

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
Nachweis von <i>Escherichia coli</i> C mit dem PhiX174-Phagentest	AM006
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, September 2000 Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

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

Die Identifizierung von *Escherichia coli* C - Stämmen, wie z. B. ABLE C (Fa. Stratagene), erfolgt mit dem Phagen Phi X174. Der Phage Phi X174 kann nur *Escherichia coli* C und *E. coli* 15-Zellen infizieren. Diese Spezifität hängt mit bestimmten Rezeptormolekülen auf der Wirtsoberfläche zusammen, an die sich der Phage mit seiner Proteinhülle anheftet, bevor die DNA in die Zelle eindringen kann.

Zum schnellen und spezifischen Nachweis von *E. coli* C Stämmen wurde ein Test auf Sensitivität gegenüber dem *E. coli* C - spezifischen Phagen PhiX174 durchgeführt. Zur weiteren Abgrenzung von *E. coli* K12 eignet sich der U3-Phagentest und die K12-Multiplex-PCR. In diesen beiden Nachweistests verhalten sich *E. coli* C – Stämme negativ. In wenigen Ausnahmefällen ist darüberhinaus eine Differenzierung über PFGE angebracht.

Im Rahmen eines Ringtests des Arbeitskreis "Gentechnische Überwachungslaboratorien" wurden der PhiX174 - Phagentest am Beispiel von *Escherichia coli* C, B und K12 Stämmen getestet und die Spezifität für *E. coli* C nachgewiesen.

2. Kurzbeschreibung

Die hier vorgestellte Nachweismethode basiert auf einem **PhiX174- Phagentest zum Nachweis** von *E. coli* C Stämmen.

3. Materialliste

3.1 Chemikalien:

Bacto Trypton
Hefeextrakt
Agar
Natriumchlorid
Magnesiumsulfat
Bakteriophage PhiX174 (NCIMB, Aberdeen, Bestell-Nr. 10382)
Escherichia coli ABLE C als Positivkontrolle (Fa. Stratagene)
E. coli K12 und *E. coli* B als Negativkontrollen

3.2 Geräte :

Eppendorfreaktionsgefäße
Agarplatten
Reagenzgläser
Mikroliterpipetten
Mikroliter-Kühlzentrifuge
Wasserbad
Inkubationsschrank

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
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

5. Durchführung

5.1 Herstellung eines Plattenlysates von PhiX174

- Einzelkolonie von *E. coli* ABLE C 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
 keine Lyse: Bakterienrasen
- Phagenlysate mit 2 ml LB-Medium abschwemmen
- Mindestens 2 Stunden bei 4 °C inkubieren
- phagenhaltiges LB-Medium abpipettieren und in steriles Röhrchen überführen
- 5 Min. bei 13.000 Upm zentrifugieren zur Sedimentation der Bakterien
- Überstand als Phagenlysat verwenden
- 1 Tropfen Chloroform zusetzen 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. Nach längerer Lagerungsdauer empfiehlt sich eine neue Titerbestimmung.

5.2 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 liegen bei ca. 10¹⁰/ ml

5.3 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

5.4 Auswertung

Nach Bebrütung muß auf der Platte ein Bakterienrasen gewachsen sein. Handelt es sich bei dem zu testenden Bakterienstamm um *E. coli* C, so sollte bis zur Phagenverdünnung von 10^{-4} (bzw. bis zu einem Titer von 1000 PFU) eine Lyse in Form einzelner Plaques (Aufklaren des Bakterienrasens) erkennbar sein. *E. coli* K12, *E. coli* B und andere *E. coli* Stämme werden nicht lysiert.

***E. coli* C Lyse durch Phage Phi X174 (+)**

***E. coli* K12 und B (-) keine Lyse**

6. Validierung

Im Ringversuch des Unterausschuß Methodenentwicklung wurde der spezifische Phagentest mit PhiX174 von allen 4 teilnehmenden Laboratorien erfolgreich durchgeführt.