

Министерство образования Республики Беларусь

**Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»**

И. И. КОНЦЕВАЯ

**Микробиология:
генетические механизмы изменчивости у бактерий**

**Практическое руководство
для студентов специальности 1-31 01 01-02
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»**

**Чернигов
Издательство «Десна Полиграф»
2017**

УДК 579 (075.8)
ББК 28.4я73
К653

Рецензенты:

кандидат биологических наук, доцент И.В. Вуевская;
кандидат химических наук, доцент С.М. Пантелеева

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом
учреждения образования «Гомельский государственный
университет имени Франциска Скорины»

Концевая И. И.

К653 Микробиология: генетические механизмы изменчивости у бактерий.
Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов /
И. И. Концевая; М-во образования РБ, Гомельский гос. ун-т
им. Ф. Скорины. – Чернигов: Десна Полиграф, 2017. – 36 с.

Практическое руководство ставит своей целью оптимизировать учебно-познавательную деятельность студентов по усвоению материала темы «Генетические механизмы изменчивости у бактерий». Рассматриваются вопросы: характеристика генетического аппарата бактерий, мобильные генетические элементы, мутации, три основных механизма переноса генетического материала у бактерий. Практическое пособие может быть использовано как на лабораторных занятиях по соответствующим темам курса «Микробиология», так и для самостоятельной подготовки по разделу «Генетика бактерий».

Адресовано студентам биологического факультета.

УДК 579 (075.8)
ББК 28.4я73

© Концевая И. И., 2017
© УО «Гомельский государственный
университет имени Франциска Скорины», 2017

Содержание

Введение.....	4
Занятие 1 Генетические механизмы изменчивости у бактерий.....	5
1 Характеристика генетического аппарата бактерий.....	5
2 Мобильные генетические элементы.....	10
3 Мутации.....	13
4 Обмен генетической информацией у бактерий.....	19
Литература.....	35

Введение

Микробиология является одной из фундаментальных биологических дисциплин. Знание микробиологии необходимо высококвалифицированному специалисту-биологу для формирования мировоззрения об огромной роли микроорганизмов в природе и в жизни человека.

На лабораторных занятиях при изучении тем «Генетические механизмы изменчивости у бактерий» студенты знакомятся с характеристикой генетического аппарата бактерий (организацией генома, классификацией генов, генетическими картами, плазмидами), мобильными генетическими элементами (инсерционными последовательностями, транспозонами, интегронами), тремя основными механизмами переноса генетического материала у бактерий (трансформацией, трансдукцией, конъюгацией), понятием «мутации». На занятиях студенты, заполняют протокол по способам генетического обмена у бактерий.

Материал занятия начинается с плана, включает изложение теоретической части и вопросы, которые можно использовать для текущего контроля усвоения знаний студентами, а также для самоконтроля. Далее перечисляются материалы, необходимые на занятии, ставится цель занятия, перечисляются задания для самостоятельной работы студентов на лабораторном занятии. Результаты наблюдений студенты оформляют в виде протокола, образцы которых представлены в практическом руководстве.

Изложение материала построено в соответствии с программой курса. Студенты, отработавшие лабораторные занятия, приобретают достаточную теоретическую подготовку и навыки, необходимые в практической работе и при выполнении экспериментальных исследованиях.

Целью практического руководства является оказание помощи студентам в овладении теоретическими основами микробиологии. Материал пособия делает процесс обучения более эффективным и способствует повышению его качества.

Практическое пособие адресовано студентам специальности 1–31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)».

Занятие 1

Генетические механизмы изменчивости у бактерий

- 1 Характеристика генетического аппарата бактерий
- 2 Мобильные генетические элементы
- 3 Мутации
- 4 Обмен генетической информацией у бактерий

1 Характеристика генетического аппарата бактерий

Организация генома. Генетический аппарат бактерий представлен бактериальной хромосомой, внехромосомными факторами наследственности – плазмидами, а также входящими в их состав мобильными генетическими элементами (рисунок 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 10⁶ п.н.

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, 8x10⁵ до 13 x 10⁶ п.н., что соответствует приблизительно 10³ генов (1 ген на 1000 п.н.). Это в 100 раз больше, чем у вирусов, и в 1000 раз меньше, чем в среднем у эукариот.

Несмотря на весьма значительную разницу в сложности организации фенотипа прокариот и эукариотических организмов, различие в количестве генов не велико. Для объяснения этого феномена в последнее время получила развитие концепция сетевых взаимодействий: дело не в различии в количестве генов, а в сложности генетических сетевых взаимодействий.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ БАКТЕРИЙ

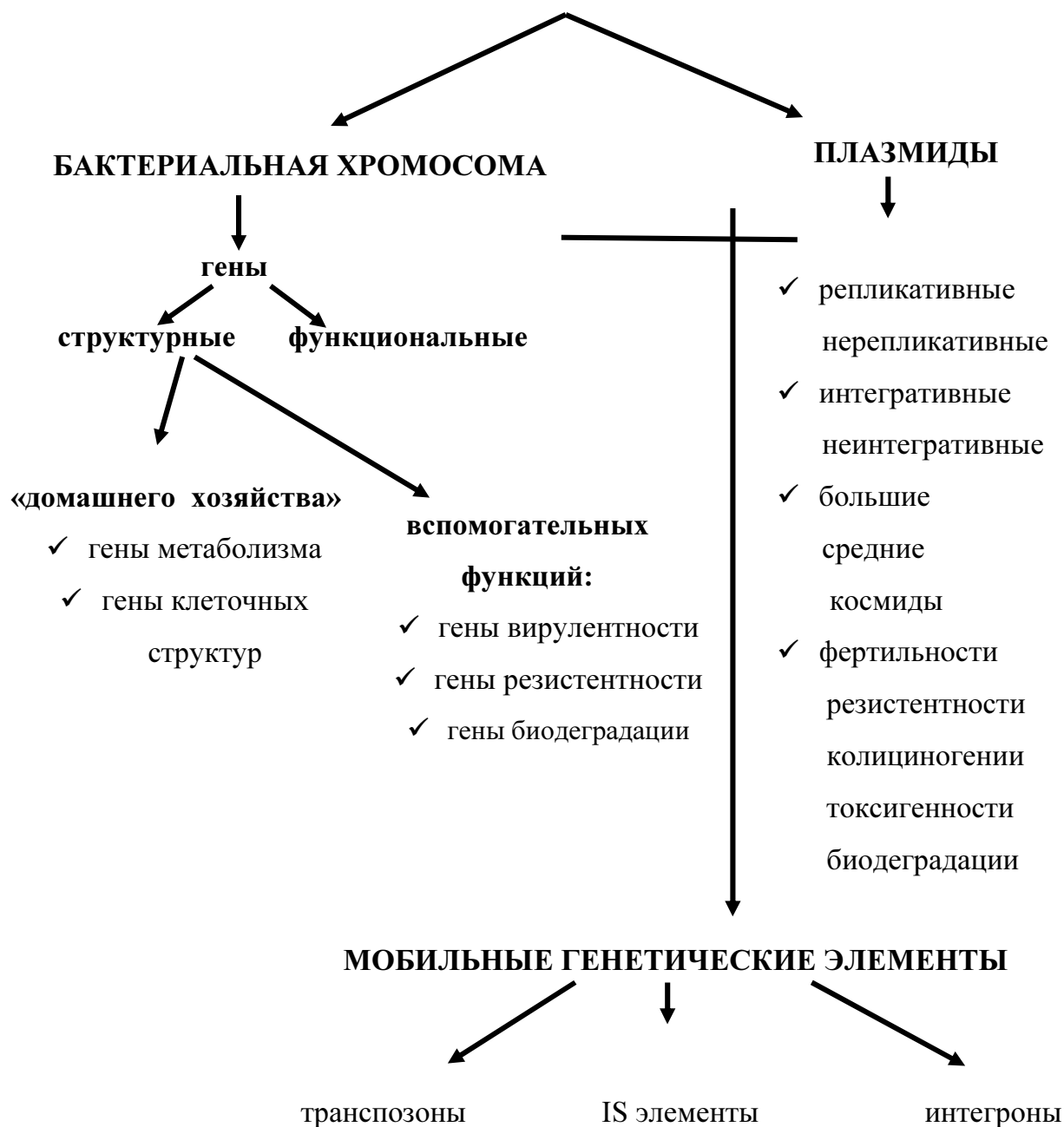


Рисунок 1 – Устройство генетического аппарата бактерий

Многочелюстные организмы, чей геном всего лишь в 5–10 раз больше микроорганизмов, имеют более сложные регуляторные системы, которые могут контролировать одновременную экспрессию большого числа различных групп генов. 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 бактерии *Mycoplasma genitalium* ($0,58 \times 10^6$ п.н.), содержащие минимальный набор генов, необходимых для выживания.

Ранее сходство микроорганизмов и их принадлежность к одному роду оценивали по содержанию ГЦ-пар (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.

Например, условно-патогенные *E. coli* K12, обитающие в кишечнике человека, и *E. coli* 0157:H7, вызывающие гемолитико-уремический синдром, имеют идентичную генетическую информацию объемом $4,1 \times 10^6$ п.н. В геноме *E. coli* 0157:H7 дополнительно содержится видоспецифическая информация размером $1,34 \times 10^6$ п.н. (приблизительно 1387 генов), а в геноме *E. coli* K12 – $0,53 \times 10^6$ п.н. (приблизительно 528 генов). *Listeria monocytogenes*, вызывающие листериоз, имеют 270 генов, отвечающих за патогенность и не встречающихся у непатогенных *Listeria innocua*. *Yersinia pestis* – возбудители чумы – в отличие от *Yersinia pseudotuberculosis*, характеризуются присутствием большого количества IS элементов, встроенных в состав приблизительно 100 генов.

Классификация генов. Основной единицей наследственности, ответственной за формирование какого-либо элементарного признака, является ген, совокупность которых формирует генотип. В соответствии с международной номенклатурой, название генов происходит от кодируемых ими признаков и его сокращают тремя малыми буквами латинского алфавита. Аналогичные гены, присутствующие у разных видов микроорганизмов, обозначают путем добавления к названию заглавной буквы латинского алфавита (гены, контролирующие разложение лактозы у разных видов бактерий – lac Z, lac Y), аллельные варианты генов, встречающихся у представителей одного вида микроорганизмов, обозначают добавлением цифрового индекса, соответствующего порядковому номеру измененного нуклеотида (lacZ 195). 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:

1 Простые повторяющиеся последовательности (SSR) – состоят из 2–6 нуклеотидов, которые могут много раз в тандеме повторяться, например, ЦАТ ЦАТ ЦАТ.

2 CpG мотивы. Богатые гуанином и цитозином последовательности нуклеотидов. Чаще встречаются в начале гена. Распознаются Toll-like рецепторами клеток иммунной системы. Обладают стимулирующим действием на В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и опосредованно – на естественные киллеры. В геноме человека так же встречаются CpG мотивы, но в метилированном состоянии, и потому не обладают иммуностимулирующим эффектом.

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-пар, положение CpG островков, геномных повторов, определение плотности генов, положения транспозонов, IS-элементов, тРНК и рРНК генов.

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 ГЦ-пар от средней величины – 37,6%: красный цвет – в большую сторону, голубой – в меньшую. Четвертое кольцо отражает содержание ГЦ-пар на основной цепи к общему содержанию ГЦ-пар в ДНК. На этом кольце видна асимметрия в содержании ГЦ-пар 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.

Плазмиды. Генетические признаки микроорганизмов могут кодироваться не только бактериальной хромосомой, но плазмидами.

Плазмиды – это внехромосомные факторы наследственности, представляющие собой небольшие кольцевые двухцепочечные суперскрученные ковалентнозамкнутые молекулы ДНК, которые располагаются в цитоплазме и способны к автономной репликации.

В плазмидах закодирована информация, необходимая для репликации плазмид в бактериях, а также информация о дополнительных признаках, сообщающих бактериям преимущества в тех или иных условиях обитания и в стрессовых ситуациях.

В одной клетке может быть несколько плазмид, совокупность которых называют плазмотипом. Например, *Borrelia burgdorferi B31* содержит 17 плазмид общим размером сравнимым с геномным – $0,53 \times 10^6$ п.н. (против $0,91 \times 10^6$ п.н. в геноме). Плазмиды могут интегрировать в бактериальную хромосому, тогда их называют эписомами. Репликация плазмид начинается со связывания с итероном (место старта репликации) иницирующего репликацию белка.

Плазмиды классифицируют на несколько групп в зависимости от:

1 Размера: большие, средние, малые (космиды).

2 Способности вызывать конъюгацию бактерий: 1) конъюгативные, которые имеют относительно большие размеры и содержат информацию, необходимую для автономной репликации и переноса ДНК реципиенту; 2) неконъюгативные, которые не способны запускать конъюгацию; они могут передаваться реципиенту при наличии в клетке конъюгативных плазмид.

3 Способности к репликации в одной клетке: совместимые и несовместимые.

4 Кодированного фенотипического эффекта:

а) Фертильности – F-плазмиды.

б) Бактериоциногенности – Col-плазмиды (ColE1, ColE2). Кодировать продукцию бактериоцинов – антибиотикоподобных веществ, обладающих бактерицидным действием в отношении близкородственных видов микроорганизмов. Встречаются у представителей нормальной микрофлоры человека с частотой 1:1000 клеток.

в) Резистентности – R-плазмиды (рисунок 2). Обуславливают устойчивость или множественную устойчивость к антибиотикам, солям

тяжелых металлов, УФ излучению (плазмиды R100, RP 4). Как правило, являются конъюгативными. Состоят из двух участков: 1) фактора переноса устойчивости, или RTF, содержащего гены репликации и переноса в клетку реципиента; 2) R-детерминанты, содержащей гены или транспозоны резистентности.

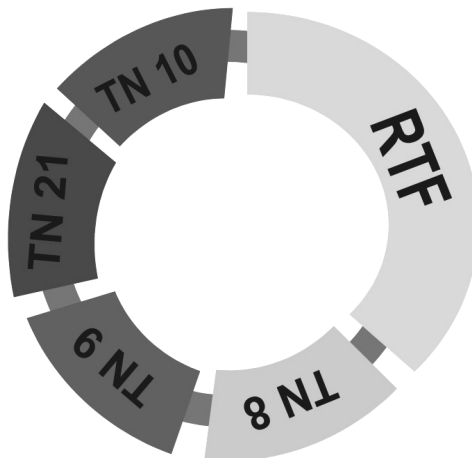


Рисунок 2 – Структура плазмиды множественной резистентности

д) Вирулентности (плазмиды LT2, K88). Кодировать продукцию энтеротоксинов, фимбрий.

е) Биодegradации – D-плазмиды. Обеспечивают расщепление сложных субстратов (углеводородов нефти и т.д.).

ж) Криптические. Фенотипический эффект не установлен.

Плазмиды участвуют в генетических перестройках, обеспечивают горизонтальный перенос генов, используются в качестве векторов в генной инженерии.

2 Мобильные генетические элементы

Мобильные генетические элементы (мигрирующие, 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.

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.н., но описаны IS-элементы более крупных и мелких размеров – 5700 п.н. и 200 п.н. Центральную часть IS-элемента занимает ген, кодирующий транспозазу; 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.н. (рисунок 3), 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 – в 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 A/T.

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.н. 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-инженерные 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 *rim 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 (рисунок 3). Транспозоны обозначают Tn с числовым индексом, например, Tn 4556. Их размер больше IS-элементов и составляет 2,500–7,000 п.н. На обоих концах Tn находятся прямые или инвертированные повторы, по которым транспозаза распознает их и вырезает. Частота транспозиций Tn сравнима с частотой мутаций.

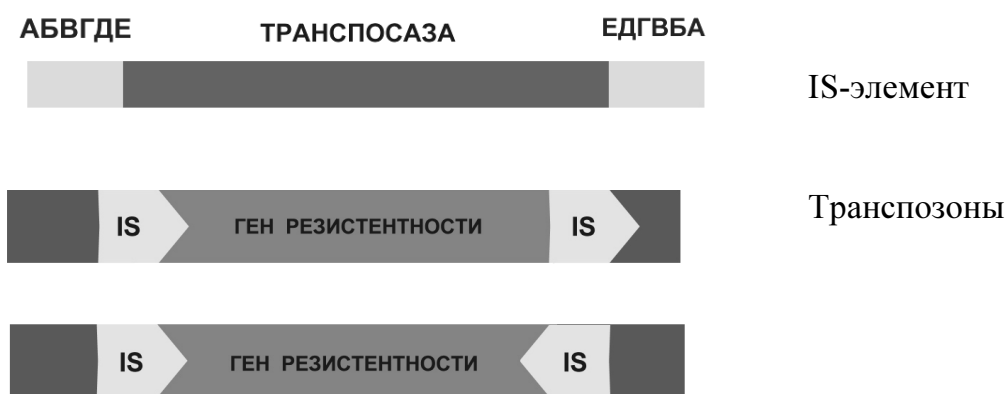


Рисунок 3 – Структура IS-элементов и транспозонов

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.н.

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.н. 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.н. и на его концах находятся инвертированные повторы размером 11 п.н. 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*, который 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.н.

3 Мутации

Термин «мутации», обозначающий «скачкообразное изменение наследственных признаков», ввел Де Фриз, изучавший изменчивость и

наследственность у растений. Позднее Бейеринк распространил это понятие на бактерии. Спустя некоторое время экспериментально был доказан спонтанный и ненаправленный характер мутаций.

В настоящее время **мутации** рассматривают как *любое стабильное наследуемое изменение ДНК*. В популяции бактерий в процессе ошибок репликации постоянно возникают мутации, которые приводят к появлению *аллелей* генов. Если условия микроокружения создают селективное преимущество мутирующему микроорганизму, то благодаря быстрому размножению, он становится преобладающим в популяции.

Некоторые штаммы характеризуются повышенной частотой мутаций, связанной с нарушением систем репарации. Такие штаммы получили название *мутаторов*. Впервые они описаны в 1950 году. Мутаторы важны в процессе видообразования микроорганизмов. Однако, мутаторы не только с высокой частотой мутируют, но и обмениваются генами, тем самым затормаживают процессы дивергенции микроорганизмов.

Мутации классифицируют в зависимости от ряда факторов: причин возникновения, последствий, направленности, локализации, типов замен нуклеотидов (рисунок 4).



Рисунок 4 – Классификация мутаций

Выделяют следующие **типы мутаций**:

1 По причинам возникновения: спонтанные и индуцированные.

Спонтанные мутации регулярно возникают в популяции бактерий без экспериментального вмешательства. Их возникновение в естественных условиях происходит с частотой 10^{-6} – 10^{-9} и связано с присутствием низких концентраций мутагенов в окружающей среде. Большинство спонтанных мутаций формируются во время репликации генома вследствие случайных ошибок при включении нуклеотидов в ДНК.

Пример механизма замены. Тимин, обычно находящийся в оксоформе и взаимодействующий с аденином, при таутомерном перемещении электронов может переходить в енольную форму, в которой он взаимодействует с гуанином. В результате в новой молекуле ДНК на месте пары А–Т появляется пара G–C.

Индуцированные мутации возникают под действием мутагенов; образовавшиеся клетки называют индуцированными мутантами. Мутагенами могут быть **химические агенты** (нитрит, алкилирующие агенты, акридиновые красители, этиленмин, азотистый или серный иприт и т.д.), **физические** (ультрафиолетовые лучи – 260 нм, ионизирующее излучение) или **биологические** (бактериофаги, транспозоны и т.д.). Под действием мутагена частота мутаций увеличивается и составляет 10^{-5} – 10^{-3} (одна мутация появляется при репликации 1000–100 000 генов).

2 По локализации: хромосомные, плазмидные и генные.

Хромосомные – мутации, приводящие к крупным перестройкам. При этом гены или их группы могут быть утрачены (делеция), перемещены в пределах хромосомы (транспозиция) или «разорваны» путем вставки посторонней ДНК (инсерция), удвоены (дупликация). За некоторым редким исключением, ревертанты не появляются. **Геномные** мутации отсутствуют у бактерий, в связи с наличием у них только одной хромосомы.

Плазмидные. Происходят в плазидах и по типу перестроек аналогичны хромосомным.

Генные – мутации, приводящие к изменениям в пределах одного гена. К ним относятся: а) точечные мутации; б) микроделеции/микроинсерции:

а) **точечные** мутации сопровождаются заменой одного нуклеотида и являются наиболее распространенной группой мутаций у прокариот. Происходят в процессе репликации генома и нередко приводят к

появлению мутантного белка. Характерна высокая частота реверсии. В зависимости от происходящих замен нуклеотидов **точечные мутации** могут подразделяться на *транзиции* и *трансверзии* (рисунок 5). *Транзиции* сопровождаются заменой пуринового основания на пуриновое, или пиримидинового на пиримидиновое. *Трансверзии* сопровождаются заменой пуринового основания на пиримидиновое, или наоборот.

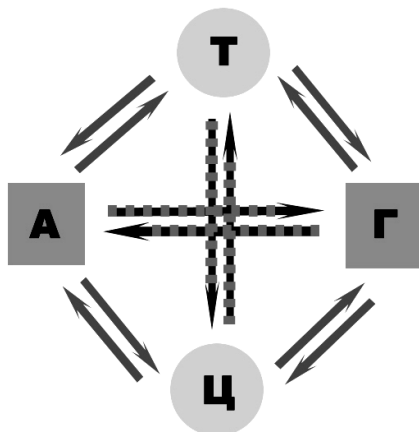


Рисунок 5 – Транзиции ($A \leftrightarrow Г$ и $Т \leftrightarrow Ц$) и трансверзии ($A \leftrightarrow Т$, $Т \leftrightarrow Г$, $Г \leftrightarrow Ц$, $Ц \leftrightarrow А$)

В зависимости от последствий, **точечные мутации** могут быть **молчащими, миссенс, нонсенс**.

Молчащие (синонимичные) мутации, несмотря на замену нуклеотида, не приводят к изменению кодируемой аминокислоты, что связано с вырожденностью (избыточностью) генетического кода, когда одна аминокислота кодируется несколькими триплетами. Молчащие мутации преимущественно происходят в третьем нуклеotide кодона.

Миссенс (несинонимичные) мутации приводят к замене нуклеотида и кодируемой аминокислоты, что, нередко, сопровождается изменением функциональной активности белка – активацией его или инактивацией.

Нонсенс мутации сопровождаются формированием стоп-кодона, или стоп-сигнала с последующей терминацией трансляции и появлением неполноценного белка с меньшей последовательностью аминокислот.

б) микроинсерции или микроделеции – генные мутации, сопровождающиеся включением дополнительной пары оснований в ДНК/РНК или их утратой. Последствием вставки или выпадения одного нуклеотида является **сдвиг рамки считывания белков**, что приводит к изменению группировки триплетов, неправильному прочтению триплетов и синтезу пептида с новым составом аминокислот. Ревертанты редки.

3. По направленности: прямые и обратные.

Обратные мутации возникают в мутированном гене и восстанавливают исходный фенотип.

Истинные обратные мутации – мутации, возникающие в мутированном триплете и точно восстанавливающие исходный генотип. Измененный при первой мутации триплет будет вновь кодировать ту же аминокислоту, что и раньше.

Реверсии (супрессорные) мутации – мутации, восстанавливающие исходный фенотип. Супрессорные мутации могут происходить как в исходном гене, так и в каких-либо других участках хромосомы (*интрагенные* и *экстрагенные* супрессорные мутации).

Выделение мутантов

Для выделения мутантов используют методы позитивной и негативной селекции.

1 **Позитивная селекция.** Используют селективную среду, на которой растут только мутантные колонии. Например, для поиска резистентных к пенициллину мутантов используют среду с пенициллином.

2 **Негативная селекция.** Используется для выявления мутантов, утративших признаки (ауксотрофы) по сравнению с родительскими клетками (прототрофными). Ауксотрофные мутанты утрачивают способность синтезировать жизненно важные нутриенты. Для их выявления используют метод реплик и минимальные питательные среды.

Геномика

Термин предложен в 1986 г. Томасом Родериком для обозначения дисциплины, занимающейся секвенированием и анализом геномов, составлением генетических карт организмов. В настоящее время под термином «геномика» понимают новое направление генетики, изучающее геномы и отдельные гены организмов на индивидуальном и популяционных уровнях для установления взаимосвязи организмов и направления их эволюции. Понятие геном следует разграничивать с понятием генотипа.

Генотип – это совокупность генов, детерминирующих фенотипические признаки.

Геном – это вся ДНК/РНК организма.

Развитие геномики начинается с началом глобального научного проекта «Геном человека» (с 1990 г.), в рамках которого в 1995 г. впервые секвенирован геном микроорганизма *Haemophilus influenzae*, в 1996 г. – *S. cerevisiae*, в 2000 г. – геном человека. В настоящее время проводится секвенирование геномов 200 видов микроорганизмов, 60 из которых уже в стадии завершения.

В геномике выделяют несколько направлений исследований: структурное, функциональное.

Структурная геномика. Определяет первичную структуру генома, границы генов и их организацию, структуру белков и других биомолекул клетки. Описывает организацию генома и протеома в целом у различных организмов. Использует методы картирования, секвенирования, рентгеноструктурного анализа, биоинформатики.

Биоинформатика – направление биологии, основанное на компьютерном анализе «in silico» первичной, вторичной, третичной структуры молекул ДНК, РНК, белков (т.е. их полных сиквенсов или сиквенсов их фрагментов). В этих целях разработаны компьютерные программы и созданы базы данных по составу геномов, протеомов организмов.

Функциональная геномика. Изучает функции каждого гена, белка и других биомолекул клетки, механизмы регуляции их активности. Оценивает роль одного гена/протеина в сложной клеточной машине. Поскольку в геноме тысячи генов, функциональная геномика изучает сетевые взаимодействия генов/белков. Функции генов могут быть установлены на основании изучения синтезируемых с них мРНК, белков и образуемых метаболитов, поэтому в функциональной геномике выделяют следующие разделы:

1) транскриптомика – раздел геномики, изучающий совокупность мРНК клетки и изменения в них в зависимости от среды и стадии развития.

2) протеомика – раздел геномики, изучающий совокупность всех белков клетки, их структуру и взаимодействие друг с другом в зависимости от микроокружения и стадии развития.

3) метаболомика – раздел геномики, изучающий метаболиты (конечные продукты клеточных процессов) и изменения в их составе в разные фазы жизненного цикла и состояния микроокружения бактерий.

Функциональная геномика использует методы биоинформатики, клонирования, направленного мутагенеза, рентгенологической кристаллографии (или ЯМР).

Геномика может быть классифицирована на фундаментальную и прикладную.

Фундаментальная геномика вскрывает основы молекулярной структуры и функции клеток.

Прикладная геномика предназначена для решения практических проблем в промышленности, медицине, сельском хозяйстве, охране окружающей среды, токсикологии, фармакологии.

В зависимости от объекта исследований подразделяется на геномику человека, животных, растений, микроорганизмов.

4 Обмен генетической информацией у бактерий

Способы обмена генетической информацией

Геном бактерий характеризуется пластичностью, или способностью изменяться. В зависимости от механизмов формирования генетического разнообразия бактерий выделяют:

1) **клональные штаммы**, генетическое разнообразие которых формируется только благодаря мутациям (*Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* spp.);

2) **панмиктические штаммы**, генетическое разнообразие которых формируется благодаря мутациям и горизонтальному переносу генов (*Neisseria gonorrhoeae*).

Горизонтальный перенос генов – обмен генетической информацией между различными эволюционными линиями. Горизонтальный перенос генов представляет собой мощный фактор эволюции, приводящий: 1) к формированию видов; 2) многообразию видов; 3) дивергенции микроорганизмов.

Горизонтальный перенос генов происходит у микроорганизмов, обитающих в схожих условиях среды, и возможен даже между отдаленными систематическими группами; позволяет быстро приобретать новые свойства. Кроме того, он приводит к стиранию границ между группами микроорганизмов, относящихся к разным таксономическим уровням. До 30 % генома бактерий может приобретаться за счет горизонтального переноса генов. Например, у *Escherichia coli* 18 % генов приобретены таким образом.

Существуют три основных способа обмена генетической информацией, или горизонтального переноса генов: трансформация, трансдукция и конъюгация. Эти процессы отличаются друг от друга способом транспортировки ДНК. Могут происходить как естественным путем, так и при искусственных манипуляциях.

Общими особенностями для всех способов обмена генетической информацией у бактерий являются:

1 Процесс переноса ДНК всегда односторонний, или однонаправленный: от донорных бактерий к реципиентным.

2 Полного обмена генетической информацией не наблюдается, результатом чего является образование мерозиготы (рисунок 6).

Состояние мерозиготы носит относительно непродолжительный характер, в конечном итоге экзогенота должна встроиться в эндогеноту. Если этого не происходит, то экзогенота элиминируется эндонуклеазами клетки-реципиента.

3 Для образования рекомбинантного потомства процесс генетического переноса должен обязательно закончиться рекомбинацией. За рекомбинацией следует процесс репликации ДНК и деления клетки, в результате чего возникают клетки, содержащие только рекомбинантную хромосому, которые называются **рекомбинантами**.

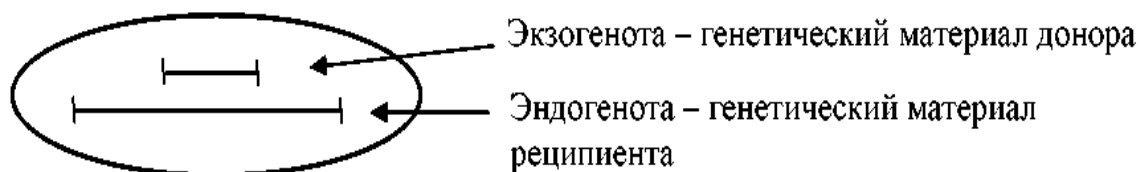


Рисунок 6 – Схема мерозиготы

Трансформация

Трансформация – разновидность рекомбинативной изменчивости микроорганизмов, сопровождающаяся переносом ДНК от донора к реципиенту через окружающую среду. В процессе трансформации ДНК-фрагмент погибшей и разрушенной бактерии встраивается в ДНК реципиента, находящегося в состоянии компетентности. Впервые продемонстрирована в 1928 г. Фредериком Гриффитом в опытах на пневмококках (*Streptococcus pneumoniae*). Описана как у грамположительных, так и грамотрицательных бактерий родов *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Escherichia*, *Pneumococcus*.

Искусственным путем трансформацию хромосомной ДНК удалось осуществить не только между бактериями одного и того же вида, но и между бактериями, принадлежащими к разным видам. Трансформировать клетки можно также и плазмидной ДНК.

Для осуществления трансформации необходимы следующие условия:

1 Наличие **небольшого** (до 20 генов) фрагмента **двухцепочечной** ДНК донорской клетки. Одноцепочечные или меньшего размера ДНК быстро разрушается нуклеазами окружающей среды.

2 Наличие реципиента, находящегося в состоянии **компетентности**.

Компетентностью при генетической трансформации обычно называется способность бактериальных клеток адсорбировать и поглощать чужеродную ДНК. Однако в последние годы в это понятие включают и все последующие стадии, вплоть до рекомбинации трансформирующей ДНК с хромосомой реципиентной бактерии.

В естественных условиях захват ДНК клеткой-реципиентом осуществляется в фазу логарифмического роста, когда продуцируются специфические ДНК-связывающие белки, кодируемые *com*-генами. У некоторых бактерий клетки компетентны в любой фазе роста

(например, у гонококков и менингококков). К трансформации могут быть способны от 0,1 до 100% клеток популяции, в зависимости от вида бактерий. В лабораторных условиях компетентность достигают путем обработки химическими веществами, например, добавлением CaCl_2 в культуру.

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

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

Однако существует много видов бактерий, у которых отсутствует естественная компетентность. Примером таких бактерий являются *E. coli* и другие, но, несмотря на это, они также могут быть трансформированы. Для этого их клетки обрабатывают тем или иным способом, индуцируя у них способность к поглощению ДНК.

Стадии трансформации (рисунок 7):

1 Адсорбция донорной ДНК на поверхности реципиентной клетки. На этом этапе ДНК чувствителен к ДНКазе.

2 Поглощение донорной ДНК реципиентной клеткой. Причем ДНК может поглощаться только теми клетками, которые находятся в состоянии компетентности. На этой стадии ДНК уже нечувствительна к действию ДНКазы.

3 Образование в реципиентной клетке однонитевых фрагментов донорной ДНК.

4 Синапсис одноцепочечной донорной ДНК с двухцепочечной хромосомой реципиента.

5 Интеграция части донорной молекулы ДНК в реципиентную ДНК в результате гомологичной рекомбинации. Рекомбинация требует сходства между генетической информации донора и реципиента и наличия генов бактериальной рекомбинации – *recA*, *B* и *C*. В редких случаях возможна рекомбинация между отдаленными видами.

6 Репликация рекомбинантной молекулы ДНК.

7 Экспрессия генов, переданных от донора, т. е. образование рекомбинантов, называемых *трансформантами*. Количество переносимой при трансформации ДНК составляет около 10 т. п. н. (тысяч пар нуклеотидов).

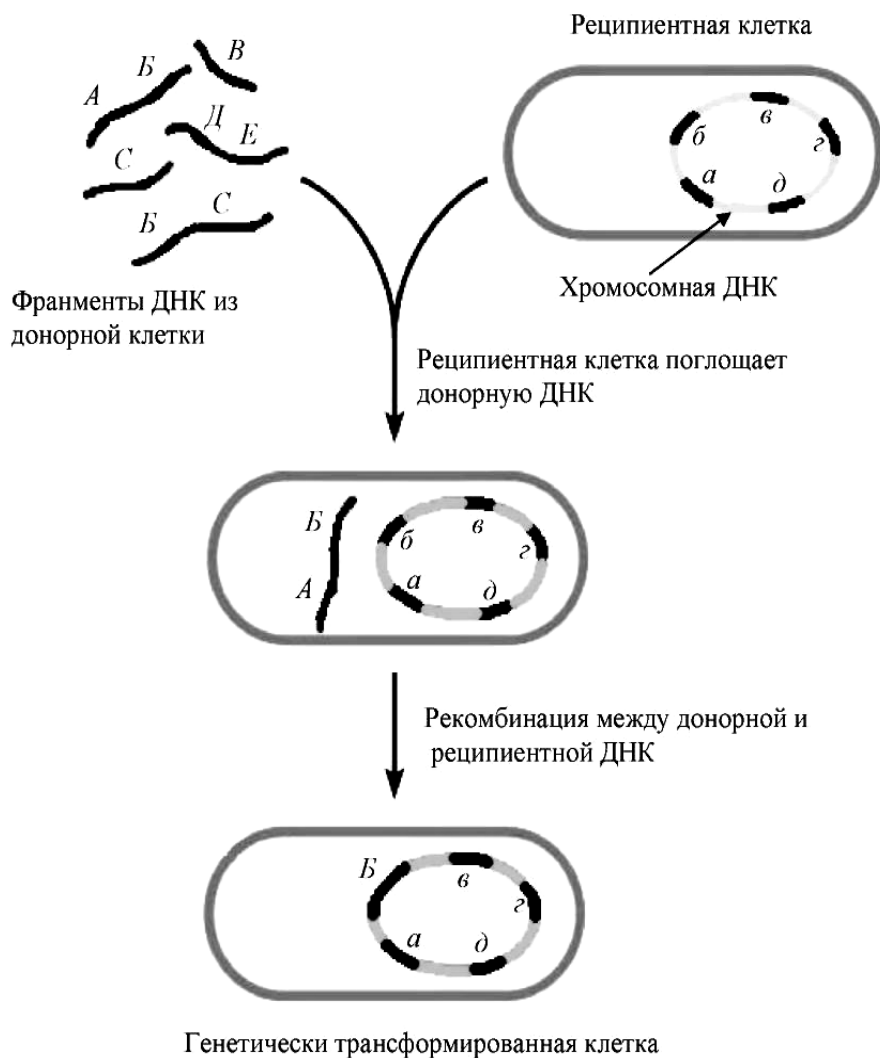


Рисунок 7 – Схема процесса трансформации

Трансформация имеет практическое использование:

- в естественных условиях приводит к усилению вирулентности.
- для картирования бактериальной хромосомы;
- для конструирования промышленно-полезных штаммов микроорганизмов;
- для введения в геном бактерий определенных маркеров или элиминирования нежелательных мутаций;
- как один из этапов получения трансгенных растений;
- может выступать в качестве модели в различных генетических и молекулярно-биологических экспериментах на изолированной ДНК.

Трансдукция

Трансдукция была открыта Дж. Ледербергом и Н. Циндером в 1952 г. у *Salmonella typhimurium* и фага P22.

Трансдукция – перенос генетической информации (хромосомных генов или плазмид) от клетки-донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при участии бактериофагов. При трансдукции фрагменты хромосомы или плазмиды должны упаковаться в головку бактериофага; выйти в составе этой фаговой частицы из клетки-донора в результате ее лизиса и попасть в другую клетку (клетку-реципиент) при новом акте заражения. Белковый капсид фаговой головки предохраняет находящуюся в ней ДНК от разрушения внеклеточными нуклеазами. В этом отношении трансдуцирующая ДНК более «сохранна», чем «голая» ДНК при трансформации. Поскольку адсорбция хвостового отростка фага на рецепторах поверхности клетки видоспецифична, то и перенос генетического материала при трансдукции может происходить, в основном, между близкородственными бактериями.

При трансдукции размеры переносимого фрагмента ДНК определяются размерами головки бактериофага. Различные фаги могут переносить фрагменты ДНК от 20 до 40 т. п. н. Таким образом, при трансдукции передаются как единичные гены, как и сцепленные маркеры.

Рекомбинанты, получаемые при данном способе обмена генетической информацией, называются **трансдуктантами**.

Трансдукцию осуществляют **умеренные фаги**. Они переносят лишь небольшой фрагмент генома клетки хозяина, и как правило, среди особей одного вида, но возможен и межвидовой перенос генетической информации, если бактериофаг имеет широкий спектр хозяев.

В зависимости от исхода взаимодействия фага с бактерией выделяют литические и умеренные фаги.

Литические (вирулентные) фаги впрыскивают нуклеиновую кислоту в клетку и репродуцируются в ней, после чего покидают клетку путем лизиса.

Лизогенные, или умеренные фаги, инъецировав свою ДНК в клетку, могут вести двояко:

- 1) начать цикл репродукции и покинуть клетку путем лизиса;
- 2) интегрировать свою генетическую информацию в геном бактерии и в его составе передаваться дочерним клеткам.

Фаги, встроенные в геном бактерий, называют **профагами**, а бактерии со встроенными в геном фагами, – лизогенными. В результате действия факторов, прерывающих лизогению (УФ, ионизирующей радиация, химические мутагены), вновь синтезируются вирусные

частицы, которые покидают клетку.

Примером умеренного фага является фаг λ , поражающий *E. coli* с последующей интеграцией его ДНК в геном бактерий (пример специфической трансдукции). **Этапы его трансдукции:**

1 Адсорбция фага к рецепторам на поверхности *E. coli*.

2 Проникновение хвостовой части фага через клеточную стенку и инъекция ДНК в клетку-хозяина.

3 Рекомбинация кольцевой молекулы ДНК фага с ДНК хозяина и установление лизогении (фаговая ДНК находится в интегрированном состоянии).

4 Передача профага дочерним клеткам в процессе размножения *E. coli*. Чем больше делений, тем большее количество клеток содержит бактериофаг.

5 Окончание лизогении. ДНК бактериофага вырезается из бактериальной хромосомы. Происходит синтез вирусных белков и репликация ДНК фага, сопровождающиеся созреванием вирусных частиц и их выходом из клетки путем ее лизиса. Во время вырезания бактериофаг может захватывать близлежащие бактериальные гены, которые в последующем попадают в клетку реципиента.

6 Встраивание генома бактериофага, несущего бактериальные гены, в ДНК бактерии-реципиента. Изучение трансдукции показало, что одни фаги могут переносить разные бактериальные гены, а другие – только определенные.

В зависимости от места встраивания бактериофага выделяют следующие виды трансдукции:

а) **генерализованная (неспецифическая, общая)**. Бактериофаг может встраиваться в любом месте генома бактерии и потому способен переносить любой фрагмент ДНК хозяина (рисунок 8).

При **генерализованной трансдукции** может переноситься любой бактериальный признак с частотой 10^{-5} – 10^{-6} . Количество бактериальной ДНК, которое может переноситься фагом, обычно составляет 1–2 % всей ДНК, содержащейся в клетке. Исключение составляет бактериофаг PBS1 *B. subtilis*, который может трансдуцировать до 8 % генома хозяина.

В осуществлении генерализованной трансдукции бактериальный вирус является только «пассивным» переносчиком генетического материала бактерий. Трансдуцирующие дефектные фаги содержат только фрагменты бактериальной ДНК. А генетическая рекомбинация у трансдуцируемых бактерий происходит по общим закономерностям рекомбинационного процесса.



Рисунок 8 – Схема генерализованной трансдукции

б) **специфическая (ограниченная)**. Бактериофаг встраивается в строго определенные места генома бактерии, а потому переносит лишь строго определенные фрагменты ДНК.

Характерными особенностями **специфической трансдукции** являются:

1) каждый трансдуцирующий фаг передает только строго определенную, весьма ограниченную область бактериальной хромосомы;

2) фаг не только переносит генетический материал, но и обеспечивает его включение в бактериальную хромосому;

3) вирус включает ДНК бактерий в свой геном и передает ее, лизогенизируя бактерии-реципиенты.

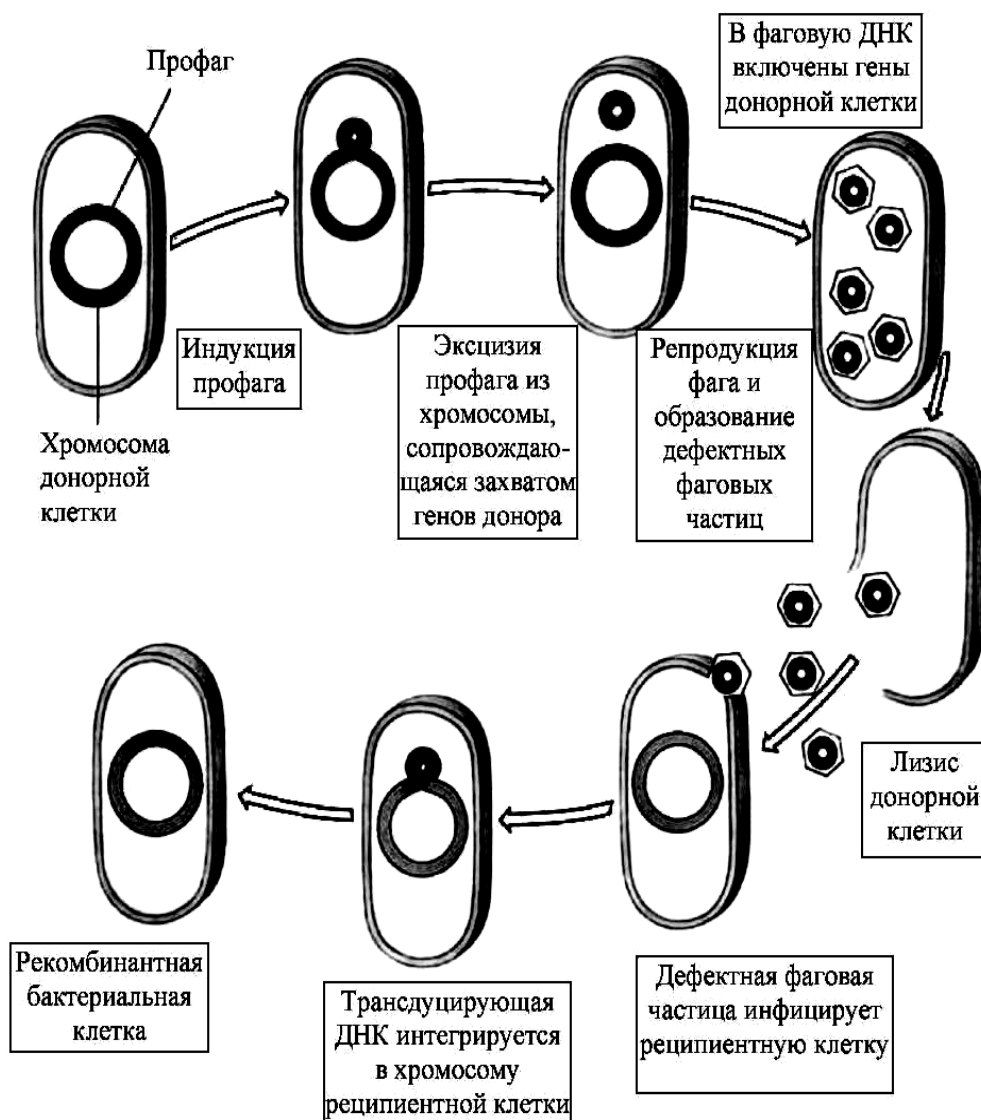


Рисунок 9 – Схема специфической трансдукции

в) **абортивная**. Участок бактериальной хромосомы донора, перенесенный бактериофагом, не вступает в рекомбинацию с хромосомой реципиента, а остается вне хромосомы. Происходит транскрипция перенесенной ДНК (на это указывает синтез соответствующего генного продукта), но не репликация. В процессе деления клетки донорский фрагмент переходит только в одну из дочерних клеток и со временем утрачивается.

Трансдукция имеет практическое использование:

- позволяет трансдуцировать плазмиды и короткие фрагменты хромосомы донора;
- для конструирования штаммов заданного генотипа, в частности изогенных штаммов. Изогенные штаммы, сконструированные при

помощи генерализованной трансдукции, различаются только по участку хромосомы, переносимому трансдуцирующим фагом;

– для точного картирования бактериальных генов, установления порядка и их расположения в оперонах.

Конъюгация

Конъюгация – генетический обмен, сопровождающийся переносом генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при их непосредственном контакте с образованием конъюгационного мостика. В естественных условиях происходит с частотой $1:10^6$.

Явление конъюгации было открыто Дж. Ледербергом и Э. Татумом в 1946 г. в экспериментах с полиауксотрофными штаммами бактерий *E. coli*. Позднее У. Хейс показал, что существуют бактерии мужского (доноры) и женского (реципиенты) типа и вклад их в конъюгацию не равнозначен. Рекомбинанты наследуют большинство своих признаков от реципиента, а от донора получают только отдельные фрагменты генома.

Для осуществления конъюгации необходимо выполнение следующих условий:

1 Наличие донора. Донор отличается от реципиента присутствием полового фактора *F* (от fertility – плодовитость), представляющего автономно реплицирующуюся плазмиду (кольцевая двухцепочечная молекула ДНК с массой 45×10^6 Да), содержащую около 25 генов, которые детерминируют: 1) процесс независимого от генома удвоения (репликации); 2) особые структуры клеточной поверхности – половые пили, или ***F-пили***, которые служат для взаимного узнавания при контакте донора и реципиента и образуют конъюгационный мостик.

2 Наличие реципиента. Не имеет плазмиды *F*.

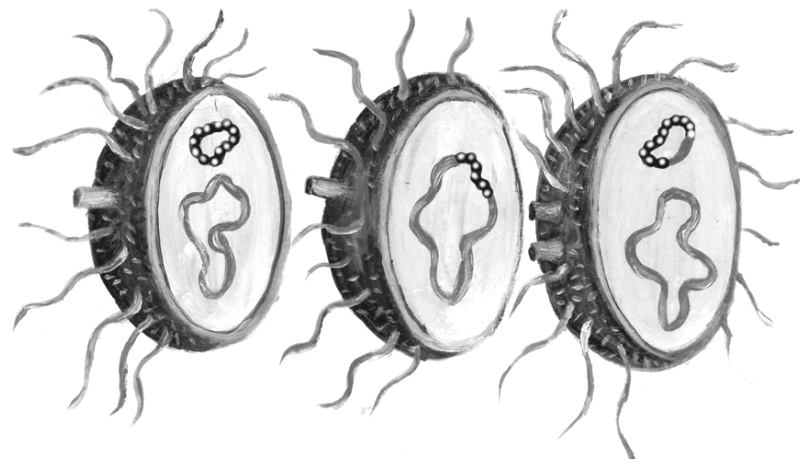
Исход конъюгации и частота передачи хромосомных признаков зависят от физиологического состояния *F* фактора.

Физиологические состояния *F* плазмиды (рисунок 10):

1 Автономное F^+ . *F* фактор находится в цитоплазме в свободном состоянии, не интегрирован в бактериальную хромосому и не несет в своем составе хромосомные гены.

2 Интегрированное, или *Hfr*. *F* фактор может интегрироваться в определенных местах в бактериальную хромосому, и в таком состоянии носит название ***эписомы***. Донорские клетки с интегрированным фактором *F* обеспечивают высокую частоту переноса хромосомной ДНК, они получили название **клеток *Hfr*** (от англ. High frequency of recombinants).

3 Автономное F'. Интегрированная F плаزمида может покидать бактериальную хромосому, захватывая близлежащие гены, таким образом превращаясь в *F'* фактор.



F⁺

Hfr

F'

Рисунок 10 – Физиологические состояния F плазмиды

Механизм и результаты конъюгации

1 Перенос плазмиды F. Происходит при автономном состоянии F фактора. От донора к реципиенту передается только плазмиды F с частотой, близкой к 100 %. Реципиент превращается в потенциального донора, донор сохраняет фактор F. Хромосомные признаки не передаются. Осуществляется следующим образом (рисунок 11):

а) Образование пары. Столкновение донора и реципиента → прикрепление секс-пилей донора к поверхности реципиента, при этом контакт клеток происходит очень короткое время → образование конъюгационного мостика, защищающего передаваемую ДНК от действия нуклеаз окружающей среды.

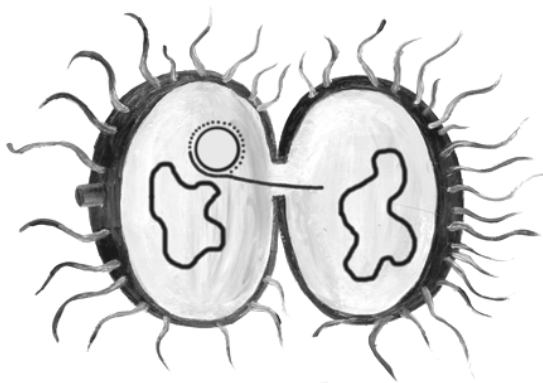


Рисунок 11 – Перенос плазмиды F

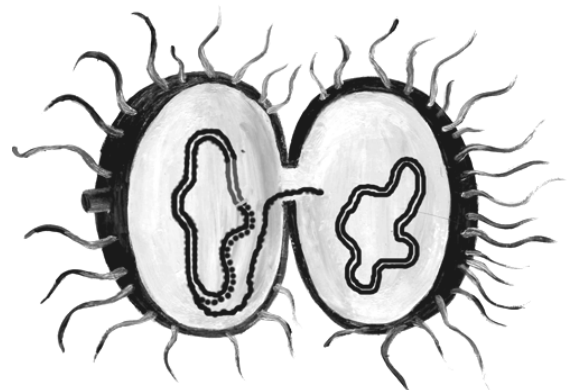


Рисунок 12 – Перенос ДНК в Hfr-состоянии

б) Перенос ДНК. Происходит разрыв в определенном месте одной из цепочек F плазмиды. Разорванная цепь движется по конъюгационному мостику. В цитоплазме реципиента перенесенная цепочка ДНК достраивается второй, концы замыкаются.

2 Перенос бактериальной ДНК за счет Hfr фактора (рисунок 12). Происходит, если F фактор интегрирован в бактериальную хромосому. В результате такой конъюгации реципиент остается F⁻, донор остается Hfr, а перенос полной хромосомной ДНК донора или ее фрагмента происходит с высокой частотой. Так как перенос всей хромосомы *E. coli* продолжается при 37°C около 100 мин, а время контакта клеток ограничено, то к реципиенту в большинстве случаев переходит не вся донорская ДНК, при этом Hfr фактор не попадает реципиенту.

Механизм конъюгации:

а) **Образование пары.**

б) **Перенос ДНК.** Происходит разрыв одной из цепочек перед местом расположения Hfr фактора, образуется репликативная вилка. Разорванная цепочка движется внутрь клетки-реципиента 5'-концом вперед. В последнюю очередь переносится Hfr фактор, поэтому он попадает реципиенту только после перехода всей хромосомы.

в) **Сайтспецифическая рекомбинация.**

3 Перенос генов фактором F'

Интеграция фактора F в бактериальную хромосому обратима. При правильном «вырезании» (эксцизии, выключении) фактора F из бактериальной хромосомы разрыв происходит исключительно по его краям, в редких случаях выключение происходит с захватом соседних участков бактериальной ДНК, что приводит к образованию фактора F'. Так как F и F' факторы передаются реципиентам с высокой частотой (100 %), то хромосомные гены с высокой частотой переносятся в клетку реципиента. Тот же самый фрагмент ДНК мог бы передаваться клеткой в состоянии Hfr штамму F⁻ с максимальной частотой 1 %.

Общая схема механизма передачи генетического материала при конъюгации представлена на рисунке 13.

Перенос генетического материала от донора к реципиенту происходит только в том случае, когда образуются эффективные конъюгационные пары. Взаимное узнавание при контакте донорных и реципиентных клеток обеспечивают половые пили. Они прикрепляются к специфическим рецепторам, находящимся на поверхности реципиентных клеток. Благодаря способности половых пилей

сокращаться, клетки донора и реципиента вступают в контакт «клеточная стенка к клеточной стенке», а затем между клетками возникает более сложное образование – конъюгационный мостик, по которому ДНК переходит из клетки-донора в клетку реципиента.

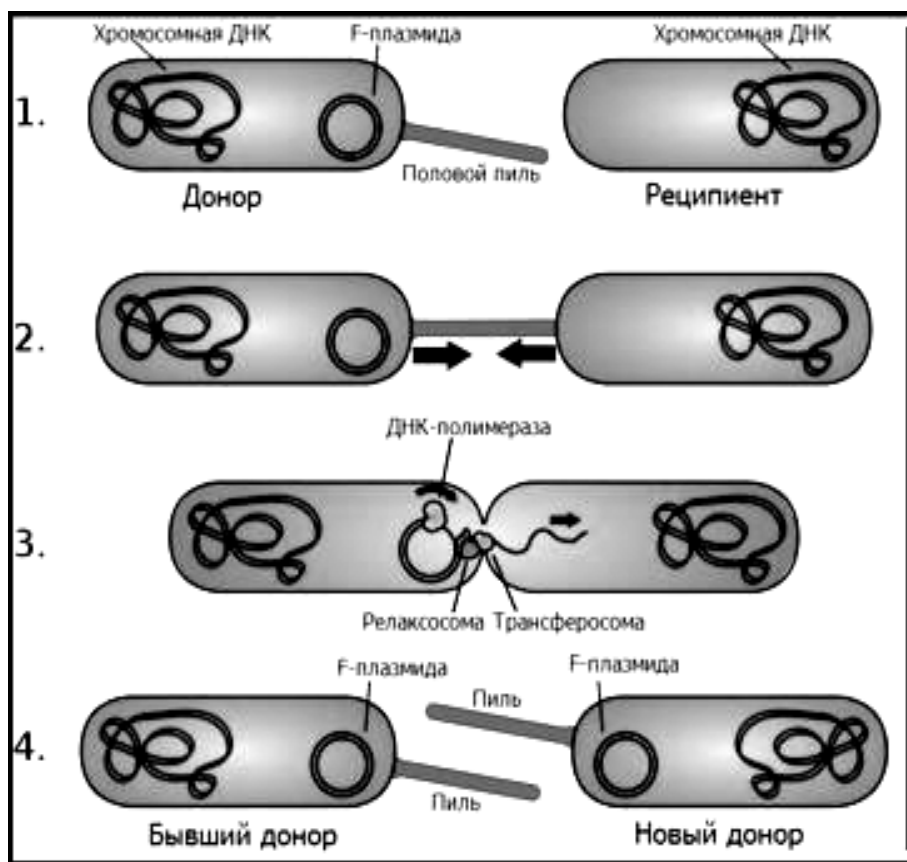


Рисунок 14 – Схематическое изображение конъюгации у бактерий:

1 – клетка-донор выпускает половой пиль; 2 – пиль прикрепляется к клетке-реципиенту, соединяя две клетки; 3 – в мобильной плазмиде происходит односторонний разрыв, и одна цепь ДНК переходит в клетку-реципиент; 4 – обе клетки достраивают вторую цепь ДНК плазмиды, восстанавливая двуцепочечную кольцевую плазмиду, и образуют половые пили. Теперь обе клетки являются полноценными донорами.

При конъюгации перенос генетического материала обеспечивается конъюгативными плазмидами, такими, например, как F-плазида у бактерий *E. coli*. Конъюгативные плазмиды содержат *tra*-опероны, ответственные за перенос генетического материала. Ряд генов *tra*-оперонов определяет синтез половых пилей, другие отвечают за перенос самой плазмиды или мобилизацию переноса хромосомной ДНК из клетки в клетку. Передача плазмиды или хромосомы начинается с одностороннего разрыва в области *oriT* плазмиды, которая называется точкой начала передачи. Для того чтобы произошла передача

хромосомных генов, плаزمида F (или другая конъюгативная плазмида) должна интегрироваться в хромосому. Разорванная в области *oriT* нить ДНК разматывается, и однонитевая ДНК, начиная с 5'-конца, переносится по конъюгационному мостику в реципиентную клетку. Одновременно на обеих нитях плазмидной и хромосомной ДНК – и той, которая остается в донорной клетке, и той, которая поступила в клетку-реципиент, – синтезируются комплементарные им нити. Благодаря этому в клетке-доноре восстанавливается целостность хромосомы и F-плазмиды.

Заключительной стадией передачи F-плазмиды является восстановление ее исходной кольцевой структуры в клетке-реципиенте, а передачи хромосомной ДНК – рекомбинация ее с хромосомой реципиента.

Процесс переноса хромосомных генов при конъюгации может осуществляться также при участии содержащихся в хромосоме конъюгативных транспозонов. Такие транспозоны, кроме генов, отвечающих за транспозицию, и генов, детерминирующих фенотипические признаки, несут *tra*-гены, напоминающие соответствующие гены конъюгативных плазмид. Конъюгативные транспозоны могут выщепляться из хромосомы, образовывать плазмидоподобные структуры и, как и конъюгативные плазмиды, индуцировать перенос мелких плазмид в клетку партнера, а также сами переходить в нее.

Процессы конъюгации, особенно ведущие к передаче плазмид, очень широко распространены среди бактерий. Конъюгация – наиболее эффективный механизм для горизонтального переноса генов в любой среде обитания бактерий. Конъюгировать могут бактерии, весьма далекие в систематическом отношении. Плазмиды, осуществляющие конъюгацию между неродственными бактериями и успешно поддерживающиеся в них, называются плазмидами широкого круга хозяев. Конечно, интеграция переданной хромосомной ДНК в геном реципиента за счет гомологичной рекомбинации при межродовых скрещиваниях практически всегда исключается; однако у бактерий имеются «обходные пути», функционирующие за счет незаконной (или негомологичной) рекомбинации.

Количество переносимой ДНК при конъюгации больше, чем при трансформации и трансдукции. В «мягких» (оптимальных для роста) условиях скрещивания может переноситься вся хромосома. Получаемые при этом способе обмена генетической информацией рекомбинанты называются **трансконоъюгантами**.

Таким образом, **в процессе конъюгации можно различить следующие стадии:**

- образование неэффективных пар;
- образование эффективных конъюгационных пар;
- перенос генетического материала из донорных клеток в реципиентные;
- постконъюгационный синтез донорной ДНК в реципиентной клетке;
- гомологичная рекомбинация перенесенного фрагмента донорной ДНК с ДНК реципиентной клетки.

Как способ генетического обмена конъюгация используется в следующих направлениях:

- 1 Передача генетических маркеров из одних клеток в другие.
- 2 Метод конъюгационного скрещивания удобен для картирования хромосомы. Карта хромосомы у бактерий строится в минутах. У бактерий *E. coli* началом карты (0 мин) являются точки локализации генов, ответственных за синтез треонина и лейцина. Показано, что при конъюгации вся хромосома бактерий *E. coli* передается за 100 мин (рисунок 15).
- 3 Изучение генетического аппарата у бактерий.
- 4 Конъюгация эффективно происходит в природе и поэтому является важной составляющей изменчивости бактерий.

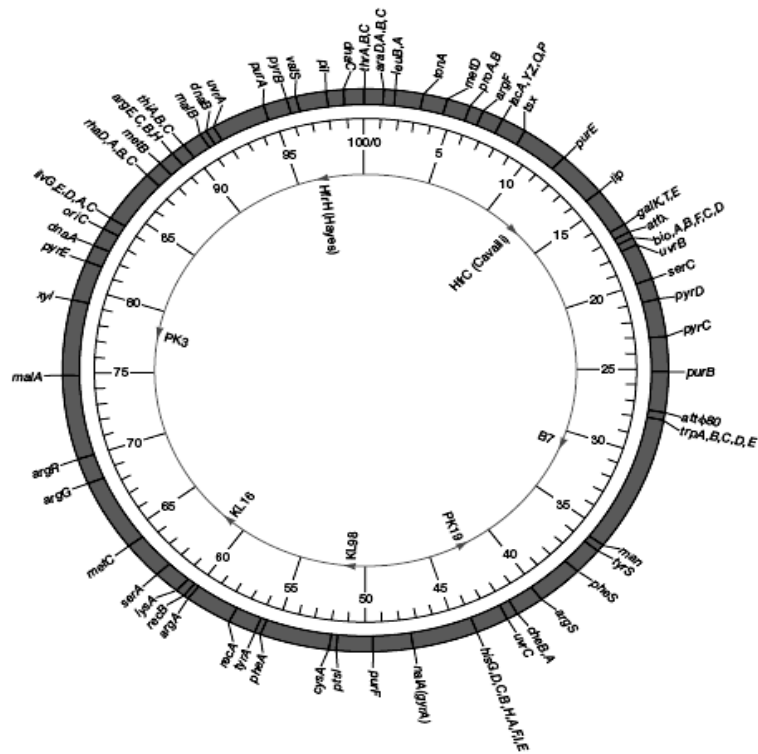


Рисунок 14 – Генетическая карта *E. coli*

Вопросы для самоконтроля

- 1 Охарактеризуйте генетический аппарат бактерий.
- 2 Дайте общую характеристику плазмидам бактерий.
- 3 Определите понятие «мобильные генетические элементы», опишите их основные свойства, функции, значение.
- 4 Дайте классификацию мутаций.
- 5 Какие процессы могут происходить в клетке-реципиенте, после попадания вовнутрь нее донорной ДНК и перехода в состояние мерозиготы?
- 6 Что такое процесс трансформации? Какие стадии он включает?
- 7 Перечислите основные стадии процесса конъюгации.
- 8 Охарактеризуйте процесс трансдукции. Чем отличается специфическая трансдукция от генерализованной?

Практическое занятие 1

Цель: изучение основных способов генетического обмена у бактерий; выявление общих и отличительных особенностей процессов трансформации, конъюгации и трансдукции.

Материалы и оборудование: протокол занятия, демонстрационные схемы (рисунки): а) мерозиготы; б) процесса трансформации; в) механизма бактериальной конъюгации; г) F-плазмиды бактерий *E. coli*; д) генерализованной трансдукции; ж) специфической трансдукции; электронная микрофотография конъюгирующих клеток *E. coli*; цветные карандаши.

Ход работы

В протоколе занятия:

- 1 Дать общую характеристику способам обмена генетической информацией у бактерий: указать три основных способа обмена генетической информацией, их общие особенности.
- 2 Нарисовать схему мерозиготы и показать два пути ее развития.
- 3 Охарактеризовать процесс трансформации согласно схеме описания: понятие трансформации, история открытия, этапы процесса трансформации, компетентность, практическое использование трансформации.

4 Составить графологическую схему «Стадии процесса трансформации», отразив в этой схеме по отдельности процесс трансформации: а) плазмидной ДНК; б) бактериальной ДНК.

5 Охарактеризовать процесс конъюгации согласно схеме описания: понятие конъюгации, история открытия, этапы процесса конъюгации, количество переносимой ДНК при конъюгации, практическое использование конъюгации.

6 Составить графологическую схему «Передача генетического материала при конъюгации», отразив в этой схеме по отдельности участие в качестве клеток-доноров: а) F^+ -доноров; б) доноров Hfr-типа.

7 Охарактеризовать процесс трансдукции согласно схеме описания: понятие трансдукции, история открытия, этапы процесса трансдукции, количество переносимой ДНК при трансдукции, типы трансдукции, практическое использование трансдукции.

8 Составить графологические схемы «Генерализованная трансдукция», «Специфическая трансдукция». Обратит внимание на существенные отличия между этими двумя типами трансдукции.

Литература

- 1 Борисов, Л. Б. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л. Б. Борисов [и др.]. – М.: Медицина, 1984. – 256 с.
Выделение и идентификация микроорганизмов; учебно-методическое пособие / Р. А. Желдакова. – Мн.: БГУ, 2003. – 36 с.
- 3 Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова. – Мн.: БГУ, 2002. – 100 с.
- 4 Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией: учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. – Минск: Высшая школа, 2013. – 799 с.
- 5 Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений /А. И. Нетрусов [и др.]. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 604 с.
- 6 Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер [и др.]. – М.: Колос, 1979. – 216 с.
- 7 Милехина, Н.В. Почвенная микробиология: учебно-метод. пособие для лабораторно-практических занятий: для студентов агроэкологического института обучающихся по направлению 110100–Агрохимия и агропочвоведение. Классификация (степень) выпускника–бакалавр / Н.В Милехина. – Брянск: Издательство Брянской ГСХА, 2014 – 56 с.

Учебное издание

Концевая Ирина Ильинична

**Микробиология:
характеристика способов
генетического обмена у бактерий**

Практическое руководство
для студентов специальности 1–31 01 01-02
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»

Технический редактор *О.Н. Ермоленко*

Подписано в печать 11.05.2017.

Формат 60×84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать на ризографе.

Усл. печ. л. 2,25. Усл. краск.-отт. 2,25. Уч.-изд. л. 2,09.

Тираж 15 экз. Заказ № 0082.

Отпечатано ООО «Издательство «Десна Полиграф»

Свидетельство о внесении субъекта издательского дела в Государственный реестр
издателей, изготовителей и распространителей издательской продукции.

Серия ДК № 4079 от 1 июня 2011 года

14027 г. Чернигов, ул. Станиславского, 40

Тел.: (0462)972-664