

F1-Praktikum Genetik

Protokoll Versuch 1: Einführung in die molekularbiologische Laborpraxis

Gruppe 8, Manfred Depner & Susanne Duncker

Einleitung

Um grundlegende Labortätigkeiten zu erlernen bzw. zu wiederholen, nahmen wir in diesem Versuch durch Photometrie eine Wachstumskurve von *Escherichia coli* auf, um die Wachstumsgeschwindigkeit zu bestimmen, bestimmten die Lebendzellzahl, präparierten transformationskompetente *Escherichia coli*-Zellen und bestimmten danach die von uns erzielte Transformationseffizienz.

Material und Methoden

Die für die Herstellung der Medien sowie zur Durchführung der Experimente erforderlichen Materialien sowie die angewandten Methoden können dem ausgeteilten Skript „Praktikum der Genetik (F1), WS 2004/2005“, S. 4 – 12, entnommen werden.

Aufnahme einer Wachstumskurve durch Photometrie

Am ersten Praktikumstag impften wir ein Reagenzglas mit einer Kultur von *E. coli* an, die über Nacht unter Schütteln bei 37 °C bebrütet wurde. Diese Kultur verwendeten wir am zweiten Tag für die Messung der optischen Dichten.

Die Messung der optischen Dichte beruht auf der Eigenschaft von Körpern, Strahlung zu absorbieren bzw. abzulenken. Dabei wird ein Lichtstrahl definierter Stärke und Wellenlänge (man verwendet meist Licht der Wellenlänge 600 nm, da die meisten Kulturmedien hier die geringste Eigenabsorption haben) durch eine Flüssigkeit gestrahlt und gemessen, wie viel Prozent des Lichts am Ende durch die Flüssigkeit hindurch gekommen sind (je mehr Licht durchkommt, desto kleiner die optische Dichte). Durch die Messung der optischen Dichte lassen sich also die Anzahl der in der Lösung befindlichen Bakterien vergleichen, jedoch nicht unterscheiden, ob diese Bakterien leben oder tot sind, da beide Partikel Strahlung absorbieren bzw. ablenken. Die Genauigkeit der Photometerdaten lässt jedoch ober- und unterhalb bestimmter Grenzen (über ca. 1,5 und unter ca. 0,1) zu wünschen übrig, da ab einer bestimmten Bakteriendichte so wenig Licht durch die Suspension durch kommt, dass eine genaue Auswertung nicht mehr möglich ist. Genauso verhält es sich mit einer zu geringen Dichte – es wird so wenig Licht absorbiert bzw. abgelenkt, dass eine genaue Bestimmung des Wertes kaum möglich ist.

Zunächst maßen wir die optische Dichte einer unverdünnten Probe der Übernachtskultur (in Tabelle 1 als $\bar{O}D_{\bar{U}k_{unverd.}}$ bezeichnet) unter Zuhilfenahme von frischem LB-Medium zur Nullwertbestimmung. Des Weiteren wurden verschiedene Verdünnungsstufen vermessen (siehe Tabelle 1).

	Gruppe 1	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6	Gruppe 7	Gruppe 8
$\bar{O}D_{\bar{U}k_{unverd.}}$	2,2	2,37	2,34	2,3	2,3	2,2	2,47
$\bar{O}D_{\bar{U}k_{1:10}}$	0,4	0,37	0,311	0,39	0,526	0,345	0,33
$\bar{O}D_{\bar{U}k_{1:20}}$	0,2	0,17	0,292	0,21	0,262	0,17	0,13
$\bar{O}D_{\bar{U}k_{1:100}}$	0,043	0,044	0,041	0,031	0,031	0,023	0,03

Tabelle 1

Wie bereits oben beschrieben sind die Photometerdaten nur innerhalb eines gewissen Rahmens verlässlich. Unser Wert der unverdünnten Kultur dürfte z.B. kaum realistisch sein – zu erwarten wäre ein Wert von ca. 3,3 (der zehnfache Wert der Verdünnungsstufe 1:10). Der Wert der Verdünnungsstufe 1:100 ist nahezu linear zum Wert der Verdünnungsstufe 1:10, der Wert der Verdünnungsstufe 1:20 weicht ein wenig von der Linearität ab.

In der darauffolgenden Zeit entnehmen wir dem Kolben mit der Kultur alle 30 Minuten eine weitere Probe, die im Photometer vermessen wurde. Die OD_{600} wurde gegen die Zeit aufgetragen (siehe Tabelle 2). Die sich so ergebende Wachstumskurve ist einmal in Diagramm 1 zu sehen, wo sie computergeneriert wurde, außerdem befindet sie sich handgezeichnet als Anhang 1 und 2 am Ende des Protokolls.

Uhrzeit	9:28	10:31	11:26	12:36	12:58	13:55	14:55	15:30
Zeit in min	0	63	118	188	210	267	327	362
oD	0,03	0,04	0,09	0,38	0,47	0,89	1,50	1,82

Tabelle 2

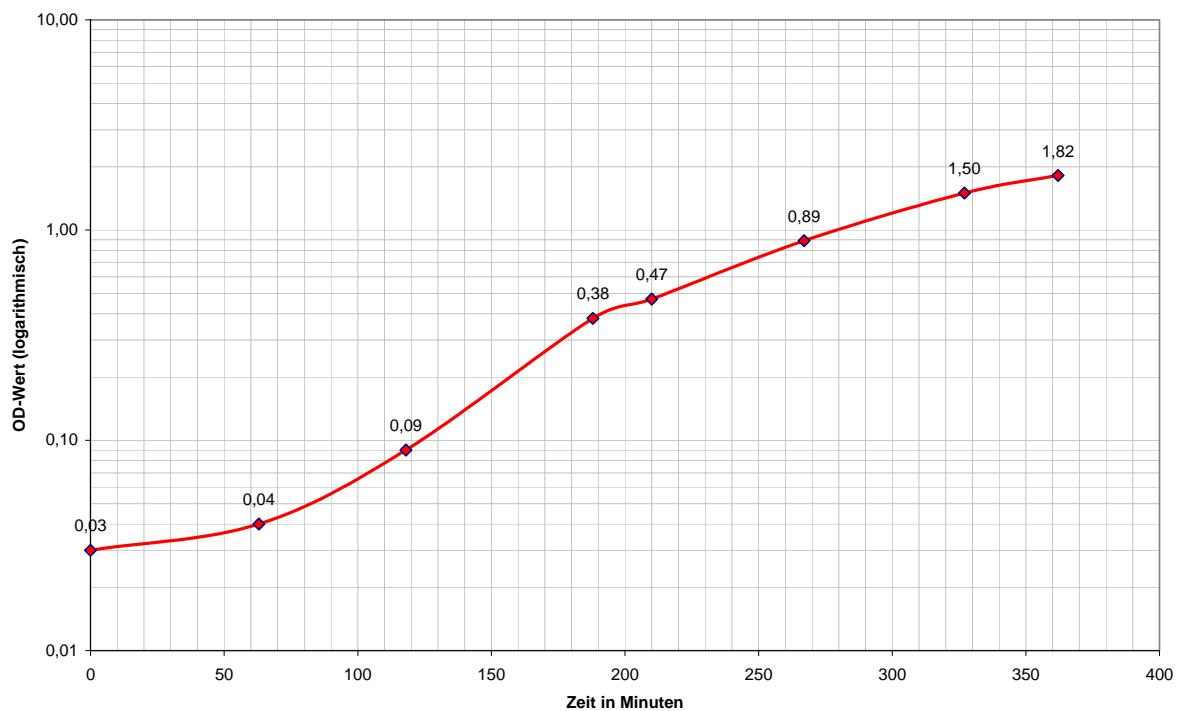


Abbildung 1

In die handgemalte Wachstumskurve legten wir die Gerade, die das logarithmische Wachstum anzeigt (siehe Anhang) und lasen an ihr die Generationszeit (Zeit, die die Zellen für die Verdopplung benötigen) von ca 34 Minuten ab.

Aufnahme einer Wachstumskurve durch Lebendzellzahlbestimmung

Die Übernachtskultur des zweiten Praktikumstags wurde verdünnt und auf Platten mit LB-Medium ausgestrichen (siehe Skript S. 9). Nach der Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden am dritten Praktikumstag die Kulturen ausgezählt und die Lebendzellzahl per ml ursprüngliche Kultur ausgerechnet.

Durch diese Methode lässt sich bestimmen, wie viele lebende Zellen sich in der zu analysierenden Lösung befanden, da nur lebende Zellen auf den Platten zu Kolonien auswachsen können.

Unsere Gruppe (Gruppe 8) zählte die in Tabelle 3 angegebenen Kulturen aus.

Verdünnung	ohne Amp.	mit Amp.
10^{-2}	sehr viele	sehr viele
10^{-4}	viele	67
10^{-5}	-	7
10^{-6}	335	-
10^{-7}	27	-
10^{-8}	5	-
10^{-9}	0	-

Tabelle 3

Anhand der ausgezählten Kulturen konnten wir die Anzahl der lebenden Zellen in unserer Stammlösung zurückrechnen. Das Ergebnis ist der Durchschnitt der zurückgerechneten Werte (siehe Tabelle 4).

Formel für die Anzahl lebender Zellen in 1 ml Übernachtskultur:

Anzahl Kulturen x 1/Verdünnungsstufe x 10 (10, da nur 100 µl ausplattiert wurden, der Wert aber pro Milliliter gelten soll)

Verdünnung: 10^{-6}	Rechnung: $335 \times 10^6 \times 10$	Lebenzellzahl: $3,35 \times 10^9$
Verdünnung: 10^{-7}	Rechnung: $27 \times 10^7 \times 10$	Lebenzellzahl: $2,7 \times 10^9$
Verdünnung: 10^{-8}	Rechnung: $5 \times 10^8 \times 10$	Lebenzellzahl: 5×10^9
Durchschnitt: $3,68 \times 10^9$		

Tabelle 4

Wir errechneten also einen Wert von $3,68 \times 10^9$ lebenden Zellen pro Milliliter Übernachtskultur. Die Werte der anderen Gruppen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Gruppe	1	3	4	5	6	7	8
ml	$1,2 \times 10^9$	$3,7 \times 10^9$	$4,25 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$1,58 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$3,68 \times 10^9$

Tabelle 5

Präparation transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Die Präparation transformationskompetenter Zellen erfolgte nach der Anleitung auf S. 10 des ausgeteilten Skripts, die Zellen wurden zur späteren Verwendung tiefgefroren.

Bestimmung der Transformationseffizienz in cfu/µg DNA

E. coli-Zellen nehmen fremde DNA nicht ohne weiteres in sich auf. Darum werden die Zellen bei der Elektroporation einem kurzen Stromstoß ausgesetzt, der die Membranen für kurze Zeit durchlässig werden lässt. Davor zugegebene Plasmide können zu diesem Zeitpunkt mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in die Zellen eindringen.

Um die Kompetenz der von uns hergestellten transformationskompetenten Zellen zu überprüfen, führten wir eine Testtransformation mit dem 3 kb großen Vektor pBluescript II SK (+) durch. Die Anleitung hierfür ist dem ausgeteilten Skript auf Seite 11f zu entnehmen. Wir verwendeten von den Assistenten ausgegebene Plasmidlösung mit einer Ausgangskonzentration von 1 µg/µl, die wir auf 100 ng/µl verdünnten (1 µl Plasmidlösung auf 9 µl Wasser).

Wir verdünnten die elektroporierten Bakterien laut Skript (S. 12) auf die Verdünnungsstufen 10^{-2} , 10^{-4} und 10^{-5} , plattierten je 100 µl davon auf ampicillinhaltige Agarplatten aus und zählten die bebrüteten Kolonien am nächsten Tag aus (s. Tabelle 6).

Verdünnung: 10^{-4}	Rechnung: $67 \times 10^4 \times 10$	Lebenzellzahl: $6,7 \times 10^6$
Verdünnung: 10^{-5}	Rechnung: $7 \times 10^5 \times 10$	Lebenzellzahl: 7×10^6
Durchschnitt: $6,85 \times 10^6$		

Tabelle 6

Berechnung der Standardabweichung:

$$(6,7 \times 10^6 - 6,85 \times 10^6)^2 = 22,5 \times 10^9$$

$$(7 \times 10^6 - 6,85 \times 10^6)^2 = 22,5 \times 10^9$$

$$\Sigma = 2,25 \times 10^{10}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{2,25 \cdot 10^{10}}{2}} = 1 \cdot 10^5$$

Das Ergebnis ($6,85 \times 10^6$ lebende Zellen) wurde mit 10 multipliziert, da die verwendete Plasmidlösung zu Beginn 1:10 verdünnt worden war. Wir erhielten also einen Wert von $6,85 \times 10^7$ cfu/ml. Die Werte der anderen Gruppen sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Gruppe	Lebendzellzahl ÜK in ml	cfu/µg DNA
1	$2,2 \times 10^9$	$4,9 \times 10^6$
3	$3,7 \times 10^9$	$5,6 \times 10^7$
4	$4,25 \times 10^9$	$11,5 \times 10^7$
5	$2,2 \times 10^9$	$2,8 \times 10^7$
6	$1,58 \times 10^9$	-
7	$1,3 \times 10^9$	$9,9 \times 10^7$
8	$3,68 \times 10^9$	$6,85 \times 10^7$

Tabelle 7

Ergebnisse und Diskussion

Verglichen mit den Ergebnissen der anderen Gruppen kann man sagen, dass unsere Zellen sowohl recht kompetent waren als auch erfolgreich transformiert wurden. Die Werte der Gruppen 4 und 6 waren laut Aussage der Assistenten unrealistisch, was durch Fehler bei der Versuchsdurchführung oder – wahrscheinlicher – auf Rechenfehler zurückzuführen ist.