

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ по дисциплине
«Генетика микроорганизмов»

Направление подготовки
Направленность (профиль)

06.03.01 Биология
Генетика, селекция и биоинформатика

Ставрополь 2026 г.

1. Цель и задачи освоения дисциплины

Целью изучения данной дисциплины является формирование у обучающихся целостной системы фундаментальных знаний о принципах организации, функционирования и изменчивости генетического аппарата микроорганизмов (прокариот и микроскопических эукариот), а также развитие профессиональных компетенций, необходимых для использования микроорганизмов в качестве модельных объектов генетического анализа, инструментов геной инженерии и агентов биотехнологических процессов.

Для достижения поставленной цели в ходе изучения дисциплины необходимо решить следующие задачи:

- изучить особенности организации геномов бактерий, архей и микроскопических грибов (хромосома, плазмиды, мобильные генетические элементы, вирусные геномы);
- раскрыть молекулярные механизмы реализации генетической информации у микроорганизмов (репликация, транскрипция, трансляция) и специфику их регуляции (опероны, регулоны, глобальная регуляция);
- проанализировать механизмы генетической изменчивости: мутагенез, репарация ДНК, а также механизмы горизонтального переноса генов (трансформация, трансдукция, конъюгация);
- освоить современные представления о микроэволюции, популяционной генетике микроорганизмов и формировании резистентности к антимикробным препаратам;
- знать структуру и функциональную организацию геномов микроорганизмов; механизмы наследственности и изменчивости; методы генетической инженерии и редактирования генома;
- уметь планировать генетические эксперименты на микроорганизмах; анализировать данные секвенирования и ПЦР-диагностики.

2. Место дисциплины в структуре образовательной программы

Учебная дисциплина относится к вариативной части учебного плана профиля Б1.В.01 «Генетика микроорганизмов» и входит в модуль Б1.В.ДВ.3.

3. Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине, соотнесённых с планируемыми результатами освоения образовательной программы.

Код, формулировка компетенции	Код, формулировка индикатора	Планируемые результаты обучения по дисциплине (модулю), характеризующие этапы формирования компетенций, индикаторов
ПК-3.Способен использовать знания о биологическом разнообразии, эволюции и филогении растений, животных и микроорганизмов в профессиональной деятельности;	ИД-1 ПК 3 Использует знания о биологическом разнообразии, эволюции и филогении растений, животных и микроорганизмов в профессиональной деятельности; ИД-2 ПК 3 Планирует и проводит исследования анатомии, морфологии, физиологии, эволюции и филогении различных групп растений, животных и	Готовность решать задачи и реализовывать проекты в области биологии

	микроорганизмов; ИД-2 ПК 3 Планирует и проводит исследования анатомии, морфологии, физиологии, эволюции и филогении различных групп растений, животных и микроорганизмов; ИД-3 ПК 3 Самостоятельно работает с биологическими объектами, собирает гербарии, коллекции животных, пробы микроорганизмов	
ПК-4. Способен использовать в профессиональной деятельности знания о молекулярных механизмах основных генетических процессов	ИД-1 ПК 4 Использует в профессиональной деятельности знания о молекулярных механизмах основных генетических процессов ИД-2 ПК 4 Самостоятельно организует, планирует и реализует генетические и молекулярно-биологические исследования ИД-3 ПК-4 Владеет знаниями о структуре и функциях белков и нуклеиновых кислот, принципах и механизмах хранения и передачи, изменчивости, реализации и воспроизведения генетической информации; строении геномов разных организмов, структурно-функциональной организации генов и геномов. ИД-4 ПК-4 Владеет знаниями о современных методах редактирования генома ИД-5 ПК-4 Способен применять основные молекулярно-генетические и молекулярно-биологические методы исследований для решения задач профессиональной деятельности в области генетики и генетических технологий ИД-1 ПК 5 Способен квалифицированно использовать современное лабораторное оборудование,	Готовность решать задачи и реализовывать проекты в области биологии

	приборы и инструменты, применяемые в генетических технологиях, в том числе, в генетическом редактировании; ИД-2 ПК 5	
ПК-5. Способен использовать в профессиональной деятельности современное биологическое оборудование и биоинформационные технологии.	Способен использовать базовые знания фундаментальных разделов математики и биоинформатики в объеме, необходимом для обработки информации и анализа данных в соответствии с задачами генетики, геномики и генетических технологий	Готовность решать задачи и реализовывать проекты в области биологии Способность применять современные информационные технологии для решения задач профессиональной деятельности

4. Объем учебной дисциплины и формы контроля

Объем занятий: всего: 3 з.е. 108 астр.ч.	ОФО, в астр. часах
Контактная работа:	
Лекции/из них практическая подготовка	28.00
Лабораторных работ/из них практическая подготовка	56.00
Самостоятельная работа	24.00
Формы контроля	
Зачет	

5. Содержание дисциплины структурированное по темам (разделам) с указанием количества часов и видов занятий

№	Раздел (тема) дисциплины и краткое содержание	Формируемые компетенции, индикаторы	Очная форма		
			Контактная работа обучающихся с преподавателем /из них в форме практической подготовки, часов		
			Лекции	Практические занятия	Лабораторные работы
6 семестр					
1	История возникновения и развития генетики микроорганизмов. микроорганизмов.	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4	2		2

		ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5				
2	Генетика микроорганизмов и ее место в системе генетических дисциплин. Новые отрасли биологии и новые аспекты классических биологических наук, возникшие на основе генетики микроорганизмов. Особенности микроорганизмов, как объекта генетических исследований. Разрешающая способность генетического анализа микроорганизмов. Методы исследования генома	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5	2		2	
3	Строение клетки и особенности организации генетического аппарата прокариот (кольцевые и линейные хромосомы). Особенности организации генов прокариот. Регуляция экспрессии генов прокариот. Эукариотические микроорганизмы. Жизненные циклы классических объектов генетических исследований: грибов (дрожжей, аспергиллов, нейроспоры) и зеленых водорослей (хламидомонады).	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5	2		2 2	2
4	Особенности организации и регуляции генов эукариот. Экспрессия генов эукариот и прокариот	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5	2		2	2
5	Бактериофаги. Общая характеристика. Классификация. Жизненный цикл бактериофага. Основные методы фаготипирования.	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5	2		2 2	2
6	Механизмы копирования ДНК в клетках про- и эукариот. Ферменты репликации ДНК про- и эукариот. Выделение ДНК из биопроб.	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4	2		4	

		ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5				
7	Понятия «фенотип» и «генотип» у микроорганизмов. Доказательства мутационной природы изменчивости у микроорганизмов. Спонтанный и индуцированный мутагенез. Прямые и обратные мутации. Различия в частотах образования разных типов мутаций и их причины. Современные представления о мутационной и модификационной изменчивости микроорганизмов. Молекулярные механизмы генных, хромосомных и геномных изменений. Методы выделения мутантов. Типы мутационных изменений у грибов, водорослей, бактерий и бактериофагов, используемые в генетических исследованиях (морфологические, устойчивости к антибиотикам, чувствительности к мутагенным факторам, ауксотрофные, условно летальные. Методы направленного мутагенеза для создания генномодифицированных микроорганизмов для практического использования. Мутационный процесс как фактор эволюции микроорганизмов.	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5	2		2	2
8	Системы репарации и ее механизмы. Гомологичная рекомбинация как способ генетического обмена у микроорганизмов. Частоты рекомбинационных событий и способы их выявления у про- и эукариотических организмов. Тетрадный анализ и генетическое картирование генов. Картирование генов с использованием тетрадного анализа. Молекулярные механизмы конверсии генов. Тетрадный анализ. Особенности тетрадного анализа при упорядоченном и неупорядоченном расположении спор в тетрадах. Роль тетрадного анализа в установлении классических постулатов генетики (чистота аллеля, прохождения кроссинговера на уровне четырех хроматид, генная конверсия). Анализ закономерностей наследования признаков при моногибридном и дигибридном скрещиваниях у дрожжей. Анализ сцепленного наследования признаков у дрожжей. Анализ митотического расщепления (на примере мицелиальных грибов).	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5	2		2	2
9	Способы переноса генетического материала у бактерий. Трансформация. Открытие эффекта.	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3	2		2	4

	Конъюгация. Открытие конъюгации у <i>Escherichia coli</i> и особенности этого процесса. Сексдукция. Перенос хромосомы при конъюгации. Мерозиготы. Частота переноса и частота включения маркеров. Методы картирования хромосомы при конъюгации. Сайт-специфическая рекомбинация. Лизогения и фаговая конверсия. Лизогенные бактерии и их свойства, индукция фага в лизогенных культурах, иммунитет. Профаг, его функции в клетке, механизм интеграции в хромосому и исключение. Специфическая и неспецифическая трансдукция. Особенности и механизмы. Использование специфической трансдукции при генетическом анализе у бактерий. Возможности генетического картирования при неспецифической трансдукции.Abortивная трансдукция. Трансдукция у разных видов бактерий Перенос генетического материала и генетическое картирование у актиномицетов. Конъюгация у актиномицетов; конъюгативные плазмиды. Половые типы актиномицетов, их сходство и различия с половыми типами кишечной палочки.	ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5			2	
					2	
					2	
10.	Внехромосомные генетические системы. Цитоплазматические системы эукариотических микроорганизмов: хлоропласты водорослей и митохондрии грибов. Мутации генов хлоропластов хламидомонады и митохондрий дрожжей и методы их выделения. Генетические карты хлоропластов и метод их построения (на примере хламидомонады). Генетические методы картирования митохондриального генома (на примере дрожжей-сахаромицетов): делеционный метод, картирование полярного района.	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5	2		4	
11.	Плазмиды. Бактериальные плазмиды, их классификация и фенотипические признаки. Репликация плазмид. Использование плазмид в генетическом анализе у бактерий. Методы генетического анализа плазмидной ДНК. Трансформация плазмидной ДНК. Биологическое значение плазмид и их роль в эволюции бактерий. Плазмиды актиномицетов. Плазмиды дрожжей-сахаромицетов: двухмикронная и трехмикронная ДНК. Плазмиды мицелиальных грибов. Плазмиды -	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5	2		4	2

	векторы биотехнологии.					
12.	Мигрирующие генетические элементы микроорганизмов. Инсерционные последовательности (Is) и транспозоны (Tp) бактерий. Классификация и структура. Механизмы транспозиции. Генетические эффекты, вызываемые внедрением в геном мигрирующих элементов: регуляторная роль и индукция мутаций, геномные перестройки. Конъюгативные транспозоны. Геномные острова. Интегроны. Бактериофаг Ми. Строение вириона и генома, упаковка фага. Цикл развития. Механизм интеграции в бактериальный геном. Последствия интеграции Ми в геном бактерий: мутагенез, геномные перестройки, транспозиция с помощью Ми хромосомных генов и плазмид. Возможности использования Ми в генетических экспериментах. Мигрирующие элементы дрожжей. Ту-элемент, его структура и способ внедрения в ДНК-мишень. Генетические эффекты, вызываемые внедрением в геном Ту-элементов: регуляторная роль и индукция мутаций, геномные перестройки. Возможные механизмы возникновения мобильных генетических элементов и их роль в эволюции бактерий.	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5	2		2	4
13.	Молекулярно-генетические методы	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5	2		4	2
14.	Генетические аспекты селекции микроорганизмов. Микроорганизмы, используемые в селекционной работе. Особенности микроорганизмов как объектов селекционной работы. Основные направления и методы селекции микроорганизмов: использование естественной изменчивости; искусственный отбор, основанный на селекции спонтанных мутаций; искусственный отбор с применением мутагенных факторов; возможности использования гибридизации; генная инженерия и селекция.	ИД-1 ПК 3 ИД-2 ПК 3 ИД-3 ПК 3 ИД-1 ПК 4 ИД-2 ПК 4 ИД-3 ПК-4 ИД-4 ПК-4 ИД-5 ПК-4 ИД-1 ПК 5 ИД-2 ПК 5	2		4	2

	ИТОГО за 6 семестр		28,0		56,0	2
	ИТОГО		28,0		56,0	2

СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. ИСТОРИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РАЗВИТИЯ ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ.

Цель работы: ознакомиться с основными этапами становления и развития генетики микроорганизмов как научной дисциплины; выявить ключевые открытия, ученых и эксперименты, определившие её развитие; сформировать представление о месте микробной генетики в современной биологии и биотехнологии.

Ход работы:

Теоретическая часть

Генетика микроорганизмов - раздел генетики, изучающий наследственность и изменчивость бактерий, архей, вирусов, дрожжей и других микроорганизмов. Благодаря простоте строения, короткому времени генерации, возможности культивирования в контролируемых условиях и высокой частоте мутаций, микроорганизмы стали идеальными модельными объектами для изучения фундаментальных генетических закономерностей.

Этапы развития генетики микроорганизмов:

1. Донаучный период и предпосылки (до начала XX века)

- Открытие микроорганизмов Антони ван Левенгуком (1676 г.).
- Работы Л. Пастера (середина XIX в.) по брожению и болезням, заложившие основы микробиологии.
- Исследования Р. Коха, установившего связь между микроорганизмами и болезнями («постулаты Коха», 1884 г.).
- Открытие феномена трансформации Д. Гриффитом (1928 г.): у мышей *Streptococcus pneumoniae* неживая «гладкая» (вирулентная) форма передавала свойство вирулентности живой «шероховатой» (непатогенной). Это первое указание на существование «трансформирующего принципа» - будущей ДНК.

2. Зарождение микробной генетики (1940–1950-е гг.)

- Эксперимент О. Эйвери, К. Маклеода и М. Маккарти (1944 г.): идентификация ДНК как «трансформирующего принципа».
- Открытие конъюгации у *Escherichia coli* Дж. Ледербергом и Э. Тейтумом (1946 г.) - первое доказательство полового процесса у бактерий.
- Открытие трансдукции Дж. Зиндером и Дж. Ледербергом (1952 г.) на *Salmonella*.

Исследования А. Херши и М. Чейза (1952 г.): эксперимент с фагом T2 подтвердил, что ДНК - носитель наследственной информации.

3. Молекулярная революция (1950–1970-е гг.)

- Структура ДНК (Уотсон, Крик, Ф.Крик и Р. Франклин, 1953 г.).
- Открытие оперонной модели регуляции генов Ж. Моно и Ф. Жакобом (1961 г.) на *E. coli*.
- Расшифровка генетического кода (Г. Корана, М. Ниренберг и др., 1960-е гг.).
- Открытие рестрикционных эндонуклеаз и ДНК-лигаз, что открыло эру рекомбинантной ДНК (1970 г.).

4. Современный этап (с 1980-х гг. по настоящее время)

- Развитие методов секвенирования ДНК (Сэнгер → NGS → долгое секвенирование).
- Проекты по секвенированию геномов микроорганизмов (первый - *Haemophilus influenzae*, 1995 г.).

- CRISPR-Cas как система редактирования генома, изначально открытая у бактерий как система адаптивного иммунитета.
- Появление синтетической биологии (создание синтетического генома *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0, 2010 г.).

Задание 1. Заполнить хронологическую таблицу ключевых событий, указав год, ученого(ых), открытие и его значение для генетики:

Год	Ученый	Открытие	Значение
1928	Гриффит		
1944	Эйвери и др.		
1946	Ледерберг и Тейтум		
1952	Херши и Чейз		
1961	Жакоб и Моно		
1970	Арбер, Смит, Натанс		
2012	Дудна, Шарпантье		
2018	Разные исследовательские группы		
2019	Анцалоне и др. (лаборатория Дэвида Лю)		
2022	Сванте Паабо		
2024	Виктор Эмброс (Victor Ambros) и Гэри Равкун		

Задание 2. Анализ классического эксперимента (на выбор)

Опишите один из следующих экспериментов:

Гриффит (1928)

Ледерберг и Тейтум (1946)

План описания:

1. Цель эксперимента
2. Используемые объекты и методы
3. Результаты
4. Выводы и значение

Задание 3. Применение микробной генетики в современной науке и практике

Приведите по 2 примера использования достижений микробной генетики в:

Медицине:

Производство рекомбинантных белков (инсулин, гормон роста).

Разработка живых векторных вакцин (на основе аттенуированных штаммов *Salmonella*).

Биотехнологии:

Создание штаммов-продуцентов антибиотиков, ферментов, биопластиков.

Биоремедиация - штаммы для деградации нефти, пестицидов.

Фундаментальной науке:

Использование *E. coli* и фагов как модельных систем для изучения репликации, транскрипции, трансляции.

Исследования CRISPR в бактериях → инструмент геномного редактирования.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2.

ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ И ЕЕ МЕСТО В СИСТЕМЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДИСЦИПЛИН. НОВЫЕ ОТРАСЛИ БИОЛОГИИ И НОВЫЕ АСПЕКТЫ КЛАССИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК, ВОЗНИКШИЕ НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ. ОСОБЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, КАК ОБЪЕКТА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МИКРООРГАНИЗМОВ. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНОМА МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучить генетику микроорганизмов, их особенности, методы исследования генома.

Ход работы:

Теоретическая часть

Место генетики микроорганизмов в системе генетических дисциплин

Генетика микроорганизмов - раздел общей генетики, изучающий закономерности наследственности и изменчивости у прокариот (бактерий, архей) и низших эукариот (дрожжей, плесневых грибов, простейших). Она занимает центральное место в современной генетике благодаря:

- простоте геномной организации микроорганизмов;
- высокой скорости размножения;
- возможности проведения количественных экспериментов на больших популяциях;
- универсальности молекулярно-генетических механизмов (репликация, транскрипция, трансляция), сходных у всех живых организмов.

Наиболее интенсивно изучаемый вид в генетике микроорганизмов – это нормальный обитатель кишечника человека *Escherichia coli*. Данная бактерия легко культивируется в жидкой питательной среде, содержащей некоторые соли и простой источник углерода, например глюкозу. Из этих соединений *E.coli* способ на синтезировать все сложные органические молекулы, образующие клетку. За сутки культивирования популяция, возникшая из одной-единственной клетки *E.coli*, может достигнуть $2 \cdot 3 \cdot 10^9$ бактерий на 1 мл среды.

Полученную культуру засевают на чашку Петри с питательной средой. После инкубации бактерии начинают быстро делиться и дают на агаре колонии, которые являются потомками единственной микробной клетки. Отсюда можно получить чистую культуру любой мутантной бактерии, присутствовавшей в исходной бактериальной взвеси.

Помимо экспериментов на бактериях, существенный вклад в генетику внесли исследования с помощью бактериофагов – вирусов бактерий. Заражая фагом (в том числе – и с измененным геномом) чувствительную культуру микроорганизмов, можно получить большую популяцию фаговых частиц. После инкубации бактерии, размножаясь, образуют на агаре сплошной газон клеток. В местах, инфицированных бактериофагом, образуются негативные колонии или бляшки. При определенных условиях каждая негативная колония на бактериальном газоне содержит потомство одной индивидуальной частицы фага. Тем самым осуществляется накопление генетического материала фага для его последующего изучения.

Генетика микроорганизмов легла в основу молекулярной генетики, генной инженерии, биотехнологии и современных методов геномики.

Разрешающая способность генетического анализа микроорганизмов

Под **разрешающей способностью** генетического анализа понимают способность выявлять и различать мутации на молекулярном уровне. У микроорганизмов она особенно высока благодаря:

- возможности анализа отдельных клеток и их потомков;
- использованию селективных и дифференциальных сред для идентификации мутантов;
- применению методов replica-plating (метод реплик), позволяющих одновременно анализировать тысячи колоний;
- высокой частоте спонтанных и индуцированных мутаций;
- возможности точного картирования генов с использованием рекомбинации и секвенирования.

Задание 1. Анализ особенностей микроорганизмов как генетических объектов. Заполните таблицу, сравнивая бактерии (например, *E. coli*) и высшие эукариоты (например, *Drosophila melanogaster*) по следующим параметрам:

Параметр	Бактерии <i>E. coli</i>	Эукариоты <i>Drosophila melanogaster</i>
Тип клетки		
Наличие ядра		
Органеллы		
Геном		
Интроны		
Репликация ДНК		
Деление клетки		
Скорость размножения		
Метаболизм		
Клеточная стенка		
Наследственность		

Сделайте вывод о преимуществах микроорганизмов для генетического анализа.

Задание 2. Моделирование разрешающей способности генетического анализа

Рассмотрите следующий эксперимент Ледербергов (1952) с replica-plating:

- На чашку Петри с питательной средой нанесли разведённую культуру *E. coli* и получили изолированные колонии.

- С помощью вельюрового тампона отпечатали (реплицировали) колонии на несколько чашек с минимальной средой и средой с антибиотиком (например, стрептомицином).

- На контрольной чашке выросли все колонии, а на селективных - только устойчивые мутанты.

Вопросы:

1. Почему метод replica-plating позволяет отличить спонтанные мутации от индуцированных?

2. Какова разрешающая способность этого метода?

3. Почему этот эксперимент стал доказательством случайного характера мутаций?

1. Почему метод replica-plating позволяет отличить спонтанные мутации от индуцированных?

Метод реплика-посева позволяет сохранить пространственное расположение колоний с исходной чашки на множестве селективных чашек. Это позволяет отследить происхождение устойчивых колоний.

Если мутации спонтанные (происходят до контакта с антибиотиком), то резистентные колонии уже существуют на исходной чашке до переноса на селективную среду. Их положение будет совпадать между основной и реплицированной чашками.

Если мутации индуцированные (вызваны действием антибиотика), то резистентные колонии появляются только после попадания на среду с антибиотиком, и их расположение будет случайным, не совпадающим с исходной чашкой.

В эксперименте Ледербергов устойчивые колонии появлялись на тех же позициях на репликах, что и на исходной чашке — даже если антибиотик не присутствовал при первоначальном росте. Это доказывает, что мутации возникли случайно и заранее, а не под действием селективного агента.

2. Какова разрешающая способность этого метода?

Разрешающая способность метода replica-plating - это способность обнаружить редкие мутанты в общей популяции.

- Метод позволяет одновременно тестировать **тысячи колоний** (обычно до 10^3 – 10^4 колоний на чашку).
- Чувствительность зависит от плотности посева: чем больше изолированных колоний можно получить и реплицировать, тем ниже частоту мутаций можно зарегистрировать.
- Практически, метод способен выявлять мутантов с частотой до 10^{-6} - 10^{-8} , что достаточно для большинства исследований спонтанного мутагенеза.

Таким образом, разрешающая способность метода - **высокая**, особенно в контексте выявления редких устойчивых мутантов среди чувствительной массы.

3. Почему этот эксперимент стал доказательством случайного характера мутаций?

До эксперимента Ледербергов существовала гипотеза **Ламарка**, согласно которой организмы могут **направленно** изменяться под действием среды (т.е. антибиотик "индуцирует" появление устойчивости у тех, кто в ней нуждается).

Результаты реплика-посева **опровергли** это:

- Устойчивые колонии находились **в тех же позициях**, что и на исходной чашке, выращенной **без антибиотика**.
- Это означает, что мутации возникли **до контакта** с антибиотиком, **случайно**, независимо от селективного давления.
- Среда лишь **отбирает** уже существующие мутанты, а **не вызывает** их появление.

Таким образом, эксперимент Ледербергов стал прямым доказательством ненаправленного, спонтанного характера мутаций и подтвердил основы дарвиновского отбора на молекулярном уровне.

Задание 3. Решить задачу

Задача:

В опыте по определению частоты спонтанных мутаций к резистентности к ампициллину у *E. coli* в 1 мл исходной культуры (10^8 клеток/мл) было обнаружено 50 мутантных колоний на чашке с ампициллином. Рассчитайте частоту мутаций. Сравните с типичной частотой мутаций у высших организмов. Сделайте вывод о разрешающей способности микроорганизмов как объектов генетического анализа.

Методы исследования генома микроорганизма

Генетический анализ состоит в экспериментальном изучении отношений, существующих между бактериями (мутантами). Для определения этих отношений используют два основных приема:

- 1) рекомбинационный - определяет пространственное расположение генов (или мутаций) на генетической карте, т.е. картирование генома;
- 2) комплементационный - определяет функциональные отношения генов (или мутантов).

Бактерии, способные к быстрому размножению, дают возможность затрачивать на эксперимент сравнительно небольшое время. Кроме того, методы отбора мутантов или рекомбинантов просты и доступны. Основным прием отбора - применение набора минимальных сред (например, с одной аминокислотой) в сочетании с посевом штампом-репликатором. Такой метод позволяет установить характер мутации (или рекомбинации) и расположение соответствующего гена на генетической карте. Наиболее часто применяются следующие методы картирования:

- 1) с помощью прерванной конъюгации (с посевом микробов на минимальные среды через определенные интервалы времени в процессе конъюгации);
- 2) с помощью трансдукции (т.е. с помощью фага);
- 3) с помощью трансформации (после искусственного разрушения бактерий-доноров изучают характер изменений бактерий-реципиентов).

Генетический анализ может проводиться и с помощью ДНК-(РНК)-зондов в реакции гибридизации. Этот метод важен не только с теоретической точки зрения, но и с практической - как наиболее специфичный метод идентификации микробов и вирусов.

ДНК-(РНК)-зонд - это одноцепочечный радиоактивно меченный (^{32}P и др.) фрагмент ДНК (РНК). Эти фрагменты нуклеиновых кислот получают: а) при рестрикции (расщеплении молекулы на две цепочки) участка ДНК (РНК) известных микроорганизмов, б) путем химического синтеза. Реакция гибридизации состоит из следующих этапов:

- 1) разрушение исследуемых микробов, денатурация и рестрикция ДНК (нужны одноцепочечные участки) и фиксация на полимерной пленке;
- 2) внесение ДНК-зонда. Если зонд комплементарен с ДНК исследуемых микробов, то произойдет связывание, т.е. гибридизация, несвязавшиеся зонды удаляют промыванием;
- 3) учет результатов - с помощью автордиографии.

Другой важной реакцией, основанной на методах генной инженерии является цепная полимеразная реакция (ЦПР), применяемая в медицинской микробиологии, вирусологии, иммунологии. Сущность метода заключается в получении из материала от больного не микроорганизма, а одноцепочечных фрагментов генома (ДНК), его биосинтезе с последующей идентификацией видоспецифических фрагментов молекулярно-генетическими методами. Биосинтез осуществляют в специальных физико-химических условиях. Реакционная смесь содержит матрицу (одноцепочечный фрагмент ДНК исследуемого возбудителя), нуклеотиды, праймеры (т.е. участки ДНК, с которых начинается биосинтез), фермент полимеразу. В результате ЦПР образуются копии ДНК исследуемых микроорганизмов, которые можно идентифицировать в реакции гибридизации.

**ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3 (1).
СТРОЕНИЕ КЛЕТКИ И ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ
ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ПРОКАРИОТ (КОЛЬЦЕВЫЕ И ЛИНЕЙНЫЕ
ХРОМОСОМЫ). ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОВ ПРОКАРИОТ.
РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОКАРИОТ**

Цель работы: изучить строение клеток прокариот и эукариот с помощью микроскопа.

Ход работы:

Оборудование и материалы: световой микроскоп, предметные стекла, стеклянные палочки, пинцет, препараты бактерий, эпителии клеток, эпидермы лука, клетки грибов, образцы животных клеток.

Теоретическая часть

Прокариоты – или доядерные одноклеточные живые организмы, не обладающие (в отличие от эукариота) оформленным клеточным ядром и другими внутренними мембранными органоидами (такими как митохондрии или эндоплазматическая сеть за исключением плоских цистерн у фотосинтезирующих видов, например, у цианобактерий).

Прокариоты не развиваются и не дифференцируются в многоклеточную форму. Некоторые бактерии растут в виде волокон или клеточных масс, но каждая клетка в колонии одинакова и способна к самостоятельной жизни.

Задание 1. Заполнить таблицу «Изучение строения клеток прокариот».

Структура	Состав	Свойства, функции
Клеточная стенка		
Клеточная мембрана		
Ядерная зона		
Рибосомы		
Запасающие гранулы		
Цитозоль (жидкий матрикс)		

Задание 2. Зарисовать схематичное строение прокариотической клетки.

Задание № 3. Сравнить клетки прокариот и эукариот.

Признаки	Прокариоты	Эукариоты		
		Растения	Животные	Грибы
ДНК				
Хромосомы				
Поверхностный аппарат клетки				
Рибосомы				
Клеточный центр				
Вакуоли				
Лизосомы, ЭПС, митохондрии				
Пластиды				
Запасной углевод				

Задание 4. Изучить информацию об особенностях организации наследственного материала у прокариот. Регуляция работы генов у прокариот.

Наследственный материал прокариотической клетки содержится в единственной кольцевой молекуле ДНК. Она располагается непосредственно в цитоплазме клетки,

полимераза разрывает связи между двумя цепочками ДНК, и на одной из них по принципу комплементарности начинается синтез иРНК, которая переносит информацию в рибосомы для синтеза ферментов, разлагающих индуктор. Когда последние молекулы индуктора будут разрушены, освобождается белок-репрессор, который снова блокирует ген-оператор (работа оперона прекращается).

Для каждого оперона имеется свой специфический индуктор (например, для лактозного оперона индуктором является лактоза).

Задание 5. Дискуссионные вопросы

1. Почему у прокариот преобладает транскрипционная регуляция, а не посттранскрипционная?
2. Какие эволюционные преимущества даёт организация генов в опероны?
3. Чем регуляция у архей отличается от бактерий? (Приведите 1–2 примера.)

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3 (2).

ЖИЗНЕННЫЕ ЦИКЛЫ КЛАССИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ: ГРИБОВ (ДРОЖЖЕЙ, АСПЕРГИЛЛОВ) И ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ (ХЛАМИДОМОНАДЫ)», БАКТЕРИЙ.

Цель работы: Изучить особенности строения и жизненных циклов эукариотических микроорганизмов, используемых в генетических исследованиях: дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), аспергиллов (*Aspergillus nidulans*) и зелёной водоросли хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii*). Сравнить их жизненные циклы с точки зрения наличия гаплоидных и диплоидных стадий, способов размножения и генетической изменчивости.

Ход работы:

Оборудование: Микроскоп, препараты (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Chlamydomonas reinhardtii*), наглядный материал.

Теоретическая часть

1. Общие принципы жизненных циклов эукариот

Жизненный цикл - чередование фаз гаплоидного (n) и диплоидного (2n) набора хромосом. В зависимости от того, какая фаза преобладает, выделяют:

- Гаплонтный цикл (преобладает гаплоидная фаза, диплоидная - только зигота, например, *Chlamydomonas*),
- Диплонтный цикл (преобладает диплоидная фаза, гаплоидные - гаметы, например, человек),
- Гапло-диплонтный (чередование гаплоидных и диплоидных поколений, как у высших растений и некоторых грибов).

Особый интерес представляют организмы, способные к вегетативному размножению в обеих фазах (например, дрожжи), что делает их удобными для генетического анализа. Среди них важное место в генетике занимают и зелёные водоросли (например, хламидомонада). Эти организмы широко используются в качестве модельных объектов благодаря:

- простоте культивирования;
- короткому жизненному циклу;
- генетической «прозрачности» (легко проводить скрещивания и анализировать потомство);
- высокой степени консервативности основных клеточных процессов по сравнению с высшими эукариотами.

Задание 1. Изучить общую характеристику грибов и их жизненных циклов (дрожжей, аспергиллов, хламидомонады).

1.1 Жизненные циклы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

У дрожжей половой процесс обычно представляет собой слияние гаплоидных, обычно неспециализированных соматических клеток (соматогамия). При этом сначала объединяется цитоплазма клеток (плазмोगамия) и образуется двуклеточная клетка. Затем

происходит объединение ядер (кариогамия) с образованием диплоидной клетки. Диплоидные клетки способны к мейотическому делению с восстановлением гаплоидного состояния.

Для дрожжей характерны сложные жизненные циклы, при которых возможно бесполое размножение в гаплоидном (гаплоидные дрожжи), диплоидном (диплоидные дрожжи) и в обоих (гапло-диплоидные дрожжи) состояниях. Многие виды дрожжей известны только в бесполом состоянии, половой цикл у них либо происходит в специфических условиях, либо вообще утерян в ходе эволюции.

Saccharomyces cerevisiae - пекарские дрожжи

- **Фазы:** гаплоидная ($n = 16$) и диплоидная ($2n = 32$).
- **Тип цикла:** гапло-диплонтный с возможностью вегетативного размножения в обеих фазах.
- **Гаплоидные клетки:** двух типов спаривания - a и α (определяются аллелями локуса *MAT*). Размножаются почкованием.
- **Спаривание:** при встрече клеток типов a и α происходит слияние (плюгамия и кариогамия) → образуется диплоидная зигота.
- **Диплоидные клетки:** также размножаются почкованием. При дефиците азота и углерода - вступают в мейоз → формируют аск (мешок) с 4 гаплоидными спорами (2 типа a и 2 типа α).
- **Генетическая значимость:**
 - Возможность прямого наблюдения сегрегации признаков у спор (тетрадный анализ).
 - Легко получать гомозиготные/гетерозиготные штаммы.



Изучение дрожжей под микроскопом

1. Нанесите каплю дрожжевой суспензии на предметное стекло. (Приготовьте дрожжевую суспензию в небольшом стакане, **размешав пакетик сухих дрожжей в 50 мл воды**. Добавьте в чашку Петри столько раствора сахарозы, чтобы закрыть дно. Перемешайте исходную дрожжевую суспензию).
2. Добавьте каплю метиленового синего для окрашивания.
3. Накройте покровным стеклом.
4. Рассмотрите под микроскопом при увеличении $\times 100$ и $\times 400$.
5. Зарисуйте клетки, отметьте почкующиеся формы.

1.2. Жизненные циклы аспергиллов *Aspergillus nidulans*

Aspergillus это многоклеточный гриб с разветвлённым мицелием. Широко распространён в природе; некоторые виды используются в биотехнологии (например, *A. niger* для получения лимонной кислоты), другие - возбудители заболеваний.

Как и у многих организмов царства грибов, грибы, принадлежащие к роду Аспергиллы в своем жизненном цикле имеют как **половое** размножение, так и **бесполое** размножение.

Бесполое размножение

Чаще всего у этих грибов наблюдается бесполое размножение. Он вырабатывается бесполоыми спорами, известными как **конидии**. Они растут на концах фиалидов. Конидии высвобождаются и переносятся ветром. Когда он падает на субстрат, если условия окружающей среды по влажности и температуре идеальны, они начинают прорастать. Первоначально первая структура, которая формируется, представляет собой зародышевую трубку, которая в конечном итоге превращается в новый мицелий.

- Основной путь — бесполое размножение: мицелий → конидиеносец → конидии → прорастание в новый мицелий.

Половое размножение

С другой стороны, половое размножение у этих грибов крайне редко и наблюдается у очень немногих видов, таких как *Aspergillus fumigatus*. Большинство грибов этого рода гомоталлические. Это означает, что мужские и женские половые органы находятся в одном мицелии и даже образованы из одной гифы. Оба органа имеют удлиненную форму, многоядерные и имеют тенденцию обертываться друг вокруг друга.

Женский половой орган делится на три части: конечный сегмент, известный как трихогин, который функционирует как рецептивная часть. Следующий сегмент известен как аскогониум, и под ним находится стебель. Точно так же мужской половой орган, полинодий, может расти в той же гифе или в соседней гифе. У него на конце одноклеточный антеридий. Слияние гамет или плазмोगамия происходит, когда кончик антеридия наклоняется над трихогином и сливается с ним. Отсюда образуются аскогенные гифы, которые начинают ветвиться, образуя другую структуру, известную как аскокарп, который у грибов рода *Aspergillus* является полым и замкнутым и называется **клеистотецием**. Внутри клеистотеция образуются аски, которые, в свою очередь, содержат так называемые аскоспоры. Там аскоспоры свободны, питаются находящейся там питательной жидкостью. Наконец, когда они полностью созреют, их отпускают. Попадая в субстрат, они прорастают, давая начало новому мицелию.

Фазы: преобладает **гаплоидная** ($n = 8$), диплоидная фаза кратковременна.

Бесполое размножение: конидии (гаплоидные) образуются на конидиеносцах.

Половое размножение:

- Гаметангии (гаплоидные гифы) разных типов совместимости (не морфологически различимы - **гомоталлический** вид).
- Слияние → дикариотическая стадия → кариогамия → диплоидная зигота в аскогонии.
- Зигота сразу вступает в мейоз → образуется **аск** с 8 аскоспорами (включая постмейотическое деление).

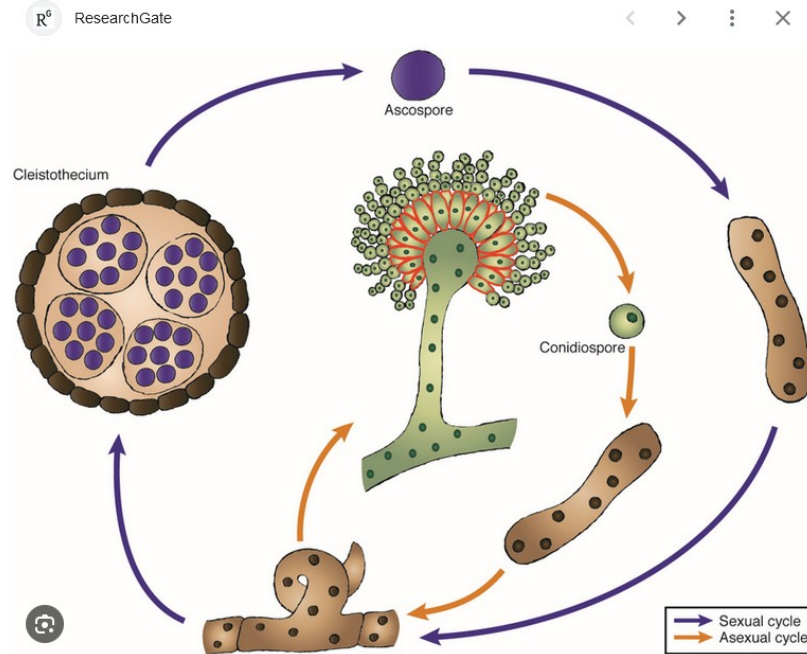
Особенности:

- Возможность получения **диплоидных штаммов** в лаборатории (путём подавления мейоза мутациями, например, *dipA*).
- Используется для анализа генного сцепления, комплементации, митотического кроссинговера.

Изучение *Aspergillus* под микроскопом

1. Возьмите готовый микропрепарат или приготовьте его, соскоблив мицелий с поверхности агаровой среды.
2. Рассмотрите под микроскопом.
3. Обратите внимание на структуру конидиеносца и конидий.

4. Зарисуйте характерную «метёлочную» структуру спороносного аппарата.



1.3 Жизненный цикл зеленых водорослей (хламидомонады) *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii - одноклеточная зелёная водоросль

Бесполое размножение. При благоприятных условиях (летом) размножается бесполом путем с помощью зооспор. Хламидомонада (n) дважды делится митотически без разрыва материнской оболочки, в результате образуются 4 клетки (n). Они растут, у каждой из них развивается жгутик, появляется глазок и клеточная стенка. С течением времени материнская оболочка, окружающая клетки, разрывается, и зооспоры выходят во внешнюю среду. Из каждой зооспоры развивается взрослая клетка.

Половое размножение. Рассмотрим изогамный половой процесс, при котором гаметы не отличаются по строению, внешнему виду, одинаково подвижны. Половое размножение активируется при наступлении неблагоприятных условий (пересыхание водоема, понижение температуры внешней среды). Внутри хламидомонады (n) путем митоза образуются половые клетки - гаметы (n). Запомните, что в половом размножении всегда участвуют половые клетки ;) Гаметы (n) разных хламидомонад попарно сливаются, в результате чего образуется зигота ($2n$), которая покрывается плотной защитной оболочкой - цистой. При благоприятных условиях зигота ($2n$) делится мейозом, по итогам которого образуются 4 хламидомонады (n).

Фазы: гаплонтный цикл (вегетативные клетки - гаплоидные, $n = 17$).

Бесполое размножение: митотическое деление (до 16 дочерних клеток в материнской оболочке).

Половое размножение:

- При стрессе (дефицит азота) гаплоидные клетки дифференцируются в **гаметы** двух типов спаривания - mt^+ и mt^- .
- Гаметы сливаются (агглютинация → плюгамия → кариогамия) → образуется **диплоидная зигота**.
- Зигота покрывается толстой стенкой, входит в стадию покоя.
- При благоприятных условиях - мейоз → 4 гаплоидные мейоспоры (по 2 каждого типа спаривания).

Генетическая значимость:

- Простота получения зигот и тетрад.

- Хлоропласт и митохондрии наследуются **унипарентально** (от mt^+ родителя - ядерные гены от обоих).

- Модель для изучения фотосинтеза, жгутиков, внутриклеточного транспорта.

Chlamydomonas (для сравнения)

Жизненный цикл *Chlamydomonas*:

- В благоприятных условиях - митотическое деление (гаплоидные клетки).
- При неблагоприятных условиях - образование гамет → слияние → зигота ($2n$) → мейоз → 4 гаплоидные клетки.

Изучение *Chlamydomonas* под микроскопом

1. Поместите каплю культуры *Chlamydomonas* на предметное стекло.
2. Накройте покровным стеклом.
3. Рассмотрите под микроскопом при $\times 400$.
4. Обратите внимание на форму клетки, наличие жгутиков, хлоропласта и глазка (стигмы).

Зарисуйте жизненный цикл хламидомонады. (Наглядный материал бесполое и половое размножение).



Задание 4. Таблица сравнения

Параметр	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (дрожжи)	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Преобладающая фаза			
Спаривание			
Зигота			
Споры в аске/после мейоза			
Возможность тетрадного анализа			

Задание 5. Написать выводы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4.

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ ЭУКАРИОТ.

Цель работы: изучить основные особенности организации и регуляции генов эукариот.

Ход работы:

Теоретическая часть

Особенности регуляции работы генов у эукариот:



Так как процесс реализации наследственной информации у эукариот многоступенчатый (транскрипция, процессинг, трансляция, посттрансляционные процессы) и растянутый во времени, то регуляция тонкой работы генов осуществляется на каждом из этапов:

1. На этапе транскрипции:

- Транскриптон – единица регуляции активности гена.
- Наличие множества **генов-регуляторов**, синтезирующих большое количество белков-регуляторов.

Такие гены располагаются в разных частях генома.

- Наличие генов-регуляторов, ускоряющих (**энхансеры**) и тормозящих (**сайленсеры**) транскрипцию.
- Наличие генов-регуляторов, которые могут управлять несколькими генами, оказывая различные эффекты.
- Индукторами транскрипции чаще всего выступают гормоны.
- Наличие гистонной регуляции – потеря связи ДНК с гистоном H1 инициирует транскрипцию.

2. На этапе процессинга:

- Альтернативный сплайсинг.
- Интроны могут кодировать фермент (матюраза), который вырезает интроны и сшивает экзоны, следовательно, отвечает за правильность сплайсинга.

3. На этапе трансляции:

- На стадии инициации возникает блок, препятствующий связи и-РНК—т-РНК—формилметионин.

В результате транскрипция не происходит.

4. На этапе посттрансляционных процессов:

- Активной формы молекулы белка не образуется.

Антимутационные свойства генетического материала.

К биологическим антимутационным механизмамотносят: диплоидность гено типа, двойная спираль ДНК, вырожденность генетического кода, блокада редупликации ДНК, экстракопирование генов, репарация ДНК (фоторепарация, эксцизионная; дорепликативная, пострепликативная, репликативная).

Задание 2. Рассмотреть рисунок. Строение ДНК эукариот.

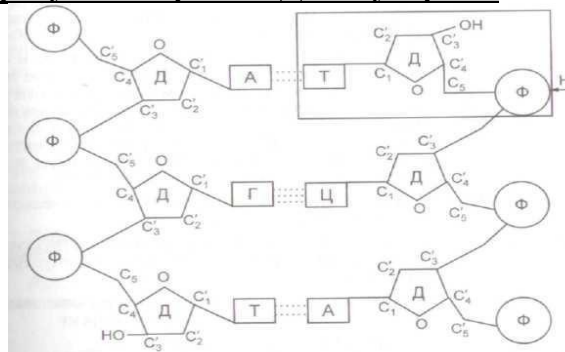


Рисунок. Строение ДНК эукариот.

А - аденин; Г - гуанин - пуриновые азотистые основания; Ц - цитозин; Т - тимин - пиримидиновые азотистые основания; Д - дезоксирибоза; Ф - остаток фосфорной

кислоты; Н - нуклеотид.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5 (1). БАКТЕРИОФАГИ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА. КЛАССИФИКАЦИЯ. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ БАКТЕРИОФАГА.

Цель работы: подробно изучить общую характеристику бактериофагов и их классификацию.

Ход работы:

Теоретическая часть

Бактериофаги – вирусы бактерий обладающие способностью специфически проникать в бактериальные клетки, репродуцироваться в них и при выходе потомства вызывать в большинстве случаев разрушение (лизис) бактерий.

Впервые о явлении бактериофагии сообщил в 1896 г. британский бактериолог Эрнест Ханкин (1865-1939 гг.). Он отметил, что вода рек Индии обладает бактерицидными свойствами в отношении холерных вибрионов. При исследовании воды он выявил наличие в ней факторов, проникающих через бактериальный фильтр и вызывающих лизис возбудителя холеры. История открытия бактериофага связана с именами Н.Ф. Гамалеи, наблюдавшего спонтанный лизис сибиреязвенных бактерий в 1898г. Английский бактериолог Ф. Туорт описал способность фильтрата стафилококков растворять свежую культуру этих же бактерий (1915г.). Французский ученый Ф.Д. Эррель подробно изучил взаимодействие фага и бактерий и сделал заключение, что открытый им литический агент является вирусом бактерий и назвал его «бактериофагом» - пожирателем бактерий.

Задание 1. Изучить строения бактериофага

Вирусы бактерий объединены в класс *Bacteriophagae*. Бактериофаги широко распространены: они выявлены у большинства бактерий, а также у других микроорганизмов, например, у грибов и поэтому их часто называют фагами. Наиболее детально изучена структура крупных фагов, к которым относятся фаги *E. coli* (T2, T4, T6). Они состоят из головки икосаэдрического типа, в которой заключена или ДНК, или РНК. бактериофаги содержат или **ДНК, или РНК**. Нуклеиновые кислоты фагов могут быть двунитевыми, однонитевыми, линейными, кольцевыми. Большинство фагов содержит двунитевую ДНК, замкнутую в кольцо.

Хвостовой отросток имеет внутри полый цилиндрический стержень, сообщающийся с головкой, а снаружи – чехол, способный к сокращению наподобие мышцы. Чехол присоединен к воротничку, окружающему стержень около головки. Хвостовой отросток заканчивается шестиугольной базальной пластинкой с шипами от которых отходят нитевидные структуры – фибриллы. (ЗАРИСОВАТЬ СТРОЕНИЕ БАКТЕРИОФАГА)

Задание 2. Познакомиться с номенклатурой и классификацией бактериофагов

Номенклатура бактериофагов основана на видовом наименовании хозяина (стафилококковый, стрептококковый, сальмонеллезный, дизентерийный, коли-бактериофаг и т.п.

Взаимодействие фагов с бактериями может протекать, как и у других вирусов, по:

***продуктивному,
абортивному
интегративному типам.***

При ***продуктивном*** типе взаимодействия образуется фаговое потомство, бактерии лизируются; при ***абортивном*** типе - фаговое потомство не образуется и бактерии сохраняют свою жизнедеятельность; при ***интегративном*** типе - геном фага встраивается в хромосому бактерии и сосуществует с ней.

Классификация бактериофагов:

По типу нуклеиновой кислоты:

- ДНК-содержащие
- РНК-содержащие.

По характеру взаимодействия с бактериями:

- Вирулентные (**вирулентные бактериофаги** взаимодействуют с бактерией по продуктивному типу).
- Умеренные (либо по **продуктивному** либо **интегративному** типам).

По специфичности взаимодействия:

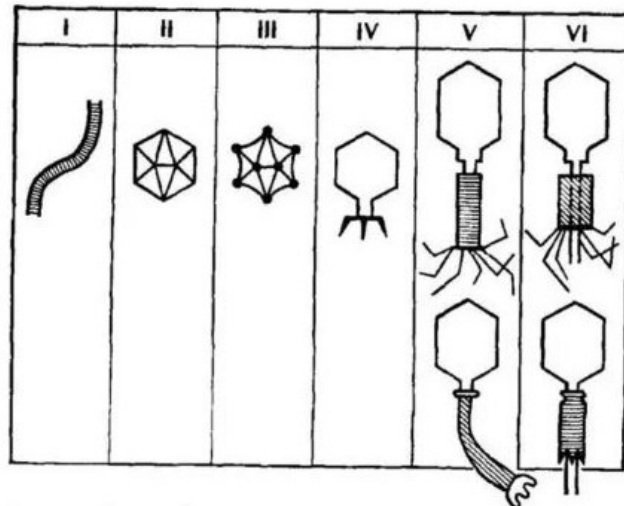
- Видовые (моновалентные) – лизируют бактерии одного вида;
- Поливалентные – лизируют бактерии разных видов;
- Типовые (Т-фаги) – лизируют бактерии разных типов/вариантов (делят бактерии в пределах вида на фаговары).

По морфологии:

- нитевидные фаги;
- фаги без отростка;
- фаги с аналогом отростка;
- фаги с короткими отростками;
- фаги с длинным отростком, чехол которого не сокращается;
- фаги с длинным отростком, чехол которого сокращается

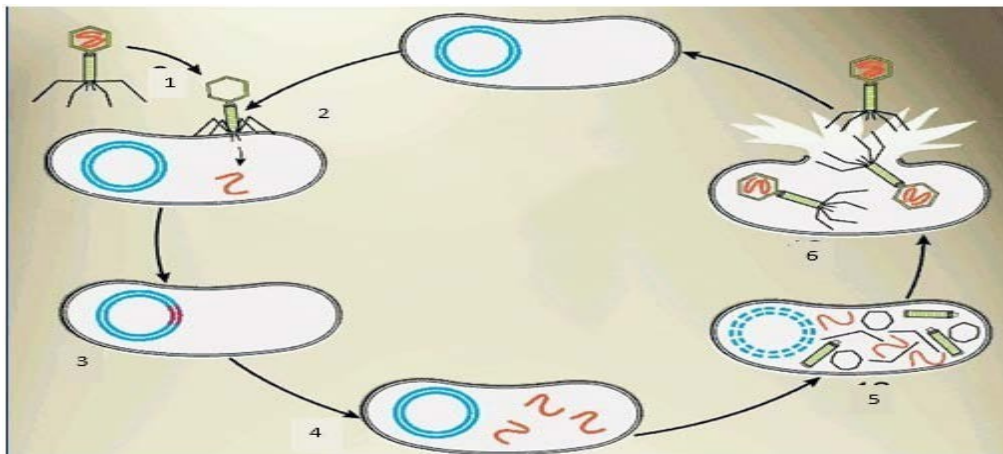
(ЗАРИСОВАТЬ).

- I – нитевидные фаги
II – фаги без отростка
III – фаги с аналогом отростка
IV – фаги с коротким отростком
V – фаги с длинным несокращающимся отростком
VI – фаги с длинным сокращающимся отростком



Классификация бактериофагов по морфологии

Задание 3. Изучить схему жизненного цикла бактериофага



Принципиальная схема жизненного цикла бактериофага: 1 – адсорбция фага на клетке; 2 – проникновение вирусной нуклеиновой кислоты в клетку; 3 – интеграция фаговой ДНК в хромосому бактерий; 4 – репликация фаговой ДНК; 5 – синтез вирусных белков, образование капсидов, упаковка ДНК в капсиды, созревание фаговых частиц; 6 – лизис клетки и выход фаговых частиц (ЗАРИСОВАТЬ)

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ № 5 (2).

БАКТЕРИОФАГИ. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ФАГОТИПИРОВАНИЯ

Цель работы: познакомиться с основными методами фаготипирования.

Ход работы:

Материалы: диагностический набор бактериофагов, дозаторы, наконечники, бактериологические петли, пробирки, чашки Петри с агаровыми пластинами, жидкая питательная среда.

Теоретическая часть

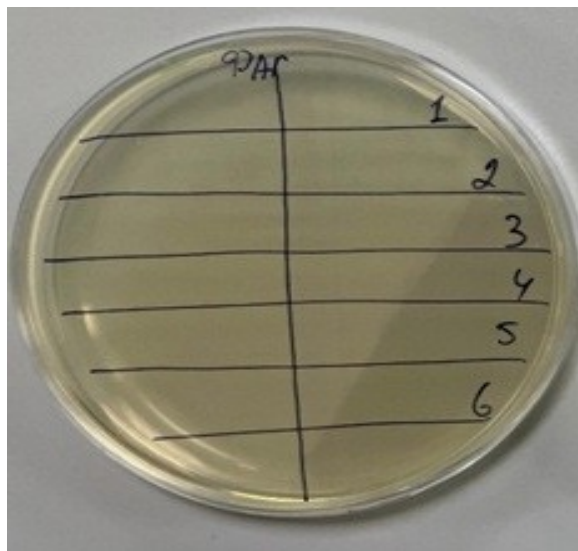
Методы фаготипирования

Фаготипирование – это фенотипический метод, в котором используются бактериофаги (сокращённо «фаги») для обнаружения и идентификации отдельных штаммов бактерий. Фаги заражают бактерии и могут приводить к лизису бактериальных клеток. Фаготипирование – быстрая, экономически выгодная, надёжная и воспроизводимая технология, не требующая специального оборудования. На практике ею пользуются для идентификации различных штаммов *Bacillus*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Yersinia* и многих других. Фаговая типизация использовалась для отслеживания источника вспышек инфекционных заболеваний в XX веке, сейчас её вытесняют генотипические методы. Однако эти методы по-прежнему используются в лабораторной практике.

Задание 1. Ознакомиться с инструкциями по применению диагностических бактериофагом

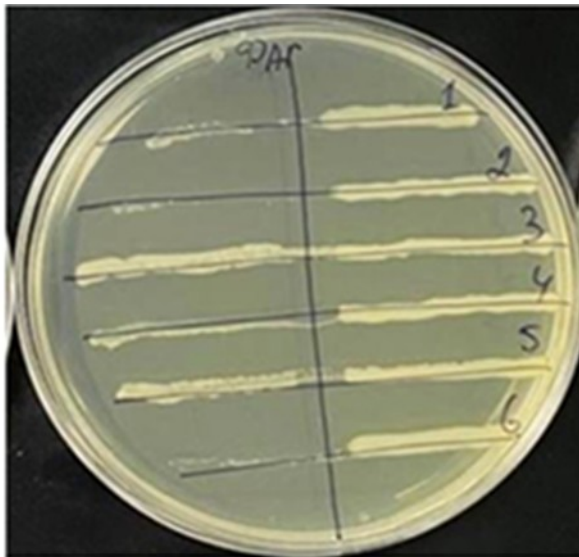
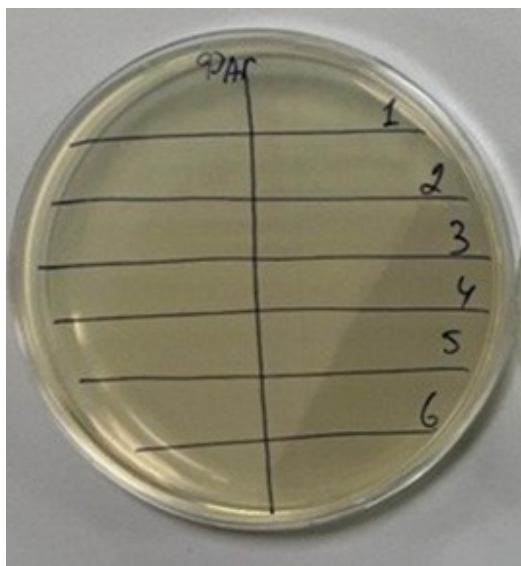
Задание 2. Ознакомиться с качественными методами (имитация методов Отто и стекающей капли)

Метод Отто (spot-test): метод заключается во внесении капли исследуемого бактериофага на засеянные сплошным газоном испытуемые бактериальные культуры с последующим термостатированием. На плотную питательную среду засевают газоном в количестве. После того, как взвесь впиталась, на газон наносится капля бактериофага. После инкубации посевов в течение 18-20 часов при температуре 37° С, фиксируют наличие или отсутствие лизиса культуры, и его степень.



Степень лизиса	Метод Отто на плотной питательной среде
++++	Полный лизис, на месте закапывания бактериофага культура не растет
+++	Лизис с наличием единичных колоний культуры
++	Лизис в виде сливных участков с островками роста культуры
+	Лизис в виде отдельных стерильных пятен на сплошном газоне культуры
-	Сплошной рост культуры, не обнаруживается ни одного стерильного пятна

Метод стекающей капли – на плотную питательную среду наносили штаммы бактериальной культуры по секторам. На верхний край чашки Петри со средой наносили каплю бактериофагов (0,2-0,3 мл), чашку поднимали чашку под наклоном так, чтобы капля препарата стекла к противоположному краю, давали препарату впитаться. Далее Посевы термостатировали при 37 °С в течение 18-20 ч. Проводили учёт результатов (качественный метод). (*Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*)



Задание 3. Ознакомиться с количественными методами (имитация методов Аппельмана и Грация)

Метод Аппельмана – способ определения литической активности (титра) бактериофага в жидкой питательной среде. Суть метода – в установлении максимального разведения бактериофага, которое вызывает полный лизис бульонной культуры бактерий.

Ход метода:

1. В ряд из 12 стерильных пробирок одинакового диаметра наливают по 4,5 миллилитра стерильного мясо-пептонного бульона.
2. В первую пробирку вносят 0,5 мл испытуемого бактериофага.
3. Делают последовательные разведения, перенося дозаторами, сменяя наконечники, из пробирки в пробирку по 0,5 мл фага. Обычно используют 10 пробирок. Из последней пробирки лишние 0,5 мл выливают.
4. Во все пробирки вносят по 1 капле 18-часовой бульонной культуры бактерий. 11-я и 12-я пробирки являются контрольными, в первой из которых находится бульон с одной каплей бульонной культуры без фага (контроль культуры), во второй – только бульон (контроль стерильности).
5. Все 12 пробирок помещают в термостат при 37 °С на 18 часов.
6. Литическую активность фага, выраженную в титре, устанавливали по последней пробирке, в которой отсутствовала мутность или осадок.

Титр бактериофага по методу Аппельмана выражается максимальным разведением фага, при котором произошёл полный лизис соответствующей культуры: например, титр бактериофага, давшего лизис в первых 7 пробирках ряда, равен 10^{-7} . Этот метод даёт качественную характеристику исследуемого фага.

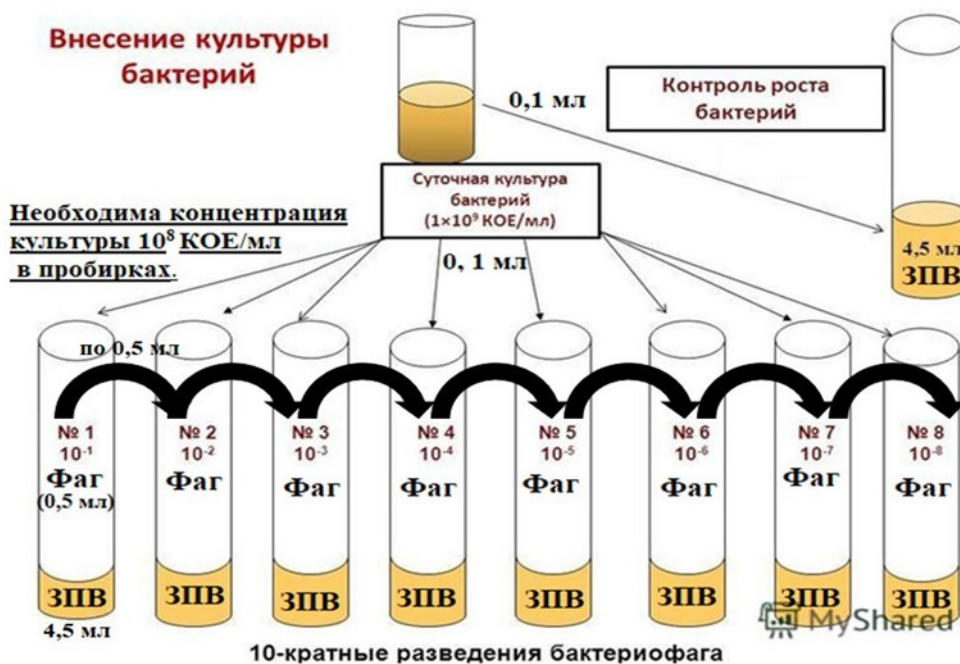


Схема постановки метода Аппельмана

Метод Грациа (метод агаровых слоёв) – метод исследования бактериофага, который позволяет определить концентрацию (титр) фага в исходной суспензии. Основан на подсчёте количества негативных колоний (стерильных пятен, бляшкообразующих единиц (БОЕ)), образовавшихся на агаровой питательной среде из определённого объёма (обычно 1 мл) взвеси бактериофага (фаголизата) при его культивировании совместно с живыми чувствительными к фагу бактериями

Ход исследования:

1. Готовят 1,5% питательный агар и разливают в стандартные чашки Петри в количестве 25–30 мл. Агар подсушивают 30 минут в термостате или 2–3 часа при комнатной температуре.
2. Отдельно готовят 0,7% питательный агар (полужидкий), разливают его в пробирки по 2,5 мл и стерилизуют.
3. Готовят ряд последовательных десятикратных разведений бактериофага. Для разведений можно пользоваться стерильным бульоном или стерильным изотоническим раствором хлорида натрия.
4. В пробирки с 0,7% питательным агаром, расплавленным на водяной бане и остуженным до температуры 45°C, добавляют по 1 мл каждого разведения титруемого фага и 0,2 мл бульонной бактериальной культуры, чувствительной к фагу.
5. Содержимое пробирок перемешивают, вращая пробирки между ладонями, и выливают вторым слоем в чашки Петри с 1,5% агаром.
6. После застывания среды чашки с посевом инкубируют при 37 °C в течение 18–24 часа.

7. Учет результатов производят через 18–20 часов инкубирования. Количество негативных колоний подсчитывают аналогично подсчету колоний бактерий, а титр фага определяют по формуле:

$$N = \frac{n \times D}{V}, \text{ где } \begin{cases} N - \text{количество фаговых частиц в 1 мл исследуемого материала,} \\ n - \text{среднее количество негативных колоний на чашку,} \\ D - \text{номер разведения,} \\ V - \text{объем высеваемой пробы, мл.} \end{cases}$$



ДОКЛАД ПО ТЕМЕ (ЗАСЛУШАТЬ):

1. Бактериофаги и их применение в разных областях

Задание 4. Выполнить тренировочные тесты

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6 (1, 2) МЕХАНИЗМЫ КОПИРОВАНИЯ ДНК В КЛЕТКАХ ПРО- И ЭУКАРИОТ. ФЕРМЕНТЫ РЕПЛИКАЦИИ ДНК ПРО- И ЭУКАРИОТ. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ.

Цель работы: Освоить методы пробоподготовки и выделения ДНК микроорганизмов из сине-зелёных водорослей (цианобактерий), оценить качество и количество полученного образца. Сравнить механизмы репликации ДНК у прокариот и эукариот, выявив особенности участвующих ферментов.

Ход работы:

Биологический материал:

- Культура цианобактерий (*Synechocystis* sp. или *Anabaena* sp.)

Оборудование

Твердотельный термостат, желательно с функцией перемешивания.

- Микроцентрифуга для пробирок типа эппендорф ёмкостью 1.5-2 мл с максимальной скоростью центрифугирования не менее 13000 об/мин.
- Дозаторы переменного объёма и наконечники к ним.
- Стерильные пробирки типа эппендорф ёмкостью 1.5 мл, свободные от нуклеаз.
- 96% этанол.
- Вода, свободная от нуклеаз.

Подготовка образцов

- Для цианобактерий: центрифугировать культуру (5000 об/мин, 10 мин), отбросить супернатант.
- Набор diaGene для выделения геномной ДНК из бактериальных культур,

СПИН-КОЛОНКИ

Состав набора

	50 выделений Кат.№ 3318.0050	250 выделений Кат.№ 3318.0250
Буфер 1	5 мл	25 мл
Буфер 2	10 мл	50 мл
Раствор для сорбции	20 мл	100 мл
Раствор для промывки 1	20 мл	100 мл
Раствор для промывки 2	15 мл	3 x 30 мл
РНКаза А	200 мкл	1 мл
Лизоцим (-18 °С)	50 мг	5 x 50 мг
Протеиназа К (-18 °С)	2 мг	5 x 2 мг
Спин-колонки (+2 +8 °С)	50 шт.	5 x 50 шт.
2 мл пробирки для сбора фильтрата	50 шт.	5 x 50 шт.

Набор предназначен для выделения геномной ДНК из бактериальных культур. Выделение ДНК начинается с лизиса бактериальных клеток в присутствии РНКазы и протеиназы К. Затем лизат наносится на спин-колонку **diaGene** с силикагелевым сорбентом. Очистка ДНК на спин-колонках начинается с избирательного связывания ДНК с сорбентом в присутствии хаотропной соли с последующей отмывкой связанной ДНК от примесей и заканчивается элюцией чистого препарата ДНК.

Сорбент позволяет выделить до 20 мкг свободной от примесей ДНК длиной 5 - 50 тысяч пар нуклеотидов.

Методика выполнения работы

Выделение геномной ДНК из бактериальных клеток

Важно:

- Перед началом работы добавьте 96% этанол в Раствор для промывки 2 (35 мл для 50 выделений, 70 мл в каждый флакон для 250 выделений). Тщательно перемешайте.
- Перед началом работы проверьте Раствор для сорбции на предмет выпадения осадка. В случае выпадения осадка Раствор необходимо прогреть в течение 5-10 минут при +55°C и размешать до растворения осадка. **Нельзя нагревать раствор выше +65°C.**
- Каждую порцию **Лизоцима** растворить в 1 мл деионизованной воды. Рекомендуется разделить раствор на аликвоты по 100 мкл и хранить при -20°C.
- Протеиназу К растворить в 100 мкл деионизованной воды (для 2 мг) или в 500 мкл деионизованной воды (для 10 мг). Рекомендуется разделить раствор на аликвоты по 20 мкл и хранить при -20°C.
- Скорости центрифугирования в об/мин приведены для настольной центрифуги MiniSpin-Eppendorf (радиус ротора - 6 см). Для центрифуг другого типа воспользуйтесь таблицами перевода g в об/мин
- После каждого использования рекомендуется плотно закрывать пакет со спин- колонками.

Этапы проведения

1. Перенесите в микроцентрифужные пробирки 1-3 мл бактериальной культуры. Центрифугируйте 5 минут при 5000 об/мин (1500g). Удалите супернатант.
2. Ресуспенсируйте осадок в 100 мкл Буфера 1. Добавьте 10 мкл Лизоцима при выделении ДНК из грам-отрицательных бактерий или 20 мкл — при выделении ДНК из грам-положительных бактерий. Добавьте 4 мкл РНКазы А. Перемешайте суспензию и инкубируйте при +37°C в течение 20 минут.
3. Центрифугируйте образцы 5 минут при 13000 об/мин (не менее 12000g). Удалите супернатант.
4. Ресуспенсируйте осадок в 180 мкл Буфера 2 и добавьте 2 мкл **Протеиназ К**. Тщательно перемешайте и инкубируйте при +56°C в течение 10

минут. **Если термостат для инкубации без функции перемешивания – необходимо регулярно перемешивать образцы вручную.**

5. Добавьте 400 мкл Раствора для сорбции. Перемешайте и инкубируйте при +60°C в течение 10 минут.

6. Поместите колонку в пробирку для сбора фильтрата. Нанесите на колонку раствор, полученный в п.5. Центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин (не менее 12000g). Удалите фильтрат.

Необходимо учитывать, что объём колонии составляет 650 мкл. Если объём образца превышает 650 мкл, образец в колонку вносите частями, удаляя каждый раз жидкость из пробирки для сбора фильтрата.

7. Нанесите на колонку 400 мкл Раствора для промывки 1 и центрифугируйте 1 мин при 13000 об/мин (не менее 12000g). Удалите фильтрат.

8. Нанесите на колонку 600 мкл Раствора для промывки 2 и центрифугируйте 1 мин при 13000 об/мин (не менее 12000g). Удалите фильтрат.

9. Поместите колонку в ту же пробирку и центрифугируйте 1 минуту при 13000 об/мин для удаления остатков буфера.

10. Поместите колонку в новую 1.5 мл пробирку. Нанесите в центр мембраны 50 мкл деионизированной воды и подождите 1-3 мин.

Минимальный объём воды для элюции – 50 мкл, максимальный – 150 мкл. При элюции 50 мкл достигает максимальной концентрации ДНК, при элюции 150 мкл – максимальный выход.

1. Элюируйте ДНК центрифугированием в течение 1 мин при 13000 об/мин (не менее 12000g). Рекомендуется перенести элюат в новую пробирку.

Полученные образцы готовы для постановки ПЦР, секвенирования, рестрикции, лигирования и прочих реакций. Образцы могут быть использованы либо немедленно, либо в течение месяца при хранении при -20°C.

Теоретическая часть (обсуждение)

Устройство ПЦР-лаборатории

ПЦР-лаборатория должна быть разделена на три зоны - по числу технологических операций:

Зона подготовки реакционной смеси ("чистая" зона);

Зона пробоподготовки;

Зона детекции.

Все три зоны должны быть изолированными комнатами, снабженными предбоксниками. Полезно иметь устройство фильтрации воздуха.

Если первую и вторую зоны в крайнем случае допускается объединить (при наличии специальных боксов), то зона детекции должна размещаться как можно дальше от двух других зон (другой этаж, другое здание) и иметь не связанную с другими зонами систему вентиляции. Это является одним из наиболее категорических требований при организации ПЦР-лаборатории.

Кроме того, желательно предусмотреть отдельные помещения для переодевания и хранения верхней одежды, приема пищи, складское помещение для лабораторных материалов.

Все производственные комнаты должны быть снабжены коротковолновыми ультрафиолетовыми лампами.

Перемещение пробирок, штативов и пр. должно производиться только в направлении из "чистой" зоны в зоны пробоподготовки и детекции.

Клинический материал, поступивший в лабораторию, должен быть как можно быстрее обработан в комнате пробоподготовки. В эту же комнату должны поступать пробирки с реакционной смесью из "чистой" зоны для внесения в них препаратов ДНК.

После этого пробирки помещают в амплификатор и, по окончании термоциклирования, не открывая крышек, переносят в зону детекции.

Все операции (пробоподготовка, подготовка реакционной смеси, электрофорез) должны выполнять разные люди.

Для обработки клинических образцов должны быть установлены ламинарные шкафы, обеспечивающие вертикальный поток воздуха для безопасности персонала при работе с инфекционным материалом, а также предусматривающие возможность работы без ламинарного потока и длительную экспозицию облучения внутренних поверхностей ультрафиолетовым светом.

Подготовку реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксе, снабженном электрическими розетками, лампами дневного и ультрафиолетового света.

Инактивацию биологического материала проводят в автоклаве в течение 1 часа при 1,5 атм. Допускается использование настольных автоклавов.

Запрещается внесение пробирок с положительными контролями или клиническими образцами как до, так и после обработки, в комнату подготовки реакционной смеси ("чистую" зону).

Все производственные комнаты должны быть снабжены необходимым оборудованием и расходными материалами, в том числе халатами, закрепленными за соответствующими помещениями.

Основные принципы подбора праймеров

При создании ПЦР тест-системы одной из основных задач является правильный подбор праймеров, которые должны отвечать ряду критериев:

1. Праймеры должны быть специфичны. Особое внимание уделяют 3'- концам праймеров, т.к. именно с них Таq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. Если их специфичность недостаточна, то, вероятно, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить нежелательные процессы, а именно синтез неспецифической ДНК (коротких или длинных фрагментов). Они видны на электрофореze в виде тяжелых или легких дополнительных полос, иногда шмеров, выглядящих сплошным мазком на электрофореze.

Это мешает оценке результатов реакции, т.к. легко перепутать специфический продукт амплификации с синтезированной посторонней ДНК. Часть праймеров и дНТФ расходуется на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности;

2. Праймеры не должны образовывать димеры и петли, т.е. не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига праймеров самих на себя или друг с другом;

3. Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной, взятой в качестве критерия при выборе праймеров, специфичности. При попадании на такую зону, отжига праймеров происходить не будет, и как следствие – ложноотрицательный результат. Иными словами, если предполагается разработать видоспецифическую тест-систему на какой-либо микроорганизм, выбирается именно та зона, которая удовлетворяет этим требованиям в пределах нуклеотидных последовательностей генома данного вида. И, наоборот, в этих последовательностях должны быть как можно более существенные отличия среди всех близкородственных видов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7 (1)

**ПОНЯТИЯ «ФЕНОТИП» И «ГЕНОТИП» У МИКРООРГАНИЗМОВ.
ДОКАЗАТЕЛЬСТВА МУТАЦИОННОЙ ПРИРОДЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ У
МИКРООРГАНИЗМОВ. СПОНТАННЫЙ И ИНДУЦИРОВАННЫЙ
МУТАГЕНЕЗ. ПРЯМЫЕ И ОБРАТНЫЕ МУТАЦИИ. РАЗЛИЧИЯ В ЧАСТОТАХ
ОБРАЗОВАНИЯ РАЗНЫХ ТИПОВ МУТАЦИЙ И ИХ ПРИЧИНЫ.
СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МУТАЦИОННОЙ И
МОДИФИКАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ.**

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕННЫХ, ХРОМОСОМНЫХ И ГЕНОМНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ.

Цель работы: изучить основные понятия фенотипа и генотипа у микроорганизмов, ознакомиться с экспериментальными доказательствами мутационной природы изменчивости, сравнить спонтанный и индуцированный мутагенез, проанализировать частоты и типы мутаций, а также рассмотреть современные молекулярные механизмы изменчивости у микроорганизмов.

Ход работы:

Теоретическая часть

Понятия «генотип» и «фенотип» у микроорганизмов

Генотип - совокупность всех генов (наследственной информации), закодированной в ДНК (или РНК у некоторых вирусов). У микроорганизмов он включает хромосомную ДНК и, при наличии, плазмиды, профаги и другие мобильные генетические элементы.

Фенотип - совокупность наблюдаемых признаков и свойств микроорганизма, проявляющихся в конкретных условиях среды: морфология, метаболизм, устойчивость к антибиотикам, подвижность, патогенность и др.

У микроорганизмов фенотип может меняться быстро (например, в ответ на стресс), но только мутации в ДНК приводят к наследуемым изменениям.

→ Фенотип = генотип + влияние внешней среды.

Особенность микроорганизмов:

- Высокая скорость размножения → возможность наблюдать изменения фенотипа в короткие сроки.
- Гаплоидность большинства прокариот → мутации проявляются сразу в фенотипе (нет маскировки рецессивными аллелями).
- Горизонтальный перенос генов (конъюгация, трансдукция, трансформация) может быстро изменять генотип вне вертикального наследования.

Термин «мутация» введен Г. де Фризом (1901), изучавшим изменчивость и наследственность у растений и определившим *мутацию* как «скачкообразное изменение наследственного признака». Это понятие М. Бейеринк (1912) позднее распространил и на бактерии. Мутация – событие редкое и обычно спонтанно происходит с частотой $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-10}$.

Доказательства мутационной природы изменчивости у микроорганизмов

В результате постановки ряда экспериментов были получены данные, свидетельствующие о том, что у бактерий мутации носят спонтанный и ненаправленный характер. К их числу относятся, прежде всего, эксперименты С. Лурия, М. Дельбрюка, Г. Ньюкомба и супругов Е. и Дж. Ледерберг.

В 1943 г. С. Лурия и М. Дельбрюк доказали спонтанное возникновение мутантов бактерий с помощью *флуктуационного теста*. В эксперименте с участием бактериофага T1, обладающего высокой вирулентностью в отношении бактерий *E. coli*, исследовался процесс возникновения устойчивости у данных бактерий к фагу.

При постановке эксперимента культуру бактерий *E. coli*, полученную из одной клетки (т. е. чистую культуру), чувствительную к бактериофагу T1, выращивали до определенной плотности и разделяли на две части. Далее одну из них распределяли по 1 мл в 100 пробирок. Вторую часть оставляли в объеме 100 мл. После этого все культуры инкубировали в одинаковых условиях. На следующем этапе выращенные культуры засеивали на агаризованную среду с фагом T1. В результате на поверхности среды формировалось определенное количество колоний, которые можно рассматривать как устойчивые к фагу. Устойчивые к фагу T1 бактерии сохраняют данное свойство также и при последующем их культивировании в отсутствие фага.

Вывод: мутации возникают **спонтанно и случайно** в процессе роста, до воздействия селективного агента (фага). Это **доказательство мутационной (не**

адаптивной) природы изменчивости.

Опыт Ледербергов (реплика-посев, 1952) доказал, что мутации устойчивости к фагам и антибиотикам возникают спонтанно, до контакта с селективным фактором.

Эксперимент Флакса и Ледерберга показал распределение мутаций по времени (колонии разного размера - «дочерние» ветви), что подтверждает их случайный характер.

Спонтанный и индуцированный мутагенез

Спонтанные мутации – это мутации, которые возникают без видимых причин. Они широко распространены в природе. Все свойства и признаки организма подвержены спонтанным мутациям.

Причины спонтанных мутаций (внешние и внутренние).

Внешние связаны с естественным радиационным фоном: космическими излучениями, радиацией элементов земной коры, радиоактивными изотопами, поступающими в организм с пищей. Обычные показатели естественного радиационного фона (как привыкли говорить, в норме, хотя понятие нормы в данном случае неприменимо) – 13 – 27 микрорентген в час.

Внутренние обусловлены генотипом. Так, у кишечной палочки есть гены-мутаторы, наличие которых увеличивает частоту мутаций других генов в 2000 раз. Длительное хранение семян приводит к увеличению частоты спонтанных мутаций. У дрозофилы в норме частота летальных мутаций, локализованных в X-хромосоме, составляет приблизительно 0,15%; но есть линии, где эта частота равна 1%.

Индукцированные мутации возникают в результате целенаправленного действия какого-то фактора.

Наследственные различия у микроорганизмов, растений, животных и человека, в том числе наследственные болезни и уродства, появились в результате мутаций. Если спонтанные мутации - явление довольно редкое (частота— 10^{-6} — 10^{-7}), то применение мутагенных агентов значительно повышает частоту их.

Факторы, способные индуцировать мутационный эффект, получили название *мутагенных*. Установлено, что любые факторы внешней и внутренней среды, которые могут нарушить гомеостаз, способны вызвать мутацию. Главнейшими мутагенами являются: химические соединения, различные виды излучений, биологические факторы.

Задание 1. Изучить и заполнить таблицу

Спонтанный мутагенез	Индукцированный мутагенез
Возникает без внешнего воздействия.	Вызывается физическими (УФ, ионизирующее излучение), химическими (нитрозосоединения, алкилирующие агенты) или биологическими (транспозоны, вирусы) факторами.
Источники: ошибки репликации ДНК, спонтанный гидролиз, окислительный стресс.	Мутагены усиливают частоту мутаций в 10^2 – 10^6 раз.
Средняя частота: $\sim 10^{-9}$ – 10^{-6} на ген/деление.	Частота зависит от дозы и типа мутагена.

Прямые и обратные мутации

- **Прямая мутация (forward)** - нарушение функции гена (например, $his^+ \rightarrow his^-$ - потеря способности синтезировать гистидин).
- **Обратная мутация (reversion)** - восстановление исходного или функционального аллеля ($his^- \rightarrow his^+$).
- **Истинная реверсия** - восстановление исходной нуклеотидной последовательности.
- **Супрессорная мутация** - мутация в другом гене или в другом участке

того же гена, компенсирующая эффект первой мутации.

Частота обратных мутаций обычно ниже, чем прямых, особенно при делециях.

Задание 2. Рассмотреть и записать таблицу «Частота образования мутаций: причины различий»

Тип мутации	пример	Относительная частота	Причины
Точечные замены (миссенс, нонсенс)	замена одного нуклеотида	высокая	Ошибки полимеразы, дезаминирование, окисление оснований
Сдвиг рамки чтения	вставка/делеция 1–2 нуклеотидов	средняя	Скольжение ДНК-полимеразы на повторах
Делеции/инверсии/дупликации	потеря или перестройка участка ДНК	низкая	Неравный кроссинговер, ошибки рекомбинации, действие транспозонов
Полная утрата гена (делеция >1 кб)		очень низкая	Требуется два двойных разрыва ДНК; часто летальна

Задание 3. Заполнить таблицу «Мутационная vs модификационная изменчивость»

Признак	Мутационная изменчивость	Модификационная изменчивость
Природа изменений	Генетические (в ДНК/РНК)	физиологические (без изменения нуклеотидной последовательности)
Наследуемость	Да (вертикальная и горизонтальная передача)	Нет (или кратковременная — через регуляторные РНК, метилирование)
Время возникновения	Длительное (требуется деление клеток для фиксации)	Быстрое (минуты–часы)
Примеры	Устойчивость к антибиотикам, ауксотрофия	Индукция β-галактозидазы лактозой, формирование биопленок, кворм-сенсинг

У микроорганизмов важную роль играет фенотипическая гетерогенность в клоне (например, persister-клетки), которая может быть следствием стохастической экспрессии генов — промежуточное звено между модификацией и мутацией.

Молекулярные механизмы изменчивости

Генные мутации

- Замены оснований: транзиции (A↔G, C↔T) и трансверсии (пурины ↔ пиримидины).
- Вставки/делеции (indels): в участках с микросателлитами (повторы).
- Пример: мутация в гене *rpoB* - устойчивость к рифампицину у *M. tuberculosis*.

Хромосомные перестройки

- Делеции, дупликации, инверсии, транслокации.
- Часто опосредованы **гомологичной рекомбинацией** (RecA-зависимой) или **негомологичным соединением концов** (NHEJ у актиномицетов).
- Пример: инверсия в хромосоме *Salmonella* при изменении фазового вариабельности жгутиков.

Геномные изменения

- Полиплоидия (редко у бактерий, но есть у *Azotobacter*, *Deinococcus*).
- Потеря/приобретение плазмид, фагов, островков патогенности

(горизонтальный перенос генов — HGT).

- Эндо- и экзогенные транспозоны (IS-элементы, Tn-транспозоны).

Современные методы секвенирования (WGS) позволяют выявлять спектры мутаций даже в малых популяциях (например, «мутационный ландшафт» при адаптации к стрессу).

Контрольные вопросы

1. Почему у микроорганизмов фенотип может не отражать генотип? Приведите 2 примера.
2. В чём принципиальное отличие мутаций от фенотипических модификаций?
3. Почему частота спонтанных точечных мутаций в бактериях не опускается ниже $\sim 10^{-10}$? Какие эволюционные компромиссы здесь действуют?
4. Как мутации в генах репарации (например, *mutS*, *uvrB*) влияют на частоту спонтанного мутагенеза?
5. Почему обратные мутации при делециях невозможны?
6. Назовите 3 механизма горизонтального переноса генов и их роль в геномной изменчивости.
7. Какие молекулярные признаки позволяют отличить мутацию, вызванную УФ-излучением, от спонтанной дезаминирования цитозина?

Дополнительные задания (по выбору)

Подготовить презентацию на тему: «CRISPR-Cas как система фиксации горизонтального переноса ДНК - пример адаптивной геномной изменчивости».

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7 (2).

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МУТАНТОВ. ТИПЫ МУТАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ У ГРИБОВ, ВОДОРОСЛЕЙ, БАКТЕРИЙ И БАКТЕРИОФАГОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ, ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К МУТАГЕННЫМ ФАКТОРАМ, АУКСОТРОФНЫЕ, УСЛОВНО ЛЕТАЛЬНЫЕ. МЕТОДЫ НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЕНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ. МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС КАК ФАКТОР ЭВОЛЮЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ.

Цель работы: ознакомиться с основными методами выделения мутантов и классификацией типов мутаций у микроорганизмов (грибы, водоросли, бактерии, бактериофаги); освоить принципы отбора и скрининга мутантов на основе фенотипических признаков. Изучить мутационный процесс микроорганизмов.

Изучить современные методы направленного мутагенеза, применяемые для создания генномодифицированных микроорганизмов, оценить их роль в биотехнологии и понять значение мутационного процесса как движущей силы эволюции микроорганизмов.

Ход работы:

Теоретическая часть

Понятие мутации и мутанта

Мутация - стойкое изменение генетического материала, приводящее к изменению признаков организма и передаваемое потомству. Мутант - организм (клетка, вирус), несущий такую мутацию и отличающийся по фенотипу от исходного (дикого) типа.

В генетических исследованиях мутанты используются для:

- установления функции генов;
- изучения путей метаболизма;
- анализа регуляции экспрессии генов;
- построения генетических карт.

Задание 1. Заполнить таблицу «Основные типы мутационных изменений, используемых в генетике микроорганизмов»

Тип мутации	Определение	Примеры использования
Морфологическ е	Изменения внешнего вида колоний, спор, мицелия, подвижности и т.п	У <i>Neurospora crassa</i> — мутации, влияющие на цвет спор (например, <i>albino</i>), форму колоний у <i>Aspergillus</i> ; у бактерий — изменение формы колоний (S- и R-формы).
Устойчивость к антибиотикам	Способность расти в присутствии ингибирующих веществ (антибиотики, токсины).	Мутанты <i>E. coli</i> , устойчивые к стрептомицину (мутации <i>rpsL</i>), рифампицину (<i>rpoB</i>); используются как селектируемые маркеры.
Чувствительность к мутагенным факторам	Повышенная чувствительность к УФ, ионизирующему излучению, химическим мутагенам.	Мутанты <i>Saccharomyces cerevisiae</i> с дефектами в репарации ДНК (например, <i>rad52</i> — чувствительны к УФ и MMS).
Ауксотрофные	Потеря способности синтезировать эссенциальное соединение (аминокислоту, витамин, нуклеотид).	<i>his⁻, leu⁻, arg⁻</i> у <i>Salmonella</i> , <i>Neurospora</i> (мутанты Бидла и Тейтума); рост возможен только на среде с добавлением соответствующего вещества.
Условно-летальные	Фенотип проявляется только при определённых условиях (температура, pH, осмотическое давление). • Температурно-чувствительные (<i>ts</i>) — рост при 25°C, но не при 37°C. • Cold-sensitive (<i>cs</i>) — рост при 37°C, но не при 20°C.	Мутанты <i>E. coli</i> с <i>ts</i> -аллелями генов ДНК-полимеразы; фаговые мутанты (например, <i>cI857</i> у λ -фага — термоиндукция лизогении).

Методы выделения мутантов

1. Индуцирование мутаций

- Физические мутагены: УФ-излучение, рентгеновские и γ -лучи.

- Химические мутагены:
- Алкилирующие агенты (EMS, MMS)
- Аналоги оснований (5-бромурацил, 2-аминопурин)
- Интеркалирующие агенты (этидий бромид, профлавин — вызывают +1/–

1 сдвиги рамки)

2. Способы отбора/скрининга мутантов

Задание 2. Заполнить таблицу

Тип мутанта	Метод выделения
Ауксотрофы	(Ледерберги): метод реплика-посева 1. Выращивание колоний на плотной среде. 2. Перенос (репликация) на минимальную и минимальную+нутриент. 3. Колонии, растущие только на полной/дополненной среде – ауксотрофы.
Резистентные к антибиотикам	Прямой посев после мутагенеза на среду с антибиотиком. Выживают только резистентные мутанты.
Морфологические	Визуальный скрининг: сравнение колоний на чашках (цвет, текстура, размер).
Условно-летальные	Посев при пермиссивных и непермиссивных условиях (напр., 30°C и 42°C).

3. Особенности у разных объектов

- Бактерии (*E. coli*, *B. subtilis*): быстро растут, легко трансформируются/трансдуцируются; основные объекты для *in vivo* и *in vitro* генетики.
- Бактериофаги (T4, λ): мутации в генах, контролирующих лизис/лизогению, хост-диапазон, образование пятен на газоне; фенотип — тип и размер бляшек.
- Грибы (*Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*): возможность тетрадного анализа; ауксотрофные мутанты — классические объекты биохимической генетики.
- Водоросли (*Chlamydomonas reinhardtii*): гаплоидный жизненный цикл, наличие хлоропластной ДНК; мутанты по фотосинтезу, жгутиковой подвижности, устойчивости к гербицидам (например, *acetolactate synthase* мутанты устойчивы к сульфонилмочевинам).

Задание 3. Индукция мутаций у *E. coli* (модельный эксперимент *in silico* / демонстрация)

1. Подготовить суспензию клеток *E. coli* (штамм дикого типа) в фосфатном буфере.
2. Обработать часть суспензии УФ-излучением (15–30 с при 254 нм).
3. Развести облучённые и контрольные клетки и высевать на чашки:
 - Чашка 1: полная среда (LB) — для оценки выживаемости.
 - Чашка 2: минимальная среда (M9) — для оценки общего числа колоний.
 - Чашка 3: M9 + 50 мкг/мл стрептомицина — для выделения *str^R* мутантов.
 - Чашка 4: M9 без гистидина — для выделения *his⁻* (если исходный штамм *his⁺*).
4. Инкубировать 24–48 ч при 37°C. Подсчитать:
 - Общее число колоний (на LB и M9).
 - Число резистентных к стрептомицину.
 - Число ауксотрофов (колонии на M9, но не на M9–His); подтвердить реплика-посевом.

Задание 4. Анализ мутантов у дрожжей *S. cerevisiae*

1. Рассмотреть готовые чашки с дрожжами:
 - Дикий тип (белые колонии на YPD).

- *ade2⁻* мутант (красные колонии — накопление промежуточного продукта).
- 2. Оценить морфологические различия.
- 3. Провести тест на термочувствительность: повторный посев *ts*-мутанта при 25°C и 37°C.

Задание 5. Работа с бактериофагом Т4 (демонстрация)

1. Зафагировать *E. coli* В штамм фагом Т4 (дикого типа и мутантом *rII*).
2. Наблюдать образование бляшек на чашках:
 - Дикий тип: мелкие, «пушистые» бляшки.
 - *rII* мутант: крупные, чётко очерченные бляшки (rapid lysis).
3. Обсудить применение *rII*-системы в экспериментах Бензера по тонкому картированию гена.

Контрольные вопросы

1. В чём принципиальное отличие *отбора* и *скрининга* мутантов?
2. Почему ауксотрофные мутанты удобны для генетического анализа?
3. Какие мутации чаще всего приводят к условно-летальному фенотипу? Приведите пример.
4. Почему бактериофаги — удобные объекты для изучения точечных мутаций и делеций?
5. Какой метод позволяет выделить только *новые* мутанты, избежав фонового роста дикого типа? (Ответ: *пенициллиновое обогащение* для ауксотрофов у бактерий — пенициллин убивает только растущие клетки, т.е. прототрофы.)

Задания на дом.

1. Составьте таблицу сравнения типов мутаций у четырёх групп организмов (грибы, водоросли, бактерии, фаги) - по 2 примера на каждый тип мутации.
2. Зарисуйте схему реплика-посева и поясните, как по ней идентифицировать ауксотроф.

Теоретическая часть

1. Мутационный процесс как фактор эволюции микроорганизмов

Основные типы мутаций у микроорганизмов:

- Точечные (замены нуклеотидов) – могут приводить к синонимическим, замещающим или нонсенс-мутациям.
- Вставки/делеции (indels) – нарушают рамку считывания, часто приводят к преждевременному прекращению трансляции.
- Хромосомные перестройки – инверсии, дупликации, делеции крупных участков.

Роль мутаций в эволюции:

- Обеспечивают генетическое разнообразие.
- Служат основой для действия естественного отбора.
- Позволяют микроорганизмам адаптироваться к новым условиям (например, антибиотикорезистентность, использование новых субстратов).
- Участвуют в формировании новых метаболических путей (например, деградация синтетических соединений — пестицидов, пластмасс).

Спонтанные мутации происходят со средней частотой $\sim 10^{-9}$ – 10^{-10} на нуклеотид за поколение, но под действием мутагенов (УФ, алкилирующие агенты, интеркалирующие соединения) частота возрастает.

2. Методы направленного мутагенеза

Направленный (целенаправленный) мутагенез — это искусственное внесение заданных изменений в геном микроорганизма с целью получения желаемых фенотипических признаков. Основные методы:

2.1. Сайт-направленный мутагенез (site-directed mutagenesis, SDM)

- Основан на использовании ПЦР с праймерами, содержащими требуемую

точковую мутацию.

- Применяется для замены, вставки или удаления конкретных нуклеотидов.
- Пример: замена аминокислоты в активном центре фермента для изменения субстратной специфичности.

2.2. CRISPR-Cas9-опосредованное редактирование генома

- Позволяет вносить точечные мутации, делеции, вставки.
- Используется с донорной ДНК (ssODN или плазмидой-донором) для гомологичной рекомбинации (HDR).
- Высокая специфичность и эффективность даже в трудноредактируемых штаммах (например, *Bacillus*, *Streptomyces*).

2.3. Мутагенез на основе фаговой рекомбинации (recombineering)

- Применяется в *E. coli* и других бактериях, экспрессирующих фаговые рекомбиназы (RecET из фага λ Red $\alpha\beta\gamma$ из фага λ).
- Использует короткие линейные ДНК-конструкции (~50–100 п.н. гомологии) для замены генов или внесения мутаций *in vivo* без рестриктаз/лигаз.

2.4. Аллелозамещение (allelic exchange)

- Классический метод: клонирование мутантного аллеля в вектор с условной репликацией (например, *sacB*-контролируемая система), последующая двойная кроссинговая замена в хромосоме.

2.5. Направленная эволюция (directed evolution)

- Комбинация случайного мутагенеза (например, error-prone PCR) и отбора/скрининга.
- Применяется для оптимизации белков (ферментов, антител, биосенсоров).
- Пример: получение термостабильных липаз или ферментов, устойчивых к органическим растворителям.

3. Практическое применение ГМО-микроорганизмов

Область применения	Примеры
Биофармацевтика	<i>E. coli</i> инсулином, интерферонами, вакцинными антигенами
Синтетическая биология	<i>Corynebacterium glutamicum</i> — продуцент аминокислот (лизин, глутамат)
Биоремедиация	<i>Pseudomonas putida</i> плазмидой для деградации толуола/ксилола
Промышленная ферментация	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> с улучшенной спиртовой толерантностью
Сельское хозяйство	<i>Rhizobium</i> spp. с повышенной эффективностью фиксации азота

Задание 1. *In silico* проектирование точечной мутации в гене фермента

Цель: Спроектировать праймеры для замены аминокислоты в активном центре β -галактозидазы (*lacZ*), чтобы улучшить каталитическую активность при 50 °C.

Ход работы:

1. Найти в базе UniProt последовательность β -галактозидазы *E. coli* (P00722).
2. Определить участок активного центра (например, Glu461 — ключевой остаток, участвующий в катализе).
3. С помощью программы NEBaseChanger (NEB) или PrimerX спроектировать праймеры для замены Glu461 → Asp (GAA/GAG → GAT/GAC).
 - Длина праймера: 30–40 п.н.
 - $T_m \approx 60$ –65 °C.
 - Мутация в центре праймера.

4. Проверить специфичность праймеров с помощью BLAST.

Ответ включить в отчёт: схема замены, последовательности праймеров, Tm.

Задание 2. Анализ последствий мутации

Используя сервер FoldX или SWISS-MODEL, предсказать структурные последствия замены Glu461 → Asp:

- Изменение стабильности белка ($\Delta\Delta G$).
- Возможное влияние на субстратный карман.

Выводы:

1. Мутационный процесс - ключевой фактор микроэволюции, обеспечивающий адаптацию и разнообразие микроорганизмов.
2. Современные методы направленного мутагенеза позволяют целенаправленно конструировать штаммы с ценными практическими свойствами.
3. Выбор метода зависит от вида микроорганизма, типа требуемого изменения и доступных генетических инструментов.
4. Комбинация *in silico* моделирования, направленного мутагенеза и скрининга открывает новые горизонты в биотехнологии, медицине и экологии.

Контрольные вопросы

1. В чём принципиальное отличие направленного мутагенеза от случайного?
2. Почему CRISPR-Cas9 требует донорной ДНК для внесения точечных мутаций?
3. Как мутации способствуют антибиотикорезистентности у бактерий?
4. Что такое «молчащая мутация» и может ли она влиять на фенотип?
5. Какие ограничения есть у recombineering в промышленных штаммах (например, *Bacillus subtilis*)?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8 (1).

СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ И ЕЕ МЕХАНИЗМЫ. ГОМОЛОГИЧНАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ КАК СПОСОБ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА У МИКРООРГАНИЗМОВ. ЧАСТОТЫ РЕКОМБИНАЦИОННЫХ СОБЫТИЙ И СПОСОБЫ ИХ ВЫЯВЛЕНИЯ У ПРО- И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ОРГАНИЗМОВ. ТЕТРАДНЫЙ АНАЛИЗ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОВ. КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕТРАДНОГО АНАЛИЗА. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КОНВЕРСИИ ГЕНОВ.

Цель работы: изучить основные механизмы репарации ДНК у микроорганизмов. Освоить принципы гомологичной рекомбинации как механизма генетического обмена. Познакомиться с методами оценки частоты рекомбинационных событий у прокариот (на примере *E. coli*) и эукариот (на примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*). Освоить метод тетрадного анализа как инструмент генетического картирования у грибов (на примере *Neurospora crassa* или *Saccharomyces cerevisiae*). Изучить молекулярные механизмы геной конверсии как проявления нерекипрочного обмена генетическим материалом в процессе мейоза. Научиться интерпретировать результаты тетрадного анализа для определения расстояний между генами и выявления эпизодов конверсии.

Теоретическая часть

ДНК подвергается постоянному воздействию экзогенных (ультрафиолетовое излучение, ионизирующая радиация, химические мутагены) и эндогенных факторов (активные формы кислорода, ошибки репликации), что приводит к повреждениям. Для сохранения целостности генома клетки обладают сложными и высокоэффективными системами репарации ДНК - набором ферментативных механизмов, исправляющих повреждения различного типа.

Основные типы повреждений ДНК

- Депуринизация/депиримидинизация - спонтанная потеря азотистого основания.

- Дезаминирование (например, цитозин → урацил).
- Образование пиримидиновых димеров (Т–Т, Ц–Т) под действием УФ-излучения.
- Окислительные повреждения (8-оксогуанин).
- Однонитевые и двунитевые разрывы.
- Межнитевые сшивки (например, под действием цисплатина).

Задание 1. Рассмотреть и заполнить таблицу «Основные механизмы репарации ДНК»

Механизм репарации	Тип повреждений	Ключевые ферменты и белки	Особенности
Прямая репарация	Алкилированные основания (O ⁶ -метилгуанин), пиримидиновые димеры	ДНК-алкилтрансфераза (MGMT), фототиаза	Восстановление без разрыва фосфодиэфирной связи; фототиаза активна только при свете (фотореактивация)
Экцизионная репарация оснований (BER)	Повреждённые/непарные основания (урацил, 8-оксогуанин)	ДНК-гликозилазы, APE1, ДНК-полимераза β, лигаза III/XRCC1	Удаление одного основания → разрыв сахар-фосфатного остова → замена 1–10 нуклеотидов
Экцизионная репарация нуклеотидов (NER)	Объёмные повреждения (димеры, сшивки)	ДНК-полимеразы δ/ε, лигаза I	Удаление олигонуклеотидного фрагмента (24–32 нт); глобальная (GG-NER) и транскрипционно-сопряжённая (TC-NER) формы
Репарация неспаренных оснований (MMR)	Ошибки репликации (мисмэтчинг, вставки/делеции)	RecA, RecBCD, RuvAB, RuvC	Распознавание «лишней» петли → эксцизия → ресинтез; корректирует ошибки ДНК-полимеразы
Репарация двунитевых разрывов (DSBR)	Двунитевые разрывы	(репрессор), RecA* (ко-протеаза),	NHEJ — быстрая, но ошибочная (соединение «вслепую») HR — точная, требует сестринской хроматиды (S/G2-фаза)

Биологическое значение репарации

- Поддержание геномной стабильности.
- Предотвращение мутаций и онкогенеза (дефекты MMR → синдром Линча; дефекты NER → пигментная ксеродерма).
- Обеспечение точности передачи генетической информации.
- Участие в процессах рекомбинации, иммунного разнообразия (V(D)J-рекомбинация), старения клеток.

Теоретическая часть

Рекомбинация

Генетическая рекомбинация — это взаимодействие между двумя геномами, т. е. между двумя ДНК, обладающими различными генотипами, которое приводит к образованию рекомбинантной ДНК, формированию дочернего генома, сочетающего гены обоих родителей.

По молекулярному механизму генетическая рекомбинация у бактерий делится на три вида: гомологичную, сайт-специфическую и незаконную.

Гомологичная рекомбинация

При гомологичной рекомбинации в процессе разрыва и воссоединения ДНК происходит обмен между участками ДНК, обладающими высокой степенью гомологии. Гомологичная рекомбинация происходит через образование промежуточного соединения, крестообразной структуры Холидея или *полухиазмы*. В полухиазме осуществляется комплементарное спаривание между одноцепочечными участками, принадлежащими разным родительским молекулам ДНК. Процесс гомологичной рекомбинации находится под контролем генов, объединенных в *REC-систему*, состоящую из генов *rec A, B, C, D*. Продукты этих генов производят расплетание нитей ДНК и их переориентацию с образованием структуры Холидея, а также разрезают структуру Холидея для завершения процесса рекомбинации.

У прокариот наряду с бесполом способом передачи генов от предков к потомкам у бактерий существует и горизонтальный перенос генов, при котором из клетки-донора в клетку-реципиент передается часть генетического материала (хромосомы), в результате образуется неполная зигота, или *мерозигота*. Затем переданный фрагмент хромосомы донора спаривается с хромосомой реципиента с последующей рекомбинацией. За рекомбинацией следует процесс репликации ДНК и деления клетки, в результате чего возникают клетки, содержащие только рекомбинантную хромосому, которые называются рекомбинантами.

Отсутствие полового размножения и мейоза, в процессе которых у высших организмов происходит рекомбинация, гаплоидный набор генов и определяют особенности рекомбинации у бактерий. В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический материал, и клетки-реципиенты, которые воспринимают его. В клетку-реципиент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки-донора, что приводит к формированию неполной зиготы - мерозиготы. В результате рекомбинации в мерозиготе образуется только один рекомбинант, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента, с включенным в него фрагментом хромосомы донора. Реципроктные рекомбинанты не образуются.

Гомологичная рекомбинация как механизм генетического обмена

Гомологичная рекомбинация (HR) - ключевой процесс:

- Участвует в репарации двойных разрывов.
- Обеспечивает генетический обмен при конъюгации, трансформации, трансдукции у бактерий.
- Лежит в основе мейотического кроссинговера у эукариот.

1. Частоты рекомбинационных событий

У *E. coli*:

Спонтанная рекомбинация — $\sim 10^{-6}$ — 10^{-8} на клетку/деление.

Индукцированная (например, после UV или DSB) — повышается в 10–1000 раз.

У дрожжей (*S. cerevisiae*):

В митозе: 10^{-6} — 10^{-4} (в зависимости от локуса).

В мейозе: до 1–3% на пару генов/мейоз (до 90 кроссоверов на геном).

Задание 2. Заполнить таблицу «Методы выявления рекомбинации»

Организм	Метод	Принцип
Прокариоты (<i>E. coli</i>)	Селективная рекомбинация в Hfr × F ⁻ скрещиваниях	Анализ передачи маркеров и их восстановления в рекомбинантах (например, <i>arg⁺ leu⁺ thr⁺</i>)
	Фаговая трансдукция с	Оценка сокотрансдукции и частоты рекомбинации между близкими генами.

	двойными маркерами	
Эукариоты (<i>S. cerevisiae</i>)	Тетрадный анализ	Прямое наблюдение всех 4-х продуктов мейоза — идентификация кроссоверов и генных конверсий.
	Селективные маркеры на хромосоме	например, <i>his3-Δ5'</i> / <i>his3-Δ3'</i> — функциональный <i>HIS3</i> восстанавливается только через HR.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8 (2).

ТЕТРАДНЫЙ АНАЛИЗ. ОСОБЕННОСТИ ТЕТРАДНОГО АНАЛИЗА ПРИ УПОРЯДОЧЕННОМ И НЕУПОРЯДОЧЕННОМ РАСПОЛОЖЕНИИ СПОР В ТЕТРАДАХ. РОЛЬ ТЕТРАДНОГО АНАЛИЗА В УСТАНОВЛЕНИИ КЛАССИЧЕСКИХ ПОСТУЛАТОВ ГЕНЕТИКИ (ЧИСТОТА АЛЛЕЛЯ, ПРОХОЖДЕНИЯ КРОССИНГОВЕРА НА УРОВНЕ ЧЕТЫРЕХ ХРОМАТИД, ГЕННАЯ КОНВЕРСИЯ). АНАЛИЗ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ ПРИ МОНОГИБРИДНОМ И ДИГИБРИДНОМ СКРЕЩИВАНИЯХ У ДРОЖЖЕЙ. АНАЛИЗ СЦЕПЛЕННОГО НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ У ДРОЖЖЕЙ.

Цель работы: Изучить гомологичная рекомбинация как способ генетического обмена у микроорганизмов, частоту рекомбинационных событий, тетрадный анализ, его особенности и его особенности, а также роль. Тетрадный анализ, анализ закономерностей наследования при моногибридном и дигибридном скрещивании у дрожжей. Изучить картирование генов с использованием тетрадного анализа. Молекулярные механизмы конверсии генов.

Ход работы:

Теоретическая часть

Тетрадный (гаметический) анализ.

Еще в 20-х годах были найдены объекты (мхи), у которых удалось проанализировать расщепление в пределах одиночной тетрады. Данный метод, позволяющий устанавливать расщепление гамет после двух делений созревания (мейоза) был назван тетрадным анализом. Он дает возможность анализировать гаметы, возникшие в результате мейотического деления, и развившиеся из них гаплоидные особи. Этот метод впервые позволил непосредственно доказать, что менделевское расщепление является результатом закономерного хода мейоза, что оно представляет не статистическую, а биологическую закономерность.

Как известно, у большинства низших организмов (грибы, мхи, водоросли) длительность диплоидной фазы (зиготы) очень мала, а наиболее продолжительна в жизненном цикле гаплоидная фаза. Эта особенность низших организмов и позволяет наиболее успешно применять к ним метод тетрадного анализа. После оплодотворения и образования зиготы у них сразу же начинается мейоз, в результате которого образуются четыре аскоспоры. т. е. споры, находящиеся в одной сумке - аске. Расположение спор в аске может быть различным: либо линейным - по оси деления (у нейроспоры), либо секторальным (у дрожжей и др.). С помощью иглы микроманипулятора можно отделить каждую спор, а затем дать ей возможность размножиться.

Приведем пример тетрадного анализа при исследовании одной аллельной пары у дрожжей. У дрожжей рода *Saccharomyces* встречаются клетки, дающие красные и белые колонии. Эти альтернативные признаки определяются одной аллельной парой гена окраски. При слиянии гаплоидных гамет образуется диплоидная зигота F1. Она вскоре приступает к мейозу, в результате чего в одном аске образуется тетрада гаплоидных спор. Разрезав аск и вынув каждую спору отдельно, переносят их на субстрат, где они

размножаются. Каждая из четырех гаплоидных клеток начинает делиться, и образуются четыре колонии.

Две из них оказываются белыми и две красными, т. е. наблюдающееся расщепление точно соответствует 1А : 1а.

То же самое можно проследить и для любой другой пары признаков, контролируемых одной парой аллелей, например для свойства дрожжей сбраживать сахара.

Из этого анализа с очевидностью следует, что расщепление генов при моногибридном скрещивании является результатом мейотического деления.

Своими исследованиями Мендель установил одно из принципиально важных, для естествознания положений, а именно: признаки (свойства) организма наследуются отдельно и при скрещивании не исчезают в поколениях, а сохраняются. Это открытие явилось замечательным подкреплением учения Ч. Дарвина и его теории о происхождении видов путем естественного отбора. Оно позволило объяснить тот механизм, с помощью которого, приспособительные признаки (свойства) организмов не поглощаются скрещиванием, а сохраняются и могут накапливаться в поколениях под действием естественного отбора.

Тетрадный анализ: основные принципы

Еще в 20-х годах были найдены объекты (мхи), у которых удалось проанализировать расщепление в пределах одиночной тетрады. Данный метод, позволяющий устанавливать расщепление гамет после двух делений созревания (мейоза) был назван тетрадным анализом. Он дает возможность анализировать гаметы, возникшие в результате мейотического деления, и развившиеся из них гаплоидные особи. Этот метод впервые позволил непосредственно доказать, что менделевское расщепление является результатом закономерного хода мейоза, что оно представляет не статистическую, а биологическую закономерность.

Тетрада - совокупность из 4 гаплоидных продуктов одного мейоза (у дрожжей - «тетрада» технически включает 4 *дуплета* спор, итого 8 клеток - *октада*; но традиционно называют тетрадой 4 мейотических продукта).

Тетрадный анализ позволяет:

- непосредственно наблюдать результаты одного мейотического деления;
- определять типы расхождения аллелей (первое или второе деление мейоза);
- точно измерять расстояния между генами и центромерой;
- выявлять генную конверсию.

2. Типы тетрад

- Родительские дитипы (PD) - 2 споры с одним родительским генотипом, 2 - с другим (2:2).
- Неродительские дитипы (NPD) - рекомбинантные генотипы (2:2, но не совпадают с родительскими).
- Тетратипы (T) - все 4 генотипа различны (например, 2 родительских + 2 рекомбинантных, или 3:1 при конверсии).

Генетическое картирование

Генетическое картирование – это определение положения какого-либо гена по отношению к двум (как минимум) другим генам. Постоянство процента кроссинговера между определенными генами позволяет локализовать их. Единицей расстояния между генами служит 1% кроссинговера; в честь Моргана эта единица называется *морганида* (M), или сантиморганида (сМ).

На первом этапе картирования необходимо определить принадлежность гена к группе сцепления. Чем больше генов известно у данного вида, тем точнее результаты картирования. Все гены разбивают на группы сцепления.

Число групп сцепления соответствует гаплоидному набору хромосом. Например, у *D. melanogaster* 4 группы сцепления, у кукурузы – 10, у мыши – 20, у человека – 23 группы сцепления. При наличии половых хромосом они указываются дополнительно (например, у человека 23 группы сцепления плюс Y-хромосома).

Как правило, число генов в группах сцепления зависит от линейных размеров соответствующих хромосом. Так, у плодовой мушки имеется одна (IV) точечная (при анализе в световом микроскопе) хромосома. Соответственно число генов в ней во много раз меньше, чем в остальных, значительно превосходящих ее по длине. Следует также отметить, что в гетерохроматических районах хромосом генов нет или почти нет, поэтому протяженные области конститутивного гетерохроматина могут несколько изменить пропорциональность числа генов и длины хромосомы.

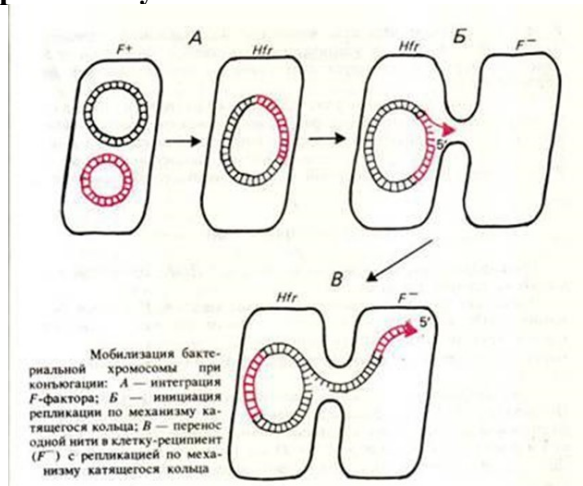
На основании генетического картирования составляются генетические карты. На генетических картах крайнему гену (т.е. наиболее удаленному от центромеры) соответствует нулевая (исходная) точка. Удаленность какого-либо гена от нулевой точки обозначается в морганидах.

Конверсия генов

Конверсия генов происходит, когда в одной и той же клетке существуют две родственные, но расходящиеся последовательности, которые могут быть субстратами для событий рекомбинации. Результатом конверсии генов является однонаправленный перенос ДНК от донора в очень похожую последовательность ДНК реципиента. Одним из наиболее изученных результатов конверсии генов у бактерий является пилусная антигенная вариация IV типа у *Neisseria gonorrhoeae*. Антигенная вариация приводит к фенотипической гетерогенности в генетически клональной бактериальной популяции, поскольку разные клетки могут экспрессировать одну из нескольких возможных антигенных форм белка. У *N. gonorrhoeae* антигенные варианты pilus обусловлены различиями в структуре белка pilin. Каждый вариант pilin разделяет консервативную N-концевую область, но они отличаются С-концом. Консервативная часть пилина кодируется локусом *pilE*, а варибельный сегмент белка кодируется до шести различными нетранскрибируемыми или слабо транскрибируемыми локусами *pilS*.

Для экспрессии полноразмерного функционального белка pilin требуется событие конверсии генов, при котором один из молчащих локусов *pilS* переносится в Скопление локуса через реакцию рекомбинации, опосредованную RecA и RecOR. Хотя локус *pilE* генетически нестабилен, событие конверсии генов не влияет на локусы *pilS*. Биологические силы, приводящие к изменению антигена пилина у *N. gonorrhoeae*, до конца не изучены. Однако уровни железа могут влиять на частоту антигенных вариаций, и это может быть важно при передаче новым хозяевам.

Задание 2. Рассмотрите схему.



ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8 (3). АНАЛИЗ МИТОТИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ (НА ПРИМЕРЕ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ).

Цель работы: изучить анализ митотического расщепления, парасексуальный цикл и его этапы у грибов. Узнать все про гетерокарионы. Разобрать методы картирования при митотическом анализе на примере аспергиллов: определение групп сцепления и локализация генов в группах сцепления. Митотические карты.

Ход работы:

Теоретическая часть

Митотическое расщепление

Редкое расщепление гетерозигот при митотическом делении впервые наблюдали у дрозофилы, а затем и у других высших организмов. Особую важность оно приобрело в генетике грибов. При изучении этого явления было показано, во-первых, что митотическое расщепление для некоторых видов, лишенных половой стадии, - единственный способ рекомбинации; во-вторых, что анализ митотического расщепления может быть ценным инструментом для исследования генетической структуры организмов.

Принципы анализа митотического расщепления были разработаны главным образом на *Aspergillus nidulans*, но они применимы ко всем грибам, в жизненном цикле которых существует диплоидная стадия или ее можно получить искусственно. Исследования на плесневых грибах показали, что расщепление гетерозиготного диплоида при вегетативных делениях связано с двумя независимо происходящими явлениями - потерей хромосом, в предельном случае ведущей к гаплоидизации, и митотическим кроссинговером. Оба явления эффективно используются для обнаружения сцепления и картирования генов.

Парасексуальный цикл и его этапы грибов.

Гаметогамия представляет собой слияние гамет, образующихся в гаметангиях или голых гаметах. Этот тип полового процесса характерен для низших грибов и может протекать в виде изогамии, гетерогамии или оогамии.

Изогамия представляет слияние двух одинаковых по форме планогамет (подвижных гамет). В результате копуляции образуется дикарион – подвижная планозигота, снабженная жгутиками. Она внедряется в ткани восприимчивого растения, теряет жгутики, становится неподвижной, одевается сплошной оболочкой и превращается в покоящуюся спору-цисту.

При созревании цисты происходит кариогамия и возникает диплоидное ядро. Впоследствии осуществляется его редукционное деление, затем образовавшиеся гаплоидные ядра делятся, возникает многоядерная клетка – зооспорангий. Вокруг каждого гаплоидного ядра обособляются участки (комочки) цитоплазмы – будущие зооспоры. При полном созревании оболочка зооспорангия разрывается, и подвижные зооспоры выбрасываются наружу. У некоторых наиболее примитивных грибов (слизевики) появляется диплоидный амебоид.

Гетерогамия представляет слияние двух подвижных морфологически разнящихся гамет. Продуктом полового процесса является циста.

Оогамия более сложная форма полового процесса, при которой крупные неподвижные яйцеклетки, формирующиеся в оогониях, оплодотворяются мелкими подвижными сперматозоидами, развивающимися в антеридиях. Оогоний имеет шаровидную форму и одет довольно толстой оболочкой, в которой заметны более тонкие места – поры. Через них происходит впоследствии оплодотворение. Первоначально сплошное многоядерное содержимое оогония распадается затем на несколько одноядерных яйцеклеток, свободно лежащих в виде шаров. Внутри оболочки иногда остается только одна яйцеклетка, на образование которой идет центральная часть плазмы. Мужская клетка – антеридий развивается на конце боковой ветви и

представляет собой округлую или цилиндрическую клетку, развивающуюся на том же мицелии или на другом, со многими клеточными ядрами, но не дифференцированную на обособленные гаметы. Антеридий к моменту созревания плотно соприкасается с оогонием и пускает через поры отростки, после чего содержимое антеридия поступает внутрь яйцеклетки и затем осуществляется плазмोगамия и кариогамия, которые не разделены во времени. После оплодотворения яйцеклетки превращаются в покоящиеся клетки – **ооспоры** с толстой, часто скульптурированной оболочкой. При прорастании происходит редукционное деление диплоидного ядра и образование гаплоидных ядер. Гаплоидные ядра поочередно делятся, возникает многоядерный зооспорангий. Ооспоры могут возникать на наружном мицелии экзогенно или внутри тканей в межклетниках – эндогенно.

Цитологический и химический анализ **гетерокарионов**, непосредственного продукта слияния клеток, открывает новые возможности для изучения факторов, ответственных за генетическую регуляцию в эукариотических клетках. По сравнению с гибридами пролиферирующих клеток гетерокарионное состояние дает важное преимущество, заключающееся в том, что гетерокарион содержит два полных генома, поскольку потери хромосом не происходит, но поскольку сегрегация и рекомбинация отсутствуют, гетерокарионы нельзя использовать для картирования генов так же, как гибриды пролиферирующих клеток. Однако, если два типа клеток, несущих различные генетические дефекты, объединены, анализ может быть использован для изучения комплементации генов. Биологическая информация, полученная с помощью гетерокарионов, подчеркнула роль цитоплазмы в контроле ядерной активности. Когда ядро G1 вступает в контакт с цитоплазмой клетки S-фазы, ядро G1 стимулируется для синтеза ДНК. Если ядро переносится в митотическую клетку, хроматин ядра G1 вынужден конденсироваться в преждевременно конденсированные хромосомы. Неактивные ядра, такие как спящее ядро эритроцита цыпленка, будут стимулироваться для инициирования синтеза РНК и ДНК, когда они вступают в контакт с активной цитоплазмой путем слияния клеток. Было показано, что специфические ядерные белки ответственны за этот процесс реактивации. Аналогичным образом было показано, что другие неактивные ядра, такие как ядра макрофагов и сперматозоидов, реактивируются путем слияния с активными клетками. Степень активации во всех этих случаях, по-видимому, определяется состоянием активной клетки. Неактивные ядра активируются до того же уровня, что и активное ядро, но редко превышают этот уровень. Если дифференцированные клетки сливаются с недифференцированными клетками, обычно дифференцированный характер быстро теряется после слияния. Это наблюдение согласуется с несколькими исследованиями гибридов пролиферирующих клеток, указывающими на некоторый тип негативного контроля дифференцированных свойств. В гетерокарионах, полученных путем слияния клеток сходного типа гистотипической дифференцировки, обычно наблюдается коэкспрессия дифференцированных маркеров.

Гетерозиготные диплоиды, метод их получения, свойства.

Гетерозиготный диплоид, полученный от двух гаплоидных акусотрофных родителей, – прототроф, так как по всем локусам имеет доминантные аллели.

Диплоид не способен расти на среде без аденина, так как локус *зи* находится в гетерозиготном состоянии $20 \text{ нии } и/зи$ и маскируется доминантным аллелем. Хотя гетерозиготные диплоиды в отличие от гетерокарионов стабильны, из них могут выщепляться сегреганты вследствие пересортировки целых хромосом или митотического кроссинговера. Выделение сегрегантов можно проводить несколькими путями. У гетерозиготного диплоида $A \cdot ABC/$ получены митотические сегреганты фенотипа aBC (80), (20), C (60).

Для картирования хромосом изучают расщепления в потомстве гетерозигот по

нескольким генам в анализирующем скрещивании (или в F_2 , если отсутствует анализатор).

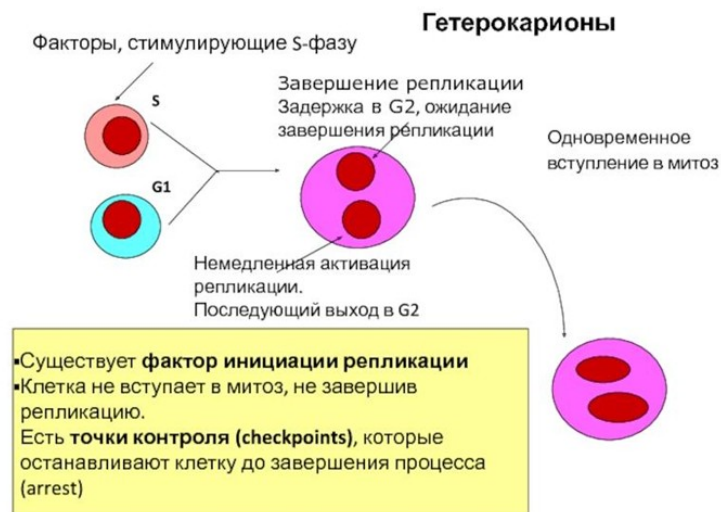
Расстояния между генами можно определить по частоте (%) возникновения рекомбинантных (кроссоверных) особей по формуле $D = 100r(1)$. Единицей расстояния при этом служит морганида (или сантиморган - cM), составляющая одну сотую моргана (М) - условной единицы длины отрезка хроматиды, на которой происходит в среднем один обмен (название дано в честь Моргана). Из курса общей генетики известно, что доля рекомбинантных (кроссоверных) особей в расщеплении по двум сцепленным далеко расположенным генам (в отсутствии третьего маркера между ними) всегда составляет меньше 50% из-за того, что в некоторых бивалентах не происходит кроссинговера в исследуемой области, а в бивалентах с одиночными и множественными обменами частота рекомбинантных хроматид составляет $1/2$. Поэтому при определении расстояний между генами можно использовать другую форму, учитывающую это обстоятельство - $D = -50 \ln(1-2r)$. В этом случае расстояние выражают в других условных единицах - «стрейнах» (название произошло от сочетания двух фамилий - *Стертеванта* и *Холдейна*).

Поскольку получение гетерозигот по многим генам достаточно трудоемкая работа, для картирования хромосом часто используют серию анализирующих скрещиваний (или F_2) с участием трех генов, причем в каждом из них один или два гена общие: $AaBbCc \times aabbcc$, $AaBbEe \times aabb ee$, $AaEeKk \times aa ee kk$ и т. д.

Митотические карты

Цитологическая карта хромосомы представляет собой фотографию или точный рисунок хромосомы, на котором отмечается последовательность расположения генов. Ее строят на основе сопоставления результатов анализирующего скрещивания и хромосомных перестроек. Например, если хромосома с доминантными генами будет последовательно терять отдельные локусы (при воздействии на нее мутагенов), то в гетерозиготе начнут проявляться рецессивные признаки. Порядок проявления признаков будет указывать на последовательность расположения генов.

Задание 1. Рассмотреть схему.



ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9 (1).

СПОСОБЫ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У БАКТЕРИЙ.

ТРАНСФОРМАЦИЯ. ОТКРЫТИЕ ЭФФЕКТА.

Цель работы: рассмотреть основные способы генетического материала

Ход работы:

Теоретическая часть

Перенос генетического материала бактерий

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

Рекомбинация может быть *гомологичной*, при которой в процессе разрыва и воссоединения ДНК происходит обмен между участками ДНК, обладающими высокой степенью гомологии. Встречается также *сайт-специфическая* рекомбинация, которая происходит только в определенных участках (сайтах) генома и не требует высокой степени гомологии ДНК, например, включение плазмиды в хромосому бактерии. Передача генетического материала между бактериями осуществляется 3-мя механизмами: конъюгацией, трансдукцией и трансформацией.

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

Хромосомная ДНК реплицируется, одна цепь копии хромосомы переносится в реципиентную F^- -клетку, тогда как другая остается в Hfr^+ -клетке, т.е. донор сохраняет свое генетическое постоянство.

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

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

абортивная.

Задание 1. Изучите подробно схему переноса.

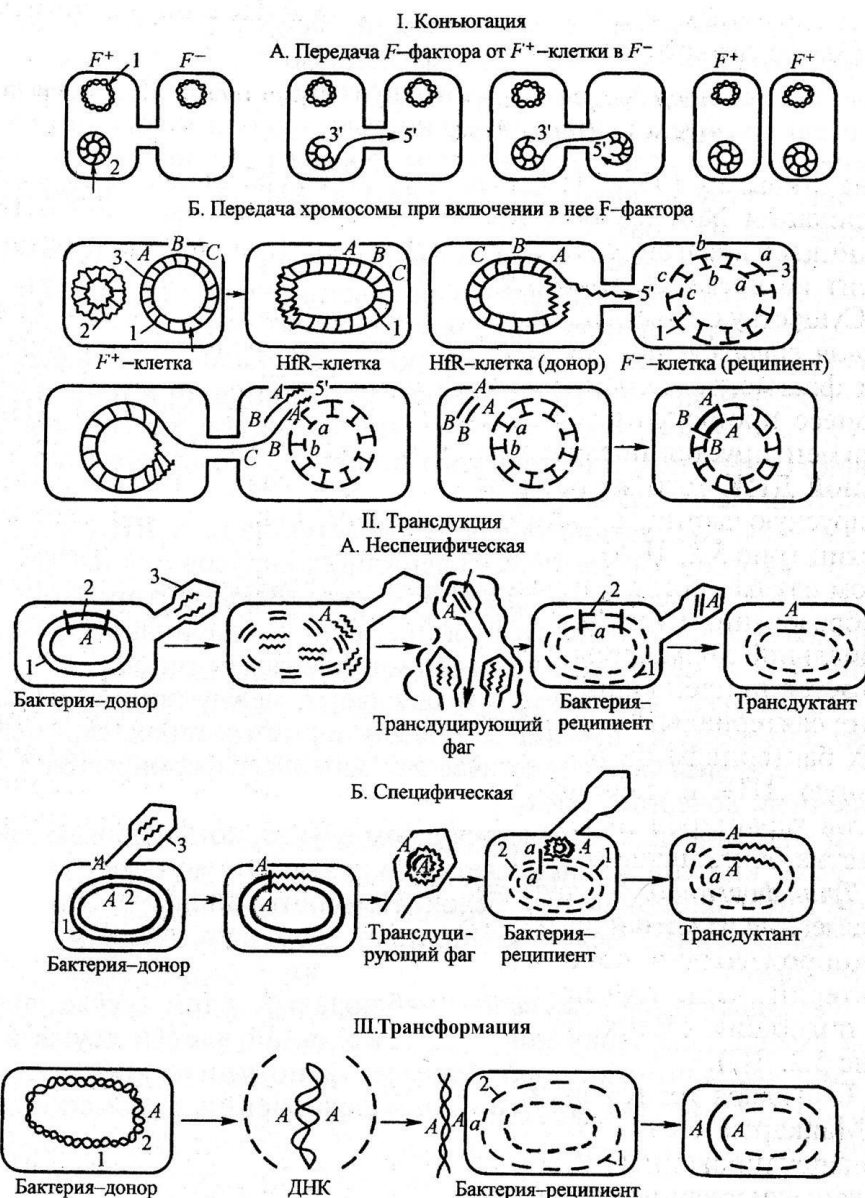


Рисунок. Передача генетической информации у бактерий. I: 1 – бактериальная хромосома; 2 – F-фактор; 3 – гены, участвующие в рекомбинации; ABC – генотип донора; abc – генотип реципиента. II: 1 – бактериальная хромосома; 2 – гены, участвующие в рекомбинации: A – переносимый фагом ген; а – генотип реципиента; 3 – фаг. III: 1 – бактериальная хромосома; 2 – гены, участвующие в рекомбинации: A – генотип донора; а – генотип реципиента. (Микробиология и иммунология. - Под ред. Воробьева А.А. - М., 1999).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9 (2).

КОНЬЮГАЦИЯ. ОТКРЫТИЕ КОНЬЮГАЦИИ У ESCHERICHIA COLI И ОСОБЕННОСТИ ЭТОГО ПРОЦЕССА. СЕКСДУКЦИЯ. ПЕРЕНОС ХРОМОСОМЫ ПРИ КОНЬЮГАЦИИ. МЕРОЗИГОТЫ. ЧАСТОТА ПЕРЕНОСА И ЧАСТОТА ВКЛЮЧЕНИЯ МАРКЕРОВ. МЕТОДЫ КАРТИРОВАНИЯ ХРОМОСОМЫ ПРИ КОНЬЮГАЦИИ

Цель работы: подробно изучить процесс конъюгации. Изучить дифференцировку у кишечной палочки, доказательство кольцевой природы хромосомы. Сексдукция.

Перенос хромосомы при конъюгации. Мерозиготы. Частота переноса и частота включения маркеров. Методы картирования хромосомы при конъюгации.

Ход работы:

Теоретическая часть

Конъюгация (от лат. conjugatio - соединение) - однонаправленный перенос части генетического материала (плазмид или бактериальной хромосомы) при непосредственном контакте двух бактериальных клеток. Открыт в 1946 году Джошуа Ледербергом и Эдвардом Татумом. Явление конъюгации было открыто и хорошо изучено у кишечной палочки (*Escherichia coli*), но в дальнейшем конъюгация была описана у множества как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Посредством конъюгации бактерии обмениваются генетическим материалом, поддерживая своё генетическое разнообразие.

Бактериальная конъюгация - это передача генетического материала между бактериальными клетками путем прямого межклеточного контакта или мостовидного соединения между двумя клетками. Это происходит через пилус. Это парасексуальный способ размножения у бактерий.

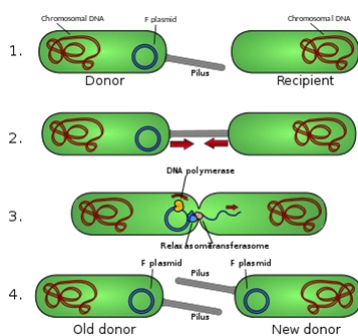
Это механизм горизонтального переноса генов, как трансформация и трансдукция, хотя эти два других механизма не включают межклеточный контакт.

Классическая бактериальная конъюгация *E. coli* часто рассматривается как бактериальный эквивалент полового размножения или спаривания, поскольку она включает обмен генетическим материалом. Однако это не половое размножение, поскольку не происходит обмена гамет и, действительно, не возникает нового организма: вместо этого трансформируется существующий организм. Во время классической конъюгации *E. coli* донорская клетка обеспечивает конъюгативный или мобилизуемый генетический элемент, который чаще всего является плазмидой или транспозоном. Большинство конъюгативных плазмид имеют системы, гарантирующие, что клетка-реципиент уже не содержит аналогичный элемент.

Передаваемая генетическая информация часто полезна для получателя. Преимущества могут включать устойчивость к антибиотикам, переносимость ксенобиотиков или способность использовать новые метаболиты. Другие элементы могут быть вредными и могут рассматриваться как бактериальные паразиты.

Конъюгация у *Escherichia coli* путем спонтанного зигогенеза и у *Mycobacterium smegmatis* путем распределительного переноса спаривания *E. coli* тем, что в этих случаях происходит существенное смешение родительских геномов.

Задание 1. Подробно рассмотрите схему.



Половая дифференцировка у кишечной палочки (свойства F, F⁺ и Hfr - штаммов).

Кишечная палочка - представляет собой грамотрицательные, палочковидные бактерии, которые обычно встречаются в нижних кишечник от теплокровных организмов (endotherms). Большинство штаммов кишечной палочки безвредны, но патогенные разновидности вызывают у людей серьезные пищевые отравления, септический шок, менингит или инфекции мочевыводящих путей. В отличие от нормальной флоры *E. coli*, патогенные разновидности продуцируют токсины и другие

факторы вирулентности, которые позволяют им находиться в частях тела, обычно не заселенных *E. coli*, и повреждать клетки-хозяева. Эти патогенные признаки кодируются генами вирулентности, переносимыми только патогенами.

Кишечная палочка и родственные бактерии составляют около 0,1% кишечной флоры, и фекально–оральная передача является основным путем, по которому патогенные штаммы бактерий вызывают заболевание. Клетки способны выживать вне организма лишь ограниченное количество времени, что делает их идеальными индикаторными организмами для тестирования образцов окружающей среды на фекальное загрязнение. Бактерию также можно легко и недорого выращивать в лабораторных условиях, и она интенсивно исследуется уже более 60 лет. *E. coli* является наиболее широко изученным модельным прокариотическим организмом и важным видом в области биотехнологии и микробиологии, где она служит хозяином. организм по большей части работает с рекомбинантной ДНК.

Немецкий педиатр и бактериолог Теодор Эшерих обнаружил кишечную палочку в 1885 году и в настоящее время она классифицируется как часть гаммапротеобактерий семейства Enterobacteriaceae.

Сексдукция (от Секс и лат. ductio – проведение) частный случай переноса генов во время конъюгации от одной бактериальной клетки – донорской («мужской») к другой – реципиентной («женской»). С. осуществляется половым фактором, выделившимся в автономное состояние из бактериальной хромосомы вместе с её фрагментом. При С. в реципиентную клетку с фрагментом хромосомы переходит и половой фактор, тогда как при обычной конъюгации включенный в хромосому половой фактор переходит в реципиентную клетку крайне редко. В результате С. клетки приобретают свойства донорских («мужских») клеток, т. е. способность в дальнейшем осуществлять при конъюгации как С., так и перенос бактериальной хромосомы. В остальном С. сходна с обычным конъюгационным переносом: клетки становятся Диплоидами по генам, содержащимся в перенесённом фрагменте, приобретая присущие диплоидам особенности взаимодействия между гомологичными генами. Стабильность таких частичных диплоидов зависит от величины перенесённого фрагмента хромосомы: с увеличением протяжённости фрагмента повышается вероятность рекомбинации между ним и гомологичным участком хромосомы, что обычно приводит к восстановлению гаплоидного состояния клетки. С. имеет сходство со специфической трансдукцией, отличаясь от неё тем, что осуществляется с помощью перешедшего в автономное состояние полового фактора, а не при посредстве умеренного фага, вышедшего из состава хромосомы бактерии.

Мерозигота

Мерозигота, или Меродиплоид, — бактериальная клетка, диплоидная по части генетического материала, внесенной в эту клетку в процессе трансформации, трансдукции или конъюгации, но гаплоидная по остальной части генома. Примером формирования мерозиготы может служить передача F-фактора у бактерий в ходе сексдукции, когда F-фактор вырезается из клеток Hfr неточно и к нему оказываются прицеплены другие бактериальные гены.

При картировании генов у бактерий с помощью конъюгации получается кольцевая генетическая карта хромосомы. Значение генетических карт позволяет планировать работу по получению организмов с определенными сочетаниями признаков, что используется в генетических экспериментах селекционной практике. Сравнение генетических карт хромосом разных видов способствует эволюционному процессу. На основе же генетических карт проводят генетический анализ. Методы картирования хромосомы при конъюгации: по градиенту передачи маркеров, по времени их вхождения в мерозиготу, по частоте кроссинговера.

**САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ. ЛИЗОГЕНИЯ И
ФАГОВАЯ КОНВЕРСИЯ. ЛИЗОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ И ИХ СВОЙСТВА,
ИНДУКЦИЯ ФАГА В ЛИЗОГЕННЫХ КУЛЬТУРАХ, ИММУНИТЕТ. ПРОФАГ,
ЕГО ФУНКЦИИ В КЛЕТКЕ, МЕХАНИЗМ ИНТЕГРАЦИИ В ХРОМОСОМУ И
ИСКЛЮЧЕНИЕ. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ
ТРАНСДУКЦИЯ. ОСОБЕННОСТИ И МЕХАНИЗМЫ. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТРАНСДУКЦИИ ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ У
БАКТЕРИЙ. ВОЗМОЖНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ ПРИ
НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТРАНСДУКЦИИ. АБОРТИВНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ.
ТРАНСДУКЦИЯ У РАЗНЫХ ВИДОВ БАКТЕРИЙ.**

Цель работы: изучить сайт-специфическая рекомбинация лизогению и конверсию. Трансдукцию.

Ход работы:

Теоретическая часть

Сайт-специфическая рекомбинация - тип генетической рекомбинации, в которой при обмене цепей ДНК происходит реакция между специфическими сайтами. Перестановка сегментов ДНК происходит путем распознавания и связывания коротких последовательностей ДНК (сайтов), в которых специальные ферменты расщепляют, переставляют и снова соединяют цепи ДНК. Для одних систем рекомбинации достаточно только фермента рекомбиназы, другие же требуют наличия дополнительных факторов. В природе сайт-специфическая рекомбинация случается при интеграции вируса в геном (образование провируса).

Системы сайтспецифической рекомбинации высокоспецифичны, быстры и эффективны даже при работе со сложными эукариотическими геномами и по этой причине широко используются в генетической инженерии. Они участвуют во множестве клеточных процессов, включая репликацию бактериального генома, патогенез, передвижение мобильных генетических элементов и образовании антител в лимфоидных клетках млекопитающих.

Сайты рекомбинации обычно имеют длину от 30 до 200 нуклеотидов и состоят из двух инвертированных повторов, с которыми связывается рекомбиназа, между которыми располагается последовательность, по которой и происходит рекомбинация. Оба сайта, по которым происходит рекомбинация, как правило идентичны, но бывают и исключения (например сайты интеграции фага λ attP и attB, см. фаг лямбда).

1. Профаг. Лизогения. Лизогенная культура. Лизогенная конверсия. Фаговары. Практическое использование фагов.

Профаг – геном фага, интегрированный в хромосомную ДНК бактериальных клеток.

Биологическое явление симбиоза микробной клетки с умеренным фагом (профагом) называется лизогенией (способность различных штаммов бактерий нести в своём составе профаг бесчисленное количество поколений), а культура бактерий, содержащая профаг, получила название лизогенной.

Различают монолизогенность и полилизогенность. Бактериальная культура, образующая после индукции один вид фага, называется монолизогенной, а бактериальная культура, образующая несколько видов фагов, называется полилизогенной.

Изменение свойств микроорганизмов под влиянием профага получило название лизогенной (фаговой) конверсии. Например, профаг придает дифтерийной палочке способность продуцировать экзотоксин.

Фаговар – вариант того или иного вида бактерий, отличающийся от других вариантов этого же вида по спектру чувствительности к типовым фагам.

По спектру действия на бактерии фаги разделяют на:

- поливалентные (лизируют близкородственные бактерии, например сальмонеллы);

- моновалентные (лизируют бактерии одного вида);

- типоспецифические (лизируют только определенные фаговары возбудителя).

Практическое использование бактериофагов.

1. Для идентификации бактерий (фагоидентификация, фаготипирование).

Метод Отто (метод стекающей капли). Для выполнения этого метода на чашку с МПА наносится капля суточной бульонной культуры и шпателем круговыми движениями распределяется по поверхности агара. Затем наносится капля суспензии известного бактериофага и наклоном чашки дают капле стечь по поверхности агара. Посевы инкубируют в термостате в течение суток, после чего учитывают результаты. При соответствии фага и бактерий в месте нанесения диагностического фага наблюдается отсутствие роста культуры.

Метод Фишера. Для выполнения этого метода каплю испытуемой суточной бульонной культуры наносят на МПА и шпателем распределяют по поверхности агара. Затем чашку условно делят на квадраты. В каждый квадрат наносят по капле суспензий разных фагов. После суточного культивирования в термостате учитывают результаты. При соответствии бактерий и фага обнаруживаются зоны лизиса.

Метод Фюрта. При выполнении этого метода в расплавленный и остуженный до 45-50° С МПА добавляют суспензию известного бактериофага и тщательно перемешивают. Полученную смесь разливают в чашки Петри. Каждую чашку условно делят на несколько секторов, в которые высевает штрихом исследуемые культуры. Чашки инкубируют в термостате, после чего учитывают результаты. Рост культуры будет отсутствовать в том секторе, в котором бактерии и фаг соответствуют друг другу.

2. Для фагопрофилактики (в настоящее время по эпидемическим показаниям фагопрофилактику проводят только при дизентерии и брюшном тифе, имеет ряд преимуществ: возможность использования в больших количествах, быстрота действия, легкость введения, полная безвредность).

3. Для фаготерапии (лечение дисбактериозов, часто – смесь разных фагов).

4. Для оценки санитарного состояния окружающей среды (по содержанию некоторых бактериофагов во внешней среде можно судить о присутствии в них соответствующих бактерий, колифаги в питьевой воде) и эпидемиологического анализа (для выявления источника и путей распространения инфекции, при этом выделение бактерий одного фаговара от разных больных указывает на общий источник их заражения).

5. Индикация бактерий с помощью реакции нарастания титра фага. Для установления присутствия определенных бактерий в исследуемую пробу добавляют известное количество специфического фага. При наличии гомологичных бактерий фаг размножается, в результате чего нарастает его титр (количество). РНТФ используют при диагностике дизентерии и брюшного тифа, для выявления бактерионосительства при брюшном тифе, для обнаружения брюшнотифозных и дизентерийных бактерий в воде и молоке, для обнаружения дизентерийных микробов на предметах внешней среды, для выявления чумного микроба и холерного вибриона в воде.

6. Генная инженерия. Трансдуцирующие фаги широко используются в генной инженерии. В частности, феномен неспецифической трансдукции применяется для картирования генома бактерий.

Трансдукция – перенос генетического материала из клетки донора в клетку реципиента через трансдуцирующий бактериофаг. Последний представляет собой умеренный фаг, который в состоянии профага получил участок ДНК от донорской клетки в результате неточного вырезания своей последовательности из генома клетки-донора. При этом бактериофаг становится дефектным, т.к. теряет часть собственной нуклеиновой кислоты. Такой фаг упаковывается в свою оболочку, выделяется из

клетки и может проникать в клетку-реципиент.

Этот вид рекомбинаций открыт Н. Циндером и Дж. Ледербергом в 1951 г.

Различают 3 вида трансдукции:

1. Неспецифическая;
2. Специфическая;
- 3.Abortивная.

Неспецифическая трансдукция. При этом трансдуцирующий бактериофаг передает в реципиентную клетку любой ген донорской клетки и включает его в гомологичную область ДНК реципиента путем рекомбинации этого гена с нуклеотидом. Трансдуцирующий бактериофаг выступает лишь в роли переносчика, в нуклеотид не встраивается, и лизогенизации реципиентной культуры не происходит.

Специфическая трансдукция. Здесь бактериофаг переносит строго определенный ген (или гены) от клетки донора к реципиенту и встраивает его в определенном участке ДНК реципиента путем сайт-специфической рекомбинации. В этом случае бактериофаг может встраиваться в нуклеотид клетки-реципиента, т.е. происходит лизогенизация бактерии. При этом такие клетки становятся невосприимчивыми, как и все лизогенные клетки, к последующему заражению гомологичным вирулентным фагом.

Обычно при специфической трансдукции переносятся бактериальные гены, сцепленные с геномом встроенного бактериофага. Чаще всего они окаймляют (фланкируют) профаг. Для *E.coli* и фага лямбда это гены *gal* и *bio*, контролируемые, соответственно, метаболизм галактозы и синтез витамина биотина.

Abortивная трансдукция. В этом случае фрагмент ДНК донора, доставленный при трансдукции, не включается в ДНК реципиента и остается в цитоплазме. Клетка не лизогенизируется, а новый признак по мере деления клетки исчезает.

Изучение трансдукции показало, что одни фаги могут переносить разные бактериальные гены, а другие – только определенные. В соответствии с этим принято выделять два типа трансдукции:

- 1) генерализованная (неспецифическая, или общая);
- 2) специфическая, или ограниченная.

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.

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.

Наиболее известным примером специфической трансдукции является трансдукция, осуществляемая фагом λ , который способен заражать клетки бактерий *E. coli* с последующей интеграцией его ДНК в геном бактерий.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9 (4).

ПЕРЕНОС ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ У АКТИНОМИЦЕТОВ. КОНЬЮГАЦИЯ У АКТИНОМИЦЕТОВ; КОНЬЮГАТИВНЫЕ ПЛАЗМИДЫ. ПОЛОВЫЕ

ТИПЫ АКТИНМИЦЕТОВ, ИХ СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЯ С ПОЛОВЫМИ ТИПАМИ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ.

Цель работы: изучить перенос генетического материала и генетическое картирование у актиномицетов. Получение гибридных клонов актиномицетов: гетерокарионы, гетероклоны и рекомбинанты, механизм их образования. Конъюгация у актиномицетов; конъюгативные плазмиды. Использование гетероклонов и рекомбинантов. Половые типы актиномицетов.

Ход работы:

Теоретическая часть

Перенос генетического материала с помощью плазмид.

Это наиболее часто встречающийся способ переноса генетического материала у актиномицетов. Линейные плазмиды актиномицетов были обнаружены раньше, чем линейные хромосомы. Впервые они были описаны у одного из видов актиномицетов в конце 70-х - начале 80-х гг. Эти плазмиды, pSLA 1 и pSLA 2, были размером несколько более 10 тпн. Они детерминировали синтез антибиотика ланкацидина. В клетке содержалось до 60 копий таких плазмид. Линейное строение их ДНК доказывалось следующим образом.

Во-первых, обработка рестриктазами давала такую комбинацию фрагментов, на основании которой могла быть построена лишь линейная, но не кольцевая карта. Далее, два фрагмента не входили в гель при электрофорезе, если ДНК не была депротеинизирована проназой. Если ДНК была обработана фенолом и додецилсульфатом натрия, то эти фрагменты можно было найти на электрофореграммах, но их передвижение было аномальным. Лишь после депротеинизации они передвигались со скоростью, соответствующей их размерам. Нативная ДНК плазмид была устойчива к 3'-экзонуклеазе, но чувствительна к экзонуклеазе фага А (5'-экзонуклеаза). Все это свидетельствовало о том, что плазмиды были линейными, и на их свободных концах находились белки, прикрепленные к 5'-концам ДНК. Впоследствии было установлено, что на концах линейных плазмид *S. rochei* находятся многочисленные повторы длиной в несколько сот пар оснований. У плазмиды pSCL из клеток *S. clavuligerus* концевые участки с повторами, размером около 1 тпн, были очень похожи друг на друга; правый участок мог гибридизоваться с левым.

ДНК одной линейной плазмиды, pSCL-1 из *S. clavuligerus*, была полностью секвенирована. Вся плазида была размером в 11696 пар нуклеотидов (п.н.). На ее концах были обнаружены занимающие ~900 п.н. концевые инвертированные повторы, имеющие ~70% гомологии с концевыми участками плазмиды из *S. rochei*. К концам "крепились" белки; видимо, с этих участков начиналась репликация ДНК, идущая от концов к центру линейной плазмиды. Однако в некоторых случаях линейные плазмиды могли реплицироваться с другой области, расположенной в центре плазмиды. Так, плазида pSCL 1 из *S. clavuligerus* размером в 12 т.п.н. могла быть клонирована в плазмиде *E. coli* pUC 19, если затем кольцевую химерную плазмиду выделяли из клеток *E. coli*, то она реплицировалась в клетках актиномицетов как кольцевая молекула. Это свойство сохранялось и тогда, когда рестриктазами "обрезали" концевые части pSCL 1 и "закольцовывали" основную часть плазмиды лигазой. Видимо, второй ориджин репликации в нормальных условиях роста был критическим. Есть упоминание о том, что линейная плазида pSA 1 под влиянием определенных мутаций может реплицироваться как кольцевая структура; при этом ее копияность возрастает от 1 до 20 - 30 копий на клетку. Линейные плазмиды могли быть конъюгативными.

Все сказанное выше относилось в основном к плаздам актиномицетов в 10 - 15 т.п.н. Однако наряду с ними в клетках актиномицетов существуют огромные плазмиды с линейной структурой: от 50 тпн (например, SLP 2) до 300 - 590 т.п.н. (SCP 1 и ряд других плазмид; 26 - 28; 76). Одна из этих плазмид - SCP I - была известна

гораздо раньше, но лишь недавно с применением пульсфореза удалось показать ее линейную структуру и другие особенности строения. В поле пульсфореза она вела себя как линейная дрожжевая хромосома сходных размеров; другим доказательством ее линейности служили расчеты с построением рестрикционной карты после применения целого спектра рестриктаз. Для этой и других гигантских плазмид характерна очень большая величина концевых участков с инвертированными повторами; у SCP 1 каждый концевой участок имел размер в 40 тпн, что в сумме составляло заметную часть всей длины плазмиды. Интересно, что у крупной линейной плазмиды SLP 2 правый концевой участок был практически полностью гомологичен обоим концам линейной хромосомы клетки, что вначале вызвало недоумение (три одинаковых концевых участка в клетке, обладающей лишь одной линейной хромосомой). Однако затем была выявлена "плазмидная принадлежность" одного из этих концов. Гигантская плаزمида SCP 1 может нести участки хромосомы, и участки этой плазмиды могут включаться в хромосому. При ее огромной величине ее копияность равняется приблизительно четырем копиям на клетку, что составляет ~20% плазмидной ДНК на клеточный геном.

Нитевидные клетки актиномицетов, как и одноклеточных грибов, не разделены септами (перегородками) и называются гифами. Скопление гифов называют мицелием. Мицелий развивается из небольшой почки, которая постепенно вытягивается в палочку, а затем в короткую нить с боковыми ответвлениями. На концах воздушного мицелия актиномицеты образуют конидии или спораносцы (прямые, волнистые или спиральные).

Экзоспоры (овальные, круглые, цилиндрические, с гладкой поверхностью или шипами) служат для размножения актиномицетов, они не термостойки, но выдерживают высушивание. Некоторые актиномицеты имеют капсулу.

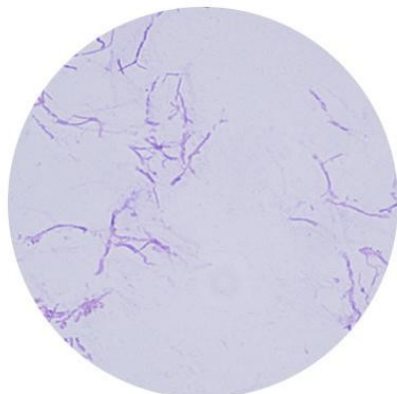
Актиномицеты размножаются бесполым путем (экзоспорами, поперечным делением, почкованием и фрагментацией мицелия на палочковидные или кокковидные формы).

Актиномицеты - бактерии, так как:

- имеют нуклеоид, а не истинное ядро, характерное для грибов;
- содержат в КС пептидогликан, а не хитин и целлюлозу, которые имеют грибы;
- чувствительны к бактериофагам и антибиотикам, а не к противогрибковым препаратам;
- хорошо растут в слабо щелочной среде, а грибы - в кислой.

Актиномицеты (лучистые грибы по старым классификациям) - формы бактерий, имеющие истинный, но не имеющие перегородок мицелий. Мицелиальный (в виде ветвящихся нитей) рост этих грамположительных бактерий придает им внешнее сходство с грибами. Это сходство усиливается вследствие наличия у высших форм актиномицетов наружных неполовых спор, которые называются конидиями.

Задание 1. Рассмотрите препарат.



В отличие от грибов, актиномицеты имеют прокариотическое строение клетки,

несодержат в клеточной стенке хитина или целлюлозы, размножаются только бесполым путем. У низших актиномицетов мицелий фрагментируется на типичные одноклеточные бактерии. Мицелий актиномицетов подразделяют на субстратный (в субстрате) и воздушный. К мицелиальным бактериям относят микобактерии, род накардий и актиномицетов, несколько родов высших актиномицет.

Представители рода *Mycobacterium*, в который входят возбудители туберкулеза, являются кислотоустойчивыми микроорганизмами, плохо воспринимающими краски. Их высокая резистентность во внешней среде, кислотоустойчивость и ряд других свойств связана с особым составом клеточной стенки, большим содержанием липидов и воска.

У представителей родов *Actinomyces* и *Nocardia* мицелий выражен в значительно большей степени, чем у микобактерий, однако в старых культурах они также проявляют тенденцию фрагментироваться на отдельные клетки неправильной формы. Микроорганизмы рода *Actinomyces* являются анаэробами, *Nocardia* - аэробами, многие из которых проявляют кислотоустойчивость.

Микроорганизмы, относящиеся к высшим актиномицетам (рода *Streptomyces*, *Micromonospora*) образуют мицелий и размножаются наружными неполовыми спорами или конидиями. Обычным местом обитания для большинства из них является почва. Для актиномицетов характерно образование друз - плотных "зерен" в гное, представляющих собой беспорядочно переплетенные в центре нити мицелия с радиально отходящими на периферию колбовидно расширенными на концах "дубинками". С некоторыми актиномицетами (например, стрептомицетами) связана способность выработки антибиотиков.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10 (1, 2)

ВНЕХРОМОСОМНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ.

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ

МИКРООРГАНИЗМОВ: ХЛОРОПЛАСТЫ ВОДОРОСЛЕЙ И МИТОХОНДРИИ

ГРИБОВ.

Цель работы: Изучить цитоплазматические системы эукариотических микроорганизмов: хлоропласты водорослей и митохондрии грибов.

Ход работы

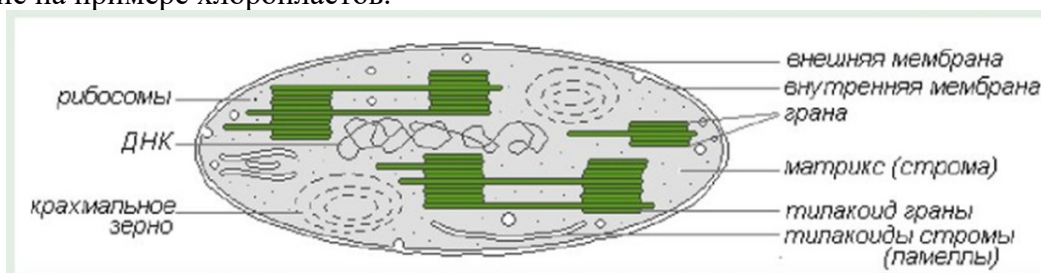
Теоретическая часть

В цитоплазме также существуют молекулы, являющиеся носителями наследственной информации – это могут быть ДНК пластид или митохондрий, а также некоторые другие агенты. Еще в 1921 г. русский ботаник Б.М. Козо-Полянский высказал мнение, что клетка – это симбиотрофная система, в которой сожительствует несколько организмов. В настоящее время эндосимбиотическая теория происхождения митохондрий и хлоропластов является общепринятой. Согласно этой теории, митохондрии — это в прошлом самостоятельные организмы. По мнению Л. Маргелис (1983), это могли быть эубактерии, содержащие ряд дыхательных ферментов. На определенном этапе эволюции они внедрились в примитивную, содержащую ядро клетку. И, действительно, оказалось, что ДНК митохондрий и хлоропластов по своей структуре несколько отличается от ядерной ДНК и сходна с бактериальной ДНК (кольцевое строение, генетический код). Сходство обнаруживается и в аппарате трансляции – рибосомы митохондрий и пластид имеют более мелкие размеры. Синтез белка в митохондриях, подобно бактериальному, подавляется антибиотиком хлорамфениколом, который не влияет на синтез белка на рибосомах эукариот. Кроме того, система переноса электронов у бактерий расположена в плазматической мембране, что напоминает организацию электронтранспортной цепи во внутренней митохондриальной мембране. Свойства митохондрий (белки, структура) закодированы

частично в ДНК митохондрий, а частично в ядре. Так, митохондриальный геном кодирует белки рибосом и частично систему переносчиков электронно-транспортной цепи, а в геноме ядра кодирована информация о белках ферментах цикла Кребса. Сопоставление размеров митохондриальной ДНК с числом и размером митохондриальных белков показывает, что в ней заложено информации почти для половины белков. Это и позволяет считать митохондрии, как и хлоропласты, полуавтономными, т. е. не полностью зависящими от ядра. Они имеют собственную ДНК и собственную белоксинтезирующую систему, и именно с ними и с пластидами связана так называемая цитоплазматическая наследственность. В большинстве случаев это наследование по материнской линии

Задание 1. Изучить материал.

Пластиды – органоиды гиалоплазмы, характерные только для клеток растений. Пластиды различаются в зависимости от наличия пигментов: хлоропласты (зеленые), хромопласты (оранжевые, желтые, красные), лейкопласты (бесцветные). Рассмотрим их строение на примере хлоропластов.



Размеры и число хлоропластов в клетке варьирует в зависимости от вида растения. Обычно это овальные или линзовидные тельца, длиной 4-7 мкм, толщиной 1-3 мкм. Число их в клетке может быть от 5-7 (у тополя в эпидерме) до 325 (в листьях картофеля). Снаружи хлоропласты покрыты оболочкой из 2 мембран, внутренняя может образовывать в полость пластиды немногочисленные выросты. Под оболочкой находится тело пластиды – строма, структурной единицей которой являются тилакоиды – плоские мешковидные мембранные образования, содержащие пигменты. Тилакоиды, собранные в виде стопки, называются грана. На мембранах гран протекает световая фаза фотосинтеза, на мембранах тилакоидов стромы – темновая. В строме хлоропластов имеются рибосомы, ДНК, иногда крахмальные зерна, белковые кристаллы, микротрубочки.

Хлоропласт (хроматофор) в клетке хламидомонады (*Chlamydomonas*) – типичная органелла растительной клетки, но не похожа на хлоропласты высших растений.

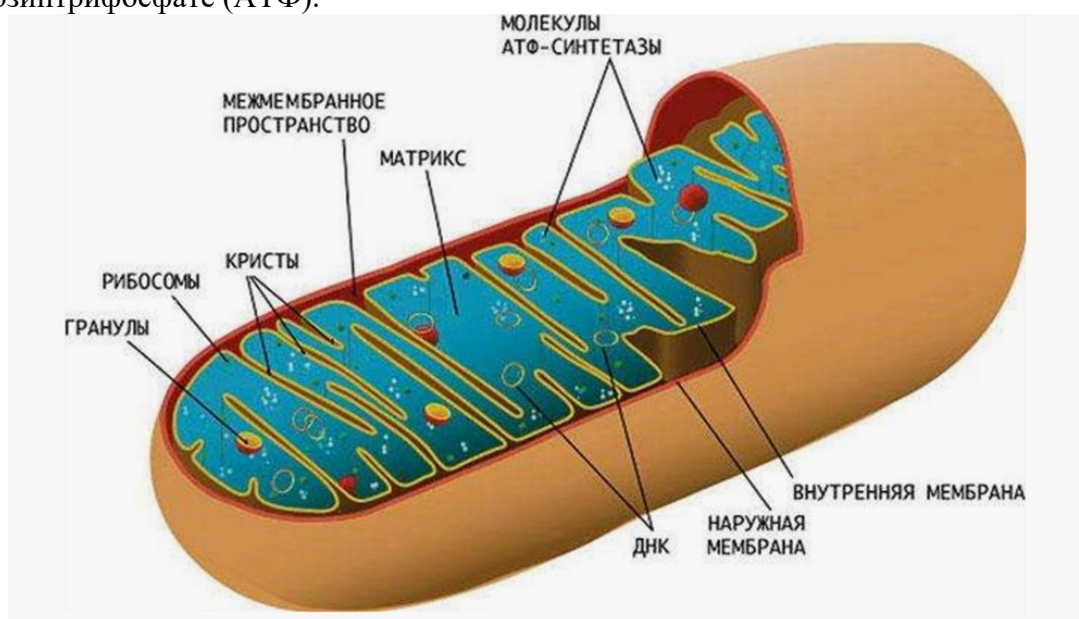


Хлоропласт хламидомонады имеет чашевидную форму с утолщенным основанием. Оболочка состоит из двух мембран. Тилакоиды – сгруппированы по 2-6 в

виде пластин, как у высших растений. По всему хлоропласту распределены кольцевые молекулы хлоропластной ДНК, которые имеют вид маленьких шариков (нуклеоидов). В нижней части хлоропласта находится пиреноид – сферическое тело около 2 мкм в диаметре, окружённое одним рядом крахмалоносных пластинок. Стигма (глазное пятно) – расположено вблизи переднего края хлоропласта непосредственно под оболочкой, слегка выдаётся наружу как маленькая выпуклость. Состоит из 2–3 рядов гранул гомогенного липидно-каротиноидного вещества. Сверху – тело дисковидной формы около 1 мкм в диаметре, сбоку – палочковидной или эллипсовидной формы.

Митохондрии – цитоплазматические органеллы в клетках животных и растений, «энергетические станции клетки», имеют собственные двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК и собственный аппарат трансляции. Электронно-транспортная (дыхательная) цепь митохондрий представлена пятью белковыми

комплексами внутренней мембраны, кодируемыми как ядерными, так и собственными митохондриальными генами. В митохондриях локализована большая часть реакций дыхания (аэробная фаза). Аккумуляция энергии дыхания осуществляется в аденозинтрифосфате (АТФ).



Митохондрии дрожжей (например, пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) – это органеллы, которые вырабатывают энергию для протекания основных биохимических процессов. По форме митохондрии могут быть сферическими, палочковидными или нитевидными. Снаружи отграничены от цитоплазмы двуслойной мембраной: внутренней и внешней. Вариативность структуры митохондрий зависит от специфики обмена, условий культивирования и фазы роста дрожжевых клеток. Например:

- Дрожжи с ярко выраженным аэробным типом обмена (облигатные аэробы и слабо бродящие факультативные анаэробы) содержат большое число сложно структурированных митохондрий с многочисленными кристами.
- У бродящих видов дрожжей мембранный аппарат выражен слабо, имеются лишь немногочисленные крупные митохондрии с неправильно ориентированными кристами.
- У дрожжей низового брожения кристы рудиментируются.

Число митохондрий в одной дрожжевой клетке варьирует в пределах 1–20 в разные периоды роста и в зависимости от условий. Как правило, 1–2 митохондрии в клетке более крупные, чем остальные, и имеют разветвлённую форму.

В митохондриях имеется собственная митохондриальная ДНК (мДНК). Она составляет 5–20% от всей ДНК клетки и кодирует некоторые ферменты

митохондриального матрикса, например, цитохром-с-оксидазу, комплекс АТФ-азы.

Особенностью пекарских дрожжей является наличие цитоплазматической мутации «петит» (*petite*), характеризующейся выраженным фенотипом. Дрожжевой митохондриальный геном называют rho-фактор (ρ-фактор). На чашках Петри с твердой средой, содержащей в качестве источника углерода 0,5% глюкозы (сбраживаемый субстрат) и 2% глицерина (не сбраживаемый субстрат дыхания), клетки дикого типа с нормальной мтДНК образуют крупные колонии (фенотип *grande* и генотип ρ^+), так как способны использовать для получения энергии глицерин, содержащийся в среде в большом количестве. Клетки, содержащие мутантную мтДНК (или полностью лишённые мтДНК) образуют мелкие колонии на таких чашках, так как способны использовать только ферментируемую глюкозу, содержащуюся в такой среде в меньшем количестве (фенотип *petite* и генотип ρ^- или ρ^0). При скрещивании клеток *petite* с *grande* в потомстве образуются оба типа клеток – ρ^- и ρ^+ в разных соотношениях. Супрессивность (*suppression* – подавление) – способность мутантной мтДНК вытеснять мтДНК дикого типа в гетероплазмичной клетке. Она измеряется, как процент потомков гетероплазмичных клеток, унаследовавших мутантную мтДНК (то есть процент маленьких колоний среди общего числа выросших диплоидных колоний).

Позднее цитоплазматические гены были выявлены и у многих других грибов. Биохимические изменения в работе митохондрий у них также были связаны с нарушениями биосинтеза цитохромной системы.

Задание 2. Изучить материал и рассмотреть схемы:

Нерегулярное расщепление в мейозе характерно для наследования признаков, детерминированных митохондриальными генами, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Это явление связано с цитоплазматической наследственностью – передачей генов, контролируемых митохондриями, без специального аппарата распределения их копий при клеточном делении. В мейозе гены, контролируемые митохондриями, не распределяются равномерно между дочерними клетками. Действительно, если в профазе мейоза в каждом ядре взаимодействуют две гомологичные хромосомы, между которыми происходит акт обмена, то митохондриальная рекомбинация представляет собой результат взаимодействия нескольких десятков молекул митохондриальной ДНК, содержащихся в одной гибридной зиготе.

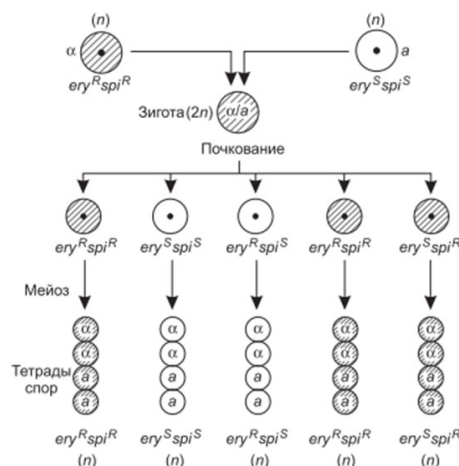


Рисунок — Двуродительское наследование детерминированных митохондриальными генами признаков антибиотикоустойчивости у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Результаты скрещивания двух рас, одна из которых устойчива к стрептомицину (SR), а другая чувствительна к нему (SS). При реципрокных скрещиваниях устойчивость или чувствительность потомков к стрептомицину определяется

исключительно тем, к какому половому типу (mt⁺ и mt⁻) принадлежит клетка расы SS или SR. Свойство передается только по материнской линии, т. е. от родителя (mt⁺). У этой водоросли обнаружены более 100 пластидных генов, которые наследуются строго по материнской линии. Передача признаков по материнской линии объясняется тем, что все пластидные гены, привносимые в зиготу отцовской клеткой (mt⁻), каким-то образом элиминируются и не попадают в образующиеся после мейоза четыре дочерние клетки. В редких случаях (менее 1 %) зигота несет пластидные гены обоих родителей. В отличие от ядерных гетерозигот их называют цитогетами. В ходе дальнейших митотических делений (при бесполом размножении этих особей) постепенно выщепляются оба родительских пластидных гена и возникают клоны клеток, несущих либо SR либо SS.

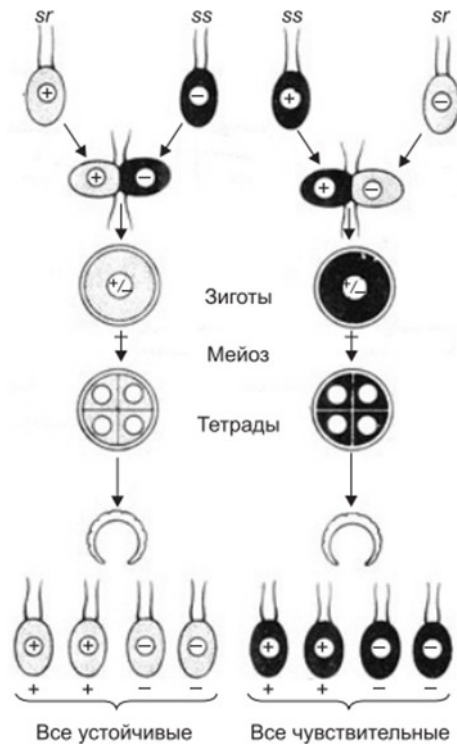


Рисунок – Однородительское наследование признака устойчивости к стрептомицину (хлДНК) у водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*

Таким образом, описанные примеры позволили расширить арсенал экспериментальных методов для исследования цитоплазматической наследственности и показать высокую значимость цитоплазматической наследственности для обеспечения жизнедеятельности организмов.

Задание 3. Контрольные вопросы:

1. Что такое цитоплазматическая наследственность?
2. Назовите виды цитоплазматической наследственности.
3. Какая характерная черта цитоплазматической наследственности?

Задание 4. Ответить на тесты по теме «Цитоплазматическая наследственность»:

I. ЧТО ТАКОЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ?

1. Передача генов вне ядра
2. Деление клетки без участия ядра
3. Наследование признаков через цитоплазму
4. Наследование по законам Менделя

II. КАКИЕ ОРГАНОИДЫ ХАРАКТЕРНЫ ТОЛЬКО ДЛЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ?

1. Митохондрии
2. Ядро
3. Цитоплазма

4. Пластиды

III. В КАКИЕ ГОДЫ ВПЕРВЫЕ БЫЛО ОБНАРУЖЕНО ВНЕЯДЕРНОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ?

1. В 1808-1809
2. В 1880 -1881
3. В 1908-1909
4. В 1980 -1981

IV. КАКИЕ ОРГАНОИДЫ ИМЕЮТ СОБСТВЕННУЮ ДНК?

1. Только митохондрии
2. Митохондрии и пластиды
3. Цитоплазма и ядро
4. Только ядро

V. ЧТО ПРОИСХОДИТ С КЛЕТКОЙ, ЕСЛИ В НЕЙ ОТСУТСТВУЮТ ПЛАСТИДЫ?

1. Клетка не способна делиться и фотосинтезировать
2. Клетка способна делиться, но не способна к фотосинтезу
3. Клетка не способна делиться, но способна к фотосинтезу
4. Клетка способна делиться и фотосинтезировать

VI. КАК ПЕРЕДАЮТСЯ ПРИЗНАКИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ?

1. Только по материнской линии
2. Только по отцовской линии
3. Одновременно по отцовской и материнской линии
4. Иногда по материнской линии, иногда – по отцовской

VII. ЕСЛИ ИНФОРМАЦИЯ ПЕРЕДАЁТСЯ ЧЕРЕЗ ЦИТОПЛАЗМУ КЛЕТКИ, ТО ГОВОРЯТ О ...

1. Хромосомной наследственности
2. Внехромосомной наследственности
3. Ядерной наследственности

VIII. В КЛЕТКАХ НЕКОТОРЫХ ЭУКАРИОТ, НАПРИМЕР ..., ОБНАРУЖИВАЮТСЯ МОЛЕКУЛЫ ДНК, КОТОРЫЕ МОГУТ ОБЕСПЕЧИВАТЬ УСТОЙЧИВОСТЬ К ТОКСИЧЕСКИМ ВЕЩЕСТВАМ. (ДОПОЛНИТЕ)

1. Дрожжей
2. Растений
3. Птиц.
4. Рептилей

IX. СКОЛЬКО ХЛОРОПЛАСТОВ НАХОДИТСЯ В КЛЕТКЕ ЭВГЛЕНЫ ЗЕЛЁНОЙ

1. Около 3
2. Около 5
3. Около 20
4. Около 10

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11 (1, 2)

ВНЕХРОМОСОМНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ. ПЛАЗМИДЫ.

Цель работы: Изучить плазмиды бактерий.

Ход работы:

Задание 1. Рассмотреть карту плазмиды.



Теоретическая часть

Плазмиды - внехромосомные мобильные генетические структуры бактерий, представляющие собой замкнутые кольца двунитчатой ДНК. По размерам составляют 0,1-5 % ДНК хромосомы. Плазмиды не связаны с бактериальной хромосомой, они могут реплицироваться независимо от нее, могут выделяться бактерией в окружающую среду или, наоборот, из этой окружающей среды получать. С помощью плазмид бактерии обмениваются друг с другом генетической информацией, например передают соседям устойчивость к какому-нибудь антибиотику.

Плазмиды существуют в бактериях в естественных условиях. Возможно искусственно синтезировать плазмиду, которая будет обладать нужными для исследователя свойствами, вшить в нее вставку и запустить в клетку. Плаزمида – это, заготовка, болванка, т.к. в одну и ту же плазмиду можно вшивать разные вставки. Поэтому плазмиды стараются сделать как можно более универсальными и подходящими для всех случаев жизни.

Надежными прижизненными маркерами для изучения живых клеток являются флуоресцирующие белки. В случае **флуоресценции** причиной свечения является предварительное возбуждение белков светом определенной длины волны, в отличие от **люминесценции**, где свечение обусловлено химической реакцией окисления особого субстрата – люциферина. Благодаря использованию флуоресцирующих белков стало возможным визуализировать процессы, происходящие при развитии инфекционного процесса в макроорганизме, оценивать выживаемость и конкурентноспособность бактерий во внешней среде. Широкое применение нашло использование зеленого флуоресцентного белка GFP (green fluorescent protein).

Ген GFP был впервые обнаружен Осаму Симомурой и его командой в 1962 году во время изучения медузы *Aequorea victoria*, у которой под зонтиком есть кольцо синего света. Первым светящимся белком, выделенным из медузы, стал экворин, люминесцирующий синим светом при окислительном присоединении молекулы целентеразина в присутствии ионов кальция (которые содержатся в морской воде). Однако самым интересным было то, что экворин давал синее свечение, а сами медузы светились зелёным! Собрав достаточное количество экворина для полного анализа, Симомура обнаружил небольшое количество зеленого флуоресцентного белка (GFP), который светится зелёным. Раствор этого белка приобретает слегка зеленоватый цвет, а ультрафиолет вызывает яркое свечение раствора. Для свечения белка необходим только возбуждающий поток света и кислород в обычных концентрациях, и больше ничего (никаких дополнительных кофакторов (небелковых химических соединений), которые

связываются с ферментами и необходимы для их биологической активности) – в отличие от экворина).

Этот интересный феномен, правда, в те времена было затруднительно использовать – биотехнология тогда делала ещё только самые первые шаги. Настоящая революция началась после встречи Шимамуры с Мартином Чалфи на одном из семинаров в Университете Колумбии (Нью-Йорк). Последний работал с прозрачным червём-нематодой *Caenorhabditis elegans*, и предложил попробовать использовать GFP для «картирования» клеток развивающихся зародышей *C. elegans*, а также для отслеживания определённых белков внутри клетки. Результат потрясал – внутри живой клетки можно было проследить за перемещением отдельных видов белков в реальном времени, при чем без особых ухищрений – для этого нужен обычный микроскоп с ультрафиолетовой лампой и светофильтром, пропускающим нужную длину волны. Таким образом Мартин Чалфи продемонстрировал возможность использования GFP в качестве флуоресцирующей генетической метки для исследования различных биологических явлений.

Позднее Роджер Тсин из Калифорнийского университета в Сан-Диего объяснил механизм возникновения флуоресценции в белке, не содержащем кофакторов и не требующем присутствия ионов металла, расширил палитру потенциальных цветов свечения (открыл флуоресцентные белки голубого, синего и жёлтого цветов), давая исследователям возможность помечать различные белки и клетки разными цветами.

За открытие и изучение зеленого флуоресцентного белка медузы *Aequorea victoria* (green fluorescent protein, GFP) трём учёным из американских институтов, Осаму Шимамуре, Роджеру Тсину и Мартину Чалфи, в 2008 году присуждена Нобелевская Премия по химии.

Основными методами флуоресцентного маркирования бактерий являются введение гена флуоресцентного белка в составе плазмиды и встраивание маркерного гена в хромосому при помощи транспозона. использование плазмид для маркирования бактерий имеет целый ряд преимуществ ввиду их многокопийности и интенсивности экспрессии белка.

Задание 2. Изучите процесс создания флуоресцентной плазмиды

Процесс создания флуоресцентной плазмиды включает несколько этапов:

1. Подбор подходящей плазмиды и выделение и очистка целевого фрагмента ДНК (гена флуоресцентного белка). Целевой фрагмент вырезают с помощью эндонуклеаз рестрикции, копируют методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) или собирают из отдельных нуклеотидов.
2. Линеаризация плазмиды с помощью эндонуклеаз рестрикции.
3. Модификация свободных концов плазмиды и гена-вставки — это позволяет их соединить под действием ДНК-лигазы, рекомбиназы или с помощью механизмов репарации *in vivo*.
4. Сшивание плазмиды и целевого гена.
5. Трансформация плазмиды в организм-хозяина. Например, плазмиду вносят в бактерию, и бактерия начинает синтезировать флуоресцентный белок и светиться.

В последние годы для облегчения мониторинга и выявления микроорганизмов широко используют методы молекулярной визуализации, главным элементом которых является применение специальных инертных контрастных макромолекул, которые не нарушают процессов жизнедеятельности клетки и не приводят к фатальным биологическим изменениям. В настоящее время в качестве удобных и эффективных прижизненных маркеров микроорганизмов используют различные флуоресцентные белки. После определения структуры белка GFP, клонирован кодирующий его ген и показана экспрессия белка в различных прокариотических и эукариотических организмах. Сейчас известно несколько десятков природных и модифицированных

генов, белковые продукты которых дают излучение практически во всех участках видимого спектра, от сине-зеленого до рубиново-красного. Белок GFP обладает рядом свойств, которые обуславливают его широкое использование в качестве биологического маркера. Он состоит из 232 аминокислот, молекулярная масса – 26 кДа; характеризуется двумя пиками поглощения при длинах волн 395 и 475 нм и пиком флуоресценции при 498 нм. Белок принимает нативную конфигурацию и образует флуорофор без участия каких-либо внешних ферментов и кофакторов, обладает низкой метаболической токсичностью. Флуоресценция, обусловленная GFP, стабильна даже в присутствии денатурирующих агентов в широком диапазоне pH, сигнал продолжителен во времени, отсутствует фоновая флуоресценция. В последние годы флуоресцентный белок GFP в качестве биосенсора успешно применяли на широком круге хозяев для установления внутриклеточной локализации и динамики белков, изучения механизмов экспрессии генов, распространения бактерий в организме животных, иммунных реакций, межбактериального взаимодействия в смешанных культурах. Основными методами флуоресцентного маркирования бактерий являются введение гена флуоресцентного белка в составе плазмиды и встраивание маркерного гена в хромосому при помощи транспозона. Использование плазмид для маркирования бактерий имеет целый ряд преимуществ ввиду их многокопийности и интенсивности экспрессии белка. В последнее время для получения флуоресцентномеченных штаммов часто используют плазмиду pTurboGFP-B. Множественная копия этой плазмиды повышает скорость накопления маркерного белка и интенсивность его флуоресценции. Плазмида pTurboGFP-B содержит ген модифицированного варианта белка GFP, клонированный из веслоногих ракообразных – копеподы *Pontellina plumata*. Белок обладает яркой зеленой флуоресценцией (максимум поглощения/испускания – 482/502 нм), характеризуется высокой скоростью синтеза в широком диапазоне температур, фотостабильностью, не токсичен для клеток, стабильно в них сохраняется.

Рядом исследователей был сконструирован рекомбинантный штамм *Y. pestis*, продуцирующий флуоресцентный белок GFP, и проанализированы перспективы его использования для изучения взаимодействия возбудителя с простейшими, а также с макроорганизмом млекопитающих (грызунов).

На основании проведенного изучения биохимических признаков установлено, что рекомбинантный штамм *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B по своим признакам не отличался от исходного. Оба штамма ферментировали глицерин, арабинозу, глюкозу, обладали денитрифицирующей активностью, не разлагали рамнозу и мелибиозу. По комплексу признаков, полученный штамм, как и исходный, относится к античному биовару основного подвида *Y. pestis*. Таким образом, введение в реципиентный штамм векторной плазмиды pTurboGFP-B не привело к изменению его свойств.

Для подтверждения присутствия векторной плазмиды в штамме *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B определяли плазмидный состав исходного и рекомбинантного штаммов.

Задание 3. Рассмотрите фотографию плазмидного состава штаммов возбудителя чумы.

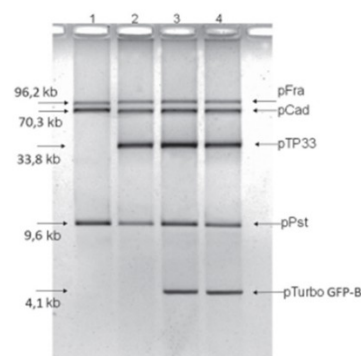


Фото 1. Плазмидный состав исходного *Y. pestis* 367 и рекомбинантного *Y. pestis* 367 pTurboGFP-в штаммов: Штаммы *Y. pestis*: 1 – EV нииэг; 2 – 367; 3 – 367 pTurboGFP-в; 4 – 367 pTurbo GFP-в (получен от зараженных животных).

У штаммов *Y. pestis* 367 и *Y. pestis* 367 pTurbo GFP-B трех резидентных плазмид возбудителя чумы – pFra (96,2 тпн), pCad (70,3 тпн) и pPst (9,6 тпн). Кроме того, в обоих штаммах выявлена плазида pTP33 (33,8 тпн), наличие которой характерно для штаммов возбудителя чумы линии 4.ANT. В рекомбинантном штамме присутствует также векторная плазида pTurboGFP-B (4,1 kb)

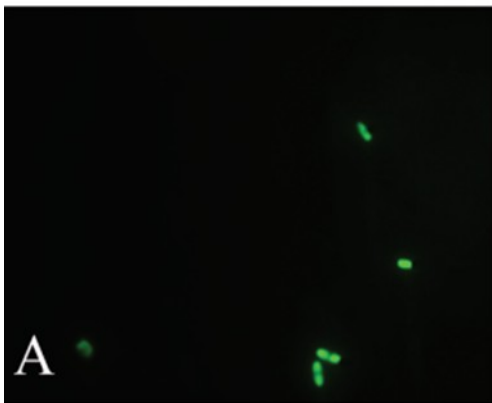
Для оценки вирулентности рекомбинантного штамма *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B *in vivo* проведено подкожное заражение белых мышей исходным и рекомбинантным штаммами в дозах $1 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10^4$ кoe/мл. в результате установлено, что оба штамма вызывали гибель животных в использованных дозах. средний срок жизни зараженных животных составил ($5,3 \pm 0,47$) сут (для исходного штамма) и ($5,5 \pm 0,50$) сут (для рекомбинантного штамма). Выявленные различия статистически недостоверны (критерий достоверности разницы – $td < 12,7$). У павших животных выявлена типичная патологоанатомическая картина чумы. Флуоресцирующие клетки штамма *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B высевали из всех органов (регионарные лимфоузлы, печень, селезенка) и крови. наибольшую обсемененность наблюдали в печени и селезенке (Фото 2. А, В). в мазках отпечатках органов погибших животных обнаружены бактериальные клетки, обладающие зеленой флуоресценцией. клетки рекомбинантного штамма четко визуализировались в отпечатках ввиду отсутствия фонового свечения.

Изучена возможность использования сконструированного штамма *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B в исследованиях по изучению экологии возбудителя чумы, в частности в изучении взаимодействия с простейшими из почвенных биоценозов природных очагов. Для совместного культивирования использовали аксенические культуры акантамеб *A. castellani*, выделенные на эпизоотических участках горно-алтайского высокогорного очага чумы. таким образом, проведено моделирование выживаемости штамма *Y. pestis* в простейших, к которым был адаптирован исходный штамм 367, поскольку этот штамм и амёбы выделены в одних и тех же участках горно-алтайского высокогорного очага чумы. В результате установлено, что рекомбинантный штамм сохраняется в клетках амёб при температуре 26 °C и влажности 20 % в течение всего срока эксперимента (21 день). при этом клетки рекомбинантного штамма четко визуализировались в люминесцентном микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss) в виде биполяров, типичной формы возбудителя чумы (рис. 2. С).

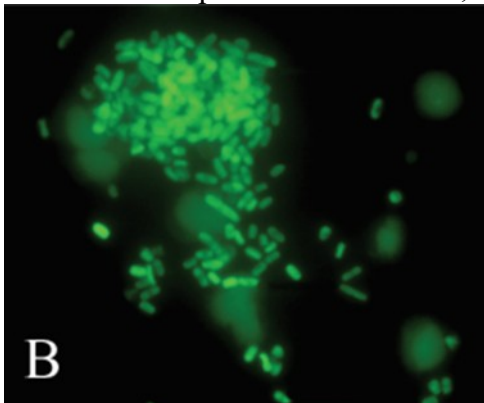
Таким образом, в результате данного эксперимента показаны преимущества использования флуоресцентного штамма для изучения взаимодействия *Y. pestis* с массовыми членами почвенных биоценозов (простейшие, слизевики). Этот штамм может применяться для изучения в лабораторных условиях механизмов персистенции возбудителя чумы в природных биоценозах очагов чумы, а также для исследования особенностей патогенеза этой инфекции.

Задание 4. Рассмотрите фотографии флуоресцентных клеток

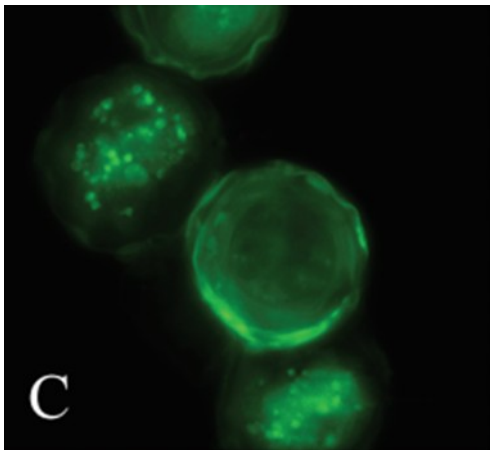
ФОТО. Выявление флуоресценции клеток штамма *Y. pestis* pTurbo GFP-B в экспериментах по заражению белых мышей и совместному культивированию с амёбами *A. castellani*:



А – в мазках крови белых мышей, павших от чумы



В – в мазках-отпечатках селезенки



С- в мазках со-культур с амёбами *A. castellani*

Задание 5. Ответить на тесты по теме:

I. ЧТО ТАКОЕ ПЛАЗМИДА?

1. отдельные хромосомы
2. небольшие круговые молекулы ДНК*
3. фрагменты РНК
4. протеиновые структуры

II. УКАЖИТЕ ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ПЛАЗМИД

1. несут генетическую информацию*
2. кодируют синтез факторов патогенности*
3. определяют образование жгутиков
4. обеспечивают бактериальную клетку энергией
5. способны встраиваться в хромосому бактериальной клетки*

III. ОСНОВНЫЕ ПРИЗНАКИ ПЛАЗМИД

1. являются внехромосомными факторами наследственности*
2. расположены в цитоплазме бактериальной клетки*

3. самостоятельно не реплицируются
4. содержат циркулярно замкнутую РНК
5. вызывают лизис бактерий

IV. F- ПЛАЗМИДЫ КОНТРОЛИРУЮТ

1. синтез половых пилей*
2. синтез бактериоцинов
3. образование токсинов
4. устойчивость к антибиотикам

V. ХАРАКТЕРИСТИКА R-ПЛАЗМИДЫ

1. половой фактор, передающийся при конъюгации бактерий
2. определяет устойчивость бактерий-хозяев к разнообразным антибактериальным препаратам*
3. контролирует вирулентные свойства бактерий и токсинообразование
4. контролирует синтез бактериоцинов, способных вызывать гибель бактерий того же вида или близких видов
5. контролирует синтез гемолизина

VI. ЖИЗНЕННО ВАЖНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРОЙ ЯВЛЯЕТСЯ

1. плазмиды
2. транспозоны
3. IS- последовательности
4. бактериальная хромосома*
5. tox-гены

VII. НАСЛЕДСТВЕННАЯ ИНФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ КРОМЕ НУКЛЕОИДА ЛОКАЛИЗОВАНА В:

1. включениях
2. плазмидах*
3. мезосомах
4. рибосомах
5. фимбриях

VIII. К ФАКУЛЬТАТИВНЫМ ОРГАНОИДАМ ПРОКАРИОТНОЙ КЛЕТКИ ОТНОСЯТСЯ

1. жгутики*
2. споры*
3. плазмиды*
4. капсулы*

IX. СТРУКТУРА, НЕОБХОДИМАЯ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО СОХРАНЕНИЯ МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ ВНЕ ОРГАНИЗМА

1. клеточная стенка
2. нуклеоид
3. эндоспора*
4. капсула
5. плазида

X. НОСИТЕЛЕМ НАСЛЕДСТВЕННОГО МАТЕРИАЛА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКЕ НЕ ЯВЛЯЮТСЯ

1. плазмиды
2. транспозоны
3. мезосомы*
4. нуклеоид
5. IS-элементы

XI. ОСНОВНОЕ СВОЙСТВО ПЛАЗМИД

1. экстрахромосомные ДНК-структуры, не способные к интеграции с бактериальным геномом.

2. ДНК-структуры, способные к саморепликации*
3. ДНК плазмид имеет линейную структуру
4. ДНК-структуры, не способные к саморепликации
5. экстрахромосомные РНК-структуры

XII. ПЛАЗМИДА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ К КОНЬЮГАЦИИ И ПРИДАЮЩАЯ ЕЙ СВОЙСТВА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ДОНОРА

1. Hly-плазида
2. K-плазида
3. Ent-плазида
4. F-плазида*
5. Tox-плазида

XIII. КАКАЯ БАКТЕРИАЛЬНАЯ КЛЕТКА ЯВЛЯЕТСЯ РЕЦИПИЕНТОМ В ПРОЦЕССЕ КОНЬЮГАЦИИ?

1. F+ клетка
2. F– клетка*
3. Hfr (high frequency of recombination) клетка
4. клетка в состоянии компетентности
5. лизогенная клетка

XIV. ПЛАЗМИДА, УЧАСТВУЮЩАЯ В ОБЕСПЕЧЕНИИ АНТАГОНИЗМА БАКТЕРИЙ

1. F-плазида
2. Col-плазида*
3. R-плазида
4. Ent-плазида
5. Hly-плазида

XV. ПЛАЗМИДА БИОДЕГРАДАЦИИ – ЭТО

1. плазида, кодирующие ферменты, отвечающие за утилизацию некоторых органических и неорганических соединений бактериями*
2. плазида, детерминирующая устойчивость к лекарственным препаратам
3. плазида, контролирующая перенос генетического материала из клетки донора в реципиентную и передачу донорских свойств
4. плазида, контролирующая синтез гемолизина у энтеропатогенных микробов и стрептококков
5. плазида, контролирующая вирулентные свойства бактерии и токсинообразование

XVI. СИНТЕЗ БЕЛКОВЫХ ПРОДУКТОВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ГИБЕЛЬ БАКТЕРИЙ ТОГО ЖЕ ИЛИ БЛИЗКИХ ВИДОВ, КОДИРУЕТ

1. плазида биодегградации
2. плазида бактериоциногении*
3. R-плазида
4. F-плазида
5. Ent-плазида

XVII. К СВОЙСТВАМ ПЛАЗМИД ОТНОСЯТСЯ ВСЕ ПЕРЕЧИСЛЕННЫЕ, КРОМЕ

1. представляют собой двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК
2. являются внехромосомными генетическими структурами бактериальной клетки
3. несовместимости неродственных плазмид*
4. придают бактериальной клетке новые свойства
5. способны встраиваться в геном бактериальной клетки

XVIII. ТРАНСМИССИВНОСТЬ ПЛАЗМИДЫ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ

1. наличием tra-оперона*
2. отсутствием tra-оперона
3. способностью к интеграции в нуклеоид бактерии
4. компактностью нуклеоида
5. размером плазмиды

XIX. ХАРАКТЕРИСТИКА ТОХ-ПЛАЗМИДЫ

1. половой фактор, передающийся при конъюгации бактерий
2. определяет устойчивость бактерий-хозяев к разнообразным лекарственным препаратам
3. контролирует вирулентные свойства бактерий и токсинообразование*
4. контролирует синтез бактериоцинов, способных вызывать гибель бактерий того же вида или близких видов

5. контролирует синтез гемолизина

XX. ПЛАЗМИДОЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЯВЛЯЕТСЯ

1. Col-плазида
2. R-плазида*
3. Ent-плазида
4. Hly-плазида
5. Tox-плазида

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12 (1) МИГРИРУЮЩИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ. ИНСЕРЦИОННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ (IS) И ТРАНСПОЗОНЫ (TN) БАКТЕРИЙ. ГЕНОМНЫЕ ОСТРОВА. ИНТЕГРОНЫ.

Цель работы: Изучить мигрирующие генетические элементы микроорганизмов.

Ход работы:

Теоретическая часть

Задание 1. Ответить на вопросы:

1. Что такое генетический перенос генов?
2. Какие основные механизмы горизонтального переноса генов вы знаете?

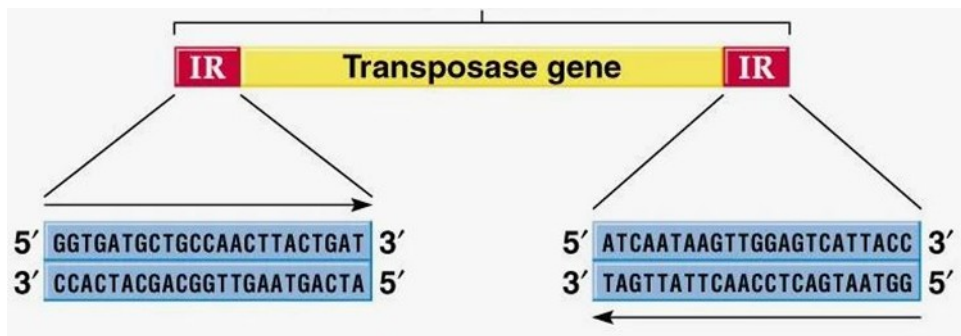
Горизонтальный перенос генов осуществляется **посредством мобильных генетических элементов (МГЭ).**

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:

- инсерционные последовательности (IS-элементы),
- транспозоны (Tn),
- интегроны (In),
- фаги,
- геномные острова и др.

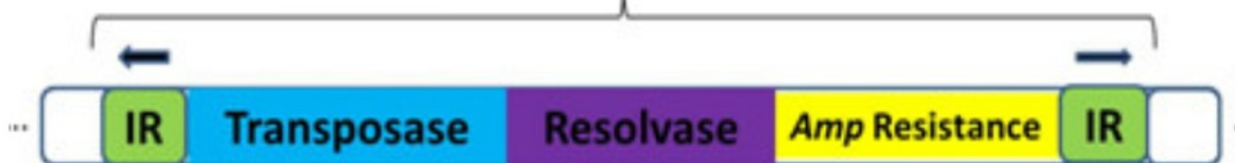
Задание 2. Рассмотреть и зарисовать схемы строения IS-элементов и транспозонов

IS-элемент

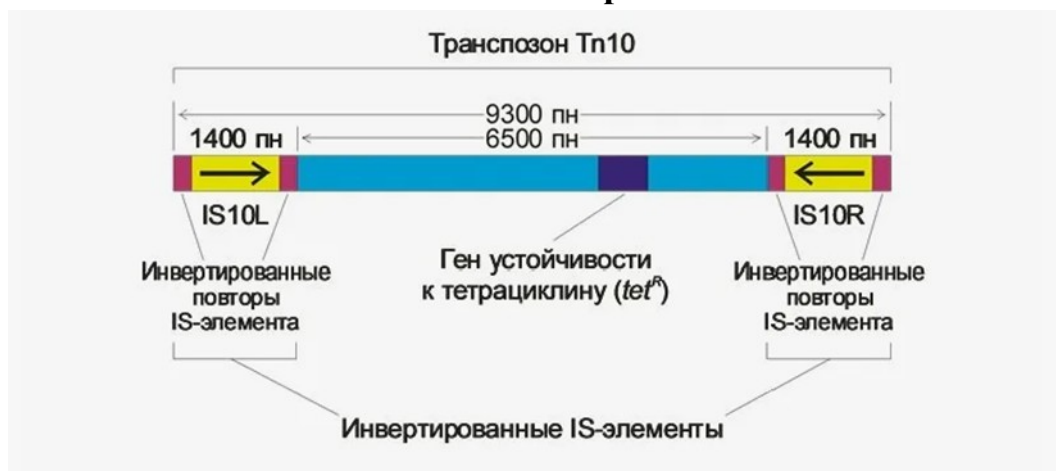


Некомпозитный транспозон

Transposon Tn3



Композитный транспозон



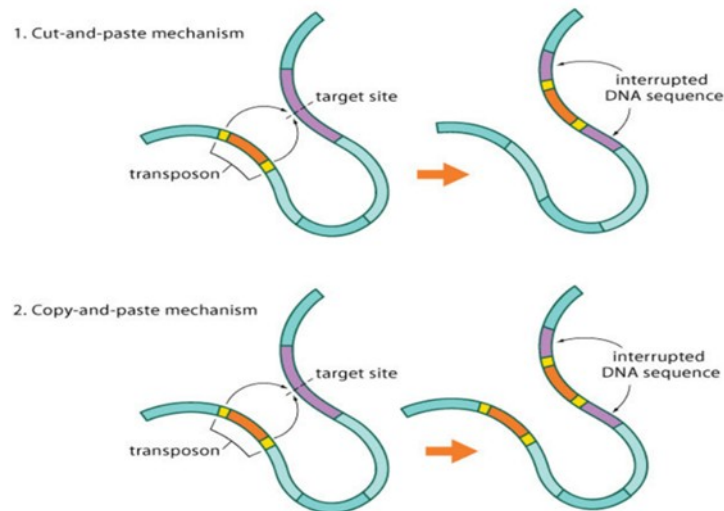
Теоретическая часть

IS-элементы (инсерционные последовательности) содержат информацию необходимую только для их переноса в различные участки ДНК. **Строение:** 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., по которым транспозаза распознает его и вырезает.

Некомпозитный транспозон Tn3 – мобильный генетический элемент прокариот. **Строение:** длина – около 5 тысяч пар нуклеотидов. Окружён по краям инвертированными (по 38 нуклеотидов) и прямыми повторами. Несёт 3 гена: Два гена кодирующие ферменты, необходимые для транспозиции: транспозазу (фермент переноса, начинает вырезание транспозона) и резолвазу (фермент, заканчивающий транспозицию и регулирующий активность транспозазы). Третий ген — ген β-лактамазы (ген устойчивости к пенициллину и некоторым его производным). Имеет собственную систему регуляции по типу аутогенного контроля. Резолваза, кодируемая вторым геном, выполняет одновременно две функции: фермента, участвующего в транспозиции, и белка-регулятора, способного блокировать транскрипцию транспозона.

Композитный (составной) транспозон – тип мобильного генетического элемента, который состоит из двух одинаковых или похожих вставочных последовательностей (IS), фланкирующих центральную область. Такие транспозоны часто встречаются в бактериальных и других прокариотических геномах. **Строение:** IS-элементы кодируют фермент-транспозазу, ответственный за перемещение транспозона. **Центральная область** часто содержит дополнительные гены или генетические элементы, (гены устойчивости к антибиотикам или другие функциональные гены).

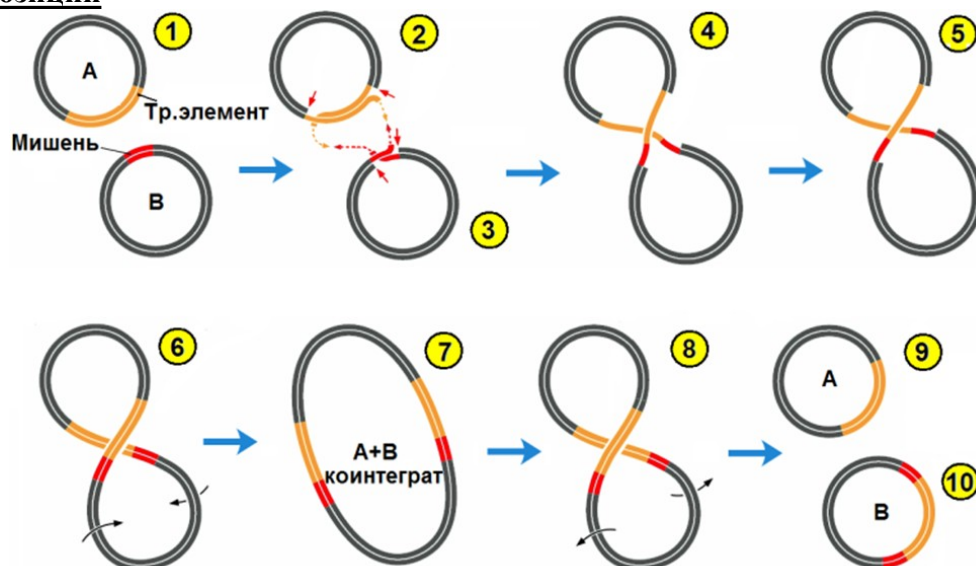
Задание 3. Рассмотреть схемы механизма нерепликативной и репликативной транспозиции



Нерепликативная или консервативная транспозиция – мобильный элемент вырезается из одной позиции в геноме и включается в другую, не синхронизирована с клеточным делением

Репликативная транспозиция – мобильный элемент сохраняется в сайте-доноре и перемещается в реципиентный сайт-мишень, синхронизирована с клеточным делением

Задание 4. Рассмотреть и зарисовать схему репликативного механизма транспозиции



2,3 – Транспозаза делает односторонние разрывы на каждом конце Тп-элемента и на концах ДНК-мишени.

4 – Свободные концы Тп-элемента присоединяются к свободным концам ДНК-мишени

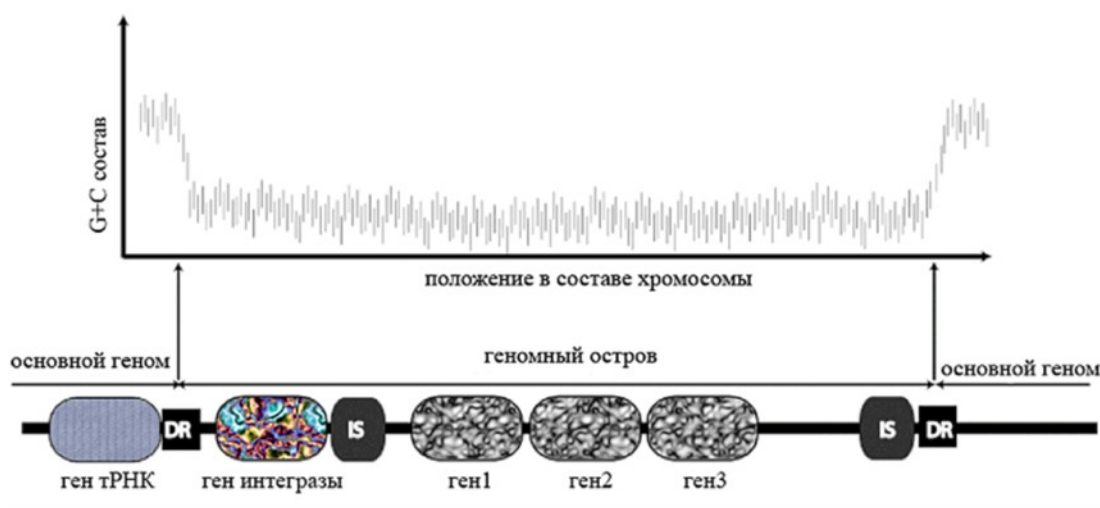
5, 6 – На односторонних матрицах происходит репликация, которая начинается со свободных концов и продолжается через Тп-элемент и ДНК-мишень.

7 – В результате образуется коинтеграция с 2-мя копиями Тп-элемента и 2-мя копиями сайта встраивания. Коинтеграция – промежуточный продукт транспозиции.

8 – Между сайтами внутри Тп-элементов происходит сайт-специфическая рекомбинация (разрешение коинтеграции)

9, 10 – Образование двух исходных репликонов. Новая копия Тп-элемента фланкирована прямыми повторами ДНК-мишени.

Задание 5. Рассмотреть схематическое изображение структуры геномного острова в составе бактериальной хромосомы



DR – прямые повторы ДНК хромосомы, фланкирующие ГО

IS – инсерционные элементы

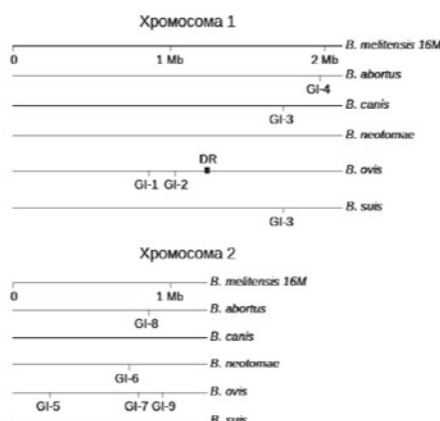


Схема расположения геномных островов в геноме штаммов *Brucella* spp., составленная на основе гибридизационного анализа с помощью микрочипов.

Геномные острова (Genomic Islands) – это кластеры генов, приобретённых в результате горизонтального переноса генов, сегменты ДНК, которые присутствуют в геноме одних штаммов и отсутствуют у других, даже близкородственных штаммов одного вида. Геномные острова могут кодировать множество функций, участвовать в

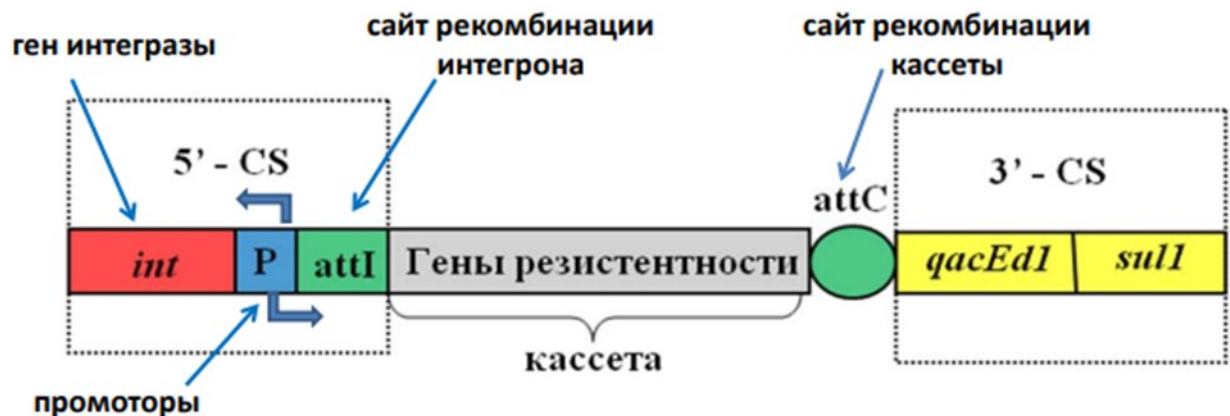
симбиозе или патогенезе и способствовать адаптации организма.

Классификация геномных островов в зависимости от их функционального содержания:

- острова патогенности, содержащие патогенные или вирулентные гены,
- острова резистентности, содержащие гены, отвечающие за устойчивость к противомикробным препаратам,
- острова симбиоза, содержащие гены, отвечающие за установление симбиоза с организмами-хозяевами,
- метаболические острова, содержащие гены, отвечающие за адаптивные метаболические возможности.

Задание 6. Рассмотреть схему строения интегров

Интегроны – это генетические механизмы, которые позволяют бактериям быстро адаптироваться и эволюционировать за счёт накопления и экспрессии новых генов.



Интегроны состоят из консервативных сегментов (CS): 5'-CS и 3'-CS и центрального вариабельного региона.

5'-консервативный сегмент содержит:

- ген интегразы *intI*
- сайт рекомбинации (интеграции) *attI*
- промоторные последовательности P_{int}/P_c , обеспечивающие транскрипцию гена интегразы и внедренных в состав интегрона генных кассет.

3'-консервативный сегмент интегров класса 1 содержит гены резистентности:

- к четвертичным аммонийным соединениям *qacEd1*
- к сульфонидамидам *sul1*

Вариабельный регион интегров представлен мобильными генными кассетами, содержащими беспромоторные ORF с attC-сайтами. Интеграза IntI катализирует сайтспецифическую рекомбинацию между сайтами attI и attC, в результате чего происходит интеграция или вырезание кассеты. Множество событий интеграции ведет к образованию мультикассетных рядов. В таких рядах все кассеты фланкированы attC-сайтами.

Генные кассеты – это автономные, нереплицирующиеся, замкнутые в кольцо элементы, содержащие по одной открытой рамке считывания и одному рекомбинационному сайту (attC). Первоначальное название сайтов рекомбинации генных кассет - 59 be (59 base elements), поскольку первый изученный сайт имел протяженность, равную 59 п.о. Позднее было показано, что размер этих сайтов у разных кассет колеблется от 57 до 141 п.н. Поэтому в последующих публикациях многие авторы стали использовать название attC для обозначения кассетных сайтов рекомбинации.

Контрольные вопросы

1. Какие мобильные элементы генома бактерий выделяют?

2. В чем отличия механизмов нерепликативной и репликативной транспозиций?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12 (2)
МИГРИРУЮЩИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ
МИКРООРГАНИЗМОВ. БАКТЕРИОФАГ MU. МИГРИРУЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ
ЭУКАРИОТ (ДРОЖЖЕЙ). ТУ- ЭЛЕМЕНТ.

Цель работы: изучить мигрирующие генетические элементы микроорганизмов.

Ход работы:

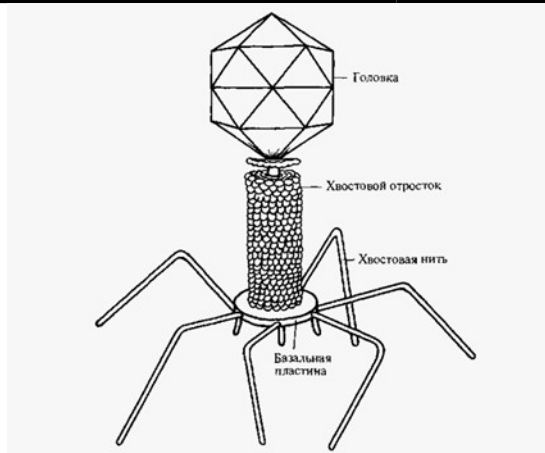
Теоретическая часть

Задание 1. Ответить на вопросы

1. Какие фаги по характеру взаимодействия с бактериями вы знаете?
2. Что такое профаг?

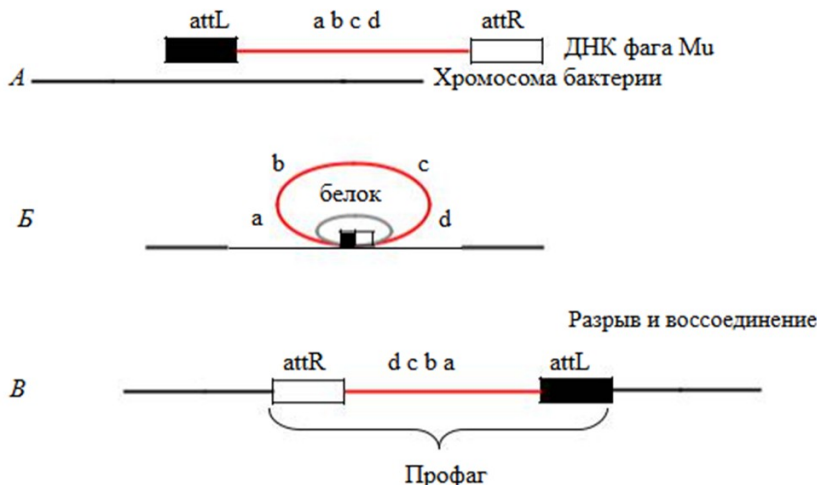
Бактериофаг Mu – ДНК-содержащий умеренный бактериофаг, способный встраиваться в большое число сайтов генома клетки-хозяина и вызывать мутации при «попадании» в пределы структурного гена (Mu - mutator phage).

Задание 2. Рассмотреть и вспомнить схему строения бактериофага



Фаг Mu не имеет оболочки, состоит из головки и хвоста. Головка имеет икосаэдрическую структуру (структура, состоящая из 20 равносторонних треугольников) шириной около 54 нм. Шейка похожа на бугорок, а хвост сократительный, с базальной пластиной и шестью короткими терминальными волокнами.

Задание 3. Рассмотреть и зарисовать схему интеграции генома фага Mu в бактериальную хромосому



Геном Mu образует кольцо лишь в момент прикрепления обоих своих концов к

одной точке бактериальной ДНК. Эти концы названы Mu-attL и Mu-attR, они соединяются не ковалентно, а удерживаются рядом на одной точке бактериальной ДНК белками.

Теоретическая часть

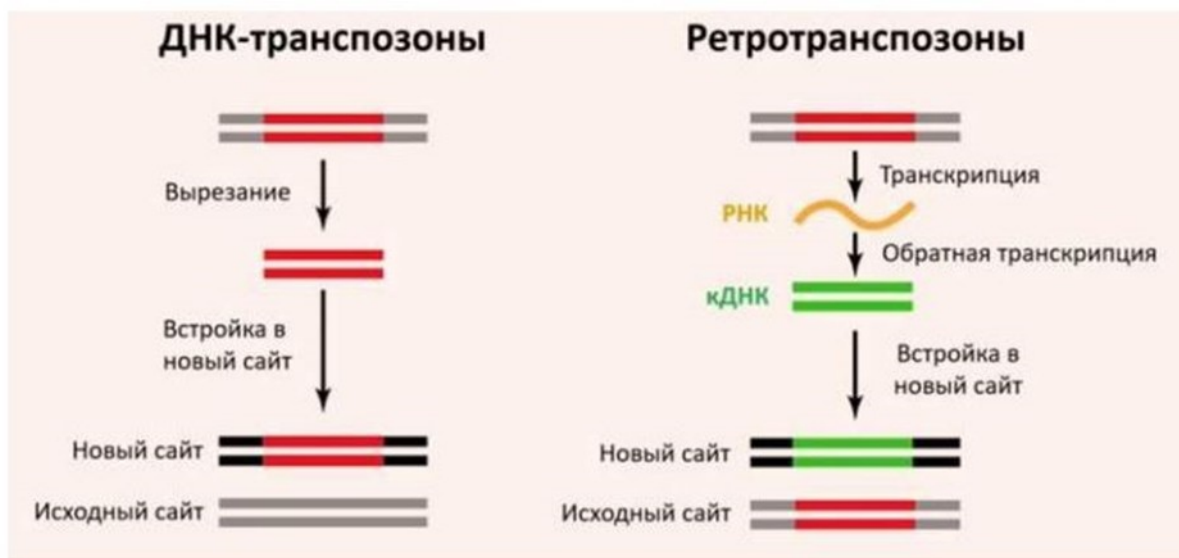
Мигрирующие элементы эукариот (дрожжей). Ту-элемент

Мигрирующие генетические элементы эукариот разделяют на две группы по механизму транспозиции: **ДНК-транспозоны** и **ретротранспозоны**.

ДНК-транспозоны или классические транспозоны, МГЭ, кодирующие фермент транспозазу, которая способна узнавать концы «своего» элемента и по этим концам вырезать его из хромосомы или встраивать в хромосомы генома хозяина. ДНК-транспозоны мобилизуются с помощью механизма, который получил название «вырезать-вставить» или «ДНК–ДНК перемещение».

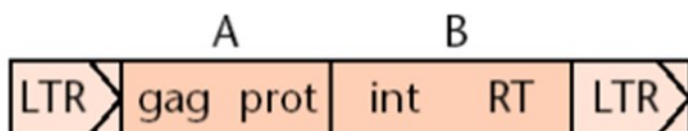
К классу **ретротранспозоны** относятся элементы, которые в процессе своего движения сначала синтезируют цепочку РНК, к которой затем с помощью фермента обратной транскриптазы синтезируется комплементарная цепочка ДНК. После дупликации двухцепочечная ДНК способна встраиваться в различные области хромосом хозяина. Такой способ встраивания называется механизмом ДНК–РНК–ДНК.

Задание 4. Рассмотреть и зарисовать схемы механизма транспозиции у эукариот



Ту-элементы – мобильные генетические элементы у дрожжей, принадлежащие к группе ретротранспозонов. Название – сокращение от английских слов transposon yeast, что означает «транспозон дрожжей». Ту-элементы перемещаются с помощью промежуточной молекулы РНК, используя те же механизмы репликации и интеграции, что и ретровирусы многоклеточных животных. Ту-элементы принадлежат к пяти семействам: Ty1, Ty2, Ty3, Ty4, Ty5.

Задание 5. Рассмотреть и зарисовать структуры ретротранспозона Ty 1 дрожжей



Размер элемента - ~ 5900 п.н.

LTR – прямые концевые повторы ~ 330 п.н.

gag – кодирует структурный РНК-связывающий белок;

prot – кодирует протеазу;

int – кодирует интегразу;
RT – обратная транскриптаза
Дублированный повтор ДНК мишени – 5 п.н.
Представлен ~ 30 копиями в геноме дрожжей

Задание 6. Ответить на тесты по теме «Мигрирующие генетические элементы микроорганизмов»:

I. К мобильным генетическим элементам у бактерий относятся:

- 1 плазмиды
- 2 транспозоны, IS-элементы
- 3 плазмиды, транспозоны и IS-элементы
- 4 плазмиды, фагитранспозоны
- 5 плазмиды, IS-элементы

II. Значение IS-элементов в том, что они:

- 1 участвуют в объединении трансмиссивных и нетрансмиссивных плазмид
- 2 могут перемещаться из одного участка генома в другой
- 3 могут встраиваться в пределах одного гена и инактивировать его
- 4 играют важную роль в эволюции бактерий
- 5 все ответы верны

III. Эти мобильные элементы представляют собой линейные фрагменты двухцепочечной ДНК длиной от 200 до 2000 п. н. Они содержат только гены *trp*, кодирующие синтез фермента транспозазы, необходимого для их миграции. По концам у них расположены инвертированные терминальные повторы. Укажите, о каких элементах идет речь:

- 1 IS-элементы*
- 2 транспозоны
- 3 фагитранспозоны
- 4 Tn-элементы
- 5 плазмиды

IV. Это сложные мигрирующие элементы. Они отличаются тем, что кроме генов, ответственных за миграцию, содержат структурные гены, которые отвечают за проявление какого-либо фенотипа. Их длина свыше 2000 п. н., имеют инвертированные концевые повторы. Укажите, о каких элементах идет речь:

- 1 IS-элементы
- 2 транспозоны*
- 3 фагитранспозоны
- 4 Tn-элементы
- 5 плазмиды

V. Какие свойства характерны для транспозонов?

- 1 способность индуцировать мутации
- 2 наличие генов, детерминирующих фенотипические признаки
- 3 наличие на концах IS- элементов
- 4 наличие генов, ответственных за синтез транспозазы
- 5 все ответы верны*

VI. Какие свойства НЕ ХАРАКТЕРНЫ для транспозонов?

- 1 способность индуцировать мутации
- 2 наличие генов, детерминирующих фенотипические признаки
- 3 наличие на концах IS- элементов
- 4 их длина варьирует от 8 до 40 п. н.*
- 5 наличие генов, ответственных за синтез транспозазы

VII. Какие из перечисленных генетических элементов способны включаться в различные области хромосомной и нехромосомной ДНК?

- 1 конъюгативная плазида

- 2 ДНК вирулентного фага
- 3 транспозоны*
- 4 неконъюгативная плазмида
- 5 никакие

VIII. Лизогения присуща:

- 1 вирулентным бактериофагам
- 2 умеренным бактериофагам*
- 3 обоим бактериофагам
- 4 вирусам
- 5 бактериофагам с одноцепочечной линейной ДНК

IX. Укажите основные признаки лизогенных бактерий: а) содержат размножающиеся бактериофаги б) способствуют переходу умеренных фагов в литические формы в) содержат геномы фагов, встроенных в генофор бактерии г) резистентны к заражению аналогичным фагом.

Выберите правильную комбинацию ответов.

- 1 а, г
- 2 б, г
- 3 а, б
- 4 б, в*
- 5 в, г

X. Только для умеренных фагов характерно состояние:

- 1 зрелого фага
- 2 профага*
- 3 вегетативного фага
- 4 внеклеточного фага
- 5 вириона

XI. Бактериальные клетки, содержащие профаг, называются:

- 1 лизогенными*
- 2 дефектными
- 3 протопластами
- 4 сферопластами
- 5 вирулентными

XII. Приобретение новых признаков, обусловленных профагом, называется

- 1 фаговой конверсией*
- 2 трансформацией
- 3 фаголизисом
- 4 конъюгацией
- 5 литическим циклом

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13 (1, 2).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНОМА МИКРООРГАНИЗМОВ: ОТ СЕКВЕНИРОВАНИЯ К ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АННОТАЦИИ.

Цель работы: Изучение современных методов секвенирования геномов микроорганизмов, освоение принципов биоинформатического анализа геномных данных, приобретение навыков работы с публичными базами данных и инструментами аннотации.

Задачи:

- 1. Ознакомиться с эволюцией методов секвенирования (от Сэнгера до NGS и Third-Gen).
- 2. Изучить этапы сборки (assembly) и аннотации генома.
- 3. Научиться извлекать и анализировать геномные данные из открытых источников (NCBI, PATRIC).

4. Провести сравнительный анализ геномов штаммов одного вида для выявления специфических генетических детерминант (факторов вирулентности или устойчивости).

Ход работы:

Теоретический обзор

1.1. Эволюция методов секвенирования

Исследование генома микроорганизмов начинается с получения первичной последовательности ДНК.

1. **Метод Сэнгера (1-е поколение):** Золотой стандарт для валидации. Высокая точность (>99.9%), но низкая пропускная способность и высокая стоимость на нуклеотид. Используется для закрытия пробелов в сборке.

2. **NGS (Next-Generation Sequencing, 2-е поколение):** Платформы Illumina (SBS). Массово-параллельное секвенирование коротких ридов (150–300 п.н.). Высокая точность, низкая стоимость, но сложности со сборкой повторяющихся регионов.

3. **Third-Generation Sequencing (TGS):** Платформы Oxford Nanopore и PacBio (SMRT). Секвенирование единичных молекул в реальном времени. Длинные риды (до нескольких Мб), что критически важно для *de novo* сборки и выявления структурных вариаций, но выше уровень ошибок (требуется полировка).

1.2. Сборка генома (Genome Assembly)

После секвенирования короткие прочтения (риды) собираются в контиги (contigs) и скаффолды (scaffolds).

- **Референсная сборка (Mapping):** Выравнивание ридов на известный геном-референс. Подходит для поиска SNP и инделов.

- **De novo сборка:** Сборка без использования референса.

Ключевые метрики качества:

- **N50:** Длина контига, при которой сумма длин всех контигов такой же длины или больше составляет 50% от размера всего генома. Чем выше N50, тем лучше сборка.

- **Глубина покрытия (Coverage):** Среднее количество раз, которое каждый нуклеотид был прочитан (для бактерий оптимально 50x–100x для Illumina).

1.3. Аннотация генома

Процесс идентификации функциональных элементов в последовательности ДНК.

1. **Структурная аннотация:** Поиск генов (ORF), тРНК, рРНК, сигналов терминации. Инструменты: Prokka, RAST, Glimmer.

2. **Функциональная аннотация:** Присвоение функции генам на основе гомологии (BLAST), доменной структуры (Pfam) и метаболических путей (KEGG, GO).

3. **Специфический скрининг:** Поиск генов устойчивости к антибиотикам (CARD, ResFinder), факторов вирулентности (VFDB), островков патогенности.

1.4. Сравнительная геномика и Пангеном

Пангеном: Совокупность всех генов, встречающихся у всех штаммов данного вида. Делится на:

- *Core genome:* Гены, присутствующие у всех штаммов (домашний метаболизм).

- *Accessory genome:* Гены, присутствующие только у части штаммов (адаптация, вирулентность, плазмиды).

Филогеномика: Построение эволюционных деревьев на основе полногеномных SNP или core-генов, что дает более высокое разрешение, чем 16S рРНК секвенирование.

Биоинформатический анализ генома штамма *Escherichia coli*.

Задание 1. Поиск и оценка качества геномной сборки

1. Перейдите на ресурс **NCBI Genome** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>).

2. В поисковой строке введите: *Escherichia coli* O157:H7.
3. Выберите любой штамм, у которого статус сборки обозначен как «**Complete Genome**» или «**Chromosome**» (избегайте статусов *Scaffold* или *Contig* для чистоты эксперимента).
4. Запишите в отчет:
 - Accession Number (номер доступа, например, NC_002655).
 - Размер генома (Mbp).
 - GC-состав (%).
 - Количество репликонов (хромосома + плазмиды).
 - Технологию секвенирования (если указана в разделе Assembly Stats).

Задание 2. Структурная аннотация и визуализация

1. Откройте страницу выбранного генома и перейдите во вкладку «Genome Data Viewer».
2. Изучите карту генома. Найдите регион локуса рибосомальной РНК (operon *rnn*).

Подсказка: Используйте поиск по геному (лупа в меню GDV) и введите 16S ribosomal RNA.

3. Сделайте скриншот региона, содержащего оперон *rnn*.
4. Определите количество копий генов 16S рРНК в данном геноме (пройдите по всему геному с помощью поиска).
5. Найдите регион происхождения репликации (*oriC*). Обычно он богат АТ-парами и находится рядом с геном *dnaA*. Запишите координаты гена *dnaA*.

Задание 3. Поиск факторов вирулентности (Сравнительный анализ)

Штамм O157:H7 является энтерогеморрагическим (ЭГКП). В отличие от комменсального штамма *E. coli* K-12, он содержит островки патогенности.

1. Откройте вкладку «**Annotation**» на странице генома в NCBI.
2. В поле поиска генов (Gene search) введите ключевые слова, характерные для вирулентности ЭГКП: Shiga toxin или *stx*.
3. Если гены найдены, запишите их названия (например, *stx1*, *stx2*) и координаты.

Сравнение:

- Откройте в новой вкладке геном лабораторного штамма *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 (Accession: NC_000913).
- Повторите поиск генов Shiga toxin.
- Зафиксируйте результат (наличие/отсутствие).
5. Используйте инструмент **NCBI BLASTn** (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>):
 - В поле **Query Sequence** вставьте последовательность гена *stx2* (скопируйте FASTA из генома O157:H7).
 - В поле **Subject** выберите «Reference genomic sequences» или вставьте последовательность гомологичного региона из K-12 (если есть гипотетический белок).
 - Запустите BLAST. Оцените процент идентичности (Identity) и покрытие (Query Cover).

Задание 4. Анализ генов устойчивости (Antimicrobial Resistance)

1. Вернитесь к геному O157:H7.
2. Найдите гены, связанные с устойчивостью к антибиотикам. Ключевые слова для поиска: resistance, beta-lactamase, efflux pump.
3. Выберите один ген (например, *ampC* или плазмидный ген устойчивости).
4. Определите, находится ли этот ген на хромосоме или на плазмиде (проверьте в разделе «Assembly» список репликонов).
5. Сделайте вывод о потенциале горизонтального переноса этого гена (локализация на плазмиде повышает риск переноса).

Контрольные вопросы

1. Объясните понятие «Пангеном». Из каких компонентов он состоит?
2. Какие преимущества дает использование длинных ридов (Nanopore/PacBio) при сборке бактериального генома?
3. Какую роль играют мобильные генетические элементы (плазмиды, транспозоны) в эволюции генома микроорганизмов?
4. Что такое MLST (Multilocus Sequence Typing) и как он соотносится с cgMLST (core genome MLST)?

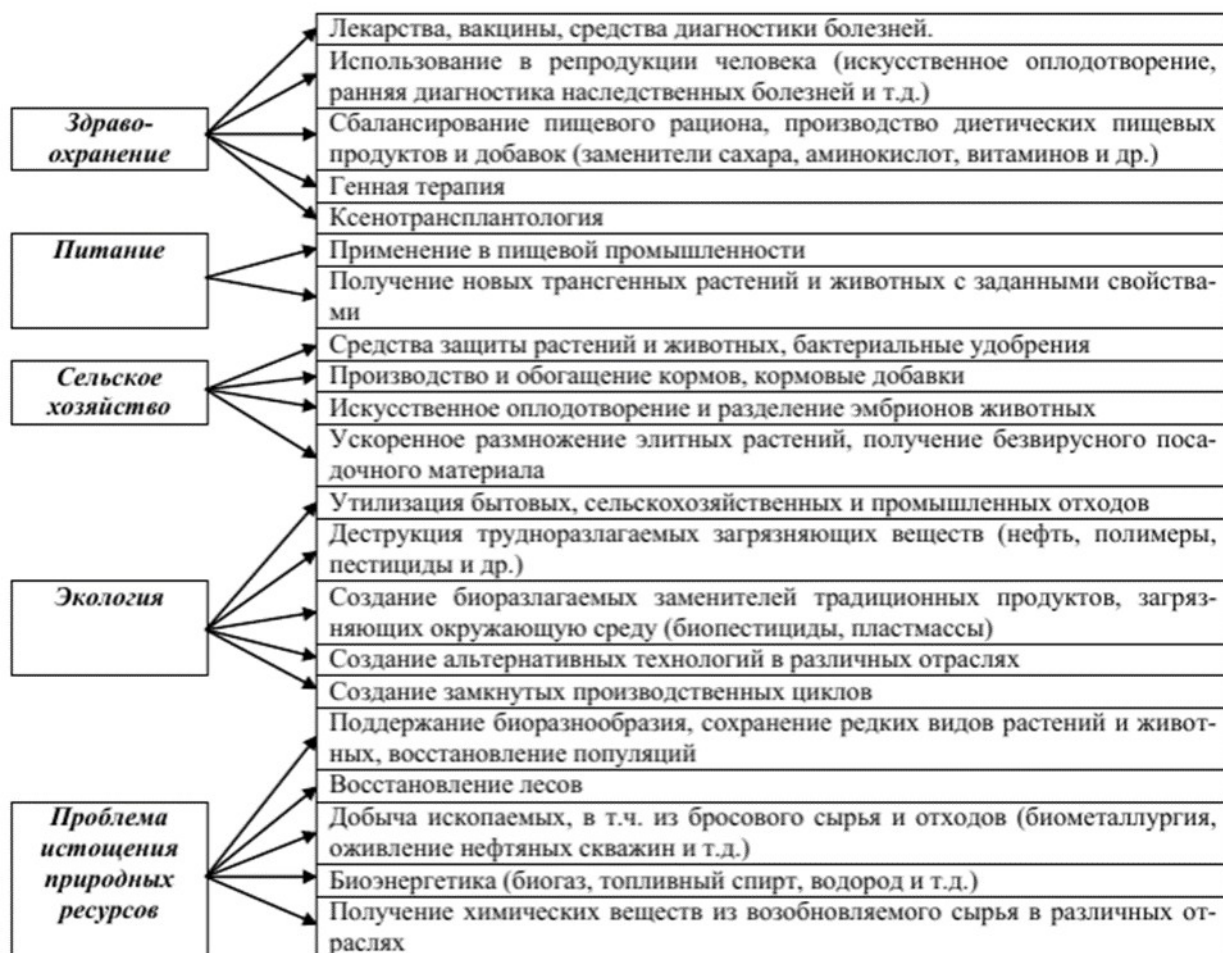
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14 (1, 2).

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СЕЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: Изучить основные методы, достижения и перспективы генной инженерии и селекции микроорганизмов.

Ход работы:

Задание 1. Рассмотреть схему основных областей применения биотехнологии:



Задание 2. Заслушать доклады по темам:

1. История и развитие генетической инженерии. Определение генетической инженерии. Теоретические основы генетической инженерии. Отличия от классической селекции.
2. Генная инженерия как наука, методы. Возможности, достижения и перспективы генной инженерии.
3. Методы отбора, основанные на фенотипическом различии рекомбинантных и нерекомбинантных клонов. Методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот. Метод прямой селекции рекомбинантных клонов по комплементации. Иммунологические методы анализа рекомбинантных клонов.

4. Применение генной инженерии и селекции микроорганизмов в медицине.
5. Применение генной инженерии и селекции микроорганизмов в сельском хозяйстве.
6. Применение генной инженерии и селекции микроорганизмов в пищевой промышленности.
7. Применение генной инженерии и селекции микроорганизмов в экологию.

Задание 3. Ответить на тесты по теме:

I. Направление биотехнологии, в котором используются микроорганизмы для получения антибиотиков, витаминов, называют:

- 1) биохимическим синтезом
- 2) генной инженерией
- 3) клеточной инженерией
- 4) микробиологическим синтезом

II. Для селекции микроорганизмов наиболее часто используются методы:

- 1) искусственного мутагенеза
- 2) межвидовой гибридизации
- 3) искусственной полиплоидизации
- 4) близкородственных скрещиваний

III. В биотехнологии используют способность бактерий к:

- 1) быстрому размножению
- 2) накоплению в их клетках ядовитых веществ
- 3) спорообразованию в неблагоприятных условиях
- 4) развитию заболеваний при попадании в организм животного

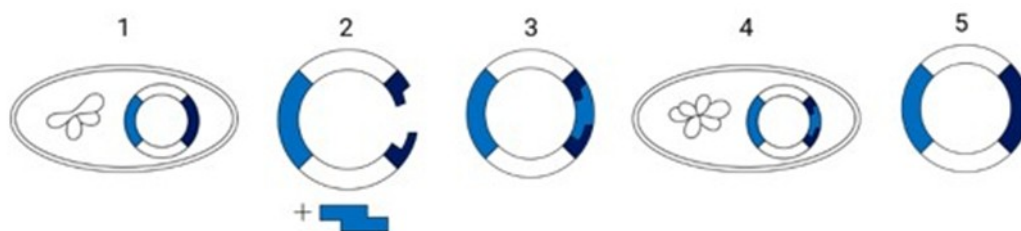
IV. Получением антибиотиков путем пересадки гена в геном бактерий занимается:

- 1) клеточная инженерия
- 2) генная инженерия
- 3) микробиология
- 4) растениеводство

V. Выберите три варианта из шести. Вещества, полученные с помощью генной инженерии.

- 1) человеческий инсулин
- 2) оспенно-гепатитная вакцина
- 3) пищевой белок
- 4) глюкозно-фруктозные сиропы
- 5) фактор некроза опухолей
- 6) синтетические подсластители

VI. Укажите правильную последовательность образования рекомбинантных плазмид:



- 1, 5, 2, 3, 4
- 1, 2, 5, 4, 3
- 1, 2, 3, 4, 5
- 2, 3, 5, 3, 4

VII. Укажите правильную последовательность этапов деятельности селекционера при создании высокопродуктивных штаммов бактерий.

- 1) воздействие мутагенами на исходную колонию бактерий
- 2) отбор бактерий с новыми признаками
- 3) присвоение номенклатурного названия штамму бактерий
- 4) получение новой колонии (штамма) и оценка её продуктивности
- 5) подбор исходной колонии бактерий

5, 4, 3, 2, 1

5, 1, 2, 4, 3

1, 2, 4, 3, 5

1, 4, 3, 2, 5

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
к выполнению самостоятельных работ по дисциплине
«Генетика микроорганизмов»

Направление подготовки
Направленность (профиль)

06.03.01 Биология
Генетика, селекция и биоинформатика

Вопросы для самостоятельной подготовки.

1. В каких состояниях бактериофаги способны существовать?
2. В каком году было открыто явление ступенчатого аллеломорфизма?
3. В каком году обнаружили кишечную палочку?
4. В каком случае наблюдается специфическая трансдукция?
5. В чем биологическое значение репликации?
6. В чем заключается метод Фишера?
7. В чем заключается механизм эксцизионной репарации?
8. В чем особенность бактериальных плазмид?
9. В чем отличие в делении эукариот от прокариот?
10. В чем отличие генной инженерии от клеточной инженерии?
11. В чем отличие генных, геномных и хромосомных мутаций?
12. В чем отличие мутационной изменчивости от патогенных заболеваний?
13. В чем отличие прямых и обратных мутаций?
14. В чем причина избыточности ДНК у эукариот?
15. В чем различие вирулентных и умеренных бактериофагов?
16. В чем различие репликации эукариот от прокариот?
17. Где больше всего находится теломеразы?
18. Где больше всего распространены бактериофаги?
19. Где широко применяются плазмиды?
20. Есть ли противопоказания у бактериофагов?
21. Из каких этапов состоит картирование?
22. Из каких этапов состоит реакция гибридизации?
23. Из чего состоит интергон?
24. Из-за в последнее время стала активно развиваться селекция микроорганизмов?
25. Изменение свойств микроорганизмов под влиянием профага получило название?
26. Изменчивость микроорганизмов для человека.
27. Как вы понимаете термин «интергоны»?
28. Как называются факторы, вызывающие мутации?
29. Как происходит отбор положительных мутантов?
30. Как происходит перенос генетического материала и генетическое картирование у актиномицетов?
31. Как происходит репрессия "молчащих" локусов типов спаривания HMR и HML?
32. Как происходит самосборка частиц?
33. Как происходит слияние протопластов у микроорганизмов?
34. Какая особенность есть у плазматической мембраны?
35. Какая фаза в жизненном цикле у низших растений более продолжительная?
36. Какая частота возникновения мутаций?
37. Какие два вида репарации обнаружены у эукариот?
38. Какие два типа трансдукции вы знаете?
39. Какие три системы репарации генетического материала вы знаете?
40. Какие антимутационные свойства генетического материала вы знаете?
41. Какие виды трансдукции вы знаете?
42. Какие выдающиеся открытия в генетике микроорганизмов вы знаете?
43. Какие два основных критерия аллелизма существует?
44. Какие два основных способа деления клетки вы знаете?
45. Какие инфекции можно лечить бактериофагами?

46. Какие методы исследования генома микроорганизма вы знаете?
47. Какие методы применяются в селекции микроорганизмов?
48. Какие основные методы исследования генома микроорганизма вы знаете?
49. Какие основные особенности деления прокариот?
50. Какие основные причины возникновения мутаций?
51. Какие основные составные компоненты клеток вы знаете?
52. Какие основные этапы репликации эукариот?
53. Какие особенности конверсии генов вы знаете?
54. Какие особенности микроорганизмов, как объекта генетических исследований вы знаете?
55. Какие особенности митохондрий грибов?
56. Какие особенности организации генетического аппарата прокариот (кольцевые и линейные хромосомы) вы знаете?
57. Какие особенности пластид водорослей?
58. Какие особенности регуляции работы генов у эукариот?
59. Какие особенности строения бактериофага М1?
60. Какие подходы применяются для слияния протопластов?
61. Какие признаки плазмид можно выделить?
62. Какие различия между α - и β -клеткам?
63. Какие системы репарации вы знаете?
64. Какие этапы включает в себя процесс трансформации?
65. Каким другим термином называют «амитоз»?
66. Каким образом фаги, имеющие хвостовой отросток прикрепляются к бактериальной клетке?
67. Каким образом активный локус МАТ может переключаться?
68. Каким образом останавливается процесс репликации у про- и эукариот?
69. Какова главная отличительная особенность между клетками прокариот и эукариот?
70. Какова скорость репликации у эукариот и прокариот?
71. Каковы особенности строения клеток прокариот?
72. Каковы отношения между искусственным отбором и селекцией?
73. Какое биологическое значение репарации ДНК?
74. Какое значение имеют гибриды, полученные при слиянии протопластов?
75. Какое место в генетике дисциплин занимает генетика микроорганизмов?
76. Какое отличие рекомбинации эукариот от прокариот?
77. Какое поведение наблюдается у слившихся протопластов?
78. Какое практическое использование бактериофагов вы знаете?
79. Какое преимущество работы с микроорганизмами?
80. Какое размножение у актиномицетов?
81. Какое строение клетки имеют актиномицеты?
82. Какой вид имеет бактериофаг?
83. Какой может быть рекомбинация?
84. Какой ученый обнаружил кишечную палочку?
85. Какой фермент является ключевым при осуществлении репликации?
86. Какую роль в народном хозяйстве выполняет селекция микроорганизмов?
87. Какую роль выполняют плазмиды?
88. Какую роль играет мутационная изменчивость всех организмов?
89. Кем был впервые обнаружен М1-фаг?
90. Количество ДНК больше у эукариот или бактерий?
91. Конъюгация у бактерий
92. Кто такие актиномицеты? Доказать.
93. Метод получения гетерозиготных диплоидов?

94. Механизм «разрыв - воссоединение» впервые сформулирован...?
95. Микроорганизмам свойственна наследственная изменчивость?
96. На какие 6 групп по морфологии разделяют фаги?
97. На какие группы по специфичности взаимодействия фаги?
98. На каком грибе были разработаны принципы анализа митотического расщепления?
99. На что похоже явление супрессивности?
100. На что похожи митохондрии грибов?
101. Назовите основные методы селекции.
102. Объясните, что такое умеренные бактериофаги?
103. Основные функции плазмид?
104. Особенности генетической рекомбинации?
105. Отличия умеренных бактериофаг от вирулентных
106. По спектру действия на бактерии фаги разделяют на...?
107. Под действием УФ-лучей у человека нарушается?
108. Половая дифференцировка у кишечной палочки.
109. Почему разница в скорости репликации у про- и эукариот велика?

110. Продуктом гетерогамии является?
111. С какими актиномицетами связана способность выработки антибиотиков?
112. С чем связан механизм возникновения хромосомных и геномных мутаций?
113. Техника парасексуальной гибридизации может позволить...?
114. У каких организмов обнаружены мобильные генетические элементы?
115. У представителей какого рода грибов мицелий выражен более ярко?
116. Характерные особенности специфичной трансдукции?
117. Чем геном эукариот отличается от прокариот?
118. Чем генотип отличается от фенотипа?
119. Чем обособлен генетический аппарат эукариотической клетки?
120. Чем обусловлены фенотипические различия между α - и α -клетками?
121. Чем отличаются клетки растений, животных и грибов.
122. Число групп сцепления соответствует какому набору хромосом?
123. Число копий плазмид, находящихся под слабым контролем, может достигать?
124. Что входит во внутрихромосомные перестройки?
125. Что входит в тетрадный анализ?
126. Что дало открытие Мю-фага?
127. Что наблюдается при заражении кишечной палочки у человека?
128. Что называют сортом, породой, штаммом?
129. Что подразумевает собой смешанный тип симметрии?
130. Что подразумевается под термином «геномные перестройки»?
131. Что позволяет гибридизация микроорганизмов?
132. Что представляет из себя бинарное деление клетки?
133. Что представляет собой конъюгация?
134. Что представляет собой цитологическая карта хромосом?
135. Что происходит при абортивной трансдукции?
136. Что происходит при делении прокариот?
137. Что происходит при делении тела клетки?

138. Что такое «слияние протопластов»?
139. Что такое абертация?
140. Что такое амитоз?
141. Что такое бактериальная конъюгация?

142. Что такое биологические векторы?
143. Что такое вирулентные бактериофаги?
144. Что такое генетическая рекомбинация?
145. Что такое генетическое копирование?
146. Что такое генные мутации?
147. Что такое гетерогамия?
148. Что такое гетерокариоз?
149. Что такое гетерокарион?
150. Что такое гифы?
151. Что такое гомокарионы и гетерокарионы?
152. Что такое дупликация?
153. Что такое изогамия?
154. Что такое индуцированные мутации?
155. Что такое клеточная инженерия?
156. Что такое конверсия генов?
157. Что такое конъюгативные транспозоны?
158. Что такое конъюгация?
159. Что такое лизогения?
160. Что такое мерозигота?
161. Что такое митотическое расщепление?
162. Что такое мобильные генетические элементы дрожжей?
163. Что такое мутаген?
164. Что такое пилус?
165. Что такое плазмиды?

166. Что такое профаг и лизогения?
167. Что такое псевдоаллелизм?
168. Что такое рекомбинантный критерий?
169. Что такое репликация?
170. Что такое реплисом?
171. Что такое сексдукция?
172. Что такое селекция?
173. Что такое специфическая трансдукция?
174. Что такое сплайсинг?
175. Что такое спонтанные мутации?
176. Что такое точковые мутации?
177. Что такое трансдукция?
178. Что такое трансдукция?
179. Что такое транскриптон?
180. Что такое транспозиции/инсерции? Что такое бактериофаг?
181. Что такое транспозоны бактерий?
182. Что такое трансформация, какие особенности она имеет?
183. Что такое трансформация?
184. Что такое фаговар?
185. Что такое экзоспоры?
186. Что такое эписомы?
187. Что такое явление супрессивности?
188. Что характерно для клеток эукариот?