

PRACOVNÍ LIST I.

MUTACE

Vypracoval:

Jméno, Příjmení, UČO

Semestr (skupina)

1. Vypočítejte frekvenci spontánních mutant ve vašem vzorku.
2. Navrhněte tři způsoby mutagenese používané v genovém inženýrství.
3. Jaká je pravděpodobnost vzniku mutace u prokaryot?
4. K čemu slouží fluktuační test? Nakreslete schéma fluktuačního testu a stručně popište.
5. Vysvětlete proč je pro nárůst mutantních kolonií na gradientu streptomycinu potřeba více času než pro nárůst kolonií bez mutace?
6. Vysvětlete rozdíl mezi spontánní a indukovanou mutací. Jaký typ mutace jste sledovali ve svém experimentu vy?

PRACOVNÍ LIST II.

TRANSDUKCE A STANOVENÍ POČTU KOPIÍ TRANSDUKOVANÝCH PLAZMIDŮ V BUŇCE POMOCÍ QPCR

Vypracoval:

Jméno, Příjmení, UČO

Semestr (skupina)

1. Vypočítejte frekvenci vámi provedené transdukce plazmidů

- Frekvence transdukce pro plazmid pT181 (tetK, rezistence k tetracyklinu):
- Frekvence transdukce pro plazmid pHOUMR-like (rezistence ke kadmiu):
- Je frekvence transdukce stejná pro oba typy plazmidů? Vysvětlete.

2. Vytvořte graf závislosti log koncentracena C_p standardu a neznámých vzorků u vámi provedené qPCR.

- použijte data uvedená v pdf souborech, které exportujete po dokončení reakce
- proložte datové body regresní přímkou a vypočítejte rovnici přímkou a R^2 pro oba běhy (kvantifikace genu blaZ nebo tetKa genu SAU) do jednoho grafu
- vypočítejte a uveďte efektivitu obou běhů v %
- zdůvodněte proč je hodnota E menší případně větší než 100%
- srovnajte svoje výpočty s výsledky uvedenými v pdf souborech

3. Vypočítejte hodnoty PCN (počet plazmidů na buňku) pro transduktanty.

4. Proč se do transdukční směsi přidává citrát sodný?

5. Jak byste ověřili, že na selekčních plotnách vyrostly transduktanty a ne jedná se o kontaminaci donorem nebo jiným druhem?

6. Jak byste odlišili transdukující částice od životaschopných fágů?

7. Jakým způsobem se bakterie brání přijímání cizorodé DNA? A jakými mechanismy podporují příjem nové genetické informace?

PRACOVNÍ LIST III.

KONJUGACE

Vypracoval:

Jméno, Příjmení, UČO

Semestr (skupina)

- 1. Vyjádřete frekvenci získaných rekombinantů na počet buněk Hfr**
- 2. Jaké jsou hlavní rozdíly v konjugaci mezi gram pozitivními a gram negativními bakteriemi?**
- 3. Dochází ke konjugaci i u jiných prokaryotických či eukaryotických organismů (Archea, kvasinky, plísňe, protozoa)?**
- 4. Ve své oblíbené bakterii jste identifikovali plazmid. Jak byste zjistili, zda je konjugativní?**

PRACOVNÍ LIST IV.

GTA

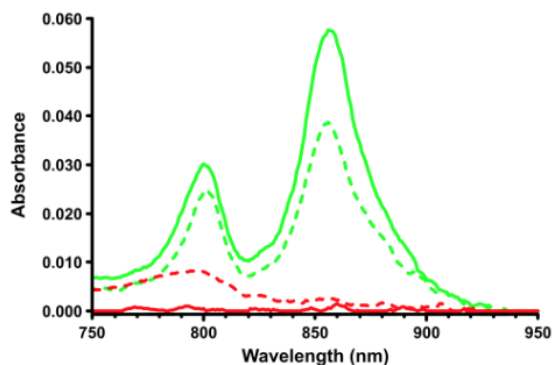
Vypracoval:

Jméno, Příjmení, UČO

Semestr (skupina)

1. Napište 3 vlastnosti, které jsou pro GTA a bakteriofágy společné/rozdílné:
2. Vyhledejte v literatuře, proč se *Rhodobacter capsulatus* inkubuje za anaerobních podmínek a v osvětleném termostatu.
3. Lyze buněk navozená uvolňováním GTA je v úloze kontrolována měřením absorbance supernatantu spektrometrem pro vlnové délky 750-950 nm. Přiložte obrázek měření vašeho vzorku a srovnajte s obrázkem níže. Vysvětlete, co pozorujeme.

Obrázek: Absorpční spektrum intracelulárních pigmentů *R. capsulatus*



4. Jaký je mechanismus přenosu Rif rezistence a jejího stabilního udržení v recipientní populaci bakterií?

PRACOVNÍ LIST V.

PULZNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (PFGE)

Vypracoval:

Jméno, Příjmení, UČO

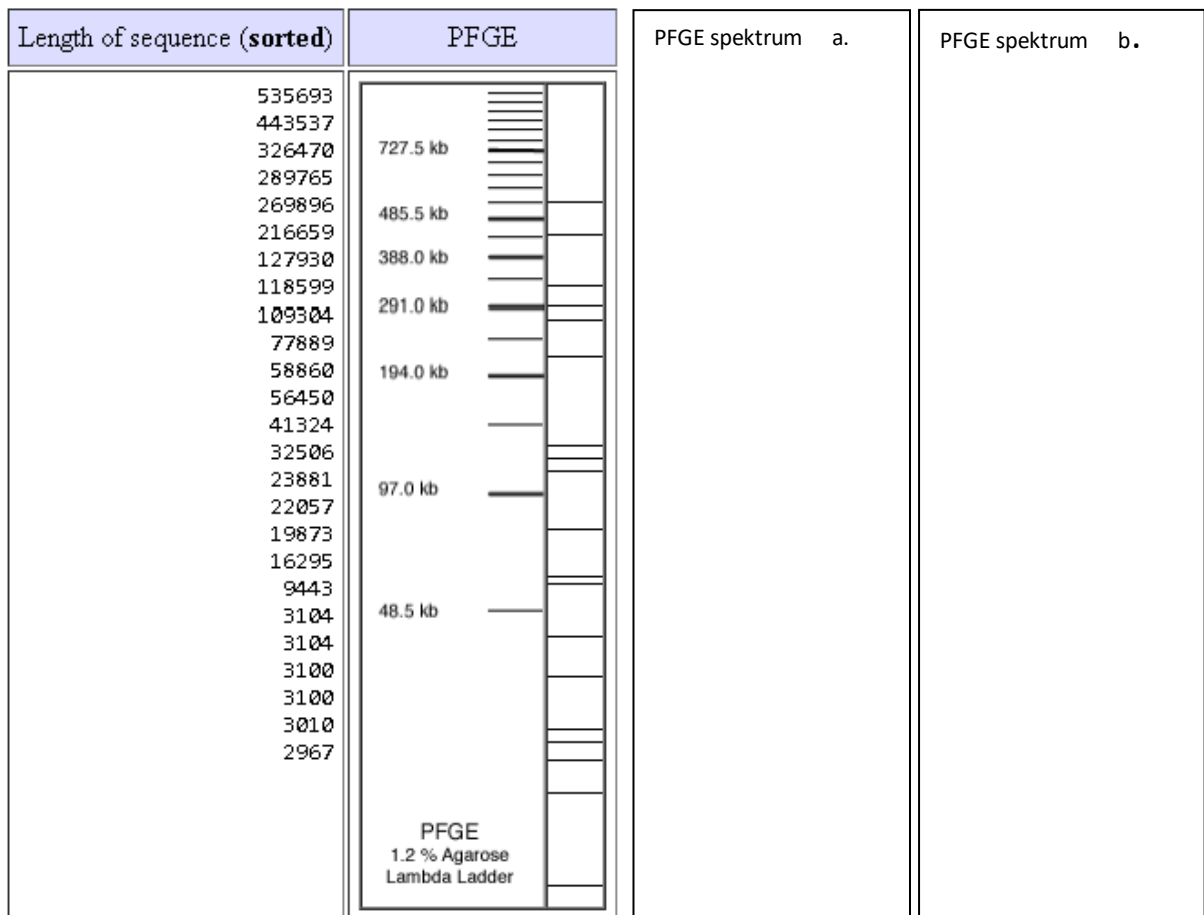
Semestr (skupina)

1. *In silico* PFGE

- Pomocí nástroje <http://insilico.ehu.es/digest/> proveďte *in silico* PFGE genomu *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* N315.
- Použijte restriktázu *Sma*I.
 - a) Kolik fragmentů vznikne takovýmto štěpením?
 - b) Jaká je sekvence rozpoznávacího místa pro restriktázu *Sma*I?
 - c) Jakou další restriktázu (případně restriktázy) by bylo možné použít, abychom získali 20 až 30 fragmentů DNA?
 - d) Jaké enzymy byste využili pro PFGE u jiných druhů bakterií? Uveďte tři příklady.

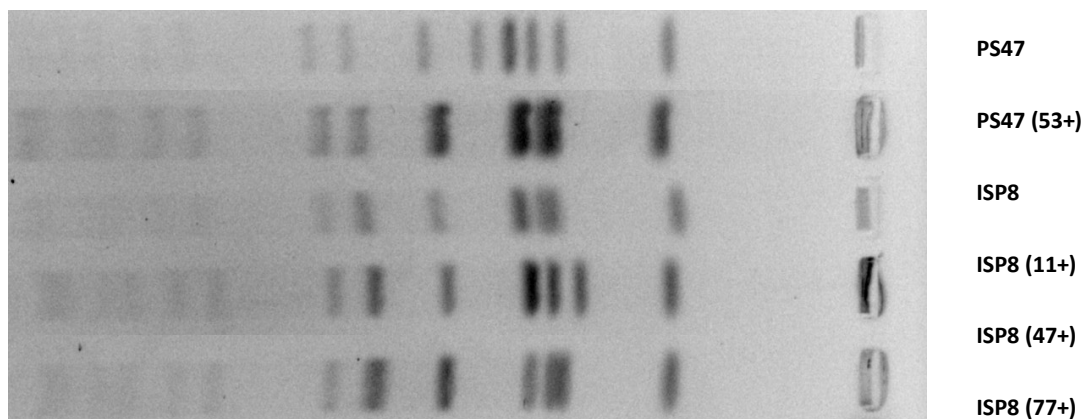
2. Změna restriktčního spektra:

- Na následujícím schématu *in silico* PFGE genomu *S. aureus* vyznačte a slovně popište, jak by se na restriktčním spektru projevila:
 - a) Integrace bakteriofága o přibližné velikosti genomu 44 kb, který nenesou restriktční místo pro *Sma*I. Uvažujte začlenění do fragmentu o velikosti 77 889 bp.
 - b) Mutace vedoucí ke vzniku nového *Sma*I restriktčního místa, které rozdělí fragment o velikosti 216 659 bp cca na poloviny.



3. Na obrázku elektroforetického gelu genomové DNA vybraných stafylokokových kmenů štěpených restrikázíou SmaI vyznačte a slovně popište změnu v restrikčním spektru, která nastala. Srovnajte s Vašimi výsledky.

- Integrací fága 53 do genomu kmene S47
- Integrací fága 11 do genomu kmene ISP8
- Integrací fága 47 do genomu kmene ISP8
- Integrací fága 77 do genomu kmene ISP8



PRACOVNÍ LIST VI.

PLAZMIDY

Vypracoval:

Jméno, Příjmení, UČO

Semestr (skupina)

1. Navržení primerů

- Navrhňte primery pro plazmidový gen tetK (kóduje protein pro efluxní pumpu – navozuje rezistenci k tetracyklinu).
- Přístupové číslo proteinu TetK je YP_006958133 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/YP_006958133.1).

a) Napište nukleotidovou sekvenci navržených primerů ve směru 5' - 3' a jejich Tm teplotu.

primer tetK_F: Tm:

primer tetK_R: Tm:

b) Navrhňte program PCR reakce a složení PCR směsi, budete-li používat:

OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer

(<https://international.neb.com/products/m0482-onetaq-2x-master-mix-with-standard-buffer#Product%20Information>)

Řiďte se doporučením výrobce.

Program PCR:

	Teplota	Doba trvání v sekundách	Počet opakování
Počáteční denaturace			
Denaturace			
Připojení primerů			
Prodlužování primerů			
Závěrečné prodlužování primerů			

PCR směs:

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	O bjem (μl) pro jednu reakci
One Taq® 2X Master Mix with Standard Buffer	2x	1x
primer -F	10 μM	0.2 μM
primer -R	10 μM	0.2 μM
Templátová DNA	< 1000 ng
Voda	x	x
Celkem			25,0 μl

2. Seřadte jednotlivé typy konformace plazmidů podle jejich elektroforetické mobility od nejnižší po nejvyšší a přiložte elektroforetogram Vašich vzorků:

- Štěpená, otevřená cirkulární forma (nicked)
- Uvolněná cirkulární forma (relax circular)
- Lineární forma (linear)
- Superspiralizovaná forma (supercoiled)

PRACOVNÍ LIST VII.

ENDOLYSIN

Vypracoval:

Jméno, Příjmení, UČO

Semestr (skupina)

1. **Popište, jak na elektroforetogramu vypadá nedegradovaná celková RNA.**
2. **Na základě provedeného experimentu (přiložte obrázek elektroforetického gelu) odpovězte na následující otázky:**
 - a) Dochází k sestřihu endolysinu?
 - b) Detekovali jste v buňkách i nesestřiženou RNA? Pokud ano, pokuste se vysvětlit proč?
 - c) Vyznačte na obrázku, ve které dráze elektroforetického gelu je správně izolovaná celková RNA. Vysvětlete proč.
3. **Jaké další geny jsou u prokaryot sestřihovány?**
4. **Jaké typy intronů se u prokaryot vyskytují?**
5. **Jak se v roztoku zbavíte dvoumocných kationtů?**
6. **Jaká je u fága funkce genu pro endolysin?**
7. **Jaký je význam intronů?**
8. **Který enzym se používá k přepisu RNA do cDNA v laboratorních podmínkách a jaké primery se používají pro přepis prokaryotické mRNA?**