

Konjugation i bakterier

af Dean Madden og John Schollar (NCBI), revideret og oversat af Claudia Girth-Diamba og Henrik Brinkmann Olsen (Solrød Gymnasium) sghbo@solgym.dk

Indledning

Der afprøves et forsøg fra NCBE (National Center for Biotechnology Education) på Universitetet i Reading, Storbritannien.

Forsøget i korte træk:

- Der laves 2 overnatskulturer i flydende næringsmedie (LB). Der podes med den ene stamkultur, som er DONOR og har et F+ plasmid med et resistensgen mod chloramfenikol. Den anden stamkultur er RECIPIENT (F-) og har et resistensgen mod rifampicin, som IKKE sidder på et plasmid men derimod er en integreret del af bakteriekromosomet.
- De to kulturer blandes (vi kalder det BAKTERIE-SEX) i et nyt kulturglas med flydende LB næringsmedie. Der skal de vokse i minimum 4 timer. I den tid vil nogle bakterier mødes og plasmider overføres fra donor til recipient (se figur 2). Bakterier, som har modtaget plasmid, kaldes KONJUGATER.
- Vi tester konjugaterne (= dem der har BEGGE resistensgener) på selektive plader - det er altså agarplader med næringsagar indeholdende både chloramfenikol (forkortelse clo) og rifampicin (forkortelse rif). På disse plader dør alle bakterier, der kun har én resistens.

Formål:

At skabe en ny bakterie der er multiresistent og dermed påvise horisontal gentransfer i bakterier.

Teori:

Bakterier har ikke kønnet formering, men er alligevel i stand til at udveksle genetisk materiale. Det sker i form af plasmider. Der er grundlæggende 3 måder hvorpå udvekslingen kan foregå:

- Transformation, hvor bakterier optager plasmider fra det omkringliggende miljø
- Transduktion, hvor overførslen sker via virus
- Konjugation, hvor der opstår fysisk kontakt mellem 2 bakterier

I dette forsøg sker udvekslingen ved konjugation. Der bruges 2 forskellige naturlige E. coli stammer:

- HT-99 der har resistens mod antibiotikaet chloramfenikol. Resistensgenet sidder på et plasmid.
- J53-R der har resistens mod antibiotikaet rifampicin. Resistensgenet sidder på bakteriekromosomet.

HT-99 er i stand til at danne en såkaldt pilus, der er en slags rør der kortvarigt forbinder bakterien fysisk til en anden bakterie (J53-R). Derved kan HT-99 sende en kopi af sit plasmid til J53-R, der dermed får resistensen mod chloramfenikol. Da den i forvejen har resistens mod rifampicin er den blevet det vi kan kalde multiresistent. J53-R bakterier der har modtaget en kopi af HT-99s plasmid kaldes konjugater. Vi kan

identificere konjugaterne ved at dyrke dem på selektive næringsmedier. De selektive næringsmedier er LB agarplader med tilsat antibiotika. Enten er der tilsat chloramfenikol eller rifampicin eller begge dele. Konjugationsprocessen er forklaret nærmere i boksen herunder:

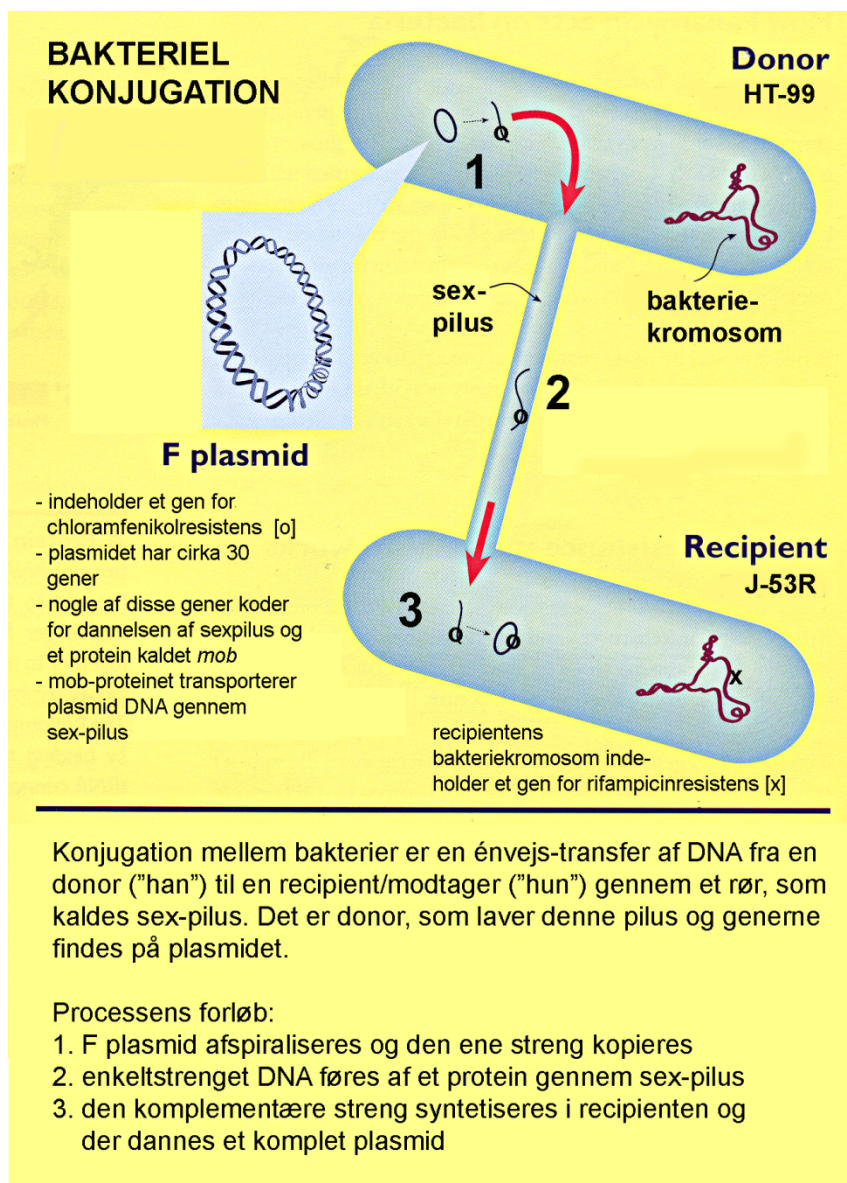
På figuren ses processen "konjugation". Stammen HT-99 har bl.a. genet for chloramfenikol-resistens på plasmider. Det ses på figuren og er mærket med en ring [o]. Plasmidet har også gener, som gør dannelsen af sexpilus (et rør som forbinder de to bakterier) og transporten af en enkeltstrenget kopi af plasmidet muligt.

Bakterier, som har sådanne plasmider, kaldes F+, hvor F står for engl. "fertility" (frugtbarhed) og er DONOR i processen konjugation.

Modtager-bakterier kaldes F-. De hedder i fagsprog RECIPIENT.

Den i forsøget brugte recipient J-53R har ikke egne plasmider. Den har dog et resistensgen mod rifampicin på bakterie-kromosomet. Denne struktur er ringformet og på figuren er resistensgenet mærket med et kryds [x].

Figuren er forandret efter "The Transformer Protocol", NCBE, University of Reading, UK. Tegneren er Dean Madden, oversættelse Claudia Girth-Diamba.



Nogle bemærkninger til stammerne og sikkerhed:

Da det er naturligt forekommende stammer, skal dette forsøg ikke anmeldes til Arbejdstilsynet, modsat arbejde med gensplejsede organismer. Men stammerne kan jo potentielt udgøre en risiko, især donorstammen HT-99, der kan overføre chloramfenikolresistens til andre bakterier. Dog er chloramfenikol ikke et antibiotikum som generelt bruges i human medicin. Efter aftale med Undervisningsministeriet (2015) bør man alligevel arbejde under skærpede sikkerhedsregler. Det er de samme regler, som bruges under arbejdet med gensplejsning i de gymnasiale uddannelser.

Materialer (fælles)

- Varmeplade eller mikrobølgeovn
- Autoklave til sterilisering af næringsagar og andet materiale, inklusive affald
- Grydelapper til håndtering af varme glas
- Termometer
- Varmeskab på ca. 30°C til inkubering af bakterier
- Stamopløsning af rifampicin (er lavet på forhånd)
- Stamopløsning af chloramfenikol (er lavet på forhånd)
- Stammerne HT-99 og J-53R i overnatskultur eller på plader
- Mikropipetter med sterile spidser
- Steril LB-broth /flydende LB, der skal bruges minimum 3 gange 10 mL til overnatskulturer af de to stammer og væstkultur til konjugation.
- Steril LB-agar, som skal fordeles på petriskåle til udstrygning af stammerne og til at lave selektive plader indeholdende antibiotika.

Materialer (per arbejdsgruppe)

- Affaldsglas med stegepose – den fyldte stegepose lukkes og placeres direkte i autoklaven til destruktion
- Malertape til markering og lukning af petriskåle
- Sterile podepinde
- 3 sterile engangsglas med 10 mL markering
- 3 tredelte petriskåle eller 9 små petriskåle
- Tusch til mærkning af petriskåle

Fremgangsmåde

2-4 dage før udpladning: Bakterierne J53-R og HT-99 stryges ud på LB-agarplader og stilles i varmeskab.

1-2 dage før udpladning: Der fremstilles overnatskulturer af de to bakteriestammer. Tag med en steril podepind en klump bakterier fra HT-99 pladen og overfør den til et sterilt engangsglas fyldt med 10 mL flydende LB. Rør lidt rundt med pinden. Gentag det samme med J-53R **med et nyt glas og en ny podepind**. Husk at mærke glassene.

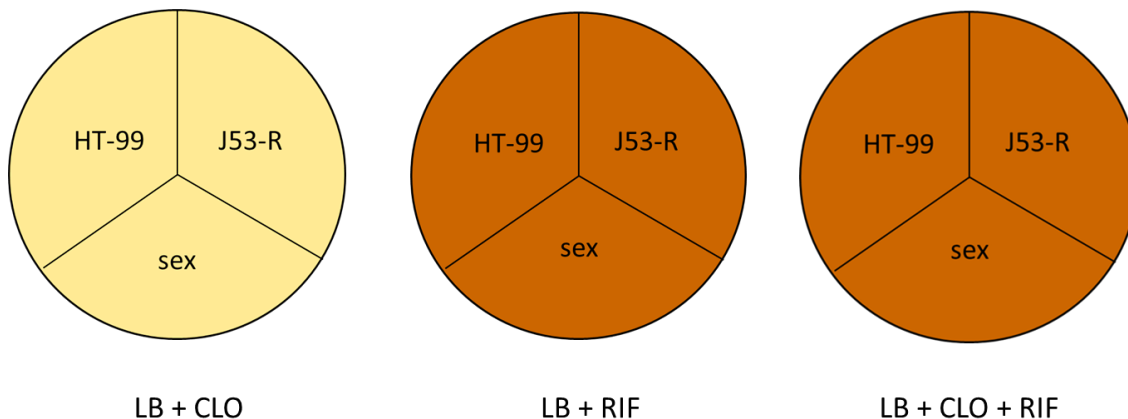
4-16 timer før udpladning: Blandingen hvor konjugationen skal foregå laves på følgende måde: Overfør 1,8 mL J53-R overnatskultur til 10 mL flydende LB i et sterilt engangsglas. Overfør derefter 0,2 mL HT-99 overnatskultur til det samme sterile engangsglas. Mærk glasset "sex" eller "konjugation". Glasset stilles i varmeskab i 4-16 timer.

Udpladning: Først skal de selektive agarplader fremstilles. Hver gruppe skal fremstille 3 tredelte petriskåle med næringsmedie: 1 kun med chloramfenikol (clo), 1 kun med rifampicin (rif) og 1 med både chloramfenikol og rifampicin (clo+rif). Først smeltes den færdige LB-agar i mikrobølgeovn eller på

varmeplade. Når temperaturen er ca. 70°C hældes 3x10 mL op i 3 sterile engangsglas der er mærket hhv. clo, rif og clo+rif.. Når temperaturen i engangsglassene er ca. 55°C, kan antibiotikaen tilsættes.

- Til glasset mærket clo tilsættes 10 µL chloramfenikolstamopløsning.
- Til glasset mærket rif tilsættes 50 µL rifampicinstamopløsning.
- Til glasset mærket clo+rif tilsættes både 10 µL chloramfenikolstamopløsning og 50 µL rifampicinstamopløsning.

Herefter omrystes forsigtigt og de tre opløsninger fordeles i hver deres tredelte petriskål.



De tre rum i hver petriskål mærkes som på figuren herover.

Udstrygning: Når pladerne er størknet udstryges der fra overnatskulturen i de relevante rum på alle tre plader. Pas på ikke at forurene de andre rum og husk at bruge en ny pødepind hver gang. Pladerne stilles til inkubation med bunden nedad ved 30°C indtil resultaterne kan aflæses (typisk dagen efter).

Resultater

Antibiotikum i næringsagar ☐ ↓ Udstrøget stamme	Rifampicin		Chloramfenikol		BÅDE Rifampicin og Chloramfenikol	
	forventet	observeret	forventet	observeret	forventet	observeret
HT-99						
J-53R						
Konjugat (sex)						

Til læreren

Forberedelse

Fremstil i god tid inden forsøget steril LB agar og steril LB Broth. Det har meget lang holdbarhed når det har været autoklaveret, så det er en god idé at have en masse på lager.

Bestilling af bakteriestammer: Stammerne bestilles fra Bioneer i Hørsholm. Send en mail til Bente og bestil HT-99 og J-53R(bms@bioneer.dk) De koster 60 kr. pr. styk. Typisk kommer de efter 1-2 dage, men bestil alligevel i god tid. De ankommer indstøbt i LB-agar og opbevares i køleskab indtil brug. Da det er naturlige stammer, skal forsøget ikke anmeldes til fagkonsulenten.

Udstrygning af stammerne: 2-5 dage før forsøget stryges stammerne ud på LB-agar. Man behøver ikke at stryge ud så der kommer enkeltkolonier. Da det er naturlige stammer skal man ikke være bange for at HT-99 mister plasmidet selvom der ikke er antibiotika i mediet. Hvis man er i god tid kan man bare lade dem vokse ved stuetemperatur.

Fremstilling af overnatskultur: Ca. 1 døgn før konjugationen fremstilles overnatskulturer. Man behøver ikke at tage enkeltkolonier, bare tag et ordentligt skrab.

Fremstilling af konjugationsblanding: 4-16 timer før selve forsøget skal bakteriestammerne mødes for at lave konjugationen. Hvis man skal plade ud om eftermiddagen kan man altså blande dem om morgenen, og hvis man skal plade ud om morgenen kan man blande dem dagen før. Det er generelt en god idé at lave 2 plader med hver stamme, 2 overnatskulturer med hver stamme, 2 sexglas osv. Så har man en reserve hvis noget ikke går som planlagt.

Fremstilling af antibiotikastamopløsninger: De to typer antibiotika kan f. eks. købes hos Skolebutik. Rifampicin opbevares i fryser og chloramfenikol i køleskab. Særligt rifampicin er ret dyr (ca. 1000 kr. for 1 g). Det kan derfor være en god idé at aftale med kolleger at lave forsøget med flere klasser samtidig, så man undgår spild.

Rifampicin:

100 mg opløses i 5 mL methanol, brug handsker og udsugning – det kan tage lang tid at opløse, brug eventuel vortex eller ryst længe og kraftigt.

Der bruges 50 mikroliter per 10 mL næringsmedium, hvor slutkoncentrationen er 0,100 mg per 1 mL medium, svarende til en fortynding på 1:1000.

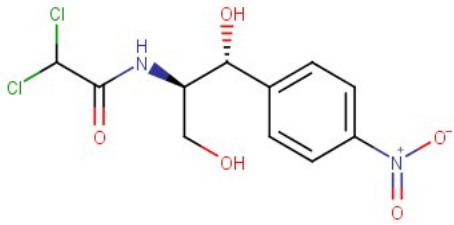
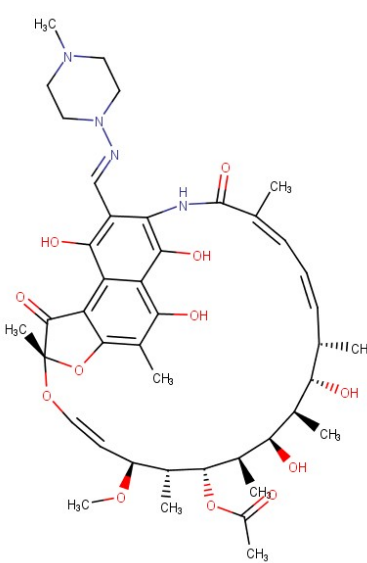
Chloramfenikol:

25 mg opløses i 1 mL metanol, brug handsker og udsugning.

Der bruges 10 mikroliter per 10 mL næringsmedium, hvor slutkoncentrationen er 0,025 mg per 1 mL medium, svarende til en fortynding på 1:1000.

Antibiotikastamopløsningerne kan laves op til 1 uge før forsøget og opbevares i køleskab.

Information om chloramfenikol	Information om rifampicin
Produktet er mærket giftigt, muligvis kræftfremkaldende og teratogent (skader fosteret). Når man afvejer pulveret, skal det ske i stinkskalet – pas på støvet. Først opløst i væske er det nok at bruge handsker, når man åbner og lukker røret. Chloramfenikol binder reversibelt til den ene (50S) af de to underenheder af bakteriers ribosomer og hæmmer derfor proteinsyntesen i mange bakterie-arter ved at forhindre dannelsen af peptidbindingen. På grund af stoffets giftighed anvendes det hos mennesket kun til udvortes brug – eksempelvis i øjensalver og dråber. Chloramfenikol produceres af bakterien <i>Streptomyces venezuelae</i>, en jordbakterie. Stoffet destrueres i varme over 55°C.	Rifampicin er det kraftigste antibiotikum mod mykobakterier dvs. tuberkulosebakterier (<i>Mycoplasmata tuberculosis</i>). Rifampicin blokerer mykobakteriernes DNA-afhængige RNA-polymerase, hvorved bakterierne dør, når de er i vækstfasen, dvs. når der skal laves store mængder RNA til proteinsyntesen. Rifampicin har desuden hæmmende virkning over for bl.a. følgende (sjældne) bakterier: <i>Legionella</i> (vokser i lunkent vand i brusere), <i>Nocardia</i> (er årsag til en sjældent lungesygdom), <i>Chlamydia</i> (seksuelt overført sygdom) og <i>Staphylococcus aureus</i> (den findes normalt på huden, men kan give problemer på sygehuse, når patienter er svækkede og har sår). I colibakterien J-53R sidder genet for rifampicin-resistens på kromosomet og kan derfor IKKE overføres til andre bakterier. Stoffet destrueres i varme over 55°C.

Kemisk formel for chloramfenikol  The chemical structure of chloramphenicol consists of a central carbon atom bonded to a chlorine atom (green), a hydroxyl group (red), an amide group (blue nitrogen), and a 2-nitrophenyl group (benzene ring with a nitro group, blue nitrogen and red oxygen).	Kemisk formel for rifampicin  The chemical structure of rifampicin is a large, complex molecule. It features a tetracyclic core with multiple hydroxyl groups (red) and methyl groups (black). A side chain includes a dimethylpiperazine ring (blue nitrogen) and a long, unsaturated side chain with several methyl groups (black) and hydroxyl groups (red).
---	--

Fremstilling af plader: Når man skal fremstille de selektive næringsmedieplader er det en god idé at have instrueret eleverne grundigt inden. Antibiotikaen må først tilsættes når temperaturen i mediet er under 55°C, men omvendt bliver agaren svær at hælde op ved omkring 35-40°C. Der er derfor et forholdsvis smalt vindue at arbejde i. Alternativt til øvelsesvejledningen kan man lade være med at udportionere LB-agaren og bare tilsætte den rette mængde antibiotika direkte i den store flaske og så hælde i petriskåle fra den.

Udstrygning af bakterier: Udstrygning foregår bare med podepinde. Vær omhyggelig med ikke at stænke ned i de forkerte rum på den tredelte petriskål. Inkubationen foregår ikke med bunden i vejret som sædvanligt, da eventuelt kondensvand kan blande stammerne. Ofte kan der ses resultater allerede efter 1 døgn ved 30°C.

Forfattere og tak til ...

- Tak til NCBE med Dean Madden og John Schollar, som har udarbejdet vejledningen og forfinet den gennem afprøvning på skoler i Storbritannien.
- Tak til Bioneer, som opbevarer og udleverer stammerne til de gymnasiale uddannelser.
- Tak til tidligere fagkonsulent Kresten Cæsar Torp i biologi og bioteknologi for gode diskussioner om sikkerhedsspørgsmål.
- Sidst men ikke mindst et stort tak til elever på Solrød Gymnasium, som har været med til at afprøve forsøget og givet gode kommentarer til den danske vejledning.