

# MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT - cvičení

podzim 2017

**Konjugace, Transdukce, PFGE – vyhodnocení  
Izolace plazmidové DNA a bakteriální RNA**

Ivana Mašlaňová

*iva.maslanova@gmail.com*

# Konjugace, Transdukce – vyhodnocení

## A. Transdukce

- vyhodnotit titr transdukujícího fága  $\phi$ JB (PFU/ml)
- stanovit titr recipientního kmene RN4220 (CFU/ml)
- vypočítat multiplicitu infekce ze stanovených titrů
- spočítat a vyhodnotit transdukce (selekce na Cd a na Tet)
- vypočítat frekvence transdukce:

**$A = Y/p$  ; Y- počet transduktant na 1 ml transdukční směsi, p – PFU/ml**

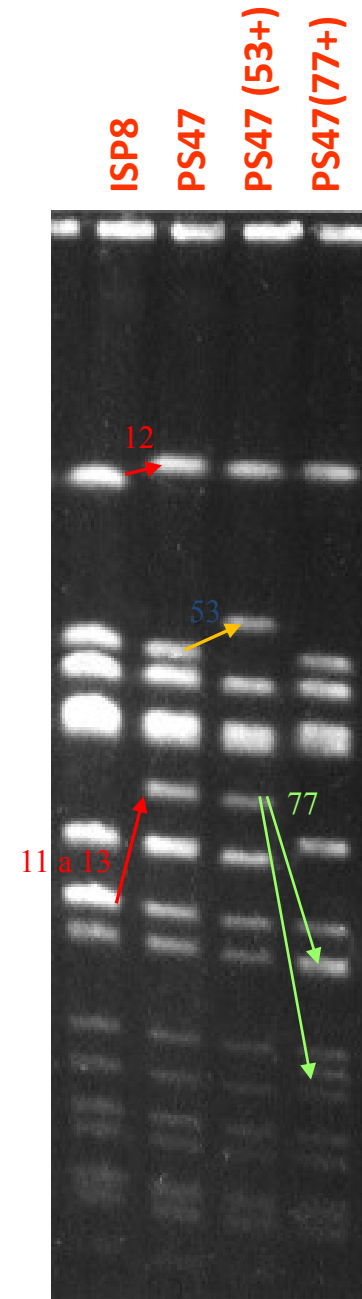
**Porovnat frekvence transdukce „tetracyklinového“ plazmidu a „kadmiového“ plazmidu.**

## B. Konjugace

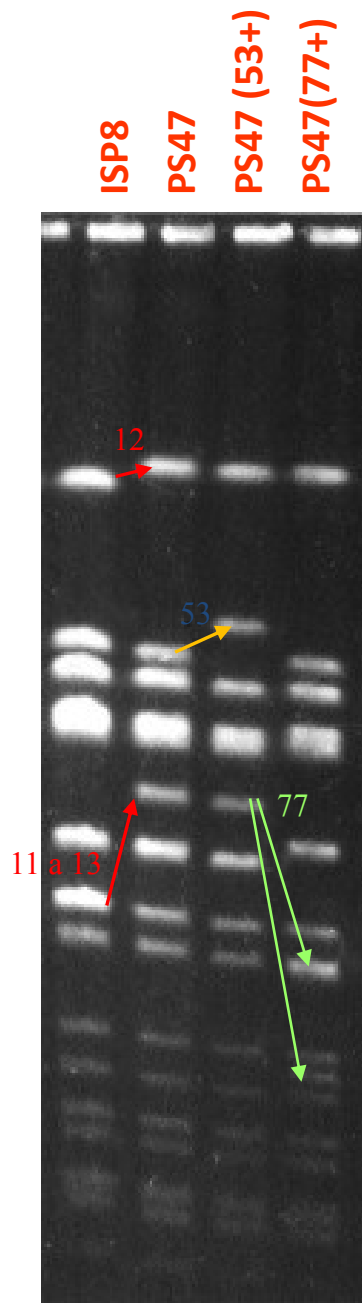
- spočítat počet konjugant vyrostlých na miskách,
- vypočítat frekvenci vzniku rekombinant (poměr konjugant/ počet Hfr buněk)

# Kmeny *Staphylococcus aureus*

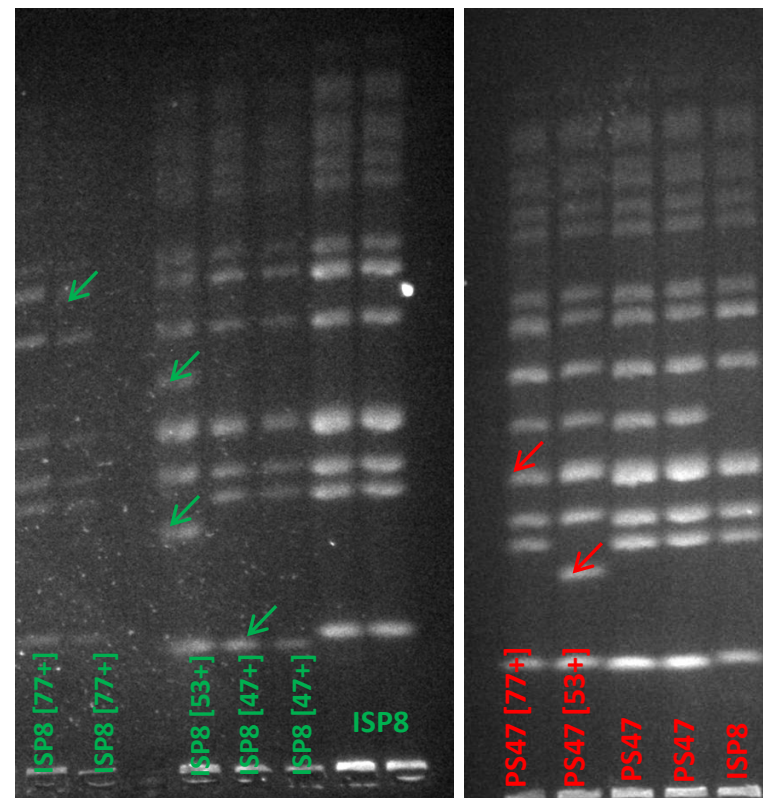
- ISP8 – bezprofágový kmen odvozený z PS47
- ISP8 (47+) – profág začleňující se do prvního fragmentu v makrorestrikčním spektru
- ISP8 (53+) – profág začleňující se do druhého fragmentu v makrorestrikčním spektru
- ISP8 (77+) – profág se *Sma*I místem v genomu začleňující se do pátého fragmentu v makrorestrikčním spektru
- ISP8 (11+) – profág začleňující se do šestého fragmentu v makrorestrikčním spektru
- PS47- tři profágy v genomu  $\phi$ 11,  $\phi$ 12 a  $\phi$ 13
- PS47 (77+) – čtyři profágy
- PS47 (53+) – čtyři profágy



# PFGE– vyhodnocení



- ISP8 – bezprofágový kmen odvozený z PS47
- ISP8 (47+) – profág začleňující se do prvního fragmentu v makrorestrikčním spektru
- ISP8 (53+) – profág začleňující se do druhého fragmentu v makrorestrikčním spektru
- ISP8 (77+) – profág se *Sma*I místem v genomu začleňující se do pátého fragmentu v makrorestrikčním spektru
- ISP8 (11+) – profág začleňující se do šestého fragmentu v makrorestrikčním spektru
- PS47- tři profágy v genomu  $\phi$ 11,  $\phi$ 12 a  $\phi$ 13
- PS47 (77+) – čtyři profágy
- PS47 (53+) – čtyři profágy



Typ genetické změny	Původní počet fragmentů	Výsledek v PFGE ve vztahu k standardnímu kmeni	Výsledný počet fragmentů
Bodová mutace tvorba RE-místa	5	Ztráta 1 fragm. standardního kmene, vznik 2 menších fragm. (suma velikostí se rovná velikosti fragm. st. kmene) 3 rozdíly ve fragmentech	6
Bodová mutace ztráta RE-místa	5	Vznik nového většího fragm., nepřítomného u st. kmene a ztráta 2 malých fragm. 3 rozdíly ve fragmentech	4
Inzerce fragm. DNA bez RE-místa	5	Počet fragm. stejný, vznik většího fragm. 2 rozdíly ve fragmentech	5
Delece fragm. bez RE-místa	5	Počet fragm. stejný, vznik menšího fragm. 2 rozdíly ve fragmentech	5

PS47

1.ISP8(53+)

2.ISP8

3.ISP8(77+)

4.ISP8(47+)

5.PS47(77+)

6.PS47

7.PS47(53+)

8.ISP8(11+)

9.ISP8

10.PS47

11.ISP8(53+)

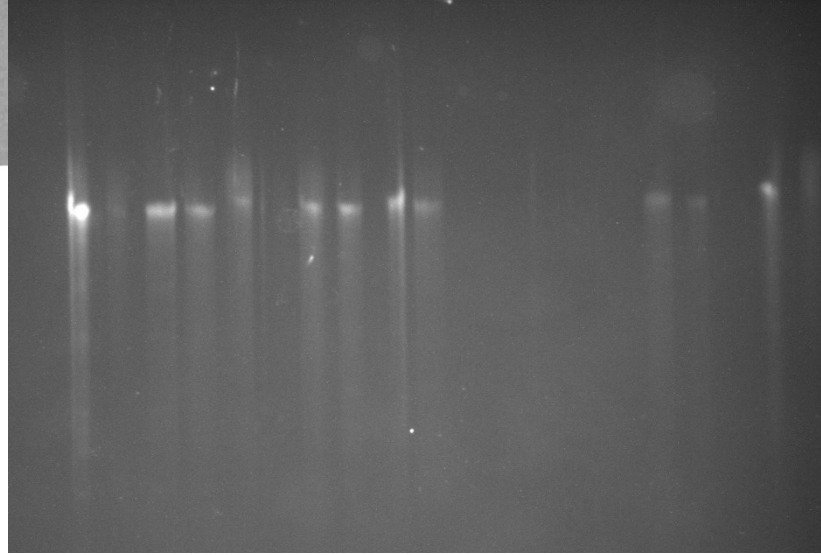
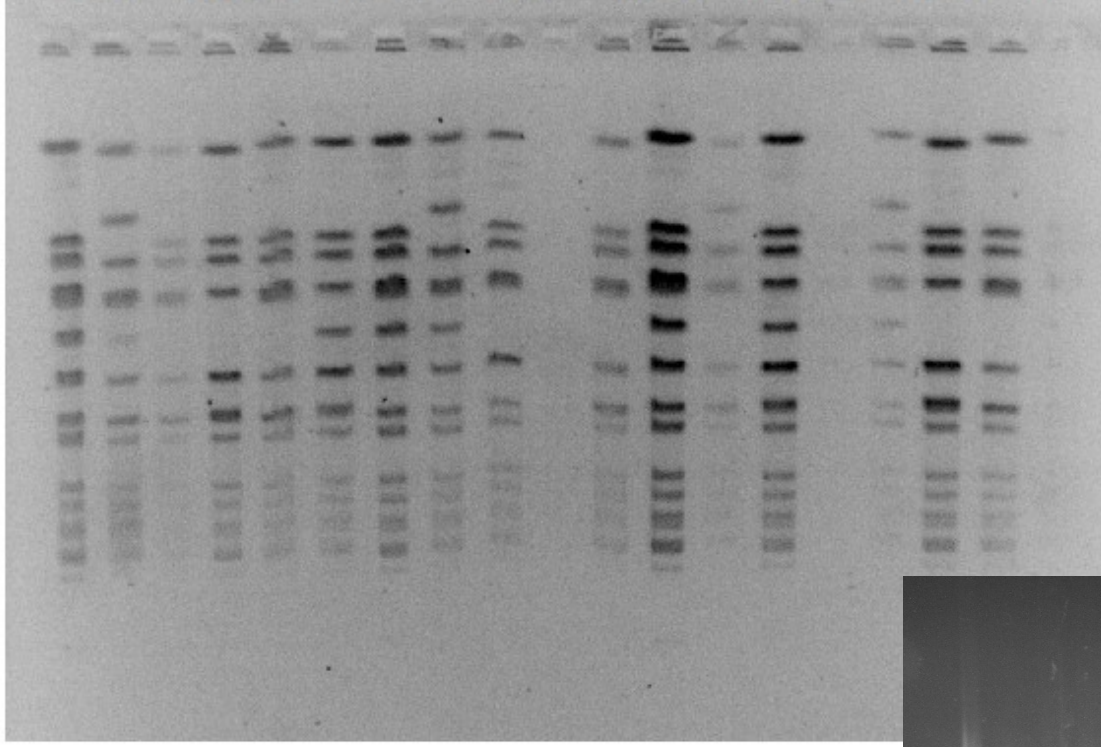
12.PS47(77+)

13.ISP8(11+)

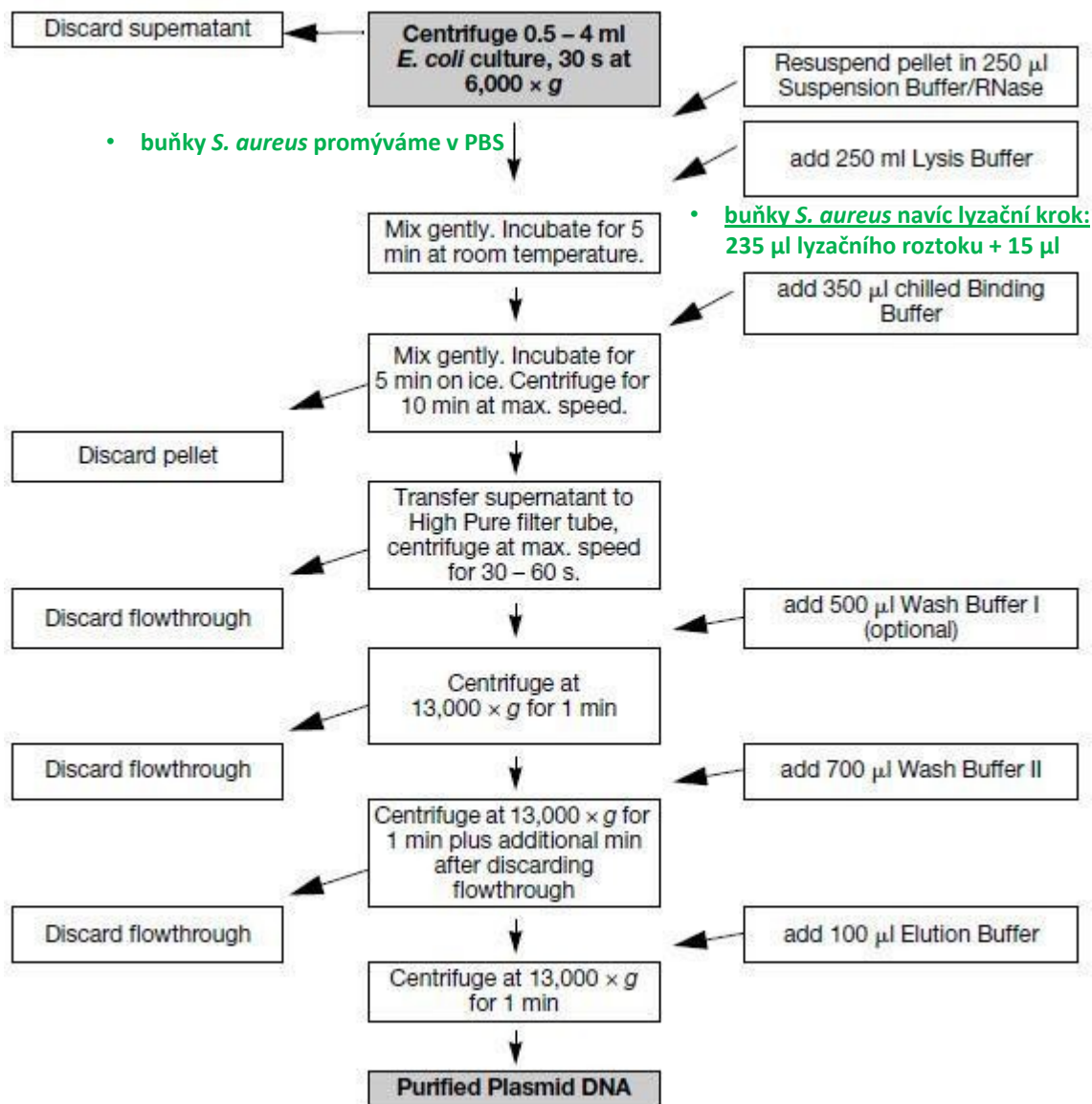
14.PS47(53+)

15.ISP8(77+)

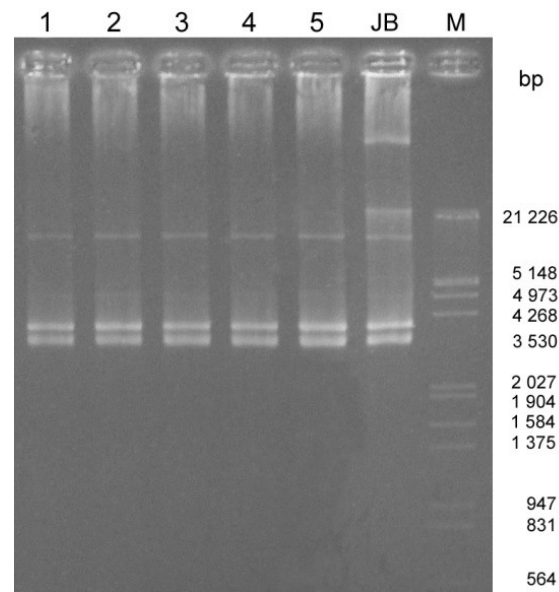
16.ISP8(47+)



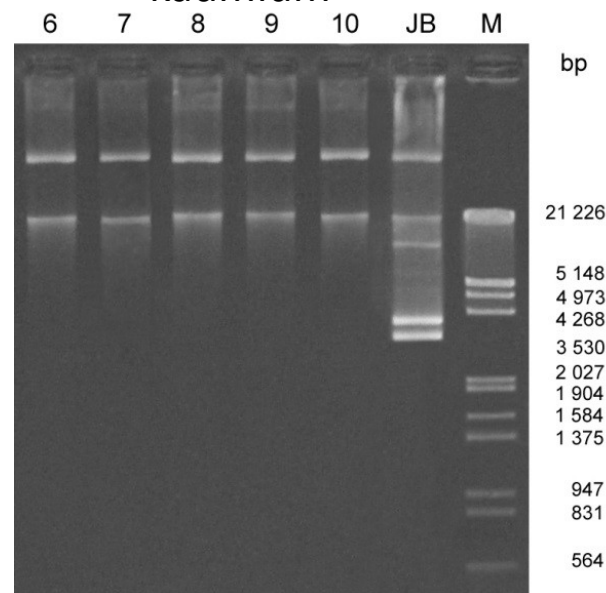
# Izolace plazmidové DNA



## tetracyklin



## kadmium



## Elektroforetická mobilita od nejnižší po nejvyšší:

- **Štěpená, otevřená cirkulární forma (nicked):** štěpena v jednom z řetězců DNA - **NEJPOMALEJŠÍ**
- **Lineární forma (linear):** linearizovaná forma, vznik rozštěpením obou řetězců.
- **Uvolněná cirkulární forma (relax circular):** oba řetězce DNA jsou neštěpené, k relaxaci dochází enzymaticky
- **Superspiralizovaná denaturovaná forma (supercoiled denatured):** jedná se o spiralizovanou formu, která je ale méně kompaktní tím, že některé oblasti molekuly jsou nespárovány
- **Superspiralizovaná forma (supercoiled):** spiralizovaná neštěpená, kruhová molekula - **NEJRYCHLEJŠÍ**

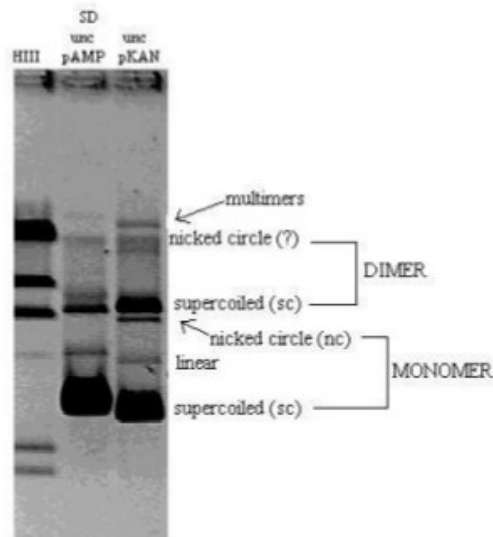
Nicked Open Circular  
(slowest)

Linear

Relaxed Circular

Supercoiled Denatured

Supercoiled (fastest)



### RŮZNÉ KONFORMACE PLASMIDŮ

Uvolněná,  
štěpená cirkulární forma



Uvolněná, kovalentně uzavřená  
cirkulární forma



Superspiralizovaná forma

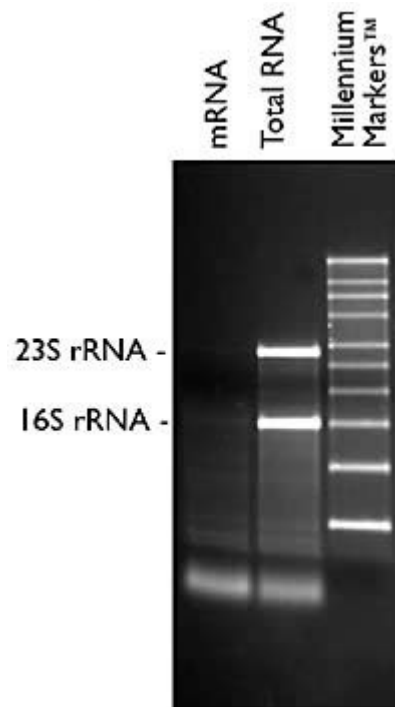
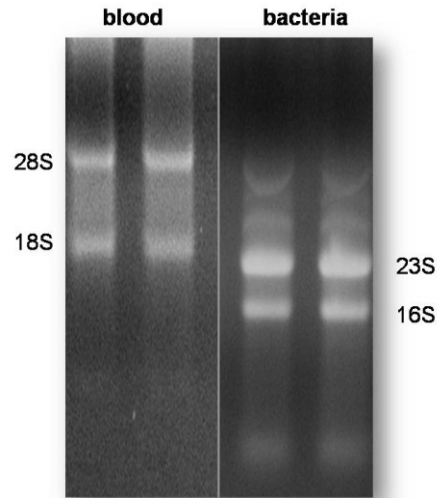
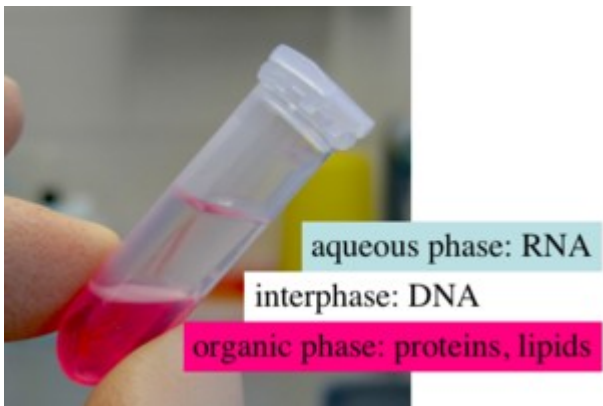


Lineární forma



# Izolace RNA

1. Trizolem
2. Fenol-chloroformem



## Zásady práce s RNA:

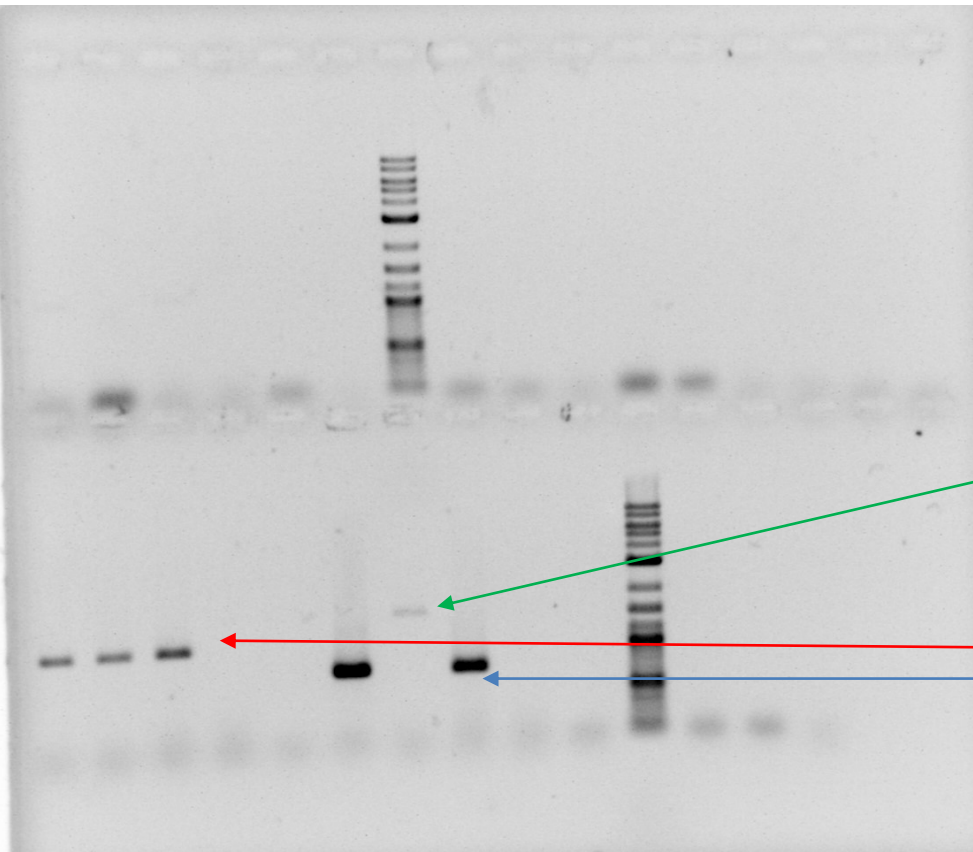
- pracujeme v rukavicích
- pracujeme v prostředí bez RNáz; inhibitory RNáz, RNáza free plastic
- sada pipet na práci s RNA, oddělené pracovní místo a ELFO pro práci s RNA
- DEPC voda ad.

## Elektroforéza RNA:

- pracujeme s reagensy „Rnase free“
- **gel složení:** 50×TAE, 60% formamid, DEPC voda, 1,2% agarózy, 1/10 EtBr
- **pufř složení:** 10×TAE
- **vzorek:** denaturace RNA 65-70 °C/15 min.



## Úloha: Endolysin - výsledky

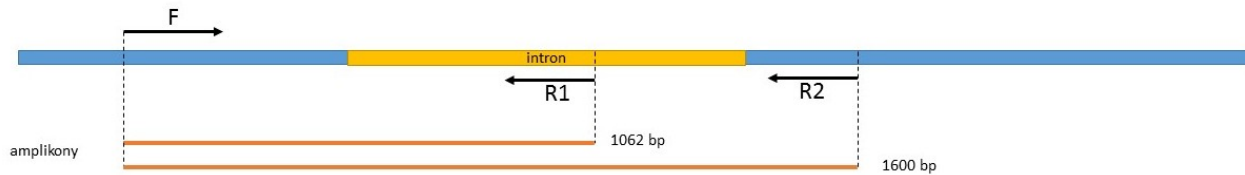


nesetřžený endolysin 1600bp F + R2

nesetřžený endolysin 1062bp F + R1

setřžený endolysin 723bp F + R2

Nesestřžená RNA



Sestřžená RNA

