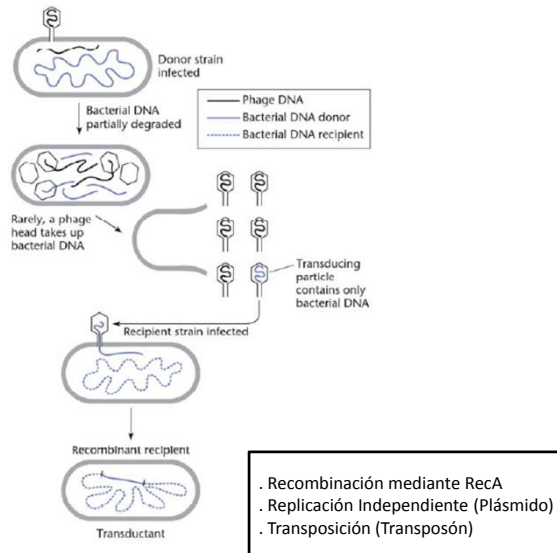


### TP2: Transducción Generalizada



### TP2: Transducción Generalizada

- 1ero.** Generar un lisado fágico
- 2do.** Titular un lisado fágico
- 3ero.** Realizar una Transducción Generalizada

- **Fago:** P22 modificado → **P22HT**

- **Cepas:** *Salmonella thyphmurium*

- (1) wt → 14028
- (2) HB303 → Km, Cm
- (3) HB405 → Km, Cm

**1- Procedimiento: Obtención del lisado P22HT transductante****Día 1**

. Diluciones P22HT ( $10^{-2}$  y  $10^{-4}$ )  
(proviene de la cepa wt)



Vortex 42°C

. 5 ml LBsoft 65°C

. 100 ul dil.  $10^{-4}$  P22HT  
. 100 ul ON Salmonella  
(HB303 ó HB405)  
. Cationes

→ Mezcla 10 min 37°C



. Verter sobre placa de LBA

. Incubar a 37°C (5 hs – ON)

**Día 2**

. 5 ml LB por placa

. Romper la capa de LBsoft (espátula)

. Tomar 1ml en eppendorf + 200 ul Cloroformo



. Centrifugar 5 min 12000 rpm → Recuperar SN + 200 ul Cloroformo

**Obtención del lisado P22HT transductante**

. Grupos 1 y 2: HB303 → *galS::Km<sup>R</sup> – galB::lacZ::Cm<sup>R</sup>*

. Grupos 3 y 4: HB405 → *cueR::Km<sup>R</sup> – copA<sup>+</sup>::lacZ::Cm<sup>R</sup>*

**2. Procedimiento: Determinación del título del lisado P22HT transductante****Día 1**

- . Diluciones P22HT ( $10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-7}$ )  
(proviene de las cepas HB303 ó HB405)



- . 5 ml LBsoft 65°C

Vortex 42°C

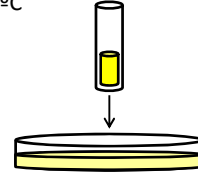
- . 100 µl dil.  $10^{-4}$  P22HT (dil.  $10^{-6}, 10^{-7}$ )
- . 100 µl ON Salmonella 14028 (wt)
- . Cationes

Mezcla 10 min 37°C



- . Verter sobre placa de LBA

- . Incubar a 37°C (5 hs – ON)



- . Contar UFP

**Día 2**

- . Estimar el nro. de ufp/ml en el lisado original

**Transducción Generalizada****Día 2**

- . Diluciones P22HT ( $10^{-1}, 10^{-2}$ )  
(provenientes de HB303 ó HB405)

- . Realizar las siguientes mezclas: Usando ON de *Salmonella* wt

| TUBO | ON Salmonella<br>( $5 \times 10^9$ ufc/ml) | Lisado P22 transductor  | Placa<br>LBA(EGTA) |
|------|--------------------------------------------|-------------------------|--------------------|
| 1    | 50 µl                                      | 50 µl (puro)            | Cm/Km              |
| 2    | 50 µl                                      | 50 µl (dil. $10^{-1}$ ) | Cm/Km              |
| 3    | 50 µl                                      | 50 µl (dil. $10^{-2}$ ) | Cm/Km              |
| 4    | 50 µl                                      | 50 µl (dil. $10^{-1}$ ) | Km                 |
| 5    | 50 µl                                      | (-)                     | Km                 |

- . Incubar 37°C 10 min

- . Sembrar en las placas correspondientes (Km/Cm ó Km y EGTA)

- . Incubar 37°C ON

**Día 3**

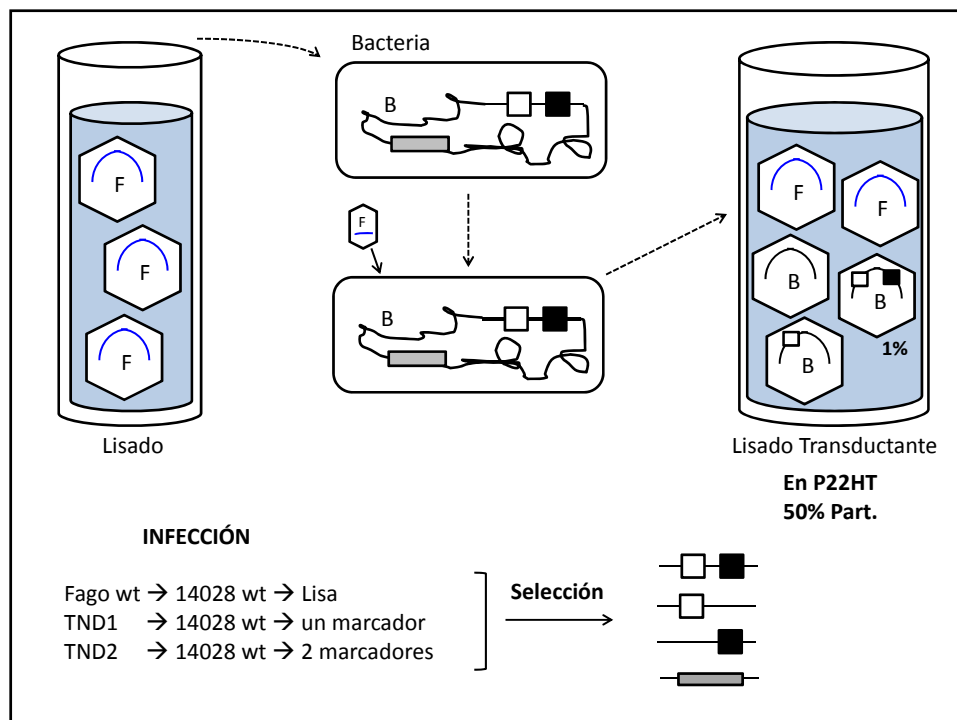
- . Recuento de colonias. Determinación de MOI óptima y Frecuencia de co-transducción

### Transducción Generalizada

| Tubo | Marcador de Selección | MOI | N° Colonias para lisados de cepa HB303 | N° Colonias para lisados de cepa HB405 |
|------|-----------------------|-----|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 1    | Cm/Km                 |     |                                        |                                        |
| 2    | Cm/Km                 |     |                                        |                                        |
| 3    | Cm/Km                 |     |                                        |                                        |
| 4    | Km                    |     |                                        |                                        |
| 5    | Km                    | 0   |                                        |                                        |

$$Fct = \frac{\text{ufc marcador}}{\text{ufc totales}} = \frac{\text{ufc Km/Cm}}{\text{ufc Km}}$$

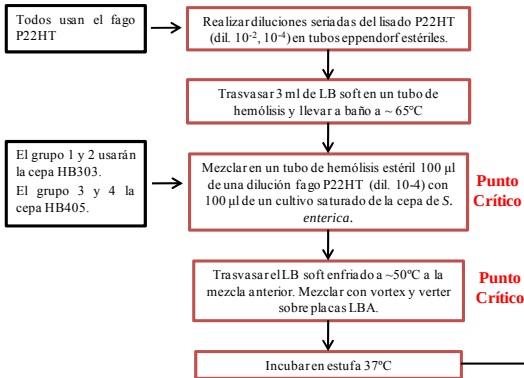
$$MOI = \frac{\text{nro fagos}}{\text{nro de bacterias}} = \frac{\text{Título de lisado (ufp/ml) x vol. de lisado (ml)}}{\text{Título del cultivo de bacterias (ufc/ml) x vol. cultivo de bact. (ml)}}$$



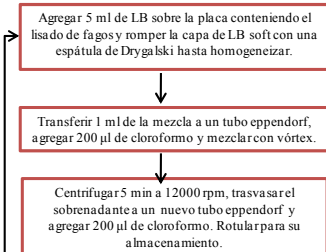
## Guía Rápida: Práctico Transducción Generalizada

### Obtención del lisado P22HT transductante

#### Día 1 (Parte 1)



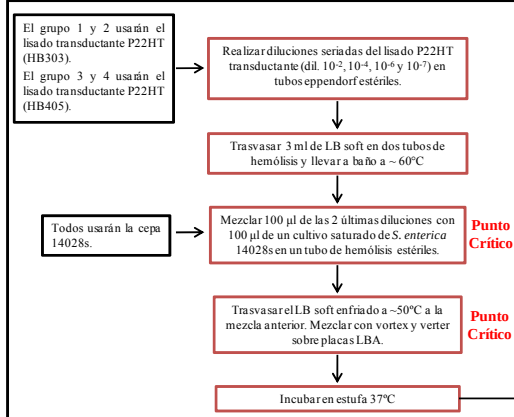
#### Día 2 (Parte 2)



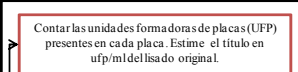
## Guía Rápida: Práctico Transducción Generalizada

### Determinación del título del lisado P22HT transductante

#### Día 1 (Parte 1)



#### Día 2 (Parte 2)



## Guía Rápida: Práctico Transducción Generalizada

### Transducción generalizada

#### Día 2 (Parte 1)

El grupo 1 y 2 usarán el lisado transducente P22HT (HB303).  
El grupo 3 y 4 usarán el lisado transducente P22HT (HB405).

Realizar diluciones seriadas del lisado transducente (dil.  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ). Cada grupo usará el lisado cuyo título determinó.

En tubos eppendorf estériles realizar las siguientes mezclas

| TUBO | ON <i>Salmonella</i><br>( $5 \times 10^9$ ufc/ml) | Lisado P22<br>transductor    | Placa<br>LBA(EGTA) |
|------|---------------------------------------------------|------------------------------|--------------------|
| 1    | 50 $\mu$ l                                        | 50 $\mu$ l (puro)            | Cm/Km              |
| 2    | 50 $\mu$ l                                        | 50 $\mu$ l (dil. $10^{-1}$ ) | Cm/Km              |
| 3    | 50 $\mu$ l                                        | 50 $\mu$ l (dil. $10^{-2}$ ) | Cm/Km              |
| 4    | 50 $\mu$ l                                        | 50 $\mu$ l (dil. $10^{-1}$ ) | Cm                 |
| 5    | 50 $\mu$ l                                        | (-)                          | Cm                 |

Todos usarán la cepa 14028s.

Incubar en estufa a 37°C 10 min. y sembrar todo el volumen en las placas usando espátula de Drygalski.

**Punto Crítico**

Incubar a 37°C hasta el día siguiente.

#### Día 3 (Parte 2)

Hacer recuento de las colonias obtenidas. Completar la tabla usando la información propia y de los otros grupos.

| Tubo | Placa | MOI | N° Colonias para lisados de cepa HB303 | N° Colonias para lisados de cepa HB405 |
|------|-------|-----|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 1    | Cm/Km |     |                                        |                                        |
| 2    | Cm/Km |     |                                        |                                        |
| 3    | Cm/Km |     |                                        |                                        |
| 4    | Cm    |     |                                        |                                        |
| 5    | Cm    | 0   |                                        |                                        |

Determine MOI óptima y frecuencia de cotransducción de los marcadores. Puede justificar las diferencias encontradas entre las cepas.