Министерство сельского хозяйства РФ

ФГОУ ВПО

«Оренбургский государственный аграрный университет»

Кафедра микробиологии

**Реферат**

по генетике микроорганизмов на тему:

**«Перенос генетического материала и генетическое картирование у актиномицетов»**

*Выполнил*: студент ΙV курса

ФВМ и Б специальности

«Микробиология» Акжигитов А.С.

*Проверил:* преподаватель кафедры

микробиологии Капустина О.А.

Оренбург 2010

**Содержание:**

ВВЕДЕНИЕ

1. Перенос генетического материла у актиномицетов
   1. Перенос генетического материала с помощью плазмид
   2. Передача генетического материала с помощью рекомбинации
   3. Перенос генетического материала посредством трансдукции

2. Генетическое картирование актиномицетов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ВВЕДЕНИЕ

Актиномицеты — это группа микроорганизмов, соединяющая в себе черты бактерий и грибов. Широко распространены в почвах, в иле водоёмов, в воздухе и на растительных остатках.

Морфологические признаки актиномицет имеют аналогию со строением несовершенных грибов. Для них характерно нитевидное или палочковидное и кокковидное строение и наличие боковых выростов; способны к формированию ветвящегося мицелия на некоторых стадиях развития диаметром 0,4—1,5 мкм, которая проявляется у них в оптимальных для существования условиях. Подчеркивая бактериальное происхождение актиномицетов, ученые называют их аналог грибного мицелия тонкими нитями. Актиномицеты включают в себя организмы с наиболее характерными среди всех бактерий нитчатым строением.

Наиболее важными вопросами, касающиеся изучения актиномицет, являются исследование механизмов передачи генетического материала и создание новых способов генетического картирования. На настоящий момент достаточно подробно изучены способы передачи генетического материала плазмидами, с помощью рекомбинации, трансдукции, конъюгации гамет, а также эффективные методы составления генетических карт.

**1. Перенос генетического материала у актиномицетов**

1.1 Перенос генетического материала с помощью плазмид

Это наиболее часто встречающийся способ переноса генетического материала у актиномицетов.

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

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

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

Все сказанное выше относилось в основном к плазмидам актиномицетов в 10 – 15 т.п.н. Однако наряду с ними в клетках актиномицетов существуют огромные плазмиды с линейной структурой: от 50 тпн (например, SLP 2) до 300 – 590 т.п.н. (SCP 1 и ряд других плазмид; 26 - 28; 76). Одна из этих плазмид – SCP I – была известна гораздо раньше, но лишь недавно с применением пульсфореза удалось показать ее линейную структуру и другие особенности строения. В поле пульсфореза она вела себя как линейная дрожжевая хромосома сходных размеров; другим доказательством ее линейности служили расчеты с построением рестрикционной карты после применения целого спектра рестриктаз. Для этой и других гигантских плазмид характерна очень большая величина концевых участков с инвертированными повторами; у SCP 1 каждый концевой участок имел размер в 40 тпн, что в сумме составляло заметную часть всей длины плазмиды. Интересно, что у крупной линейной плазмиды SLP 2 правый концевой участок был практически полностью гомологичен обоим концам линейной хромосомы клетки, что вначале вызвало недоумение (три одинаковых концевых участка в клетке, обладающей лишь одной линейной хромосомой). Однако затем была выявлена "плазмидная принадлежность" одного из этих концов. Гигантская плазмида SCP 1 может нести участки хромосомы, и участки этой плазмиды могут включаться в хромосому. При ее огромной величине ее копийность равняется приблизительно четырем копиям на клетку, что составляет ~20% плазмидной ДНК на клеточный геном.

**1.2 Перенос генетического материала с помощью рекомбинации**

Явление рекомбинации у актиномицет напоминает гибридизацию у высших организмов. Установлено, что при контакте клеток (чаще дефектных) двух разных штаммов бактерий или актиномицетов свойства одного штамма переходят к другому. В результате получаются смешанные формы с признаками двух исходных культур. Такой процесс происходит между двумя родственными организмами.

Явление генетической рекомбинации было продемонстрировано многими исследователями у ряда представителей рода Streptomyces, в том числе продуцирующих антибиотики, но только у одного из штаммов *Str. coelicolor* генетические исследования проводились планомерно в течение многих лет . Однако, хотя основные сведения о генетической системе актиномицетов получены для *Str. coelicolor,* результаты исследований других видов актиномицетов согласуются с ними, что дает возможность говорить об общих особенностях генетической рекомбинации в пределах рода Streptomyces (Actinomyces, по классификации Н. А. Красильникова).

Методические подходы при изучении генетики актиномицетов принципиально те же, что и для других микроорганизмов. Скрещивания производят между штаммами, маркированными различными генетическими факторами (биохимическая недостаточность, устойчивость к антибиотикам и др.), а отбор рекомбинантов ведут на специально подобранных селективных средах. И то и другое необходимо, так как генетическая рекомбинация — явление редкое и генетические рекомбинанты составляют лишь незначительную долю в популяции исходных штаммов.

В настоящее время можно считать установленным, что процесс генетической рекомбинации у актиномицетов в основном сходен с процессом конъюгации у бактерий, детально изученным у *Е. coli, Str. coelicolor,* подобно бактериям, имеет единую кольцевую группу сцепления, на которой определено местоположение около 40 различных генетических локусов. Характерная особенность генетической карты *Str. coelicolor* состоит в неслучайном расположении генетических локусов, сосредоточенных преимущественно в двух областях карты, тогда как две другие области являются почти «пустыми». Такое разобщение двух групп локусов в пространстве (возможно, лишь кажущееся) и послужило причиной первоначального представления о наличии у актиномицетов двух независимых групп сцепления.

Явление генетической рекомбинации описано у большинства изученных видов актиномицетов. Однако возникновение генетических рекомбинантов при внутривидовых скрещиваниях наблюдается далеко не во всех комбинациях мутантов, даже если они и происходят из одного и того же штамма. Вопрос о половой полярности штаммов внутри одного вида до сих пор остается не решенным, хотя и имеются некоторые данные в пользу ее существования. Лучше изучен вопрос об особенностях самого процесса генетической рекомбинации у актиномицетов. Этот процесс состоит из нескольких этапов, причем, как установлено недавними исследованиями, оба родительских штамма принимают неодинаковое участие в скрещивании: один — играет роль донора, другой — реципиента генетического материала, напоминая в этом отношении бактерии.

Как и у бактерий, в результате переноса генетического материала от одного штамма к другому происходит образование неполных зигот (мерозигот), содержащих полный геном реципиентного штамма и часть генома донорного. При этом диплоидный участок мерозиготы может варьировать как по составу, так и по протяженности, а процесс возникновения частичного диплоидного ядра происходит во времени. В отличие от бактерий, для актиномицетов характерно длительное существование стадии мерозиготы, сохраняющейся в течение ряда поколений, постепенно сменяющейся стадией образования гаплоидных рекомбинантов. В соответствии с этим у актиномицетов описаны клоны, являющиеся по своей генетической структуре мерозиготами. Они характеризуются нестабильностью и в процессе размножения выщепляют различные клоны гаплоидных рекомбинантов. Открытие таких клонов, названных гетероклонами, дало возможность разработать простой метод генетического анализа у актиномицетов, основанный на учете различных типов гаплоидных рекомбинантов в потомстве гетероклонов.

Таким образом, процесс генетической рекомбинации у актиномицетов состоит из нескольких этапов, последний из которых заключается в образовании гаплоидных рекомбинантов. Эти рекомбинанты, в отличие от гетероклонов, являются стабильными и служат основным объектом исследований в промышленных скрещиваниях. Однако необходимо иметь в виду, что вследствие неодинакового участия двух родительских штаммов в скрещивании, когда один из них поставляет только часть своего генетического материала другому, гаплоидные рекомбинанты наследуют большинство генетических факторов от одного родителя и только некоторые — от другого. Иными словами, по своей генетической структуре гаплоидные рекомбинанты, как правило, более напоминают одного родителя, чем другого, что неизбежно ограничивает возможности гибридизации у актиномицетов.

Наряду с генетической рекомбинацией у актиномицетов наблюдается другое широко распространенное явление — гетерокариозис, во многом сходное с аналогичным явлением у грибов.

Первоначально считали, что возникновение гетерокарионов между двумя штаммами представляет собой первый необходимый этап генетической рекомбинации. Однако в настоящее время имеются данные, что оба эти явления не связаны между собой причинно и происходят независимо друг от друга. Поскольку гетерокариотические клоны являются обычно нестабильными, расщеплясь при размножении на оба исходных родительских типа, гетерокариозис не может использоваться в качестве способа получения гибридных форм у актиномицетов.

**1.3 Передача генетического материала посредством трансдукции**

Трансдукция - передача генетического материала от одной бактерии (донора) другой (реципиенту) с помощью умеренных бактериофагов. Открыта в 1952 Дж. Ледербергом и Н. Циндером при анализе причин изменения наследств, признаков у некоторых штаммов бактерии (Salmonella typhimurium) при их совместном выращивании обнаружена у многих бактерий: сальмонелл, шигелл, бацилл, а также у актиномицетов. Установлено, что при индукции профага иногда происходит включение в зрелую фаговую частицу фрагмента бактериальной хромосомы. Фаг, несущий генетический материал бактерии, называют трансдуцирующим (ТФ). При заражении ТФ чувствительной бактерии фрагмент хромосомы донора переносится в клетку реципиента. В зависимости от типа бактериофага от донора к реципиенту переносится либо строго определённый фрагмент бактериальной хромосомы (специфическая или ограниченная трансдукция), либо любой фрагмент бактериальной хромосомы (общая или неспецифическая трансдукция). Фаги, осуществляющие специфическую трансдукцию, как правило, переносят несколько генов, а осуществляющие общую трансдукцию— 1—2% генов бактерий. В этом случае в ТФ собственная ДНК заменена аналогичным по размерам фрагментом бактериальной хромосомы. Это свойство трансдукции используется в генетическом картировании: по частоте совместного переноса двух генов судят о расстоянии между ними на хромосоме.

В случае устойчивой общей трандукции фрагмент включается в хромосому реципиента за счёт двойного кроссинговера, и в результате возникают устойчивые рекомбинанты. При абортивной общей трансдукции фрагмент донора не включается в хромосому реципиента и не реплицируется, поэтому при делении клеток сохраняется только в одной линии потомков. При ограниченной трандукции фрагмент донора включается в хромосому реципиента вместе с несущим его геномом фага, который т. о. переходит в состояние профага.

**2. Генетическое картирование актиномицетов**

Генетика актиномицетов исследована достаточно хорошо. Для наиболее изученных видов еще с конца 50-х гг. составлялись на основании конъюгационных скрещиваний подробные генетические карты с множеством нанесенных на них маркеров. Эти карты были кольцевыми.

Генетическое картирование проводится с помощью Днк – гибридизации. Данный метод основан на способности ДНК и РНК специфически соединяться (гибридизироваться) с комплементарными олигонуклеотидными фрагментами, искусственно синтезированными и меченными ферментом, флюорохромом или изотопом. Эти фрагменты называются зондами. Для проведения молекулярной гибридизации молекулу исследуемой ДНК расплетают, одну нить закрепляют на специальном фильтре, который помещают в раствор, содержащий меченый зонд. Создаются условия, благоприятные образованию двойных спиралей. При наличии комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют между собой двойную спираль. После окончания гибридизации и отмывания несвязавшихся продуктов проводится детекция образовавшегося комплекса при помощи соответствующей метки.

Данные о наличии перестроек генома ряда мутантов актиномицетов получены в экспериментах по ДНК - гибридизации, в которых в качестве зонда использовали 0,85 т.п.н. фрагмент плазмиды pUS8, несущий ген kmr.

Поскольку ДНК актиномицетов имеет высокий ГЦ-состав (70-74%) , для получения макрофрагментов хромосомной ДНК используются эндонуклеазы рестрикции, сайты узнавания которых содержат лишь АТ-пары. А в результате картирования актиномицетов определяют размеры хромосомной ДНК исследуемых штаммов как сумму размеров обнаруженных макрофрагментов ДНК, а также определяют длину молекулы ДНК. Дальнейшие исследования в этой области позволят сделать новые открытия в этой области.

**Заключение**

Таким образом, на настоящий момент у актиномицетов описана передача генетического материала с помощью плазмид, причем для данной группы микроорганизмов характерны не только кольцевые плазмиды, но также и линейные. Хорошо изучен процесс трансдукции, осуществляемый с помощью актинофага, а рекомбинация еще находится на стадии изучения.

На основании конъюгационных скрещиваний с конца 50-х годов были созданы кольцевые генетические карты актиномицетов. При создании генетических карт применяются химические и физические методы, наиболее эффективным является метод ДНК-гибридизации, осуществляемый с использованием олигонуклеотидных праймеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика / Ф. Айала, Дж. Кайгер.- М.: Мир, 1987.- 368 с.
2. Гершковиш И. Генетика / И. Гершковиш. - М.: Мир, 1970. – 280 с.
3. Захаров И.А., Мацелюх Б.П. Генетические карты микроорганизмов / И.А.Захаров, Б. П. Мацелюх. - М.: Наука, 1986. – 250c.
4. Прозоров А.А. Строение генома бактерий: единство или многообразие? // Генетика. – 1995. – Т. 31. – № 6. – С. 741–752.
5. Прокофьева-Бельговская А.А. Строение и развитие актиномицетов / А.А. Прокофьева-Бельговская. – М., 1963. – 250 с.
6. Рыбчин В.Н. Основы генетичесой иженерии./ В.Н.Рыбчин. - С.-П.: Издательство СПбГТУ,1999.- 350с.
7. Сингер М., Берг Б. Гены и геномы./ М. Сингер, Б. Берг.- М.: Мир, 1998.- 394с.