

3. úloha. Konjugace kmenů Escherichia coli Hfr a F⁻

Konjugace je proces, při kterém je DNA přenášena z donorové buňky do recipientní v důsledku kontaktu buněk a vytvoření konjugačního můstku. Uskutečnění konjugace lze dokázat vznikem rekombinantů, které nemohly vzniknout jinak, než rekombinací mezi genomem donorového a recipientního kmene. Konjugace u E. coli je závislá na přítomnosti a stavu F faktoru. F je plazmid (94,5 kb), který se může autonomně replikovat v buňce nebo integrovat do hostitelského chromozómu. Podle stavu F faktoru se označují příslušné kmeny:

Označení	Stav F faktoru	Vlastnosti
F ⁻	F faktor není přítomen v buňce	Vhodný recipient během konjugace.
F ⁺	F faktor je přítomen v cytoplazmě	Může být přenášen konjugací do recipientní buňky; přenos chromozomálních genů může zprostředkovat při velmi nízké frekvenci.
F'	F faktor nese segment bakteriálního chromozómu	Může být přenášen spolu s asociovaným bakteriálním segmentem chromozómu; může zprostředkovat přenos chromozomálních genů při střední frekvenci v důsledku integrace do chromozómu v homologických oblastech
Hfr	F faktor je integrován do bakteriálního chromozómu	Může přenášet chromozomální znaky při vysoké frekvenci (od pevného bodu na chromozómu, který je charakteristický pro každý Hfr)

Objekt:

Donor: Escherichia coli HfrH Reich $tr^+ leu^+ pro^+ ade^+ thi^- str^s$

Recipient: Escherichia coli F⁻ 28R801 $tr^- leu^- pro^- ade^- thi^- str^r$

Do recipientních buněk přechází segment $tr^+ leu^+ pro^+ ade^+ thi^-$.
Marker str zůstává v endogenotu.

Postup:

1. Příprava mladých kultur donorového a recipientního kmene: Naočkovat 1 kličku do 20 ml PNS média a inkubovat při 37 °C 18 hodin (do log. fáze růstu).
2. Smíchat kultury donorového a recipientního kmene v poměru 1 : 1 (5 ml + 5 ml) a inkubovat za aerace (při šetrném míchání na vodní lázni) při teplotě 37 °C 3 hodiny.
3. Současně stanovit titr donorového kmene HfrH rozsevem na plotny MPA ve zředění 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , vždy po 3 plotnách.
4. Přesvědčit se, že ani kmen HfrH ani F⁻ nerostou na selektivní půdě. Kontrolu provést výsevem po 0,1 ml kultury zředěné 10^{-1} na 3 plotny MA + streptomycin 100 µg/ml + thiamin 5 µg/ml. Ředění provádět ve fyziologickém roztoku!
5. Po 3 hodinách inkubace vyšetřit neředěnou směs na selektivní půdu po 0,1 a 0,2 ml (vždy po 3 plotnách).
6. Hodnocení pokusu: vyjádřit frekvenci rekombinantů na počet buněk Hfr.

Živné půdy:

PNS bujón	půda pro konjugaci	
	glukóza	1 g
	Bacto beef extract	1,5 g
	Yeast extrakt	1,5 g
	pepton	5 g
	NaCl	3,5 g
	K ₂ HPO ₄	3,68 g
	KH ₂ PO ₄	1,32 g
	H ₂ O dest.	1000 ml
		pH 7,2 (upravit 10M NaOH)
	autoklávovat 20 min. /121 °C	

MPA masopeptonový agar (kompletní půda)

MA minimální agar:

složka A 1,5% vodní agar, pH 7,2

složka B (4× koncentrovaný roztok solí)

NH ₄ Cl	20 g
NH ₄ NO ₃	4 g
Na ₂ SO ₄	8 g
K ₂ HPO ₄	12 g
KH ₂ PO ₄	4 g
H ₂ O dest.	1000 ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,6 ml z 1M zásobního roztoku sterilně přidat po autoklávování

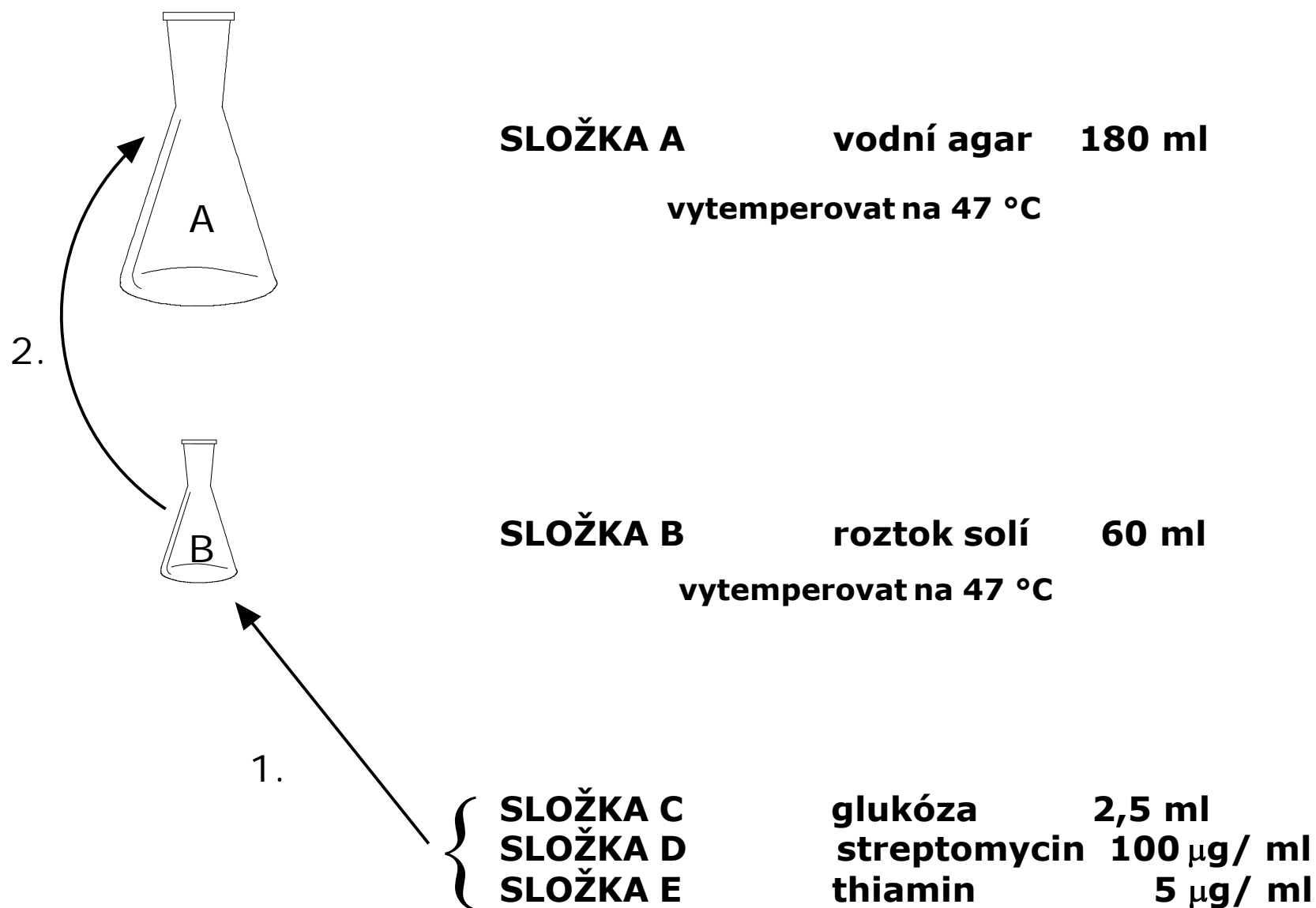
složka C 20% glukóza - přidat 1ml na 100 ml MA

složka D streptomycin - přidat do konečné koncentrace 100 µg/ml ze zásobního roztoku 100 mg/ml

složka E thiamin přidat do konečné koncentrace 5 µg/ml ze zásobního roztoku 50 mg/ml

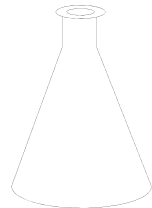
Při přípravě MA smíchat složky B (1 díl) + C + D + E, vytemperovat na 45 °C a smíchat se složkou A (3 díly).

Příprava minimálního agaru na konjugaci

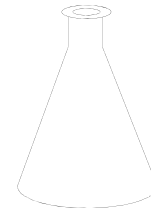


KONJUGACE

Kontrola na MA + str + thi
10⁻¹ ředit ve fyziol. rozt.
1 plotna (0,1 ml)



E. coli HfrH Reich



E. coli F- 28R801

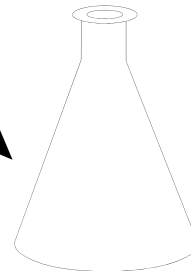
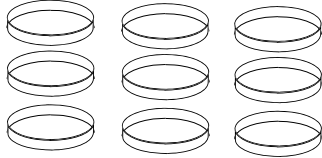
Kontrola na MA + str + thi
10⁻¹ ředit ve fyziol. rozt.
1 plotna (0,1 ml)



5 ml

5 ml

Titr na LBA₋₇
10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷
po 3 plotnách (po 0,1 ml)



KONJUGACE
37 °C / 3 hod / šetrně třepat

Výsev na MA + str + thi
neředěné
3 plotny (0,1 ml) + 3 plotny (0,2 ml)

