

Versuch 4: Regulation des Lactose (*lac*)-Operons

Versuchsinhalt und Grundlagen

Phänotypische und enzymatische Untersuchung von *lac*-Regulationsmutanten

Verschiedene *lac*-Mutanten von *E. coli* K-12 werden mit und ohne Lactose im Wachstumsmedium angezogen und anschließend im β -Galactosidase-Test untersucht. Mit den Ergebnissen können die *lac*-Genotypen der Mutanten abgeleitet und das *lac*-Operon-Regulationsmodell veranschaulicht werden.

Material

pro Gruppe: K12 (*E. coli* K-12 Wildtyp)
L17 (*E. coli* K-12 Derivat)
CSH36 (*E. coli* K-12 Derivat)
S146 (*E. coli* K-12 Derivat) ; jeweils auf einer Platte als Rasen
2 LBo-Platten
1 McConkey-Lactose-Platte
0.5 ml Lactose (20%); in Eppendorf-Probengefäß
10 ml Phosphatpuffer (PP), pH 7; in Plastik-Röhrchen
1 ml β -ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactosid), 10 mM; in Eppendorf-Probengefäß
10 ml Na_2CO_3 (Natriumcarbonat), 250 mM; in Plastik-Röhrchen
Toluol; in Wheaton-Glasröhrchen
8 kurze Reagenzgläser, Reagenzglasständer, sterile Glasstäbchen
soweit vorhanden je eine 1000 μl , eine 200 μl und eine 20 μl Pipette mit Spitzen
von der Schule zur Verfügung zu stellen: Stoppuhr, Wasserbad (37°C), ggf. Inkubator für Platten (37°C)

1.Tag:

Stichworte für den einführenden theoretischen Teil:

Notwendigkeit der Regulation der Genexpression allgemein

⇒ Ressourcen- und Energie-Ersparnis

Regulation der Transkription am Beispiel des *lac*-Operons in *E. coli*

⇒ an Tafel entwickeln: einfaches Modell des *lac*-Operons mit Regulation

Mutanten: Phänotyp ⇒ Genotyp ?

Kurze Erklärung der McConkey Indikatorplatten

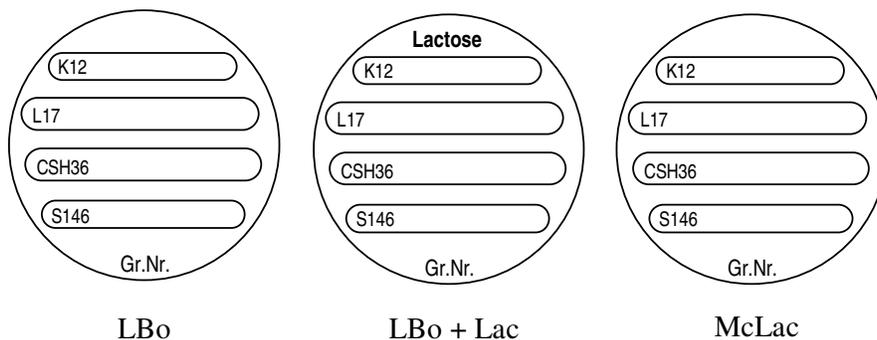
- ⇒ Vollmedium
- Neutralrot als pH-Indikator
- Rot-Färbung wegen Ansäuerung durch die Zucker-vergärenden Zellen

Versuchsdurchführung:

Auf 1 Vollmedium-Platte 300µl Lactose mit Glasstab verteilen und eintrocknen lassen

Platten wie folgt beschriften:

(Gr.Nr. =Gruppennummer)



auf alle Platten je

- K12
- L17
- CSH36
- S146

von der entsprechenden Masterplatte mit einem Glasstab abnehmen und wie abgebildet verteilen. Bitte darauf achten, dass genügend Zellen sich am Glasstab befinden !

anschließend werden die Platten über Nacht bei 37°C bebrütet, alternativ kann das auch zwei Tage bei Raumtemperatur erfolgen

2.Tag:

Stichworte für den einführenden theoretischen Teil:

an Tafel Wiederholung: *lac*-Operon mit Regulation

- Basalspiegel
- Allolactose
- polycistronische mRNA

Hinweis auf Wachstum der Zellen mit und ohne Lactose im Medium

Erklärung des β -Galactosidase-Tests

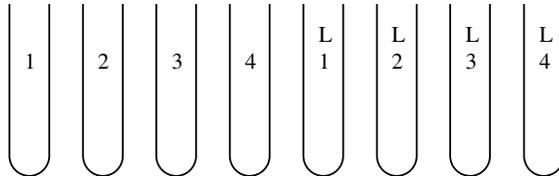
- ⇒ β -ONPG als Substrat der β -Galactosidase ⇒ Gelbfärbung
- Toluol für die Lyse der Zellen
- Na_2CO_3 zum Abstoppen der Reaktion (Denaturierung des Enzyms)

Versuchsdurchführung:

β -Galactosidase-Test

pro Gruppe:

8 kurze Reagenzgläser wie folgt beschriftet:



jeweils 1 ml PP zugeben

von den beiden LBo-Platten mit Glasstäben Bakterien abnehmen ($\approx \frac{1}{3}$ des Ausstriches) und in jeweils 1 ml PP (mit 1000 μ l Pipette und blauer Spitze vorher in das Röhrchen geben) wie folgt resuspendieren:

	von LBo-Platte (ohne Lactose)				von LBo-Platte mit Lactose			
Bakterien:	K12	L17	CSH36	S146	K12	L17	CSH36	S146
in Röhrchen Nr.:	1	2	3	4	L1	L2	L3	L4

(die Trübung sollte in allen Röhrchen möglichst gleich sein!)

jeweils 20 μ l Toluol (mit der 20 μ l Pipette und gelber Spitze) zugeben und gut schütteln

2-3 min in das 37°C –Wasserbad stellen zum Äquilibrieren der Probe

danach (außerhalb des Wasserbades) in 30sec-Abständen

je 100 μ l β -ONPG zugeben (dabei mit der Pipettenspitze in die Probe eintauchen und für jede Probe eine neue Spitze verwenden) und die Röhrchen zurück ins Wasserbad stellen

nach 7 min wieder in 30sec-Abständen

je 1ml Na₂CO₃ zugeben (ohne in die Probe einzutauchen, deshalb genügt eine Spitze für alle Proben)

anschließend die Intensitäten der Gelbfärbung vergleichen und notieren

z.B. +	= starke Gelbfärbung	\Rightarrow	viele β -Galactosidase-Moleküle pro Zelle
(+)	= schwache Gelbfärbung	\Rightarrow	wenig β -Gal. pro Zelle (= Basalspiegel)
-	= keine Gelbfärbung	\Rightarrow	keine β -Galactosidase vorhanden

Auswertung:

Ergebnisse an der Tafel in einer Tabelle notieren und gemeinsam anhand des *lac*-Operon-Modells auswerten. Die "Schüler" sollten selbst den möglichen Genotyp, basierend auf den Ergebnissen des Enzymtests, ableiten können.

Stamm	Gelbfärbung nach Wachstum auf		Transkription des <i>lac</i> -Operons	möglicher <i>lac</i> -Genotyp	Lac-Phänotyp (McLac-Platte)
	LBo –	LBo + Lac			
K12	(+)	+	induzierbar	Wildtyp	+
L17	-	-	? (keine β -Gal.)	<i>lacZ</i> oder <i>lacP</i> oder Δlac	-
CSH36	+	+	konstitutiv	<i>lacI</i> oder <i>lacO</i>	+
S146	(+)	(+)	nicht induzierbar	<i>lacY</i> (oder <i>lacI^S</i>)	-

Stichworte zur Auswertung:

Begriffsdefinitionen: "induzierbar" "konstitutiv" "nicht induzierbar"

lacI^S = Superrepressor nur kurz erwähnen

Lac-Phänotyp / McConkey-Platten

Hinweis auf übergeordnete Regulation durch Glukose über cAMP und CRP (CAP)

Hinweis auf Regulationsnetzwerke bei Pro- und Eukaryonten und

deren Aufklärung über Mutantanalyse