

## **Protokoll**

B.Sc. Cindy Hahn

B.Sc. Laura Wolf

B.Sc. Olivia Halamoda

B.Sc. Julia Lenhart

B.Sc. Tomas Cabrera

B.Sc. Martin Zerbst

# **pGLO - Versuch**

**Mittweida 2016**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>II</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Zielsetzung .....</b>	<b>3</b>
<b>3 Material.....</b>	<b>4</b>
3.1 Chemikalien .....	4
3.2 Medien .....	4
3.3 Bakterienstamm .....	5
3.4 Geräte .....	5
<b>4 Methoden .....</b>	<b>6</b>
4.1 Ansetzen der Übernachtskultur .....	6
4.2 Herstellung elektrokompenter Zellen .....	6
4.3 Transformation elektrokompenter Zellen .....	6
4.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	7
4.5 Hitzeschocktransformation .....	7
4.6 Ausplattieren von Bakterien .....	7
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>8</b>
5.1 Elektroporation .....	8
5.2 chemische Transformation.....	10
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>12</b>
6.1 Elektroporation .....	12
6.2 Chemische Transformation.....	14
6.3 Vergleich der Methoden .....	15
<b>7 Ausblick .....</b>	<b>16</b>
<b>8 Zusammenfassung .....</b>	<b>18</b>
<b>9 Summary.....</b>	<b>19</b>
<b>10 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>20</b>
<b>11 Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>22</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Skizze des pGLO Plasmids mit der Anordnung aller für die Transformation signifikanten Genabschnitte.....	2
---	---

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien.....	4
Tabelle 2 Verwendete Medien .....	4
Tabelle 3 Verwendeter Bakterienstamm.....	5
Tabelle 4 Verwendete Geräte .....	5
Tabelle 5 Gewachsene Kolonien vor der Elektroporation.....	8
Tabelle 6 Gewachsene Kolonien nach der Elektroporation.....	8
Tabelle 7 Gewachsene Kolonien nach der chemischen Transformation .....	10

## **Abkürzungsverzeichnis**

Amp .....	Ampicillin
Ara .....	Arabinose
DNA.....	Desribonukleinsäure
<i>E. coli</i> .....	<i>Eschericha coli</i>
GFP .....	Green Fluorescent Protein
KBE .....	Kolonienbildende Einheiten
LB .....	lysogeny broth
OD.....	optische Dichte
rpm .....	Umdrehungen pro Minute
TrE .....	Transformationseffizienz
TrR .....	Transformationsrate
UV .....	Ultraviolett
Verd .....	Verdünnung

## **1 Einleitung**

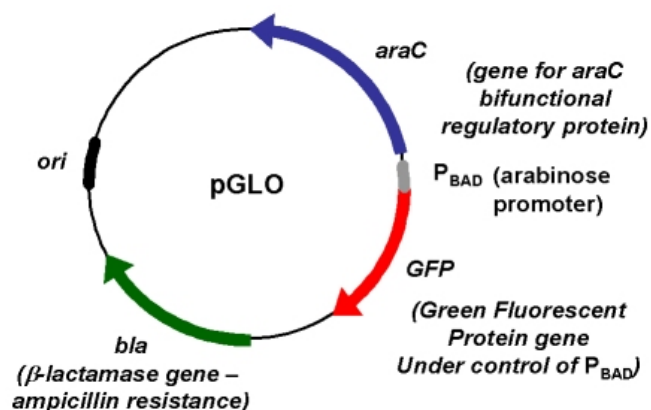
Bakterielle Transformation beschreibt einen Vorgang auf bakterieller Ebene, bei dem ein Bakterium Fremd-DNA aufnimmt und in sein Genom einbaut. Da viele Bakterien eine Zellmembran besitzen, die für DNA nicht durchlässig ist, müssen diese Bakterienzellen vor der Transformation kompetent gemacht werden. Dazu gibt es verschiedene Verfahren. Eines der gängigsten Verfahren ist die Elektroporation. Bei dieser Methode wird die Bakterienmembran mit Hilfe eines elektrischen Feldes für DNA durchlässig gemacht (Dower et al., 1988). Ein weiteres Verfahren ist die chemische Transformation. Hierfür wird meist eine Calciumchlorid-Lösung mit anschließendem Hitzeschock verwendet. Beide Verfahren erhöhen die Fähigkeit der Zellmembran DNA aufzunehmen (Mandel and Higa, 1970). Die bakterielle Transformation ist bereits seit 1928 bekannt, als Frederick Griffith einen nicht pathogenen Stamm der Art *Pneumococcus* in einen pathogenen Stamm transformierte (Mercenier and Chassy, 1988).

In unserem Versuch wurde das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) für das Transformationsexperiment verwendet, da es ein einzelliger Organismus mit kurzer Reproduktionszeit ist und gut unter Laborbedingungen kultiviert werden kann.

Damit ein Bakterium ein fremdes Gen aufnehmen kann, wird dieses vorher in ein Plasmid eingebaut. Plasmide sind ringförmige, bis zu mehreren kb große selbstreplizierende DNA-Strukturen, die in prokaryontischen Bakterien vorkommen (Casali, 2003). Sie werden mit Hilfe der Polymerase des Bakteriums repliziert. Aufgrund ihrer Größe können Plasmide leicht aus den Zellen aufgereinigt und extrahiert werden. Sie können so modifiziert werden, dass sie bestimmte Gene exprimieren. Manche Plasmide exprimieren auch Antibiotika-Resistenzgene, die bei der Selektion in Transformationsexperimenten eine große Rolle spielen.

Das hier verwendete pGLO Plasmid enthält drei wichtige Abschnitte: das Gen für die Expression vom grünfluoreszierenden Protein (engl. Green fluorescent protein; GFP), ein Ampicillin-Resistenzgen (Beta-Lactamase, kurz: bla) und ein araC-Operon, welches die Expression des GFP in den transformierten Zellen reguliert (Mosher, 2002).

Ein guter Indikator für den Erfolg der Transformation ist die Expression von GFP. GFP ist ein Protein, welches ursprünglich in der Qualle *Aequorea victoria* vorkommt. Die Produktion von GFP in den transformierten Zellen wird über ein *araC*-Operon gesteuert. In Abwesenheit von Arabinose, einem Monosaccharid, bindet das Regulatorprotein AraC an den Arabinose-Operator *araO* und in Folge dessen kann der Promoter  $P_{BAD}$  nicht aktiviert und GFP nicht exprimiert werden. Nach Zugabe von Arabinose bildet sich ein Komplex aus AraC und Arabinose. Dieser bindet an der Initiator-Region des  $P_{BAD}$  Promotors und aktiviert damit die Expression von GFP. Die GFP-Expression kann unter UV-Licht nachgewiesen werden, hierbei fluoreszieren betroffene Zellen grün (Siegele and Hu, 1997).



**Abbildung 1 Skizze des pGLO Plasmids mit der Anordnung aller für die Transformation signifikanten Gene.**

Ori bezeichnet den Replikationsursprung des Plasmids. Bla steht für den Genabschnitt, der für die Beta-Lactamase codiert. GFP steht für das grünfluoreszierende Protein und *araC* für das Operon, welches die Expression von GFP steuert.  $P_{BAD}$  ist der für GFP zuständige Promoter (Blaber, 2004).

Ein weiterer Indikator für eine erfolgreiche Transformation ist die Ampicillin-Resistenz der transformierten Bakterien. Ampicillin ist ein Breitspektrumantibiotikum der Gruppe der Penicilline und wird oft bei Entzündungen im menschlichen Körper, wie Ohrentzündungen oder Lungenentzündungen, eingesetzt. Auch bei durch *E. coli* verursachten Erkrankungen ist Ampicillin gut einsetzbar, da *E. coli* keine Resistenz gegenüber diesem besitzt.

Bei einer erfolgreichen Transformation von *E. coli* mit dem pGLO Plasmid sind diese in der Lage auf einem Nährmedium, welches mit Ampicillin versetzt ist, zu wachsen (Mosher, 2002).

## **2. Zielsetzung**

In diesem Versuch sollten Bakterien vom *E. coli*-Stamm HB101 K12 mit dem pGLO Plasmid transformiert werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt, eine Elektroporation und eine chemische Transformation. Zur Vorbereitung der Transformationen wurden die *E. coli* Zellen entsprechend kompetent gemacht. Während des Versuches sollte die Transformationseffizienz, die Sterberate und die Transformationsausbeute bestimmt werden, wobei eine Transformationseffizienz größer als  $1 \cdot 10^4$  Transformanden/ $\mu\text{g}$  eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden sollte.

### **3 Material**

Für den Versuch wurden folgende Materialien verwendet.

#### **3.1 Chemikalien**

**Tabelle 1 Verwendete Chemikalien**

Chemikalien	Hersteller
Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
MgCl	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
MgSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe

#### **3.2 Medien**

**Tabelle 2 Verwendete Medien**

Medium	Zusammensetzung
<b>LB Medium</b>	1% (w/v) Pepton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl pH 7,5 (autoklaviert)
<b>LB – Agar</b>	1L LB-Medium 1,5% (w/v) Agar
<b>LB/Amp/Ara – Agar</b>	1 L LB-Medium 1,5% (w/v) Agar 100 µg/ml Ampicillin 6 mg/ml Arabinose
<b>SOC-Medium</b>	2% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM MgCl 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glukose

Medium	Zusammensetzung
<b>VM ELPO Medium</b>	1% (w/v) Tryptonextrakt 0,5% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) NaCl

### 3.3 Bakterienstamm

**Tabelle 3 Verwendeter Bakterienstamm**

Bakterienstamm	Beschreibung
<b><i>E. coli</i> HB101 K12</b>	F- mcrB mrr hsdS20(rB- mB-); recA13 leuB6 ara-14 proA2; lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1; rpsL20(SmR) glnV44 λ-;

### 3.4 Geräte

**Tabelle 4 Verwendete Geräte**

Apparatur	Hersteller
Centrifuge 5702 R	Eppendorf
Eporator®	Eppendorf
ThermoMixer C	Eppendorf
VIS-Spektralphotometer DR 3800	Hach Lange



## **4 Methoden**

Folgende Methoden wurden für den Versuch angewendet.

### **4.1 Ansetzen der Übernachtskultur**

Für die Übernachtskultur wurden 10 ml LB-Medium mit dem Bakterienstamm *E. coli* HB101 K12 mithilfe einer Impföse angeimpft und über Nacht bei 37°C und 120 rpm inkubiert.

### **4.2 Herstellung elektrokompenter Zellen**

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurde der Bakterienstamm *E. coli* HB101 K12 verwendet. Hierfür wurden 100 ml VM-ELPO mit 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte ( $OD_{600nm}$ ) von 0,4 bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Nach Erreichen der OD wurde die Kultur für 15 min auf Eis gestellt und anschließend für 15 min bei 2000xg und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml und 4°C kaltem sterilen Aqua bidest resuspendiert und anschließend wieder für 15 min bei 2000xg und 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand komplett entfernt wurde, wurde das Pellet in 50 ml 4°C kaltem sterilen Aqua bidest resuspendiert und anschließend wieder für 15 min bei 2000xg und 4°C zentrifugiert. Für einen weiteren Waschschrift wurde das Pellet in 2 ml 10%iger Glycerin Lösung resuspendiert und für 15 min bei 2000xg und 4°C zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet wieder in 0,3 ml einer 10%igen Glycerin Lösung resuspendiert.

### **4.3 Transformation elektrokompenter Zellen**

Für die Elektroporation wurden 2 Ansätze mit unterschiedlich eingesetzter Menge des Plasmids pGLO angesetzt. Für den ersten Ansatz wurden 25 ng Plasmid und für den zweiten Ansatz wurden 5 ng Plasmid jeweils zu 50 µl elektrokompenter Zellsuspension hinzugefügt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ohm und 25 µF für 4,8 ms. Anschließend wurden die Zellsuspension in 1 ml SOC Medium bei 37°C und 300 rpm für 1 h inkubiert. Abschließend wurden jeweils 100 µl von verschiedenen Verdünnungen auf LB-Platten ausplattiert.

#### 4.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde der Bakterienstamm *E. coli* HB101 K12 verwendet. Hierfür wurden 5 ml aus einer Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium suspendiert und bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Sobald eine optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) von 0,3 erreicht wurde, wurde die Kultur für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 3000xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml 4°C 0.1 M  $CaCl_2$  resuspendiert und erneut für 10 min bei 3000xg und 4°C zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 5 ml 4°C 0.1 M  $CaCl_2$  resuspendiert.

#### 4.5 Hitzeschocktransformation

Die Transformation der Bakterien mit den Plasmiden erfolgte mit der Hitzeschock-Methode. Hierfür wurde 50 ng des Plasmids pGLO zu 46,2 µl kompetenter Zellsuspension hinzugegeben. Die Suspension wurde für 10 min bei 4°C inkubiert. Um eine hohe Transformationseffizienz zu erreichen, wurde ein Hitzeschock für 60 s bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für weitere 2 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Hinzufügen von 450 µl SOC-Medium wurde die Zellsuspension für 45 min bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Abschließend wurden jeweils 50 µl von verschiedenen Verdünnungen auf LB-Platten ausplattiert.

#### 4.6 Ausplattieren von Bakterien

Zur Herstellung von Agarplatten wurde LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar autoklaviert. Im abgekühlten Zustand (50°C) wurde dem Medium Ampicillin und Arabinose hinzugegeben und unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Zur Ausplattierung wurde die entsprechende Menge mit dem Drigalski-Spatel ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte die Auswertung.

## 5 Ergebnisse

Die folgenden Tabellen fassen die Ergebnisse der Ausplattierung der verschiedenen Ansätze nach einer Inkubationszeit der Agarplatten über Nacht zusammen. Die Ausplattierung auf LB-Medien ermöglicht es, die Gesamtzellzahl der Ansätze zu ermitteln. Mit Hilfe des Selektivmediums LB/Amp/Ara konnte eine erfolgreiche Transformation nachgewiesen werden.

### 5.1 Elektroporation

In Tabelle 5 sind die ermittelten koloniebildenden Einheiten (KBE) vor der Transformation in verschiedenen Verdünnungen dargestellt, welche benötigt werden, um die Sterberate bei der Elektroporation zu ermitteln. Teilweise waren die Verdünnungen zu gering, so dass die koloniebildenden Einheiten auf den Agarplatten nicht ermittelt werden konnten. Diese sind in den Tabellen mit einem Minus gekennzeichnet.

**Tabelle 5 Gewachsene Kolonien vor der Elektroporation**

Medium	Verd.	KBE			Ø
<b>LB/Amp/Ara</b>	10 <sup>0</sup>	-	-	-	
<b>LB</b>	10 <sup>-6</sup>	73	76	62	70,3
	10 <sup>-7</sup>	9	10	11	10
	10 <sup>-8</sup>	1	1	0	1
	10 <sup>-9</sup>	0	0	0	0

Die Anzahlen der gewachsenen Kolonien nach der Elektroporation sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6 Gewachsene Kolonien nach der Elektroporation.**

Medium	Verd.	KBE Ansatz 1 (25 ng)			Ø	Verd.	KBE Ansatz 2 (5 ng)			Ø
<b>LB</b>	10 <sup>-4</sup>	131	135	-	133	10 <sup>-4</sup>	61	94	91	82
	10 <sup>-5</sup>	18	23	21	20,67	10 <sup>-5</sup>	6	12	12	10
	10 <sup>-6</sup>	1	2	3	2					
<b>LB/Amp/Ara</b>	10 <sup>-2</sup>	282	-	-	282	10 <sup>-2</sup>	26	39	19	28
	10 <sup>-3</sup>	33	37	44	38	10 <sup>-3</sup>	3	0	0	1
	10 <sup>-4</sup>	3	2	2	2,33					

Mit der Ermittlung der Anzahl der KBE konnte die Transformationseffizienz und die Transformationsrate sowie die Sterberate ermittelt werden. Die Transformationseffizienz gibt die Anzahl der Transformanden pro eingesetzte DNA-Menge an. Durch das Verhältnis von Transformanden zur Gesamtzellzahl wird die Transformationsrate bestimmt. Für die Berechnung der Transformationseffizienz und der Transformationsrate für die Elektroporation wurden bei Ansatz 1 mit 25 ng Plasmid auf den Selektivmedien bei einer Verdünnung von  $10^{-3}$  im Durchschnitt 38 KBE und auf den LB-Medien bei einer Verdünnung von  $10^{-5}$  20,67 KBE ermittelt. Bei Ansatz 2 mit 5 ng Plasmid wurden bei einer  $10^{-2}$  Verdünnung durchschnittlich 28 KBE auf den Selektivmedien und bei einer  $10^{-5}$  Verdünnung 10 KBE auf LB-Medien ermittelt.

Die Transformationseffizienz wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Anzahl der Transformanden}}{\text{eingesetzte DNA Menge } [\mu\text{g}]}$$

Transformationseffizienz (Elektroporation Ansatz 1):

$$\frac{38 [\text{KBE}] * 10^3 * 1050 [\mu\text{l}]}{0,025[\mu\text{g}] * 100 [\mu\text{l}]} = 1,6 * 10^7 \left[ \frac{\text{KBE}}{\mu\text{g}} \right]$$

Transformationseffizienz (Elektroporation Ansatz 2):

$$\frac{28 [\text{KBE}] * 10^2 * 1050 [\mu\text{l}]}{0,005[\mu\text{g}] * 100 [\mu\text{l}]} = 5,88 * 10^6 \left[ \frac{\text{KBE}}{\mu\text{g}} \right]$$

Die Transformationsrate berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Transformationsrate} = \frac{\text{Anzahl der transformierte Zellen}}{\text{Anzahl der Lebendzellen}} * 100 \%$$

Transformationsrate (Elektroporation Ansatz 1):

$$\frac{38 [\text{KBE}] * 10^3}{20,67 [\text{KBE}] * 10^5} * 100 \% = 1,84 \%$$

Transformationsrate (Elektroporation Ansatz 2):

$$\frac{28 [\text{KBE}] * 10^2}{10 [\text{KBE}] * 10^5} * 100 \% = 0,28 \%$$

Die Sterberate ergibt sich aus dem Verhältnis der Anzahl der Lebendzellen vor der Transformation und der nach der Transformation. Im Durchschnitt wurden bei einer Verdünnung von  $10^{-7}$  10 KBE auf den LB-Medien vor der Elektroporation ermittelt.

Sterberate (Elektroporation Ansatz 1):

$$\frac{(10 [KBE] * 10^7) - (20,67 [KBE] * 10^5)}{10 [KBE] * 10^7} * 100 \% = 98 \%$$

Sterberate (Elektroporation Ansatz 2):

$$\frac{(10 [KBE] * 10^7) - (10 [KBE] * 10^5)}{10 [KBE] * 10^7} * 100 \% = 99 \%$$

Die Transformationseffizienz der Elektroporation mit einem Plasmideinsatz von 25 ng beträgt  $1,6 * 10^7$  KBE/ $\mu$ g. Die Transformationsrate dieses Ansatzes wies einen Wert von 1,84% auf und die Sterberate lag bei 98%. Bei einem Plasmideinsatz von nur 5 ng sind die Werte ähnlich. Die Transformationseffizienz beträgt  $5,88 * 10^6$  KBE/ $\mu$ g und die Transformationsrate liegt bei 0,28%. Die Sterberate betrug 99%.

## 5.2 chemische Transformation

Bei der chemischen Transformation wurden folgende Anzahlen koloniebildender Einheiten auf den jeweiligen Agarplatten ermittelt (Tabelle 7).

**Tabelle 7 Gewachsene Kolonien nach der chemischen Transformation**

Medium	Verd.	KBE			Ø
LB	$10^{-4}$	384	350	432	388,7
	$10^{-5}$	0	37	47	42
	$10^{-6}$	4	2	4	3,3
	$10^{-7}$	0	0	1	0,3
LB/Amp/Ara	$10^0$	225	360	344	309,7
	$10^{-1}$	49	29	36	38
	$10^{-2}$	1	3	4	2,7

Anhand der ausgezählten Kolonien konnte, wie bei der Elektroporation, die Transformationseffizienz und die -rate bestimmt werden. Die eingesetzte DNA-Menge bei diesem Versuch betrug 50 ng.

Transformationseffizienz (chemische Transformation):

$$\frac{38 [KBE] * 10^1 * 500 [\mu l]}{0,05[\mu g] * 50 [\mu l]} = 7,6 * 10^4 \left[\frac{KBE}{\mu g}\right]$$

Transformationsrate (chemische Transformation):

$$\frac{38 [KBE] * 10^1}{3,333 [KBE] * 10^6} * 100\% = 0,01\%$$

Die Transformationseffizienz der chemischen Transformation beträgt  $7,6 * 10^4$  KBE/ $\mu$ g.  
Es wurde zudem eine Transformationsrate von 0,01% erreicht.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Elektroporation**

Die höchste Transformationseffizienz (TrE), die in diesem Versuch durch Elektroporation erzielt wurde ( $1,6 \times 10^7$  KBE/ $\mu$ g DNA), ist verglichen mit der veröffentlichten TrE von Dower et al. (1988) niedriger. Durch ihre Methode erreichten die Autoren TrE-Werte zwischen  $1 \times 10^9$  und  $1 \times 10^{10}$  KBE/ $\mu$ g DNA. Dower et al. (1988) benutzten für ihre Experimente *E. coli* Stämme LE329 und DH5a, sowie Plasmide pBR329 (4150 bp) und pUC18 (2686 bp). Dabei wurden die besten TrE-Werte unter Anwendung von Stamm LE392 und Plasmid pUC18 erreicht (ca.  $1 \times 10^{10}$  BE/ $\mu$ g). Die TrE-Werte, die mithilfe des Plasmids pUC18 erzielt wurden, waren immer höher als die von dem Plasmid pBR329, unabhängig vom *E. coli* Stamm. Diese Ergebnisse zeigen, dass einige *E. coli* Stämme durch Elektroporation effizienter als andere transformiert werden können und dass mit kleineren Plasmiden in der Regel höhere TrE-Werte zu Stande kommen (Dower et al., 1988).

In dem hier durchgeführten Versuch wurden dagegen der *E. coli* Stamm K12 und das Plasmid pGLO (5.371 bp) verwendet. pGLO ist im Vergleich zu den verwendeten Plasmiden von Dower et al. (1988) größer. Dieses erklärt die niedrigeren TrE-Werte im Versuch.

Ein weiterer Faktor, der die hier erreichten TrE-Werte erklären könnte, ist die Tatsache, dass ein elektrisches Feld mit der Feldstärke von 2,4 kV/cm verwendet wurde. Die Nachforschungen von Dower et al. (1988) ergaben, dass die Feldstärke die TrE während der Elektroporation stark beeinflusst. Sheng et al. (1995) stellten außerdem fest, dass bei Plasmiden mit einer Größe von 7,3 kb die Feldstärke für ein optimales elektrisches Feld zwischen 16 und 18 kV/cm liegen sollte. Dagegen konnten mit größeren Molekülen wie beispielsweise Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) maximale TrE-Werte bei einer Feldstärke von 13 kV/cm erreicht werden. Es ist also ersichtlich, dass im hier durchgeführten Versuch ein elektrisches Feld benutzt wurde, das weit unterhalb des optimalen Feldstärkebereichs liegt. Dies könnte zu TrE-Werten geführt haben, die niedriger als diejenigen sind, die von Dower et al. (1988) und Sheng et al. (1995) veröffentlicht wurden.

Dower et al. (1988) konnten bestimmen, dass die Feldstärke und die Zeit, in der das elektrische Feld aufrechterhalten wurde, die TrE stark beeinflussten. Diese zwei Parameter konnten sich gegenseitig ausgleichen, so dass elektrische Felder mit niedrigen Feldstärken und längeren Laufzeiten ähnliche TrE erreichten wie Felder mit hohen Feldstärken mit kurzen Laufzeiten. Elektrische Felder mit einer Feldstärke unter 2,0 kV/cm erzielten maximal  $1 \times 10^6$  KBE/ $\mu$ g DNA, selbst bei einer Dauer von 900 ms. Ferner ergaben die Nachforschungen von Dower et al. (1988), dass sowohl ein elektrisches Feld mit einer Feldstärke von ca. 7 kV/cm und einer Laufzeit von 20 ms als auch ein Feld mit einer Feldstärke von ca. 11 kV/cm und einer Laufzeit von 5 ms ein TrE-Wert von ungefähr  $1,5 \times 10^9$  KBE/ $\mu$ g DNA erreichten.

In dem hier durchgeführten Versuch wurde ein elektrisches Feld mit einer Feldstärke von 2,4 kV/cm und einer Laufzeit von 4,8 Millisekunden angewendet. Diese Laufzeit ist somit wesentlich niedriger als die von Dower et al. (1988) gemeldete Laufzeit für eine so niedrige Feldstärke. Dies könnte auch zum Teil erklären, warum die hier erzielte TrE um zwei Größenordnungen kleiner als die TrE von Dower et al. (1988) ist. Dies deutet daraufhin, dass bei der hier angewandten Methode die elektrische Feldstärke und die Laufzeit des elektrischen Feldes optimiert werden sollten.

Ein weiterer Punkt, der für eine Optimierung der hier durchgeführten Elektroporationsmethode spricht, ist die Tatsache, dass Dower et al. (1988) optimale TrE-Werte bei Sterberaten zwischen 50 und 75% fanden. Dabei waren die Sterberaten von der Feldstärke und der Laufzeit des elektrischen Feldes abhängig. Dagegen betrugen die in diesem Versuch erzielten Sterberaten 98% (Ansatz 1) beziehungsweise 99% (Ansatz 2).

Man kann auch feststellen, dass in dem hier durchgeführten Versuch sowohl TrE ( $1,6 \times 10^7$  KBE/ $\mu$ g DNA) und Transformationsrate (TrR) (1,84%) vom Ansatz 1, bei dem 25 ng Plasmid eingesetzt wurden, wesentlich höher sind als TrE ( $5,88 \times 10^6$  KBE/ $\mu$ g DNA) und TrR (0,28%) vom Ansatz 2, bei dem lediglich 5 ng Plasmid benutzt wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Dower et al. (1988) überein, die eine direkte Beziehung zwischen TrE und Plasmidkonzentration feststellen konnten.



## 6.2 Chemische Transformation

In diesem Versuch wurde eine TrE von  $7,6 \times 10^4$  KBE/ $\mu$ g DNA und eine TrR von 0,01% erreicht. Beide Werte sind wesentlich niedriger als von Dagert and Ehrlich (1979) berichtet. Die von diesen Autoren veröffentlichte Methode erzeugte eine TrE von  $2 \times 10^7$  KBE/ $\mu$ g DNA und eine TrR von 20%.

Obwohl in unserer Methode und in derjenigen von Dagert and Ehrlich (1979) *E. coli* mit kaltem 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  kompetent gemacht wurde, gibt es methodische Unterschiede, welche die Abweichung in den Ergebnissen erklären könnten.

Dagert and Ehrlich (1979) benutzten den *E. coli* Stamm K12 und das Plasmid pBR322 (4.361 bp). Für die Transformation verwendeten sie eine Inkubationszeit von 20-25 Minuten auf Eis, gefolgt von 5 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ , alles in Anwesenheit des einzuführenden Plasmids. Dagegen wurde in unserem Versuch der *E. coli* Stamm K12 und das Plasmid pGLO (5.371 bp) eingesetzt. Für die Hitzeschock-Transformation wurde eine Inkubationszeit von 10 min auf Eis angewandt, gefolgt von 60 s bei  $42^\circ\text{C}$  und daraufhin 2 min bei  $4^\circ\text{C}$ , alles in Anwesenheit des einzuführenden Plasmids.

Darüber hinaus verwendeten Dagert and Ehrlich (1979) nach der Transformation eine „Erholungsphase“ von einer Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  unter Anwendung von LB-Medium. In unserer Methode betrug dagegen diese Phase 45 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  unter Anwendung von SOC-Medium. Es ist möglich, dass die längere Dauer der Erholungsphase von Dagert and Ehrlich (1979) ein erhöhtes Eindringen des Plasmids in die Zellen ermöglichte, da eine bessere Interaktion zwischen den  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen, der negativ geladenen Zellmembran und den negativ geladenen Plasmiden stattfand. Außerdem benutzten sie ein Plasmid, das 1.000 bp kürzer ist als das, welches in unserer Methode verwendet wurde.

Diese zwei Faktoren (längere Dauer der Erholungsphase und kleineres Plasmid) könnten die von Dagert and Ehrlich (1979) veröffentlichten höheren TrE und TrR erklären. Nichtsdestotrotz ist auch klar, dass die TrE und TrR, welche im hier beschriebenen Versuch erzielt wurden, weit unterhalb anderer veröffentlichter Werte liegen (Hanahan et al., 1991; Roychoudhury et al., 2009; Yoshida and Sato, 2009). In der hier angewandten

Methode ist es daher notwendig die Inkubationszeiten sowie die Dauer der Erholungsphase zu optimieren.

Es ist sonderbar, dass Dagert and Ehrlich (1979) ohne Hitzeschock bei 42°C so hohe TrE und TrR erzielten. Besonders, wenn man bedenkt, dass die abrupte Erhitzung von fast 0°C auf 42°C das Membranpotenzial stark schwinden lässt und das darauf folgende abrupte Abkühlen zurück auf 0°C das Membranpotenzial wiederherstellt (Panja et al., 2006). Die Minderung des Zellmembranpotentials vereinfacht das Eindringen des Plasmids in die *E. coli* Zelle. Auch wenn die Änderung des Potentials nicht durch einen Temperaturschock herbeigeführt wird (Panja et al., 2006; Yoshida and Sato, 2009), sollten höhere TrE und TrR erreicht werden, als eine Methode, die diesen Schritt nicht umsetzt.

### 6.3 Vergleich der Methoden

Die hier erzielte TrE der Elektroporation unter Einsatz sowohl von 5 ng Plasmid ( $\text{TrE} = 5,88 \cdot 10^6 \text{ KBE}/\mu\text{g}$ ) als auch 25 ng Plasmid ( $\text{TrE} = 1,6 \cdot 10^7 \text{ KBE}/\mu\text{g}$ ) sind wesentlich höher als die TrE der chemischen Transformation unter Einsatz von 50 ng Plasmid ( $\text{TrE} = 7,6 \cdot 10^4 \text{ KBE}/\mu\text{g}$ ). Diese Situation wurde prinzipiell erwartet, da mehrere Forscher bereits berichtet hatten, dass die TrE der Elektroporation grundsätzlich höher als die der chemischen Transformation ist (Hanahan et al., 1991; Yoshida and Sato, 2009; Tu et al., 2016). Bemerkenswert ist der sehr große Abstand von bis zu 3 Größenordnungen zwischen der TrE der chemischen Transformation und die der Elektroporation. Hanahan et al. (1991) meldeten Unterschiede von bis zu zwei Größenordnungen für verschiedene *E. coli* Stämme, was darauf hindeutet, dass die hier angewandte Methode zur chemischen Transformation, wie bereits erwähnt, optimiert werden muss.

Zusätzlich liegen die in unserem Versuch erreichten TrRs, sowohl für beide Elektroporationsansätze als auch für die chemische Transformation weit unterhalb veröffentlichter Werte (Dagert and Ehrlich, 1979; Dower et al., 1988; Sheng et al., 1995; Roychoudhury et al., 2009). Dies betont die Optimierungsnotwendigkeit beider hier angewandten Methoden.

## **7 Ausblick**

Es wäre aufschlussreich, verschiedene Methoden zur chemischen Transformation von *E. coli* unter Einsatz desselben Plasmids zu testen, sodass die TrE und TrR miteinander verglichen werden können und die hier protokollierte Methode optimiert werden kann.

Von Interesse wären in diesem Fall ein Vergleich vom hier protokollierten Versuch mit der Methode von Dagert and Ehrlich (1979). Ein weiterer Vergleich mit der Methode, die Roychoudhury et al. (2009) unter Anwendung von  $\text{RbCl}_2$  beschreiben, wäre auch interessant, weil diese Substanz die niedrigsten TrE und TrR in ihrem Versuch erzeugte. Nichtsdestotrotz erzielt die Fachgruppe Biotechnologie und Chemie der Hochschule Mittweida gute Ergebnisse unter Anwendung von  $\text{RbCl}_2$ . Aus diesem Grund wäre ein Vergleich unter Einsatz dieser Substanz zu empfehlen (Kretschmer, 2016).

Darüber hinaus wäre es sehr interessant, die selbe Elektroporationsmethode, die hier protokolliert wird, bei elektrischen Feldern mit verschiedenen Stärken und Einwirkzeiten anzuwenden, um auf diese Weise zu bestimmen, welche Feldstärken und welche Einwirkzeiten bei *E. coli* Stamm K12 und Plasmid pGLO optimierte TrE-Werte erzeugen.

Tu et al. (2016) beschrieben vor wenigen Monaten eine Methode zur Elektroporation, deren TrE eine Größenordnung höher als bisherige Methoden erreicht. Sehr überraschend dabei ist die Tatsache, dass die von Ihnen beschriebene Methode keine Kühlung der Zellsuspension benötigt und vollständig bei Raumtemperatur (ca. 24°C) geschieht. Ein Vergleich dieser Raumtemperatur-Elektroporationsmethode mit der Methode, die von uns hier angewandt wurde, würde viel Potential enthalten und sollte ein nächster Schritt auf der Suche effizienterer Transformationsmethoden sein.

Ein weiterer interessanter Aspekt liegt in den verwendeten Selektionsfaktoren zur Bestimmung erfolgreicher Transformanden. Der bisherige Einsatz von Antibiotikaressistenzgenen hat sich als äußerst effektiv erwiesen, wobei hier auch gewisse Risiken darin liegen, dass allgemein Antibiotika verwendet wird und auch Plasmide mit Resistenzgenen eingesetzt werden.

Die Selektion der Transformanden kann auch über beobachtbares Fluoreszenzverhalten durch in ausplattierten Kolonien exprimiertes GFP erfolgen. Durch diesen Schritt wäre der Einsatz von Resistenzgenen überflüssig, müsste aber durch eine Verdünnungsreihe und einer Untersuchung auf Fluoreszenz umständlicher gestaltet werden. Der Vorteil läge hierbei in der reduzierten Größe des Plasmids, welches anstelle des bla und GFP Gens nur noch das GFP Gen enthalten würde, somit kürzer wäre und eine höhere TrE bewirken könnte. Da das GFP Gen mit 717 bp (Consortium, 2015) außerdem kürzer ist, als bla mit 856 bp (Consortium, 2015) hinsichtlich der Verbesserung der TrE ebenfalls ein Austausch möglich, um die Größe des Plasmids zu reduzieren. Zu überprüfen wäre für diesen Fall allerdings, ob die Selektion zu sehr verkompliziert würde, da mehr Arbeitsschritte und Zeit nötig werden. Da es allerdings bereits Selektionsverfahren gibt, die auf Antibiotikaresistenz verzichten, könnte sich der Einsatz von GFP ebenfalls etablieren (Mignon et al., 2015).

## **8 Zusammenfassung**

Die TrE von  $5,9 \cdot 10^6$  KBE/ $\mu$ g Plasmid für 5 ng und  $1,6 \cdot 10^6$  KBE/ $\mu$ g Plasmid für 25 ng Plasmid bei der Elektroporation zeigen, dass eine erhöhte Menge Plasmid bessere TrE erzielt. Der Vergleich zur Chemotransformation zeigt, dass diese mit  $7,6 \cdot 10^4$  KBE/ $\mu$ g Plasmid bei 50 ng eingesetztem Plasmid außerdem weniger effektiv ist.

Im Hinblick auf die TrR zeigte sich die Chemotransformation mit 0,01 % vergleichsweise ineffizient, wohingegen sich die Elektroporation mit 0,28 % für 5 ng Plasmid und 1,84 % für 25 ng Plasmid als effizienter erwies. Zudem zeigte sich auch bei der Elektroporation ein besseres Ergebnis durch die erhöhte Menge eingesetzten Plasmids.

Insgesamt lagen die erreichten TrE und TrR aber für beide Verfahren unter den Werten von Dagert and Ehrlich (1979), die eine TrE von  $2 \cdot 10^7$  KBE/ $\mu$ g DNA und eine TrR von 20% erreichten. Eine ebenfalls bessere TrE von bis zu  $1 \cdot 10^{10}$  KBE/ $\mu$ g DNA erreichten Dower et al. (1988) mit Ihrem Protokoll.

Dadurch zeigt sich, dass die hier angewandten Methoden noch Optimierungsbedarf besitzen. Das Potenzial für GFP als positiver Selektionsmarker sollte ebenfalls in späteren Versuchen genauer untersucht werden

## **9 Summary**

The resulting transformation efficiency of  $5,9 \cdot 10^6$  KBE/ $\mu$ g Plasmid for 5 ng and  $1,6 \cdot 10^6$  KBE/ $\mu$ g Plasmid for 25 ng used Plasmid during electroporation showed that a higher amount of Plasmid yields better results. Compared to chemotransformation with a transformation efficiency of  $7,6 \cdot 10^4$  KBE/ $\mu$ g Plasmid for 50 ng Plasmid, electrotransformation is also the more effective method.

Transformation rate showed that chemotransformation was inefficient. Since only 0.01 % were reached. Electroporation was more efficient with 0.28 % for 5 ng and 1.84 % for 25 ng plasmid which shows that better results were achieved through higher amounts of pGLO.

In total, transformation efficiency and Transformation rate were below the results of Dagert and Ehrlich (1979) who achieved a transformation efficiency of  $2 \cdot 10^7$  KBE/ $\mu$ g DNA and a Transformation rate of 20%. Also a better transformation efficiency of up to  $1 \cdot 10^{10}$  KBE/ $\mu$ g achieved Dower et al. (1988) with their protocol. In both cases, the applied methods need to be optimized.

Also, the potential of GFP as a positive selectable marker should be researched thoroughly in later experiments.

## **10 Literaturverzeichnis**

- Blaber, 2004. BCH 4053L Biochemistry Lab. Spring 2004.  
<http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053L/Lecture07/Lecture07.htm>. Accessed 4 September 2016.
- Casali, N. (Ed.), 2003. E. coli plasmid vectors. Methods and applications. Humana Press, Totowa NJ, XI, 316 S.
- Consortium, T.U., 2015. UniProt: a hub for protein information. Nucl. Acids Res. 43 (D1), D204-D212.
- Dagert, M., Ehrlich, S.D., 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. Gene 6 (1), 23–28.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W., 1988. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucleic Acids Research 16 (13), 6127–6145.
- Hanahan, D., Jessee, J., Bloom, F.R., 1991. Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. Methods in enzymology 204, 63–113.
- Kretschmer, 2016. Personal communication.
- Mandel, M., Higa, A., 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. Journal of molecular biology 53 (1), 159–162.
- Mercenier, A., Chassy, B.M., 1988. Strategies for the development of bacterial transformation systems. Biochimie 70 (4), 503–517.
- Mignon, C., Sodoyer, R., Werle, B., 2015. Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever. Pathogens (Basel, Switzerland) 4 (2), 157–181.
- Mosher, R., 2002. Using pGLO to demonstrate the effects of catabolite repression on gene expression in Escherichia coli. Bioscene 28 (3), 17–23.
- Panja, S., Saha, S., Jana, B., Basu, T., 2006. Role of membrane potential on artificial transformation of E. coli with plasmid DNA. Journal of biotechnology 127 (1), 14–20.
- Roychoudhury, A., Basu, S., Sengupta, D.N., 2009. Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of E. coli using two common plasmid vectors. Indian journal of biochemistry & biophysics 46 (5), 395–400.
- Sheng, Y., Mancino, V., Birren, B., 1995. Transformation of Escherichia coli with large DNA molecules by electroporation. Nucl Acids Res 23 (11), 1990–1996.

- Siegele, D.A., Hu, J.C., 1997. Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (15), 8168–8172.
- Tu, Q., Yin, J., Fu, J., Herrmann, J., Li, Y., Yin, Y., Stewart, A.F., Muller, R., Zhang, Y., 2016. Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency. *Scientific reports* 6, 24648.
- Yoshida, N., Sato, M., 2009. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Applied microbiology and biotechnology* 83 (5), 791–798.



## **11 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

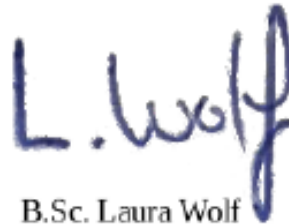
Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 18.09.2016



B.Sc. Cindy Hahn



B.Sc. Laura Wolf



B.Sc. Olivia Halamoda



B.Sc. Julia Lenhart



B.Sc. Tomas Cabrera



B.Sc. Martin Zerbst