

A. INHALT

A.	Inhalt	1
B.	Bestimmung der Zellzahl mit der Zählkammer	2
C.	Messung der Größe von Mikroorganismen	4
D.	Unterscheidung von gram-negativen und gram-positiven Bakterien	5
E.	Isolierung und Identifizierung unbekannter Bakterien	8
F.	Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur	13
G.	Katabolit-Repression	16
H.	Biologisch-chemisches Screening	20
I.	Selektive Wirkung von Antibiotika auf verschiedene Organismen	21
K.	Bestimmung der bakteriostatischen und bakteriziden Konzentration von Antibiotika	24
L.	Diaminopimelinsäure-Bestimmung mittels einer DAP-auxotrophen Mangelmutante von E.coli ...	26
M.	Klonierung des Kanamycin-Resistenzgens	28
N.	Transposon-Mutagenese	30

B. BESTIMMUNG DER ZELLZAHL MIT DER ZÄHLKAMMER

B.1 Einleitung

Die Anzahl von Zellen in einem Medium kann bestimmt werden, indem man die Probe mikroskopisch analysiert. In diesem Fall wird zur Auszählung eine Zählkammer verwendet, in der die Probe als Flüssigkeit ausgezählt werden kann.

Die Zählkammer besteht aus einer Glasplatte, in die ein Gitternetz aus kleinen Quadraten mit bekannter Fläche eingraviert ist. Über jedem Quadrat befindet sich nach Auftragen der Probe ein geringes, genau definiertes Volumen. Aus der Zellzahl pro Einheiten des Gitternetzes kann dann auf die Zellzahl in einem Milliliter der Lösung und damit auf die Zellzahl im vorhandenen Medium hochgerechnet werden.

Im Versuch wird eine Zählkammer für Hefezellen verwendet. Sie unterscheidet sich von Bakterienzählkammern in ihrer größeren Höhe und damit dem Volumen der Kammerelemente.

Mittels des bekannten Kammervolumens und den ausgezählten Zellen kann man dann den Titer (Zellzahl / ml) nach folgender Formel berechnen:

$$TF = \frac{Z}{V} \quad (1)$$

mit Z = gefundene Zellzahl pro Kleinstquadrat

V = Volumen über einem Kleinstquadrat (ml) $\rightarrow 2.5 \times 10^{-7}$ ml

F = Verdünnungsfaktor der ausgezählten Suspension

B.2 Auswertung/Diskussion

Insgesamt wurden 8 Kleinquadrate ausgezählt, damit ergaben sich folgende Werte.

Tabelle B-1: Auszählung der Hefesuspension

Kleinquadrat (16 Kleinstquadrate)	Zellzahl	Zellzahl/Kleinstquadrat
1	34	2.13
2	24	1.50
3	52	3.25
4	33	2.06
5	39	2.44
6	22	1.38
7	48	3.00
8	46	2.88

Damit ergibt sich für Z (gefundene Zellzahl pro Kleinstquadrat):

$$Z = \frac{2.13 + 1.50 + 3.25 + 2.06 + 2.44 + 1.38 + 3.00 + 2.88}{8} = 2.33 \quad (2)$$

Zur Auszählung wurde die erhaltene Hefestammlösung 1:10 verdünnt. Damit ergibt sich für F (Verdünnungsfaktor der ausgezählten Suspension):

$$F = 10 \quad (3)$$

Aus diesen Werten ergibt sich der Titer der Hefelösung wie folgt:

$$T_{ml} = \frac{2.3310}{2.510^{-7} ml} \cdot 9.3210^{-7} \quad (4)$$

Das bedeutet dass sich in einem Milliliter der Hefesuspension ca. 9.32×10^7 Hefezellen befinden.

C. MESSUNG DER GRÖÖE VON MIKROORGANISMEN

C.1 Einleitung

Zur Messung der Größe von Mikroorganismen wird ein Mikroskop mit einem Okularmikrometer verwendet. Dies enthält eine Skala die mittels eines Objektmikrometers geeicht wird. Mit dem geeichten Okularmikrometer kann dann die Größe der Mikroorganismen direkt unter einem einfachen Lichtmikroskop ermittelt werden.

C.2 Auswertung/Diskussion

Zur Bestimmung der Größe verschiedener Mikroorganismen wurde das Okularmikrometer als erstes kalibriert.

Tabelle C-1: Kalibriertabelle zur Größenmessung

	40er Objektiv	100er Objektiv
15 Skalenteile entsprechen	50 μm	20 μm
5 Skalenteile entsprechen	16.67 μm	6.67 μm

Mit Hilfe dieser Werte können nun die Längen, bzw. Breiten der Mikroorganismen bestimmt werden. In einigen Fällen konnten nur Werte abgeschätzt werden, da die Mikroorganismen in Bewegung waren oder mit dem 100er Objektiv nicht scharf abgegrenzt werden konnten.

Tabelle C-2: Größen und Breiten der untersuchten Mikroorganismen

Organismus	Länge (μm)	Literaturwert (μm)
<i>Bacillus subtilis</i>	5.3	1 - 1.5
<i>Staphylococcus carnosus</i>	1.2	2.5 - 3.2
<i>Escherichia coli</i>	2.67	2 - 3.5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	16.67	2.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6.67	4.5 - 8
<i>Micrococcus luteus</i>	2.00	1 - 1.5
Breite (μm)		
<i>Streptomyces spec.</i>	2.4	1 - 2
<i>Botrytis cinerea</i>	1.2	9 - 11

Die größte Abweichung vom Literaturwert wurde bei *Pseudomonas* und bei *Botrytis* festgestellt. Ein Grund für die große Abweichung könnte unter anderem sein, dass sich die Mikroorganismen ständig in starker Bewegung befanden und die Größe deshalb nur sehr ungenau geschätzt werden konnte.

D. UNTERSCHIEDUNG VON GRAM-NEGATIVEN UND GRAM-POSITIVEN BAKTERIEN

Es gibt mehrere Möglichkeiten Bakterien einzuteilen, z.B. nach der Struktur oder nach ihrer Lebensweise (z.B. aerob oder anaerob) oder weiteren physiologischen Parametern. Eine sehr bedeutende Unterscheidungsmöglichkeit beruht auf den verschiedenen Zellwandstrukturen und den damit verbundenen Färbereigenschaften bei der Gramfärbung. Durch sie können Bakterien in gram-negative und gram-positive Prokaryonten unterteilt werden.

Die gram-negative Zellwand besitzt eine vielschichtige komplexe Struktur; sie besteht aus starren Schichten, welche hauptsächlich aus Peptidoglycan bestehen. Zusätzlich enthält sie eine äußere Wandschicht, welche vor allem aus Lipopolysacchariden besteht.

Die grampositive Zellwand besteht dagegen fast ausschließlich aus Peptidoglycan und ist im Vergleich zu der gramnegativen Zellwand meist viel dicker. Ein wichtiges Charakteristikum sind hier die Teichonsäure und die Lipoteichonsäure, welche kovalent an das Peptidoglycan gebunden sind.

In den folgenden Versuchen werden Möglichkeiten zur grundlegenden Unterscheidung von gramnegativen und grampositiven Bakterien durchgeführt.

D.1 Die Gram-Färbung

D.1.a Einleitung

Die Gramfärbung beruht wie bereits erwähnt auf den unterschiedlichen Zellwandstrukturen der Bakterien. In der Gramfärbung wird in der Zelle ein unlöslicher Kristallviolett-Iod-Komplex gebildet und durch Alkohol aus den gramnegativen Bakterien entfernt. Dies funktioniert jedoch nicht bei grampositiven Prokaryonten.

Ursache ist, dass die sehr dicken mehrschichtigen Zellwände der gram-positiven Bakterien durch den Alkohol dehydriert werden und sich dadurch die Poren der Zellwände schließen und so den Farbstoff in den Wänden einschließen. Bei gramnegativen Bakterien dringt der Alkohol leicht in die Lipopolysaccharidschicht ein und entfernt den Farbstoffkomplex. Zusätzlich ist die Peptidoglycanschicht sehr dünn, so dass der Farbstoff sehr leicht hinaustritt.

Unterscheidung von gram-negativen und gram-positiven Bakterien

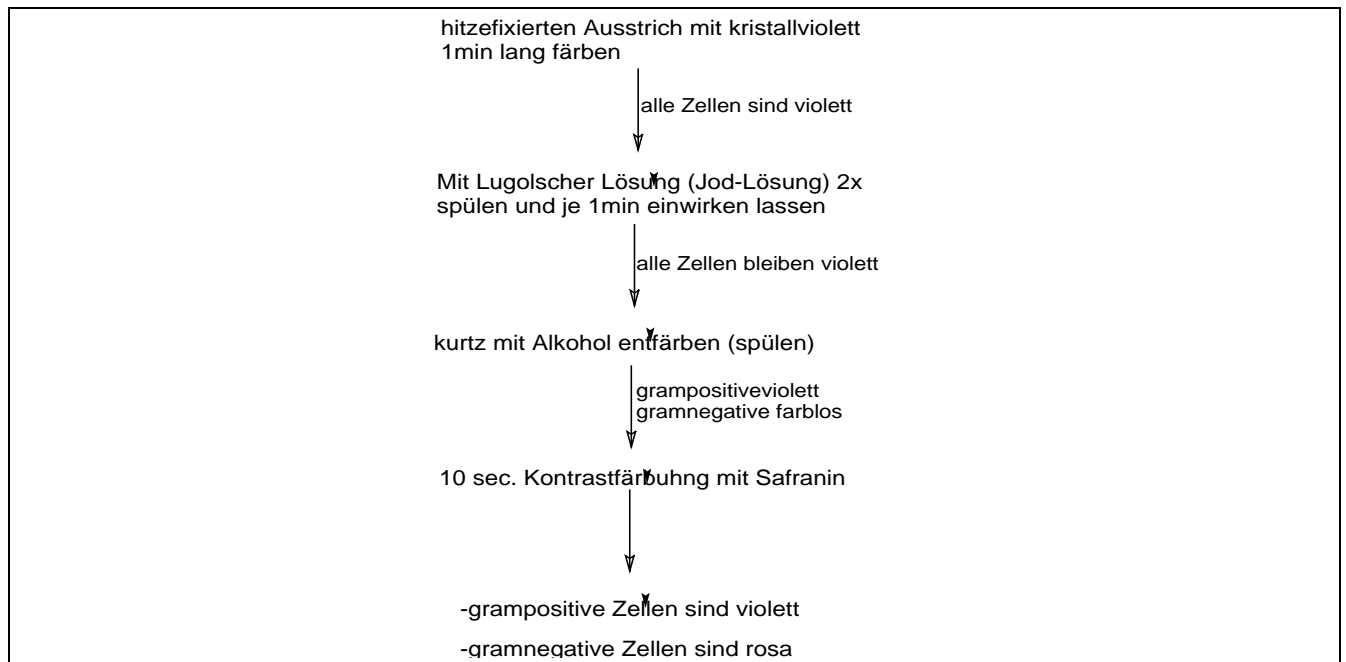


Abbildung D-1: Ablauf der Gram-Färbung (genaue Anleitung siehe Skript)

D.1.b Auswertung / Diskussion:

Es wurden insgesamt vier Gramfärbungen durchgeführt bei folgenden Bakterien:

- *Bacillus subtilis*
- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus carnosus*
- Alle drei Stämme zusammen

Die erhaltenen Färbungen waren bis auf *Escherichia coli* recht eindeutig.

Jedoch konnte im Vergleich zu den anderen beiden Stämmen die entstandene dunkelrote Färbung eindeutig als gramnegative Färbung identifiziert werden.

Tabelle D-1: Resultate der Gram-Färbung

Prokaryont	Farbe	Zuordnung
<i>Bacillus subtilis</i>	violett	gram-positiv
<i>Escherichia coli</i>	dunkelrot	gram-negativ
<i>Staphylococcus carnosus</i>	violett	gram-positiv

D.2 Alkalische Lyse

D.2.a Einleitung

Bei dieser Methode handelt es sich um ein Schnellverfahren zur Gram-Differenzierung.

Das Verfahren beruht darauf, dass 3%ige KOH die Zellwand von gram-negativen Bakterien zerstört. Durch diese Lyse wird die DNA frei, welche dann vorsichtig als viskoser Faden mit einem Zahnstocher aus der Lösung gezogen werden kann. Gram-positive Bakterien lysieren unter anderem durch die dicke ihrer Zellwand unter diesen Bedingungen gar nicht oder kaum.

E. ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG UNBEKANNTER BAKTERIEN

Ziel des Versuchs ist es aus einer beliebigen Probe Bakterien zu isolieren, zu vermehren und zu identifizieren.

E.1 Isolierung unbekannter Bakterien

Um Mikroorganismen untersuchen und identifizieren zu können, müssen sie als erstes vermehrt werden. Dazu sind geeignete Nährmedien notwendig die alle für ein optimales Wachstum notwendige Bedingungen erfüllen. Das bedeutet, dass man durch die Wahl bestimmter Medien nur ganz bestimmte Mikroorganismen zum Wachstum bringen kann. Eine einfache Vermehrung reicht aber nicht aus. Durch großes Verdünnen der Bakterienlösungen können diese vereinzelt werden, so dass sich auf den Nährmedien separate Kolonien bilden. Durch einen so genannten Verdünnungsausstrich können dann die einzelnen Kolonien noch einmal aufgetrennt werden und von den dann erhaltenen Kolonien Reinulturen angezogen werden.

Für die Vermehrung verwendete Medien:

- *Komplexmedium I (KI)*: Bei diesem Medium handelt es sich um ein Medium, auf dem alle Mikroorganismen wachsen können. Da keine speziellen Bakterien herausselektiert werden, kann durch die auf diesem Medium wachsenden Kolonien die Gesamtkeimzahl der Probelösung bestimmt werden.
- *McConkey-Agar*: Hier handelt es sich um ein Selektivmedium, auf dem nur gram-negative Bakterien wachsen können. Es eignet sich besonders für Salmonellen, Shigellen und andere Coliforme.

E.1.a Bestimmung der Keimzahl der Probe

Für diesen Versuch wurde eine Erdprobe aus einem käuflichen Basilikumtopf verwendet. Ca. 1 g dieser Bodenprobe wurden in 9 ml Saline (Verhältnis 1:10) aufgeschlämmt. Anschließend wurde die Probe stehengelassen, bis sich die Erde absetzt hatte und ein klarer Überstand gebildet wurde. Von diesem Überstand wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Dazu wurden 0.5 ml dieser Lösung mit 4.5 ml Saline 1:10 verdünnt. Es wurde noch je eine 1:100, 1:1000 und eine 1:10000 Verdünnung angesetzt. Von der Ausgangslösung und den Verdünnungen wurden anschließend je 100µl auf je einen KI- und einen McConkey-Agar ausplattiert. Alle Platten wurden dann über Nacht bei 37 °C inkubiert.

E.1.b Auswertung/Diskussion

Bestimmung des Titers: Da durch das Ausplattieren die Bakterien vereinzelt wurden, kann man aus der Zahl der Kolonien pro Platte auf die Anzahl der lebenden Keime in der Probelösung schließen.

Auszählung der Platten: Zum KI-Medium sei angemerkt, dass alle Platten bis auf die der 1:100 Verdünnung ausgezählt werden konnten, da bei dieser Verdünnungsstufe eine großflächige Kolonie fast

die ganze Platte bedeckte. Ursache könnte zum einen eine falsche Verdünnung oder aber eine Verunreinigung sein, da bereits bei der 1:10 Verdünnung nur 38 kleine vereinzelte Kolonien entstanden sind.

Tabelle E-1: Auszählung der Lebendkeimzahlen

Verdünnung	Ausgang	1:10	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵
Anzahl der Kolonien (KI)	528	38	großflächige Kolonie	8	3	0
Anzahl der Kolonien (McConkey)	?	23	3	0	0	0

Für die beiden Medien soll jeweils der Titer bestimmt werden. Da bei beiden Medien die 1:100-Verdünnung durch gute Vereinzelung leicht auszuzählen waren, werden diese Ergebnisse für die Berechnung des Titers weiter verwendet. Für den Titer gilt:

$$T = \frac{Z}{V} \quad (6)$$

Berechnung für Komplexmedium I (Gesamtkeimzahl):

Mit $V = 0.1$ ml, dem Verdünnungsfaktor 10 und den 38 ausgezählten Kolonien gilt:

$$T = \frac{3810}{0.1\text{ml}} = 3800\text{ml}^{-1} \quad (7)$$

Das bedeutet dass sich in 1 ml der Lösung 3800 Keime befinden. Als Probe wurde aber 1 g Erde in 9 ml Saline aufgeschlämmt verwendet. In dem 1 g Erde befanden sich daher insgesamt 34200 Keime.

Berechnung für McConkey-Agar (Anzahl gramnegativer Bakterien):

Mit $Z = 0.1$ ml, dem Verdünnungsfaktor 10 und den 23 ausgezählten Kolonien gilt:

$$T = \frac{2310}{0.1\text{ml}} = 2300\text{ml}^{-1} \quad (8)$$

Das bedeutet, dass sich in 1 ml Probenlösung 2300 gramnegative Bakterien befinden und in 1 g Erde insgesamt 20700 Keime.

E.1.c Verdünnungsausstrich zur Isolierung von Einzelkolonien:

Sowohl bei den Verdünnungsausstrichen des KI-Mediums als auch bei denen des McConkey-Agars wuchsen gut abgetrennte Einzelkolonien heran.

E.2 Identifizierung unbekannter Bakterien

Bei der Untersuchung der Kolonien auf den KI-Platten ergaben sich folgende makroskopische Merkmale:

Form	Oberfläche	Farbe	Muster
rund	glatt/rau	gelblich	rund

Des Weiteren ergaben sich folgende mikroskopische Merkmale:

Form	Beweglichkeit	Sporen	Größe
Stäbchen	mobil	keine	Keine genaue Messung möglich

Bei der Untersuchung der Kolonien auf den McConkey-Platten ergaben sich folgende makroskopische Merkmale:

Form	Oberfläche	Farbe	Muster
rund	glatt	gräulich	rund

Des Weiteren ergaben sich folgende mikroskopische Merkmale:

Form	Beweglichkeit	Sporen	Größe
Kokken	mobil	keine	Keine genaue Messung möglich

Um eine genauere Bestimmung der Mikroorganismen zu erhalten, müssen außer der morphologischen Unterscheidung weitere Methoden herangezogen werden.

Dazu gehört außer der Bestimmung des Gram-Verhaltens vor allem die Bestimmung physiologischer Merkmale wie z.B. die Fähigkeit zu anaeroben oder aeroben Wachstum und die Verwertung verschiedener Kohlenstoff-Quellen. Weitere Methoden beziehen sich auf die Bildung spezifische Enzyme und die Ausscheidung bestimmter Stoffwechselprodukte.

Zur Analyse dieser Faktoren werden spezielle Nährmedien sowie spezielle Reagenzien verwendet.

E.2.a Analyse der Kulturen auf Komplexmedium I

Bei den Kolonien auf dem KI-Medium wurden folgende Versuche durchgeführt:

(1) **Gram-Färbung**

Wie im vorherigen Versuch beschrieben, wurde eine Gram-Färbung durchgeführt

(2) **Untersuchung auf Stärke-Abbau**

Eine resuspendierte Kolonie wird auf einem Stärke-Agar ausgestrichen und ca. 3 Tage lang inkubiert. Anschließend wird die Platte mit Lugolscher Lösung überflutet. Der Agar färbt sich durch die Jod-Stärke Reaktion violett. Um die Kolonien, welche Stärke abbauen, bildet sich ein gelblicher Hof.

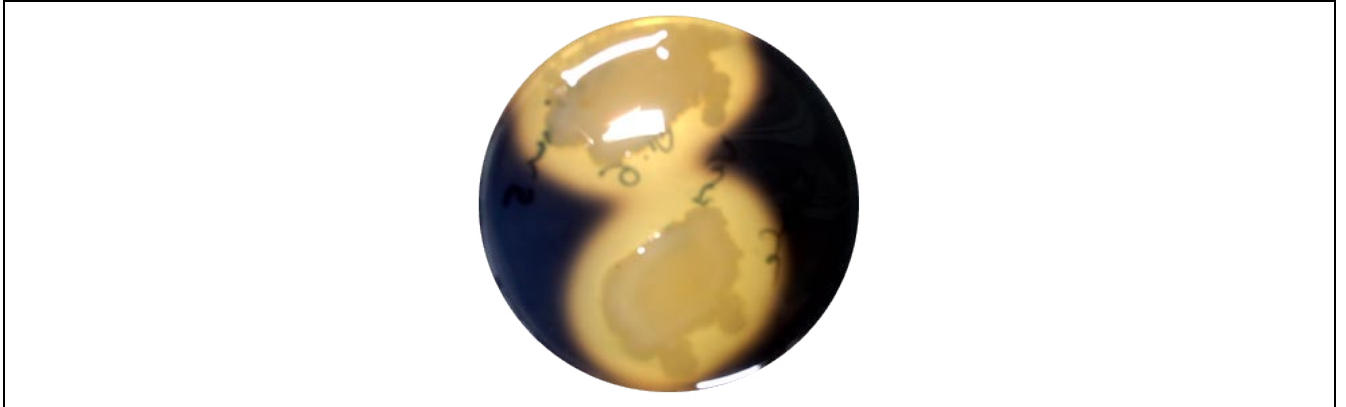


Abbildung E-1: Photo der Stärke-Test-Platte (mit Iodfärbung)

(3) Untersuchung auf Protease-Ausscheidung

Die Isolate werden auf einem Magermilch-Agar ausgestrichen. Nachdem die Platte einen Tag lang inkubiert wurde, bilden sich um Kolonien, die Proteasen ausscheiden, klare Zonen aus, da hier die Milch-Proteine abgebaut werden.

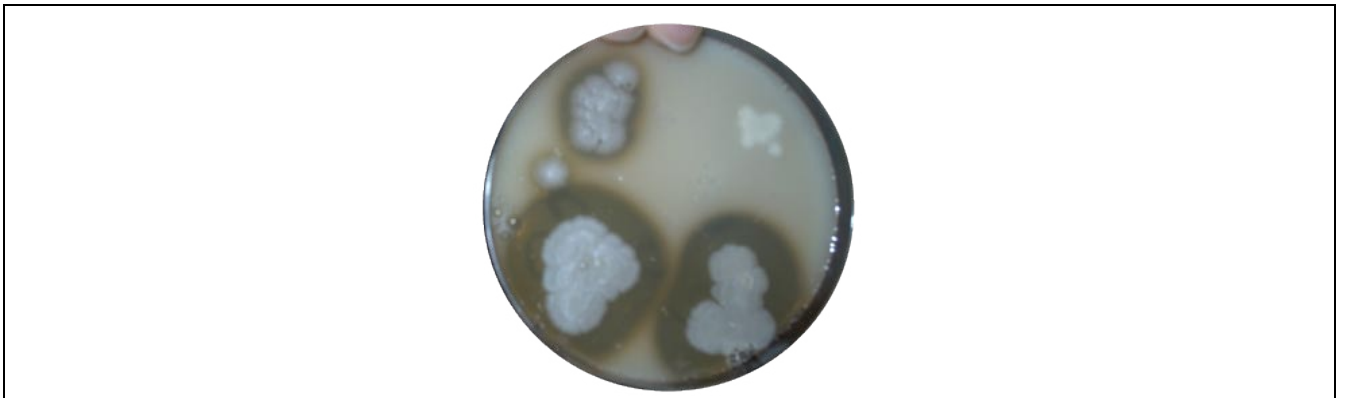


Abbildung E-2: Photo der Protease-Test-Platte

(4) Untersuchung auf Citrat-Verwertung

Auf ein mit Phenolrot versetzten Citrat-Agar wird etwas von der Bakteriensuspension ausgestrichen. Bauen die Bakterien der Kolonie Citrat ab, wird das Medium um die Kolonie alkalisch und der pH-Indikator schlägt von rot nach violett um.

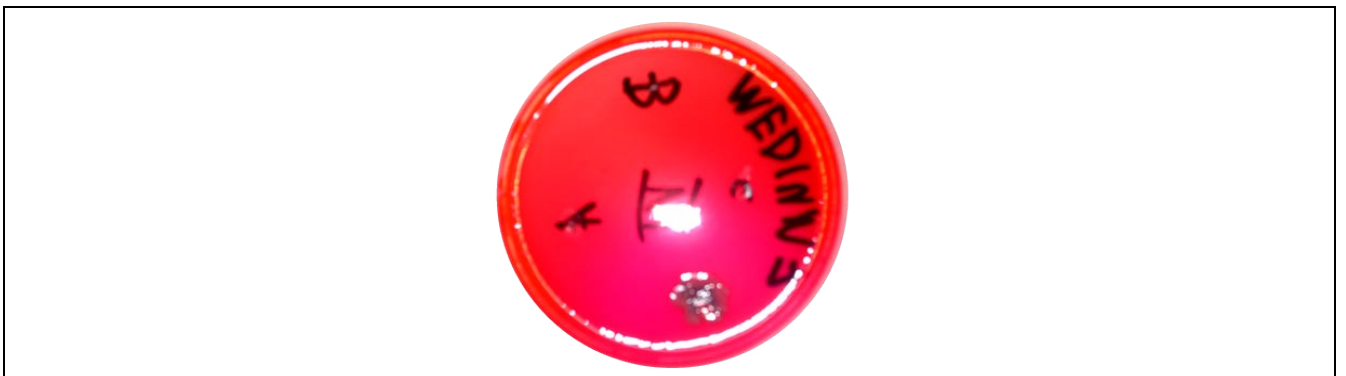


Abbildung E-3: Photo der Citrat-Test-Platte

E.2.b Auswertung

Bei der Untersuchung der Reinkultur auf dem Komplexmedium I ergaben sich nach Durchführung der Tests folgende Ergebnisse:

Gram-Differenzierung	Stärke-Abbau	Protease-Ausscheidung	Citrat-Verwertung
gram-positiv	ja	ja	ja

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte keine eindeutige Identifikation des Bakteriums erfolgen.

E.2.c Analyse der Reinkultur auf McConkey-Agar

Da die Bakterien auf diesem Medium wachsen, ist bereits bekannt, dass sie gram-negativ sind. Um physiologische Merkmale der Bakterien zu bestimmen, wurde zunächst ein Oxidase-Test durchgeführt. Dazu wurde ein Teil einer Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher auf die Reaktionszone eines Oxidase-Teststreifens aufgebracht. Bei positiver Reaktion verfärbt sich dieser Bereich blau. Bei unserer Kolonie war dies der Fall, d.h. der Oxidase-Test war positiv. Zur weiteren Untersuchung gramnegativer Bakterien kann ein Test mittels eines Enterotubes durchgeführt werden (Anleitung und Aufbau siehe Anhang). Dazu muss die Kolonie jedoch Oxidase-negativ sein. Da dies bei uns nicht der Fall war, wurde für die Durchführung dieses Tests eine gram-negative / Oxidase-negative Kolonie der Gruppe 9 verwendet (Bakterien stammen aus Blumenwasser).

Tabelle E-2: Resultate des Enterotube-Tests

Glucose	Gasproduktion	Ornithin	H ₂ S	Indol	Adonitol	Lactose	Arabinose
+	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	Voges Proskauer	Dulcitol	Phe	Harnstoff	Citrat	Lysin	
-	-	-	-	-	-	-	

Es ergab sich mit diesen Ergebnissen ID = 4000, dieser Nummer sind *Yersinia pestis* oder *Shigella flexneri* zuzuordnen.

Da es sich bei der ersten Art um den Erreger der Pest handelt, wollen wir dieses Ergebnis ausschließen. Es ist anzunehmen dass es sich bei den Bakterien um eine Shigellen-Art handelt.

F. WACHSTUM VON BAKTERIEN IN FLÜSSIGKULTUR

F.1 Versuchsbeschreibung

In diesem Versuch soll das Wachstum von Bakterien unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum von *Escherichia coli* sowie *Pseudomonas fluorescens* bei verschiedenen Temperaturen, in verschiedenen Medien und Kolben (Normalkolben oder Schikanekolben) als Stand- und Schüttelkultur verfolgt. Letztere Parameter (Form der Kolben und Stand/Schüttelkultur) bestimmen die Verfügbarkeit von Sauerstoff in den Medien.

Unsere Gruppe untersuchte das Wachstum von *P. fluorescens* bei 27 °C.

F.2 Versuchsergebnisse

Das Wachstum wurde einerseits mit Hilfe von Trübungsmessungen (Extinktion bei 578 nm) verfolgt.

Tabelle F-1: Ergebnisse der Extinktionsmessungen

Zeit [h]	1	2	3	4	5	6
	Schüttelk. Normalk. K1	Schüttelk. Schikanek. K1	Schüttelk. Normalk. S2	Schüttelk. Schikanek. S2	Standk. Normalk. K1	Standk. Normalk. S2
0		0.036				
1.5	0.089	0.084	0.051	0.035	0.060	0.048
3	0.334	0.339	0.141	0.072	0.094	0.076
4.5	1.270	1.320	0.310	0.227	0.135	0.101
6	2.400	3.340	0.310	0.569	0.475	0.367

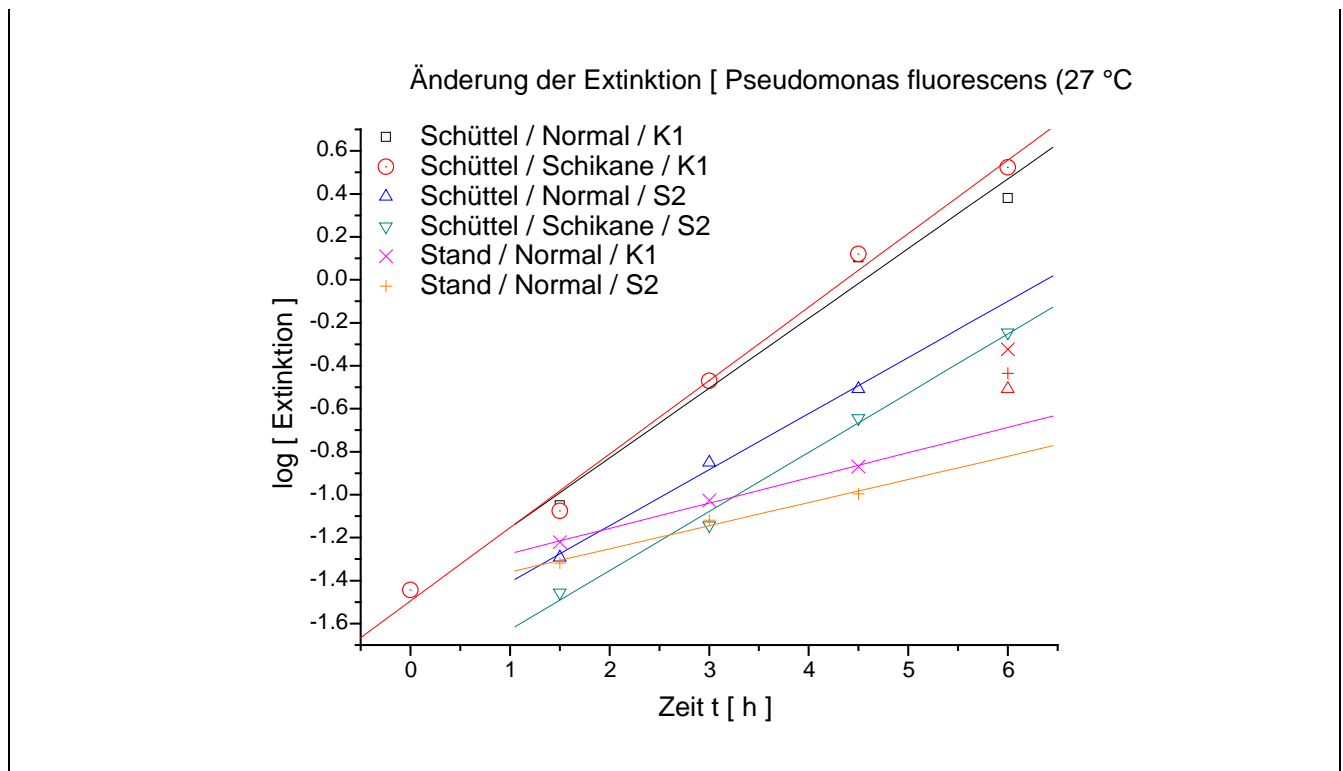


Abbildung F-1: log(Extinktions)-Zeit-Verläufe mit Regressionsgeraden

Die Ergebnisse der linearen Regression tragen wir in Abhängigkeit der Probennummer auf.

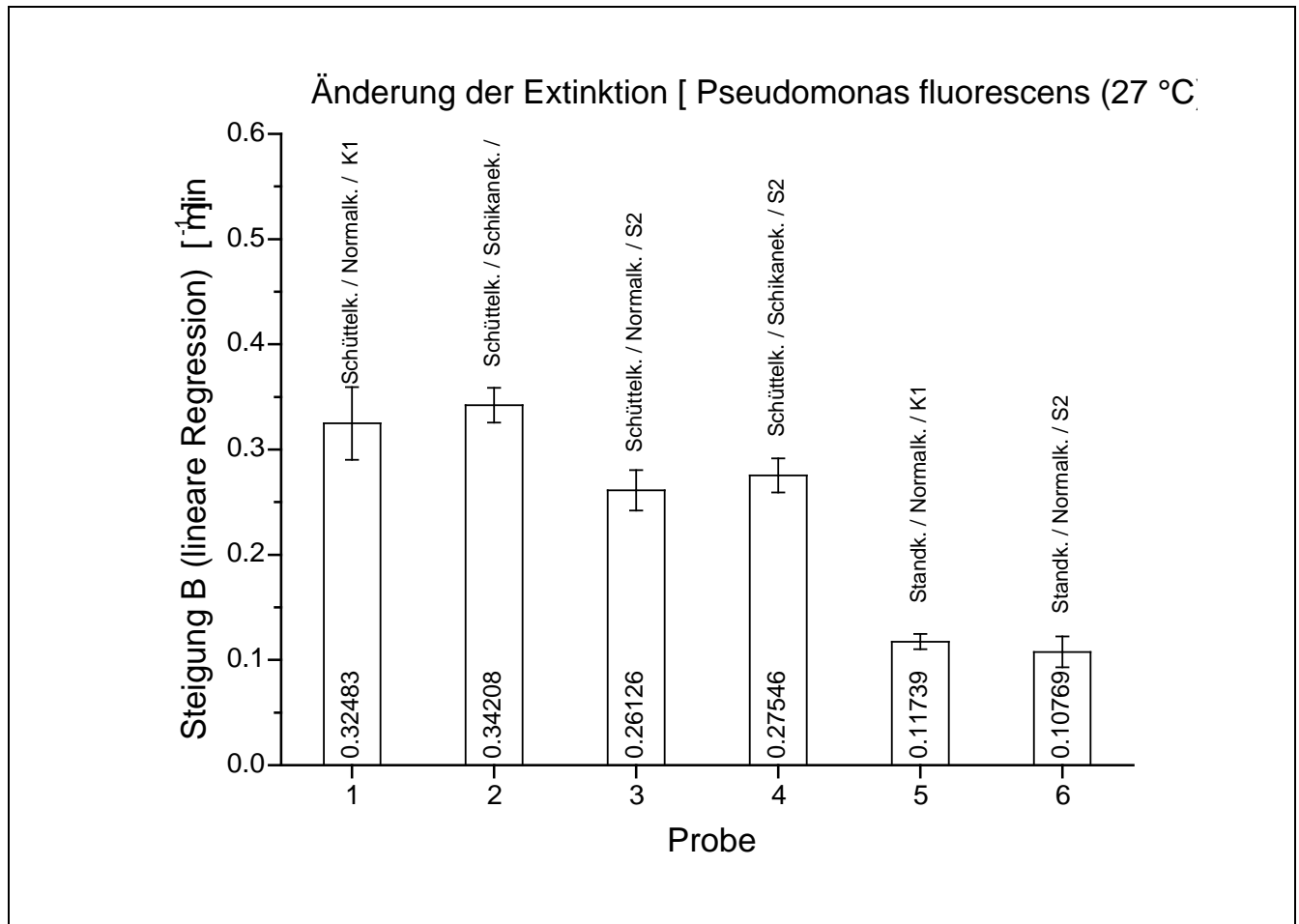


Abbildung F-2: Extinktionsänderung in Abhängigkeit der Probe

Andererseits wurden Proben von Kolben 2 verdünnt und ausplattiert, um die Lebendzellzahl (bzw. die Zahl der koloniebildenden Einheiten) zu bestimmen.

Tabelle F-2: Bestimmte Lebendzellzahlen von Probe 2

Zeit [h]	Verdünnung	Kolonienzahl	Koloniebildende Einheiten
0	1.00E-04	124	1.24E+07
1.5	1.00E-04	169	1.69E+07
1.5	1.00E-05	31	3.10E+07
1.5	1.00E-05	31	3.10E+07
3	1.00E-05	96	9.60E+07
3	1.00E-06	11	1.10E+08
4.5	1.00E-06	16	1.60E+08
4.5	1.00E-07	2	2.00E+08
4.5	1.00E-08	0	-
6	1.00E-06	71	7.10E+08
6	1.00E-07	7	7.00E+08
6	1.00E-08	7	7.00E+09

Den Logarithmus des Mittelwerts aus den gewonnenen Ergebnissen tragen wir gegen die Zeit auf:

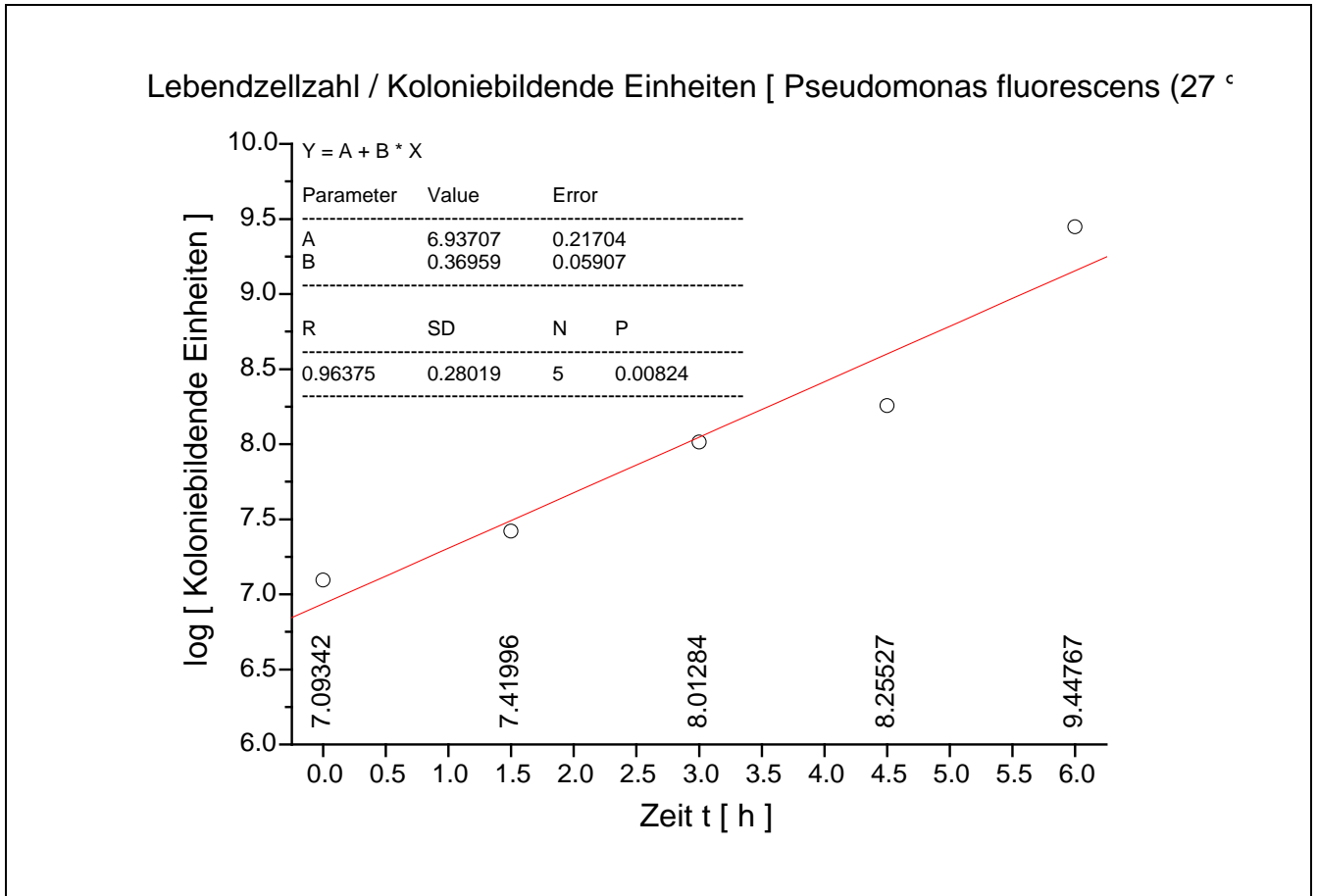


Abbildung F-3: *log*(Lebendzellzahl)-Zeit-Verläufe von Probe 2

Ein Vergleich der Ergebnisse der Messung der optischen Dichte und der Bestimmung der Lebendzellzahl zeigt die folgende Abbildung. Die Abweichung resultiert vermutlich aus einer Messungenauigkeit.

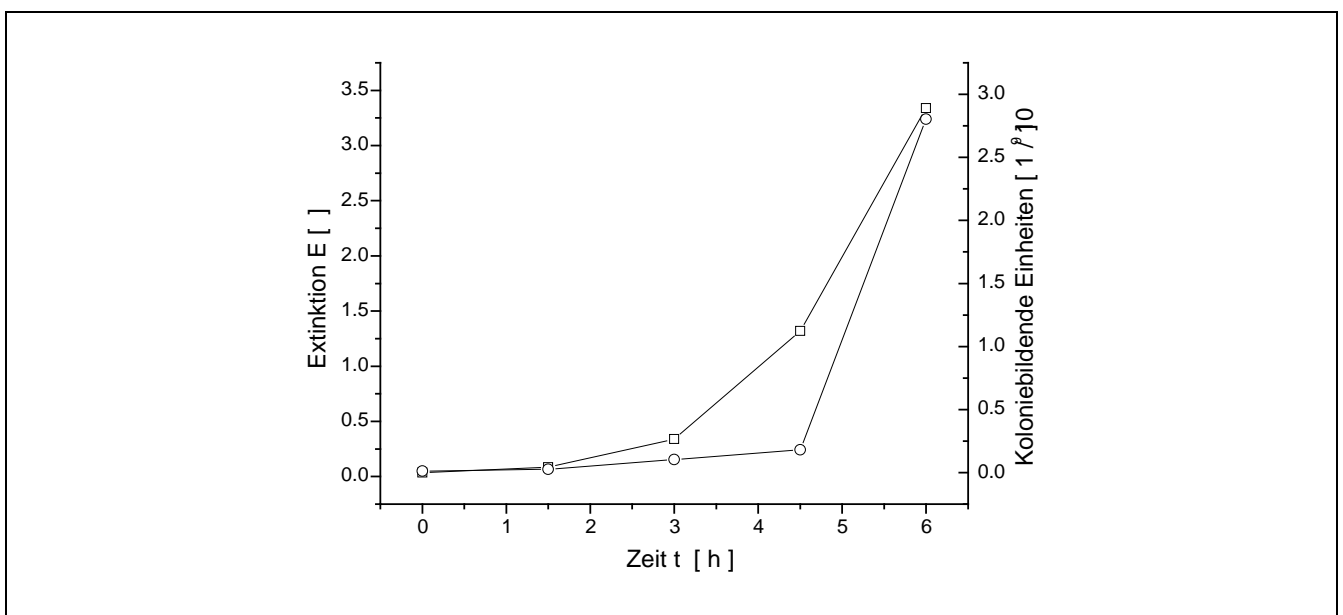


Abbildung F-4: Vergleich der Trübungsmessung und der Lebendzellzahlbestimmung von Probe 2

G. KATABOLIT-REPRESSION

G.1 Versuchsbeschreibung

In diesem Versuch soll das Prinzip der Katabolitrepression untersucht werden, das hier die Verwertung von verschiedenen Kohlenstoffquellen betrifft. Wir untersuchen ein Modellsystem, das als Xylose-Operon *Staphylococcus xylosus* entnommen wurde und es diesem ermöglicht, mittels der auf dem Operon codierten Enzyme Xylose-Isomerase und Xylose-Kinase Xylose zu verwerten. Das Operon unterliegt der zweifachen Regulation; es wird durch Xylose induziert und durch Glucose reprimiert. Zu diesem Zweck wird einerseits der Repressor *xlyR* exprimiert, der an die zweite Operatorregion bindet, wenn er nicht an Xylose gebunden ist. Die erste Operatorregion andererseits unterliegt der (allgemeinen) Regulation von cAMP; die cAMP-Konzentration wird vor allem durch das Vorhandensein von Glucose bestimmt. Eine hohe Glucose-Konzentration hat zur Folge, dass wenig cAMP in der Zelle vorliegt und das cAMP-Response-Element CRE (in Abwesenheit von cAMP) an die erste Operatorregion des Xylose-Operons bindet. Fehlt demnach Glucose, so wird das CRE durch cAMP besetzt und kann nicht an die Operatorregion binden; das Operon kann - die Anwesenheit von Xylose vorausgesetzt - abgelesen und die für die Xyloseverwertung notwendigen Enzyme synthetisiert werden.

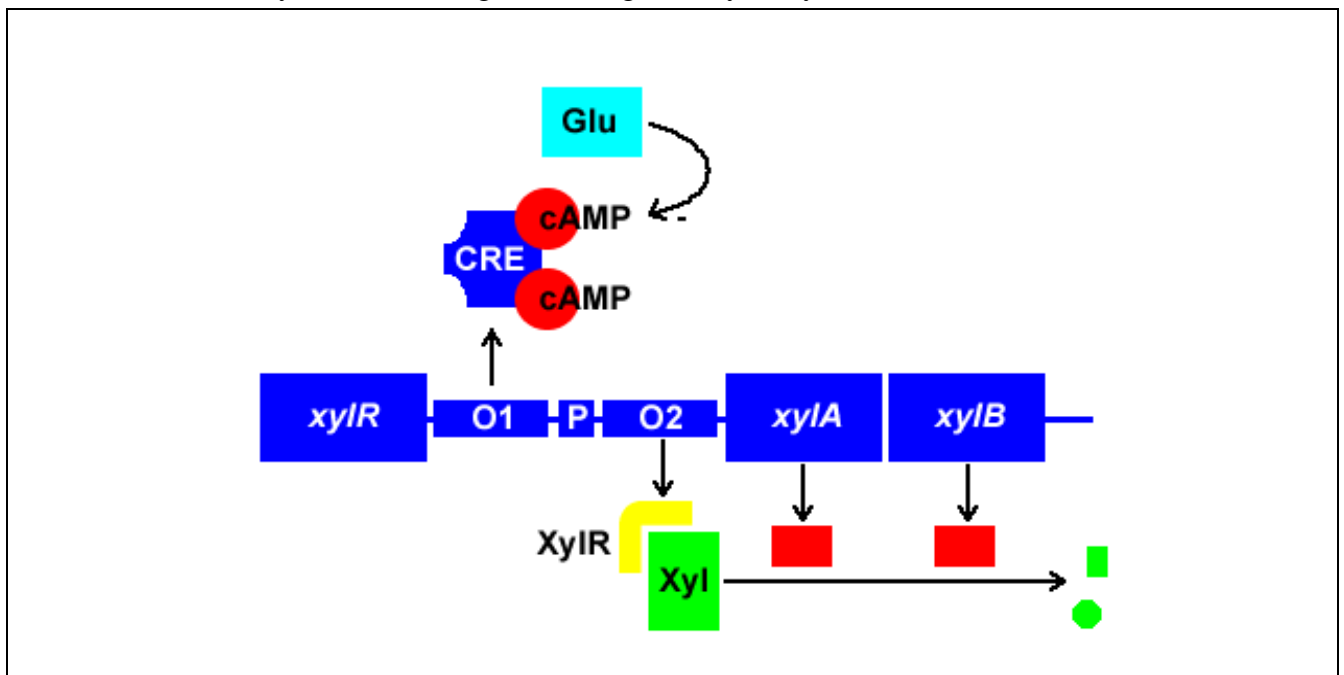


Abbildung G-1: Modell des Xyl-Operons (mit Regulatoren)

Zur Untersuchung der Katabolitrepression in diesem Versuch wurden die enzymcodierenden Bereiche des Operons (*xylA*, *xylB*) durch das Gen für das Exoenzym Lipase ersetzt, dessen (über die enzymatische Aktivität ermittelte) Konzentration Ausdruck für die Regulationsprozesse des Operons darstellt.

Im Versuch wurden zwei Stämme eingesetzt, welche das Lipase-Gen entweder von einem Plasmid konstitutiv exprimieren (Stamm pLipPS1) oder in denen das Lipase-Gen der oben beschriebenen Regulation unterliegt (Operon ebenfalls auf einem Plasmid im Stamm pCX15), dieser Stamm wurde bei verschiedenen Bedingungen inkubiert; entweder ohne Glucose und Xylose oder mit Glucose oder Xy-

lose oder mit Glucose und Xylose. Darüber hinaus wurde der Stamm pLipPS1 inkubiert (ohne Xylose und Glucose), ansonsten unter identischen Bedingungen. Nach beendeter Inkubation bei 37 °C für ca. 6 Stunden wurden Proben der Kulturen entnommen, eingefroren und mit diesen am nächsten Tag der Lipase-Aktivitäts-Test durchgeführt. Die Substratlösung (p-Nitrophenylcaprylat) wurde zu diesem Zweck frisch angesetzt, die Messdauer des Tests betrug zwei Stunden, die Proben wurden bei 37 °C inkubiert.

G.2 Versuchsergebnisse

Tabelle G-1: Extinktions-Zeit-Messungen der Proben (37 °C)

Zeit	Referenz KI / Testpuffer	Probe 1 pCX15	Probe 2 pCX15 / Xylose	Probe 2 (1:100)	Probe 3 pCX15 / Xylose & Glucose	Probe 4 pCX15 / Glucose	Probe 5 pLipPS1	Probe 5 (1:100)
0	0	0.077	0.245	-0.038	0.054	-0.065	0.032	-0.053
10		0.053	0.837	-0.035	0.04	-0.061	0.277	-0.051
15		0.06	1.931	-0.021	0.036	-0.044	0.745	-0.044
20	0.012	0.086	2.284	-0.006	0.04	-0.026	1.094	-0.036
27	0.024	0.124	2.37	0.011	0.069	-0.003	1.354	-0.03
35	0.033	0.157	2.38	0.028	0.091	0.017	1.457	-0.022
45	0.045	0.197	2.397	0.047	0.116	0.039	1.534	-0.013
55	0.055	0.242	2.39	0.069	0.148	0.065	1.562	-0.001
65	0.07	0.3	2.387	0.095	0.187	0.097	1.596	0.012
80	0.093	0.384		0.139	0.252	0.144	1.62	0.034
95	0.124	0.461	2.38	0.173	0.307	0.179	1.637	0.049
105	0.128	0.519		0.204	0.351	0.207	1.634	0.061
115	0.15	0.599		0.243	0.411	0.25	1.65	0.077

Die Änderung der Extinktion lässt sich nach graphischer Auftragung mittels linearer Regression beschreiben.

Katabolit-Repression

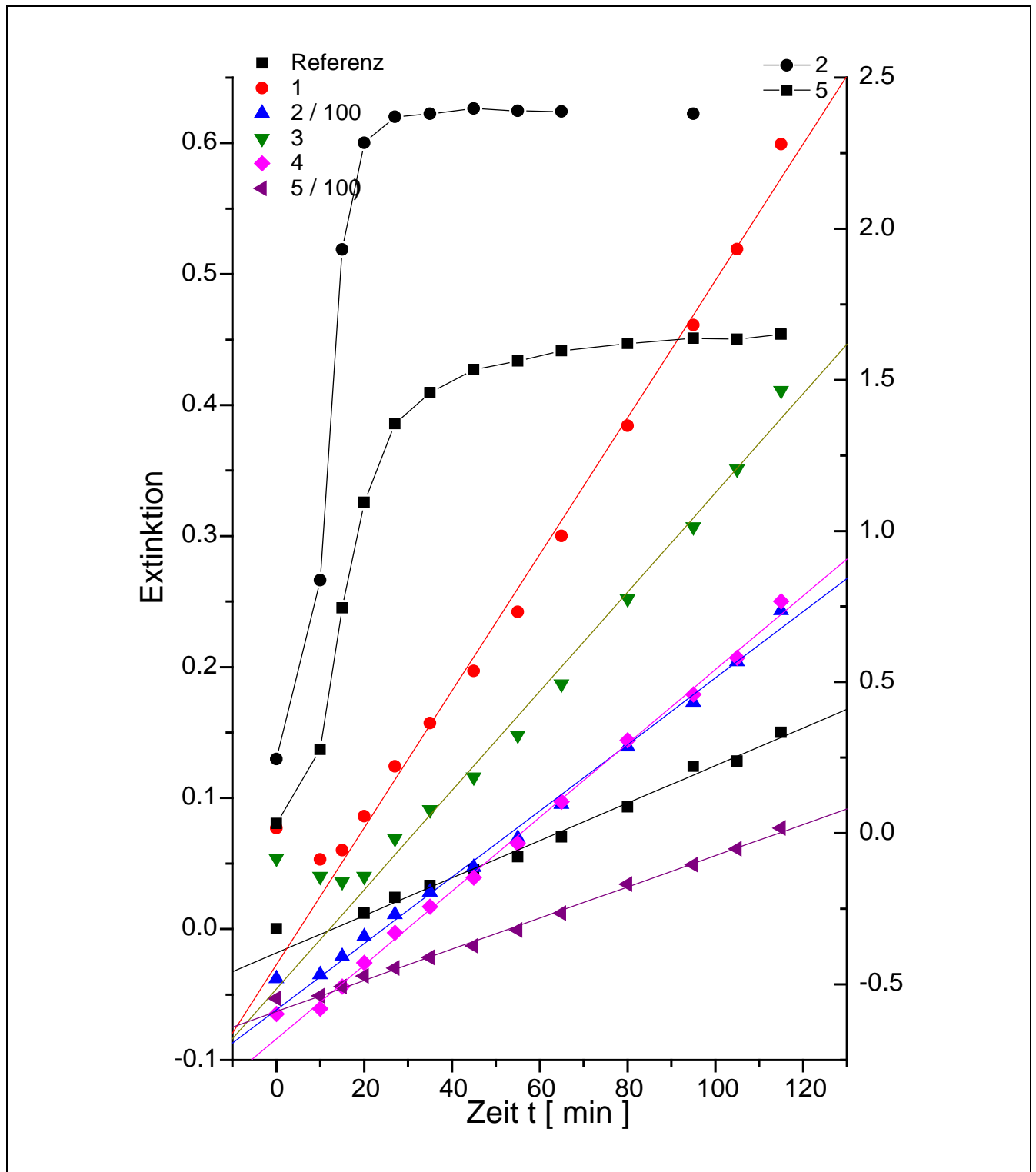


Abbildung G-2: Extinktions-Zeit-Verläufe mit linearen Regressionsergebnissen

Die Ergebnisse der linearen Regression tragen wir nun in Abhängigkeit der Probe (bzw. deren Zusammensetzung) auf, wir wollen dabei den Maximalwert der Extinktionsänderung auf 100 % normieren und geben so die relative Expressionsrate der Lipase in den verschiedenen Proben an.

Katabolit-Repression

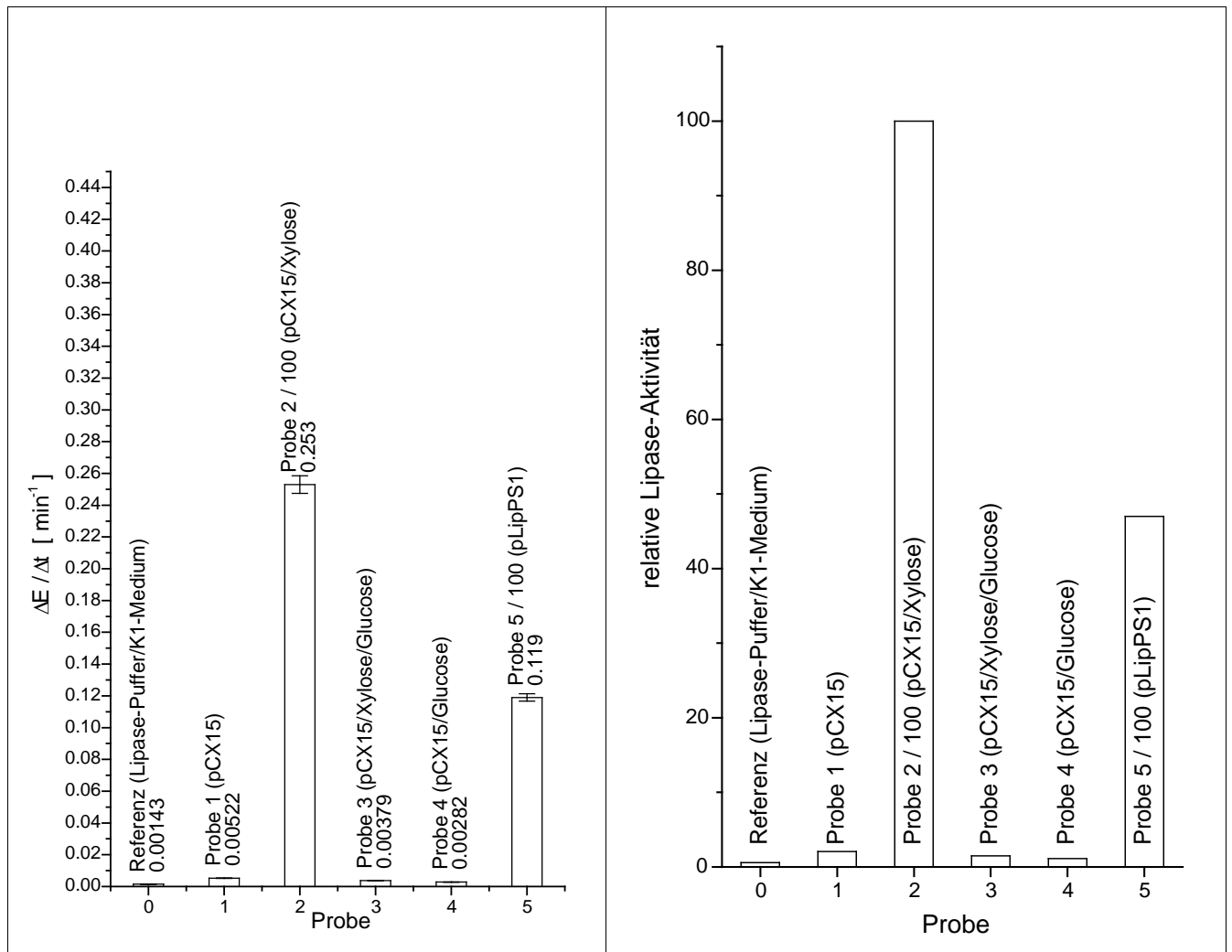


Abbildung G-3: Vergleich der Lipase-Aktivitäten (absolut und relativ)

Wir können so schließlich die Ergebnisse miteinander vergleichen und Induktions- sowie Repressionsfaktor angeben.

Abbildung G-4: Ergebnisse von Versuch G

	Lipaseaktivität in %				Induktionsfaktor	Repressionsfaktor	
	-	Xylose	Xylose & Glucose	Glucose		- / Glucose	- / Xylose & Glucose
pCX15	2.06	100.00	1.50	1.11	48.47	1.85	1.38
pLipPS1	47.04						

Es zeigt sich, dass das Ergebnis mit dem oben beschriebenen Mechanismus der Katabolitrepression gut übereinstimmt. Anzumerken sei noch, dass in Anwesenheit von Xylose neben Glucose eine geringfügig stärkere Expression der Lipase stattgefunden hat, im Vergleich zu dem Fall, in dem Glucose allein vorliegt, was zeigt, dass es sich bei dem Mechanismus der Katabolitrepression in gewisser Weise um Gleichgewichtsreaktionen und -verhältnisse handelt, die sich in An- oder Abwesenheit der Metaboliten verschieben.

H. BIOLOGISCH-CHEMISCHES SCREENING

Der Stamm *Streptomyces olivaceus* produziert das Antibiotikum Granaticin, welches wir nach entsprechender Inkubationszeit aus der Flüssigkultur mit Ethylacetat extrahierten. Das Antibiotikagemisch (aus Granaticin A und Granaticin B) wurde neben einem Standard mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die aufgetrennten Banden wurden auf eine mit *Bacillus subtilis* versetzte Agarplatte übertragen (Einzelheiten siehe Skript), wo auch ein Filterrondell mit der Ausgangslösung aufgelegt wurde.

H.1 Ergebnisse

Es zeigte sich auf dem Chromatogramm eine Vielzahl von Banden, die dem (abgebildeten) Chromatogramm des Standards entsprachen.



Abbildung H-1: Chromatogramm (Standard)

Das biologisch-chemische Screening war uneindeutig, da praktisch alle aufgetrennten Komponenten (Banden) einen Hemmhof erzeugten.



Abbildung H-2: Photo der Test-Agar-Platte (Mitte: Filterrondelle, im Gegen-Uhrzeigersinn von unten: aufsteigendes Chromatogramm)

Wahrscheinlich war die Menge der aufgetragenen Lösung zu groß. Dennoch lassen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Banden erkennen, die antibiotische Wirkung ist auf jeden Fall deutlich zu erkennen.

I. SELEKTIVE WIRKUNG VON ANTIBIOTIKA AUF VERSCHIEDENE ORGANISMEN

I.1 Einleitung

Antibiotika sind definitionsgemäß chemische Substanzen, welche von Mikroorganismen, vor allem von Bakterien und Pilzen, im Sekundärmetabolismus synthetisiert werden und bereits in geringen Mengen das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmen. Diese Stoffe können auf verschiedene Weisen in Gruppen unterteilt werden. Eine wichtige Einteilungsmöglichkeit folgt den Zielorten bzw. Organismen, z.B. ob die Antibiotika auf Eukaryonten oder Prokaryonten wirken. Im Versuch werden Antibiotika gegen beide Gruppen verwendet, welche zusätzlich unterschiedliche Wirkorte, wie z.B. die Ribosomen, die Zellmembran oder die Zellwand haben.

I.2 Auswertung/Diskussion

Im Anschluss an die Inkubation wurde der Durchmesser der entstandenen Hemmhöfe um die Filterrondellen ausgemessen.

Tabelle I-1: Größe der Hemmhöfe (Durchmesser in cm)

Antibiotikum (je 1g)	Lösungsmittel	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. cinerea</i>
Penicillin G / K+	50% EtOH	1.2	0.6	-	-
Nystatin	100% Aceton	-	-	1.0	2.4
Cycloheximid	100% Aceton	-	-	2.2	1.5
Erythromycin	100% Aceton	2.6	-	-	-
Polymyxinsulfat	H ₂ O (deion.)	0.9	1.2	-	1.0
Chloramphenicol	100% EtOH	2.0	1.0	-	-
Streptomycin	H ₂ O (deion.)	-	1.4	-	-
Thiostrepton	100% EtOH	1.3	-	-	-
Nalidixin	H ₂ O (deion.)	-	0.8	-	-

Auffällig sind vor allem die unterschiedlichen Wirkungen auf Prokaryonten und Eukaryonten. Dadurch wird die verschiedene Spezifität der Antibiotika deutlich.

I.2.a Wirkung der Antibiotika und Vergleich mit den Versuchsergebnissen

(1) Penicillin

Penicillin gehört zu der Gruppe der β -Lactamantibiotika. Es wirkt nur auf wachsende Prokaryonten mit einer aktiven Zellwandsynthese, da es die Quervernetzung des Peptidoglycans verhindert. Penicillin bindet an die dafür zuständige Transpeptidase und inaktiviert diese so. Durch die fehlende Quervernetzung kommt es am Ende zur Lyse der Zelle.

Dass dieses Antibiotikum nur auf Prokaryonten wirkt, ist auch im Versuch deutlich sichtbar geworden.

(2) Nystatin

Nystatin wirkt fungizid. Es verursacht das Entstehen von Löchern in den Zellwänden der Pilze und sorgt so für eine Lyse der Zellen.

Bei *Saccharomyces* und *Botrytis* handelt es sich um Pilze. Der Versuch bestätigt die beschriebene Wirkungsweise.

(3) Cycloheximid

Dies ist ein Antibiotikum, welches nur auf Eukaryonten wirkt. Es hemmt die 60S-Untereinheit der eukaryontischen Ribosomen und unterbindet so die Proteinbiosynthese.

Auch hier bestätigt der Versuch diese Tatsache.

(4) Erythromycin

Es hemmt die Proteinbiosynthese, indem es an die 50S-Untereinheit prokaryontischer Ribosomen bindet und die Translokation verhindert. Das Antibiotikum wirkt besonders gut auf gram-positive Bakterien.

Im Versuch war nur ein Hemmhof um *B. subtilis* sichtbar. Da es sich um ein gram-positives Bakterium handelt, gehen wir davon aus, dass die Hemmung auf *E. coli* (einem gram-negativen Bakterium) zu gering war, um dieses in diesem Versuch sichtbar zu machen.

(5) Polymyxinsulfat

Polymyxin ist ein Peptidantibiotikum welches unspezifisch sowohl auf Eukaryonten als auch auf Prokaryonten wirkt. Es bindet mit seinen freien NH₂-Gruppen an Phospholipide der Cytoplasmamembran und bewirkt dadurch die Zerstörung der Zelle.

Im Versuch wird die fehlende Spezifität deutlich, da sowohl *B. subtilis*, *E. coli* als auch *Botrytis* gehemmt werden.

(6) Chloramphenicol

Es hemmt die prokaryontische Proteinbiosynthese indem es die Peptidyltransferaseaktivität der Ribosomen hemmt.

Im Versuch wirkt das Antibiotikum wie erwartet auf die Prokaryonten *B. subtilis* und *E. coli*.

(7) Streptomycin

Es hemmt die Proteinbiosynthese der Prokaryonten indem es in der 30S-Untereinheit der Ribosomen zu einem falschen Ablesen der mRNA führt.

Wirkte im Versuch nur auf *E. coli*. Wahrscheinlich reichte die Konzentration nicht aus um *B. subtilis* zu hemmen oder wir haben das Antibiotikum nicht richtig aufgetragen.

(8) *Thiostrepton*

Dies ist ein Antibiotikum welches, wie im Versuch deutlich wird, nur auf gram-positive Prokaryonten wirkt. Auch hier wird die Proteinbiosynthese spezifisch gehemmt.

(9) *Nalidixin*

Nalidixin ist ein DNA-Gyrase-Hemmer vor allem für gram-positive Bakterien. Im Versuch wirkte es nur auf das gram-negative Bakterium *E. coli*. Dieses Ergebnis konnten wir uns nicht erklären.

K. BESTIMMUNG DER BAKTERIOSTATISCHEN UND BAKTERIZIDEN KONZENTRATION VON ANTIBIOTIKA

K.1 Einleitung

Bei Antibiotika unterscheidet man eine bakteriostatische und eine bakterizide Wirkung. Bakteriostatisch bedeutet, dass die Mikroorganismen reversibel durch das Antibiotikum im Wachstum gehemmt werden, wirken Antibiotika dagegen bakterizid, werden die Mikroorganismen abgetötet oder zerstört und ihre Zahl verringert sich effektiv.

Im Versuch sollen die Konzentrationen zweier verschiedener Antibiotika (Chloramphenicol und Streptomycin) ermittelt werden, ab denen sie bakteriostatisch oder bakterizid wirken. Dazu werden Verdünnungsreihen dieser Antibiotika angesetzt und diese zu Mikroorganismen in Flüssignährmedien gegeben. Nach einer gewissen Inkubationszeit wird die Bakterienzahl bzw. das Wachstum der Bakterien (Trübungsmessung) ermittelt werden.

K.2 Auswertung/Diskussion

Tabelle K-1: Versuchsergebnisse und Bestimmung der Lebendzellzahlen

Röhrchen-Nr.		1	2	3	4	5	6
KI		5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Übernachtskultur		0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
Antibiotikum		0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	-	-
Wachstum	Chloramph.	nein	nein	ja	ja	ja	ja
	Streptom.	ja	nein	ja	ja	ja	ja
Zellzahl / 100µl	Chloramph.	1384	416	-	-	-	-
	Streptom.		Rasen	-	-	-	-
Titer (Zellen / ml)	Chloramph.	1.38×10^5	4.16×10^4	-	-	-	-

Von den Ansätzen wurde einer als Referenz in den Kühlschrank gestellt, um das Wachstum der Bakterien zu unterbinden. Wird die Probe wieder bei 37 °C inkubiert, erhält man eine Probe in der alle Bakterien zum Wachstum befähigt sind.

Nach der Übernachtsinkubation zeigte sich nur in den Proben 1 mit Chloramphenicol und 2 bei beiden Antibiotika kein Wachstum (also keine Trübung). In diesen Proben wurde das Wachstum der Bakterien gehemmt oder sie wurden abgetötet. Um festzustellen, ob die Antibiotika bakteriostatisch oder bakterizid gewirkt haben, wurden je 100 µl der drei Proben auf Medien ausplattiert, um durch die Anzahl der darauf gewachsenen Kolonien den Titer zu bestimmen. Die Referenz ohne Antibiotikum wurde ebenfalls ausplattiert. Es bildete sich ein Rasen, so dass kein Titer bestimmt werden konnte.

Trotzdem kann man diese Platte zum Vergleich heranziehen. Da sich bei Ansatz 2 mit Streptomycin ebenfalls ein Zellrasen gebildet hat und damit sehr viele Klone vorhanden sind, kann man davon ausgehen, dass das Antibiotikum in dieser Konzentration bakteriostatisch wirkt.

Die Ergebnisse der Ansätze mit Chloramphenicol lassen darauf schließen, dass hier ein Fehler bei der Antibiotika-Konzentration vorlag. Hier wirkt, wie man anhand des kleineren Titors sieht, die geringere

Konzentration bakterizid und die höhere bakteriostatisch. Da dies aber normalerweise auszuschließen ist, kann das Ergebnis nur ein Anzeichen für einen Fehler in der Versuchsdurchführung sein.

L. DIAMINOPIMELINSÄURE-BESTIMMUNG MITTELS EINER DAP-AUXOTROPHEN MANGELMUTANTE VON E.COLI

L.1 Einleitung

Die Diaminopimelinsäure ist ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Quervernetzung der einzelnen Peptidoglycanstränge (Murein), welche das Stützskelett der Bakterien darstellen. Durch die beiden Aminogruppen des Mureins können zwei Peptidbindungen ausgebildet werden, die heteropolymeren Stränge sind so miteinander verknüpft.

Fehlt die Fähigkeit zur Synthese von DAP, sind die Bakterienstämme nicht in der Lage, ohne eine äußere Zugabe zu überleben und sich zu vermehren.

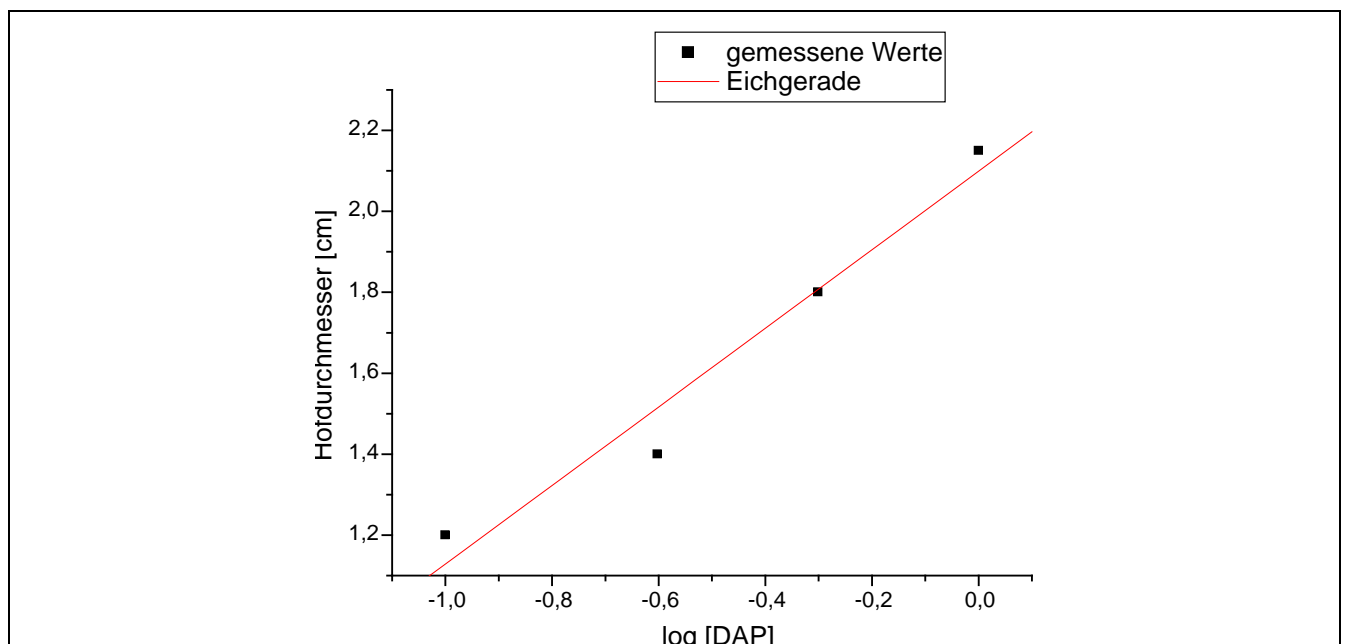
Im Versuch verwendet man eine Mangelmutante von *E. coli*, welche mit einem DAP-freien Medium vermischt und zu Platten gegossen wurde. Auf diese Platten wurden dann mit verschiedenen Konzentrierten DAP-Lösungen getränkte Filterrondelle gegeben. Diese Proben werden dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anhand der Wachstumshöfe um die Filter kann dann eine Kalibriergerade erstellt werden und damit die unbekannte Konzentration einer DAP-Lösung ermittelt werden.

L.2 Auswertung

Nach der Inkubation wurden die Durchmesser der Wachstumshöfe der bekannten Konzentrationen zum Erstellen einer Kalibriergeraden bestimmt.

Tabelle L-1: DAP-Konzentrationsabhängige Größe der Filterrondelle.

Konz. DAP [mg / ml]	log [DAP]	Hofdurchmesser [cm]
0.1	-1.000	1.2
0.25	-0.602	1.4
0.5	-0.301	1.8
1	0.000	2.15



Parameter	Value	Error		
A	-0.63152	0.00213		
B	5.95434E-4	9.47291E-5		
0.80146	0.00667	24	<0.0001	

Abbildung L-1: Kalibriergerade und Ergebnisse der linearen Regression

Die Geradengleichung lautet:

$$y = 0.971 x + 2.0993 \quad (9)$$

Anhand dieser eichgeraden kann nun die Konzentration der unbekanntes Lösung bestimmt werden. Der Hofdurchmesser dieser Lösung beträgt 1,8 cm. Damit gilt:

$$\log[\text{DAP}] = (1.8 - 2.0993) / 0.971 = -0.308 \quad (10)$$

Die Konzentration der DAP-Lösung wurde demnach zu 0.49 mg / ml ermittelt. Die tatsächliche Konzentration der unbekanntes Lösung betrug jedoch 0.8 mg / ml. Die große Abweichung könnte vor allem an der ungenauen Messung des Hofdurchmessers mit einem Lineal liegen.

M. KLONIERUNG DES KANAMYCIN-RESISTENZGENS

M.1 Versuchsinhalt und Durchführung

Der Begriff „Klonierung“ beschreibt die Neukombination von DNA-Elementen. Wir inserierten in diesem Versuch ein mittels PCR amplifiziertes DNA-Fragment für die Kanamycin-Resistenz *aphII* in einen als Vektor dienendes Plasmid (pUC18), das in Klone eines E. Coli-Stammes transformiert wurde. Das Plasmid enthält als Marker das Ampicillin-Resistenz-Gen *bla*. Mit Hilfe dieser beiden Resistenzgene konnten auf Ampicillin und/oder Kanamycin enthaltenen Selektivmedien Bakterienklone vermehrt werden, die das Plasmid (Ampicillinresistenz) bzw. das modifizierte Plasmid (Ampicillin- und Kanamycinresistenz) aufgenommen haben. Die entsprechenden Klone wurden vermehrt, die Plasmid-DNA isoliert und mit dieser nach einer Restriktionsspaltung eine Elektrophorese durchgeführt.

Der Versuchsvorschrift des Skripts wurde, die folgenden Punkte ausgenommen, gefolgt: In der PCR wurde kein Mineralöl zur Überschichtung verwendet, darüber hinaus wurden die im Skript angegebenen Zeiten für die Zentrifugationsschritte – auf Anweisung der Assistenten – nicht streng eingehalten.

M.2 Ergebnisse

Als Ergebnis dieses Versuchs erhalten wir erstens anhand der auf den Selektivmedien gewachsenen Kolonien, ob und in welchem Grad die Insertion des *aphII*-Gens für die Kanamycin-Resistenz und die Transformation der Zellen erfolgreich war.

Auf den Selektivmedien mit Ampicillin zeigte sich Wachstum von zwei Kolonien, auf den Selektivmedien mit Ampicillin und Kanamycin zeigte sich kein Wachstum.

Die Kolonien wurden in Flüssigmedium vermehrt und die Plasmid-DNA isoliert. Es wurde nach Restriktionsverdau mit *EcoRI/HindIII* eine Elektrophorese durchgeführt:

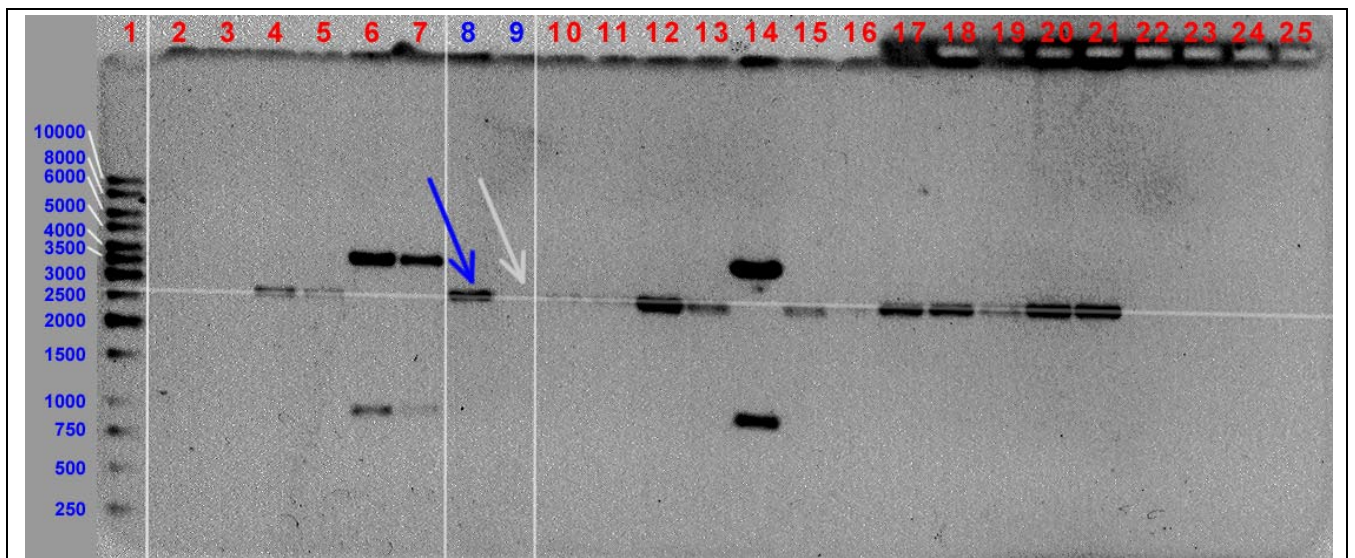


Abbildung M-1: PCR von Versuch M

Tabelle M-1: Erwartete und gefundene DNA-Fragmente

Komponente	Größe	Bande 8	Bande 9
Plasmid pUC18	2686 bp	x	x
aphII	1321 bp	-	-
Plasmid mit aphII	4007 bp	-	-

Es konnte also nur das unmodifizierte Plasmid nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass kein Wachstum auf Ampicilin-/Kanamycin-Selektivmedien stattfand und die Ergebnisse der Elektrophorese zeigen, dass die Klonierung nicht erfolgreich war. Das Wachstum auf Ampicilin zeigt, dass zumindest die Transformation in gewissem Maße erfolgreich war. Die Bahnen 6 und 7 des Elektrophorese-Gels zeigen eine erfolgreiche Klonierung, die Banden entsprechen hierbei dem modifizierten Plasmid und *aphII*.

N. TRANSPOSON-MUTAGENESE

Transposons inserieren an beliebigen Stellen eines Replikons (einer selbstständig replizierenden Einheit), was die Analyse der entstehenden DNA-Fragmente im Gegensatz zum vorherigen Versuch erschwert. Das Transposon benötigt ein Trägerreplikon, da es sich selbst nicht vermehren kann; ein solches Trägerreplikon kann ein Phagen genom, ein Plasmid oder das Bakterienchromosom sein. Das vorliegende Transposon trägt ein Gen für die Kanamycin-Resistenz, sowie, da es sich um ein zusammengesetztes Transposon handelt, das promotorlose *lacZ*-Gen.

Wichtig zu erwähnen und bedeutsam für die Auswertung des Versuches ist die Tatsache, dass, wenn ein Transposon in ein Gen inseriert, dieses Gen meist inaktiviert wird. Inseriert das verwendete Transposon direkt hinter einen Promotor, so kann *lacZ* exprimiert werden, was sich mit einfachen Methoden nachweisen lässt.

N.1 Versuchsbeschreibung

Das im Versuch verwendete Transposon wurde zur Transformation der Bakterienzelle in einen modifizierten λ -Bakteriophage inseriert. Der Bakteriophage ist dermaßen mutiert, dass der „normale“ Prozess der Vermehrung unter Lyse des infizierten Bakteriums nicht durchlaufen werden kann, darüber hinaus kann die Phagen-DNA nicht in das Bakteriengenom inserieren. Nur das im Phagen genom vorhandene Transposon kann demzufolge mittels konservativer Transposition in die DNA des Bakteriums (Genom oder Plasmid p21gfpde) inserieren. Die Bakterien (*E. Coli*) wurden mit dem Bakteriophagen inkubiert, sodass eine Infektion mit der Phagen-DNA (also auch dem Transposon) stattfinden konnte.

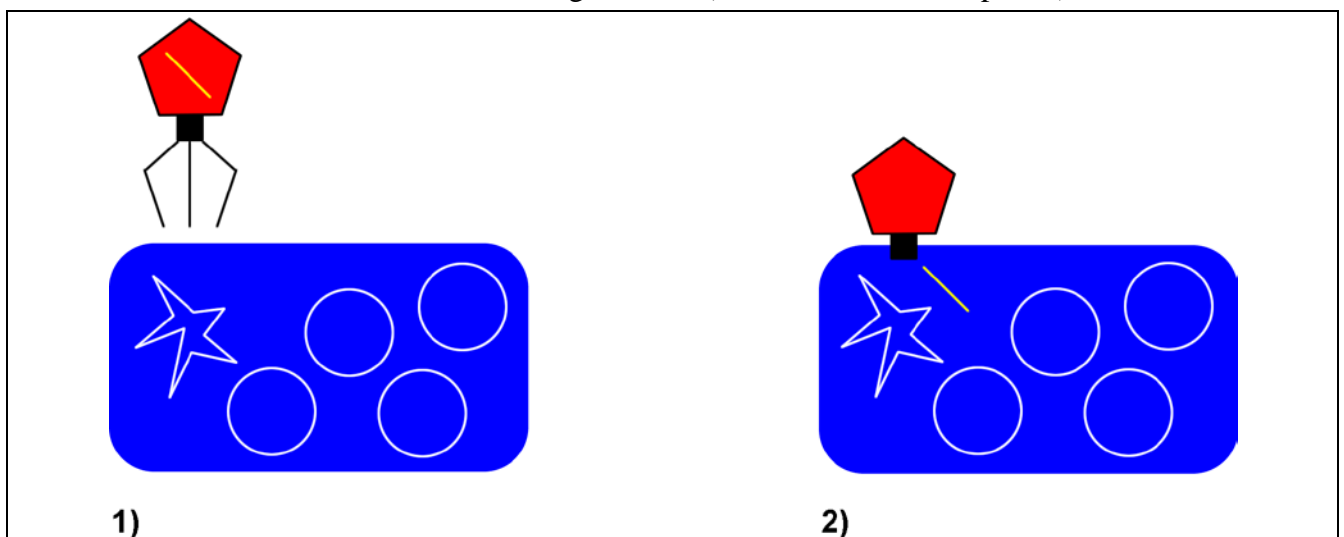


Abbildung N-1: Infektion des Bakteriums mit Phagen-DNA (enthält Transposon). Der Übersichtlichkeit halber wurde nur das Transposon, nicht aber die Phagen-DNA dargestellt.

Das im Bakterium befindliche Transposon kann nun entweder in das Bakteriengenom oder in das in der Zelle befindliche Plasmid inserieren. Nach dem Wachstum der Kultur liegen Klone vor, in denen das Transposon entweder im mehrfach vorhandenen (multicopy-)Plasmid oder im Genom vorliegt, und die keine DNA des Phagen enthalten.

Transposon-Mutagenese

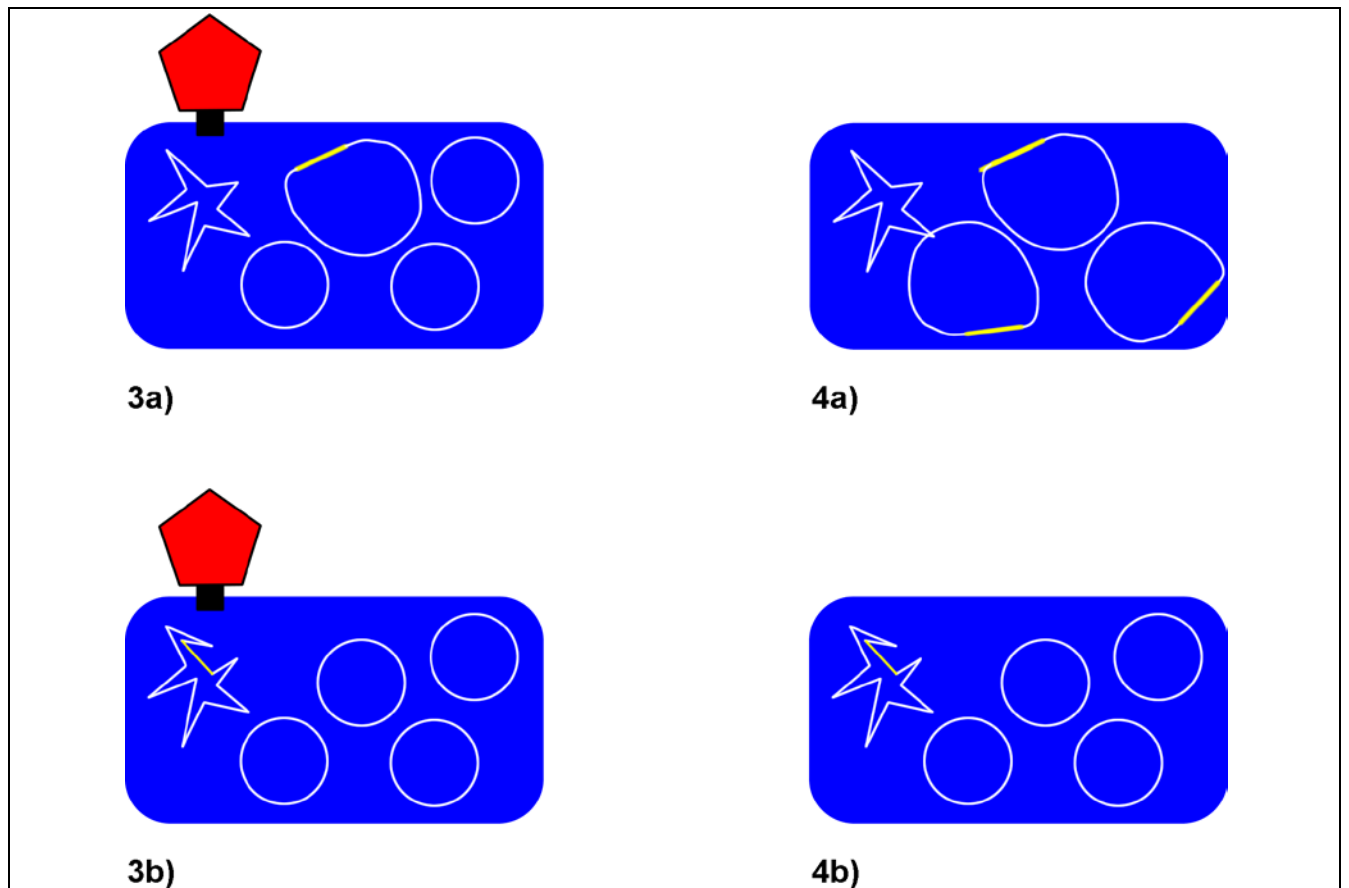
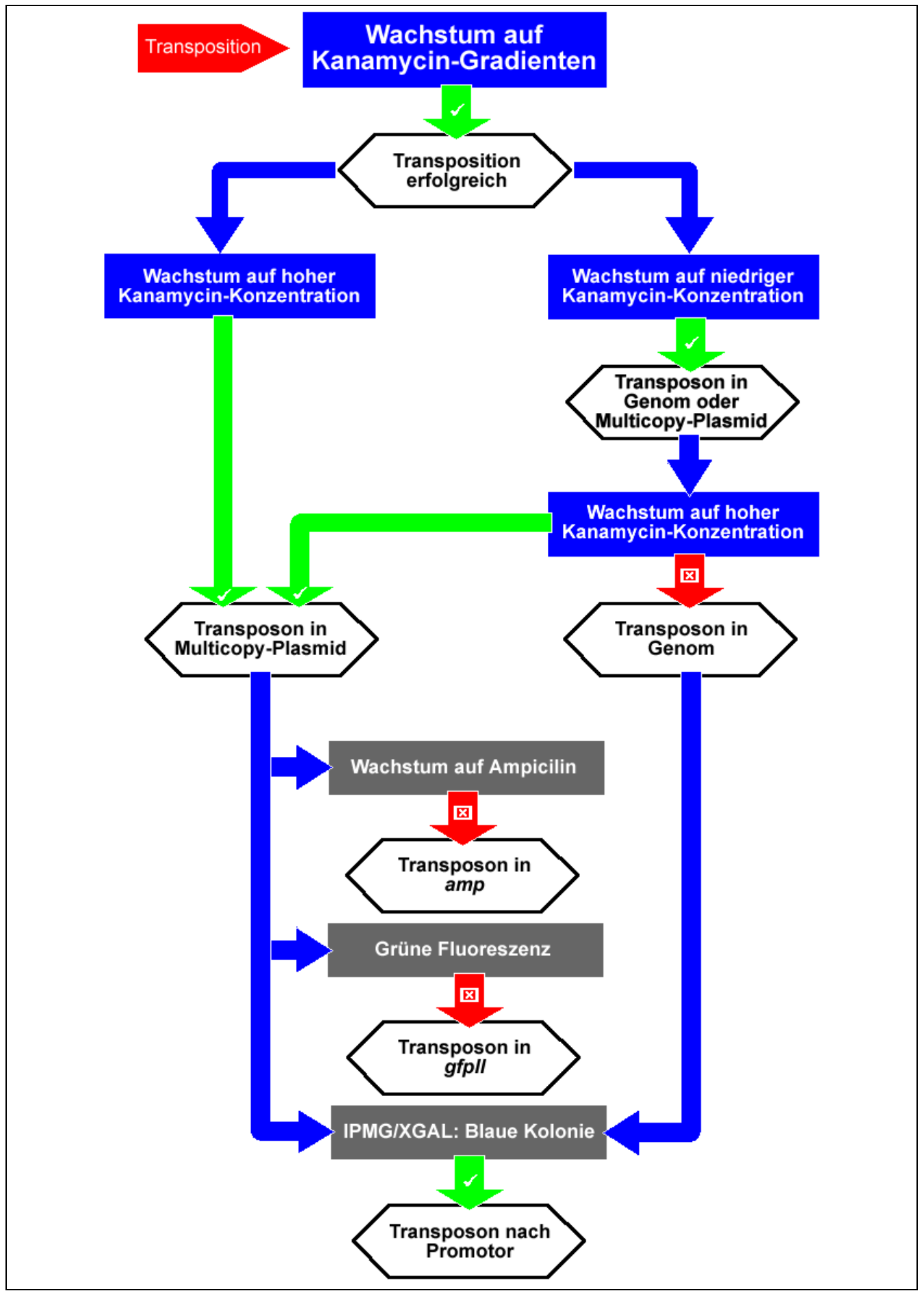


Abbildung N-2: Prozesse nach Infektion und Insertion des Transposons. Klone mit modifiziertem multicopy-Plasmid (4a) und modifiziertem Genom (4b) nach Vermehrung.

Um die Position des Transposons zu bestimmen, stehen uns mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, die in der folgenden Abbildung zusammengefasst wurden.

Abbildung N-3: (folgende Seite) Versuchsschema zur Untersuchung der Insertionsstelle

Transposon-Mutagenese



N.2 Versuchsergebnisse

Wir folgten dem oben dargestellten Schema sowie der Anleitung. Wir beobachteten das folgende Wachstum der (ggf. modifizierten) Zellen:

- Kolonien, die auf Gradientenplatten wachsen: 5 im äußeren Bereich (unverdünnt), entspricht einem Titer von 50 Zellen / ml.
- Kolonien, die auf Pa-Km₂₅-Platten wachsen: 45 (unverdünnt) bzw. 2 (Verdünnung 1:10), dies entspricht einem mittleren Titer von 163 Zellen / ml.
- Die Gesamtzellzahl entspricht: 768 (Verdünnung 10⁻⁶), 1332 (Verdünnung 10⁻⁷) und 2260 (Verdünnung 10⁻⁵), dies entspricht einem Titer von 2.4 x 10¹⁰ Zellen / ml im Mittel.

Die 5 auf dem Gradienten gewachsenen Kolonien wuchsen auf Km₄₀ und AMP₁₅₀ und fluoreszieren grün. Eine Kolonie wurde auf IPTG/XGAL blau, die Frequenz blauer Mutanten entspricht demzufolge 0.2, für die Transpositionsfrequenz erhalten wir einen Wert 2 x 10⁻⁹ aus obigen Werten.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich das Transposon bei allen Kolonien im Plasmid befindet (Wachstum auf Km₄₀) und die Gene *gfp'* und *amp* nicht betroffen sind, wohingegen bei einem Klon das Transposon direkt hinter einen Promotor inserierte (blaue Kolonie).

Die Plasmid-DNA von vier modifizierten Kolonien (keine blaue Kolonie) wurde isoliert und mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen behandelt, mit den Fragmenten wurde anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Zur Diskussion der Ergebnisse wollen wir zuerst noch einmal das Plasmid und das Transposon getrennt voneinander betrachten und die (zu erwartenden) Einzelfragmente bestimmen.

Tabelle N-1: Fragmentgrößen der beteiligten DNA-Moleküle (fettgedruckte Fragmente sollten in der Elektrophorese auftreten)

Restriktionsenzym	Plasmid		Transposon				
	Fragment A	Fragment B	Fragment A	Fragment B	Fragment C	Fragment D	Fragment E
XbaI	3194	1173	369	5684			
BamHI	4132	235	350	5500	180		
HindIII	3762	605	361	3452	953	799	488

Transposon-Mutagenese

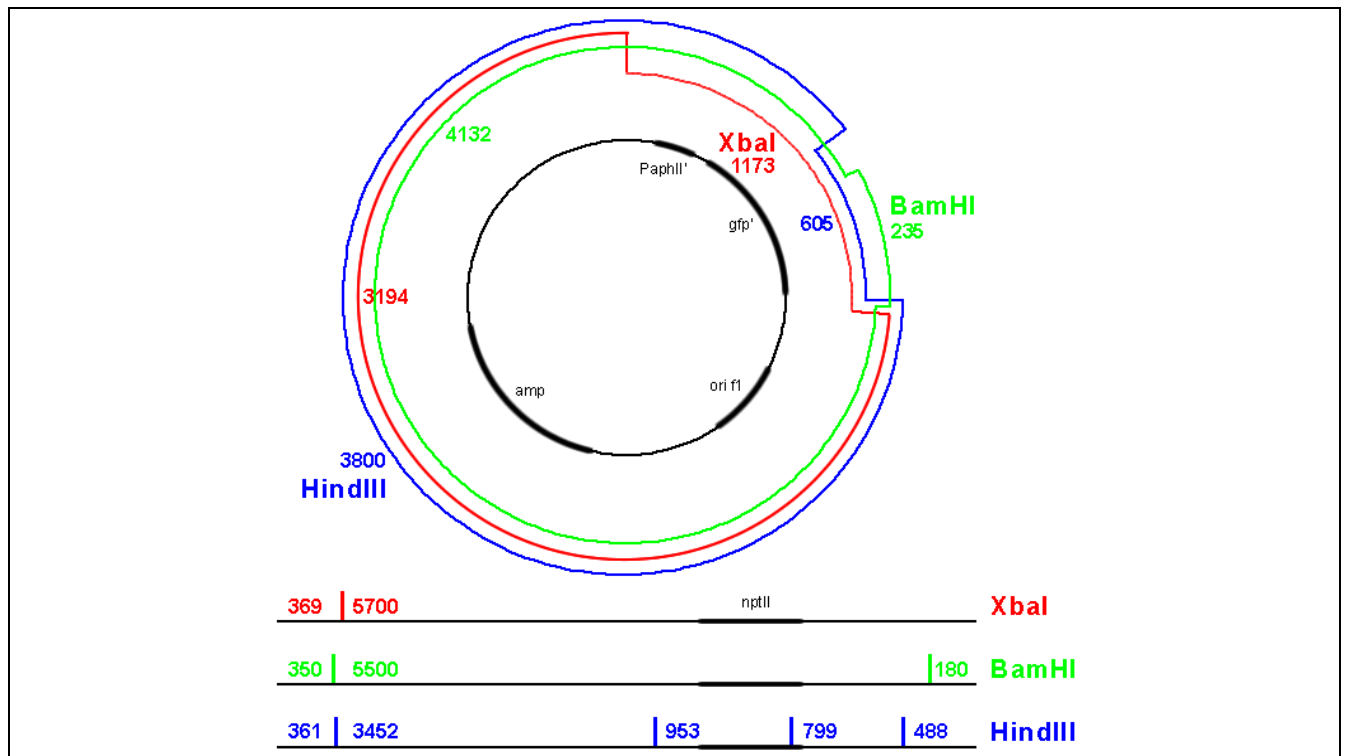


Abbildung N-4: Zu erwartende Fragmente (Plasmid oben, Transposon unten)

Im Falle der untersuchten DNA aus den modifizierten Stämmen liegen aufgrund der Insertion des Transposons in das Plasmid andere Verhältnisse vor; das erste und letzte Fragment des Transposons sollten nicht separat auftreten, da diese in Verbindung mit Plasmidfragmenten vorliegen. Je nach Position des Transposons im Plasmid wird eines der beiden oben angegebenen Plasmidfragmente in zwei Teile gespalten, die Reststücke beinhalten dann die schon erwähnten Anfangs- und Endstücke des Transposons, wobei die Länge der beiden Teile davon abhängig ist, an welcher Stelle das Transposon inserierte. Wir halten fest, dass wir ein unmodifiziertes Fragment des Plasmids erwarten, darüber hinaus ggf. unmodifizierte Fragmente des Transposons (je nach verwendetem Restriktionsenzym) sowie zwei aus einem Plasmidfragment und dem Anfangs- bzw. Endfragment des Transposons hervorgegangene kombinierte DNA-Abschnitte.

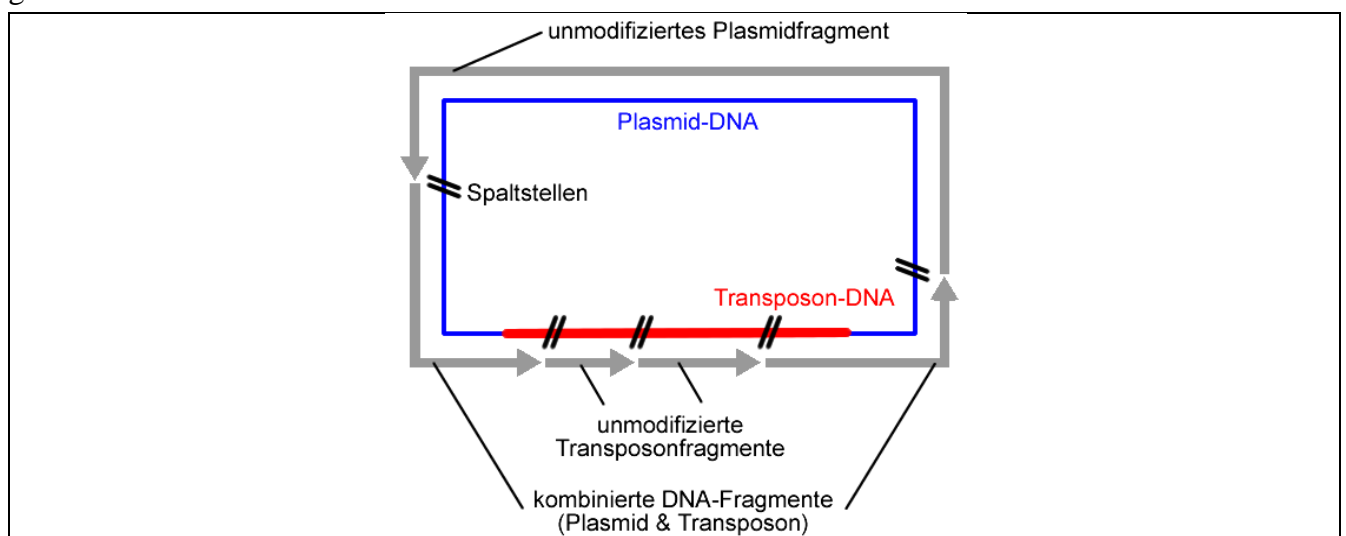


Abbildung N-5: Schematische Darstellung der Fragmentierung des modifizierten Plasmid

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Elektrophorese.

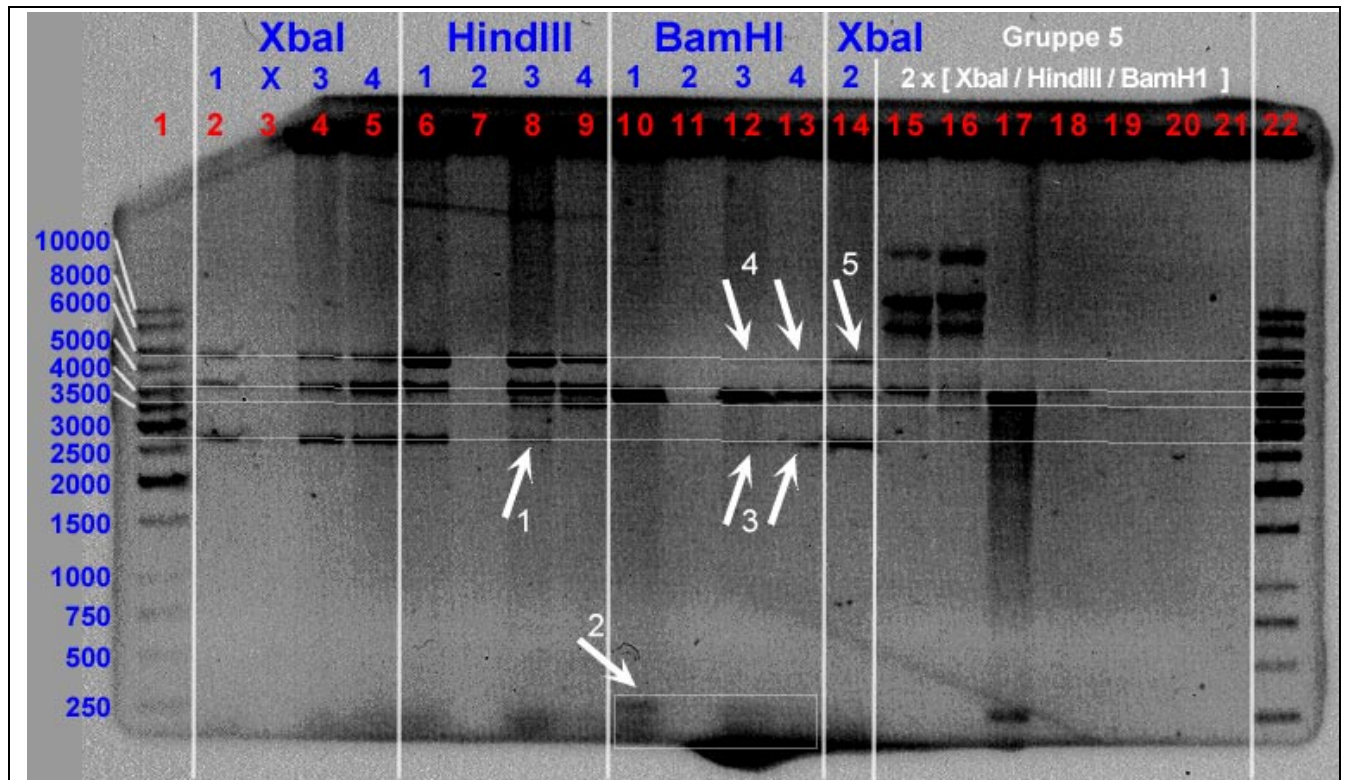


Abbildung N-6: Elektrophorese von Versuch N (Pfeile weisen auf nur im Original deutlich erkennbare Banden hin).

Das Gel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und im UV photographiert, und das Bild ausgedruckt.

Bei der ersten Betrachtung fällt auf, dass bei *HindIII* und *BamHI* aus unbekanntem Gründen (ggf. Pipetierfehler) die Proben aus Kolonie 2 fehlen. Darüber hinaus zeigen sich bei den Proben 3 und 4 identische Ergebnisse, Probe 1 besitzt dahingegen andere Merkmale.

Zur Auswertung wurde das Bild von uns eingescannt, die Positionen der Banden des Standards und der Proben wurden dann am Computer als y-Koordinate innerhalb des Bildes (mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogramms) ermittelt. Die Auftragung der y-Koordinaten der Banden des DNA-Ladder-Mix gegen die logarithmische Zahl der Basenpaare sollte einen linearen Zusammenhang ergeben, es ergab sich dieser jedoch nicht genau. Um dennoch mit Hilfe des Standards über die y-Koordinaten der Probenbanden auf deren Größe zurück schließen zu können, wurde eine Anpassung an eine sigmoidale Funktion durchgeführt, die den Verlauf der Kurve gut wiedergibt.

Transposon-Mutagenese

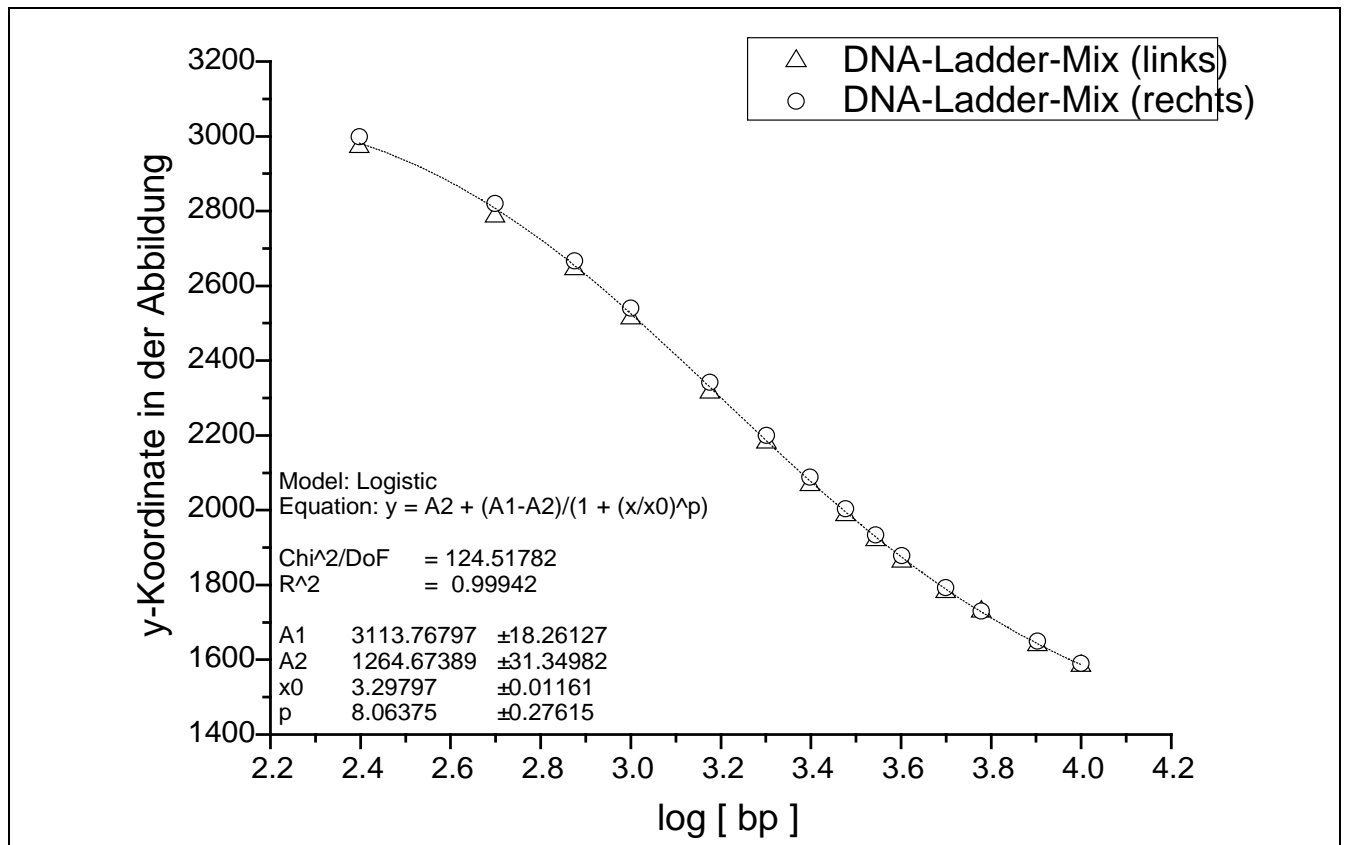


Abbildung N-7: Kalibrierfunktion aus DNA-Ladder-Mix zur Bestimmung der Fragmentlänge

Mit Hilfe der gewonnenen Funktionsparameter lassen sich aus den y-Koordinaten der Probenbanden die Zahl der Basenpaare bestimmen.

Tabelle N-2: Ergebnisse der Elektrophorese: Fragmentgröße in Basenpaaren (bp) (in Klammern: mit Pfeilen markierte Banden, siehe Abbildung oben)

XbaI				
1	5887	4407		2800
2	5608	4238 (5)	3966 (5)	2675
3	5815	4304		2770
4	5727	4260		2752
BamHI				
1		4006		276 (2)
2				
3	5820 (4)	4027		2686 (3) ~ 280
4	5750 (4)	3986		2986 (3)
HindIII				
1	5509	4293		2752
2				
3	5509	4216	3701	2782 (1)
4	5625	4216	3665	

Wir wollen unsere Auswertung damit beginnen, die Transposonfragmente zu suchen, die wir gemäß Tabelle N-1 erwarten. Bei XbaI liegen solche nicht vor, bei BamHI ein Fragment mit der Größe von 5500 bp. Dieses können wir (mehr oder weniger gut) wieder finden, auch wenn hier 5820 und 5750 bp

bei den Kolonien 3 und 4 ermittelt wurden. Bei *HindIII* sollten sich Fragmente bei 3452, 953 und 799 bp finden, die kleineren Fragmente lassen sich nicht finden, das größte Fragment lässt sich ggf. bei 3701 und 3665 bp bei den Kolonien 3 und 4 wieder finden.

Nun wollen wir das eine unmodifizierte Plasmidfragment suchen, das andere Plasmidfragment – in dem das Transposon inserierte – findet sich nicht mehr in der Elektrophorese, es liegt ja gespalten und mit den Transposonfragmenten versehen vor, die Banden an anderen Stellen ergeben müssten. Bei ***BamHI*** könnte Fragment A (4132 bp) wahrscheinlich unmodifiziert vorliegen (4006, 4027 und 3986 bp in der Elektrophorese), Fragment B (235 bp) wäre dementsprechend modifiziert. Die entsprechenden Fragmente aus modifizierter DNA hätten dann die folgende Größe: $350 + x$ ($x < 235$) sowie $180 + (235 - x)$. Bei *XbaI* entspricht keine Bande einem der unmodifizierten Plasmidfragmente (3194 bp oder 1173 bp). Bei ***HindIII*** hingegen ist das Auftreten von Fragment A (3762 bp) möglich, das Fragment B (605 bp) müsste dementsprechend modifiziert vorliegen, dann mit den Größen: $361 + x$ ($x < 605$) sowie $488 + (605 - x)$.

Bisher konnten wir einige Banden mehr oder weniger gut zuordnen, jedoch sind die Ergebnisse eher fragwürdig. Einerseits fehlen einige Banden, die mit Sicherheit vorhanden sein sollen (z.B. Transposon-Fragmente bei *HindIII*, Plasmidfragment bei *BamHI*), auch die Zuordnung ist nicht mit hoher Genauigkeit möglich, da für die Zuordnung Abweichungen um bis zu ca. 300 bp zum vorhergesagten Wert in Kauf genommen wurden.

Dennoch lässt sich anhand obiger Ausführung die folgende Vermutung anstellen: ***Die Transposition bei den Kolonien 3 und 4 fand wohl in der Nähe der MCS statt***, hier haben wir in Übereinstimmung der Restriktionsverdau von *BamHI* und *HindIII* gefunden, dass jeweils das kleinere Fragment von der Transposition betroffen ist, *gfp* jedoch nicht deaktiviert wurde. Folglich sollte nur ein kleiner Bereich zwischen MCS und *gfp* in Frage kommen, in den das Transposon inserierte.

Eine genauere Analyse gestaltet sich den schon genannten Gründen schwierig. Auch ist das vollständige Fehlen der Banden der Kolonie 2 bei *BamHI* und *HindIII* verwunderlich, da sich bei *XbaI* Ergebnisse finden lassen. Hilfreich wäre darüber hinaus eine Elektrophorese der ungespaltenen Plasmid-DNA gewesen, da rein rechnerisch die Summe der Größen der in einer Bahn gefundenen Fragmente die Größe der eingesetzten DNA überschreitet, so ergibt sich rechnerisch für Plasmid und Transposon eine Größe von 10420 bp, die Summe der Fragmentlängen liegen aber bei ca. 12800-13400 bp.

Insgesamt sind die Ergebnisse uneinheitlich, die Abweichungen machen eine genauere Analyse unmöglich, da es uns darüber hinaus an Praxis fehlt.