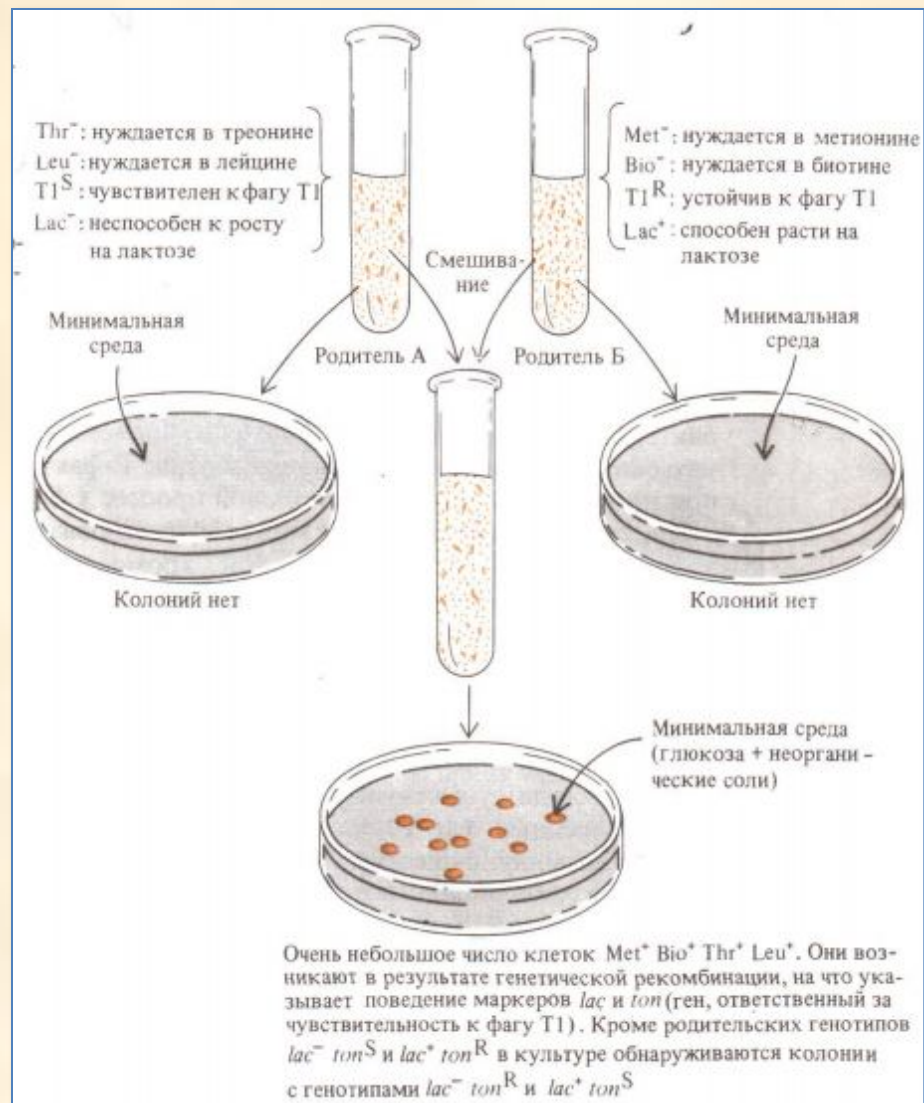


Генетика мікроорганізмів

План

1. Кон'югація
2. Контроль статевого диференціювання
3. Картування бактеріальних генів
4. Реплікація
5. F-фактори та сексдукція
6. Трансформація
7. Трансдукція, віруси



Использование множественно ауксотрофных штаммов для, демонстрации скрещивания у *E. coli*.

Життєві цикли. Процеси, що ведуть до рекомбінації в бактерій і бактеріофагів

Між процесами, що ведуть до рекомбінації у еукаріот, при всій їхній розмаїтості набагато більше подібності, чим між аналогічними процесами в еукаріот і прокаріот. Процеси, що передують рекомбінації в прокаріот, не настільки складні, що пов'язане з відносною простотою їхньої організації. Прокаріоти, до яких відносять бактерії, актиноміцети, цианобактерії (синьозелені водорості) і ін., як правило, одноклітинні, диференціювання їхніх клітин ніколи не досягає рівня, характерного навіть для примітивних еукаріот, у них не буває ні мейозу, ні мітозу, а будова клітини характеризується відсутністю компартменталізації. На електронних мікрофотографіях клітин прокаріот можна бачити тільки дві структурно відмінних ділянки: цитоплазму і нуклеоплазму, або **нуклеоїд**. Цитоплазма й **нуклеоїд** не розділені мембраною. Внутрішні мембрани також відсутні. Єдине виключення — фотосинтетичний апарат цианобактерій, що розташовується на сплосчених мембранних мішках, або **тилакоїдах**, подібних до тилакоїдів пластид. На відміну від рослин у цианобактерій вони не укладені в спеціальну органелу, а лежать безпосередньо в цитоплазмі.

Саме простота організації прокаріот пояснює швидкий прогрес у вивченні генетичного апарата бактерій, до яких генетики звернулися тільки на початку 40-х років. З 1944 по 1952 р. у бактерій були розшифровані три основних процеси, що приводять до об'єднання й рекомбінації генетичного матеріалу: **трансформація, кон'югація й трансдукція**.

Всі ці способи «гібридизації» бактерій використовують у їхньому генетичному аналізі залежно від цілей, які ставить перед собою експериментатор.

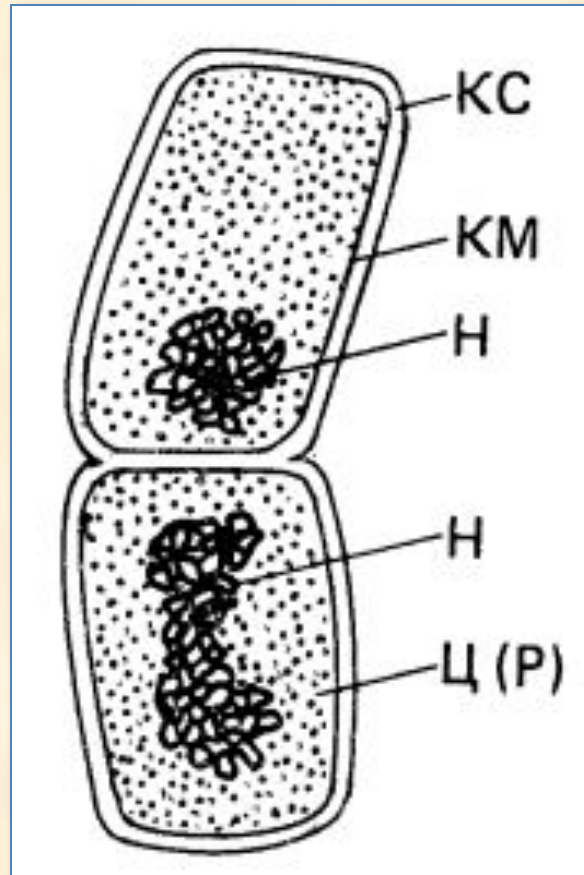


Схема будови прокаріотичної клітини, що ділиться:

КС - клітинна стінка, КМ - клітинна мембрана, Н - нуклеолазма, або нуклеоїд, що має фибриллярну структуру, Ц(Р) - цитоплазма, заповнена рибосомами

Кон'югація

Кон'югацією називається безпосередній контакт між клітинами бактерій, супроводжуваний переносом генетичного матеріалу із клітин донора в клітини реципієнта.

Процес кон'югації в бактерій *E. coli* (кишкової палички) був відкритий в 1946 р. Дж. Ледербергом і Е. Тэйтумом на підставі генетичного підходу. При цьому дослідники керувалися наступними засадами, що стали потім класичними при виявленні полового процесу в будь-яких мікроорганізмів.

1. Необхідно працювати зі штамми одного виду бактерій.
2. Варто враховувати розходження по декількох стабільних ознаках.
3. Для одержання гібридів або рекомбинантів необхідно застосовувати метод селективних середовищ, для того щоб реєструвати навіть дуже рідкі події.

У відношенні перших двох положень ця методологія сходить до правил менделівського гібридологічного аналізу.

Контроль статевого диференціювання. Епісоми і плазмід.

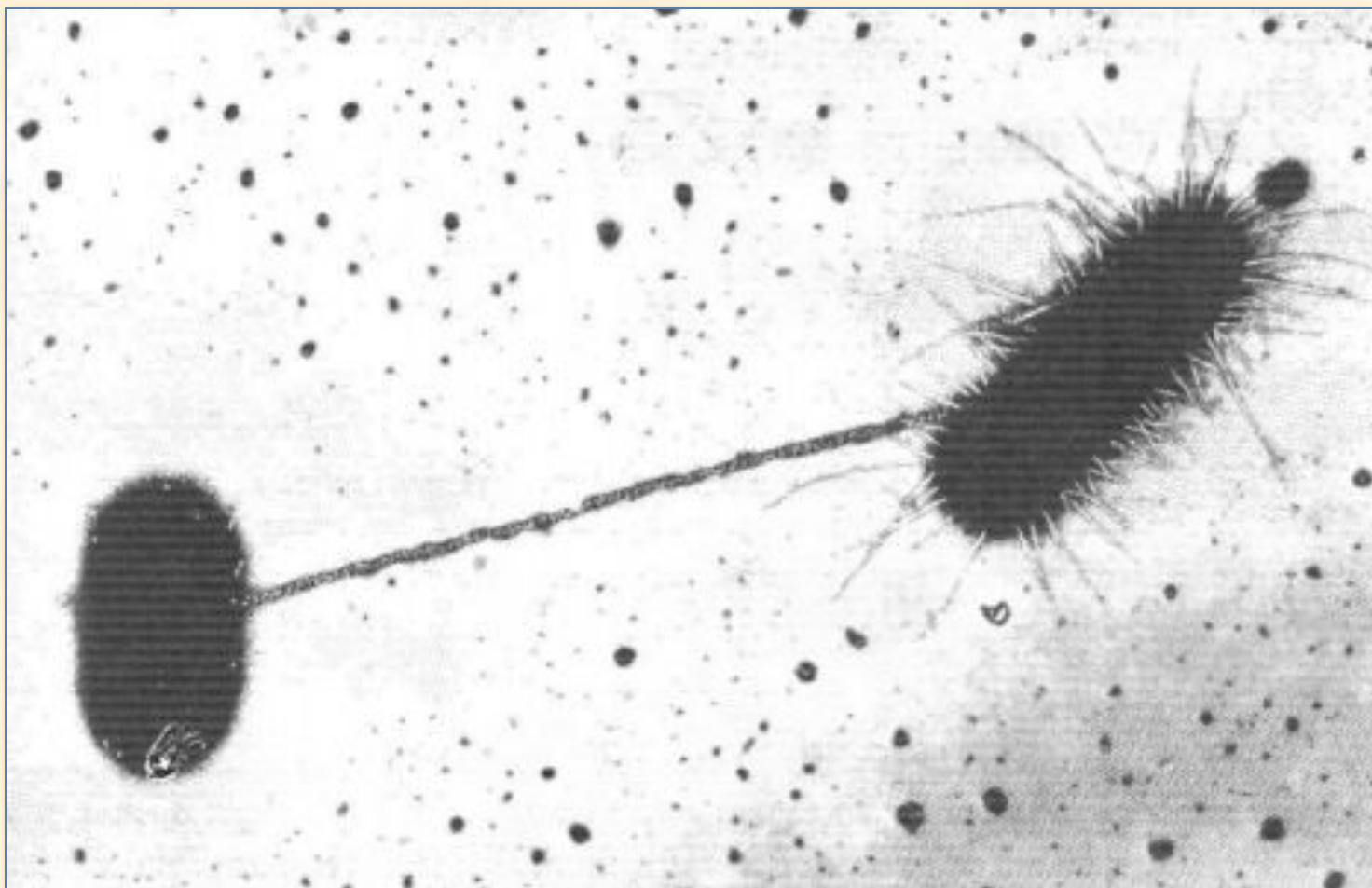
Виявилося, що серед штамів *E. coli* існує різноманітність по частоті утворення рекомбінантів при схрещуванні.

1. При спільній інкубації будь-яких двох штамів F^- рекомбінанти не утворюються.
2. При схрещуванні F^+ і F^- утворюються рекомбінанти із частотою близько $1 * 10^{-4}$ — $1 * 10^{-6}$. При цьому близько 90% клітин F^- за 1 год перетворюються в клітини F^+ . Отже, F-Фактор має інфекційну природу. Він відноситься до категорії плазмид — не хромосомних генетичних детермінант.
3. У комбінації $F^+ * F^+$ рекомбінанти утворюються із частотою $1 * 10^{-7}$ і рідше. У дійсності ці події відображають перехід F^+ в F^- з наступною кон'югацією між клітинами F^+ і F^- .
4. Виявлені також штами, які при схрещуванні з F^- утворюють до $1 * 10^{-1}$ рекомбінантів. При цьому клітини F^- не заражаються F-фактором. Такі високоефективні донори названі Hfr (від англ. *high frequency recombination* — висока частота рекомбінації). Виявилося, що клітини F^+ можуть перетворюватися в клітини Hfr і назад. Надалі в більшості експериментів по кон'югації бактерій використовували донори Hfr. Здатність бути донором якщо і передається реципієнтові при кон'югації зі штамом Hfr, те дуже рідко. У цьому випадку майже всі рекомбінанти зберігають властивості F^- . На підставі цих даних був зроблений висновок, що F-фактор може поєднуватися із хромосомою *E. coli*, інтегрувати з нею.

Таким чином, F-фактор може існувати у двох станах: автономному й інтегрованому. Такі генетичні детермінанти одержали найменування епісом. До їхнього числа відноситься бактеріофаг λ , який або реплікується автономно й лізирує клітини, або вбудовується в геном *E. coli* у вигляді профагу й реплікується разом з ним. Існують епісоми, що визначають стійкість до антибіотиків. Це R-Фактори. Вони можуть «збирати» кілька генів стійкості до різних антибіотиків і переносити їхній інфекційним шляхом між штамми й видами патогенних бактерій.

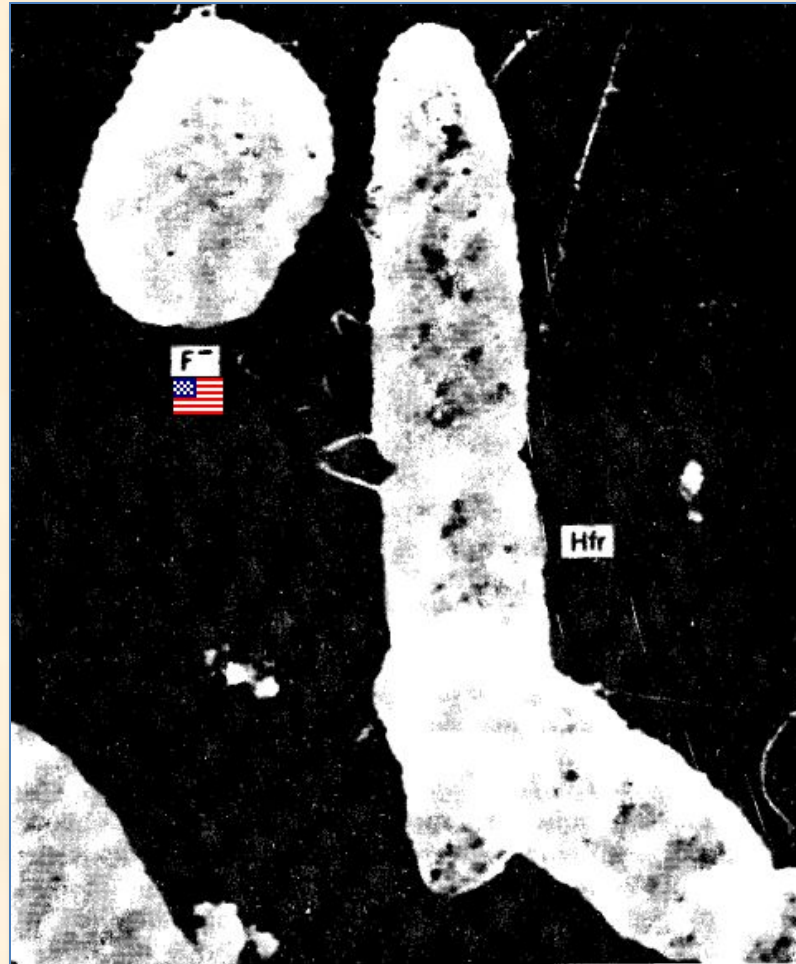
R-фактори подібно F-факторам мають інфекційну природу. Вони були відкриті в 50-х роках у період захоплення антибіотиками, яке викликало за собою появу бактерій, стійких відразу до декільким інгібіторам.

Нехромосомні генетичні детермінанти бактерій і еукаріот поєднують у більш широку групу — плазміди. Оскільки F-фактор і інші епісоми можуть реплікуватись автономно, тобто незалежно від бактеріальної хромосоми, їх також називають плазмідами.

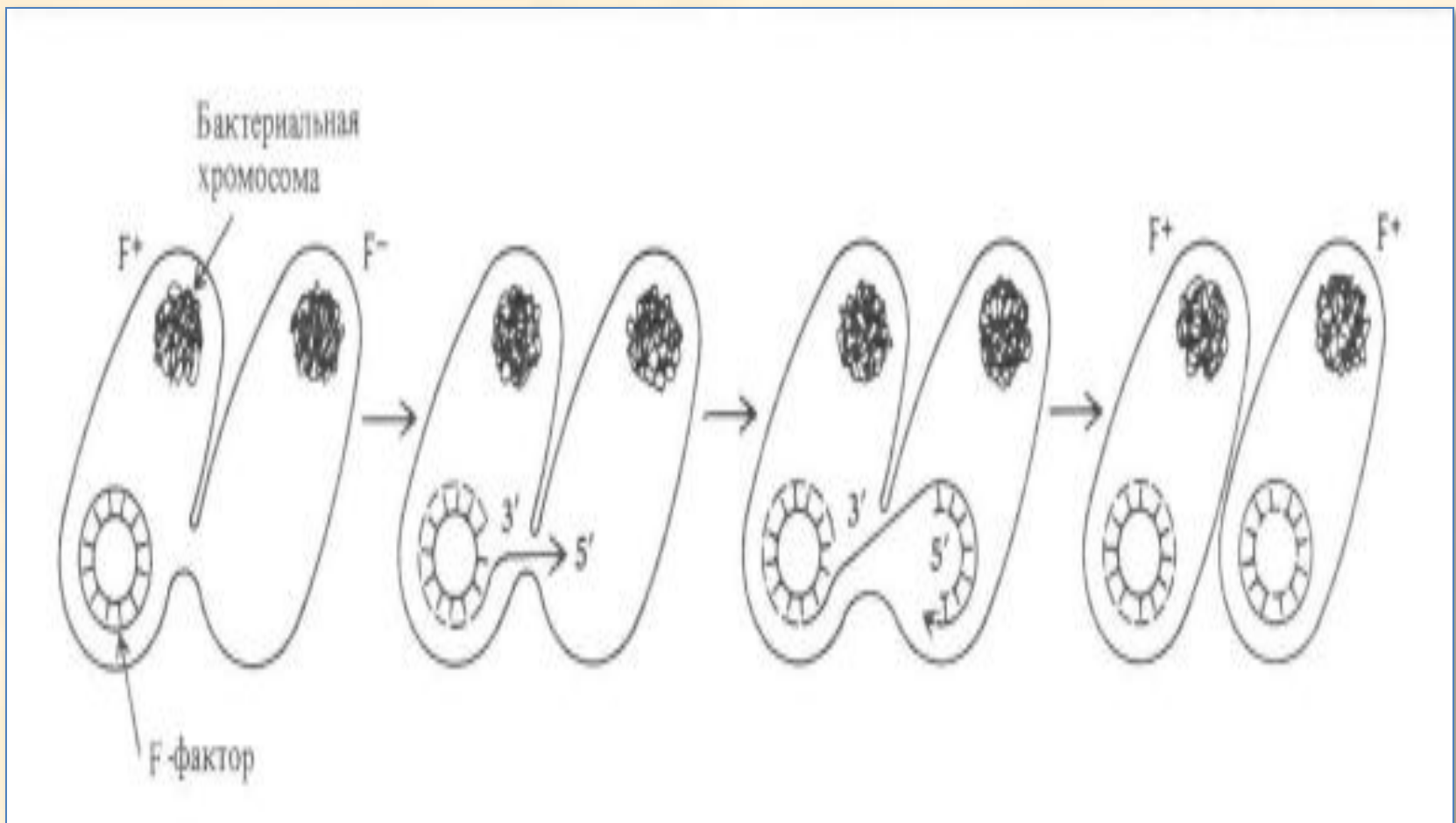


Электронная микрофотография клеток *F-* *E. coli*(справа) и *F+* (слева). *F*-пили можно отличить от пилей другого типа, поскольку к ним прикреплены частицы фага, специфичного в отношении *F+* -штаммов.

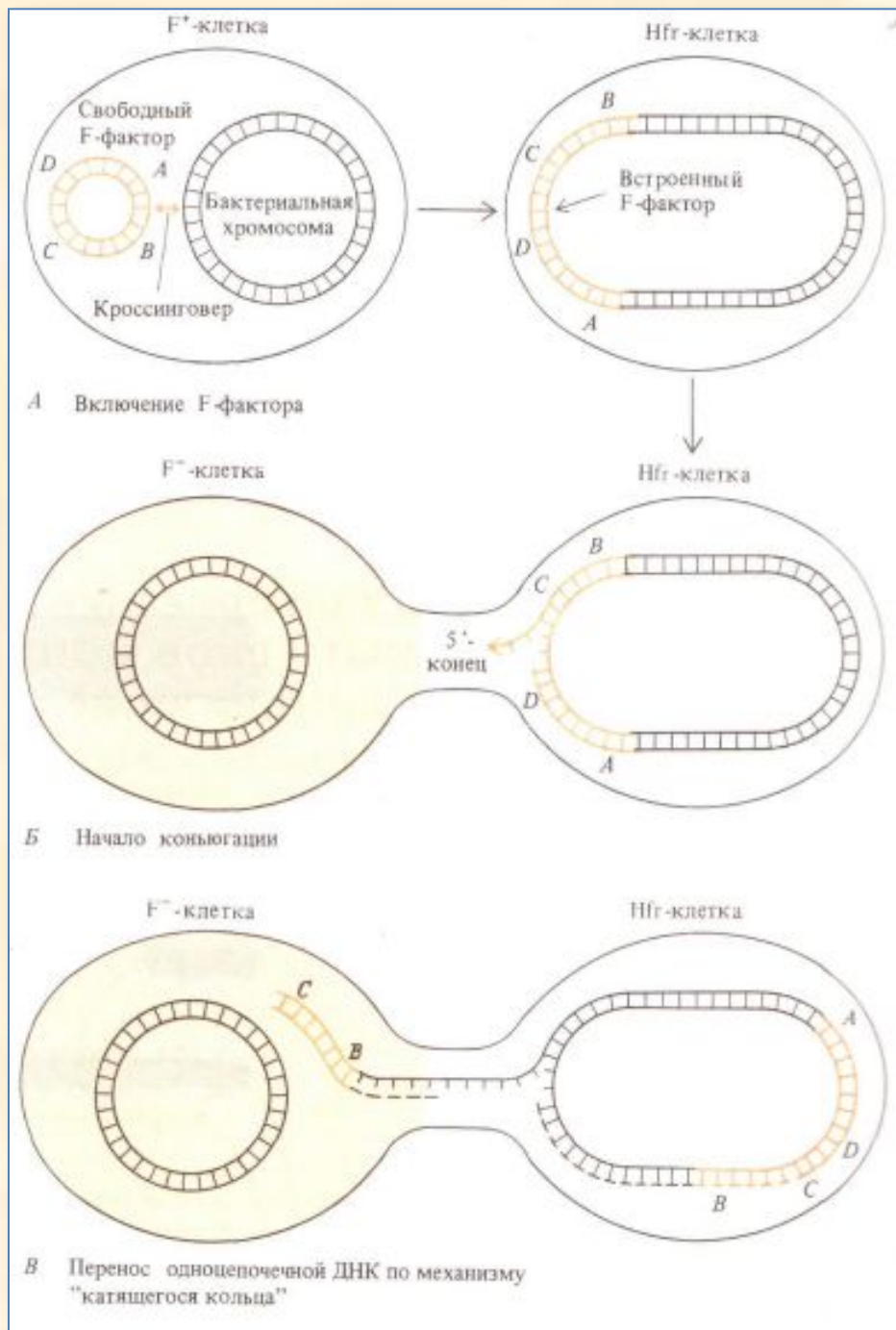
Известно несколько таких бактериофагов, наследственным веществом у них всех служит РНК. РНК фага вводится в клетку через пили.



Кон'югація між клітинами *F* (Hfr — довгаста) і *b* (кругла) *E. coli*

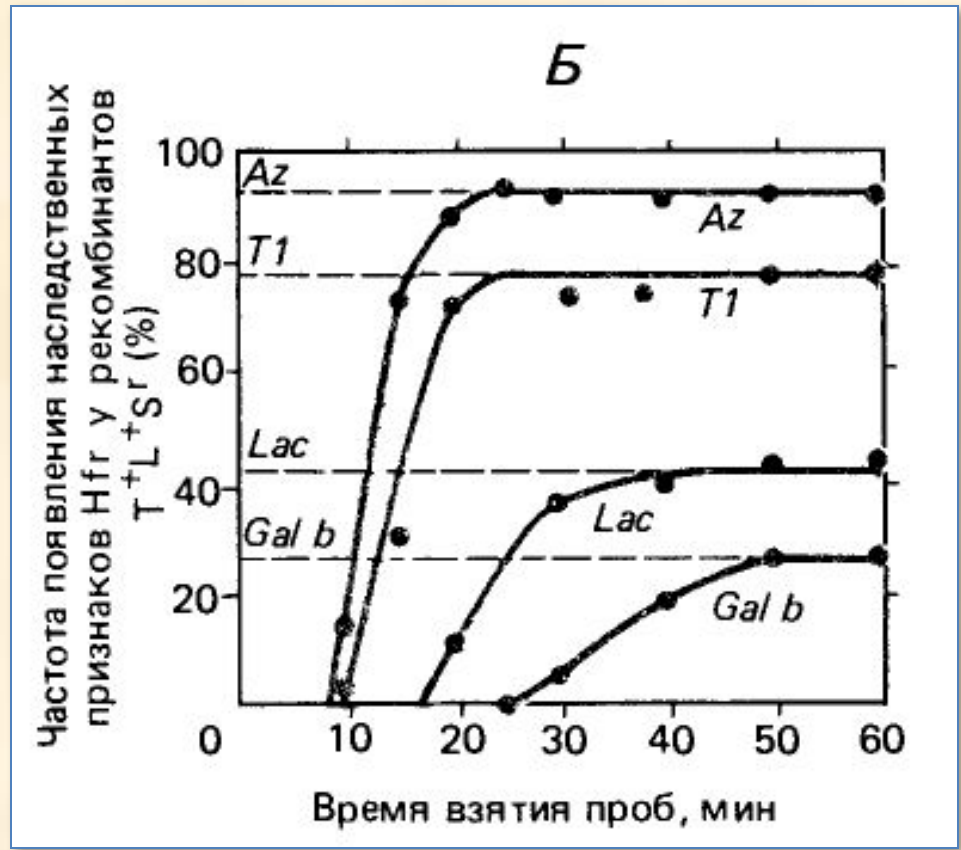
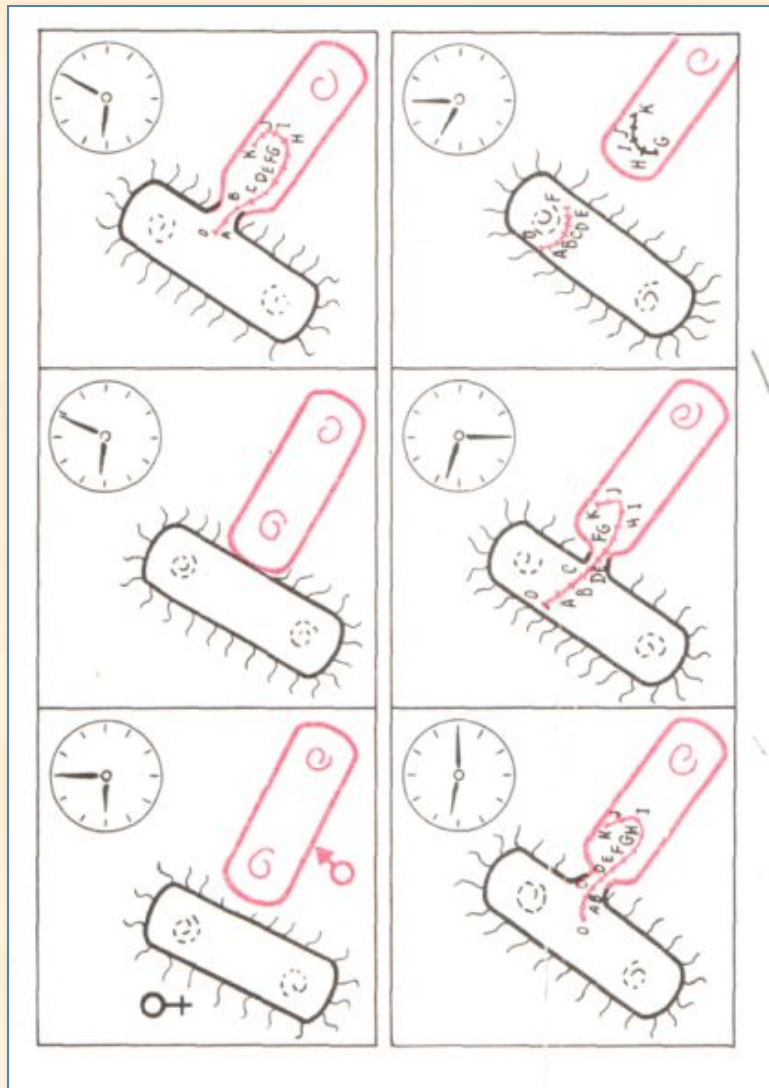


Схематическое изображение механизма, с помощью которого ДНК F-фактора передастся от F^+ - клетки F^- -клетке в процессе репликации по типу катящегося кольца.

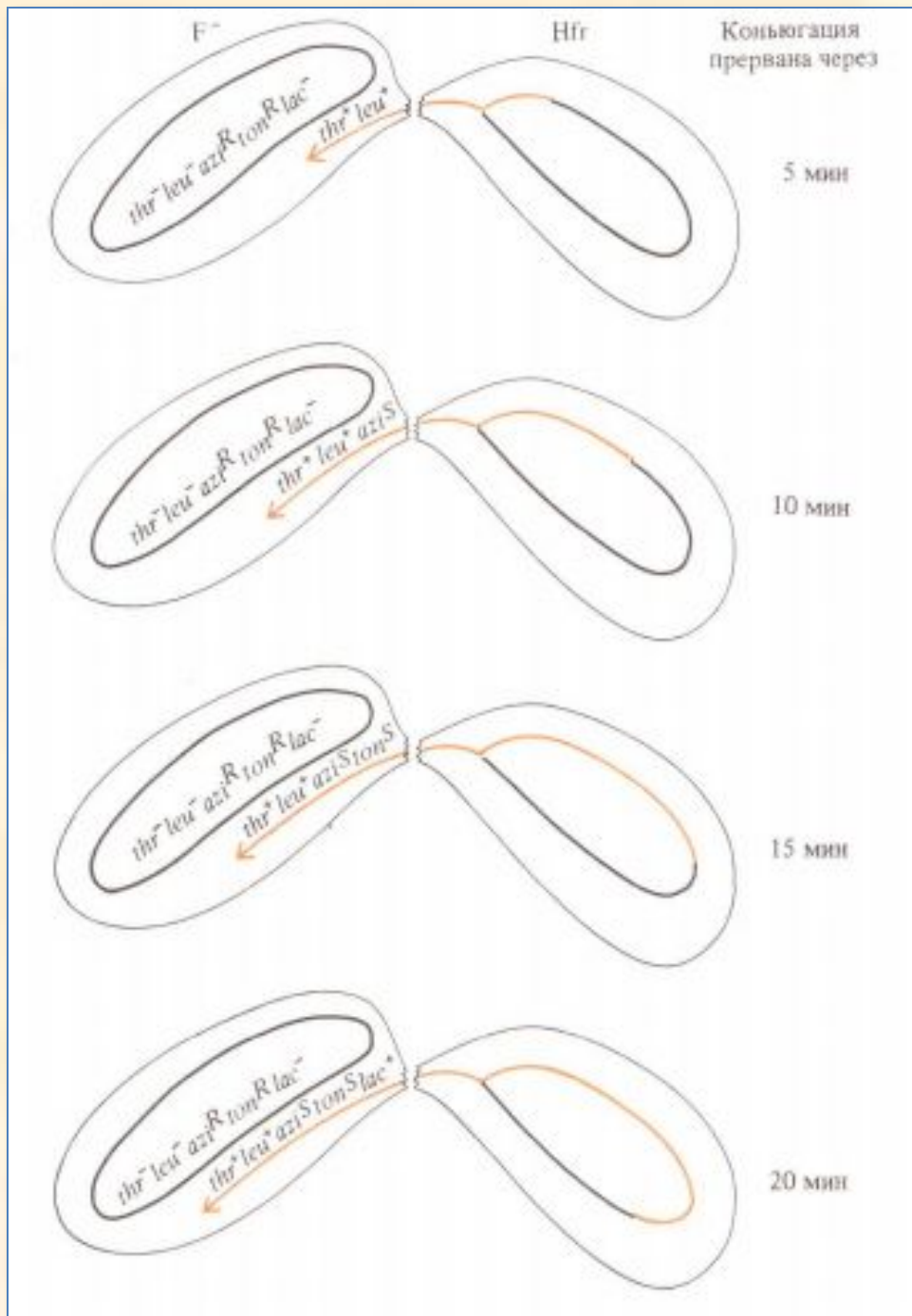


Мобилизация бактериальной хромосомы при включении F-фактора в клетку hfr . При конъюгации репликация хромосомы начинается с встроенного F-фактора. Отрезок F-фактора входит 5'-концом в F^- -клетку и увлекает за собой ДНК hfr -клетки. Если конъюгацию прервать до того, как в клетку перейдет вся Hfr -хромосома, то клетка-реципиент сохранит F^- -тип.

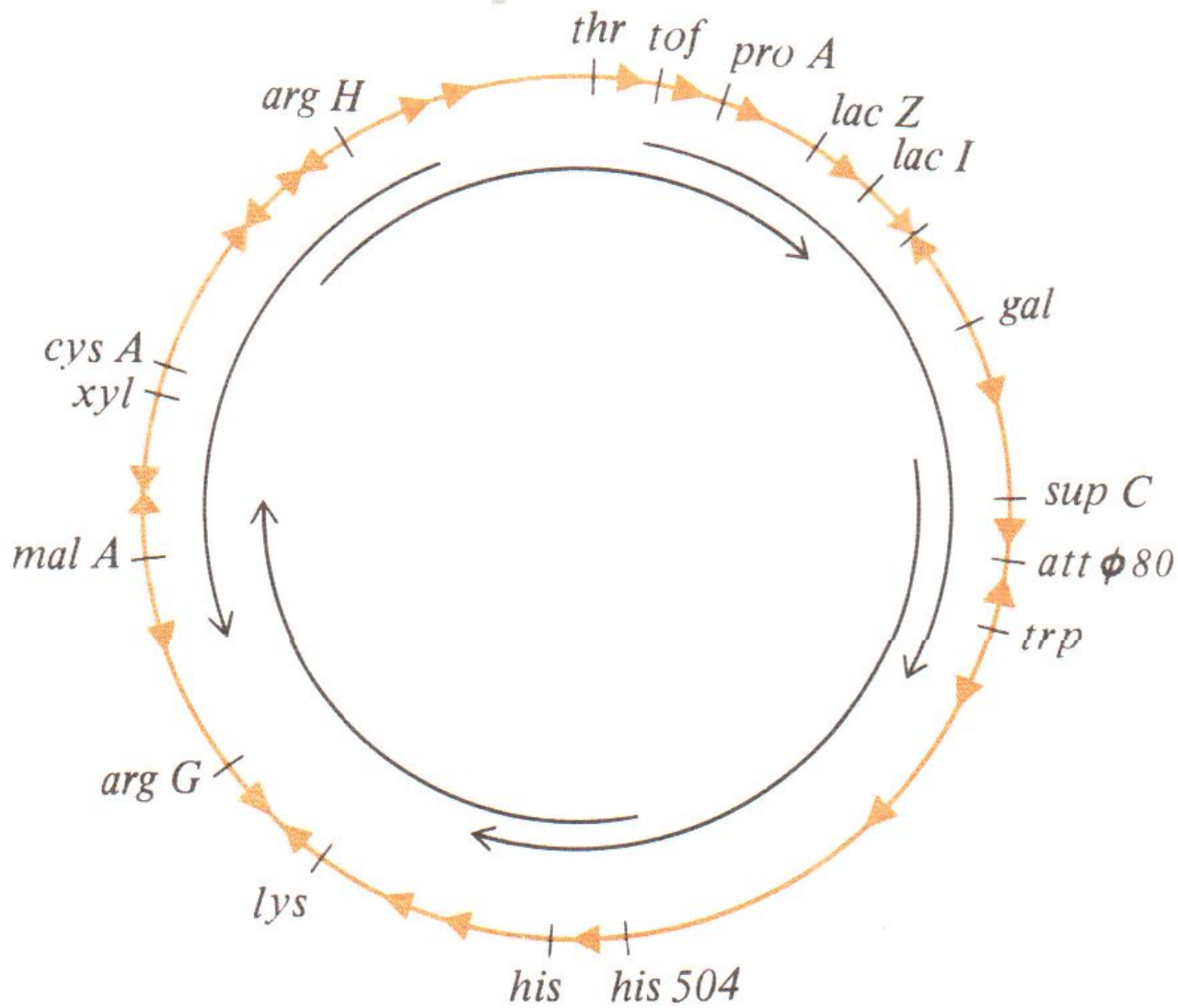
Фізичне картування бактеріальних генів методом перерваної кон'югації



Опыт Ф. Жакоба и Е. Вольмана по прерыванию конъюгации
 А — схема эксперимента; Б — зависимость появления рекомбинантов от времени конъюгации



Схема, иллюстрирующая полярность переноса Hfr-хромосомы в эксперименте с прерванной конъюгацией. К рекомбинации с хромосомой F⁻-клетки способны лишь те гены Hfr-хромосомы, которые к моменту прекращения конъюгации оказались в реципиентной F⁻-клетке.



Сайты интеграции F-фактора в хромосому некоторых Hfr-штаммов *E. coli*

Реплікація при кон'югації

Взаємини F-епісоми і бактеріальної хромосоми можна представити в такий спосіб. У клітинах F-відсутній F-фактор. Клітини F⁺, у результаті втрати F-фактора стають клітинами F⁻. Перенос F-фактора в клітини F⁻ перетворює їх у клітини F⁺. Можлива інтеграція F-фактора з бактеріальною хромосомою, і тоді при кон'югації вона переноситься в F⁻ - реципієнти. У штамів Hfr F-фактор інтегрований із хромосомою. F-фактор — представник більше широкого класу кон'югативних плазмід, виявлених у різних бактерій, здатних мобілізувати хромосому при кон'югації й передавати її реципієнтам.

Звичайно автономний F-фактор при розмноженні бактерій реплікується, подібно бактеріальній хромосомі, утворюючи θ-подібні фігури як проміжний продукт реплікації. Установлення кон'югаційного контакту між клітинами, можливо, служить сигналом для активації або синтезу ферментів, що беруть участь у переносі ДНК, зокрема ферментів, що розривають одну нитку в ДНК F-фактора.

Однонитовий розрив відзначається в крапці, відмінної від звичайної точки ініціації реплікації F-фактора. Якщо схрещуються F⁺ і F⁻, то 5'-кінець ланцюга ДНК, що звільняється в результаті надрізу, починає «розмотуватися» і проникає в клітину F⁻. Таким чином, у донор попадає одностанцюгова копія F-фактора, яка там реплікується і перетворюється у двостанцюгову форму, що замикається в кільце.

Якщо F-фактор інтегрований із хромосомою, то при кон'югації надріз F-фактора ініціює її реплікацію по механізму кільця, що котиться, і передачу одностанцюгової копії хромосоми в клітину-реципієнт. Це також було продемонстровано за допомогою міні-клітин. Таким чином, при кон'югації частина F-фактора передається разом з першими маркерами, а частина — із самими останніми, що буває дуже рідко через розриви кон'югаційного каналу й ДНК, що переноситься.

F'-фактори й сексдукція

Вирізання (ексцизія) F-фактору із хромосоми Hfr -штаму іноді буває неточним, і тоді ділянка бактеріальної хромосоми заміщає ділянка F-фактора. Утвориться так званий F'- фактор; він стає здатним переносити бактеріальні гени незалежно від хромосоми, але разом із властивостями донора. Це явище називається сексдукцією. Завдяки сексдукції можна одержувати в *E. coli* часткові диплоїди (меродиплоїди) по тим генам, які включені в F'-Фактор. Таким чином, можливе дослідження алельних відносин і ефектів збільшення дози гена в бактерій, що в деякій мірі компенсує відсутність у них регулярної диплоїдної фази.

Між гомологічними ділянками на F'-Факторі й хромосомі можлива рекомбінація, що буде приводити до утворення клітин Hfr з дуплікацією бактеріальних генів у випадку подинного кросинговеру або до реципрокного обміну генами між F' і бактеріальною хромосомою у випадку подвійного кросинговеру.

Трансформація

Трансформація бактерій — це перенос ДНК, ізольованої з одних клітин в інші.

Дослідження на пневмококах, проведені Евері, Мак-Леодом і Мак-Карті в 1944 р., свідчили про те, що саме ДНК є генетичним матеріалом. Вони розглянули дві форми бактерій - інфекційну (вірулентну, позначену як S), що утворює гладкі колонії на агарі, і мутантну, невірулентну (позначену R), що утворює шорсткуваті колонії. Евері і його колеги показали, що ДНК, виділена з убитих теплом S-бактерій, здатна трансформувати невірулентну R-форму у вірулентну, причому вірулентність трансформованих R-бактерій передавалася наступним поколінням. Звідси випливало, що ДНК несе генетичну інформацію.

Для того щоб ДНК проникнула в бактеріальні клітини, вони повинні перебувати в стані компетентності. Виникненню компетентності, що здобувається лише частиною клітин культури звичайно в середині логарифмічної стадії росту, сприяє особливий білок. У присутності хлорамфеніколу — інгібітору білкового синтезу — стан компетентності не розвивається. У той же час антибіотик, доданий до компетентної культури, компетентності не пригнічує. Отже, білок, що стимулює компетентність, виробляється в ході росту культури.

Спочатку ДНК зв'язується з поверхнею компетентних клітин. Зазвичай ДНК що трансформується має молекулярну масу близько $1 \cdot 10^7$ Д, що становить близько 0,5% бактеріальної хромосоми. ДНК, пов'язана з компетентними клітинами, розщеплюється спеціальними нуклеазами до фрагментів з молекулярною масою $4-5 \cdot 10^6$ Д.

У останні роки у зв'язку з розвитком генної інженерії широко застосовується плазмідна, або векторна, трансформація, що полягає у введенні в клітини бактерій, а також еукаріотів генів, інтегрованих у природні або штучні плазміди.

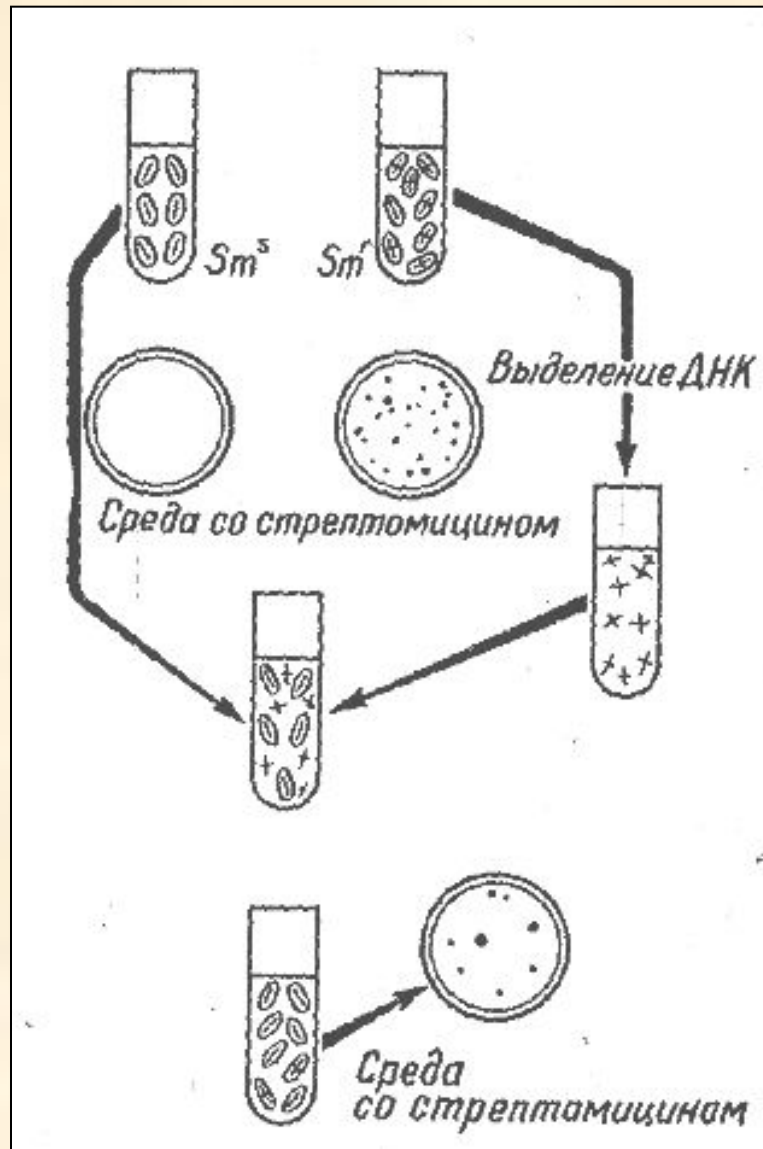


Схема досліду, що демонструє явище трансформації:
 Штами бактерій Sm^s – чутливі до стрептоміцину Sm^r - нечутливі до стрептоміцину

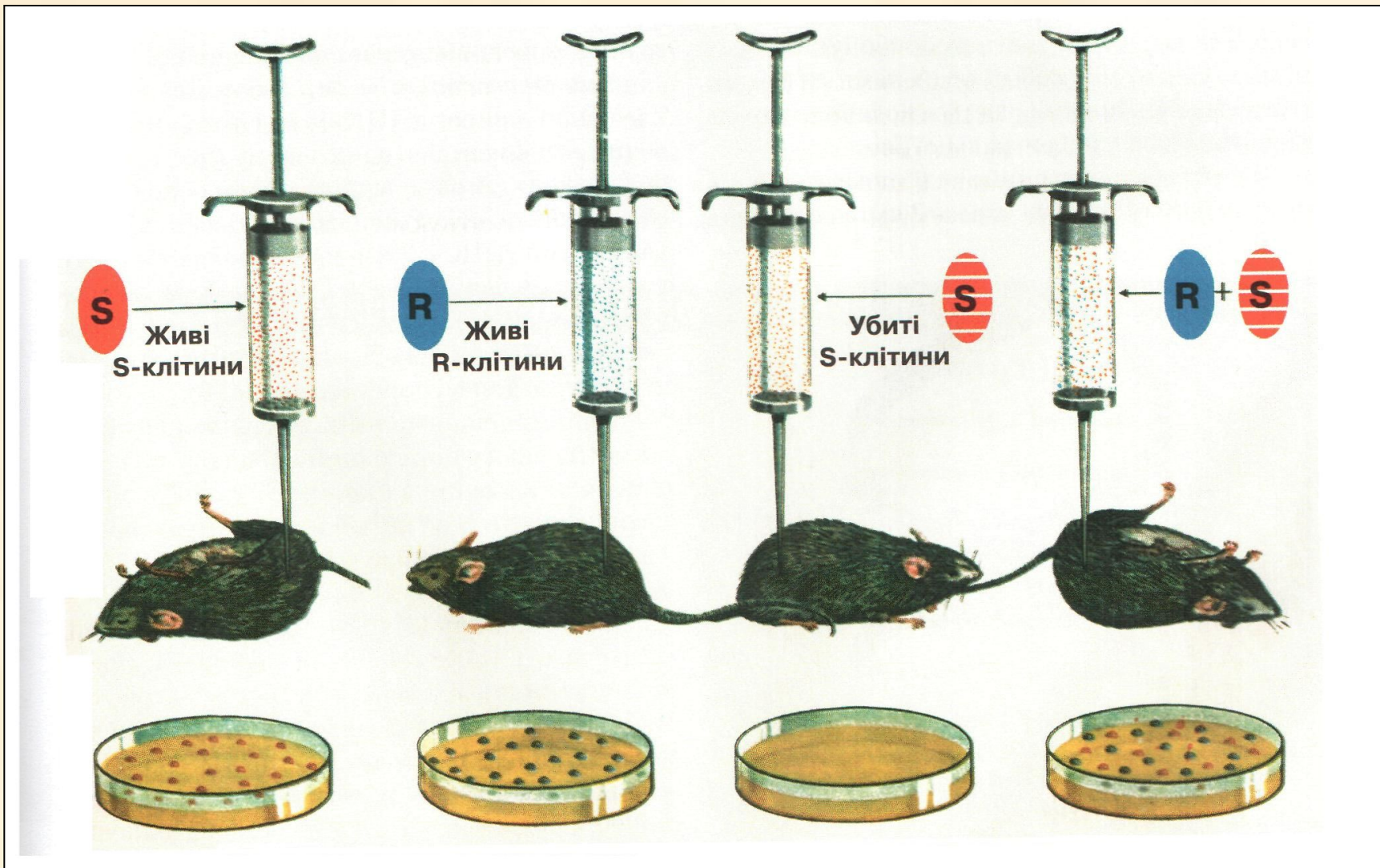


Схема дослідів Евірі, Мак-Леода і Мак-Карті по трансформації пневмококів

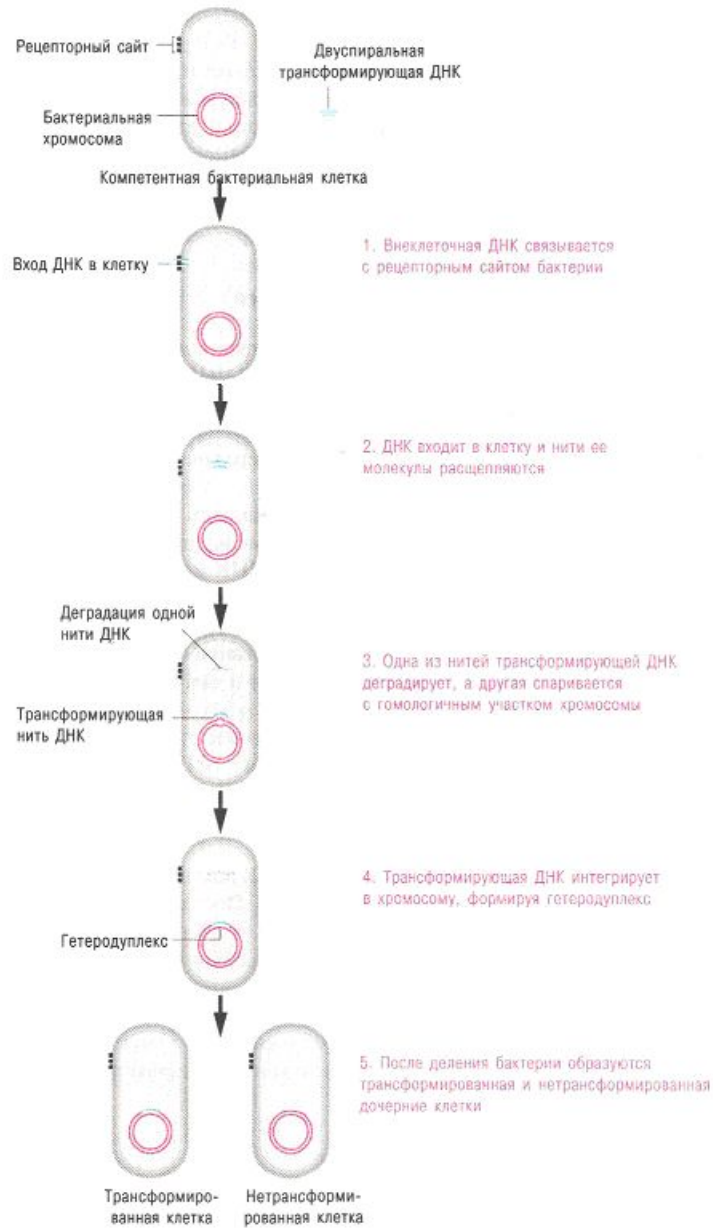
Механізм бактеріальної трансформації

У результаті трансформації відбувається генетична рекомбінація між бактеріальними клітинами. Невеликі фрагменти позаклітинної ДНК потрапляють у бактерію й забезпечують клітині-реципієнту нові властивості

Трансформація використовується для картируванні бактеріальних генів, хоча й меншою мірою, ніж кон'югація.

Процес трансформації включає кілька етапів, суть яких (1) у потраплянні фрагментів ДНК у клітину-реципієнта й (2) у рекомбінації між цією ДНК і гомологічними генами реципієнта. Позахромосомна ДНК може проникнути тільки в компетентні клітини, що несуть на своїй поверхні кілька рецепторних сайтів. Для проходження ДНК крізь клітинну стінку й мембрану потрібні енергія й спеціальні транспортні білки, оскільки пригнічення синтезу білків і багатих енергією молекул у клітині-реципієнті інгібує й сам процес трансформації.

Після надходження фрагмента ДНК у бактеріальну клітину одна з ниток двуспіральної молекули руйнується нуклеазами, а інша бере участь у трансформації (кроки 2-3). Нитка, що залишився, ДНК утворює синапс із гомологічною ділянкою хромосоми й рекомбінує з ним (крок 4). Заміщена ділянка бактеріальної хромосоми деградує. Рекомбінація виявляється в тому випадку, якщо ДНК отримана бактерією від клітини іншого штаму, несучою інші гени або мутацію. Після інтеграції чужорідної ДНК у бактеріальну хромосому вона несе один вихідний ланцюг ДНК і одну чужу (наприклад, мутантний ген), така структура називається гетеродуплексом. Якщо в ДНК дикого типу вбудовується мутантний ген, то виходять інсерційні мутанти. У результаті напівконсервативної реплікації, хромосома однієї з дочірніх кліток ідентична вихідній, а хромосома іншої містить чужий (мутантний) ген, тобто утворюється одна трансформована й одна нетрансформована клітина (крок 5)



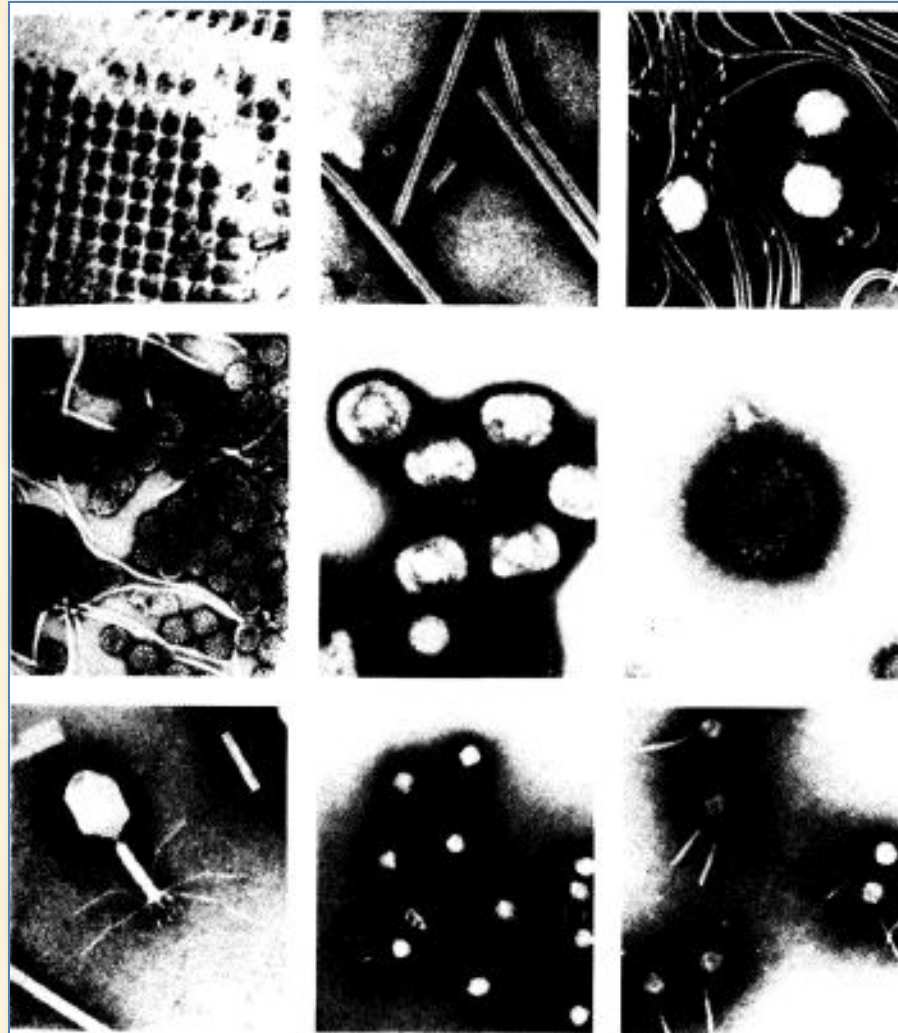
Возможные этапы трансформации бактериальной клетки с помощью экзогенной ДНК. В трансформации участвует только одна из цепей этой ДНК. Трансформация завершается после деления клетки.

Віруси

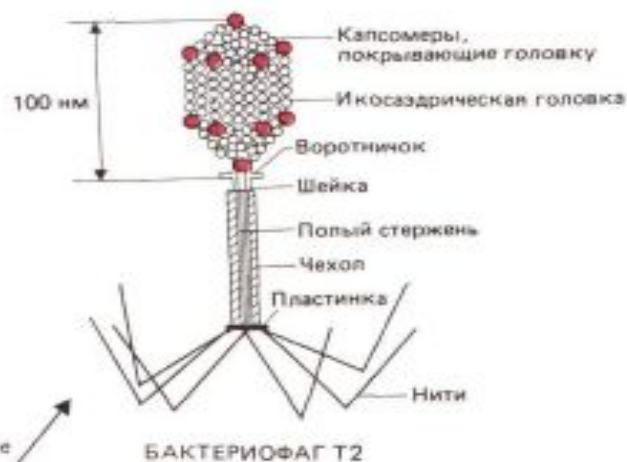
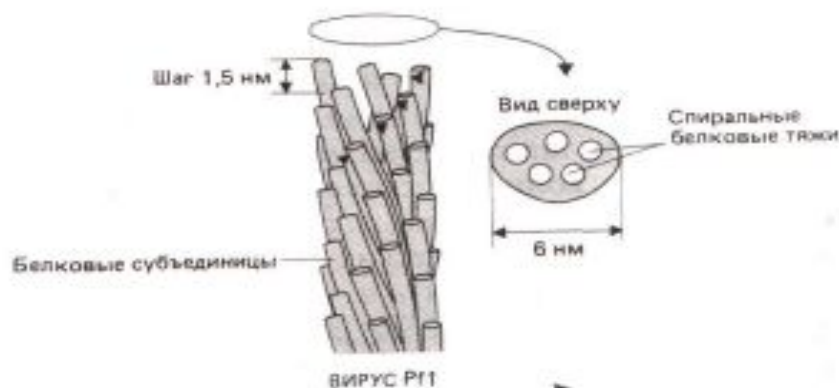
Віруси-частки, що містять нуклеїнові кислоти, білки, а іноді й ліпіди й здатні розмножуватися лише в клітині-хазяїні. Поза клітиною віруси можуть перебувати тільки у нереплікативному стані, оскільки в більшості з них немає ферментів, необхідних для повного відтворення зрілої вірусної частки. Діаметр вірусних часток (їх називають також віріонами) рівний 20-300 нм. Таким чином, вони набагато менше, ніж навіть дрібні із прокаріотичних клітин. Тому що розміри білків і деяких нуклеїнових кислот перебувають у діапазоні 2-50 нм, вірусну частку можна було б вважати просто комплексом макромолекул. Через їхні малі розміри й нездатність до самовідтворення віруси часто відносять до розряду «неживого».

ДНК-містячі віруси несуть як генетичний матеріал або одно-, або двох-ланцюгову ДНК, що може бути як лінійної, так і кільцевої. У ДНК закодована інформація про всі білки вірусу. Віруси класифікують залежно від того, одне- або двох-ланцюгова в них ДНК і про- або еукаріотичною є клітина-хазяїн. Віруси, що заражають бактерії, називаються бактеріофагами.

Структура вірусу в принципі така: це молекула ДНК у білковій «обгортці», навиваємій «капсидом».



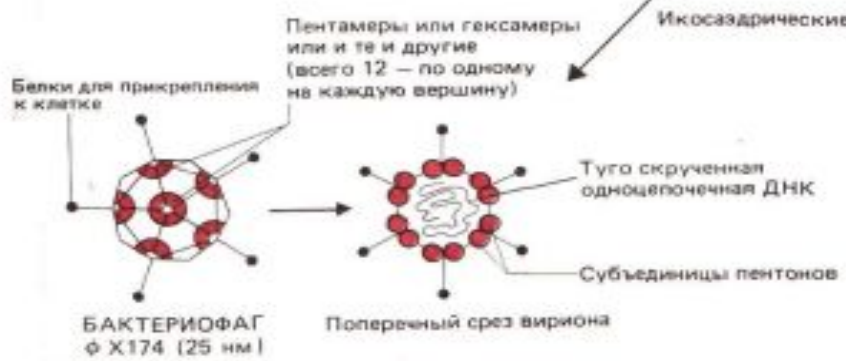
Электронные микрофотографии различных вирусов. *Верхний ряд:* РНК-вирусы полиомиелита (увеличение $\times 115\ 000$); табачной мозаики ($\times 145\ 000$) и саркомы Рауса ($\times 55\ 000$). *Средний ряд:* ДНК-вирусы папилломы кролика ($\times 65\ 000$), оспы ($\times 40\ 000$) и простого герпеса ($\times 140\ 000$). *Нижний ряд:* ДНК-бактериофаги Т4 ($\times 110\ 000$), Т7 ($\times 65\ 000$) и лямбда ($\times 65\ 000$)



С ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

С ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

ДНК-СОДЕРЖАЩИЕ ВИРУСЫ



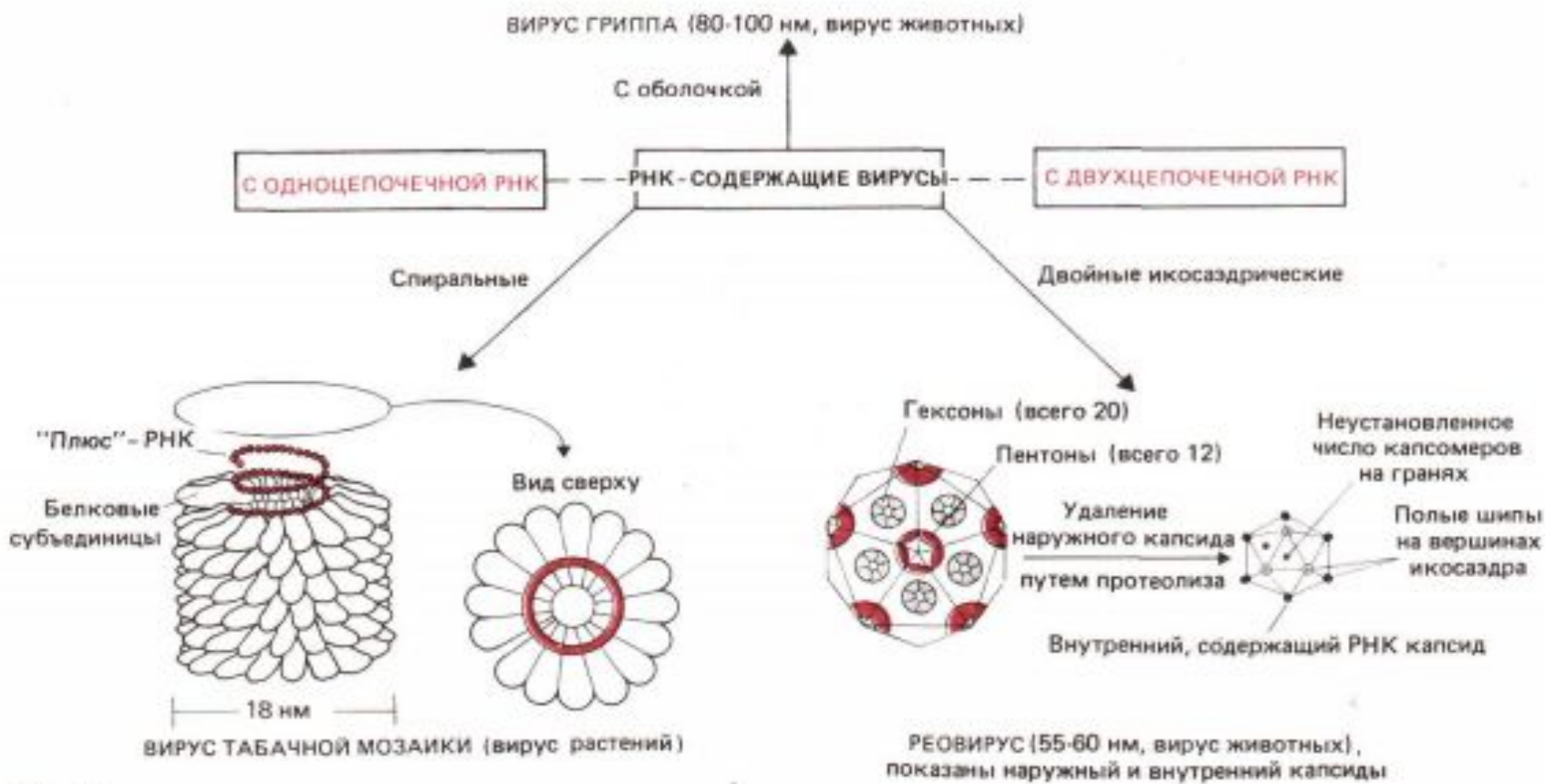
Інфікування — процес, за допомогою якого вірус впроваджується в клітину-хазяїна й «набудовує» її метаболічний апарат на відтворення віріонів. Заражені вірусом клітини або залишаються живими (у цьому випадку говорять, що вірус невірулентний), або піддаються лізису, що приводить до вивільнення вірусних часток. Незмінним підсумком зараження клітин ДНК-містячими бактеріофагами є лізис. ДНК-містячі віруси тварин викликають лізис рідко; клітини, однак, можуть загинути через виниклих при зараженні хромосомних ушкоджень, від імунологічної реакції організму на заражену тканину або просто в результаті порушення вірусом нормальних клітинних функцій.

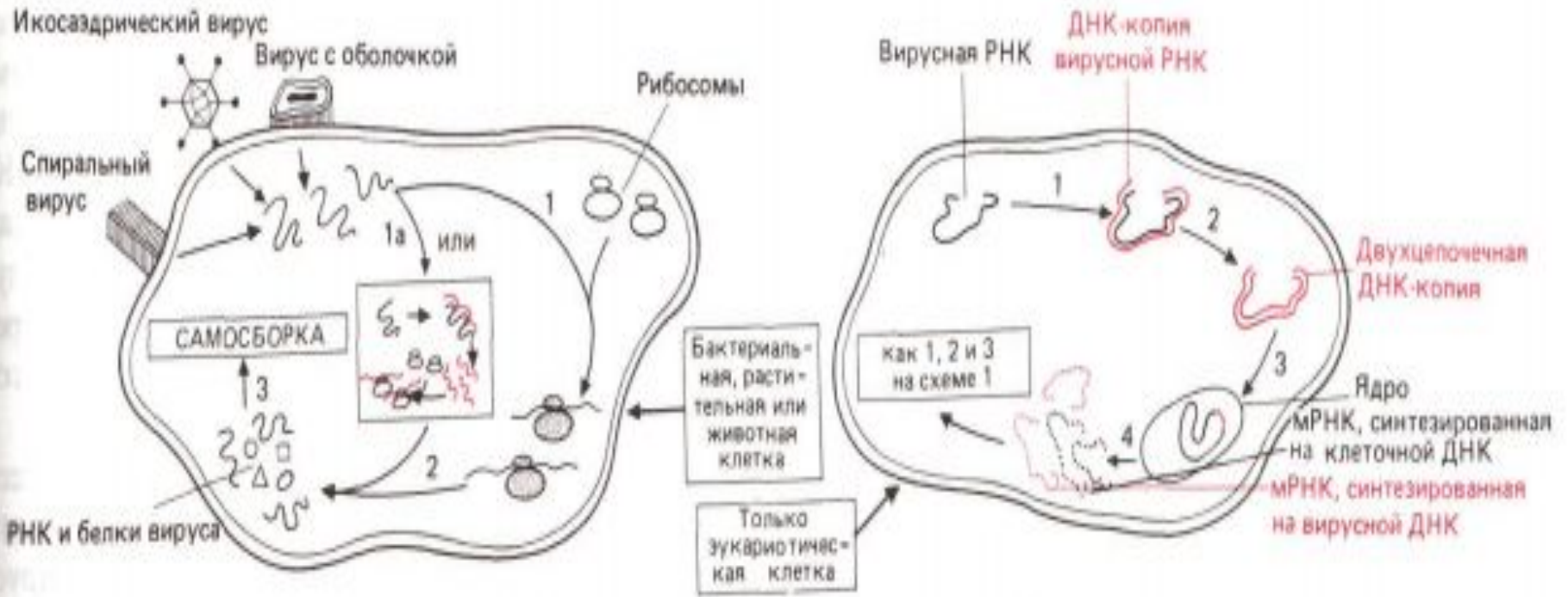


Узагальнена схема розмноження ДНК вірусів

РНК-містячі віруси не мають ДНК: генетична інформація цих вірусів закодована в РНК. РНК може бути одне- або двох-ланцюговою, а клітина-хазяїн - про- або еукаріотичною. Тільки віруси з одноланцюговою РНК заражають бактерії, тоді як віруси рослин і тварин можуть бути як одно-, так і двохланцюгові.

Віруси з одноланцюговою РНК можна розділити на два типи: з «плюс»-ланцюгом і «мінус»-ланцюгом. У вірусів першого типу ланцюг РНК може функціонувати в клітині-хазяїні безпосередньо як мРНК, тоді як у вірусів другого типу на «мінус»-ланцюга повинна спочатку за допомогою клітинних РНК-полімераз утворитися «плюс»-ланцюг. Віруси тварин бувають як першого, так і другого типів, а більшість вірусів рослин ставиться до «плюс»-типу. Особливий клас «плюс»-одноланцюгових вірусів утворюють ретровіруси, які здатні заражати тільки клітини тварин.





- 1 – присоединение вирусной РНК к рибосомам клетки-хозяина
 1а – синтез мРНК на вирусной РНК
 (Может происходить в ядре эукариотической клетки)
 2 – синтез белков
 3 – самосборка вируса, за которой следует лизис клетки или отпочковывание

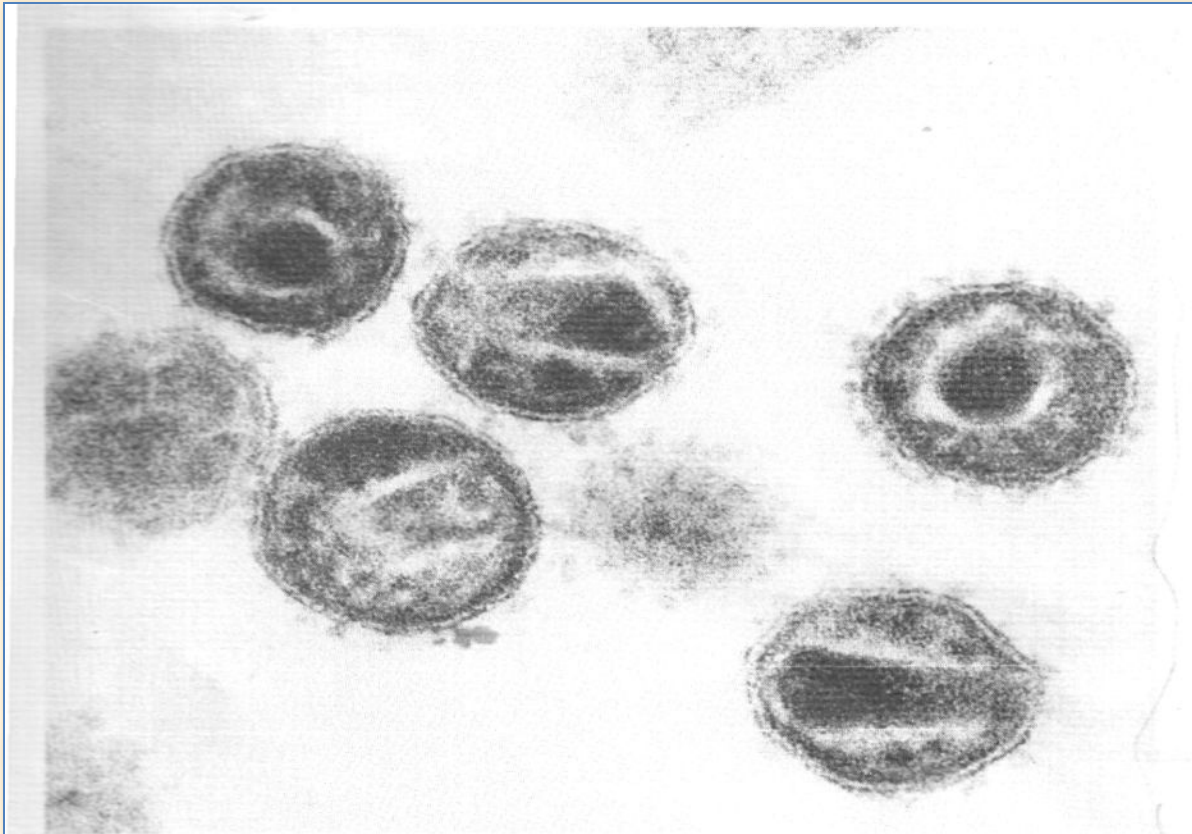
СХЕМА 1 (ДЛЯ ВИРУСОВ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ ИЛИ ЗУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК)

- 1 – синтез ДНК-копии (показана красным) на вирусной РНК обратной транскриптазой вируса
 2 – синтез двухцепочечной ДНК клеточной ДНК-полимеразой
 3 – встраивание вирусной двухцепочечной ДНК в геном клетки
 4 – образование мРНК на генах клетки и вируса

СХЕМА 2 (ТОЛЬКО ДЛЯ ВИРУСОВ ЗУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК)

вірусів

Вірус імунодефіциту людини



ВИРИОН HIV — сферическая частица поперечным сечением 1000 \AA . В ее сердцевине, имеющей форму усеченного конуса, заключен генетический материал — РНК. Вирион одет мембраной, подобной клеточной, из которой выступают белковые «шипы» (здесь они слабо различимы). Микрофотография получена Г. Гельдербломом из Института Роберта Коха в Берлине (увеличение $\times 200\ 000$).

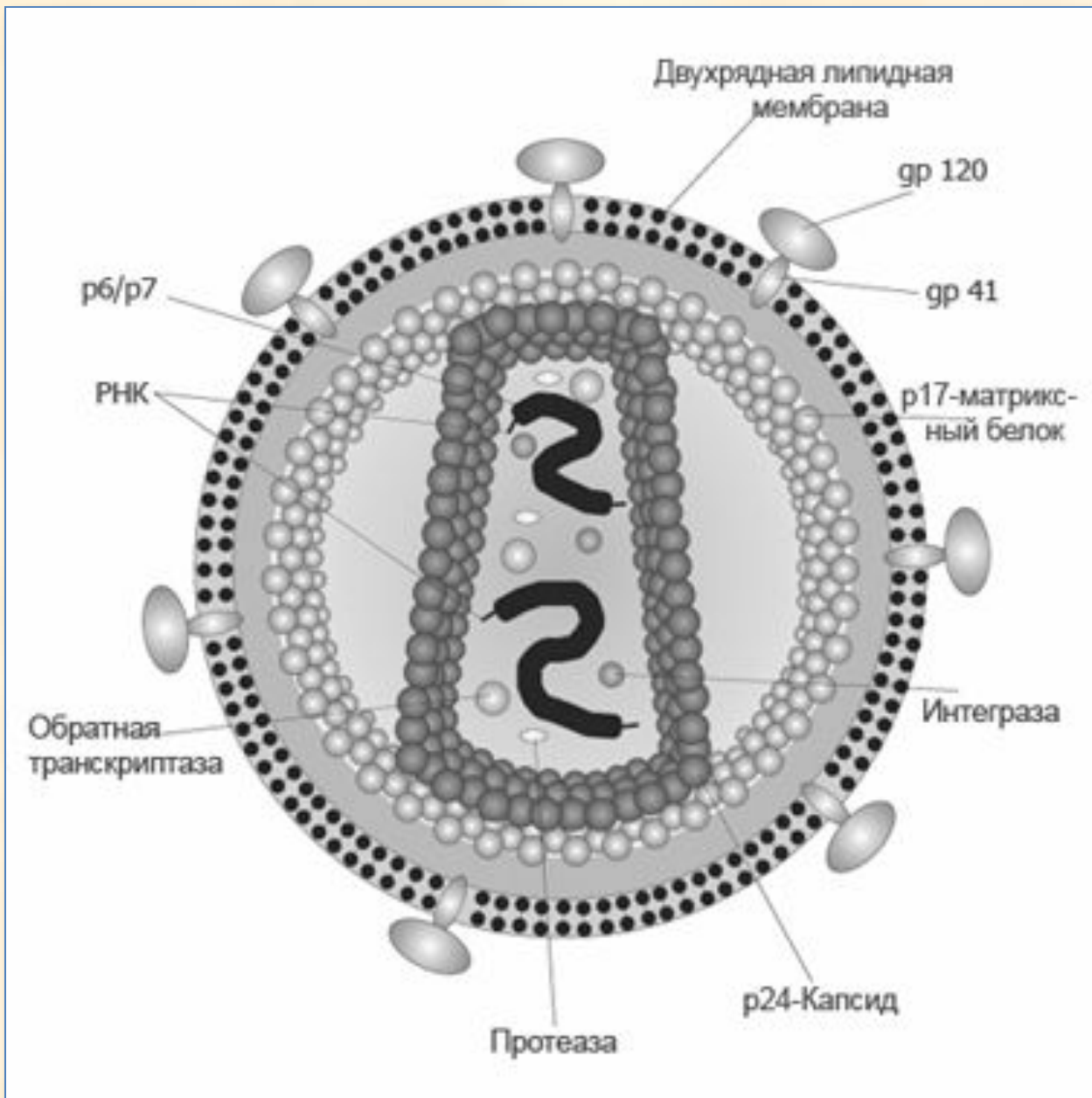
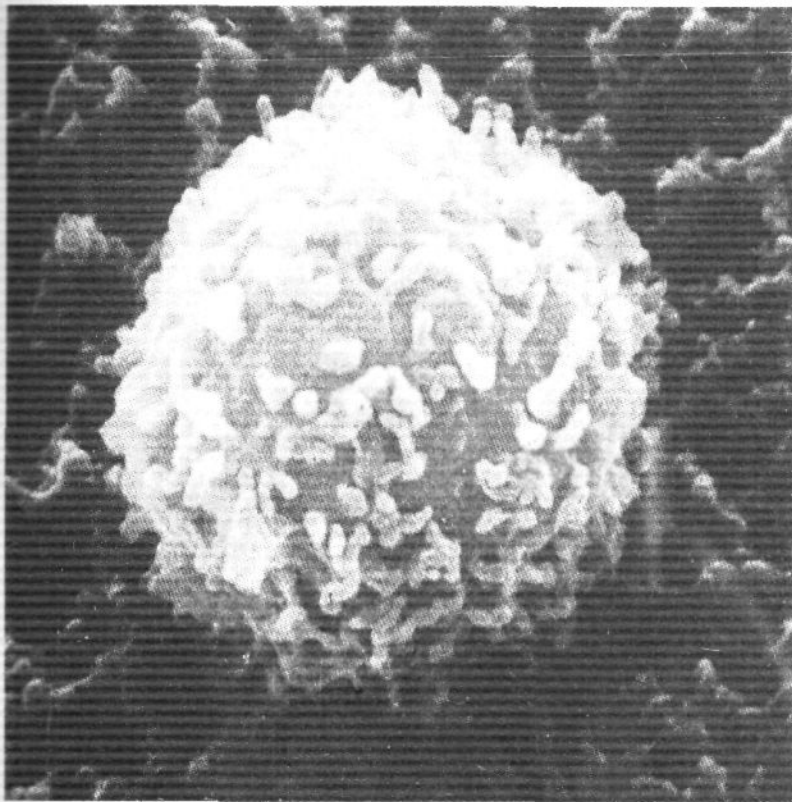
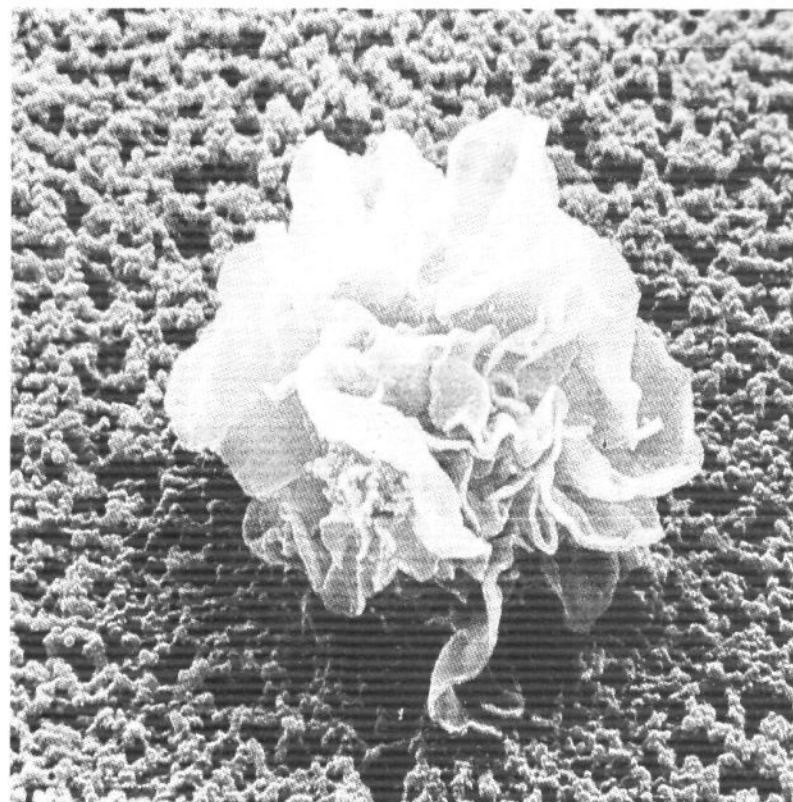


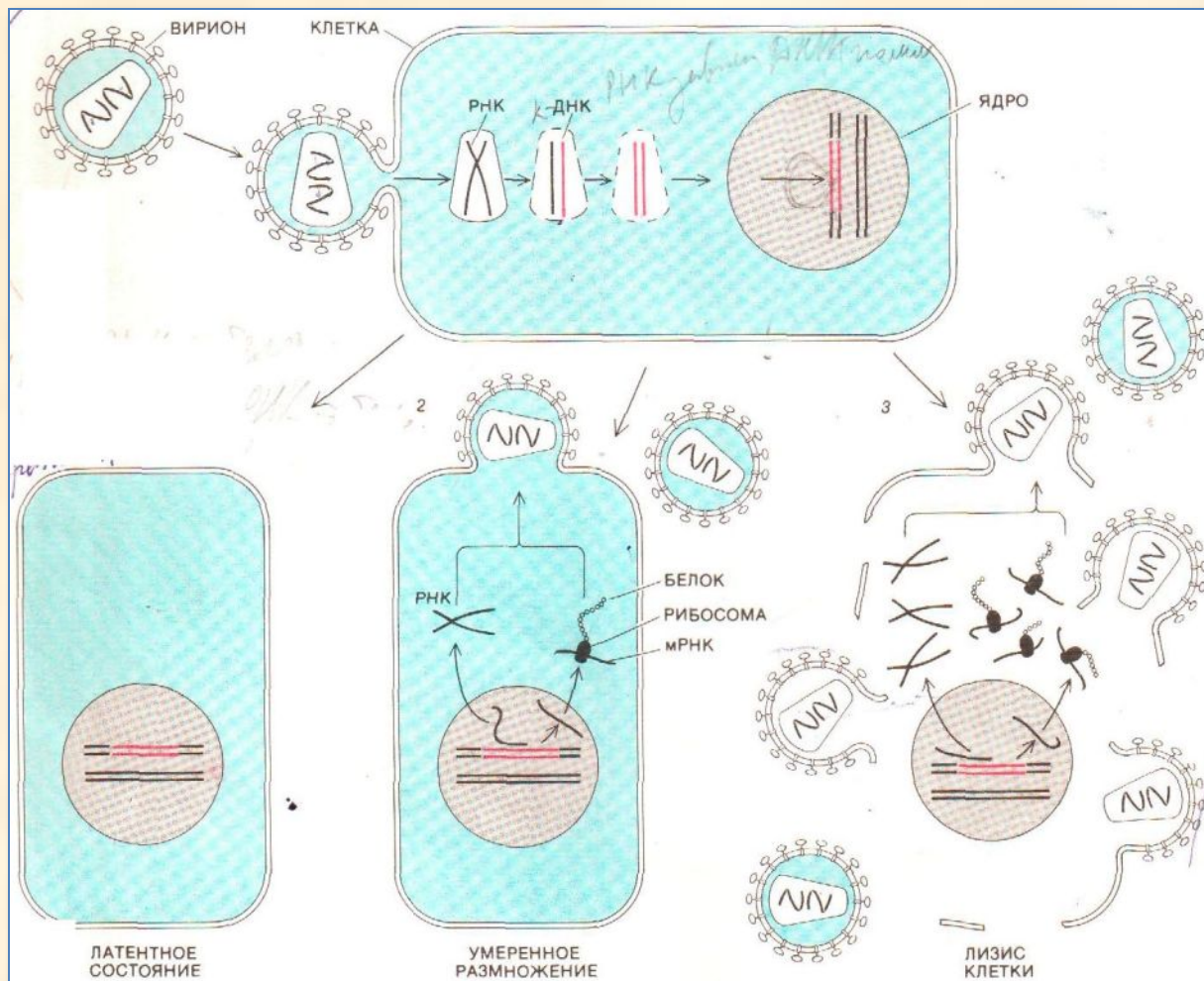
Схема будови вірусу імунодефіциту людини



ОСНОВНЫМИ МИШЕНЯМИ HIV являются лейкоциты, называемые T4-лимфоцитами (слева) и макрофагами (справа). Характерная особенность СПИДа — постепенное истощение популяции T4-клеток. В отличие от T4-лимфоцитов

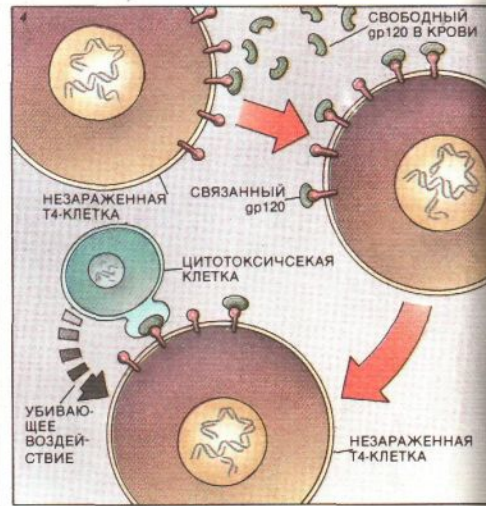
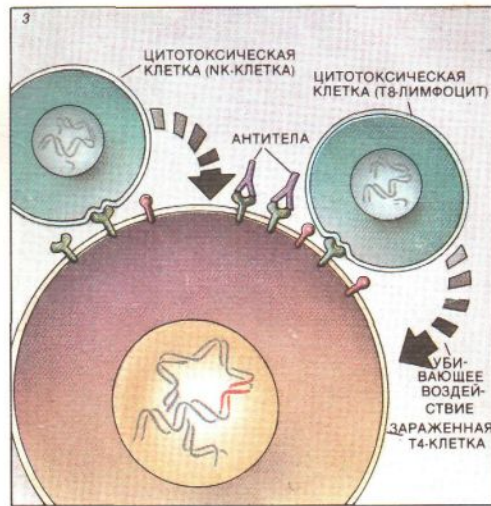
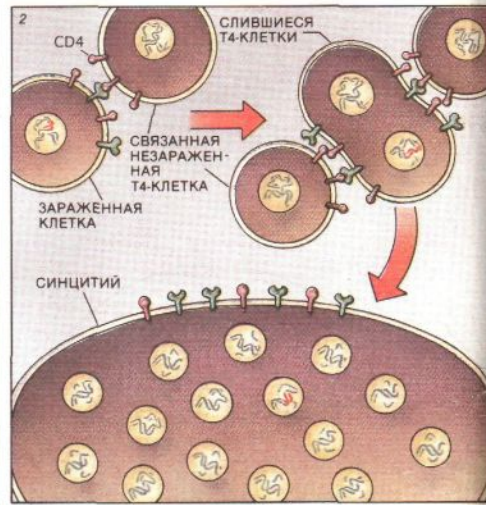
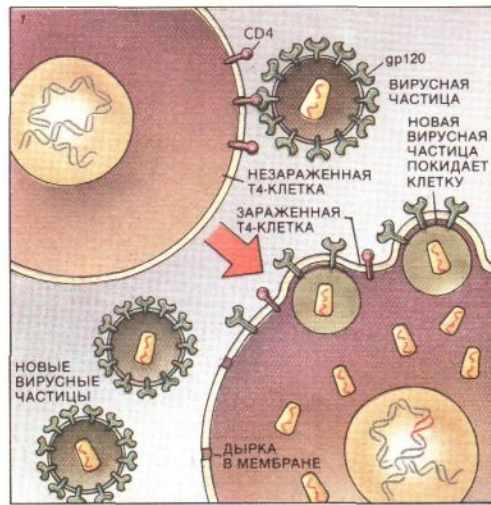


макрофаги вирус не убивает, поэтому они могут служить резервуаром инфекции в организме. Макрофаги способны, кроме того, переносить вирус в мозг, чем, по-видимому, обусловлены поражения центральной нервной системы.



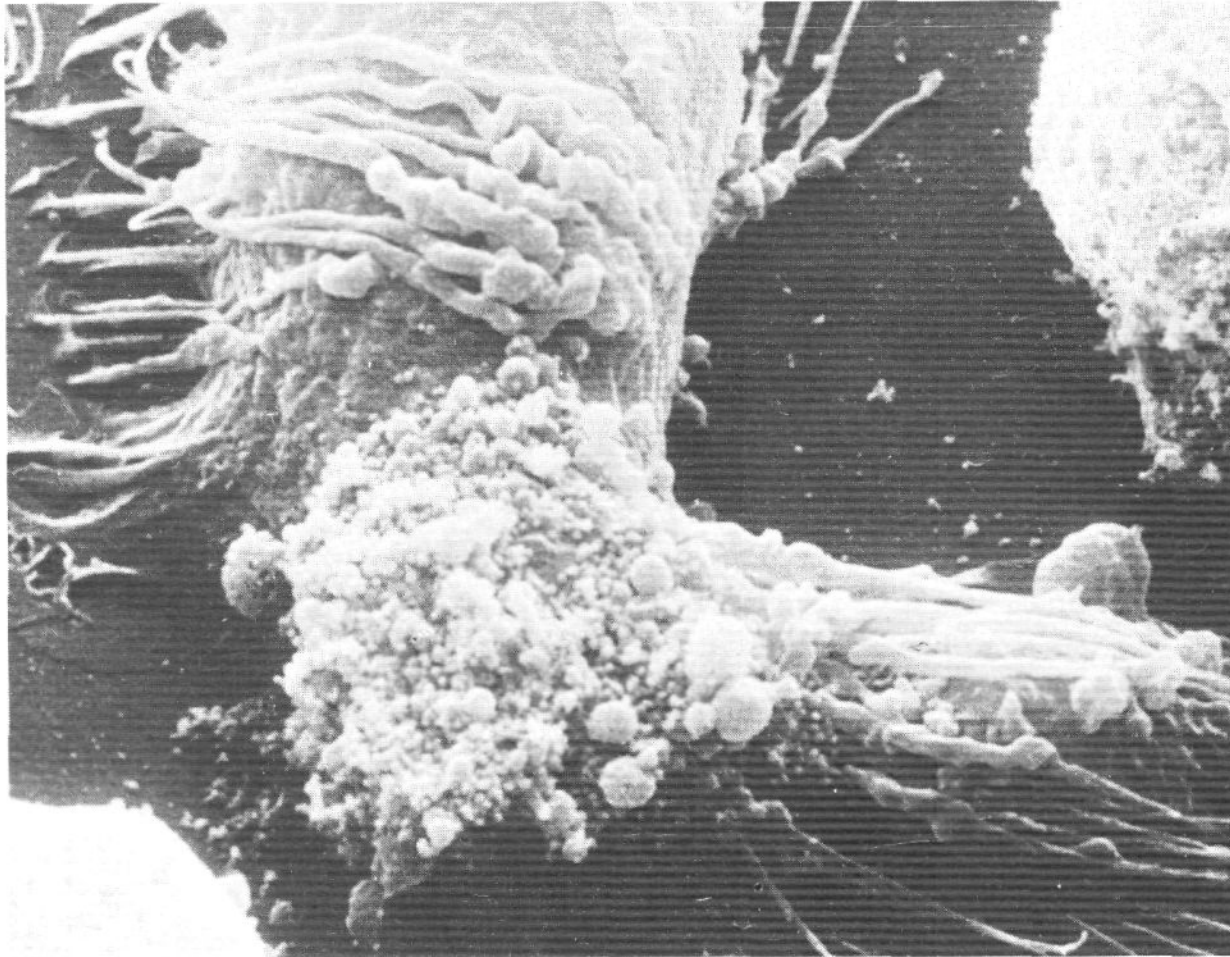
ИНФЕКЦИЯ HIV начинается с того, что вирусная частица присоединяется к поверхности подходящей клетки, оболочка вируса и мембрана клетки сливаются, так что сердцевина вириона, содержащая, кроме белков, генетический материал вируса — РНК, оказывается в цитоплазме клетки. Находящаяся в сердцевине обратная транскриптаза синтезирует одноцепочечную ДНК, комплементарную вирусной РНК, затем эта РНК расщепляется и синтезируется вторая цепь ДНК, комплементарная первой. Двухцепочечная вирусная ДНК (провирус) проникает в ядро клетки и встраивается в хромосомную ДНК. В такой скрытой форме

HIV может существовать долгое время, никак себя не проявляя (1). Когда же провирус почему-либо активизируется, при помощи клеточного механизма транскрипции образуются РНК-копии провируса и мРНК. По этим мРНК на рибосомах клетки синтезируются вирусные белки. Из них и РНК-копий формируются новые вирусные частицы, которые покидают клетку, отпочковываясь от ее поверхности. Если HIV размножается умеренно, зараженная клетка остается целой и жизнеспособной (2). Если же репликация вируса очень интенсивна, происходит лизис клетки, т. е. она разрывается и гибнет (3).



ГИБЕЛЬ Т4-ЛИМФОЦИТОВ, необходимых для иммунной защиты, — это главная причина постепенного угнетения иммунной системы, характерного для инфекции HIV. HIV напрямую разрушает клетки, когда размножается в них: новые вирусные частицы, покидая клетку, повреждают клеточную мембрану (1). HIV может также опосредованно уничтожить Т4-лимфоциты. На поверхности зараженной клетки располагается вирусный белок gp120, обладающий высоким сродством к белку поверхности Т4-лимфоцитов, называемому антигеном CD4. Из-за этого нормальные Т4-лимфоциты присоединяются к зараженным клеткам и слива-

ются с ними, образуя нежизнеспособную многоклеточную структуру — синцитий (2). Таким образом, вместе с пораженной клеткой гибнут и все здоровые, включившиеся в синцитий. Кроме того, HIV вызывает нормальный клеточный иммунный ответ. При этом цитотоксические клетки (с помощью антител либо сами по себе) уничтожают зараженные Т4-лимфоциты, на поверхности которых имеются вирусные белки (3). При инфекции HIV в крови может циркулировать свободный белок gp 120 (4). Он способен связываться с молекулами CD4 нормальных клеток; в результате иммунная система принимает их за зараженные и атакует.



ВИРИОНЫ HIV в массе покидают зараженную клетку линии H9 в культуре. Вирусные частицы (мелкие шарики) видны в центральной части снимка. Основная проблема при получении специфических реагентов, необходимых для выяснения причины СПИДа, сводилась к тому, чтобы научиться размножать вирус в непрерывной культуре. Этого добились в лаборатории Галло, используя линию H9. (Микрофотография получена М. Эзелом; увеличение $\times 10\,000$.)

Трансдукція

Трансдукцією називають переніс генів з одних бактеріальних клітин в інші за допомогою бактеріофага.

Вірулентні й помірні бактеріофаги. Бактеріофаги, або віруси бактерій, ділять на дві категорії: вірулентні й помірні. Вірулентний бактеріофаг (або просто — фаг), проникаючи в клітину, викликає літичну реакцію, тобто розмножується й лізірує бактерію. Помірні бактеріофаги можуть викликати як літичну, так і лизогенну реакцію. В останньому випадку фаг, що інфікує, переходить у стан профага, що відтворюється синхронно із хромосоною бактерії. Бактерії, що несуть профаг, називають лизогеними. Лизогенні бактерії здобувають імунітет, тобто стійкість до додаткового зараження тим же бактеріофагом, що їх лизогенізував.

Лизогенний стан стійко відтворюється. Профаг при цьому втрачається із частотою близько 1 на 10^5 — 10^6 клітинних поділів. У лизогенних культурах може відбуватися індукція бактеріофага, у результаті чого спостерігається масовий лізис бактерій. Таке явище відбувається спонтанно і стимулюється цілим рядом агентів, що ушкоджують ДНК: ультрафіолетовими й рентгенівськими променями, алкілюючими з'єднаннями, азотистим іпритом, органічними перекисами й т.д. Варто підкреслити, що, заражаючи бактеріальну клітину, помірний фаг може викликати як літичну, так і лизогенну реакцію. Імовірність того й іншого варіанта залежить від фізіологічного стану культури. Крім того, помірні бактеріофаги можуть мутаційним шляхом перетворюватися у вірулентні, що підкреслює відносність класифікації.

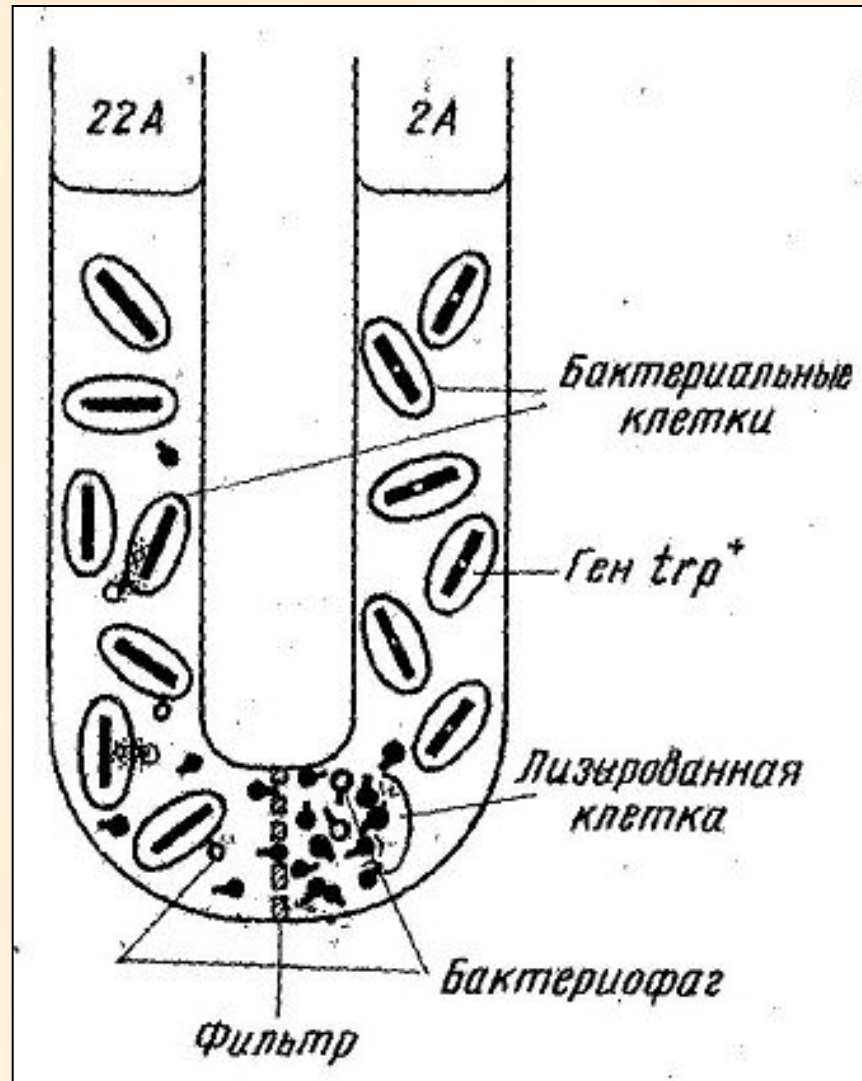


Схема досліду, що демонструє явище трансдукції у сальмонели:

Штами бактерій 22А – які нездатні синтезувати триптофан (trp^-), та штам 2А – які здатні синтезувати триптофан (trp^+) та лизогенні по

Загальна, або неспецифічна, трансдукція

Трансдукцію здійснюють помірні бактеріофаги. До їхнього числа ставиться й фаг P22, за допомогою якого Н. Зиндер уперше виявив трансдукцію в *Salmonella typhimurium*.

Два штами цієї бактерії, які мають потребу в амінокислотах (один — phe trp tyr ++, іншої — —++met his), висівали в змішаній культурі на мінімальне середовище. У результаті по' з'явилися протрофні колонії із частотою близько $1 \cdot 10^{-4}$. Як видно, логіка експерименту була та ж, що й при пошуках кон'югації в *E. coli*. Цього разу, щоправда, іншими виявилися результати вирощування двох названих штамів *S. typhimurium* у різних відростках U-подібної трубки, розділених бактеріальним фільтром. Рекомбінанти були отримані і у цьому випадку. Отже, для їхнього утворення не потрібний контакт між клітинами, як при кон'югації.

Виявилось, що фільтрівний агент, що переносить гени, — це помірний бактеріофаг P22, по якому був лізогенним один зі штамів, вивчених Н. Зиндером і Дж. Ледербергом. Оскільки фаг P22 могли трансдукувати будь-які гени сальмонели, це явище назвали загальною або неспецифічною трансдукцією. Як показав в 1955 р. Е. Леннокс, таку ж здатністю має і бактеріофаг P1 *E. coli*. Цей фаг переносить дуже невеликий фрагмент хромосоми *E. coli*. Наприклад, спільна трансдукція генів thr і leu спостерігалася тільки в 1 % випадків, тобто одна фагова частка з 100, трансдукуючих ген thr, несла й ген leu, хоча на генетичній карті *E. coli*, побудованої при кон'югації, ці локуси тісно зчеплені й перебувають на відстані близько 2 % загальної довжини генома.

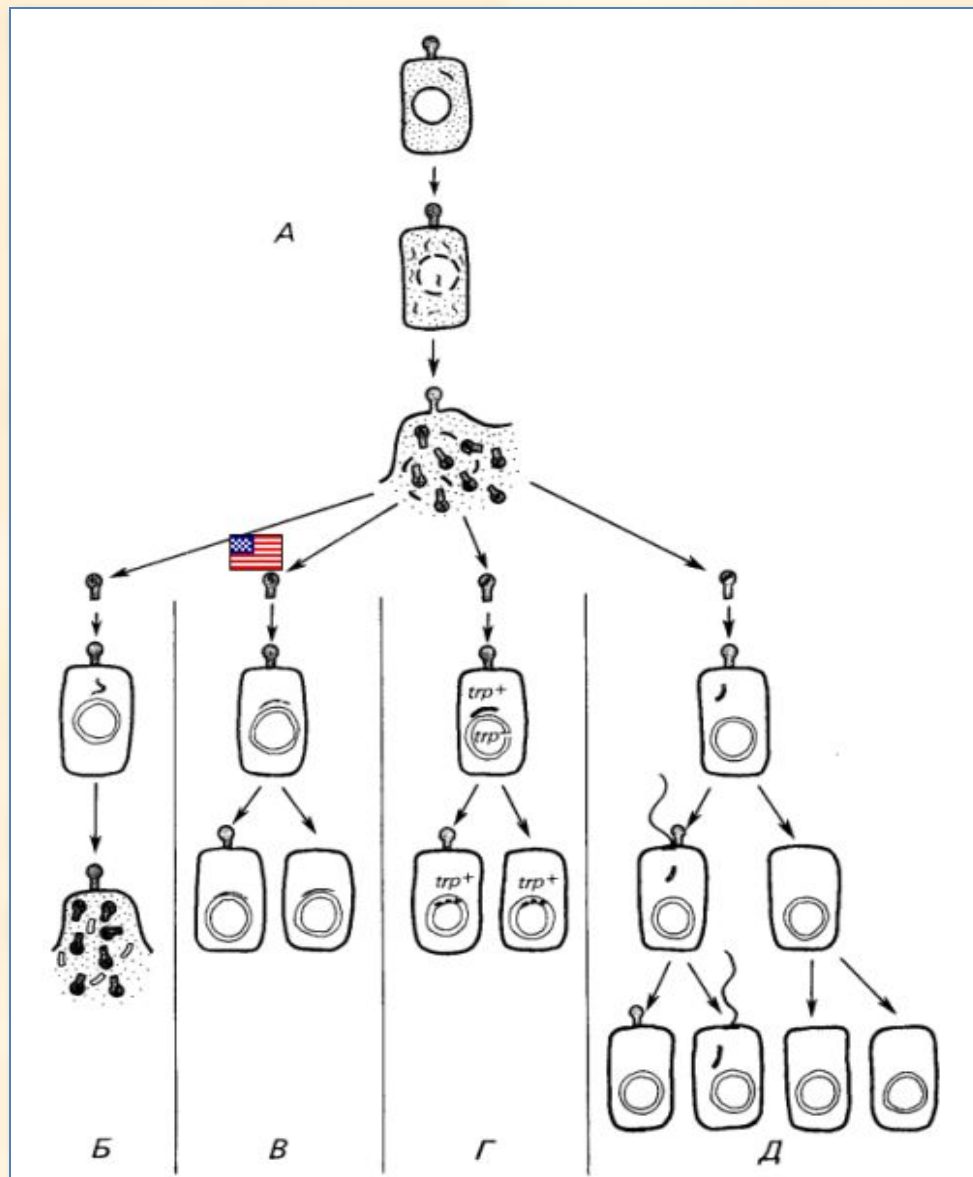
Перенос генів при загальній трансдукції може привести до двох різних станів трансдуктантів. В одних випадках привнесений ген успадковується стабільно, оскільки інтегрує із хромосомою реципієнта. Це повна трансдукція. В інших випадках при абортивній трансдукції внесений фагом фрагмент генома не реплікується й передається по одній лінії при розмноженні трансдуктанта, тобто із двох клітин — нащадків кожного розподілу — лише одна одержує трансдукований ген. Так, зокрема, можна трансдукувати ген, що визначає наявність джгутика в *S. typhimurium*. У цьому випадку у всьому клоні — потомстві трансдуктанта — жгутик, а отже, рухливість зберігає тільки одна клітина. Абортивна трансдукція відбувається частіше, ніж повна, іноді в 10 разів.

Специфічна трансдукція. Сайт-специфічна рекомбінація

Специфічна трансдукція відрізняється від неспецифічної тим, що бактеріофаг може переносити тільки певні гени, як це характерно для фага до *E. coli*, що може трансдукувати тільки гени локусу *gal*, відповідального за засвоєння галактози, і *bio* — гени синтезу біотину. Помірний бактеріофаг до при лізогенізації *E. coli* інтегрує в її хромосому на ділянці між локусами *gal* і *bio*. Це було показано в кон'югаційних схрещуваннях лізогенних Hfr і нелізогенних F^- -бактерій. Gal^+ -трансдуктанти виникають звичайно із частотою $1 \cdot 10^{-5} - 10^{-6}$ і, як правило, генетично нестабільні. Вони віщеплюють клітини Gal^- із частотою близько $2 \cdot 10^{-3}$ на клітинний поділ. Це явище пояснюється тим, що трансдуктанти Gal^- частково гетерозиготні gal/gal^+ , тобто несуть додатковий фрагмент gal^+ разом з ділянкою *gal* реципієнта. Такий стан називається гетерогенотой.

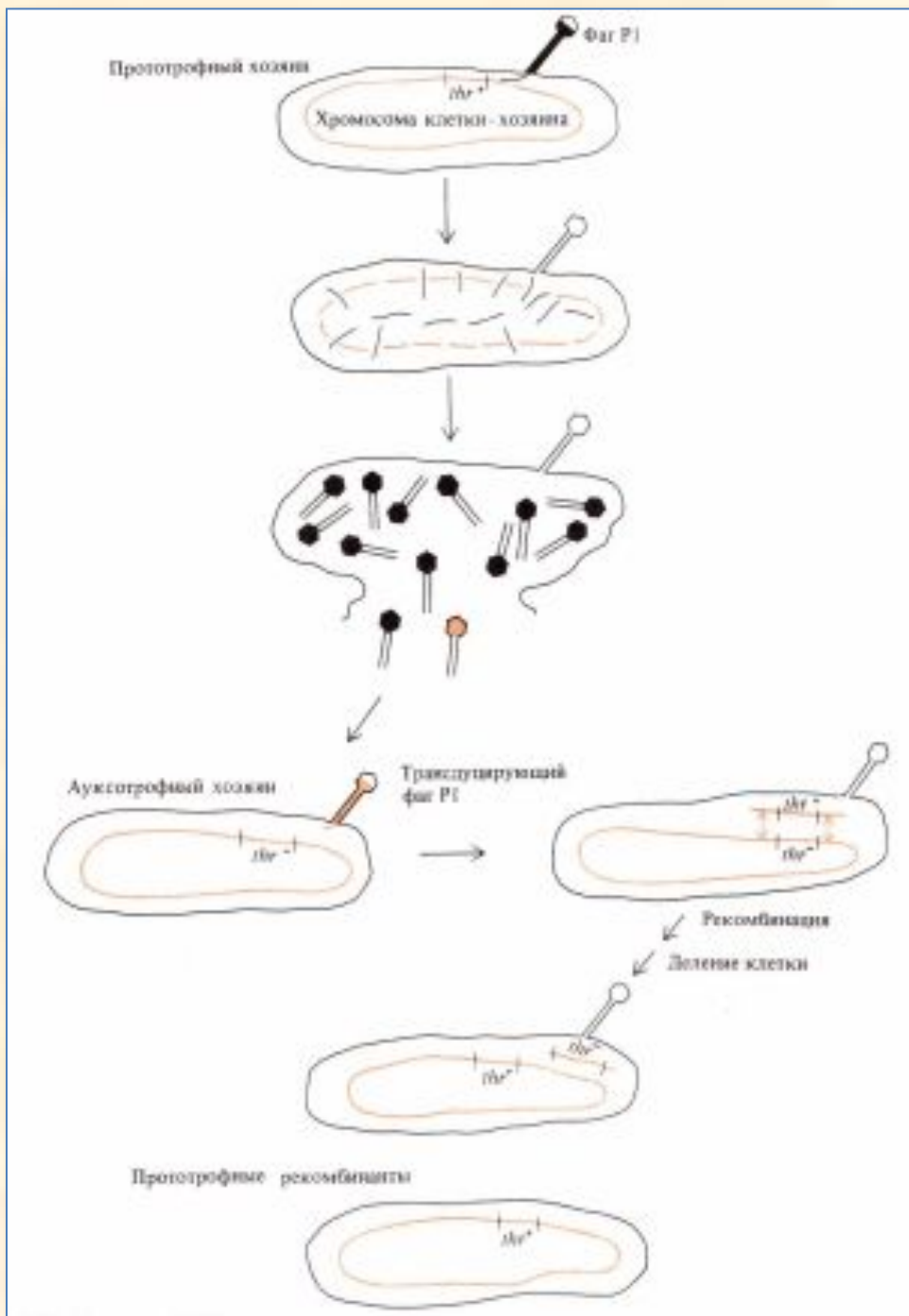
При опроміненні гетерогенот ультрафіолетовим світлом удалося одержати фаголізати, здатні до трансдукції з дуже високою частотою.

Сайт-специфічна рекомбінація. Геном фага λ проникає в бактеріальну клітину в лінійній формі, однак на кінцях лінійної молекули ДНК є так звані липкі кінці — одониткові ділянки по 12 нуклеотидів, комплементарні один одному. У клітині ДНК λ замикається в кільце. У такому виді вона інтегрує в геном бактерії. Принцип цієї інтеграції запропонований А. Кэмпбеллом в 1962 р.: кільце генома λ реципрокно рекомбінує з кільцем бактеріальної хромосоми. Один обмін приводить до інтеграції ДНК фага λ із ДНК бактеріальної хромосоми.



Відносини помірною бактеріофага й бактеріальної клітини

A и *Б* — літичний цикл; *В* — лізогенізація; *Г* — повна трансдукція; *Д* — абортівна трансдукція



Перенос ДНК из донорной бактериальной клетки в реципиентную в результате трансдукции фагом P1. В популяции трансдуцирующих фагов P1 можно обнаружить фаговые частицы, несущие любые участки бактериальной ДНК донорного штамма. После инфицирования фагом реципиентной клетки среди рекомбинантов посредством специальной селекции можно выделить носителей желаемого участка ДНК донорной бактерии.

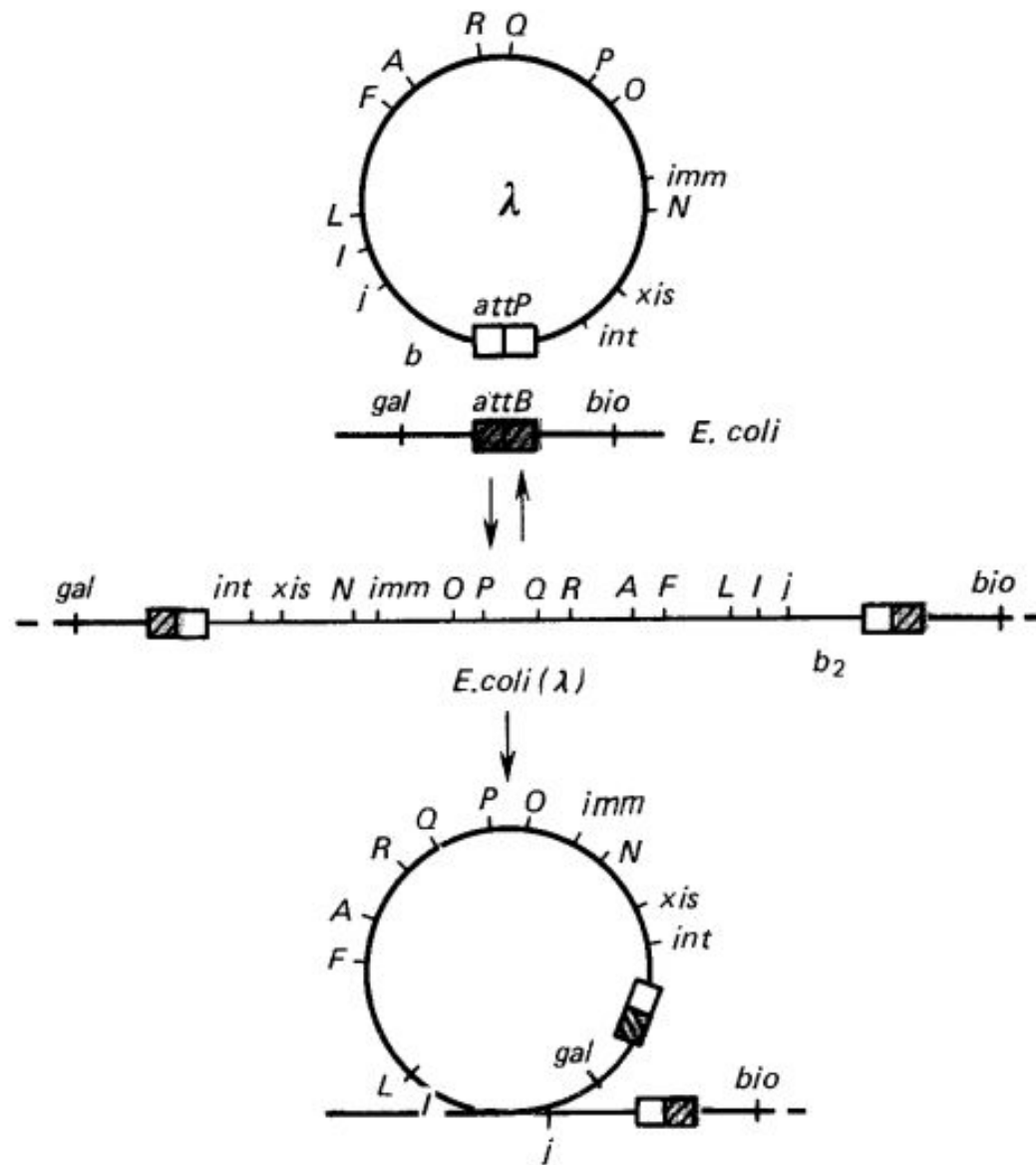
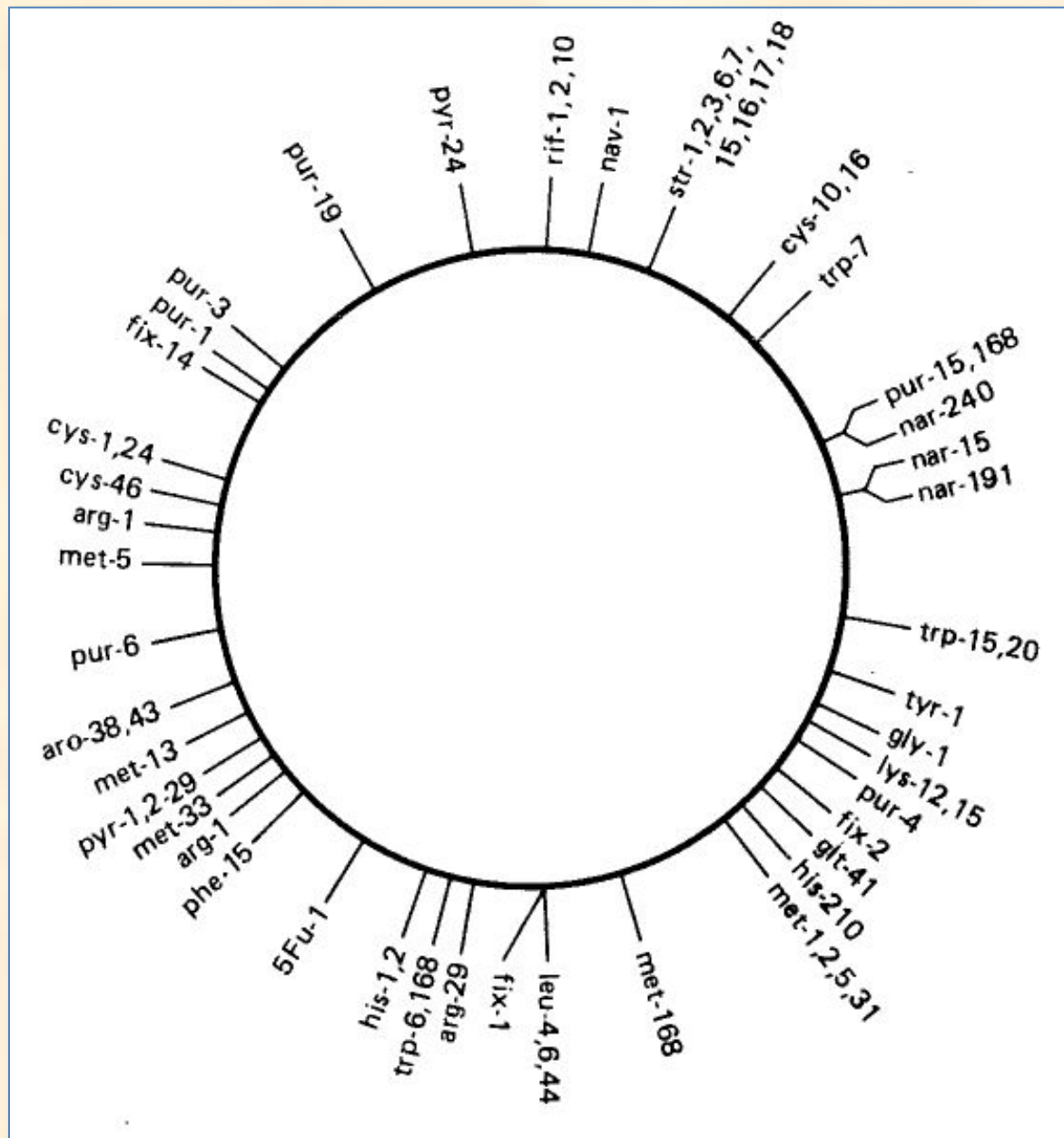


Схема інтеграції й ексцизії геному бактеріофага λ за рахунок сайт-специфічної рекомбінації із хромосомою *E. coli* і утворення трансдукучих часток

Генетичний аналіз у бактерій

При кон'югації в клітину-реципієнт переноситься звичайно менше половини бактеріального геному, і дуже рідко весь геном. При трансдукції розміри стерпного фрагмента визначаються ємністю оболонки бактеріофага, але вони не перевищують 1/100 довжини хромосоми *E. coli*, тобто складають ділянки до $3,2 * 10^4$ п. н. При трансформації фрагменти, що включаються в геном бактерій, мають порівнянну довжину: від 1,5 до $20 * 10^3$ п. н. Таким чином, «зигота» бактерій завжди є частковою зиготою або **мерозиготою**.

Конкретні завдання генетичного аналізу диктують вибір того або іншого методу введення генетичного матеріалу в клітини-реципієнти. Так, кон'югація що переривається, дозволяє встановити послідовність генів на хромосомі. Однак цей метод незручний при картуванні маркерів, які розділяють 1-2 хв карти. У цих випадках необхідно картування по трьох точкам, що проводять як на основі кон'югації, так і на основі трансдукції або трансформації. Для інтеграції лінійного фрагмента, внесеного в клітину, потрібен подвійний кросинговер з кільцевою хромосомою.



Генетична карта *Rhizobium leguminosarum*