

Úloha: ELEKTROPORACE TETRACYKLINOVÉHO PLAZMIDU pT181 DO RECIPIENTNÍHO KMENE *S. aureus* RN4220

(I.skupina)

Nastavení přístroje Gene Pulser Xcell: Voltáž (V)2500, Kapacitní odpor (μ F)25, Odpor (Ω)200, Kyveta (mm) 2

Pozn. Všechny média před použitím sterilizovat. Výsledná selekce transformant se provádí na 1,5% TSA agaru s příslušnou selekční látkou. Předem je nutné ověřit, na jakých minimálních koncentracích rostou buňky obsahující přenášený plazmid a zda na stejné koncentraci neroste recipientní kmen bez plazmidu.

I. Příprava stafylokokových kompetentních buněk

Výchozím materiálem je kultura recipientního kmene inkubovaná v TSB/37°C/18 h.

- 0,5 ml kultury (viz výše) přidáme do 50 ml LB a inkubujeme při 30°C do OD₆₀₀0,4 (maximálně 0,7).
- Inkubace na ledu 30 min. (*Pozn. Od tohoto kroku je důležité pracovat při teplotách kolem 4°C, tzn. udržovat na ledu a předchladit rotor v centrifuze.*)
- Centrifugace 10 min./7000 rpm/4°C.
- Vylít supernatant a resuspendovat pelet ve 40 ml 0,5M sacharózy.
- Centrifugace 10 min./8000 rpm/4°C.
- Vylít supernatant a resuspendovat pelet ve 20 ml 0,5M sacharózy.
- Centrifugace 10 min./8000 rpm/4°C.
- Vylít supernatant a resuspendovat pelet v 10 ml 0,5M sacharózy.
- Centrifugace 10 min./8000 rpm/4°C.
- Vylít supernatant a resuspendovat pelet v 250 μ l 0,5M sacharózy.
- Buňky rozdělíme po 50 μ l a skladujeme v -80°C. (*Pozn. Nejlepší je pracovat s ten den připravenými buňkami.*)

II. Elektroporace

- Připravit DNA pro elektroporaci do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek (5 ng – 2 μ g ne ve větším objemu než 20 μ l). Je možno vyzkoušet různé koncentrace/objemy elektroporované DNA (5 μ l, 10 μ l a 20 μ l).
- Rozmrazit kompetentní buňky při pokojové teplotě. Přidat 50 μ l buněk ke každému vzorku DNA, opatrně promíchat pipetou. Inkubace vzorků při pokojové teplotě/30 minut.
- Připravit pro každý vzorek 1 ml BHI média a 0,2 cm kyvety (vše při pokojové teplotě).
- Nastavení přístroje Gene Pulser Xcell:
 1. Zapnout přístroj, připojit modul pro kyvety.
 2. Otevřít „Pre-Set protocol“; Bacteria protocol screen (zmáčknout 4; potom dvakrát Enter); pro výběr protokolu pro buňky *S. aureus* zmáčknout 6; potom šipkami vybrat *S. aureus*; zmáčknout Enter.
- Přenést směs kompetentních buněk a DNA do 0,2 cm kyvety a uzavřít kyvetu víčkem.

- Umístit kyvetu do modulu pro kyvetu.
- Zmáčknout červené tlačítko „Pulse“.
- Následně přidat do kyvetu 1 ml BHI média a opatrně přepipetovat směs do sterilní mikrozkušavky vhodného objemu.
- Inkubovat 1 h./37°C/250 rpm.
- Vyšet příslušné objemy elektroporovaných buněk (50 µl, 100 µl, 200 µl v triplikátech) na TSA misky s příslušnou selekční látkou (ATB, těžké kovy apod.).
- Inkubace 36 – 48 h./37°C.



Kyvetu pro elektroporaci

III. Média

TSB (Trypton Soya Broth)

Rozpustit 30 g TSB v 1l H₂O, pH)7,4

LB

Trypton ...10g

Yeast extract...5g

NaCl...10g

Směs rozpustit v 1l H₂O, pH)7

BHI (Brain heart infusion broth)

37g BHI rozpustit v 1l H₂O, pH)= 7,4

Úloha: ELEKTROPORACE PENICILINÁZOVÉHO PLAZMIDU pUSA300_HOUMR-like DO RECIPIENTNÍHO KMENE *S. aureus* RN4220

(II.skupina)

I. Příprava kompetentních buněk

Nastavení přístroje Gene Pulser Xcell : C = 25 μ F; PC = 100 ohm; V = 2,9 kV.

Pozn. Všechny média před použitím sterilizovat. Výsledná selekce transformant se provádí na 1,5% TSA agaru s příslušnou selekční látkou. Předem je nutné ověřit, na jakých minimálních koncentracích rostou buňky obsahující přenášený plazmid a zda na stejné koncentraci neroste recipientní kmen bez plazmidu.

- Zaočkování kultury z TSA misky do 3 ml B2 bujónu. Inkubace 37°C/přes noc za mírného třepání (250 rpm).
- Zaočkování 1,5 ml noční kultury do 150 ml B2 bujónu v 1l baňce. Inkubace 37°C, třepání 250 rpm, do hustoty OD₆₀₀ = 0,8-0,85. Nárůst do požadované hustoty trvá přibližně 4 h.
- Ochladit buňky v ledové lázni (15 minut). Přenést buňky do 4×50 ml centrifugační zkumavky (BECKMAN). Centrifugace 12 000×g/15 minut/4°C. Opatrně slít supernatant. Udržovat buněčný pelet na ledu.
- Resuspendovat pelety v 5 ml sterilní, vychlazené vodě. Sloučit pelety do jedné centrifugační zkumavky, opět provést centrifugaci a promytí. Centrifugace 12 000×g/15 minut/4°C. Opatrně slít supernatant. Opakujeme dvakrát.
- Resuspendovat buněčný pelet v 25 ml sterilního a vychlazeného roztoku 10% glycerolu. Přenést do 30-50 ml centrifugační zkumavky (BECKMAN). Centrifugace 12 000×g/15 minut/4°C. Opatrně slít supernatant.
- Resuspendovat buňky v 20 ml 10% glycerolu. Inkubace 15 minut/20°C. Centrifugace 12000×g/15 minut/4°C. Opatrně slít supernatant.
- Resuspendovat buněčný pelet ve 2ml 10% glycerolu. Konečná koncentrace buněk by měla být 1×10^{10} CFU.
- Rozdělit buňky po 250 μ l do sterilních 1,5 ml mikrozkuvek. Takto připravené buňky jsou ihned k použití, do vlastní elektroporace udržujeme na ledu.
- Skladujeme při -70°C. Buňky můžeme takto skladovat několik měsíců.

II. Elektroporace

- Připravit DNA pro elektroporaci do sterilních 1,5 ml mikrozkuvek (5 ng – 2 μ g ne ve větším objemu než 20 μ l). Je možno vyzkoušet různé koncentrace/objemy elektroporované DNA (5 μ l, 10 μ l a 20 μ l).
- Rozmrazit kompetentní buňky při pokojové teplotě. Přidat 50 μ l buněk ke každému vzorku DNA, opatrně promíchat pipetou. Inkubace vzorků při pokojové teplotě/30 minut.
- Připravit pro každý vzorek 1 ml BHI média a 0,2 cm kyvety (vše při pokojové teplotě).
- Nastavení přístroje Gene Pulser Xcell:

1. Zapnout přístroj, připojit modul pro kyvety.

2. Otevřít „Pre-Set protocol“; Bacteria protocol screen (zmáčknout 4; potom dvakrát Enter); pro výběr protokolu pro buňky *S. aureus* zmáčknout 6; potom šipkami vybrat *S. aureus*; zmáčknout Enter.

- Přenést směs kompetentních buněk a DNA do 0,2 cm kyvety a uzavřít kyvetu víčkem.
- Umístit kyvetu do modulu pro kyvety.
- Zmáčknout červené tlačítko „Pulse“.
- Následně přidat do kyvety 1 ml BHI média a opatrně přepipetovat směs do sterilní mikrozskumavky vhodného objemu.
- Inkubovat 1 h./37°C/250 rpm.
- Vyšetřit příslušné objemy elektroporovaných buněk (50 µl, 100 µl, 200 µl v triplikátech) na TSA miskách s příslušnou selekční látkou (ATB, těžké kovy apod.).
- Inkubace 36 – 48 h./37°C.

III. Roztoky a média:

1. **Trypton soya agar (TSA):** rozpustit 40 g TSA (Becton Dickinson nebo Oxoid) v 1 l vody. Autoklávovat.

Složení v 1l vody:

<i>Pancreatic digest of casein</i>	15,0
<i>Enzymatic digest of soya bean</i>	5,0
<i>NaCl</i>	5,0
<i>Agar</i>	15,0
<i>pH 7.3 ± 0.2</i>	

2. **B2 médium:** 10 g hydrolyzovaný kasein, 25 g yeast extract, 5 g glukóza, 25 g NaCl, 1 g K₂HPO₄, rozpustit v 900 ml vody a upravit pH na 7,5; doplnit do 1 l vodou. Autoklávovat.

3. **BHI** (Brain heart infusion broth); 37g BHI rozpustit v 1l H₂O, pH)=7,4.

4. **10% glycerol:** 12,6g glycerolu (hustota = 1,26) do 90 ml vody. Autoklávovat nebo sterilizovat filtrací.



Kyvety pro elektroporaci