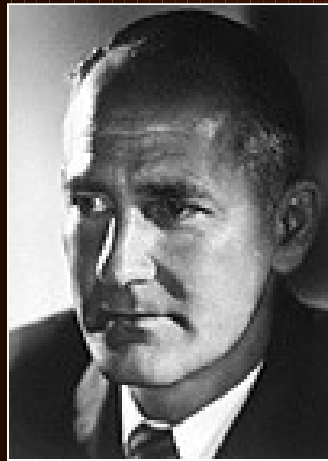
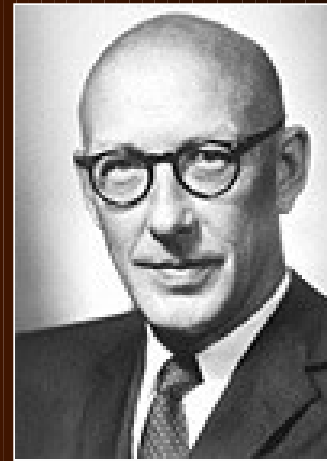


# Генетический анализ у бактерий

*Neurospora crassa*, 1940 г.



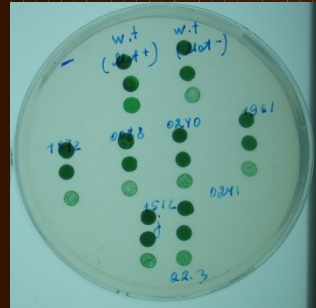
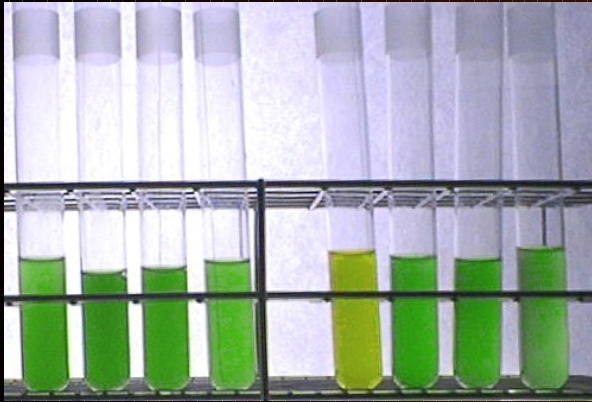
Д. Бидл



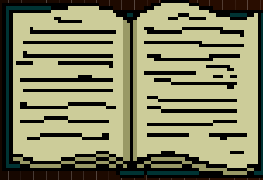
Э. Татум

Нобелевская премия по физиологии или медицине, 1958 г.

«за фундаментальные исследования организации генетического материала у бактерий».



- Генетический анализ бактерий дал ключевые представления о природе и структуре генетического материала, о генетическом коде, мутациях.
- На результатах генетического анализа бактерий в значительной степени базируются такие современные технологии, как генетическая инженерия и биотехнология.



# Факты

- Каждый человек содержит в своем организме ~ 1,5 кг бактерий.
- На 1 см<sup>2</sup> кожи около 250 000 бактерий.
- На теле 1 человека больше микроорганизмов, чем людей на Земле.
- Около 30% всей биомассы на Земле составляют бактерии.
- Предполагают, что на Земле более 1 миллиарда видов бактерий.



## Словарь

- **Штамм** – генетически однородная культура данного вида, выделенная из одной клетки и отличающаяся от остальных культур происхождением и часто рядом признаков, несущественных для систематики.
- Штамм, выделенный из природы и являющийся типичным представителем данного вида, называется **ДИКИМ ТИПОМ**.

# Клонирование – один из основных методов генетического анализа в культуре микроорганизмов

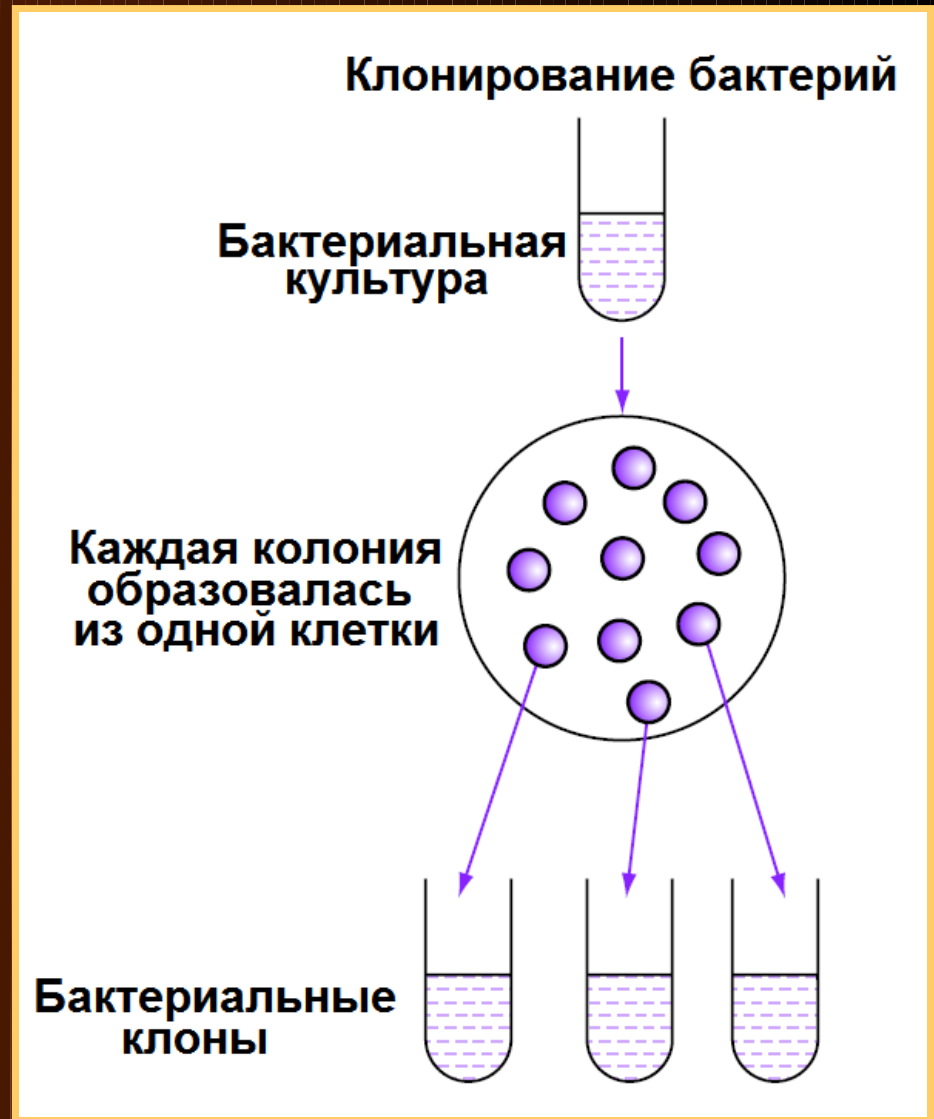
- **Клон** – группа клеток или молекул идентичных клетке или молекуле, от которых они произошли.
- В генетике клон – это генетически однородное потомство, полученное при размножении одной клетки или вирусной частицы.
- У эукариотических организмов клон – потомство одной клетки (споры), делящейся митотически.

Получение отдельных клонов позволяет изучать свойства генетически однородной совокупности клеток (популяции).



# Клонирование – один из основных методов генетического анализа в культуре микроорганизмов

- **Клон** – группа клеток или молекул идентичных клетке или молекуле, от которых они произошли.
- В генетике клон – это генетически однородное потомство, полученное при размножении одной клетки или вирусной частицы.
- У эукариотических организмов клон – потомство одной клетки (споры), делящейся митотически.



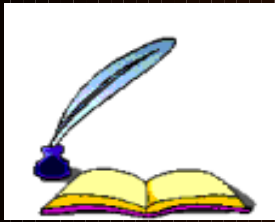


Признаки микробных культур, или культуральные свойства можно подразделить на несколько типов:

- а) *морфологические*  
(цвет колонии, морфология колонии)
- б) *физиологические*  
(отношение к температуре, рН)
- в) *биохимические*  
(потребность в факторах роста).

- Совокупность всех наблюдаемых признаков данного штамма называется его фенотипом.
- Наследственной основой фенотипа является генотип – наследуемая генетическая организация.





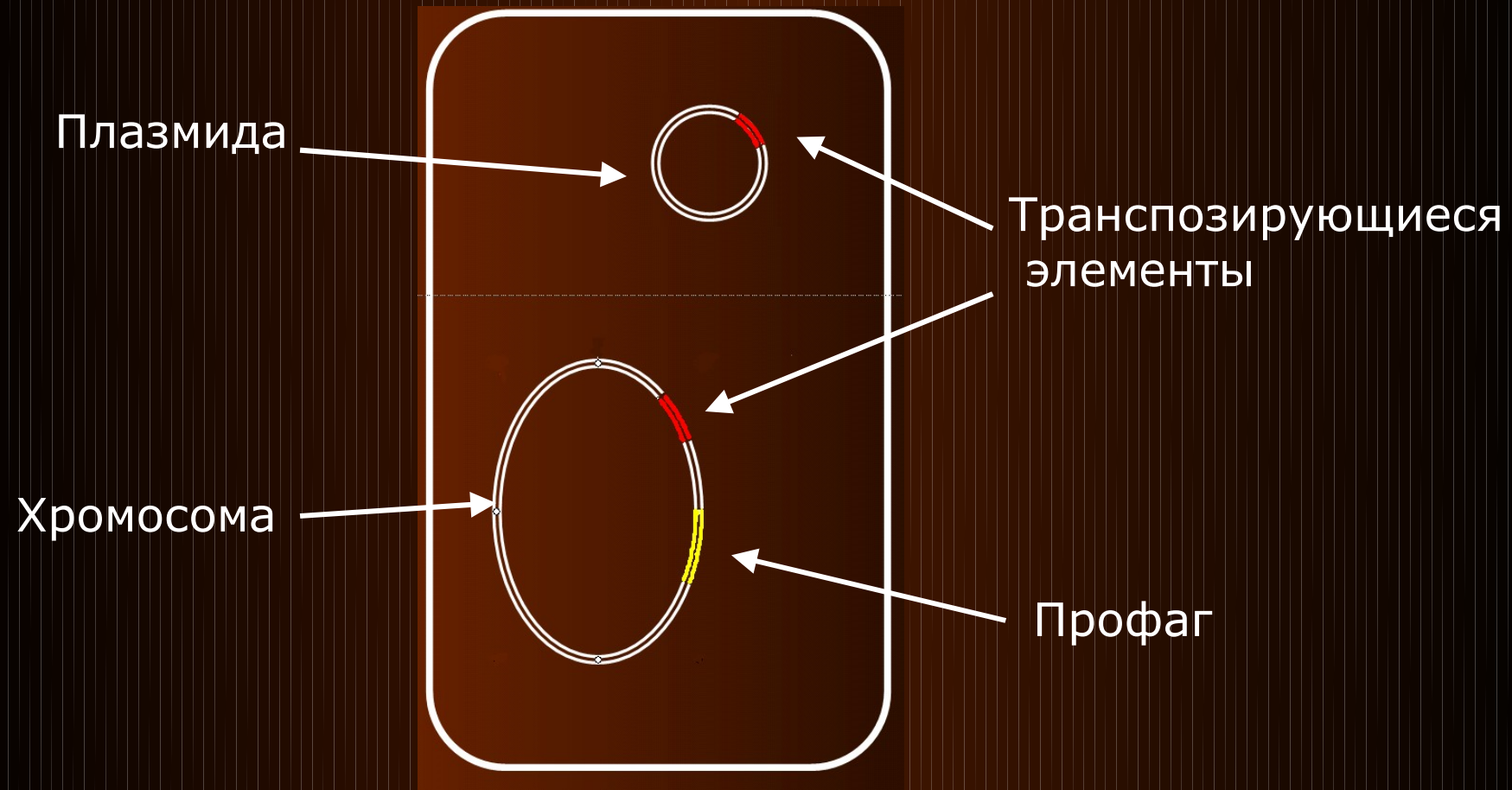
## Словарь

- Культуры, растущие на наиболее бедной питательной среде из сред, обеспечивающих рост микроорганизма данного вида, называются **прототрофными**.
- Культуры, требующие добавки к простой среде, называются **ауксотрофными**.

# Генетические элементы бактериальной клетки:

- Хромосома
- Плазмиды
- Профаги
- Транспозирующиеся элементы

# Генетические элементы бактериальной клетки:



- **Плазмиды** бактерий, в большинстве случаев являются кольцевыми молекулами ДНК. Эти молекулы способны автономно реплицироваться в клетках бактерий и имеют собственный ориджин репликации.
- **Профаг** – состояние фаговой ДНК при лизогении, при которой фаговая ДНК интегрируется в бактериальную хромосому или реплицируется как плазида.
- **Транспозирующие элементы**, как правило, не существуют автономно и интегрированы в другие молекулы ДНК, такие как хромосома, плазида, профаг.



## *Escherichia coli*

Размер клеток:

1,7 x 0.65 мкм

1 кольцевая хромосома

Размер –  $4,6 \cdot 10^6$  п.н.

4289 генов

# Топология бактериальных хромосом

## Бактерия

## Геном

*Escherichia coli*

1 кольцевая хромосома  
1 линейная хромосома;

*Agrobacterium tumefaciens C58*

1 кольцевая  
хромосома;

*Bacillus cereus F083676*

1 кольцевая хромосома

*Rhodobacter sphaeroides*

2 кольцевых  
хромосомы

*Rhodococcus facians*

1 линейная хромосома

*Streptomyces ambofaciens*

1 линейная хромосома

*Borrelia burgdorferi*

1 линейная хромосома



# Топология бактериальных геномов

## Бактерия

## Геном

*Escherichia coli*

1 кольцевая хромосома

*Rhodobacter sphaeroides*

2 различных кольцевых хромосомы

Цианобактерии

8-12 идентичных кольцевых хромосом  
3-8 кольцевых плазмид

*Bacillus cereus* F083676

1 кольцевая хромосома  
1 мегаплазида

*Agrobacterium tumefaciens*  
C58

1 линейная хромосома;  
1 кольцевая хромосома;  
2 плазмиды

*Borrelia burgdorferi*

1 линейная хромосома  
до 20 линейных и кольцевых плазмид

*Rhodococcus facians*

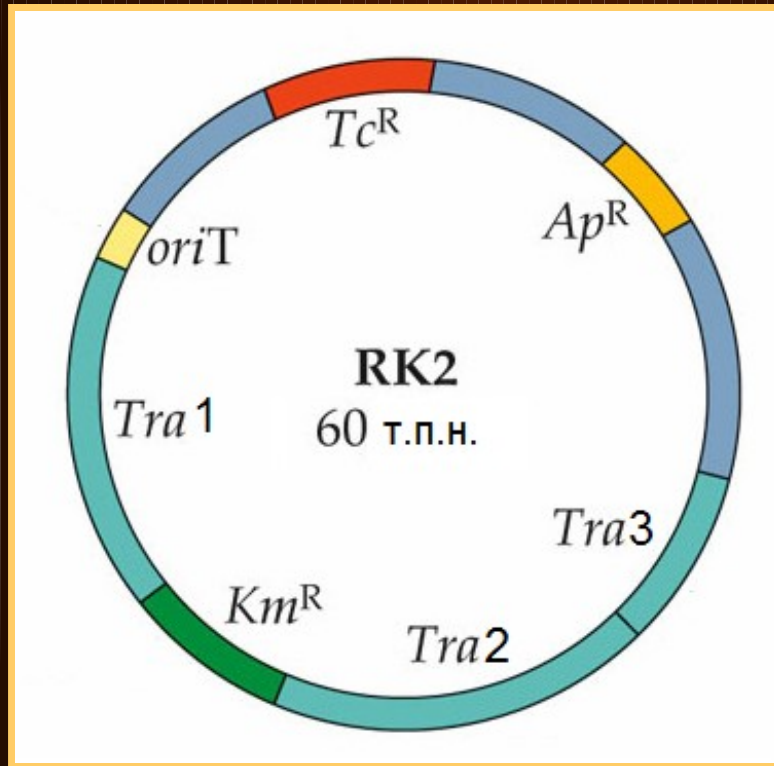
1 линейная хромосома  
1 линейная плазида

*Streptomyces ambofaciens*

1 линейная хромосома

# Характеристика некоторых плазмид

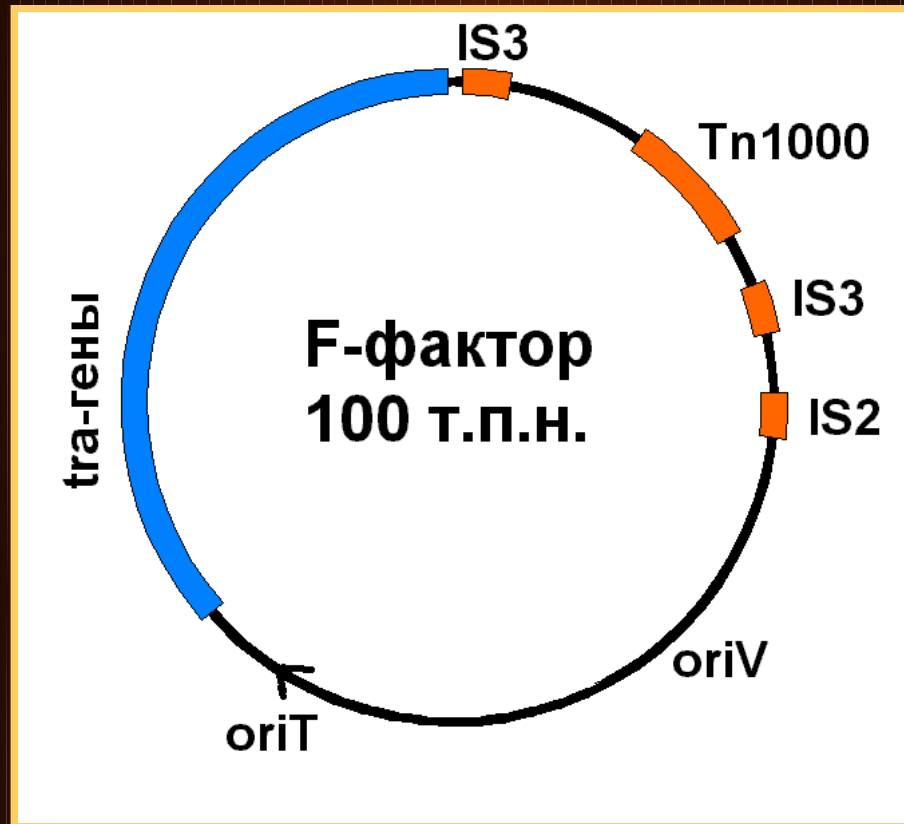
Плазмида	Характеристика	Источник
ColE1	Бактериоцин, который убивает клетки <i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>
Tol	Деградация толуола и бензойной кислоты	<i>Pseudomonas putida</i>
Ti	Индукция опухолей у растений	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
pSym	Образование клубеньков на корнях бобовых растений	<i>Rhizobium meliloti</i>
SCP1	Синтез антибиотика метиленомицина	<i>Streptomyces coelicolor</i>
RK2	Устойчивость к ампициллину, канамицину и тетрациклину	<i>Klebsiella aerogenes</i>



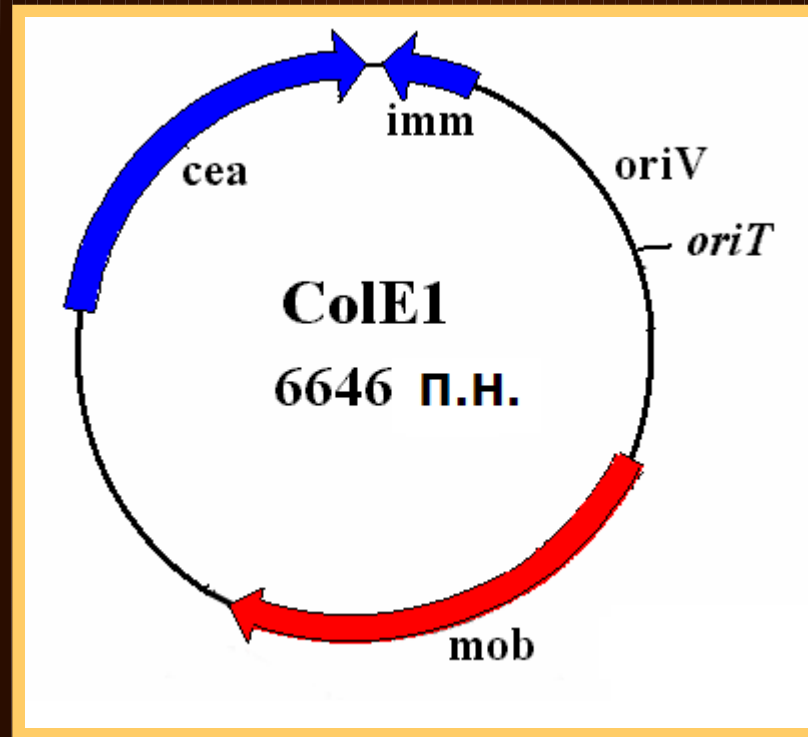
### **Основные свойства плазмиды RK2:**

- Широкий круг хозяев.
- Низкая копияность.
- Конъюгативная.

# Структурно-функциональная организация полового фактора F

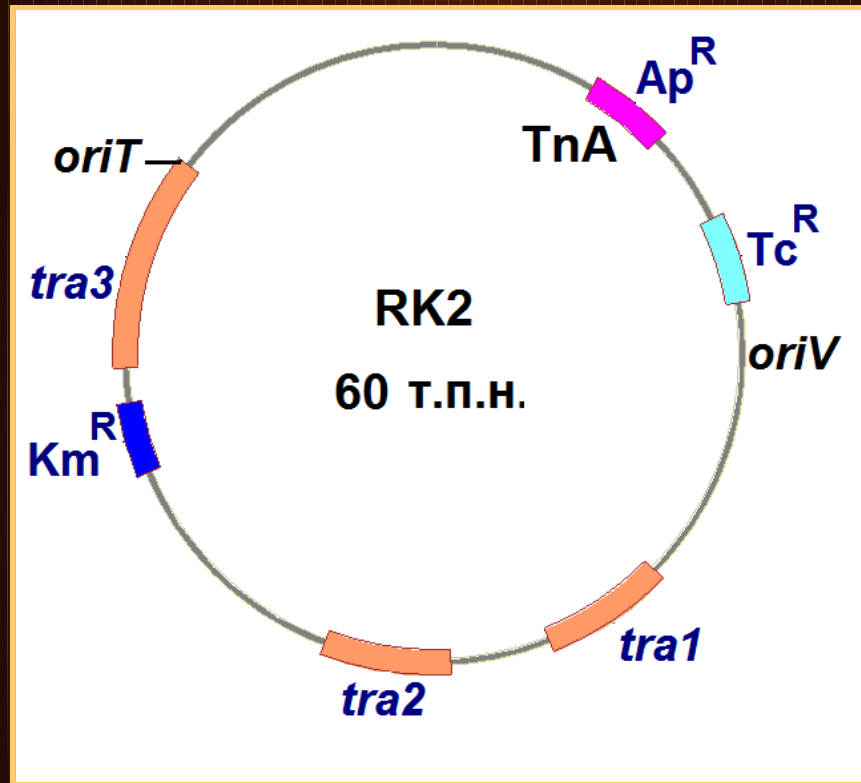


F-фактор (fertility) содержит около 60 генов  
*tra*-район содержит 35 генов, контролирующих  
конъюгативный перенос ДНК



### Основные свойства плазмиды ColE1:

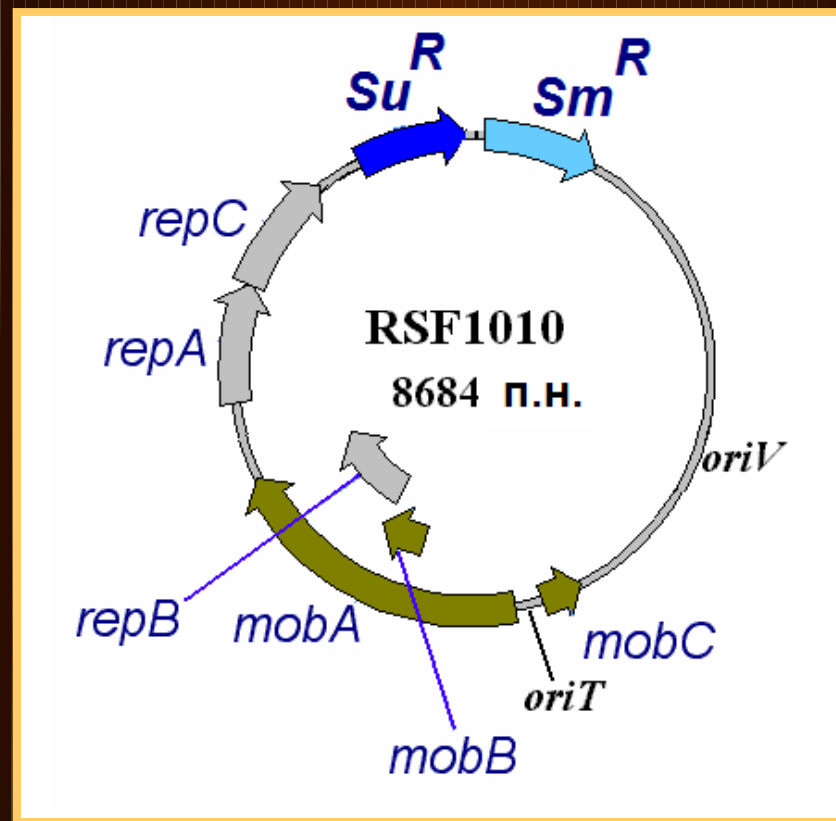
- узкий круг хозяев (сем. *Enterobacteriaceae*)
- мультикопийная (~ 20 копий на клетку)
- неконъюгативная, но способная к мобилизации



### Основные свойства плазмиды RK2:

- детерминирует устойчивость клеток к ампицилину, тетрациклину и канамицину
- широкий круг хозяев
- низкая копияность
- конъюгативная





### Основные свойства плазмиды RSF1010:

- детерминирует устойчивость клеток к сульфаниламидам и стрептомицину
- широкий круг хозяев
- мульткопийная (~ 30 копий на клетку)
- неконъюгативная, но способная к мобилизации

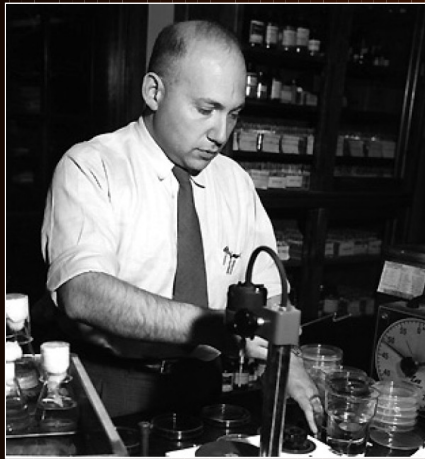
- Любому организму, который слишком строго контролирует неизменность генетической информации, передаваемой из поколения в поколение, имеет мало шансов на выживание.
- Поэтому бактерии выработали механизмы обмена генетическим материалом с помощью горизонтального переноса генов.
- Практически все известные бактерии обладают по крайней мере, одним из трех способов переноса генетической информации, приводящей к рекомбинации генетического материала – **конъюгацией, трансформацией и трансдукцией**.

Все процессы передачи генетической информации у бактерий являются однонаправленными – одна клетка выступает в качестве донора, другая – в качестве реципиента.

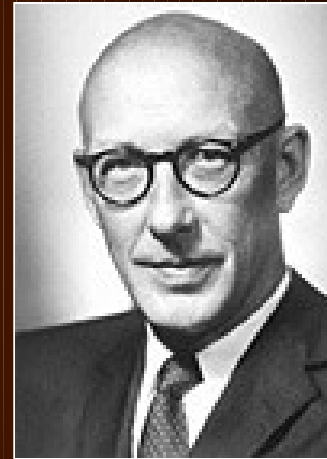
- **Вертикальный перенос генов** — организм получает генетический материал от своего предка.
- **Горизонтальный перенос генов** — процесс, в котором организм передаёт генетический материал другому организму, не являющемуся ему потомком.

# Конъюгация у бактерий

- Перенос генетического материала от одной бактериальной клетки (донора) к другой (реципиенту) при их непосредственном контакте был открыт Дж.Ледербергом и Э.Татумом в 1946г.
- Процесс назван конъюгацией.



Дж. Ледерберг



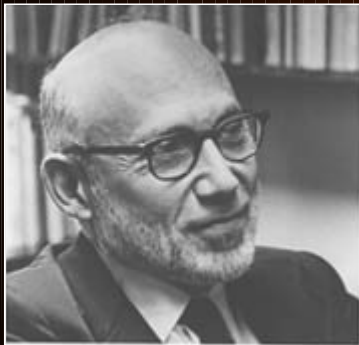
Э. Татум

*Нобелевская премия по физиологии или медицине, 1958 г.*

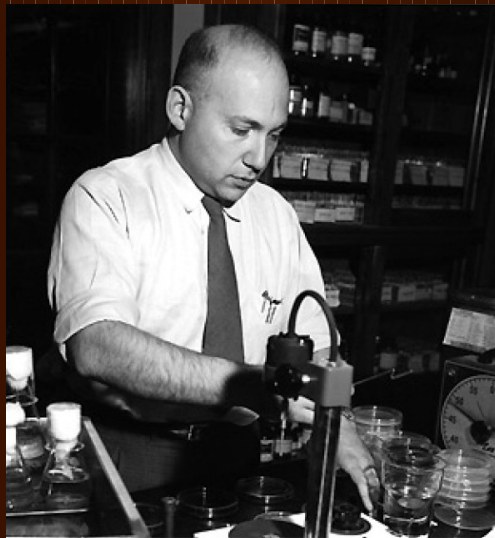
«за фундаментальные исследования организации генетического материала у бактерий».

# Половой процесс у бактерий

- Половой процесс у бактерий в форме прямого переноса генетического материала от одной бактериальной клетки (донора) к другой (реципиенту) при их непосредственном контакте был открыт Дж.Ледербергом и Э.Татумом в 1946г. Процесс назван конъюгацией.



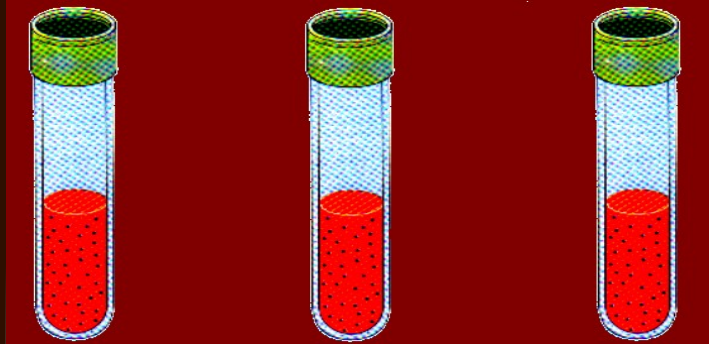
Дж.  
Ледерберг



# Эксперимент Дж.Ледерберга и Э.Татума по скрещиванию двух ауксотрофных штаммов

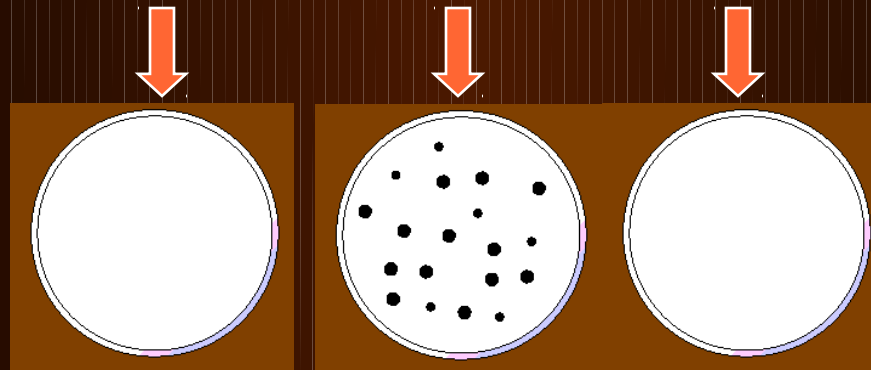
Смешанная культура

Met<sup>-</sup> Bio<sup>-</sup>



Thr<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Thi<sup>-</sup>

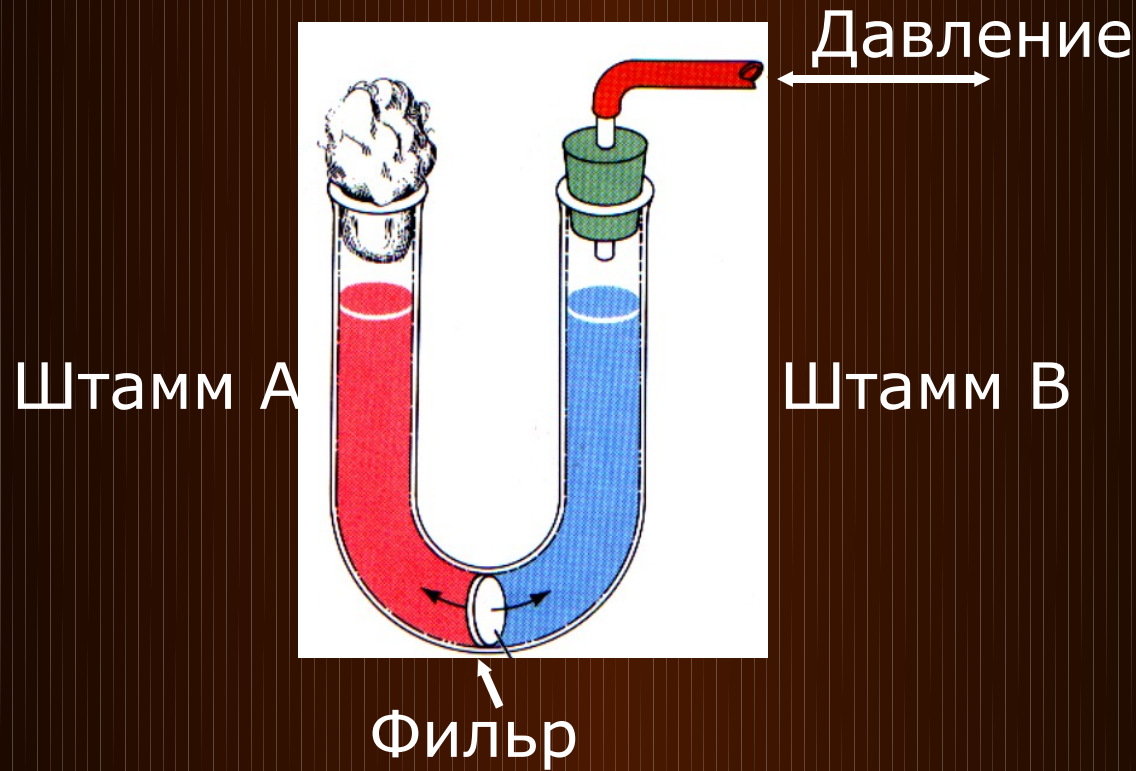
Клетки отмывали от среды и высевали на чашки с минимальной средой.  
Прототрофы возникали с частотой  $\sim 10^7$  клеток.



Met<sup>+</sup> Bio<sup>+</sup> Thr<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> Thi<sup>+</sup>



# Эксперимент Б.Дэвиса, демонстрирующий необходимость физического контакта между клетками для генетической рекомбинации

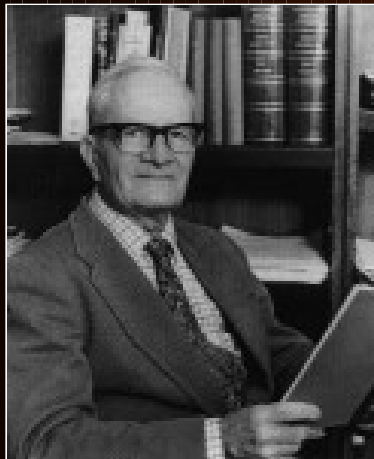


# Конъюгация

- Конъюгация – процесс переноса плазмиды, а иногда и хромосомной ДНК из клетки-донора в клетку-реципиент при их непосредственном контакте или через мостик-подобное соединение.

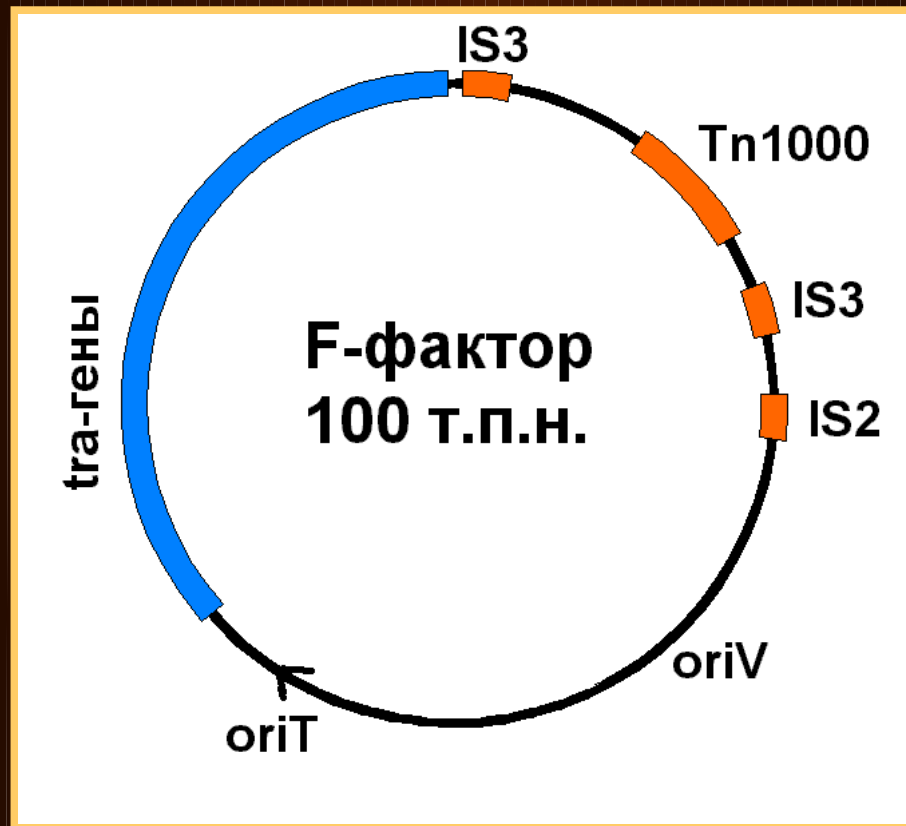
# Конъюгация у бактерий

- Способность бактерий быть донорами генетического материала при конъюгации определяется присутствием в них конъюгативных плазмид.
- Прототип конъюгативных плазмид – F-плазида (fertility, половой фактор) описан у *E.coli* У.Хейсом в 1952 г.
- F-фактор – первая описанная плазида у бактерий.



У.Хейс

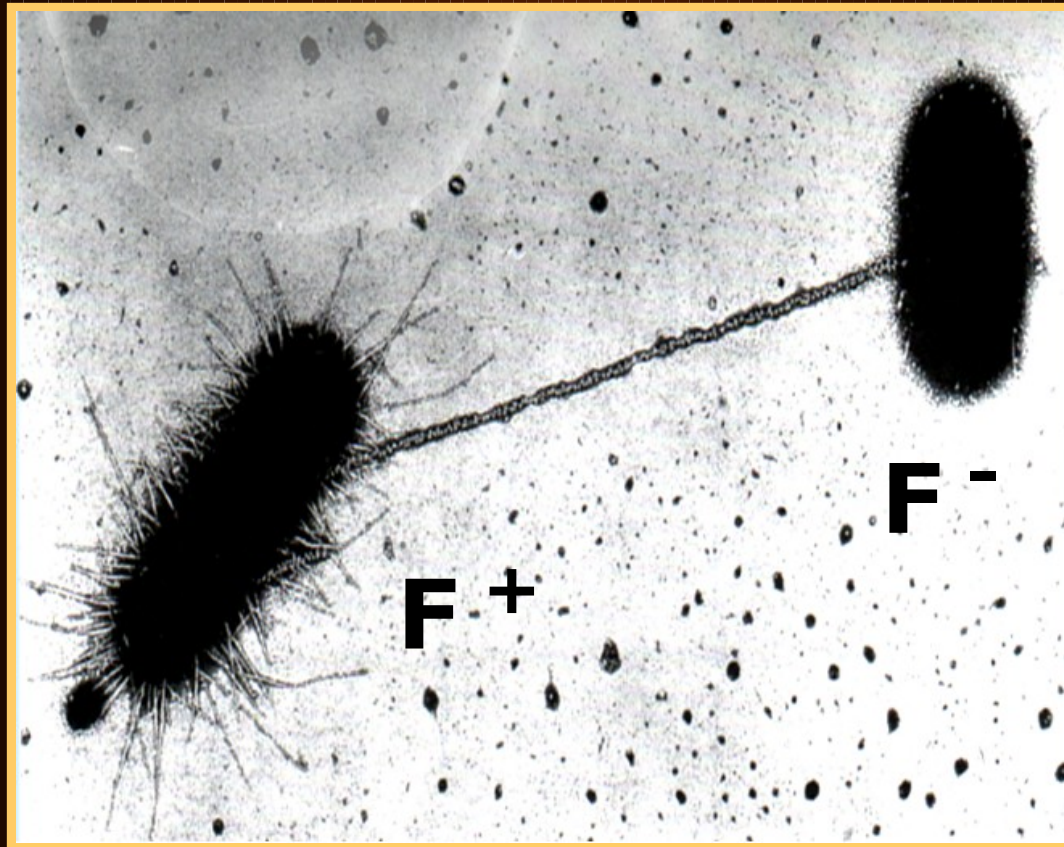
## Структурно-функциональная организация плазмиды F



F-фактор (fertility, плодовитость) содержит около 60 генов.

**tra**-район содержит 36 генов, контролирующих конъюгативный перенос ДНК (в том числе гены, контролирующие синтез пилей)

## Конъюгация у *E.coli*



Конъюгирующая пара

Донорная клетка – F<sup>+</sup>, «мужская»

Реципиентная клетка – F<sup>-</sup>, «женская»



## Конъюгация у *E.coli*



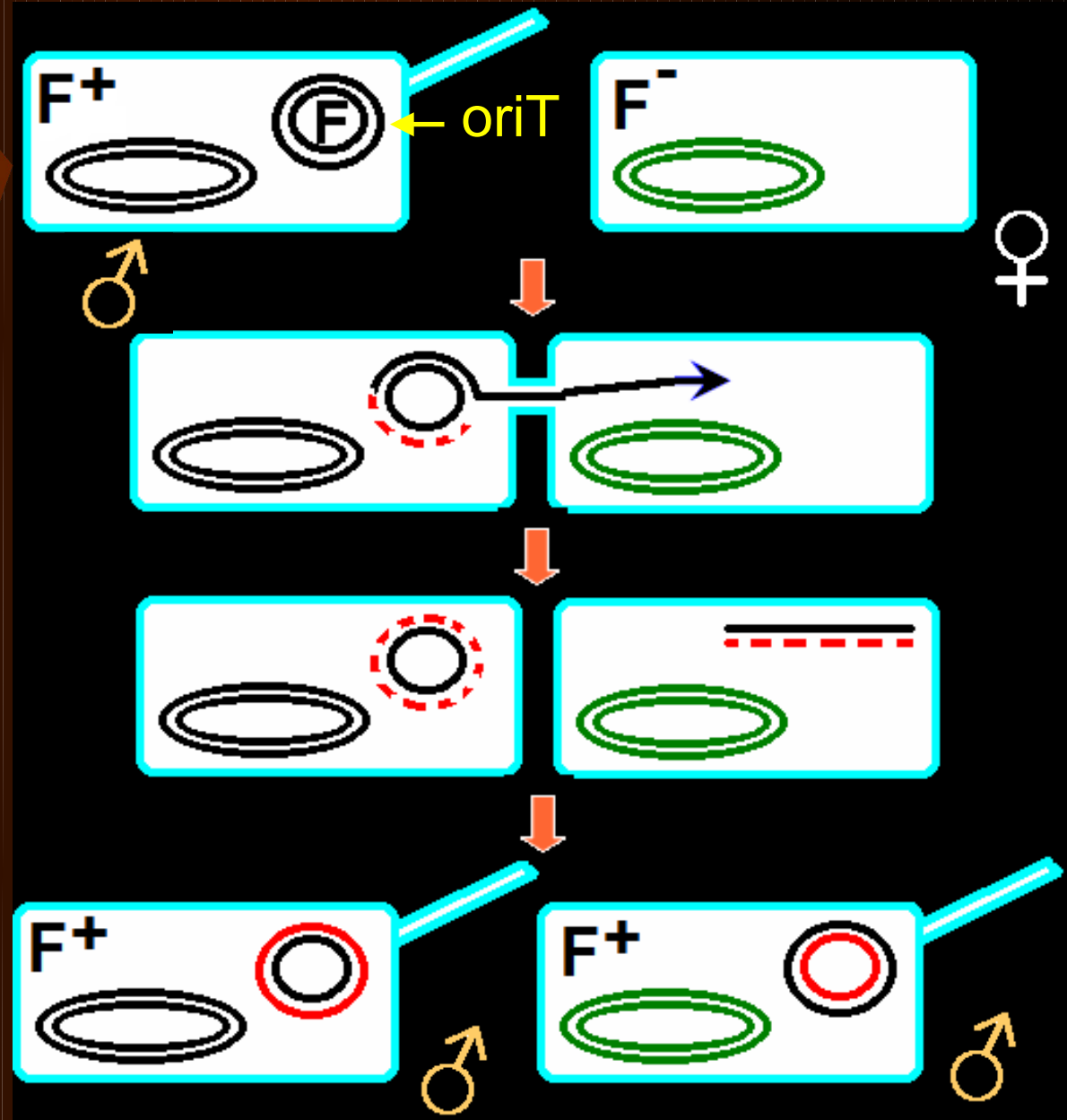


# **DNA Transfer by Bacterial Conjugation**

**Claire A. Woodall**

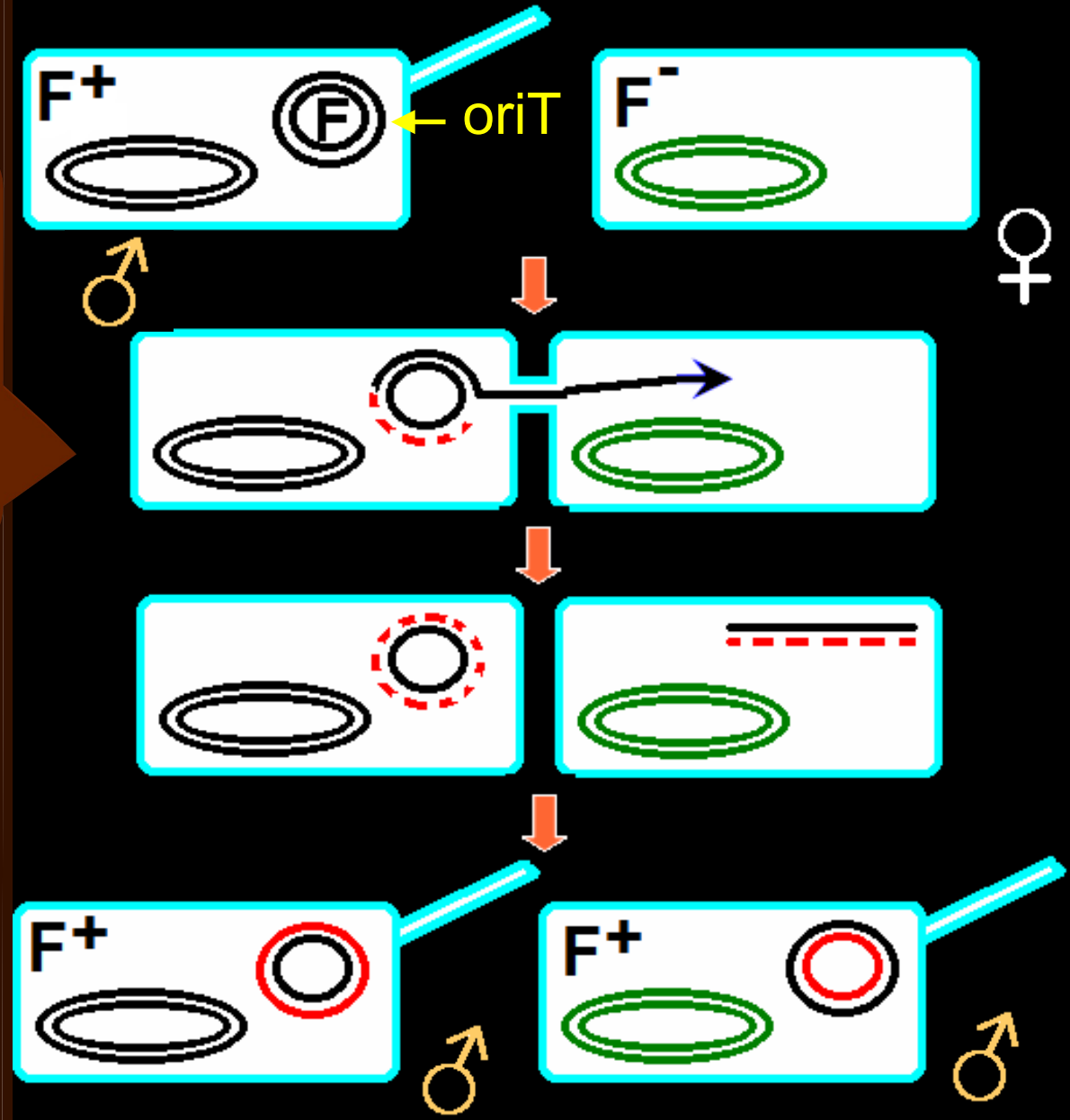
# Конъюгативный перенос полового фактора

Донорные, мужские клетки, содержащие F-плазмиду, имеют от 1 до 3 пилей. Пили имеют осевой канал. Они обеспечивают контакт между клетками конъюгирующей пары.



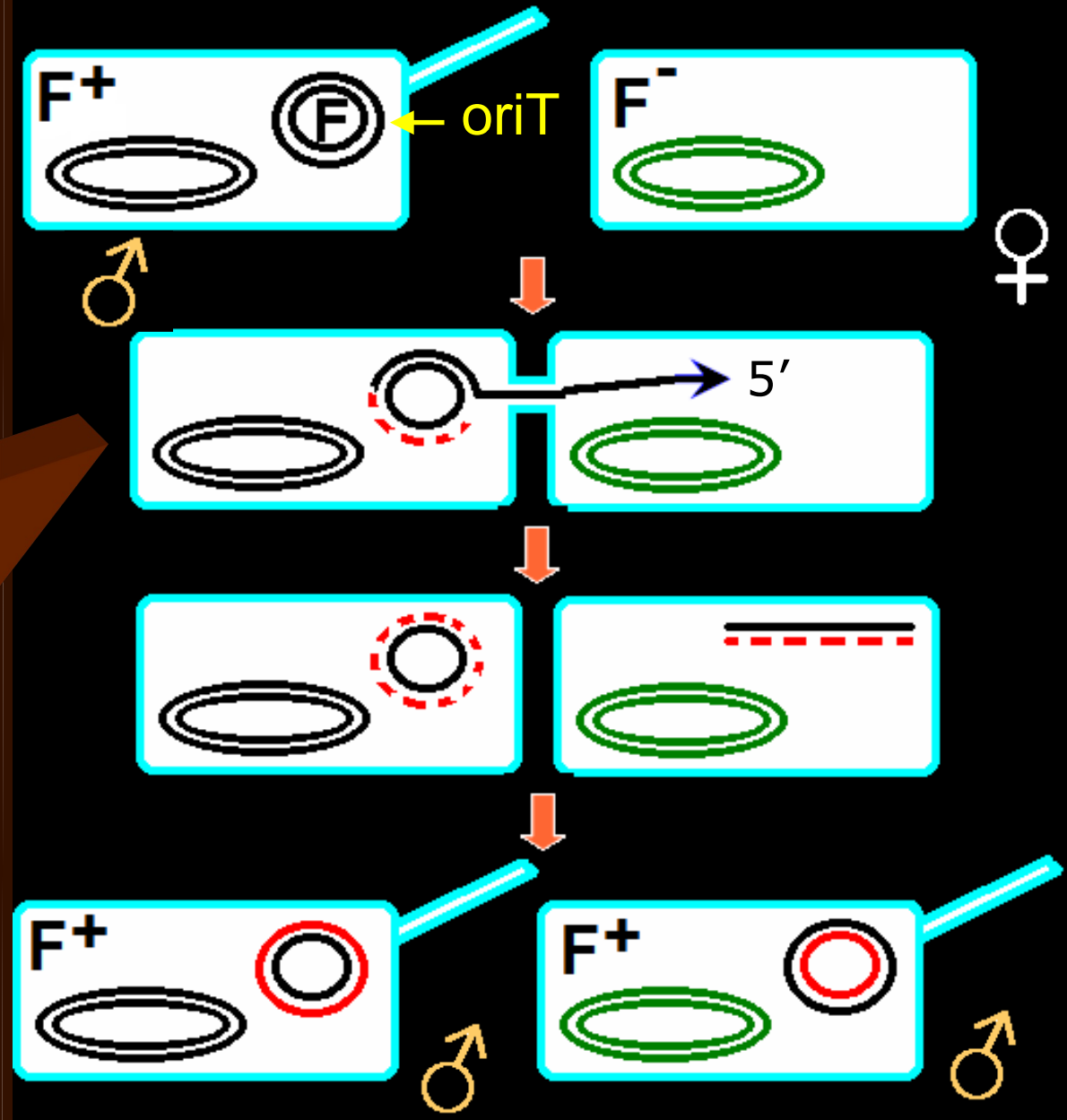
# Конъюгативный перенос полового фактора

После установления контакта пили сокращаются и клетки входят в тесный контакт.



# Конъюгативный перенос полового фактора

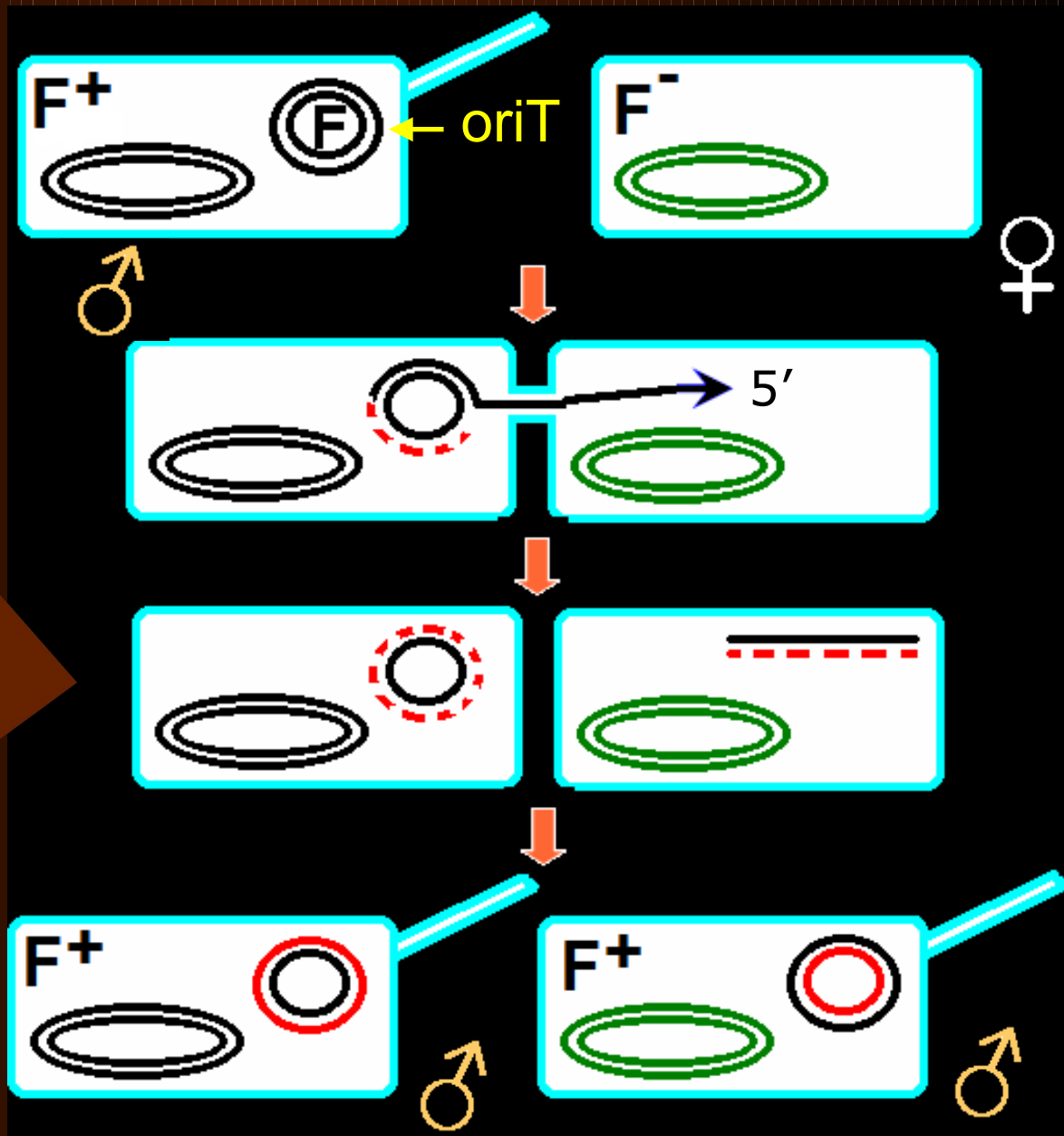
В сайт *oriT* плазмиды F вводится однострессовой разрыв (никрирование ДНК) и эта нить, начиная с 5'-конца передается в реципиентную клетку.



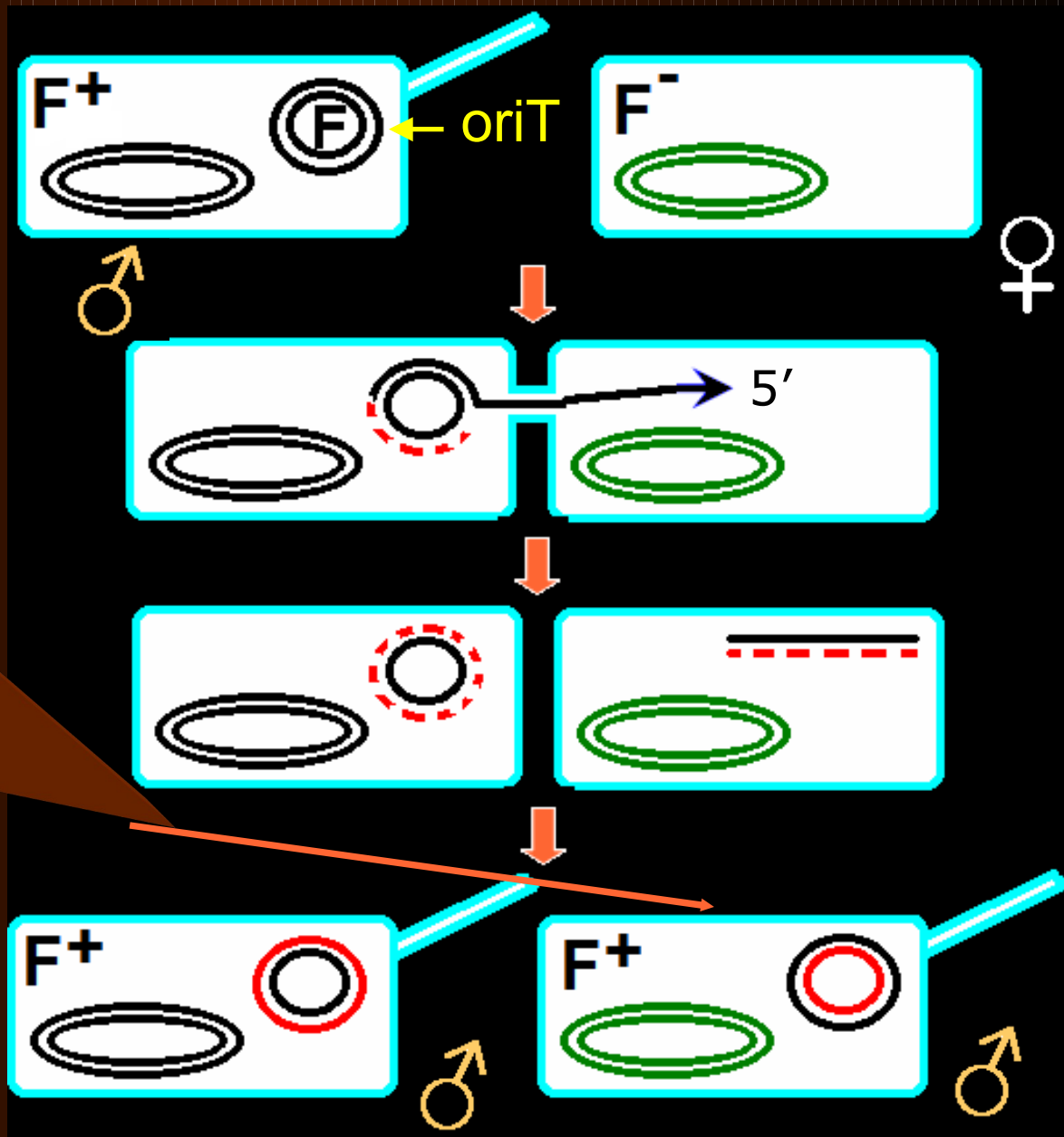
# Конъюгативный перенос полового фактора

При этом в донорной клетке синтезируется комплементарная нить ДНК.

В реципиентной клетке также синтезируется комплементарная нить и ДНК замыкается в кольцо.



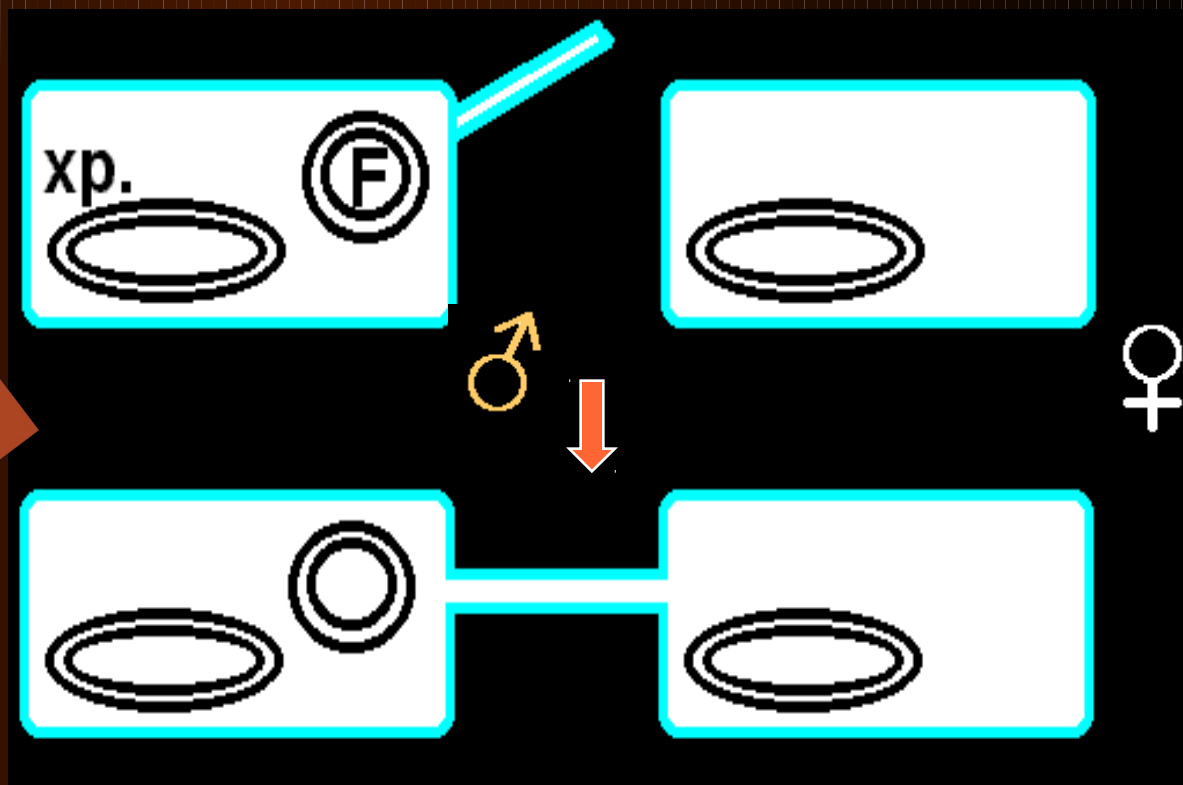
# Конъюгативный перенос полового фактора



Реципиентная клетка, получившая F-плазмиду, приобретает и все свойства мужской клетки, т.е. она сама теперь является донором.

# Конъюгативный перенос полового фактора

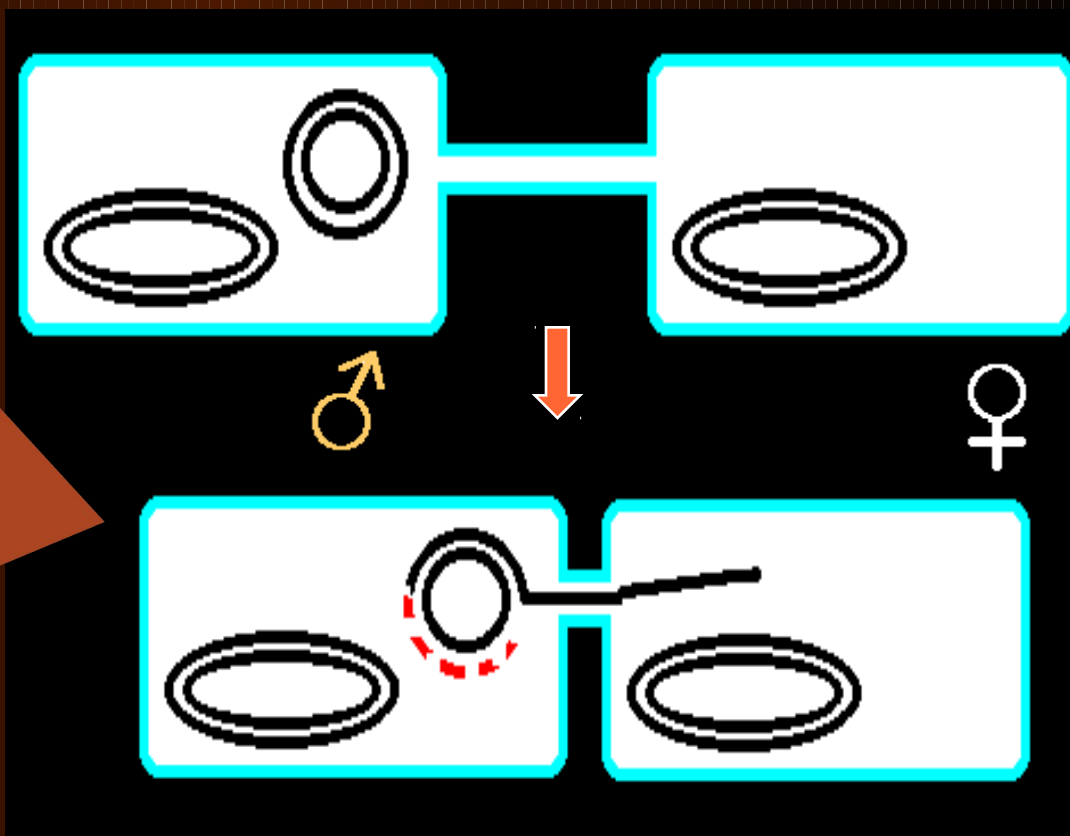
Пили имеют осевой канал. Они обеспечивают контакт между клетками конъюгирующей пары.





# Конъюгативный перенос полового фактора

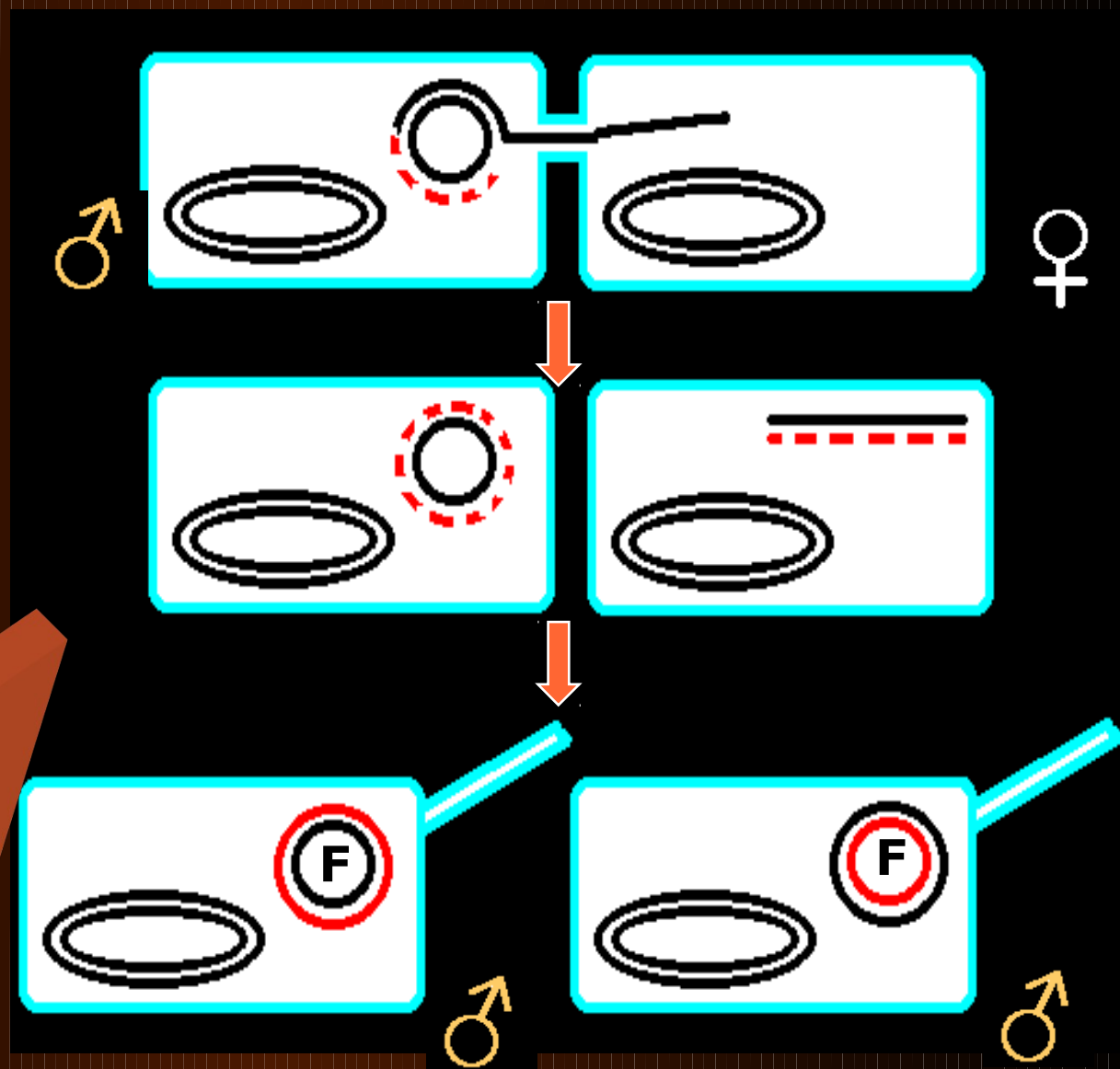
Затем в сайт *oriT* полового фактора вводится однонитевой разрыв (никирование ДНК) и эта нить, начиная с 5'-конца передается в реципиентную клетку.



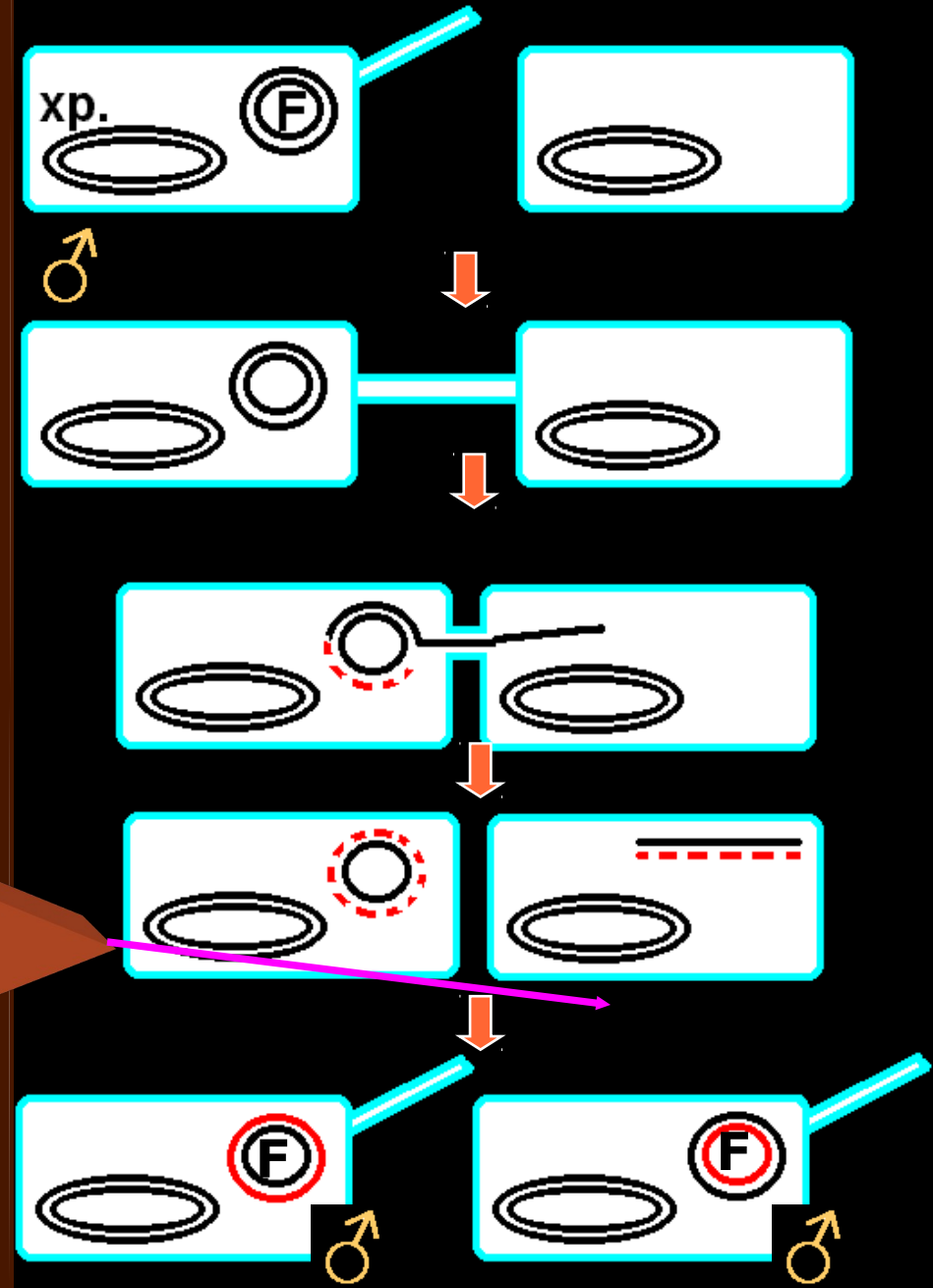
# Конъюгативный перенос полового фактора

При этом в донорной клетке синтезируется комплементарная нить ДНК.

В реципиентной клетке также синтезируется комплементарная нить и ДНК



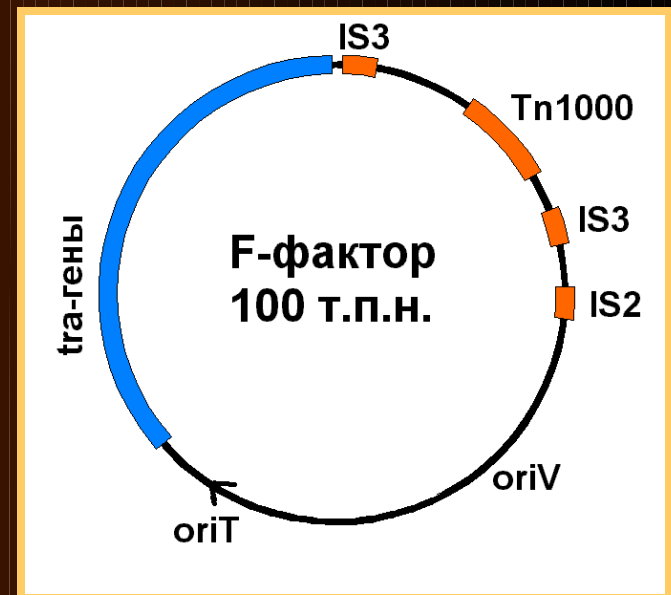
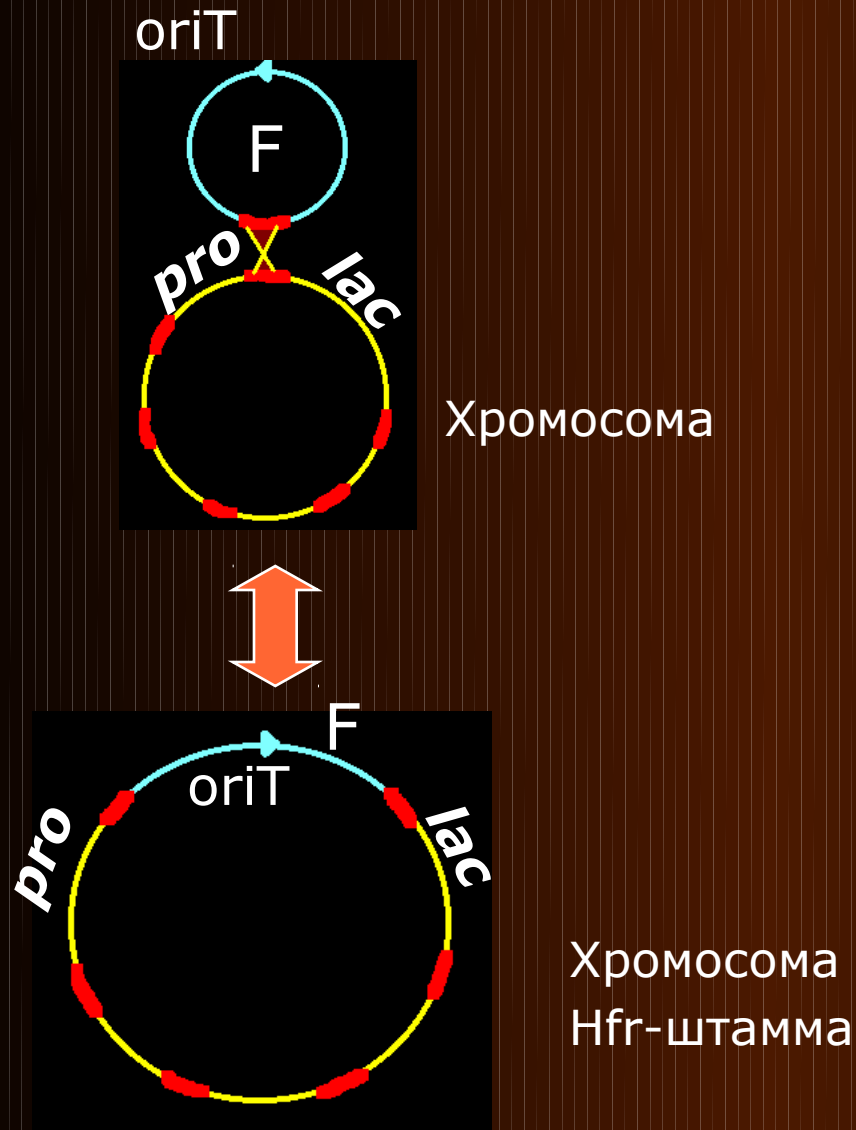
# Конъюгативный перенос полового фактора



Реципиентная клетка, получившая половой фактор, приобретает и все свойства мужской клетки, т.е. она сама теперь является донором.

- F-плазмида передается с высокой частотой  $\sim 10^{-1}$ .
- F-плазмида может интегрироваться в хромосому. При ее переносе в реципиентную клетку также будет происходить перенос хромосомной ДНК.
- В популяции  $F^+$ -клеток F-плазмида интегрируется в хромосому с низкой частотой. Поэтому  $F^+$ -штаммы могут переносить с низкой частотой хромосомные маркеры в  $F^-$ -клетки.
- Если изолировать клетки с интегрированной F-плазмидой и получить из них чистую культуру, то такие штаммы (Hfr-штаммы; Hfr-high frequency of recombination) передают хромосомные маркеры с высокой частотой  $\sim 10^{-2}$ .

# Схема интеграции F-фактора в хромосому

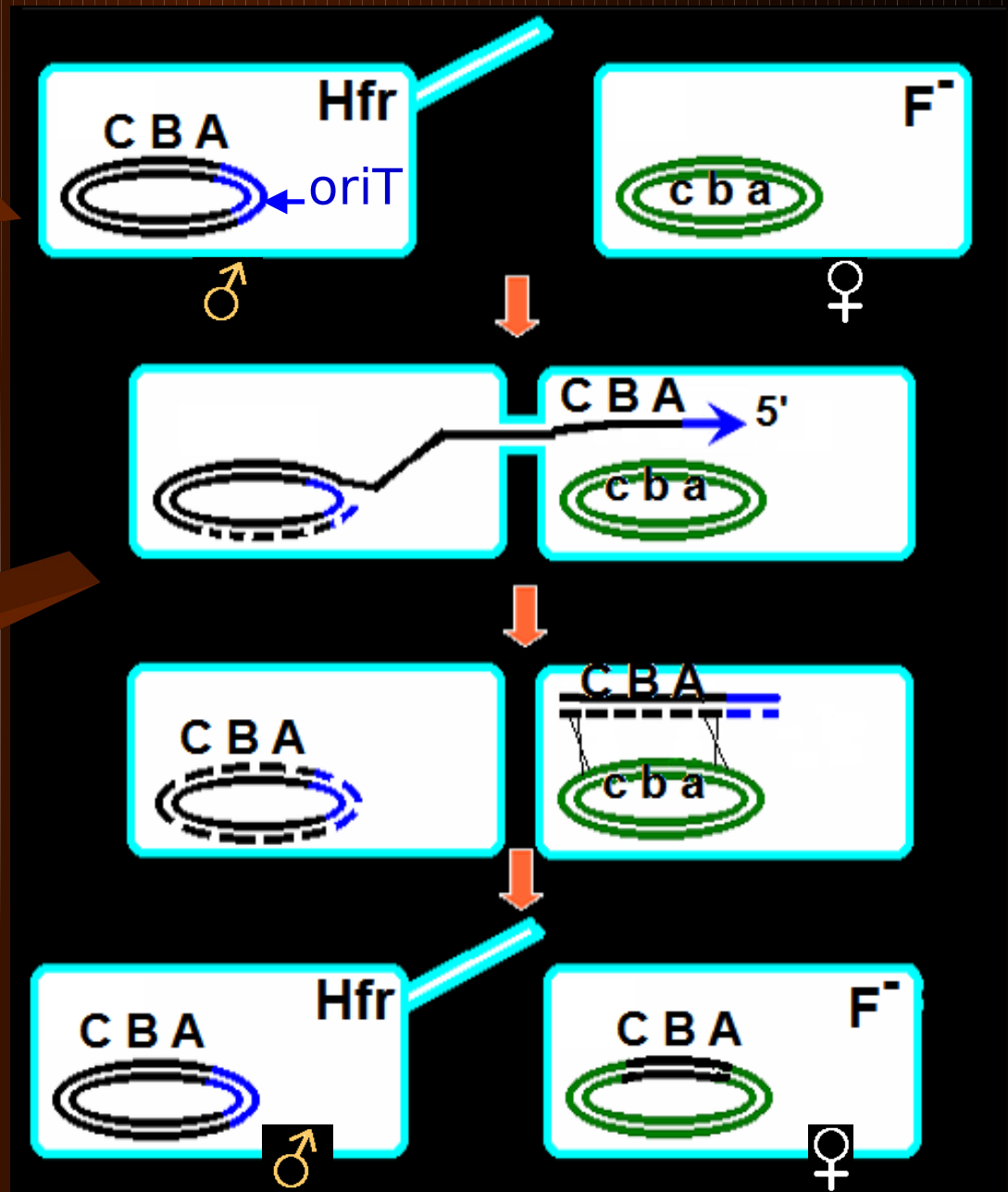


# Схема переноса хромосомных генов при конъюгации

В Hfr-клетках плазида F интегрирована в хромосому.

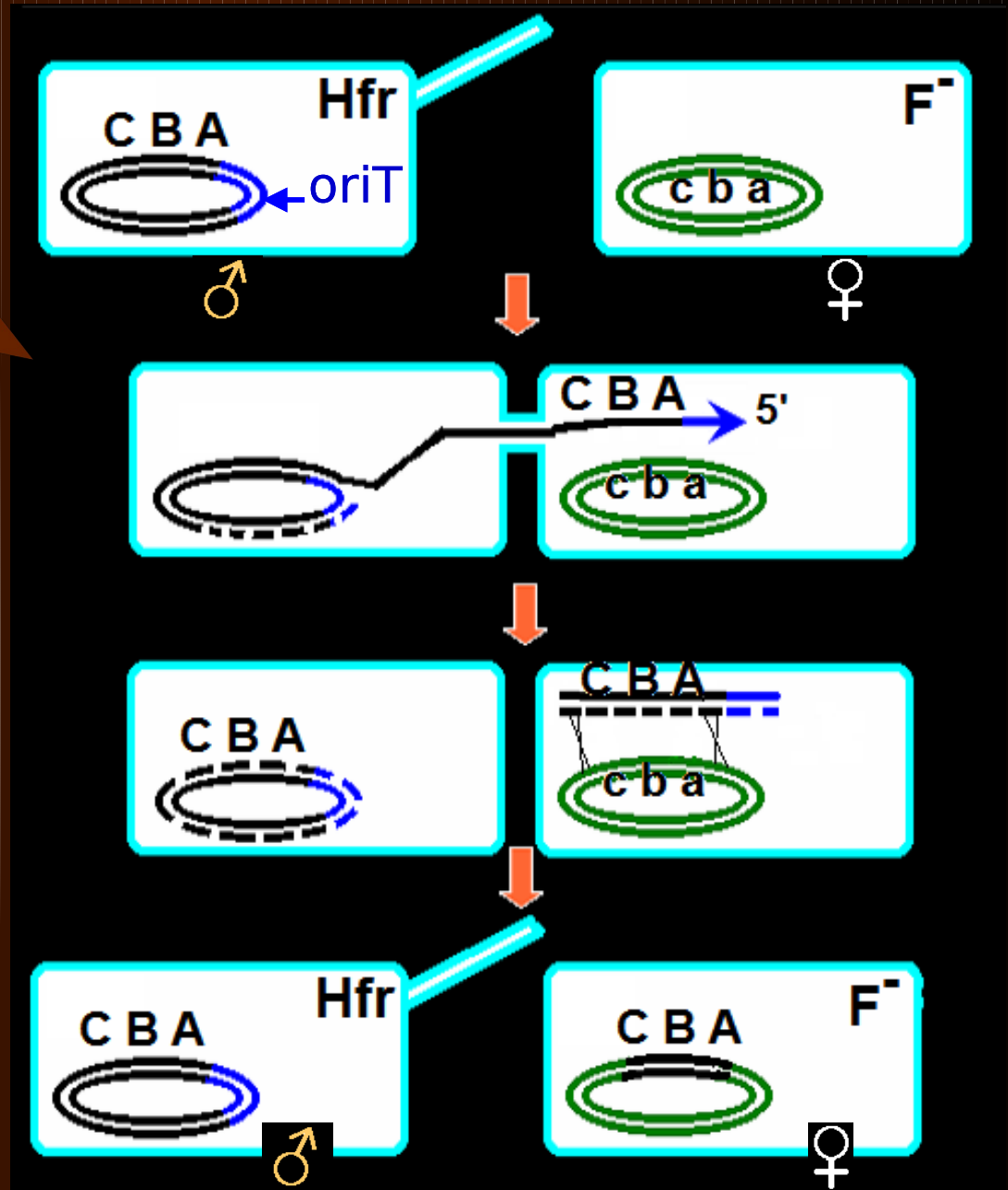
Hfr-клетки имеют пили.

После установления контакта пили сокращаются и клетки входят в тесный контакт.



# Схема переноса хромосомных генов при конъюгации

В сайт *oriT* плазмиды F вводится односторонний разрыв (никирование ДНК) и эта нить, начиная с 5'-конца передается в реципиентную клетку.

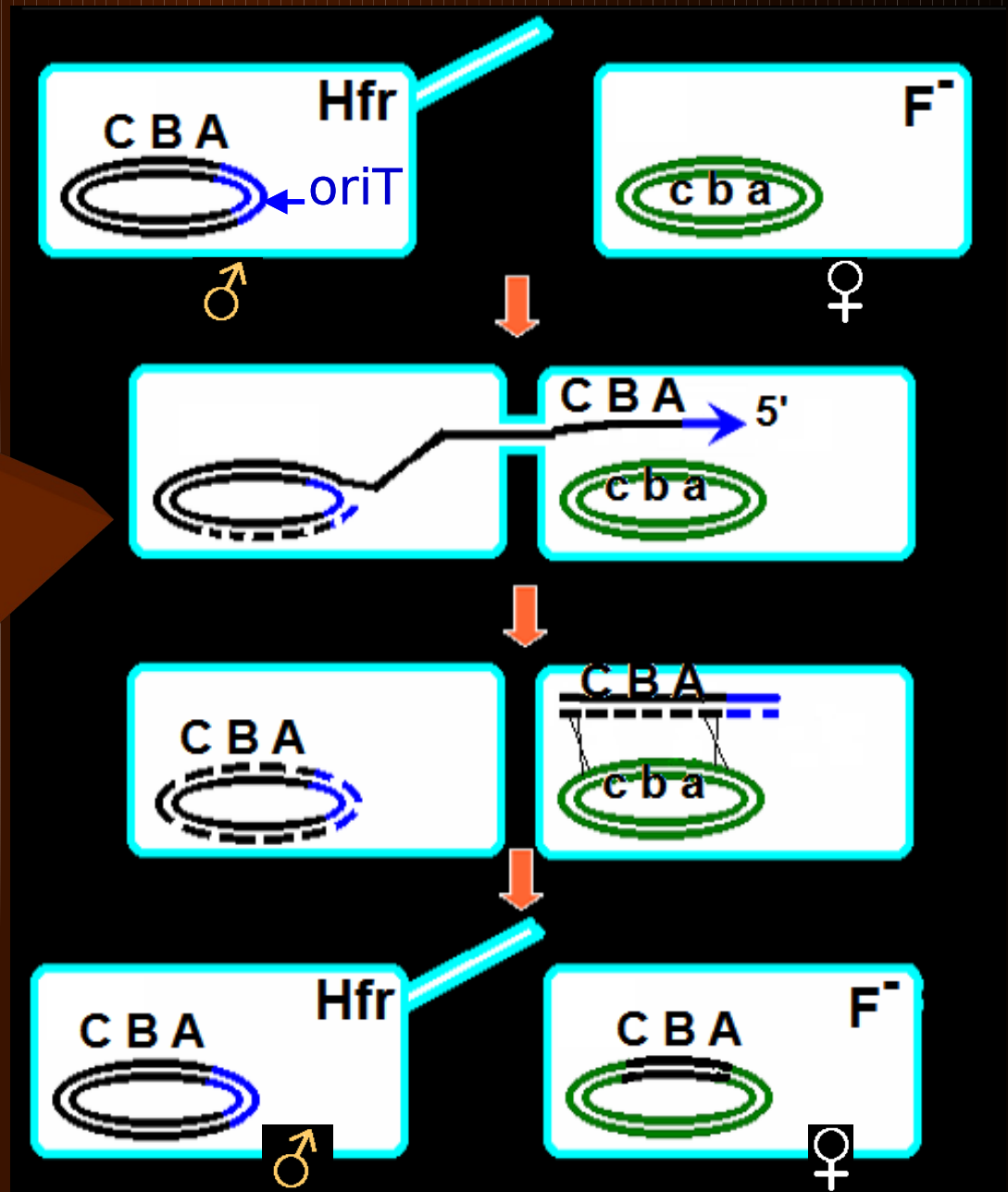




# Схема переноса хромосомных генов при конъюгации

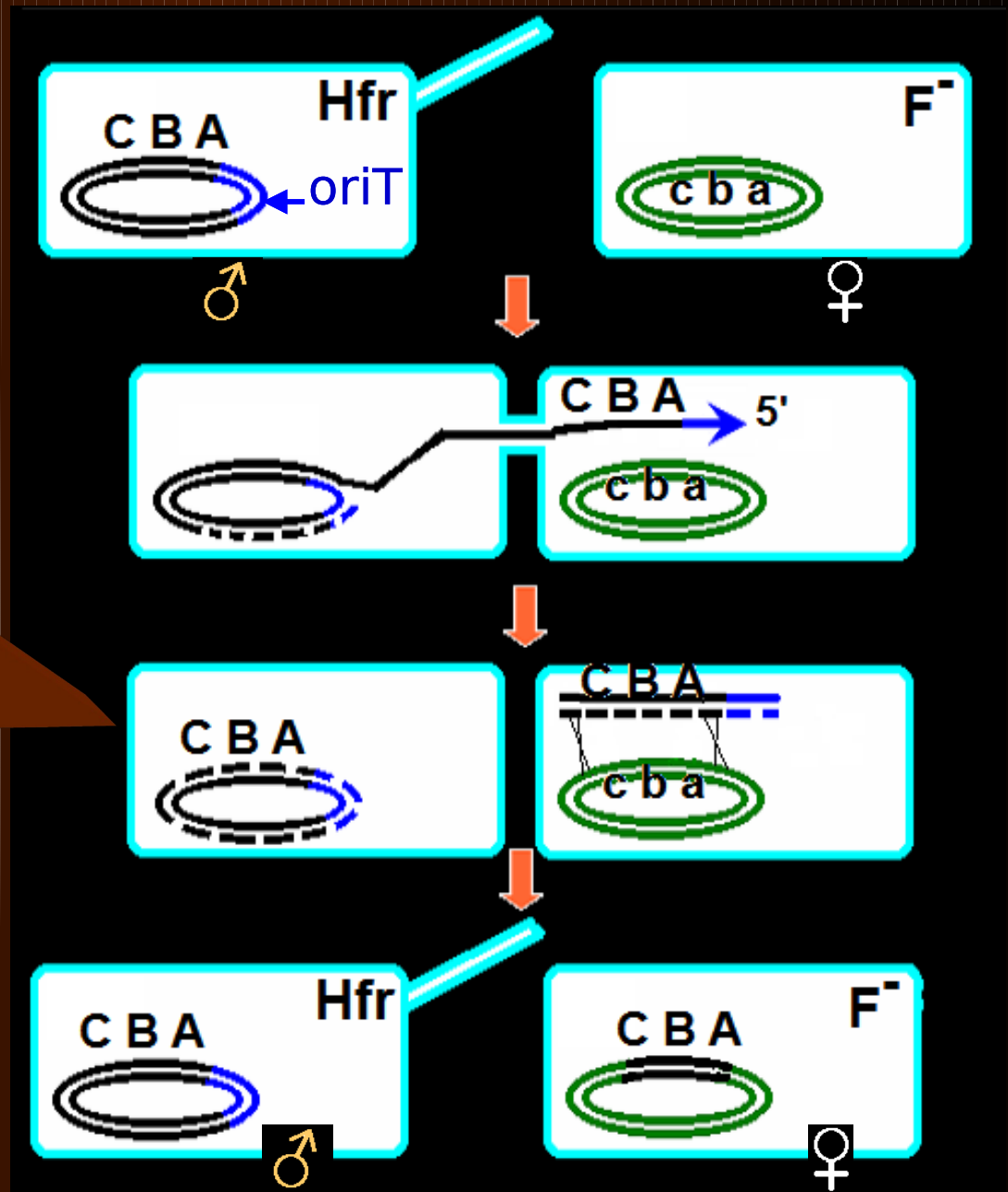
При этом в донорной клетке синтезируется комплементарная нить ДНК.

В реципиентной клетке также синтезируется комплементарная нить, но, в отличие от переноса F-фактора, ДНК не замыкается в кольцо.



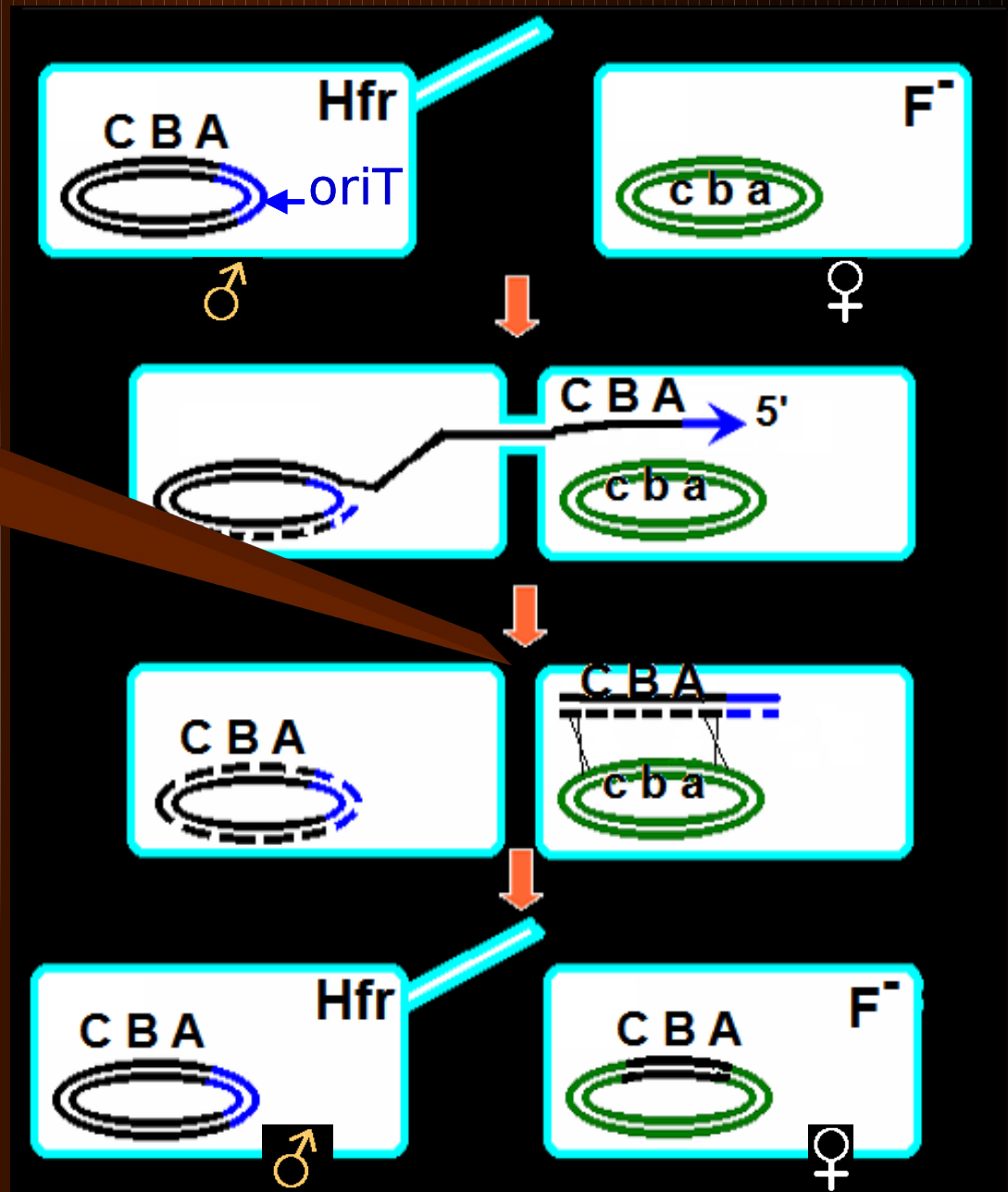
# Схема переноса хромосомных генов при конъюгации

Донорная клетка переносит только часть своего генома в реципиентную клетку, в результате чего возникает не полная, а частичная зигота – мерозигота.

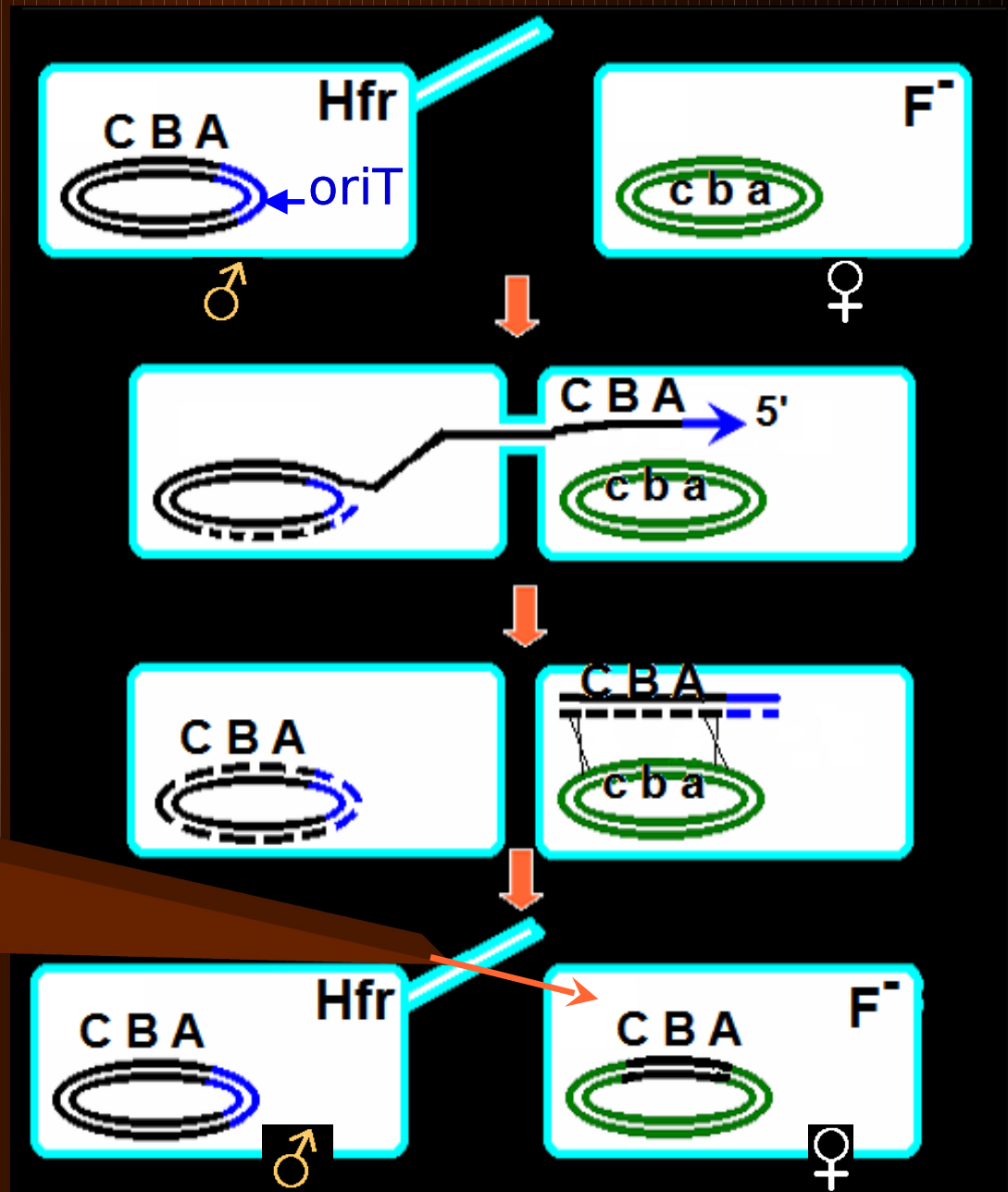


# Схема переноса хромосомных генов при конъюгации

Рекомбинанты  
возникают в  
результате  
двойного  
кроссинговера



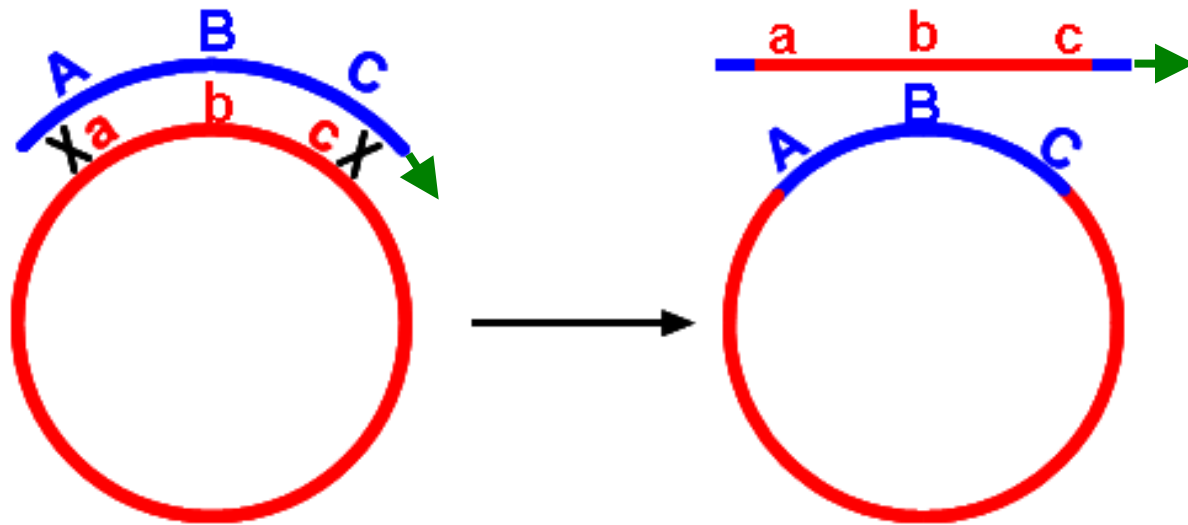
# Схема переноса хромосомных генов при конъюгации



Реципиентные клетки никогда не приобретают F-фактора или способности быть Hfr-донорами.

# Общая схема кроссинговера

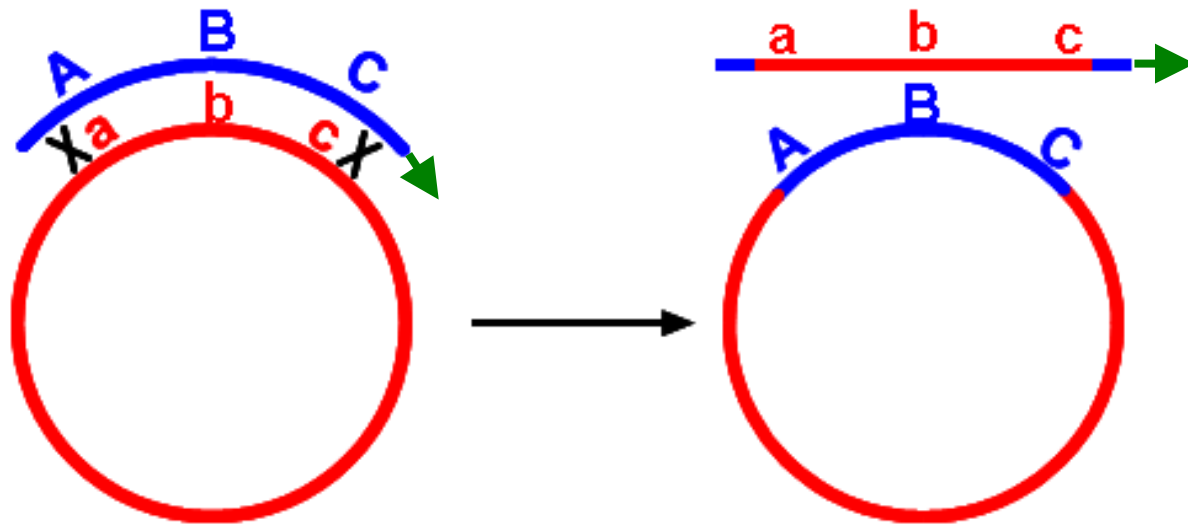
При рекомбинации у *E.coli*



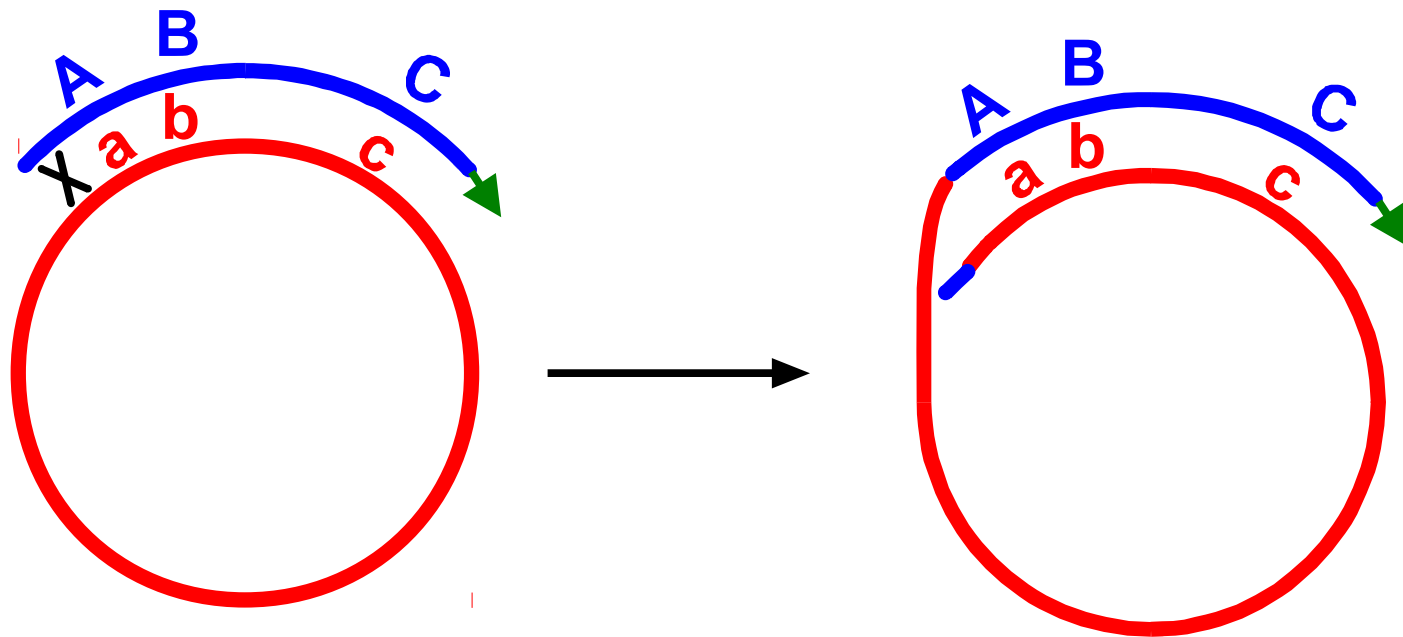
Донорная клетка переносит только часть своего генома в реципиентную клетку, в результате чего возникает не полная, а частичная зигота – **мерозигота**.

# Общая схема кроссинговера

При рекомбинации у *E.coli*



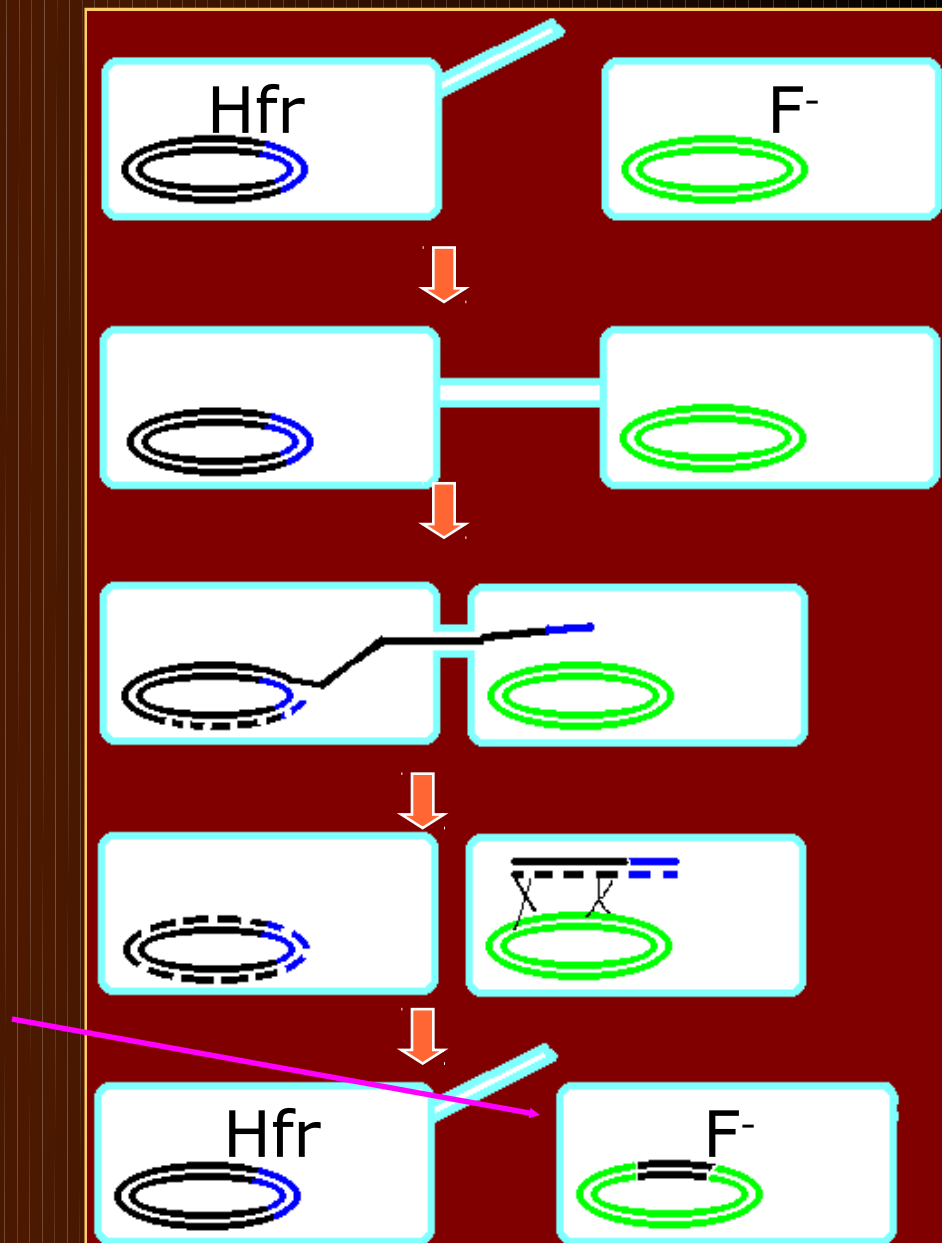
Клетка-реципиент имеет кольцевую хромосому и получает от донора линейный фрагмент двуцепочечной ДНК. Большая часть донорного фрагмента замещает гомологичный участок в хромосоме. Кроссинговер происходит дважды.



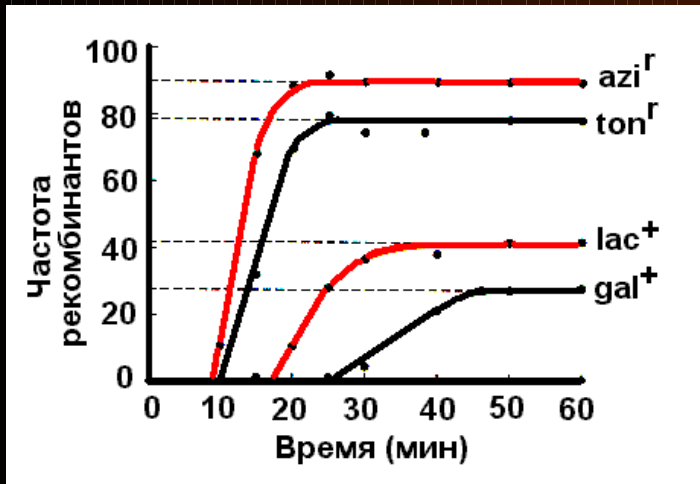
Одиночный кроссинговер привел бы к образованию линейной молекулы и гибели клетки



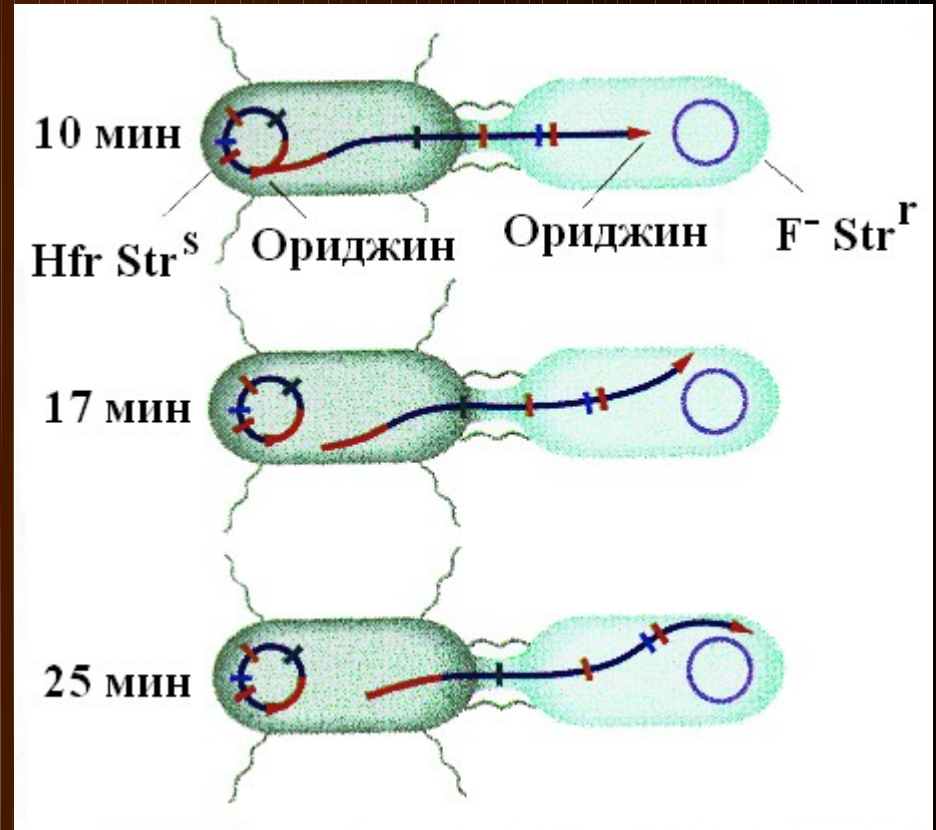
# Схема переноса хромосомных генов при конъюгации



# Результат эксперимента с прерыванием конъюгации Э.Вольмана и Ф.Жакоба (1961 г.)



**Кинетика переноса генов  
в скрещивании Hfr x F<sup>-</sup>**



**Схема переноса маркеров  
в зависимости от времени**

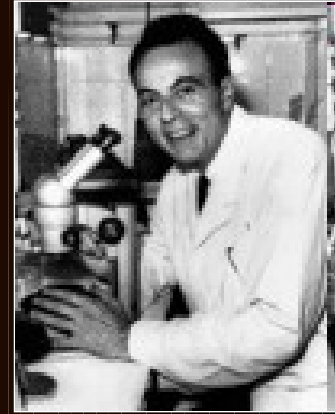
## Эксперименты с прерыванием конъюгации Э.Вольмана и Ф.Жакоба (1961 г.)



Э.Вольман

Скрещивание  
Hfr x F<sup>-</sup> (в соотношении 1:10)

Hfr	Str <sup>s</sup>	Azi <sup>r</sup>	Gal <sup>+</sup>	Lac <sup>+</sup>	Ton <sup>r</sup>
F <sup>-</sup>	Str <sup>r</sup>	Azi <sup>s</sup>	Gal <sup>-</sup>	Lac <sup>-</sup>	Ton <sup>s</sup>



Ф.Жакоб

Str<sup>s</sup>/Str<sup>r</sup> – чувствительность/устойчивость к стрептомицину

Azi<sup>s</sup>/Azi<sup>r</sup> – чувствительность/устойчивость к азиду натрия

Ton<sup>s</sup>/Ton<sup>r</sup> – чувствительность/устойчивость к фагу T1

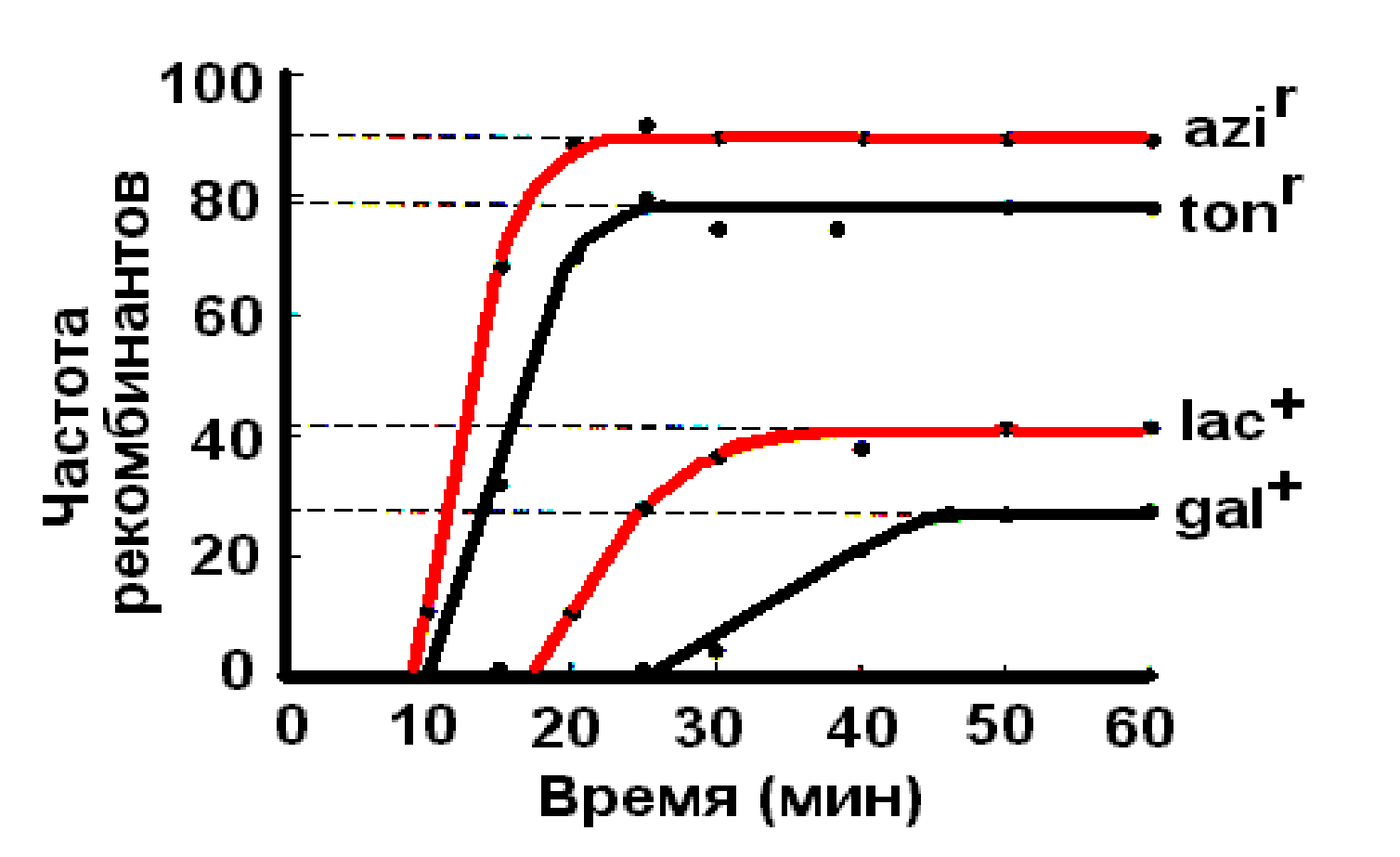
Gal<sup>+</sup>/Gal<sup>-</sup> – способность/неспособность утилизировать галактозу

Lac<sup>+</sup>/Lac<sup>-</sup> – способность/неспособность утилизировать лактозу

Селективная среда для отбора рекомбинантов всегда  
содержала стрептомицин, чтобы убить клетки донора

# Результат эксперимента с прерыванием конъюгации Э.Вольмана и Ф.Жакоба (1961 г.)

Hfr	Str <sup>s</sup>	Azi <sup>r</sup>	Gal <sup>+</sup>	Lac <sup>+</sup>	Ton <sup>r</sup>
F <sup>-</sup>	Str <sup>r</sup>	Azi <sup>s</sup>	Gal <sup>-</sup>	Lac <sup>-</sup>	Ton <sup>s</sup>



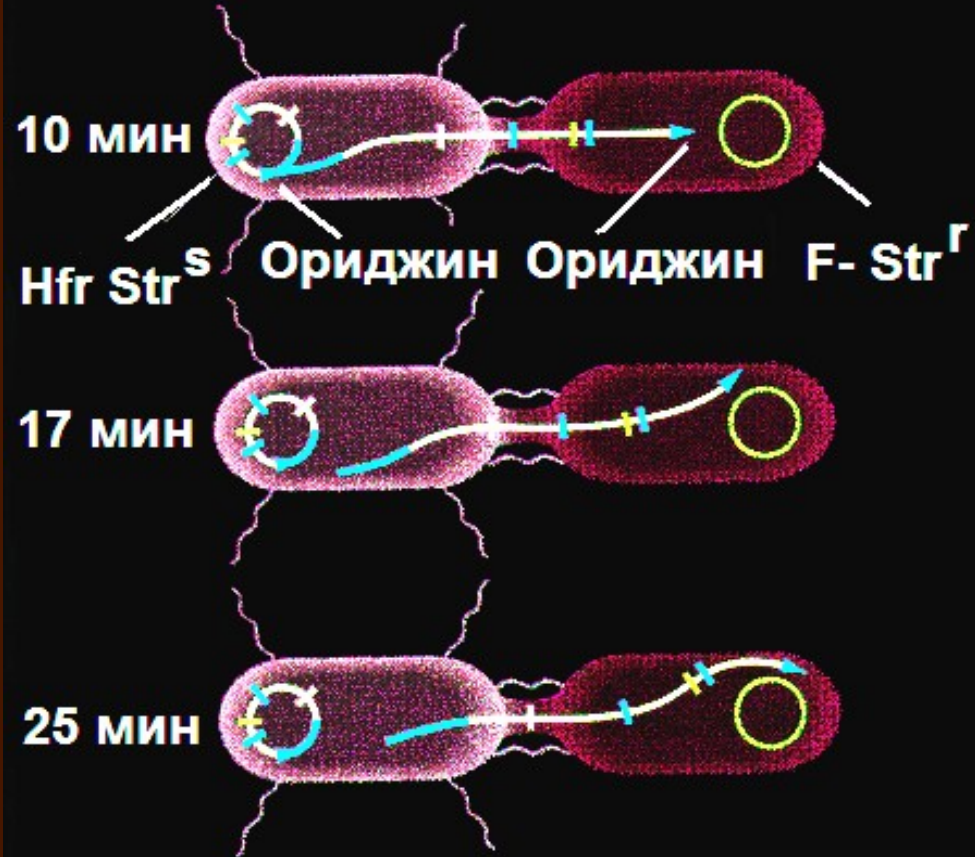
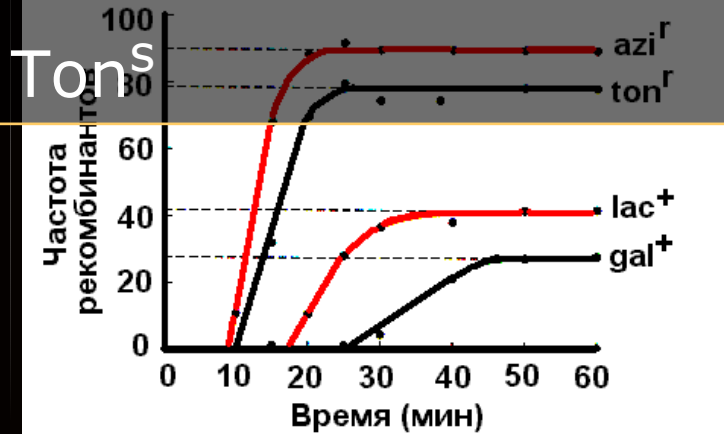
Кинетика переноса генов в скрещивании Hfr x F<sup>-</sup>

# Результат эксперимента с прерыванием конъюгации Э.Вольмана и Ф.Жакоба (1961 г.)

Hfr Str<sup>s</sup> Azi<sup>r</sup> Gal<sup>+</sup> Lac<sup>+</sup>

Ton<sup>r</sup>

F<sup>-</sup> Str<sup>r</sup> Azi<sup>s</sup> Gal<sup>-</sup> Lac<sup>-</sup>



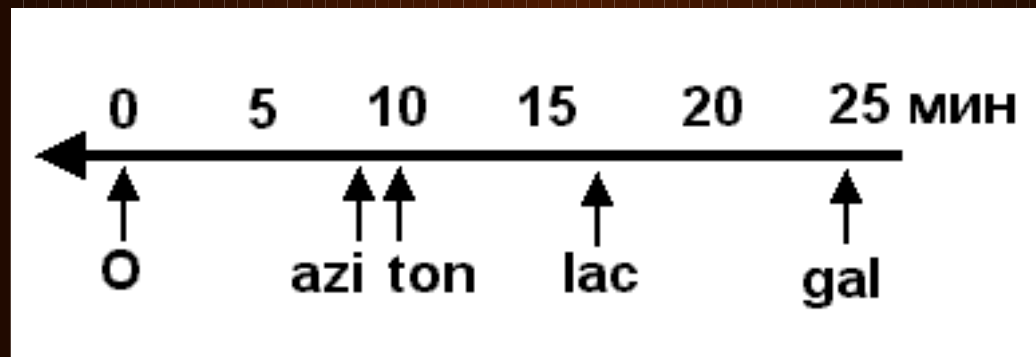
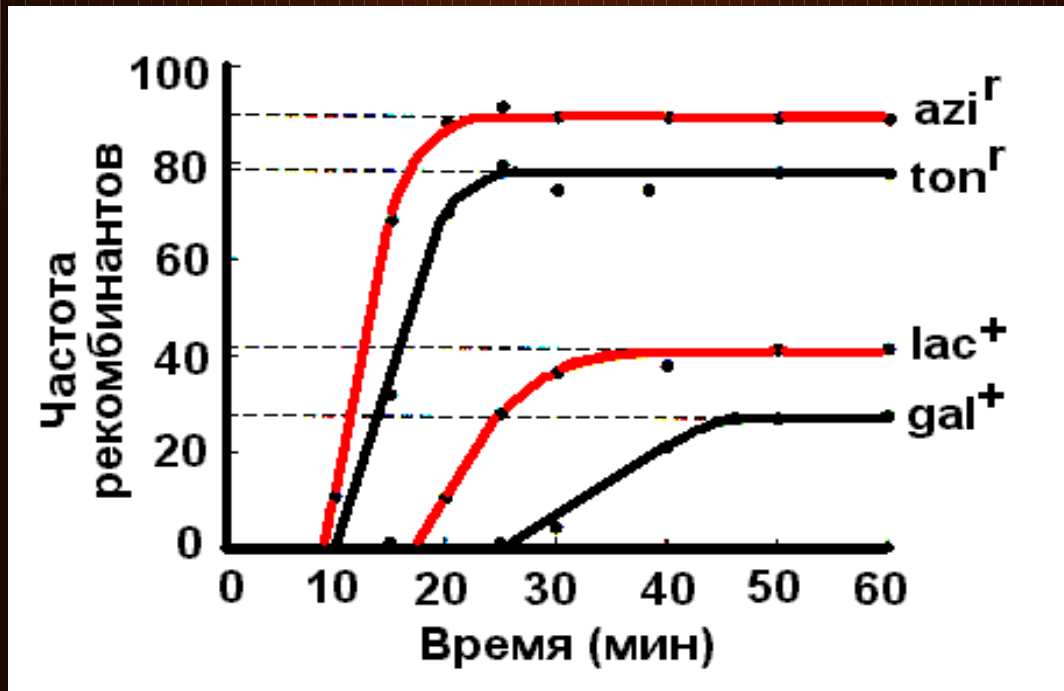
**Кинетика переноса  
генов**

**в скрещивании Hfr x**

**Схема переноса  
маркеров**

**в зависимости от  
времени**

# Кинетика переноса генов в скрещивании Hfr x F<sup>-</sup>

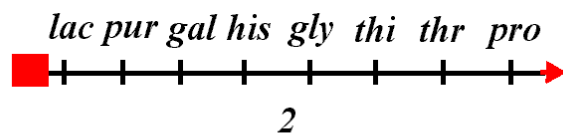
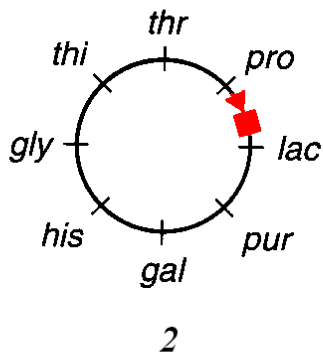
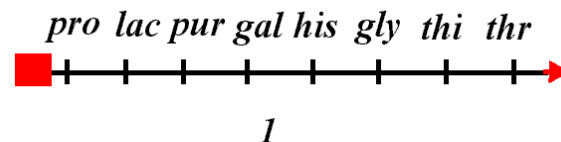
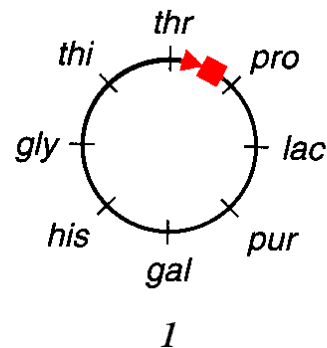
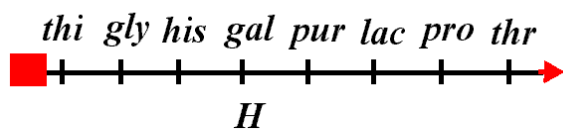
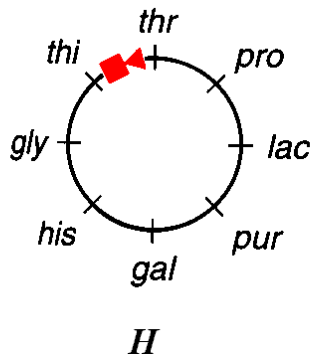


Карта участка хромосомы *E. coli*



# Кольцевая карта хромосомы *E.coli*

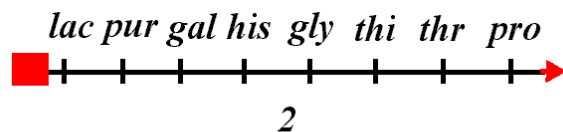
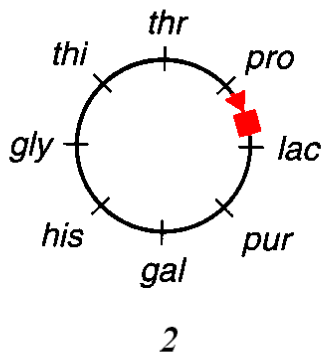
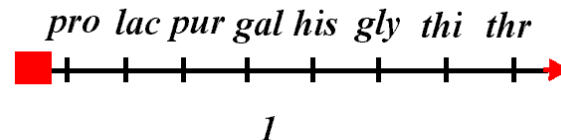
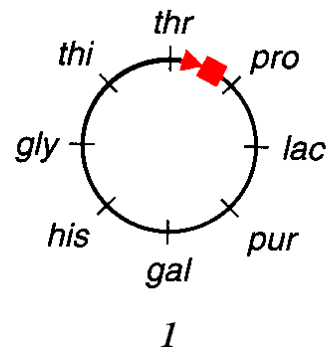
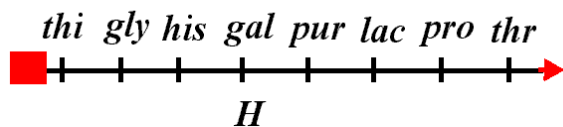
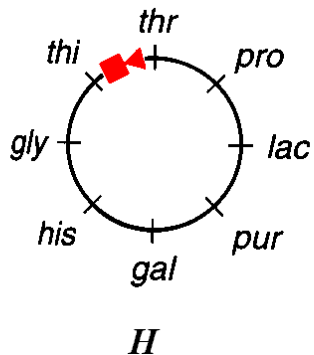
- ➔ Половой фактор
- ➔ Начало вхождения
- Конец вхождения



Последовательность переноса генов совершенно одинакова для всех Hfr-штаммов, однако штаммы отличаются положением точки *O* в этой последовательности и направлением переноса генов.

# Кольцевая карта хромосомы *E.coli*

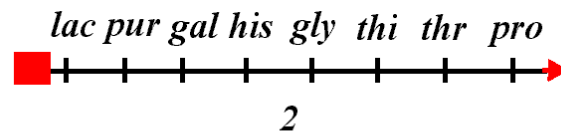
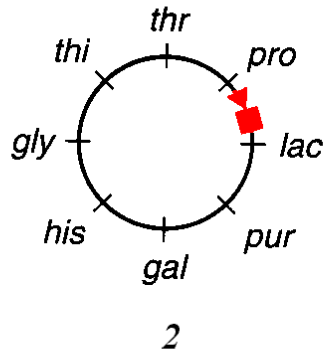
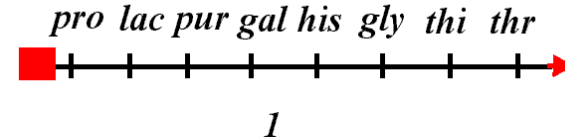
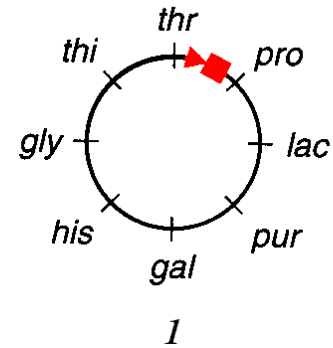
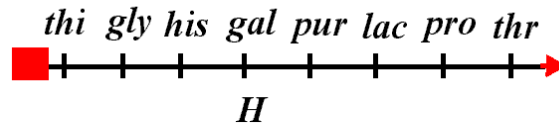
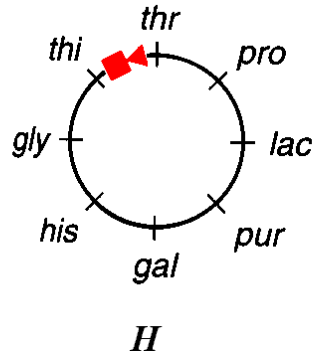
- ➔ Половой фактор
- ➔ Начало вхождения
- Конец вхождения



Следовательно, различные Hfr-штаммы образовались в результате интеграции полового фактора в различные сайты хромосомы и в различной ориентации.

# Кольцевая карта хромосомы *E.coli*

- ▶ Половой фактор
- ▶ Начало вхождения
- Конец вхождения

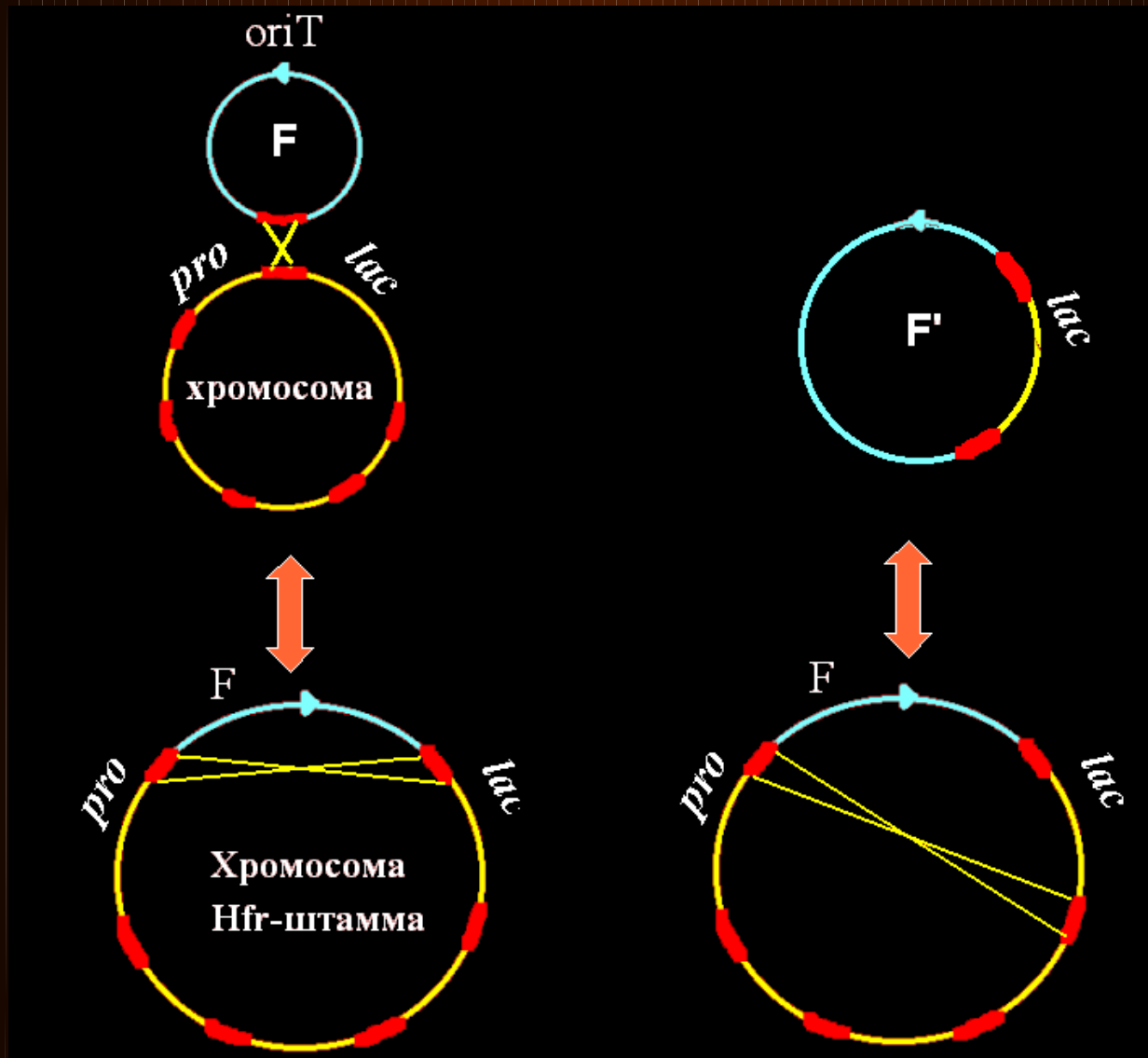


Перестановки генов можно объяснить тем, что хромосома *E.coli* является кольцевой.

## Использование конъюгации для генетического картирования

- Перенос хромосомной ДНК от Hfr-донора к реципиенту F- происходит ориентированно начиная с точки O (сайт интеграции F-фактора).
- Скорость переноса хромосомы на единицу ее длины постоянна, поэтому **время** вхождения каждого гена в реципиентную клетку **служит мерой их генетического расстояния**, т.е. представляет генетическую карту.
- Вся хромосома *E.coli* передается за 100 мин.
- Генетическая карта *E.coli* является кольцевой.

## Образование F'-факторов

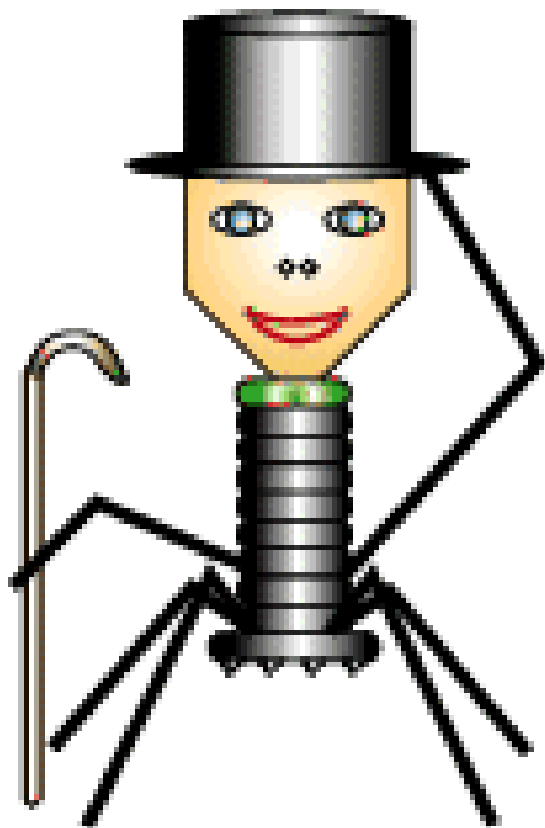


**Перенос хромосомных генов, обусловленный F'-факторами, называется сексдукцией.**

# Bugs enjoy hamster sex

- Although bacteria have been persuaded in the past to share DNA with plants and yeast, they had never been caught at it with mammalian cells before. For Virginia Waters of the University of California, San Diego, persistence paid off. She laid *Escherichia coli* on top of hamster cells and allowed them to get intimate: "You leave them overnight," she says.
- Waters showed the bacteria had transferred DNA by tracking a gene that makes green fluorescent protein. Post-coital hamster cells literally light up<sup>1</sup>.

# Схема морфологического строения фага Т4



Головка

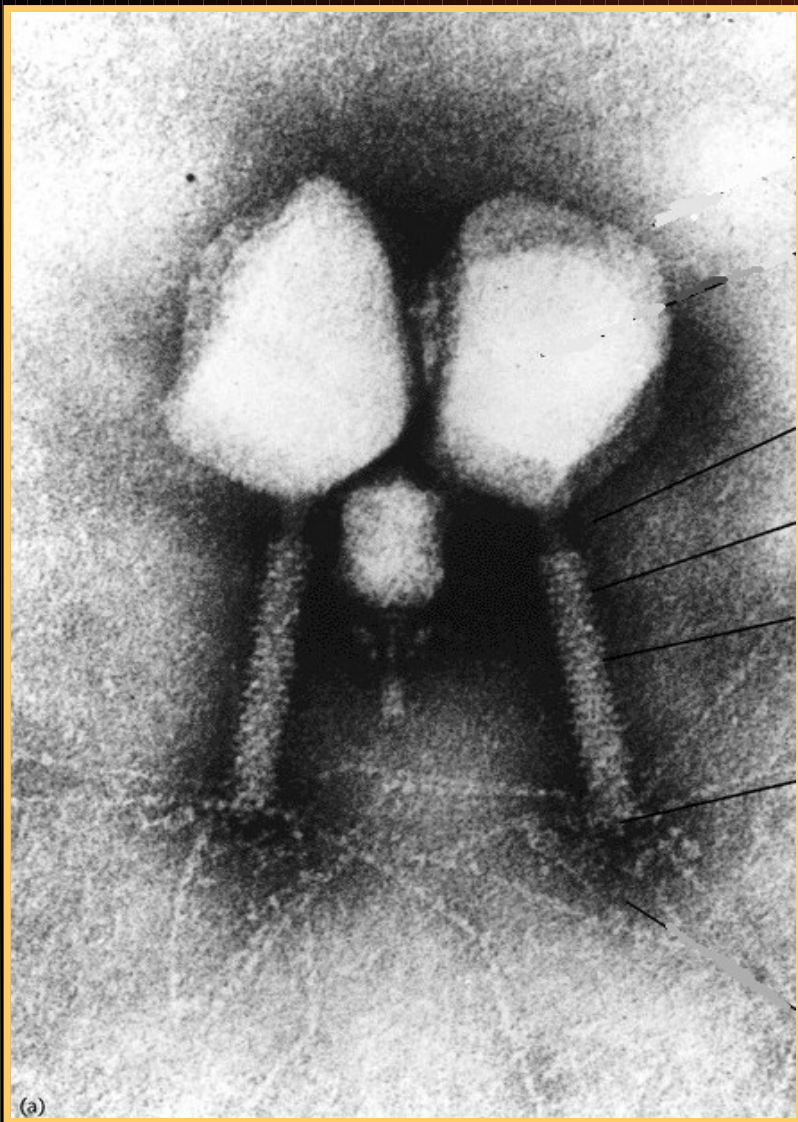
ДНК

Хвостовой стержень с футляром

Нити отростка

Базальная пластинка





## Фаг Т4

Размер

0,065 x 0.10 мкм

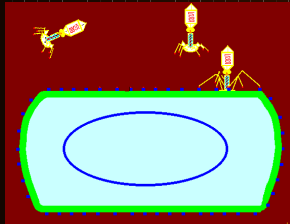
1 линейная двунитевая ДНК

Размер 170 т.п.н.

Около 100 генов

# Литический цикл развития фагов

Адсорбция



Проникновение  
ДНК фага в клетку

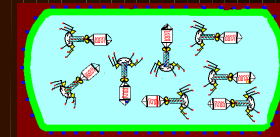


*Внутриклеточное  
развитие*

Синтез фаговых  
белков и ДНК

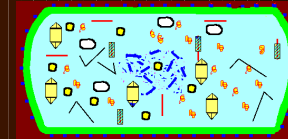


Лизис хозяйской клетки  
и выход фагового  
потомства



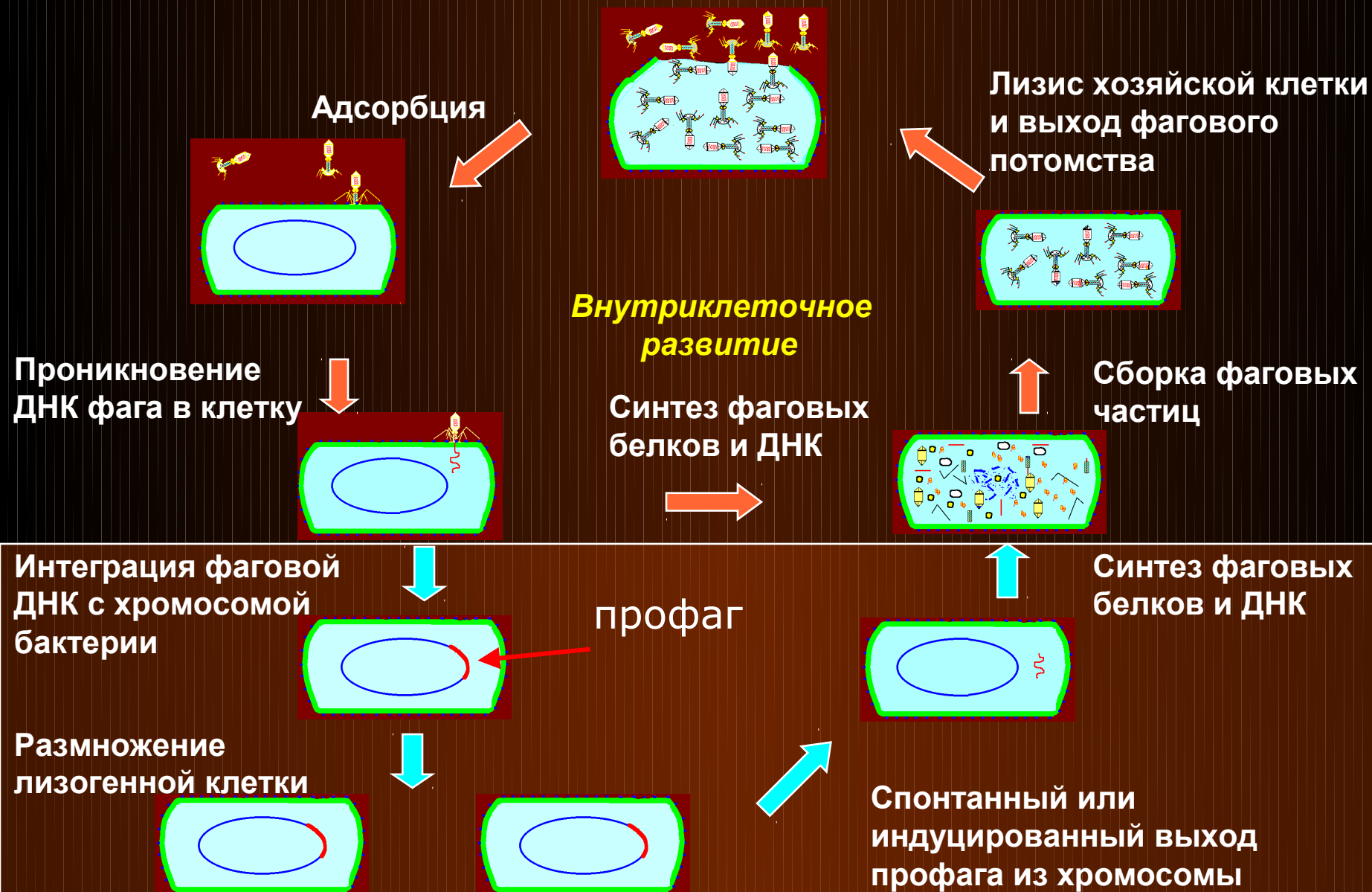
*Созревание*

Сборка зрелых  
фаговых частиц



**Умеренные фаги способны не только автономно размножаться, но и интегрировать в геном бактериальной клетки, переходя в состояние профага**

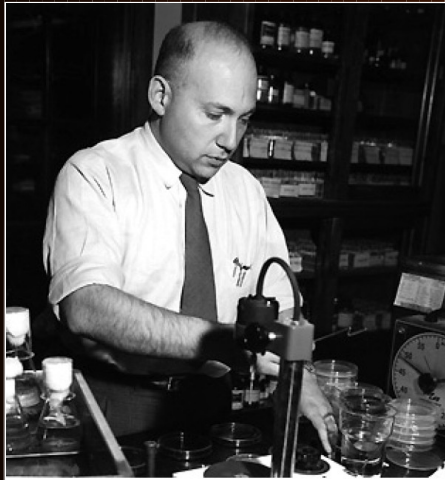
# Литический и лизогенный циклы развития умеренных фагов



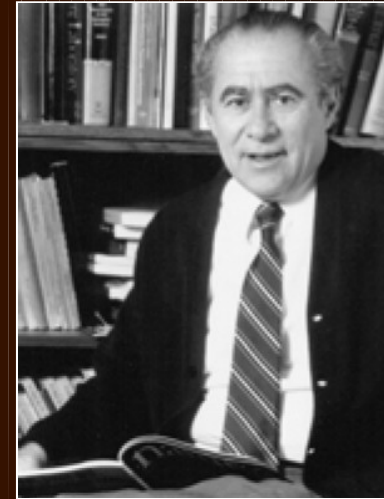
# Трансдукция

- Трансдукцией называется перенос ДНК из клетки-донора в клетку-реципиент, осуществляемый бактериофагом.

Открыта Дж.Ледербергом и Н.Циндером в 1951 г. при поиске полового процесса у *Salmonella thyphimurium*.



Дж.Ледерберг



Н.Циндер



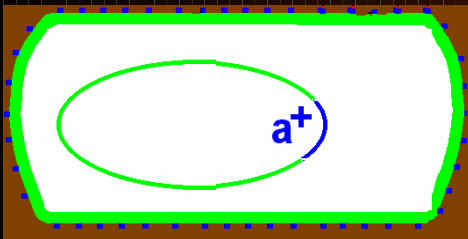
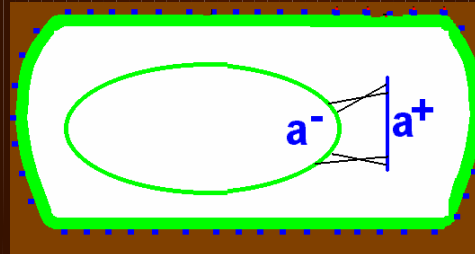
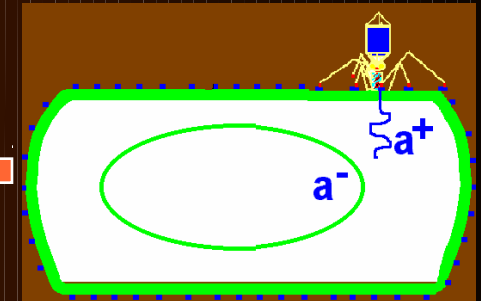
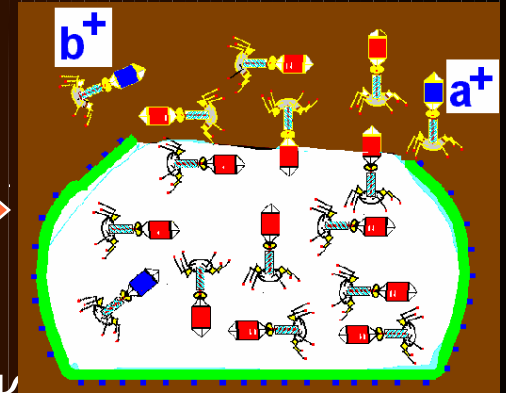
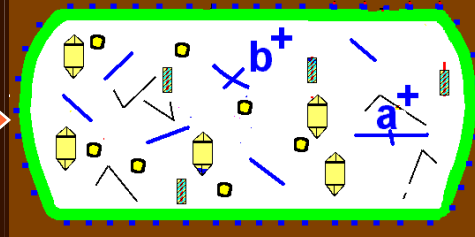
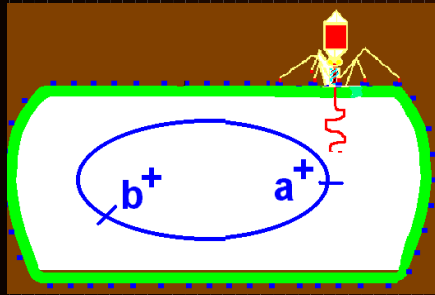
# Общая (неспецифическая) трансдукция

Некоторые умеренные фаги (P22, P1) способны переносить любой участок хромосомы бактерии (фаг P22 – у *Salmonella thyphimurium*, фаг P1 у *Escherichia coli*)



При формировании фаговых частиц у 0,3% популяции фага вместо упаковки ДНК фага происходит ошибочное включение фрагмента хромосомной ДНК в головку фага.

# Механизм общей трансдукции



Рекомбинанты возникают в результате двойного кроссинговера

В головку фага, помещается фрагмент ДНК около 1,5% генома бактерии (1,5 мин карты *E.coli*, 40 генов)

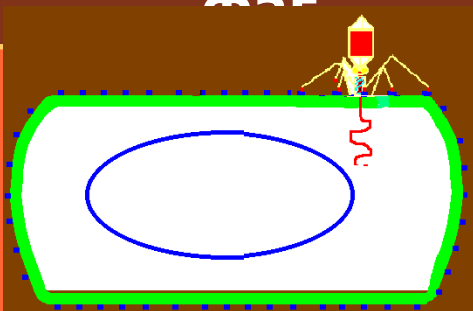


# Специфическая трансдукция

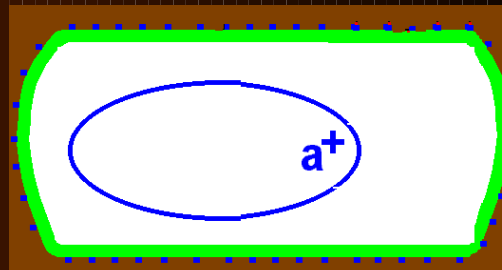
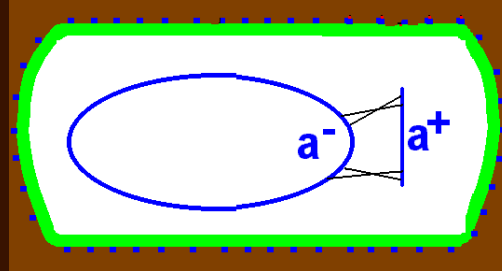
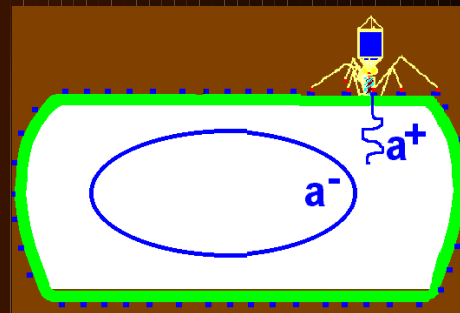
- Отличается от неспецифической трансдукции тем, что бактериофаг может переносить только определенные гены.
- Это явление характерно для умеренного бактериофага лямбда. Этот фаг может трансдуцировать только гены *gal* и *bio*.
- Трансдукция осуществляется с низкой частотой –  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$ .

# Механизм общей трансдукции

Нормальный умеренный фаг



Дефектный фаг



Рекомбинанты  
возникают в  
результате двойного  
кроссинговера

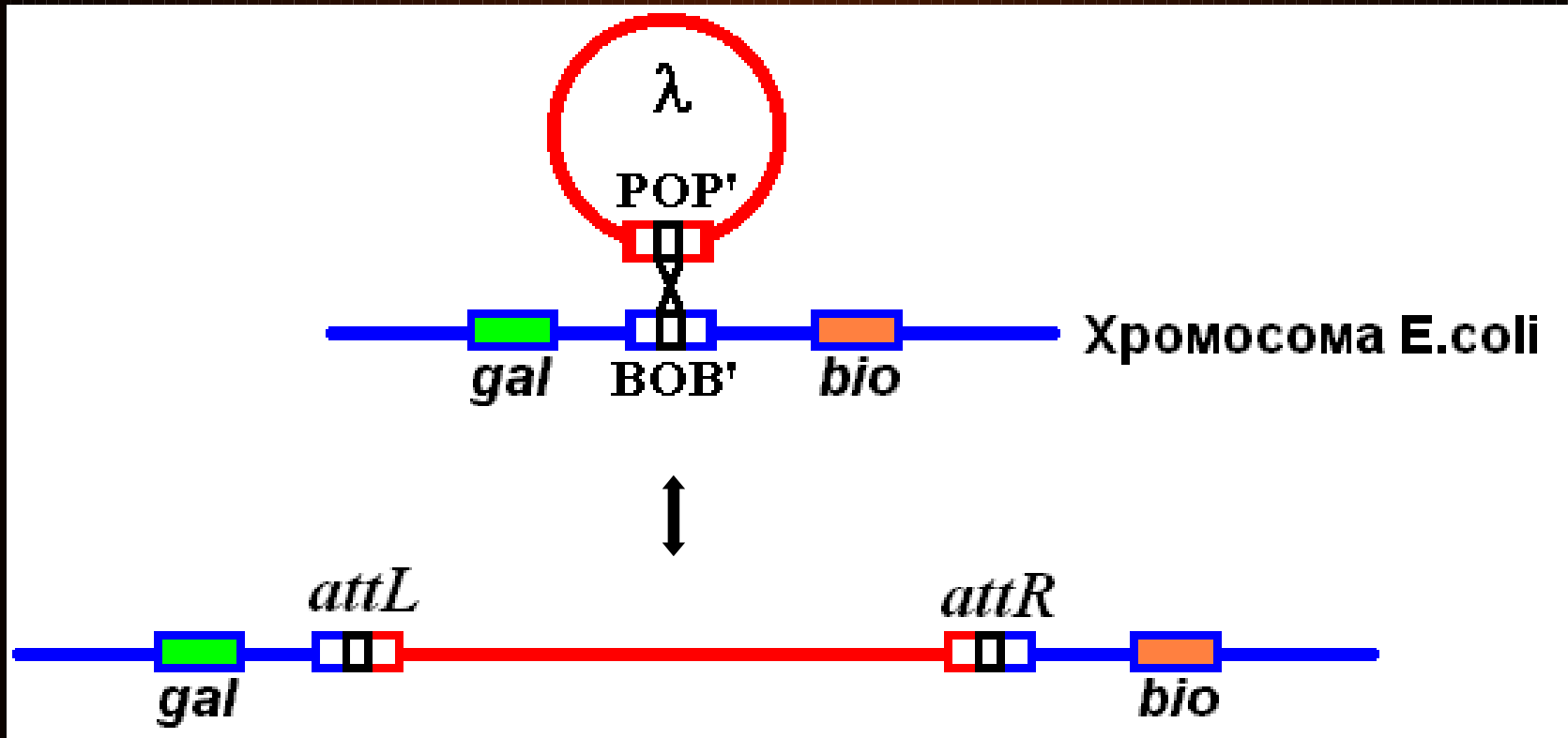


# После проникновения в клетку линейная ДНК фага $\lambda$ замыкается в кольцо



**Липкие концы – однонитевые комплементарные участки по 12 нуклеотидов**

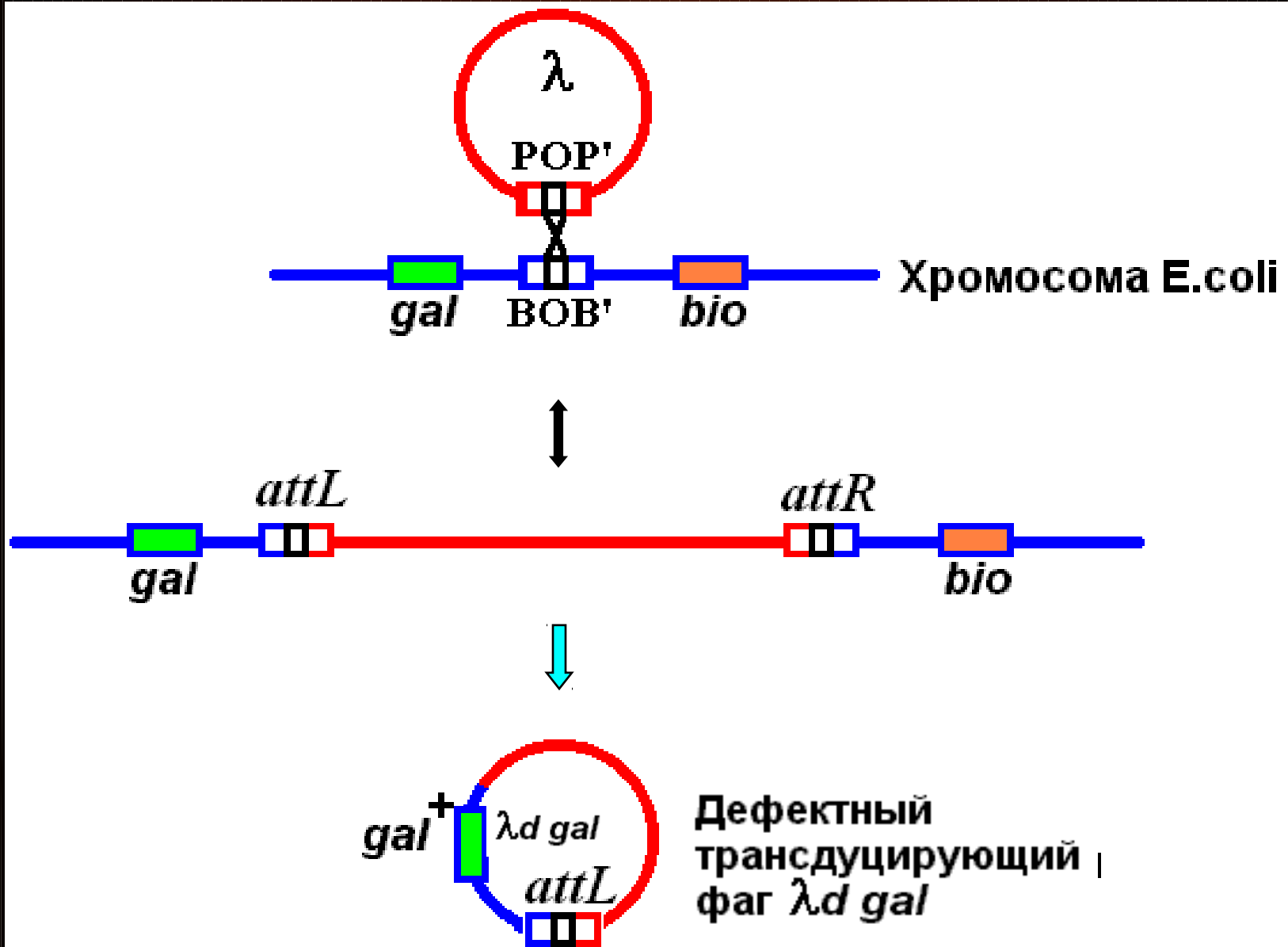
## Схема интеграции фага $\lambda$ в хромосому *E.coli* и образование трансдуцирующего фага

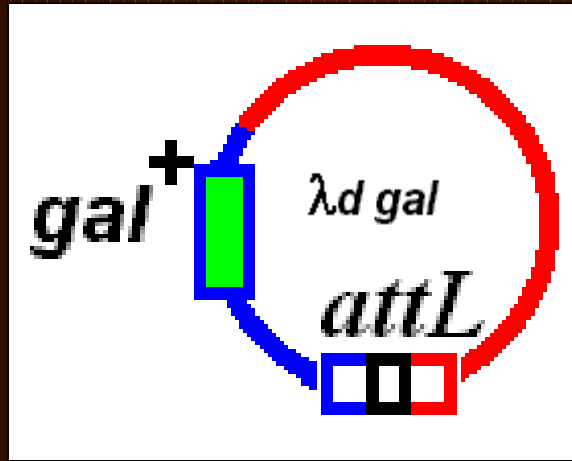


Интеграция и вырезание фага  $\lambda$  осуществляется с помощью механизма сайт-специфической рекомбинации по участкам гомологии  $attP$  и  $attB$  и контролируется фаговыми генами  $int$  и  $xis$ .

Размер хромосомы у фага  $\lambda$  около 49 т.п.н.

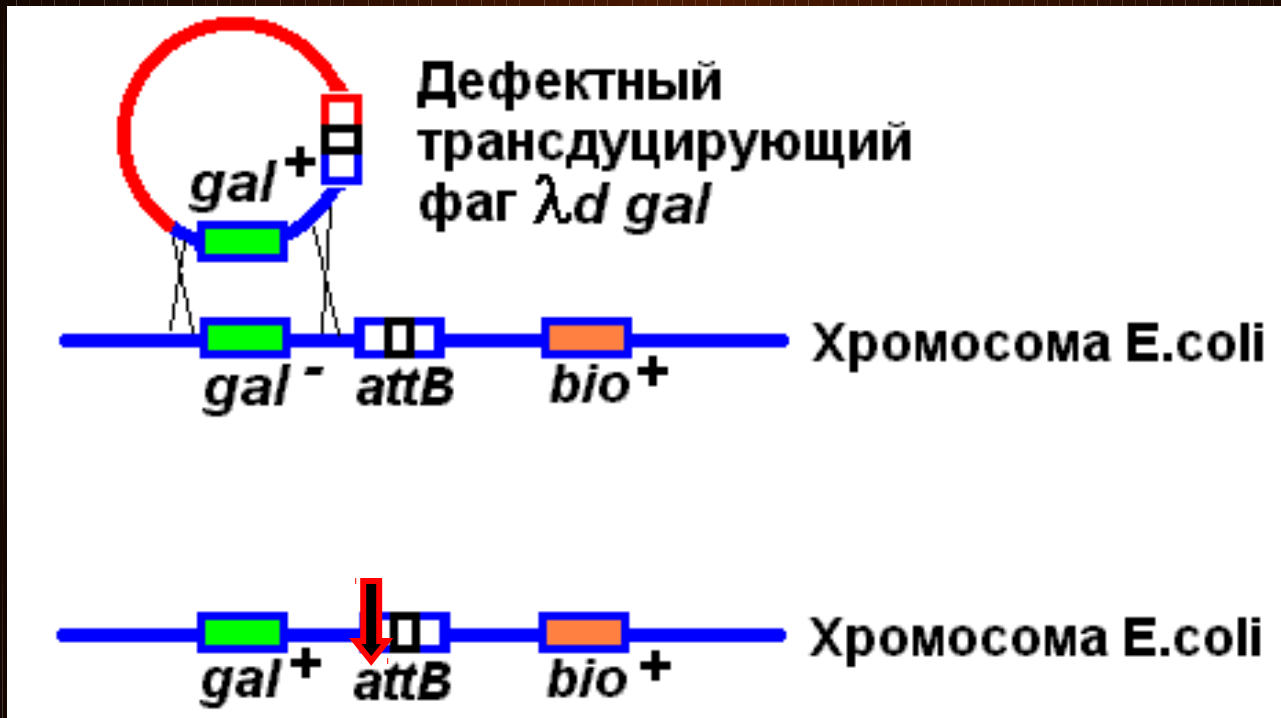
# Схема интеграции фага $\lambda$ в хромосому *E.coli* и образование трансдуцирующего фага





- Трансдуцирующий фаг дефектен, поскольку гены, контролируемые рост и созревания фага во время литического цикла, замещены бактериальной ДНК.
- Фаг способен инфицировать бактерии, но не способен там размножаться.
- Кроме того, он не может интегрировать в хромосому, поскольку имеет гибридный *att*-сайт. Его интеграция возможна только в присутствии фага-помощника (нормального фага).

## Специализированная трансдукция

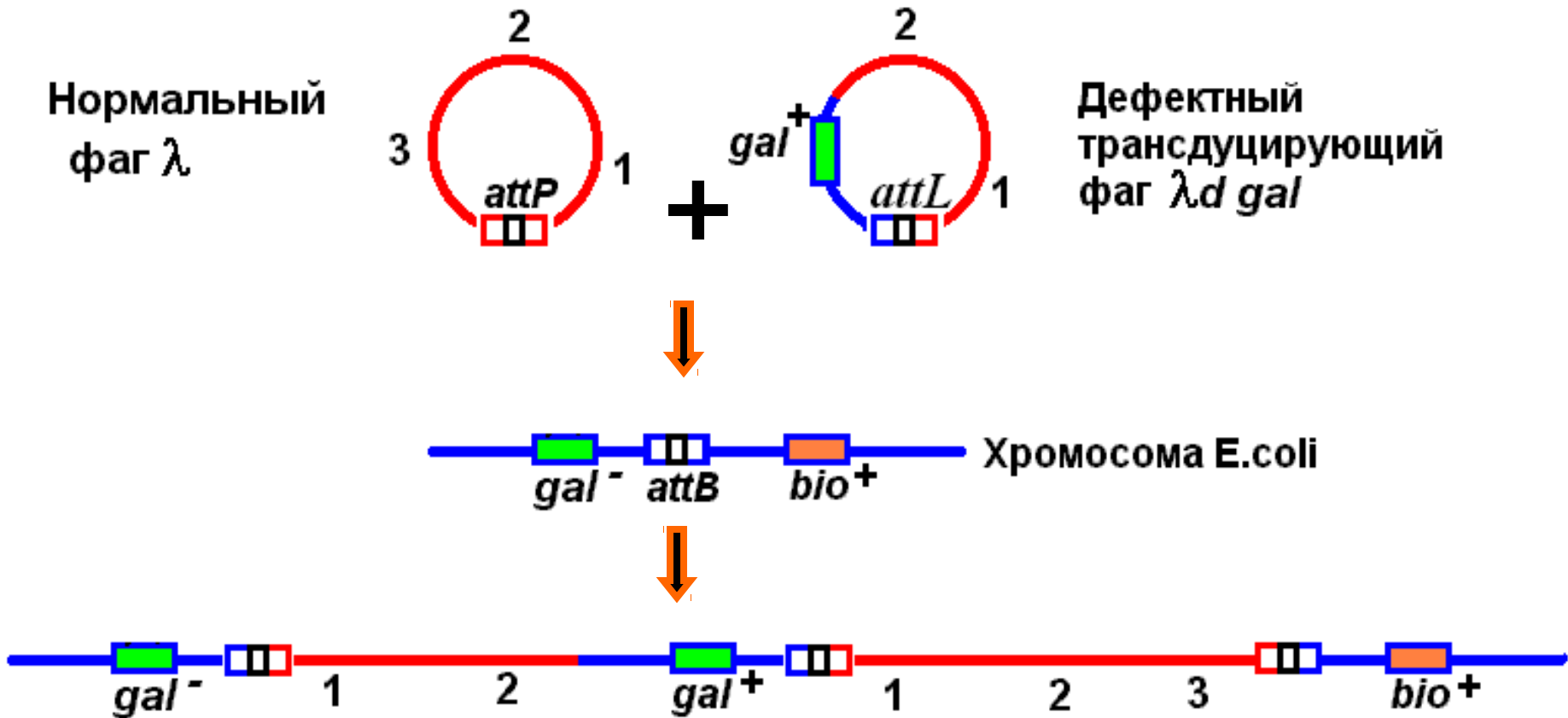


- Трансдуцирующий фаг не может интегрироваться в хромосому, поскольку имеет гибридный *att*-сайт.

1) Участки хромосомной ДНК, введенные фагом, могут рекомбинировать с хромосомой реципиентной клетки и замещать гомологичные участки в хромосоме.  
При этом лизогенных трансдуктантов не образуется.

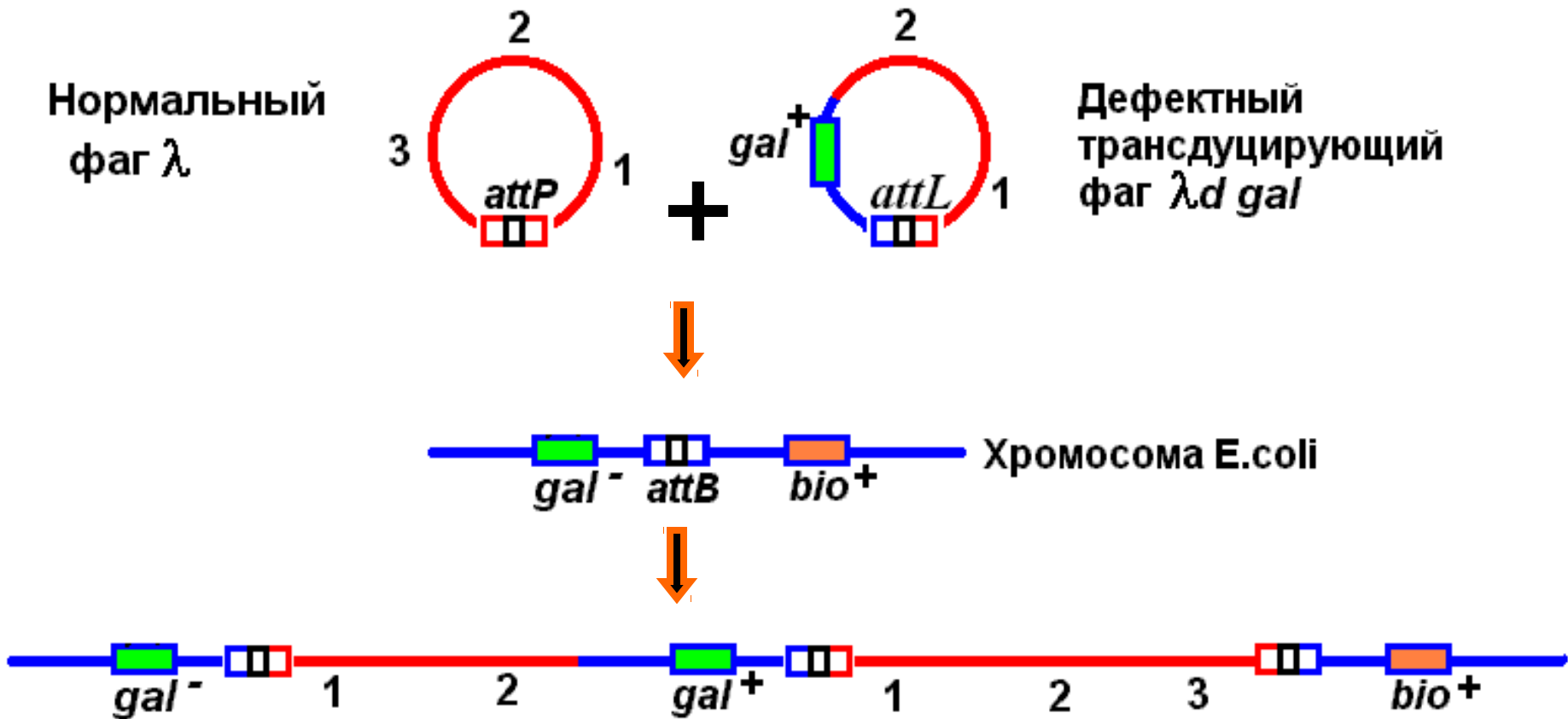


# Специализированная трансдукция



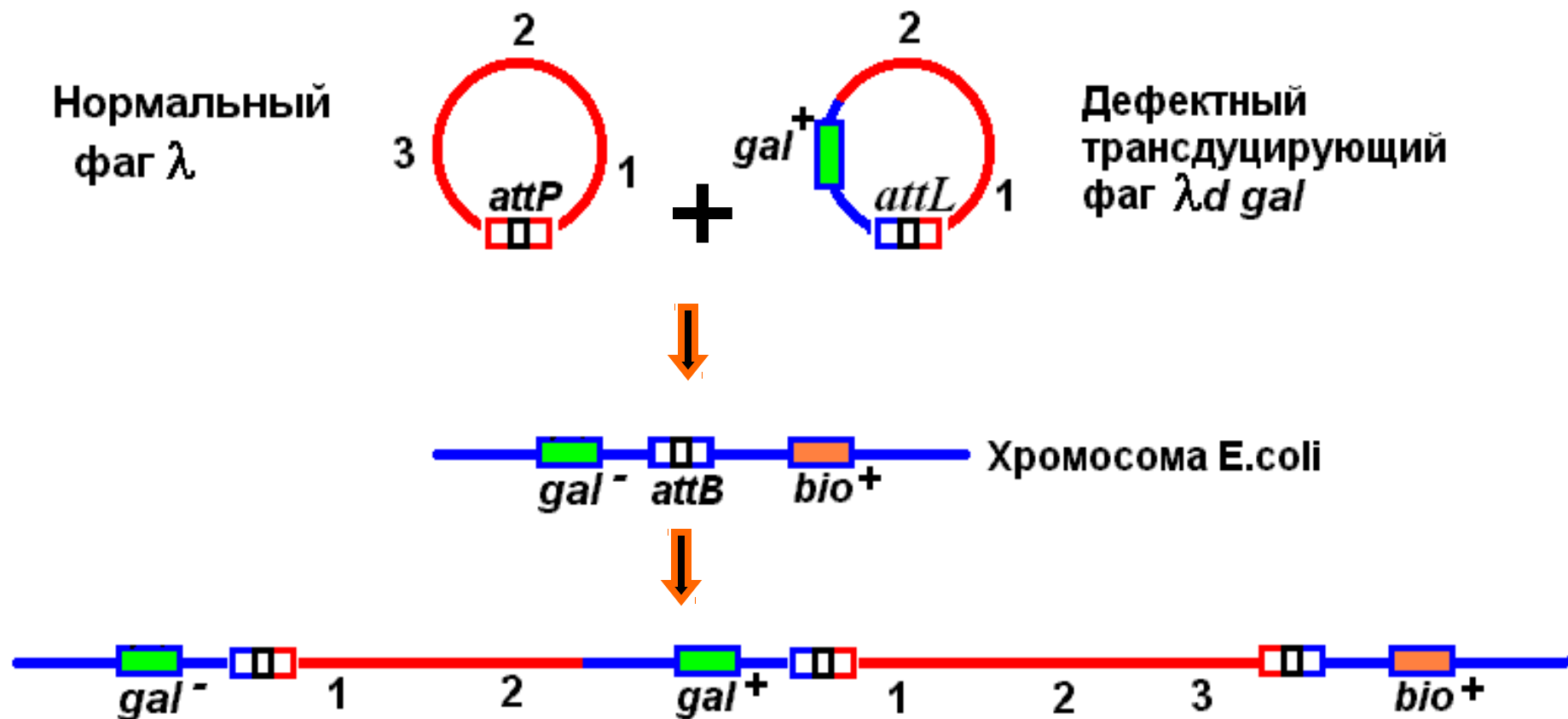
2) При множественном заражении, когда клетки инфицируются трансдуцирующим фагом и нормальным фагом (который в данном случае выполняет роль фага-помощника) происходит двойная лизогенизация обоими фагами.

# Специализированная трансдукция



Например, если трансдуцирующий фаг переносит участок ДНК с аллелем дикого типа *gal* (*gal*<sup>+</sup>), а реципиент нес мутантный аллель *gal* (*gal*<sup>-</sup>), то образуются частичные гетерозиготы (гетерогеноты), у которых донорный участок *gal*, внесенный фагом, добавлен к геному реципиента.

# Специализированная трансдукция



Трансдуктанты Gal<sup>+</sup> частично гетерозиготны (gal<sup>-</sup>/gal<sup>+</sup>). Такое состояние называется гетерогенотой.

Трансдуктанты Gal<sup>+</sup> нестабильны и выщепляют клетки Gal<sup>-</sup> с частотой около  $2 \times 10^{-3}$  на клеточное деление.

Bact

ence

pathogenesis emphasized the dissemination of toxin genes among bacterial strains (10). However, it has become increasingly clear that toxin genes are only a subset of the diverse virulence factors encoded by bacteriophages. For example, some phages encode regulatory factors that increase expression of virulence genes not encoded by the phage (84), while others encode enzymes that alter bacterial components related to virulence (31, 58). Furthermore, phages have unique properties that enable them to contribute more directly to bacterial

#### Exotoxin production

*B. avium*

Pertussis toxin is phage encoded in *B. avium*.

*C. botulinum*

Botulinum toxin is phage encoded.

*C. diphtheriae*

Diphtheria toxin is phage encoded.

*E. coli*

The Shiga toxins are phage encoded.

*P. aeruginosa*

Pseudomonas cytotoxins are phage encoded.

*S. dysenteriae*

The Shiga toxin genes are associated with phage sequences, probably a defective prophage.

*S. aureus*

Staphylococcal enterotoxins are phage encoded. Staphylococcal exfoliative toxins are phage encoded. Toxic shock syndrome toxin is encoded by SapI, a mobile pathogenicity island transduced at high frequency by phage 80 $\alpha$ .

*S. pyogenes*

Streptococcal pyrogenic (erythrogenic, scarlatinal) exotoxins are phage encoded.

*V. cholerae*

Cholera toxin is phage encoded.

...that phages serve as a driving force in bacterial pathogenesis, acting not only in the evolution of bacterial pathogens through gene transfer, but also contributing directly to bacterial pathogenesis at the time of infection. This review provides

Historically, exotoxin production has been the most widely recognized bacterial characteristic linked to bacteriophage infection (10). However, phage infection of bacteria is increas-



# **lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation**

# Трансформация

- Трансформацией называется процесс переноса генетической информации, в результате которого экзогенная ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает ее наследственные изменения.

# Трансформация

1. Открыта Ф.Гриффигом в 1928 г. у *Salmonella typhimurium*.
2. О.Эйвери, К.Мак-Леод и М.Мак-Карти в 1944 г. установили, что «трансформирующим началом» является ДНК.



Ф.Гриффит



О.Эйвери



К.Мак-Леод



М.Мак-Карти



**Способность клетки быть трансформированной в результате поглощения экзогенной ДНК называется компетентностью.**

**По развитию состояния компетентности бактерии можно разделить на две группы:**

1. **Бактерии с природной компетентностью**
  - а) у которых компетентность возникает лишь в определенной фазе роста (стрептококки, бациллы)
  - б) клетки которых компетентны в любой фазе роста (гонококки, менингококки).
2. **Бактерии с отсутствием естественной компетентности (*E.coli*).**

## Стадии трансформации

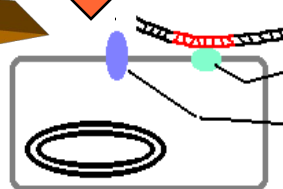
1. Развитие компетентности.
2. Связывание ДНК с клеточной поверхностью.
3. Процессинг ДНК и ее поглощение.
4. Интеграция в хромосому с помощью гомологичной (*recA*-зависимой) рекомбинации.

ДНК  
адсорбируется  
на мембране с  
помощью ДНК-  
связывающего  
белка

ДНК из лизированной  
бактерии, способной  
метаболизировать лактозу



Реципиентная бактерия,  
неспособная  
метаболизировать  
лактозу



ДНК-связывающий белок

Нуклеаза



ДНК-транслокационный  
аппарат

Нуклеотиды

SSB-белок



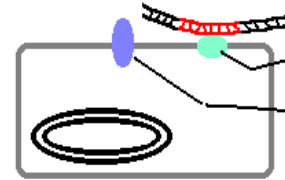
Трансформант  
(способен метаболизировать лактозу)

Однонитевая ДНК переносится через мембрану с помощью транслокационного аппарата, в то время как другая нить деградирует

ДНК из лизированной бактерии, способной метаболизировать лактозу

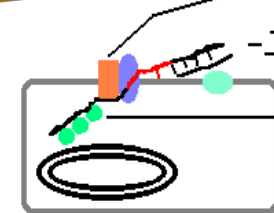


Реципиентная бактерия, неспособная метаболизировать лактозу



ДНК-связывающий белок

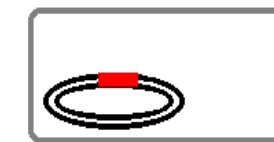
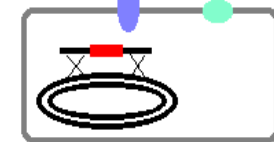
Нуклеаза



ДНК-транслокационный аппарат

Нуклеотиды

SSB-белок



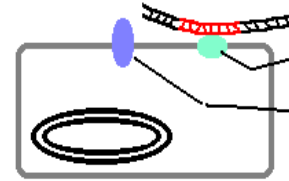
Трансформант

(способен метаболизировать лактозу)

ДНК из лизированной  
бактерии, способной  
метаболизировать лактозу

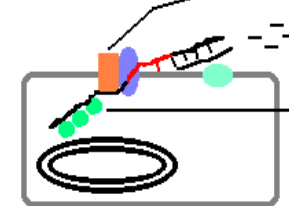


Реципиентная бактерия,  
неспособная  
метаболизировать  
лактозу



ДНК-связывающий белок

Нуклеаза



ДНК-транслокационный  
аппарат

Нуклеотиды

SSB-белок



Трансформант

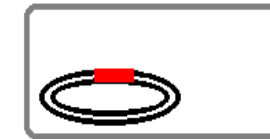
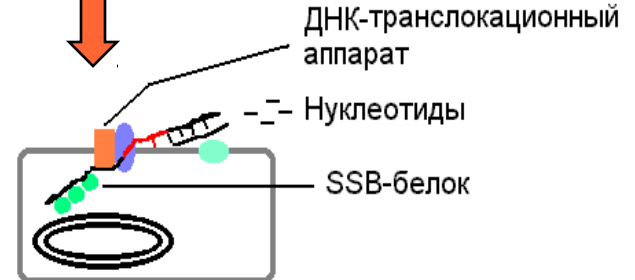
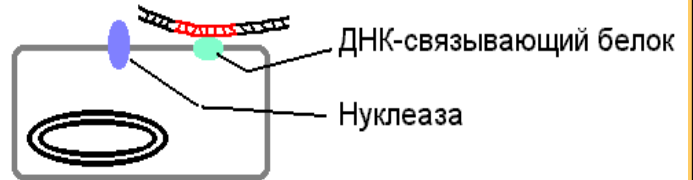
(способен метаболизировать лактозу)

Однонитевая ДНК  
спаривается с  
гомологичной  
последовательнос  
тью ДНК  
реципиентной  
хромосомы

ДНК из лизированной бактерии, способной метаболизировать лактозу



Реципиентная бактерия, неспособная метаболизировать лактозу



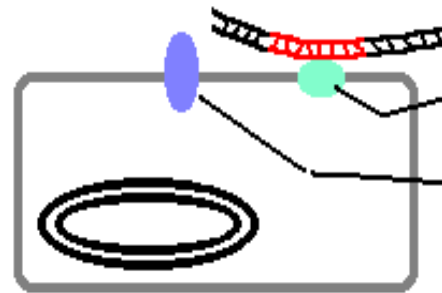
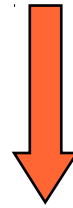
Трансформант (способен метаболизировать лактозу)

Рекомбинация  
однонитевой  
ДНК с  
бактериальной  
хромосомой

ДНК из лизированной бактерии, способной метаболизировать лактозу

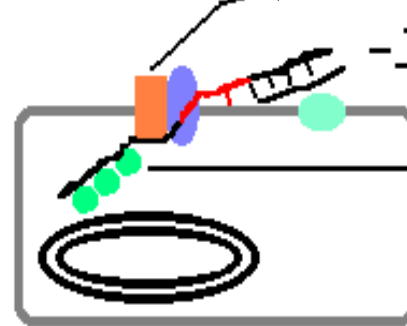
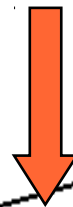


Реципиентная бактерия, неспособная метаболизировать лактозу



ДНК-связывающий белок

Нуклеаза



ДНК-транслокационный аппарат

Нуклеотиды

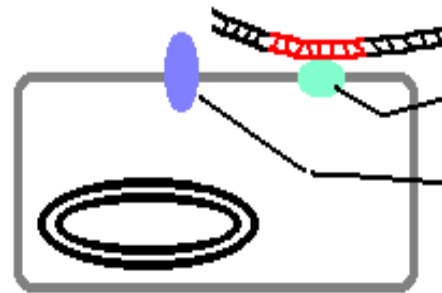
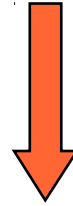
SSB-белок

ДНК адсорбируется на мембране с помощью ДНК-связывающего белка

ДНК из лизированной бактерии, способной метаболизировать лактозу

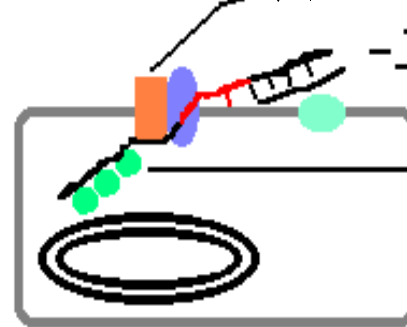
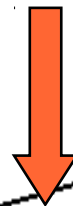


Реципиентная бактерия, неспособная метаболизировать лактозу



ДНК-связывающий белок

Нуклеаза



ДНК-транслокационный аппарат

Нуклеотиды

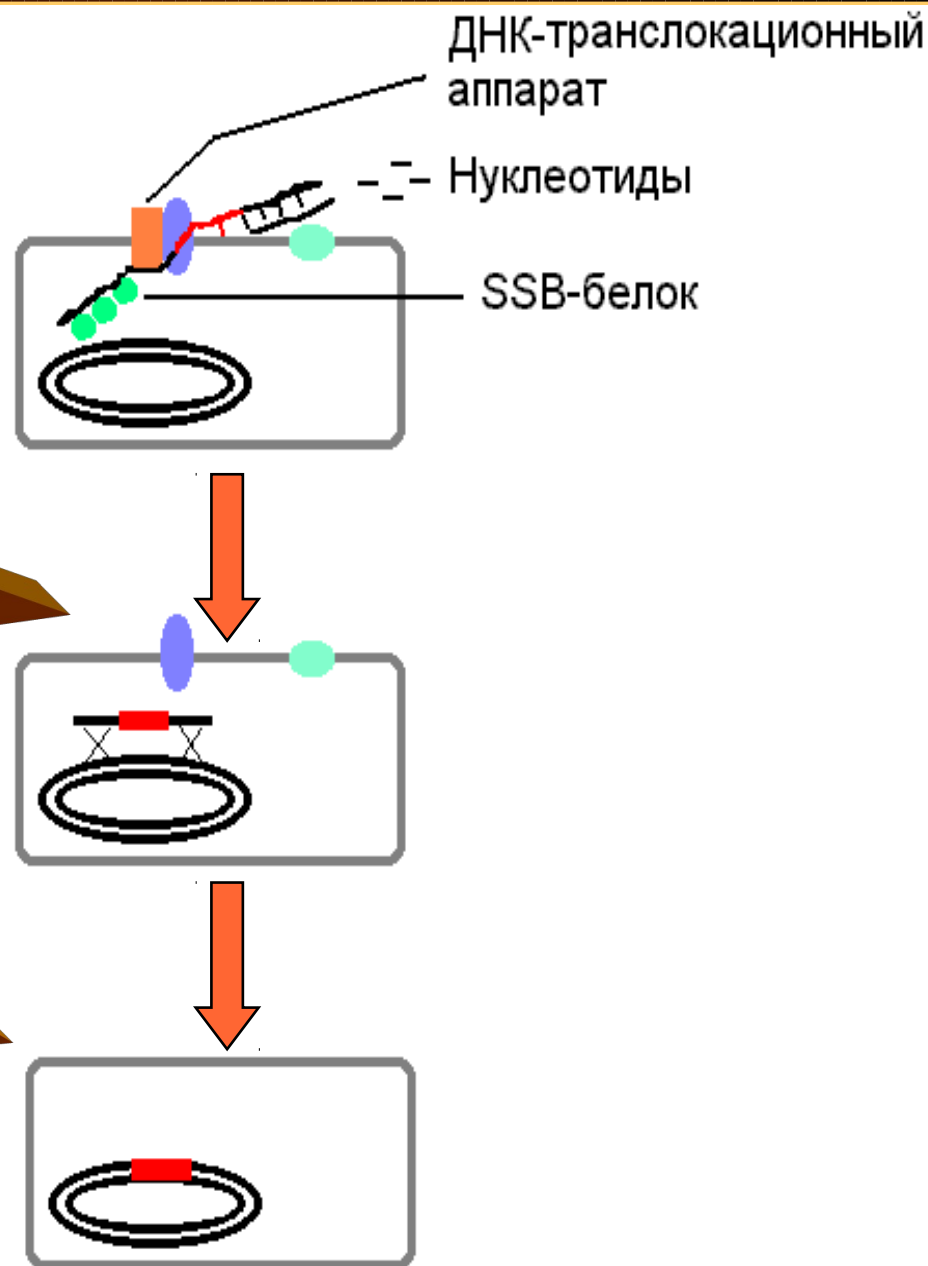
SSB-белок

Однонитевая ДНК переносится через мембрану с помощью транслокационного аппарата, в то время как другая нить деградирует

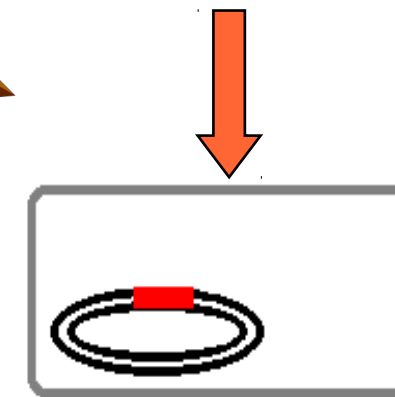
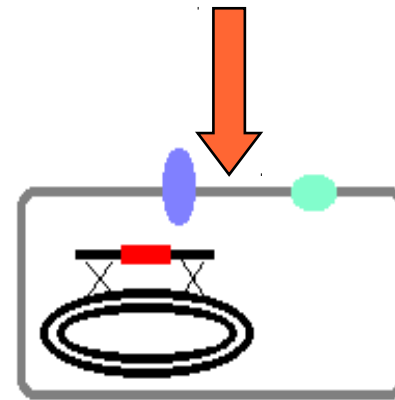
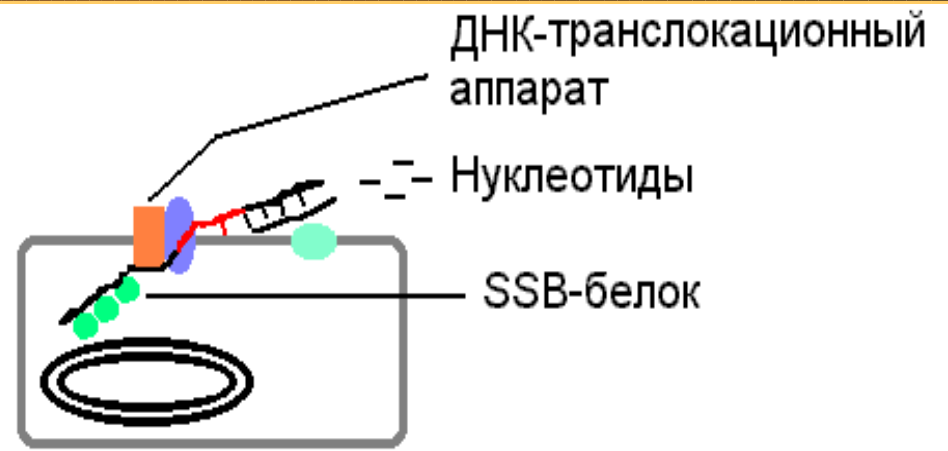


Однонитевая ДНК спаривается с гомологичной последовательностью ДНК реципиентной хромосомы

Рекомбинация однонитевой ДНК с бактериальной хромосомой



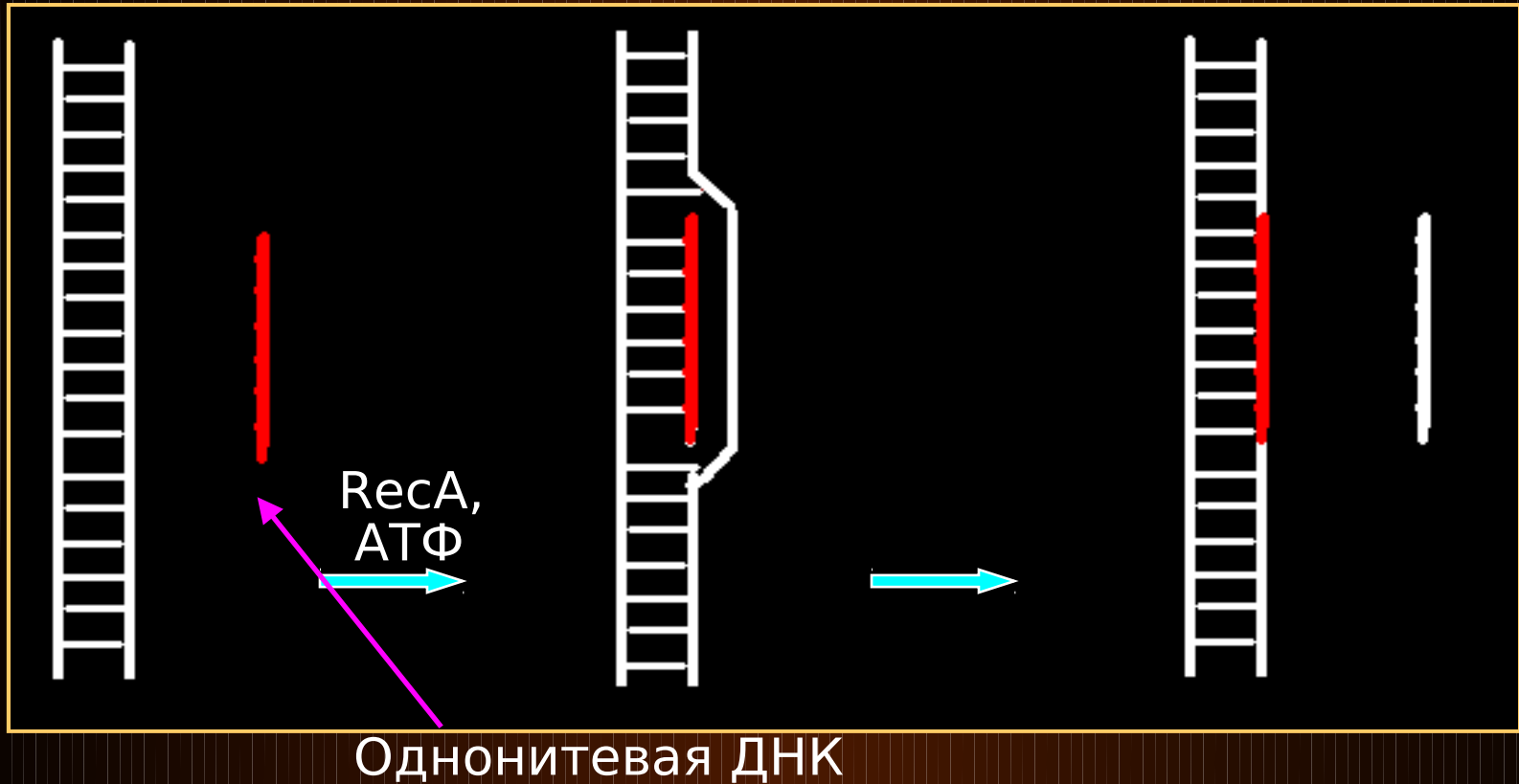
Трансформант  
(способен метаболизировать лактозу)



Рекомбинация  
однонитевой ДНК с  
бактериальной  
хромосомой

Трансформант  
(способен метаболизировать лактозу)

# Рекомбинация при трансформации



Рекомбинация осуществляется путем замещения одной из двух цепей реципиентного дуплекса на гомологичный фрагмент ДНК донора.

В результате образуется временный гетеродуплекс ДНК, который в дальнейшем подвергается коррекции, направленной на удаление некомплементарного основания.

# Трансформация E.coli плазмидной ДНК



# Конъюгация

● Конъюгация – процесс переноса плазмиды, а иногда и хромосомной ДНК из клетки-донора в клетку-реципиент при их непосредственном контакте или через мостик-подобное соединение.

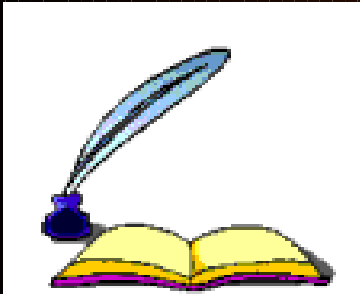
● Бактериальную конъюгацию часто некорректно рассматривают как бактериальный эквивалент полового размножения или скрещивания поскольку она включает обмен генетическим материалом.

● Однако бактериальная конъюгация – это просто перенос генов от одной бактерии к другой, в отличие от слияния гамет при половом размножении у высших организмов.

● Установлено, что бактерии могут конъюгировать не только с бактериями других видов, но также с дрожжами, клетками растений и млекопитающих\*.

\* Конъюгативный перенос Ti-плазмиды из *Agrobacterium tumifaciens* в растения, плазмид F и RP4 из *E. coli* в дрожжи, *Sacromyces cerevisiae*, плазмиды RP4 из *E. coli* в клетки яичника китайского хомячка.

- Иногда под **половым процессом** подразумевают не столько оплодотворение, сколько **любой обмен генетическим материалом**, не обязательно сопряженный с **размножением**. В этом случае к разновидностям **полового процесса** относят конъюгацию у бактерий, называемую также *парасексуальным процессом*.
- Поскольку при **трансформации** и **трансдукции** также происходит обмен генетическим материалом, то некоторые исследователи также относят их разновидностям **полового процесса** у бактерий.



## Рекомендуемая литература

*Алиханян С.И., Акифьев А.П., Чернин Л.С.*  
Общая генетика. М.:Высшая школа, 1985.

*Стент Г., Кэлиндар Р.* Молекулярная генетика.  
М.:Мир, 1981.

*Инге-Вечтомов С.Г.* Генетика с основами  
селекции. М.:Высшая школа, 1989.

# HORIZONTAL GENE TRANSFER IN PROKARYOTES: Quantification and Classification<sup>1</sup>

---

Eugene V. Koonin,<sup>1</sup> Kira S. Makarova,<sup>1,2</sup> and L. Aravind<sup>1</sup>

The availability of multiple prokaryotic genomes for comparative analysis ushered in the new age of “lateral genomics” (21). Dramatic differences in gene repertoires even among bacteria that belong to the same evolutionary lineage, such as *E. coli* and *Haemophilus influenzae* (106), indicated that genome evolution could not be reasonably described in terms of vertical descent alone. It is clear that much of the difference was attributable to differential gene loss, particularly in parasites, but horizontal gene transfer is the other major evolutionary factor that could help explain the emerging complex picture of prokaryotic genomes. The archaeal genomes presented a particularly striking “genomescape” Subsequently, high transformability has been demonstrated for a variety of microbial species (69). Moreover, bacteriophages and plasmids well known to cross-species barriers provide additional, potentially highly effective vehicles for horizontal gene transfer (42, 77, 101). Given the fact that microbes typically co-exist in tightly knit communities such as microbial mats and the microflora of animal intestines (49, 79, 93, 104, 111), it appears that opportunities should abound for DNA transfer by various means between diverse prokaryotes and potentially even between eukaryotes and prokaryotes, although in the latter case, the extra complication of getting rid of introns resident in eukaryotic genes is involved.