

Praktikum 10

Stoffwechselregulation am Beispiel der Glutamin–Synthetase

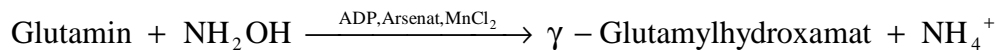
Aufgaben:

1. Glutamytransferase–Test
2. Auswertung: Antibiotika–Diffusionstest
3. Auswertung: Plattendiffusionstest zur Bestimmung einer unbekanntes Kanamycinkonzentration

Durchführung:

1. Glutamytransferase–Test

Dieser Versuch wird an Zellen von *Klebsiella terrigena* durchgeführt, die zur Erzeugung von Ammoniummangel in Glucose–Histidin–Medium und zur Erzeugung von Ammoniumüberschuß in Glucose–Ammonium–Medium kultiviert wurden. Die Aktivität der Glutamin–Synthetase soll gemessen, bzw. in diesem Fall nur bestätigt werden. Dazu wird der γ –Glutamytransferase–Test durchgeführt, der auf folgender Reaktion beruht:



Als ersten Schritt des Tests füllt man je 5 Reagenzgläser mit 20 μl der beiden Zellkulturen und gibt dann noch 0,4 ml GS–Mix dazu. Nun schließt sich eine Vorinkubation von 10 Minuten bei 37°C an. Danach wird in den Reagenzgläsern durch Zugabe von 50 μl 2,9% Glutamin die enzymatische Reaktion in Gang gesetzt. Die Reaktion wird nach 0, 5, 10, 20 und ∞ Minuten Inkubation durch ein Stopp–Mix abgebrochen. In den jeweils ersten Ansatz (Inkubationszeit 0 Minuten) gibt man abweichend davon sofort 1 ml Stopp–Mix und dann erst Glutamin, um die Reaktion gar nicht erst beginnen zu lassen.

Gibt man das Stopp–Mix hinzu, in dem FeCl_3 enthalten ist, kann man durch Braunfärbung das gebildete Hydroxamat nachweisen. Die Intensität der Braunfärbung ist proportional zur vorhandenen Enzymaktivität.

Die Zellen, die unter Ammoniummangel aufgezogen wurden, haben im Gegensatz zu den Zellen im Glucose–Ammonium–Medium verstärkt das Enzym Glutamin–Synthetase expressioniert, um den Stickstoffbedarf zu decken.

Dies bestätigen auch die Beobachtungen während des Versuchs. In den Ansätzen mit den „Mangel–Zellen“ ist mit fortschreitender Inkubationszeit eine zunehmende Braunfärbung der ursprünglich gelben Ausgangslösung zu beobachten, während die Ansätze der Zellen im Ammoniumüberschuß während der gesamten Inkubationsperiode die gelbe Färbung beibehalten.

2. Auswertung: Antibiotika–Diffusionstest

In diesem Versuch sollte die Antibiotika–Resistenzausprägung verschiedener Stämme untersucht werden. Dazu wurden fünf verschiedene Antibiotika–Plättchen auf die Agarplatten mit den betreffenden Kulturen gelegt. Sind die Stämme für ein bestimmtes Antibiotikum sensitiv, so bildet sich ein Hemmhof um das Plättchen aus. Sind sie dagegen resistent, bilden sich solche Hemmhöfe nicht. (Ergebnisse siehe Tabelle)

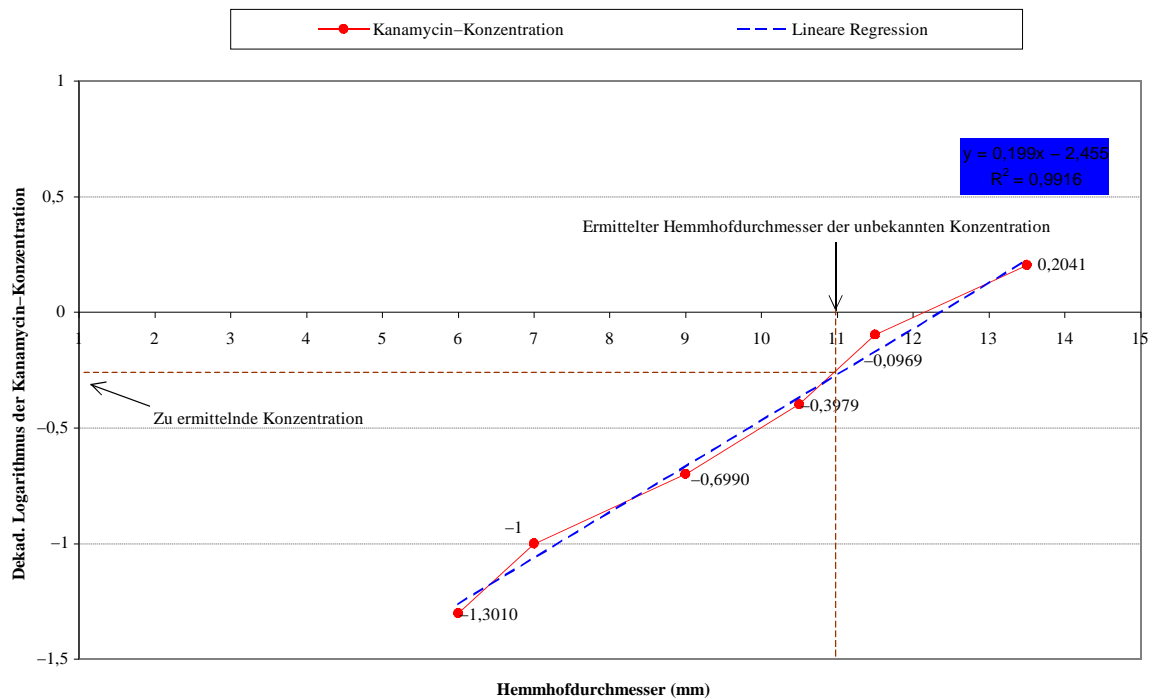
Stamm	Beobachtung (✓ Hemmhof; – kein Hemmhof)				
	Chloramphenicol C:0	Tetracyclin TE:0	Ampicillin AMP10	Streptomycin S25	Kanamycin K:0
<i>Escherichia coli</i> S17–1	✓	✓	✓	✓	✓
<i>E. coli</i> S17–1 (pVK101)	✓	–	✓	(✓)	–
<i>E. coli</i> S17–1 (pSUB202)	–	–	–	✓	(✓)
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	✓	–	–	–	–
<i>R. eutropha</i> H16 (pVK101)	✓	✓	–	–	✓

3. Auswertung: Plattendiffusionstest zur Bestimmung einer unbekanntes Kanamycinkonzentration

Um die unbekanntes Kanamycin–Konzentration zu ermitteln, werden die Hemmhofdurchmesser um die Antibiotika–Plättchen der vorgegebenen Kanamycinkonzentrationen bestimmt und die dekadischen Logarithmen der verwendeten Kanamycinkonzentrationen gegen die entsprechenden Hemmhofdurchmesser aufgetragen. Mit der so erstellten Eich–gerade läßt sich die unbekanntes Antibiotikumkonzentration ermitteln. (Ergebnisse siehe Tabelle und Diagramm)

Kanamycin-Konzentration (in mg/ml)	Hemmhofdurchmesser (in Millimetern)
0,05	6
0,1	7
0,2	9
0,4	10,5
0,8	11,5
1,6	13,5
unbekannte Konzentration	11

Bestimmung einer unbekanntes Kanamycin-Konzentration



Das Diagramm zeigt, daß die zu ermittelnde Konzentration bei ca. $-0,25$ auf der y-Achse liegt. Um die Kanamycin-Konzentration c in mg/ml zu erhalten rechnet man: $c = 10^{-0,25}$. Die so bestimmte Konzentration beträgt $0,56$ mg/ml, was der von den Praktikumsleitern vorgegebenen Konzentration von 6 mg/ml sehr nahe kommt.