

## Praktikum 6

### Struktur und Eigenschaften bakterieller DNA, genetische Übertragung

Am vorangegangenen Kurstag wurde DNA von *Bacillus subtilis* 168 i<sup>+</sup> isoliert, DNA des prototrophen Wildstammes, der in der Lage ist, die aromatische Aminosäure Tryptophan zu synthetisieren. Diese Eigenschaft soll heute auf den Stamm *B. subtilis* 168 i<sup>-</sup> übertragen werden, der durch Mutation die Fähigkeit zur Tryptophanbiosynthese verloren hat. Er ist Tryptophan auxotroph Trp<sup>-</sup> oder i<sup>-</sup>. Die i<sup>-</sup>-Stämme können sich nur dann vermehren, wenn dem Wachstumsmedium Tryptophan zugesetzt wird.

Mit der Wildstamm-DNA soll im Versuch eine Transformation von kompetenten Zellen einer tryptophanbedürftigen Mutante zur Wildtypform durchgeführt werden. Durch die Transformation erlangt ein kleiner Teil der Zellen wieder die Fähigkeit, prototroph Tryptophan zu synthetisieren.

Eine gelungene Transformation ist ein seltenes Ereignis. Darum müssen die Rekombinanten selektiert werden, indem man sie auf Minimalagar ausplattiert. Tryptophanbedürftige Empfängerzellen, die nicht transformiert wurden oder gar nicht erst kompetent wurden, können auf diesem Medium keine Kolonien bilden. Es wachsen nur die Transformanten.

#### Aufgaben:

1. Anzucht kompetenter Zellen
2. Zugabe der DNA
3. Bestimmen der Lebendzellzahl des Rezipienten

#### Durchführung:

##### 1. Anzucht kompetenter Zellen

Die kompetenten Zellen werden uns im Versuch gestellt. Die Zellen wurden durch einen Medienwechsel in den kompetenten Zustand versetzt. *B. subtilis* 168 i<sup>-</sup> wurde dazu auf dem Minimalmedium I bei 30°C angezogen. Danach werden die Zellen in das wesentlich geringer konzentrierte Minimalmedium II übertragen und für zwei bis drei Stunden bei 30°C inkubiert.

Zusammensetzung	Medium I	Medium II
Minimalmedium	500 ml	500 ml
Hefeextrakt	100 mg	50 mg
L-Tryptophan	25 mg	2,5 mg

##### 2. Zugabe der DNA

Die am letzten Kurstag gewickelte DNA von *Bacillus subtilis* 168 i<sup>+</sup> wird in 1 ml steriler 10 mM Tris/MgCl<sub>2</sub>-Lösung durch Drehen im Gegenuhrzeigersinn gelöst und für 10 min bei 37°C inkubiert. Dann wird von der gelösten DNA noch eine 10<sup>-1</sup>-Verdünnung erstellt, indem man zu 1,8 ml 10 mM Tris/MgCl<sub>2</sub>-Lösung 0,2 ml gelöste DNA pipettiert.

Nun werden fünf Versuchsansätze vorbereitet:

Ansatz Nr.	Kompetente Zellen [ml]	Medium II [ml]	DNA 10 <sup>0</sup> [ml]	DNA 10 <sup>-1</sup> [ml]	10 mM Tris/MgCl <sub>2</sub> [ml]	Dnase (1 mg/l) [ml]
1	0,8	-	0,2	-	-	-
2	0,8	-	-	0,2	-	-
3	0,8	-	-	-	0,2	-
4	0,8	-	0,2	-	-	0,1
5	-	0,8	0,2	-	-	-

Zunächst werden nur DNA, MgCl<sub>2</sub> und DNase einpipettiert und die Ansätze für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach dieser Zeit werden entsprechend der Tabelle entweder 0,8 ml kompetente Zellen oder steriles Minimalmedium II dazugegeben und die Inkubation im Wasserbad für weitere 30 min wiederholt.

Nach der Inkubation werden von jedem Ansatz 0,1 ml auf Minimalagar ohne Tryptophan ausplattiert und bei 30°C inkubiert. (Auswertung siehe nächsten Praktikumstag)

Frage: Welche Funktion haben die verschiedenen Ansätze?

Es soll demonstriert werden, wann eine Transformation funktionieren kann und andererseits unter welchen Bedingungen (z.B. Vorhandensein eines bestimmten Stoffs) sie gerade nicht möglich ist. Auch der Einfluß unterschiedlicher DNA-Konzentrationen soll gezeigt werden.

Zu den fünf Ansätzen wurden folgende Vermutungen über mögliche Beobachtungen angestellt:

Ansatz Nr.	Mögliche Beobachtung
1	Wachstum auf Minimalmedium aufgrund von Transformation
2	Wachstum auf Minimalmedium aufgrund von Transformation, jedoch wegen weitaus geringerer DNA-Konzentration in einem viel geringeren Umfang (Transformations-Häufigkeit nimmt ab)
3	Kein Wachstum auf Minimalmedium, da von den kompetenten Zellen die zur Transformation notwendige DNA nicht aufgenommen werden kann.
4	Kein Wachstum auf Minimalmedium, da die DNase sämtliche DNA zerstückelt und somit für eine mögliche Transformation unbrauchbar macht.
5	Kein Wachstum auf Minimalmedium, da keine kompetenten Zellen vorhanden sind. Der physiologische Zustand der Kompetenz der Empfängerzellen ist zur DNA-Aufnahme nötig.

**3. Bestimmen der Lebendzellzahl des Rezipienten**

Zur Lebendzellzahlbestimmung des Rezipienten werden von *B. subtilis* i Verdünnungen bis  $10^{-5}$  in Saline hergestellt. Die Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  bis  $10^{-5}$  werden auf tryptophanhaltigem Minimalagar ausplattiert. (Auswertung siehe nächsten Praktikumstag)

Frage: Wozu dient die Lebendzellzahlbestimmung?

Die Lebendzellzahlbestimmung soll helfen, Aussagen über die Effizienz der Transformation anzustellen. Es kann ermittelt werden, wieviel lebende Zellen vorhanden waren und wieviele im Verhältnis dazu transformiert werden konnten.