

Jméno: Charvátová Lucie, Ihnátová Markéta, Souralová Tereza

Datum: 4. 10. 2016

PROTOKOL Č. 4

Název úlohy: Konjugace kmenů *Escherichia coli* Hfr a F⁻

Studovaný předmět: *Escherichia coli* HfrH Reich (donor), *Escherichia coli* F⁻ 28R801 (recipient)

Materiál: PNS bujón, MPA, MA (koncentrovaný roztok solí, 20% glukóza, streptomycin, thiamin)

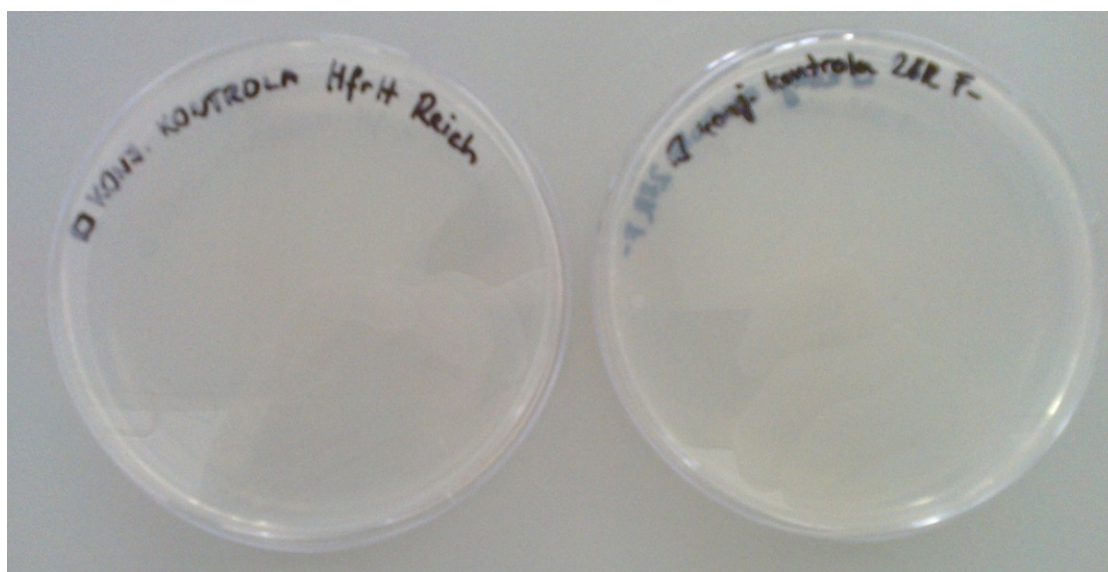
Princip metody:

Po kontaktu dvou buněk a vytvoření konjugačního můstku může být mezi těmito buňkami přenesena DNA (z donorové buňky do recipientní). V důsledku toho vznikají rekombinanty s novými vlastnostmi.

V našem pokusu jsme smíchaly kulturu donorového a recipientního kmene a následně nechaly inkubovat. Během této inkubace jsme založily misky ke stanovení titru donorového kmene (k vyjádření frekvence rekombinantů) a jiné misky ke zjištění, zda ani jeden z použitých kmenů neroste na selektivní půdě.

Výsledkem pokusu je tedy zjištění frekvence rekombinant, které narostly na selektivní půdě, na které by nemohl růst ani donorový ani recipientní kmen.

Fotografie:



Obr. 1: Kontrolní misky (ověření, že ani jeden kmen neroste na selektivní půdě)

Výpočty:

Množství složek C, D a E přidaných k MA:

Složka A (vodní agar)... 180 ml

Složka B (roztok solí)... 60 ml

Složka C (glukóza)... 2,5 ml -> glukózy se přidávalo 1 ml do 100 ml MA -> přidali jsme 2,5 ml glukózy, z toho lze odvodit, že počítáme s celkovým objemem směsi 250 ml

Složka D (streptomycin) ... přidat do konečné koncentrace 100 µg/ml, přičemž zásobní roztok má koncentraci 100 mg/ml -> naředit 1000x -> do objemu 250 ml přidáme 250 µl zásobního roztoku streptomycinu

Složka E (thiamin) ... přidat do konečné koncentrace 5 µg/ml, přičemž zásobní roztok má koncentraci 50 mg/ml -> naředit 10 000x -> do objemu 250 ml přidáme 25 µl zásobního roztoku thiaminu

Titration donorového kmene Hfr:

hodnoty stanoveny z ředění 10^{-5} :

$$(112+94+116)/3 = 107,33 \cdot 10^5 \text{ CFU}/100 \mu\text{l} = 1073,3 \cdot 10^5 \text{ CFU}/\text{ml} = 1,07 \cdot 10^8 \text{ CFU}/\text{ml}$$

Počet konjugantů:

1) Na miskách, kde jsme pipetovali 0,1 ml -> 5, 7, 15
 $(5+7+15)/3 = 27 \text{ konjugantů}/100 \mu\text{l} = 270 \text{ konjugantů}/\text{ml}$

2) Na miskách, kde jsme pipetovali 0,2 ml -> 36, 40, 31
 $(36+40+31)/3 = 35,6 \text{ konjugantů}/200 \mu\text{l} = 178,3 \text{ konjugantů}/\text{ml}$

Frekvence rekombinantů: počet konjugantů/titr donorového kmene Hfr

$$178,3 \text{ konjugantů}/1,07 \cdot 10^8 \text{ CFU} = 166,6 \cdot 10^{-8} = 1,6 \cdot 10^{-6}$$

Diskuse a závěr:

Potvrdily jsme, že podle očekávání ani jeden z používaných kmenů neroste na selektivní půdě. Kmen *Escherichia coli* HfrH Reich, tedy náš donor, je senzitivní ke streptomycinu a proto neroste na půdě s obsahem tohoto antibiotika. Kmen *Escherichia coli* F⁻ 28R801, náš recipient, na této půdě rovněž neroste, neboť tento kmen je deficientní v genech pro syntézu základních aminokyselin, a proto není schopen růst na minimálním agaru bez přídavku těchto aminokyselin.

V samotném provedení konjugace jsme byly úspěšné - frekvence vzniklých rekombinantů činila $1,6 \cdot 10^{-6}$. Pokud bychom tuto frekvenci měly srovnat s transdukcí menšího plazmidu (pT181), který byl přenášen s frekvencí v řádu 10^{-5} , pak je to méně úspěšný proces. Transdukce většího plazmidu (pHOUMR-like) však probíhala s frekvencí v řádu 10^{-8} , což činí naopak konjugaci více úspěšnou.