

# Biotechnology Explorer™

## pGLO™ Bacterial Transformation Kit

Katalognummer

166-0003EDU

[explorer.bio-rad.com](http://explorer.bio-rad.com)

**Lagern Sie die Reagenzien dieses Kits bei Raumtemperatur.**

Das Vervielfältigen von Teilen dieses Dokuments ist nur für den Schulgebrauch erlaubt.



---

Für technische Unterstützung rufen Sie bitte ihre örtliche Bio-Rad Niederlassung an.  
Für die USA wählen Sie bitte: 1-800-4BIORAD (1-800-424-6723)

## Wie kann man mit Hilfe einer Qualle das Thema beleuchten?

Eine der größten Herausforderungen für Schüler, die das erste Mal mit der Biotechnologie bzw. Molekularbiologie in Kontakt kommen, ist die Tatsache, dass viele der untersuchten Ereignisse und Vorgänge unsichtbar sind. Das Biotechnology-Explorer-Programm hat die Lösung: ein Gen einer biolumineszenten Qualle und deren Grün Fluoreszierendes Protein (GFP). Wenn das GFP mit einer Handlampe, die langwelliges ultraviolettes Licht abgibt, betrachtet wird, so fluoresziert das Protein in strahlendem Grün.

Das *Wild-Typ-Gen* für GFP wurde ursprünglich aus der Quallenart *Aequorea victoria* isoliert und von der Firma Maxygen Inc., einer Biotechnologie-Firma aus Santa Clara in Kalifornien, verändert. Spezifische Mutationen, die in die DNA-Sequenz eingeführt wurden, führen zu einer vielfachen Verstärkung der Fluoreszenz des Proteins. Diese veränderte Form des GFP-Gens wurde in das pGLO-Plasmid von Bio-Rad eingefügt und ist nun ausschließlich über Bio-Rad für Bildungszwecke erhältlich.

GFP leuchtet unglaublich hell. Die Schüler können daher die Genexpression in Echtzeit beobachten, wenn pGLO zur Transformation von Bakterien eingesetzt wird. Im Anschluss an die Transformation erlaubt das GFP Purification Kit den Schülern die Aufreinigung des GFP aus den transformierten Bakterien mittels eines einfachen Chromatographie-Verfahrens. Man kann den gesamten Vorgang mit Hilfe der UV-Handlampe verfolgen.

## Angeleitetes Forschen

Das Ziel dieses Lehrstoffs ist es die Schüler durch den Denkprozess zu führen, der Teil der wissenschaftlichen Vorgehensweise innerhalb eines Labors ist. Das Hauptaugenmerk liegt hier nicht so sehr auf der Lösung oder dem Ergebnis, sondern eher wie das Ergebnis erreicht wurde und wie es durch sorgfältige Beobachtung und Analyse untermauert werden kann. Dieses Verfahren kann als angeleitete fragend-vorgehende Laboruntersuchung bezeichnet werden.

Auf jedem Schritt dieses Weges wird Wert darauf gelegt, dass die Schüler den Fortgang des Experiments und die Vorgehensweise bei der Auswertung der Messdaten verstehen. Anstatt den Schüler die Erklärungen und Deutungen vorzugeben, stellt das *Schülerhandbuch* eine Reihe von Fragen, um das Nachdenken über alle Gesichtspunkte des Experiments zu schärfen und anzuregen. Die Antworten werden im *Lehrkraft-Leitfaden zu den Lösungen* bereit gestellt.

Die intensive Beteiligung der Schüler an diesem Prozess wird zu einem verbesserten Verständnis wissenschaftlicher Vorgänge führen und das organisierte und logisch richtige Herangehen an eine gestellte Aufgabe aufwerten. Weiterhin erwarten wir, dass Schüler, die sich verstärkt auf diese Art des Arbeitens einlassen, eine positivere Wahrnehmung ihre Fähigkeit entwickeln den wissenschaftlichen Erkenntnisprozess zu verstehen.

Dieser Lehrstoff auf Basis des GFP von Bio Rad ist einzigartig und hat eine beispiellose Begeisterung unter Lehrkräften ausgelöst, die Naturwissenschaften unterrichten. Wir streben eine kontinuierliche Verbesserung von Lehrstoff und Produkten an. Ihre Beteiligung ist ausserordentlich wichtig für uns. Wir freuen uns auf ihre Erfahrungen, Kommentare und Vorschläge.

Ron Mardigian

Direktor, Biotechnology Explorer Program, Bio-Rad Laboratories

[ron\\_mardigian@bio-rad.com](mailto:ron_mardigian@bio-rad.com)

# INHALTSVERZEICHNIS

## Lehrkraft-Leitfaden

Einführung in die Transformation .....	5
Das pGLO-System .....	5
Kontrollliste der Kit-Bestandteile.....	7
Umsetzung des Zeitplans .....	8
Herausstellung wichtiger Unterrichtsabschnitte.....	8
Allgemeine Laborfertigkeiten.....	9
Einzelheiten zum Experiment.....	11
Begriffserklärungen.....	12
Vorbereitungen der Lehrkraft - Überblick .....	14
Arbeitsplatz-Kontrollliste .....	14
Vorbereitungen der Lehrkraft - Leitfaden.....	16
Transformation Kit - Kurzanleitung.....	22
Lehrkraft-Leitfaden zu den Lösungen .....	24

## Schüler-Handbuch

Unterrichtseinheit 1	Einführung in die Transformation .....	37
	Zentrale Fragen.....	38
Unterrichtseinheit 2	Transformationspraktikum .....	41
	Fragen zur Überprüfung.....	46
Unterrichtseinheit 3	Datenerfassung und Auswertung.....	47
	Auswertung der Ergebnisse .....	48
	Fragen zur Überprüfung.....	49
Unterrichtseinheit 4	Zusatzaufgabe: Berechnung der Transformationseffizienz .....	51

## Anhänge

Anhang A	Historische Anknüpfungspunkte der Biotechnologie.....	57
Anhang B	Glossar der Fachbegriffe .....	61
Anhang C	Grundlegende Fachausdrücke und Begriffe der Molekularbiologie .....	64
Anhang D	Genregulation .....	70
Anhang E	Quellenangaben .....	73

## Einführung in die Transformation

Während dieses Praktikums werden Ihre Schüler eine Methode kennen lernen, die als genetische Transformation bekannt ist. Eine genetische Transformation findet statt, wenn eine Zelle neues genetisches Material (DNA) aufnimmt und exprimiert. Dieses neue genetische Material stattet den Organismus oft mit einem neuen Merkmal aus, das nach der Transformation identifiziert werden kann. „Genetische Transformation“ bedeutet dem Wortsinn nach „Veränderung, die durch Gene hervorgerufen wird“. Zu dieser Veränderung gehört das Einfügen von einem oder mehreren Genen in einen Organismus, um die Merkmale dieses Organismus zu verändern.

Die genetische Transformation wird in vielen Bereichen der Biotechnologie angewendet. In der Landwirtschaft werden Gene, die für Kälte-, Schädlings- und Dürresistenz kodieren, mittels genetischer Transformation in Pflanzen eingefügt. Im Bereich Bioremediation werden beispielsweise Bakterien mit Genen transformiert, die es den Zellen erlauben Erdöl-Teppiche biologisch abzubauen. In der Medizin können Krankheiten, die durch nicht-funktionsfähige Gene hervorgerufen werden, mit Hilfe der Gentherapie behandelt werden, das bedeutet durch genetische Transformation der Zellen eines Kranken mit einer funktionstüchtigen, gesunden Version des krankheitsauslösenden Gens.

Gene können aus menschlicher, tierischer oder pflanzlicher DNA heraus geschnitten und in Bakterien gesetzt werden. So kann z. B. das gesunde menschliche Gen für das Hormon Insulin in Bakterien transformiert werden. Geeignete Bedingungen vorausgesetzt, können diese Bakterien echtes menschliches Insulin herstellen. Dieses Insulin kann dann zur Behandlung von Patienten eingesetzt werden, die unter Diabetes leiden – einer Krankheit, die durch nicht normal funktionierende Insulingene hervorgerufen wird.

## Das pGLO-System

Mit Hilfe des pGLO Transformation Kits können Schüler eine einfache Methode anwenden, um Bakterien mit einem Gen zu transformieren, das für das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) kodiert. Der Ausgangsorganismus dieses Gens ist die biolumineszente Qualle *Aequorea victoria*, deren GFP fluoresziert und die Qualle im Dunkeln leuchten lässt. Nach erfolgter Transformation exprimieren die Bakterien das neu erworbene Quallengen und stellen das fluoreszierende Protein her, welches nach Anregung durch ultraviolettes Licht ein hellgrünes Leuchten erzeugt.

In diesem Versuch erlernen die Schüler den Vorgang der Übertragung von Genen zwischen verschiedenen Organismen - ein Verfahren, das mit Hilfe eines Plasmids abläuft. Bakterien besitzen natürlicherweise ausser einem großen Chromosom noch ein oder mehrere ringförmige DNA-Elemente, die Plasmide genannt werden. Die Plasmid-DNA enthält normalerweise Gene für ein oder mehrere Merkmale, die das Überleben von Bakterien begünstigen. In der Natur können Bakterien Plasmide untereinander austauschen, was ihnen ermöglicht diese nützlichen Gene miteinander zu teilen. Dieser natürliche Mechanismus ermöglicht den Bakterien sich an neue Umweltbedingungen anzupassen. Die neuerlich vermehrt auftretenden bakteriellen Antibiotika-Resistenzen lassen sich auf die Übertragung von Plasmiden zurückführen.

Bio-Rads einzigartiges pGLO-Plasmid trägt das GFP-Gen und ein weiteres Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin vermittelt. Weiterhin enthält das pGLO-Plasmid ein spezielles Genregulationssystem,

das es erlaubt die Expression des fluoreszierenden Proteins in den transformierten Zellen zu kontrollieren. Das GFP-Gen kann in den transformierten Zellen durch einfaches Hinzufügen des Zuckers Arabinose zum Nährmedium angeschaltet werden. Das Wachstum auf Ampicillin-haltigen Platten wird zur Selektion auf pGLO-transformierte Zellen durchgeführt. Transformierte Zellen erscheinen auf Platten ohne Arabinose weiss (Phänotyp des Wild-Typs), auf Platten mit Arabinose als Bestandteil des Nähragars fluoreszieren sie grün. Der einzigartige Aufbau des pGLO-Plasmids erlaubt es Lehrkräften und Schülern zum ersten Mal die Mechanismen der Genregulation (Anhang D) und genetischen Selektion in einfacher Art und Weise zu untersuchen. Ausserdem ist der gesamte Vorgang mit einer in der Anschaffung günstigen UV-Lampe zu beobachten.

Um von diesem Experiment profitieren zu können, sollten Ihre Schüler zum einen wissen, was ein Gen ist und zum anderen die Beziehung zwischen Genen und Proteinen verstehen. Für eine detailliertere Erörterung dieser und anderer molekularbiologischer Grundsätze und Fachbegriffe verweisen wir auf die Übersicht in Anhang B.

Dieses pGLO Transformation Kit bietet die Möglichkeit für ein zusätzliches Praktikum, das eine Aufreinigung des rekombinanten fluoreszierenden Proteins aus transformierten Bakterien mit Hilfe des GFP Chromatography Kits (Katalog-Nummer 166-0005EDU) umfasst.

## Kontrollliste der Kit-Bestandteile (V)

Dieser Abschnitt zeigt eine Aufstellung der Bestandteile des Transformation-Kit. Es wird auch zusätzlich benötigtes Zubehör aufgelistet. Jedes Kit enthält genügend Material um 8 Schülerarbeitsplätze auszurüsten. Bitte benutzen Sie diese Liste, um die Vollständigkeit aller Bestände und Vorräte zu prüfen bevor das Experiment durchgeführt wird. Alle Bestandteile des Kits können bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur gelagert werden.

### Bestandteile des Kits

Bestandteile des Kits	Klassensatz	(V)
1. <i>E. coli</i> HB101 K-12, lyophilisiert	1 Fläschchen	<input type="checkbox"/>
2. Plasmid (pGLO), lyophilisiert, 20 µg	1 Fläschchen	<input type="checkbox"/>
3. Ampicillin, lyophilisiert, 30 mg	1 Fläschchen	<input type="checkbox"/>
4. L (+) Arabinose, lyophilisiert, 600 mg	1 Fläschchen	<input type="checkbox"/>
5. Transformationslösung (50 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 6.1), steril, 15 ml	1 Flasche	<input type="checkbox"/>
6. LB-Nährlösung, steril, 10 ml	1 Flasche	<input type="checkbox"/>
7. LB-Nähragarpulver, steril (reicht für 500 ml)	1 Tüte	<input type="checkbox"/>
8. Pipetten, steril und einzeln verpackt	50	<input type="checkbox"/>
9. Impfösen, steril, 10 µl, Packung à 10 Ösen	8 Packungen	<input type="checkbox"/>
10. Petrischalen, 60 mm, steril, Packung à 20	2 Tüten	<input type="checkbox"/>
11. Mikroreaktionsgefäße, 2,0 ml (jeweils 10: gelb, grün, blau, orange, lila, rosa)	60	<input type="checkbox"/>
12. Schaumswimmer für Reaktionsgefäße	8	<input type="checkbox"/>
13. Handbuch (Instruction manual)	1	<input type="checkbox"/>

### Benötigtes Zubehör – nicht im Kit enthalten

1. UV-Lampe, langwellig (Katalog-Nummer 166-0500EDU)	1 erforderlich	<input type="checkbox"/>
2. Uhr oder Wecker um 50 Sekunden einzustellen	1 erforderlich	<input type="checkbox"/>
3. Mikrowellengerät	1 erforderlich	<input type="checkbox"/>
4. 37°C Inkubationsofen (Katalog-Nummer 166-0501EDU)*	1 unverbindlich	<input type="checkbox"/>
5. Wasserbad mit Temperaturkontrolle, 1-6 Liter (Katalog-Nummer 166-0508EDU)**	1 erforderlich	<input type="checkbox"/>
6. Thermometer zur Bestimmung von 42°C	1 erforderlich	<input type="checkbox"/>
7. Flasche mit 1 Liter Fassungsvermögen	1 erforderlich	<input type="checkbox"/>
8. 500 ml Messzylinder	1 erforderlich	<input type="checkbox"/>
9. Destilliertes Wasser (vom Supermarkt), 500 ml	1 erforderlich	<input type="checkbox"/>
10. Zerstoßenes Eis und Behälter (z. B. Styroporbecher)	1-8	<input type="checkbox"/>
11. 10 ml Bleichlösung (Hauhaltsbleiche)	10 ml	<input type="checkbox"/>
12. Filzstifte (Permanent Marker)	4-8	<input type="checkbox"/>

\*Falls ein Inkubationsofen nicht zur Verfügung steht, können Sie versuchen eine elektrische Heizdecke zu benutzen oder Sie konstruieren einen Inkubator mit einem Karton und einer Niedrigvolt-Glühbirne. Ansonsten werden die Agarplatten 48 bis 72 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (siehe „Allgemeine Laborfertigkeiten“).

\*\*Falls ein Wasserbad mit Temperaturkontrolle nicht vorhanden ist, benutzen Sie einen Styropor-Behälter für heisses Wasser. Benutzen Sie eine Heizplatte oder heisses Wasser aus dem Hahn, um das Wasser auf 42°C zu bringen.

## Umsetzung des Zeitplans

Jede der drei Laborabschnitte ist so aufgebaut, dass er in aufeinanderfolgenden 50 Minuten-Zeiteinheiten durchgeführt werden kann. Das ausführliche Labor-Protokoll finden Sie im Schülerhandbuch.

### Vorschlag eines Labor-Ablaufplans für die Schüler

Tag 1	Vorbereitungen	Vortrag und Besprechung Vorüberlegungen 1-4 (Schülerhandbuch)
Tag 2	Praktikum Transformation	Transformation der Zellen und Ausplattieren Zentrale Fragen zum Schüler-Praktikum
Tag 3	Datenerfassung und Analyse	Begutachten der Transformanden und Kontrollen Analyse und Auswertung der Ergebnisse Schüler-Überlegungen
Tag 4	Ergänzende Aktivitäten	Berechnung der Transformationseffizienz GFP Chromatography Kit (Katalognummer 166-0005EDU)

## Herausstellung wichtiger Unterrichtsabschnitte

Dieser Abschnitt beschreibt experimentelle und begriffliche Fragen/Punkte, die sich als schwierig für die Schüler erweisen können. Diese Punkte sind sehr wichtig, um ein erfolgreiches Ergebnis des Versuchs zu erzielen. Die Anleiter sollen die Aufmerksamkeit der Schüler auf diese Punkte richten und, wenn möglich, die entsprechende Technik vorführen bevor die Schüler diese selbstständig versuchen durchzuführen.

Es ist sehr wichtig die Schüler darauf hinzuweisen, dass sie die entsprechenden Reagenzien sowohl in die richtigen Reaktionsgefäße füllen als auch die Zellen auf die richtigen Agarplatten ausbringen. Daher ist es entscheidend für die problemlose Durchführung des Experiments, die Reaktionsgefäße deutlich zu beschriften und im allgemeinen gut vorbereitet und organisiert zu sein. Die Kurzanleitung unterstützt die Gliederung des Laborpraktikums. Dieses graphische Laborprotokoll liefert Abbildungen zu allen praktischen durchzuführenden Schritten während des Ablaufs der Transformation.



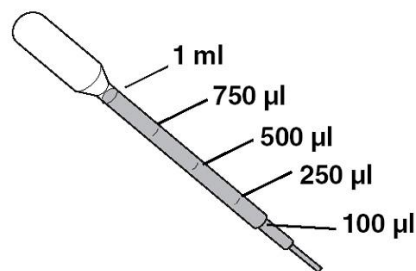
# Allgemeine Laborfertigkeiten

## Steriltechnik

Bei Anwendung jedweder mikrobiologischen Technik (d.h. beim Arbeiten mit bzw. Kultivieren von Bakterien) ist es wichtig keine kontaminierenden Bakterien in das Experiment einzuführen. Weil kontaminierende Bakterien allgegenwärtig sind und sich z.B. auf Fingerkuppen, Laborbänken usw. finden, ist es wichtig Kontakt mit diesen Oberflächen zu vermeiden. Wenn die Schüler mit Impfösen, Pipetten und Agarplatten arbeiten, sollten Sie betonen, dass das Ende der Öse, die Spitze der Pipette und die Oberfläche der Agarplatte nicht berührt oder in Kontakt mit kontaminierenden Oberflächen gebracht werden sollten. Obwohl ein geringes Maß an Kontaminationen wahrscheinlich nicht das Experiment ruinieren wird, werden die Schüler von einer Einführung in das Prinzip des sterilen Arbeitens sicher profitieren, denn die Anwendung der Steriltechnik gehört zum Thema Sauberkeit und Sicherheit im Zusammenhang mit der menschlichen Gesundheit.

## Handhabung der Pipette

Vor dem Einstieg in die Laborabschnitte sollten Sie die Schüler auf die Pipetten-Skalierung aufmerksam machen. Im Verlaufe des Praktikums werden sowohl die 100 und 200  $\mu\text{l}$  als auch die 1 ml Markierungen zur Bestimmung dieser Maßeinheiten benutzt werden.



## Arbeiten mit *E. coli*

Sowohl der Wirtsorganismus des Kits, ein K-12 Stamm von *E.coli*, als auch der das rekombinante GFP-Gen beinhaltende Vektor und die durch deren Kombination entstehenden Transformanten sind nicht pathogen im Gegensatz zu dem in den Nachrichten erwähnten *E. coli* Stamm O157:H7. Trotzdem ist bei Handhabung der *E. coli* K12-Mengen dieses Transformation-Kits die Beachtung der Grundsätze der allgemeinen mikrobiologischen Arbeitstechniken notwendig. Diese Techniken schließen die im folgenden erwähnten Arbeitsschritte ein – sind aber nicht auf diese beschränkt. Die Arbeitsoberflächen werden einmal täglich sowie nach jedem Verschütten lebenden Materials dekontaminiert. Sämtliche flüssigen und festen kontaminierten Abfälle werden vor der Entsorgung dekontaminiert. Alle Personen sollen (i) nach der Arbeit mit Organismen, die rekombinante DNA-Moleküle enthalten und (ii) vor Verlassen des Labors, ihre Hände waschen. Alle Arbeitsschritte im Labor sollen mit der gebotenen Sorgfalt durchgeführt werden, um die Bildung von Aerosolen zu vermeiden. Mechanische Pipettierhilfen werden verwendet. Das Pipettieren mit dem Mund ist verboten. Essen, trinken, rauchen und das Auftragen von Kosmetik sind im Arbeitsbereich nicht erlaubt. Das Tragen von schützenden Laborbrillen und –handschuhen wird dringend empfohlen.

## Dekontamination und Entsorgung

Falls ein Autoklav nicht verfügbar ist, können sämtliche Lösungen und Bestandteile des Kits (Impfösen und Pipetten), die mit Bakterien in Kontakt gekommen sind, zum Zweck der Sterilisation für 20 Minuten in eine frisch angesetzte 10% Bleichlösung getaucht werden. Eine flache Schale mit dieser Lösung sollte an jeden Arbeitsplatz gestellt werden. Alle Impfösen und Pipetten sollten für eine Sterilisation gesammelt werden, egal welche Methode der Sterilisation Sie wählen. Sterilisieren Sie die Petrischalen durch Bedecken des Agars mit einer 10% Bleichlösung. Lassen Sie die Petrischalen für 1 Stunde oder länger stehen und gießen Sie anschließend die überschüssige Flüssigkeit in den Ausguss. Einmal sterilisiert können die Agarplatten, doppelt verpackt, als normaler Abfall entsorgt werden. Bei der Arbeit mit Bleichlösung werden Sicherheits-Laborbrillen empfohlen.

## UV-Lampen

Ultraviolette (UV) Strahlung kann die Haut und die Augen schädigen. Kurzwelliges UV-Licht ist schädlicher als langwelliges UV-Licht. Die Bio-Rad UV-Lampe, die für dieses Labormodul empfohlen wird, gibt langwelliges UV-Licht ab. Falls möglich sollten Sie UV-Licht undurchlässige Sicherheits-Laborbrillen verwenden.

## Inkubation

Diese Anweisung beschreibt den Gebrauch eines 37°C Inkubators. Das Transformationsexperiment kann allerdings auch ohne die Verwendung eines Inkubators durchgeführt werden, die Anzahl der für die Kultivierung von Kolonien optimaler Größe benötigten Tage hängt aber von der Umgebungstemperatur ab. Die besten Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn die Kolonien der „Starter-Platte“ frisch sind (24 bis 48 Stunden Wachstum) und einen Durchmesser von ungefähr 1 bis 1,5 mm aufweisen. **Die Aufbewahrung der Kulturplatten im Kühlschrank führt zu einer signifikant niedrigeren Effizienz der Transformation.** 37°C (98.6°F) ist die optimale Temperatur für das Wachstum von *E. coli* – niedrigere Temperaturen führen zu einer verringerten Wachstumsrate. Bei einer Temperatur von 28°C (82°F) wird eine Inkubationszeit von zwei Tagen benötigt, um eine optimale Koloniegröße zu erreichen. 21°C (70°F) führt nach drei Tagen Inkubationszeit zu optimaler Koloniegröße. Passen Sie die Vorbereitungszeiten und den Ablaufplan des Praktikums den von Ihnen gewählten Inkubationstemperaturen an.

## **Einzelheiten zum Experiment**

### **Üben der Techniken**

Einige Ausbilder ziehen es vor Trockenübungen durchzuführen, um die Steriltechnik, den Gebrauch der Pipetten und Impfösen sowie die Steriltechnik und das Ausplattieren der Bakterien auf der Agaroberfläche zu demonstrieren. Die etwaige Laborerfahrung und Vertrautheit der Schüler mit diesen Techniken zugrunde legend, müssen Sie entscheiden welches Vorgehen das beste für Ihre Schüler ist.

### **Übertragen von Bakterienkolonien von Agarplatten in Reaktionsgefäße**

Der Versuch eine einzelne Kolonie von der "Starter-Platte" zu kratzen führt zur Versuchung mehr Zellen als notwendig zu nehmen. Eine einzelne Kolonie mit ungefähr 1 mm Durchmesser enthält 1 Million Bakterienzellen.

### **DNA-Transfer**

Der Transfer von Plasmid-DNA aus dem Reaktionsgefäß in die Transformationslösung ist entscheidend. Die Schüler müssen die Impföse genau betrachten, um einen Film der Plasmid-Lösung in der Öse zu erkennen. Es sieht ähnlich aus wie der Film einer Seifenlösung in einem Drahttring wenn man Seifenblasen macht.

### **Hitzeschock**

Der Vorgang, der verwendet wird, um die Aufnahme fremder DNA durch Bakterien zu steigern wird Hitzeschock genannt. Es ist wichtig, dass die Schüler den zeitlichen Anweisungen des Protokolls folgen. Ausserdem ist der schnelle Temperaturwechsel und die Dauer des Hitzeschocks wichtig. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, müssen die Reaktionsgefäße, die die Zellsuspension enthalten, direkt vom Eis in das 45°C warme Wasserbad transferiert und nach 50 Sekunden wieder zurück in das Eis gestellt werden. Das Ausbleiben des Hitzeschocks führt beispielsweise zu einer 10-fachen Abnahme der Transformanden während ein 90 Sekunden andauernder Hitzeschock nur halb so viele Transformanden ergibt wie ein 50 Sekunden langer Hitzeschock. So oder so wird das Experiment dennoch funktionieren.

### **Ausplattieren der Transformanden und Kontrollen**

Mehr Kulturvolumen der Transformanden als im Protokoll angegeben mit den Pipetten auf die Platten aufzubringen macht keinen Sinn, da die Platten die zusätzliche Flüssigkeit nicht aufnehmen können und daher das Ausplattieren ungleichmäßig wäre. Das Übertragen der Bakteriensuspension von den Reaktionsgefäßen auf die Petrischalen erfordert einige Sorgfalt. Die Bakterien werden sich auf dem Boden absetzen, deshalb können die Schüler den oberen Teil des geschlossenen Reaktionsgefäßes zwischen Zeigefinger und Daumen halten während sie den unteren Teil des Gefäßes mit dem Zeigefinger der anderen Hand anschnipsen. Stellen Sie sicher, dass die Schüler das Gefäß mit ihren Fingern antippen oder die Suspension vor dem Aufziehen mit der Pipette umrühren. Stellen Sie zudem sicher, dass die Schüler die Petrischale sofort nach dem Pipettieren und Ausplattieren der Transformationskulturlösung mit dem Deckel verschließen.

### **GFP Chromatographie-Kit**

Falls Sie planen an das pGLO-Transformationsexperiment das GFP-Aufreinigungs-Experiment (166-0005EDU) anzuschließen, müssen Sie die mit dem pGLO-Plasmid transformierten Bakterien, die auf den LB/amp/ara Platten gewachsen sind, aufbewahren. Die beste Art und Weise die Platten aufzubewahren ist die Lagerung an einem kühlen Ort, wie z.B. einem Kühlschrank, und zwar mit der Medienunterseite der Petrischale nach oben. So bleiben die Zellen am Leben, schränken aber ihr aktives Wachstum ein bis Sie diese wieder für das nächste

Experiment benötigen. Die Lagerung "auf dem Kopf" verhindert, dass das Kondenswasser auf dem Medium zu einem Verwischen der Kolonien führt.

Idealerweise sollten die Platten innerhalb von 1 bis 2 Wochen benutzt werden. Für eine längere Lagerung sollten Sie sicherstellen, dass die Platten mit Parafilm umwickelt werden, um einen Flüssigkeitsverlust zu vermeiden.

## **Begriffserklärungen**

### **Medien**

Die flüssigen und festen Medien, nachstehend bezeichnet als LB (benannt nach Luria und Bertani) Nährlösung und LB Nähragar, werden aus einem Hefeextrakt und einem Enzymverdau von Fleischnebenprodukten hergestellt, welche eine Mischung von Kohlenhydraten, Aminosäuren, Nukleotiden, Salzen und Vitaminen liefern, die alle jeweils Nährstoffe für bakterielles Wachstum sind. Agar, der aus Algen hergestellt wird, schmilzt wenn er erhitzt wird und formt nach Abkühlung ein festes Gel (entsprechend Jell-O). Dieses Agargel liefert eine feste Unterlage, auf der Bakterien kultiviert werden können.

### **Antibiotische Selektion**

Das pGLO-Plasmid, enthält sowohl das GFP-Gen als auch das Gen für beta-Lactamase, welche eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin vermittelt. Das beta-Lactamaseprotein wird von Bakterien, die das Plasmid enthalten, produziert und ausgeschieden. Die beta-Lactamase inaktiviert Ampicillin, das Bestandteil des LB Nähragars ist, und ermöglicht somit bakterielles Wachstum. Auf Agarplatten, die Ampicillin enthalten, können nur solche Bakterien überleben, die mit dem Plasmid transformiert sind und das beta-Lactamasegen exprimieren. Nur eine sehr geringe Anzahl der Zellen nimmt das Plasmid auf und wird dadurch transformiert. Nicht transformierte Zellen können nicht auf den Ampicillin-haltigen Selektionsplatten wachsen.

### **Transformationslösung**

Es wird angenommen, dass das  $\text{Ca}^{2+}$ -Kation der Transformationslösung (50 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 6,1) die abstoßenden negativen Ladungen des Phosphat-Rückgrats der DNA und die Phospholipide der Zellmembran neutralisiert und so der DNA ermöglicht in die Zelle zu gelangen.

### **Hitzeschock**

Der Hitzeschock erhöht die Permeabilität der Zellmembran in Bezug auf die DNA. Der Mechanismus ist nicht bekannt, die Dauer des Hitzeschocks ist jedoch entscheidend und wurde auf die verwendeten Bakterien und die angewendeten Transformationsbedingungen hin optimiert.

### **Erholung**

Die 10-minütige Inkubationszeit, die dem Zusatz von LB-Nährlösung folgt, erlaubt den Zellen zu wachsen und das Ampicillin-Resistenzprotein beta-Lactamase zu exprimieren, so dass die transformierten Zellen auf den folgenden Ampicillin-Selektionsplatten überleben können.

Die Erholungskultur kann bei Raumtemperatur oder über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert werden, um die Transformationseffizienz um das 10-fache zu steigern.

### **Genregulation von pGLO**

Die Genexpression in allen Organismen wird sorgfältig reguliert, um eine Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen zu ermöglichen und die verschwenderische Überproduktion nicht benötigter Proteine zu verhindern. Gene, die am Abbau verschiedener Nahrungsquellen beteiligt sind, sind gute Beispiele für hoch

regulierte Gene. Der einfache Zucker Arabinose ist z.B. sowohl eine Energie- als auch eine Kohlenstoffquelle für Bakterien. Die Bakteriengene, die verdauende Enzyme für den Abbau von Arabinose zu Nahrungszwecken kodieren, werden nicht exprimiert wenn Arabinose nicht im Aussenmedium vorhanden ist. Wenn Arabinose allerdings vorhanden ist, werden diese Gene angeschaltet. Wenn Arabinose sich erschöpft werden die Gene wieder abgeschaltet.

Die Arabinose löst die Transkription dieser Gene aus, indem es die Bindung der RNA-Polymerase begünstigt. Innerhalb des pGLO-Plasmids wurden einige der Gene, die am Abbau der Arabinose beteiligt sind, mit dem Quallengen ausgetauscht, das für das GFP kodiert. Wenn Bakterien, die mit der DNA des pGLO-Plasmids transformiert wurden, in der Anwesenheit von Arabinose kultiviert werden, wird das GFP-Gen angeschaltet und die Bakterien leuchten nach Bestrahlung mit UV-Licht hellgrün.

Dies ist ein hervorragendes Beispiel für das „Zentrale Dogma der Molekularbiologie“:

DNA => RNA => PROTEIN => MERKMAL. Wenn Arabinose im Nährmedium fehlt, bleibt das GFP-Gen abgeschaltet und die Kolonien erscheinen weiss. Eine detailliertere Beschreibung und Analyse der Genregulation und der Funktion des Arabinose-Promotors wird im Anhang D gegeben.

## Vorbereitungen der Lehrkraft - Überblick

Dieser Abschnitt umfasst den vorgeschlagenen Ablaufplan für die Vorbereitungen von Seiten der Lehrkraft. Der ausführliche Plan für die Vorbereitungen findet sich unter „Vorbereitungen der Lehrkraft – Leitfaden“.

<b>Lehrkraft</b>	<b>Vorbereitungen</b>	<b>Wann</b>	<b>Zeit</b>
Schritt 1	Lesen Sie das Transformations-Handbuch Fertigen Sie Kopien des Schüler-Handbuchs und der Kurzanleitung für jeden Schüler an.	Sofort	1 Stunde
Schritt 2	Stellen Sie die Nähragarplatten her	3–7 Tage vor Praktikum 1	1 Stunde
Schritt 3	Bereiten Sie die „Starter-Platten“ vor Aliquotieren Sie die Lösungen	24–36 Stunden vor Praktikum 1	30 Minuten
Schritt 4	Bauen Sie die Schüler-Arbeitsplätze auf	vor Praktikum 1	10 Minuten

## Arbeitsplatz-Kontrollliste (V)

**Schüler-Arbeitsplätze.** Materialien und Vorräte, die vor Beginn der Laborexperimente an jedem Arbeitsplatz vorhanden sein sollten, sind unten aufgelistet. Die Bestandteile, die mit diesem Kit bereit gestellt werden, reichen für 8 vollständige Schüler-Arbeitsplätze aus.

**Arbeitsplatz der Lehrkraft (allgemein).** Eine Aufstellung der Materialien, Vorräte und Geräte, die an einem für alle Schülergruppen zugänglichen Ort zu finden sein sollen, sind unten aufgelistet. Es ist der Lehrkraft überlassen, ob die Schüler Zugang zu den gemeinsamen Puffern und Lösungen haben sollen oder ob die Lehrkraft die Lösungen in Reaktionsgefäßen aliquotiert.

## Unterrichtseinheit 2 Transformations-Praktikum

<b>Schüler-Arbeitsplätze</b>	<b>Benötigte Anzahl</b>	<b>(V)</b>
<i>E. coli</i> “Starter-Platte” (LB)	1	<input type="checkbox"/>
Agarplatten, gegossen (1 LB, 2 LB/amp, 1 LB/amp/ara)	4	<input type="checkbox"/>
Transformationslösung	1	<input type="checkbox"/>
LB-Nährlösung	1	<input type="checkbox"/>
Impfösen	7 (1 Pkg à 10)	<input type="checkbox"/>
Pipetten	5	<input type="checkbox"/>
Reaktionsgefäß-Schwimmer (Schaum)	1	<input type="checkbox"/>
Zerstoßenes Eis und Behälter (z. B. Styroporbecher)	1	<input type="checkbox"/>
Filzstift (Permanent Marker)	1	<input type="checkbox"/>
<b>Arbeitsplatz der Lehrkraft (allgemein)</b>		
Rehydrierte pGLO-Plasmid DNA	1 Gefäß	<input type="checkbox"/>
Wasserbad 42°C und Thermometer	1	<input type="checkbox"/>
37°C Inkubator		<input type="checkbox"/>
(optional, siehe Allgemeine Laborfertigkeiten - Inkubation)	1	<input type="checkbox"/>

### Unterrichtseinheit 3 Datenerfassung und Analyse

<u>Schüler-Arbeitsplätze</u>	<u>Benötigte Anzahl</u>	<u>(V)</u>
Inkubierte Transformations- und Kontrollplatten:	Satz von jeweils 4	<input type="checkbox"/>
LB/amp/ara	1	<input type="checkbox"/>
LB/amp	2	<input type="checkbox"/>
LB	1	<input type="checkbox"/>
<b>Arbeitsplatz der Lehrkraft (allgemein)</b>		
UV-Lampe	1-8	<input type="checkbox"/>

## Vorbereitungen der Lehrkraft - Leitfaden

<u>Zielsetzung</u>	<u>Benötigte Zeit</u>	<u>Wann</u>	
Schritt 1	Vorbereitung der Agarplatten	1 Stunde	3-4 Tage vor Praktikum 1
Schritt 2	Rehydrierung <i>E. coli</i>	2 Minuten	24–36 Stunden vor Praktikum 1
	„Starter-Platten“ beimpfen	15 Minuten	
	Rehydrierung pGLO von Plasmid-DNA	2 Minuten	
Schritt 3	Aliquotieren der Lösungen	10 Minuten	vor Praktikum 1
	Aufbau der Arbeitsplätze	10 Minuten	

### Vorbereitungen Schritt 1: 3-7 Tage vor dem Transformationspraktikum

#### 1. Bereiten Sie Nähragar vor (ohne Autoklavieren)

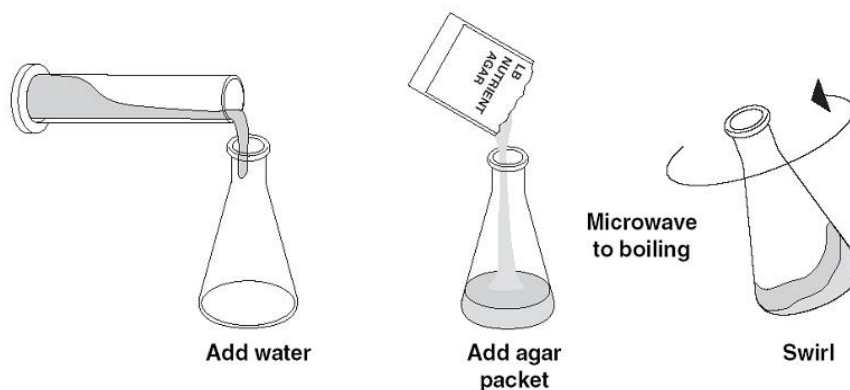
Die Agarplatten sollten mindestens drei Tage vor der Durchführung des Schüler-Experiments hergestellt werden. Sie sollten bei Raumtemperatur für zwei Tage aufbewahrt werden und danach in einem Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert werden. Die zwei Tage lange Lagerung auf der Laborbank lässt den Agar so weit austrocknen, dass er später die Transformationslösung bereitwillig aufnehmen kann (Schüler-Unterrichtseinheit 2).

Zur Herstellung des Agars werden 500 ml destilliertes Wasser in einen Erlenmeyerkolben mit 1 L oder mehr Fassungsvermögen gegeben. Fügen Sie den gesamten Inhalt der Packung mit LB Nähragar in den Kolben.

Schwenken Sie die Flasche, um den Agar zu lösen und erhitzen Sie in einer Mikrowelle bis zum Kochen.

Wiederholen Sie das Erhitzen und Schwenken etwa dreimal bis der gesamte Agar gelöst ist (bis keine durchsichtigen Klümpchen mehr in der Lösung treiben). Aber achten Sie darauf die Flasche etwas abkühlen zu lassen bevor Sie schwenken, damit das heiße Medium nicht überkocht und Ihre Hand verbrüht.

Wenn der gesamte Agar gelöst ist, lassen Sie den LB-Nähragar soweit abkühlen bis die Aussenfläche des Kolbens 50°C erreicht hat und Sie den Kolben anfassen können. Während der Agar abkühlt, sollten Sie die Platten markieren und die Arabinose- und Ampicillin-Lösungen vorbereiten (siehe unten). Achten Sie darauf den Agar nicht soweit abkühlen zu lassen, dass er beginnt sich zu verfestigen.



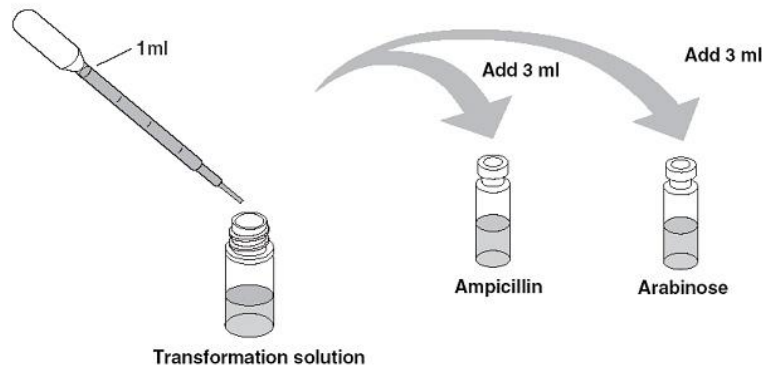


## 2. Vorbereiten der Arabinose- und Ampicillin-Lösungen

**Beachten Sie:** Die Arabinose benötigt mindestens 10 Minuten, um sich zu lösen – seien sie nicht ungeduldig.

Die Arabinose wird in einem Gläschen in getrockneter Form angeliefert. Fügen Sie mit einer sterilen Pipette 3 ml der Transformationslösung direkt in das Gläschen, um den Zucker zu rehydrieren. Mischen Sie den Inhalt des Gläschens, die Verwendung eines Vortexers hilft dabei. (Die Transformationslösung wird hier aus praktischen Gründen verwendet, weil sie eine sterile Lösung ist. Steriles Wasser würde den gleichen Zweck erfüllen.)

Ampicillin wird ebenfalls in einem Gläschen in getrockneter Form angeliefert. Fügen Sie mit einer neuen sterilen Pipette 3 ml Transformationslösung direkt in das Gläschen, um das Antibiotikum zu rehydrieren. (Die Transformationslösung wird hier aus praktischen Gründen verwendet, weil sie eine sterile Lösung ist. Steriles Wasser würde den gleichen Zweck erfüllen.)



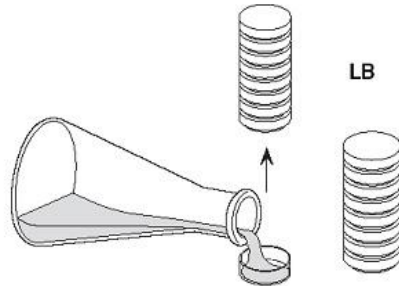
**Beachten Sie:** Übermäßige Hitze ( $>50^{\circ}\text{C}$ ) zerstört Ampicillin und Arabinose, der Nähragar verfestigt sich aber bei  $27^{\circ}\text{C}$ . Also muss man das Abkühlen des Agars aufmerksam verfolgen und die Agarplatten dann nach Beginn ohne Unterbrechung gießen. Überschüssige Blasen kann man folgendermaßen entfernen nachdem alle Platten gegossen sind: Durch kurzes Abflammen der Oberfläche jeder Platte mit der Flamme eines Bunsenbrenners. Nachdem die Platten gegossen sind sollten Sie diese so lange nicht bewegen bis der Agar fest geworden ist. Gießen Sie überschüssigen Agar in den Müll – nicht in den Ausguss. Wischen Sie etwaige Agartropfen von der Seite der Petrischalen.

## 3. Beschriften Sie die Platten

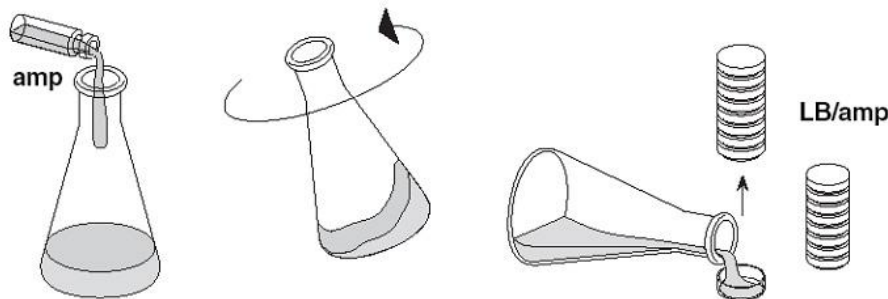
Die 40 bereitgestellten Agarplatten sollten mit einem Stift (Permanent Marker) auf der Unterseite der Petrischale in der Nähe des Randes beschriftet werden. Beschriften Sie 16 Platten mit „LB“, 16 Platten mit „LB/amp“ und 8 Platten mit „LB/amp/ara“.

#### 4. Gießen Sie LB-Nähragarplatten (LB, LB/amp, LB/amp/ara)

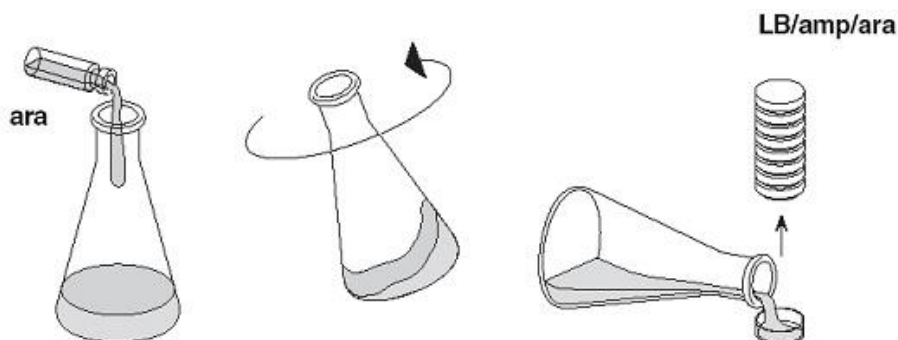
Erstens, gießen Sie LB-Nähragar in 16 Petrischalen, die mit „LB“ beschriftet sind. Stapeln Sie 4 bis 8 Stück der leeren Schalen übereinander und beginnen Sie bei der unteren Schale mit einer Hand deren Deckel mitsamt dem Stapel anzuheben und leicht seitlich zu versetzen, um mit der anderen Hand den LB-Nähragar einzugießen. Befüllen Sie die Schale etwa zu einem Drittel, maximal bis zur Hälfte (ca. 12 ml) mit Agar, schließen Sie den Deckel und arbeiten Sie sich in gleicher Weise weiter durch den Stapel. Gießen Sie auf diese Art und Weise 16 Platten und beschriften Sie diese mit „LB“. Lassen Sie die Platten im Stapel stehend abkühlen.



Zweitens, fügen Sie das gelöste Ampicillin zum übrig gebliebenen LB-Nähragar hinzu. Schwenken Sie kurz, um das Ganze zu vermischen. Gießen Sie mit der oben beschriebenen Technik 16 Platten, die mit „LB/amp“ beschriftet sind.



Drittens, fügen Sie die gelöste Arabinose zum übrig gebliebenen LB-Nähragar mit Ampicillin hinzu. Schwenken Sie kurz, um das Ganze zu vermischen und gießen Sie unter Anwendung der oben beschriebenen Technik 8 Platten, die mit „LB/amp/ara“ beschriftet sind.



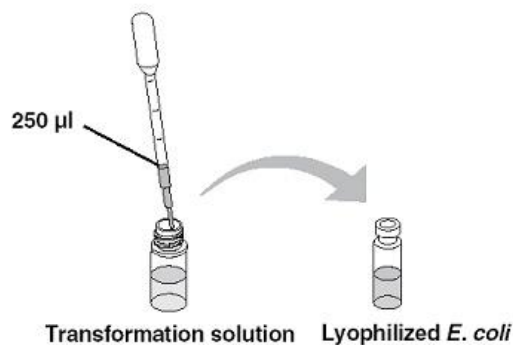
#### 5. Lagerung der Platten

Nachdem die Platten nach 2 Tagen bei Raumtemperatur ausgehärtet sind, können die Platten entweder sofort benutzt werden oder sie werden als Stapel von 20 Platten in der darüber gezogenen Plastiktüte gelagert. Der Stapel wird, nach Überstreifen der Plastiktüte, umgedreht, um die Platten „auf dem Kopf“ in einem Kühlschrank zu lagern.

## Vorbereitungen Schritt 2: 24-36 Std. vor dem Transformationspraktikum

### 1. Rehydrieren der Bakterien

Benutzen Sie eine sterile Pipette, um die gefriergetrockneten *E. coli* HB101 durch direktes Hinzufügen von 250 µl der Transformationslösung zu rehydrieren. Verschließen Sie das Gläschen und lassen Sie die Zellsuspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Schütteln Sie das Gläschen bevor Sie die Bakterien auf die LB-„Starter-Platten“ ausstreichen (Die Transformationslösung wird hier aus praktischen Gründen verwendet, weil sie eine sterile Lösung ist. Steriles Wasser würde den gleichen Zweck erfüllen.) Lagern Sie die rehydrierten Bakterien bis zum weiteren Gebrauch im Kühlschrank (die besten Ergebnisse erzielen Sie innerhalb von 24 Stunden, nicht länger als 3 Tage lagern).



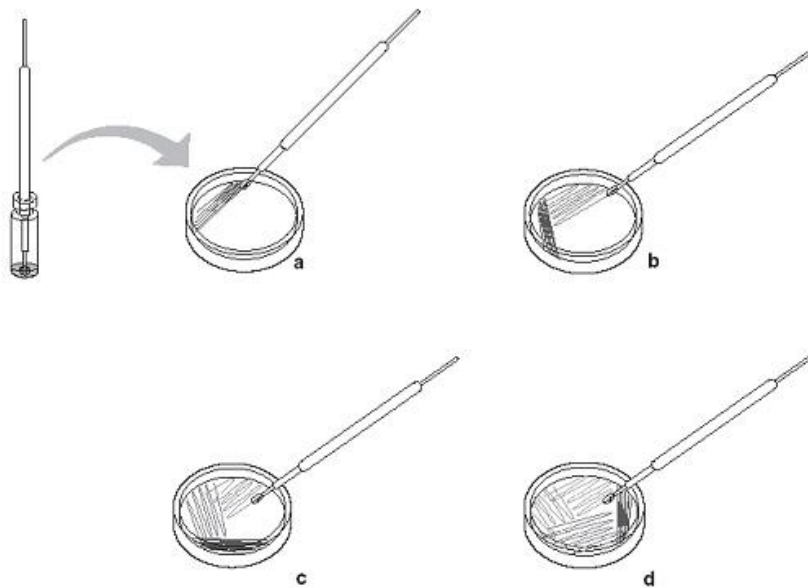
### 2. Ausstreichen auf „Starter-Platten“, um Einzelkolonien zu erhalten

Jede Praktikumsgruppe benötigt ihre eigene „Starter-Platte“ (Rezipienten-Kultur) als Ausgangsmaterial, um Zellen für die Transformation zu erhalten. Dieses Kit beinhaltet genügend Material, um acht komplette Schüler-Arbeitsplätze auszurüsten. Die LB-Platten sollten Bakterienausstriche mit Einzelkolonien aufweisen und 24-36 Stunden lang vor dem Transformations-Experiment bei 37°C inkubiert werden.

Benutzen Sie 8 LB-Nähragarplatten und die rehydrierten *E. coli* Bakterien, die Sie im letzten Schritt vorbereitet haben, um für jede Schülergruppe eine „Starter-Platte“ herzustellen. Der Sinn des Ausstreichens ist es, ausgehend von einer konzentrierten Bakteriensuspension, Einzelkolonien zu erzeugen. Eine sehr geringe Menge der Bakteriensuspension reicht für viele Ausstriche. Unter günstigen Umständen kann sich eine Zelle innerhalb von 24 Stunden so vermehren, dass sie millionenfach genetisch identische Zellen bildet. In einer Bakterienkolonie von 1 mm Durchmesser befinden sich also Millionen von einzelnen Bakterienzellen.

- a. Tauchen Sie eine sterile Impföse in die Suspension der rehydrierten Bakterien. Tauchen Sie die Öse direkt in das Gläschen ohne dieses zu neigen. Nehmen Sie die Öse wieder heraus und streichen Sie die Bakterien - wie unten gezeigt - auf der Platte aus. Das Ausstrich soll nacheinander in vier Quadranten erfolgen. Der erste Ausstrich soll die Zellen lediglich verteilen. Bewegen Sie die Öse ein Dutzend mal hin und her. In den nachfolgenden Quadranten werden die Zellen immer mehr verdünnt, was die Wahrscheinlichkeit erhöht Einzelkolonien zu erhalten.

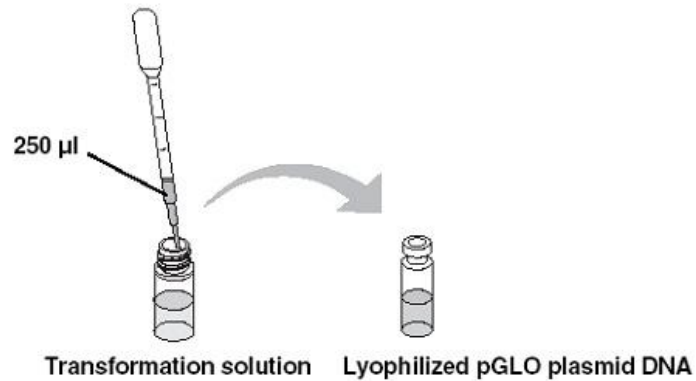
- b. Bei den folgenden Ausstrichen ist es das Ziel, so viel wie möglich der Fläche des Quadranten zu nutzen. Drehen Sie die Schale um ungefähr 45 Grad (so dass die Ausstreichbewegung unverkrampft erfolgen kann) und beginnen Sie mit dem zweiten Ausstrich. Tauchen Sie in die rehydrierten Bakterien nicht erneut ein. Ziehen sie die Öse kurz zweimal durch den vorangehenden Ausstrich und bewegen Sie die Öse dann im gewählten Quadranten etwa 10 mal hin und her.
- c. Drehen Sie die Schale erneut und wiederholen Sie den Ausstrichvorgang..
- d. Drehen Sie die Schale schließlich noch einmal und streichen Sie ein letztes Mal aus. Wiederholen Sie die Schritte a bis d mit den restlichen LB-Platten entsprechend der Anzahl der Anzahl der Schülerarbeitsplätze.



- e. Stellen Sie die Platten “kopfüber” über Nacht bei 37°C in den Inkubator oder – falls ein Inkubator nicht vorhanden ist – inkubieren Sie die Platten für 2-3 Tage bei Raumtemperatur.  
**VOR BENUTZUNG NICHT KÜHLEN !**
- f. *E. coli* bildet gleichmäßig runde, weissliche Kolonien, die glatte Ränder aufweisen. Vermeiden Sie die Verwendung von Agarplatten mit anderen, kontaminierenden Kolonien.

### 3. Vorbereitung des pGLO-Plasmids

Benutzen Sie eine sterile Pipette, um das gefriergetrocknete pGLO-Plasmid durch direktes Hinzufügen von 250  $\mu\text{l}$  der Transformationslösung zu rehydrieren. Beachten Sie, dass das Gläschen aufgrund der geringen DNA-Menge leer erscheint. Lagern Sie die gelöste DNA wenn möglich in einem Kühlschrank. (Die Transformationslösung wird hier aus praktischen Gründen verwendet, weil sie eine sterile Lösung ist. Steriles Wasser würde den gleichen Zweck erfüllen.)



## Vorbereitungen Schritt 3: Vor Beginn des Transformationspraktikums

### 1. Aliquotieren Sie die Lösungen

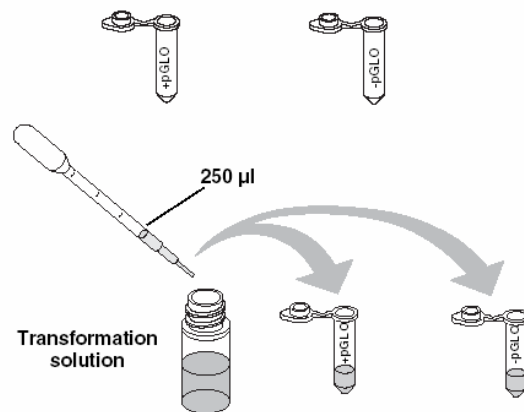
Aliquotieren Sie für jede Schülergruppe 1 ml der Transformationslösung ( $\text{CaCl}_2$ ) und 1 ml der LB-Nährlösung in unterschiedliche farbmarkierte 2 ml-Reaktionsgefäße (Kit-Inhalt). Falls die LB-Nährlösung einen Tag vor dem Praktikum aliquotiert wird, sollte sie bis dahin im Kühlschrank aufbewahrt werden. Beschriften Sie die Reaktionsgefäße.

### 2. Bauen Sie die Arbeitsplätze für das Transformations-Praktikum 1 auf.

Die für jeden Arbeitsplatz bereitzustellenden Materialien sind unter „Arbeitsplatz-Kontrollliste“ aufgeführt.

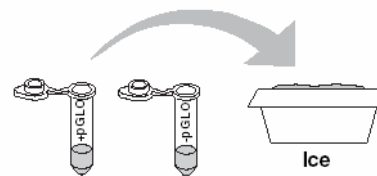
## Transformation Kit - Kurzanleitung

1. Beschriften Sie zwei geschlossene Reaktionsgefäße mit (+)pGLO bzw. (-)pGLO. Beschriften Sie beide Gefäße mit ihrem Gruppennamen. Stellen Sie die Gefäße in das Schaumgestell.

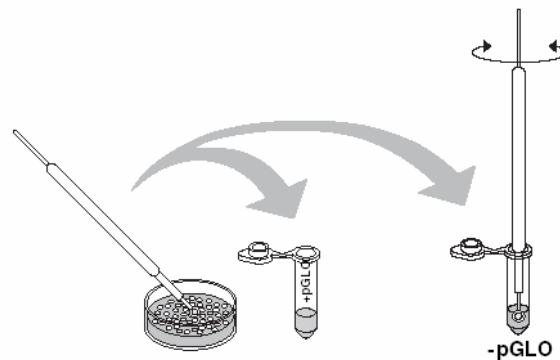


2. Öffnen Sie die Gefäße und pipettieren Sie 250 µl der Transformationslösung (CaCl<sub>2</sub>) hinzu.

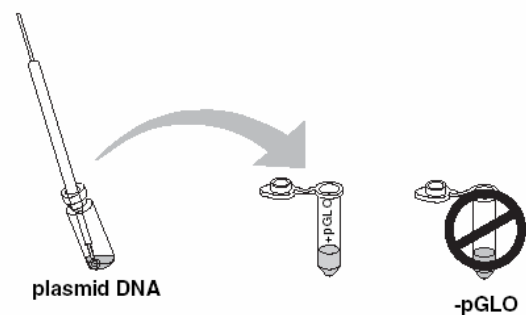
3. Stellen Sie die Gefäße auf Eis.



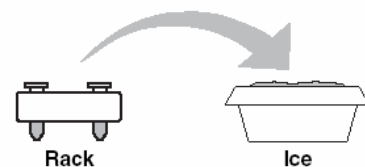
4. Nehmen Sie eine Einzelkolonie mit einer sterilen Impföse von der „Starter-Platte“ auf. Nehmen Sie das (+)pGLO-Gefäß und tauchen sie die Öse in die Transformationslösung am Boden des Gefäßes. Drehen Sie die Öse zwischen Finger und Daumen bis die ganze Kolonie sich in der Lösung verteilt hat. Stellen Sie das Gefäß zurück in das Gestell in der Eis-Box. Wiederholen Sie den Vorgang für das (-)pGLO-Gefäß.



5. Untersuchen Sie die pGLO-Plasmid-DNA-Lösung mit der UV-Lampe. Notieren Sie ihre Beobachtungen. Tauchen Sie eine neue sterile Öse in das Gefäß mit der Plasmid-DNA-Lösung. Nehmen Sie die Öse heraus. Es sollte sich jetzt ein Flüssigkeitsfilm in der Öse gebildet haben. Der Anblick ähnelt dem Aussehen einer Seifenlösung im Ring beim Seifenblasen. Vermischen Sie die DNA-Lösung mit der Zellsuspension im (+)pGLO-Gefäß. Schließen Sie das Gefäß und setzen Sie es zurück auf das Eis. Verschließen Sie auch das (-)pGLO-Gefäß. Geben Sie keine Plasmid-DNA in das (-)pGLO-Gefäß. Warum nicht?



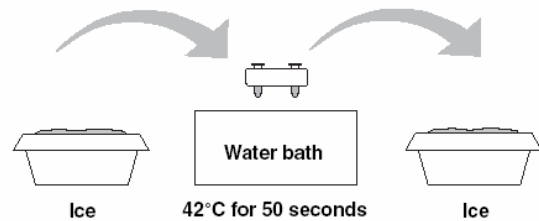
6. Inkubieren Sie die Gefäße für 10 Minuten auf Eis. Stellen Sie sicher, dass die Gefäße tief in das Schaumgestell gedrückt werden. Nur so hat das untere Ende jedes Gefäßes guten Kontakt mit dem Eis.



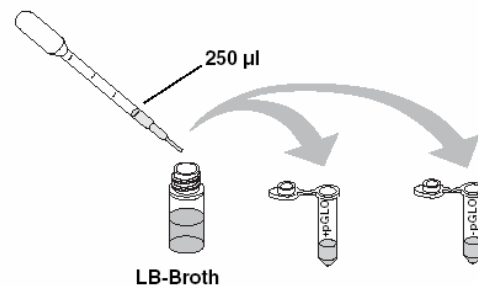
7. Während die Gefäße sich auf Eis befinden beschriften Sie die vier Agarplatten auf der Unterseite (nicht auf dem Deckel) wie folgt:  
 Beschriften Sie eine LB/amp-Platte mit (+)pGLO;  
 Beschriften Sie die LB/amp/ara-Platte mit (+)pGLO;  
 Beschriften Sie die andere LB/amp-Platte mit (-)pGLO;  
 Beschriften Sie die LB-Platte mit (-)pGLO.



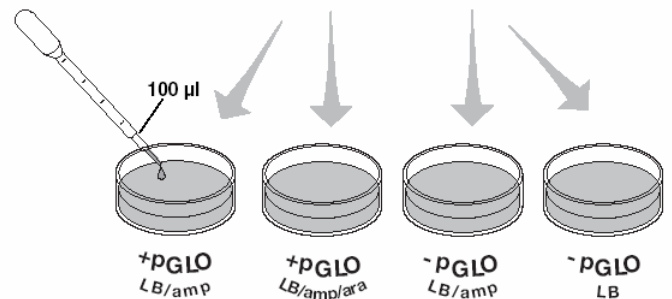
8. Hitzeschock. Benutzen Sie das Schaumgestell und überführen Sie die sowohl das (+)pGLO- als auch das (-) pGLO-Gefäß in das Wasserbad (42 °C). Inkubieren Sie die Gefäße dort für genau 50 Sekunden. Stellen Sie sicher, dass die Gefäße tief in das Schaumgestell gedrückt werden. Nur so hat das untere Ende jedes Gefäßes guten Kontakt mit dem warmen Wasser. Stellen Sie die Gefäße nach 50 Sekunden wieder zurück auf Eis. Um die besten Ergebnisse zu erzielen, soll der Wechsel von Eis (0°C) in das Wasserbad (42°C) und zurück möglichst schnell durchgeführt werden. Inkubieren Sie die Gefäße für 2 Minuten auf Eis.



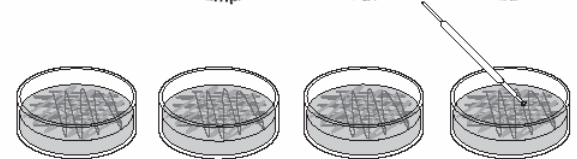
9. Nehmen Sie das Gestell aus dem Eis und stellen Sie es auf die Laborbank. Geben Sie 250 µl der LB-Nährlösung mit einer sterilen Pipette in ein geöffnetes Gefäß und schließen Sie dieses wieder. Wiederholen Sie diesen Schritt mit einer neuen sterilen Pipette und einem anderen Gefäß. Inkubieren Sie die Gefäße für 10 Minuten bei Raumtemperatur.



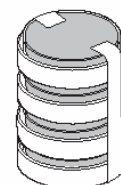
10. Schnippen Sie mit Ihren Fingern an das Gefäß, um den Inhalt zu mischen. Unter Benutzung steriler Pipetten für jedes Gefäß geben Sie nun 100 µl der Transformations- und Kontroll-Suspensionen auf die entsprechenden Platten



11. Benutzen Sie eine neue sterile Impföse für jede Platte. Streichen Sie die Suspensionen gleichmäßig über die Agaroberfläche aus, indem Sie die flache Seite der Öse vor und zurück ziehen.



12. Stapeln Sie Ihre Platten und binden Sie diese mit einem Klebeband zusammen. Schreiben Sie Ihren Gruppennamen auf die Unterseite des Stapels und stellen Sie den Stapel kopfüber bis zum folgenden Tag in den 37°C Inkubator.



# Anhang

## Lehrkraft-Leitfaden zu den Lösungen

### Unterrichtseinheit 1      Zentrale Fragen

1. Um einen gesamten Organismus zu transformieren, muss man das neue Gen (bzw. die neuen Gene) in jede Zelle des Organismus einbauen. Welche Art Organismus ist für eine solche Gesamt-Transformation besser geeignet – einer, der aus vielen Zellen besteht, oder einer, der aus einer einzigen Zelle besteht?

**Ein einzelliger Organismus ist in diesem Fall der am besten geeignete Empfänger, weil dieser aus lediglich einer Zelle besteht, die das neue Gen aufzunehmen braucht.**

2. Wissenschaftler möchten oft wissen, ob der genetisch veränderte Organismus seine neuen Merkmale an seine Nachkommen und zukünftige Generationen weitergeben kann. Welche Art Organismus wäre besser geeignet für eine Untersuchung, die diese Informationen liefert: Ein Organismus, dessen neue Generationen sich schnell entwickeln und fortpflanzen oder einer, bei dem diese Vorgänge langsamer ablaufen?

**Ein Organismus, der sich schnell fortpflanzt. Das schnelle Erzeugen von Nachkommen erlaubt eine schnelle Überprüfung, ob das neue Merkmal weitergegeben wurde.**

3. Auch Sicherheitsaspekte spielen eine wichtige Rolle bei der Wahl eines Versuchsorganismus. Welche Merkmale und Eigenschaften sollte ein Organismus aufweisen (oder nicht aufweisen), um sicher zu gehen, dass dieser nicht den Menschen oder die Umwelt schädigen kann?

**Der Organismus sollte keine Gifte oder Stoffe herstellen, die Menschen krank machen können. Der Organismus sollte kräftiges Wachstum im Labor zeigen, sollte aber nicht ausserhalb des Labors überleben können. Der Organismus sollte keine Pflanzen und Tiere infizieren können.**

4. Welche Art Organismus sollte, auf der Grundlage der oben gemachten Überlegungen, die ideale Wahl für die Durchführung einer genetische Veränderung sein: ein Bakterium, ein Regenwurm, ein Fisch oder eine Maus? Begründen Sie ihre Schlussfolgerung!

**Ein Bakterium wäre der am besten geeignete Wirtsorganismus. Bakterien sind kleine, einzellige Organismen, die sich schnell und leicht vermehren lassen.**

**Beachten Sie: Das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*), Stamm HB101;K-12, erfüllt die oben angeführten Anforderungen am ehesten: es besteht aus nur einer Zelle, es pflanzt sich alle 20 Minuten fort, es führt nicht zu Erkrankungen des Menschen und es kann ausserhalb des Labors nicht überleben.**



## Unterrichtseinheit 1      Weitere Überlegungen

Rufen Sie sich noch einmal in Erinnerung, dass es das Ziel einer genetischen Veränderung ist, die Merkmale eines Organismus (Phänotyp) zu verändern. Bevor eine Veränderung des Phänotyps eines Organismus festgestellt werden kann, muss eine gründliche Untersuchung des normalen Phänotyps (Zustand vor der Transformation) durchgeführt werden. Betrachten Sie die *E. coli*-Kolonien auf den „Starter-Platten“. Zählen Sie alle zu beobachtenden Merkmale und Eigenschaften auf.

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

Beschreiben Sie wie Sie zwei Nähragarplatten, *E. coli*-Zellen und Ampicillin verwenden könnten, um den Einfluss von Ampicillin auf *E. coli*-Zellen zu zeigen.

**Gleiche Mengen einer *E. coli*-Zellsuspension könnten auf zwei unterschiedliche LB-Nähragarplatten ausgestrichen werden, von denen eine einfachen LB-Nähragar und die andere LB-Nähragar mit Ampicillin enthält. Das Wachstum der *E. coli*-Zellen auf beiden Platten könnte verglichen werden. Falls Ampicillin das Wachstum der *E. coli*-Zellen negativ beeinflusst, sollten weniger Bakterienkolonien auf dieser Platte sein. Wenn Ampicillin keinen Effekt zeigt, sollte auf beiden Platten eine ungefähr gleiche Anzahl von Kolonien vorhanden sein.**

Ergebnisse: Welchen Hinweis bezüglich des Effekts von Ampicillin auf *E. coli*-Zellen erwarten Sie als Ergebnis Ihres Experiments?

**Antibiotika töten normalerweise Bakterien ab (sie wirken bakterizid) oder sie verzögern das Wachstum (sie wirken bakteriostatisch). Daher sollten, wenn überhaupt, nur sehr wenige Bakterienkolonien auf der Ampicillin-Platte zu finden sein. Das Vorhandensein von Kolonien auf der Ampicillin-Platte würde anzeigen, dass diese Bakterien gegen das Antibiotikum Ampicillin resistent sind.**

## Unterrichtseinheit 2      Fragen zur Überprüfung

1. Auf welchen Platten erwarten Sie Bakterien, die den anfangs untersuchten nicht transformierten *E. coli*-Kolonien ähneln? Erklären Sie Ihre Vorhersagen.

**Bakterien, die den nicht-transformierten *E. coli*-Zellen ähneln werden auf der LB/(-)pGLO-Platte zu finden sein. Diese Bakterien wurden der “Starter-Platte” entnommen, es wurde ihnen kein Plasmid hinzugefügt und sie wurden abermals auf einer LB-Platte ausplattiert. Daher sind sie praktisch identisch mit den nicht transformierten *E. coli*-Zellen der Starterkultur.**

2. Auf welcher(n) Platte(n) werden genetisch veränderte Bakterienzellen wahrscheinlich zu finden sein? Erklären Sie ihre Vorhersagen.

**Die transformierten Zellen werden auf den LB/amp- und LB/amp/ara-Platten zu finden sein. Genetisch veränderte Zellen haben das pGLO-Plasmid aufgenommen, welches das Ampicillin-Resistenzgen exprimiert — diese Zellen können daher auf den Ampicillin-haltigen Platten überleben.**

3. Welche Platten sollten verglichen werden, um feststellen zu können, ob überhaupt eine Transformation stattgefunden hat? Warum?

**Die LB/amp (-) pGLO- und die LB/amp (+) pGLO-Platten sollten direkt miteinander verglichen werden. Zellen, die nicht mit DNA behandelt wurden (-pGLO) , sollten das Ampicillin-Resistenzgen nicht exprimieren und werden auf den LB/amp-Platten nicht wachsen. Mit DNA behandelte Zellen (+pGLO) sollten das pGLO-Plasmid enthalten und das Ampicillin-Resistenzgen exprimieren — die entsprechende LB/amp-Platte wird transformierte Bakterienkolonien enthalten.**

4. Was bedeutet “Kontrollplatte”? Welchem Zweck dient eine Kontrolle?

**Eine Kontrollplatte hilft bei der Auswertung der Versuchsergebnisse. Bei 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 Veränderung Bakterienkolonien produziert, die auf Ampicillin wachsen können (aufgrund der Aufnahme des pGLO-Plasmids und der Expression des Ampicillin-Resistenzgens). Die (-) pGLO/LB–Kontrollplatte kann mit jeder LB/amp-Platte verglichen werden, um zu zeigen, dass die Aufnahme des Plasmids Voraussetzung für das Wachstum in Anwesenheit von Ampicillin ist. Die (-) pGLO LB/amp-Platte zeigt, dass die Starterkultur nicht auf der LB/amp-Platte wächst. Ohne diese Kontrolle würde man nicht bestimmen können, ob die Kolonien auf der LB/amp (+) pGLO-Platte wirklich transformiert sind.**

### Unterrichtseinheit 3      Datenerfassung und Auswertung

1. Beobachten und zeichnen Sie das, was Sie auf jeder der vier Platten sehen können. Fügen Sie Ihre Zeichnungen in die rechte Spalte der Tabelle ein. Tragen Sie Ihre Ergebnisse ein, damit Sie Ihre Beobachtungen der “+ pGLO”-Zellen und der nicht transformierten *E. coli*-Zellen miteinander vergleichen können. Schreiben Sie die folgenden Beobachtungen für jede Platte auf.

2. Wieviel bakterielles Wachstum können Sie auf jeder Platte beobachten?

**Es sollten viele Kolonien auf den LB/amp- und LB/amp/ara-Platten vorhanden sein, die das pGLO-Plasmid erhalten haben (~ 75 Kolonien). Es sollte kein Wachstum auf der LB/amp (-) pGLO-Platte zu sehen sein. Es sollte ein Bakterienrasen auf der LB (-) pGLO-Platte zu sehen sein.**

3. Welche Farbe haben die Bakterien?

**Die Bakterien auf der (+) pGLO LB/amp-Platte und den (-) pGLO LB-Platten sollten weisslich erscheinen. Die Bakterien auf der (+) pGLO LB/amp/ara-Platte sollten bei Bestrahlung mit normaler Raumbeleuchtung weisslich erscheinen, bei Bestrahlung langwelligen, ultravioletten Lichts sollten sie aber hellgrün fluoreszieren.**

4. Bestimmen Sie die Anzahl der Bakterienkolonien auf jeder Platte (zählen Sie die einzelnen Punkte).

**Es sollten etwa 75 Bakterienkolonien auf den beiden (+) pGLO-Platten sein. Der Bakterienrasen auf der LB-Platte besteht aus einem gleichmäßig verteilten Ausstrich von Bakterien – einzelne Kolonien können daher nicht gezählt werden.**

Platten	Beobachtungen
+pGLO, LB/amp	Viele transformierte Bakterienkolonien (~75). Die Kolonien erscheinen weiss.
+pGLO, LB/amp/ara	Viele transformierte Bakterienkolonien (~75).  Erscheinen bei Bestrahlung mit normaler Raumbeleuchtung weiss, nach Einwirkung ultravioletten Lichts fluoreszieren sie hellgrün.
-pGLO, LB/amp	Kein bakterielles Wachstum auf dieser Platte.
-pGLO, LB	Ein gleichmäßiger Bakterienrasen ist auf dieser Platte vorhanden. Der Rasen erscheint cremefarben.

## Unterrichtseinheit 3      Auswertung der Ergebnisse

1. Welche der anfangs beobachteten Merkmale der *E. coli*-Zellen haben sich anscheinend nicht verändert?

Führen Sie diese "nicht-transformierten" Merkmale unten auf und notieren Sie, wie Sie das

Auswertungsergebnis für jedes der aufgelisteten Merkmale erhalten haben.

<b>Ausgangsmerkmal</b>	<b>Auswertung der Beobachtungen</b>
<b>Farbe</b>	<b>Bakterien haben eine weissliche Farbe</b>
<b>Koloniegröße</b>	<b>Koloniegröße ist vor und nach der Transformation ähnlich</b>

2. Welche der Anfangsmerkmale der *E. coli*-Zellen haben sich nach Durchführung der Transformation nicht grundsätzlich verändert? Notieren Sie diese Merkmale und beschreiben Sie die Unterschiede, die Sie beobachtet haben.

<b>Neues Merkmal</b>	<b>Beobachteter Unterschied</b>
<b>Farbe</b>	<b>Die Kolonien auf der LB/amp/ara-Platte fluoreszieren bei Bestrahlung mit UV-Licht hellgrün</b>
<b>Ampicillin</b>	<b>Die transformierten Kolonien können auf Ampicillin wachsen</b>

3. Was kann man über die Eigenschaften bestimmter Gene des Plasmids folgern, wenn die genetisch veränderten Zellen die Fähigkeit erlangt haben in der Anwesenheit des Antibiotikums Ampicillin zu überleben?

**Das Plasmid muss ein Gen für die Ampicillin-Resistenz exprimieren (das Produkt des *bla*-Gens ist die beta-Lactamase, das Protein, welches Ampicillin abbaut).**

4. Wie könnten Sie aufgrund Ihrer Ergebnisse beweisen, dass die beobachteten Veränderungen ursächlich auf die Methode zurückzuführen sind, die Sie angewendet haben?

**Am besten vergleicht man die Kontrolle mit den anderen Platten. Die Zellen, die nicht mit dem Plasmid behandelt wurden (LB/amp (-) pGLO- und LB/amp/ara (-) pGLO-Platten) können nicht auf Ampicillin wachsen. Zellen hingegen, die mit dem Plasmid behandelt wurden (LB/amp (+) pGLO- und LB/amp/ara (+) pGLO-Platten) können auf LB/amp-Platten wachsen. Daher kann nur das Plasmid die Ampicillin-Resistenz vermittelt haben.**

## Unterrichtseinheit 3 Fragen zur Überprüfung

### Was leuchtet?

1. Erinnern Sie sich an Ihre Beobachtungen, als Sie mit der UV-Lampe eine Probe der pGLO-Plasmid-DNA beschienen haben? Beschreiben Sie Ihre Beobachtungen.

**Die Plasmidprobe fluoreszierte nicht.**

2. Welche der zwei möglichen Ursachen für die Fluoreszenz kann man nun ausschließen?

**Die DNA des pGLO-Plasmids und die Bakterien der Ausgangskultur können als Ursache der Fluoreszenz ausgeschlossen werden.**

3. Welche Hinweise bezüglich der eigentlichen Ursache der Fluoreszenz lassen sich aus dieser Beobachtung ableiten?

**Die Quelle der Fluoreszenz ist wahrscheinlich irgendein Protein, das vom Plasmid kodiert wird.**

4. Welche Ergebnisse belegen eindeutig, dass Ihr Versuch eine Transformation durchzuführen erfolgreich bzw. nicht erfolgreich durchgeführt wurde?

**Ein erfolgreicher Versuch wird einerseits durch die Anwesenheit von Kolonien auf den (+) pGLO LB/amp- und (+) pGLO LB/amp/ara-Platten angezeigt und andererseits durch das Fehlen von Kolonien auf der (-) pGLO LB/amp-Platte. Ausserdem sollten die Kolonien auf der LB/amp/ara-Platte grün fluoreszieren.**

**Ein nicht erfolgreiches Experiment zeigt ein Fehlen von Kolonien auf den (+) pGLO LB/amp- und (+) pGLO LB/amp/ara-Platten. Solch ein Ergebnis könnte durch das Nicht-Hinzufügen von Plasmid in das mit „ (+) pGLO“ beschriftete Reaktionsgefäß oder durch das Nicht-Hinzufügen einer Bakterienkolonie in das mit „(+), pGLO“ beschriftete Reaktionsgefäß zustande gekommen sein.**

## Unterrichtseinheit 3      Fragen zur Überprüfung

### Das Zusammenspiel von Genen und Umwelt

Schauen Sie noch einmal Ihre Platten an. Können Sie *E. coli*-Zellen beobachten, welche auf LB-Platten wachsen, die weder Ampicillin noch Arabinose enthalten?

**Ja. Die Bakterien, die kein Plasmid erhalten haben, wachsen auf den LB-Platten ohne Ampicillin bzw. Arabinose.**

1. Können Sie aufgrund Ihrer Ergebnisse und durch einen Blick auf die Platte sagen, ob diese Bakterien Ampicillin-resistent sind? Erläutern Sie.

**Nein. Man kann nicht nur durch Betrachten der Kolonien sagen, ob die Bakterien Ampicillin-resistent sind. Beide Typen von Bakterien (diejenigen, welche Ampicillin-resistent sind und diejenigen, welche nicht resistent sind) sehen nach Kultivierung gleich aus. Man erinnere sich an die Kolonien auf der LB-“Starterplatte” und der +pGLO LB/amp-Platte.**

2. Wie würden Sie die Umgebung (das Medium) verändern, um deutlich zeigen zu können, dass die Bakterien Ampicillin-resistent sind?

**Die beste Test wäre es die Bakterien auf der LB-Platte wachsen zu lassen und dann auf einer LB/amp-Platte auszustreichen. Wenn die Bakterien auf der LB/amp-Platte wachsen, sind sie gegen Ampicillin resistent. Wenn keine Bakterienkolonien sichtbar sind, so sind sie nicht Ampicillin-resistent (sie reagieren empfindlich auf Ampicillin).**

3. Es kommt oft vor, dass Merkmale eines Organismus durch das Zusammenwirken seiner Gene und Faktoren der Umwelt zustande kommen. Denken Sie über die grüne Farbe nach, die Sie in den genetisch veränderten Bakterien gesehen haben:

a. Welche zwei Faktoren müssen in der Umgebung vorhanden sein, damit die grüne Farbe für Sie sichtbar wird? (Hinweis: ein Faktor ist Bestandteil der Platte und der andere Faktor hängt von der Art und Weise ab, wie Sie die Bakterien betrachten).

**Der Zucker Arabinose in der Agaroseplatte wird benötigt, um die Expression des GFP-Gens anzuschalten. Das UV-Licht ist notwendig, damit das GFP-Protein in den Bakterien fluoresziert.**

b. Wie lösen Ihrer Meinung nach die zwei von Ihnen genannten Umweltfaktoren das grüne Leuchten der genetisch veränderten Bakterien aus?

**Der Zucker Arabinose schaltet die Expression des GFP-Gens durch Binden an das regulatorische Protein *araC*, das am *P<sub>BAD</sub>*-Promotor sitzt, ein. Wenn Arabinose vorhanden ist, bindet es an *araC*, was zu einer Konformationsänderung von *araC* führt. Dies wiederum ermöglicht die Transkription des Gens durch die RNA-Polymerase (siehe Anhang D für eine detailliertere Beschreibung). Die Bestrahlung mit UV-Licht führt dazu, dass das GFP fluoresziert, in dem es Energie in Form grünen Lichtes abgibt.**

c. Welchen Vorteil gewinnt ein Organismus durch die Möglichkeit bestimmte Gene als Reaktion auf gewisse Bedingungen ein- oder auszuschalten ?

**Die Genregulation ermöglicht eine Anpassung an wechselnde Bedingungen und verhindert so, dass nicht benötigte Proteine auf verschwenderische Weise überproduziert werden. Gute Beispiele hoch regulierter Gene sind Enzyme, die Kohlenhydrat-haltige Nährstoffe abbauen. Ist beispielsweise der Zucker Arabinose im Nährmedium vorhanden, ist es aus Sicht der Bakterien sinnvoll die Enzyme herzustellen, die diese Zuckerquelle abbauen können. Umgekehrt wäre es aus energetischer Sicht Verschwendung die Enzyme für den Arabinoseabbau zu produzieren, wenn Arabinose nicht im Medium vorhanden ist.**

## Unterrichtseinheit 4      Zusatzaufgaben

### 1. Bestimmung der gesamten Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen.

Stellen Sie Ihre LB/amp/ara-Platte neben eine UV-Lampe. Jede Kolonie auf der Platte stammt von einer einzigen Zelle ab. Im Verlauf der Vermehrung einer einzelnen Zelle werden immer mehr Zellen gebildet, was am Ende zur Bildung einer sogenannten Kolonie führt. Der direkteste Weg die **Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen** zu bestimmen ist es die Kolonien auf der Platte zu zählen.

Fügen Sie die Zahl hier ein =>

Gesamtzahl der Zellen =

**190**

### 2. Bestimmung der DNA-Menge des pGLO-Plasmids in den auf der LB/amp/ara-Platte ausgestrichenen Bakterienzellen.

Wir benötigen zwei Informationen, um die DNA-Menge des pGLO-Plasmids in den auf der LB/amp/ara-Platte ausgestrichenen Bakterienzellen dieses Versuch zu bestimmen. (i) Wie groß war die Gesamtmenge der DNA zu Beginn des Experiments? (ii) Welcher Anteil der DNA (innerhalb der Bakterien) wurde wirklich auf die LB/amp/ara-Platten ausgebracht?

Nach Berechnung dieser Werte, müssen Sie die in diesem Versuch verwendete **Gesamtmenge der pGLO-Plasmid-DNA** mit dem **Anteil der DNA** multiplizieren, den Sie auf die LB/amp/ara-Platte ausgestrichen haben. Das Ergebnis der Multiplikation wird Ihnen die Menge der pGLO-Plasmid-DNA in den Bakterienzellen angeben, die auf die LB/amp/ara-Platte ausgebracht wurden.

#### a. Bestimmung der Gesamtmenge der DNA

Die Gesamtmenge der pGLO-Plasmid-DNA, mit der wir begonnen haben, ist gleich dem Produkt der Konzentration und dem verwendeten Gesamtvolumen, oder anders ausgedrückt

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

Sie haben bei diesem Versuch 10  $\mu\text{l}$  pGLO-DNA einer Konzentration von 0,08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingesetzt. Das bedeutet, dass jeder Mikroliter der Lösung 0,08  $\mu\text{g}$  pGLO-DNA enthielt. Berechnen Sie die **Gesamtmenge der DNA, die in diesem Versuch verwendet wurde.**

Fügen Sie die Zahl hier ein =>

Gesamtmenge der DNA ( $\mu\text{g}$ )  
in diesem Experimentes =

**0,8**

Wie verwenden Sie diese Information weiter?

**Diese Zahl wird mit dem Anteil der DNA multipliziert, um die Gesamtmenge der DNA zu bestimmen, die auf die Agarplatte ausgebracht wurde.**



**b. Bestimmung der DNA-Menge des pGLO-Plasmids in den auf der LB/amp/ara-Platte ausgestrichenen Bakterienzellen.** Da nicht alle Moleküle der pGLO-Plasmid-DNA, die Sie den Bakterien hinzugefügt haben, auf die Agarplatte übertragen wird, müssen Sie herausfinden, welcher Anteil der DNA wirklich auf die LB/amp/ara-Platte ausplattiert wurde. Dividieren Sie daher das Volumen der DNA, die Sie auf die LB/amp/ara-Platte ausgebracht haben, durch das Gesamtvolumen der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß, das die DNA enthielt. Die entsprechende Formel lautet:

$$\text{Anteil der DNA} = \frac{\text{Volumen (ausgebracht auf LB/amp-Platte)}}{\text{Gesamtvolumen im Reaktionsgefäß}}$$

Sie haben 100 µl einer Zellsuspension ausgestrichen, die pGLO-DNA aus einem Reaktionsgefäß enthielt, das mit 510 µl Lösung gefüllt war. Erinnern Sie sich warum das Gesamtvolumen 510 µl betrug? Schauen Sie im Protokoll nach und finden Sie alle Schritte, wo Sie dem Reaktionsgefäß Flüssigkeit hinzugefügt haben. Addieren Sie die Volumenangaben.

Benutzen Sie die oben angegebene Formel, um den Anteil der DNA zu berechnen, der auf die LB/amp/ara-Platte gelangte.

Fügen Sie die Zahl hier ein =>

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

• Wie verwenden Sie diese Information weiter?

**Diese Zahl wird mit der DNA-Menge multipliziert, die verwendet wurde, um die DNA-Menge zu bestimmen, die auf eine Agarplatte ausgebracht wurde.**

Wie viel Mikrogramm DNA haben Sie auf allen LB/amp/ara-Platten verteilt?

Um diese Frage zu beantworten, müssen Sie die **Gesamtmenge der verwendeten DNA** mit dem **Anteil der DNA** multiplizieren, die Sie auf der LB/amp/ara-Platte verteilt haben.

Verteilte pGLO DNA (µg) = Gesamtmenge der verwendeten DNA (µg) x Anteil der DNA

Fügen Sie die Zahl hier ein =>

Verteilte pGLO-DNA (µg) = <u>0,16</u>
---

• Was sagt diese Zahl aus?

**Diese Zahl gibt Ihnen an, wie viel DNA auf der Agarplatte verteilt wurde.**

Schauen Sie sich die oben durchgeführten Berechnungen an. Entscheiden Sie sich welche der berechneten Zahlen in die unten aufgeführte Tabelle gehören. Füllen Sie die folgende Tabelle aus:

Anzahl der Kolonien auf der LB/amp/ara-Platte	190
Auf den Platten verteilte Mikrogramm pGLO-DNA	0,16 µg

Benutzen Sie nun die Werte aus der Tabelle, um die Effizienz der pGLO-Transformation zu berechnen.

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Gesamtanzahl der auf der Agarplatte wachsenden Zellen}}{\text{Auf den Platten verteilte DNA-Menge}}$$

Fügen Sie die Zahl hier ein =>

**1187 Transformanden / µg**  
Transformationseffizienz

### Auswertung

Berechnungen der Transformationseffizienz führen zu großen Zahlen. Wissenschaftler verwenden oftmals eine Art mathematische Kurzschrift die Exponentialschreibweise genannt wird. So wird beispielsweise eine berechnete Transformationseffizienz von 1000 Bakterien/µg DNA oft folgendermaßen geschrieben:

**10<sup>3</sup> Transformanden/µg (10<sup>3</sup> drückt auf andere Art folgendes aus: 10 x 10 x 10 oder 1000)**

- Wie drücken Wissenschaftler 10000 Transformanden/µg in der Exponentialschreibweise aus?  
**10<sup>4</sup>**  
Stellen wir uns vor Wissenschaftler würden eine Effizienz von **5000 Bakterien/µg DNA** berechnen. Dies würde folgendermaßen geschrieben:  
5,0 x 10<sup>3</sup> transformants/µg DNA ("5 mal 1000")
- Wie würden Wissenschaftler 40000 Transformanden/µg in der Exponentialschreibweise schreiben?  
**4,0 x 10<sup>4</sup>**

Ein letztes Beispiel: Wenn 2600 Transformanden/ $\mu\text{g}$  DNA berechnet würden, dann würde die Exponentialschreibweise wie folgt aussehen:

$2,6 \times 10^3$  Transformanden/ $\mu\text{g}$  DNA (2,6 mal 1000)

Gleichermaßen gilt:

$$5600 = 5,6 \times 10^3$$

$$271000 = 2,71 \times 10^5$$

$$2420000 = 2,42 \times 10^6$$

- Wie würden Wissenschaftler 960000 Transformanden/ $\mu\text{g}$  DNA in der Exponentialschreibweise ausdrücken?

**$9,6 \times 10^5$**

- Schreiben Sie die von Ihnen berechnete Transformationseffizienz in der Exponentialschreibweise.

$1,2 \times 10^3$  Transformanden/ $\mu\text{g}$  DNA

- Erklären Sie in ein oder zwei Sätzen, was Ihre Berechnung der Transformationseffizienz bedeutet:  
**Die Transformationseffizienz ist ein quantitativer Wert, der beschreibt, wie effektiv man ein Plasmid in Bakterien transformieren kann. Die Zahl gibt die Anzahl der transformierten Kolonien an, die man pro Mikrogramm DNA erhält.**

Erfahrungsgemäß gehen Biotechnologen davon aus, dass die Transformationseffizienz des hier verwendeten Protokolls zwischen  $8,0 \times 10^2$  und  $7,0 \times 10^3$  Transformanden/ $\mu\text{g}$  DNA liegt.

- Wie fällt Ihre Transformationseffizienz im Vergleich mit dem oben gezeigten Wert aus?  
**Die berechnete Effizienz ( $1,2 \times 10^3$ ) liegt innerhalb der oben erwähnten Grenzwerte für die Effizienz dieses Protokolls.**
- Notieren Sie in der unten aufgeführten Tabelle die Werte der Transformationseffizienzen der anderen Teams Ihrer Klasse.

Team	Effizienz
------	-----------

\_\_\_\_\_

**Die Antworten fallen unterschiedlich aus.**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

- Wie stellt sich Ihre Transformationseffizienz im Vergleich mit denen der anderen Teams dar?  
**Die Antworten fallen unterschiedlich aus.**

- Berechnen Sie die Transformationseffizienz des folgenden Experiments, indem Sie die unten aufgeführten Informationen und Ergebnisse verwenden.

**DNA-Plasmidkonzentration—0,08 µg/µl**

**250 µl CaCl<sub>2</sub> Transformationslösung**

**10 µl Plasmidlösung**

**250 µl LB Nährlösung**

**100 µl auf Agarplatten ausgebrachte Zellen**

**227 gezählte Kolonien transformierte Zellen**

Füllen Sie die folgende Tabelle aus und zeigen Sie diese dann der Lehrkraft.

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

- Zusatzaufgabe

Wenn ein bestimmtes Experiment eine Transformationseffizienz von  $3 \times 10^3$  Bakterien/µg DNA aufweisen würde, wie viele Kolonien von Transformanden könnten dann auf einer LB/amp/ara-Platte wachsen? Sie können annehmen, dass die Konzentration der DNA und der Anteil der Zellen, die auf dem LB-Agar ausgebracht werden die gleichen Werte haben wie bei diesem pGLO-Versuch.

**Transformationseffizienz = Anzahl der Kolonien/ auf der Platte verteilte DNA (µg)**

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

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

$$480 = X$$

**480 Transformanden-Kolonien**

# Schüler-Handbuch

## pGLO-Transformation

### Unterrichtseinheit 1 Einführung in die Transformation

In diesem Praktikum werden Sie eine Methode anwenden, die als genetische Transformation bekannt ist. Erinnern Sie sich, dass ein Gen einem Stück DNA entspricht, das die Bauanleitung zur Herstellung eines Proteins liefert (besser ausgedrückt: das Gen kodiert für das Protein). Ein solches Protein verleiht einem Organismus eine bestimmte Eigenschaft. „Genetische Transformation“ bedeutet dem Wortsinn nach „Veränderung, die durch Gene hervorgerufen wird“. Zu dieser Veränderung gehört das Einfügen von einem oder mehreren Genen in einen Organismus, um die Merkmale dieses Organismus zu verändern. In der Landwirtschaft werden Gene, die für Kälte-, Schädlings- und Dürresistenz kodieren, mittels genetischer Transformation in Pflanzen eingefügt. Im Bereich Bioremediation werden beispielsweise Bakterien mit Genen transformiert, die es den Zellen erlauben Erdöl-Teppiche biologisch abzubauen. In der Medizin können Krankheiten, die durch nicht-funktionsfähige Gene hervorgerufen werden, mit Hilfe der Gentherapie behandelt werden, das bedeutet durch genetische Transformation der Zellen eines Kranken mit einer funktionstüchtigen, gesunden Version des krankheitsauslösenden Gens.

Sie werden eine Methode benutzen, um Bakterien mit einem Gen zu transformieren, das für das Grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert. Die Ausgangsorganismus dieses Gens ist die biolumineszente Qualle *Aequorea victoria*, deren GFP fluoresziert und die Qualle im Dunkeln leuchten lässt. Nach erfolgter Transformation exprimieren die Bakterien das neu erworbene Quallengen und stellen das fluoreszierende Protein her, welches nach Behandlung mit ultraviolett Licht ein hellgrünes Leuchten erzeugt.

In diesem Praktikum lernen Sie den Vorgang der Übertragung von Genen zwischen verschiedenen Organismen kennen - ein Verfahren, das mit Hilfe eines Plasmides abläuft. Bakterien besitzen natürlicherweise ausser einem großen Chromosom noch ein oder mehrere ringförmige DNA-Elemente, die Plasmide genannt werden. Die Plasmid-DNA enthält normalerweise Gene für ein oder mehrere Merkmale, die das Überleben von Bakterien begünstigen. In der Natur können Bakterien Plasmide untereinander austauschen, was ihnen erlaubt diese nützlichen Gene miteinander zu teilen. Dieser natürliche Mechanismus ermöglicht den Bakterien sich an neue Umweltbedingungen anzupassen. Die neuerlich vermehrt auftretenden bakteriellen Antibiotika-Resistenzen lassen sich auf die Übertragung von Plasmiden zurückführen.

Bio-Rads einzigartiges pGLO-Plasmid trägt das GFP-Gen und ein weiteres Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin vermittelt. Weiterhin enthält das pGLO-Plasmid ein spezielles Genregulationssystem, das es erlaubt die Expression des fluoreszierenden Proteins in den transformierten Zellen zu kontrollieren. Das GFP-Gen kann in den transformierten Zellen durch einfaches Hinzufügen des Zuckers Arabinose zum Nährmedium angeschaltet werden. Das Wachstum auf Ampicillin-haltigen Platten wird zur Selektion auf pGLO-transformierte Zellen durchgeführt. Transformierte Zellen erscheinen auf Platten ohne Arabinose weiss (Phänotyp des Wild-Typs), auf Platten mit Arabinose als Bestandteil des Nährgarns fluoreszieren sie grün.

Ihnen werden alle Hilfsmittel und ein Protokoll zur Durchführung der genetischen Transformation zur Verfügung gestellt. Ihre Aufgaben sind:

1. Die Durchführung der genetischen Transformation.
2. Die Bewertung der Ergebnisse bei Ihrem Versuch einen Organismus genetisch zu verändern.

## Unterrichtseinheit 1      Zentrale Fragen

Viele Gesichtspunkte müssen bei der Planung eines wissenschaftlichen Laborexperiments bedacht werden. Unten finden Sie einige Fragen, über die man nachdenken sollte, wenn man die Herausforderung annimmt eine genetische Transformation durchzuführen.

Da wissenschaftliche Laborexperimente so konzipiert werden, dass man eine Antwort auf eine Frage erhält, besteht unser erster Schritt sinnvollerweise darin, eine Frage zu diesem Versuch zu formulieren.

### **Überlegung 1: Kann ich einen Organismus genetisch verändern? Welchen Organismus wähle ich?**

1. Um einen gesamten Organismus zu transformieren, muss man das neue Gen (bzw. die neuen Gene) in jede Zelle des Organismus einbauen. Welche Art Organismus ist für eine solche Gesamt-Transformation besser geeignet – einer, der aus vielen Zellen besteht, oder einer, der aus einer einzigen Zelle besteht?

2. Wissenschaftler möchten oft wissen, ob der genetisch veränderte Organismus seine neuen Merkmale an seine Nachkommen und zukünftige Generationen weitergeben kann. Welche Art Organismus wäre besser geeignet für eine Untersuchung, die diese Informationen liefert: Ein Organismus, dessen neue Generationen sich schnell entwickeln und fortpflanzen oder einer, bei dem diese Vorgänge langsamer ablaufen?

3. Auch Sicherheitsaspekte spielen eine wichtige Rolle bei der Wahl eines Versuchsorganismus. Welche Merkmale und Eigenschaften sollte ein Organismus aufweisen (oder nicht aufweisen), um sicher zu gehen, dass dieser nicht den Menschen oder die Umwelt schädigen kann?

4. Welche Art Organismus sollte, auf der Grundlage der oben gemachten Überlegungen, die ideale Wahl für die Durchführung einer genetischen Veränderung sein: ein Bakterium, ein Regenwurm, ein Fisch oder eine Maus? Begründen Sie Ihre Schlussfolgerung!

## Überlegung 2: Wie kann ich beurteilen ob Zellen genetisch verändert wurden?

Rufen Sie sich noch einmal in Erinnerung, dass es das Ziel einer genetischen Veränderung ist, die Merkmale eines Organismus (Phänotyp) zu verändern. Bevor eine Veränderung des Phänotyps eines Organismus festgestellt werden kann, muss eine gründliche Untersuchung des normalen Phänotyps (Zustand vor der Transformation) durchgeführt werden. Betrachten Sie die *E. coli*-Kolonien auf den „Starter-Platten“. Zählen Sie alle zu beobachtenden Merkmale und Eigenschaften auf:

Die folgenden vor der Transformation durchgeführten Beobachtungen können eine Vergleichsgrundlage liefern, um später beurteilen zu können, ob eine genetische Veränderung stattgefunden hat.

a) Anzahl der Kolonien

b) Größe :        1) der größten Kolonie  
                      2) der kleinsten Kolonie  
                      3) einer durchschnittlichen Kolonie

c) Farbe der Kolonien

d) Verteilung der Kolonien auf der Platte

e) Erscheinungsbild bei Bestrahlung der Kolonien mit UV-Licht

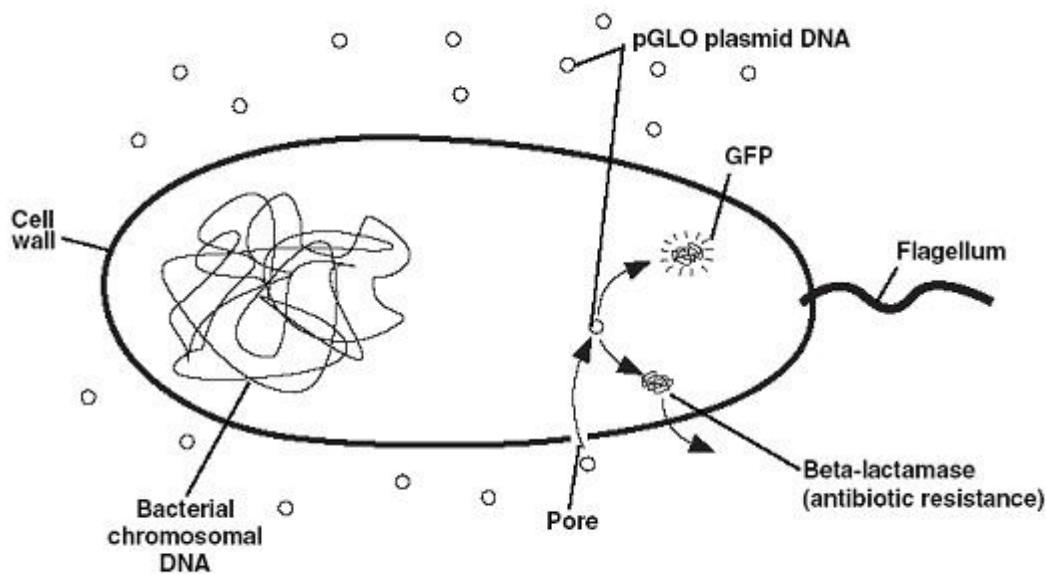
f) Die Fähigkeit der Zellen in Anwesenheit des Antibiotikums Ampicillin zu wachsen und sich zu vermehren.

1. Beschreiben Sie wie Sie zwei Nähragarplatten, *E. coli*-Zellen und Ampicillin verwenden könnten, um den Einfluss von Ampicillin auf *E. coli*-Zellen zu zeigen.

2. Welchen Hinweis bezüglich des Effekts von Ampicillin auf *E. coli*-Zellen erwarten Sie als Ergebnis Ihres Experiments?

### Überlegung 3: Die Gene

Eine genetische Veränderung durch Transformation kommt durch den Einbau neuer DNA in die *E. coli*-Zellen zustande. Bakterien besitzen natürlicherweise ausser einem großen Chromosom noch ein oder mehrere ringförmige DNA-Elemente, die Plasmide genannt werden. Plasmid-DNA enthält normalerweise mehrere Gene, die jeweils für mehrere Eigenschaften kodieren. Wissenschaftler benutzen gentechnische Verfahren, um Gene, die für neue Merkmale kodieren, in ein Plasmid einzufügen. In unserem Fall trägt das pGLO-Plasmid das GFP-Gen, das für das Grün Fluoreszierende Protein kodiert, sowie ein *bla*-Gen, das für ein Protein kodiert, welches den Bakterien eine Antibiotika-Resistenz vermittelt. Das gentechnisch veränderte Plasmid kann anschließend verwendet werden, um Bakterien zu transformieren und ihnen so die neue Merkmale zu verleihen.



### Überlegung 4: Der Vorgang der Transformation

Die hier verwendete Transformationsmethode besteht aus drei Hauptschritten. Diese Schritte sollen es einerseits ermöglichen die Plasmid-DNA in die *E. coli*-Zellen einzuführen und andererseits geeignete Bedingungen schaffen, die es den Zellen erlauben ihre neu erworbenen Gene zu exprimieren.

#### Um die pGLO-Plasmid-DNA durch die Zellmembran zu transportieren müssen Sie:

1. Eine  $\text{CaCl}_2$  (Calciumchlorid)-haltige Transformationslösung verwenden
2. Eine Methode anwenden, die als Hitzschock bezeichnet wird

#### Um transformierte Zellen in Anwesenheit von Ampicillin wachsen zu lassen müssen Sie:

3. Die Zellen während einer kurzen Inkubationsphase mit Nährstoffen versorgen, um zu gewährleisten, dass sie ihre neu erworbenen Gene exprimieren



## Unterrichtseinheit 2      Transformationspraktikum

### Arbeitsplatz-Kontrollliste (V)

**Ihr Arbeitsplatz:** Alle Materialien und Vorräte, die vor Beginn der Laborexperimente an ihrem Arbeitsplatz vorhanden sein sollten, sind unten aufgelistet.

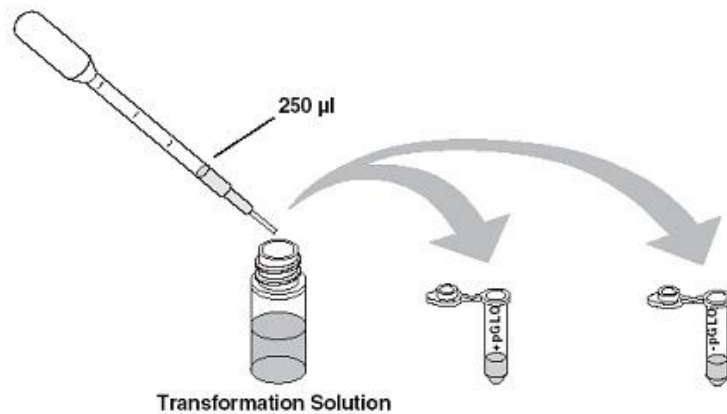
<b>Schüler-Arbeitsplätze</b>	<b>Benötigte Anzahl</b>	<b>(V)</b>
<i>E. coli</i> "Starter-Platte" (LB)	1	<input type="checkbox"/>
Agarplatten, gegossen (1 LB, 2 LB/amp, 1 LB/amp/ara)	4	<input type="checkbox"/>
Transformationslösung	1	<input type="checkbox"/>
LB Nährlösung	1	<input type="checkbox"/>
Impfösen	7 (1 Pkg à 10)	<input type="checkbox"/>
Pipetten	5	<input type="checkbox"/>
Reaktionsgefäß-Schwimmer (Schaum)	1	<input type="checkbox"/>
Zerstoßenes Eis und Behälter (z. B. Styroporbecher)	1	<input type="checkbox"/>
Filzstift (Permanent Marker)	1	<input type="checkbox"/>
<b>Arbeitsplatz der Lehrkraft (allgemein)</b>		
Rehydrierte pGLO-Plasmid DNA	1 Gefäß	<input type="checkbox"/>
Wasserbad 42°C und Thermometer	1	<input type="checkbox"/>
37°C Inkubator		<input type="checkbox"/>
(optional, siehe Allgemeine Laborfertigkeiten - Inkubation)	1	<input type="checkbox"/>

## Transformationsmethode

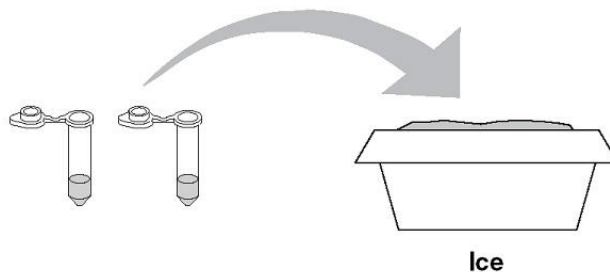
1. Beschriften Sie zwei geschlossene Reaktionsgefäße mit (+)pGLO bzw. (-)pGLO. Beschriften Sie beide Gefäße mit ihrem Gruppennamen. Stellen Sie die Gefäße in das Schaumgestell.



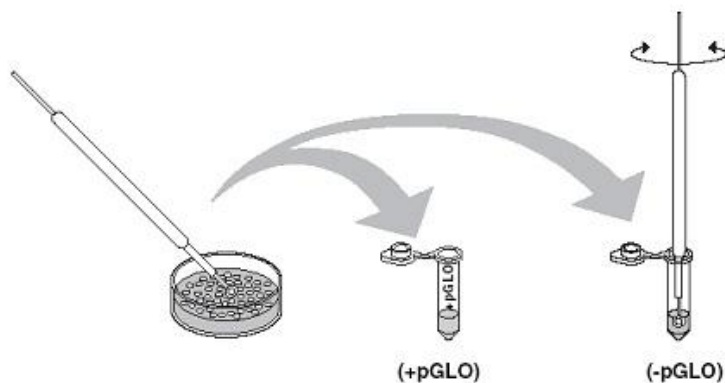
2. Öffnen Sie die Gefäße und pipettieren Sie 250 µl der Transformationslösung (CaCl<sub>2</sub>) hinzu.



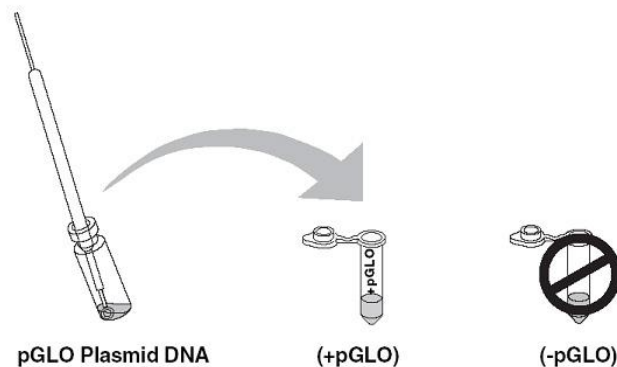
3. Stellen Sie die Gefäße auf Eis.



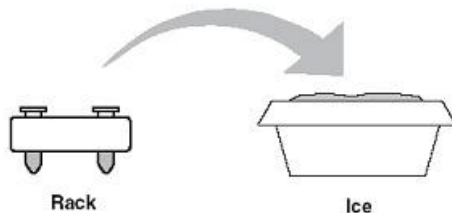
4. Nehmen Sie eine **Einzelkolonie** mit einer sterilen Impföse von der „Starter-Platte“ auf. Nehmen Sie das (+)pGLO-Gefäß und tauchen sie die Öse in die Transformationslösung am Boden des Gefäßes. Drehen Sie die Öse zwischen Finger und Daumen bis die ganze Kolonie sich in der Lösung verteilt hat. Stellen Sie das Gefäß zurück in das Gestell in der Eis-Box. Wiederholen Sie den Vorgang für das (-)pGLO-Gefäß.



5. Untersuchen Sie die pGLO-Plasmid-DNA-Lösung mit der UV-Lampe. Notieren Sie ihre Beobachtungen. Tauchen Sie eine **neue sterile Öse** in das Gefäß mit der Plasmid-DNA-Lösung. Nehmen Sie die Öse heraus. Es sollte sich jetzt ein Flüssigkeitsfilm in der Öse gebildet haben. Der Anblick ähnelt dem Aussehen einer Seifenlösung im Ring beim Seifenblasen. Vermischen Sie die DNA-Lösung mit der Zellsuspension im **(+)pGLO-Gefäß**. Schließen Sie das Gefäß und setzen Sie es zurück auf das Eis. Verschließen Sie auch das **(-)pGLO-Gefäß**. Geben Sie keine Plasmid-DNA in das **(-)pGLO-Gefäß**. Warum nicht?



6. Inkubieren Sie die Gefäße für 10 Minuten auf Eis. Stellen Sie sicher, dass die Gefäße tief in das Schaumgestell gedrückt werden. Nur so hat das untere Ende jedes Gefäßes guten Kontakt mit dem Eis.

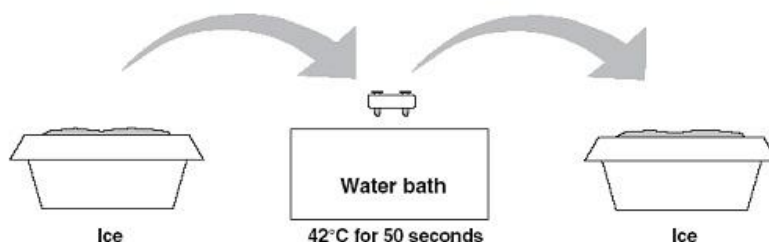


7. Während die Gefäße sich auf Eis befinden beschriften Sie die vier Agarplatten auf der Unterseite (nicht auf dem Deckel) wie folgt:

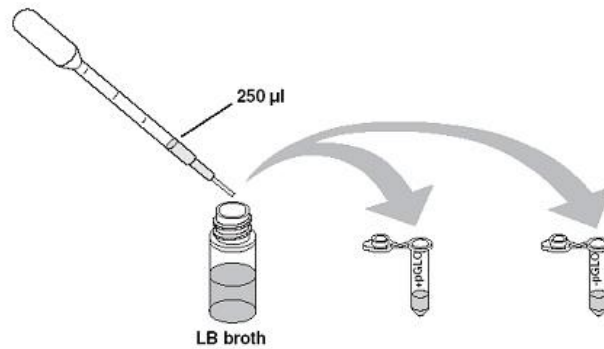
- Beschriften Sie eine **LB/amp**-Platte mit **(+)pGLO**
- Beschriften Sie die **LB/amp/ara**-Platte mit **(+)pGLO**
- Beschriften Sie die andere **LB/amp**-Platte mit **(-)pGLO**
- Beschriften Sie die **LB**-Platte mit **(-)pGLO**



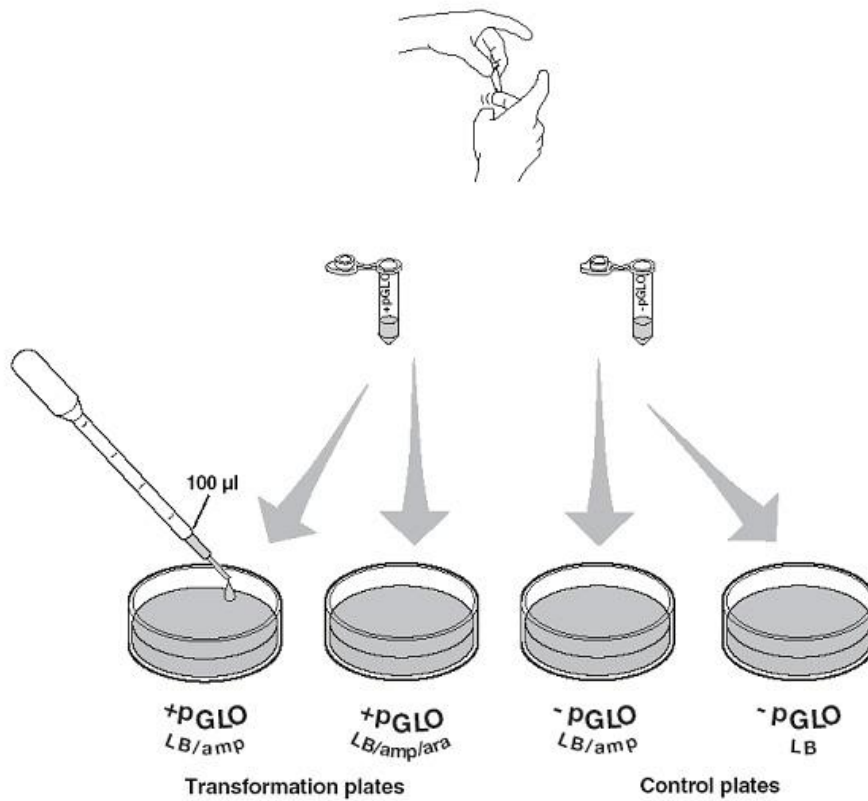
8. **Hitzeschock.** Benutzen sie das Schaumgestell und überführen Sie die sowohl das **(+)pGLO-** als auch das **(-) pGLO-Gefäß** in das Wasserbad (42 °C). Inkubieren Sie die Gefäße dort für genau 50 Sekunden. Stellen Sie sicher, dass die Gefäße tief in das Schaumgestell gedrückt werden. Nur so hat das untere Ende jedes Gefäßes guten Kontakt mit dem warmen Wasser. Stellen Sie die Gefäße nach 50 Sekunden wieder zurück auf Eis. Um die besten Ergebnisse zu erzielen, soll der Wechsel von Eis (0°C) in das Wasserbad (42°C) und zurück möglichst schnell durchgeführt werden. Inkubieren Sie die Gefäße für 2 Minuten auf Eis.



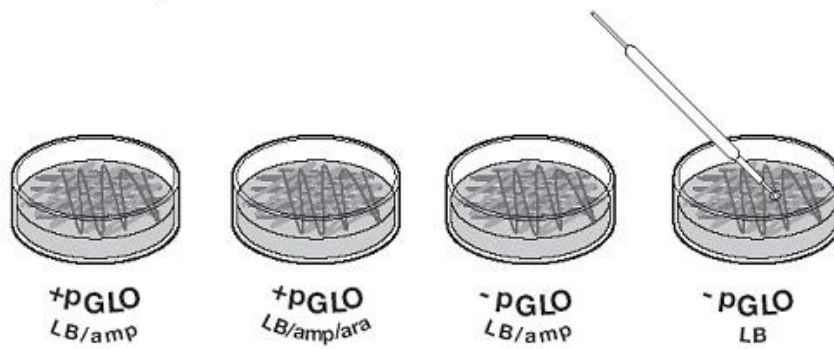
9. Nehmen sie das Gestell aus dem Eis und stellen Sie es auf die Laborbank. Geben Sie 250  $\mu$ l der LB-Nährlösung mit einer Sterilen Pipette in ein geöffnetes Gefäß und schließen Sie dieses wieder. Wiederholen Sie diesen Schritt mit einer neuen sterilen Pipette und einem anderen Gefäß. Inkubieren Sie die Gefäße für 10 Minuten bei Raumtemperatur.



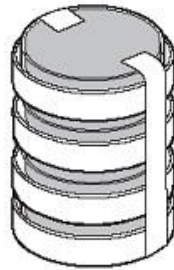
10. Schnippen Sie mit Ihren Fingern an das Gefäß, um den Inhalt zu mischen. Unter Benutzung steriler Pipetten für jedes Gefäß geben Sie nun 100  $\mu$ l der Transformations- und Kontroll-Suspensionen auf die entsprechenden Platten.



11. **Benutzen Sie eine neue sterile Impföse für jede Platte.** Streichen Sie die Suspensionen gleichmäßig über die Agaroberfläche aus, indem Sie die flache Seite der Öse vor und zurück ziehen.



12. Stapeln Sie Ihre Platten und binden sie diese mit einem Klebeband zusammen. Schreiben Sie Ihren Gruppennamen auf die Unterseite des Stapels und stellen Sie den Stapel kopfüber bis zum folgenden Tag in den 37°C Inkubator.





## Unterrichtseinheit 3 Datenerfassung und Auswertung

### A. Datenerfassung

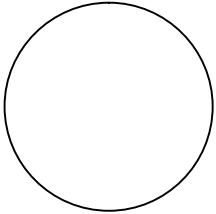
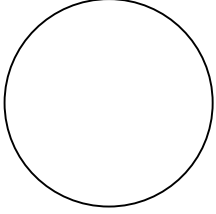
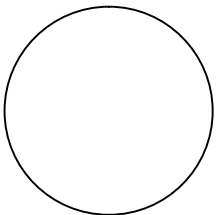
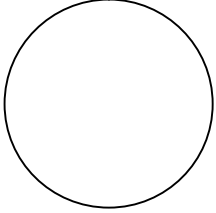
Begutachten Sie die Ergebnisse des Transformations-Praktikums unter normaler Raumbeleuchtung. Schalten Sie dann das Licht aus und halten Sie die UV-Lampe über die Platten.

1. Beobachten und zeichnen Sie das, was Sie auf jeder der vier Platten sehen können. Fügen Sie Ihre Zeichnungen in die rechte Spalte der Tabelle ein. Tragen Sie Ihre Ergebnisse ein, damit Sie ihre Beobachtungen der "+ pGLO"-Zellen und der nicht transformierten *E. coli*-Zellen miteinander vergleichen können. Schreiben Sie die folgenden Beobachtungen für jede Platte auf.

2. Wie viel bakterielles Wachstum können Sie auf jeder Platte beobachten?

3. Welche Farbe haben die Bakterien?

4. Bestimmen Sie die Anzahl der Bakterienkolonien auf jeder Platte (zählen Sie die einzelnen Punkte).

<b>Transformationsplatten</b>	<b>Platten</b>	<b>Beobachtungen</b>
	+pGLO, LB/amp 	
	+pGLO LB/amp/ara 	
		<b>Beobachtungen</b>
<b>Kontrollplatten</b>	-pGLO LB/amp 	
	-pGLO LB 	

## B. Auswertung der Ergebnisse

Das Ziel der Auswertung der Ergebnisse dieses Versuchs ist es zu bestimmen, ob eine genetische Veränderung stattgefunden hat.

1. Welche der anfangs beobachteten Merkmale der *E. coli*-Zellen haben sich anscheinend nicht verändert? Führen Sie diese "nicht-transformierten" Merkmale unten auf und notieren Sie wie Sie das Auswertungsergebnis für jedes der aufgelisteten Merkmale erhalten haben.

**Ausgangsmerkmal**

**Auswertung der Beobachtungen**

2. Welche der Anfangsmerkmale der *E. coli*-Zellen haben sich nach Durchführung der Transformation nicht grundsätzlich verändert? Notieren Sie diese Merkmale und beschreiben Sie die Unterschiede, die Sie beobachtet haben.

**Neues Merkmal**

**Beobachteter Unterschied**

3. Was kann man über die Eigenschaften bestimmter Gene des Plasmids folgern, wenn die genetisch veränderten Zellen die Fähigkeit erlangt haben in der Anwesenheit des Antibiotikums Ampicillin zu überleben?

4. Wie könnten Sie aufgrund ihrer Ergebnisse beweisen, dass die beobachteten Veränderungen ursächlich auf die Methode zurückzuführen sind, die Sie angewendet haben?



**Was leuchtet?**

Wenn eine grüne Fluoreszenz in den *E. coli*-Kolonien beobachtet wird, kann eine neue Frage gestellt werden, „Welches sind die zwei möglichen Ursachen für die Fluoreszenz innerhalb der Kolonien, wenn diese mit UV-Licht bestrahlt werden?“

**Erklären Sie:**

1. Erinnern Sie sich an Ihre Beobachtungen, als Sie mit der UV-Lampe eine Probe der pGLO-Plasmid-DNA beschienen haben? Beschreiben Sie Ihre Beobachtungen.

2. Welche der zwei möglichen Ursachen der Fluoreszenz kann man nun ausschließen?

3. Welche Hinweise bezüglich der eigentlichen Ursachen der Fluoreszenz lassen sich aus dieser Beobachtung ableiten?

4. Welche Ergebnisse belegen eindeutig, dass Ihr Versuch eine Transformation durchzuführen erfolgreich bzw. nicht erfolgreich durchgeführt wurde?

**Das Zusammenspiel von Genen und Umwelt**

Schauen Sie sich noch einmal Ihre Platten an. Können Sie *E. coli*-Zellen beobachten, welche auf LB-Platten wachsen, die weder Ampicillin noch Arabinose enthalten?

**1.** Können Sie aufgrund Ihrer Ergebnisse und durch einen Blick auf die Platte sagen, ob diese Bakterien Ampicillin-resistent sind? Erläutern Sie.

**2.** Wie würden Sie die Umgebung (das Medium) verändern, um deutlich zeigen zu können, dass die Bakterien Ampicillin-resistent sind?

**3.** Es kommt oft vor, dass Merkmale eines Organismus durch das Zusammenwirken seiner Gene und Faktoren der Umwelt zustande kommen. Denken Sie über die grüne Farbe nach, die Sie in den genetisch veränderten Bakterien gesehen haben:

**a.** Welche zwei Faktoren müssen in der Umgebung vorhanden sein, damit die grüne Farbe für Sie sichtbar wird? (Hinweis: ein Faktor ist Bestandteil der Platte und der andere Faktor hängt von der Art und Weise ab, wie Sie die Bakterien betrachten).

**b.** Wie lösen Ihrer Meinung nach die zwei von Ihnen genannten Umweltfaktoren das grüne Leuchten der genetisch veränderten Bakterien aus?

**c.** Welchen Vorteil gewinnt ein Organismus durch die Möglichkeit bestimmte Gene als Reaktion auf gewisse Bedingungen ein- oder auszuschalten ?

## Unterrichtseinheit 4 Zusatzaufgabe: Berechnung der Transformationseffizienz

Ihre nächste Aufgabe ist es zu lernen, wie man das Ausmaß der Transformation von *E. coli*-Zellen bestimmt. Diese quantitative Verfahren wird als Bestimmung der Transformationseffizienz bezeichnet.

Bei vielen Experimenten ist es wichtig soviel *E. coli*-Zellen wie möglich zu transformieren. So werden beispielsweise bei einigen Anwendungen der Gentherapie Zellen eines Patienten gesammelt, transformiert und dann zurück in den Patienten transferiert. Je mehr Zellen transformiert werden, und somit das gewünschte Protein produzieren, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Therapie einen positiven Ausgang nimmt. Die Transformationseffizienz wird berechnet, damit die Forscher einen Anhaltspunkt haben wie gut eine Transformation durchgeführt wurde.

### Die Aufgabe

Sie werden die Transformationseffizienz berechnen, damit Sie einen Anhaltspunkt dafür bekommen, wie effizient Sie DNA-Moleküle in Bakterienzellen transferiert haben. Die Transformationseffizienz ist eine Zahl. Sie widerspiegelt die Gesamtanzahl von Bakterienzellen, die das grüne Protein exprimieren, dividiert durch die DNA-Menge, die während des Versuchs verwendet wurde. (Sie gibt an, wie viel Bakterienzellen mit einem Mikrogramm DNA transformiert wurden.) Die Transformationseffizienz wird anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Gesamtanzahl der auf der Agarplatte wachsenden Zellen}}{\text{Auf den Platten verteilte DNA-Menge (\mu\text{g})}}$$

Bevor Sie die Effizienz berechnen können, benötigen Sie daher die folgenden zwei Informationen:

- (1) **Die Gesamtanzahl der grün fluoreszierenden Kolonien, die auf der LB/amp/ara-Platte wachsen.**
- (2) **Die Gesamtmenge der pGLO-Plasmid-DNA in den Bakterienzellen, die auf die LB/amp/ara-Platte gestrichen wurden.**

## 1. Bestimmung der gesamten Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen.

Stellen Sie Ihre LB/amp/ara-Platte neben eine UV-Lampe. Jede Kolonie auf der Platte stammt von einer einzigen Zelle ab. Im Verlauf der Vermehrung einer einzelnen Zelle werden immer mehr Zellen gebildet, was am Ende zur Bildung einer sogenannten Kolonie führt. Der direkteste Weg die **Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen** zu bestimmen ist es die Kolonien auf der Platte zu zählen.

Fügen Sie die Zahl hier ein =>

Gesamtzahl der Zellen =  _____
--------------------------------------

## 2. Bestimmung der DNA-Menge des pGLO-Plasmids in den auf der LB/amp/ara-Platte ausgestrichenen Bakterienzellen.

Wir benötigen zwei Informationen, um die DNA-Menge des pGLO-Plasmids in den auf der LB/amp/ara-Platte ausgestrichenen Bakterienzellen dieses Versuch zu bestimmen. (i) Wie groß war die Gesamtmenge der DNA zu Beginn des Experiments? (ii) Welcher Anteil der DNA (innerhalb der Bakterien) wurde wirklich auf die LB/amp/ara-Platten ausgebracht?

Nach Berechnung dieser Werte, müssen Sie die in diesem Versuch verwendete **Gesamtmenge der pGLO-Plasmid-DNA** mit dem **Anteil der DNA** multiplizieren, den Sie auf die LB/amp/ara-Platte ausgestrichen haben. Das Ergebnis der Multiplikation wird Ihnen die Menge der pGLO-Plasmid-DNA in den Bakterienzellen angeben, die auf die LB/amp/ara-Platte ausgebracht wurden.

### a. Bestimmung der Gesamtmenge der DNA

Die Gesamtmenge der pGLO-Plasmid-DNA, mit der wir begonnen haben, ist gleich dem Produkt der Konzentration und dem verwendeten Gesamtvolumen, oder anders ausgedrückt

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

Sie haben bei diesem Versuch 10  $\mu\text{l}$  pGLO-DNA einer Konzentration von 0,08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingesetzt. Das bedeutet, dass jeder Mikroliter der Lösung 0,08  $\mu\text{g}$  pGLO-DNA enthielt. Berechnen Sie die **Gesamtmenge der DNA, die in diesem Versuch verwendet wurde**.

Fügen Sie die Zahl hier ein =>

<b>Gesamtmenge der DNA (<math>\mu\text{g}</math>)</b> in diesem Experimentes =  _____
--

Wie verwenden Sie diese Information weiter?

**b. Bestimmung der DNA-Menge des pGLO-Plasmids in den auf der LB/amp/ara-Platte ausgestrichenen Bakterienzellen.** Da nicht alle Moleküle der pGLO-Plasmid-DNA, die Sie den Bakterien hinzugefügt haben, auf die Agarplatte übertragen wird, müssen Sie herausfinden, welcher Anteil der DNA wirklich auf die LB/amp/ara-Platte ausplattiert wurde. Dividieren Sie daher das Volumen der DNA, die Sie auf die LB/amp/ara-Platte ausgebracht haben, durch das Gesamtvolumen der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß, das die DNA enthielt. Die entsprechende Formel lautet:

$$\text{Anteil der DNA} = \frac{\text{Volumen, ausgebracht auf LB/amp-Platte } (\mu\text{l})}{\text{Gesamtvolumen im Reaktionsgefäß } (\mu\text{l})}$$

Sie haben 100  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension ausgestrichen, die pGLO-DNA aus einem Reaktionsgefäß enthielt, das mit 510  $\mu\text{l}$  Lösung gefüllt war. Erinnern Sie sich warum das Gesamtvolumen 510  $\mu\text{l}$  betrug? Schauen Sie im Protokoll nach und finden Sie alle Schritte, wo Sie dem Reaktionsgefäß Flüssigkeit hinzugefügt haben. Addieren Sie die Volumenangaben.

Benutzen Sie die oben angegebene Formel, um den Anteil der DNA zu berechnen, der auf die LB/amp/ara-Platte gelangte.

Fügen Sie die Zahl hier ein =>

Anteil der DNA = <hr style="width: 50px; margin: 0 auto;"/>
--

- Wie verwenden Sie diese Information weiter?

**Wie viel Mikrogramm DNA haben Sie auf allen LB/amp/ara-Platten verteilt?**

Um diese Frage zu beantworten, müssen Sie die **Gesamtmenge der verwendeten DNA** mit dem **Anteil der DNA** multiplizieren, die Sie auf der LB/amp/ara-Platte verteilt haben.

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

Fügen Sie die Zahl hier ein =>

Verteilte pGLO-DNA ( $\mu\text{g}$ ) = <hr style="width: 50px; margin: 0 auto;"/>
---

- Was sagt diese Zahl aus?

Schauen Sie sich die oben durchgeführten Berechnungen an. Entscheiden Sie sich welche der berechneten Zahlen in die unten aufgeführte Tabelle gehören. Füllen Sie die folgende Tabelle aus:

Anzahl der Kolonien auf der LB/amp/ara-Platte =	
Auf den Platten verteilte Mikrogramm pGLO-DNA =	

Benutzen Sie nun die Werte aus der Tabelle, um die Effizienz der pGLO-Transformation zu berechnen.

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Gesamtanzahl der auf der Agarplatte wachsenden Zellen}}{\text{Auf den Platten verteilte DNA-Menge}}$$

Fügen Sie die Zahl hier ein =>

Transformationseffizienz = _____ Transformanden / $\mu\text{g}$
--

### Auswertung

Berechnungen der Transformationseffizienz führen zu großen Zahlen. Wissenschaftler verwenden oftmals eine Art mathematische Kurzschrift die Exponentialschreibweise genannt wird. So wird beispielsweise eine berechnete Transformationseffizienz von 1000 Bakterien/ $\mu\text{g}$  DNA oft folgendermaßen geschrieben:

**$10^3$  Transformanden/ $\mu\text{g}$**  ( $10^3$  drückt auf andere Art folgendes aus:  $10 \times 10 \times 10$  oder 1000)

- Wie drücken Wissenschaftler 10000 Transformanden/ $\mu\text{g}$  in der Exponentialschreibweise aus?

Stellen wir uns vor Wissenschaftler würden eine Effizienz von **5000 Bakterien/ $\mu\text{g}$  DNA** berechnen. Dies würde folgendermaßen geschrieben:

**$5,0 \times 10^3$  transformants/ $\mu\text{g}$  DNA** ("5 mal 1000")

- Wie würden Wissenschaftler 40000 Transformanden/ $\mu\text{g}$  in der Exponentialschreibweise schreiben?



- Berechnen Sie die Transformationseffizienz des folgenden Experiments indem Sie die unten aufgeführten Informationen und Ergebnisse verwenden.

**DNA-Plasmidkonzentration—0,08 µg/µl**

**250 µl CaCl<sub>2</sub> Transformationslösung**

**10 µl Plasmidlösung**

**250 µl LB Nährlösung**

**100 µl auf Agarplatten ausgebrachte Zellen**

**227 gezählte Kolonien transformierte Zellen**

Füllen Sie die folgende Tabelle aus und zeigen Sie diese dann der Lehrkraft.

Anzahl der Kolonien auf der LB/amp/ara-Platte =	
Auf den Platten verteilte Mikrogramm DNA =	
Transformationseffizienz =	

- Zusatzaufgabe

Wenn ein bestimmtes Experiment eine Transformationseffizienz von  $3 \times 10^3$  Bakterien/µg DNA aufweisen würde, wie viele Kolonien von Transformanden könnten dann auf einer LB/amp/ara-Platte wachsen? Sie können annehmen, dass die Konzentration der DNA und der Anteil der Zellen, die auf dem LB-Agar ausgebracht werden die gleichen Werte haben wie der dieses pGLO-Praktikums.



## Anhang A Historische Anknüpfungspunkte der Biotechnologie

Die Technik der biologischen Transformation hat eine interessante Geschichte.

1928 führte Frederick Griffith, ein Londoner Arzt, der in einem Pathologielabor arbeitete, ein Experiment durch, dessen Ergebnisse er Zeit seines Lebens nie vollständig deuten konnte. Griffith verwandelte (transformierte) immer wieder einen sicheren, nicht-pathogenen Bakterienstamm der Gattung *Pneumococcus* in einen tödlichen pathogenen Stamm. Er erreichte diese erstaunliche Veränderung der Bakterien durch Behandlung der sicheren Bakterien mit hitze-inaktivierten tödlichen Bakterien. Die Mischung dieser zwei Bakterienstämme enthielt keine lebenden virulenten Bakterien; die Mischung tötete aber die Mäuse, in die sie injiziert wurde. Er wiederholte das Experiment viele Male – immer mit dem gleichen Ergebnis. Er und viele seiner Kollegen waren verblüfft und ratlos. Was verwandelte die sicheren Bakterien in die tödlichen Bakterien? Erst viele Jahre später wurde dieses Experiment als der erste dokumentierte Fall einer im Labor durchgeführten biologischen Transformation bekannt und niemand konnte es erklären. Griffith war mit DNA nicht vertraut, wusste aber, dass die Transformation vererbbar war. Geschichtlich gesehen können die Transformations-Experimente von Griffith als Geburtsstunde analytischer Genmanipulation angesehen werden, die zur Entstehung der Gen- und Biotechnologie führten, bis zur Aussicht einer Genmanipulation beim Menschen.

1944, sechszehn Jahre nach den Experimenten von Griffith, veröffentlichte eine Forschergruppe des Rockefeller Institute unter Leitung von Oswald T. Avery einen Aufsatz, der unmittelbar aus der Arbeit von Griffith hervorging. “Welche Art Substanz ist verantwortlich?”, fragte Avery seine Mitarbeiter. Avery und seine Mitarbeiter arbeiteten mit den gleichen Stämmen der Lungenentzündung hervorrufenden Bakterien und legten für diese Frage eine entscheidende Antwort vor. Sie konnten beweisen, dass die gesuchte Substanz die DNA ist, und dass eine biologische Transformation zustande kommt, wenn Zellen fremde DNA aufnehmen und exprimieren. Obwohl viele Jahre vergingen bis Avery die volle Anerkennung erhielt, wird sein Beitrag zu diesem elementaren Fortschritt biologischen Wissens heute allgemein anerkannt. Aufbauend auf den Arbeiten von Avery und anderen entwickelte Douglas Hanahan die Technik der Kolonietransformation, die in diesem Bio-Rad-Experiment verwendet wird.<sup>1,2</sup>

### Geschichtlicher Zusammenhang

#### *Genetische Transformation*

- 1865— Gregor Johann Mendel: Mendel präsentierte seine Entdeckungen, die die Prinzipien beschrieben, durch die Erbmerkmale von der Elterngeneration an die Nachkommen weitergegeben werden.
- 1900— Carl Correns, Hugo De Vries, Erich Tschermak: Pflanzengenetiker, die Vererbungsstudien durchführten. Sie entdeckten, dass ihre Arbeit im Wesentlichen eine Wiederholung der Arbeiten eines unbekanntes österreichischen Augustinermönchs namens Gregor Johann Mendel waren, der Erbsen untersuchte.
- 1928— Frederick Griffith: Griffith verwandelte nicht-pathogene *Diplococcus pneumonia* in pathogene Bakterien mit Hilfe hitze-inaktivierter virulenter Bakterien. Er schlug vor, dass das “transformierende Prinzip” im Zusammenhang mit der Synthese der Polysaccharid-Kapsel stand.

- Griffith war mit DNA nicht vertraut, wusste aber, dass die Transformation vererbbar war. Die Transformations-Experimente von Griffith können als Geschichtlich gesehen können als Geburtsstunde analytischer Genmanipulation angesehen werden, die zur Entstehung der Gen- und Biotechnologie führten, bis zur Aussicht einer Genmanipulation beim Menschen.
- 1944— Oswald Avery, Colin MacLeod: Avery und seine Kollegen gaben bekannt, dass sie den transformierenden Faktor mit hoher Reinheit isoliert hatten, und dass dieser Faktor DNA war. Seit diesem klassischen Versuch der Molekulargenetik, wurden die Transformation, die Konjugation (Bakterienpaarung) und die Transduktion (DNA-Übertragung durch Viren) für die Übertragung von Genen zwischen verschiedenen Arten von Bakterien, *Drosophila*, Mäusen, Pflanzen und Tieren, Säugerzellkulturen sowie für die Gentherapie des Menschen genutzt.
- 1952— Alfred Hershey, Martha Chase: Hershey und Chase verwendeten Radioisotope des Schwefels und Phosphors, sowie den Bakteriophagen T2 um schlüssig zu beweisen, dass die DNA das informationstragende Molekül bei der Vererbung ist. Zusammen mit den Arbeiten von Avery, MacLeod, und McCarty unterstrich der Versuch von Hershey/Chase die Erkenntnis, dass die DNA der transformierende Stoff und das informationstragende Molekül der Vererbung ist.
- 1972— Paul Berg, Janet Mertz: Berg verwendete die neu entdeckte Endonuklease *EcoRI*, um die DNA von SV40 und des Bakteriophagen P22 zu schneiden. Dann benutzte er die Enzyme Terminale Transferase und DNA-Ligase um diese getrennten Fragmente mit einander zu einem Stück DNA zu verbinden. Das Erschaffen dieses ersten neu-kombinierten DNA-Moleküls stand am Anfang des Zeitalters der Biotechnologie. Das neu entstandene Molekül wurde, wegen Bedenken innerhalb der Wissenschaftsgemeinschaft hinsichtlich Genübertragungen, nicht in eine Säugetierzelle eingeführt.
- 1973— Herbert Boyer, Stanley Cohen, Annie Chang: Boyer, Cohen und Chang benutzen *EcoRI* zur Isolierung eines intakten Gens für Kanamycin-Resistenz. Boyer, Cohen und Chang fügten das Gen für die Kanamycin-Resistenz in ein *EcoRI*-geschnittenes Plasmid ein, das bereits das Gen für die Tetracyclin-Resistenz enthielt und stellten so ein neu-kombiniertes bakterielles Plasmid-Molekül mit doppelter Antibiotika-Resistenz her. Danach wurde *E. coli* mit dem veränderten Plasmid transformiert.
- 1977— Genentech, Inc.: Das erste Produkt der Gentechnik, das in Bakterien exprimierte menschliche Somatostatin-Gen (human growth hormone-releasing inhibitory factor), wurde von der Firma Genentech vorgestellt.
- 1980— J. W. Gordon, Frank Ruddle: Gordon and Ruddle übertrugen erfolgreich normale Gene in Mäusekeimzellen mit Hilfe der Mikroinjektion.
- 1982— Richard Palmiter, Ralph Brinster: Palmiter und Brinster transferierten das Gen für das Wachstumshormon der Ratte mittels Mikroinjektion in Mäuseembryonen. Dieses war der erste Bericht einer Keimzellen-„Heilung“ bei Säugetieren. Die Maus, die die DNA aufnahm, wurde „little“ genannt, da sie an angeborenem Zwergwuchs litt.
- 1988— Steven Rosenberg: Rosenberg und seinen Kollegen wurde die Erlaubnis erteilt den ersten Versuch einer Genübertragung an menschlichen Patienten durchzuführen, die an metastasierendem Melanom litten. Dieses Experiment stellte ein genetisches „tracking“ („Verfolgen“) mit dem Markergen NeoR dar und war keine Gentherapie.
- 1990— W. French Anderson, Michael Blaese, Kenneth Culver: Am Freitag, den 14. September 1990 um 12:52 Uhr wurde das vier Jahre alte Mädchen Ashanti De Silva aus Cleveland die erste Gentherapie-Patientin. Am National Cancer Institute in Ohio wurde sie mit den eigenen weissen Blutzellen infundiert. Diese

- trugen die verbesserte Version des Adenosin-Deaminasegens (ADA). Ein Jahr lang erwarteten die Doktoren Anderson, Blaese und Culver keine aussagekräftigen Ergebnisse von diesem Versuch. Ein zweites Mädchen, namens Cynthia Cutshall, wurde im Jahr 1990 auf ähnliche Weise behandelt. Medienberichte im Jahre 1993 zeigten wie die beiden lachenden Mädchen mit kindlichem Tatendrang auf einem Schulhof spielen. Das Immunsystem beider Mädchen funktionierte wirksam.
- 1994— Weitere Kandidaten für eine Gentherapie sind u.a. Patienten mit Sichelzellanämie, Bluterkrankheit, Diabetes, Krebs und Herzkrankheiten. Die Keimzelltherapie wird während eines Treffens des Recombinant DNA Advisory Committee diskutiert. Im Jahr 1996 wartet eine immer größere Anzahl von Anträgen auf eine Prüfung durch das Human Gene Therapy Subcommittee of the Recombinant DNA Advisory Committee.
- 1995— Unter der Leitung von J. Craig Venter veröffentlicht eine Gruppe am Institute for Genomic Research (TIGR) in Maryland, die gesamte Gensequenz des Bakteriums *Hemophilus influenzae*. Diese erste Entschlüsselung der genetische „Blaupause“ eines frei lebenden Organismus stellt einen wichtigen Meilenstein mikrobiologischer Forschung dar.
- 1996— Die multinationale Zusammenarbeit von mehr als 100 Laboratorien aus Europa, USA, Canada, und Japan ermöglicht als erstes die gesamte Genomsequenz eines Eukaryoten, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, zu enträtseln. *S. cerevisiae* ist eine wirtschaftlich bedeutende Hefe, die allgemein beim Backen und zur Herstellung von alkoholischen Getränken verwendet wird. Außerdem wird sie vielfach als Modellorganismus im Labor eingesetzt, um zelluläre und molekulare Vorgänge von Eukaryoten zu verstehen.
- 1997— Unter der Leitung von Ian Wilmut berichteten Wissenschaftler des Roslin Institute in Schottland von der erfolgreichen Klonierung eines Schafes mit Namen Dolly aus der Euterzelle eines ausgewachsenen Tieres. Die Klonierung von Dolly löste international zahlreiche Debatten über ethische und moralische Fragen in Zusammenhang mit dem Klonieren aus. Danach klonierten Wissenschaftler des Roslin Institute, in Zusammenarbeit mit der Firma PPL Therapeutics, zwei genetisch veränderte Lämmer, namens Polly und Molly. Die genetische Veränderung bestand bei beiden aus einem eingefügten menschlichen Gen, das es ermöglicht in der Milch ein Protein namens Faktor IX, einen Blutgerinnungsfaktor, zu produzieren, um diesen zu extrahieren und zur Behandlung der Bluterkrankheit einzusetzen.
- 1998— Mehr als 99% der Genomsequenz des ersten mehrzelligen Organismus, dem winzigen Rundwurm *Caenorhabditis elegans*, werden bekannt gegeben. Obwohl *C. elegans* ein einfacher Organismus ist, haben er und der Mensch doch viele wichtige genetische und biologische Eigenschaften gemein und daher wird er Forschern erlauben die Gene zu identifizieren und zu charakterisieren, deren Funktionen wichtig für das Verständnis von Biologie und Krankheiten des Menschen sind. Wissenschaftler haben eine detaillierte und genaue Karte für die meisten der 30 000 bekannten menschlichen Gene erstellt – ein Meilenstein für das Human Genome Project.
- 2000— Eine Arbeitsgruppe unter der Führung von Ingo Potrykus von der Eidgenössisch Technischen Hochschule in Zürich, Schweiz und Peter Beyer von der Universität Freiburg in Deutschland gibt die Erzeugung einer genetisch veränderten Reissorte namens „golden rice“ bekannt. Dieser „golden rice“ produziert große Mengen beta-Carotin, ein Stoff, den der menschliche Körper in das Vitamin A umwandeln kann. „Golden rice“ könnte die durch Vitamin A-Mangel hervorgerufene Blindheit lindern, unter der Millionen in Armut lebender Menschen auf der ganzen Welt leiden.

Die Genomsequenz der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wird nach Zusammenarbeit zahlreicher Wissenschaftlern mit der Firma Celera Genomics veröffentlicht. *D. melanogaster*, ein in vielen Laboren verwendeter Modell-Organismus, ist das größte Tier, dessen genetischer Code entziffert wurde. Ein grober Entwurf des menschlichen Genoms wurde von einem Team aus 16 Instituten, die sich zum Human Genome Sequencing Consortium zusammen geschlossen haben, fertiggestellt. Forscher von Celera Genomics geben die Fertigstellung des „ersten Zusammenbaus“ des Genoms bekannt..

2001— Am 12. Februar 2001 geben Celera Genomics und das International Human Genome Sequencing Consortium gemeinsam die Veröffentlichung der annähernd vollendeten Sequenz des menschlichen Genoms bekannt – die genetische „Blaupause“ eines menschlichen Wesens. Die Bewältigung dieser Aufgabe durch das internationale Team nahm fast 20 Jahre in Anspruch und gelang nur durch die Zusammenarbeit tausender Wissenschaftler aus der ganzen Welt. Celera Genomics konnte die Arbeit nach eigenen Angaben in ungefähr neun Monaten fertig stellen. Beide Gruppen unterschieden sich was die Abschätzung der Anzahl der Gene innerhalb des menschlichen Genoms anging. Die von beiden Gruppen vorhergesagte Spanne, zwischen 25000 und 40000 Gene, liegt allerdings viel niedriger als die vorhergehender Schätzungen, die von 100000 Genen ausgingen. Dieses unerwartete Ergebnis deutet darauf hin, dass selbst ein so komplexer Organismus wie der Mensch aus relativ wenigen Genen entstehen kann, deren Anzahl nur doppelt so hoch ist, wie die des Wurms *C. elegans* oder der Fliege *D. melanogaster*. Die Enthüllung der gesamten Sequenz des menschlichen Genoms erlaubt es Forschern auf der ganzen Welt neue Behandlungsmöglichkeiten für viele Krankheiten zu entwickeln. Präsident George Bush entschied, dass nur Versuche, die die bereits existierenden 64 Linien embryonaler Stammzellen verwenden, berechtigt sind eine Forschungsförderung von Seiten des Bundes zu erhalten. Diese Entscheidung des Präsidenten war für viele Wissenschaftler enttäuschend, da sie hofften embryonale Stammzellen zur Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten für unterschiedliche Leiden zu nutzen.

Advanced Cell Technology, eine kleine Firma aus Massachusetts, gab bekannt, dass sie erfolgreich menschliche Embryonen zum Zweck der Stammzellgewinnung kloniert hätte. Diese Methode könnte letztendlich genutzt werden, um Patienten mit unterschiedlichen Krankheiten zu behandeln, indem Ersatzzellen, wie z.B. Nerven- und Muskelzellen, hergestellt werden, die später ohne das Risiko einer Abstoßungsreaktion in den Patienten zurück transplantiert werden können.

PPL Therapeutics, die Firma, die an der Klonierung des Schafs Dolly beteiligt war, gab bekannt, dass sie fünf gentechnisch veränderte Ferkel kloniert hätten. Das eingefügte inaktive Gen, auch „knock-out“-Gen genannt, dient dazu eine Abstoßung ihrer Organe nach möglicher Transplantation in den Menschen zu verhindern. Der Erfolg von PPL Therapeutics weckt Hoffnungen für Tausende von Menschen, die auf geeignete Spenderorgane wie Herz, Lunge, Niere oder Leber warten.

2002— Das Schaf Dolly, das erste aus einer ausgewachsenen Zelle klonierte Säugetier, entwickelte im relativ frühen Alter von fünf Jahren Arthritis. Es ist nicht zweifelfrei erwiesen, dass Dollys Zustand das Ergebnis eines durch die Klonierung ausgelösten genetischen Defekts war oder ob er zufällig auftrat. Diese Nachricht hat neuerliche Debatten ausgelöst, die sich um das vorzeitige Altern und die Gesundheitsprobleme klonierter Tiere drehen. Weiterhin sind sie ein Rückschlag für diejenigen, die behaupten, dass das Klonieren im großen Umfang Organe für Patienten mit anstehender Transplantation bereitstellen könnte.

## **Anhang B Glossar der Fachbegriffe**

<b>Agar</b>	Unterstützt als stabile Matrix das bakterielle Wachstum. Enthält eine Nährstoffmischung aus Kohlenhydraten, Aminosäuren, Nukleotiden, Salzen, und Vitaminen.
<b>Antibiotika-Selektion</b>	Gebrauch eines Antibiotikums, um Bakterien auswählen zu können, die das gewünschte Gen enthalten. Das pGLO-Plasmid enthält des Gen für die beta-Lactamase, das die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin vermittelt. Wenn Bakterien mit dem pGLO-Plasmid transformiert wurden, beginnen sie mit der Produktion und Sekretion des beta-Lactamaseproteins. Die ausgeschiedene beta-Lactamase baut Ampicillin ab, was die Wirtszelle gegen das Antibiotikum unempfindlich macht. Nur die Bakterien, die das pGLO-Plasmid enthalten können auf Ampicillin-haltigem Nährmedium wachsen und Kolonien bilden, im Gegensatz zu Zellen, die kein pGLO-Plasmid aufgenommen haben. Diese können nicht auf den Ampicillin-haltigen Selektionsplatten wachsen.
<b>Arabinose</b>	Ein aus Pflanzen isoliertes Kohlenhydrat, das normalerweise von Bakterien als Nährstoffquelle verwendet wird.
<b>Ausstreichen</b>	Das Streichens der mit einer Bakteriensuspension benetzten Impfpöse über eine Agarplatte.
<b>Beta-Lactamase</b>	Beta-Lactamase ist ein Protein, das die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin vermittelt. Das beta-Lactamaseprotein wird von Bakterien hergestellt, die mit einem Plasmid transformiert wurden, das das beta-Lactamasegen enthält. Die ausgeschiedene beta-Lactamase inaktiviert das Ampicillin, welches im LB-Nähragar vorhanden ist. Dieses ermöglicht bakterielles Wachstum und die Expression neu erworbener Gene, die auch Teil des Plasmids sind , z.B. GFP.
<b>Biotechnologie</b>	Die Anwendung biologischer Kenntnisse zur zielgerichteten Handhabung lebender Organismen, hauptsächlich auf genetischer Ebene, um nützliche Produkte herzustellen.
<b>Genmanipulation</b>	Die Veränderung des Erbmaterials eines Organismus (DNA) durch Einführen oder Entfernen bestimmter Gene.
<b>Genregulation</b>	Die Genexpression in allen Organismen wird sorgfältig reguliert, um die Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen zu ermöglichen, was die verschwenderische Überproduktion nicht benötigter Proteine verhindert.

Die Gene, die am Abbau verschiedener Nahrungsquellen beteiligt sind, sind gute Beispiele für hoch regulierte Gene. Der einfache Zucker Arabinose ist z.B. sowohl eine Energie- als auch eine Kohlenstoffquelle für Bakterien. Die Bakteriengene, die verdauende Enzyme für den Abbau von Arabinose zu Nahrungszwecken kodieren, werden nicht exprimiert wenn Arabinose nicht im Aussenmedium vorhanden ist. Wenn Arabinose allerdings vorhanden ist, werden diese Gene angeschaltet. Wenn Arabinose sich erschöpft werden die Gene wieder abgeschaltet. Ausführlichere Erklärungen zur Rolle von Arabinose bei der Regulation und Expression des GFP-Gens finden sich in Anhang D.

### **Gentechnologie**

Der Vorgang des Schneidens und Zusammenfügens von DNA-Fragmenten als Mittel zur Isolierung von Genen oder zur Veränderung ihrer Struktur oder Funktion.

### **Grün fluoreszierendes Protein**

Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) wurde ursprünglich aus der Quallenart *Aequorea victoria* isoliert. Das Gen für GFP wurde kürzlich kloniert. Die einzigartige dreidimensionale Konformation von GFP führt nach UV-Exposition zu einer Resonanzschwingung und einer Energieabgabe in Form sichtbaren grünen Lichtes.

### **Klonieren**

Klonieren ist der Vorgang der Herstellung praktisch unendlich vieler Kopien oder Klone eines Organismus oder eines Abschnittes einer DNA. Eine Klonierung produziert eine Population mit genetisch identischen Eigenschaften.

### **Kolonie**

Eine Ansammlung genetisch identischer Bakterienzellen , die auf einer Agarplatte wachsen. Alle Zellen einer Kolonie sind genetisch identisch und werden daher als Klone bezeichnet.

### **Kulturmedien**

Die Fest- und Flüssigmedien, die nach Luria und Bertani als LB-Agar bzw. LB-Nährlösung bezeichnet werden, bestehen aus einem Hefeextrakt und einem enzymatischen Verdau von Nebenprodukten der Fleischherstellung. Diese stellen eine Nährstoffmischung von Kohlenhydraten, Aminosäuren, Nukleotiden, Salzen und Vitaminen dar, die bakterielles Wachstum ermöglichen. Agar, der aus Algen hergestellt wird, schmilzt wenn er erhitzt wird und formt nach Abkühlung ein festes Gel (entsprechend Jell-O). Dieses Agargel stellt eine feste Unterlage bereit, auf der Bakterien kultiviert werden können.

### **pGLO**

Ein Plasmid, das die GFP-Gensequenz und ein für beta-Lactamase kodierendes Ampicillin-Resistenzgen trägt.

<b>Plasmid</b>	Ein ringförmiges DNA-Molekül, das in der Lage ist sich selbst zu replizieren, und das ein oder mehrere Antibiotika-Resistenzgene sowie klonierte Fremdgene - wie z.B. GFP - trägt.
<b>Screening</b>	Der Vorgang des Aufspürens gewünschter Bakterien aus einer Bakterien-Bibliothek.
<b>Steriltechnik</b>	Anwendung von Techniken, die ein sorgfältiges und sauberes Arbeiten ermöglichen, um die während eines Versuchs von aussen eingetragenen Verunreinigungen durch Bakterien zu minimieren.
<b>Vektor</b>	Ein sich selbstständig replizierendes DNA-Molekül, wie z.B. ein Plasmid, in das Stücke einer Fremd-DNA eingefügt werden, um diese in einer Wirtszelle vervielfältigen zu können.

## **Anhang C Grundlegende Fachausdrücke und Begriffe der Molekularbiologie**

Beim Betrachten der belebten Welt wird deutlich, dass alle lebenden Organismen eine einzigartige Gestalt annehmen. Eine genaue „Blaupause“ dieses Aufbaus wird an die Nachkommen weitergegeben.

Zellen sind die kleinsten funktionellen Einheiten, die in der Lage sind sich unabhängig fortzupflanzen. Viele Bakterien können z.B. als Einzelzellen überleben. Die chemischen Bausteine - die Moleküle - innerhalb jeder Zelle arbeiten dabei eng zusammen.

### **Zellen können kultiviert und geerntet werden**

Zellen können an ihren natürlichen Standorten gesammelt und im Labor in speziellen Behältern kultiviert werden. Um ausreichendes Zellwachstum zu ermöglichen, müssen geeignete Wachstumsbedingungen und Nahrung bereitgestellt werden. Bakterien und Hefen kann man sehr einfach kultivieren. Auch Zellen von Pflanzen, Insekten und Tieren können kultiviert werden, die Pflege dieser Zellenkulturen gestaltet sich allerdings schwieriger. Nach abgeschlossenem Wachstum können die kultivierten Zellen geerntet und untersucht werden.

### **Klonieren**

Wenn eine Zellpopulation ausgehend von einer einzigen Zelle hergestellt wird, sind alle Zellen der Population genetisch identisch. Eine solche Population wird als „klonal“ bezeichnet. Der Vorgang der Herstellung einer solchen Population wird als „Klonen“ bezeichnet. Der Zweck des Ausstreichens von Bakterien auf einen Agar ist es Einzelkolonien zu erhalten, die jeweils einer einzigen Zelle entstammen.

### **Ein Blick in die Zelle**

Jedes der Moleküle innerhalb einer Zelle erfüllt bestimmte Aufgaben. Ein Beispiel sind DNA-Moleküle, die Informationen speichern (wie etwa die Festplatte eines Computers Informationen speichert). Proteine dagegen sind die Arbeitspferde der Zelle. Um diese Moleküle untersuchen zu können, müssen wir zuerst eine klonale Population eines bestimmten Zelltyps herstellen, um die Zellen dann aufbrechen und den Inhalt analysieren zu können. Es ist auch möglich eine bestimmte Proteinsorte aus einer Mischung verschiedener Proteine eines Zelltyps aufzureinigen. Jede Art Protein hat einzigartige physikalische und chemische Eigenschaften. Diese Eigenschaften ermöglichen beispielsweise die Auftrennung verschiedener Proteine aufgrund ihrer Größe, Ladung oder Hydrophobizität.

### **Besondere Moleküle, spezielle Aufgaben**

Wir werden uns mit drei bestimmten Arten zelleigener Moleküle näher beschäftigen: DNA, RNA und Proteinen. Jedes dieser Moleküle übt bestimmte Aufgaben aus. DNA-Moleküle sind wie Aktenschränke, in denen Informationen aufbewahrt werden. Die RNA hilft beim Abrufen und Ausführen der Anweisungen, die in der DNA gespeichert sind. Proteine sind dazu da chemische Arbeiten innerhalb (und oft auch ausserhalb) der Zelle auszuführen.

### **DNA—Die universell verwendete Matrize der biologischen Information**

Das „Drehbuch“ eines jeden Organismus liegt verschlüsselt in dessen Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die in den DNA-Molekülen hinterlegte Information einer jeden Zelle reicht aus, um jede Aufgabe einer Zelle in Gang zu setzen.



DNA besteht aus sehr langen kettenförmigen Molekülen, die aus sich wiederholenden Untereinheiten aufgebaut sind. Jede Untereinheit (Nukleotid) enthält eine von vier möglichen Basen, die aus der Kette herausragen:

Adenin (**A**)      Cytosin (**C**)

Thymin (**T**)      Guanin (**G**)

Die Nukleotide werden in Kopf-Schwanz-Orientierung zusammengefügt, daher besteht ein langer DNA-Strang im Wesentlichen aus einem chemischen Rückgrat, in dessen Verlauf die Basen herausragen. Die Information, die von diesem Molekül getragen wird, liegt verschlüsselt als Abfolge der Basen **A**, **G**, **C** und **T** entlang des DNA-Strangs vor.

### Weitere wichtige Punkte zur DNA-Struktur

1. Da die Untereinheiten der DNA-Kette in Kopf-Schwanz-Orientierung zusammengefügt werden, ist die Zeichenfolge gerichtet (z.B. **GTCAA**). Konventionsgemäß schreiben wir die DNA-Sequenz am freien 5'-Ende des Rückgrats beginnend in Richtung des anderen freien Endes (3') auf.

*z.B.* **5'...AACTG...3'**

2. Die entlang der Kette herausstehenden Basen können spontan Wasserstoffbrücken mit entsprechend zugänglichen Basen auf anderen DNA-Strängen bilden. Dabei gelten folgende Regeln:

(i) **A** bildet Wasserstoffbrücken mit **T**

(ii) **C** bildet Wasserstoffbrücken mit **G**

Infolge dieser Regeln werden die beiden Basen **A** und **T**, sowie die Basen **G** und **C**, als „komplementär“ bezeichnet.

(iii) Damit zwei DNA-Stränge miteinander paaren können, müssen diese komplementär und gegenläufig orientiert sein.

*z.B.* kann (**5'...AGGTC...3'**) mit (**5'...GACCT...3'**) paaren. Diese beiden Stränge haben komplementäre Sequenzen. Der Doppelstrang wird wie folgt geschrieben:

**5'...AGGTC...3'**

**3'...TCCAG...5'**

Das oben dargestellte Molekül enthält 5 Basenpaare. In der Natur kommt DNA tatsächlich fast immer in doppelsträngiger Form vor.

3. Typischerweise sind DNA-Moleküle Tausende, manchmal Millionen Basenpaare lang. Es kommt vor, dass die beiden Enden eines DNA-Moleküls zusammengefügt werden, um ringförmige DNA zu bilden.

4. Doppelstrang-DNA, kommt in seiner natürlichen Form als aufgewundene Spirale oder Schraube (Helix) vor. Weil sie doppelsträngig ist, wird sie oft auch als Doppelhelix bezeichnet.

Die Architektur der DNA ermöglicht eine sehr einfache Vervielfältigungsstrategie: Die beiden DNA-Stränge eines jeden DNA-Moleküls entwinden sich. Danach kann an jedem freiliegenden DNA-Strang mit Hilfe eines Enzyms namens DNA-Polymerase ein neuer komplementärer Strang synthetisiert werden. Daraus ergeben sich zwei jeweils doppelsträngige Tochtermoleküle, die mit dem Elternmolekül identisch sind.

### Proteine und RNA sind die Arbeitspferde der Zelle

Die Biochemie des Lebens erfordert Hunderte sehr spezifische und effiziente chemische Wechselwirkungen, die alle gleichzeitig ablaufen. Die an diesen Wechselwirkungen beteiligten Hauptakteure sind kurzlebige Proteine

und RNA-Moleküle die entweder zusammen oder unabhängig voneinander arbeiten können, um eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben auszuführen. Ebenso wie DNA und RNA bestehen auch die Proteine aus langen Ketten sich wiederholender Untereinheiten.

## **RNA**

RNA (Ribonukleinsäure), besteht wie die DNA aus vier Arten von Bausteinen, die kettenartig miteinander verbunden sind. Sie unterscheidet sich von der DNA in den folgenden Gesichtspunkten:

Die vier Basen der RNA sind **A**, **G**, **C**, und **U** (Uracil); die Regeln der Basenpaarung sind die gleichen wie für die DNA mit der Ausnahme, dass **A** mit **U** paart. Obwohl RNA mit komplementärer RNA oder DNA paaren kann, ist die RNA der Zelle in der Regel einzelsträngig. Der Zucker innerhalb des RNA-Rückgrats ist Ribose, nicht Desoxyribose. RNA-Moleküle sind im Vergleich mit DNA-Molekülen in der Regel kurz; das kommt daher, weil jede RNA für sich genommen eine Kopie einen kurzen Abschnitts eines DNA-Moleküls ist.

Der Vorgang des Kopierens einer DNA in die entsprechende RNA wird als Transkription bezeichnet. Diese wird mit Hilfe eines Proteins namens RNA-Polymerase durchgeführt.

## **Proteine**

Proteine (genauer: Polypeptide) sind lange, kettenförmige Moleküle, die strukturell viel mannigfaltiger sind als DNA bzw. RNA. Dies ist durch die Protein-Untereinheiten begründet, die aus zwanzig unterschiedlichen Aminosäuren bestehen. Die genaue Abfolge der Aminosäuren entlang einer Polypeptidkette bestimmt wie die Kette sich in ihre dreidimensionale Struktur faltet. Die genaue dreidimensionale Struktur wiederum bedingt deren Funktion.

Die **Funktion**, die ein Protein ausführt, hängt also von der genauen **Sequenz** ihrer Aminosäuren ab.

In den meisten Fällen führt ein Protein nur eine Aufgabe aus. Im allgemeinen können viele unterschiedliche Aufgaben von Proteinen übernommen werden: Einige Proteine, die Enzyme genannt werden, funktionieren als Katalysatoren bei chemischen Reaktionen; einige tragen bestimmte Signale von einem Teil einer Zelle zum anderen – oder im Falle der Hormone, von einer Zelle zur anderen; einige Proteine (Antikörper) haben die Aufgabe Eindringlinge zu bekämpfen; viele Proteine werden zu integralen Bestandteilen unterschiedlicher physikalischer Strukturen im Innern von Zellen; andere wiederum (regulatorische Proteine) üben eine Kontrollfunktion über unterschiedliche Aktivitäten innerhalb der Zelle aus, um diese innerhalb erlaubter Schwellenwerte zu halten.

## **Linearer Code, dreidimensionale Auswirkungen**

In lebenden Systemen ist DNA das „Hauptlager“ für Informationen. Wie bereits erwähnt, liegt diese Art der Information linear vor, d.h. verschlüsselt als Abfolge von **A**, **C**, **G** und **T** Bausteinen entlang des DNA-Moleküls. Dieser lineare Code kann an die Nachkommen weitergegeben werden – weil exakte Kopien der DNA durch Replikation hergestellt werden können.

Jederzeit können kurze Abschnitte jeder DNA für die Transkription ausgewählt werden. Diese Abschnitte werden Gene genannt. Das Enzym RNA-Polymerase kopiert den gesamten Abschnitt - Base für Base. Das

zusammengebaute RNA-Molekül besteht aus einer Abfolge von **A, G, C** und **U**, die der DNA-Sequenz des transkribierten Gens genau komplementär sind.

Ausser der Bereitstellung eines Matrizenstrangs für die Erstellung einer RNA-Kopie enthält die DNA auch noch Sequenzinformationen, die der RNA-Polymerase verraten an welcher Stelle die Transkription eines Gens begonnen und abgeschlossen werden soll. Diese Informationen schließen auch ein, wieviel Kopien hergestellt werden sollen und wann dies geschehen soll. Es können sogar Informationen innerhalb der RNA eingeschlossen werden, die die Langlebigkeit und Produktivität dieser RNA bestimmen.

Es gibt drei Hauptklassen von RNAs, die durch das Kopieren eines DNA-Strangs entstehen: Boten-RNAs (messenger RNAs oder mRNAs), die die Sequenzinformation zum Zusammenbau von Proteinen weitergibt; transfer RNAs (oder tRNAs), die in der Fertigungsstrasse der Proteine mitarbeiten; und RNAs, die strukturelle Aufgaben haben. So helfen beispielsweise ribosomale RNAs (oder rRNAs) dabei das Gerüst der Ribosomen, die man als Fabriken der Proteinherstellung ansehen kann, aufzubauen.

mRNAs tragen die Sequenzinformation um Proteine herzustellen. Das Lesen dieser Nukleotidabfolge durch die Ribosomen und die Umwandlung in eine Abfolge von Aminosäuren wird als Translation bezeichnet. Wie wird das erreicht? Es gibt nur vier Arten von Nukleotiden aber zwanzig Arten von Aminosäuren.

Während der Translation liest das Ribosom drei Nukleotide zur gleichen Zeit und weist jedem folgenden Triplet eine bestimmte Aminosäure zu. **Beachten Sie:** Triplets werden oft **Codons** genannt. Jede Aminosäure wird dann an das Ende der wachsenden Proteinkette angefügt. Es gibt 64 mögliche Triplets oder Codons. Die lineare Information, die sich in der DNA befindet, wird benutzt, um eine lineare Sequenz aus Aminosäuren zusammzusetzen. Diese Sequenz wiederum bestimmt die Art und Weise, wie sich das Protein präzise in eine Gestalt mit bestimmten chemischen Eigenschaften falten wird.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Informationsübertragung innerhalb der Zelle folgenden Ablauf hat:

DNA => RNA => PROTEIN => MERKMAL

Obwohl die Information selbst linearer Natur ist, sind die Auswirkungen doch dreidimensional. Eine grundlegende Annahme der Gentechnik ist es, dass dauerhafte und wünschenswerte Änderungen der Funktionsweise einer Zelle durch Veränderungen der linearen Sequenz ihrer DNA erreicht werden können

### **Gene sind eigenständige „Akten“ der DNA-Information**

Ein Gen ist ein Abschnitt innerhalb eines DNA-Moleküls, das für das Kopieren in ein RNA-Molekül ausgewählt wurde. Diese RNA kann auf direktem oder indirektem Weg eine Aufgabe ausführen. Es ist daher zweckmäßig ein Gen als eine Funktionseinheit anzusehen.

Viele Merkmale, wie z.B. die Resistenz gegen ein Antibiotikum, werden durch einzelne Gene gesteuert. Die meisten Merkmale aber, wie z.B. die Farbe einer Rose oder die Form einer Nase, werden durch mehrere gemeinsam wirkende Gene kontrolliert.

Die Länge eines Gens kann stark variieren: Einige sind nur wenige hundert Basenpaare lang; einige können zehn Tausende Basenpaare aufweisen. Ein langes DNA-Molekül kann eine kleine Anzahl oder bis zu Tausenden von Genen tragen.

Ein Zelle wiederum kann ein oder mehrere DNA-Moleküle (Chromosomen) enthalten. Daher kann die Anzahl der Gene einer Zelle stark variieren. *E. coli*, ein Bakterium, enthält ein DNA-Molekül mit ungefähr 5000 Genen. Eine menschliche Zelle enthält dagegen 46 DNA-Moleküle, die etwa 100000 Gene tragen.

Die Gene einer Zelle werden nicht alle zur selben Zeit und mit gleicher Rate in RNA umgeschrieben (d.h. „exprimiert“). Wenn man daher von „Genfunktion“ spricht, meint man das Expressionsniveau. Diese Rate kann von der Zelle in Übereinstimmung mit vorher festgelegten Regeln, die ihrerseits in den DNA-Code geschrieben sind, kontrolliert werden.

Ein Beispiel: Die Zellen unseres Körpers (sämtliche 100 Billionen) enthalten jeweils identische DNA-Moleküle. Leberzellen beispielsweise exprimieren aber nur diejenigen Gene, welche für die Aufgaben der Leber benötigt werden. Hautzellen hingegen exprimieren einen völlig unterschiedlichen Satz von Genen.

### **DNA kann mit Hilfe von Restriktionsenzymen in Stücke geschnitten werden**

Restriktionsenzyme sind Proteine, die von Bakterien hergestellt werden, um sich gegen eindringende Fremd-DNA (z.B. virale DNA) zu verteidigen. Jedes Restriktionsenzym erkennt eine spezifische Erkennungssequenz von 4 - 6 Basenpaaren Länge und schneidet jede DNA, die solche Sequenzen enthält.

Das Restriktionsenzym *BamHI* beispielsweise erkennt die Sequenz (5'..GGATCC.. 3') und schneidet den DNA-Strang zwischen den beiden G-Nukleotiden dieser Sequenz.

Restriktionsenzyme schneiden DNA unterschiedlichen Ursprungs, vorausgesetzt die Erkennungsregion ist vorhanden. Es ist daher unwichtig, ob die DNA aus Bakterien, Pflanzen oder Menschen stammt.

### **DNA-Stücke können durch DNA-Ligase zusammengefügt werden**

Die DNA-Ligase ist ein Enzym, das DNA-Stücke zusammenklebt – vorausgesetzt die Enden sind kompatibel. Daher kann ein mit *BamHI* geschnittenes Stück DNA des Menschen, eines Frosches oder einer Tomate auf einfache Weise mit einem Stück bakterieller DNA zusammengefügt werden, das ebenso mit *BamHI* geschnitten wurde. Dieses Vorgehen ermöglicht die Herstellung neu-kombinierter DNAs (oder „Hybriden“) durch Zusammenfügen von DNA-Stücken aus zwei unterschiedlichen Quellen.

Gene können aus menschlicher oder pflanzlicher DNA herausgeschnitten und in Bakterien eingeführt werden. So kann zum Beispiel das menschliche Gen für das Hormon Insulin in Bakterien eingeschleust werden. Die richtigen Bedingungen vorausgesetzt, können diese Bakterien dann echtes menschliches Insulin herstellen.

### **Plasmids sind kleine, ringförmige DNA-Stücke**

Plasmide sind kleine, ringförmige DNAs, die man in einigen Bakterienzellen finden kann. Sie replizieren ihre eigene DNA durch Ausleihen der zellulären Polymerasen. Sie können daher unbegrenzt in den Zellen überdauern ohne selbst viel Arbeit zu investieren.

Aufgrund ihrer geringen Größe können Plasmid-DNAs auf einfache Weise aus Bakterienzellen extrahiert und gereinigt werden. Wenn sie mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden, können sie mit fremder DNA – jedweder Herkunft - verbunden werden, die mit dem gleichen Enzym geschnitten wurde.

Die entstandenen Hybrid-DNAs können durch eine sogenannte Transformation wieder in Bakterienzellen eingebracht werden. Dann können die Hybrid-Plasmide sich wie immer in den Bakterien endlos vermehren, mit der Ausnahme, dass die eingefügte Fremd-DNA nun auch mitvermehrt wird. Die Fremd-DNA bekommt sozusagen eine Art „Mitfahrgelegenheit“.

Jedes Hybrid-Plasmid enthält nun eine perfekte Kopie der Fremd-DNA, die ursprünglich mit dem Plasmid zusammengefügt wurde. Man sagt, dass das Stück Fremd-DNA „kloniert“ wurde; das Plasmid, das die Fremd-DNA aufgenommen hat, wird als Klonierungsvektor bezeichnet.

Außer ihrer Nützlichkeit für das Klonieren fremder Gene, tragen Plasmide manchmal eigene Gene. Bakterien sterben nachdem sie einem Antibiotikum ausgesetzt wurden. Antibiotika-Resistenzgene ermöglichen allerdings, dass Bakterien in Anwesenheit eines Antibiotikums wie z.B. Ampicillin wachsen können. Solche Gene kann man oft auf Plasmiden finden. Wenn Fremd-DNA in ein solches Plasmid inseriert und das Hybrid-Plasmid in Bakterien transformiert wird, ist es einfach diejenigen Bakterien herauszusuchen, die das Plasmid ausgenommen haben – weil sie die Fähigkeit erworben haben in Anwesenheit des Antibiotikums zu wachsen, wohingegen alle anderen Bakterien abgetötet werden.

### **DNA-Bibliotheken**

DNA, die aus einem bestimmten Zelltyp isoliert wurde, kann in Stücke geschnitten und die Gesamtheit der entstehenden Fragmente kann kloniert werden, um eine Plasmid-Population zu erhalten. Dieses Vorgehen produziert einen Bestand neu-kombinierter Hybrid-DNAs. Nach Wiedereinführen dieser Hybride in Bakterienzellen hat jede transformierte Zelle ein bestimmtes Hybrid-Molekül erhalten, welches vervielfältigt wird. Jedes Hybrid enthält zwar den selben Vektor jedoch eine jeweils unterschiedliche Insert-DNA.

Im Falle von 1000 unterschiedlichen DNA-Molekülen in der ursprünglichen Mischung, erfolgt die Bildung von 1000 unterschiedlichen Hybrid-Molekülen und 1000 verschiedenen transformierten Zellen, die jeweils eines der 1000 ursprünglichen Stücke der Erbinformation tragen.

Solch eine Sammlung wird als DNA-Bibliothek bezeichnet. Wenn der ursprüngliche Extrakt aus menschlichen Zellen hergestellt wurde, wird die Bibliothek als menschliche Bibliothek bezeichnet. Einzelne DNAs, die von bestimmtem Interesse sind, können aus solch einer Bibliothek „gefischt“ werden, indem ein Screening mit einer geeigneten Sonde durchgeführt wird.

## Anhang D Genregulation

Unser Körper enthält Tausende verschiedener Proteine, die unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Verdauungsenzyme sind Proteine; einige der hormonellen Signale, die durch unseren Körper zirkulieren, und die Antikörper, die unseren Körper vor Krankheiten schützen, sind Proteine. Die Informationen für den Zusammenbau eines Proteins ist in unserer DNA hinterlegt. Der Abschnitt der DNA, der den Code zur Herstellung eines Proteins enthält, wird als Gen bezeichnet. Es gibt zwischen 30 000 und 100 000 Gene im menschlichen Genom. Jedes dieser Gene kodiert für ein bestimmtes Protein: ein Gen, ein Protein. Das Gen, welches für ein Verdauungsenzym unseres Mundes kodiert unterscheidet sich von dem, das für einen Antikörper oder einen Augenfarbstoff kodiert.

Aus unterschiedlichsten Gründen regulieren die Organismen die Expression ihrer Gene und letztendlich die Menge und Art der Proteine, die in ihren Zellen vorhanden sind. Zu diesen Gründen gehören unter anderem Entwicklungsschritte, Zellspezialisierungen und Anpassungen an die Umwelt. Die Genregulation ermöglicht nicht nur die Anpassung an unterschiedliche Bedingungen, sondern verhindert auch die verschwenderische Überproduktion nicht benötigter Proteine, die den Organismus ansonsten einen Wettbewerbsnachteil einbringen würde. Gene, die am Transport und Abbau (Katabolismus) der Nahrung beteiligt sind, sind gute Beispiele hoch regulierter Gene. Der Zucker Arabinose ist beispielsweise eine Energie- und Kohlenstoffquelle. *E. coli* Bakterien stellen drei Enzyme (Proteine) her, die benötigt werden, um Arabinose als zu Nahrungszwecken abzubauen. Die Gene, die für diese Enzyme kodieren, werden nicht exprimiert, wenn Arabinose nicht im Aussenmedium vorhanden ist. Sie werden allerdings exprimiert, wenn Arabinose sich im umgebenden Medium befindet. Wie kann man sich das erklären?

Die Regulation der Expression von Proteinen erfolgt oft auf dem Niveau der Transkription. Diese Regulation findet an einer ganz bestimmten Stelle auf der DNA statt – dem Promotor. An dieser Stelle bindet die RNA-Polymerase an die DNA und beginnt mit der Transkription des Gens. Bei Bakterien sind Gruppen ähnlicher Gene oft direkt hintereinander angeordnet und werden von nur einem Promotor transkribiert. Diese von einem einzigen Promotor kontrollierten Gengruppen, werden „Operons“ genannt.

Die drei Gene (*araB*, *araA* und *araD*), die für die drei am Abbau von Arabinose beteiligten Enzyme kodieren sind im sogenannten Arabinose-Operon zusammengefasst<sup>3</sup>. Das Einsetzen der Transkription dieser drei Proteine hängt von einem einzigen Promotor ab, dem *PBAD*-Promotor. Die Transkription dieser drei Gene setzt die gleichzeitige Anwesenheit der DNA (Promotor und Operon), der RNA-Polymerase, einem DNA-bindenden Protein namens *araC* und der Arabinose voraus. Das Protein *araC* bindet die DNA in der Nähe des Bindungsortes der RNA-Polymerase (am Beginn des Arabinose-Operons). Wenn Arabinose im Medium vorhanden ist, wird es von den Bakterien aufgenommen.

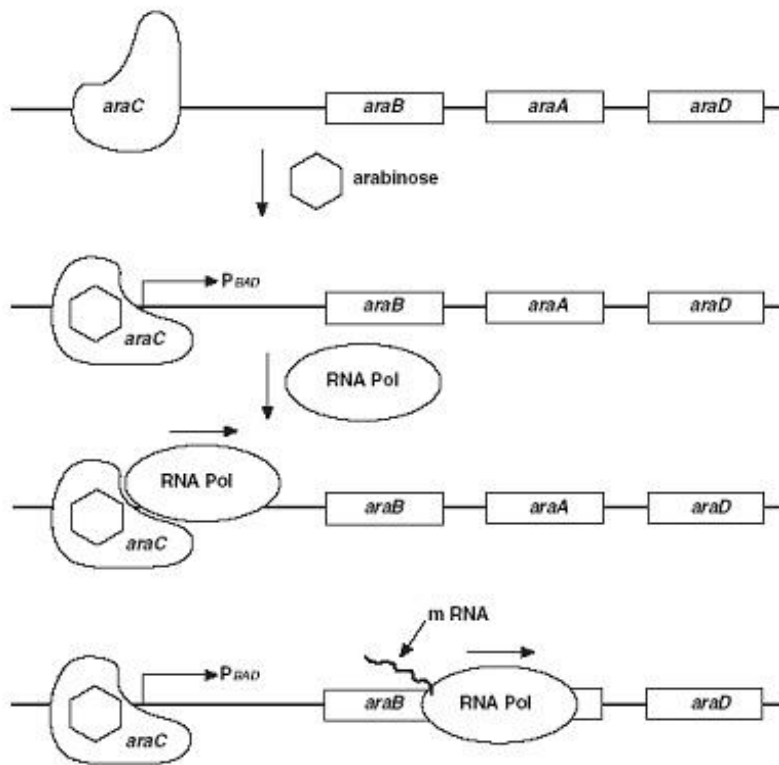
Einmal aufgenommen geht die Arabinose sofort eine Wechselwirkung mit *araC* ein, das an die DNA gebunden ist. Diese Wechselwirkung führt zu einer Gestaltänderung von *araC*, was wiederum die Bindung der RNA-Polymerase begünstigt – die drei Gene *araB*, *A* und *D* werden transkribiert. Die drei Enzyme werden hergestellt und bauen die Arabinose ab. Schließlich erschöpft sich die Arabinose im Medium. In Abwesenheit von Arabinose nimmt *araC* wieder seine ursprüngliche Gestalt ein und somit kommt die Transkription zum Erliegen.

Der DNA-Code des pGLO-Plasmid wurde so verändert, dass er Teile des Arabinose-Operons enthält. Sowohl der Promotor (*PBAD*) als auch das *araC*-Gen sind vorhanden. Die Gene *araB*, *A* und *D*, die für den Arabinoseabbau kodieren, wurden allerdings gegen ein einzelnes Gen ausgetauscht, das für GFP kodiert. In Anwesenheit von Arabinose begünstigt das *araC*-Protein daher die Bindung der RNA-Polymerase und es wird GFP hergestellt. Durch fortwährende Produktion von GFP fluoreszieren die Zellen hellgrün. In Abwesenheit von Arabinose kann *araC* die Bindung der RNA-Polymerase nicht länger erleichtern und somit wird das GFP-Gen nicht mehr transkribiert. Wenn GFP nicht hergestellt wird zeigen die Bakterien den Phänotyp des Wildtyps – weisse Kolonien, die nicht fluoreszieren.

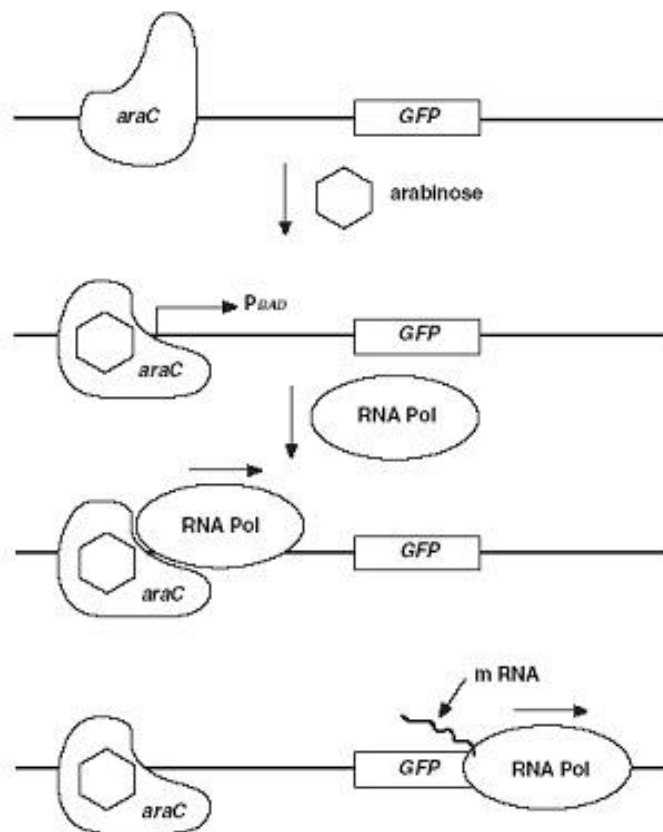
Dies ist ein hervorragendes Beispiel für das „Zentrale Dogma der Molekularbiologie“:

DNA => RNA => PROTEIN => MERKMAL

## Das Arabinose-Operon



## Die Expression von GFP





## Anhang E Quellenangaben

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).