



Blau-Weiss Selektion / α -Komplementation

Die Blau-Weiß-Selektion dient während gentechnischer Prozesse der Identifikation rekombinanter Bakterien. So können sowohl diejenigen Bakterien identifiziert werden, die das gewünschte Plasmid tragen, als auch eine Aussage darüber getroffen werden, ob die gentechnische Modifikation korrekt ausgeformt ist.

Zur Blau-Weiß-Selektion geeignet sind Vektoren (Plasmide), die an der Insertionsstelle (MCS, Multiple Cloning Site) das Gen für die β -Galactosidase (*lacZ*) tragen. Nach Insertion eines DNA-Fragmentes in die MCS entsteht auf Basis dieses Plasmids eine verkürzte oder inaktive Galactosidase.

Als bakterieller ‚Wirt‘ für das Plasmid wird zur Transformation ein mutierter Bakterienstamm verwendet, der selbst kein funktionsfähiges weiteres Gen für eine Galactosidase enthält (z. B. *E. coli* Stämme JM109, DH5 α und XL1-Blue). Bei der Galactosidase-Genmutante dieser Stämme (*lacZ* Δ M15-Mutante, abgeleitet von *E. coli* M15) erfolgte eine Deletion der Aminosäuren 11 bis 41, wodurch die Bildung der enzymatisch aktiven Homotetramerform unmöglich wird. Bakterien, die sowohl die Mutante Galactosidase, als auch erfolgreich rekombinierte Plasmide tragen, können somit keine funktionsfähige Galactosidase bilden.

→ Bakterien, die erfolgreich rekombinierte Vektoren enthalten, bilden weiße Kolonien

Anders bei Bakterienzellen, welche ein nicht-rekombiniertes Plasmid tragen. Hier wird auf dem Plasmid ein kurzes Peptid der Galactosidase (α -Peptid) exprimiert, das die mutierte genomische Peptidsequenz ersetzen kann und mit dem ‚ ω -Peptid‘ eine funktionsfähige Galactosidase bildet (α -Komplementierung).

→ Bakterien, die nicht-rekombinierte Vektoren tragen, bilden blaue Kolonien.

Bakterien, die nicht transformiert wurden, die also kein (Antibiotikaresistenz-tragendes) Plasmid enthalten, werden durch Antibiotika am Wachstum gehindert.

Zur α -Komplementierung werden einer Agarplatte sowohl IPTG zur Induktion des Mechanismus, als auch X- β -Gal als Farbsubstrat zugesetzt.



Guter Rat ist Roth.

Technische Info

Mechanismus

IPTG inhibiert als Galactopyranosid den lac-Repressor und führt hierdurch zu einer Induktion des *lac*-Promotors. Auf dem Plasmid wird daraufhin der etwa 146 Aminosäuren lange C-Terminus einer β -Galactosidase exprimiert, das als sogenannter α -Donor die C-Terminal deletierte β -Galactosidase des Bakterienstammes komplementiert. Die entstehende funktionsfähige β -Galactosidase schneidet das Galactosid X-Gal, wobei ein blauer Farbstoff entsteht - diese *lac+* Klone sind dunkelblau.

Da der C-Terminus des α -Donors **vor** und dessen N-Terminus **nach** der Klonierungsstelle des Plasmids codiert ist, führt eine inserierte Fremd-DNA in aller Regel zu einem *frame shift* oder wenigstens einer starken Kettenverlängerung, so dass kein funktionsfähiger α -Donor, sprich keine funktionsfähige Galactosidase entstehen kann - rekombinante Klone bleiben weiß. Auftretende hellblaue Klone resultieren entweder aus sehr kurzen Insertionen oder aus der Tatsache, dass häufig der C-Terminus des α -Donors für eine rudimentäre Funktion ausreicht, so dass auch in rekombinanten Klonen X-Gal in geringem Maß geschnitten wird.

Protokoll

Stammlösungen

IPTG: 0,5 M (1 g /8,4 ml) in Wasser, steril filtrieren, aliquotiert einfrieren

X- β -Gal: 100 mg/ml (240 mM) in DMF, aliquotiert und dunkel bei -20 °C aufbewahren

Ansatz

10 μ l IPTG-Lösung + 10 μ l X- β -Gal-Lösung pro 25 ml autoklaviertem, abgekühltem Agar zugeben und Platten gießen.

Alternativ je 10 μ l IPTG- und X- β -Gal-Lösung mit ca. 100 μ l Wasser mischen und auf einer vorbereiteten 9 cm Agarplatte ausstreichen.

IPTG, BioScience-Grade Best.-Nr. 2316

X- β -Gal, BioScience-Grade Best.-Nr. 2315

s.s. 04/2016