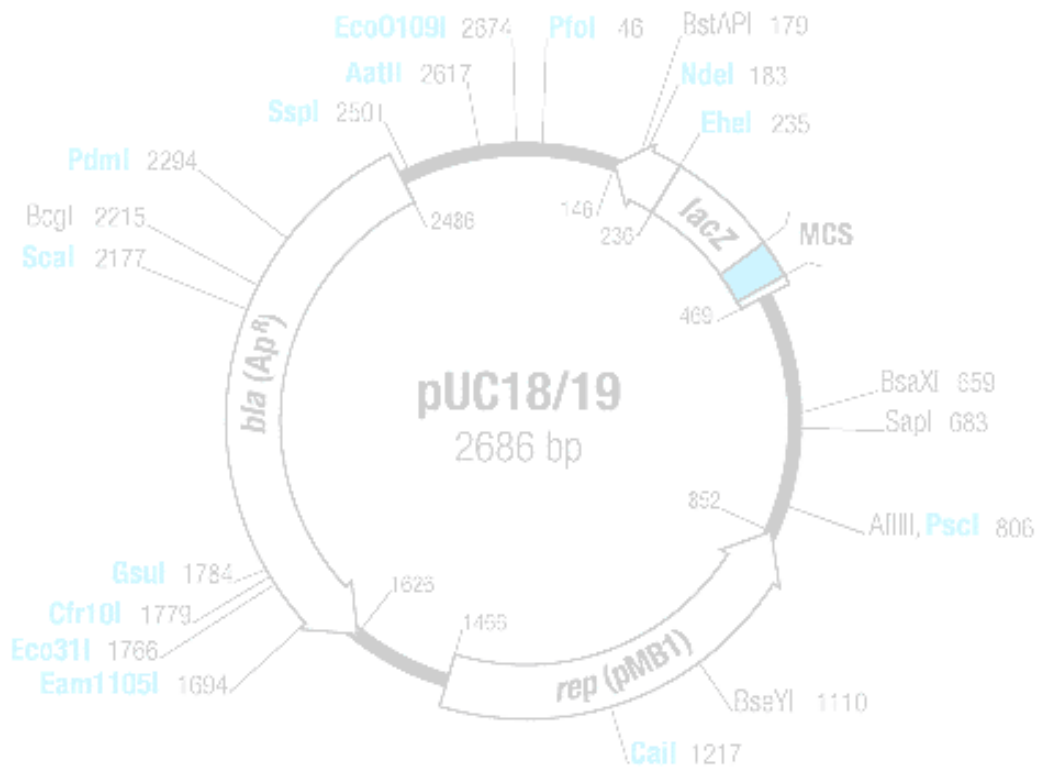


FACHARBEIT

# Herstellung kompetenter Zellen und Nachweis durch Blau-Weiß-Selektion



Abgegeben am: 25.01.2008

Bewertung:

Facharbeit: \_\_\_\_\_ Punkte

Mündliche Prüfung: \_\_\_\_\_ Punkte

Gesamtergebnis: \_\_\_\_\_ Punkte

Datum und Unterschrift  
des Kursleiters:

\_\_\_\_\_

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>2. PLASMIDPRÄPARATION .....</b>	<b>3</b>
2.1. EINFÜHRUNG .....	3
2.2. DURCHFÜHRUNG .....	4
2.3. NACHWEIS DURCH DIE GELELEKTROPHORESE.....	5
2.3.1. <i>Herstellung des Gels</i> .....	5
2.3.2. <i>Beladen und Lauf des Gels</i> .....	6
2.3.3. <i>Färbung des Gels</i> .....	6
2.4. AUSWERTUNG .....	6
<b>3. HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER ZELLEN .....</b>	<b>7</b>
3.1. EINFÜHRUNG .....	7
3.2. VORBEREITUNGEN.....	8
3.3. DURCHFÜHRUNG .....	9
3.3.1. <i>Herstellung chemisch kompetenter Zellen (CaCl<sub>2</sub>-Methode)</i> .....	9
3.3.2. <i>Transformation</i> .....	10
3.4. NACHWEIS.....	10
3.5. AUSWERTUNG .....	11
<b>4. BLAU-WEIß-SELEKTION .....</b>	<b>12</b>
4.1. EINFÜHRUNG .....	12
4.2. DURCHFÜHRUNG .....	12
4.3. FEHLERANALYSE UND AUSWERTUNG.....	13
<b>5. NACHWORT.....</b>	<b>14</b>
<b>6. QUELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>15</b>
<b>7. SCHÜLERERKLÄRUNG.....</b>	<b>16</b>

## **1. Einleitung**

Das Thema meiner Facharbeit ist die Herstellung chemisch kompetenter Zellen mittels der Calciumchloridmethode und darauffolgendem Nachweis durch die sogenannte Blau-Weiß-Selektion.

Nachdem ich am Anfang der 12. Jahrgangsstufe das Praktikum in unserem fachbeliebig ausgestatteten Labor begonnen hatte, bot sich eine Facharbeit auf dem faszinierenden Gebiet der Genetik förmlich an. Wir erlernten den Umgang mit anfangs gewöhnungsbedürftigen Geräten, wie Pipetten oder Mikrozentrifugen, nachdem uns oft genug versichert wurde, dass das Ersetzen eines solchen Gerätes ein tiefes Loch in das Schulbudget reißen würde. Es folgten weitere Erfolgserlebnisse, wie mehrfache Plasmidpräparationen mit einer Gelelektrophorese als Nachweismethode, die mich immer weiter dazu anspornten in die Tiefen der Genetik vorzudringen. So stieß ich auf das Herstellen chemisch kompetenter Zellen – eine neue Herausforderung, die mich reizte und somit als geeignetes Facharbeitsthema anbot.

Die folgenden Seiten geben einen tieferen Einblick in meinen Versuchsaufbau, angefangen bei der Plasmidpräparation, bis hin zum Nachweis der chemisch kompetenten Zellen durch die Blau-Weiß-Selektion.

## **2. Plasmidpräparation**

### **2.1. Einführung**

„Die Plasmidpräparation ist eine Molekularbiologische Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA.“ (de.wikipedia.org, 2008 b) Plasmide sind, im Bereich der Molekularbiologie, relativ kleine und ringförmige DNA-Moleküle, die neben der chromosomalen DNA in einer Bakterienzelle existieren.

Zur Isolierung reiner Plasmid-DNA wird zunächst die Zellwand der Bakterien durch die denaturierende Eigenschaft des alkalischen Natriumdodecylsulfates (SDS) zerstört. Diesen Vorgang bezeichnet man deshalb als alkalische Lyse.

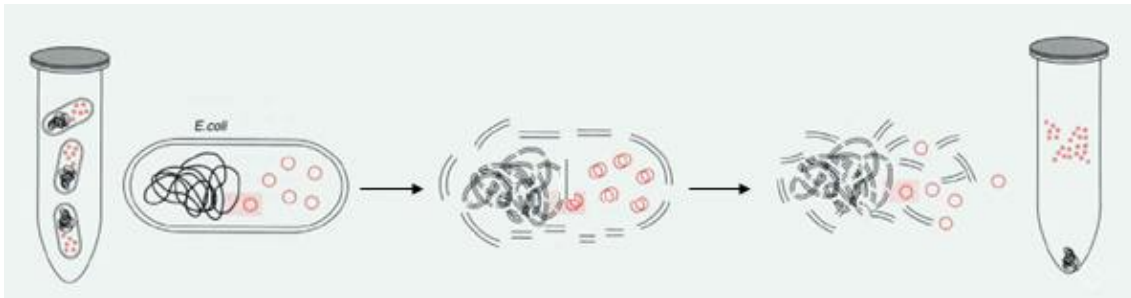


Abbildung 1: Plasmid-Isolierung (bearbeitet: [www.biologie.uni-erlangen.de](http://www.biologie.uni-erlangen.de), 2008)

Daraufhin werden unbrauchbare Substanzen, wie die chromosomale DNA und weitere Zelltrümmer durch Zentrifugation und Hochsalz abgetrennt, bis man eine Plasmidlösung erhält, die durch die Behandlung mit einer QIAprep-Säule und diversen Puffern zur Abtrennung von restlichen Proteinen und Puffersalzen führt. Somit erhält man das gereinigte Plasmid. (vgl. Abschnitt mit [www.nugi-zentrum.de](http://www.nugi-zentrum.de), 2006 e)

## 2.2. Durchführung

Durchführung der Plasmidpräparation nach dem Original-Protokoll des QIAprep-Kits. Weitere Beschreibungen sind unter folgender Internetadresse zu finden: [www.nugi-zentrum.de](http://www.nugi-zentrum.de), 2006 d

Zur Plasmidpräparation benötigt man eine Übernachtskultur mit *Escherichia coli* (*E. coli*), Darmbakterien, in denen das pUC18 Plasmid vorhanden ist. Dazu impft man am Tag vor der Versuchsdurchführung 1-5 ml LB-Medium mittels einer sterilen Pipettenspitze mit *E. coli* Bakterien an und stellt dieses über Nacht in den auf 37°C erhitzten Inkubator, so dass man es am nächsten Tag in Eppendorfreaktionsgefäße (Eppis) abfüllen kann. Das LB-Medium stellt man her, indem man 20g des Trockenmediums in 1l destilliertes Wasser schüttet und dann autoklaviert.

Nun nimmt man ein ca. 2 ml befülltes Eppi, zentrifugiert die Bakteriensuspension und verwirft den Überstand, welcher Mediumbestandteile enthält. Zu dem Niederschlag, der aus Bakterienzellen besteht, gibt man 250 µl Puffer P1 hinzu und resuspendiert so lange, bis keine Zellklumpen mehr sichtbar sind.

Daraufhin kommen 250 µl Puffer P2 dazu; das Eppi zum Mischen 4-6mal vorsichtig drehen. Auch wenn man jetzt 350 µl Puffer N3 dazu gibt, sollte das Eppi nur 4-6mal vorsichtig gedreht werden.

Die Lösung, die dem Laboranten nun trübe erscheinen sollte, muss für 10 min. zentrifugiert werden. Der Überstand enthält das notwendige Plasmid und wird mit einer Pipette auf eine QIAprep-Säule aufgetragen, welche in einem Zentrifugenröhrchen steckt.

Anschließend wird 30-60s lang zentrifugiert und der Durchlauf, der Proteine und Puffersalze enthält, verworfen. Nun muss man die QIAprep-Säule mit 0,5 ml Puffer PB waschen, erneut für 30-60s zentrifugieren und den gewonnenen Durchlauf wiederum verworfen.

Dann erfolgt derselbe Schritt mit 0,75 ml Puffer PE und auch in diesem Fall wird der Durchlauf erneut verworfen. Diesmal wird jedoch noch einmal für 1min. zentrifugiert um Puffer PE vollständig zu entfernen.

Um einen Durchlauf zu bekommen, in dem Plasmid-DNA enthalten ist, steckt man die QIAprep-Säule in ein steriles Eppi und gibt 50 µl Puffer EB darauf.

Nachdem man 1min. wartet und nochmals 1min. zentrifugiert, erhält man den gewünschten Durchlauf und somit das gereinigte Plasmid.

## **2.3. Nachweis durch die Gelelektrophorese**

### **2.3.1. Herstellung des Gels**

Durchführung nach dem Durchführungsprotokoll von Herrn Schmitt. Weitere Beschreibungen finden sich unter folgender Internetadresse: [www.nugizentrum.de](http://www.nugizentrum.de), 2006 c

Ob man das gewünschte Plasmid erhalten hat, kann man mit Hilfe einer Gelelektrophorese nachweisen.

Um das benötigte Gel für die Gelelektrophorese herzustellen, wiegt man 0,6 g Agarose ab und gießt diese mit TAE-Puffer, der in unserem Labor bereits in der fertigen Konzentration vorhanden war, auf 60 ml in einer Schraubdeckelflasche auf. Nun gibt man einen Rührfisch in die Flasche um einen Siedeverzug zu vermeiden und kocht das Gel unter Beobachtung in der Mikrowelle auf, bis es komplett klar wird.

Hinweis: Am besten Lederhandschuhe zum Aufkochen verwenden, da die Flasche sehr heiß wird.

Das heiße Gel kann anschließend in die Gelkammer der Gelelektrophoreseapparatur gegossen und der Kamm in das noch flüssige Gel eingesetzt werden.

### **2.3.2. Beladen und Lauf des Gels**

Nachdem das Gel abgekühlt ist, bedeckt man es vollständig mit TAE-Puffer, der als „Lauf- und Gelpuffer der Agarosegelelektrophorese“ dient (www.nugi-zentrum.de, 2006 a) und kann nun den Gelkamm vorsichtig entfernen, so dass die Geltaschen mit Elektrophoresepuffer gefüllt werden können. Anschließend können 5 µl Größenmarker in eine dieser Geltaschen pipettiert werden. Gleichzeitig werden 5 µl der Plasmid-Lösung in einem sterilen Eppi mit 2 µl Gelladungspuffer gemischt und gleichermaßen vorsichtig in die restlichen Geltaschen pipettiert.

Hinweis: Wenn man mehrere Proben in die Geltaschen füllt, sollte schriftlich festgehalten werden, welche Probe in welche Tasche gefüllt wurde.

Daraufhin kann man die Spannungsquellen anschließen; dabei sollte man jedoch die Polung beachten. Da DNA-Moleküle negativ geladen sind, laufen sie in Richtung der Kathode. Wenn man nun die Spannungsquelle anschließt, sollte man beachten, dass maximal eine Spannung von  $7 \text{ Vcm}^{-1}$  Elektrodenabstand anlegt wird. In unserem Labor beträgt der Elektrodenabstand der Gelelektrophoreseapparatur 14cm, d.h. wir konnten in unserem Fall eine maximale Spannung von 98 V anlegen.

Dann lässt man das Gel laufen, bis die blaue Bande des Bromphenolblaus fast das Ende des Agarosegels erreicht hat.

### **2.3.3. Färbung des Gels**

„DNA-Banden werden erst nach der Färbung mit Ethidiumbromid und anschließender Anregung der Fluoreszenz durch einen UV-Transilluminator sichtbar.“ (www.nugi-zentrum.de, 2006 b)

Die Färbung wird aufgrund des gefährlichen Potentials von Ethidiumbromid jedoch durch die Lehrkraft ausgeübt.

## **2.4. Auswertung**

Ein essentieller Vektor des pUC18 Plasmids ist, neben eines Gens für  $\beta$ -Galactosidase, das Ampicillinresistenz-Gen. Somit konnten ich und meine La-

borpartnerin Jana Krieger unsere gereinigten Plasmide zu einer Transformation in chemisch kompetente Zellen ohne pUC18 Plasmid nutzen.

Das folgende Bild zeigt eine Gelelektrophorese während unserem Laborpraktikum.



**Abbildung 2: Gelelektrophorese im Labor des Bernhard-Strigel-Gymnasiums Memmingen**

### 3. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

#### 3.1. Einführung

„Der Begriff „Kompetenz“ bedeutet in diesem Zusammenhang die Fähigkeit von Zellen, DNA aufnehmen, d.h. transformiert werden zu können.“  
([www.chemgapedia.de](http://www.chemgapedia.de), 2003)

Durch Behandlung der E.coli Bakterien mit Calciumchlorid können diese in die Lage versetzt werden, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Neben der Calciumchloridmethode gibt es auch noch weitere Methoden, wie die Behandlung der Bakterien mit Rubidiumchlorid, oder Manganchlorid, doch in den meisten Fällen wird die Calciumchloridmethode verwendet.

Durch einen Überschuss an Calcium-Ionen wird die Durchlässigkeit der Membran verändert, d.h. die Permeabilität der Zellmembran kurzzeitig erhöht und gleichzeitig die Aufnahmefähigkeit der Zellen für Fremd-DNA gesteigert.

(retro.mta-labor.info)

### 3.2. Vorbereitungen

Herstellung chemisch kompetenter Zellen mittels Calciumchloridmethode nach dem Durchführungsprotokoll von Herrn Schmitt.

Bevor man mit der Herstellung chemisch kompetenter Zellen beginnen kann, sind einige Vorbereitungen notwendig.

Da man einen größeren Teil der Durchführung bei Bedingungen unter 4°C durchführen muss, benötigt man eine Kühlbox, in der man eine Zentrifuge und einen Mixer unterbringen kann. Hierzu fanden meine Laborpartnerin Jana und ich mehrere Kühlboxen die sich im Labor befanden, für unsere Zwecke jedoch zu klein waren. Deshalb schnitten wir zwei Kühlboxen zurecht und verbanden diese mit Styroporkleber um diese abzudichten. Damit die feuchten Eiswürfel, mit denen man die Kühlbox befüllen muss um auf die gewünschten 4°C zu kommen, nicht in den Kontakt mit der Zentrifuge oder dem Mixer kommen konnten bauten wir aus den restlichen Styroporresten ein kleines Podest. Somit war die Sicherheit vor einem Kurzschluss der technischen Laborgeräte gewährleistet.



**Abbildung 3: Kühlbox**

*Hinweis:* Die Temperatur in der Kühlbox mit einem handelsüblichen Thermometer nachmessen.

Außerdem benötigt man für die Durchführung einige Chemikalien, wie 100 ml Calciumchlorid (1 mol Calciumchlorid; 110,99 g/mol) und 100 ml Calciumchlorid

in 90% Glycerin, beides jeweils autoklaviert und deshalb am besten schon einige Zeit im Voraus angefertigt.

3ml einer Übernachtskultur mit E.coli Bakterien die kein pUC18 Plasmid besitzen sind ebenso notwendig.

### 3.3. Durchführung

#### 3.3.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen (CaCl<sub>2</sub>-Methode)

Wenn man nun diese Vorbereitungen getroffen hat, schüttet man 1 ml der Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium und lässt dieses solange im Inkubator bei 37°C durchschütteln, bis die optische Dichte 600 (OD600) von ca. 0,4 - 0,6 (nicht mehr und nicht weniger) erreicht ist, die man mit Hilfe eines Spektralphotometers nachweisen kann. Dazu stellt man zur Kontrolle eine Küvette mit LB-Medium in den Küvettenhalter, so dass auf dem Anzeigergerät ein 0 Wert auftaucht. Dann drückt man die Taste  $\lambda_{nm}$ , stellt das Spektralphotometer auf 600 und drückt anschließend die Taste E. Anschließend stellt man das Anzeigergerät auf ABS, drückt die Taste 0ABS100%T und steckt nun eine Küvette mit der Bakterienlösung hinein. Die Messung erfolgt und der Wert der Absorption wird auf dem Anzeigergerät angezeigt.

Bei unserer Messung ergaben sich folgende Werte:

ZEIT	Optische Dichte
11:45	0,000
13:15	0,148
13:44	0,276
14:05	0,382
14:16	0,462

**Tabelle 1: Messung der optischen Dichte am 18.07.2007**

Nach einer Zeitspanne von 2,5 Stunden war ein optimaler Wert der optischen Dichte erreicht. Daraufhin füllt man jeweils 1 ml der Zellen in Eppis um, lässt diese auf Eis abkühlen und stellt gleichzeitig die Calciumchlorid- und Glycerin-Lösung auf Eis.

Jeder weitere Schritt darf nur noch bei 4 °C durchgeführt werden!

Nun stellt man die Zentrifuge in die darauf angepasste, mit Eiswürfeln befüllte Kühlbox und zentrifugiert die Zellen 5 Minuten bei 4-5000rpm.

Danach wird der Überstand verworfen, jeweils 1 ml Calciumchlorid dazupipetiert und ebenfalls in der Kühlbox resuspendiert. Anschließend wird erneut bei 4-5000rpm. 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Diesmal wird jeweils 1 ml der Glycerinlösung hinzugegeben, welche die Zellen beim Einfrieren isolieren soll und nochmals resuspendiert.

Hinweis: Die Glycerinlösung ist wegen ihrer dickflüssigen Konsistenz schwierig zu pipettieren.

### **3.3.2. Transformation**

Transformation nach dem Durchführungsprotokoll von Herrn Schmitt.

Zur Transformation wird nur ein Eppi mit kompetenten Zellen benötigt, der Rest kann, um eine erneute Transformation durchzuführen, eingefroren und nach Bedarf aufgetaut werden (dauert ca.20 min.)

Zu den Zellen gibt man nun 0,5 µl der pUC18 Plasmidlösung hinzu. Da unsere Plasmidpräparation schon länger her war, verwendeten wir ein frisches Plasmid von Kathrin vom 27.06.2007, das wir aus dem Gefrierfach stibitzten.

Nachdem man die Zellen für 20-30 Minuten auf Eis stehen lässt, verpasst man ihnen einen 40s langen Hitzeschock bei 42°C im Heizblock.

Hinweis: Den Hitzeblock am besten schon längere Zeit zuvor einschalten, da dieser seine Zeit braucht, bis er die gewünschte Temperatur erreicht hat.

Der Hitzeschock muss außerdem genau 40s bei genau 42°C dauern, da die Transformation sonst nicht funktioniert. (MÜHLHARDT, 2003 a)

Danach müssen die Zellen sofort wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt werden.

Dann nimmt man die Zellen aus dem Eis und pipettiert 400 µl LB-Medium dazu. Anschließend befestigt man das Eppi am besten mit Tesafilm im 37°C beheizten Inkubator und lässt es 1 Stunde gut durchschütteln.

### **3.4. Nachweis**

Wenn diese lange Zeitspanne überwunden ist, kann man die Zellen auf LB-Agar-Ampicillin-Platten ausplattieren. Um Ampicillinplatten herzustellen, benötigt man 7,5g Agar-Agar, das man in 500 ml destilliertes Wasser hinzugibt. Da-

zu kommen 25g Ampicillin und 10g LB-Medium. Dieses Gemisch wird in der Mikrowelle aufgeköcht, bis es aufklart und dann autoklaviert. Daraufhin kann man sterile Petrischalen damit aufgießen.

Anschließend pipettiert man die gewünschte Menge der Zellen auf die Platten, taucht einen Drigalski-Spatel in Alkohol, hält diesen über einen Bunsenbrenner und verstreicht die Zellen mit dem sterilen Spatel gleichmäßig darauf.

Da die pUC18 Plasmide, die in die kompetenten Zellen transformiert wurden, das Ampicillinresistenz-Gen besitzen und die Transformation erfolgreich war, müssten die E.coli Bakterien auf den Ampicillinplatten wachsen.

### 3.5. Auswertung

Unsere Herstellung chemisch kompetenter Zellen und die darauffolgende Transformation, sowie der Nachweis auf Ampicillin-Platten verliefen erfolgreich. Auf allen Platten sind Bakterienkolonien gewachsen.



Abbildung 4: Chemisch kompetente Zellen auf Ampicillinplatten

Da wir jedoch jeweils 50 µl-200 µl ausplattiert haben sind komplette Bakterienrasen gewachsen, bei denen keine einzelnen Bakterienkolonien erkennbar waren. Deshalb reichen zum Ausplattieren der Zellen ca. 5 µl-50 µl.



**Abbildung 5: Erneute Transformation mit 50 µl der Zellen (2 Monate später)**

2 Monate später transformierten wir die eingefrorenen Zellen ein zweitesmal, um zu testen, ob diese während dieser Zeitspanne und ihren Lagerungsbedingungen noch kompetent geblieben sind. Doch weiteres zu einer Langzeitstudie findet sich in der Facharbeit von Jana Krieger.

## 4. Blau-Weiß-Selektion

### 4.1. Einführung

Die Blau-Weiß-Selektion dient normalerweise zur Selektion von klonierten Bakterien. Hierzu wird ein Plasmid mit eingeschleuster Fremd-DNA in ein Bakterium transformiert und vervielfältigt. Diesen Anwendungsbereich verwendet man z.B. zur billigen und schnellen Herstellung von Proteinen für medizinische Zwecke.

Ich verwendete die Blau-Weiß-Selektion jedoch als Nachweis für die Zellen, die das pUC18 Plasmid aufgenommen haben. Denn das pUC18 Plasmid enthält, neben einem Ampicillinresistenz-Gen, auch ein LacZ-Gen, welches für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase codiert. Dieses wird von dem Farbstoff X-Gal gespalten, so dass es zu einer Blaufärbung kommt. Durch IPTG, das als Aktivator des lac-Operons fungiert (de.wikipedia.org, 2008 a), wird sichergestellt, dass das LacZ-Gen in die  $\beta$ -Galactosidase übersetzt wird.

### 4.2. Durchführung

Nach der Transformation 40 µl IPTG und 40 µl X-Gal mit einem sterilen Dri-galski-Spatel auf LB-Agar Platten (ohne Ampicillin) ausstreichen. Die Platten

daraufhin ca. 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen. Anschließend 5 µl-50 µl der transformierten, chemisch kompetenten Zellen auf die LB-Agar-IPTG-X-Gal-Platten pipettieren und gleichermaßen mit einem sterilen Drigalski-Spatel verstreichen. Dann stellt man die Platten in den 37°C beheizten Inkubator und wartet bis zum nächsten Tag auf das Ergebnis.

Hinweis: X-Gal ist lichtempfindlich und sollte deshalb im Gefrierfach in einem Eppi aufbewahrt werden, das man in Alu-Folie gewickelt hat.

### 4.3. Fehleranalyse und Auswertung

Die Blau-Weiß-Selektion, die ich am 10.10.2007 anschließend an unsere Transformation durchgeführt habe, hat leider nicht geklappt, da nur weiße Bakterienkolonien erkennbar waren.

Überlegung: Hat die Transformation nicht geklappt, oder stimmt etwas mit X-Gal nicht?

Daraufhin nahm ich ein Eppi mit E.coli Bakterien die sicher pUC18 Plasmide enthalten aus dem Gefrierfach und plattierte diese mit Hilfe einer sterilen Öse auf 2 Platten mit jeweils 40 µl IPTG und 40 µl X-Gal aus. Da X-Gal so lichtempfindlich sein könnte, dass deshalb die Selektion nicht geglückt ist, wickelte ich beide Platten in Alu-Folie ein und stellte sie über Nacht bei 37°C in den Inkubator. Am nächsten Tag waren jedoch wieder nur weiße Bakterienkolonien erkennbar. Also stellte ich beide Platten in den Kühlschrank und zerbrach mir weiterhin den Kopf, was ich falsch gemacht haben könnte. Als ich zwei Wochen später zufällig noch mal nachschaute, entdeckte ich, dass am Rand der einen Platte einige blassblaue Bakterienkolonien erkennbar waren, sich auf der zweiten Platte jedoch nichts verändert hatte. Laut Cornel Mülhardt heißt es: „Man findet oft blassblaue Kolonien oder weiße mit einem blauen Zentrum. Ein Grund dafür ist, dass die Färbung noch recht schwach ist, wenn die Platten aus dem Brutschrank kommen und sich erst nach 1-2 Stunden im Kühlschrank zur vollen Pracht entwickelt.“(MÜHLHARDT, 2003 b) Doch eigentlich müssten dann alle Bakterienkolonien auf dieser Platte blau gefärbt sein.

Überlegung: Entweder hatten die meisten Bakterien die ich aus dem Kühlschrank nahm doch kein Plasmid, oder X-Gal funktioniert nur teilweise!?

Also plattierte ich diesmal 40 µl IPTG und 40 µl X-Gal auf 2 Ampicillinplatten aus, auf die ich anschließend die E.coli Bakterien mit pUC18 Plasmiden mit Hilfe einer sterilen Öse ausstrich. Nachdem diese wiederum eine Nacht im Inkubator verbracht hatten, war am nächsten Tag auf einer Platte eine einzige blau gefärbte Bakterienkolonie erkennbar, auf der anderen Platte ist eine einzige weiße Bakterienkolonie gewachsen.

Auswertung: Das heißt, dass in den meisten E.coli Bakterien mit angeblichen pUC18 Plasmiden, die ich aus dem Gefrierfach nahm, gar keine Plasmide drin waren, da sonst viel mehr Zellen auf den Ampicillinplatten sichtbar sein müssten. Jedoch stimmte mit meinem verwendeten X-Gal auch etwas nicht, da die einzige Bakterienkolonie auf der Ampicillinplatte die weiß gewachsen ist, auch hätte blau werden müssen, weil auf einem pUC18 Plasmid das Ampicillinresistenz-Gen und das LacZ-Gen vorhanden sind.



Abbildung 6:

LB-Agar-IPTG-X-Gal-Platte mit blassblauer Färbung am Rand (rechts)

LB-Ampicillin-IPTG-X-Gal-Platte mit einer einzigen blauen Bakterienkolonie (links)

## 5. Nachwort

Trotz vieler Stunden, die ich im Labor unter der Betreuung von Herrn Schmitt und Herrn Weber verbracht habe, hat mir die Arbeit immer viel Spaß bereitet und mich sehr viel über die Arbeitsmethoden im Bereich der Genetik gelehrt.

Auch wenn nicht immer alles klappt - so ist es eben mit Laborarbeiten und umso mehr freut man sich über die Erfolge.

## 6. Quellenverzeichnis

### 6.1. Literaturverzeichnis

- (1) MÜHLHARDT, 2003 a: MÜHLHARDT, Cornel. (2003): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 4.Auflage, München, Spektrum Akademischer Verlag, S.131, ISBN 3-8274-1460-1
- (2) MÜHLHARDT, 2003 b: MÜHLHARDT, Cornel. (2003): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 4.Auflage, München, Spektrum Akademischer Verlag, S.138, ISBN 3-8274-1460-1
- (3) SCHMITT Patrick, 2006: *Einführung in die Grundarbeitstechniken der Molekularbiologie*, „Durchführung der Gelelektrophorese“ S.22
- (4) SCHMITT Patrick, 2007 : Durchführungsprotokoll, persönliche Mitteilung nach Dr. Markus Albert, Uni-Darmstadt  
„Herstellung chemisch kompetenter Zellen (CaCl<sub>2</sub>-Methode)“
- (5) SCHMITT Patrick, 2007 : Durchführungsprotokoll, persönliche Mitteilung nach Dr. Markus Albert, Uni-Darmstadt  
„Transformation chemisch kompetenter Zellen“
- (6) QUIAGEN, 2003: „QIAprep® Miniprep Handbook“ Cat.No.27990, S.22-23

### 6.2. Internetquellen

- (1) de.wikipedia.org, 2008 a: o. Verf., Wikimedia Foundation Inc., St. Petersburg [Stand: 19.01.2008]  
“<http://de.wikipedia.org/wiki/IPTG>”
- (2) de.wikipedia.org, 2008 b: o. Verf., Wikimedia Foundation Inc., St. Petersburg [Stand: 17.01.2008]  
„<http://de.wikipedia.org/wiki/Plasmidpr%C3%A4paration>“
- (3) retro.mta-labor.info: Sanel Odobasiv, mta-labor, Speyer [Stand: 18.01.2008]  
“[http://retro.mtalbor.info/cms/fachbereiche/molbio/methoden/kompetente\\_bakterien/kompetente\\_bak.](http://retro.mtalbor.info/cms/fachbereiche/molbio/methoden/kompetente_bakterien/kompetente_bak.)”
- (4) www.chemgapedia.de, 2003: o. Verf., Fachinformationszentrum Chemie GmbH, Berlin [Stand: 17.01.2008]  
„[http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/gentechnik/praktikum\\_vorb.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/praktikum/arbeits technik/komp\\_zellen.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/gentechnik/praktikum_vorb.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/praktikum/arbeits technik/komp_zellen.vscml.html)“
- (5) www.nugi-zentrum.de, 2006 a: STUPPERICH Erhard: Netzwerk Universität Gymnasien Industrie, Ulm [Stand: 19.01.2008]  
„[http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Allgemeines/Rezepte\\_Nukleinsauren.html](http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Allgemeines/Rezepte_Nukleinsauren.html)“

- (6) [www.nugi-zentrum.de](http://www.nugi-zentrum.de), 2006 b: STUPPERICH Erhard: Netzwerk Universität Gymnasien Industrie, Ulm [Stand: 17.01.2008]  
„<http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Molekularbiologie/Agarosegel/Ergebnisse.html>“
- (7) [www.nugi-zentrum.de](http://www.nugi-zentrum.de), 2006 c: STUPPERICH Erhard: Netzwerk Universität Gymnasien Industrie, Ulm [Stand: 17.01.2008]  
„<http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Molekularbiologie/Agarosegel/Methoden.html>“
- (8) [www.nugi-zentrum.de](http://www.nugi-zentrum.de), 2006 d: STUPPERICH Erhard: Netzwerk Universität Gymnasien Industrie, Ulm [Stand: 17.01.2008]  
„<http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Molekularbiologie/Plasmid/Methode.html>“
- (9) [www.nugi-zentrum.de](http://www.nugi-zentrum.de), 2006 e: STUPPERICH Erhard: Netzwerk Universität Gymnasien Industrie, Ulm [Stand: 17.01.2008]  
„[http://www.nugi-zentrum.de/pdf\\_Dateien/Plasmid/Plasmidisolierung\\_erklaerg.pdf](http://www.nugi-zentrum.de/pdf_Dateien/Plasmid/Plasmidisolierung_erklaerg.pdf)“

### 6.3. Abbildungsnachweis

Abbildung 1: <http://www.biologie.uni-erlangen.de/mibi/lectures/f1-praktikum/versuchsvortraege/GrundlagenMethoden%20WS0607.pdf>  
[Stand: 20.01.2008], bearbeitet

## 7. Schülererklärung

Ich erkläre, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benützt habe.

Memmingen, den 24.01.2008

Martha Dziuk