

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
Nachweis von <i>Escherichia coli</i> K12 mittels PCR und U3-Phagentest	AM003
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 1999 Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Im Rahmen der Gentechniküberwachung ist die Identifizierung von *Escherichia coli* K12 und die Unterscheidung von non-K12 Stämmen eine häufige, sicherheitsrelevante Fragestellung.

Zum schnellen und spezifischen Nachweis von *E. coli* Stämmen wurde eine Multiplex-PCR (modifiziert nach Kuhnert et al. (1995) Appl. Env. Microbiol 61: 4135-4139) etabliert. *E. coli* K12-Zellen bilden aufgrund einer Insertionsmutation im *rfb*-Operon kein K-Oberflächenantigen aus. Mittels PCR wird diese für *E. coli* K12 spezifische Insertion des IS-Elementes im *rfb-50* Gen mit dem Primerpaar K12IS-L/ K12-R als 969 Bp-Fragment nachgewiesen. Durch Einsatz eines zweiten Primerpaares ECPAL-L/ -R im gleichen PCR-Ansatz, wird ein in Enterobakterien hochkonserviertes Lipoprotein (*pal*-Gen) als 278 Bp-Fragment amplifiziert. Das 278 Bp-PCR-Produkt läßt den Rückschluß auf "Enterobacteriaceen" (z.B. *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*) zu.

Zur Absicherung der Ergebnisse aus den PCR-Analysen wird zusätzlich ein Test auf Sensitivität gegen den K12-spezifischen Phagen U3 durchgeführt. In wenigen Ausnahmefällen ist darüberhinaus eine biochemische Überprüfung von Auxotrophien, ein serologischer Nachweis des H48-Antigens und/ oder eine Differenzierung über PFGE angebracht.

Im Rahmen eines Ringtests des Arbeitskreis "Gentechnische Überwachungslaboratorien" wurden die beiden Nachweismethoden am Beispiel von 12 *Escherichia coli* Stämmen getestet.

2. Kurzbeschreibung

Die hier vorgestellten Nachweismethoden basieren auf einer PCR (Polymerase Chain Reaction), die aus folgenden Arbeitsschritten besteht:

- Aufarbeitung der Proben, Isolierung der genomischen DNA
- Durchführung der PCR ; Amplifizierung der spezifischen Sequenzen
- Agarosegelelektrophorese zur Analyse der PCR-Produkte

und einem **U3-Phagentest**, der zur Bestätigung der PCR-Resultate empfohlen wird.

3. Materialliste

3.1 Chemikalien:

Bacto Trypton
Hefeextrakt
Agar
Tween 20
Proteinase K
EDTA
Eisessig
Ethanol
Natriumchlorid
Tris
HCl
10 x dNTP-Mix (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP)

Primer K12-IS-L; 25 µM; (5' CGC GAT GGA AGA TGC TCT GTA 3')
 Primer K12-R ; 25 µM; (5' ATC CTG CGC ACC AAT CAA CAA 3')
 Primer K12-L ; 25 µM; (5' TTC CCA CGG ACA TGA AGA CTA CA 3')
 Primer ECPAL-F; 25 µM; (5' GGC AAT TGC GGC ATG TTC TTC C 3')
 Primer ECPAL-R; 25 µM;(5' CCG CGT GAC CTT CTA CGG TGA C 3')
 Hitzestabile DNA-Polymerase mit geeignetem Puffer
 Restriktionsenzyme mit geeigneten Puffern
 Xylene Cyanol FF
 Bromphenolblau
 Sucrose
 Agarose
 Ethidiumbromid
 DNA-Längenstandard (z.B. Lambda-DNA HindIII geschnitten)
 Bakteriophage U3 (DSM, Braunschweig, Bestell-Nr. 8976)
 Escherichia coli K12/ Kontrollstamm

3.2 Geräte :

Eppendorfreaktionsgefäße
 PCR-Reaktionsgefäße
 Agarplatten
 Reagenzgläser
 Mikropistill, z.B. Eppendorf Artikel-Nr. 0030 120.973
 Mikroliterpipetten
 Mikroliter-Kühlzentrifuge
 Wasserbad oder Thermoblock
 Thermocycler
 Apparatur für horizontale Elektrophorese mit Netzgerät
 UV-Durchlichtkasten
 Foto- oder Video-Dokumentation

4 Lösungen

LB-Medium	10 g/l Bacto Tryptone 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 18 g/l Agar
Lysispuffer	100 mM Tris-HCl pH 8,5 0,05 % Tween 20 - Zusatz von 240 µg Proteinase K / ml Lysispuffer
P1-Weichagar	8 g/l Nutrient Broth 5 g/l NaCl 6,5 g/l Agar - autoklavieren und bei 4 °C aufbewahren; vor Gebrauch aufkochen und auf 50 °C temperieren
1 x TE	10 mM Tris-HCl pH 7,8 1 mM EDTA pH8

5 x Ladepuffer: 0,25 % (w/v) Xylencyanol
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
40 % (w/v) Sucrose
in Wasser (bei 4 ° C lagern)

10 x TBE-Elektrophoresepuffer 108 g/l Tris Base
55 g/l Borsäure
9,3 g/l EDTA (pH 8)

alternativ:

50 x TAE-Elektrophoresepuffer: 242 g Tris
57,1 ml Essigsäure
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Färbe-Stammlösung: 1% Ethidiumbromid

Färbe-Arbeitslösung: 0,5 µg Ethidiumbromid /ml Elektrophoresepuffer oder Wasser

5. Durchführung

5.1 Aufarbeitung der Proben

Die Aufarbeitung der Proben ist abhängig von der Fragestellung. Für eine qualitative Aussage genügt ein Schnellnachweis aus Einzelkolonien oder einer Bakteriensuspension. Prinzipiell kann auch isolierte genomische DNA eingesetzt werden.

Als Positivkontrolle wird ein *E. coli* K12 Stamm, z.B. NM522 (*lac⁻ thi⁻ pro⁻*) oder DH1 (*thi⁻*) mitgeführt:

5.1.2. Arbeitsprotokoll

A) Aufarbeitung für den Schnellnachweis aus Proben:

Um die beste Nachweisgrenze zu erzielen kann die zu untersuchende Probe direkt in die PCR eingesetzt werden. Das eingesetzte Volumen sollte dabei 1/10 des Reaktionsvolumen nicht übersteigen. Falsch negative Ergebnisse, die auf Inhibitoren zurückzuführen sind, lassen sich durch Amplifizierung des ECPAL-Fragmentes weitgehend ausschließen.

B) Aufarbeitung für den Nachweis aus reinen Kulturen:

- Bakterienstamm auf LB-Agarplatten auf Einzelkolonien ausstreichen
- über Nacht bei 37 ° C inkubieren
- 3 - 5 Einzelkolonien in 450 µl Lysispuffer lösen
- 1 Stunde bei 60 ° C inkubieren
- 15 Minuten bei 97 ° C erhitzen (Proteinase K inaktivieren)
- 5 Minuten bei 11.000 Upm abzentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- 1 - 5 µl des Lysates in die PCR- Reaktion einsetzen

5.2 PCR-Reaktion

Abhängig vom verwendeten Thermocycler werden die Reaktionsansätze in geeigneten Gefäßen durchgeführt. Für die Voruntersuchungen wurde ein "Omnigene -Thermocycler " der Fa. Hybaid und PCR-Gefäße der Fa. Biozym, (Best. Nr. 711010) verwendet.

5.2.1 Reaktionsansatz:

- Herstellen des Mastermix für n Ansätze:
 - n x 5 µl 10 X PCR-Puffer
 - n x 5 µl 10 X dNTP (200 µM)
 - n x 1 µl Primer K12-IS-L (0,5 µM)
 - n x 1 µl Primer K12-R (0,5 µM)
 - n x 1 µl Primer ECPAL-L (0,5 µM)
 - n x 1 µl Primer ECPAL-R (0,5 µM)
- In jeden Ansatz werden folgende Lösungen pipettiert:
 - 12 µl Mastermix
 - 36 µl H₂O
 - 1 µl Probe (DNA)
 - 1 µl Taq-Polymerase (0,5 -1 U)

Es wird jeweils eine Reaktionskontrolle (1 µl TE statt der Probe), eine Negativ- Kontrolle (*E. coli* non K12) und eine Positivkontrolle (*E. coli* K12) mitgeführt.

- Reaktionsansätze in geschlossenen Gefäßen mischen, ggf. mit PCR-Mineralöl überschichten und anschließend kurz zentrifugieren
- die Gefäße in den auf 94 °C vorgeheizten Thermocycler stellen und das Temperatur-Zeit-Programm starten
- nach Ablauf der Amplifikation die Reaktionsansätze bei 4 °C lagern

5.2.2 Temperatur-Zeit-Programm:

- 1 x 3 min bei 94 °C
- 35 x Denaturierung 30 sec bei 94 °C
- Annealing 30 sec bei 60 °C
- Synthese 30 sec bei 72 °C
- 1 x 10 min bei 72 °C

6. Analyse der PCR-Produkte

6.1 Elektrophorese

Die Produkte in den Reaktionsansätzen werden durch eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

- 1,0 % ige Agaroselösung in 1 x Elektrophoresepuffer in der Mikrowelle aufkochen
- nach Abkühlen auf 60 °C das verdampfte Wasser ergänzen
- die Lösung auf den Geltisch gießen und den Probenkamm einsetzen
- Gel bei Raumtemperatur erstarren lassen (ca. 30 Min.)
- Gel in die Elektrophoresekammer einsetzen und etwa 2 mm mit 1 x Elektrophoresepuffer überschichten
- Probenkamm vorsichtig herausziehen
- je 15 µl der Proben mit 3 ul Ladepuffer mischen und in die Probenaschen einfüllen
- an mindestens einer Position einen DNA-Längenstandard auftragen

Die Elektrophorese wird bei etwa 5 V/cm durchgeführt. Die Dauer der Elektrophorese ist abhängig von der Geometrie der Elektrophoresekammer. Der Farbstoff Xylencyanol sollte

etwa bis zur Mitte des Gels wandern.

Nach der Elektrophorese wird das Gel in die Färbe-Arbeitslösung überführt und für mindestens 15 Minuten unter ständigem Schwenken gefärbt. Danach erfolgt die Entfärbung in Elektrophoresepuffer oder Wasser für 15 Minuten.

Die DNA wird auf dem UV-Durchlichtkasten sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

7. Auswertung des PCR-Analysen

Ist in der Probe das K12-spezifische DNA-Fragment vorhanden, muß eine Bande mit der Größe von 969 Basenpaaren und zusätzlich das Enterobakterien-spezifische 278 Bp große ECPAL-Fragment erkennbar sein. Bei dieser Fragmentkombination handelt es sich um *E. coli* K12-Stämme. Ist nur das 278 Bp Fragment sichtbar, dann handelt es sich bei der Probe um ein Enterobakterium, nicht aber um *E. coli* K12. Fehlt auch die 278 Bp-Bande, so liegt in der Probe kein Enterobakterium vor.

Zur weiteren Identifizierung sollten dann biochemische Verfahren eingesetzt werden.

Anmerkung: Mit der genannten Primerkombination K12IS-L/ K12-R können die gängigen *E. coli* K12 Stämme sicher anhand des 969 bp-Fragmentes nachgewiesen werden. Einige wenige *E. coli* K12 Stämme, z.B. WG1 haben jedoch eine Deletion im Bereich des IS-Elementes, so daß der Primer K12IS-L nicht bindet und deshalb mit der Primerkombination K12IS-L/ K12-R kein PCR-Produkt erhalten wird. Hier ist dann eine PCR mit den Primern K12-L / K12-R zu empfehlen (Amplifikationsbedingungen wie oben beschrieben), die bei derartigen *E. coli* K12 Stämmen zu einem PCR-Produkt von 488 Bp führen sollte. Die folgende Übersicht zeigt eine Zusammenstellung der in *E. coli* K12 möglichen PCR-Fragmentmuster:

Kombination A:

K12-L/ K12-R	1687 Bp	<i>E. coli</i> K12	
K12-IS-L/ K12-R	969 Bp	<i>E. coli</i> K12	häufigstes K12-Muster

Kombination B:

K12-L/ K12-R	0 Bp	<i>E. coli</i> K12	
K12IS-L/ K12-R	969 Bp	<i>E. coli</i> K12	seltenes K12-Muster z.B. AB311, YN 2980

Kombination C:

K12-L/ K12-R	488 Bp	<i>E. coli</i> K12	
K12IS-L/ K12-R	0 Bp	<i>E. coli</i> K12	seltenstes K12-Muster (WG1 -Stamm)

ECPAL-L/ ECPAL-R	278 Bp	<i>E. coli</i> K12, <i>E. coli</i> (Umweltisolate und Laborstämme) und, verwandte Stämme, z.B. (<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>)
------------------	--------	--

8. U3-Phagentest

Der Bakteriophage U3 (Watson, G. and K. Paigen (1973): Isolation and characterization of an *Escherichia coli* bacteriophage requiring cell wall galactose. J. Virology 8: 669-674) lysiert *E. coli* K12-Stämme spezifisch und eignet sich daher zum Nachweis von *E. coli* K12 und zur Unterscheidung von non-K12 *E. coli* Stämmen.

Es ist jedoch zu beachten, dass der Bakteriophage U3 auf die Anwesenheit von Galaktose in der Zellwand von *E. coli* K12-Stämmen (Gal+) reagiert (Rezeptorbindung). Einige neuere *E. coli* K12 Stämme, die eine gal-Mutation besitzen (z. B. galK in TOP10, ED8767, DH10B), bieten dem Phagen deshalb keinen entsprechenden funktionellen Rezeptor und sind daher

gegen ihn resistent. Der entsprechende Stammbhintergrund (Genotyp) ist deshalb bei der Anwendung des U3-Phagentests stets zu berücksichtigen.

8.1 Herstellung eines U3-Plattenlysates

- Einzelkolonie von *E. coli* K12, z.B. DH5 in 3 ml LB (+20 mM MgSO₄) animpfen
- bei 37 °C schüttelnd inkubieren bis zur leichten Trübung: OD₆₀₀ =0,3; entspricht ca. 3x10⁸ Bakterien /ml
- 3 ml vorgewärmten P1-Weichagar (im Wasserbad bei 37 °C halten) mit 10 - 50 µl der Bakteriensuspension (ca. 2x10⁶ bis 1x 10⁷ Bakterien) und 5-10 µl Phagensuspension mischen und sofort auf vorgewärmte, frische LB-Platten überschichten; das Verhältnis von Bakterien zu Phagen sollte etwa **m.o.i. 0,1 bis m.o.i. 0,5** sein;
Kontrolle: P1-Weichagar + Bakterien ohne Phagen
- über Nacht bei 37 °C inkubieren Lyse: Aufklaren des Bakterienrasens
Kontrolle: Bakterienrasen
- Phagenlysate mit 2 ml LB-Medium abschwemmen
- 5 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugieren zur Sedimentation der Bakterien
- Überstand als Phagenlysat verwenden und bei 4 °C aufbewahren (Titer bestimmen)

Bemerkung: Bei der Anreicherung und Lagerung des Phagenlysates sollte möglichst auf Kunststoffgefäße verzichtet werden, da der Phagentiter durch Bindung an Kunststoff reduziert werden kann und damit Reproduzierbarkeit und Aussagewert beeinträchtigt werden.

8.2 Bestimmung des Phagentiters der Lysate

- Phagenlysate mit 0,9 % iger NaCl -Lösung stufenweise verdünnen auf 10⁻⁵ bis 10⁻⁹
- jeweils 0,1 ml der entsprechenden Verdünnung mit 0,1 ml Bakterienkultur und 3 ml vorgewärmten P1-Weichagar mischen (im Wasserbad bei 37 °C halten) und sofort auf vorgewärmte, frische LB-Platten überschichten
- über Nacht bei 37 °C inkubieren und Plaques auszählen; Phagentiter von U3 liegen durchschnittlich bei 1-5x10⁸/ ml

8.3 Phageninfektion

- Phagenlysat stufenweise auf 10⁻⁵ verdünnen
- eine Kolonie des zu testenden Bakterienstammes in 2 ml 0,9 % NaCl-Lösung einreiben und etwa 2 Stunden bei 37 °C inkubieren
- 100 µl der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatte ausspateln
- je 10 µl jeder Phagenverdünnungsstufe auf die Agarplatte auftropfen (im Uhrzeigersinn)
- Agarplatte über Nacht bei 37 °C inkubieren

8.4 Auswertung:

Nach Bebrütung muß auf der Platte ein Bakterienrasen gewachsen sein. Handelt es sich bei dem zu testenden Bakterienstamm um *E. coli* K12, so sollte bis zur Phagenverdünnung von 10⁻⁴ eine Lyse in Form einzelner Plaques (Aufklaren des Bakterienrasens) erkennbar sein.

9. Validierung

Im Ringtest des Unterausschuß Methodenentwicklung wurde der spezifische Nachweis von 12 *E. coli* K12 Stämmen mittels Multiplex-PCR sowie der spezifische Test mit dem Phagen U3 von allen 6 teilnehmenden Laboratorien erfolgreich durchgeführt.