

# Rozložení skupin

- Skupina A – kmen *Staphylococcus aureus* ISP8-4F\_A + kontrolní kmeny na test citlivosti k STR

- Skupina B – kmen *Staphylococcus aureus* ISP8-4F\_B + kontrolní kmeny na test citlivosti k STR

- Skupina C – kmen *Staphylococcus aureus*STR8511 + kontrolní kmeny na test citlivosti k

## Dobře popisovat misky k rozlišení skupin

1. 24.9. – zahájení pokusu, příprava gradientních ploten (GrPL), očkování kultur, stanovení titru buněk a test na citlivost kmenů na STRE
2. 26.9. – vyhodnocení GrPL, CPM a testu citlivosti
3. 1. 10. – čárkování „mutant“ na plotny se STRE
4. 3. 10. – závěrečné vyhodnocení úlohy I.
5. Ve skupině rozdělit dílčí úkoly pro aktivitu každého člena skupiny
6. Hodnocení experimentů fotograficky, misky s gradienty po kultivaci i testy citlivosti stejně
7. Protokoly v pdf za skupinu s bohatou diskuzí výsledků elektronicky poslat na: [vladkar@sci.muni.cz](mailto:vladkar@sci.muni.cz).

## **Úloha:** Izolace spontánních mutant rezistentních ke streptomycinu metodou gradientních ploten

### **Teoretický úvod:**

- **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. Takto se vytváří rezistence k tetracyklinu.
- **Upozornění:** očkování provádět ve sterilním prostředí flow-boxu; použitý materiál pečlivě **roztřídit** a odnést do umývárny.

## **Objekt:** Kmeny *Staphylococcus aureus* citlivé ke streptomycinu

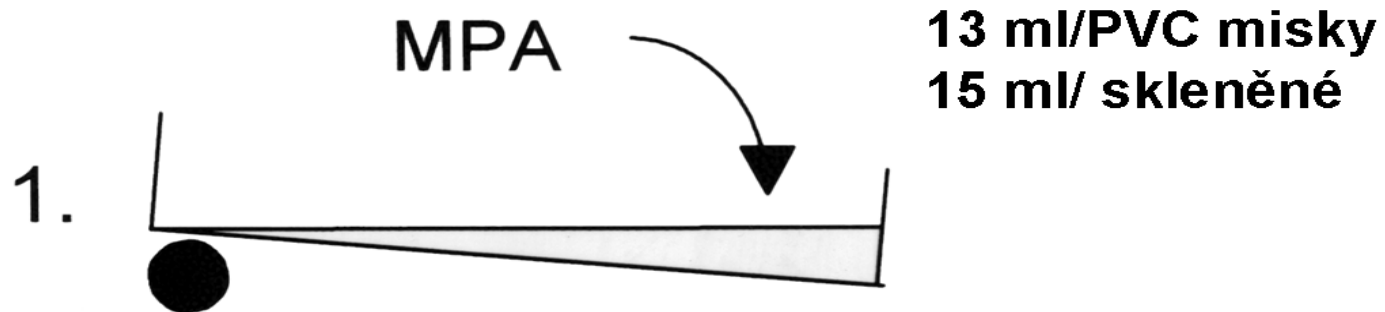
### **Postup:**

#### ***První den.***

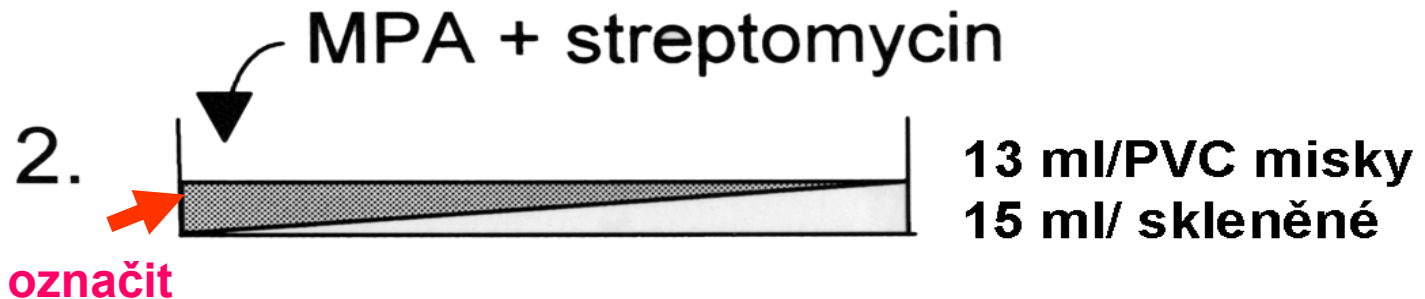
- Z 18 hod. kultury vyrostlé na MPA agaru, odebrat 5 i více plných kliček a resuspendovat ve 3 ml MPB. Je nutno vyjít z husté bakteriální suspenze (cca  $10^9$  buněk/ml), protože frekvence STRE-R mutant je velmi nízká.
- Z takto připravené husté kultury provést rozsev ze zředění  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  vždy na 3 plotny, pro stanovení celkového počtu buněk v  $\text{cm}^3$  (tj. titr buněk). Kultivace při  $37^\circ\text{C}/20$  hod.
- Připravit gradientní plotny se streptomycinem o výsledných koncentracích: 10, 50, 100 a 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Obr. 1). **Pozor! Musí být celá plocha zalita rovně!**
- Pro přípravu zásobního roztoku rozpustit 0,4 g krystalického streptomycinu v 4 ml sterilní destilované vody. Získá se koncentrát ATB a ten se pak ředí dle účelu. (ATB přidávat do roztavené MPA půdy o teplotě max  $55^\circ\text{C}$ ).
- Provést rozsevy po 0,1 ml na gradientní plotny (vždy 2 plotny od příslušné koncentrace) a pečlivě rozetřít hokejkou po celé ploše (Obr. 2).
- Naočkované plotny inkubovat dnem vzhůru při  $37^\circ\text{C}$  /24 hod (dle potřeby prodloužit čas).

Obr. 1.

## Příprava gradientních ploten

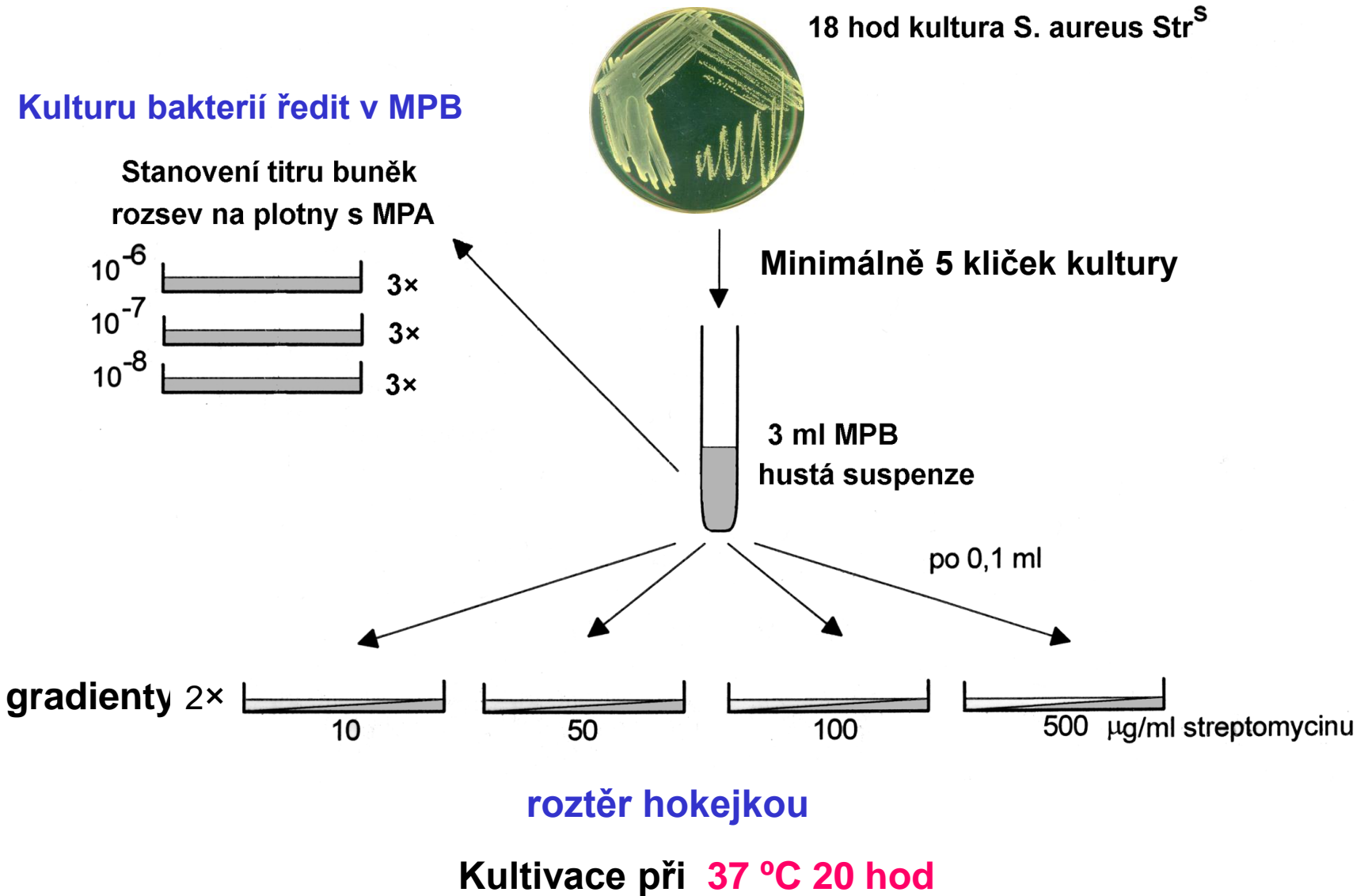


MPA nechat ztuhnout při laboratorní teplotě

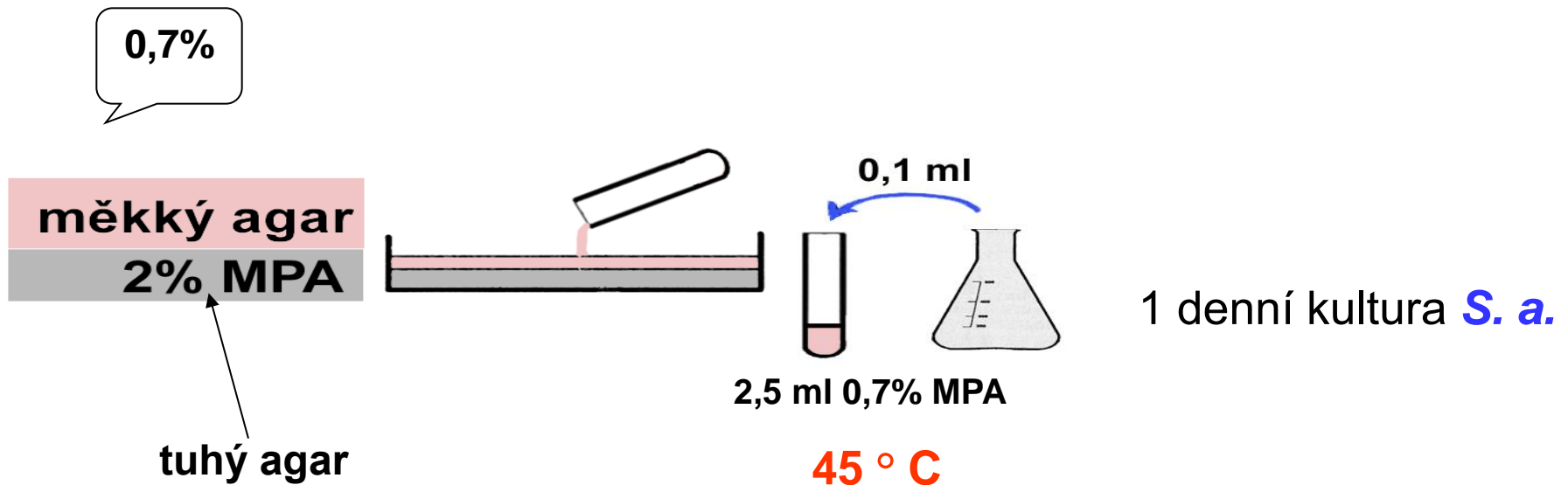


ATB přidat do roztaveného MPA max. 55 °C

## Obr. 2. Izolace mutant z gradientních ploten



# Test citlivosti kmene *S. aureus* k STRE – příprava ploten

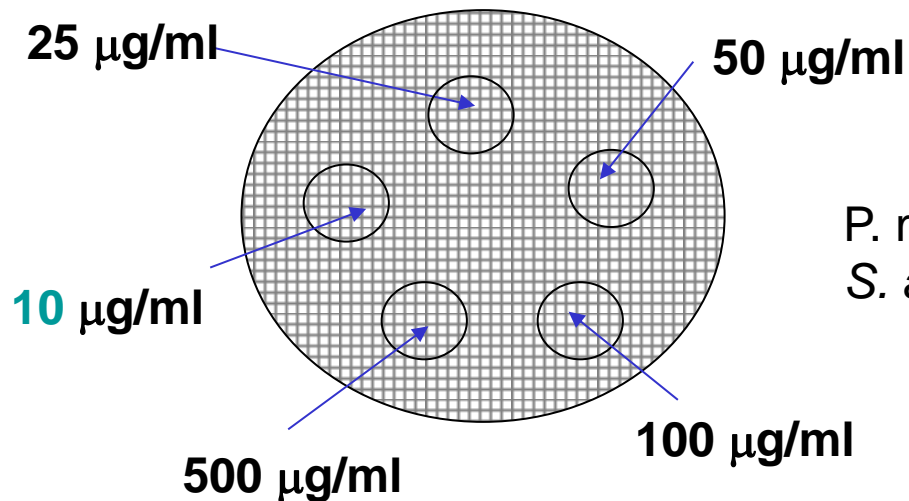


## Kontrolní kmeny:

Citlivý: *Staphylococcus nepalensis* CCM7045

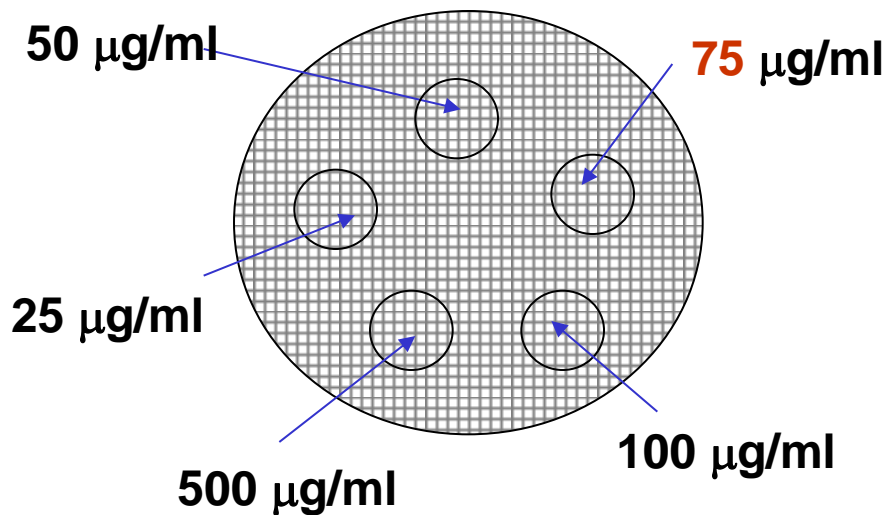
Rezistentní: *Staphylococcus aureus* MRSA E9

# Test citlivosti *S. aureus* ke STRE



P. miska s MPA + inokulum  
*S. aureus* naočkované přes 0,7% MPA.

**Nakápnout ATB na misky**



**Inkubace při 37°C/ 20 hod.**

Hodnocení citlivosti kultury k ATB  
Vyfotit do protokolu !!!!

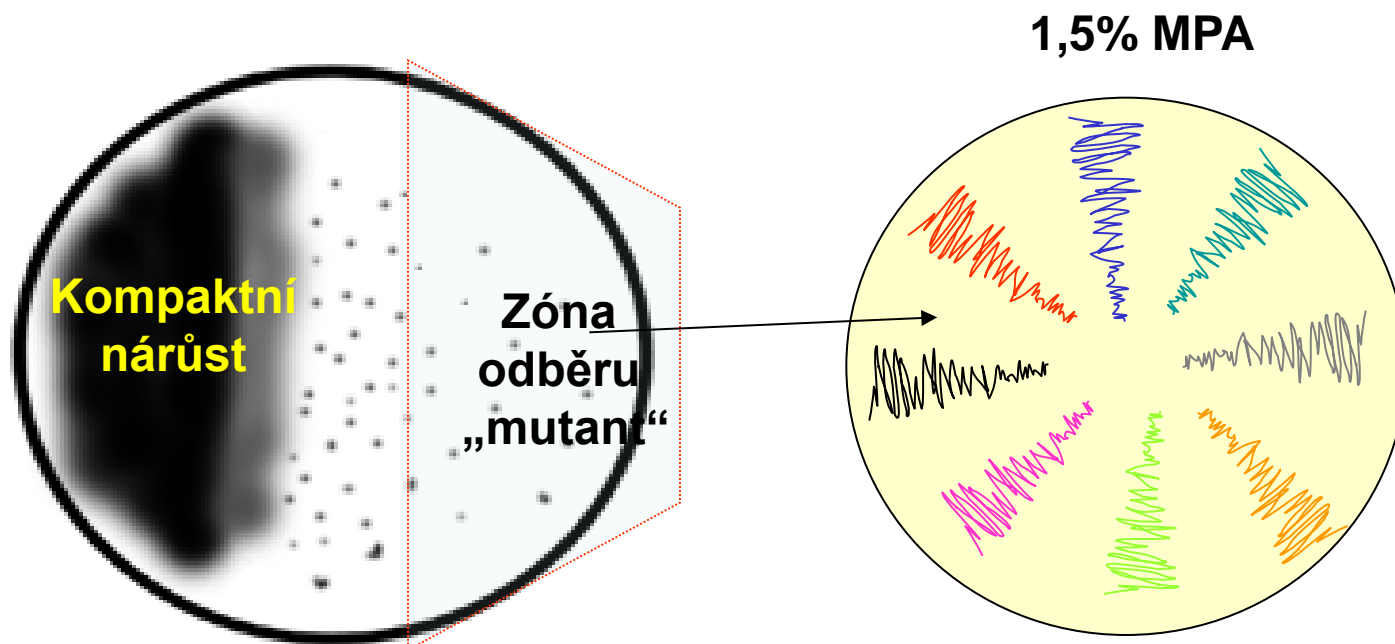
## Pokračování experimentu izolace spontánních mutant

**Příprava ploten na proužkování (připravit čerstvé plotny, ATB se rozkládá při delší úchově).**

- Do známého objemu roztaveného a vytemperovaného MPA na max. 55 °C přidat Vámi vypočítané množství zásobního roztoku streptomycinu tak, aby bylo dosaženo požadované výsledné koncentrace (Obr. 3).
- Jednotlivé kolonie mutant 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 (Obr. 4).

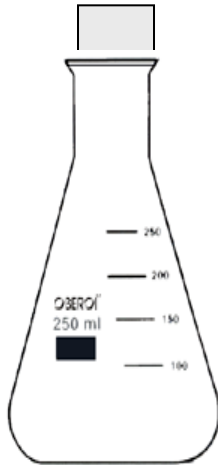


**Pokračování pokusu - Varianta B) izolace mutant přes pasáž**  
provést odběr 10 kolonií mutant a přeočkovat je na MPA-plotny

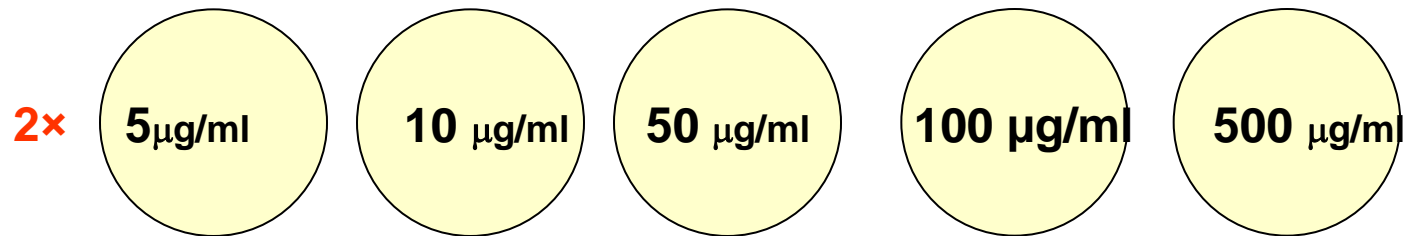
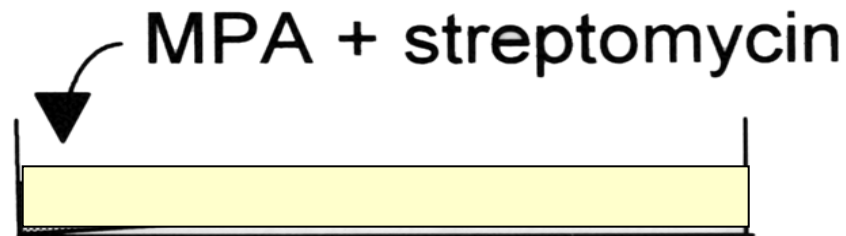


**Kultivovat při 37 °C 24 hod** a poté uložit do **chladu**  
pokud se nedá pokračovat v pokuse.

### Obr. 3. Příprava ploten na proužkování

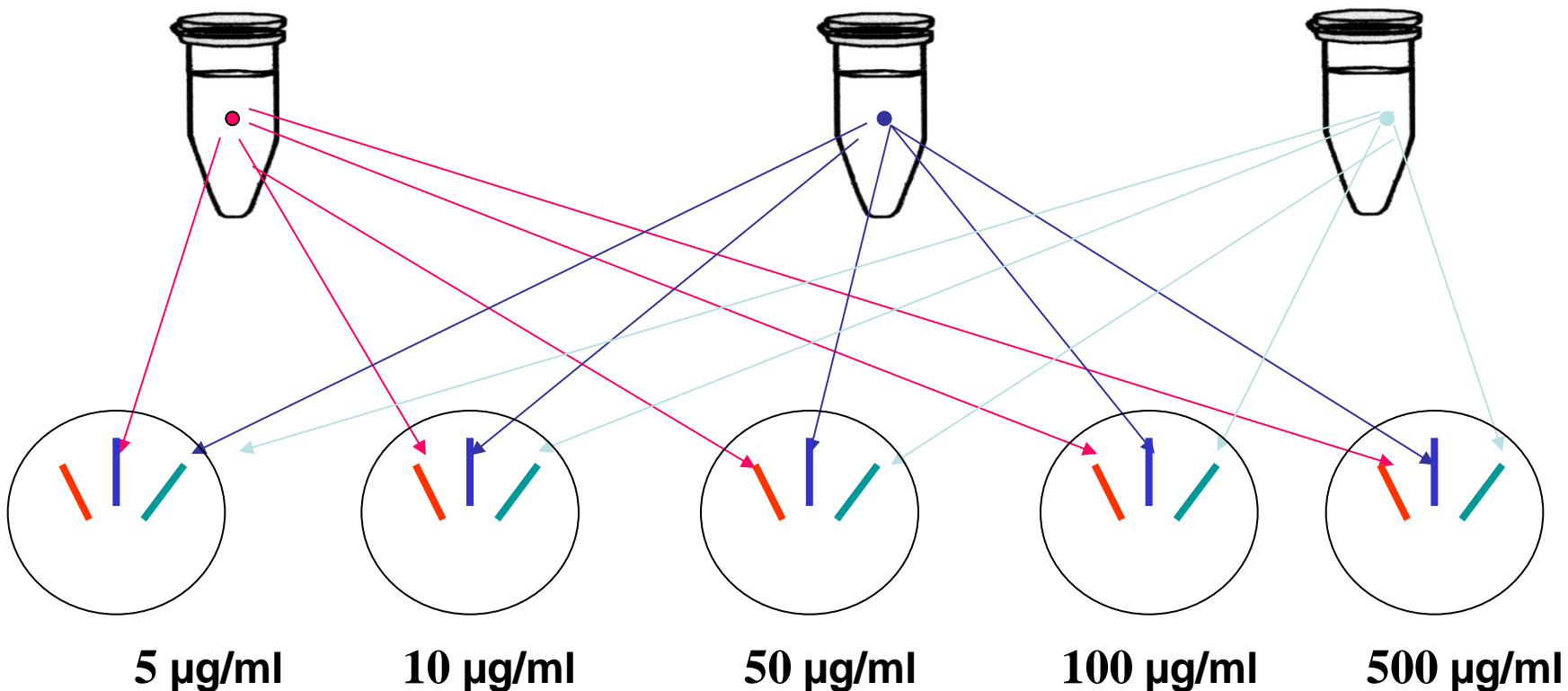


Baňka obsahující rozvařený 1,5% MPA, vytemperovaný na **max. 55 °C**. Přidat ze zásobního roztoku STRE na výslednou koncentraci, zamíchat a rozlít na Petriho misky.



Po utuhnutí, označit koncentraci STRE a uložit do lednice

Obr. 4. Ověření spontánních mutant proužkováním ze suspenze v MPB



**Na každou miskou přidat 1 proužek kontrol. citl. a rezistentního kmene**

Inkubace při 37 °C po 20 hod

# Hodnocení pokusu

- Z výsledků stanovit nejvyšší koncentraci, ke které je kmen rezistentní a určit mutační index (frekvence mutace) u jednotlivých koncentrací streptomycinu.
- Výpočet mutačního indexu:

$$F_{\text{konc.ATB}} = \text{titr mutant}_{\text{konc.ATB}} : \text{titr buněk}$$

- Vypracovat protokol (za skupinu):
  - standardní členění:*
  - úvod, princip metody, materiál
  - výsledky doplnit fotodokumentací
  - diskuze a závěr

Protokol ve formě pdf poslat na adresu: [vladkar@sci.muni.cz](mailto:vladkar@sci.muni.cz)

# Míchání ATB

