

Pokus 1: Nespecifická transdukce.

1. Při transdukci je genetický materiál přenášen fágovou kapsidou. Každá transdukující částice přenáší pouze malé množství DNA.
2. Při **nespecifické** transdukci může být kterákoli část bakteriálního chromosomu zabalena“ do kapsidy a tudíž každý genetický znak může být přenesen do potenciálního recipienta. Je to dáno určitou nespecifitou enkapsidačního mechanismu. Zabalené množství bakteriální DNA odpovídá velikosti kapsidy a tím i velikosti DNA bakteriofága využitého pro transdukci. DNA přenášená při nespecifické transdukci je dvouřetězcová.
3. Transdukce je užitečná při mapování malých struktur, např. pořadí sousedních genů nebo při konstrukci kmenů s novou kombinací mutantních alel. Velikost přenášené DNA je limitována obsahem fágové kapsidy.

Úvod:

Transdukce je přenos genetické informace z jedné bakterie do druhé bakteriofágovým vektorem. Bakteriofág se skládá z genetické informace viru obsažené v proteinovém obalu, který chrání genetický materiál před vlivy okolí. Při nespecifické transdukci může být přenesena kterákoli část bakteriálního chromosomu, při specifické transdukci může být přenesena jen určitá malá oblast bakteriálního chromosomu. Všeobecně se věří, že při pečlivé snaze lze vždy najít určitého bakteriofága, který bude uskutečňovat transdukci ve kterémkoli bakteriálním druhu.

Budeme pracovat s bakteriofágem *Bacillus subtilis* PBS1. Jde o velkého fága (DNA fága má velikost cca 250kb, [kilo base pairs] což odpovídá přibližně 2 % celkového chromosomu *B. subtilis*). Přísluší do skupiny lysogenních fágů. Lysogenie znamená schopnost fága stabilně asociovat s hostitelskou bakterií, takže hostitel není zabit, ale fágový chromosom je replikován vedle nebo spolu s bakteriálním chromosomem. Za určitých podmínek je možno dereprimovat profága, který se pomnoží, zabije hostitele, hostitelská buňka lysuje a uvolní velké množství fágových partikulí. Toto pomnožení a uvolnění fága se nazývá lytická fáze. Preparát bakteriofága se nazývá lysát, protože vznikl lysou infikovaných buňek..). U fága PBS1 je v lysátu cca 0.1- 1% transdukujících partikulí. Při růstu fága PBS1 na *B. subtilis* vznikají dva typy partikulí. Většina fágových partikulí obsahuje 250 kb fágové DNA a menšina obdobně velkou část náhodně vybrané bakteriální DNA. Po infekci bakterií touto směsí fágových partikulí se každá nezávisle adsorbuje na bakteriální buňku. Adsorpce PBS1 vyžaduje Mg^{2+} a flagelované buňky, takže tento stupeň musí být proveden v roztocích s dostatečnou koncentrací volných Mg^{2+} a v kultuře na počátku stacionární fáze. Jakmile došlo k adsorpci a k injekci DNA, budou mít uvedené dva typy partikulí odlišný vliv na postiženou buňku. V našem případě používáme virulentní mutantu fága, která nemůže uskutečnit lysogenii (označovaný také jako PBS1 vir).

Virové partikule se pomnoží a lysují buňku. Buňky, které adsorbovaly transdukující částice, mohou změnit svůj genotyp po proběhlé rekombinaci přenášené DNA s homologní oblastí hostitelské DNA. V našich pokusech budeme selektovat žádané transduktanty.

Protože lysát, který použijeme, obsahuje směs virových a transdukujících partikulí, použijeme nízkou četnost infekce (počet partikulí na buňku), aby buňky, které obdržely transdukující DNA, nebyly současně infikovány i fágovou partikulí. Jakmile bude adsorpční proces dokončen, snížíme koncentraci Mg^{2+} , aby virové partikule uvolněné lytickou infekcí neinfikovaly další buňky. Koncentraci Mg^{2+} snížíme vysetím transdukční směsi v top agarovém medium pufrované fosfátem. V případě použití nefosfátové pevné půdy se do transdukční směsi těsně před vysetím přidá citronan sodný tak, aby pětinasobně převýšil koncentraci Mg^{2+} .

Z populace buněk, které podstoupily transdukci (směs neinfikovaných buněk nebo buněk infikovaných fágem PBS1 nebo buněk infikovaných transdukující partikulí) selektujeme žádané transduktanty vysetím na selektivní medium, které bude postrádat právě ten "auxotrofní požadavek", který je syntetisován

produktem genu, jehož přenos sledujeme (ostatní nezbytné přísady jsou v médiu přítomny). Nebo v případě antibiotikové rezistence na LB medium s přidáním příslušného antibiotika.

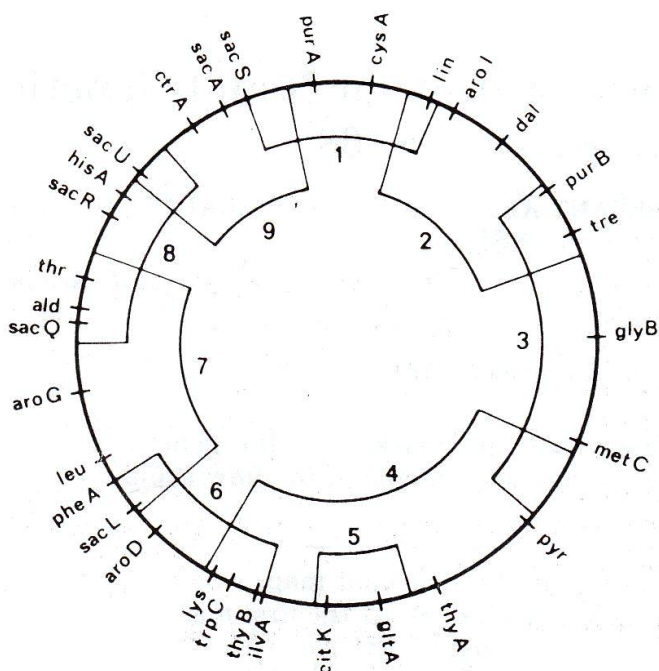
Příprava PBS1 lysátu: Bakteriální kmen je infikován fágem PBS1 (lyzátem předchozího hostitele) v přítomnosti Mg^{2+} a při OD_{450} cca 0,8. Buňky se dále kultivují, až dojde k lysi, kterou poznáme podle poklesu turbidity kultury. Poté se zfiltruje přes molekulární filtr o průměru pórů 45 μm . Při přípravě fágového lysátu pro přesné genetické studie je vhodné tento proces zopakovat, aby byla podstatně snížena pravděpodobnost přítomnosti transdukujících partikulí z původního infikujícího lysátu, který mohl být připraven lysou geneticky odlišného hostitele. Supernatant se po filtraci uskladňuje v lednici a může být používán po několik měsíců.

Detailní popis přípravy PBS1 lysátu: Ke kultuře *Bacillus subtilis* kultivované v PAB médiu do OD 0,8 (cca 5×10^7 buněk/ml) při $37^\circ C$ se přidá sterilní $MgSO_4$ do koncentrace 2mM. Dále se přidá PBS1 lyzát do multiplicity infekce 1:1 (obvykle k 0,5 ml kultury se přidá 0.2 - 0.5 ml lyzátu podle jeho titru. Po 15 minutách růstu se kultura naředí 10x do předehřátého PAB media s 2mM $MgSO_4$ a pokračuje se v kultivaci. OD kultury se bude ještě po určitou dobu zvětšovat, pak se nárůst OD zastaví a obvykle do 2 hodin dojde k lysi kultury, která se projeví poklesem OD . Pokud k lysi nedojde po 2 hodinách nechá se kultura bez třepání při laboratorní teplotě přes noc. Fágový lyzát se prefiltruje do sterilní zkumavky přes mol. filtr..

Titrování PBS1 fága (zjišťování koncentrace infekčních partikulí): Plaky fága PBS1 jsou velmi malé a lze je poměrně obtížně detekovat. Vhodný testovací kmen (*B. subtilis* 168, se nechá narůst do koncentrace cca 5×10^7 buněk/ml při $37^\circ C$ v PAB s 2mM $MgSO_4$. Do sterilních zkumavek se přidá 0.5 ml této kultury a 0.5 ml nového lyzátu naředěného 10^{-4} , 10^{-6} a 10^{-7} v PAB s 2mM $MgSO_4$). Ve čtvrté zkumavce je pouze bakteriální kultura bez fága, která bude sloužit jako kontrola bakteriálního nárůstu bez plaků. Fágové partikule se ponechají preadsorbovat po dobu 10 minut při $37^\circ C$. Pak se do každé zkumavky přidají 3ml PAB-top agaru (roztaveného a uchovávaného při $45^\circ C$). Po promíchání se obsah každé zkumavky nalije na LB agarové plotny a po ztuhnutí top agaru se misky přenesou do $37^\circ C$. Plaky se odečítají po 12-14 hodinách růstu.

Co bychom měli prokázat:

1. Nespecifickou transdukcí lze přenést geny přítomné v malé části chromosomu donora do recipientní buňky.
2. Lze přenést jak divoký gen, tak jeho mutantní formu. Přenos genu divokého typu lze často selektovat. Přenos mutace lze uskutečnit spolu s přenosem "blízkého" selektovatelného genu a mezi takto získanými transduktanty lze zjistit mutaci, která byla kotransdukována se selektovaným genem.
3. Pomocí transdukce lze mapovat pořadí současně přenášených genů nebo lokalizovat studovanou mutaci.
4. Pokusíme se lokalizovat inserci kazety chloramfenikolové rezistence do genu způsobující osmolabilitu. Použijeme k tomu sadu auxotrofních mutantů (Kit 1-9) Appl. Environ. Microbiol. 33, 989, 1977.



Popis pokusu:

1. Bakteriální kmeny: Recipientním kmenem je jednak Kit9 B.s. QB123 - (*sacA321*, *ctrA1*, *trpC2*) a Kit1. B.s.QB944 (*purA16*, *cysA14*, *trpC2*)

Donorovým kmenem je původní mutant L42 (*spo0F*, *trpC2*, *cat*, *yxkO*)

2. Symboly:

sacA321 – defektní v utilizaci sacharosu

ctrA1 – defektní v utilizaci cytidinu v nepřítomnosti amonných iontů – netýká se našeho pokusu

trpC2 – tryptofanová auxotrofie – je v jiné části chromosomu- tryptofan je potřeba přidávat vždy

spo0F – iniciace sporulace – není důležité pro náš pokus

cat – resistance k chloramfenikolu – 5 µg/ml media

purA16 - auxotrofie na adenin

cysA14 – auxotrofie na cystein

3. Hrubý nárys pracovního postupu:

- Příprava recipientních buněk: Noční kultura se inokuluje do PAB media na OD cca 0,1 (1:25) a kultivuje se za aerace při 37 °C asi 3 hod. do OD 0,5, zcentrifuguje se a resuspenduje v TM mediu na OD 1.
- Adsorpce fága: Napipetujte 0.5 ml buněčné suspence od obou kmenů *B. subtilis* do 2x 3 sterilních zkumavek. Do dvou od každého kmene přidejte 2 koncentrace lysátu, dvě ponechte jako kontroly. Ponechte tyto zkumavky stát při pokojové teplotě 15-20 min.
- Vysetí: Připravte si 6 top agarů s MM mediem nebo s LB mediem a citrátem. Pak přidejte obsah každé transdukční zkumavky do top agaru a ten vylijte na předem označený LB agar s chloramfenikolem. Když top agary ztuhnou (15-20 min), obraťte misky dnem vzhůru a uložte je do inkubátoru (37°C) na 1.5-2 dny.
- Zjišťování frekvence kotransdukce: Sterilními párátky naočkujte podle dodaného rastru 80 transduktant od každého kmene na misky stejného složení jako původní selekční misky (LB chloramfenikol). Až buňky na těchto matricových miskách vyrostou (1 den), zjistěte přenos neselektovaných znaků pomocí techniky „replica plating“. Při této technice, jsou buňky očkovány pomocí razítka z vyrostlé matricové plotny na testovací agary. To nám umožní ověření současného přenosu sledovaného (neselektovaného)

znaku (neobsahují příslušnou aminokyselinu nebo vitamin nebo obsahují místo glukosy jiný cukr, jehož metabolismus by mohl být přenesenou mutací poškozen). Repliky je možno vyhodnotit po jednom dni.

Časová osa pokusu:

- 1.den: transdukce.
- 2.den: Vyhodnocení úspěšnosti transdukce a příprava matric ke zjišťování současného přenosu neselektovaných znaků.
- 3.den: Replikování matric na misky pro zjištění současného přenosu neselektovaných znaků.
- 4.den: Vyhodnocení současného přenosu neselektovaných znaků.

Přesné instrukce:

(postup se může měnit podle toho, jak vám budou dodány recipientní buňky)

1. Poskytnutý materiál:

- a) Kultura B.s. QB123 a B.s.QB944 v komplexním mediu nebo na LB plotnách.
- b) PAB medium
- c) Zkumavky se sterilním, cysteinem, adeninem a tryptofanem vždy v 1% koncentraci, sacharosou v 10% koncentraci.
- d) Sterilní zkumavky uzavřené víčky.
- e) Zkumavky s roztaveným minimálním (K120 bez cukru) „top agarem“ (nižší koncentrace agaru [0.7%], někdy označován jako soft [měkký] agar) udržovaným při teplotě cca 45°C ve vodní lázni nebo v "hot"bloku.
- f) LB agaray s chloramfenikolem v koncentraci 5 µg/ml.
- f) Minimální glukosové agary s glukosou (K120 Dex) - glukosa (starší název dextrosa) přidána do koncentrace 10g/l.
- g) Minimální agary bez cukrů (K120)
Složení minimálních agarů K120: 69mM (K,H)₃ PO₄ pufr pH 7, 15mM (NH₄)₂SO₄, 0.4mM MgSO₄, 2.5x10⁻⁴ % FeSO₄, thiamin (1mg/l), 1mM citronan dvojsodný, agar (15g/l).
- h) Mikropipety a sterilní špičky v krabičkách.
- i) Sterilní párátko.
- j) Sterilní samety pro "replica plating" techniku.
- k) Bloky (raznice) pro "replica plating" techniku.
- l) Rastrová mřížka pro přípravu matricových ploten pro replica plating.

2. Příprava buněčné suspence pro transdukci:

Pokud jsou poskytnuty buněčné kultury, označte je, umístěte do třepačky a inkubujte 2-3 hod. Stanovte OD_{450} . Do šesti označených zkumavek napipetujte po 0.5 ml buněčné suspence. Dvě kontrolní zkumavky označte C (nebude přidán PBS1 lysát, slouží jako kontrola frekvence reverse mutací u recipientního kmene) a dvě a dvě transdukční označte K1 a K9. (Hodnoty OD_{450} jsou spíše orientační, protože OD je závislá na rozptylu světla a nikoliv na absorpci a závisí na konstrukci i seřízení používaného fotometru. OD jedné bakteriální suspence se budou lišit, budou-li měřeny na fotometrech různých typů. V našem případě předpokládáme, že při $OD_{450}=1$, by koncentrace buněk *B. subtilis* měla být cca $5 \times 10^7 - 10^8$ buněk na ml.)

3. Adsorpce bakteriofága:

Do 2 zkumavek označených K1 a K9 přidejte 250 μ l, do dalších dvou obdobných zkumavek 50 μ l lysátu donorové bakterie *B. subtilis* L42, zamíchejte a ponechte na laboratorním stole alespoň 15 min. Stejnou dobu ponechte při laboratorní teplotě 2 kontrolní zkumavky bez fága. Dvě různá množství lysátu se použijí proto, aby alespoň na jedné selekční misce bylo dostatečně množství kolonií, které by se dobře dále inokulovaly pomocí sterilních párátěk.

5. Vyšetí:

Po adsorpci fága smíchejte bakteriální suspensi s top agarem (sterilním přelitím top agaru do bakteriální suspence - po vyndání top agaru z teplé lázně počkejte asi 20 sekund před smícháním s bakteriální suspensí) a výslednou směs sterilně vylijte na misku s agarem. Počkejte 15-20 minut, až agary ztuhnou, a nechte inkubovat při 37°C 36-48 hodin.

6) Analýza transduktant - frekvence rekombinant:

PBS1 fág přináší do recipientní buňky cca 250 000 párů bází (něco přes 2 % bakteriálního chromosomu) a musí přinést do chromosomu hostitelské buňky minimálně oblast mutace, aby bylo možno získat transduktanty divokého typu pro selektovaný znak. Protože crossing over je víceméně náhodný, je možné při jednom přenosu transdukovat i další znaky, které nazýváme vázané znaky. Protože mapa chromosomu *B. subtilis* je známá, můžeme předpovídat, které donorové znaky lze přenést spolu se selektovanými. Tyto znaky budeme zjišťovat pomocí replica plating techniky, což je vhodná technika, která umožňuje najednou otestovat kolonie z jedné agarové plotny.

a) **Příprava a nárůst matric pro repliky:** Nejprve se na dvě různé matricové plotny (Lb cat agary) naočkuje vždy až 80 jednotlivých kolonií (podle předlohového rastru) z příslušných dvou selekčních ploten. Jednotlivé kolonie se inokulují sterilními párátky. Dávejte pozor, aby inokulace byla pouze z jedné kolonie. Současná inokulace ze dvou těsně sousedících kolonií zkreslí výsledky transdukčního mapování, protože současně jsou inokulovány dva různé transduktanty. Růst v inkubátoru při 37°C 1.5 - 2 dny.

b) **Orazítkování narostlých matricových ploten na testovací agary a replikační kontroly.** Růst při 37°C na „orazítkovanych“ testovacích agarech a replikačních kontrolách je možno odečítat již další den.

Replica plating technika v podstatě imituje princip razítka. Na sterilní samet se orazítkují kolonie z matricového agaru a z něho se zase „orazítkují“ testovací agarové plotny a replikační kontroly.

Je vhodné připravit testovací agary ve stejný den, jako se provádí příprava matric - tentokrát přidáním příslušných přísad na již nalitou minimální agarovou plotnu. Dodané agary jsou předsušené, přidané roztoky se do nich „vsáknou“, nízkomolekulární látky se rozdifundují po agaru a misky se pak uskladní v lednici (předejde se tak problému sušení v den, kdy se tato agary budou používat).

Na každý agar se nanese 0.1 ml každého přísadku. Pro agar, kde bude zdrojem uhlíku a energie sacharosa, poskytneme agarovou plotnu bez cukru. V tomto případě přidáte 0.3 ml 10% sacharosu. V ostatních případech budeme používat agary do nichž byla již přidána glukosa.

Každý testovací agar bude oproti matrici (postrádat selektovaný přísadku), ale bez ještě jednoho sledovaného přísadku. Pro auxotrofní znaky je tento přísadku vypuštěn, pro „cukerný“ znak se používá plotna s tímto cukrem, ale bez glukosy, aby se prokázalo, zda transduktanty na těchto cukrech rostou. Agar pro replikační kontrolu bude mít všechny přísadky jako matrice.

Testovací plotny připravte podle následujícího schématu:

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

Místo razítkovací metody je možno přeočkovat narostlé buňky z matrice na selekční plotny párátky. Je to zdlouhavější, ale pro začátečníky přesnější.

7. Presentace a analýza dat:

Budete zjišťovat pro každý z 80 selektovaných transduktantů současný přenos neselektovaných znaků. P V případě Kitu1 budete zjišťovat dva znaky (adenin, cystein), v případě Kitu 9 jeden znak – utilizace sacharózy jako jediného zdroje uhlíku. Podle frekvence přenosu znaků určete přibližnou polohu inserce chloramfenikolové kazety mezi jednotlivé markery.