

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
Differenzierung von E.coli-Stämmen mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese	AM004
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, August 2000 Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Verfahren, mit welchem E.coli-Stämme unterhalb der Speziesebene subtypisiert werden können. In dieser Vorschrift sind zwei alternative Elektrophoreseverfahren beschrieben, weil die eingesetzten Pulsfeldgelelektrophoreseapparaturen nicht einheitlich programmiert werden können und die benutzten Blöckchen ein unterschiedliches Volumen haben. Bei dem hier durchgeführten Ringversuch wurden Pulsfeldgelelektrophoreseapparaturen von Biometra, Hula und Biorad eingesetzt.

Die nachstehende Methode ist an die von der Fa. BIORAD (www.bio-rad.com/40350.html) angelehnt.

2. Kurzbeschreibung

Die hier beschriebene Methode umfaßt folgende Einzelschritte:

- Anzucht der Bakterien
- Einbettung der Bakterien in Agaroseblöckchen
- Isolierung der genomischen DNA
- Restriktionsverdau der DNA
- Auftrennung der verdauten DNA im gepulsten elektrischen Feld
- Dokumentation des Ergebnisses

3. Materialien

3.1 Chemikalien und Lösungen

Low Melting Point Agarose zur Blöckchenherstellung, geeignet für Restriktionsverdau

Agarose für Pulsfeldgelelektrophorese geeignet

Ethidiumbromid (10mg/ml in a. dest)

Luria - Bertani-Bouillon (nach Miller)

10 g Casein enzym. hydrolysiert
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
950 ml a.bidest.
pH 7,5 mit 10 M NaOH einstellen,
auf 1000 ml mit a.bidest auffüllen

Zellsuspensionspuffer:	10 mM Trispuffer pH 7,2 20 mM NaCl 50 mM EDTA
Lysozympuffer:	10 mM Trispuffer, pH 7,2 50 mM NaCl 2 g/l Natriumdesoxycholat 5 g/l Natriumlaurylsarcosin 1 g/l Lysozym
Proteinase K -Puffer:	100 mM EDTA Lsg, pH 8,0 2 g/l Natriumdesoxycholat 10 g/l Natriumlaurylsarcosine 1 g/l Proteinase K
Waschpuffer :	20 mM Trispuffer, pH 8,0 50 mM EDTA Lsg
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) Stammlösung (Lagerung: -20°C):	100 mM PMSF in Isopropylalkohol
TBE Puffer:	10 x: 108g Tris 55g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 9,0

3.2 Geräte

Eppendorfreaktionsgefäße
 Zentrifugenröhrchen, 15 ml
 Erlenmeyerkölbchen
 Brutschrank
 Schüttler
 Zentrifuge
 UV-Transilluminator
 Kamera
 Pulsfeldgelektrophoreseapparat
 Wasserbad
 Waage
 Zentrifuge

4. Durchführung (die alternative Aufarbeitung mit dem Biometragerät ist kursiv dargestellt).

4.1 Bakterienkultur

Nach einer Übernachtkultur wird eine 1:20 Verdünnung im 50 ml Luriabuillon vorgenommen und eine weitere Bebrütung bei 37°C als Schüttelkultur bis zur optischen Dichte A_{600} 0,8 -1,0 vorgenommen.

Nach einer weiteren Verdünnung (1:20) mit PBS der Bakteriensuspension wird eine Dichte von ca. 5×10^8 / ml photometrisch zur Präparation der Blöckchen eingestellt. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (5 min., $1000 \times g$, 4°C) und das Zellpellet im halben Blöckchenvolumen mit Zellsuspensionspuffer resuspendiert (Endkonzentration ca. 1×10^8 / ml).

Alternative für das Biometragerät:

15 ml einer Übernachtkultur werden auf eine OD von max. 2,0 entsprechend ca. 10^9 /ml eingestellt.

1,0-2,0 ml dieser Suspension werden zentrifugiert (10 min, $5000 \times g$, 4°C) der Überstand verworfen, und in 1 ml Zellwaschpuffer resuspendiert.

300 µl dieser im Zellwaschpuffer resuspendierten Bakterienlösung werden ebenso wie die gleiche Menge 2 % ige Agarose bei 50°C äquilibriert.

Für die übrigen Modelle:

Gleichzeitig wird eine 2% ige Agaroselösung (Low melting point) in a. bidest auf 50 °C äquilibriert.

Für alle Modelle:

Anschließend werden die Blöckchen durch Vermischen der bei den Suspensionen gegossen und erstarren gelassen.

Die Agaroseblöckchen werden für 2 h oder über Nacht bei 37°C in dem Lysozympuffer inkubiert.

Danach wird der Lysozympuffer entfernt, das Blöckchen mit sterilem Wasser gespült und anschließend bei 50°C über Nacht in Proteinase K - Puffer inkubiert.

Die Blöckchen werden 4 mal im Waschpuffer (1h, leichte Bewegung) gewaschen.

Vor einem direkt anschließenden Restriktionsverdau können die Blöckchen mit 1mM PMSF Lsg. zur Inaktivierung der Proteinase K vor dem zweiten Waschschrift behandelt werden.

Waschen und anschließend in 0,1 x konzentriertem Waschpuffer resuspendieren.

4.2 Restriktionsverdau

In einem sterilen Reaktionsgefäß werden pro Blöckchen 1 ml des gewünschten Restriktionsenzymes im vom Hersteller vorgegebenen Restriktionsenzym-puffer (1X) zugesetzt und für ca. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Puffer aufgezogen und durch 0,3 ml Enzym - Reaktionspuffergemisch (30-50 U Enzym) ersetzt und über Nacht bei einer geeigneten Temperatur inkubiert (zB.: Not I 37°C, Sfi I 50°C).

Alternativ für das Biometragerät

Die Blöckchen werden zweimal 1h in 500 µl Restriktionsenzym-puffer äquilibriert. Der Verdau findet in 100 µl Restriktionspuffer mit 15 U für 1/3 Blöckchen bei 50°C über Nacht im Wasserbad statt.

Der Puffer wird durch 1 ml frischen (1X) Waschpuffers ersetzt und das Blöckchen darin für 30 min inkubiert.

Der Waschpuffer wird nun durch 0,5 x TBE Puffer (*Biometra 0,25 x TBE*) ersetzt. Sollen die Blöckchen längere Zeit aufgehoben werden, so sollte der Puffer entfernt werden, damit keine kleinen DNA Stücke aus dem Blöckchen diffundieren können. Die Blöckchen können dann bei 4°C gelagert werden.

4.3 Auftrennung der verdauten DNA im gepulsten elektrischen Feld

- Als Agarose wird ein Produkt geeignet für Nukleinsäuretrennungen (z.B. Fa. Biozym) von Bruchstücken > 500 bp benutzt.
- Für die hier beschriebene Applikation wird ein 1%iges Gel gegossen.
- Folgende Laufparameter werden gewählt:

Die hier aufgeführten Daten Beziehen sich auf ein PFGE - Gerät der Fa. Biometra (Rotaphor)

*Laufpuffer: 0,025 M TBE
Dauer 3 x 13 h + 2 h
Zeitintervall 60 bis 10 sec., linear
Winkel 120° bis 119°, linear
Spannung 180V bis 120V, linear
Geschwindigkeit 7
Temperatur 13-14°C
Rotation ohne Spannung*

Die nachstehend aufgeführten Daten beziehen sich auf Pulsfeldgelelektrophoresegeräte der Fa. Biorad bzw. Fa. Hula

Laufpuffer: 0,5 X TBE
Dauer 21 h
Zeitintervall 3 bis 26 sec., linear
Winkel 120°, linear
Spannung 6V/cm, linear
Geschwindigkeit 7
Temperatur 13-14°C

4.4 Darstellung der DNA - Bruchstücke

Das Gel wird nach Ende der PFGE in Ethidiumbromidlsg. (5mg/1000 ml A. dest) bei Raumtemperatur 30 'gefärbt und anschließend auf einem Transilluminator betrachtet. Das Ergebnis wird fotografisch dokumentiert.

5. Validierung

Im Ringversuch 2/2000 des Arbeitskreises Gentechnisches Überwachungslabor wurde ein E. coli K 12 - Stamm aus 12 anderen E.coli Stämmen heraus aufgrund seines Pulsfeldmusters von allen 4 teilnehmenden Laboratorien erkannt. Es wurde in diesem Ringtest das Restriktionsenzym Sfi I verwendet