

## Bakterielle Konjugation

VerfasserInnen: Debora Ledergerber [debora.ledergerber.riniken@bluewin.ch](mailto:debora.ledergerber.riniken@bluewin.ch), Christoph Leemann [ch.leemann@bluewin.ch](mailto:ch.leemann@bluewin.ch), Adrian Jäggi [jaeggi\\_2000@yahoo.de](mailto:jaeggi_2000@yahoo.de), Christina Brandenberger [cbrandenberger@hotmail.com](mailto:cbrandenberger@hotmail.com), Stephanie Samartin [stephanie.samartin@freesurf.ch](mailto:stephanie.samartin@freesurf.ch)

Betreuerin: M. Yuhana [myuhana@botinst.unizh.ch](mailto:myuhana@botinst.unizh.ch)

### I. Einleitung

Mittels *triparental mating* wollen wir zeigen, wie im horizontalen Gentransfer ein *ina*-freier Bakterienstamm (*Vibrio harveyi*) das Fremdgen (*ina*<sup>+</sup>) durch Konjugation übernehmen kann.

### II. Vorgehen

*Escherichia coli* (pJL 1703) : *tra*<sup>-</sup>, *ina*<sup>+</sup>, *Kan*<sup>r</sup>, *Amp*<sup>s</sup>, *lux*<sup>-</sup> (Donor) enthält das *ina*<sup>+</sup> Gen, das für das INA Protein kodiert, welches die Bildung von Eiskristallen katalysieren kann. Es enthält aber kein *tra*<sup>+</sup> Gen, das für die Ausbildung von Sex Pili verantwortlich ist, die für den Transfer von *ina*<sup>+</sup> zum *Vibrio harveyi* Bakterium (Recipient) nötig sind. Aus diesem Grunde ist es nötig, ein Helfer Bakterium zu haben (*E. coli*, pRK 2013) : *tra*<sup>+</sup>, *ina*<sup>-</sup>, *Kan*<sup>r</sup>, *Amp*<sup>s</sup>, *lux*<sup>-</sup> (Helfer), das sein Gen *tra*<sup>+</sup> in das Bakterium *E. coli* (pJL 1703) transferiert. Dadurch wird der Donor, welcher nun *tra*<sup>+</sup> enthält, fähig, sich mit dem *V. harveyi* Bakterium (Recipient) zu konjugieren und kann mit letzterem das *ina*<sup>+</sup> Gen austauschen.

Das *V. harveyi* Bakterium hat die Fähigkeit, im Dunkeln zu leuchten, dies dank des Genes *lux*<sup>+</sup>, welches den beiden *E. coli* Bakterien fehlt.

Um nur die Bakterienkolonien auszuwählen, welche aus Bakterien des Types *ina*<sup>+</sup> und *lux*<sup>+</sup> entstanden sind, (welche also den ganzen Konjugationsvorgang durchlaufen haben), benützt man zwei Resistenzgene zur Selektion:

Für die beiden *E. coli*: *Kan*<sup>r</sup> (Kanamicin resistant)

Für *V. harveyi*: *Amp*<sup>r</sup> (Ampicillin resistant)

Zusammengefasst sind die für das Experiment massgebenden Genotypen:

*E. coli* (pJL 1703) : *tra*<sup>-</sup>, *ina*<sup>+</sup>, *Kan*<sup>r</sup>, *Amp*<sup>s</sup>, *lux*<sup>-</sup> (D = Donor)  
*E. coli* (pRK 2013) : *tra*<sup>+</sup>, *ina*<sup>-</sup>, *Kan*<sup>r</sup>, *Amp*<sup>s</sup>, *lux*<sup>-</sup> (H = Helfer)  
*Vibrio harveyi*: : *tra*<sup>-</sup>, *ina*<sup>-</sup>, *Kan*<sup>s</sup>, *Amp*<sup>r</sup>, *lux*<sup>+</sup> (R = Recipient)

### III. Ergebnisse

Um unsere theoretischen Ueberlegungen zu bestätigen, haben wir fünf Kombinationen ausgeführt, die dann auf Agarnährmedien in Petrischalen, welche die Wirkstoffe Kanamicin und Ampicillin enthalten, ausgeplattet wurden.

Nach 48h Inkubation bei 30°C ergab sich folgendes Bild:

Experiment Nr.	1	2	3	4	5
Kombination	R	R+D	R+H	D+H	R+D+H
Wachstum auf Amp+Kan	-	-	-	-	+
Biolumineszenz	-	-	-	-	+

#### IV. Diskussion und Erklärungen

- 1 Der Recipient ist Kanamicin empfindlich und kann somit in diesem Umfeld nicht wachsen.
- 2 Kein Gentransfer, da beide *tra*<sup>-</sup> sind und somit bleibt der Donor Amp<sup>S</sup> und der Recipient Kan<sup>S</sup>.
- 3 Eine Konjugation kann stattfinden, aber der Promotor der *Kan*<sup>r</sup> Gene welcher sich im "Helper" befindet ist sehr spezifisch und kann durch die Polymerase des *V. harveyi* Bakteriums nicht gelesen werden (**narrow host range**). Daher ist auch nach einem erfolgten Gentransfer *Kan*<sup>r</sup> im Recipient nicht aktiv und daher die rekombinanten *V. harveyi*-Zellen immer noch empfindlich auf Kanamicin.
- 4 Es findet ein Gentransfer statt, jedoch bleiben beide Amp<sup>S</sup> und können somit auf Agarmedien, die Ampicillin enthalten nicht gedeihen, aber:
- 5 sobald D+H mit dem *V. harveyi* Bakterium zusammengebracht werden, findet ein zweiter Gentransfer statt, bei dem der Recipient nebst dem *ina*<sup>+</sup> auch das *Kan*<sup>r</sup> erhält. Eine Tatsache, die sich im Wachstum von Kolonien auf dem selektiven Nährmedium (Amp+Kan) manifestiert.

#### Lumineszenz

Prüfung auf Wachstum lumineszenter Bakterien. Auf LB+Kan+Amp gemäss Experimentieranleitung unter Punkt 3. Lumineszenz ist nur dort festzustellen, wo *V. harveyi* wachsen konnte, d.h. nur in Ansatz 5.

#### Eis Nukleierung

Auf den Amp+Kan Platten werden die leuchtenden Bakterienkolonien ausgewählt, welche auch das *ina*<sup>+</sup> Gen enthalten sollten.

Nach Vermehrung auf Petrischalen mit LB+Kan+Amp werden die erhaltenen Kolonien auf die Präsenz des *ina*<sup>+</sup> Gens getestet. In mit sterilisiertem PBS (*Phosphate buffered saline*) gefüllten Reagenzgläsern werden einige Bakterien zugegeben, gut gemischt und für fünf Minuten bei -5°C inkubiert. Unsere Resultate sind die folgenden:

Ansatz in PBS Nr. Kombination	Eisbildung
1. PBS	-
2. <i>V. harveyi</i> Recipient	-
3. <i>E. coli</i> (pJL1703) Donor	+
4. <i>E. coli</i> (pRK2013) Helper	-
5. Transkonjugante <i>V. harveyi</i>	+

*ina*<sup>+</sup> Bakterien werden bereits in Kunstschneekanonen benutzt um die Kristallisierung von Wasser zu katalysieren: Welche ökologischen Folgen werden aus all dieser in unserer einheimischen Bergwelt verteilten DNA und den Bakterien wohl resultieren?

Für alle, die sich vertieft mit diesem Versuch auseinandersetzen wollen, verweisen wir auf die interessanten Links, die auf der Experimentieranleitung angegeben sind.