

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.1.2 Генетика микроорганизмов

Направление подготовки (специальность) 36.06.01 Ветеринария и зоотехния
(уровень подготовки кадров высшей квалификации по программе подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре)

Профиль подготовки (специализация) 06.02.02 Ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Конспект лекций.....	3
1.1	Лекция № 1 Введение в генетику микроорганизмов	3
1.2	Лекция № 2 Изменчивость микроорганизмов.....	7
1.3	Лекция № 3 Гибридологический анализ.....	13
1.4	Лекция № 4 Трансформация.....	15
1.5	Лекция № 5 Трансдукция.....	19
1.6	Лекция № 6 Методы исследования модификационной изменчивости.....	20
1.7	Лекция № 7 Цитоплазматические генетические системы эукариотических микроорганизмов.....	23
1.8	Лекция № 8 Плазмиды	25
1.9	Лекция № 9 Методы переноса генетической информации у бактерий.....	30
2.	Методические указания по проведению практических занятий.....	33
2.1	Практическое занятие № ПЗ-1 Организация генетического аппарата микроорганизмов.....	33
2.2	Практическое занятие № ПЗ-2 Популяционная изменчивость бактерий.....	39
2.3	Практическое занятие № ПЗ-3 Методы исследования мутационной изменчивости.....	40
2.4	Практическое занятие № ПЗ-4 Конъюгация	41
2.5	Практическое занятие № ПЗ-5 Мигрирующие генетические элементы бактерий.....	42
2.6	Практическое занятие № ПЗ-6 Транспозоны бактерий.....	45
2.7	Практическое занятие № ПЗ-7 Методы переноса генетической информации у бактерий.....	49

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Введение в генетику микроорганизмов».

Вопросы лекции:

- 1.1 Место генетики микроорганизмов в системе биологических знаний.
- 1.2 История генетики микроорганизмов.
- 1.3 Объекты генетики микроорганизмов. Структура генома.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Место генетики микроорганизмов в системе биологических знаний. Мир микроорганизмов, включающий микроскопические грибы и одноклеточные водоросли, бактерии и вирусы, представляет исключительный интерес. По строению клеток и способу размножения высшие животные и растения не столь резко отличаются друг от друга, как микроорганизмы. Благодаря этому изучение генетики микроорганизмов раскрыло такие явления, о существовании которых нельзя было, и подозревать при генетическом исследовании высших организмов.

Значение генетики микроорганизмов, однако, заключается не только в обнаружении новых генетических явлений, но и главным образом в ее тесной связи с рядом других областей биологии. Генетика микроорганизмов не просто взяла на вооружение идеи и методы многих наук общей генетики, микробиологии, биохимии, биофизики, она вместе с тем внесла существенный вклад в их развитие.

В классической генетике до середины 40-х годов представления о гене, о природе мутаций и, особенно о репродукции гена и его функции носили в основном абстрактный характер. Но благодаря достижениям генетики микроорганизмов в 50-60-е годы удалось выяснить материальную основу явлений наследственности и изменчивости. Решающее значение в этом отношении имели работы по трансформации у бактерий, воспроизведению фаговых частиц, химическому мутагенезу у бактерий и вирусов и биохимическим мутациям у грибов и бактерий. Это явилось фундаментом современной генетики и обусловило дальнейшие открытия в тех ее областях, где преобладал еще описательный метод.

Чрезвычайно велик вклад генетики микроорганизмов в биохимию и молекулярную биологию. Если в 40-50-х годах речь шла о частных вопросах биохимии, то уже в 60-е годы выяснилось, что без генетики микроорганизмов невозможно не только решение, но и сама постановка актуальных и перспективных для современной молекулярной биологии проблем.

Что же касается микробиологии, то благодаря генетике она получила возможности обнаружения таких явлений в жизненном цикле микроорганизмов, которые ранее ускользали от внимания наблюдателей. Это, к примеру, открытия полового процесса и плазмид у бактерий, парасексуального процесса у несовершенных грибов, давшие ключ к пониманию эволюции микроорганизмов, их систематики, к решению ряда проблем в изучении популяций микроорганизмов и эволюции способов размножения у живых существ. Связи генетики микроорганизмов с другими науками постоянно расширяются. Итак, все сказанное приводит к выводу, что генетика микроорганизмов в настоящее время занимает в биологии одну из ключевых позиций. Ее успехи являются условием развития смежных наук.

2. История генетики бактерий. Бактерии размножаются исключительно вегетативным способом. Из-за отсутствия гетерозиготности и мейотического кроссинговера их генетический анализ долго ограничивался регистрацией спонтанных и индуцированных мутаций, а также фенотипических проявлений гомологической рекомбинации в результате парасексуального процесса – векторного переноса генов от донора к реципиенту.

В 1943 г. Лурия и Дельбрюк заложили основы генетики бактерий. В 1928 г. Гриффит открыл «трансформирующее начало», которым бактерии обмениваются друг с другом, что приводит к изменениям их генотипа. В 1944 г. Эвери, Маклеод С. М. и Маккарти (М. McCarty) доказали, что генетическая трансформация бескапсульных авирулентных пневмококков осуществляется с помощью ДНК, полученной из клеток вирулентного инкапсулированного штамма. Следом за этим Херши и Чейз установили, что при заражении фагом T2 внутри бактериальной клетки проникает только вирусная ДНК. Тем самым была окончательно доказана роль ДНК как носителя наследственной информации.

В начале 1950-х годов у бактерий были обнаружены внехромосомные автономно реплицирующиеся генетические элементы. По предложению Ледерберга их назвали плазмидами. В 1946 г. Ледерберг и Тейтем открыли конъюгацию, или контактный процесс, обеспечивающий передачу генов при помощи плазмид от донора к реципиенту. В 1949 г. Андрэ Львов открыл у *Bacillus megaterium* лизогению – феномен индуцированного фагом клеточного лизиса. Гомологичная рекомбинация в результате трансдукции, или переноса бактериальных генов с хромосомой умеренного фага осуществляется с помощью тех же механизмов, что и конъюгативная рекомбинация. В 1952 г. Ледерберг и Зиндер обнаружили этот процесс у сальмонелл.

В начале 1980-х годов Рид выявил у бактерий негомологичную рекомбинацию. В 1968 г. Линн и Эрбер открыли ферменты-рестриктазы, мишенью которых служит проникшая в клетку чужеродная ДНК. В 1970 г. Смит обнаружил у *Haemophilus influenzae* первую сайтспецифическую рестриктазу Hind II. Это открытие легло в основу современных технологий рекомбинантных ДНК и методов клонирования генов.

В настоящее время определена полная последовательность нуклеотидов хромосом паразитических бактерий: микоплазмы *Mycoplasma genitalium* и *Haemophilus influenzae*. В 1997 г. определена полная первичная структура хромосом *E. coli* и *Bacillus subtilis* длиной около 4,6 и 4,2 млн п.о. соответственно.

3. Объекты генетики микроорганизмов. Структура генома. Огромное значение в становлении и развитии генетики имел выбор бактерий и вирусов в качестве основных модельных систем для изучения общегенетических закономерностей. Упомянутые микроорганизмы в отличие от такого классического объекта, как мушка дрозофила, обладают уникальными для генетических экспериментов свойствами.

1. Гаплоидностью, т.е. наличием одной хромосомы, что устраняет явление доминантности.
2. Высокой скоростью размножения обеспечивающей получение в лабораторных условиях многомиллиардных популяций в течение нескольких часов.
3. Высокой разрешающей способностью методов генетического анализа бактерий и вирусов, позволяющей обнаружить их мутанты с частотой 10^{-9} и ниже.
4. Половой дифференциацией, заключающейся в существовании донорных и реципиентных бактериальных клеток, соответственно отдающих или воспринимающих генетическую информацию.
5. Наличием у бактерий обособленных фрагментов ДНК – плазмид, транспозонов и Is-

последовательностей.

Организация генома прокариот. Основу генетического аппарата кишечной палочки составляет бактериальная хромосома, входящая в состав нуклеоида – ядерноподобной структуры. Нуклеоид по морфологии напоминает соцветие цветной капусты и занимает примерно 30% объема цитоплазмы. Нуклеоиды представлены в виде диффузно окрашенных областей, свободных от рибосом. При этом вытянутые участки ДНК на внешней части нуклеоидов направлены в окружающую цитоплазму. С помощью специфических антител установлено, что молекулы РНК-полимеразы, ДНК-топоизомеразы I и гистоноподобного белка HU ассоциированы с нуклеоидами. Вытянутые участки ДНК по периферии нуклеоидов обычно интерпретируют как сегменты бактериальной хромосомы, вовлеченные в транскрипцию. Эти участки состоят из петель ДНК бактериальной хромосомы, которые в зависимости от физиологического состояния клетки находятся в транскрипционноактивном состоянии или втягиваются внутрь нуклеоидов при подавлении транскрипции.

Одна бактериальная хромосома содержит до 1000 известных генов. Обычно это гены «домашнего хозяйства», то есть необходимые для поддержания жизнедеятельности клетки. Все множество известных генов делится на 10 групп, контролирующих следующие процессы (в скобках указано количество изученных генов):

1. Транспорт различных соединений и ионов в клетку (92).
2. Реакции, поставляющие энергию, включая катаболизм различных природных соединений (138).
3. Реакции синтеза аминокислот, нуклеотидов, витаминов, компонентов цепей переноса электронов, жирных кислот, фосфолипидов и некоторых других соединений (221).
4. Генерация АТФ при переносе электронов (15).
5. Катаболизм макромолекул (22).
6. Аппарат белкового синтеза (164).
7. Синтез нуклеиновых кислот, включая гены, контролирующие рекомбинацию и репарацию (49).
8. Синтез клеточной оболочки (42).
9. Хемотаксис и подвижность (39).
10. Прочие гены, в том числе с неизвестной функцией (110).

В лаг-фазе в клетке имеется одна бактериальная хромосома, но в фазе экспоненциального роста ДНК реплицируется быстрее, чем происходит деление клетки; тогда число бактериальных хромосом на клетку увеличивается до 2...4...8. Такое состояние генетического аппарата называется **полигаплоидностью**.

При делении клетки сестринские копии бактериальной хромосомы распределяются по дочерним клеткам с помощью мезосомы.

Кроме бактериальной хромосомы в состав генетического аппарата прокариот входит множество мелких репликонов – плазмид – кольцевых молекул ДНК длиной в тысячи п.н. Плазмиды такого размера содержат несколько десятков генов. Обычно это «гены роскоши», обеспечивающие устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам, кодирующие специфические токсины, а также гены конъюгации и обмена генетическим материалом с другими особями.

Геном вирусов. Вирусы являются внутриклеточными паразитами и используют для своего размножения белоксинтезирующий аппарат клетки-хозяина. Геном вирусов,

заклученный внутри вирионов, может быть представлен одноцепочечными или двухцепочечными ДНК или РНК. Гены вирусов могут быть заключены в одной хромосоме или разделены на несколько блоков (хромосом), которые все вместе и составляют геном таких вирусов. Например, у реовирусов геном представлен двухцепочечной РНК и состоит из десяти сегментов. Геномы вирусов, содержащих одноцепочечную РНК, также могут быть либо цельными (например, у ретровирусов), либо сегментированными (например, у ортомиксовирусов или аренавирусов). Геном РНК-содержащих вирусов представлен только линейными молекулами РНК. Все известные ДНК-содержащие вирусы позвоночных имеют геном, заключенный в одной хромосоме, линейной или кольцевой, одно- или двухцепочечной. У некоторых вирусов, например, у вируса гепатита В, геном представлен кольцевой ковалентно замкнутой молекулой двухцепочечной ДНК, в обеих цепях которой в разных местах обнаружены одноцепочечные участки. У нескольких родов, например, адено-ассоциированных вирусов, комплементарные цепи ДНК находятся в различных вирусных частицах.

Геном архебактерий. Архебактерия *Methanococcus jannaschii*, первичная структура генома которой была определена в 1996 г., обнаружена в горячих морских глубоководных источниках. Геном *M. jannaschii* состоит из основной кольцевой хромосомы и двух небольших внехромосомных элементов, размеры которых составляют соответственно 1700, 58 и 16 т.п.о. Подобные размеры геномов типичны для архе- и эубактерий. GC-состав ДНК этого термофила невысок и составляет всего 31%. Геном организован компактно: обнаружено около 1700 потенциальных кодирующих участков ДНК, по одному на каждые 1000 п.о. Многие ДНК-локусы *M. jannaschii* не обнаруживают гомологии с известными последовательностями. Функциональное значение большого числа потенциальных кодирующих последовательностей генома этого микроорганизма остается невыясненным. *M. jannaschii* отличается от других прокариот и эукариот большим набором только ему свойственных генов и функций. Таким образом, система транскрипции архебактерий представляется как более простая версия соответствующей эукариотической системы.

Геном водорослей. Ядра клеток большинства водорослей имеют типичную для эукариот структуру. Их количество может быть от одного до многих на клетку.

Снаружи ядра покрыты оболочкой, состоящей из двух мембран, причем наружная мембрана покрыта рибосомами. Пространство между ядерными мембранами называется перинуклеарным. В нем могут находиться хлоропласты или лейкопласты, как у охрофитовых, примнезиофитовых и криптофитовых. У пединеллофициевых на наружной ядерной мембране имеются участки, которые функционируют как центры организации микротрубочек (ЦОМТ) аксонем. К наружной ядерной мембране могут примыкать дополнительные слои. Например, у рафидофициевых она усилена снаружи фибриллярным материалом. Обязательным компонентом ядра является хроматин, представляющий ДНК в комплексе с основными белками. Исключением являются динофитовые, у которых очень мало гистонов и отсутствует нуклеосомная организация хроматина. Их ДНК особым образом укладывается в хромосомах: кольцевые хроматиновые нити в хромосомах уложены в виде восьмерок. В ядре может быть от одного до нескольких ядрышек; они могут исчезать или сохраняться во время митоза.

Геном грибов. У грибов ядерный геном по своему размеру занимает промежуточное положение между геномом бактерий и высших эукариот. Например, пекарские дрожжи имеют 15 хромосом, но каждая хромосома в среднем в 5 раз меньше «хромосомы»

кишечной палочки и только в 4 раза больше ДНК Т-фага. В среднем размер генома у грибов на два порядка меньше, чем у высших растений. Число хромосом разных грибов составляет 2 - 28, но большинство видов имеет 10-12 хромосом. Гораздо более значительные колебания отмечены в размерах ДНК на гаплоидный геном: от 0,015 нг у дрожжей *Saccharomyces* до 8,2 нг у зигомицета *Entomophaga*, т.е. разница в содержании ДНК более чем в 500 раз (у высших растений менее чем в 100 раз). Наименьшие размеры генома имеет аскомицет *Aeshbya gossypii* - 9,7 млн пар нуклеотидов (у сахаромицетных дрожжей - 13,5 млн, у большинства грибов - 25 - 40 млн). Это самый маленький геном среди всех исследованных эукариот (меньшие размеры ДНК имеют только нуклеоморфы некоторых водорослей, но они находятся не у свободноживущих организмов, а у эндосимбиотических структур).

Структура ядерного генома грибов также промежуточная между бактериальным и геномом высших эукариот. У истинных грибов процент повторяющихся последовательностей низкий (10-15%); у бактерий они почти отсутствуют, а у высших эукариот составляют значительную часть генома. Повторы в геноме грибов представлены почти исключительно рибосомальными генами. Исключение составляют оомицеты (псевдогрибы), в геноме которых повторы составляют 18 - 65%. Грибные интроны (некодируемые последовательности ДНК, вырезаемые перед трансляцией) также более мелкие, чем у высших эукариот. Таким образом, в процентном отношении протяженность ДНК, участвующей в синтезе белков, у грибов больше, чем у высших эукариот. У многих грибов обнаружены мелкие В-хромосомы.

Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Изменчивость микроорганизмов».

Вопросы:

1. Диссоциация.
2. Фенотипическая изменчивость (модификация)
3. Генотипическая (наследуемая) изменчивость
4. Практическое значение изменчивости

1. Диссоциация.

Способность живых организмов сохранять определенные признаки на протяжении многих поколений называется наследственностью.

В процессе изучения наследственности оказалось, что каждое последующее поколение под влиянием различных факторов может приобретать признаки, отличающие их от предыдущих поколений. Это свойство называется изменчивостью. Таким образом, наследственность и изменчивость тесно связаны между собой.

Наука, изучающая наследственность и изменчивость живых организмов, называется генетикой (от греч. *genos* - рождение).

Еще в XIX веке Ч. Дарвин доказал, что все существующие виды живых организмов произошли путем изменчивости от немногих форм, а возникшие изменения, передаваемые по наследству, являются основой эволюционного процесса. Теория Дарвина получила высшую оценку у классиков марксизма-ленинизма. Ф. Энгельс рассматривал ее как одно из величайших открытий XIX века.

Изучение наследственности и изменчивости у высших организмов связано с большими трудностями из-за большой продолжительности их жизни и немногочисленности потомства.

Удобным объектом для этого изучения являются микроорганизмы, для которых характерен короткий жизненный цикл, быстрое размножение и способность давать многочисленное потомство. Кроме того, они обладают выраженной морфологией, которую можно изучать визуально при помощи светового микроскопа. Микроорганизмы биохимически активны, что легко учитывать при использовании специальных питательных сред.

Способность микроорганизмов изменять свои свойства при воздействии различных факторов (температура, ультрафиолетовое и рентгеновское излучение и др.) позволяет широко использовать их в качестве модели при изучении наследственности и изменчивости.

Первым объектом генетических исследований была кишечная палочка, которая хорошо культивируется в лабораторных условиях. Важное значение имело также то, что морфологические, культуральные и биохимические свойства этой бактерии хорошо изучены. В дальнейшем объектом генетических исследований стали и другие бактерии, а также вирусы.

Исследования генетики микроорганизмов показали, что у них роль носителя генетической информации играет ДНК (у некоторых вирусов РНК).

Молекула ДНК в бактериях состоит из двух нитей, каждая из которых спирально закручена относительно другой. При делении клетки нитчатая спираль удваивается - каждая из нитей служит как бы шаблоном или матрицей, на которой строится новая нить. При этом каждая нить, возникшая в процессе деления клеток, содержит вновь образовавшуюся двунитчатую молекулу ДНК.

В состав ДНК входят четыре азотистых основания - аденин, гуанин, цитозин и тимин, порядок расположения в цепи у разных организмов определяет их наследственную информацию, закодированную в ДНК.

Функциональной единицей наследственности является ген, который представляет собой участок нити ДНК. В генах записана вся информация, касающаяся свойств клетки.

Полный набор генов, которым обладает клетка, называется генотипом. Гены подразделяются на структурные, несущие информацию о конкретных белках, вырабатываемых клеткой, и гены-регуляторы, регулирующие работу структурных генов. Например, клетка вырабатывает те белки, которые необходимы ей в данных условиях, однако при изменении условий гены-регуляторы изменяют свойства клетки, приспособляя их к новым условиям.

Изменения морфологических, культуральных, биохимических и других свойств микроорганизмов, возникающие под действием внешних факторов, взаимосвязаны. Например, изменения морфологических свойств сопровождаются обычно изменениями физиологических особенностей клетки.

В процессе изучения изменчивости микроорганизмов была обнаружена особая форма изменчивости - диссоциация. Этот вид изменчивости был описан П. де Крюи и Дж. Аркрайтом и выражается в том, что при посеве некоторых культур на плотные питательные среды происходит разделение колоний на два типа: гладкие, круглые, блестящие колонии с ровными краями - S-форма (от англ. smooth - гладкий), и плоские,

непрозрачные колонии неправильной формы, с неровными краями - R-форма (от англ. rough - шероховатый). Существуют также переходные формы: M-формы (слизистые) и g-формы (карликовые).

Колонии, относящиеся к гладкой S-форме, могут при определенных условиях переходить в R-форму и обратно, однако переход R-формы в S-форму происходит труднее.

Диссоциация наблюдается у ряда бактерий, в частности у возбудителей сибирской язвы, чумы и др.

Характеристика S- и R-форм колоний

S-форма	R-форма
Колонии гладкие, блестящие правильной выпуклой формы	Колонии мутные, шероховатые неправильной формы,
При росте в бульоне равномерная муть	Растут в бульоне в виде осадка
У подвижных бактерий имеются жгутики	У подвижных бактерий жгутики могут отсутствовать
У капсульных бактерий имеется капсула	Капсулы отсутствуют
Биохимически активны	Биохимические свойства выражены слабо
Болезнетворны	Большинство бактерий менее болезнетворны
Выделяются чаще в остром периоде заболевания	Выделяются обычно при хронической форме заболевания

Болезнетворные бактерии чаще бывают в S-форме. Исключением являются возбудители туберкулеза, чумы, сибирской язвы, у которых болезнетворной является R-форма (рис. 26).

Изменения, возникающие в бактериальных клетках могут быть ненаследуемые - фенотипическая изменчивость и наследуемые - генотипическая изменчивость.

2. Фенотипическая изменчивость (модификация)

Модификация микроорганизмов возникает как ответ клетки на неблагоприятные условия ее существования. Это адаптивная реакция на внешние раздражители. Модификация не сопровождается изменением генотипа, в связи с чем возникшие в клетке изменения по наследству не передаются. При восстановлении оптимальных условий возникшие изменения утрачиваются. Модификация может касаться разных свойств микроорганизмов - морфологических, культуральных, биохимических и др.

Морфологическая модификация выражается в изменениях формы и величины бактерий. Например, при добавлении пенициллина к питательной среде клетки некоторых бактерий удлиняются. Недостаток в среде солей кальция вызывает у палочки сибирской язвы повышенное спорообразование. При повышенной концентрации солей кальция способность образовывать споры утрачивается и т. д. При длительном росте бактерий в одной и той же среде возникает полиморфизм, обусловленный влиянием накопившихся в ней продуктов их жизнедеятельности.

Культуральная модификация состоит в изменении культуральных свойств бактерий при изменении состава питательной среды. Например, при недостатке кислорода у стафилококка утрачивается способность образовывать пигмент. Чудесная палочка при комнатной температуре образует ярко-красный пигмент, но при 37° С способность образовывать этот пигмент утрачивается и т. д.

Биохимическая (ферментативная) модификация. Каждый вид бактерий имеет определенный набор ферментов, благодаря которым они усваивают питательные вещества. Эти ферменты вырабатываются на определенных питательных субстратах и предопределены генотипом.

В процессе жизнедеятельности бактерий обычно функционируют не все гены, ответственные за синтез соответствующих ферментов. В геноме бактерий всегда имеются запасные возможности, т. е. гены, определяющие выработку адаптивных ферментов. Например, кишечная палочка, растущая на среде, не содержащей углеводов лактозу, не вырабатывает фермент лактазу, но если пересеять ее на среду с лактозой, то она начинает вырабатывать этот фермент. Адаптивные ферменты позволяют приспособиться к определенным условиям существования.

Таким образом, модификация - это способ приспособления микроорганизма к условиям внешней среды, обеспечивающий им возможность расти и размножаться в измененных условиях. Приобретенные свойства не передаются по наследству, поэтому они не играют роли в эволюции, а способствуют в основном выживанию микробных популяций.

3. Генотипическая (наследуемая) изменчивость

Генотипическая изменчивость может возникать в результате мутаций и генетических рекомбинаций.

Мутации (от лат. mutatio - изменять) - это передаваемые по наследству структурные изменения генов.

Крупные мутации (геномные перестройки) сопровождаются выпадением или изменением относительно крупных участков генома - такие мутации, как правило, необратимы.

Мелкие (точковые) мутации связаны с выпадением или добавлением отдельных оснований ДНК. При этом изменяется лишь небольшое число признаков. Такие измененные бактерии могут полностью возвращаться в исходное состояние (ревертировать).

Бактерии с измененными признаками называются мутантами. Факторы, вызывающие образование мутантов, носят название мутагенов.

Бактериальные мутации делят на спонтанные и индуцированные. Спонтанные (самопроизвольные) мутации возникают под влиянием неконтролируемых факторов, т. е. без вмешательства экспериментатора. Индуцированные (направленные) мутации появляются в результате обработки микроорганизмов специальными мутагенами (химическими веществами, излучением, температурой и др.).

В результате бактериальных мутаций могут отмечаться: а) изменение морфологических свойств; б) изменение культуральных свойств; в) возникновение у микроорганизмов устойчивости к лекарственным препаратам; г) потеря способности синтезировать аминокислоты, утилизировать углеводы и другие питательные вещества; д) ослабление болезнетворных свойств и т. д.

Если мутация приводит к тому, что мутагенные клетки обретают по сравнению с остальными клетками популяций преимущества, то формируется популяция из мутантных клеток и все приобретенные свойства передаются по наследству. Если же мутация не дает клетке преимуществ, то мутантные клетки, как правило, погибают.

Генетические рекомбинации.

Трансформация. Клетки, которые способны воспринять ДНК другой клетки в процессе трансформации, называются компетентными. Состояние компетентности часто совпадает с логарифмической фазой роста.

Трансдукция - это перенос генетической информации (ДНК) от бактерии донора к бактерии реципиенту при участии бактериофага. Трансдуцирующими свойствами обладают в основном умеренные фаги. Размножаясь в бактериальной клетке, фаги включают в состав своей ДНК часть бактериальной ДНК и передают ее реципиенту. Различают три типа трансдукции: общую, специфическую и abortивную.

1. Общая трансдукция - это передача различных генов, локализованных на разных участках бактериальной хромосомы. При этом бактерии доноры могут передать реципиенту разнообразные признаки и свойства - способность образовывать новые ферменты, устойчивость к лекарственным препаратам и т. д.

2. Специфическая трансдукция - это передача фагом только некоторых специфических генов, локализованных на специальных участках бактериальной хромосомы. В этом случае передаются только определенные признаки и свойства.

3. Abortивная трансдукция - перенос фагом какого-то одного фрагмента хромосомы донора. Обычно этот фрагмент не включается в хромосому клетки реципиента, а циркулирует в цитоплазме. При делении клетки реципиента этот фрагмент передается только одной из двух дочерних клеток, а второй клетке достается неизменная хромосома реципиента.

С помощью трансдуцирующих фагов можно передать от одной клетки другой целый ряд свойств, таких как способность образовывать токсины, споры, жгутики, продуцировать дополнительные ферменты, устойчивость к лекарственным препаратам и т. д.

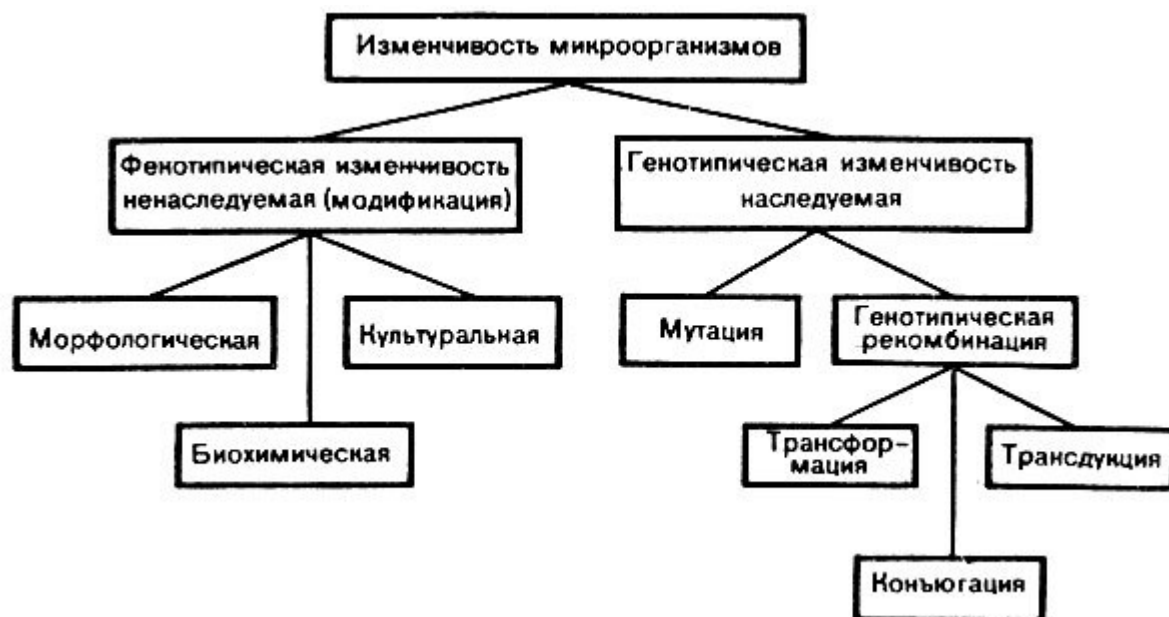
Конъюгация - это передача генетического материала от одной бактерии к другой при непосредственном контакте клеток. Клетки, передающие генетический материал, называются донорами, воспринимающие его - реципиентами. Этот процесс носит односторонний характер - от клетки донора к клетке реципиента.

Бактерии донора обозначаются F⁺ (мужской тип), а бактерии реципиента - F⁻ (женский тип). При тесном сближении клеток F⁺ и F⁻ между ними возникает цитоплазматический мостик. Образование мостика контролируется фактором F (от англ. fertility - плодовитость). Этот фактор содержит гены, ответственные за образование половых ворсинок (sex-pili). Функцию донора могут выполнять только те клетки, которые содержат фактор F. Клетки реципиента лишены этого фактора. При скрещивании фактор F передается клеткой донора реципиенту. Получив фактор F, женская клетка сама становится донором (F⁺).

Процесс конъюгации можно прервать механическим способом, например встряхиванием. В этом случае реципиент получает неполную информацию, заключенную в ДНК.

Перенос генетической информации путем конъюгации лучше всего изучен у энтеробактерий.

Конъюгация, как и другие виды рекомбинации, может осуществляться не только между бактериями одного и того же вида, но и между бактериями разных видов. В этих случаях рекомбинация называется межвидовой.



Плазмиды - это сравнительно небольшие внехромосомные молекулы ДНК бактериальной клетки. Они расположены в цитоплазме и имеют кольцевую структуру. В плазмидах содержится несколько генов, функционирующих независимо от генов, содержащихся в хромосомной ДНК.

Типичным признаком плазмид служит их способность к самостоятельному воспроизведению (репликации).

Они могут также переходить из одной клетки в другую и включать в себя новые гены из окружающей среды. К числу плазмид относятся:

Профаги, вызывающие у лизогенной клетки ряд изменений, передающихся по наследству, например способность образовывать токсин (см. трансдукцию).

F-фактор, находящийся в автономном состоянии и принимающий участие в процессе конъюгации (см. конъюгацию).

R-фактор, придающий клетке устойчивость к лекарственным препаратам (впервые R-фактор был выделен из кишечной палочки, затем из шигелл). Исследования показали, что R-фактор может быть удален из клетки, что вообще характерно для плазмид.

R-фактор обладает внутривидовой, межвидовой и даже межродовой трансмиссивностью, что может явиться причиной формирования трудно диагностируемых атипичных штаммов.

Бактериоциногенные факторы (col-факторы), которые впервые были обнаружены в культуре кишечной палочки (*E. coli*), в связи с чем названы колицинами. В дальнейшем они были выявлены и у других бактерий: холерного вибриона - вибриоцины, стафилококков - стафилоцины и др.

Col-фактор - это маленькая автономная плазида, которая детерминирует синтез белковых веществ, способных вызывать гибель бактерий собственного вида или близкородственного. Бактериоцины адсорбируются на поверхности чувствительных клеток и вызывают нарушения метаболизма, что приводит клетку к гибели.

В естественных условиях только единичные клетки в популяции (1 на 1000) спонтанно продуцируют колицин. Однако при некоторых воздействиях на культуру

(обработка бактерий УФ-лучами) количество колицинпродуцирующих клеток увеличивается.

4. Практическое значение изменчивости

Еще Пастер искусственным путем получил необратимые изменения у возбудителей бешенства, сибирской язвы и приготовил вакцины, предохраняющие от этих заболеваний. В дальнейшем исследования в области генетики и изменчивости микроорганизмов позволили получить большое число бактериальных и вирусных штаммов, используемых для получения вакцин.

Результаты исследования генетики микроорганизмов с успехом были использованы для выяснения закономерностей наследственности высших организмов.

Большое научное и практическое значение имеет также новый раздел генетики - генная инженерия.

Методы генной инженерии позволяют изменять структуру генов и включать в хромосому бактерий гены других организмов, ответственных за синтез важных и нужных веществ. В результате микроорганизмы становятся продуцентами таких веществ, получение которых химическим путем представляет очень сложную, а иногда даже невозможную задачу. Этим путем в настоящее время получают такие медицинские препараты, как инсулин, интерферон и др. При использовании мутагенных факторов и селекции были получены мутанты-продуценты антибиотиков, которые в 100-1000 раз активнее исходных.

Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Гибридологический анализ».

Вопросы:

1. Основные принципы гибридологического анализа
2. Правило единообразия первого поколения
3. Правило расщепления. Второй закон
4. Гипотеза «чистоты гамет»

Гибридологический метод – изучение наследования путем гибридизации (скрещивания), то есть объединения двух генетически разных организмов (гамет). Гетерозиготный организм, который получается при этом, называется гибридом, а потомство – гибридным.

1. Основные принципы гибридологического анализа:

- 1) для скрещивания используются чистосортные (гомозиготные) родительские организмы, которые отличаются между собою за одной или несколькими парами альтернативных признаков;
- 2) проводится точный количественный учет потомства в отдельности за каждым исследуемым признаком в ряде поколений.

С помощью скрещивания можно установить:

1. доминантен или рецессивен исследуемый признак (и соответствующий ему ген);
2. генотип организма;
3. взаимодействие генов и характер этого взаимодействия;
4. явление сцепления генов;

5. расстояние между генами;
6. сцепление генов с полом.

Сущность гибридологического метода изучения наследственности состоит в том, что о генотипе организма судят по признакам его потомков, полученных при определенных скрещиваниях. Основы этого метода были заложены работами Г. Менделя. Мендель скрещивал между собой сорта гороха, различающиеся теми или иными признаками (формой и окраской семян, окраской цветков, высотой стебля и др.), а затем следил, как наследуются признаки того и другого родителя их потомками в первом, втором и последующих гибридных поколениях. Прodelав эту работу на достаточно большом количестве растений, Г. Мендель смог установить очень важные статистические закономерности количественного соотношения гибридных растений, обладающих признаками того и другого исходного сорта. Гибридологический метод нашел широкое применение в науке и практике.

Гибридологический метод не подходит для человека по морально-этическим соображениям, а так же из-за малого количества детей и позднего полового созревания, скрещивать *homo sapiens* в эксперименте не представляется возможным. Поэтому для изучения генетики человека применяют косвенные методы.

Результаты были обобщены Менделем в следующих трех положениях:

- правило единообразия первого гибридного поколения;
- закон расщепления второго гибридного поколения;
- гипотеза чистоты гамет.

2. Правило единообразия первого поколения:

при скрещивании гомозиготных особей, отличающихся друг от друга по одной паре альтернативных признаков, все потомство в первом поколении единообразно как по фенотипу, так и по генотипу.

3. Правило расщепления. Второй закон.

При скрещивании однородных гибридов первого поколения между собой (самоопыление или родственное скрещивание) во втором поколении появляются особи как с доминантными, так и с рецессивными признаками, т. е. наблюдается расщепление.

Согласно второму правилу Менделя можно сделать вывод, что:

- 1) аллельные гены, находясь в гетерозиготном состоянии, не изменяют друг друга;
- 2) при созревании гамет у гибридов образуется приблизительно равное число гамет с доминантными и рецессивными аллелями;
- 3) при оплодотворении мужские и женские гаметы, несущие доминантные и рецессивные аллели, свободно комбинируются.

Таким образом, второе правило Менделя формулируется так: при скрещивании двух гетерозиготных особей, т. е. гибридов, анализируемых по одной альтернативной паре признаков, в потомстве наблюдается расщепление по фенотипу в соотношении 3:1 и по генотипу 1:2:1.

4. Гипотеза «чистоты гамет».

Правило расщепления показывает, что хотя у гетерозигот проявляются лишь доминантные признаки, однако рецессивный ген не утрачен, более того, он не изменился. Следовательно, аллельные гены, находясь в гетерозиготном состоянии, не сливаются, не разбавляются, не изменяют друг друга. При образовании половых клеток в каждую гамету попадает только один ген из аллельной пары.

Лекция №4. (2 часа)
Тема: «Трансформация».

Вопросы:

1. История открытия и изучения
 2. Трансформация у прокариот.
 3. Трансформация у эукариот.
 4. Генетическое картирование при трансформации
-

1.История открытия и изучения.

Трансформация - процесс поглощения клеткой организма свободной молекулы ДНК из среды и встраивания её в геном, что приводит к появлению у такой клетки новых для неё наследуемых признаков, характерных для организма-донора ДНК.

Трансформация была открыта в 1928 году, когда британский учёный Ф. Гриффит показал возможность превращения непатогенных штаммов *Streptococcus pneumoniae* в патогенные (различаются наличием полисахаридной капсулы, позволяющей закрепляться на тканях высших организмов) в результате взаимодействия с убитыми клетками патогенных штаммов.

Эксперимент Гриффита был выполнен в 1928 году Фредериком Гриффитом, доказывает, что бактерии способны передавать генетическую информацию по механизму трансформации. Гриффит заражал мышей двумя штаммами пневмококков (*Streptococcus pneumoniae*) — типа III-S (гладкие) и II-R (шероховатые). Пневмококки штамма III-S покрыты полисахаридной капсулой, которая защищает их от иммунной системы хозяина, и являются вирулентными, то есть способны приводить к смерти зараженной особи. Бактерии штамма II-R не имеют защитной капсулы и невирулентны. До эксперимента Гриффита бактериологи полагали, что виды неизменны и сохраняют свои свойства из поколения в поколение. В ходе эксперимента бактерии вирулентного штамма III-S убивали нагреванием и добавляли к бактериям штамма II-R. По отдельности убитые бактерии III-S и живые бактерии II-R не приводили к смерти мышей. Однако в крови мышей, умерших после введения смеси, были обнаружены бактерии обоих штаммов, III-S и II-R. Гриффит пришел к заключению, что невирулентные бактерии штамма II-R трансформировались в вирулентный штамм каким-то компонентом убитого штамма III-S. В настоящее время известно, что «трансформирующим началом» в эксперименте Гриффита была ДНК штамма III-S. Нагревание убивало бактерии, однако их ДНК оставалась неповрежденной и в ходе эксперимента захватывалась бактериями штамма II-R. Бактерии штамма III-S содержат гены, кодирующие компоненты, необходимые для синтеза полисахаридной оболочки. Бактерии штамма II-R, получившие эти гены, получали защиту от иммунной системы мыши и убивали последних. Штамм бактерий в ходе эксперимента изменялся. Точная природа трансформирующего начала (ДНК) была установлена в эксперименте Эвери, Маклеода и Маккарти, а также в эксперименте Херши и Чейз.

Эксперимент Освальда Эвери, Колина Маклауда и Маклина Маккарти, произведённый в 1944 году, доказал, что веществом, вызывающим трансформацию бактерий, является ДНК. Это явилось первым материальным доказательством роли ДНК в наследственности. Эксперимент Эвери, Маклауда и Маккарти стал кульминацией исследований, начатых экспериментом Гриффита в 1928 году и проводившихся в Рокфеллеровском институте медицинских исследований в 1930-х — 1940-х годах. В эксперименте Гриффита убитые пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*) вирулентного штамма III-S, введенные с живыми невирулентными пневмококками штамма II-R, вызывали инфекцию типа III-S. В статье, опубликованной в феврале 1944 года в Журнале экспериментальной медицины (англ. *Journal of Experimental Medicine*), Эвери с соавторами показал, что ДНК, но

не белки являлись веществом, определяющим наследственность у бактерий. После разработки метода серологического типирования медики получили возможность определять принадлежность бактерий к тому или иному штамму. Человек или животное, в организм которого попадает определенный штамм бактерий, в результате иммунного ответа образует антитела, специфически реагирующие с антигенами на поверхности этих бактерий. Содержащая антитела сыворотка крови может быть выделена и использована для тестирования разных штаммов. Антитела реагируют только с бактериями того типа, который использовался при иммунизации. Штаммы пневмококка были впервые описаны и типированы немецким бактериологом Фридрихом Нойфельдом (нем. *Fred Neufeld*). До исследований Гриффита бактериологи полагали, что штаммы не изменяются от поколения к поколению. В эксперименте Гриффита, результаты которого были опубликованы в 1928 году, было установлено, что какой-то «трансформирующий агент» заставляет пневмококков превращаться из одного штамма в другой. Гриффит, британский офицер, медик, многие годы занимался серологическим типированием пневмонии. Гриффит предполагал, что штаммы, склонные к вирулентности и невирулентные штаммы превращаются друг в друга (но не предполагал, что разные штаммы могут одновременно заражать один организм). Проверая данную возможность, Гриффит показал, что трансформация может происходить в случае, когда мышей иммунизировали убитыми бактериями вирулентного штамма и живыми бактериями невирулентного штамма. Позднее из умерших мышей были выделены живые бактерии вирулентного штамма.

Данные, полученные Гриффитом, позднее были подтверждены Нойфельдом в Институте Коха и Мартином Досоном в Рокфеллеровском институте. Учёные Рокфеллеровского института продолжили изучение трансформации в последующие годы. Совместно с Ричардом Сиа Досон разработал метод трансформации клеток бактерий *in vitro* (эксперимент Гриффита был сделан в условиях *in vivo*). После отъезда Досона в 1930 году, Джеймс Эллоуэй предпринял попытки продолжить исследования Гриффита и к 1933 году получил водный экстракт трансформирующего агента. Колин Маклауд работал над очисткой этих растворов с 1934 по 1937 год. Исследования были продолжены в 1940 году и завершены Маклином Маккарти.

Эксперимент. Пневмококки в норме образуют *гладкие* (то есть крупные, с ровной поверхностью) колонии и имеют полисахаридную капсулу, компоненты которой и запускают образование антител. В ходе эксперимента пневмококки, образующие гладкие колонии, были убиты нагреванием, и из них был извлечён компонент, растворимый в водно-солевом растворе. Белки были осаждены хлороформом, а полисахаридные капсулы, обуславливающие антигенные свойства бактерий, гидролизваны специфичным ферментом. Для подтверждения полного гидролиза капсул, была проведена процедура иммунопреципитации специфическими антителами. После разделения в спирте из полученной активной фракции были выделены волокнистые тяжи. Химический анализ показал, что соотношение углерода, водорода, азота и фосфора в полученном осадке соответствует соотношению этих же элементов в молекуле ДНК. Для подтверждения того, что действующим началом трансформации является именно ДНК, а не РНК, белки или другие компоненты клетки, Эвери с сотрудниками обработали смесь трипсином, химотрипсином, рибонуклеазой, но эта обработка никак не влияла на трансформирующие свойства. Лишь обработка ДНКазой приводила к разрушению трансформирующего начала. Таким образом было установлено, что действующим началом бактериальной трансформации является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК).

В 1944 году О. Эйвери (США) показал, что для передачи признака достаточно обработки ДНК патогенного штамма пневмококка. Это открытие стало первым свидетельством роли ДНК как носителя наследственности. В 1960-х годах началось изучение трансформации у животных, в конце 1970-х - у растений.

1. Трансформация у прокариот.

В любой популяции лишь часть бактерий способна к поглощению из среды молекул ДНК. Состояние клеток, при котором это возможно, называют состоянием компетентности. Обычно максимальное число компетентных клеток наблюдается в конце фазы логарифмического роста. В состоянии компетентности бактерии вырабатывают особый низкомолекулярный белок (фактор компетентности), активизирующий синтез аутолизина, эндонуклеазы I и ДНК-связывающего белка. Аутолизин частично разрушает клеточную стенку, что позволяет ДНК пройти через неё, а также снижает устойчивость бактерий к осмотическому шоку. В состоянии компетентности также снижается общая интенсивность метаболизма. Возможно искусственное приведение клеток в состояние компетентности. Для этого применяют среды с высоким содержанием ионов кальция, цезия, рубидия, электропорацию или заменяют клетки реципиента протопластами без клеточных стенок. Эффективность трансформации определяется количеством колоний, выросших на чашке Петри после добавления к клеткам 1 мкг суперскрученной плазмидной ДНК и посева клеток на питательную среду. Современные методы позволяют добиваться эффективности 10^6 - 10^9 . Поглощаемая ДНК должна быть двухнитевой (эффективность трансформации однонитевой ДНК на порядки ниже, однако несколько возрастает в кислой среде), её длина — не менее 450 пар оснований. Оптимальное pH для прохождения процесса — около 7. Для некоторых бактерий (*Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus*) поглощаемая ДНК должна содержать определённые последовательности. ДНК необратимо адсорбируется на ДНК-связывающем белке, после чего одна из нитей разрезается эндонуклеазой на фрагменты длиной 2-4 тыс. пар оснований и проникает в клетку, вторая полностью разрушается. В случае если эти фрагменты имеют высокую степень гомологии с какими-либо участками бактериальной хромосомы, возможна замена этих участков на них. Поэтому эффективность трансформации зависит от эволюционного расстояния между донором и реципиентом. Общее время процесса не превышает нескольких минут. Впоследствии, при делении, в одну дочернюю клетку попадает ДНК, построенная на основе исходной нити ДНК, в другую — на основе нити с включённым чужеродным фрагментом (выщепление).

Минимальная длина цепочки ДНК, способной интегрироваться в реципиентную хромосому, составляет около 500 пар нуклеотидов. Обычно в рекомбинации участвуют фрагменты донорной ДНК длиной около 200 тысяч пар нуклеотидов, или около 1/200 всей бактериальной хромосомы. Частота трансформации по хромосомным маркерам зависит от свойств данного препарата ДНК, её концентрации, состояния клетки реципиента, вида бактерий. У пневмококков при селекции по одиночному маркеру частота трансформации составляет 10^{-2} – 10^{-3} на одну клетку реципиента. У гемофильных бактерий частота трансформации варьирует от 10^{-3} до 10^{-7} . Трансформация, хотя и с очень низкой частотой, может происходить даже между разными видами бактерий, что помогает установить степень родства между ними.

ДНК, освобождающееся в окружающую среду при лизисе стареющих культур бактерий, в природных условиях обладает трансформирующей способностью. Это значит, что трансформация является одним из природных способов обмена генетическим материалом у бактерий. Очень редко бывает, что единичная бактериальная клетка приобретает в результате трансформации более чем одно новое свойство. Передача через ДНК большего числа признаков наблюдается лишь в том случае, если культура микроба-донора генетически близка к клеткам микроба-реципиента. С помощью трансформирующей ДНК могут передаваться такие признаки, как капсулообразование, синтез необходимых клетке веществ, ферментативная активность, устойчивость к ядам, антибиотикам и другим лекарственным веществам.

2. Трансформация у эукариот.

Трансформация эукариотических клеток с использованием синтетических полимерных катионов. Доставка чужеродных нуклеиновых кислот внутрь интактных

клеток, или трансформация, лежит в основе многих методов генной инженерии. Транспортировка функциональных генов в ткани может сделать возможной коррекцию генной недостаточности и мутаций, следствием которых являются тяжелые наследственные патологии или раковые опухоли. В настоящее время разработан целый ряд приемов для введения ДНК в клетки, среди которых наиболее распространены преципитация фосфатом кальция или диэтиламиноэтил-декстраном (ДЕАЕ-декстраном), электропорация, микроинъекция, встраивание ДНК в реконструированную оболочку вирусов или липосомы (искусственные мембранные липидные везикулы).

4. Генетическое картирование при трансформации

Генетическая карта — схема взаимного расположения структурных генов, регуляторных элементов и генетических маркеров, а также относительных расстояний между ними на хромосоме (группе сцепления). Метод построения генетических карт называется генетическим картированием. Первоначально взаимное расположение генов на хромосомах определяли по частоте кроссинговера (перекрёста) между ними. Впервые на возможность подобного построения генетических карт хромосом экспериментально показали в 1913-1915 годах Т. Морган, А. Стёртевант и другие сотрудники Моргана, основываясь на явлениях сцепления генов и кроссинговера. С тех пор генетическое расстояние принято измерять в сантиморганах (или сантиморганидах, сокращённо — сМ), при этом 1 сМ соответствует частоте кроссинговера в 1 %.

Первым организмом, для которого была получена генетическая карта, стала черная дрозифила (*Drosophila melanogaster*). В дальнейшем генетическое картирование стали осуществлять для других видов. Так, первой птицей и первым домашним животным, для которых была построена генетическая карта, стала курица. Приоритет в построении первой генетической карты курицы и её опубликовании в 1930 году принадлежит советским русским учёным А. С. Серебровскому и С. Г. Петрову.

Помимо генетических, существуют и другие карты хромосом:

- Цитогенетическая карта — пространственное представление порядка взаимного расположения структурных элементов хромосом (например, их дифференциально окрашенных участков на идеограммах или локусовгибридизации меченых ДНК-зондов).
- Физическая карта — представление порядка следования физических маркеров (фрагментов молекулы ДНК), расстояние между которыми определяется в парах нуклеотидов (п. н.).
- Рестрикционная карта — вид физической карты, на которой указан порядок следования и расстояния между сайтами расщепления ДНК-рестриктазами (обычно участок узнавания рестриктазы размером 4—6 п. н.). Маркерами этой карты являются рестрикционные фрагменты (сайты рестрикции).

Конечной целью изучения генома данного организма является интеграция его генетических, цитогенетических и физических карт, а также их привязка к полной геномной последовательности.

Генетическое и физическое картирование. Возможность картирования основана на теоретическом постоянстве процента кроссинговера между определёнными генами. Однако при таком методе генетического картирования физическое расстояние между генами нередко отличается от их генетического расстояния, так как кроссинговер происходит не с одинаковой вероятностью в разных участках хромосом. При использовании современных методов генетического картирования расстояние между генами измеряется в тысячах пар нуклеотидов (т. п. н.) и соответствует физическому. При создании генетической карты устанавливают последовательности расположения генетических маркеров (в этом качестве использовали различные полиморфные локусы

ДНК, то есть наследуемые вариации в структуре ДНК) по длине всех хромосом с определённой плотностью, то есть на достаточно близком расстоянии друг от друга.

Трансформация используется также для генетического картирования у бактерий. При трансформации в хромосому реципиента встраивается сравнительно небольшой фрагмент ДНК. Если два гена находятся в хромосоме на значительном расстоянии друг от друга, они не могут локализоваться в одном и том же фрагменте, трансформирующий ДНК. Одновременная котрансформация двумя независимыми фрагментами, содержащими эти гены, - событие крайне мало вероятное. Таким образом, частота котрансформации двух генетических маркеров служи показателем расстояния между ними.

Лекция №5. (2 часа)

Тема: «Трансдукция».

Вопросы:

1. История изучения.
2. Общая (неспецифическая) трансдукция
3. Специфическая трансдукция
4. История изучения.

1. История изучения Трансдукция (от лат. transductio —перемещение) — процесс переноса бактериальной ДНК из одной клетки в другую бактериофагом. Общая трансдукция используется в генетике бактерий для картирования генома и конструирования штаммов. К трансдукции способны как умеренные фаги, так и вирулентные, последние, однако, уничтожают популяцию бактерий, поэтому трансдукция с их помощью не имеет большого значения ни в природе, ни при проведении исследований.

История изучения. Эстер Lederberg была первой учёной, кому удалось выделить бактериофаг лямбда, ДНК вирус, из *Escherichia coli* K-12 в 1950 году. Собственно открытие трансдукции связано с именем американского учёного Джошуа Lederberga. В 1952 году он совместно с Нортон Циндером обнаружил общую трансдукцию. В 1953 Lederbergom и др. было показано существование abortивной трансдукции, в 1956 - специфической.

Поведение фагов в бактериальной клетке. Фаги способны к реализации двух путей развития в бактериальной клетке:

Литический — после попадания в бактерию ДНК фага сразу же начинается его репликация, синтез белков и сборка готовых фаговых частиц, после чего происходит лизис клетки. Фаги, развивающиеся только по такому сценарию, называют вирулентными.

Лизогенный — попавшая в бактериальную клетку ДНК фага встраивается в её хромосому или существует в ней как плазида, реплицируясь при каждом делении клетки. Такое состояние бактериофага носит название профаг. Система его репликации в этом случае подавлена синтезируемыми им самим репрессорами. При снижении концентрации репрессора профаг индуцируется и переходит к литическому пути развития. Реализующие подобную стратегию бактериофаги называются умеренными. Для некоторых из них стадия профага является обязательной, другие в некоторых случаях способны сразу развиваться по литическому пути.

2. Общая (неспецифическая) трансдукция

Осуществляется фагом P1, существующим в бактериальной клетке в виде плазмиды, фагами P22 и Mu, встраивающимися в любой участок бактериальной хромосомы. После

индуцирования профага с вероятностью в 10^{-5} на одну клетку возможна ошибочная упаковка фрагмента ДНК бактерии в капсид фага, ДНК самого фага в нём в этом случае нет. Длина этого фрагмента равна длине нормальной фаговой ДНК, его происхождение может быть любым: случайный участок хромосомы, плаزمид, другие умеренные фаги.

Попадая в другую бактериальную клетку, фрагмент ДНК может включаться в её геном, обычно путём гомологичной рекомбинации. Перенесённые фагом плазмиды способны замыкаться в кольцо и реплицироваться уже в новой клетке. В ряде случаев фрагмент ДНК не встраивается в хромосому реципиента, не реплицируется, но сохраняется в клетке и транскрибируется. Это явление носит название abortивной трансдукции.

3. Специфическая трансдукция

Наиболее хорошо изучена специфическая трансдукция на примере фага λ . Этот фаг встраивается только в один участок (att-сайт) хромосомы *E. coli* с определённой последовательностью нуклеотидов (гомологичной att-участку в ДНК фага). Во время индукции его исключение может пройти с ошибкой (вероятность 10^{-3} — 10^{-5} на клетку): вырезается фрагмент тех же размеров что и ДНК фага, но с началом не в том месте. При этом часть генов фага теряется, а часть генов *E. coli* захватывается им. Вероятность переноса гена в этом случае падает при увеличении расстояния от него до att-сайта.

Для каждого специфически встраивающегося в хромосому умеренного фага характерен свой att-сайт и, соответственно, расположенные рядом с ним гены, которые он способен передавать. Ряд фагов может встраиваться в любое место на хромосоме и переносить любые гены по механизму специфической трансдукции. Кроме того, в хромосоме обычно есть последовательности, частично гомологичные att-участку ДНК фага. При повреждении полностью гомологичного att-сайта можно добиться включения фага в хромосому по этим последовательностям и передачу в ходе специфической трансдукции генов, соседних уже с ними.

Когда умеренный фаг, несущий бактериальные гены, встраивается в хромосому новой бактерии-хозяина, она содержит уже два одинаковых гена — собственный и принесённый извне. Поскольку фаг лишён части собственных генов, часто он не может индуцироваться и размножиться. Однако при заражении этой же клетки «вспомогательным» фагом того же вида, индуцирование дефектного фага становится возможным. Из хромосомы выходят и реплицируются как ДНК нормального «вспомогательного» фага, так и ДНК дефектного, вместе с переносимыми им бактериальными генами. Поэтому около 50% образующихся фаговых частиц несут бактериальную ДНК. Это явление носит название трансдукции с высокой частотой (HFT от англ. *high frequency transduction*).

Лекция №6. (2 часа)

Тема: «Методы исследования модификационной изменчивости».

Вопросы:

1. Виды модификаций у бактерий
2. Популяционная изменчивость
3. Статистические методы изучения модификационной изменчивости

Фенотипическая (модификационная, ненаследственная) изменчивость — фенотипические, временные, наследственно не закрепленные изменения у бактерий. Модификации также контролируются геномом бактерий, но в отличие от мутаций не сопровождаются изменениями первичной структуры ДНК. Модификации возникают как

адаптивные (лат. *adaptatio* — приспособление) реакции бактерий на изменения окружающей среды. Это позволяет бактериям быстро приспосабливаться к изменяющимся условиям среды и сохранять численность популяции. После устранения причины бактерии реверсируют к исходному фенотипу.

Фенотип (от греч. *phaino* — являю) — совокупность экспрессированных (реализованных) генетически детерминированных признаков, т. е. индивидуальное проявление генома. При этом микроорганизм наследует не признак, а потенциальную способность к проявлению этого признака. Условия окружающей среды способствуют проявлению (экспрессии) генов или, наоборот, подавляют их функциональную активность.

Генотип микроорганизмов проявляется в фенотипе в виде определенных признаков: в способности к образованию жгутиков, капсулы, ферментации углеводов, образованию токсинов. При изменении условий существования фенотип бактерий изменяется при сохранении генотипа.

Фенотип бактерий обозначают теми же знаками, что и генотип, но с прописной буквы.

1. Виды модификаций у бактерий:

1) *морфологические* — проявляются обратимыми изменениями морфологии (обратимая утрата капсулы, жгутиков, фимбрий, КС, способности к спорообразованию). Напр., образующиеся под действием пенициллина L-формы бактерий, лишенные КС, могут сохраняться и даже размножаться внутри клеток хозяина, а после прекращения действия пенициллина вновь реверсировать к исходной форме. При выращивании многих бактерий на питательной среде с суббактериостатическими концентрациями антибиотиков и антисептиков также можно получить их модификации, характеризующиеся изменением морфологических признаков. Напр., *B. anthracis* при 42,5⁰С спор не образует, а при 35–37⁰С — образует споры.

2) *биохимические* — проявляются индуцибельным синтезом ферментов. Напр., кишечная палочка только в присутствии лактозы синтезирует ферменты, необходимые для ее ферментации. Стафилококки только в присутствии пенициллина синтезируют фермент пенициллиназу, разрушающий данный антибиотик.

3) *антигенные* — проявляются сменой антигенов микроорганизмов в ходе инфекционного заболевания в результате включения «молчащих» генов (без их перестройки). К модификациям такого рода относятся изменения антигенной структуры гонококка, трепонемы сифилиса, боррелий возвратного тифа, холерного вибриона.

Стандартное проявление модификации — распределение однородной популяции на несколько типов — **диссоциация**. Обычно диссоциации возникают в условиях, неблагоприятных для исходной популяции. Примером диссоциации может служить изменение вида и структуры бактериальных колоний на твердых питательных средах.

Для обозначения диссоциирующих колоний используют первые буквы английских названий: *S-колонии* (англ. *smooth* — гладкий); *R-колонии* (англ. *rough* — ероховатый); *M-колонии* (англ. *mucoid* — слизистый) и *D-колонии* (англ. *dwarf* — карликовый).

SR-диссоциация — появление в чистой культуре, образующей S-формы колоний, R-форм колоний как внешнее проявление изменений свойств образующих их бактериальных клеток.

Механизмы SR-диссоциации:

- инсерционная мутация, приводящая к утрате генов, контролирующих синтез полисахаридных звеньев ЛПС наружной мембраны КС (у *E. coli*);
- лизогенизация фагами (у *C. diphtheriae*);
- интеграция в хромосому R-плазмиды, транспозонов или IS-последовательностей;
- рекомбинации (у *S. pyogenes*).

Биологическое значение SR-диссоциации: в процессе диссоциации одновременно с изменением морфологии колоний изменяются другие свойства бактерий:

- R-формы более резистентны к физическим и химическим факторам внешней среды, дольше сохраняются в воде, молоке как факторах передачи инфекций;
- S-формы более резистентны к фагоцитозу и действию антител;
- так как диссоциации сопровождаются изменениями биохимических, морфологических, антигенных и вирулентных свойств возбудителей, это значительно усложняет этиологическую диагностику.

2. Популяционная изменчивость — изменчивость, возникающая в результате конкурентных отношений в популяции бактерий между особями с различными генотипами. При этом происходит селективный отбор мутантных особей, потомство которых будет составлять все увеличивающуюся часть популяции, в результате чего изменяется генотипический состав и фенотипические свойства популяции в целом.

Практическое использование изменчивости

Практическое использование изменчивости:

- получение аттенуированных вакцинных штаммов;
- получение антибиотиков;
- изучение механизмов антибиотикорезистентности;
- биотехнология (получение диагностических, лечебных и профилактических препаратов с помощью генно-инженерных методов);
- разработка биологического оружия (с этой целью отбираются вирулентные штаммы микроорганизмов, резистентные к антимикробным веществам);
- изменчивость патогенных микроорганизмов — основная движущая сила в развитии и совершенствовании систем защиты человека от чужеродной генетической информации. Микроорганизмы — важный фактор естественного отбора в человеческой популяции.

3. Статистические методы изучения модификационной изменчивости

При изучении явлений изменчивости исследователи имеют дело с совокупностью особей или их признаков. Более общую или полную совокупность называют генеральной. Генеральная совокупность может включать такое большое число особей (признаков), что изучение ее будет очень затруднено или вообще невозможно. В этих случаях для изучения используется выборочная совокупность, или выборка. Например, для определения элементов продуктивности определённого сорта нельзя проанализировать все растения, сохранившиеся на засеянной делянке к моменту уборки урожая. Поэтому используют выборку, состоящую лишь из нескольких десятков растений.

Выборку составляют по принципу случайности, т.к. она должна как можно объективнее отображать генеральную совокупность. Число единиц, составляющих выборку, называется ее объемом и обозначается буквой *n*. Между единицами выборки всегда имеются различия: любой изучаемый признак приобретает разные значения, т.е. варьирует.

Это различие между единицами совокупности называют вариацией, или дисперсией. Отдельная особь или величина изучаемого признака называется вариантом и обозначается буквой x . Минимальные и максимальные значения вариант называются лимитами. Для изучения любой совокупности особей составляют вариационный ряд, группируя по классам и последовательно располагая варианты в порядке возрастания (убывания) значений признака с указанием их частоты - f (число вариант в каждом классе).

Частота отклонения отдельных вариант от средней арифметической генеральной совокупности является функцией их величин. Графически эта закономерность, основанная на законе распределения случайных величин, выражается симметричной плавной кривой, называемой кривой нормального распределения. Чем ближе по значению варианты к средней арифметической, тем чаще они встречаются, и, наоборот, чем больше варианты от нее отклоняются, тем реже они встречаются в генеральной совокупности.

Среднюю арифметическую выражают в тех же единицах измерения, что и характеризуемый ею признак. Она дает обобщенную характеристику изучаемого признака, являясь как бы точкой равновесия, вокруг которого колеблются все его значения. Однако средняя арифметическая не дает представления о характере варьирования данного признака.

Возведение отклонения в квадрат позволяет увеличивать значения положения данного класса в вариационном ряду. При этом чем дальше от середины ряда расположена варианта, тем более увеличивается размах её колебаний и наиболее отдаленные варианты приобретают большее значение.

Среднее квадратическое отклонение характеризует степень разнообразия признака в выборке с определенной средней арифметической. Для применения среднего квадратического отклонения в качестве меры сравнения степени варьирования признаков, выраженных разными единицами измерения, его выражают в процентах от средней арифметической. Этот показатель, будучи величиной относительной, выражает изменчивость признаков в процентах и называется коэффициентом вариации (V).

Лекция №7. (2 часа)

Тема: «Цитоплазматические генетические системы эукариотических клеток».

Вопросы:

1. Нуклеоид
2. Плазмиды
3. Транспозоны

Генетическая система бактерий состоит из ядерных и внеядерных структур. Аналог ядра прокариотов значительно отличается от ядра эукариотических клеток. Он представлен *нуклеоидом*, лишенным оболочки и включающем в себя почти всю ДНК бактерии. Бактериальная хромосома состоит из одной *двунитевой молекулы ДНК кольцевой формы*. Молекула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепочек. Каждый *нуклеотид* состоит из азотистого основания, сахара дезоксирибозы и фосфатной группы. Азотистые основания представлены пуринами (аденин, гуанин) и пиримидинами (тимин, цитозин). Каждый нуклеотид обладает полярностью. У него имеются дезоксирибозный 3'-

конец и фосфатный 5'-конец. Нуклеотиды соединяются в полинуклеотидную цепочку фосфодиэфирными связями между 5'-концом одного нуклеотида и 3'-концом другого. Соединение между двумя цепочками обеспечивается водородными связями комплементарных азотистых оснований: аденина с тиминном, гуанина с цитозином. Нуклеотидные цепи антипараллельны: на каждом конце линейной молекулы ДНК расположены 5'-конец одной цепи и 3'-конец другой цепи. Наследственная информация у бактерий хранится в форме последовательности нуклеотидов ДНК, которая определяет последовательность аминокислотных остатков в молекуле белка. Каждому белку соответствует свой *ген*, т.е., дискретный участок на ДНК, отличающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов. Бактериальная хромосома содержит до 4000 отдельных генов. Совокупность всех генов называется *геномом*. Внешнее проявление генома называется *фенотипом*. Размеры бактериальной хромосомы у различных представителей царства *Procaryotae* варьируют от 3×10^8 до $2,5 \times 10^9$ Д. Бактериальная клетка гаплоидна, а удвоение хромосомы всегда сопровождается ее делением. Генетическая информация в бактериях может содержаться во *внеядерных* (внехромосомных) молекулах ДНК, представленных плазмидами, транспозонами и инсерционными (вставочными) последовательностями. Они не являются жизненно необходимыми, так как не кодируют информацию о синтезе ферментов, участвующих в метаболизме бактериальной клетки.

Плазмиды бактерий представляют собой двунитевые молекулы ДНК размером от 10^6 до 10^8 Д, несущие от 40 до 50 генов. Количество плазмид в бактериальной клетке может быть от 1 до 200. Выделяют плазмиды, находящиеся в виде отдельной замкнутой молекулы ДНК (*эписомы*) и встроенные в хромосому бактерии (*интегрированные плазмиды*). Плазмиды выполняют регуляторные и кодирующие функции. Первые направлены на компенсацию метаболических дефектов, вторые вносят в бактерию информацию о новых признаках. Как составляющая часть генетического материала бактерии плазмиды играют важную роль в ее жизнедеятельности, детерминируя такие характеристики, как способность продуцировать экзотоксины, ферменты или бактериоцины, устойчивость к лекарственным препаратам и т.д.

Удвоение ДНК некоторых плазмид индуцирует деление бактерий, т.е. увеличивает их «плодовитость». Такие плазмиды обозначают как *F-плазмиды* или F-факторы (от англ. *fertility* – плодовитость). Интегрированные F-плазмиды называют *Hfr-плазмиды* или Hfr-факторы (от англ. *high frequency of recombinations* – высокая частота рекомбинаций). Hfr-факторы осуществляют перенос части генетической информации данной хромосомы в другую клетку.

Плазмиды, детерминирующие устойчивость к лекарственным препаратам, называются *R-плазмидами* или R-факторами (от англ. *resistance* – устойчивость). R-плазмиды содержат гены, детерминирующие синтез ферментов, которые разрушают антибактериальные препараты. В результате бактериальная клетка становится устойчивой к действию целой группы лекарственных веществ. Многие R-плазмиды являются трансмиссивными и, распространяясь в популяции бактерий, переносят резистентность к воздействию антибактериальных препаратов.

Плазмиды патогенности контролируют вирулентные свойства микроорганизмов, детерминируя синтез факторов патогенности. Так, например, Ent-плазида определяет синтез энтеротоксина. Развитие инфекционного процесса, вызванного возбудителями

чумы, сибирской язвы, кишечного иерсиниоза, клещевого иксодового боррелиоза связано с функционированием плазмид патогенности.

Конъюгативные плазмиды переносятся от бактерии к бактерии внутри вида или между представителями близкородственных видов в процессе конъюгации. Чаще всего конъюгативными плазмидами являются F- или R-плазмиды. Подобные плазмиды относительно крупные (25-150 млн Д) и часто выявляются у грамотрицательных палочек. Большие плазмиды обычно присутствуют в количестве 1-2 копий на клетку и их репликация тесно связана с репликацией бактериальной хромосомы.

Неконъюгативные плазмиды обычно имеют небольшие размеры и характерны для грамположительных кокков, но встречаются также у некоторых грамотрицательных микроорганизмов (например, у *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*). Мелкие плазмиды могут присутствовать в больших количествах (более 30 на клетку), так как только наличие такого количества обеспечивает их распределение в потомстве во время клеточного деления. При наличии в бактерии одновременно конъюгативных и неконъюгативных плазмид донор может передавать и неконъюгативные плазмиды за счет связывания генетического материала последних с факторами, обеспечивающими их перенос в процессе конъюгации.

Подвижные генетические элементы входят в состав бактериального генома, бактериальной хромосомы и плазмид. К ним относятся *вставочные последовательности* в ДНК и *транспозоны*. Вставочные или инсерционные последовательности (Is-элементы) представляют собой участки ДНК, способные перемещаться из одного места локализации в другое, и содержат только гены, необходимые для перемещения. Is-последовательности осуществляют координацию взаимодействий плазмид, умеренных фагов, транспозонов и нуклеоида для обеспечения репродукции; регулируют активность генов бактериальной клетки. Они могут инактивировать гены, в которые включились («выключение» гена) или, встраиваясь в хромосому, проявлять эффект промотора, включающего или выключающего транскрипцию соответствующих генов.

Транспозоны (Tn) – это сегменты ДНК, состоящие из вставочных последовательностей и структурных генов, обеспечивающих синтез молекул со специфическими биологическими свойствами (токсичность, устойчивость к антибиотикам и др.). Транспозоны не способны к самостоятельной репликации и размножаются только в составе бактериальной хромосомы.

Лекция № 8. (2 часа)

Тема: «Плазмиды».

Вопросы:

- 1.Строение и свойства плазмид.
2. Классификация плазмид.
3. Картирование плазмидной ДНК
4. Значение плазмид.

1. Строение и свойства плазмид.

Все известные плазмиды представляют собой кольцевидные суперспирализованные молекулы двунитевой ДНК, размеры которых варьируют от 1,5 до 200 МД и более (от 1500 до 400 000 пар нуклеотидов). Однако чаще всего встречаются

плазмиды с молекулярной массой 3-6 или 50-70 МД. В соответствии с размерами плазмидной ДНК ее молекулярно-генетическая организация характеризуется определенным уровнем сложности. Чем больше молекулярная масса, тем больше и сложнее набор генов, тем многообразнее функции плазмид. Они несут гены саморепликации; гены, контролирующие самоперенос или мобилизацию на перенос; другие гены, определяющие специфические функции самой плазмиды. Кроме того, в ДНК плазмид могут быть гены, которые наделяют клетку-хозяина многими другими свойствами. Очень часто эти гены интегрируются в плазмидную ДНК в виде транспозонов, поэтому молекулярно-генетическая организация плазмид, особенно высокомолекулярных, очень сложна.

В последние годы они найдены и у низших эукариот. В большинстве случаев плазмиды представляют собой суперскрученные ковалентно-замкнутые кольцевые молекулы ДНК (длиной от 2 до 600 тпн). Благодаря такой структуре они не подвергаются действию нуклеаз. Существуют также линейные плазмиды, на которые нуклеазы не действуют, потому что нити на концах их ДНК защищены белками либо соединяются ковалентно.

Для плазмид как живых существ характерны следующие свойства, частью присущие только им и контролируемые их специфическими генами.

1. Саморегулируемая репликация. Эта функция свойственна всем живым организмам. В составе плазмидных ДНК имеются фиксированная точка *ori* (точка начала репликации) и соответствующие гены, контролирующие репликацию. Репликация мелких плазмид требует, очевидно, дополнительного участия генов клетки-хозяина. Различают плазмиды со строгим контролем репликации и с ослабленным. Строгость контроля репликации плазмид заключается в том, что их дупликация осуществляется синхронно с удвоением бактериальной хромосомы и, по-видимому, одними и теми же репликативными комплексами, в которых главную роль играет ДНК-полимераза III. В бактериальной клетке насчитывается от 1 до 3 копий таких плазмид. Их минимальный размер 20-30 тпн, а максимальный на порядок больше. **Плазмиды с ослабленным контролем репликации** вместо ДНК-полимеразы III используют ДНК-полимеразу I. В каждой бактериальной клетке содержится в среднем 40-50 копий их, в связи с чем эти плазмиды называют еще мультикопийными. Они, как правило, невелики по размеру - не более 15-30 тпн.

2. Явление поверхностного исключения. Этот механизм не позволяет проникнуть в клетку, уже содержащую плазмиду, другой родственной ей плазмиде. Поверхностное исключение обеспечивается синтезом под контролем генов плазмиды особых белков наружной мембраны, которые препятствуют установлению контакта этой клетки с клеткой, несущей такую же плазмиду, или подавляют конъюгативный метаболизм ДНК этой плазмиды.

3. Явление несовместимости. Суть его заключается в том, что две близкородственные плазмиды не могут стабильно сосуществовать в одной клетке, одна из них подвергается элиминации (удалению). Если плазмиды не могут стабильно сосуществовать в одной клетке, их называют несовместимыми. **Несовместимость плазмид** обуславливается блокированием репликации и распределения дочерних молекул ДНК по клеткам.

Несовместимость, вызванная блокированием репликации, наблюдается у плазмид как со строгим, так и с ослабленным контролем репликации. Она приводит к тому, что в клетке только одна из двух плазмид (или один из двух типов их) сохраняет способность к удвоению.

Несовместимость, вызванная блокированием распределения дочерних молекул ДНК по клеткам, характерна для низкокопийных плазмид. В ее основе лежит процесс связывания белком *par* (partition) плазмидной ДНК со специфическим сайтом, располагающимся на клеточной мембране, где и происходит репликация ДНК, а также ее распределение по клеткам при их делении. Предполагается, что у белка *par* определенной плазмиды на мембране только один такой сайт, поэтому с ним может связаться лишь одна

молекула ДНК. Следовательно, плазмиды, имеющие одинаковые или сходные гены *rag*, несовместимы.

Тест на совместимость позволяет разделять плазмиды на группы несовместимости. Их число достигает нескольких десятков. Плазмиды, входящие в одну группу, несовместимы, т.е. исключают друг друга. Несовместимыми могут быть и плазмиды с разным фенотипическим проявлением.

4. Контроль числа копий плазмиды на хромосому клетки. Различают малокопийные (1-4 копии) и многокопийные плазмиды (12-38 копий, например у плазмиды R6K). Информация, необходимая для осуществления репликации плазмиды, обычно заключена в небольшой участок ее ДНК, получивший название основного, или базового репликона. У малокопийных плазмид он состоит из 2,0-2,5 т.п.н., а у многокопийных - из 1 т.п.н. Система, которая регулирует репликацию, контролирует также и число копий, и явление несовместимости.

5. Контроль стабильного сохранения плазмид в клетке-хозяине (контроль стабильного поддержания).

6. Контроль равномерного распределения дочерних плазмид в дочерние бактериальные клетки. Последние две функции тесно взаимосвязаны. Природные бактериальные плазмиды стабильно сохраняются в клетке-хозяине. Это указывает на то, что их распределение между дочерними клетками происходит не случайно, т. е. не по принципу случайности, а существует генетический механизм контроля не только репликации, но и равномерного распределения (сегрегации) вновь синтезированных плазмид при клеточном делении. Гены, осуществляющие этот контроль, независимы от системы контроля репликации. Более того, эти гены даже взаимозаменяемы у разных плазмид без утраты своих функций. Функции стабильного поддержания и равномерного распределения опосредуются различными механизмами. Взаимосвязь этих функций с жизнью клетки-хозяина настолько важна для плазмид и клеток, что клетки, утратившие плазмиду, погибают. Плазмида «вынуждает» клетку-хозяина даже ценой собственной жизни обеспечивать ее воспроизводство и распространение по вертикали и горизонтали. У F-плазмиды обнаружены гены типа *hok* (*host killing* - убивающие хозяина), продукты которых вызывают быструю гибель клетки, утратившей плазмиду (в содержащих плазмиды клетках действие этих продуктов репрессировано другим геном плазмиды). Следовательно, носительство плазмид для клетки-хозяина становится генетически необходимым, благодаря этому обеспечивается существование плазмид как организмов.

7. Важнейшим свойством плазмид является также их способность переноситься из клетки в клетку при конъюгации. Плазмиды, обладающие собственными системами переноса (оперонами *tra*), называются **конъюгативными**. Они вызывают появление у клеток пилей (волосков) определенного типа, способных адсорбировать специфические фаги.

Конъюгативные плазмиды свойственны, главным образом, грамотрицательным бактериям. Они, как правило, имеют довольно ограниченное число клеток-хозяев, в которые могут переносить и реплицировать свою ДНК. Но есть плазмиды и с широким кругом клеток-хозяев. Например, RP4, выделенная из бактерий *Pseudomonas*, легко переносится при конъюгации в грамотрицательные клетки *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* и др. Следует подчеркнуть, что такой канал переноса генов между различными видами и родами бактерий способствует их адаптации к изменяющимся условиям.

8. Способность к мобилизации на перенос (у неконъюгативных плазмид). Наличие транспозонов в плазмидах способствует их объединению друг с другом или с фаговыми ДНК, т.е. образованию коинтегратов. При этом неконъюгативные плазмиды могут переноситься в другие клетки конъюгативными плазмидами или фагами. Такая форма

пассивного переноса носит название **мобилизации плазмид**. Коинтеграаты в реципиентных клетках распадаются на репликоны, которые продолжают автономное существование.

9. Способность наделять клетку-хозяина дополнительными важными для него биологическими свойствами, способствующими выживанию бактерий, а, следовательно, и плазмид в природе.

Плазмиды придают клеткам различные фенотипические признаки: устойчивость к антибиотикам (тетрациклину, пенициллину, хлорамфениколу и т.д.; всего более 20), катионам (висмута, кадмия, кобальта, ртути, свинца, сурьмы), анионам (арсенату, арсениту), мутагенам (акридинам, этидиумбромиду, УФ-свету), бактериоцинам. Клетки с плазмидами способны вызывать биodeградацию камфоры, ксилола, нафталина, никотин-никотината, n-алканов, салицилата, толуола; синтезировать антибиотики, бактериоцины, гемолизин, инсектициды, пигменты, поверхностные антигены, сероводород, токсины, фибринолизин; использовать в качестве источника углерода различные сахара и необычные аминокислоты; конъюгировать с реципиентными штаммами бактерий; индуцировать опухоли у растений; осуществлять рестрикцию и модификацию ДНК.

Итак, основными биологическими свойствами плазмид являются их способность к репликации, конъюгативность, интегрируемость, несовместимость, поверхностное исключение и фенотипические признаки, которые они придают бактериям.

1. Классификация плазмид.

F-плазида, или половой фактор, представляет собой циркулярно-замкнутую нить ДНК с молекулярной массой $60 \cdot 10^6$. Она контролирует синтез половых ворсинок (sex или F-pili), которые способствуют эффективному спариванию бактерий-доноров с реципиентными клетками при конъюгации. Данная плазида реплицируется в независимом от хромосомы состоянии и передается при конъюгации в клетки бактерий-реципиентов.

Сравнительно легкая элиминация и очень быстрая и эффективная передача F-плазмиды реципиентным клеткам дали основание считать, что она располагается в цитоплазме бактерий вне хромосомы. Однако F-плазида может встраиваться в бактериальную хромосому и находиться с ней в интегрированном состоянии.

R-плазмиды. Известно большое количество R-плазмид, определяющих устойчивость бактерий-хозяев к разнообразным лекарственным препаратам. Передача R-плазмид от одних бактерий к другим привела к их широкому распространению среди патогенных и условно-патогенных бактерий, что чрезвычайно осложнило химиотерапию вызываемых ими заболеваний.

R-плазмиды имеют сложное молекулярное строение. В их состав входят: r-ген, который может содержать более мелкие мигрирующие элементы - Is-последовательности, транспозоны и tra-опероны. R-ген, ответственный за устойчивость бактерий к какому-либо антибиотику, контролирует синтез фермента, вызывающего его инактивацию или модификацию.

Плазмиды патогенности. Данные плазмиды контролируют вирулентные свойства бактерий и токсинообразование, особенно энтеробактерий. В частности, F-, R-плазмиды и плазмиды бактериоциногенности (чаще в форме эписом) включают *tox+*-транспозоны, кодирующие токсинообразование. Нередко *tox+*-плазмиды кодируют синтез интактных протоксинов (например, дифтерийного или ботулинического), активируемых клеточными протеазами, образование которых контролируют гены бактериальных хромосом.

Бактериоциногенные плазмиды. В 1925 г. Грациа показал, что некоторые бактерии выделяют в окружающую среду агенты (бактериоцины), убивающие другие бактерии, но не действующие на клетки самого продуцирующего штамма. В норме лишь небольшая часть клеток такой популяции активно образует бактериоцин. Однако некоторые факторы, в частности ультрафиолетовый свет, «индуцируют» синтез ряда бактериоцинов. Бактериоцины известны у большого числа разных грамположительных и

грамотрицательных бактерий. Бактериоцинам дают названия, указывающие на их происхождение: мегацины из *Bacillus megaterium*, субтилицины из *Bacillus subtilis* и колицины из *E. coli*. Наиболее изучены колицины, продуцируемые кишечными палочками, шигеллами и некоторыми другими энтеробактериями. Характерной чертой Col-плазмид является потенциальная летальность для клеток-продуцентов, которая сближает их с профагами. Колициногенные (Col) плазмиды находятся в клетках энтеробактерий в автономном состоянии и передаются при конъюгации без сцепления с хромосомой. Однако некоторые из них (ColV, ColB) могут встраиваться в бактериальную хромосому и находиться в ней в интегрированном состоянии. Они, так же как и F-плазмиды, передаются путем конъюгации в реципиентные клетки, благодаря имеющемуся у них *tra*-оперону.

Биологическая роль бактериоцинов, по-видимому, заключается в том, что они придают штамму-носителю (и популяции плазмид, обитающих в этом штамме) селективное преимущество перед близкородственными штаммами, которых он убивает. Хотя небольшая часть клеток, непосредственно образующих колицин, при этом погибает, клон в целом преуспевает.

Криптические плазмиды. Эти молекулы: ДНК называли *криптическими* (скрытыми) *плазмидами*, так как они не содержат генов, которые можно было бы обнаружить по их фенотипическому выражению.

Плазмиды биодеградации. Данные плазмиды несут информацию об утилизации некоторых органических соединений, которые бактерии используют в качестве источников углевода и энергии. Они могут играть важную роль в экологии патогенных бактерий, обеспечивая им селективные преимущества во время пребывания в объектах окружающей среды и в организме. Плазмиды деградации, часто обнаруживаемые у бактерий, обеспечивают метаболизирование разнообразных веществ, например, у *Pseudomonas* - алифатических углеводородов (октан, декан и др.), ароматических углеводородов (ксилолы, толуол, нафталин и др.), а также продукты их окислительных превращений - салицилат, бензоат, терпенов и хлор содержащих углеводородов, в том числе пестицидов. Другие бактерии содержат плазмиды, позволяющие им разлагать наиболее доступные источники углерода (например, сахарозу, рафинозу и лактозу в случае кишечных бактерий). Такие плазмиды могут кодировать все ферменты данного пути деградации или лишь часть из них; в последнем случае полная деградация возможна при кооперации различных микроорганизмов.

Жизненный цикл плазмид складывается из двух главных процессов: вегетативной (или конъюгативной) репликации и равномерного распределения между дочерними клетками. Оба эти процесса относительно независимы друг от друга и контролируются специфическими системами плазмид. Однако вегетативная репликация плазмид и распределение их между дочерними клетками скоординированы с клеточным делением так, что дочерняя клетка стабильно получает необходимое число копий данной плазмиды.

2. Картирование плазмидной ДНК.

Картирование генов, локализованных в ДНК плазмид, проводят с помощью ряда методов. Для построения генетической карты наилучшим является метод комплементации между штаммами, содержащими перекрывающиеся делеции. Он дает возможность установить последовательность генов, но не позволяет оценить относительные расстояния между ними. Этот метод дополняется электронно-микроскопическим изучением гетеродуплексов, что позволяет установить местоположение той или иной точки на ДНК в единицах, соответствующих тысячам пар оснований.

3. Значение плазмид

Значение плазмид для эпидемиологии и эпизоотологии состоит в том, что они контролируют синтез различных факторов патогенности у многих видов бактерий, в том числе у возбудителей чумы, сибирской язвы, иерсиниозов, дизентерии, эшерихиозов и др. Не вызывает сомнения, что возникновение диареогенных кишечных палочек

(энтеротоксигенных, энтеропатогенных, энтероинвазивных и др.) является следствием приобретения ими плазмид, которые наделяют их факторами адгезии, инвазии и способностью синтезировать термолабильные и термостабильные энтеротоксины. Наличие в природе таких плазмид (особенно с широким кругом хозяев) может стать реальной причиной образования новых вариантов патогенных бактерий.

Не менее важную роль играют R-плазмиды. В условиях широкого применения антибиотиков и других химиопрепаратов происходит естественный отбор тех штаммов патогенных бактерий, которые являются носителями R-плазмид. Среди них формируются новые клоны патогенных бактерий. В настоящее время они играют ведущую роль в эпидемиологии и эпизоотологии инфекционных болезней, и от их распространения во многом зависит эффективность антибиотико- и химиотерапии, а в итоге - здоровье и жизнь.

Общебиологическое значение плазмид заключается в том, что они выполняют, по крайней мере, три важнейшие функции для бактерий, обеспечивая одновременно существование, как бактерий, так и собственное. Во-первых, они контролируют у бактерий обмен генетическим материалом. Во-вторых, контролируя синтез факторов патогенности, они обуславливают благоприятные возможности для размножения патогенных бактерий в естественных для них условиях (в организме животного и человека), а, следовательно, для сохранения этих видов в природе. В-третьих, плазмиды являются уникальным биологическим средством самозащиты бактерий, так как они обеспечивают их приобретенным и наследуемым специфическим иммунитетом против различных химических (лекарств. веществ) и др. агентов.

Лекция №9. (2 часа)

Тема: «Методы переноса генетической информации у бактерий».

Вопросы:

1. Конъюгация
2. Трансформация
3. Трансдукция

Обмен генетическим материалом у бактерий осуществляется путем генетических рекомбинаций. Под *генетической рекомбинацией* подразумевают взаимодействие между двумя геномами, которое приводит к образованию рекомбинаций ДНК и формированию дочернего генома, сочетающего гены обоих родителей. Особенности рекомбинаций у бактерий определяются отсутствием истинного полового процесса и мейоза у прокариот и гаплоидным набором генов. В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический материал, и клетки-реципиенты, которые этот материал воспринимают. В клетку-реципиент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки-донора, т.е. один или несколько генов. Образуется только один рекомбинант, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента с включением фрагментов хромосомы донора.

Рекомбинация может быть *гомологичной*, при которой в процессе разрыва и воссоединения ДНК происходит обмен между участками ДНК, обладающими высокой степенью гомологии. Встречается также *сайт-специфическая* рекомбинация, которая происходит только в определенных участках (сайтах) генома и не требует высокой степени гомологии ДНК, например включение плазмиды в хромосому бактерии. Передача

генетического материала между бактериями осуществляется 3-мя механизмами: конъюгацией, трансдукцией и трансформацией.

Конъюгация— это перенос генетического материала путем прямого контакта между двумя клетками. Необходимым условием конъюгации является наличие в клетке-доноре трансмиссивной плазмиды. Трансмиссивные плазмиды кодируют половые пили, образующие конъюгационную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по которой плазмидная ДНК передается из клетки-донора в клетку-реципиент. В результате такого переноса клетка-реципиент получает донорские свойства. Интегративной трансмиссивной плазмидой является F-фактор. Клетки-доноры, обладающие F-фактором, обозначаются как F^+ -клетки, а клетки-реципиенты, не имеющие F-фактора — F^- -клетки. Если F-фактор встраивается в хромосому клетки-донора и начинает функционировать в виде единого с хромосомой трансмиссивного репликона, то хромосома донора приобретает способность передаваться в клетку-реципиент. Донорские клетки, имеющие встроенный в хромосому F-фактор, называются *Hfr-клетками*. Хромосомная ДНК реплицируется, одна цепь копии хромосомы переносится в реципиентную F^- -клетку, тогда как другая остается в Hfr^+ -клетке, т.е. донор сохраняет свое генетическое постоянство.

Передача генетического материала при конъюгации начинается с расщепления ДНК в районе локализации F-фактора. Одна нить донорской ДНК передается через конъюгационный мостик в клетку-реципиент. Процесс сопровождается достраиванием комплементарной нити до образования двунитевой структуры. Переданная в реципиентную клетку и достроенная до двунитевой структуры, нить ДНК рекомбинирует с гомологичным участком реципиентной ДНК с образованием стабильной генетической структуры. Биологическая значимость конъюгации хорошо видна на примере распространения резистентности бактерий к антибиотикам. Устойчивость к антибиотикам бактерия может получить в результате мутации, что происходит 1 раз на каждые 10^6 клеточных делений. Однако, однажды изменившись, генетическая информация может быстро распространяться среди сходных бактерий посредством конъюгации, поскольку каждая третья из близкородственных бактерий способна именно к этому типу генетического переноса.

Трансформация— передача генетической информации через выделенную из клетки-донора ДНК. Процесс трансформации может произвольно происходить в природе у некоторых видов бактерий, чаще грамположительных, когда ДНК, выделенная из погибших клеток, захватывается реципиентными клетками. Как правило, любая чужеродная ДНК, попадающая в бактериальную клетку, расщепляется рестрикционными эндонуклеазами; но при некоторых условиях такая ДНК может быть интегрирована в геном бактерии. По происхождению ДНК может быть плазмидной либо хромосомной и нести гены, трансформирующие реципиента. Подобным путем процессы трансформации могут распространять гены, кодирующие факторы вирулентности, среди бактериальных популяций; однако в обмене генетической информацией трансформация играет незначительную роль.

Трансформация служит хорошим инструментом для картирования хромосом, поскольку трансформированные клетки включают различные фрагменты ДНК. Определение частоты одновременного приобретения двух заданных характеристик (чем ближе расположены гены, тем более вероятно, что они оба включатся в один и тот же участок ДНК) дает информацию о взаиморасположении соответствующих генов в

хромосоме. Перенос экстрагированной ДНК является основным методом генной инженерии, используемым при конструировании рекомбинантных штаммов с заданным геномом.

Трансдукция– передача бактериальной ДНК посредством бактериофага. В процессе репликации фага внутри бактерий фрагмент бактериальной ДНК проникает в фаговую частицу и переносится вместе с ней в бактерию-реципиент. При этом фаговые частицы как правило дефектны, они теряют способность к репродукции. Так как трансдуцируются лишь небольшие фрагменты ДНК, вероятность рекомбинации, затрагивающей какой-то определенный признак, очень мала: она составляет от 10^{-6} до 10^{-8} . Существуют три типа трансдукции: неспецифическая (общая), специфическая и abortивная.

Общая (неспецифическая) трансдукция– перенос бактериофагом фрагмента любой части бактериальной хромосомы. В клетке, инфицированной бактериофагом, в ходе сборки дочерней популяции в головки некоторых фагов может проникнуть фрагмент бактериальной ДНК или плазмиды либо вместе с вирусной ДНК, либо вместо нее. Этот процесс происходит вследствие того, что бактериальная ДНК фрагментируется после фаговой инфекции и кусочек бактериальной ДНК того же размера, что и фаговая ДНК, проникает в вирусную частицу с частотой приблизительно 1 на 1000 фаговых частиц. При такой форме трансдукции в клетки-реципиенты могут быть внесены практически любые гены. Феномен неспецифической трансдукции может быть использован для картирования бактериальной хромосомы.

Специфическая трансдукция наблюдается в том случае, когда фаговая ДНК интегрирует в бактерию с образованием профага. При исключении ДНК фага из бактериальной хромосомы в результате случайного процесса захватывается прилегающий к месту включения фаговой ДНК фрагмент бактериальной хромосомы. Так как большинство умеренных фагов интегрируют в бактериальную ДНК в специфических участках, для таких бактериофагов характерен перенос в клетку-реципиент определенного участка бактериальной ДНК донора. Специфическая трансдукция может служить механизмом переноса вирулентных генов среди бактерий при условии, что эти гены локализованы в непосредственной близости от мест интеграции профага.

Наиболее характерным примером служит трансдукция, осуществляемая фагом λ . Обычно он трансдуцирует определенные гены: *gal* (кодирует синтез галактозы) и *bio* (кодирует синтез биотина). При переходе в состояние профага фаг λ включается в определенный участок хромосомы бактерии-хозяина – между генами *gal* и *bio*. Отделение фаговой ДНК от бактериальной хромосомы может происходить неточно и какой-то фрагмент ее останется в хромосоме, а близко расположенные гены будут захвачены фаговой ДНК. В случае заражения трансдуцирующим фагом клеток, дефектных по определённому гену, например *gal*⁻, может произойти рекомбинация с заменой собственного дефектного гена бактерии интактным трансдуцированным геном с образованием рекомбинанта (трансдуктанта) *gal*⁺.

Abortивная трансдукция. При abortивной трансдукции внесенный фрагмент ДНК донора не встраивается в хромосому реципиента, а остается в цитоплазме и там самостоятельно функционирует. Впоследствии он передается одной из дочерних клеток (т.е. наследуется однолинейно) и затем теряется в потомстве.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Организация генетического аппарата микроорганизмов»

Цель работы: изучить организацию генетического аппарата прокариот и эукариотических микроорганизмов.

Задачи работы:

1. Изучить строение генетического аппарата бактерий
2. Изучить строение генетического аппарата грибов родов *Aspergillus*, *Neurospora* и дрожжей
3. Изучить строение генетического аппарата водорослей рода *Chlamydomonas*
4. Изучить строение генетического аппарата бактериофагов

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

мультимедиа проектор, экран, компьютер, учебная доска

Описание (ход) работы:

Микроорганизмы в отличие от классического объекта генетики - мушка дрозофила, обладают уникальными для генетических экспериментов свойствами.

1. Гаплоидностью, т.е. наличием одной хромосомы, что устраняет явление доминантности.
2. Высокой скоростью размножения обеспечивающей получение в лабораторных условиях многомиллиардных популяций в течение нескольких часов.
3. Высокой разрешающей способностью методов генетического анализа бактерий и вирусов, позволяющей обнаружить их мутанты с частотой 10^{-9} и ниже.
4. Половой дифференциацией, заключающейся в существовании донорных и реципиентных бактериальных клеток, соответственно отдающих или воспринимающих генетическую информацию.
5. Наличием у бактерий обособленных фрагментов ДНК - плазмид, транспозонов и Is-последовательностей.

Бактерии

Генетический аппарат бактерий представлен бактериальной хромосомой, внехромосомными факторами наследственности - плазмидами, а также входящими в их состав мобильными генетическими элементами (схема 1).

Жизненно важная генетическая информация бактерий сосредоточена в располагающейся непосредственно в цитоплазме единственной хромосоме, что позволяет отнести бактерии к гаплоидным организмам. Возможны некоторые исключения, например, *Vibrio cholerae* содержит две кольцевидные хромосомы размером 2,69 и 1,07 x 10^6 п.о.

ДНК в хромосоме суперспирализована; ее размер в раскрученном состоянии может достигать 1 мм. ДНК состоит из двух комплементарных друг другу цепочек: напротив аденина одной цепочки в другой находится тимин, напротив гуанина – цитозин. Цепи антипараллельны и располагаются во взаимно противоположных направлениях: одна в ориентации 5' → 3', другая - 3'→ 5'. На 5' конце ДНК находится фосфатная группа, прикрепленная к 5-ому углеродному атому дезоксирибозы. 3' конец оканчивается ОН-

группой, присоединяющейся к 3-ему углеродному атому дезоксирибозы.

В геноме разных видов бактерий содержание нуклеотидов варьирует от $5,8 \times 10^5$ до 13×10^6 п.о., что соответствует приблизительно 10^3 генов (1 ген на 1000 п.о.)

Как правило, микроорганизмы, обитающие во внешней среде, имеют больший размер генома, чем патогены человека и животных, что связано с адаптацией патогенов к одной экологической нише – организму человека. Самый маленький геном среди бактериальных патогенов имеют *Mycoplasma genitalium* ($0,58 \times 10^6$ п.о.), содержащие минимальный набор генов, необходимых для выживания. Ранее сходство микроорганизмов и их принадлежность к одному роду оценивали по содержанию Г+С (в %), которое может варьировать от 29% у *Borrelia burgdorferi* и до 65% у *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* или 67% у *Pseudomonas aeruginosa*. Расшифровка последовательности нуклеотидов в геноме большинства патогенов позволяет использовать первичную структуру ДНК для оценки родства различных видов микроорганизмов. Как правило, бактерии одного рода и семейства проявляют сходство 70 – 80 % генетической информации, и только 20 - 30% объема генома приходится на уникальную для вида или варианта генетическую информацию.

Классификация генов. Основной единицей наследственности, ответственной за формирование какого-либо элементарного признака, является ген, совокупность которых формирует генотип. Гены подразделяются на структурные и функциональные в зависимости от их роли в клетке. Структурные гены детерминируют первичную структуру белков бактерий и могут быть классифицированы на две большие группы:

1. Гены «домашнего хозяйства»:

а) гены, отвечающие за биохимические процессы в клетке (метаболизм аминокислот, углеводов, энергии, липидов, ко-факторов и витаминов, сложных углеводов и липидов, нуклеотидов);

б) гены, отвечающие за биологические процессы клетки (подвижность клеток, обработку информации из внешней среды, транспорт веществ через мембраны, сигнальную трансдукцию, обработку генетической информации, репликацию и репарацию, развитие и деградацию, транскрипцию, трансляцию).

2. Гены добавочных/вспомогательных функций: а) вирулентности; б) устойчивости к антибиотикам; в) деградации редких субстратов (углеводородов нефти, пластификаторов, хлорфенолов и т.д.).

В составе первичной структуры ДНК микроорганизмов могут находиться следующие компоненты: **простые повторяющиеся последовательности (SSR), CpG мотивы.**

В последнее время расшифрована первичная структура ДНК многих микроорганизмов, что требует дальнейшего анализа информации, закодированной в ней. Описание структурных компонентов генома и их функций получило название **аннотирование генома**, которое включает: определение границ, расположения, функций генов и механизмов их регуляции, положение промоторов, содержание Г + Ц, положение CpG островков, геномных повторов, определение плотности генов, положения транспозонов, IS элементов, тРНК и рРНК генов.

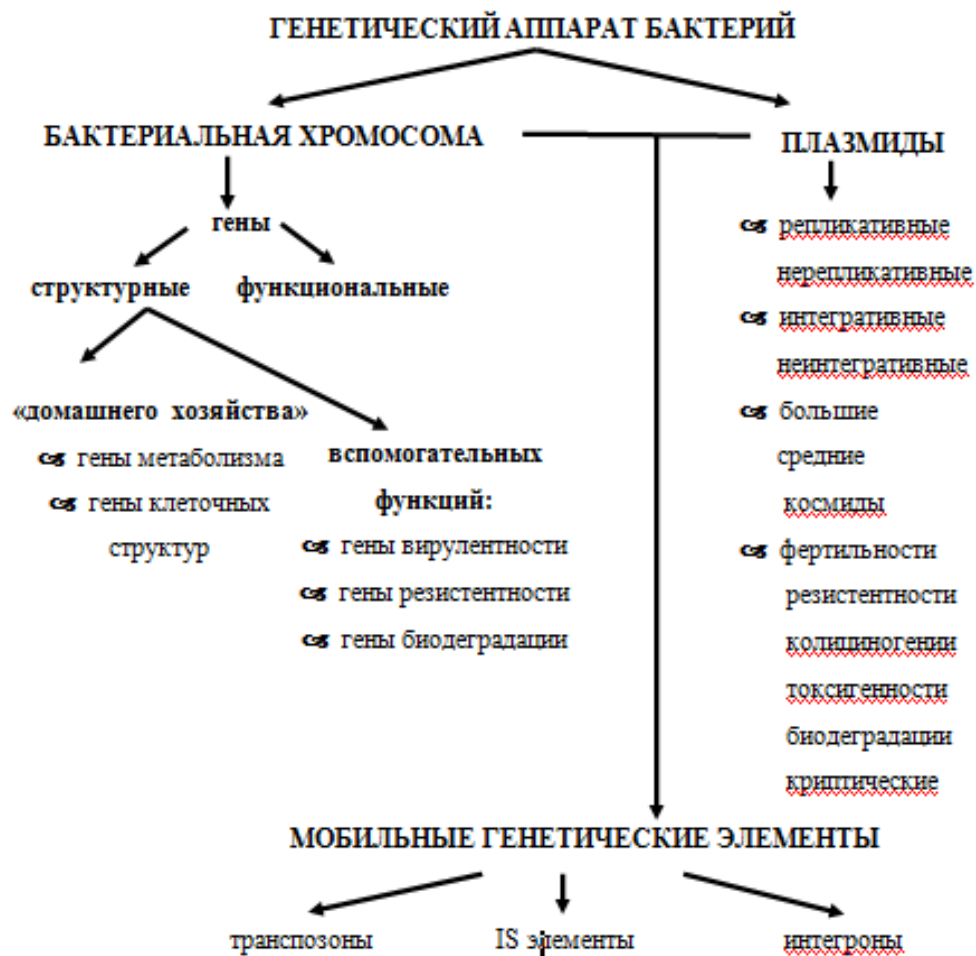


Схема 1. Устройство генетического аппарата бактерий

Генетические карты. Геном микроорганизмов отображают графически в виде концентрических колец. Такое графическое изображение генома получило **название генетической карты**. 2 наружных кольца изображения определяют положение на двух цепочках ДНК открытых рамок считывания, которые соответствуют старту синтеза белка, или началу гена. Рамки считывания обозначены разными цветами, в соответствии с функциями генов. Плотность рамок считывания выше в начале репликона. Третье кольцо отражает отклонение в процентном содержании Г+Ц от средней величины – 37,6%: красный цвет – в большую сторону, голубой – в меньшую. Четвертое кольцо отражает содержание Г+Ц на основной цепи к общему содержанию Г+Ц в ДНК. На этом кольце видна асимметрия в содержании Г+Ц в начале и конце репликона. Пятое кольцо отражает положение повторов, окрашенных в соответствии с размерами. Кольца 6 и 7 отражают положение тРНК и рРНК генов.

Аспергилл (Aspergillus)

Аспергилл - гомоталлический гриб, половой цикл которого сходен с циклом нейроспоры. Бесполое размножение осуществляется с помощью конидий. Мицелий диких штаммов не способен к неограниченному росту, он образует многочисленные гаплоидные зеленые колонии ($n = 8$). На питательной среде примерно через 6 час конидии прорастают, и из каждой конидии образуется бесцветная гифа, разделенная на множество клеток с помощью перегородок с отверстиями, через которые ядра могут перемещаться из клетки в клетку. Гифы, переплетаясь, образуют мицелий. Через 20 час начинается

созревание мицелия, его ядра увеличиваются, хромосомы большинства клеток становятся политенными. В клетках, в которых не происходит политенизации хромосом, при их дифференцировке возникают особые гифы - конидиеносцы. На конце конидиеносца формируется пузырек, который отделяется от него перегородкой. При созревании пузырька образуются выросты - одноядерные клетки (первичные стеригмы). Последние образуют одну или две вторичные одноядерные стеригмы, при делении которых формируется шарообразная конидия. После 100 делений возникают цепочки одноядерных конидий, которые постепенно стареют, меняя цвет, и отмирают. Но многие из них сохраняют жизнеспособность в течение нескольких лет. Цепочки конидий образуют колonoобразную головку. Гифы разных мицелиев могут срастаться, при этом образуется гетерокарион, содержащий ядра разных генотипов. Если конидиеносец формируется на гетерокариотическом мицелии, то образующиеся цепочки конидий могут быть генетически и фенотипически различными (так как в каждую конидиогенную клетку попадает только одно ядро), например, зелеными и белыми.

Половой процесс у аспергилла протекает на среде, содержащей мало азота и много восстановителей. При этом формируются половые органы - спирально закрученные, короткие гифы, при слиянии которых возникает двуядерная клетка, от которой отходят многочисленные аскогенные гифы. Ядра в этих гифах делятся митотически и после деления остаются рядом. Аскогенные гифы обрастают мицелием и превращаются в примордий, развивающийся в клейстотеций, в котором формируются аски. Гаплоидные ядра родоначальников асков сливаются и сразу же происходит мейоз, образуется 4 гаплоидных дочерних ядра, которые делятся митотически и превращаются в аскоспоры, расположенные в аске беспорядочно. Количество асков в зрелом клейстотеции может колебаться от 10 до 100 000. На аспергилле был открыт парасексуальный процесс, доказано существование митотической рекомбинации. Это дало возможность использовать парасексуальный процесс в генетическом анализе не только на аспергилле, но и на других грибах. На аспергилле впервые был разработан специальный метод картирования с использованием гаплоидизации гетерозиготных диплоидов на нем применяют те же методы генетического анализа, что и на других микроорганизмах - анализ случайной выборки спор, митотической сегрегации и др.

Нейроспора (*Neurospora crassa*)

Нейроспора - хлебная плесень - многоклеточный гриб, его вегетативное тело состоит из нитей (гифов), переплетение которых образует мицелий. Клетки гриба многоядерны, и ядра гаплоидны, перегородки между стенками клеток мицелия имеют отверстия, так что цитоплазма гриба объединена. На гифах формируются вегетативные споры (конидии) с разным числом ядер: многоядерные макроконидии или одноядерные микроконидии, при прорастании которых вновь образуется мицелий. Таким образом, «бесполое размножение нейроспоры осуществляется прорастанием спор. Мицелии диких штаммов способны к неограниченному росту.

Для полового размножения необходимо участие двух плесеней противоположных типов спаривания А и а. Половой процесс, носящий название гаметангиомии, осуществляется с участием специализированных клеток — гаметангиев. Женский гаметангий состоит из двух частей - аскогона и тонких длинных волокон - трихогин (от греч. трихос - волос, гине - самка). В качестве мужского гаметангия выступают гаплоидные микроконидии. При оплодотворении конидия по трихогине попадает в аскогон. Гаплоидные ядра после плазмогонии объединяются попарно, образуя дикарион. Из аскогона вырастают аскогенные гифы, в которых ядра дикариона синхронно делятся. На аскогенных гифах в плодовых телах (перитециях) развиваются сумки (аски). После оплодотворения оба гаплоидных ядра существуют некоторое время раздельно и многократно делятся митотически, образуя множество аскогенных гиф. Спустя определенное время кончик каждой аскогенной гифы выпячивается и изгибается. Ядра в ней делятся митотически, и образуются четыре гаплоидных ядра. Затем возникают три

клетки, две из них содержат по одному, и одна - два гаплоидных ядра, которые сливаются и образуют диплоидное ядро зиготы. Зигота делится мейотически, при этом в обоих делениях сохраняется ориентация веретена и споры располагаются в определенном (линейном) порядке. Четыре гаплоидные споры еще раз делятся митотически и образуется аск с 8 упорядоченными спорами, расположенными вдоль оси аска. Гифы разных штаммов нейроспоры могут сливаться и образовывать гетерокарион, содержащий ядра разного генотипа, на котором могут формироваться как гомо-, так и гетерокариотические макроконидии, а также микроконидии с генотипами исходных штаммов.

В генетических исследованиях нейроспора появляется в 40-х гг прошлого века, и опыты на ней позволили сформулировать основополагающую гипотезу «один ген — один фермент». На нейроспоре получены прямые доказательства закона чистоты гамет, происхождение кроссинговера на стадии четырех нитей, разработан метод тетрадного анализа, на ней ведется изучение митохондриального наследования, биохимических молекулярных генетических процессов.

Дрожжи

Дрожжи *Saccharomyces* - одноклеточные грибы. Дрожжевые клетки имеют округлую форму, очень мелкое ядро и не превышают 5-10 мкм. Клеточное деление у них осуществляется путем почкования. Вегетативные клетки штаммов, выделяемые в природных условиях или используемые в производстве, диплоидные. При определенных условиях в вегетативной клетке происходит мейоз и она превращается в аск с четырьмя аскоспорами.

На свежей питательной среде споры прорастают и попарно копулируют. При копуляции за слиянием клеток (цлазмогамия) почти сразу же следует слияние и их ядер (кариогамия). В результате образуется диплоидная зигота, далее размножающаяся вегетативно. Некоторые штаммы дрожжей гомоталличны, т. е. копуляция у них может происходить между спорами так же, как и между гаплоидными клетками, в любых комбинациях. У других (главным образом у производственных видов *Sacch. cerevisiae*) споры принадлежат к одному из двух типов спаривания, обозначаемых А и а. Копуляция совершается лишь при встрече спор или клеток противоположных типов спаривания. У гетероталличных дрожжей при искусственном выделении одиночных спор могут быть получены гаплоидные клоны, у гомоталличных при этом происходит автодиплоидизация, т. е. удвоение числа хромосом за счет слияния сестринских клеток.

Водоросли рода *Chlamydomonas*

Chlamydomonas одноклеточные организмы, которые активно передвигаются в воде с помощью двух одинаковых жгутиков, расположенных на переднем конце клетки. *Chlamydomonas* имеет овальную или каплевидную форму, одета клеточной стенкой.

В цитоплазме находятся одно ядро, 2 (ряд видов имеет 4 и больше) сократительные вакуоли и крупный чашевидный хлоропласт, в передней части которого расположен глазок, а в нижней утолщенной части - пиреноид.

Водоросль размножается бесполом и половым путем. При бесполом размножении в клетке образуются 2 - 4 - 8-16 двужгутиковых зооспор, каждая из которых по своему строению похожа на маленькую хламидомонаду. Митоз полужакрытый, на полюсах образуются полярные отверстия в оболочке ядра, через которые проходят микротрубочки веретена. Деление протопласта осуществляется с помощью фикопласта и впячивания плазмалеммы. Базальные тела жгутиков служат центрами организации микротрубочек. Зооспоры выходят из оболочки материнской клетки и в воде дорастают до взрослой особи.

При половом размножении под оболочкой материнской клетки формируются гаметы, которые выходят в воду. Половой процесс (изо-, гетеро- или оогамный) наступает

при лимите азота. Есть виды гомоталличные, есть гетероталличные. На клеточной мембране гамет формируются специальные структуры на переднем конце клетки и специальные агглютины (линейные молекулы гликопротеинов) на поверхности жгутиков. С помощью жгутиков гаметы объединяются в пары, протопласты сливаются через образование оплодотворяющей трубки, вырастающей от переднего конца между жгутиками у одной из сливающихся гамет. После слияния образуется зигота. Она покрывается толстой оболочкой и переходит в состояние покоя (гипнозигота). В состав ее оболочки может входить спорополленин. Весной при ее прорастании происходит мейотическое деление ядра, и образуются 4 - 8 молодых гаплоидных особей. Таким образом, в жизненном цикле *Chlamydomonas* диплоидной стадией является только зигота.

При определенных условиях *Chlamydomonas* может втягивать жгутики и формировать пальмеллоидную стадию. На этой стадии клетки теряют подвижность, погружены в слизь, в которой, как и в клеточной стенке, много гидроксипролина и сахаров. В таком состоянии они могут делиться. При попадании в воду такие клетки быстро образуют жгутики.

Бактериофаги

Бактериофаги — простейшие организмы, которые используются в генетических исследованиях. Большинство фагов имеют сперматозоидную форму. Они состоят из головки, которая содержит нуклеиновую кислоту, и отростка. У некоторых фагов отросток очень короткий или вовсе отсутствует. Размеры фаговой частицы колеблются от 20 до 200 нм. Средний диаметр головки равен 60-100 нм, длина отростка 100-200 нм.

T2. Генетический материал, ДНК, заключен в головке фага. T2 — вирулентный фаг; инфицирование этим фагом чувствительной клетки-хозяина приводит к ее лизису и высвобождению фагов-потомков. Фаговые частицы прикрепляются к специфическим участкам бактериальной клеточной стенки с помощью фибрилл отростка. Чехол отростка сокращается, и содержимое головки проникает внутрь бактерии, как бы впрыснутое шприцем. Фаговая ДНК проходит через отросток в бактериальную клетку, подавляет белок-синтезирующие механизмы клетки-хозяина и заставляет их синтезировать компоненты фага, используя в качестве матрицы фагоспецифические мРНК. В цитоплазме бактерии происходит сборка полных фаговых частиц, которые затем выходят из клетки в результате лизиса клеточной оболочки.

Есть и такие фаги, которые, инфицируя клетку, не обязательно вызывают ее лизис; вместо этого фаговый геном может включиться в бактериальную хромосому. Пример такого умеренного или лизогенизирующего фага - фаг лямбда. Интегрированный фаговый геном называют профагом.

Контрольные вопросы: Охарактеризуйте строение клетки и генома эукариотических микроорганизмов. Охарактеризуйте строение клетки и организацию генетического аппарата прокариот. Охарактеризуйте строение бактериофага. В чем различие умеренных и вирулентных бактериофагов?

Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Популяционная изменчивость бактерий».

Цель работы: освоить методы изучения популяционной изменчивости у бактерий.

Задачи работы:

1. Ознакомиться с методами изучения популяционной изменчивости у бактерий

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: термостат, микробиологические петли, спиртовки, питательные среды, лабораторная посуда.

Описание (ход) работы:

Популяция микроорганизмов – это совокупность особей одного вида, относительно длительно обитающих на определённой территории (в биотопе). Совокупность генов всех популяций одного вида микроорганизмов составляет их **генофонд**. Популяции микроорганизмов *гетерогенны* и *полиморфны*, то есть состоят из смеси особей, клонов, вариантов, отличающихся по большему или меньшему числу признаков. Гетерогенность популяции определяет её приспособленность к различным условиям обитания и создаёт важный для эволюции резерв наследственной изменчивости. Положение отдельных клонов и вариантов бактерий в популяции неодинаково: одни занимают в ней доминирующее положение, другие – субдоминирующее, третьи – минорное, низкочастотное. Структура популяции бактерий динамична во времени. В результате конкуренции и изменений условий обитания доминантные штаммы могут стать минорными, а минорные – доминантными; появляются новые варианты и исчезают исходные.

Популяционная изменчивость подразделяется на 2 типа: *модификационную (фенотипическую)* и *мутационно-рекомбинационную (генотипическую)*.

Модификационный тип реализуется с помощью постоянно действующих механизмов репрессии и индукции структурных генов, не сопровождающихся их перестройкой. Модификации способствуют выживанию бактерий и исчезают после устранения модифицирующего фактора. Материальной основой генотипической популяционной изменчивости являются генетические изменения – мутации и рекомбинации. Частота прямых спонтанных мутаций у бактерий колеблется от 10^{-4} до 10^{-9} (наиболее часто 10^{-6} - 10^{-7}), уровень обратных мутаций составляет 10^{-7} - 10^{-9} . Частота индуцированных мутаций может увеличиваться в сотни раз. Пропорция мутантов к неизменённым клеткам, независимо от количества генераций, постоянна и составляет $2 \cdot 10^{-8}$. Это поддерживается частотой обратных мутаций, ведущих к восстановлению исходного генотипа: равновесная пропорция мутантных клеток = уровень мутаций нормальных клеток в мутантные (A-B)/уровень мутаций мутантных клеток в нормальные (B-A).

Возникающие мутанты подвергаются генетической селекции под воздействием внешних факторов, что ведёт к естественному отбору полезных мутаций. Последние создают преимущества в выживании их обладателям. Селекционирующие факторы окружающей среды могут стимулировать у бактерий программированные изменения первичной структуры ДНК – мутации по типу транслокаций, инверсий, делеций.

Например, у *Neisseria gonorrhoeae* имеется 12 генов, кодирующих 12 типов белка пилина, посредством которого происходит адгезия гонококков на эпителии мочевого тракта человека. Специфические антитела, блокируя 1 тип белка пилина, передают об этом сигнал внутрь бактериальной клетки, что сопровождается транслокацией генов. При этом ген, кодирующий предшествующий белок пилина, выключается, но включается другой ген, контролирующий синтез пилина иного типа. Смена функционирования генов может происходить также по механизму инверсий. Так, у *Salmonella typhi* смена продукции жгутиковых белков флагеллинов I и II типов происходит вследствие инверсии гена (частота инверсий – 10^{-4}). Инверсия возникает спонтанно, тогда как действие антител селекционируют мутанты.

Контрольные вопросы: 1. Что такое популяционная изменчивость? 2. Назовите и объясните суть основных методов изучения популяционной изменчивости у бактерий.

Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: «Методы исследования мутационной изменчивости».

Цель работы: освоить методы изучения мутационной изменчивости и модификационной изменчивости.

Задачи работы:

1. Изучить метод выявления мутационной изменчивости во флуктуационном тесте Лурия-Дельбрюка.
2. Освоить метод выявления модификационной изменчивости

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: центрифуга, источник УФЛ, термостат, счетчик колоний, микробиологические петли, спиртовки, питательные среды, лабораторная посуда.

Описание (ход) работы:

Методика выявления мутационной изменчивости во флуктуационном тесте Лурия-Дельбрюка.

Данный тест используют для изучения природы возникновения различных свойств у бактерий: устойчивости к бактериофагу, лекарственным препаратам, способности расщеплять углеводы и т. д. В соответствии с гипотезой адаптации каждая клетка в популяции в присутствии того или иного фактора - фага, антибиотика и т. д. - может с некоторой долей вероятности приобрести устойчивость к нему (адаптироваться). Согласно гипотезе спонтанных мутаций каждая клетка бактерий также с небольшой долей вероятности может приобрести устойчивость к тому или иному фактору в результате мутаций независимо от присутствия этого фактора в среде обитания.

С помощью флуктуационного теста Лурия-Дельбрюка можно подтвердить мутационную природу возникшего свойства.

Готовят два ряда культур.

1. «Параллельные культуры»: в пробирку содержащую 10 мл МПБ (№1), и в 10 пробирок, содержащих по 1 мл МПБ (№2...11), одновременно высевает одинаковое количество клеток *E.coli* (300 – 500 бактериальных клеток). Посевы инкубируют при 37°C 24 ч.

2. «Независимые» культуры: в 20 чашек Петри разливают МПА с добавлением стрептомицина (конечная концентрация антибиотика 100 ЕД на чашку). Первые 10 чашек засевают по 0,1 мл культурой, взятой из пробирки № 1; следующие 10 чашек засевают по 0,1 мл культурами, взятыми из пробирок №2...11. Посевы инкубируют при 37°C 24 ч. После инкубирования подсчитывают число выросших колоний на всех чашках Петри с «параллельными» и «независимыми» культурами.

На стрептомициновом агаре давать колонии могут только устойчивые к стрептомицину клетки *E. coli*.

Примерно одинаковое число колоний на всех чашках (нет статистически достоверных отличий) подтверждает теорию адаптации. Если же на чашках, засеянных культурами из пробирок №2... 11, наблюдают существенную разницу в числе колоний, а на чашках, засеянных культурой из пробирки № 1, нет статистически достоверных отличий, то можно говорить о мутационной природе наблюдаемой стрептомицинустойчивости. Мутации - редкое событие, и при посеве из отдельных пробирок мутанты вырастают только в некоторых чашках. При посеве же из общей пробирки предсуществующие мутанты будут равномерно распределены в жидкой среде и соответственно в чашках с агаром.

Выявление модификационной изменчивости

Изучают колонии *Proteus mirabilis*, выросшие на питательном агаре в чашке Петри через 24 ч после посева разведенной культуры. Отмечают, что все колонии протей окружены зоной роения. Пересевают все колонии петлей на поверхность питательного агара с 1% сухой желчью в чашки Петри и инкубируют при 37°C 18-24 ч. Все колонии протей, выросшие на питательном агаре с желчью, не имеют зон роения. Вновь пересевают каждую колонию в чашку Петри с питательным агаром и инкубируют при 37°C 18-24 ч. Наблюдают, что все колонии, выросшие на питательном агаре, окружены зоной роения. Изменение фенотипа протей на питательной среде с желчью (утрату роения) следует считать модификацией, т.к. налицо все три ее отличительных признака: определенность (связь отсутствия роения с определенным фактором - желчью), общность изменений (утрата роения наблюдается у всех изученных клеток или колоний популяции), обратимость (при отсутствии желчи в питательной среде восстанавливается исходный фенотип).

Контрольные вопросы: Охарактеризуйте общую схему проведения теста Лурия-Дельбрюка. Что такое мутация? Что означает термин «биохимические мутанты»? Что такое модификационная изменчивость? Как выявить модификационную изменчивость микроорганизмов?

Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: «Конъюгация».

Цель работы: ознакомиться с процессом конъюгации у микроорганизмов.

Задачи работы:

1. Изучить условия протекания конъюгации у бактерий.
2. Определить особенности течения конъюгации у разных групп микроорганизмов

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: микробиологические петли, спиртовки, питательные среды, лабораторная посуда.

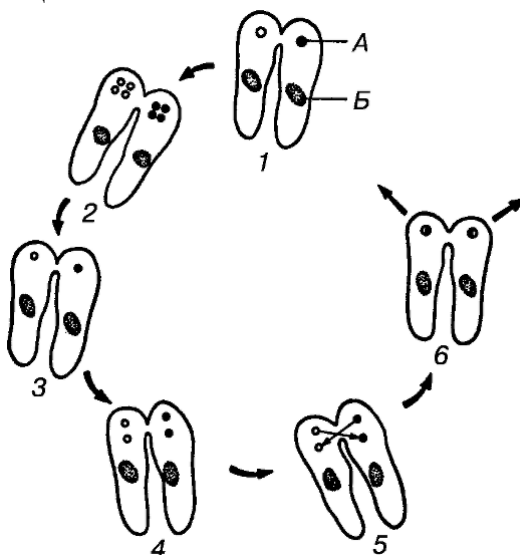
Описание (ход) работы:

Конъюгация (от лат. *conjugatio* — соединение) — процесс точного и тесного сближения гомологичных хромосом.

- Конъюгация у водорослей — половой процесс, происходящий при слиянии двух вегетативных клеток.
- Конъюгация у инфузорий — обмен половыми ядрами (микронуклеусами) с последующим их попарным слиянием в синкарион. Впоследствии синкарион делится с образованием новых половых и вегетативных ядер.
- Конъюгация у бактерий — процесс переноса части генетического материала (плазмид, бактериальной хромосомы) при непосредственном контакте двух бактериальных клеток.
- Конъюгация хромосом, или Синапсис — спаривание гомологичных хромосом в профазе первого деления мейоза.

Задание 1

Описать стадии конъюгации.



В тетради зарисовать схему с обозначениями.

Контрольные вопросы: 1. Определение конъюгации. 2. Особенности течения конъюгации у грибов. 3. Особенности течения конъюгации у бактерий. 4. Особенности течения конъюгации у водорослей. 5. Особенности течения конъюгации у инфузорий.

Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: «Мигрирующие генетические элементы бактерий».

Цель работы: изучить мигрирующие генетические элементы микроорганизмов.

Задачи работы:

1. Инсерционные последовательности (Is) Классификация и структура.
2. транспозоны (Tn) бактерий. Классификация и структура.
3. Механизмы транспозиции.

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
мультимедиа проектор, экран, компьютер, учебная доска

Описание (ход) работы:

Мобильные генетические элементы (прыгающие гены) - участки ДНК, способные к транспозиции, или случайному перемещению, из одного места в другое: в пределах одной молекулы ДНК, из одной ДНК в другую. Не способны к самостоятельной репликации. Размножаются в составе бактериальной хромосомы или плазмид. К подвижным генетическим элементам относятся IS элементы, транспозоны, интегроны.

Транспозиция обеспечивается ферментом – транспозазой. Ген, кодирующий этот фермент, входит в состав всех мобильных генетических элементов. Транспозаза обладает эндонуклеазной и лигазной функцией: она разрезает ДНК по краям мобильного генетического элемента (эндонуклеазная функция) и сшивает его с разрывом ДНК в новом месте (лигазная функция). В некоторых случаях транспозиция сопровождается удвоением мобильных генетических элементов и перемещением копии в другое место.



Структура IS элементов и транспозонов

Инсерционные последовательности, или IS элементы. Это разновидность мобильных генетических элементов, которые не несут в своем составе структурные гены, а только гены, отвечающие за перемещение. Многообразие IS элементов обозначают цифровыми индексами - IS1, IS 6010. Их размер меньше, чем транспозонов, и составляет от 700 до 1800 п.о., но описаны IS элементы более крупных и мелких размеров — 5700 п.о. и 200 п.о. Центральную часть IS элемента занимает ген, кодирующий траспозазу; некоторые IS элементы несут промоторы или репрессоры генов, или их части. На обоих концах IS элемента находятся повторяющиеся последовательности, или палиндромы, размером 10 – 40 п.о., по которым транспозаза распознает его и вырезает. В геноме бактерий присутствует, как правило, небольшое количество их копий: в геноме *E. coli* IS1 встречается в 6 - 10 копиях, а IS2 – 5 копиях. Транспозиция происходит двумя путями: 1) консервативным: покидая один участок IS элемент встраивается в другой; 2) репликативным: синтезируется копия, которая встраивается в другой участок генома. Встраивание, как правило, осуществляется в участках богатых А/Т.

Значение IS элементов. 1) Участвуют в мутационной изменчивости микроорганизмов – инсерциях и делециях. Инсерция IS элементов в бактериальную ДНК приводит к синтезу неполноценного белка. При встраивании некоторых IS элементов по обоим их концам происходит удвоение небольшого участка хромосомы размером 5 - 9 п.о. С меньшей частотой (10^{-3} - 10^{-4}) IS элементы приводят к делециям в прилегающих генах: покидая ДНК, IS4 вырезает участки хромосомальной ДНК по обоим своим концам.

2. Являются генетическими маркерами вида или рода бактерий. Некоторые IS последовательности специфичны для определенных видов микроорганизмов, что позволяет их использовать для видовой идентификации бактерий.

3. Являются местом распознавания и встраивания плазмид и генно-инженерных векторов. Плазмиды и генно-инженерными векторы встраиваются в бактериальную хромосому в области IS последовательностей.

4. Участвуют в регуляции функций генов – активации или репрессии, так как несут в своем составе промоторы или репрессоры генов или их компоненты. Например, формирование резистентности к метронидазолу у анаэробных микроорганизмов связано с активацией молчащих *him* A, B, C, D, E генов в результате встраивания IS элементов, несущих промоторы этих генов.

Транспозоны. Это разновидность мобильных генетических элементов, которые содержат в своем составе один или несколько структурных генов и гены, ответственные за перемещение. Транспозоны обозначают Tn с числовым индексом, например, Tn 4556. Их размер больше IS элементов и составляет 2,500 - 7,000 п.о. На обоих концах Tn находятся прямые или инвертированные повторы, по которым транспозаза распознает их и вырезает. Частота транспозиций Tn сравнима с частотой мутаций. В зависимости от структуры выделяют два класса транспозонов:

1. Сборные (Tn 5, 9, 10, 903 и 1681). Состоят из фенотипического модуля (гены резистентности) и двух располагающихся по краям IS элементов, ориентированных в одном или противоположных направлениях. IS элементы обеспечивают перемещение транспозонов, но могут покидать его и перемещаться самостоятельно.

Tn10, имеющий по краям две копии IS10, подвергается переносу с частотой 10^{-7} . Этот транспозон встраивается, преимущественно, в участках с последовательностью GCTNAGC (при встраивании этот участок удваивается), как правило, полностью безошибочно вырезается, но в некоторых случаях в процессе эксцизии может захватывать из бактериальной хромосомы дополнительно 50 п.о.

2. Комплексные (Tn 1, 3, 4, 7, 501 и 551). Состоят из фенотипического модуля (гены резистентности) и располагающихся по краям не прямых повторов размером 30 - 40 п.о. Функционируют как единое и неделимое целое. Частота транспозиций комплексных транспозонов составляет 10^{-4} — 10^{-6} . Большинство из них при встраивании проявляют сайт-специфичность: Tn7, например, имеет только один участок встраивания в хромосому *E. coli*. Некоторые транспозоны (Tn3) обеспечивают «иммунитет» клетки к встраиванию идентичных транспозонов.

Бактериофаг μ , или мутатор, также относится к комплексным транспозонам. Этот самый сложно организованный транспозон содержит 38 000 п.о. и на его концах находятся инвертированные повторы размером 11 п.о. Он не имеет определенного сайта встраивания в бактериальную ДНК, в процессе вырезания из нее обычно захватывает участок размером 10% своего размера. Бактериофаг μ часто используют в генетических исследованиях, так как в естественных условиях он не входит в состав бактериальных геномов и потому легко проводить его детекцию.

Перенос транспозонов осуществляется консервативным или репликативным механизмом. Консервативный перенос происходит путем вырезания транспозона из одного участка и транспозицией в другой без увеличения количества копий, при этом участок ДНК, откуда вырезается транспозон, утрачивает свои функции. При репликативном способе переноса синтезированная копия транспозона перемещается в новое место, при этом механизме увеличивается количество копий.

Функции. Транспозоны участвуют в регуляции активности генов, инактивируя их или активируя. Осуществляют горизонтальный перенос генов, например, вирулентности или резистентности, обуславливая распространение устойчивости к антибиотикам среди

микроорганизмов.

Интегроны. Отвечают за сайт-специфическую рекомбинацию. Интегроны - мелкие генетические элементы, содержащие промотор и ген тирозиновой рекомбиназы - *int*, которая распознает и обеспечивает встраивание в сайт *att I* бактериальной хромосомы. Не содержат гены, отвечающие за транспозицию. Способны соединяться с кассетами генов, кодирующими резистентность и другие признаки, при этом генетические кассеты должны содержать обеспечивающие подвижность гены и элемент размером 59 п.о.

Контрольные вопросы: Чем отличаются инсерционные последовательности (*Is*) и транспозоны (*Tn*) бактерий. Какова классификация и структура мигрирующих элементов? Назовите механизмы транспозиции. Какие генетические эффекты вызывает внедрение в геном мигрирующих элементов? Что такое интегроны? Что такое конъюгативные транспозоны? Какова роль *Tn* в эволюции бактерий? Как происходит интеграция в бактериальный геном бактериофага *Mu* и каковы последствия интеграции *Mu* в геном бактерий.

Лабораторная работа №6 (2 часа).

Тема: «Транспозоны бактерий».

Цель работы: изучить транспозоны микроорганизмов.

Задачи работы:

1. Изучить транспозоны (*Tn*) бактерий.
2. Ознакомиться с классификацией и структурой транспозонов бактерий.

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: мультимедиа проектор, экран, компьютер, учебная доска

Описание (ход) работы:

Транспозоны - это участки **ДНК** организмов, способные к передвижению (транспозиции) и размножению в пределах **генома**. Транспозоны также известны под названием «прыгающие гены» и являются примерами **мобильных генетических элементов**.

Транспозоны формально относятся к так называемой некодирующей части генома — той, которая в последовательности **пар оснований ДНК** не несёт информацию об аминокислотных последовательностях белков, хотя некоторые классы мобильных элементов содержат в своей последовательности информацию **о ферментах**, транскрибируются и катализируют передвижения; например, **ДНК-транспозоны** и **ДДП-1** кодируют белки **транспозаза**, **БОРС1** и **БОРС2**.

У разных видов транспозоны распространены в разной степени: так, у человека транспозоны составляют до 45 % всей последовательности ДНК, у плодовой мухи *Drosophila melanogaster* часть мобильных элементов составляет лишь 15—20 % всего генома. У **растений** транспозоны могут занимать основную часть генома — так, у **кукурузы** (*Zea mays*) с размером генома в 2,3 миллиардов пар оснований по крайней мере 85 % составляют различные мобильные элементы.

Мобильные генетические элементы относятся к повторяющимся элементам генома — тем, которые имеют несколько копий в последовательности ДНК клетки. Повторяющиеся элементы генома могут располагаться в тандеме (микросателлиты, теломеры и т. д.) и могут быть рассеяны по геному (мобильные элементы, псевдогены и т. д.).

Мобильные генетические элементы по типу транспозиции можно разделить на два класса: ДНК-транспозоны, которые применяют метод «вырезать и вставить», и ретротранспозоны, передвижение которых имеет в своем алгоритме синтез РНК из ДНК с последующим обратным синтезом ДНК из молекулы РНК, то есть метод «копировать и вставить».

Транспозоны также можно разделить по степени автономности. Как ДНК-транспозоны, так и ретротранспозоны имеют автономные и неавтономные элементы. Неавтономные элементы для транспозиции нуждаются в ферментах, которые кодируются автономными элементами, которые часто содержат значительно изменённые участки транспозонов и дополнительные последовательности. Количество неавтономных транспозонов в геноме может значительно превышать количество автономных.

ДНК-транспозоны

Схема передвижения транспозонов

I. ДНК-транспозоны: способ передвижения «вырезать и вставить».

II. ДДП-1-ретротранспозоны: способ передвижения «копировать и вставить».

ДНК-транспозоны передвигаются по геному способом «вырезать и вставить» благодаря комплексу ферментов под названием транспозаза. Информация об аминокислотной последовательности белка транспозазы закодирована в последовательности транспозона. Кроме того, этот участок ДНК может содержать другие, связанные с транспозоном последовательности, например гены или их части. Большинство ДНК-транспозонов имеют неполную последовательность. Такие транспозоны не являются автономными и передвигаются по геному благодаря транспозазе, которая закодирована другим, полным, ДНК-транспозоном.

На концах участков ДНК-транспозона расположены инвертированные повторы, которые являются особыми участками узнавания транспозазы, таким образом отличая эту часть генома от остальных. Транспозаза способна делать двухцепочные разрезы ДНК, вырезать и вставлять в ДНК-мишень транспозон.

К ДНК-транспозонам принадлежат Ac/Ds-элементы растений, которые были впервые открыты Барбарой Макклинтон в кукурузе. Ac-элемент (англ. *Activator*) является автономным и кодирует транспозазу. Есть несколько типов Ds-элементов, которые способны к формированию разрывов хромосом и которые перемещаются по геному благодаря Ac-элементам.

Гелитроны - тип транспозонов, который есть у растений, животных и грибов, но который широко представлен в геноме кукурузы, где он, в отличие от других организмов, находится в частях ДНК, богатых генами. Гелитроны транспозируются по механизму «катящегося кольца» (англ. *rolling circle*). Процесс начинается с разрыва одной цепи ДНК-транспозоны. Высвобожденный участок ДНК вторгается в последовательность-мишень, где формируется гетеродуплекс. С помощью ДНК-репликации завершается внедрение транспозона в новый участок.

Гелитроны могут захватывать соседние последовательности при транспозиции.

Ретротранспозоны — это мобильные генетические элементы, которые применяют метод «копировать и вставить» для распространения в геноме животных. По крайней мере 45 % генома человека составляют ретротранспозоны и их производные. Процесс передвижения включает промежуточную стадию молекулы РНК, которая считывается с участка ретротранспозона и которая затем, в свою очередь, используется как матрица для обратной транскрипции в последовательность ДНК. Новосинтезированный ретротранспозон встраивается в другой участок генома.

Активные ретротранспозоны млекопитающих делятся на три основные семьи: Alu-повторы, ДДП-1, SVA.

Структура ДДП-1-ретротранспозона.

- **ДДП-1-ретротранспозоны** — длинные диспергированные повторы — тип ретротранспозонов, который широко распространён у млекопитающих и составляет до 20 % генома. ДДП-1 -элементы имеют длину около 6 тысяч пар оснований^[7]. Большинство этих ретротранспозонов в геноме представлено неполно, хотя существует примерно 150 полных и потенциально мобильных ДДП-1-элементов в последовательности ДНК человека и примерно 3000 — у мыши. Процесс передвижения начинается со считывания молекулы РНК с элемента ДДП-1. РНК транспортируется к цитоплазме, где от неё транслируются белки БОРС1 (который является РНК-связывающим белком) и БОРС2 (который является белком с эндонуклеазной и возвратно-транскриптазной активностями). БОРС1, БОРС2 и РНК транспозона формируют рибонуклеопротеин и импортируются в ядро, где происходит обратная транскрипция ретротранспозона. Большинство случаев вставки ДДП-1-элементов происходит не до конца, и такие копии больше не способны к самостоятельной мобилизации. Существуют сведения о неканонических функциях ДДП-1-элементов во время инактивации X-хромосомы.

- **ДКП** — длинные концевые повторы — ретротранспозоны, имеющие конечные повторяющиеся последовательности, которые играют важную роль в транскрипции и обратной транскрипции РНК транспозона. ДКП-элементы кодируют белки *pol* и *gag*, которые близки к белкам ретровирусов, но, в отличие от последних, ДКП не хватает белков, которые смогли бы сформировать внешнюю оболочку (суперкапсид) и выйти из клетки.

- **КДП** — короткие диспергированные повторы являются неавтономными ретротранспозонами: они требуют активности ДДП-1-элементов для передвижения, в ДНК-последовательности КДП содержат только участок связывания РНК-полимеразы. В число КДП входят Alu-ретротранспозоны.

Структура Alu-ретротранспозона.

- **Alu-повтор** (*Alu* от *Arthrobacter luteus*) — широко распространённые мобильные элементы в геноме человека. Alu-элементы имеют длину около 300 пар оснований и часто расположены в интронах, участках генома, которые не транслируются, и межгенных участках. Приставку *Alu*-ретротранспозоны получили за то, что они содержат последовательность распознавания рестрикционного энзима AluI. Анализ последовательностей показал, что Alu-элементы возникли у приматов примерно 65 миллионов лет назад от гена 7SL РНК, который входит в рибосомный комплекс. Alu-ретротранспозоны не имеют собственной обратной транскриптазы, поэтому для передвижения им необходимы ферменты ДДП-1-элементов.

Alu-элементы являются участками, где происходит до 90 % всех случаев A-I редактирования РНК.

- SVA — мобильные элементы длиной в 2-3 тысячи пар оснований ДНК, состоящие из нескольких частей: коротких разбросанных элементов (КДП), переменного числа tandemных повторов (ВЧТП), Alu-последовательности и СТ-повтора, с последовательностью CCCTCT, которая встречается чаще всего и имеет название гексамер (Hex)^[21]. SVA элементы значительно варьируют в длину из-за разного количества составляющих повторов. Они не являются автономными и нуждаются в белках, закодированных в ДДП1 ретротранспозонах для передвижения, но они активны в геноме человека. SVA-элементы претерпевают высокий уровень метилирования ДНК в большинстве тканей человека. Интересным фактом является заниженное метилирование ДНК SVA-ретротранспозонов в мужских половых клетках человека, тогда как у шимпанзе SVA-последовательности сперматозоидов высоко метилированы.

Мобильные элементы генома достаточно широко представлены в растительных и животных геномах. Их высокая активность является риском для стабильности генома, поэтому их экспрессия жестко регулируется, особенно в тех тканях, которые принимают участие в формировании гамет и передаче наследственной информации потомкам. У растений и животных регуляция активности мобильных элементов генома происходит путём *de novo* метилирования последовательности ДНК и активности некодирующих РНК вместе с белковыми комплексами Аргонавт.

Основная роль малых некодирующих РНК, которые взаимодействуют с пиви-комплексом, или пиРНК, заключается в подавлении мобильных элементов генома в зародышевых тканях. Эта роль пиРНК достаточно высоко консервативна у животных.

У мышей мобильные элементы генома на протяжении онтогенеза находятся преимущественно в неактивном состоянии, которое достигается путём эпигенетических взаимодействий и активности некодирующих РНК. В период эмбрионального развития эпигенетическая метка метилирования ДНК подвергается репрограммированию: родительские метки стираются, а новые устанавливаются. В этот период часть белков-аргонавтов — пиви-белки (Mili и Miwi2) — и некодирующие РНК, которые с ними взаимодействуют — пиРНК — играют ключевую роль в *de novo* подавлении ретротранспозонов мышей путём метилирования ДНК, и пинг-понг цикла пиРНК амплификации, и подавления мишени. Если у мышей возникает недостаток белков Mili и Miwi2, это приводит к активации ДДП-1 и ДКП и остановке гаметогенеза и стерильности у самцов. Недавние работы показали, что у мухи *Drosophila melanogaster* активным кофактором в подавлении является белок СФГ-1.

Механизм пи РНК-индуцированного подавления транспозонов окончательно не выяснен, но схематически его можно представить такой моделью:

- первичное накопление одноцепочечных молекул РНК, пиРНК-прекурсоров;
- созревание пиРНК и их амплификация с помощью пиви-белков (пинг-понг цикл);
- подавление целевого транспозона, что может происходить несколькими путями: деградация РНК (с помощью РНКазной активности Н-подобного домена белков-аргонавтов), подавление трансляции и привлечение **хроматин**-модифицирующих систем (таких, как SWI/SNF белки) и дальнейшее эпигенетическое подавление транспозона.

В отличие от вирусов, которые используют организм хозяина для размножения и способны его покинуть, мобильные генетические элементы существуют исключительно в

организме хозяина. До некоторой степени поэтому транспозоны способны регулировать свою активность. Примером этого является *Ac* ДНК-транспозоны — автономные мобильные элементы растений, кодирующие собственную транспозазу. *Ac*-элементы проявляют способность снижать активность транспозазы при увеличении её копий.

Также подавление растительных автономных ДНК-транспозонов MuDR может происходить с помощью Muk. Muk является вариантом MuDR и имеет в своей последовательности несколько палиндромных участков ДНК. Когда Muk транскрибируется, такая РНК формирует шпильку, затем режется комплексом ферментов на малые интерферирующие РНК (миРНК), которые заглушают активность MuDR с помощью процесса РНК-интерференции.

Контрольные вопросы: 1. Виды транспозонов. 2. Эволюционная роль транспозонов. 3. Строение транспозонов бактерий. 4. Механизмы подавления транспозонов.

Лабораторная работа №7 (2 часа).

Тема: «Методы переноса генетической информации у бактерий»

Цель работы: ознакомиться с методами переноса генетической информации микроорганизмов.

Задачи работы:

1. Методика осуществления конъюгации у *E. coli*.
2. Картирование генома по градиенту передачи маркеров
3. Методика приготовления компетентных клеток *E. coli*
4. Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидными ДНК
5. Трансформация *Bacillus subtilis*
6. Изучить виды трансдукции
7. Методика проведения специфической трансдукции

Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: центрифуга, источник УФЛ, термостат, счетчик колоний, микробиологические петли, спиртовки, питательные среды, лабораторная посуда.

Описание (ход) работы:

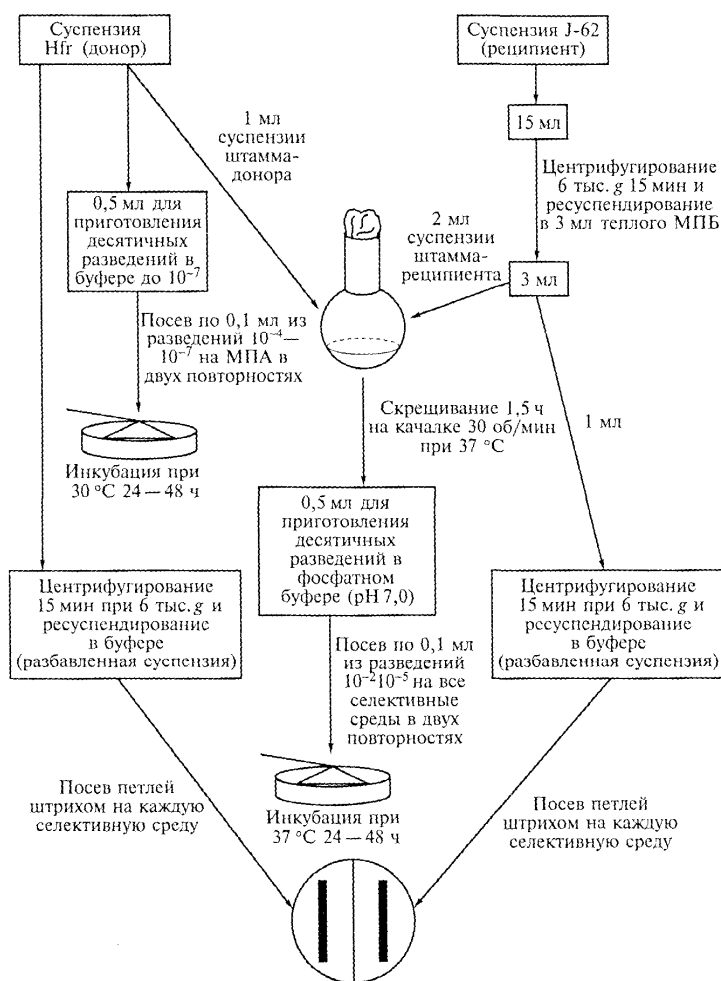


Схема опыта по конъюгации

Донор: *E. coli* K-12 HfrC Leu⁺ Thr⁺ Sm^s Реципиент: *E. coli* C-600 Leu⁻ Thr⁻ Sm^r.

К 4,5 мл суточной бульонной культуры реципиента добавляют 0,5 мл суточной бульонной культуры донора и инкубируют при 37°C в течение 1 ч. Затем делают разведения смеси физиологическим раствором от 10⁻¹ до 10⁻⁵ и высевают по 0,1 мл на селективную среду в чашки Петри (на среде могут вырасти только колонии бактерий рекомбинантов, ставших прототрофами в результате получения генов Leu и Thr донора). В качестве контроля на ту же среду засевают раздельно по 0,1 мл культуры донора и реципиента. Они не должны расти на селективной среде, т.к. доноры чувствительны к стрептомицину, а реципиенты - ауксотрофы по лейцину и треонину. Для определения числа жизнеспособных клеток донора разводят его культуру физиологическим раствором и высевают из разведений 10⁻⁶ до 10⁻⁷ по 0,1 мл на селективную среду без стрептомицина. Все посеы инкубируют при 37°C 24-48 ч.

После подсчета выросших колоний определяют частоту рекомбинаций по отношению числа рекомбинантов к числу донорских клеток. Например, после посева 0,1 мл смеси в разведении 10⁻⁴ на селективной среде выросло 150 колоний рекомбинантов, а после посева 0,1 мл культуры донора в разведении 10⁻⁶ выросло 75 колоний. Следовательно, частота рекомбинантов будет: $1.5 \cdot 10^{-4} / 7.5 \cdot 10^{-6} = 2 \cdot 10^{-2}$.

Получение компетентных клеток *E. coli*.

Ночную культуру *E. coli* штамма C600, выращенную без перемешивания, разводят в 20 раз теплой средой LB и инкубируют на качалке при 37 °C в течение 90-100 мин. Клетки осаждают центрифугированием на холоде (6 тыс. g, 10-15 мин), ресуспендируют в 1/2 объема культуры 10 mM раствора хлористого кальция при 4 °C, осаждают центрифугированием на холоду (6 тыс. g, 10-15 мин) и ресуспендируют в 100 mM растворе

хлористого кальция при 4 °С (1/20 исходного объема).

Приготовленные таким образом клетки *E. coli* сохраняют компетентность при их инкубации во льду в течение суток. Компетентность утрачивается даже при незначительном и кратковременном повышении температуры. Для более длительного хранения к компетентным клеткам добавляют глицерин до конечной концентрации 15%, разливают аликвоты по 0,2 мл, замораживают и хранят при -20...-80°С.

Трансформация компетентных клеток *E. coli*.

К 0,2 мл компетентных клеток *E. coli* добавляют 1 - 10 мкл плазмидной ДНК (1 - 100 нг) и инкубируют во льду в течение 30-45 мин. Затем клетки подвергают тепловому шоку 5- 10 мин при 42С. Добавляют к клеткам 0,5 мл среды LB и инкубируют с аэрацией при 37С в течение 2 ч. После инкубации высевают по 0,1 мл культуры на чашки с селективной средой и инкубируют в течение 16-24 ч.

Трансформация *Bacillus subtilis*

Реципиент - штамм *Bacillus subtilis* Str^s (сенная палочка, чувствительная к стрептомицину). Донор - ДНК, выделенная из штамма *B. subtilis* Str^r (устойчивого к стрептомицину). Селективная среда для отбора рекомбинантов (трансформантов) - питательный агар, содержащий 100 ЕД/мл стрептомицина. К 1 мл бульонной культуры *B. subtilis* добавляют 1 мл ДНК донора и инкубируют 30 мин при 37 ° С. Для определения количества образовавшихся стрептомицинустойчивых рекомбинантов 0,1 мл смеси высевают на селективную среду. Частоту трансформации определяют по отношению количества выросших колоний рекомбинантных клеток к числу клеток реципиентного штамма.

Реципиент - штамм *E. coli* lac⁻, лишенный β-галактозидазного оперона, контролирующего ферментацию лактозы. Трансдуцирующий фаг - фаг λ dgal, в геноме которого часть генов замещена β-галактозидазным опероном *E. coli*. Селективная среда - среда Эндо, на которой лактозоотрицательные колонии бактерий реципиентного штамма образуют бесцветные колонии, а лактозоположительные колонии рекомбинантного штамма - ярко малиновые с металлическим оттенком. К 1 мл 3-часовой бульонной культуре реципиентного штамма добавляют 1 мл трансдуцирующего фага в концентрации 10⁶ - 10⁷ частиц в 1 мл. Смесь инкубируют 60 мин при 37 ° С и готовят ряд десятикратных разведений. Из пробирки с 10⁻⁶ разведением по 0,1 мл культуры высевают на три чашки со средой Эндо и инкубируют в течение суток. Величину трансдукции вычисляют по отношению количества клеток рекомбинантов, обнаруженных на всех чашках к числу клеток реципиентного штамма.

Контрольные вопросы: 1. Что такое конъюгация и чем она обусловлена? 2. Чем обуславливается у *Escherichia coli* различная резистентность к стрептомицину и зависимость от ростовых факторов? 3. Охарактеризуйте этапы постановки опыта по конъюгации. 4. В чем заключается анализ конъюгационного скрещивания по градиенту передачи маркеров донора рекомбинантам? 5. Что такое компетентность и чем она обусловлена? 6. Как получают компетентные клетки *Escherichia coli*? 7. Охарактеризуйте этапы постановки опыта по трансформации. Каковы особенности трансформации *Bacillus subtilis*? 8. Что такое трансдукция? 9. Охарактеризуйте этапы постановки опыта по проведению специфической трансдукции.