

Transdukce:

Provedení pokusu:

1. Naočkejte noční kultury buněk recipientů *B.subtilis* 1. QB123 - (sacA321, ctrA1, trpC2) a 2. QB944 (purA16, cysA145, trpC2) do 10 ml čerstvého PAB media (1:25) a kultivujte při 37 °C do OD₄₅₀ = 0,7-0,8. (počet buněk asi 5.10⁷)
2. Do šesti sterilních zkumavek napipetujte po 0.5 ml buněčné suspence. Do tří 1. recipient(QB123, Kit9) do dalších tří 2. recipient (QB944, Kit1). Kontrolní2 zkumavky označte C (nebude přidán PBS1 lysát, slouží jako kontrola frekvence reverse mutací u recipientního kmene) a 4 transdukční označte vždy po dvou K9/2 a K9/10 a K1/2 a K1/10.
3. přidejte 250 µl a 50µl (PBS1 lysátu donorové bakterie *B. subtilis* L42 (spo0F, cat::yxcO) do 4 transdukčních zkumavek. Přidejte MgSO₄ do konečné koncentrace 2mM.
4. Nechte adsorbovat 15-20 min při laboratorní teplotě bez třepání.
5. Po adsorpci fága smíchejte bakteriální suspensi s top agarem a vylejte rovnoměrně na misku s LB cat agarem.
6. Kultivujte 36-48 hodin při 37 °C.

Analýsa transduktant - frekvence rekombinant:

Příprava a nárůst matric pro repliky:

1. Naočkejte vždy až 80 jednotlivých kolonií (podle předlohového rastru) z příslušných dvou selekčních ploten.(Kit9 a Kit1) na 2 LB cat agarové plotny. Jednotlivé kolonie se inokulují sterilními párátky. Dávejte pozor, aby inokulace byla pouze z jedné kolonie.
2. Kultivujte přes noc při 37 °C.

Testování na současně přenášený znak:

1. Připravte si testovací misky podle následujícího schématu:
2. Zjistěte frekvenci současného přenosu neselektovaných znaků pomocí „ replica plating“ metody: orazítkujte matrici na připravené plotny pro analýzu současně přenášených znaků.
3. Kultivujte přes noc při 37 °C
4. Po nárůstu kolonií spočítejte a porovnejte s počtem na matricových miskách.. Vypočtete pravděpodobnost současného přenosu.
5. Určete polohu inserce chloramfenikolové resistance vůči neselektovaným znakům.

Schéma pro testovací agary

| Selektovaný znak | Sledovaný znak | Cukr | Přídavky. |
|------------------|----------------|-----------|-----------|
| Cat (K1) | PurA16 | glukosa | Cys, Trp |
| | Cys | glukosa | Ade, Trp |
| | Pur, Cys | glukosa | Trp |
| Cat (K9) | sac | sacharosa | Trp |

2. Konjugace:

Provedení pokusu:

1. Naočkujte noční kulturu buněk recipienta (TC 247) i donora (bude přidělen) do 10 ml čerstvého LB media (1:50) a kultivovat při 37 °C do $OD_{450} = 0,2-0,3$. Je nutné aby buňky byly v exponenciálním růstu.
2. V průběhu růstu kultury si označte glukosové MM agary se streptomycinem (skupina, selekce, čas odběru). (podle tabulky jednotlivých selekcí) Na označené misky napipetujte **příslušné auxotrofní požadavky podle typu selekce** 0,1 ml každé a rozetřete sterilně hokejkou.
3. Selekcce: a) Leu+ znamená růst na MM agaru a prolinu, histidinu a methioninu.
b) Pro+ znamená růst na MM agaru a leucinu, histidinu a methioninu.
c) His+ znamená růst na MM agaru a prolinu, leucinu a methioninu.
d) Met+ znamená růst na MM agaru a prolinu, histidinu a leucinu.
4. Označte si ředící zkumavky a do každé dejte 2.5 ml ředícího minimálního media. Připravte si ledovou lázeň.
5. Označte si konjugační baňky a přidejte 2.5 ml donorové (OD_{600} cca 0.2) a 7.5 ml recipientní (OD_{600} cca 0.2) kultury. Poměr koncentrací buněk by měl být 3:1, ve prospěch recipienta.
6. Odeberte první vzorek, (0.1 ml konjugační směsi do 2.5 ml minimálního media K120) od této doby se počítá čas konjugace.
7. Odebraný vzorek zortexujte 5 sekund, uložte do ledu.
8. Odebírejte vzorky (0.1 ml do 2.5 ml minimálního media MM) v časech podle tabulky pro jednotlivé typy donora.. Pokud odeberete v jiném čase, zaznamenejte si to. Přerušování konjugace proveďte opět vortexováním, jak bylo uvedeno výše
9. Vzorky vysejte na všechny selekční plotny podle tabulky.
10. Kultivujte přes noc při 37 °C.

Analýza rekombinant (transkonjugant):

Určení času vstupu genu (znaku) do recipienta:

1. Spočítejte počet kolonií na každé selekční misce.
2. Vyjádřete počet kolonií na 1ml konjugační směsi
3. Vyneste počet selektovaných rekombinant (exkonjugant) v 1 ml konjugační směsi jako funkci času a určete čas vstupu selektovaného znaku (průsečík získané křivky a osy, na které je vynesena čas konjugace).

Zjištění současného přenosu neselektovaných znaků

Z vybraných selekčních ploten připravte matricové plotny a zjistěte frekvenci současného přenosu neselektovaných znaků pomocí „replica plating“ metody.

1. Připravte si matricové plotny, které budou obsahovat stejné přísady jako selekční plotny. Naočkujte na tyto misky sterilními párátky vždy 80 jednotlivých kolonií podle předlohy rastru z určených selekčních misek.
 2. Kultivujte přes noc při 37 °C.
 3. Orazítkujte technikou „replica plating“ narostlé matricové plotny na testovací agary.
 4. Testovací agary budou postrádat kromě selektovaného i auxotrofní přísady pro zjišťování současně přenášený znak.
 5. Frekvenci současného přenosu neselektovaného znaku vyjádřete v procentech.
- a) Graficky vyjádřete frekvenci přenosu jednotlivých znaků v závislosti na čase, odečtěte čas vstupu jednotlivých znaků a stanovte jejich pořadí na genetické mapě *E.coli*.
- b) Vyjádřete frekvenci současného přenosu neselektovaných znaků (v procentech) při dlouhé době konjugace a vyvoďte závěry ze získaných dat (vztah polohy selektovaného a neselektovaného znaku k *oriT*).

3.Nespecifická mutageneze.

Provedení pokusu

1. Naočkejte noční kulturu buněk MC4100 do 10 ml čerstvého LB media (1:25) a kultivujte při 37 °C do OD600 = 0,5-0,6.
2. Buňky stočte v 15 ml Falcon centrifugační kyvetě při 4 000 ot/min
3. resuspendujte v TM mediu na OD =1
4. Ve třech sterilních zkumavkách infikujte 300 µl buněčné suspenze 70 µl fágového lysátu neředěného a ředěného 10⁻¹ a 10⁻². Redit lze LB mediem.
5. Nechte adsorbovat fága 15-20 min
6. Pro stabilizování inzertů přeneste všechny infikované buňky do 25 ml LB media s přidaným citronanem sodným do konečné koncentrace 5 mM.
7. Ponechte růst na třepačce 60-70 minut při 30°C. Citronan blokuje další adsorpci fága, která by měla za následek nadbytečnou lysi buněk.
8. Centrifugujte buněčnou suspensi a resuspendujte v 5 ml minimálního media (MM).
9. Vysejte na misky s minimálním mediem pro selekci auxotrofů a pro selekci v ara operonu vysejte na Mc Conkey agary s arabinosou.

Selekce auxotrofů:

1. Selekcce buněk resistantních k ampicilinu: Homogenně vysejte 0.02 ml na jeden agar MM s ampicilinem a 0.150 ml na druhý.
2. Kultivujte přes noc při 30 °C.
3. Připravte pár matric inokulovaných lysogeny resistantními k ampicilinu.
4. Každá matrice je inokulována ve stejných polohách buňkami z téže kolonie, jedna na minimálním (MM, Amp) a druhá na komplexním mediu (LB, Amp) tj. inokulace celkem 160 kolonií z 80 původních na selekční LB plotně. Na polohování kolonií použijte papírové rastry s mřížkou.
5. Kultivujte přes noc při 30 °C
6. Srovnáním růstu na komplexním a minimálním mediu identifikujte auxotrofy.

Zjištění auxotrofního požadavku:

1. Identifikované auxotrofy přeneste z LB matrice na sérii misek s přidanými auxotrofními požadavky. Tyto misky si připraví celý turnus dohromady podle tabulky (viz příloha). Jedna až dvě misky na skupinu. Na tyto misky pak přenesou postupně všechny skupiny své auxotrofy. Na každé misce bude patřičný auxotrof vždy ve stejné poloze na mřížce.
2. Nechá se kultivovat přes noc při 30 °C.
3. Auxotrofní požadavek se určí podle toho na jakém typu ploten vyrostl, popř. nevyrostl. Konkrétní auxotrof musí růst na dvou médiích

Inserce Mud (Ap,lac) do ara genů:

1. Selekcce buněk resistantních k ampicilinu: Vysejte 0.1, 0.3, 0.8 ml buněčné suspenze obsahující inserty (lysogeny) na arabinosa-laktosa-ampicilin-MacConkey agary
2. Kultivujte v termostatu při 28°- 30°C.

Hodnocení narostlých kolonií

1. "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
2. Růžové nebo světle červené kolonie, které metabolisují laktosu mírnou rychlostí. [Rovněž není synthetisován ribulosa-5P. β-galaktosidasa je exprimována ze „středně silného“ promotoru].

3. Tmavě červené kolonie, které metabolisují laktosu rychle. [Není syntetisován ribulosa-5P. β -galaktosidasa je exprimována ze "silného" promotoru]
4. Přeneste 2-3 případy každého typu kolonie jak na MacConkey-laktosa-arabinosa-ampicilin agar tak na laktosa-ampicilin-MacConkey podle rastru.
5. inkubace při 28°-30°C, 24 hod.
6. Srovnejte barvu purifikovaných kolonií po růstu na laktosa-ampicilin-MacConkey a arabinosa-laktosa-ampicilin-MacConkey agarech. Vysvětlete.

Složení diagnostických ploten:

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

- a. Každý nutriční přídavek je obsažen ve dvou médiích
- b. Konkrétní auxotrof musí růst na dvou médiích (společné biosynthetické dráhy)
- c. Některé purinové mutanty rostou na adenosinu nebo guanosinu (1,2,6)
- d. Některé purinové mutanty rostou na adenosinu + thiaminu (pouze 6)
- e. Mutanty s mutací na začátku aromatické dráhy porostou pouze na 8
- f. Mutanty s blokováním na začátku lysinové dráhy porostou pouze na 4
- g. 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 | | | | |

4. Transformace

Provedení pokusu:

1. Napipetujte 5 μ l roztoku plazmidu (300 ng) do 500 μ l suspenze dodaných kompetentních buněk *B. subtilis* 168.
2. Inkubujte 20 min při 37 °C, poté přidejte dalších 500 μ l LB media, přeneste suspenzi do sterilní zkumavky a kultivujte za aerace ještě 60 min.
3. poté vysejte na selektivní medium (LB agar s chloramfenikolem) ve dvou koncentracích
 - a. 100 μ l přímo suspenze
 - b. Stočte v sterilní „eppendorfce“ a resuspendujte v 100 μ l LB media a vysejte vše
4. Inkubujte přes noc při 37 °C.

Analýza transformant:

1. Přechárkujte transformanty a vytvořte matrice
 - a. na LB agary se škrobem
 - b. na LB agary s x-galem,
 - c. na původní selekční agar
2. Inkubujte přes noc při 37°C
3. Narostlé transformanty detekujte na plotnách se škrobem přelitím Lugulovým roztokem.
4. Transformanty na x-galových plotnách umístěte do lednice (cca 12 °C) na půl hodiny
5. Kultivujte přes noc při 37 °C
6. Vyhodnoťte zbarvení kolonií z lednice.

Vyhodnocení:

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

Schémata pro odebírání vzorků při konjugaci u jednotlivých kmenů.

KL14(108): λ -*relA1*, *spoT1*, *thi-1*

| čas | 0 min | 20 min | 35 min | 45 min | 55 min | 75 min | 120 min |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| selekce | | | | | | | |
| Met | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,2 ml | | |
| Leu | 0,4 ml | | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,2 ml |
| Pro | 0,4 ml | | | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,2 ml |
| His | 0,4 ml | | | | | 0,4 ml | 0,4 ml |

XS57 (15): Hfr Hayes *thi lacZ*

| čas | 0 min | 8 min | 12 min | 20 min | 50 min | 90 min | 120 min |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| selekce | | | | | | | |
| Leu | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,2 ml | | | |
| Pro | 0,4 ml | | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,1 ml | | |
| His | 0,4 ml | | | | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,2 ml |
| Met | 0,4 ml | | | | | 0,4 ml | 0,4 ml |

CD17 (14), Hfr Broda

| čas | 0 min | 8 min | 12 min | 20 min | 40 min | 70 min | 120 min |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| selekce | | | | | | | |
| Pro | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,2 ml | 0,2 ml | | | |
| Leu | 0,4 ml | | 0,4 ml | 0,2 ml | 0,2 ml | | |
| Met | 0,4 ml | | | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,2 ml | 0,2 ml |
| His | 0,4 ml | | | | 0,4 ml | 0,4 ml | 0,4 ml |