

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации**  
**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение**  
**высшего профессионального образования**  
**«Саратовский государственный аграрный университет**  
**имени Н.И. Вавилова»**

**МЕТАБОЛИЗМ И ГЕНЕТИКА ПРОКАРИОТ**

**краткий курс лекций**

**для аспирантов**

Направление подготовки  
**06.06.01 Биологические науки**

Профиль подготовки  
**Микробиология**

**Саратов 2014**

Рецензенты:

Доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология и биотехнология» ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» Щербаков А.А.

Доктор биологических наук, директор Саратовского филиала Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. Опарин М.Л.

**Метаболизм и генетика прокариот:** краткий курс лекций для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Микробиология) / Сост.: Ю.А. Попов, С.В. Иващенко // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2014. – 53 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Метаболизм и генетика прокариот» составлен в соответствии с программой дисциплины и предназначен для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Микробиология). Краткий курс лекций содержит теоретический материал по вопросам конструктивного и энергетического обмена веществ, генетической наследственности и изменчивости у прокариотов. Материал ориентирован на вопросы профессиональной компетенции будущих исследователей и преподавателей-исследователей.

© Попов Ю.А., Иващенко С.В., 2014  
© ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2014

## Введение

Дисциплина «Метаболизм и генетика прокариот» является одной из составляющих, необходимых для подготовки высококвалифицированных исследователей направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Микробиология).

В кратком курсе лекций рассматривают вопросы конструктивного и энергетического обмена веществ, генетической наследственности и изменчивости у прокариотов, а также вопросы генной инженерии.

## **ПОСТУПЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРОКАРИОТИЧЕСКУЮ КЛЕТКУ**

### **1.1. Многообразие функций клеточной мембраны у прокариот.**

Барьерная функция мембраны. Структура и функции транспортных систем связаны с мембраной. Механизмы транспорта. Кинетический анализ служит методом идентификации и описания транспортных процессов. Энергетика транспорта с участием переносчика: механизм сопряжения. Для прокариот характерно большое разнообразие механизмов транспорта: диффузия, вторичный транспорт, первичный транспорт, перенос с присоединением химической группы. Регуляция и разнообразие транспортных систем. Секреция макромолекул.

### **1.2. Субстратное фосфорилирование.**

Синтез АТФ сопряжён с экзергоническими реакциями окисления. Выход АТФ зависит от изменения свободной энергии в сопряжённой с фосфорилированием реакции. Для сопряжения синтеза АТФ с расщеплением глюкозы необходим разрыв связи С-С и последующее окисление образовавшихся продуктов. При субстратном фосфорилировании происходит образование высокоэнергетического соединения. Окисление пирувата сопряжено с запасанием энергии. Катаболическая роль цикла трикарбоновых кислот состоит в образовании восстановительных эквивалентов для окислительного фосфорилирования.

### **1.3. Электротранспортное фосфорилирование.**

При электротранспортном фосфорилировании выход АТФ соответствует изменению свободной энергии в окислительно-восстановительной реакции. Все АТФ-синтазы действуют по одному механизму. Дыхательные цепи весьма разнообразны по составу. Механизмы сопряжения транспорта электронов и переноса протонов могут быть различными. Фотофосфорилирование происходит при транспорте электронов и переносе протонов с использованием энергии света.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Опишите механизмы транспорта питательных субстратов через бактериальные мембраны.
2. Раскройте механизм субстратного фосфорилирования.
3. Укажите сущность электротранспортного фосфорилирования.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

#### **Основная**

1. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М.: Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
2. Никитина Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4

3. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
4. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Высшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

#### Дополнительная

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002.
2. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0
3. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
4. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

## АНАБОЛИЗМ У ПРОКАРИОТ

### 2.1. Рост и питание.

Характер роста периодической культуры отражает физиологические особенности микроорганизма. На рост и физиологическое состояние клеток влияют физико-химические факторы. Среды для выращивания бактерий содержат все необходимые питательные вещества. Для выращивания чистых культур микроорганизмов необходима стерилизация сред и инструментов. Рост можно измерять разными методами. Методы хранения культур обеспечивают длительное поддержание их жизнеспособности. Работа микробиологов основана на методах селективного культивирования и получения чистых культур. Непрерывное культивирование служит ценным инструментом исследования. Методы культивирования основаны на подавлении микробного роста.

### 2.2. Ассимиляция макро- и микроэлементов.

Автотрофные бактерии используют  $\text{CO}_2$  в качестве единственного источника углерода. Для синтеза метаболитов-предшественников из  $\text{C}_2$ -субстратов необходимы дополнительные реакции. Метилотрофные бактерии используют в качестве единственного источника углерода одноуглеродные соединения. Источником аммиака могут служить различные азотсодержащие соединения. Восстановление  $\text{N}_2$  до  $\text{NH}_3$  катализирует нитрогеназа. Ассимиляция фосфора не требует окислительно-восстановительных реакций. Источниками серы для микроорганизмов обычно служат сульфат и тиосульфат. Микроэлементы и электролиты клетки поглощают с помощью специальных транспортных систем.

### 2.3. Биосинтез клеточных строительных блоков.

Молекулярный состав клеток прокариот соответствует сложности их организации. Основные метаболиты-предшественники - это немногочисленные интермедиаты центральных путей метаболизма. Механизмы включения азота, фосфора, серы,  $\text{C}_1$ -фрагментов и молекулярного кислорода в состав клеточных компонентов. Образование строительных блоков из основных метаболитов-предшественников, полимеризация и сборка макромолекул происходят с затратой АТФ и NADPH. Основные метаболиты-предшественники для синтеза строительных блоков образуются как интермедиаты центральных метаболических путей. Аминокислоты образуются из нескольких основных метаболитов-предшественников. Фосфорилированные углеводы служат важными предшественниками многих строительных блоков. Строительными блоками для синтеза нуклеиновых кислот служат рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды. Сахара и нуклеотидсахара служат важными строительными блоками. Биосинтез липидов в соответствии с их структурой весьма сложен. Все бактерии синтезируют только одно или несколько полимерных запасных веществ. Многие растворимые клеточные компоненты необходимы лишь в небольшом количестве.

### Вопросы для самоконтроля

1. Раскройте связь между ростом культуры бактерий и её физиологическим состоянием.
2. Как физико-химические факторы влияют на рост культуры прокариот?
3. Раскройте классификацию питательных сред по назначению и консистенции. Какие требования предъявляются к питательным средам?
4. Как можно измерить рост микроорганизмов?
5. Назовите способы получения чистой культуры бактерий.
6. Как осуществляется ассимиляция прокариотами углерода?
7. Как осуществляется ассимиляция прокариотами азота?
8. Как осуществляется ассимиляция прокариотами фосфора?
9. Как осуществляется ассимиляция прокариотами серы?
10. Раскройте механизмы включения азота, фосфора, серы, С1-фрагментов и молекулярного кислорода в состав клеточных компонентов
11. Какие метаболиты-предшественники необходимы для синтеза аминокислот, нуклеиновых кислот, липидов и сложных углеводов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### Основная

1. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М.: Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
2. Никитина Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
3. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
4. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

#### Дополнительная

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002.
2. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0
3. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
4. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

## Лекция 3

### ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ У ПРОКАРИОТ

#### 3.1. Окисление органических соединений.

Использование микробами полимерных органических субстратов включает внеклеточную стадию разложения. Экзоферменты выделяются во внешнюю среду или остаются связанными с клеточной поверхностью. Синтез и секреция экзоферментов осуществляются как тонко регулируемые процессы. Внутриклеточные запасные полимеры расщепляются ферментами цитоплазмы. Расщепление высокополимерных субстратов с образованием растворимых продуктов катализируют экзоферменты. Разложение лигнина - сложного гетерополимера, состоящего из фенилпропаноидных соединений. Белки как субстраты для роста многих микроорганизмов. Рибонуклеиновые и дезоксирибонуклеиновые кислоты - распространённые биополимеры, легко разлагаемые внеклеточными гидролазами. Липиды входят в состав мембран у всех организмов. Для ассимиляции продуктов разложения биополимеров используются различные варианты основных метаболитических путей. окисление углеводов - наиболее распространённых питательных субстратов - происходит несколькими путями. Аминокислоты служат вторыми по значению питательными субстратами. Разложение ароматических соединений происходит с участием молекулярного кислорода или анаэробным способом. Жирные кислоты, воски, углеводороды, стеролы и C<sub>1</sub>-соединения используют специализированные бактерии. Ассимиляция микробами гетероциклических азотсодержащих соединений. Органические кислоты представляют собой распространённые природные субстраты, образующиеся и как продукты брожения. Ксенобиотики - синтетические, устойчивые к биodeградации соединения, в норме не характерные для природных сред. Некоторые бактерии осуществляют неполное окисление простых органических веществ.

#### 3.2. Окисление неорганических соединений.

Хемолитотрофы получают энергию в процессе окисления неорганических субстратов. Хемолитотрофы весьма разнообразны по типам метаболизма. По механизмам запасания энергии хемолитотрофы не отличаются принципиально от хемогетеротрофов. По углеродному метаболизму хемолитотрофы не отличаются от гетеротрофов и фототрофов. Хемолитотрофы адаптированы к росту в особых, часто экстремальных средах, бедных органическими веществами. Серные бактерии составляют весьма гетерогенную группу. Нитрифицирующие бактерии окисляют аммоний и нитрит. Водородокисляющие бактерии получают энергию путём окисления водорода. Карбокситрофные бактерии - факультативные хемолитоавтотрофы. Железо- и марганец-окисляющие бактерии.

#### Вопросы для самоконтроля

1. Раскройте роль эндо- и экзоферментов в окислении органических соединений в прокариотической клетке.
2. Укажите пути расщепления белков и аминокислот.
3. Как расщепляются в клетке нуклеиновые кислоты?
4. Опишите пути расщепления углеводов.
5. Укажите пути расщепления липидов.

6. Как протекает расщепление неорганических субстратов у хемолитотрофов?
7. Опишите расщепление неорганических субстратов серными и нитрифицирующими бактериями.
8. Опишите расщепление неорганических субстратов водородокисляющими, карбокситрофными и железо- и марганец-окисляющими бактериями.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### Основная

1. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М.: Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
2. Никитина Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
3. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
4. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

### Дополнительная

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002.
2. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0
3. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
4. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

## Лекция 4

### АЭРОБНОЕ И АНАЭРОБНОЕ ДЫХАНИЕ. БРОЖЕНИЯ

#### 4.1. Аэробное дыхание и регуляция аэробно/анаэробного метаболизма.

Уникальными свойствами  $O_2$  обусловлена его роль в жизнедеятельности клеток.

Кислород выполняет разнообразные функции в метаболизме прокариот. Большое число ферментов и кофакторов катализирует реакции с участием кислорода. Присутствие  $O_2$  служит важным экологическим и физиологическим фактором. Бактерии способны выживать при недостатке и постоянном изменении концентрации  $O_2$ . Молекулярный кислород служит доминирующим регуляторным сигналом.

Использование кислорода в качестве акцептора электронов обеспечивает эффективное получение энергии. Кислород служит энергетически наиболее выгодным акцептором электронов. У бактерий обнаружены различные типы аэробных дыхательных цепей. Многие бактерии обладают разветвлённой аэробной дыхательной цепью. Соотношение  $H^+/2e^-$  при аэробном дыхании может варьировать. При использовании  $Fe^{2+}$  и нитрита в качестве донора электронов необходим обратный перенос электронов для восстановления  $NAD^+$ .

Кислород может служить косубстратом в реакциях метаболизма. Бактерии обладают механизмами защиты от действия токсичных форм кислорода. Билюминисценция зависит от присутствия кислорода.

#### 4.2. Анаэробный энергетический метаболизм.

В анаэробной электронтранспортной цепи вместо  $O_2$  используются другие акцепторы электронов. Два пути нитратного и нитритного дыхания. Восстановление fumarата сопряжено с транспортом электронов. Некоторые бактерии и археи осуществляют серное дыхание. Система восстановления  $Fe^{3+}$  имеет высокий окислительно-восстановительный потенциал. Восстановление диметилсульфоксида и триметиламин-N-оксида путём анаэробного дыхания приводит к образованию продуктов с резким запахом. Синтез ацетата из двух  $C_1$ -единиц сопровождается выделением энергии. Способностью к метаногенезу обладают только археи. Диссимиляционное восстановление сульфата до  $H_2S$  широко распространено в природе. Получение энергии в процессе восстановительного дехлорирования.

Брожение - это анаэробный окислительно-восстановительный процесс. Известны 4 пути анаэробного разложения фосфосахаров. Пируват образуется как интермедиат во многих процессах брожения: молочнокислое, спиртовое, маслянокислое, пропионовокислое и другие. Субстратами брожения могут служить аминокислоты. Сбраживание N-гетероциклических соединений происходит аналогично сбраживанию аминокислот. Синтрофные бактерии связывают процессы брожения и метаногенеза.

Энергия запасается не только посредством окислительно-восстановительных реакций.

#### Вопросы для самоконтроля

1. Какие функции выполняет кислород в метаболизме прокариот?
2. Опишите аэробную дыхательную цепь.
3. Раскройте механизм нитратного и нитритного путей дыхания.

4. Опишите серное дыхание и дыхание, сопровождающееся восстановлением  $\text{Fe}^{3+}$ .
5. Опишите пути дыхания, связанные с метаногенезом и восстановлением сульфата.
6. Укажите 4 пути анаэробного разложения фосфосахаров.
7. Опишите молочнокислое, спиртовое, маслянокислое, пропионовокислое брожения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### Основная

1. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 8-е изд., стер. – М.: Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
2. Никитина Е.В. Микробиология: учебник/ Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
3. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
4. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

### Дополнительная

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002.
2. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0
3. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
4. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ БАКТЕРИЙ. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ. Ч. 1

### 5.1. Свойства ДНК как химической и биологической макромолекулы.

Химические связи: 1/ковалентные (50-100 ккал/моль); 2/Н-связи, электростатической природы, слабые (3-4 ккал/моль). Специфическое спаривание оснований при помощи Н-связей - А:Т, Г:Ц.

3/ван-дер-ваальсовы связи (диполь-дипольные). 4/ионные - электростатической природы. Слабые (5 ккал/моль).

Правозакрученная малая (12Å) и большая (22Å) бороздки.

Антипараллельность - фосфодиэфирные мостики ориентированы в противоположных направлениях.

Конформации: В, А, С, D, E, Z (zigzag - форма остова) - неканоническая левая спираль, образуется при чередовании Pur-Pur-Pur-Pur.

Способность к денатурации (процесс нарушения Н-связей между полинуклеотидными цепями и стэкинг-взаимодействий). Гиперхромный эффект. Ренатурация. Понятие гомологии нуклеотидных последовательностей. Зависимость ренатурации от степени гомологии. Молекулярная гибридизация.

Показатель ГЦ-пар, таксономическое значение.

### 5.2. Организация генетического материала в бактериальной клетке.

Величина генома бактерий. Понятие kilobase (кпн). Дальтон (1 Да = 1,6605x10<sup>-24</sup> г).

Минимальная величина генома - *Mycoplasma genitalis*, 580 kb; максимальная - у *Mucosoccus xanthus* – 9500 kb. Средняя величина - у хромосомы *E. coli* около 4600 kb.

Форма нуклеоида (кольцевые и линейные хромосомы).

Супервитки образуются на уровне третичной структуры ДНК, домены-петли. У *E. coli* 80-100 доменов. Есть крупные домены (по 100 kb) и короткие (несколько сотен bp).

Топоизомеразы - ферменты, способные изменять число витков в кольцевых молекулах ДНК. Гистоноподобные белки образуют каркас для сверхвитков. У энтеробактерий пять НЛР. Высококонсервативны В «стяжке» нуклеоида участвуют также молекулы РНК.

Таким образом, нативная форма генетического материала - ДНК/РНК/протеид.

Локализация в виде ДНК-мембранного комплекса. Сайты специфического прикрепления 20-30 у *E. coli* и 70-80 у *B. subtilis*.

Кодирующая емкость: 1 kb ДНК кодирует включение 333 аминокислот, то есть синтез белка молекулярной массой около 37 кДа. В хромосоме *E. coli* (4600 kb) возможно до 3500 генов; за вычетом нетранскрибируемых областей расчетное число генов - 2500.

Первая генетическая карта *E. coli* в 1964г. (конъюгация, трансформация, трансдукция). Анализ *in silico* (“в кремнии”) = компьютерный анализ результатов секвенирования. Первые сиквенсы – в 1995г: грам+ *Haemophilus influenzae* и грам- *Mycoplasma genitalis*. Сиквенс определил местоположение, размеры и дедуцированные продукты генов многих микроорганизмов. Хромосома *E. coli* K-12 - 4653831 bp.

Оказалось, что рассчитанный объем некодирующих областей завышен. Реально он у *E. coli* = 12%, у *B. subtilis* = 14%. Число ORF у *E. coli* K-12 оказалось равным 4290.

Оперонная организация генов характерна для бактерий. Оперон - единица координированной экспрессии генов, участвующих в обеспечении какого-либо метаболического процесса. Лас-оперон.

Число хромосом. Утверждение, что у бактерии всегда одна хромосома неверно. У *Rhodobacter spheroides*, бруцелл - две хромосомы. Две хромосомы у *Agrobacterium tumefaciens* (одна кольцевая, вторая – линейная), возбудителя желтухи *Leptospira interrogans*, холерного вибриона.

Интроны и экзоны, соответственно участки, автокаталитически вырезающихся при созревании иРНК и транслируемые участки, присутствующие в зрелых молекулах.

Паралоги и ортологи. Гомологичные гены, расположенные в геноме одной бактерии - паралоги. Если гомологичные гены - в геномах разных видов, речь идет об ортологах.

Понятия гена, генотипа, фенотипа. Ген - последовательность нуклеотидов в ДНК, которая в процессе транскрипции переводится в нуклеотидную последовательность РНК, а на этапе трансляции реализуется в виде последовательности аминокислот полипептида. Генотип = сумме аллелей (структурных форм) всех генов клетки. Фенотип = совокупности всех структурных и функциональных свойств клетки.

### Вопросы для самоконтроля

1. Каковы факторы, стабилизирующие структуру молекулы ДНК?
2. Каким образом происходит компактизация генетического материала в клетке микроорганизма?
3. Каким образом организованы опероны в бактериальной хромосоме?

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### Основная

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2

#### Дополнительная

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.
3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1

5. Смирязев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков: учебник / А.В. Смирязев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

## Лекция 6

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ БАКТЕРИЙ. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ. Ч. 2

#### 6.1. Репликация молекулы ДНК.

Суть - матричный синтез. Механизмы: дисперсивный, консервативный, полуконсервативный. Принцип комплементарности оснований.

Стадия инициации. Участок инициации *oriC* находится на определенном расстоянии от сайта прикрепления к мембране, узнается белком-инициатором *dnaA*, затем присоединяется *dnaC*-белок. ДНК-топоизомераза вносит оц-разрыв в одну цепь ДНК, и становится возможным вращение спирали вокруг фосфодиэфирных связей. Спираль раскручивает ДНК-хеликаза. Белок *ssb* стабилизирует оц-участки. Репликационные вилки.

Стадия элонгации. Основной фермент - ДНК-полимераза. ДНК-полимераза III не может иницировать синтез цепи, нужна затравка (праймер). Затравку синтезирует РНК-полимераза (несколько десятков рибонуклеотидов). Вскоре после начала полимеризации затравка выщепляется РНК-азой N. Брешь застраивается дезоксирибонуклеотидами.

Специфическое спаривание проходит по обоим цепям. Антипараллельность ДНК ставит проблему полимеризации в направлении 3'5', которая разрешается синтезом 5'3' по ведущей цепи непрерывно и 5'3'-фрагментами по отстающей цепи. Фрагменты Оказаки 100-2000 нп. Параллельно с полимеризацией проходит выборочная модификация оснований. В основном, - метилирование с помощью ДНК-метиلاзы.

Стадия терминации. На участке *terC* репликация заканчивается. *TerC* - протяженная область (более 200 kb), в составе которой имеется несколько некодирующих последовательностей. ДНК-лигаза восстанавливает ковалентную непрерывность вновь синтезированной цепи, замыкая кольцо (репарируя ник).

Репликацию осуществляет реписома - комплекс белков, работающих синхронно, с высокой степенью точности (10<sup>-10</sup>).

#### 6.2. Процесс транскрипции.

Первый этап реализации генетической информации в онтогенезе. Необходимы четыре рНТФ и ДНК-зависимая РНК-полимераза. Субъединицы:  $\alpha$ (две) по 40 кДа,  $\beta$  - 155 кДа,  $\beta'$  - 165 кДа +  $\sigma$  (основная) - 80 кДа. Понятие промотора. Против хода транскрипции расположена область из 6 нп, близкая по составу для всех промоторов - блок Прибнова или "-10". Есть еще последовательность с центральным нуклеотидом на -35 - ТТГАЦА.

Стадии транскрипции: 1) инициация (посадка РНК-полимеразы на промотор). 2) элонгация от 5' к 3'. Скорость включения - 40-50 нуклеотидов/сек при 37°C. 3) Терминация. Имеются стоп-сигналы, узнаваемые самой РНК-полимеразой - блоки полиА. Перед терминаторами часто локализованы палиндромы - двухцепочечные последовательности ДНК, которые читаются одинаково в обоих направлениях. Частота ошибок 10<sup>-4</sup>. Механизм коррекции не существует.

### 6.3. Генетический код и процесс трансляции.

Наличие 4 основных нуклеотидов в ДНК и 20 природных аминокислот белков. Свойства генетического кода: 1) триплетен; 2) неперекрывающийся; 3) количество возможных триплетов 64, из них 61 – смысловые; 3 – вырожденные (например, аргинин: ЦГХ, АГА, АГГ; валин - ГУХ); 4) стабилен; 5) универсален; 6) коллинеарность гена и белка.

Трансляция (синтез белка на матрице РНК). Может идти параллельно с транскрипцией. Процесс сложен, включает большой “реквизит”. Рибосомы. До 20000 в клетке быстрорастущей *E. coli*. тРНК. Структура. Шпильки. На 3' конце ЦЦА, на 5' конце Г. Половина молекулы одноцепочечная, вторая - двухцепочечная. иРНК. Высокомолекулярны, гетерогенны, нестабильны. Аминокислоты. 20 природных.

Аминоацил-тРНК-синтетазы. Функция - взаимодействие трех субстратов: тРНК, аминокислот, АТФ. Ионы магния, макроэрги (ГТФ), факторы инициации, элонгации, терминации.

Стадия инициации. иРНК при помощи полипуринового участка 3'...AGGAGG...5' (области Шайна-Дальгарно), расположенного за 4-7 нп перед иницирующим кодоном прикрепляется по принципу комплементарности оснований к высококонсервативному 3' концу 16S рРНК. Затем присоединяется 50S.

Стадия элонгации. Любая аминоацил-тРНК, кроме инициаторной, может входить в А участок и связываться антикодоном с кодоном.  $\alpha$ -аминогруппа аминокислоты, вошедшей в А-центр, оказывается вблизи от эфирной связи, соединяющей  $\alpha$ -карбонильную группу аминокислоты, содержащейся в пептиде в П-центре, с 3' концом адениловой кислоты тРНК. Второй этап элонгации – транслокация. После образования пептидной связи, тРНК с пептидом перемещается в П участок, вытесняя свободную тРНК, а в А-участок попадает новая аминоацил-тРНК.

Стадия терминация происходит при попадании в А участок одного из нонсенс-кодонов. Частота ошибок - около  $10^{-4}$ .

#### Вопросы для самоконтроля

1. Каковы основные стадии процесса синтеза ДНК на матрице ДНК?
2. Какие структуры у РНК-полимеразы и у молекулы ДНК принимают участие в инициации синтеза рибонуклеиновых кислот?
3. Что нужно (реквизит) для осуществления процесса трансляции?

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

##### Основная

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2

Дополнительная

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.
3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
5. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков: учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

## МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ. ФАКТОРЫ СПОНТАННОГО И ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА. Ч. 1

### 7.1. Биологическая значимость разных видов изменчивости у бактерий.

Стабильность и изменчивость генетического кода - диалектическое единство.

Два типа изменчивости - наследуемая (генотипическая) и фенотипическая.

Два вида наследственной изменчивости: мутационная и рекомбинационная.

Мутации - внезапные, стабильные, наследуемые изменения структуры генетического материала. Бесконечное разнообразие мутантов по функциям: ауксотрофность, антибиотикоустойчивость, ферментация сахаров, устойчивость к фагам и прочие. Любое мутационное изменение может быть охарактеризовано с помощью ряда основных альтернативных критериев.

### 7.2. Критерии дифференциации мутационных изменений.

**Точковые - протяженные.** 1) Точковые мутации. Затрагивают единичный сайт. А. Замена нуклеотида (чаще всего) – транзиции, трансверзии. Б. Мутации со сдвигом рамки считывания (frameshift) – делеции, инсерции. 2) Протяженные мутации. Захватывают области ДНК. Они, как правило, необратимы. Инверсии. Делеции. Транслокации. Амплификации (частный случай - дупликации).

**Выявляемые - криптоические.** 1) Выявляемые мутации. Возможные эффекты изменения нуклеотидной последовательности гена (изменение фенотипа): а) приобретение белком чувствительности к температуре, ионам, другим факторам. б) утрата чувствительности к ингибированию конечным продуктом. 2) Скрытые мутации. Замена аминокислоты без изменения функции белка: не в АЦФ; замена нуклеотида без изменения смысла кодона, как следствие вырожденности кода, например, валин - ГУХ.

**Миссенс - нонсенс.** Миссенс - изменение смысла кодона. Нонсенс - при образовании кодонов УАА, УГА, УАГ.

**Полные - неполные.** Полные - совершенная утрата функции фермента или прекращение синтеза структурного белка. Неполные - понижение уровня активности фермента или уменьшение количества синтезируемого продукта.

**Условные - безусловные.** Безусловные мутации проявляются независимо от условий существования (в природе) или культивирования (в лаборатории), например, инактивация фермента. Условные: проявление мутации лишь в определенных, непермиссивных условиях.

**Монотропные - плеiotропные.** Монотропные мутации затрагивают один ген и изменяют одно свойство. Плеiotропные мутации приводят к изменению ряда свойств.

**Полярные - неполярные.** Полярные относятся к генам, образующим оперон. Полярные мутации инактивируют один ген, одновременно влияя на транскрипцию других генов, расположенных дистально от первого по отношению к оператору.

**Прямые - обратные.** Прямые - изменение исходного фенотипа. Обратные (реверсии) - возврат к исходному фенотипу.

**Истинные обратные - супрессорные.** Истинная - возврат к фенотипу дикого типа вследствие восстановления исходной структуры гена. При истинной обратной мутации фенотип и генотип ревертанта неотличимы от исходных. Супрессия - подавление

эффекта первой мутации с помощью второй, локализованной в другом участке данного гена или в другом гене. Внутригенные супрессии. Межгенные супрессии. Смысл и примеры фенотипической супрессии.

### Вопросы для самоконтроля

1. Каковы механизмы образования точковых и протяженных мутаций?
2. Каким путем образуются миссенс и нонсенс мутации?
3. В чем отличие истинных обратных мутаций от супрессорных?

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### Основная

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2

#### Дополнительная

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.
3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
5. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков: учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

## МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ. ФАКТОРЫ СПОНТАННОГО И ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА. Ч. 2

### 8.1. Факторы спонтанного мутагенеза.

Спонтанные мутации происходят под действием различных факторов, но без целенаправленного экспериментального воздействия.

А. Ошибки процесса репликации. Таутомерия - процесс перераспределения электронов и протонов в молекуле – один из механизмов мутагенеза.

Б. Действие эндогенных метаболитов. Пример: интермедиаты синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований мутагенны.

В. Физические факторы внешней среды: космическое излучение, УФО. pH среды и температура - в крайних значениях - вызывают апуринизацию ДНК, ведущую к мутациям.

Г. Перемещение мигрирующих /мобильных/ генетических элементов (МГЭ) = подвижных генетических элементов (ПГЭ). ПГЭ - автономные единицы, в нуклеотидной последовательности которых заключена информация о структуре специализированных белков, обеспечивающих их перемещение. Транспозиция происходит за счет взаимодействия специализированных белков с концевыми последовательностями перемещаемого элемента. Репликационная транспозиция двухэтапна. Сначала ПГЭ соединяется с ДНК мишени, специфически расщепленной в участке встраивания, затем происходит репликация ПГЭ. Таким образом осуществляется дупликация ПГЭ и последующее разрешение коинтеграта за счет сайтспецифической рекомбинации между копиями ПГЭ. В итоге “возвращаются” молекулы донорной и реципиентной ДНК, причем, с копиями ПГЭ в каждой из них. Разные типы ПГЭ: вставочные последовательности, транспозоны, умеренные фаги.

Вставочные последовательности (insertion sequence = IS элементы) содержат только генетические детерминанты, связанные с функцией внедрения, - имеются только гены, кодирующие транспозазу, резольвазу и повторы на концах.

Транспозоны (Tn-элементы), помимо детерминант перемещения, содержат уникальные последовательности ДНК, то есть, “кодирующие” гены, чаще всего, - гены устойчивости к лекарствам, ионам тяжелых металлов.

Умеренные бактериофаги при лизогенизации могут «мутировать» клетку. Для фага λ до 1% лизогенизированных клеток аутотрофы.

Механизмы возникновения мутаций при перемещении ПГЭ:

- 1) при внедрении в любой сайт генома может нарушаться структурная целостность гена;
- 2) вследствие внедрения возможна дестабилизация прилегающих областей генома;
- 3) при неправильном вырезании ПГЭ образуются делеции;
- 4) включение-выключение транскрипции по типу флип-флоп.

### 8.2. Факторы и химические вещества, индуцирующие мутации.

Индукцированные мутации вызваны целенаправленным внешним воздействием на клетку (ДНК), определяемым экспериментатором. 1) Химическая модификация оснований (азотистая кислота, алкилирующие соединения). 2) Интеркаляция (акридин оранжевый, бромид этидия). 3) Аналоги оснований (5 БУ, аналог Т).

### Вопросы для самоконтроля

1. Каков механизм образования (спонтанных) мутации в процессе репликации?
2. В чем состоят особенности структуры разных групп подвижных генетических элементов?
3. Каким способом перемещение МГЭ вызывают мутационные изменения?
4. За счет каких свойств красители могут индуцировать мутации у бактерий?

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### Основная

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2

#### Дополнительная

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.
3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
5. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков: учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

Четыре основные типа систем излечения повреждений: фотореактивация (ФР), эксцизионная репарация (ЭР), пострепликативная репарация (ППР), SOS-репарация. Процессы репарации ДНК, наряду с репликацией, являются механизмами поддержания генетической стабильности клеток, направленными на обеспечение нативной структуры ДНК и точность передачи генетической информации.

### 9.1. Фотореактивация (световая репарация).

УФ-облучение (max 260-270 нм) вызывает разного рода нарушения структуры НК. Основной механизм УФ-повреждений - димеры, большей частью, пиримидиновые. При дозах до  $3 \times 10^6$  эрг/см<sup>2</sup>/дальтон число димеров находится в линейной зависимости от интенсивности облучения. Димеры приводят к деформациям и локальной денатурации ДНК, что нарушает репликацию и транскрипцию. Имеется прямая корреляция между числом димеров, количеством мутаций и процентом гибели клеток. Фермент дезоксирибонуклеотидаза имеет сродство к димерам. Комплекс фермент-субстрат с димерами образуется и в темноте, но для его распада необходима активация видимым светом. Эффективность работы ФР относительно невелика - до 80%.

### 9.2. Система эксцизионной репарации.

Синоним - репарация по механизму “выщепление-замещение”. Осуществляется эксцизией повреждений из одной нити по матрице второй. Ферменты ЭР также не имеют видовой специфичности. ЭР бактерий универсальна: репарировать различные виды повреждений ДНК. Многоэтапность процесса: опознавание, надрезание моноспирали (инцизия), удаление повреждения, деградация части ДНК (эксцизия), ресинтез ДНК, восстановление ковалентной целостности сахарофосфатного остова. Поэтому, этапы эксцизионной репарации контролируются набором из более 20 генов: *uvrABCDE*, *polABC*, *recABC*, *lexA* и других. Формируется мультиэнзимный комплекс.

#### I) ЭР пиримидиновых димеров (ЭРПД).

1) Инцизия. В клетках *E. coli* осуществляет *uvrABC*-нуклеаза, инцизирующая УФ-эндонуклеаза (эксинуклеаза).

2) Эксцизия. Происходит дополнительная деградация ДНК. В 99% случаев на 1 димер у *E. coli* удаляется до 30 нуклеотидов, в 1% пробел намного больше - до 9000 (!).

3) Репаративный синтез. Ключевой этап. Проводят совместно ДНК-полимеразы трех типов. Ресинтез отличается от нормальной репликации тем, что осуществляется относительно небольшими, “случайными заплатками”.

4) Восстановление целостности цепи ДНК. Ковалентное связывание 3'ОН и 5'PO<sub>4</sub> концов ДНК-лигазой.

#### II) ЭР других повреждений.

1) Однонитевые повреждения.

а) Однонитевые разрывы (после  $\gamma$ -радиации). Три пути: сверхбыстрый; быстрый; медленный.

б) Апурицированные участки ДНК могут формироваться при действии ДНК-гликозилаз, из-за потери модифицированного основания, образовываться под действием жестких излучений, температуры, крайних значений pH. АП-участки

утрачивают кодирующие свойства и, кроме того, препятствуют репликации. Репарацию ведут 5'-АП-эндонуклеазы, 3'-АП-эндонуклеазы. Стадийность: нуклеаза, хеликаза, полимераза, лигаза.

в) Модифицированные основания (алкилированные, формилированные, дезаминированные). Репарацию осуществляют ДНК-гликозилазы, разные по субстратной специфичности (3-метиладенин-; 6-метиламинопурин). Гликозилазы низкомолекулярны.

г) Ошибочно спаренные основания. Коррекция проходит по матрице правильной (т.е. материнской, исходной) нити, имеющей маркер (например, ГАТЦ, где А метилирован). Репарация многоэтапна. Участвует набор ферментов; главный - узнающая нуклеаза. Коррекция осуществляется с помощью продуктов, кодируемых генами *mut S, L, H, U, D, T, dam* (ДНК-аденинметилаза) и другими.

2) Двунитевые повреждения.

а) Поперечные сшивки ДНК, вызываемые митомицином С, ипритами, УФО, а также сшивки ДНК-РНК и ДНК-белок нарушают нормальное прохождение генетических процессов. Их репарация многоэтапна. Сначала выщепляется одно плечо сшивки ферментами *uvr*, далее в пробеле проходит репаративный синтез с участием ферментов *гесА*-зависимой рекомбинации, РМ системы, ДНК-лигазы.

б) Двунитевые разрывы. Репарация возможна только при наличии 4-5 копий геномов и активных систем ЭР и рекомбинации.

### 9.3. Пострепликативная и SOS-репарации.

При **пострепликативной репарации** (ПРР) двуцепочечная структура ДНК восстанавливается путем репарации репликативных брешей во вновь синтезируемой ДНК. ПРР - путь восстановления нативной структуры ДНК дочерних молекул; в исходной нити повреждения остаются. ДНК реплицируется, но медленно. Синтезируются нити с оц-разрывами, расстояние между которыми равно расстояниям между повреждениями (например, димерами) в материнской цепи. Возникшие "оппозитные" бреши исчезают за 60-90 мин инкубации в питательной среде. ПРР есть и у штаммов, не способных к ЭР. ПРР конститутивна, как и ЭР. У *E. coli* контролируется продуктами более 20 генов: *dna, pol, radA, B, C, гес*. Мутанты по гену *гесА* не способны к репарации этого типа, поэтому, она носит также название "рекомбинационная". То есть, ПРР репарация рекомбинационная, залечивает пробелы, образованные в дочерних цепях напротив повреждений (неудаленных димеров).

**SOS-репарация** - ответ клетки, выражающийся в увеличенной способности репарировать повреждения ДНК путем индукции синтеза компонентов ЭР длинными фрагментами и *гесА*-зависимой репарации. Индуктор, сигнал бедствия - ДНК-повреждающие агенты: УФО,  $\gamma$ -радиация, алкилирующие агенты, повышенная температура.

Особенность SOS-репарации – она индуцируемая. SOS-ответ сопряжен с синтезом белка *de novo*; индуцируется экспрессия около 40 генов, имеющих отношение к репарации, рекомбинации и репликации - SOS-регулон. Главные регуляторные белки - *гесА* и *lexA*. Белок *lexA*, 23 кДа репрессирует многие бактериальные опероны, в том числе, кодирующие репаративные функции, в том числе: *din*, а также *umuC, гесА, uvrA, uvrB* и прочие. *LexA*-репрессор ингибирует гены-мишени, содержащие так называемые SOS-блоки. Некоторые из *lexA*-зависимых генов, причастных к SOS-функции, активны и в интактных клетках, но в меньшей степени. Например, у генов *uvrB, гесА* и других

есть два промотора, из которых только один *lexA*-зависим. При SOS-индукции транскрипция идет с обоих промоторов. Белок *recA* *E. coli* - 38 кДа, обладает несколькими активностями: АТФ-азной, хеликазной, протеолитической, АТФ-зависимой синаптазной. В условиях SOS-индукции синтез резко увеличивается и количество *recA* белка достигает 30% от содержания суммарного белка. Происходит активация его протеазной функции. Белок *recA* переходит в активную форму, которая образуется при его полимеризации на оц-ДНК в присутствии АТФ. *RecA* протеаза разрезает белок-репрессор *lexA*.

Гены, имеющие SOS-блоки, дерепрессируются. Обеспечивается возможность “трансповреждающего” синтеза (*translesion synthesis*) ДНК, в результате которого напротив повреждения (димера) будет находиться не брешь, а некий нуклеотид. В итоге, возрастает выживаемость клетки (SOS-репарация) и возникает мутация (SOS-мутагенез), вследствие произвольной подстановка нуклеотида во вновь синтезируемую нить. Восстановление жизнеспособности поврежденных клеток обеспечивается ценой повышенного мутагенеза. Характерна неточность восстановления структуры ДНК.

После того, как повреждения сняты, “мутагенная репарация”, восстанавливающая структуру ДНК и спасающая клетку от гибели, должна быть прекращена. При снятии индуцирующего сигнала, *recA* теряет протеазную активность. Повышается уровень экспрессии *lexA* белка, он накапливается и выключает SOS-гены. Следовательно, белки *recA* и *lexA* являются взаимными мишенями в SOS цикле.

### Вопросы для самоконтроля

1. Каким образом могут репарироваться пиримидиновые димеры?
2. С помощью каких ферментов и на каких стадиях проходит эксцизионная репарация однонитевых повреждений в молекуле ДНК?
3. Почему работа системы SOS-репарации не является конститутивной и как она осуществляется?

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### Основная

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2

#### Дополнительная

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.
3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
5. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков: учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

## **ЯВЛЕНИЕ И МЕХАНИЗМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕКОМБИНАЦИИ У БАКТЕРИЙ**

### **10.1. Система рестрикции-модификации.**

Синоним системы рестрикции-модификации (РМ) - система хозяйской специфичности. Исходный эксперимент – попеременное пассирование бактериофагов: круг хозяев фага зависит от природы того штамма, на котором осуществлялся последний репродуктивный цикл. Подобную изменчивость нельзя объяснить мутациями или отбором, она обусловлена прямым влиянием клетки-хозяина. Примеры вариантов взаимодействия фаг-бактерия на моделях штаммов: E. coli C - E. coli K \* E. coli B - E. coli K \* E. coli K - E. coli K (P1) \* E. coli C - E. coli C (pSA).

Ограничение экспрессии чужеродной генетической информации (restriction) происходит при всех видах генетического обмена.

Система ферментативная, двухкомпонентная.

1) Модифицирующие ферменты. Как правило, ДНК-метилтрансферазы.

Метилируются АиЦв5МЦ и 6МАП. Метилирование - сразу после репликации. Донор метильной группы S-аденозилметионин. Другой способ модификации - гликозилирование глюкозилтрансферазами; донор группы - УДФ-глюкоза.

2) Специфические эндонуклеазы (рестриктазы), узнающие тетра- и гексануклеотидные сайты (идентичные узнаваемым модифицирующими ферментами) и гидролизующие молекулу ДНК. Затем экзонуклеазы I, III, V (recBC-кодируемая) и другие расщепляют фрагменты ДНК до олиго- и мононуклеотидов.

Схема постановки эксперимента на наличие РМ системы. Контроли (прогрев, % адсорбции фага, множественность инфекции).

Значимость РМ-систем:

1) ограничение функционирования чужеродной генетической информации (влияние на эффективность конъюгации, трансформации);

2) наличие РМ систем - первый этап на пути образования новых видов, так как обеспечивает репродуктивную изоляцию, необходимую для видообразования;

3) подбор оптимальных реципиентов;

4) обнаружение доноров ферментов рестрикции для генно-инженерных и биотехнологических работ.

### **10.2. Рекомбинации генетического материала у бактерий.**

Генетическая рекомбинация - процесс взаимодействия (двух) молекул ДНК, который завершается формированием структур(ы), имеющих(ей) нуклеотидную последовательность частично одной, а частично другой молекулы.

Роль рекомбинаций. Значение для филогенеза: вклад в эволюцию микроорганизмов, так как отбор действует не только на основе мутационной изменчивости, но и на базе новых комбинаций генов, возникающих в клетке. Значение в онтогенезе: перестройки генетического материала участвуют в регуляции экспрессии генов (например, реорганизация локусов, кодирующих антигены гонококков, спирохет, боррелий обеспечивают им возможность преодоления иммунных барьеров макроорганизма).

Для осуществления взаимодействия молекул ДНК, они должны быть совмещены в одной клетке. Основные процессы переноса генетической информации:

трансформация, трансфекция, лизогенная конверсия, трансдукция (разные виды), слияние протопластов, конъюгация. Понятия эндогеноты, экзогеноты, донора, реципиента, меродиплоида.

Судьба экзогеноты:

- 1) деградация экзогеноты нуклеазами (в том числе, РМ-системы);
- 2) возникновение меродиплоидных клеток, если фрагмент не может ни интегрировать, ни автономно реплицироваться;
- 3) образование клона частично диплоидных клеток, если интеграции нет, но фрагмент может автономно реплицироваться;
- 4) интеграция - при наличии гомологии.

Существуют несколько типов рекомбинаций.

**Гомологичная (общая) рекомбинация.** Обмен гомологичными участками, в том числе, с участием “передвижных” областей гомологии (например, IS-элементов), приводящий к появлению новых комбинаций генов. Основана на спаривании комплементарных цепей ДНК. Обеспечивается набором белков и ферментов (более 25): ДНК-полимераза I, гиразы, ssb-белок, лигаза, компоненты репарирующей системы КНО, *uvrAB* (хеликазы). Главную роль играют ферменты Rec-системы (от *recA* до *recJ*).

В ходе рекомбинации белок *recA* обеспечивает синапсис = конъюгацию двух молекул ДНК (поскольку при рекомбинациях необходим прямой физический контакт) и последующую переориентацию цепей молекулы ДНК. Таким образом, *recA* стимулирует образование спаренных цепей между комплементарными участками ДНК. Этапы рекомбинации: разрыв, обуславливающий подвижность, перекрест, спаривание с комплементарной цепью другой молекулы с помощью H-связей, выщепление неспаренных участков, ресинтез, ковалентное связывание. Мажорный путь общей рекомбинации - через продукты генов *recA-recBCD*. Для реализации функции *recA* необходимо не только наличие оц-разрывов, но и раскрутка дуплекса, осуществляемая, вероятно, продуктом гена *recBCD* - нуклеазой V. Минорный путь общей рекомбинации - с участием продукта гена *recF* (в мутантах *recBC* проявляется при наличии мутации *sbcB*, блокирующей синтез экзонуклеазы I).

**Специализированная (ограниченная) рекомбинация.** Суть - обмен генофорами, часто различных по составу и объему генетической информации, на коротких специализированных (гомологичных) участках. Пример - интеграция ДНК фагов или плазмид в хромосому бактерий. Тоже зависима от бактериальных Rec-ферментов. Кроме того, у фагов может быть своя рекомбинационная система. Например, система *red* у фага  $\lambda$ . При сайт-специфической рекомбинации главную роль играет взаимное узнавание белков, связанных с рекомбинационными сайтами. Эти сайты короткие и гомология между ними непосредственно для синапсиса не существенна. Она важна для связывания со специфическими белками и для обмена цепями между сайтами.

**Незаконная (неправильная) рекомбинация.** Она, во-первых, *recA*-независимая, а во-вторых, включает негомологичные обмены. Таким способом происходят транслокации, инверсии, миграция Tn элементов. Механизм малоизучен, показано, что в этих рекомбинациях участвуют топоизомеразы и другие ферменты. Мигрирующие генетические элементы являются горячими точками рекомбинации, приводящими к делециям или другим геномным перестройкам (инсерциям и инверсиям).

### Вопросы для самоконтроля

1. Каков механизм действия молекулярных компонентов системы рестрикции-модификации?
2. В чем состоит суть и отличия мутационной изменчивости бактерий и рекомбинационной?

3. Что необходимо для осуществления интеграции экзогеноты в бактериальную хромосому?
4. Сколько типов рекомбинационных систем можно определить у разных видов микроорганизмов?

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### Основная

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2

### Дополнительная

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.
3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
5. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков: учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

## ОБМЕН ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИЕЙ У БАКТЕРИЙ ПУТЕМ ТРАНСФОРМАЦИИ, ТРАНСДУКЦИИ, ТРАНСФЕКЦИИ, СЛИЯНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ

### 11.1. Трансформация у бактерий.

Трансформация представляет собой сложный процесс, при котором изолированная ДНК бактерии донора проникает в клетку бактерии реципиента, вызывая в ней наследственные изменения. Генетическая трансформация применима для:

- 1) картирования бактериальной хромосомы;
- 2) доказательства хромосомной или плазмидной детерминированности свойств;
- 3) для введения в клетки генов, сконструированных *in vitro*.

Если первый путь использования метода трансформации представляет лишь исторический интерес, то второй и, особенно, третий, активно эксплуатируются в настоящее время. Трансформация чаще всего - внутривидовая; межвидовая - редко из-за малой гомологии, наличия РМ-систем.

- 1928 г., Griffith, пневмококки, трансформация R (II) в S (III). Отсутствие капсулы, атрибута вирулентности, - следствие изменения регуляции (или мутации) в гене УДФ-глюконатдегидрогеназы, под действием которой УДФ-глюкоза превращается в УДФ-глюкуроновую кислоту, компонент клеточной стенки. 1950-е гг., Taylor, мутант пневмококка ER, еще более дефектный по капсулообразованию, чем R. Показано, что ДНК из R превращает ER в R, сообщая остаточную способность к капсулообразованию; ДНК из S трансформирует ER на первом этапе в R, а затем в S-форму.

- 1950-е гг., Hochkiss, трансформировать можно и другие признаки. Перенос признаков контролируется дискретно и независимо.

Понятие эффективности трансформации - количество трансформантов на 1 мкг трансформирующей ДНК. Понятие компетентности трансформации - способность бактериальных клеток воспринимать (то есть, сорбировать и поглощать) экзогенную ДНК, - базовое понятие. Компетентные клетки имеют морфологические, физиологические, биохимические особенности.

Природнокомпетентными называются бактерии, у которых наблюдается восприимчивость к молекулам экзогенной ДНК, без дополнительных воздействий на клетки. Примеры природнокомпетентных видов бактерий: пневмококки, стрептококки, сенная палочка, гемофилусы, гонококки, менингококки. Механизмы трансформации у разных групп бактерий имеют много общего, но есть и различия. В детерминировании состояния компетентности у грам+ микроорганизмов (бацилл, пневмококков, стрептококков) принимают участие более двадцати генов: *com* (A, E, X) и другие. У кокков в экспоненциальной клеточной фазе роста компетентна каждая клетка; у бацилл - лишь 10-15% бактериальной популяции. Проникновение ДНК в клетку зависит от нарушения целостности клеточной стенки и обнажения участков цитоплазматической мембраны. Образование протопластов, помимо несбалансированного роста клеточной стенки, связано с действием аутолизина, выделяемых в культуральную среду компетентными клетками. Доказательством участия аутолитических ферментов в трансформации является факт угнетения как аутолиза, так и компетентности клеток этаноламином. Происходит сорбция ДНК на участках ЦМ - рецепторах, их около 50 на клетку бацилл и до 80 на клетку пневмококков. Затем происходит поглощение: один

конец молекулы ДНК прикреплен к рецептору, другой проникает в клетку. Адсорбция и поглощение не зависят от видовой принадлежности ДНК. У грам- бактерий (гемофильных бактерий, менингококков и гонококков) наиболее четко дифференцировка клеток по состоянию компетентности выражена в стационарной фазе. Изменения морфогенетические: на клеточной поверхности появляются пузырьковидные впячивания, трансформосомы. Стенка трансформосом имеет два липидных слоя, содержит белки и полисахариды, характерные для оболочки клетки. На этих органеллах, на «спец»белках сорбируется ДНК. Каждая сорбирует и поглощает одну молекулу ДНК. В отличие от грам+, сорбция высокоспецифична. Поглощенная трансформосомами ДНК поступает внутрь клетки через специальную пору диаметром 5 нм. Таким образом, начальная стадия трансформации (сорбция и проникновение ДНК в клетку) у грам+ и грам- бактерий очень отличаются. Последующие стадии - сходны.

**Эклипс-период.** Маркеры не проявляются. В периплазме происходит частичный переход дц-молекул в оц-форму. Кроме того, молекулы ДНК фрагментируются с помощью появляющихся специфических эндонуклеаз. Идет подготовка к интеграции.

**Интеграция ДНК по принципу разрыв-воссоединение.** Включается одна нить, по гомологичным участкам (например, область Strr в зону Strs). Ресинтез, ковалентное связывание. Встраивание осуществляется по типу гомологичной рекомбинации.

**Экспрессия маркеров.** Возможна задержка. Например, гены glu, mal экспрессируются через 10 мин после интеграции в хромосому, trp - через 160 мин.

Есть природно-некомпетентные виды и роды бактерий (Escherichia, Yersinia, Vibrio и другие), неспособные естественным образом поглощать экзогенную ДНК. *Искусственная (индуцированная, наведенная) компетентность* - способность микроорганизмов к поглощению изолированной бактериальной ДНК, возникающая под воздействием различных физических и химических факторов. *Кальций-зависимая трансформация.* Суть: обработка клеток катионами кальция при низкой температуре (0°C) с последующим тепловым шоком (37-42°C). При этом, обработка хлористым кальцием сокращает число жизнеспособных клеток. *Криотрансформация бактерий* - индукция компетентности клеток путем быстрого замораживания при низких температурах (-196°C) и последующего быстрого оттаивания (+37-42°C). *Электропорация* - при воздействии высоковольтного электрического поля в мембранах образуются сквозные поры. Клетки, находящиеся в таком состоянии, - «электропермеабилитизованные», то есть, обладающие повышенной проницаемостью.

## 11.2. Трансфекция.

Трансфекция (трансформация, заражение) реципиентной клетки бактерии фаговой ДНК, свободной от белковой оболочки. «Трансфекция» - гибридный термин, сочетание слов «трансформация» и «инфекция». Эффективность трансфекции: число инфекционных центров в расчете на один мкг фаговой ДНК. Эффективность зависит от многих обстоятельств, в том числе: от структуры, от концентрации ДНК. Трансфекция подобна инфекции в феномене образования бляшки. Один из способов переноса генетической информации (но не «генетического обмена»), связанных с функционированием в клетке бактериофагов.

## 11.3. Лизогенная конверсия.

Кроме того, что любой профаг является для клетки: потенциально летальным фактором и придает ей устойчивость к заражению гомологичным фагом, он может

привносить микробу и другие свойства. Лизогенная конверсия - изменение наследственного потенциала бактерии за счет лизогенизации умеренным бактериофагом. В 1950 г показано, что авирулентная, нетоксигенная форма *Corynebacterium diphtheriae* переходит в вирулентную, токсигенную при лизогенизации фагом  $\beta$ . Фаг  $\lambda$  (серологически родственный  $\beta$ ) не влияет на токсигенность. В опытах по рекомбинации определили, что Тох-ген локализуется в фаговом геноме. Получены мутанты фага  $\beta$ , кодирующие синтез нетоксичного белка, ПРМ.

#### 11.4. Общая, abortивная и специализированная трансдукция.

Трансдукция - путь передачи фрагментов бактериального генома инфицирующими фагами. Виды трансдукции - общая, abortивная, специализированная.

**Общая (генерализованная)** имеет место у эшерихий, сальмонелл, бацилл и других родов и семейств микроорганизмов. Открыта J. Lederberg в середине XX века. При совместном выращивании двух ауксотрофных штаммов сальмонелл, на минимальной среде появлялись прототрофы с частотой  $10^{-5}$ . Для образования рекомбинантов прямой контакт бактерий не нужен (в U-образной трубке Дэвиса они появляются). Механизм: образование в популяции дефектных фаговых частиц. Они полностью дефектны, так как содержат вместо фаговой ДНК - фрагменты бактериального генома. При общей трансдукции может быть перенесен любой участок хромосомы, а также плазмид, профагов. Лимитирован только размер ДНК. Максимальный размер включаемого фрагмента ограничен величиной фагового капсида: у фага P22 он вмещает 27 мДа, у фага P1 - 50 мДа. Последний реально переносит вдвое больше ДНК, чем P22. Он трансдуцирует 2% генома *E. coli*, а фаг P22 - только около 1%. Лизат колифага P1 содержит до 0,3% трансдуцирующих частиц. Так как его геном равен  $10^5$  нп, а геном бактерии  $10^6$  нп, то трансдуцирующие фаги содержат менее 3% бактериального генома. Этот расчет подтвержден экспериментально: совместная трансдукция генов *leu* и *threo* (расстояние между ними = 2% генома *E. coli*) редка, а гены, удаленные на 3%, вместе не передаются, так как не помещаются в корпускуле. Метод общей трансдукции долгое время использовали для тонкого картирования (определение групп сцепления генов) и конструирования штаммов заданного фенотипа, в частности, изогенных штаммов.

**Abortивная трансдукция** - частный случай общей трансдукции. Если рекомбинация невозможна, а перенесенный фрагмент не деградирует, он остается в одной клетке. Фрагмент транскрибируется и обеспечивает проявление функции в клетке. Abortивные трансдуктанты формируют микроколонии из-за нежизнеспособности на селективной среде клеток, не получивших при делении трансдуцирующего фрагмента. То есть, при делении фрагмент передается только одной из дочерних клеток. Это явление и называется abortивной трансдукцией.

При **специализированной (ограниченной) трансдукции** фагом передается только определенный участок хромосомы клетки-хозяина. Предварительная лизогенизация клетки – необходимое условие. Пример фага, осуществляющего специализированную трансдукцию - колифаг  $\lambda$ . Лизогенный путь его развития определяется геном *C*, продукт которого, *c*-репрессор, блокирует транскрипцию генов, детерминирующих вирулентный путь развития: *N*, *O*, *P*. Если репрессор неактивен, реализуется вирулентный путь. Фаг  $\lambda$  лизогенизирует *E. coli* с частотой  $10^{-4}$ . Возможна делизогенизация, спонтанная или индуцированная. Механизм специализированной трансдукции - неправильное вырезание ДНК профага. Часть фаговой ДНК остается в

хромосоме, а гены бактерии включаются в корпускулу (до 30%). Большая часть трансдуцирующих фагов дефектна ( $\lambda d$ ).

Явление LFT. Индуцировали профаг  $\lambda$ , выращенный на gal<sup>+</sup> клетках. Одна из миллиона зараженных фагом реципиентных клеток gal<sup>-</sup> стала gal<sup>+</sup>. При этом, все трансдуктанты были лизогенными и иммунными к повторному заражению фагом  $\lambda$ . Перенесенный признак нестабилен; gal<sup>-</sup> варианты выщепляются с частотой  $10^{-3}$  на деление. Следовательно, трансдуктанты - частичные гетерозиготы gal<sup>+</sup>/gal<sup>-</sup>, то есть, участок gal<sup>+</sup> не замещает gal<sup>-</sup> в хромосоме, а дополняет. HFT - при смешанной инфекции с фагом-помощником получают репродукцию 50% нормальных фагов и 50% трансдуцирующих, то есть, с намного более высокой частотой. Эти трансдуктанты - тоже нестабильные лизогенные гетерозиготы. Специализированную трансдукцию активно использовали для картирования генома бактерий (принцип котрансдукции, то есть, определение тесно сцепленных генов).

### 11.5. Процесс слияния протопластов.

Метод описан на модели бацилл в 1970-х гг., независимо венгерскими и английскими исследователями. Он воспроизведен у эшерихий, псевдомонад, коринебактерий, стрептококков, иерсиний и других видов бактерий. Применяется чаще для грам<sup>+</sup> бактерий, чем для грам<sup>-</sup>, так как внешняя мембрана последних создает трудности для получения истинных протопластов. Процесс проходит в несколько стадий.

1) Лишение бактерий клеточной стенки. Протопласты получают в гипертонических средах, с добавлением стабилизаторов (сахароза, сукцинат натрия).

2) Индукция (ионы Ca<sup>++</sup>; вирус Сендай; ПЭГ 6000, 50%, 1-2 мин, 24°C) и слияние. В процессе формирования рекомбинантов (фьюжантов) есть несколько этапов.

3) Регенерация в исходную форму с клеточной стенкой на регенерационных гипертонических средах. Для каждого вида - свой состав. Контроль слияния может быть микроскопическим (например, по количеству спор) или по появлению новой комбинации маркеров (разные плазмиды у партнеров в слиянии).

Особенности генетического обмена путем слияния протопластов. Метод прецизионный, на выход рекомбинантов оказывает влияние масса факторов: условия лизиса, степень протопластирования, компоненты ростовых и регенерационных сред. Перспективен как способ получения гибридного потомства у микробов, не обладающих другими системами генетического обмена.

#### Вопросы для самоконтроля

1. Каковы стадии осуществления трансформации у грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов?
2. В чем сходство и отличие явлений трансформации и трансфекции?
3. Почему привнесение в бактериальную клетку нового свойства при помощи бактериофага названо «лизогенной конверсией»?
4. Каковы механизмы образования трансдуцирующих фагов при разных видах трансдукции?
5. В чем состоит своеобразие метода обмена генетической информацией у микроорганизмов при помощи слияния протопластов?

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### Основная

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2

### Дополнительная

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.
3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
5. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков: учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

## ВНЕХРОМОСОМНАЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ. Ч. 1

Геном бактерий - совокупности всех репликонов. Хромосома является обязательным генетическим материалом; плазмидная и фаговая ДНК - дополнительными. Плазмиды - репликоны, стабильно сохраняющиеся во внехромосомном состоянии без специальной селекции; они содержат гены, продукты которых не являются жизненнонеобходимыми для клетки. Могут придавать придавать селективные преимущества. Разнообразие плазмид. Убиквитарность.

Номенклатура плазмид. Обозначение: префикс "р" и конкретизация - по функции или буквенно-цифровая аббревиатура. Среди R- и D-плазмид есть исключения.

### 12.1. Свойства плазмидных репликонов.

1. Способность к автономной от хромосомы репликации.
2. Молекулярные массы от 1,5 мДа (у *E. coli*) до 300-500 мДа (рода *Pseudomonas*).  
Определяемость верхней и нижней границ.
3. Кодированная емкость: от 2 до 200 и более белков. Миниклетки, в которые сегрегирует ДНК плазмид после репликации - система изучения экспрессии плазмидных генов.
4. Плазмиды в клетке – в разных, альтернативных макромолекулярных формах. Мономерные: 1, ос, ссс. Олиго- или мультимерные: катенаны- и конкатенаты-конкатемеры. Взаимопереходы макромолекулярных форм.
5. Альтернативные состояния: автономное и интегрированное. Возможность интеграции зависит от гомологии. Схему интеграции предложил А. Campbell. Рекомбинация сайтспецифическая, с участием ферментов *hcs*-системы. Способность к дезинтеграции: если по точкам встраивания - правильное вырезание; если не по границам - образование “замещенных” плазмид (например, F).

### 12.2. Критерии классификации плазмид.

1. Конъюгативность (трансмиссивность) и неконъюгативность (нетрансмиссивность).
  2.  $F_i^+$  и  $F_i^-$  - критерии: (не)способность репрессировать функции переноса других, конъюгативных плазмид.
  3. Несовместимость - неспособность двух плазмид стабильно сосуществовать в одной бактериальной клетке при отсутствии селективного давления, направленного на поддержание одной из них. Inc группы плазмид. Некоторые плазмиды проявляют атипичную несовместимость. Например, плазмиды из IncJ несовместимы с плазмидами из IncB. Плазмиды, входящие в одну Inc-группу, имеют ряд общих свойств.
- Две гипотезы о механизме несовместимости - R. Pritchard и F. Jacob. В пользу гипотезы Ф. Жакоба свидетельствует, в частности, идентификация на хромосоме *E. coli* гена, участвующего в образовании мембранного сайта. Выделен мутант поддерживающий несколько копий F-фактора.

### 12.3. Репликация молекул ДНК бактериальных плазмид.

Репликон – молекула ДНК, обладающая способностью к автономному воспроизведению (репликации). Размеры базовых плазмидных репликонов различны: от 1,0 до 2,5 kb. Они содержат несколько генетических детерминант: *ori*-пункт репликации; структурные гены репликации (*rep*); ген негативного контроля числа копий (*cop*); ген, обеспечивающий распределение копий (*par*); *ter*-область. Реплицируются только мембраносвязанные молекулы: происходит их "протягивание" через мембранные сайты. ДНК многих плазмид существует в виде релаксационного комплекса (сверхскрученные молекулы, ассоциированные с белком-эндонуклеазой). Релаксация - образование открыто-кольцевой формы в результате активации нуклеазы, вносящей ник в одну из цепей. Роль этих комплексов неясна. Возможно, они необходимы для инициации вегетативной репликации ДНК или для конъюгационной репликации ДНК (образование свободного оц-конца). Ферментативный аппарат: ДНК-полимераза (репликация больших плазмид зависит от ДНК-полимеразы III, а ДНК-полимераза I типа нужна для репликации малых), РНК-полимераза; ДНК-лигаза; модифицирующие ферменты.

Малокопийные и многокопийные плазмиды. Трансмиссивные, высокомолекулярные плазмиды присутствуют в клетке в 1-2 копиях; нетрансмиссивные, низкомолекулярные – в количестве 15-30 копий. Копийность зависит и от генома клетки-хозяина.

Строгий и релаксированный контроль репликации. Малокопийные плазмиды реплицируются под контролем, который координирован с терминацией репликации хромосомной ДНК. Явление амплификации плазмид. Значение амплификации плазмид, кодирующих целевые продукты, для биотехнологических производств.

Описано несколько типов плазмидных репликонов. Два из них:

1. Тип ColE1. Репликоны этого типа не кодируют никаких белков, необходимых для репликации, поэтому, продолжают репликацию в хлорамфеникол-обработанных клетках.

2. Репликоны типа IncFII (*E. coli*) кодируют белок *rep*, нужный для репликации, он считывается с двух промоторов, один из них регулируется белком гена *copB*.

Модели репликации:

а)  $\sigma$ -структура, катящееся кольцо: разрыв одной нити, прикрепление 5' концом к мембране, достройка второй нити. Репликация начинается на *ori*, идет однонаправленно. Затем - нарезка мономеров из конкатемеров.

б)  $\theta$ -структура (*тэта*).

#### Вопросы для самоконтроля

1. Внехромосомные элементы наследственности: определение, распространение, отличительные особенности?
2. Каковы основные характеристики плазмидных ДНК?
3. Критерии классификации плазмидных ДНК?
4. Репликационный аппарат и особенности репликации ДНК бактериальных плазмид?

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

##### Основная

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8

2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2

#### Дополнительная

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.
3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
5. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков: учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

## **ВНЕХРОМОСОМНАЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ. Ч. 2**

Плазмиды бактерий подразделяются на различные функциональные группы.

### **13.1. Плазмиды бактериоциногенности.**

Плазмиды, под контролем которых микроорганизмы продуцируют вещества, летальные для бактериальных клеток, бактериоцины. Описано более двух сотен.

Бактериоцины обозначаются по виду или роду бактерий-продуцентов. При адсорбции комплекса бактериоцин-белок иммунитета на мембране чувствительной клетки (рецепторы-гликопротеиды), белковые репрессоры отщепляются и в клетку проникают бактериоцины, действующие на разные мишени. У *E. coli* - колицины: E1, E2, E3 - нуклеазы, деградируют ДНК и рРНК; А, I, К - ингибируют синтез белков и нуклеиновых кислот, разобщают окислительное фосфорилирование.

Детерминирование синтеза бактериоцинов за редчайшим исключением осуществляется плазмидными генами. Эти плазмиды могут нести гены, кодирующие и другие свойства, не связанные с бактериоциногенностью (то есть, помимо структуры бактериоцина, белков иммунитета к бактериоцину и белков, способствующих выходу бактериоцина из клетки). Плаزمида CloDF13 из *Enterobacter cloacae* детерминирует синтез 10 полипептидов, один из них - клоацин, расщепляя 16S рРНК, подавляет трансляцию.

### **13.2. Плазмиды, кодирующие синтез антибиотиков.**

У представителей рода *Streptomyces* найдены плазмиды, детерминирующие синтез антибиотиков, например, конъюгативная плазмида SCP1, ее замещенные производные; недавно найдена SCP2 – около 30 kb, 3-5 копий в клетке. Возможно, что SCP и подобные ей плазмиды регулируют синтез антибиотиков.

### **13.3. Плазмиды, кодирующие устойчивость к антибиотикам (R).**

Плазмидную природу имеют ферменты, инактивирующие антибиотики. Обычно синтез ферментов конститутивен, но есть и регуляторные варианты: продукция пенициллиназ у бацилл, ацетилаз для инактивации хлорамфеникола у стафилококков. Индукция чаще происходит у грам+. Плазмидная устойчивость имеет больше возможностей для переноса в другие клетки: трансформация Smr у пневмококков, гонококков; трансдукция Rep плазмид у энтеробактерий, стафилококков; конъюгация (чаще всего) - у многих видов бактерий.

Общие характеристики.

1. Диапазон молмасс от 1 до 120 и более мДа.
2. R-плазмиды могут содержать на одном репликоне несколько различных генов устойчивости к антибиотикам.
3. Конъюгативность и неконъюгативность.
4. Часто гены устойчивости - в составе Tп.
5. Возможность интеграции в хромосому.
6. Мало- и многокопийность.
7. Способность к амплификации.

8. Возможность транзиции. Сложность структуры. Диссоциация на RTF и  $\gamma$ -детерминанту, разные по молекулярным массам и функциям. Котрансдукция фагом P1.

Явление транзиции плазмидных ДНК.

#### **13.4. Плазмиды биodeградации (D).**

Многие D-плазмиды позволяют клетке утилизировать несколько различных субстратов. Катаболические плазмиды широко распространены в природе: до 50% бактерий, выделенных из загрязненных мест, содержат D-плазмиды. Камфорные, октановые, салицилатные, ксилольные, октанольные, нафталиновые, толуольные. Исторически, обозначения плазмид почти всегда отражают название разлагаемого субстрата CAM, OCT, SAL, XYL, OCT, NAN, TOL. D-плазмиды изучены плохо: они высокомолекулярные, от 70 до 500 мДа. Природные микроорганизмы-хозяева, в основном, грам-: псевдомонады (*Ps. putida*, *Ps. aeruginosa*), клебсиеллы, представители родов *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Alcaligenes* и других. D-плазмиды относятся к группам несовместимости Inc P1, P2, P7, P9. Плазмиды, которые принадлежат к двум последним, имеют ограниченный круг хозяев.

#### **13.5. "Опухолеродные" плазмиды.**

Продукты, кодируемые генами этих плазмид, вызывают образование опухолей (выпуклых наростов, галлов) у растений. Природные хозяева этих плазмид - почвенные бактерии рода *Agrobacterium*. Агробактерии по патогенности подразделяются на виды, которые являются этиологическими агентами трех типов рака у растений: корончатого галла (crown gall); стеблевого галла (cane gall); бородатого корня (hairly root). Ti-плазмиды (tumor inducing) у *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rubi*. Ri-плазмиды (root inducing) у *Agrobacterium rhizogenes*. Размеры от 200 до 250 мДа.

Показано, что молекулярной основой неоплазии является интеграция в ядерный геном растений *vir*-района плазмиды - фрагмент размером около 5%. Плазмид-содержащие агробактерии нужны только для индукции опухолей, но не для их поддержания: стерильные галловые ткани культивируются на простых средах без добавок ростовых гормонов. Галлы характеризуются анаплазией, способностью к сверхросту, дедифференцированностью, перевиваемостью, гормоннезависимым ростом *in vitro*, способностью к метастазированию.

#### **13.6. Плазмиды "вирулентности".**

«Vir» плазмиды кодируют синтез веществ, ассоциируемых с проявлением вирулентности, то есть, обуславливающих или усиливающих вирулентные свойства клеток. Три группы:

а) Плазмиды, детерминирующие продукты, угнетающие функции макроорганизма: Ну-плазмиды; Тох-плазмиды.

б) Плазмиды, детерминирующие продукты, дающие возможность бактериям размножаться в необычных условиях. Например, стрептококк, вызывающий кариес, с плазмидой, кодирующей продукцию полисахарида, который разрушает зубную эмаль.

в) Плазмиды, кодирующие продукты, наделяющие бактерии особыми свойствами, обуславливающими их выживание и распространение. К-плазмиды. Возбудители многих заболеваний проникают внутрь организма через слизистые; другие

колонируют слизистые и реализуют факторы патогенности с токсическими функциями. Поэтому, прикрепление к эпителиальным клеткам - важный этап в развитии многих бактериальных инфекций. Поверхность слизистых оболочек имеет структурные и функциональные особенности, позволяющие им противостоять инфицированию. В частности, имеются факторы неспецифической устойчивости (лизоцим, интерферон, лактоферрин) и специфические реакции местного клеточного и гуморального. Адгезия к мембране клеток эукариотов осуществляется посредством пилей, чаще всего, белковой природы, хотя стрептококки и стафилококки имеют пили, составленные из липотейхоевых кислот.

У ЕТЕС, выделенных от поросят, найден антиген К88, он образует белковые нити. Вызывает МРГА эритроцитов морской свинки. К88+-клетки сорбируются тканеспецифично и многослойно на клетках тонкого кишечника. Антиген К99 продуцируется штаммами, патогенными для телят и ягнят. Антигены СFA I, II, III формируют фимбрии у штаммов ЕТЕС, патогенных для людей. Все перечисленные адгезины кодируются генами плазмид. Молекулярные массы плазмид - выше 40 мДа.

### Вопросы для самоконтроля

1. Бактериоциногенность, генетическая детерминированность?
2. Каковы основные характеристики плазмид, кодирующих синтез антибиотиков и плазмид, определяющих устойчивость бактерий к антибактериальным препаратам?
3. Какие необычные свойства придают клетке бактерии D-плазмиды?
4. Что такое плазмиды «опухолеродности»?
5. Плазмиды, определяющие вирулентные свойства бактерий: характеристики, примеры.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### Основная

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2

#### Дополнительная

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.
3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1

5. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков: учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

## ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Генная инженерия - конструирование рекомбинантных геномов и изучение экспрессии генов, входящих в их состав - новая методология молекулярной биологии.

### 14.1. Значение генной инженерии в современном мире.

1972, P. Berg, первая рекомбинантная ДНК – комбинация ДНК вируса SV40 и фага P1gal. Живой измененный организм – любой живой организм, обладающий новой комбинацией генетического материала, полученной благодаря использованию современной биотехнологии.

Многие фирмы США, Европы, России занимаются разработкой препаратов на основе генно-инженерной технологии. Необычно короткий путь от фундаментальных разработок до практического применения обусловлен тем, что генная инженерия не изменила принципиальных представлений о природе наследственности.

Технология рекомбинантной ДНК позволяет реализовать важные направления научной и производственной деятельности человека.

1) Генетическая модификация микроорганизмов с целью улучшения качества или увеличения количества синтезируемых продуктов.

2) Генетическая модификация высших растений для увеличения общей продуктивности, калорийности, содержания питательных веществ, повышения устойчивости к пестицидам, вредителям.

3) Конструирование генно-инженерных вакцинных штаммов.

4) Получение штаммов-продуцентов новых диагностических и профилактических препаратов, в том числе, иммуногенных белков.

5) Перенос участков геномов эукариот в клетки бактерий для целевого синтеза белков или гормонов.

6) Генетическая модификация соматических клеток для исправления наследственных дефектов.

### 14.2. Стратегия генно-инженерных работ.

Основные этапы создания рекомбинантных штаммов следующие:

1) фрагментация ДНК и фракционирование;

2) получение векторных молекул;

3) ферментативное соединение фрагмента ДНК с вектором *in vitro* (фрагменты ДНК из любого источника, видовых границ нет);

4) введение полученных гибридных молекул в реципиентные клетки;

5) репликация гибридных молекул, размножающих клонируемый фрагмент ДНК;

6) селекция клонов клеток или фагов, содержащих индивидуальные молекулы гибридных ДНК;

7) структурно-функциональный анализ гибридных ДНК, изучение параметров экспрессии клонированных генов.

#### **Фрагментация.**

1. Гидродинамическое или УЗ-разрушение молекул ДНК на фрагменты.

2. Расщепление рестриктазами - ферментами, узнающими специфические последовательности нуклеотидов и расщепляющими ДНК на фрагменты, если нуклеотидные последовательности не несут метильной группы на определенном основании (то есть, нет модифицирующей метки).

Широко распространены. Более 1000 штаммов-продуцентов, некоторые из которых синтезируют несколько рестриктаз. Три основных типа рестриктаз.

**Фракционирование** осуществляется одним из методов: электрофорезом с последующей элюцией из агарозного (или смешанного) геля, центрифугированием в градиентах концентрации сахарозы, гель-фильтрацией, хроматографией.

**Получение векторных молекул.** Вектор (молекула-переносчик, повозка, vehicle) - фрагмент ДНК, обеспечивающий репликацию гибридной молекулы в клетке. Основные требования к вектору:

- 1) способность к автономной репликации;
- 2) возможность реплицироваться в нескольких видах микроорганизмов;
- 3) амплифицируемость (плазмиды) или урожайность (фага);
- 4) удобные селективные генетические маркеры;
- 5) наличие уникальных сайтов расщепления несколькими рестриктазами, не нарушающих существенных функций вектора.

Плазмидные векторы. Исторически первый - интактная плаزمида ColE1.

Фаговые векторы. Прежде всего, на основе фага  $\lambda$ .

Космиды - плазмиды, содержащие cos-сайт фага  $\lambda$  (участок, соответствующий липким концам молекулы) и вводимые в клетку упаковкой ДНК в головку фага.

**Сшивка фрагмента с вектором.**

1. Коннекторный способ. Первая рекомбинантная ДНК, полученная P. Berg построена из ДНК фага  $\lambda$  и вируса SV40 с использованием коннекторов, взаимнокомплементарных гомополимерных последовательностей.

2. Рестриктазно-лигазный способ более популярен. Гибридизация по "липким" концам и зашивание оц-разрывов ДНК-лигазой E. coli. Проводят при 4°C. Подбор оптимальных соотношений фрагментов для получения желаемого выхода гибридов.

3. Сшивка по "тупым" концам (стык-в-стык) ДНК-лигазой фага T4.

4. Использование адапторов или линкеров (синтетических коротких сегментов ДНК, содержащих сайты рестрикции).

**Введение рекомбинантной ДНК в клетку.** Реципиенты, чаще всего, кишечная (грам-) и сенная (грам+) палочки. Проблема безопасного реципиента. Для увеличения эффективности введения в клетки чужеродной генетической информации лучше использовать:

- 1) штаммы gm;
- 2) штаммы с высоким уровнем лигазной активности;
- 3) штаммы с гесА- генотипом, чтобы рекомбинантная ДНК не интегрировалась.

Методы введения генетической информации - трансформация и трансфекция, в системе Са-обработки, криотрансформации, электропорации.

**Селекция гибридных клонов.** Методы селекции: комплекс биохимических, генетических, иммунологических приемов, обеспечивающих получение бактериальных клонов, несущих рекомбинантные ДНК с желаемыми вставками.

При создании рекДНК и их клонировании возможны два подхода.

1. Клонирование индивидуальных генов (фрагментов), выделенных фракционированием. Здесь главное - найти и выделить нужный фрагмент для

клонирования, а поиск гибридных клонов нетруден, так как все клоны, содержащие рекДНК, несут одну и ту же вставку.

2. Использование смеси фрагментов, здесь сложна идентификация нужного клона после трансформации (способ шот-ган).

**Изучение экспрессии клонированных генов.** В условиях производства оправдано использование только высокоактивных штаммов-продуцентов. Наряду с этим качеством, микроорганизмы должны обладать и другими свойствами, обеспечивающими успешное ведение технологического процесса:

- 1) высокой скоростью роста;
- 2) устойчивостью к повышенной температуре и кислотности среды;
- 3) стабильностью наследования признаков;
- 4) способностью микроорганизмов усваивать дешевые доступные продукты;
- 5) безвредностью для человека и животных.

Основным условием конструирования новых продуцентов является разработка методов экспрессии генетического материала. Для эффективной экспрессии клонированного гена необходимо решить несколько проблем.

1. Стабилизация репликации гетерологичной ДНК в клетке.
2. Правильный контроль транскрипции гена.
3. Возможность трансляции иРНК на рибосомах.
4. Стабильность белковых продуктов.

#### Вопросы для самоконтроля

1. Каковы основные этапы генно-инженерного конструирования (с их описанием)?
2. Вопросы безопасности генно-инженерных работ?
3. Достижения современной биотехнологии, основанные на использовании генно-инженерной методологии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

##### Основная

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2
4. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия [Электронный ресурс]: учебно-справочное пособие; доп. МО / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2010. – 514 с. – ISBN 978-5-379-01064-5 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

##### Дополнительная

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.

3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
5. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков: учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

## **ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НОВЕЙШИХ СПОСОБОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ, ОСНОВАННЫЕ НА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МЕТОДОЛОГИИ**

### **15.1. Общие понятия микробиологической диагностики.**

Большинство существующих методов индикации, идентификации, дифференциации и типирования бактерий, в том числе, патогенных, основано на определении различных фенотипических свойств. Нестабильность фенотипа (в частности, зависимость экспрессии генов от условий роста, мутационная утрата свойства) вносит элемент неопределенности в получаемые результаты. Это обстоятельство обусловило необходимость разработки приемов детекции, идентификации и типирования микроорганизмов, основанных на анализе структуры генома, как более стабильной основы.

Методы, основанные на молекулярно-генетических маркерах, отвечают современным требованиям, предъявляемым к диагностическим тест-системам (быстрота анализа, высокая чувствительность, специфичность, стандартность). К числу этих методов относятся: определение плазмидного профиля (скрининг плазмид), рестрикционный анализ, генетическое зондирование, геномная "дактилоскопия", определение ПЦР-профиля (различные варианты), риботипирование, вычитающий рестрикционный фингерпринтинг, типирование с использованием зондов на IS-элементы (IS-типирование), мультилокусный электрофорез ферментов, тестирование локусов, содержащих короткие повторяющиеся последовательности (VNTR-анализ или мультилокусный VNTR-анализ - MLVA), мультилокусное сиквенс-типирование (MLST).

### **15.2. Скрининг плазмид.**

Геном – сумма репликонов клетки (хромосома, профаги, плазмиды).

Плазида - кольцевая внехромосомная ДНК, способная к автономной репликации. Несет в своем составе гены, не являющиеся жизненно необходимыми для клетки. Различные функциональные группы плазмид. Для патогенных бактерий особое значение имеют плазмиды, содержащие гены вирулентности, кодирующие продукты, способствующие выживанию патогена и его диссеминации (антигены адгезии, белки, транспортирующие железо из связанных комплексов или продукты, подавляющие функции макроорганизма (гемолизины, токсины).

Скрининг (screen – просеивать, отбирать) плазмид - проведение электрофореза клеточного лизата в агарозном геле и выявление внехромосомных элементов наследственности по наличию флуоресцирующих в УФ-свете фракций ДНК.

1976 г., Jane Meyers из лаборатории S. Falkow. Экспериментальная схема анализа. В результате электрофореза образуется специфическая картина распределения молекул нуклеиновых кислот (или фрагментов) в зависимости от молекулярных масс, суммарного заряда, конформации. Плазмиды - удобные эпидемиологические маркеры. Например, различные госпитальные штаммы энтеробактерий имеют специфический плазмидный профиль. Состав плазмид может быть применен для анализа

происхождения штаммов. Плазмидный скрининг - простой и ставший уже рутинным метод мониторинга патогенных бактерий, но его применение ограничено.

### **15.3. Рестрикционный анализ.**

PM-система - ферментативная система защиты "чистоты" генома. Убиквитарность.

Рестриктазы - эндонуклеазы, узнающие специфические нуклеотидные последовательности и расщепляющие ДНК на фрагменты, если узнаваемые последовательности не несут метильной группы (или другой модификации) на конкретном нуклеотидном основании в составе определенного сайта.

В основе рестрикционного анализа лежит реакция взаимодействия специфических эндонуклеаз с ДНК, в результате которой образуются фрагменты (рестрикты), специфичные для разных организмов. Рестрикты разделяют по размерам путем гель-электрофореза. Картина их распределения служит основой для идентификации бактерий. Рестрикционный анализ применим для анализа хромосомной ДНК и внехромосомных репликонов. Даже при одинаковой мол. массе плазмидных ДНК профиль их рестрикции часто бывает неодинаковым. Наибольшее использование рестрикционный анализ, наряду с плазмидным скринингом, получил в эпидемиологии внутрибольничных инфекций для выявления источника инфекции, контроля эпидемиологического благополучия в стационарах, установления различий между эпидемически значимыми и неэпидемическими штаммами.

### **15.4. Генетическое зондирование.**

В 1980 г. S. Falkow впервые использовали генетические зонды (фрагменты ДНК, содержащие гены термолabileного и термостабильного токсинов) для детекции энтеротоксигенных *E. coli*. В последующие годы это направление интенсивно развивалось. Метод ДНК-зондирования также основан на различиях нуклеотидных последовательностей ДНК у разных организмов. Генетические зонды это диагностические препараты, используемые для детекции, идентификации, типирования микроорганизмов путем молекулярной гибридизации. ДНК-зонд - участок нуклеиновой кислоты, находящийся в одонитевой форме и меченый радиоактивно или нерадиоактивно.

В ходе реакции молекулярной гибридизации зонд образует с участком ДНК исследуемого микроорганизма (также находящимся в одонитевой форме) гибридную двунитевую молекулу. Специфичность реакции обусловлена тем, что двунитевые комплексы образуются молекулами, которые имеют большую гомологию (подобие) нуклеотидных последовательностей. Три стадии осуществления метода: денатурация ДНК, ренатурация в присутствии меченого зонда, детекция метки.

Основные варианты проведения реакции гибридизации: 1) дот-анализ на твердой подложке; 2) в растворе; 3) блот-гибридизация. Характеристики метода зондирования:

1. Высокая специфичность, позволяющая идентифицировать бактерии в чистых и смешанных культурах, в образцах из окружающей среды и биологическом материале.

2. Возможность проведения анализа многих проб одновременно.

3. Вероятность обнаружения как экспрессирующихся, так и "молчащих" генов. Выявляются не только вирулентные штаммы, но и потенциально вирулентные (несущие в составе генома репрессированные детерминанты).

4. Можно определять латентную инфекцию, когда еще нет высокого уровня продукции антител и серологические тесты не дают результатов.

5. Возможность идентификации бактерий, проявляющих антигенную вариабельность: отсутствие экспрессии антигена или мутации, изменяющие биохимические реакции, редко бывают обусловлены значительными изменениями последовательности нуклеотидов.

6. Возможность идентификации труднокультивируемых бактерий.

7. Время постановки - 6-8 часов. Чувствительность -  $10^3$ - $10^6$  микробных клеток в 1 мл.

### **15.5. Геномная дактилоскопия (фингерпринтинг).**

Метод основан на выявлении в генетическом материале микроорганизмов, человека, животных, растений уникальных по структуре участков ДНК, характерных для данного индивидуума. Сущность метода: обнаружение геномного полиморфизма сочетанием рестрикционного анализа и гибридизации со специфическими зондами. Количество и расположение фрагментов различных геномов, реагирующих с ДНК-зондом, индивидуально: вероятность их совпадения ничтожно мала.

Вариабельные тандемные повторы (VNTR – variable number of tandem repeats) представляют собой участки ДНК, содержащие последовательно расположенные и монотонно повторяющиеся нуклеотидные сайты произвольного состава.

Гибридизационная картина, создаваемая суммой гипервариабельных локусов, чрезвычайно полиморфна, так как является комбинацией множества (нескольких десятков) независимо варьирующих элементов. Полиморфизм столь высок, что гибридизационная картина достигает индивидуальной специфичности. Таким образом, для каждого микроорганизма существует "дактилоскопический отпечаток" генома.

Мультилокусный VNTR-анализ = Multi-locus-VNTR-analysis, MLVA.

### **15.6. Полимеразная цепная реакция.**

В 1985 г R .Saiki, C. Mullis et al. предложен метод амплификации ДНК в условиях *in vitro*. Основа метода использование ДНК-полимеразы для многократной генерации новых копий нуклеотидной последовательности, фланкируемой специфичными праймерами. Сущность метода состоит в одновременном копировании *in vitro* двух комплементарных цепей ДНК. Праймеры служат для определения концов последовательности, которую предполагают копировать. Методическая схема: чередование температурных режимов: то денатурации / то отжига / то полимеризации. Экспоненциальное увеличение числа копий тестируемой уникальной последовательности молекулы-мишени не только обеспечивает высокую чувствительность метода, но и ускоряет их выявление. Каждый раунд ПЦР занимает от 2 до 5 минут. Для достижения высокой чувствительности достаточно 20-30 раундов, то есть, 2-4 часа. Теоретически, за это время число копий увеличивается до 1 миллиона.

**Регистрация результатов ПЦР.** Амплифицированная ДНК после *электрофореза и окраски бромидом этидия* визуализируется в 2-3% геле агарозы или полиакриламида в виде полос, образованных фрагментами определенных молекулярных масс. Результаты электрофореза ампликонов сравнивают с контрольными образцами. Делается вывод о наличии ДНК детектируемого объекта в образце. Другой метод оценки результатов ПЦР - *ферментно-гибридизационный*: в лунке планшета иммобилизуют ДНК-зонд, с которым гибридизуется продукт амплификации; в результате аффинного взаимодействия происходит связывание биотина и авидина с образованием комплекса; меченый пероксидазой авидин выявляется в ферментативной реакции с субстратом и

дальнейшей регистрацией оптической плотности. *ПЦР в реальном времени* - контроль накопления продуктов амплификации с помощью специальных приборов, детектирующих свечение флуорохромов, без электрофореза. Так как кинетика накопления продуктов амплификации связана с исходным количеством матрицы, можно оценить ее количество.

ПЦР - высокоэффективный способ детекции микроорганизмов, позволяющий в течение 3-5 часов выявлять генетический материал единичных клеток. Молекула ДНК может быть амплифицирована непосредственно в пробе; из смеси извлекается только определенная нуклеотидная последовательность. Характеристики метода ПЦР-анализа.

1. Высокая чувствительность - 10-100 микробных клеток.
2. Выявление труднокультивируемых форм бактерий.
3. Обнаружение атипичных форм микробов, бактерии в L-форме, а также бактерии с измененной антигенной структурой.
4. Возможность диагностики хронических форм заболевания.
5. Независимость результатов анализа от иммунного статуса пациента.
6. Постановка диагноза в течение одного рабочего дня.

### **15.7. Мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ).**

Метод базируется на сравнении последовательностей нуклеотидов нескольких частей генома микроорганизма. Применение МЛСТ подразумевает секвенирование определенных фрагментов генома, обозначение аллелей, объединение номеров по нескольким локусам в аллельный профиль и генетическую характеристику штамма. Метод МЛСТ позволяет описывать генетическое разнообразие и клональную структуру бактериальной популяции, оценивать эволюционный потенциал патогена. Вкупе с данными об источнике выделения штамма, МЛСТ позволяет определить как связаны изоляты, имеющие разное происхождение, проследить закономерности циркуляции штаммов с определенным фенотипом. В качестве локусов для секвенирования выбирают фрагменты генов, не ассоциированных с факторами патогенности микроорганизма. Достоинства метода: он обеспечивает максимально возможную степень дифференциации штаммов; возможность абсолютной стандартизации и сопоставления данных, полученных в разных лабораториях; однозначная интерпретация результатов секвенирования; объединение данных в Интернете. Схемы МЛСТ разработаны для широкого спектра бактериальных инфекций, в том числе, особо опасных.

#### **Вопросы для самоконтроля**

1. Возможности микробиологической диагностики с помощью методов плазмидного скрининга и рестрикционного анализа?
2. Каковы диагностические преимущества метода генетического зондирования?
3. Полимеразная цепная реакция: стадии, характеристики.
4. Метод идентификации бактерий при помощи определения нуклеотидной последовательности молекул ДНК (секвенирование): этапы, перспективы?

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

##### **Основная**

1. Бакай, А.В. Генетика : учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8

2. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2

#### Дополнительная

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.
3. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
5. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков: учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4

## Библиографический список

1. Айала, Ф. Современная генетика: В 3-х томах. Пер. с англ. / Ф. Айала, Д. Кайгер. - М.: Мир, 1987. – Т. 1. - 295 с.; Т. 2. - 368 с.; Т. 3. - 335 с.
2. Бакай, А.В. Генетика: учебник / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с. – ISBN 978-5-9532-0648-8
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. - 589 с.
4. Гусев, М.В. Микробиология : учебник / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 7-е изд., стер. – М.: Академия, 2007. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-3731-8
5. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Жученко, А.А. Генетика: учебное пособие / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский; ред. А.А. Жученко ; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2006. – 480 с. – ISBN 5-9532-0069-2
7. Картель, Н.А. Генетика [Электронный ресурс]: энциклопедический словарь / Н.А. Картель, Е.Н. Макеева, А.М. Мезенко. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 992 с. – ISBN 978-985-08-1311-4 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
8. Нетрусов, А.И. Микробиология. Университетский курс: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-7979-0
9. Никитина, Е.В. Микробиология: учебник / Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 368 с. – ISBN 978-5-98879-075-4
10. Общая биология и микробиология: учебное пособие для студ. вузов по направлению «Биотехнология»; доп. УМО / А.Ю. Просеков [и др.]. - СПб.: Проспект Науки, 2012. – 320 с. – ISBN 978-5-903090-71-6
11. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 800 с. – ISBN 978-985-06-2237-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
12. Смиряев, А.В. Генетика популяций и количественных признаков : учебник / А.В. Смиряев, А.В. Кильчевский; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 272 с. – ISBN 978-5-9532-0422-4
13. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с. ISBN 5-03-003707-1
14. Степанов, В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков [Электронный ресурс]: учебник; доп. УМО / В.М. Степанов. – М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2005. – 336 с. – ISBN 5-211-04971-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
15. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия [Электронный ресурс]: учебно-справочное пособие; доп. МО / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2010. – 514 с. – ISBN 978-5-379-01064-5 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

## Содержание

<b>Введение</b>	3
<b>1. Лекция 1. Поступление питательных веществ в прокариотическую клетку</b>	4
1.1. Многообразие функций клеточной мембраны у прокариот	4
1.2. Субстратное фосфорилирование	4
1.3. Электротранспортное фосфорилирование	4
Вопросы для самоконтроля	4
Список литературы	4
<b>2. Лекция 2. Анаболизм у прокариот</b>	6
2.1. Рост и питание	6
2.2. Ассимиляция макро- и микроэлементов	6
2.3. Биосинтез клеточных строительных блоков	6
Вопросы для самоконтроля	7
Список литературы	7
<b>3. Лекция 3. Окислительные процессы у прокариот</b>	8
3.1. Окисление органических соединений	8
3.2. Окисление неорганических соединений	8
Вопросы для самоконтроля	8
Список литературы	9
<b>4. Лекция 4. Аэробное и анаэробное дыхание. Брожения</b>	10
4.1. Аэробное дыхание и регуляция аэробно/анаэробного метаболизма	10
4.2. Анаэробный энергетический метаболизм	10
Вопросы для самоконтроля	10
Список литературы	11
<b>5. Лекция 5. Молекулярные основы наследственности бактерий. Основные понятия генетики микроорганизмов. Ч. 1</b>	12
5.1. Свойства ДНК как химической и биологической макромолекулы	12
5.2. Организация генетического материала в бактериальной клетке	12
Вопросы для самоконтроля	13
Список литературы	13
<b>6. Лекция 6. Молекулярные основы наследственности бактерий. Основные понятия генетики микро-организмов. Ч. 2</b>	15
6.1. Репликация молекулы ДНК	15
6.2. Процесс транскрипции	15
6.3. Генетический код и процесс трансляции	16
Вопросы для самоконтроля	16
Список литературы	16

<b>7. Лекция 7. Мутационная изменчивость бактерий.</b>	
<b>Факторы спонтанного и индуцированного мутагенеза. Ч. 1</b>	18
7.1. Биологическая значимость разных видов изменчивости у бактерий	18
7.2. Критерии дифференциации мутационных изменений	18
Вопросы для самоконтроля	19
Список литературы	19
<b>8. Лекция 8. Мутационная изменчивость бактерий.</b>	
<b>Факторы спонтанного и индуцированного мутагенеза. Ч. 2</b>	20
8.1. Факторы спонтанного мутагенеза	20
8.2. Факторы и химические вещества, индуцирующие мутации	20
Вопросы для самоконтроля	21
Список литературы	21
<b>9. Лекция 9. Ферментативные системы репарации повреждений ДНК</b>	22
9.1. Фотореактивация (световая репарация)	22
9.2. Система эксцизионной репарации	22
9.3. Пострепликативная и SOS-репарации	23
Вопросы для самоконтроля	24
Список литературы	24
<b>10. Лекция 10. Явление и механизмы рестрикции-модификации. Генетические рекомбинации у бактерий</b>	26
10.1. Система рестрикции-модификации	26
10.2. Рекомбинации генетического материала у бактерий	26
Вопросы для самоконтроля	27
Список литературы	28
<b>11. Лекция 11. Обмен генетической информацией у бактерий путем трансформации, трансдукции, трансфекции, слияния протопластов</b>	29
11.1. Трансформация у бактерий	29
11.2. Трансфекция	30
11.3. Лизогенная конверсия	30
11.4. Общая, abortивная и специализированная трансдукция	31
11.5. Процесс слияния протопластов	32
Вопросы для самоконтроля	32
Список литературы	33
<b>12. Лекция 12. Внехромосомная наследственность бактерий. Ч. 1</b>	34
12.1. Свойства плазмидных репликонов	34
12.2. Критерии классификации плазмид	34
12.3. Репликация молекул ДНК бактериальных плазмид	35
Вопросы для самоконтроля	35
Список литературы	35

<b>13. Лекция 13. Внехромосомная наследственность бактерий.</b>	
<b>Ч. 2</b>	37
13.1. Плазмиды бактериоциногенности	37
13.2. Плазмиды, кодирующие синтез антибиотиков	37
13.3. Плазмиды, кодирующие устойчивость к антибиотикам (R)	37
13.4. Плазмиды биодegradации (D)	38
13.5. "Опухолеродные" плазмиды	38
13.6. Плазмиды "вирулентности"	38
Вопросы для самоконтроля	39
Список литературы	39
<b>14. Лекция 14. Принципы и методы генной инженерии</b>	41
14.1. Значение генной инженерии в современном мире	41
14.2. Стратегия генно-инженерных работ	41
Вопросы для самоконтроля	43
Список литературы	43
<b>15. Лекция 15. Теоретические основы новейших способов микробиологической диагностики, основанные на молекулярно-генетической методологии</b>	45
15.1. Общие понятия микробиологической диагностики	45
15.2. Скрининг плазмид	45
15.3. Рестрикционный анализ	46
15.4. Генетическое зондирование	46
15.5. Геномная дактилоскопия (фингерпринтинг)	47
15.6. Полимеразная цепная реакция	47
15.7. Мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ)	48
Вопросы для самоконтроля	48
Список литературы	48
<b>Библиографический список</b>	50
<b>Содержание</b>	53