

## Praktikum 5

### Bakterielle Zellhülle: Zellwand und Membran

#### Aufgaben:

1. Isolierung chromosomaler DNA von *Bacillus subtilis* 168 i<sup>+</sup>
  - 1.1. Lysis von *Bacillus subtilis* 168 i<sup>+</sup> (Trp<sup>+</sup>)
  - 1.2. Isolierung von DNA aus *Bacillus subtilis* 168 i<sup>+</sup> (Trp<sup>+</sup>)
2. Auswertung: Differenzierung von Enterobacteriaceen (letzter Praktikumstag)

#### Durchführung:

##### 1. Isolierung chromosomaler DNA von *Bacillus subtilis* 168 i<sup>+</sup>

###### 1.1. Lysis von *Bacillus subtilis* 168 i<sup>+</sup> (Trp<sup>+</sup>)

Das mit Saline gewaschene Zellpellet einer Kolonie von *B. subtilis* 168<sup>+</sup> wird in 2,5 ml A-Medium (4,5 g NaCl & 1,5 g Natrium-2-Hydrat ad 500 ml H<sub>2</sub>O) resuspendiert. Diese Zellsuspension wird mit 0,2 ml Lysozym-Lösung vermischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Vervollständigung der Lysis wird nun 0,4 ml Natriumaurylsulfatlösung (25%ige SDS-Lösung) hinzugesetzt und das Reagenzglas in ein 45°C-Wasserbad gehalten (Aufklärung der Lösung).

Die Lysis wird mikroskopisch kontrolliert:

Vor und nach Zugabe des Lysozyms und nach Zugabe der SDS-Lösung wird jeweils ein mikroskopisches Präparat der Zellsuspension angelegt und unter dem Mikroskop betrachtet. Beobachtungen:

- Vor der Lysis ist *Bacillus subtilis* 168 i<sup>+</sup> stäbchenförmig und bewegt sich rege.
- Nach dem Einwirken des Lysozyms haben viele Einzelzellen sphärische Gestalt angenommen.
- Nach Zugabe der SDS-Lösung sind die Zellen aufgebochen. Die DNA kann isoliert werden.

###### 1.2. Isolierung von DNA aus *Bacillus subtilis* 168 i<sup>+</sup> (Trp<sup>+</sup>)

Aus dem Lysat *Bacillus subtilis* 168 i<sup>+</sup> von wird in diesem Versuchsteil chromosomale DNA isoliert, die in einem späteren Versuch Verwendung finden wird. Die DNA-Reinigung wird in folgenden Schritten durchgeführt:

###### – Aussalzen von Proteinen

Zur Erhöhung der Ionenkonzentration werden dem Lysat 1,7 ml (w/v) NaCl zugesetzt und vorsichtig gemischt.

###### – Emulgierung von Lipiden

Nun werden 0,1 ml 25% (w/v) Natriumdesoxycholat hinzugegeben, das die Lipid-Emulgierung und damit die Ab-trennung der Fette aus der Lösung ermöglicht. Anschließend wird die Suspension für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

###### – Abtrennen der ausgefallenen Komponenten (v.a. Proteine) durch Zentrifugation

Die Glasröhrchen werden 15 min bei 20°C mit 4000 rpm zentrifugiert und anschließend der klare Überstand in ein neues Zentrifugenglas dekantiert.

###### – Extraktion von Proteinen und Membranbestandteilen

Das geschieht mit einem Lösungsmittelgemisch aus Chloroform-Octanol. Nach Zugabe von 5 ml werden die Glas-röhrchen verschlossen und für 5 min vorsichtig geschwenkt. Dann wird zur Phasentrennung eine Zentrifugation (4000 rpm für 15 min bei 20°C) durchgeführt. Die obere, wäßrige Phase enthält danach die DNA, die nun mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgehebert und in ein neues Reagenzglas überführt wird.

###### – Fällung der DNA mit Ethanol

Die Lösung wird nun mit der doppelten Menge eiskaltem Ethanol überschichtet und mit einem Glasstab durch Drehen in einer Drehrichtung die DNA an der Grenze der wäßrigen und ethanolischen Phase aufgewickelt. Die erhaltene DNA wird in 80%igem Ethanol für spätere Versuche aufbewahrt.

##### 2. Auswertung: Differenzierung von Enterobacteriaceen (letzter Praktikumstag)

Hier sollen nun die restlichen Ergebnisse der Differenzierungsversuche (Stämme A und B) des letzten Praktikumstags ausgewertet werden:

Test	Beobachtung Probe „A“	Beobachtung Probe „B“
Citrat-Medium	kein Wachstum	Blaufärbung des Citratmediums, Bildung kleiner rundlicher Kolonien
Gasbildung	keine Bläschen	Bläschenbildung
	→ <i>Escherichia coli</i>	→ <i>Klebsiella terrigena</i>