



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 312. MIKROBIOLOGIJA

Laboratorinis darbas

DNR pernešimas transformacijos būdu. Bakterijų konjugacija

Mikroorganizmų genetika. DNR pernešimo tarp bakterijų būdai.

Prokariotai paprastai haploidai ir dažniausiai turi tik vieną chromosomą. Greit augančiose ląstelėse būna ir daugiau DNR kopijų: kadangi greit ląstelės dalijasi greičiau, nei replikuojasi DNR, tai replikacija paprastai inicijuojama iš anksto, prieš dalijantis ląstelėms ir laikinai susidaro daugiau nei viena DNR kopija ląstelėje.

Mikroorganizmų chromosoma paprastai yra žiedinė DNR molekulė. Taip pat yra ir plazmidžių – mažų žiedinių DNR molekulių. Kai kurios bakterijos turi ne žiedinę, o linijinę chromosominę DNR. *Borelia burgdoferi* bakterija, Laimo ligos sukėlėja, turi linijinę chromosomą. *Streptomyces lividans* chromosoma taip pat linijinė, galuose kovalentiškai prijungti baltymai.

E. coli bendras genomo dydis – apie 4600 tūkstančių bazių porų. Kompaktiškai supakuota DNR ląstelėje vadinama nukleoidu. Toje ląstelės vietoje nėra ribosomų, matomai todėl, kad nukleoido DNR egzistuoja panašioje į gelį būsenoje. Jei ištiestume *E. coli* chromosomą tai DNR ilgis būtų 1mm ilgio, tuo tarpu bakterijos ilgis tik 2-3µm. Taigi DNR turi būti kompaktiškai supakuota - superspiralizuota. Prie jų dar jungiasi struktūriniai baltymai, kurie daro DNR dar kompaktiškesnę. Archėjose chromosominė DNR supakuota kartu su baltymais, kurie primena eukariotų histonus.

Plazmidės būna kelių tūkstančių bazių porų dydžio, kai kurios kelių milijonų bazių porų dydžio dydžio. Chromosoma apibrėžiama kaip genetinis elementas, kuriame esantys genai dalyvauja metabolizmo procesuose, būtinuose visose augimo sąlygose. T.y. joje yra visi vadinamieji “namų ūkio” (angl. “housekeeping”) genai. Laikantis tokio apibrėžimo, galima laikyti, kad kai kurios bakterijos turi kelias chromosomas: *Rhodobacter spheroides*, *Brucella*, taip pat gali būti borelijos atveju, kuri turi linijinę chromosomą ir kelias žiedines ar linijines plazmides.

DNR pernešimo būdai

Pernešta į kitą organizmą (patekusi į ląstelę) DNR išlieka tik tuomet, kai ji gali replikuotis. DNR fragmentai, kurie gali replikuotis, bendrai vadinami replikonais. Kai į ląstelę patenka plazmidė, ji gali autonomiškai replikuotis ląstelės citoplazmoje. Kitas atvejis, kai DNR gali būti stabiliai paveldima – kai ji integruojasi į jau esantį replikoną. Tam reikalinga rekombinacija. Homologinės rekombinacijos metu introdukuota DNR gali pakeisti panašią seką, esančią replikone (pvz., bakterinėje chromosomoje).

Pagrindiniai DNR pernešimo būdai tarp prokariotų yra transformacija, konjugacija ir transdukcija.

Transformacija

Tai vienos DNR perdavimas iš donoro recipientui. Šiuo atveju recipientas paima DNR iš terpės, nereikalingas kontaktas su kita ląstele (su donoru). Kai kurie organizmai gali natūraliai transformuotis, taigi gali pasiimti DNR savo normalioje aplinkoje, kas gali turėti biologinių ir evoliucinių pasekmių. Genai, pvz., tie, kurie nulemia atsparumą antibiotikams, gali patekti pas patogeninius organizmus. Dauguma prokariotų gali būti dirbtinai transformuojami (pvz. *E.coli*), tai tapo svarbius įrankiu genetikai ir genų inžinerijai. Natūraliai transformuojasi *Bacillus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus*, ir *Neisseria*.

Natūrali transformacija dažnai priklauso nuo ląstelių augimo stadijos. Kai kuriuose organizmuose iš aplinkos patekusi DNR surišama specialių receptorių, esančių ląstelių paviršiuje, pagalba. Paprastai šie kamienai paima tik vieną DNR grandinę, o kita degraduojama. Tokiu būdu iš aplinkos gali patekti mobilūs genomo elementai arba genai, nulemiantys atsparumą vaistams. Dauguma natūraliai besitransformuojančių kamienų pasiima tik DNR, kurios sekos yra panašios į jų pačių DNR sekas.

Ląstelių sugebėjimas transformuotis, paimti svetimą DNR, vadinamas kompetentiškumu. Kaip aukščiau paminėta, kai kurioms mikroorganizmų rūšims ši savybė būdinga natūraliai visą laiką, kai

kurioms tam tikrų augimo periodų metu, tuo tarpu kitoms, pvz., *E.coli*, nebūdinga, bet gali būti indukuota dirbtinai. Ta plačiai naudojama genų inžinerijoje.

Konjugacija

Konjugacija – genetinės medžiagos pernešimas esant kontaktui tarp dviejų ląstelių. Tai pagrindinis būdas, kuriuo bakterijos keitėsi genetinė medžiaga evoliucijos eigoje. Taip pat taikomas genetiškai manipuliuojant prokariotais (mielėse ir kituose eukariotuose konjugacijos neaptikta).

Konjugacijai reikalingi du faktoriai. Pirma – DNR vieta, kur prasideda DNR pernešimas. Ji vadinama *oriT* arba *mob*. (nuo anglų kalbos “origin of transfer” arba “mobility”). Kitas faktorius – baltymai, kurie reikalingi pernešimui atlikti. Juos koduojantys genai vadinami *tra*. Šie genai dažnai būna plazmidėje.

F+ faktorius. F faktorius (F+) – tai konjugacinė plazmidė, jos dydis 100kb (tai apytiksliai 1% *E.coli* chromosomos dydžio). Ji koduoja apie 26 *tra* genus. Sumaišius kultūrą, turinčią šią plazmidę su kultūra be plazmidės, po kurio laiko, visos bakterijos turės F+ plazmides. Ląstelės su F+ (donoro ląstelės) perneša kai kuriuos *tra* baltymus į paviršių ir jie prijungia recipientų ląsteles. Šios paviršinės struktūros vadinamos piliais – tai ilgi polimerai su specifiniais baltymais viršūnėse, kurie prisijungia prie recipientų ląstelių. Susidarius kontaktui, pilis depolimerizuojamas donoro ląstelės paviršiuje, dėl ko abi ląstelės pritraukiamos viena prie kitos. Kiti *tra* baltymai suformuoja mažą porą tarp dviejų ląstelių. Dar kiti *tra* baltymai atpažįsta *oriT/mob* vietą F+ plazmidėje ir įkerpa DNR toje vietoje. DNA polimerazė pradeda kopijuoti vieną DNR grandį pradedant nuo įkirpimo (niko), atkurdamą dvigrandę DNR donoro plazmidėje, tuo tarpu kaip viengrandę DNR, pernešama per porą į recipiento ląstelę, kur susintetinama komplementari grandinė, o susidariusi dvigrandė molekulė recipiente recirkuliarizuojasi (vėl virsta žiedine - tai būtina, kad plazmidė vėliau galėtų replikuotis). Po konjugacijos tiek donoras tiek recipientas turi konjugacines plazmides.

Chromosomos pernešimas konjugacijos metu. F+ gali integruotis į chromosomą (kamienai vadinami **Hfr**). Tuomet *tra* baltymai vis vien sudarys ryšį tarp donoro ir recipiento ląstelių, įkirps DNR *oriT* vietoje ir pradės pernešimą. Šiuo atveju pernešama DNR bus nebe plazmidė, o visa bakterinė chromosoma. Šiuo atveju pernešamos DNR kiekis didelis, dėl to ji sunkiai recirkuliarizuojasi recipiente. Pernešimas vyksta ilgai, *E.coli* atveju apie 100 minučių, tik apie 1/1000 pernešimų pilnai pasibaigia.

Konjugacijos taikymas. *In vitro* patogų manipuluoti mažomis plazmidėmis, tuo tarpu konjugacinės plazmidės yra didelės (nes jose yra visi *tra* genai). Tačiau plazmidė gali būti pernešama konjugacijos metu net jeigu ji neturi *tra* genų, tik *oriT* vietą (keliasdešimt bazių porų dydžio). Taigi atliekant genų inžinerijos manipuliacijas, galima naudoti dvi plazmides: F+ su *tra*

genais ir mažą plazmidę su tiksliniais genais ir *oriT*. Konjugacijos metu pernešama viena ar abi plazmidės. Recipiento ląstelės, turinčios tikslinę plazmidę, atrenkamos pagal genetinį žymenį, pvz., atsparumo antibiotikams geną.

Yra ir kitų konjugacinių elementų – pvz., konjugaciniai transpozonai. Jie yra chromosomoje (kad galėtų būti perduoti iš kartos į kartą, jie turi būti replikone) ir juda iš vienos ląstelės į kitą konjugacijos būdu panašiai kaip HFr.

Transdukcija

Tai genų pernešimas viruso (fago) dalelės pagalba. Išeidamas iš infekuotos ląstelės virusas pasiima dalį šeimininko DNR, kurią gali pernešti š kitą šeimininką. Šiuo atveju nereikia kontakto tarp dviejų ląstelių. Transdukcija – vienas geriausių būdų pernešti DNR *E. coli* ir *Salmonella typhimurium*. Taip pat naudojama ir genų inžinerijoje.

1. dalis Bakterijų *E. coli* transformacija

Darbo metu naudojama plazmidė, turinti beta-laktamazės geną, koduojantį fermentą, kuris skaido penicilino tipo antibiotikų (beta-laktaminių antibiotikų) molekules. Turinčios šį geną bakterijos gali augti terpėje, kurioje yra ampicilino. Pagal tai galima atskirti ląsteles, į kurias transformacijos būdu pateko plazmidė. Plazmidėje taip pat yra replikacijos pradžios vieta *ori*, kuri būtina, kad plazmidė galėtų replikuotis ir beta galaktozidazės geno dalį. Galaktozidazė, esant terpėje substrato X-gal, gamina mėlynos spalvos junginį. Kada transformuojamos bakterijos, turinčios defektyvią galaktozidazę, plazmidėje esanti geno seka leidžia atsistatyti aktyviam fermentui (esant terpėje X-gal ir geno induktoriaus IPTG išauga mėlynos spalvos kolonijos).

Konstruojant plazmides, galaktozidazės genas naudojamas greitai transformantų atrankai. Naujas DNR fragmentas, perkirpus plazmidę įstatomas galaktozidazės sekos viduje. Šiuo atveju geno seka pažeidžiama, ir, transformavus tokia plazmide bakterijas, išaugs baltos transformantų kolonijos. Taip galima atskirti transformantus, į kuriuos pateko tik plazmidė (mėlynos kolonijos), nuo transformantų, į kuriuos pateko plazmidė su įterpta nauja seka.

Darbo priemonės:

37⁰C inkubatorius bakterijų auginimui

Laminarinis boksas steriliam sėjimui

Spiritinė lempelė

Mikrobiologinė kilpelė

Automatinės pipetės, sterilūs antgaliai

Stiklinis arba nerūdijančio plieno sklaidytuvas

Ledo vonelė

42⁰C vandeninis termostatas

Šaldoma centrifuga

Skysta LB terpė

Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe, turinčia ampicilino 50μg/ml

E. coli kompetentinė kultūra

Plazmidinė DNR (tirpalas)

Darbo eiga:

1. Į ependorf tipo mėgintuvėlius įpilti 100 - 200μl kompetentinės *bakterijų* kultūros (kamienas K12) ir įdėti 1 μg plazmidinės pUC 19 (ar kitos plazmidės turinčios beta laktamazės geną) DNR; į kontrolinį mėgintuvėlį DNR nededame; mėgintuvėlių turinį švelniai sumaišyti pipete;
2. laikyti ledo vonelėje 15 - 30min.;
3. temperatūrinis šokas: perkeliame mėgintuvėlius į 42⁰C termostatą; laikyti 2min (ne ilgiau);
4. mėginius atvėsinti ir užpilti 1ml sterilios skystos LB terpės;
5. inkubuoti 37⁰C temperatūroje 0,5 – 1 val.
6. Sukoncentruoti bakterijų ląsteles - centrifuguoti 1-2min., didžiąją supernatanto dalį nupilti, resuspenduoti ląsteles likusiame tūryje (apie 200μl)
7. išsėti bakterijas -įpilti bakterijų suspensiją į lėkštelės centrą ir sklaidome ją steriliu sklaidytuvu, kol lėkštelės paviršius praranda slidumą;
8. Inkubuoti 37⁰C termostate per naktį
9. Įvertinti rezultatus

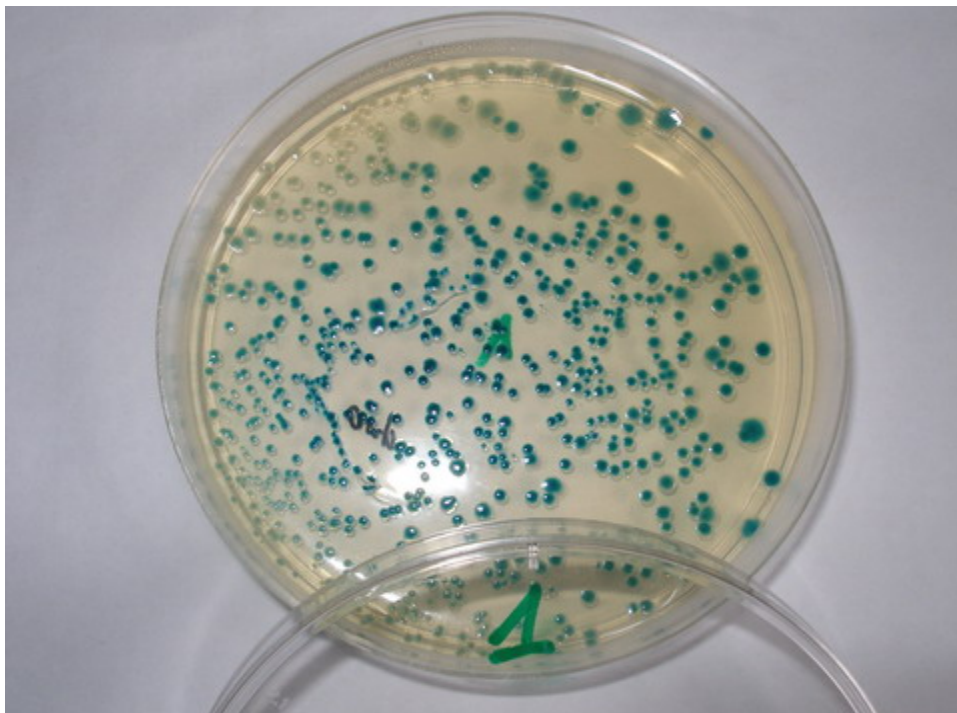
Pastabos: Jei atliekamas “baltų – mėlynų” kolonijų testas, prieš sėjant bakterijas lėkštelės paviršiuje reikia išsklaidyti paruoštus reagentų tirpalus - 35μl IPTG ir 70μl X-gal .

Reagentus reikia išsklaidyti tolygiai, kitaip pakraščiuose esančios kolonijos, net ir turėdamos aktyvią galaktozidazę, nenusidažys mėlynai (kaip matyti 1pav.)

Dirbant su atšaldyta bakterijų kultūra, reiktų stengti imti mėgintuvėlius tik už kraštų, kad jie nuo rankų nesušiltų;

Sėjant, nudeginus sklaidytuvą liepsnoje nepamiršti jį prieš sklaidant atvėsinti, kitaip dalis bakterijų žus nuo karščio;

1pav. *E. coli* transformantai



2pav. Ilgiau auginant bakterijas, aplink transformantų kolonijas pradeda augti kitos, neturinčių plazmidžių bakterijų kolonijos (nuotraukoje mažos baltos kolonijos)

