

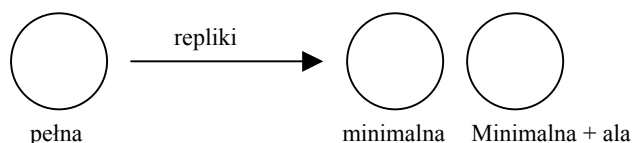
Ćwiczenie 1: Mutageneza

Dziki szczep drożdży rosną na pożywce minimalnej (zawierającej tylko składniki niezbędne do życia: źródło energii i węgla, sole mineralne, odpowiednie pH, wodę. Z tych substancji mikroorganizm syntetyzuje sobie wszystkie potrzebne do życia związki). Mutanty pokarmowe drożdży nie mają tej zdolności i w zależności od rodzaju mutacji trzeba dodawać do podłoża hodowlanego brakujące składniki, np.: aminokwasy. Mutanty można otrzymywać naświetlając dziki szczep drożdży światłem UV.

Masz do dyspozycji szalki, podłoża do hodowli drożdży pełne i minimalne, wszelkie dodatki (aminokwasy, witaminy, antybiotyki). Zaproponuj doświadczenie:

1. Jak wyselekcjonować z mieszaniny drożdży dzikich po wystawieniu ich na działanie UV mutanty pozbawione zdolności syntezy alaniny?

Przykład rozwiązania: Należy wysiać mieszaninę drożdży po mutagenezie na pożywkę pełną (wyrosną wszystkie kolonie zdolne do życia, również mutanty pokarmowe). Następnie posłużyć się metodą replik – odcisnąć na sterylnym kawałku flaneli kolonie rosnące na tak przygotowane szalce wzorcowej i odciskać jej odbicia na przygotowanych szalkach z podłożami selekcyjnymi. Poszukując mutantu ala- należy zrobić repliki na podłożu minimalnym i na podłożu minimalnym z dodatkiem alaniny. Kolonie które nie rosną na podłożu minimalnym, a rosną z dodatkiem alaniny to poszukiwane mutanty.



2. Jak wyselekcjonować z mieszaniny drożdży dzikich po wystawieniu ich na działanie UV mutanty pozbawione zdolności syntezy proliny?
3. Jak wyselekcjonować z tej samej mieszaniny podwójne mutanty – pozbawione zdolności syntezy alaniny i proliny?
4. Co można zrobić, aby mutant ala- odzyskał zdolność do syntezy alaniny?

Ćwiczenie 2: Podłoża i hodowle bakteryjne

W probówce znajduje się mieszanina kilku szczepów bakterii *E. coli*, o podanych właściwościach. Chcesz rozróżnić te bakterie. Jakie podłoża zastosować? Masz do dyspozycji: podłoże minimalne, podłoże pełne, dowolne dodatki.

- **Szczep 1: *GyrA96 leuB*** - odporny na kwas nalidiksowy (antybiotyk) i bakterie nie potrafią syntetyzować leucyny
- **Szczep 3: *LacY metB*** - bakterie nie potrafią wykorzystywać laktozy jako źródła węgla i nie potrafią syntetyzować metioniny
- **Szczep 4: *ProAB rpsL*** - bakterie nie potrafią syntetyzować proliny i są odporne na streptomycynę (antybiotyk)
- **Dzikie** - bakterie mogą rosnąć na podłożu minimalnym, ale nie niosą żadnej oporności na antybiotyki.

Podłoże minimalne: podłoża minimalne mają różny skład w zależności od szczepu bakterii, ale zawsze zawierają tylko składniki niezbędne do życia danego organizmu. Przykładowo, podłoże minimalne dla *E. coli* zawiera: glukozę (jedyne źródło węgla), Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NH_4Cl , NaCl , MgSO_4 i CaCl_2 - z tych substancji bakteria syntetyzuje sobie wszystkie potrzebne jej do życia związki.

Podłoże pełne zawiera wszystkie związki, których bakteria może potrzebować, także te bardzo złożone. Co ważne - dokładny skład podłoża pełnego jest nieznan. Składa się ono bowiem w większości z ekstraktów z hodowli drożdżowych i bakteryjnych - ich skład jest nieokreślony ilościowo ani jakościowo, jednak wiadomo, że zawierają komplet związków potrzebnych bakteriom do życia. Podłoża pełne są uniwersalne (takie same dla różnych szczepów bakterii).

Podpowiedź: należy zastosować metodę replik, podobnie jak w ćwiczeniu 1.

Ćwiczenie 3: Sklonuj sobie gen

Przykład jak można sklonować sobie gen

Chcesz tak zmodyfikować szczep E.coli, który nie potrafi syntetyzować argininy (E.coli arg-), aby zyskał tę zdolność. Masz do dyspozycji: wyjściowy szczep E.coli arg-, wrażliwy na ampicylinę i tetracyklinę; szczep dziki E.coli; plazmid A (przedstawiony na rysunku), wszelkie dostępne podłoża, i dodatki do nich, enzymy restrykcyjne i dobrze wyposażone laboratorium.

Przykładowy sposób postępowania:

- a. *Należy wyizolować i oczyścić DNA genomowe z dzikiego szczepu E.coli*
- b. *Tak przygotowane DNA pociąć enzymem restrykcyjnym*
- c. *Tym samym enzymem restrykcyjnym przeciąć plazmid A (enzym ten przecina plazmid tylko w miejscu MUK)*
- d. *Zmieszać pocięte plazmidy z pociętym DNA genomowym bakterii, przeprowadzić reakcję ligacji. Powstanie zbiór kolistych cząsteczek plazmidowych, z których każda będzie niosła inny fragment DNA genomowego bakterii E.coli oraz plazmidy wyjściowe nie niosące żadnej wstawki. Uzyskaliśmy w ten sposób bibliotekę genomową E.coli.*
- e. *Taką mieszaniną należy stransformować bakterie szczepu arg-*
- f. *Wysiać na podłoża, które umożliwią selekcję bakterii a) niosących plazmid, b) niosących plazmid ze wstawką, c) niosących plazmid którego wstawka niesie gen umożliwiający produkcję argininy:*

a) LB+amp: rosna bakterie posiadające plazmid

b) LB+amp+tet: rosna bakterie posiadające plazmid bez wstawki

Do dalszych testów bierzemy te kolonie, które wyrosły na podłożu z ampicyliną, ale znikły na tetracyklinie.

c) Pożywka minimalna + amp: rosna poszukiwane bakterie – na pożywce minimalnej, na której brak jest również argininy te bakterie umiały same wytworzyć argininę.

Na podstawie podanego przykładu przedstaw rozwiązanie następujących zadań:

Chcesz, aby szczep E.coli pro- (niezdolny do syntezy proliny) uzyskał zdolność do syntezy proliny. Proszę dokonać tego za pomocą każdego z podanych plazmidów (plazmidu A i plazmidu B). Proszę przedstawić kolejność wykonywanych czynności, skład podłoży oraz interpretację wyników („co znaczy, jeśli na tym podłożu ten szczep nie wyrośnie, a co znaczy jeśli wyrośnie”). Jakie będą niezbędne kontrole w tym doświadczeniu?

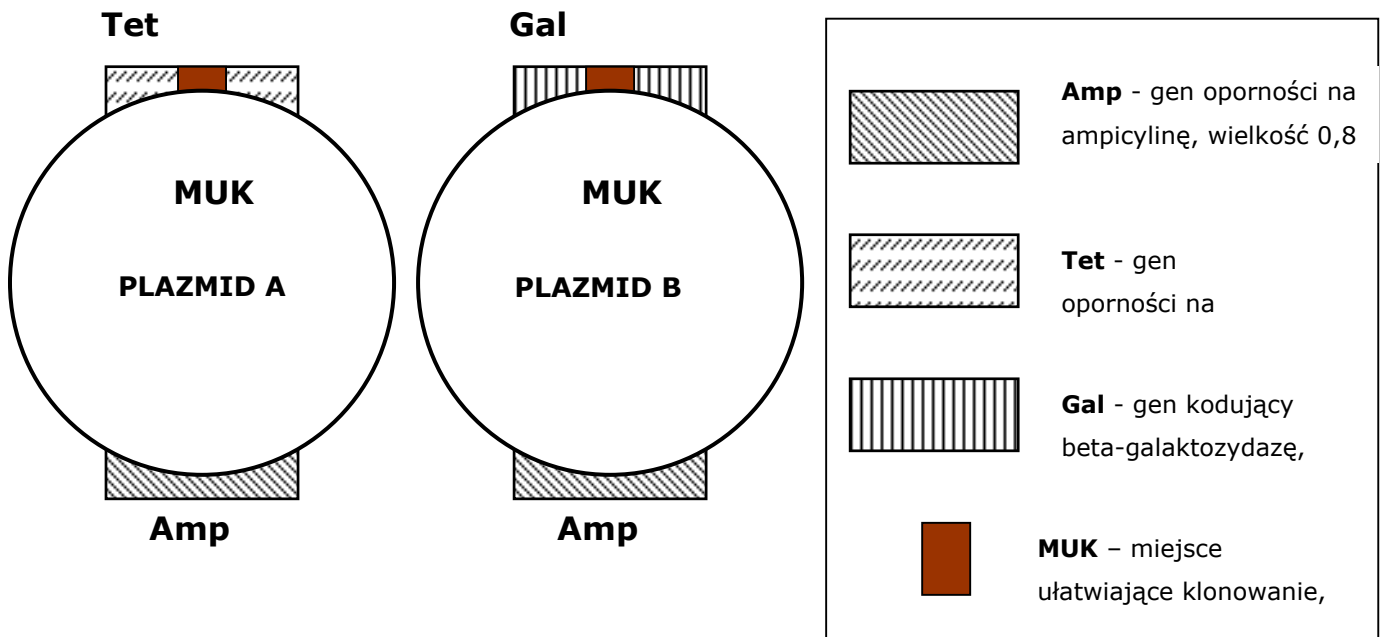
Masz do dyspozycji:

- Dzikie szczep E. coli (wrażliwy na antybiotyki)
- Laboratoryjny szczep E. coli pro- wrażliwy na antybiotyki oraz nie wytwarzający beta-galaktozydazy)
- Dwa plazmidy:
 - Plazmid A: zawiera gen oporności na ampicylinę oraz miejsce ułatwiające klonowanie umieszczone wewnątrz genu oporności na tetracyklinę

- o **Plazmid B**: zawiera gen oporności na ampicylinę oraz miejsce ułatwiające klonowanie umieszczone wewnątrz genu beta-galaktozydazy

Powyższymi plazmidami można transformować oba szczepy bakterii. Schematyczne mapki tych plazmidów narysowane są w pkt. 2.

- Enzymy restrykcyjne
- Pożywki, enzymy i inne podstawowe odczynniki (agarozą, bromek, ampicylina, tetracyklina, prolina, X-Gal itp.)

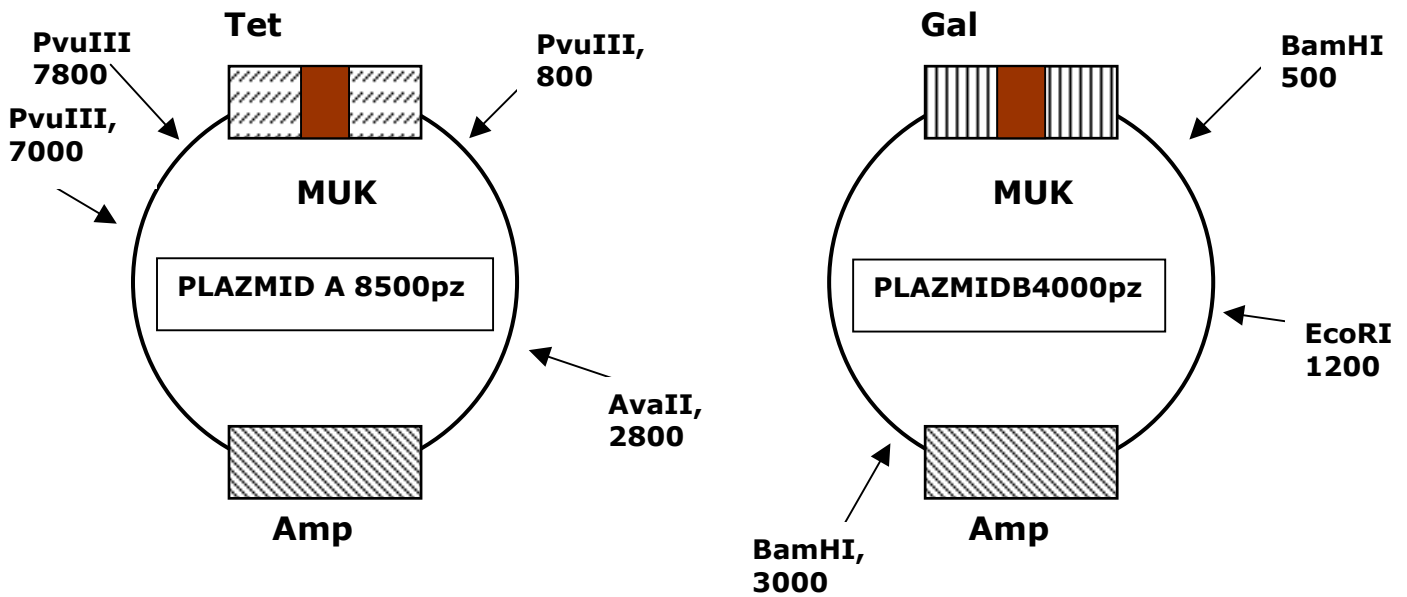


Uwagi:

- Szczep dziki E.coli może rosnąć na podłożu minimalnym, umie sam syntetyzować wszystkie niezbędne związki organiczne.
- Podłoże minimalne: zawiera tylko składniki niezbędne do życia danego organizmu. Przykładowo, podłoże minimalne dla E. coli zawiera: glukozę (jedyne źródło węgla), Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NH₄Cl, NaCl, MgSO₄ i CaCl₂ – z tych substancji bakteria syntetyzuje sobie wszystkie potrzebne jej do życia związki.
- Sekwencja MUK – tzw. Sekwencja ułatwiająca klonowanie, to sekwencja którą przecina większość powszechnie używanych enzymów restrykcyjnych
- Dla potrzeb doświadczenia zakładamy, że działający gen Gal powoduje zabarwienie kolonii na niebiesko, o ile w pożywce obecny jest związek X-Gal (nie jest to do końca prawda, ale tu przyjmujemy, że tak jest)
-

Ćwiczenie 4: Zabawa w matematyka, czyli mapa restrykcyjna

Na rysunku poniżej zaznaczono schematyczne mapy plazmidów wraz z miejscami cięcia odpowiednich enzymów restrykcyjnych (zakładamy, że dany plazmid tną tylko te wymienione enzymy). Proszę narysować układ prążków na żelu po trawieniu tymi enzymami wg tabeli. Proszę wpisać w tabelkę wielkości powstających fragmentów DNA, a następnie narysować układ prążków na żelu. Podane wartości pod nazwami enzymów oznaczają odległość miejsca cięcia od przyjętego punktu „0” na naszym rysunku znajdującego się na godzinie dwunastej (środek sekwencji MUK). Wartości podane są w parach zasad.



Enzym	PLAZMID A
<i>AvaII</i>	Jeden prążek wielkości 8500 pz
<i>PvuIII</i>	Trzy prążki: 800, 6200, 1500 pz
<i>AvaII/PvuIII</i>	

Enzym	PLAZMID B
<i>EcoRI</i>	
<i>BamHI</i>	
<i>EcoRI/BamHI</i>	