

---

---

## Ćwiczenie 5

### Bakteriofagi i transdukcja, transformacja bakterii *Escherichia coli* DNA plazmidowym

#### 1. Omówienie wyników poprzedniego ćwiczenia.

#### 2. Oznaczanie wrażliwości bakterii na bakteriofagi (ang.: streak-test).

Do streak-testu należy zastosować następujące szczepy: *Escherichia coli* A17λ<sup>-</sup>λ<sup>S</sup>, A135λ<sup>-</sup>λ<sup>R</sup>, L2λ<sup>+</sup>λ<sup>S</sup>, A142[λ.dv] λ<sup>S</sup>, A40 *dnaB* oraz *Salmonella anatum*.

Na płytkach z podłożem agarowym nanieść w postaci kreski około 0.1 ml lizatu fagowego bakteriofaga λ oraz T4. Następnie, po wsiąknięciu lizatu (!), za pomocą jałowych wykałaczek pobrać materiał z kolonii bakteryjnych i przeciągnąć przez linię z naniesionym lizatem fagowym. Płytki inkubować 24 godziny w temperaturze 37°C. Określić jaka jest wrażliwość bakterii na użyte bakteriofagi. Jeżeli po kontakcie z fagiem nie jest widoczny wzrost bakterii to znaczy, że badany szczep bakteryjny jest wrażliwy na danego bakteriofaga. Natomiast normalny wzrost bakterii po kontakcie z bakteriofagiem świadczy o oporności tego szczepu na danego bakteriofaga.

#### 3. Przygotowanie lizatu bakteryjnego do transdukcji (pokaz 1 na grupę).

Nocną hodowlę bakterii (**dawca**) *E.coli* MG1655 (transpozon ten położony jest w pozycji 7,75' na mapie chromosomu *E. coli*) rozcieńczyć 1:100 w pożywce LB (**100µl bakterii + 9.9 ml pożywki LB**) i hodowano przez około 45 minut w 37°C, do OD<sub>600</sub>= 0.2. Po tym czasie dodać **0.1 ml 1M CaCl<sub>2</sub>** (do stężenia końcowego około 10 mM) oraz **75 µl** lizatu bakteriofaga P1 *vir*. Całość wytrząsać 2-3 godziny do czasu całkowitej lizy komórek bakteryjnych (wyraźne przejaśnienie hodowli). Po odwirowaniu szczątków bakteryjnych lizat przechowuje się w temperaturze 4°C w obecności chloroformu.

#### 4. Transdukcja ogólna bakteriofagiem P1.

Metoda ta wykorzystuje naturalne właściwości bakteriofaga P1 polegające na tym, że może on przenosić (**transdukować**) fragmenty chromosomu *E.coli* o wielkości do 100kb. Zdolność ta została wykorzystana w mapowaniu genów chromosomalnych i plazmidowych, oraz w przenoszeniu (transdukcji) homologicznych fragmentów DNA, z chromosomu dawcy do chromosomu biorcy. Proces ten zwany transdukcją ogólną zachodzi z częstością 10<sup>-5</sup>-10<sup>-8</sup>/komórkę dla różnych genów, bez względu na ich położenie na chromosomie. Jeżeli dwa geny są zlokalizowane blisko siebie (ściśle sprzężone) to mogą być przeniesione przez tę samą cząstkę fagową (kotransdukcja). Częstość kotransdukcji maleje ze wzrostem odległości między dwoma genami. Znaczniki genetyczne leżące w odległości większej niż 100 kb nie mogą być kotransdukowane. Do transdukcji ogólnej używa się faga P1 *vir*, który zawsze wchodzi na drogę lityczną, i który z bardzo małą częstością, w wyniku „błędu”, pakuje do główki potomnej, DNA gospodarza zamiast własnego genomu. Po infekcji mieszaniną bakteriofagów potomnych, taki DNA nie może się replikować ale może integrować się (rekombinować) z chromosomem biorcy na zasadzie rekombinacji homologicznej katalizowanej m.in. przez białko RecA.

W probówce Eppendorfa przygotować mieszaninę bakteryjną do transdukcji zawierającą:

- **0.1 ml** nocnej hodowli szczepu *E. coli* MG1655  $\Delta lac145 zah-281::tet^r$  (**biorca**)
- **x (1-100) µl** wcześniej otrzymanego lizatu fagowego P1 (MG1655 Lac+) (**dawca**)
- **20 µl** 100mM CaCl<sub>2</sub>.

**Uwaga!** Każda para dodaje inną ilość lizatu fagowego. **1 para:** 10 µl; **2 para:** 20 µl; **3 para:** 30 µl; **4 para:** 40 µl; **5 para:** 50 µl; **6 para:** 100 µl lizatu fagowego.

Mieszaninę bakteryjną inkubować **20 min w 37°C** w cieplarni. Po tym czasie dodać roztwór cytrynianu sodu

do końcowego stężenia 10 mM (**24  $\mu$ l 0.1M**). Następnie dodać **0.6 ml** LB i inkubować hodowlę przez **30 min**. Po tym czasie wcierać transduktanty (**100  $\mu$ l**) na płytki McConkeya z tetracykliną (15 $\mu$ g/ml), laktozą (1%) i 10 mM cytrynianem sodu (1 płytka na parę). Płytki inkubować przez noc w temperaturze 37°C. Po tym czasie obserwować wyrosłe kolonie bakteryjne.

**Dodatkowo należy wykonać następujące posiewy kontrolne (2 płytki McConkeya na grupę):**

**a)** posiew izolacyjny *E.coli* MG1655  $\Delta lac145 zah-281::Tn10tet^S$  (biorca) na płytkę z podłożem McConkey'a uzupełnionym tetracykliną.

**a')** posiew izolacyjny *E. coli* MG1655  $lac^+$  (dawca) na płytkę z podłożem McConkey'a uzupełnionym tetracykliną

**b)** posiew izolacyjny *E.coli* MG1655  $\Delta lac145 zah-281::Tn10tet^S$  (biorca) na płytkę z podłożem McConkey'a bez antybiotyku.

**b')** posiew izolacyjny *E. coli* MG1655  $lac^+$  (dawca) na płytkę z podłożem McConkey'a bez antybiotyku.

**Zagadnienia do samodzielnego przygotowania:**

- cykle życiowe bakteriofagów (lityczny i lizogeniczny)
- transdukcja, koniugacja i transformacja – jako sposoby przenoszenia materiału genetycznego mikroorganizmów.