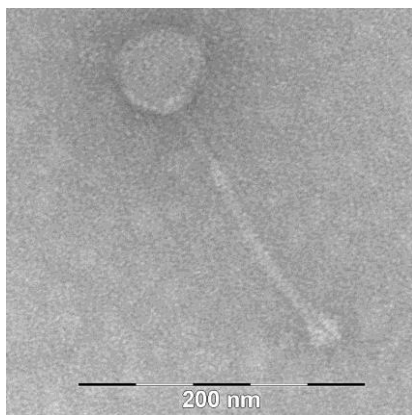


3. Úloha: Transdukce plazmidů do restriktivně-deficientního kmene *S. aureus* RN4220

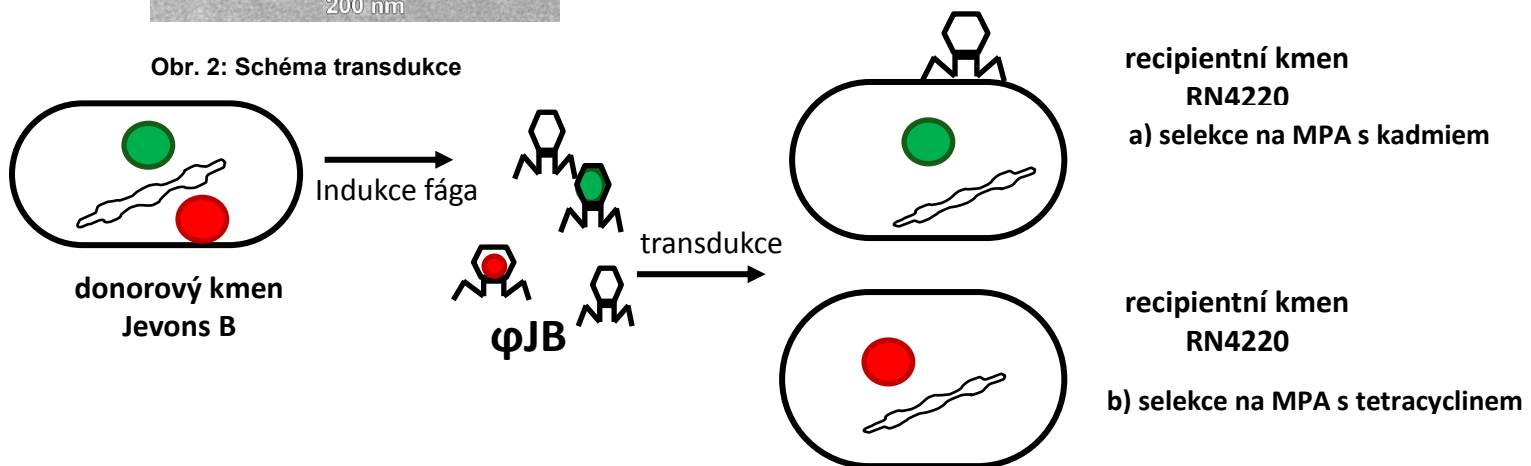
Cílem úlohy bude přenos plazmidů kódujících geny rezistence do bezplazmidového recipientního kmene *S. aureus* RN4220 prostřednictvím bakteriofága ϕ JB (Obr. 1). Tento způsob přenosu DNA z donorového do recipientního kmene se označuje jako **transdukce** (Obr. 2).

V úloze se pracuje s bakteriofágem ϕ JB, který byl indukován z donorového kmene *S. aureus* Jevons B. Tento donorový kmen obsahuje dva plazmidy (pT181, pHOUMR-like). Plazmid pT181 kóduje gen pro rezistenci k tetracyklinu, plazmid pHOUMR-like gen pro rezistenci ke kadmii a k β -laktamovým antibiotikům. Úkolem bude připravit kmen RN4220 obsahující plazmid pT181 a dále kmen RN4220 s plazmidem pHOUMR-like.

Obr. 1: Bakteriofág ϕ Jevons B (elektronová mikroskopie)



Obr. 2: Schéma transdukce



Materiál:

- Připravený fágový lyzát JB (cca 500ml), recipientní kmen RN4220.
- MPA, soft agar, roztoky tetracyklinu, kadmia, citrátu sodného a roztok CaCl_2 .
- Sterilní odměrný válec, kónické zkumavky (50ml), petriho misky, sada pipet, špičky, epinky, vodní třepací lázeň

1. Postup transdukce plazmidů:

1. Zaočkování recipientního kmene (20 μ l zamražené kultury do 20 ml MPB) a inkubace 37 °C / 18 hod.
2. Stanovení titru recipientního kmene (pro výpočet frekvence transdukce).
3. Přidání roztoku CaCl₂ ke kultuře recipientního kmene do výsledné koncentrace 2 mM.
4. Smíchání 1 ml kultury recipienta s 1 ml transdukujícího fágového lyzátu tak, že hodnota multiplicity infekce (poměr počtu fágových částic k počtu buněk) bude max. 1.
5. Inkubace transdukční směsi při 37 °C / 25 min. za stálého třepání.
6. Přidání roztoku citrátu sodného k transdukční směsi do výsledné koncentrace 15 mM, centrifugace 3000 rpm / 10 min. / 4–8 °C a resuspendace peletu v roztoku 17mM citrátu sodného (objem pro resuspendaci závisí na počtu misek, na které se bude transdukční směs vysévat a na množství směsi vyšetě na jednu misku (ideálně 100–300 μ l)).
7. Vyšetí transdukční směsi na misky s MPA obohaceným o citrát sodný (20 mM) a tetracyklin (5 μ g/ml) nebo kadmium (2,5.10⁻⁴M).
8. Inkubace misek při 37 °C / 24–48 hod.

Úkol: Zjištění počtu kolonií transduktant na miskách a výpočet frekvence transdukce jako podíl počtu transduktant (CFU/ml – *colony-forming units / 1 ml*) k počtu fágových částic v transdukujícím lyzátu (PFU/ml – *plaque-forming units / 1 ml*).

Frekvence transdukce:

Parametry charakterizující transdukci plazmidů (Rosypal, 1981)

$$Y = m p^\alpha = Y b c^\alpha = a c^\alpha - 1 p$$

$$A = Y/p = a c^\alpha - 1$$

Y – teoretický počet transduktant na 1ml transdukční směsi

p – počet virionů (PFU) transdukujícího fága v 1ml transdukční směsi

A - frekvence transdukce = **Y/p**

m - koeficient počtu přenesených plazmidů na 1ml transdukční směsi $p = 1$. Teoreticky reprezentuje počet transduktant v transdukční směsi obsahující jeden virion.

α – koeficient, jehož hodnota je vyjádřena vztahem:

$$\alpha = (\log Y - \log m) / \log p$$

Yb – teoretický počet přenesených plazmidů na 1ml transdukční směsi, pokud platí $p = b$;

b – počet buněk (CFU) recipientního kmene v 1ml transdukční směsi; $c = p/b$ - vstupní poměr

a – konstanta vyjadřující frekvenci transdukce, pokud platí $c = 1$

Stanovení titru bakterií nebo bakteriofágů

Stanovení titru bakterií nebo fágových částic vychází z ověřeného předpokladu, že z 1 životaschopné buňky/fágové částice vyrůstá 1 kolonie/1 plaka. Bakteriální kulturu nebo fágový lyzát je třeba ředit, aby se kolonie/plaky po nárůstu nepřekrývaly a šlo je spočítat. Titry se provádí na 3 miskách od každého ředění, aby se odhalila případná chyba v provedení, výsledné počty se zprůměrují. Výsledek se uvádí v CFU/ml (colony forming units) pro bakterie a v PFU/ml (plaque forming units) pro fágy.

2. Postup stanovení titru recipientního kmene (CFU/ml):

1. naředit kulturu 10^{-3} až 10^{-6} dle očekávaného výsledku
 - ředit desítkovou řadou: do 900 μ l bujónu 100 μ l kultury, promíchat, vyměnit špičku a novou špičkou přenést 100 μ l kultury do dalších 900 μ l bujónu atd.
 - ředění do plastových epinek a plastovými špičkami nebo do sterilních wassermanek a skleněnými pipetami
2. do zkumavky s vytemperovaným 0,7% LBA na 50 °C přidat 100 μ l 18hod bakt. kultury v ředění
3. od jednoho ředění provést výsev na 3 misky
4. kultivace 18 hod / 37 °C, misky otočit dnem vzhůru

3. Postup stanovení titru fágového lyzátu (PFU/ml):

1. naředit fágový lyzát 10^{-3} až 10^{-7} dle očekávaného výsledku
 - ředit desítkovou řadou: do 900 μ l bujónu 100 μ l lyzátu, promíchat, vyměnit špičku a novou špičkou přenést 100 μ l lyzátu do dalších 900 μ l bujónu atd.
 - ředění do plastových epinek a plastovými špičkami nebo do sterilních wassermanek a skleněnými pipetami
2. do zkumavky s vytemperovaným 0,7% LBA na 50 °C přidat 250 μ l 0,02 M CaCl₂, 100 μ l 18hod bakt. kultury, 100 μ l lyzátu v ředění
3. od jednoho ředění provést výsev na 3 misky
4. kultivace 18 hod / 37 °C, misky otočit dnem vzhůru