

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



Molekulare Mikrobiologie

Versuchsdurchführende
Huyen Anh Nguyen (572309)

Versuchsort
Haus 14, Kursraum
Gruppe 4

Versuchsleiter
Prof. Dr. Marc Erhardt

Versuchsbetreuer
Dr. Caroline Kühne
Heidi Landmesser

Abgabe 31. Januar 2025

Contents

1	Note from the Author	2
2	Insertion mutagenesis using the transposable element T-Pop	3
2.1	Einleitung	3
2.2	Methode	3
2.3	Ergebnis	4
2.4	Diskussion	4
3	The Luria-Delbrück fluctuation test	5
3.1	Einleitung	5
3.2	Methode	5
3.3	Ergebnis	5
3.4	Diskussion	5
4	Phenotypic analysis of type-III protein secretion	6
4.1	Analysis of protein secretion via the fT3SS in Salmonella mutants using SDS-PAGE and western blot	6
4.1.1	Einleitung	6
4.1.2	Methode	6
4.1.3	Ergebnis	7
4.1.4	Diskussion	7
4.2	Luciferase assay to measure gene expression	7
4.2.1	Einleitung	7
4.2.2	Methode	7
4.3	Motility assay to analyze the swimming behavior of Salmonella mutants	8
4.3.1	Einleitung	8
4.3.2	Methode	8
4.3.3	Ergebnis	8
4.3.4	Diskussion	8
5	Dissecting the regulatory mechanism of an unknown flagellar regulator	9
5.1	Einleitung	9
5.2	Methode	9
5.3	Ergebnis	9
5.4	Diskussion	9
6	Anhang	10
	Bibliography	10

Note from the Author

Wir erklären ausdrücklich, dass wir die Anmerkungen zur Anfertigung des Protokolls gelesen und befolgt haben, dass es sich bei der von uns eingereichte Arbeit um eine von uns erstmalig, selbstständig ohne fremde Hilfe verfasste Arbeit handelt und dass wir sämtliche verwendete zulässige Literatur (Fachpublikationen/-bücher), die unverändert oder abgewandelt wiedergeben werden, insbesondere Quellen für Texte, Grafiken, Tabellen und Bilder als solche kenntlich gemacht haben. Uns ist bewusst, dass Verstöße gegen diese Grundsätze als Täuschung betrachtet und entsprechend der Prüfungsordnung und/oder der Fächerübergreifenden Satzung zur Regelung von Zulassung, Studium und Prüfung der Humboldt-Universität zu Berlin geahndet werden.

Insertion mutagenesis using the transposable element T-Pop

2.1 Einleitung

In diesen Experiment wird untersucht, wie viele Gene des Salmonella Chromosom durch die fljB-lac Fusion beeinflusst wurden. Für die Proteine des Flagellum sind die zwei Gene FljB und FliC in der Salmonella verantwortlich.²

2.2 Methode

In Table 2.1 wurden die in dem Versuch verwendete Biologisches Material aufgeführt.

Table 2.1: Verwendete biologische Material für die Insertion von Mutagenen mittels eines T-Pop Transposon.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
P22 Phagen Lysat	TH3468	F'128 (pro-lac) zzzf-3834::Tn10dTc[del-20 del-25] (T-POP3) / proAB4
Recipienten Salmonellazellen	EM8052	MvP103 sseC::aphT (Km ^R) fljB23028::MudJ-Cm (Km in MudJ replaced by FCF) / pNK2880 (Ap ^R)

Tag 1: 13.11.2024

Es wurde wie im Skript¹ drei verschiedene Probe-Lösungen auf den LB-Agarplatten ausplattiert: Recipientenzellen mit dem Phagenlysat (drei Replikate), Recipientenzellen mit PBS-Puffer (Phosphatpuffer) und Phagenlysat mit PBS-Puffer.

Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert

Tag 2: 14.11.2024

Die drei Platten mit den Recipientenzellen und Phagenlysat wurde wie im Skript¹ auf MacConkey-lactose Platten mit Tetracyclin (abgekürzt: Mac-Lac-Tc) und MacConkey-lactose Platten ohne Tetracyclin (abgekürzt: Mac-Lac) mittels Replikationsstempel repliziert. und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tag 3: 15.11.2024

Kolonien der jeweiligen Platten wurden ermittelt und den Phänotyp bestimmt.

2.3 Ergebnis

Table 2.2: Mittelwert von der Table 6.1. Der Transposon T-POP wurde mit dem Phagenstamm TH3468 in die Salmonella-Recipientenstamm EM8052 in den Genom eingefügt. Hier wurde der Mittelwert der Anzahl der Gene ermittelt, die durch die Insertion betroffen sind.

#TcR	Lac ⁻	lac ⁻ (beide Platten)	Tc-dep.-Lac ⁻	Tc-dep.Lac ⁺	Ratio: $\frac{Lac^-}{\#TcR}$	Genes affected
130	2	1.5	0.5	0	2/130	72

2.4 Diskussion

The Luria-Delbrück fluctuation test

3.1 Einleitung

3.2 Methode

Table 3.1: Verwendete biologische Material für die den Luria-Delbrück Fluktationstest. Die Stämme wurden in E25-Medium (E Salz Minimal Medium mit 0.0025 % Glukose) kultiviert bevor es im Versuch in E1000 kultiviert wurde.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
Salmonella Wildtyp	EM7653	MvP103 sseC::aphT (Km^R) wildtype
Salmonella Mutant	EM8021	MvP103 sseC::aphT (Km^R) Δ mutS::FCF (Cm^R)

3.3 Ergebnis

3.4 Diskussion

Phenotypic analysis of type-III protein secretion

4.1 Analysis of protein secretion via the fT3SS in *Salmonella* mutants using SDS-PAGE and western blot

4.1.1 Einleitung

4.1.2 Methode

Table 4.1: *Salmonella*-Stämme die für den Versuch der Analyse der Sekretionsproteine mittels SDS-PAGE und Western Blot verwendet wurde.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
Salmonella Wildtyp	EM8016	MvP103 sseC::aphT (Km ^R) Δ hin5717::FRT (fliC-ON)
Salmonella Mutant	EM8035	MvP103 sseC::aphT (Km ^R) Δ hin5717::FRT (fliC-ON) Δ fliP6659::tetRA

4.1.3 Ergebnis

4.1.4 Diskussion

4.2 Luciferase assay to measure gene expression

4.2.1 Einleitung

4.2.2 Methode

Table 4.2: Salmonella-Stämme die für den Luciferase Assay verwendet wurde.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
Salmonella Wildtyp 1	EM8009	pRG38 (P_{flhD} -luxCDABE; Tc^R)
Salmonella Wildtyp 2	EM8008	pRG52 (P_{flhB} -luxCDABE; Tc^R)
Salmonella Wildtyp 3	EM8007	pRG19 (P_{motA} -luxCDABE; Tc^R)
Salmonella Mutant 1	EM8044	$\Delta flgE22964::FCF$ / pRG38 (P_{flhD} -luxCDABE; Tc^R)
Salmonella Mutant 2	EM8045	$\Delta flgE22964::FCF$ / pRG52 (P_{flhB} -luxCDABE; Tc^R)
Salmonella Mutant 3	EM8043	$\Delta flgE22964::FCF$ / pRG19 (P_{flhB} -luxCDABE; Tc^R)

4.3 Motility assay to analyze the swimming behavior of Salmonella mutants

4.3.1 Einleitung

4.3.2 Methode

Table 4.3: Salmonella-Stämme die für den Motility-Assay verwendet wurde.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
Salmonella Wildtyp	EM8016	MvP103 sseC::aphT (Km^R) Δ hin5717::FRT (fliC-ON)
Salmonella Mutant 1	EM8033	MvP103 sseC::aphT (Km^R) Δ hin5717::FRT (fliC-ON) Δ fliT5758::FCF
Salmonella Mutant 2	EM8034	MvP103 sseC::aphT (Km^R) Δ hin5717::FRT (fliC-ON) Δ fliS5728::FRT
Salmonella Mutant 3	EM8035	MvP103 sseC::aphT (Km^R) Δ hin5717::FRT (fliC-ON) Δ fliP6659::tetRA
Salmonella Mutant 4	EM8036	MvP103 sseC::aphT (Km^R) Δ hin5717::FRT (fliC-ON) Δ fliC7715::tetRA

4.3.3 Ergebnis

4.3.4 Diskussion

Dissecting the regulatory mechanism of an unknown flagellar regulator

5.1 Einleitung

5.2 Methode

Table 5.1: Salmonella-Stämme die für die Untersuchung des unbekannten Flaggella Regulator verwendet wurde.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
Salmonella Wildtyp	EM8017	fliL23026::MudJ-Cm (Km^R in MudJ replaced by FCF = Cm^R)
Salmonella Mutant	EM9900	fliL23026::MudJ-Cm (Km^R in MudJ replaced by FCF = Cm^R) Δ regulator::tetRA

5.3 Ergebnis

5.4 Diskussion

Anhang

Table 6.1: Der Transposon T-POP wurde in die Recipientenzellen des Stammes EM8052 (Table 2.1) über Nacht mit einem Phagenlysate TH3468 (Table 2.1) transduziert. Anzahl der Kolonien von Gruppe 1-8, die auf MacConkey-lactose Platten mit Tetracyclin und MacConkey-lactose Platten ohne Tetracyclin gewachsen sind, wurden bestimmt und die Anzahl der betroffenen Gene ermittelt.

Gr.	#TcR	Lac ⁻	lac ⁻ (beide Platten)	Tc-dep.-Lac ⁻	Tc-dep.Lac ⁺	Ratio: $\frac{Lac^-}{\#TcR}$	Genes affected
1	246	5	3	2	0	5/246	81
2	77	1	0	0	1	1/77	52
3	115	1	1	0	0	1/115	35
4	93	2	1	1	0	2/93	86
5	33	1	1	0	0	1/33	121
6	95	0	0	0	0	NA	NA
7	106	1	1	0	0	1/106	38
8	274	6	5	1	0	6/274	88

Bibliography

¹ Dr. Caroline Kühne. Skript modul mb22 - praktikum molekulare mikrobiologie, 2024.

² Tomoko Yamaguchi. Structural and functional comparison of salmonella flagellar filaments composed of fljB and fliC. 2020. doi:10.3390/biom10020246.