

CVIČENÍ IV.

IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA, ELEKTROFORÉZA PLAZMIDOVÉ DNA, TRANSFORMACE

Rychlé šíření antimikrobiální rezistence mezi bakteriemi odlišných druhů nebo rodů se uskutečňuje především horizontálním přenosem genů rezistence nesených na mobilních genetických elementech (plazmidy, transpozony, integrony a genové kazety). Znamé jsou tři mechanismy horizontálního přenosu genetické informace. Jedná se o 1) transformaci, kdy dochází k přijetí úseků volné exogenní DNA kompetentní recipientní buňkou uvolněných do extracelulárního prostoru donorovou bakterií, 2) transdukci, což je bakteriofágem zprostředkovaný přenos DNA a 3) konjugaci, kdy dochází k přenosu DNA z buňky donorové do buňky recipientní, které jsou za tímto účelem dočasně spojené pomocí konjugačního pilu (přenos zprostředkovaný plazmidy nebo jinými konjugativními prvky).

Plazmid je dvouřetězcová extrachromozomální kruhová molekula DNA schopná autonomní replikace. Plazmidy se liší svou velikostí od několika stovek párů bází až po statisíce párů bází, přičemž bakterie může zároveň nést více typů plazmidů i více kopií jednoho plazmidu. Struktura plazmidů není statická, naopak se mění v průběhu času. Plazmidy obsahují geny pro svoji autonomní replikaci, pro kontrolu počtu svých kopií a pro zajištění stability během buněčného dělení. Kromě toho může plazmid nést geny kódující různé metabolické procesy a unikátní funkce, které nejsou nezbytné pro přežití buňky za fyziologických podmínek, ale jsou přínosem pro buňku ve specifických situacích. Jedná se např. o rezistenci k antibiotikům, dezinfekčním látkám, kationtům těžkých kovů, o vlastnosti virulence nebo funkce fertility atd.

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2005): Základy buněčné biologie. Espero Publishing. 645 s.

Lipps G. (2008): Plasmids: current research and future trends. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom, 263 s.

Huddleston J. R. (2014): Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist* 7, 167-176.

Rosypal S. (2006): Úvod do molekulární biologie. Díl první. Vstup do molekulární biologie - Molekulární biologie prokaryotické buňky. Brno. 289 s.

Snustad D. P., Simmons M. J. (2009): Genetika. MUNI Press, Brno. 894 s.

von Wintersdorff C. J., Penders J., van Niekerk J. M., Mills N. D., Majumder S., van Alphen L. B., Savelkoul P. H., Wolfs P. F. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front Microbiol* 7, 173.

ÚLOHA 1: Izolace plazmidové DNA

Testované kmeny: *E. coli* 39R861, *E. coli* 172DI/B, testované izoláty

Kontrolní kmen *E. coli* 39R861 slouží pro kontrolu extrakce plazmidů, kmen nese 4 plazmidy o velikosti 147 kb, 63 kb, 36 kb a 7 kb, které jsou dobře viditelné na gelu. Tento kmen ale nenese žádné geny rezistence, proto pro kontrolu transformace používáme plazmidovou DNA kontrolního kmene 172DI/B, který nese gen *bla*_{TEM-52}.

Postup dle Birnboim a Doly (1979):

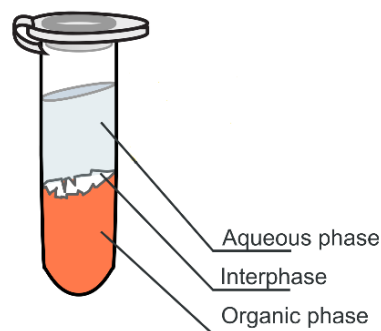
- 1) Dle počtu testovaných kmenů si nachystáme a popíšeme příslušné množství eppendorf zkumavek, do kterých napipetujeme 500 µl sterilní destilované vody.

- 2) Kličkou nabereme bakteriální kulturu a resuspendujeme ji v nachystané sterilní destilované vodě (můžeme lehce zvortexovat).
- 3) Zapneme funkci rychlého zchlazení na centrifuze.
- 4) Připravíme čerstvé roztoky lysozymu a SDS v URIN zkumavce (množství na 24 vzorků). Navážky připravujeme na analytických vahách.

roztok lysozymu: 0,01 g lysozymu (po vyjmutí z lednice uchováváme na ledové tříšti) + 2,5 ml roztoku č. 1. Připravený roztok uchováváme v ledové tříšti.

roztok 1% SDS: 0,06 g sodium dodecyl sulfátu (dodecylsírán sodný) + 5 ml roztoku č. 2

- 5) Zkumavky s kulturami centrifugujeme při 12 000 otáčkách po dobu 2 minut. Poté odpipetujeme supernatant. Supernatant pipetujeme do skleněné nádoby označené „Bakteriologický odpad“.
- 6) K peletám přidáme 100 µl roztoku lysozymu a několikrát promícháme opakovaným nasátím a vypuštěním. Po přidání lysozymu do první zkumavky začneme stopovat čas 5 minut, zkumavky inkubujeme při pokojové teplotě (*vznikají protoplasty*). Ihned po uplynutí stopovaných 5 minut pokračujeme následujícím krokem. Při práci zachováváme stejné pořadí zkumavek.
- 7) Do zkumavky přidáme 200 µl 1% roztoku SDS, promícháme několikerým převrácením zkumavky (je možné použít 1 špičku na všechny vzorky, pokud se nedotkneme vnitřku zkumavky) a ihned vložíme do ledu na 5 min. Čas je opět nutné stopovat od prvního přidání SDS (*dochází k lýzi buněk a denaturaci DNA, chlazením se omezuje činnost nukleáz*).
- 8) Přidáme 150 µl vychlazeného roztoku č. 3 (*neutralizační roztok, dochází k srážení chromozomální DNA a proteinů*), promícháme několikerým převrácením zkumavky a necháme stát v ledu 5–10 min (*dochází k renaturaci plazmidové DNA*).
- 9) Centrifugujeme při 12 000 otáčkách 10 minut při teplotě 4 °C (*sedimentace zbytků buněk a chromozomální DNA*). Během centrifugace si nachystat a popsat nové eppendorf zkumavky.
- 10) Pipetou odebereme supernatant do čisté zkumavky.
- 11) Centrifugujeme při 12 000 otáčkách 4 minuty při teplotě 4 °C. Během centrifugace si nachystat a popsat nové eppendorf zkumavky, následně pipetou odebereme supernatant do čisté zkumavky. V některých případech už není možné vidět sediment, v tom případě odebereme supernatant až téměř ke dnu zkumavky.
- 12) Přidáme 200 µl fenol-chloroformu do každé zkumavky (před pipetováním láhev promícháme několikerým převrácením, pracujeme v rukavicích). Zkumavky uložené ve stojánku překlopíme dalším stojánkem, abychom mohli 3 minuty promíchávat několikerým převrácením všech zkumavek naráz (*dochází k denaturaci proteinů*).
- 13) Centrifugujeme při 12 000 otáčkách 3 minuty při teplotě 4 °C. Po odstředění by ve zkumavce měly být patrné tři fáze: Spodní nažloutlá (fenol, organické sloučeniny), prostřední bílá sraženina (proteiny) a horní vodná fáze obsahující plazmidy. Pomocí špičky s ustříženým hrotem odebereme horní vodnou fázi do čisté eppendorf zkumavky. Je potřeba postupovat opatrně, aby nebyla odebrána proteinová mezivrstva (odebíráme raději méně než více). Vodná fáze musí být čirá. Pokud není zcela čirá (má mírně mléčné zbarvení), je potřeba znovu přidat fenol-chloroform (tentokrát 100 µl), znovu promíchat převrácením 2 minuty a znovu centrifugovat.
- 14) Přidáme dvojnásobný objem vychlazeného 96% ethanolu (cca 600-700 µl) a promícháme. Necháme přes noc inkubovat v mrazáku při -20 °C (*srážení plazmidové DNA*).



Postup můžeme přerušit a vzorky uložit při -20 °C na několik dnů.

- 15) Centrifugujeme zkumavky při 12 000 otáčkách 10 minut při teplotě 4 °C (pant uzávěru směrem od rotoru).
- 16) Opatrně slijeme etanol a jeho zbytky necháme dobře okapat otřením hrdla zkumavky na čistém filtračním papíru. Pelet DNA by měl být viditelný na stěně zkumavky na straně pantu.
- 17) K peletu přidáme 500 µl 70% ethanolu (*abychom odstranili všechny přebytečné soli*), pomalu promícháme převrácením a zcentrifugujeme při 12 000 otáčkách 5 minut při teplotě 4 °C.
- 18) Opatrně slijeme supernatant a k sedimentu přidáme 500 µl 96 % ethanolu a otáčením zkumavky opláchneme stěny.
- 19) Centrifugujeme při 12 000 otáčkách 5 minut při teplotě 4 °C.
- 20) Slijeme supernatant a sediment necháme dobře okapat na filtračním papíru (nebo pipetou odsajeme zbytky alkoholu z opačné strany než je pelet DNA, který je na straně pantu uzávěru). Otevřené eppendorf zkumavky s DNA necháme v termostatu vysušit 30 min (vodorovně na filtračním papíru v plastové krabici). Ve zkumavce nesmí zůstat žádný zbytek ethanolu (jinak prodloužit dobu vysoušení).
- 21) Pelety plazmidové DNA rozpustíme v 20 µl PCR vody a 1 µl RNázy A (10 mg/ml). Za použití ustrížené špičky opatrně nasajeme a vypustíme, kapky PCR vody pouštíme po stěnách zkumavky, abychom plazmidovou DNA přenesli do roztoku. Vše provádíme opatrně.
- 22) Zkumavky dáme na 10 min do termostatu, poté do -20 °C (pokud nezpracováváme tentýž den).

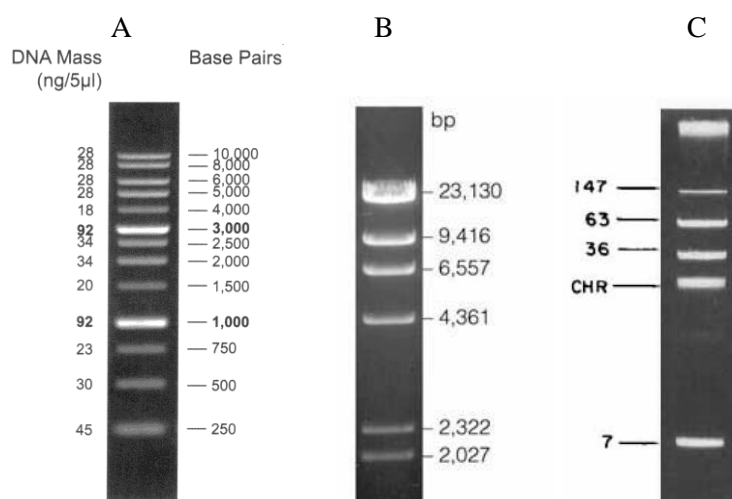
Reference: Birnboim, H. L., Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979, vol. 7, no. 6, p. 1513-1523.

ÚLOHA 2: Elektroforéza plazmidové DNA

Účelem této úlohy je ověření správného provedení Úlohy 1: Izolace plazmidové DNA. Po provedení elektroforézy by měl být na gelu viditelný band náležící plazmidové DNA (u kontrolního kmene detekujeme 4 plazmidy o velikosti 147 kb, 63 kb, 36 kb a 7 kb) a band odpovídající chromozomální DNA o přibližné velikosti 20 kb (viz následující obrázek).

Postup:

- 1) Nachystáme si 0,8% agarózový gel dlouhý alespoň 15 cm (tuhne aspoň 1 hodinu, použít speciální agarózu na plazmidy). Po zchlazení gelu do něj přidáme MIDORI GREEN, nalijeme do formy a necháme ztuhnout (viz Cvičení III. – příprava agarózového gelu).
- 2) Elektroforetickou vanu naplníme čerstvým vychlazeným 0,5x TBE.
- 3) Na kousek parafilmu nanese příslušný počet kapek (3 µl) 10x Loading Dye. Ke kapce 10x Loading Dye připipetujeme 10 µl plazmidové DNA a promícháme.
- 4) Do první jamky gelu napipetujeme 3 µl hmotnostního standardu 2-log („dlouhý“ žebřík).
- 5) Do druhé jamky gelu napipetujeme 3 µl hmotnostního standardu *HindIII* digest (DNA fága λ štěpená enzymem *HindIII*).
- 6) Do následujících jamek pipetujeme 13 µl nachystané směsi (plazmidová DNA s 10x Loading Dye).
- 7) Elektroforézu necháme probíhat při 120 V po dobu 2,5 hodiny (malé vany) nebo 180 V po dobu 2,5 hodiny. Elektroforetickou vanu je potřeba obložit chladicími vložkami.
- 8) Po uběhnutí elektroforézy zdokumentujeme gel pomocí fotodokumentačního systému nebo pomocí UV-transluminátoru (z důvodu bezpečnosti pozorujeme gel přes plastový kryt).

Obrázek: Hmotnostní standardy a plasmidy kontrolního kmene *E. coli* 39R861.

- A. 2-log neboli „dlouhý“ žebřík
 B. DNA fága Lambda štěpená *Hind*III (Lambda DNA-*Hind*III digest, Biolabs)
 C. Kontrola *E. coli* 39R861 nese plasmidy o velikosti 147 kb, 63 kb, 36 kb a 7 kb
 CHR = zbytky chromozomální DNA (silnější rozmazaný band o velikosti cca 20 kb)

Seznam používaných roztoků:

Roztok č. 1 (25 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM glukóza; pH = 8)

Roztok č. 2 (0,2 M NaOH, pH = 8)

Roztok č. 3 (3 M octan sodný, pH = 4,8)

Fenol-chloroform-izoamylalkohol 25:24:1

96% ethanol

70% ethanol

RNáza A (10 mg/ml)

TE pufr (10 mM Tris, pH = 8; 1 mM EDTA, pH = 8)

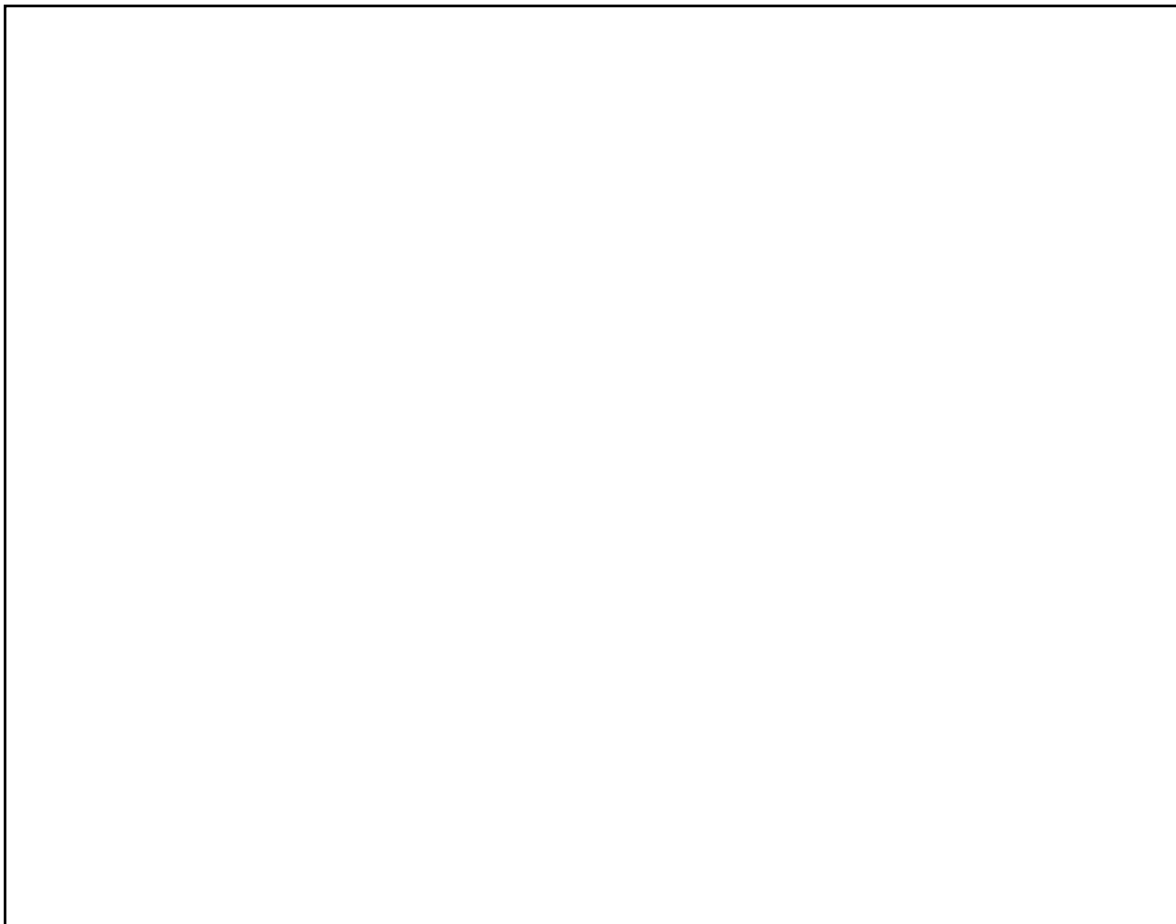
10× TBE pufr

10x Loading Dye

ethidium bromid

ÚKOL 1:

Zakreslete výsledek elektroforézy plazmidové DNA. Označ všechny hmotnostní standardy, chromozomální DNA a plazmidovou DNA. Odečti velikost izolovaných plazmidů a zapiš ji do protokolu.



ÚLOHA 3: Transformace chemicky kompetentních buněk plazmidovou DNA

Účelem úlohy je zjištění schopnosti horizontálního přenosu genu (genů) rezistence nesených na plazmidu (plazmidech) donorové bakterie do recipientního organismu metodou transformace.

Donor = dárce genetické informace

Recipient = příjemce genetické informace

Transformant = kompetentní buňka, která přijala plazmid s příslušným genem rezistence

Postup:

- 1) Nachystáme si ledovou tříšť do polystyrenové krabice.
- 2) Plazmidovou DNA včetně kontroly a kompetentní buňky *E. coli* (TOP 10 nebo DH5 α) uložíme na led.

- 3) Do popsaných 1,5 ml eppendorfek napipetujeme 1 μ l plazmidové DNA příslušného vzorku a 20 μ l kompetentních buněk. Směs opatrně promícháme pipetováním nahoru a dolů. *Pracovat rychle, nenechat dlouho rozmrazat, po použití by se neměly kompetentní buňky opět zamrazovat.*
- 4) Zkumavky (obsahující směs kompetentních buněk a DNA) umístíme na 30–60 minut na led. Mezitím nastavíme termoblok na 42 °C.
- 5) Po inkubaci na ledu podrobíme buňky teplotnímu šoku tak, že je umístíme do vyhřátého termobloku po dobu 45 sekund a poté je ihned přemístíme zpět na led na 2 minuty.
- 6) Do každé zkumavky přidáme 1 ml LB bujónu, promícháme a inkubujeme v termostatu při 37 °C po dobu 1 hodiny (možnost nechat třepat v suché lázni na 37 °C až 2 hodiny).
- 7) Po inkubaci buňky centrifugujeme při 5 000 rpm po dobu 5 minut.
- 8) Opatrně slijememe supernatant převrácením zkumavky. Supernatant sléváme do bakteriologického odpadu. Ve zkumavce zůstane cca 100 μ l supernatantu, který využijeme pro resuspendování peletu.
- 9) Pipetováním resuspendujeme pelet se zbytkem LB bujónu a veškerou kulturu ze zkumavky přepipetujeme na LB agar s cefotaximem (2 mg/l). Kulturu rozetřeme po celém povrchu plotny bakteriologickou hokejkou.
- 10) Misky kultivujeme dnem vzhůru do druhého dne při 37 °C.
- 11) Pokud druhý den vyrostou kolonie, tak z každé misky odpícháme 4 a přeočkujeme hustým hádkem na $\frac{1}{4}$ LB agaru s příslušným antibiotikem. Misky se 4 narostlými koloniemi uchovááme v ledničce až do ukončení testování transformantů.
- 12) Z narostlé kultury vyizolujeme DNA teplotní lýzí a provedeme PCR na *bla* gen, který byl prokázán u donorového kmene, jehož plazmidová DNA byla použita pro transformaci. Tím si ověříme, zda byla transformace úspěšná a obdrželi jsme transformanta s příslušným genem rezistence.

ÚKOL 2: Zakreslete, co jste pozorovali na misce druhý den po provedení transformace.

