

Bestimmung der Mutationsfrequenz

Mikrobiologie Praktikum

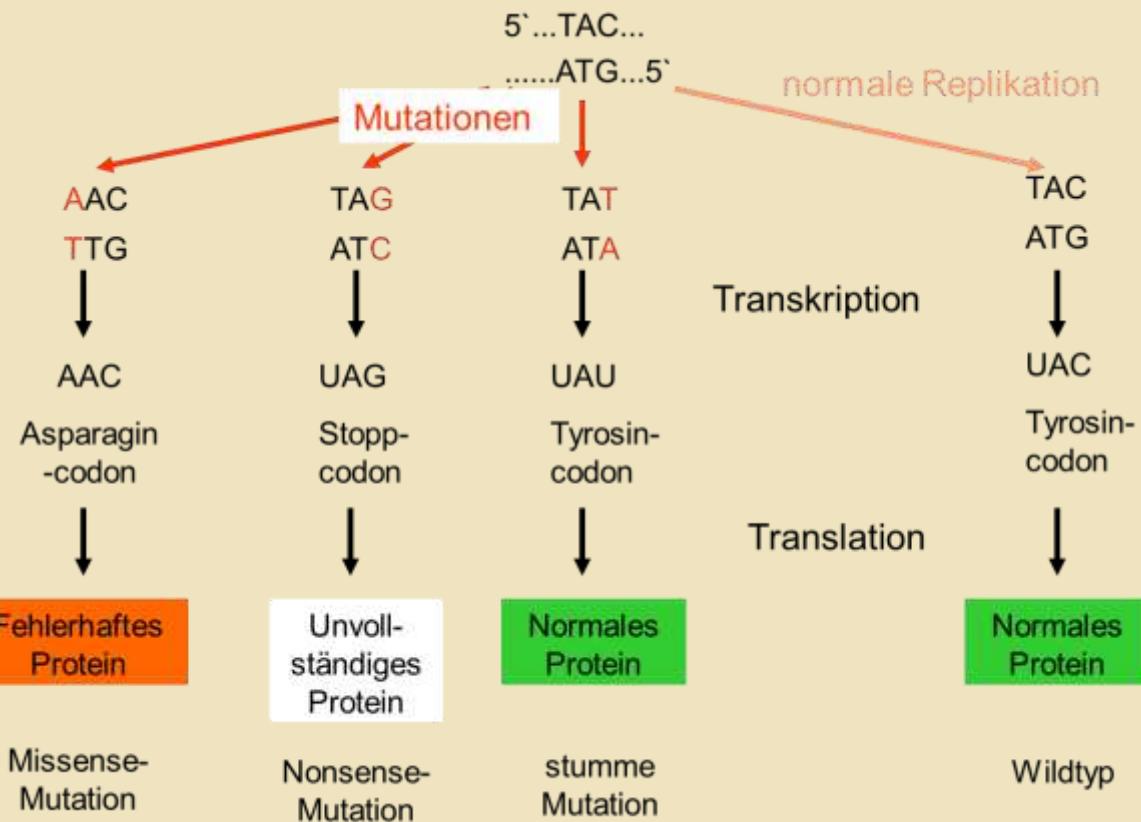
- **Eine Mutation ist eine Änderung der Nucleinsäuresequenz des Genoms eines Organismus**
 - Genmutationen (Punktmutationen)
 - Chromosomenmutationen
 - Genommutationen
- **Mutante : Individuum, das eine solche Veränderung enthält**
- **Eine Mutation resultiert immer in einem veränderten Genotyp, aber nicht zwangsweise in einem veränderten Phänotyp**

- Eine spontane Mutation geschieht ohne äußere Einwirkung unter „normalen“ Umweltbedingungen z.B durch Fehler bei der Basenpaarung während der Replikation
- Eine induzierte Mutation wird durch ein Mutagen (z.B Strahlung, Chemikalien, etc.) ausgelöst

- **Selektierbare Mutationen:** Führen zu einem Vorteil der Mutante gegenüber der Elternzelle
- **Nichtselektierbare Mutationen:** Können stille Mutationen ohne Einfluss sein oder aber nachteilig für die Mutante

Beispiele Punktmutationen:

- Insertion
- Deletion
- Missense
- Nonsense



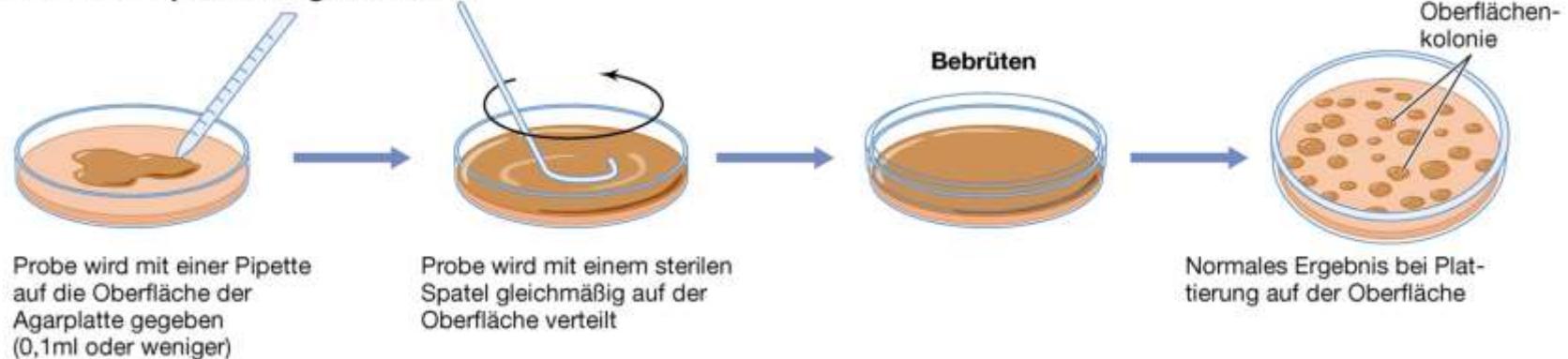
Bestimmung der Häufigkeit spontaner Mutationen, die zu einer Antibiotika-Resistenz führen können

- **Nalidixinsäure (Nal) ist ein Chinolon und inhibiert Topoisomerasefunktion der Gyrase (neg. supercoiling)**
- **Mutanten weisen i.d.R. eine Mutation in dem Gen der Gyrase auf**
- **Diese Genmutation (eine Basenpaarsubstitution) führt zu einer Änderung in der Amiosäurensequenz der Gyrase**
- **Diese Änderung führt zu einer reduzierten Affinität der Chinolone an die Gyrase → Abnahme der Wirkung des Chinolons**

1. Aufkonzentrieren (20:1) der ÜN-Kultur von *E. coli*:
Zentrifugation, Resuspension (Endvolumen 2.25 mL)
2. Bestimmung Mutanten/mL: Hiervon jeweils 8 x 100 µL auf NB-Agar mit 32 µg/mL Nalidixinsäure und 8 x 100 µL auf NB-Agar mit 64 µg/mL ausplattieren; Inkubation (48 h bei 37°C)
3. Doppelbestimmung zur Ermittlung der KBE/mL:
Verdünnungsreihe 10^{-1} - 10^{-9} herstellen(1:10 je Schritt mit Endvolumen von 5 mL), von 10^{-6} bis 10^{-9} je 100 µL ausplattieren; Inkubation (18 h bei 37°C)

Koloniezahlbestimmung durch Ausplattieren

Oberflächenplattierungsverfahren



- **Abflämmen des Spatels nach jeder Platte!**
- **Spatel in Ethanol tauchen und an der Flamme entzünden**
- **Spatel SOFORT wieder aus der Flamme nehmen und Ethanol verbrennen lassen**
- **Warten bis Spatel abgekühlt ist , dann ausplattieren**
- **Platten beschriften: Name, Gruppe, Versuch, Verdünnungsstufe**
- **Sortieren: höchste Verdünnung unten (z.B. 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4})**

- **Auszählen der Antibiotikaplatten → Mutanten/mL**
- **geeignete Verdünnungsstufe auswählen, Bestimmung der Mutationsfrequenz:**

Mutationsfrequenz = Mutanten/mL : KBE/mL