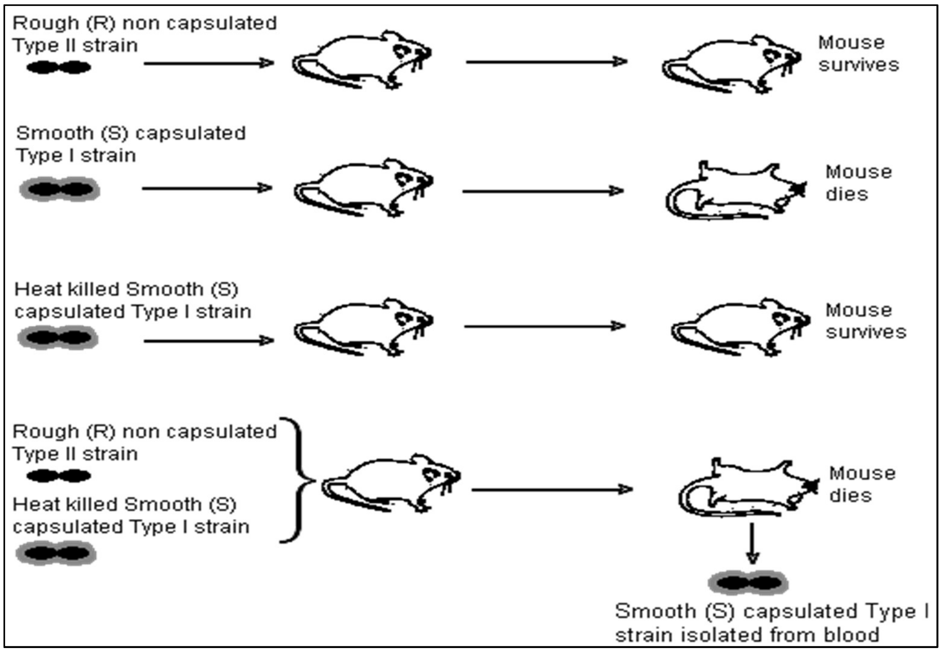
CHAPTER : 6

BACTERIAL GENETICS

TRANSFORMATION

Transformation में एक recipient द्वारा दिये गये, free naked DNA को donor अपने अन्दर ग्रहण कर लेता है। ये bacteria में genetic exchange का पहला example था। पहली बार 1928 में Griffith ने इसे प्रायोगिक रूप से सिद्ध किया था। उन्होंने पाया कि जिन *Pneumococci bacteria* में capsule होती है वो smooth (S) appearance strain के होते हैं और जिन pneumococci में capsules नहीं होते वो rough (R) strain माने जाते हैं।



ii. Type I/Smooth capsuled pneumonia, virulent या जानलेवा पाये गये और उनके infection से mouse की मृत्यु हो जाती है, परन्तु rough strain pneumococci (type II) हानिरहित पाये गये।

iii. Griffith ने यह भी पाया कि जब mouse में live non-capsulated (R, type II) strains और heat killed capsulated (S, type I) strains का mixture inject किया जाता है तो भी mouse की death हो जाती है।

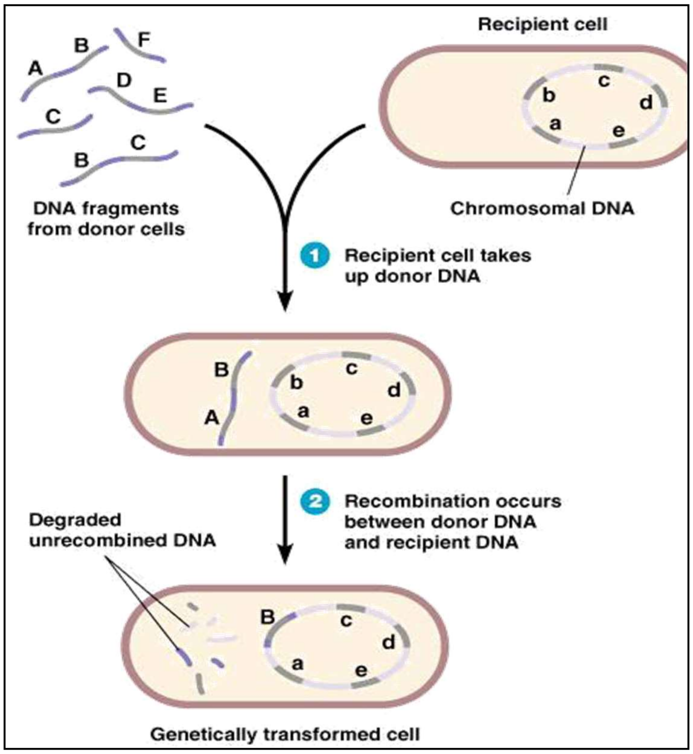
iv. अगर इन दोनों bacterias को अकेले inject किया जाता है तो mouse की death नहीं होती परन्तु इनका mixture घातक होता है। Capsule के साथ कुछ live S strains को isolate किया गया, animal के blood में से जिससे पता लगा कि dead S cells के कुछ factors R strain को S type में convert कर देते हैं। Factor जिसकी वजह से ये transformation हुआ वो DNA है, **ये Avery, McLeod और McCarty ने 1944 में बताया।**

Transformation एक प्रकार का gene transfer है जो कि donor cell द्वारा दिये गये DNA का recepient cells द्वारा uptake करने की वजह से होता है। कुछ bacteria (जैसे: ***Bacillus, Haemophilus, Neisseria, Pneumococcus***) environment में से DNA ले सकते हैं और लिया गया DNA recipient के chromosome में incorporate हो जाता है।

Aadhar Institute
27, Kisaan Marg, Tonk Road, Jaipur-302015
Phone: 0141-2700670, 9314503070

ऊपर दिये हुए **Transformation** में निम्न **steps** निहित होती **हैं:**

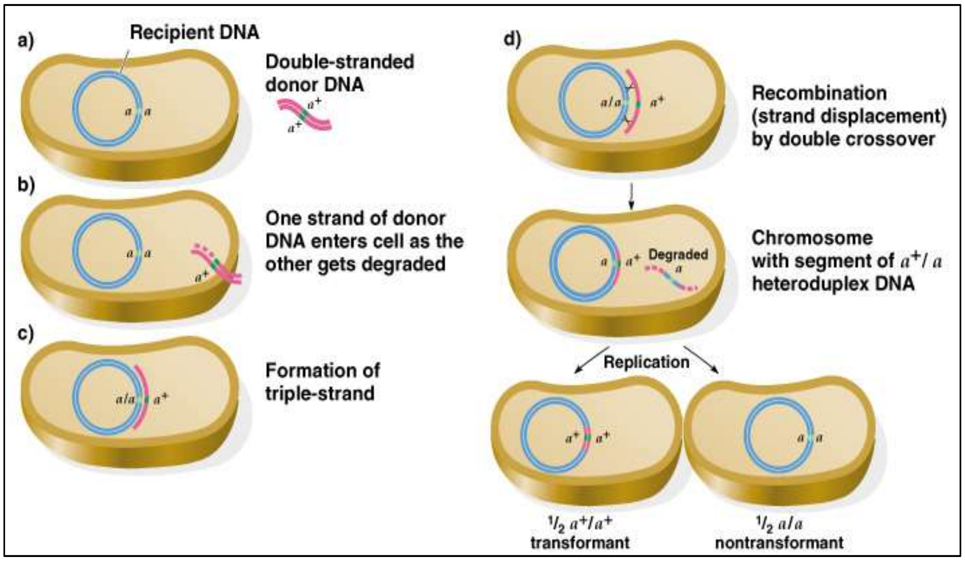
1. जब Donor bacterium मर जाता है और degrade होने लगता है।
2. Dead donor bacterium का एक DNA fragment (ज्यादातर 20 genes long होते हैं) DNA binding proteins से bind हो जाता है जो component living cell की cell wall पर उपस्थित होते हैं।
3. फिर nuclease enzymes bound DNA को fragments में काट देता है।
4. एक strand नष्ट कर दी जाती है और दूसरी recipient bacterium में प्रवेश हो जाती है।
5. Rec A protein, donor DNA के fragment और recipient's DNA के बीच में genetic exchange (recombination) बढावा देता है। कुछ bacteria, naturally ही DNA ले लेते हैं, परन्तु ये bacteria अपनी growth cycle (log phase) के particular time पर ही DNA ले सकते हैं जब वो एक specific protein competence factor उत्पन्न करते हैं। Gram positive और gram negative द्वारा DNA का uptake different होता है। Gram positive bacteria में DNA एक single stranded molecule की तरह लिया जाता है और complementary strand, recipient में ही बनाई जाती है, परन्तु Gram negative bacteria में double stranded DNA ही लिया जाता है।



Mapping by Transformation: Transformation mapping की जानकारी से हम known genotype के bacterial strain के DNA को दूसरे known genotype के strain में जोडते हैं, परन्तु ये इनके 2 या ज्यादा loci पर different allele होंगे। हम फिर देखेगें कि donor allele का recipient strain के bacteria में समावेश (incorporation) हो सकता है क्या? जितना ज्यादा,, 2 loci के alleles host में साथ–साथ समावेश (incorporate) होते हैं, उतने ही ज्यादा ये loci एक दूसरे के पास होते हैं। इसीलिए हम index of co-occurrence जो कि map distance के साथ विपरीत संबंध में है, का उपयोग कर सकते हैं। **जितनी ज्यादा co-occurrence होगी, उसने ही ज्यादा 2 loci पास होंगे।**

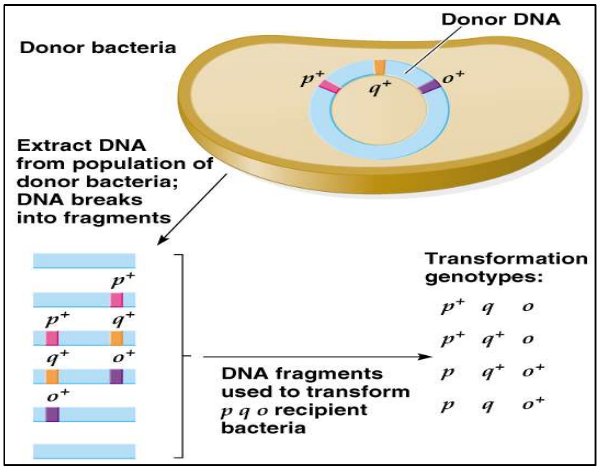
1. सबसे पहले, हमें DNA लेना होगा – हम ये किसी अच्छे से bacteria isolate करके कर सकते हैं। **Transformation द्वारा mapping उन स्थितियो में की जाती है जबकि conjugation या transduction द्वारा यह संभव नही होता।**
   i. Donor DNA को निकाल कर purify करके fragments में तोडा जाता है जो recepients के साथ incubate करने पर उसमें चला जाता है। इससे donor और recipient में पहचाने जाने योग्य phenotypic (genotypic भी) अन्तर दिखने लगते है।
   ii. अगर DNA fragment अन्दर जाकर recipient chromosome के साथ homologous recombination करता है तो recipient एक नए phenotype को दिखाएगा जिसे अलग अलग testing द्वारा पता लगाया जा सकता है।
2. कुल cells जिन्हे एक नए DNA से expose किया जाता है उनका बहुत कम प्रतिशत ही complete transformation कर पाता है।

Aadhar Institute
27, Kisaan Marg, Tonk Road, Jaipur-302015
Phone: 0141-2700670, 9314503070



3. Transformation experiments यह सुनिश्चित करने के लिए किए जाते है कि

- genes linked तो नही है
  - A. Transformation छोटे DNA fragments जिनमें कुछ ही genes होते है के साथ सबसे अच्छा काम करता है।
  - B. Co-transformation दो genes के एक दूसरे के पास होने का indicateon है इसे गणितीय रूप से analyse किया जा सकता है।
    - A. प्रायोगिक रूप से दो genes अगर बहुत पास है तो co-transformation की संभावनाएँ हमारी आशाओ से भी ज्यादा होगी।
    - B. यदि co-transformation का rate genes के अलग–अलग transformation rate के बराबर है तो इसका मतलब है कि वे genes linked है।
- Genetic map पर genes का order निकालना
  1. माना कि दो genes (p+q) co-transform होते है और linked है इनमें से एक (माना q) gene o के साथ co-transformation show करता है तो उनके बीच का distance उनकी co-transformation frequency के अनुसार analyze किया जाता है जैसे कि gene p और o rarely co-transform होते है तो gene order होगा p-q-o
  2. अगर p और o frequency co-transform होते है तो gene order होगा p-o-q
- Genes के बीच का map distance recombination frequencies द्वारा निकाला जाता है।



CONJUGATION:

Bacterial conjugation, DNA का एक **living donor** bacterium से **living recipient** bacterium में transfer को कहते हैं।

Leiderburg and Tatum ने E-coli के दो auxotrophic mutant का प्रयोग करते हुए conjugation की खोज की।

a) Strain A's genotype met bio thr^+ leu^+ thi^+ था। यह methionine और biotin द्वारा supplement किये हुए minimal media पर grow करता था।

b) Strain B's genotype met^+ bio^+ thr leu thi था।यह thrionine, lucine और thymine द्वारा supplement किये हुए minimal media पर grow करता था।

Aadhar Institute
27, Kisaan Marg, Tonk Road, Jaipur-302015
Phone: 0141-2700670, 9314503070

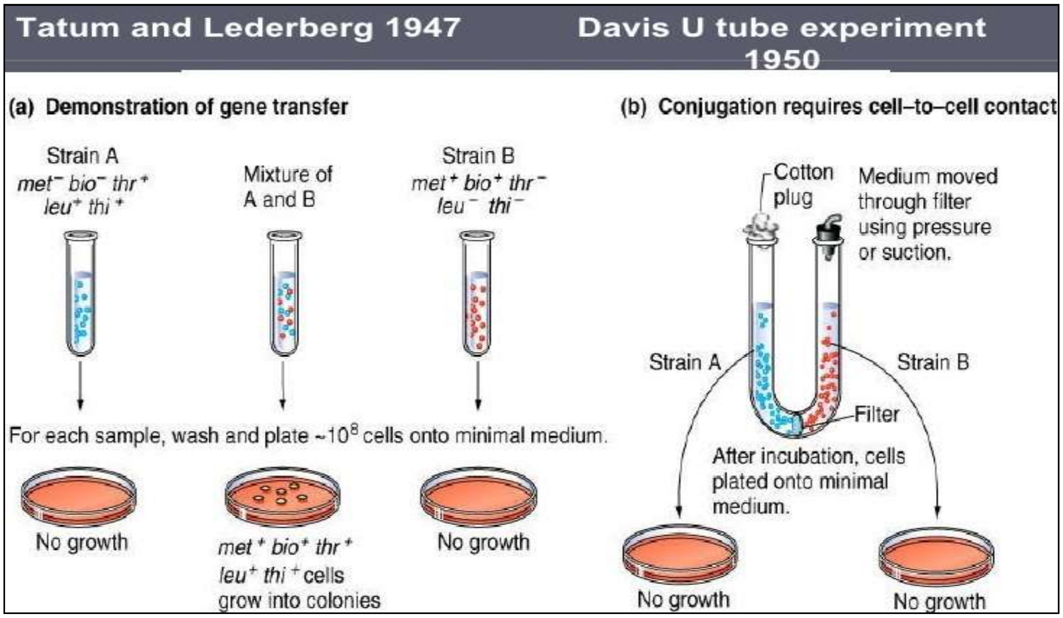
c) strain a और b को mix किया गया और minimal media पर plating करने से $1/10^6$ cells met^+, bio^+, thr^+, leu^+, thi^+ phenotype वाली प्राप्त हुई।

d) ना तो strain a और ना ही strain b minimal media पर grow कर सकता था। इससे सिद्ध हुआ कि यह नया phenotype recombination की वजह से पैदा हुआ था।

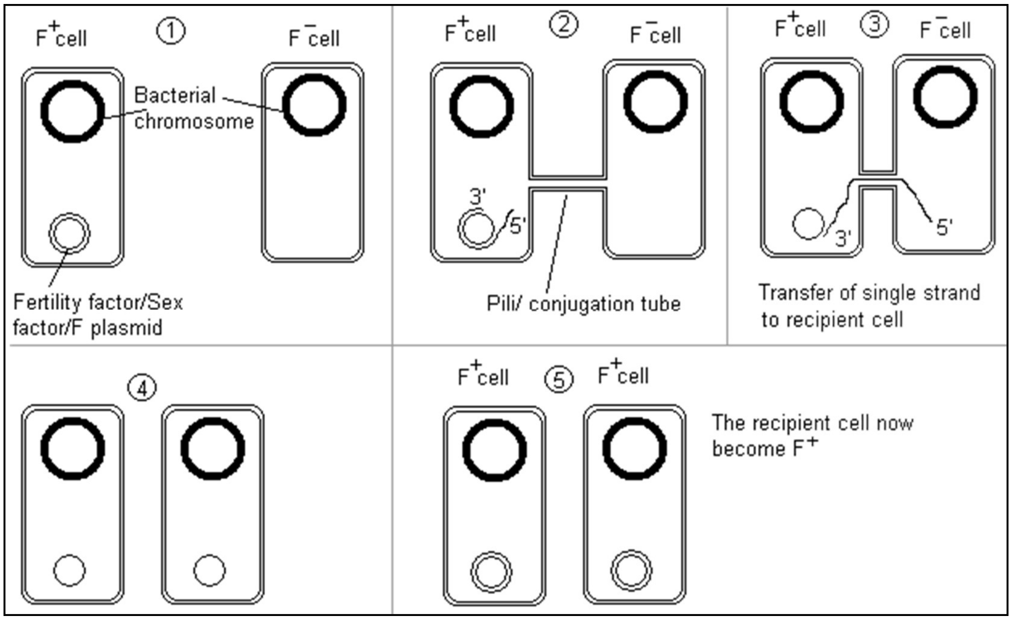
a) Davis ने यह जॉच की कि cell to cell contact की आवश्यकता है या नही।

A. इसके लिए उन्होने strain a को filter के एक तरफ और strain b को दूसरी तरफ रखा। इस filter के आर पार molecules तो गुजर सकते थे लेकिन cells नही।

B. जब cells को minimal media पर plate किया गया तो किसी तरह की prototrophic colonies प्राप्त नही हुई।



b) **Plasmids double-stranded circular DNA** का एक **small autonomously replicating circular piece** होता है। Conjugation में plasmid का एक donor bacterium से recipient bacterium में transfer होता है। **Gram-negative bacteria में plasmid का transfer bacteria के same strain या closely related strains मे ही होता है।** कुछ plasmids को F factor (F plasmid, fertility factor या sex factor) कहा जाता है क्योंकि **इनमें ऐसे genes होते हैं जो खुद के transfer में मदद करते हैं।**



Aadhar Institute
27, Kisaan Marg, Tonk Road, Jaipur-302015
Phone: 0141-2700670, 9314503070

c) एक cell में F factor स्वतंत्र रूप से replicate करता है। **ये genes sex pilus और जरूरी enzymes के लिए code करते हैं। जिन cells में F plasmids, F+ होता है वो male होते हैं और donors की तरह कार्य करते हैं।** जिन cells में ये plasmid **अनुपस्थित** होता है वो F- (female) होते हैं और recipient की तरह कार्य करते हैं। वे सभी plasmids, जिनकी वजह से उनकी host cell, conjugation के दौरान donor की तरह कार्य करती है, वो transfer factor कहलाते हैं। हर F+ Gram negative bacterium में 1 से 3 sex pili होते हैं, जो कि recipient bacteria पर उपस्थित विशेष outer membrane protein से जुड़ते हैं और mating की शुरूआत करते हैं। फिर sex pilus, **वापस खींच लिया जाता है** जिससे दोनों bacteria संपर्क में आ जाते हैं और दोनो, cells में सीधे envelop to envelop संपर्क हो जाता है।

d) Gram-positive bacteria में कुछ चिपचिपे surface molecules स्त्रावित होते हैं, जो कि दो bacteria को पास (contact) में लाते हैं। Gram-positive donor bacteria, adhesins produce करता है जो कि उन्हें इकट्ठा करवाता है और इस दौरान sex pilli शामिल नहीं होते। फिर DNA, donor से recipient में स्थानांतरित हो जाता है।

e) Plasmid-mediated conjugation, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus lactis* और *Enterococcus faecalis* में पाया जाता है और Gram-positive bacteria में Gram-negative bacteria की तुलना में कम पाया जाता है।

F+ conjugation:

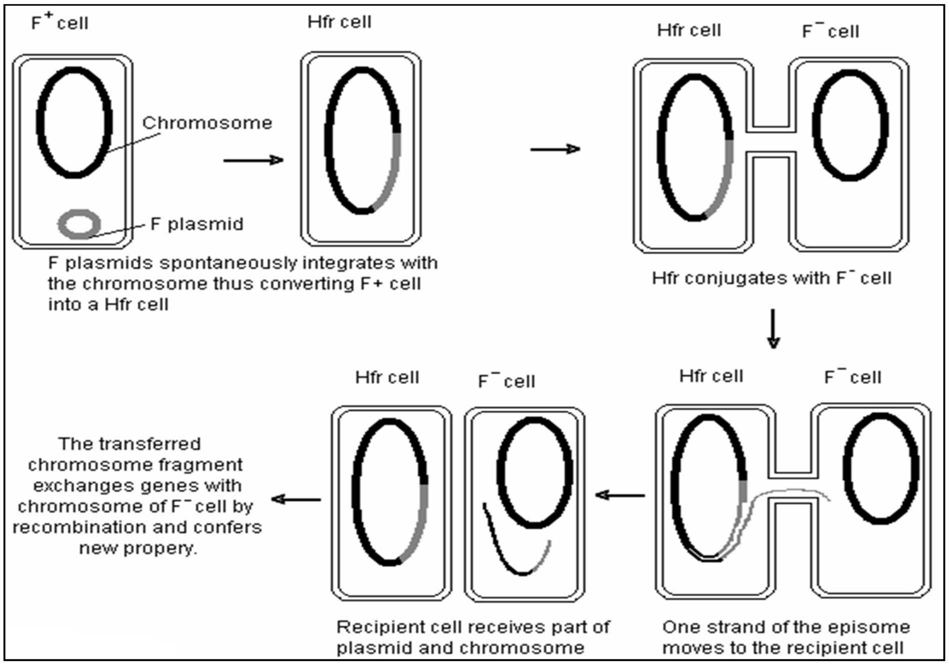
इसकी वजह से एक F+ plasmid (जो सिर्फ sex pilus के लिए coding करता है) का donor bacterium से female recipient bacterium में स्थानांतरित होता है लेकिन chromosomal DNA का नहीं। Plasmid की दोनों strands separate हो जाती हैं और **एक strand recipient bacterium में प्रवेश हो जाता है और 5' से 3' direction में** बढता जाता **है लेकिन एक strand donor में ही रहती है। दोनों donor और recipient cells** दोनो में **complimentary strand संश्लेषित हो जाते हैं।** फिर recipient भी एक F+ male बन जाता है और sex pilus बना सकता है। Conjugation के दौरान सिर्फ DNA ही donor से recipient में pass होता है, ना कि cytoplasm या कोई cell material.

Mating pairs को force द्वारा ही अलग किया जा सकता है जिससे conjugation रूक जाता है अर्थात् mating pairs बहुत थोडे समय के लिए ही जुड़े रहते हैं। Conjugation के बाद, cells अलग हो जाती है। अगर successful conjugation होता है तो recipient F+ बन जाता है और donor F+ बना रहता है।

Hfr (high frequency recombinant) conjugation:

a) जब किसी recombination event के द्वारा Plasmids, bacterial chromosome के साथ integrate हो सकता है,

b) यह integration दोनों DNA के बीच की homology पर निर्भर करता है। Integration के बाद दोनों plasmid और chromosome, एक single unit की तरह replicate करते हैं। एक plasmid जो किसी chromosome में integrate(जुडने) करने में सक्षम होता है उसे episome कहते हैं। अगर F-plasmid chromosome में integrate(जुड जाता है) होता है तो उसे Hfr cell कहते हैं। Integration के बाद, दोनों chromosome और plasmid को recipient cell में conjugally transfer किया जा सकता है। इन्हे Hfr cell इसीलिए कहलाते हैं क्योंकि वे chromosomal genes को high frequency से recipient cells में conjugally transfer कर सकते हैं।



Aadhar Institute
27, Kisaan Marg, Tonk Road, Jaipur-302015
Phone: 0141-2700670, 9314503070

c) DNA को origin of transfer पर काटा किया जाता है और फिर DNA replicate होता है। एक DNA strand, F⁻ cell में cytoplasmic bridge के द्वारा pass होती है, जहां complementary strand का संश्लेषित होता है। Integrated plasmid के साथ ही, chromosome भी F⁻ cell में जाता है। पूरा ही chromosome के transfer होने से पहले ही bacterial connection टूट जाता है। इसलिए F+ plasmid का बचा हुआ कभी कभी ही recipient में प्रवेश हो पाता है। ज्यादातर Hfr chromosome के साथ साथ plasmid का सिर्फ एक छोटा हिस्सा ही, conjugation के दौरान recipient cell में transfer होता है। इसलिए recipient cell पूरा F factor receive नहीं कर पाते।

d) Conjugation के बाद Hfr cell, Hfr ही रहती है और F⁻ negative cell भी F+ नहीं बनता और **F⁻** ही बना रहता है, परन्तु transferred chromosome का fragment, F⁻ cell के chromosome से recombine हो जाता है जिसकी वजह से recipient cell में कुछ नई properties transfer हो जाती है।

जब chromosomal material recipient cell में होता है, तो recombination हो जाता है:

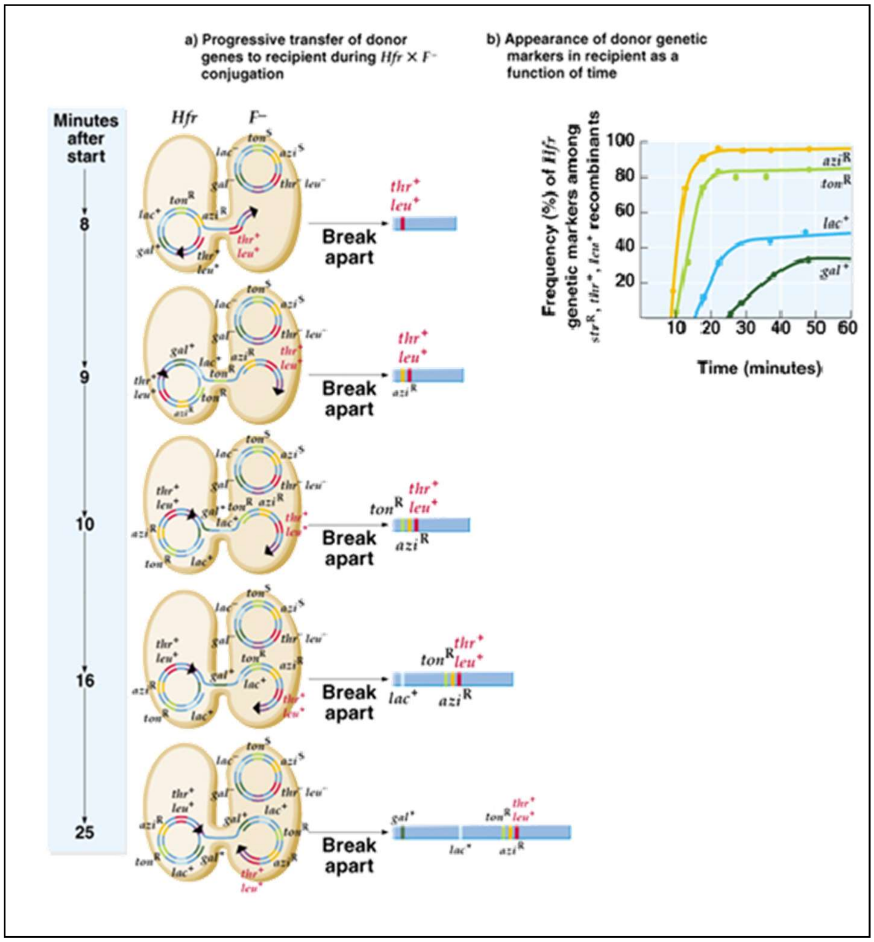
- ▶ Recombination, double stranded होता है।
- ▶ Donor genes, recipient cell में recombine होते हैं।
- ▶ Recipient cell के corresponding genes, chromosome के बाहर recombine होते हैं और फिर cell में reabsorb हो जाते हैं।

Interrupted Mating Mapping

1 Conjugation start होने के साथ ही जो genes origin of replication site (replication की दिशा में) के पास होते हैं वो pili में से सबसे पहले move होते हैं।

2. एक set time के बाद, conjugation अवरूद्ध हो जाता है, जो genes origin of replication के close से, सिर्फ वही conjugate करेंगे। जितना लम्बा समय, उतनी ही ज्यादा उनकी conjugate करने की ability होगी।

3. Notice करो कि कौन से genes recombine हुए, और जो genes recombine हुए वो origin of replication से X distance (conjugation time-distance) की दूरी पर स्थित होंगे।



F-plasmids के different strains और interrupted mating technique, उपयोग करके हम chromosome पर genes का क्रम निर्धारित कर सकते हैं।

Aadhar Institute
27, Kisaan Marg, Tonk Road, Jaipur-302015
Phone: 0141-2700670, 9314503070