

## 11a. Genaustausch bei Bakterien II: Transformation

VerfasserInnen: Yvonne Schwarzenbach, [s0171289@access.unizh.ch](mailto:s0171289@access.unizh.ch)  
Michael Raissig, [s0171495@access.unizh.ch](mailto:s0171495@access.unizh.ch)  
Simon Aeschbacher, [s0170009@access.unizh.ch](mailto:s0170009@access.unizh.ch)

Betreuerin: Munti Yuhana, [myuhana@botinst.unizh.ch](mailto:myuhana@botinst.unizh.ch)

---

### 1. Einleitung

#### 1.1 Ziel

Im Zentrum des Experimentes stehen das Verständnis und die Durchführung einer genetischen Transformation von Bakterien. Das GFP (green fluorescent protein)-Gen soll mit Hilfe des pGlo-Plasmids auf einen Stamm von *E. coli* (K12:HB101) übertragen werden.

#### 1.2 GFP, pGlo-Plasmid und Arabinose-Operon

Das "Green Fluorescent Protein" (Abb. 1) stammt ursprünglich aus der leuchtenden Qualle *Aequorea victoria*. Die dreidimensionale Konformation von GFP wird bei UV-Bestrahlung zu Resonanz angeregt und gibt Energie in Form von sichtbarem Licht ab.

Das pGlo-Plasmid (Abb. 2) codiert für GFP und für eine  $\beta$ -Lactamase, welche Ampicillin-Resistenz bietet (zur Wirkung von  $\beta$ -Lactamasen siehe BBOM 10th: 20.8, Figure 20.19). Diese Resistenz ermöglicht die Selektion von Zellen, die erfolgreich mit der pGlo-DNA transformiert worden sind.

Zusätzlich befindet sich auf dem Plasmid ein modifiziertes Arabinose-Operon, das zur Regulation der GFP-Expression dient. Auf dem natürlichen Arabinose-Operon befindet sich eine Promotorregion vor drei Genen, welche Proteine zum Abbau von Arabinose (AraB, AraA und AraD) codieren. Ein weiteres Gen ausserhalb dieser Transkriptionseinheit kodiert das DNA bindende Regulator-Protein AraC, welches fortlaufend exprimiert wird. Der Regulator AraC bindet an den genannten Promotor und hindert dadurch die RNA-Polymerase daran, die drei Arabinose-Abbau-Gene zu transkribieren. In Gegenwart von Arabinose ändert AraC jedoch seine Konformation, sodass die Polymerase binden und die Transkription beginnen kann. Die Gene zum Abbau von Arabinose werden aktiviert. Ist die Arabinose vollständig abgebaut, wechselt AraC zurück in die erste Konformation, die Transkription wird wieder gestoppt (substratinduzierte Expression).

Abb. 1: Röntgenkristallstruktur von GFP  
From NPACI see URL below

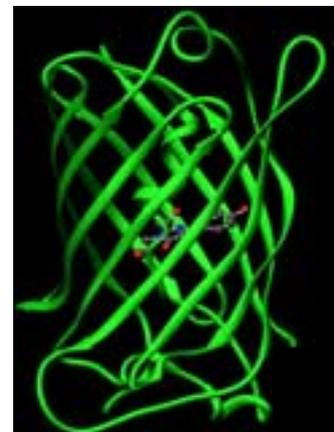




Abb. 2: **Schema des pGlo-Plasmiden** (5.9 kb); *araC*: Gen für Regulator-Protein für GFP-Expression; GFP: Gen für green fluorescent protein; *bla*: Gen für  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin Resistenz) from URL listed below.

Das modifizierte Arabinose-Operon auf pGlo enthält nun anstelle der drei Gene zum Abbau von Arabinose das Gen für GFP. GFP wird jetzt also genauso reguliert wie die Arabinose-Abbau-Gene im natürlichen Operon: Wird den transformierten Zellen Arabinose gegeben, findet die GFP-Expression statt, ohne Arabinose wird das GFP-Gen nicht transkribiert (Näheres dazu in der Anleitung zu [Exp. 11](#) auf der Kurshomepage).

Transformierte Zellen werden also auf Selektivmedium mit Ampicillin im UV-Licht weiss erscheinen, wenn sie keine Arabinose erhalten und fluoreszierend grün, wenn sie Arabinose erhalten.

### 1.3 Kompetenz

Damit Transformation geschehen kann, müssen die Empfängerzellen kompetent sein (fähig, DNA durch die Zellwand und die Membranen aufzunehmen). Im Versuch wird dies durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$ .  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen neutralisieren die negativ geladenen Phosphat-Gruppen des tDNA-Rückgrats und der Phospholipid-Doppelschicht und erleichtern dadurch den Plasmiden das Durchdringen der Zellmembran (ungeladene Teilchen diffundieren besser durch biologische Membranen).

## 2. Vorgehen

Zwei Ansätze von einen Tag alten *E. coli*-Zellen werden zentrifugiert, vom Überstand getrennt, mit Transformationslösung (enthält  $\text{CaCl}_2$ ) versetzt und 15 Minuten auf Eis gesetzt, wieder zentrifugiert und diesmal für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Damit sind die Zellen kompetent.

Der eine Ansatz (Label "+DNA") wird mit pGlo-Plasmid-Lösung versetzt und auf Eis gebracht, der andere Ansatz (Label "-DNA") wird ohne Plasmid-Zugabe auf dem Eis belassen. Diese Zellen dienen als Negativkontrolle. Unterdessen werden vier Agarplatten folgendermassen beschriftet (LB für "Luria Bertani Medium"):

- LB+Amp (+DNA)
- LB+Amp+Ara (+DNA)
- LB+Amp (-DNA)
- LB (-DNA)

Beide Ansätze werden schnell in ein  $42^\circ\text{C}$ -Wasserbad gegeben, 50 Sekunden lang inkubiert und schnell wieder auf Eis gekühlt und 2 Minuten dort belassen. Schnelle Wechsel zwischen Eis und Wasserbad sind wichtig für eine erfolgreiche Transformation.

Beide Ansätze werden mit flüssigem LB-Medium versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden die Zellen auf die entsprechenden Agarplatten gegeben und verteilt. Über Nacht wird bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

Genaue Angaben zur Durchführung finden sich in der Anleitung zu Experiment 11

[http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3\\_03/pdf/11transfo02.pdf](http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_03/pdf/11transfo02.pdf) auf der Kurshomepage

[http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3\\_03/start/homepage.html](http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_03/start/homepage.html)

Wir erwarten folgende Ergebnisse:

Tabelle 1	-DNA (ohne pGlo)		+DNA (+pGlo)	
	Wachstum	Fluoreszenz unter UV Bestrahlung	Wachstum	Fluoreszenz unter UV Bestrahlung
<b>LB</b>	+++ <sup>1)</sup>	-		
<b>LB+Amp</b>	-	-	+ <sup>2)</sup>	-
<b>LB+Amp+Ara</b>			+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>

(+++): starkes Wachstum (Bakterienrasen); (+): erkennbares Wachstum (einzelne Kolonien); (-): kein Wachstum, alle Zellen abgestorben

<sup>1)</sup> optimale Bedingungen für gutes Wachstum

<sup>2)</sup> weniger Wachstum erwartet als bei <sup>1)</sup>, weil nicht alle Zellen das pGlo-Plasmid aufgenommen und damit die Ampicillin-Resistenz erlangt haben.

### 3. Ergebnisse

Nach der Inkubation werden die Phänotypen der Bakterien auf den vier Agarplatten untersucht. Betrachtet werden die Zelldichte und die Fähigkeit zu Fluoreszenz unter UV-Beleuchtung in der Dunkelkammer. Es zeigt sich folgendes Bild:

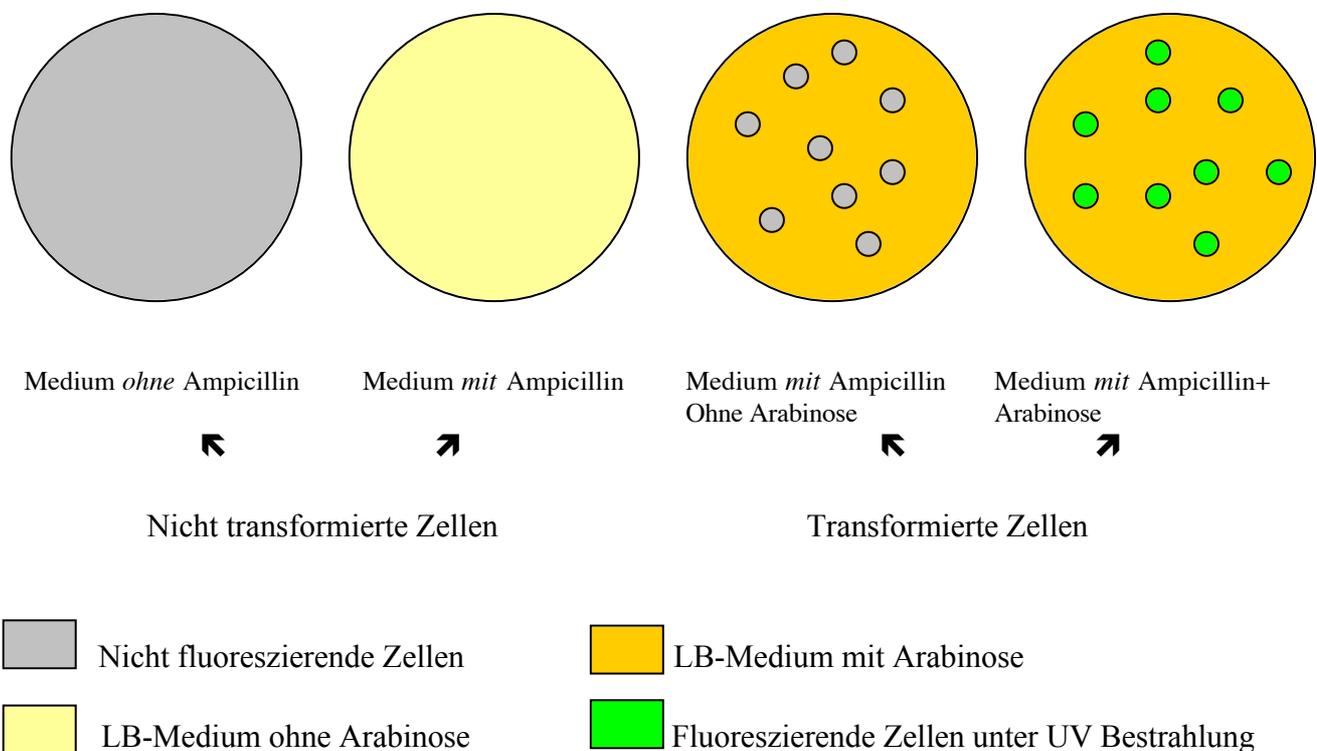


Abb. 3: **Resultat:** Schema der vier Agarplatten mit den darauf gewachsenen Zellen unter UV-Beleuchtung (366 nm).

#### 4. Diskussion

Auf der Platte mit LB-Medium ohne Ampicillin (LB) sind die nicht transformierten *E. coli*-Zellen (-DNA) unter optimalen Bedingungen gewachsen. Die beobachtete Dichte ist hoch. Auf der Platte mit LB-Medium und Ampicillin (LB+Amp) sind die nicht transformierten *E. coli*-Zellen (-DNA) nicht gewachsen, weil sie gegen Amp nicht resistent sind. Die nicht transformierten Zellen leuchten nicht, weil sie kein GFP enthalten.

Auf der Platte mit LB-Medium und Ampicillin (LB+Amp) sind transformierte *E. coli*-Zellen (+DNA) gewachsen, weil sie auf den aufgenommenen Plasmiden die Amp-Resistenz besitzen. Da nicht alle Zellen transformiert wurden, ist die Dichte geringer als unter optimalen Bedingungen. Die Zellen leuchten nicht unter UV-Bestrahlung, weil ihr Medium keine Arabinose enthält. Ebenfalls und mit ähnlicher Dichte wie auf LB+Amp gewachsen sind Zellen auf dem LB-Amp-Medium mit Arabinose. Diese Zellen leuchten unter UV-Bestrahlung, weil sie GFP exprimieren (Abb. 4). Diese Ergebnisse decken sich mit der Erwartung.

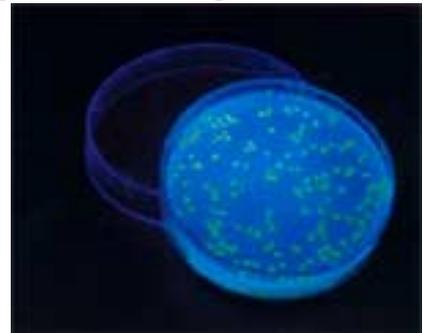


Abb. 4: **GFP exprimierende Zellen** unter UV-Bestrahlung  
From Universidad de Antofagasta, URL see below

#### Anhang

##### Literatur und Quellen

BBOM 9<sup>th</sup>: 9.6, 10.16, 7.2

BBOM 10<sup>th</sup>: 10.6, 31.1, 8.5, 20.8

<http://www.npaci.edu/online/v4.14/crystalstructure.gif> (Abb. 1)

<http://www.gunn.palo-alto.ca.us/~ghorsma/rainforest/pGLO.JPG> (Abb. 2)

<http://www.uantof.cl/facultades/cbbm/IMAGENES/pglo.gif> (Abb. 4)

##### Weiterführende Fragen

Man könnte sich überlegen, welcher Anteil an Zellen des Ansatzes "mit DNA" erfolgreich transformiert wurde. Dazu würde man mittels einer Verdünnungsreihe von Bakterien, an denen die Transformation durchgeführt wurde, die Konzentration an transformierten Zellen im Ansatz berechnen und diese mit der Gesamtkonzentration an Zellen im Ansatz "ohne DNA" vergleichen, welche gleich ermittelt würde. Voraussetzung ist allerdings, dass die Zellen der beiden Ansätze aus der gleichen Ursprungskultur stammen und gleich verdünnt sind.

## 11b. Bacterial genetic exchange: Transformation of pGlo into *E. coli*

Authors: Silvia Schelbert [smetis@bluewin.ch](mailto:smetis@bluewin.ch)  
 Katharina Schmid [kathaschmid@gmx.ch](mailto:kathaschmid@gmx.ch)  
 Micha Wüger [miwueger@swissonline.ch](mailto:miwueger@swissonline.ch)

Advisor: Munti Yuhana, [myuhana@botinst.unizh.ch](mailto:myuhana@botinst.unizh.ch)

---

**Introduction:** What is genetic transformation?  
 How can the GFP (green fluorescent protein) gene be transferred and expressed by this mechanism into *E. coli*?

**Method:** We added to two Eppendorf tubes (ET) overnight culture of *E. coli* (HB101) and  $\text{CaCl}_2$  since the  $\text{Ca}^{2+}$  ion facilitates the pGlo plasmid to enter into the *E. coli* cell. This process was repeated once. The *E. coli* cells were then competent to receive the pGlo plasmid.  
 In the ET marked „+DNA“ we added pGlo in solution whereas nothing was added to the tube marked „-DNA“.  
 In order to stimulate the *E. coli* cells to accept the plasmid we did a heat shock treatment by incubating the tubes at 42°C in a waterbath for 50 seconds.  
 Finally we added nutrition solution (LB) to each tube.  
 Aliquotes of *E. coli* cells from the two different treatments were now distributed onto four „agar plates“ as follow:  
     LB+Amp (+DNA treatment)  
     LB+Amp+Ara (+ DNA treatment)  
     LB+Amp (-DNA treatment)  
     LB (-DNA treatment)  
 Growing time: 24 hours.  
 (The whole procedure is also shown in appendix 2)

**Results and Discussion:**

	-DNA		+DNA	
	growth	glow	growth	glow
LB	+	-		
LB+Amp	-	-	+	-
LB+Amp+Ara			+	+

pGlo plasmid:



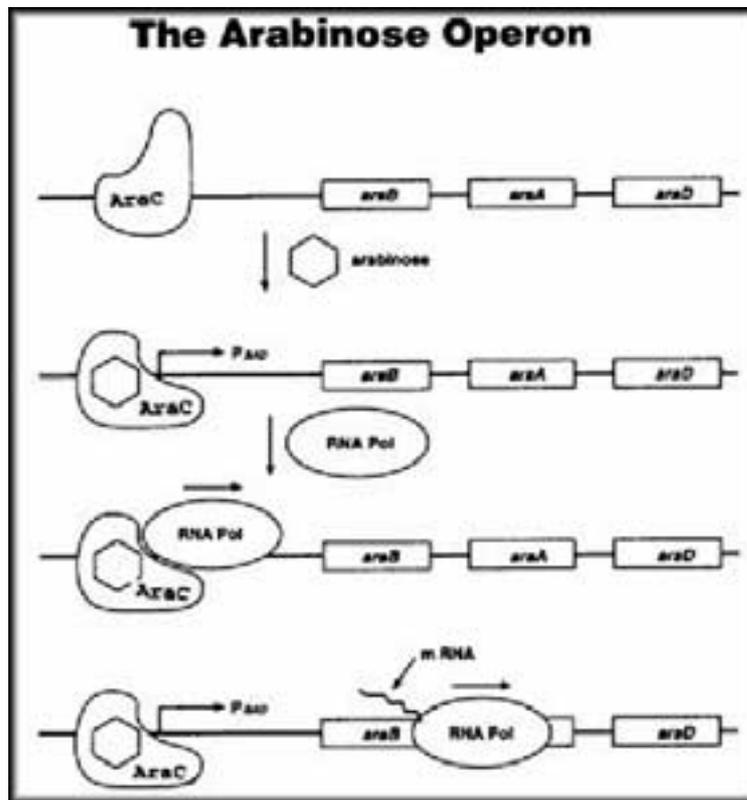
- *bla*: B-lactamase gene, encodes resistency against Ampicillin
- *GFP*: green fluorescence protein gene
- *araC*: regulator gene which encodes a repressor (a DNA-binding) protein

In the +DNA treatment (to which pGlo was added), the *E. coli* competent cells got the plasmid which contains the *Amp<sup>r</sup>*, *GFP* and the *araC* regulator genes. This *Amp<sup>r</sup>* gene allows them to grow also on plates with Ampicillin.

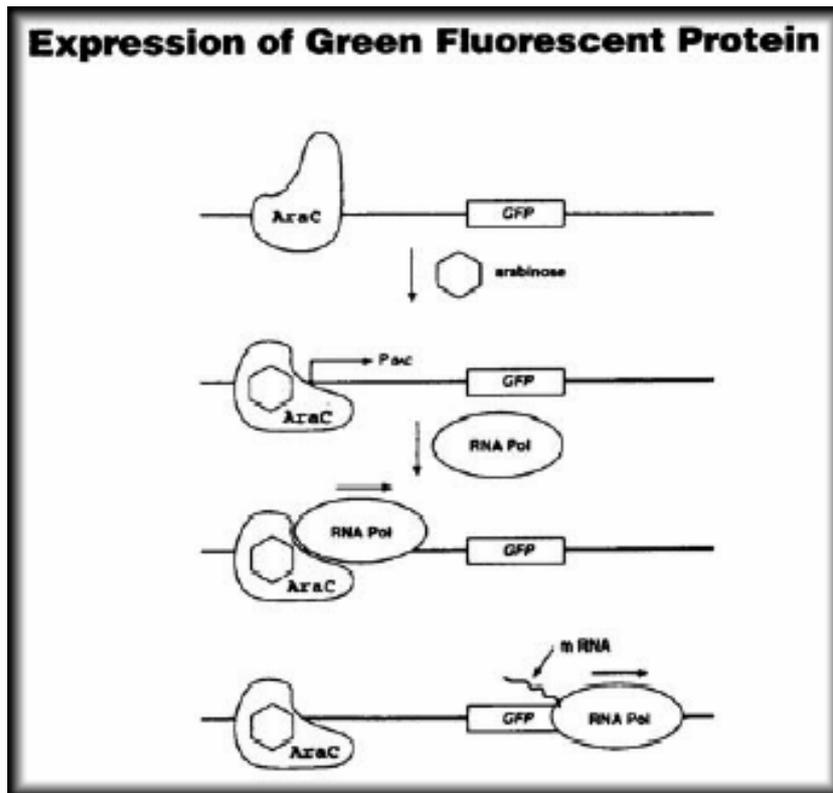
The GFP is only expressed when arabinose is present in the medium. That is why the +DNA colonies only glow on LB+Amp+Ara plates.

We observed less colonies from +DNA on plates LB+Amp and LB+Amp+Ara, because the possibility to receive the plasmid is very low.

Appendix 1:



The three genes (*araB*, *araA* and *araD*) code three digestive enzymes that are involved in the breakdown of arabinose. They are clustered together as arabinose operon. These three proteins are dependent on initiation of transcription from a single promoter (*P<sub>BAD</sub>*). Transcription of these three genes requires the presence of the DNA template (promotor and operon), RNA Polymerase, a DNA binding protein called AraC and arabinose. AraC (a regulator protein) binds to the DNA at the binding site for the RNA Polymerase (the beginning of the arabinose operon). When arabinose is present in the environment, bacteria take it up. Once inside, the arabinose interacts directly with AraC which is bound to the DNA. The interaction causes AraC to change its shape which in turn promotes the binding of RNA Polymerase and the three genes (*araB*, *araA* and *araD*) are transcribed. In the absence of arabinose, the AraC returns to its original shape and transcription is shut off.



The DNA of the pGlo plasmid has been engineered to incorporate aspects of the arabinose operon. Both, the promoter *PBAD* and *araC* gene are present in the construct. However, the three genes *araB*, *araA* and *araD* have been replaced by a single gene which codes for the Green Fluorescent Protein (GFP). Therefore, in the presence of arabinose, the GFP gene is transcribed, and cells fluoresce green when exposed to UV radiation. In the absence of arabinose, the GFP gene is not transcribed, bacterial colonies will appear to have a wild type (natural) phenotype, with no fluorescence.

Appendix 2:

