

Pokus IV: Přirozená transformace.

Úvod:

1. Některé bakteriální druhy (hlavně G+, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*) jsou tzv. přirozeně kompetentní.
2. Fyziologický stav bakterií, kdy jsou schopny přijímat cizorodou DNA
3. Děj je podmíněn přítomností receptorů a přenašečů DNA v membráně. Do buňky je přenášen pouze jeden řetězec DNA, který se homologně rekombinuje s vyšší frekvencí než dvouřetězcová DNA.
4. Tímto způsobem přenášená DNA pochází z mrtvých lyzovaných buněk, lineární DNA o velikosti 7 -10 kbp se přenáší z největší účinností v min. koncentraci 5-10 µg/ml
5. Těto schopnosti se využívá k efektivní přípravě cílených mutantů (a to jak knock-out, tak k vnášení bodových mutací). Dále ke komplementaci či sledování aktivit promotorů insercí dané alely či fúze reportérového genu s promotorem do tzv. nepotřebného genu (u *B. subtilis* např. do *amy* lokusu).

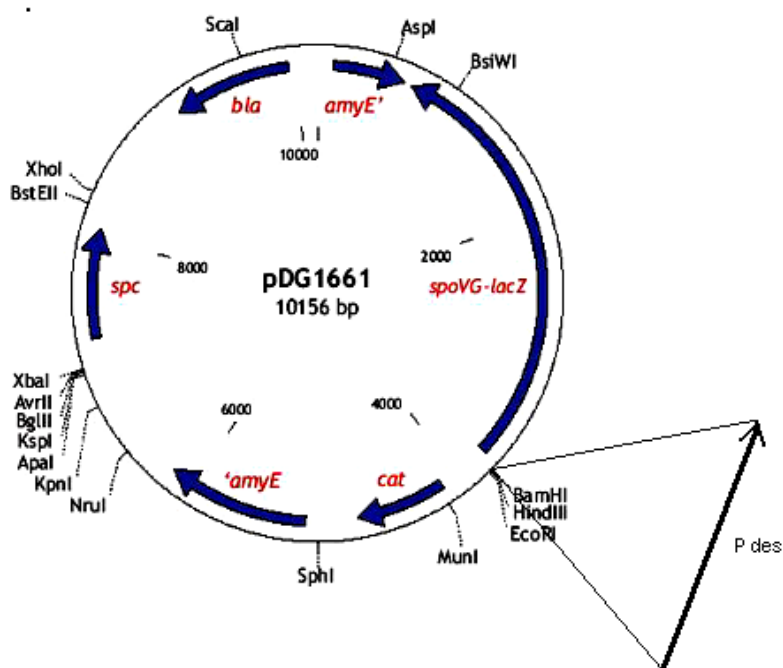
Co bychom měli prokázat:

Vyisolovat mutantu *B. subtilis* s vloženým konstruktem do *amy* lokusu. Konstrukt je připraven pomocí plazmidu pDG1661 s vloženým promotorem desaturázy před reportérový gen β-galaktosidázy.

Bakteriální kmeny: *Bacillus subtilis* 168: divoký kmen nesoucí pouze auxotrofii na tryptofan (*trp*-)

Plasmidy: plasmid pDG1661: s insertovaným promotorem desaturázy z *Bacillus subtilis*. (desaturáza je enzym, který přeměňuje mastné nasycené kyseliny v membráně na nenasycené a tím mění fyzikální vlastnosti membrány, tzv. ji ztekucuje. To je potřeba při chladovém šoku, kdy při původním složení membrány dojde k její rigidizaci vlivem snížené teploty). Plasmid obsahuje gen *cat*, umožňující resistenci k chloramfenikolu (koncentrace 5 µg/ml media) a dále dvě části *amy* lokusu zajišťující inserci do genu *amy* (rozklad škrobu).

Struktura integračního plazmidu pDG1661 s vloženým promotorem desaturasy do BamHI – EcoRI míst polyklonovacího místa



Legenda:

<i>amyE'</i> ... <i>amyE'</i>	5' a 3' segmenty <i>amyE</i> genu <i>Bacillus subtilis</i> 168.
<i>spoVG-lacZ</i>	<i>lacZ</i> kodující sekvence z <i>Escherichia coli</i> , fuzována s ribozóm-vazebním místem <i>spoVG</i> z <i>Bacillus subtilis</i> .
<i>spc</i>	koduje spektinomycinovou adenylyltransferázu, selektovatelné v <i>B.subtilis</i> a <i>E.coli</i> (spektinomycin 100 µg/ml).
<i>cat</i>	koduje chloramfenikolovou acetyltransferázu, selektovatelné v <i>B.subtilis</i> a <i>E.coli</i> (chloramfenikol 5 µg/ml).
<i>bla</i>	koduje β-laktamázu selektovatelnou pouze v <i>E.coli</i> (ampicilin 50 µg/ml).

Popis pokusu:

1) **Příprava kompetentních buněk:** Pro zrychlení praktika budou dodány již připravené kompetentní buňky.

Kompetentní buňky *Bacillus subtilis* byly připraveny podle protokolu z manuálu

„Molecular biological methods for *Bacillus*“ (HARWOOD and CUTTING 1990).

1. Buňky vhodného kmene (*B.s.* 168) byly vysety na plotny s komplexním médiem a kultivovány při 37 °C přes noc.
2. 10 ml SpC média zaočkováno jednou kolonií (u ověřených kmenů bylo očkováno z konzervy).
3. Kultivováno přes noc při 37 °C za třepání.
4. 1,4 ml narostlé kultury bylo přidáno do 10 ml vytemperovaného čerstvého SpC média.
5. Kultivováno 3 hodiny při 37 °C.
6. Přidáno 11 ml SpII média a pokračováno v kultivaci při 37 °C. Kultura během kultivace byla důkladně vzdušněna.
7. Po 2 hodinách kultivace jsou buňky maximálně kompetentní.
8. Pro skladování byly kompetentní buňky sklizeny centrifugací resuspendovány v supernatantu (medium v kterém rostly, 2 ml), byl přidán sterilní glycerol do konečné koncentrace 10 % (v/v), promícháno a rozpipetováno po malých objemech do mikrozkušavek. Zmrazeno v tekutém dusíku nebo -70 °C. Skladováno v -70 °C.

SpC medium: 0,075 M (NH₄)₂SO₄, 0,43 M K₂HPO₄, 0,2 M KH₂PO₄, 0,03 M citronan sodný, 4 mM MgSO₄·7H₂O, 0,2 ml 50% (w/v) glukóza, 0,4 ml 10 % (w/v) Yeast Extract, 0,5 ml 1 % (w/v) Casamino Acids.

SpII medium: : 0,075 M (NH₄)₂SO₄, 0,43 M K₂HPO₄, 0,2 M KH₂PO₄, 0,03 M citronan sodný, 4 mM MgSO₄·7H₂O, 2 ml 50% (w/v) glukóza, 2 ml 10 % (w/v) Yeast Extract, 2 ml 1 % (w/v) Casamino Acids, 1 ml 0,1 M CaCl₂.

2) **Transformace buněk:** Připravené kompetentní buňky *B. subtilis* transformovat připraveným konstruktem plazmidu pDG1661 s promotorem desaturázy a linearizový restriční enzymem XhoI. Podle protokolu:

1. 100 µl čerstvých nebo rozmražených (37 °C) kompetentních buněk přenést do sterilní mikrozkušavky.
2. Přidat 0,2-0,5 µg plazmidové DNA a zamíchat.
3. Inkubovat 20 minut při 37 °C třepání.
4. Přidat 500 µl LB média a inkubovat 1 hodinu při 37 °C za třepání.
5. Buňky stočit, resuspendovat v 100 µl LB média a vysít na selektivní LB agar. (chloramfenikol)
6. Kultivovat při 37 °C.

3) **Kontrola transformant:** přeočkování vyrostlých transformant na LB agary se škrobem. Po kultivaci při 37 °C, detekce aktivity amylázy pomocí Lugulova roztoku. Kontrola pozitivních klonů na selektivních mediích s x-galem (kontrola funkce promotoru).

Časová osa pokusu:

1. den: Transformace
2. den: Vyhodnocení úspěšnosti transformace a přenesení transformant na další selektivní LB medium se škrobem, LB agary s x-galem a vytvoření matrice na původním selektivním agaru.
3. den: Vyhodnocení aktivity amylázy v jednotlivých klonech pomocí Lugulova roztoku. Transformanty s insercí v *amy* lokusu ztrácejí schopnost štěpit škrob, okolo kolonie se nevytváří neobarvená průhledná zóna. LB agary s x-galem umístit na noc do lednice (na zjištění aktivity promotoru před reportérovým genem *β-galaktosidázy*.)
4. den: Vyhodnocení. Klony se správně vloženým promotorem se zbarví modře.

Poskytnutý materiál:

1. Kompetentní buňky *Bacillus subtilis* 168
2. Konstrukt plazmidu pDG1661 s vloženým promotorem desaturázy *B. subtilis* 168, linearizovaný enzymem BstEII
3. LB medium
4. Selekční plotny: LB s chloramfenikolem (5 µg/ml), LB se škrobem (1 %), LB a x-gal.

Provedení pokusu:

Provést transformaci linearizovaného plazmidu pDG1661 s vloženým promotorem před gen *β-galaktosidázy*. Podle protokolu uvedeného výše.

1. Napipetovat 5 µl roztoku plazmidu (300 ng) do suspenze dodaných kompetentních buněk *B. subtilis* 168.
2. Inkubovat 20 min při 37, poté přidat dalších 500 µl LB media a kultivovat ještě 60 min.
3. poté vysít na selektivní medium (LB agar s chloramfenikolem) ve dvou koncentracích
 - a. 100 µl přímo suspenze

- b. stočit a resuspendovat v 100 μ l LB media a vysít vše
4. Inkubovat přes noc při 37 °C.

Analýza transformant:

1. Přečárkovat transformanty
 - a. na LB agary se škrobem
 - b. na LB agary s x-galem,
 - c. vytvoření matrice na původní selekční agar - LB cat
 - d. Na LB se Spektinomycinem
2. Inkubace přes noc při 37°C
3. Narostlé transformanty detekovat na plotnách se škrobem přelitím Lugulovým roztokem.
4. Transformanty na x-galových plotnách – pozitivní klony jsou modré
5. Na LB spektinomycin – pozitivní klony nenarostly.

Vyhodnotit:

1. Porovnat modré kolonie s těmi, které nevytvářejí zóny rozloženého škrobu okolo kolonií.
2. Vysvětlit dvoubarevnost některých kolonií.