**Тема: Внехромосомные репликоны.**

**Основные вопросы, выносимые на обсуждение семинара.**

1. Основные виды плазмид и их характеристики.
2. Свойства плазмид.
3. Фенотипические признаки, обусловленные плазмидами.
4. Методы выделения плазмид.

**Краткое содержание темы:**

Плазмиды — небольшие молекулы ДНК, физически отдельные от геномных хромосом и способные реплицироваться автономно. Как правило, плазмиды встречаются у бактерий и представляют собой двухцепочечные кольцевые молекулы, но изредка плазмиды встречаются также у архей и эукариот.

В природе плазмиды обычно содержат гены, повышающие устойчивость бактерии к неблагоприятным внешним факторам (в т. ч. устойчивость к антибиотикам), нередко они могут передаваться от одной бактерии к другой (иногда даже к бактерии другого вида) и, таким образом, служат средством горизонтального переноса генов.

Попадание плазмиды в клетку может осуществляться двумя путями: либо при непосредственном контакте клетки-хозяина с другой клеткой в процессе конъюгации, либо путём трансформации, то есть искусственное введение в клетку плазмиды, которому предшествует изменение экспрессии определённого гена клетки-хозяина (приобретение клеткой компетентности).

Искусственные плазмиды используются как векторы в клонировании ДНК, причём благодаря их способности к репликации обеспечивается возможность репликации рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине.

Размер плазмид варьирует от 1 до свыше 1000 тысяч пар оснований. Количество идентичных плазмид в пределах одной клетки изменяется от одной до тысяч в зависимости от дополнительных обстоятельств. Плазмиды можно считать частью мобилома, поскольку они часто передаются при конъюгации — механизме горизонтального переноса генов.

Впервые термин плазмида (англ. plasmid) был предложен американским молекулярным биологом Джошуа Ледербергом в 1952 году.

Существует несколько систем классификации плазмид, базирующихся на:

* топологии (линейные или кольцевые),
* механизмах репликации,
* маркерных генах, содержащихся на плазмидах (например: устойчивость к антибиотикам, гены биодеградации ксенобиотиков, системы рестрикции — модификации, гены синтеза бактериоцинов и т. д. — или полному отсутствию оных — криптические плазмиды),
* круге хозяев,
* копийности,
* совместимости,
* конъюгативные (способные к переносу в другие клетки)/неконъюгативные.

Вне зависимости от типа, все плазмиды содержат точку инициации репликации (ori V).

Многие плазмиды не вызывают заметных изменений в фенотипе своих хозяев. Другие, напротив, ответственны за проявление у клетки-хозяина свойств, помогающих ей выжить в определённых условиях окружающей среды, и без этих плазмид бактерии погибали бы или их рост замедлялся.

Функции плазмид в клетке чрезвычайно разнообразны. К ним относят:

* перенос генетического материала при конъюгации — F-плазмида;
* плазмиды бактериоциногенности контролируют синтез белков, летальных для других бактерий — Col-плазмиды;
* синтез гемолизинов — Hly-плазмиды (являются конъюгативными);
* устойчивость к тяжёлым металлам;
* устойчивость к антибиотикам (R-плазмиды);
* синтез энтеротоксинов — Ent-плазмиды;
* устойчивость к УФ-излучению;
* синтез антигенов, обеспечивающих адгезию бактерий на клетках в организме человека и животных — плазмиды антигенов колонизации;
* система рестрикции-модификации;
* расщепление камфоры (плазмида САМ), ксилола (плазмида XYL), салицилата (плазмида SAL) (обнаружены у некоторых штаммов *Pseudomonas*).

Наиболее известной конъюгативной плазмидой является F-плазмида, или F-фактор. F-плазмида является эписомой длиной около 100 тыс. пар оснований. У неё есть собственная точка начала репликации — oriV и точка разрыва — oriT. F-плазмида, как и все конъюгативные плазмиды, кодирует белки, противодействующие прикреплению пилей других бактерий к клеточной стенке данной.

Помимо прочей генетической информации, F-плазмида несёт локусы tra и trb, организованные в один оперон в общей сложности содержащие 34 тыс. пар оснований. Содержащиеся в них гены ответственны за различные аспекты процесса конъюгации: синтез пилина и сборка половых пилей, запуск и регулирование процесса переноса генетического материала, разрыв в локусе oriT и расплетание цепи ДНК.

Кроме того, на половых пилях адсорбируются бактериофаги, специфичные к клеткам, содержащим F-плазмиду. К ним относятся РНК-содержащие фаги: R17, MS2, Qβ, f12, а также фаги с одноцепочечной ДНК: fd, f1, M13.

R-плазмида, или R-фактор, представляет собой кольцевую двуспиральную молекулу ДНК. В ней заключены гены, ответственные за механизм репликации и перенос свойств резистентности в клетку- реципиент (фактор переноса устойчивости, или RTF (от англ. resistance transfer factor)), а также гены, определяющие устойчивость к конкретному антибиотику (обозначаются r (от англ. resistance).

R-фактор передаётся при трансдукции и обычно делении клетки. Некоторые R-плазмиды могут передаваться при конъюгации бактерий, то есть являются конъюгативными. Возможна передача R-плазмид между бактериями различных видов, родов и даже семейств. Так, RP1, плазмида, ответственная за устойчивость к ампициллину, тетрациклину и канамицину у бактерий рода *Pseudomonas* семейства *Pseudomonadaceae* может передаваться кишечной палочке *E. coli*, относящейся к семейству *Enterobacteriaceae*.

Механизм превращения R+-клетками антибиотиков в неактивную форму связан с действием на них специфических ферментов, кодируемых R-плазмидой.

С действием R-плазмид часто бывает связан тот факт, что некоторые бактериальные заболевания с трудом поддаются лечению при помощи известных на данный момент антибиотиков.

Col-плазмиды (от англ. colicinogeny — колициногенность) определяют синтез особых белков — колицинов, подавляющий рост и размножение других бактерий, но безвредных для бактерий, их выделяющих.

Этот феномен был открыт в 1925 г. A. Gratia у штамма *E. coli*. Установлено, что *E. coli* синтезируют колицины различных типов: A, B, C, D и т.д. Колицины адсорбируются на клетках, лишённых Col-фактора, и, не проникая внутрь, нарушают их метаболизм, вызывая гибель клетки.