

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE PROKARYOT - cvičení

podzim 2019

GTA, Transdukce

Ivana Mašlaňová

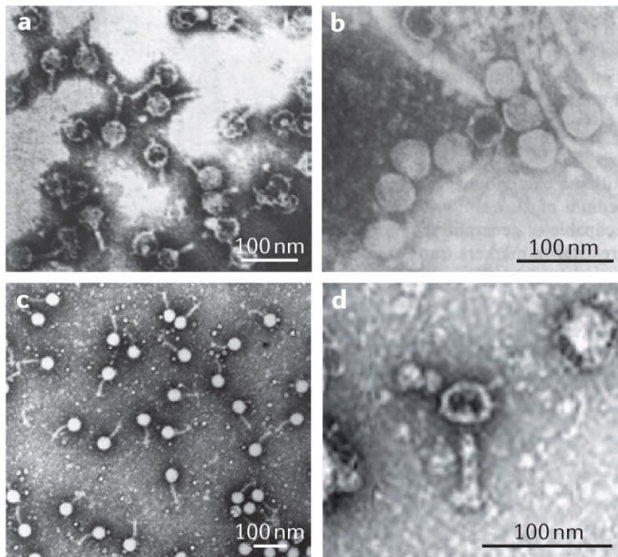
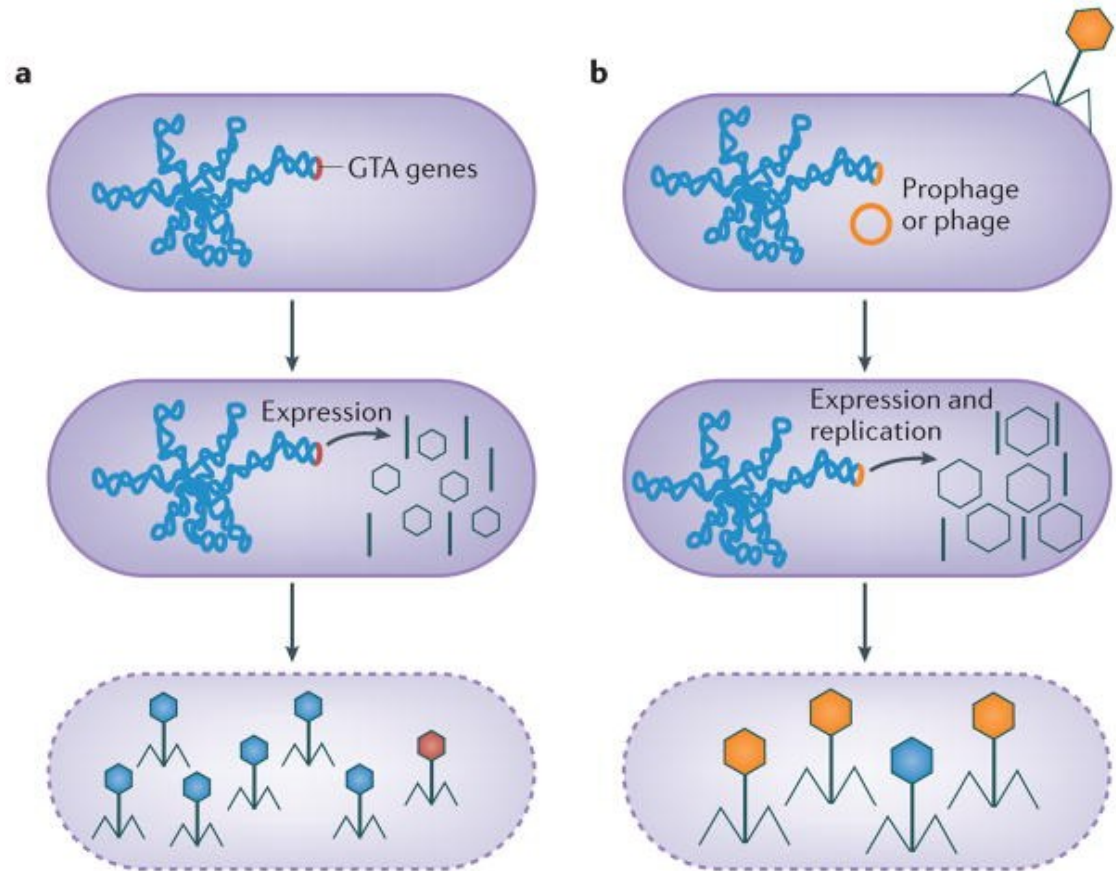
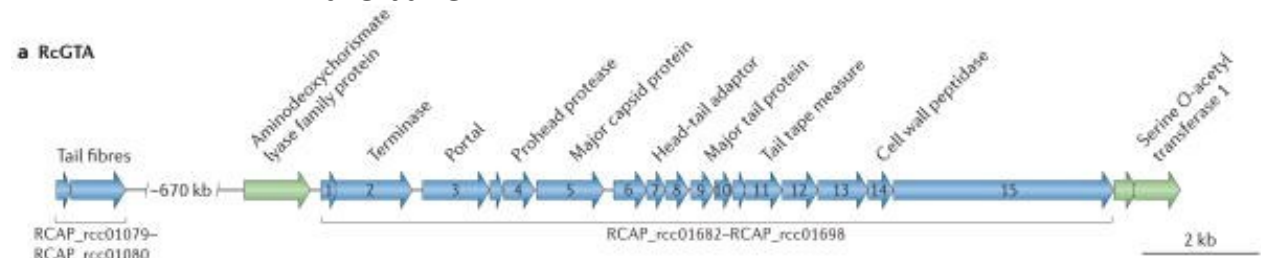
iva.maslanova@gmail.com

Rhodobacter capsulatus

8 proteinů, průměr hlavy 30 nm, bičík 30-50 nm. Nebyly identifikovány fágy příbuzné s GTA.

Přenos je regulován bakteriálními geny, které indukují expresi strukturních genů GTA během specifické růstové fáze buněk

Rhodobacter capsulatus	
Domain:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Class:	Alphaproteobacteria
Order:	Rhodobacterales
Family:	Rhodobacteraceae
Genus:	Rhodobacter
Species:	<i>R. capsulatus</i>



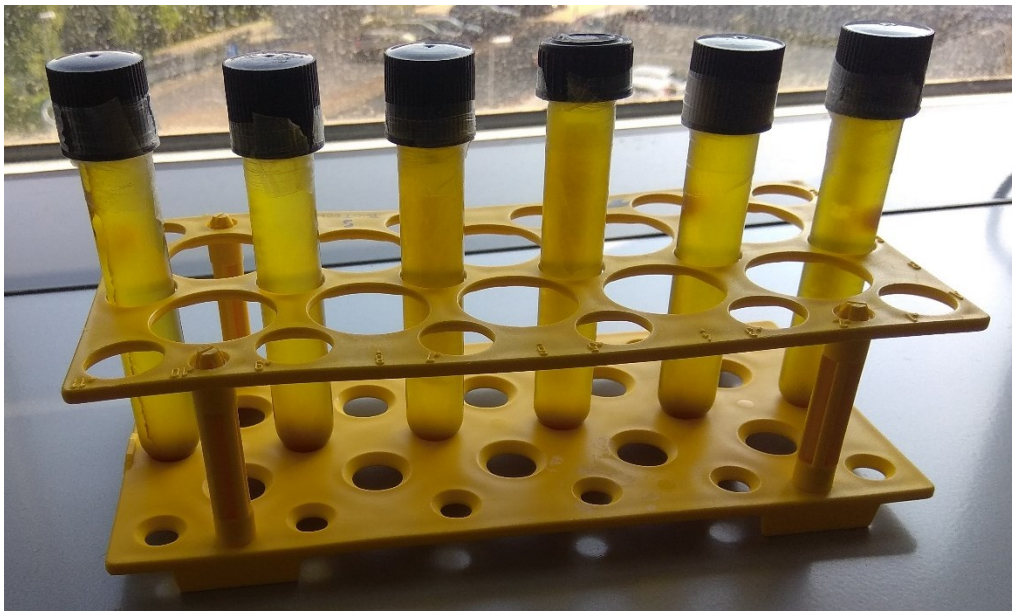
GTA

Bakteriální kmeny:

Donor: *Rhodobacter capsulatus* DE442 (Rif rezistentní, producent GTA)

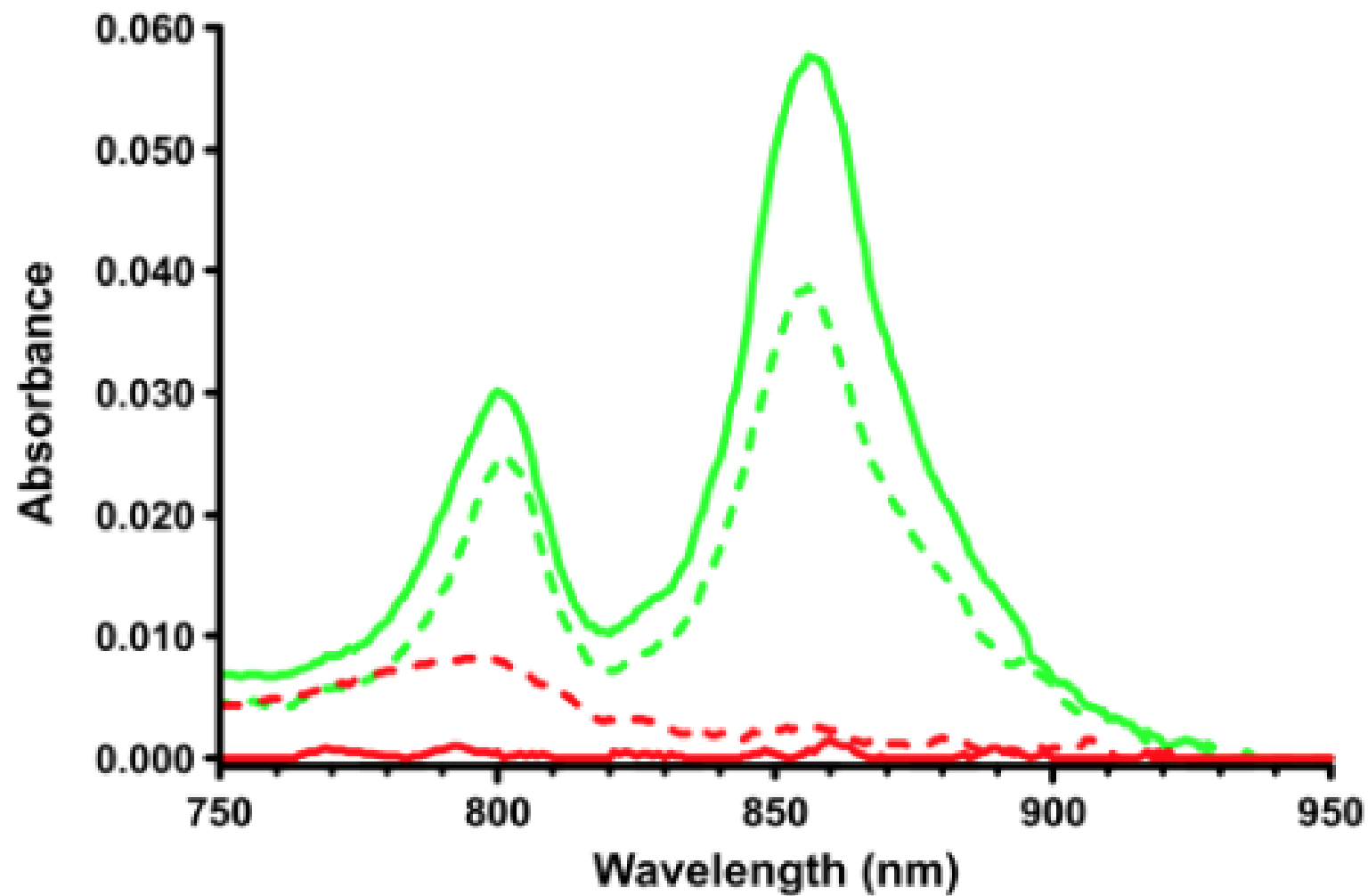
Recipient: *Rhodobacter capsulatus* B10 (Rif citlivý)

- 1 ml buněk (12 000g/2 min), kontrola absorbance supernatantu spektrometrem pro vlnové délky 750-950 nm, jako blank použít YPS medium. Při indukci GTA by měli být vidět dva píky (absorbance intracelulárních pigmentů, které jsou uvolňovány při buněčné lyzi indukované GTA)
- filtrace supernatantu bakteriologickými filtry 0,8 μm nebo 0,4 μm do normálních a následně filtrem 0,22 μm do sterilních zkumavek.



- uvolnění intracelulárních pigmentů během buněčné lyze
- uvolnění GTA





- centrifugovat 28 h. recipientní kulturu (6000 g/ 4 min) a resuspendovat v ½ objemu sterilního G pufru (pro 20 ml tedy v objemu 10 ml)
- do skleněné zkumavky přidat 0,4 ml G pufru, 0,2 ml kultury a 0,1 ml filtrátu z *Rhodobacter capsulatus* DE442 (Rif rezistentní, producent GTA).

KONTROLY:

- 1. Kontrola spontánních mutant -0,5 ml G pufru, 0,2 ml recipientní kultury**
- 2. Kontrola kontaminace filtrátu – 0,6 G pufru, 0,1 ml filtrátu**
- 3. Kontrola životaschopnosti buněk – 0,5 ml G pufru, 0,2 ml recipientní kultury (vyšet na YPS misky bez rifampicinu)**
- 4. Pozitivní kontrola – 0,4 ml G pufru, 0,2 ml recipientní kultury, 0,1 ml filtrátu s GTA (*provedeno pracovníky LMDM*)**

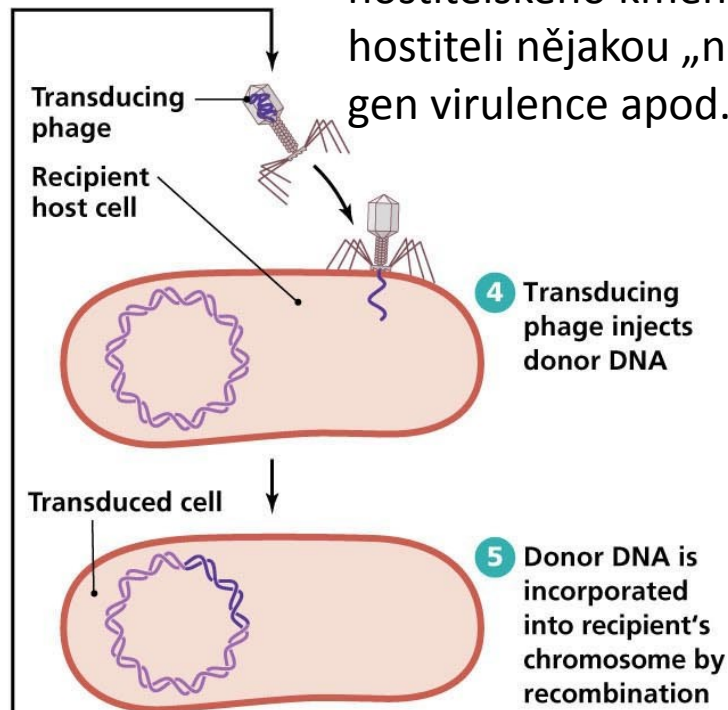
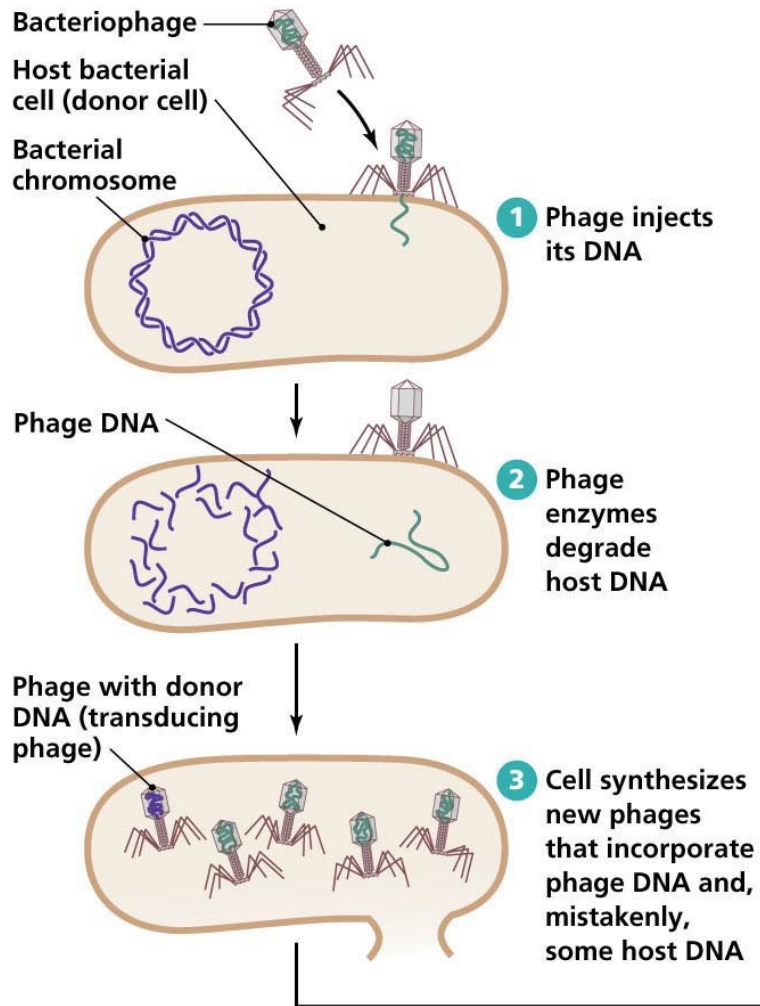
- inkubovat směs 1 h. / 35° C / 150 rpm

- k směsi přidat 0,9 ml RCV media a inkubovat další 3 hodiny.

- centrifugovat 4 min. / 6000g ve 2 ml Eppendorf zkumavkách, pellet resuspendovat ve zbytku supernatantu a vysét na YPS petriho misky s rifampicinem (výsl. koncentrace 100 µg/ml)

- inkubovat ve 35° C/ 2 – 3 dny

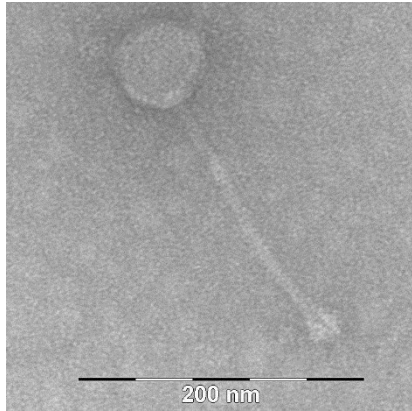
Transdukce



Bakteriofágem zprostředkovaný HGT.
Generalizovaná transdukce – defektní fágová částice sbaluje náhodnou část bakteriálního chromozomu.

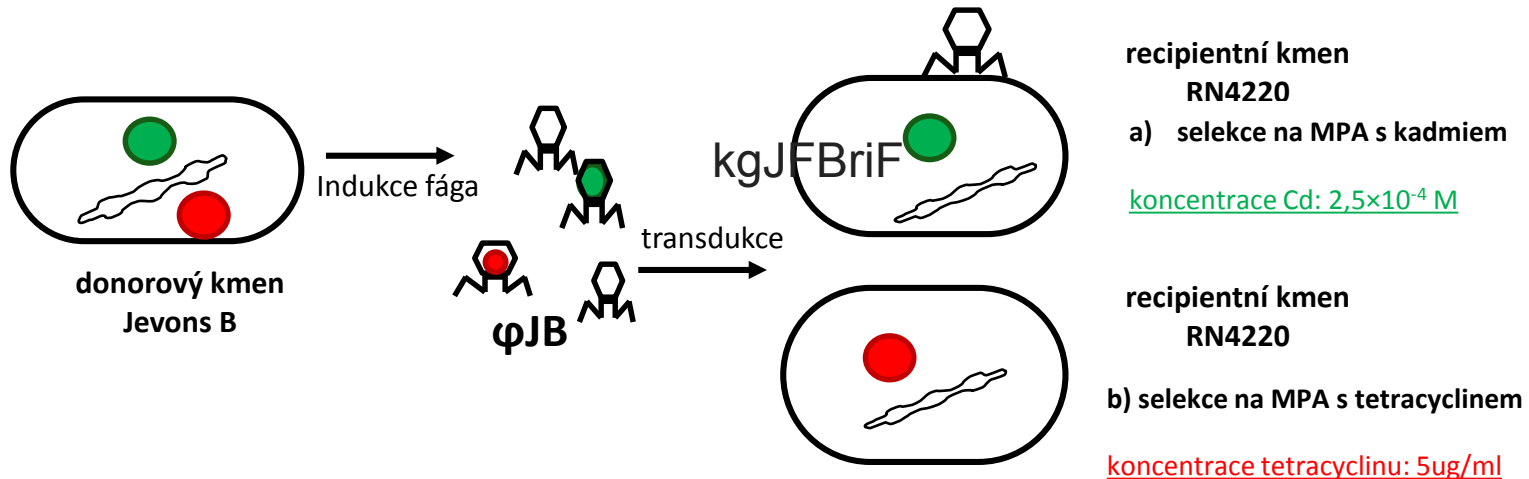
Specializovaná transdukce – SaPI
Lyzogenní konverze – bakteriofág se integruje do chromozomu hostitelského kmene a poskytuje hostiteli nějakou „novou vlastnost“ – gen virulence apod.

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, morfotyp B1, dlouhý, nekontraktilní bičík

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

Postup transdukce

