

**Глава 5. Генетический анализ: картирование генов**

<b>5.1. Получение мутаций</b>	<b>2</b>
<b>5.2. Тест мутаций на аллелизм</b>	<b>3</b>
<b>5.3. Межаллельная комплементация</b>	<b>4</b>
<b>5.4. Определение группы сцепления</b>	<b>6</b>
<b>5.4.1. Картирование гена с помощью рецессивных маркеров</b>	<b>6</b>
<b>5.4.2. Картирование гена с помощью доминантных маркеров</b>	<b>7</b>
<b>5.5. Локализация гена в группе сцепления</b>	<b>8</b>
<b>5.5.1. Классический метод</b>	<b>8</b>
<b>5.5.2. Картирование летальных мутаций</b>	<b>10</b>
<b>5.5.3. Селективные схемы скрещивания</b>	<b>10</b>
<b>5.5.4. Соотношение кроссоверной и молекулярной карт генов</b>	<b>11</b>
<b>5.5.5. Картирование генов с помощью хромосомных перестроек</b>	<b>11</b>
<b>5.5.6. Картирование генов с помощью соматического кроссинговера</b>	<b>12</b>
<b>5.6. Метод анеуплоидных тесторов</b>	<b>13</b>
<b>5.6.1. Нуллисомия</b>	<b>13</b>
<b>5.6.2. Моносомия</b>	<b>14</b>
<b>5.7. Методы клеточной биологии</b>	<b>14</b>
<b>5.8. Локализация генов с помощью гибридизации нуклеиновых кислот <i>in situ</i></b>	<b>15</b>
<b>5.9. Генеалогический метод</b>	<b>16</b>
<b>5.10. Трансформация у бактерий</b>	<b>17</b>
<b>5.11. Трансдукция</b>	<b>24</b>
<b>5.12. Конъюгация</b>	<b>29</b>

## 5. Генетический анализ: картирование генов

Картирование генов сначала с точностью до группы сцепления, а затем уже в определенном участке хромосомы, является важнейшей частью генетического анализа.

У дрозофилы анализ проходит следующие этапы:

1. Получение мутаций, спонтанных или индуцированных.
2. Тест мутаций на аллелизм.
3. Картирование гена в группе сцепления.
4. Построение кроссоверных карт генов.
5. Картирование генов с помощью хромосомных перестроек.
6. Картирование генов с помощью гибридизации *in situ*.

Не обязательно проводить все эти этапы. Если в руках исследователя есть ДНК данного гена, то для его хромосомной локализации легче сразу провести гибридизацию *in situ*. Однако, чаще всего именно для получения ДНК гена, необходимо провести все этапы генетического анализа.

Для изучения наследования признаков у человека гибридологический анализ не применим. Его успешно заменяет генеалогический метод. Генеалогическое древо, или родословная, строится, начиная от персоны, обладающей определенным признаком.

У организмов, генетика которых развита недостаточно хорошо, картирование генов проводят с помощью методов клеточной биологии.

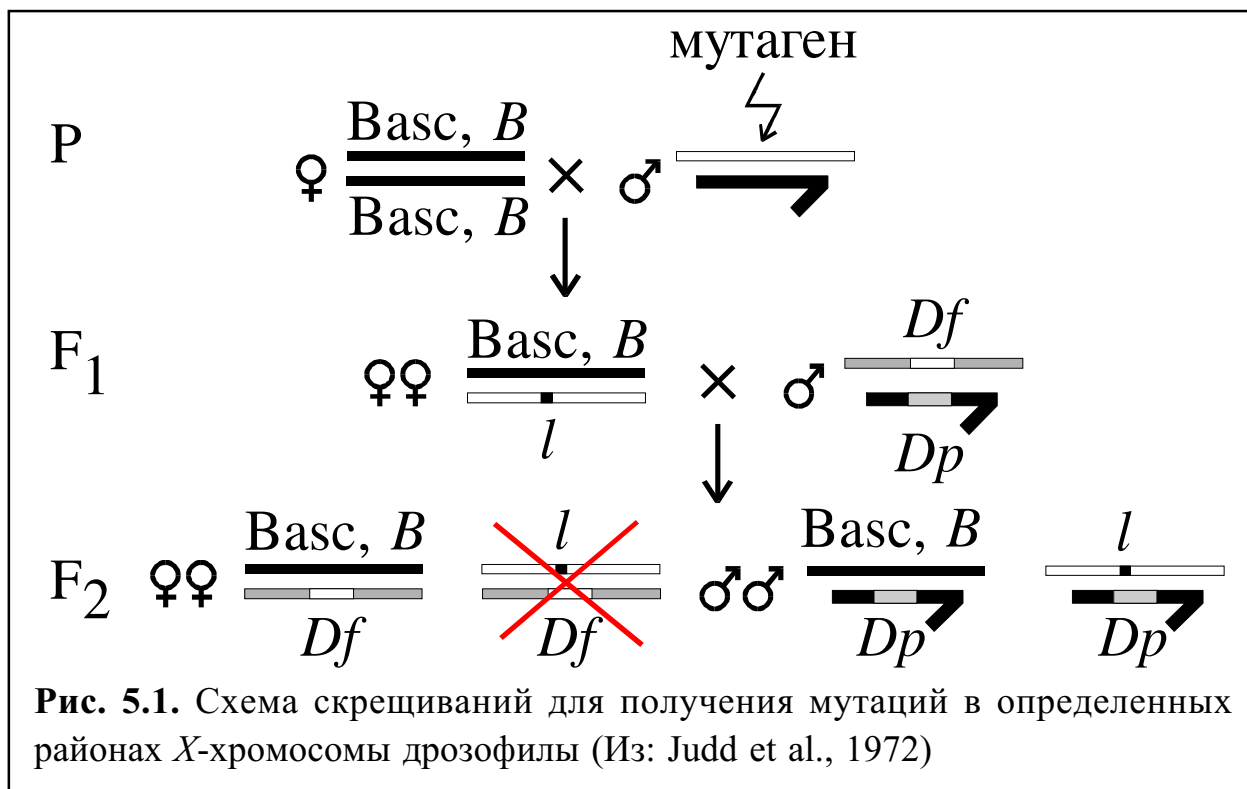
### 5.1. Получение мутаций

Спонтанно возникшие мутации выявляют, главным образом, в результате обследования диких популяций изучаемого организма.

Индукцированные мутации получают с помощью различных схем скрещиваний, в зависимости от наличия предварительных знаний о локализации гена. Если известна только локализация гена с точностью до хромосомы, то получают новые мутации, картированные в пределах этой хромосомы. У дрозофилы используют такие схемы скрещиваний как *С1В* для *X*-хромосомы или *Су L/Pm* для второй хромосомы (см. раздел 4.2.1.). Известны и другие схемы.

Если предварительно известно не только в какой хромосоме, но и в каком ее районе расположен ген, существуют специальные схемы скрещиваний, позволяющие буквально “насытить” мутациями этот район хромосомы. Такой подход успешно применили американские ученые Б. Джадд и его сотрудники в 1972 году (рис. 5.1.).

Самок, гетерозиготных по балансерной линии *Вasc*, несущей доминантную мутацию *Var (V)*, скрещивают с обработанными мутагеном самцами. В потомстве отбирают самок, несущих хромосому *Вasc* и мутагенизированную хромосому, и скрещивают их индивидуально с самцами, имеющими делецию в *X*-хромосоме и дупликацию *X*-хромосомного материала в *Y*-хромосоме. Наличие дупликации в *Y*-хромосоме, “перекрывающей” нехватку генов в *X*-хромосоме, позволяет этим самцам выжить.



**Рис. 5.1.** Схема скрещиваний для получения мутаций в определенных районах X-хромосомы дрозофилы (Из: Judd et al., 1972)

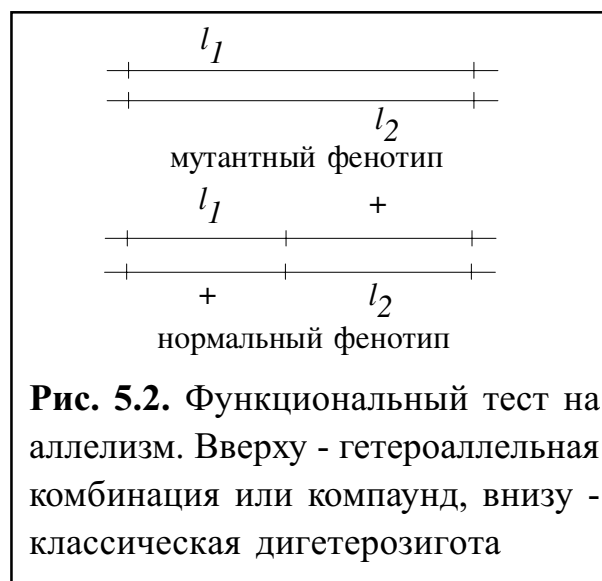
В F<sub>2</sub> в каждой индивидуальной пробирке анализируют расщепление среди самок. Если в мутагенизированной X-хромосоме возникла летальная мутация в участке, удаляемом делецией, то самки Bar<sup>+</sup> гибнут. В то же время самцы Bar<sup>+</sup> являются носителями этой летали.

В последние годы мутации у дрозофилы индуцируют с помощью мобильного элемента генома (P-элемента). Наличие мутаций, индуцированных таким образом, позволяет выделить и клонировать ДНК данного гена (см. раздел 7.5.4.).

### 5.2. Тест мутаций на аллелизм

В результате мутагенизации, как правило, получают большое число мутаций. Для того, чтобы определить сколько и каких генов они затрагивают проверяют все мутации в гетерозиготе во всех парных сочетаниях с целью установить, нарушают мутации одну и ту

же функцию или разные. Согласно этому функциональному критерию, если не поврежденные мутациями участки генов взаимодействуют комплементарно и образуется гибрид дикого типа, то мутации затрагивают разные гены. Если же у гибрида получается мутантный фенотип, это означает, что обе мутации затрагивают один и тот же ген (рис. 5.2.).



**Рис. 5.2.** Функциональный тест на аллелизм. Вверху - гетероаллельная комбинация или компаунд, внизу - классическая дигетерозигота

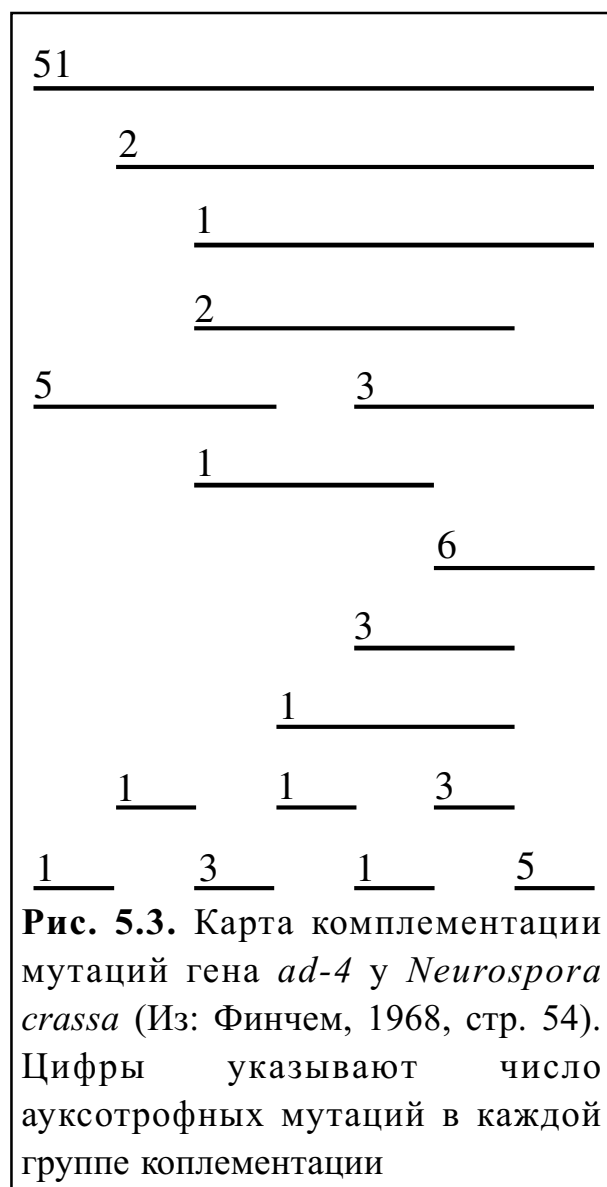
### 5.3. Межаллельная комплементация

Это такая ситуация, когда два мутантных аллеля совместно способны обеспечить образование нормально функционирующего фермента, а в отдельности ни один из них это сделать не в состоянии. Как находят факты межаллельной комплементации?

В генетических экспериментах очень часто выделяют ряд мутаций, имеющих, по крайней мере, на первый взгляд, сходное фенотипическое выражение, локализующихся в одном и том же небольшом генетическом сегменте и не дающих комплементации при проверке на аллелизм. Такие мутации приписывают одному и тому же гену. Затем индуцируют все новые и новые мутации такого же типа и, когда их число становится достаточно большим, выясняется, что хотя почти все они по-прежнему некомплементарны, в некоторых комбинациях можно обнаружить комплементарность. Явление это широко распространено (Финчем, 1968). Часто бывает так, что наряду с классами мутаций, комплементарных между собой в любых парных сочетаниях, существуют и другие мутации, не комплементарные мутациям двух или более комплементарных классов (перекрывающиеся с ними на комплементарных картах), а также мутации (они обычно составляют абсолютное большинство), перекрывающиеся со всеми остальными. Комплементационные взаимоотношения всей совокупности мутантов можно представить в виде схемы, или комплементационной карты, которая

очень часто, хотя и не всегда, бывает линейной. В основу построения комплементационной карты положен следующий принцип: все взаимно комплементарные мутации изображаются в виде неперекрывающихся линий, а все некомплементарные - в виде перекрывающихся (рис. 5.3.). Группа мутаций, обнаруживающих одинаковые комплементационные отношения со всеми другими мутациями, называется *группой комплементации*.

Предпосылками межаллельной комплементации являются независимое действие аллелей и наличие гибридного

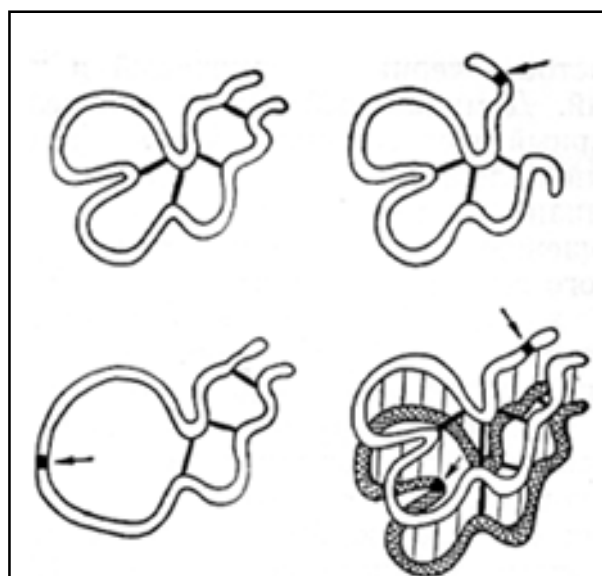


белка - продукта данного гена. Согласно гипотезе Кэтчсайда и Овертона (см. Финчем, 1968, стр. 93) среди продуктов гена существует два типа полипептидных цепей. Предполагается, что одной из стадий в образовании фермента является агрегация не менее двух полипептидных цепей. В некоторых случаях объединяются гетерологичные продукты. Затем, по-видимому, происходит специфическое свертывание полипептидных цепей. У каждого мутанта имеется какой-то дефект, обуславливающий не совсем правильное свертывание и, как следствие, образование белка, достаточно сильно отличающегося от нормального фермента и потому лишенного специфической активности. Одна из причин, по которым разные мутантные полипептидные цепи могут оказаться комплементарными это способность к кооперативному свертыванию в гетерологичных агрегатах (рис. 5.4.).

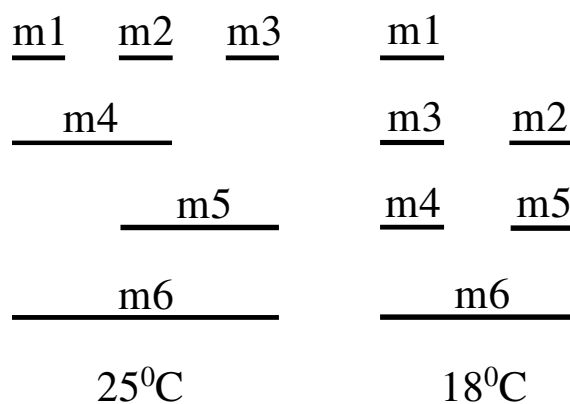
Одной из важных характеристик межallelельной комплементации является изменение карты комплементации при варьировании температуры (рис. 5.5.).

Существование межallelельной комплементации требует более тщательного анализа аллелизма мутаций. Скрещивания необходимо проводить при разных температурах: у дрозофилы это 18°C, 25°C, и 29°C.

[Дополнительный сведения см. учебники Инге-Вечтомова, 1989 и Алиханян с соавт. 1985, стр. 225].



**Рис. 5.4.** Схема комплементации двух полипептидных цепей молекулы белка, состоящей из двух одинаковых цепей (из: Гершензон, 1983, стр. 399). 1 - нормальная конфигурация цепи; 2 и 3 - обе цепи имеют по-разному искаженную конфигурацию вследствие двух мутаций; 4 - при сборке молекулы белка цепи взаимно исправляют свою конфигурацию и молекула оказывается функционально нормальной



**Рис. 5.5.** Карты комплементации при разных температурах

## 5.4. Определение группы сцепления

(см. более подробно: Тихомирова, 1990).

Если признак передаётся только от отца к сыну, то весьма очевидно, что данный ген картирован в *Y*-хромосоме. Например, у человека встречается такой признак, как волосатые уши. Он бывает только у мужчин и передается по мужской линии. Ген картирован в *Y*-хромосоме.

Многочисленные “сцепленные с полом” гены локализованы в *X*-хромосоме. Характер их наследования отличается от всех других: 1. Реципрокные скрещивания дают разные результаты. 2. В одном направлении скрещивания потомки  $F_1$  единообразны, в другом - наблюдается расщепление, причем дочери похожи на отца, а сыновья на мать (наследование крест-накрест, или крисс-кросс). К числу таких признаков относятся среди прочих гемофилия и дальтонизм у человека.

Для локализации гена в аутосоме используют тесторные линии. Существует, по крайней мере два таких метода: одномоментный и последовательный. Одномоментным называют метод скрещивания анализируемой особи с линией - тестором, в которой все хромосомы маркированы. В этом случае картируемый ген обязательно окажется сцепленным с каким-то маркером.

Последовательный метод состоит в том, что анализируемую особь последовательно скрещивают с линиями - тесторами, маркированными только по одной или нескольким хромосомам.

### 5.4.1. Картирование гена с помощью рецессивных маркеров

В качестве линии-тестора можно взять линию, в которой маркированы все хромосомы дрозофилы, кроме половой: мутация *black* (*b*, черное тело) - во второй хромосоме, мутация *pink* (*p*, розовые глаза) - в третьей хромосоме и *bent* (*bt*, изогнутые крылья) - в четвертой хромосоме.

Если в реципрокных скрещиваниях  $F_1$  и  $F_2$  получены разные результаты, то картируемая мутация **r** находится в *X*-хромосоме, если результаты одинаковые - значит в аутосоме.

Теперь надо проанализировать расщепление в  $F_1$  и  $F_2$  по отдельным парам признаков, прежде всего убедиться в том, что новый признак **r** действительно обусловлен рецессивным аллелем и дает расщепление 3:1. Затем нужно провести попарный анализ. Если новый признак и признак линии-тестора детерминируется генами, локализованными в разных группах сцепления, расщепление будет 9:3:3:1.

Однако, при анализе одной пары признаков расщепление в  $F_2$  обязательно будет 2:1:1:0, т.к. в рассматриваемом случае гены находятся в транс-положении:

$$\frac{r}{+} \frac{+}{b} \quad \text{ИЛИ} \quad \frac{r}{+} \frac{+}{p}$$

Этот факт укажет на то, что **r** локализован в той паре хромосом, в которой расположен ген, дающий расщепление 2:1:1:0.

**5.4.2. Картирование гена с помощью доминантных маркеров**

В этом методе, предложенном К. Бриджесом, используются доминантные маркеры: *S* - Star (звездчатые глаза, гомозиготы летальны), локализованный во второй хромосоме, и ген *D* (Dichaete, растопыренные крылья, гомозиготы летальны, см. рис. 4.1.В). Хромосомы 4 и *X* в данной схеме не метятся. Если реципрокные скрещивания дают одинаковые результаты, следует считать, что ген **Г** локализован в аутосоме. Теперь нужно решить, в какой именно. Ставится следующее скрещивание (рис. 5.6.а).

Из этих потомков отбирают только тех особей, которые имеют признаки *S* и *D* (самцов, т.к. у них подавлен кроссинговер). Ставится анализирующее скрещивание (рис. 5.6.б).

1. Если мутация **Г** локализована в хромосоме 2, то она проявится у мух с признаком *D* или у мух без маркерных признаков и не проявится у мух с *S* и *D*, а также с *S*-признаками.
2. Если мутация **Г** локализована в хромосоме 3, то она проявится у мух с признаком *S* и у мух без маркерных признаков, но не проявится у мух с *S* и *D*, а также с *D*-признаками.
3. Если мутация **Г** локализована в хромосоме 4, то она проявится у половины мух с признаками *S* и *D*, у половины мух с признаком *S*, у половины мух с признаком *D*, и у половины мух без маркеров.

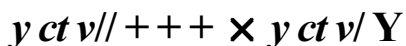


**Рис. 5.6.** Схема картирования гена с помощью доминантных маркеров (Из: Тихомирова, 1990, стр. 157-158)

## 5.5. Локализация гена в группе сцепления

### 5.5.1. Классический метод

Допустим, нужно прокартировать мутацию, определяющую у дрозофилы желтый цвет тела - *yellow* (*y*). Для локализации *y*, эту линию нужно скрестить с тесторной, несущей как минимум два маркерных гена: *ct* - вырезки на крыльях и *v* - алые глаза, поскольку вместе с *y* их будет 3 в одной хромосоме. Это как раз тот минимум, который необходим для точной локализации гена.



В результате скрещивания получены следующие классы потомков:

некроссоверы:

$y\ ct\ v//\ y\ ct\ v$	3200	69%
$y\ ct\ v//\ +\ +\ +$	3050	

кроссоверы:

$+ +\ v//\ y\ ct\ v$	540	11%
$y\ ct\ +//\ y\ ct\ v$	451	

$+ ct\ +//\ y\ ct\ v$	90	2%
$y\ +\ v//\ y\ ct\ v$	101	

$+ ct\ v//\ y\ ct\ v$	830	18%
$y\ +\ +//\ y\ ct\ v$	800	

всего 9062 - 100%. Получаются следующие расстояния между генами:

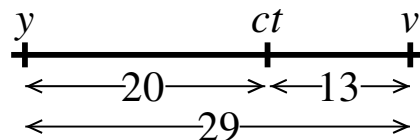
$$y - v = 11 + 18 = 29\%$$

$$v - ct = 2 + 11 = 13\%$$

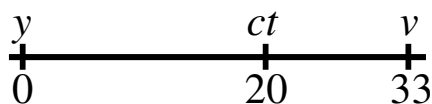
$$y - ct = 2 + 18 = 20\%$$

Теперь в произвольной точке прямой линии нужно поместить ген *y*, на

расстоянии 29 морганид от него - ген *v*, ген *ct* отстоит от *v* на 13% либо влево, либо вправо. Для решения этого вопроса надо определить расстояние между генами *y* и *ct*, оно равно 20%, следовательно, единственно возможное решение: ген *ct* находится слева от гена *v*:



Если учесть двойных кроссоверов между *y* и *v* (а число их нужно умножить на 2), то получится  $2 \times 2 = 4$ , а общее расстояние между ними - 33 морганиды. Этому значению равна сумма расстояний *y* - *ct* и *ct* - *v*. Ген *y* расположен на конце X-хромосомы, он находится в положении 0, ген *ct* - на 20 единиц правее, а ген *v* - на 13 единиц правее гена *ct*, что позволяет путем суммирования определить положение *v* на 33 морганиде.



Таким образом, Стертевант пришёл к выводу, что расстояние между двумя генами (**rf**) равно сумме или разности расстояний между ними и любым третьим геном, расположенным в той же группе сцепления (закон аддитивности):  $rf_{ac} = rf_{ab} + rf_{bc}$ . Закон аддитивности показывает, что **rf** есть линейная функция расстояния. Стертевант не проводил различий между частотой появления рекомбинантов в анализирующем скрещивании (**rf**) и частотой собственно кроссинговера. Однако, эти величины совпадают лишь в том случае, если обе составляющие ( $rf_{ab}$  и  $rf_{bc}$ ) не превышают десятка единиц



**Дополнение 5.1.**

Идея построения генетических карт по результатам рекомбинационного анализа принадлежит А. Стертеванту. Вот что он пишет в своих воспоминаниях. “В 1909 году Каствл (Castle) опубликовал диаграммы, показывающие взаимоотношение между генами, определяющими окраску кролика... Они были восприняты как попытка выявить пространственные взаимоотношения в ядре. В конце 1911 года в разговоре с Морганом об этой попытке... я внезапно понял, что вариации в силе сцепления, уже приписанные Морганом различиям в пространственном расположении генов, открывают возможность определения последовательности в линейном измерении хромосомы. Ночью я сделал первую карту” (Sturtevant, 1965, p. 305, из Кушев, 1971, стр. 14).

(морганид). На более длинных участках хромосом экспериментально определяемое значение  $rf_{ac}$  оказывается всегда меньше “теоретически ожидаемого” ( $rf_{ab} + rf_{bc}$ ). Основываясь на законе аддитивности, расстояние  $rf_{ay}$  можно определить двумя способами - непосредственно измерив его в соответствующем скрещивании ( $a \times y$ ), или суммировав значения  $rf$ , определяемые на небольших интервалах между данной парой генов  $a$  и  $y$  при наличии промежуточных маркеров  $b, c, \dots x$ . Понятно, что при таком последовательном суммировании даже небольших расстояний мы можем получить значения общей длины карты данной хромосомы (если  $a$  и  $y$  расположены на её концах) в сотни и тысячи

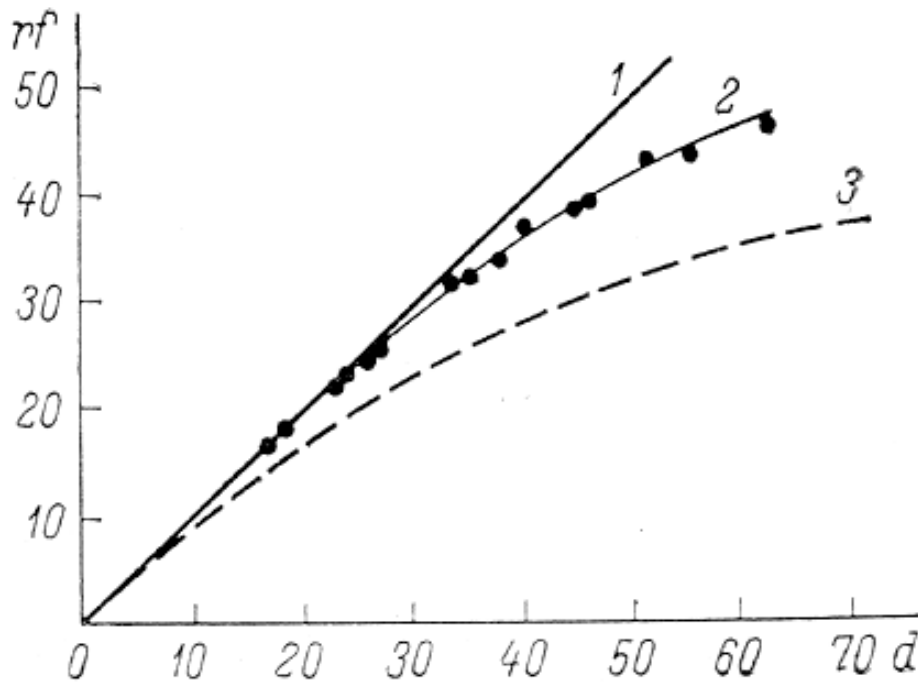
морганид. В то же время частота рекомбинации между  $a$  и  $y$  не может превышать 50% - значения, наблюдаемого при независимом наследовании признаков. Отступления от аддитивности на больших расстояниях Стертевант приписал наличию двойных кроссинговеров. Второй кроссинговер между  $a$  и  $c$  ликвидирует последствия первого: рекомбинанты по  $a$  и  $c$  не появляются, хотя рекомбинация имела место (см. раздел 3.2.3.). Если интервал между генами достаточно длинный, то число четных обменов равно числу нечетных, и наступает рекомбинационное равновесие ( $rf = 50\%$ ). Таким образом на длинных отрезках хромосомы вероятность рекомбинации не является более мерой генетического расстояния (Из: Кушев, 1971, стр. 14-17).

При картировании генов, расположенных далеко друг от друга, выделяют два понятия: расстояние на карте ( $d$ ) и частоту рекомбинации ( $rf$ ). Расстояние подсчитывается на основании определения суммарной частоты кроссоверов, частота рекомбинации учитывает только тех кроссоверов, которые выявляются по обмену маркеров.

Часто взаимоотношения между расстоянием ( $d$ ) и частотой рекомбинаций ( $rf$ ) выражается *картирующей функцией* (Рис. 5.7).

Картирующая функция, предложенная Холдейном (J.V.S. Haldane), выражается формулой

$rf = \frac{1}{2}(1 - e^{-2d})$  или  $d = -\frac{1}{2} \ln(1 - 2rf)$ , где  $e$  - основание натуральных логарифмов  $d$  - расстояние на карте  $rf$  - частота рекомбинации маркеров



**Рис. 5.7.** Картирующие функции (Из: Кушев, 1971, стр. 17). По оси абсцисс:  $d$  (в %), по оси ординат  $rf$  (в %). **1** - кривая, описываемая функцией Стертеванта ( $rf = d$ ); **2** - эмпирическая кривая (Mather, 1938), построенная по точкам, ордината каждой из которых представляет собой частоту рекомбинации для данной пары мутантов, а абсцисса - сумму частот рекомбинаций для небольших последовательных интервалов ( $d$ ) между данной парой маркеров; **3** - кривая, описываемая функцией Холдейна

Функция Холдейна показывает, что по мере увеличения расстояния,  $rf$  ассимптотически приближается к 0.5. Значения  $rf$  и  $d$  практически совпадают лишь на отрезке кривой до  $rf = 0,1$  (Из: Кушев, 1971, стр. 17).

В настоящее время кроссоверные генетические карты составлены для очень многих организмов (см. справочники: Захаров, 1979; O'Brien, 1982; Lindsley, Zimm, 1992).

### 5.5.2. Картирование летальных мутаций

(не читал)

(см. Тихомирова, 1990, стр. 181-183).

### 5.5.3. Селективные схемы скрещивания

В некоторых случаях особенности организации гена, участка хромосомы или самой хромосомы позволяют составить схемы скрещиваний, позволяющие анализировать огромные выборки потомков, в результате чего появляется возможность картировать мутации на очень коротких расстояниях и даже внутри гена. Известны схемы, позволяющие надежно картировать взаимное расположение генов, лежащих рядом, и расстояние между ними, например, картирование леталей, локализованных очень близко друг к другу

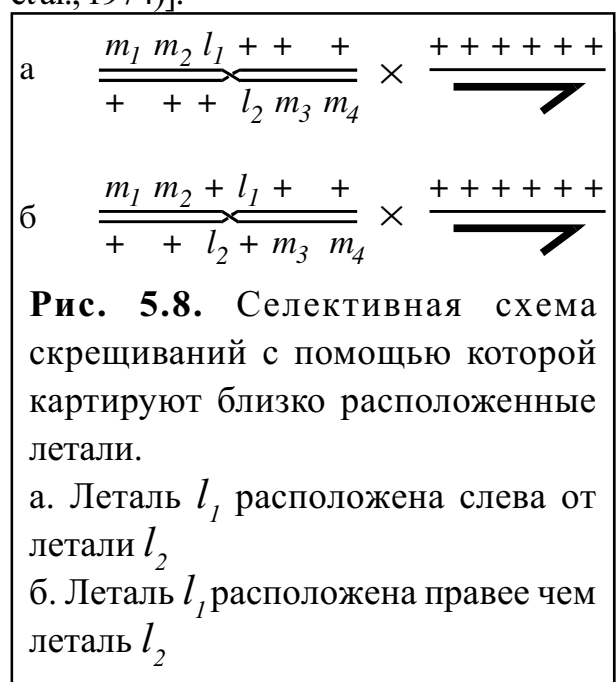
в X-хромосоме дрозофилы. В этом случае летали ( $l_1-l_2$ ) маркируются рецессивными видимыми мутациями, часть которых расположена дистальнее ( $m_1, m_2$ ) или проксимальнее ( $m_3, m_4$ ) леталей (рис. 5.8).

Получают самок, гетерозиготных по этим леталям, их скрещивают с любым самцом и анализируют потомство: подсчитывают число самок, а самцы-некроссоверы все гибнут, т.к. обе X-хромосомы у самки-матери несут летали. Выживают только кроссоверы + + + + + +, т.е. если кроссинговер произошел между летальями и эти летали расположены в том порядке, в котором они расположены на выше приведенной схеме (рис. 5.8.а). Если  $l_2$  расположена левее чем  $l_1$ , выживают кроссоверы

$m_1 m_2 + + m_3 m_4$  (рис. 5.8.б).

Расстояние между летальями определяется как отношение удвоенного числа выживших самцов к числу самок в потомстве (по: Lefevre, 1971; Zhimulev et al., 1981).

[Картирование в локусе *rosy* (??? Chovnick et al., 1974)].



### 5.5.4. Соотношение кроссоверной и молекулярной карт генов

Учитывая то, что на частоту кроссинговера влияют разнообразные факторы, всегда остается ощущение того, что кроссоверные расстояния относительно и они не имеют соответствия каким-то реальным физическим единицам, например числу нуклеотидов ДНК. Обычно, чтобы получить данные о соотношении между единицей кроссинговера и числом нуклеотидов в ДНК, значение размера генома делят на общую длину кроссоверной карты (Табл. 5.1).

Данные таблицы 5.1 позволяют сделать следующие заключения: 1. Частота генетической рекомбинации значительно выше у прокариот и низших эукариот, чем у эукариот. Так, дрожжи имеют кроссоверную карту размером 4200 единиц, в то время, как дрозофила или нематода (представитель круглых червей) - 280 и 320, соответственно. 2. Как следствие, у прокариот число нуклеотидов на единицу карты значительно ниже, чем у эукариот.

### 5.5.5. Картирование генов с помощью хромосомных перестроек

Мутации лучше всего картировать, используя наборы делеций и дупликаций. Картирование гена с помощью делеций изображено на Рис. 4.9.-4.11. С помощью транслокаций (изменяется сцепленность наследования) можно определять группы сцепления (см. раздел 4.3.4.).

**Табл. 5.1.** Соотношение кроссоверных и молекулярных карт (Из: Lewin, 1994, стр. 128)

Виды	Размер генома в парах нуклеотидов (а)	Число кроссоверных единиц карты в геноме (б)	Размер кроссоверной единицы в парах нуклеотидов (а/б)
Фаг Т4	$1.6 \times 10^5$	800	200
<i>E. coli</i>	$4.2 \times 10^6$	1750	2400
Дрожжи	$2.0 \times 10^7$	4200	5000
Грибы	$2.7 \times 10^7$	1000	27000
Нематоды	$8.0 \times 10^7$	320	250000
Дрозофила	$1.4 \times 10^8$	280	500000
Мышь	$3.0 \times 10^9$	1700	1800000
Человек (муж.)	$3.3 \times 10^9$	2809	1200000
Человек (жен.)	$3.3 \times 10^9$	4782	700000

### 5.5.6. Картирование генов с помощью соматического кроссинговера

Порядок генов в хромосоме можно определить и с помощью митотического кроссинговера. Однако, расстояния получаются совершенно иные (рис. 5.9).

#### Литература к разделам 5.1. - 5.5.

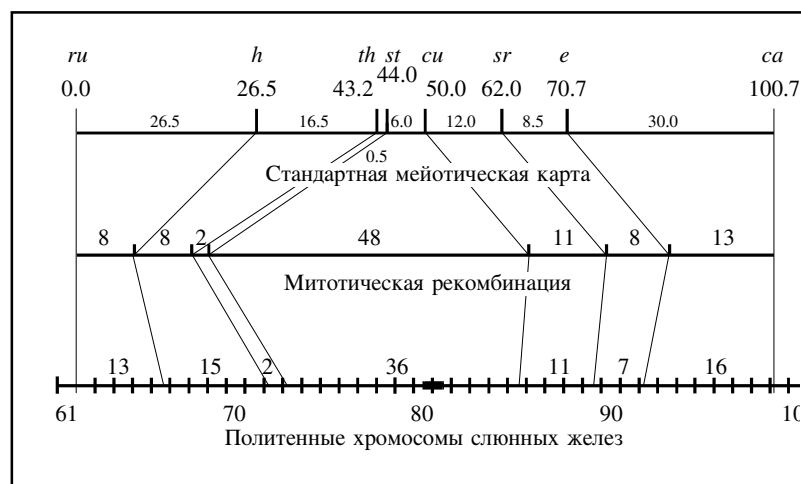
Гершензон С.М. Основы современной генетики. Киев, Наукова Думка, 1-558, 1983.

Захаров И.А. Генетические карты высших организмов. Ленинград, Наука, стр. 1-157, 1979.

Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. Москва, Высшая школа, 1-592, 1989.

Кушев В.В. Механизмы генетической рекомбинации. Ленинград, Наука, 1-247, 1971.

Лобашев М.Е. Генетика. Ленинград, Изд-во ЛГУ, 1-751, 1967.



**Рис. 5.9.** Сопоставление расстояний между генами третьей хромосомы дрозофилы, выявленных с помощью мейотического и митотического кроссинговера (из: Ashburner, 1989, p. 912)

Тихомирова М.М. Генетический анализ. Ленинград, Изд-во Ленинградского Университета, 1-280, 1990.

Финчем Дж. Генетическая комплементация. Москва, Мир, 1-183, 1968.

Ashburner M. *Drosophila*. A laboratory handbook. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press, 1-1331, 1989.

Judd B.H., Shen M.W., Kaufman T.C. The anatomy and function of a segment of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 71, 139-156, 1972.

Lefevre G. Jr. Salivary chromosome bands and the frequency of crossing over in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 67, 497-513, 1971.

Lindsley D.L., Zimm G.G. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, 1-1133, 1992.

O'Brien S. Genetic maps. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol. 2, 1-405, 1982.

Srb A.M., Owen R.D., Edgar R.S. General genetics, second edition. Freeman and Co., San Francisco and London, 1-577, 1965.

Zhimulev I.F., Pokholkova G.V., Bgatov A.V., Semeshin V.F., Belyaeva E.S. Fine cytological analysis of the band 10A1-2 and the adjoining regions in the *Drosophila melanogaster* X chromosome. II. Genetical analysis. *Chromosoma* 82, 25-40, 1981.

## 5.6. Метод анеуплоидных тесторов

(Тихомирова, 1990, стр. 161-167).

Анеуплоидные особи - это особи, геномы которых не содержат какое-то число хромосом. Если недостает двух гомологичных хромосом - такие особи называют нуллисомиками, одной гомологичной хромосомы - моносомиками. Особей с одной лишней гомологичной хромосомой называют трисомиками (см. раздел 4.4.4).

### 5.6.1. Нуллисомия

Если скрещивание линии, содержащей картируемую мутацию **r**, с тесторной линией нулли-**A** дает в  $F_1$  нормальных потомков

$$\begin{array}{l} P \quad rr \times 0_A 0_A \\ \downarrow \\ F_1 \quad \text{дикий тип} \end{array}$$

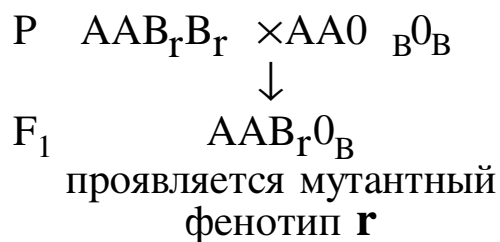
в этом случае мутация **r** не картируется в хромосоме **A** и нужно взять следующую линию-тестор, например, нулли-**B**.

$$\begin{array}{l} P \quad rr \times 0_B 0_B \\ \downarrow \\ F_1 \quad \text{мутантный фенотип r} \end{array}$$

Во втором скрещивании проявляется мутантный фенотип **r**, значит, мутация картирована в хромосоме **B**. Полностью генотипы для первого скрещивания записываются следующим образом:

$$\begin{array}{l} P \quad A A B_r B_r \times 0_A 0_A B_R B_R \\ \downarrow \\ F_1 \quad A 0_A B_R B_r \\ \text{мутация не проявляется} \end{array}$$

Для второго скрещивания:



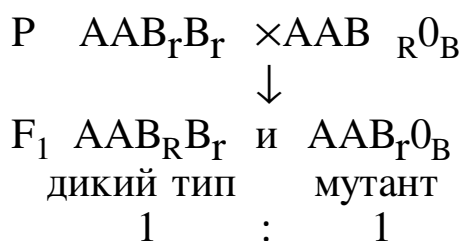
Иногда картирование производится уже в процессе создания линий нуллисомиков. Удалось показать, что ген красной окраски зерна у пшеницы располагается в 3D-хромосоме (третьей хромосомы генома D), т.к. у нуллисомика именно по этой хромосоме зерно белой окраски (см. Майстренко, 1971).

### 5.6.2. Моносомия

Ставится следующее скрещивание рецессивной мутантной формы с моносомиком:



Если мутация локализована в хромосоме B.



Результаты первого и второго скрещивания различаются очень четко, и этот метод может быть использован для локализации генов по их рецессивным мутациям.

### Литература к разделу 5.6.

Майстренко О.М. Создание серии моносомных линий у мягкой

пшеницы *Triticum aestivum* L. и их использование в генетических исследованиях. В кн. Цитогенетика пшеницы и ее гибридов. (под ред. П.М. Жуковского и В.В. Хвостовой), Москва, Наука, с. 57-93, 1971.

Тихомирова М.М. Генетический анализ. Ленинград, Издательство Ленинградского Университета, с. 1-280, 1990.

### 5.7. Методы клеточной биологии

В последнее время для картирования генов широко используют методы клеточной биологии. С 1960-х годов повсеместно используют метод получения гибридных клеток в культуре. Удалось получить гибриды клеток разнообразных животных и растений, известны гибриды соматических клеток человека и животных (мышей, китайского хомячка и др.) и даже растений. Сначала использовали вирус Сендай, добавление которого в культуру способствует увеличению частоты слияния разных клеток от 0,0001 до 5-10%. Затем стали использовать полиэтиленгликоль, после воздействия которым через 2-5 час. можно наблюдать слившиеся клетки.

После образования соматических гибридов происходит выравнивание митотического цикла, оба ядра делятся одновременно. Но постепенно начинается элиминация хромосом, причем теряются хромосомы одного

вида. Так, в гибридных клетках мыши с китайским хомячком в одних условиях могут элиминироваться хромосомы хомячка, а в других - только хромосомы мыши. Просматривая панель - серию клонов клеток, экспериментатор должен отобрать клетки, которые имеют все хромосомы одного вида и только одну хромосому другого, изучаемого, вида.

Для получения клеток, используемых в гибридизации, подбирают особей, у которых биохимические маркеры - ферменты существенно различаются.

Когда в клетке остается только одна хромосома изучаемого вида, определяют активность данного фермента или его электрофоретическую подвижность. Если эти характеристики соответствуют тем, которые были у вида-донора хромосомы, значит ген, кодирующий данный фермент, картирован в той единственной хромосоме, которая осталась в гибридной клетке от вида-донора.

Очевидно, что этот метод является разновидностью классического генетического анализа. Ограничением его является то, что картировать можно только биохимические признаки. (Из: Тихомирова, 1990, стр. 167).

### **5.8. Локализация генов с помощью гибридизации нуклеиновых кислот *in situ***

Можно экспериментальным путем денатурировать ДНК, входящую в состав хромосом на цитологическом

преparate, затем нанести на этот препарат фрагмент меченой ДНК, и произвести ренатурацию, в результате чего цепи ДНК вновь сомкнутся из-за комплементарных отношений нуклеотидов. Меченая ДНК в некоторых случаях займет место нативной цепи, в том месте молекулы ДНК или хромосомы, которое имеет гомологию с данным фрагментом. Используя этот метод очень легко можно картировать любой тип ДНК и гены. Необходимо иметь лишь меченый фрагмент ДНК, называемый зондом. Раньше использовали радиоактивную метку, чаще всего изотоп  $^3\text{H}$ , сейчас доступна нерадиоактивная метка: биотин, дигоксигенин.

Чтобы получить меченый зонд, меченый нуклеотидтрифосфат вводят в ДНК в реакции с ДНК - полимеразой или фрагментом Кленова. Затем после гибридизации в случае  $^3\text{H}$ , препарат покрывают фотоэмульсией, он экспонируется, радиоактивное излучение восстанавливает кристаллы галоидного серебра в фотоэмульсии. В результате последующего фотопроявления участок гибридизации зонда с хромосомой становится меченым черными точками восстановленного серебра, которое хорошо видно под микроскопом.

Аналогичным образом биотин-УТР включается в ДНК зонда с помощью ДНК-полимеразы или фрагмента Кленова. Биотин связывается с авидином и ферментом щелочной фосфатазой. После этого в раствор добавляют субстрат для этого

фермента. Продукты расщепления субстрата щелочной фосфатазой нерастворимы и имеют красно-коричневый цвет. Таким образом, место локализации зонда в хромосоме будет окрашено. Часто вместо конъюгата авидина и щелочной фосфатазы используют антитела на биотин, меченные флуоресцентными красками или коллоидным золотом.

Дигоксигенин - это сложное органическое соединение, связывающееся непосредственно с азотистым основанием нуклеотида. Такой “нуклеотид” вводится в ДНК зонда. На дигоксигенин вырабатываются антитела, их метят флуоресцентными красителями и наносят на препарат хромосом. Участок гибридизации зонда флуоресцирует.

### Литература к разделу 5.8.

Manual of Boehringer Mannheim, Biochemica. The DIG system user's guide for filter hybridization, 1993.

Pardue M.L. In situ hybridization to DNA of chromosomes and nuclei. In: *Drosophila - a practical approach*

(D.B. Roberts, editor), IRL Press, Oxford - Washington, 111-137, 1986.

### 5.9. Генеалогический метод

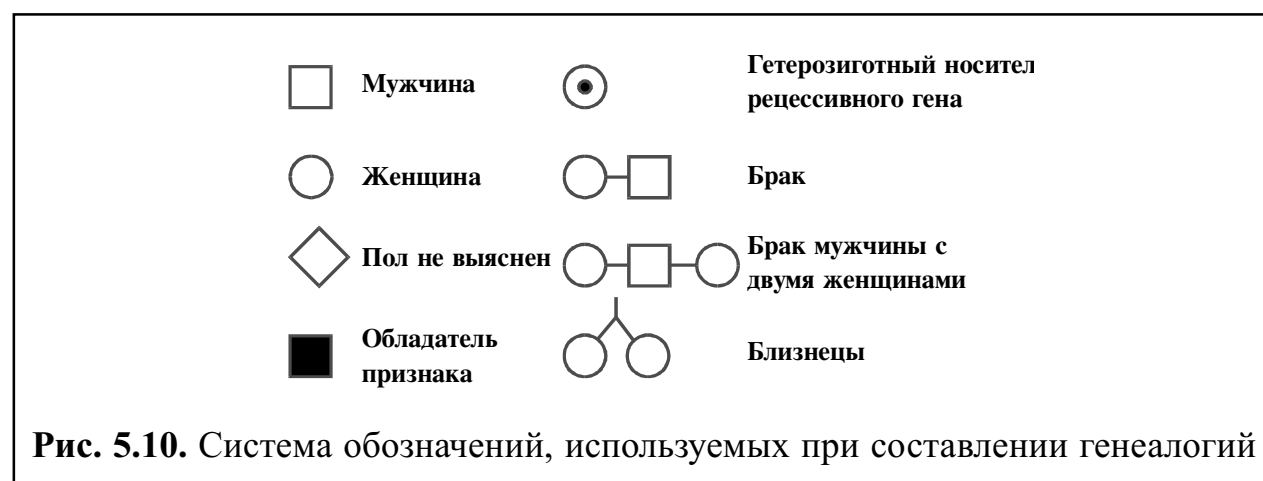
Существует система обозначений, пользуясь которой можно схематично изобразить как родственные отношения между членами семьи, так и наличие (отсутствие) у них определенного признака.

На основании анализа родословных решают наследуется признак или нет, доминантный он или нет.

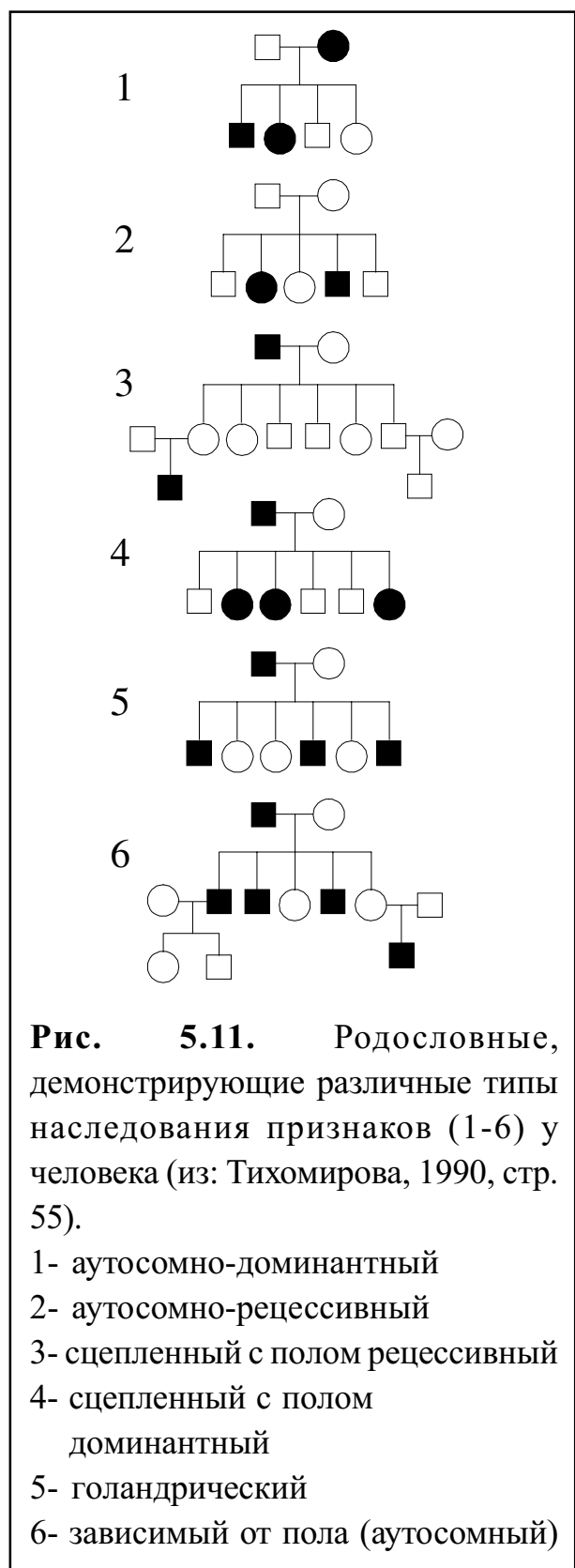
На рисунке 5.10. показаны символы, используемые при построении родословных.

Ауто сомно - доминантное наследование характеризуется тем, что изучаемый признак проявляется в каждом поколении, независимо от пола (Рис. 5.11.1); для ауто сомно-рецессивного наследования характерно проявление изучаемого признака у потомков, родители которых могут проявления этого признака не иметь (Рис. 5.11.2).

Сцепленное с полом рецессивное наследование имеет сходство с рецессивно-ауто сомным в том смысле,







что для него также характерно появление потомков с признаком, которого не было у родителей, а также так называемый “проскок поколений”,

т.е. возможность отсутствия потомков с изучаемым признаком в одном из поколений в родословной, а затем его проявление у потомков следующих поколений (Рис. 5.11.).

Голандрический тип наследования характеризуется передачей признака от отца к сыну (Из: Тихомирова, 1990, стр. 54-55) (Рис. 5.11.5).

Зависимый от пола аутосомный признак проявляется только у мужчин в последовательных поколениях, в том числе гетерозиготных, но гетерозиготная по этому признаку женщина, у которой он не проявляется, может передать его сыну (Рис. 5.11.6).

На Рис. 5.12. показана родословная передачи гемофилии в королевских и царских семьях Европы.

### **Литература к разделу 5.9.**

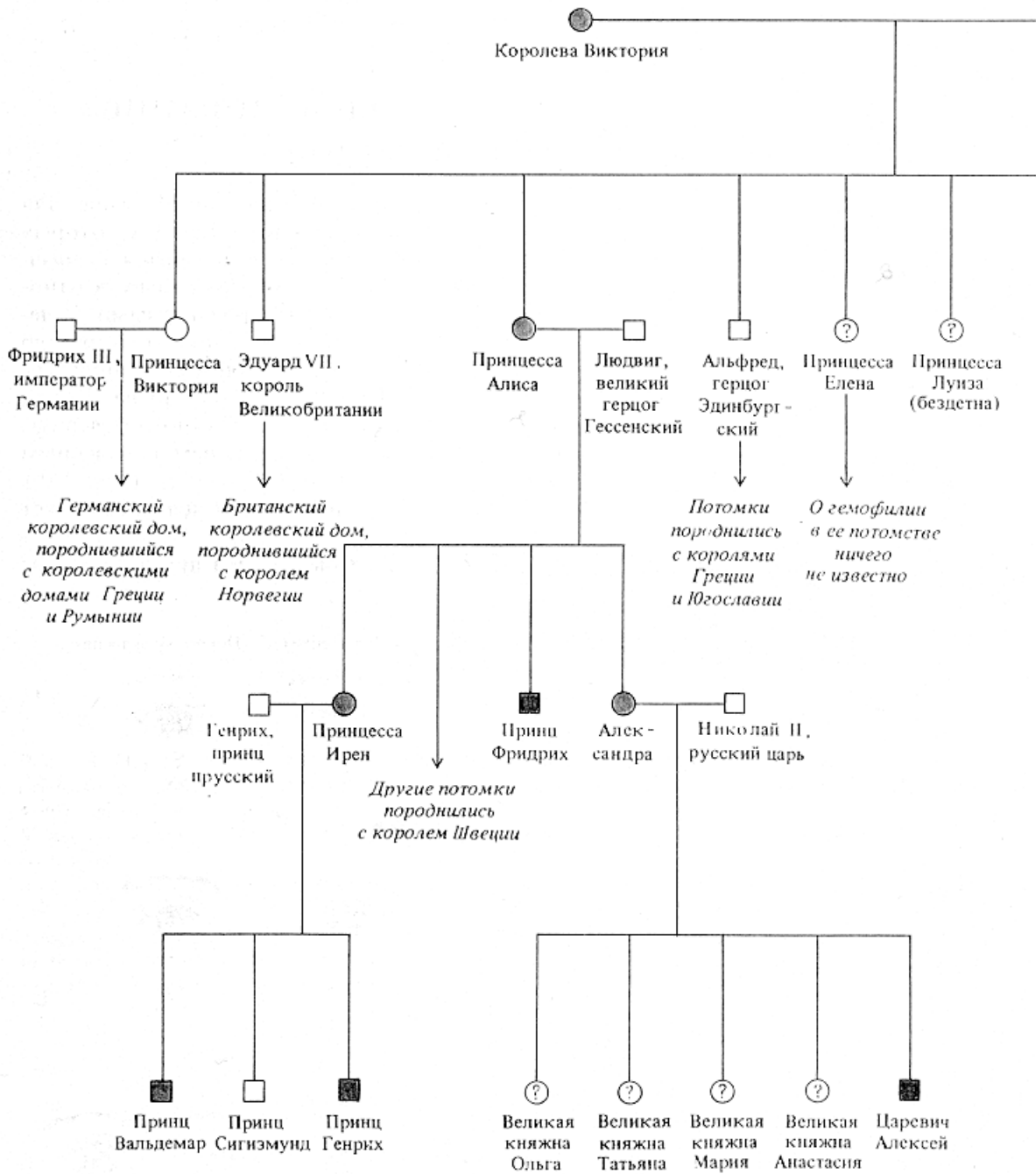
Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. т. 1, Москва, Мир, 1-295, 1988

Гершензон С.М. Основы современной генетики. Киев, Наукова Думка, 1-558, 1983

Тихомирова М.М. Генетический анализ. Ленинград, Изд-во Ленинградского Университета, 1-280, 1990

### **5.10. Трансформация у бактерий**

Трансформация - это перенос генетического материала от одного организма другому. Посредством генетической рекомбинации часть трансформирующей молекулы ДНК может обмениваться с частью хромосомной ДНК донора.



**Рис. 5.12.** Часть родословной по наследованию гемофилии в королевских и царских семьях Европы (Из: Айала, Кайгер, 1987, стр. 76)

Трансформацию используют также в экспериментах для определения порядка генов, расстояний между ними в молекуле ДНК и построения генетических карт.

Известно, что бактерия *Pneumococcus pneumoniae* имеет несколько форм. Вирулентность бактерии определяется наличием мукополисахаридной капсулы, расположенной на поверхности клетки.

Эта капсула защищает бактерию от воздействий со стороны организма-хозяина. В результате, размножившиеся бактерии убивают зараженное животное. Бактерии этого штамма (S-штамм) образуют гладкие колонии. Авирулентные формы бактерий не имеют защитной капсулы и образуют шероховатые колонии (R-штамм). Микробиолог Фредерик Гриффитс в 1928 году инъецировал мышам живого

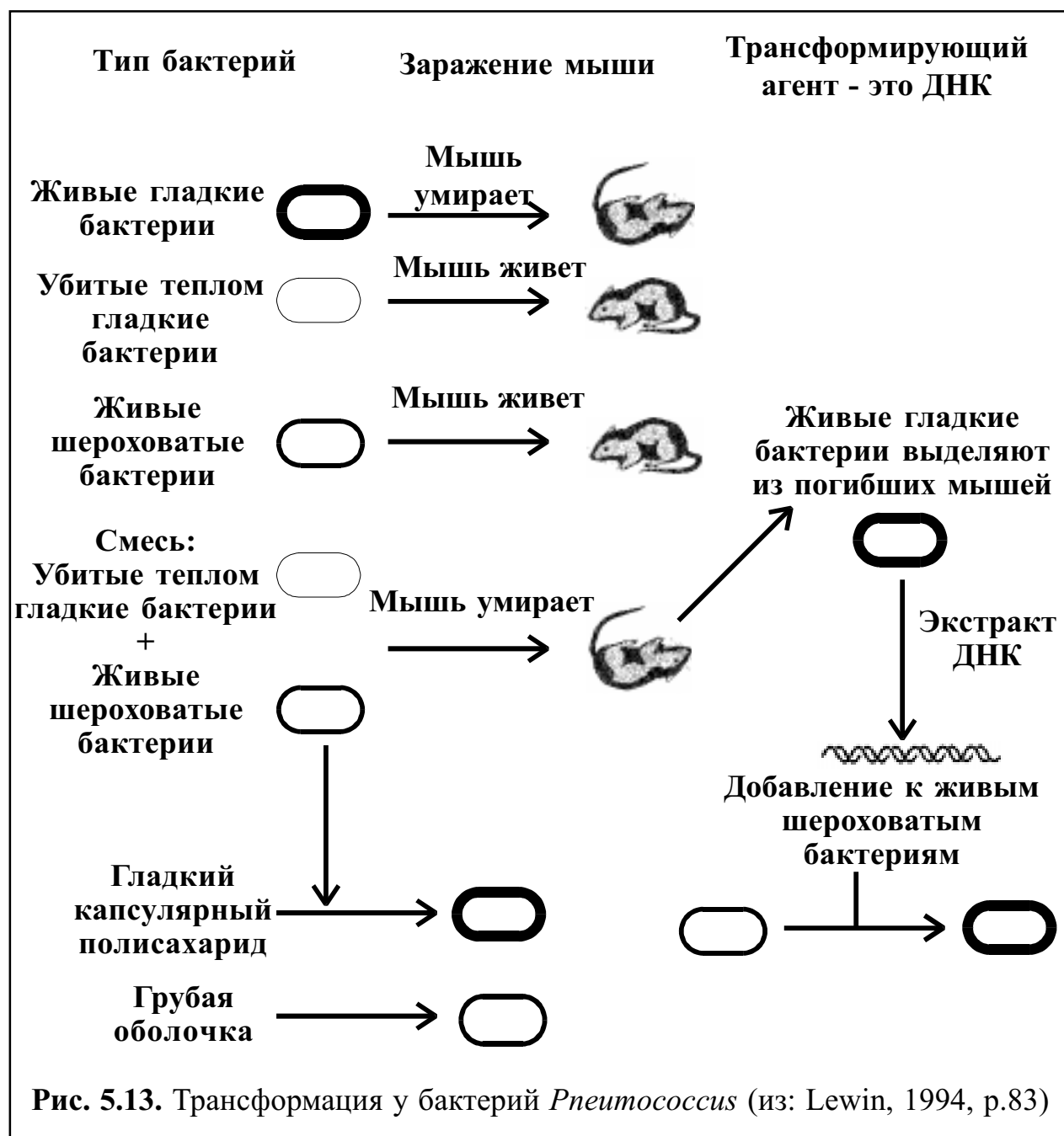


Рис. 5.13. Трансформация у бактерий *Pneumococcus* (из: Lewin, 1994, p.83)

пневмококка R-штамма вместе с S-штаммом, убитым высокой температурой (65°C) (рис. 5.13.). Спустя некоторое время ему удалось выделить из заражённых мышей живых пневмококков, обладающих капсулой. Таким образом, оказалось, что свойство убитого пневмококка - способность образовывать капсулу - перешло к живой бактерии, т.е. произошла трансформация. Поскольку признак наличия капсулы является наследственным, то следовало предположить, что какая-то часть наследственного вещества от бактерий штамма S перешла к клеткам штамма R (Из: Лобашев, 1967, стр. 430-433).

В 1944 году О.Т. Эвери, К.М. Маклеод и М. Маккарти (О.Т. Avery, С.М. MacLeod, М. McCarty) показали, что такое же превращение типов пневмококков может происходить в пробирке, т.е. *in vitro*. Эти исследователи установили существование особой субстанции - “трансформирующего принципа”, - экстракта из клеток штамма S, обогащенного ДНК. Как далее выяснилось, ДНК, выделенная из клеток S-штамма и добавленная в культуру R-штамма, трансформировала часть клеток в S-форму. Клетки стойко передавали это свойство при дальнейшем размножении. Обработка “трансформирующего фактора” ДНК-азой, ферментом разрушающим ДНК, блокировала трансформацию.

Эти данные впервые показали, что именно ДНК, а не белок, как полагали до тех пор, является наследственным материалом.

Явление трансформации используют также для построения генетических карт у бактерий. При трансформации одна бактерия (реципиент) поглощает изолированную ДНК другой бактерии (донора). Весь процесс можно разделить на несколько стадий:

1. Обратимое присоединение молекул двухцепочечной донорной ДНК к рецепторным сайтам на поверхности клетки реципиента - на этой стадии ДНК донора чувствительна к разрушению ДНК-азой.

2. Необратимое поглощение ДНК донора - эта стадия и все последующие уже нечувствительны к обработке ДНК-азой.

3. Превращение двухцепочечной ДНК донора в одноцепочечные фрагменты под действием клеточных нуклеаз.

4. Ковалентное присоединение одноцепочечной ДНК донора к хромосоме реципиента.

5. Сегрегация и фенотипическая экспрессия интегрированного гена донора в трансформированной клетке (Из: Алиханян и др. 1985, стр. 281-282).

Важным условием способности клетки к трансформации является развитие у нее особого физиологического состояния, называемого компетентностью. Компетентные клетки несут на поверхности новый антиген, называемый фактором компетентности. При добавлении факторов компетентности в культуру бактериальных клеток изменяются

клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана. Стенка становится более пористой. Дополнительные впячивания мембраны внутрь клеток обеспечивают приближение присоединенного к ней нуклеоида к клеточной поверхности, что облегчает взаимодействие между донорной и реципиентной ДНК. Условиями, существенными для присоединения ДНК к компетентным клеткам, является ее размеры (молекулярная масса не менее  $3 \times 10^5$ ) и интактность двухцепочечной структуры. По этим причинам ДНК, разрушенная ДНКазой не обладает трансформирующей активностью.

Увеличить компетентность можно обработкой некоторыми химическими агентами или воздействием сильным электрическим полем (электропорация).

Процесс переноса ДНК схематически показан на Рис. 5.14.

Первые три стадии трансформации - присоединение ДНК, ее поглощение и деградация одной цепи - осуществляются с равной эффективностью независимо от ее гомологии с ДНК реципиента. Однако, процесс интеграции (или рекомбинации) ДНК специфичен в отношении гомологичной ДНК и с негомологичной ДНК происходит с очень низкой частотой (Из Алиханян и др., 1985, стр. 282-283).

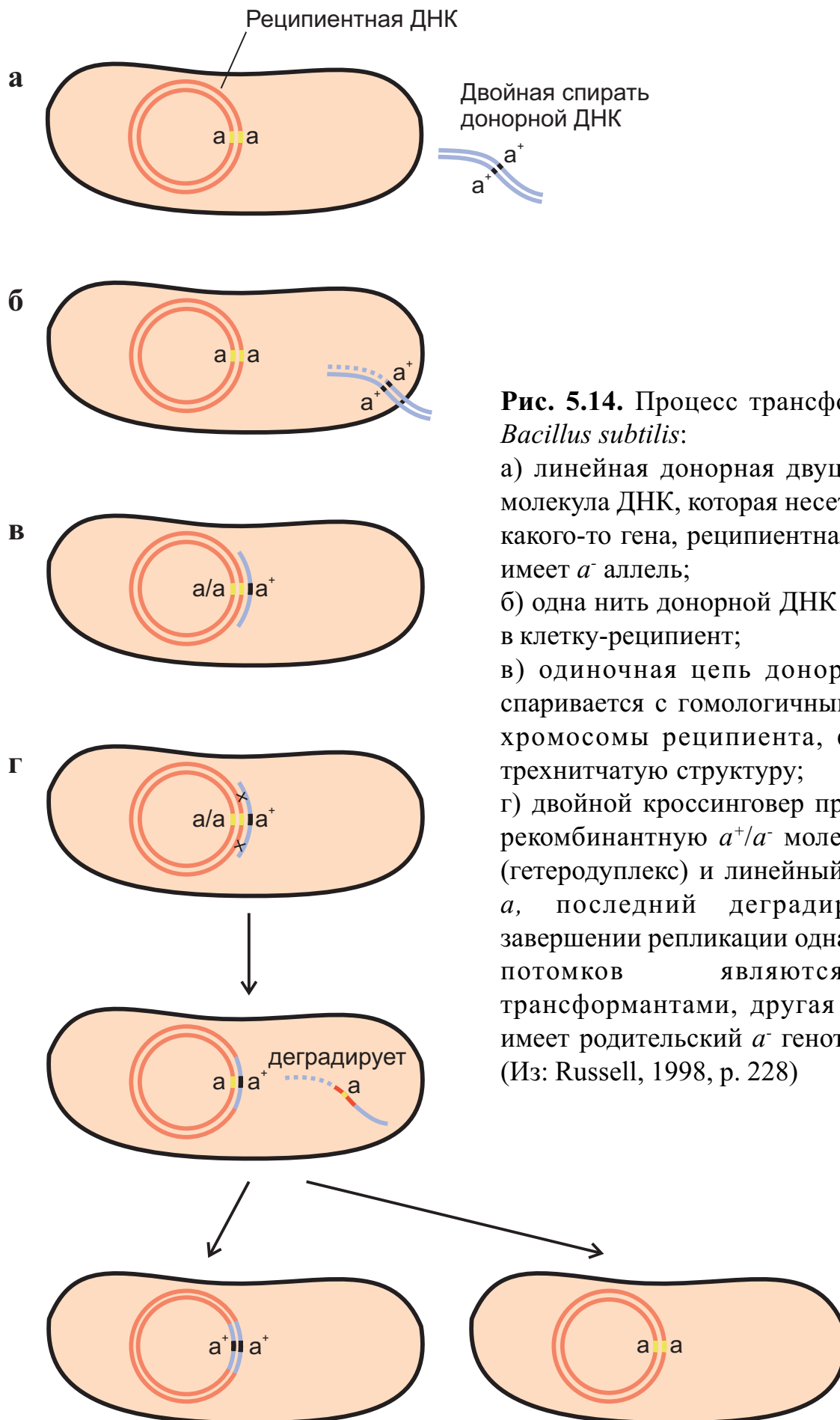
Минимальная длина цепочки ДНК, способной интегрироваться в реципиентную хромосому составляет около 500 п.н. Однако, обычно в рекомбинации участвуют фрагменты донорной ДНК длиной около 20 т.п.н.

[?? уточнить цифру] или 1/200 часть всей бактериальной хромосомы.

Рекомбинация при трансформации происходит путем замещения участка одной из двух цепей реципиентного дуплекса на гомологичный одноцепочечный фрагмент ДНК донора. В результате образуется временный гетеродуплекс ДНК, в дальнейшем подвергающийся коррекции, направленной на удаление некомплементарных оснований. В результате коррекции молекулярные гетерозиготы превращаются в гомозиготы, что служит условием образования чистых клонов трансформантов.

Частота трансформации по хромосомным маркерам зависит от свойств данного препарата ДНК, ее концентрации, состояния клетки реципиента, вида бактерий. При селекции трансформантов по одиночному маркеру штаммы пневмококков трансформируются с частотой  $10^{-2}$  -  $10^{-3}$  на одну клетку реципиента. У гемофильных бактерий частота трансформации варьирует от  $10^{-3}$  до  $10^{-7}$ . Трансформация может происходить между различными видами бактерий, хотя и с очень низкой частотой. Использование межвидовой трансформации помогает установить степень родства между различными бактериями.

ДНК, освобождающаяся в окружающую среду при лизисе стареющих культур бактерий, в природных условиях обладает трансформирующей активностью. Это



**Рис. 5.14.** Процесс трансформации у *Bacillus subtilis*:

а) линейная донорная двуцепочечная молекула ДНК, которая несет  $a^+$  аллель какого-то гена, реципиентная бактерия имеет  $a$  аллель;

б) одна нить донорной ДНК проникает в клетку-реципиент;

в) одиночная цепь донорной ДНК спаривается с гомологичным районом хромосомы реципиента, формируя трехнитчатую структуру;

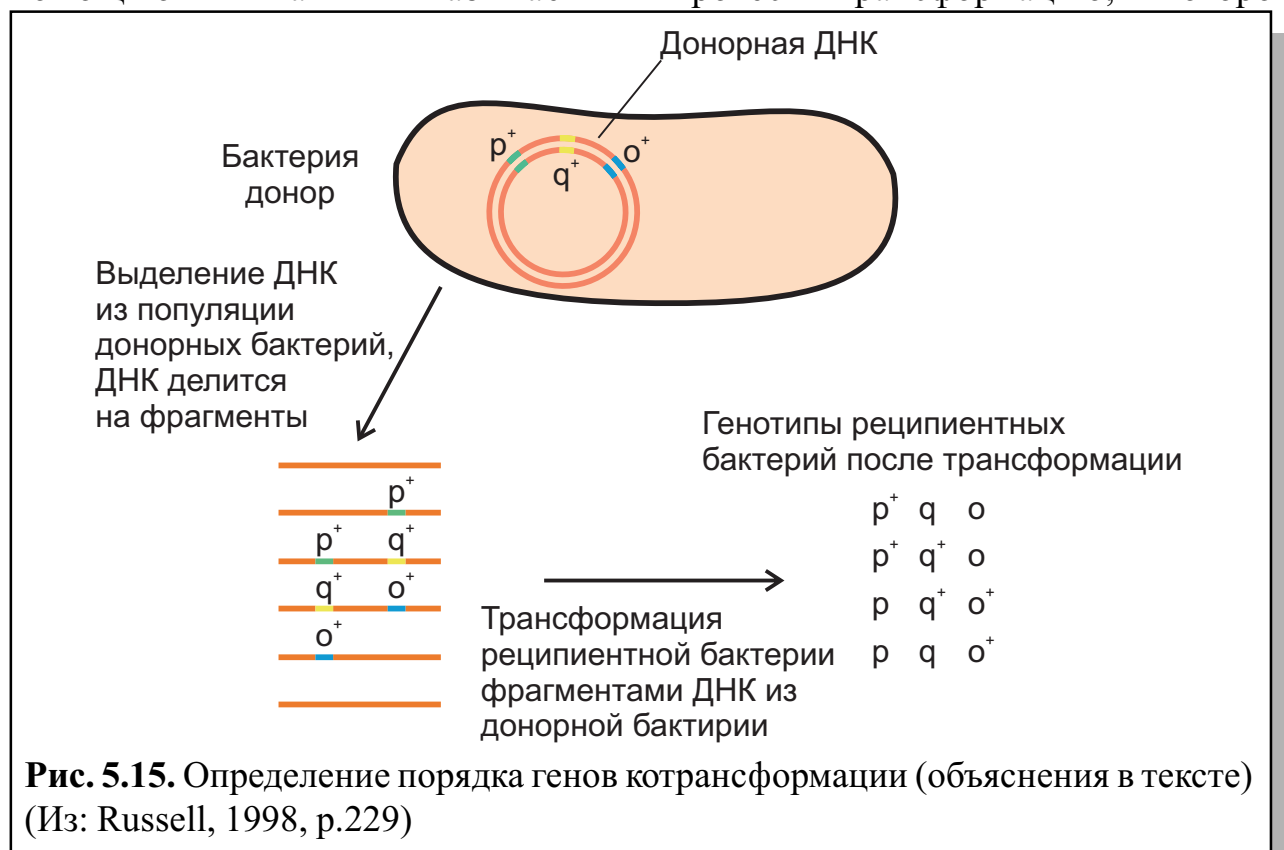
г) двойной кроссинговер продуцирует рекомбинантную  $a^+/a$  молекулу ДНК (гетеродуплекс) и линейный фрагмент  $a$ , последний деградирует. По завершении репликации одна половина потомков являются  $a^+$  трансформантами, другая половина имеет родительский  $a$  генотип.

(Из: Russell, 1998, p. 228)

значит, что трансформация является одним из природных способов обмена генетическим материалом у бактерий. (Алиханян и др., 1985, стр. 283-285).

Трансформация используется для генетического картирования у бактерий. Как уже отмечалось, при трансформации в хромосому реципиента встраивается сравнительно небольшой фрагмент ДНК. Если два гена находятся в хромосоме, на значительном расстоянии друг от друга, они не могут локализоваться в одном и том же фрагменте трансформирующей ДНК. Одновременная трансформация двумя независимыми фрагментами, содержащими эти два гена - событие крайне маловероятное. Таким образом, частота котрансформации двух генетических маркеров служит показателем расстояния между ними. С помощью так называемых

трехфакторных скрещиваний можно установить порядок взаиморасположения исследуемых генов (Рис. 5.15.). Допустим, что донор несет два диких аллеля ( $a^+$  и  $c^+$ ) и один мутантный ( $b$ ), а реципиент содержит два мутантных ( $a$  и  $c$ ) и один дикий ( $b^+$ ). Маркер, по которому будет идти отбор трансформантов, называют селективным. Частота котрансформации обычно пропорциональна генетическому расстоянию между селективным и неселективным маркерами. Если при анализе 100 трансформантов, отобранных по маркеру  $a^+$ , 6 оказались  $a^+b$ , а 50 -  $a^+c^+$ , то частота котрансформации маркеров  $a^+$  и  $b$  составляет 6%, а  $a^+$  и  $c^+$  - 50%. Следовательно маркер  $c^+$  находится ближе к маркеру  $a^+$ , чем маркер  $b$ . Для подтверждения такого вывода нужно провести трансформацию, в которой



селективным маркером будет  $c^+$ . В этом случае анализ 100 трансформантов, отобранных по маркеру  $c^+$  на носительство неселективных маркеров, показывает, что генотип  $c^+b$  имеют 10 клонов, а генотип  $c^+a^+$  - 40. Следовательно, маркер  $c^+$  находится ближе к маркеру  $a^+$ , чем к маркеру  $b$ . Следовательно, эти три гена расположены в таком порядке:  $a - c - b$ , а расстояние между генами  $a$  и  $c$  меньше, чем между  $c$  и  $b$ . (Из Алиханян и др., 1985, стр. 285-286).

### 5.11. Трансдукция

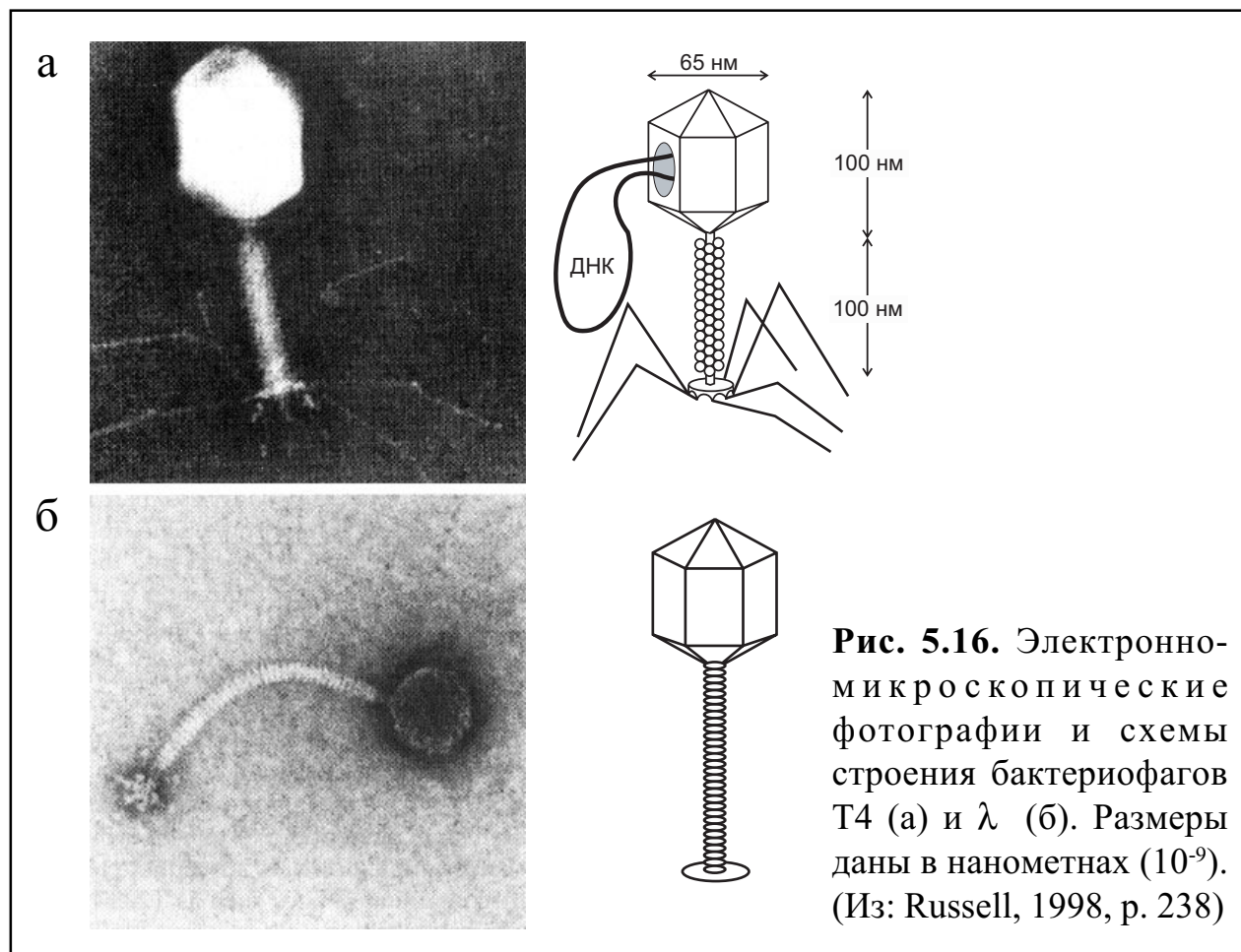
Трансдукцией называется перенос ДНК из одной клетки (донора) в другую (реципиент) с помощью бактериофагов (Рис. 5.16., 5.17., 5.18.). Этот способ

генетического обмена был открыт в 1952 году Н. Зиндером и Дж. Ледербергом (N.D. Zinder, J. Lederberg) у *Salmonella typhimurium*.

Различают три типа трансдукции: общую (неспецифическую), ограниченную (специфическую) и abortивную.

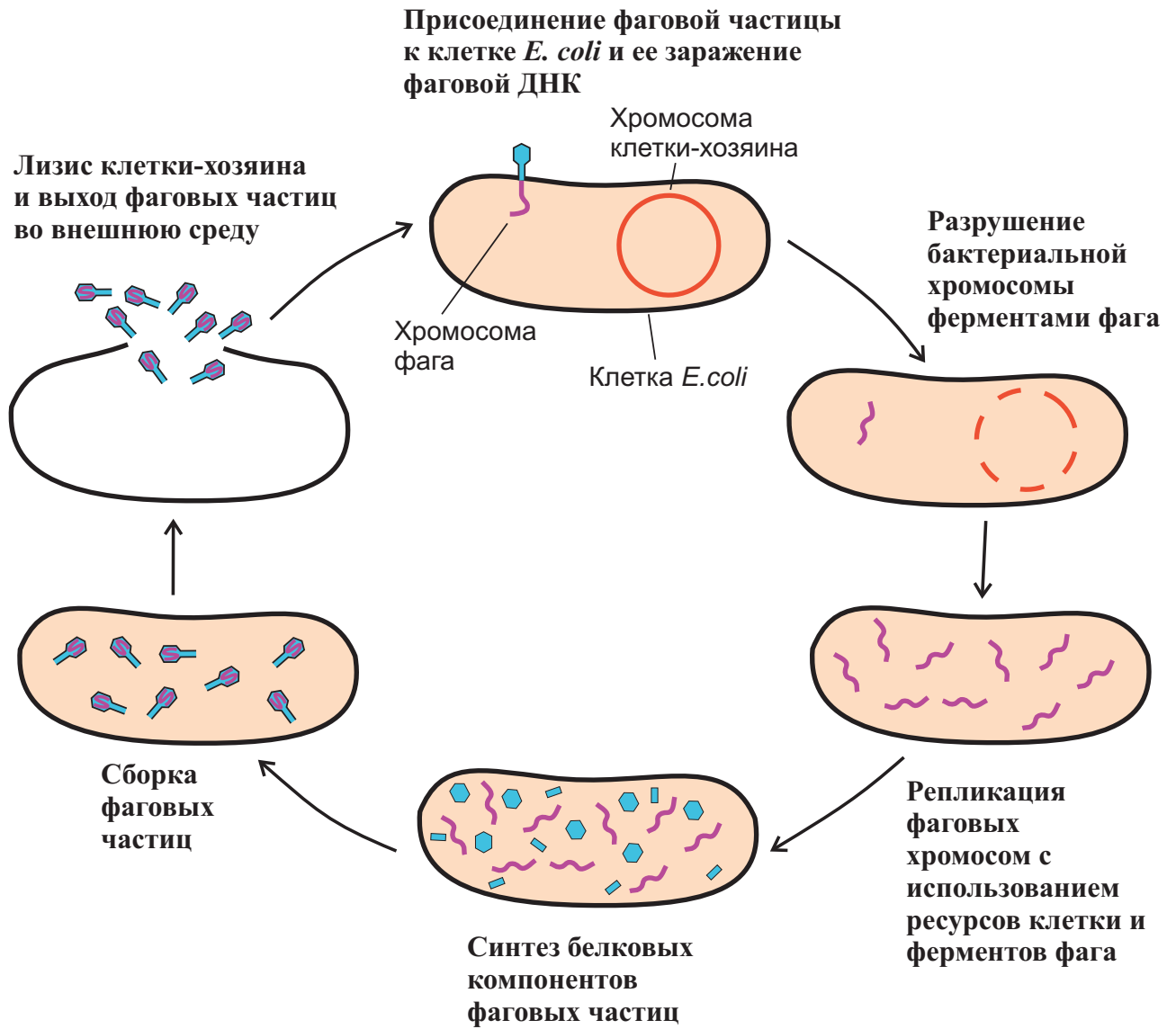
*Общая трансдукция.* В экспериментах U-образная трубка в нижней части была разделена посередине бактериальным фильтром. В одну половину этой трубки были помещены тифозные бактерии штамма 22А, а в другую половину - штамма 2А (рис. 5.19.)

При этом бактериальные клетки не могут переходить через фильтр. Штамм 22А нес мутацию, блокирующую синтез

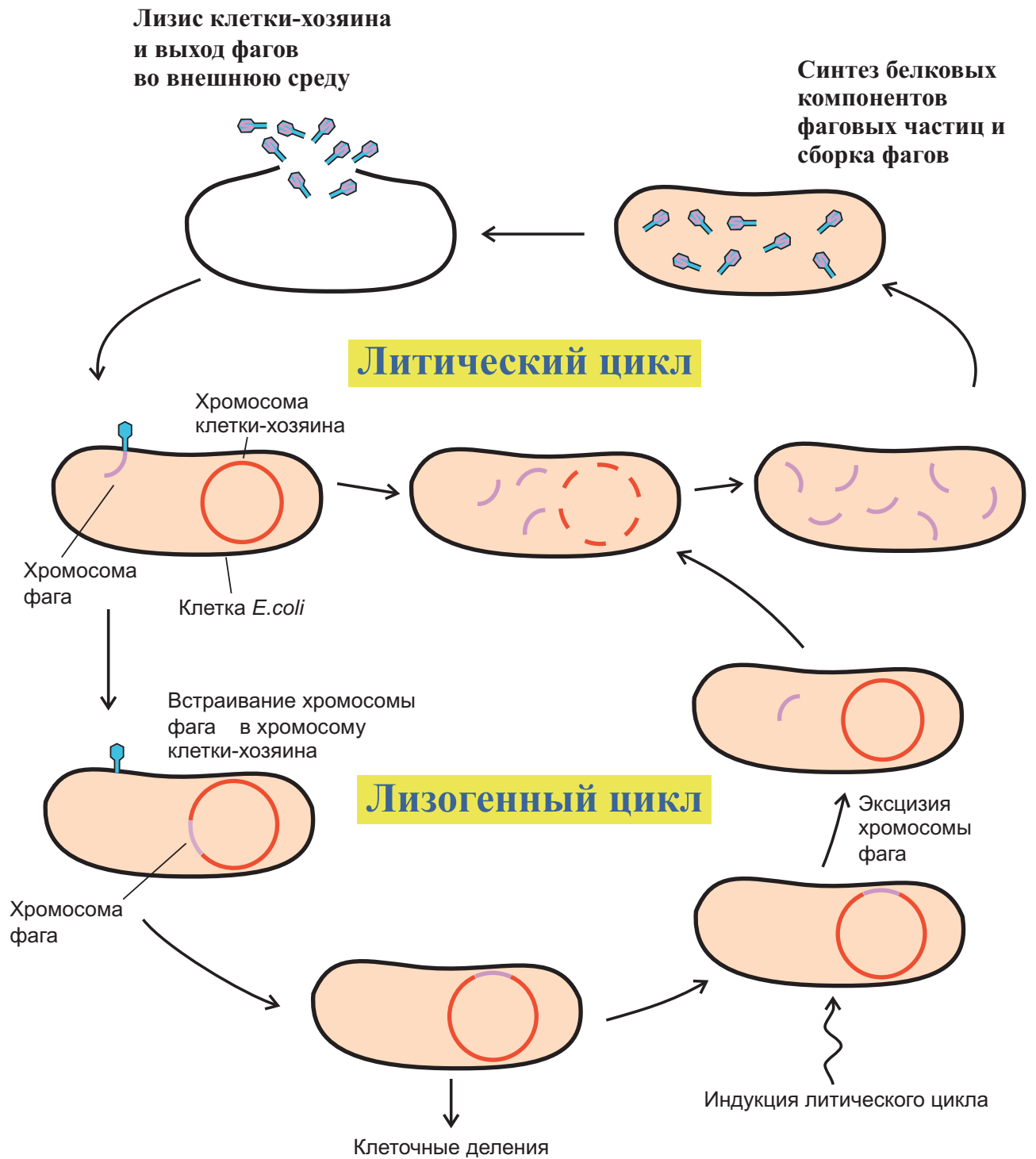


**Рис. 5.16.** Электронно-микроскопические фотографии и схемы строения бактериофагов Т4 (а) и  $\lambda$  (б). Размеры даны в нанометрах ( $10^{-9}$ ). (Из: Russell, 1998, p. 238)

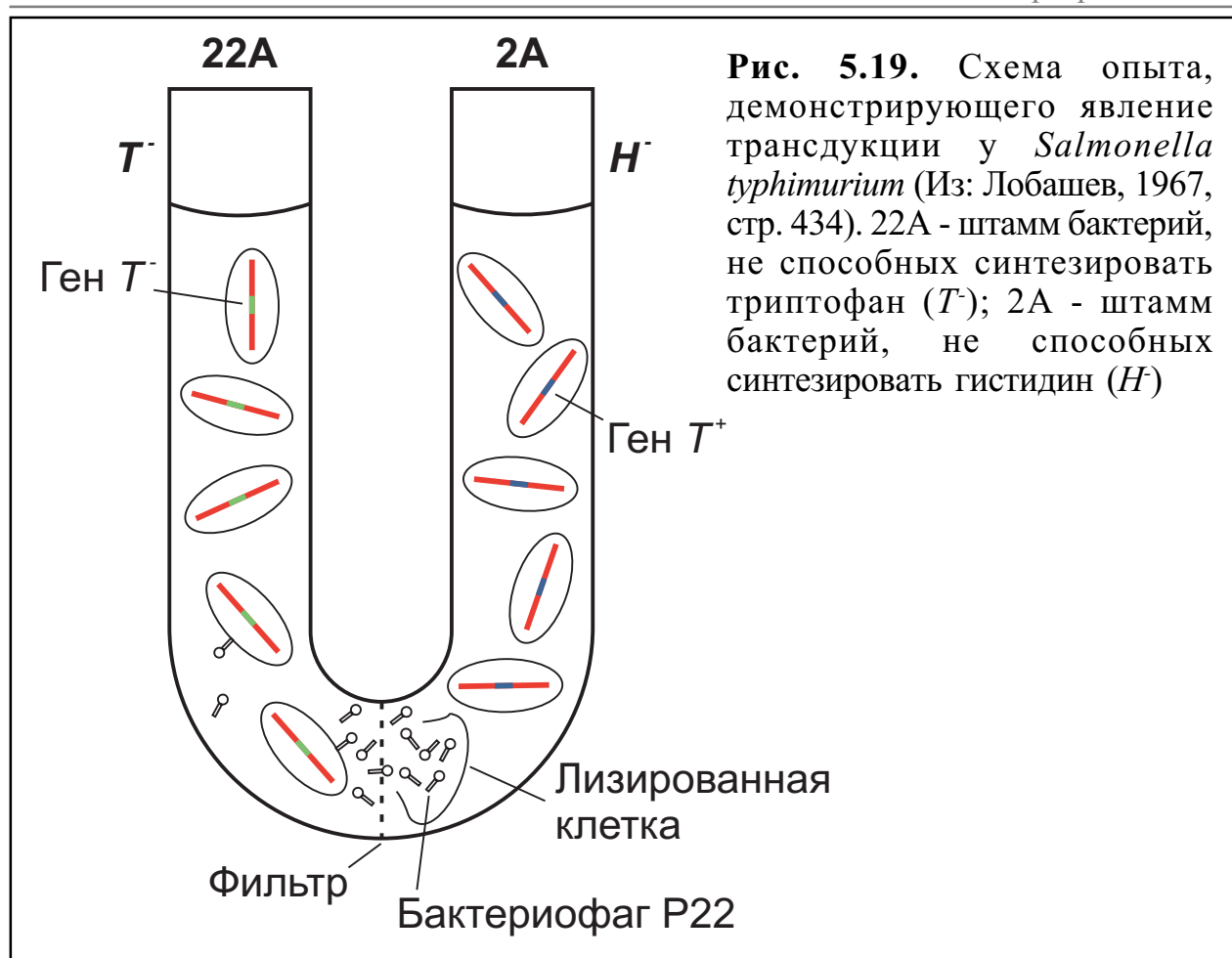




**Рис. 5.17.** Жизненный цикл вирулентного фага, например T2 или T4 (Из: Russell, 1998, p. 239)



**Рис. 5.18.** Жизненный цикл умеренного фага, например  $\lambda$ . Когда умеренный фаг инфицирует клетку, развитие может пойти по литическому или лизогенному пути (Из: Russell, 1998, p. 240)



**Рис. 5.19.** Схема опыта, демонстрирующего явление трансдукции у *Salmonella typhimurium* (Из: Лобашев, 1967, стр. 434). 22А - штамм бактерий, не способных синтезировать триптофан ( $T^-$ ); 2А - штамм бактерий, не способных синтезировать гистидин ( $H^-$ )

триптофана  $T^-$ . Штамм 2А имел мутацию, блокирующую синтез гистидина  $H^-$ . После инкубации этих двух разных штаммов в трубке, разделенной фильтром, был произведен рассев клеток обоих штаммов. При расसेве клеток штамма 22А на среде без триптофана было обнаружено небольшое число колоний. Следовательно, некоторые клетки приобрели способность синтезировать триптофан и смогли дать

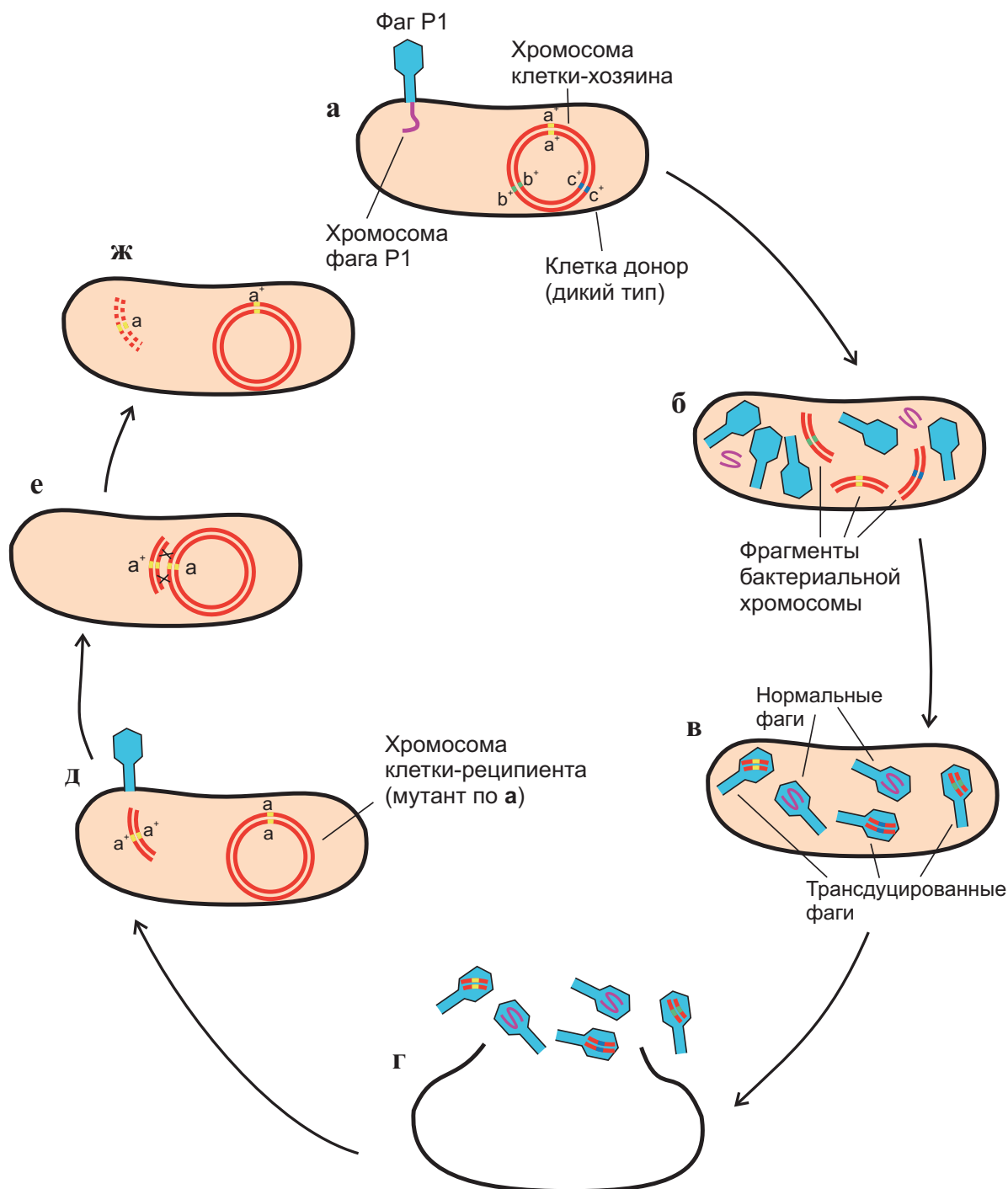
колонии на среде без этой аминокислоты. Фильтрующим агентом, переносящим ген  $T^+$  от штамма 2А к штамму 22А, оказался бактериофаг (см. Лобашев, 1967, стр. 434). В случае общей трансдукции фрагменты бактериальной донорной ДНК случайно включаются в созревающую частицу вместе с фаговой ДНК, или даже вместо неё (Рис. 5.20).

При этом бактерия-донор через фаг передает лишь отдельный фрагмент ДНК длиной 1/50 - 1/100 от всей бактериальной хромосомы.

Обнаружение котрансдуцируемости двух или более генетических маркеров указывает на их сцепленность, а по частоте такой котрансдукции можно судить о порядке расположения маркеров на генетической карте. Например, если маркеры  $a^+$  и  $b^+$ ,

#### Дополнение 5.2.

В 1958 году за открытие генетической рекомбинации и организации генетического материала у бактерий Дж. Ледербергу (J. Lederberg) была присуждена Нобелевская премия.



**Рис. 5.20.** Схема общей трансдукции между линиями *E. coli*.

- Клетка дикого типа, инфицированная фагом P1;
- ДНК клетки-хозяина деградирует в ходе литического цикла;
- в ходе сборки фаговых частиц некоторые фрагменты бактериальной хромосомы включены в некоторые фаги-потомки, что потом приведет к трансдукции;
- лизис;
- трансдуцирующий фаг инфицирует ауксотрофную бактерию-реципиента;
- двойной кроссинговер приводит к обмену донорного гена  $a^+$  b реципиентного гена  $a$ ;
- образование стабильного трансдуктанта  $a^+$  (Из: Russell, 1998, p. 241)

а также  $b^+$  и  $c^+$  котрансдуцируются попарно, а  $a^+$  и  $c^+$  не котрансдуцируются, следовательно, они локализируются в порядке  $a - b - c$ .

Величина трансдуцируемого фрагмента определяется размером ДНК донора, способной упаковаться в головку фага. Доказано, что в частицах трансдуцирующего фага практически вся фаговая ДНК заменена на бактериальную. Поскольку ДНК фага P1 состоит примерно из  $10^2$  т.п.н., а хромосома *E. coli* - из примерно  $4 \times 10^3$  т.п.н., то фрагмент хромосомной ДНК, способный включиться в трансдуцирующую частицу, составляет около 2,3% хромосомы *E. coli*. Если исходить из того, что длина среднего гена равна 1 т.п.н., то при трансдукции фагом P1 возможен совместный перенос около 100 генов, а фагом P22 - около 40 генов (Из: Алиханян и др. 1985, стр. 287, детали на стр. 287-288).

*Ограниченная трансдукция.* При ограниченной трансдукции происходит рекомбинация между фаговой и хромосомной бактериальной ДНК, поэтому фаговые трансдуцирующие частицы обязательно содержат ДНК обоих типов. (см. Алиханян и др., 1985, стр. 287, детали на стр. 288-291).

*Абортивная трансдукция.* Трансдуцируемый фагом фрагмент ДНК донора не включается в хромосому клетки-реципиента, а остается в ее цитоплазме и в таком виде способен поддерживаться и проявляться фенотипически. (см. Алиханян и др., 1985, стр. 287).

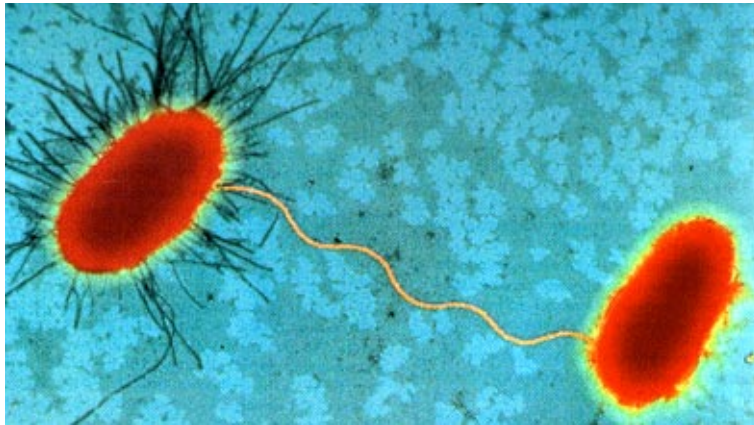
## 5.12. Конъюгация

Наличие полового процесса у бактерий было доказано следующим образом: у *E. coli*, был получен ряд биохимических мутантов с потребностями в биотине ( $B^-$ ), метионине ( $M^-$ ), пролине ( $P^-$ ), треонине ( $T^-$ ). Все эти штаммы не росли на минимальной среде.

В опытах Дж. Ледерберга и Э. Татума (1946 г.) были взяты два штамма, различающиеся по генотипу:  $B^-M^-P^-T^-$  и  $B^+M^+P^+T^+$ . Клетки обоих ауксотрофных штаммов в течение некоторого времени выращивали в смешанной культуре, а затем высевали на минимальную среду. Ни один из двух исходных штаммов не мог расти на этой среде. Однако, на каждые  $10^9$  посеянных клеток из смешанной культуры на минимальной среде выросло около 100 колоний. По генотипу эти клетки могли быть только  $B^+M^+P^+T^+$ .

Появление этих колоний нельзя было объяснить трансформацией или трансдукцией, поскольку гибридные клетки не могли быть получены, если суспензии двух исходных штаммов разделяли бактериальным фильтром. Очевидно, что для появления рекомбинантов необходим непосредственный контакт между бактериальными клетками. Такое заключение было сделано на основе чисто генетических экспериментов. Позднее с помощью электронной микроскопии были получены фотографии конъюгирующих бактерий, соединенных друг с другом тонким мостиком-пилем (Рис. 5.21.)

Изучение ряда штаммов кишечной палочки выявило наличие у неё



**Рис. 5.21.** Конъюгация у *E. coli*. Электронная микрофотография  $F^+$  клетки (слева), связанной с  $F^-$  клеткой (справа) половой ворсинкой - F-пилем. (Из: Russell, 1998, p. 224)

“половой” дифференциации. Выразалось это в том, что исследованные штаммы первоначально распались на две группы. В первой группе штаммов конъюгации клеток не было. Во второй группе конъюгация происходила, но количество рекомбинантов было небольшим. Представители обеих групп вступали в конъюгацию друг с другом в 100-1000 раз чаще. Представителей этих групп стали рассматривать как разные половые типы  $F^-$  и  $F^+$ . Скрещивания бактерий штаммов  $F^- \times F^-$  - всегда безуспешны, а  $F^+ \times F^+$  лишь изредка дает рекомбинацию. Поведение бактерий этих типов функционально различно. В потомстве  $F^+$  никогда не получают рекомбинанты, в то же время от клеток  $F^-$  получают рекомбинанты, совмещающие признаки обоих родителей. Таким образом, при конъюгации клеток происходит односторонняя передача генетического материала от клетки  $F^+$  в клетку  $F^-$ . Клетки  $F^-$  после конъюгации приобретают характеристики  $F^+$ .

Позже был выявлен и третий половой тип, определяющий высокую

частоту рекомбинации - Hfr (High frequency recombination). Клетки этого типа возникают в культурах  $F^+$ .

Скрещивания  $F^- \times Hfr$  дают особенно высокий процент рекомбинантов - 1 на 10 исходных клеток (в скрещиваниях  $F^- \times F^+$  - 1 на  $10^4$  исходных клеток).

Скрещивания  $F^- \times F^+$  показывают, что фактор фертильности (F-фактор) передается с высокой частотой независимо (автономно) от остальных генов. Клетки Hfr теряют способность к автономной передаче F-фактора. Генетический анализ показал, что в линии Hfr фактор фертильности передаётся сцепленно с другими генами и занимает определённый локус в бактериальной хромосоме. Таким образом, F-фактор, если он присутствует в клетке, ведёт себя двояко: как автономная цитоплазматическая частица (в клетках  $F^+$ ) или как локус хромосомы (в клетках Hfr). F-фактор отсутствует в  $F^-$  клетках (Из: Лобашев, 1967, стр. 436-440).

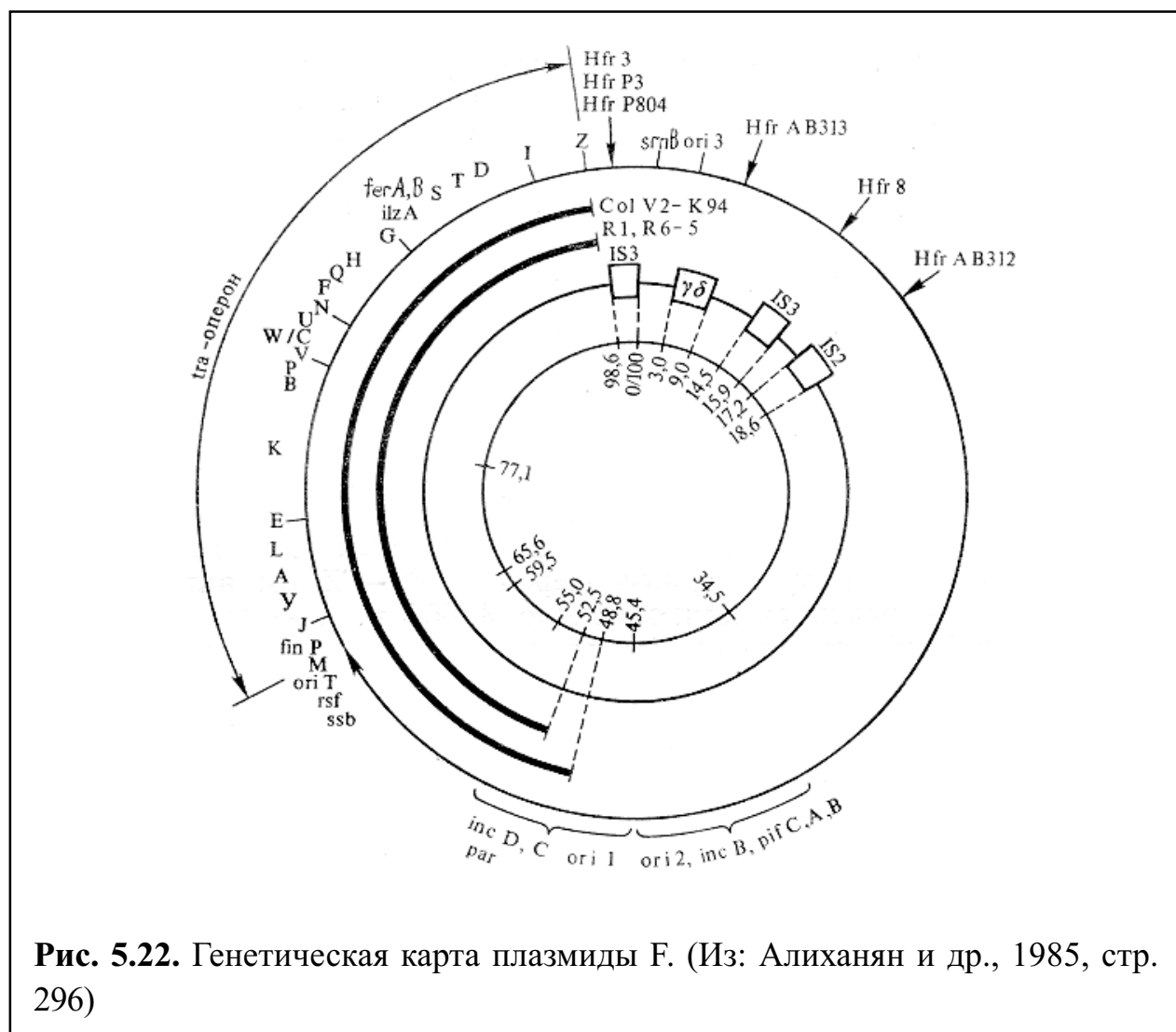
F-фактор несет гены, контролирующие образование пилей и

способность к переносу этих факторов. F-фактор является плазмидой (рис. 5.22.). - кольцевой молекулой ДНК, реплицирующейся в клетке автономно от хромосом и содержащей некоторое число генов. Она была открыта У. Хейсом в 1952 году.

F-фактор и другие плазмиды, способные находиться в клетке в свободном состоянии либо интегрироваться с её хромосомой, называют также *эписомами*.

F-фактор - это крупная плазида. Длина её ДНК составляет около 100 т.п.н. (рис. 5.22.).

В настоящее время в плазмиде F идентифицировано около 20 генов, контролирующих различные этапы конъюгации. Большая часть этих генов образует единый оперон *traY-Z* (*tra* - transfer - перенос) длиной около 30 т.п.н. На внутреннем круге отмечено расположение некоторых координат; на следующем круге - *IS* и *TN* - элементов; нарисованные жирными линиями полукруги указывают районы гомологии плазмиды F с плазмидами группы Inc FI и плазмидами из группы Inc FII. На внешнем круге показано расположение генов *tra* - оперона и ряда других генов, контролирующих различные функции



**Рис. 5.22.** Генетическая карта плазмиды F. (Из: Алиханян и др., 1985, стр. 296)

плазмиды. Локусы *ori 1-3* - точки начала вегетативной репликации плазмидной ДНК. Стрелками указаны места интеграции плазмиды с хромосомой, ведущей к образованию указанных Hfr-штаммов.

F<sup>-</sup>-штамм *E. coli* не несет F-фактора, но может принимать его от донора. Такие штаммы называют реципиентными или женскими. В мужской клетке F-фактор может находиться в двух альтернативных состояниях: в автономном, когда он реплицируется независимо от хромосомы (F<sup>+</sup>-штамм), и в интегрированном, когда он присоединяется к хромосомной ДНК и реплицируется в ее составе. Схема передачи плазмиды F в свободном и интегрированном состоянии представлены на Рис. 5.23. Частота интегрирования F-фактора в хромосому штамма-хозяина составляет 1 на 10<sup>6</sup> клеток F<sup>+</sup>. Штаммы, все клетки которых содержат интегрированный F-фактор, переносят некоторые хромосомные маркеры с частотой 10<sup>-1</sup>, т.е. в 10<sup>5</sup> раз чаще, чем F<sup>+</sup>-клетки.

Образование Hfr-клеток происходит в результате кроссинговера между кольцевыми ДНК хромосомы и F-фактора. В хромосоме *E. coli* более 20 сайтов, в которых может происходить интеграция плазмиды F (рис. 5.22.). В ее основе лежит сайт-специфическая рекомбинация, опосредованная особыми последовательностями ДНК - IS элементами.

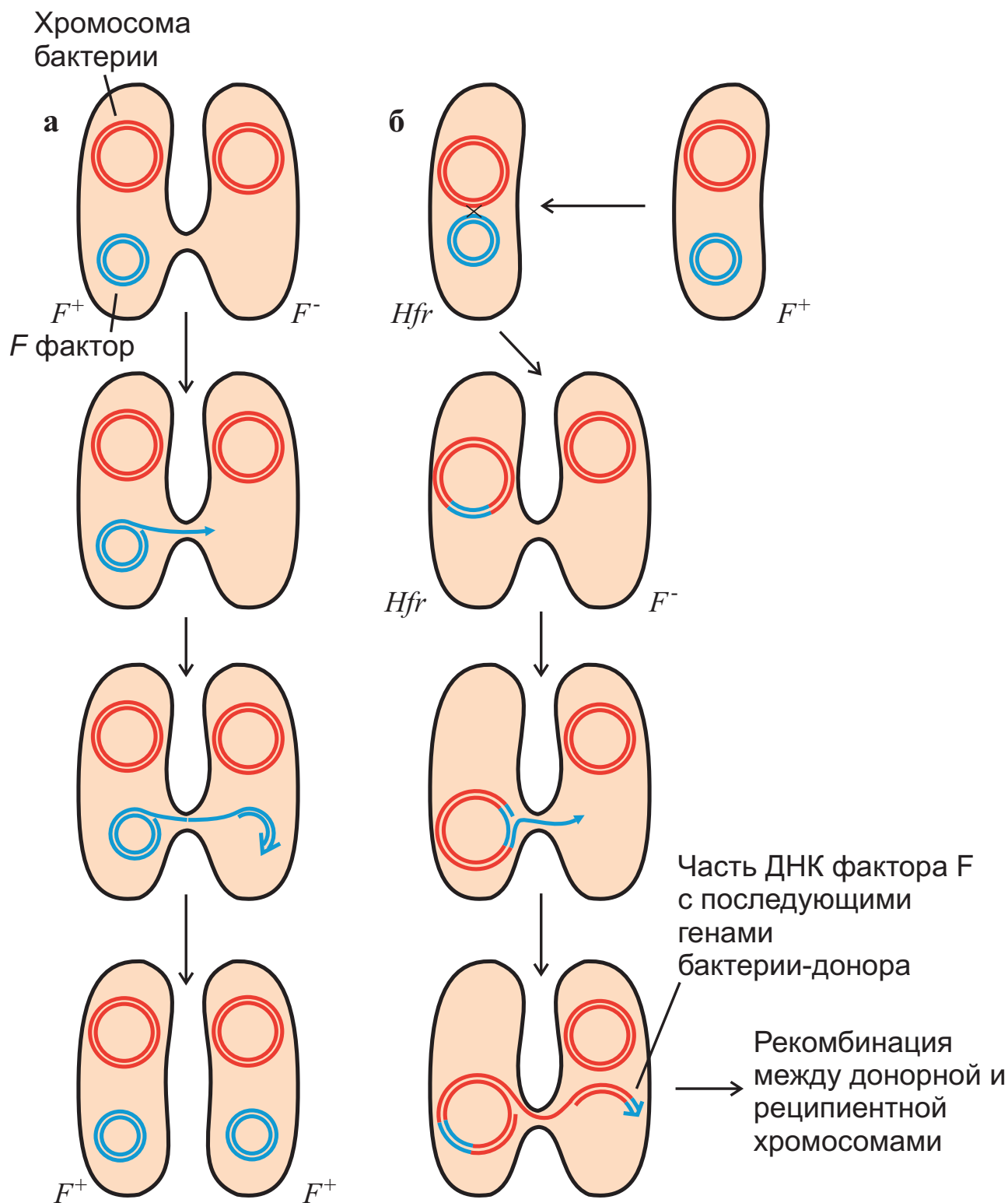
Начало конъюгационного переноса связано с разрезанием одной из нитей ДНК плазмиды F в локусе *oriT*,

расположенном перед генами *tra*-оперона и ориентированном таким образом, что *tra*-область переносится в реципиентную клетку последней. Этот надрез осуществляется сайт-специфичной эндонуклеазой, кодируемой генами *traY* и *traZ*. Раскручивание дуплекса ДНК происходит под действием фермента ДНК-геликазы, кодируемой плазмидным геном *traI*. Фермент движется по молекуле ДНК в направлении от 5' к 3' - концу и раскручивает ее со скоростью около 1200 п.н. в 1 секунду. Освободившийся в результате надрезания и раскручивания 5' - конец одной из цепей ДНК переносится через конъюгационную пору в клетку реципиента. Одновременно эта ДНК реплицируется.

Процесс конъюгации можно использовать для генетического картирования (Рис. 5.24.). Генетический материал переносится от донора к реципиенту однонаправленно в строгой линейной последовательности. Если резко (в специальном аппарате-блэндере) встряхнуть культуры клеток, вступивших в конъюгацию, то они разъединяются. В зависимости от продолжительности конъюгации до встряхивания в F<sup>-</sup> клетку будет перенесена большая или меньшая часть хромосомы Hfr. Части перенесенной хромосомы могут рекомбинировать с гомологичным участком хромосомы F<sup>-</sup>.

За 1 мин. передается примерно 40 т.п.н., т.е. около 1% длины бактериальной хромосомы, и следовательно, на перенос





**Рис. 5.23.** Передача генетического материала в результате конъюгации у *E. coli*.  
 а - Передача F фактора от донора к реципиенту в скрещивании  $F^+ \times F^-$ .  
 б - Образование линии Hfr в результате интеграции F фактора и передачи бактериальных генов от донорных к реципиентным клеткам в ходе скрещивания  $Hfr \times F^-$  (Из: Russell, 1998, p. 232)



