Grundpraktikum Genetik

Versuchsprotokolle © Josef Riedl 10/2003

1	UV-Schäden und DNA-Reparatur	S. 2
2	Konjugation, Plasmide, Chemotaxis	S. 4
3	P1-Transduktion	S. 6
4	Ames-Test	S. 8
5	Mutantenselektion	S. 10
6	Regulationsmutanten, Plasmide, cis-trans-Test	S. 12
7	Plasmid-Transformation	S. 14
8	λ -Technologie	
8a	Gewinnung von λ -Phagen, Konfluente Lyse	S. 16
8b	Restriktion und Modifikation	S. 18
8c	Phagenkreuzung	S. 20
8d	Cross-Streaking, Typen von λ -Phagen	S. 22

Endgültige Version vom 31/10/2003

Vielen Dank an Dr. W. Mages für etliche Anmerkungen und genaue Korrektur.

UV-Schäden und DNA-Reparatur

1

Sinn des Experiments

UV-Strahlung führt in DNA-Molekülen zur Dimerisierung von Pyrimidinen, v.a. zu T-Dimeren. Diese führen ohne Reparatur zu Replikations- und Transkriptionsproblemen und damit zu irreversiblen Schäden und zum Zelltod. Die Zelle besitzt daher eine Reihe von Systemen, um UV-Schäden zu beheben.

Photo Repair: direkte Spaltung von T-Dimeren (lichtabhängig), Gen *phr*; aber relativ schnell überlastet

Excision Repair: universelles Reparatursystem (Nuclease, Pol I, Ligase) für Schäden aller Art (lichtunabhängig); Gene *uvr*

SOS Repair: durch ssDNA induzierbares Reparatursystem bei sehr starker Schädigung, aber fehleranfällig und für Mutationen verantwortlich; Gene *lex*, *uvr*, *sfi*, *umuC* u.a.

Im Versuch soll ermittelt werden, wie sich verschiedene UV-Bestrahlungsdosen auf die Überlebensrate von Bakterien auswirken. Dabei wird auch untersucht, wie die Reparatursysteme den Effekt von UV-Strahlung beeinflussen, indem Photo Repair (durch An- und Abwesenheit von Licht) und Excision Repair (durch Mutation) einzeln ausgeschaltet werden.

Eingesetzte Bakterien

***Escherichia coli* K12 AB1157**

uvr+, *phr+* Reparatursysteme wie beim Wildtyp

***Escherichia coli* K12 AB1886**

phr+ Photo Repair intakt

uvr- Excision Repair defekt

Arbeitsschritt	Bedeutung
<p>Vorbereitung der Bakterienstämme (nicht im Kurs) Anzucht in Vollmedium Verdünnung auf ca. 3×10^8 Bakterien/ml Ernte durch Zentrifugation Suspension in Saline</p> <p><i>Der Versuch ab hier wird gruppenweise getrennt mit beiden Stämmen parallel durchgeführt.</i></p> <p>Kontrollprobe Entnahme von 0,5 ml aus der Original-Suspension in Saline. Keine Bestrahlung.</p> <p>Raumlicht aus, nur noch Gelblicht.</p>	<p>Gewinnung der Bakterienstämme Entfernen des Vollmediums; Saline erlaubt das Überleben, aber kein Wachstum, das die Ergebnisse verfälschen könnte.</p> <p>Diese Probe liefert später die genaue Ausgangszellzahl vor Bestrahlung.</p> <p>Einige Proben sollen später unter Ausschaltung des Photo Repair untersucht werden. Alle Zellen werden deshalb vorerst von Weißlicht ferngehalten.</p>

UV-Bestrahlungsproben

Der Rest der Suspension wird zusammen mit einem Rührer in eine Petrischale gegeben. Schrittweise wird mit UV-Licht bestrahlt und nach jeder Bestrahlung zweimal 0,5 ml entnommen und in Reagenzgläser gegeben.

Belichtung

Die eine Hälfte der gewonnenen Proben wird für 2h belichtet, die andere Hälfte im Dunkeln aufbewahrt (beide bei 37°C).

Man erhält Proben von Zellen, die mit unterschiedlichen UV-Dosen bestrahlt wurden (zwei Proben pro UV-Dosis und pro Stamm). - Die *uvr*-Mutanten (AB 1886) sind anfälliger und werden deshalb mit geringeren UV-Dosen und damit insgesamt weniger bestrahlt.

Die Zellen im Licht können einen Teil der Schäden durch Photo Repair beheben. Den Zellen im Dunkeln bleibt nur der Excision Repair (falls nicht mutiert).

Verdünnung und Plattierung

Von allen Proben (inkl. Kontrollprobe) werden verschiedene Verdünnungsstufen angelegt.

Es wird auf Vollmedium plattiert und bei 37°C im Dunkeln inkubiert.

Die Überlebensrate muß durch Auszählen von Kolonien in einer entsprechenden Verdünnung bestimmt werden. Gutes Auswachsen von Kolonien wird sichergestellt, nachträglicher Photo Repair ist immer noch ausgeschlossen.

Auswertung

Geeignete Platten werden ausgezählt und die Zellzahl in der jeweiligen Probe ausgerechnet. Teilen durch den Wert der Kontrollprobe ergibt die Überlebensrate.

Auftragung von Überlebensrate gegen Bestrahlungsdosis (J/m^2) und $\log(\text{Überlebensrate})$ gegen Dosis.

Man erhält insgesamt 20 „Meßwerte“ für die Überlebensrate: von beiden Stämmen jeweils mit/ohne Licht und jeweils vier verschiedene UV-Dosen plus Kontrollprobe.

Man erhält vier Graphen: für beide Stämme jeweils mit/ohne Licht.

Ergebnis

Die vier Graphen entsprechen dem Verhalten der vier möglichen Kombinationen der beiden Reparatursysteme. Folgende Meßwerte wurden erhalten:

Photo Rep.	Exc. Rep.	0	40	80	120	160	J/m^2
+	+	100	84	29	18	11	%
-	+	100	68	33	11	2	%
Photo Rep.	Exc. Rep.	0	3	6	9	12	J/m^2
+	-	100	97	68	19	14	%
-	-	100	7	1,6	0,4	0,2	%

Das heißt: Die Überlebensrate der *uvr*-Mutante fällt schon bei wenig Strahlung sehr stark ab im Vergleich zum Stamm mit intaktem Excision Repair. Der Ausfall des Photo Repair im Dunkeln läßt die Kurve zwar jeweils stärker abfallen, der Beitrag ist jedoch vergleichsweise gering. Der Photo Repair ist also eher ein zusätzlicher Schutz, während Fehler im Excision Repair dramatische Folgen haben. - Die Kurve des WT in linearer Auftragung ist sigmoid; sie fällt zu Beginn, solange Photo Repair funktioniert, nur schwach, dann recht stark, erreicht aber nie 0% (nicht alle Bakterien werden von der Strahlung erfaßt).

Konjugation und Chemotaxis

2

Sinn des Experiments

Für ein normales Chemotaxis-Verhalten (Reaktion auf Lockstoffgradienten, korrekte Steuerung, intakter Geißelapparat) benötigt ein Bakterium eine Reihe von Genen (v.A. *che*- und *mot*-Gene). Defekte in diesen Genen führen zu unterschiedlichen Mängeln im Bewegungsverhalten. Verschiedene derartige Mutanten von *Sinorhizobium meliloti* werden in diesem Versuch mikroskopisch und makroskopisch (Schwärmplatten) untersucht. Nimmt ein Bakterium mit Gendefekt ein DNA-Fragment mit intaktem Gen auf, besteht die Möglichkeit der Komplementation. Bei *S. meliloti* kann ein solcher Gentransfer nicht durch Transformation mit freier DNA erfolgen. Eine Aufnahme von Plasmiden von einem *E. coli*-Donorstamm über Konjugation ist aber möglich. Diese Methode wird im Experiment verwendet, um einen immotilen *S. meliloti*-Stamm zu komplementieren.

Eingesetzte Bakterien

<i>Escherichia coli</i> S-17	mit zwei Plasmiden; bildet Sex-Pili aus
<i>recA</i>	defektes Rekombinationssystem, verhindert Plasmid-Einbau ins Genom
<i>hsdR</i>	defektes Restriktionsenzym, erleichtert Aufnahme von Fremd-DNA
<i>SmR</i>	Streptomycin-Resistenz, toleriert aber nur geringe Dosis
<i>thi</i>	Thiamin-Biosynthesedefekt
<i>RP4-2</i>	chromosom-integriertes Plasmid
<i>tra</i>	erkennt <i>mob</i> -Region, unterstützt Übertrag des pRU-Plasmids
<i>pRU1902</i>	Vektor-Plasmid mit den zu übertragenden Genen
<i>GmR</i>	Gramicidin-Resistenz für Selektion
<i>NmR</i>	Neomycin-Resistenz für Selektion
<i>motB,C</i>	<i>S. meliloti</i> -Motorproteine
<i>mob</i>	Genregion für Plasmidübertrag
<i>rep</i>	Replikationsbereich mit broad host range; Replikation des Plasmids in unterschiedlichen Rezipienten-Bakterien möglich
<i>Sinorhizobium meliloti</i> RU11/513	und andere Stämme (siehe unten)
Δ <i>motBC</i>	Deletion der Motorproteine
<i>SmR</i>	Streptomycin-Resistenz auch für höhere Dosen

Arbeitsschritt

Bedeutung

Kreuzung

Mischen von *E. coli*- und *S. meliloti* RU11/513-Zellen in einem Reagenzglas (Verhältnis 1:8), leichtes Schütteln;
Auftragen von 0.1 ml auf einen Rundfilter auf einer TYC-Platte

Inkubation bei 30°C

Zusammenheftung von Donor- und Rezipientenzellen; Konjugation zwischen den beiden Bakterienarten;
Übertragung des pRU-Plasmids mit intaktem *mot*-Gen auf den *mot*-mutierten *Sinorhizobium*-Stamm

Optimaltemperatur für *Sinorhizobium*

Isolation der Exkonjuganten

Abnehmen der Rundfilter, Abspülen der Bakterien mit 1 ml TYC; Verdünnungsreihe bis auf 10E-5; Plattierung auf TYC/Neomycin/Streptomycin

Ziel ist die Isolation einzelner Exkonjuganten (bzw. Kolonien). Nm tötet Rezipienten, die kein Plasmid aufgenommen haben; Sm tötet *E. coli* (hohe Dosis).

Inkubation bei 30°, drei Tage	Auswachsen von Kolonien, langsames Wachstum als bei <i>E. coli</i>
Von einer geeigneten Platte mit Einzelkolonien: Picken von vier Kolonien und jeweils Reinigungsausstrich Plattierung wie oben Inkubation bei 30°, drei Tage	Nochmalige Reinigung, um Einzelkolonien zu erhalten. - Reinigungsausstrich: Punktförmiges Auftragen der Bakterien, schrittweise Verdünnung durch stufenartiges Verstreichen mit Glaspipetten
Schwärmtest Picken von nochmals vereinzelt Kolonien von den vier Ausstrichen; Auftragen auf Schwärmplatten; ebenso Auftragen von Wildtyp und fünf anderen Stämmen Inkubation bei 30°, drei Tage	Entspricht vier (verschiedenen) Proben aus den im 1. Schritt erhaltenen Exkonjuganten. Schwärmplatten: weicher Agar erlaubt Bewegung der Bakterien; Motiv ist der stoffwechselbedingte Nährstoffgradient.
Ausmessen der Durchmesser der entstandenen Schwärme	Maß für Beweglichkeit der einzelnen Stämme.

Meßwerte und Kommentare

Stamm	Mutation	mm Ø	Erklärung
11/001	WT	25,2	Wildtyp, bestes (intaktes) Bewegungsverhalten
Kreuzung	Δ motBC, motBC	15,7	Fehlen der Mot-Gene wird durch Plasmid-codierte Gene kompensiert; deutlich motil
11/514	Δ motBC, motBC	14,3	Kontrollstamm, entspricht der Kreuzung
11/310	Δ cheA	11,1	Kinase fehlt, nur Läufe, kein Taumeln, aber durch Agar-Netzwerk behindert
11/112	Tn::motC	5,8	\ jeweils Motorprotein C defekt; jiggly (un-
11/213	Fusion motB-motC	4,7	/ kontr. Bewegung, ausgefranter Ring
11/513	Δ motBC	4,3	Fehlen zweier Motorproteine, komplett immotil (kleinster Ring, stark begrenzt)

Ergebnis

Die Kreuzung war erfolgreich. Der immotile Stamm wird durch die korrekten Gene auf dem eingeschleusten Plasmid in seiner Beweglichkeit wiederhergestellt. Die anderen Mutanten zeigen deutliche Unterschiede im Phänotyp, wie es der jeweilige Genotyp erwarten läßt.

Anmerkungen

Komplementation: Die Exkonjuganten sollten im Grunde dem WT entsprechen, bleiben aber deutlich unter dessen Wert, wie auch 11/514. Ein Grund dafür ist die unpassende zeitliche und mengenmäßige Synchronisation der Genproduktion, da die eingeschleusten Gene jetzt vom Plasmid-eigenen Neomycin-Promotor und nicht im Zusammenhang mit dem *Sinorhizobium*-Operon exprimiert werden.

Aussagekraft: Der hier durchgeführte Test kann nur als halbquantitativ gelten. Für exakte Labortests müssen besser reproduzierbare Bedingungen gefunden werden.

Notizen

P1-Transduktion

3

Sinn des Experiments

Der Bakteriophage P1 ist ein allgemein transduzierender Phage. Er kann im Prinzip jeden Abschnitt des Wirtschromosoms bis zu einer Länge von 1,8 min transduzieren. Gene, die weiter als 1,8 min auseinanderliegen, können nicht zusammen transduziert werden. Für kleinere Abstände steigt die Cotransduktionsrate, je enger die betrachteten Gene benachbart sind. Mit diesem Prinzip können Genkarten hoher Auflösung erstellt werden.

Im Versuch wird ein Bakterienstamm mit intakten Genen mit P1 infiziert. Ein kleiner Teil der Phagen nimmt bei der anschließenden Vermehrung bakterielle DNA auf. Die Phagen werden isoliert und zur Infektion eines Stammes mit drei Mutationen benutzt. Dieser Stamm wird in einigen Fällen durch übertragene DNA komplementiert, und zwar in einer oder mehreren der drei Defekte. Diese Komplementationereignisse werden getrennt voneinander untersucht. Man erhält damit Aufschluß über die grundsätzliche Erfolgsrate der Transduktion, aber auch über die Kotransduktionsraten und damit die Genabstände.

Eingesetzte Bakterien

***Escherichia coli* KL16** prototroph, entspricht hier dem Wildtyp
wird als Donor und als Indikatorbakterium für Phagen-Plattierung verwendet

***Escherichia coli* L146** wird als Rezipient verwendet

metB Methionin-Auxotrophie; wächst nicht ohne Methionin-Zugabe

mtIA Mannitol-Katabolismus defekt; wächst nicht bei Mannitol als einziger C-Quelle

xylI Xylose-Katabolismus defekt; wächst nicht bei Xylose als einziger C-Quelle

Arbeitsschritt	Bedeutung
<p>Vorbereitung 1:5-Verdünnung von 1 ml einer KL16-Kultur mit LB-Medium</p> <p>Infektion Mischen von 2,5 ml Weichagar, 0,1 ml P1-Lysat, 0,25 ml der Bakterienverdünnung; rasches Ausgießen auf vorgewärmte LB-Platten; Abkühlen der Platten bei Raumt.</p> <p>Inkubation 3-6 h, 37°C</p>	<p>Einstellen des korrekten Bakterien-Titers</p> <p>Infektion (m.o.i. ca. 0,25) der Donorbakterien mit P1; nach der Lyse enthält ein Teil der gebildeten Phagen bakterielle DNA. Weichagar wird verwendet, damit Phagen/Bakterien leichter diffundieren können. Kurze Brutzeit verhindert Resistenzbildung der Bakterien.</p>
<p>Überschichten der Platten mit 3 ml LB, Stehenlassen im Kühlschrank (über Nacht)</p>	<p>Extraktion der Phagen aus dem festgewordenen Agar ins Flüssigmedium</p>
<p>Gewinnung des Lysats Abpipettieren der Flüssigkeit von beiden Platten in ein Zentrifugenglas; Zentrifugation, Entnahme des Überstands; Zugabe von 0,5 ml Chloroform</p> <p>Bestimmung des Phagentiters Verdünnung des Lysats bis 1E-9 mit LB Plattierung mit KL16-Suspension und Weichagar; Inkubation bei 37°C</p>	<p>Entfernen von Zell- und Agarresten aus dem Lysat; Abtöten evtl. noch vorhandener Donor-Bakterien durch CHCl₃</p> <p>Verdünnung und Plattierung, um Plaques zählen zu können. KL16 dient hier nur als Indikator.</p>
<p>Auszählen geeigneter Platten</p>	<p>Bestimmung der Phagen-Gesamtmenge</p>

Erneute Infektion - Transduktion

Drei Ansätze mit je 0,8 ml L146-Suspension und 0,4 ml Lysat (unverdünnt) bzw. 0,4 ml Lysat (1:10 in LB) bzw. 0,4 ml LB

20 min bei 37°

Zugabe von 5 ml P1-Saline, Zentrifugation; Aufnehmen des Pellets in 0,5 ml Saline

Plattierung von 0,1 ml auf MM-Platten mit

- a) Thi, His, Arg, Met + Mannitol
- b) Thi, His, Arg, Met + Xylose
- c) Thi, His, Arg, Glucose, ohne Met

Plattieren von 0,1 ml Lysat und 0,1 ml des verwendeten LB auf LB-Platten

Inkubation bei 37°C

Hier werden die Rezipienten-Bakterien mit den Phagen (die z.T. Donor-DNA transportieren) - in verschiedener Konzentration - zusammengebracht. Der Ansatz mit LB dient als Kontrolle. Infektion bei 37°.

Die P1-Saline enthält Citrat, das Ca⁺⁺ bindet und weitere Phagenadsorption blockiert.

Es wachsen nur Bakterien, die

- a) das intakte mtl-Gen
- b) das intakte xyl-Gen
- c) das intakte met-Gen

durch die P1-Transduktion erhalten haben.

(Lysat und LB werden nur auf Sterilität geprüft.)

Eine Verdünnung ist nicht erforderlich, da die entspr. Transduktionsereignisse ohnehin selten sind.

Auszählen geeigneter Platten.

Test auf Kotransduktion - 2. Selektion

Von den erfolgreichen Platten werden zufällig 100 Kolonien ausgewählt und mit dem Zahnstocher auf zwei andere Platten übertragen, und zwar auf solche, die jeweils einen der beiden noch nicht betrachteten Marker selektieren.

Inkubation bei 37°C

Die Platten mit reinem Lysat bzw. LB sollten leer sein (außer Kontamination).

Die Platten mit nur L146-Suspension und LB (ohne Phagen) sollten ebenfalls leer sein (nur spontane Revertanten). Weiteres siehe unten.

Wurde einer Zelle nur einer der Marker a,b,c (s.o.) übertragen, so ist diese auf den beiden neuen Platten nicht mehr lebensfähig. Nur Bakterien, die außer dem Marker der ersten Platte noch ein weiteres intaktes Gen über den P1-Phagen erhalten haben, können auch hier überleben. Man erhält daraus die jeweilige Wahrscheinlichkeit, daß „Y“ übertragen wird unter der Voraussetzung, daß X übertragen wurde“ (Kotransduktionsrate).

Auszählen der angewachsenen Kolonien.

Ergebnis

Aus den gesammelten Werten lassen sich verschiedene Ergebnisse ableiten.

Transduktionsrate: Man berechnet das Verhältnis aus den ganz zu Beginn eingesetzten Phagen und den Transduktionsereignissen für einen bestimmten Marker. Zunächst wird angenommen, daß jeder Phage ein Donorbakterium infiziert (100%). Nur 1/1000 der Phagen nimmt aber dort Wirts-DNA auf (0,1%). Da jeder solche Phage aber nur 90 kbp, also 2% des Wirtsgenoms aufnimmt, ist ein bestimmtes Gen X nur in 1/50 der transduzierenden bzw. in 1/50000 aller Phagen enthalten. Wenn nun (*) in ca. 10% der Fälle eine Infektion des Rezipienten und Einbau des transportierten Gens durch Rekombination erfolgt, erhält man eine Transduktion von X bei 1/500 000 aller Phagen; die Transduktionsrate muß ca. 2E-6 betragen. Der letzte Wert (*) hängt dabei von der m.o.i. ab. Bei einer m.o.i. ≤ 1 ist die TD-Rate der m.o.i. direkt proportional. Bei m.o.i. = 1 ergibt sich theoretisch der optimale Wert. Ist die m.o.i. höher, treten Mehrfachinfektionen auf, die zur Lyse des Rezipienten führen und damit die TD-Rate wieder absenken.

Im Versuch wurden zwei Ansätze mit verschiedener m.o.i. (Lysat 1:1 und 1:10), die jeweils aus Bakterientiter (gegeben) und Phagentiter (bestimmt) berechnet werden muß, durchgeführt. Für beide wird nun die Transduktionsrate ermittelt

Kotransduktion: Im letzten Schritt wurden erhalten: Kotransduktion von mtl+met 0/100, von mtl+xyl 13/100. Die Marker mtl und met liegen also mehr als 90 kb auseinander. Für den zweiten Fall kann man nach der Formel $d = 2 (1 - \sqrt[3]{\text{Kotransduktionsrate}})$ den Genabstand in Minuten mit $d = 0,99$ min angeben. (Theoretischer Wert ca. 0,73 min).

Anmerkungen

Die Kartierung nach der hier verwendeten Methode ist (es müssen ja analoge Experimente für viele bekannte Marker durchgeführt werden) wird heute durch die Gensequenzierung in Durchführbarkeit, Genauigkeit und Vollständigkeit weit übertroffen.

Ames-Test

4

Sinn des Experiments

Der Ames-Test ist eine Methode, um Substanzen auf ihre mutagene Wirkung zu testen (und damit langwierige Tierversuche zu ersetzen). Dabei werden mutierte Bakterien eingesetzt, die His-auxotroph sind und außerdem weitere Mutationen tragen, die speziell im Ames-Test von Nutzen sind. Solche Bakterien werden nun zusammen mit der Testsubstanz auf eine Platte ohne His gebracht. Nur Mutanten können also überleben. Die Mutanten-Anzahl wird für verschiedene Konzentrationen der Substanz sowie für eine Blindprobe (ohne Substanz, nur Spontanmutationen) ermittelt. Man erhält eine Dosis-Effekt-Kurve: für kleine Substanzmengen erhält man hohe Mutationsraten, für hohe Dosen überwiegt jedoch der toxische Effekt der Substanz und man erhält nur geringe Zellzahlen.

Eingesetzte Bakterien

***Salmonella typhimurium*, WT / TA98 / TA100**

rfa Zellwanddefekt, höhere Durchlässigkeit für Substanzen

bla+ Ampicillin-Resistenz

muc+ Gene des *E. coli*-SOS-Repairs, führt zu mehr Fehlern/Mutationen

$\Delta(uvrB-bio)$ Deletion im Excision-Repair, verhindert Reversions-unabh. Reparatur

his- His-Auxotrophie, durch Rasterverschiebung (Stamm TA98) oder Basensubstitution (Stamm TA100)

Arbeitsschritt

Bedeutung

Markertest

Plattieren der drei Bakterienstämme auf verschiedene Platten (unverdünnt)

a) auf Vollmedium, alle drei Stämme als Linien kreuzgestrichen zu einer Linie Penicillin/Ampicillin

b) auf McConkey-Platten (mit u.a. Kristallviolett)

c) auf Vollmedium-Platten mit anschließender UV-Bestrahlung für 0, 5, 15 Sekunden

Die drei ersten Mutationen bzw. Marker sollen zunächst überprüft werden.

WT sollte am Kreuzungspunkt nicht wachsen, TA98 und TA100 sollten resistent sein.

Kristallviolett (Zellgift) dringt nur in TA98 und TA100 ein (*rfa*); WT überlebt.

TA98 / TA100 sind deutlich empfindlicher gegen UV-Strahlung, das Wachstum ist deutlich schlechter als beim WT, während auf der Kontrollplatte (0 s) alle Stämme gleich gut wachsen können.

Auftragen der Probe

Eine Mischung aus 0,1 ml Bakterien und 0,1 ml Testsubstanz (in versch. Konz.) wird mit 3 ml Weichagar auf einer Platte ohne His ausplattiert. (Bei UV: Bestrahlen in untersch. Dauer).

Erstes Zusammenbringen der Bakterien mit der Substanz. Es erfolgt nun ggf. die Mutagenisierung und eine bestimmte Anzahl Bakterien wird wieder His-prototroph.

Spot-Test (nicht für UV)

Auf eine wie oben hergestellte Platte ohne Testsubstanz wird in der Mitte ein kleiner Rundfilter (1 cm) mit etwas Testsubstanz aufgebracht.

Inkubation aller Platten bei 37°.

Es entsteht durch Diffusion ein radialer Konzentrationsgradient (entspricht einer „räumlichen Verdünnungsreihe“ der Testsubstanz).

Auswertung

Überprüfen der Resultate des Marker-Tests

Zählen der gewachsenen Kolonien auf den Test-Platten.

Zeichnen einer Dosis-Effekt-Kurve (Zahl der Mutanten gegen Dosis/Menge der Testsubstanz)

siehe oben

Jede Kolonie entspricht einer revertierten Mutante, die wieder His-prototroph und damit auf der Platte lebensfähig ist.

Ergebnis

Man erkennt einen Bereich niedriger Dosis und hoher Überlebensrate (durch mutagenen Effekt) und einen Bereich hoher Dosis und niedriger Überlebensrate (durch toxische Wirkung auch auf die Revertanten). Die wenigen Kolonien in der Probe ohne Substanz/Bestrahlung entsprechen den spontanen Reversionsmutationen. Dasselbe Ergebnis erkennt man auch bei der Spot-Test-Platte (von innen nach außen entspricht sinkender Konzentration).

Anmerkungen

His auf His-freien Platten: Eine Spur His wird auch hier zugegeben, damit alle Bakterien zunächst überleben können (manche Rückmutationen benötigen erst einige Generationen, um sich zu manifestieren.)

Unterschied TA98 / TA100: UV verursacht Rasterverschiebungen (über T-Dimere), Streptozotocin Punktmutationen (über Methylierung). Da dies die Rückmutation ergeben soll, wird für UV eine Rasterversch.-Mutante (TA98), für Stz aber eine Punkt-Mutante (TA100) eingesetzt.

Mikrokolonien: Manchmal findet man auf der Testplatte sehr kleine Kolonien. Diese stammen von Bakterien, die außer der Reversion weitere Mutationen z.B. in Stoffwechselgenen erhalten haben und deshalb zwar überleben, aber langsam wachsen.

Der Ames-Test ist aktuelle Laboranwendung. Das Problem, daß Substanzen nicht in der unmittelbaren, sondern ggf. in einer vom Körper modifizierten Form wirksam werden, wird bei professionellen Tests dadurch gelöst, daß zu den Proben zusätzlich Leberenzyme gegeben werden, die die Modifikation auch *in vitro* simulieren sollen.

Notizen

Mutantenselektion

5

Sinn des Experiments

In vielen Bereichen werden bestimmte Bakterien-Mutanten benötigt. Ein Weg, solche zu erhalten, ist die (zufällige) Mutagenisierung mit UV-Strahlung oder MNNG. Anschließend müssen aber die gesuchten Mutanten isoliert werden. Im Fall einer Antibiotika-Resistenz ist das leicht durch direkte Selektion mit dem Antibiotikum möglich. Im Fall einer Auxotrophie, z.B. His(-), muß indirekte Selektion angewendet werden. Dabei werden die Kolonien einer Platte, die u.a. die Mutanten enthält, auf eine Platte mit His und eine Platte ohne His gestempelt (Replikaplattierung). Die Mutanten fehlen auf der His-freien Platte und können dann auf der anderen Platte identifiziert und von dieser isoliert werden. Im Kurs wird dieses Verfahren für His-Auxotrophie durchgeführt.

Eingesetzte Bakterien

E. coli K12 KO121; *rpsL* (Streptomycin-Resistenz) - mit MNNG mutagenisiert

Arbeitsschritt

Bedeutung

Photometrische Messung der Extinktion (OD) bei 650 nm, bis OD=0,15

Messung der Wachstumskurve, bis exponentielles Wachstum abläuft. (Minimalmedium ohne His - Nur WT kann wachsen, die gesuchte Mutante nicht.)

Zugabe von Penicillin

Penicillin (stört Zellwandbiosynthese, aber nicht bestehende Zellwände) tötet nur die exponentiell wachsenden WT-Zellen, aber nicht die ruhenden His- Zellen.

Weitere Messung der Extinktion, bis OD=0,03

Der Zelltiter nimmt ab, da WT-Zellen mit schadhafter Zellwand absterben.

Zentrifugation

Isolieren der überlebenden Zellen (His-Mutante und einige WT-Zellen).

Zugabe von 5 ml Wasser, Zentrifugation

WT-Zellen, die noch ohne ihre Zellwand überlebt haben, werden durch mechanische und osmotische Belastung getötet.

Suspension in insg. 10 ml Vollmedium
Inkubation (37°) über Nacht

Da letztendlich selektiv WT-Zellen durch das Verfahren getötet werden, sollte der relative Anteil der Mutanten nun erhöht sein. Um die absolute Zellzahl zu erhöhen, werden die Überlebenden in Vollmedium gezogen.

Verdünnung,
Messung der OD und Berechnung der Zellzahl,
Verdünnungsreihe,
Plattierung auf Minimalmedium mit His und Streptomycin.

Es sollen Platten mit ca. 100-300 Einzelkolonien für die Stempelung erhalten werden.
His-Mutanten sollen überleben.
Str dient zur Abwehr von zufällig anwesenden anderen Bakterien (Kontaminationen).

Inkubation bei 37°	Auswachsen von Kolonien
Auswahl von Platten mit gut sichtbaren Einzelkolonien; Stempeln je eines Abdrucks auf eine MM-Platte mit / ohne His. Inkubation bei 37°.	Bildung von Kolonien auf den gestempelten Platten. His-Mutantenkolonien fehlen aber auf der Platte ohne His.
Vergleich der beiden Platten und Auszählen	Die Kolonien, die nur auf der Platte mit His gewachsen sind, sind His-Mutanten. Durch das Auszählen wird die Ausbeute an His-Mutanten ermittelt.

Ergebnis

Es wurde eine Ausbeute von ca. 20% erhalten. Einige Gruppen arbeiten mit einem Stamm, der nicht mit MNNG vorbehandelt wurde; die Ausbeute ist dort wesentlich kleiner (ca. 2%, nur spontane Mutanten).

Anmerkungen

In der Regel wird dieses Verfahren so nicht ausschließlich angewendet, um bestimmte Mutanten zu erhalten. Es gibt bessere Methoden, um gezielt bestimmte Mutanten zu erzeugen. Falls doch mit dieser Methode gearbeitet wird, werden nachträglich Kontrollen (z.B. Sequenzierung) durchgeführt, um sicherzustellen, daß die isolierte Mutante keine anderen Mutationen erhalten hat.

Notizen

Regulationsmutanten, cis-trans-Test

6

Sinn des Experiments

Genexpression wird in Zellen durch verschiedenste Mechanismen gesteuert. Dabei spielen cis-Elemente (dem regulierten Gen direkt benachbarte Sequenzen, z.B. Promotoren oder Protein-Bindestellen) und trans-Elemente (diffundierbare Produkte und ihre entspr. Gene, z.B. DNA-bindende Aktivatoren und Inhibitoren) eine Rolle.

Die Gene für den Lactose-Abbau in *E. coli* sind auf dem Chromosom zu einem Operon zusammengefaßt, das neben drei Strukturgenen auch regulatorische Gene und Sequenzen enthält. Auch hier findet man cis-agierende (Promotor, Operator) und trans-agierende Komponenten (Inhibitor). Defekte in jedem dieser Gene führen zu Mutanten mit fehlerhaftem Lactose-Katabolismus (Lac-) oder fehlerhafter Operon-Regulation (Lac-, Lac^c). Diese Mutanten unterscheiden sich aber, je nach betroffenem Gen, hinsichtlich des Lac-Phänotyps (Lac +/-c), hinsichtlich des Auftretens bestimmter Enzyme (β -Galactosidase als leicht nachweisbares Genprodukt von lacZ) und auch hinsichtlich des Verhaltens gegenüber Komplementation (Funktionen defekter trans-Elemente können in einer partiell diploiden Zelle, die zusätzlich das intakte Gen enthält, von diesem übernommen werden; nicht bei cis). Im Versuch werden vier verschiedene Stämme unbekanntem Genotyps und ihre Nachkommen (nach Konjugation) betrachtet. Anhand der jeweiligen Beobachtungen soll insgesamt auf den Eltern-Genotyp zurückgeschlossen werden.

Eingesetzte Bakterien

***E. coli* DS675 (Donor 1)**

his, trp (auxotroph), *rpsL*, $\Delta(lac)$ (bakt. Operon), *F'lac* (F-Plasmid mit Lac-Operon)

***E. coli* CSH36 (Donor 2)**

$\Delta(lac)$ (bakt. Operon), *F'lac* (F-Plasmid mit Lac-Operon)

***E. coli* L17 (Rezipient 1)**

rpsL (Str-Resistenz), *lac*, F-

***E. coli* S146 (Rezipient 2)**

rpsL (Str-Resistenz), *lac*, F-

Arbeitsschritt

Bedeutung

Kreuzung

Ausstreichen von Bakteriensuspensionen D1, D2, R1, R2 (Kontrollen) und D1+R1, D1+R2, D2+R1, D2+R2 (hierbei Auftragen des zweiten Striches auf dem ersten).
Platte: Minimalmedium+Lac+Str.

Inkubation: zwei Tage bei 37°C.

Der Genübertrag erfolgt durch Konjugation. Die Platte führt zur selektiven Anzucht der Exkonjuganten (Selektion gegen D1 wegen His/Trp-Mangel, gegen D2 wegen Str, gegen R1 u. R2 wegen Lac-Phänotyp und Lac als einzigem Zucker).

Reinigung der neuen Stämme

Überprüfen des Wachstums auf den angesetzten Platten.

Entnahme einer Probe von jedem der Exkonjuganten-Striche durch Berühren mit einem Zahnstocher

Die Elternstämme sollten nicht oder nur sehr gering wachsen (s.o).

Aufnahmen von Exkonjuganten, aber auch spurenweise Elternstamm-Bakterien.

Ausstreichen auf einer McConkey-Platte mit Lac und Str nach einer speziellen Vereinzlungstechnik (z.B. m.H. weiterer Zahnstocher).

Inkubation bei 37°C.

Platte: Vollmedium mit Wachstums-hemmern und einem pH-Indikator. Exkonjuganten können (nach erfolgr. Komplementation) Lac verstoffwechseln und bilden Säuren durch Gärung, was zu Rotfärbung der Kolonien führt. R1 u. R2 wachsen auf Aminosäuren und bilden keine Säuren: weiße Kolonien.

Auswählen von roten Einzelkolonien; damit Wiederholen des Vereinzlungsausstrichs auf MC-Lac-Str-Platten.

Inkubation bei 37°C

Die roten Kolonien sollen bereits aus Exkonjuganten bestehen. Der Schritt kann für Exkonj.-Stämme entfallen, bei denen bereits rote Einzelkolonien zweifelsfrei zugeordnet werden können.

Probenvorbereitung

Ausstreichen von allen acht Stämmen (Exkonj. aus Vereinzlung, Eltern aus urspr. Suspension) auf MC-Glc
Inkubation bei 37°C

Das Lac-Operon wird durch Glucose heruntergefahren. Alle Zellen sollen, von den vorigen Ausstrichen unabhängig, auf diese Bedingungen gebracht werden.

Übertragen der acht Stämme jeweils einmal auf eine TB-Platte und eine MC-Lactose-Platte. (Großzügige Striche).
Inkubation bei 37°C

Getrennte Betrachtung von Lac-Operon-induzierenden Bedingungen (MC-Lac) und nicht-induz. Bedingungen (TB-Vollmedium ohne Zucker) wird ermöglicht.

Probenentnahme und Enzymtest

Abkratzen der 16 Bakterienkulturen, Überführen in Reagenzgläser mit 1ml Phosphatpuffer und etwas Toluol.
Inkubation, 5 min bei 37°C.
Zugabe von β -ONPG, weitere Inkubation.

Toluol öffnet die Zellwände. Eventuell vorhandene β -Gal reagiert mit dem chromogenen Substrat β -ONPG und bildet Nitrophenol (gelb).

Ergebnisse

Im Laufe des Versuches wurde insgesamt eine Reihe von Daten für jeden der Eltern- und Exkonjugantenstämme gesammelt:

a) Lac-Phänotyp, indirekt in der Rotfärbung auf der MC-Lac-Platte feststellbar: Lac+ bei allen Stämmen außer R1, R2.

b) Expression einer funktionsfähigen β -Galactosidase. Dieser Befund ergibt sich aus einer Gelbfärbung im letzten Schritt. Bei Ausbleiben oder Schwäche der Gelbfärbung kann nicht festgestellt werden, ob der Fehler in der Regulation oder im lacZ-Gen selbst liegt.

c) Abhängigkeit der β -Galactosidase-Aktivität von induzierenden Bedingungen. Falls auch in der Probe aus nicht-induzierenden Bedingungen eine Aktivität gemessen wird, deutet dies auf eine Fehlregulation hin.

d) Zusatzinformation (gegeben): R1 bildet intakte Permease. Bei R1 $\times$ D1 ist Permease induzierbar.

Manche dieser Befunde liefern einen direkten und sicheren Hinweis auf intakte/defekte Gene. Andere lassen sich nur in Kombination, v.a. unter Betrachtung der komplementierten Exkonjuganten, deuten. Eine genaue Ergebnistabelle und Diskussion mit Lösungsvorschlag siehe gesonderten Anhang.

Plasmid-Transformation

7

Sinn des Experiments

Es gibt verschiedene Wege, gezielt DNA in Bakterien einzuschleusen. Man benutzt dabei Mechanismen, die auch in der Natur vorkommen und bei denen DNA von Zellen aufgenommen wird. Dazu gehören Phagentransduktion und Konjugation. Allerdings kann man eine Zelle auch „zwingen“, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Zellen werden zunächst kompetent gemacht und nehmen dann (allerdings nicht quantitativ) DNA in Form von Plasmiden auf.

Plasmide sind eigenständige DNA-Elemente und werden auch unabhängig repliziert. Dabei kommt es auch vor, daß viele Plasmide pro Zelle gebildet werden. Ein derart funktionierendes Plasmid kann nun im Labor als Vektor benutzt werden, d.h. ein bestimmtes Gensegment wird an einer bestimmten Stelle im Plasmid eingesetzt und mit diesem in Bakterienzellen vermehrt.

Die Effizienz dieses Verfahrens und das Verhalten von beladenen Vektor-Plasmiden werden in diesem Versuch untersucht.

Eingesetzte Bakterien

E. coli DH10B

galU, galK

$\Delta(msr,hsdRM,mcrBC)$

$\Delta lacX74$

rpsL

verkürzte Lipid-Polysacch. wegen fehlender Gal; „undichter“

Deletion der Restriktionssysteme, toleranter gegen Fremd-DNA

Deletion im Lac-Operon, insbesondere keine β -Galactosidase

Streptomycin-Resistenz

Arbeitsschritt

Kompetenzbehandlung (nicht im Kurs)

mit Calciumchlorid

höhere Aufnahmebereitschaft für DNA

Titerbestimmung

Plattierung verschiedener Verdünnungen der Rezeptorzellen von $10E-7$ bis $10E-9$

Für die Bestimmung des Anteils an Zellen, die bei der Transformation DNA aufnehmen, benötigt man die genaue Gesamtzellzahl.

DNA-Verdünnung

Eine Probe DNA (pUCBM20-Plasmid) wird in einer Reihe bis auf $10E-4$ verdünnt.

Man will auch die Abhängigkeit der Transformationsrate von der zugegebenen DNA untersuchen. - Das pUCBM20-Plasmid ist ein unbeladener pUC-Vektor (2.7 kB) mit u.a. einer Amp-Resistenz, die es ermöglicht, Zellen zu selektieren, die das Plasmid tatsächlich aufgenommen haben.

Transformation

Man gibt jeweils zusammen: 200 μ l kompetente Zellen (s.o.) und 10 μ l DNA-Probe (Verdünnungen bzw. Blindprobe mit Ca-Chlorid).

10 min auf Eis

1 min bei $42^{\circ}C$

5 min auf Eis

Die besondere Prozedur erhöht die DNA-Aufnahme in die Zellen (Ca^{2+} neutralisiert DNA-Ladungen, Hitze erhöht Fluidität).

Danach: Ansetzen verschiedener Verdünnungsstufen für alle Transformations-Ansätze

Plattieren auf Vollmedium-Platten mit Amp

Blau-Weiß-Screening

Die oben angegeben Prozedur wird mit einer weiteren DNA-Probe durchgeführt, einem 1:1-Gemisch aus pUCBM20 und pVcNR1. Plattierung auf Vollmedium mit Amp und X-Gal.

Inkubation aller Platten bei 37°C.

Höhere Verdünnungen werden bei hoher DNA-Menge benötigt (hohe Anzahl an Transformanten erwartet).

Selektion auf Transformanten

pVcNR1 ist ein beladener Vektor (10,8 kb; enthält ebenfalls Amp-Resistenz). Erklärungen siehe unten. Es werden sich blaue und weiße Bakterienkolonien bilden.

Transformanten (mit Plasmid-codierter Amp-Resistenz) bilden Kolonien.

Auswertung

Auszählen geeigneter Platten.
Berechnung der Titer für die Transformationsansätze mit verschiedenen DNA-Mengen.

Doppelt-logarithmische Auftragung Transformationsrate gegen DNA-Menge.
Blau-Weiß-Screening: Auszählen des Verhältnis von blauen/weißen Kolonien.

Vermeiden eines stark gestreckten Diagramms (Größenordnung der Werte stark unterschiedlich).

Ergebnis

Man erkennt eine lineare Abhängigkeit der Transformationsrate von der eingesetzten DNA-Menge (bei immer steigenden Mengen würde man selbstverständlich ein Plateau erreichen). Die max. Transformationsrate liegt im Bereich von $2E-4$.

Blau-Weiß-Screening:

Das pUCBM20-Plasmid trägt das Gen für das Enzym β -Galactosidase (in den Zellen defekt, s.o.). Das Insert von pVcNR1 liegt in diesem Gen und verhindert die Bildung einer funktionsfähigen β -Gal. Transformanten, die eines der beiden Plasmide aufgenommen haben, unterscheiden sich also im Vorhandensein der β -Gal. Dies wird makroskopisch sichtbar gemacht durch Wachstum auf Platten mit X-Gal, einem Molekül, das durch intakte β -Gal in einen blauen Farbstoff verwandelt wird. Die entspr. Kolonien werden blau. Bakterien, die das pVc-Plasmid aufgenommen haben, bleiben weiß.

Man erhält ein Verhältnis blau:weiß von etwa 10:6. Das bedeutet, daß das pUC-Plasmid ohne Insert besser aufgenommen wird. Der Grund liegt im Größenunterschied (2,7 bzw. 10,8 kb).

Anmerkungen

Die Größe wird in der Praxis zum limitierenden Faktor. Bei Plasmiden ab ca. 20 kbp versagt die normale Transformation. Es bleibt die Möglichkeit der Elektroporation; derart kompetent gemachte Zellen können größere Plasmide aufnehmen. Außerdem können ggf. Phagen als transduzierende Vehikel eingesetzt werden, die längere DNA-Fragmente transportieren können.

Gewinnung von λ -Phagen

8a

Sinn des Experiments

Analog zum Ausstreichen von Bakterien benötigt man eine Methode, um Phagen klonal zu vermehren. Das ist in flüssigen Medien möglich, aber schwierig; auf Platten kann man eine konfluente Lyse durchführen. Dabei wird ein einzelner Phagen-Plaques ausgestochen und zusammen mit einer „Indikator“-Bakterien-Suspension in Weichagar ausplattiert. Durch Vermehrung und Ausbreitung der Phagen und jeweils Lyse der befallenen Bakterien erhält man nach Inkubation einen einzigen, die Platte ausfüllenden Plaques („konfluente Lyse“).

Diese Weichagar-Schicht (Lysat aus Bakterien und Phagen) kann man nun abnehmen, verschiedene Verdünnungen anlegen und plattieren und auf einer geeigneten Platte die Plaques-Zahl bestimmen. Daraus folgt der Titer des Lysats.

Eingesetzte Bakterien

***E. coli* M2701**

lam⁻ ohne Lambda-Phage

lam^{-s} sensitiv (normal) gegenüber Lambda-Infektion

Arbeitsschritt

Bedeutung

Vorbehandlung der Indikatorbakterien (nicht im Kurs)

Anzucht in MB-Medium (mit MgSO₄ und Maltose) bis zur exponentiellen Phase (OD-Bestimmung)

Aufbewahrung in TB

Mg⁺⁺ ist für die Anheftung von Phagen erforderlich. Die Anwesenheit von Maltose regt die Bildung der LamB-Maltose-Pore an, die vom Phagen benutzt wird.

Gewinnung der Phagen

Aus einer gegebenen Platte mit Plaques wird steril ein Plaques herausgestanzt (Pasteurpipette) und in ein Reagenzglas mit 0.3 ml TM ausgeblasen.

Zugabe von 1 Tropfen Chloroform

Mischen

Entmischen

Entspricht dem Abnehmen einer Einzelkolonie, man entnimmt einen Klon von Phagen.

Abtöten der Bakterien, die sich noch im Plaques befanden. (Phagen werden nicht beschädigt.)

Chloroform setzt sich von der Phagen-Suspension ab.

Abmessen von 4 ml sloppy agar, 45°C

Zugabe von 0.1 ml Indikatorbakterien

Sollen einen Rasen bilden, in dem die Plaques erkennbar sein werden.

Zugabe von 0.1 ml Phagensuspension

ohne Chloroform-Phase

Schnelles Ausgießen auf eine TB-Platte

Auf der Platte befinden sich jetzt Indikatorbakt. und Phagen (m.o.i. ca. 0.1)

Inkubation 5-6 h

Konfluente Lyse.

<p>Zugabe von 4 ml Medium auf die Platte</p> <p>Abkratzen der Weichagar-Schicht in ein Reagenzglas, Zugabe von Chloroform, Zentrifugation</p> <p>Abnehmen des Überstands (*), Zugabe von Chloroform</p> <p>Verdünnungsreihe und Ausplattieren von je 2.5 ml Weichagar, 0.1 ml Indikatorbakterien und 0.1 ml der entspr. Verdünnung Inkubation, 37°</p>	<p>Ermöglicht höhere Ausbeute.</p> <p>Gewinnung des Lysats, Abtöten von Bakterien, Trennung des fl. Lysats von Weichagar und Bakterien</p> <p>Der Überstand entspricht dem Lysat (*): Phagen und evtl. tote Zellen.</p> <p>Durch das Verdünnen wird sichergestellt, daß mind. eine Platte etwa 200-300 Plaques enthalten wird.</p>
<p>Auszählen</p>	<p>Diese Platte wird für die Berechnung des Phagen-Titers im Lysat (*) verwendet.</p>

Ergebnis

Als „Endprodukt“ erhält man das reine Lysat (*), im Prinzip eine Suspension klonierter Phagen, und den zugehörigen Titer (Phagen/ml). Über den Titer kann man außerdem die „Ausbeute“ bei der konfluenten Lyse bestimmen und auswerten; temperente oder defekte Phagen-Stämme liefern einen niedrigeren Titer, da ein Teil der Phagen im Ausgangsmaterial keine Vermehrung im Indikatorbakterium betreibt.

Anmerkungen

Der Versuch wird gruppenweise mit verschiedenen Phagenstämmen durchgeführt. Die oben erwähnten Unterschiede im Titer werden wie folgt ermittelt und interpretiert:

λ^+	Wildtyp	9.9 E7	z.T. lysogen, daher im Endeffekt weniger lysierende Phagen
λ^{vir}	virulent	3.9 E9	Lysogenie defekt, daher hauptsächlich lysierende Phagen hohe Ausbeute (vir: Mutationen im Operator, daher kein vollständiger Ausfall der Lyse)
λ^{hi434}		4.7 E8	z.T. lysogen
$\lambda^{cl h80}$	virulent	6.8 E9	Lysogenie defekt (clear: Repressor mutiert oder fehlend, Lyse definitiv unterbunden), daher fast nur lysierende Phagen
λ^{c1857}		4.7 E9	hitzelabiler Repressor, entspricht daher bei 37° $\lambda^{cl h80}$ dennoch nicht nur lysierende Phagen

Notizen

Restriktion und Modifikation

8b

Sinn des Experiments

Restriktionssysteme werden von Zellen verwendet, um artfremde DNA zu erkennen und zu zerstören. Auch Phagen können solche Systeme besitzen, um konkurrierende Phagen einer Zweitinfektion auszuschalten. Das Erkennungsmerkmal für fremd/eigen ist dabei das spezifische Methylierungsmuster.

Hier wird die Infektion mit λ vir-Phagen betrachtet, und zwar in mehreren Fällen:

- λ infiziert ein phagen-freies Bakterium: normale Infektion
- λ infiziert ein P1-befallenes Bakterium: Infektion wird verhindert; wenige λ erhalten aber zuerst die Methylierung, führen die Infektion durch und werden dann zum P1-modifizierten λ vir x P1
- λ vir x P1 infiziert ein phagen-freies Bakterium: normale Infektion, aber die P1-bedingte Modifikation geht verloren und es entstehen wieder normale λ vir
- λ vir x P1 infiziert ein P1-befallenes Bakterium: ungehinderte Infektion, unter Beibehaltung der P1-Modifikation.

Eingesetzte Bakterien

E. coli B34-5 mit und ohne P1 (liegt lysogen als Plasmid vor)

Arbeitsschritt	Bedeutung
Beide erwähnten Phagentypen (λ vir und λ vir x P1) sind bereits vorbereitet (Lysate).	
Verdünnungsreihe mit beiden Lysaten	Abhängig von den obigen Fällen wird die Infektion gut oder sehr schlecht verlaufen. Daher sind verschiedene Phagenkonzentrationen erforderlich.
Plattieren von versch. Verdünnungsstufen beider Phagentypen jeweils auf beide Bakterientypen:	Phagenverdünnung auf der Platte:
λ vir und B34-5	1E-6, 1E-7
λ vir und B34-5(P1)	1:1
λ vir x P1 und B34-5	1E-6, 1E-7
λ vir x P1 und B34-5(P1)	1E-6, 1E-7
Inkubation, 37°	Bildung von Plaques bei Infektion
Auszählen von geeigneten Platten	Berechnung des Titers der erfolgreich infizierten Zellen und daraus Berechnung der efficiency of plating (Quotient aus dem Titer – unter Berücksichtigung der Endverdünnung – und der eingesetzten Phagenzahl.

Ergebnis

Folgende Werte wurden erhalten:

λ vir	und	B34-5	9.5 E8	erfolgreiche Infektion
λ vir	und	B34-5(P1)	1.4 E2	kaum Infektion
λ vir x P1	und	B34-5	1.45 E8	erfolgreiche Infektion
λ vir x P1	und	B34-5(P1)	1.5 E8	erfolgreiche Infektion

Die Ergebnisse entsprechen der oben gemachten Vorhersage.

Anmerkungen

Das Ergebnis der zweiten Zeile (wenig Infektion) sind gerade die überlebenden Phagen, die dem Restriktionssystem von P1 entkommen sind, bzw. von diesem modifiziert wurden. Hier handelt es sich also um Plaques von λ vir x P1.

Notizen

Phagenkreuzung

8c

Sinn des Experiments

Zwei Phagen, die sich bei einer Mehrfachinfektion im Bakterium begegnen, können über ein eigenes Rekombinationssystem (*red* bei Lambda, *recA*-unabhängig) Eigenschaften austauschen. Beispielsweise können sich zwei Suppressor-sensitive Mutanten (solche lassen sich, ähnlich temperatur-sensitiven Mutanten, leicht in einem speziellen Wirt vermehren) gegenseitig komplementieren, so daß in einem Rasen aus Suppressor-freien Bakterien wieder Phagen lebensfähig werden.

Eingesetzte Bakterien und Phagen

<i>E. coli</i> N594	<i>pm</i> -	ohne Suppressor
<i>E. coli</i> N479	<i>pm</i> +	mit Suppressor
λ S7	<i>sus</i> +	Mutation im Gen S (für Holin)
λ FII	<i>sus</i> +	Mutation im Gen F (für Kopf-Protein)

Arbeitsschritt

Bedeutung

Kontrolle der Phagenmutanten

Beide Phagen (bzw. die bereitgestellten Lysate) werden jeweils zu den Bakterien mit und ohne Suppressor kreuzgestrichen.

Ansätze

Es werden jeweils angesetzt:
1 ml N594 und 0.1 ml Phagen-Lysat von
a) S7
b) FII
c) 1:1-Gemisch aus S7 und FII

10 min Inkubation bei 32°C

Verdünnungsreihe (nur bei c)

Plattieren jeweils mit 2.5 ml Top-Agar und 0.1 ml N594 (hoher Titer)

Inkubation bei 37°

Beide Mutanten dürfen nur auf Bakterien mit Suppressor lebensfähig sein und Plaques bilden.

Die durchschnittliche m.o.i beträgt 2, Mehrfachinfektionen sind beabsichtigt. N594 dient hier als Wirt, nicht als Indikator, und wird deshalb mit geringem Titer eingesetzt.

Adsorption und Aufnahme der Phagen

Bei a und b ist keine Phagenvermehrung erwarten.

N594 dient hier als Indikator.

Phagen im Bakterium (bei Ansatz c) können rekombinieren; entstandene Rekombinanten, bei denen beide Gene wieder intakt sind, bilden Plaques.

Auszählen von geeigneten Platten.

Berechnung des Titers und der Anzahl der erfolgreichen Rekombinationsereignisse in Bezug auf die beiden untersuchten Mutationen.

Ergebnis

Folgende Werte wurden erhalten:

Lysat von	Titer
a) S7	1.3 E2
b) FII	1.6 E2
c) 1:1-Gemisch	2.48 E7

Der ursprüngliche Phagentiter betrug $2 \text{ E}9$.

Die Plaques bei Ansatz a und b entsprechen nur den spontanen Revertanten. Die Plaques bei c sind dagegen (mehrheitlich) durch Kreuzung entstanden (wobei selbstverständlich nur ein Teil der Rekombinanten gerade zu Individuen führt, die in beiden betrachteten Genen intakt sind).

Zusätzlich kann man nun den Abstand der beiden Mutationen berechnen (die Rate der kompensierten Rekombinanten steigt mit dem Abstand). Es gilt

$$\text{map units} = \text{Anzahl Rekombinanten} / \text{Gesamttiter}$$

also

$$\text{map units} = 2.48 \text{ E}7 / (2 \text{ E}9 * 0.1) = 12.4$$

Der Literaturwert beträgt 21.

Notizen

Cross-Streaking

8d

Sinn des Experiments

Verschiedene Stämme und Mutanten von λ verhalten sich bei der Infektion von Bakterienstämmen unterschiedlich. Die tatsächliche Infektion hängt dabei von Immunität oder Resistenz des Bakteriums und von den Defekten des Phagen ab. Durch cross-streaking können gewissermaßen „Tabellen“ für bestimmte Kombinationen aus Phagen- und Bakterienstämmen ausplattiert und deren Verhalten untersucht werden. Solche Testreihen können auch Aufschluß über eine unbekannte λ -Mutante geben.

Eingesetzte Bakterien und Phagen

<i>E. coli</i> N594	<i>pm-</i>	ohne Suppressor
<i>E. coli</i> JG7 (λ)	<i>lam+</i>	bereits mit λ infiziert, daher immun
<i>E. coli</i> JG7 λ^R	<i>lam-r</i>	resistent gegen λ aufgrund Defekt in der LamB-Pore, die spezifisch von λ benutzt wird
<i>E. coli</i> C600	<i>tonB</i>	defekte TonB-Pore (Fe-Transport), die von $\Phi 80$ benutzt wird
λ hi	<i>pm+</i>	besitzt Suppressor
	<i>λhi434</i>	enthält bereits einen bestimmten λ -Phagen

Arbeitsschritt

Bedeutung

Auftragen von sechs verschiedenen Phagen-Lysaten (s.u.; darunter ein unbekannter Stamm) auf EMBO-Platten (je zwei pro Platte)

Trocknen lassen

Quer dazu Auftragen der vier Bakterienstämme auf jeder Platte

Inkubation 37°

EMBO: ohne Zucker, enthält Eosin und Methylenblau; Nachbarn von lysierten Bakterien nehmen deren Inhalt auf und bilden dann Zuckerabbauprodukte, die eine Braunfärbung verursachen; damit ist eine leichtere Identifikation von lysierten Zonen möglich.

Bildung von lysierten Zonen, falls eine Infektion und Vermehrung möglich war

Auswertung

nur Lyse ja oder nein (+ oder -)

Ergebnis

Man erhält folgende Beobachtungen (nach Phagen geordnet):

Phage λ + (Wildtyp)

N594	+	„Normalfall“
JG7(λ)	-	da immun wegen Vorinfektion (Repressor wird gebildet)
JG7 λ^R	-	da resistent wegen Poren-Defekt
C600	+	TonB wird nicht benötigt

Ergebnis

Phage λ vir (virulent wegen fehlender Repressor-Affinität, ohne Lysogenie)

N594	+	„Normalfall“
JG7(λ)	+	Immunität (Repressor) wird wegen Operator-Defekt nicht erkannt
JG7 λ^R	-	Resistenz (defekte LamB-Pore) kann nicht umgangen werden
C600	+	TonB wird nicht benötigt

Phage λ clear h λ (virulent wegen defektem Repressor)

N594	+	„Normalfall“
JG7(λ)	-	hier kein Operator-Defekt, Repressor des „Vorgängers“ wird erkannt
JG7 λ^R	-	da resistent wegen Poren-Defekt
C600	+	TonB wird nicht benötigt

Phage λ clear h80 (virulent, host-range-Eigenschaften von Φ 80)

N594	+	„Normalfall“
JG7(λ)	-	Operator (intakt) wie beim Wildtyp, erkennt also Immunität
JG7 λ^R	+	es wird wie bei Φ 80 die TonB-Pore, nicht LamB benutzt
C600	-	TonB wird hier für die Infektion benötigt

Phage λ hi434 (besitzt hybriden Operator z.T. aus Φ 434; hi = heteroimmun)

N594	+	„Normalfall“
JG7(λ)	+	ausgetauschter Operator, der den Repressor nicht erkennt
JG7 λ^R	-	da resistent wegen Poren-Defekt
C600	-	da vorinfiziert mit demselben Phagen, der passenden Repressor bildet

Phage ? (unbekannt)

N594	-
JG7(λ)	-
JG7 λ^R	-
C600	+

(Es kommt hier auf die pm+-Eigenschaft von C600 an: der Phage ist suppressor-abhängig und kann nur auf einem permissiven Wirt wachsen. Andere Aussagen können hier nicht getroffen werden.)

Notizen