

Pokus 2: Bakteriální konjugace

1. Konjugace je přenos genetického materiálu z jedné bakteriální buňky do druhé. Nezbytný je určitý druh těsného kontaktu konjugujících buněk, při jehož ustavení hrají roli sex-specifické pili. Sex-pili jsou kodovány F-plasmidem.
2. Při Hfr x F⁻ konjugaci přenáší donorová buňka část svého genomu do recipientní buňky. Přenášený genetický materiál je extra kopií, takže donor neztrácí žádnou genetickou informaci.
3. Přenášený materiál má formu **jednořetězcové** DNA. Jednořetězcová DNA je vysoce rekombinogenní a po jejím přenosu do recipienta proběhne řada rekombinačních procesů.
4. Ve srovnání s transdukcí je při Hfr konjugaci přenášena podstatně větší část genetické informace. Bakteriální konjugace je užitečná při přenosu a mapování "velkých" oblastí DNA.

Úvod:

Nejznámějším konjugativním přenosem je přenos F-plasmidu u *E.coli* K12. F-plasmid může existovat ve dvou formách. Buď v autonomní formě jako plasmid nebo integrovaný do bakteriálního chromosomu. V druhém případě jsou takovéto kmeny nazývány Hfr (high frequency of recombination) a mohou v průběhu konjugace přenášet část nebo celý chromosom. Může probíhat konjugace F⁺ x F⁻, F' x F⁻ nebo Hfr x F⁻.

F' je označení pro F-plasmid, který byl kdysi integrován do chromosomu *E.coli* a vyrekombinoval se homologní rekombinací i s částí chromosomální DNA. Existuje sbírka F' plasmidů označených pomocí genů, které přenášejí (F' *lac*, *proAB*) nebo číselně (např. F' 112). V popisu této sbírky je uvedeno, která část chromosomu *E.coli* je přenášena.

Proces přenosu celého chromosomu (Hfr x F⁻) trvá asi 100 minut. Většinou je tento přenos mechanicky přerušen dříve. Tudíž geny, které jsou přenášeny později, mají mnohem menší pravděpodobnost přenosu než geny přenášené časné i při dlouhé době ponechané pro potenciální kontakt konjugujících bakterií. Výsledkem je kvantitativní gradient přenosu, který může být použit k mapování přenášených genů. Stejně užitečný je dočasný gradient přenosu získaný přerušovanou konjugací.

Konjugace se přerušuje intenzivním mechanickým pohybem (např. vortexováním) a nové vytváření konjugačních párů se podstatně omezuje nařazením. Případný přenos DNA mezi malým množstvím nově vytvořených konjugujících párů se omezuje snížením teploty, protože tento proces je závislý na energii. Prokázat bude možno pouze ty znaky, které byly přeneseny před vortexováním (ukončením kontaktu konjugujících buněk). Pořadí přenášených genů bude dáno a) frekvencí jejich přenosu a b) mnohem přesněji časem vstupu sledovaných genů do buňky.

F-plasmid kóduje determinanty, které téměř kompletně zabraňují přenosům F⁺ x F⁺, F⁺ x F', případně F' x F'. Jinak je konjugace F⁺ x F⁻ i Hfr x F⁻ velice účinný proces. V případě F⁺ x F⁻ se může F-plasmid rozšířit téměř stoprocentně v populaci *E.coli*. V kapalném mediu je kontakt buněk redukován jejich pohybem. Mnohem účinnější je konjugace na selekčním agarovém mediu, na které se do stejného místa nanese suspence donora a hostitele a nechá se zaschnout (tzv. spot mating). Totéž je možno provést na membránovém filtru, kam se do stejného místa "nafiltrují" buňky donora a hostitele. Filtr s buňkami se pak přenesou na selekční agar (tzv. filter mating). Jiný často používaný způsob spočívá v rovnoměrném nanesení recipienta na selekční misku, po kterém musí plotna zaschnout (přirozeně nebo v laminárním boxu). Kolonie donora se nanosou pomocí replica-plating techniky (viz dále).

Při konjugaci F⁺ x F⁻ je přenášena jednořetězcová DNA (replikovaná mechanismem valivé kružnice). V recipientu je doplněna na dvojřetězcovou a nakonec se uzavře kruhová molekula F-plasmidové DNA. Zdá se, že se přenesou přesně jednotková délka kopie F-plasmidu (nikoliv "více než jednotková, jak by mohlo vyplývat z replikace mechanismem valivé kružnice). Recirkularizace je proces nezávislý na RecA proteinu a mohlo by jít o proces revertující původní štěpení v *oriT*. Jako hostitelské kmeny pro F' plasmidy se používají kmeny *E.coli*, které mají sníženou schopnost homologní rekombinace

(nejčastěji mutanty v genu *recA*), aby nedocházelo ke vzniku Hfr kmene rekombinací mezi bakteriálním chromosomem a homologní sekvencí na F' plasmidu.

Při konjugaci Hfr x F⁻ se nikdy nepřenese celý chromosom tak, aby se přenášená jednořetězcová DNA mohla doplnit na dvořetězcovou formu a recipient se stal diploidem s dvěma odlišnými chromosomy (jeden od donora). Přenášená jednořetězcová DNA vstupuje do rekombinačního procesu s chromosomální DNA recipienta. Často bývá mechanicky přerušena a proto je její doplnění na dvořetězcovou formu velmi nepravděpodobné. Vedle uvedeného se zdá, že i parciální diploidie některých genů buňku *E.coli* znevýhodňuje.

F-plasmid se může integrovat do chromosomu *E.coli* (většinou homologní rekombinací nebo transposicí) v mnoha různých místech a ve dvou možných orientacích, čímž vzniká řada různých Hfr kmenů, které se liší se počátečním přenášeným genem a orientací přenosu DNA (ve směru nebo proti směru hodinových ručiček). V našem pokusu budou použity tři různé Hfr kmeny, které se právě liší polohou počátečního přenášeného lokusu i orientací přenosu.

Při pokusech s konjugací *E.coli* je důležitá tzv. kontraselekcce proti donoru i recipientu a současně selekcce žádoucích rekombinantů. Po vysetí konjugační směsi by ani donor ani recipient neměli růst. Růst by měly pouze selektované rekombinanty. Prakticky se to uskutečňuje několika způsoby:

- a) Přidáním antibiotika, ke kterému je recipient resistantní a donor sensitivní a současně nepřidáním esenciálního auxotrofního přídatku pro recipienta, přičemž přenos genů podílejících se biosynthese této látky je selektován.
- b) Další možností je použití dvou antibiotik. Donor je sensitivní k jednomu antibiotiku a recipient k druhému. Při konjugaci pak musí dojít k přenosu determinanty resistance z donora do recipienta, aby selektovaní rekombinanti byli resistantní k oběma antibiotikům.
- c) Další alternativou je, že donor je auxotrofní na určitou látku, na kterou není auxotrofní recipient a recipient je auxotrofní na jinou látku, na kterou není auxotrofní donor. Geny biosynthese látky, na kterou je recipient auxotrofní by měly být konjugací přeneseny do recipienta. Žádná z těchto látek není přidána do selekčního media. Selektovaní rekombinanti pak získali selektované biosynthetické geny od donora. Obdobný přístup se uplatňuje při konjugaci F' x F⁻. Vhodné stanovení selekčních a kontraselekčních podmínek je klíčem úspěchu pro každý pokus s konjugativním přenosem genů.

Co bychom měli prokázat:

1. Při bakteriální konjugaci jsou geny přenášeny v určitém pořadí. Frekvence přenosu různých genů různě závisí na době kontaktu donorové a recipientní buňky. Lze určit minimální čas nezbytný pro kontakt recipienta s donorem, po němž již lze přenos určitého genu prokázat. Čím je tento čas kratší, tím je vyšší frekvence přenosu tohoto genu určená při delší době konjugace.
2. Toto pořadí záleží na použitém donorovém kmeni.
3. Konjugace je přerušena intenzivním mechanickým pohybem.
4. Genetická mapa *E.coli* je kruhová (jde o strukturu bez počátku a konce).
5. Frekvence současného přenosu neselektovaného znaku se znakem selektovaným závisí na tom, zda je tento znak vůči znaku selektovanému proximální nebo distální (zda je přenášen dříve nebo později).

Popis pokusu:

1. Bakteriální kmeny:

Recipient: TC249: F-*leu proC his met rpsL*

Donorové kmeny: XS57: Hfr Hayes *thi lacZ*

CD17: Hfr Cavalli *mal*

CFE34: Hfr AB312 *thi* nebo KL14: identický PO68 (typ počátku konjugativní

replikace DNA jako u CFE 34) *relA1*, *spoT1*, *thi-1*

KL16: Hfr, λ *E14*, *relA1*, *spoT1*, *thi-1*

2. Nové symboly: *thi*: požadavek na thiamin (vitamin B1) *mal*: mutant nemůže využívat maltosu

Hfr Hayes, Cavalli, AB312 (KL14) jsou Hfr kmeny s různým místem integrace F-plasmidu.

3. Osnova pokusu:

- a) Použité buňky: Donorové buňky by měly být v logaritmické fázi růstu v Kml mediu. Obvykle používáme také logaritmicky rostoucí recipientní buňky, není to však nezbytné.
- b) Konjugace: Po nárůstu obou kultur na $OD_{600} = \text{cca } 0.2$, smíchejte určitý objem donorových buněk s trojnásobkem tohoto objemu recipientních buněk. Inkubujte bez třepání nebo jen jemně třepejte při 37°C.
- c) Odběry: Odeberte vzorky (podle časového plánu - viz dále) a nařeďte je 1:26 v minimálním mediu K120 o teplotě 0°C. Snížení teploty zastaví proces přenosu DNA, který je závislý na energii. Intenzivní vortexování mechanicky rozdělí konjugační páry. Jako čas 0 počítejte čas smíchání donorové a recipientní kultury.
- d) Vyšetí a selekce rekombinant: Pro vyšetí vzorků použijte top agary, do kterých přidejte nezbytné auxotrofní přísady (po 100 μ l), kromě těch, na které selektujete rekombinanty (exkonjuganty). Po přidání ředěné buněčné suspence (konjugace přerušena intenzivním vortexováním) do top agaru výslednou směs krátce VORTEXUJTE a pak nalijte na minimální agar s glukosou a streptomycinem. Donorové buňky neporostou na selektivních agarech vzhledem k přítomnosti streptomycinu. Recipientní buňky porostou pouze tehdy, pokud získaly gen, na jehož produkt byly selektovány. Po ztuhnutí top agaru (15-20 minut) obraťte misky dnem vzhůru a přeneste do termostatu (37°C).
- e) Zjišťování frekvence přenosu genů a současného přenosu neselektovaných znaků: Po inkubaci (1-2 dny) spočítejte kolonie na každé misce a zjistěte frekvenci současného přenosu neselektovaných znaků.

Časová osa pokusu:

- 1.den: Konjugace a selekce rekombinant a příprava misek pro matrice, replikační kontroly a misky pro sledování neselektovaných znaků.
- 2.den: Kvantifikace selektovaných exkonjugantů a inokulace matric pro sledování přenosu neselektovaných znaků.
- 3.den: Replikování matric na testovací plotny pro zjištění přenosu neselektovaných znaků.
- 4.den: Kvantifikace přenosu neselektovaných znaků.

Přesné instrukce:

1. Poskytnutý materiál:

- a) Kultury TC249, XS57, CD17 A CFE34 (nebo KL14) v LB mediu.
- b) LB medium na ředění kultur, minimální medium K120 bez cukru na ředění odběrů.
- c) Sterilní baňky, třepací vodní lázeň 37°C, sterilní zkumavky na ředění.

d) Minimální glukosové agary (K120 Dex) se streptomycinem, sterilní roztoky leucinu, prolinu, histidinu a methioninu. Minimální glukosové agary s antibiotikem (streptomycin)

Složení minimálních agarů K120: 69mM $(\text{K},\text{H})_3\text{PO}_4$ pufr pH 7, 15mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4mM MgSO_4 , $2.5 \times 10^{-4} \% \text{FeSO}_4$, thiamin (1mg/l), 1mM citronan dvojsodný, agar (15g/l)

Pozn. Minimální glukosové agary obsahují automaticky thiamin. Tento fakt není důležitý pro praktikum, ale agary stejného typu používáme také v laboratoři, protože většina sbírkových kmenů *E.coli* K12 je mutantní v biosynthese thiaminu. Neuvažujte tedy o možném přenosu mutantního *thi* genu.

e) Mikropipety a sterilní špičky v krabičkách.

f) Sterilní párátko.

g) Sterilní samety.

h) Raznice pro "replica plating" techniku.

i) Rastrové mřížky pro přípravu matric pro "replica plating" techniku.

j) Ledová lázeň.

2. Příprava a provedení pokusu:

a) Vhodně řed'te kultury, aby stále rostly exponenciálním růstem (Kultury by měly být mimo inkubátor co možná nejkratší dobu). Nezapomeňte kultury řádně označit.

b) Označte si konjugační baňky.

c) Označte si ředící zkumavky a do každé dejte 2.5 ml ředícího minimálního media K120 media.

Připravte si ledovou lázeň.

d) Do konjugační baňky přidejte 2.5 ml donorové (OD_{600} cca 0.2 to je asi 2×10^8 buněk per ml) a 7.5 ml recipientní (OD_{600} cca 0.2) kultury. [Poměr koncentrací buněk by měl být 3:1, ve prospěch recipienta. Objemové poměry lze měnit podle densit kultur.] Čas smíchání je $T=0$, **odeberte první vzorek**, (0.1 ml konjugační směsi do 2.5 ml minimálního media K120) od této doby se počítá čas konjugace. Odebrané vzorky (podle níže uvedeného schématu) zvortexujte jednu minutu nebo zvortexujte 5 sekund, uložte do ledu a vortexujte 1 minutu později. Po vortexování dlouhém 1 minutu vzorky ihned vysejte nebo uložte do ledu (před vysetím opět krátce vortexujte).

d) Pokračování pokusu. Odebírejte vzorky (0.1 ml do 2.5 ml minimálního media K120) v čase podle předpisu uvedeného níže. Pokud odeberete v jiném čase zaznamenejte si to. Přerušeni konjugace proved'te opět vortexováním, jak bylo uvedeno výše a vzorky vysejte.

3. Vysetí:

a) Označte si glukosové agary se streptomycinem (skupina, selekce, čas odběru). Na označené misky napipetujte **příslušné auxotrofní požadavky podle typu selekce** (podle tabulky jednotlivých selekcí 0,1 ml každé) a rozetřete sterilně hokejkou. Na takto připravené misky vysejte **uvedené** množství odebraného zvortexovaného vzorku (naředěná konjugační bakteriální suspence v minimálním K120 mediu) podle následující tabulky.

Rozpis odběru vzorků při konjugaci:**Konjugace A: XS57 x TC249**

čas: 0min, 8min, 12min, 18min, 28min, 50min, 90min, 130min,

selekce**Leu⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.2ml**Pro⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.2ml, 0.1ml**His⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.2ml,**Met⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml,**Konjugace B: CD17 x TC249**

čas: 0min, 8min, 12min, 20min, 40min, 70min, 120min,

selekce**Pro⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.2ml, 0.1ml,**Leu⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.2ml, 0.1ml,**Met⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.2ml, 0.1ml,**His⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml,**Konjugace C: CFE34 x TC249 (KL14 x TC249)**

čas: 0min, 20 min, 35min, 45min, 75 min, 120min,

selekce**Met⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml,**Leu⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.2ml, 0.2ml,**Pro⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.2ml, 0.2ml**His⁺** 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml, 0.4ml,**Konjugace D: KL16 x TC249**

čas: 0 min, 20 min, 35 min, 45 min, 75 min, 120 min

selekce**His⁺** 0,4 ml, 0,4 ml, 0,4 ml, 0,4 ml, 0,2 ml**Pro⁺** 0,4 ml, 0,4 ml, 0,4 ml, 0,4 ml, 0,4 ml**Leu⁺** 0,4 ml, 0,4 ml, 0,4 ml, 0,4 ml**Met⁺** 0,4 ml, 0,4 ml, 0,4 ml

Tabulka popisující auxotrofní přídavky při jednotlivých typech selekcí:

- Selekce:**
- a) **Leu⁺** znamená růst na glukosovém minimálním agaru a prolinu, histidinu a methioninu.
 - b) **Pro⁺** znamená růst na glukosovém minimálním agaru a leucinu, histidinu a methioninu.
 - c) **His⁺** znamená růst na glukosovém minimálním agaru a prolinu, leucinu a methioninu.
 - d) **Met⁺** znamená růst na glukosovém minimálním agaru a prolinu, histidinu a leucinu.

4. Analýza rekombinant (exkonjugant):

Každá pracovní skupina získá z výsledků svých konjugačních pokusů dvě různé informace:

a) Průběh frekvence přenosu selektovaných znaků v závislosti na době konjugace, ze kterého lze určit čas vstupu těchto znaků.

b) Frekvenci současného přenosu neselektovaných znaků po dlouhé době konjugace.

4/A. Určení času vstupu genu (znaku) do recipienta: Spočítejte počet kolonií na každé selekční misce.

V případě příliš velkého počtu kolonií rozdělte misku na pravidelné sektory a po zjištění počtu kolonií v jednom sektoru přepočtete počet kolonií na celou misku. Vyjádřete počet kolonií na 1 ml konjugační směsi. Vyneste počet selektovaných rekombinant (exkonjugant) v 1 ml konjugační směsi jako funkci času a určete čas vstupu selektovaného znaku (průsečík získané křivky a osy, na které je vynesena čas konjugace).

4/B. Zjištění současného přenosu neselektovaných znaků: Z vybraných vzorků exkonjugantů (podle následující tabulky, která pro každou skupinu určuje vybraný typ selekce a čas odběru) připravte matricové plotny a zjistěte frekvenci současného přenosu neselektovaných znaků pomocí „replica plating“ metody.

a) Příprava a nárůst matric pro repliky: Předem (v den provedení konjugace) si připravte matricové plotny, které budou obsahovat stejné přídavky jako selekční plotny. Po nárůstu selektovaných rekombinant naočkujte na tyto misky sterilními párátky vždy 80 jednotlivých kolonií podle předlohového rastru z určených selekčních misek. Pozor na současnou inokulaci ze dvou těsně sousedících kolonií, která by mohla ovlivnit výsledky. Proto si k inokulaci vybírejte jednotlivé, dobře izolované kolonie. Růst v inkubátoru při 37°C 1-2 dny.

b) Orazítkování narostlých matricových ploten na testovací agary a replikační kontroly. V den provedení konjugace si rovněž připravte plotny na replikační kontrolu i testovací agary (podle následující tabulky). Orazítkujte technikou replica plating narostlé matricové plotny na testovací agary a replikační

kontroly. Replikační kontroly mají stejné přídavky jako selekční misky respektive matrice (postrádají pouze selektovaný požadavek). Testovací agary budou postrádat kromě selektovaného i auxotrofní přídavek pro zjišťovaný současně přenášený znak.

Tabulka auxotrofních přídavků pro sledování současného přenosu neselektovaných znaků:

Donor	Selekt.znak	Čas odběru	Test na neselektované znaky
XS57	His ⁺	130min	Leu ⁺ (přidat prolin a methionin) Pro ⁺ (přidat leucin a methionin) Met ⁺ (přidat leucin a prolin)
	Met ⁺	160min	Leu ⁺ (přidat prolin a histidin) Pro ⁺ (přidat leucin a histidin) His ⁺ (přidat leucin a prolin)
CD17	Met ⁺	120min	Leu ⁺ (přidat histidin a prolin) His ⁺ (přidat leucin a prolin) Pro ⁺ (přidat leucin a histidin)
	His ⁺	160min	Leu ⁺ (přidat methionin a prolin) Met ⁺ (přidat leucin a prolin) Pro ⁺ (přidat leucin a methionin)
CFE34 (KL14)	Pro ⁺	120min	Leu ⁺ (přidat histidin a methionin) His ⁺ (přidat leucin a methionin) Met ⁺ (přidat leucin a histidin)
	His ⁺	160min	Leu ⁺ (přidat methionin a prolin) Met ⁺ (přidat leucin a prolin) Pro ⁺ (přidat leucin a methionin)

Frekvenci současného přenosu neselektovaného znaku vyjádřete v procentech. Neberte v úvahu ty skvrny nárůstu, které nevyrostou na tzv. replikační kontrole (která slouží jako kontrola provedení otisku).

5. Presentace a analýza získaných dat:

- Graficky vyjádřete frekvenci přenosu jednotlivých znaků v závislosti na čase, odečtěte čas vstupu jednotlivých znaků a stanovte jejich pořadí na genetické mapě E.coli.
- Vyjádřete frekvenci současného přenosu neselektovaných znaků (v procentech) při dlouhé době konjugace a vyvoďte závěry ze získaných dat (vztah polohy selektovaného a neselektovaného znaku k *oriT*).