

## REKOMBINATIONSKLONIERUNG MITTELS BAKTERIOPHAGEN $\lambda$

$\lambda$ InCh ist ein Bakteriophage  $\lambda$  Vektor, wobei InCh „Into the Chromosome“ bedeutet.

$\lambda$ InCh kann als ein Werkzeug verstanden werden, um chromosomale Integration von Genen, die sich auf Plasmiden befinden, als Einzelkopie zu bewirken. Das heißt, ein resultierender *Escherichia coli* Stamm hat eine Einzelkopie eines Plasmidfragmentes stabil im Chromosom insertiert, ist aber nicht lysogen und nicht hitzeinstabil.

Das  $\lambda$ InCh System vereinfacht also den Transfer eines zu exprimierenden Gens (im konkreten Fall das *pyr4* Gen aus *Trichoderma reesei*, kodierend für die Orotidin-5'-monophosphat-decarboxylase) von einem Plasmid (konkret pFG1) in das Chromosom von *E. coli* DHB 6501.

Dafür sind drei *in vivo* Schritte, die sowohl homologe Rekombination als auch „site“-spezifische Rekombination beinhalten, erforderlich:

- 1) Doppelrekombination von homologen Stellen am Plasmid und  $\lambda$ InCh („bla“- und „near-ori“-Stellen), die eine Ampicillinresistenz, Verlust der Kanamycinresistenz und die Aufnahme des Plasmidgens bewirkt. Findet während der Lyse statt.
- 2) Die Ampicillinresistenz und das benachbarte Gen aus dem Plasmid werden in das *E. coli* Chromosom integriert durch „site“-spezifische Rekombination des Phagen mit der „att“-Stelle („att“ für „attachment“). Findet durch die Transfektion statt.
- 3) Deletion der  $\lambda$  DNA aus dem *E. coli* Chromosom durch homologe Rekombination über die „near att“-Stellen. Die Temperatursensitivität geht verloren. Findet beim Heilen des *E. coli* Stammes vom Phagen statt.

Letztlich überprüfen Sie positive Transfektanten indem Sie mittels eines kommerziell verfügbaren Kits die DNA von drei Klonen isolieren und mittels PCR auf Verlust der Phagensequenzen bzw. auf Vorhandensein und Orientierung des eingebrachten *pyr4* Gens testen.

*Hinweise:*

\* wird von dem/r Betreuer/in ausgegeben

(B) befindet sich am Betreuertisch

(E) befindet sich im allgemeinen Entnahmebereich auf RT

(G) befindet sich in der Gefrierlade

(K) befindet sich im Kühlschrank

alle weiteren Materialien/Lösungen sind selbst herzustellen oder am Hörer/innenplatz vorhanden

Gerahmte Teile: es ist unter sterilen Bedingungen zu arbeiten!

*Abkürzungen:*

amp, Ampicillin

kan, Kanamycin

KB, Kühlblock für 0,2-mL-RG

min, Minute(n)

RG, Reaktionsgefäß(e)

RT, Raumtemperatur

o/n, über Nacht

s, Sekunde(n)

sb, steriles, bi-distilliertes Wasser

## 1. Medien

**LB-Medium:**            1 % (w/v) Pepton (E)  
                              0,5 % (w/v) NaCl (E)  
                              0,5 % (w/v) Hefeextrakt (E)

- in beliebiges Gefäß geben
- etwas destilliertes Wasser zugeben und rühren
- mit dest. Wasser auf gewünschtes Volumen auffüllen, rühren
- in Epruvetten aliquotieren (Dispenser bei Betreuer/in erhältlich)
- mit Kappen verschließen
- in Korb oder Becherglas stellen
- mit Alufolie abdecken
- autoklavieren
- auf RT oder im Kühlschrank lagern

**LB-Platten:**

- Herstellung von LB in Schottflasche wie oben
- 1,5 % (w/v) Agar-Agar (E) zugeben
- schwenken
- Schottflasche verschließen (dann eine Vierteldrehung retour)
- autoklavieren
- auf ca. 50 °C abkühlen lassen/temperieren (Wasserbad)

- falls erforderlich, Antibiotika und/oder Zucker zugeben  
• Medium in Petrischalen gießen

- Medium fest werden lassen
- Platten können einige Tage auf RT, längerfristig im Kühlschrank gelagert werden

**Topagarose:**            0,5 % (w/v)    NaCl (E)  
                              1 % (w/v)        Pepton (E)  
                              0,6 % (w/v)     Agarose (E)

- Herstellung in Schottflasche (Vorgehensweise siehe oben)
- autoklavieren
- unter ständigem Schwenken 3,3 ml in sterile Epruvetten aliquotieren
- mit sterilen Kappen verschließen
- auf 47 °C temperieren und alsbald (gleicher Tag) verwenden

## 2. Transformation von lysogenem *Escherichia coli* DHB6500

Lösungen:            Plasmidlösung pFG1 (G)  
                              LB-Medium  
                              chemisch-kompetente *E. coli* DHB6500-Zellen\*  
                              *E. coli* DHB6501-Zellen\*

Materialien:        LB/amp/kan-Platten  
                              LB-Platten  
                              Eisbad

Durchführung:

- ein Aliquot kompetenter Zellen langsam auf Eis auftauen lassen
- Plasmid pFG1 auftauen, schütteln, abzentrifugieren

- 50 ng Plasmid pFG1 zu 100 µl aufgetauten, kompetenten DHB6500-Zellen mischen
- 30 min auf Eis stehen lassen
- Hitzeschock: bei 30 °C für 2 min (exakt!) am Thermoblock
- zurück auf Eis stellen
- 300 µl LB zugeben
- Zellen bei 30 °C 30 min regenerieren
- 100 µl der Bakteriensuspensionen auf LB/amp/kan-Platten ausplattieren (Drigalskyspatel)

- bei 30 °C, o/n inkubieren

- Vereinzelausstrich einer Dauerkultur von *E. coli* DHB6501 auf einer LB-Platte

- bei 37 °C, o/n inkubieren

## 3. Anzucht der lysogenen *E. coli* DHB6500-Transformanten und des DHB6501 Mutterstammes

Lösungen:            LB-Medium  
                              Ampicillin (1000-fach) (K)  
                              Kanamycin (1000-fach) (K)  
                              steriles 1 M MgSO<sub>4</sub> (E)  
                              sterile 20 % (w/v) Maltose (K)

Materialien:        sterile Zahnstocher

Durchführung:

- zehn 5-mL-Aliquote LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin versetzen
- mit je einer Einzelkolonie der DHB6500/pFG1-Transformanten beimpfen

- bei 30 °C, 200 rpm o/n schütteln

Hinweis: Eprovettenkappe mit einem Streifen Klebeband an der Eprovette befestigen. Dort auch die Beschriftung anbringen.

- ein 5-mL-Aliquot LB-Medium mit MgSO<sub>4</sub> und Maltose zu einer Endkonzentration von 2 mM bzw. 0,2 % versetzen
- mit einer Einzelkolonie DHB6501 beimpfen

- bei 37 °C, 200 rpm o/n schütteln

#### 4. Herstellung des „low frequency transducing lysate“ (LFT)

Lösungen: LB-Medium  
steriles 1 M MgSO<sub>4</sub> (E)  
Chloroform (E)

Materialien: sterile 1,5-mL-RG

Durchführung:

- zehn 5-mL-Aliquote LB-Medium mit MgSO<sub>4</sub> zu einer Endkonzentration von 2 mM versetzen
- mit je 50 µL der DHB6500/pFG1-Anzucht beimpfen

- bei 42 °C (Wasserbad) 15 min inkubieren
- bei 37 °C 1 h, 200 rpm schütteln

- 50 µL Chloroform zu jedem Aliquot geben, kräftig schütteln

- bei 37 °C, 200 rpm 15 min schütteln
- 500 µL in 1,5-mL-RG überführen
- Zentrifugieren: 10.000 rpm/ 12.000 x g, 4 °C, 10 min
- 100 µL von jedem Überstand in einem 1,5-mL-RG vereinigen
- 15 µL Chloroform zugeben, schwenken
- das primäre λInCh-Lysat weiter verwenden oder im Kühlschrank aufbewahren

#### 5. Transfektion des DHB6501 zur Herstellung des sekundären Lysogens

Lösungen: LB-Medium  
steriles 1 M MgSO<sub>4</sub> (E)  
LB/amp-Platten

Materialien: sterile 1,5-mL-RG

Durchführung:

- LFT-Verdünnungsreihe: 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-4</sup> in LB/MgSO<sub>4</sub> (2 mM)  
Hinweis: besonders gut schütteln!
- 100 µL der LFT-Verdünnungen mit jeweils 100 µL DHB6501 in einem 1,5-mL-RG mischen

- bei 30 °C 15 min inkubieren

- alle Ansätze auf 1 mL mit LB/MgSO<sub>4</sub> (2 mM) auffüllen

- bei 30 °C 1 h inkubieren

- Je 100  $\mu$ L jedes Ansatzes auf eine LB/amp-Platte ausplattieren (Drigalskyspatel)

- bei 30 °C o/n inkubieren

## 6. Überprüfung des Phänotyps des sekundären Lysogens

Materialien: LB/amp-Platten  
LB/kan-Platten  
LB-Platten  
sterile Zahnstocher

Durchführung:

- 100 Einzelkolonien von den Platten mit den niedrigsten Konzentrationen auf zwei LB/amp-Platten überimpfen (kurzer Schrägstrich)  
Hinweis: Benützung der Plattenvorlage empfohlen.

- bei 30 °C o/n inkubieren

- jede der angewachsenen Kolonien jeweils auf eine LB/kan-Platte, eine LB-Platte und eine LB/amp-Platte weiterüberimpfen (kurzer Schrägstrich)  
Hinweis: diese Reihenfolge bei der Überimpfung beibehalten.

- LB/amp- und LB/kan-Platten bei 30 °C, LB-Platte bei 42 °C (für Inkubator Betreuer/in kontaktieren) jeweils o/n inkubieren

## 7. Herstellung des „high frequency transducing lysate“ (HFT)

Lösungen: LB-Medium  
Ampicillin (1000-fach) (K)  
steriles 1 M  $MgSO_4$  (E)  
Chloroform (E)

Durchführung:

- einen positiven Klon des sekundären Lysogens in ein 5-mL-Aliquot LB/amp überimpfen

- bei 30 °C, 200 rpm o/n schütteln

- ein 5-mL-Aliquot LB-Medium mit  $MgSO_4$  zu einer Endkonzentration von 2 mM versetzen
- das Aliquot mit 50  $\mu$ L der sekundären Lysogen-Anzucht beimpfen

- bei 42 °C (Wasserbad) 15 min inkubieren
- bei 37 °C, 200 rpm 1 h schütteln

- 50  $\mu$ L Chloroform zu geben, kräftig schütteln

- bei 37 °C, 200 rpm 15 min schütteln
- 500  $\mu$ L in ein 1,5-mL-RG überführen
- Zentrifugieren: 10.000 rpm / 12.000 x g, 4 °C, 10 min
- Überstand in neues 1,5-mL-RG überführen

- 15  $\mu\text{L}$  Chloroform zugeben, schwenken
- das sekundäre  $\lambda\text{InCh}$ -Lysat weiterverwenden oder im Kühlschrank aufbewahren

## 8. Phagentiterbestimmung des HFT-Lysats

Lösungen: LB-Medium  
steriles 1 M  $\text{MgSO}_4$  (E)  
sterile 20 % (w/v) Maltose (K)  
Topagarose  
LB/ $\text{MgSO}_4$  (2 mM)/Maltose (0,2 %)-Platten

Materialien: 1,5-mL-RG  
Eisbad

Durchführung:

- ein 5-mL-Aliquot LB-Medium mit  $\text{MgSO}_4$  und Maltose zu einer Endkonzentration von 2 mM bzw. 0,2 % versetzen
- das Aliquot mit je 50  $\mu\text{L}$  der DHB6501-Anzucht (aus Punkt 3) beimpfen

- bei 37 °C, 200 rpm schütteln bis  $\text{OD}_{600} = 0,2$  erreicht ist (dauert ca. 1 bis 1,5 h)
- auf Eis stellen

- HFT-Verdünnungsreihe:  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  in LB/ $\text{MgSO}_4$  (2 mM)  
Hinweis: besonders gut schütteln!
- je 100  $\mu\text{L}$  der HFT-Verdünnungen  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  mit jeweils 100  $\mu\text{L}$  DBH6501 in 1,5-mL-RG mischen

- bei 37 °C 5 min inkubieren

- einen Ansatz zu einem 3,3-mL-Aliquot geschmolzener, auf 47 °C temperierte Topagarose geben
- am Vibrationsschüttler kurz schütteln
- sofort auf eine LB/ $\text{MgSO}_4$  (2 mM)/Maltose (0,2 %)-Platte gießen
- für die beiden weiteren Ansätze wiederholen

- Platten fest werden lassen
- bei 37 °C o/n inkubieren

## 9. Heilung des sekundären Lysogens

Lösungen: LB-Medium  
Ampicillin (1000-fach) (K)

Materialien: 1,5-mL-RG  
LB/amp-Platten  
LB/kan-Platten

Durchführung:

- drei 5-mL-Aliquote LB-Medium mit Ampicillin versetzen
- mit drei positiven Kolonien des sekundären Lysogens beimpfen
- bei 30 °C, 200 rpm o/n schütteln

- serielle Verdünnung (unverdünnt,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$ ) der Übernachtskulturen in LB/amp-Medium herstellen
  - 100  $\mu\text{L}$  jedes Klons und jeder Verdünnung auf jeweils einer LB/amp-Platte ausplattieren
  - bei 42 °C o/n inkubieren
  - pro Ansatz jeweils eine gut isolierte Kolonie von den Platten mit den wenigsten Kolonien auswählen
- davon Vereinzelausstriche auf LB/amp-Platten herstellen
  - bei 30 °C o/n inkubieren
- jeweils 20 Kolonien pro Ansatz auf eine LB/kan-Platte, eine LB-Platte und eine LB/amp-Platte weiterüberimpfen (kurzer Schrägstrich)  
Hinweis: diese Reihenfolge bei der Überimpfung beibehalten (vgl. oben)
  - LB/amp- und LB/kan-Platten bei 30 °C, LB-Platte bei 42 °C (für Inkubator Betreuer/in kontaktieren) jeweils o/n inkubieren

## 10. DNA Extraktion von Transfektanten

Lösungen: LB-Medium  
Ampicillin (1000-fach) (K)  
peqGOLD Bacterial DNA Kit (peqLab; VWR) (B)  
sb Wasser

Materialien: 1,5-mL-RG

Durchführung:

- pro Ansatz jeweils 1 Kolonie mit dem richtigen Phänotyp auswählen
- jeweils ein 5-mL-Aliquot LB-Medium mit Ampicillin versetzen und beimpfen
- bei 37 °C, 200 rpm o/n schütteln

### Zellwandverdau und Lyse

- 1 mL jeder Übernachtskultur in jeweils ein 1,5-mL-RG überführen
- Zentrifugieren: 10 min, 4000 x g
- Überstand verwerfen
- Pelletierte Zellen in TE Buffer und Lysozym nach Angabe untenstehender Tabelle resuspendieren:

Bakterien	gram-	gram+
TE Puffer	190 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Lysozym	10 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

- bei 30 °C 10 min inkubieren
- Zentrifugieren: 5 min, 4000 x g
- Überstand verwerfen
- Pellet in 400  $\mu\text{L}$  DNA Lysis Buffer T resuspendieren
- 20  $\mu\text{L}$  Proteinase K und 15  $\mu\text{L}$  RNase A (20 mg/mL) zugeben
- 10 s kräftig schütteln
- 70 °C, 30 min, schütteln

### Laden und Binden

- 200  $\mu\text{L}$  DNA Binding Buffer dazu mischen
- eine PerfectBind DNA Column in ein 2-mL-Collection Tube setzen
- Ansatz auf die Säule pipettieren
- Zentrifugieren: 1 min, 10 000 x g

- Eluat und Collection Tube verwerfen
- Vorgang eventuell wiederholen, bis das gesamte Lysat auf die PerfectBind DNA Column geladen ist.

### Waschen I

- PerfectBind DNA Column in ein frisches 2-mL-Collection Tube setzen
- 650 µL des komplettierten DNA Wash Buffers (Pufferkonzentrat plus 1,5 Volumen abs. Ethanol) auf die PerfectBind DNA Column pipettieren
- Zentrifugieren: 1 min, 10 000 x g
- Eluat und Collection Tube verwerfen
- Waschschrift erneut mit 650 µL DNA Wash Buffer durchführen

### Trocknen

- PerfectBind DNA Column in geleertes 2-mL-Collection Tube setzen
- Zentrifugieren: 1 min, 10 000 x g

### Elution

- PerfectBind DNA Column in ein sauberes 1,5-mL-RG setzen
- 50 – 100 µL Elution Buffer oder sb Wasser genau auf die Säulchenmatrix
- bei RT 3 - 5 min inkubieren
- Zentrifugieren: 1 min, 6 000 x g
- isolierte DNA weiter verwenden oder bei - 20 °C aufbewahren

## 11. PCR zur Identifikation positiver Transfektanten

Lösungen: sb Wasser  
 Taq-Polymerase (G)  
 Puffer für Taq-Polymerase (G)  
 dNTPs (10 mM) (G)  
 Primer (G)

Materialien: 1,5-mL-RG  
 0,2-mL-RG

### Durchführung:

- 1:10-Verdünnungen der DNA-Extrakte in sb Wasser herstellen

*Anzahl der Proben je Mastermix:*

__ DNA Proben	__
1 Leerprobe	1
Aufschlag	1
Gesamtanzahl	__

*Mastermix:*

Hinweise: Die Zugabe des sb Wassers dient zum Erhalt des nötigen Volumens.  
 Fügen Sie die Polymerase als letzte Komponente vor der Aliquotierung des Mastermixes zu

PCR zur Überprüfung des Verlusts der Phagensequenzen:

Reagens	1 Reaktion [ $\mu$ L]	__ Reaktionen [ $\mu$ L]
10x Taq Buffer	1,5	
MgCl <sub>2</sub>	1,5	
dNTP Mix (10 mM)	0,3	
gal_f	0,3	
INT_r	0,3	
Taq-Polymerase	0,1	
sb Wasser	10,0	
DNA Templat (1:10)	1,0	
Gesamt	15,0	

PCRs zur Überprüfung der Orientierung der *pyr4* Sequenz in *E. coli* DHB6501:

Reagens	1 Reaktion [ $\mu$ L]	__ Reaktionen [ $\mu$ L]
10x Taq Buffer	1,5	
MgCl <sub>2</sub>	1,5	
dNTP Mix	0,3	
gal_f	0,3	
<b>pyr4_fw</b>	0,3	
Taq-Polymerase	0,1	
sb Wasser	10,0	
DNA Templat (1:10)	1,0	
Gesamt	15,0	

Reagens	1 Reaktion [ $\mu$ L]	__ Reaktionen [ $\mu$ L]
10x Taq Buffer	1,5	
MgCl <sub>2</sub>	1,5	
dNTP Mix	0,3	
gal_f	0,3	
<b>pyr4_rv</b>	0,3	
Taq-Polymerase	0,1	
sb Wasser	10,0	
DNA Templat (1:10)	1,0	
Gesamt	15,0	

Primersequenzen:

gal\_f: CTTGCTGAGTACGTGAGTTC; bindet die *gal* Stelle im *E. coli* DHB6501 Genom  
 INT\_r: GGACACCATGGCATCACAGT; bindet eine Sequenz in den Phagengenomen  
 pyr4\_fw: TGTACCTGGCCGACAAGATTGG;  
 pyr4\_rv: TAGGCTTTCCACGCTGCTGATC; die *pyr4* Primer umspannen einen Bereich von 149-1124 bp nach dem Startcodon

zu erwartende Amplikongrößen:

im nicht geheilten Stamm mit gal\_fw und INT\_rv: 1128 bp  
 im geheilten Stamm mit gal\_fw und INT\_rv: kein Amplikon (Phagengene nicht mehr vorhanden)  
 im geheilten Stamm mit gal\_fw / pyr4 rv: ca. 5000 bp  
 im geheilten Stamm mit gal\_fw / pyr4 fw: ca. 5000 bp

- pro Mastermix ein 1,5-mL-RG auf Eis bereitstellen
- Reagenzien und gegebenenfalls die Proben auftauen, schütteln, kurz abzentrifugieren, auf Eis stellen

- Mastermix herstellen: die oben berechneten Mengen der Reagenzien (außer der Probe) in die RG pipettieren, gut schütteln und kurz abzentrifugieren
- 14  $\mu\text{L}$  Mastermix in 0,2-mL-RG vorlegen
- Proben: 1  $\mu\text{L}$  DNA dazu mischen
- Leerproben: 1  $\mu\text{L}$  sb Wasser dazu mischen
- RG bis zum Start der PCR auf KB stellen
- PCR Programm:

1x	95 °C	3 min
30x	95 °C	30 s
	57 °C	60 s
	72 °C	<i>variabel (1kb/min)</i>
1x	72 °C	7 min
1x	16 °C	$\infty$

- PCR Produkte weiter verwenden oder bei - 20 °C aufbewahren

## 12. Agarosegelelektrophorese (vgl. auch Übungsbeispiel 6)

Lösungen: 6x Purple Loading Dye (K)  
DNA-Marker: Gene Ruler 1kb DNA Ladder (K)  
DNA-Färbemittel SYBR Safe (K)  
TAE Laufpuffer (A)

Materialien: 250-mL-Erlenmeyerkolben mit Deckel (A)  
Agarose (A)  
Wägeschälchen für Agarose (A)  
Topfhandschuh (A)  
Agarosegelelektrophoreseschlitten (A)  
Agarosegelelektrophoresekamm (A)  
Kleine Wasserwaage (A)  
Pipette (A)  
Meßzylinder (A)

Durchführung:

- Entscheiden Sie aufgrund der Tabelle, welche Agarosekonzentration das Gel haben soll

Agarosekonzentration (%)	Größe linearer DNA-Fragmente, für die eine gute Auflösung erreicht wird (kb)
0,5	30 - 1
0,7	12 - 0,8
1,0	10 - 0,5
1,2	7 - 0,4
1,5	3 - 0,2
2,0	< 0,2

- die entsprechende Menge Agarose in das dafür vorgesehene Wägeschälchen einwiegen
- weiter vorgehen wie in Punkt 3 der Arbeitsvorschrift für Übung 6 beschrieben (Kamm für schmale Gelspuren verwenden)
- PCR Proben mit entsprechendem Volumen 6x Purple Loading Dye mischen
- 5  $\mu\text{L}$  DNA-Marker in die erste Geltasche pipettieren
- 5  $\mu\text{L}$  des Probe-Ladepuffer Gemisches in die weiteren Geltaschen pipettieren
- Gellauf: für ca. 50 min bei 90 V laufen lassen
- Gießkammer, Schlitten und Kamm mit dest.  $\text{H}_2\text{O}$  reinigen und retournieren
- Gel mit dem Schlitten auf den Gel-Imager legen

- falls ausreichende Auftrennung erfolgt ist, das Gel ohne Schlitten auf den Gel-Imager legen fotografieren und das Bild speichern
- falls keine ausreichende Auftrennung erfolgt ist, das Gel weiter laufen lassen

### 13. Auswertung/Abgabe

- Bestimmung des Phagentiters in PFU/ $\mu$ L durch Auszählen der Plaques auf allen auszählbaren Platten (= Verdünnungen)
- Angabe der bestimmten Phagentiter auf der jeweiligen ausgezählten Platte
- Angabe des Phagentiter-Mittelwertes und der Abweichung auf einer Platte (oder dem Klebeband, siehe nächster Punkt)
- die Platten zur Bestimmung des Phagentiters und die drei zur Überprüfung des Phänotyps des sekundären Lysogens mit Parafilm verschließen, mit Klebeband zusammenbinden (Beschriftung!) und abgeben. Ausgewählten Klon (sek. Lys.) deutlich markieren!
- Abgabe der beschrifteten Gelelektrophoresebilder auf einem DIN A4-Blatt mit
  - Erwähnung der zu erwartenden/erhaltenen Amplikonlängen
  - Feststellung, ob die Integration des *pyr4* Gens in das Genom von *E. coli* DHB6501 erfolgreich war sowie
  - Erklärung (samt einfacher Skizze), in welcher Orientierung das Fragment integriert wurde.

	1	2	3	4	5		
	6	7	8	9	10	11	
12	13	14	15	16	17	18	
19	20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31	32	33	34
35	36	37	38	39	40	41	
	42	43	44	45	46	47	
		48	49	50			

	1	2	3	4	5		
	6	7	8	9	10	11	
12	13	14	15	16	17	18	
19	20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31	32	33	34
35	36	37	38	39	40	41	
	42	43	44	45	46	47	
		48	49	50			

