

ЗАНЯТИЕ № 4

Тема: Теория гена

Цель занятия: изучить общие принципы строения генов про- и эукариот.

Вопросы, рассматриваемые на занятии:

1. Исследование тонкой структуры гена на примере фага Т4. Мутационная и рекомбинационная делимость гена.
2. Строение гена. Кодированный регион. Регуляторные элементы

РЕФЕРАТ

Происхождение и молекулярная эволюция генов.

Формируемые понятия: ген, аллелизм, компаунд

Ученые, работавшие (работающие) в данном направлении: С. Бензер, Т. Морган, В.Л. Иогансен, А.С. Серебровский, Н.П. Дубинин

Некоторые аспекты темы:

Функциональный и рекомбинационный критерии аллелизма. Первая попытка конкретизации представлений о гене принадлежит Т.Х. Моргану, который в своем классическом труде «Теория гена» описал ген как единую неделимую единицу наследственности. В целом представления школы Т. Х. Моргана можно кратко представить следующим образом: ген имеет основные свойства хромосом (способность к редупликации, к закономерному распределению в митозе и мейозе), занимает определенный участок (локус) хромосомы, является единицей мутации (т. е. изменяется как целое), единицей рекомбинации (т. е. кроссинговера никогда не наблюдали в пределах гена), единицей функции (т. е. все мутации одного гена нарушают одну и ту же функцию). Ген может существовать в двух или нескольких аллельных состояниях.

Однако с развитием науки стало возможным изучать в экспериментах более тонкую структуру гена. Так, С. Бензер при анализе около 3 тысяч мутантов бактериофага Т4 по гену *rII* на основе результатов функционального или комплементационного теста установил наличие в этой области двух генов (*A* и *B*). Функциональный тест на аллелизм основан на скрещивании рецессивных мутантов (в данном случае заражении клетки кишечной палочки 2 мутантами попарно) и заключается в последующем анализе функции гена (нарушается она или нет), Если в результате скрещивания функция восстанавливается, значит, мутации относятся к разным генам, если нет – мутации, хотя и разные, повреждают

один ген (в этом случае гибрид является *компаундом*).

Мутации	Цис-положение	Транс-положение
Аллельные (в одном гене)		
Фенотип гибрида	Дикий тип	Мутант
Неаллельные (в разных генах)		
Фенотип гибрида	Дикий тип	Дикий тип

Опыты С. Бензера по картированию мутаций. Межаллельная комплементария

В таблице приведены результаты теста на комплементарность для десяти точковых мутаций. «+» – комплементария мутации; «-» – отсутствие комплементарии. По результатам, приведенным в таблице, определите группы комплементарии.

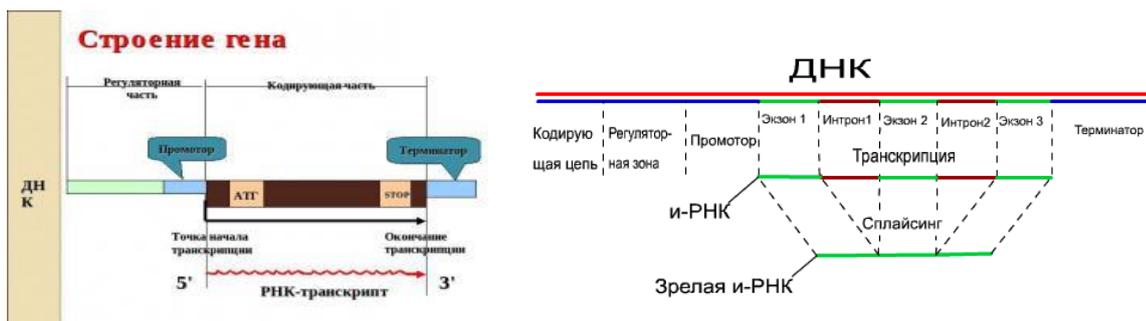
Мутации	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
2		-	+	+	+	+	+	+	+	-
3			-	-	-	+	+	-	-	+
4				-	-	+	+	-	-	+
5					-	+	+	-	-	+
6						-	-	+	+	+
7							-	+	+	+
8								-	-	+
9									-	+
10										-

Решение.
 Анализируем поочередно горизонтальные строки.
 1. Мы видим, что при скрещивании мутанта 1 с мутантом 6 и 7 не происходит комплементарии мутации (знак «-»), следовательно, эти мутации затрагивают одну область гена, поэтому мы можем отнести эти мутации к одной группе комплементарии. При скрещивании мутанта 1 с мутантом 2, 3, 4, 5, 8, 9 и 10 происходит комплементария мутации (знак «+»), следовательно, эти мутации затрагивают разные области гена, поэтому мы можем отнести эти мутации к другой группе комплементарии.
Итак ответ:
 Ответ. Группа 1 – мут. 1, 6, 7; группа 2 – мут. 2, 10; группа 3 – мут. 3, 4, 5, 8, 9.

Рекомбинационный критерий аллелизма основан на изучении аллелей в кроссинговере (рекомбинации). Если мутации не рекомбинируют, они затрагивают один ген.

Рекомбинантные варианты фага, которые могли возникнуть только в результате внутригенного кроссинговера, были получены С. Бензером при заражении бактерий разными мутантами по гену *rIII*, комплементария которых невозможна. Оказалось, что наименьшее генетическое расстояние, разделяемое рекомбинацией (рекон), равно одной паре нуклеотидов. Этот же факт подтвердили и опыты Ч. Яновского с мутантами кишечной палочки по генам триптофансинтетазы. Анализ этих мутантов также продемонстрировал, что одна пара нуклеотидов является и наименьшей единицей мутации (мутон). Таким образом была доказана **делимость гена**; хотя он, однако, по-прежнему рассматривается в качестве функциональной единицы наследственности (один ген — один цистрон или одна полипептидная цепь).

Структура гена. С точки зрения современной биологии, гены — это участки ДНК, несущие какую-либо целостную информацию — о строении одной молекулы белка или одной молекулы РНК. Гены, кодирующие синтез белков (**«гены домашнего хозяйства»**), называются структурными. Гены, которые контролируют и направляют деятельность структурных генов, являются функциональными.



Для выполнения своей функции ген должен иметь определенную структуру, в которую входит **структурная (кодирующий регион) и регуляторная части**. Последняя включает в себя области **промотора, терминатора и регуляторных элементов**. Функционирование генов называется их **экспрессией**. Следует помнить, что строение и экспрессия генов про- и эукариот имеет свои особенности.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003.*
- 2. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. — СПб.: изд-во Н-Л, 2010.*
- 3. Алиханян С.И. и др. Общая генетика. — М.: Высш. шк., 1987*
- 4. Генетика./Под ред. В.И. Иванова. - М.: Академкнига,2006-640 стр.*
- 5. У. Клаг, М. Камминс. Основы генетики. М.: Техносфера, 2009. – 894 стр.*

ЗАНЯТИЕ № 5

Тема: Строение и регуляция действия генов прокариот.

Цель занятия: изучить строение и функционирование генов и геномов прокариотических организмов.

Вопросы, рассматриваемые на занятии:

1. Строение генов и геномов прокариот.
2. Промоторная специфичность РНК-полимеразы бактерий и фагов.
3. Оперонные системы регуляции действия генов у бактерий.
4. Механизмы репрессии и активации транскрипции у прокариот.
5. Генетический анализ лактозного и триптофанового оперонов

Формируемые понятия: прокариоты, кольцевая хромосома, плаزمида, транспозон, промотор, терминатор, РНК-полимераза, σ -фактор, Rho-белки, оперон, негативная и позитивная регуляция

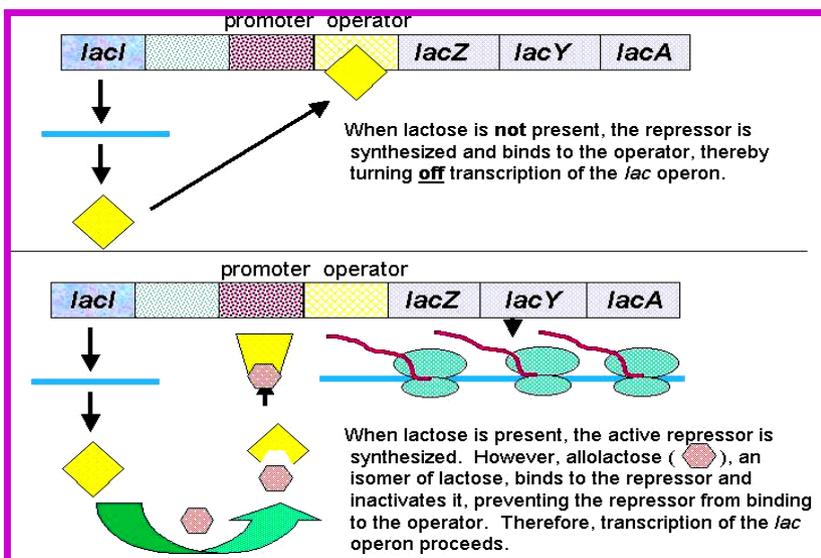
Ученые, работавшие (работающие) в данном направлении: Ж. Моно, Дж. Ледерберг, Ф. Жакоб, А. Львов, Ч. Яновский, К. Берtrand

Некоторые аспекты темы: Геном прокариот (эубактерий, или истинных бактерий) в большинстве случаев организован в кольцевые молекулы ДНК, хотя у ряда бактерий обнаружены хромосомы и в виде линейных молекул (например, у *Borrelia burgdorferi* – возбудителя болезни Лайма у человека). Кроме хромосом, которых может быть как одна, так и несколько, в состав генома прокариот входят плазмиды – отдельные и способные к самостоятельной репликации короткие кольцевые 2х-цепочечные ДНК, ответственные за особые свойства бактериальной клетки (фертильность, антибиотикорезистентность, синтез витаминов и т.д.). Плотность генов в геноме прокариот, в среднем, около 1 гена на тысячу пар оснований, что наряду с практически полным отсутствием интронов обуславливает наличие очень высокой пропорции ДНК, кодирующей белки (85-90%). Около 1 % бактериальной ДНК является некодирующей, и она обычно представлена в виде инсерционных последовательностей и транспозонов – мигрирующих генетических элементов прокариот.

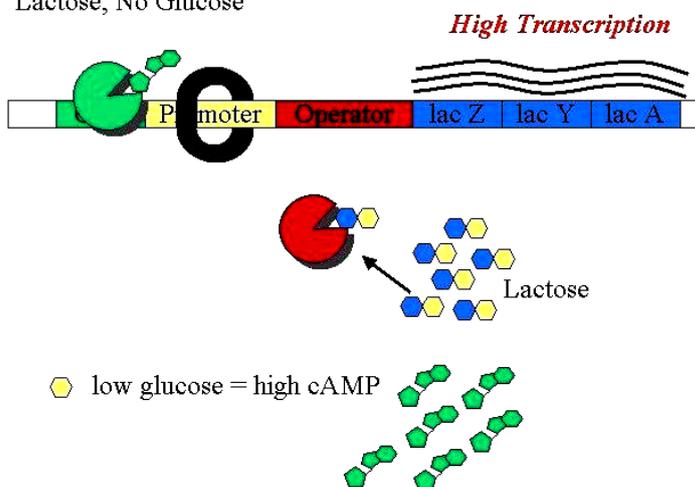
Транскрипцию генов прокариот осуществляет РНК-полимераза (сложный белок, состоящий из 4 субъединиц) в комплексе с σ -фактором, который диссоциирует при начале элонгации. Терминация транскрипции у прокариот может быть Rho-зависимая (за счет связывания с ДНК Rho-белка) и Rho-независимая (формирование шпильчатой структуры ДНК). Отсутствие ядра

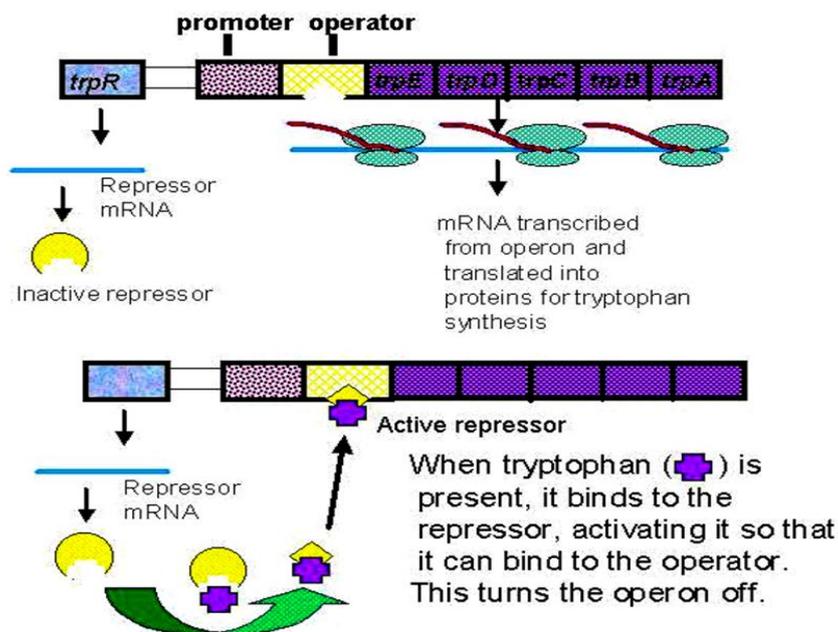
позволяет клеткам прокариот осуществлять транскрипцию и трансляцию генов сопряженно.

Для бактериальных геномов характерно наличие оперонов, функционирующих как единая транскрипционная единица. Транскрипция прокариот контролируется регуляторными белками. Белок-репрессор является подавителем транскрипции, белок-активатор усиливает ее, индуктор - белок, блокирующий репрессор. Белки-регуляторы влияют на работу оперона, связываясь с определенным участком ДНК в области промотора - оператором. Лактозный оперон - пример негативной регуляции оперонной системы прокариот (транскрипцию выключает белок-репрессор); в то время как триптофановый оперон – образец позитивного контроля работы генов (оперон начинает функционировать на синтез субстрата, если последний в среде отсутствует)



Lactose, No Glucose





ЛИТЕРАТУРА

1. Жимулев И.Ф. *Общая и молекулярная генетика*. — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003.
2. Инге-Вечтомов С.Г. *Генетика с основами селекции*. — СПб.: изд-во Н-Л, 2010.
3. Алиханян С.И. и др. *Общая генетика*. — М.: Высш. шк., 1987
4. *Генетика*./Под ред. В.И. Иванова. - М.: Академкнига, 2006-640 стр.
5. У. Клаг, М. Камминс. *Основы генетики*. М.: Техносфера, 2009. – 894 стр.

ЗАНЯТИЕ № 6

Тема: Генетический анализ у прокариот

Цель занятия: изучить механизмы передачи генетической информации у прокариот

Вопросы, рассматриваемые на занятии:

1. Конъюгация у бактерий: половой фактор кишечной палочки. Методы генетического картирования при конъюгации.
2. Генетическая рекомбинация при трансформации.
3. Трансдукция у бактерий. Виды трансдукции.
4. Использование конъюгации, трансформации и трансдукции для картирования генов прокариот. Кольцевая карта хромосом прокариот.

Формируемые понятия: конъюгация, трансдукция, трансформация, гомологичная генетическая рекомбинация, рекомбинантные штаммы, ауксотрофность, прототрофность, донор, реципиент, мигрирующие генетические элементы прокариот

Ученые, работавшие (работающие) в данном направлении: Дж. Рот, Дж. Ледерберг, А. Львов, Ч. Яновский, К. Берtrand, Р. Девис, Д. Бодстайн

Некоторые аспекты темы:

Генетика микроорганизмов возникла в 40-е годы прошлого столетия. Благодаря разработке специфических методов исследования и созданию коллекций мутантных форм организмов, за короткий промежуток времени оказалось возможным проводить генетический анализ у многих прокариот. Были построены генетические карты хромосом кишечной палочки (*Escherichia coli*), возбудителя сальмонеллеза (*Salmonella typhimurium*), сенной палочки (*Bacillus subtilis*), бактерий рода *Pseudomonas*, цианобактерий и др. Для картирования бактериальной хромосомы используются разные процессы, ведущие к генетической рекомбинации у бактерий.

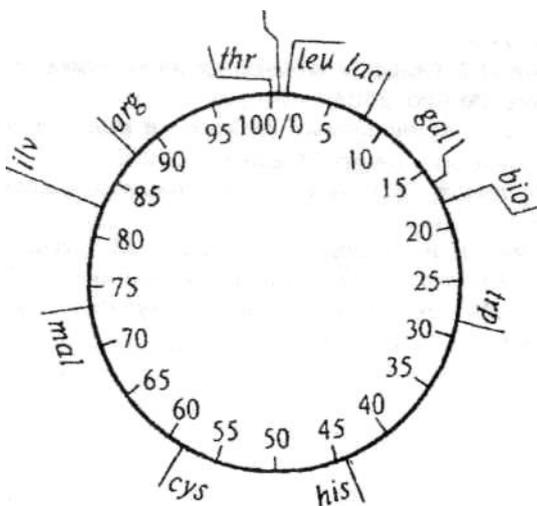
Опыты по **конъюгации** применяются при построении временной карты кольцевой хромосомы бактерий, единицей измерения которой является минута — время, за которое у кишечной палочки, например, из клетки донора в клетки реципиента переносится около $4 \cdot 10^4$ пар нуклеотидов или около 1 % бактериальной хромосомы. Ориентированный

перенос хромосомы у *E. coli* осуществляет половой фактор - F-эписома, присутствующая в клетках или в автономном или в интегрированном в бактериальную хромосому состоянии. У других бактерий половой процесс опосредуется другими конъюгативными плазмидами, например, R-плазмидами.

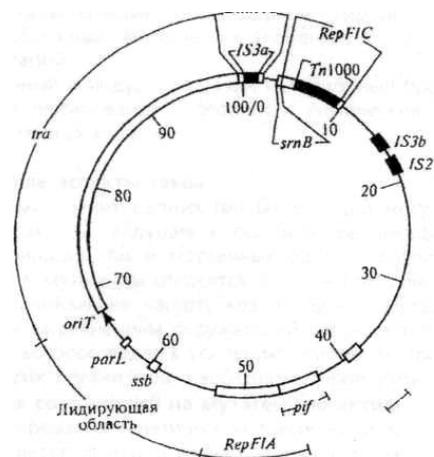
Следующие примеры, демонстрирующие применение конъюгации для картирования генов, для решения которых следует воспользоваться прилагаемыми картами хромосомы кишечной палочки и F-фактора:

1. При скрещивании *HfrH* штамма *E. coli*, несущего маркеры *thr*⁺*leu*⁺*lac*⁺*gal*⁺*λ*^s*Str*^s*Azi*^s со штаммом-реципиентом, ауксотрофным по треонину и лейцину, не сбраживающим лактозу и галактозу, устойчивым к фагу λ, стрептомицину и азиду натрия (*thr*⁻*leu*⁻*lac*⁻*gal*⁻*λ*^r*Str*^r*Azi*^r) смесь бактерий после прерывания конъюгации высевали на селективную минимальную среду со стрептомицином. Прототрофные рекомбинанты возникали, если скрещивание длилось не менее 8 минут. При проверке рекомбинантов на другие маркеры оказалось, что *Azi*^s появлялся у них тогда, когда скрещивание не прерывали в течение 9 минут, *λ*^s – в течение 11 минут, *lac*⁺ и *gal*⁺ — в течение 18 и 25 минут соответственно. Как расположены гены на карте хромосомы?

2. Скрещивание описанных выше штаммов длилось 20 минут. Вели отбор сбраживающих лактозу рекомбинантов, выросших на среде со стрептомицином. Какие еще маркеры донора обнаружались у них?



Упрощенная генетическая карта хромосомы кишечной палочки



Генетическая карта плазмиды

Умеренные бактериофаги могут участвовать в передаче генетической информации между клетками бактерий. При этом в процессе общей

трансдукции в клетки реципиента может попасть любой из генов донора, поскольку в головки бактериофагов случайным образом упаковываются фрагменты бактериальной ДНК.

Специфическую трансдукцию осуществляют профаги, которые при индукции из бактериальной хромосомы захватывают при неправильном вырезании часть соседней с местом интеграции бактериальной ДНК.

Следующий пример демонстрирует применение трансдукции для картирования генов:

3. Фаголизатом клеток штамма a^+c^+d обработали клетки штамма acd^+ . Среди отобранных трансдуктантов a^+ были обнаружены клоны генотипа a^+d , клонов a^+c^+ не оказалось. Среди трансдуктантов c^+ некоторые несли маркер d , а клонов с маркером a^+ не было. Локализируйте гены a , c и d на данном фрагменте бактериальной хромосомы.

Трансформация - это процесс передачи в клетки бактерий изолированной ДНК как хромосомного, так и плазмидного происхождения. Фрагменты трансформирующей ДНК не большие, но могут содержать несколько генов. По частоте котрансформации разных хромосомных маркеров бактерии судят о последовательности генов на данном участке хромосомной карты.

4. Из клеток бактериального штамма, имеющего генотип a^+bc^+ , была выделена ДНК, которой трансформировали клетки штамма генотипа av^+c . При анализе 100 трансформантов, отобранных по маркеру a^+ , 6 клонов имели генотип a^+v , а 50 — a^+c^+ . Из 100 трансформантов, отобранных по маркеру c^+ , 10 клонов имели генотип c^+e , а 40 - a^+c^+ . Как расположены маркеры a , v и c на генетической карте бактериальной хромосомы?

Мигрирующие генетические элементы (МГЭ) бактерий - это инсерционные последовательности и транспозоны. Встраиваясь в различные участки ДНК бактерий, они вызывают инактивацию генов и мутации разных типов, что ведет к дестабилизации бактериального генома. Для незаконной рекомбинации, лежащей в основе перемещений МГЭ по геномам прокариот, необходимы как специфические ферменты транспозиции, так и наличие в ДНК специфических сайтов интеграции МГЭ. *Решите следующую задачу.*

5. Гены TnA и TnR транспозона $Tn3$ кодируют транспозазу и ее репрессор соответственно. Как изменится частота перемещения транспозона по хромосоме бактерии, если инактивирован: а) ген TnR ; б) ген TnA ; в) оба гена?

ЛИТЕРАТУРА:

1. Жимулев И.Ф. *Общая и молекулярная генетика.* — Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003.
2. Инге-Вечтомов С.Г. *Генетика с основами селекции.* — СПб.: изд-во Н-Л, 2010.
3. Алиханян С.И. и др. *Общая генетика.* — М.: Высш. шк., 1987
4. *Генетика./Под ред. В.И. Иванова.* - М.: Академкнига, 2006-640 стр.
5. У. Клаг, М. Камминс. *Основы генетики.* М.: Техносфера, 2009. – 894 стр.

