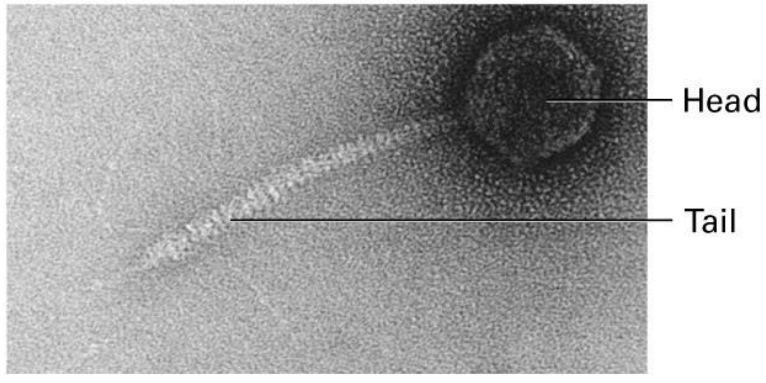


(a) λ Phage virion



Εργαστηριακές ασκήσεις ΜΒ

Άσκηση 7

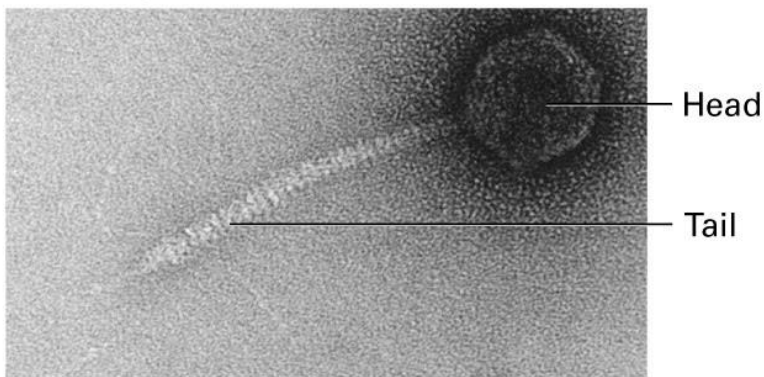
Τιτλοδότηση εναιωρήματος βακτηριοφάγων λ (φαγικής βιβλιοθήκης)

Ο βακτηριοφάγος λ

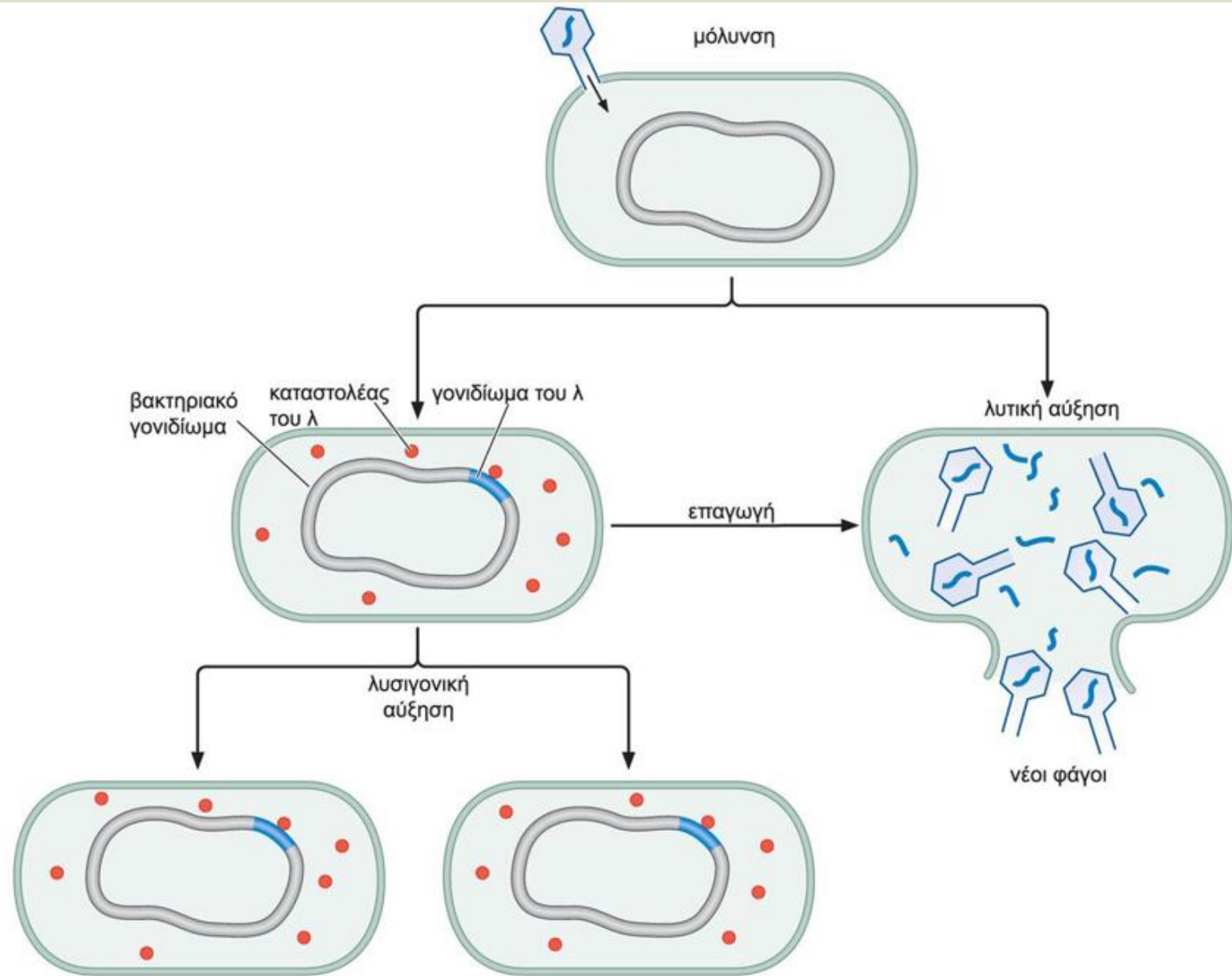
- ❖ DNA ιός που προσβάλλει βακτήρια *E. coli*. Ανήκει στους ήπιους φάγους
- ❖ Γονιδίωμα: γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA μήκους περίπου 50 kb, με συμπληρωματικά μονόκλινα άκρα μήκους 12 bp.
- ❖ Σωματίδιο φάγου: αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, που περικλείει το μόριο DNA και μια ουρά επίσης πρωτεϊνικής φύσεως.

Με την ουρά ο φάγος προσκολλάται στην επιφάνεια του βακτηριακού ξενιστή (σε ειδικό υποδοχέα) και απελευθερώνει το DNA του στο εσωτερικό του κυττάρου. Μετά την είσοδο στον ξενιστή το ιικό DNA κυκλοποιείται και χρησιμοποιεί τους μηχανισμούς του βακτηρίου προκειμένου να μεταγράψει τα γονίδιά του και να πολλαπλασιαστεί.

(a) λ Phage virion

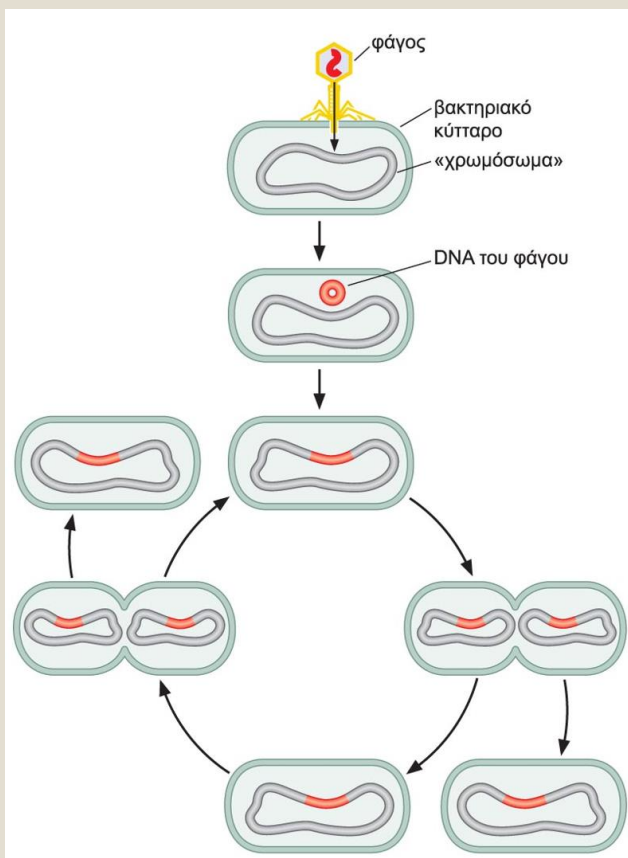


Δύο μονοπάτια μπορεί να ακολουθηθούν μετά τη μόλυνση



Λυσιγονικός κύκλος

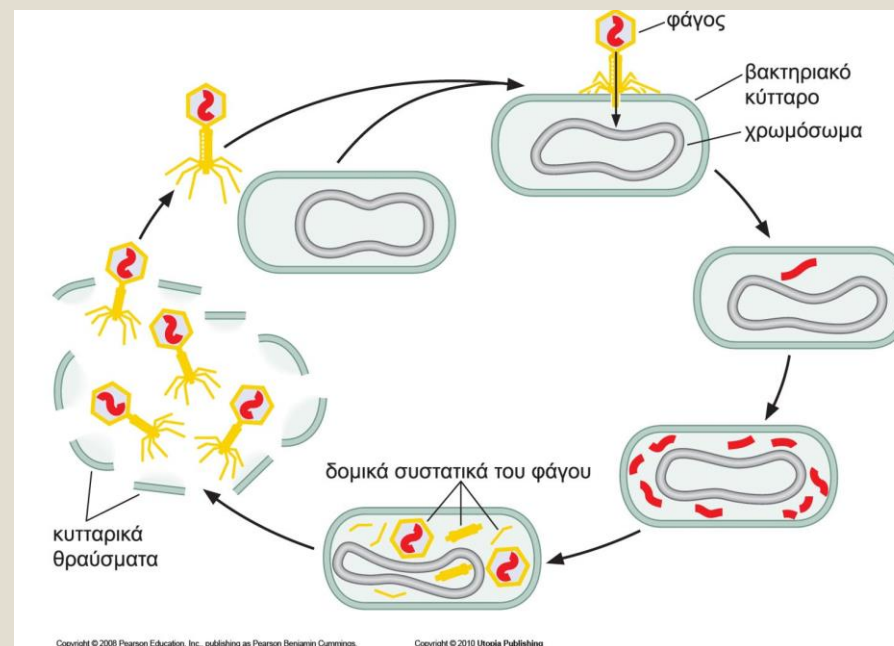
- Είσοδος του DNA του φάγου
- Παρεμπόδιση έκφρασης όψιμων πρωτεϊνών του φάγου και ενσωμάτωση του ιικού DNA στο βακτηριακό χρωμόσωμα (προφάγος)
- Παθητική αναπαραγωγή του προφάγου
- Είναι δυνατή η **μεταστροφή** σε λυτικό κύκλο με **επαγωγή**.



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Λυτικός κύκλος

- Είσοδος του DNA του φάγου
- Αντιγραφή και έκφραση του γονιδιώματος του φάγου
- Σύνθεση πρωτεϊνών του μανδύα κεφαλής και ουράς
- Συγκρότηση νέων ικών (~200) σωματιδίων και λύση του βακτηρίου

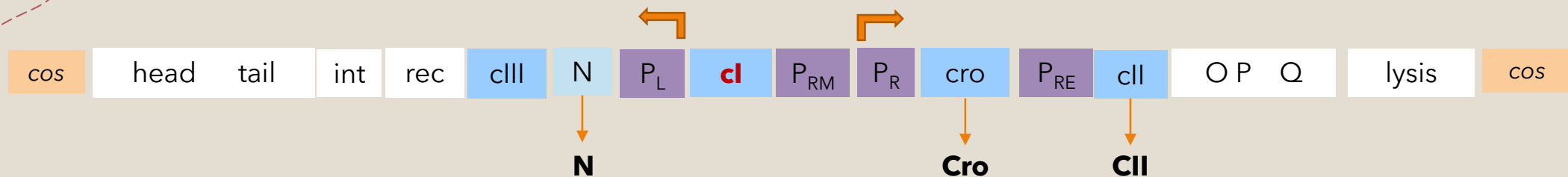


Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Copyright © 2010 Utokpia Publishing

Γονιδίωμα φάγου:
~50 γονίδια: κωδικοποιούν πρωτεΐνες

- Καψιδίου
- Αντιγραφής
- Ανασυνδυασμού
- Κυτταρικής λύσης
- Ρυθμιστικές πρωτεΐνες (cI, cII, cIII, cro)
- Υποκινητές: P_L , P_R , P_{RM} , P_{RE}



Αμέσως μετά τη μόλυνση: ενεργοποιούνται P_L , P_R και εκφράζονται N, cro, cII

Λήψη απόφασης για λυτικό ή λυσιγονικό κύκλο: **CII + συνθήκες περιβάλλοντος**

Ενεργή CII → ενεργοποίηση έκφρασης **cI** (καταστολέας λ), καταστολή έκφρασης όψιμων γονιδίων, ενεργοποίηση ενσωμάτωσης → **λυσιγονικός κύκλος**

Ανενεργή CII → καταστολή cI, αύξηση συγκέντρωσης Cro → καταστολή cI, έκφραση όψιμων γονιδίων → **λυτικός κύκλος**

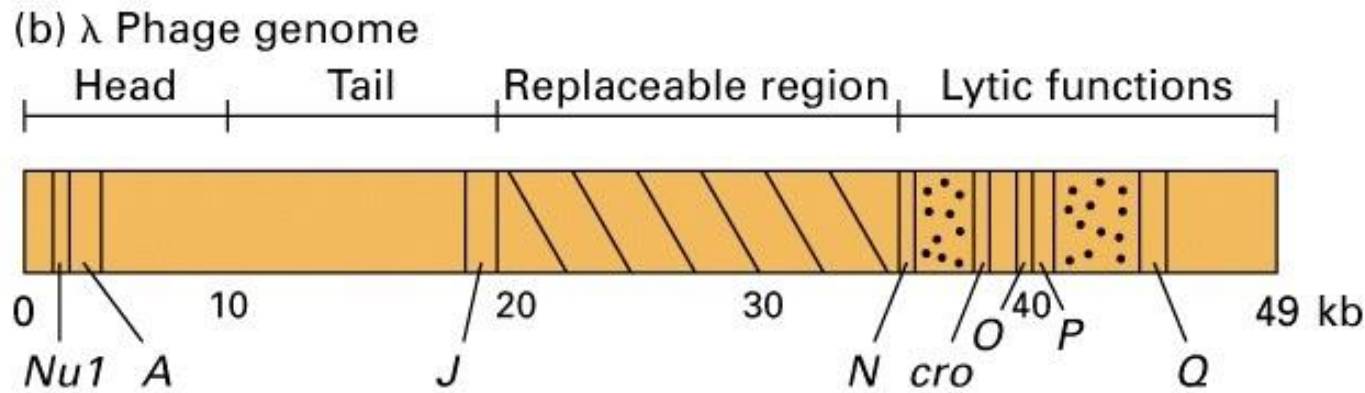
Συνθήκες περιβάλλοντος:

- Πολλαπλότητα της μόλυνσης (μοί) : πόσα σωματρία φάγου μόλυναν ένα δεδομένο βακτηριακό κύτταρο
 - $\leq 1 \rightarrow$ λυτικός κύκλος
 - $\geq 2 \rightarrow$ λυσιγονικός κύκλος (αυξημένη σύνθεση CII, CIII \rightarrow αυξημένη πιθανότητα καθιέρωσης έκφρασης καταστολέα λ CI)
- Συνθήκες αύξησης *E.coli*:
 - Καλές συνθήκες, πολλά υγιή κύτταρα (παράγουν πρωτεάση που αποικοδομεί την CII \rightarrow μειωμένη σύνθεση καταστολέα λ CI) \rightarrow λυτικός κύκλος
 - Κακές συνθήκες \rightarrow λυσιγονικός κύκλος

Γενικότερα, φαίνεται πως όταν η πιθανότητα επιβίωσης του φάγου είναι μικρή, λόγω μη μεγάλης διαθεσιμότητας βακτηρίων-ξενιστών, ευνοείται ο λυσιγονικός κύκλος και το αντίθετο.

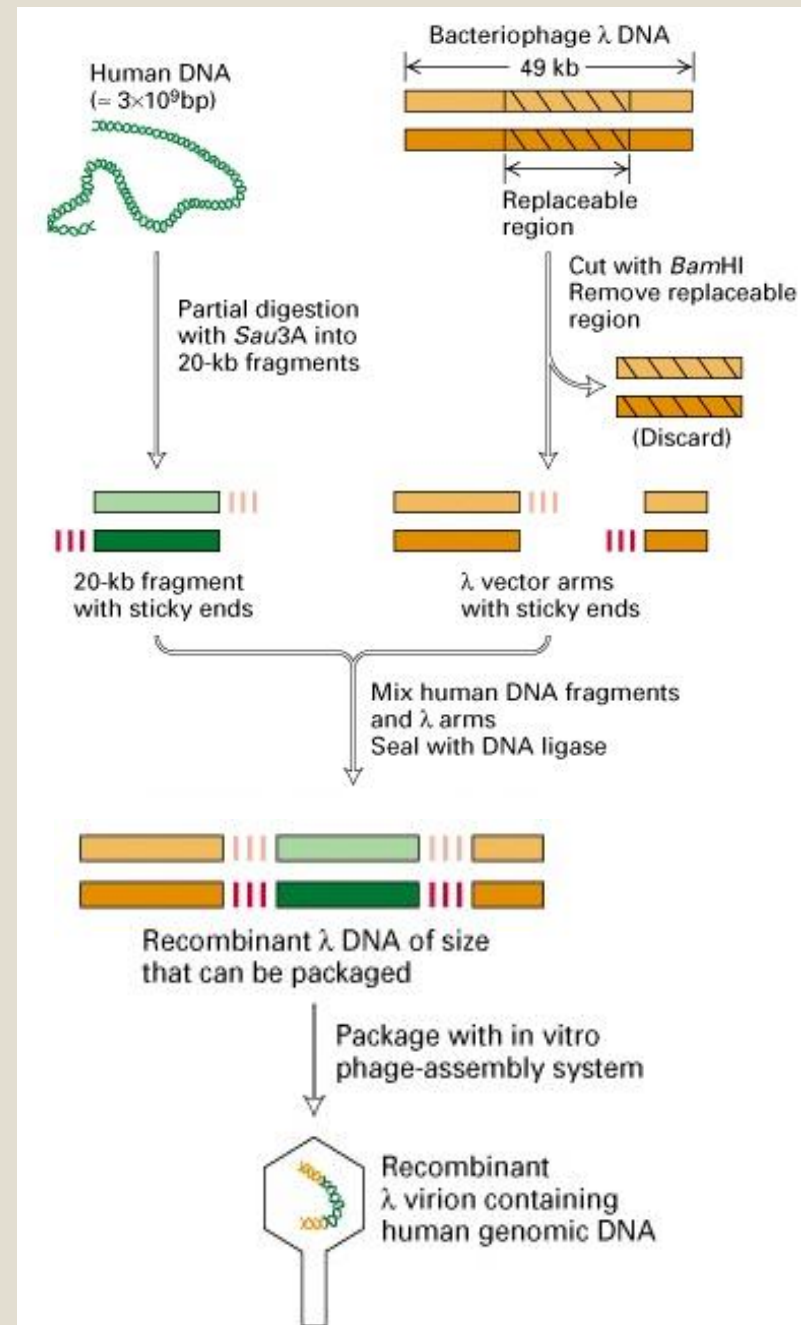
Η μεταστροφή από τον λυσιγονικό στο λυτικό κύκλο επάγεται από καταστάσεις στρες, όπως ακτινοβολία UV, που προκαλούν βλάβες στο DNA.

Τροποποίηση βακτηριοφάγου λ και χρήση του ως φορέα κλωνοποίησης



Επιμόλυνση βακτηρίων ξενιστών

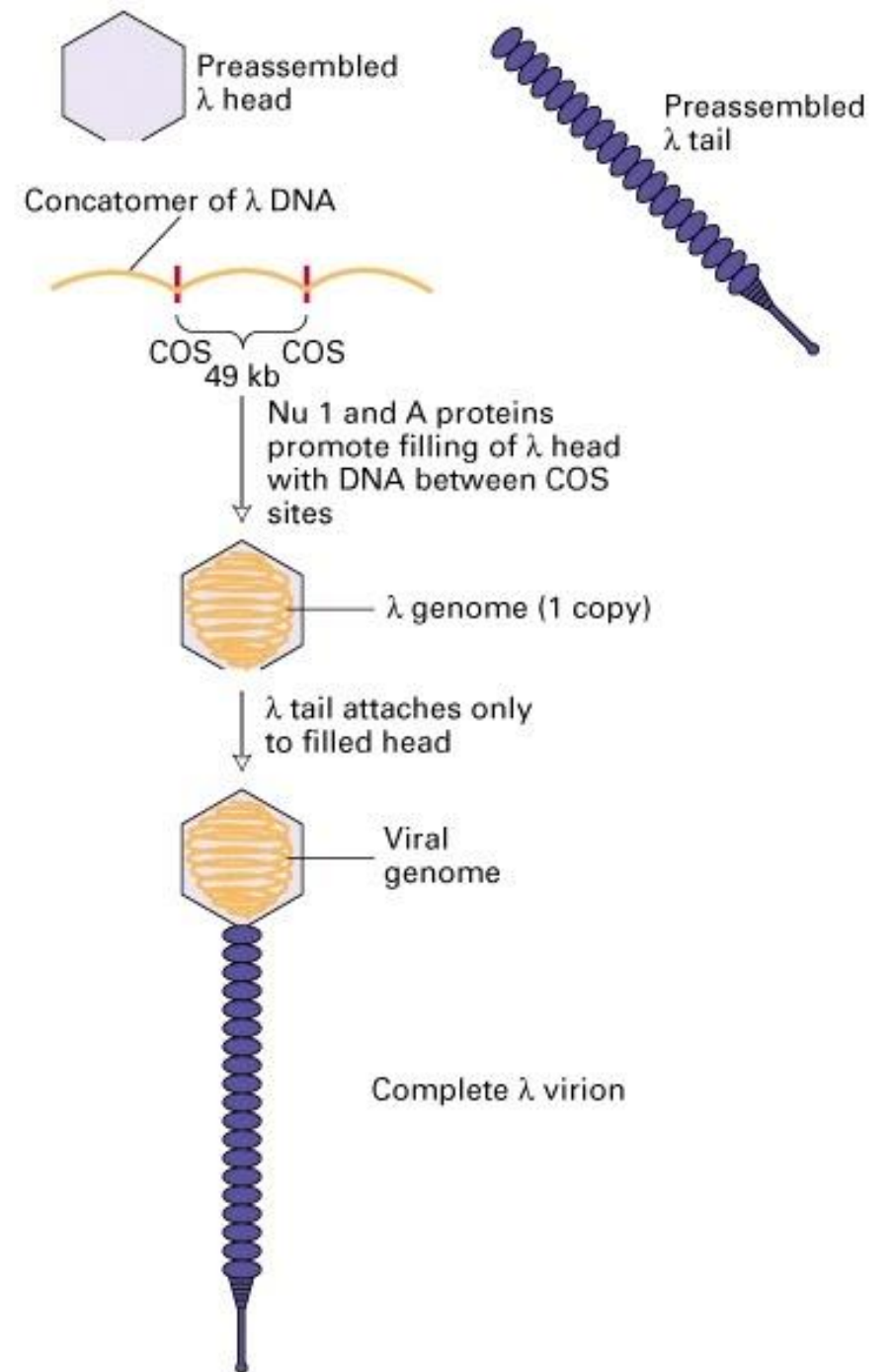
Ο βακτηριοφάγος λ προσδένεται στους υποδοχείς της **μαλτόζης** που βρίσκονται στην επιφάνεια του βακτηρίου, προκειμένου να εισάγει το DNA του στο κύτταρο και αυτή η διαδικασία διευκολύνεται από τα **ιόντα μαγνησίου**.



Συγκρότηση ιικών σωματιδίων

Άδειες κεφαλές και ουρές συγκροτούνται από αντίγραφα διαφορετικών λ πρωτεϊνών. Κατά το τελευταίο στάδιο της μόλυνσης σχηματίζονται πολυμερή μόρια DNA (concatomers) που χωρίζονται μεταξύ τους από τις θέσεις cos. Δύο πρωτεΐνες του λ (Nu1 & A) προσδένονται στις cos θέσεις και προκαλούν εισαγωγή του DNA που υπάρχει ανάμεσα σε δύο διαδοχικές cos θέσεις σε μια άδεια κεφαλή.

Όταν γεμίσουν οι κεφαλές με DNA, συνδέονται με προσυγκροτημένες λ ουρές (παραγωγή ολοκληρωμένων λ ιών ικανών να μολύνουν τα βακτήρια E-coli)



Κλωνοποίηση σε βακτηριοφάγο λ → κατασκευή γονιδιωματικής ή cDNA βιβλιοθήκης → Τιτλοδότηση

- ✓ Μια βιβλιοθήκη αποτελείται από εκατομμύρια φαγικά σωμάτια τα οποία περιέχουν το DNA του φάγου ανασυνδυασμένο με τμήματα του γονιδιώματος (στην περίπτωση της χρωμοσωμικής βιβλιοθήκης) ή με μόρια cDNA (στην περίπτωση της cDNA βιβλιοθήκης).
- ✓ Τα φαγικά αυτά σωμάτια βρίσκονται ως εναιώρημα σε διάλυμα.
- ✓ **Τίτλος:** Ο αριθμός των σωματιδίων φάγου στο εναιώρημα της βιβλιοθήκης
Τιτλοδότηση: διαδικασία προσδιορισμού του τίτλου ενός εναιωρήματος φάγων.
- ✓ **Πλάκες:** στρογγυλές διαυγείς περιοχές (σαν τρύπες) πάνω σε ένα τρυβλίο γεμάτο από βακτήρια. Δημιουργούνται μετά από πολλούς κύκλους βακτηριακής αύξησης και ικής επιμόλυνσης εξαιτίας της λύσης των βακτηρίων από τους φάγους.
- ✓ Ο τίτλος μετριέται σε «**μονάδες παραγωγής πλακών**», **pfu** (plaque forming units) που βρίσκονται σε 1 ml, δηλαδή **pfu/ml**.

Παρασκευή τρυβλίων με θρεπτικό υλικό LB

ζυγίζουμε

	50 ml	100 ml	200 ml	250 ml	500 ml
Tryptone	0,5	1 gr	2	2,5	5
Yeast extract	0,25	0,5	1	1,25	2,5
NaCl	0,5	1	2	2,5	5
NaOH 1M	0,175 ml	0,35 ml	0,7	0,875	1,75
αγαρ 1,5%	0,75 gr	1,5 gr	3 gr	3,75 gr	7,5 gr
agar agar, 0,7%	0,35 gr	0,7 gr	1,4 gr	1,75 gr	3,5 gr

αποστειρώνουμε



Προσθέτουμε ~20 ml σε κάθε τρυβλίο petri.



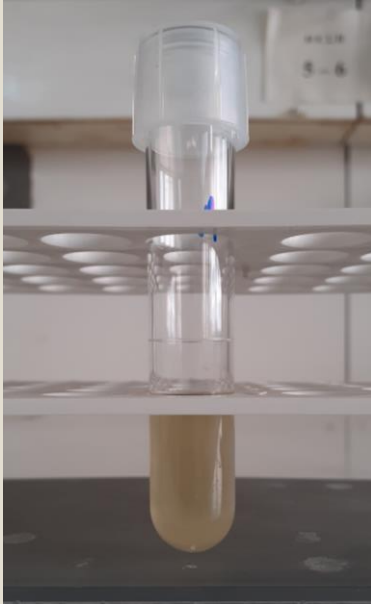
Πειραματική διαδικασία

Υλικά:

- Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB (Luria broth - ανά λίτρο: 10 g Tryptone, 5 g Yeast extract, 10 g NaCl και το pH ρυθμίζεται στο 7.5 με NaOH)
- 20% μαλτόζη
- 10 mM $MgSO_4$
- Διάλυμα SM (0,2 M Tris pH 7,5, 1 mM $MgSO_4$, 0,1 M NaCl, ζελατίνη 0,01% w/v)
- Κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος E. coli (LE392)
- Τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB - bottom agar (θρεπτικό μέσο LB - 1,5% w/v άγαρ)
- Θρεπτικό υλικό LB – top agar (θρεπτικό μέσο LB – 0,7% w/v άγαρ)
- Εναιώρημα φάγων βιβλιοθήκης αγνώστου τίτλου

1. Εμβολιάζουμε 20 ml LB, που περιέχει 0.4 ml 20% μαλτόζη, με 0.2 ml από μία φρέσκια καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους LE392. Επωάζουμε στους 37°C για 1.5-2 ώρες έως ότου η οπτική πυκνότητα (O.D) της νέας καλλιέργειας να έχει τιμή ~0.5 (εκθετική φάση ανάπτυξης).

Η μαλτόζη επάγει την έκφραση του βακτηριακού γονιδίου $lamb$ που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του σακχάρου.



ο/η καλλιέργεια του LE392



Εμβολιασμός θρεπτικού LB+ maltose



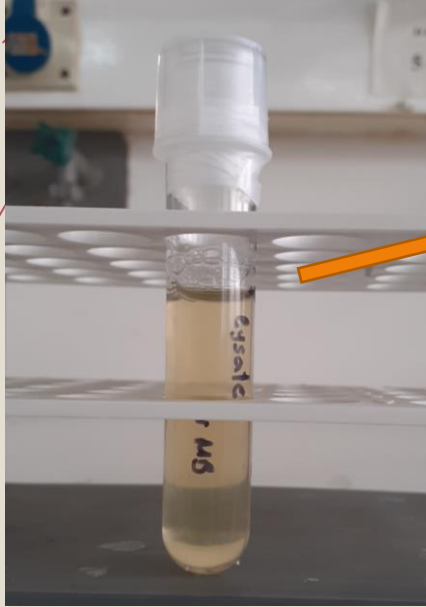
Επώαση μέχρι $OD_{600nm} \sim 0.5$

2. Μοιράζουμε από 3 ml σε αποστειρωμένους σωλήνες (των 10ml) και φυγοκεντρούμε στις 4000 rpm, στους 4°C για 10 min.
3. Αδειάζουμε το υπερκείμενο στο απολυμαντικό. Στο ίζημα προσθέτουμε 1,5 ml αποστειρωμένου διαλύματος 10 mM $MgSO_4$ και επαναδιαλύουμε ήπια. Διατηρούμε τα κύτταρα στον πάγο. Αυτά είναι plating cells.

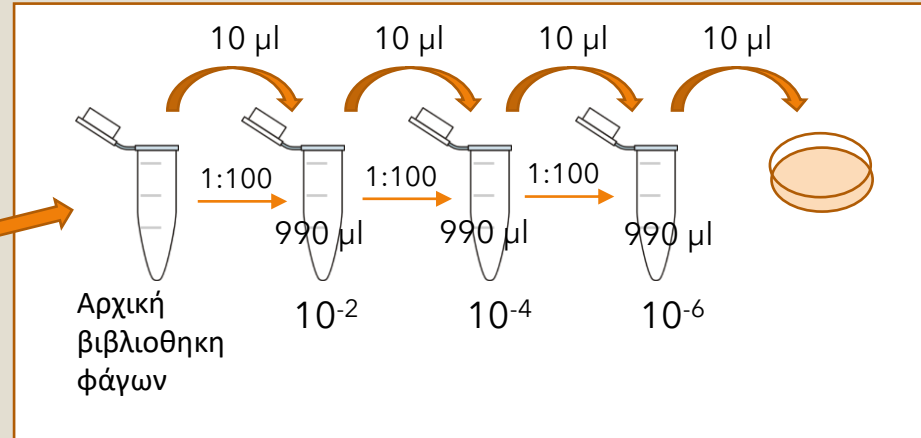


Plating cells

1. Κάνουμε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων της βιβλιοθήκης σε διάλυμα SM χρησιμοποιώντας σωληνάκια τύπου errendorf



Βιβλιοθήκη
(εναιώρημα φάγων)



2. Μεταφέρουμε 200 μ l plating cells σε σωληνάκι τύπου errendorf.
3. Μεταφέρουμε 10 μ l από την τελική αραιώση στο ίδιο σωληνάκι με τα plating cells.
4. Επωάζουμε 20 λεπτά στους 37°C.

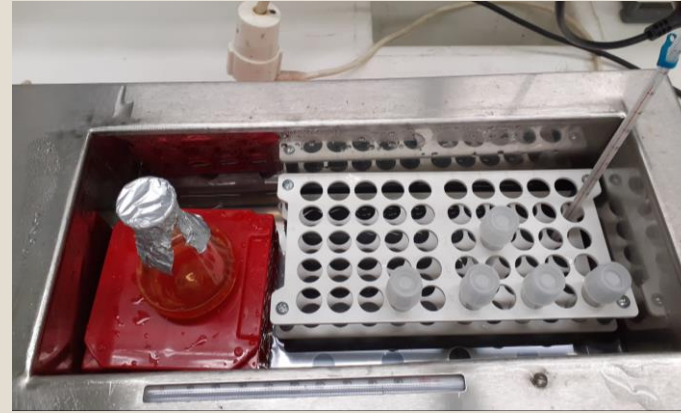


Ανάμιξη 200 μ l plating cells με 10 μ l φάγων

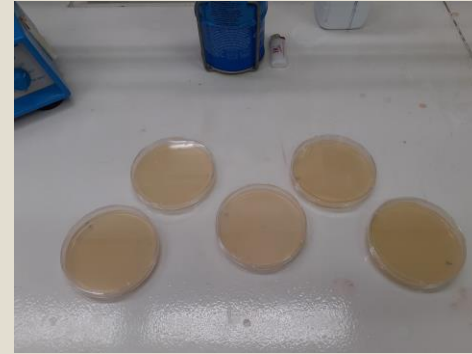


Επώαση 20 min, 37°C

5. Παράλληλα ετοιμάζουμε για κάθε σωληνάκι ένα σωλήνα με 2,5 ml του agar και τον διατηρούμε στους 48-50°C



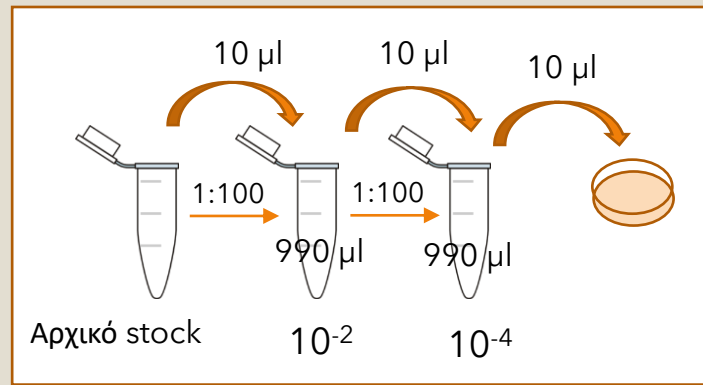
6. Μεταφέρουμε το μίγμα φάγων-plating cells στο σωλήνα με το top agar, αναδεύουμε και αμέσως ρίχνουμε το περιεχόμενο σε προθερμασμένα τρυβλία με bottom agar.
7. Αφήνουμε 15-20 λεπτά τα τρυβλία σε θερμοκρασία δωματίου για να πήξει το top agar.
8. Αναστρέφουμε τα τρυβλία και επωάζουμε στους 37°C ο/η



Αποτελέσματα

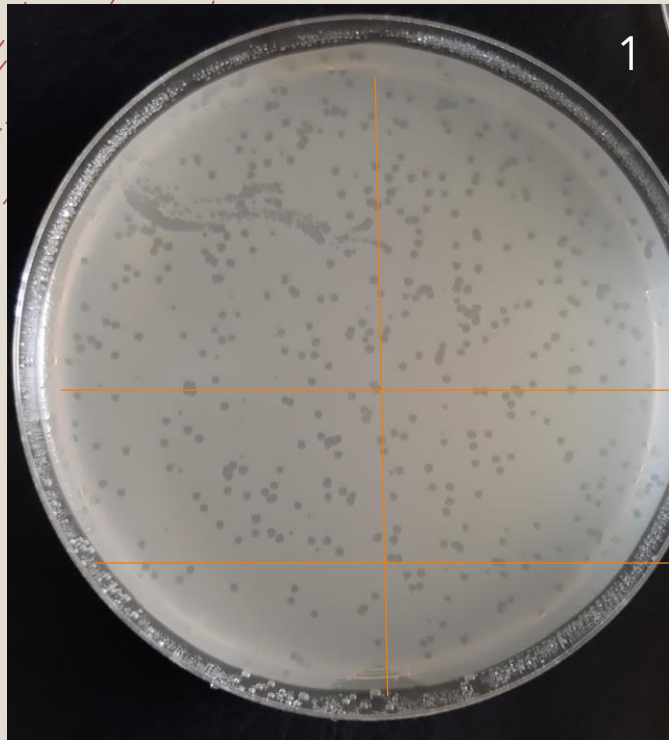
Βιβλιοθήκη R

Αραίωση 10^{-4}



Βιβλιοθήκη P

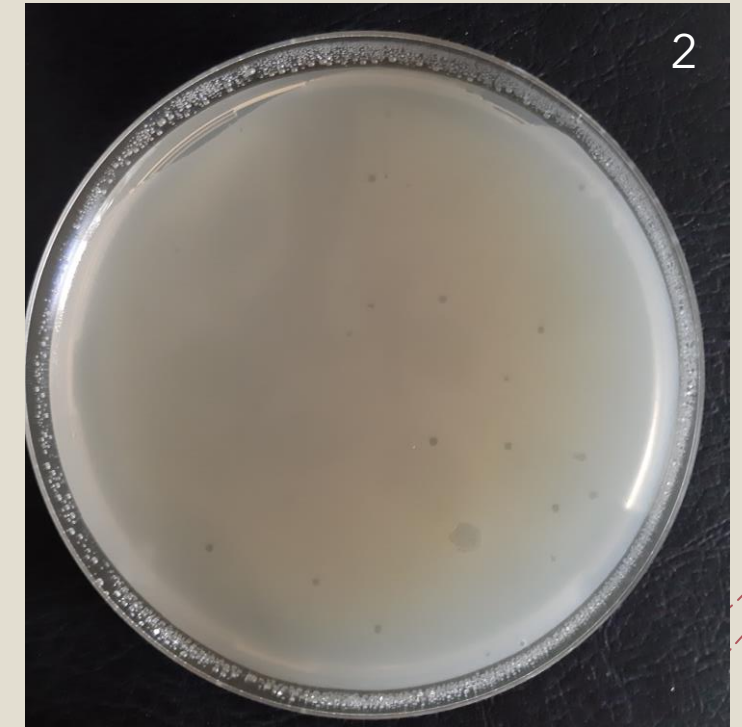
Αραίωση 10^{-4}



~400

$400 \text{ pfu}/10\mu\text{l} \rightarrow 400 \times 10^2/\text{ml} \rightarrow 400 \times 10^2 \times 10^4 \text{ pfu}/\text{ml} \rightarrow 4 \times 10^8 \text{ pfu}/\text{ml}$

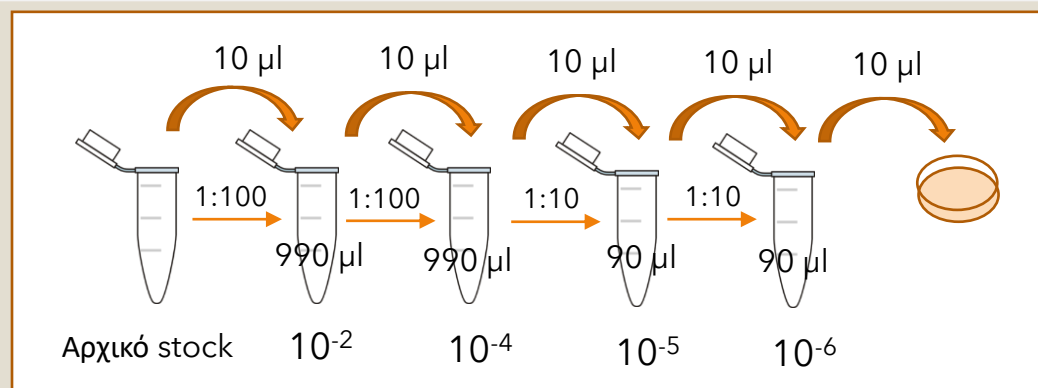
- Μετράμε τον αριθμό πλακών στο τρυβλίο
- Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της αραίωσης (σε pfu/ml) που χρησιμοποιήσαμε για αυτό το τρυβλίο (με βάση τον όγκο που πήραμε από την αραίωση, π.χ. αρ. πλακών/10 µl)
- Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του αρχικού stock πολλαπλασιάζοντας με το αντίστροφο της αραίωσης



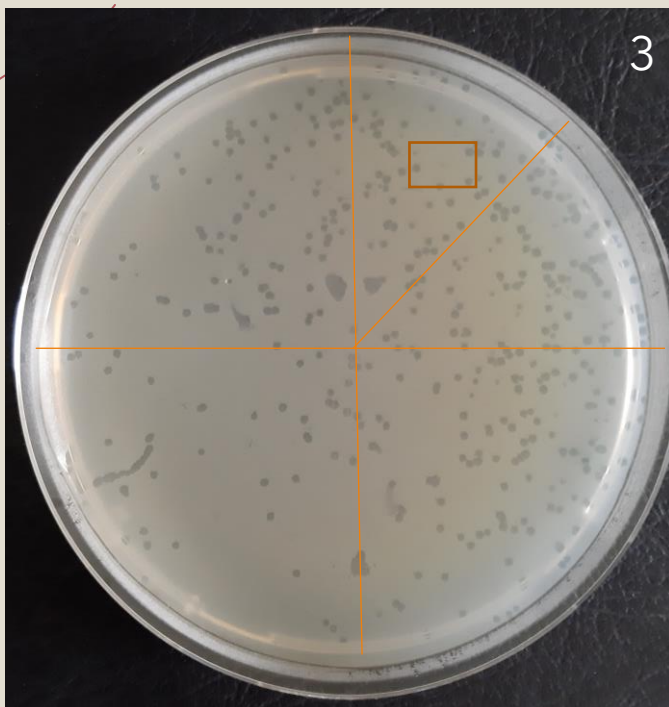
~18

$18 \text{ pfu}/10\mu\text{l} \rightarrow 18 \times 10^2/\text{ml} \rightarrow 18 \times 10^2 \times 10^4 \text{ pfu}/\text{ml} \rightarrow 1.8 \times 10^7 \text{ pfu}/\text{ml}$

Βιβλιοθήκη Α



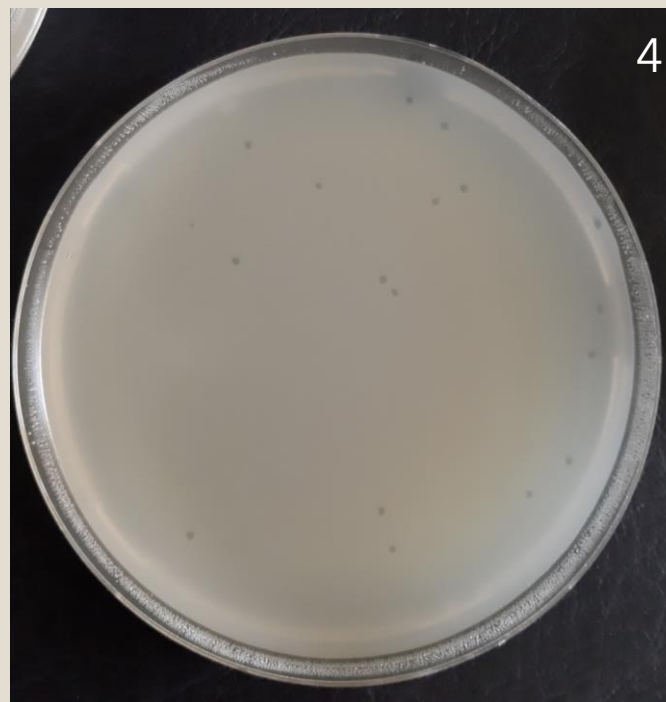
Αραίωση 10⁻⁴



~300

300 pfu/10µl → 300x10²/ml → 300 x10²x10⁴ pfu/ml → 3x10⁸ pfu/ml

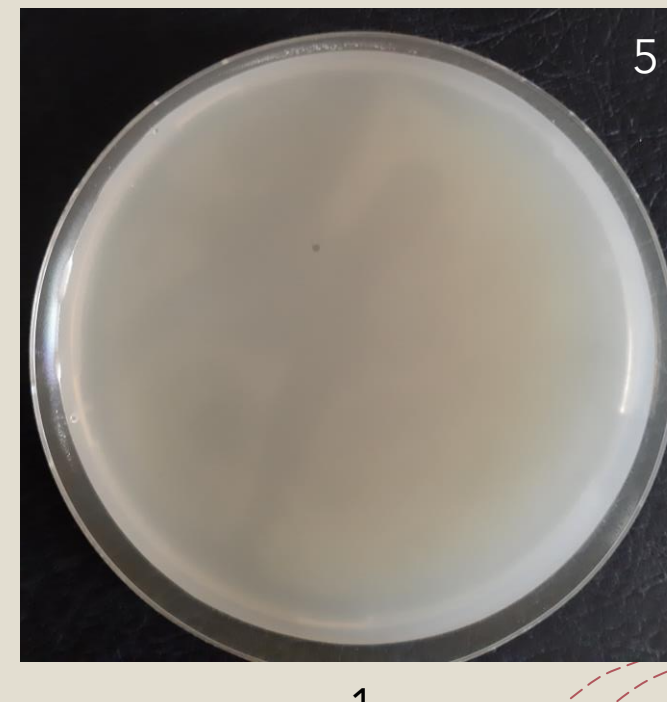
Αραίωση 10⁻⁵



18

18 pfu/10 µl = 18x10²/ml → 18 x10²x10⁵ pfu/ml → 1.8x10⁸ pfu/ml

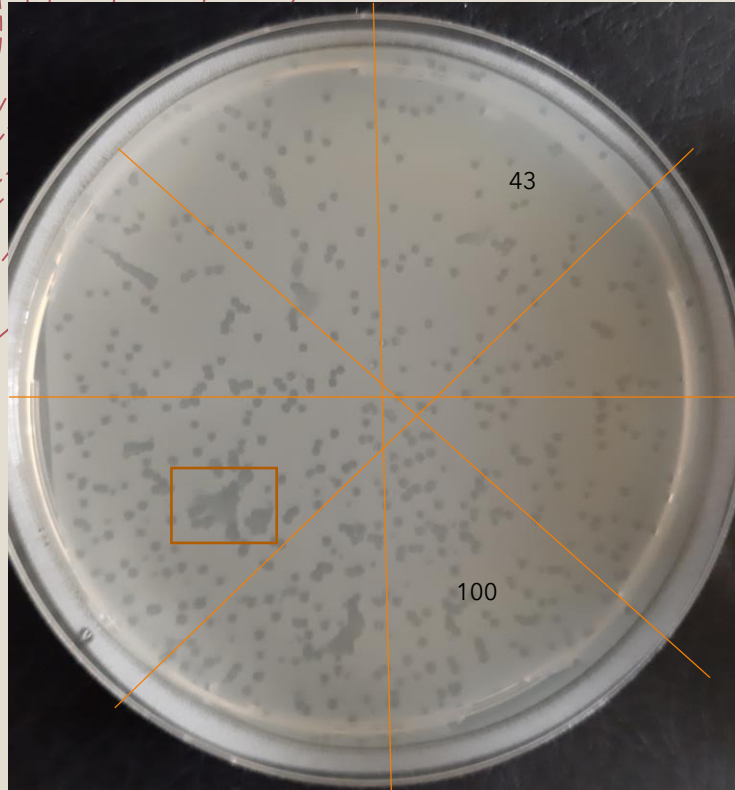
Αραίωση 10⁻⁶



1

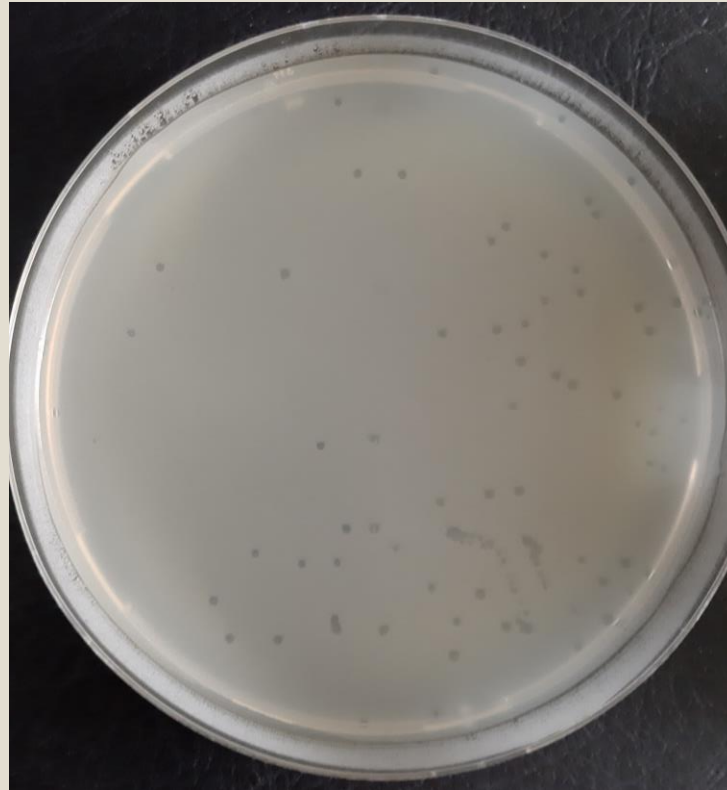
1 pfu/10 µl = 1x10²/ml → 1 x10²x10⁶ pfu/ml → 1x10⁸ pfu/ml

Αραίωση 10^{-6}



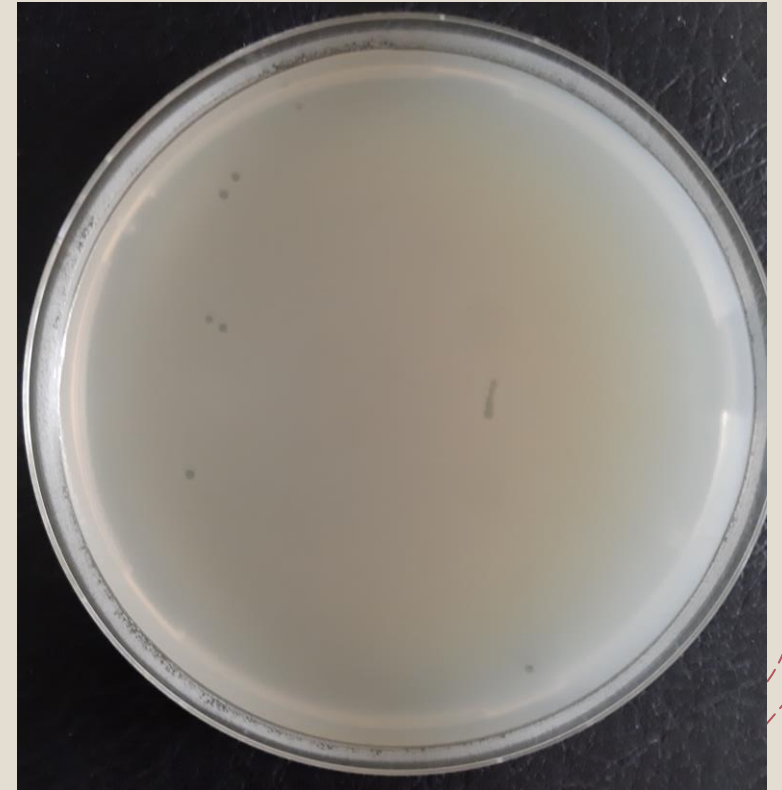
600

Αραίωση 10^{-7}



70

Αραίωση 10^{-8}



7-10

$7 \text{ pfu}/10\mu\text{l} \rightarrow 7 \times 10^2/\text{ml} \rightarrow 7 \times 10^2 \times 10^8 \text{ pfu}/\text{ml} \rightarrow 7 \times 10^{10} \text{ pfu}/\text{ml}$

$70 \text{ pfu}/10\mu\text{l} \rightarrow 70 \times 10^2/\text{ml} \rightarrow 70 \times 10^2 \times 10^7 \text{ pfu}/\text{ml} \rightarrow 7 \times 10^{10} \text{ pfu}/\text{ml}$

$600 \text{ pfu}/10\mu\text{l} \rightarrow 600 \times 10^2/\text{ml} \rightarrow 600 \times 10^2 \times 10^6 \text{ pfu}/\text{ml} \rightarrow 6 \times 10^{10} \text{ pfu}/\text{ml}$