

## PRAKTIKUM Z BAKTERIÁLNÍ GENETIKY:

### Uvod:

Pokusy prováděné v praktiku z bakteriální genetiky využívají ke studiu bakterii *Escherichia coli*, která je (snad s výjimkou *Salmonella typhimurium* a *Klebsiella aerogenes*) relativně snadným objektem pro genetické studie. Obdobné pokusy s jinými bakteriálními druhy jsou většinou podstatně obtížnější.

### Kultivační media:

a) **Definovaná kultivační media** (někdy zvaná minimální nebo také syntetická) obsahují pufr (obvykle fosfátový), jako zdroj dusíku obvykle slouží  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nebo  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , jako zdroj hořečnatých iontů slouží  $\text{MgSO}_4$  nebo  $\text{MgCl}_2$ . Někdy se přidávají železnaté ionty ve formě  $\text{FeSO}_4$ . U sporulujících bacilů se přidávají vápenaté ionty ve formě  $\text{CaCl}_2$ . Pro jiné bakterie postačí jako zdroj těchto iontů (i dalších biogenních prvků) nečistoty v základním fosfátovém pufru. Dále se přidává zdroj uhlíku, a u auxotrofů nezbytné aminokyseliny, báze nebo vitamíny.

b) **Komplexní kultivační media** nejsou chemicky přesně definovaná. Obsahují hydrolyzáty bílkovin živočišného nebo rostlinného původu, obecně nazývané peptony, které obsahují jednotlivé aminokyseliny a malé peptidy.

Příklad: často používaný trypton je hydrolyzátem mléčného proteinu - kaseinu pomocí extraktu z pankreatu, kde je hlavní proteasou trypsin. Trypton tedy obsahuje aminokyseliny a peptidy z kaseinu a látky z pankreatického extraktu.

Jako zdroj vitaminů a bází (vedle aminokyselin a peptidů) slouží obvykle kvasničný autolysát nebo extrakt z hovězího masa (jak kvasničný autolysát tak extrakt z hovězího masa obsahují také značné množství aminokyselin a peptidů).

Pro kultivaci patogenních bakterií byly vyvinuty ještě bohatší preparáty z různých živočišných tkání (mozek), protože dané bakterie bývají vysoce specializovanými parazity. Naopak půdní bakterie a bakterie žijící v přírodních vodách často vyžadují relativně chudá, avšak komplexní media (extrakty z brambor, mrkve nebo ovesné mouky atp.) a na příliš bohatých médiích buď nerostou, nebo rostou pouze v atypických formách nebo neproběhne celý jejich životní cyklus.

Je třeba si pamatovat, že peptony v některých případech nemusí obsahovat všechny aminokyseliny. Například pepton vzniklý hydrolyzou kaseinu pomocí koncentrované  $\text{HCl}$  neobsahuje tryptofan, který je při hydrolyse bílkovin na aminokyseliny sám hydrolysován. Řada bakterií syntetizuje atypickou aminokyselinu - kyselinu diaminopimelovou, která je složkou buněčné stěny. Eukaryotické organismy ji nesyntetizují a tak není v komerčních peptonech přítomna.

Většina komplexních medií je pufována aminokyselinami a peptidy. Proto se přidávají peptony v nadbytečném množství. Při velmi vysokých nárůstech na těchto médiích, kdy zbývající aminokyseliny nestačí upufrovat medium, dochází k jeho alkalizaci uvolňovaným amoniakem. Všechny nezbytné minerální složky jsou obsaženy jako kontaminace v peptonech, extraktech z tkání nebo v autolysátu kvasinek.

Zvláštní formou komplexních medií jsou výše uvedená definovaná media doplněná některým z peptonů a (nebo) kvasničným autolysátem, ovšem v podstatně nižších množstvích (cca 15%) než jsou v klasických komplexních médiích.

c) **Pevná kultivační media** se připravují přidáním agaru do 1.5 -3% koncentrace do výše uvedených komplexních nebo definovaných medií a nalévají se do sterilních petriho misek, zkumavek s uzávěry nebo do speciálních plochých lahví s uzávěrem. Na jejich povrchu mohou růst bakterie ve formě kolonií nebo souvislého nárůstu. Striktní aerobové vytvářejí jen tenkou vrstvu buněk (limitováno difusí kyslíku - *Bacillus subtilis*), fakultativní anaerobové (*E.coli*) vytvářejí tlustší nárůsty.

Zvláštní formou pevných medií je tzv. "**top**" nebo "**soft**" agar, který vzniká po přidání agaru do nižších koncentrací (0.6-0.8%), které se používají například při transdukčních experimentech nebo při přípravě fágových lysátů o velmi vysokém titru. Pokud jsou do roztaveného

(45°C) top agaru přidány buňky E.coli, mohou v něm (po nalití na základní podložní agar a ztuhnutí ochlazením) vytvářet kolonie. Top agar nemusí obsahovat žádné živiny, které pak difundují z podložního agaru. Na částečně předsušená agarová media je možno přidat roztoky obsahující aminokyseliny, báze nebo vitamíny, které po vsáknutí kapaliny rozdifundují v agaru. Toto je možno učinit u látek, kde menší rozdíly koncentrací v různých místech nejsou zásadním problémem. Není však vhodné tímto způsobem přidávat antibiotika.

Důležitou charakteristikou komplexních i definovaných kultivačních medií (vedle jejich složení) je i osmolarita media, která určuje jeho osmotický tlak. Při přeočkovávání z jednoho media na jiné je vhodné, aby obě media měla stejnou osmolaritu (aťby byla isoosmolární). To platí jak pro kapalná tak pevná media. Osmolarita media je určena součtem molárních koncentrací iontových i neiontových složek (uvědomte si, že osmolarita 1g glukosy rozpuštěné v 1 litru vody je podstatně vyšší než osmolarita 1g glykogenu [polymer glukosy] rozpuštěného také v 1 litru vody). Proto ve všech pokusech budeme přecházet mezi isoosmolárními medii, ať už jsou komplexní nebo transdukční nebo definovaná.

### **Kultivace bakterií:**

Na pevných mediích probíhá za příslušné teploty v termostatu. V kapalných mediích je aerace zajišťována na termostatovaných třepačkách (třepání nejen míchá kulturu, ale i zvětšuje povrch kapalně fáze ve styku se vzduchem, na kterém se rozpouští kyslík) nebo ve zkumavkách v rotátorech, kde se povrch kapaliny zvětší nakloněním zkumavky, které rovněž rotuje (míchání). Rotátory se umísťují do termostatů.

### **Isolace monoklonií:**

Schopnost vytvořit jednu kolonii z jedné buňky je alfou a omegou bakteriální genetiky. Umožňuje purifikovat nové kmeny, které vznikly genetickými přenosy. Někdy je možnost tvorby monoklonií snížena. Např. buňky bakterií vytvářejících slizové pouzdro "drží" pohromadě a obtížně se purifikují z nárůstu na agarovém mediu (při očkování kličkou nebo sterilním párátkem). Pak je třeba vytvořit dobře zvortexovanou naředěnou suspensi bakterií a tu vyset na agar. Bakterie rostoucí ve vícebuněčných vláknech (streptomycey) musí po genetickém přenosu projít sporulací, aby bylo možno získat geneticky uniformní monokolonie.

Idealně se získají monokolonie po růstu na selektivním mediu po "křížení" bakterií (konjugace) nebo dalších genetických manipulacích. Ty by pak měly být repasážovány pro získání monoklonií na neselektivním mediu. Na tomto mediu by měly růst všechny buňky jako kolonie. Monokolonie z neselektivního media (např. komplexní medium) by neměly obsahovat "ukryté" buňky, protože na takovém mediu mohou všechny buňky růst a vytvářet "plnohodnotné" kolonie. Bakterie je možno očkovat na povrch agarových ploten očkovacími kličkami nebo jehlami. Velkou výhodou při očkování velkého počtu kolonií je použití sterilních párátek, která se nemusí po každé inokulaci sterilizovat plamenem, ale použije se další sterilní párátko.

**Technika ("replica plating") inokulace mnoha kolonií pomocí raznice pokryté sterilním sametem** (nebo sterilním filtračním papírem) umožňuje orientovanou inokulaci velkého množství kolonií na povrch agarových misek s různými medii a tak testovat fenotyp většího množství kolonií najednou. Buňky bakterií více "přilnou" k sametu než k agaru, na který je tento samet otištěn, takže lze tento typ razítkování opakovat (zkušený pracovník až 6x). Větším problémem než samotný přenos buněk je, že při každém otisku sametu na agar dojde k nasátí kapaliny z agaru, což vede k "rozpítí" a "slévání" otisků kolonií na sametu a tím i na oražených agarech. Proto vlastní otisk nemá být příliš silný. Přesto by se měl samet přitisknout po celé ploše petriho misky. Výhodou je razítkování nárůstu bakterií z pravidelného nárůstu (který vznikl inokulací mnoha kolonií sterilními párátky na Petriho misku s agarem, pod kterou byla podložena matrice s pravidelnou mřížkou s očíslovanými políčky. Podle políček této mřížky se kolonie inokulují. Anglický název pro takovouto misku je "master plate" ) než neuspořádaného souboru kolonií. Hodnocení je pak snadnější a rychlejší. Každé "kolonii" je přiřazeno určité číslo, podle toho, do kterého políčka byla původně

očkována a jsou srovnávány "kolonie" rostoucí ve stejné poloze na matrici t.j. v políčku označeném stejným číslem.

### **Uchovávání bakteriálních kmenů.**

Zvolená technika záleží na tom jak dlouho chceme určitý kmen uchovat, jaký je jeho genotyp, zda obsahuje plasmid nebo profága a jak je stabilní. V průběhu uchování může docházet jak ke ztrátě životaschopnosti tak ke genetickým změnám.

- a) Lyofilisace: Nejvhodnější technika pro dlouhodobé uchovávání. Spočívá v lyofilisaci, při které se z kultury (v přítomnosti ochranných látek) v malé skleněné ampulce za snížené teploty a tlaku odsublimuje veškerá voda a ampulka se zataví. Lyofilisované kmeny se pak mohou uchovávat v temnu i při pokojové teplotě.
- b) Uchování v pevném stavu při -70°C v 10-16% glycerolu. Kultura vyrostlá v kapalném či na pevném mediu se přenesení do sterilního glycerolu a zmrazí. Takto uchovávané kmeny vydrží 5 i více let. Některé kmeny (např. deficientní v reparačních procesech) ztrácejí za těchto podmínek životaschopnost podstatně rychleji než jiné. Často zlepšení přinese snížení koncentrace glycerolu na 4-8%. Pro různé kmeny musí být správný způsob uchování empiricky vyzkoušen. Při -70°C se uchovávají bakterie také v 8% dimethylsulfoxidu.
- c) Uchování v kapalném stavu při -15° až -20°C ve 40% glycerolu. Tato technika je méně spolehlivá než uchovávání při -70°C, přesto takto uchovávané kmeny mohou vydržet životaschopné několik let. Výhodou je, když kmeny před přenesením do glycerolu vyrostly na minimálním mediu (oproti kulturám vyrostlým na komplexním mediu), protože buňky vyrostlé na minimálním mediu mají za těchto podmínek větší životaschopnost. Bohužel řada kmenů s mnohými mutacemi (obzvláště mutace postihující reparaci a rekombinaci) na minimálních mediích roste velmi špatně a pro uchování musí tedy vyrůst na komplexním mediu.
- d) Uchovávání ve vpichových agarech. Kultury se inokulují vpichem inokulační kličky do agarů s komplexním mediem (používá se nižší 0.6% koncentrace agaru). Tyto agary bývají v malých zkumavkách nebo malých lahvičkách se šroubovacím uzávěrem. Podmínkou je vzduchotěsné uzavření, aby agary nevysychaly. Uchovávají se v temnu při pokojové teplotě, kdy část kultury odumírá a část se pomnožuje. Může proto docházet ke genetickým změnám (reverse mutací, ztráta profága nebo plasmidu). Přesto si vhodné kmeny za těchto podmínek udrží životaschopnost i několik let.
- e) Uchovávání bakterií na agarech na Petriho miskách nebo na tzv. šikmých agarech (ve zkumavkách) v ledničce při 2° - 4°C po dobu několika týdnů. Petriho misky je vhodné chránit proti vyschnutí Parafilmem.
- f) Uchovávání kapalných kultur při 2°- 4°C v ledničce po dobu 1-2 týdnů. Kultura by měla být narostlá v minimálním mediu případně kultura narostlá v komplexním mediu by měla být zcentrifugována a buňky resuspendovány ve vhodném pufru. Tento způsob uchování není vhodný pro autolysující bakterie (různé druhy rodu Bacillus).
- g) Další metody. Bakteriální kmeny je možno uchovávat v kapalném dusíku, v minerálním oleji případně ve sterilním písku (Streptomycety).
- h) Bakterie tvořící endospory (Bacillus, Clostridium) se nejlépe uchovávají ve formě spor. Důležité je promytí spor od živin (aby spory případně nevyklíčily) sterilní vodou nebo 10% glycerolem a v nich pak spory uchovat v ledničce (voda) nebo při -10° až - 70°C (glycerol).

### **Popis genotypu uchovávaných kmenů a dokladů o způsobu uchování:**

Pro další dobré použití uchovávaných kmenů je důležité zapsat jejich genotyp, případně poznámky k fenotypu a data přeočkování dané kultury.

### **Resuscitace uchovávaných kmenů:**

Bakteriální kmeny je třeba inokulovat na komplexní pevné nebo kapalné medium (Bez přítomnosti antibiotika u resistantních kmenů. Selekcí antibiotiky je třeba uplatnit až při další kultivaci). Je vhodné použít raději nižší kultivační teplotu (20° - 28°C) a u kapalně kultury aerovat málo nebo vůbec ne.

## Genetické znaky bakterií:

Bakterie jsou velmi malé a proto se většinou nestudují jejich morfologické znaky (Samozřejmě platí výjimky. Někdy se také studuje morfologie bakteriálních kolonií, která bývá závislá na určitých biochemických znacích). Většina geneticky studovaných znaků bakterií je sledována pomocí růstu za určitých podmínek. Optimální odpověď je buď roste nebo neroste.

Většina genetických změn má za následek přerušení určité biochemické dráhy, ať už anabolické nebo katabolické. Mutace, která vede k přerušení funkce anabolické dráhy má za následek to, že mutantní kmen vyžaduje přidání produktu této dráhy do kultivačního media. Příklad: mutace prvního stupně biosynthesy tryptofanu, postihující enzym anthranylátsynthetasu způsobí, že mutantní kmen neporooste pokud nebude mít v kultivačním mediu přidaný tryptofan, nebo anthranylát nebo indol nebo jiný intermediát biosyntézy tryptofanu, to je látku produkovanou v postižené nebo následující biosyntetické reakci. Takovéto mutace se nazývají **auxotrofní**. Auxotrofní mutanty tedy nerostou, pokud do media není přidána látka, kterou vyžadují, protože ji nedovedou syntetizovat. Podíl auxotrofních buněk v kultuře můžeme **zjišťovat** (anglicky **score**), nebo také **číselně vyjádřit** podle toho jaká frakce populace roste nebo neroste bez určitého přídatku. **Auxotrofní mutanty nelze selektovat. Selektovat můžeme pouze reverzi auxotrofní mutace. Tato reverse povede k prototrofii v daném znaku.** (Prototrofní kmeny vyžadují pro růst z organických látek pouze zdroj uhlíku a energie. Nikoliv další anabolické produkty.) K auxotrofii na většinu aminokyselin, všechny vitamíny a další intermediáty může vést jedna mutace. Protože jsou biosyntetické dráhy rozvětvené, jedna mutace může vytvořit auxotrofní požadavek na dva znaky. Naopak v mnoha základních biosyntetických drahách existuje více než jeden enzym katalysující určitou reakci nebo více než jedna cesta vedoucí k danému intermediátu. V těchto případech auxotrofní požadavek nemůže vzniknout jedinou mutací. Z tohoto důvodu nemůže jediná mutace způsobit auxotrofní požadavek na glycin, aspartát, glutamát, guanin atp.

Všechny kmeny E.coli, které budeme v praxi používat jsou auxotrofní. Většina používaných derivátů E.coli K12 je auxotrofní na vitamin B1- thiamin. (Auxotrofie byly popsány na aminokyseliny, báze, vitamíny a některé mastné kyseliny)

Existuje také mnoho potenciálně auxotrofních mutací, které nikdy nemůžeme získat, protože produkt dané reakce nemůže buňka transportovat z media.

**Esenciální gen:** je to gen, který poskytuje produkt, jehož funkce je pro buňku esenciální a funkci tohoto genu nemůžeme obejít poskytnutím produktu reakce do kultivačního media (DNA polymerasa). Tyto geny nemůžeme studovat stejně jako geny anabolismu, ale můžeme izolovat tzv. **podmíněné mutace**, které tyto procesy ovlivňují.

Druhou běžnou skupinou mutací jsou ty, které ovlivňují katabolické dráhy. Bakterie mohou využívat jako zdroj uhlíku a energie řadu organických látek (cukry, polyoly, kys. mléčnou, kys. jantarovou atp). Obecně lze říci, že několik prvních reakcí utilizace dané látky je pro danou látku specifických. Mutace v enzymu specifickém pro utilizaci daného zdroje uhlíku a energie má pak za následek neschopnost bakterie růst na této látce, zatímco není ovlivněna schopnost růstu na ostatních substrátech. Tyto mutanty můžeme **zjišťovat a početně kvantifikovat** (anglicky **score**), srovnáním např. schopnosti růstu na minimálním mediu s glukosou a růstu na minimálním mediu se studovaným substrátem, jehož katabolismus byl mutován.

Příklad: mutant neschopný růstu na laktose neporooste na minimálním mediu s laktosou (bez dalšího zdroje uhlíku a energie). Vysetím tohoto mutantu na minimální medium s laktosou můžeme **selektovat** buňky schopné růstu na laktose (revertanty).

Třetím typem mutací jsou takové mutace, které vedou k resistenci bakterie k jedovaté látce, toxinu, bakteriofágu, detergentu nebo antibiotiku. Výhodou takovýchto mutací je možnost jejich **přímé selekce**. Pouze resistantní mutanty porostou v přítomnosti takovéto látky.

Na druhé straně je možno připravit mutanty se zvýšenou citlivostí k určitému toxinu. Takovéto mutace nelze izolovat přímou selekcí.

**Podmíněné nebo podmíněně letální mutace:**

Tyto mutace mají za následek mutantní fenotyp za určitých podmínek a kvazi-normální fenotyp za jiných podmínek. Obecně řečeno je možno získat takové mutace, které mají za následek teplotní sensitivitu určitého enzymu, který je pak nefunkční při vysoké (nepermisivní) teplotě a je funkční při nízké (permisivní) teplotě. Pokud je takováto mutace v anabolické dráze, např. pro syntézu tryptofanu, bude mutant vyžadovat tryptofan při vysoké teplotě a nebude ho vyžadovat při nízké teplotě. Pokud takováto mutace postihne gen pro DNA polymerasu III, mutant neporooste při vysoké teplotě a poroste při nízké teplotě. V druhém případě je mutace podmíněně letální, zatímco v prvním případě je pouze "letální" to, že zapomeneme přidat do media tryptofan.

Existují rovněž mutace chladově sensitivní, kdy genový produkt je nefunkční při nízké teplotě a je funkční při vysoké teplotě.

Existují také mutace, které způsobí, že buňky nerostou v nízko-osmolárním mediu a rostou v mediu o vysoké osmolaritě.

### Genetická nomenklatura u bakterií:

Používají se různé symboly při popisu fenotypu a genotypu. Fenotypové symboly se píšou latinkou s velkým prvním písmenem. Genotypové symboly se píšou *kurzívou* s malým prvním písmenem. Fenotypové symboly užívají obvykle znamének + a - ke zdůraznění toho, zda daná funkce je přítomna nebo ne. Genotypové symboly nepoužívají těchto znamének. Obvykle se používají třípísmenové symboly pro aminokyseliny (*trp*), pro báze (*ade*), pro cukry (*lac*) atp. Jediné znaky, které se uvádějí jsou ty, ve kterých se mutant liší od divokého kmene. Pokud je kmen popsán jako *lac*, znamená to, že má mutaci ovlivňující metabolismus laktosy. Protože divoký kmen metabolizuje laktosu, je fenotyp mutantu  $Lac^-$ . Pokud má daný kmen mutaci v anthranylátsynthetase můžeme jeho genotyp zapsat *lac trpE*. Velké písmeno E označuje specifický gen biosyntézy tryptofanu (*trpE* je gen, který koduje anthranylátsynthetasu). Podobně, pokud víme, že naše mutanta má defektní  $\beta$ -galaktosidasu, můžeme popsat genotyp našeho mutantu *lacZ trpE*. Při popisu fenotypu obvykle nepřidáváme písmeno specifikující gen v biosyntetické dráze protože nám jde pouze o popis celkového znaku. Pro teplotní sensitivitu se používá symbol ts v horním indexu, pokud je třeba. Pokud jde o teplotně sensitivní *lacZ* mutantu, může být jeho fenotyp popsán  $Lac^{ts}$ . Fenotyp kmene resistantního k tetracyklinu se zapíše  $Tet^r$  a fenotyp kmene, který má konstitutivní expresi *lac* operonu se popíše  $Lac^c$  (z historických důvodů se však fenotyp takového kmene obvykle zapíše jako  $Lac^+$ ).

U bakterií se poměrně těžko používá termín druh (jako u eukaryot). Nelze použít kritéria získání reproduktivně schopného potomstva. Co však lze nalézt, je kontinuum kmenů s možnou vzájemnou rekombinací DNA (s různou účinností rekombinace). Dokonce termín *E.coli* zahrnuje spíše heterogenní skupinu organismů. Kmeny *E.coli*, které budeme v praxi používat jsou všechny odvozeny z izolátu K-12, ze sbírky bakterií na Stanford University. Tento kmen se stal populárním hlavně díky objevu **J.Lederberga**, který prokázal, že obsahuje konjugativní plasmid F (od fertility factor). Do dnes je dobře prostudován **kmen E.coli K-12** a několik málo dalších (*E.coli*B, *E.coli*C, *E.coli*W). Existují také patogenní kmeny *E.coli* (reservoirem je infikovaný hovězí dobytek), které jsou však minoritní. Kmeny, se kterými budeme pracovat se adaptovaly pro růst na umělých mediích po dobu více než 50 let, takže se zdá, že ztratily schopnost infikovat člověka. Odolné a výkonné kmeny *E.coli*, které těžce pracují v našich střevních traktech, nebudou nahrazeny těmito "chudáčky", kteří byli po tolik generací v rukou vědců pouze hýčkáni.