



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKY MIKROORGANISMŮ

Praktikum z molekulární biologie prokaryot (Bi7311)

Autoři

Mgr. Ivana Mašlaňová, Ph.D.

Mgr. Lucie Kuntová, Ph.D.

Mgr. Adéla Indráková

Mgr. Pavol Bárdy

Obsah

Úvod	3
Obecné zásady bezpečnosti práce v mikrobiologické a molekulárně-biologické laboratoři	4
Mutace a reparace	5
ÚLOHA: IZOLACE SPONTÁNNÍCH MUTANT REZISTENTNÍCH KE STREPTOMYCINU METODOU GRADIENTNÍCH PLOTEN	6
Transdukce	10
ÚLOHA: TRANSDUKCE PLAZMIDŮ DO RESTRIKČNĚ-DEFICIENTNÍHO KMENE <i>S. AUREUS</i> RN4220	11
Konjugace – přenos F faktoru	16
ÚLOHA: KONJUGACE KMENŮ <i>ESCHERICHIA COLI</i> HFR A F	17
Gene transfer agents	20
ÚLOHA: PŘÍPRAVA GTA A PŘENOS RIFAMPICINOVÉ REZISTENCE DO RECIPIENTNÍHO KMENE <i>RHODOBACTER CAPSULATUS</i>	21
Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)	24
ÚLOHA: IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA PRO PULZNÍ GELOVOU ELEKTROFORÉZU A PROVEDENÍ PULZNÍ GELOVÉ ELEKTROFORÉZY	25
Plazmidy	28
ÚLOHA: IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA Z TRANSDUKTANT A ELEKTROFORÉZA PLAZMIDŮ V AGARÓZOVÉM GELU	29
ÚLOHA: STANOVENÍ POČTU KOPÍÍ PLAZMIDŮ (PLASMID COPY NUMBER – PCN) V BUŇCE POMOCÍ QPCR.....	33
Polyvalentní bakteriofág a jeho endolysin	40
ÚLOHA: SETŘÍH FÁGOVÉHO ENDOLYZINU	42
PRACOVNÍ LIST I	47
MUTACE	47
PRACOVNÍ LIST II	48
TRANSDUKCE A STANOVENÍ POČTU KOPÍÍ TRANSDUKOVANÝCH PLAZMIDŮ V BUŇCE POMOCÍ QPCR.....	48
PRACOVNÍ LIST III	49
KONJUGACE	49
PRACOVNÍ LIST IV	50
GTA	50
PRACOVNÍ LIST V	51
PULZNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (PFGE)	51
PRACOVNÍ LIST VI	54
PLAZMIDY.....	54
PRACOVNÍ LIST VII	57
ENDOLYSIN	57

Úvod

Studium molekulární biologie prokaryot zásadně ovlivňuje humánní a veterinární medicínu i průmysl. V klinické praxi jsou poznatky tohoto oboru nezbytné pro úspěšnost léčby, která se stává stále obtížnější kvůli rostoucí rezistenci k antibiotikům vznikající v důsledku evoluce nových bakteriálních kmenů. V průmyslu jsou mikroorganismy nezastupitelné v biotechnologických procesech potravinářského, chemického či farmaceutického průmyslu. Porozumění molekulárním mechanismům u prokaryot umožňuje vytvářet nová léčiva, technologie či zefektivňovat současné postupy a ve svém důsledku vede ke zlepšení kvality života nás všech.

Jak ukazuje poslední desetiletí výzkumu, evoluci prokaryot významně ovlivňuje horizontální přenos genů. V průběhu praktika se studenti seznámí s analýzami pro identifikaci změn v prokaryotických genomech vlivem mutací, horizontálního přenosu genů transdukcí, konjugací a transformací, což prakticky doplní náplň přednášek. Studenti pochopí mechanismy evoluce prokaryot v praxi a získají přehled o technikách využitelných k manipulaci bakteriálních genomů.

Obecné zásady bezpečnosti práce v mikrobiologické a molekulárně-biologické laboratoři

Biologické riziko při práci v mikrobiologické a molekulárně-biologické laboratoři je spojeno se zvýšeným rizikem infekce pracovníků (studentů) organismy, s nimiž manipulujeme. Důsledné dodržování pravidel a kontrola pracovních postupů má preventivní charakter. Všechny mikroorganismy považujeme za potenciálně patogenní.

Za biologický infekční materiál považujeme veškeré mikroorganismy (bakterie, viry) a laboratorní materiál, který s nimi přišel do styku.

1. Vstup do laboratoře je povolen pouze pracovníkům a studentům účastnícím se daného praktika.
2. V laboratoři vykonáváme pouze úkony související s náplní a obsahem cvičení.
3. V laboratoři je zakázáno pít, jíst a kouřit.
4. Během cvičení používáme ochranné pracovní pomůcky (plášť, přezůvky).
5. V laboratoři je zakázáno otevírat okna, cirkulaci vzduchu zajišťuje klimatizace.
6. Před příchodem do laboratoře je vhodné seznámit se s obsahem cvičení.
7. Před započítím a po ukončení práce provedeme dezinfekci ploch a rukou vhodnými prostředky.
8. Na pracovní plochu nepatří osobní věci. Oblečení, batohy, tašky odkládáme v šatně. Hodinky, šperky (náramky, prsteny) jsou zakázány, mobilní telefony během praktika nepokládáme na pracovní plochu.
9. V laboratoři udržujeme pořádek a čistotu. Dekontaminaci pracoviště a přístrojů provádíme ihned po znečištění.
10. S mikroorganismy pracujeme ve flow-boxech a s vhodnými ochrannými pomůckami (plášť, rukavice).
11. Kahany necháváme hořet pouze po dobu, kdy je užíváme.
12. Manipulace s tlakovými nádobami, centrifugami, autoklávy a přístroji je povolena pouze pod dozorem proškolené osoby (vyučující).
13. Použité sklo a zbytky mikrobiálních kultur odkládejte na určená místa. Veškerý kontaminovaný materiál je nutné sterilizovat nebo dezinfikovat vhodnými prostředky, případně vyhodit do nádob určených na nebezpečný odpad.
14. Dojde-li k náhodnému potřísnění pokožky infekčním materiálem nebo k poranění, oznamte tuto skutečnost vyučujícímu. Pokožku je nutné ošetřit vhodným dezinfekčním prostředkem.
15. Po ukončení práce je nutné uklidit a dekontaminovat pracovní plochu. Odchod z místnosti je povolen pouze se svolením vyučujícího.

Mutace a reparace

Mutanta je varianta daného kmene nebo druhu, u nichž je modifikován jeden nebo více znaků, přenášejících se do potomstva. Aby mohla být změna dědičná, musí dojít ke změnám na úrovni genetického materiálu (DNA, RNA).

Mutanty bakteriálních kmenů jsou využívány v praxi ke studiu metabolických drah, způsobu regulace genové exprese a k přípravě laboratorních kmenů vhodných pro klonování. Příprava mutantních variant má značný význam pro přípravu průmyslově a zemědělsky využívaných bakteriálních kmenů, např. kmeny s nadprodukcí určitých látek (enzymů, mastných kyselin, vitamínů, antibiotik aj.) nebo kmenů vhodných k vakcinaci.

Proces vedoucí ke vzniku nových variant daného bakteriálního kmene se označuje jako **mutageneze**. K mutagenezi lze použít chemické, fyzikální nebo biologické mutageny. Po působení mutageny je třeba ponechat bakterie růst, aby došlo k fenotypové expresi navozených změn v genetickém materiálu (DNA, RNA). Obvykle je mutován jen jeden řetězec DNA. Buňka tak obsahuje zásobu standardních genových produktů. Mutantní buňky proto vykazují fyziologicky normální fenotyp, dokud nedojde k vyředění produktů nemutovaných genů. Následnou replikací genomu dojde k separaci řetězce obsahujícího mutovanou variantu genu do dceřiných buněk. Prodleva v projevu mutantního fenotypu je označována jako **fenotypové zdržení (lag)**. Tento jev můžeme sledovat u mutací navozujících rezistenci k antibiotikům (rifampicinu, streptomycinu aj.). Aby došlo k projevu rezistentního fenotypu, musí dojít k rozdělení buněk a expresi mutované varianty genu zodpovědné za navození rezistence.

Vznikne-li mutace působením určitého fyzikálního nebo chemického faktoru, mluvíme o **mutaci indukované**. Pokud je vznik mutace náhodný, jedná se o **mutaci spontánní**. Tato mutace vzniká během některého z molekulárních procesů (replikace, transkripce, rekombinace, reparace) odehrávajících se v buňce bez působení vnějších faktorů. Molekulární podstata spontánních a indukovaných mutací je stejná (delece, inserce nebo substituce nukleotidů). Frekvence spontánních mutací je podstatně nižší než u mutací indukovaných.

Je důležité odlišovat **mutaci od adaptace**. **Adaptace** je schopnost organismu přizpůsobit se danému prostředí. K adaptaci organismů vlivem řady faktorů v prostředí dochází v delším časovém horizontu a proces adaptace je reverzibilní. Dědí se pouze schopnost organismu adaptovat se na dané podmínky.

Flukтуаční test

Cílem testu je prakticky prokázat, zda mutace vznikají v organismu spontánně, nebo jako odpověď na vliv prostředí. Flukтуаční test odpovídá na otázku, zda jsou mutace přítomny v organismu před působením daným mutagenem, nebo vznikají v organizmech po vystavení tomuto faktoru.

Tedy způsobem přirozeného výběru popsaným Darwinem, nebo jak se domníval Lamarck, že se organismy přizpůsobují pouze díky okolnímu prostředí.

Teoretické předpoklady flukтуаčního testu:

- Pravděpodobnost mutace je velmi nízká, ale stejná pro každou buňku (10⁻⁶-10⁻¹⁰).
- Při fyziologické adaptaci reagují buňky na přítomnost látky v prostředí. Ta působí jako selekční faktor, který indukuje adaptivní odpověď (např. tvorbu enzymů apod.). Počet reagujících buněk v různých populacích je zhruba stejný.
- Uvažujeme-li určitou kulturu pocházející z jedné buňky, pak na konci kultivace bude počet mutant odrážet dobu, ve které mutace vznikla (tj. ve které generaci). Vzhledem k nízké pravděpodobnosti mutace lze předpokládat, že i počty mutant v jednotlivých klonech budou rozděleny podle Poissonovy řady - to proto, že záleží na generaci, ve které k mutaci došlo. Proto se budou významně lišit počty mutant v jednotlivých kulturách a v kultuře, kde byly buňky pěstovány dohromady.

Úloha: Izolace spontánních mutant rezistentních ke streptomycinu metodou gradientních ploten

Cíl úlohy: Cílem úlohy je izolovat kolonie *S. aureus* rezistentní ke streptomycinu, které vznikly spontánní mutací u citlivého kmene *S. aureus* při inkubaci na gradientních plotnách.

Seznam materiálu

- 18-ti hodinové bakteriální kultury na MPA (kmeny *Staphylococcus aureus* citlivé ke streptomycinu).
- Misky s 2% MPA, MPB na přípravu suspence bakteriální kultury.
- MPA na gradientní plotny: 160 ml na podkladovou vrstvu, 4 × 50 ml MPA na různé koncentrace streptomycinu (zvláště v Erlenmeyerových baňkách).
- MPA (5 × 300 ml) na selekci spontánních mutant na plotnách s 5 různými koncentracemi antibiotika (připravují se vždy čerstvé až dle vyhodnocení nárůstu na gradientních plotnách).
- Zásobní roztok streptomycinu (100 mg/ml).
- Sterilní hokejky, sterilní Petriho misky, pipety a 25 ml pipety s upravenou špičkou, plastové špičky, sterilní párátko.

Postup:

A. Izolace spontánních mutant

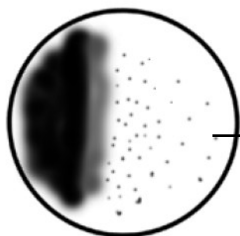
1. den

1. Z 18-ti hodinové bakteriální kultury kultivované na MPA odebrat 5 kliček a resuspendovat ve 3 ml MPB.
2. Z připravené suspenze stanovit titr buněk (CFU/ml) rozsevem 100 μ l z ředění 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , od jednoho ředění provést výsev na 3 misky s MPA. Kultivace při $37^{\circ}\text{C}/20$ hod.
3. Připravit gradientní plotny se streptomycinem o výsledných koncentracích: 10, 50, 100 a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Zásobní roztok streptomycinu přidat do rozvařené MPA půdy, předem vytemperované na max. 55°C .
4. Provést rozsevy bakteriální suspenze po 100 μ l na gradientní plotny, 3 plotny od příslušné koncentrace (**Obr. 1**).
5. Kultivovat při $37^{\circ}\text{C}/48$ hod.

2. – 3. den

1. Vyhodnocení nárůstu kultury na gradientních plotnách s antibiotikem. Jednotlivé kolonie za linií kompaktního nárůstu lze považovat za mutované bakterie (**Obr. 2**). Spočítat všechny domnělé mutanty.

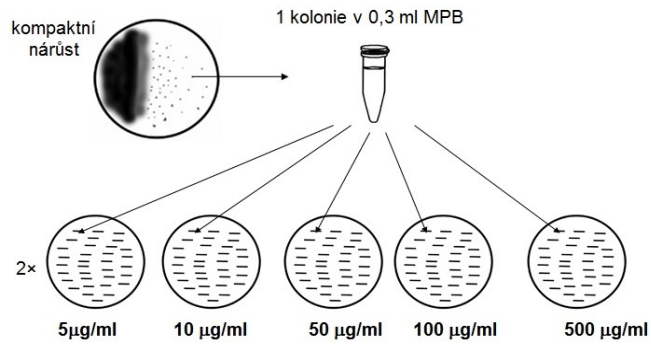
Obr. 2. Nárůst kultury bakteriálního kmene na gradientní plotně



Jednotlivé kolonie za zónou kompaktního nárůstu spočítat a přenést do MPB k přípravě suspenze buněk a přečárkování

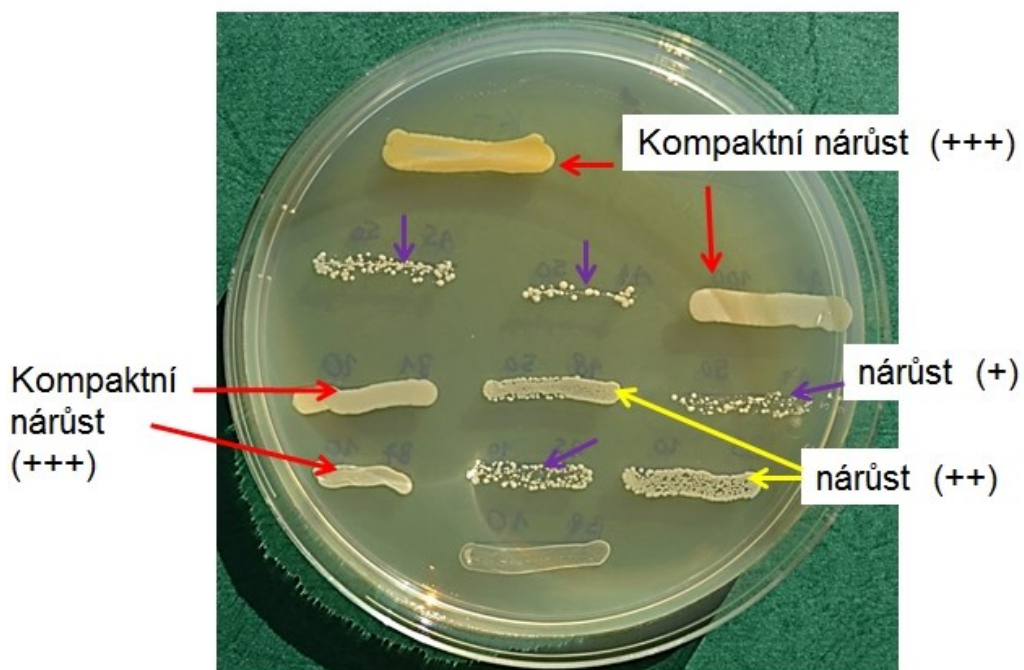
2. Přečárkovat vybrané mutanty sterilním párátkem na MPA se streptomycinem o koncentracích 5, 10, 50, 100 a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (**Obr. 3**).
3. Kultivovat při $37^{\circ}\text{C}/20$ hod.
4. Hodnotit izolované mutanty testovaného kmene *S. aureus* (**Obr. 4**).

Obr. 3. Ověření necitlivosti mutant k antibiotiku



5. Hodnotit izolované mutanty testovaného kmene *S. aureus* dle obr. 4.

Obr. 4. Nárůst mutant *S. aureus* na MPA s antibiotikem



B. výpočet frekvence spontánních mutací.

Stanovit počet získaných mutant a určit frekvenci mutací k jednotlivým koncentracím streptomycinu. Výpočet mutačního indexu (F):

$$F = \frac{Mu}{N}$$

Mu – počet získaných mutant v 1 ml původní suspenze

N – počet buněk v 1 ml původní suspenze

C. Stanovení citlivosti kmenů ke streptomycinu

1. den

1. Stanovit citlivost kmenů k streptomycinu. Z připravené suspence testovaného kmene odebrat 100 μ l a vyšetřit přes 0,7% MPA vytemperovaný na 45°C na plotnu s 2% MPA. Po utužení vykápnot antibiotikum (10, 50, 100 a 500 μ g/ml) na povrch agarové plotny a po vsáknutí kultivovat při 37°C/20 hod. Jako kontrolu použít kmen *S. aureus* rezistentní ke streptomycinu.

2. den

1. Vyhodnotit test ověření citlivosti testovaného kmene k antibiotiku.

Literatura:

Methods in Molecular Biology (2016) 1373: 111-115, doi: 10.1007/7651_2014_190

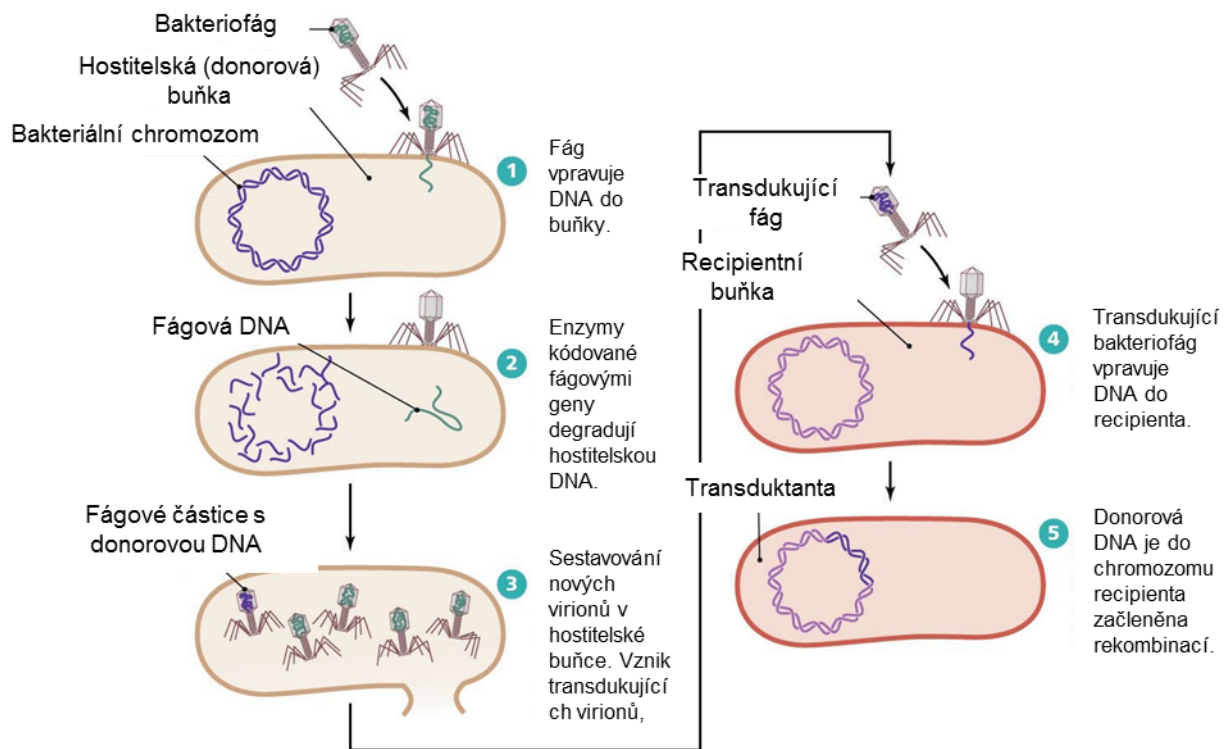
An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. New York: W. H. Freeman; 2000. Spontaneous mutations. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21897/>

Mechanisms of Streptomycin Resistance: Selection of Mutations in the 16S rRNA Gene Conferring Resistance. Springer B, Kidan YG, Prammananan T, Ellrott K, Böttger EC, Sander P. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(10):2877-2884. doi:10.1128/AAC.45.10.2877-2884.2001.

Transdukce

Bakteriální genomy se vyznačují velkou genetickou variabilitou, která souvisí se schopností bakterií adaptovat se na měnící se podmínky prostředí. Vysoká adaptabilita a rychlá evoluce bakteriálních genomů je spojena s přežíváním bakterií pod neustálým selekčním tlakem, např. antimikrobiálních látek. Variabilita genomů je výsledkem spolupůsobení mutací genů a získem nebo ztrátou DNA. Akumulace mutací je pomalý proces, sám o sobě nedostačující k rychlé adaptaci bakteriálních populací. Hlavní evoluční sílu tak představuje horizontální přenos genů (HGT), zprostředkovaný několika mechanismy: (a) **transformací** – přenos samotné DNA; (b) **konjugací** – přenos DNA zprostředkovaný přímým kontaktem buněk prostřednictvím pilusu; (c) **transdukci** (**Obr. 5**) – přenos genetického materiálu v populaci bakteriálních buněk prostřednictvím virových částic (bakteriofágů).

Obrázek 1: Transdukce. Transdukce zahrnuje několik kroků: (a) fág infikuje hostitelskou buňku, (b) fág se replikuje v hostiteli, (c) sestavování fágových virionů, některé viriony chybně sbalují i hostitelskou DNA – vznik transdukujících částic, (d) uvolnění fágového potomstva do prostředí.



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

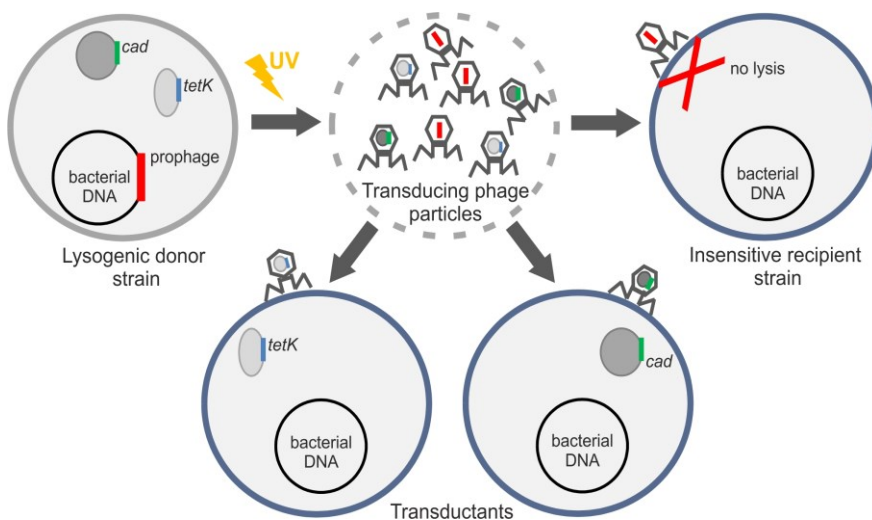
Proces transdukce u rodu *Staphylococcus* je nejčastěji zprostředkován mírnými (temperovanými) fágy z řádu *Caudovirales*, čeledi *Siphoviridae*. V průběhu transdukce je genetický materiál začleněn do virionu bakteriofága

a je přenesen do jiného mikroorganismu. Transdukující fágová částice je stabilní, chráněna proteinovým obalem, proto se sbalená DNA šíří snadněji než volná DNA. Genetický materiál je chráněn před degradací hostitelskými restričními endonukleázami.

Klíčovým krokem transdukce je sbalení DNA do virionu během lytického cyklu fága. Tento proces je vysoce specifický pro fágovou DNA. Při chybném sbalení může s frekvencí 10^{-4} - 10^{-8} dojít k začlenění bakteriální DNA (plazmidy, části chromozomu) do hlavy fága a přenesení segmentu DNA do nového hostitele. Transdukce může být obecná nebo specifická, podle specifity sbalování bakteriální DNA.

Životní cyklus mírných fágů se skládá z lyzogenního a lytického cyklu. Během lytického cyklu dochází ke vzniku transdukujících částic (**Obr. 1**). Přechod bakteriofágů z lyzogenního do lytického cyklu může být v laboratorních podmínkách indukován různými chemickými nebo fyzikálními činidly (např. UV záření, mitomycin C, ciprofloxacin aj.) (**Obr. 2**).

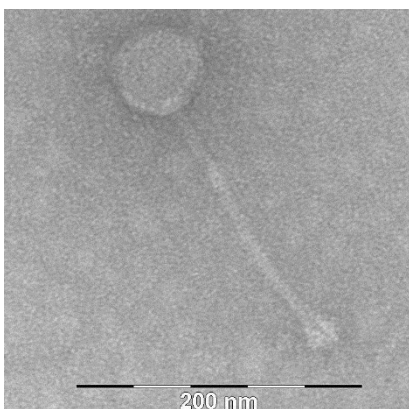
Obrázek 2: Vznik transdukujících fágových částic. Po indukcii profága prostřednictvím UV záření dojde k uvolnění fágového potomstva. S různou frekvencí dochází ke vzniku transdukujících částic přenášejících část bakteriálního chromozomu.



Úloha: Transdukce plazmidů do restričně-deficientního kmene *S. aureus* RN4220

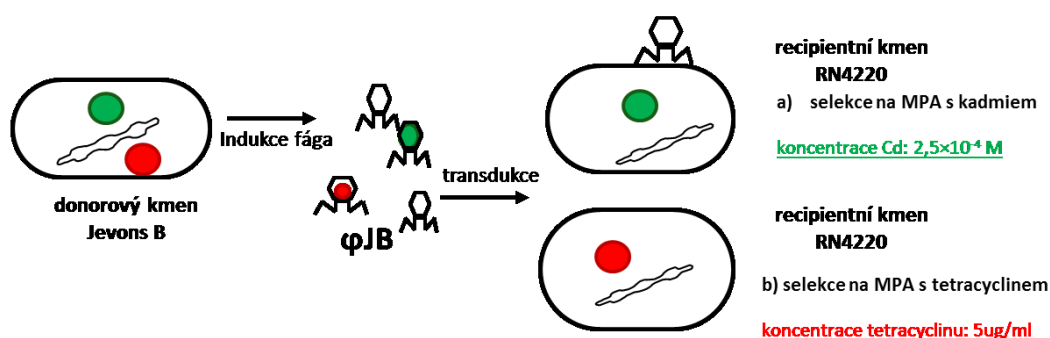
Cíl úlohy: Cílem úlohy je přenos plazmidů kódujících geny rezistence do bezplazmidového recipientního kmene *S. aureus* RN4220 prostřednictvím bakteriofága ϕ JB (**Obr. 3**).

Obrázek 3: Bakteriofág ϕ JB. Snímek z transmisního elektronového mikroskopu (TEM).



V úloze se pracuje s bakteriofágem ϕ JB, který byl indukován UV zářením z donorového kmene *S. aureus* Jevons B. Tento donorový kmen obsahuje dva plazmidy (pT181, pHOUMR-like). Plazmid pT181 kóduje gen pro rezistenci k tetracyklinu, plazmid pHOUMR-like gen pro rezistenci k β -laktamovým antibiotikům a ke kadmiu. Úkolem bude připravit kmen RN4220 obsahující plazmid pT181 a dále kmen RN4220 s plazmidem pHOUMR-like (**Schéma I**).

Schéma I. Přenos plazmidů pT181, pHOUMR-like do recipientního kmene RN4220 transdukací. Po indukci bakteriofága z donorového kmene Jevons B dochází k uvolnění fágového potomstva. Transdukující lyzát je pomnožen na recipientním kmeni RN4220 a pomocí vhodných selekčních médií jsou selektovány buňky obsahující plazmidy s geny rezistence (transduktanty).



Seznam materiálu:

- Připravený fágový lyzát ϕ JB (cca 500 ml), recipientní kmen *S. aureus* RN4220.
- MPA, 0,7% soft agar, roztoky tetracyklinu (5 mg/ml), kadmia $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (0,01 M), citrátu sodného (0,1 M) a roztok CaCl_2 (20 mM).
- Sterilní odměrný válec, kónické zkumavky (50 ml), Petriho misky, sada pipet, špičky, Eppendorfovy mikrozukavky, Wassermannovy zkumavky s kovovým kloboukem, vodní třepací lázeň

Postup:

Úloha zahrnuje několik dílčích kroků:

- transdukce plazmidů.
- stanovení titru recipientního kmene (CFU/ml) a titru fágového lyzátu (PFU/ml).
- výpočet frekvence transdukce.
- ověření přenosu plazmidových genů rezistence (*tetK* a *blaZ*) pomocí PCR
- ověření úspěšnosti transdukce pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE)

A. transdukce plazmidů.

1. Zaočkovat recipientní kmen (20 μ l zamražené kultury do 20 ml MPB) a inkubace 37 °C / 18 hod.
3. Přidat roztok CaCl₂ (zás. roztok 20 mM) ke kultuře recipientního kmene do výsledné koncentrace 2 mM.
4. Smíchat 1 ml kultury recipienta s 1 ml transdukujícího fágového lyzátu tak, že hodnota multiplicity infekce (poměr počtu fágových částic k počtu buněk) bude max. 1.
5. Inkubovat transdukční směs při 37 °C / 25 min. za stálého třepání.
6. Přidat roztok citrátu sodného (zás. roztok 0,1 M) k transdukční směsi do výsledné koncentrace 15 mM, centrifugovat 3000 rpm / 10 min. / 4–8 °C a resuspendovat pelet v roztoku 17 mM citrátu sodného (objem pro resuspendaci závisí na počtu misek, na které se bude transdukční směs vysévat a na množství směsi vyseté na jednu misku (ideálně 100–300 μ l).
7. Vyset transdukční směs na misky s MPA obohaceným o citrát sodný (20 mM) a tetracyklin (5 μ g/ml) nebo kadmium (2,5.10⁻⁴M).
8. Inkubovat selekční misky s transdukční směsí při 37 °C / 24–48 hod.

B. Stanovení titru recipientního kmene (CFU/ml) a titru fágového lyzátu (PFU/ml).

Stanovení titru bakterií nebo fágových částic vychází z ověřeného předpokladu, že z 1 životaschopné buňky/fágové částice vyrůstá 1 kolonie/1 plaka. Bakteriální kulturu nebo fágový lyzát je třeba ředit, aby se kolonie/plaky po nárůstu nepřekrývaly a šlo je spočítat. Titry se provádí na 3 miskách od každého ředění, aby se odhalila případná chyba v provedení, výsledné počty se zprůměrují. Výsledek se uvádí v CFU/ml (colony forming units) pro bakterie a v PFU/ml (plaque forming units) pro fágy.

Postup stanovení titru recipientního kmene (CFU/ml):

1. naředit kulturu 10⁻³ až 10⁻⁶ dle očekávaného výsledku.
 - ředit desítkovou řadou: do 900 μ l bujónu 100 μ l kultury, promíchat, vyměnit špičku a novou špičkou přenést 100 μ l kultury do dalších 900 μ l bujónu atd.
 - ředění do plastových mikrozkuvek a plastovými špičkami nebo do sterilních Wassermannových zkuvek a skleněnými pipetami.
2. do zkuvky s 0,7% měkkým masopeptonovým agarem vytemperovaným na 45 °C přidat 100 μ l 18-ti hod. bakteriální kultury příslušného ředění (10⁻³ až 10⁻⁶).
3. od jednoho ředění provést výsev na 3 misky s MPA.
4. kultivovat 18 hod. / 37 °C, misky otočit dnem vzhůru (kondenzující voda).

Postup stanovení titru fágového lyzátu (PFU/ml):

1. naředit fágový lyzát 10⁻³ až 10⁻⁷ dle očekávaného výsledku.
 - ředit desítkovou řadou: do 900 μ l bujónu 100 μ l lyzátu, promíchat, vyměnit špičku a novou špičkou přenést 100 μ l lyzátu do dalších 900 μ l bujónu atd.
 - ředění do plastových mikrozkuvek a plastovými špičkami nebo do sterilních Wassermannových zkuvek a skleněnými pipetami (materiál zvolit na základě doporučení pro daného fága).
2. do zkuvky s 0,7% měkkým masopeptonovým agarem vytemperovaným na 47°C přidat 250 μ l 0,02 M CaCl₂, 100 μ l 18-ti hod. bakteriální kultury (titrační kmen pro daného fága), 100 μ l lyzátu v příslušném ředění (10⁻³ až 10⁻⁷).

3. od jednoho ředění provést výsev na 3 misky s MPA.
4. kultivovat 18 hod. / 37 °C, misky otočit dnem vzhůru.

C. výpočet frekvence transdukce.

Zjištění počtu kolonií transduktant na miskách a výpočet frekvence transdukce jako podíl počtu transduktant (CFU/ml – *colony-forming units / 1 ml*) k počtu fágových částic v transdukujícím lyzátu (PFU/ml – *plaque-forming units / 1 ml*).

Titry bakteriální kultury a fágového lyzátu počítáme jako průměrné počty kolonií/plak na miskách příslušného ředění. Počty je nutné přepočítat na objem 1ml kultury/lyzátu.

Frekvence transdukce:

$$A = Y/p$$

Y – teoretický počet transduktant na 1ml transdukční směsi

p – počet virionů (PFU) transdukujícího fága v 1ml transdukční směsi

A - frekvence transdukce = **Y/p**

D. ověření přenosu plazmidových genů rezistence (*tetK* a *cadD*) pomocí PCR.

Úspěšnost transdukce lze v prvním kroku ověřit přítomností genů rezistence v transduktantech pomocí jednoduché PCR. U transduktant selektovaných na plotnách s tetracyklinem zjišťujeme přítomnost genu *tetK*, u transduktant selektovaných na kadmiu přítomnost genu *cadD*.

Seznam materiálu:

- Předem připravená plazmidová DNA: donorový kmen *S. aureus* Jevons B, recipientní kmen *S. aureus* RN 4220
- PCR reagenty: voda pro PCR, nukleotidy, DNA-polymeráza, MgCl₂
- sada pipet, špičky, Eppendorfovy mikrozkušavky, cycler, vybavení pro provedení elektroforézy

Postup:

Nejprve zjistíme sekvenci obou plazmidů a genů *tetK* a *cadD* pomocí databáze NCBI. Zkontrolujeme sekvenci primerů, zda odpovídají sekvencím sledovaných genů.

Název primeru	Sekvence primeru	Velikost produktu (bp)	Reference
<i>tetK-F</i>	TCGATAGGAACAGCAGTA	169	Ng <i>et al.</i> , 2001
<i>tetK-R</i>	CAGCAGATCCTACTCCTT		
<i>cadD-F</i>	GGATATTAGGTTTATTGGGTT	162	Varga <i>et al.</i> , 2012
<i>cadD-R</i>	CGCCACAACCTTGCTATCGTA		

Reakční směs pro PCR mícháme dle doporučení výrobce (např. FasrStart PCR Master, Roche Diagnostics).

Protokol PCR:

Počáteční denaturace	94°C/4 min
Amplifikace (30 cyklů)	94°C/30 s
	55 °C/30 s
	72 °C/4 min
Závěrečná extenze	72°C/4 min

Literatura:

Efficient plasmid transduction to *Staphylococcus aureus* strains insensitive to the lytic action of transducing phage. Mašlaňová I, Stříbná S, Doškař J, Pantůček R. FEMS Microbiology Letters 2016; 363(19): fnw211, doi:10.1093/femsle/fnw211.

Molecular characterisation of a new efficiently transducing bacteriophage identified in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Varga M, Pantůček R, Růžičková V, Doškař J. Journal of General Virology 2016; 97(1):258-268.

Phage transduction. Shan G., Roberts A., Mullany P. (eds) Clostridium difficile. Methods in Molecular Biology, 2016, vol 1476. Humana Press, New York, NY, doi.org/10.1007/978-1-4939-6361-4_13.

Bacteriophage Transduction in *Staphylococcus aureus*. Olson M.E. In: Bose J. (eds) The Genetic Manipulation of Staphylococci. Methods in Molecular Biology, 2014, vol 1373. Humana Press, New York, NY

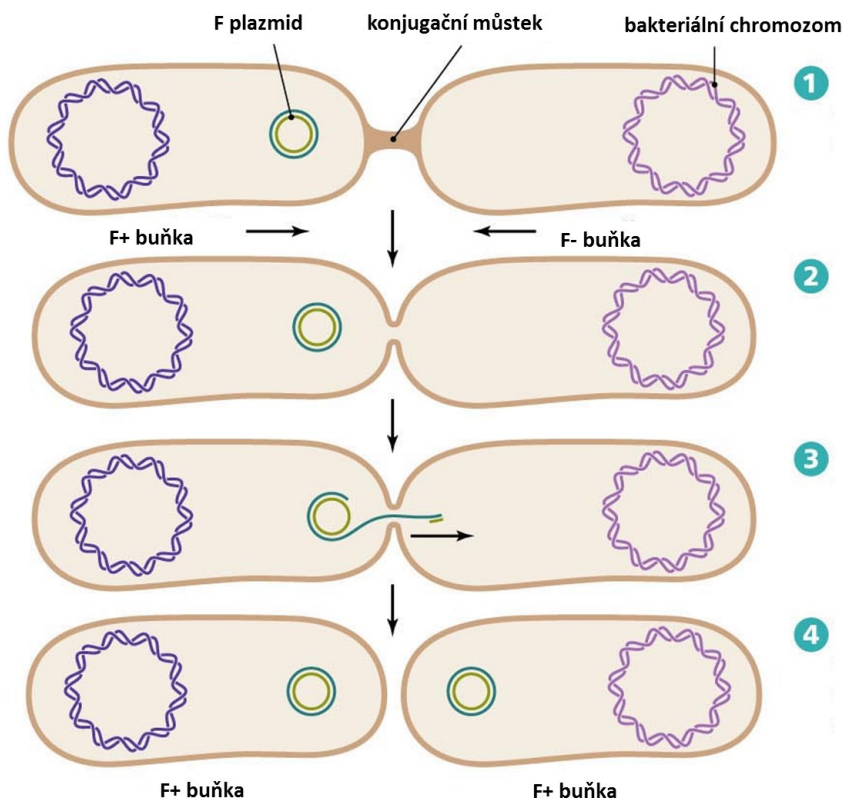
Bacteriophages of *Staphylococcus aureus* efficiently package various bacterial genes and mobile genetic elements including SCCmec with different frequencies. Mašlaňová I, Doškař J, Varga M, Kuntová L, Mužík J, Malúšková D, Růžičková V, Pantůček R. Env Microbiol Reports 2013; 5(1):66-73.

Konjugace – přenos F faktoru

Konjugace je proces, při kterém je DNA přenášena z donorové buňky do recipientní v důsledku kontaktu buněk a vytvoření konjugčního můstku (**Obr. 4**). 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 cytoplasmě	Může být přenášen konjugací do recipientní buňky; přenos chromozomálních genů může zprostředkovat při velmi nízké frekvenci.
F' ⁻	F faktor nese segment bakteriálního chromozomu	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 chromozomu	Může přenášet chromozomální znaky při vysoké frekvenci (od pevného bodu na chromozómu, který je charakteristický pro každý Hfr)

Obrázek 4: Konjugace u *E. coli*. (1) Donorová buňka vytváří pilus, kterým kontaktuje recipientní buňku. (2) Dochází k vytvoření póru mezi oběma buňkami. (3) Jeden plazmidový řetězec přechází do dceřinné buňky. (4) Dosyntetizování komplementárního plazmidového řetězce v donorové i recipientní buňce – vznik F⁺ buněk.



Úloha: Konjugace kmenů *Escherichia coli* Hfr a F

Cíl úlohy: Cílem úlohy je stanovit frekvenci konjugace mezi donorovým kmenem *E. coli* HfrH Reich a *E. coli* F⁻ 28R801, ověřit vznik transkonjugant. Pozorování změny fenotypových vlastností transkonjugant.

Kmeny použité v experimentu		Fenotypové vlastnosti kmenů*
Donor	<i>Escherichia coli</i> HfrH Reich	tre ⁺ leu ⁺ pro ⁺ ade ⁺ thi ⁻ str ^s
Recipient	<i>Escherichia coli</i> F ⁻ 28R801	tre ⁻ leu ⁻ pro ⁻ ade ⁻ thi ⁻ str ^r

*auxotrofní mutanty pro esenciální aminokyseliny threonin, leucin, adenin, thimin; rezistentní / senzitivní k streptomycinu

Do recipientních buněk přechází segment **tre⁺, leu⁺, pro⁺, ade⁺, thi⁻**. Marker **str^{S/R}** zůstává v endogenu.

Seznam materiálu:

Bakteriální kmeny:

Escherichia coli HfrH Reich, *Escherichia coli* F⁻ 28R801

Média a materiál:

- Sterilní laboratorní sklo – Erlenmayerovi baňky 250 ml, 100 ml, 50 ml, 25 ml, petriho misky

Minimální agar: míchá se ze složek A+B+C+D+E

- vodní agar: 3,96g agaru č. 3 do 180 ml dH₂O; autoklávueme
- roztok solí (4x koncentrovaný roztok solí):
20 g NH₄Cl; 4g NH₄(NO)₂; 8g Na₂SO₄; 12g K₂HPO₄; KH₂PO₄; rozpuštěno v 1l dH₂O; přidat 1,6 ml z 1M zásobního roztoku MgSO₄.7H₂O po autoklávování
- 2,5 ml 20% glukózy
- streptomycin (výsl. konc. 100 g/ml, zás. roztok 100 mg/ml)
- thyamin (5 g/ml, zás. roztok 50 mg/ml)

LBA médium: do 1 l dH₂O – 10 g Trypton, 5 g Yeast extract, 10 g NaCl, pH 7, autoklávueme, pro agar přidavek agaru č. 2, na 1 l media 15 g agaru

PNS médium: do 1 l dH₂O – 1 g glukózy, 1,5 g Bacto beef extract, 1,5 g Yeast extrakt, 5 g pepton, 3,5 g NaCl, 3,68 g K₂HPO₄, 1,32 g KH₂PO₄, pH 7,2 (upravit 10M NaOH) autoklávovat 20 min. /121 °C

Příprava minimálního agaru (MA) pro konjugaci:

Složka A: vodní agar 180 ml (vytemperovaný na 45 °C)

Složka B: roztok solí 60 ml (vytemperovaný na 45 °C)

Složka C: 20% glukóza

Složka D: streptomycin (výsl. konc. 100 µg/ml, zás. roztok 100 mg/ml)

Složka E: thyamin (výsl. konc. 5 µg/ml, zás. roztok 50 mg/ml)

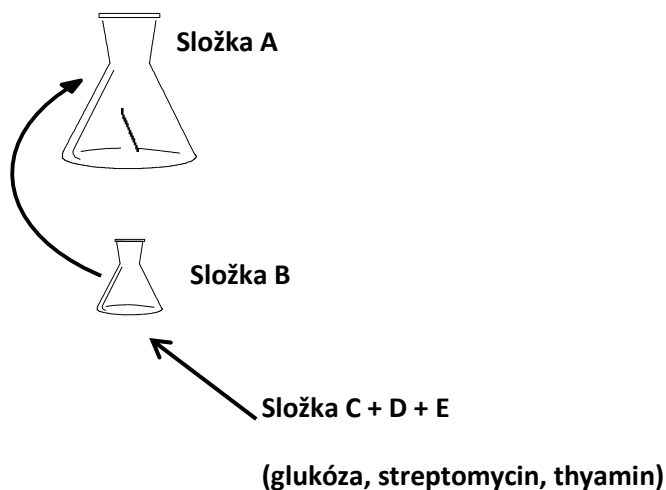


Schéma konjugace

Kontrola (MA, str, thi)

Ředění kultury na 10^{-1} , ve fyziologickém roztoku, výsev 0,1 ml, 1 plotna.



E. coli HfrH Reich

Kontrola (MA, str, thi)

Ředění kultury na 10^{-1} , ve fyziologickém roztoku, výsev 0,1 ml, 1 plotna.



E. coli F⁻ 28R801



Konjugace

5ml + 5ml (Inkubace 37°C/ 3 hod.)

Stanovení titru kultury na LBA

Ředění 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , po třech plotnách (0,1 ml)



Výsev transkonjugant
MA, streptomycin, thiamin
(3 plotny po 0,1 ml, 3 plotny po 0,2 ml)



Postup:

1. Zaočkovat kulturu donorového a recipientního kmene: naočkovat 1 kličku do 20 ml PNS média a inkubovat při 37 °C 18 hodin (do logaritmické 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. Stanovit titr donorového kmene HfrH rozsevem na plotny LBA 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 + thyamin 5 µg/ml. **Ředění provádět ve fyziologickém roztoku!**
5. Po 3 hodinách inkubace vyset neředěnou konjugační směs na selekční půdu po 0,1 a 0,2 ml (vždy po 3 plotnách).

Literatura:

Conjugation in *Escherichia coli*. Phornphisutthimas S., Thamchaipenet A., Panijpan B. (2007) Biochemistry and Molecular Biology Education 35 (6): 440–445, <https://doi.org/10.1002/bmb.113>

Developing an efficient and reproducible conjugation-based gene transfer system for bifidobacteria. Wilfredo Dominguez and Daniel J. O'Sullivan. (2013) Microbiology 159: 328–338.

Bacterial conjugation. Griffiths A. J. F., Miller J. H., Suzuki D. T., *et al.* An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman; 2000.

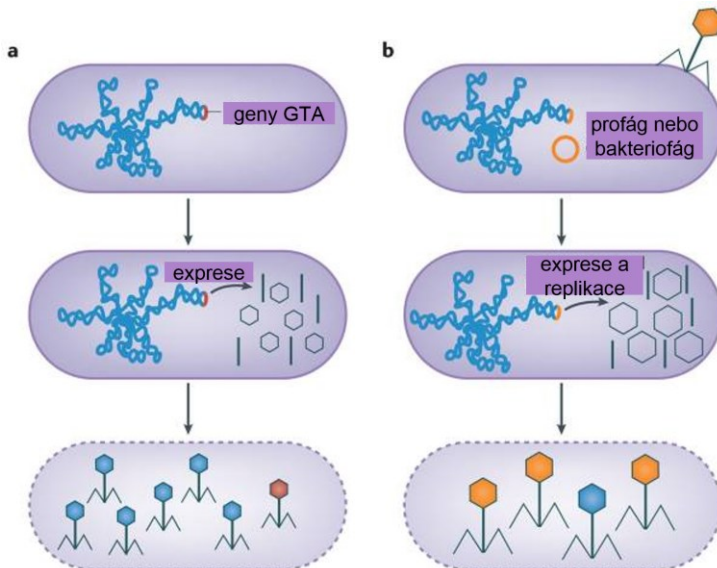
Gene transfer agents

Horizontální přenos genů hraje významnou roli v evoluci bakteriálních a archeálních genomů. Zajímavým příkladem je přenos genů zprostředkovaný částicemi, které se označují jako gene transfer agents (GTA). Tyto částice lze identifikovat u širokého spektra prokaryot. Ačkoli GTA připomínají fágy, postrádají některé jejich charakteristické znaky. GTA sbalují do svých kapsidů náhodné části chromozomu svého hostitele a zároveň nesbalují geny kódující jejich virion, které jsou během sbalování silně transkribovány a tudíž pro sbalování blokovány transkripčním aparátem. Toto je hlavní rozdíl oproti bakteriofágům, účastníci se obecně transdukcí. Produkce GTA není výsledkem infekce, ale geny kódující tyto fágům podobné částice jsou lokalizovány v genomu buňky, která je producentem GTA.

Všechny známé GTA mají strukturu podobnou bičíkatým fágům a jsou uvolňovány do vnějšího prostředí lyzí své hostitelské buňky. Uvolněné GTA pak přenášejí části DNA hostitele do nového recipienta. Oproti tomu, transdukující fágové částice vznikají během replikace fágových částic uvnitř hostitelské buňky a pouze zlomek nově vzniklých virionů obsahuje DNA svého hostitele (**Obr. 5**).

Obrázek 5: Srovnání GTA s transdukující fágovou částicí.

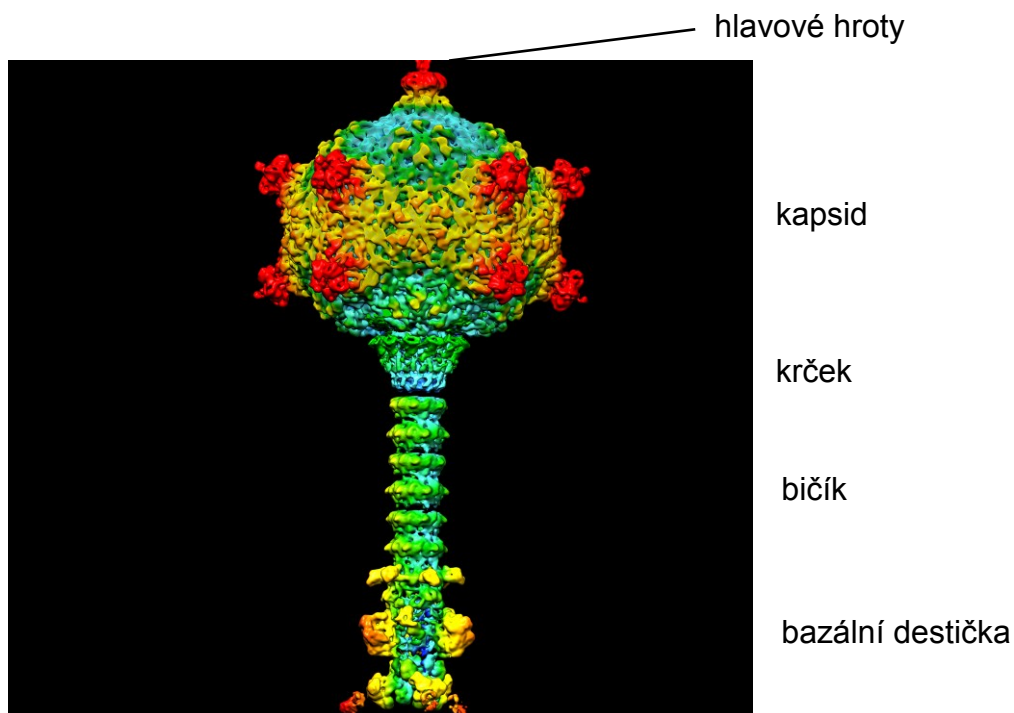
(a) Geny kódující GTA jsou lokalizovány na hostitelském chromozomu (červeně) a jejich exprese vede k tvorbě částic (černá). Náhodné segmenty DNA z produkující buňky jsou zabaleny v částicích (modré viriony) a pouze některé částice obsahují geny pro vlastní produkci GTA (červený virion). Pro GTA je charakteristické, že kapacita hlavičky je nedostatečná, aby sbalila DNA s geny kódujícími všechny strukturální proteiny pro tvorbu virionu (naznačeno malými hlavičkami). GTA vyžadují pro uvolnění z buněk lyzi svého hostitele (přerušovaná čára). (b) Při produkci transdukčních fágových částic dochází k expresi fágových nebo profágových genů v genomu hostitele, což vede k produkci nových virionů (černá) a replikaci fágového genomu. Následně vzniká nové fágové potomstvo (oranžové viriony) a s nízkou frekvencí při chybném sbalení DNA dochází ke vzniku transdukující částice (modrý virion).



První objevená fágům podobná částice (GTA) je označována jako RcGTA podle jejího producenta, purpurově zbarvené fotosyntetizující bakterie druhu *R. capsulatus*. U směsných kultur kmenů s různými fenotypy rezistence k antibiotikům byly pozorovány dvojitě rezistentní kmeny a způsob genetické výměny byl podobný transdukcí. Nevyžadoval kontakt mezi buňkami a proces přenosu nebyl ovlivněn působením DNázy.

Částice GTA je kódována několika klastry genů, přičemž nejvýznamnější je 14 kb klastr 17 genů. Každá částice RcGTA obsahuje ve svém virionu přibližně 4kb of DNA, což je pouze 30% z minimálního počtu bp pro tvorbu její vlastní struktury (**Obr. 6**).

Obrázek. 6: Struktura fágům podobných částic – GTA.



Úloha: Příprava GTA a přenos rifampicinové rezistence do recipientního kmene *Rhodobacter capsulatus*

Cíl úlohy: Cílem úlohy je připravit filtrát obsahující GTA indukované z hostitelského kmene *Rhodobacter capsulatus* DE442 (Rif rezistentní, producent GTA) a prokázat přenos genu pro rezistenci k rifampicinu prostřednictvím GTA do recipientního kmene *Rhodobacter capsulatus* B10 (Rif citlivý).

Seznam materiálu:

Bakteriální kmeny:

Rhodobacter capsulatus DE442 (Rif rezistentní, producent GTA); *Rhodobacter capsulatus* B10 (Rif citlivý)

Média a material:

Rifampicin, Petriho misky s YPS médiem s ATB a bez ATB, bakteriologické filtry 0.22 μm , sterilní skleněné zkumavky (15 ml)

RCV bujón/agar (objem 1 l; autoklávuje): 4 g D, L- kyseliny jablečné; 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 10 mM pufr fosforečnanu draselného; 200 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 75 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 12 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 20 mg Na_2EDTA ; **1 ml roztoku stopových prvků**; 1 mg thiamine hydrochloride (vitamín B1 hydrochlorid). pH upravit na 6.8 pomocí NaOH před autokláfováním. (pro agar přidat agar č. 1 – 1,5%)

Roztok stopových prvků (v 250ml dH₂O): 0.7 g H_3BO_3 ; 398 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 188 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 60 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

G pufr (sterilizovat filtrací): 10 mM Tris-HCl (pH 7.8); 1 mM MgCl_2 ; 1 mM CaCl_2 ; 1 mM NaCl; 0.5 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)

YPS médium (autoklávuje): 0.3% yeast extract; 0.3% Bactopeptone; 2 mM CaCl_2 ; 2 mM MgSO_4 ; (pro agar přidat agar č. 2 do koncentrace 1 – 1,5%, pro selekci přidat Rifampicin do koncentrace 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Postup:

A. Příprava filtrátu obsahujícího GTA

1. den:

- ráno naočkovat *R. capsulatus* DE442 do 20 ml RCV bujónu, inkubovat 28 h./ 35 °C /200 rpm

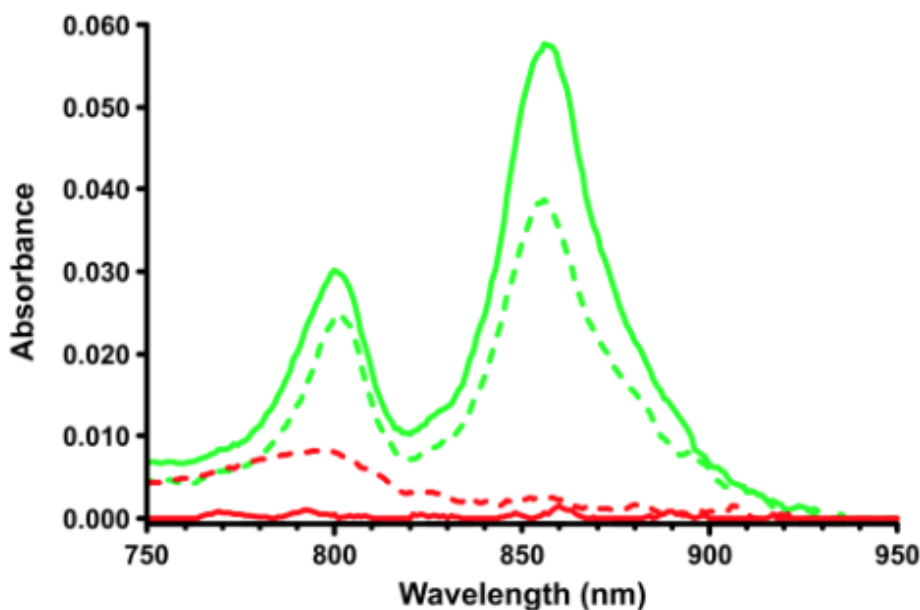
2. den:

- přeočkovat 28 h. kulturu *R. capsulatus* DE442 do YPS media (1% celkového objemu)
- naplnit sterilní skleněné zkumavky po vrch, pečlivě uzavřít a ujistit se, že uvnitř nejsou vzduchové bubliny, víčko zkumavek utěsit parafilmem
- inkubovat stacionárně 65 h./35°C v osvětleném termostatu

5. den:

- centrifugace 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) - (Obr. 7).
- centrifugace zbytku buněk (8000 g/30 min/4°C), filtrace supernatantu bakteriologickými filtry 0,8 µm nebo 0,4 µm do normálních a následně filtrem 0,22 µm do sterilních zkumavek.
- uchovávat ve 4°C.

Obrázek 7: Absorpční spektrum intracelulárních pigmentů *R. capsulatus* (Fogg et al., 2012).



B. Přenos Rif rezistence do recipientního kmene prostřednictvím GTA

1. den:

- zaočkovat *R. capsulatus* B10 do 20 ml RCV bujónu, inkubovat 28 h. /35 °C/ 200 rpm

2. den:

- centrifugovat 28 h. 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). Jako kontrolu spontánních mutant přidáme do další zkumavky místo filtrátu G pufr. Jako kontrolu kontaminace filtrátu přidáme do další zkumavky jenom 0,6 ml G

pufru a 0,1 ml filtrátu. Pro kontrolu životaschopnosti buňek přidáme do další zkumavky 0,5 ml G pufru, 0,2 ml kultury a tuhle směs na konci protokolu vysejeme na YPS plotnu bez rifampicinu.

- 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

Literatura:

One for All or All for One: Heterogeneous Expression and Host Cell Lysis Are Key to Gene Transfer Agent Activity in *Rhodobacter capsulatus*. Paul C., Fogg M., Alexander B., Westbye J., Beatty T. (2012), PLoS ONE 7(8): e43772.

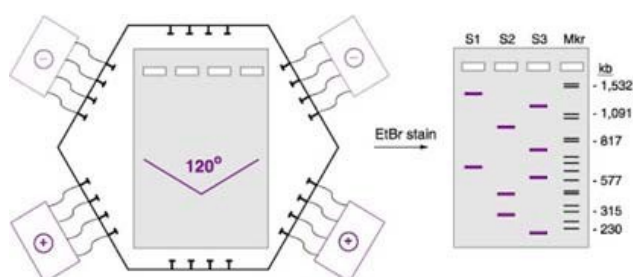
Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. Lang A. S., Zhaxybayeva O., and Beatty J. T. (2012), Nat. Rev. Microbiol. 10(7): 472–482. doi: 10.1038/nrmicro2802.

Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)

Pulzní gelová elektroforéza (PFGE) je elektroforetická metoda umožňující na rozdíl od klasické elektroforézy efektivní dělení molekul DNA větších než 15 kb (až do velikosti několika Mb).

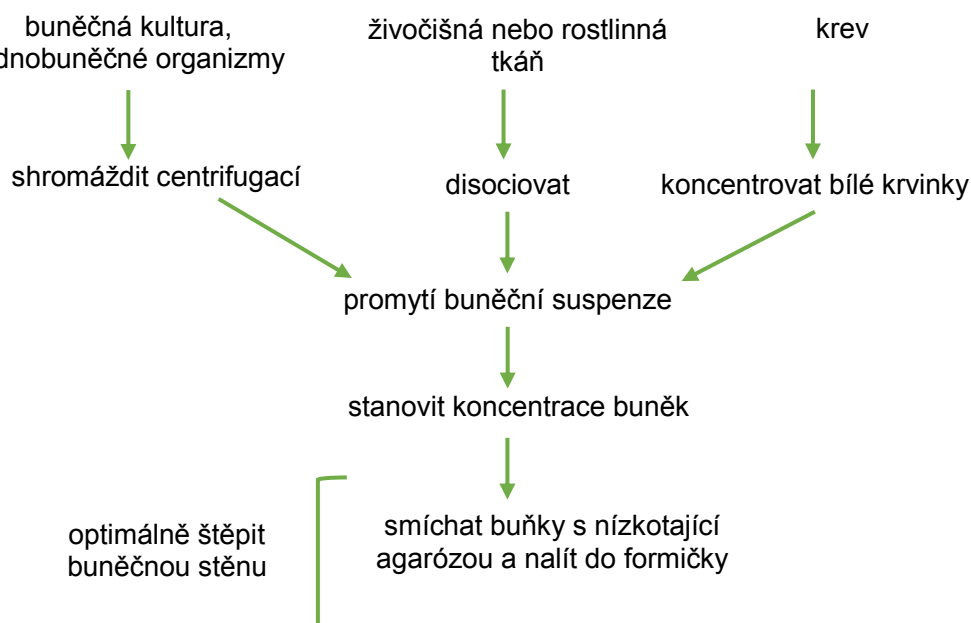
Při pulzní elektroforéze se periodicky mění orientace elektrického pole (**Obr. 8**). Molekuly DNA v agaróze se relaxují při odstranění jednoho pole a zaujímají určitou konformaci při působení nového pole. Tento proces reorientace je závislý na velikosti molekul.

Obrázek 8: Pulzní gelová elektroforéza - elektrické pole se periodicky mění ve třech směrech (a) směrem od středu gelu, (b, c) v úhlu 60° po obou stranách gelu.



Při přípravě vzorků větších než 500 kb je nutné molekuly DNA chránit před mechanickým poškozením (působení střížných sil) a před nukleolytickou degradací během izolace. Proto se používá speciální metoda izolace, při které jsou buňky nejprve fixovány v nízkotající agaróze a teprve potom je prováděna lyze a purifikace DNA (**Schéma II**).

Schéma II: Obecné schéma přípravy vzorků pro PFGE.



Základní pojmy:

Pulzní pole (pulsed field): Elektroforetický proces, který používá více než jedno elektrické pole, a ve kterém se elektrická pole střídavě aktivují.

Pulzní interval (switch interval, switch time, pulse time): Čas, po který je každé ze střídajících se elektrických polí aktivováno.

Reorientační úhel (reorientation angle): Úhel mezi dvěma střídajícími se elektrickými poli, tj. úhel mezi různými směry, ve kterých molekuly DNA putují.

Homogenní pole (homogeneous field): Elektrické pole, které má uniformní potenciálové rozdíly po celém poli.

Úloha: Izolace bakteriální DNA pro pulzní gelovou elektroforézu a provedení pulzní gelové elektroforézy

Cíl úlohy: Porovnat makrorestrikční spektrum vybraných kmenů *S. aureus*, ověřit makrorestrikční spektrum transduktant (viz úloha Transdukce).

Bakterie druhu *Staphylococcus aureus* patří mezi běžné humánní patogeny a jsou původcem širokého spektra akutních a chronických onemocnění. Většina rozdílů mezi kmeny *S. aureus* je způsobena přítomností mobilních genetických elementů, jako jsou plasmidy, bakteriofágy, ostrovy patogenity, transpozony a inserční sekvence.

Kmeny použité v první části této úlohy (A.) patří mezi běžné laboratorní kmeny, lišící se obsahem profágů ve svých genomech. Na základě výsledků PFGE můžeme navzájem odlišit jednotlivé kmeny a identifikovat, kde v genomu došlo k začlenění profágů. Na základě změny počtu fragmentů či změny jejich velikosti v makrorestrikčním spektru je možné určit typ genetické změny v genomu studovaného kmene (**Tab.1**).

V druhé části úlohy (B.) ověříme na základě makrorestrikčních spekter úspěšnost transdukčního experimentu. Získané transduktanty mají makrorestrikční spektrum shodné s recipientním kmenem *S. aureus* RN 4220. Jako kontroly použijeme donorový kmen *S. aureus* Jevons B a recipientní kmen *S. aureus* RN 4220.

Seznam materiálu: Bakteriální kultury inkubované v 2×YT médiu při 37°C/18h.

- 37°C inkubátor, vortex.
- Skleněné 10 ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem, mikrozkušavky
- Vodní lázeň předehřátá na 55°C.
- SeaKem Gold agaróza (Lonza), Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad)
- TE pufr (10 mM Tris. Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0), 0,5M EDTA, promývací roztok (10 mM TrisCl, 10 mM EDTA, 10mM EGTA, 1M NaCl, pH 7,5), lyzostafin (0,5 mg/ml), lyzační roztok (6 mM Tris. Cl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,5% Brij 58, 0,2% Na-deoxycholát, 0,5% laurylsarkosin, pH 7,6), deproteinizační roztok (25 mM EDTA, 20 mM EGTA, 1% laurylsarkosin, pH 9,0), lysozym (50mg/ml), proteináza K (10 mg/ml)
- Vhodné restrikční enzymy (pro *S. aureus* používáme *Sma*I), sterilní deionizovaná voda

Seznam bakteriálních kmenů:

S. aureus ISP8 [77+], ISP8 [53+], ISP8 [47+] a *S. aureus* PS47 [53+], PS47 [77+], PS47

S. aureus Jevons B, *S. aureus* RN 4220

Postup:

1. den

1. Zaočkovat kulturu do 20 ml 2× YT média a inkubovat 18 h při 37 °C

2. den

1. Odebrat 10 ml kultury, přidat 100 µl 0,5 M EDTA a chladit kulturu 10 min. při 4 °C.
2. Centrifugovat 10 min. při 4 °C a 4000 ot. / min.
3. Dvakrát promýt v 5 ml promývacího roztoku zchlazeného na ledu.
4. Naředit bakteriální kulturu promývacím roztokem na hodnotu optické hustoty $OD_{600} = 0,2 - 0,3$.
5. Centrifugovat 10 min. při 4 °C a 4000 ot. / min., slít supernatant a odsát zbytky roztoku, tak, aby nedošlo k porušení peletu
6. Sediment resuspendovat ve 100 µl promývacího roztoku a přenést do mikrozkušavek.
7. Mikrozkušavky s bakteriální suspenzí postupně zahřívát 2-3 min. na 55 °C.
8. K buněčné suspenzi přidat 10 µl lyzostafinu (zásobní koncentrace 0,5 mg/ml), přidat 110 µl 2% agarózy s nízkým bodem tání (roztok v 50 mM Tris. Cl, 5 mM EDTA, pH 8,0) předem vytemperované na 55 °C a pečlivě promíchat pipetou.
9. Suspenzi přepipetovat po 200 µl do komůrek tvořítka a uložit na 20-30 min. do lednice.
10. Vzniklé agaróзовé bločky přenést do lyzační směsi, která obsahuje 1 ml lyzačního roztoku a 20 µl lyzostafinu (zásobní koncentrace 0,5 mg/ml), a inkubovat je za mírného třepání ve vodní lázni o teplotě 37°C pro dobu 2 až 3 hodin

Pozn.: Lyzační roztok připravujeme do skleněných zkumavek se šroubovacím uzávěrem. Jednotlivé roztoky dále jen vyměňujeme a s bločky nemanipulujeme. Pokud nedojde v tomto kroku k projasnění bloček, ponecháme lyzovat přes noc při 4 °C.

11. Lyzační směs vyměnit za směs deproteinizační, která obsahuje 1 ml deproteinizačního roztoku a 25 µl proteinázy K (zásobní koncentrace 20 mg/ml), a inkubovat bločky za mírného třepání ve vodní lázni o teplotě 55 °C po dobu 12 hodin (roztok vyměnit po šesti hodinách).

Pozn.: Předem vyhřát lázeň na 55°C.

3. den:

1. Bločky promýt alespoň 5× v 10 ml 1× TE pufru při 4 °C, TE pufr vyměňovat po 1,5 hodinách, průběžně chladit na 8 °C.
2. Bločky lze po důkladném promytí štěpit restriční endonukleázou (nejčastěji štěpíme přes noc).

Pozn.: nenaštěpené bločky je možné skladovat po dobu 1 roku v lednici (TE pufr vyměňovat jednou za měsíc).

Restriční štěpení (postup)

- Pro restriční štěpení uřízneme z bločku vzorek o velikosti cca 1×1×5 mm.
- S bločky manipulujeme sterilně pomocí nerezových špachtlí, které sterilizujeme v etanolu a následným ožhnutím nad plamenem.
- Bločky řežeme pomocí ostrého skalpelu, nejlépe na sterilní Petriho misce, kterou si můžeme podložit tmavou podložkou pro lepší manipulaci.
- **Vlastní štěpení:**
Do mikrozkušavky namíchat restriční směs (na 1 vzorek: 10 µl 10× restričního pufru, 85 µl vody a 5-10 U restričního enzymu). Inkubujeme při požadované teplotě několik hodin nebo přes noc.

4.-5. den:

1. Vlastní provedení PFGE.

Příprava gelu a nastavení elektroforézy (poznámky)

- Připravit 1,2% agarózový gel v 1×TAE pufru. Vychladit 2000 ml 1×TAE pufru v elektroforetické vaně.
- Připravit 0,8% low-melting agarózu v 1×TAE pufru vytemperovanou na 45°C pro zalití bločků do gelu.
- Jednotlivé bločky vkládáme pomocí nerezové špachtle do jamek připraveného gelu (mezi jednotlivými vzorky špachtli sterilizujeme).
- Jamky s bločky zakápnout připravenou 0,8% low-melting agarózou.
- Podmínky elektroforézy pro rozdělení *Sma*I fragmentů chromozomální DNA *S. aureus*:
 - Pulzní časy 1 – 70s, lineární vzestup
 - Teplota 14°C.
 - Napětí 6 V/cm.
 - Čas cca 24 h. pro gel délky 14 cm.

Literatura:

Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.
Tenover *et al.* (1995). J. Clin. Microbiol. 33 (9): 2233 – 2239.

Plazmidy

Plazmidy jsou autonomní kovalentně uzavřené kružnicové replikony tvořené dsDNA, které se stabilně dědí v extrachromozomálním stavu a jsou pro buňku, na rozdíl od chromozomální DNA, postradatelné. Nesou geny, které nejčastěji kódují rezistenci k antibiotikům. Počet kopií v buňce je nepřímo úměrný velikosti plazmidu. K přípravě vektorů jsou používány plazmidové DNA o nižší molekulové hmotnosti, neboť poskytují více kopií a snadnější manipulaci. V současnosti jsou plazmidové vektory využívány ke klonování v *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* aj.

Pro izolaci plazmidové DNA z buněk se používá řada různých metod. Všechny musí obsahovat čtyři základní kroky:

(a) Růst bakteriální kultury. Plazmidy se nejčastěji izolují z bakteriální kultury (rostoucí v médiu obsahující příslušné antibiotikum), která byla inokulována jednou kolonií odpíchnutou z agarové plotny. Většina plazmidových vektorů používaných v současné době (např. pUC řada) se replikuje jako vícekopiové vektory a je u nich možné dosáhnout vysokého výtěžku při izolaci z kultury, která rostla ve standardním LB médiu do logaritmické fáze růstu. Avšak vektory dřívější generace (např. pBR322), které se nereplikují tak snadno, vyžadují selektivní amplifikaci několikahodinovou inkubací částečně rostoucí kultury v médiu s chloramfenikolem, který inhibuje syntézu proteinů a tak zabraňuje replikaci bakteriálního chromozómu, avšak replikace relaxovaných plazmidů pokračuje a počet jejich kopií se zvyšuje.

(b) Izolace bakterií a jejich lyze. Bakterie jsou získány centrifugací a lyzovány jednou z mnoha metod zahrnujících působení detergentů, organických rozpouštědel, alkalického pH nebo tepla. Volba jedné z těchto metod závisí na velikosti plazmidu, bakteriálním kmeni a metodě, která bude následně použita pro purifikaci plazmidové DNA. Velké plazmidy (> 15 kb), které jsou citlivé na poškození, by měly být izolovány metodou minimalizující působení fyzikálních sil (lyze dodecylsulfátem sodným). Pro malé plazmidy je možné použít více metod.

(c) Oddělení plazmidové DNA od ostatních vysoko a nízkomolekulárních komponent. Po přidání EDTA a v některých případech lyzačních enzymů jsou buňky vystaveny působení detergentu a lyzovány varem nebo alkalicky. To způsobí denaturaci chromozomální DNA, která je obvykle již ve formě lineárních fragmentů a během renaturace se spojí se zbytky lyzovaných buněk a rychle klesá při centrifugaci na dno zkumavky. Naproti tomu vlákna plazmidové DNA, tvořená kovalentně uzavřenými molekulami se při denaturaci nerozcházejí, protože jsou v důsledku nadšrubovicové struktury vzájemně propletená a mohou na rozdíl od lineárních fragmentů rychle renaturovat. Lyze varem není doporučována při izolaci z kmenů produkujících endonukleázu A. Endonukleáza A není varem kompletně inaktivována a plazmidová DNA může být degradována během následných inkubací za přítomnosti Mg^{2+} . Tomuto problému lze předejít zařazením extrakce s fenol-chloroformem.

(d) Purifikace plazmidové DNA a stanovení koncentrace a čistoty. Proteiny odstraňujeme extrakcí směsí fenol-chloroform. Precipitaci DNA provádíme 96 % ethanolem po přidání jednomocných iontů. Odstranění RNA provádíme působením pankreatickou RNázou. Vysoce čisté kovalentně uzavřené kružnicové DNA je možné získat po centrifugaci v gradientu CsCl-ethidium bromid. Z dalších metod je možné použít pro purifikaci plazmidové DNA precipitaci polyetylén glykolem, chromatografii a komerční metody využívající adsorpci na silikagelovou kolonku.

Obecně během izolačních postupů je třeba dodržovat následující zásady:

Správně volit iontovou sílu extrakčního a purifikačního roztoku a udržovat ji v průběhu celého experimentu.

Udržovat optimální hodnotu pH prostředí (většinou neutrální, tj. pH 7,0 až 7,5). Výrazně vyšší nebo nižší hodnoty pH způsobují denaturaci DNA.

Zabránit působení nukleáz, tj. enzymů, které degradují nukleové kyseliny:

To lze docílit:

- (a) prováděním izolace při nízkých teplotách
- (b) přidáním inhibitorů nukleáz (např. EDTA, citronan sodný aj.)
- (c) zabráněním exogenní kontaminace mikroflórou, tzn. pracovat se sterilním materiálem

Úloha: Izolace plazmidové DNA z transduktant a elektroforéza plazmidů v agarózovém gelu

Cíl úlohy: Cílem úlohy je izolace plazmidů z transduktant, donorového a recipientního kmene pro jejich pozdější kvantifikaci pomocí qPCR.

Seznam materiálu:

- 18-ti hodinové bakteriální kultury (donorový kmen Jevons B, transduktanty)
- Komerční kity pro izolaci plazmidové DNA (pro PCR, klonování, sekvenování, *in vitro* transkripce) :
 - High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche)
 - nebo NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel)
- Plastové špičky, pipety, mikrozkušavky, PBS, lyzostafin, kónické 15 ml zkumavky.
- SERVA agaróza, elektroforetická vana a příslušenství, velikostní marker.

A. Izolace plazmidové DNA

Kit je určen pro izolaci plazmidové DNA metodou založenou na alkalické lyzi u E. coli a s níže uvedenou modifikací u druhu S. aureus.

Postup:

1. den

1. Naočkovat stafylokokovou bakteriální kulturu s příslušným plazmidem, inkubovat 18h/37 °C ve 20 ml MPB.

2. den

Pracujeme v laminárním boxu, sterilně

1. Centrifugovat cca 7 ml bakteriální kultury při 4500 rpm/15 min.
2. Odstranit supernatant, promýt v 5 ml PBS, resuspendovat pelet.
3. Centrifugovat při 4500 rpm/15 min., odstranit veškerý supernatant.
4. Připravit lyzační směs: 235 µl suspenzní pufr (součást kitu: Roche roztok č. 1, Macherey-Nagel roztok A1), 15 µl lyzostafinu.
5. Pelet důkladně resuspendovat v předem připravené lyzační směsi (250 µl), přepipetovat do Eppendorfovy mikrozkušavky a inkubovat při 37 °C do lyze buněk (projasnění, zvýšení viskozity) cca 30 min. – 2 h.
Pracujeme na stole podle návodu výrobce kitu
6. Přidat 250 µl lyzačního pufru (Roche roztok č. 2, Macherey-Nagel roztok A2), promíchat pomalým převrácením zkumavky, inkubovat 5 min/pokojevá teplota.
7. Přidat 250 µl (roztok č. 3, Roche) nebo 300 µl (roztok A3, Macherey-Nagel) vazebného pufru. U kitu Roche inkubovat na ledu 5 min a roztok č. 3 předem vychladit. Zkumavku opatrně promíchat, abychom dosáhli co nejvyšší výtěžek plazmidové DNA bez chromozomální DNA.
8. Centrifugovat 10 min při max. otáčkách.
9. Supernatant přenést na filtr kolonky umístěné do sběrné zkumavky. Navázání DNA na filtr centrifugací max. rpm/1 min.

10. Promývat DNA podle doporučení výrobce kitu.
Roche: 500 μ l roztok č. 4, centrifugovat při max. rpm/1 min; 700 μ l roztok č. 5, centrifugovat při max. rpm/1 min (dvakrát po sobě, odstranění veškerého roztoku)
Macherey-Nagel: 450 μ l pufru AQ, centrifugovat při max. rpm/3 min (odstranění veškerého roztoku).
11. Eluovat DNA. Opatrně odstranit sběrnou zkumavku a umístit kolonku do sterilní mikrozskumavky pro uchování DNA.
Roche: napipetovat na střed filtru 50-100 μ l elučního pufru, centrifugovat při max. rpm/1 min, pro vyšší výtěžek eluční pufr zahřát na 60 °C a nechat stát 10 min. při lab. teplotě.
Macherey-Nagel: napipetovat na střed foltru 50 μ l elučního pufru AE, inkubovat 1 min. při laboratorní teplotě, centrifugovat při max. rpm/1 min.
12. Stanovit čistotu a koncentraci DNA.
13. DNA uchovávat v mikrozskumavkách při -20 °C.

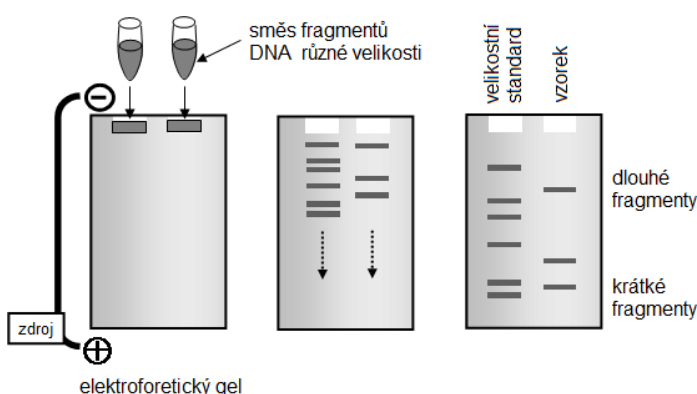
B. Elektroforéza (ELFO) v agarózovém gelu

Fragmenty nukleových kyselin lze dle jejich velikosti rozdělit elektroforézou (**Obr. 9**). Elektroforéza využívá rozdílné pohyblivosti jednotlivých fragmentů danou právě jejich rozdílnou velikostí. Nukleová kyselina nese díky záporně nabitým fosfátům záporný náboj, a proto se v elektrickém poli pohybuje od záporného pólu (katody) ke kladnému (anodě).

ELFO je jedna ze separačních technik využívaná při izolaci a analýze nukleových kyselin. Principem ELFO separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě - anodě. Rychlost pohybu molekul DNA v gelu (elektroforetická pohyblivost) je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Konvenční elektroforézou v agarózovém gelu lze separovat molekuly nukleových kyselin o velikosti od 100 bp do cca 50 kb. Gely o nižší hustotě (0,7-1,2 % agaróza) jsou používány k separaci velkých fragmentů (tisíce bází), gely o vyšší hustotě (1,5-3 % agaróza) jsou používány k separaci malých fragmentů (stovky až desítky bází). Standardně se používá napětí 5 - 8 V/cm.

Molekuly nukleových kyselin v gelu je nutné vizualizovat barvením. Nejčastěji je používán etidiumbromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA (resp. RNA) a vytváří s nimi komplex, který po osvětlení UV světlem červeně fluoreskuje.

Obr. 9: Schématické znázornění rozdělení DNA pomocí metody ELFO



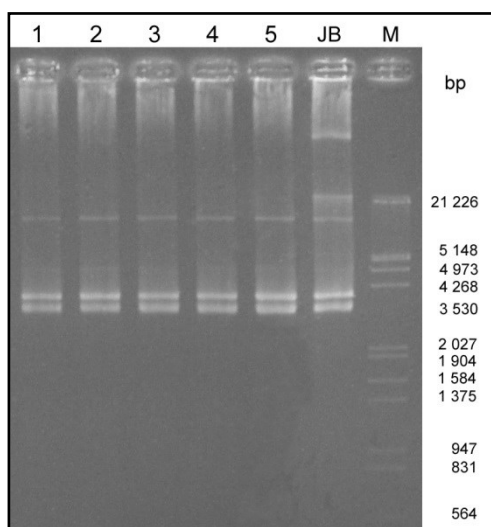
Postup:

1. Navázat potřebné množství (podle požadované hustoty gelu) agarózy SERVA do nádoby o vhodném objemu
 - použité sklo musí být čisté, nesmí obsahovat zbytky mycího prostředku
2. Přidat potřebné množství 1xTAE pufru
 - nejlépe použít pufr ze stejné várky ředění jako bude v ELFO vaně, aby byl zajištěn shodný obsah iontů a tím stejnoměrné vedení elektrického napětí během ELFO
 - 1xTAE se připravuje ředěním ze zásobního 50x koncentrovaného roztoku TAE.
 - Potřebný objem přidávaného 1xTAE pufru zjistíme následujícím výpočtem:
 $V = \text{šířka gelu} \times \text{délka gelu} \times \text{výška gelu}$ (vždy 0,5 cm)
3. Agarózu rozpuštěnou v 1xTAE pufru rozvařujeme opatrně v mikrovlnné troubě (1 – 3 min. podle výkonu zvoleného spotřebiče)
 - agarózový gel opatrně promícháme (pozor na utajený var)
 - nechat vytemperovat na 55 °C
 - nalít do připravené formy, která je vyvážená pomocí vodováhy do roviny
4. 1xTAE pufr v ELFO vanách je nutno vyměňovat po cca 4 cyklech běžné délky (1-2 h) nebo po každém dlouhém cyklu (3 h a více)
5. Nanášení vzorků:
 - k vzorku, který chceme nanášet na připravený gel přidáme malé množství nanášecího pufru, na gel nanášíme cca 10 μ l vzorku s nanášecím pufrům, nezapomínáme na pozitivní a negativní kontroly a velikostní standard.
 - optimální velikost elektrického napětí při elektroforéze se udává jako 5-8 V/cm
6. Gel barvíme cca 30 min v lázni s ethidiumbromidem o konc. 1 μ g/ml (zás. roztok 10 mg/ml) tj. 60 μ l EtBr do 600 ml 1xTAE.
7. Nabarvený gel opláchnout v destilované vodě. Focení gelu.

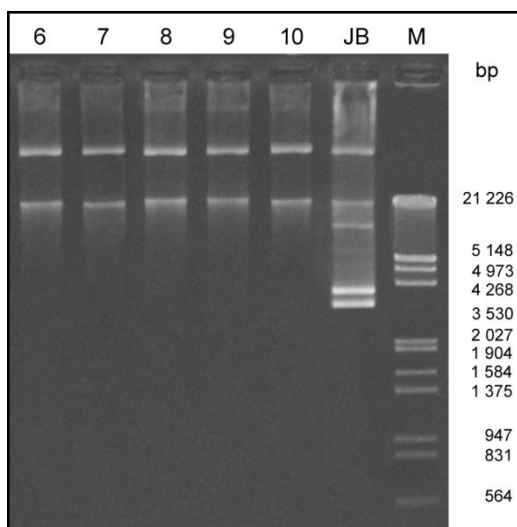
Pozn: Veškerou práci s EtBr je nutno provádět v **NITRILOVÝCH RUKAVICÍCH!!!** Pokud dojde ke kontaminaci EtBr, je nutné tuto plochu ošetřit dekontaminačním roztokem.

Obr. 10: Výsledky izolace plazmidové DNA z transduktant

A: selekce transduktant na tetracyklinu



B: selekce transduktant na kadmii

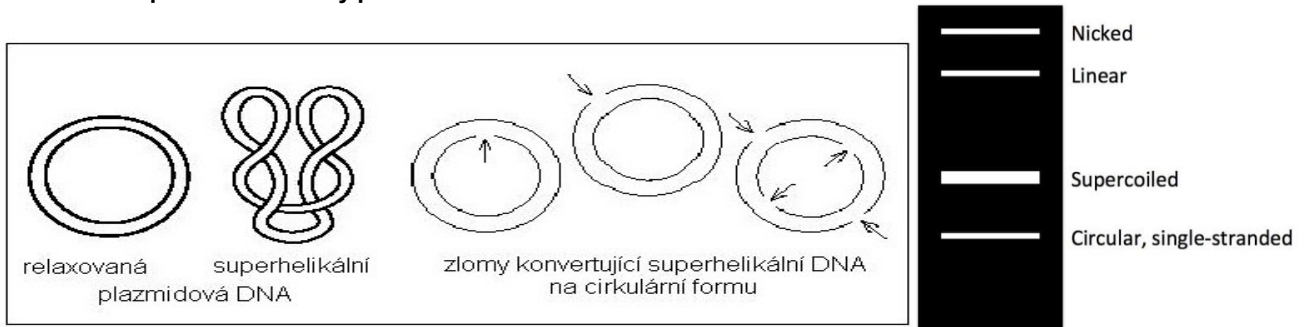


M – velikostní standard (DNA Marker III); **JB** – donorový kmen Jevons B; **1-5** – transduktanty selektované na tetracyklinu (plazmid 4,4 kbp), **6-10** – transduktanty selektované na kadmii (plazmid 28 kbp)

C. Konformace plazmidové DNA a její mobilita v agarózovém gelu

Molekula plazmidové DNA se v buňkách přirozeně vyskytuje v superhelikální formě (jinak označováno CCC forma nebo také forma I). Tato uzavřená cirkulární forma však díky zlomům konvertuje na otevřenou cirkulární formu (OC nebo také forma II), která je spolu s relaxovanou formou plazmidu stabilnější (**Obr.1**). Zlomy mohou být způsobeny mechanickým poškozením při manipulaci se vzorkem během izolace nebo působením endonukleáz štěpících superhelikální DNA (např. DNA-áza I). V nativní buňce o formě plazmidu rozhodují enzymy označované jako DNA gyrázy, které za spotřeby energie z ATP zavádějí superhelikální smyčky do plazmidové DNA a enzymy navozující relaxovaný stav (relaxázy). Během replikace se mohou vytvářet formy obsahující více než jednu molekulu stejné plazmidové DNA. Nejčastěji jsou vytvářeny dimery nebo trimery.

Obrázek 1.:Topoizomerní formy plazmidů.

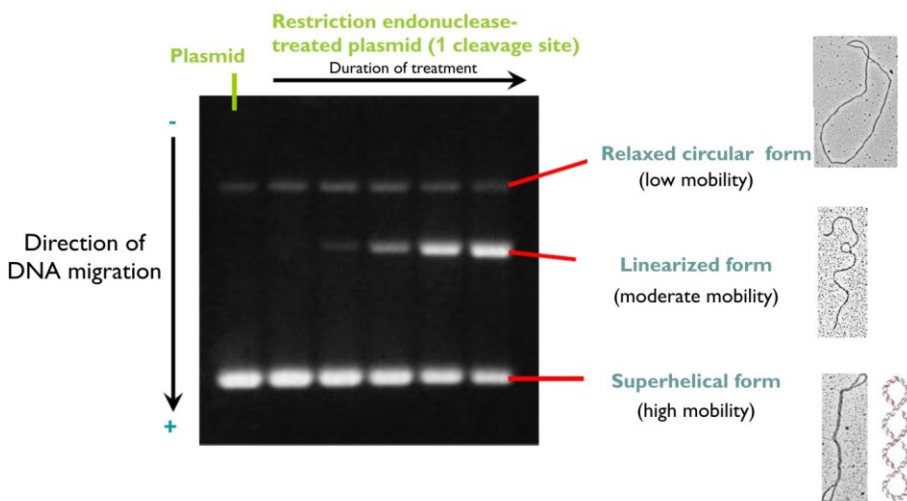


Jednotlivé formy pak během elektroforézy na agarózovém gelu migrují různou rychlostí, přičemž nejrychleji se pohybuje nejvíce kondenzovaná a tudíž nejmenší CCC forma.

Elektroforetická mobilita od nejnižší po nejvyšší:

- **Štěpená, otevřená cirkulární forma (nicked):** štěpená v jednom z řetězců DNA - **NEJPOMALEJŠÍ**
- **Lineární forma (linear):** linearizovaná forma, vznik rozštěpením obou řetězců.
- **Uvolněná cirkulární forma (relax circular):** oba řetězce DNA jsou neštěpené, k relaxaci dochází enzymaticky
- **Superspiralizovaná denaturovaná forma (supercoiled denatured):** jedná se o spiralizovanou formu, která je ale méně kompaktní tím, že některé oblasti molekuly jsou nespárovány
- **Superspiralizovaná forma (supercoiled):** spiralizovaná neštěpená, kruhová molekula – **NEJRYCHLEJŠÍ**

Obrázek 2.:Topoizomerní formy plazmidů a jejich elektroforetická mobilita.



Úloha: Stanovení počtu kopií plazmidů (plasmid copy number – PCN) v buňce pomocí QPCR

Cíl úlohy: Stanovit počet kopií penicilinázového a tetracyklinového plazmidu u transduktant, kmene *S. aureus* Jevon B a kmene RN 4220 na bakteriální buňku pomocí QPCR.

Absolutní kvantifikací stanovíme počet kopií genu *blaZ*, *tetK* lokalizovaného na plazmidu a bakteriálního genu *SAU* lokalizovaného v jedné kopii na bakteriálním chromozomu. Přesný počet plazmidů na buňku (PCN) stanovíme podle vztahu:

$$PCN = \frac{\text{velikost chromozomální DNA [bp]} \times \text{množství plazmidové DNA [pg]}}{\text{velikost plazmidové DNA [bp]} \times \text{množství chromozomální DNA [pg]}}$$

Přesný postup:

LEE C.L. - OW D.S. - OH S.K. Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *J Microbiol Methods*, 2006, 65: 258-267.

LEE C et al. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.*, 2006, 123: 273-280.

Seznam materiálu:

- Celogenomová bakteriální DNA pro přípravu kalibrační přímky, desítkové ředění od 100 ng do 0,1 pg (1. Skupina). Kvantifikace bakteriálního genu *SAU* lokalizovaného na bakteriálním chromozomu.
- Plazmidová DNA pro přípravu kalibrační přímky, desítkové ředění od 100 ng do 0,1 pg (2. skupina). Kvantifikace plazmidového genu *blaZ* nebo *tetK* v závislosti na typu kvantifikovaného plazmidu (pT181 nebo pUSA300-HOUMR-like).
- DNA neznámých vzorků.
- LightCycler® 480 SYBR Green I Master (protokol na stránkách výrobce <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/c5c29b3a-97ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>)
- RT-PCR grade water

Pro qPCR je používán přístroj značky Roche – Light Cycler 480 II. Všechny reakce jsou připravovány v triplicátech v optických 96-jamkových destičkách. Reakční směs je připravována v objemu 10 µl a obsahuje 5 µl 2× konc. Master Mix (Roche), primery o výsledné koncentraci 300 µM, příslušnou DNA v celkovém objemu 1,25 µl.

Standardní řada pro qPCR je připravena 10-ti násobným ředěním plazmidové a celogenomové DNA. Standardní ředící řady jsou ideálně připravovány ze zásobních vzorků celogenomové DNA a jsou skladovány při -20°C.

Postup:

1. Izolace plazmidové a celogenomové DNA pro přípravu kalibrační přímky.
2. Izolace celogenomové DNA neznámých vzorků (transduktant).
3. Příprava kalibračních řad:

Tři různé kalibrační přímky:

I. skupina (Tab.I):

- kalibrační přímka z **celogenomové bakteriální DNA** (kmen Jevons B) pro stanovení počtu kopií genu *SAU*, ředění připravit v koncentracích: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg a 0,1 pg

- kalibrační přímka bude mít celkem sedm datových bodů a každé ředění bude pipetováno na 96-jamkovou destičku v triplikátu (př. 100 ng – jamky A1-A3) – z důvodů stanovení průměrné hodnoty C_t a standardní odchylky.

II. skupina (Tab.II):

- kalibrační přímka z **plazmidové bakteriální DNA** (kmen Jevons B) pro stanovení počtu kopií genu *blaZ*, ředění připravit v koncentracích: 30 ng, 3 ng, 0,3 ng, 30 pg, 3 pg, 0,3 pg a 0,03 pg

- kalibrační přímka bude mít celkem sedm datových bodů a každé ředění bude pipetováno na 96-jamkovou destičku v triplikátu (př. 30 ng – jamky A1-A3) – z důvodů stanovení průměrné hodnoty C_t a standardní odchylky.

III. skupina (Tab.III):

- kalibrační přímka z **plazmidové bakteriální DNA** (kmen Jevons B) pro stanovení počtu kopií genu *tetK*, ředění připravit v koncentracích: 30 ng, 3 ng, 0,3 ng, 30 pg, 3 pg, 0,3 pg a 0,03 pg

- kalibrační přímka bude mít celkem sedm datových bodů a každé ředění bude pipetováno na 96-jamkovou destičku v triplikátu (př. 30 ng – jamky A1-A3) – z důvodů stanovení průměrné hodnoty C_t a standardní odchylky.

Pozn.: Pracovat ideálně ve třech skupinách, každá skupina připraví jednu reakční směs a jednu kalibrační přímku. Skupina I a II napipetuje jednu destičku dohromady, skupina III (gen *tetK*) napipetuje destičku zvlášť.

4. Přípravit Master Mix:

	1x	...x
SYBR Green I Master	5	
Primer R (5uM)	0,75	
Primer F (5uM)	0,75	
PCR voda	2,25	
DNA	1,25	
Celkem	10	

- Do jamek na 96 jamkové destičce pipetovat 8,75 ul takto připraveného mastermixu (triplikáty viz Tab. I, II a III).
- Do jamek dle Tab. I, II a III napipetovat DNA kalibrační přímky a neznámých vzorků (1,25 ul/jamka). Pracovat rychle, reagentie chladíme na ledu, destičku nevystavujeme zbytečně dlouho přímému světlu.
- Do jamek označených jako „non template“ pipetujeme pouze vodu – slouží jako negativní kontrola.
- Provést QPCR, po skončení běhu stanovit Treshold a jednotlivé C_t .

Pozn.: V tabulce IV vidíte vzorové výsledky, koncentrace DNA jsou přepočítány na log hodnoty, je třeba též započítat objem DNA, který dáváte do reakce. Graf I ukazuje, jak by měl vypadat finální výstup v protokolu.

Program reakce:

I. Iniciační denaturační krok : 95°C/10 min.

II. 95°C/15 s

III. 60°C/45 s

} 40x

IV. disociační krok: 95°C/15 s; 60°C/60 s; 95°C/15 s; 60°C/15 s

9. Vypočítat účinnost PCR z grafu: hodnoty log. ředění vs. průměrné hodnoty C_t , zjistit E, E%, R^2 , směrnici přímký (k) – vzor viz **Tab. III, Graf I.**

Dle vzorců:

Výpočet efektivity reakce (E)

$y=ax+b$; kde $a=k$

Směrnice (k)= $-\text{Log}(E+1)$

$E=10^{-1/k}$

$E[\%]= (E-1)\times 100$

Stanovení PCN – výpočty do protokolu

Z dat uvedených v pdf souborech, které exportujete po dokončení reakce:

1. Vytvořte graf závislosti log koncentrace na C_p standardu a neznámých vzorků

- proložte datové body regresní přímkou a vypočítejte rovnici přímký a R^2 pro oba běhy (kvantifikace genu *blaZ* nebo *tetK* a 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

2. Vypočítejte hodnoty PCN pro oba neznámé vzorky podle vztahu uvedeného v zadání úlohy

Tabulka I: Příprava kalibrační přímky pro gen SAU

Kalibrační přímka pro primery SAU1 a SAU2 (300 nM, 300 nM)

celogenomová
DNA Jevons B

Wells	Master Mix	Forward primer 5µM	Reverse primer 5µM	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem
A1-A3	5	0,75	0,75	100 ng	1,25	2,25	10
A4-A6	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
A7-A9	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
A10-A12	5	0,75	0,75	0,1 ng	1,25	2,25	10
B1-B3	5	0,75	0,75	0,01 ng	1,25	2,25	10
B4-B6	5	0,75	0,75	0,001 ng	1,25	2,25	10
B7-B9	5	0,75	0,75	0,0001 ng	1,25	2,25	10

počet vzorků		Master Mix	F primer	R primer	PCR voda
	ul				

celogenomová
DNA

Vzorek	Wells	Master Mix	Forward primer 5µM	Reverse primer 5µM	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem
Transdukta	C1-C3	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transdukta	C4-C6	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Transdukta	C7-C9	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transdukta	C10-C12	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Bez tem.	D1-D3	5	0,75	0,75	-	0	3,5	10

Tabulka II: Příprava kalibrační přímky pro gen *blaZ*

Kalibrační přímka pro primery blaZ-F a blaZ-R (300 nM, 300 nM)

plazmidová DNA *S. aureus* Jevons B

Wells	Master Mix	Forward primer 5μM	Reverse primer 5μM	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem	počet částic přepočet
D4-D6	5	0,75	0,75	30 ng	1,25	2,25	10	
D7-D9	5	0,75	0,75	3 ng	1,25	2,25	10	
D10-D12	5	0,75	0,75	0,3 ng	1,25	2,25	10	
E1-E3	5	0,75	0,75	0,03 ng	1,25	2,25	10	
E4-E6	5	0,75	0,75	0,003 ng	1,25	2,25	10	
E7-E9	5	0,75	0,75	0,0003 ng	1,25	2,25	10	
E10-E12	5	0,75	0,75	0,00003 ng	1,25	2,25	10	

počet vzorků		Master Mix	F primer	R primer	PCR voda
	ul				

celogenomová DNA z transduktant (*blaZ*)

Vzorek	Wells	Master Mix	Forward primer 5μM	Reverse primer 5μM	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem
Transduktanta I	F1-F3	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta I	F4-F6	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta II	F7-F9	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta II	F10-F12	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Bez tem.	G1-G3	5	0,75	0,75	-	0	3,5	10

Tabulka III: Příprava kalibrační přímky pro gen *tetK* (na zvláštní destičku)

Kalibrační přímka pro primery tetK-F a tetK-R (300 nM, 300 nM)

plazmidová DNA *S. aureus* Jevons B

Wells	Master Mix	Forward primer 5 μ M	Reverse primer 5 μ M	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem	počet částic přepočet
A1-A3	5	0,75	0,75	30 ng	1,25	2,25	10	
A4-A6	5	0,75	0,75	3 ng	1,25	2,25	10	
A7-A9	5	0,75	0,75	0,3 ng	1,25	2,25	10	
A10-A12	5	0,75	0,75	0,03 ng	1,25	2,25	10	
B1-B3	5	0,75	0,75	0,003 ng	1,25	2,25	10	
B4-B6	5	0,75	0,75	0,0003 ng	1,25	2,25	10	
B7-B9	5	0,75	0,75	0,00003 ng	1,25	2,25	10	

počet vzorků		Master Mix	F primer	R primer	PCR voda
	ul				

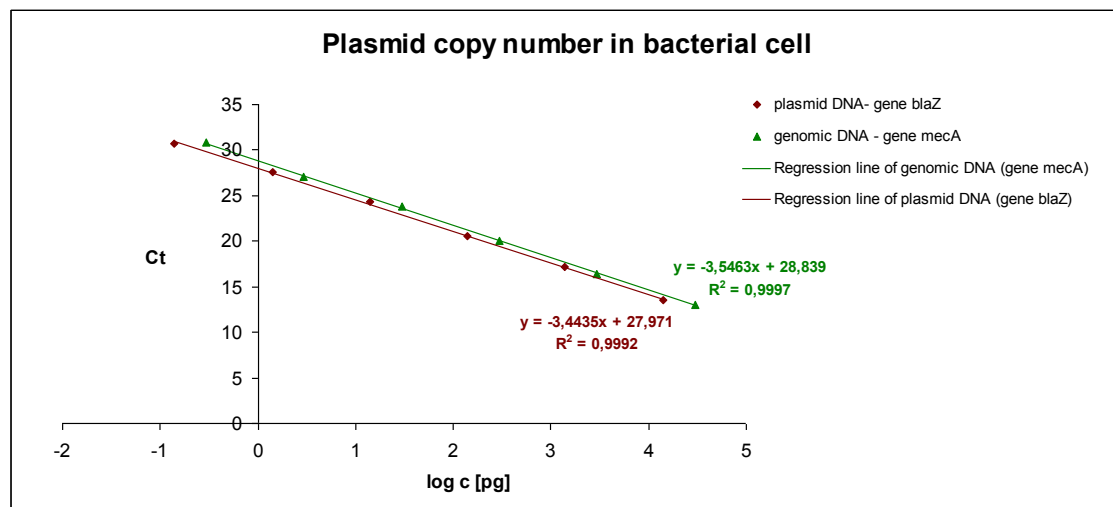
celogenomová DNA z transduktant (*tetK*)

Vzorek	Wells	Master Mix	Forward primer 5 μ M	Reverse primer 5 μ M	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem
Transduktanta I	C1-C3	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta I	C4-C6	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta II	C7-C9	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta II	C10-	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Bez tem.	D1-D3	5	0,75	0,75	-	0	3,5	10

Předpokládaný výsledek (vzor)

blaZ	1	2	3	4	5	6	genomova	genomova	genomova	Efektivita	Efektivita %			
							DNA Tr.COL 124 ng	DNA Tr.COL 12,4 ng	DNA Tr.COL 1,24 ng					
Qty (pg/ul)	14000	1400	140	14	1,4	0,14	403000	96200	10400	1,951651	95			
log Qty	4,146	3,146	2,146	1,146	0,146	-0,8539	5,605	4,983	4,017					
Ct (prumer)	13,5308	17,168	20,6172	24,2799	27,5558	30,6694	8,7016	10,8138	14,1348					
StDev +/-	0,0898	0,1136	0,0741	0,0594	0,1389	0,3111	0,2667	0,0629	0,0612					
mecA	1	2	3	4	5	6	genomova	genomova	genomova	genomova	genomova	genomova	Efektivita reakce	Efektivita reakce (%)
							DNA Tr.COL 124 ng	DNA Tr.COL 12,4 ng	DNA Tr.COL 1,24 ng	DNA COL 109 ng	DNA COL 10,9 ng	DNA COL 1,09 ng		
Qty (pg/ul)	29700	2970	297	29,7	2,97	0,297	103000	14100	927	126000	20700	2610	1,914186	91%
log Qty	4,473	3,473	2,473	1,473	0,473	-0,527	5,013	4,149	2,967	5,100	4,316	3,417		
Ct (prumer)	13,049	16,444	20,02	23,754	27	30,793	11,108	14,128	18,367	10,772	13,542	16,722		
StDev +/-	0,041	0,043	0,043	0,119	0,166	0,138	0,333	0,012	0,328	0,2	0,141	0,046		

Závislost Ct na logaritmických hodnotách koncentrací, výpočet efektivity reak



Literatura:

Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. Lee C.L. - Ow D.S. - Oh S.K. J Microbiol Methods, 2006, 65: 258-267.

LEE C et al. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. J Biotechnol., 2006, 123: 273-280.

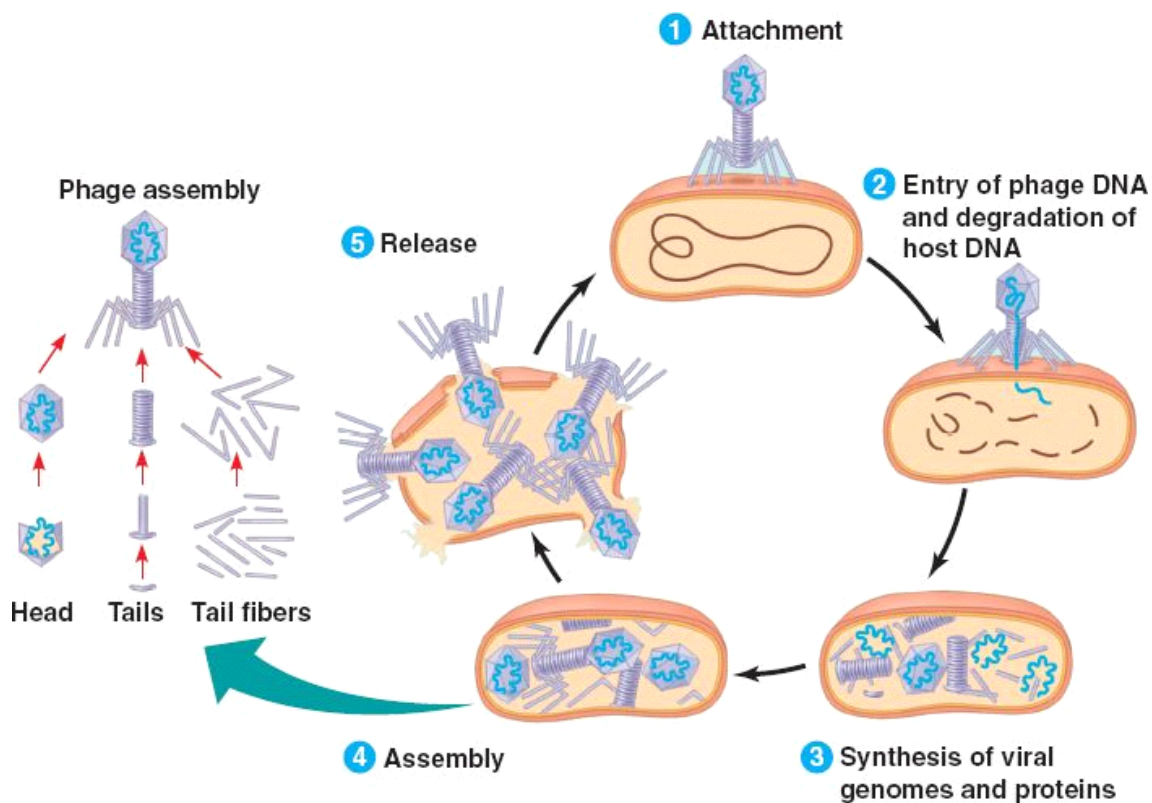
Characteristics and distribution of plasmids in a clonally diverse set of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Kuntová, Lucie & Pantůček, Roman & Rajova, Jana & Růžičková, Vladislava & Petrás, Petr & Maslanova, Ivana & Doškař, Jiří. (2012). Archives of microbiology. 194. 607-614. 10.1007/s00203-012-0797-y.

Bacteriophages of *Staphylococcus aureus* efficiently package various bacterial genes and mobile genetic elements including SCCmec with different frequencies. Mašlaňová I, Doškař J, Varga M, Kuntová L, Mužik J, Malúšková D, Růžičková V, Pantůček R. Environ Microbiol Rep. 2013 Feb; 5(1):66-73. doi: 10.1111/j.1758-2229.2012.00378.x.

Polyvalentní bakteriofág a jeho endolysin

Rostoucí rezistence bakterií k antibiotikům vede k obnovení zájmu o jiné způsoby léčby bakteriálních infekcí. Jednou z využitelných alternativ je fágová terapie, která je známá bezmála sto let. Její princip spočívá v usmrcení bakterií jejich viry označovanými jako bakteriofágy, v přirozeném procesu množení virového potomstva. Ideální terapeutický bakteriofág má široké rozmezí hostitelů, jinými slovy je polyvalentní, nepřenáší žádné geny z hostitele transdukci a jeho životní cyklus je striktně lytický (Obrázek 1). Při lytickém životním cyklu se fág adsorbuje na povrch hostitele, následuje injekce genomové DNA do buňky, která je v zápětí transkribována a translatována. Postupně dochází k zastavení exprese bakteriálních genů a degradaci bakteriální DNA, namísto toho je replikována fágová genomová DNA a jsou syntetizovány proteiny nezbytné pro průběh infekce a strukturní proteiny fágového kapsidu. Nové virové potomstvo se sestaví uvnitř hostitelské buňky a je následně uvolněno lyzí buněčné stěny hostitele. Tu zprostředkovávají fágem kódované enzymy exprimované na konci životního cyklu.

Obrázek 1: Životní cyklus lytického fága (ref. <https://www.flickr.com/photos/hixtine/6374709127/>)



Stafylokokové bakteriofágy s lytickým způsobem života patří do čeledi *Myoviridae*. Jejich životní cyklus trvá kolem 30 minut a na jeho konci využívají pro uvolnění potomstva z buněk enzymy endolysin a holin (amidázu). Holiny jsou malé membránové proteiny, které kontrolují správné načasování lyze. V průběhu fágového životního cyklu se akumulují v plazmatické membráně, po dosažení kritické koncentrace se oligomerizují a vytvoří kanálek, přes který jsou transportovány

endolyziny. Endolyziny se tak dostanou na místo svého působení neboli k bakteriálnímu peptidoglykanu, který štěpí mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukozaminem. Endolyziny jsou schopné štěpit buněčnou stěnu i z vnější strany a byly by tak využitelné jako antibakteriální agens.

Úloha: Setřih fágového endolyzinu

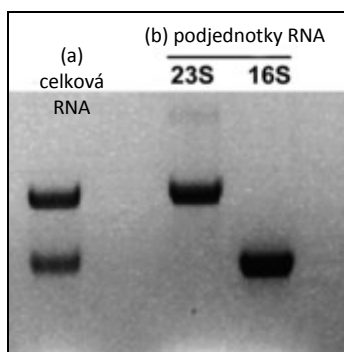
Setřih RNA byl považován za charakteristický znak exprese eukaryotických genů, avšak dnes je známo i množství prokaryotických genů, jejichž RNA obsahuje introny. Příkladem takového genu je gen pro endolyzin fága K, který infikuje široké spektrum hostitelů druhu *Staphylococcus aureus*. V dnešním cvičení se seznámíte s izolací RNA u gram pozitivních prokaryot a se zásadami práce s RNA.

Stejně jako u izolace bakteriální DNA, také bakteriální RNA se purifikuje a izoluje několika možnými způsoby. Mohou se používat speciální komerčně dostupné kity s kolonkami, kde jejich matrix na sebe naváže RNA z roztoku a RNA je postupně purifikována na kolonce. Dále se používá metoda založená na izolaci fenol-chloroformem nebo řada komerčně dostupných produktů, velmi rozšířená je izolace TRIzolom nebo RNazolom.

Při práci s RNA je nutné dodržovat několik zásad, protože RNA je velice náchylná na působení RNáz z prostředí. Striktně pracujeme v rukavicích, používáme sterilní špičky s filtrem, pipety určené pro práci s RNA, vodu prostou nukleáz (například ošetřenou diethylpyrokarbonátem = DEPC) a ideálně pracujeme v části laboratoře, která je vymezena pouze pro práci s RNA.

Převážná část bakteriální RNA je tvořena dvěma typy ribozomální RNA (16S rRNA a 23S rRNA) a mRNA. Správně izolovaná totální bakteriální RNA tvoří na elektroforetickém gelu dva celistvé proužky (horní 23S a dolní 16S rRNA) (viz obr.).

Obr. (a) celková bakteriální 16S a 23S rRNA, (b) purifikované podjednotky bakteriální RNA



Izolace celkové RNA TRIzolom

Níže uvedený postup popisuje izolaci celkové bakteriální RNA pomocí komerčně dostupného TRIzolu. Kit je možné používat pro gram-pozitivní a gram-negativní bakterie.

V prvním kroku jsou bakteriální buňky rozrušeny skleněnými kuličkami. Lyzi buněk a udržení integrity RNA napomáhá TRIzol. Po přidání chloroformu ve druhém kroku a následné centrifugaci dojde k oddělení bezbarvé vodné fáze s obsahem RNA a růžové organické fáze, která obsahuje buněčné

zbytky. RNA je z vodné fáze precipitována izopropanolem a shromážděna na dně zkumavky centrifugací. Po přečištění RNA ethanolem je získaný pelet RNA rozpuštěn v DEPC vodě.

Seznam materiálu:

- Bakteriální kultura, fág
- Komerční kit pro izolaci celkové bakteriální RNA:
TRIZOL® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit; Kat. č.: 16096-040 (Ambion®)¹
- Roztoky, chemikálie, média: 20 ml MPB, DEPC voda, chloroform
- Plasty: špičky s filtrem, pipety pro práci s RNA
- Ostatní vybavení: laminární box pro práci s RNA, stolní centrifuga, mikrozukavky, Dry Heater

Postup²:

1. den

1. Naočkovat bakteriální kulturu, inkubovat **18h/37 °C** ve vhodném kultivačním médiu.

2. den

2. Přeočkovat 2 ml kultury do 20 ml čerstvého média a kultivovat při 37°C do OD₆₀₀ = 0,3 – 0,5 (cca 10⁸ CFU/ml).
3. Smíchat bakteriální kulturu s 2 ml fágového lyzátu (zásobní titr kolem 10⁸ PFU/ml) a CaCl₂ do výsledné koncentrace 0,002 M.
4. Ihned odebrat **1,5 ml** suspenze do sterilní mikrozukavky (čas T = 0 min), poté pokračovat v odběrech v čase T = 5; 10; 15 a 20 min.
5. Po odběru suspenzi ihned centrifugovat **15 000 rpm/1 min** na stolních centrifugách.
6. Získaný pelet resuspendovat v 1 ml TRIZOLU a přenést do mikrozukavky s kuličkami.
7. Homogenizovat na homogenizátoru 2 min.
8. Centrifugovat 10 000 g/3 min/4°C a vzorek přenést do čisté RNase-free zkumavky (bez kuliček!!!!).
9. Přidat 0,2 ml **vychlazeného chloroformu** a promíchat převrácením zkumavky.
10. Inkubovat 2 – 3 min/laboratorní teplota.
11. **Centrifugace 12 000 g/15 min/4 °C.**
12. Přenést **vodnou fázi** obsahující RNA (cca 400 µl) do čisté mikrozukavky.
Pozn. Je-li vodná fáze narůžovělá, přidat znovu chloroform a opakovat předchozí kroky.
13. Přidat 0,5 ml na ledu **vychlazeného izopropanolu** a pomalu promíchat převrácením zkumavky.
14. Inkubace 10 min/laboratorní teplota.
15. Centrifugace **15 000 g/10 min/4 °C.** Opatrně odsát supernatant, RNA se jeví jako poloprůhledný gel na spodu zkumavky.
16. Resuspendovat pelet v 1 ml **75 % etanolu** a dobře zvortexovat.
17. Centrifugovat **7 500 g/5 min/4 °C.** Opatrně odstranit supernatant.
18. Pelet RNA sušit na vzduchu, nepoužívat sušení ve vakuové odparce.

¹ Originální protokol viz stránky distributora kitu:

http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizolmax_man.pdf

²Před vlastním experimentem je nutné vychladit rotor centrifugy a vychladit chemikálie.

- Vysušenou RNA rozpustit v **25-50 µl DEPC vody**. Lze zahřát na 60 °C/10 min, pokud je třeba zvýšit rozpustnost RNA.
- Na nanodropu zjistit koncentraci a čistotu RNA, uchovávat v lednici při -80°C max 2 měsíce.

Ošetření RNA DNázou

Pro citlivé analýzy jako PCR, qPCR a sekvenování je nezbytné zbavit vyizolovanou RNA zbytků genomové DNA. Pro tento účel se používají speciální DNázy připravené tak, aby neobsahovaly stopy RNáz. Po proběhnutí reakce je nutné odstranit DNázu, aby nedošlo k degradaci cDNA při reverzní transkripci, a divalentní kationty z pufru, aby nemohly sloužit jako kofaktory pro nukleázy z prostředí.

TURBO DNA-free 5™ Kit, Catalog nr AM1907

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_055740.pdf

Postup:

- Připravit reakční směs o výsledném objemu 50 µl:

Složka	Objem
RNA	max 10 µg/ 50 µl reakční směsi
10× Pufr	10 µl
DNase	1 µl
ddH ₂ O	doplnit do výsledného objemu 50 µl

- Inkubace 60 min/37°C.
- Zastavit reakci přidáním 0,1 objemu (=5 µl) Inactivation reagent (ten obsahuje kuličky, dobře ho před přidáním zvortexovat).
- Inkubace 5 min při laboratorní teplotě, 2-3× promíchat převrácením (flick the tube).
- Centrifugace 10 000 g/1,5 min, přepipetovat supernatant do sterilní zkumavky.

Přepis RNA do cDNA

Roche Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit, Catalog nr 04379012001

<https://shop.roche.com/shop/products/transcriptor-first-strand-cdna-synthesis-kit>

!!!Pracovat na ledu, používat RNase free plasty, vodu!!!

RNA je pro svou náchylnost k degradaci nevhodná pro dlouhodobé skladování a další aplikace. Z toho důvodu se přepisuje do komplementární DNA pomocí reverzní transkriptázy. Rekombinantní enzym v tomto kitu má také aktivitu RNázy H, která degraduje RNA z RNA:DNA hybridu. Jako primery se u reverzní transkripce využívají náhodné hexanukleotidy nebo oligodT. Pro zvýšení stability RNA za vyšších teplot se do reakční směsi přidává také Inhibitor RNáz. Pro ukončení reakce se směs zahřeje na vysokou teplotu, čímž dojde k degradaci reverzní transkriptázy.

Postup:

- Připravit mastermix (bez RNA) podle následující tabulky

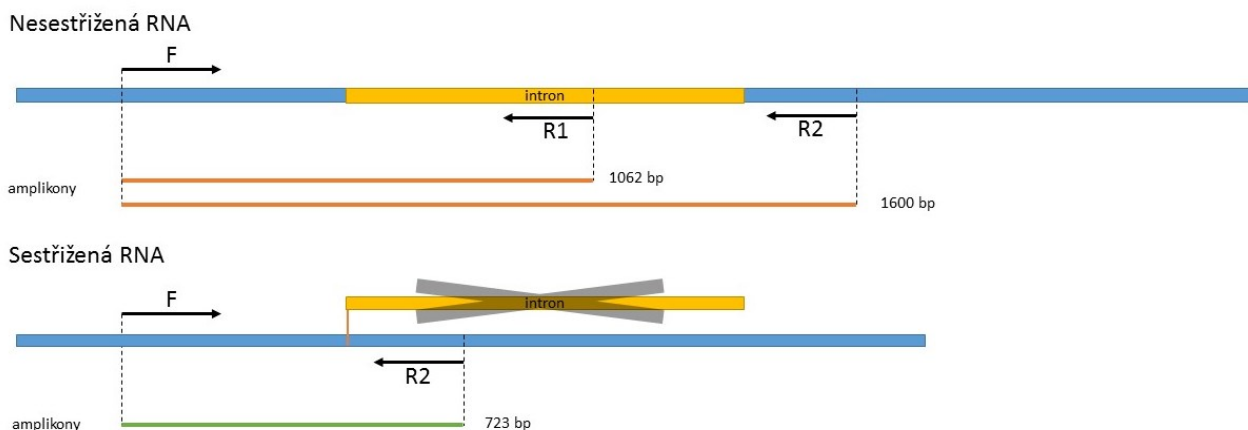
Složka	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem v 1 vzorku (20 µl)	Objem v ... vzorcích
Random hexamers	600 µM	60 µM	2 µl	
Pufr	5×	1×	4 µl	

RNase Inhibitor	40 U/ μ l	20 U	0,5 μ l	
dNTP	10 mM každý	1 mM každý	2 μ l	
RT	20 U/ μ l	10 μ l	0,5 μ l	
ddH ₂ O	-	-	YY μ l	
RNA		Do 1 μg	XX μ l	

2. Rozpipetovat směs do mikrozkušavek, přidat RNA (pokud byla skladována v mrazáku, nahřát předem 10 min při 65°C a schladit na ledu).
3. Inkubovat 10 min/25°C (dochází k nasedání primerů).
4. Inkubovat 30 min/55°C (dochází k syntéze cDNA, především produktů do 4 kbp).
5. Inaktivovat reverzní transkriptázu 85°C/5 min, poté schladit na ledu.
6. Uchovávat -15 až -25°C.

PCR pro detekci sestřihu endolyzinu

Navržená PCR využívá jednoho forward primeru F nasedající na 5' konec genu a dvou reverse primerů. První reverse primer R1 se váže v oblasti intronu, druhý reverse primer R2 se váže do exonu za intronem (obr). Při PCR reakcích z genomové DNA vzniká pro primerový pár F a R1 produkt dlouhý 1062 bp a pro primerový pár F a R2 produkt o délce 1600 bp. Při PCR se sestřizenu RNA (cDNA), pak primery F a R2 dají vzniknout produktu o délce 723 bp. Produkt z primerů F a R1 nevzniká.



Postup:

1. Namíchat PCR pro každý z reverse primerů podle následujícího rozpisu Tab

Složka	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem v 1 vzorku (25 μ l)	Objem v vzorcích
FastStart	2×	1×	12,5 μ l	
Primer F	10 μ M	0,4 μ M	1 μ l	
Primer R	10 μ M	0,4 μ M	1 μ l	
ddH ₂ O	-	-	8,5 μ l	
cDNA			2 μ l	

2. Vložit vzorky do termocykleru a nastavit program podle Tab

Cyklus	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	5 min	1

Denaturace	94 °C	45 s	35
Nasedání primerů	50 °C	45 s	
Extenze	72 °C	90 s	
Závěrečná extenze	72 °C	7 min	1
Chlazení	4 °C	nekonečno	

3. Provést gelovou elektroforézu, jako marker využít žebříček 2log.

Literatura:

http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizolmax_man.pdf

Role of SH3b binding domain in a natural deletion mutant of *Kayvirus* endolysin LysF1 with a broad range of lytic activity.
 Benešík, M., Nováček, J., Janda, L. et al. *Virus Genes* (2018) 54: 130. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1507-2>

PRACOVNÍ LIST I

Mutace

Vypracoval:

Jméno, Příjmení, UČO

Semestr (skupina)

1. **Vypočítejte frekvenci spontánních mutant ve vašem vzorku.**
2. **Navrhňte tři způsoby mutagenese používané v genovém inženýrství.**
3. **Jaká je pravděpodobnost vzniku mutace u prokaryot?**
4. **K čemu slouží flukтуаční test? Nakreslete schéma flukтуаčního 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 koncentrace na 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 přímky a R^2 pro oba běhy (kvantifikace genu *blaZ* nebo *tetK* a 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 nejedná 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 mechanizmy podporují příjem nové genetické informace?

PRACOVNÍ LIST III

Konjugace

Vypracoval/a:

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

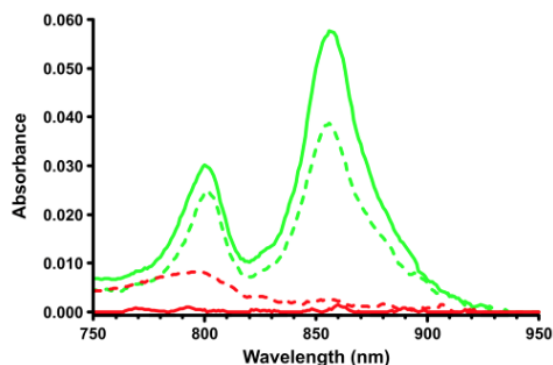
Vypracoval/a:

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)

5. *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.

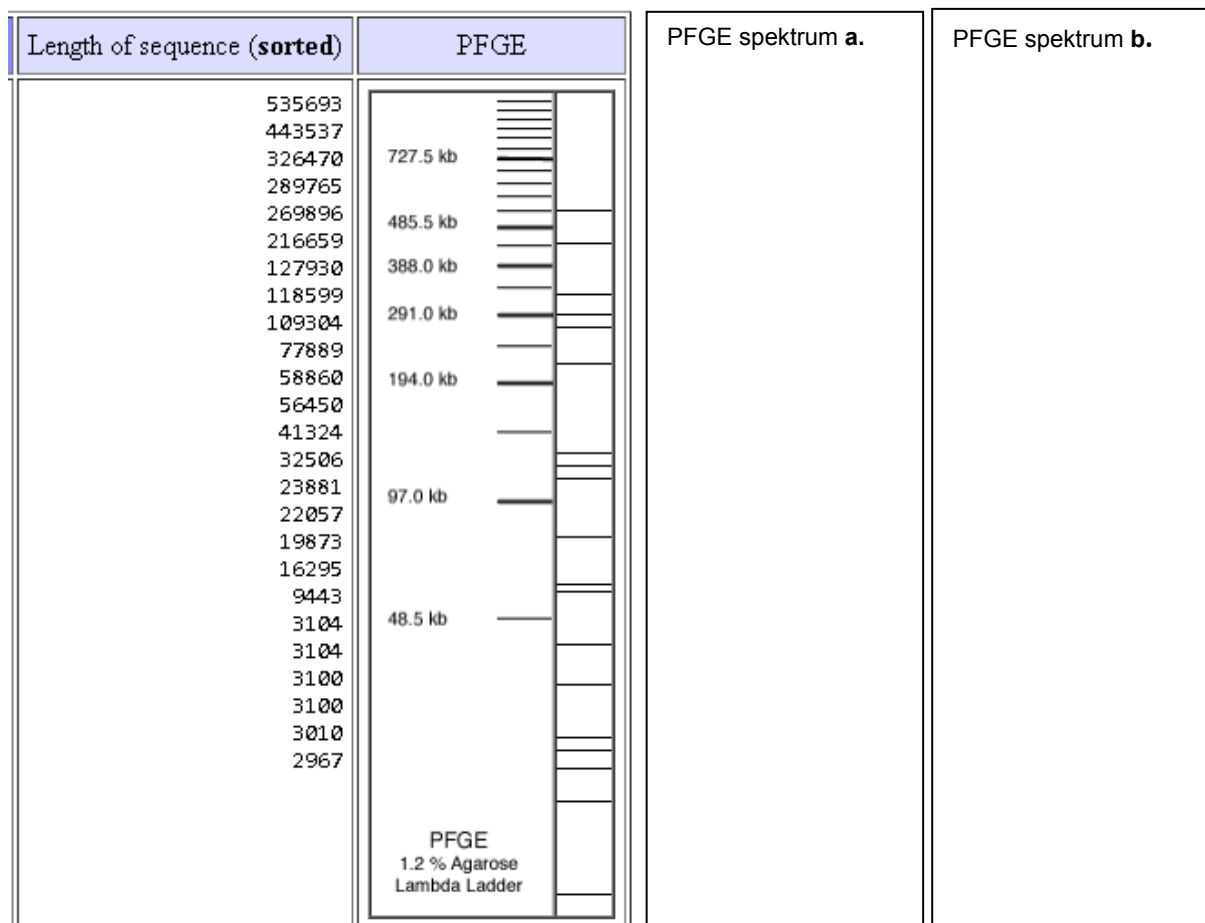
- b) Jaká je sekvence rozpoznávacího místa pro restriktázu *Sma*I

- 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.

6. Změna restriktivního spektra:

Na následujícím schématu *in silico* PFGE genomu *S. aureus* vyznačte a slovně popište, jak by se na restriktivním spektru projevila:



- a) Integrace bakteriofága o přibližné velikosti genomu 44 kb, který nese restriční místo pro *Sma*I. Uvažujte začlenění do fragmentu o velikosti 77 889 bp.
- b) Mutace vedoucí ke vzniku nového *Sma*I restričního místa, které rozdělí fragment o velikosti 216 659 bp cca na poloviny.
7. Na obrázku elektroforetického gelu genomové DNA vybraných stafylokokových kmenů štěpených restriktázou *Sma*I vyznačte a slovně popište změnu v restričním 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

PS47

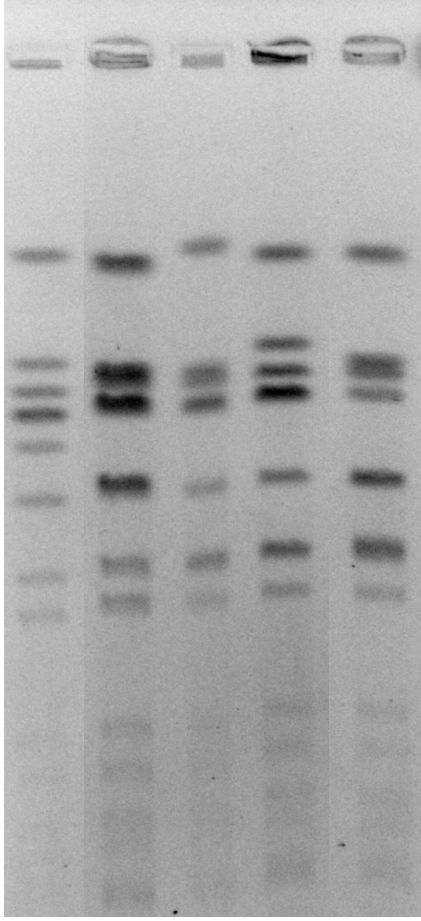
PS47 (53+)

ISP8

ISP8 (11+)

ISP8 (47+)

ISP8 (77+)



PRACOVNÍ LIST VI

Plazmidy

Vypracoval:

Jméno, Příjmení, UČO

Semestr (skupina)

1. Navržení primerů

Navrhněte 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 T_m teplotu.

primer tetK_F: T_m :

primer tetK_R: T_m :

b. Navrhněte 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.

PCR směs:

Reagencie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem (μl) pro jednu reakci
OneTaq® 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

Program PCR:

	teplota	doba trvání v s	počet opakování
Počáteční denaturace			
Denaturace			
Připojení primerů			
Prodlužování primerů			
Závěrečné prodlužování primerů			

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)

3. Stručně popište princip izolace plazmidové DNA pomocí komerčních kitů pro izolaci plazmidové DNA (pro PCR, klonování, sekvenování, *in vitro* transkripce). V kterém kroku dojde k separaci plazmidové DNA od chromozomální DNA ?

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?**