

Material

für 6 Gruppen
(im Kit enthalten)

- 1.5 ml-Eppendorfröhrchen (6x)
- Gelbes Eppendorfröhrchen (6x)
- Grünes Eppendorfröhrchen (6x)
- Pipettenspitzen blau, gelb, weiss
- Entsorgungsflasche
- Entsorgungsbeutel
- Petrischalen
- LB-Agar Pulver für Platten
- Lyophilisierte Bakterien *E. coli* K12
- pGEM1-Plasmid (0.2mg/ml)
- LB-Medium (LB = Luria Bertoni)
- Ampicillin (50mg/ml)
- CaCl₂

Geräte

(im Koffer enthalten)

- 200-1000 µl-Mikropipette
- 20-200 µl-Mikropipette
- 0.5-10 µl-Mikropipette
- Thermoblock 37°C
- Rack

Nicht enthalten:

- Dampfkochtopf
- Pasteurpipetten
- Bunsenbrenner
- 200 ml-Erlenmeyerkolben (4x)
- Eisbad
- Klebeband

Vorbereitung

(Dauer ca. 120 Min.)

Giessen der LB-Agar Platten (Dauer: ca. 75 Minuten)

Achten Sie dabei auf steriles Arbeiten!

Die Platten können ca. 4 Monate bei 4°C aufbewahrt werden.

Platten mit LB-Medium:

1. Lösen Sie den Inhalt von zwei Beuteln «Agar Base» in 400 ml entmineralisiertem Wasser.
2. Kochen Sie die Lösung in einem Dampfkochtopf für 20 Minuten (Ring 2).
3. Lassen Sie die Lösung auf ca. 60°C abkühlen und giessen Sie die Lösung in sterile Petrischalen (aus 400 ml kann man ca. 25 Platten herstellen).
4. Markieren Sie die Platten am Rand mit einem gelben Strich.

Platten mit LB-Medium + Ampicillin:

1. Stellen Sie das LB-Medium für Platten wie oben beschrieben her.
2. Nach dem Kochen (Autoklavieren) lassen Sie die Lösung auf ca. 60°C abkühlen. Geben Sie 800 µl von dem im Kit mitgelieferten Ampicillin zu 400 ml Medium. Das entspricht 2/1000 des Mediumvolumens. Die Ampicillin-Stammlösung hat eine Konzentration von 50 mg/ml.
3. Giessen Sie anschliessend das Medium in die Platten.
4. Markieren Sie die Platten am Rand mit einem violetten Strich.

Rehydrieren der Bakterien und Herstellen der *E.coli* K12 Start-Platte

(Dauer: ca. 20 Minuten, Inkubation 16-18 Stunden)

1. Pipettieren Sie 250 μl CaCl_2 in das mitgelieferte Röhrchen mit den lyophilisierten Bakterien und lassen Sie die Bakterien 5 Minuten bei RT stehen.
2. Schütteln Sie das Röhrchen leicht.
3. Verdünnen Sie die Bakteriensuspension 1:100, indem Sie zu 10 μl Bakteriensuspension 990 μl CaCl_2 geben.
4. Beschriften Sie eine gelb markierte LB-Agar Platte auf dem Plattenboden mit «Start-Platte». Pipettieren Sie 100 μl der verdünnten Bakteriensuspension auf die Start-Platte und verteilen Sie die Bakterien-suspension mit einem sterilen Ausplattierrechen auf dem Nährboden.
5. Verschiessen Sie die Start-Platte mit Klebeband und inkubieren Sie sie bei 37°C über Nacht (ca. 16-18 Stunden). Legen Sie dabei die Platte mit dem Nährboden nach oben hin.

Vorheizen des Heizblockes (mindestens 30 Minuten vor Gebrauch)

Stellen Sie zum Aufheizen des Heizblocks die Solltemperatur 5°C höher als die gewünschte Temperatur ein. Kontrollieren Sie die Temperatur mit einem Thermometer, das im Metallbock steht, und regulieren Sie die Einstellung bei Bedarf.

Herstellen eines Ausplattierrechen

Die Ausplattierrechen können gut von den Schülern hergestellt werden. Jede Arbeitsgruppe benötigt 4 Stück.

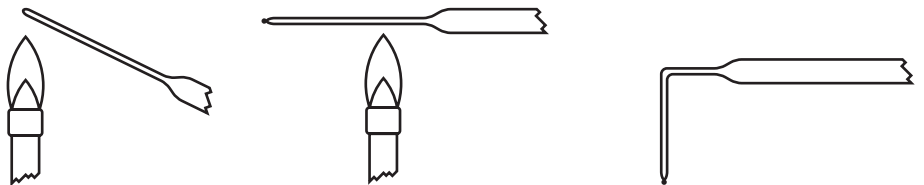


Abb. 1

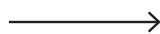


Abb. 2

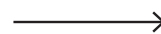


Abb. 3

1. Verschiessen Sie die Pipettenöffnung am dünnen Ende, indem Sie diese in die Flamme halten, bis sie zugeschmolzen ist (Abb. 1). Dies ist notwendig, da sonst beim Ausplattieren ein Teil der Bakteriensuspension durch die Kapillarkwirkung in die Pasteurpipette gezogen wird und dies das Ergebnis verfälscht.
2. Halten Sie die Pasteurpipette ca. 5 cm vom Ende des dünneren Teils in die Flamme (Abb. 2). Nach kurzer Zeit knickt das vordere Ende rechtwinklig nach unten.
3. Nehmen Sie die Pipette aus der Flamme und lassen Sie das Glas abkühlen (Abb. 3). Ziehen Sie das abgeknickte Ende noch einmal durch die Flamme.

Achtung: Die Ausplattierrechen sind jetzt steril.

Entsorgung

Der bei diesem Experiment entstehende feste Abfall muss in einem autoklavierbaren Entsorgungsbeutel gesammelt werden. Die Entsorgungsbeutel und die mit Bakterien bewachsenen Platten müssen im Dampfkochtopf bei 120°C für 20 Minuten autoklaviert werden (siehe Biosicherheit).

Die nach dem Ausplattieren noch in den Röhrchen verbleibenden Reste der Bakteriensuspensionen (je ca. 300 µl nach Punkt 12. und 14.) müssen in der mitgelieferten Entsorgungsflasche gesammelt werden. Der Rest der rehydrierten Bakterien für die Start-Platte gehört ebenfalls in die Entsorgungsflasche.

Lagerung

Die rehydrierten Bakterien können, wenn sie nicht sofort auf der Start-Platte ausplattiert werden, bis zu 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt werden.

Für die Transformation sollten die Kolonien der Start-Platte frisch sein. Sind sie schon etwas älter, stellt man eine frische Start-Platte her. Dazu wird eine Kolonie der alten Platte in 1 ml CaCl₂ oder LB-Medium suspendiert, 100 µl davon auf eine neue LB- Platte verteilt und die Platte bei 37°C über Nacht inkubiert.

Die mit Bakterien bewachsenen Platten können 1-2 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.