

Национальный университет республики Узбекистана  
имени Мирзо Улугбека

Биолого-почвенного факультета

кафедры генетики и цитоэмбриологии

## КУРСОВАЯ РАБОТА

Предмет: Основы молекулярной генетики

Тема; Геномная организация эукариотов

сдала: магистр 1 курса Д.М. Тошева

принял: к.б.н., доц. А.К. Рахимов

Ташкент -2014

## Содержание

Содержание.....2

Введение.....**Ошибка! Закладка не определена.**

**Бактерии как экспериментальный объект**

**Бактериальный геном**

**Мутанты *E. coli***

**F-фактор: генетический элемент, определяющий пол бактерий**

**Физическое картирование бактериальных генов методом прерванной конъюгации**

**Кольцевая форма генома *E. coli***

**Подвижные генетические элементы (транспозоны)**

**Заключение**

**Литература**

## Введение

Связь между менделевскими генами и хромосомами клетки была твердо доказана Бриджесом в 1916 году (гл. 3). Ему удалось установить, что все

гены имеют некоторые общие свойства. Во-первых, они способны создавать собственные копии (самореплицироваться) во время удвоения хромосом в период, предшествующий мейозу. Во-вторых, в результате мутаций гены могут переходить в различные аллельные формы, что также предполагает способность к саморепликации. Редкость мутаций указывает на то, что гены представляют собой очень стабильные структуры, способные к точной дубликации. В-третьих, гены различными способами оказывают влияние на фенотип. Проявление альтернативных признаков, как впервые заметил Мендель (длинный или короткий стебель, гладкие или морщинистые семена и т. п.), служит основным критерием идентификации генов при наблюдениях над расщеплением аллелей в потомстве различающихся по данному признаку родителей. Устойчивая передача признаков из поколения в поколение, нарушаемая лишь мутациями, ставит перед нами вопросы: как определяются такие признаки? Что представляет собой образующее ген вещество, способное к саморепликации, мутациям и фенотипическому проявлению?

Ответы на такие фундаментальные вопросы неизбежно очень сложны, когда вопросы формулируются применительно к росту, развитию и размножению высших организмов, например человека, или даже менее сложных организмов, таких как мухи или растения гороха. Чем проще устроен организм, тем больше он подходит для решения подобных вопросов. Первые сведения о физических и химических основах наследственности были получены при работе с микроорганизмами.

Бактерии, ранее изучавшиеся лишь постольку, поскольку они являются возбудителями болезней человека и домашних животных, оказались удобным объектом для исследования наследственности и природы генетического материала. Вирусы, устроенные проще, чем бактерии, оказались и более удобным объектом. Вирусы способны размножаться лишь внутри живых клеток. Бактериофаги проникают в бактериальные клетки; другие вирусы поражают клетки растений и животных, и многие из них патогенны.

Еще в 1922 г. генетик Мёллер отметил два важных общих свойства бактериофагов и генов: и те и другие способны к размножению, создавая точные копии самих себя; и те и другие в результате мутаций могут принимать новые формы. Мёллер писал<sup>1)</sup>:

«С другой стороны, если тельца Д'Эрелля (бактериофаги) действительно представляют собой гены, в основных чертах сходные с генами хромосом, то

это дает нам возможность подступиться к проблеме гена с совершенно новых позиций... Было бы слишком опрометчиво назвать эти тельца генами, однако мы должны признать, что какие-либо отличия между генами и ими нам не известны. Следовательно, мы не можем категорически отвергать возможность того, что когда-нибудь мы научимся растирать гены в ступке, а затем снова собирать их в пробирке. Должны ли генетики превратиться в бактериологов, химиков и физиков, одновременно оставаясь при этом зоологами и ботаниками? Хотелось бы надеяться».

В 1922 г. генетики считали, что менделевские гены могут находиться лишь в ядрах клеток. Бактериофаги явно много мельче бактериальных клеток. Не могут ли они представлять собой «высвободившиеся» гены, способные к размножению, лишь попадая в бактериальную клетку? Эта гипотеза стимулировала множество исследований бактериофагов и других вирусов, исследований, частично подтвердивших идею Мёллера.

В этой главе мы рассмотрим, как изучение бактерий и вирусов привело к пониманию химической природы генетического материала и как были определены его физическая структура и свойства. В последующих главах мы проанализируем, какой вклад внесло изучение микроорганизмов в наши представления об организации и механизмах проявления генетического материала.

### **Бактерии как экспериментальный объект**

Наиболее интенсивно исследуемый вид бактерий-это обитатель кишечника человека *Escherichia coli* Эта бактерия легко выращивается в жидкой среде, содержащей некоторые соли ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4$ ), ничтожные количества некоторых других необходимых элементов и какой-нибудь простой источник углерода, например глюкозу. Из этих веществ *E. coli* способна синтезировать все сложные органические молекулы, образующие клетку (такие бактерии называются *прототрофами*). В питательной среде всего лишь за один день плотность популяции, возникшей из единственной клетки *E. coli*, может достичь  $2-3 \cdot 10^9$

<sup>1</sup> *Muller HJ.* (1922). *American Naturalist*, **56**, 32.

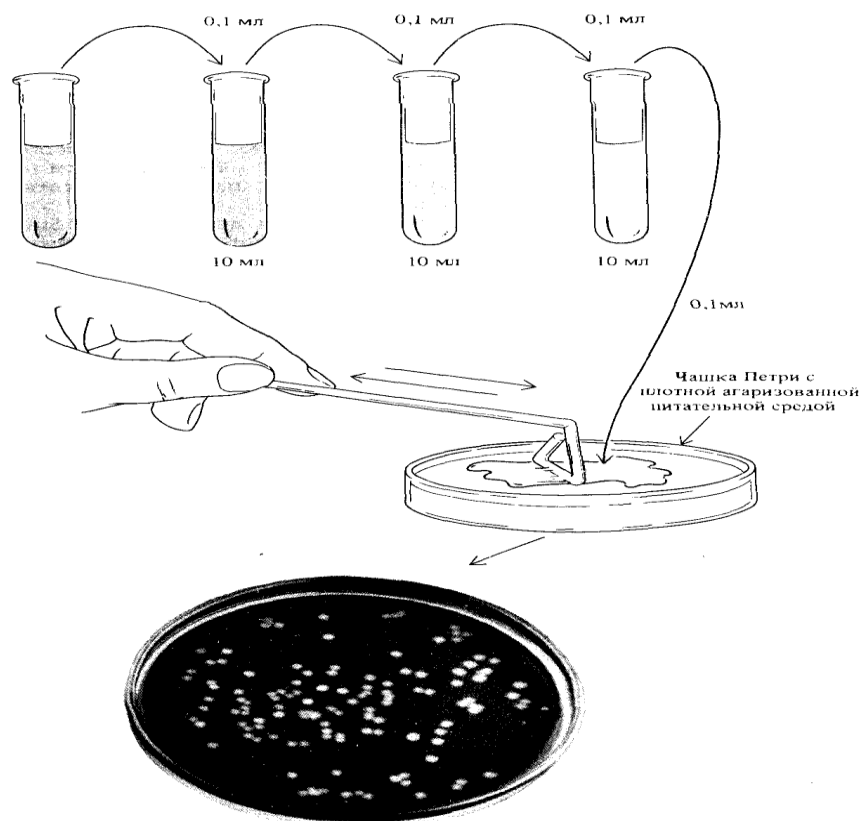


Рис. 1.1. Для определения количества живых бактериальных клеток в культуре ее образец последовательно разводят и фиксированный объем суспензии из последнего разведения высевают на твердую среду. После инкубации каждая бактериальная клетка, размножаясь, образует видимую невооруженным глазом колонию своих потомков. Подсчитав число колоний на чашке, легко узнать концентрацию бактериальных клеток в исходной культуре. Например, на чашке выросло 100 колоний, следовательно, в 0,1 мл разбавленной культуры содержалось 100 клеток, а их число в исходной пробе равно  $(100 \text{ клеток}/0,1 \text{ мл}) \cdot 10^2 \cdot 10^2 \cdot 10^2 = 10^9$  клеток в 1 мл (Stent G.S., Calendar R. 1978. Molecular Genetics, 2nd éd., W. H. Freeman, San Francisco.) [Имеется перевод: Стент Г., Кэлиндар Р. 1981. Молекулярная генетика, М., Мир.]

бактерий в миллилитре. Многие другие бактерии, особенно паразитические, не способны сами синтезировать некоторые органические соединения, и потому присутствие соответствующих соединений в среде необходимо для их существования. Такие бактерии называются *ауксотрофами*.

Количество живых клеток в бактериальной культуре можно приблизительно подсчитать, если развести определенным образом культуру и фиксированный объем суспензии высеять в чашку Петри на

поверхность твердой питательной среды (с агар-агаром) (рис. 4.1). Если культура разведена достаточно для того, чтобы отдельные клетки оказались на значительном расстоянии друг от друга, то при инкубации чашки Петри в подходящих условиях каждая бактерия начинает быстро делиться и формирует на поверхности агара различимую невооруженным глазом колонию. Количество таких колоний можно подсчитать и, умножив полученную величину на коэффициент разведения, определить число клеток в исходной культуре (см. рис. 4.1). Этот способ дает возможность изучать потомство любой отдельной клетки. Например, можно получить чистую культуру любой мутантной бактерии, присутствовавшей в исходной суспензии клеток путем ее разведения и посева в чашке Петри. Этот простой метод лежит в основе всех исследований по генетике бактерий и использовался во всех обсуждаемых ниже экспериментах.

Результаты, полученные на бактериях, внесли значительный вклад в наше понимание механизмов наследственности. В начальный период развития генетики исследования велись главным образом на высших организмах, размножающихся, так же как и человек, половым путем. У бактерий некоторые формы полового процесса были обнаружены лишь в 1946 году. Только постепенно ученые осознали, что механизмы наследования признаков у человека и бактерий в основах своих имеют очень много общего.

## Бактериальный геном

Генетические исследования организации генома бактерий начались вскоре после того, как было показано, что именно ДНК является веществом наследственности у пневмококков. Бактерии, так же как и вирусы, представляют генетикам возможность работать с популяциями колоссальной численности, затрачивая на эксперимент сравнительно небольшое время. Описываемые в этой главе методы отбора позволяют выявлять и изучать очень редкие генетические события. Объектом наиболее обширных и тщательных исследований служили и продолжают служить кишечные бактерии *Escherichia coli* и именно на них мы сосредоточим внимание в этой главе. Генетические свойства *E. coli* характерны не только для этого вида бактерий, а методология генетических исследований, разработанная на *E. coli*, создает фундамент и для изучения других видов.

Исследования генетики бактерий внесли очень большой вклад в наши знания о наследственности. Во-первых, они продемонстрировали сколь *разнообразны* генетические процессы, которые могут реализовываться в природе у отдельных видов организмов. Познание этого разнообразия у

прокариот проливает свет на возможные механизмы взаимодействия генома человека с геномами вирусов и приводит к переоценке роли многих генетических явлений, наблюдавшихся у эукариотических организмов, но не находивших объяснения. Велика роль генетики бактерий и в изучении регуляции и экспрессии активности генов. Эта тема будет рассматриваться в последующих главах. Механизмы организации этих процессов у сравнительно простых прокариотических организмов закладывают основы для их понимания у более сложно устроенных эукариот.

Как отмечалось в гл. 7, генетический анализ генома вирусов формально развивался аналогично генетическому анализу, используемому при исследовании организмов, имеющих мейоз. Однако, когда этот же подход был использован для анализа мутаций *E. coli*, возникло множество затруднений, пока генетики не осознали, что никакая аналогия между половым процессом у мейотических организмов и у бактерий невозможна. В настоящее время существуют представления, согласно которым бактерия содержит множество генетических элементов, более или менее независимых друг от друга и взаимодействующих между собой посредством механизмов, не находящихся формальной аналогии с процессом мейоза. Открытие класса генетических элементов, названных эписомами, (в особенности F-эписом) и трансдуцирующих фагов дало возможность успешно применить принципы генетического анализа к бактериям и весьма подробно описать организацию бактериального генома.

### **Мутанты *E. coli***

Прежде чем обсуждать генетику бактерий, мы должны познакомиться с типами изучаемых мутаций и с используемыми для них обозначениями. *E. coli* дикого типа растет в лабораторных условиях на очень простой среде, единственным органическим составляющим которой служит источник углерода; как правило это глюкоза. Штаммы дикого типа прототрофны (см. главу 4): они способны синтезировать любые сложные органические молекулы, необходимые для их метаболизма и роста. Эти биосинтетические способности (*анаболические функции*) требуют работы (экспрессии) многих существенных (т.е. необходимых для существования бактерий) генов. Многие мутации, нарушающие экспрессию необходимых биосинтетических функций, называются условно летальными (см. главу 7), поскольку бактерии с такими мутациями могут существовать только при добавлении в среду необходимых органических молекул. Такие мутанты называются ауксотрофами (т. е. требующими дополнительного питания).

При изучении организации бактериальных генов мы будем рассматривать ауксотрофные мутации только в качестве генетических маркеров. Более подробно они будут обсуждаться в главе 10. Фенотип ауксотрофных бактерий обозначают латинскими буквами, указывающими соединение, которое необходимо добавлять в среду для их нормального роста. Например,  $Met^-$ ,  $Thi^-$  и  $Pur^-$  обозначают, соответственно, мутантные штаммы, нуждающиеся в метионине, тиамине и пурине; соответствующие прототрофные фенотипы (дикий тип) обозначаются символами  $Met^+$ ,  $Thi^+$  и  $Pur^+$ .

Мутации в самых различных генах могут давать одинаковые ауксотрофные фенотипы, и соответствующие генотипы обозначают теми же буквосочетаниями, что и фенотипы, но курсивом. Например, мутации *metA* и *metB* - это мутантные аллели генов дикого типа *metA*<sup>+</sup> и *metB*<sup>+</sup>, причем каждый мутант характеризуется фенотипом  $Met^-$ . Как мы увидим далее, каждый из этих генов дикого типа необходим для биосинтеза метионина.

*E. coli* может использовать в качестве источника углерода многие органические соединения, более сложные чем глюкоза, поскольку обладает способностью превращать молекулы сложных Сахаров в молекулы

глюкозы или других простых Сахаров, а также способностью расщеплять другие типы сложных молекул, например, аминокислот или жирных кислот. Такое расщепление сложных молекул называется *катаболизмом*. Мутации, затрагивающие катаболические функции, ограничивают типы молекул, которые могут служить источниками углерода для соответствующего мутанта. Например, мутант с фенотипом  $Lac^-$  не способен к росту в условиях, когда единственным источником углерода служит лактоза (молочный сахар), тогда как дикий тип  $Lac^+$  способен утилизировать лактозу. Фенотип  $Lac^-$  может возникать в результате мутаций в генах *lacZ*<sup>+</sup> и *lacY*<sup>+</sup>, обуславливающих появление мутантных генотипов *lacZ* и *lacY*, соответственно. Заметим, что для того, чтобы определить, способен ли данный штамм к росту на определенной среде, надо знать, затрагивает ли соответствующая мутация анаболическую или катаболическую функцию. Например, мутант  $Met^-$  нуждается для нормального роста в среде, обогащенной метионином, тогда как мутант  $Lac^-$  не может расти на среде, содержащей в качестве источника углерода только лактозу и нуждается в другом источнике углерода. Оба типа мутаций служат удобными условно летальными генетическими маркерами.

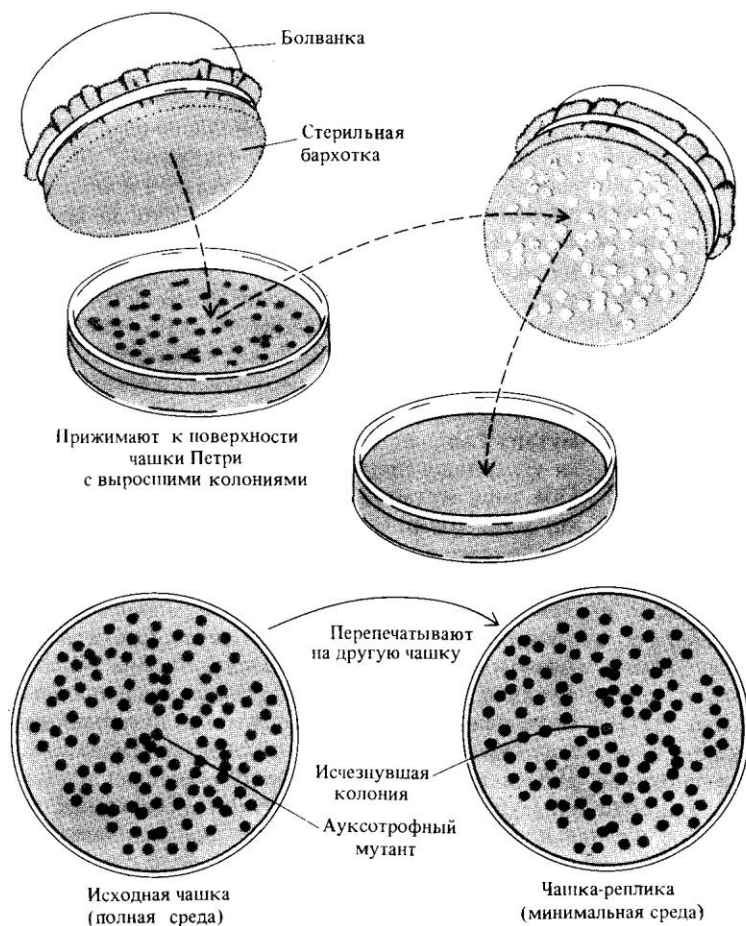


Температурочувствительные мутации широко используются и в генетике бактерий. Необходимые для нормального существования (существенные) гены, которые невозможно выявить посредством ауксотрофных мутаций, обычно могут быть идентифицированы с помощью температурочувствительных мутаций. Примерами жизненноважных функций могут служить функции, связанные с синтезом белков или нуклеиновых кислот из молекул-предшественников-аминокислот или нуклеотидов (подробное обсуждение мутаций, затрагивающих синтез ДНК, содержится в главе 13).

Существуют также мутации бактерий, вызывающие устойчивость к определенным бактериофагам или антибиотикам. Первые из них обычно влияют на способность фага прикрепляться к бактерии-мутанту, поскольку у мутанта несколько изменены белки мембраны. Устойчивые (резистентные) мутанты легко отбираются при посеве клеток, подвергнутых действию какого-либо мутагена, непосредственно на среду, содержащую данный фаг или антибиотик: выросшая бактериальная колония и есть мутант. Мутации, вызывающие устойчивость к определенным антибиотикам, хорошо известны, поскольку они создают серьезную проблему для медицины и здравоохранения. Фенотип устойчивости к фагу T1, обозначается символом T1<sup>R</sup> (фенотип чувствительности к фагу-XI<sup>S</sup>). Соответственно, устойчивость и чувствительность к антибиотику стрептомицину обозначают как Str<sup>R</sup> и Str<sup>S</sup>. Ген чувствительности к фагу T1 обозначается как *ton*, (*ton*<sup>+</sup> -синоним XI<sup>S</sup>; ген чувствительности к стрептомицину-*str* (*str*<sup>+</sup> -синоним *str*<sup>S</sup>).

Мутантные штаммы легко получить при действии на бактерии дикого типа мутагенных факторов, например, рентгеновских или ультрафиолетовых лучей, или химических мутагенов. Обработанную культуру высевают на перmissive среду. Например, если нужно получить ауксотроф по определенной аминокислоте, то сперва подвергнутые действию мутагена бактерии высевают на среду, содержащую все 20 аминокислот. После появления колоний, их перепечатают на чашку с минимальной средой, для того чтобы определить, какие из этих колоний ауксотрофные (рис2). Затем каждая из ауксотрофных колоний с пер-

Рис. 2 Метод перепечатывания колоний, при котором бактерии быстро переносят с одной питательной среды на другую. На рисунке схематически изображена последовательность операций, позволяющая идентифицировать ауксотрофные мутанты, способные к росту на исходной обогащенной среде, но не образующие колоний на новой (минимальной) среде. [Stent G. S., Calendar R., (1978) Mol. Genetics, 2nd ed., W. H. Freeman, San Francisco.]



миссивной среды «перепечатывается» на 20 чашек Петри с минимальным агаром, к которому добавлено по одной аминокислоте. При этом выясняется, присутствие какой именно аминокислоты необходимо для роста мутанта. Для отбора температурочувствительных мутантов обработанные мутагеном клетки высевают на чашку и инкубируют при 30°C. Выросшие колонии перепечатывают и чашку-реплику инкубируют при 42°C. Колонии, растущие при пермиссивной температуре 30°C, но не способные к росту при 42°C, образованы *ts*-мутантами. Подвергая полученные мутанты повторному (и последующему) воздействию мутагена и производя соответствующий отбор, можно получать штаммы, содержащие по несколько мутаций.

### Генетические элементы *E. coli*

Клетки *E. coli* могут содержать по несколько различных генетических элементов, каждый из которых способен к саморепликации. Хромосома бактерии - это длинная кольцевая молекула ДНК с мол. массой примерно в  $2,5 \cdot 10^9$  дальтон, что соответствует  $3,2 \times 10^6$  н.п. Как уже обсужда-

лось в гл. 4, на бактериальной хромосоме имеется точка (сайт), с которой начинается репликация ДНК, и от которой она распространяется в обе стороны при репликации тета-типа. Генетические факторы, управляющие репликацией бактериальной хромосомы, локализованы в самой хромосоме. Хромосома вместе с сайтом инициации представляют собой самореплицирующуюся генетическую молекулу - *репликон* по терминологии, которую предложили Франсуа Жакоб, Сидни Бреннер и Франсуа Кузин.

В клетках *E. coli* могут содержаться и другие репликоны, способные существовать отдельно от бактериальной хромосомы. Они называются *эписомами*, и *плазмидами*, и представляют собой кольцевые молекулы ДНК различных размеров от  $10^3$  н.п. до почти трети величины самой бактериальной хромосомы. Одна из наиболее интересных и тщательно изученных эписом получила наименование F-фактора (фактора фертильности). F-фактор определяет половой процесс у *E. coli*. Эписома - это генетический элемент, который может существовать либо в форме

репликона отдельно от бактериальной хромосомы, либо встраиваться в бактериальную хромосому и составлять при этом часть репликона бактерии. Эписомой является и бактериофаг  $\lambda$ , способный существовать как вне клетки в форме фага, так и внутри бактериальных клеток, либо в качестве отдельного репликона (при литической инфекции), либо в форме профага, составляя часть бактериального репликона. В противоположность эписомам, плазмиды не встраиваются в другие репликоны, а всегда существуют в форме свободных (автономных) репликонов. Умеренный фаг P1, находясь в состоянии профага, представляет собой плазмиду, существующую отдельно от бактериального репликона. Однако, большинство плазмид не покидают пределов клетки и не образуют внеклеточных форм.

Некоторые эписомы инфекционны, поскольку их копии могут переходить из одной бактериальной клетки в другую, в которой исходно эписом данного типа не было. Генетические функции, необходимые для репликации, инфекционности и способности вытеснять другие эписомы, кодируются эписомальной ДНК. Во многих эписомах содержатся также гены, не необходимые для их существования. Например, некоторые инфекционные эписомы содержат гены устойчивости к определенным антибиотикам. Бактерии, в которые попадает такой *фактор устойчивости*, становятся устойчивыми к данному антибиотику. Имея высокую селективную ценность в современных условиях насыщения антибиотиками, факторы устойчивости быстро распространяются среди различных штаммов и видов бактерий, в том числе патогенных. Это создает серьезные проблемы для медицины. Особенно опасна способность факторов устойчивости накапливать гены, обуславливающие устойчивость к разным антибиотикам, и передавать ранее чувствительным бактериям множественную устойчивость.

### **F-фактор: генетический элемент, определяющий пол бактерий**

F-фактор обладает поразительной способностью определять пол, казалось бы, бесполой бактерий. Его существование было обнаружено генетиками, когда они пытались определить, происходят ли скрещивания

Рис.3.

Использование

множественно  
ауксотрофных  
штаммов для

демонстрации  
скрещивания у  
*E. coli*. В этом

скрещивании  
 $met^+$ ,  $bio^+$ ,  $thr^+$   
и  $leu^+$  -

селективные  
маркеры, а  $ton$   
и  $lac$  -  
неселективные  
маркеры.

[Watson J.D.

(1976).

Molecular

Biology of the  
Gene, 3rd ed.,

W. A.

Benjamin,

Menlo Park,

Calif.]

[Имеется

перевод:

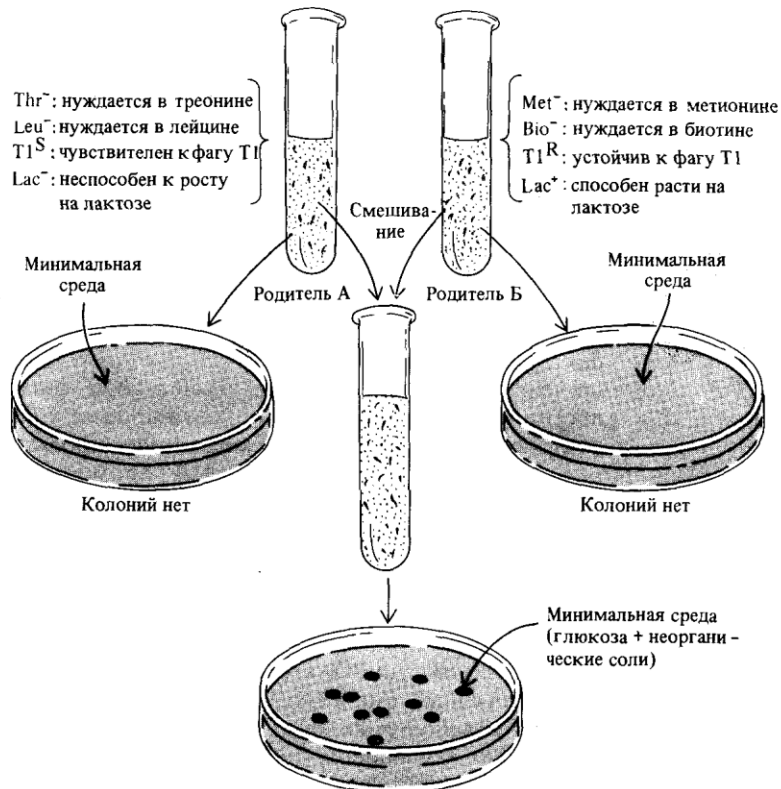
Уотсон Дж.

1978.

Молекулярная

биология гена.

М., Мир.]



Очень небольшое число клеток  $Met^+ Bio^+ Thr^+ Leu^+$ . Они возникают в результате генетической рекомбинации, на что указывает поведение маркеров  $lac$  и  $ton$  (ген, ответственный за чувствительность к фагу T1). Кроме родительских генотипов  $lac^- ton^S$  и  $lac^+ ton^R$  в культуре обнаруживаются колонии с генотипами  $lac^- ton^R$  и  $lac^+ ton^S$

между различными линиями *E. coli*. Для этого исследовали возможность генетической рекомбинации между различными мутантными штаммами.

Множественные ауксотрофы бактерий, полученные посредством нескольких последовательных этапов мутагенеза и селекции, смешивали и смесь высевали на минимальную среду. Появление колоний должно было свидетельствовать о возникновении рекомбинантов дикого типа, как это изображено на рис 3

Использование множественных ауксотрофов гарантирует, что колонии дикого типа, способные к росту на минимальной среде, возникают именно в результате рекомбинации, а не вследствие обратных мутаций. Если штамм, ауксотрофный по одной аминокислоте, ревертирует к дикому типу с частотой  $1 \cdot 10^6$ , то появление колоний дикого типа на минимальной среде можно расценить и как результат реверсии, и как результат рекомбинации. Если же мутант ауксотрофен по двум аминокислотам, то частота реверсии к дикому типу должна составлять  $10^6 \cdot 10^6 = 10^{12}$ . Однако, при использовании таких двойных ауксотрофов в эксперименте колонии дикого типа на минимальной среде образуются-

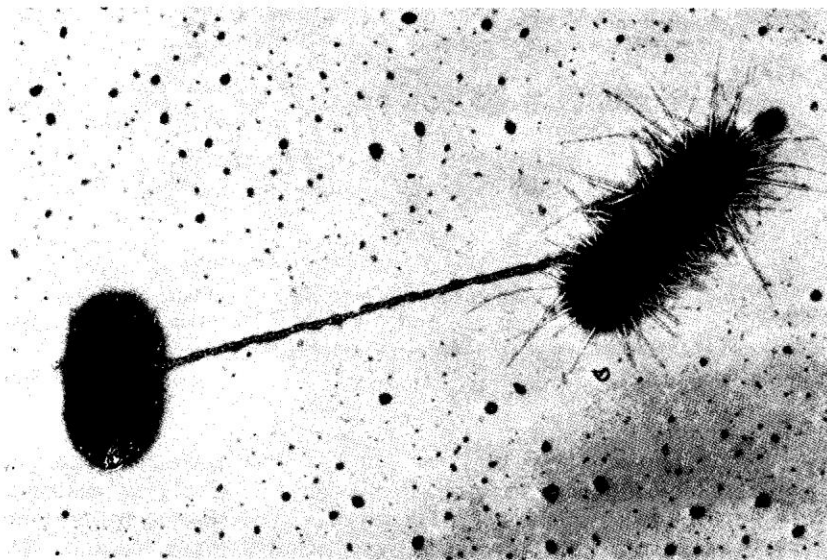


Рис. 4. Электронная микрофотография клеток  $F^+$  *E. coli* (справа) и  $F^-$  (слева). F-пили можно отличить от пилей другого типа, поскольку к ним прикреплены частицы фага, специфичного в отношении  $F^+$ -штаммов.

Известно несколько таких бактериофагов, наследственным веществом у них всех служит РНК. РНК фага вводится в клетку через пили (Prof. Charles C. Brinton, Jr. Judith Carnahan, University of Pittsburg).

вались с частотой примерно  $1 \cdot 10^5$ , т.е. много чаще, чем этого можно было бы ожидать, основываясь на предположении об обратных мутациях. Эти эксперименты обнаружили существование у *E. coli* двух половых типов, обозначенных символами  $F^+$  и  $F^-$ . Затем было установлено, что клетки типа  $F^+$  содержат F-фактор, или эписому, тогда как в клетках  $F^-$ -типа эта эписома отсутствует.

Дальнейшие исследования бактерий двух типов привели к поразительному и совершенно неожиданному открытию: оказалось, что F-фактор инфекционен. Когда обладавшие F-фактором и чувствительные к стрептомицину клетки ( $Str^S, F^+$ ) смешивали со стрептомицинустойчивыми

бактериями ( $Str^R$ ,  $F^-$ ), и эту смесь высевали на агар, содержащий стрептомицин, то колонии образовывали, естественно, лишь  $Str^R$ -клетки, т. е. клетки, несущие аллель  $str^R$ . Большинство из этих колоний оказалось  $F^+$ , а не  $F^-$ -типа. F-фактор содержит множество генов, сообщающих ему инфекционность. Некоторые из этих генов кодируют белки пилей, структур типа трубочек, расположенных на поверхности  $F^+$ -клеток (рис. 4). F-пили соединяются с соответствующими рецепторами на поверхности  $F^-$ -клеток, что приводит к образованию цитоплазматического мостика между двумя клетками. В процессе роста  $F^+$  клеток F-фактор реплицируется по тета-типу, так же как и бактериальная хромосома. Однако, когда между  $F^+$ - и  $F^-$ -клетками возникает цитоплазматический мостик, F-фактор переходит к реплика-

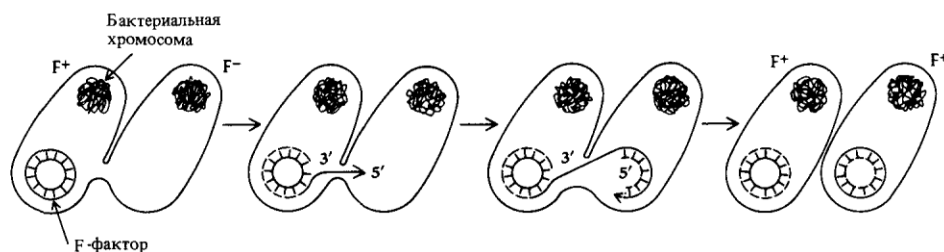


Рис. 5. Схематическое изображение механизма, с помощью которого ДНК F-фактора передается от  $F^+$ -клетки  $F^-$ -клетке в процессе репликации по типу катящегося кольца.



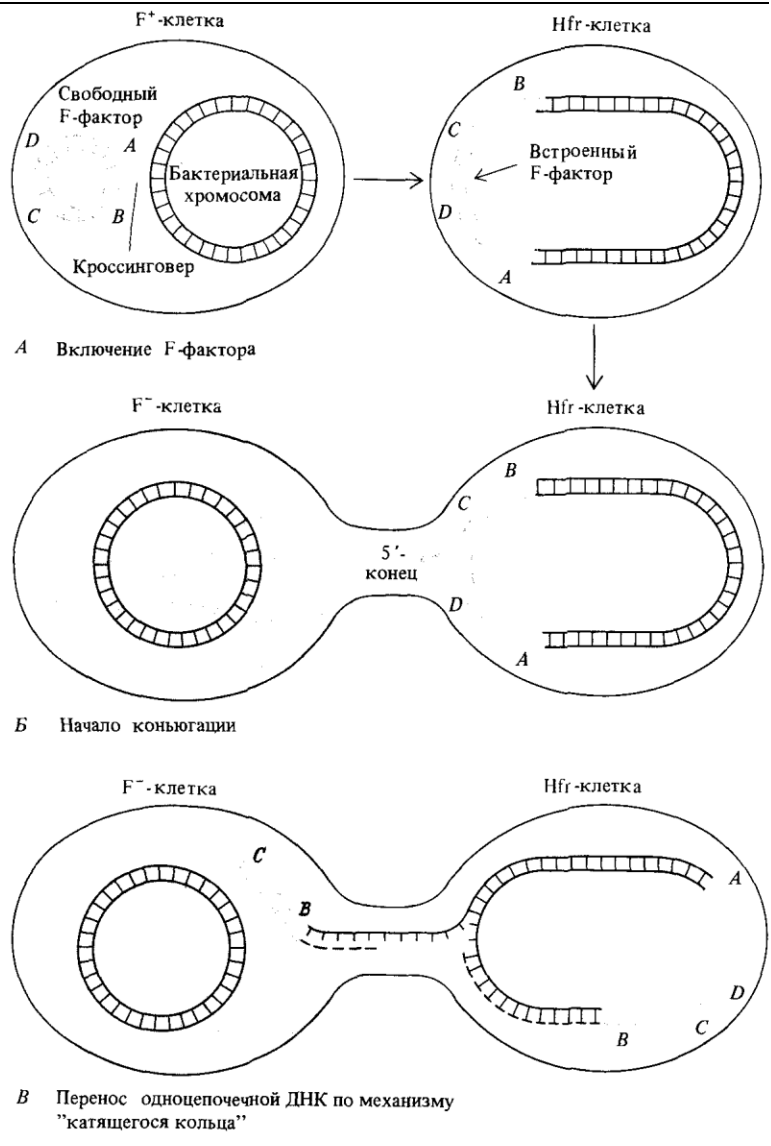
ции по сигма-типу (см. гл. 4). 5'-РО<sub>4</sub> одноцепочечный конец реплицирующегося F-фактора проникает в F<sup>-</sup>-клетку, и там синтезируется комплементарная цепь. Репликация ДНК F-фактора приводит к переносу копии F-фактора в F<sup>-</sup>-клетки, превращая их в F<sup>+</sup>-клетки (рис. 5).

Как уже упоминалось ранее, F-фактор представляет собой эписому, которая может либо существовать самостоятельно, либо встраиваться в репликон бактерии. В встроенном состоянии F-фактор может переносить бактериальную хромосому в F<sup>-</sup>-клетки. Частота возникновения рекомбинантов дикого типа для генов бактериальной хромосомы при скрещивании F<sup>+</sup>- и F<sup>-</sup>-штаммов очень низка (порядка одной клетки на 10<sup>5</sup> родительских клеток), поскольку лишь небольшое число клеток F<sup>+</sup> культуры участвует в образовании рекомбинантов, хотя частота инфицирования F-фактором довольно высока. Однако, из F<sup>+</sup>-культуры можно выделить штаммы, при скрещивании которых с F<sup>-</sup>-клетками рекомбинанты образуются гораздо чаще (частота рекомбинации > 10<sup>-2</sup>). Эти штаммы обозначаются символом Hfr (от англ. *high frequency recombination* -высокая частота рекомбинации). В них F-фактор в свободном, автономном состоянии отсутствует, он встроен в бактериальную хромосому. Когда клетки Hfr вступают в контакт с клетками F<sup>-</sup>, между ними образуется цитоплазматический мостик, называемый *конъюгационной трубкой*, и интегрированный F-фактор инициирует репликацию бактериальной хромосомы по типу катящегося кольца с того сайта, в который он встроен. Эта репликация приводит к переносу бактериальной хромосомы в F<sup>-</sup>-клетку (рис. 8.5).

Когда копия бактериальной хромосомы клетки Hfr попадает в клетку F<sup>-</sup>, становится возможной рекомбинация между генетическими маркерами, содержащимися в хромосоме клетки Hfr, и генами, содержащимися в хромосоме F<sup>-</sup>-клетки (рис. 8.5). При конъюгации клеток Hfr и F<sup>-</sup> часто происходит разрушение соединяющей их конъюгационной трубки и, соответственно, обрыв хромосомы Hfr. В результате в F<sup>-</sup> клетку целая Hfr-хромосома попадает довольно редко.

После того, как конъюгация инициирована, возникновение рекомбинантов дикого типа определяется исключительно жизнеспособностью F<sup>-</sup>-родителя. К такому выводу можно прийти при анализе результатов реципрокных скрещиваний, выполняемых на минимальной среде, содержащей стрептомицин.

Рис. 6. Мобилизация бактериальной хромосомы при включении F-фактора в клетке Hfr. При конъюгации репликация хромосомы начинается с встроенного F-фактора. Отрезок F-фактора входит 5'-концом в F<sup>-</sup>-клетку и увлекает за собой ДНК Hfr-клетки. Если конъюгацию прервать до того, как в клетку перейдет вся Hfr-хромосома, то клетка-реципиент сохранил F<sup>-</sup>-тип.



Скрещивание 1 : Hfr, Thr<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> Str<sup>s</sup> x F<sup>-</sup>, Thr<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Str<sup>R</sup>

Результат: колонии образуют лишь рекомбинанты Thr<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> Str<sup>R</sup>.

Скрещивание 2: Hfr, Thr<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Str<sup>R</sup> x F<sup>-</sup>, Thr<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> Str<sup>S</sup>.

Результат: колоний нет.

Первое скрещивание показывает, что применение стрептомицина устраняет колонии, которые в противном случае образовались бы из клеток родителя Hfr. Формировать колонии могут только рекомбинанты дикого типа, поскольку родители F<sup>-</sup>-типа не могут расти на минимальной среде в отсутствие треонина и лейцина. Второе скрещивание показывает, что для образования рекомбинантов необходима жиз-

неспособность родителя F<sup>-</sup>, а не Hfr. Рекомбинантные колонии Str<sup>R</sup> не образуются, поскольку ген sfr<sup>R</sup> локализован слишком далеко от сайта, с которого начинается передача хромосомы и потому почти никогда не попадает в F<sup>-</sup>-клетку.

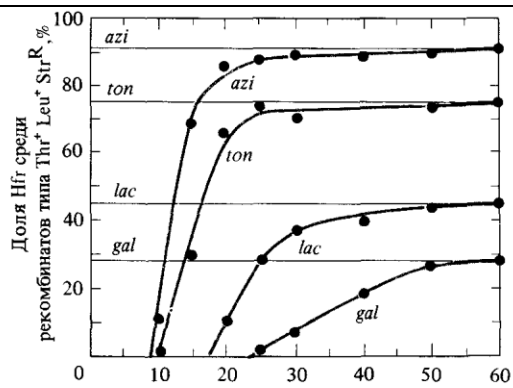
То, что поступление бактериальных генов из Hfr в F<sup>-</sup>-клетку происходит последовательно, всегда начиная с сайта интеграции F-фактора в бактериальную хромосому, дает возможность картировать гены по порядку их попадания в F<sup>-</sup>-клетку (подробнее мы обсудим это в следующем разделе). Как показано на рис. 6, проникновение хромосомы в F<sup>-</sup>-клетку всегда начинается с нуклеотидной последовательности интегрированного F-фактора. При этом в F<sup>-</sup>-клетку поступает не весь F-фактор. Для того чтобы в клетку попала оставшаяся его часть, необходимо, чтобы в F<sup>-</sup> перешла вся Hfr-хромосома. Это случается очень редко из-за спонтанных разрывов конъюгационной трубки, и поэтому большинство отбираемых рекомбинантов остаются принадлежащими F<sup>-</sup>-типу.

### **Физическое картирование бактериальных генов методом прерванной конъюгации**

Последовательное поступление генов из Hfr в F<sup>-</sup>-клетки представляет возможность картировать их в бактериальной хромосоме в соответствии с порядком и временем их попадания в клетки. Рассмотрим, например, следующее скрещивание.

Скрещивание 3: Hfr, Thr<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> Az<sup>S</sup> Tl<sup>S</sup> Lac<sup>+</sup> Gal<sup>+</sup>, Str<sup>S</sup> x

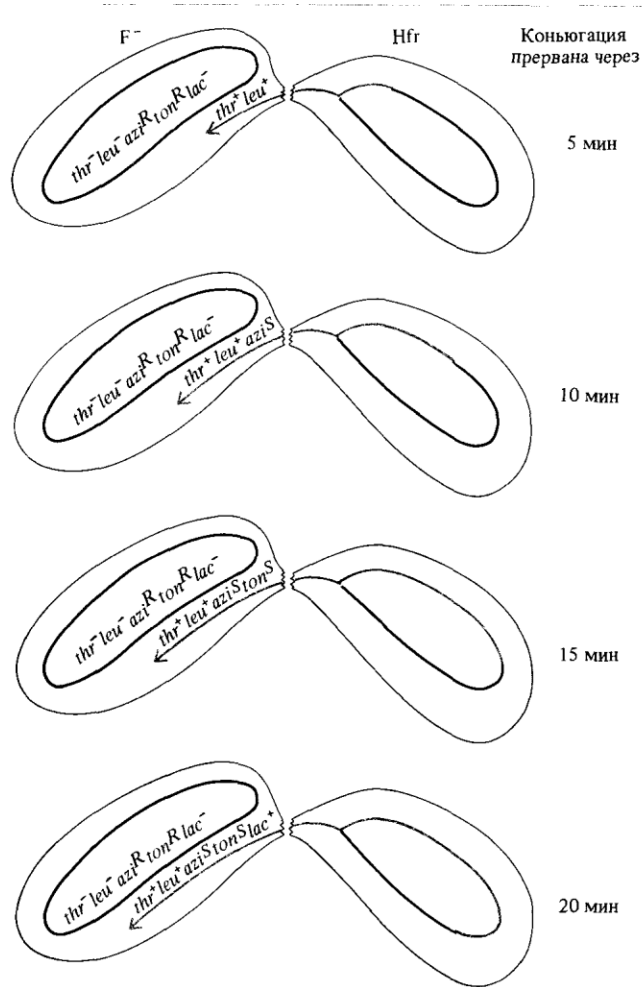
F<sup>-</sup>, Thr<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Az<sup>R</sup> Tl<sup>R</sup> Lac<sup>-</sup> Gal<sup>-</sup> Str<sup>R</sup>



Продолжительность конъюгации (мин)

Рис. 7. Графики зависимости доли неселективных маркеров среди отобранных рекомбинантов типа  $\text{Thr}^+ \text{Leu}^+ \text{Str}^-$  в скрещивании 3 от продолжительности конъюгации. После прерывания конъюгации культуру высевают на селективную среду. Экстраполяция графиков для частоты каждого из неселективных маркеров к оси абсцисс дает время от начала конъюгации, по прошествии которого маркер становится способен к рекомбинации с хромосомой  $\text{F}^-$ -клетки.

Рис. 8.. Схема, иллюстрирующая полярность переноса Hfrхромосомы в эксперименте с прерванной конъюгацией. К рекомбинации с хромосомой F<sup>-</sup>-клетки способны лишь те гены Hfr-хромосомы, которые к моменту прекращения конъюгации оказались в реципиентной F<sup>-</sup>-клетке.



Скрещивание между указанными штаммами начинается со смешивания двух культур в момент времени  $t = 0$ . Через последовательные интервалы времени из смеси отбирают пробы и резко взбалтывают их на мешалке с тем, чтобы разрушить конъюгационные трубки, соединяющие скрещивающиеся клетки. Затем образец высевают на агар со стрептомицином, содержащий в качестве источника углерода глюкозу. На этой среде отбираются рекомбинанты  $\text{Thr}^+ \text{Leu}^+ \text{Str}^R$ . Соответствующие три маркера  $\text{thr}^+$ ,  $\text{leu}^+$  и  $\text{str}^R$ , называются *селективными*. Гены, обуславливающие чувствительность к азиду (*azi*), к фагу T1 (*ton*), гены утилизации лактозы (*lac*) и галактозы (*gal*) являются в данном случае *неселективными маркерами*, поскольку среда, на которой выращиваются клетки, не позволяет различать аллели этих локусов у участвующих в скрещиваниях бактерий. Затем отобранные рекомбинанты  $\text{Thr}^+ \text{Leu}^+ \text{Str}^R$

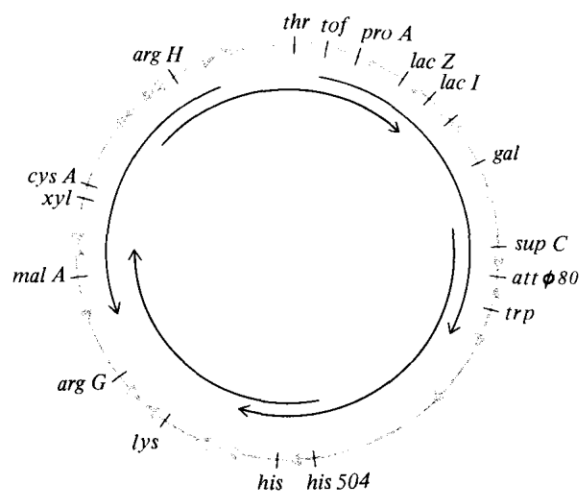
пересекают на различные среды, с тем чтобы определить генотипы этих рекомбинантов по неселективным маркерам. Частота соответствующих аллелей откладывается на графике как функция от про-

должительности скрещивания (рис. 7). Полученные кривые показывают, что различные неселективные маркеры Hfr становятся способны к рекомбинации с хромосомой  $F^-$  -клеток по истечении различного времени от начала скрещивания (рис. 8.). Экстраполяция частоты каждого маркера к нулю указывает время попадания маркера в  $F^-$  клетку (рис. 7). Эти данные позволяют упорядочить гены по Hfr хромосоме, начиная от точки интеграции F-фактора, и оценить физические расстояния между ними, измеряя эти расстояния в минутах, прошедших с начала скрещивания.

### **Кольцевая форма генома *E. coli***

Из одного  $F^+$  штамма может возникнуть множество различных штаммов Hfr, для каждого из которых характерна собственная локализация и ориентация F-фактора в хромосоме бактерии (рис. 9). Это проявляется в описанных выше опытах с прерванной конъюгацией: в каждом Hfr-штамме передача бактериальной хромосомы начинается с собственной, иной чем у других штаммов точки; различна также и ориентация хромосомы при этом. Для каждого штамма можно установить характер сцепления между генами, расположенными неподалеку от точки, с которой начинается передача бактериальной хромосомы. Совокупность таких данных по множеству различных штаммов Hfr позволяет установить характер сцепления маркеров в хромосоме в целом и построить физическую карту хромосомы *E. coli*. Как показано на рис. 8.9, эта карта имеет форму кольца, что полностью соответствует кольцевой форме бактериальной ДНК.

Рис. 9. Сайты интеграции F-фактора в хромосому некоторых Hfr-штаммов *E. coli*. Вставки обозначены стрелками, направление которых соответствует направлению передачи хромосомы при конъюгации. Стрелки внутри хромосомы указывают отношения сцепления, установленные для некоторых Hfr-штаммов. Наложение этих стрелок свидетельствует о кольцевой форме генетической карты.



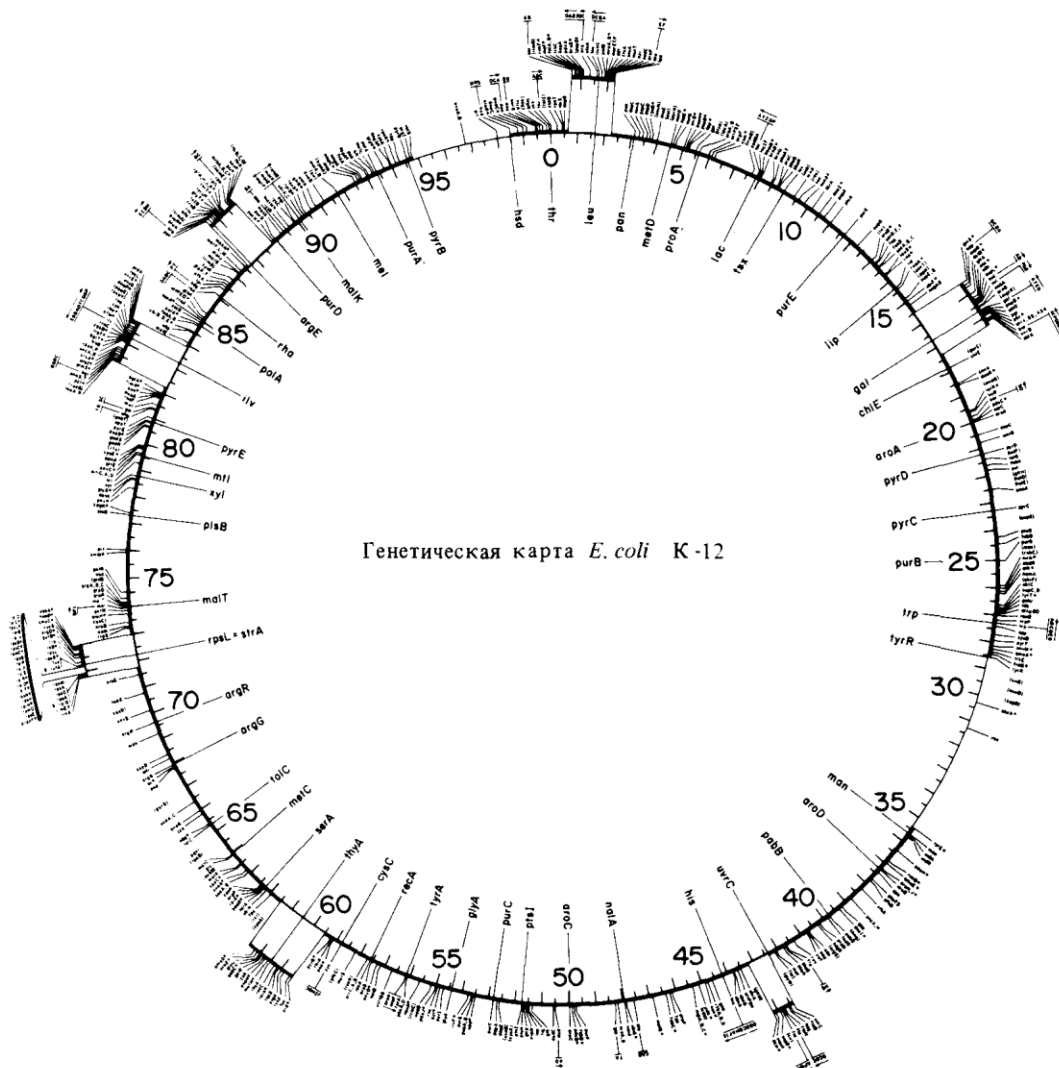


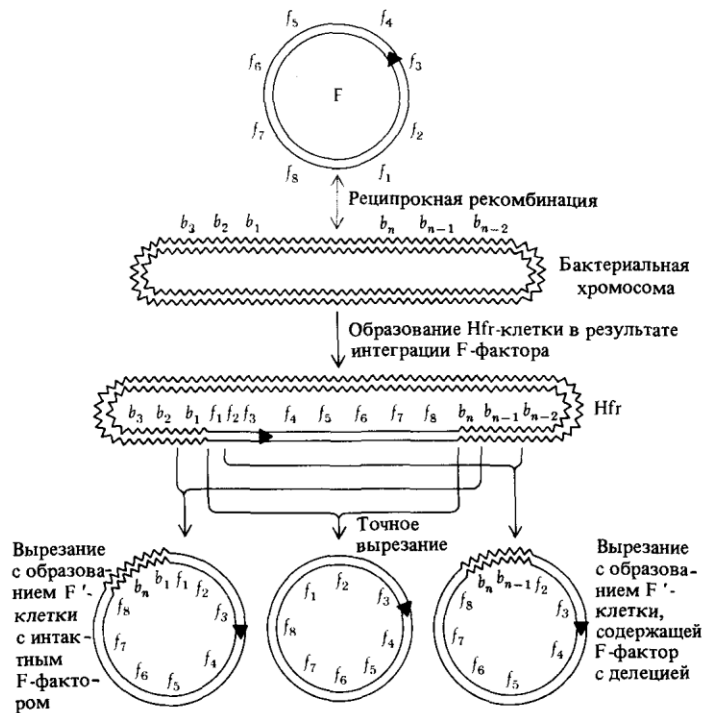
Рис. 10. Генетическая карта *E. coli*, построенная методом рекомбинационного картирования и по данным экспериментов с прерванной конъюгацией. [Bachmann B. ], Low K. B., Taylor A. L. (1976). *Vact. Rev.*, 40, 116-167.]

### **F-штаммы и частичные диплоиды**

F-фактор, интегрированный в геном клеток Hfr штамма, иногда может спонтанно «вырезаться» из хромосомы. Клетка при этом из Hfr превращается в F<sup>+</sup>. Неточное вырезание может привести к тому, что ставший автономным F-фактор захватывает смежный участок бактериальной хромосомы или, наоборот, теряет некоторый участок собственной ДНК



Рис. 11. Образование Hfr-штамма в результате интеграции F-фактора в бактериальную хромосому; последующее вырезание приводит к возникновению либо  $F^+$ , либо  $F'$  штамма. Символами  $f'$  и  $V$  обозначены произвольные сайты F-фактора и бактериальной хромосомы, соответственно. Два типа неточного вырезания F-фактора могут приводить, как это указано на рисунке, к возникновению либо  $F'$  штамма с интактным (неповрежденным) F-фактором, либо  $F'$  штамма, содержащего F-фактор с делецией.



(рис. 11). Кольцевой F-фактор, включающий в себя бактериальные гены, представляет собой самостоятельный репликон, получивший наименование F'-элемента. F'-элементы обычно, так же как и сам F-фактор, инфекционны, и их копии переносятся в F<sup>-</sup>-клетки. F'-штаммы отличаются от штаммов Hfr поведением при скрещивании с клетками F<sup>-</sup>. Сравните результаты скрещиваний 4 и 5, в которых использовались штаммы Hfr и F', полученный из него. Смешанные культуры высевали на минимальную среду, содержащую стрептомицин.

Скрещивание 4: Hfr, Thr<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> Str<sup>S</sup> x F<sup>-</sup>, Thr<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Str<sup>R</sup>

Результат: отбираются рекомбинанты F<sup>-</sup>, Thr<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> Str<sup>R</sup>

Скрещивание 5: F', Thr<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> Str<sup>S</sup> x F<sup>-</sup>, Thr<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Str<sup>R</sup>

Результат: отбираются рекомбинанты F', Thr<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> Str<sup>R</sup>.

Колонии, отобранные в четвертом скрещивании, принадлежат F<sup>-</sup> типу и не способны передавать гены *thr*<sup>+</sup> и *leu*<sup>+</sup> клеткам F<sup>-</sup> типа. Напротив, клетки колоний, полученных в пятом скрещивании, содержат активный F-фактор, обеспечивающий им способность скрещиваться с клетками типа F<sup>-</sup> и передавать им Thr<sup>+</sup> и Leu<sup>+</sup>. Потомство от таких скрещиваний фенотипически будет принадлежать F<sup>+</sup>-типу; клетки при этом содержат F'-элемент.

При передаче F'-элемента F<sup>-</sup>-клеткам возникает так называемая *частичная диплоидность*. Такая частичная диплоидность позволяет осуществлять комплементационный анализ различных мутантов и выявлять доминантность или рецессивность различных аллелей определенных генов. Примеры использования результатов таких исследований приводятся в гл.

В частично диплоидной клетке рекомбинация может происходить между генами бактерии, входящими в состав F'-элемента, и генами гомологичного участка бактериальной хромосомы. Единичный кроссинговер приводит к включению F'-элемента в бактериальную хромосому и образованию клетки типа Hfr с дубликацией генов, содержащихся в F'-элементе. Двойной кроссинговер приводит к образованию клетки F'-типа, в которой произошел обмен маркерами между бактериальной хромосомой и F'-элементом.

## Подвижные генетические элементы (транспозоны)

Привычные представления о стабильности генетической организации были сильно поколеблены в 70-х годах исследованиями подвижных генетических элементов у бактерий. Первые такие элементы у бактерий получили название *инсерционных последовательностей (IS)* или вставок. У *E. coli* они были выявлены как причина возникновения определенного типа мутаций. Эти мутации полностью подавляют экспрессию гена, в котором они происходят.

Исследование гетеродуплексных молекул, образованных ДНК мутанта и ДНК дикого типа, показало, что инсерционные мутанты содержат участки ДНК, встроенные в молекулу ДНК дикого типа (рис. 12). Было обнаружено, что несколько различных встраивающихся последовательностей могут вызывать мутации многих генов. Некоторые свойства наиболее известных из этих последовательностей представлены в табл. 1. Они различаются размером, но имеют некоторые общие черты строения. На концах содержатся одинаковые или почти одинаковые нуклеотидные последовательности, расположенные, однако, в обратном порядке. В случае IS1, например, концевые последовательности содержат по 23 нуклеотида, 18 из которых одинаковы для обоих

Рис. 12.  
Электронная  
микрофотография  
гетеродуплексной  
молекулы ДНК  
 $\lambda gal^+/\lambda gal3$ .  
Одноцепочечная  
петля (указана  
стрелкой) -это  
вставка IS2 в гене  
 $gal^+$  [Ahmed A.,  
Scraba D.  
(1975).Mol.  
Gen.Genet.,

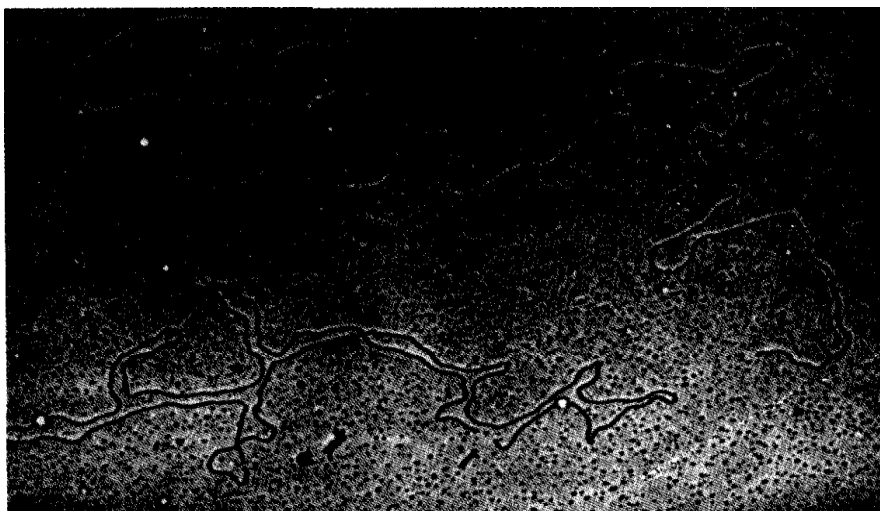


Таблица 1. Характеристика инсерционных последовательностей

Название	Число копий в клетке <i>E. coli</i>	Длина (н.п.)	Число н.п. инвертированном повторе	общих в	Длина повтора в ДНК-мишени (н.п.)
IS1	5-8 копий на хромосому	768	18/23		9
IS2	5 на хромосому, 1 на F	1327	32/41		5
IS3	5 на хромосому, 1 на F	1400	32/38		3 или 4
IS4	1 или 2 копии на Хромосому	1400	16/18		11
IS5	Известна только в фагах $\lambda$ и Ми	1195	15/16		4
IS10		1329	17/23		9
IS50		1533	8/9		9
□□	1 на F, 1 или более на хромосому	5700	35		5

концов. Кроме того, когда инсерция встраивается в ДНК-мишень, небольшой участок последовательности ДНК-мишени повторяется около каждого конца инсерции. Эта повторяющаяся последовательность ДНК, окаймляющая инсерцию, содержит обычно от 5 до 9 нуклеотидов.

Инсерционные последовательности обладают следующими генетическими свойствами:

1. Наиболее характерная особенность -это способность перемещаться по геному. При этом происходит репликация инсерционной последовательности: исходный экземпляр остается в прежнем сайте, а копия встраивается в мишень. Сайты-мишени, куда встраиваются инсерционные последовательности, вообще говоря, почти не обладают специфичностью. Функции, обеспечивающие способность к перемещению (транспозиции), закодированы в самой инсерционной последовательности и жестко регулируются, поскольку транспозиция представляет собой редкое событие, происходящее на порядок реже, чем сами спонтанные мутации.

2. Инсерционные последовательности могут точно вырезаться; при этом происходит реверсия IS-индуцированной мутации к дикому типу.

3. В сайтах, смежных по отношению к инсерции, возникают делеции бактериальных генов (рис. 13).

4. В смежных по отношению к инсерции сайтах происходят инверсии бактериальных генов.

5. Инсерционные последовательности обеспечивают взаимодействие между такими генетическими элементами, как F-фактор и бактериальная хромосома.

Возможные механизмы реализации этих свойств мы обсудим в гл. 14, а здесь лишь прокомментируем последнее свойство.

Физическая карта F-фактора *E. coli* изображена на рис. 14, А. Она содержит 94 500 н. п., в ее состав входят гены, обеспечивающие конъюга-

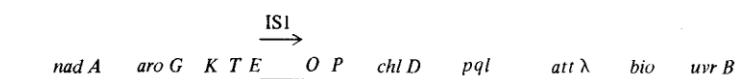
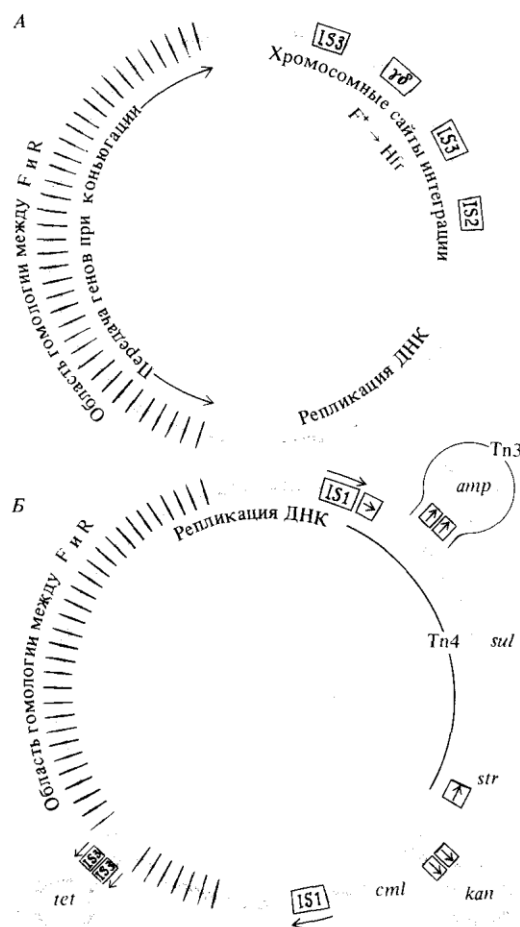


Рис. 13. Цветными линиями обозначены делеции, индуцируемые элементом IS1 в *gal*-опероне *E. coli*.

ционный перенос хромосом (гены *tra*), и гены, обеспечивающие репликацию самого F-фактора. Кроме того, карта включает четыре инсерционных последовательности: две IS3', одну последовательность IS 2 и одну, так называемую  $\gamma\delta$ . Эти последовательности представляют собой сайты, которыми F-фактор встраивается в хромосому бактерии, что и приводит к возникновению клетки Hfr. Свидетельствующие об этом

Рис. 14. А. Физическая карта F-фактора *E. coli*, на которой изображена локализация генов, необходимых для передачи хромосомы, и IS-элементы, ответственные за интеграцию F-фактора в бактериальную хромосому. Б. Физическая карта фактора устойчивости, на которой указаны области гомологии с F-фактором и сайты устойчивости к некоторым антибиотикам, окаймленные IS-элементами и образующие транспозоны. Обратите внимание на то, что транспозон Tn3, несущий ген *amp*,



представляет собой часть  
более крупного  
транспозона Tn4.

данные были получены при изучении структуры F'-элементов посредством гетеродуплексного картирования. В ДНК F'-элемента бактериальная ДНК, интегрированная в F-фактор, отделена с обеих сторон от ДНК F-фактора идентичными инсерционными последовательностями. Способность F-фактора встраиваться в различные участки хромосомы *E. coli* может быть обусловлена двумя событиями: кроссинговером между инсерционными последовательностями, входящими в состав как F-фактора, так и бактериальной хромосомы, либо транспозицией инсерционной последовательности F-фактора в мишень бактериальной хромосомы, приводящей к слиянию двух отдельных кольцевых репликонов в один (см. гл. 14).

Инсерционные последовательности относительно невелики и кодируют лишь функции, необходимые для их транспозиции. Второй класс подвижных элементов, так называемые *транспозоны* (Tn), содержат кроме того гены, не имеющие отношения к транспозиции, но сообщающие важные свойства клеткам бактерии-хозяина. Структурные свойства некоторых транспозонов представлены в табл. 2. Некоторые транспозоны, например Tn5, содержат на каждом конце известную инсерционную последовательность. Эти последовательности могут быть как одинаково, так и противоположно направленными. Другие транспозоны на концах содержат простые инвертированные повторы, по размерам близкие инсерционным последовательностям. Тот факт, что две одинаковые инсерционные последовательности могут функционировать согласованно, обеспечивая транспозицию инвертированного участка ДНК, как в случае Tn5, свидетельствует о том, что другие транспозоны, в настоящее время устроенные по-другому, могли эволюционно возникнуть из такой структуры в результате утраты большей части внутренних участков исходной предковой инсерционной последовательности. Так же как и в случае инсерционных последовательностей, перемещение транспозонов приводит к образованию повторов в последовательности ДНК-мишени по обоим концам транспозона.

Впервые транспозоны были обнаружены, когда оказалось, что некоторые гены устойчивости к антибиотикам связаны с инфекционными *факторами устойчивости*. Общая структура факторов устойчивости изображена на рис. 14, Б. При исследовании гетеродуплексной ДНК, образованной ДНК F-фактора, и фактора устойчивости обнаружена гомология по всей области



tra-генов, что свидетельствует об эволюционном родстве этих структур. Последовательность ДНК, кодирующая устойчивость к тетрациклину, *tet*, обрамлена элементами IS 3 и встроена в область гомологии фактора устойчивости и F-фактора. В негомологичной области карты локализованы гены, кодирующие резистентность к ампициллину (*amp*), сульфонамиду (*sul*), стрептомицину (*str*), хлорамфениколу (*cml*) и канамицину (*kan*). Эти гены устойчивости порознь или группами обрамлены IS элементами или другими инвертированными повторами (указаны стрелками на рис. 8.13, Б). Отдельные гены устойчивости например, *tet* или *amp*, могут переноситься в другие эписомы или плазмиды, а также в хромосомы фагов и бактерий, почему и возник термин транспозон.

Наиболее крупный из известных транспозонов - это умеренный бактериофаг Mu. Mu может в форме профага встраиваться в любое место генома *E. coli*, инактивируя гены, оказавшиеся на месте мишени. При литическом развитии Mu ДНК для репликации должна быть встроена

Таблица .2. Характеристика некоторых транспозонов

Транспозон	Обусловливает	Длина а	Число общих	Длина повтора в ДНК-мишени (н.п.)
	Устойчивость	(н.п.)	н.п. в инвертированном повторе	
Tn 1, Tn 2, Tn 3	К ампициллину	4975	38	5
Tn 4	К ампициллину, стрептомицину, сульфонамиду	20500	мало	Включает Tn 3
Tn 5	К канамицину	5400	8/9	Концы Tn 5 представляют собой противоположно ориентированные инсерции IS50
Tn 6	К канамицину	4200		
Tn 7	К триметоприму, стрептомицину	14000		

Tn 9	К хлорамфени колу	2638	18/23	Концы Tn 9 представляют собой одинаково ориентированные инсерции IS1
Tn 10	К тетрациклину	9300	17/23	Концы Tn 10 представляют собой противоположно ориентированные инсерции IS10
Tn 204	К хлорамфени колу	2457	18/23	
Tn 402	К триметоприму	7500		
Tn 501	К ртутинионам	7800	38	
Tn 732	К гентамицину , тобрамицину	11000		
Tn 903	К канамицину	3100	1050	9
Tn 1681	К теплоустойчивому энтеротоксину	2088	18/23	Концы Tn 1681 представляют собой инсерции IS1
Бактериофаг		38 000	нет	5

в хромосому хозяина. Выделенная из фага Му ДНК содержит, кроме линейного генома фага, присоединенные к каждому его концу короткие случайные последовательности ДНК бактерии-хозяина. В случае, когда участок бактериальной хромосомы заключен между двумя Му-генами, он может транспозироваться целиком. Интересно, что впервые подвижные генетические элементы были описаны Барбарой Мак-Клинтон еще в 1951 году на кукурузе. Она назвала их *контролирующими элементами*, поскольку они встраивались по соседству с некоторыми генами, в частности, генами, определяющими пигментацию зерен, и оказывали влияние на этот признак растения. Мак-Клинтон описала также способность контролирующих элементов

перемещаться по геному. В настоящее время стало ясно, что подвижные генетические элементы составляют неотъемлемую часть генома как прокариотических, так и эукариотических организмов. Описание структуры этих элементов на молекулярном уровне началось с прокариот, поскольку соответствующие методы исследования ДНК прокариотических организмов были разработаны в 70-х годах, тогда как метод рекомбинантных ДНК, позволяющих на том же уровне исследовать ДНК эукариотических организмов, стал доступен лишь в 80-х годах. Вспомним о подвижных элементах в гене *white* дрозофилы .

### Генетическое картирование *E. coli*

Метод прерванной конъюгации удобен при физическом картировании генов, довольно удаленных друг от друга, но не может использоваться при картировании маркеров, находящихся на близком расстоянии. Такие локусы картируют посредством рекомбинационного анализа, основанного на тех же принципах, которые были использованы при постановке трехфакторных скрещиваний (гл. 5 и 7).

Для рекомбинационного картирования требуется клетка реципиента с кольцевой ДНК хромосомы и ДНК донорной клетки. ДНК клетки-донора может вводиться в клетку реципиента различными способами: с помощью Hfr-хромосомы (при *конъюгации*), вместе с фагом-вектором (*трансдукция*), или путем прямой передачи ДНК из клетки донора в клетку-реципиент, как это описано в гл. 4 в отношении пневмококков (*трансформация*). Образующаяся при этом частично диплоидная клетка

называется *мерозиготой*. Мерозиготы нестабильны, поскольку донорная ДНК представляет собой фрагмент целого репликона. Генетические



Рис. 15. Генетическое картирование посредством рекомбинационного анализа мерозигот, возникающих в результате конъюгации. Отбирается дистальный маркер *C*. Расстояние на генетической карте между *B* и *C* определяется как умноженное на 100 отношение числа рекомбинантов *bC* к числу рекомбинантов *C*. Поскольку в отличие от скрещивания между мейотическими организмами, реципрокные рекомбинанты в таком скрещивании не образуются, расстояния на генетической карте, определяемые таким образом, не аналогичны расстояниям, определяемым при скрещивании мейотических организмов.

маркеры, содержащиеся в донорной ДНК, могут реплицироваться и сохраниться в потомстве, только если они попадают в репликон клетки реципиента в результате рекомбинации. Как показано на рис. 8.14, для того, чтобы часть донорной ДНК встроилась в хромосому реципиента и при этом сохранилась кольцевая структура хромосомы, требуется два (или даже несколько) кроссинговеров.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Бактерии, ранее изучавшиеся лишь постольку, поскольку они являются возбудителями болезней человека и домашних животных, оказались удобным объектом для исследования наследственности и природы генетического материала.

Генетические исследования организации генома бактерий начались вскоре после того, как было показано, что именно ДНК является веществом наследственности у пневмококков. Бактерии, так же как и вирусы, представляют генетикам возможность работать с популяциями колоссальной численности, затрачивая на эксперимент сравнительно небольшое время. Описываемые в этой главе методы отбора позволяют выявлять и изучать очень редкие генетические события.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1 Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: В 3-х т. Т. 1.

2 Щелкунов С.Н. - Генетическая инженерия - 2004

3 Mushkambarov\_n\_n\_kuznecov\_s\_l\_molekulyarnaya\_biologiya