Genetische Manipulation von *Escherichia coli*

Die genetische Manipulation von Organismen ist zu einer Standardprozedur geworden: inzwischen ist die Erzeugung mancher transgener Organismen schon mit einfachen Mitteln zu bewerkstelligen. Im Folgenden wird *Escherichia coli*-Bakterien das Leuchtgen einer Meeresqualle eingebaut, welches für GFP kodiert.

Es wird darauf hingewiesen, dass die Herstellung transgener Organismen in Deutschland nur in dafür vorgesehenen und zugelassenen S1- oder S2-Laboratorien, z.B. an Universitäten, erlaubt ist!

Geräte:

Petrischalen mit Agarose-Nährboden (der außerdem L-Arabinose enthalten muss!), Pipetten, Kulturröhrchen, Impföse, Wasserbad, Eisbad, UV-Lampe, Inkubator

Chemikalien:

Calciumchloridlösung 1 M
pGlo-Plasmide (Lösung; von Biorad)
Nährlösung für *Escherichia coli*
Stamm von Escherichia coli (B)

2-Propanol oder Ethanol (F, Xi)

Wasser
Eis

Durchführung:

250 µl Calciumchloridlösung werden in ein leeres Kulturröhrchen gegeben. Man gibt 100 µl Nährlösung hinzu. Mit einer Impföse wird etwas pGlo-Lösung aufgenommen und ebenfalls zur Lösung im Kulturröhrchen hinzugefügt. Mit einer anderen Impföse wird ein E. coli-Stamm aufgenommen und in die Lösung gegeben, woraufhin man verschließt und durch Antippen gründlich vermischt. Nun wird das Röhrchen 10 Minuten lang im Eisbad gekühlt, dann 50 Sekunden lang bei 55°C im Wasserbad erhitzt und anschließend *sofort* wieder zwei Minuten lang in das Eisbad überführt. Nun werden Petrischalen mit Agarose-Nährboden mit der Lösung ausgestrichen und 1-2 Tage lang im Inkubator bei 37°C warm gehalten. Wird jetzt die Bakterienkultur mit UV-Licht bestrahlt, fluoresziert sie.

Entsorgung:

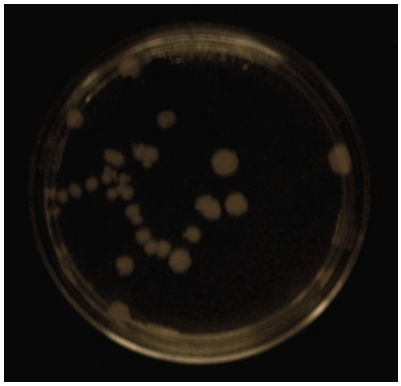
Die Bakterienkultur wird mit 2-Propanol oder Ethanol unschädlich gemacht und kann dann über das Abwasser entsorgt werden.

Copyright illumina-chemie.de, Autor: Cyanwasserstoff, Geschrieben am 08.04.2008

Erklärung:

Das pGlo-Plasmid enthält das Leuchtgen einer Meeresqualle sowie ein induzierbares Operon, welches bei Anwesenheit von L-Arabinose die Transkription des eigentlichen Leuchtgens einleitet. Es kann durch einen Vektor (wie z.B. Bakteriophagen), durch eine „gene gun“ oder durch Hitzeschock in ein Bakterium eingebracht werden. Bei diesem Versuch nehmen die *Escherichia coli*-Bakterien als Folge des Hitzeschocks das Plasmid auf und stellen von dort an dank der Anwesenheit von L-Arabinose im Agarose-Gel ein unter UV-Licht fluoreszierendes Protein, das GFP, her.

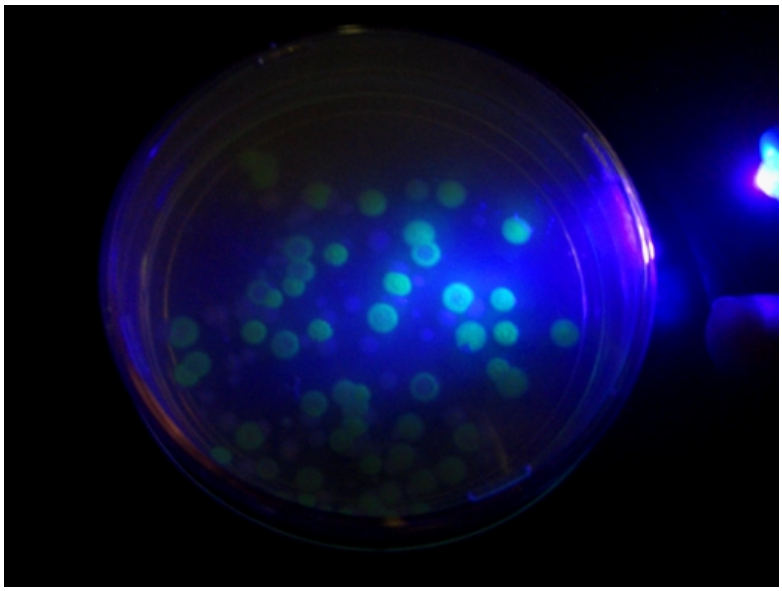
Bilder:



Verwendeter (noch nicht manipulierter) Bakterienstamm

Mit transgenem *Escherichia coli*-Stamm ausgestrichenes Agarosegel

Copyright illumina-chemie.de, Autor: Cyanwasserstoff, Geschrieben am 08.04.2008



Fluoreszenz

Copyright illumina-chemie.de, Autor: Cyanwasserstoff, Geschrieben am 08.04.2008