

BAKTERIÁLNÍ GENETIKA

PRAKTICKÝ KURZ 2012



ÚLOHA I – GENERALIZOVANÁ TRANSDUKCE

Cíl úlohy:

- lokalizovat gen s inzercí kazety chloramfenikolové rezistence,
 - vznik nespecifickou mutagenezí
 - způsobuje osmolabilitu u *Bacillus subtilis* 168.

Způsob provedení:

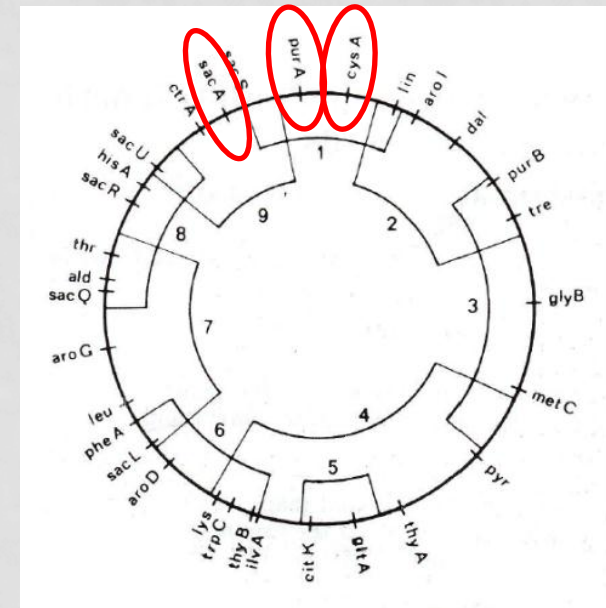
- Pomocí generalizované transdukce přenést geny z mutantního **donora** do **recipienta** s hledanou allelou ve WT formě a zároveň obsahující několik auxotrofních markerů.
 - Recipienti -
 - Kit 9 *B.s.* QB123 - (*sacA321*, *ctrA1*, *trpC2*)
 - Kit1. *B.s.*QB944 (*purA16*, *cysA14*, *trpC2*)
 - Donor – *Bacillus subtilis* L42 (*spo0F*, *trpC2*, *yxkO::cat*,)
 - Vektor – fág PBS1

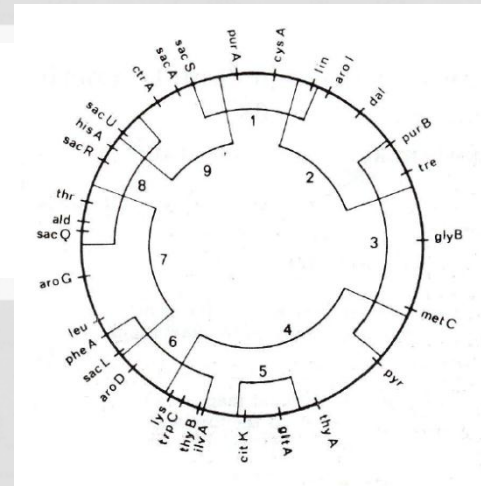
ÚLOHA I - GENERALIZOVANÁ TRANSDUKCE

Teorie:

- ATB kazeta – selektovaný marker – část genomu s hledanou mutací
- Auxotrofní mutace - podle typu – lokalizace v chromozomu
 - Geny blízké markeru jsou kotransdukovatelné s markerem
 - Přenos allel ve WT formě je selektovatelný -
 - Čím jsou blíže k sobě, tím s větší frekvencí se přenáší současně
 - Frekvence kotransdukce

- Selektovaný marker – rezistence k chloramfenikolu (chloramfenikol acetyl transferáza)
- Neselektovaný marker - auxotrofie v recipientech
 - Kit1 – cys, ade
 - Kit9 – sacharosa





- Kotransdukční index – r

- počet transduktantů s dvěma markery

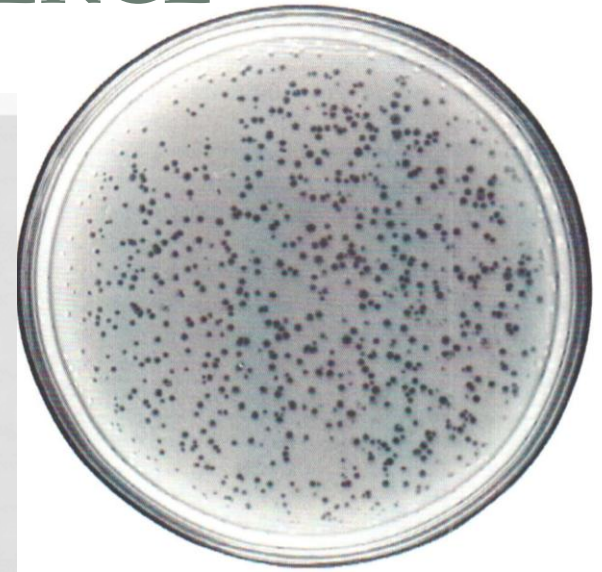
$$r = \frac{\text{počet transduktantů s dvěma markery}}{\text{počet selektovaných transduktantů}}$$

počet selektovaných transduktantů

- Kotransdukční frekvence – f

- Procentuální vyjádření kotransdukčního indexu
- Příkladový výsledek
 - Cat+ - počet kolonií - 50
 - Cat+, cys+ - počet kolonií - 23 r = 0,46, f= 46%
 - Cat+, ade+ - počet kolonií – 36, r=0,72, f=72%
 - Cat+, sac+ - počet kolonií - 10, r= 0,2, f=20%

MULTIPLICITA INFEKCE



Infikování permissivních buněk je jednoduché

Stačí pouze smíchat

Fágy kolidují s buňkami a infikují je

Pravděpodobnost infekce jedné buňky

$P_i = e^{-MOI}$ - počet buněk, které zůstanou neinfikovány

MOI - poměru koncentrace buněk a fágů -

$MOI = 2,5 \times 10^9 \text{ phage} / 5 \times 10^8 \text{ cells} = 5$

$MOI = 2,5 \times 10^8 \text{ phage} / 5 \times 10^8 \text{ cells} = 0,5$

MOI = 5 - vysoká - 5 fágů na 1 buňku - příprava lyzátů

MOI = 0,5 - nízká - 1 fág na 2 buňky - pro transdukcii

MOI 5 - 0,67% buněk zůstane neinfikovaných

MOI 1 - 37% buněk zůstane neinfikovaných

We will use MOI 0,1 - 1 fág na 10 buněk

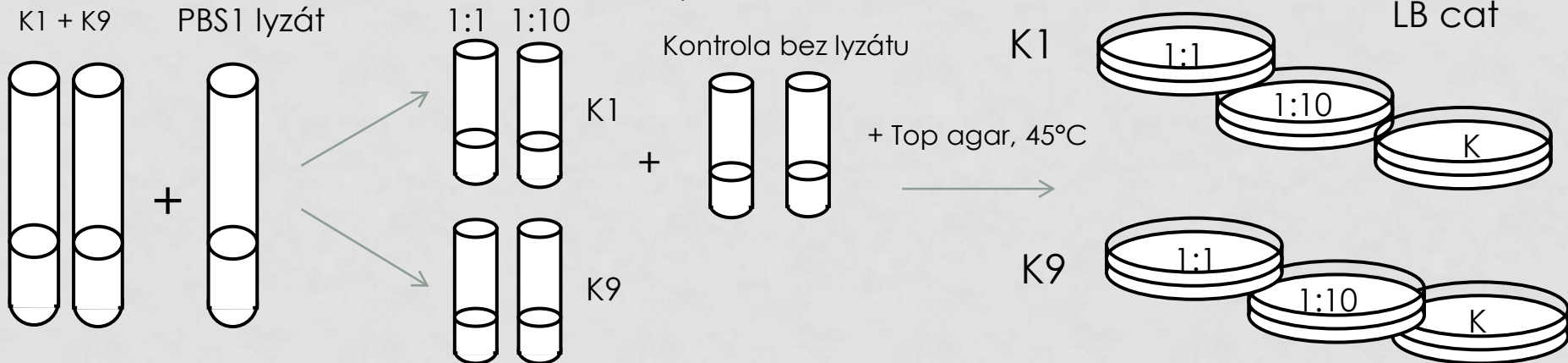
Naše buňky OD = 0,8 - 10^7 buněk

Titř fága je $1,6 \times 10^6$

Fág v poměru 1:1 a 1:2

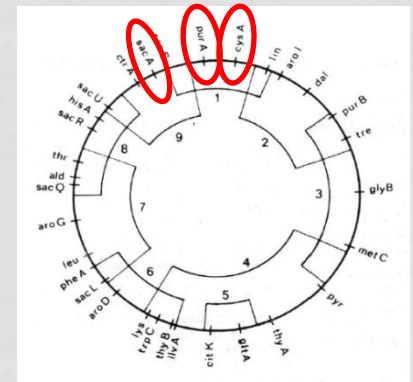
PROVEDENÍ POKUSU

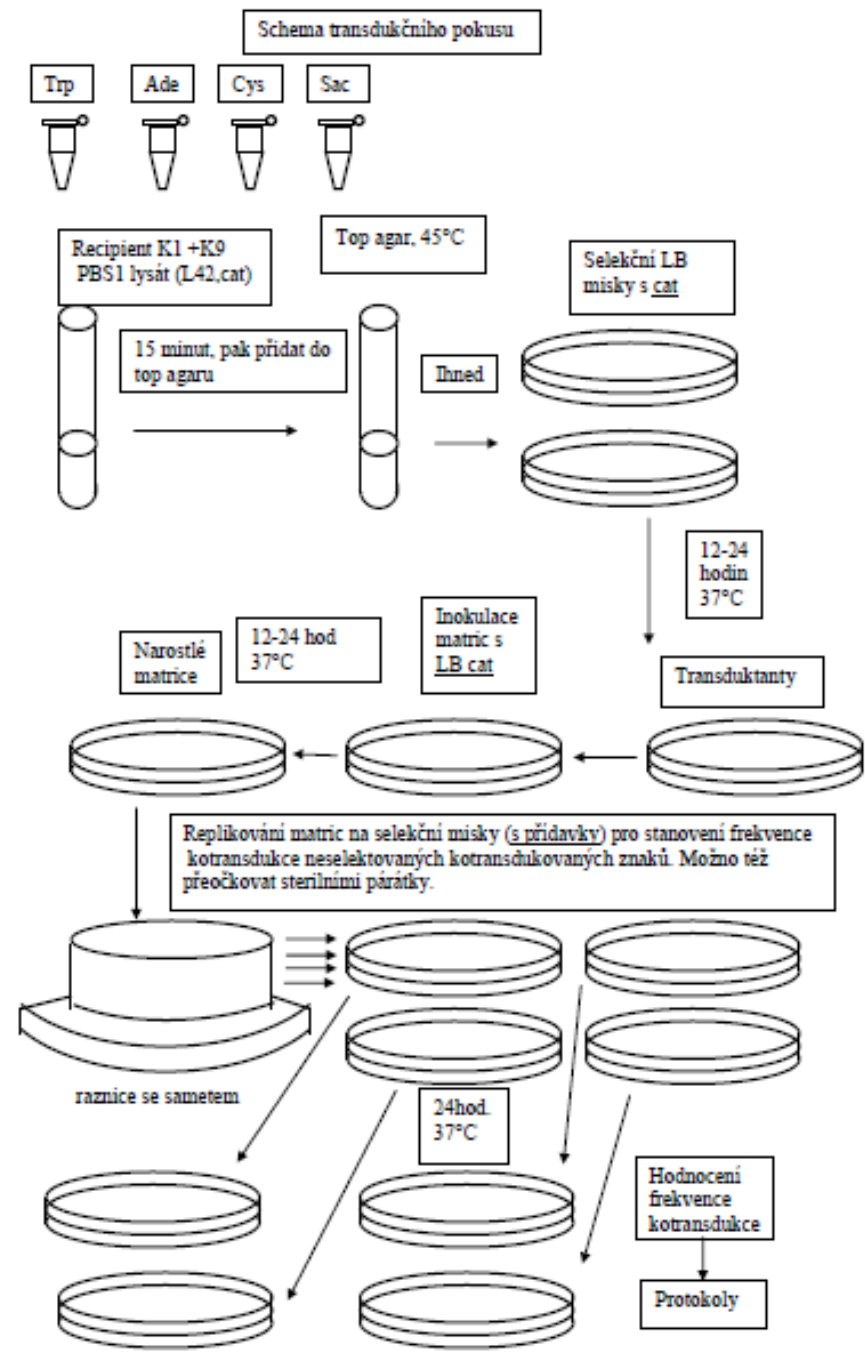
- 1. den
 - Kultivovat recipienta – Kit1, Kit9
 - 10ml LB media inokulovat 1:25 noční kulturou
 - Kultivovat při 37 °C za aerace do OD 0,8 cca 3 hod.
 - Přidat MgSO₄ do koncentrace 2mM
 - Infikovat fágovým lyzátem PBS1 připraveným lyzí buněk donora – B.s. L42
 - Smíchat 0,5 ml buněk + 0,5 ml lyzátu (neředěným a ředěným 10⁻¹)
 - Inokulace 20 min laboratorní teplota, bez třepání
 - Smíchat s 3 ml top agaru a vysít na LB plotnu s cat
 - Kontrola bez fága
 - Dát kultivovat do termostatu při 37 °C



PROVEDENÍ POKUSU

- 2. den
 - Vytvoření matric na další analýzu
 - Přeočkovat transduktanty podle matrice na LB cat agary.
 - Kultivovat přes noc při 37 °C
- 3. den
 - Metodou replica plating přeneste narostlé matrice na MM agary pro selekci současně přenášeného znaku
 - Kit1 –
 - MM glukosa + cys (try)
 - MM glukosa + adenosin (try)
 - Kit9 –
 - MM + sacharóza
- 4. den
 - Určení frekvence kotransdukce neselektovaného znaku
 - Spočítejte kolonie na jednotlivých miskách a vypočítejte frekvenci kotransdukce a určete polohu mutace na genetické mapě.



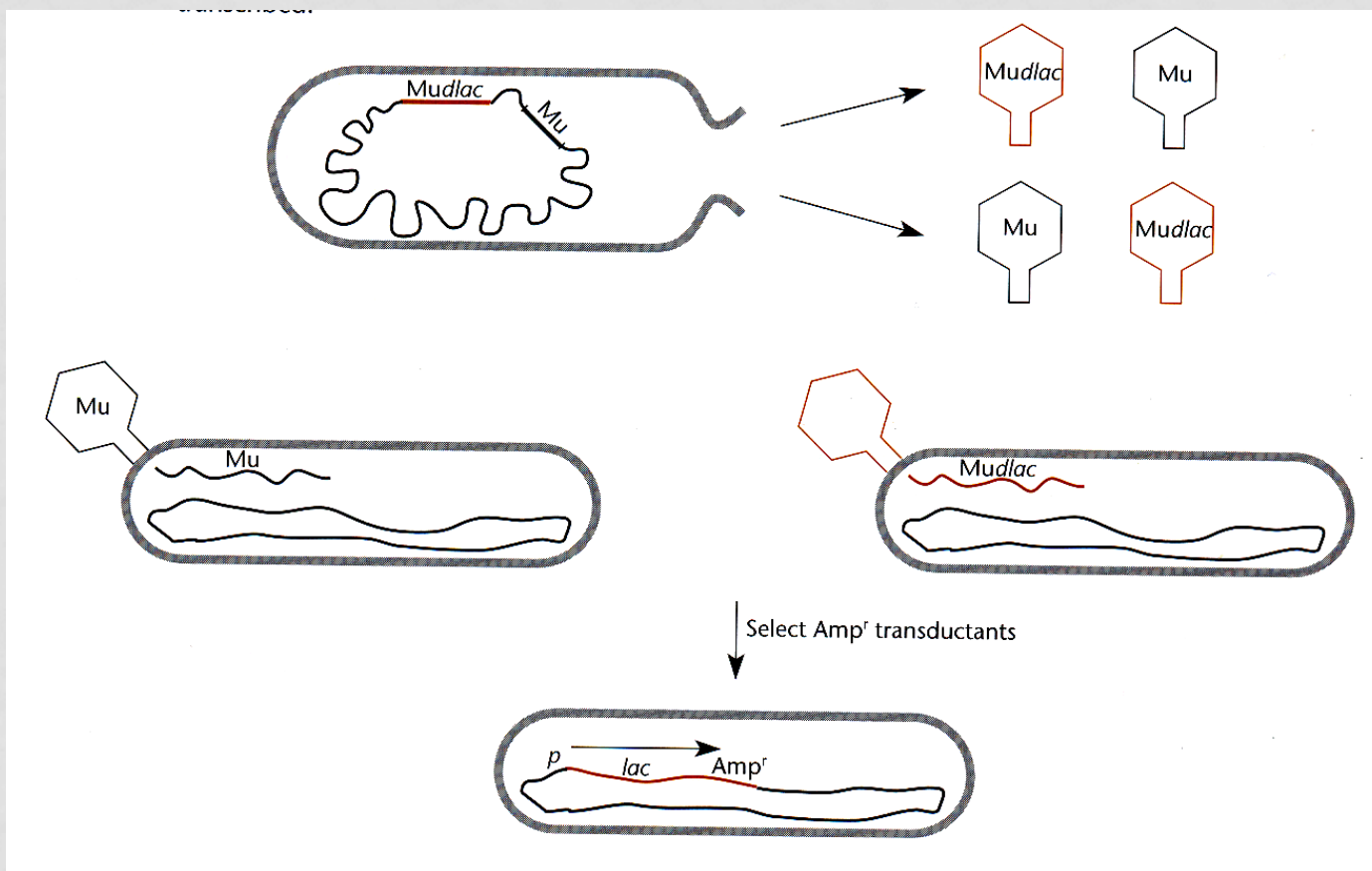


ÚLOHA III

NESPECIFICKÁ MUTAGENEZE

- **Cíl úlohy:**
 - Inserční inaktivací genů pomocí fága *MudI(Ap,lac)* připravit auxotrofní mutanty.
 - Insercí fága *MudI(Ap,lac)* připravit genovou fúzi reportérového *lac* genu s regulační oblastí *ara* operonu
- **Specifikace kmenů:**
- **recipient:** MC4100: *thi*, $\delta(argF-lac)$ U169, *araD139*, *rpsL150*,
- **Fágový lyzát:** čerstvě připravený lyzát z buněk kmene *E.coli* Mal103
 - dvojitý lysogen *Muclts*, *MudI(Ap, lac)*
 - (další znaky: *relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR* nejsou pro náš účel důležité)
 - Transpozon použitý pro nespecifickou mutagenezi

SCHÉMA PRINCIPU FÚZE S PROMOTOREM



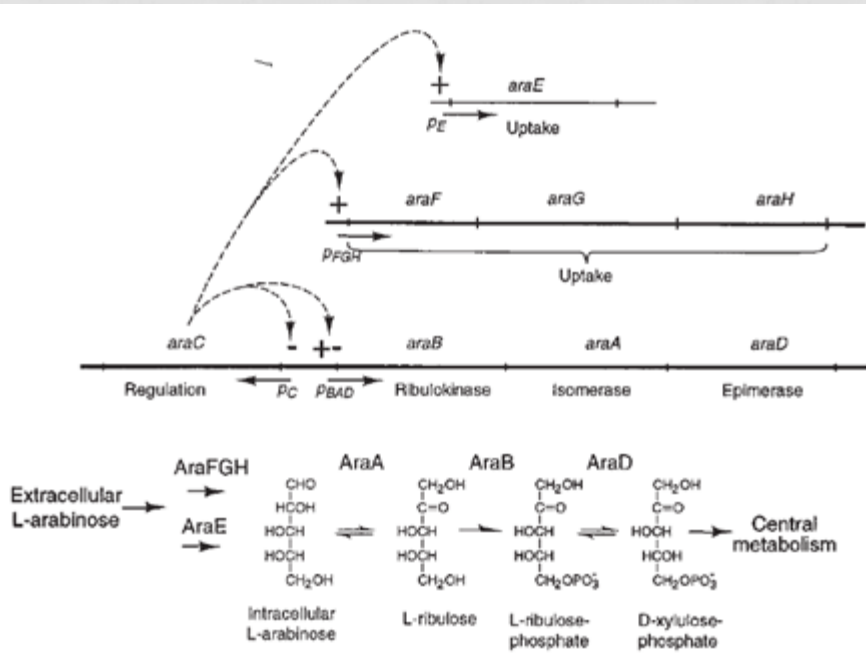
BAKTERIOFÁG MU - PŘÍKLAD VEKTORŮ

Some useful Mud vectors

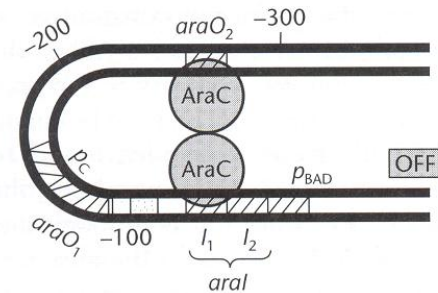
	NAME	SIZE (Kb)	USE (Reference)
	MudI (aka Mud1)	37.2	Original operon fusion phage (Casadaban and Cohen, 1979)
	MudII301 (aka Mud2)	35.6	Similar to Mud1 but forms gene fusions (Casadaban and Chou, 1984)
	MudI1734 (aka MudJ)	11.3	Operon fusion mini-Mud deleted for transposition functions (Beatriz et al., 1984)
	MudII1734 (aka MudK)	9.7	Gene fusion mini-Mud deleted for transposition functions (Beatriz et al., 1984)
	Mud5005	7.9	In vivo cloning vector (Castilho et al., 1993)

- tpn^+ indicates the Mud carries the $Mu A^+ B^+$ genes required for transposition.
- $c(TS)$ is a temperature-sensitive mutation in the $Mu c$ gene required for repression of transposition.
- Mud1, Mud2, MudJ, and MudK all lack transcriptional start site (i.e. promoter) for the *lac* operon.
- P_X indicates the promoter for gene *X*.
- *ZYA* indicates the *lac* operon; '*ZYA*' indicates that the *lacZ* gene is lacking translational start sites.
- '*trp*' is a short region from the *E. coli trp* operon which provide translational start sites for the *lacZ* gene.
- Ori is the origin of replication from the multicopy plasmid pMB9.
- aka means "also known as".

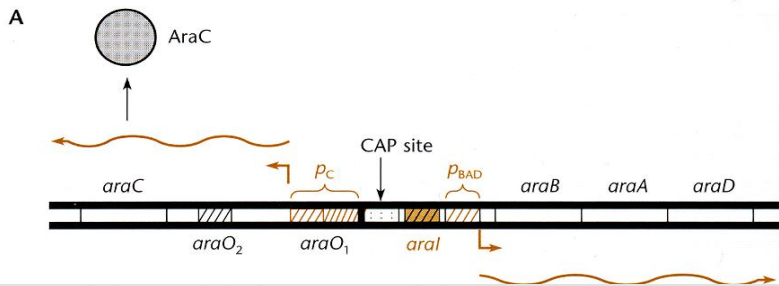
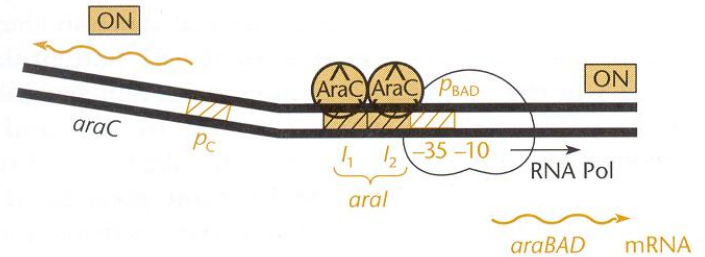
ARA OPERON – SCHÉMA A REGULACE



A Absence of L-arabinose



B Presence of L-arabinose

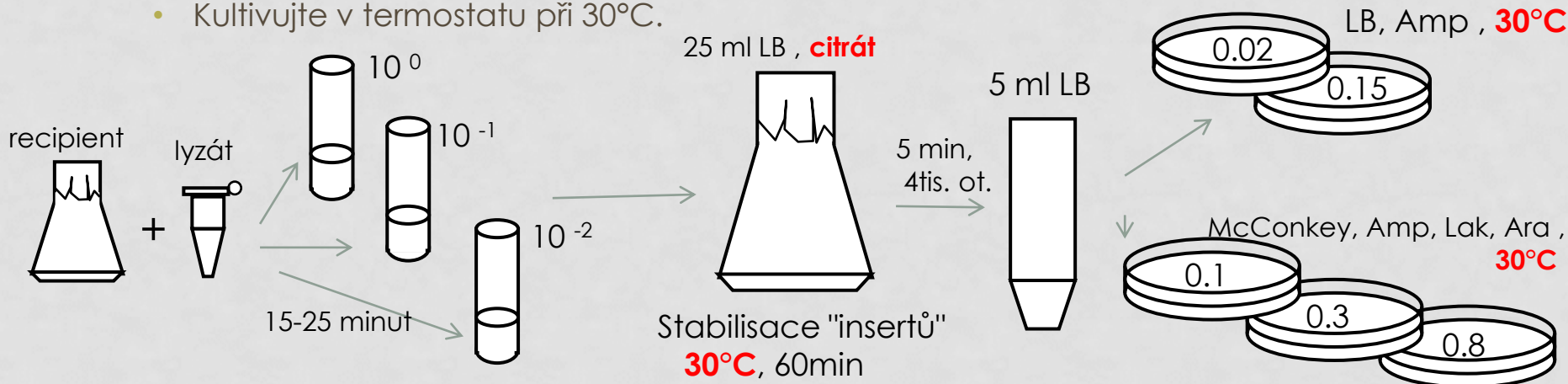


PROVEDENÍ POKUSU

- 1.den:
 - Příprava "inzertů" (lysogenů), jejich vyšetí na selekční misky, t.j. Kml-Amp a MacConkey-Amp-laktosa-arabinosa
 1. Kultivace recipienta – 10 ml LB inokulujte 1:25 noční kultury kmene MC4100 a kultivace za třepání při 37 °C do OD cca 0,5-0,5 (cca 1,5 hodiny)
 2. Centrifugace a resuspendování v TM mediu na OD ~ 1
 3. Infekce fágovým lysátem.
 1. 300 µl buněčné suspenze 70 µl fágového lysátu neředěného a ředěného 10⁻¹ a 10⁻². celkem 3 zkumavky.
 4. Ponechte fága adsorbovat 15 - 25 minut při pokojové teplotě.
 5. Stabilizace lysátů –
 - smíchat obsah všech infekčních zkumavek a jejich přenesení do 25 ml LB media s 5 mM citrátem sodným . (chelatace Mg a Ca iontů – zastavení adsorbce fága)
 - Kultivace 60 min při 30 °C
 6. Zakoncentrování centrifugací a vyšetí na selekci

SCHÉMA PROVEDENÍ POKUSU III- 1. DEN

- Centrifugujte buněčnou suspensi a resuspendujte v 5 ml LB media.
- **Selekce auxotrofů:**
 - Selekcce buněk resistentních k ampicilinu:
 - Homogenně vysejte 0.02 ml a 0.150 ml na LB agar s ampicilinem
 - Kultivujte přes noc při 30 °C.
- **Inserce Mud (Ap,lac) do ara genů:**
 - Selekcce buněk resistentních k ampicilinu a inzertovaných v ara operonu:
 - Vysejte 0.1, 0.3, 0.8 ml buněčné suspence obsahující inserty (lysogeny) na arabinosa-laktosa-ampicilin-MacConkey agary
 - Kultivujte v termostatu při 30°C.



PROVEDENÍ POKUSU III

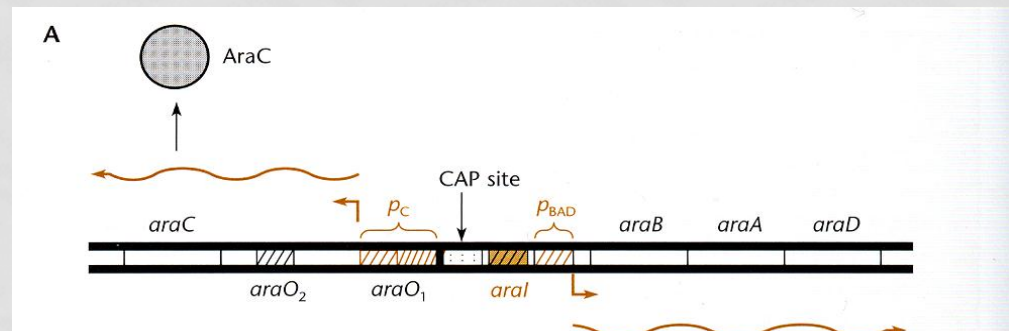
AUXOTROF

- 2. den
 - Vytvoření matric pro další selekci auxotrofů
 - Přeočkujte 2x 96 kolonií lysogenů na LB amp podle rastru
 - Kultivujte přes noc při 37 °C
- 3. den
 - Narostlé matrice přeneste metodou replica plating na LBamp a Mmamp agary
- 4. den
 - Srovnáním nárůstu na Lb a MM určete potencionální auxotrofy
 - Přeočkujte je na 11 diagnostických ploten, vytvořených podle tabulky.
- 5. den
 - Vyhodnoťte nárůsty na diagnostických plotnách

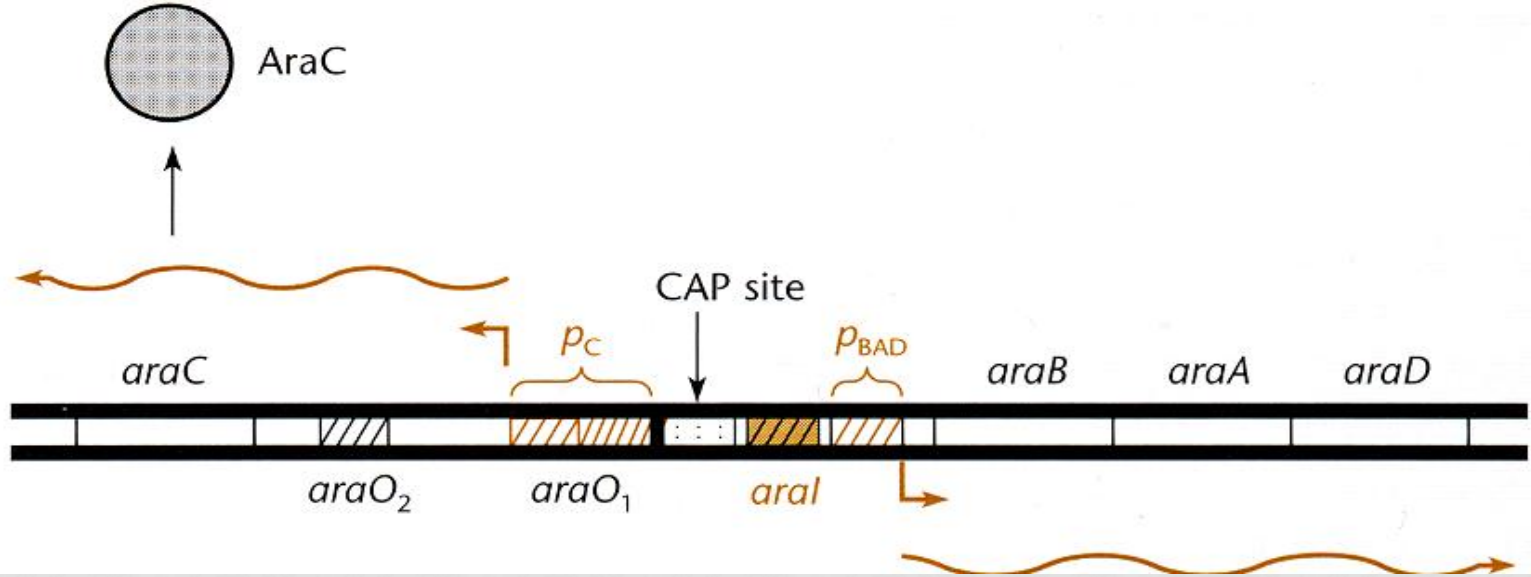
PROVEDENÍ POKUSU III

ARA OPERON

- 2. den
 - Analýza lysogenů v ara operonu
 - Vytvoření matrice na McM agary s arabinozou
 - Kultivace přes noc při 37 °C
- 3. den
 - Analýza lysogenů v ara operonu
 - Přenést klony na plotny McM s ara a bez
- 4. den
 - Vyhodnocení lokalizace inzercí v rámci ara operonu na základě regulace z promotorů



A

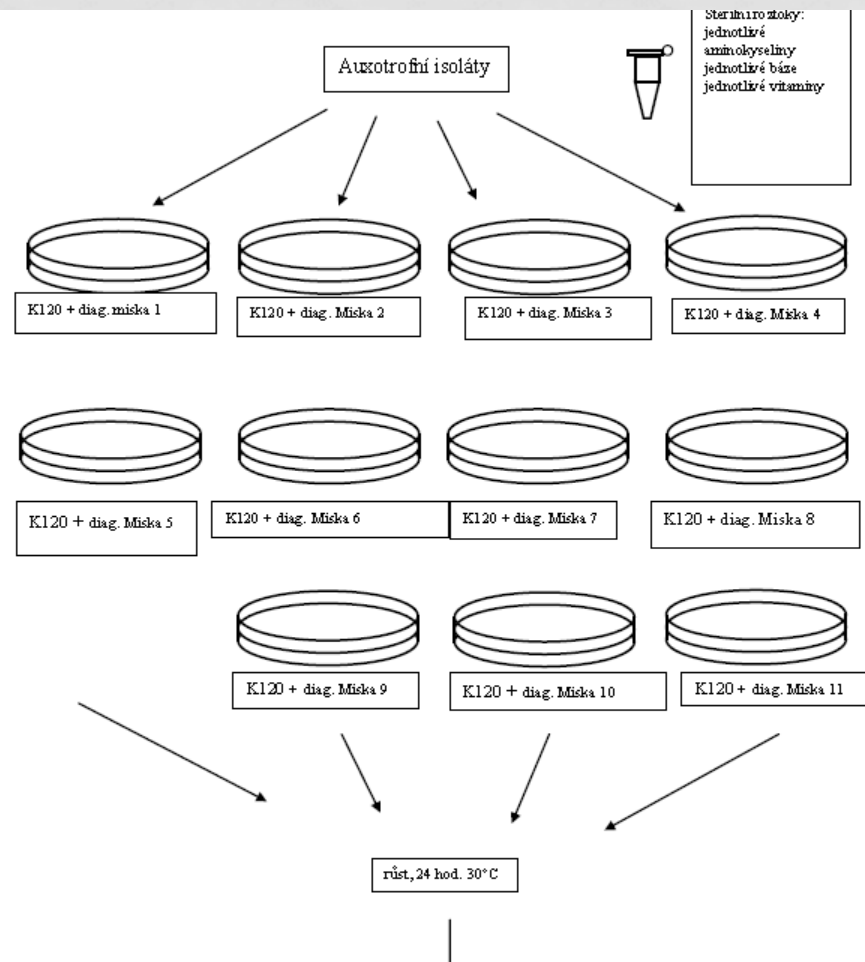
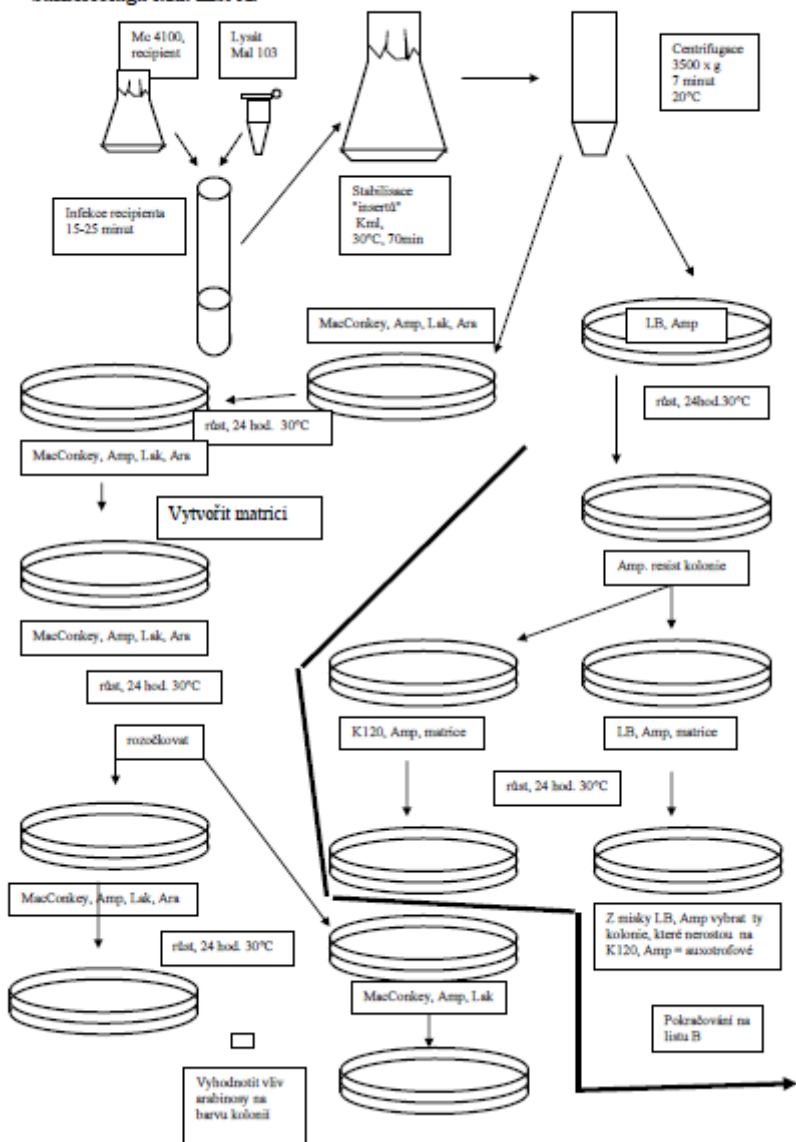


DIAGNOSTICKÉ PLOTNY

- Klony které vyrostou na dvou diagnostických plotnách nesou auxotrofii k příslušné aminokyselině

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

Schema pokusu č.3 - inserční inaktivace genů a tvorba genových fúzí pomocí bakteriofága Mu. List A.



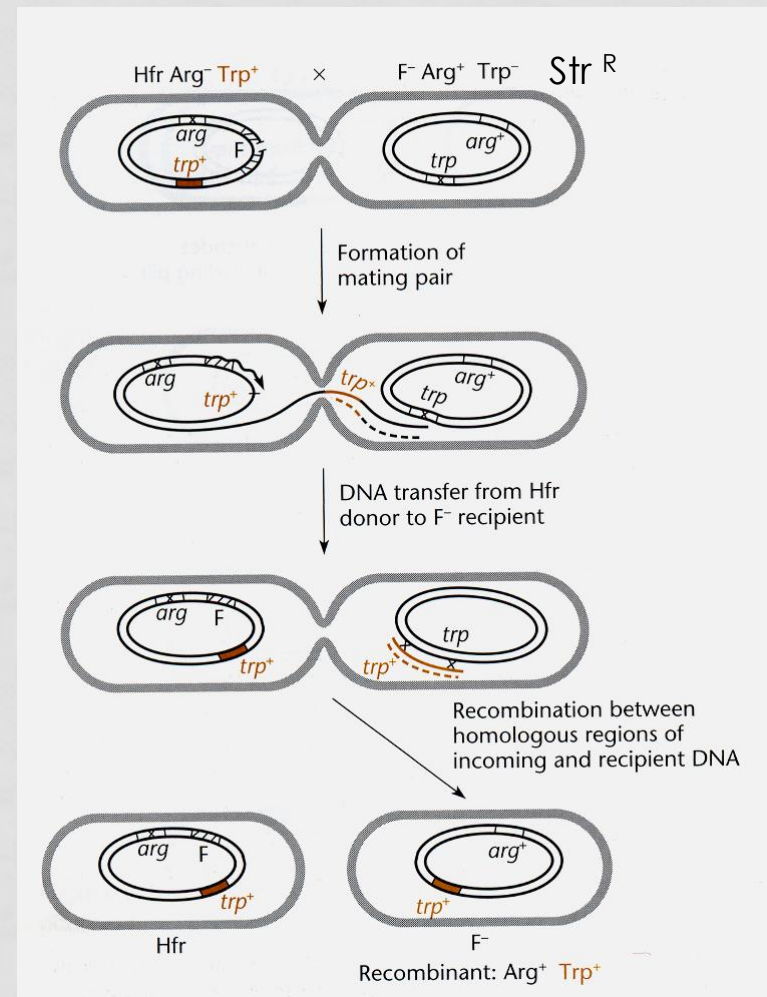
ÚLOHA II

KONJUGACE

- Cíl úlohy:
- Stanovení místa inserce F plazmidu v genomu *E. coli*.
 - Při Hfr x F⁻ konjugaci, donorové buňky přenášejí část svého genomu do recipientních buněk.
 - Při bakteriální konjugaci jsou geny přenášeny v určitém pořadí.
 - Proces přenosu celého chromozomu (HFR x F) trvá asi 100 minut.
 - Obvykle je tento přenos mechanicky přerušen dříve.
 - Tudíž, geny, které jsou přenášeny později jsou přeneseny s daleko menší pravděpodobností než geny které jsou přenášeny dříve.

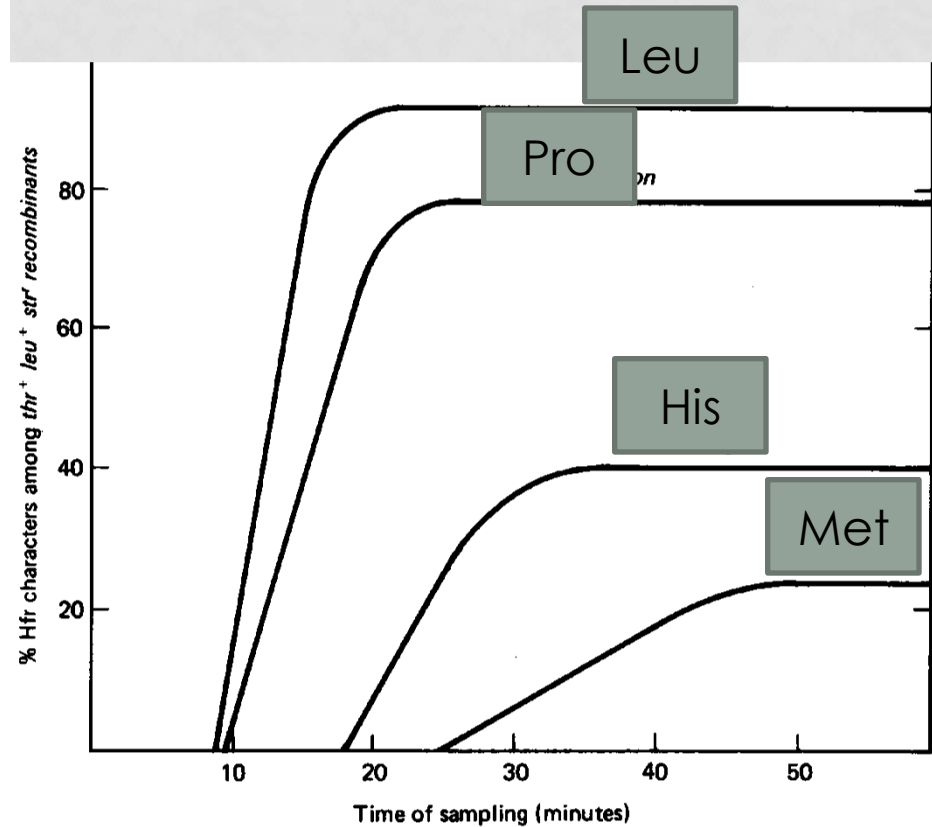
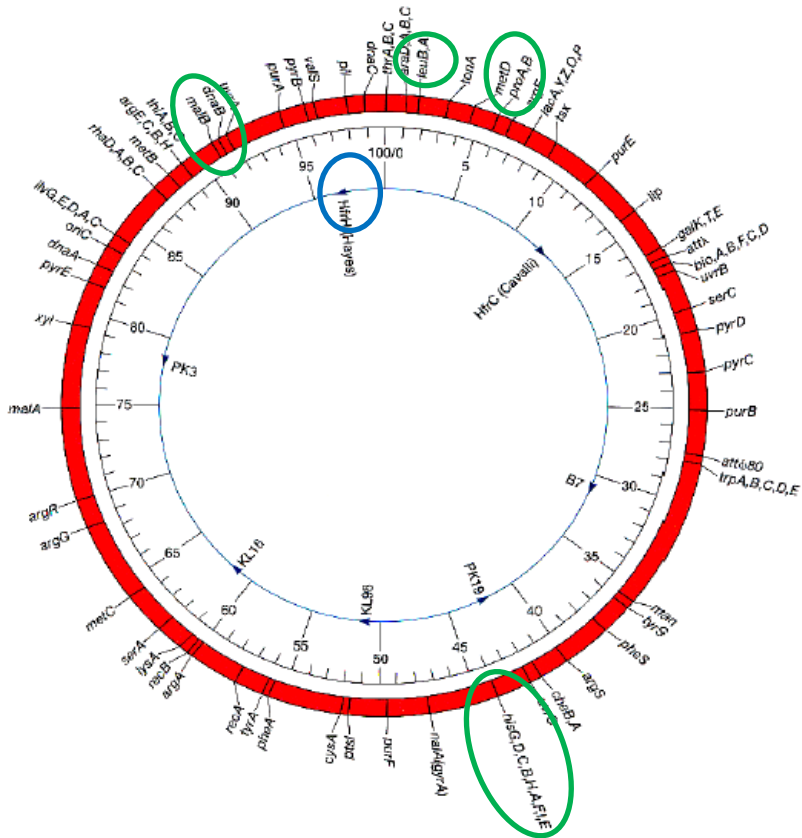
HFR PŘENOS

- Při konjugačních experimentech
 - kontraselekcce proti donoru i recipientovi,
 - zároveň výběr žádoucích rekombinantů.
 - Po vysetí konjugační směsi, ani donor ani recipient nemá růst.
 - Růst by měly pouze vybrané rekombinanty (selektovaný marker).
- Prakticky se uskutečňuje několika způsoby:
 - přidáním antibiotik, na které je donor citlivý a recipient rezistentní
 - paralelně je příjemce auxotrofní a vynecháním této auxotrofie jsou selektovány rekombinanty .

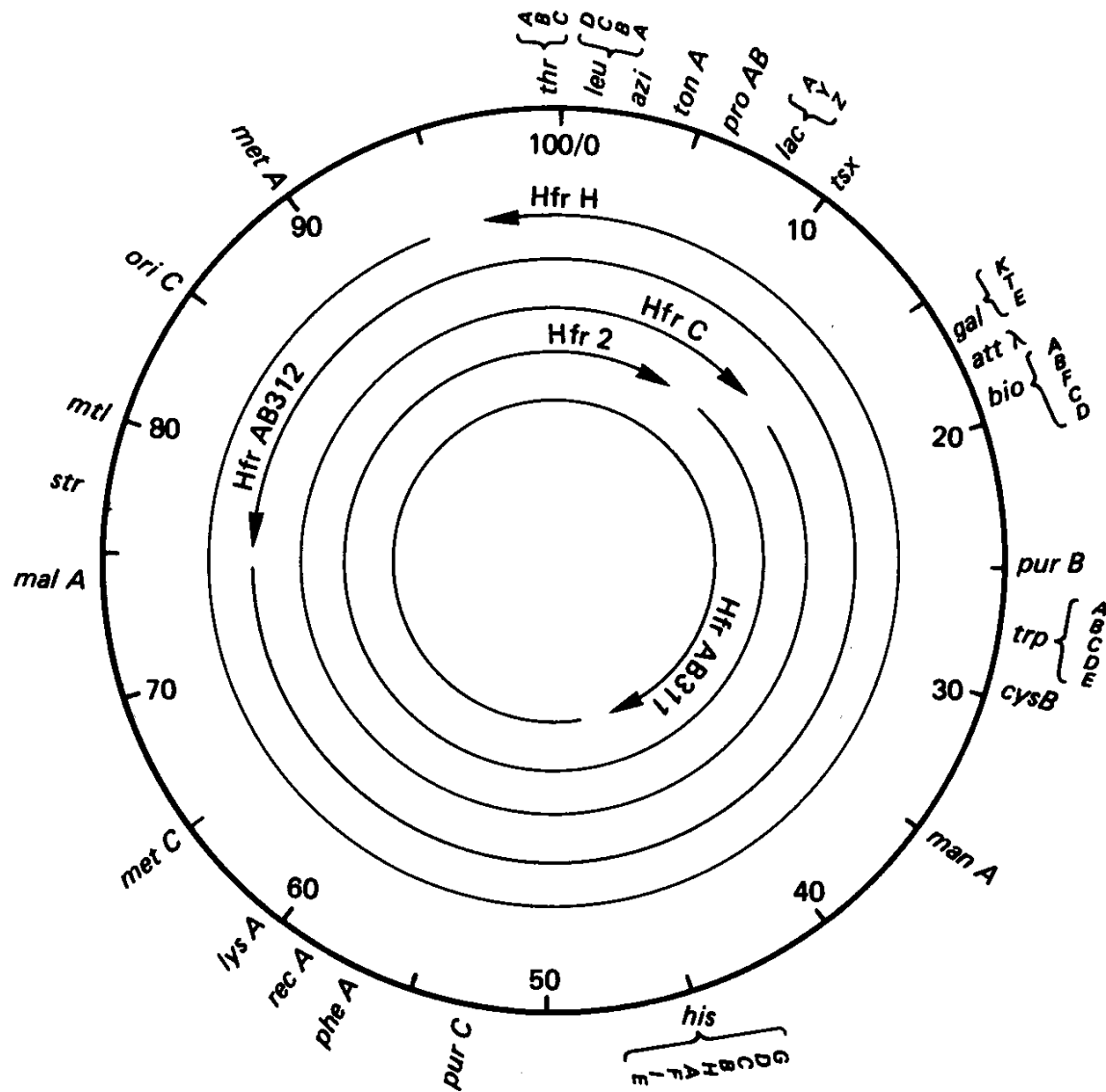


MAPOVÁNÍ

Recipient: *E. coli* TC249: F⁻, Met⁻, Leu⁻, Pro⁻, His⁻, rpsL^r
Donor: *E. coli* HfrH: Hfr, thi⁻



MAPA HFR KMENŮ U *E. COLI*



PROVEDENÍ POKUSU

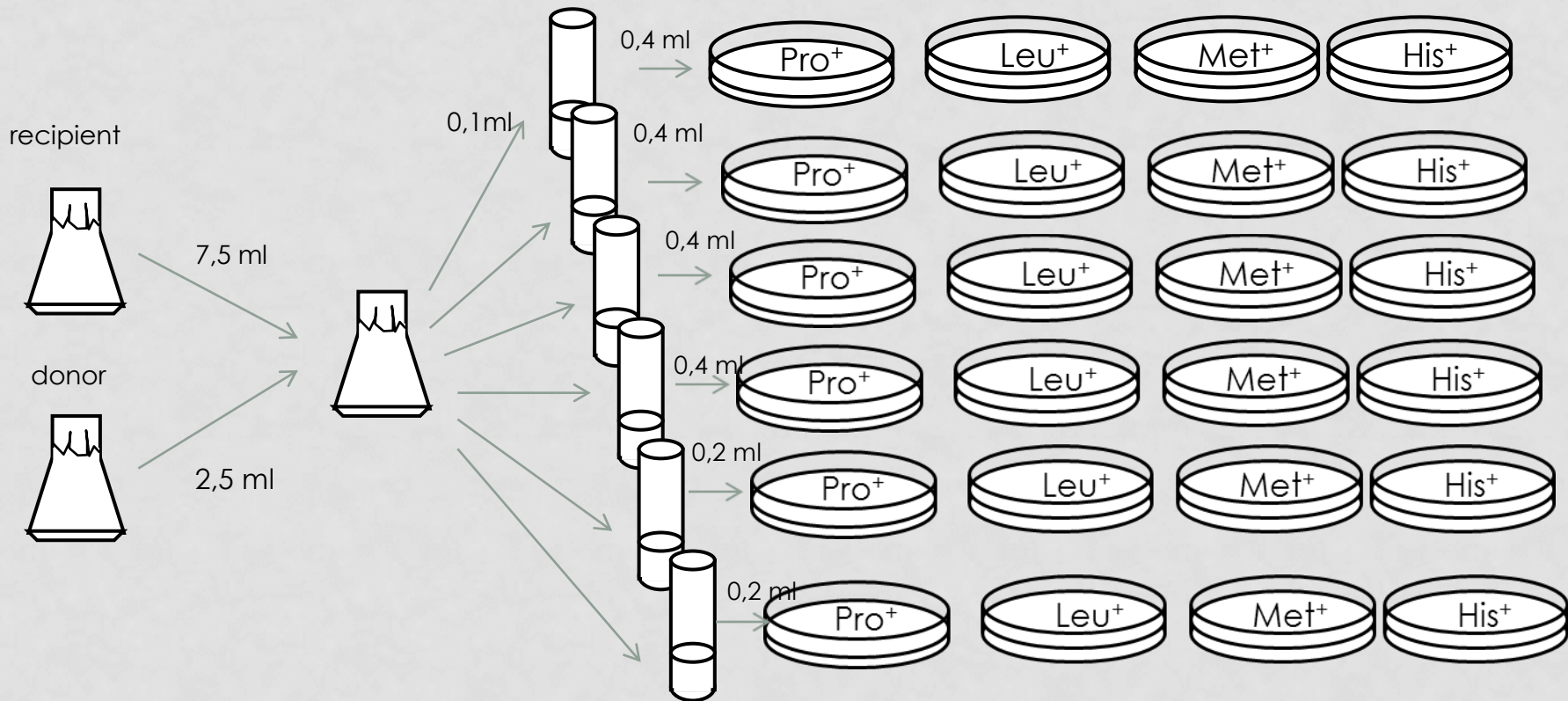
- 1. den:
 - Příprava donora a recipienta
 - Naočkujte noční kulturu do 10 ml LB media (1: 50)
 - Kultivovat při 37 °C za aerace do OD 0,2-0,3
 - Konjugační reakce:
 - Smíchejte kulturu donora a recipienta v poměru 1:3 (2,5 ml donora a 7,5 ml recipienta)
 - Odeberte vzorek v čase 0 (0,1 ml) a zředte 2,5 ml MM media
 - Zvortexujte a uchovejte v ledu
 - Inkubujte konjugační směs při 37 °C za mírného třepání (30 ot/min)
 - Odebírejte vzorky v časech uvedených v tabulkách (0,1 ml)
 - Selektce transkonjugant:
 - Vysejte podle tabulky 0,4 (0,2) ml vzorku ze všech časů na selekční MM agary.

PROVEDENÍ POKUSU

- 1. den
 - Příprava selekčních ploten.
 - napipetujte **příslušné auxotrofní požadavky podle typu selekce** na označené MM str misky (0,1 ml každé) a rozetřete sterilně hokejkou.
- Selekcce:
 - **Leu+** na MM agar + prolin, histidin a methionin.
 - **Pro+** na MM agaru + leucin, histidin a methionin.
 - **His+** na MM agaru + prolin, leucin a methionin
 - **Met+** na MM agaru + prolin, histidin a leucin

PROVEDENÍ POKUSU

- 1. den schema:



KL14(108): λ -relA1, spoT1, thi-1

čas selekce	0 min	20 min	35 min	45 min	55 min	75 min	120 min
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

CD17 (14), Hfr Broda

čas selekce	0 min	8 min	12 min	20 min	40 min	70 min	120 min
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

KL 16(101): Hfr, λ -E14, relA1, spoT1, thi-1

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

KL 96(98): λ -relA1, spoT1, thi-1

čas selekce	0 min	8 min	20 min	30 min	40 min	70 min	120 min
His	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	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Leu	0,4 ml			0,4 ml	0,4 ml	0,2 ml	0,2 ml
Met	0,4 ml				0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml

PROVEDENÍ POKUSU

- 2. den
 - Spočítejte kolonie na jednotlivých miskách
 - Převeďte na počet kolonií/ml
 - Zapište do tabulky a vynesete do grafu a určete pořadí jednotlivých markerů k místu integrace F plazmidu.
 - Z misek u distálních znaků vytvořte matrice na misky se stejným složením media
- 3. den
 - Přerazítkejte narostlé matrice na misky umožňující vyšetření na druhý neselektovaný znak
 - Selektovaný znak His
 - His + Leu - MM + Pro, Met
 - His + Pro - MM + Met, Leu
 - His + Met - MM + Pro, Leu

PROVEDENÍ POKUSU

- 4. den
 - Spočítejte počet narostlých dvojitých transkonjugantů
 - Na základě frekvence přenosu dvou znaků určete jejich vzájemnou vzdálenost
 - Nakreslete schema genetické mapy a zakreslete polohu inserce F plasmidu.

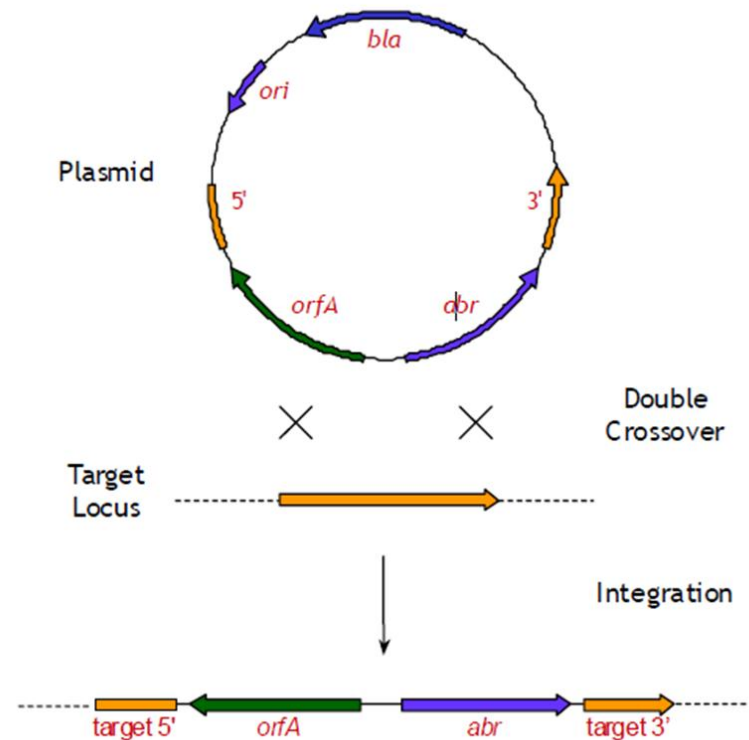
ÚLOHA IV

TRANSFORMACE

- **Cíl úlohy:**
 - izolovat mutanty *B. subtilis* s konstruktem fúze promotoru genů *mutLS* vloženým do *amy* lokusu.
- **Způsob provedení:**
 - Transformace linearizovaného plazmidu pDG1661 s vloženým promotorem před reportérový gen
 - Plazmid pDG 1661 s promotorem
 - Přirozeně kompetentní buňky *Bacillus subtilis* s mutací s vlastním genu pro utilizaci laktózy
 - Selektce na ATB rezistenci v plazmidu.

- **Princip úlohy:**

- Využití ektopické integrace vektoru k vložení hypotetického čtecího rámce, *orfA*, do cílového místa na chromozomu, jako například B. subtilis amyE genu.

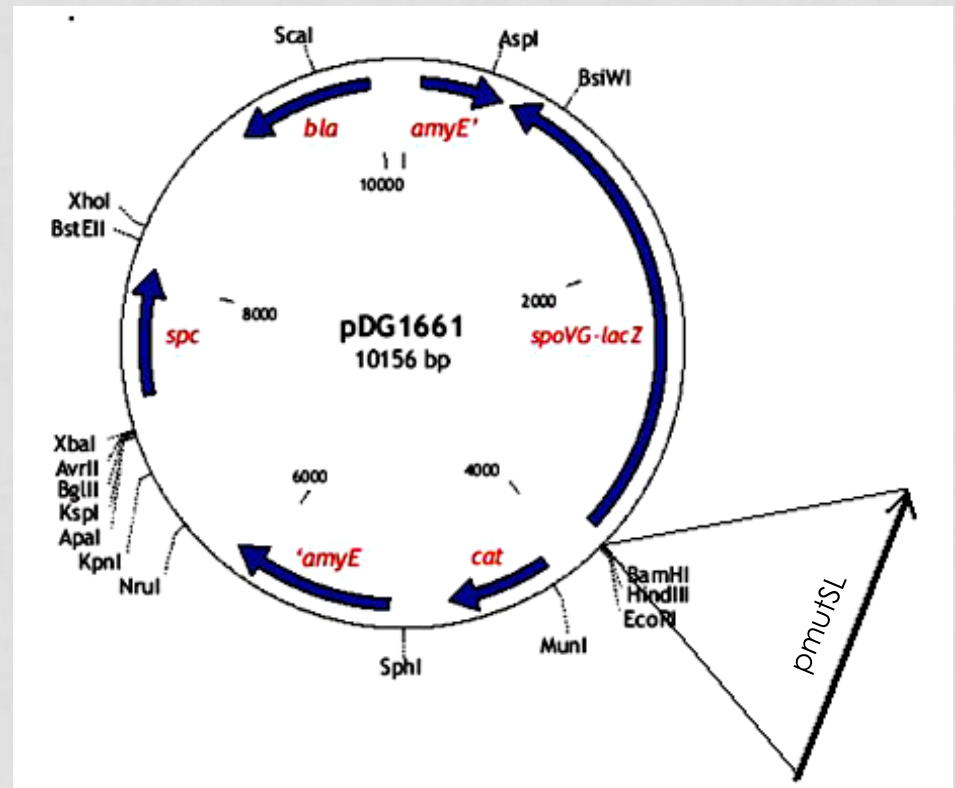
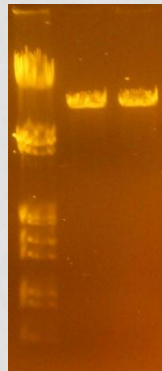
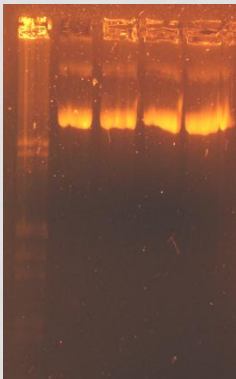


SCHEMA KONSTRUKTU

- Promoter probe plazmid pDC1661 z BGSC

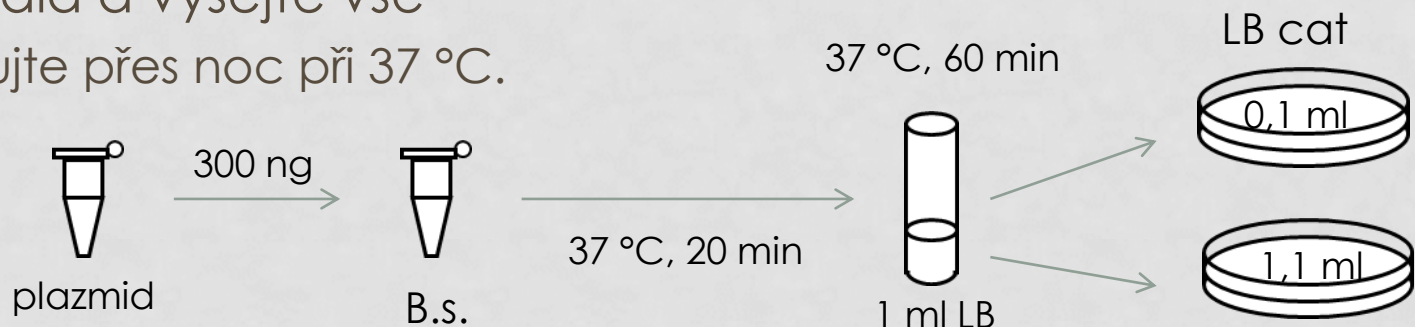
konstrukt je připraven s použitím plazmidu pDG1661
promotor genu *mutSL* je vložený před β -galaktosidázový reportér.

Plazmid byl linearizovaný XhoI

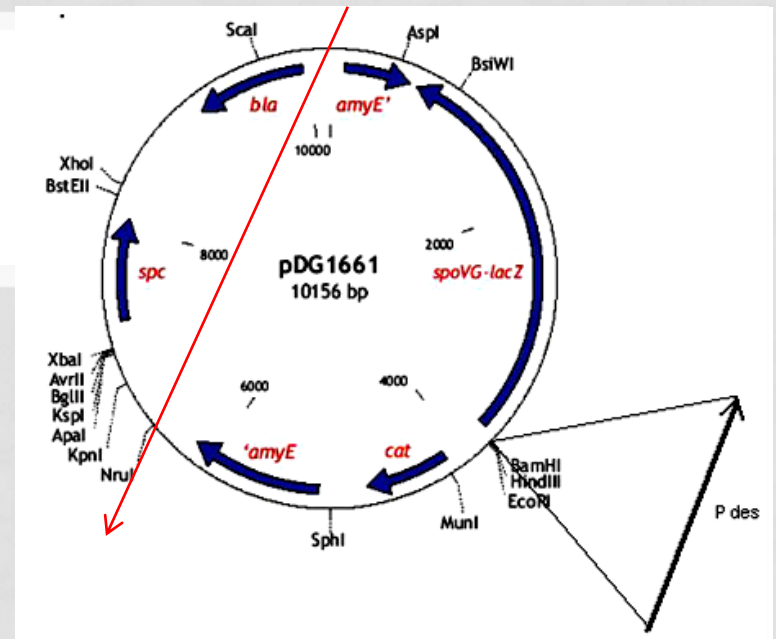


PROVEDENÍ POKUSU

- 1. den
 - Napipetujte 20 μ l roztoku linearizovaného plazmidu (300 ng) do 200 μ l suspenze dodaných kompetentních buněk *B. subtilis* 168.
 - 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.
 - poté vysejte na selektivní medium (LB agar s chloramfenikolem) ve dvou koncentracích
 - 100 μ l přímo buněčné suspenze
 - Stočte v sterilní „eppendorfce“ a resuspendujte v 100 μ l LB media a vysejte vše
 - Inkubujte přes noc při 37 °C.



PROVEDENÍ POKUSU



- 2. den
 - Narostlé transformanty podrobte analýze správnosti inserce do amy lokusu.
 - Naočkujte transformanty na tři typy agarových medií podle rastru
 - na LB agary se škrobem a přidejte WT
 - na LB agary s x-galem,
 - na původní selekční agar
 - na LB agary se spektinomycinem
- 3. den vyhodnoťte a určete správné klony
 - Přelijte misku se krobem Lugulovým roztokem a pozorujte přítomnost zóny okolo kolonií