

MIROŚŁAWA WŁODARCZYK

Zakład Genetyki Bakterii

Instytut Mikrobiologii

Uniwersytet Warszawski

Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

e-mail: miraw@biol.uw.edu.pl

CO TO JEST PLAZMID?

U organizmów prokariotycznych (bakterii i archeonów) podstawowa informacja genetyczna zawarta jest zazwyczaj w jednej, dwuniciowej kuliście zamkniętej cząsteczce DNA stanowiącej tzw. chromosom. Wielkość chromosomu prokariotycznego mierzona liczbą tysięcy par zasad (kb) zawiera się w przedziale od niespełna 600 do blisko 10000 kb. U *Escherichia coli*, modelowego organizmu w badaniach genetycznych bakterii, wartość ta wynosi 4700 kb, co odpowiada długości $\sim 1400 \mu\text{m}$. W komórce chromosom jest upakowany w zwartą, lecz nieoblioną strukturę określaną mianem nukleoidu, funkcjonalnego odpo-

wiednika jądra (nukleus) eukariotycznego. Oprócz chromosomu, w bardzo wielu komórkach bakteryjnych występują dodatkowe elementy genetyczne – plazmidy. Plazmidy nie są niezbędne do życia komórki, gdyż wszystkie geny metabolizmu podstawowego (ang. house keeping genes) zlokalizowane są w chromosomie, tym niemniej posiadanie plazmidów znacznie zwiększa zasób informacji genetycznej gospodarza. Wielka różnorodność puli genów zlokalizowanych na plazmidach odgrywa znaczącą rolę w zdolnościach adaptacyjnych prokariotów i w ich ewolucji.

DEFINICJA

Plazmidy są to autonomiczne, pozachromosomowe elementy genetyczne występujące (zwykle w postaci kolistych lub rzadziej liniowych cząsteczek DNA) u bardzo wielu organizmów prokariotycznych oraz u niektórych eukariotów. Ich najbardziej charakterystyczną cechą jest fizyczna odrębność od chromosomu gospodarza oraz zdolność do trwałego utrzymywania się (ang. maintenance) w komórce i replikowania się w niej w kontrolowany sposób.

Czasem definicja plazmidu uzupełniana jest stwierdzeniem, że plazmid nie koduje funkcji, które byłyby niezbędne do życia komórki (w „normalnych” warunkach). Konsekwencją tego jest fakt, że usunięcie plazmidu z

komórki (tzw. wyleczenie, ang. curing) nie jest letalne dla komórki gospodarza.

Można też sformułować bardziej lakoniczną definicję: „Plazmidy są to samodzielne pozachromosomowe replikony”.

Termin „plazmid” został po raz pierwszy oficjalnie zaproponowany przez profesora Joshua Lederberga, pioniera badań genetycznych bakterii, w 1952 r. jako generyczna nazwa wszystkich znanych w tym czasie „pozachromosomowych cząstek genetycznych” (LEDERBERG 1952). Wbrew pozornej zgodności z podaną powyżej współczesną definicją, znaczenie terminu plazmid sformułowane przez Lederberga było znacznie szersze, gdyż obejmowało tak różne „cząstki genetyczne” jak pa-

sożyty, symbionty, organelle, wirusy, episomy itp. i miało na celu zasygnalizowanie, że jądro komórkowe nie jest wyłącznym „magazynem” informacji genetycznej, może ona bowiem być w różnej formie zlokalizowana także w cytoplazmie. W obecnym znaczeniu termin plazmid zaczął być używany niemal 10 lat później. Pewne swe przemyślenia dotyczące postępu

badania nad plazmidami, które już w 1978 r. owocowały powstaniem wysoce specjalistycznego czasopisma „Plasmid”, a w ostatniej dekadzie publikowaniem rocznie około 3000 prac dotyczących problematyki plazmidowej, przedstawił Lederberg w rocznicowym (45 lat od użycia terminu „plasmid”) artykule (LEDERBERG 1997).

ODKRYCIE I POCZĄTEK BIOLOGII PLAZMIDÓW

Pierwszym czynnikiem genetycznym spełniającym kryteria współczesnej definicji plazmidów był tzw. czynnik F. Odkryty został on na przełomie lat 40. i 50. ubiegłego wieku. podczas badań nad rekombinacją u *Escherichia coli* K12. Nazwa czynnik F pochodzi od angielskiego terminu Fertility – płodność, gdyż posiadanie przez komórkę takiego czynnika warunkowało jej płodność, rozumianą jako zdolność do jednokierunkowego przekazywania materiału genetycznego podczas bezpośredniego kontaktu z inną komórką. O istnieniu czynnika płodności wnioskowano wtedy wyłącznie na podstawie eksperymentów z zakresu klasycznej analizy genetycznej. To, że czynnik F zbudowany jest z DNA i występuje w formie wolnej w cytoplazmie komórki wykazano 10 lat później. Wykorzystano tu metodę ultrawirowania w gradiencie gęstości chlorku cezu (MARMUR i współaut. 1961), która ujawniła pojawianie się w *Serratia marcescens* (której chromosom zawiera 58% par GC), po koniugacji z *E. coli* (F⁺), dodatkowej frakcji DNA o zawartości par GC = 50%, czyli charakterystycznej dla DNA *E. coli*. Faktem, który zainicjował postęp badań nad plazmidami i przeniósł je z poziomu analizy pewnego rodzaju ciekawostki naukowej do sfery badań mających bezpośrednie znaczenie dla zdrowia człowieka, było odkrycie, że czynniki genetyczne odpowiedzialne za gwałtowne rozprzestrzenianie się tzw. wielorakiej oporności na antybiotyki w czasie epidemii czerwonki w Japonii w końcu lat 50. ubiegłego wieku wykazują, istotne podobieństwo do czynnika F. Pierwszym opisanym plazmidem z grupy plazmidów opornościowych „R” (ang. Resistance), był plazmid NR1 (znany także jako R100 i R222) izolowany z *Shigella flexneri* strain 222/CTS, warunkujący oporność na chloramfenikol, tetracyklinę i streptomycynę (MITSUHASHI i współaut. 1960). Obecnie, plazmidy typu R są najliczniejszą grupą spośród wszystkich opisanych. Na początku lat

70. zidentyfikowano pierwsze plazmidy kataboliczne (TOL, CAM, OCT itp.). Wczesne lata 70. to także okres, w którym z wykorzystaniem naturalnych plazmidów, wykonano pionierskie eksperymenty będące podstawą rozwoju techniki zwanej inżynierią genetyczną. Pierwszym takim eksperymentem, przeprowadzonym w Stanford University przez grupę badawczą Stanleya Cohena, było wstawienie fragmentu genu kodującego oporność na kanamycynę do małego plazmidu pSC101 niosącego cechę oporności na tetracyklinę (COHEN i współaut. 1973).

Od tego czasu badania nad plazmidami potoczyły się dwiema drogami. Pierwsza to tzw. biologia plazmidów, a więc obszar badań, w którym plazmid jako taki stanowi przedmiot badań; analizowana jest struktura cząsteczki, wszelkie mechanizmy stanowiące o jego stabilnym utrzymywaniu się w populacji bakterii (ang. maintenance functions), analiza funkcji fenotypowych kodowanych przez geny obecne w naturalnych plazmidach, mechanizmy przekazywania plazmidów w obrębie gatunku oraz między gatunkami bakterii, znaczenie tego procesu w ogólnie ujmowanym procesie horizontalnego transferu genów, ewolucja plazmidów itp. Typowym przykładem potraktowania plazmidu jako fascynującego obiektu biologicznego może być książka Davida Summersa, w której nie pada ani razu termin „wektor” (SUMMERS 1996). Drugi sposób spojrzenia na plazmidy to spojrzenie czysto instrumentalne – plazmid jako doskonałe narzędzie inżynierii genetycznej, czyli zespołu nowoczesnych technik biologii molekularnej umożliwiających przeprowadzanie rekombinacji genetycznej genami *in vitro* (lub jak określają to niektórzy: celowe manipulowanie genami *in vitro*). Cząsteczki plazmidów stały się istotnie podstawą konstrukcji doskonałych i różnorodnych wektorów do klonowania genów, jest to prawda niepodważalna, lecz niewątpliwie na-

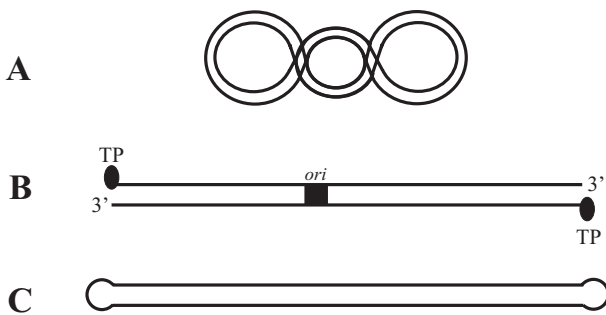
tura nie „stworzyła” plazmidów z takim zamysłem. W przedstawianym czytelnikom opracowaniu podejmujemy próbę zaprezentowa-

nia obu zasygnalizowanych aspektów badań nad plazmidami.

STRUKTURA CZĄSTECZKI PLAZMIDOWEJ

Większość plazmidów to koliste cząsteczki dwuniciowego DNA tworzące strukturę tzw. CCC-DNA (ang. covalently closed circle), która wykazuje negatywne superskręcenie (wyjątkiem są plazmidy izolowane z hipertermofilnych Archaea, u których udokumentowano pozytywne superskręcenie cząsteczek DNA plazmidowego, co jak się wydaje jest jednym z elementów ich przystosowania do funkcjonowania w temperaturach powyżej 100°C). Przez wiele lat sądzono, że wszystkie plazmidy bakteryjne występują w formie CCC-DNA (Ryc. 1A), co powodowało, że ta cecha struktury cząstecz-

stępujący na przykład u *Streptomyces*, jest to „prawdziwa” liniowa cząsteczka dwuniciowego DNA (posiadająca wolne końce), której cechą charakterystyczną jest obecność białek terminalnych (TP) połączonych z końcem 5’-łańcucha DNA (Ryc. 1B). Białka te chronią DNA przed atakiem komórkowych 5’-egzonukleaz, a czasem, podobnie jak u adenowirusów, mogą pełnić rolę startera w replikacji cząsteczki DNA. Wszystkie plazmidy tej grupy posiadają także długie terminalne powtórzenia. Drugi typ, zwany typem „szpilki do włosów” (ang. hairpin loop) to cząsteczki widoczne w mikroskopie elektronowym jako struktury liniowe, lecz których końce są kowalencyjnie połączone. Przykładem może być 16 kb liniowy plazmid z *Borrelia burgdorferi* (HINNEBUSCH i BARBOUR 1991). Plazmid ten to jeden polinukleotydowy łańcuch, który jest komplementarny na całej swej długości, z wyjątkiem krótkich naprzeciwległych odcinków, w wyniku czego powstają jednoniciowe pętle (Ryc. 1C)) na końcach płaskiej liniowej dwuniciowej struktury (stąd nazwa „hairpin loop”). Taki plazmid po denaturacji tworzy jedną jednoniciową kolistą cząsteczkę.



Ryc. 1. Formy strukturalne naturalnych plazmidów bakteryjnych.

A – Plazmid kolisty w formie CCC-DNA (kowalently zamkniętego koła). B – Plazmid liniowy; TP – białka terminalne, *ori* – punkt startu replikacji. C – Plazmid liniowy typu „hairpin loop”

ki plazmidu była (i czasem wciąż jest) umieszczana w jego definicji. Takiemu pogładowi sprzyjało powszechne stosowanie do izolacji i oczyszczania plazmidów metod preferujących tę formę strukturalną DNA (patrz następny rozdział). Nie wszystkie jednak plazmidy są koliste, pierwsze liniowe plazmidy wykryto na początku lat 80. u drożdży *Kluyveromyces lactis*, a wkrótce także u bakterii, np. u przedstawicieli rodzajów *Streptomyces*, *Borrelia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* (MEINHARDT i współaut. 1997). Wśród plazmidów liniowych wyróżniamy dwa typy strukturalne. Pierwszy z nich, wy-

W literaturze spotykany jest czasem termin „plazmidy jednoniciowe”. Należy wyjaśnić, że plazmidy jednoniciowe, to nie jest kolejna naturalna forma strukturalna plazmidów. Termin ten odnosi się do pośredniej formy replikacyjnej występującej w szlaku replikacyjnym plazmidów bakterii Gram-dodatnich replikujących się według mechanizmu „toczącego się koła” (ang. rolling circle replication, RCR). Przy pewnych zaburzeniach procesu replikacji może następować nagromadzenie się tych jednoniciowych kolistych form w komórce do ilości wykrywalnej metodami fizykochemicznymi. Z kolei, widoczne czasem w preparatach mikroskopii elektronowej lub w obrazach elektroforetycznych, formy OC i liniowe towarzyszące klasycznej postaci CCC-DNA, są najczęściej wynikiem przekształceń formy CCC w wyniku zerwania (pęknięcia) jednego lub dwóch naprzeciwległych wiązań fosfodwuestrowych w cząsteczce kolistej.

WIELKOŚĆ

Wielkość plazmidów jest bardzo zróżnicowana i zawiera się w granicach od około 1000 par zasad (1 kb) do nawet około 1700 kb. Najmniejsze plazmidy, o wielkości nieznacznie przekraczającej 1 kb, zidentyfikowano w *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma* sp. i *Helicobacter pylori* (kompletne sekwencje tych plazmidów znajdują się w bazie danych NCBI). Z kolei plazmidy o górnej granicy podanej wielkości, zwane megaplazmidami, zostały zidentyfikowane wśród przedstawicieli *Rhizobium* i są to często plazmidy odpowiedzialne za proces symbiotycznego wiązania azotu (pSym) przez gospodarza (BANFALVI i współaut. 1981). Wielu badaczy mianem megaplazmidów określa także plazmidy o wielkości poniżej 1 Mb (1000 kb), nawet już plazmidy o wielkości 150–200 kb (0,15–0,2 Mb), czyli po prostu bardzo duże.

Dolna wartość wielkości plazmidu wyznaczana jest minimalną ilością informacji genetycznej potrzebnej do kodowania funkcji absolutnie niezbędnych do jego powielenia (replikacji), nie pozostawiając praktycznie miejsca na kodowanie żadnych dodatkowych cech fenotypowych. W takiej sytuacji mielibyśmy do czynienia z tzw. „prawdziwym” plazmidem kryptycznym. Z kolei górna granica wielkości

plazmidu może przekraczać nawet wielkość chromosomów niektórych bakterii (np. chromosom *Mycoplasma genitalium* ma 580 kb, *Helicobacter pylori* 1600 kb). Sama tylko wielkość cząsteczki DNA nie może więc być parametrem rozróżniającym pomiędzy plazmidem a chromosomem. Z reguły duże plazmidy to te, które niosą geny warunkujące złożone procesy fizjologiczne (np. zdolność do koniugacji), skomplikowane szlaki metaboliczne (plazmidy kataboliczne, np. pWW0) lub oporność na kilka antybiotyków i innych substancji antybakteryjnych (np. plazmid NR1, RK2). Znając wielkość plazmidu łatwo jest w przybliżeniu oszacować ile średniej wielkości białek może być kodowanych przez jego genom, czyli określić tzw. teoretyczną pojemność kodującą plazmidu (przyjmujemy, że gen kodujący średniej wielkości białko, ~30 kDa, zajmuje 1 kb). Takie szacunki dają nam wyobrażenie jaki procent całkowitej, niesionej przez komórkę informacji genetycznej, „przypada” na informację niesioną przez plazmid. Wartość ta dla modelowego układu: komórka *E. coli* niosąca plazmid F (czyli szczep F⁺) wynosi ~2%, ale może osiągać wartości nawet do kilkudziesięciu procent w przypadku bardzo dużych lub wielokopio- wych plazmidów.

NAZEWNICTWO

Zanim opracowano metody wykazywania fizycznej obecności DNA plazmidowego w komórkach (patrz następny rozdział), o obecności plazmidów wnioskowano na podstawie cech fenotypowych, jakie ich obecność nadawała komórkom gospodarza. Konsekwencją tego było nazywanie plazmidów w oparciu o te właśnie cechy. I tak, jak już wspomniałam, nazwa plazmidu F pochodzi od cechy płodności (ang. fertility), która zależy od jego obecności w komórce *E. coli*. Plazmidy niosące geny oporności na antybiotyki, to plazmidy R. Dla pierwszego z nich przyjęto nazwę NR1 (pierwszy plazmid R opisano w National Institute of Health w Japonii), kolejne obok oznaczenia R zyskiwały dodatkowo numery lub symbole literowe. Plazmidy degradacyjne (kataboliczne) TOL, CAM, OCT itp. oznaczono symbolami informującymi jakie substancje są degradowane pod kontrolą tychże plazmidów (odpowiednio: TOLuen, CAMphor, OCTane). Plazmidy odpowiedzialne za produkcję koli-

cyn przez *Escherichia coli* to grupa plazmidów Col (ColE1, ColIb, ColIV itd.). W miarę lawinowego zwiększania się liczby nowoodkrywanych (a potem także konstruowanych *in vitro*) plazmidów, tego typu nazewnictwo stało się mało przejrzyste i wprowadzające szereg nieporozumień. W związku z tym zaproponowano standaryzację nazewnictwa plazmidów, której zasady opublikowano w 1976 r. (NOVICK i współaut. 1976). Od tego czasu plazmidy winny być oznaczane symbolami i numerami, podobnie jak szczepy bakteryjne, a wybrany symbol winien być poprzedzony prefiksem „p” – od plazmid. Zwykle symbole literowe pochodziły od nazwisk odkrywców. I tak np. pBR322 – plazmid skonstruowany przez Bolivara i Rodrigueza jako 322 plazmid w ich kolekcji, po wprowadzeniu do niego genu oporności na chloramfenikol zyskał oznaczenie pBR325. Znany powszechnie mały plazmid opornościowy z kolekcji Stanleya Cohena nosi nazwę pSC101, z kolei seria plazmi-

dów pUB pochodzi z laboratorium University of Bristol. Te zasady nazewnictwa plazmidów zostały zaakceptowane i weszły do powszechnego użycia, jednak wiele utrwalonych tradycją nazw pozostało niezmiennych (F, ColE1, RK2 itp.). Prawdopodobnie niewielu badaczy (zwłaszcza młodych) zajmujących się plazmidami pamięta, że w 1977 r. założony został centralny ośrodek rejestrujący i wydający certyfikaty legalności używania wybranych symboli plazmidów, po ustaleniu, że nie zostały one dotychczas wykorzystane przez inną osobę. Ośrodek „The Plasmid Reference Center

(PRC)” funkcjonował przy Stanford University, a był prowadzony przez żonę profesora Lederberga – Esther Lederberg. Okresowo publikowane były bieżące listy „Plasmid Prefix Designations Registered by PRC” (LEDERBERG 1986). O ile wiem, zwyczaj rejestracji oznaczeń plazmidów został jakiś czas temu zarzucony, dlatego przed użyciem wybranego przez siebie oznaczenia plazmidu w oficjalnej publikacji warto sprawdzić w odpowiednich bazach danych, czy nie powielamy użytego wcześniej symbolu, aby uniknąć mogących wyniknąć z tego nieporozumień.

KLASYFIKACJA

W miarę odkrywania coraz to większej liczby plazmidów i opisywania niezwykle różnorodności funkcji przez nie kodowanych pojawiła się naturalna w biologii potrzeba opracowania systemu ich klasyfikacji. Pierwsze systemy klasyfikacji plazmidów oparte były o fenotypy komórek gospodarza, które zależały od obecności określonego plazmidu (lub grupy plazmidów). Wyróżniono więc np. plazmidy „koniugacyjne” (plazmid F), warunkujące oporność na antybiotyki (NR1, RK2), bakteriocynogenne (ColE1), degradacyjne (TOL), symbiotyczne (pSYM) itd. Klasyfikacja taka, aczkolwiek dla pewnych celów użyteczna, ma szereg niedogodności, z których na pierwszym miejscu należy podkreślić, że jest to klasyfikacja wykluczająca (lub zachodząca), gdyż według niej wiele plazmidów należałoby włączyć do dwóch lub nawet trzech grup (np. plazmidy R1 czy RK2 to plazmidy opornościowe, ale także koniugacyjne). Powstała próba opracowania schematu klasyfikacji opartego o cechę, która byłaby unikatowa dla każdej wyróżnionej grupy. Po poznaniu zjawiska niezgodności plazmi-

dów, które definiujemy jako niemożność współistnienia dwóch plazmidów w jednej linii komórkowej, tę właśnie cechę odzwierciedlającą stopień pokrewieństwa systemów replikacyjnych plazmidów, przyjęto za podstawę klasyfikacji. Pionierskie próby takiej klasyfikacji podjęła Naomi Datta już we wczesnych latach 70., a podsumowuje je praca z 1979 r. (DATTA 1979). Wtedy system kwalifikowania plazmidu do odpowiedniej grupy niezgodności (Inc) prowadzono metodami genetyki klasycznej, co było procedurą dość żmudną. Nowoczesny, wprowadzony przed kilkunastu laty system tzw. typowania replikowanego, oparty na stwierdzaniu homologii (lub jej braku) między replikonami przy użyciu technik hybrydizacji DNA, z wykorzystaniem odpowiednich specyficznych sond molekularnych reprezentujących różne grupy niezgodności, pozwolił na znaczny postęp w klasyfikacji plazmidów. Najpełniejszy system tego typu klasyfikacji, wyróżniający około 30 grup niezgodności, stworzono dla plazmidów z Enterobacteriaceae (COUTURIER i współaut. 1988).

METODY IDENTYFIKACJI PLAZMIDÓW

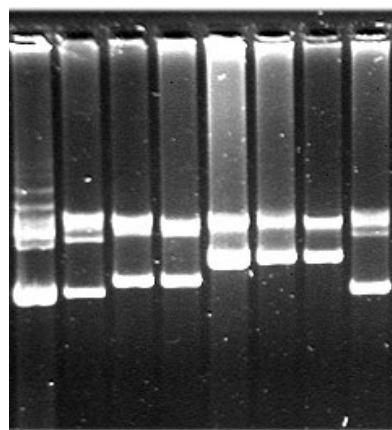
Zwięzłe omówienie tego zagadnienia nie jest proste, a nie jest moją intencją przedstawianie przeglądu technik eksperymentalnych do tego celu wykorzystywanych. Najogólniej mówiąc, o obecności plazmidu(ów) w komórce bakteryjnej możemy wnioskować pośrednio, na podstawie cechy fenotypowej gospodarza zależnej od potencjalnej obecności plazmidu lub na podstawie bezpośredniego wykazania (metodami fizykochemicznymi) obecności DNA plazmidowego w komórce. W pierwszym

przypadku dążymy do udowodnienia korelacji pomiędzy jakąś konkretną właściwością fizjologiczną badanych bakterii a potencjalną obecnością pozachromosomowego czynnika tę cechę warunkującą. Klasyczny przykład (dzięki któremu odkryto plazmid F, a także pierwsze plazmidy opornościowe, R) to analiza kinetyki rozprzestrzeniania się analizowanej cechy w populacji komórek. Cechy o plazmidowej lokalizacji (przy założeniu, że mamy doczynienia z plazmidem koniugacyjnym) będą rozprze-

strzeniały się w populacji z częstością znacznie wyższą niż cechy, których determinanty genetyczne zlokalizowane są w chromosomie. Inną drogą jest poddanie hodowli komórek o interesującym nas fenotypie działaniu czynnika usuwającego plazmidy z komórki (ang. curing) i poszukiwanie klonów, które utraciły badaną cechę fenotypową. Wśród mikrobiologów środowiskowych popularna staje się metoda identyfikacji plazmidów zwana „izolacją egzogenną” (SMALLA i współaut. 2000). Metoda ta jest cenna z tego powodu, że pozwala na wykrywanie plazmidów w bakteriach pochodzących z naturalnego środowiska bez potrzeby otrzymania ich hodowli; można ją więc stosować nawet w odniesieniu do tzw. bakterii niehodowalnych (ang. unculturable). Ograniczeniem metody egzogennej izolacji jest natomiast możliwość wykrywania tylko plazmidów zdolnych do transferu koniugacyjnego i niosących przydatny do selekcji marker. Polega ona na przeprowadzeniu eksperymentu koniugacji, w którym biorcą jest dobrze scharakteryzowany laboratoryjny szczep bakteryjny, natomiast „dawca” to próbka pobrana ze środowiska, w której mogą znajdować się różne bakterie, także takie, które niosą plazmid warunkujący cechę wykorzystywaną do selekcji transkoniugantów. Jeżeli w wyniku takiego eksperymentu uzyskamy biorcę „wzbogaconego” o dodatkową, wybraną cechę fenotypową, to mamy podstawę do wnioskowania, że związana jest ona z nabyciem drogą koniugacji plazmidu pochodzącego z zewnątrz (stad nazwa techniki „egzogenna”), od bliżej nieokreślonego dawcy. Plazmid taki znajduje się teraz w znanym nam gospodarzu, co umożliwi jego dalszą analizę, otrzymanie w czystej postaci i standardową charakterystykę (patrz następny rozdział).

Wykrywanie plazmidów poprzez stwierdzenie fizycznej obecności DNA plazmidowego w puli totalnego DNA komórkowego następuje w kilku etapach, z których każdy może być realizowany wieloma sposobami. Pierwszy etap to łagodna liza hodowli bakteryjnej w wyniku której otrzymujemy tzw. surowy lizat, z którego następnie usuwamy możliwie dużo DNA chromosomowego, aby DNA plazmidowy, stanowiący zwykle niewielki procent całkowitego DNA był łatwiejszy do uwidocznienia. Większość obecnie stosowanych metod opiera się na klasycznej metodzie tzw. lizy alkalicznej (BIRNBOIM i DOLY 1979), w której krytycznym momentem jest przeprowadzenie

lizy komórek przy użyciu lizozymu i SDS-u przy pH 12,5. W tym etapie następuje także fragmentacja i denaturacja DNA chromosomowego, podczas gdy znacznie mniejsze cząsteczki DNA plazmidowego zachowują swą strukturę i po zwirowaniu masy DNA chromosomowego i pozostałych elementów wielkocząsteczkowych mogą być odzyskane z supernatantu. Powszechnie stosowana do celów identyfikacyjnych jest wersja powyższej metody zwana potocznie „mini-lizą alkaliczną”. Analizujemy wtedy niewielką objętość hodowli (1,5 ml), a analizę lizatu, po wstępnym oczyszczeniu, prowadzimy metodą elektroforezy w żelu agarozowym, która pozwala nam uwidocznić obecne w lizacie plazmidy, a także określić ich liczbę i przybliżoną wielkość (Ryc. 2). Głównym ograniczeniem tej metody jest jej przydatność do



Ryc. 2. Wyniki analizy elektroforetycznej w żelu agarozowym lizatów kilku szczepów bakterii niosących plazmidy różnej wielkości

identyfikacji jedynie niezbyt dużych plazmidów kolistych (takich jednak jest większość). Duże plazmidy (ponad 100 kb) mogą nie być w tych warunkach wykrywane, gdyż podczas preparatyki ulegają łatwo mechanicznemu uszkodzeniu, a ich DNA przechodzi do frakcji DNA liniowego. Identyfikacja dużych plazmidów możliwa jest przy zastosowaniu metod, w których liza komórek przeprowadzana jest bezpośrednio w żelu agarozowym, co minimalizuje niekontrolowane uszkodzanie ich cząstek (ECKHARDT 1978) lub przy zastosowaniu analizy elektroforetycznej typu PFGE (ang. pulsed field gel electrophoresis), przystosowanej do analizy dużych cząstek DNA. Także plazmidy liniowe nie są w warunkach lizy alkalicznej wykrywane, gdyż ulegają, podobnie jak liniowe fragmenty chromosomu, nieodwracalnej denaturacji. W przypadku plazmidów linio-

wych wymagane jest przeprowadzanie preparatyki w warunkach neutralnych (niedenaturujących).

Opisana metoda pozwala identyfikować także plazmidy kryptyczne, czyli takie, które nie niosą innych, poza zdolnością do własnej replikacji, rozpoznanych cech fenotypowych. Obecnie wiele firm biotechnologicznych ofe-

ruje gotowe zestawy do izolacji DNA plazmidowego; zwykle opierają się one na klasycznej metodzie lizy alkalicznej, lecz dzięki zastosowaniu różnego typu ułatwień technicznych, znacznie upraszczają i przyspieszają procedurę, a także dostarczają preparat DNA plazmidowego o wysokim stopniu czystości.

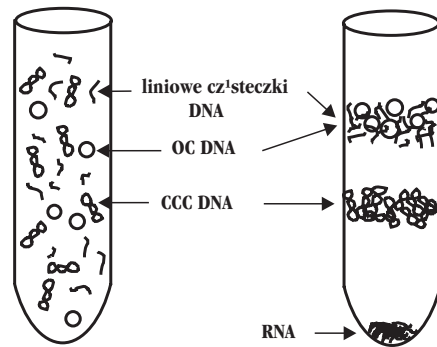
PREPARATYWNA IZOLACJA DNA PLAZMIDOWEGO I SCHEMAT STANDARDOWEJ CHARAKTERYSTYKI PLAZMIDU

Techniki służące do wykrycia plazmidu w bakteriach poprzez wykazanie fizycznej obecności jego DNA w komórkach gospodarza mogą być wykorzystane także do preparatyki DNA plazmidowego. Aby jednak preparat taki charakteryzował się stopniem czystości odpowiednim do przeprowadzania jego dalszej charakterystyki molekularnej, należy zastosować procedury usuwające z preparatu pozostałości DNA chromosomowego, towarzyszące białka, RNA, potencjalne inhibitory reakcji enzymatycznych itp. Technika powszechnie stosowaną do otrzymywania dużych ilości czystego DNA plazmidowego była przez lata procedura ultrawierowania w gradiencie gęstości chlorku cezu z bromkiem etydyny, w której separacja DNA plazmidowego od chromosomowego opiera się na zróżnicowanym stopniu inkorporacji bromu etydyny (CsCl+EtBr) przez koliste plazmidowe formy, formy OC i liniowe chromosomowe (po celowej fragmentacji natywnych chromosomów) cząsteczki DNA, co prowadzi do zróżnicowania ich gęstości pławnej umożliwiającej rozdział w gradiencie (Ryc. 3). Obecnie, opisana technika ultrawierowania jako dość pracochłonna, długotrwała i droga, ustępuje w popularności stosowaniu korzystaniu z licznych komercyjnych zestawów do oczyszczania DNA.

Niezależnie od wybranej metody oczyszczania DNA plazmidowego należy uwzględnić fakt, że jeżeli chcemy otrzymać czysty preparat DNA jednego tylko plazmidu musimy być pewni, że materiał (klon bakterii) użyty do preparatyki DNA zawiera tylko ten jeden plazmid. Gdy wstępna analiza (np. obraz elektroforetyczny lizatu) wskazuje na obecność więcej niż jednego plazmidu, należy każdy z nich (lub ten nas interesujący) przenieść z naturalnego gospodarza (odpowiednimi metodami, których omawianie przekracza zakres tego opracowania) do wybranego szczepu bezplazmidowego i taki klon użyć do preparatyki DNA interesującego

nas plazmidu. Szczególnie trudne jest otrzymanie czystego preparatu DNA plazmidów liniowych; jedna z możliwości to reizolacja takiego plazmidu z odpowiedniego prążka DNA uwiocznionego w żelu agarozowym po elektroforezie.

Dysponując czystym preparatem DNA plazmidowego możemy zaplanować zgodną z naszymi potrzebami jego dalszą charakterystykę. Jest jednak kilka elementów charakterystyki,



Przed wirowaniem

Po wirowaniu

Ryc. 3. Oczyszczanie DNA plazmidowego metodą ultrawierowania w gradiencie chlorku cezu z bromkiem etydyny.

Próbka przed wirowaniem zawiera mieszaninę różnych form DNA, resztki RNA i białek w roztworze CsCl+EtBr. Po wirowaniu (typowe warunki: 48 godz., 40 tys. obr/min) następuje rozdzielenie formy CCC-DNA od pozostałych

których przeprowadzenie zalecane jest w standardowej analizie każdego plazmidu.

WIELKOŚĆ PLAZMIDU

Określić ją możemy poprzez: (i) porównanie tempa migracji w żelu agarozowym naturalnej formy badanego plazmidu z tempem migracji wzorcowych plazmidów o znanej wielkości,

(ii) zsumowanie wielkości liniowych fragmentów restrykcyjnych otrzymanych po trawieniu DNA plazmidu jednym lub kilkoma enzymami restrykcyjnymi, (iii) zmierzenie tzw. długości konturowej plazmidu z użyciem mikroskopii elektronowej i przyrównanie do obecnej w tym samym preparacie cząsteczki DNA o znanej długości, (iv) zsekwencjonowanie całej cząsteczki DNA plazmidu. Ostatnią metodą uzyskujemy najdokładniejszy wynik, jednak niezbyt często kompletne sekwencjonowanie jest uzasadnione na etapie wstępnej charakterystyki plazmidu.

ANALIZA RESTRYKCYJNA

Przeprowadzając analizę restrykcyjną DNA plazmidowego z wykorzystaniem kilku enzymów restrykcyjnych możemy skonstruować mapę restrykcyjną, będącą unikatowym opisem tegoż plazmidu. Mapa taka jest niezmiernie przydatna w planowaniu bardziej szczegółowej analizy molekularnej plazmidu (np. w identyfikacji modułów strukturalnych i funkcjonalnych).

TYPOWANIE REPLIKONOWE

Dzięki wykorzystaniu techniki hybrydyzacji z charakterystycznymi dla różnych grup niezgodnościowych znakowanymi sondami replikonowymi możemy potwierdzić lub wykluczyć przynależność badanego plazmidu do określonej grupy niezgodności (Inc), otrzymując jednocześnie cenne informacje dotyczące typu jego systemu replikacyjnego.

IDENTYFIKACJA MINIMALNEGO REPLIKONU

Celem takiej analizy jest zidentyfikowanie najmniejszego fragmentu badanego plazmidu, który niesie minimalną, lecz wystarczającą do samodzielnej replikacji ilość informacji genetycznej. Po trawieniu DNA plazmidu enzymem/enzymami restrykcyjnymi i ligacji z wybranym markerem selekcyjnym przeprowadzamy transformację odpowiedniego gospodarza i selekcjonujemy klony odporne na wybrany czynnik selekcyjny (THOMAS 1987). Z reguły plazmidowy minimalny replikon (nawet pochodzący z dużego plazmidu) stanowi frag-

ment genomu plazmidowego o wielkości około 3 kb. Zidentyfikowany minimalny replikon jest doskonałym materiałem do analizy systemu replikacyjnego plazmidu.

LICZBA KOPII

Każdy plazmid, w swoim naturalnym gospodarzu, występuje w określonej, charakterystycznej dla siebie liczbie kopii. Mówimy o plazmidach (a) jednokopiiowych (np. plazmid F), kiedy to na komórkę, a precyzyjnie mówiąc na jeden ekwiwalent chromosomu przypada jedna cząsteczka plazmidu, (b) niskokopiiowych, gdy liczba kopii plazmidu określana w analogiczny sposób wynosi 3–8 cząsteczek (np. pSC101) lub (c) wysoko(wielokopiiowych (np. ColE1), dla którego typowa liczba kopii wynosi 15–20, lub R6K z liczbą kopii około 30. Plazmid w innym gospodarzu może występować w innej liczbie kopii, a ponadto w warunkach laboratoryjnych jesteśmy w stanie zaburzać systemy regulujące replikację chromosomu i plazmidu doprowadzając do nagromadzenia się w komórce nawet kilkuset kopii plazmidu (np. amplifikacja plazmidów typu ColE1 poprzez hodowanie gospodarza w obecności chloramfenikolu lub spektynomycyny). Celowo zwiększana jest też „kopijność” niektórych wektorów plazmidowych, co ma znaczenie przy maksymalizacji odzyskania ilości klonowanego w takim wektorze egzogenego DNA. Metod określenia liczby kopii plazmidu w komórce jest wiele, ich opisywanie przekracza zaplanowane ramy tego opracowania, zwracam jedynie uwagę, że jest to ważna cecha charakteryzująca każdy plazmid.

ZAKRES GOSPODARZA

Określony plazmid charakteryzuje się typowym dla siebie zakresem gospodarza (ang. host range). Plazmid o wąskim zakresie gospodarza może funkcjonować tylko w swoim naturalnym gospodarzu lub filogenetycznie bliskich mu bakteriach. Na przykład plazmid ColE1 i seria plazmidów o analogicznym systemie replikacyjnym, w tym popularne wektory, np. pBR3222 lub seria pUC, mogą replikować się tylko w różnych szczepach *Escherichia coli*. Inne plazmidy mogą funkcjonować w wielu różnych, czasem bardzo odległych filogene-

tycznie gatunkach i wtedy nazywamy je plazmidami o szerokim zakresie gospodarza. (THOMAS 1989). Podstawy molekularne tego procesu są złożone, nie do końca poznane i ich dyskusja przekracza ramy tego rozdziału (zainteresowanych odsyłam do artykułu I. KONIECZNEGO, w tym zeszycie KOSMOSU). Ogólnie mówiąc problem zakresu gospodarza wiąże się z typem systemu replikacyjnego, a głównie ze stopniem jego uzależnienia od uczestniczących w replikacji lub jej regulacji czynników bakteryjnych i sposobami „komunikowania się” systemu replikacyjnego plazmidu z aparatem replikacyjnym gospodarza. Dysponując preparatem DNA plazmidowego możemy wprowadzając go (np. poprzez elektroporację) do różnych szczepów bakteryjnych i potwierdzając jego stabilne w nich funkcjonowanie, określić zakres gospodarza.

ZDOLNOŚĆ DO TRANSFERU KONIUGACYJNEGO

Wiele plazmidów wykazuje zdolność do przekazywania swego DNA do komórek bezplazmidowych w drodze bezpośredniego z nimi kontaktu. Gdy plazmid niesie komplet genów potrzebny do wytworzenia kontaktu z komórką biorcy i przekazania do niej DNA, klasyfikujemy go jako plazmid koniugacyjny (Tra^+). Wyróżniamy też plazmidy, zwane mobilizowalnymi ($\text{Tra}^- \text{Mob}^+$), które transferu swego DNA do komórki biorcy mogą dokonać jedynie przy współudziale dodatkowego plazmidu (tzw. mobilizującego), gdyż nie dysponują własnym mechanizmem prowadzącym do wytworzenia kontaktu komórek. Określenie zdolności koniugacyjnych plazmidu może być dokonane w klasycznym eksperymencie genetycznym lub poprzez odnalezienie w jego genomie sekwencji homologicznych z elementami innych systemów koniugacyjnych. I znów, nie podejmuję w tym miejscu analizy mechanizmów procesu koniugacji bakteryjnej. Zwracam jednak uwagę, że poza mało popularnym systemem koniugacji z udziałem transpozonów koniugacyjnych, zawsze elementem odpowiedzialnym za proces koniugacji bakteryjnej jest obecny w komórce dawcy plazmid. Jest to prawdziwe zarówno w systemie z udziałem pilusów płciowych (np. modelowy układ *E.coli*/plazmid F), jak i koniugacji tzw. feromonowej (spotykanej głównie u bakterii Gram-dodatnich). Zaintere-

sowanych odsyłam do monografii „Bacterial Conjugation” (CLEWELL 1993).

NIEZGODNOŚĆ

Problem wykorzystania zjawiska niezgodności (ang. incompatibility) w tak ważnym procesie jak nowoczesna klasyfikacja plazmidów, o którym mówiono wcześniej, jednoznacznie wskazuje na ważność tego zjawiska w biologii plazmidów. Zaklasyfikowanie plazmidu do odpowiedniej grupy niezgodności to ważny element jego charakterystyki. Zjawisko to rzutuje na często spotykany obraz obecności w jednej komórce bakteryjnej więcej niż jednego rodzaju plazmidu. W skrajnych przypadkach wykazano w jednej komórce obecność kilkunastu różnych plazmidów, np. u *Borrelia burgdorferi* (FRASER i współaut. 1997).

FUNKCJE KODOWANE PRZEZ PLAZMIDOWY DNA

Mimo, że wymieniony na ostatnim miejscu, jest to temat niezwykle ważny i wzbudzający bardzo duże zainteresowanie „plazmidologów”, a chyba jeszcze większe ludzi spoza grona ścisłych specjalistów. Różnorodność bakteryjnych cech fenotypowych zależnych od obecności w ich komórkach plazmidów jest zadziwiająca. Tematowi temu poświęcony jest kolejny artykuł M. WŁODARCZYK w tym numerze KOSMOSU, dlatego teraz nie będzie on rozwijany. Wśród plazmidowo kodowanych cech są takie, które wydają się mieć oczywiste korzystne znaczenie dla bakterii niosących dany plazmid (możliwość wzrostu w obecności antybiotyków i różnych substancji toksycznych) oraz takie, których znaczenie jest mniej oczywiste (produkcja bakteriocyn, niektóre właściwości związane z patogennością). Wiele cech bakterii kodowanych przez geny plazmidowe ma negatywne (znów świetnym przykładem jest zależna od plazmidów lekooporność bakterii chorobotwórczych) lub pozytywne (wykorzystanie bakterii niosących plazmidy degradacyjne w bioremediacji) „przełożenie” na znaczenie dla człowieka – jest to jednym z elementów motywacji do lepszego poznania tej ogromnej przecież puli materiału genetycznego, aby minimalizować niekorzystne oddziaływanie na nasze życie, a coraz doskonalej wykorzystywać jej pozytywne aspekty.

WHAT IS A PLASMID?

SUMMARY

The paper constitutes a general introduction to the biology and application of bacterial plasmids. The current definition of a plasmid is given as well as historical background of the discovery of plasmids and early plasmid research. Plasmid structure and size range are presented. The rules recommended for

proper plasmid naming and classification are given. The methods of plasmid identification in bacterial cells and its isolation in the form of purified DNA preparations are summarized, followed by the scheme of a typical procedure for plasmid characterization.

LITERATURA

- BANFALVI Z., SAKANYAN V., KONEZ C., KISS A., DUSHA I., KONDOROSI A., 1981. *Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet. 184, 318-325.
- BIRNBOIM H. C., DOLY J., 1979. *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucl. Acid. Res. 7, 1513-1523.
- CLEWELL D. B., 1993. *Bacterial Conjugation*. Plenum Press, New York, London.
- COHEN S. N., CHANG A. C., BOYER H. W., HELING R. B., 1973. *Construction of biologically functional plasmid in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3240-3244.
- COUTURIER M., BEX F., BEERGQUIST P. L., MASS W. K., 1988. *Identification and classification of bacterial plasmids*. Microbiol. Rev. 52, 375-395.
- DATTA N., 1979. *Plasmid classification: incompatibility grouping*. [W:] *Plasmid of Medical, Environmental and Commercial Importance*. TIMMIS K. N., PUHLER A. (red). Elsevier/North Holland Publishing Co., Amsterdam, 3-12.
- ECKHARDT T., 1978. *A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria*. Plasmid 1, 584-588.
- FRASER C. M. i 25 współaut., 1997. *Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete Borrelia burgdorferi*. Nature 390, 580-586.
- HINNEBUSCH J., BARBOUR A. G., 1991. *Linear plasmids of Borrelia burgdorferi have a telomeric structure and sequence similar to those of a eukaryotic virus*. J. Bacteriol. 173, 7233-7239.
- LEDERBERG E. M., 1986. *Prefix designations. Plasmid prefix designations by the Plasmid Reference Center 1977-1985*. Plasmid 15, 57-92.
- LEDERBERG J., 1952. *Cell genetics and heredity symbiosis*. Physiol. Rev., 32, 403-430.
- LEDERBERG J., 1997. *Personal perspective. Plasmid (1952-1997)*. Plasmid 39, 1-9.
- MARMUR J., ROWND R., FALKOW S., BARON I.S., SCHILDKRAUT C., DOTY P., 1961. *The nature of intergeneric episomal infection*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 972-979.
- MEINHARDT F., SCHAFRATH R., LARSEN M., 1997. *Microbial linear plasmids*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 329-336.
- MITSUHASHI S., HARADA K., HASHIMOTO H., 1960. *Multiple resistance of enteric bacteria and retransmission of drug resistance to other strains by mixed cultivation*. Japan. J. Exper. Med. 30, 179-184.
- NOVICK R. P., CLOWES R. C., COHEN S. N., CURTIS III R., DATTA N., FALKOW S. 1976. *Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal*. Bacteriol. Rev. 40, 168-189.
- SMALLA K., OSBORN M., WELLINGTON E.M.H., 2000. *Isolation and characterization of plasmids from bacteria*. [W:] *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread*. THOMAS C.M. (red). Harwood Academic Reading, UK, 207-248.
- SUMMERS D., 1996. *The Biology of Plasmids*. Blackwell Science.
- THOMAS C. M., 1987. *Plasmid replication*. [W:] *Plasmids, a Practical Approach*. HARDY K. G. (red). IRL Press. Oxford, Washington D.C., 7-36.
- THOMAS C. M., 1989. *Promiscuous Plasmids of Gram-negative Bacteria*. Academic Press.