

Versuch 3: Bakterielle Konjugation

Versuchsinhalt

Übertragung eines F'-Plasmides, Technik der Strichkreuzung, Prinzip von Selektionsplatten, Markertest.

Eine Strichkreuzung wird durchgeführt, bei der ein F'-Plasmid von einem Bakterienstamm in einen anderen Stamm übertragen wird. Das Prinzip der Selektion auf unterschiedliche Stoffwechselmerkmale wird erläutert.

Grundlagen

Die Konjugation stellt neben der Transduktion und der Transformation einen der drei genetischen Austauschmechanismen bei Bakterien (Stichwort „horizontaler Gentransfer“) dar. Im Gegensatz zu den beiden anderen DNA-Transfermechanismen ist bei der Konjugation ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen Donor- und Rezipienten-Zelle notwendig. Üblicherweise wird bei diesem Vorgang Plasmid-DNA (z. B. das sog. F-Plasmid) mit hoher Effizienz übertragen. Nach Integration eines F-Plasmides in das Chromosom der Zelle können zudem chromosomale Gene ausgetauscht werden. Die Konjugation wird auch heute noch zur Konstruktion von Bakterienstämmen mit spezifischen Eigenschaften oder zur Kartierung unbekannter Gene mit Hilfe der Methode der „unterbrochenen Paarung“ verwendet. Darüber hinaus spielt der gleiche Mechanismus bei der Entstehung multiresistenter Bakterienstämme, die bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten mit Antibiotika ein immer größeres Problem darstellen, sowie beim gerichteten DNA-Transfer von Bakterien in Wirtspflanzen (Stichwort „Ti-Plasmid“) eine Rolle. Das Prinzip der Konjugation wird im Rahmen des Kursversuches gezeigt.

Material

Benötigte Bakterienstämme:

<i>E. coli</i> K-12 Stämme:	Genotyp	Phänotyp
PS8/ F' ^{lac} (Donorstamm)	F' ^{lac} / <i>metB1</i>	Met ⁻ Lac ⁺
S136 (Rezipientenstamm)	F' / prototroph Δ <i>lac</i>	Lac ⁻

Geräte und weiteres Zubehör:

- MacConkey- und Minimal- Laktose- Agarplatten
- sterile Zahnstocher
- sterile Glasstäbe
- sterile Methionin-Stammlösung (4mg/ml)

Durchführung

1. Tag: Kreuzung

Die zu kreuzenden Stämme werden in LB₀ Vollmedium über Nacht bei 37° C inkubiert.

Die Stämme PS8/ F⁺lac und S136 werden auf einer Minimal- (MM) Laktose-Platte entsprechend Abbildung 1 gegeneinander ausgestrichen. Hierbei ist zu beachten, dass zunächst 30µl des Rezipienten S136 mit einer sterilen Pipette als Tropfen aufgetragen und anschließend mit einem sterilen Glasstab verteilt werden. Bevor der Donor PS8/ F⁺lac aufgetragen werden kann, muss der Rezipient vollständig eingetrocknet sein! Nachdem die Zellsuspensionen vollständig auf der Platte getrocknet sind, werden die Platten 2 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

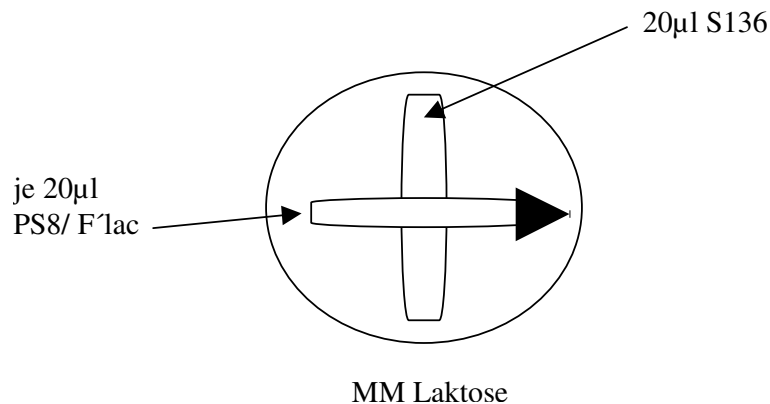
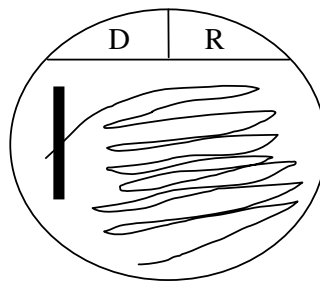


Abb.1: Die Abbildung zeigt die Durchführung der Strichkreuzung. Wichtige Punkte sind, dass zunächst der Rezipient vollständig getrocknet sein muss, bevor der Donor quer dazu ausgestrichen werden kann. Ferner ist bei der Auftragung des Donors zu beachten, dass dieser nur in Richtung des Pfeils ausgestrichen wird.

2. Tag: Auswertung der Kreuzungs-Platten und Reinigung der Exkonjuganten

Auf den Kreuzungsplatten sollten nur in den Bereichen, in denen Donor und Rezipientenzellen zusammen liegen, ein deutliches Zellwachstum der Exkonjuganten zu sehen sein. Dagegen können der Donor und der Rezipient allein auf der MM-Laktose-Platte nicht wachsen.

Um nachzuweisen, dass tatsächlich ein genetischer Austausch stattgefunden hat, muss mit den Exkonjuganten ein Markertest durchgeführt werden. Dazu müssen die Exkonjuganten zunächst von den Donor- und den Rezipientenzellen gereinigt werden. Dieses geschieht, indem die Zellen auf einer MacConkey- (McC)-Laktose-Platte mit Hilfe steriler Glasstäbe zu Einzelkolonien entsprechend der Abbildung 2 ausgestrichen werden. Als Kontrollen werden ebenfalls Donor- und Rezipientenzellen von den unbewachsenen Sektoren der Kreuzungsplatte auf die Reinigungsplatte aufgetragen. Die Platten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.



McC Laktose

Abb.2: Die Abbildung zeigt die Durchführung der Exkonjugantenreinigung. Ausgehend von der Kreuzungsplatte wird zunächst der Donor oben links mit Hilfe eines sterilen Glasstabes als Strich aufgetragen. Getrennt davon wird oben rechts der Rezipient als Strich aufgetragen. Schließlich werden Exkonjuganten aus dem Sektor mit dem deutlichen Wachstum von der MM-Laktose-Platte auf die McC-Laktose-Platte übertragen und danach mit einem neuen sterilen Glasstab zu Einzelkolonien ausgestrichen.

3. Tag: Markertest

Ein Markertest wird mit 5 Exkonjuganten und den Elternstämmen auf einer McC-Laktose-Platte und einer MM-Laktose-Platte \pm Methionin durchgeführt. Dazu wird zunächst die MM-Laktose-Platte vorbereitet, indem an einer zuvor markierten Stelle etwa 20 μ l einer sterilen Methionin-Stammlösung (4mg/ml) entsprechend Abbildung 3 aufgetragen werden. Nachdem die Methionin-Stammlösung eingetrocknet ist, werden Donor-, Rezipienten- und Exkonjugantenzellen entsprechend der Abbildung 3 auf den Markertestplatten ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

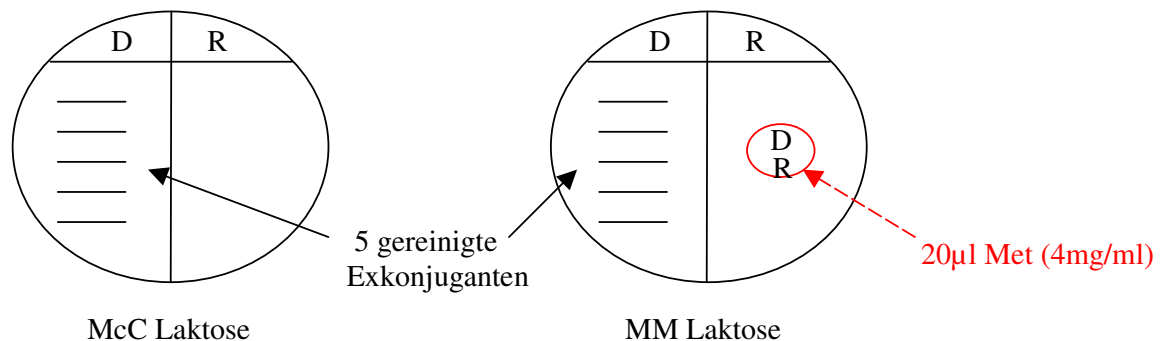


Abb.2: Die Abbildung zeigt die Durchführung des Markertests. Ausgehend von der Reinigungsplatte werden zunächst der Donor auf der MM-Platte im Bereich ohne Methionin, dann im Bereich mit Methionin und schließlich auf der McC-Platte mit einem sterilen Glasstab aufgetragen. Entsprechend wird mit dem Rezipienten verfahren. Schließlich werden 5 verschiedene Einzelkolonien der gereinigten Exkonjuganten jeweils zunächst auf der MM-Platte und dann auf der McC-Platte ausgestrichen.

4. Tag: Auswertung

Welche Phänotypen haben die Stämme? Stimmen die Phänotypen mit den jeweiligen Genotypen überein?

Zeitbedarf für Konjugationsversuch

1. Tag	Einführung Kreuzung, EK-Ausstriche, Markertest	1,5 Stunden
2. Tag	Auswertung	1,0 Stunden

Materialbedarf (Platten):

1. pro Gruppe

2 MM Lac –Platten
2 McC Lac- Platten
20µl Methionin-Lösung