

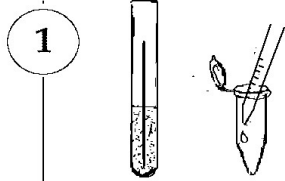
Grünes Licht für Bakterien

- Transfer eines Gens in *Escherichia coli* -

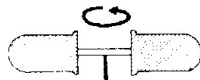
Für viele molekularbiologische Untersuchungen eignen sich Plasmide in besonderem Maße als Vektormoleküle. Über sie gelangt das Fremdgen in die Bakterien (Transformation), deren Kolonien dann als Klone die rekombinierte DNA enthalten und als Lieferanten für das gewünschte Gen-Produkt dienen.

In unserem Experiment verwenden wir ein Plasmid, in dem ein Teil des Arabinose-Operons durch ein eukaryotisches Gen ersetzt wurde, das für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) kodiert. Durch dessen Anregung mit UV-Licht können die erfolgreich transformierten Bakterienkolonien auf einfache Weise sichtbar gemacht werden.

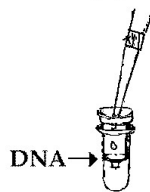
1. Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe von Silika-Technologie und Zentrifugation



Es werden Bakterienzellen aus einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* verwendet.



In Zentrifugationsschritten werden die Plasmide von den übrigen Zellbestandteilen getrennt.

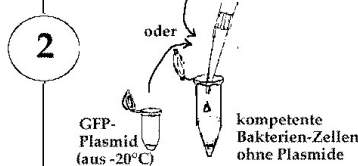


Mit Hilfe eines speziellen Verfahrens wird die DNA an einer Silika-Membran (Pfeil) in einem Reaktionsgefäß gebunden.



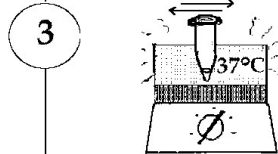
Am Ende wird die hoch gereinigte Plasmid-DNA in einem Puffer gelöst-in einem Eppendorfgefäß aufgefangen.

2. Transformation der Bakterien



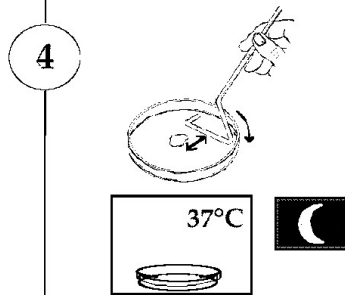
Die Plasmide, die das GFP-Gen tragen, werden durch Hitze- und Kälteschock in kompetente Bakterienzellen eingeschleust.

3. Inkubation der transformierten Bakterien



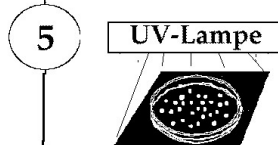
Während der Inkubationszeit in einem geeigneten Nährmedium exprimieren die transformierten Bakterienzellen das Resistenzgen, das sich auf dem Plasmid befindet.

4. Kultivierung und Selektion



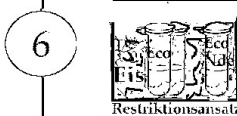
Die inkubierten Bakterienzellen werden unter sterilen Bedingungen auf verschiedenen Nährböden ausplattiert und über Nacht kultiviert.

5. Auswertung



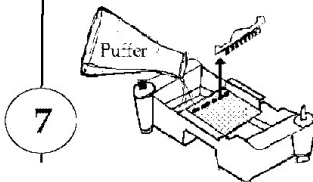
Die transformierten Bakterien werden durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar.

6. Restriktion



Die Plasmid-DNA wird mit Restriktionsendonucleasen geschnitten. Diese Enzyme zeichnen sich dadurch aus, dass sie nur innerhalb spezifischer DNA-Sequenzen das Plasmid auseinander schneiden.

7. Gelelektrophorese und Auswertung



Um die DNA sichtbar zu machen, wird die geschnittene Plasmid-DNA auf ein Gel aufgetragen. Die DNA-Fragmente wandern nach Anlegen einer Spannung durch das Porensystem des Gels.