

Plasmidy a konjugace

.

Plasmidy – základní charakteristika

- DNA molekuly – extrachromosomální DNA
- Byly nalezeny ve všech baktériích
- 1000 až 10 000 bp i větší
- Nejčastěji kruhové dsDNA, u řady baktérií lineární
- V různém počtu kopií (1 až 100)
- Nesou geny, které kodují většinou neesenciální funkce
- Genové produkty bývají v určitých situacích baktériím přínosem, umožňují jim žít v rozličných ekologických nikách

Druhy plasmidů podle genů, které nesou

- R plasmidy (geny pro rezistenci k antibiotikům)
- F plasmidy (fertilní) (geny pro konjugaci)
- Col plasmidy (geny pro bakteriocin kolicin)
- Tol plasmidy (geny pro degradaci toluenu)
- Ti plasmidy (geny pro iniciaci tumoru u rostlin)
- Kryptické plasmidy (nesou žádné známé geny)

Názvosloví

- Obvykle písmeno p ... plasmid
- RB ... iniciály jména (Bolivar, Rodrigez)
- 322 ... pracovní číslo konstruovaného plasmidu
- pBR322
- Některé plasmidy mají původní označení např. F plasmid nebo RK2 plasmid *E.coli*

Příklady přirozeně se vyskytujících plasmidů u mikroorganismů

- .

Replikace plasmidů

- Nezávisle na chromosomu
- Jsou to samostatné replikony
- Mají počátek replikace ori
- Obvykle kódují protein nezbytný pro iniciaci replikace, ostatní proteiny kódují geny na chromosomu buňky

Geny ori oblasti

- Často determinují další vlastnosti plasmidu
- Hostitelské rozmezí
- Počet kopií
- Inkompatibilitu

Hostitelské rozmezí plasmidu

- Určuje druhy bakterií, ve kterých se plasmid může replikovat
- Plasmidy s ori oblastí ColE1 (pBR322, pET, pUC) mají úzké rozmezí hostitele (kmeny *E.coli*)
- Plasmidy s ori oblastí RK2 a RSF1010 mají široké rozmezí hostitele (G- bakterie, RSF1010 dokonce i v některé G+)
- Plasmidy G+ bakterií mívají široké rozmezí hostitele (pUB110)
- Většinou plasmidy izolované z G- bakterií se nereplikují v G+ bakteriích a naopak

Počet kopií plasmidu

- Je určován oblastí ori
- Relaxované plasmidy – plasmidy s vysokým počtem kopií - mají mechanismus, kterým inhibují iniciaci replikace, dosáhne-li počet kopií plasmidu určitého počtu (ColE1)
- Stringentní plasmidy – plasmidy s nízkým počtem kopií – mají mechanismus, který udržuje nízký počet plasmidů v buňce (F plasmid)

V jedné buňce

- může být více různých plasmidů
- jsou to plasmidy kompatibilní

Termín inkompatibilita

- Vyjadřuje, že dva plasmidy spolu nemohou existovat v jedné buňce

Plasmidy se dělí do inkompatibilitních skupin Inc

- Stabilně koexistující plasmidy patří do různých Inc skupin (např. plasmid RP4 patří do IncP, RSF1010 patří do IncQ a mohou koexistovat v 1 buňce naproti tomu RP4 a RK2 patří do IncP a nemůžou koexistovat v 1 buňce)

Inkompatibilní plasmidy

- Nemohou existovat v jedné buňce
- Mají stejný mechanismus kontroly replikace
- Nebo mají shodnou par funkci
- Par funkce zajišťuje rozdělování plasmidů do nově vzniklých buněk

Stanovení skupiny inkompatibility

- Zjišťuje se, zda je plasmid schopen koexistovat v buňce se známými plasmidy
- Po transformaci plasmidu do buňky se sleduje, zda buňka ztrácí marker, který plasmid nese
- Obvykle to bývá gen pro rezistenci na antibiotikum
- Nejprve je selektována kolonie rezistentní k oběma antibiotikům nesených na obou plasmidech
- Buňky jsou kultivovány bez ATB a vysévány na miskou s ATB
- Není-li % buněk, které ztratily jeden nebo druhý plasmid vyšší než % buněk, které ztratily oba plasmidy, patří plasmidy do různých Inc skupin a mohou koexistovat v jedné buňce

Stanovení rozmezí hostitele

- Nebývá přesně známé
- Po přenesení plasmidu do buňky (transformace, konjugace)
- Existují různé bariéry, které zabraňují přenosu plasmidů mezi jednotlivými druhy
- Bariéry většinou neznáme

Stanovení ori oblasti

- Nedá se použít klasických genetických postupů, protože bez ori oblasti se plasmid v buňce nemnoží
- Využívají se techniky rekombinantní DNA

Obr. Stanovení ori oblasti

- .

Replikace plasmidů otáčivou kružnicí

- Replikační vidlice postupuje jedním směrem po kružnici
- Kružnice otáčivá znamená model vyjadřující způsob replikace malých kružnicových molekul, podle kterého replikační vidlice opakovaně postupuje po kružnicové matici.
- Viz prof. Rosypal

Obr. Replikace plasmidů otáčivou kružnicí (Rosypal 2003)

- .