Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение
высшего образования «Оренбургский государственный университет»
Химико-биологический факультет
Кафедра биохимии и микробиологии

Методы создания компетентных клеток

Лабораторная работа №9
по «Генетике микроорганизмов»

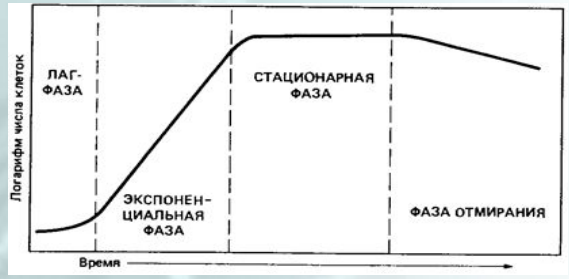
Давыдова Ольга Константиновна, к.б.н., доцент

План:

- Определение компетентности
  - Химические методы
  - Физические методы

Определение

- **Компетентностью** при генетической трансформации обычно называется способность бактериальных клеток адсорбировать и поглощать чужеродную ДНК.
- У многих видов бактерий компетентность возникает лишь на определенном этапе роста культуры.
- Например, культуры *стафилококков* находятся в стадии компетентности *в ранней логарифмической фазе роста*.
  Культуры бактерий *Bacillus subtilis* находятся в стадии компетентности
  на более *поздних этапах экспоненциального роста*,
- *гемофильные бактерии – в стационарной фазе роста*.
- У некоторых бактерий клетки компетентны *в любой фазе роста* (например, *у гонококков и менингококков*).
-



- Установлено, что в компетентных культурах стрептококков, гемофильных бактерий к трансформации способна почти каждая клетка. В то же время у *B. subtilis* в этих же условиях ДНК могут поглощать только 10–15 % клеток популяции, у *Aspergillus niger* – 0,1–0,2 %, у *Rhizobium japonicum* – до 0,1 % клеток всей популяции.

Определение

- В ряде научных лабораторий было показано, что состояние компетентности можно передать от компетентных клеток некомпетентным посредством фильтратов суспензий бактериальных культур, следовательно существует какой-то внеклеточный **фактор, обеспечивающий состояние компетентности**.

- Хотя естественная трансформация описана более чем у 50 видов бактерий, факторы компетентности известны лишь у стрептококков и бацилл. Возможно, что у некоторых видов они еще просто не обнаружены;

- однако можно считать установленным, что трансформация у таких хорошо изученных микроорганизмов, как гонококки и менингококки, осуществляется без факторов. Это вполне объяснимо, так как клетки гонококков и менингококков способны к трансформации в любой стадии роста культуры: компетентность является их постоянным свойством.

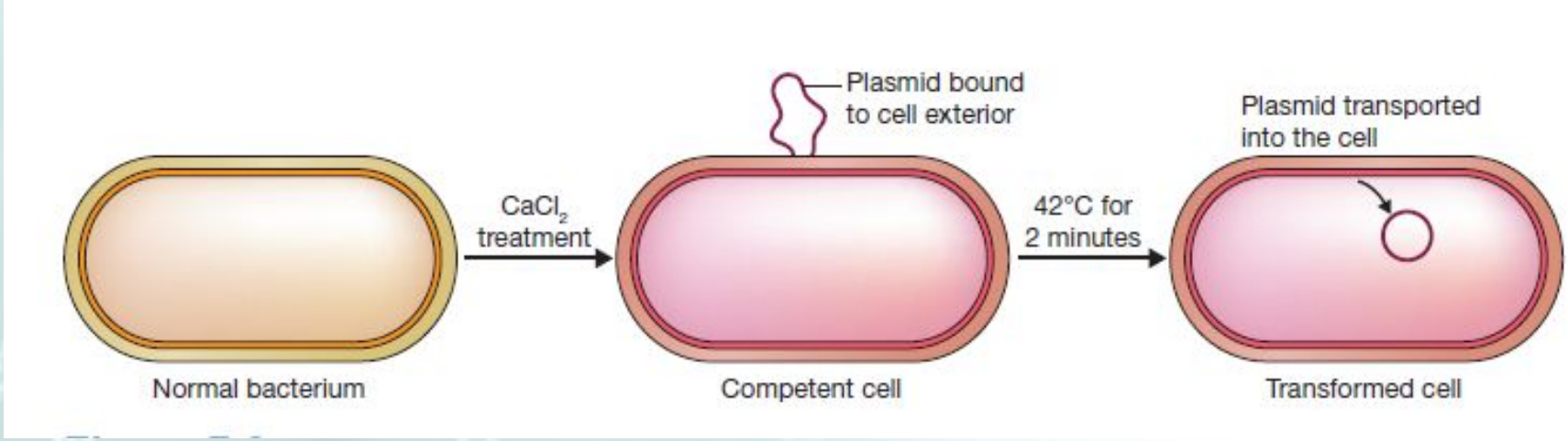
Определение

- **Компетентные** клетки у различных видов бактерий **отличаются от некомпетентных** не только способностью к поглощению ДНК, но и другими свойствами:
-

  • обладают сниженным уровнем метаболизма;
  • более устойчивы к пенициллину, чем остальные клетки в популяции;
  • сниженным темпом репликации ДНК или вообще ее отсутствием;
  • меньшими размерами, чем некомпетентные;
  • изменением наружных слоев, наличием обнаженных участков цитоплазматической мембраны;
  • повышенной чувствительностью к осмотическому шоку, тепловой обработке;
  • сниженным поверхностным зарядом.

- Однако существует много видов бактерий, у которых отсутствует естественная компетентность. Примером таких бактерий являются *E. coli,* бактерии рода *Erwinia* и другие, но несмотря на это, они также могут быть трансформированы.

Химические методы



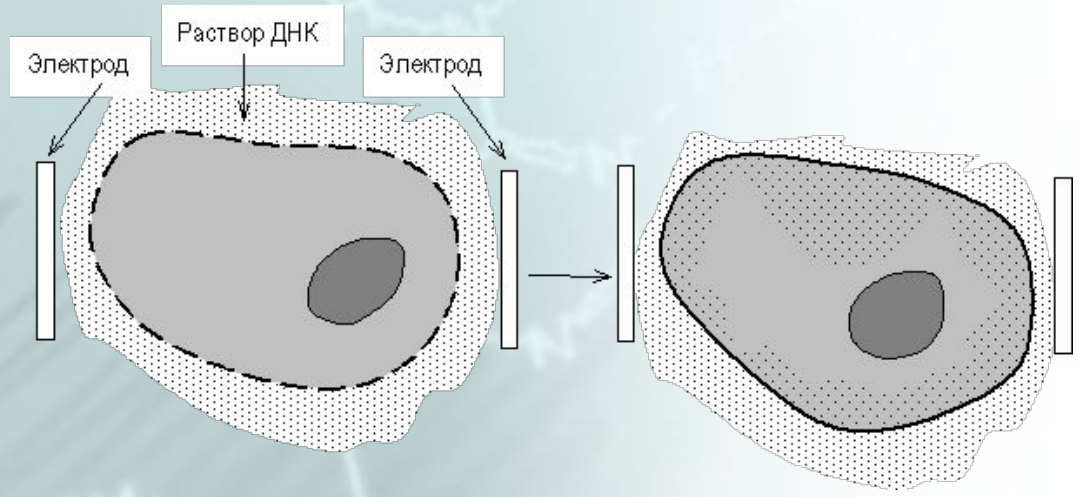
Клетки *E. coli* не обладают природной компетентностью. Однако ввиду важности этого организма для молекулярной генетики, были разработаны методы, позволяющие придавать им искусственную компетентность, выращивая клетки в специальных минимальных питательных средах, содержащих глюкозу в качестве источника углерода. Наибольшую известность приобрел метод индукции компетентности с помощью ионов кальция – **кальциевый метод**. Клетки бактерий выдерживают в присутствии ионов Ca2+ (50 мМ) при 0 ºС с последующим кратковременным тепловым воздействием при 37 ºС или 42 ºС. Эффективность трансформации повышается при совместном действии ионов Ca2+ с ионами Mg2+, Mn2+ или Rb+. Кроме того, эффективность трансформации повышается при увеличении времени инкубирования с ионами Ca2+, а также при добавлении диметилсульфоксида. Ионы Mg2+ необходимы для активации специфических нуклеаз, участвующих в захвате экзогенной ДНК.

Физические методы

- Широко используется также способ индукции компетентности за счет глубокого замораживания с последующим оттаиванием клеток. При этом осуществляется трансформация как хромосомной, так и плазмидной ДНК. Такой способ трансформации получил название **криотрансформации**. Чтобы получить трансформанты с помощью этого метода, смесь реципиентных клеток и ДНК донора в присутствии криопротектора (0,5 % раствора твина-80) замораживают (до –196 ºС), а затем отогревают при +42 ºС и высевают на селективные среды, позволяющие отобрать трансформанты.

Физические методы

- Механизмы индукции компетентности изучены недостаточно. Показано, что высокие концентрации ионов кальция и других щелочно-земельных металлов вызывают структурную реорганизацию клеточных мембран, а также плазмолиз. В мембранах обнаруживаются полиморфные структурные изменения, образуются участки соединения и слияния мембран. При этом усиливается мембранная проницаемость, увеличиваются размеры периплазматического пространства. В связи с этим предполагается, что ДНК поступает в цитоплазму за счет дефектов в мембранах, а также в участках их слияния.
Возможно, что аналогичные изменения возникают в клетках и под влиянием других воздействий, индуцирующих компетентность. Высказывается предположение, что в процессе замораживания-оттаивания молекулы ДНК поступают в цитоплазму путем диффузии через временные быстро репарируемые дефекты мембран.

Физические методы

- В последнее время трансформацию успешно осуществляют с помощью **электропорации**. Существуют специальные приборы – электропораторы, которые за счет кратковременного воздействия (обычно 5–20 мс) электрического поля высокой напряженности (1–15 кВ/см) на клеточную мембрану приводят к образованию в ней пор (электропробой).
Время существования и размер пор достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. Объем клетки при этом увеличивается. Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и клеток-реципиентов для каждой системы клеток подбирают экспериментально.