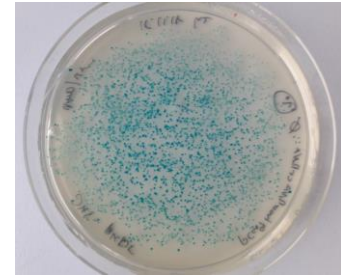


Warum sind manche Bakterien blau?

Einige Bakterien, wie z.B. das Darmbakterium *Escherichia coli*, können das Protein Lactase - auch β -Galactosidase genannt – herstellen. Es ist ein Enzym, das den Milchzucker Lactose für die Bakterien nutzbar macht. Im Experiment bewirkt Lactase, dass die farblose Substanz X-Gal zu einem blauen Indigofarbstoff umgesetzt wird. In Anwesenheit von X-Gal bilden diese Bakterien auf einer Agarplatte blaue Kolonien. Das Gen, das für die Lactase codiert und damit für die Blaufärbung verantwortlich ist, heißt *lacZ*.



CRISPR-Cas9

Mit Hilfe von CRISPR-Cas9 ist es nun möglich, exakt dieses *lacZ*-Gen in den Bakterien anzusteuern und abzuschalten. Die Bakterien bilden daraufhin in Anwesenheit von X-Gal weiße Kolonien. Die Komponenten des CRISPR-Cas9-Systems (das ist zum einen das „Schneideprotein“ Cas9 und zum anderen die guide-RNA (gRNA), welche das Cas9-Protein sequenzgenau zum *lacZ*-Gen führt) bringen wir in Form eines Plasmids in die Zellen ein.

Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Moleküle, die in Bakterien relativ häufig vorkommen. Wir haben im Labor ein Plasmid hergestellt, das die Gene für Cas9 und die gRNA trägt. Wenn wir dieses Plasmid in die Zellen einbringen, ein Prozess, den wir *Transformation* nennen, werden die beiden CRISPR-Cas9-Komponenten hergestellt – also *exprimiert*.

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. Die gentechnische Veränderung verleiht einem Organismus neue Eigenschaften – er ist *transformiert*. In unserem Fall trägt das verwendete Plasmid die Gene für Cas9 und für die gegen *lacZ*-gerichtete gRNA. Mit speziellen Methoden kann auch in höhere Organismen, z.B. Pflanzen- oder Säugetierzellen, „Fremd“-DNA eingebracht werden.

Kompetente Zellen

Organismen nehmen unter normalen Bedingungen in der Regel sehr selten DNA aus der Umgebung auf. Damit im Labor erfolgreich transformiert werden kann, werden sogenannte 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 (*Hitzeschock*) 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 die gewünschten Gene, sondern kodiert gleichzeitig für eine Antibiotikaresistenz (Chloramphenicol; Cam^R). Nur die Bakterienzellen, die das Plasmid aufgenommen haben, können auf einem chloramphenicolhaltigen 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 μ L pipettieren

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

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

Legende zum Skript:



Arbeitsanweisung



Zusatzinformation



Zusatzfragen

TEIL I: *lacZ* CRISPRn - Transformation

Schritt 1: Vorbereitung der Zellen



Bakteriensuspension (kompetente Bakterienzellen) auf Eis auftauen und zwei Eppis beschriften („K“ = Kontrolle, „lacZ“ = CRISPR-Cas9 gegen *lacZ*). In jedes Eppi nun **80 µl** der aufgetauten Bakteriensuspension überführen.
2 µl Kontroll-Plasmid-DNA zu der Zellsuspension „K“ geben und **2 µl** lacZ-CRISPR-Cas9 zur Zellsuspension „lacZ“ 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! 1 – 2 min auf Eis stehen lassen.

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, 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?



Gibt es 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 xg** (1700 x Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in **100 µl** LB-Medium resuspendiert, dazu vorsichtig auf und ab pipettieren.

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

Schritt 5: Ausplattieren der Zellen





Unter dem Bunsenbrenner werden nun **40 µl** der Zellen auf LB-Cam-Agar-Platten mit **40 µl** IPTG und **40 µl** X-Gal ausplattiert. Die Platten werden verschlossen und **über Nacht** bei **37°C** im Brutschrank inkubiert.

Das Antibiotikum Chloramphenicol, das dem Nährboden zugesetzt wurde, dient der Selektion transformierter Klone, da die verwendeten Plasmide für eine


Chloramphenicolresistenz kodieren. Nur Bakterienzellen, die Plasmid-DNA aufgenommen haben, können auf dem speziellen Nährboden wachsen. Das hinzugefügte Lactase-Substrat X-Gal und das Lactose- Analog IPTG bewirken folgendes: IPTG induziert die Expression der Lactase. X-Gal wird von Lactase gespalten, wobei der blau färbender Indigofarbstoff entsteht.

TEIL II: Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = polymerase-chain-reaction) kann gezielt ein gewünschtes DNA-Stück milliardenfach kopiert und damit nachgewiesen werden. In unserem Fall wollen wir die Anwesenheit des lacZ-Gens nachweisen. Wir machen die PCR direkt „über“ die Bakterienkolonien.

-  Mit einer Impföse (oder einer gelben Spitze) wird ein Bruchteil einer Bakterienkolonie in **25 µl** UV-H₂O, welches in ein Eppi vorgelegt wurde, überführt und für **10 min** bei **95°C** auf dem Heizblock gekocht. Dann ganz kurz runterzentrifugieren (30 sec pulse).
-  In einem speziellen Reaktionsgefäß („PCR-tube“) wird der **Mastermix (25 µl)** vorgelegt, er enthält alle für die PCR-Reaktion notwendigen Komponenten. Pipettiere **25 µl** der gekochten Bakterienlösung zum Mastermix.

Mastermix		
UV-Wasser	11 µL	
PCR-Puffer mit MgCl ₂	5 µL	Der Inkubationspuffer schafft eine „angenehme“ Umgebung für die Taq-Polymerase.
dNTP-Mix	5 µL	Der dNTP-Mix enthält alle Einzelbausteine, also die vier Nukleotide, die für die DNA-Synthese notwendig sind.
lacZ Primer-Mix	2 µL	Der Primer-Mix enthält zwei Primer (kurze einzelsträngige DNA-Stücke), die der Taq-Polymerase beim Kopieren des gewünschten DNA-Abschnitts als Startpunkt dienen.
Taq-Polymerase	2 µL	Die hitzestabile Taq-Polymerase ist das Enzym, das an Primern ansetzt und entsprechend der Vorlage einen neuen DNA-Strang synthetisiert. Sie kopiert also die DNA.
„Bakteriensud“	25 µL	Enthält die bakterielle DNA (Template-DNA)
Gesamtvolumen	50 µL	

-  Stellt eure PCR-tubes nun in die PCR-Maschine.



PCR Programm:


28 Zyklen

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
Denaturierung	95°C	3 min	Durch die lange Zeit der Denaturierung soll sicher gestellt werden, dass die Ziel-DNA einzelsträngig ist.
Denaturierung	95°C	30 sec	Die doppelsträngige DNA wird einzelsträngig, weil die Wasserstoffbrückenbindungen gespalten werden.
Annealing	55°C	15 sec	Bei dieser Temperatur lagern sich die Primer an.
Elongation	72°C	15 sec	Die Taq-Polymerase wird aktiv und synthetisiert einen neuen DNA-Strang anhand des vorliegenden Einzelstrangs. Das 3'OH-Ende eines Primers dient als Start.
Elongation	72°C	2 min	Die endgültige Elongation der PCR-Produkte soll durch diesen Schritt sicher gestellt werden.


Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente der Größe nach auftrennen und sichtbar gemacht werden.

Schritt 1: Vorbereitung des 2%igen Agarosegel

-  Für ein Gel werden **2 g** Agarose in ein Gefäß gegeben und mit 1x TBE-Puffer auf **100 ml** aufgefüllt und gekocht. Damit nichts anbrennt, wird die Lösung mit einem „Rührfisch“ gerührt.


Agarose ist ein Pulver aus einer Rotalge, mit dem man ein Gel herstellen kann. Den Puffer brauchen wir, um den pH-Wert konstant zu halten. Die Agarose löst sich beim Erhitzen im Wasser.

-  Die Lösung leicht abkühlen lassen, **5 µl** Midori Green (oder Ethidiumbromid) zufügen und die Lösung ins Gelbett füllen, danach den Kamm einstecken. Nach dem Erstarren (ca. **30 min** später) den Kamm herauslösen und das Gel mit 1x TBE-Puffer übergießen, bis es vollkommen bedeckt ist.

Mit Hilfe eines „Kammes“ werden Taschen im Gel hinterlassen, in die ihr später eure DNA einfüllen könnt.

Midori Green (oder Ethidiumbromid) sind Farbstoffe, während des Gellaufs die DNA anfärben (s.u.).

Schritt 2: Beladen des Gel

-  Mischt **10 µl** des PCR-Produkts in einem neuen Eppi mit **5 µl** Auftragspuffer.

Der Auftragspuffer enthält:


- **Glycerin** zum Beschweren der Lösung, die sich dann leichter in die Geltaschen pipettieren lässt.
- Einen **blauen Farbstoff** (Bromphenolblau), der das korrekte Pipettieren der Probe in die Geltasche erleichtert. WICHTIG: Dieser Farbstoff färbt **nicht** die DNA!

-  Pipettiere nun **15 µL** der mit Auftragspuffer versetzten PCR-Produkte in eine der Geltaschen.


*In die erste Tasche wird ein **Marker** (Größenstandard) aufgetragen, der uns nachher dabei hilft unseren Fragmenten eine Größe zuzuordnen!*

WICHTIG: Die Reihenfolge des Probenauftrags notieren!

Schritt 3: Starten der Gelelektrophorese

-  Zum Starten der Gelelektrophorese wird eine Spannung von **100 Volt** angelegt. Nach **30 - 45 min** nehmen wir das Gel aus dem Puffer und legen es auf die Blaugrün-GelPic-Box (oder den UV-Tisch). So können wir die DNA-Banden sichtbar machen.

Midori Green (oder Ethidiumbromid) sind bei Tageslicht unsichtbare Farbstoffe, die sich an bzw. in die DNA einlagern (sie anfärben) und bei Blaugrün-/UV-Licht fluoreszieren.

-  Das PCR-Produkt aufbewahren, bis das Agarosegel ausgewertet wurde.

Auswertung des Experiments:

Gel 1:



Spur	Probe	Spur	Probe
1		12	
2		13	
3		14	
4		15	
5		16	
6		17	
7		18	
8		19	
9		20	
10		21	
11		22	

Bemerkungen:

Die Bakterienzellen unseres eigenen CRISPR-Experiments brauchen über Nacht, um zu sichtbaren Kolonien zu wachsen.

Wir schicken Ihnen in der nächsten Woche gerne die Ergebnisse der Experimente zu! Geben Sie uns dazu Ihre E-Mail Adresse an, wenn Sie das wünschen.

Es ist zu erwarten, dass nicht alle Experimente funktionieren! Seien Sie nicht enttäuscht! Sie haben an einem Tag zwar (hoffentlich) viel gelernt, aber Sie sind (noch) keine Experten mit vielen Jahren Laborroutine!