

# Genetische Rekombination durch bakterielle Konjugation

(Experimente 10 und 12, Gruppe D)

AutorenInnen: Anna Kopps, [annakopps@gmx.ch](mailto:annakopps@gmx.ch)  
Regina Strasser, [reginastrasser@baden.ch](mailto:reginastrasser@baden.ch)  
Joseph Marino, [jo\\_ma@gmx.ch](mailto:jo_ma@gmx.ch)

Tutorin: Munti Yuhana, [myuhana@botinst.unizh.ch](mailto:myuhana@botinst.unizh.ch)

## 1. Ziel des Experiments

Einem lumineszenten Bakterienstamm (*Vibrio harveyi*) soll durch triparental mating das Fremdgen *ina*<sup>+</sup> eingeführt werden.

## 2. Verwendete Bakterienstämme

Mit folgenden Bakterienstämmen wurde gearbeitet:

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

## 3. Theoretischer Hintergrund

Das *tra*-Gen steuert die Konjugation, indem es Sexpili synthetisiert. Demzufolge sind nur *tra*<sup>+</sup> tragende Bakterien Spenderzellen. Nach einer erfolgreichen Genübertragung haben beide Zellen eine Kopie von *tra*<sup>+</sup>. Das Gen *ina*<sup>+</sup> codiert für das Protein INA, welches Eisbildung katalysiert. Kan<sup>r</sup> und Amp<sup>r</sup> sind Antibiotikaresistenzgene.

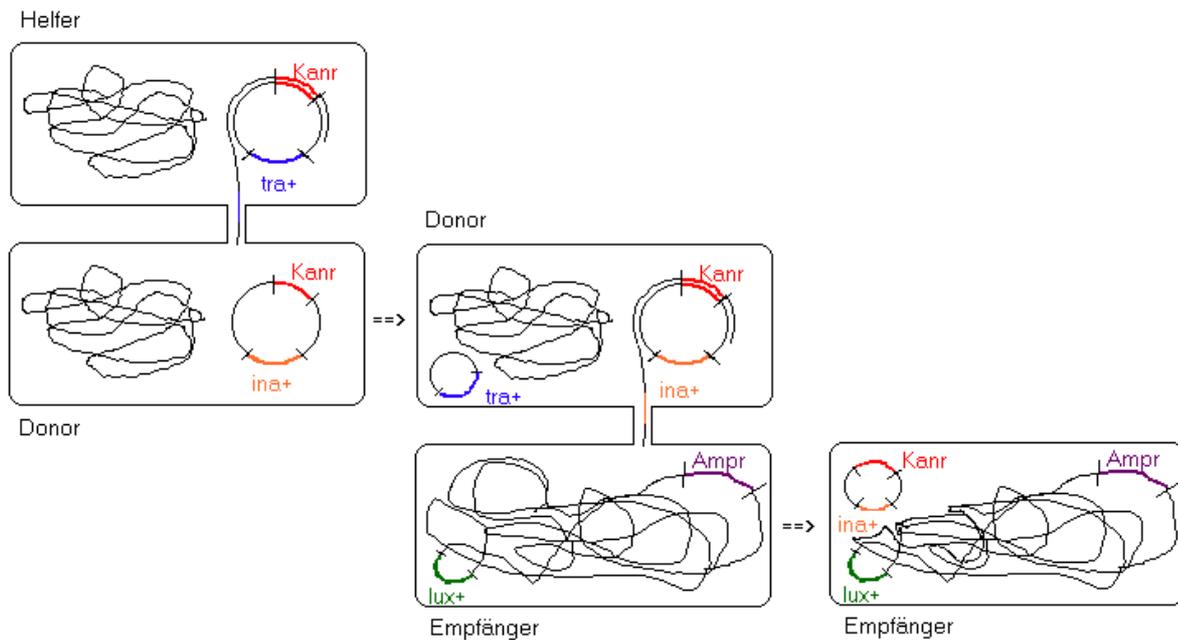
*lux* codiert für das Enzym Luciferase, welches die Lichtproduktion katalysiert. In vitro ist die Lichtemission mit aerober Oxidation gekoppelt: die Luciferase katalysiert die Oxidation von Flavin und von einem langkettigen Aldehyd. So wird Energie in Form von Licht frei. Die Luciferasesynthese wird von Autoinducern induziert. Viele lumineszente Bakterien sind Symbionten oder Parasiten verschiedener Meerestiere.

## 4. Versuchsbeschreibung

Die drei Bakterienstämme werden in ein Eppendorfröhrchen zusammenpipettiert, in welchem die Konjugation stattfinden soll. Die als Helfer eingesetzten *E. coli* (pRK 2013) konjugieren dabei mit den Donoren *E. coli* (pJL 1703) und übertragen das *tra*<sup>+</sup>-Gen. Die Donoren, die eine Kopie von *tra*<sup>+</sup> bekommen haben, können nun mit den Empfängern *Vibrio harveyi* konjugieren und ihnen *ina*<sup>+</sup> und Kan<sup>r</sup> transferieren. Um den Erfolg des triparental matings zu erkennen, werden die Bakterien inkubiert und danach auf LB+Amp+Kan-Agar zum weiteren Wachstum ausplattiert. *Vibrio harveyi* (*tra*<sup>-</sup>, *ina*<sup>+</sup>, Kan<sup>r</sup>, Amp<sup>r</sup>, *lux*<sup>+</sup>) werden an der Lumineszenz und der Fähigkeit, Eiskristalle zu bilden, erkannt.

Zur Kontrolle werden weitere Kombinationen der Bakterienstämme angesetzt: R+D, R+H, D+H. Auch R alleine wird ausplattiert.

**Konjugationsschema:**



**5. Auswertung und Diskussion**

Kombination	R+D+H	R+D	R+H	D+H	R
Wachstum auf Amp + Kan	✓	x	x	x	x
Biolumineszenz	✓	x	x	x	x
Diskussion	triparental mating hat funktioniert; aufgrund der Lumineszenz handelt es sich um <i>V. harveyi</i> . <i>Kan<sup>r</sup></i> wurde vom Donor übertragen.	Beide Stämme sind <i>tra<sup>-</sup></i> , keine Konjugation konnte erfolgen und somit auch kein Gentransfer. Beide haben jeweils nur ein Antibiotikaresistenzgen	Konjugation kann stattfinden da H <i>tra<sup>+</sup></i> trägt. Die transferierten Gensequenzen sind aber so spezifisch, dass sie nicht gelesen werden können ( <i>narrow host range</i> ).	Konjugation kann zwar stattfinden, aber sie besitzen nur Kanamycinresistenz. Somit können sie nicht wachsen.	Resistenz gegen Kanamycin fehlt, was ein Wachstum verhindert.