

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT - cvičení

podzim 2016

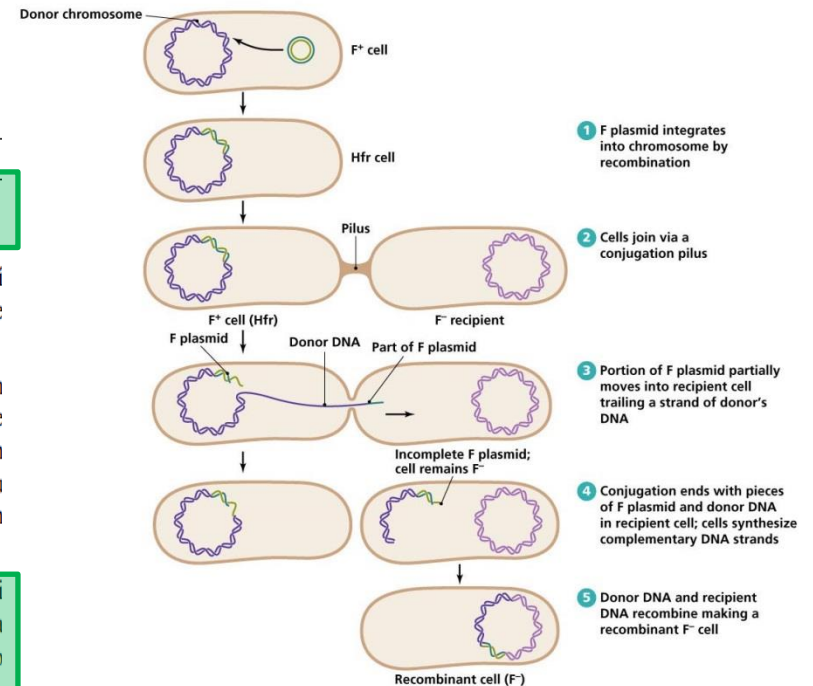
Konjugace, Transdukce

Ivana Mašlaňová

iva.maslanova@gmail.com

Konjugace

Označení	Stav F faktoru	Vlastnosti
F ⁻	F faktor není přítomen v buňce	Vhodný recipient během konjugace.
F ⁺	F faktor je přítomen v cytoplasmě	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)



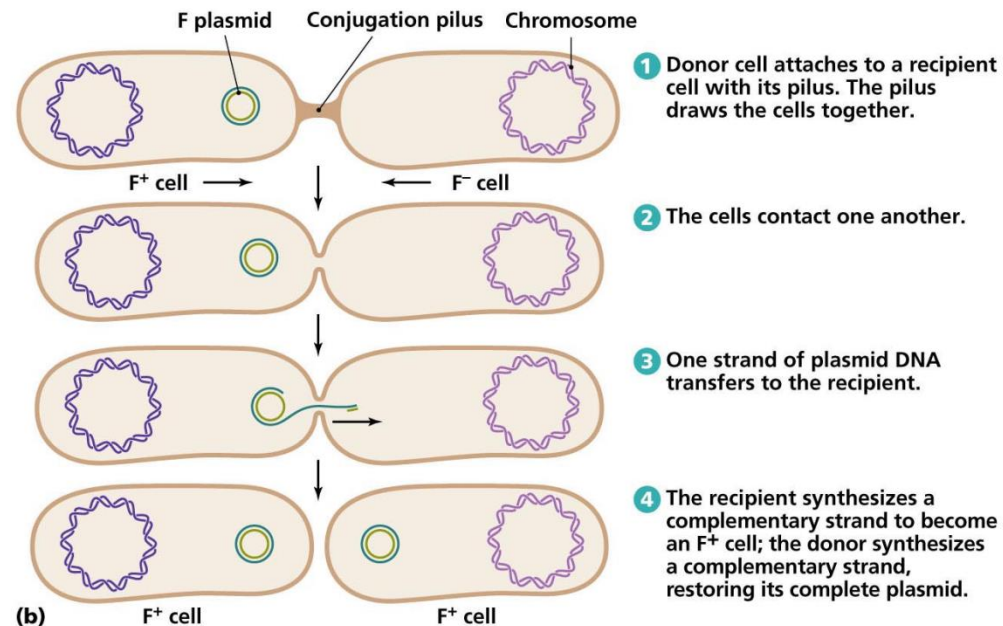
Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Objekt:

Donor: Escherichia coli HfrH Reich tre⁺ leu⁺ pro⁺ ade⁺ thi⁻ str^s

Recipient: Escherichia coli F⁻ 28R801 tre⁻ leu⁻ pro⁻ ade⁻ thi⁻ str^r

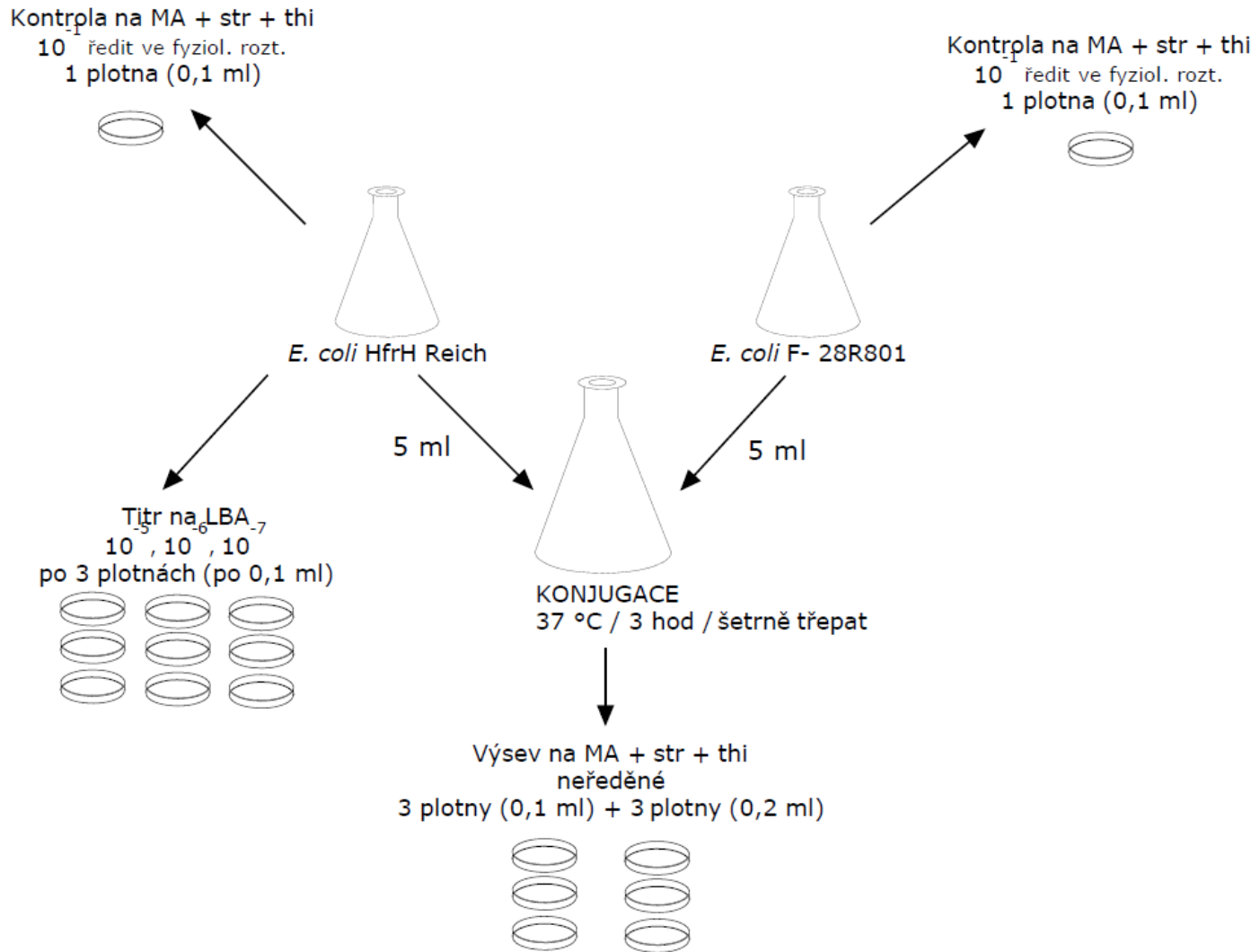
Do recipientních buněk přechází segment tre⁺ leu⁺ pro⁺ ade⁺ thi⁻. Marker str zůstává v endogenotu.



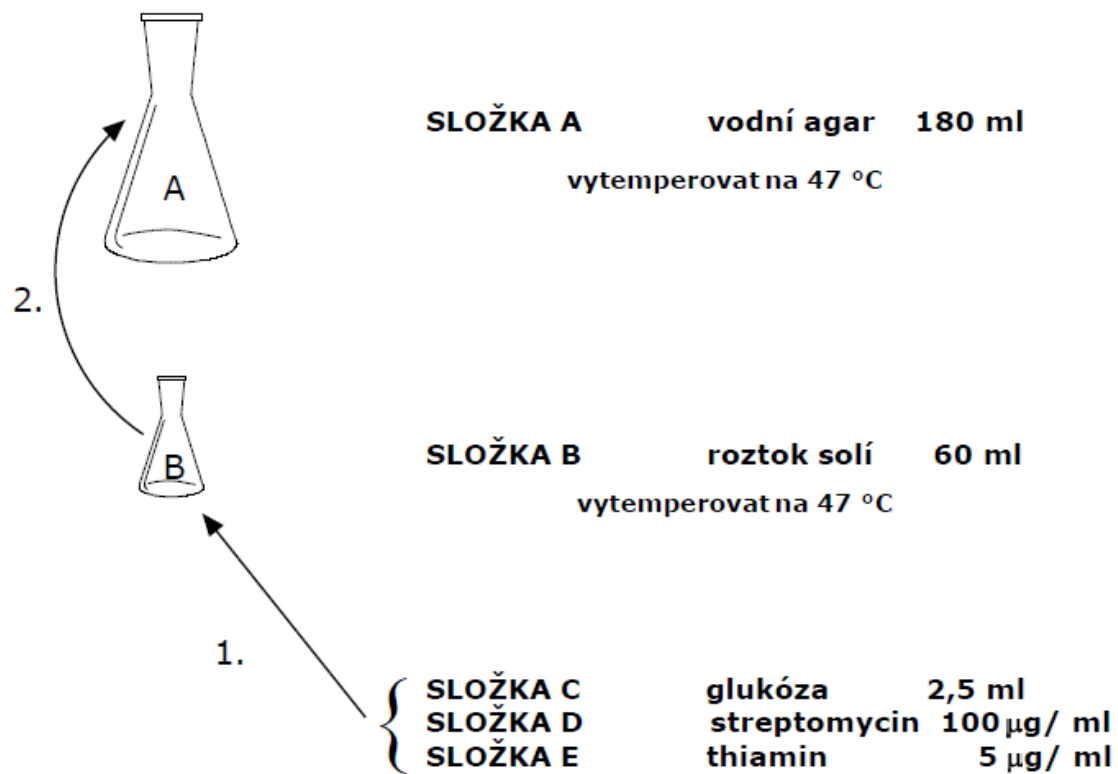
Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Postup konjugace

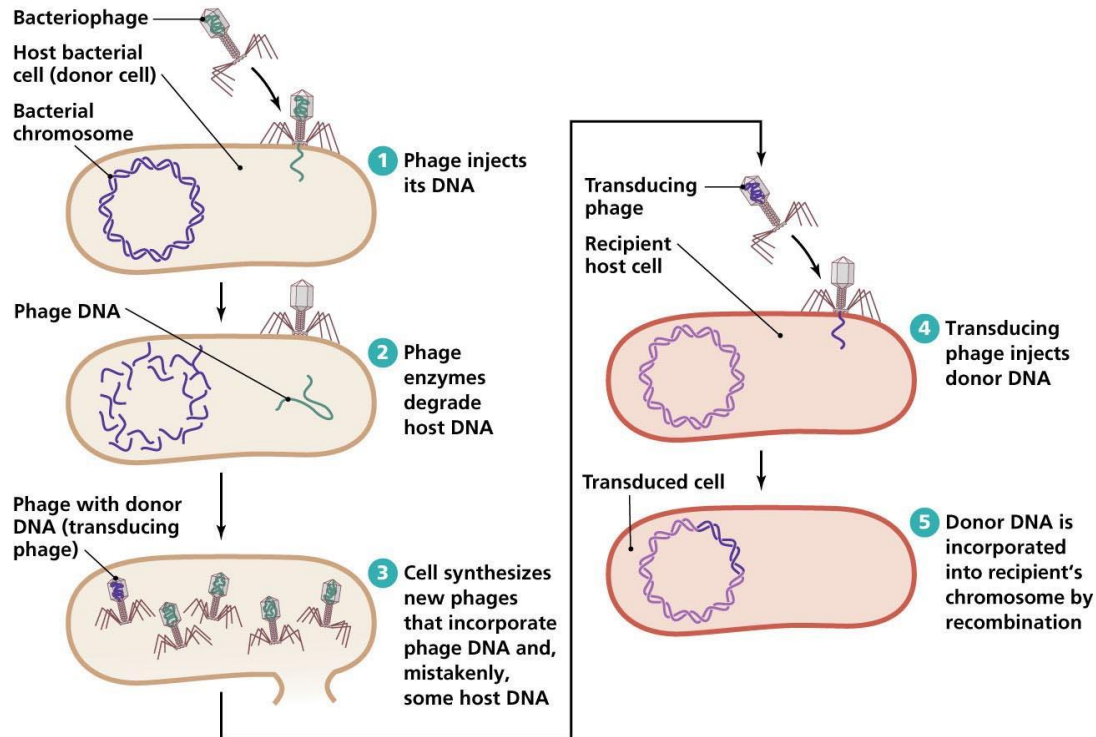
KONJUGACE



Příprava minimálního agaru na konjugaci



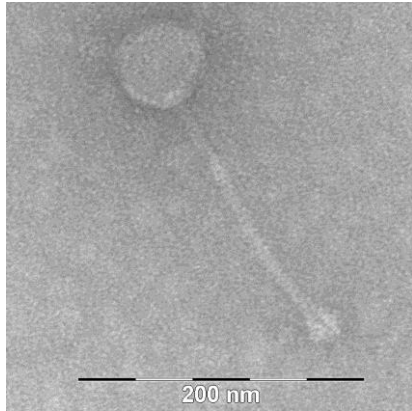
Transdukcce



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

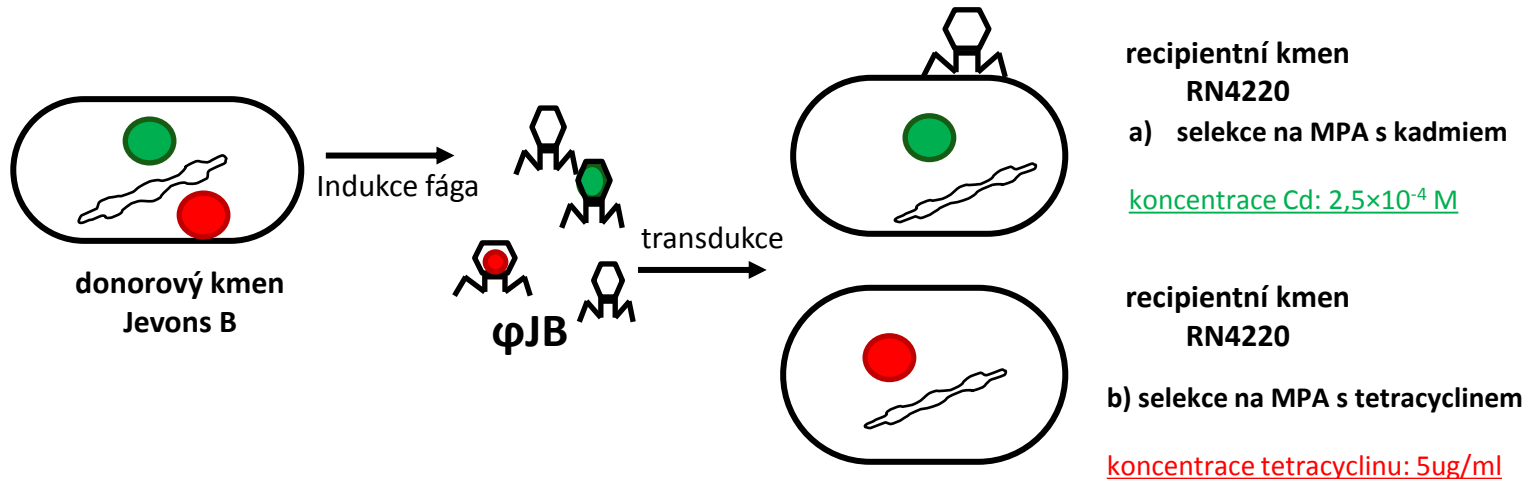
Bakteriofágem zprostředkovaný HGT.
Generalizovaná transdukcce – defektní fágová částice sbaluje náhodnou část bakteriálního chromozomu.
Specializovaná transdukcce – SaPI
Lyzogenní konverze – bakteriofág se integruje do chromozomu hostitelského kmene a poskytuje hostiteli nějakou „novou vlastnost“ – gen virulence apod.

Úloha 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

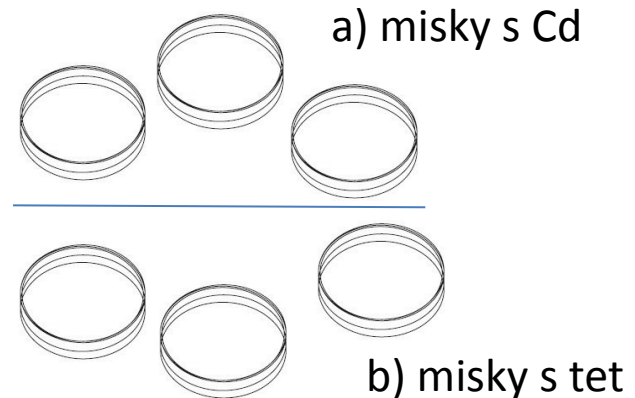
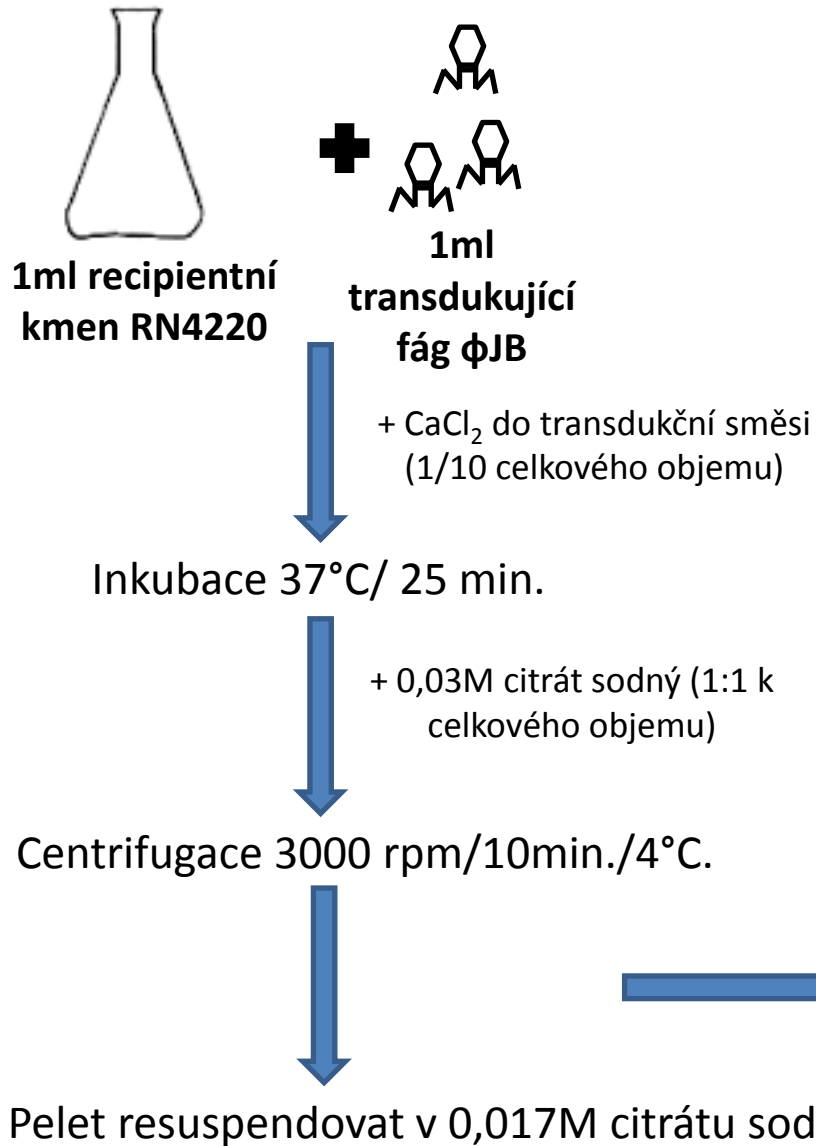


Donorový kmen Jevons B – v genomu dva různé plazmidy, tetracyclinový plazmid (pT181; 4,4 kb) a β -laktamázový plazmid s rezistencí ke kadmiu (28 kb)

Bakteriofág ϕJB – fág sérologické skupiny B, morfortyp B1, dlouhý, nekontraktilní bičík

Recipientní kmen – *S. aureus* RN4220, restrikcčně-deficientní laboratorní kmen, citlivý k ATB, bezplazmidový

Postup transdukce

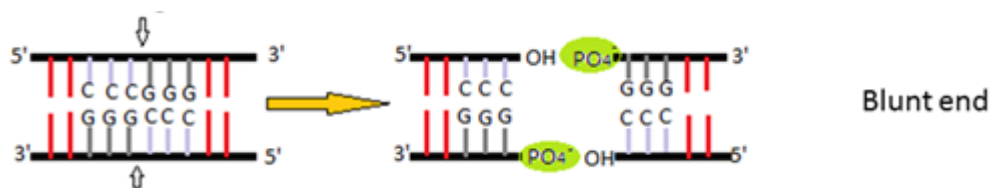


Úloha PFGE – štěpení bločků

Příprava a složení restriční směsi

Složení restriční směsi/ 1-2 bločky

Voda	68 μ l
Restriční pufr.....	8 μ l
Restriktáza <i>Sma</i> I (8U).....	0,8 μ l
<u>Celkový objem.....</u>	<u>76,8 μl</u>



*Sma*I – aktivita při laboratorní teplotě