

Pokus 3: Nespecifická mutageneze - bakteriofág Mu.

1. Výhodou bakteriofága Mu (mutátorový bakteriofág) oproti transposonům je účinný přenos jeho dvojřetězcové DNA vlastní fágovou kapsidou do nového hostitele.
2. Po infekci nového hostitele se Mu DNA vrekombinuje svým specifickým a účinným způsobem do náhodné polohy na jeho genomu a inaktivuje "zasazený" gen. Takto lze snadno připravit auxotrofní mutanty.
3. Při použití vhodného rekombinantního Mu fága, který obsahuje reporterový gen, lze selektovat genové fúze.

Úvod:

Řada genetických elementů podstupuje nehomologní rekombinaci. Mezi ně patří bakteriofág Mu, řada transposonů a bakteriofág lambda. Jejich společnou vlastností je, že podstupují integraci rekombinací v místech, která mají malou nebo žádnou homologii se sekvencí na elementu. Lambda je formálně členem této skupiny, její preferenční místo integrace obsahuje centrální oblast 15 párů bází, která je identická na DNA fága i na chromosomu, ale rekombinace není závislá ani zprostředkovaná mechanismem homologní rekombinace buňky. Ostatní elementy se integrují víceméně náhodně, i když každý element preferuje určitá místa před jinými.

Bakteriofág Mu je lysogenní fág s asi 39 kilobázemi DNA v každém virionu a vyžaduje vápenaté ionty k adsorpci na hostitelskou buňku. Mu lysogenisuje integrací do hostitelského genomu do víceméně náhodných poloh. Po integraci do určitého genu je exprese tohoto genu přerušena. Budeme používat variantu fága Mu označovanou *MudI(Ap,lac)*. Tento fág je defektní. Postrádá některé Mu geny, které byly nahrazeny v jedné poloze genem pro syntézu β -laktamasy (z transposonu Tn3, způsobuje resistenci k ampicilinu) a v druhé poloze (na "levém" konci integrovaného genomu profága) *lacZ* a *lacY* geny, které postrádají *lac* promotor. Vzhledem k nepřítomnosti promotoru nejsou *lac* geny **na fágu** normálně exprimovány. Pokud však se fág integruje do oblasti hostitelské DNA, která je transkribována, pokračuje transkripce iniciovaná v bakteriálním genu do integrovaných *lac* genů přenášených fágem a exprese *lacZ* genu je možno snadno stanovit. Použitý fág má termosensitivní represor. Lysogeny (bakteriální kmeny s integrovaným profágem) je tedy třeba udržovat při teplotách **pod 34°C**. Aby byla eliminována možnost integrace Mu do hostitelových *lac* genů a aby šlo odlišit expresi *lac* genů hostitele a fága, budeme používat hostitelský kmen, který má *lac* geny deletovány.

Budeme používat dva typy selekce:

- a) Resistenci vůči ampicilinu. Po získání populace Ap-resistentních buněk, která představuje inserty *MudI(Ap,lac)* do nejrůznějších genů, se pokusíme nalézt kolonie, které získaly nějaký auxotrofní

požadavek (ztratily schopnost syntetisovat nějakou aminokyselinu nebo bázi nebo vitamín). V serii vylučovacích experimentů se pokusíme tento "auxotrofní požadavek" identifikovat.

b) Resistenci vůči ampicilinu a arabinose současně. Tento postup umožní selektovat inserce *Mud* do *ara* genů. Použitý hostitelský kmen je *araD* mutant, který postrádá epimerasu, konvertující ribulosa-5P na xylulosa-5P. Hromadění ribulosa-5P v buňce (samozřejmě pouze v přítomnosti L-arabinosy v kultivačním mediu) je toxické a vede k inhibici růstu a smrti buněk. Přežijí pouze ty buňky, u nichž inserce *Mud* do genomu inaktivuje některý z genů před *araD* (interferuje s časnějším biochemickým stupněm v metabolismu L-arabinosy) nebo inaktivuje indukci *ara* genů (např. inaktivace exprese "induktoru" *ara* genů). Inserce *Mud* do *ara* genů budeme selektovat na indikátorovém mediu zvaném MacConkey agar s laktosou, arabinosou a ampicilinem. Bude třeba vyšetřit mnoho buněk, protože pouze malá frakce *Mud* lysogenů bude resistantní k arabinose a růst na tomto mediu. Přítomnost laktosy v agaru nám ukáže, zda jsou *lac* geny exprimovány za daných podmínek, to znamená, zda transkripce započatá v některém promotoru *ara* operonu (na chromosomu hostitele) bude pokračovat do části insertovaného *Mud*, která obsahuje výše uvedené *lac* geny bez regulačních oblastí. Metabolismus laktosy se projeví zčervenáním kolonií, protože se sníží pH a tím se změní barva pH indikátoru přítomného v MacConkey agaru (neutrální červeně).

Hostitelské buňky jsou Ara negativní. Pouze velmi řídké revertanty by mohly využít arabinosu. Tyto však budou eliminovány ampicilinem v mediu. Rudé kolonie tedy využívají laktosu pomocí *lac* genů, které byly vneseny s *Mud*.

Zdrojem partikulí *MudI(Ap,lac)* bakteriofága je lysát z kmene Mal103, který je dvojitým lysogenem.

Obsahuje mutantního fága *MucI_{ts}* (má termosensitivní represor) a rekombinantního fága *MudI(Ap,lac)*.

MucI_{ts} slouží jako helper fág. Jeho partikule jsou rovněž v lysátu obsaženy, ale na průběh experimentu nemají vliv, pokud není použita příliš vysoká multiplicita infekce.

Příprava Mu lysátu: *E. coli* Mal103 (dvojitý lysogen *MucI_{ts}* a *MudI(Ap,lac)*) se submersně kultivuje v LB mediu při **30°C** do časně logaritmické fáze růstu (OD cca 0.2). Ke kultuře se přidá $MgSO_4$ do konečné koncentrace 2mM a $CaCl_2$ do konečné koncentrace 0.2mM (přítomnost hořčičných a vápenatých iontů usnadní proběhnutí lytického cyklu a zřejmě také chrání viriony proti působení chloroformu v poslední fázi přípravy lysátu). Kultura se přenesse do vodní lázně vytemperované na **44°C** a stacionárně se inkubuje 30 minut (po teplotní inaktivaci cíl represoru dojde k indukci lytického cyklu a tvorbě virionů). Pak se kultura přenesse na třepačku vytemperovanou na **40°C** a pokračuje kultivace. Buňky by měly lysovat do 60 -120 minut. Po proběhlé lysi se přidá chloroform v poměru cca 10 ml kultury + 0.1 ml chloroformu a suspenze se dobře protřepe (zvortexuje). Následuje centrifugace při 4500 x g, 10 minut. Supernatant se přenesse do sterilní zkumavky a uschová při 4°C. Lysáty fága Mu jsou nestabilní a rychle ztrácejí titer (koncentrace infekčních fágových partikulí). Nejvhodnější je vždy použít čerstvý lysát.

Co bychom měli prokázat:

- 1) Inserční inaktivaci genů pomocí fága *MudI(Ap,lac)* lze snadno připravit auxotrofní mutanty.
- 2) Insercí fága *MudI(Ap,lac)* lze připravit genovou fůzi reportérového *lac* genu s regulační oblastí studovaného genu. Pomocí takovéto genové fůze lze studovat promotorovou regulaci exprese tohoto

hostitelského genu na základě snadno stanovitelné aktivity β -galaktosidasy (jejíž gen je "přinesen" profágem). Základním trikem je selekce potřebné genové fúze z velkého množství genových fúzí, které automaticky vznikají insercí rekombinantního *MudI*(Ap, *lac*) fága do chromosomu hostitele v populaci hostitele.

Popis pokusu:

1. Hostitelský kmen: MC4100: *thi, δ (argF-lac)U169, araD139, rpsL150*, (další znaky: *relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR* nejsou pro náš účel důležité)

2. Fágový lysát: Čerstvý lysát Mal103, dvojitého lysogena *MucI_{ts}, MudI(Ap, lac)*: δ (*gpt-proAB-argF-lac*)XIII *rpsL*[*MudI(Ap, lac)*] [*MucI_{ts}* 62]

3. Nové symboly: δ (*argF-lacU*): delece mezi geny *argF* a *lacU* včetně těchto genů.

araD139: mutace v genu *araD* s alelickým číslem 139, ribulosa-5P není konvertován na xylulosa-5P v přítomnosti arabinosy, hromadění ribulosa-5P je toxické.

δ (*gpt-proAB-argF-lac*): delece všech genů mezi *gpt* a *lac*, včetně těchto genů.

4. Hrubý nárys pracovního postupu:

Buňky jsou infikovány lysátem a ponechány růst při 30°C v komplexním kapalném mediu LB v přítomnosti citrátových iontů za neselektivních podmínek, aby se mohly lysogeny vytvořit a ty pak byly selektovány na agarech s ampicilinem (selekce insertů do kterékoli oblasti genomu) a na agarech s ampicilinem a arabinosou (insece do *ara* genů).

a) Mezi buňkami resistantními k ampicilinu se budeme snažit identifikovat auxotrofy.

b) Budeme studovat lysogeny resistantní vůči ampicilinu a arabinose. Polovina z nich je ve správné orientaci ke dvěma promotorům v *ara* oblasti. K silnému promotoru operonu *araBAD* a středně silnému promotoru genu *araC*. Tyto dva typy insertů lze rozlišit na základě vlivu arabinosy na expresi β -galaktosidasy ve vzniklé genové fúzi.

Časová osa pokusu:

1.den: Příprava "insertů" (lysogenů), jejich vyšetí na selekční miskách, t.j. LB-Amp a MacConkey-Amp-laktosa-arabinosa.

2.den: identifikace auxotrofií mezi ampicilin-resistantními koloniemi a identifikace kolonií s genovou fúzí *lac* genů do *ara* oblasti a jejich purifikace.

3.den: Podrobná identifikace auxotrofií I a zjišťování, zda v koloniích s insertem *MudI* do *ara* oblasti jsou *lac* geny pod arabinosovou kontrolou.

4.den: Podrobná identifikace auxotrofií II a vyhodnocení testů na kontrolu arabinosou.

5.den: Podrobná identifikace auxotrofií III.

6.den: Odečtení posledních výsledků.

Přesné instrukce:

A - auxotrofní insece:

A/1. Poskytnutý materiál: Suspence buněk MC4100 v TM, čerstvý lysát dvojitého lysogena *MucI_{ts}, Mud(Ap, lac)*, sterilní zkumavky pro infekci buněk fága, kultivační baňky se sterilním mediem LB obsahujícím 5mM citronan sodný, minimální medium K120, sterilní centrifugační zkumavky, agarové misky LB s ampicilinem, MacConkey agary s ampicilinem, laktosou a arabinosou, MacConkey agary s ampicilinem a laktosou, minimální agary K120 s ampicilinem, sterilní roztoky směsí aminokyselin, bází, vitaminů, sterilní roztoky jednotlivých aminokyselin, bází a vitaminů.

A/2. Infekce hostitelských buněk Mu fágem:

K 1 ml buněčné suspence MC4100 v TM ($OD_{600}=1$) přidejte 0.25 ml lysátu kmene Mal103. Ponechte fága adsorbovat 15 - 25 minut při pokojové teplotě.

A/3. "Stabilisace insertů (lysogenů)": Přidejte výše uvedenou transdukční směs k 25 ml LB media s 5mM citronanem sodným. Ponechte růst na třepačce 70 minut při 30°C. Citronan blokuje další adsorpci fága, která by měla za následek nadbytečnou lysi buněk.

A/4. Selekcce buněk resistantních k ampicilinu:

Centrifugujte buněčnou suspensi a resuspendujte v 5 ml minimálního media K120. Homogenně vysejte 0.02 ml na jeden agar LB s ampicilinem a 0.150 ml na druhý. Nezapomeňte vyset suspensi na MacConkey agary podle podrobných pokynů pro inserci do ara genů, viz dále. Přeneste misky do termostatu 30°C (případně 28°C- dva dny inkubace).

A/5. Identifikace inserčních auxotrofních mutantů:

Identifikace probíhá na jednoduchém principu zjištění látky, kterou mutant potřebuje pro růst.

Připravte 2 páry matric inokulovaných lysogeny resistantními k ampicilinu. Každý pár je tvořen dvěma matricemi inokulovanými ve stejných polohách buňkami z téže kolonie, jedna na minimálním (K120, Amp) a druhá na komplexním mediu (LB, Amp) tj. inokulace celkem ze 160 kolonií. Po kultivaci při 30°C (1-2 dny) zjistíte, které z nich mají nějaký (jakýkoli) auxotrofní požadavek (srovnáním růstu na komplexním a minimálním mediu). Počet testovaných kolonií je zvolen tak, aby každá skupina získala alespoň jednoho auxotrofa.

A/6. Zjištění auxotrofního požadavku:

Identifikace bude provedena pro celý turnus najednou. Vzhledem k provázanosti metabolických drah pro aminokyseliny byla vypracována tabulka s deseti diagnostickými minimálními agary, na které jsou napipetovány kombinace čtyř auxotrofních požadavků – aa a base. Nárůst vždy na dvou a to 1-5 a 6-10 určuje patřičný auxotrofní mutaci.

Složení diagnostických ploten: (Advanced Bacterial genetics, Davis R.W., Botstein D., Roth J.R., pp. 209- 211), Cold Spring Harbor, New York 1980)

Každý nutriční přídatek je obsažen ve dvou mediích,

Konkrétní auxotrof musí růst na dvou médiích s těmito výjimkami.

- Některé purinové mutanty rostou na adenosinu nebo guanosinu (1,2,6)
- Některé purinové mutanty rostou na adenosinu + thiaminu (pouze 6)
- Mutanty s mutací na začátku aromatické dráhy porostou pouze na 8
- Mutanty s blokováním na začátku lysinové dráhy porostou pouze na 4

Plotny 11 jsou pouze pro vitaminy, požadují další selekci na jednotlivé součásti

	1	2	3	4	5
6	adenosin	guanosin	cystein	methionin	thiamin
7	histidine	leucin	isoleucin	lysin	valin
8	fenylalanin	tyrosin	tryptofan	threonin	prolin
9	glutamin	asparigin	uracil	asparagová kys.	arginin
10	thymin	serin	glutamová kys.	DAP	glycin
11 pyridoxin, nicotinová kyselina, biotin, panthothenat, alanin					

B - inserce Mud (Ap,lac) do ara genů:

B/1. - Tato část je součástí postupu **A** (auxotrofní inserce) až do bodu **A/4**, kdy je připravena buněčná suspence v K120 mediu. Vysejte 0.1, 0.3, 0.8 ml této buněčné suspence obsahující inserty (lysogeny) na arabinosa-laktosa-ampicilin-MacConkey agary a kultivujte v termostatu při 28°- 30°C.

B/2. - Hodnocení narostlých kolonií. Jsou tři možnosti:

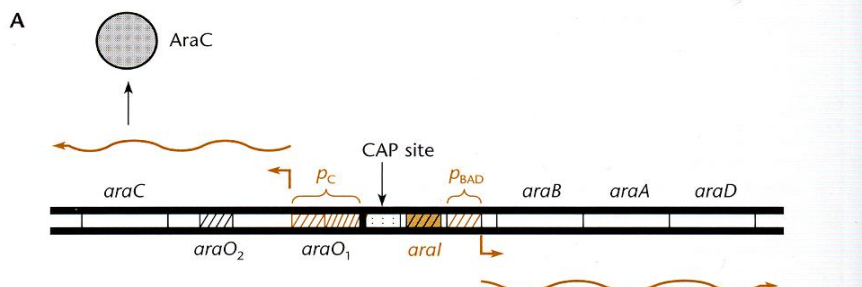
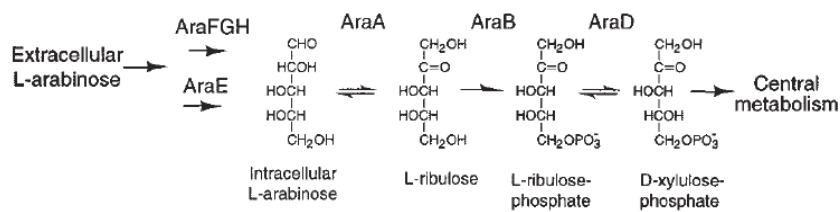
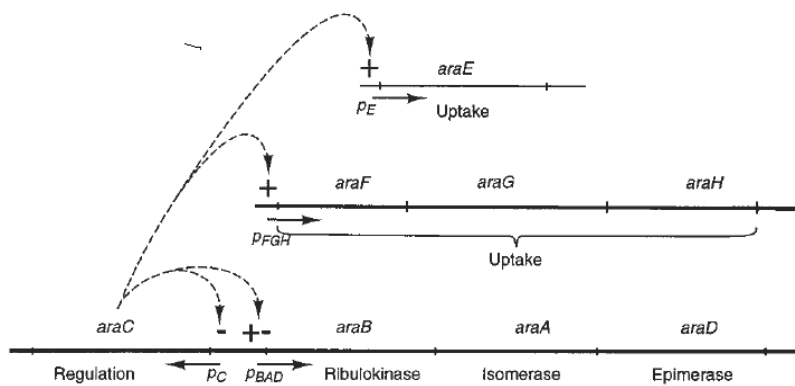
- "Bezbarvé" kolonie, které nemetabolisují laktosu (rostou pouze na peptonu, který je v mediu obsažen). [Mud(Ap,lac) fág je insertován tak, že se v přítomnosti arabinosy nesynthetisuje ribulosa-5P, ale k expresi β -galaktosidasy a tudíž k metabolismu laktosy nedochází].
- Růžové nebo světle červené kolonie, které metabolisují laktosu mírnou rychlostí. [Rovněž není synthetisován ribulosa-5P. β -galaktosidasa je exprimována ze "středně silného" promotoru].
- Tmavě červené kolonie, které metabolisují laktosu rychle. [Není synthetisován ribulosa-5P. β -galaktosidasa je exprimována ze "silného" promotoru].

B/3. - Purifikujte dva případy každého typu kolonie na stejném na MacConkey-laktosa-arabinosa-ampicilin agaru (inkubace při 28°-30°C, 24 hod).

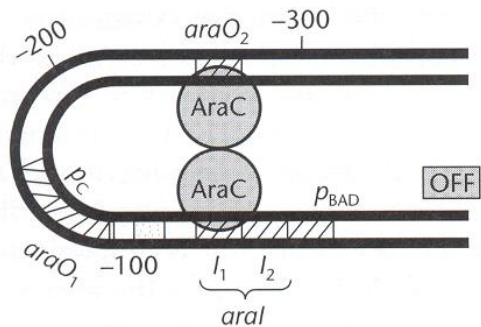
B/4. - Ověřte, zda je exprese lac genů závisí na přítomnosti arabinosy.

Srovnajte barvu purifikovaných kolonií po růstu na **laktosa**-ampicilin-MacConkey a **arabinosa-laktosa**-ampicilin-MacConkey agarech (inkubace při 28°-30°C, 24 hod). Bude možno identifikovat kolonie, které laktosu metabolisují (jsou červené) pouze v přítomnosti arabinosy („indukce“ β -galaktosidasy a β -galaktosidpermeasy arabinosou - lac geny pod kontrolou *araBAD* promotor-operátorové oblasti). Jiné kolonie laktosu utilisují bez ohledu na přítomnost arabinosy (lac geny pod kontrolou *araC* promotoru).

Schéma arabinosového operonu:



A Absence of L-arabinose



B Presence of L-arabinose

