

Herstellung und Isolierung von *Lac*-Mutanten aus *E. coli*

Verfasserinnen: Bachmann Nicole nicole.bachmann@bluewin.ch, Blaser Nicole shandle@gmx.ch,
Haefeli Cornelia corneliahaefeli@hotmail.com, Ris Carolin l.morf@gigon-guyer.ch,
Stallmach Lena stlena@yahoo.de
Assistentin: Maibach Romana maibach@immv.unizh.ch

Einleitung

Ziel dieses Versuches ist die Herstellung und Unterscheidung von *lacZ*- und *lacY*-Mutanten, welche als Bestandteile des *lac*-Operons für die Verwendung der Lactose in der Zelle verantwortlich sind. Das *lacY*-Gen einerseits erwirkt die Produktion einer Permease, welche die Lactose in die Zelle transportiert, das *lacZ*-Gen andererseits codiert für die β -Galactosidase, welche Lactose in Glucose und Galactose spaltet. Das *lacZ*-Gen wird nur bei Vorhandensein von Lactose in der Zelle exprimiert.

Vorgehen

Lac-Mutanten kommen natürlich mit einer sehr geringen Frequenz vor. Mit der Mutagenese mittels Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS) und anschliessender Ampicillin-Selektion lässt sich die Frequenz erhöhen. Dazu werden die mutierten Bakterien in einem Medium mit Lactose als einziger Energiequelle und Ampicillinzusatz wachsen gelassen. Die *lac*-negativen Bakterien zeigen, im Gegensatz zu den *lac*-positiven Bakterien, kein Wachstum, da sie die Lactose nicht verwerten können. Ampicillin tötet aber nur die wachsenden und somit die *lac*-positiven Bakterien ab, während die *lac*-negativen überleben können. Idealerweise hat man nach dieser Selektion nur noch *lac*-negative Bakterien in der Suspension, jedoch überleben auch Ampicillin-resistent gewordene *lac*-positive Bakterien.

Um die *lac*-negativen von den *lac*-positiven *E. coli* zu unterscheiden verwenden wir eine MacConkey-Agarplatte. Auf dieser Platte wachsen die *lac*-positiven Bakterien als rote Kolonien und die *lac*-negativen Bakterien als weisse Kolonien.

Der nächste Schritt ist die Unterscheidung von *lacZ*- und *lacY*-Mutanten. Die Mutanten (weisse Kolonien auf der MacConkey-Platte) werden dazu auf zwei weitere MacConkey-Platten gegeben. Die eine Platte ist zusätzlich mit IPTG (Isopropylthiogalactosid) versetzt, welches das *lacZ*-Gen induziert β -Galactosidase zu exprimieren. Nach Wachstum über Nacht bei 30°C wachsen auf der ursprünglichen MacConkey-Platte alle Kolonien weiss und auf der MacConkey-Platte mit IPTG-Zusatz die *lacY*-Mutanten rot, denn sie haben eine defekte Permease nicht aber β -Galactosidase und können somit die in die Zelle diffundierende Lactose bestens abbauen. Die *lacZ*-Mutanten jedoch, welche eine defekte β -Galactosidase besitzen, wachsen weiss, da sie nicht in der Lage sind, die Lactose abzubauen.

Ergebnis

Bei unserem Versuch konnten wir keine Mutanten beobachten, alle Kolonien wuchsen auf beiden Platten rot.