

## Úloha: Izolace spontánních mutantů rezistentních ke streptomycinu metodou gradientních ploten

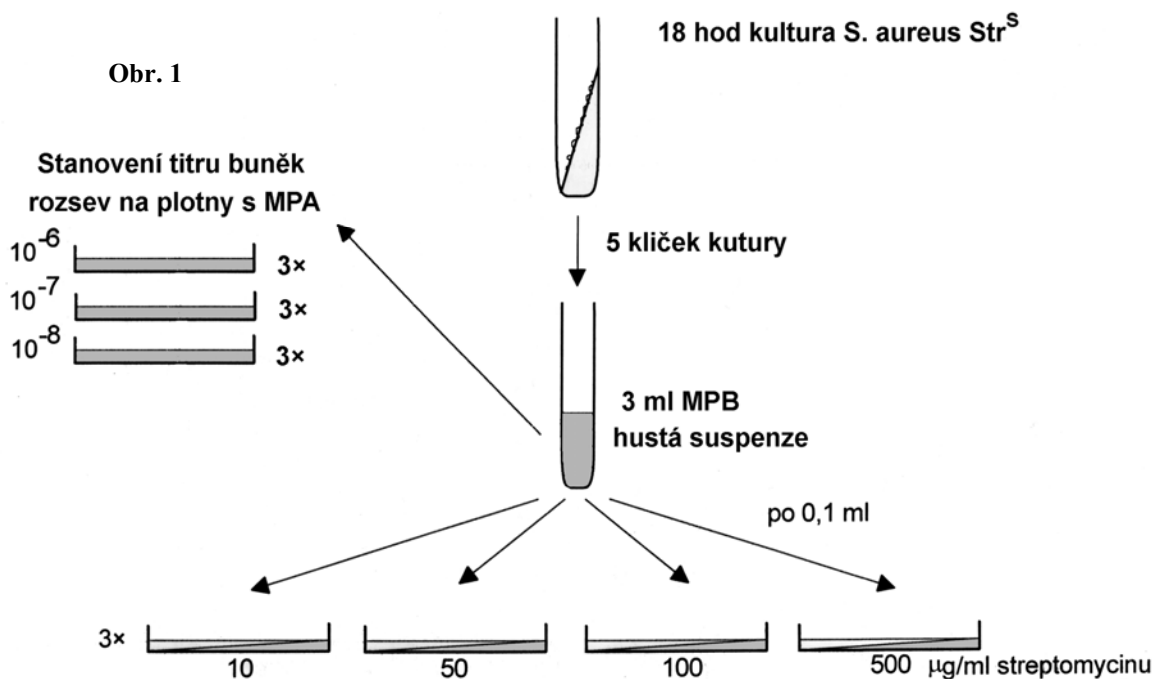
**Teorie a zahájení pokusu:** Molekulární podstata spontánních a indukovaných mutací je stejná. Liší se však ve frekvenci. Frekvence spontánních mutací je podstatně nižší. Tím se také liší od fenotypové modifikace, neboť ta proběhne prakticky současně ve všech buňkách. Spontánní mutace - rezistence k 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 roztrždit a odnést do umývárny.

**Objekt:** Kmeny *Staphylococcus aureus* citlivé ke streptomycinu: kmeny *S. aureus* dle výběru, každá skupina má svůj kmen.

Postup: **První den.**

1. Z 18 hod. kultury vyrostlé na MPA agaru, odebrat 5 kliček a resuspendovat ve 3 ml MPB. Je nutno vyjít z husté bakteriální suspenze (cca  $10^9$  buněk/ml), protože frekvence  $\text{str}^R$  mutantů je velmi nízká.
2. 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.
3. Připravit gradientní plotny se streptomycinem o výsledných koncentracích: 10, 50, 100 a 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pro přípravu zásobního roztoku rozpustit 0,3 g krystalického streptomycinu ve 3 ml sterilní destilované vody (přidávat do roztavené MPA pŕdy o teplotě max  $55^\circ\text{C}$ ).
4. Provést rozsevy po 0,1 ml na gradientní plotny (vždy 2 plotny od příslušné koncentrace, viz obr. 1) a pečlivě rozetřít hokejkou po celé ploše.
5. Naočkované plotny inkubovat dnem vzhůru při  $37^\circ\text{C}/24$  hod



U kmenů bakterií vybraných do pokusu je třeba provést test citlivosti k antibiotiku. Z připravené suspenze kmene odebrat 0,1 ml a vyočkovat přes 0,7% soft MPA (45 °C) na plotnu s 1,5% MPA. Po utužení vykápnout antibiotikum (10, 50, 100 a 500 µg/ml) na povrch agarové plotny, a po vsáknutí kultivovat při 37 °C/20 hod.

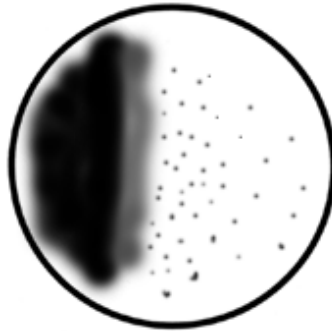
### ***Druhý den.***

**Stanovit titr buněk ve výchozí suspenzi**

**Vyhodnotit test citlivosti kmene k antibiotiku**

**Rozhodnout o dalším pokračování pokusu dle nárůstu „mutant“.**

Jednotlivé kolonie za linií kompaktního nárůstu představují domnělé mutanty (viz obr. 1). Dle nárůstu je třeba rozhodnout, zda je nutno prodloužit kultivaci o další den.



Pokračování pokusu se bude rozhodovat dle nárůstu mutant.

### ***Ukončení pokusu.***

Z výsledků stanovit koncentraci, ke které je kmen rezistentní a určit frekvenci mutací k jednotlivým koncentracím streptomycinu.

Výpočet mutačního indexu (frekvence) mutant:  $F = \text{titr mutant} : \text{titr buněk}$

Vypracovat protokol: protokol obsahuje fotografickou dokumentaci výsledků pokusu

**Materiál na 1 skupinu.**

Na inokulum dvou kmenů 2 misky s 2% MPA – **očkuje se křížovým roztěrem den před zahájením pokusu**

Kmeny: dle výběru vyučujícím

3 dny před pokusem vyset ze zmražených konzerv na Petri misky a ověřit schopnosti růstu.

**MPB:** na ředění: 20 ml MPB

Na proužkování: 20 ml MPB

Na suspenzi mutant: 3 ml MPB

**MPA:** Na titr buněk SAU: 300 ml MPA

MPA na gradientní plotny: 160 ml na podkladovou vrstvu

4 × 50 ml MPA (zvlášt v Erlenkách) na 4 různé koncentrace streptomycinu

Navážka STRE 0,3 g antibiotika. Rozpouští se až těsně před použitím ve ve 3 ml sterilní destil. vodě a uchovává se v temnu a chladu.

Na test citlivosti ke STRE 2 Petri misky s 2% MPA.

Je nutné mít sterilní hokejky a 25 ml pipety s upravenou špičkou