

Генетический обмен у бактерий

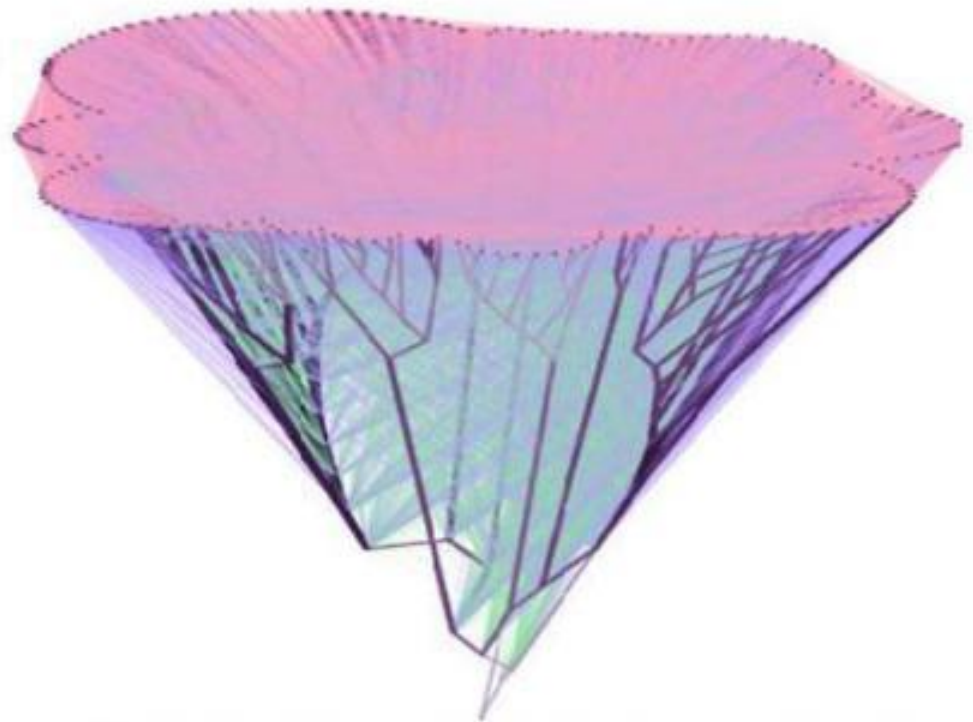


Работа студентки

Рябчун Александры

Генетические процессы у прокариот

Около 80% генов в каждом прокариотическом геноме участвовали в процессе горизонтального обмена на том или ином этапе эволюции.



Трехмерная схема эволюции прокариот

Генетический обмен у бактерий

процесс передачи генетического материала у бактерий.

Основные пути осуществления:

- трансформация
- трансдукция
- конъюгация

Конечным этапом генетического обмена, который может быть как внутривидовым, так и межвидовым, является **рекомбинация**.

Рекомбинация

процесс взаимодействия между молекулами ДНК, приводящей к формированию новой рекомбинантной молекулы, несущей признаки от бактерии-донора и от бактерии-реципиента.

Рекомбинация

Законная

- Требует наличия протяженных комплементарных участков ДНК в рекомбинируемых молекулах
- Происходит только между близкородственными видами

Незаконная

- Не требует наличия протяженных комплементарных участков ДНК
- Происходит при участии Is-элементов, обеспечивающих быстрое встраивание в хромосому

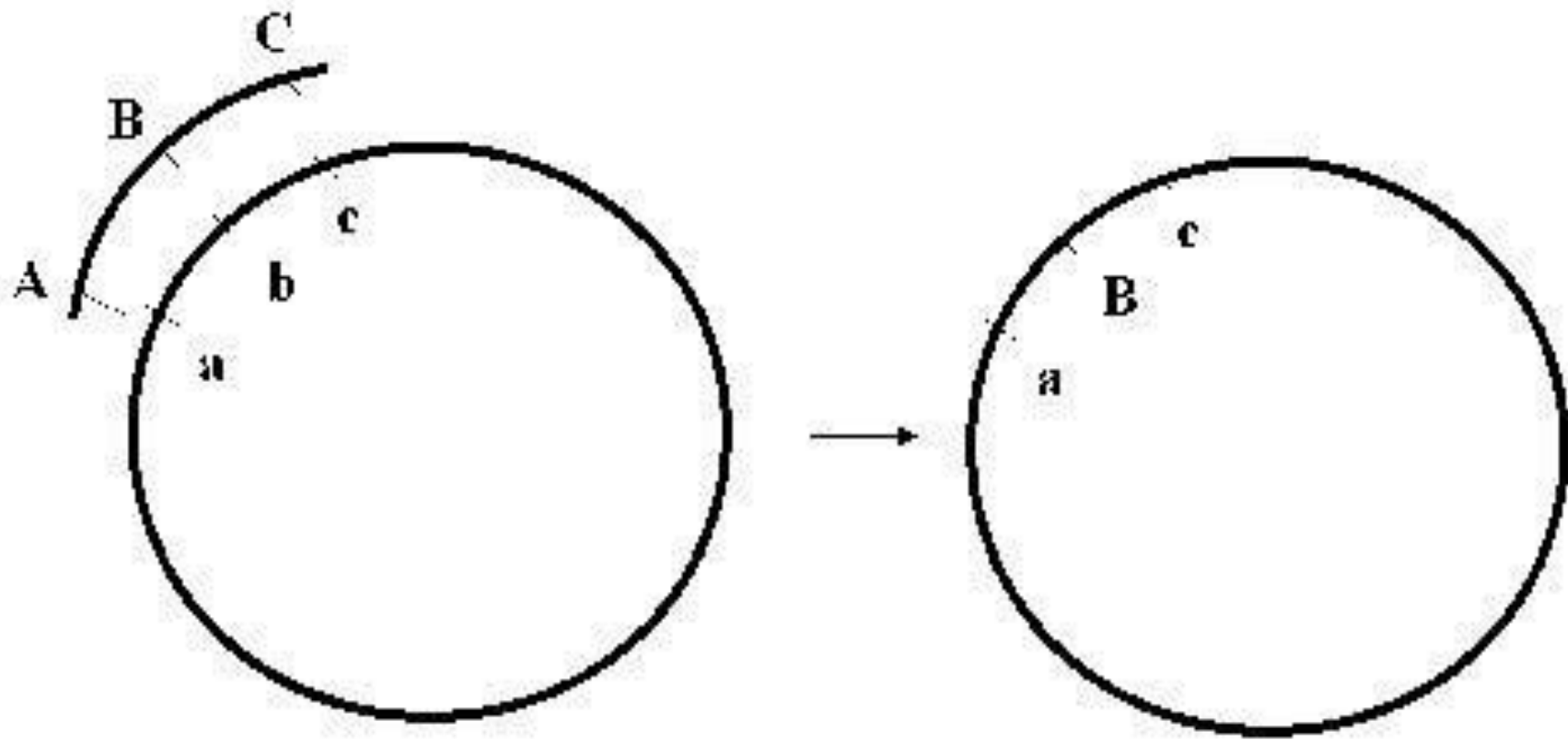


Схема рекомбинации у бактерий

b = Lac⁻

B = Lac⁺

Трансформация

Передача генетического материала между бактериями при помощи фрагментов ДНК.

(описал Ф. Гриффитс 1928 г. Установили О. Эвери, К. Мак-Леод, М. Мак-Карти 1944г.)

Для эксперимента Ф.Р. Гриффит использовал два разных штамма пневмококов:

- Бескапсульный неvirulentный штамм **R** (*от англ.: rough – шероховатый*) растёт на твёрдой питательной среде в виде шероховатых колоний.
- Бактерии штамма R при введении в организм мышей не вызывают гибели подопытных животных (рис., А).
- ✓ Клетки другого – virulentного штамма **S** (*от англ.: smooth – гладкий*) имеют полисахаридную оболочку (капсулу) и развиваются на питательной среде в виде гладких колоний.
- ✓ Мыши, после заражения этими бактериями, заболевают и гибнут (рис., Б).

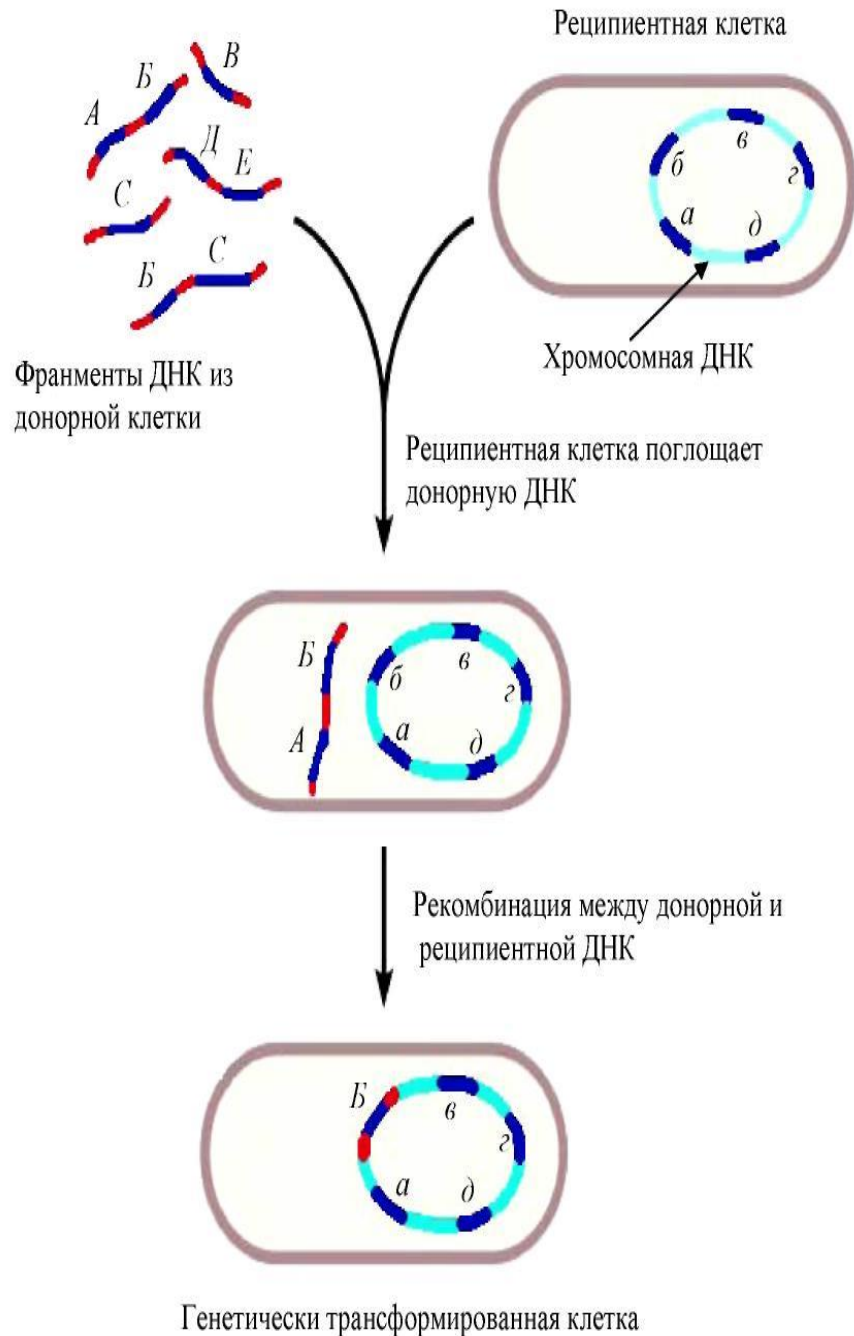


Рис.Г (трансформация).

- Ф. Гриффит убивал клетки S-штамма нагреванием и смешивал их с клетками пневмококков из бескапсульного неvirulentного R-штамма.
- Смесь живых R- и мертвых S-клеток впрыскивал мышам.
- Так как подопытные мыши не получили живых вирулентных бактерий, можно было ожидать, что они выживут.
- Однако подопытная партия мышей после опыта погибла (рис., Г).
- Изучение популяций бактерий, размножившихся в инфицированных мышах, показало, что часть неvirulentных клеток R-штамма превратилась в вирулентные клетки S.

Условия, необходимые для успешной трансформации:

- Гомологичность ДНК: ДНК донора должна быть выделена из бактериальной культуры того же вида, что и реципиент(или близкородственного)
- Участок трансформирующей ДНК с молекулярным весом 10-30 мегадальтон должен сохранять двунитчатую суперспирализацию
- Концентрация ДНК не должна быть малой или избыточной, в обоих случаях количество рекомбинантов снижается
- Клетки-реципиенты должны быть компетентными, т.е. обладать системой транспорта ДНК из внешней среды в цитоплазму



Стадии трансформации

1. Адсорбция ДНК-донора на клетке-реципиенте
2. Проникновение ДНК внутрь клетки-реципиента
3. Соединение ДНК с гомологичным участком хромосомы реципиента с последующей рекомбинацией

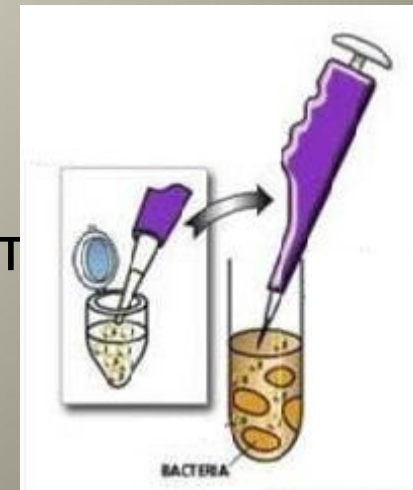
Постановка опыта по передаче локуса устойчивости к стрептомицину

В опыт берут:

- ✓ Донор: ДНК стрептомицинустойчивого штамма
- ✓ Реципиент: стрептомицинчувствительная культура в компетентном состоянии
- ✓ Селективную среду, содержащую стрептомицин

Последовательность действий:

1. Компетентные клетки реципиента соединяют с ДНК донора и инкубируют в течение 30 минут для контакта.
2. В пробирку вносят раствор фермента ДНК-азы для разрушения не проникшей в реципиентные клетки ДНК.



3. Полученную смесь высевают на чашки с селективной средой и инкубируют.
4. Делают контрольные высевы ДНК донора и культуры-реципиента на селективной среде.

Результаты опыта:

1. В обоих контролях рост колоний отсутствует.
2. На опытных чашках вырастают колонии рекомбинантов, которые приобрели признак стрептомициноустойчивости



1



2

С помощью данного опыта можно определить **частоту трансформации** – отношение числа выросших рекомбинантов к числу реципиентных клеток.

Трансдукция

(Н. Циндер и Дж. Ледерберг, 1951 г.)

процесс переноса генетического материала от бактерии-донора к бактерии-реципиенту с помощью бактериофага

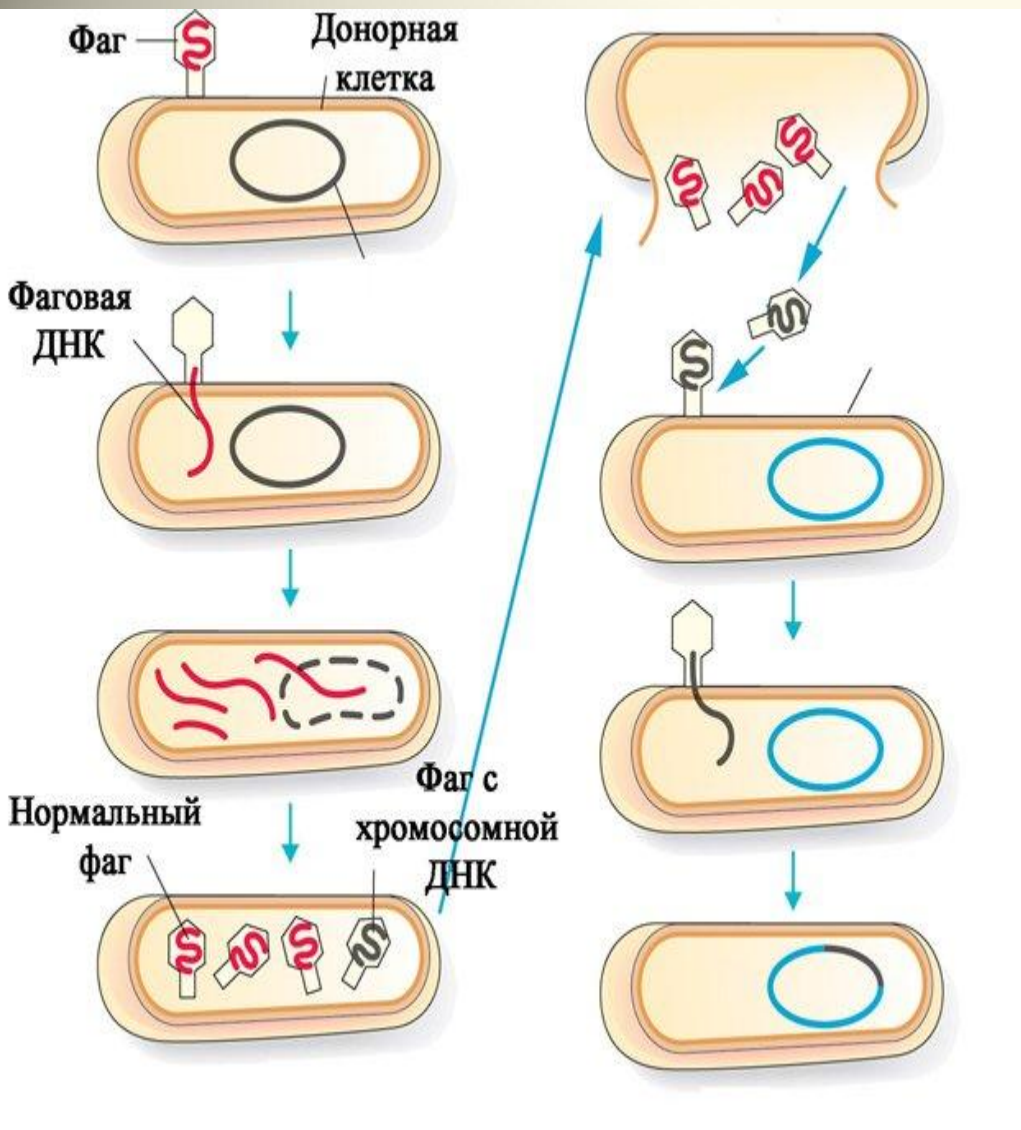
специфическая

неспецифическая

(локализованная)

(общая)

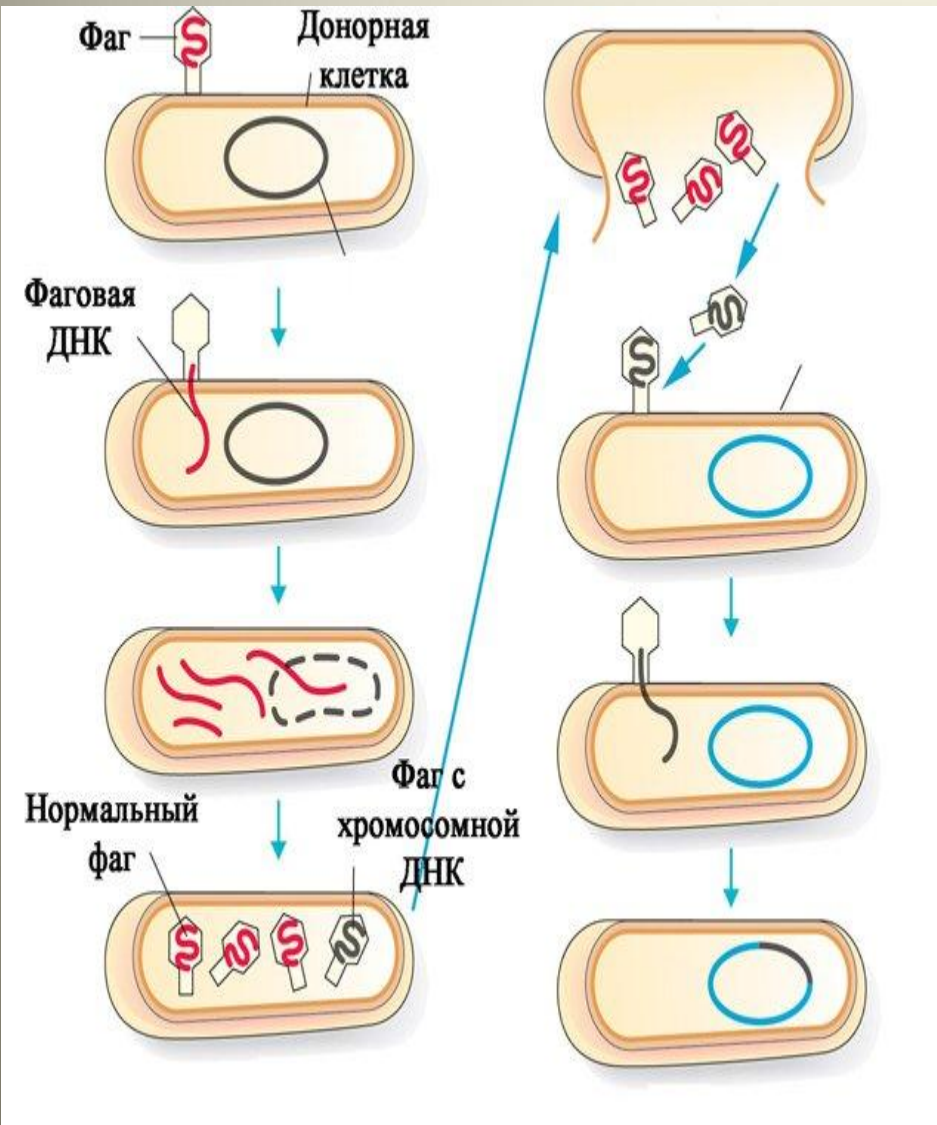
абортивная



Неспецифическая трансдукция:

- бактериофаг переносит любые гены донора;
- неспецифическую трансдукцию осуществляют **вирулентные фаги**;
- включение ДНК клетки-реципиента (серая) при сборке фага носит случайный характер

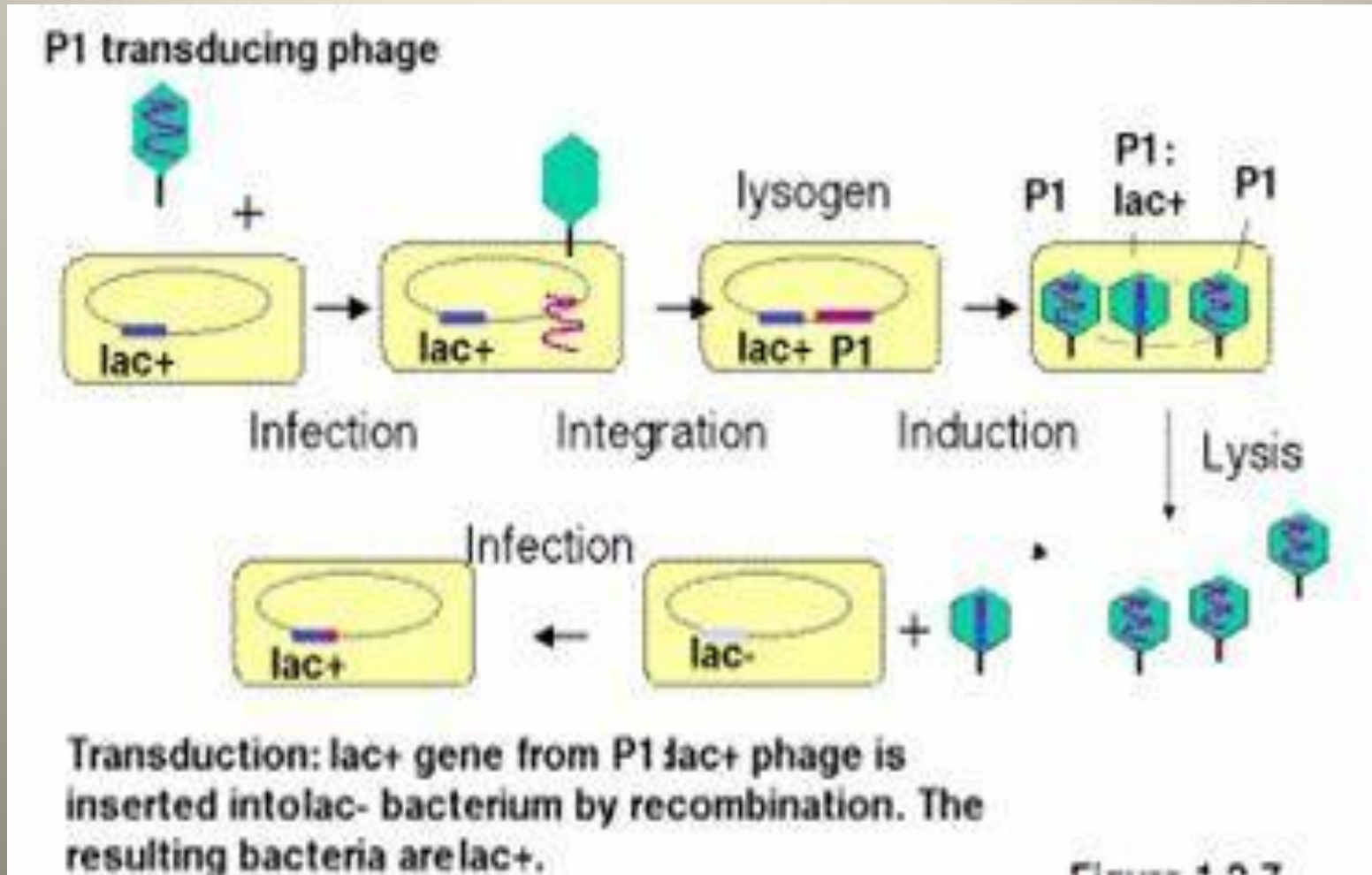
Основные этапы:



- *Адгезия* на поверхности бактерии-донора с последующим проникновением
- *Репродукция* бактериофага внутри клетки
- Самосборка фаговых частиц и *образование дефектного бактериофага* (сохраняет инфекционные свойства и содержит какой-либо фрагмент ДНК бактерии донора)
- *Перенос* дефектным бактериофагом включенной ДНК в клетку-реципиент
- *Рекомбинация* и включение перенесенной ДНК в клетку-реципиент, а следовательно, изменение ее свойств

Специфическая трансдукция

фаг переносит определенные гены от бактерии-донора к бактерии-реципиенту

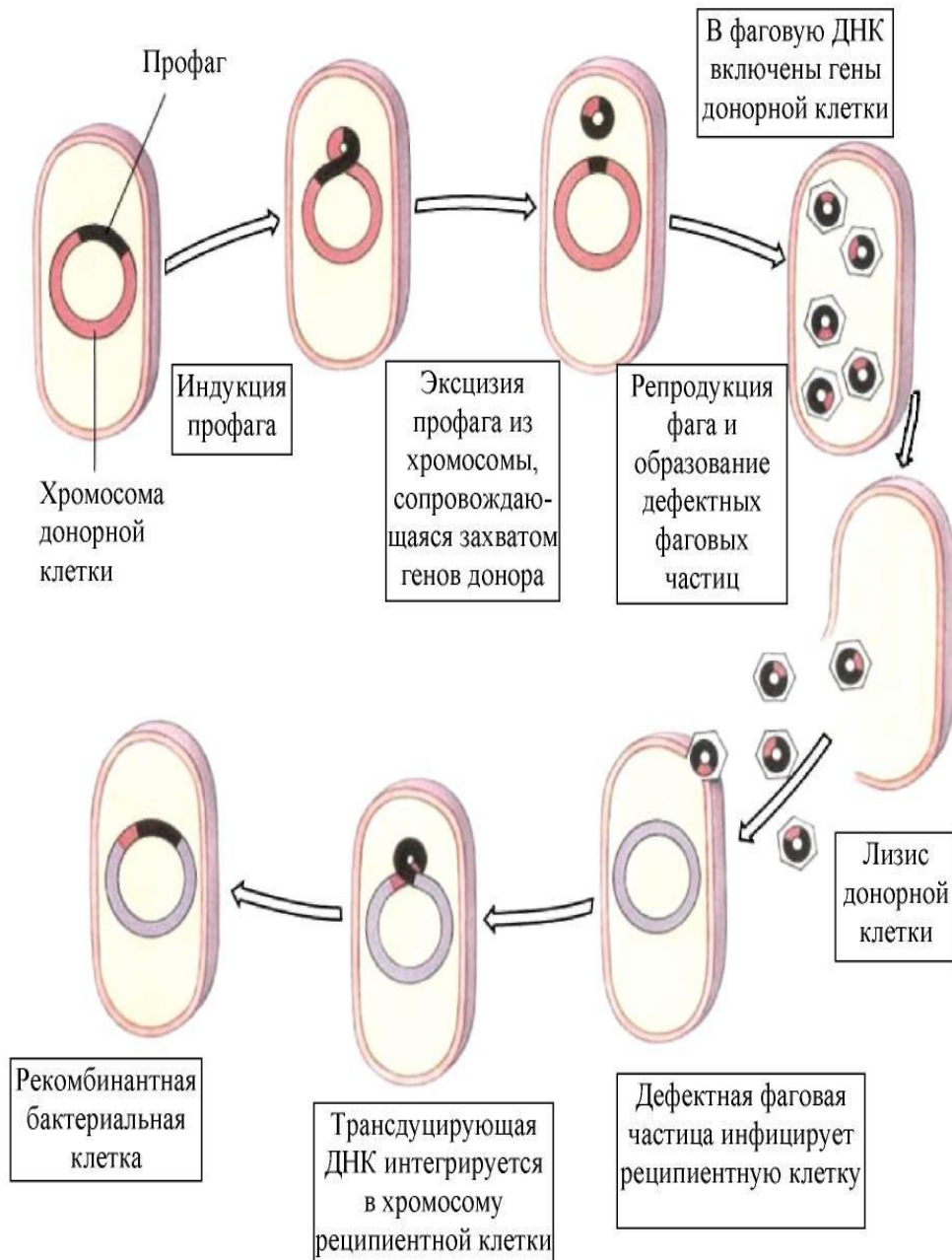


Перенос гена lac^+ с помощью фага P1

Основные этапы:



1. Интеграция ДНК умеренного бактериофага в определенный участок хромосомы клетки-донора
2. Захват соседних бактериальных генов (например, «gal» или «bio» в случае фага лямбда) при выходе из хромосомы



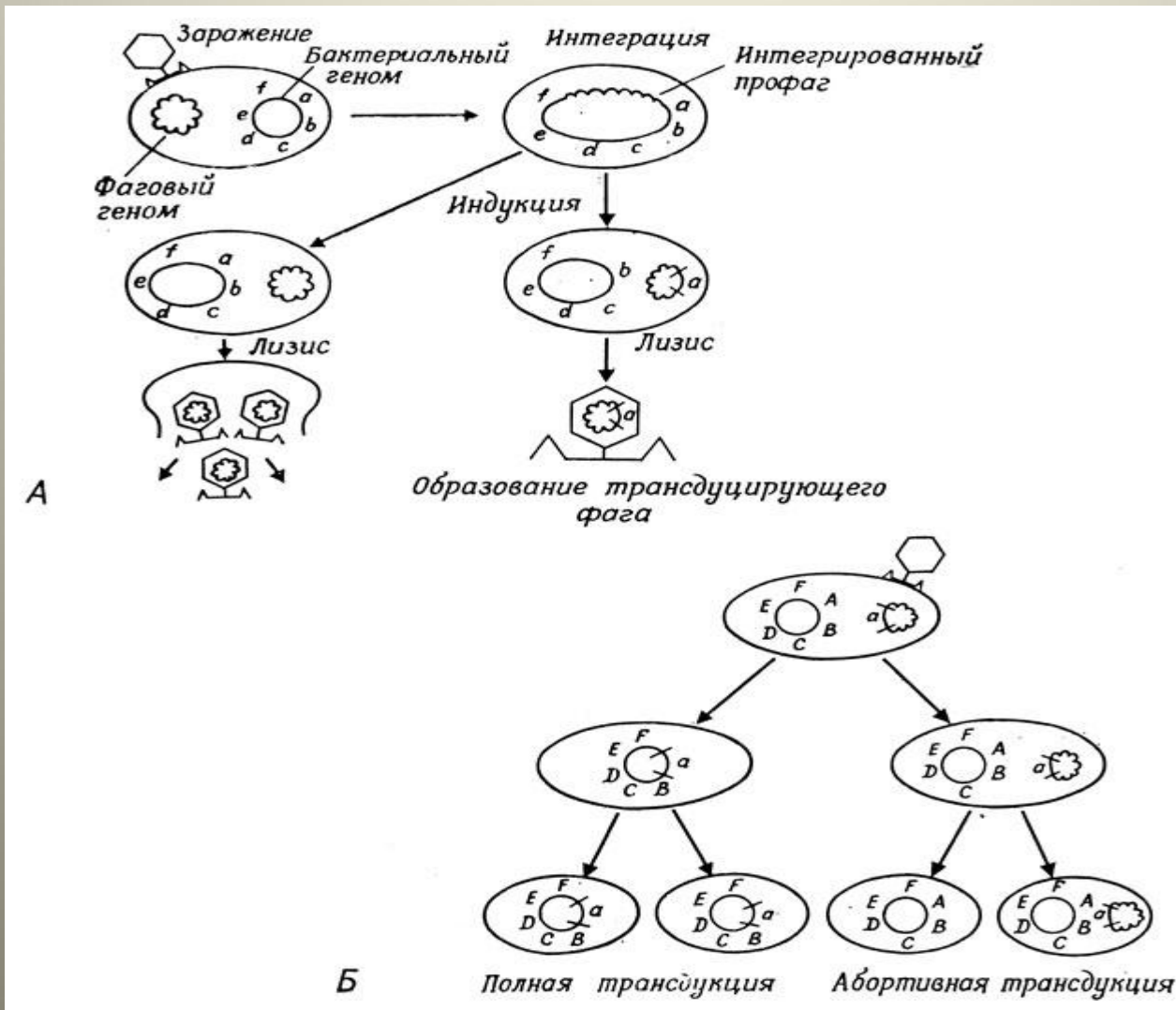
3. *Формирование дефектного бактериофага* (потерян фрагмент собственной ДНК фага, но захвачен фрагмент ДНК донора)

3. *Перенос захваченного фрагмента ДНК донора в клетку-реципиент*

3. *Включение его в геном клетки-реципиента посредством сайт-специфической рекомбинации*

Абортивная трансдукция-

трансдукция, при которой перенесенный материал передается только одной из двух дочерних клеток.



Основные этапы:

- *Формирование дефектного бактериофага, который содержит фрагменты собственной ДНК и ДНК донора*
- *Перенос дефектным бактериофагом включенной ДНК в клетку-реципиент*
- *Внесенный фагом фрагмент донорной ДНК **не интегрирует в бактериальную хромосому и не реплицируется***
- *Однолинейное наследование донорного гена и в конечном итоге утрачивается в потомстве*

Постановка опыта по передаче локуса

«gal+»

В опыт берут:

- ✓ Донор: Трансдуцирующий фаг, выделенный из «gal+» E.coli
- ✓ Реципиент: Бульонная культура-реципиента E.coli «gal-»
- ✓ Среду ЭМС (селективная, дифференциально-диагностическая). «gal+» колонии – сине-черные; «gal-» колонии – неокрашенные.

Последовательность действий:

1. В опытную пробирку вносят культуру-реципиент и фаголизат трансдуцирующего фага, инкубируют в течение 30 минут
2. Из полученной смеси готовят разведения, делают высевы на чашки с ЭМС-средой, инкубируют
3. Делают контрольные высевы фаголизата и культуры-реципиента на чашки с ЭМС-средой

Результаты опыта:



1. В контроле культуры-реципиента выросли бесцветные «gal-» колонии
2. На опытной чашке: бесцветные «gal-» колонии культуры-реципиента и сине-черные «gal+» колонии рекомбинантов

С помощью данного опыта можно определить **частоту специфической трансдукции** – *отношение числа выросших рекомбинантов к числу участвующих в опыте реципиентных клеток.*

Феномен трансдукции может быть использован для картирования бактериальной хромосомы по оценке частоты совместного переноса признака



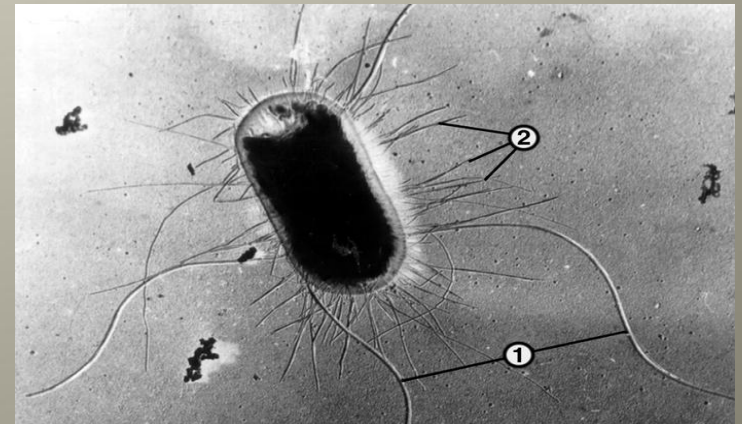
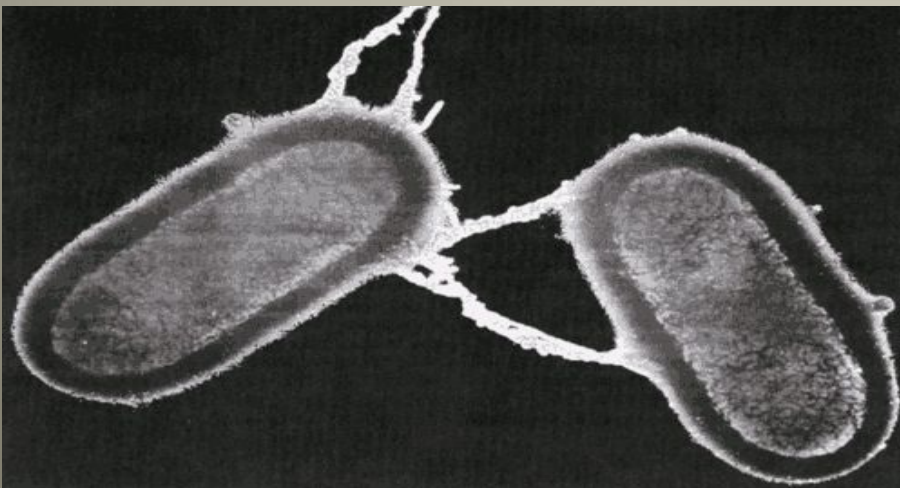
Конъюгация

форма обмена генетическим материалом между бактериями при их непосредственном клеточном контакте.

Необходимое условие : наличие в клетке-доноре трансмиссивной плазмиды.

Процесс конъюгации у бактерий впервые был обнаружен Джошуа Ледербергом и Эдвардом Тейтумом в 1946 г.

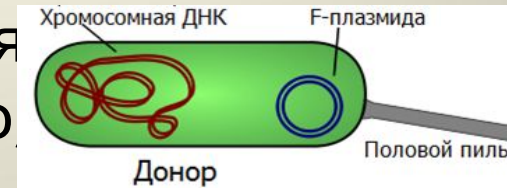
- ❑ Процесс конъюгации определяют и контролируют особые трансмиссивные F-плазмиды (фактор фертильности).
- ❑ F- плазмиды кодируют образование половых пилей, конъюгативного мостка между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по которой плазмидная ДНК передается в новую клетку.



Электроннограмма клетки кишечной палочки, напыленной платинопалладиевым сплавом: видны жгутики (1) и пили (2)

В зависимости от состояния F-фактора и его положения в клетке различают **три типа донорных клеток** - F^+ , Hfr и F' .

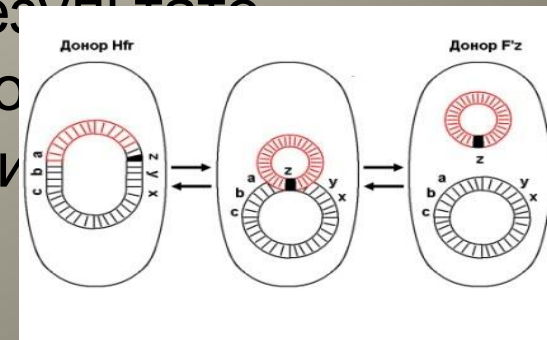
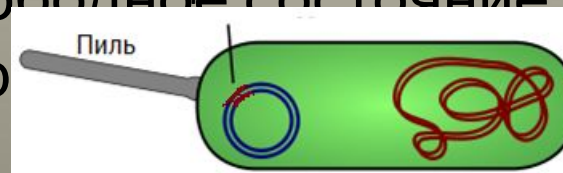
F^+ -клетки: F- плазмиды находятся в свободном состоянии в клетке и реплицируются автономно.



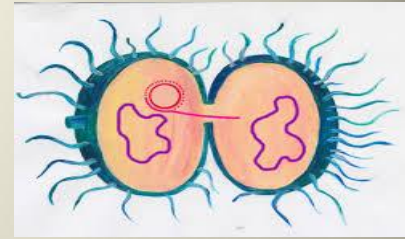
Hfr-штаммы (от англ, high frequency of recombination - высокая частота рекомбинаций) - F- плазида в результате сайт-специфической рекомбинации, опосредованной IS-элементами интегрируется в бактериальную хромосому.



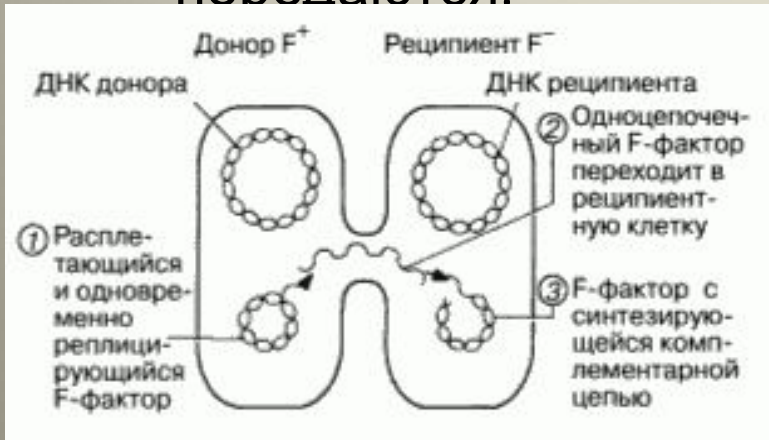
F' -клетки происходят от Hfr-штаммов в результате спонтанного отделения F-фактора от хромосомы. В результате перехода в свободное состояние плазмиды захватывает хромосомную ДНК.



Типы скрещивания:



1. **Скрещивание $F^+ \times F^-$:** передается только F-плазмида, при этом F^- клетка становится F^+ -клеткой, приобретая плазмиду и свойства донора. Хромосомные гены не передаются.



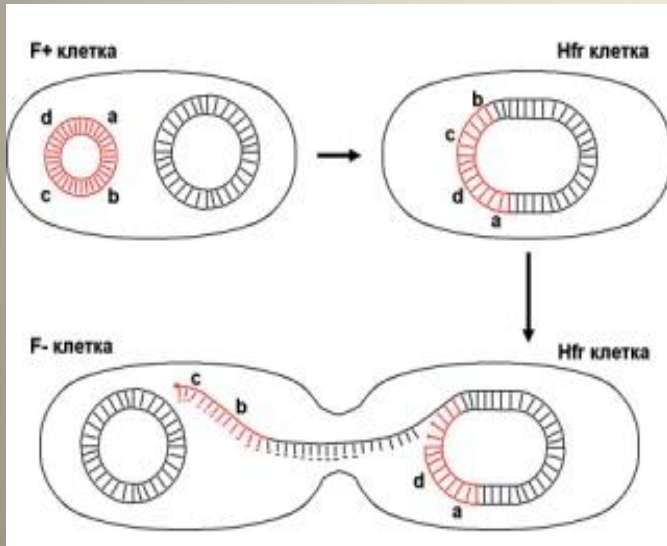
При попадании F-фактора в реципиентную клетку она становится F^+ и приобретает способность передавать фактор фертильности другим F^- -клеткам.

- Первый этап конъюгации — прикрепление клетки-донора к реципиенту с помощью F-пилей.
- *Образование моста* между обеими клетками конъюгационного мостика, через который передаётся F-фактор
- Разрыв и деспирализация одной из нитей ДНК, *проникновение* проксимального конца в клетку-реципиент через конъюгационный мостик
- *Достраивание второй нити ДНК* в клетке-реципиенте и восстановление ДНК-донора

Типы скрещивания:

2. Скрещивание Hfr x F⁻: *(есть рекомбинанты)*

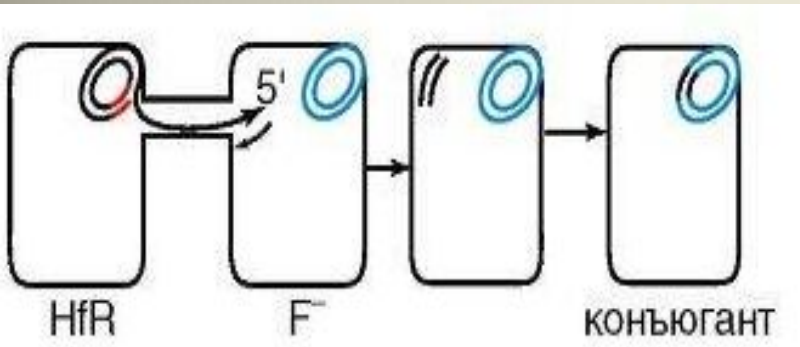
- При переносе генетического материала бактериальная ДНК реплицируется, начиная от места включения F-фактора
- 1. Белок (кодируемый *tra* – опероном) узнает определенную последовательность в ДНК плазмиды (*origin*), затем разрывает одну цепь ДНК и связывается с 5' - концом.
- 2. Цепь ДНК с которой связан белок, переносится в клетку, двигаясь 5' - концом вперед – реципиент, а другая остаётся в Hfr-клетке, то есть донор сохраняет своё генетическое постоянство.
- 3. После начала конъюгации хромосомный материал переносится, начиная от генов



Типы скрещивания:

2. Скрещивание Hfr x F⁻:

(есть рекомбинанты)



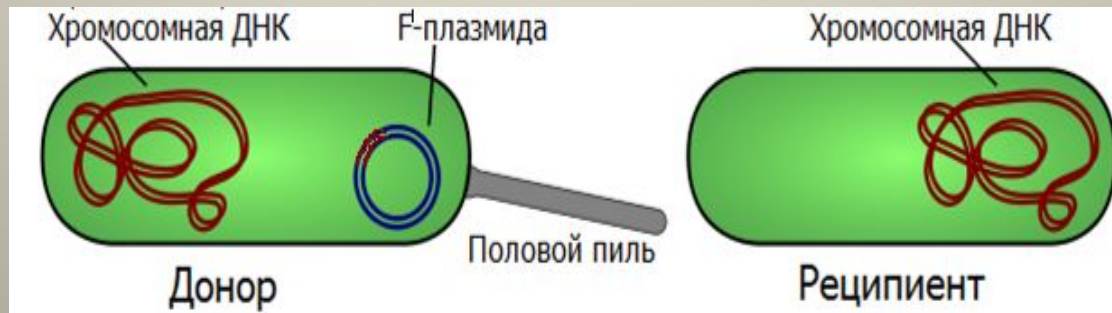
- В бактерии-реципиенты обычно попадают первые из переносимых генов, размер которых зависит от времени, в течение которого проходила конъюгация, и очень редко — все гены.

- Позже всех переносится участок плазмиды, содержащий ген переноса кодирующий F-пили.
- Поскольку полная трансмиссия — явление редкое, реципиентная клетка при Hfr-конъюгации обычно остаётся F⁻.
- Вслед за процессом переноса в клетке-реципиенте происходит гомологичная рекомбинация между донорской ДНК и собственной ДНК реципиента.

Типы скрещивания:

3. Скрещивание $F' \times F^-$: *(есть рекомбинанты)*

происходит аналогично скрещиванию $F^+ \times F^-$ и реципиентная клетка превращается в донорную



События развиваются, как в предыдущем скрещивании

Постановка опыта скрещивания Hfr x F⁻ по передаче локусов Pro, Thr, Leu

В опыт берут:

- ✓ Донор-штамм с генотипом **Hfr** Pro⁺, Thr⁺, Leu⁺, чувствительный к стрептомицину
- ✓ Реципиент-штамм с генотипом **F⁻** Pro⁻, Thr⁻, Leu⁻, резистентный к стрептомицину
- ✓ Минимальный агар, содержащий стрептомицин

Последовательность действий:

1. В опытную пробирку вносят культуры донора и реципиента, инкубируют в течение 30 минут
2. Готовят разведения и высевают на селективную среду, инкубируют
3. Делают контрольные высевы культуры донорных и реципиентных клеток на чашки с селективной средой

Результаты опыта:

1. На контрольных чашках рост отсутствует (донор не может расти из-за чувствительности к антибиотику, реципиент – ауксотроф)
2. На опытной чашке вырастают рекомбинанты – прототрофы, устойчивые к стрептомицину

С помощью данного опыта можно определить **частоту рекомбинаций** – *отношение числа выросших рекомбинантов к числу участвующих в опыте реципиентных клеток.*

