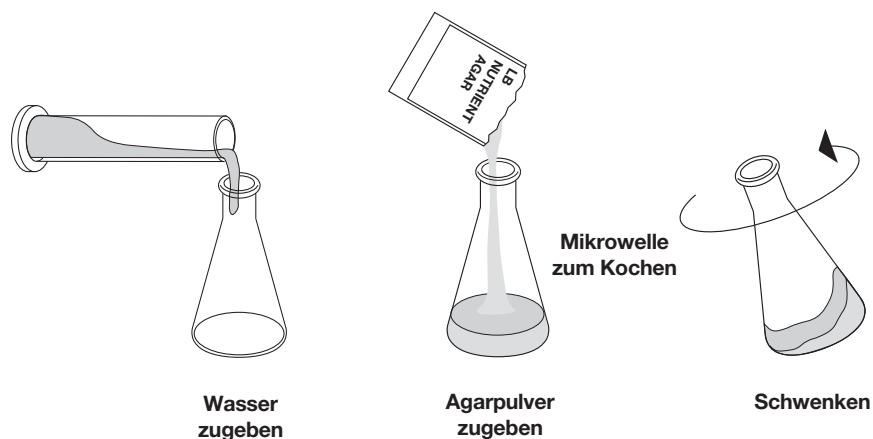
Vorbereitungsschritt 1: 3–7 Tage vor dem Transformationslabor

1. Vorbereitung des Nährstoffagars (ohne Autoklav)

Die Agarplatten sollten mindestens drei Tage vor der Durchführung des Versuchs vorbereitet werden. Sie sollten zunächst zwei Tage bei Raumtemperatur stehengelassen werden, bevor sie bis zur Verwendung kühl gelagert werden, damit der Agar ausreichend trocknen (fest werden) und später in der Lerneinheit 2 die flüssige Transformationslösung aufnehmen kann.

Zur Herstellung des Agars 500 ml destilliertes Wasser in einen 1-l-Erlenmeyerkolben oder größer geben. Die besten Ergebnisse werden mit einem Kolben und nicht mit einem Becherglas erzielt. Den gesamten Inhalt der Packung mit LB-Nährstoffagar zugeben. Den Kolben schwenken, um den Agar aufzulösen, und in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzen. Das Erhitzen und Schwenken ungefähr dreimal wiederholen, bis der gesamte Agar aufgelöst ist (**bis keine durchsichtigen Partikel mehr zu sehen sind**). Den Kolben vor dem Schwenken stets etwas abkühlen lassen, damit das heiße Medium nicht überkocht und keine Verbrennungen an der Hand verursacht. Ungleichmäßiges Mischen des Agars kann dazu führen, dass Agar nicht fest wird.

Sobald sich der Agar aufgelöst hat, den LB-Nährstoffagar abkühlen lassen, bis sich der Kolben gut anfassen lässt (50 °C). Während der Agar abkühlt, die Platten beschriften und Arabinose und Ampicillin wie unten beschrieben vorbereiten (Schritt 3). Es ist darauf zu achten, den Agar nicht so lange abkühlen zu lassen, dass er bereits im Kolben beginnt fest zu werden. Es kann helfen, den Kolben mit dem geschmolzenen Agar in ein auf 50 °C eingestelltes Wasserbad zu stellen, um ein zu schnelles Abkühlen des Agars zu verhindern.



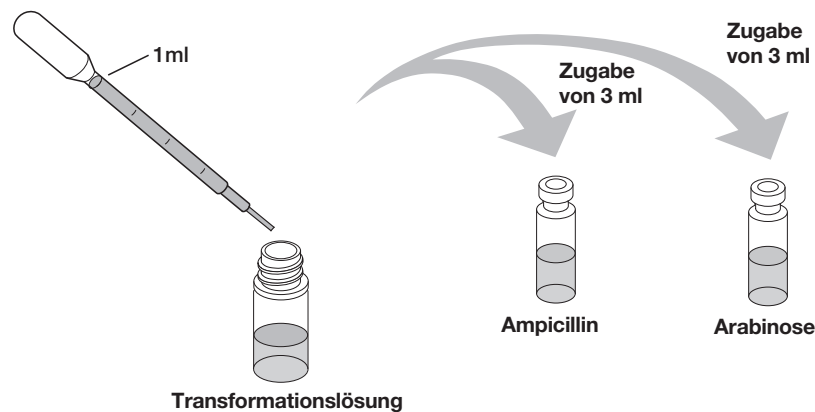
Zum Auflösen des Agars wird am besten eine Mikrowelle verwendet, alternativ ist aber auch eine Heizplatte geeignet. Es ist darauf zu achten, nicht so lange zu kochen, bis alle Flüssigkeit verdampft ist. Den Agar zum Sterilisieren 5–10 Minuten lang sieden lassen.

2. Vorbereitung von Arabinose und Ampicillin

Hinweis: Es dauert mindestens 10 min, bis sich die Arabinose aufgelöst hat—es ist Geduld erforderlich.

Die Arabinose wird trocken in einem kleinen Fläschchen versendet. Mit einer neuen sterilen Pipette 3 ml Transformationslösung direkt in das Fläschchen geben, um den Zucker zu rehydratisieren. Den Inhalt des Fläschchens mischen (zum Beispiel auf dem Vortexmischer). (Hier wird Transformationslösung verwendet, da es sich um eine praktische sterile Lösung handelt. Steriles Wasser würde aber genauso gut funktionieren.) Die Pipette nach dem Gebrauch entsorgen.

Auch das Ampicillin wird trocken in einem kleinen Fläschchen versendet. Mit einer neuen sterilen Pipette 3 ml Transformationslösung direkt in das Fläschchen geben, um das Antibiotikum zu rehydratisieren. (Hier wird Transformationslösung verwendet, da es sich um eine praktische sterile Lösung handelt. Steriles Wasser würde aber genauso gut funktionieren.)



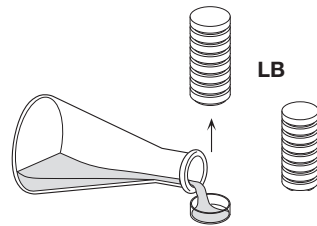
Hinweis: Übermäßig hohe Temperaturen ($> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) zerstören das Ampicillin und die Arabinose, aber der Nährstoffagar wird bei $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ fest. Deshalb muss das Abkühlen des Agars sorgfältig überwacht werden, bevor alle Platten nacheinander ohne Unterbrechung gegossen werden. Es kann helfen, den Kolben mit dem geschmolzenen Agar in ein auf $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingestelltes Wasserbad zu stellen, um ein zu schnelles Abkühlen des Agars zu verhindern. Überschüssige Luftblasen können entfernt werden, nachdem alle Platten gegossen wurden, indem die Oberfläche jeder Platte kurz mit einem Bunsenbrenner abgeflammt wird. Die gegossenen Platten nicht mehr bewegen, bis sich der Agar verfestigt hat. Restmengen des Agars in den Müll geben, nicht im Waschbecken entsorgen. Agartropfen, die sich an den Seiten der Platten befinden, abwischen.

3. Beschriftung der Platten

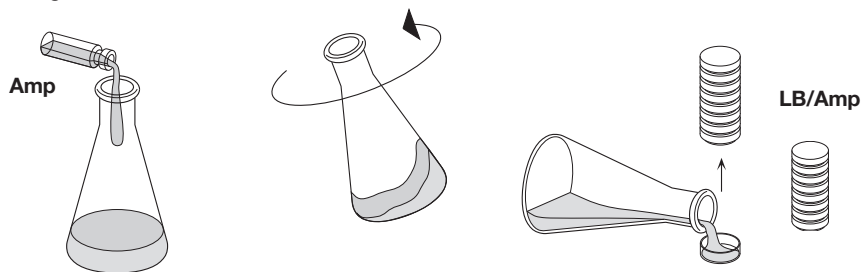
Die 40 mitgelieferten Agarplatten sind auf der Unterseite randnah mit einem Permanentmarker zu beschriften. Nicht die Deckel beschriften. 16 Platten mit **LB**, 16 Platten mit **LB/Amp** und 8 Platten mit **LB/Amp/Ara** beschriften.

4. Gießen der Platten mit LB-Nährstoffagar (LB, LB/Amp, LB/Amp/Ara)

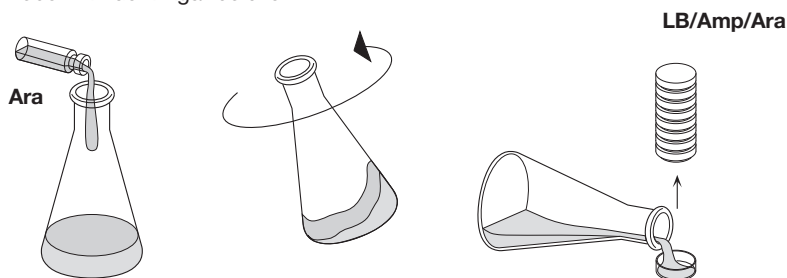
Den **LB-Nährstoffagar** zuerst in die **16 Platten gießen, die mit „LB“ beschriftet sind**. Jeweils 4 bis 8 leere Platten stapeln. Dann beginnend mit der unteren Platte den Deckel und die Platten darüber mit einer Hand gerade nach oben und zur Seite abheben und mit der anderen Hand den LB-Nährstoffagar hinein gießen. Die Platte etwa zu einem Drittel bis zur Hälfte (ca. 12 ml) mit Agar füllen, den Deckel wieder aufsetzen und mit der nächsten Platte im Stapel (d. h. mit der zweiten Platte von unten) fortfahren. Auf diese Weise 16 Platten gießen. Die Platten in dieser gestapelten Konfiguration abkühlen lassen.



Zweitens das **hydratisierte Ampicillin** zu der Restmenge an **LB-Nährstoffagar** geben. Zum Mischen kurz schwenken. Die 16 mit **LB/Amp** beschrifteten Platten auf die gleiche Weise wie oben beschrieben mit dem Agar befüllen.



Drittens die **hydratisierte Arabinose** zu der Restmenge an **LB-Nährstoffagar mit Ampicillin** geben. Kurz mischen und dann die 8 mit **LB/Amp/Ara** beschrifteten Platten auf die gleiche Weise wie oben beschrieben mit dem Agar befüllen.



Der Agar in den Platten sollte innerhalb von 30 Minuten fest werden.

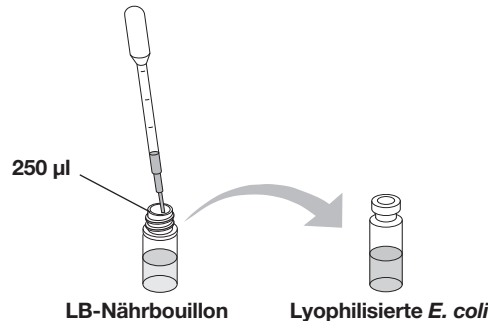
5. Aufbewahrung der Platten

Nachdem der Agar in den Platten zwei Tage lang bei Raumtemperatur fest geworden ist, können die Platten entweder direkt verwendet oder jeweils in 20er-Stapeln in einem darüber gestülpten Plastikbeutel gelagert werden. Durch das Abdecken mit dem Plastikbeutel trocknen die Platten nicht aus. Der Stapel wird dann umgedreht und der Beutel mit Klebeband verschlossen. So werden die Platten dann bis zur Verwendung verkehrt herum bei 4 °C gelagert. Die Platten werden umgedreht, um zu vermeiden, dass sich an der Innenseite des Deckels Kondenswasser bildet, das auf den Agar tropfen könnte.

Vorbereitungsschritt 2: 24–36 St. vor dem Transformationslabor

1. Bakterien rehydratisieren

Die lyophilisierten *E. coli* HB101 rehydratisieren, indem 250 µl LB-Nährbouillon mit einer sterilen Pipette direkt in das Fläschchen gegeben werden. Das Fläschchen wieder verschließen und vorsichtig schütteln um sicherzustellen, dass alle Bakterien rehydratisiert sind. Das Fläschchen 8–24 Stunden bei 37 °C inkubieren. Wenn kein Inkubator oder Wasserbad zur Verfügung steht, kann das Fläschchen auch in viel Wasser, das zuvor auf 37 °C erwärmt wurde, gestellt und dann 16–24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. Restmengen der LB-Nährbouillon bis zur Verwendung bei 4 °C kühl stellen.

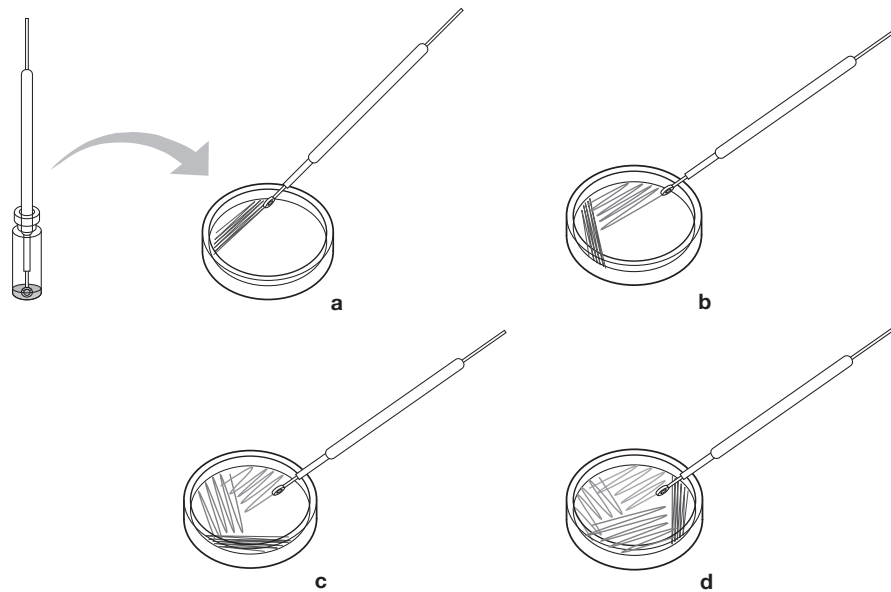


2. Starterplatten austreichen, um Einzelkolonien von Bakterien auf Agarplatten zu produzieren

Jedes Laborteam benötigt eine eigene Starterplatte als Zellausgangsmaterial für die Transformation. Dieses Kit enthält ausreichend Material für acht vollständige Arbeitsplätze. Das Austreichen der Bakterien auf LB-Platten zum Erhalt von Einzelkolonien und die Inkubation für 24–36 Stunden bei 37 °C sollten stattfinden, bevor die geplante Transformation durchgeführt wird.

Die im letzten Schritt rehydratisierten *E. coli* verwenden und auf acht **LB**-Agarplatten (vorbereitet in Schritt eins) austreichen (eine Starterplatte für jedes Team von Kursteilnehmenden). Der Zweck des Ausstreichens besteht darin, ausgehend von einer konzentrierten Bakteriensuspension Einzelkolonien zu erzeugen. Bereits eine winzige Menge der Bakteriensuspension reicht aus. Unter günstigen Bedingungen vermehrt sich eine Zelle in nur 24 Stunden zu Millionen genetisch identischer Zellen.

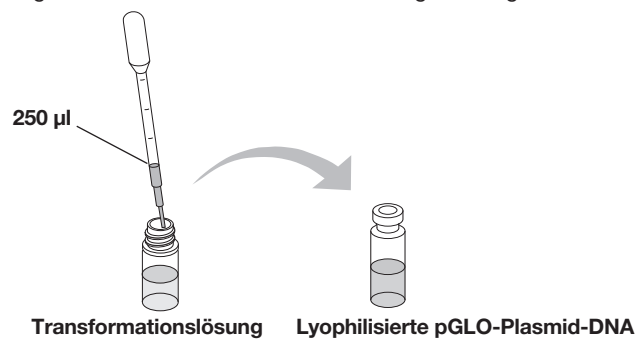
- Das Fläschchen mit *E. coli* HB101 vorsichtig schütteln, um die Bakterien zu resuspendieren. Eine sterile Impföse in einer geraden Linie in die rehydratisierte Bakterienkultur in dem Fläschchen eintauchen. Die Impföse wieder herausziehen; es muss sich ein Bakterienfilm an der Öse befinden. Die Platten wie unten abgebildet austreichen. Das Austreichen erfolgt nacheinander in vier Quadranten. Der erste Ausstrich dient lediglich dazu, die Zellen zu verteilen. Die Impföse etwa ein Dutzend Mal in dem kleinen angezeigten Bereich hin und her bewegen. In den nachfolgenden Quadranten werden die Zellen immer mehr verdünnt, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Einzelkolonien entstehen.
- Bei den anschließenden Ausstrichbewegungen sollte möglichst viel von der Agaroberfläche in der Platte genutzt werden. Die Platte um etwa 45 Grad drehen (so dass die Ausstrichbewegung komfortabel mit der Hand durchgeführt werden kann) und mit dem zweiten Ausstrich beginnen. Die Impföse kein zweites Mal in die rehydratisierten Bakterien tauchen. Die Impföse etwa zwei Mal in den vorhergehenden Ausstrich hinein und danach wie gezeigt insgesamt etwa 10 Mal vor und zurück bewegen.
- Die Platte erneut drehen und das Austreichen wiederholen.
- Die Platte ein letztes Mal drehen und ein letztes Mal austreichen. Die Schritte a–d mit den verbleibenden **LB**-Platten für die vorhandenen Arbeitsplätze wiederholen. Dieselbe Impföse für alle Platten verwenden. Fertig ausgestrichene Platten sofort mit dem Deckel versehen, um eine Kontamination zu vermeiden.



- e. Die Platten über Nacht umgedreht bei 37 °C in den Inkubator stellen oder 2–3 Tage lang bei Raumtemperatur stehen lassen, wenn kein Inkubator verfügbar ist. Innerhalb von 24–36 Stunden für die Transformation verwenden, da sich die Bakterien im aktiven Wachstumsstadium befinden müssen, um eine hohe Transformationseffizienz zu erreichen. Eine Verzögerung von mehr als 36 Stunden wirkt sich ungünstig auf die Transformation aus. **VOR DER VERWENDUNG NICHT KÜHLEN.**
- f. *E. coli* bilden cremefarbene Kolonien, die gleichmäßig rund sind und einen glatten Rand aufweisen. Möglichst keine Platten mit verunreinigten Kolonien verwenden.

3. pGLO-Plasmid vorbereiten

Mit einer neuen sterilen Pipette 250 µl Transformationslösung in das Fläschchen mit lyophilisierter pGLO-Plasmid-DNA geben. Es ist zu beachten, dass die DNA-Menge so gering ist, dass es eventuell aussieht, als sei das Fläschchen leer. Das Fläschchen umdrehen, um die Plasmidlösung gut zu mischen, und darauf achten, dass sich die DNA löst und nicht am Deckel haften bleibt. Die hydratisierte DNA nach Möglichkeit im Kühlschrank aufbewahren. (Hier wird Transformationslösung verwendet, da es sich um eine praktische, sterile und nukleasefreie Lösung handelt. Steriles Wasser würde aber genauso gut funktionieren.)



Vorbereitungsschritt 3: Vor dem Transformationslabor

1. Lösungen aliquotieren

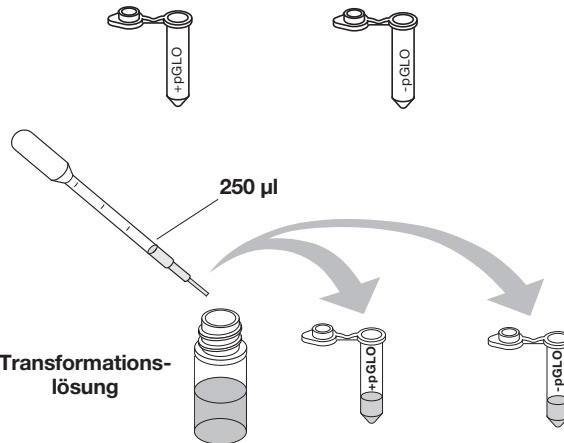
Für jeden Arbeitsplatz 1 ml Transformationslösung (CaCl₂) und 1 ml LB-Nährbouillon in separate farbcodierte 2-ml-Mikroröhrchen aliquotieren, die im Kit enthalten sind. Wenn die LB-Nährbouillon 1 Tag vor der Laborarbeit aliquotiert wird, sollte sie kühl gestellt werden. Die Röhrchen beschriften.

2. Die Arbeitsplätze für das Transformationslabor einrichten

Die Materialien, die an jedem Arbeitsplatz bereit zu stellen sind, stehen auf Seite 11.

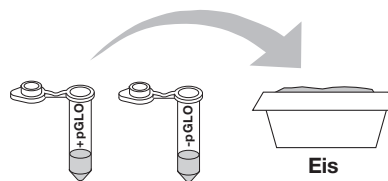
Transformationskit – Kurzanleitung

1. Ein geschlossenes Mikroteströhrchen mit +pGLO und ein anderes mit -pGLO beschriften. Beide Röhrchen mit dem Namen Ihrer Gruppe beschriften. In das Röhrchengestell aus Schaumstoff/Styropor stellen.

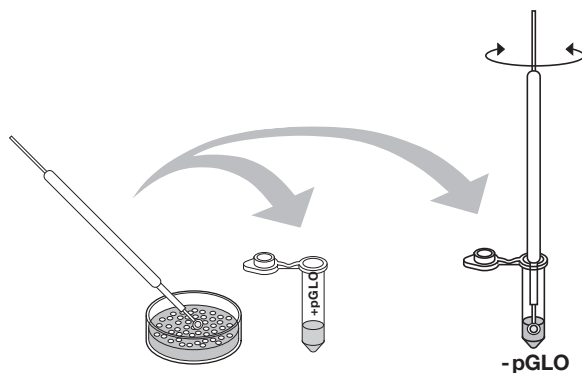


2. Die Röhrchen öffnen und mit einer sterilen Transferpipette 250 µl Transformationslösung (CaCl₂) in jedes Röhrchen pipettieren.

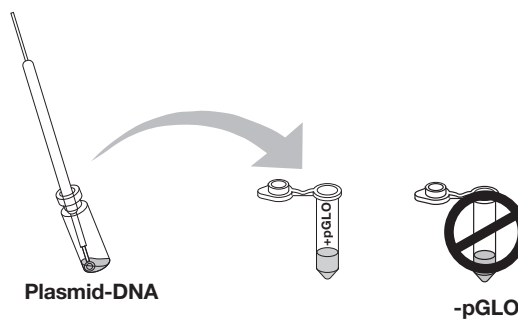
3. Die Röhrchen auf zerstoßenes Eis stellen. Keine Eiswürfel verwenden.



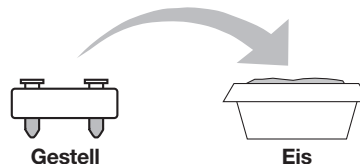
4. Mit einer sterilen Impföse eine Einzelkolonie mit Bakterien aus der Starterplatte aufnehmen. Die Impföse bis zum Boden in das mit +pGLO beschriftete Röhrchen einführen und in die Transformationslösung tauchen. Die Impföse zwischen Zeigefinger und Daumen hin und her drehen, bis die gesamte Kolonie in der Transformationslösung verteilt ist (also keine größeren Stückchen mehr vorhanden sind). Das Röhrchen wieder in das Gestell auf Eis stellen. Den Vorgang mit einer neuen sterilen Impföse mit dem -pGLO-Röhrchen wiederholen.



5. Die pGLO-Plasmid-DNA-Lösung mit der UV-Lampe untersuchen. Die Beobachtungen aufschreiben. Eine neue sterile Impföse in das Röhrchen mit der Plasmid-DNA-Stammlösung stecken. Die volle Impföse wieder herausziehen. Die Öse sollte mit einem Film aus Plasmidlösung überzogen sein, ähnlich wie ein Seifenfilm über einem Ring zum Herstellen von Seifenblasen. Den Inhalt der Öse in die Zellsuspension in dem mit +pGLO beschrifteten Röhrchen einmischen. Optional 10 µl pGLO-Plasmid in das mit +pGLO beschriftete Röhrchen pipettieren und mischen. Das mit -pGLO beschriftete Röhrchen schließen und wieder in das Gestell auf Eis stellen. Keine Plasmid-DNA in das -pGLO-Röhrchen geben. Warum nicht? Das mit -pGLO beschriftete Röhrchen schließen und wieder in das Gestell auf Eis stellen.



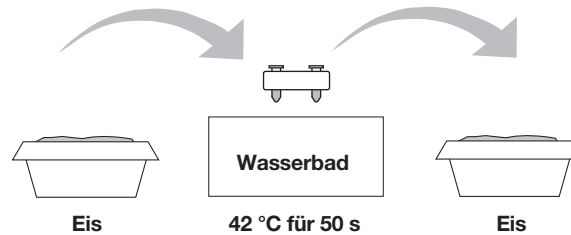
6. Die Röhrchen 10 min auf Eis stellen. Darauf achten, die Röhrchen so in das Gestell zu setzen, dass der Boden der Röhrchen nach unten herausragt und mit dem Eis in Kontakt kommt.



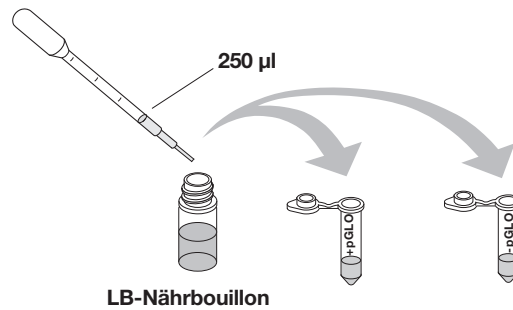
7. Während die Röhrrchen auf Eis stehen, vier LB-Nährstoffagarplatten am Boden (nicht am Deckel) wie abgebildet beschriften.



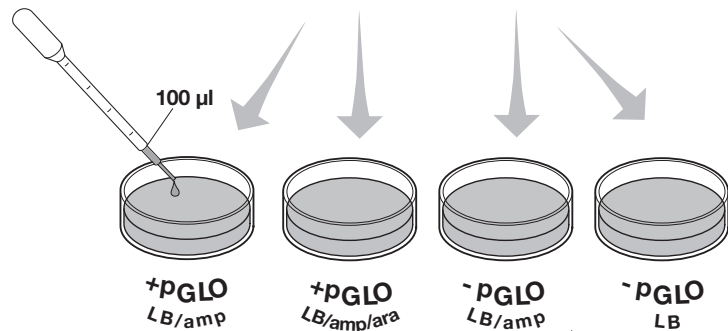
8. Hitzeschock. Das Schaumstoff/ Styropor-Gestell als Halterung verwenden und sowohl das mit (+) pGLO als auch das mit (-) pGLO beschriftete Röhrrchen für **genau 50 Sekunden** in das auf 42 °C eingestellte Wasserbad setzen. Darauf achten, die Röhrrchen so in das Gestell zu setzen, dass der Boden der Röhrrchen nach unten herausragt und mit dem warmen Wasser in Kontakt kommt. Nach Ablauf der 50 Sekunden beide Röhrrchen wieder zurück auf Eis stellen. Für optimale Transformationsergebnisse muss der Wechsel von Eis (0 °C) auf 42 °C und wieder zurück auf Eis **schnell erfolgen**. Röhrrchen 2 min auf Eis stellen.



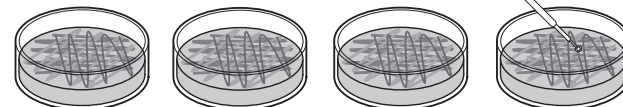
9. Das Gestell mit den Röhrrchen aus dem Eis nehmen und auf den Tisch stellen. Ein Röhrrchen öffnen und mit einer neuen sterilen Pipette 250 µl LB-Nährbouillon hinein geben. Das Röhrrchen dann wieder schließen. Eine **neue sterile Pipette** nehmen und den Vorgang mit dem anderen Röhrrchen wiederholen. Die Röhrrchen 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen.



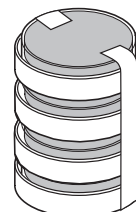
10. Mit dem Finger vorsichtig an die geschlossenen Röhrrchen schnippen, um den Inhalt zu mischen. Eine **neue sterile Pipette für jedes Röhrrchen verwenden** und 100 µl aus jedem Röhrrchen auf die entsprechenden Platten pipettieren (wie in der Abbildung gezeigt).



11. Für jede Platte eine **neue sterile Impföse verwenden**. Die Suspensionen gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilen, indem die flache Seite einer neuen sterilen Impföse schnell auf der Plattenoberfläche hin und her geführt wird.



12. Die Platten stapeln und mit Klebeband umwickeln. Den Namen der Gruppe und die Lerneinheit auf den Boden des Stapels schreiben und den Stapel bis zum nächsten Tag **umgedreht** bei 37 °C in den Inkubator stellen.



Empfehlungen für Kursleitende zur Beantwortung von Fragen

Lerneinheit 1 Fragen zur Verdeutlichung

1. Um einen ganzen Organismus genetisch zu transformieren, müssen Sie das/die neue(n) Gen(e) in jede Zelle des Organismus einbringen. Welcher Organismus eignet sich besser für eine vollständige genetische Transformation —einer aus vielen Zellen oder einer aus einer einzigen Zelle?

Ein einzelliger Organismus wäre für eine genetische Transformation am besten geeignet, da er nur eine Zelle enthält, die das neue Gen aufnehmen muss.

2. Es kann wichtig sein zu erfahren, ob der genetisch veränderte Organismus seine neuen Eigenschaften an seine Nachkommen und zukünftige Generationen weitergeben kann. Was wäre ein besserer Kandidat für Ihr Experiment, um diese Informationen zu erhalten – ein Organismus, bei dem sich neue Generation schnell heranwächst und sich reproduziert, oder einer, bei dem diese Vorgänge langsamer vonstatten gehen?

Ein Organismus, der sich schnell reproduziert. Durch die schnelle Produktion von Nachkommen oder neuen Abkömmlingen lässt sich schnell beurteilen, ob das neue Merkmal weitergegeben wurde.

3. Sicherheit ist ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Auswahl eines Organismus für ein Versuchsvorhaben. Welche Eigenschaften oder Merkmale sollte der Organismus haben (bzw. nicht haben), um sicherzugehen, dass er weder Ihnen noch der Umwelt schadet?

Der Organismus sollte keine Giftstoffe oder Verbindungen produzieren, die Menschen krank machen könnten. Der Organismus sollte in der Laborumgebung gut wachsen, aber außerhalb des Labors nicht überleben können. Der Organismus sollte nicht in der Lage sein, Pflanzen oder Tiere zu infizieren.

4. Was wäre ausgehend von den obigen Überlegungen die beste Wahl für eine genetische Transformation: ein Bakterium, ein Regenwurm, ein Fisch oder eine Maus? Begründen Sie Ihre Wahl.

Der beste Wirtsorganismus wäre ein Bakterium. Bakterien sind kleine, einzellige Organismen, die sich schnell und leicht vermehren.

Hinweis: Der Stamm HB101 K-12 des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) erfüllt die oben beschriebenen Anforderungen optimal: Diese Bakterien sind Einzeller, verdoppeln sich alle 20 Minuten, rufen keine Erkrankungen beim Menschen hervor und können außerhalb des Labors nicht überleben.

Lerneinheit 1 Fragen zum Überlegen

Denken Sie daran, dass das Ziel der genetischen Transformation darin besteht, die Merkmale bzw. Eigenschaften eines Organismus (den Phänotyp) zu verändern. Bevor eine Veränderung des Phänotyps eines Organismus festgestellt werden kann, muss eine gründliche Untersuchung seines normalen Phänotyps (das heißt, des Phänotyps vor der Transformation) durchgeführt werden. Sehen Sie sich die *E. coli*-Kolonien auf Ihren Starterplatten an. Listen Sie alle sichtbaren Merkmale oder Eigenschaften auf, die beschrieben werden können.

Farbe der Kolonien, Anzahl der Kolonien, Verteilung der Kolonien auf der Platte.

Beschreiben Sie, wie Sie zwei LB-Nährstoffagarplatten, einige *E. coli* und etwas Ampicillin verwenden könnten, um zu bestimmen, wie *E. coli*-Zellen durch Ampicillin beeinflusst werden.

Es könnten gleiche Mengen von Zellen auf zwei verschiedenen LB-Nährstoffagarplatten ausplattiert werden, von denen die eine nur LB-Nährstoffagar und die andere LB-Nährstoffagar und Ampicillin enthält. Man könnte das Wachstum von *E. coli* auf den beiden Platten vergleichen. Wenn Ampicillin das Wachstum von *E. coli* negativ beeinflusst, sollten auf der entsprechenden Platte weniger Bakterienkolonien gewachsen sein. Wenn Ampicillin keine Auswirkungen hat, sollten sich auf beiden Platten ungefähr gleich viele Kolonien befinden.

Ergebnisse: Was könnten Ihre Versuchsergebnisse über die Wirkung von Ampicillin auf die *E. coli*-Zellen aussagen?

Antibiotika töten normalerweise Bakterien ab (sind bakterizid) oder hemmen deren Wachstum (bakteriostatisch). Daher sollten, wenn überhaupt, nur wenige Bakterienkolonien auf der Ampicillin-Platte vorhanden sein. Das Vorhandensein von Kolonien auf der Ampicillin-Platte würde den Schluss zulassen, dass diese Bakterien gegen das Antibiotikum Ampicillin resistent sind.

EMPFEHLUNGEN FÜR
KURSLEITENDE ZUR
BEANTWORTUNG VON FRAGEN

Lerneinheit 2 Fragen zur Wissensüberprüfung

1. Auf welcher der Platten würden Sie erwarten, Bakterien zu finden, die den ursprünglichen, nicht transformierten *E. coli*-Kolonien am ähnlichsten sind? Begründen Sie Ihre Annahme.

Bakterien, die den nicht transformierten Bakterien ähnlich sind, wachsen auf der LB/(-) pGLO-Platte. Diese Bakterien stammen von der Starterplatte, ihnen wurde kein Plasmid zugegeben, und sie wurden wieder auf einer LB-Platte ausplattiert. Somit sind sie nahezu identisch mit den nicht transformierten Bakterien auf der Starterplatte.

2. Wenn es genetisch veränderte Bakterienzellen gibt, auf welcher Platte/welchen Platten würden sie sich am wahrscheinlichsten befinden? Begründen Sie Ihre Annahme.

Die transformierten Zellen wachsen auf der LB/Amp- und auf der LB/Amp/Ara-Platte. Genetisch transformierte Zellen haben das pGLO-Plasmid aufgenommen, das das Ampicillin-Resistenzgen exprimiert—diese Zellen können auf den Ampicillin-haltigen Platten überleben.

3. Welche Platten sollten verglichen werden, um festzustellen, ob eine genetische Transformation stattgefunden hat? Warum?

Die LB/Amp (-) pGLO- und die LB/Amp (+) pGLO-Platten sollten direkt miteinander verglichen werden. Zellen, die nicht mit DNA (-pGLO) behandelt wurden, sollten das Ampicillin-Resistenzgen nicht exprimieren und auf den LB/Amp-Platten nicht wachsen. Zellen, die mit DNA (+pGLO) behandelt wurden, sollten das pGLO-Plasmid enthalten und das Ampicillin-Resistenzgen exprimieren—die entsprechende LB/Amp-Platte enthält daher Kolonien transformierter Bakterien.

4. Was ist mit Kontrollplatte gemeint? Welchem Zweck dient eine Kontrolle?

Eine Kontrollplatte liefert einen Vergleich, der bei der Interpretation von Versuchsergebnissen hilft. In diesem Experiment sind beide (-) pGLO-Platten Kontrollplatten. Die LB/Amp-Kontrollplatte kann mit der LB/Amp (+) pGLO-Platte verglichen werden. Dieser Vergleich zeigt, dass die genetische Transformation Bakterienkolonien hervorbringt, die auf Ampicillin wachsen können (aufgrund der Aufnahme des pGLO-Plasmids und der Expression des Ampicillin-Resistenzgens). Die (-) pGLO/LB-Kontrollplatte kann mit jeder der LB/Amp-Platten verglichen werden, um zu zeigen, dass die Plasmidaufnahme für das Wachstum in Gegenwart von Ampicillin erforderlich ist. Die (-) pGLO LB/Amp-Platte zeigt, dass die Starterkultur nicht auf der LB/Amp-Platte wächst. Ohne diese Kontrolle würde man nicht wissen, ob die Kolonien auf der LB/Amp (+) pGLO-Platte tatsächlich aus transformierten Bakterien hervorgegangen sind.

Lerneinheit 3 Erfassung und Analyse von Daten

1. Sehen Sie sich jede der vier Platten an und erstellen von dem, was Sie sehen, eine Zeichnung in der rechten Spalte der Datentabelle. Alternativ kann das Protokoll eine digitale Dokumentation der Platten mit dem Blue Digital Bioluminescence System von Vernier (Anhang E) vorsehen. Durch das Aufzeichnen Ihrer Daten können Sie Ihre Beobachtungen für die „+ pGLO“-Zellen mit denen für die nicht transformierten *E. coli* vergleichen. Schreiben Sie auf, was Sie auf jeder Platte zu folgenden Punkten feststellen.

2. Wie viel Bakterienwachstum stellen Sie, relativ gesehen, auf jeder Platte fest?

Sowohl auf den LB/Amp- als auch auf den LB/Amp/Ara-Platten, die das pGLO-Plasmid erhalten haben, sollten mehrere Kolonien vorhanden sein (ungefähr 75 Kolonien). Auf der LB/Amp (-) pGLO-Platte sollten keine Bakterien gewachsen sein. Auf der LB (-) pGLO-Platte sollte sich ein Bakterienrasen befinden.

3. Welche Farbe haben die Bakterien?

Die Bakterien auf der (+) pGLO LB/Amp-Platte und auf den (-) pGLO LB-Platten sollten weißlich sein. Die Bakterien auf der (+) pGLO LB/Amp/Ara-Platte sollten unter normalem Raumlicht weißlich aussehen, aber hellgrün leuchten, wenn sie langwelligem UV-Licht ausgesetzt werden.

4. Zählen Sie, wie viele Bakterienkolonien (Punkte) sich auf jeder Platte befinden.

Auf den beiden (+) pGLO-Platten sollten etwa 75 Bakterienkolonien vorhanden sein. Der Bakterienrasen auf der LB-Platte besteht aus gleichmäßig verteilten Bakterien, es können keine Einzelkolonien gezählt werden.

Platten	Beobachtungen
+pGLO, LB/Amp	Viele transformierte Bakterienkolonien (ca. 75). Die Kolonien erscheinen weiß.
+pGLO, Die Kolonien sehen unter LB/Amp/Ara	Viele transformierte Bakterienkolonien (ca. 75) Raumlicht weiß aus, leuchten unter UV-Licht jedoch hellgrün.
-pGLO, LB/Amp	Auf dieser Platte ist kein Bakterienwachstum vorhanden.
-pGLO, LB	Diese Platte enthält einen gleichmäßigen Bakterienrasen. Der Rasen erscheint cremefarben.

EMPFEHLUNGEN FÜR
KURSLEITENDE ZUR
BEANTWORTUNG VON FRAGEN

Lerneinheit 3 Analyse der Ergebnisse

1. Welche der Merkmale, die Sie ursprünglich bei den *E. coli* beobachtet haben, scheinen sich nicht verändert zu haben? Tragen Sie diese vor der Transformation vorhandenen Merkmale unten ein und begründen Sie Ihre Analyse in Bezug auf jedes genannte Merkmal.

Ursprüngliches Merkmal	Analyse der Beobachtungen
Farbe	Bakterien haben eine weißliche Farbe
Koloniegröße	Die Koloniegröße vor und nach der Transformation ist ähnlich

2. Welche der *E. coli*-Merkmale, die Sie ursprünglich festgestellt haben, scheinen sich jetzt, d. h. nach Durchführung der Transformation, erheblich verändert zu haben? Führen Sie diese Merkmale unten auf und beschreiben Sie die Veränderungen, die Sie festgestellt haben.

Neues Merkmal	Festgestellte Veränderung
Farbe	Die Kolonien auf der LB/Amp/Ara-Platte leuchten unter UV-Licht grün
Ampicillin	Die transformierten Kolonien können bei Ampicillin-Resistenz wachsen

3. Wenn die genetisch transformierten Zellen die Fähigkeit erworben haben, in Gegenwart des Antibiotikums Ampicillin zu leben, was kann dann über die anderen Gene auf dem Plasmid gefolgert werden, die bei Ihrer Transformation beteiligt waren?

Das Plasmid muss ein Gen für Ampicillin-Resistenz exprimieren (das Proteinprodukt des *bla*-Gens codiert Beta-Lactamase, das Ampicillin abbaut).

4. Wie ließe sich anhand der Ergebnisse, die Sie erhalten haben, beweisen, dass die aufgetretenen Veränderungen auf das von Ihnen durchgeführte Verfahren zurückzuführen sind?

Am besten vergleichen Sie die Versuchsplatten mit der Kontrolle. Zellen, die nicht mit dem Plasmid behandelt wurden (LB/Amp (-) pGLO-Platte und LB/Amp/Ara (-) pGLO-Platte), könnten auf Ampicillin nicht wachsen, wohingegen Zellen, die mit dem Plasmid behandelt wurden (LB/Amp (+) pGLO-Platte und LB/Amp/Ara (+) pGLO-Platte), auf der LB/Amp-Platte wachsen können. Somit muss das Plasmid Resistenz gegen Ampicillin verleihen.

Lerneinheit 3 Fragen zur Wissensüberprüfung

Was leuchtet?

1. Rufen Sie sich in Erinnerung, was Sie beobachtet haben, als Sie die UV-Lampe auf eine Probe der ursprünglichen pGLO-Plasmid-DNA gerichtet haben, und beschreiben Sie Ihre Beobachtungen.

Die Plasmidprobe wies keine Fluoreszenz auf.

2. Welche der beiden möglichen Quellen der Fluoreszenz kann nun ausgeschlossen werden?

Die pGLO-Plasmid-DNA und die ursprünglichen Bakterien können als Fluoreszenzquelle ausgeschlossen werden.

3. Was sagt diese Beobachtung über die Quelle der Fluoreszenz aus?

Die Fluoreszenzquelle ist wahrscheinlich ein Protein, das vom Plasmid codiert wird.

4. Beschreiben Sie, woraus Sie ableiten können, ob Ihr Versuch, eine genetische Transformation durchzuführen, erfolgreich war oder nicht.

Der Erfolg des Experiments zeigt sich an dem Vorhandensein von Kolonien auf den (+) pGLO LB/Amp- und (+) pGLO LB/Amp/Ara-Platten und dem Fehlen von Kolonien auf der (-) pGLO LB/Amp-Platte. Außerdem sollten die Kolonien auf der LB/Amp/Ara-Platte grün leuchten.

Wenn das Experiment nicht erfolgreich war, sind auf den (+) pGLO LB/Amp- und (+) pGLO LB/Amp/Ara-Platten keine Kolonien vorhanden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass dem (+) pGLO-Röhrchen kein Plasmid zugegeben wurden oder dass keine Bakterienkolonie in das (+) pGLO-Röhrchen gegeben wurde.

EMPFEHLUNGEN FÜR
KURSLEITENDE ZUR
BEANTWORTUNG VON FRAGEN

Lerneinheit 3 Fragen zur Wissensüberprüfung

Die Wechselwirkung zwischen Genen und Umwelt

Sehen Sie sich nochmals Ihre vier Platten an. Sind einige *E. coli* auch auf den LB-Platten gewachsen, die kein Ampicillin/keine Arabinose enthalten?

Ja. Auf einer Platte, die nur LB-Nährstoffagar enthält, wachsen Bakterien, die das Plasmid nicht erhalten haben.

1. Geben Ihre Ergebnisse Aufschluss darüber, ob diese Bakterien Ampicillin-resistent sind, wenn Sie sie auf der LB-Platte betrachten? Erklären Sie Ihre Antwort.

Nein. Ob die Bakterien Ampicillin-resistent sind, lässt sich durch bloßes Betrachten nicht erkennen. Beide Arten von Bakterien (die Ampicillin-resistenten und die Ampicillin-empfindlichen) sehen in der Kultur ähnlich aus—denken Sie an die Kolonien auf der LB-Starterplatte und die Kolonien auf der +pGLO LB/Amp-Platte.

2. Wie würden Sie die Wachstums Umgebung der Bakterien verändern, um am besten festzustellen, ob sie Ampicillin-resistent sind?

Der beste Test wäre, einige der auf der LB-Platte wachsenden Bakterien zu nehmen und sie auf einer LB/Amp-Platte auszustreichen. Wenn die Bakterien auf der LB/Amp-Platte lebensfähig sind, dann sind sie gegen Ampicillin resistent. Wenn keine Bakterienkolonien überleben, waren sie nicht Ampicillin-resistent (d. h. sie waren Ampicillin-empfindlich).

3. Sehr oft ergeben sich die Merkmale eines Organismus aus einer Kombination seiner Gene und seiner Wachstums Umgebung. Denken Sie an das grüne Leuchten, das Sie in den genetisch veränderten Bakterien festgestellt haben:

- a. Welche beiden Faktoren müssen in der Umgebung der Bakterien vorhanden sein, damit Sie das grüne Leuchten sehen? (Hinweis: Ein Faktor befindet sich in der Platte und der andere Faktor hängt mit der Art der Betrachtung der Bakterien zusammen).

Der Zucker Arabinose in der Agaroseplatte wird benötigt, um die Expression des GFP-Gens einzuschalten. Das UV-Licht ist notwendig, um das GFP-Protein in den Bakterien zum Fluoreszieren zu bringen.

- b. Warum bewirken die beiden oben aufgeführten Umweltfaktoren, dass die genetisch veränderten Bakterien grün werden? Begründen Sie Ihre Annahme.

Der Zucker Arabinose aktiviert die Expression des GFP-Gens, indem er an ein regulatorisches Protein, *araC*, bindet, das auf dem P_{BAD} -Promotor sitzt. Wenn Arabinose vorhanden ist, bindet sie an *araC* und ändert damit die Konformation von *araC*, was die Transkription des Gens durch RNA-Polymerase ermöglicht (siehe ausführliche Beschreibung in Anhang D). Bei Bestrahlung mit UV-Licht werden die Elektronen im Chromophor von GFP angeregt und nehmen einen höheren energetischen Zustand ein. Wenn sie wieder zurück auf einen niedrigeren Energiezustand fallen geben sie sichtbares fluoreszierendes grünes Licht einer längeren Wellenlänge (509 nm) ab.

- c. Welchen Vorteil hätte es für einen Organismus, bestimmte Gene als Reaktion auf bestimmte Bedingungen ein- oder ausschalten zu können?

Die Genregulation ermöglicht die Anpassung an unterschiedliche Bedingungen und verhindert eine Überproduktion und damit eine Verschwendung nicht benötigter Proteine. Gute Beispiele für stark regulierbare Gene sind die Enzyme, die Kohlenhydrat-Nahrungsquellen abbauen. Wenn der Zucker Arabinose im Wachstumsmedium vorhanden ist, ist es für Bakterien von Vorteil, die Enzyme zu bilden, die zum Abbau der Zuckerquelle erforderlich sind. Wenn umgekehrt keine Arabinose im Nährmedium vorhanden ist, wäre es eine Energieverschwendung, die Enzyme zum Abbau von Arabinose herzustellen.

Lerneinheit 4 Vertiefungsaktivität

1. Bestimmung der Gesamtzahl an grün fluoreszierenden Zellen.

Stellen Sie Ihre LB/Amp/Ara-Platte in die Nähe einer UV-Lichtquelle. Sie können davon ausgehen, dass jede Kolonie auf der Platte von einer einzigen Zelle abstammt. Durch die Vermehrung der einzelnen Zellen entstehen immer mehr Zellen und bilden eine so genannte Kolonie. Der direkteste Weg zur Bestimmung der **Gesamtzahl grün fluoreszierender Zellen** besteht darin, die Kolonien auf der Platte zu zählen.

Geben Sie diese Zahl her ein →

Gesamtzahl an Zellen =
190

2. Bestimmung der Menge an pGLO-Plasmid-DNA in den auf der LB/Amp/Ara-Platte ausgestrichenen Bakterienzellen.

Wir benötigen zwei Informationen, um die Menge an DNA (bzw. pGLO) in den Bakterienzellen, die in diesem Experiment auf der LB/Amp/Ara-Platte ausgestrichen wurden, festzustellen. (i) Die Gesamtmenge an DNA am Anfang des Experiments und (ii) den Anteil der DNA (in den Bakterien), der tatsächlich auf den LB/Amp/Ara-Platten verteilt wurde.

Nachdem Sie diese Daten berechnet haben, müssen Sie die **Gesamtmenge der in diesem Experiment verwendeten pGLO-Plasmid-DNA** mit dem DNA-Anteil multiplizieren, den Sie auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt haben. Das Ergebnis dieser Multiplikation ist die Menge an pGLO-Plasmid-DNA in den Bakterienzellen, die auf der LB/Amp/Ara-Platte ausgestrichen wurden.

a. Bestimmung der Gesamtmenge an DNA

Die Gesamtmenge an pGLO-Plasmid-DNA, mit der wir begonnen haben, ist gleich dem Produkt aus der Konzentration und dem verwendeten Gesamtvolumen:

$$\text{DNA } (\mu\text{g}) = (\text{Konzentration der DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l})) \times (\text{Volumen der DNA in } \mu\text{l})$$

In diesem Experiment haben Sie 10 μl pGLO in einer Konzentration von 0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verwendet. Das bedeutet, dass jeder Mikroliter Lösung 0,08 μg pGLO-DNA enthielt. Berechnen Sie die **Gesamtmenge an DNA, die Sie in diesem Experiment verwendet haben.**

Geben Sie diese Zahl her ein →

DNA-Gesamtmenge (μg)
in diesem Experiment =
0,8

Wie verwenden Sie diese Information?

Diese Zahl wird mit der verwendeten DNA-Fraktion multipliziert, um die Gesamtmenge der auf der Agarplatte verteilten DNA zu bestimmen.

EMPFEHLUNGEN FÜR
KURSLEITENDE ZUR
BEANTWORTUNG VON FRAGEN

- b. **Bestimmung des Anteils an pGLO-Plasmid-DNA (in den Bakterien), der tatsächlich auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt wurde.** Da nicht die gesamte pGLO-Plasmid-DNA, die Sie zu den Bakterienzellen gegeben haben, auf die Agarplatte übertragen wird, müssen Sie herausfinden, welcher Anteil der DNA tatsächlich auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt wurde. Dazu wird das DNA-Volumen, das Sie auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt haben, durch das Gesamtvolumen der Flüssigkeit im Teströhrchen mit der DNA dividiert. Die dazugehörige Formel lautet:

$$\text{Verwendeter DNA-Anteil} = \frac{\text{auf der LB/Amp/Ara-Platte verteiltes Volumen}}{\text{Gesamtvolumen im Teströhrchen}}$$

Sie haben 100 µl Zellen, die pGLO-DNA enthalten, aus einem Teströhrchen mit insgesamt 510 µl Lösung verteilt. Wissen Sie noch, warum es insgesamt 510 µl Lösung waren? Schauen Sie im Laborprotokoll nach und suchen Sie alle Schritte, bei denen Sie Flüssigkeit in das Reaktionsröhrchen gegeben haben. Addieren Sie die Volumennengen.

Verwenden Sie die Formel oben, um den **DNA-Anteil zu berechnen**, den Sie auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt haben.

Geben Sie diese Zahl hier ein →

Anteil der DNA = <u>0,2</u>

- Wie verwenden Sie diese Information?

Diese Zahl wird mit der verwendeten DNA-Menge multipliziert, um die Gesamtmenge der auf einer Agarplatte verteilten DNA zu berechnen.

Wie viele Mikrogramm DNA haben Sie also auf den LB/Amp/Ara-Platten verteilt?

Um diese Frage zu beantworten, müssen Sie die **Gesamtmenge der in diesem Experiment verwendeten DNA** mit dem **DNA-Anteil** multiplizieren, den Sie auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt haben.

$$\text{Verteilte pGLO-DNA } (\mu\text{g}) = \text{Verwendete DNA-Gesamtmenge } (\mu\text{g}) \times \text{DNA-Anteil}$$

Geben Sie diese Zahl hier ein →

Verteilte pGLO DNA (µg) = <u>0,16</u>

- Was sagt diese Zahl aus?

Diese Zahl sagt Ihnen, wie viel DNA auf der Agarplatte verteilt wurde.

**EMPFEHLUNGEN FÜR
 KURSLEITENDE ZUR
 BEANTWORTUNG VON FRAGEN**

Sehen Sie sich alle Ihre obigen Berechnungen an. Entscheiden Sie, welche der berechneten Zahlen in die folgende Tabelle einzutragen sind. Füllen Sie die folgende Tabelle aus:

Anzahl der Kolonien auf der LB/Amp/Ara-Platte	190
Mikrogramm pGLO-DNA, die auf den Platten verteilt wurde	0,16 µg

Verwenden Sie nun die Daten in der Tabelle zur Berechnung der Effizienz der pGLO-Transformation.

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Gesamtanzahl der auf der Agarplatte gewachsenen Zellen}}{\text{Menge der auf die Agarplatte aufgebrauchten DNA}}$$

Geben Sie diese Zahl hier ein →

1.187 Transformanten/µg Transformationseffizienz
--

Analyse

Bei der Berechnung der Transformationseffizienz erhält man sehr große Zahlen. In der Wissenschaft wird häufig eine mathematische Abkürzung verwendet, die als wissenschaftliche Notation bezeichnet wird. Wenn die berechnete Transformationseffizienz beispielsweise 1.000 Bakterien/µg DNA beträgt, wird diese Zahl häufig folgenderweise angegeben:

10³ Transformanten/µg (10³ ist eine andere Schreibweise für 10 x 10 x 10 oder 1.000)

- Wie würde man eine Zahl von 10.000 Transformanten/µg in wissenschaftlicher Notation angeben?

10⁴

Nehmen wir nun an, man hätte eine Effizienz von **5.000 Bakterien/µg DNA** errechnet. Diese Zahl würde man folgenderweise angeben:

5,0 x 10³ Transformanten/µg (5 Mal 1.000)

- Wie würde man eine Zahl von 40.000 Transformanten/µg in wissenschaftlicher Notation angeben?

4,0 x 10⁴

**EMPFEHLUNGEN FÜR
 KURSLEITENDE ZUR
 BEANTWORTUNG VON FRAGEN**

Ein letztes Beispiel: Wenn die Berechnung 2.600 Transformanten/ μg ergibt, wäre die wissenschaftliche Notation für diese Zahl:

$$2,6 \times 10^3 \text{ Transformanten}/\mu\text{g} \quad (2,6 \text{ Mal } 1.000)$$

Entsprechend:

$$5.600 = 5,6 \times 10^3 \quad 271.000 = 2,71 \times 10^5 \quad 2.420.000 = 2,42 \times 10^6$$

- Wie würde man eine Zahl von 960.000 Transformanten/ μg in wissenschaftlicher Notation angeben?
 $9,6 \times 10^5$
- Geben Sie Ihre selbst berechnete Transformationseffizienz in wissenschaftlicher Notation an.

$$1,2 \times 10^3 \quad \text{Transformanten}/\mu\text{g}$$

- Erklären Sie in ein bis zwei Sätzen, was Ihre berechnete Transformationseffizienz bedeutet:
Die Transformationseffizienz ist ein quantitativer Wert, der beschreibt, wie effektiv Sie dabei waren, ein Plasmid in Bakterien einzubringen. Die Zahl gibt die Anzahl transformierter Kolonien an, die pro Mikrogramm zugegebener DNA produziert werden.

In der Biotechnologie geht man davon aus, dass das Transformationsprotokoll, das Sie gerade durchgeführt haben, im Allgemeinen eine Transformationseffizienz zwischen $8,0 \times 10^2$ und $7,0 \times 10^3$ Transformanten pro Mikrogramm DNA ergibt.

- Wie sieht Ihre Transformationseffizienz im Vergleich zu diesen Zahlen aus?
Die berechnete Effizienz ($1,2 \times 10^3$) liegt innerhalb der erwartungsgemäßen Grenzwerte für dieses Protokoll.
- Tragen Sie in die folgende Tabelle die Transformationseffizienz mehrerer Gruppenteams ein.

Team	Effizienz
Die Antworten werden unterschiedlich ausfallen.	

- Wie sieht Ihre Transformationseffizienz im Vergleich zu der Transformationseffizienz der anderen Gruppen aus?
Die Antworten werden unterschiedlich ausfallen.

EMPFEHLUNGEN FÜR
KURSLEITENDE ZUR
BEANTWORTUNG VON FRAGEN

- Berechnen Sie die Transformationseffizienz des folgenden Experiments mit den unten aufgeführten Informationen und Ergebnissen.

DNA-Plasmidkonzentration – 0,08 µg/µl

250 µl CaCl₂-Transformationslösung

10 µl Plasmidlösung

250 µl LB-Nährbouillon

100 µl auf dem Agar ausgestrichene Zellen

227 gezählte Kolonien transformierter Bakterien

Füllen Sie die folgende Tabelle aus und zeigen Sie Ihre Berechnungen dem/der Kursleitenden.

Anzahl der Kolonien auf der LB/Amp/Ara-Platte	227
Auf den Platten verteilte DNA-Menge in Mikrogramm	0,16
Transformationseffizienz	$1,4 \times 10^3$

- Zusatzaufgabe

Wenn ein bestimmtes Experiment eine bekannte Transformationseffizienz von 3×10^3 Bakterien/µg DNA hätte, wie viele transformierte Kolonien würden dann voraussichtlich auf der LB/Amp/Ara-Platte wachsen? Sie können dabei davon ausgehen, dass die DNA-Konzentration und der Anteil der Zellen, die auf dem LB-Agar verteilt werden, gleich sind wie im pGLO-Labor.

Transformationseffizienz = Anzahl der Kolonien pro auf einer Platte verteilter DNA (µg)

$$3,0 \times 10^3 = X/0,16$$

$$(3,0 \times 10^3)(0,16) = X$$

$$480 = X$$

480 Transformantenkolonien

Handbuch für Kursteilnehmende

pGLO-Transformation

Lerneinheit 1 Einführung in die Transformation

In dieser Labor-Lerneinheit werden Sie ein Verfahren durchführen, das als genetische Transformation bezeichnet wird. Wichtig ist, sich in Erinnerung zu rufen, dass es sich bei einem Gen um ein Stück DNA handelt, das die Anweisungen (den Code) zum Herstellen eines Proteins enthält. Dieses Protein verleiht einem Organismus eine bestimmte Eigenschaft bzw. ein bestimmtes Merkmal. Genetische Transformation bedeutet wörtlich eine durch Gene verursachte Veränderung und beinhaltet das Einfügen eines Gens in einen Organismus, um ein Merkmal/eine Eigenschaft des Organismus zu verändern. Genetische Transformation wird in vielen Bereichen der Biotechnologie eingesetzt. In der Landwirtschaft können Gene, die Eigenschaften wie Frost-, Schädlings- oder Fäulnisresistenz codieren, genetisch in Pflanzen transformiert werden. Bei der biologischen Sanierung können Bakterien mit Genen transformiert werden, die es ihnen ermöglichen, Ölverschmutzungen abzubauen. In der Medizin beginnt man damit, Krankheiten, die durch defekte Gene verursacht werden, durch Gentherapie zu behandeln, das heißt durch genetische Transformation der Zellen einer kranken Person mit gesunden Kopien des defekten Gens, das die Krankheit verursacht.

Sie werden Bakterien mit einem Gen transformieren, das das grün fluoreszierende Protein (GFP) codiert. Dieses Gen stammt ursprünglich aus der biolumineszierenden Qualle *Aequorea victoria*. Das grün fluoreszierende Protein ermöglicht es der Qualle, im Dunkeln zu leuchten. Nach der Transformation exprimieren die Bakterien ihr neu erworbenes Quallengen und bilden das Fluoreszenzprotein, das sie unter UV-Licht in strahlendem Grün leuchten lässt.

In dieser Lerneinheit erfahren Sie mehr über den Vorgang der Übertragung von Genen von einem Organismus zu einem anderen mit Hilfe eines Plasmids. Zusätzlich zu einem großen Chromosom enthalten Bakterien von Natur aus ein oder mehrere kleine ringförmige DNA-Stücke, so genannte Plasmide. Diese Plasmid-DNA enthält normalerweise Gene für ein oder mehrere Merkmale, die für das Überleben der Bakterien von Vorteil sein können. In der Natur können Bakterien Plasmide selbst übertragen und dadurch diese nützlichen Gene mit anderen Bakterien teilen. Dieser natürliche Mechanismus ermöglicht es Bakterien, sich an eine neue Umgebung anzupassen. Das in letzter Zeit verstärkte Auftreten bakterieller Resistenzen gegen Antibiotika ist auf die Weitergabe von Plasmiden zurückzuführen.

Das pGLO-Plasmid von Bio-Rad codiert das Gen für GFP und ein Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin. pGLO enthält außerdem ein spezielles Genregulationssystem, das verwendet werden kann, um die Expression des Fluoreszenzproteins in transformierten Zellen zu steuern. Das Gen für GFP lässt sich in transformierten Zellen durch Zugabe des Zuckers Arabinose zum Nährmedium der Zellen einschalten. Die Selektion auf Zellen, die mit pGLO-DNA transformiert wurden, erfolgt durch Anzucht auf Ampicillin-Platten. Auf Platten, die keine Arabinose enthalten, bilden transformierte Zellen weiße Kolonien (Wildtyp-Phänotyp). Wenn Arabinose im Nährstoffagar enthalten ist, leuchten sie unter UV-Licht grün.

Die benötigten Materialien und ein Protokoll zur Durchführung der genetischen Transformation werden Ihnen zur Verfügung gestellt.

Ihre Aufgaben:

1. Durchführung der genetischen Transformation.
2. Bestimmung des Erfolgsgrades bei der genetischen Veränderung eines Organismus.

Lerneinheit 1 Fragen zur Verdeutlichung

Bei der Planung eines wissenschaftlichen Laborexperiments müssen viele Überlegungen angestellt werden. Im Folgenden sind einige Gesichtspunkte aufgeführt, die bei der Durchführung einer genetischen Transformation zu berücksichtigen sind.

Da wissenschaftliche Laborexperimente dazu dienen, eine bestimmte Fragestellung zu untersuchen, könnte der erste Schritt darin bestehen, auch für dieses Experiment eine solche Fragestellung zu formulieren.

Überlegung 1: Kann ich einen Organismus genetisch transformieren? Welchen Organismus?

1. Um einen ganzen Organismus genetisch zu transformieren, müssen Sie das neue Gen in jede Zelle des Organismus einführen. Welcher Organismus eignet sich besser für eine vollständige genetische Transformation – einer aus vielen Zellen oder einer aus einer einzigen Zelle?

2. Es kann wichtig sein zu erfahren, ob der genetisch veränderte Organismus seine neuen Eigenschaften an seine Nachkommen und zukünftige Generationen weitergeben kann. Was wäre ein besserer Kandidat für Ihr Experiment, um das herauszufinden – ein Organismus, bei dem jede neue Generation schnell heranwächst und sich reproduziert, oder einer, bei dem diese Vorgänge langsamer vonstatten gehen?

3. Sicherheit ist ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Auswahl eines Organismus für ein Versuchsvorhaben. Welche Eigenschaften oder Merkmale sollte der Organismus haben (bzw. nicht haben), um sicherzugehen, dass er weder Ihnen noch der Umwelt schadet?

4. Was wäre ausgehend von den obigen Überlegungen die beste Wahl für eine genetische Transformation: ein Bakterium, ein Regenwurm, ein Fisch oder eine Maus? Begründen Sie Ihre Wahl.

Überlegung 2: Wie lässt sich feststellen, ob Zellen genetisch verändert wurden?

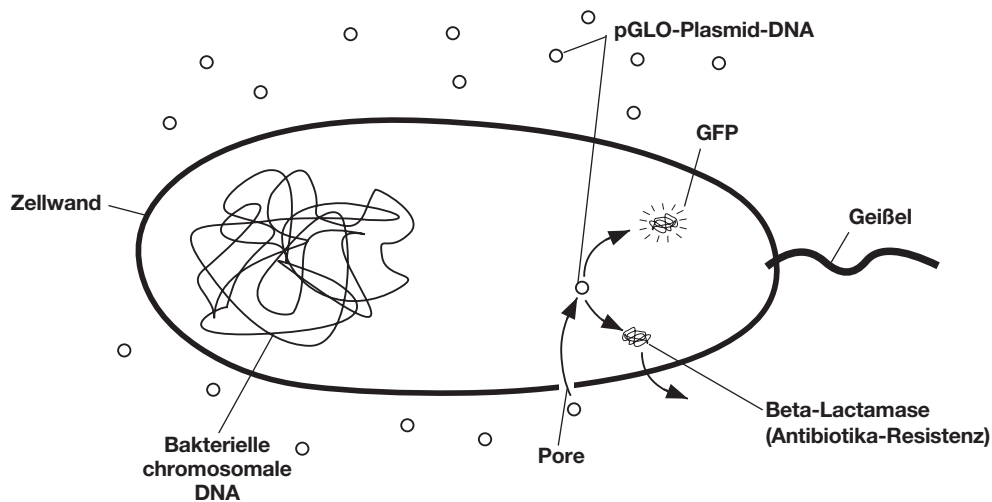
Denken Sie daran, dass das Ziel der genetischen Transformation darin besteht, die Merkmale bzw. Eigenschaften eines Organismus (den so genannten Phänotyp) zu verändern. Bevor eine Veränderung des Phänotyps eines Organismus festgestellt werden kann, muss sein natürlicher Phänotyp (das heißt, der Phänotyp vor der Transformation) gründlich untersucht werden. Sehen Sie sich die *E. coli*-Kolonien auf Ihren Starterplatten an. Listen Sie alle sichtbaren Merkmale oder Eigenschaften auf:

Die folgenden Feststellungen über *E. coli* vor der Transformation könnten Vergleichsdaten darstellen um festzustellen, ob tatsächlich eine genetische Transformation stattgefunden hat.

- a) Anzahl der Kolonien
 - b) Größe:
 - 1) der größten Kolonie
 - 2) der kleinsten Kolonie
 - 3) der meisten Kolonien
 - c) Farbe der Kolonien
 - d) Verteilung der Kolonien auf der Platte
 - e) Aussehen unter ultraviolettem (UV) Licht
 - f) Die Fähigkeit der Zellen, in Gegenwart eines Antibiotikums wie Ampicillin zu überleben und sich zu vermehren
1. Beschreiben Sie, wie Sie zwei LB/Agarplatten, einige *E. coli* und etwas Ampicillin verwenden könnten, um zu bestimmen, welche Auswirkungen Ampicillin auf die *E. coli*-Zellen hat.
 2. Was könnten Ihre Versuchsergebnisse über die Wirkung von Ampicillin auf die *E. coli*-Zellen aussagen?

Überlegung 3: Die Gene

Bei der genetischen Transformation wird in *E. coli*-Zellen ein neues Stück DNA eingebracht. Zusätzlich zu einem großen Chromosom enthalten Bakterien oft ein oder mehrere kleine ringförmige DNA-Stücke, so genannte Plasmide. Plasmid-DNA enthält normalerweise Gene für mehr als ein Merkmal. In der Forschung werden Hilfsmittel aus der Gentechnik verwendet, um Gene, die neue Merkmale codieren, in ein Plasmid einzufügen. In diesem Fall wurde das pGLO-Plasmid gentechnisch so verändert, dass es zum einen das GFP-Gen enthält, welches das grün fluoreszierende Protein GFP codiert, und zum anderen ein Gen (*bla*), das ein Protein codiert, welches den Bakterien Resistenz gegen ein Antibiotikum verleiht. Das gentechnisch veränderte Plasmid kann dann verwendet werden, um Bakterien genetisch zu transformieren und ihnen dadurch diese neue Eigenschaft zu verleihen.



Überlegung 4: Der Vorgang der Transformation

Das Vorgehen bei dieser Transformation besteht im Wesentlichen aus drei Schritten. Diese Schritte zielen darauf ab, Plasmid-DNA in die *E. coli*-Zellen einführen und den Zellen ein Milieu zu bieten, in dem sie ihre neu erworbenen Gene exprimieren.

Um die pGLO-Plasmid-DNA durch die Zellmembran zu bringen, werden Sie folgenderweise vorgehen:

1. Sie verwenden eine Transformationslösung mit CaCl_2 (Calciumchlorid).
2. Sie führen einen so genannten **Hitzeschock** durch.

Um es transformierten Zellen zu ermöglichen, in Gegenwart von Ampicillin zu wachsen, müssen Sie:

3. Den Zellen Nährstoffe zur Verfügung stellen und sie für kurze Zeit inkubieren, damit die Zellen damit beginnen, ihre neu erworbenen Gene zu exprimieren.

Lerneinheit 2 Transformationslabor

Checkliste für die Arbeitsplätze (✓)

Ihr Arbeitsplatz: Nachstehend sind das Material und die Zubehörartikel aufgeführt, die vor Beginn dieser Laborversuche an Ihrem Arbeitsplatz vorhanden sein sollten.

Arbeitsplatz der Kursteilnehmenden

Material	Menge	(✓)
<i>E. coli</i> -Starterplatte	1	<input type="checkbox"/>
Gegossene Agarplatten (1 LB, 2 LB/Amp, 1 LB/Amp/Ara)	4	<input type="checkbox"/>
Transformationslösung	1	<input type="checkbox"/>
LB-Nährstoffbouillon	1	<input type="checkbox"/>
Impfösen	7 (1 Packung mit 10 St.)	<input type="checkbox"/>
Pipetten	5	<input type="checkbox"/>
Halter/Schwimmständer für Mikrozentrifugenröhrchen aus Schaumstoff/Styropor	1	<input type="checkbox"/>
Behälter (zum Beispiel aus Styropor) mit zerstoßenem Eis (keine Eiswürfel)	1	<input type="checkbox"/>
Permanentmarker	1	<input type="checkbox"/>
Ein Exemplar der Kurzanleitung	1	<input type="checkbox"/>
Mikrozentrifugenröhrchen	2	<input type="checkbox"/>

Gemeinsam genutzter Arbeitsplatz. Eine Liste von Material, Zubehörartikeln und Gerätschaften, die an einem gemeinsamen Arbeitsplatz vorhanden sein sollten, der von allen Teams genutzt werden kann, ist ebenfalls unten aufgeführt.

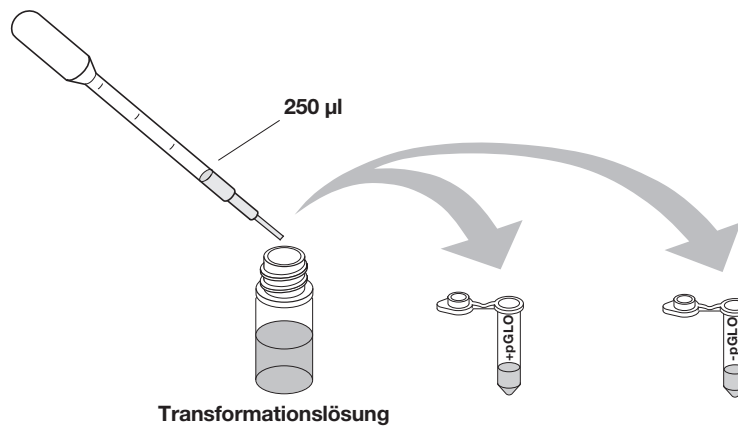
Material	Menge	
Rehydratisiertes pGLO-Plasmid	1 Fläschchen	<input type="checkbox"/>
Auf 42 °C eingestelltes Wasserbad und Thermometer	1	<input type="checkbox"/>
UV-Lampe	1	<input type="checkbox"/>
Auf 37 °C eingestellter Inkubator (optional, siehe „Allgemeine Laborvorkenntnisse–Inkubation“)	1	<input type="checkbox"/>
Verstellbare Mikropipetten, 2–20 µl	1	<input type="checkbox"/>
Spitzen für Mikropipetten, 2–20 µl	1	<input type="checkbox"/>

Transformationsverfahren

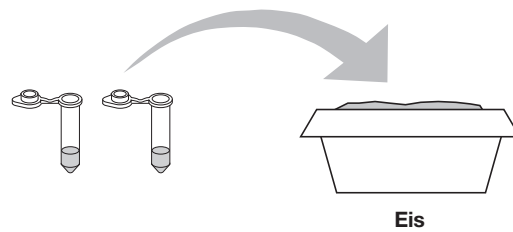
1. Ein geschlossenes Mikroteströhrchen mit **+pGLO** und ein anderes mit **-pGLO** beschriften. Beide Röhrchen mit dem Namen Ihrer Gruppe beschriften. In das Röhrchengestell aus Schaumstoff/ Styropor stellen.



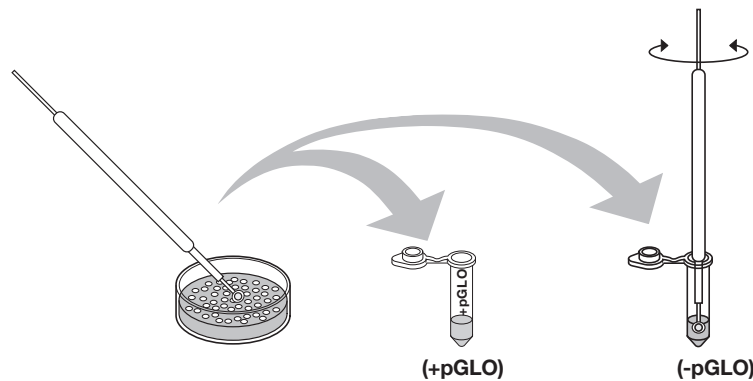
2. Die Röhrchen öffnen und mit einer sterilen Pipette 250 µl Transformationslösung (CaCl₂) in jedes Röhrchen überführen.



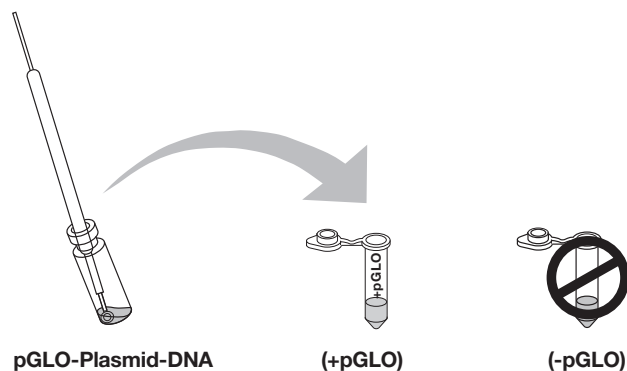
3. Die Röhren auf Eis stellen.



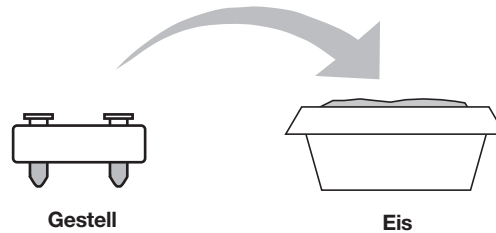
4. Mit einer sterilen Impföse **2-4 große Bakterienkolonien** aus Ihrer Starterplatte aufnehmen. Wählen Sie „fette“ Starterkolonien (d. h. solche mit einem Durchmesser von 1-2 mm). Es ist wichtig, Einzelkolonien aufzunehmen (keine Probe aus dem dicht gewachsenen Teil der Platte), da sich die Bakterien in der aktiven Wachstumsphase befinden müssen, um eine hohe Transformationseffizienz zu erzielen. Wählen Sie nur Bakterienkolonien, die gleichmäßig rund sind und einen glatten Rand haben. Die Impföse bis zum Boden in das mit **+pGLO** beschriftete Röhren einführen und in die Transformationslösung tauchen. Die Impföse zwischen Zeigefinger und Daumen hin und her drehen, bis die gesamte Kolonie in der Transformationslösung verteilt ist (also keine größeren Stückchen mehr vorhanden sind). Das Röhren wieder in das Gestell auf Eis stellen. Den Vorgang mit einer neuen sterilen Impföse mit dem mit -pGLO beschrifteten Röhren wiederholen.



5. Die pGLO-DNA-Lösung mit der UV-Lampe untersuchen. Schreiben Sie auf, was Sie sehen. Eine **neue sterile Impföse** in das Röhren mit der Stammlösung mit pGLO-Plasmid-DNA eintauchen. Die volle Impföse wieder herausziehen. Die Öse sollte mit einem Film aus Plasmidlösung überzogen sein, ähnlich wie ein Seifenfilm über einem Ring zum Herstellen von Seifenblasen. Den Inhalt der Öse in die Zellsuspension in dem mit **+pGLO** beschrifteten Röhren einmischen. Optional 10 µl pGLO-Plasmid in das +pGLO Röhren geben und mischen. **Keine** Plasmid-DNA in das mit **-pGLO** beschriftete Röhren geben. Beide Röhren, **+pGLO** und **-pGLO**, schließen und wieder in das Gestell auf Eis stellen.



6. Die Röhrrchen 10 min auf Eis stellen. Darauf achten, die Röhrrchen so in das Gestell zu setzen, dass der Boden der Röhrrchen nach unten herausragt und mit dem Eis in Kontakt kommt.

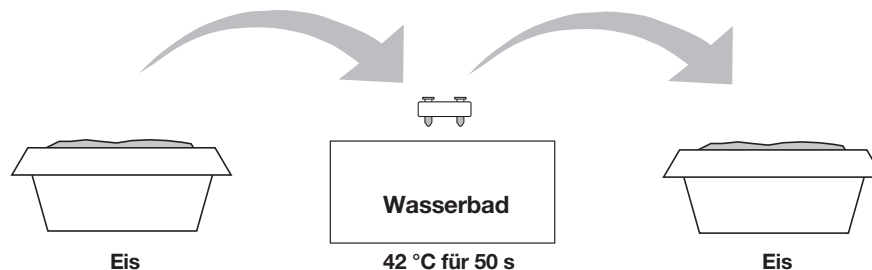


7. Während die Röhrrchen auf Eis stehen, vier LB-Nährstoffagarplatten am Boden (nicht am Deckel) wie folgt beschriften:
- Eine **LB/Amp**-Platte beschriften mit: **+ pGLO**
 - Die **LB/Amp/Ara**-Platte beschriften mit: **+ pGLO**
 - Die andere **LB/Amp**-Platte beschriften mit: **- pGLO**
 - Die **LB-Platte** beschriften mit: **- pGLO**

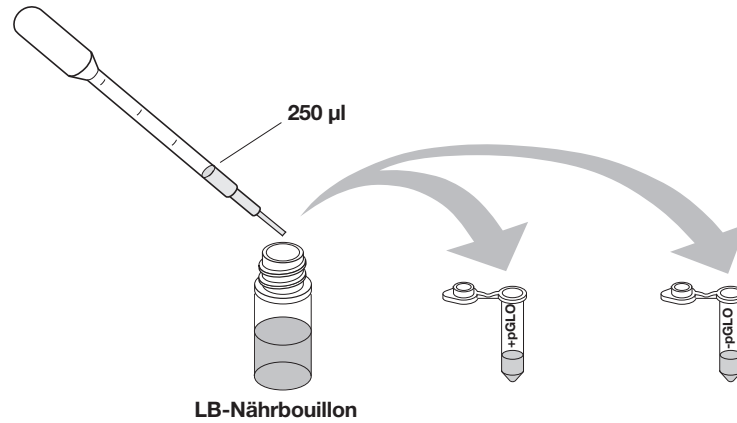


8. **Hitzeschock.** Unter Verwendung des Schaumstoff-/Styroporgestells als Halterung die mit (+) pGLO und (-) pGLO beschrifteten Röhrrchen **für genau 50 Sekunden** in das auf 42 °C eingestellte Wasserbad tauchen. Darauf achten, die Röhrrchen so in das Gestell zu setzen, dass der Boden der Röhrrchen nach unten herausragt und mit dem warmen Wasser in Kontakt kommt. Die Temperatur des Wasserbads der Genauigkeit halber mit zwei Thermometern überprüfen.

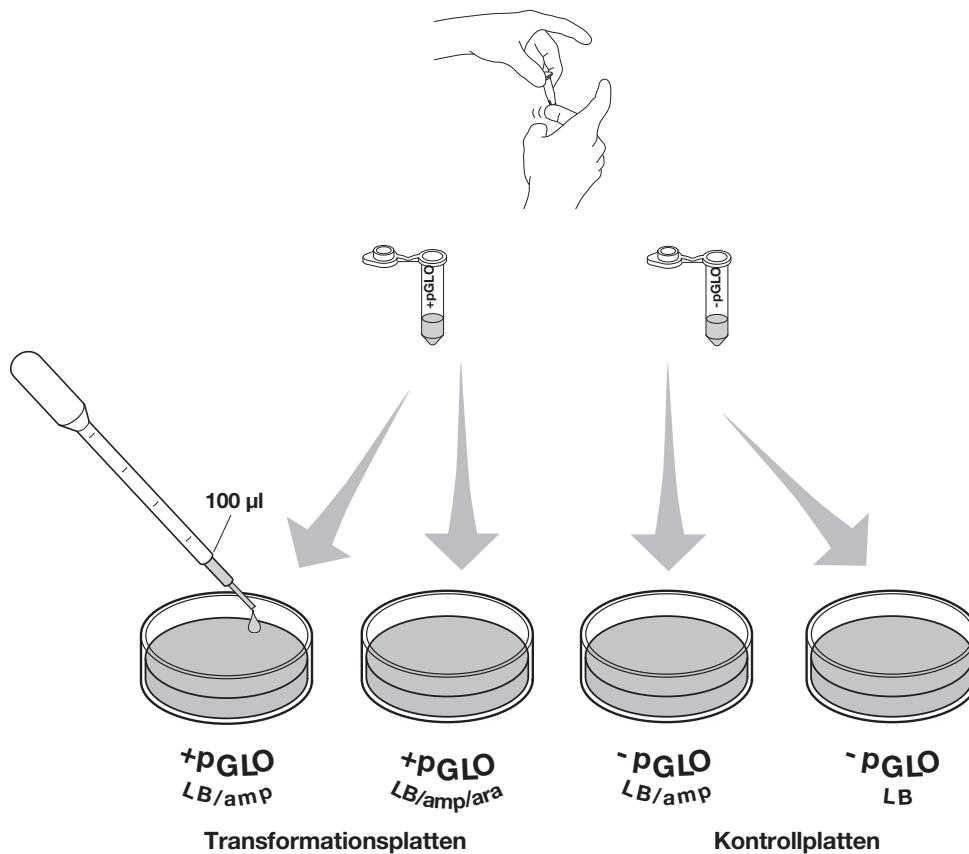
Nach Ablauf der 50 Sekunden beide Röhrrchen wieder auf Eis stellen. Für optimale Transformationsergebnisse muss der Transfer von Eis (0 °C) auf 42 °C und wieder zurück auf Eis schnell erfolgen. Röhrrchen 2 min auf Eis stellen.



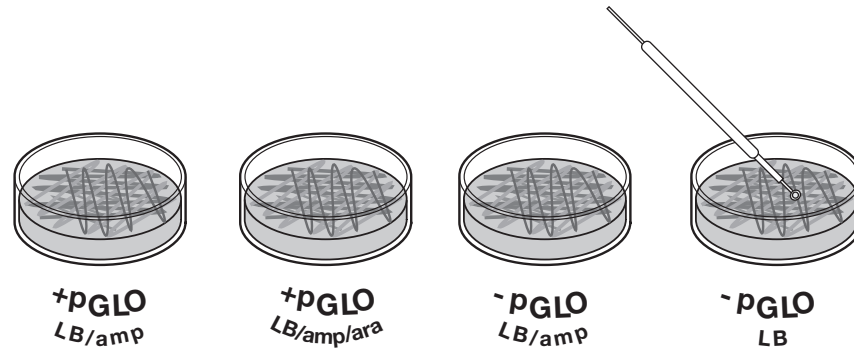
9. Das Gestell mit den Röhrcchen aus dem Eis nehmen und auf den Tisch stellen. Ein Röhrcchen öffnen und mit einer neuen sterilen Pipette 250 μ l LB-Nährbouillon hinein geben. Das Röhrcchen dann wieder schließen. Eine neue sterile Pipette nehmen und Vorgang mit dem anderen Röhrcchen wiederholen. Die Röhrcchen 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen.



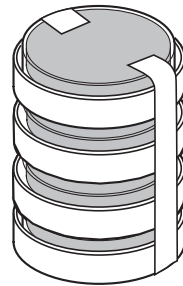
10. Vorsichtig mit den Fingern an die geschlossenen Röhrcchen schnippen, um die Bakterien zu mischen und zu resuspendieren. Für jedes Röhrcchen eine neue sterile Pipette verwenden und 100 μ l der Transformationssuspension bzw. der Kontroll suspension auf die jeweiligen Nährstoffagarplatten geben.



11. **Für jede Platte eine neue sterile Impföse verwenden.** Die Suspensionen müssen gleichmäßig auf der Oberfläche des LB-Nährstoffagars verteilt werden, indem die flache Seite einer neuen sterilen Impföse schnell auf der Plattenoberfläche hin und her bewegt wird. **NICHT ZU TIEF IN DEN AGAR DRÜCKEN.** Nur jeweils eine Platte öffnen und nach dem Verteilen der Zellsuspension sofort wieder den Deckel aufsetzen. Dadurch wird Kontamination minimiert.



12. Die Platten stapeln und mit Klebeband umwickeln. Schreiben Sie Ihren Gruppennamen und Ihre Unterrichtseinheit auf den Boden des Stapels und stellen Sie den Plattenstapel bis zum nächsten Tag **verkehrt herum** in den auf 37 °C eingestellten Inkubator. Die Platten werden umgedreht, um Kondenswasser auf dem Deckel zu vermeiden, das auf die Kultur tropfen und Ihre Ergebnisse beeinträchtigen könnte.

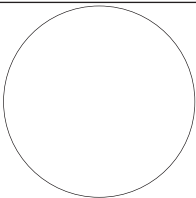
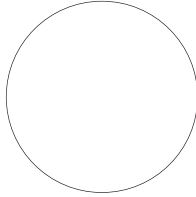
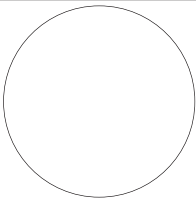
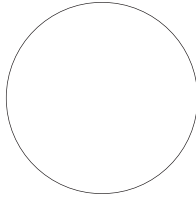


Lerneinheit 3 Erfassung und Analyse von Daten

A. Datenerfassung

Betrachten Sie die Resultate aus dem Transformationslabor bei normaler Raumbeleuchtung. Schalten Sie dann das Licht aus und halten Sie die UV-Lampe über die Platten. Alternativ kann das Protokoll eine digitale Dokumentation der Platten mit dem Blue Digital Bioluminescence System von Vernier (Anhang E) vorsehen.

1. Sehen Sie sich jede der vier Platten genau an und machen Sie eine Zeichnung von dem, was Sie sehen. Tragen Sie Ihre Zeichnungen in die Datentabelle unten ein. Durch das Aufzeichnen Ihrer Daten können Sie die Beobachtungen für die „+ pGLO“-Zellen mit Ihren Beobachtungen für die nicht transformierten *E. coli* vergleichen. Schreiben Sie auf, was Sie auf jeder Platte zu folgenden Punkten feststellen.
2. Wie viel Bakterienwachstum stellen Sie, relativ gesehen, auf jeder Platte fest?
3. Welche Farbe haben die Bakterien?
4. Wie viele Bakterienkolonien befinden sich auf jeder Platte (zählen Sie die Punkte, die Sie sehen).

	Beobachtungen	
Transformationsplatten	+pGLO LB/Amp	
	+pGLO LB/Amp/Ara	
Kontrollplatten	-pGLO LB/Amp	
	-pGLO LB	

B. Ergebnisanalyse

Das Ziel der Datenanalyse bei diesem Experiment ist es festzustellen, ob eine genetische Transformation stattgefunden hat.

1. Welche der Merkmale, die Sie ursprünglich bei den *E. coli* beobachtet haben, scheinen sich nicht verändert zu haben? Tragen Sie diese vor der Transformation vorhandenen Merkmale unten ein und begründen Sie Ihre Analyse in Bezug auf jedes genannte Merkmal.

Ursprüngliches Merkmal Analyse der Beobachtungen

2. Welche der *E. coli*-Merkmale, die Sie ursprünglich festgestellt haben, scheinen sich jetzt, d. h. nach Durchführung der Transformation, erheblich verändert zu haben? Führen Sie diese Merkmale unten auf und beschreiben Sie die Veränderungen, die Sie festgestellt haben.

Neues Merkmal Festgestellte Veränderung

3. Wenn die genetisch transformierten Zellen die Fähigkeit erworben haben, in Gegenwart des Antibiotikums Ampicillin zu wachsen, was lässt sich dann über die anderen Gene auf dem Plasmid, das Sie für Ihre Transformation verwendet haben, schließen?

4. Wie ließe sich anhand der Ergebnisse, die Sie erhalten haben, beweisen, dass die aufgetretenen Veränderungen auf das von Ihnen durchgeführte Verfahren zurückzuführen sind?

Lerneinheit 3 Fragen zur Wissensüberprüfung

Name _____

Was leuchtet?

Wenn in den *E. coli*-Kolonien eine fluoreszierende grüne Farbe beobachtet wird, könnte sich eine neue Fragestellung ergeben: „Was sind die zwei möglichen Quellen der Fluoreszenz in den Kolonien unter UV-Licht?“

Erklären Sie:

1. Rufen Sie sich in Erinnerung, was Sie beobachtet haben, als Sie die UV-Lampe auf eine Probe der ursprünglichen pGLO-Plasmid-DNA gerichtet haben, und beschreiben Sie Ihre Beobachtungen.
2. Welche der beiden möglichen Quellen der Fluoreszenz kann nun ausgeschlossen werden?
3. Was sagt diese Beobachtung über die Quelle der Fluoreszenz aus?
4. Beschreiben Sie, woraus Sie ableiten können, ob Ihr Versuch, eine genetische Transformation durchzuführen, erfolgreich war oder nicht.

Lerneinheit 3 Fragen zur Wissensüberprüfung

Name _____

Die Wechselwirkung zwischen Genen und Umwelt

Sehen Sie sich nochmals Ihre vier Platten an. Sind auch auf der LB-Platte, die kein Ampicillin oder Arabinose enthält, *E. coli*-Kolonien gewachsen?

1. Geben Ihre Ergebnisse Aufschluss darüber, ob diese Bakterien Ampicillin-resistent sind, wenn Sie sie auf der LB-Platte betrachten? Erklären Sie Ihre Antwort.

2. Wie würden Sie die Wachstums Umgebung der Bakterien—die Platte, auf der sie wachsen—verändern, um am besten festzustellen, ob sie Ampicillin-resistent sind?

3. Sehr oft werden die Merkmale/Eigenschaften eines Organismus durch eine Kombination aus seinen Genen und seiner Umwelt verursacht. Denken Sie an das grüne Leuchten, das Sie in den genetisch veränderten Bakterien festgestellt haben:
 - a. Welche beiden Faktoren müssen in der Umgebung der Bakterien vorhanden sein, damit Sie das grüne Leuchten sehen? (Hinweis: Ein Faktor befindet sich in der Platte und der andere Faktor hängt mit der Art der Betrachtung der Bakterien zusammen).

 - b. Warum bewirken die beiden oben aufgeführten Umweltfaktoren, dass die genetisch veränderten Bakterien grün werden? Begründen Sie Ihre Annahme.

 - c. Welchen Vorteil hätte es für einen Organismus, bestimmte Gene als Reaktion auf bestimmte Bedingungen ein- oder ausschalten zu können?

Lerneinheit 4 Vertiefungsaktivität: Berechnung der Transformationseffizienz

Als nächstes werden Sie lernen, wie Sie feststellen können, in welchem Ausmaß Sie *E. coli*-Zellen genetisch verändert haben. Dieses quantitative Maß wird als Transformationseffizienz bezeichnet.

In vielen Experimenten ist es wichtig, möglichst viele Zellen genetisch zu transformieren. Beispielsweise werden bei einigen Gentherapien Zellen aus dem betreffenden Patienten entnommen, im Labor transformiert und dann wieder in den Patienten eingeführt. Je mehr Zellen transformiert werden, um das benötigte Protein zu produzieren, desto wahrscheinlicher ist es, dass die Therapie anschlägt. Die Transformationseffizienz wird berechnet, um eine bessere Aussage darüber treffen zu können, wie gut die Transformation funktioniert.

Die Aufgabe

Sie werden eine Berechnung der Transformationseffizienz durchführen, um Aufschluss darüber zu erhalten, wie effektiv Sie DNA-Moleküle in Bakterienzellen eingeschleust haben. Die Transformationseffizienz wird durch eine Zahl angegeben. Diese Zahl entspricht der Gesamtzahl der Bakterienzellen, die das grüne Protein exprimieren, dividiert durch die im Experiment verwendete DNA-Menge. (Sie gibt die Gesamtzahl der Bakterienzellen an, die mit einem Mikrogramm DNA transformiert wurden.) Die Transformationseffizienz wird anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Gesamtzahl der auf der Agarplatte wachsenden Kolonien}}{\text{Menge der auf die Agarplatte aufgetragenen DNA (in } \mu\text{g)}}$$

Bevor Sie also die Effizienz Ihrer Transformation berechnen können, benötigen Sie zwei Informationen:

- (1) Die Gesamtzahl der grün fluoreszierenden Kolonien auf Ihrer LB/Amp/Ara-Platte.
- (2) Die Gesamtmenge an pGLO-Plasmid-DNA in den auf der LB/Amp/Ara-Platte ausgestrichenen Bakterienzellen.

1. Bestimmung der Gesamtzahl an grün fluoreszierenden Zellen

Stellen Sie Ihre LB/Amp/Ara-Platte in die Nähe einer UV-Lampe. Sie können davon ausgehen, dass jede Kolonie auf der Platte von einer einzigen Zelle abstammt. Durch die Vermehrung der einzelnen Zellen entstehen immer mehr Zellen und bilden eine so genannte Kolonie. Der direkteste Weg zur Bestimmung der **Gesamtzahl der Bakterien, die mit dem pGLO-Plasmid transformiert wurden**, besteht darin, die Kolonien auf der Platte zu zählen.

Geben Sie diese Zahl hier ein →

Gesamtzahl der Kolonien = _____

2. Bestimmung der Menge an pGLO-DNA in den auf der LB/Amp/Ara-Platte ausgestrichenen Bakterienzellen

Wir benötigen zwei Informationen, um die Menge an pGLO-DNA in den Bakterienzellen, die in diesem Experiment auf der LB/Amp/Ara-Platte ausgestrichen wurden, festzustellen. (a) Die Gesamtmenge an DNA am Anfang des Experiments und (b) den Anteil der DNA (in den Bakterien), der tatsächlich auf den LB/Amp/Ara-Platten verteilt wurde.

Sobald Sie diese Daten berechnet haben, multiplizieren Sie die **Gesamtmenge an pGLO-DNA**, die in diesem Experiment verwendet wurde, mit dem **DNA-Anteil**, den Sie auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt haben. Damit erhalten Sie die Menge an pGLO-DNA in den auf der LB/Amp/Ara-Platte ausgestrichenen Bakterienzellen.

a. Bestimmung der Gesamtmenge an pGLO-Plasmid-DNA

Die Gesamtmenge an DNA am Anfang des Experiments entspricht dem Produkt aus der Konzentration und dem verwendeten Gesamtvolumen bzw.

$$(\text{DNA in } \mu\text{g}) = (\text{Konzentration der DNA in } \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times (\text{Volumen der DNA in } \mu\text{l})$$

In diesem Experiment haben Sie 10 μl pGLO in einer Konzentration von 0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verwendet. Das bedeutet, dass jeder Mikroliter Lösung 0,08 μg pGLO-DNA enthielt. Berechnen Sie die **Gesamtmenge an DNA**, die Sie in diesem Experiment verwendet haben.

Geben Sie diese Zahl hier ein →

Gesamtmenge der in diesem Experiment verwendeten pGLO-DNA (μg) = _____

Wie verwenden Sie diese Information?

- b. **Bestimmung des Anteils an pGLO-Plasmid-DNA (in den Bakterien), der tatsächlich auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt wurde:** Da nicht die gesamte DNA, die Sie zu den Bakterienzellen gegeben haben, auf die Agarplatte übertragen wird, müssen Sie herausfinden, welcher Anteil der DNA tatsächlich auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt wurde. Dazu wird das DNA-Volumen, das Sie auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt haben, durch das Gesamtvolumen der Flüssigkeit im Teströhrchen mit der DNA dividiert. Die dazugehörige Formel lautet

$$\text{Anteil der verwendeten DNA} = \frac{\text{Auf der LB/Amp/Ara-Platte verteiltes Volumen } (\mu\text{l})}{\text{Gesamtvolumen der Probe im Teströhrchen } (\mu\text{l})}$$

Sie haben 100 μl Zellen mit DNA aus einem Teströhrchen mit einem Gesamtvolumen von 510 μl Lösung ausgestrichen. Wissen Sie noch, warum es insgesamt 510 μl Lösung waren? Schauen Sie im Laborprotokoll nach und suchen Sie alle Schritte, bei denen Sie Flüssigkeit in das Reaktionsröhrchen gegeben haben. Addieren Sie die Volumenmengen.

Verwenden Sie die Formel oben, um den **Anteil an pGLO-Plasmid-DNA** zu berechnen, den Sie auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt haben.

Geben Sie diese Zahl hier ein →

DNA-Anteil = _____

- Wie verwenden Sie diese Information?

Wie viele Mikrogramm pGLO-DNA haben Sie also auf den LB/Amp/Ara-Platten verteilt?

Um diese Frage zu beantworten, **müssen Sie die Gesamtmenge an pGLO-DNA**, die in diesem Experiment verwendet wurde, **mit dem Anteil der pGLO-DNA**, den Sie auf der LB/Amp/Ara-Platte verteilt haben, multiplizieren.

Verteilte pGLO-DNA in μg = Verwendete Gesamtmenge an DNA in μg x verwendeter Anteil der DNA

Geben Sie diese Zahl hier ein →

Ausgebrachte pGLO-DNA (μg) = _____
--

- Was sagt diese Zahl aus?

Sehen Sie sich alle Ihre obigen Berechnungen an. Entscheiden Sie, welche der berechneten Zahlen in die folgende Tabelle einzutragen sind. Füllen Sie die nachstehende Tabelle aus.

Anzahl der Kolonien auf der LB/Amp/Ara-Platte =	
Mikrogramm der auf die Platten aufgetragenen pGLO-DNA	

Verwenden Sie nun die Daten in der Tabelle zur Berechnung der Effizienz der pGLO-Transformation.

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Gesamtzahl der auf der Agarplatte wachsenden Kolonien}}{\text{Menge der auf die Agarplatte aufgetragenen DNA (in } \mu\text{g)}}$$

Geben Sie diese Zahl hier ein →

Transformationseffizienz = _____ Transformanten/ μg

Analyse

Bei der Berechnung der Transformationseffizienz erhält man sehr große Zahlen. In der Wissenschaft wird häufig eine mathematische Abkürzung verwendet, die als wissenschaftliche Notation bezeichnet wird. Wenn die berechnete Transformationseffizienz beispielsweise 1.000 Bakterien/ μg DNA beträgt, wird diese Zahl häufig folgenderweise angegeben:

10^3 Transformanten/ μg (10^3 ist eine andere Schreibweise für $10 \times 10 \times 10$ bzw. 1.000)

- Wie würde man eine Zahl von 10.000 Transformanten/ μg in wissenschaftlicher Notation angeben?

Nehmen wir nun an, man hätte eine Effizienz von 5.000 Bakterien/ μg DNA errechnet. Diese Zahl würde man folgenderweise angeben:

5×10^3 Transformanten/ μg (5×1.000)

- Wie würde man eine Zahl von 40.000 Transformanten/ μg in wissenschaftlicher Notation angeben?

Ein letztes Beispiel: Wenn die Berechnung 2.600 Transformanten/ μg ergibt, wäre die wissenschaftliche Notation für diese Zahl:

$2,6 \times 10^3$ Transformanten/ μg (2,6 x 1.000)

Entsprechend:

$5.600 = 5,6 \times 10^3$ $271.000 = 2,71 \times 10^5$ $2.420.000 = 2,42 \times 10^6$

- Wie würde man eine Zahl von 960.000 Transformanten/ μg in wissenschaftlicher Notation angeben?
- Geben Sie Ihre selbst berechnete Transformationseffizienz in wissenschaftlicher Notation an.
- Erklären Sie in ein bis zwei Sätzen, was Ihre berechnete Transformationseffizienz bedeutet.

In der Biotechnologie geht man davon aus, dass das Transformationsprotokoll, das Sie gerade durchgeführt haben, im Allgemeinen eine Transformationseffizienz zwischen $8,0 \times 10^2$ und $7,0 \times 10^3$ Transformanten pro Mikrogramm DNA ergibt.

- Wie sieht Ihre Transformationseffizienz im Vergleich zu diesen Zahlen aus?
- Tragen Sie in die folgende Tabelle die Transformationseffizienz mehrerer Gruppenteams ein.

Team	Effizienz

- Wie sieht Ihre Transformationseffizienz im Vergleich zu der Transformationseffizienz der anderen Gruppen aus?

- Berechnen Sie die Transformationseffizienz des folgenden Experiments mit den unten aufgeführten Informationen und Ergebnissen.

DNA-Plasmidkonzentration: 0,08 µg/µl

250 µl CaCl₂-Transformationslösung

10 µl pGLO-Plasmidlösung

250 µl LB-Nährbouillon

100 µl auf dem Agar ausgestrichene Zellen

227 Transformanten-Kolonien

Füllen Sie die folgende Tabelle aus und zeigen Sie Ihre Berechnungen dem/der Kursleitenden.

Anzahl der Kolonien auf der LB/Amp/Ara-Platte =
Mikrogramm der auf die Platten aufgegebenen DNA =
Transformationseffizienz =

- **Zusatzaufgabe:**

Wenn ein bestimmtes Experiment eine bekannte Transformationseffizienz von 3×10^3 Bakterien/µg DNA hätte, wie viele transformierte Kolonien würden dann voraussichtlich auf der LB/Amp/Ara-Platte wachsen? Sie können dabei davon ausgehen, dass die DNA-Konzentration und der Anteil der Zellen, die auf dem LB-Agar verteilt werden, gleich sind wie im pGLO-Labor.

Anhang A

Links zur Geschichte der Biotechnologie

Die biologische Transformation hat eine interessante Geschichte. Im Jahr 1928 führte Frederick Griffith, ein Londoner Arzt, der in einem pathologischen Labor arbeitete, ein Experiment durch, dessen Ergebnis er zeit seines Lebens nie vollständig klären konnte. Griffith veränderte (transformierte) einen ungefährlichen, nicht pathogenen Pneumokokken-Bakterienstamm dauerhaft zu einem tödlich pathogenen Stamm. Er erreichte diese erstaunliche Veränderung, indem er die ungefährlichen Bakterien mit tödlichen Bakterien behandelte, die er vorher durch Erhitzen abgetötet hatte. Obwohl das Gemisch der beiden Bakterienstämme keine lebenden, virulenten Bakterien enthielt, führte es bei den Mäusen, denen es injiziert wurde, zum Tod. Griffith wiederholte das Experiment viele Male, immer mit dem gleichen Ergebnis. Er und viele seiner Kollegen waren perplex. Was war es, das ungefährliche Bakterien in tödliche Killer verwandelt hatte? Erst viele Jahre später wurde klar, dass dies der erste protokollierte Fall einer biologischen Transformation in einem Labor war, aber zunächst niemand eine Erklärung dafür hatte. Griffith wusste nichts von DNA, er erkannte aber, dass die Transformation vererbbar war. Griffiths Transformationsexperiment kann als Geburtsstunde der analytischen Genmanipulation betrachtet werden, aus der die DNA-Rekombinationstechnologie und die Biotechnologie hervorgingen, die die Möglichkeit der Genmanipulation beim Menschen eröffneten.

Im Jahr 1944, sechzehn Jahre nach Griffiths Experiment, veröffentlichte eine Forschungsgruppe am Rockefeller Institute unter der Leitung von Oswald T. Avery eine Arbeit, die direkt an der Arbeit von Griffith ansetzte. „Welche Substanz ist dafür verantwortlich“? war die Frage, die Avery seinen Mitarbeitern immer wieder stellte. Avery und seine Mitarbeiter arbeiteten mit den gleichen Lungenentzündung verursachenden Bakterienstämmen und lieferten eine präzise Antwort auf diese Frage. Sie bewiesen, dass es sich bei der Substanz um DNA handelt und dass eine biologische Transformation stattfindet, wenn Zellen fremde DNA aufnehmen und exprimieren. Obwohl es viele Jahre dauerte, ist Averys Beitrag zu diesem grundlegenden Fortschritt des biologischen Wissens heute allgemein anerkannt. Aufbauend auf der Arbeit von Avery und anderen entwickelte Douglas Hanahan die Technik der Kolonietransformation, die auch Sie bei Ihrem Experiment anwenden.^{1, 2}

Historischer Kontext

Genetische Transformation

- 1865—Gregor Johann Mendel: Mendel beschrieb auf der Grundlage seiner Ergebnisse die Prinzipien, nach denen genetische Merkmale von den Eltern an die Nachkommen weitergegeben werden. Auf der Basis seiner Arbeit entstand das Konzept des Gens als Grundeinheit der Vererbung.
- 1900—Carl Correns, Hugo De Vries, Erich Tschermak: Pflanzengenetiker stellten im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Vererbung fest, dass sie im Wesentlichen die fast vier Jahrzehnte zuvor durchgeführte Arbeit eines unbekanntes österreichischen Augustinermonchs, Gregor Johann Mendel, an Erbsen wiederholt hatten.
- 1928—Frederick Griffith: Griffith transformierte nichtpathogene *Diplococcus pneumonia*-Bakterien zu pathogenen Bakterien, indem er durch Hitze abgetötete virulente Bakterien verwendete. Er nahm an, dass der transformierende Faktor etwas mit dem Aufbau der Polysaccharidkapsel zu tun hatte. Griffith wusste nichts von DNA, er erkannte aber, dass die Transformation vererbbar war. Griffiths Transformationsexperiment kann als Geburtsstunde der analytischen Genmanipulation angesehen werden, aus der die DNA-Rekombinationstechnologie hervorging und die die Möglichkeit der Genmanipulation beim Menschen eröffnete.
- 1944—Oswald Avery, Colin MacLeod: Avery und seine Kollegen gaben bekannt, dass sie den Transformationsfaktor in hoher Reinheit isoliert hatten – es war DNA. Seit diesem klassischen Experiment der Molekulargenetik wurden Transformation, Konjugation (bakterielle Paarung) und Transduktion (viraler DNA-Transfer) verwendet, um Gene zwischen Bakterienarten, *Drosophila*, Mäusen, Pflanzen und Tieren, Säugetierzellen in Kultur und für die Gentherapie beim Menschen zu übertragen.
- 1952—Alfred Hershey, Martha Chase: Hershey und Chase verwendeten Radioisotope von Schwefel und Phosphor sowie den Bakteriophagen T2, um schlüssig zu zeigen, dass DNA das Informationsmolekül der Vererbung ist. Neben der Arbeit von Avery, MacLeod und McCarty lieferte das Experiment von Hershey/Chase endgültig den Beweis dafür, dass DNA die transformierende Substanz und das Informationsmolekül der Vererbung ist.

- 1972—Paul Berg, Janet Mertz: Berg verwendete das neu entdeckte Endonuklease-Enzym *EcoRI*, um DNA von SV40 und DNA des Bakteriophagen P22 zu schneiden, und setzte dann diese separaten Stücke mithilfe der Enzyme terminale Transferase und DNA-Ligase wieder zu einem DNA-Stück zusammen. Die Herstellung des ersten rekombinanten DNA-Moleküls war der Beginn des Zeitalters der Biotechnologie. Das neue Molekül wurde aufgrund von Bedenken in der wissenschaftlichen Gemeinschaft bezüglich genetischer Übertragungen nicht in eine Säugetierzelle eingebracht.
- 1973—Herbert Boyer, Stanley Cohen, Annie Chang: Berg, Boyer und Cohen verwendeten *EcoRI*, um ein intaktes Gen für Kanamycin-Resistenz zu isolieren. Sie spleißten das Kanamycin-Resistenzgen in ein mit *EcoRI* geschnittenes Plasmid, das bereits das Gen für Tetracyclin-Resistenz enthielt, und erhielten so ein rekombinantes bakterielles Plasmidmolekül mit doppelter Antibiotikaresistenz. Dieses gentechnisch hergestellte Plasmid verwendeten sie dann, um *E. coli* zu transformieren.
- 1977—Genentech, Inc.: Dem Unternehmen gelang es, das erste gentechnische Produkt, das Gen für menschliches Somatostatin (hemmt die Freisetzung von menschlichem Wachstumshormon), in Bakterien zu exprimieren.
- 1980—J. W. Gordon, Frank Ruddle: Gordon und Ruddle nutzten Mikroinjektion, um normale Gene erfolgreich in Keimbahnzellen von Mäusen einzuführen.
- 1982—Richard Palmiter, Ralph Brinster: Palmiter und Brinster nutzten Mikroinjektion, um das Gen des Wachstumshormons der Ratte in Mausembryos einzuführen. Dies war der erste Bericht einer genetischen Keimbahn-„Heilung“ bei einem Säugetier. Die Empfängermaus wurde „little“ genannt, weil sie an einer Form von angeborenem Kleinwuchs litt.
- 1988—Steven Rosenberg: Rosenberg und seine Kollegen erhielten die Genehmigung, das erste Gentransfer-Experiment an menschlichen Patienten mit metastasierendem Melanom durchzuführen. Dieses Experiment beinhaltete ein genetisches Tracking mit dem Markergen Neo^R, aber keine Gentherapie.
- 1990—W. French Anderson, Michael Blaese, Kenneth Culver: Am Freitag, dem 14. September 1990, um 12:52 Uhr wurde am National Cancer Institute ein vierjähriges Mädchen, Ashanthi De Silva aus Cleveland, Ohio, zur ersten menschlichen Gentherapie-Patientin. Sie erhielt Infusionen mit ihren eigenen weißen Blutkörperchen mit einer korrigierten Version des Adenosindesaminase(ADA)-Gens. Die behandelnden Ärzte, Anderson, Blaese und Culver, erwarteten frühestens nach etwa einem Jahr bedeutsame Ergebnisse des Experiments. Bei einem zweiten Mädchen, Cynthia Cutshall, wurde 1990 eine ähnliche Injektion durchgeführt. Fotos vom Juni 1993 zeigten die beiden Mädchen fröhlich beim Spielen auf einem Schulhof. Beide Mädchen hatten ein funktionierendes Immunsystem.
- 1994—Weitere Gentherapieandidaten sind Patienten mit Sichelzellenanämie, Hämophilie, Diabetes, Krebs oder Herzerkrankung. Die Keimbahn-Gentherapie wird während der Sitzung des Beratungsausschusses für rekombinante DNA (Recombinant DNA Advisory Committee) diskutiert. Bis 1996 nimmt die Zahl der Anträge auf Überprüfung durch das Human Gene Therapy Subcommittee des Recombinant DNA Advisory Committee stetig zu.
- 1995—Eine Gruppe unter der Leitung von J. Craig Venter am The Institute for Genomic Research (TIGR) in Maryland veröffentlichte die vollständige Gensequenz des Bakteriums *Haemophilus influenzae*, dem ersten natürlich vorkommenden Organismus, dessen genetischer „Bauplan“ entschlüsselt wurde, und setzte damit einen Meilenstein in der mikrobiologischen Forschung.
- 1996—Im Rahmen eines multinationalen Projekts, in dem mehr als 100 Labore in Europa, den USA, Kanada und Japan zusammenarbeiteten, wurde erstmals die komplette Genomsequenz eines Eukaryoten entschlüsselt, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* ist eine Hefe von erheblichem kommerziellem Nutzen. Sie wird üblicherweise beim Backen und bei der Fermentation von alkoholischen Getränken und im Labor häufig als Modellorganismus zur Untersuchung zellulärer und molekularer Prozesse bei Eukaryoten verwendet.
- 1997—Wissenschaftler am Roslin Institute in Schottland unter der Leitung von Ian Wilmut meldeten das erfolgreiche Klonen eines Schafs namens Dolly aus der Euterzelle eines ausgewachsenen Schafs. Das Klonschaf Dolly löste international eine Debatte über ethische und moralische Fragen in Bezug auf das Klonen aus. Danach kloneten Wissenschaftler des schottischen Roslin Institute in Zusammenarbeit mit dem in Schottland ansässigen Unternehmen PPL Therapeutics erfolgreich zwei Lämmer namens Polly und Molly. Die beiden Tiere wurden mit einem menschlichen Gen genetisch verändert, sodass ihre Milch Faktor IX, ein Gerinnungsprotein im Blut, enthielt, das isoliert und zur Behandlung von Hämophilie beim Menschen verwendet werden kann.

1998—Über 99 % der Genomsequenz des ersten vielzelligen Organismus, des winzigen Spulwurms *Caenorhabditis elegans*, wurden entschlüsselt. *C. elegans* ist zwar ein primitiver Organismus, aber viele wichtige genetische und biologische Merkmale sind ähnlich wie beim Menschen und könnten daher helfen, Gene beim Menschen zu identifizieren und zu beschreiben, die eine Rolle bei der biologischen Funktion und der Entstehung von Krankheiten spielen.

Wissenschaftler erstellten eine detaillierte und genaue physische Karte der Positionen der meisten der 30.000 bekannten menschlichen Gene, ein Meilenstein für das Human Genome Project.

2000—Ein Team unter der Leitung von Ingo Potrykus von der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich und Peter Beyer von der Universität Freiburg in Deutschland berichtete über die Herstellung von gentechnisch veränderten Reispflanzen („Goldener Reis“), die große Mengen an Beta-Carotin herstellen können, einer Substanz, die der menschliche Körper zu Vitamin A umwandeln kann. Goldener Reis könnte bei Millionen von in Armut lebenden Menschen auf der ganzen Welt eine durch Vitamin-A-Mangel verursachte Erblindung beheben.

Im Rahmen einer Zusammenarbeit zwischen einem Privatunternehmen, Celera Genomics, und Forschern weltweit wurde die Genomsequenz der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* veröffentlicht. *D. melanogaster*, ein im Labor häufig verwendeter Modellorganismus, war das bis dato größte Tier, dessen genetischer Code entschlüsselt wurde.

Ein Team aus 16 internationalen Einrichtungen, die das Human Genome Sequencing Consortium bilden, erstellte eine erste ungefähre Karte des menschlichen Genoms. Die Forscher von Celera Genomics gaben außerdem den Abschluss ihrer „ersten Assemblierung“ des Genoms bekannt.

2001—Am 12. Februar 2001 meldeten Celera Genomics und das International Human Genome Sequencing Consortium gemeinsam die Veröffentlichung der nahezu vollständigen Sequenz des menschlichen Genoms – dem genetischen „Bauplan“ des Menschen. Für diese Errungenschaft benötigte das internationale Team fast zwanzig Jahre und das Projekt erforderte die Zusammenarbeit von Tausenden von Wissenschaftlern weltweit. Celera Genomics ging davon aus, die Arbeit in weiteren ungefähr neun Monaten abgeschlossen zu haben. Die beiden Gruppen unterschieden sich in ihren Schätzungen bezüglich der Anzahl der Gene im menschlichen Genom, aber die von beiden Gruppen prognostizierte Zahl zwischen 25.000 und 40.000 Genen ist immer noch sehr viel niedriger als die vorherige Schätzung von 100.000 Genen. Diese unerwartete Feststellung ließ den Schluss zu, dass selbst ein so komplexer Organismus wie ein Mensch aus relativ wenigen Genen bestehen kann – nur doppelt so vielen wie im Wurm *C. elegans* oder der Fliege *D. melanogaster*. Die Enthüllung der vollständigen Sequenz des menschlichen Genoms ermöglicht es Forschern auf der ganzen Welt, mit der Entwicklung von Behandlungen für viele Krankheiten zu beginnen.

US-Präsident George Bush entschied, dass nur Forschungsprojekte mit den bestehenden 64 embryonalen Stammzelllinien für eine mögliche Finanzierung durch staatliche Fördermittel infrage kommen. Die Entscheidung des US-Präsidenten war für viele Wissenschaftler enttäuschend, die hofften, mithilfe embryonaler Stammzellen Behandlungen für viele Krankheiten entwickeln zu können.

Advanced Cell Technology, ein kleines Unternehmen in Massachusetts, meldete, erfolgreich menschliche Embryos geklont zu haben, um deren Stammzellen zu isolieren. Diese Methode könnte letztendlich zur Behandlung von Patienten mit einer Vielzahl von Krankheiten eingesetzt werden, indem Ersatzzellen wie zum Beispiel für Nerven- und Muskelzellen hergestellt werden, die wieder in dieselbe Person zurück transplantiert werden können, ohne dass das Risiko besteht, dass sie vom Körper abgestoßen werden.

PPL Therapeutics, das Unternehmen, das am Klonen des Schafs Dolly beteiligt war, klonete fünf genetisch veränderte Ferkel mit einem inaktivierten bzw. „ausgeknockten“ Gen, das die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßung ihrer Organe bei der Transplantation in einen menschlichen Empfänger erheblich verringern würde. Der Erfolg von PPL Therapeutics bedeutet Hoffnung für Tausende von Menschen, die darauf warten, ein Spenderorgan wie etwa ein Herz, eine Lunge, eine Niere und eine Leber zu erhalten.

2002—Das Schaf Dolly, das erste Säugetier, das aus der Zelle eines ausgewachsenen Tieres geklont worden war, erkrankte relativ früh im Alter von fünf Jahren an Arthritis. Es ist nicht klar, ob Dollys Erkrankung das Ergebnis eines genetischen Defekts war, der durch das Klonen verursacht wurde, oder ob es sich um einen Zufall handelte. Die Meldung löste erneut Debatten darüber aus, ob geklonte Tiere anfällig für vorzeitiges Altern und Gesundheitsprobleme sind. Sie war auch ein Rückschlag für all jene, die argumentieren, dass mithilfe der Klontechnik Organe für Patienten auf der Transplantationsliste bereitgestellt werden können.

2008—Für die wegweisende Entdeckung und Verwendung von GFP wird der Nobelpreis für Chemie vergeben. Osamu Shimonura isolierte GFP als erster und stellte fest, dass es unter UV-Licht fluoreszierende Eigenschaften hat. Martin Chalfie verwendete GFP als leuchtenden genetischen Marker. Roger Y. Tsien beschrieb den Fluoreszenzmechanismus von GFP.

Anhang B Begriffsglossar

Agar	Eine gallertartige Substanz, die aus Algen gewonnen wird. Dient als solide Matrix zur Unterstützung des Bakterienwachstums. Enthält eine Nährstoffmischung aus Kohlenhydraten, Aminosäuren, Nukleotiden, Salzen und Vitaminen.
Antibiotika-Selektion	Verwendung eines Antibiotikums zur Selektion von Bakterien, die die relevante DNA enthalten. Die DNA im pGLO-Plasmid enthält das Gen für Beta-Lactamase, das Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin verleiht. Bakterien, die mit dem pGLO-Plasmid transformiert worden sind, beginnen mit der Herstellung und Freisetzung des Proteins Beta-Lactamase. Die freigesetzte Beta-Lactamase baut Ampicillin ab und macht das Antibiotikum für den bakteriellen Wirt unschädlich. Nur Bakterien, die das pGLO-Plasmid enthalten, können auf Ampicillin-haltigem Nährmedium wachsen und Kolonien bilden. Nichttransformierte Zellen, die das pGLO-Plasmid nicht aufgenommen haben, können dagegen auf den Ampicillin-Selektionsplatten nicht wachsen.
Arabinose	Ein aus Pflanzen isoliertes Kohlenhydrat, das normalerweise Bakterien als Nahrungsquelle dient. In diesem Experiment initiiert Arabinose die Transkription des GFP-Gens, sodass die Zellen unter UV-Licht grün leuchten.
Ausstreichen	Vorgang, bei dem eine Impföse mit Bakterien quadrantenweise über eine Agarplatte geführt wird, um Einzelkolonien zu erhalten.
Beta-Lactamase	Beta-Lactamase ist ein Protein, das Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin verleiht. Das Beta-Lactamase-Protein wird nur von solchen Bakterien produziert und ausgeschieden, die mit einem Plasmid transformiert wurden, welches das Gen für Beta-Lactamase enthält. Die abgegebene Beta-Lactamase inaktiviert das im LB-Nährstoffagar vorhandene Ampicillin, was das Bakterienwachstum und die Expression neu erworbener Gene ermöglicht, die ebenfalls auf dem Plasmid enthalten sind, wie z. B. GFP.
Biotechnologie	Anwendung der Biologie in der Praxis durch die spezifische Manipulation lebender Organismen, insbesondere auf genetischer Ebene, um potenziell nützliche Produkte herzustellen.
DNA-Rekombinationstechnik	Der Vorgang des Schneidens und Rekombinierens von DNA-Fragmenten zur Isolierung von Genen oder zur Veränderung ihrer Struktur und Funktion.
Genregulation	In allen Organismen ist die Genexpression sorgfältig reguliert, um eine Anpassung an unterschiedliche Bedingungen zu ermöglichen und eine Überproduktion von nicht benötigten Proteinen zu verhindern. Die am Transport und Abbau von Nahrung beteiligten Gene sind gute Beispiele für stark regulierte Gene. Beispielsweise kann der einfache Zucker Arabinose von Bakterien als Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt werden. Die bakteriellen Enzyme, die benötigt werden, um Arabinose abzubauen oder zu verdauen und sie so als Nahrungsquelle nutzen zu können, werden nur exprimiert, wenn Arabinose im Wachstumsmilieu vorhanden ist, andernfalls nicht. Mit anderen Worten werden die Gene für diese Verdauungsenzyme erst dann eingeschaltet, wenn Arabinose vorhanden ist. Wenn Arabinose zur Neige geht, werden diese Gene wieder abgeschaltet. Anhang D enthält eine ausführlichere Erläuterung der Rolle, die Arabinose bei der Regulation und Expression des Gens für das grüne fluoreszierende Protein spielt.
Gentechnik	Die Manipulation des genetischen Materials (DNA) eines Organismus durch Einführen oder Eliminieren bestimmter Gene.

Grün fluoreszierendes Protein	Grün fluoreszierendes Protein (GFP) wurde ursprünglich aus der biolumineszierenden Qualle <i>Aequorea victoria</i> isoliert. Das Gen für GFP wurde vor kurzem kloniert. Aufgrund seiner besonderen dreidimensionalen Konformation schwingt GFP, wenn es ultraviolettem Licht ausgesetzt wird, und gibt Energie in Form von sichtbarem grünem Licht ab. Bei Bestrahlung mit UV-Licht werden die Elektronen im Chromophor von GFP angeregt und nehmen einen höheren energetischen Zustand ein. Wenn sie wieder zurück auf einen niedrigeren Energiezustand fallen, geben sie sichtbares fluoreszierendes grünes Licht einer längeren Wellenlänge (~509 nm) ab.
Klonen	Klonen ist der Prozess der Erzeugung praktisch endlos vieler Kopien oder Klone eines Organismus oder eines DNA-Segments (im letzteren Fall spricht man von Klonieren). Durch das Klonen entsteht eine Population mit identischem genetischem Bauplan.
Kolonie	Ein Klumpen genetisch identischer Bakterienzellen, die auf einer Agarplatte wachsen. Da alle Zellen in einer einzelnen Kolonie genetisch identisch sind, werden sie als Klone bezeichnet.
Kulturmedium	Die flüssigen und festen Medien, die als LB-Nährbouillon (benannt nach Luria und Bertani) und LB-Agar bezeichnet werden, werden aus einem Hefeextrakt und einem enzymatischen Verdau von Fleischnebenprodukten hergestellt, die eine Mischung aus Kohlenhydraten, Aminosäuren, Nukleotiden, Salzen und Vitaminen (Nährstoffe für das Bakterienwachstum) enthalten. Der aus Algen gewonnene Agar polymerisiert beim Erwärmen und Abkühlen zu einem festen Gel (ähnlich wie Wackelpudding) und dient dazu, eine feste Unterlage zu schaffen, auf der die Bakterien wachsen können.
Plasmid	Ein ringförmiges DNA-Molekül, das zur Selbstreplikation fähig ist und ein oder mehrere Gene für Antibiotikaresistenzproteine und ein kloniertes Fremdgen wie GFP enthält. Es handelt sich um ein extrachromosomales DNA-Molekül, das von der chromosomalen DNA getrennt ist. Plasmide kommen von Natur aus in Bakterien vor.
pGLO	Plasmid, das die Gensequenz des grün fluoreszierenden Proteins und das Ampicillin-Resistenzgen enthält, das Beta-Lactamase codiert.
Screening	Prozess zur Identifizierung gewünschter Bakterien aus einer Bakterienbibliothek.
Sterile Arbeitstechnik	Minimierung der Möglichkeit einer bakteriellen Kontamination von außen während eines Experiments durch Einhaltung von Sauberkeit und sorgfältiger Ausführung von Labortechniken.
Vektor	Ein sich autonom replizierendes DNA-Molekül, z. B. ein Plasmid, in das Fragmente von Fremd-DNA eingefügt und dann in einer Wirtszelle vermehrt werden.

Anhang C

Grundlegende Konzepte und Begriffe aus der Molekularbiologie

Das Studium der Lebewesen zeigt, dass sich alle jeweils auf besondere Weise organisieren. Ein detaillierter Bauplan dieser Organisation wird an die Nachkommen weitergegeben.

Zellen sind die kleinsten funktionellen Einheiten, die sich selbstständig reproduzieren können. Viele Bakterien können beispielsweise als Einzelzellen überleben. Die chemischen Moleküle in jeder Zelle sind so organisiert, dass sie zusammenwirken.

Zellen können in einer Kultur gezüchtet und geerntet werden.

Zellkultur ist der Prozess, bei dem Zellen am Ort ihres natürlichen Vorkommens gesammelt und unter kontrollierten Bedingungen in Laborbehältern gezüchtet werden. Damit Zellen wachsen können, müssen die benötigten Nährstoffe bereitgestellt und geeignete Wachstumsbedingungen geschaffen werden. Bakterien und Hefen lassen sich sehr einfach in Kultur züchten. Zellen von Pflanzen, Insekten und Tieren können ebenfalls gezüchtet werden, sind aber anspruchsvoller.

Nachdem das Wachstum abgeschlossen ist, können Zellen in Kultur geerntet und untersucht werden.

Klonen

Wenn durch Wachstum aus einer einzelnen Zelle eine Zellpopulation entsteht, sind alle Zellen in der Population genetisch identisch. Eine solche Population wird als klonal bezeichnet. Der Prozess der Erzeugung einer klonalen Population wird als Klonen (Klonieren) bezeichnet. Der Zweck des Ausstreichens von Bakterien auf Agar besteht darin, Einzelkolonien zu erzeugen, die jeweils aus einer einzelnen Zelle hervorgehen.

Blick ins Innere von Zellen

Die Moleküle innerhalb einer Zelle erfüllen jeweils eine bestimmte Funktion. Zum Beispiel sind DNA-Moleküle Informationsspeicher (wie die Festplatte in einem Computer). Proteine sind wichtige Funktionseinheiten der Zelle.

Um diese Moleküle zu untersuchen, wird eine klonale Population aus einem interessierenden Zelltyp hergestellt, die Zellen geöffnet und ihr Inhalt sortiert. Es ist zum Beispiel relativ einfach, alle Proteine von allen DNA-Molekülen zu trennen.

Es ist auch möglich, eine einzelne Proteinart aus der Mischung von Proteinen zu reinigen, die innerhalb eines Zelltyps vorhanden sind. Jede Proteinart hat besondere physikalische und chemische Eigenschaften. Diese Eigenschaften ermöglichen beispielsweise die Trennung von Proteinarten nach Größe, Ladung oder dem Grad ihrer wasserabweisenden Eigenschaften (Hydrophobie).

Spezielle Moleküle, spezielle Funktionen

Wir werden uns drei ganz besondere Arten von Molekülen in Zellen genauer ansehen: DNA, RNA und Proteine. Jedes dieser Moleküle erfüllt eine andere Funktion. DNA-Moleküle sind wie Aktenschranke, in denen Informationen aufbewahrt werden. RNA hilft dabei, die in der DNA gespeicherten Anweisungen abzurufen und auszuführen. Proteine dienen dazu, innerhalb (und oft auch außerhalb) der Zelle chemische Aufgaben zu erfüllen.

DNA—Die universelle Vorlage für biologische Informationen

Der Hauptbauplan jedes Organismus ist in seiner Desoxyribonukleinsäure (DNA) verschlüsselt. Die Information innerhalb des DNA-Moleküls/der DNA-Moleküle jeder Zelle reicht aus, um jede einzelne Funktion dieser Zelle auszuführen.

DNA-Moleküle sind sehr lange Ketten, die aus sich wiederholenden Untereinheiten bestehen. Jede Untereinheit (Nukleotid) enthält eine von vier möglichen Basen, die seitlich herausragen:

Adenin (A)	Cytosin (C)
Thymin (T)	Guanin (G)

Da Nukleotide Kopf-an-Schwanz verbunden sind, besteht ein langer DNA-Strang im Wesentlichen aus einem chemischen Gerüst, aus dem seitlich Basen herausragen. Die auf diesem Molekül enthaltene Information ist in der Abfolge der Basen **A, G, C** und **T** entlang seiner Länge codiert.

Weitere Hinweise zur Struktur von DNA

1. Da die Untereinheiten von DNA-Ketten Kopf-an-Schwanz verbunden sind, verläuft die Sequenz in einer bestimmten Richtung. Man kam überein, eine DNA-Sequenz immer vom freien 5'-Ende (ausgesprochen „5-Strich“) des Gerüsts bis zum anderen Ende, dem „3-Strich“-Ende bzw. 3', zu schreiben.

Zum Beispiel 5'...AACTG...3'

2. Die hervorstehenden Basen entlang der Kette können nach folgenden Regeln spontan Wasserstoffbrückenbindungen mit verfügbaren Basen auf anderen DNA-Strängen bilden:

- (i) **A** bildet ein Paar mit **T**
- (ii) **C** bildet ein Paar mit **G**

Aufgrund dieser Regeln werden **A** und **T** als komplementäre Basen bezeichnet; **G** und **C** sind ebenfalls komplementär.

- (iii) Damit zwei DNA-Stränge Paare bilden können, müssen sie komplementär sein und in entgegengesetzten Richtungen verlaufen.

Zum Beispiel kann (5'...AGGTC...3') ein Paar mit (5'...GACCT...3') bilden. Diese beiden Stränge haben komplementäre Sequenzen. Der Doppelstrang der Basenpaare wird wie folgt geschrieben:

5'...AGGTC...3'
3'...TCCAG...5'

Das Molekül oben enthält fünf Basenpaare. Tatsächlich kommt DNA in der Natur fast immer in doppelsträngiger Form vor, wobei die beiden Stränge komplementäre Sequenzen enthalten.

3. DNA-Moleküle sind oftmals Tausende, manchmal Millionen, von Basenpaaren lang. Manchmal sind die beiden Enden eines DNA-Moleküls miteinander verbunden, um eine ringförmige DNA zu bilden.
4. Doppelsträngige DNA hat von Natur aus die Form einer Spirale bzw. Helix. Da sie zweisträngig ist, wird sie oft als Doppelhelix bezeichnet.

Der Aufbau der DNA ermöglicht eine sehr einfache Strategie bei der Reproduktion: Die beiden Stränge jedes DNA-Moleküls trennen sich auf und werden „ausgepackt“, dann erlaubt jeder Strang, dass ein Enzym namens DNA-Polymerase eine neue komplementäre Kopie des Stranges herstellt. Daraus resultieren zwei Tochtermoleküle, die jeweils doppelsträngig und mit dem Ausgangsmolekül identisch sind.

Proteine und RNA sind wichtige Funktionselemente der Zelle

Die Biochemie des Lebens erfordert Hunderte von sehr spezifischen und effizienten chemischen Wechselwirkungen, die alle gleichzeitig ablaufen. Die wichtigsten Akteure bei diesen Wechselwirkungen sind kurzlebige Protein- und RNA-Moleküle, die ineinandergreifend, aber auch unabhängig voneinander, eine Vielzahl von Funktionen erfüllen können. Wie DNA sind auch RNA und Proteine lange Ketten sich wiederholender Einheiten.

RNA

RNA (Ribonukleinsäure) besteht wie DNA aus vier Arten von Bausteinen, die als Kette aneinandergereiht sind. Sie unterscheidet sich von der DNA in folgender Hinsicht:

Die vier Basen in RNA sind **A**, **G**, **C** und **U** (Uracil). Die Paarungsregeln sind die gleichen wie für DNA, außer dass **A** ein Paar mit **U** bildet. Obwohl RNA Basenpaarungen mit komplementärer RNA oder DNA bilden kann, liegt sie in der Zelle normalerweise als Einzelstrang vor. Der Zucker im RNA-Rückgrat ist Ribose, nicht Desoxyribose. RNA-Moleküle sind im Vergleich zu DNA-Molekülen im Allgemeinen kurz, denn jede RNA ist selbst eine Kopie eines kurzen Abschnitts eines DNA-Moleküls. Der Prozess des Kopierens von DNA-Segmenten zu RNA wird als Transkription bezeichnet und von einem Protein namens RNA-Polymerase durchgeführt.

Proteine

Proteine (genauer gesagt Polypeptide) sind ebenfalls lange kettenartige Moleküle, aber strukturell vielfältiger als DNA oder RNA. Das liegt daran, dass die Untereinheiten von Proteinen, die so genannten Aminosäuren, in zwanzig verschiedenen Typen vorkommen. Die genaue Sequenz der Aminosäuren entlang einer Polypeptidkette bestimmt, wie sich diese Kette in ihre dreidimensionale Struktur faltet. Die genauen dreidimensionalen Eigenschaften dieser Struktur bestimmen wiederum ihre Funktion.

Was ein Protein **tut**, hängt von der genauen **Sequenz** seiner Aminosäuren ab.

In den meisten Fällen erfüllt ein Protein jeweils nur eine Funktion. Insgesamt betrachtet, können Proteine aber ganz unterschiedliche Funktionen ausüben: Einige Proteine, so genannte Enzyme, wirken als Katalysatoren bei chemischen Reaktionen, manche übertragen Signale von einem Teil einer Zelle zu einem anderen—oder, im Fall von „Hormonen“, von einer Zelle zur anderen. Manche Proteine (Antikörper) haben die Aufgabe, Eindringlinge zu bekämpfen und viele Proteine werden in verschiedene physikalische Strukturen innerhalb von Zellen eingebaut. Wieder andere (regulatorische Proteine) überwachen verschiedene Aktivitäten innerhalb von Zellen, um sie innerhalb „zulässiger“ Grenzen zu halten.

Linearer Code, dreidimensionale Konsequenzen

DNA ist der primäre Informationsspeicher in lebenden Systemen. Wie erwähnt, ist diese Information linear, d. h. durch die Abfolge der **A-, G-, C-, T-**Bausteine entlang des DNA-Moleküls codiert. Dieser lineare Code kann an die Nachkommen—weitergegeben werden, da DNA in exakten Kopien repliziert werden kann.

Es werden jeweils kurze Segmente jedes DNA-Moleküls ausgewählt, um transkribiert zu werden. Diese Segmente werden als Gene bezeichnet. Das Enzym, die RNA-Polymerase, kopiert das gesamte Segment Base für Base und setzt ein RNA-Molekül zusammen, das eine Sequenz aus **A, G, C** und **U** enthält, die genau komplementär zur DNA-Sequenz des transkribierten Gens ist.

Zusätzlich zur Bereitstellung einer Master-Vorlage zum Kopieren von RNAs enthält DNA auch Sequenzinformationen, die der RNA-Polymerase mitteilen, wo sie mit der Transkription eines Gens (Promotor) beginnen und wo sie damit aufhören soll, wie viele Kopien sie herstellen soll und zu welchem Zeitpunkt. Es können sogar bestimmte Informationen in die RNA-Sequenz eingebaut werden, mit denen die Langlebigkeit und Produktivität dieser RNA festgelegt wird.

Es gibt drei Hauptklassen von RNAs, die von DNA-Matrizen kopiert werden: Boten-RNAs bzw. messenger- oder mRNAs, die die für den Zusammenbau von Proteinen erforderlichen Sequenzinformationen weitergeben, Transfer- bzw. tRNAs, die das Protein zusammensetzen, und RNAs, die strukturelle Funktionen erfüllen. Beispielsweise helfen ribosomale bzw. rRNAs beim Aufbau des Gerüsts für Ribosomen, den „Fabriken“, in denen Proteine zusammengesetzt werden.

mRNAs tragen die Sequenzinformationen zur Herstellung von Proteinen. Ribosomen übertragen diese Sequenz von Nukleotiden durch einen Prozess namens „Translation“ in eine Sequenz von Aminosäuren. Wie läuft das ab? Es gibt nur vier Arten von Nukleotiden, aber zwanzig Arten von Aminosäuren.

Bei der Translation liest das Ribosom jeweils 3 Nukleotide und weist jedem dieser aufeinanderfolgenden Triplets eine Aminosäure zu. **Hinweis:** Solche Triplets werden oft als **Codons** bezeichnet. Die einzelnen Aminosäuren werden immer an das Ende der wachsenden Proteinkette angehängt. Es gibt 64 mögliche Triplets oder Codons. Somit wird die in der DNA enthaltene lineare Information verwendet, um Aminosäuren in einer linearen Sequenz zu einem Protein zusammenzusetzen. Diese Sequenz wiederum bestimmt, **wie sich das Protein in eine präzise Form** mit charakteristischen chemischen Eigenschaften faltet.

Zusammenfassend erfolgt die primäre Informationsübertragung innerhalb von Zellen in dieser Reihenfolge:

DNA→RNA→PROTEIN→MERKMAL

Obwohl die Informationen selbst linear sind, sind die Auswirkungen dreidimensional. Die DNA-Rekombinationstechnologie beruht vom Grundsatz her auf der Annahme, dass dauerhafte und wünschenswerte Veränderungen der Funktionsweise lebender Zellen erreicht werden können, indem die lineare Sequenz ihrer DNA verändert wird.

Gene sind diskrete Dateien mit DNA-Informationen

Ein Gen ist ein Segment innerhalb eines DNA-Moleküls, das ausgewählt wird, um in RNA kopiert zu werden. Diese RNA erfüllt entweder direkt oder indirekt eine Funktion. Der Einfachheit halber kann man sich ein Gen daher als eine Funktionseinheit vorstellen.

Viele Merkmale, wie etwa die bakterielle Resistenz gegen ein Antibiotikum, werden von einzelnen Genen bestimmt. Die meisten Merkmale, — wie die Farbe einer Rose oder die Form einer Nase, — werden aber von mehreren Genen bestimmt, die zusammenwirken.

Gene können unterschiedlich lang sein: Manche sind nur wenige hundert Basenpaare lang; einige können Zehntausende von Basenpaaren lang sein. Ein DNA-Molekül kann nur eine Handvoll oder aber bis zu Tausende von Genen aufweisen. Eine Zelle wiederum kann ein oder mehrere DNA-Moleküle (Chromosomen) enthalten. Daher kann die Anzahl der Gene in einer Zelle stark variieren. *E. coli*, ein Bakterium, enthält ein DNA-Molekül mit etwa 5.000 Genen. Eine menschliche Zelle enthält 46 DNA-Moleküle, die insgesamt etwa 100.000 Gene enthalten.

Die Gene in einer bestimmten Zelle werden **nicht** jeweils zur gleichen Zeit oder mit der gleichen Geschwindigkeit in RNA kopiert (*d. h.* „exprimiert“). Wenn man von Genfunktion spricht, bezieht man sich also eigentlich auf den Grad der Expression eines Gens. Dieser Grad kann von der Zelle nach vorgegebenen Regeln gesteuert werden, und auch diese sind in der Sequenz der DNA verankert.

Ein Beispiel: Alle Zellen in unserem Körper (etwa 100 Billionen) enthalten jeweils identische DNA-Moleküle. Leberzellen beispielsweise exprimieren jedoch nur die für die Leberfunktion erforderlichen Gene, wohingegen Hautzellen eine ganz andere Untergruppe von Genen exprimieren.

DNA kann mit Restriktionsenzymen in Stücke geschnitten werden

Restriktionsenzyme sind Proteine, die von Bakterien als Abwehr gegen eindringende Fremd-DNA (z. B. von einem Virus) hergestellt werden. Jedes Restriktionsenzym erkennt eine bestimmte Sequenz von typischerweise 4–6 Basenpaaren und schneidet DNA an jeder Stelle, an der diese Sequenz vorkommt.

Beispielsweise erkennt das Restriktionsenzym *Bam*HI die Sequenz (5'..GGATCC..3') und schneidet den DNA-Strang zwischen den beiden **G**-Nukleotiden in dieser Sequenz.

Restriktionsenzyme schneiden jede DNA, in der die jeweilige Erkennungssequenz vorhanden ist. Dabei spielt es keine Rolle, ob die DNA bakteriellen, pflanzlichen oder menschlichen Ursprungs ist.

DNA-Stücke können durch DNA-Ligase miteinander verknüpft werden

DNA-Ligase ist ein Enzym, das DNA-Stücke zusammenklebt, sofern die Enden kompatibel sind.

So kann zum Beispiel ein mit *Bam*HI geschnittenes Stück menschlicher DNA oder Frosch- oder Tomaten-DNA leicht mit einem ebenfalls mit *Bam*HI geschnittenen Stück bakterieller DNA verbunden werden. Das ermöglicht die Herstellung von rekombinanten DNAs oder Hybriden durch Verbinden von DNA-Stücken aus zwei verschiedenen Quellen.

Gene können aus menschlicher DNA oder Pflanzen-DNA herausgeschnitten und in Bakterien eingeführt werden. Beispielsweise ist es möglich, das menschliche Gen für das Hormon Insulin in Bakterien einzuschleusen. Unter den richtigen Bedingungen können diese Bakterien dann echtes menschliches Insulin herstellen.

Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Stücke

Plasmide sind kleine ringförmige DNAs, die in einigen Bakterienzellen vorkommen. Sie replizieren ihre eigene DNA, indem sie sich die Polymerasen der Zellen ausleihen. Daher können sie ohne viel Eigenaufwand unbegrenzt in Zellen überdauern.

Aufgrund ihrer geringen Größe lassen sich Plasmid-DNAs leicht aus Bakterienzellen extrahieren und reinigen. Wenn sie mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden, können sie mit einer fremden DNA— aus jeder beliebigen Quelle —, die mit demselben Enzym geschnitten wurde, verknüpft werden.

Die resultierenden Hybrid-DNAs können mit einem als Transformation bezeichneten Verfahren erneut in Bakterienzellen eingeführt werden. Die hybriden Plasmide können nun genauso wie bisher in den Bakterien überdauern, außer, dass die daran gebundene Fremd-DNA ebenfalls überdauert und weitergegeben wird. Die Fremd-DNA wird sozusagen als kostenloser Passagier mitgenommen

Jedes Hybridplasmid enthält nun eine perfekte Kopie des damit verbundenen ursprünglichen Stücks Fremd-DNA. Das Stück Fremd-DNA wurde „kloniert“, das Plasmid, das die fremde DNA trug, wird Klonierungsvehikel oder Vektor genannt.

Zusätzlich zu ihrem Nutzen zum Klonieren fremder Gene tragen Plasmide manchmal eigene Gene. Bakterien sterben, wenn sie Antibiotika ausgesetzt werden. Antibiotikaresistenzgene ermöglichen es Bakterien jedoch, in Gegenwart eines Antibiotikums wie Ampicillin zu wachsen. Solche Gene befinden sich häufig auf Plasmiden. Wenn Fremd-DNA in solche Plasmide eingeführt wird und die Hybride durch Transformation in Bakterienzellen eingeschleust werden, ist es einfach, diejenigen Bakterien auszuwählen, die das Plasmid—erhalten haben, weil sie die Fähigkeit erworben haben, in Gegenwart des Antibiotikums zu wachsen, während alle anderen Bakterienzellen absterben.

DNA-Bibliotheken

Wenn DNA aus einer Zelle extrahiert wird, kann sie in Stücke geschnitten und massenweise in eine große Population von Plasmiden kloniert werden. Bei diesem Vorgang entsteht eine Population hybrider (rekombinanter) DNAs. Nach dem Einführen dieser Hybride zurück in die Zellen hat jede transformierte Zelle ein ganz bestimmtes Hybrid erhalten und vermehrt. Diese Hybride enthalten jeweils die gleiche Vektor-DNA, aber ein anderes DNA-Insert.

Wenn in der ursprünglichen Mischung 1.000 verschiedene DNA-Moleküle vorhanden sind, werden 1.000 verschiedene Hybride gebildet. Es entstehen 1.000 verschiedene transformierte Zellen, von denen jede eines der ursprünglichen 1.000 Stücke mit genetischer Information enthält. Eine solche Sammlung wird als DNA-Bibliothek bezeichnet. Wenn der ursprüngliche Extrakt aus menschlichen Zellen stammte, ist die Bibliothek eine Humanbibliothek.

Aus einer solchen Bibliothek können einzelne interessierende DNAs herausgefischt werden, indem die Bibliothek mit einer geeigneten Sonde gescreent wird.

Anhang D Genregulierung

Unser Körper enthält Tausende verschiedener Proteine, die viele verschiedene Aufgaben erfüllen. Verdauungsenzyme sind Proteine; einige der Hormonsignale in unserem Körper sowie die Antikörper, die uns vor Krankheiten schützen, sind ebenfalls Proteine. Die Informationen für den Zusammenbau eines Proteins sind in unserer DNA enthalten. Der Abschnitt der DNA, der den Code für die Herstellung eines Proteins enthält, wird als Gen bezeichnet. Das menschliche Genom enthält mehr als 30.000–100.000 Gene. Jedes Gen codiert ein ganz bestimmtes Protein: es gilt das Prinzip ein Gen – ein Protein. Das Gen, das ein Verdauungsenzym im Mund codiert, unterscheidet sich von einem, das einen Antikörper oder das Pigment der Augenfarbe codiert.

Organismen regulieren die Expression ihrer Gene und letztendlich die Mengen und Arten von Proteinen, die in ihren Zellen vorhanden sind, aus einer Vielzahl von Gründen, zum Beispiel aufgrund von entwicklungsbedingten Veränderungen oder zellulärer Spezialisierung oder zur Anpassung an die Umwelt. Die Genregulation ermöglicht nicht nur die Anpassung an unterschiedliche Bedingungen, sondern verhindert auch eine verschwenderische Überproduktion nicht benötigter Proteine, die für den Organismus einen Wettbewerbsnachteil bedeuten würde. Gute Beispiele für stark regulierte Gene sind die am Transport und Abbau (Katabolismus) von Nahrung beteiligten Gene. Beispielsweise ist der Zucker Arabinose sowohl eine Energiequelle als auch eine Kohlenstoffquelle. *E. coli*-Bakterien produzieren drei Enzyme (Proteine), die zur Verdauung von Arabinose als Nahrungsquelle benötigt werden. Wenn keine Arabinose in der Zellumgebung vorhanden ist, werden die Gene, die diese Enzyme codieren, nicht exprimiert. Wenn hingegen Arabinose vorhanden ist, findet ihre Expression statt. Warum ist das so?

Die Regulation der Expression von Proteinen erfolgt häufig auf der Ebene der Transkription von DNA zu RNA. Diese Regulation findet an einer ganz bestimmten Stelle auf der DNA-Matrize statt, dem so genannten Promotor, wo sich die RNA-Polymerase auf die DNA setzt und mit der Transkription des Gens beginnt. In Bakterien befinden sich Gruppen verwandter Gene oft in so genannten Clustern und werden ausgehend von einem gemeinsamen Promotor zu RNA transkribiert. Diese Gencluster, die von einem einzigen Promotor kontrolliert werden, werden Operons genannt.

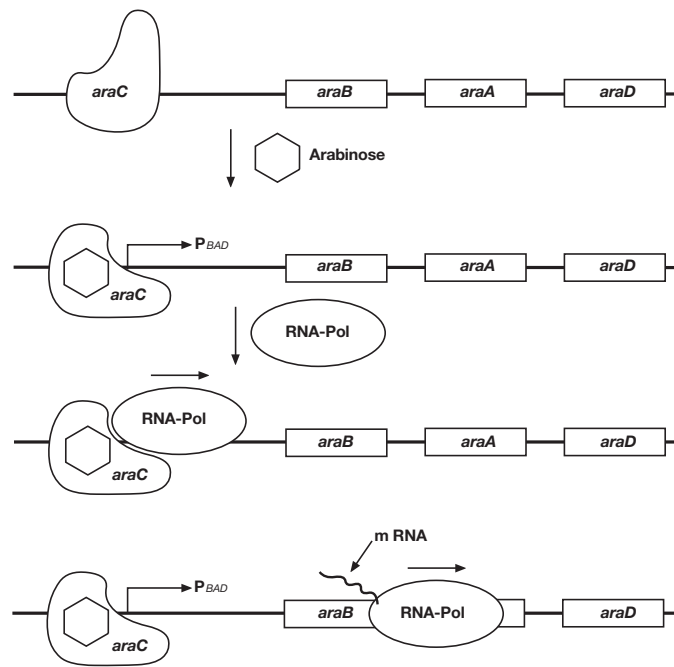
Die drei Gene (*araB*, *araA* und *araD*), die drei Verdauungsenzyme codieren, die am Abbau von Arabinose beteiligt sind, sind im so genannten Arabinose-Operon geclustert.³ Diese drei Proteine sind von der Initiation der Transkription durch einen einzigen Promotor, P_{BAD} , abhängig. Die Transkription dieser drei Gene erfordert die gleichzeitige Anwesenheit der DNA-Matrize (Promotor und Operon), der RNA-Polymerase, eines DNA-bindenden Proteins namens *araC* und Arabinose. *araC* bindet an der Bindungsstelle für die RNA-Polymerase in der DNA (dem Anfang des Arabinose-Operons). Wenn Arabinose in der Umgebung vorhanden ist, nehmen die Bakterien sie auf. In der Zelle interagiert die Arabinose direkt mit *araC*, das an die DNA gebunden ist. Die Interaktion hat zur Folge, dass *araC* eine andere Form annimmt, die wiederum die Bindung der RNA-Polymerase begünstigt (und tatsächlich dabei hilft), und die drei Gene *araB*, *A* und *D* werden transkribiert. Drei Enzyme werden hergestellt und bauen Arabinose ab, bis irgendwann keine Arabinose mehr vorhanden ist. Ohne Arabinose nimmt *araC* wieder seine ursprüngliche Form an und die Transkription wird abgeschaltet.

Der DNA-Code des pGLO-Plasmids wurde verändert, um Teile des Arabinose-Operons einzubauen. Es sind sowohl der Promoter (P_{BAD}) als auch das *araC*-Gen vorhanden. Allerdings wurden die Gene, die den Katabolismus von Arabinose codieren, *araB*, *A* und *D*, durch ein Gen ersetzt, das GFP codiert. Somit begünstigt das *araC*-Protein in Gegenwart von Arabinose die Bindung von RNA-Polymerase und es wird GFP hergestellt. Die Zellen leuchten grün, während sie immer mehr GFP produzieren. Ist keine Arabinose vorhanden, wird die Bindung von RNA-Polymerase von *araC* nicht länger begünstigt, und das GFP-Gen wird nicht transkribiert. Wenn kein GFP hergestellt wird, behalten die Bakterienkolonien ihren (natürlichen) Wildtyp-Phänotyp – bei und bilden weiße Kolonien ohne Fluoreszenz.

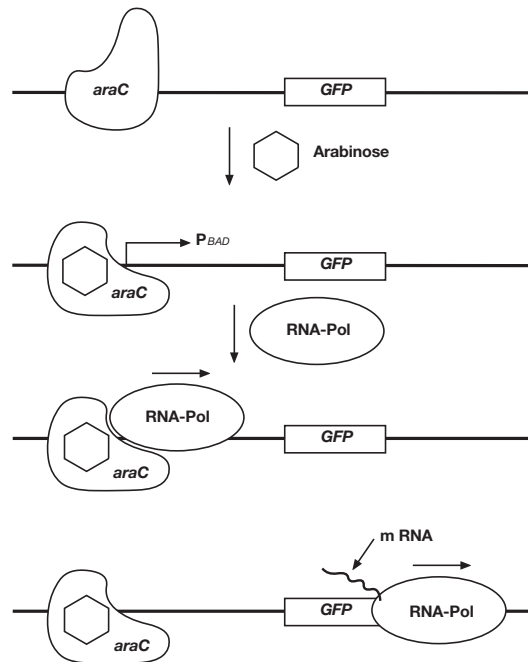
Dies ist ein hervorragendes Beispiel für das zentrale molekulare Dogma der Biologie, umgesetzt in die Praxis:

DNA → RNA → PROTEIN → MERKMAL.

Das Arabinose-Operon



Expression von grün fluoreszierendem Protein



Anhang E

Fotodokumentation von pGLO-Platten mit dem BlueView Transilluminator von Vernier

1. Den Logger *Pro*[®] starten und aus dem Menü „File“ (Datei) die Option „New“ (Neu) wählen.
2. Den BlueView Transilluminator vorbereiten.
 - a. Die +pGLO LB/Amp-Platte in die Mitte der blauen Plattform des BlueView Transilluminators stellen.
 - b. Den BlueView Transilluminator einstecken und einschalten.
3. Positionierung des digitalen Handmikroskops ProScope HR[™].
 - a. Das 1–10X Objektiv auf das ProScope aufsetzen.
 - b. Das ProScope mit dem USB-Anschluss verbinden.
 - c. Das ProScope am Stativ befestigen und das Stativ neben dem Transilluminator aufstellen.
 - d. Das ProScope so einstellen, dass sein Objektiv parallel zur Oberfläche des Transilluminators ist.
4. Den Logger *Pro* vorbereiten.
 - a. Aus dem Menü „Page“ (Seite) „Add Page“ (Seite hinzufügen) ► „Blank Page“ (Leerseite) ► OK wählen.
 - b. Text aus den Insert-Menüs wählen und einen Titel zur Beschreibung des Tests eingeben, zum Beispiel „+ pGLO, LB/Amp/Ara-Kolonien“.
 - c. Aus dem Insert-Menü „Video Capture“ (Videoaufnahme) ► „Take Photo“ (Foto aufnehmen) wählen.
 - d. Das ProScope HR so einstellen und fokussieren, dass die Kolonien scharf gestellt sind.
5. Zur Bildgebung die Haube über dem ProScope und dem Transilluminator schließen. Die Haube verfügt über eine Zugangsklappe, über die letzte Anpassungen der besten Position, des Fokus und der Auflösung vorgenommen werden können.
6. Wenn Sie mit dem Bild zufrieden sind, klicken Sie auf „Take Photo“ (Foto aufnehmen) und wählen dann aus dem Menü „Page“ (Seite) die Option „Auto Arrange“ (Automatisch anordnen).
7. Der Bildschirm sollte nun aussehen wie in Abbildung 1.
8. Fügen Sie für die nächste Platte eine neue Seite und einen neuen Titel hinzu und machen Sie eine Aufnahme.
9. Wiederholen Sie das für jede weitere Platte.
10. Daten zur Anzahl der Kolonien und Angaben zu den einzelnen Platten können in die Datentabelle auf Seite 1 eingegeben werden (optional).

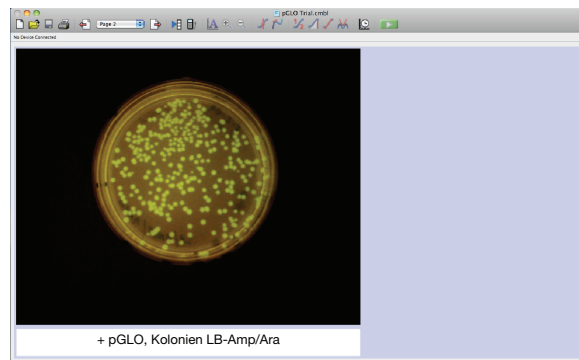


Abb. 1

Anhang F Literatur

1. Hanahan, Douglas, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557 (1983).
2. Hanahan, Douglas, Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA Cloning: A Practical Approach* (Ed. D. M. Glover), Vol. 1. IRL Press, Oxford (1987).
3. Schleif, Robert, Two positively regulated systems, *ara* and *mal*, In *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt. ASM Press, Washington, D.C. (1996).

Parafilm ist eine Marke der American National Can Co.
Jell-O ist eine Marke der Kraft Foods, Inc.
Logger *Pro* ist eine Marke von Vernier Software & Technology.
Pro Scope HR ist eine Marke von Bodelin Technologies.



1660033EDU

(01)03610520499177



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Web site bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 43 1 877 89 01 177 **Belgium** 32 (0)3 710 53 00 **Brazil** 55 11 3065 7550
Canada 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 420 241 430 532 **Denmark** 45 44 52 10 00 **Finland** 358 09 804 22 00
France 33 01 47 95 69 65 **Germany** 49 89 31 884 0 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungary** 36 1 459 6100 **India** 91 124 4029300
Israel 972 03 963 6050 **Italy** 39 02 216091 **Japan** 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 31 (0)318 540 666
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 47 23 38 41 30 **Poland** 48 22 331 99 99 **Portugal** 351 21 472 7700 **Russia** 7 495 721 14 04
Singapore 65 6415 3188 **South Africa** 27 (0) 861 246 723 **Spain** 34 91 590 5200 **Sweden** 46 08 555 12700 **Switzerland** 41 026674 55 05
Taiwan 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 662 651 8311 **United Arab Emirates** 971 4 8187300 **United Kingdom** 44 020 8328 2000

