



Schülerakademie 2012

Skript

DAS BAKTERIUM *ESCHERICHIA COLI*

Bei *Escherichia coli* (abgekürzt: *E. coli*) handelt es sich um ein Bakterium, das im Darm der Menschen und Tiere vorkommt. Die meisten Stämme von *E. coli* sind nicht krankheitsauslösend, es existieren jedoch pathogene Stämme. Es ist der molekulargenetisch am besten untersuchte Organismus bei dem die Genomsequenzen einiger Stämme vollständig bekannt sind und genetische Methoden etabliert.



Abb. 1 *Escherichia coli*

In der Molekularbiologie wird *E. coli* häufig als Modellorganismus verwendet. Neben der wissenschaftlichen Grundlagenforschung, finden diese Bakterien auch Verwendung in der industriellen Biotechnologie zur Produktion von Enzymen oder anderen Proteinen, wie z.B. menschliches Insulin.

Diese Bakterium besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die es für die wissenschaftliche Entwicklung und für industrielle Anwendungen interessant macht:

- ✓ Einfache Züchtung und Haltung
- ✓ im Labor verwendete Stämme meist Sicherheitsstämme
- ✓ Kurze Generationsdauer
- ✓ Kostengünstig
- ✓ Genom komplett entschlüsselt

WAS IST EIN PLASMID?

Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Moleküle und besitzen die Eigenschaft sich autonom zu vervielfältigen, sodass mehrere Kopien in einer Zelle vorliegen können. Zellen können Gene enthalten, die den Zellen neue wichtige Fähigkeiten verleihen, wie z.B. ein Resistenz-Gen gegen ein Antibiotikum (s. Abb. 2). Dies ermöglicht Bakterien mit dem Plasmid in einem Medium zu wachsen, dass dieses Antibiotikum enthält, während plasmidlose Bakterien in ihrem Wachstum gehindert werden oder absterben.

In der Gentechnik werden Plasmide als „Werkzeuge“ genutzt, um DNA-Sequenzen in die Zelle zu transferieren, da diese folgende Vorteile aufweisen:

- ✓ einfache Isolierung
- ✓ besitzen Replikations-Startstelle für eigenständige Replikation („origin of replication“, kurz: ori)
- ✓ Sollte nicht zu groß sein (weniger als 10 000 Basenpaare)
- ✓ geeignete Schnittstelle für Restriktionsenzyme besitzen, um den Einbau von Fremd-DNA zu ermöglichen
- ✓ Vorhandensein von einem Plasmid im Organismus muss diesem einen selektiven Vorteil verschaffen, sonst werden sie aufgrund der höheren Belastung für die Zelle wieder ausgeschleust

Mit Hilfe von Plasmiden ist es möglich Zellen gentechnisch zu verändern und neue Zell-Stämme zu erzeugen, die besondere und spezifische Fähigkeiten besitzen, um z.B. Proteine, Vitamine oder andere Metabolite mit diesen Zellen zu produzieren. Eines der bekanntesten Plasmide ist das Plasmid pUC19, dass in der folgenden Abbildung dargestellt ist.

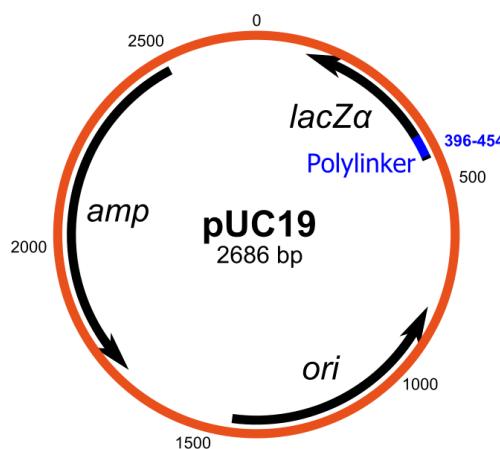


Abb. 2 Plasmid mit Ampicillin-Resistenz, origin of replication („ori“), lacZ-Gen

KONZENTRATION UND REINHEIT VON PLASMIDEN

Die Konzentration an DNA wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ doppelsträngiger bzw. 33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ einzelsträngiger DNA. Da die DNA-Lösung mit Proteinen, Phenolen und Kohlenhydraten verunreinigt sein kann, muss die Reinheit der Lösung bestimmt werden. Proteine und Phenole absorbieren bei einer Wellenlänge von 280 nm. Über den Quotient aus OD_{260} und OD_{280} kann der Grad der Verunreinigung ermittelt werden. Der Wert für reine DNA liegt hier bei 1,8, während ein Wert von 1,5 bereits einer 1:1 Mischung aus DNA und Protein entspricht. Eine Verunreinigung durch Zucker, organische Lösungsmittel oder Salze kann mit dem Quotienten aus OD_{260} und OD_{230} ermittelt werden. Für reine DNA ist dieser >2.

TRANSFORMATION

Für die Erzeugung gentechnisch veränderter Mikroorganismen (kurz: GVO) spielt *horizontaler Gentransfer*, d.h. die nicht-geschlechtliche Übertragung von Genen über Artgrenzen hinweg, eine große Rolle. Bei Prokaryoten gibt es prinzipiell drei Methoden, um DNA in die Zellen einzuschleusen: die Transformation, die Konjugation und die Transfektion. Die Transformation stellt eine der Standart-Techniken für die Gentechnik dar. Mit Hilfe dieser Methode wird freie DNA in kompetente Zellen eingebracht. Kompetenz bedeutet in diesem Zusammenhang die Fähigkeit freie DNA aufzunehmen. Die Zellmembran stellt hierbei die zu überwindende Barriere dar.

Es gibt zwei Transformationsmethoden, die chemische Transformation und Transformation via Elektroporation. Bei der im Versuch verwendeten Elektroporation wird die Membran permeabel gemacht, indem kurze elektrische Impulse angelegt werden. Dadurch entstehen Löcher in der Membran (s. Abb. 3).

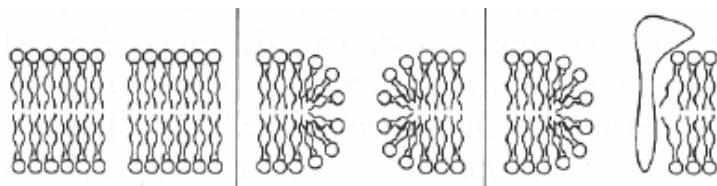


Abb. 3: Durch Elektroporation entstehende Löcher in der Membran

Eine Elektroporationsanlage ist in Abb. 4 dargestellt. Wichtig ist es, dass die Konzentration an Ionen im Transformationsansatz gering ist. Experimentell konnte bestimmt werden, dass bei *E. coli* bei einer Spannung von 2,5 kV und einer Zeitkonstante von ca. 5 ms die besten Transformationsergebnisse erzielt werden konnten.



Abb. 4: Elektroporationsanlage BioRad Gene Pulser II (links), Elektroporationsküvetten (rechts)

FLUORESZIERENDE PROTEINE

Fluoreszierende Proteine dienen aufgrund ihrer Fähigkeit zu fluoreszieren als Reporter für z.B. die Analyse intrazellulärer Transportvorgänge und die Lokalisierung von Proteinen in lebenden Organismen. Das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) stellt hierbei das am besten charakterisierte Protein dar (s. Abb. 5 links). Erstmals wurde es entdeckt in der Qualle *Aequorea victoria*. Wird GFP mit blauem oder ultraviolettem Licht angeregt, so fluoresziert es in grün. In den letzten Jahren wurden noch weitere fluoreszierende Proteine entdeckt, wie z.B. das Rot-fluoreszierende Protein (RFP) in Korallen (s. Abb. 5 rechts).



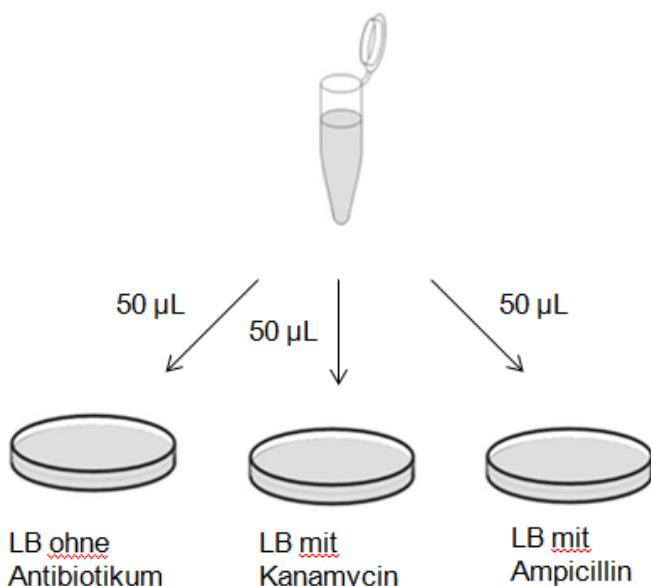
Abb. 5: GFP (links) und RFP (rechts)

VERSUCH 1: TRANSFORMATION

In diesem Versuchsteil soll ein Plasmid-Mix via Elektroporation in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes KRX eingebracht werden. Der Plasmid-Mix enthält zwei verschiedene Plasmide. Eines der Plasmide enthält ein GFP-Gen und die Resistenz A und das zweite enthält ein RFP-Gen und die Resistenz B. Es soll herausgefunden werden, welche Resistenz auf dem jeweiligen Plasmid vorliegt. Dafür werden die Transformationsansätze nach der Elektroporation auf 3 verschiedene LB-Agarplatten ausplattiert, 1x ohne Antibiotikum, 1x mit Kanamycin und 1x mit Ampicillin.

Ablauf:

1. 100 μ L kompetente *E. coli* Zellen **auf Eis**(!!) auftauen und mit 50 μ L eiskaltem Glycerin (10 %) verdünnen
2. 2 μ L des Plasmid-Mixes hinzugeben, zum Mischen 2-3 x hoch und runter pipettieren (nicht vortexen!) und die Zellen für 1 min auf Eis lagern
3. Ansatz in Elektroporationsküvetten überführen und diese in die Elektroporationsanlage stellen
4. Einstellungen für die Elektroporation: U = 2,5 kV, C = 25 μ F, R = 400 Ω
5. 450 μ L SOC-Medium in Elektroporationsküvette pipettieren, Zellen suspendieren und in ein Eppi überführen
6. 1 h bei 37 ° C schütteln
7. Zellen 2 min bei 800 rpm abzentrifugieren, Überstand bis auf ca. 200 μ L verwerfen und Zellen verbleibender Flüssigkeit resuspendieren
8. Zur Selektion je 50 μ L ausplattieren auf LB-Agarplatten mit Kanamycin, Ampicillin und ohne Antibiotikum.



9. Über Nacht bei 37 °C inkubieren
10. Am Folgetag die LB-Agarplatten auswerten, dazu gehört:
 - Kolonien zählen
 - Platten unter UV-Lampe anschauen → Fluoreszieren die Kolonien? Wenn ja, in welcher Farbe?

VERSUCH 2: PLASMIDISOLIERUNG

Um Gene, die auf einem Plasmid in einem Organismus vorliegen zu verändern oder um sie auf andere Organismen zu übertragen, müssen Plasmide isoliert werden. Hierfür verwenden wir eine Flüssigkultur von *E. coli* KRX mit einem Plasmid, welches RFP enthält. Dieses Plasmid soll aus dem Mikroorganismus isoliert werden und anschließend möglichst in hoher Konzentration und Reinheit vorliegen.

Ablauf:

Verwendet wird das GeneJet Plasmidminiprep Kit von Fermentas. Alle Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

1. 2 mL der Flüssigkultur bei 8000 rpm abzentrifugieren, Überstand abgießen und Mediumreste mit der Pipette vollständig entfernen
2. Pellet in 250 µL **Resuspension Solution** durch vortexen vollständig resuspendieren und die Zellsuspension in Mikrozentrifugenröhren überführen
3. 250 µL **Lysis Solution** hinzugeben und durch 4-5 x invertieren des Röhrchen gründlich mischen bis die Lösung klar und zähflüssig ist
4. 350 µL **Neutralization Solution** hinzugeben und durch 4-5 x invertieren mischen
5. 5 Minuten zentrifugieren um Zelltrümmer und chromosomal DNA abzutrennen
6. Überstand in GeneJet Spin-Säule pipettieren und dabei vermeiden, dass das weiße Präzipitat auf die Säule überführt wird
7. 1 min bei 10.000-14.000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen und die Säule wieder in das Auffangröhren stellen
8. 500 µL **Wash Solution** in die Spin-Säule geben; 60 s zentrifugieren und Durchfluss verwerfen; Säule zurück in das Auffangröhren stellen
9. Wiederholung von Schritt 8
10. Erneut 1 min zentrifugieren, um den Rest der Wash Solution zu entfernen.

11. Säule in ein neues 1.5 mL Eppi stellen. 50 μ L **Elution Buffer** zufügen, um Plasmid-DNA zu eluieren. (**Achtung:** Nicht mit der Pipette an die Membran kommen); 2 min bei Raumtemperatur inkubieren und dann 2 Minuten zentrifugieren.

12. Messung im Nanodrop (s. Abb. 6)

- Plasmidkonzentration
- OD_{260}/OD_{280}
- OD_{260}/OD_{230}

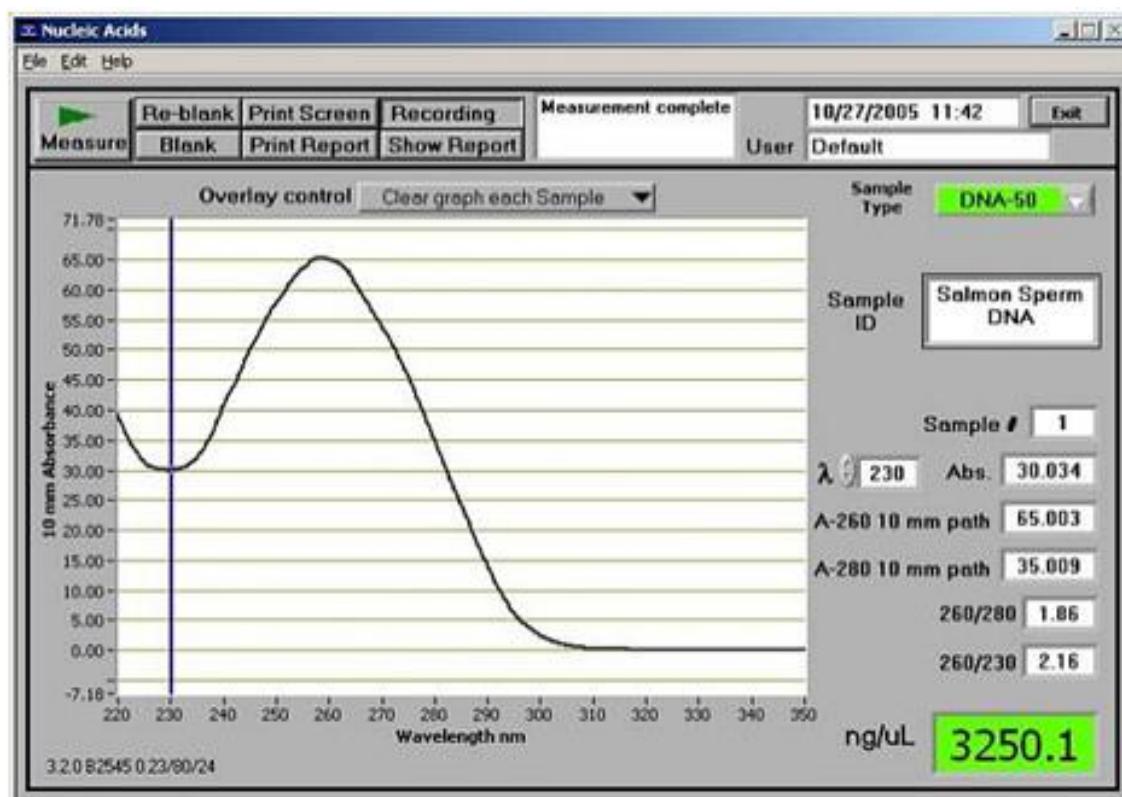


Abb. 6: Screenshot von der Software für das Nanodrop

AUSWERTUNG

Versuch 1: Transformation

Wie hoch ist die Zeitkonstante bei der Transformation? Wie ist sie zu bewerten?

Tabelle 1: Ergebnisse Transformation

	LB-Agarplatten ohne Antibiotikum	LB-Agarplatten mit Kanamycin	LB-Agarplatten mit Ampicillin
Anzahl Kolonien			
Fluoreszenz? Wenn ja, Farbe?			
Weitere Beobachtungen			

Wozu führt das Inkubieren auf LB-Agarplatten ohne Antibiotikum?

Welche Resistenz hat das Plasmid mit dem GFP und welche hat das mit dem RFP?

Versuch 2: Plasmidisolierung

Tabelle 2: Ergebnisse Nanodrop

Plasmidkonzentration	
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	
OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	

Wie ist die Qualität eurer isolierten Plasmid-DNA?

QuickProtocol™

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit



Note. All steps should be carried out at room temperature.

All centrifugations should be carried out in a microcentrifuge at $\geq 12000 \times g$ (~11000rpm).

1 Resuspend Cells, Lyse and Neutralize



Add to the pelleted cells:

250 μ l of Resuspension Solution (with RNase A) and vortex.

250 μ l of Lysis Solution and invert the tube 4-6 times.

350 μ l of Neutralization Solution and invert the tube 4-6 times.

Centrifuge 5min.

2 Bind DNA



Load the supernatant to GeneJET™ spin column.

Centrifuge 1min.

3 Wash the column



Add 500 μ l of Wash Solution and centrifuge for 30-60s.

Discard the flow-through.

Centrifuge empty column for 1min.

} Repeat twice

4 Elute purified DNA



Add 50 μ l of Elution Buffer to the column and incubate 2min.

Centrifuge 2min.

Collect the flow-through.

QuickProtocol and GeneJET are Fermentas trademarks