

## Praktikum 7

### Bakteriophagen Mu als Mutagen

**Aufgaben:**

1. Bestimmung des Phagentiters
2. Infektion von *Escherichia coli* W 3110 mit dem Phagen Mu zur Mutantengewinnung
3. Auswertung zur Transformation vom letzten Kurstag
  - 3.1. Betrachtung der verschiedenen Ansätze
  - 3.2. Lebendzellzahl des Rezipienten
  - 3.3. Abschlußbetrachtung

**Durchführung:**

**1. Bestimmung des Phagentiters**

Da Phagen lichtmikroskopisch nicht auszumachen sind, wird zu ihrem Nachweis ein Phagenlysat sowie ein für den Phagen sensibler Bakterienstamm verwendet. Mit Hilfe dieser **Phagentitration** kann die Anzahl der Phagen pro ml Lysat bestimmt werden.

Während Bakteriensuspensionen ohne Phagen einen geschlossenen Bakterienrasen ergeben, bilden sich bei Suspensionen, die Phagen enthalten, im Bakterienrasen Löcher – sog. **Plaques** – aus. Diese Plaques entstehen durch das Lysieren einer großen Anzahl von Bakterien. Zunächst wird an den betreffenden Stellen eine einzelne Bakterienzelle befallen, die dann Phagen bildet, die anschließend die Nachbarzellen infizieren.

Vorgehen: Das bereits präparierte Phagenlysat des Phagen Mu (Herstellung siehe Script Seite 38) wird mit dem Verdünnungsmedium bis auf  $10^{-8}$  verdünnt. Je 0,1 ml der Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  bis  $10^{-8}$  werden mit je 0,5 ml einer Kultur von *E. coli* W 3110 (sensitiv gegenüber dem Phagen Mu) für 10 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Suspension wird mit 3 ml Weichagar vermischt, auf LB-Agar ausplattiert und für 24 Stunden bei 43°C inkubiert.

(Ergebnis siehe nächsten Praktikumstag)

**2. Infektion von Escherichia coli W 3110 mit dem Phagen Mu zur Mutantengewinnung**

In diesem Versuch wird das Phagenlysat zur Gewinnung von Insertionsmutanten eingesetzt.

0,5 ml Bakteriensuspension des Mu-sensitiven *E. coli* W 3110 werden in 3 ml Weichagar eingemischt und über einer LB-Agarplatte verstrichen. Mit einer sterilen Pipette wird ein Tropfen Phagenlysat auf die Mitte der erkalteten Agarplatte getropft. Die Platte wird anschließend für 24 Stunden bei 30°C inkubiert.

(Ergebnis siehe nächsten Praktikumstag)

**3. Auswertung zur Transformation vom letzten Kurstag** (siehe auch letzter Praktikumstag)

**3.1. Betrachtung der verschiedenen Ansätze**

Die fünf verschiedenen Ansätze sollen veranschaulichen, wann eine Transformation funktionieren kann und andererseits unter welchen Bedingungen (z.B. Vorhandensein eines bestimmten Stoffs) sie gerade nicht möglich ist. Sie sind wie folgt zusammengesetzt:

Ansatz Nr.	Kompetente Zellen [ml]	Medium II [ml]	DNA $10^0$ [ml]	DNA $10^{-1}$ [ml]	10 mM Tris/MgCl <sub>2</sub> [ml]	DNase mg/l [ml]	(1
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	–	–	–	–

Bei den Ansätzen könnten theoretisch folgende Beobachtungen gemacht werden:

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.

Ansatz Nr.	Mögliche Beobachtung
4	Kein Wachstum auf Minimalmedium, da die DNase sämtliche DNA zerstückt 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.

Am heutigen Kurstag wurden folgende Beobachtungen gemacht:

Ansatz Nr.	Beobachtung
1	Auf dem Minimalagar ist eine große Kolonie zu beobachten. Es ist davon auszugehen, daß bei nur einer Zelle die Transformation erfolgreich ablaufen konnte.
2	Auf dem Minimalagar ist ebenfalls nur eine Kolonie zu entdecken, die aber wesentlich kleiner ist, wie die Kolonie in Ansatz 1. Die Koloniegröße kann aber nicht die Vermutung untermauern, die in der vorhergehenden Tabelle angestellt wurde. Demnach hätten sich nämlich in Ansatz 2 aufgrund der geringeren Konzentration an DNA weit weniger Kolonien ausbilden müssen bzw. müßten bei Ansatz 1 mehr Kolonien zu finden sein. Scheinbar wurde auch im Fall von Ansatz 2 nur eine Zelle transformiert.
3	Auf dem Minimalagar treten keinerlei Kolonien in Erscheinung. Erklärung siehe obrige Tabelle
4	Auf dem Minimalagar treten keinerlei Kolonien in Erscheinung. Erklärung siehe obrige Tabelle
5	Auf dem Minimalagar treten keinerlei Kolonien in Erscheinung. Erklärung siehe obrige Tabelle

### **3.2. Bestimmen der Lebendzellzahl des Rezipienten**

Zur Lebendzellzahlbestimmung des Rezipienten wurden von *B. subtilis* i- Verdünnungsstufen von  $10^{-3}$  bis  $10^{-5}$  auf tryptophanhaltigem Minimalagar ausplattiert.

Es wurden für die drei Ansätze folgende Anzahlen lebender Zellen ermittelt:

Verd.Stufe	Ausgezählte Einzelzellen)	Kolonien (ursprünglich	Lebendzellzahl (Angabe pro ml)
$10^{-3}$		1208	$1,21 \cdot 10^6$ Zellen/ml Ausgangslösung
$10^{-4}$		152	$1,52 \cdot 10^6$ Zellen/ml Ausgangslösung
$10^{-5}$		32	$3,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml Ausgangslösung

Ein aus den Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  errechneter Mittelwert läßt auf ca.  $1,36 \cdot 10^6$  Zellen/ml Ausgangslösung schließen.

### **3.3. Abschlußbetrachtung**

Die Lebendzellzahlbestimmung soll abschließend helfen, Aussagen über die Effizienz der Transformation anzustellen. Es kann ermittelt werden, wieviele Zellen im Verhältnis zu der ursprünglich in der Ausgangslösung vorhandenen Zellzahl transformiert werden konnten.

Anhand der Ansätze 1 und 2 aus dem Versuch 3.1. kann man sagen, daß nur eine Zelle pro 0,8 ml Ausgangslösung kompetenter Zellen transformiert werden konnte. Um letztendlich ein Verhältnis bilden zu können, wird auf 1 ml aufgerechnet. Eine transformierte Zelle pro 0,8 ml würde somit 1,25 transformierten Zellen pro 1 ml kompetenter Zelllösung entsprechen. Nun muß man noch daß Verhältnis mit der aus der Lebendzellzahlbestimmung ermittelten Zellzahl pro Milliliter Ausgangslösung bilden. Das Verhältnis sagt aus, daß pro Milliliter 1,25 Zellen der 1360000 ursprünglich vorhandenen Zellen transformiert werden konnten, das entspricht einer von 1088000 Zellen. Eine Transformation stellt demnach ein seltenes Ereignis dar.