

Bachelorarbeit
Studiengang Biotechnologie

Titel:

**„Medienoptimierung für die pDNA-Herstellung mit *E. coli* DH5 alpha und
DH10 beta.“**

Autor:

Lars-Ole Koop – [REDACTED]

[REDACTED]

Bearbeitungszeitraum: 21.11.2022 – 20.02.2023

Erster Gutachter: Prof. Dr. Christian Kaiser (HAW Hamburg)

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbständig von mir verfasst wurde und nur die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Des Weiteren sind verwendete Tabellen, Grafiken, Bilder und andere Materialien zitiert oder selbständig erstellt worden. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher in keiner Prüfungsbehörde vorgelegt und nicht veröffentlicht.

(Ort, Datum)

(Lars-Ole Koop)

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Medienoptimierung für die Plasmid-DNA (pDNA) Herstellung mit den beiden *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämmen DH5 alpha und DH10 beta. Hierfür wurde das *pUC 19* Plasmid durch Elektroporation mit dem Elektroporator in die *E. coli* Stämme transformiert und von jedem Stamm fünf mikrobielle Dauerkulturen hergestellt.

Anschließend wurde das Wachstumsverhalten von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium untersucht. Dafür wurde eine Batch-Kultivierung mit vorheriger Vorkultur im Schüttelkolben durchgeführt. Das LB-Medium wurde durch Zugabe von 8 g/L Glucoselösung, durch Zugabe von Aminosäuren wie Leucin, Arginin und Thiamin und durch Verwendung einer anderen LB-Medium Charge optimiert. Trotz des optimierten Mediums wuchsen die beiden *E. coli* Stämme nicht höher als auf eine optische Dichte (*OD*) von 4,00. Die Kultivierung im synthetischen Medium war für *E. coli* DH5 alpha, aber nicht für *E. coli* DH10 beta, möglich. Nach Literaturrecherche wurden die beiden Bakterienstämme im glycerinhaltigem Medium (Glycerolmedium) im Schüttelkolben kultiviert. Mit dem Glycerolmedium wurden optische Dichten bis zu einem Wert von 15 bei einer Kultivierungsdauer von 24 Stunden erreicht.

Das *pUC 19* Plasmid wurde durch alkalische Lyse mit einem Plasmid Mini Prep Kit aus der Suspension isoliert. Nach der Isolation wurde der Plasmidgehalt mit dem Nanodrop Spektralphotometer gemessen und die Varianz der Messmethode bestimmt. Durch ein Agarosegel wurden die einzelnen Isoformen des *pUC 19* Plasmids sichtbar. Im weiteren Verlauf wurden die Unterschiede der fünf mikrobiellen Dauerkulturen der beiden *E. coli* Stämme untersucht. Dafür wurde eine Kultivierung, ein PlasmidPrep, eine Messung mit dem Nanodrop und ein Agarosegel durchgeführt. Jeweils eine mikrobielle Dauerkultur wies eine geringere Plasmidkonzentration auf als die anderen vier.

Zum Abschluss wurde die Kultivierung von *E. coli* DH10 beta parallel in zwei Bioreaktoren durchgeführt. Nach der Kultivierung im Bioreaktor wurde zusätzlich die gravimetrische Bio-trockenmassebestimmung durchgeführt und der Plasmidgehalt nach der Isolation mit dem PlasmidPrep mit dem Nanodrop Spektralphotometer bestimmt.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich unterstützt haben.

Zuallererst geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Christian Kaiser, der diese Bachelorarbeit begutachtet und betreut hat. Dabei wurde mir mit hilfreichen Anregungen und konstruktiver Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat.

Außerdem geht mein Dank an Prof. Dr. Gesine Cornelissen, die die Funktion des Zweitgutachters übernommen hat.

Ein besonderer Dank geht an Frau Petra Derr, die bei der Durchführung dieser Arbeit mit viel Engagement Fragen beantwortet und mit hilfreichen Anregungen bei der praktischen Durchführung der Arbeit unterstützt hat.

Einen großen Dank geht an Herrn Florian Schiffel für die hilfreichen Ratschläge bei Fragen und die Benutzung des Labors für Mikrobiologie.

Des Weiteren danke ich meiner Mutter Gabriele Marlies Koop, meinem Vater Roland Jürgen Koop, meinem Bruder Finn-Lasse Koop und meine beste Freundin Angel Narayan Schmekel, die mich alle sehr im Alltag geholfen haben und mich mit aufmunternden Worten motiviert haben.

Abschließend bedanke ich mich besonders bei meinem Schwager Jimmy Jipp, meiner Schwester Nadine Jipp und wiederholt meinem Bruder Finn-Lasse Koop für das Korrekturlesen dieser Bachelorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	I
Zusammenfassung	II
Danksagung	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Biotechnologie.....	1
1.2 Gentherapie und genetische Impfung	1
1.3 Zielsetzung.....	2
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Plasmid DNA.....	3
2.2 Isoformen von Plasmiden	4
2.3 <i>pUC 19</i> Plasmid.....	5
2.4 Batch-Kultivierung	6
2.5 <i>Escherichia coli</i>	7
3 Materialien	8
3.1 Geräte.....	8
3.2 Chemikalien, Proteine und Enzyme	9
3.3 <i>Escherichia Coli</i> Stämme und Plasmide	10
3.4 Nährmedien	10
3.5 Lösungen und DNA-Ladder	12
4 Methoden	14
4.1 Transformation von <i>E. coli</i>	14
4.1.1 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i>	14
4.1.2 Transformation durch Elektroporation von <i>E. coli</i>	14
4.2 Mikrobielle Dauerkultur	15

4.3	<i>E. coli</i> Kultivierung	15
4.3.1	<i>E. coli</i> Kultivierung im Schüttelkolben.....	15
4.3.2	<i>E. coli</i> Kultivierung im Bioreaktor.....	16
4.4	Bestimmung der optischen Dichte ΔOD bei 600 nm.....	17
4.5	Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration (BTM-Konzentration) in Mikroreaktionsgefäßen.....	18
4.6	Plasmidisolierung	19
4.7	Konzentrationsmessung.....	20
4.8	Agarose-Gelelektrophorese	20
5	Ergebnisse	22
5.1	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta.....	22
5.1.1	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUCD/lacZ</i> 22	
5.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC</i> 19	23
5.2	Wachstumsbestimmung von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta.....	27
5.2.1	Batch-Kultivierung der beiden Stämme mit <i>pUC</i> 19 Plasmid im LB-Medium (1)	27
5.2.2	Batch-Kultivierung der beiden Stämme mit und ohne <i>pUC</i> 19 Plasmid im LB-Medium (1)	29
5.2.3	Batch-Kultivierung der beiden Stämme mit und ohne <i>pUC</i> 19 Plasmid im LB-Medium (1) mit Zugabe von Glucose.....	31
5.2.4	Batch-Kultivierung der beiden Stämme mit und ohne <i>pUC</i> 19 Plasmid im LB-Medium (2) und synthetischen Medium mit Zusatz von Aminosäuren	33
5.3	Batch-Kultivierung der beiden Stämme mit und ohne <i>pUC</i> 19 Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren.....	35
5.3.1	Bestimmung der Varianz der PlasmidPrep Methode und Plasmidgehalts mit dem Nanodrop.....	37
5.4	Batch-Kultivierung und Unterschiedsbestimmung der 5 Klone von <i>E. coli</i> DH5 alpha mit <i>pUC</i> 19 Plasmid	42
5.5	Batch-Kultivierung und Unterschiedsbestimmung der 5 Klone von <i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC</i> 19 Plasmid	47
5.6	Kultivierung von <i>E. coli</i> DH10 beta Klon 5 mit <i>pUC</i> 19 Plasmid im Bioreaktor BIOSTAT CTA und BIOSTAT CTB	52
6	Diskussion.....	58
7	Fazit und Ausblick	61
8	Literaturverzeichnis	62

Abkürzungsverzeichnis

$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ Diammoniumhydrogenphosphat

260/230 Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm zu 230 nm

260/280 Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm zu 280 nm

A260 Absorptionskoeffizient bei 260 nm

A280 Absorptionskoeffizient bei 280 nm

Amp Ampicillin

Arg Arginin

BTM Biotrockenmasse

ccc covalently closed circular

cfu colony forming units

c_x Biotrockenmassekonzentration

E. coli *Escherichia coli*

HPLC *High-performance liquid chromatography*

kb Kilobasen

KH_2PO_4 Kaliumdihydrogenphosphat

k_{La} volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient

lac-Operon Lactose-Operon

Leu Leucin

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Magnesiumsulfat-Heptahydrat

$m_{R,0}$ Taramasse

$m_{R,X}$ Bruttomasse

NaCl Natriumchlorid

NaOH Natriumhydroxid

oc open-circular

OD optische Dichte

OD_{med} optische Dichte einer Medienprobe

OD_{susp} Optische Dichte einer Suspensionsprobe

ORI *origin of replication*

pDNA Plasmid DNA

pO₂ Gelöstsauerstoffkonzentration

s Standardabweichung

sc *supercoiled*

Thi Thiamin

var Variationskoeffizient

V_L Volumen

\bar{x} Mittelwert

ΔOD Differenz der optischen Dichte von Suspension und zellfreiem Überstand

μ_{\max} maximale Wachstumsrate

σ^2 Varianz

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schema eines typischen Plasmidvektors zur Klonierung von DNA-Fragmenten.** Ein ringförmiger Plasmidvektor besteht aus einem Promotor, einer Markersequenz, einem Gen, welches eine Antibiotika Resistenz verleiht und einen Replikationsursprung (*replication of origin, ORI*)^[1]..... 4
- Abbildung 2: Die unterschiedlichen topologischen Plasmidformen.** Die kovalent-geschlossene-zirkuläre Form (ccc), die lineare Form und die offenkettig-zirkuläre (oc) Form sind als Monomer (oben) und als Dimer (unten) dargestellt^[2]..... 5
- Abbildung 3: Schema des *pUC 19* Plasmid.** Das *pUC 19* Plasmid besteht aus 2686 Basenpaaren (bp). Es hat ein Gen, welches eine Ampicillinresistenz verleiht, einen Replikationsursprung und ein *lacZ α* Gen^[3]..... 6
- Abbildung 4: Verschiedene Kultivierungsformen.** Die Batch-Kultur, Fed-Batch-Kultur und die kontinuierliche Kultur sind abgebildet. Bei der Batch Kultur gibt es ein konstantes Volumen und bei der Fed-Batch-Kultur wird durch Zufütterung von Substrat das Volumen verändert. Bei der kontinuierlichen Kultur wird durch Zugabe von Substrat sowie gleichzeitiger Ernte ein konstantes Volumen erreicht^[4]..... 7
- Abbildung 5: Kultivierung von *E. coli* DH10 beta im Bioreaktor BIOSTAT® CTB.** Der Bioreaktor ist mit 3 L Glycerolmedium (2) und 300 mL Inokulum gefüllt. Durch Sonden wird der pH-Wert, die Temperatur und die Gelöstsauerstoffkonzentration gemessen und durch Zugabe von Säure und Lauge, durch eine Heizung und durch den Rührer geregelt..... 17
- Abbildung 6: *E. coli* NEB DH5 alpha und NEB DH10 beta auf LB-Agarplatten.** Links ist der *E. coli* NEB DH10 beta Stamm und rechts der *E. coli* NEB DH5 alpha Stamm. Die Stämme wurden per 3-Ösenausstrich auf den Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37 °C bebrütet. 22
- Abbildung 7: *E. coli* DH5 alpha und DH10 beta mit *pUCD/lacZ* auf LB-Agarplatten mit Ampicillin.** Auf der linken Seite sieht man oben und unten die Negativkontrolle mit Wasser der beiden Stämme. Auf der rechten Seite sieht man oben eine Kolonie bei *E. coli* 10 beta mit *pUCD/lacZ* und unten eine Kolonie bei *E. coli* 5 alpha mit *pUCD/lacZ*. 23
- Abbildung 8: Transformierte *E. coli* DH5 alpha mit *pUC 19* Plasmid.** Der *E. coli* DH5 alpha mit *pUC 19* Plasmid wurde auf die LB-Agarplatten mit Ampicillin Zusatz bei einer Verdünnungsstufe von 10⁻³ ausplattiert. Die Einzelkolonien der Agarplatten wurden ausgezählt. 24
- Abbildung 9: Transformierte *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid.** Der *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid wurde auf die LB-Agarplatten mit Ampicillin Zusatz bei einer Verdünnungsstufe von 10⁻² ausplattiert. Die Einzelkolonien der Agarplatten wurden ausgezählt. 25
- Abbildung 10: Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (1).** Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Von beiden *E. coli* Stämmen wurden zwei unterschiedliche Klone (1 und 2) kultiviert. Der *E. coli* DH10 beta Stamm erreicht eine höhere ΔOD_{MW} , als der *E. coli* DH5 alpha. 27

- Abbildung 11: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{\max} von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (1).** Für die Bestimmung der Wachstumsrate wurde $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Von beiden *E. coli* Stämmen wurden zwei unterschiedliche Klone (1 und 2) kultiviert. Aus der linearen Steigung ergibt sich die Wachstumsrate. Bei dem *E. coli* DH5 alpha Stamm wuchsen die Bakterien mit einer Geschwindigkeit von $0,43 \text{ h}^{-1}$ und $0,47 \text{ h}^{-1}$. Der *E. coli* DH5 alpha Stamm wuchs schneller mit $0,66 \text{ h}^{-1}$ und $0,63 \text{ h}^{-1}$. Man sieht, dass das Wachstum der Bakterien nach 3-4 Stunden langsamer wird. 28
- Abbildung 12: Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (1).** Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Der *E. coli* DH10 beta Stamm und *E. coli* DH5 alpha Stamm ohne Plasmid erreichen eine ΔOD_{MW} von 3,09 und 3,16 nach 7,50 h. Die beiden Stämme mit Plasmid wachsen deutlich geringer auf eine ΔOD_{MW} von 0,52 und 1,75. 29
- Abbildung 13: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{\max} .** Für die Bestimmung der Wachstumsrate wurde $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Aus der linearen Steigung ergibt sich die Wachstumsrate. Der *E. coli* DH10 beta Stamm ohne Plasmid wuchs am schnellsten mit einer Wachstumsrate von $0,82 \text{ h}^{-1}$. Die Stämme ohne Plasmid weisen im gleichen Medium ein schnelleres Wachstum als die mit Plasmid auf. Außerdem wächst der *E. coli* DH10 beta schneller als der *E. coli* DH5 alpha. Die Stämme wachsen nach 3-4 h nicht mehr exponentiell weiter. 30
- Abbildung 14: Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (1) mit Zusatz von 8 g/L Glucose.** Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Der *E. coli* DH10 beta Stamm und *E. coli* DH5 alpha Stamm ohne Plasmid erreichten eine ΔOD_{MW} von 1,53 und 1,75 nach 6,50 h. Die beiden Stämme mit Plasmid wuchsen ähnlich auf eine ΔOD_{MW} von 1,27, 1,43 und 1,77. Bei dem *E. coli* DH5 alpha mit Plasmid sieht man das mit dem LB-Medium (2) das Wachstum genauso stark war wie mit dem LB-Medium (1) mit Zugabe von Glucose. 31
- Abbildung 15: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{\max} von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (1) mit Zusatz von 8 g/L Glucose.** Für die Bestimmung der Wachstumsrate wurde $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Aus der linearen Steigung ergibt sich die Wachstumsrate. Der *E. coli* DH10 beta Stamm ohne Plasmid mit einer Wachstumsrate von $0,87 \text{ h}^{-1}$ wuchs ähnlich schnell, wie der *E. coli* DH10 beta Stamm mit Plasmid, der $0,88 \text{ h}^{-1}$ schnell wuchs. Auch der DH5 alpha Stamm wuchs mit und ohne Plasmid ähnlich schnell, aber langsamer als der DH10 beta Stamm. Dort wurden Wachstumsraten von $0,69 \text{ h}^{-1}$ und $0,61 \text{ h}^{-1}$ mit Zugabe von 8g/L Glucoselösung und $0,64 \text{ h}^{-1}$ mit dem LB-Medium (2) erreicht. 32
- Abbildung 16: Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (2) mit Zusatz von Aminosäuren.** Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin. Zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Die beiden Stämme ohne Plasmid wuchsen auf eine deutlich höhere ΔOD von 3,28 und 3,56. Mit Plasmid kam der *E. coli* DH5 alpha auf eine ΔOD von 0,92 und der *E. coli* DH10 beta auf 2,34. Nach 7 Stunden wurde der Prozess abgebrochen, da sich das Wachstum der Bakterien einstellte. 33

- Abbildung 17: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{\max} von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (2) mit Zusatz von Aminosäuren.** Es wird $\ln\Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin und zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Ohne Plasmid wachsen die beiden Stämme etwas schneller als mit. Bei *E. coli* DH5 alpha mit *pUC 19* Plasmid ergibt sich eine Wachstumsrate von $0,85 \text{ h}^{-1}$ und ohne von $0,92 \text{ h}^{-1}$. Bei *E. coli* DH10 beta wachsen die Bakterien mit Plasmid, mit einer Geschwindigkeit von $0,92 \text{ h}^{-1}$ und ohne Plasmid mit $1,00 \text{ h}^{-1}$. Alle Stämme wachsen drei Stunden lang exponentiell und werden dann im Wachstum langsamer. 34
- Abbildung 18: Kultivierung von *NEB E. coli* DH5 alpha im synthetischen Medium mit Zusatz von Arg und Thi.** Es wird die ΔOD_{MW} (blau) und $\ln\Delta OD_{MW}$ (rot) gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem *E. coli* DH5 alpha wurden die Aminosäuren Arg und Thi hinzugegeben. Das Bakterium wächst mit einer Geschwindigkeit von $0,24 \text{ h}^{-1}$ und erreicht eine ΔOD_{MW} von 4,08. 7 Stunden lang wurde stündlich die ΔOD bestimmt. Danach wurde über Nacht weiter inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die ΔOD wieder gemessen. 34
- Abbildung 19: Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren.** Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin und zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Der *E. coli* DH10 beta erreichte die höchste ΔOD von 8,00 nach 7,58 Stunden. Der *E. coli* DH5 alpha hat eine ΔOD von 6,44, der *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid von 6,88 und der *E. coli* DH5 alpha mit *pUC 19* Plasmid von 6,08 nach 7,58 Stunden. 36
- Abbildung 20: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{\max} von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren.** Es wird die $\ln\Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin und zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Die beiden *E. coli* Stämme wachsen mit einer Geschwindigkeit von $0,54 \text{ h}^{-1}$ - $0,66 \text{ h}^{-1}$. Am schnellsten wuchs der *E. coli* DH10 beta mit einer Wachstumsrate von $0,66 \text{ h}^{-1}$. Die ersten drei Stunden wuchsen die Bakterien mit einer konstanten Geschwindigkeit und fangen danach an, etwas langsamer zu wachsen. 36
- Abbildung 21: 1 % Agarosegel der Proben von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta.** Probenreihenfolge: 1. Größenstandard, 2. *pUC 19* Standard, 3. *E. coli* DH5 alpha nach der ersten Elution, 4. *E. coli* DH5 alpha nach der zweiten Elution, 5. *E. coli* DH5 alpha nach der ersten Elution geschnitten mit BSAI, 6. *E. coli* DH10 beta nach der ersten Elution, 7. *E. coli* DH10 beta nach der zweiten Elution, 8. *E. coli* DH10 beta nach der ersten Elution mit BSAI geschnitten, 9. Größenstandard. Als Größenstandard wurde der Quick-Load® Purple-1 kb Plus DNA Ladder verwendet. 38
- Abbildung 22: Kultivierung der 5 Klone von *E. coli* DH5 alpha mit *pUC 19* Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren.** Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin hinzugegeben. Die Klone 2, 3 und 5 haben eine ähnliche ΔOD_{MW} nach 6 Stunden von 3,01, 3,06 und 3,21. Die Klone 1 und 4 weisen nach 6 Stunden

höhere Werte auf. Bei Klon 1 wird eine ΔOD_{MW} von 4,55 und bei Klon 4 von 5,03 erreicht. 43

Abbildung 23: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{max} der 5 Klone von *E. coli* DH5 alpha mit *pUC 19* Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren. Es wird die $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin hinzugegeben. Die fünf Klone wuchsen mit einer Wachstumsrate von $0,44 \text{ h}^{-1}$ bis $0,55 \text{ h}^{-1}$. Der *E. coli* DH5 alpha Klon 1 wuchs mit $0,55 \text{ h}^{-1}$ am schnellsten und der *E. coli* DH5 alpha Klon 4 mit $0,44 \text{ h}^{-1}$ am langsamsten. 43

Abbildung 24: 1 % Agarosegel der einzelnen Klone von *E. coli* DH5 alpha.
Probenreihenfolge: 1. Größenstandard, 2. *pUC 19* Standard, 3. *E. coli* DH5 alpha (1.1) nach der ersten Elution, 4. *E. coli* DH5 alpha (1.2) nach der ersten Elution, 5. *E. coli* DH5 alpha (2.1) nach der ersten Elution, 6. *E. coli* DH5 alpha (2.2) nach der ersten Elution, 7. *E. coli* DH5 alpha (3.1) nach der ersten Elution, 8. *E. coli* DH5 alpha (3.2) nach der ersten Elution, 9. *E. coli* DH5 alpha (4.1) nach der ersten Elution, 10. *E. coli* DH5 alpha (4.2) nach der ersten Elution, 11. *E. coli* DH5 alpha (5.1) nach der ersten Elution, 12. *E. coli* DH5 alpha (5.2) nach der ersten Elution, 13. *E. coli* DH5 alpha (1.1) nach der zweiten Elution, 14. *E. coli* DH5 alpha (1.2) nach der zweiten Elution, 15. *E. coli* DH5 alpha (2.1) nach der zweiten Elution, 16. *E. coli* DH5 alpha (2.2) nach der zweiten Elution, 17. Größenstandard, 18. Größenstandard, 19. Größenstandard, 20. *pUC 19* Standard, 21. *E. coli* DH5 alpha (3.1) nach der zweiten Elution, 22. *E. coli* DH5 alpha (3.2) nach der zweiten Elution, 23. *E. coli* DH5 alpha (4.1) nach der zweiten Elution, 24. *E. coli* DH5 alpha (4.2) nach der zweiten Elution, 25. *E. coli* DH5 alpha (5.1) nach der zweiten Elution, 26. *E. coli* DH5 alpha (5.2) nach der zweiten Elution und Größenstandard. 27. Größenstandard. Als Größenstandard wurde der Quick-Load® Purple – 1 kb Plus DNA Ladder verwendet. 46

Abbildung 25: Kultivierung der 5 Klone von *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren. Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Die 5 unterschiedlichen Klone lagen nach Stunden im Bereich von einem ΔOD_{MW} von 5,94 und 6,53. Die Kultivierung startet mit einer Start optischen Dichte von 0,39. 48

Abbildung 26: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{max} der fünf Klone von *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren. Es wird die $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Die 5 Klone von *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid wuchsen für vier Stunden mit einer Wachstumsrate von $0,54 \text{ h}^{-1}$. Danach wuchsen die Bakterien langsamer weiter. 48

Abbildung 27: 1 % Agarosegel der einzelnen Klone von *E. coli* DH10 beta.
Probenreihenfolge: 1. Größenstandard, 2. *pUC 19* Standard, 3. *E. coli* DH10 beta (1.1) nach der ersten Elution, 4. *E. coli* DH10 beta (1.2) nach der ersten Elution, 5. *E. coli* DH10 beta (2.1) nach der ersten Elution, 6. *E. coli* DH10 beta (2.2) nach der ersten Elution, 7. *E. coli* DH10 beta (3.1) nach der ersten Elution, 8. *E. coli* DH10 beta (3.2) nach der ersten Elution, 9. *E. coli* DH10 beta (4.1) nach der ersten Elution, 10. *E. coli* DH10 beta (4.2) nach der ersten Elution, 11. *E. coli* DH10 beta (5.1) nach der ersten Elution, 12. *E. coli* DH10 beta (5.2) nach der ersten Elution, 13. *E. coli* DH10 beta (1.1) nach der zweiten Elution, 14. *E. coli*

DH10 beta (1.2) nach der zweiten Elution, 15. <i>E. coli</i> DH10 beta (2.1) nach der zweiten Elution, 16. <i>E. coli</i> DH10 beta (2.2) nach der zweiten Elution, 17. Größenstandard, 19. Größenstandard, 20. <i>pUC</i> 19 Standard, 21. <i>E. coli</i> DH10 beta (3.1) nach der zweiten Elution, 22. <i>E. coli</i> DH10 beta (3.2) nach der zweiten Elution, 23. <i>E. coli</i> DH10 beta (4.1) nach der zweiten Elution, 24. <i>E. coli</i> DH10 beta (4.2) nach der zweiten Elution, 25. <i>E. coli</i> DH10 beta (5.1) nach der zweiten Elution, 26. <i>E. coli</i> DH10 beta (5.2) nach der zweiten Elution, 27. Größenstandard. Als Größenstandard wurde der Quick-Load® Purple – 1 kb Plus DNA Ladder verwendet.	51
Abbildung 28: Batch-Kultur von <i>E. coli</i> DH10 beta (5) mit <i>pUC</i> 19 Plasmid im Glycerolmedium (2) mit Zusatz von Leucin im BIOSTAT CTB. Die Basenzugabe (hellgrün) in mL, die Temperatur (rot) in °C, der pH-Wert (dunkelgrün), die Gelöstsauerstoffkonzentration pO_2 (blau) in % und die Rührerdrehzahl (schwarz) in rpm werden gegen die Zeit in h aufgetragen.	52
Abbildung 29: Batch-Kultur von <i>E. coli</i> DH10 beta (5) mit <i>pUC</i> 19 Plasmid im Glycerolmedium (2) mit Zusatz von Leucin im BIOSTAT CTA. Die Basenzugabe (hellgrün) in mL, die Temperatur (rot) in °C, der pH-Wert (dunkelgrün), die Gelöstsauerstoffkonzentration pO_2 (blau) in % und die Rührerdrehzahl (schwarz) in rpm werden gegen die Zeit in h aufgetragen.	52
Abbildung 30: Kultivierung von <i>E. coli</i> DH10 beta (5) mit <i>pUC</i> 19 Plasmid im Glycerolmedium (2) mit Zusatz von Aminosäuren im BIOSTAT CTA und BIOSTAT CTB. Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium <i>E. coli</i> DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Im BIOSTAT CTA lag der ΔOD -Wert nach 7 Stunden bei 26,57 und im BIOSTAT CTB bei 23,74.	53
Abbildung 31: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{max} von <i>E. coli</i> DH10 beta (5) mit <i>pUC</i> 19 Plasmid im Glycerolmedium (2) mit Zusatz von Aminosäuren im BIOSTAT CTA und CTB. Es wird die $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium <i>E. coli</i> DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Im BIOSTAT CTA wuchs der <i>E. coli</i> DH10 beta (5) mit einer Wachstumsrate von $0,78 \text{ h}^{-1}$ schneller als der BIOSTAT CTB, der $0,75 \text{ h}^{-1}$ schnell wuchs.....	54
Abbildung 32: Biotrockenmassebestimmung c_X von <i>E. coli</i> DH10 beta (5) im BIOSTAT CTA und BIOSTAT CTB. Die Biotrockenmasse c_X ist gegen die Zeit aufgetragen. Nach 7 Stunden beträgt c_X im BIOSTAT CTB 12,65 g/L und im BIOSTAT CTA 14,10 g/L.....	55
Abbildung 33: 1 % Agarosegel von <i>E. coli</i> DH10 beta aus der Kultivierung im Biostat CTA und CTB. Von jedem Bioreaktor wurde eine Doppelbestimmung beim PlasmidPrep durchgeführt. Probenreihenfolge: 1. Größenstandard, 2. <i>pUC</i> 19 Standard, 3. <i>E. coli</i> DH10 beta CTA (1) nach der ersten Elution, 4. <i>E. coli</i> DH10 beta CTA (2) nach der zweiten Elution, 5. <i>E. coli</i> DH10 beta CTB (1) nach der ersten Elution, 6. <i>E. coli</i> DH10 beta CTB (2) nach der ersten Elution, 7. <i>E. coli</i> DH10 beta CTA (1) nach der zweiten Elution, 8. <i>E. coli</i> DH10 beta CTA (2) nach der zweiten Elution, 9. <i>E. coli</i> DH10 beta CTB (1) nach der zweiten Elution, 10. <i>E. coli</i> DH10 beta CTB (2), 11. Größenstandard. Als Größenstandard wurde der Quick-Load® Purple – 1 kb Plus DNA Ladder verwendet.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Arbeit eingesetzte Geräte. Name, Hersteller und Modell der eingesetzten Geräte sind angegeben.	8
Tabelle 2: In dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien Proteine und Enzyme. Name, Hersteller und Artikelnummer der eingesetzten Chemikalien, Proteine und Enzyme sind angegeben.	9
Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Nährmedien. Name, Reagenzien und Zusammensetzung der eingesetzten Medien sind angegeben.	10
Tabelle 4: Zusammensetzung des synthetischen Mediums ^[22] . Die 3 Flaschen wurden autoklaviert und anschließend zum Abkühlen stehen gelassen. Nach dem Abkühlen werden die 3 Flaschen zusammen in die erste Flasche gegossen und gemischt. Die Aminosäuren Thiamin, Arginin, Leucin und Ampicillin werden nach Bedarf erst in die Schüttelkolben dazu gegeben.	12
Tabelle 5: In dieser Arbeit eingesetzte Lösungen. Name, eingesetzte Reagenzien und die Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen sind angegeben.	12
Tabelle 6: In dieser Arbeit eingesetzte DNA-Ladder. Name, Hersteller und Artikelnummer der verwendeten DNA-Ladder sind angegeben.	13
Tabelle 7: Verdünnungsschema zur Messung der optischen Dichte. Die Verdünnungen wurden direkt in der Küvette durchgeführt ^[27]	18
Tabelle 8: Koloniezahl der ausgezählten Agarplatten von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta mit und ohne <i>pUC 19</i> Plasmid. Der verwendete Bakterienstamm, die Verdünnungsstufe, die gezählten Klone und die Koloniezahl sind in der Tabelle dargestellt.	25
Tabelle 9: Übersicht der Wachstumsbestimmung von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC 19</i> Plasmid im LB-Medium (1). Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.	27
Tabelle 10: Übersicht der Wachstumsbestimmung von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta mit und ohne <i>pUC 19</i> Plasmid im LB-Medium (1). Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.	29
Tabelle 11: Übersicht der Wachstumsbestimmung von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta mit und ohne <i>pUC 19</i> Plasmid im LB-Medium mit Zugabe von 8 g/L Glucose. Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.	31
Tabelle 12: Übersicht der Wachstumsbestimmung von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta mit und ohne <i>pUC 19</i> Plasmid. Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.	33
Tabelle 13: Übersicht der Wachstumsbestimmung von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta mit und ohne <i>pUC 19</i> Plasmid. Der verwendete	

Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.....	35
Tabelle 14: Bestimmung der Plasmid Konzentration von <i>E. coli</i> DH5 alpha mit dem Nanodrop. Die Probe, die Konzentration c, das Volumen V und die Masse m sind in der Tabelle dargestellt. Die erste Elution beim PlasmidPrep ist mit E1 abgekürzt, die zweite Elution beim PlasmidPrep mit E2, die Probennummer steht dahinter. Der erste Schritt im PlasmidPrep wurde mit einer ΔOD von 10 durchgeführt.	38
Tabelle 15: Bestimmung der Plasmid Konzentration von <i>E. coli</i> 10 beta mit dem Nanodrop. Die Probe, die Konzentration c , das Volumen V und die Masse m sind in der Tabelle dargestellt. Die erste Elution beim PlasmidPrep ist mit E1 abgekürzt, die zweite Elution beim PlasmidPrep mit E2, die Probennummer steht dahinter. Der erste Schritt im PlasmidPrep wurde mit einer ΔOD von 10 durchgeführt.	39
Tabelle 16: Statistische Auswertung der Nanodrop Messung des PlasmidPreps aus der Kultivierung mit <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC 19</i> Plasmid. Der Mittelwert \bar{x} (Gl.3), die Varianz σ^2 (Gl.4), die Standardabweichung s (Gl.5) und der Variationskoeffizient var (Gl.6) von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta nach der ersten und zweiten Elution sind dargestellt. Die Abweichungen des PlasmidPreps sind bei <i>E. coli</i> DH10 beta größer als bei <i>E. coli</i> DH5 alpha.	41
Tabelle 17: Übersicht der Wachstumsbestimmung von <i>E. coli</i> DH5 alpha und <i>E. coli</i> DH10 beta mit und ohne <i>pUC 19</i> Plasmid. Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.....	42
Tabelle 18: Bestimmung der Plasmid Konzentration der verschiedenen Klone von <i>E. coli</i> DH5 alpha mit dem Nanodrop. Die Probe, die Konzentration c , das Volumen V und die Masse m sind in der Tabelle als Mittelwert einer Doppelbestimmung dargestellt. Die erste Elution beim PlasmidPrep ist mit E1 abgekürzt, die zweite Elution beim PlasmidPrep mit E2. Der erste Schritt im PlasmidPrep wurde mit einer ΔOD von 10 durchgeführt.	44
Tabelle 19: Bestimmung der Unterschiede der Gesamtmassen zwischen den einzelnen Klonen von <i>E. coli</i> DH5 alpha. Die verglichenen Klone und die Abweichung in % sind dargestellt. Der fünfte Klon weicht mit 28,81 %, 34,48 %, 34,87 % und 37,58 % deutlich von den anderen ab. Die anderen Klone liegen alle im Bereich von 0-10 %.....	45
Tabelle 20: Übersicht der Wachstumsbestimmung von <i>E. coli</i> DH10 beta mit und ohne <i>pUC 19</i> Plasmid. Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.	47
Tabelle 21: Bestimmung der Plasmid Konzentration der verschiedenen Klone von <i>E. coli</i> DH10 beta mit dem Nanodrop. Die Probe, die Konzentration c , das Volumen V und die Masse m sind in der Tabelle als Mittelwert einer Doppelbestimmung dargestellt. Die erste Elution beim PlasmidPrep ist mit E1 abgekürzt, die zweite Elution beim PlasmidPrep mit E2. Der erste Schritt im PlasmidPrep wurde mit einer ΔOD von 10 durchgeführt.	49

Tabelle 22: Bestimmung der Unterschiede der Gesamtmassen zwischen den einzelnen Klonen von *E. coli* DH10 beta. Die verglichenen Klone und die Abweichung in % sind dargestellt. Der zweite Klon weicht mit 18,48 %, 19,53 %, 23,29 % und 25,38 % deutlich von den anderen ab. Die Abweichungen zwischen den anderen Klonen liegen alle im Bereich zwischen 0 und 10 %. 50

Tabelle 23: Bestimmung der Plasmid Konzentration der verschiedenen Klone von *E. coli* DH10 beta mit dem Nanodrop. Die Konzentration c , das Volumen V und die Masse m der Proben sind in der Tabelle als Mittelwert einer Doppelbestimmung dargestellt. Die erste Elution beim PlasmidPrep ist mit E1 abgekürzt, die zweite Elution beim PlasmidPrep mit E2. Der erste Schritt im PlasmidPrep wurde mit einer ΔOD von 10 durchgeführt..... 55

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Biotechnologie

Biotechnologie ist die Nutzung lebender Organismen oder ihrer Produkte zum Vorteil des Menschen, zur Herstellung eines Produkts oder zur Lösung eines Problems. Einer der ersten biotechnologisch genutzten Prozesse durch den Menschen ist die Gärung von Hefe mit der Brot, Bier und Wein bis heute hergestellt wird, sowie die Milchsäuregärung zur Herstellung von z.B. Käse und Joghurt. Die ersten wissenschaftlichen Auseinandersetzungen mit der Mikrobiologie, die etwa im späten 19. Jahrhundert begann, endeten in der Entdeckung der Antibiotika, die auch heute noch breite Anwendung finden. Im Jahr 1928 entdeckte Alexander Fleming, dass Schimmelpilze der Gattung *Penicillium* das Wachstum des Bakteriums *Staphylococcus aureus* hemmt. Das daraus entstandene Antibiotikum *Penicillin* behandelt bakterielle Infektionen bei Menschen ^[1]. Im Jahr 1973 haben Stanley Cohen und Herbert Boyer zum ersten Mal ein fremdes Gen gezielt in einen Wirtsorganismus übertragen und damit den Grundstein für die moderne Biotechnologie gelegt. Knapp zehn Jahre später wurden die ersten gentechnisch erzeugten Medikamente auf dem Markt zugelassen. Heutzutage sind viele gentechnisch hergestellte Medikamente wie z.B. Insulin (bei Diabetes), Erythropoietin (bei Blutarmut), rekombinante Antikörper und Vakzine erhältlich. Im Mittelpunkt des wissenschaftlichen wie auch des medizinischen Interesses stehen heute die Genomforschung und die Zelltechnik ^[2].

1.2 Gentherapie und genetische Impfung

Die Behandlung genetisch bedingter Erkrankungen durch das Einbringen therapeutischer Gene wurde erstmals in den 1970er Jahren erforscht. Durch den Fortschritt in der Molekularbiologie und der Gentechnik ergeben sich erste zu behandelnde Indikationen wie z.B. die cystische Fibrose oder das Gaucher Syndrom. In den Vordergrund rückt die Behandlung der verschiedenen Formen von Krebs und kardiovaskulärer Erkrankungen. Außerdem wird die kurative und präventive Impfung gegen Infektionen wie HIV oder Hepatitis C erforscht ^[3].

Es werden unterschiedliche Transfermethoden zum Einbringen therapeutischer Gene entwickelt. Dabei wird zwischen viralen und nicht viralen Systemen unterschieden. Durch virale Vektoren können die zu behandelnden Zellen besser angesteuert werden. Es besteht jedoch das Risiko, dass virale Erbinformation in das Genom der Wirtszellen integriert werden können. Die Aktivierung von Onkogenen als Folge dieser Integration kann zu krebsähnlichen Symptomen führen. Plasmid-DNA wird als Klonierungsvektor zum Einbringen rekombinanter Gene in

Mikroorganismen genutzt und zur Übertragung therapeutischer Gene in der Gentherapie und der genetischen Impfung verwendet. Im Vergleich zu viralen Vektoren zeichnet nicht-virale Systeme, wie die pDNA, ihr verringertes Sicherheitsrisiko und eine einfache Herstellungsweise aus. Für die genetische Impfung spielt die pDNA eine wichtige Rolle. Durch Einbringen DNA kodierter Antigene wird eine Immunisierung herbeigeführt. Dabei wird die Injektion direkt ins Gewebe durchgeführt ^[3].

Im humanmedizinischen Bereich befanden sich im Jahr 2007 weltweit 1309 Verfahren zur Gentherapie in der klinischen Phase. Bei 18,4 % wurde als Vektorsystem Plasmid-DNA eingesetzt ^[3]. Es sind bei vielen Krankheiten pDNA Vaccine in der Forschung. Bei HIV, Krebs, Grippe, Malaria, Tuberkulose und Leishmaniasis spielen pDNA Vaccine eine wichtige Rolle ^[4].

1.3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Medienoptimierung für die pDNA-Herstellung mit *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta im Schüttelkolben sowie im Bioreaktor. Dazu wurde das Plasmid *pUC* 19 eingesetzt. Es wird in dieser Arbeit das Wachstumsverhalten und die Plasmidproduktion von *E. coli* Bakterien im Schüttelkolben und im Bioreaktor untersucht.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Plasmid DNA

Plasmide sind autonom replizierende, kleine, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten vorkommen ^[5]. Chromosomale DNA ist die genomische DNA dieser Organismen. Die chromosomale DNA enthält alle wichtigen Informationen für das Wachstum, die Entwicklung und die Reproduktion des Organismus. Die pDNA ist im Vergleich zur genomischen DNA, welche linear ist, kreisförmig und erhält keine genetischen Informationen ^[6]. Ein pDNA-Molekül besteht aus einer Promotor Sequenz, einen Replikationsursprung (*origin of replication, ORI*) und eine Markersequenz. Der Replikationsursprung ist ein spezifischer Bereich, der für die selbständige Replikation des Vektors notwendig ist. Außerdem kann ein Gen in das Plasmid eingebracht werden, welches der Zelle eine Antibiotika Resistenz verleiht. Mit einer Resistenz z.B. auf Ampicillin (Amp), wird es dem Bakterium ermöglicht auf Ampicillin haltigem Medium zu wachsen ^[7]. Der Aufbau eines pDNA-Moleküls ist in Abbildung 1 dargestellt.

In der Natur vorkommende Plasmide besitzen inhärente und phänotypische Funktionen. Zu den inhärenten Funktionen gehören Fähigkeiten wie Konjugation, Mobilisierung, Replikation, Kontrolle der Kopienzahl, Mechanismen der stabilen Vererbung von Plasmiden und Inkompatibilität. Zu den phänotypischen Funktionen zählt man z. B. Antibiotika- oder Schwermetallresistenzen. Die für phänotypische Funktionen kodierenden Gene sind für das Bakterium nicht essenziell, geben aber einen Vorteil gegenüber anderen Bakterien ^[8]. Plasmide können in einer Zelle in unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen. Es wird zwischen *low copy* (bis zu 20 Kopien pro Zelle) und *high copy* (20-1000 Kopien pro Zelle) Plasmiden unterschieden ^[9].

Plasmide werden in der Gentechnik häufig als Transportvehikel für rekombinante DNA eingesetzt und spielen in bestimmten Gentherapien und Ansätze zur Vakzinierung, wie in 1.2 beschrieben, eine entscheidende Rolle ^[9]. Das meistens verwendete Bakterium zur pDNA-Produktion ist *Escherichia coli*. Die Stämme DH5 alpha, DH5, DH1 und DH10B kommen dabei am häufigsten zum Einsatz ^[10].

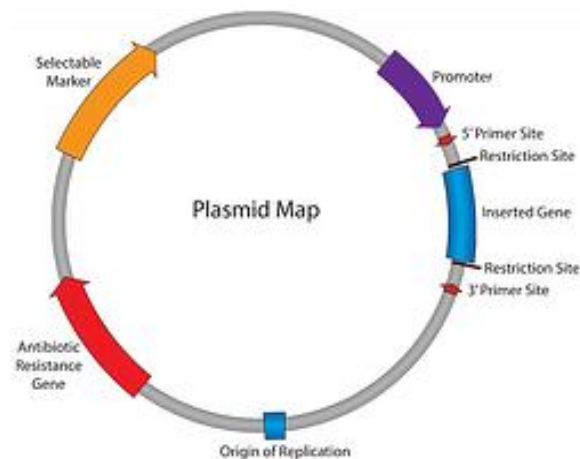


Abbildung 1: Schema eines typischen Plasmidvektors zur Klonierung von DNA-Fragmenten. Ein ringförmiger Plasmidvektor besteht aus einem Promotor, einer Markersequenz, einem Gen, welches eine Antibiotika Resistenz verleiht und einen Replikationsursprung (*replication of origin, ORI*)^[1].

2.2 Isoformen von Plasmiden

Plasmide haben eine ringförmige Doppelhelixstruktur. Durch diese Struktur können Plasmide in unterschiedlichen topologischen Formen ausgebildet werden^[9]. Es gibt drei unterschiedliche Isoformen, die sich anhand ihrer Ladung, Größe und Hydrophobizität unterscheiden. Diese Formen heißen kovalent-geschlossen-zirkuläre Form (*supercoiled, sc* oder *covalently closed circular, ccc*), offenkettig-zirkuläre Form (*open-circular, oc*) oder lineare pDNA^[11]. Die unterschiedlichen topologischen Formen können wiederum in oligomerer Form als Dimer, Trimer etc. vorkommen und werden auch Konkatemere genannt^[12]. Die Strukturen der unterschiedlichen Isoformen sind in Abbildung 2 zu sehen. Am häufigsten nach der Isolation aus bakteriellen Zellen kommt die kovalent-geschlossen-zirkuläre Form vor. Diese hat eine kompakte Struktur, bei welcher die doppelsträngige DNA um sich selbst gewunden ist. Durch Nukleasen oder mechanischen Stress wird ein DNA-Strang geschnitten, wodurch das Plasmid in die offene zirkuläre Form übergeht, da die Stränge nicht mehr gewickelt sind. Diese Form ist entspannt und weniger kompakt. Lineare pDNA-Moleküle entstehen, wenn beide Stränge an der gleichen Stelle gebrochen werden. Natürlich kommt diese Form in Bakterien wie *Borrelia*, *Streptomyces* und *Escherichia* vor. In Plasmidpreparation werden oft dimere Plasmidformen gefunden, die doppelt so groß wie die monomere Form sind. In einem Agarosegel kann man alle Formen voneinander trennen^[13].

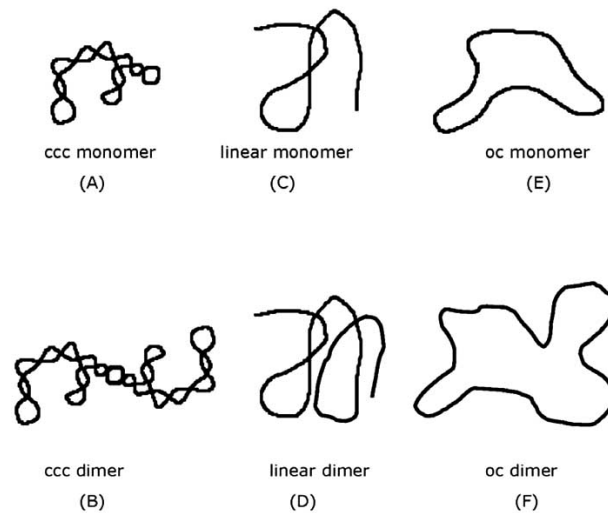


Abbildung 2: Die unterschiedlichen topologischen Plasmidformen. Die kovalent-geschlossene-zirkuläre Form (ccc), die lineare Form und die offenkettig-zirkuläre (oc) Form sind als Monomer (oben) und als Dimer (unten) dargestellt ^[2].

2.3 *pUC 19* Plasmid

Das in dieser Arbeit verwendete *pUC 19* Plasmid ist ein *high copy* Plasmid, welches zu den am häufigsten verwendeten Klonierungsvektoren im Bakterium *E. coli* zählt. Es zählt mit 2686 bp zu den kleinen Plasmiden (Abbildung 3). Das Plasmid besitzt einen Replikationsursprung zwischen 1000 bp und 1500 bp und einen Polylinker (396 bp – 454 bp). Durch das Gen, welches eine Antibiotikaresistenz verleiht (1700 bp – 2500 bp), können Bakterien mit einem *pUC 19* Plasmid auf Ampicillin haltigem Medium wachsen. Dadurch kann nach einer Transformation selektiert werden, welche Zellen das Plasmid enthalten und welche es nicht erhalten haben. Das *lacZ* Gen (100 bp - 450 bp) sorgt dafür, dass die β -Galactosidase exprimiert wird. Dies ist ein Enzym, welches die Lactose in Galactose und Glucose spaltet. Es kann auch Allolactose in Lactose umwandeln ^[14]. Das *lacZ* Gen ist neben das *lacY*- und *lacA*-Gen eines von drei Genen, welches zu den Strukturgenen des Lactose-Operon (*lac*-Operon) gehört. Das *lac*-Operon ist wichtig für den Import und Abbau von Lactose in Bakterien ^[15].

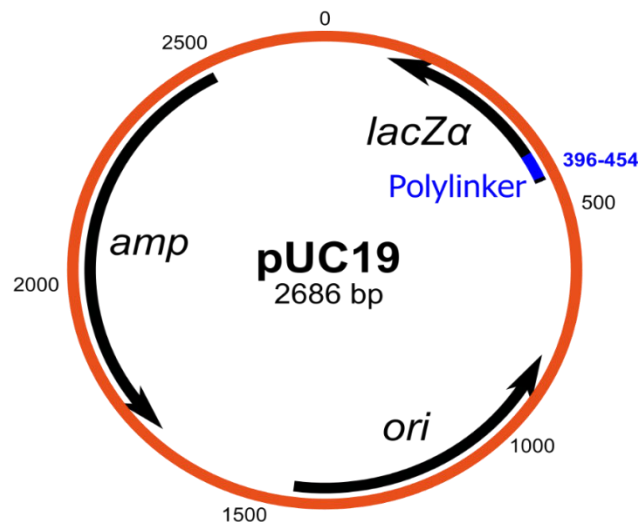


Abbildung 3: Schema des pUC 19 Plasmid. Das pUC 19 Plasmid besteht aus 2686 Basenpaaren (bp). Es hat ein Gen, welches eine Ampicillinresistenz verleiht, einen Replikationsursprung und ein lacZα Gen ^[3].

2.4 Batch-Kultivierung

Der Chargenprozess, auch Batch-Kultivierung genannt, ist ein diskontinuierliches Produktionsverfahren zur Herstellung von abgegrenzten Stoffmengen. Durch das Volumen des Produktionsgefäßes, z. B. ein Schüttelkolben oder Bioreaktor, wird dem Prozess eine begrenzte Materialmenge zugeführt. Wenn die Nährstoffe aufgebraucht sind, endet das Wachstum der Kultur durch Akkumulation toxisch wirkender Substanzen oder durch Sauerstoffmangel ^[16]. Die Vorteile bei diesem Verfahren sind die geringe Mutationsrate, bedingt durch die geringe Anzahl an Generationszyklen, der geringe apparative Ablauf und der geringe Mess- und regelungstechnische Aufwand. Der hohe Aufwand für Vorkulturen, das Beanspruchen des Materials durch Sterilisieren und die Totzeiten für Befüllen, Sterilisieren und Entleeren sind Kritikpunkte beim Anwenden dieser Methode ^[17]. Ein weiteres Verfahren ist die Fed-Batch-Kultivierung. Dieses diskontinuierliche Produktionsverfahren unterscheidet sich von der Batch-Betriebsweise durch gezielte Zufütterung von Nährstofflösungen während der Fermentation ^[18]. Im kontinuierlichen Betrieb wird durch einen kontinuierlichen Zustrom Substrat-Lösung hinzugefügt und das Kulturmedium gleichwertig abgeführt (Abbildung 4) ^[19].

Die Bioreaktionstechnik beschäftigt sich mit der Umsetzung der Edukte mit Biokatalysatoren in Produkte. Damit eine hohe Produktqualität und Produktivität erreicht werden können, wird die Umsetzung durch Off- und On-line-Überwachung der Konzentration der Mikroorganismen sowie ggf. der Edukte und Produkte kontrolliert. In Bioreaktoren kann, im Gegensatz zum

Schüttelkolben, die Temperatur, der Druck, das Flüssigkeitsniveau, der Flüssigkeits- und Gasdurchsatz, die Rührerdrehzahl, die gelöste Sauerstoffkonzentration (pO_2) und der pH-Wert des Mediums durch Sonden gemessen und die entsprechenden Größen in den meisten Fällen geregelt werden ^{[20][21]}.

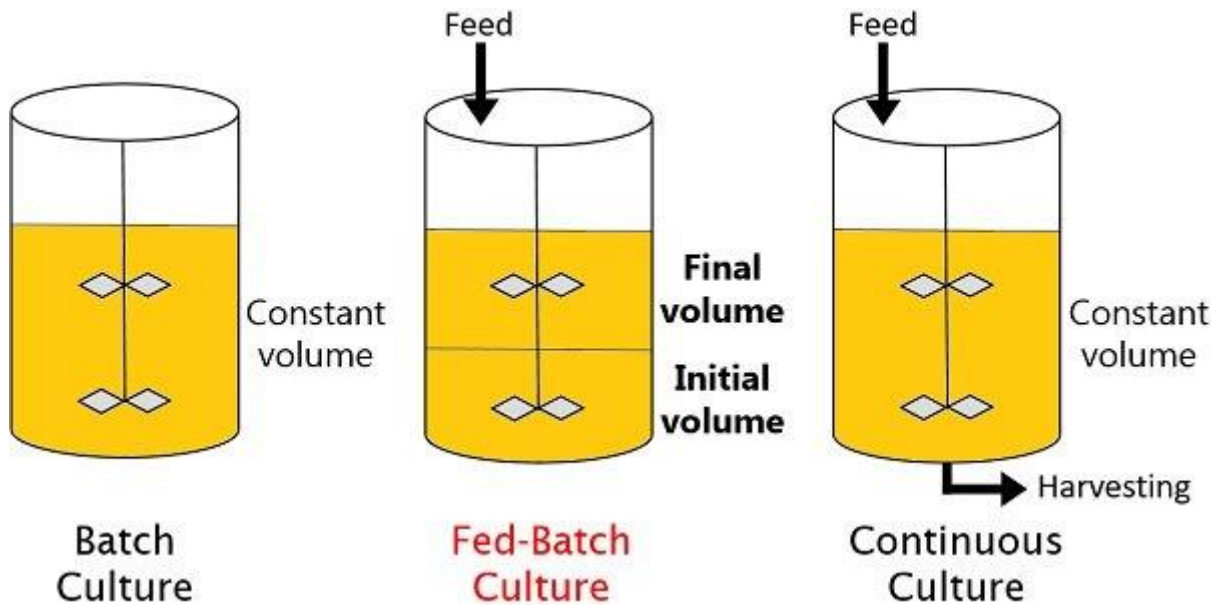


Abbildung 4: Verschiedene Kultivierungsformen. Die Batch-Kultur, Fed-Batch-Kultur und die kontinuierliche Kultur sind abgebildet. Bei der Batch Kultur gibt es ein konstantes Volumen und bei der Fed-Batch-Kultur wird durch Zufütterung von Substrat das Volumen verändert. Bei der kontinuierlichen Kultur wird durch Zugabe von Substrat sowie gleichzeitiger Ernte ein konstantes Volumen erreicht ^[4].

2.5 Escherichia coli

Escherichia coli ist ein gramnegatives Stäbchenbakterium aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Mit *E. coli* können hohe Wachstumsraten erreicht werden und eine relativ einfache, genetische Modifizierbarkeit zur Überexpression rekombinanter Proteine gewährleistet werden. *E. coli* besitzt einen heterotrophen, fakultativ anaeroben Stoffwechsel. Die häufigste eingesetzte Kohlenstoffquelle ist Glucose. Eine hohe Glucosekonzentration führt bei der Fermentation mit *E. coli* zum Overflow-Metabolismus mit Bildung von Acetat. Hohe Acetatkonzentrationen können dabei das Wachstum (über 6 g/L) und die Produktbildung (über 2,4 g/L) hemmen. Alternative Kohlenstoffquellen wie Fructose, Fumarat oder das, in dieser Arbeit verwendete, Glycerin führen zu einer langsameren und geringeren Aufnahme der Kohlenstoffquelle ^[18].

3 Materialien

3.1 Geräte

Tabelle 1: In dieser Arbeit eingesetzte Geräte. Name, Hersteller und Modell der eingesetzten Geräte sind angegeben.

Name	Hersteller	Modell
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	BP 2215
Autoklav	Systec GmbH, Linden, Deutschland	Systec V-150
Bioreaktor	Braun Biotech International GmbH, Berlin, Deutschland	BIOSTAT®CTA, Nr:1163
Bioreaktor	Braun Biotech International GmbH, Berlin, Deutschland	BIOSTAT®CTB, Nr_1101
Elektroporator	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Eporator
Inkubationsschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland	BD-115, ED-115
Magnetrührer	IKA®- Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland	RH basic 2
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland	MR 3001
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	BP 8100
Schüttelheizblock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	ThermoMixer F2.0
Schüttelinkubator	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, Deutschland	AXON SI-20
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA	Innova 4200
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA	innova® 42
Sicherheitswerkbank	Thermo Fischer Scientific Inc., Massachusetts, USA	HERASafe KS 12
Sicherheitswerkbank	Heraus Holding GmbH, Hanau, Deutschland	HS 12
Spektralphotometer	Thermo Fischer Scientific Inc., Massachusetts, USA	NanoDrop 2000C
Spektralphotometer	Thermo Fischer Scientific Inc., Massachusetts, USA	Genesys 10 UV

Name	Hersteller	Modell
Spektralphotometer	Thermo Fischer Scientific Inc., Massachusetts, USA	Genesys 10S Vis
Trockenschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland	UT 6120
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Centrifuge 5418 R
Zentrifuge	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland	Centrisart A-14

3.2 Chemikalien, Proteine und Enzyme

Tabelle 2: In dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien Proteine und Enzyme. Name, Hersteller und Artikelnummer der eingesetzten Chemikalien, Proteine und Enzyme sind angegeben.

Name	Hersteller	Artikelnummer
α - D (+) - Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	BP 2215
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	5210.2
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	5210.4
Agarose	Life Technologies, Paisley Schottland	15510-027
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	K029.2
BD Bacto™ Peptone	Becton, Dickson and Co., Pennsylvania, USA	211677
BSAI-HF®v2	New England Biolabs® Inc., Frankfurt am Main, Deutschland	R3733S
Di-Ammoniumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	P736.1
Ethanol ROTIPURAN® ≥ 99,8 %, p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	9065.1
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	7530.4
Hefeextrakt, mikro-granuliert	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	2904.4
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	P018.2

Name	Hersteller	Artikelnummer
L-Arginin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	1655.1
L-Isoleucin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	3922.1
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	P828.3
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	3957.1
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	3957.2
PCR-Wasser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T143.2
Thiaminchlorid-hydrochlorid	MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland	8181.022K

3.3 *Escherichia Coli* Stämme und Plasmide

In dieser Arbeit wurde der *E. coli* Stamm *NEB*[®] DH5 alpha und der *E. coli* Stamm *NEB*[®] DH10 beta zur Expression des *pUC* 19 Plasmids verwendet.

Plasmid: *pUC* 19 ($c = 92 \text{ ng}/\mu\text{L}$)

pUCD/lacZ ($c = 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$)

3.4 Nährmedien

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Nährmedien. Name, Reagenzien und Zusammensetzung der eingesetzten Medien sind angegeben.

Name	Reagenzien	Zusammensetzung
LB-Medium (1)	LB-Lennox	20 g/L
	VE-Wasser	Auffüllen zum gewünschten Volumen
LB-Medium (2)	Hefeextrakt	5,00 g/L
	Peptone	10,00 g/L
	Natriumchlorid (NaCl)	5,00 g/L
	VE-Wasser	Auffüllen zum gewünschten Volumen

Name	Reagenzien	Zusammensetzung
Glycerolmedium (1)	Glycerol	10,00 g/L
	Hefeextrakt	10,00 g/L
	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	13,30 g/L
	Diammoniumhydrogenphosphat ((NH ₄) ₂ PO ₄)	4,00 g/L
	Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1,20 g/L
	Spurenelemente	1:100
	VE-Wasser	Auffüllen zum gewünschten Volumen
Glycerolmedium (2)	Glycerol	25,00 g/L
	Hefeextrakt	25,00 g/L
	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	13,30 g/L
	Diammoniumhydrogenphosphat ((NH ₄) ₂ PO ₄)	4,00 g/L
	Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1,20 g/L
	Leucin (Leu)	0,30 g/L
	Spurenelemente	1:100
	VE-Wasser	Auffüllen zum gewünschten Volumen

Tabelle 4: Zusammensetzung des synthetischen Mediums ^[22]. Die 3 Flaschen wurden autoklaviert und anschließend zum Abkühlen stehen gelassen. Nach dem Abkühlen werden die 3 Flaschen zusammen in die erste Flasche gegossen und gemischt. Die Aminosäuren Thiamin, Arginin, Leucin und Ampicillin werden nach Bedarf erst in die Schüttelkolben dazu gegeben.

Komponente	Konzentration <i>c</i>	Volumen <i>V</i>	Flasche
VE-Wasser		372 mL	1
KH ₂ PO ₄	13,30 g/L	50 mL	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,00 g/L		
Natriumhydroxid (NaOH) 4M		2,5 mL	
Glucose · 1 H ₂ O	8,00 g/L		2
VE-Wasser		47 mL	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,20 g/L	1,20 mL	3
VE-Wasser		25 mL	
Spurenlösung		5 mL	
Thiamin · HCl (Thi)	4,5 mg/L		Zugabe nach Bedarf
Arginin (Arg)	0,1 g/L		Zugabe nach Bedarf
Leucin	0,3 g/L		Zugabe nach Bedarf
Ampicillin	100 mg/L		Zugabe nach Bedarf

3.5 Lösungen und DNA-Ladder

Tabelle 5: In dieser Arbeit eingesetzte Lösungen. Name, eingesetzte Reagenzien und die Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen sind angegeben.

Name	Reagenzien	Zusammensetzung
Ampicillin-Lösung	Ampicillin VE-Wasser	100 mg/mL
Arginin-Lösung	L-Arginin VE-Wasser	10 g/L
Glycerin-Lösung	Glycerin VE-Wasser	50 % w/v
Leucin-Lösung	Leucin VE-Wasser	30 g/L

Name	Reagenzien	Zusammensetzung
Saline	NaCl VE-Wasser	9 g/L
Thiamin-Lösung	Thiamin VE-Wasser	450 mg/L

Tabelle 6: In dieser Arbeit eingesetzte DNA-Ladder. Name, Hersteller und Artikelnummer der verwendeten DNA-Ladder sind angegeben.

Name	Hersteller	Artikelnummer
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	B7025S
Quick-Load® Purple – 1 kb Plus DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	N0550S

4 Methoden

4.1 Transformation von *E. coli*

4.1.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*

Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. Dafür wurden 10 mL LB-Medium in einen 100 mL Schüttelkolben mit Strömungsbrechern, mit einer Einzelkolonie des entsprechenden Stammes von einer Agarplatte angeimpft. Die Vorkultur wurde anschließend über Nacht bei 37 °C und 120 min⁻¹ inkubiert. Am folgenden Tag wurden 1,4 mL LB-Medium in einem 2,0 mL Mikroreaktionsgefäß mit 50 µL der Vorkultur angeimpft und in der Folge für zwei Stunden im Schüttelheizblock bei 37 °C und 700 rpm inkubiert. Es sollten deutliche Schlieren beim Invertieren des Mikroreaktionsgefäßes sichtbar sein. Für drei Minuten wurde bei 5000 g bei 4 °C zentrifugiert. Ab diesem Schritt wurde durchgehend auf Eis gearbeitet. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Zellpellet verblieb am Boden des Mikroreaktionsgefäßes. Das Zellpellet wurde in 1,0 mL eiskaltem Glycerin (10% w/v) resuspendiert und vollständig gelöst. Es wurde wieder bei 5000 g bei 4 °C für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Zellpellet verblieb am Boden des Mikroreaktionsgefäßes und wurde in 1,0 mL eiskaltem Glycerin vollständig gelöst. Anschließend wurde erneut für drei Minuten bei 5000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig bis auf ungefähr 100 µL abpipettiert. Anschließend wurde das Zellpellet resuspendiert. Abschließend stehen elektrokompente Zellen für die nachfolgende Elektroporation zur Verfügung ^[23].

4.1.2 Transformation durch Elektroporation von *E. coli*

Zu einem Mikroreaktionsgefäß mit den elektrokompenten Zellen wurde 1 µL *pUC 19* Plasmid (10 ng/µL) gegeben. Als Kontrolle wurde 1 µL H₂O zu einem weiterem Mikroreaktionsgefäß mit elektrokompenten Zellen pipettiert. Die Suspension mit Plasmid und mit Wasser wurde in den Spalt, der auf -20 °C gekühlten Elektroporationsküvette, überführt. Im Elektroporator wurde die Elektroporation durchgeführt. Die benötigte Zeit (5,0 ms – 5,7 ms) und die Spannung bei der Elektroporation (1630 V bis 1650 V) wurde notiert. In die Küvette wurde danach 1 µL gekühltes LB-Medium gegeben und mit der Pipette gemischt. Die transformierten Zellen wurden in das ursprüngliche Reaktionsgefäß überführt. Bei 37 °C und 700 rpm wurden die beiden

Mikroreaktionsgefäße im Schüttelheizblock für 2 Stunden inkubiert. Es wurden Verdünnungsstufen von 10^0 bis 10^{-8} der transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Außerdem wurden die Kontrolle mit Wasser auf LB-Agarplatten mit Ampicillin und die transformierten Zellen mit Verdünnungsstufen von 10^{-5} und 10^{-6} ausgestrichen sowie bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Verdünnungen wurden im Mikroreaktionsgefäß mit Saline durchgeführt. Mit dem Ausplattieren der Kontrolle wurde überprüft, ob die Transformation funktioniert hat. Am nächsten Tag wurden die Kolonien auf den LB-Agarplatten mit und ohne Ampicillin ausgezählt und die Transformationseffizienz bestimmt ^[24].

4.2 Mikrobielle Dauerkultur

Zuerst wurde eine Glycerin-Lösung (50 % w/w) angesetzt und bei 121 °C für 15 Minuten im Autoklaven sterilisiert. In einem 100 mL Kolben wurde 10 mL LB-Medium gegeben und mit einer Einzelkolonie von *E. coli* DH5 alpha oder *E. coli* DH10 beta mit *pUC* 19 Plasmid angeimpft. Bei einer Temperatur von 37 °C und 800 rpm wurde im Schüttelinkubator für 6-7 Stunden inkubiert, bis eine deutliche Trübung des Nährmediums erkennbar ist. Nach der Inkubation wurde die Dauerkultur angesetzt. Dafür wurden 300 μL der hergestellten Glycerin-Lösung und 700 μL der Bakterienkultur unter der Sicherheitswerkbank in einem 2,0 mL Mikroreaktionsgefäß mit Schraubverschluss pipettiert und mit der Pipette vermischt. Die mikrobielle Dauerkultur wurde im Ultratiefkühlschrank bei -80 °C gelagert ^[25].

4.3 *E. coli* Kultivierung

Die Kultivierung der beiden *E. coli* Stämme DH5 alpha und DH10 beta mit und ohne *pUC* 19 Plasmid fand aerob bei 37 °C auf LB-Agarplatten mit oder ohne Zusatz von Ampicillin im Schüttelkolben sowie im Bioreaktor mit unterschiedlichem Kultivierungsmedium statt.

4.3.1 *E. coli* Kultivierung im Schüttelkolben

Bei der Kultivierung im Schüttelkolben wurde zuerst eine Vorkultur in einem 100 mL Schüttelkolben hergestellt. Dafür wurde 10 mL LB-Medium, Glycerolmedium oder synthetisches Medium in die Schüttelkolben gegeben. Zu den *E. coli* Stämmen mit *pUC* 19 Plasmid wurde 10 μL einer Ampicillin-Lösung (100 mg/mL) pipettiert, damit im Medium eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ erreicht wird. Es wurde entweder, direkt aus der mikrobiellen Dauerkultur oder mit einzelnen Kolonien von der Agarplatte mit einer Pipettenspitze angeimpft. Die Schüttelkolben wurden über Nacht bei 37 °C und einer Rührerdrehzahl von 120 min^{-1} inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die optische Dichte der Vorkultur mit einem Photometer bestimmt. In einem

1000 mL Schikanekolben wurden 100 mL LB-Medium, synthetisches Medium oder Glycerolmedium gegeben. Zu den *E. coli* Stämmen mit *pUC 19* Plasmid wurde 100 μL einer Ampicillin-Lösung (100 mg/mL) pipettiert, damit im Medium eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ erreicht wurde. Anhand der optischen Dichte wurde das Animpfvolumen berechnet und die Schikanekolben entsprechend mit der Vorkultur angeimpft, sodass eine bestimmte optische Dichte (*OD*) zum Start erreicht wurde. Die Schüttelkolben wurden bei 37 °C und einer Rührerdrehzahl von 120 min^{-1} inkubiert. Für die Messung der optischen Dichte wurde 1 oder 2 mL Probe unter der Sicherheitswerkbank entnommen. Die Kultivierung wurde abgebrochen, wenn die Bakterien kein exponentielles Wachstum mehr aufwiesen.

4.3.2 *E. coli* Kultivierung im Bioreaktor

Das Wachstumsverhalten von *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid im Bioreaktor BIOSTAT CTA und BIOSTAT CTB wurde untersucht (Abbildung 5). Es wurde die mikrobielle Dauerkultur *E. coli* DH10 beta (5) mit *pUC 19* verwendet. Dafür wurde eine Vorkultur in sechs 1000 mL Schüttelkolben mit 100 mL Glycerolmedium (1), 100 μL Ampicillin-Lösung (100 $\mu\text{g/mL}$) und 2 mL Leucin-Lösung (0,3 g/L) angesetzt. Die mikrobielle Dauerkultur von *E. coli* DH10 beta (5) wurde aufgetaut, 130 μL in jeden Kolben pipettiert und über Nacht bei 37 °C und einer Rührerdrehzahl von 120 min^{-1} inkubiert. Nach 16 Stunden wurde die optische Dichte der Vorkultur bestimmt. Die sechs Zellsuspensionen wurden aus dem Schüttelkolben unter der Sicherheitswerkbank in eine Flasche überführt. Daraus wurden jeweils 300 mL in zwei Animpfflaschen überfüllt. Die beiden Bioreaktoren wurden zuerst, laut Laborvorschrift, aufgebaut und mit 3 Liter Glycerolmedium (2) sterilisiert ^[26]. Das verwendete Medium im Bioreaktor wies eine höhere Hefeextrakt- und Glycerol-Konzentration von 25 g/L auf. Der Bioreaktor wurde mit der Vorkultur aus der Animpfflasche angeimpft. Die Kultivierung wurde bei einer Temperatur von 37 °C und einen pH-Wert von 7, der durch Zugabe von Lauge und Base gehalten wurde, durchgeführt. Außerdem wurde der *pO₂*-Wert konstant auf 20 %, durch angepasste Rührerdrehzahl, gehalten. Nach dem Animpfen wurden meistens stündlich Proben für die Biotrockenmassebestimmung und für die Bestimmung der optischen Dichte aus den beiden Bioreaktoren BIOSTAT CTA und BIOSTAT CTB gezogen. Die Probenahme erfolgte nach Laborvorschrift. Dafür wurde ein 50 mL Falcon Tube unter das Probenahmeventil gehalten und ca. 10 mL Probevorlauf genommen. Dieser wurde anschließend verworfen. Danach wurde 10 mL Probe entnommen. Das Probenahmeventil wurde vor und nach der Probenahme durchdämpft ^[26]. Nach 7 Stunden wurde die Kultivierung abgebrochen, da die Bakterien kein exponentielles Wachstum mehr aufwiesen. Außerdem wurden ein letztes Mal Proben genommen,

diesmal auch für eine Doppelbestimmung mit dem PlasmidPrep. Die Proben für den Plasmid-Prep wurden auf eine ΔOD von 10 verdünnt. Anschließend wurden die beiden Bioreaktoren sterilisiert und am nächsten Tag abgebaut und gereinigt [26].



Abbildung 5: Kultivierung von *E. coli* DH10 beta im Bioreaktor BIostat® CTB. Der Bioreaktor ist mit 3 L Glycerolmedium (2) und 300 mL Inokulum gefüllt. Durch Sonden wird der pH-Wert, die Temperatur und die Gelöstsauerstoffkonzentration gemessen und durch Zugabe von Säure und Lauge, durch eine Heizung und durch den Rührer geregelt.

4.4 Bestimmung der optischen Dichte ΔOD bei 600 nm

Die optische Dichte ist eine, mit einem Photometer, gemessene Extinktion. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde zuerst bei 600 nm ohne Küvette im Strahlengang auf null abgeglichen. 1 mL unverdünnte Probe wurde in eine Halbmikroküvette pipettiert. Die optische Dichte der Suspension (OD_{susp}) wurde bestimmt. Ergibt sich ein Messwert, der größer ist als 0,6, muss verdünnt werden und die Messung mit der verdünnten Probe wiederholt werden. Die verwendeten Verdünnungen sind in Tabelle 7 angegeben. Die Verdünnungsstufen wurden so gewählt, dass der ablesbare Extinktionswert zwischen 0,12 und 0,6 liegt. In diesem Bereich liegt die Messung im linearen Bereich des Lambert-Beer'schen Gesetzes, welches gegeben sein muss, um einen linearen Zusammenhang zwischen Extinktion und Trübung zu haben. Dadurch erhält man eine Proportionalität zwischen ΔOD und der Biotrockenmassekonzentration. Nach der

Messung wurde die Suspension in einem Mikroreaktionsgefäß bei 16000 g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Küvette pipettiert und die optische Dichte des Überstandes (OD_{med}) gemessen. Die OD_{med} wurde von der OD_{susp} abgezogen, um die ΔOD zu erreichen. Dies ist in Gleichung eins beschrieben ^[17].

$$\Delta OD = OD_{\text{susp}} - OD_{\text{med}} \quad \text{Gl. (1)}$$

mit

ΔOD Differenz der optischen Dichte von Suspension und zellfreien Überstand

OD_{susp} Optische Dichte einer Suspensionsprobe

OD_{med} Optische Dichte einer Medienprobe

Tabelle 7: Verdünnungsschema zur Messung der optischen Dichte. Die Verdünnungen wurden direkt in der Küvette durchgeführt ^[27].

ΔOD	Verdünnung	F	Pipette 1 Probe μL	Pipette 2 Probe μL
0 bis 0,6	-	1	1000	-
0,6 bis 3	1:5	5	200	800
3 bis 15	1:25	25	40	960

4.5 Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration (BTM-Konzentration) in Mikroreaktionsgefäßen

Die Biotrockenmassebestimmung wurde in Doppelbestimmung ausgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Mikroreaktionsgefäße beschriftet. Es wurde eine Trocknung der geöffneten Mikroreaktionsgefäße über Nacht bei 105 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Mikroreaktionsgefäße in einem Exsikkator abgekühlt und auf der Analysenwaage gewogen. 1 mL Probe wurde mit der Pipette in das entsprechende Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Dieses wurde verschlossen und in der Zentrifuge mit der zweiten Probe für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die restliche Flüssigkeit mit einer Pipette vorsichtig abgenommen. Zur Trocknung wurden die Mikroreaktionsgefäße geöffnet und bei 105 °C im Trockenschrank über Nacht gestellt. Nach dem Abkühlen der trockenen Mikroreaktionsgefäße mit den Pellets im Exsikkator, wurden diese mit einer Pinzette entnommen und auf der

Analysenwaage bei einem stabilen Wert gewogen ^[28]. Die Biotrockenmassekonzentration wurde, wie in Gleichung 2 beschrieben, aus dem Quotienten der Differenz von Brutto- und Taramasse und dem eingesetztem Volumen, berechnet.

$$c_X = \frac{m_{R,X} - m_{R,0}}{V_L} \quad \text{Gl. (2)}$$

mit

c_X Zellmassenkonzentration in g/L

$m_{R,X}$ Bruttomasse

$m_{R,0}$ Taramasse

V_L eingesetztes Volumen in mL

4.6 Plasmidisolierung

Das Plasmid wurde aus der *E. coli* Zelle durch alkalische Lyse isoliert. Dazu wurde das *NEB* Monarch Plasmid Miniprep Kit (New BioLabs Inc., MA, USA) verwendet. Das Zentrifugieren fand immer bei 16000 g statt. Im ersten Schritt wurde 1-5 mL Zellsuspension in ein 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß gegeben, so dass eine theoretische ΔOD von 10 erreicht wurde. Anschließend wurde für 30 Sekunden zentrifugiert. Wenn mehr als 1,5 mL Zellsuspension eingesetzt wurde, wurde das Pellet nach dem Zentrifugieren in Zellsuspension resuspendiert und wieder für 30 Sekunden zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 200 μL *Plasmid Resuspension Buffer* (B1) mit der Pipette resuspendiert. Es wurde 200 μL *Plasmid Lysis Buffer* (B2) hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde fünf bis sechs Mal invertiert und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspension verfärbt sich dunkelpink. Zum Neutralisieren wurde 400 μL *Plasmid Neutralization Buffer* (B3) pipettiert, das Reaktionsgefäß sehr vorsichtig invertiert und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisierung war erfolgreich, wenn die Farbe der Zellsuspension komplett gelb war und sich ein Präzipitat gebildet hat. Der *B3 Buffer* muss wegen der RNase A bei 4 °C gelagert werden, nachdem er geöffnet wurde. Anschließend wurde das Lysat für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet muss fest sein, falls nötig muss etwas länger zentrifugiert werden. Der Überstand wurde vorsichtig in eine Säule mit neuen Mikroreaktionsgefäß überführt und für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es wurde 200 μL *Plasmid Wash Buffer* 1 auf die Säule gegeben und danach für eine Minute zentrifugiert. 400 μL *Plasmid Wash Buffer* 2 wurde auf die Säule pipettiert und wieder für eine Minute zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt und

zwei Mal mit 30 μL *DNA Elution Buffer* eluiert und für 1 Minute zentrifugiert. Für die zweite Elution wurde die gleiche Säule mit einem neuen 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß verwendet ^[29].

4.7 Konzentrationsmessung

Reinheit und Erfolg der Plasmidisolierung wurde mit dem Spektralphotometer Nanodrop 2000c (Thermo Fischer Scientific Inc., Massachusetts, USA) überprüft. Der Messbereich liegt bei 2-15000 ng/ μL . Vor jeder Messung wurde der Gerätearm aufgestellt sowie die oberen und unteren Messplätze mit einem Papiertuch gereinigt. Es wurde zuerst als Blindwert 2 μL *DNA Elution Buffer* auf die Messplätze pipettiert. 2 μL des Eluats wurden zum Messen auf die Messplätze pipettiert. Während der Messung werden durch eine Xenon Blitzlichtlampe Lichtblitze durch die Probe geschickt und durch ein Spektralphotometer vermessen. Da mit dem Nanodrop 2000c die Konzentration von Nukleinsäuren bestimmt wurde, wurde der Absorptionskoeffizient bei 260 nm (A_{260}), der Absorptionskoeffizient bei 280 nm (A_{280}), das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm zu 280 nm ($260/280$) und das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm zu 230 nm ($260/230$) aufgenommen. Bei dem Verhältnis $260/280$ wird ein Wert von 1,8 als reine DNA und ein Wert von 2,0 als reine RNA angesehen. Ist der Wert deutlich geringer, sind Protein- oder Phenol Verunreinigungen erhalten. Bei dem Verhältnis $260/230$ deutet ein Wert zwischen 1,8 und 2,2 auf reine Nukleinsäuren hin. Geringere Werte sprechen für Verunreinigungen der Probe ^[30].

4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung und Aufreinigung von Nukleinsäuren. Die, in wässrigen Lösungen, eine negative Ladung aufweisenden Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die negative Nettoladung ist proportional zur Größe, so dass ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis besteht. Von der Größe und der Konformation (linear, offen-zirkulär und kovalent-geschlossen-zirkulär) des Plasmids hängt die Wanderungsgeschwindigkeit ab. Dabei wandern größere Produkte langsamer als kleinere. Durch die unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten lassen sich die DNA-Fragmente auftrennen. Die kovalent-geschlossen-zirkuläre Isoform wandert am schnellsten durch das Agarosegel. Im Gegensatz dazu durchläuft die offen-zirkuläre Isoform das Gel am langsamsten. Durch einen Größenstandard, welcher im Gel mitläuft, wird die Größe der einzelnen Fragmente bestimmt. Von der Größe, der zu untersuchenden Produkte, hängt die Wahl der Agarosekonzentration ab ^[31].

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde nach laborinterner Arbeitsanweisung durchgeführt. Es wurden 1 % Agarosegele hergestellt. Je nach Anzahl der Proben wurde ein großes oder kleines Gel gegossen. Für die Herstellung eines großen Gels wurde 1g Agarose mit 1x TAE-Puffer auf 100 g aufgefüllt (kleines Gel: 0,5 g auf 50 g). Durch Erhitzen in der Mikrowelle wurde die Agarose gelöst und das Gel anschließend gegossen. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Gels wurde es in der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer gegeben. Proben und Marker konnten in die Taschen pipettiert werden. Zur Erhöhung der Dichte wurde 6x Ladepuffer zu den Proben gegeben (1 μ L pro 5 μ L Probe), damit sie in die Taschen sinken. Die Gelelektrophorese lief bei einer Spannung von 120 V für 40-60 Minuten. Anschließend wurde das Gel mit einer Färbelösung, aus 100 mL Laufpuffer und 30 μ L GelGreen Farbstoff, für 30-60 Minuten gefärbt. Zum Schluss wurden die Gele mit einem UV-Transilluminator angeregt und fotografiert ^[32].

5 Ergebnisse

5.1 Transformation von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta

5.1.1 Transformation von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit *pUCD/lacZ*

Für die Transformation der beiden *E. coli* Stämme DH5 alpha und DH10 beta wurden diese zuerst auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Abbildung 6). Die Herstellung der elektrokompenten Zellen und die Transformation wurde mit dem Plasmid *pUCD/lacZ* durchgeführt. Die Transformation wurde bei beiden *E. coli* Stämmen mit einer Konzentration von 2 ng/μL und 10 ng/μL ausgeführt. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatte mit Ampicillin Zusatz ausplattiert und auf 37 °C über Nacht inkubiert.



Abbildung 6: *E. coli* NEB DH5 alpha und NEB DH10 beta auf LB-Agarplatten. Links ist der *E. coli* NEB DH10 beta Stamm und rechts der *E. coli* NEB DH5 alpha Stamm. Die Stämme wurden per 3-Ösenausstrich auf den Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

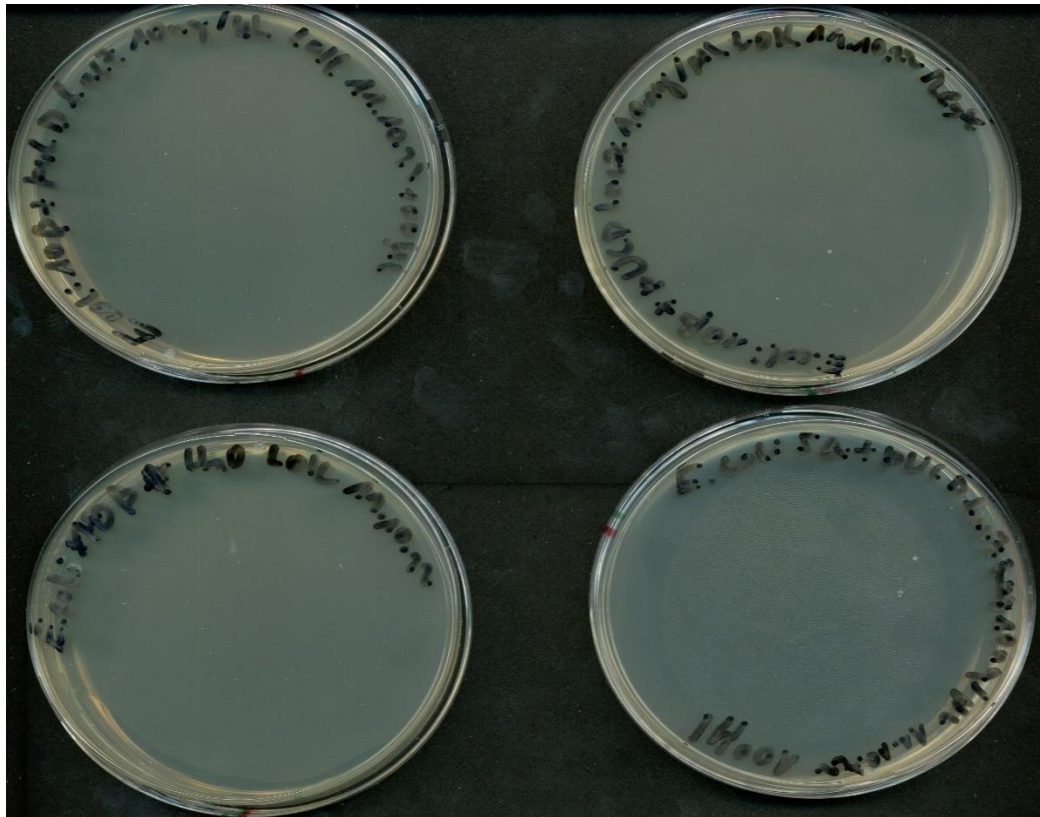


Abbildung 7: *E. coli* DH5 alpha und DH10 beta mit *pUCD/lacZ* auf LB-Agarplatten mit Ampicillin. Auf der linken Seite sieht man oben und unten die Negativkontrolle mit Wasser der beiden Stämme. Auf der rechten Seite sieht man oben eine Kolonie bei *E. coli* 10 beta mit *pUCD/lacZ* und unten eine Kolonie bei *E. coli* 5 alpha mit *pUCD/lacZ*.

In Abbildung 7 wird ersichtlich, dass sich auf den Agarplatten der beiden Stämme mit *pUCD/lacZ* Plasmid nur eine Kolonie befand. Mit dieser Kolonie wurde die Herstellung einer mikrobiellen Kultur durchgeführt. Da aber mehr Kolonien erwartet wurden, war die Transformation nicht erfolgreich. Da das Plasmid schon etwas länger im Gebrauch war, wurde beschlossen ein neues *pUC 19* Plasmid zu bestellen und damit die Transformation zu wiederholen.

5.1.2 Transformation von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19*

Für die Transformation der beiden *E. coli* Stämme DH5 alpha und DH10 beta wurden diese zuerst auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Herstellung der elektrokompenten Zellen und die Transformation wurde mit dem Plasmid *pUC 19* durchgeführt. Nach der ersten Transformation mit den verschiedenen Verdünnungsstufen wurde bestimmt, dass bei den Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} die transformierten Zellen am besten ausgezählt werden konnten. Die Transformation wurde wiederholt ausgeführt. Diesmal wurden nach der Transformation jeweils zehn Platten von den Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} von den beiden *E. coli* Stämmen mit *pUC 19* Plasmid ausplattiert. Außerdem wurden jeweils zehn

Platten von den Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6} von *E. coli* NEB DH5 alpha und NEB DH10 beta hergestellt. Die Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht bebrütet und am nächsten Tag ausgezählt. Die gut auszählbaren Platten wurden ausgezählt und die Transformationseffizienz bestimmt (Tabelle 8). In Abbildung 8 und Abbildung 9 sind als Beispiel die auszählbaren Agarplatten von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta abgebildet. Die Transformation verlief erfolgreich. Es wurden jeweils fünf Kolonien pro Stamm gepickt und dadurch fünf mikrobielle Dauerkulturen hergestellt. Diese wurden *E. coli* DH5 alpha mit *pUC* 19 Kolonie 1-5 und *E. coli* DH10 beta mit *pUC* 19 Kolonie 1-5 benannt.

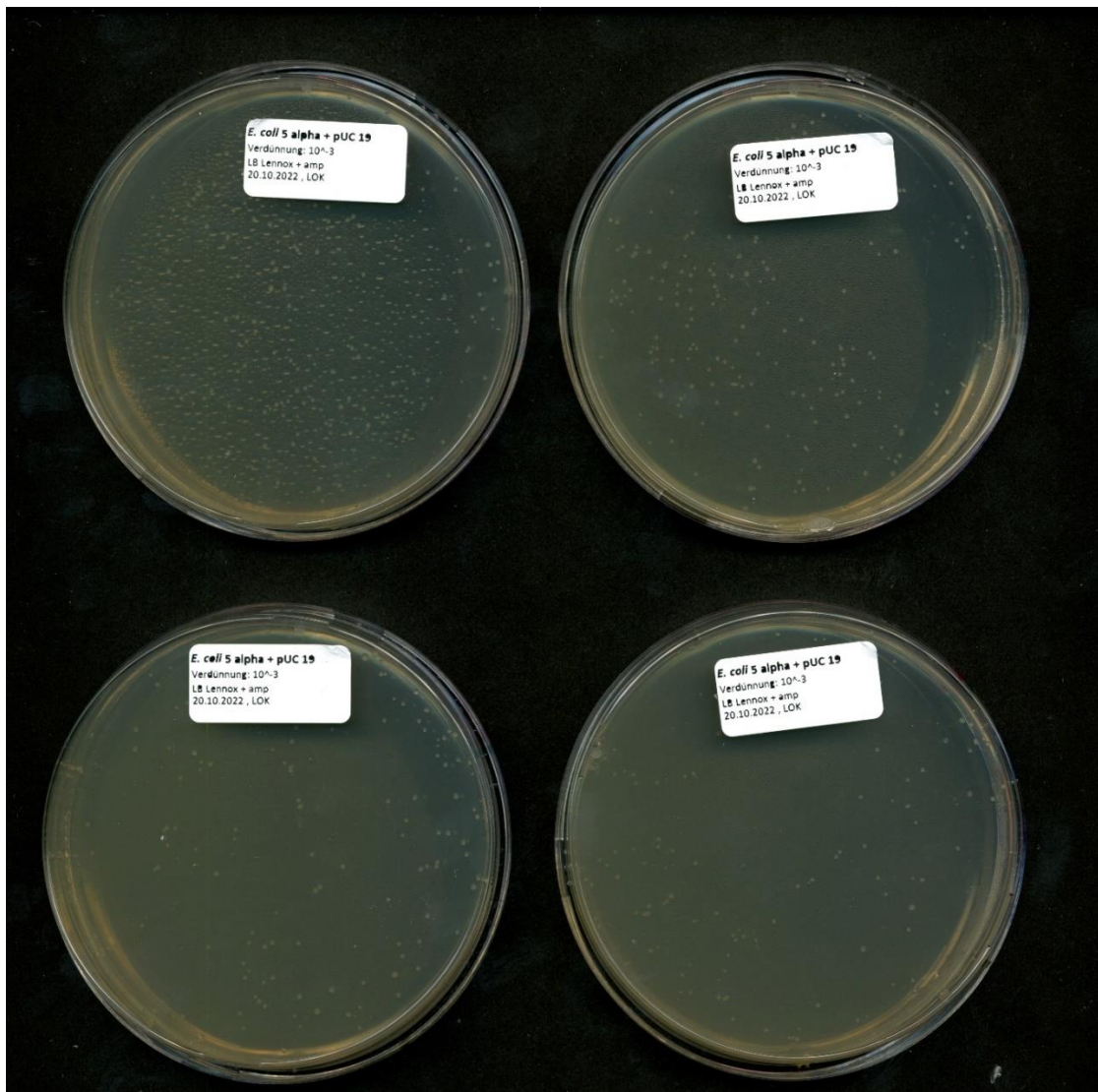


Abbildung 8: Transformierte *E. coli* DH5 alpha mit *pUC* 19 Plasmid. Der *E. coli* DH5 alpha mit *pUC* 19 Plasmid wurde auf die LB-Agarplatten mit Ampicillin Zusatz bei einer Verdünnungsstufe von 10^{-3} ausplattiert. Die Einzelkolonien der Agarplatten wurden ausgezählt.

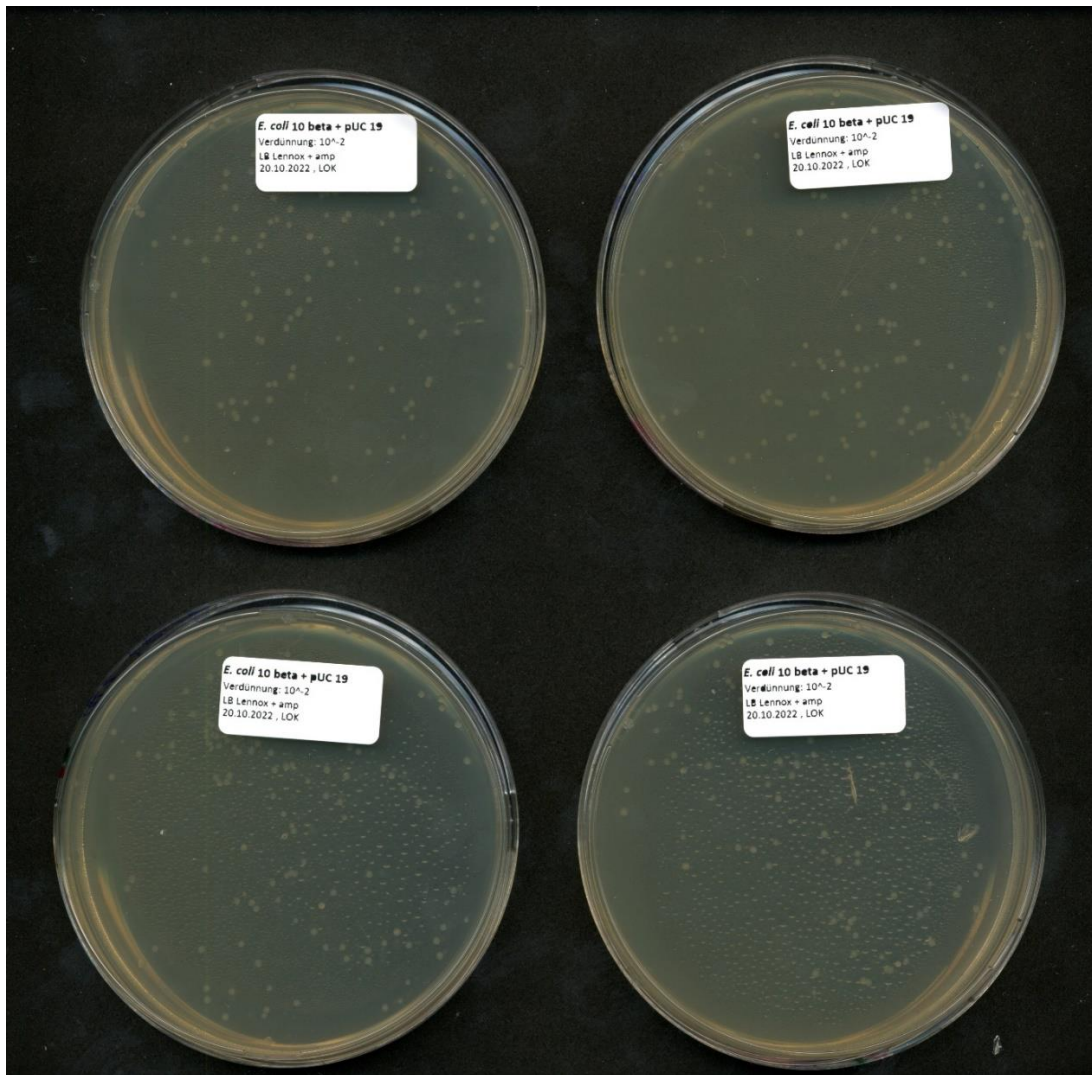


Abbildung 9: Transformierte *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid. Der *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid wurde auf die LB-Agarplatten mit Ampicillin Zusatz bei einer Verdünnungsstufe von 10^{-2} ausplattiert. Die Einzelkolonien der Agarplatten wurden ausgezählt.

Tabelle 8: Koloniezahle der ausgezählten Agarplatten von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid. Der verwendete Bakterienstamm, die Verdünnungsstufe, die gezählten Klone und die Koloniezahle sind in der Tabelle dargestellt.

Stamm	Verdünnungsstufe	gezählte Klone (Durchschnitt)	Koloniezahle
<i>E. coli</i> DH5 alpha	10^{-5}	200,66	$200,6 \cdot 10^{-5}$
<i>E. coli</i> DH5 alpha + <i>pUC 19</i>	10^{-3}	150,00	$1,5 \cdot 10^{-5}$
<i>E. coli</i> DH10 beta	10^{-6}	115,25	$1152,5 \cdot 10^{-5}$
<i>E. coli</i> DH10 beta + <i>pUC 19</i>	10^{-2}	111,80	$0,1118 \cdot 10^{-5}$

Transformand/Gesamtzelltiter:	<i>E. coli</i> DH5 alpha: $\frac{150000 \text{ cfu}}{20060000 \text{ cfu}} = 7,476 \cdot 10^{-3}$
	<i>E. coli</i> DH10 beta: $\frac{11180 \text{ cfu}}{115,25 \cdot 10^6 \text{ cfu}} = 1,118 \cdot 10^{-5}$
Transformand/ μg Plasmid:	<i>E. coli</i> DH5 alpha: $\frac{150000 \text{ cfu}}{0,01 \mu\text{g}} = 1,5 \cdot 10^7 \text{ cfu}/\mu\text{g } pUC 19$ DNA
	<i>E. coli</i> DH10 beta: $\frac{11180}{0,01 \mu\text{g}} = 1,118 \cdot 10^6 \text{ cfu}/\mu\text{g } pUC 19$ DNA
Literaturwert:	<i>E. coli NEB DH5</i> alpha = $1 \cdot 10^{10} \text{ cfu}/\mu\text{g } pUC 19$ DNA ^[33]
	<i>E. coli NEB DH10</i> beta = $2 \cdot 10^{10} \text{ cfu}/\mu\text{g } pUC 19$ DNA ^[34]

Nach dem Literaturwert wurde ein Wert von $1 \cdot 10^{10} \text{ cfu}/\mu\text{g } pUC 19$ DNA bei *E. coli* DH5 alpha und $2 \cdot 10^{10} \text{ cfu}/\mu\text{g } pUC 19$ DNA mit *E. coli* DH10 beta erwartet. Die im Labor erfassten Transformationseffizienzen lagen deutlich darunter. Dies könnte daran liegen, dass dort bessere Transformationsbedingungen herrschen als im Labor an der HAW. Außerdem wurde erwartet, dass doppelt so viele Zellen/ $\mu\text{g } pUC 19$ DNA mit dem Bakterium *E. coli* DH10 beta als mit DH5 alpha erreicht werden. Bei dieser Durchführung gab es eine höhere Ausbeute mit $1,5 \cdot 10^7 \text{ cfu}/\mu\text{g } pUC 19$ DNA bei der Transformation mit *E. coli* DH5 alpha als mit *E. coli* DH10 beta mit $1,118 \cdot 10^6 \text{ cfu}/\mu\text{g } pUC 19$ DNA. Nach der Transformation wurden jeweils fünf mikrobielle Kulturen mit dem *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta Stämmen mit *pUC 19* Plasmid hergestellt und damit die weiteren Versuche durchgeführt.

5.2 Wachstumsbestimmung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta

5.2.1 Batch-Kultivierung der beiden Stämme mit pUC 19 Plasmid im LB-Medium (1)

Tabelle 9: Übersicht der Wachstumsbestimmung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit pUC 19 Plasmid im LB-Medium (1). Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.

Bakterienstamm	Medium	Inkubationszeit in h	ΔOD_{End}	μ_{max} in h^{-1}
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit pUC 19 (1)	LB-Medium (1)	7,18	0,36	0,47
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit pUC 19 (2)	LB-Medium (1)	7,18	0,52	0,43
<i>E. coli</i> DH10 beta mit pUC 19 (1)	LB-Medium (1)	7,18	1,51	0,66
<i>E. coli</i> DH10 beta mit pUC 19 (2)	LB-Medium (1)	5,20	1,13	0,63

Das Wachstumsverhalten der in Tabelle 9 abgebildeten Bakterienstämme wurde untersucht. Dafür wurden die mikrobiellen Dauerkulturen *E. coli* DH5 alpha mit pUC 19 Kolonie 1 und *E. coli* DH10 beta mit pUC 19 Kolonie 1 verwendet. Die beiden Stämme wurden mittels 3-Ösenaustrich auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen. Diese wurden über Nacht in einem Inkubationsschrank bei 37 °C inkubiert. Von der LB-Amp-Agarplatte wurden von den beiden Stämmen jeweils zwei Klone gepickt und die vier Schüttelkolben mit jeweils einem Klon angeimpft.

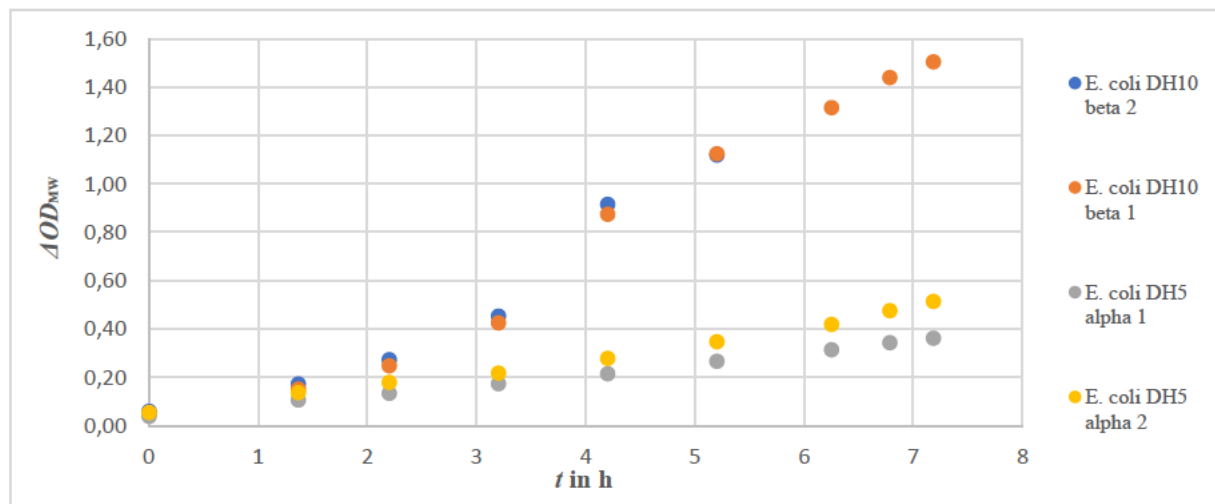


Abbildung 10: Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit pUC 19 Plasmid im LB-Medium (1). Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Von beiden *E. coli* Stämmen wurden zwei unterschiedliche Klone (1 und 2) kultiviert. Der *E. coli* DH10 beta Stamm erreicht eine höhere ΔOD_{MW} , als der *E. coli* DH5 alpha.

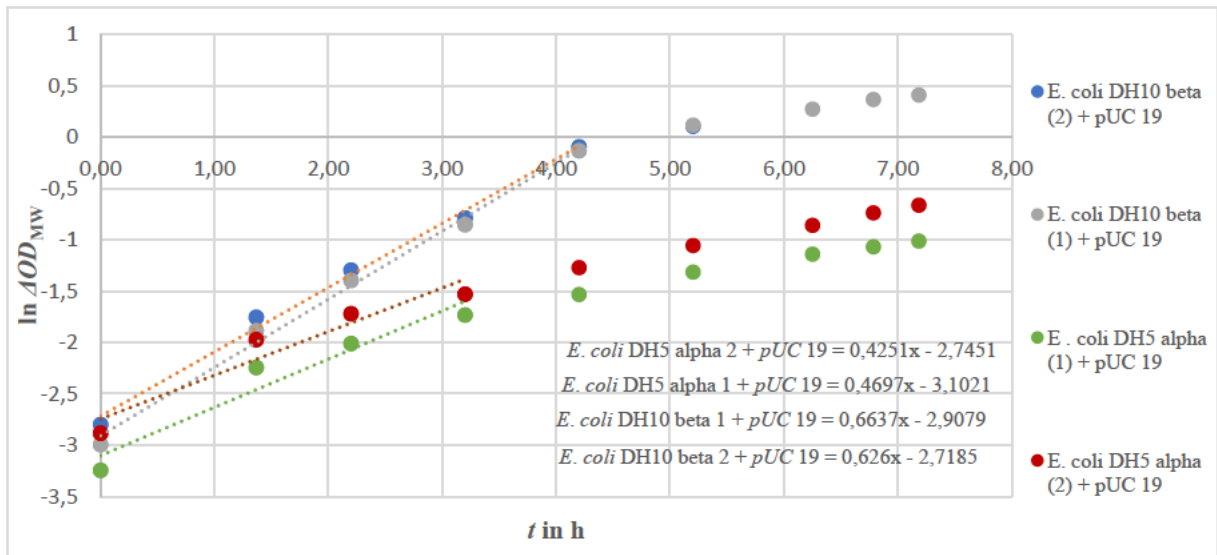


Abbildung 11: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{max} von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit pUC 19 Plasmid im LB-Medium (1). Für die Bestimmung der Wachstumsrate wurde $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Von beiden *E. coli* Stämmen wurden zwei unterschiedliche Klone (1 und 2) kultiviert. Aus der linearen Steigung ergibt sich die Wachstumsrate. Bei dem *E. coli* DH5 alpha Stamm wuchsen die Bakterien mit einer Geschwindigkeit von $0,43 \text{ h}^{-1}$ und $0,47 \text{ h}^{-1}$. Der *E. coli* DH5 alpha Stamm wuchs schneller mit $0,66 \text{ h}^{-1}$ und $0,63 \text{ h}^{-1}$. Man sieht, dass das Wachstum der Bakterien nach 3-4 Stunden langsamer wird.

Aus Abbildung 10 und Abbildung 11 wird ersichtlich, dass die Bakterien zuerst exponentiell wuchsen. In dieser Phase ergaben sich Wachstumsraten für *E. coli* 5 alpha von $0,43 \text{ h}^{-1}$ und $0,47 \text{ h}^{-1}$ und für den *E. coli* 10 beta Stamm Wachstumsraten von $0,66 \text{ h}^{-1}$ und $0,63 \text{ h}^{-1}$. Der *E. coli* DH10 beta Stamm wuchs damit im LB-Medium (1) schneller als der *E. coli* 5 alpha Stamm. Bei beiden Stämmen war eine deutliche Abnahme des Wachstums nach 3-4 Stunden zu verzeichnen, wobei sich niedrige ΔOD -Werte von weniger als 1 ergaben. Es wurde vermutet, dass den Bakterien essenzielle Nährstoffe für das Wachstum fehlten. Nach einer Prozesszeit von 7,18 h wurden drei Kultivierung beendet. Die Kultivierung von der Kolonie *E. coli* DH10 beta 2 mit pUC 19 Plasmid wurde schon nach 5,20 h beendet, da dort geplant war ein PlasmidPrep durchzuführen. Da die Wachstumsraten geringer als erwartet waren und keine hohe ΔOD während der Kultivierung erreicht wurde, wird die Kultivierung im LB-Medium (1) wiederholt, um einen Fehler im Handling auszuschließen. Zusätzlich werden die beiden Stämme ohne transformiertes Plasmid parallel kultiviert.

5.2.2 Batch-Kultivierung der beiden Stämme mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (1)

Tabelle 10: Übersicht der Wachstumsbestimmung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (1). Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.

Bakterienstamm	Medium	Inkubationszeit in h	ΔOD_{End}	μ_{max} in h^{-1}
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit <i>pUC 19</i>	LB-Medium (1)	7,75	0,52	0,51
<i>E. coli</i> DH5 alpha	LB-Medium (1)	7,75	3,06	0,66
<i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC 19</i>	LB-Medium (1)	7,75	1,75	0,56
<i>E. coli</i> DH10 beta	LB-Medium (1)	7,75	3,16	0,82

Mit den in Tabelle 10 abgebildeten Bakterienstämmen und Medium wurde die Kultivierung durchgeführt. Dafür wurden zuerst die beiden Stämme mit und ohne Plasmid mittels 3-Ösen-austrich auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Diese wurden über Nacht in einem Inkubationsschrank bei 37 °C inkubiert. Es wurde von jeder Platte jeweils eine Kolonie gepickt und in den vier Schüttelkolben angeimpft.

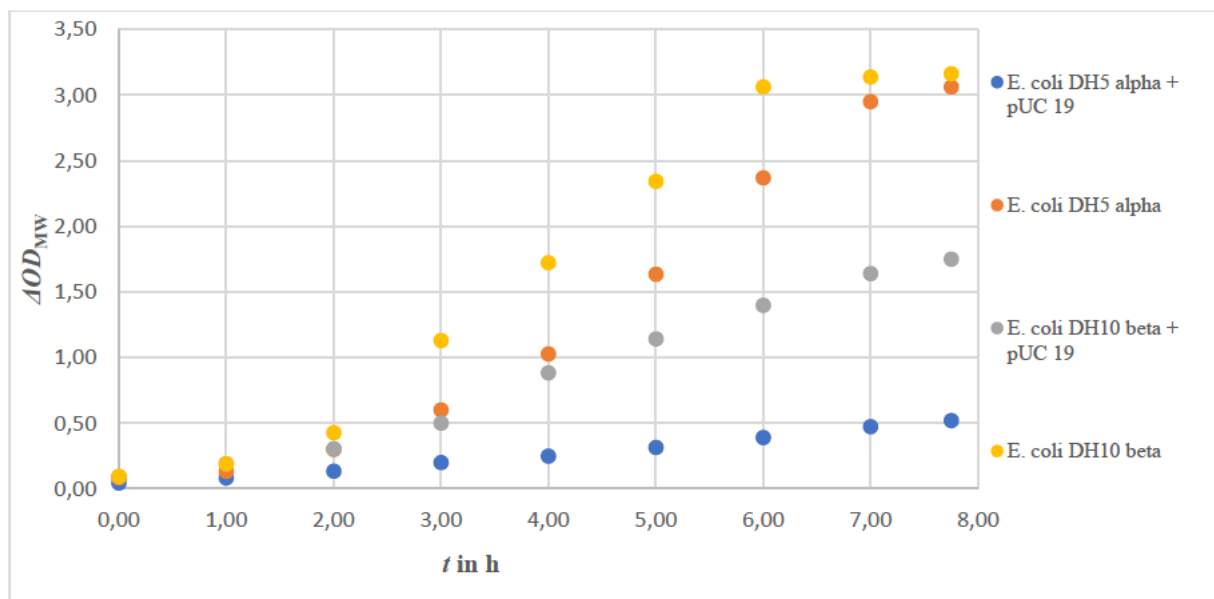


Abbildung 12: Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (1). Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Der *E. coli* DH10 beta Stamm und *E. coli* DH5 alpha Stamm ohne Plasmid erreichen eine ΔOD_{MW} von 3,09 und 3,16 nach 7,50 h. Die beiden Stämme mit Plasmid wachsen deutlich geringer auf eine ΔOD_{MW} von 0,52 und 1,75.

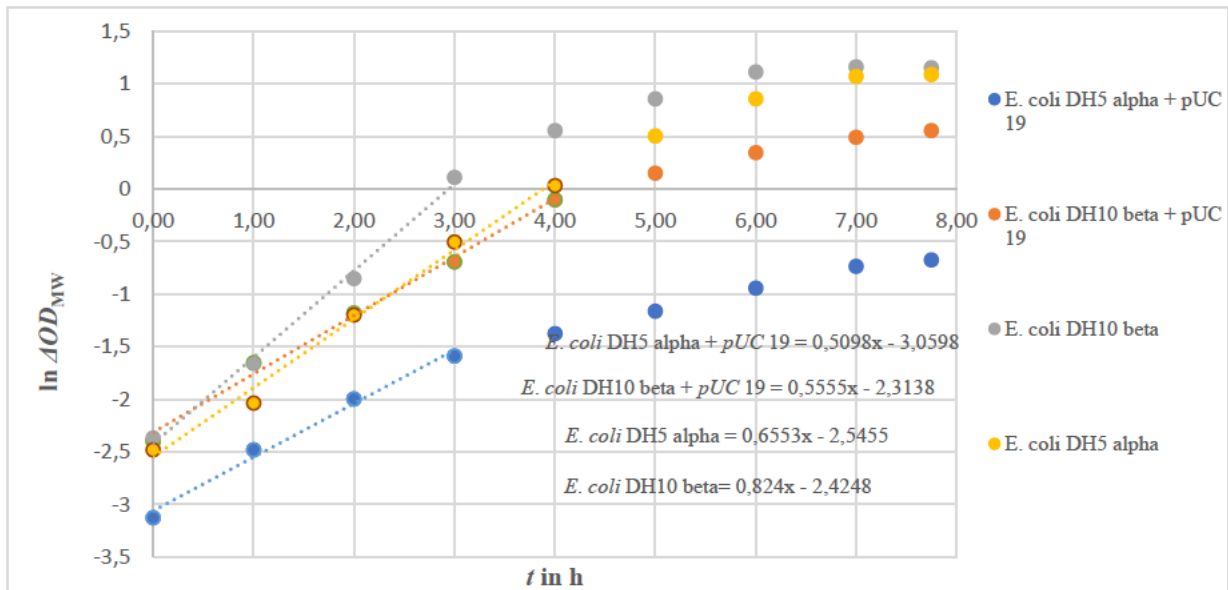


Abbildung 13: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{max} . Für die Bestimmung der Wachstumsrate wurde $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Aus der linearen Steigung ergibt sich die Wachstumsrate. Der *E. coli* DH10 beta Stamm ohne Plasmid wuchs am schnellsten mit einer Wachstumsrate von $0,82 \text{ h}^{-1}$. Die Stämme ohne Plasmid weisen im gleichen Medium ein schnelleres Wachstum als die mit Plasmid auf. Außerdem wächst der *E. coli* DH10 beta schneller als der *E. coli* DH5 alpha. Die Stämme wachsen nach 3-4 h nicht mehr exponentiell weiter.

Aus Abbildung 12 wird ersichtlich, dass die *E. coli* Stämme *NEB*[®] DH5 alpha und *NEB*[®] DH10 beta ohne transformiertes Plasmid im LB-Medium (1) besser wachsen als mit Plasmid. Es wurden ΔOD -Werte von bis zu 3 erreicht. Mit Plasmid wuchs der *E. coli* DH5 alpha auf eine OD von 0,52 und der *E. coli* DH10 beta auf 1,75. Aus Abbildung 13 wird ersichtlich, dass alle Stämme mit und ohne Plasmid für die ersten 3-4 Stunden exponentiell wuchsen. Danach wuchsen die Bakterien langsamer weiter. Ohne Plasmid wuchsen die Bakterien schneller. Es wurde vermutet, dass durch das lacZ Gen auf dem *pUC* 19 Plasmid, zu viel Lactose produziert wird. Dadurch wird das Bakterium selbst induziert und wächst deshalb nicht gut in dem Medium. Als Schlussfolgerung wird beim nächsten Versuch 8 g/L Glucose zu dem LB- Medium hinzugegeben, damit die Produktion der Lactose inhibiert wird.

5.2.3 Batch-Kultivierung der beiden Stämme mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (1) mit Zugabe von Glucose

Tabelle 11: Übersicht der Wachstumsbestimmung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium mit Zugabe von 8 g/L Glucose. Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.

Bakterienstamm	Medium	Inkubationszeit in h	ΔOD_{End}	μ_{max} in h^{-1}
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit <i>pUC 19</i>	LB-Medium (2)	5,67	1,27	0,64
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit <i>pUC 19</i>	LB-Medium (1) + 8 g/L Glucoselösung	6,50	1,53	0,62
<i>E. coli</i> DH5 alpha	LB-Medium (1) + 8 g/L Glucoselösung	6,50	1,43	0,69
<i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC 19</i>	LB-Medium (1) + 8 g/L Glucoselösung	6,50	1,77	0,88
<i>E. coli</i> DH10 beta	LB-Medium (1) + 8 g/L Glucoselösung	6,50	1,75	0,87

Unter den in Tabelle 11 aufgeführten Kultivierungsbedingungen wurde die Batch-Kultivierung im Schüttelkolben durchgeführt. Dafür wurden zuerst die beiden Stämme ohne Plasmid mittels 3-Ösenaustrich auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und eine Kolonie zum Animpfen gepickt.

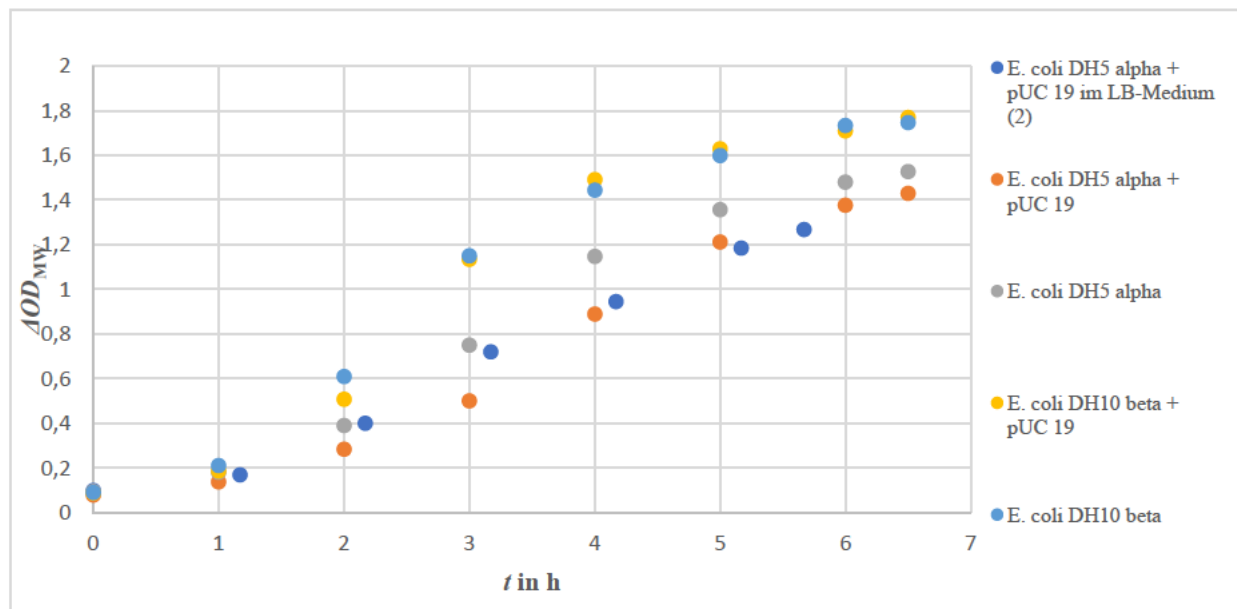


Abbildung 14: Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (1) mit Zusatz von 8 g/L Glucose. Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Der *E. coli* DH10 beta Stamm und *E. coli* DH5 alpha Stamm ohne Plasmid erreichten eine ΔOD_{MW} von 1,53 und 1,75 nach 6,50 h. Die beiden Stämme mit Plasmid wuchsen ähnlich auf eine ΔOD_{MW} von 1,27, 1,43 und 1,77. Bei dem *E. coli* DH5 alpha mit Plasmid sieht man das mit dem LB-Medium (2) das Wachstum genauso stark war wie mit dem LB-Medium (1) mit Zugabe von Glucose.

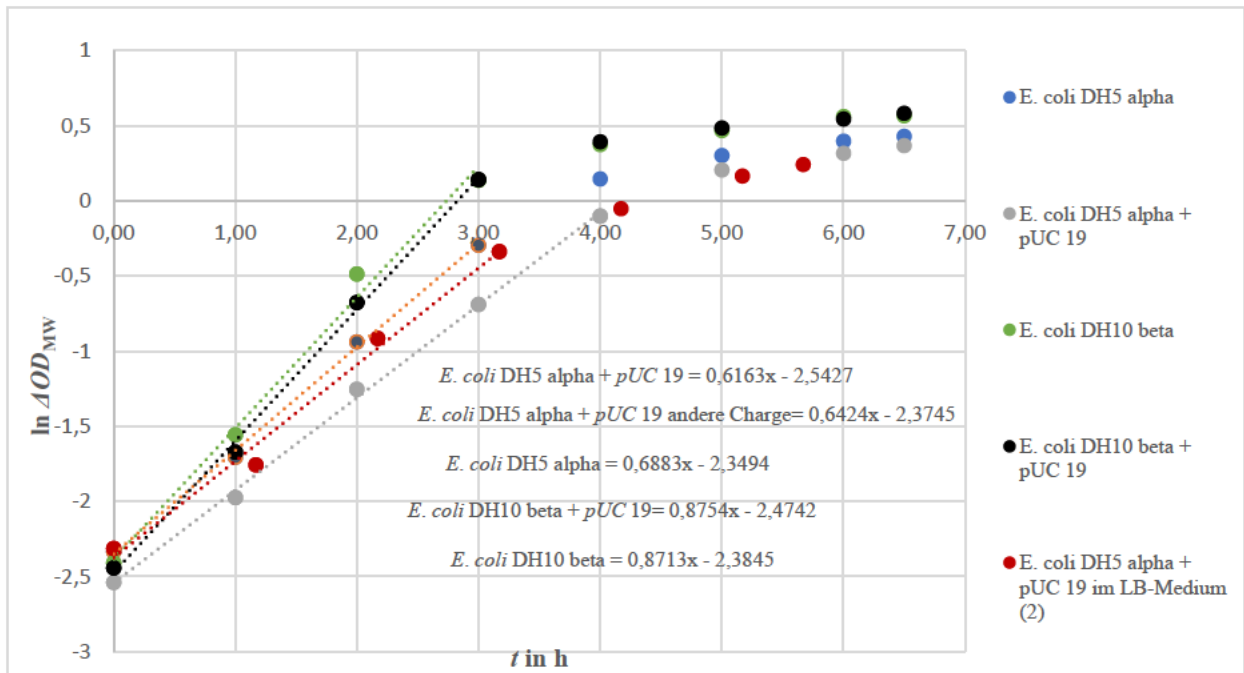


Abbildung 15: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{max} von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (1) mit Zusatz von 8 g/L Glucose. Für die Bestimmung der Wachstumsrate wurde $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Aus der linearen Steigung ergibt sich die Wachstumsrate. Der *E. coli* DH10 beta Stamm ohne Plasmid mit einer Wachstumsrate von $0,87 \text{ h}^{-1}$ wuchs ähnlich schnell, wie der *E. coli* DH10 beta Stamm mit Plasmid, der $0,88 \text{ h}^{-1}$ schnell wuchs. Auch der DH5 alpha Stamm wuchs mit und ohne Plasmid ähnlich schnell, aber langsamer als der DH10 beta Stamm. Dort wurden Wachstumsraten von $0,69 \text{ h}^{-1}$ und $0,61 \text{ h}^{-1}$ mit Zugabe von 8g/L Glucoselösung und $0,64 \text{ h}^{-1}$ mit dem LB-Medium (2) erreicht.

Im Vergleich zum Versuch 5.2.2 wuchsen die Stämme mit Plasmid, durch die Zugabe von 8 g/L Glucose, deutlich schneller (Abbildung 15). Dies bestätigt die Vermutung, dass die Bakterien durch das *lacZ* Gen des *pUC 19* Plasmids induziert wurden. Außerdem sind die Wachstumsraten mit und ohne Plasmid der jeweiligen Stämme ähnlich. Auch mit dem LB-Medium (2) wurden bei dem *E. coli* DH5 alpha höhere Wachstumsraten mit $0,64 \text{ h}^{-1}$ erreicht als mit dem vorher verwendeten LB-Medium (1). Leider wuchsen die Stämme auch mit Zugabe von Glucose nur auf eine ΔOD von maximal 1,77 (Abbildung 14), da das Wachstum wieder nach 3-4 Stunden langsamer wurde. Da sich mit dem LB-Medium (2) ähnliche Ergebnisse ergeben haben, wie mit dem vorher benutzen LB-Medium (1) mit der Zugabe von 8 g/L Glucose, wurde entschieden mit dem LB-Medium (2) weiterzuarbeiten und dieses zu optimieren. Der *E. coli* DH5 alpha hat eine Auxotrophie auf Thiamin (Thi) und Arginin (Arg) und der *E. coli* DH10 beta auf Leucin (Leu). Es wird vermutet, dass den Bakterien diese Aminosäuren für den Wachstum nach 3-4 Stunden fehlen. Im nächsten Schritt wird das LB-Medium (2) verwendet und die Aminosäuren Thiamin sowie Leucin hinzugegeben. Außerdem wird die Kultivierung im synthetischen Medium mit Zugabe der Aminosäuren durchgeführt.

5.2.4 Batch-Kultivierung der beiden Stämme mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (2) und synthetischen Medium mit Zusatz von Aminosäuren

Tabelle 12: Übersicht der Wachstumsbestimmung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid. Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.

Bakterienstamm	Medium	Inkubationszeit in h	ΔOD_{End}	μ_{max} in h^{-1}
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit <i>pUC 19</i>	LB-Medium (2) + Arg (0,1 g/L) + Thi (4,5 mg/L)	7,00	0,92	0,85
<i>E. coli</i> DH5 alpha	LB-Medium (2) + Arg (0,1 g/L) + Thi (4,5 mg/L)	7,00	3,28	0,92
<i>E. coli</i> DH5 alpha	Synthetisches Medium + Arg (0,1 g/L) + Thi (4,5 mg/L)	31,00	4,08	0,24
<i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC 19</i>	LB-Medium (2) + Leu (0,3 g/L)	7,00	2,34	0,92
<i>E. coli</i> DH10 beta	LB-Medium (2) + Leu (0,3 g/L)	7,00	3,56	1,00

Mit den in Tabelle 12 beschriebenen Kultivierungsbedingungen wurde die Kultivierung durchgeführt. Die Vorkultur wurde direkt mit der mikrobiellen Kultur angeimpft.

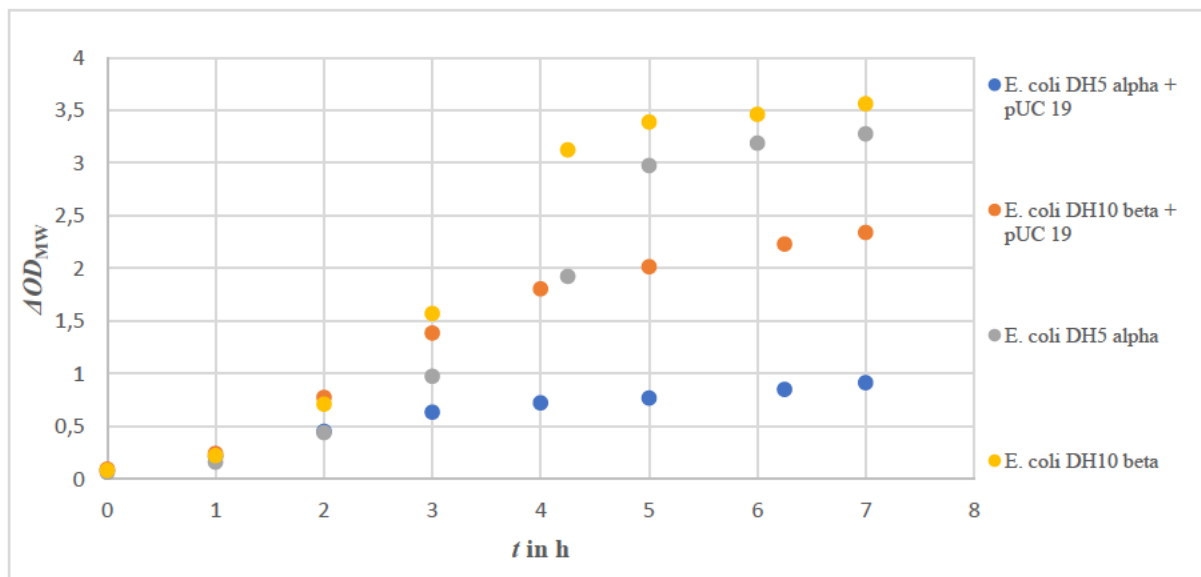


Abbildung 16: Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (2) mit Zusatz von Aminosäuren. Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin. Zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Die beiden Stämme ohne Plasmid wuchsen auf eine deutlich höhere ΔOD von 3,28 und 3,56. Mit Plasmid kam der *E. coli* DH5 alpha auf eine ΔOD von 0,92 und der *E. coli* DH10 beta auf 2,34. Nach 7 Stunden wurde der Prozess abgebrochen, da sich das Wachstum der Bakterien einstellte.

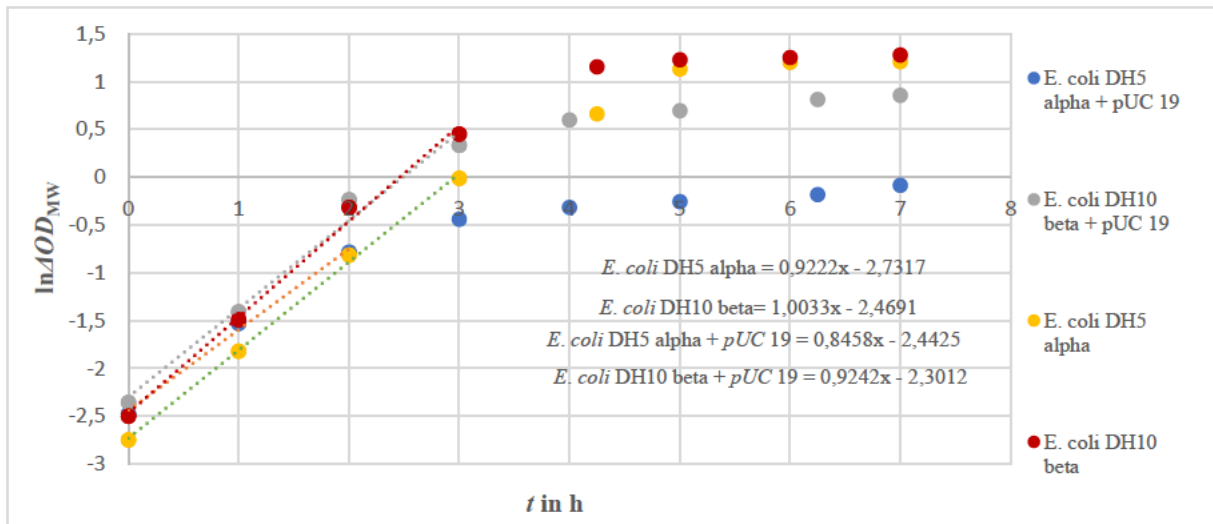


Abbildung 17: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{max} von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im LB-Medium (2) mit Zusatz von Aminosäuren. Es wird $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin und zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Ohne Plasmid wachsen die beiden Stämme etwas schneller als mit. Bei *E. coli* DH5 alpha mit *pUC 19* Plasmid ergibt sich eine Wachstumsrate von $0,85 \text{ h}^{-1}$ und ohne von $0,92 \text{ h}^{-1}$. Bei *E. coli* DH10 beta wachsen die Bakterien mit Plasmid, mit einer Geschwindigkeit von $0,92 \text{ h}^{-1}$ und ohne Plasmid mit $1,00 \text{ h}^{-1}$. Alle Stämme wachsen drei Stunden lang exponentiell und werden dann im Wachstum langsamer.

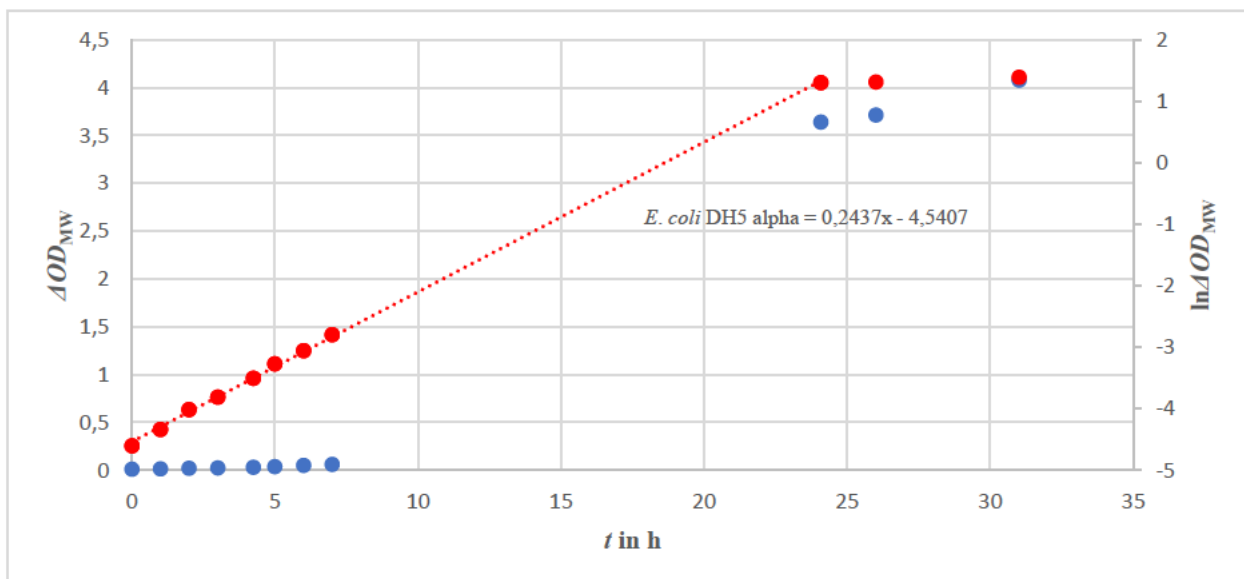


Abbildung 18: Kultivierung von *NEB E. coli* DH5 alpha im synthetischen Medium mit Zusatz von Arg und Thi. Es wird die ΔOD_{MW} (blau) und $\ln \Delta OD_{MW}$ (rot) gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem *E. coli* DH5 alpha wurden die Aminosäuren Arg und Thi hinzugegeben. Das Bakterium wächst mit einer Geschwindigkeit von $0,24 \text{ h}^{-1}$ und erreicht eine ΔOD_{MW} von 4,08. 7 Stunden lang wurde stündlich die ΔOD bestimmt. Danach wurde über Nacht weiter inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die ΔOD wieder gemessen.

Aus Abbildung 17 wird ersichtlich, dass im Vergleich zu den vorherigen Versuchen, alle Stämme mit und ohne *pUC 19* Plasmid eine deutlich höhere Wachstumsrate zwischen $0,85 \text{ h}^{-1}$ und $1,00 \text{ h}^{-1}$ aufwiesen. Dies zeigt, dass durch die Zusätze mehr Nährstoffe zu Beginn der

Kultivierung für die Bakterien vorhanden sind. Aus Abbildung 16 wird ersichtlich, dass die beiden Stämme ohne Plasmid auf einen ΔOD -Wert von 3,28 und 3,56 kamen. Mit Plasmid wurde ein geringerer Wert von 0,92 bei *E. coli* DH5 alpha und von 2,34 bei *E. coli* DH10 beta erreicht. Im synthetischen Medium wuchs der *E. coli* DH10 beta nicht. Der *E. coli* DH5 alpha wuchs langsam im synthetischen Medium, mit Zusatz der Aminosäuren Arg und Thi, mit einer Wachstumsrate von $0,24 \text{ h}^{-1}$ und kommt auf eine ΔOD von 4,08 (Abbildung 18). Im LB-Medium (2) wuchsen die Stämme für drei Stunden exponentiell und wuchsen danach deutlich langsamer. Im Gegensatz dazu wuchs im synthetischen Medium der *E. coli* DH5 alpha 24 Stunden lang konstant. Der Versuch hat die besten Ergebnisse gebracht und die Zugabe der Aminosäuren hat die Wachstumsrate der Bakterien erhöht. Da immer noch keine hohen optischen Dichten erreicht wurden, die Bakterien trotz Zugabe der auxotrophen Substanzen nach 3 Stunden langsamer wurden und im synthetischen Medium nur der *E. coli* DH5 alpha Stamm wuchs, wurde in der Literatur nach einer Medium-Zusammensetzung geschaut. In der Literatur wird Glycerol als C-Quelle, Hefeextrakt, Salze und Spurenelemente verwendet ^{[35][36][37]}. Im nächsten Schritt wurde entschieden die Bakterien mit und ohne Plasmid in dem Glycerolmedium mit Zugabe der Aminosäuren zu inkubieren und die Wachstumskurve aufzunehmen.

5.3 Batch-Kultivierung der beiden Stämme mit und ohne *pUC 19* Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren

Tabelle 13: Übersicht der Wachstumsbestimmung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid. Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.

Bakterienstamm	Medium	Inkubationszeit in h	ΔOD_{End}	μ_{max} in h^{-1}
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit <i>pUC 19</i>	Glycerolmedium (1) + Arg (0,1 g/L) + Thi (4,5 mg/L)	24,00	12,84	0,61
<i>E. coli</i> DH5 alpha	Glycerolmedium (1) + Arg (0,1 g/L) + Thi (4,5 mg/L)	24,00	13,66	0,54
<i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC 19</i>	Glycerolmedium (1) + Leu (0,3 g/L)	24,00	12,86	0,61
<i>E. coli</i> DH10 beta	Glycerolmedium (1) + Leu (0,3 g/L)	24,00	13,80	0,66

Das Wachstumsverhalten der in Tabelle 13 abgebildeten Bakterienstämme wurde untersucht. Die Vorkultur wurde direkt mit der mikrobiellen Kultur angeimpft und über Nacht bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$

und einer Rührerdrehzahl von 120 min^{-1} inkubiert. Nach 7,58 Stunden wurden die Messungen abgebrochen und die Schüttelkolben über Nacht bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ weiter inkubiert. Am nächsten Morgen wurde von jedem Schikanekolben einmal die optische Dichte gemessen.

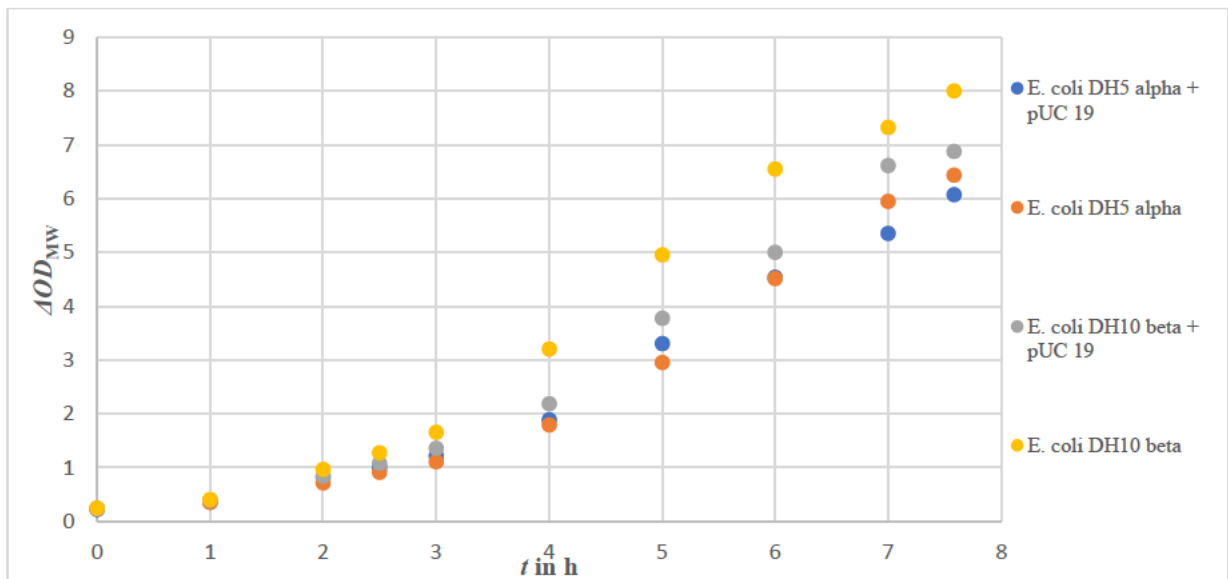


Abbildung 19: Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren. Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin und zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Der *E. coli* DH10 beta erreichte die höchste ΔOD von 8,00 nach 7,58 Stunden. Der *E. coli* DH5 alpha hat eine OD von 6,44, der *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid von 6,88 und der *E. coli* DH5 alpha mit *pUC 19* Plasmid von 6,08 nach 7,58 Stunden.

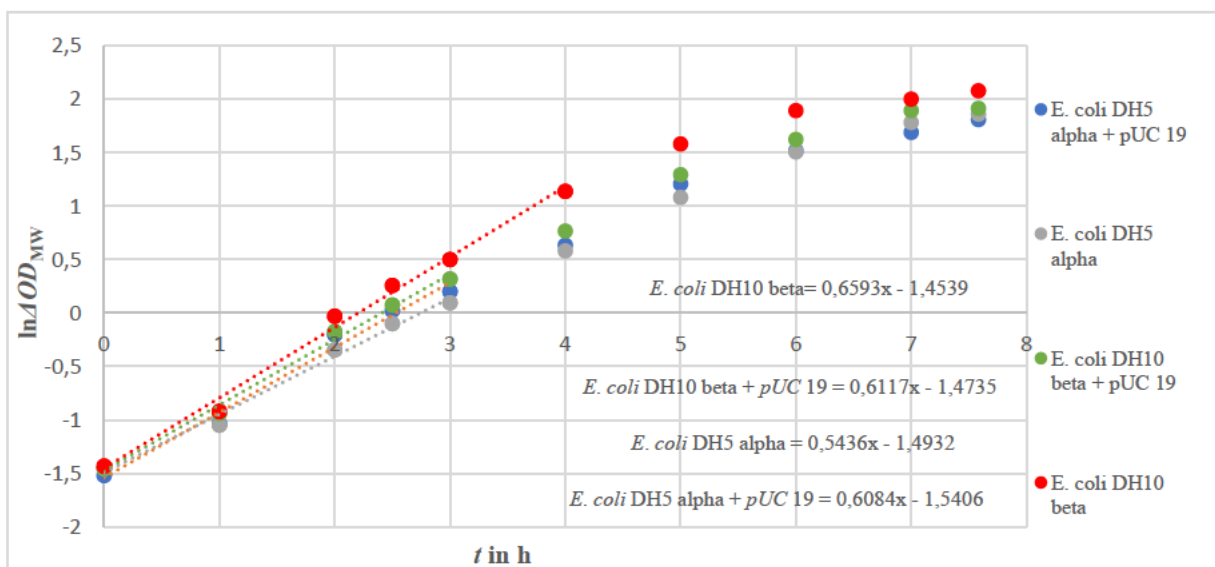


Abbildung 20: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{max} von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren. Es wird die $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin und zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Die beiden *E. coli* Stämme wachsen mit einer Geschwindigkeit von $0,54 \text{ h}^{-1}$ - $0,66 \text{ h}^{-1}$. Am schnellsten wuchs der *E. coli* DH10 beta mit einer Wachstumsrate von $0,66 \text{ h}^{-1}$. Die ersten drei Stunden wuchsen die Bakterien mit einer konstanten Geschwindigkeit und fangen danach an, etwas langsamer zu wachsen.

Mit dem verwendeten Glycerolmedium (1) wuchsen die beiden Bakterienstämme auf eine höhere ΔOD , als mit dem vorher verwendeten LB-Medium. Nach 24 Stunden wurden Werte von 12,84 bis 13,80 erreicht (Abbildung 19). Der Unterschied zwischen den *E. coli* Stämmen untereinander und zwischen den *E. coli* Stämmen mit und ohne *pUC 19* Plasmid waren nicht mehr erkennbar. Aus Abbildung 20 wird ersichtlich, dass die Bakterien mit Wachstumsraten zwischen $0,54 \text{ h}^{-1}$ und $0,66 \text{ h}^{-1}$ wuchsen. Nach 4 Stunden fing das Wachstum an, langsamer zu werden. Nach der Kultivierung wurden jeweils 10 PlasmidPreps der beiden Stämme durchgeführt und die Varianz der Methode mit dem Nanodrop überprüft.

5.3.1 Bestimmung der Varianz der PlasmidPrep Methode und Plasmidgehalts mit dem Nanodrop

Aus der Schüttelkolbenkultivierung mit *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid wurden jeweils zehnmal 1 mL Probe genommen und die alkalische Lyse mit dem Monarch Plasmid Mini Prep Kit durchgeführt. Im Nanodrop wurden drei Messungen pro Probe durchgeführt. Es wurde ein 1 % kleines Agarosegel hergestellt, auf welches, die im Nanodrop gemessenen Proben aufgetragen wurden. Im Agarosegel wurde das *pUC 19* Plasmid in die einzelnen Isoformen aufgetrennt (Abbildung 21).

In Abbildung 21 werden die unterschiedlichen Isoformen des Plasmids, durch mehrere Banden im Agarosegel ersichtlich. Die stärkste Bande bei den ungeschnittenen Proben lag bei 2,0 Kilobasen (kb). Dies ist die kovalent-geschlossene Form des *pUC 19* Plasmids, welche die am häufigsten vorkommende Form ist. Da beim *pUC 19* Standard dort auch eine Bande zu sehen ist, wurde bestätigt, dass *pUC 19* Plasmid aus den Proben isoliert wurde. Bei den Taschen 5 und 8 sind die Proben mit BSAI geschnitten wurden. Dort lag die Bande der linearen Isoform bei knapp 3,0 Kilobasen. Die *open circular* (oc) Form erkennt man an den Banden, die zwischen 3,0 kb und 4,0 kb lagen. Bei den *pUC 19* Standard waren zwei weitere Banden bei 4,0 kb und 8,0 kb erkennbar. Die Bande bei 4,0 kb zeigt die kovalent-geschlossene dimere Form und bei 8,0 kb handelt es sich um die offene-zirkuläre dimere Form ^[13].

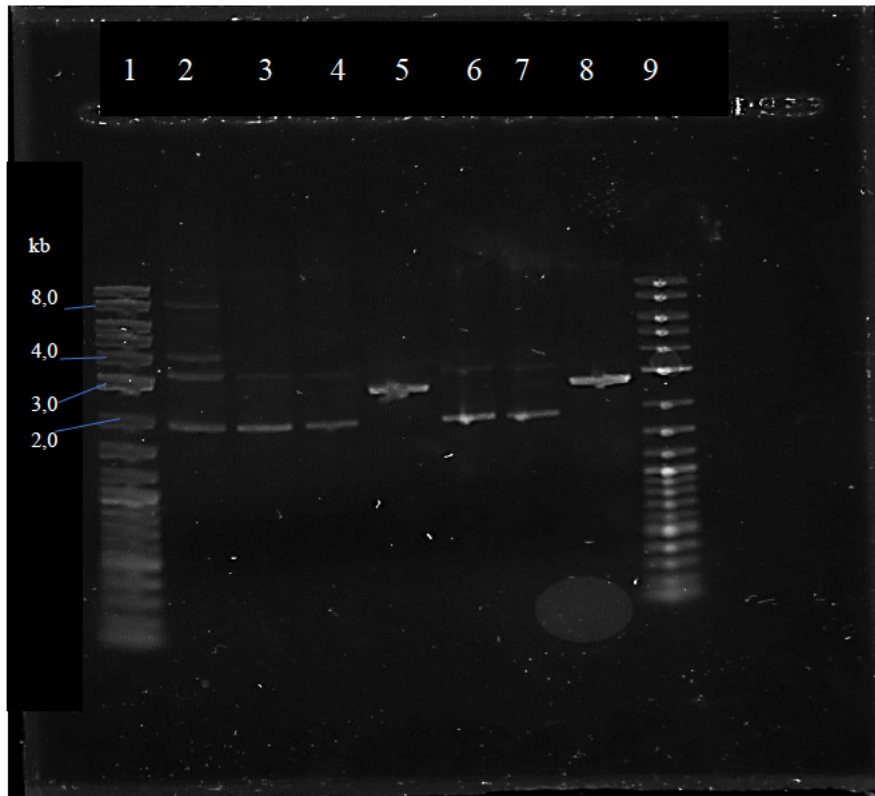


Abbildung 21: 1 % Agarosegel der Proben von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta. Probenreihenfolge: 1. Größenstandard, 2. *pUC* 19 Standard, 3. *E. coli* DH5 alpha nach der ersten Elution, 4. *E. coli* DH5 alpha nach der zweiten Elution, 5. *E. coli* DH5 alpha nach der ersten Elution geschnitten mit BSAI, 6. *E. coli* DH10 beta nach der ersten Elution, 7. *E. coli* DH10 beta nach der zweiten Elution, 8. *E. coli* DH10 beta nach der ersten Elution mit BSAI geschnitten, 9. Größenstandard. Als Größenstandard wurde der Quick-Load® Purple-1 kb Plus DNA Ladder verwendet.

Tabelle 14: Bestimmung der Plasmid Konzentration von *E. coli* DH5 alpha mit dem Nanodrop. Die Probe, die Konzentration c , das Volumen V und die Masse m sind in der Tabelle dargestellt. Die erste Elution beim PlasmidPrep ist mit E1 abgekürzt, die zweite Elution beim PlasmidPrep mit E2, die Probennummer steht dahinter. Der erste Schritt im PlasmidPrep wurde mit einer ΔOD von 10 durchgeführt.

Probe	c in ng/ μ L	V in mL	$m_{\Delta OD 10}$ in ng	m in ng
<i>E. coli</i> DH5 alpha E1.1	234,80	26	6104,80	610,48
<i>E. coli</i> DH5 alpha E1.2	276,33	25	6908,33	690,83
<i>E. coli</i> DH5 alpha E1.3	302,55	24	7261,20	726,12
<i>E. coli</i> DH5 alpha E1.4	337,73	23	7767,87	776,79
<i>E. coli</i> DH5 alpha E1.5	342,93	23	7887,47	788,75
<i>E. coli</i> DH5 alpha E1.6	254,03	26	6604,87	660,49
<i>E. coli</i> DH5 alpha E1.7	275,70	25	6892,50	689,25

Probe	c in ng/ μ L	V in mL	$m_{\Delta OD10}$ in ng	m in ng
<i>E. coli</i> DH5 alpha E1.8	251,20	26	6531,20	653,12
<i>E. coli</i> DH5 alpha E1.9	250,83	26	6521,45	652,15
<i>E. coli</i> DH5 alpha E1.10	270,97	25	6774,17	677,42
<i>E. coli</i> DH5 alpha E2.1	89,85	25	2246,25	224,63
<i>E. coli</i> DH5 alpha E2.2	86,93	25	2173,33	217,33
<i>E. coli</i> DH5 alpha E2.3	82,15	26	2135,90	213,59
<i>E. coli</i> DH5 alpha E2.4	80,25	26	2086,50	208,65
<i>E. coli</i> DH5 alpha E2.5	94,15	24	2259,60	225,96
<i>E. coli</i> DH5 alpha E2.6	91,10	24	2186,40	218,64
<i>E. coli</i> DH5 alpha E2.7	85,40	25	2135,00	213,50
<i>E. coli</i> DH5 alpha E2.8	86,20	25	2155,00	215,50
<i>E. coli</i> DH5 alpha E2.9	101,85	23	2342,55	234,26
<i>E. coli</i> DH5 alpha E2.10	134,20	24	3220,80	322,08

Tabelle 15: Bestimmung der Plasmid Konzentration von *E. coli* 10 beta mit dem Nanodrop. Die Probe, die Konzentration c , das Volumen V und die Masse m sind in der Tabelle dargestellt. Die erste Elution beim PlasmidPrep ist mit E1 abgekürzt, die zweite Elution beim PlasmidPrep mit E2, die Probennummer steht dahinter. Der erste Schritt im PlasmidPrep wurde mit einer ΔOD von 10 durchgeführt.

Probe	c in ng/ μ L	V in μ L	$m_{\Delta OD10}$ in ng	m in ng
<i>E. coli</i> DH10 beta E1.1	131,90	26	3429,40	342,94
<i>E. coli</i> DH10 beta E1.2	324,45	24	7786,80	778,68
<i>E. coli</i> DH10 beta E1.3	262,30	25	6557,50	655,75
<i>E. coli</i> DH10 beta E1.4	223,70	25	5592,50	559,25
<i>E. coli</i> DH10 beta E1.5	128,50	26	3341,00	334,10
<i>E. coli</i> DH10 beta E1.6	273,40	24	6561,60	656,16

Probe	c in ng/μL	V in μL	m _{ΔOD10} in ng	m in ng
<i>E. coli</i> DH10 beta E1.7	238,50	26	6201,00	620,10
<i>E. coli</i> DH10 beta E1.8	242,90	25	6072,50	607,25
<i>E. coli</i> DH10 beta E1.9	129,25	26	3360,50	336,05
<i>E. coli</i> DH10 beta E2.1	51,50	27	1390,50	139,05
<i>E. coli</i> DH10 beta E2.2	75,05	25	1876,25	187,63
<i>E. coli</i> DH10 beta E2.3	41,87	26	1088,53	108,85
<i>E. coli</i> DH10 beta E2.4	49,95	26	1298,70	129,87
<i>E. coli</i> DH10 beta E2.5	96,60	23	2221,80	222,18
<i>E. coli</i> DH10 beta E2.6	87,35	24	2096,40	209,64
<i>E. coli</i> DH10 beta E2.7	83,95	24	2014,80	201,48
<i>E. coli</i> DH10 beta E2.8	45,45	27	1227,15	122,72
<i>E. coli</i> DH10 beta E2.9	76,33	25	1908,33	190,83

$$\text{Mittelwert } (\bar{x}) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{Gl. (3)}$$

$$\text{Varianz } (\sigma^2) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Gl. (4)}$$

$$\text{Standardabweichung } (s) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Gl. (5)}$$

$$\text{Variationskoeffizient } (var) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Gl. (6)}$$

Tabelle 16: Statistische Auswertung der Nanodrop Messung des PlasmidPreps aus der Kultivierung mit *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid. Der Mittelwert \bar{x} (Gl.3), die Varianz σ^2 (Gl.4), die Standardabweichung s (Gl.5) und der Variationskoeffizient var (Gl.6) von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta nach der ersten und zweiten Elution sind dargestellt. Die Abweichungen des PlasmidPreps sind bei *E. coli* DH10 beta größer als bei *E. coli* DH5 alpha.

Probe	<i>E. coli</i> DH5 alpha E1	<i>E. coli</i> DH5 alpha E2	<i>E. coli</i> DH10 beta E1	<i>E. coli</i> DH10 beta E2
\bar{x} (c) in ng/ μ L	279,71	93,21	217,21	67,56
\bar{x} (m) in ng	692,54	229,41	543,36	168,08
σ^2 (c) in (ng/ μ L) ²	1368,09	245,70	5091,30	419,21
σ^2 (m) in ng ²	3185,58	1115,08	2723,62	1817,23
s (c) in ng/ μ L	36,99	15,67	71,35	20,47
s (m) in ng	56,44	33,40	165,03	42,63
var (c) in %	13,22	16,82	32,85	30,31
var (m) in %	8,15	14,56	30,37	25,37

$$\text{Gesamtmasse} = \bar{x} (m) \text{ E1} + \bar{x} (m) \text{ E2} \quad \text{Gl. (7)}$$

Gesamtmasse *E. coli* DH5 alpha in ng = 692,54 ng + 229,41 ng = 921,95 ng

$$\text{Prozentualer Anteil E1} = \frac{692,54 \text{ ng}}{921,95 \text{ ng}} \cdot 100 = 75,12 \%$$

$$\text{Prozentualer Anteil E2} = \frac{229,41 \text{ ng}}{921,95 \text{ ng}} \cdot 100 = 24,88 \%$$

Gesamtmasse *E. coli* DH10 beta in ng = 543,36 ng + 168,08 ng = 711,44 ng

$$\text{Prozentualer Anteil E1} = \frac{543,36 \text{ ng}}{711,44 \text{ ng}} \cdot 100 = 76,38 \%$$

$$\text{Prozentualer Anteil E2} = \frac{168,08 \text{ ng}}{711,44 \text{ ng}} \cdot 100 = 23,62 \%$$

Die Gesamtmasse vom *pUC 19* Plasmid bei der Kultivierung mit *E. coli* DH5 alpha wurde mit Gleichung 7 berechnet und war mit 921,95 ng höher als bei *E. coli* DH10 beta mit einer Plasmidausbeute von 711,44 ng. Nach der ersten Elution mit 30 μ L Elutionspuffer konnte bei beiden Bakterienstämmen ungefähr 75 % der Gesamtausbeute isoliert werden. Die restlichen 25 % erhält man, wenn man ein zweites Mal mit Elutionspuffer eluiert. Dadurch wurde unser Verdacht bestätigt, dass nach der ersten Elution noch viel Plasmid an der Säule bleibt. Der Variationskoeffizient beträgt bei *E. coli* DH5 alpha bei der ersten Elution 8,15 % und 13,22 % und bei der zweiten Elution 14,56 % und 16,82 %. Bei *E. coli* DH10 beta ist der Variationskoeffizient deutlich höher. Dort liegt er zwischen 25,37 % und 32,85 % (Tabelle 16). Aus Tabelle 15

wird ersichtlich, dass bei *E. coli* DH10 beta deutliche Ausreißer mit 131,90 ng/μL, 128,50 ng/μL und 129,25 ng/μL vorhanden sind. Diese geringen Werte findet man nicht bei der Nanodrop-Messung der Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha (Tabelle 14). Das deutet darauf hin, dass die Durchführung des PlasmidPreps bei den Proben von *E. coli* DH10 beta nicht gleichmäßig stattgefunden hat. Es wurde entschieden, im nächsten Versuch, die Kultivierung der fünf verschiedenen Klone vom Bakterium *E. coli* DH5 alpha mit *pUC* 19 Plasmid durchzuführen. Nach der Kultivierung wird von jedem Klon ein PlasmidPrep in Doppelbestimmung durchgeführt und mit dem Nanodrop gemessen.

5.4 Batch-Kultivierung und Unterschiedsbestimmung der 5 Klone von *E. coli* DH5 alpha mit *pUC* 19 Plasmid

Tabelle 17: Übersicht der Wachstumsbestimmung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC* 19 Plasmid. Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.

Bakterienstamm	Medium	Inkubationszeit in h	ΔOD_{End}	μ_{max} in h ⁻¹
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit <i>pUC</i> 19 (1)	Glycerolmedium (1) + Arg (0,1 g/L) + Thi (4,5 mg/L)	22,75	13,65	0,55
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit <i>pUC</i> 19 (2)	Glycerolmedium (1) + Arg (0,1 g/L) + Thi (4,5 mg/L)	22,75	14,19	0,48
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit <i>pUC</i> 19 (3)	Glycerolmedium (1) + Arg (0,1 g/L) + Thi (4,5 mg/L)	22,75	14,81	0,48
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit <i>pUC</i> 19 beta (4)	Glycerolmedium (1) + Arg (0,1 g/L) + Thi (4,5 mg/L)	22,75	15,11	0,44
<i>E. coli</i> DH5 alpha mit <i>pUC</i> 19 (5)	Glycerolmedium (1) + Arg (0,1 g/L) + Thi (4,5 mg/L)	22,75	12,93	0,49

Nach den in Tabelle 17 dargestellten Kultivierungsbedingungen wurde das Batchverfahren durchgeführt. Die Vorkultur wurde direkt mit der mikrobiellen Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und einer Rührerdrehzahl von 120 min⁻¹ inkubiert. Nach 6,00 Stunden wurden die Messungen abgebrochen und die Schüttelkolben über Nacht bei 37 °C weiter inkubiert. Es wurde nach sechs Stunden jeweils zwei Proben pro Klon für den Plasmid Mini Prep Kit genommen, auf eine ΔOD von 10,00 aufkonzentriert und am gleichen Tag durchgeführt. Am nächsten Morgen wurde von jedem Schikanekolben einmal die optische Dichte gemessen.

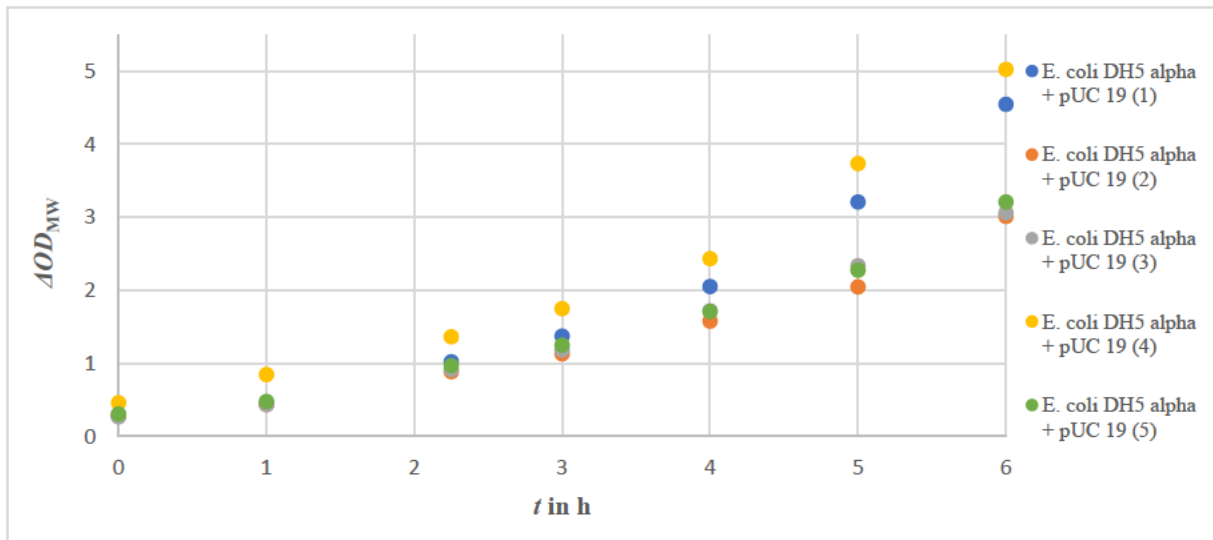


Abbildung 22: Kultivierung der 5 Klone von *E. coli* DH5 alpha mit *pUC* 19 Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren. Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin hinzugegeben. Die Klone 2, 3 und 5 haben eine ähnliche ΔOD_{MW} nach 6 Stunden von 3,01, 3,06 und 3,21. Die Klone 1 und 4 weisen nach 6 Stunden höhere Werte auf. Bei Klon 1 wird eine ΔOD_{MW} von 4,55 und bei Klon 4 von 5,03 erreicht.

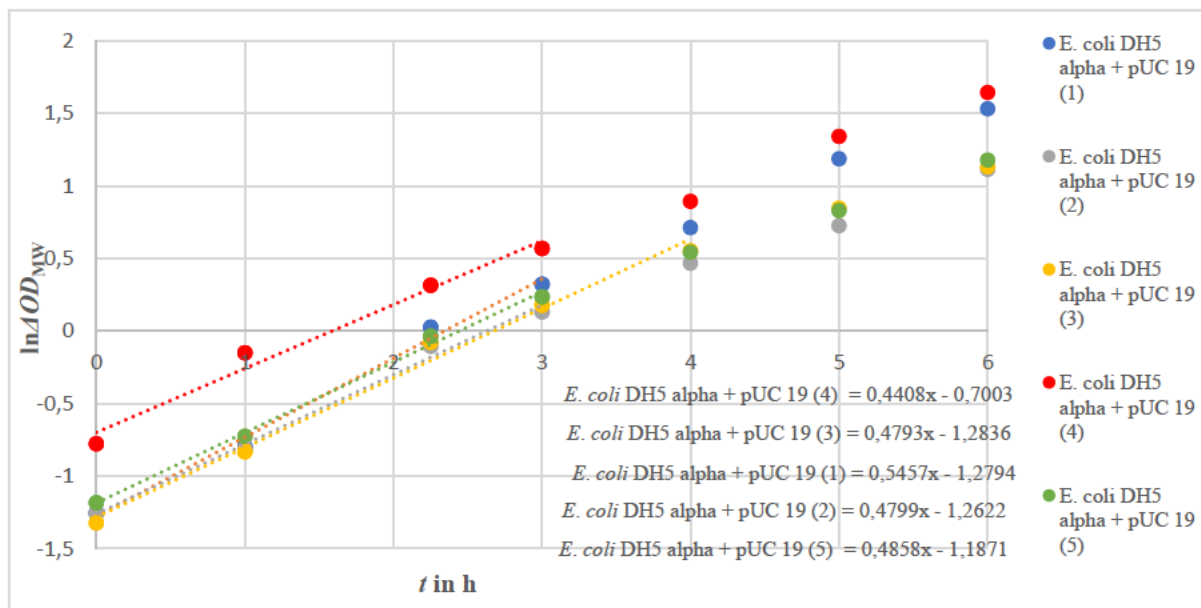


Abbildung 23: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{max} der 5 Klone von *E. coli* DH5 alpha mit *pUC* 19 Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren. Es wird die $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha wurde Arginin und Thiamin hinzugegeben. Die fünf Klone wuchsen mit einer Wachstumsrate von $0,44 \text{ h}^{-1}$ bis $0,55 \text{ h}^{-1}$. Der *E. coli* DH5 alpha Klon 1 wuchs mit $0,55 \text{ h}^{-1}$ am schnellsten und der *E. coli* DH5 alpha Klon 4 mit $0,44 \text{ h}^{-1}$ am langsamsten.

Die ΔOD_{MW} der einzelnen Klone von *E. coli* DH5 alpha mit *pUC* 19 nahm nach 22,75 Stunden Inkubation im Schüttelkolben einen Wert zwischen 12,93 und 15,11 (Abbildung 22). In 5.3 lag die ΔOD bei Klon 1 bei den gleichen Kultivierungsbedingungen bei 12,84 und diesmal bei 13,65. Dies ist ein Unterschied von 4,86 %. Dieser Unterschied ist gering, weshalb man sagen kann, dass die beiden Kultivierungen vergleichbar abgelaufen sind. Die Klone 2, 3 und 5

wuchsen mit einer ähnlichen Wachstumsrate von ungefähr $0,48 \text{ h}^{-1}$ (Abbildung 23). Der 4. Klon wuchs mit einer Geschwindigkeit von $0,44 \text{ h}^{-1}$ langsamer, wobei der 1. Klon mit $0,55 \text{ h}^{-1}$ schneller wuchs.

Tabelle 18: Bestimmung der Plasmid Konzentration der verschiedenen Klone von *E. coli* DH5 alpha mit dem Nanodrop. Die Probe, die Konzentration c , das Volumen V und die Masse m sind in der Tabelle als Mittelwert einer Doppelbestimmung dargestellt. Die erste Elution beim PlasmidPrep ist mit E1 abgekürzt, die zweite Elution beim PlasmidPrep mit E2. Der erste Schritt im PlasmidPrep wurde mit einer ΔOD von 10 durchgeführt.

Probe	c_{MW} in ng/ μL	V_{MW} in μL	$m_{\Delta OD10}$ in ng	m_{MW} in ng
<i>E. coli</i> DH5 alpha (1) E1	150,03	26,0	3913,13	391,31
<i>E. coli</i> DH5 alpha (2) E1	121,63	26,5	3227,58	322,76
<i>E. coli</i> DH5 alpha (3) E1	139,40	26,0	3624,40	362,44
<i>E. coli</i> DH5 alpha (4) E1	142,75	26,0	3708,95	370,90
<i>E. coli</i> DH5 alpha (5) E1	84,83	27,0	2262,23	226,22
<i>E. coli</i> DH5 alpha (1) E2	21,30	25,0	532,50	53,25
<i>E. coli</i> DH5 alpha (2) E2	29,46	23,5	670,17	67,02
<i>E. coli</i> DH5 alpha (3) E1	24,65	25,0	610,85	61,09
<i>E. coli</i> DH5 alpha (4) E2	23,50	23,5	551,33	55,13
<i>E. coli</i> DH5 alpha (5) E2	19,78	24	512,52	51,25

Die Gesamtmasse wurde mit Gleichung 7 berechnet.

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH5 alpha (1)} = 391,31 \text{ ng} + 53,25 \text{ ng} = 444,56 \text{ ng}$$

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH5 alpha (2)} = 322,76 \text{ ng} + 67,02 \text{ ng} = 389,78 \text{ ng}$$

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH5 alpha (3)} = 362,44 \text{ ng} + 61,09 \text{ ng} = 423,53 \text{ ng}$$

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH5 alpha (4)} = 370,90 \text{ ng} + 55,13 \text{ ng} = 426,03 \text{ ng}$$

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH5 alpha (5)} = 226,22 \text{ ng} + 51,25 \text{ ng} = 277,47 \text{ ng}$$

Tabelle 19: Bestimmung der Unterschiede der Gesamtmassen zwischen den einzelnen Klonen von *E. coli* DH5 alpha. Die verglichenen Klone und die Abweichung in % sind dargestellt. Der fünfte Klon weicht mit 28,81 %, 34,48 %, 34,87 % und 37,58 % deutlich von den anderen ab. Die anderen Klone liegen alle im Bereich von 0-10 %.

Vergleich	Abweichung in %
Klon 1 zu Klon 2	12,32
Klon 1 zu Klon 3	4,73
Klon 1 zu Klon 4	4,17
Klon 1 zu Klon 5	37,58
Klon 2 zu Klon 3	7,97
Klon 2 zu Klon 4	8,51
Klon 2 zu Klon 5	28,81
Klon 3 zu Klon 4	0,59
Klon 3 zu Klon 5	34,48
Klon 4 zu Klon 5	34,87

Bei der Gesamtmasse des produzierten *pUC 19* Plasmids gab es minimale Unterschiede (Tabelle 18). Die Gesamtmasse der Klone 1 bis 4 lagen zwischen 389,78 ng und 444,56 ng. Das sind prozentuale Unterschiede von 0,59 % und 12,32 %. Die Klone 3 und 4 sind in dieser Hinsicht mit einer Abweichung von 0,59 % am ähnlichsten (Tabelle 19). Da eine Varianz von mehr als 10 % der PlasmidPrep Methode errechnet wurde und sich die Klone 1-4 in diesem Bereich befinden, gibt es keine messbaren Unterschiede zwischen den vier Klonen. Bei *E. coli* DH5 alpha (5) betrug die Gesamtmasse vom *pUC 19* Plasmid nur 277,47 ng. Die Abweichungen zu den anderen Klonen beträgt 37,58 %, 28,81 %, 34,48 % und 34,87 %. Dies sind deutliche Unterschiede. Deshalb wird geraten für hohe Plasmidausbeuten eine Kultivierung mit den Klonen 1-4 durchzuführen.

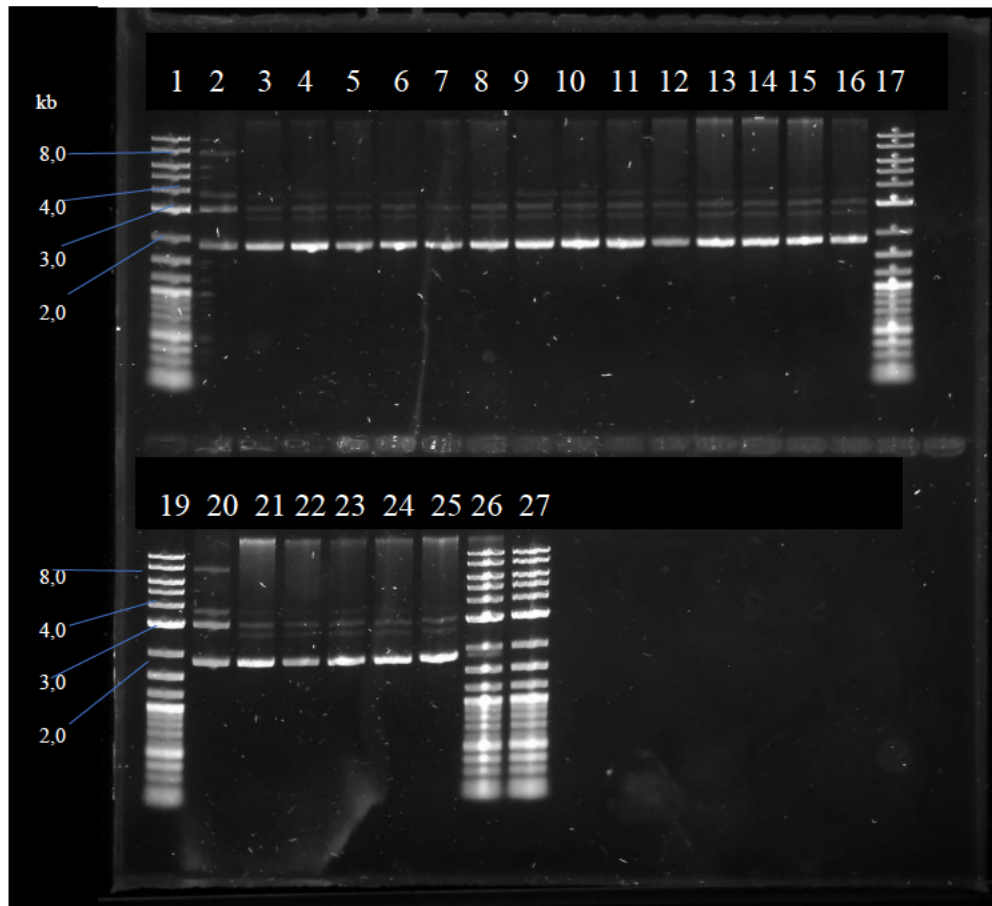


Abbildung 24: 1 % Agarosegel der einzelnen Klone von *E. coli* DH5 alpha. Probenreihenfolge: 1. Größenstandard, 2. *pUC* 19 Standard, 3. *E. coli* DH5 alpha (1.1) nach der ersten Elution, 4. *E. coli* DH5 alpha (1.2) nach der ersten Elution, 5. *E. coli* DH5 alpha (2.1) nach der ersten Elution, 6. *E. coli* DH5 alpha (2.2) nach der ersten Elution, 7. *E. coli* DH5 alpha (3.1) nach der ersten Elution, 8. *E. coli* DH5 alpha (3.2) nach der ersten Elution, 9. *E. coli* DH5 alpha (4.1) nach der ersten Elution, 10. *E. coli* DH5 alpha (4.2) nach der ersten Elution, 11. *E. coli* DH5 alpha (5.1) nach der ersten Elution, 12. *E. coli* DH5 alpha (5.2) nach der ersten Elution, 13. *E. coli* DH5 alpha (1.1) nach der zweiten Elution, 14. *E. coli* DH5 alpha (1.2) nach der zweiten Elution, 15. *E. coli* DH5 alpha (2.1) nach der zweiten Elution, 16. *E. coli* DH5 alpha (2.2) nach der zweiten Elution, 17. Größenstandard, 19. Größenstandard, 20. *pUC* 19 Standard, 21. *E. coli* DH5 alpha (3.1) nach der zweiten Elution, 22. *E. coli* DH5 alpha (3.2) nach der zweiten Elution, 23. *E. coli* DH5 alpha (4.1) nach der zweiten Elution, 24. *E. coli* DH5 alpha (4.2) nach der zweiten Elution, 25. *E. coli* DH5 alpha (5.1) nach der zweiten Elution, 26. *E. coli* DH5 alpha (5.2) nach der zweiten Elution und Größenstandard, 27. Größenstandard. Als Größenstandard wurde der Quick-Load® Purple – 1 kb Plus DNA Ladder verwendet.

Des Weiteren wurde ein Agarosegel mit allen Eluaten von *E. coli* DH5 alpha durchgeführt, um auf die Isoformen der einzelnen Klone zu untersuchen. Bei allen Proben lag die stärkste Bande bei 2,0 kb. Dies ist die kovalent-geschlossen-zirkuläre monomere Form. Zwei schwächere Banden bei 3,0 kb und 2,8 kb waren auch bei allen Proben zu erkennen. Dabei handelt es sich um die lineare Form (2,8 kb) und die offene-zirkuläre Form (3,0 kb). Bei 4,0 kb war bei den Proben eine sehr schwache Bande zu sehen, die auch beim *pUC* 19 Standard zu sehen war. Dies ist die kovalent-geschlossene dimere Form. Beim *pUC* 19 Standard war bei 8,0 kb eine weitere Bande zu sehen, die der offenen zirkulären dimere Form entspricht (Abbildung 24) ^[13]. Im nächsten Schritt werden die fünf Klone von *E. coli* DH 10 beta auf Unterschiede untersucht.

5.5 Batch-Kultivierung und Unterschiedsbestimmung der 5 Klone von *E. coli* DH10 beta mit *pUC 19* Plasmid

Tabelle 20: Übersicht der Wachstumsbestimmung von *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid. Der verwendete Bakterienstamm, das Medium, die Inkubationszeit, die ΔOD_{End} und die maximale Wachstumsrate μ_{max} sind dargestellt.

Bakterienstamm	Medium	Inkubationszeit in h	ΔOD_{End}	μ_{max} in h^{-1}
<i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC 19</i> (1)	Glycerolmedium (1) + Leu (0,3 g/L)	22,75	12,49	0,54
<i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC 19</i> (2)	Glycerolmedium (1) + Leu (0,3 g/L)	22,75	12,31	0,54
<i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC 19</i> (3)	Glycerolmedium (1) + Leu (0,3 g/L)	22,75	12,73	0,54
<i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC 19</i> beta (4)	Glycerolmedium (1) + Leu (0,3 g/L)	22,75	11,63	0,54
<i>E. coli</i> DH10 beta mit <i>pUC 19</i> (5)	Glycerolmedium (1) + Leu (0,3 g/L)	22,75	12,49	0,54

Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 20 abgebildet. Die Vorkultur wurde direkt mit der mikrobiellen Kultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit einer Rührerdrehzahl von 120 min^{-1} inkubiert. Nach 6,00 Stunden wurden die Messungen abgebrochen. Die Schüttelkolben wurden über Nacht bei 37 °C weiter inkubiert. Es wurde nach 6 Stunden jeweils 2 Proben pro Klon für den Plasmid Mini Prep Kit genommen, auf eine ΔOD von 10 aufkonzentriert und am gleichen Tag durchgeführt. Am nächsten Morgen wurde von jedem Schikanekolben einmal die optische Dichte gemessen.

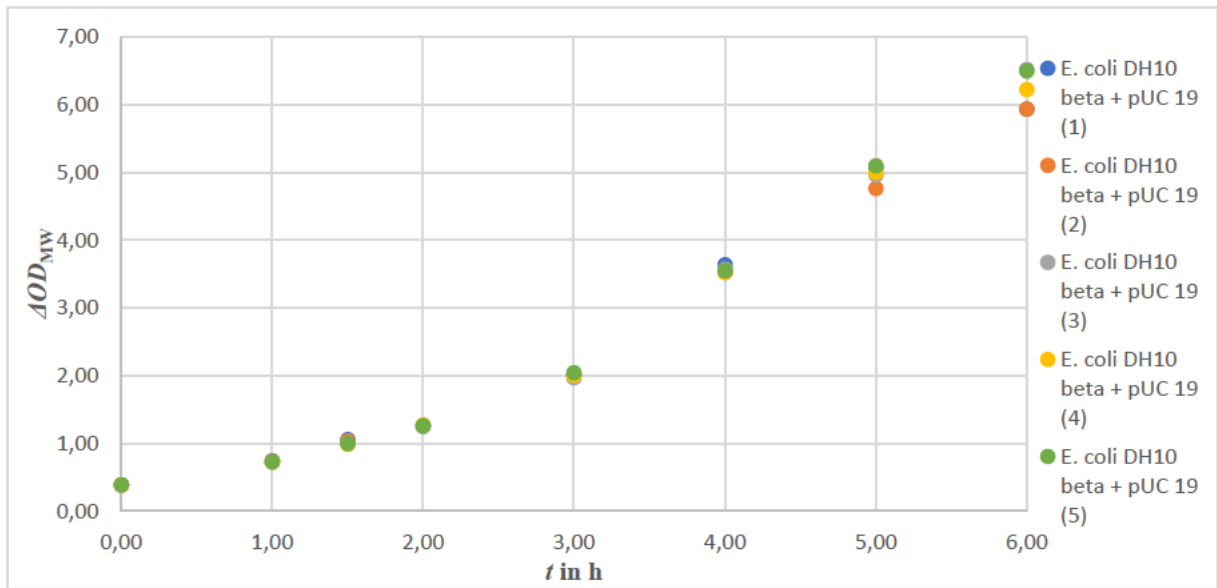


Abbildung 25: Kultivierung der 5 Klone von *E. coli* DH10 beta mit *pUC* 19 Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren. Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Die 5 unterschiedlichen Klone lagen nach Stunden im Bereich von einem ΔOD_{MW} von 5,94 und 6,53. Die Kultivierung startet mit einer Start optischen Dichte von 0,39.

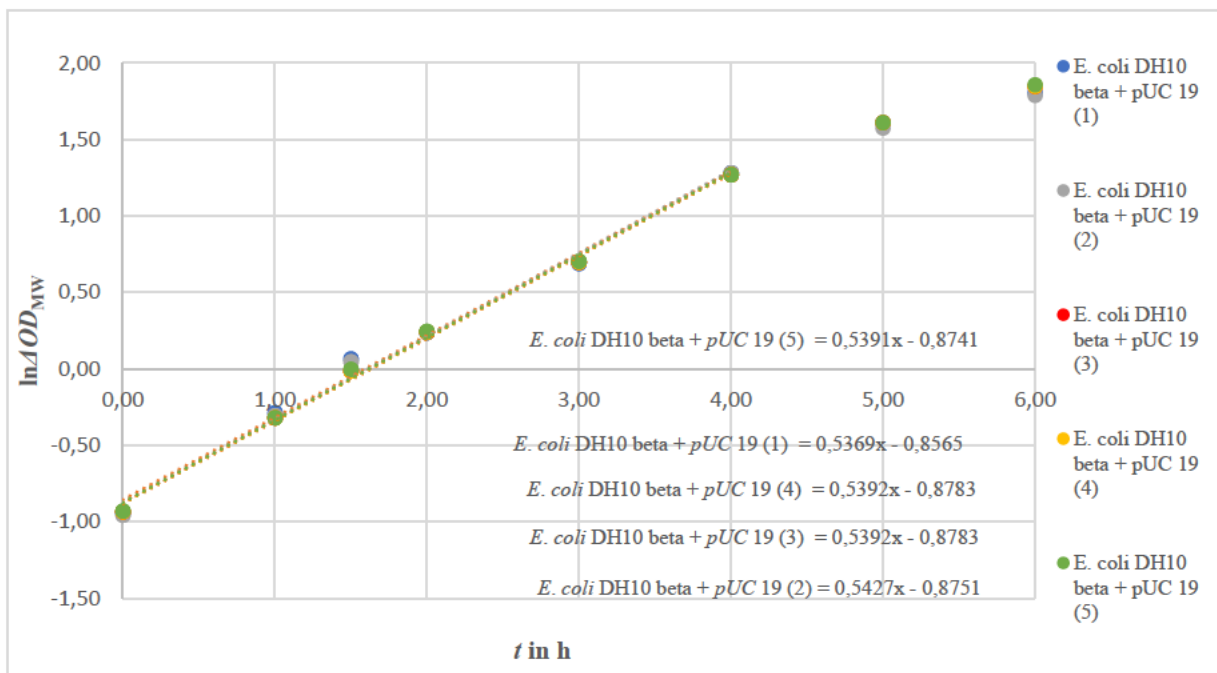


Abbildung 26: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{max} der fünf Klone von *E. coli* DH10 beta mit *pUC* 19 Plasmid im Glycerolmedium (1) mit Zusatz von Aminosäuren. Es wird die $\ln \Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Die 5 Klone von *E. coli* DH10 beta mit *pUC* 19 Plasmid wuchsen für vier Stunden mit einer Wachstumsrate von $0,54 \text{ h}^{-1}$. Danach wuchsen die Bakterien langsamer weiter.

In der Wachstumsrate waren alle fünf Klone von *E. coli* DH10 beta gleich und wuchsen mit einer Geschwindigkeit von $0,54 \text{ h}^{-1}$ für vier Stunden und wuchsen danach langsamer weiter (Abbildung 26). Die Klone erreichten nach 22,75 Stunden eine ΔOD_{MW} zwischen 11,63 und

12,49 (Abbildung 25). Die Abweichung zwischen dem höchsten und niedrigsten Wert betrug 8,50 %.

Tabelle 21: Bestimmung der Plasmid Konzentration der verschiedenen Klone von *E. coli* DH10 beta mit dem Nanodrop. Die Probe, die Konzentration c , das Volumen V und die Masse m sind in der Tabelle als Mittelwert einer Doppelbestimmung dargestellt. Die erste Elution beim PlasmidPrep ist mit E1 abgekürzt, die zweite Elution beim PlasmidPrep mit E2. Der erste Schritt im PlasmidPrep wurde mit einer ΔOD von 10 durchgeführt.

Probe	c_{MW} in ng/ μ L	V_{MW} in μ L	$m_{\Delta OD10}$ in ng	m_{MW} in ng
<i>E. coli</i> DH10 beta (1) E1	190,50	25,0	4674,90	467,49
<i>E. coli</i> DH10 beta (2) E1	158,03	25,0	3942,35	394,24
<i>E. coli</i> DH10 beta (3) E1	199,18	25,0	4972,05	497,21
<i>E. coli</i> DH10 beta (4) E1	202,83	22,0	4295,45	429,55
<i>E. coli</i> DH10 beta (5) E1	205,13	24,5	5024,95	502,50
<i>E. coli</i> DH10 beta (1) E2	45,93	25,5	1169,48	116,95
<i>E. coli</i> DH10 beta (2) E2	30,43	25,0	760,80	76,08
<i>E. coli</i> DH10 beta (3) E1	47,38	24,5	1159,23	115,92
<i>E. coli</i> DH10 beta (4) E2	66,80	22,5	1474,13	147,41
<i>E. coli</i> DH10 beta (5) E2	51,13	25,0	1278,13	127,81

Die Gesamtmasse wurde mit Gleichung 7 berechnet.

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH10 beta (1)} = 467,49 \text{ ng} + 116,95 \text{ ng} = 584,44 \text{ ng}$$

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH10 beta (2)} = 394,24 \text{ ng} + 76,08 \text{ ng} = 470,32 \text{ ng}$$

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH10 beta (3)} = 497,21 \text{ ng} + 115,92 \text{ ng} = 613,13 \text{ ng}$$

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH10 beta (4)} = 429,55 \text{ ng} + 147,41 \text{ ng} = 576,96 \text{ ng}$$

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH10 beta (5)} = 502,50 \text{ ng} + 127,81 \text{ ng} = 630,31 \text{ ng}$$

Tabelle 22: Bestimmung der Unterschiede der Gesamtmassen zwischen den einzelnen Klonen von *E. coli* DH10 beta. Die verglichenen Klone und die Abweichung in % sind dargestellt. Der zweite Klon weicht mit 18,48 %, 19,53 %, 23,29 % und 25,38 % deutlich von den anderen ab. Die Abweichungen zwischen den anderen Klonen liegen alle im Bereich zwischen 0 und 10 %.

Vergleich	Abweichung in %
Klon 1 zu Klon 2	19,53
Klon 1 zu Klon 3	4,68
Klon 1 zu Klon 4	1,28
Klon 1 zu Klon 5	7,28
Klon 2 zu Klon 3	23,29
Klon 2 zu Klon 4	18,48
Klon 2 zu Klon 5	25,38
Klon 3 zu Klon 4	5,90
Klon 3 zu Klon 5	2,73
Klon 4 zu Klon 5	8,46

Die *pUC* 19 Plasmidausbeute mit dem Bakterium *E. coli* DH10 beta ist deutlich höher als mit DH5 alpha (Tabelle 21 und 5.4). Aus Tabelle 22 ist ersichtlich, dass sich die Klone 1, 3, 4 und 5 mit einer Abweichung zwischen 1,28 % und 8,46 % nicht deutlich unterscheiden. Da die Abweichung der Plasmid Prep Methode mehr als 10 % betrug, konnten keine messbaren Unterschiede zwischen diesen vier Klonen gefunden werden. Zu dem zweiten Klon konnten messbare Unterschiede errechnet werden. Dieser Klon unterscheidet sich von den anderen um 18,48 %, 19,53 %, 23,29 % und 25,38 %. *E. coli* DH10 beta (5) hat mit 630,31 ng die höchste Plasmidmasse pro eingesetzte Zellen. Deshalb wurde dieser ausgewählt, um die folgende Kultivierung in den beiden Bioreaktoren BIostat CTA und CTB durchzuführen. Für diese Kultivierung wird die Glycerol und Hefeextrakt Konzentration im Medium auf 25 g/L erhöht.

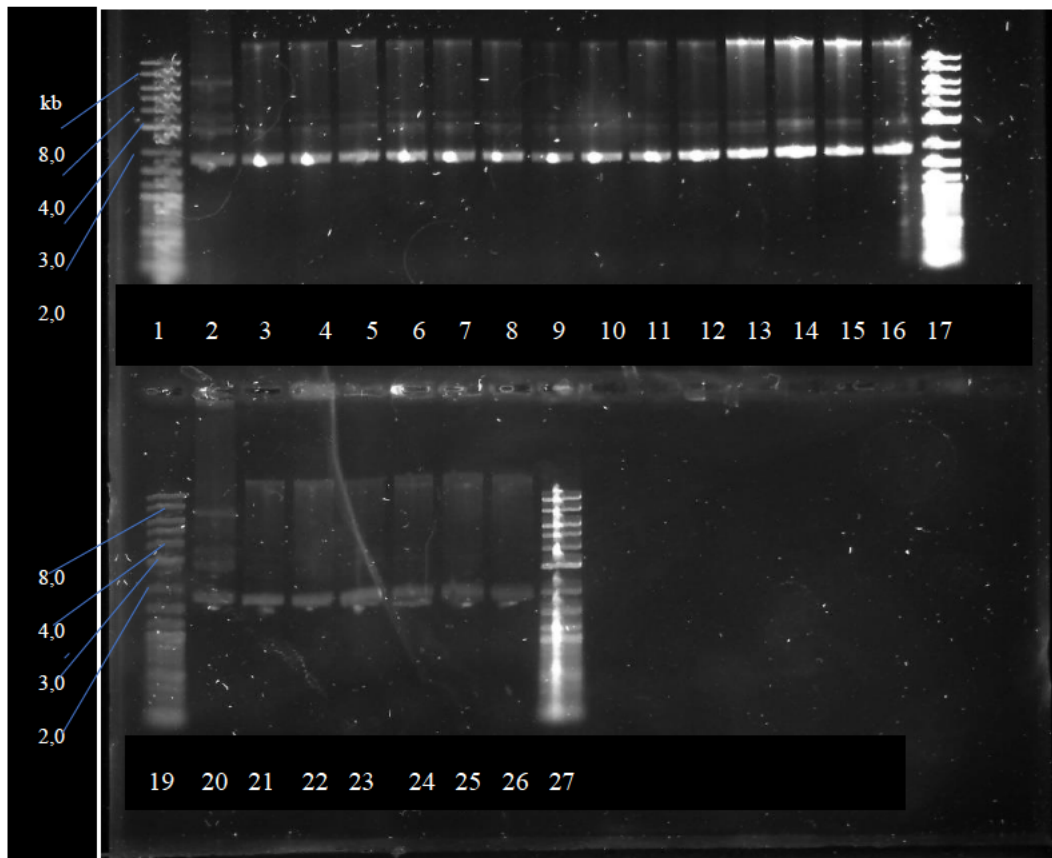


Abbildung 27: 1 % Agarosegel der einzelnen Klone von *E. coli* DH10 beta. Probenreihenfolge: 1. Größenstandard, 2. *pUC* 19 Standard, 3. *E. coli* DH10 beta (1.1) nach der ersten Elution, 4. *E. coli* DH10 beta (1.2) nach der ersten Elution, 5. *E. coli* DH10 beta (2.1) nach der ersten Elution, 6. *E. coli* DH10 beta (2.2) nach der ersten Elution, 7. *E. coli* DH10 beta (3.1) nach der ersten Elution, 8. *E. coli* DH10 beta (3.2) nach der ersten Elution, 9. *E. coli* DH10 beta (4.1) nach der ersten Elution, 10. *E. coli* DH10 beta (4.2) nach der ersten Elution, 11. *E. coli* DH10 beta (5.1) nach der ersten Elution, 12. *E. coli* DH10 beta (5.2) nach der ersten Elution, 13. *E. coli* DH10 beta (1.1) nach der zweiten Elution, 14. *E. coli* DH10 beta (1.2) nach der zweiten Elution, 15. *E. coli* DH10 beta (2.1) nach der zweiten Elution, 16. *E. coli* DH10 beta (2.2) nach der zweiten Elution, 17. Größenstandard, 19. Größenstandard, 20. *pUC* 19 Standard, 21. *E. coli* DH10 beta (3.1) nach der zweiten Elution, 22. *E. coli* DH10 beta (3.2) nach der zweiten Elution, 23. *E. coli* DH10 beta (4.1) nach der zweiten Elution, 24. *E. coli* DH10 beta (4.2) nach der zweiten Elution, 25. *E. coli* DH10 beta (5.1) nach der zweiten Elution, 26. *E. coli* DH10 beta (5.2) nach der zweiten Elution, 27. Größenstandard. Als Größenstandard wurde der Quick-Load® Purple – 1 kb Plus DNA Ladder verwendet.

Des Weiteren wurde ein Agarosegel mit allen Eluaten von *E. coli* DH10 beta durchgeführt, um auf die Isoformen der einzelnen Klone zu untersuchen. Bei allen Proben lag die stärkste Bande bei 2,0 kb. Dies ist die kovalent-geschlossen-zirkuläre monomere Form. Zwei schwächere Banden bei 3,0 kb und 3,2 kb waren bei den Proben zu erkennen. Dabei handelt es sich um die lineare Form (3,0 kb) und die offene-zirkuläre Form (3,2 kb). Beim *pUC* 19 Standard war auf der Höhe von 8,0 kb eine weitere Bande zu sehen, welche der offenen-zirkulären dimeren Form entspricht. Außerdem war bei den meisten Proben eine Bande zu erkennen, die über dem Bereich des Größenstandards liegt. Es könnten größere DNA-Moleküle, durch Verunreinigungen, in die Proben gekommen sein (Abbildung 27) [13].

5.6 Kultivierung von *E. coli* DH10 beta Klon 5 mit *pUC* 19 Plasmid im Bioreaktor BIOSTAT CTA und BIOSTAT CTB

Die Kultivierung wurde, wie in 4.3.2 beschrieben, durchgeführt. Die Biotrockenmassebestimmung, der PlasmidPrep mit anschließender Nanodrop-Messung und ein Agarosegel wurden ebenfalls ein Tag nach der Kultivierung durchgeführt.

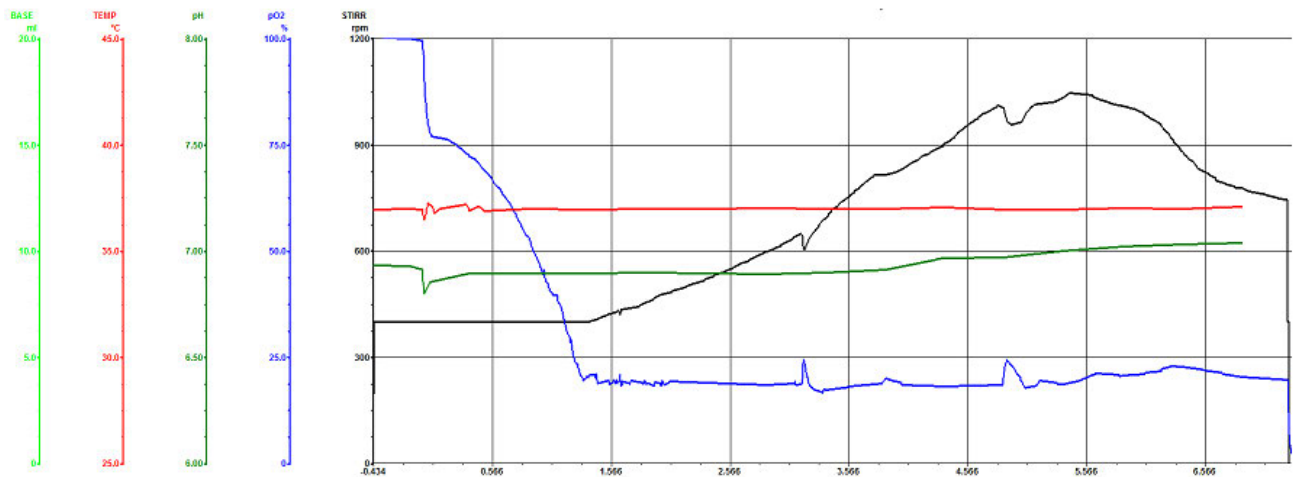


Abbildung 28: Batch-Kultur von *E. coli* DH10 beta (5) mit *pUC* 19 Plasmid im Glycerolmedium (2) mit Zusatz von Leucin im BIOSTAT CTB. Die Basenzugabe (hellgrün) in mL, die Temperatur (rot) in °C, der pH-Wert (dunkelgrün), die Gelöstsauerstoffkonzentration pO_2 (blau) in % und die Rührerdrehzahl (schwarz) in rpm werden gegen die Zeit in h aufgetragen.

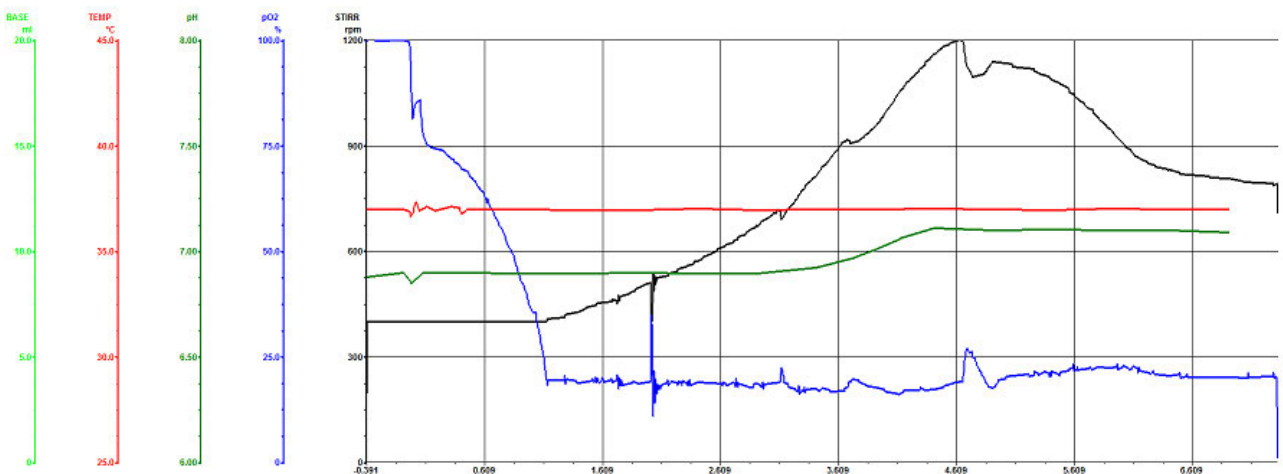


Abbildung 29: Batch-Kultur von *E. coli* DH10 beta (5) mit *pUC* 19 Plasmid im Glycerolmedium (2) mit Zusatz von Leucin im BIOSTAT CTA. Die Basenzugabe (hellgrün) in mL, die Temperatur (rot) in °C, der pH-Wert (dunkelgrün), die Gelöstsauerstoffkonzentration pO_2 (blau) in % und die Rührerdrehzahl (schwarz) in rpm werden gegen die Zeit in h aufgetragen.

Aus Abbildung 28 und Abbildung 29 wird der Kultivierungsverlauf von *E. coli* DH10 beta (5) im BIOSTAT CTA und BIOSTAT CTB ersichtlich. Die Temperatur wurde auf einen eingestellten Wert von 37 °C konstant gehalten. Die Basenzugabe ist nicht ersichtlich, da vor der Kultivierung mehr als 20 mL 1 M Natronlauge hinzugegeben wurde. Die Rührerdrehzahl blieb für 1,25 h (BIOSTAT CTB) und 1,00 h (BIOSTAT CTA) konstant auf den eingestellten Wert von 400 rpm. Danach stieg der Wert, in der exponentiellen Wachstumsphase bis auf eine Rührerdrehzahl von 1000 rpm (BIOSTAT CTB, nach 4,75 h) und von 1200 rpm (BIOSTAT CTA, 4,50 h). Danach nahm die Rührerdrehzahl wieder ab. Das Rühren beeinflusst den volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizient $k_L a$ -Wert, so dass der O₂-Transfer beeinflusst wird. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 M Natronlauge und 1 M Phosphorsäure zwischen 6,9 und 7,1 gehalten, da im neutralen Bereich die besten Bedingungen für die Kultivierung mit *E. coli* DH10 beta herrschen. Die Gelöstsauerstoffkonzentration sank eine Stunde nach dem Animpfen auf einen Wert von 20 % und wurde danach konstant gehalten.

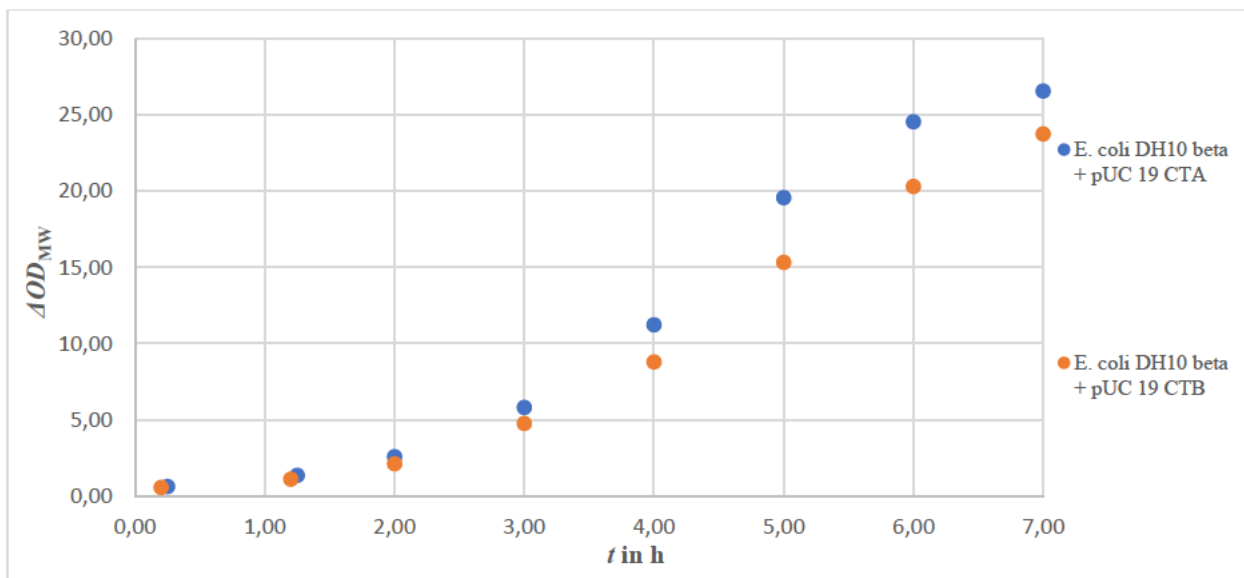


Abbildung 30: Kultivierung von *E. coli* DH10 beta (5) mit *pUC 19* Plasmid im Glycerolmedium (2) mit Zusatz von Aminosäuren im BIOSTAT CTA und BIOSTAT CTB. Es wird die ΔOD_{MW} gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Im BIOSTAT CTA lag der ΔOD -Wert nach 7 Stunden bei 26,57 und im BIOSTAT CTB bei 23,74.

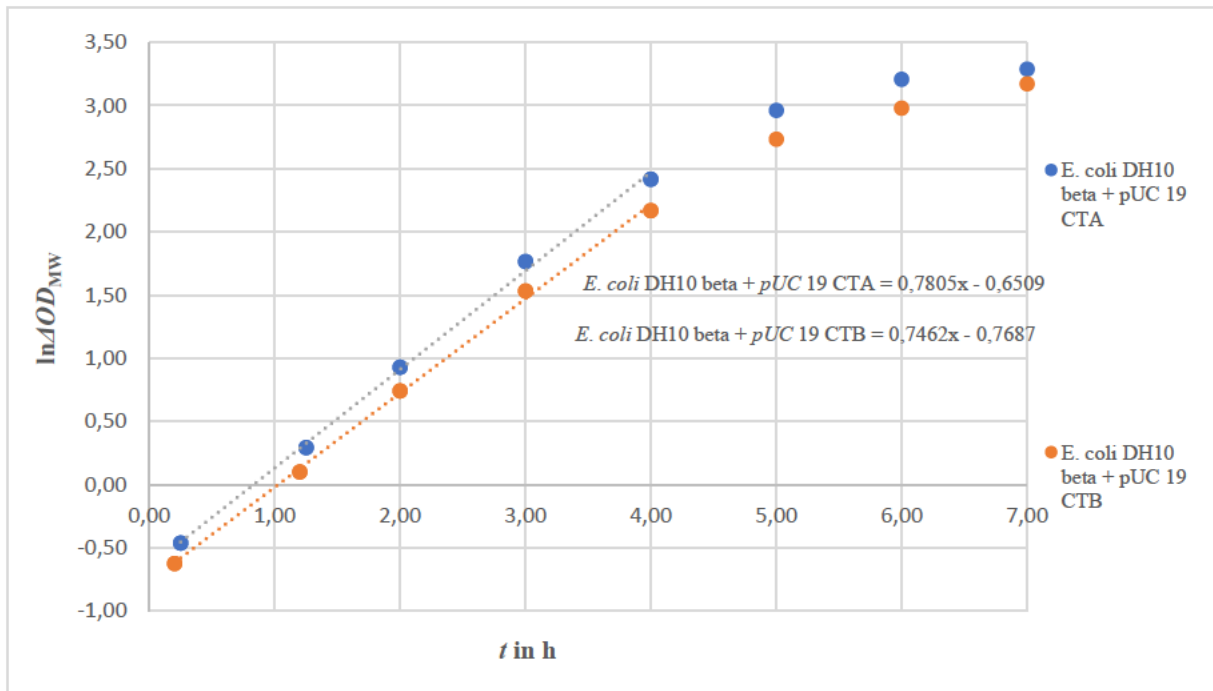


Abbildung 31: Bestimmung der Wachstumsrate μ_{\max} von *E. coli* DH10 beta (5) mit *pUC 19* Plasmid im Glycerolmedium (2) mit Zusatz von Aminosäuren im BIOSTAT CTA und CTB. Es wird die $\ln\Delta OD_{MW}$ gegen die Zeit aufgetragen. Zu dem Bakterium *E. coli* DH10 beta wurde Leucin hinzugegeben. Im BIOSTAT CTA wuchs der *E. coli* DH10 beta (5) mit einer Wachstumsrate von $0,78 \text{ h}^{-1}$ schneller als der BIOSTAT CTB, der $0,75 \text{ h}^{-1}$ schnell wuchs.

Die optische Dichte erreichte nach 7 Stunden im BIOSTAT CTA einen Wert von 26,57 und im BIOSTAT CTB einen von 23,74 (Abbildung 30). Aus Abbildung 31 wird ersichtlich, dass *E. coli* DH10 beta (5) im BIOSTAT CTA mit einer Wachstumsrate von $0,78 \text{ h}^{-1}$ leicht schneller wuchs als im BIOSTAT CTB, der $0,75 \text{ h}^{-1}$ schnell wuchs. Die Wachstumsrate war höher als im Schüttelkolben aus dem Versuch 5.5, die dort bei $0,54 \text{ h}^{-1}$ lag. Dies liegt daran, dass im Bioreaktor durch Zufuhr von Laugen und Säuren sowie durch den Sauerstoffeintrag mit dem Rührer, bessere Bedingungen herrschten als im Schüttelkolben. In den ersten 4 Stunden der Kultivierung wuchsen die Bakterien exponentiell und danach langsamer weiter. Dies wurde auch schon bei der Kultivierung im Schüttelkolben festgestellt. Als nächstes wurde die Biotrockenmasse bestimmt.

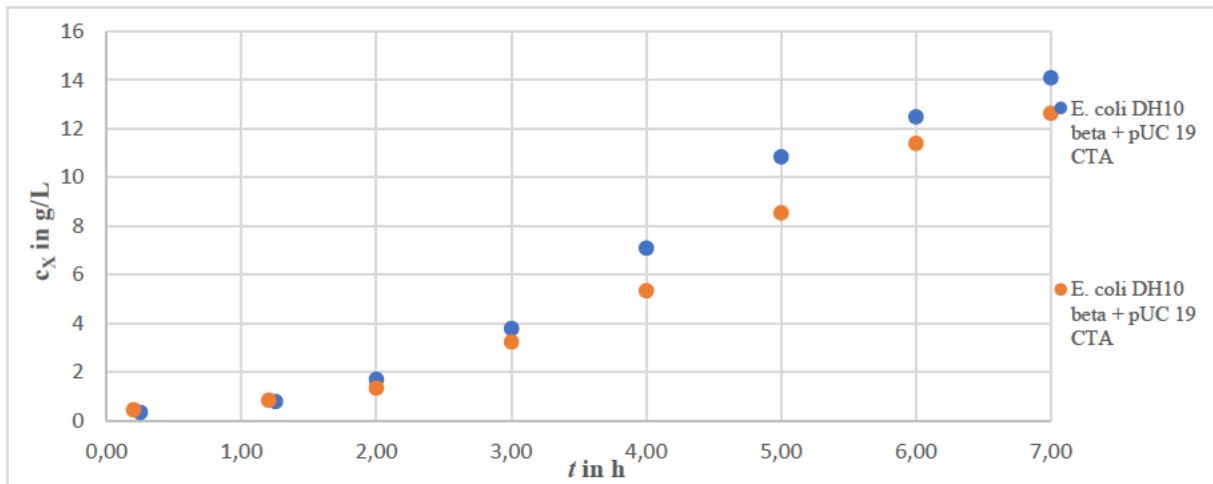


Abbildung 32: Biotrockenmassebestimmung c_X von *E. coli* DH10 beta (5) im BIostat CTA und BIostat CTB. Die Biotrockenmasse c_X ist gegen die Zeit aufgetragen. Nach 7 Stunden beträgt c_X im BIostat CTB 12,65 g/L und im BIostat CTA 14,10 g/L.

Die Biotrockenmassekonzentration verlief parallel zu der optischen Dichte. Vier Stunden wuchs diese exponentiell an. Danach wurde das Wachstum stündlich langsamer. Im BIostat CTA wurde eine Biotrockenmasse von 14,10 g/L und im BIostat CTB wurde eine von 12,65 g/L produziert (Abbildung 32). Damit wurde im BIostat CTA mehr Biotrockenmasse hergestellt. Dies stimmt auch mit dem Ergebnis der optischen Dichte überein.

Tabelle 23: Bestimmung der Plasmid Konzentration der verschiedenen Klone von *E. coli* DH10 beta mit dem Nanodrop. Die Konzentration c , das Volumen V und die Masse m der Proben sind in der Tabelle als Mittelwert einer Doppelbestimmung dargestellt. Die erste Elution beim PlasmidPrep ist mit E1 abgekürzt, die zweite Elution beim PlasmidPrep mit E2. Der erste Schritt im PlasmidPrep wurde mit einer ΔOD von 10 durchgeführt.

Probe	c_{MW} in ng/ μ L	V_{MW} in μ L	$m_{\Delta OD10}$ in ng	m_{MW} in ng
<i>E. coli</i> DH10 beta (5) CTA E1	62,73	26,0	1630,85	163,09
<i>E. coli</i> DH10 beta (5) CTB E1	74,78	25,0	1863,35	186,34
<i>E. coli</i> DH10 beta (5) CTA E2	24,28	27,0	662,85	66,29
<i>E. coli</i> DH10 beta (5) CTB E2	27,60	25,0	690,70	69,07

Die Gesamtmasse wurde mit Gleichung 7 berechnet.

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH10 beta (5) CTA} = 163,09 \text{ ng} + 66,29 \text{ ng} = 229,38 \text{ ng}$$

$$\text{Gesamtmasse } E. coli \text{ DH10 beta (5) CTB} = 186,34 \text{ ng} + 69,07 \text{ ng} = 255,41 \text{ ng}$$

$$\text{Abweichung zwischen CTA und CTB} = \frac{255,41 \text{ ng} - 229,38 \text{ ng}}{255,41 \text{ ng}} \cdot 100 = 10,19 \%$$

Die Plasmid Masse betrug bei der Kultivierung von *E. coli* DH10 beta (5) im BIOSTAT CTA 229,38 ng und im CTB 255,41 ng und wichen 10,19 % voneinander ab (Tabelle 23). Im Verhältnis, zu der Kultivierung im Schüttelkolben von *E. coli* DH10 beta (5), wurden deutlich geringere Plasmidkonzentrationen und Massen mit dem Nanodrop gemessen. Im Schüttelkolben wurde eine Plasmidmasse von 630,31 ng bestimmt. Diesmal wurde im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen, der PlasmidPrep erst am nächsten Tag durchgeführt. Dafür wurde 1,0 mL Probe pelletiert und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Wahrscheinlich ist es ein Grund dafür, dass bei der Kultivierung im Bioreaktor die Plasmidkonzentration deutlich geringer war als im Schüttelkolben, da durch die Lagerung im Kühlschrank Plasmid DNA zerstört wurde. Außerdem waren die Bakterienzellen bei der Kultivierung in dem Bioreaktor durch Zugabe von Lauge und Säure mehr Stress ausgesetzt. Dies führte dazu das weniger Plasmid hergestellt wird als bei der Kultivierung im Schüttelkolben.

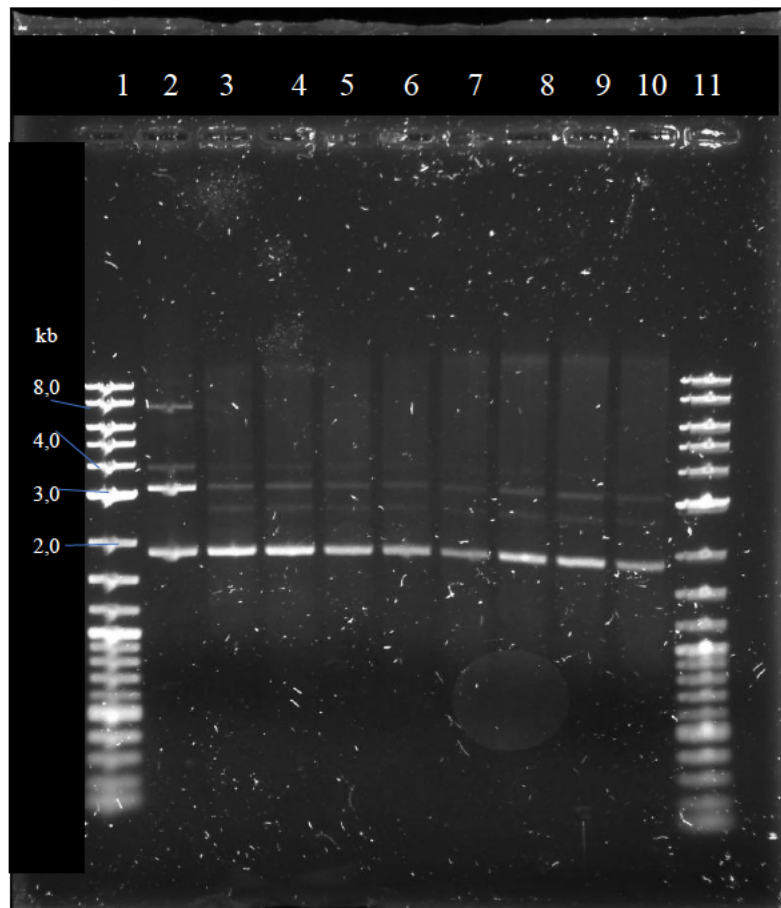


Abbildung 33: 1 % Agarosegel von *E. coli* DH10 beta aus der Kultivierung im Biostat CTA und CTB. Von jedem Bioreaktor wurde eine Doppelbestimmung beim PlasmidPrep durchgeführt. Probenreihenfolge: 1. Größenstandard, 2. *pUC* 19 Standard, 3. *E. coli* DH10 beta CTA (1) nach der ersten Elution, 4. *E. coli* DH10 beta CTA (2) nach der zweiten Elution, 5. *E. coli* DH10 beta CTB (1) nach der ersten Elution, 6. *E. coli* DH10 beta CTB (2) nach der ersten Elution, 7. *E. coli* DH10 beta CTA (1) nach der zweiten Elution, 8. *E. coli* DH10 beta CTA (2) nach der zweiten Elution, 9. *E. coli* DH10 beta CTB (1) nach der zweiten Elution, 10. *E. coli* DH10 beta CTB (2), 11. Größenstandard. Als Größenstandard wurde der Quick-Load® Purple – 1 kb Plus DNA Ladder verwendet.

Des Weiteren wurde ein Agarosegel mit allen Eluaten von *E. coli* DH10 beta durchgeführt, um auf die Isoformen des Klons zu untersuchen. Bei allen Proben lag die stärkste Bande bei 2,0 kb. Dies ist die kovalent-geschlossen-zirkuläre monomere Form. Zwei schwächere Banden bei 2,7 kb und 3,0 kb waren bei den Proben zu erkennen. Dabei handelt es sich um die lineare Form (2,7 kb) und die offene-zirkuläre Form (3,0 kb), die beim *pUC* 19 Standard stark zu erkennen ist. Beim *pUC* 19 Standard war bei 8,0 kb eine weitere Bande zu sehen, die der offenen-zirkulären dimeren Form entspricht. Bei 4,0 kb sieht man die kovalent-geschlossene dimere Form, die beim *pUC* 19 Standard leichter zu erkennen ist als bei den Proben. Außerdem war bei den meisten Proben eine Bande zu erkennen, die über dem Bereich des Größenstandards liegt. Es könnten größere DNA-Moleküle, durch Verunreinigungen in die Proben, gekommen sein. Mit dem Agarosegel konnte bestätigt werden, dass *pUC* 19 Plasmid bei der Kultivierung mit *E. coli* DH10 beta produziert und mit dem PlasmidPrep isoliert wird (Abbildung 33) ^[13].

6 Diskussion

Nach Optimierung der Transformation durch die Verwendung des neu bestellten *pUC 19* Plasmids, wurde diese erfolgreich durchgeführt (5.1.1 und 5.1.2). Die bestimmte Transformationseffizienz beträgt bei *E. coli* DH5 alpha bei $1,5 \cdot 10^7$ cfu/ μ g *pUC 19* DNA und bei *E. coli* DH10 beta bei $1,118 \cdot 10^6$ cfu/ μ g *pUC 19* DNA. Diese lagen deutlich unter dem vom Hersteller angegebenen Werten, die bei *E. coli* DH5 alpha bei $1 \cdot 10^{10}$ cfu/ μ g *pUC 19* DNA ^[33] und bei *E. coli* DH10 beta bei $2 \cdot 10^{10}$ cfu/ μ g *pUC 19* DNA liegen (5.1.2) ^[34]. Durch eine längere Inkubationszeit von 30 Minuten der *E. coli* Zellen mit dem *pUC 19* Plasmid könnte eine höhere Transformationseffizienz erreicht werden. Es wurden 10 ng *pUC 19* Plasmid für die Transformation verwendet. Die optimale Menge für gute Transformationseffizienzen, liegt zwischen 100 pg und 1 ng. Allerdings steigt die absolute Anzahl der erhaltenen Kolonien pro Transformationsreaktion, bei DNA-Mengen bis zu 100 ng weiter an ^[38]. Außerdem ist das Auszählen der Agarplatten eine fehleranfällige Methode.

Bei der Kultivierung von *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC 19* Plasmid im Schüttelkolben wurde das verwendete Medium optimiert. Zuerst wurde das LB-Medium (1) verwendet, mit dem die Stämme ohne *pUC 19* Plasmid auf eine höhere optische Dichte und mit einer schnelleren Wachstumsrate wuchsen als die mit Plasmid (5.2.1 und 5.2.2). Durch Zugabe von 8 g/L Glucose zum LB-Medium (1) und durch Verwendung einer anderen Charge zur Herstellung des LB-Medium (2) wuchsen die Stämme mit und ohne Plasmid mit einer ähnlichen Wachstumsrate. Trotzdem wuchsen die Kulturen nicht auf höhere optische Dichten an. Sie lagen maximal bei 3,2 (ohne Plasmid) und 1,7 (mit Plasmid). Außerdem stellte sich das exponentielle Wachstum nach drei Stunden ein (5.2.3). Da die Verwendung von LB-Medium (2) leicht bessere Ergebnisse gegeben hat, als mit dem LB-Medium (1) und Zusatz von 8 g/L Glucose, wurde entschieden mit dem LB-Medium (2) weiterzuarbeiten. Zu diesem Medium wurden dann die Aminosäuren Leucin (0,3 g/L), Arginin (0,1 g/L) und Thiamin (4,5 mg/L) hinzugegeben. Dies wurde gemacht, da *E. coli* DH5 alpha eine Auxotrophie auf Arginin und Thiamin und *E. coli* DH10 beta eine Auxotrophie auf Leucin hat. Durch eine Auxotrophie können die Bakterien diese essenziellen Substanzen nicht selbstständig synthetisieren und müssen zusätzlich hinzugegeben werden. Die Wachstumsraten erhöhte sich bis auf einen Wert von $1,00 \text{ h}^{-1}$ und die optischen Dichten bei den beiden Bakterien Stämmen kamen auf Werte von 3,56 (DH5 alpha), 3,28 (DH10 beta) ohne Plasmid und 2,34 (DH10 beta) mit Plasmid (5.2.4). Bei *E. coli* DH5 alpha mit Plasmid war jedoch die optische Dichte mit 0,92

geringer. Die Ergebnisse waren am erfolgreichsten, aber trotzdem wuchsen die Stämme nur für drei Stunden exponentiell und die optische Dichte war noch nicht hoch genug.

Deshalb wurde entschieden, mit einem glycerinhaltigem Medium (Glycerolmedium), mit Zusatz von Salzen und Spurenelementen die Kultivierung im Schüttelkolben durchzuführen. Weiterhin wurden die Aminosäuren hinzugegeben, da dadurch im LB-Medium die besten Bedingungen herrschten. In dem Glycerolmedium wurden für *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta mit und ohne *pUC* 19 Plasmid *OD*-Werte zwischen 12-14 erreicht. Die Wachstumsraten waren geringer als im LB-Medium und lagen zwischen $0,54 \text{ h}^{-1}$ und $0,66 \text{ h}^{-1}$ (5.3). Dies ist durch die geringere und langsamere Aufnahme von Glycerin als Kohlenstoffquelle für *E. coli* zu erklären ^[18].

Bei der Durchführung des PlasmidPreps wurde die Elution mit 30 μL zweimal durchgeführt. Im Nanodrop wurde bestimmt, dass bei der ersten Elution knapp 75 % des Plasmids und bei der zweiten Elution noch knapp 25 % Plasmid eluiert wird. Dadurch wurde bestätigt, dass es sinnvoll ist, um die Plasmidausbeute zu erhöhen, eine zweifache Elution durchzuführen (5.3.1). Die Varianz des PlasmidPreps wurde bestimmt und beträgt bei der ersten Elution 8,15 % (Masse) und 13,22 % (Konzentration). Bei der zweiten Elution beträgt die Varianz 14,56 % (Masse) und 16,82 % (Konzentration). Bei *E. coli* DH10 beta lag der Variationskoeffizient deutlich höher, mit knapp 30 %, welches daran lag, dass die PlasmidPreps nicht identisch durchgeführt wurden. Mit der Varianz von *E. coli* DH5 alpha wurde bei der Beurteilung, der Unterschiede zwischen den einzelnen Kolonien gerechnet. Die fünf Kolonien lagen bei der optischen Dichte, nach einer 24 Stunden Kultivierung im Schüttelkolben in einem Abstand von 14,42 % (5.4) und 8,50 % (5.5). Bei der Plasmidausbeute lagen vier der fünf Kolonien, in dem Bereich der bestimmten Varianz. Deshalb unterscheiden sich diese Kolonien nicht signifikant. Bei einer Kolonie wurde deutlich weniger Plasmid hergestellt, weshalb empfohlen wird, diese nicht weiter zu verwenden (5.4 und 5.5).

In einem 1 % Agarosegel wurde mit einem *pUC* 19 Standard bestätigt, dass es sich bei den isolierten Plasmiden um das *pUC* 19 Plasmid handelt. Im Agarosegel konnten die unterschiedlichen Isoformen dargestellt werden. Es konnten die kovalent-geschlossen-zirkuläre, offen-zirkuläre und lineare Form, in ihrer monomeren und dimeren Form, identifiziert werden (5.3.1). Die am häufigsten vorkommende Form nach der Isolation aus bakteriellen Zellen, ist die kovalent-geschlossen-zirkuläre Form. Diese hat eine kompakte Struktur, in welcher die doppelsträngige DNA um sich selbst gewunden ist. Dies wurde mit einer starken Bande im Agarosegel bestätigt (5.3.1). Im Agarosegel tauchte auch eine Bande über dem Größenstandard auf. Bei

dieser handelt es sich wahrscheinlich um Verunreinigungen mit anderen Nukleinsäuren, sodass beim PlasmidPrep die pDNA nicht komplett aufgereinigt wurde (5.5 und 5.6).

Bei der Kultivierung von *E. coli* DH10 beta mit *pUC* 19 Plasmid im Bioreaktor wurden nach 7 Stunden, optische Dichten von 23,74 (BIOSTAT CTB) und 26,57 (BIOSTAT CTA) mit dem Glycerolmedium (2) erreicht. Die Kultivierung wurde abgebrochen, da das Wachstum der Bakterien langsamer wurde. Die Biotrockenmasse verläuft wie erwartet parallel zur optischen Dichte. Es wurde 14,10 g/L (im BIOSTAT CTA) und 12,65 g/L (im BIOSTAT CTB) produziert. Die Plasmidmenge im Bioreaktor lag mit einer Masse von 255,41 ng deutlich unter dem Wert aus der Kultivierung im Schüttelkolben. Diesmal wurde im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen der PlasmidPrep erst am nächsten Tag durchgeführt. Dafür wurde 1,0 mL Probe pelletiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Wahrscheinlich ist es ein Grund dafür, dass bei der Kultivierung im Bioreaktor die Plasmidkonzentration deutlich geringer ist als im Schüttelkolben, da durch die Lagerung im Kühlschrank pDNA zerstört wurde. Außerdem sind die Bakterienzellen bei der Kultivierung in dem Bioreaktor, durch Zugabe von Lauge und Säure mehr Stress ausgesetzt. Dies führt dazu, dass weniger Plasmid hergestellt wird als bei der Kultivierung im Schüttelkolben.

7 Fazit und Ausblick

Die Kultivierung und pDNA-Herstellung vom *pUC 19* Plasmid mit den Bakterienstämmen *E. coli* DH5 alpha und *E. coli* DH10 beta wurde durch Medienoptimierung erfolgreich durchgeführt. Mit dem Glycerolmedium wuchsen die beiden Stämme nach 24 h bis zu *OD*-Werten von 15 im Schüttelkolben. Im Bioreaktor wurden *OD*-Werte von 23,74 (BIOSTAT CTB) und 26,57 (BIOSTAT CTA) sowie Biotrockenmassen von 14,10 g/L (im BIOSTAT CTA) und 12,65 g/L (im BIOSTAT CTB) erreicht. In Zukunft könnten die Plasmidausbeuten, die optischen Dichten und die Biotrockenmasse durch weitere Optimierung des Mediums erhöht werden. Es könnten höhere Hefeextrakt- und Glycerinkonzentration verwendet werden, damit die Bakterien mehr Substrat zum Verbrauchen haben. Diese Änderung könnte zuerst im Schüttelkolben und dann im Bioreaktor vorgenommen werden.

Im Bioreaktor könnte ebenfalls die Kultivierung mit dem Bakterium *E. coli* DH5 alpha unter gleichen Bedingungen, wie mit *E. coli* DH10 beta durchgeführt werden. Es könnte verglichen werden, mit welchem Stamm im Bioreaktor mehr *pUC 19* Plasmid produziert wird. Es könnten weitere Produktionsverfahren, wie die Fed-Batch-Kultivierung und die kontinuierliche Prozessführung, durchgeführt werden, um die Plasmidausbeute zu vergrößern. Die Produktion des *pUC 19* Plasmids dürfte auch in größeren Bioreaktoren mit einem Fassungsvermögen von bis zu 100 L stattfinden, wofür ein Scale-up gemacht werden müsste.

Außerdem könnte durch eine Aufreinigung mit der *High-performance liquid chromatography* (HPLC) mit einem Anion-Austauscher, die Plasmidkonzentration der einzelnen Isoformen quantifiziert werden. Dadurch könnte bestimmt werden, wie groß der prozentuale Anteil der einzelnen Isoformen im *pUC 19* Plasmid sind. Die kovalent-geschlossene Isoform könnte rein gewonnen werden, welche die effizienteste Isoform bei der Genexpression ist.

Abschließend ist zu erwähnen, dass die Medienoptimierung erfolgreich war, es jedoch weiterhin viele, in diesem Abschnitt erwähnte, Anhaltspunkte für weitere Forschung gibt.

8 Literaturverzeichnis

- [1] THIEMAN, William J.; PALLADINO, Michael A.; (2007); „Biotechnologie“, 1. Auflage, Pearson Studium
- [2] SCHMIDT, Rolf D.;(2016), “Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik”, 3. Auflage, Wiley-VCH
- [3] VOß, Carsten; (2008), „Aufarbeitung von Plasmid-DNA für Gentherapie und genetische Impfung“, Chemie Ingenieur Technik 80, No.6
- [4] GHAFARIFAR, F.; (2018), „Plasmid DNA vaccines: where are we now?“, Drugs of today, 54(5):315-333
- [5] FUNNELL, B., and PHILLIPS, G. (2004). “Preface,” in Plasmid Biology, eds B. Funnell and G. Phillips (Washington, DC: ASM Press), xi.
- [6] ULLRICH, Oliver; (2013), „Molekularbiologie“, Vorlesung für Molekularbiologie HAW Hamburg
- [7] E. M. F. Mota; (2012). “Validation of an analytical method using an anion-exchange monolithic column for the assessment of supercoiled plasmid DNA”, Master degree dissertation, University of Beira Interior Sciences,
- [8] SCHUHMANN, W; (1990), „Biologie bakterieller Plasmide“, 1. Auflage, Vieweg-Verlag.
- [9] STREITNER, Nadine; (2008), „Extraktion pharmazeutisch einsetzbarer Plasmid-DNA und Integration in einen skalierbaren Aufarbeitungsprozess“, Dissertation an der technischen Fakultät der Universität Bielefeld
- [10] BORJA, Gheorghe M; MORA, Eugenio Meza; BARRON, Blanca; GOSSET, Guillermo; RAMIREZ, Octavio T; LARA, Alvaro R; (2012), „Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode“, Microbial Cell Factories
- [11] A. Abdulrahman, A. Ghanem. “Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccines: A review”, Elsevier, 0003-2670, 2018
- [12] MAUKSCH, Christof; (2008), “Untersuchungen zum nichtviralen Gentransfer mittels integrierender und extrachromosomal-replikationskompetenter Plasmid-DNA in hämatopoetische Zellen “Dissertation an der Freien Universität Berlin
- [13] SCHLEEF, Martin; (2001), „Plasmids for Therapy and Vaccination“, 1.Auflage, Wiley-VCH
- [14] LIN-CHAO, Sue; CHEN, Wen-Tsuan; WONG, Ten-Tsao; (1992), „High copy number of the *pUC* plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II“, Mol Microbiol
- [15] JUERS, Douglas H.; MATTHEWS, Brian W.; HUBER, Reuben E; (2012), „LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance“, Protein Sci.
- [16] RICHTER, Gerhard; (2003), „Praktische Biochemie – Grundlagen und Techniken“, 1. Auflage, Gregor Thieme Verlag

- [17] KAISER, Christian; (2022), „Fermentations- und Bioreaktortechnik“, Vorlesung für Fermentations- und Bioreaktortechnik HAW Hamburg
- [18] JEUDE, Markus; (2007), „Entwicklung und Anwendung einer Fed-batch-Betriebsweise mit Nährstofffreisetzungssystemen zur kontrollierten Kultivierung und zum Screening von Mikroorganismen in Schüttelreaktoren“, Dissertation an der Technischen Hochschule Aachen
- [19] SCHELLENBERG, Jana; (2023), „Implementierung einer kontinuierlichen Prozessführung zur Produktivitätssteigerung bei der Kultivierung tierischer Zellen“, Dissertation an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm-Leibniz-Universität Hannover
- [20] SCHUEGERL, Karl; (1997), „Bioreaktionstechnik: Bioprozesse mit Mikroorganismen und Zellen“, 1. Auflage, Springer Basel AG
- [21] PUSKEILER, Robert; WEUSTER-BOTZ, Dirk; (2004), „Rührkesselreaktoren im mL-Maßstab: Kultivierung von *Escherichia Coli*“, Chemie Ingenieur Technik 76, No.12, Wiley-VCH
- [22] KORZ, D.J.; RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SANDERS, E. A.; DECKWER, W.-D.; (1995), „Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*, *Journal of Biotechnology*, Volume 39, Issue 1
- [23] SCHIFFEL, Florian; (2018), „Herstellung elektrokompetenter *E. coli* (kleine Mengen)“, ROP_LP02; Version: 02, Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg
- [24] SCHIFFEL, Florian; (2018), „Transformation von *E. coli*“, ROP_LP02; Version: 02, Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg
- [25] SCHIFFEL, Florian; (2018), „Mikrobielle Dauerkultur“. ROP_LP01; Version: 02, Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg
- [26] KAISER, Christian; (2022), „Versuch Bioreaktortechnik“, Fermentations- und Bioreaktortechnik Praktikum; Version 4.19; Labor für Bioverfahrenstechnik HAW Hamburg
- [27] SANDERS, Ernst A.; (2013), „Bestimmung der Optischen Dichte bei 600 nm“, SOP 320101; Version: 04, Labor für Bioverfahrenstechnik HAW Hamburg
- [28] SANDERS, Ernst A.; (2013), „Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration in Mikroreaktionsgefäßen“, SOP 320001; Version 03, Labor für Bioverfahrenstechnik HAW Hamburg
- [29] NEW ENGLAND BIOLABS^{inc.}; (2020), „Monarch[®] Plasmid Miniprep Kit“, Version 3.1 <https://www.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manual1010.pdf?rev=5bc17659c6df4f9cbb585e6d6973180d&hash=926E0752DD30125061D3419C486176A6> (Letzter Aufruf: 13.01.2023 um 13:09 Uhr)
- [30] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., (2016), „Nano Drop 2000/2000c Spektralphotometer“, Version 1.0, Kurzanleitung zu dem Gerät
- [31] LEE, Yun Pei; COSTUMBRADO, John; HSU, Chih-Yuan; KIM, Young Hoon; (2012), „Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments“, *Journal of visualized experiments*
- [32] SCHIFFEL, Florian; (2018), „Agarosegelelektrophorese“, ROP_LP07; Version: 02, Labor für Angewandte Mikrobiologie HAW Hamburg

- [33] NEW ENGLAND BIOLABS_{inc.} ;(2023), „NEB[®] 5-alpha Electrocompetent *E. coli*“, <https://international.neb.com/products/c2989-neb-5-alpha-electrocompetent-e-coli#Product%20Information> (Letzter Aufruf: 13.01.2023 um 12:56 Uhr)
- [34] NEW ENGLAND BIOLABS_{inc.} ;(2023), „NEB[®] 10-beta Electrocompetent *E. coli*“, <https://international.neb.com/products/c3020-neb-10-beta-electrocompetent-e-coli#Product%20Information> (Letzter Aufruf: 13.01.2023 um 13:02 Uhr)
- [35] CARNES, Aaron E.; HODGSON, Clague P.; WILLIAMS, James A., (2006), „Inducible *Escherichia Coli* fermentation for increased plasmid DNA production“, *Biotechnol. Appl. Biochem.*
- [36] SALEM-BEKHIT, Mounir M.; BAYOMI, Mohsen; AL-ANAZI, Fares; RADAWAN, Hashem, (2013), „Yield Production of Recombinant Plasmid DNA with *Escherichia Coli* in Fed-Batch Culture by Pseudo-Exponential Feeding“, *Biotechnol. & Biotechnol.*
- [37] VOß, Carsten; SCHMIDT, Torsten; SCHLEEF, Martin; FRIEHS, Karl; FLASCHEL, Erwin, (2003), „Production of supercoiled multimeric plasmid DNA for biopharmaceutical application“, *Journal of Biotechnology* 105
- [38] NEW ENGLAND BIOLABS_{inc.} ;(2023), „Tipps für effiziente Transformation“, <https://www.neb-online.de/kompetente-zellen/tipps-fuer-effiziente-transformationen/> (Letzter Aufruf: 01.02.2023 um 13:35 Uhr)

Bilderverzeichnis:

- [1] https://blog.addgene.org/hs-fs/hub/306096/file-404153303-png/Plasmid_Map.png?width=384&name=Plasmid_Map.png (Abruf: 24.01.2023 um 11:22 Uhr)
- [2] <https://www.researchgate.net/profile/George-Dickson/publication/47698259/figure/fig1/AS:394179378204676@1470991095667/Fig-1-Plasmid-DNA-exists-in-different-forms.png> (Abruf 24.01.2023 um 23:10 Uhr)
- [3] <https://thebiologynotes.com/puc19-vector-structure-sites-applications/> (Abruf: 21.12.2022 um 11:35 Uhr)
- [4] <https://biologyreader.com/wp-content/uploads/2021/07/diagram-of-fed-batch-culture.jpg> (Abruf: 30.01.2023 um 13:25 Uhr)