

Esercitazioni del Corso di “MGBMEMM”

A.A.: 2023-2024

Docente: PROSEDA Gianni

TRASDUZIONE P1

La trasduzione è il fenomeno attraverso il quale il DNA batterico viene trasferito da una cellula batterica (detta donatrice) ad un'altra cellula batterica (detta recipiente) attraverso una particella fagica (detta particella trasducente).

Esistono due tipi di trasduzione: generalizzata e specializzata.

La prima si distingue dalla seconda perché le particelle trasducenti contengono DNA esclusivamente batterico e questo deriva da una parte qualsiasi del genoma batterico del ceppo donatore.

Questa esercitazione si basa sull'applicazione in laboratorio del fenomeno della trasduzione generalizzata al fine di trasferire il gene difettivo (*recA1*) da un ceppo di *E.coli* donatore ad un ceppo di *E.coli* recipiente che presenta una forma allelica regolarmente funzionante (*recA*).

Per realizzare la trasduzione utilizzeremo il fago temperato P1.

Questo fago, durante l'infezione di un ceppo di *E.coli* (ceppo donatore), produce una nucleasi che frammenta il genoma batterico molto lentamente e, nella fase di incapsidamento del genoma fagico, può accadere (con una frequenza di 10^{-3}) che un frammento del genoma batterico (di dimensioni comparabili a quella del genoma fagico) venga inserito in una particella virale completa producendo una **particella trasducente**.

La particella trasducente è perfettamente in grado di reinserire il DNA contenuto nel capsido in un secondo ceppo batterico di *E.coli* (ceppo recipiente) e, se si verifica un fenomeno di doppia ricombinazione omologa, si ha la sostituzione di porzioni del genoma batterico del ceppo recipiente con le medesime regioni del genoma del ceppo donatore.

In questa particolare esercitazione saremo costretti ad effettuare una variante della trasduzione generalizzata che è definita **cotrasduzione**.

Il fenotipo prodotto dalla mutazione *recA1* (*recA* difettivo) non è, infatti, selezionabile su piastra in modo efficace ed è quindi necessario fare riferimento ad un fenotipo selezionabile. Sul cromosoma del ceppo donatore, nei pressi del gene *recA1* difettivo, è presente un trasposone, il *Tn10*, che contiene un gene per la resistenza alla tetraciclina.

Siccome i frammenti del genoma batterico che P1 è in grado di trasdurre (80 - 100 kb) hanno dimensioni ben maggiori della distanza tra il *Tn10* e il gene *recA1* risulterà alta la probabilità che trasducendo il *Tn10* (seguendo l'acquisizione della resistenza alla tetraciclina) venga cotrasdotto anche il gene *recA1* difettivo.

La probabilità, inoltre, è tanto più elevata quanto più i due elementi genetici sono vicini e, sulla base della percentuale dei cloni (Tc^R *recA*⁻) rispetto a tutti i cloni ottenuti dalla trasduzione (Tc^R), è possibile calcolare la distanza tra il locus di *Tn10* e quello del gene *recA* (Fig 3)

Ceppo donatore:

MC4001

F araΔ139 Δ(arg-lac)U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR srl::Tn10 recA1

Ceppo recipiente:

YK4122

Derivato *trp*⁻ di YK1100 (*recA*⁺)

Figura 1

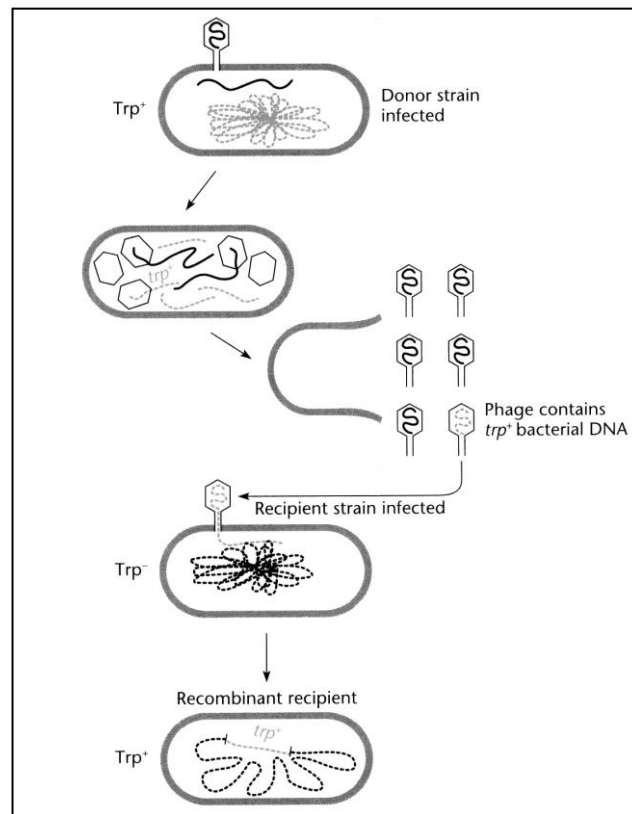
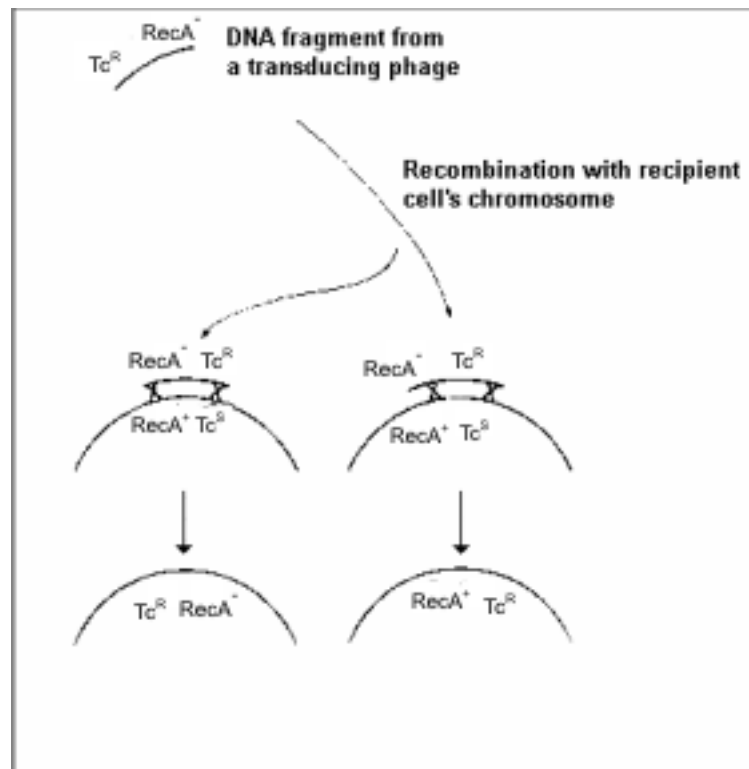


Figura 2



I° Giorno

- PREPARAZIONE DELLO STOCK FAGICO
 - ◇ Diluire una coltura O.N. di MC4001 cinquanta volte in LB (0.2 ml in 10 ml totali) e lasciare in agitazione a 37°C per 30 minuti.
 - ◇ Al termine dei 30 minuti aggiungete 25 µl di una soluzione di CaCl₂ 1M (al fine di ottenere una soluzione a concentrazione finale di 2.5·10⁻³ M).
 - ◇ Dividete equamente (5 ml e 5 ml) la coltura in due Falcon-50 separate.
 - ◇ Ad una di queste, differenziata dall'altra dal simbolo "φ", aggiungete 0.1 ml della preparazione fagica di P1.
 - ◇ Lasciate entrambe le Falcon a 37°C per ~2 ore.
 - ◇ Aggiungete 2-3 gocce di cloroformio alla Falcon contenente il fago e agitate fortemente. Quindi, trasferita in un tubo da centrifuga, centrifugate la preparazione a ~10.000 g per 10 min.
 - ◇ Dopo aver centrifugato prelevate delicatamente circa 1 ml del sopranatante e versatelo in una nuova provetta da 2 ml per conservarlo a +4°C per la notte.
- ANALISI DEI SISTEMI DI RIPARAZIONE TRAMITE CEPPI TEST DI AMES

II° Giorno

- TRASDUZIONE
 - ◇ Preparate una diluizione dello stock fagico nella seguente maniera: 1 ml di buffer T (CaCl₂ 3.125·10⁻³ M e MgSO₄ 12.5·10⁻³ M), 0.5 ml di stock fagico.
 - ◇ In una provetta è stata fatta crescere una coltura batterica di 5 ml del ceppo recipiente YK4122 sino ad una OD₆₀₀ di circa 0.6-0.8. Aggiungete a questa provetta 12,5 µl di una soluzione di CaCl₂ 1M (al fine di ottenere una soluzione a concentrazione finale di 2.5·10⁻³ M) e, dopo aver ben miscelato, prelevate aliquote da 0.5 ml di coltura che verserete in 4 provette eppendorf da 2 ml marcate con 500, 250, 100 e 0 mentre lascerete vuota quella marcata con una "φ".
 - ◇ Aggiungete alle provette Eppendorf: 0.5 ml della diluizione fagica in bufferT nella provetta marcata con 500 ed in quella marcata con una "φ", 0.25 ml in quella marcata con un 250, 0.1 ml in quella marcata con un 100 e nulla in quella marcata con uno 0 (vedi schema riassuntivo in fondo alla pagina).
 - ◇ Lasciate adsorbire a 37°C con provette ferme per 20 min.
 - ◇ Quindi aggiungete un ugual volume di LB citrato 2·10⁻² M e lasciate a 37°C per 1 ora.
 - ◇ Allo scadere dell'ora prevista centrifugate le provette, eliminate il sovranatante, ad eccezione di ~0.1 ml che utilizzerete per risospendere i pellet, e piastrare su piastre contenenti LB Agar Tc (tetraciclina) Citrato 10⁻² M.
 - ◇ Le piastre vengono lasciate a 37°C O.N.

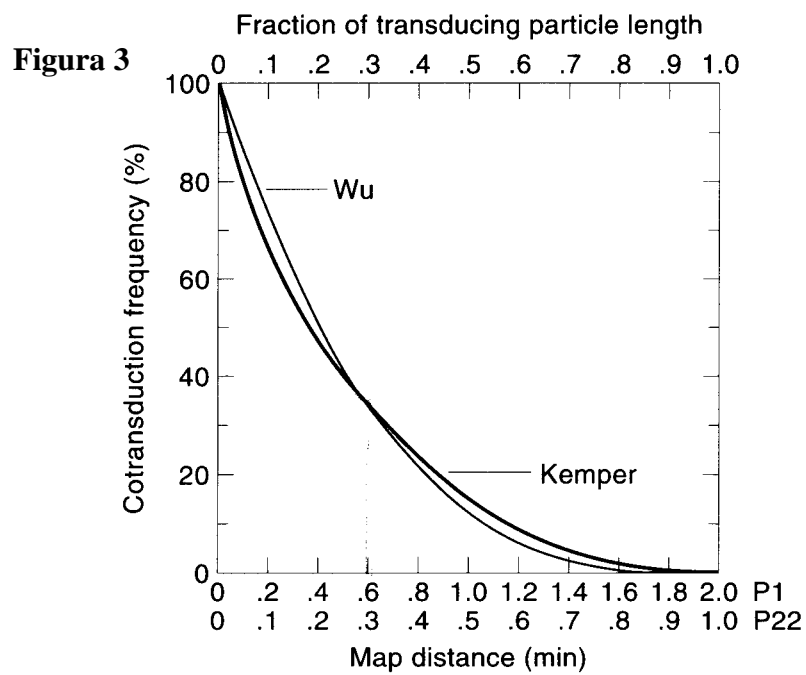
Schema riassuntivo:

Provetta	Vol col. Batterica	Vol. prep. P1	Vol totale*
φ	0	0.5	0.5
500	0.5	0.5	1
250	0.5	0.25	0.75
100	0.5	0.1	0.6
0	0.5	0	0.5

*Volumi di LB Citrato 10⁻² M da aggiungere

III° GIORNO

- ANALISI DEI RISULTATI DELLA TRASDUZIONE
- VALUTAZIONE DELLA DISTANZA GENICA TRA *Tn10* ed il gene *recA*



BD MacConkey II Agar

USO PREVISTO

BD MacConkey II Agar è un terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e la differenziazione di *Enterobacteriaceae* e di numerosi altri bacilli Gram-negativi da campioni clinici.

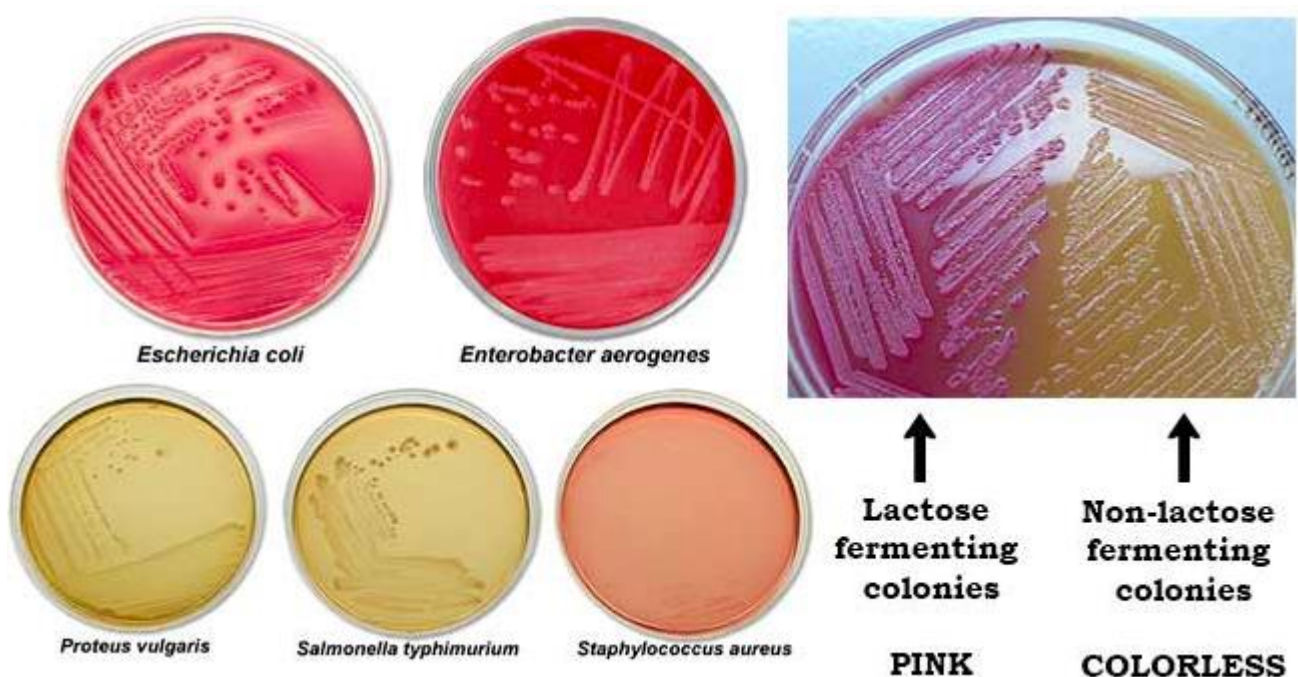
PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.

Sono attualmente disponibili numerosi terreni di coltura per l'isolamento, la coltura e l'identificazione di *Enterobacteriaceae* e alcuni batteri non fermentanti. Uno dei primi terreni fu allestito e documentato da MacConkey nel 1900 e nel 1905. La preparazione di questo terreno è basata sulla conoscenza che i sali biliari vengono precipitati dagli acidi e alcuni enterobatteri fermentano il lattosio mentre altri non possiedono tale capacità. Il terreno è stato poi modificato a più riprese.

L'agar MacConkey è scarsamente selettivo in quanto la concentrazione di sali biliari, che inibiscono i microrganismi Gram-positivi, è bassa rispetto ad altre tecniche di piastratura per enterobatteri. Il terreno è ideale per campioni clinici contenenti microflora mista provenienti da urina, distretto respiratorio, ferite, ecc., in quanto consente di effettuare una prima classificazione degli enterobatteri e degli altri Gram-negativi in fermentanti e non-fermentanti il lattosio. L'agar MacConkey viene utilizzato anche per le analisi microbiologiche degli alimenti.

Nel **BD MacConkey Agar** i nutrienti sono costituiti dai peptoni, il cristalvioletto inibisce i batteri Gram-positivi, in particolare enterococchi e stafilococchi, e la differenziazione degli enterobatteri si ottiene combinando lattosio e rosso neutro come indicatore di pH. Si ottengono colonie incolori o rosa-rosse a seconda della capacità dell'isolato di fermentare il carboidrato.



Antibiogramma e sistemi di riparazione del DNA

Materiali:

- Dischi di carta
- Soluzioni di antibiotici (Gentamicina 1 mg/ml; Ampicillina 5 mg/ml e acido Nalidixico 2 mg/ml)
- Pinzette
- Piastre Petri con terreno LB
- spatole
- coltura batterica del ceppo WP2 uvrA- pKM101 (polV)
- Piastre Petri vuote, micropipette e puntali

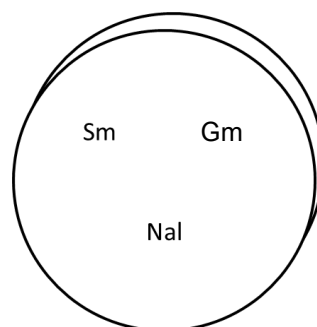
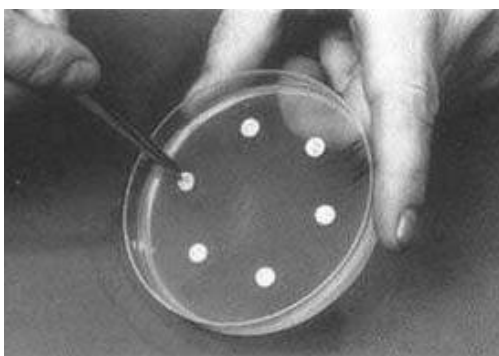
Procedura:

Questa procedura deve essere eseguita in doppio (2X), ottenendo così due piastre gemelle.

- Prendere 200 µl di ogni coltura batterica e metterli al centro della superficie della piastra corrispondente (segnata sotto con un pennarello) e spargere questo campione su tutta la superficie fino a completo assorbimento (ripetere per la seconda piastra).

- Prendere la piastra Petri vuota e le soluzioni antibiotiche, prelevare con una micropipetta (P20) 5 µl di ogni soluzione antibiotica e trasferire la soluzione in diversi punti del fondo del disco Petri formando delle gocce.

Con le pinzette, posare i dischetti di carta sulle gocce in modo che assorbano il liquido. Trasferire quindi i dischetti di carta imbevuti in punti diversi (vedi figura) sulla superficie della piastra precedentemente seminata. Premere delicatamente con le pinzette (senza danneggiare il terreno di coltura) e segnare le posizioni di ciascuna soluzione antibiotica con il pennarello sul fondo della piastra (vedi figura).



- Esporre alla luce UV per 10 secondi una delle piastre gemelle prodotte e contrassegnarla sul fondo con un "IR" (irradiato).

- Chiudere entrambe le piastre (esposta e non esposta), capovolgerle e lasciarle a 37°C tutta la notte.

