

1. úloha. Pulzní gelová elektroforéza genomové DNA bakterií

Pulzní elektroforéza je elektroforetická metoda umožňující na rozdíl od klasické elektroforézy efektivní dělení molekul DNA větších než 50 kb (až do velikosti několika Mb). Při pulzní elektroforéze se periodicky mění orientace elektrického pole. Při působení elektrického pole se molekuly DNA prodlužují a zarovnávají ve směru elektrického pole a migrují směrem k anodě. Bylo zjištěno, že po odstranění elektrického pole se prodloužená molekula DNA vrací nazpět do relaxovaného stavu. Doba této relaxace závisí na délce molekuly. Periodické změny orientace elektrického pole způsobují relaxaci a opěrné prodlužování a zarovnávání molekul podle orientace nového pole.

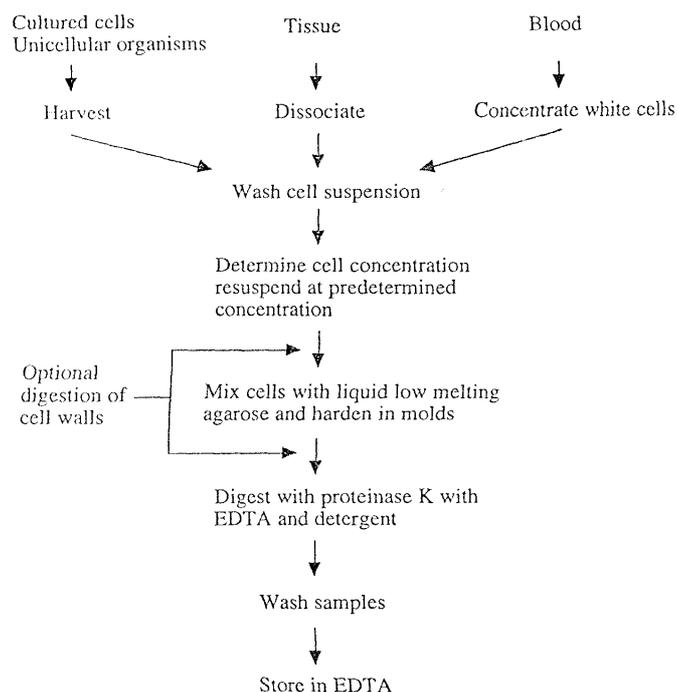
Princip pulzní elektroforézy je následující: Při působení prvního pole se molekula zarovná ve směru tohoto pole a začne migrovat v gelu. První pole je odstraněno a začne působit druhé pole. DNA musí změnit konformaci a reorientovat se než začne migrovat v druhém el. poli. Čas nutný pro tuto reorientaci (**reorientační čas**) je velmi citlivý na velikosti molekuly. Větším molekulám trvá reorientace déle než menším. Zatímco větší molekuly se ještě reorientují, menší už mohou začít migrovat gelem. Jestliže doby působení obou střídajících se polí jsou stejné, DNA migruje rovně gelem cik-cak způsobem.

Používané termíny: Switch interval (**pulzní čas**) - doba po kterou je každé ze střídajících se elektrických polí aktivní. **Reorientační úhel**: úhel mezi dvěma střídajícími se poli. **Inverzní pole** - Uspořádání pulzní elektroforézy, kdy se střídají pole orientovaná v opačném směru (reorientační úhel je 180°).

Používané **hmotnostní standardy**: konkatemery připravené z DNA bakteriofága λ mají obvykle 1 - 20 -merů (ladder); konkatemery z ligovaných plazmidů; chromozómy *Saccharomyces cerevisiae* nebo *S. pombe*

Při přípravě vzorků DNA větších než 500 kb je nutné molekuly chránit jak před mechanickým poškozením (působením střížných sil), tak před nukleolytickou degradací během izolace. K tomuto účelu se používá speciální metoda izolace, při které jsou buňky nejprve fixovány v nízkotající agaróze a teprve potom prováděna lyze a purifikace DNA.

Princip izolace DNA:



Objekt: Kmeny *Staphylococcus aureus*:

Postup:

Izolace DNA pro pulzní gelovou elektroforézu (PFGE)

1. 20 ml 2× YT-media naočkovat bakteriální kulturou (z 18 hod. kultury) a inkubovat při 37 °C do $OD_{600} = 0,2$ (ca. 1-2 hodiny na třepačce).
2. Přidat 200 µl 0,5 M EDTA a kulturu zchladit na 4 °C /10 min.
3. Centrifugovat při 3000 min⁻¹, 4°C, 15 min, centrifuga K23.
4. Dvakrát promýt 2 ml promývacího roztoku zchlazeného na ledě (10 mM Tris.Cl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl, pH 7,5) a resuspendovat v 200 µl stejného roztoku.
5. 100 µl bakteriální suspenze zahřát v mikrozkuhavce na 55 °C (2-3 min.), přidat 7 µl lyzostafinu ze zásobního roztoku 0,5 mg/ml (lyzostafin přidávat pouze k *Staphylococcus*) a smíchat se 100 µl 2% low melting point agarose (roztok v 50 mM Tris.Cl, 5 mM EDTA, pH 8), předem vytemperované na 55 °C.
6. Suspenzi rychle přepipetovat do komůrek tvořítka po 200 µl a uložit na 20 min. při 4 °C.
7. Vzorky přenést do 1 ml lyzačního roztoku (6 mM Tris.Cl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,5% Brij 58, 0,2% Na-Deoxycholát, 0,5% Laurylsarkosin, pH 7,6), 500 µg lysozymu (zásobní roztok 50mg/ml), 1 µg RNasy (zásobní roztok 10 mg/ml). Inkubovat za mírného třepání při 37 °C na vodní lázni 2-3 hod.
8. Lyzační pufr vyměnit za deproteinizační (25 mM EDTA, 20 mM EGTA, 1% laurylsarkosin, pH 9,0) a přidat 500 µg proteinasy K (zásobní roztok 10 mg/ml). Inkubovat 12 hod. při 55 °C za mírného třepání.
9. 4 - 5 × promýt v 10 ml TE (pH 8,0) při 4 °C. TE pufr vyměňovat po 2 hodinách (za mírného třepání) nebo nechat stát vždy 24 hod.
10. Agaróзовые vzorky se mohou skladovat 12 měsíců v TE pufru při 4 °C (1× za měsíc vyměnit) nebo delší dobu v 0,5 M EDTA pH 8,0.

Restrikční štěpení velkých fragmentů DNA v agaróze

1. Pro restrikční štěpení uříznout ca. 1×1×5 mm bloček a přenést do Eppendorf zkumavky.
2. Přidat 10 µl 10× restrikčního pufru, 85 µl vody a 5-10 U restriktázy. Inkubovat při požadované teplotě přes noc. Naštěpené vzorky se mohou přímo nanášet na gel.

Příprava gelu a nastavení elektroforézy

1. Připravit 1,2% agarózový gel v 1×TAE pufru
2. Nanést vzorky naštěpené DNA do jamek na gelu a zalít 0,8% low-melting agarózou v 1× TAE pufru, vytemperovanou na 45 °C.
3. Optimální podmínky pro rozdělení fragmentů chromozomální DNA (s CHEF-DRII zařízením): Pulzní časy 1 - 90 s, lineární vzestup; Koncentrace agarózy (Lachema) 1,2 %; Teplota 14°C; Napětí 170 V; Doba elektroforézy 28 hod. pro gel délky 14 cm
4. Obarvit gel v roztoku ethidiumbromidu 1 µg/ml 1 - 2 hodiny, odbarvit v dest. vodě a fotografovat pod UV světlem 302 nm.

Poznámky:

1. 2× YT médium: Trypton ...16g, Yeast-extrakt ...10g, NaCl ...5g, voda do 1000 ml, pH 7,0.
2. Laurylsarkosin sterilizovat filtrací, ostatní roztoky sterilizovat autoklávováním.

Úloha: Izolace spontánních mutantů rezistentních ke streptomycinu metodou gradientních ploten

Princip: Molekulární podstata spontánních a indukovaných mutací je stejná. Liší se však ve frekvenci. Frekvence spontánních mutací je podstatně nižší. Tím se také liší od fenotypové modifikace, neboť ta proběhne prakticky současně ve všech buňkách. Spontánní mutace - rezistence k antibiotikům probíhají dvěma způsoby. Buď se rezistence k antibiotikům vytvářejí postupně v několika stupních (např. u penicilinu) nebo hned v prvním stupni získáme mutanty rezistentní k různým koncentracím antibiotika.

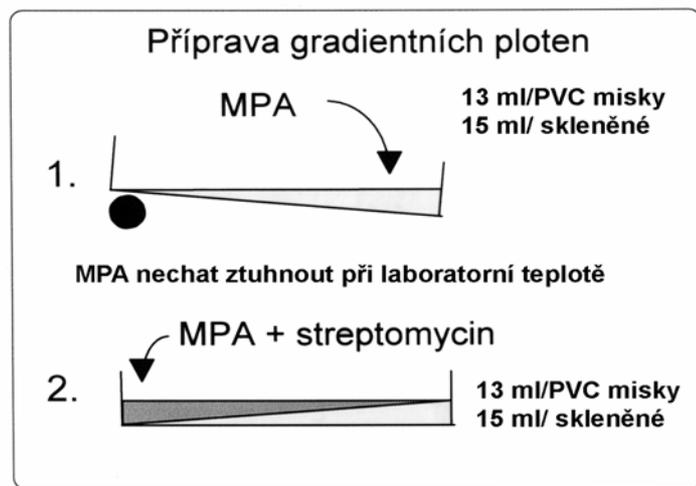
Upozornění: očkování provádět ve sterilním prostředí flow-boxu; použitý materiál pečlivě roztrždit a odnést do umývárny.

Objekt: Kmeny *Staphylococcus aureus* citlivé ke streptomycinu: kmeny *S.a.* 8511-A; *S.a.* 8511-B; *S.a.* ISP- A; *S.a.* ISP- B.

Postup: **První den.**

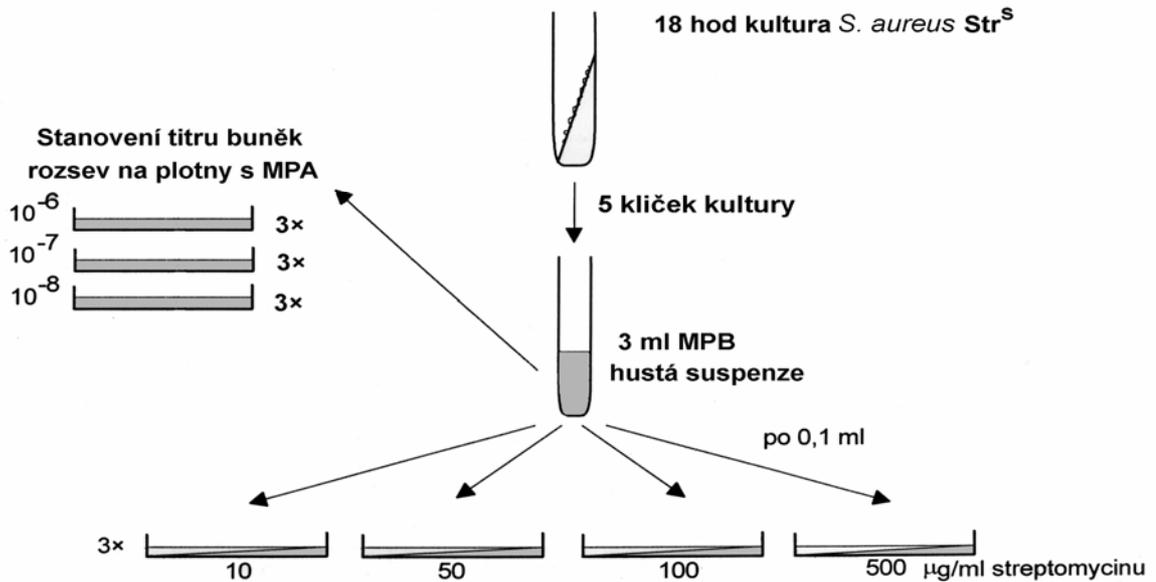
1. Z 18 hod. kultury vyrostlé na MPA agaru, odebrat 5 kliček a důkladně resuspendovat ve 3 ml MPB. Je nutno vyjít z husté bakteriální suspenze (cca 10^9 buněk/ml), protože frekvence str^R mutantů je velmi nízká.
2. Z takto připravené husté kultury provést rozsev ze zředění 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} vždy na 3 plotny s MPA, pro stanovení celkového počtu buněk v cm^3 (tj. títř buněk). Kultivace při $37^\circ\text{C}/24$ hod.
3. Připravit gradientní plotny (Obr. 1) se streptomycinem o výsledných koncentracích: 10, 50, 100 a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Pro přípravu zásobního roztoku rozpustit 0,5 g krystalického streptomycinu v 5 ml sterilní destilované vody (přidávat do roztavené MPA půdy o teplotě max 55°C).

Obr. 1



4. Provést rozsevy po 0,1 ml na gradientní plotny (vždy 3 plotny od příslušné koncentrace, viz obr. 2) a pečlivě rozetřít hokejkou po celé ploše.

Obr. 2

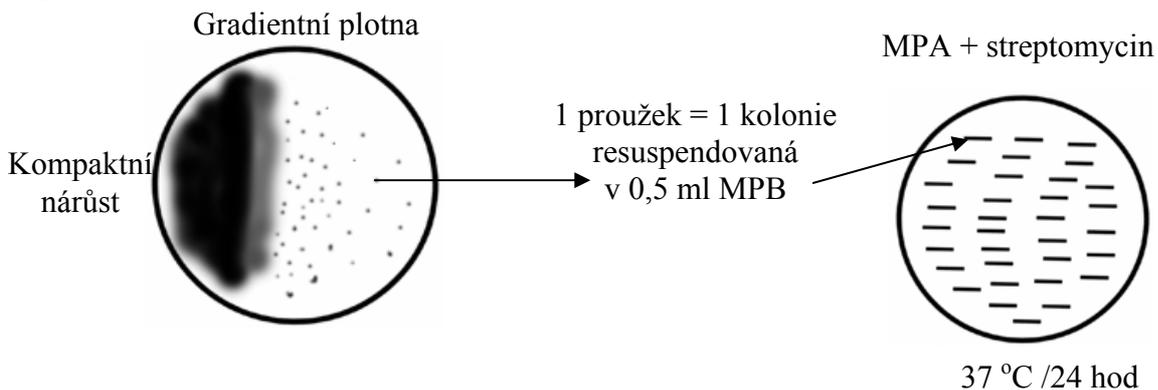


5. Naočkované plotny inkubovat dnem vzhůru při 37 °C /24 hod

Druhý den.

Jednotlivé kolonie za linií kompaktního nárůstu přenést do mikrozkušavek s 0,5 ml MPB. Přeočkovat na plotny s různými koncentracemi streptomycinu (5, 10, 25, 50, 100 a 500 µg/ml) formou proužků (viz obr. 3). Příprava ploten: Do známého objemu roztaveného MPA a vytemperovaného na max. 55 °C přidat vámi vypočítané množství zásobního roztoku streptomycinu tak, aby bylo dosaženo požadované výsledné koncentrace.

Obr. 3.



Třetí den.

Z výsledků stanovit nejvyšší koncentraci, ke které je kmen rezistentní a určit frekvenci mutací k jednotlivým koncentracím streptomycinu.

Výpočet frekvence mutant: $F = \text{titr mutant} / \text{titr buněk}$

Vypracovat protokol a odevzdat vyučujícímu. Protokol bude obsahovat: Název úlohy; Objekt; Princip metody stručně; Výsledky (titry buněk, titr mutant...Závěr (hodnocení a diskuze o výsledcích).

3. úloha. Flukтуаční test na rezistenci ke streptomycinu a stanovení mutační rychlosti

Flukтуаční test slouží k tomu, abychom bezpečně rozlišili, zda pod vlivem vnějších změněných podmínek došlo k fyziologické adaptaci nebo zda nová vlastnost buněk je výsledkem spontánní mutace. Necháme-li růst paralelně v několika zkumavkách stejné množství inokula bakteriálního kmene např. citlivého ke streptomycinu po několik buněčných generací a pak vysejeme na plotny se streptomycinem, dostaneme výsledky:

a) šlo-li o fyziologickou adaptaci (která je možná až ve styku s faktorem, který ji vyvolává) pak se výskyt rezistentních kolonií na jednotlivých plotnách řídí Poissonovou distribucí a $s^2 \cong x$ a $\chi^2 < \chi^2_{\text{teor.}}$

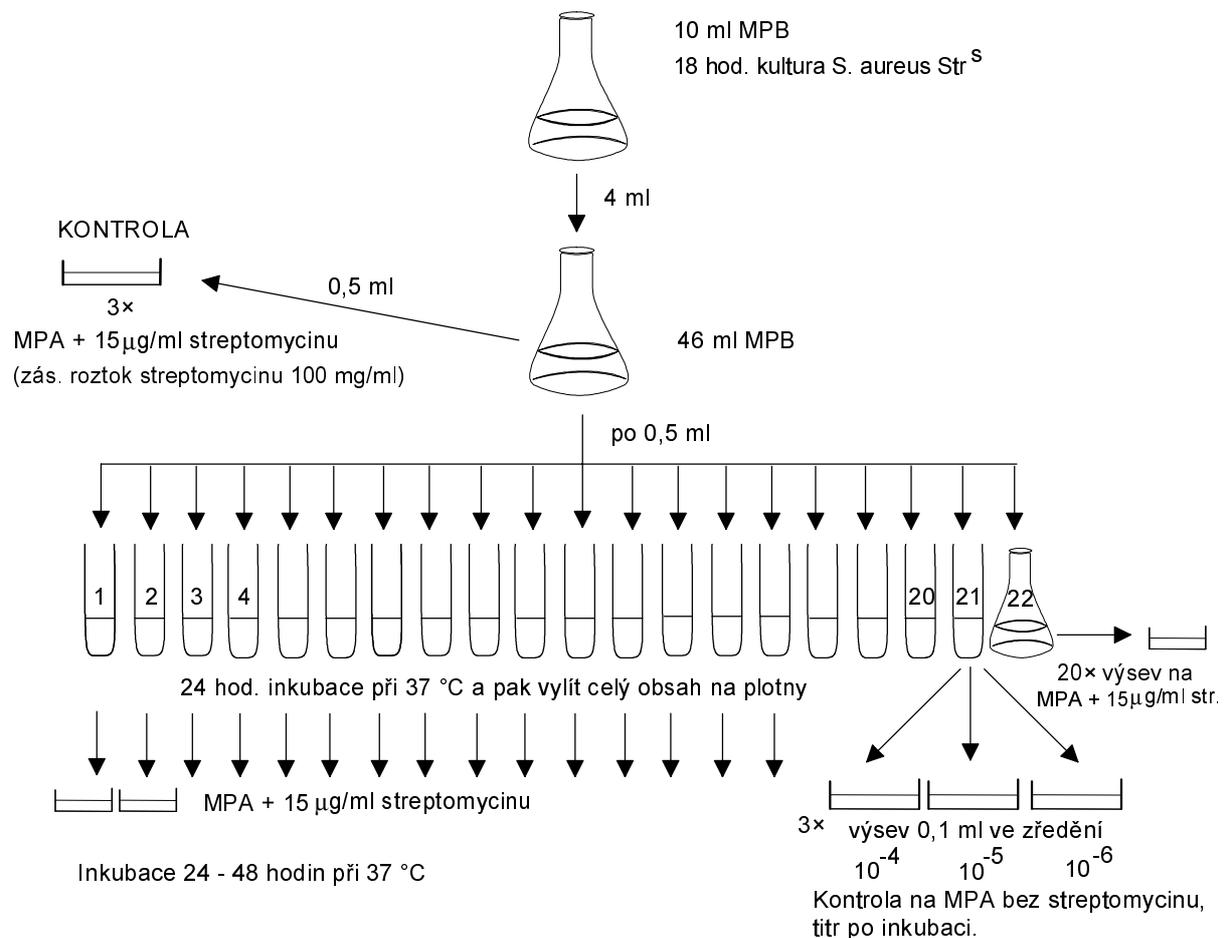
b) šlo-li o spontánní mutace (které vznikaly i v době mimo styk se streptomycinem) pak se výskyt rezistentních kolonií neřídí Poissonovou distribucí, z čehož plyne $s^2 \gg x$ a $\chi^2 > \chi^2_{\text{teor.}}$

Mutační rychlost udává pravděpodobnost, že buňka bude za určitou dobu v určitém znaku mutovat. Udává se např. jako pravděpodobnost na 1 buňku a 1 generaci.

Objekt: Staphylococcus aureus HS 1160 Str^s, Staphylococcus aureus 8511 Str^s, Staphylococcus aureus ISP8 Str^s

Úkol: Dokažte, zda vzniklá rezistence ke streptomycinu je výsledkem spontánní mutace nebo fyziologické adaptace. V případě, že se jedná o spontánní mutaci, stanovte mutační rychlost.

Schema postupu:



4. úloha. Konjugace kmenů Escherichia coli Hfr a F⁻

Konjugace je proces, při kterém je DNA přenášena z donorové buňky do recipientní v důsledku kontaktu buněk a vytvoření konjugačního můstku. Uskutečnění konjugace lze dokázat vznikem rekombinantů, které nemohly vzniknout jinak, než rekombinací mezi genomem donorového a recipientního kmene. Konjugace u E. coli je závislá na přítomnosti a stavu F faktoru. F je plazmid (94,5 kb), který se může autonomně replikovat v buňce nebo integrovat do hostitelského chromozómu. Podle stavu F faktoru se označují příslušné kmeny:

Označení	Stav F faktoru	Vlastnosti
F ⁻	F faktor není přítomen v buňce	Vhodný recipient během konjugace.
F ⁺	F faktor je přítomen v cytoplazmě	Může být přenášen konjugací do recipientní buňky; přenos chromozomálních genů může zprostředkovat při velmi nízké frekvenci.
F'	F faktor nese segment bakteriálního chromozómu	Může být přenášen spolu s asociovaným bakteriálním segmentem chromozómu; může zprostředkovat přenos chromozomálních genů při střední frekvenci v důsledku integrace do chromozómu v homologických oblastech
Hfr	F faktor je integrován do bakteriálního chromozómu	Může přenášet chromozomální znaky při vysoké frekvenci (od pevného bodu na chromozómu, který je charakteristický pro každý Hfr)

Objekt:

Donor: Escherichia coli HfrH Reich tre⁺ leu⁺ pro⁺ ade⁺ thi⁻ str^s

Recipient: Escherichia coli F⁻ 28R801 tre⁻ leu⁻ pro⁻ ade⁻ thi⁻ str^r

Do recipientních buněk přechází segment tre⁺ leu⁺ pro⁺ ade⁺ thi⁻.
Marker str zůstává v endogenotu.

Postup:

1. Příprava mladých kultur donorového a recipientního kmene: Naočkovat 1 kličku do 20 ml PNS média a inkubovat při 37 °C 18 hodin (do log. fáze růstu).
2. Smíchat kultury donorového a recipientního kmene v poměru 1 : 1 (5 ml + 5 ml) a inkubovat za aerace (při šetrném míchání na vodní lázni) při teplotě 37 °C 3 hodiny.
3. Současně stanovit titr donorového kmene HfrH rozsevem na plotny MPA ve zředění 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, vždy po 3 plotnách.
4. Přesvědčit se, že ani kmen HfrH ani F⁻ nerostou na selektivní půdě. Kontrolu provést výsevem po 0,1 ml kultury zředěné 10⁻¹ na 3 plotny MA + streptomycin 100 µg/ml + thiamin 5 µg/ml. Ředění provádět ve fyziologickém roztoku!
5. Po 3 hodinách inkubace vyšetřit neředěnou směs na selektivní půdu po 0,1 a 0,2 ml (vždy po 3 plotnách).
6. Hodnocení pokusu: vyjádřit frekvenci rekombinantů na počet buněk Hfr.

Živné půdy:

PNS bujón	půda pro konjugaci	
	glukóza	1 g
	Bacto beef extract	1,5 g
	Yeast extrakt	1,5 g
	pepton	5 g
	NaCl	3,5 g
	K ₂ HPO ₄	3,68 g
	KH ₂ PO ₄	1,32 g
	H ₂ O dest.	1000 ml
		pH 7,2 (upravit 10M NaOH)
	autoklávovat 20 min. /121 °C	

MPA masopeptonový agar (kompletní půda)

MA minimální agar:

složka A 1,5% vodní agar, pH 7,2

složka B (4× koncentrovaný roztok solí)

NH ₄ Cl	20 g
NH ₄ NO ₃	4 g
Na ₂ SO ₄	8 g
K ₂ HPO ₄	12 g
KH ₂ PO ₄	4 g
H ₂ O dest.	1000 ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,6 ml z 1M zásobního roztoku sterilně přidat po autoklávování

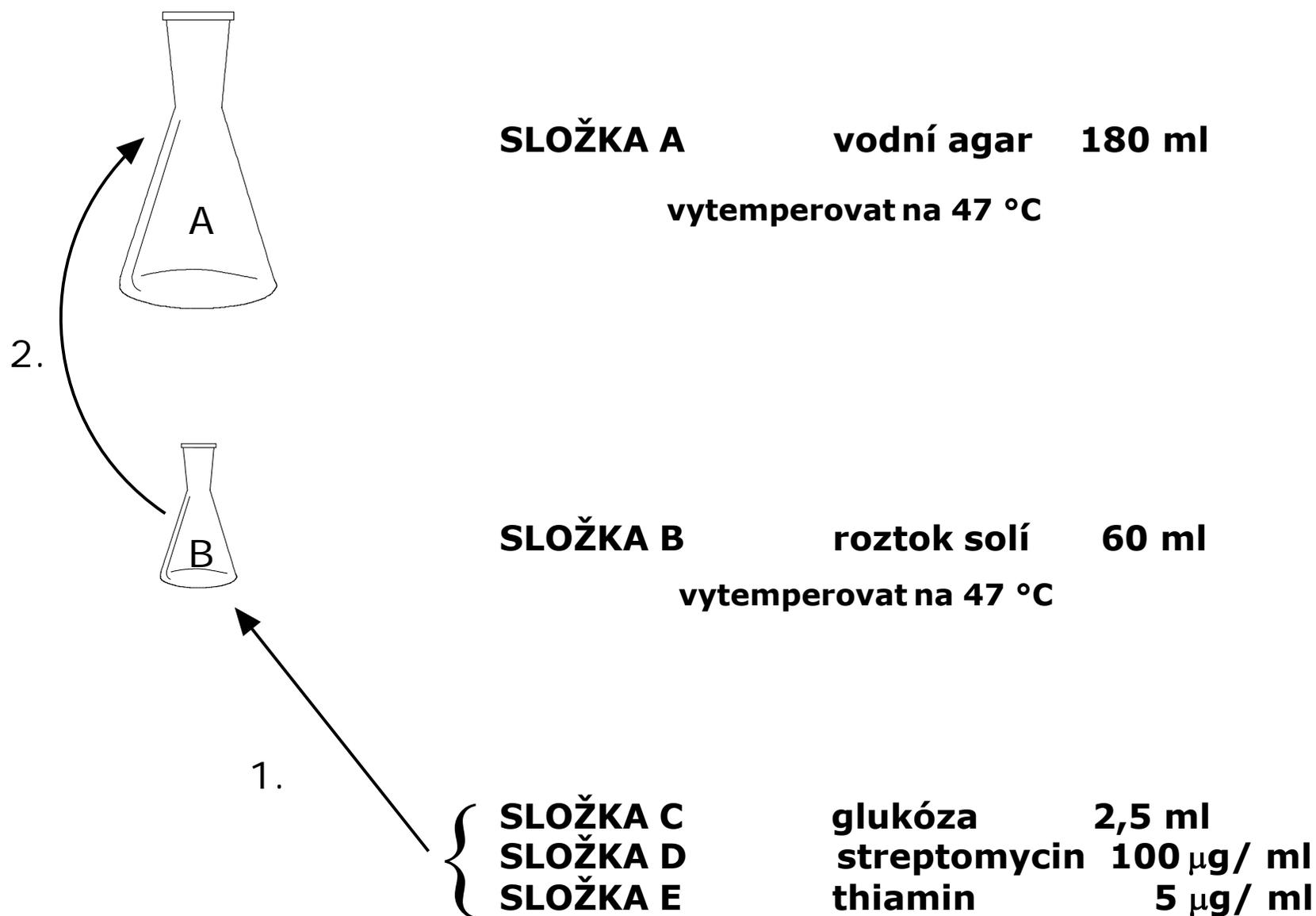
složka C 20% glukóza - přidat 1ml na 100 ml MA

složka D streptomycin - přidat do konečné koncentrace 100 µg/ml ze zásobního roztoku 100 mg/ml

složka E thiamin přidat do konečné koncentrace 5 µg/ml ze zásobního roztoku 50 mg/ml

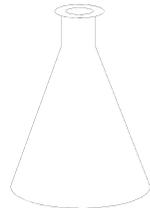
Při přípravě MA smíchat složky B (1 díl) + C + D + E, vytemperovat na 45 °C a smíchat se složkou A (3 díly).

Příprava minimálního agaru na konjugaci



KONJUGACE

Kontrola na MA + str + thi
10⁻¹ ředit ve fyziol. rozt.
1 plotna (0,1 ml)



E. coli HfrH Reich



E. coli F- 28R801

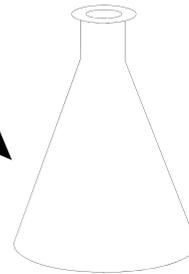
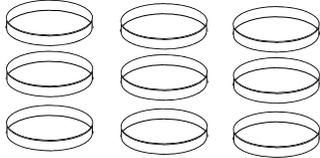
Kontrola na MA + str + thi
10⁻¹ ředit ve fyziol. rozt.
1 plotna (0,1 ml)



5 ml

5 ml

Titr na LBA₋₇
10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷
po 3 plotnách (po 0,1 ml)



KONJUGACE
37 °C / 3 hod / šetrně třepat

Výsev na MA + str + thi
neředěné
3 plotny (0,1 ml) + 3 plotny (0,2 ml)

