

Modul 1: Transformation – Herstellen eines gentechnisch veränderten Organismus

Transformation

Als Transformation wird ein Vorgang bezeichnet, bei dem gezielt „fremde“ (heterologe) DNA (z.B. ein Plasmid, das ein gewünschtes Gen trägt) in einen Organismus (z.B. das Bakterium *Escherichia coli*) eingebracht wird, so dass ein gentechnisch veränderter Organismus (GVO) entsteht.

In unserem Fall trägt das verwendete Plasmid das Gen für Lactase, dessen Genprodukt Milchzucker (Lactose) spalten kann. Gene, wie in unserem Fall das Lactase-Gen, werden häufig mittels Plasmide in Bakterien eingebracht, z.B. mit dem Ziel das entsprechende Genprodukt in großen Mengen herstellen zu lassen. Die in den Bakterienzellen hergestellte Lactase kann dann genutzt werden um lactosefreie Milch für Menschen mit Lactoseintoleranz herzustellen.

Die gentechnische Veränderung verleiht einem Organismus also neue Eigenschaften. Mit speziellen Methoden kann auch in höhere Organismen, z.B. Pflanzen- oder Säugetierzellen, „Fremd“-DNA eingebracht und damit eine gentechnische Veränderung erzeugt werden.

Kompetente Zellen

Organismen nehmen unter normalen Bedingungen in der Regel keine DNA aus der Umgebung auf oder tun dies mit äußerst geringer Wahrscheinlichkeit. Damit im Labor erfolgreich transformiert werden kann, werden so genannte kompetente Bakterienzellen verwendet, die leichter Fremd-DNA aufnehmen. Diese Zellen werden zuvor mit Calciumchloridlösung behandelt, was dazu führt, dass die Zellwand „löchrig“ wird und das Eindringen fremder DNA wahrscheinlicher macht. Um die Aufnahme noch effektiver zu machen, werden zusätzlich extreme Bedingungen („Hitzchock“) verwendet.

Selektion durch Antibiotikaresistenzen

Bei der Transformation nehmen nur sehr wenige der kompetenten Zellen die Fremd-DNA auf. Um erfolgreich transformierte Zellen von solchen zu unterscheiden, die keine Plasmid-DNA aufgenommen haben, wird eine Selektion verwendet.

Das Plasmid trägt nicht nur das gewünschte Gen, sondern kodiert gleichzeitig für eine Antibiotikaresistenz (Ampicillinresistenz; Amp^R). Nur die Bakterienzellen, die das Plasmid aufgenommen haben, können auf einem ampicillinhaltigen Nährboden wachsen. Alle anderen Zellen sterben durch das Antibiotikum ab.

Zu Anfang gleich ein paar Tipps:

Wichtig: Beschriftet eure Eppis immer gut, sonst findet ihr eure Probe nicht mehr!

Zu den Pipetten:

1000er Pipette (blau): blaue Spitzen benutzen und nur 100-1000 µL pipettieren

200er Pipette (gelb): gelbe Pipettenspitze und nur 20-200 µL pipettieren

20er Pipette (gelb): gelbe Pipettenspitze und nur 2-20 µL pipettieren

Legende zum Skript:



Arbeitsanweisung



Zusatzinformation



Zusatzfragen



Schritt 1: Vorbereitung der Zellen



Bakteriensuspension (kompetente Bakterienzellen) auf Eis auftauen. 1 µL Plasmid-DNA zu der Zellsuspension geben, vorsichtig mischen und weitere 20 min auf Eis inkubieren!

Schritt 2: Hitzeschock



Gefäß mit den Zellen für genau 90 s im Heizblock auf 42°C erhitzen und danach sofort wieder auf Eis stellen!

Durch den Hitzeschock nehmen die kompetenten Zellen DNA aus der Umgebung auf. Sehr wichtig ist, dass man die Zellen nur für genau 90 s erhitzt.



Stelle Vermutungen auf, warum die Zellen nicht länger als 90 s auf 42°C erhitzt werden dürfen? Was könnte in den Zellen passieren? (Das gleiche Phänomen erklärt auch, warum Fieber > 40°C über längere Zeit für uns Menschen gefährlich ist!)



Organismen nehmen normalerweise „freiwillig“ keine fremde DNA aus der Umgebung in ihre Zellen auf. Überlege dir, warum Zellen möglichst vermeiden sollten Fremd-DNA aufzunehmen?



Was könnte der Grund dafür sein, dass die Bakterien unter extremen Bedingungen aber doch fremde DNA aufnehmen?



Kennst du ein Phänomen, bei der fremde DNA in menschliche Zellen gelangt ist? Wie kommt die DNA in diesem Fall in Zellen?

Schritt 3: Regeneration der Zellen



Dann gibt man möglichst zügig 1 mL LB-Medium zu den Zellen und inkubiert den Ansatz für 30 min bei 37°C im Brutschrank.

Hier bekommen die Zellen etwas Zeit sich zu „erholen“, bevor sie Selektionsdruck ausgesetzt werden.

Schritt 4: Zentrifugation



Im Anschluss werden die Zellen für 3 min bei 1700 rcf zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen.

Das Zentrifugieren dient dazu die Zellen am Boden des Gefäßes zu sammeln.

Schritt 5: Ausplattieren der Zellen



Die Zellen werden nun durch vorsichtiges Pipettieren im verbliebenen Restmedium resuspendiert und unter dem Bunsenbrenner auf LB-Amp-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten werden verschlossen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Das Antibiotikum Ampicillin, das dem Nährboden zugesetzt wurde, dient der Selektion transformierter Klone, da die verwendeten Plasmide für eine Ampicillinresistenz kodieren. Nur Bakterienzellen, die Plasmid-DNA aufgenommen haben, können auf dem speziellen Nährboden wachsen.

