



Федеральное агентство по рыболовству
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Астраханский государственный технический университет»
Система менеджмента качества в области образования, воспитания, науки и инноваций сертифицирована DQS
по международному стандарту ISO 9001:2015

Институт рыбного хозяйства, биологии и природопользования

Кафедра «Прикладная биология и микробиология»

Учебно-методическое пособие по дисциплине
«Селекционные методы исследований в прикладной микробиологии и
биотехнологии»
для аспирантов направления
06.06.01 «Биологические науки»
направленность «Биотехнологии (в том числе бионанотехнологии)»

Астрахань – 2017

Составитель: д.б.н., профессор, зав. Кафедрой «Прикладная биология и микробиология» О.Б. Сопрунова

Рецензент: к.б.н., доцент С.В. Еремеева

Учебное пособие по дисциплине «Селекционные методы исследований в прикладной микробиологии и биотехнологии» утверждено на заседании кафедры **«Прикладная биология и микробиология» «09» ноября 2017 г., протокол № 10.**

© Астраханский государственный технический университет

СОДЕРЖАНИЕ

1. Роль и место генетики микроорганизмов в системе биологических наук. Основная терминология и номенклатура, применяемые в генетике микроорганизмов
2. Наследственность и изменчивость микроорганизмов
3. Способы передачи генетической информации у бактерий. Конъюгация
4. Способы передачи генетической информации у бактерий: трансформация
5. Способы передачи генетической информации у бактерий: трансдукция
6. Селекция промышленных микроорганизмов. Популяционные закономерности
7. Методы генетического конструирования микроорганизмов для использования в качестве промышленных штаммов

Роль и место генетики микроорганизмов в системе биологических наук.

Основная терминология и номенклатура, применяемые в генетике микроорганизмов

Особенностью современной генетики является широкое использование в ней как объектов исследования бактерий и их вирусов (бактериофагов). Дрозофила не занимает теперь монопольного положения при изучении теоретических проблем общей генетики. Интересно отметить, что микроорганизмы долго не привлекали к себе достаточного внимания исследователей. Ошибочно считалось, что бактерии лишены дифференцированных структур, определяющих их наследственные признаки. Отсюда возникло неверное представление об обособленности бактерий и вирусов от других классов живых существ и в связи с этим — о невозможности их использования для изучения генетических проблем. Весьма малые размеры бактериальной клетки, кажущееся отсутствие у них дифференцированных структур, надежно отделяющих их от среды, в которой они развиваются, породили ложную теорию о том, что фенотип микробов не находится под контролем генетических структур, как это наблюдается у высших растений и животных. Предполагалось, что изменения, наблюдаемые у микроорганизмов, возникают в результате прямого действия химических факторов среды на компоненты клетки. Сейчас для нас совершенно очевидна неполноценность этих взглядов, возникшая в результате несоответствия между применявшимися методами исследования и биологическими особенностями изучаемого объекта.

Несмотря на это, все же оставалось ясным, что микроорганизмы таят в себе ряд качеств, превращающих их в весьма ценный объект для генетических исследований. Они легко культивируются, очень быстро размножаются, а их малые размеры дают возможность оперировать с огромным количеством особей при весьма малых объемах исследуемого материала. Так, например, в отдельном опыте с дрозофилой экспериментатор в среднем может учесть от 100 до 1000 мушек, в то время как в эксперименте с бактериями он оперирует популяцией, содержащей до 10^{10} — 10^{11} индивидуальных организмов. Однако развитие микробной генетики и превращение ее в одну из важных отраслей современной биологии оказалось возможным лишь после того, как возникли связи между микробиологией, физикой, физической химией и биохимией.

Генетика микроорганизмов (включая ее основной раздел — генетику бактерий) появилась на свет лишь в тридцатых годах XX столетия. Создание техники морфологического исследования как в световом, так и в электронном микроскопе опровергло утверждение об отсутствии у бактерий структур, аналогичных ядру клеток высших организмов, что явилось одной из важных предпосылок для включения этих микроорганизмов в сферу генетических исследований.

Именно на бактериях впервые была установлена химическая природа наследственного материала и тем самым заложен фундамент молекулярной

генетики. Последующее развитие этой новой отрасли генетики завершилось, как известно, решением проблемы генетического кода.

Оценивая вклад генетики микробов в развитие общей генетики, нельзя не указать, что на микробных объектах были открыты формы переноса генетического материала (трансформация, трансдукция, конъюгация), не известные классической генетике, на основе которых, в свою очередь, удалось изучить молекулярные механизмы генетических рекомбинаций, тонкую структуру гена и ряд других вопросов. Все это показывает, насколько плодотворным оказалось использование микроорганизмов для решения ряда общих проблем, сформулированных классической генетикой.

На данном этапе генетика микроорганизмов играет важнейшую роль в развитии генетической мысли, определяет правильную направленность исследований, стимулирует возникновение новых идей и расширяет возможности для их экспериментального изучения. Не будет преувеличением утверждать, что каждый, интересующийся любой из проблем современной генетики, должен быть знаком с основами генетики микробов.

Построение любой номенклатуры прежде всего предусматривает четкое определение подлежащих обозначению понятий и применение к ним единых терминов. В полной мере это относится и к генетической номенклатуре, что и определяет предпосылаемое описанию собственно номенклатуры определение основных терминов, применяемых в бактериальной генетике.

Генетический аппарат бактерий, как и других организмов, именуется **геномом**. Основные генетические детерминанты бактерий, обеспечивающие их жизнедеятельность, организованы в **бактериальную хромосому** — молекулу ДНК, замкнутую в кольцо, фрагменты которой представляют собой **хромосомные гены**.

Помимо хромосомных генетических детерминант, бактериям присущи **эписомные генетические элементы** (находящиеся в свободном или интегрированном с бактериальной хромосомой состоянии) и **плазмиды** (существующие в бактериях только автономно). Как эписомы, так и плазмиды по своей природе являются кольцевыми молекулами ДНК, размер которых составляет 1—2% от размера хромосомы, что предполагает возможность включения в их состав до 50—100 генетических детерминант.

Геном бактерий, таким образом, включает как хромосомные, так и внехромосомные генетические детерминанты — гены. Термин «ген» изначально существует в генетике и обозначает наименьшую, функционально активную структурно организованную генетическую единицу, детерминирующую синтез одного полипептида.

Различают **гены структурные** и **гены регуляторные**. Первые определяют структуру синтезируемых бактериями белков, вторые — регуляцию их синтеза.

Номенклатура предусматривает взаимозаменяемость терминов «ген» и «локус», которые согласно формулировке, предложенной ее авторами обозначают специфическую последовательность нуклеотидов, детерминирующую последовательность аминокислот соответствующего полипептида.

В современной литературе по генетике бактерий используются и другие термины, определяющие собой генетические детерминанты как таковые либо находящиеся в составе бактериальной хромосомы. В первом случае таким термином является заимствованный из генетики бактериальных вирусов «**цистрон**», во втором — «**генетический локус**».

Введение понятия «цистрон» в бактериальную генетику было обусловлено тем, что в составе некоторых фрагментов бактериальной хромосомы, рассматривавшихся ранее как единая функциональная единица и именуемых генами, было выявлено наличие нескольких функционально и структурно обособленных генетических единиц. Так, например, в составе фрагмента бактериальной хромосомы, именовавшегося ранее триптофановым геном, методом генетического анализа было установлено несколько функциональных единиц, каждая из которых, как оказалось, детерминирует фермент, обеспечивающий превращение исходного или предыдущего промежуточного продукта в последующий промежуточный продукт с конечным образованием триптофана.

Подобно триптофану, синтез других соединений также совершается путем образования и последующего использования ряда промежуточных продуктов. Все превращения, происходящие в ходе этого синтеза, называют **биохимическим** путем синтеза соответствующего соединения, последнее же именуется **конечным продуктом**.

Изучение генетических основ образования ряда конечных метаболитов выявило ту же закономерность, что и установленную для синтеза триптофана; при этом были выявлены отдельные генетические детерминанты, которые контролируют образование продуктов, обеспечивающих превращение промежуточных соединений в ходе синтеза конечного продукта. К этим-то генетическим единицам и начали применять термин «цистрон», что оказалось не оправданным.

Генотипы бактерий могут различаться как по набору генов, так и по состоянию их, т. е. по отсутствию или наличию у них разного рода **мутаций**, представляющих собой различные структурные перестройки (замена оснований, делеция и т. д.) в соответствующем генте фрагменте молекулы ДНК.

Мутации могут возникать в разных участках гена, что может отражаться в различно выраженных нарушениях его функции. Участок гена, в котором локализована данная мутация, называют **сайт** (англ. site — участок). В отечественной литературе локализацию мутации часто называют «участок».

Различные генотипы свойственны не только разным видам бактерий, но и разным штаммам одного и того же вида. При генетической характеристике

штаммов принято различать штаммы дикого типа и их производные, или дериваты.

Дикими типами считают штаммы, свойства которых соответствуют свойствам штаммов данного вида, наиболее часто встречающимся в естественных условиях. Штаммы дикого типа могут быть выделены не только из естественной среды, но и отобраны из коллекций лабораторных культур.

Производные штаммов дикого типа могут отличаться от последних состоянием одного или нескольких генов, а также наличием или отсутствием эпизомных элементов.

Гены, детерминирующие свойства, характерные для штаммов дикого типа, именуются **генами дикого типа**, а гены, несущие мутации,— **мутировавшими генами**, или **аллелями гена дикого типа**.

Производные штаммы, обладающие мутировавшими генами, называются **мутантами**.

Благодаря свойственному бактериям генетическому обмену, сопровождающемуся возникновением генетических рекомбинаций, мутировавшие гены и гены дикого типа могут взаимно заменяться. В результате генетических скрещиваний возникают **рекомбинантные генотипы**, свойственные производным штаммам бактерий — **рекомбинантам**, образующимся при указанных скрещиваниях.

Следует иметь в виду, что штаммы, генотипически идентичные экспериментально получаемым мутантам и рекомбинантам — производным штаммов дикого типа, могут быть выделены также из естественной среды. Происхождение этих штаммов, по-видимому, связано с осуществлением генетических процессов (мутабельность, генетический обмен и др.) в условиях естественного обитания бактерий.

О генотипе таких штаммов, в частности о полноценном или мутировавшем состоянии их генов, судят на основании сложившихся представлений о генах, присущих дикому типу данного вида бактерий.

При определении генотипа штаммов, выделенных в естественных условиях особенно следует иметь в виду необходимость проведения тщательных генетических исследований. Известно, что штаммы, фенотипически не обнаруживающие нарушения функций, могут нести мутации, но выражение этих мутаций может быть подавлено другими мутациями, локализованными в генах-супрессорах. Поэтому при генотипической характеристике штаммов следует исключить (или выявить) наличие супрессоров.

Сумму свойств бактерий, проявляющихся в данных условиях, называют их **фенотипом**. Понятие «фенотип» может характеризовать свойства бактериального штамма или относиться к отдельным генам. В последнем случае говорят о **фенотипическом выражении гена**.

Обозначать гены строго соответственно представлению о их функции, т. е. соответственно детерминируемому полипептиду, не представляется возможным. Для многих генетически выявленных и охарактеризованных генов детерминируемые ими полипептиды остаются неустановленными. И в тех случаях, когда указанные полипептиды уже известны, идентификация их, как правило, осуществлялась после выявления (а следовательно, и обозначения) соответствующего гена.

Выявление же генов и установление их функции производятся на основании утраты данной функции в результате мутации. Вследствие этого гены принято называть словом, которое отражает фенотипическое изменение, возникающее при мутации в данном гене. Например, галактозный, арабинозный и мальтозный гены называют так потому, что мутации в этих генах приводят к утрате бактериями способности использовать соответствующие углеводы в качестве единственных источников энергии. Таково же происхождение названия триптофанового, треонинового, лейцинового и других генов, мутации в которых обуславливают утрату способности синтеза соответствующих аминокислот.

Принятая условность названия генов, отражающаяся и в их номенклатурном обозначении, не вносит каких-либо неясностей. Наоборот, избираемые обозначения играют мнемоническую роль, т. е. обеспечивают ассоциации с соответствующими признаками бактерий, что облегчает запоминание названий генов и обозначающих их символов.

Номенклатурное обозначение генов определяется их названием и обеспечивается символами из трех строчных букв латинского алфавита (*ara* для арабинозного гена, *mal* для мальтозного, *gal* для галактозного, *trp* для триптофанового, *leu* для лейцинового, *thr* для треонинового т. д.). В случае отсутствия мутации в гене (дикий тип данного гена) к его буквенному обозначению добавляется знак плюс (*trp*⁺, *ara*⁺, *leu*⁺ и т. д.).

Структурные гены, продукты которых осуществляют отдельные стадии синтеза одного конечного продукта, называют, исходя из наименования последнего. При этом каждый отдельный ген обозначается прописной буквой латинского алфавита, которая пишется вслед за трехбуквенным символом. Для известных и вновь выявляемых генов одного биохимического пути применяют прописные буквы в порядке их алфавитной очередности. Считается желательным, чтобы алфавитный порядок используемых букв соответствовал порядку участия продуктов соответствующих генов в ходе синтеза конечного метаболита. Так, например, гены биохимического пути синтеза триптофана обозначаются *trpA*, *trpB*, *trpC* и т. д.

Здесь следует заметить, что в сложных клеточных метаболических процессах отдельные промежуточные продукты участвуют не в одном, а во многих биохимических путях. Более того, конечные метаболиты одних биохимических путей являются промежуточными продуктами для синтеза других соединений.

Таким образом, строгого разграничения биохимических путей быть не может. Вследствие этого и гены, контролирующие превращение промежуточных продуктов, не могут быть строго разграничены соответственно биохимическим путям. Поэтому обозначение группы генов одним и тем же символом следует рассматривать лишь как свидетельство участия их продуктов в данном биохимическом пути, но не как отрицание значения этих генов для осуществления других клеточных процессов.

Для обозначения генов регуляторного типа применяется тот же принцип, что и для структурных генов. При желании подчеркнуть регуляторный характер гена предлагается использовать определенные буквы. Если продукты генов являются репрессорами, их можно обозначать, начиная с буквы R, (например *argR*, *argS* и т.д.). Для обозначения же генов-операторов можно пользоваться буквами O и последующими (например, *araO*, *araP* и т. д.). Допускается применение и прописных букв в общей очередности использования их для обозначения генов данного биохимического пути. Например, ген, регулирующий активность структурных генов *araA*, *araB*, *araD*, назван *araC*.

Гены, ответственные за чувствительность или резистентность бактерий к различным агентам, обозначают символом, происходящим от наименования соответствующего агента (*str*, если ген определяет чувствительность к стрептомицину, *azi* — к азиду, *uvr* — к УФ-лучам, *pen* — к пенициллину, *clk* — к колицину K, *chr* — к хромому, *acr* — к акридину и т. д.).

В случае выявления нескольких генов, в которых мутации вызывают изменение чувствительности к одному и тому же агенту, их обозначают по тому же принципу, что и гены одного биохимического пути. Так, у кишечных палочек описан ряд генов *uvr* (*uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD* и т.д.). У сальмонелл установлено два гена, определяющих чувствительность к стрептомицину (*strA* и *strB*).

Супрессорные локусы, мутации в которых подавляют выражения мутаций в других генах, обозначают символом *sup*. Прописная буква, добавляемая к данному символу, как и в случаях с другими генами, используется для обозначения различных *sup*-локусов (*supA*, *supB* и т. д.).

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Место генетики микроорганизмов в системе биологических наук, ее связь с другими науками.
2. Микроорганизмы как объект генетических исследований.
3. Особенности современной генетики микроорганизмов.
4. Понятия «ген», «локус» и «цистрон».
5. Штамм дикого типа, мутантные штаммы.
6. Номенклатурное обозначение генов.

Наследственность и изменчивость микроорганизмов

Успехи в познаний генетической организации бактериальной клетки стали возможны благодаря прогрессу в изучении изменчивости бактерий, разработки методов селекции и развития исследований в области бактериального мутагенеза. Поэтому целесообразно привести некоторые данные об изменчивости бактерий и дать ряд определений, необходимых для дальнейшего изложения.

Генотип и фенотип бактерий

Генотипом бактерии, так же как генотипом другого организма, обозначается совокупность генов, т. е. ее генетический потенциал.

Фенотип — это комплекс признаков, наблюдаемых у бактерии в конкретных условиях ее существования. Таким образом, фенотип бактерии представляет собой результат взаимодействия ее генотипа и среды. Иными словами, действие определенного гена проявляется фенотипически лишь в определенных условиях внешней среды.

Например, ряд бактерий способен синтезировать ферменты, обеспечивающие сбраживание лактозы, только в присутствии данного углевода. Установлено, что этот признак обусловлен специальными генами бактериальной хромосомы. Изменение наследственного признака возникает вследствие мутации хотя бы одного из генов, контролирующих этот признак. Такая бактерия не синтезирует соответствующего фермента, независимо от присутствия углевода в среде.

Таким образом, изменение способности бактерий ферментировать лактозу может быть результатом изменений либо генетического аппарата, либо среды, в которой бактерия находится. В первом случае мы говорим о генотипической изменчивости, во втором — о фенотипической, не наследственной изменчивости. Это иллюстрирует одно из фундаментальных положений генетики: взаимоотношение между генотипом и фенотипом зависит от условий окружающей среды.

Одним из важнейших заключений, сделанных на основании изучения структуры и функции ДНК, является то, что наследственные изменения у организмов возникают в результате изменения последовательности нуклеотидов вдоль цепочки ДНК. Такие изменения последовательности оснований в зависимости от их локализации в хромосоме фенотипически проявятся в изменении того или иного признака бактерии.

Очевидно также, что изменение последовательности нуклеотидов в ДНК может быть следствием разных процессов. Первый из них можно определить как результат ошибок при репликации ДНК. Ошибки возникают спонтанно или как следствие химических, физических или физико-химических воздействий. Комплементарная нить ДНК, синтезирующаяся на такой поврежденной матрице, отличается от родительской тем, что вместо данного азотистого основания,

присутствовавшего в данной точке, появляется иное, т.е. искажается генетическая информация. В молекуле ДНК может также произойти выпадение участков (делеция), перемещение отдельного участка относительно другого (транслокация) или же изменение ориентации данного сегмента молекулы, т. е. его поворот на 180° (инверсия).

Третий процесс, также завершающийся изменением последовательности нуклеотидов, возникает в результате замены участка ДНК клетки аналогичным участком из другой бактерии, генетически отличающейся от первой. В этом случае изменение наследственных признаков у бактерий возникает в результате

переноса фрагмента генетического материала одной клетки в другую с последующей рекомбинацией между хромосомой реципиента и фрагментом хромосомы донора. Изменение генотипа, возникающее в результате первых двух процессов, относят к категории мутаций. Иными словами, мутацией называют изменение генотипа, не связанное с рекомбинационным механизмом.

Бактериальные мутации обнаруживают по появлению наследственных (генотипических) изменений, которые могут относиться к любому из известных признаков микроорганизма. По мере расширения наших знаний, касающихся структуры, физиологии и биохимии бактерий, увеличиваются возможности обнаружения разных типов мутантов. К таким важнейшим признакам относятся:

1. ауксотрофность по аминокислотам, т. е. неспособность бактерии синтезировать соответствующую аминокислоту; ауксотроф растет на питательной среде в присутствии готовой аминокислоты или какого-нибудь из ее промежуточных продуктов; микроорганизмы, способные синтезировать соответствующую аминокислоту или другие необходимые для жизни соединения, называют прототрофами;
2. ауксотрофность по пуринам;
3. ауксотрофность по пиримидинам;
4. ауксотрофность по витаминам;
5. способность или неспособность бактерии утилизировать различные источники энергии;
6. чувствительность — резистентность к различным антибактериальным веществам или зависимость от них;
7. чувствительность или резистентность к бактериофагу;
8. лизогенность;
9. колициногенность.

Для обозначения мутантов предложена следующая система символов. Ауксотрофность, или прототрофность, обозначают начальными буквами метаболита, например, потребность в гистидине — *his* или *his*⁻, в триптофане — *try* или *try*⁻, в аргинине — *arg* или *arg*⁻ и т. д., прототрофность по аргинину — *arg*⁺.

Если на генетической карте известно положение мутировавшего гена, то к наименованию метаболита добавляют большую латинскую букву, обозначающую

ген. Обозначение *his B* характеризует гистидиновый ауксотроф, мутация которого локализована в гене В, а *his E* — ауксотроф, у которого мутация произошла в другом гене Е. Для дифференцирования двух мутантов в одном и том же гене к обозначению добавляют арабскую цифру, например, *try D-10*, *try D-55*, что означает 10-й и 55-й триптофановые ауксотрофы по гену D.

Соответственно двойные и тройные ауксотрофы характеризуют следующим образом: *arg⁻*, *cys⁻* или *arg*, *cys* т. е. ауксотроф зависимый и от аргинина и цистина.

Если двойной ауксотроф получен в результате двух последовательных, независимых мутационных актов, он обозначается трехбуквенным индексом; если он получен в результате одного мутационного события, т. е. в бактерии одновременно возникли две мутации, то такой ауксотроф обозначают двухбуквенным символом, например *phty*, т. е. бактерия, зависимая от фенилаланина и тирозина.

Мутирование по перечисленным признакам дает возможность осуществить эффективную селекцию мутантов и произвести их количественный учет.

Подразделение мутаций на различные группы определяется критерием, используемым для их дифференцирования. Это можно пояснить следующими примерами. Если в качестве критерия для отличия двух мутаций использовать их происхождение, то можно говорить о спонтанных и индуцированных мутациях; если в качестве критерия используется направление мутационного изменения, т. е. изменение дикого типа в мутантный или наоборот, то мутации подразделяют на прямые и обратные. Наконец, мутационные изменения можно дифференцировать по локализации их в хромосоме, по характеру изменений в кодирующем аппарате и т. д.

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Генотип и фенотип бактерий
2. Важнейшие признаки мутантных бактерий
3. Примеры обозначения мутантных штаммов бактерий

Способы передачи генетической информации у бактерий. Конъюгация

Конъюгация – это один из способов переноса генетического материала от одной бактериальной клетки к другой. Этот феномен был открыт при изучении генетических рекомбинаций у бактерий в 1946 г. учеными Ледербергом и Татумом. Передача генетической информации при конъюгации связана с установлением непосредственного контакта между донорской (мужской) и реципиентной (женской) бактериальной клетками. После установления такого контакта в женскую клетку может быть перенесен значительный фрагмент мужской хромосомы (иногда даже вся хромосома), а затем этот фрагмент может подвергнуться рекомбинации с соответствующим (гомологичным) участком хромосомы реципиента.

Половой фактор

Способность к конъюгации определяется половым фактором (F), представляющим собой эписомный генетический элемент, присутствующий в клетках в свободном или интегрированном с хромосомой состоянии. Клетки, несущие фактор F, обладают свойствами донора и именуется мужскими клетками. Женские (F⁻) клетки лишены фактора F и в скрещиваниях исполняют роль реципиента. Конъюгация состоит в сближении конъюгирующих клеток, образовании между ними конъюгационного мостика и передаче через этот мостик генетического материала донора в клетку реципиента. Передача генетического материала происходит только от клеток, содержащих фактор F, к клеткам, лишенным этого фактора, т. е. от F⁺ к F⁻ бактериям.

Наличие у кишечных палочек полового (F) фактора устанавливают путем определения их чувствительности к особому рода фагам, адсорбирующимся на поверхностных структурах, детерминируемых геном фактора F. К числу таких фагов, именуемых мужскими, относятся фаги fd, fl и M13, геном которых представлен однонитевой ДНК, а также рНК-содержащие фаги: R17, MS2, f2, M12, fr, Qβ. Получены также фаги, специфические для сальмонелл, содержащих фактор F. F-фактор представляет собой кольцевую молекулу ДНК (Sharp e. a., 1972) молекулярной массы около $4 \cdot 10^7$ дальтон. В количественном отношении его ДНК составляет около 2% от ДНК бактериальной хромосомы (молекулярная масса бактериальной хромосомы $2,9 \cdot 10^9$). На основании этого рассчитано, что ДНК фактора F включает около $6 \cdot 10^4$ нуклеотидов. В геноме фактора F заложена информация, обеспечивающая его вегетативную репликацию в автономном состоянии, а также обуславливающая его свойства как полового фактора. Последние прежде всего проявляются в образовании бактериями, обладающими фактором F, специальных поверхностных структур бактериальной клетки — пилей (от англ. pili-ворсинка). Пили представляют собой длинные (от 1 до 20 мкм) тонкие трубчатые фибриллы белковой природы, просвет которых имеет величину 3 нм. Число пилей у каждой мужской клетки немногочисленно и, как полагают,

соответствует числу копий фактора F, содержащихся в клетке. Существуют данные, позволяющие предполагать, что пили обеспечивают не только контакт конъюгирующих клеток, но и саму передачу генетического материала донора, чему служит их внутренний канал. Прямых доказательств этого (обнаружение ДНК в просветах пилей конъюгирующих клеток) не получено. К тому же малый размер внутреннего канала пилей относительно молекулы ДНК позволяет сомневаться в том, что указанная функция им действительно присуща. Наличием пилей не ограничиваются атрибуты мужских бактерий, обусловленные присутствием фактора F и обеспечивающие их способность передавать свой генетический материал. Полная генетическая карта фактора F еще не построена, т. е. исчерпывающих данных о генах этого фактора и их функции нет. Вместе с тем показано, что в пределах фактора F существует 11 комплементарных групп — генов *tra* (от англ. transfer — перенос), функции которых необходимы для осуществления конъюгационного переноса генетического материала. При этом функции только семи из них связаны с формированием пилей, а функции других — с переносом хромосомы как таковым. Описана температурочувствительная мутация (*ts*) фактора F, не влияющая на его способность к автономной репликации и на образование конъюгирующих пар с клетками F⁻, но обуславливающая утрату способности переносить генетический материал при непермиссивной температуре. Указанная мутация изменяет чувствительность к некоторым РНК-содержащим мужским фагам. Действие ее снимается в присутствии дерепрессированного (*fi*⁺) фактора R. Наличие такой мутации говорит в пользу приведенного выше предположения, что пили необходимы не только для образования пар, но и для переноса генетического материала.

У фактора F получены также мутации *ts*, обуславливающие утрату способности его автономной репликации. Кроме того, получены мутации фактора F, свидетельствующие о возможном наличии в его составе гена (или генов), контролирующего несовместимость двух факторов F в одной клетке, т. е. невозможность их совместной репликации в одной бактериальной клетке. Maas и Goldschmidt описали мутации *inc*⁻ фактора F (от англ. incompatibility — несовместимость). В исследованиях с факторами F, несущими мутации *inc*⁻, были получены данные, свидетельствующие о возможности совмещения мутировавших факторов F. При этом, однако, полностью не исключалось, что наблюдаемое проявление автономности двух факторов F было связано с их рекомбинацией или рекомбинациями с хромосомой. Исследования, осуществленные в условиях, исключающих рекомбинации (использование мутантов *recA*), продемонстрировали выделение бактериального мутанта, допускающего репликацию двух факторов F в одной клетке. Такая возможность оказалась строго специфичной: в полученном мутанте только одна из нескольких испытанных пар факторов F могла реплицироваться. На основании полученных результатов авторы пришли к

заклучению, что в несовместимости факторов F определенную роль играет клетка-хозяин.

Имеющиеся сведения относительно факторов F относятся к кишечным палочкам, у которых этот фактор был обнаружен впервые. В дальнейшем фактор F кишечных палочек был передан экспериментальным путем сальмонеллам и шигеллам, что сыграло большую роль в развитии генетических исследований на этих микроорганизмах.

Другие половые факторы бактерий.

Половой фактор обнаружен также у холерного вибриона. Наряду со сходством этого фактора с фактором F кишечных палочек он имеет и значительные отличия. Приоритет воспроизведения генетического обмена у данных микроорганизмов принадлежит индийским исследователям, назвавшим половой фактор холерных вибрионов фактором P. Конъюгационные скрещивания $P^+ \times P^-$ холерных вибрионов продемонстрировали не только возможность передачи фактора P, но и мобилизацию этим фактором хромосомных маркеров. При этом был установлен односторонний ориентированный перенос ($P^+ \rightarrow P^-$) хромосомы и стимуляция донорной активности УФ-облучением. У холерных вибрионов, обладающих фактором P, обнаружены поверхностные структуры, аналогичные пиям кишечных палочек (Bhaskaran e. a., 1969). Фактор P был выделен и охарактеризован как ковалентно связанная замкнутая двунитевая молекула ДНК размером 86 млн. дальтон. Согласно полученным данным (Parker, Romig, 1972), 40% этой молекулы представлены парами ГЦ (против 47 пар ГЦ хромосомной ДНК холерных вибрионов).

Одна из примечательных особенностей холерных вибрионов, содержащих фактор P, состоит в образовании на газоне клеток P^- так называемых лакун. По внешнему виду они напоминают негативные колонии, образуемые некоторыми бактериальными вирусами, или зоны ингибированного роста, возникающие при действии бактериоцинов. Parker и Romig (1972) показано, что образование лакун обусловлено свойствами донорских клеток. Лакуны, по мнению этих авторов, представляют собой участки активного взаимодействия клеток P^+ и P^- и не возникают вследствие выделения ими продукта, диффундирующего в среду.

Таким образом, имеющиеся данные, характеризующие фактор P, позволяют полагать, что этот фактор может рассматриваться как своеобразная плаزمид, отличная от фактора F.

Фактор P может передаваться в скрещиваниях не только «классических» штаммов холерных вибрионов, но и холерных вибрионов типа Эль-Тор (P^+ с классическими холерными вибрионами (P^-). При этом частота передачи несколько снижается по сравнению с гомологичными скрещиваниями. Повышение эффективности указанной передачи наблюдается в результате выращивания клеток P^+ перед скрещиванием при 44,5° C (Bhaskaran e. a., 1973).

Bhaskaran и Sinha (1971) описали другой трансмиссибельный фактор, идентифицированный у нехолерных вибрионов. Этот фактор, названный авторами фактор V, может сосуществовать с фактором R.

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Конъюгация как способ передачи генетической информации у бактерий.
2. Половой фактор F *E. coli*.
3. Другие половые факторы бактерий.
4. Строение половых пилей.

Способы передачи генетической информации у бактерий: трансформация

К настоящему времени обнаружены или предполагаются различные стадии трансформации, которые можно в общих чертах представить следующим образом:

1. Контакт ДНК с клеткой. Обратимая стадия.
2. Поглощение ДНК (называемое также проникновением, включением или фиксацией). Необратимая стадия, нечувствительная к ДНК-азе. Биологически активная трансформирующая ДНК временно не обнаруживается. Не изменяется при обработке хлорамфениколом.

3. Соединение («спаривание», синапсис) трансформирующей ДНК с соответствующим фрагментом хромосомы реципиента. Интеграция части трансформирующей (экзогенной) молекулы ДНК с реципиентной (эндогенной) ДНК хромосомы в результате рекомбинации. Можно обнаружить биологически активную ДНК. Последующие события подавляются хлорамфениколом.

4. Репликация интегрированной в хромосоме новой информации.

Можно обнаружить биологически активную ДНК. Введенный маркер реплицируется (копируется) при последующей репликации ДНК хромосомы реципиента.

Развитие трансформированного клона

Если осуществление первых стадий обязательно связано с ростом культуры, то третья и четвертая стадии могут проходить в условиях слабого роста и даже в том случае, когда рост и синтез ДНК подавляются (по крайней мере частично). Естественно, что необходимым для осуществления пятой стадии условием является нормальный синтез ДНК.

Для того чтобы быть поглощенной клетками, молекула ДНК не должна иметь размеры меньше тех, которые, по-видимому, соответствуют молекулярному весу, равному приблизительно 10^5 . Молекулярный вес ДНК в препарате, обладающем высокой трансформирующей активностью, составляет около 10^7 ; с уменьшением молекулярного веса молекулы ДНК происходит быстрое уменьшение трансформирующей активности вследствие разрыва молекулы (без разделения комплементарных цепей) под действием высокого давления или ультразвука. Одноцепочечная (прогретая) ДНК включается в клетки значительно хуже, чем нативная двуцепочечная ДНК.

В исследованиях с ДНК, меченой Р32, было получено экспериментальное доказательство того, что в процессе проникновения в клетку двуцепочечная ДНК превращается в одноцепочечную; по крайней мере при трансформации у пневмококков, что донорная ДНК проникает одним концом молекулы через клеточную мембрану и прикрепляется к одной из цепей ДНК реципиента. ДНК-аза последовательно атакует одну из цепей ДНК и разрушает ее (будучи неактивной для другой цепи, имеющей противоположную полярность), тем самым

способствуя втягиванию второй, неповрежденной нити в клетку. Хотя это предположение и нуждается в экспериментальной проверке, имеющиеся данные указывают, что, по меньшей мере у пневмококков, трансформирующая ДНК сразу после поглощения находится в одноцепочечной форме и в таком виде участвует в последующей рекомбинации. Очевидно, существованием такой одноцепочечной формы можно объяснить отсутствие биологически активной ДНК на второй стадии трансформации.

Рассчитано, что у компетентных бактерий на клетку приходится от 30 до 75 участков, адсорбирующих ДНК. Как показано при изучении конкурентных взаимоотношений в процессе трансформации между трансформирующей ДНК и ДНК другого типа (гомологичной или гетерологичной), эти участки могут связывать любые ДНК, имеющие достаточный молекулярный вес. Таким образом, большие количества нетрансформирующей гомологичной или гетерологичной ДНК могут конкурировать с ДНК, несущей исследуемый маркер, и снижать или снимать действие трансформирующей ДНК.

Как показано в исследованиях с использованием ДНК, меченной P32, ДНК, полученная из клеток различных видов и даже не вызывающая образование трансформантов, может проникать в компетентные клетки приблизительно с той же эффективностью, что и ДНК из близкородственных видов. Для того чтобы вызвать события, приводящие к образованию трансформированного потомства, по-видимому, достаточно, чтобы в клетку вошла лишь одна молекула трансформирующей ДНК.

Как было обнаружено в ряде исследований, необратимое поглощение меченой ДНК непосредственно коррелировало с частотой трансформации, однако полученные недавно данные показывают, что такая корреляция наблюдается не всегда. Время, необходимое для эффективного первоначального контакта ДНК с компетентной клеткой, может быть очень коротким. Так, трансформация может происходить, если ДНК-аза добавляется спустя 10 сек. после обработки компетентных клеток пневмококков трансформирующей. Те изменения у *Neisseria meningitidis*, которые позволяют отдельным клеткам в популяции клеток образовать колонии, характерные для типоспецифических вариантов после обработки трансформирующим началом, выделенным из типоспецифических клеток, вызываются в течение первых трех минут. Это означает, что после трех минут инкубации клеток с ДНК добавление ДНК-азы к этой системе не окажет влияние на проявление трансформации.

В большинстве случаев (но не во всех) для интеграции части информации экзогенной ДНК с ДНК клетки реципиента (более точно, для рекомбинации между трансформирующей ДНК и эндогенной ДНК) требуется, по-видимому, весьма незначительное время. Интеграция может происходить в пределах 10—30 мин. после поглощения ДНК.

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Определите понятие бактериальной трансформации. От чего зависит вероятность трансформации?
2. Механизм бактериальной трансформации
3. Стадии трансформации
4. Генетическая рекомбинация при трансформации

Способы передачи генетической информации у бактерий: трансдукция

Путь передачи генетического материала от одних бактерий другим, не требующий прямого контакта скрещиваемых бактерий и именуемый трансдукцией, состоит в переносе фрагментов хромосомы бактериальными вирусами, инфицирующими бактерии. Принципиально различными являются два вида трансдукции: генерализованная (или неспецифическая) и специфическая.

В осуществлении первого бактериальный вирус является только переносчиком генетического материала бактерий; во втором вирус включает этот материал в свой геном и передает его, лизогенизируя бактерии-реципиенты. С точки зрения использования генерализованной и специфической трансдукции в исследованиях по генетике бактерий оба феномена представляют значительный интерес, хотя и служат чаще всего различным целям. Последнее обстоятельство определяется указанными выше особенностями процессов, приводящих к генерализованной и специфической трансдукции.

Генерализованная трансдукция

В трансдукционных скрещиваниях бактерий, осуществляемых с помощью фагов, которые обеспечивают генерализованную трансдукцию, реципиентам передается генетический материал от бактерий (доноров), служивших хозяином в предыдущем цикле развития фага.

Впервые генерализованная трансдукция была воспроизведена сальмонеллезным фагом Р22. Использование этого фага в генетических исследованиях, осуществленных на сальмонеллах, оказалось весьма плодотворным с точки зрения как анализа генетического аппарата сальмонелл, так и выяснения механизма генерализованной трансдукции. Генерализованная трансдукция у кишечных палочек осуществляется фагом Р1, применение которого внесло еще больший информационный вклад в развитие представлений о механизмах трансдукции и позволило вскрыть ряд молекулярно-генетических закономерностей, далеко выходящих за рамки самого трансдукционного процесса. Генерализованная трансдукция воспроизведена у ряда микроорганизмов:

B. subtilis, стафилококков и некоторых других.

Фаги, обеспечивающие генерализованную трансдукцию, обычно являются умеренными, т. е. способными лизогенизировать бактериальные клетки. Однако способность этих фагов к генерализованной трансдукции не обусловлена лизогенизацией. Показано, что генерализованная трансдукция обеспечивается своего рода дефектными частицами фагов, присутствующими в фаговой популяции. Указанная дефектность состоит в том, что заключающийся в головках трансдуцирующих частиц генетический материал представлен только фрагментом

бактериальной ДНК (т. е. ДНК хозяина, в котором репродуцировался данный фаг) и не содержит генетического материала фага. Аналогичные данные получены также с фагом P22. При этом показано, что включенная в трансдуцирующие частицы фагов P22 бактериальная ДНК синтезируется до фаговой инфекции и имеет тот же молекулярный вес, что и ДНК фага ($27 \cdot 10^6$ дальтон). Образование трансдуцирующих частиц не связано с интеграцией профагов в хромосому, а происходит в ходе репродукции фагов, сопровождающейся распадом бактериальной ДНК. Вследствие этого трансдуцирующие фаголизаты несут фаговые корпускулы, переносящие различные (включенные в их головки) фрагменты бактериальной хромосомы. Проявлением этого служит формирование трансдуктантов по самым различным генам. Согласно предположению, основанному на исследованиях с фагом P22, трансдуцирующие фаговые частицы, переносящие данный маркер, по своей генетической композиции однородны. Однако результаты исследований ряда авторов свидетельствуют о генетической гетерогенности фрагментов, переносящих один и тот же маркер.

Вследствие разнородности генетического материала, включенного в трансдуцирующие и нетрансдуцирующие частицы, первые были отделены от вторых путем использования метки, включающейся в ДНК, и последующего градиентного центрифугирования. Это позволило установить концентрацию трансдуцирующих частиц в популяции трансдуцирующего фага, составляющих, согласно произведенным расчетам, около 0,3% общей популяции фага P1. Если геном фага состоит примерно из 10^6 нуклеотидных пар, а геном бактерий хозяина (*E. coli*) включает в свой состав $3 \cdot 10^6$ пар нуклеотидов, то трансдуцирующий фаг содержит 3% бактериального генома. Того же порядка цифры получены на основании генетических исследований контрансдукционных скрещиваний. Фаголизаты, обеспечивающие генерализованную трансдукцию, могут быть получены как путем инфекции нелизогенных, так и путем индукции лизогенных по данному фагу бактерий. В обоих случаях бактерии, явившиеся хозяином в последнем цикле развития фага (инфицируемые в первом случае и индуцируемые во втором), будут бактериями-донорами. Трансдуцирующие частицы при сборке корпускул включают в свои головки фрагменты бактериальной ДНК, размер которых сравним с величиной фаговой ДНК. При этом упаковываемая в головку фага бактериальная ДНК представлена линейными, двунитевыми структурами, возникшими при фрагментации хромосомы бактерии-хозяина, присущей бактериальной клетке в момент ее инфицирования.

Полагают, что функция фага может и не быть ответственной за поломы, возникающие в бактериальной ДНК. Двунитевые же разрезы ДНК, ограничивающие ее включение в фаговую головку (т. е. определяющие размер включаемого в фаг фрагмента бактериальной ДНК), по-видимому, определяются функцией фага.

Согласно, имеющимся данным, ДНК трансдуцирующих фагов (P22) при инфекции бактерий превращается в циркулярную форму, что обеспечивается концевыми нуклеотидными повторностями. Циркуляризации же бактериальной ДНК, переносимой трансдуцирующим фагом, не происходит. Фрагменты ДНК донора, вступающие в рекомбинацию с ДНК реципиента, представлены линейными структурами.

Рекомбинации, происходящие при трансдукции, зависят от *Rec*⁺ фенотипа, т. е. осуществляются общим рекомбинационным механизмом. Однако показана возможность образования tandemных диплоидов, т. е. включение привнесенного фагом фрагмента хромосомы донора в последовательность генов реципиента без замещения соответствующего фрагмента реципиентной ДНК. Так, установлено, что возможно получение нестабильных трансдуктантов по трансдуцируемому фагом P1 *missens*-супрессору и *lac* области. В исследованиях с фагом P22 показана возможность передачи и включения обычно летального в гаплоидном состоянии мутантногосупрессора. Образующиеся по данному супрессору трансдуктанты, как и описанные выше, нестабильны и относятся авторами к числу хромосомных дупликаций в области включающегося супрессора.

Генерализованная трансдукция широко используется для конструирования штаммов заданного генотипа, в частности изогенных штаммов. Здесь малый размер передаваемых фрагментов обеспечивает преимущество трансдукции перед конъюгацией. Изогенные штаммы, сконструированные при помощи генерализованной трансдукции, различаются только по участку хромосомы, переносимому трансдуцирующим фагом. Эти различия могут быть еще меньшими при определенном методе. подбора изогенных пар.

Воспроизведение генерализованной трансдукции сопровождается не только формированием рекомбинантов, но и явлением, известным под названием абортивной трансдукции.

Абортивная трансдукция

При абортивной трансдукции, как и при завершенной: генерализованной, клетки-реципиенты приобретают генетический материал донора, передаваемый им фагом от предыдущего хозяина. Однако в отличие от генерализованной, завершенной трансдукции, проявляющейся в образовании рекомбинантов, при абортивной трансдукции рекомбинации не происходит. При инфицировании бактерий фагами, обеспечивающими генерализованную трансдукцию, только часть реципиентов включает в свой геном привнесенные фрагменты генетического материала донора; у другой части реципиентов этот материал остается неинтегрированным в хромосому. Возникновение рекомбинаций в ходе трансдукции определяется, рядом причин, общих для любого рекомбинационного процесса. Так как рекомбинация по своему существу явление случайное,

неинтегрированные фрагменты составляют большую часть по сравнению с интегрированными. Они-то и обеспечивают abortивную трансдукцию.

Находясь в клетке реципиента, abortивно трансдуцированные фрагменты оказываются доступными транскрипции, что обеспечивает проявление соответствующей функциональной активности, например, приобретение клеткой-реципиентом способности синтезировать какую-то аминокислоту; в геноме такой клетки ген, обеспечивающий указанный синтез, дефектен, в привнесённом же фрагменте соответствующий ген полноценен. Обладая способностью быть транскрибированным, abortивно трансдуцируемый фрагмент, не будучи включённым в хромосому реципиента, неспособен к другой генетической функции — самовоспроизведению. Вследствие этого при делении клетки он передается только одной из дочерних особей. Образующаяся на селективной среде колония содержит, таким образом, только одну клетку, несущую abortивно трансдуцированный фрагмент генома донора. Характерным признаком колоний, образуемых abortивными трансдуктантами-прототрофами, является их микроразмер, обусловленный нежизнеспособностью на селективной среде клеток, не получивших при делении трансдуцированного фрагмента. При малом размере число колоний abortивных трансдуктантов значительно превосходит число колоний истинных трансдуктантов (рекомбинантов).

Abortивную трансдукцию можно также наблюдать при передаче генов, обеспечивающих подвижность бактерий. В этом случае abortивные трансдуктанты образуют на питательной среде «ползущие» следы — «шлейфы».

Характерное проявление abortивной трансдукции позволяет констатировать ее наличие, что используется в генетическом анализе.

Специфическая трансдукция

Специфическая трансдукция, впервые открытая в исследованиях с фагом λ , отличается от генерализованной как по своему проявлению, так и по механизму осуществления. Характерное проявление специфической трансдукции состоит в передаче каждым специфически трансдуцирующим фагом только определенной, весьма ограниченной области бактериальной хромосомы. Эта особенность связана с тем, что специфическая трансдукция обеспечивается фагами, несущими фрагменты бактериального генетического материала в своем геноме; лизогенизация такими фагами бактерий-реципиентов обеспечивает включение в их геном профага, в составе генома которого присутствует участок генома бактерии донора.

Таким образом, если в описанной выше генерализованной трансдукции фаг выступает в качестве «пассивного» переносчика генетического материала бактерий, а генетические рекомбинации, у трансдуцируемых бактерий происходят по общим закономерностям рекомбинационного процесса, то при специфической

трансдукции фаг не только переносит генетический материал, но и обеспечивает его включение в бактериальный геном.

Специфическая трансдукция, следовательно, осуществляется путем лизогенизации.

Лизогенизировать бактерии могут умеренные фаги, т. е. фаги, способные к двум видам инфекции: 1) продуктивной (литической), в результате которой фаг осуществляет вегетативный цикл развития, заканчивающийся формированием зрелого фагового потомства и лизисом бактерии-хозяина; 2) редуктивной (лизогенной), в результате которой инфицирующий фаг превращается в профаг, включающийся в бактериальный геном и репродуцирующийся в его составе при последующих делениях бактерий.

Профаг, включающийся в бактериальную хромосому, представляет собой геном умеренного фага. Наиболее детально изучен геном умеренного фага λ , который лизогенизирует *E. coli* K12.

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Генерализованная трансдукция
2. Свойства трансдуцирующих фагов
3. Абортивная трансдукция
4. Специфическая трансдукция

Селекция промышленных микроорганизмов. Популяционные закономерности

Популяционные закономерности

Каждая клетка в микробной популяции является независимым организмом, дающим свой клон, свою линию. Судьба мутации, произошедшей в данной клетке, зависит от целого ряда факторов: от её отношения к питательной среде, от скорости деления, от жизнеспособности самой мутации, от характера споруляции.

У «культурных» штаммов чаще всего возникают обратные мутации. Возврат к дикой форме обычно сопровождается повышением жизнеспособности и активной споруляцией. Клетки, несущие подобную мутацию, способны «занять» всю популяцию, как бы «выдавливая» клетки исходной популяции.

Одни штаммы характеризуются крайне низкой частотой обратных мутаций, другие, при высокой частоте обратных мутаций, продолжают стойко сохранять популяцию в пределах исходного генотипа. Такие штаммы характеризуются как устойчивые.

Обратная мутация у полезных форм микроорганизмов чаще всего затрагивает селекционный признак, то есть свойство, которое в результате длительной селекции гипертрофированно. При этом наблюдается снижение полезных свойств микроорганизмов в данной популяции. В таких случаях принято говорить о «снижении активности штамма», либо о «потере активности штамма».

Скорость потери полезного свойства штамма зависит от мутабельности соответствующего гена, от происхождения штамма, а также от генетической природы данного свойства. Так, если какой-либо признак контролируется серией генов, то есть является количественным, то потеря этого признака может происходить только постепенно и ступенчато, так же как и его приобретение.

Принцип ступенчатости отбора

В подавляющем большинстве случаев селекционеру необходимо количественное увеличение уже имеющегося свойства, например повышение выхода определённого продукта биосинтеза. Таким образом, при селекции хозяйственно полезных форм микроорганизмов отбор почти всегда идёт по количественным признакам, контролируемым полигенной системой. Увеличение продуктивности данного штамма может произойти в результате мутирования одного или нескольких генов этой системы, то есть в результате так называемой «малой» мутации.

Процесс получения высокоактивных штаммов обычно состоит из нескольких этапов, на каждом из которых отбирается наиболее продуктивный вариант, то есть к ранее полученным мутационным изменениям добавляются новые мутации,

что сопровождается ступенчатым увеличением продуктивности организма. Многократный отбор вариантов с повышенной активностью на основе многократного применения различных мутагенов физической и химической природы даёт возможность посредством накопления незначительных изменений активности на каждом этапе отбора значительно увеличить в конечном итоге продуктивность данного микроорганизма.

Особенности изменчивости по количественным признакам

На основании многочисленных долгосрочных исследований были сделаны следующие обобщения:

1. При обработке мутагенными факторами большинство изменённых вариантов по продуктивности относится к группе минус-вариантов, то есть имеющих пониженную активность.
2. Большую роль в определении эффективности применения мутагенов в селекции микроорганизмов играет определение эффективной дозы. Слишком высокие дозы, резко повышая пропорцию минус-вариантов, сильно сокращают, а при некоторых дозах полностью элиминируют плюс-варианты.
3. Нельзя для получения высокоактивных вариантов заранее устанавливать эффективные дозы мутагенов по частоте морфологических изменений.
4. Повышение активности не всегда сопровождается изменением морфологических признаков.

Роль больших мутаций в изменчивости количественных признаков

Помимо используемого в селекции аспекта ступенчатого накопления в геноме микроорганизмов индуцированных «малых» мутаций, существует аспект, связанный с направленным получением «больших» мутаций, резко изменяющих какой-либо признак, либо вызывающих появление качественно нового признака или исчезновение старого.

Примером практического применения таких мутаций может служить полное подавление синтеза золотисто-желтого пигмента у продуцента пенициллина *Penicillus chrysogenum*. Этот пигмент снижал выход продукта на стадии выделения и химической очистки антибиотика. Беспигментные штаммы послужили основой для новых линий продуцентов.

Другим примером может служить описанный Кельнером случай, когда у микроорганизмов, никогда не выделявших антибиотика, после их обработки рентгеновскими лучами, возникли формы, выделяющие антибиотик.

На получении больших мутаций основан отбор мутантов — продуцентов аминокислот.

Мутагены в селекции микроорганизмов

Ионизирующие излучения. Наиболее часто в селекции микроорганизмов применяются рентгеновские лучи, γ -лучи и быстрые нейтроны.

Первым видом излучений, у которого было открыто мутагенное действие, были рентгеновские лучи. Этим открытием наука обязана Надсону и Филиппову (1925).

Рентгеновские лучи обладают высокой проникающей способностью. Под действием рентгеновских лучей возникают как точковые мутации, так и хромосомные aberrации.

γ -лучи являются естественным коротковолновым излучением. Их поглощение живыми клетками практически полное.

Помимо прямого воздействия ионизирующих излучений на генетический аппарат организмов, важное значение имеет и не прямое, опосредованное их воздействие. Механизм непрямого воздействия ионизирующих излучений на генетический аппарат клетки вкратце таков.

В результате облучения клетки, в ней образуются нестойкие химически активные вещества – радикалы, которые вступают во взаимодействие с ДНК хромосомы, внося в неё изменения.

Наиболее сильным летальным эффектом обладают протоны и α -частицы, у рентгеновского излучения летальный эффект выражен слабее. В отношении мутагенного эффекта наблюдалось обратное соотношение: x -лучи примерно в 2 раза эффективнее α -частиц.

При облучении x -лучами частота мутаций, как правило, непрерывно возрастает при увеличении дозы.

Частота мутаций зависит также от некоторых внешних факторов, например, от наличия кислорода в суспензии клеток, или от степени насыщенности клеток водой и т. д.

Быстрые нейтроны используются в селекции крайне редко, при этом отсутствуют какие-либо данные об их преимуществе над другими видами излучения.

УФ-лучи. Мутагенное действие УФ-лучей было открыто А.А.Промптовым в 1931 году. Уже к концу 30-х годов начинается интенсивное изучение биологического действия данного вида излучения.

УФ-лучи различной длины волны неодинаково эффективны. Наиболее выраженным летальным действием обладают лучи с длиной волны равной 2650 Å.

Примерно в то же время было выяснено, что различные компоненты клетки неодинаково поглощают УФ-лучи. Интенсивнее всего они поглощаются нуклеопротеидами. Холлендер и Иманс в 1941 году показали, что спектр поглощения УФ-лучей нуклеиновой кислотой почти полностью совпадает со спектром их летального и мутагенного действия с максимумом в обоих случаях при 2650 Å.

Микроорганизмы различных видов проявляли неодинаковую чувствительность к воздействию УФ-лучей. Кроме того, летальное и мутагенное действие УФ-лучей зависит не только от количества энергии, поглощенной клеткой, но в очень большой степени определяется ее физиологическим состоянием в момент облучения, а также условиями, в которых находится клетка в момент облучения и после него.

Было установлено, что мутации могут возникать и в результате непрямого действия УФ-лучей. Например, облучение УФ-лучами питательной среды и некоторых ее компонентов также вызывает наследственные изменения. При помещении клеток в облученный бульон частота мутаций среди них значительно увеличивается.

К снижению летального эффекта ультрафиолета приводит облучение клеток лучами видимого спектра. Обнаружено, что клетки, «убитые» смертельными дозами УФ-лучей, можно «оживить», если осветить их солнечным или искусственным светом. Это явление было названо фотореактивацией. Свет противодействует не только летальному эффекту ультрафиолета, но и влияет также на другие особенности облученных клеток: возникновение мутаций, задержка роста, подавление образования адаптивных ферментов.

Эффект фотореактивации используется для изучения мутационного процесса под действием сверхвысоких доз УФ-лучей, достигающих 20000—30000 эрг/мм².

Действие ультрафиолетового облучения на ДНК. В ряде экспериментов было показано, что большинство мутаций, вызванных воздействием ультрафиолета, относятся к классу точковых. Это замена одной пары нуклеотидов на другую или вставка пары оснований. При облучении нити ДНК УФ-лучами в ней возникают множественные разрывы между нуклеотидами. Также наблюдается образование поперечных сшивок между комплементарными нитями молекулы ДНК. Еще один эффект, связанный с воздействием ультрафиолета связан с образованием димеров нуклеотидов. Наиболее часто отмечается образование тиминовых димеров, однако встречаются урацил-урациловые, урацил-тиминовые, урацил-цитозиновые, цитозин-тиминовые и цитозин-цитозиновые димеры. Димеризация чаще всего возникает между соседними основаниями. Следующим этапом может быть выпадение этой пары оснований.

Химические мутагены.

Большую роль в открытии химических веществ, вызывающих наследственные изменения, сыграли исследования советских генетиков В. В. Сахарова (1933), М. Е. Лобашева (1934) и И. А. Рапопорта (1938). Эти работы могут считаться первыми в мировой литературе по действию химических веществ на наследственные изменения.

Первые работы по химическому мутагенезу были связаны практически с поисками соединений и элементов, обладающих высокой проникающей

способностью. По этому принципу были выбраны для получения мутаций у *Drosophila* такие вещества, как йод, аммиак, медный купорос, марганцевокислый калий, нитрат свинца. Помимо этих неорганических веществ было испытано канцерогенное вещество — метилхолантрен. Идея использования метилхолантрена была иная и вытекала из генетических представлений о канцерогенезе как о соматических мутациях.

При сравнении первых данных о биологическом действии химических мутагенов оказалось, что 1) частота мутаций, вызываемая этими веществами, небольшая, но реально превышает частоту мутаций в контроле; 2) во всех случаях у возникших мутантов не были обнаружены видимые деструктивные изменения основных компонентов ядра — хромосом.

При сопоставлении рентгеновых мутаций с первыми экспериментальными мутациями под действием химических агентов было установлено, что из 27 рентгеновых мутаций 20 были нарушениями структур хромосом (хромосомными абберациями), тогда как среди 25 мутаций, полученных под действием иода и марганцевокислого калия, ни одной хромосомной абберации обнаружено не было. Однако Олкерс, вводя в цветочные почки *Oenothera* этилуретан и хлористый калий, показал возможность возникновения хромосомных аббераций под действием химических веществ. Несколько лет спустя на примере другого растения (*Crepis capillaris*) было установлено, что под действием этиленимина возникает до 9,5% перестроек хромосом.

Таким образом, начальные представления, сложившиеся на основании первых работ о том, что под действием химических агентов возникают лишь мутации как следствие невидимых изменений в генах и хромосомах, явились результатом специфических свойств, использованных в этих работах мутагенов, а не общих особенностей химических веществ.

Большое значение в исследованиях, касающихся проблем химического мутагенеза, имели работы Ш. Ауэрбах. Ей принадлежит заслуга открытия мутагенного действия серного и азотного аналогов иприта — горчичного газа. Эти вещества вызывают у *Drosophila* до 25 % летальных, сцепленных с полом мутаций. Дальнейшее исследование показало, что аналоги иприта вызывают как прямые и обратные точковые мутации, так и хромосомные перестройки. Ауэрбах и Робсон установили, что нет принципиальных различий в характере изменений, вызываемых как этими мутагенами, так и рентгеновыми лучами.

Аналоги иприта позже многократно использовались в селекции промышленных микроорганизмов.

Позднее появляются сообщения о целом ряде веществ, также вызывающих мутации: эпоксндах, диметилсульфате, диэтилсульфате, диазометане, акролеине и других насыщенных альдегидах. В 1948 г. Рапопорт открыл очень мощный мутагенный эффект простейшего гетероциклического соединения —

этиленмина. В последнее время в качестве мутагенов предложены нитрозоэтилмочевина, нитрозометилмочевина и нитрозогуанидин.

Таков первый этап исследований, характеризующийся сбором материалов для доказательства мутагенности целого ряда веществ. Ныне этих факторов насчитывается несколько сотен.

Второй этап в развитии исследований по химическому мутагенезу знаменует углубление этих исследований, т. е. использование химических мутагенов для выяснения целого ряда генетических закономерностей.

Большое место среди химических мутагенов занимают алкилирующие вещества, особенно 2-хлоралкильные соединения.

Какие выводы следуют из данных Вестергаарда? Во-первых, многие соединения способны вызывать повышение частоты обратных мутаций. Во-вторых, все эти соединения различны по своему строению и принадлежат к разным классам веществ. В-третьих, у всех соединений имеется одна общая черта: все они химически неустойчивы и активно вступают в реакции. В противоположность результатам, полученным с этими соединениями, обратные мутации по адениновому локусу у *Neurospora* не возникали при использовании фенолов, 8-оксифеина, уретана, гидразида малеиновой кислоты, которые вызывают разрывы хромосом, летальные и видимые мутации у других организмов: *Dr. melanogaster*, *Anthirrinum*, *Allium*, *Vicia*. В-четвертых, среди этих соединений имеются соединения «абиологические», т. е. такие, которые в естественных условиях едва ли вступают в контакт с клетками, а последние едва ли подвергаются их воздействию в нормальных условиях.

Наряду с такими соединениями среди химических мутагенов имеются также промежуточные продукты метаболизма клеток, такие, как перекись водорода и органические перекиси, которые, в противоположность указанной группе соединений, не являются чужеродными и случайными для жизнедеятельности клеток.

Нужно отметить, что у многих живых организмов очень небольшая часть спонтанных мутаций (у людей 10—15%) вызывается естественной радиацией. Возможно, что остальные мутации являются следствием воздействия химических мутагенов. Если правильна точка зрения, что химические мутагены играют важную роль в происхождении спонтанных мутаций, то, очевидно, необходимо допустить существование буферной системы в клетках для поддержания низкой частоты спонтанных мутаций.

Так, например, известен такой природный антимутаген, как каталаза. Добавление каталазы мгновенно прекращает мутагенное действие перекиси водорода. Но тогда можно, пользуясь ферментным ядом, например цианистым калием, инактивирующим каталазу, получить мутации. Следовательно, цианистый калий — косвенный мутаген. Этот мутагенный эффект цианистого калия показан Собелсом на *Neurospora* и у *Dr. melanogaster*. Путем

предварительной обработки цианистым калием резко повышалось мутагенное действие X-лучей.

Таким образом, можно говорить о мутагенах типа «перекись водорода» как мутагенах первого порядка и о мутагенах типа цианистого калия как мутагенах второго порядка.

Дюлане опубликовал интересное исследование о мутагенном эффекте р-хлорэтиламина и родственных соединений у плесени *P. chrysogenum* — продуцента пенициллина. Исходя из данных экспериментальных исследований частоты обратных мутаций у тиаминзависимого штамма *P. chrysogenum* под действием различных соединений, Дюлане считает, что степень мутагенности определяется характером тех группировок, на которые замещена третья валентность азота, причем автор обнаружил, что увеличение длины алкильной группы дает в результате резкое снижение мутагенности.

Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Популяционные закономерности
2. Принцип ступенчатости отбора
3. Особенности изменчивости по количественным признакам
4. Роль больших мутаций в изменчивости количественных признаков
5. Физические мутагены, применяемые в селекции микроорганизмов
6. Химические мутагены, применяемые в селекции микроорганизмов

Методы генетического конструирования микроорганизмов для использования в качестве промышленных штаммов

Получение и поддержание чистой культуры

Основой любого микробиологического производства является штамм-продуцент целевого продукта.

При промышленном использовании важное значение имеют такие свойства продуцента, как способность использовать различные источники углерода, отсутствие потребности в дополнительных факторах роста, низкая чувствительность к примесям, попадающим в питательную среду, способность к максимально полному использованию основного компонента питательной среды (углерода). Большие трудности возникают в производственной ферментации в результате появления посторонней микрофлоры. Если же оптимальные значения pH сильно сдвинуты в кислую или щелочную области, эти трудности преодолеваются легче. Для сохранения стерильности особенно привлекательны термофильные продуценты.

Для получения более активных микроорганизмов используют селекцию, которая представляет собой направленный отбор мутантов — организмов, наследственность которых приобрела скачкообразное изменение в результате структурной модификации в нуклеотидной последовательности ДНК.

Получение мутантов

Самым простым методом получения штаммов с измененными генетическими свойствами является индуцированный мутагенез и ступенчатый отбор полученных клонов методом селекции.

Если в естественных экосистемах вероятность образования мутантов в среднем равна 10^{-8} – 10^{-11} на одну клетку, то при использовании мутагенов — $2,5 \times 10^{-4}$. Однако мутагенез является неспецифичным методом; возможно образование как нужных, так и ненужных свойств. Чтобы получить штаммы с определенными свойствами, мутагенез проводят обычно несколько раз.

К физическим факторам мутагенного действия относятся ультрафиолетовые лучи, ионизирующие излучения (рентгеновские и γ -лучи), корпускулярные излучения (быстрые электроны, позитроны, нейтроны и др.), а также ультразвук.

Химические мутагены принято делить на ингибиторы предшественников нуклеиновых кислот (азагуанин, азасерин, кофеин, теобромин и др.), аналоги азотистых оснований (5-бром урацил, 2-аминопурин и др.), алкилирующие соединения (диметилсульфат, окись пропилена, фенол и др.), супермутанты (*N*-нитрозонитрометилгуанидин, *N*-нитрозометилмочевина и др.), которые, алкилируя цитозин, вызывают его замену тимина, а также нарушают синтез предшественников ДНК.

К биологическим мутагенам относятся фаги.

После обработки популяции мутагеном проводят тотальный скрининг полученных клонов и отбирают наиболее продуктивные. Если это необходимо, то осуществляют ступенчатый отбор по интересующему признаку.

Индукцированные путем генетических изменений свойства, как правило, являются нестабильными, и новый штамм подвергается реверсии (обратному мутированию). Поэтому мутанты приходится регулярно клонировать и отбирать из популяции клеток активные клоны. Кроме сохранения активности важно обеспечить жизнеспособность штамма при хранении.

Получение рекомбинантов

Значительное повышение выхода продуктов синтеза может быть достигнуто при более глубоком и целенаправленном изменении генома клеток. Данный метод основывается на конструировании *in vitro* функционально активных генетических структур, введении и стабильном поддержании этой генетической информации в клетках. Генетическое конструирование включает несколько этапов: получение нужного гена, встраивание гена в генетический элемент (вектор), способный к репликации, перенос генов в клетки организма-реципиента.

Получить нужный ген можно выделением его из ДНК, путем химико-ферментативного синтеза, воссозданием на основе изолированной матричной РНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы (ревертазы).

Изолированную ДНК подвергают фрагментации, для чего используют рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы), катализирующие расщепление ДНК на участках, имеющих определенные последовательности нуклеотидов.

Химико-ферментативный синтез генов включает химический синтез коротких (8–16-звенных) одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов) за счет поэтапного образования эфирных связей между нуклеотидами и сшивку олигонуклеотидов между собой посредством ДНК-лигазы с образованием двухцепочечных полинуклеотидов.

Обратная транскриптаза (ревертаза) катализирует синтез нити ДНК, комплементарной мРНК. Полученную одноцепочечную ДНК (комплементарную ДНК, кДНК) используют в качестве матрицы для синтеза второй нити ДНК с применением ДНК-полимеразы или ревертазы.

Ген, полученный тем или иным способом, содержит информацию о структуре белка, но сам не может реализовать эту информацию. Поэтому перенос генетической информации в клетку осуществляется в составе векторов. Векторы — это, как правило, кольцевые молекулы, способные акцептировать чужеродную ДНК и автономно реплицироваться. Ген вместе с вектором образует рекомбинантную ДНК. Различают два основных класса векторов: вирусы и плазмиды. Большой интерес представляют космиды — плазмиды, в состав которых введен *cos*-участок ДНК фага λ *E. coli*, отвечающий за упаковку ДНК в фаговую частицу. Такие плазмиды способны передавать очень большой объем генетической информации; рекомбинантные ДНК могут быть упакованы в фаговые частицы. Векторные плазмиды и вирусы со встроенными чужеродными генами часто называют гибридными или химерными.

Рекомбинантные ДНК вводят в клетку хозяина и поддерживают там обычно с помощью плазмид, вирусов и пр. Метод введения генов в клетку с помощью векторов называют *трансформацией*, при использовании фагов — *трансдукцией*. Трансформация представляет собой наиболее универсальный путь передачи генетической информации.

Конъюгацию и *трансфекцию* можно рассматривать как варианты трансформации, осложненной наличием специальных приспособлений для эффективного переноса генов. При конъюгации информация перекачивается из одной клетки бактерии (донорной) в другую (реципиентную) по половым ворсинкам. Под трансфекцией понимают передачу всего набора генов вируса или фага, приводящую к развитию вирусных частиц в клетке. После окончания трансформации и трансдукции клоны с нужными свойствами отбирают методом селекции.

Для придания определенного признака бактериям часто используют конъюгацию; при этом мутанты получают свойства родительских клеток. Данный метод основывается на удалении оболочек бактерий ферментативным методом, слиянии протопластов и последующей регенерации оболочек. При конъюгации в клетку переносятся целые органеллы.

Поддержание чистой культуры штамма-продуцента

Поддержание биообъекта в рабочем состоянии, сохранение его ценных свойств является важной задачей. Поскольку в биореакторе численность популяции микроорганизмов очень велика (более 10^{15} клеток), существенное значение приобретают спонтанные мутации, которые могут привести к накоплению мутантных форм. Процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм более приспособленными в клеточной популяции носит название автоселекции. Поэтому проблема сохранения ценных штаммов-продуцентов имеет большое значение, в частности и при их длительном хранении, и при переносе этих штаммов из лабораторных культиваторов в промышленные биореакторы. Для поддержания культур микроорганизмов используют способ их выращивания на богатых питательных средах с частыми пересевами. Накопление в этом случае нежелательных мутантов может быть предотвращено проведением скрининга после пересева с проверкой функциональной активности клеточных клонов. Длительное хранение клеток без утраты ценных свойств осуществляют, затормаживая протекающие в них жизненные процессы. Существуют следующие методы подготовки клеток к хранению:

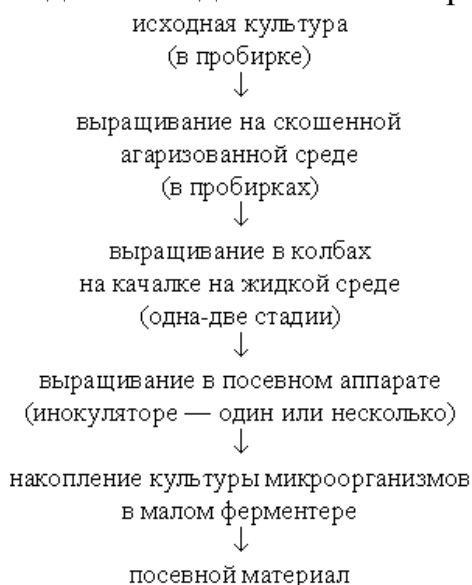
- лиофильное высушивание клеток (обезвоживание под вакуумом после замораживания при $(-40)–(-60)$ °С;
- высушивание на воздухе в стерильной почве, песке, на активном угле, на дисках агар-агара и других носителях. Вариантом этого метода является высушивание под вакуумом из жидкого состояния (L-высушивания);
- сохранение спор (метод пригоден для спорообразующих бактерий);

- криоконсервация — глубокое замораживание клеток с последующим их хранением в жидком азоте (-196°C) или его парах (-150°C);
- хранение под слоем вазелинового масла; выращенную в пробирках культуру заливают простерилизованным вазелиновым маслом на высоту слоя 1 см: культуру подвергают пересеву 1–2 раза в год;
- комбинированные методы хранения.

Значительные трудности при культивировании клеток в промышленном масштабе вызывает контаминация, т. е. попадание в культуру посторонней микрофлоры. Для сохранения свойств микроорганизмов при масштабировании проводится комплекс мероприятий: создание условий в биореакторе, максимально приближенных к условиям в лабораторном культиваторе; применение антимуtagens — веществ, снижающих частоту спонтанных мутаций; использование продуцентов с так называемыми многократно вырожденными мутациями; создание селективных условий, в которых преимущество получает культивируемый штамм.

Получение посевного материала

При выращивании посевных доз культуры применяют принцип масштабирования, т. е. проводят последовательное выращивание продуцента:



Первая стадия выращивания посевного материала осуществляется в заводской лаборатории. Исходную культуру размножают на скошенной агаризованной среде в пробирке в стерильных условиях при оптимальных составе питательной среды и режиме выращивания.

Выращенную культуру стерильно смывают в колбы Эрленмейера, которые помещают на качалку и выращивают при перемешивании и термостатировании в течение 18–36 ч. Наилучшие результаты дает культура, которая находится в стадии физиологической зрелости в конце логарифмической фазы роста.

На следующем этапе готовую культуру из колб стерильно переносят в посевной аппарат (инокулятор), в котором содержится питательная среда. Объем питательной среды в аппарате не должен превышать 60 % общего объема; количество посевного материала обычно составляет 10–12 об. % от объема питательной среды. Культивирование продолжают (12–14 ч) до достижения концентрации микроорганизмов 14–20 г/л. Для накопления посевного материала может применяться однократное или двукратное (0,2 и 3,2 м³) выращивание.

На заключительном этапе используют малый ферментер (50 м³), откуда посевной материал передается в ферментер, где осуществляется основная ферментация.

На всех стадиях производства исходная культура подвергается микробиологическому контролю.