

ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У БАКТЕРИЙ

- ДНК = нуклеоид (бактериальная «хромосома») – кодирует жизненно важные признаки
- внехромосомные факторы наследственности:
 - Плазмиды,
 - Транспозоны,
 - IS-последовательности
- кодируют признаки, дающие преимущество.

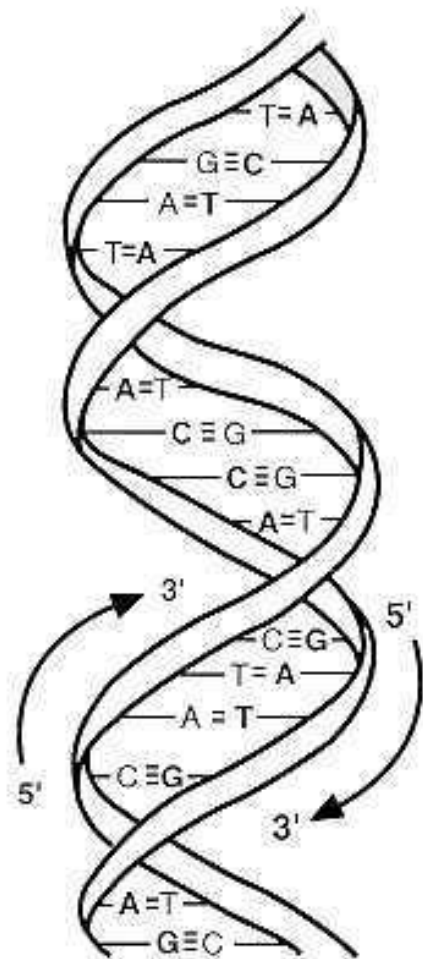
- Единицей наследственности является ГЕН = участок ДНК, в котором зашифрована последовательность аминокислот в полипептидной цепочке, контролирующая отдельный признак особи.

Гены:

- **Структурные** = обуславливают синтез определенного белка (фермента), при мутации образуется белок измененного состава,
- **Ген-регулятор** = определяет синтез белковой молекулы-репрессора, подавляющего деятельность структурных генов в отсутствии субстрата,
= при наличии субстрата репрессор временно инактивируется и структурные гены, освобожденные от его влияния, начинают функционировать,
- **Ген-оператор** = посредник между геном-регулятором и структурными генами,
= расположен рядом со структурными генами.

- Совокупность генов, сосредоточенных в нуклеоиде («Хромосоме») бактерий называется **генотип**.
- **Фенотип** – совокупность всех признаков микроорганизма, сформировавшаяся в результате взаимодействия генотипа с внешней средой.
- Генетические элементы, способные самостоятельно реплицироваться наз-ся **репликонами = ДНК и плазмиды**.

ДНК

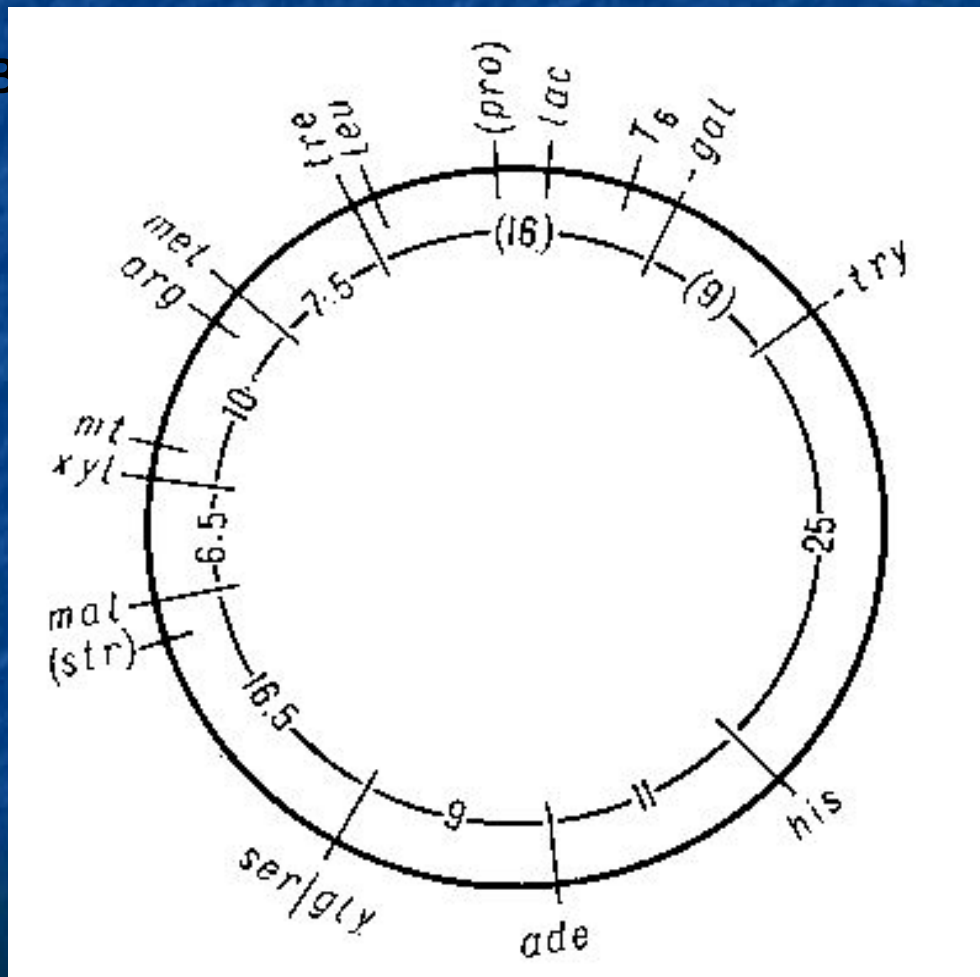


ДНК («хромосома»)

- двухцепочечная кольцевая молекула,
 - сод-т до 5 тыс. генов,
 - имеет молекулярную массу $1,7-2,8 \times 10^9$ дальтон,
 - включает $3-5 \times 10^6$ пар оснований,
 - имеет гаплоидный набор генов,
-
- расположена в цитоплазме клетки в многократно свернутом и плотно упакованном виде,
-
- содержит гены, обуславливающие **жизненно-важные** для бактерий признаки.

Генетическая карта

- = это схематическое изображение всех генов микроорганизма.
- Гены, отвечающие за определенный признак, обозначают строчными буквами латинского алфавита со знаком + (например, гистидиновый ген – his+), отсутствие гена знак – «-»



ВНЕХРОМОСОМНЫЕ ФАКТОРЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

- **автономные** — являются репликоном
 - плазмиды
- **неавтономные** - реплицируются только в составе репликона (нуклеоида или плазмиды):
 - Транспозоны,
 - IS-последовательности,
 - умеренные фаги.

ВСТРАИВАНИЕ В НУКЛЕОИД ВНЕХРОМОСОМНЫХ ФАКТОРОВ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

- **в ГОМОЛОГИЧНЫХ участках**
 - Плазмиды,
 - Умеренные фаги.

- **в любых участках**
 - Транспозоны,
 - IS-последовательности.

ПЛАЗМИДЫ

- внехромосомные факторы наследственности у бактерий,
 - двухцепочечные молекулы ДНК,
 - несут 40-50 генов,
 - не являются жизненно важными для бактерии,
 - обуславливают признаки, позволяющие лучше приспособиться к условиям обитания.
-
- **ВОЗМОЖНЫЕ СОСТОЯНИЯ**
 - **автономное** (в цитоплазме)
 - **интегрированное** (в нуклеоиде). В этом случае плаزمида называется **ЭПИСОМА**.

ПЛАЗМИДЫ

■ функции

1. регуляторная – компенсирует нарушение функции ДНК нуклеоида,
2. кодирующая – вносит в генотип новую информацию.

■ содержание tra-оперона

- Трансмиссивные (конъюгативные) - содержат
- Нетрансмиссивные (неконъюгативные) - не содержат

ПЛАЗМИДЫ

- контроль репликации плазмид со стороны нуклеоида
 - **строгий** (делятся синхронно с нуклеоидом) ⇒ 1-2 копии на клетку (большие плазмиды),
 - **ослабленный** (делятся чаще нуклеоида) ⇒ 10-30 копий на клетку (малые плазмиды).
- **СОВМЕСТИМОСТЬ**
 - > 20 групп несовместимости, объединяющих родственные плазмиды.

ФУНКЦИИ TRA-ОПЕРОНА

- детерминирует образование конъюгативных пилей,
- мобилизует на перенос:
 - саму конъюгативную плазмиду (F^+),
 - другую, неконъюгативную, плазмиду (RTF),
 - участок нуклеоида (Hfr).

Фенотипические признаки, сообщаемые бактерии плазмидами

- устойчивость к антибиотикам,
- образование бактериоцинов,
- продукция факторов патогенности,
- способность к синтезу антибиотиков,
- расщепление сложных органических веществ,
- образование ферментов рестрикции и модификации.

Наиболее изучены плазмиды:

- **F- плазида** = половой фактор – контролирует синтез половых ворсинок,
= бывает: - автономной → бактерия наз-ся F⁺ штаммом
- интегрированной → Hfr – штамм,
= конъюгативная
- **R-плазида** (resistance - устойчивость) – обуславливает синтез ферментов, разрушающих антибиотики, сульфаниламиды и др., в результате бактериальная клетка становится устойчивой к лекарственным препаратам,
- в 1 плазмиде м.б. 3-10 детерминант устойчивости.

Наиболее изучены плазмиды:

- **Col-плазмиды** - обуславливают синтез **бактериоцинов** (= белки, задерживающие рост других штаммов бактерий того же вида). Бактерии, несущие такие плазмиды, обладают преимуществом при заселении биотопа.
- **Плазмиды патогенности** – определяют:
 - синтез **энтеротоксинов** (Ent-)
 - **ферментов патогенности** (Hly-),
 - **поверхностного антигена вирулентности** (Vir-).
- **Плазмиды биodeградации** – несут информацию об утилизации органических соединений, которые бактерии используют в качестве источника углерода и энергии.

ТРАНСПОЗОНЫ

- **определение**

= нуклеотидные последовательности (от 2 000 до 20000 пар нуклеотидов), способные менять место своей локализации в молекуле ДНК и мигрировать из одной молекулы ДНК в другую.

- **состояние в бактериальной клетке**

1. **интегрированное** в репликон (реплицируется вместе с ним),
2. **автономное** (замыкается в кольцо и не реплицируется).

ТРАНСПОЗОНЫ

- **Состав:**
 - особые концевые структуры, которые отличают транспозон от др. фрагментов ДНК (**маркеры транспозона**),
 - **гены транспозиции**,
 - **гены**, детерминирующие синтез
 - **токсинов**,
 - **ферментов**, обеспечивающих устойчивость к антибиотику,
 - **белков**, обеспечивающих др. признаки.

IS-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- **определение**

=вставки нуклеотидных последовательностей (порядка 1 000 пар нуклеотидов),

- содержат только гены, необходимые для собственного перемещения:

= ген, кодирующий фермент **транспозазу** – обеспечивает исключение **IS**-элемента из ДНК и его интеграцию в новый локус,

= ген, обуславливающий синтез репрессора, регулирующего весь процесс перемещения,

- не способны реплицироваться самостоятельно.

IS-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

- отличия от транспозонов
 1. содержат только гены транспозиции,
 1. не обнаружены в свободном состоянии.

Функции IS-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

1. **координация взаимодействия** внехромосомных факторов наследственности между собой и с бактериальной хромосомой для обеспечения их рекомбинации,
1. **регуляторная** - регуляция транскрипции генов путём их «включения/выключения»,
1. **индукция мутаций** - инверсии, дупликации на протяжении 5-9 пар нуклеотидов.

Изменчивость микроорганизмов

- **Модификационная** = ненаследуемая,
- **Генотипическая** = наследуемая.

Изменчивость микроорганизмов

- **Модификационная** = ненаследуемая, фенотипическая, адаптационная,
 - возникает как приспособительная реакция организма на условия среды,
 - встречаются часто и касаются одновременно всех особей популяции,
 - вскоре утрачиваются.

МОДИФИКАЦИИ У БАКТЕРИЙ

Фенотипические изменения у бактерий

- не сопровождаются изменениями первичной структуры ДНК,
- они выражаются:
 - в изменении формы и размеров микробной клетки,
 - морфологии колоний,
 - биохимических и антигенных признаков.

Изменчивость микроорганизмов

- **Наследуемая = генотипическая**
 - изменения затрагивают лишь отдельные клетки,
 - приобретенные признаки передаются потомству и в силу лучшей адаптации к условиям существования измененные клетки с новыми признаками постепенно вытесняют клетки исходного штамма.
- *Изменения генома могут происходить в результате **мутаций и рекомбинаций.***

МУТАЦИИ У БАКТЕРИЙ

Определение


Изменения в первичной структуре ДНК, которые выражаются в наследственно закреплённой утрате или изменении какого-либо признака (-ов).

Классификация мутаций по происхождению

- **спонтанные** – трудно или невозможно связать с действием определённого фактора (мутагена)
 - **ошибки в работе ДНК-полимеразы** при репликации ДНК
 - **инсерционные** – при встраивании в нуклеоид внехромосомных факторов наследственности
- **индуцированные** – в эксперименте под воздействием мутагена

Классификация мутаций по количеству мутировавших генов:

■ **Генные** затрагивают один ген:

- замена одной пары азотистых оснований другой,
-  - вставка дополнительных нуклеотидов,
- утрата «-«→ замена одной аминокислоты другой или **нонсенс-мутация** = бессмысленная,

■ **Хромосомные** затрагивают несколько генов.

- Важную роль играют мигрирующие генетические элементы: Is- последовательности и Tn- транспозоны = биологические мутагены.

Хромосомные мутации

- **делеции** – потеря гена,
- **инверсия** – поворот участка хромосомы или нарушение порядка гена,
- **дупликации** – удвоение гена,
- **транспозиция** – перемещение гена.

Классификация мутаций по направленности

- **прямые** – потеря или изменение признака,
- **обратные (реверсии)** – восстановление признака:
 - **истинные** – восстанавливается и фенотип и генотип,
 - **супрессорные** – восстанавливается только фенотип.

SR-ДИССОЦИАЦИИ

= появление в чистой культуре 2 видов бактериальных клеток, которые отличаются по характеру образуемых колоний на твердой питательной среде:

S-колонии – форма круглая, поверхность гладкая, чаще образуются при выделении от больного человека, бактериальные клетки характеризуются высокой вирулентностью,

R- колонии имеют неровные края, шероховатую поверхность.

Между ними м.б. **переходные формы**: O- мутные, Д-карликовые.

- Процесс диссоциации обычно протекает в одном направлении: от S- к R-.

SR-ДИССОЦИИИ

- **механизм**

Это **инсерционная** мутация, приводящая к утрате генов, контролирующих синтез полисахаридных звеньев ЛПС наружной мембраны клеточной стенки

- **биологическое значение:**

- **R-формы** более устойчивы к физико-химическим факторам внешней среды,
- **S-формы** более устойчивы к фагоцитозу и действию антител.

Значительно усложняют выделение и идентификацию чистой культуры.

МУТАГЕНЫ

- Мутагены – факторы, вызывающие мутации.
- Различают:
 - физические мутагены** – ультрафиолетовые лучи, ионизирующие излучения, магнитные поля, температура,
 - химические** – пероксидазы, акридиновые красители, азотная кислота,
 - биологические** – Is-последовательности и Tn-транспозоны, фаги, антибиотики, фитонциды.

МУТАГЕНЫ

Классификация по механизму действия:

1. аналоги азотистых оснований ⇨ замена пар оснований,
2. акридиновые красители ⇨ выпадения или вставки оснований,
3. УФ, некоторые продукты микробного метаболизма ⇨ нарушение работы ДНК-полимеразы ⇨ образование тиминовых димеров,
4. нитрозосоединения ⇨ множественный эффект («супермутагены»).

РЕПАРАЦИИ

Определение

Процесс восстановления повреждённой ДНК ферментами репарационных систем

Различают 2 типа репарационных систем:

Система фотореактивации

Система темновой репарации.

Система фотореактивации



Этапы темновой репарации:

- установление места повреждения ДНК = **эндонуклеаза**,
- «вырезание» поврежденного фрагмента = **полимераза 1**,
- синтез фрагмента по матрице сохранившейся нити ДНК – **ДНК-полимераза 1 или III**,
- встраивание синтезированного фрагмента в молекулу поврежденной нити ДНК = **лигаза**

Система темновой репарации

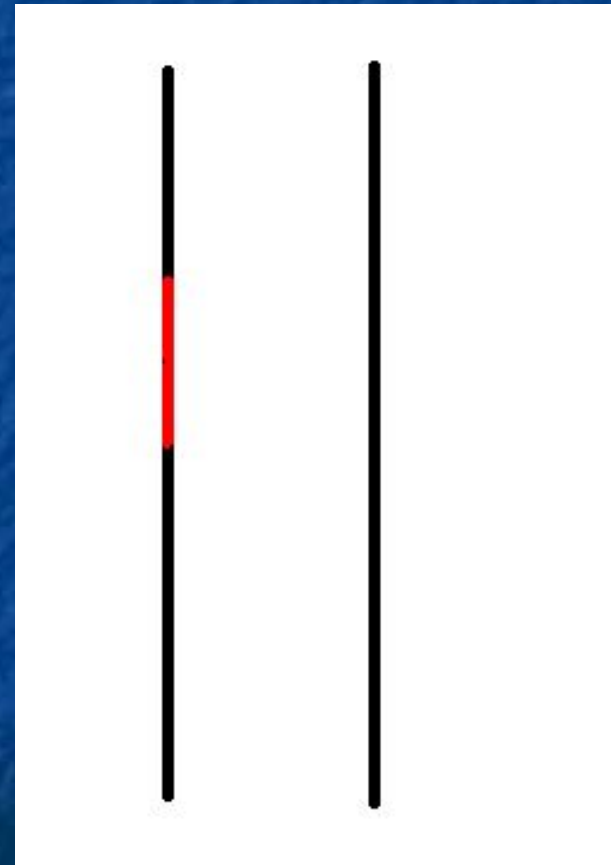
УФ-лучи



тиминовые димеры

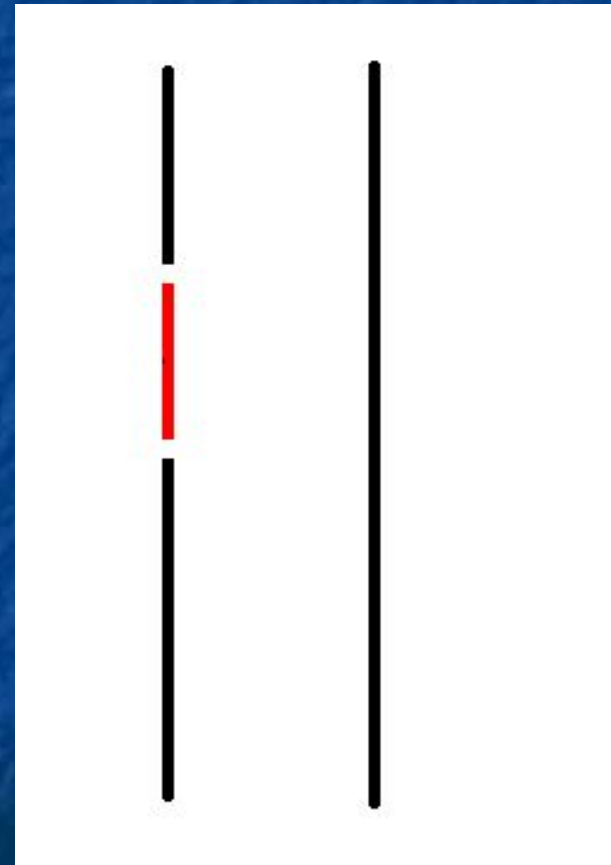


темнота



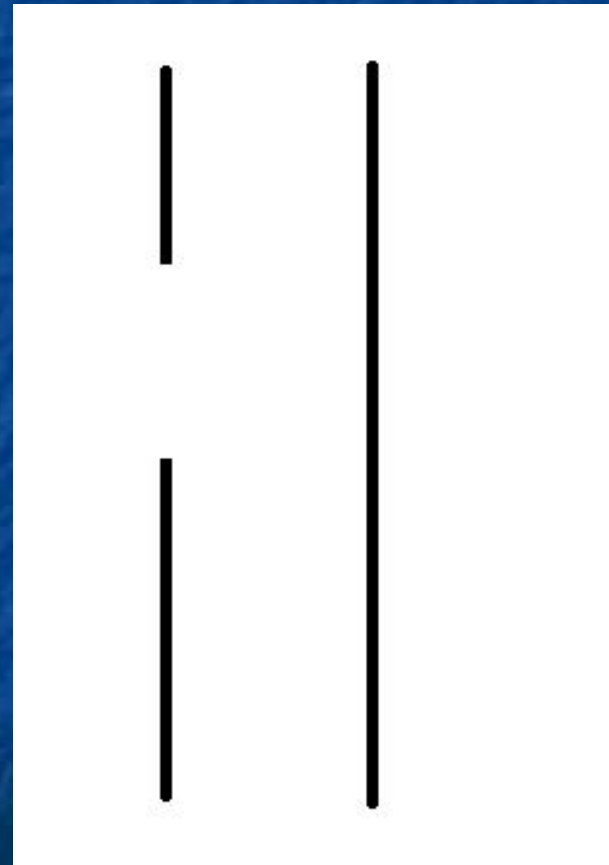
Система темновой репарации

обнаружение и
нарезание
повреждённого
участка
(эндонуклеаза)



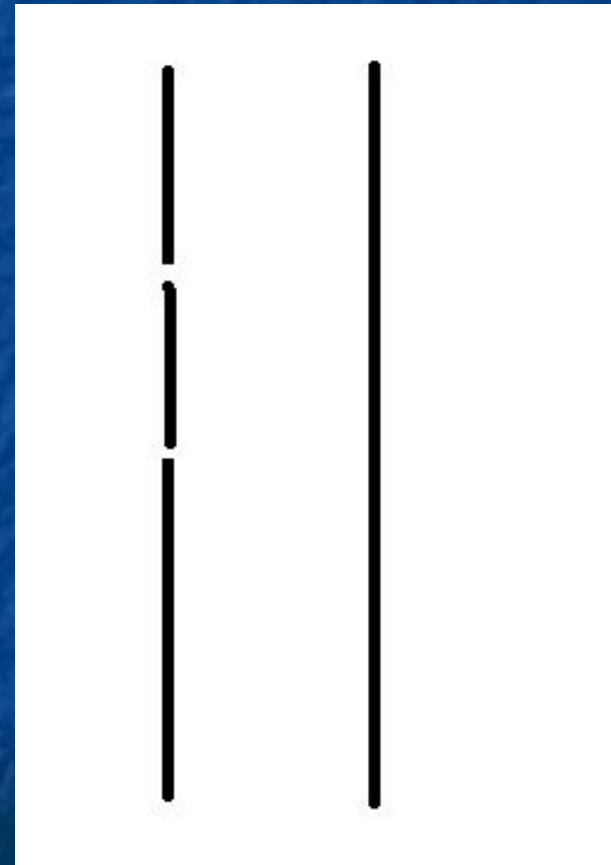
Система темновой репарации

удаление
повреждённого
участка
(ДНК-полимераза I)



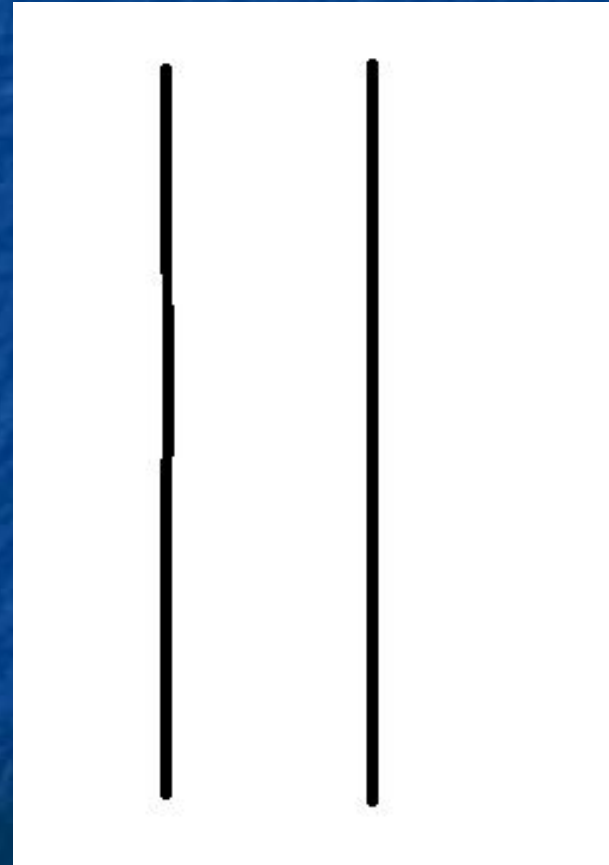
Система темновой репарации

синтез на матрице второй
нити ДНК нового, не
содержащего мутации,
участка
(ДНК-полимераза I или III)



Система темновой репарации

«вшивание» нового
участка в цепь ДНК
(лигаза)



Генетические рекомбинации

- = перераспределение генетического материала родителей в потомстве, обуславливающее комбинативную изменчивость организмов,
- = взаимодействие между двумя геномами, которое приводит к образованию рекомбинантной ДНК и формированию дочернего генома, сочетающего гены обоих родителей.
- Они происходят при участии ферментов в пределах отдельных генов.

Механизм рекомбинаций

клетки=доноры



передают информацию



клеткам-реципиентам



рекомбинат

генотип рекомбинанта =
генотип реципиента+ часть генотипа донора

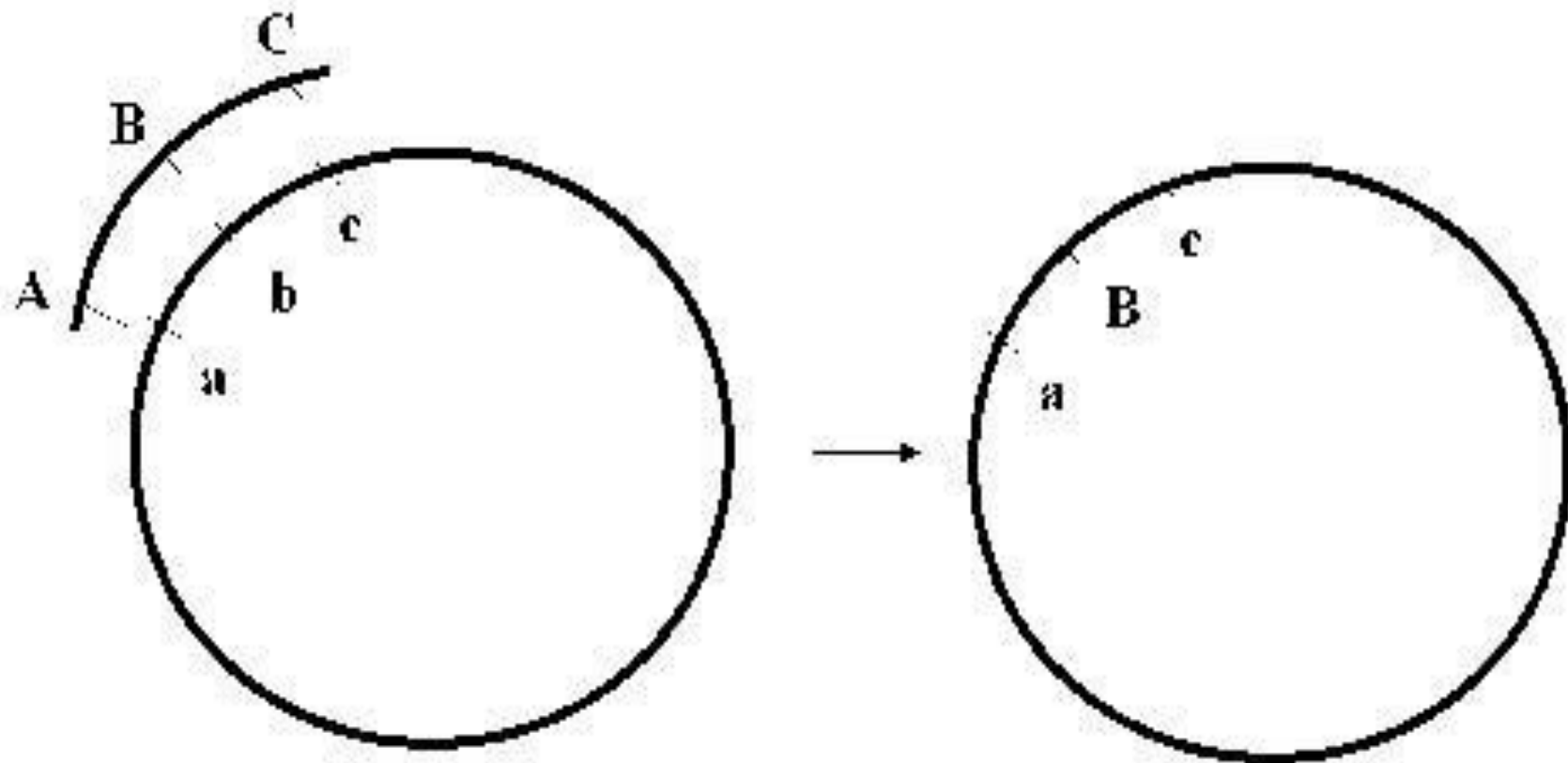


Схема рекомбинации у бактерий

$b = \text{Lac}^-$

$B = \text{Lac}^+$

ВИДЫ РЕКОМБИНАТИВНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ У БАКТЕРИЙ

1. **Трансформация** – непосредственная передача генетического материала от донорской к реципиентной клетке
1. **Конъюгация** – передача генетического материала от донорской к реципиентной клетке с помощью конъюгационных пилей
1. **Трансдукция** – передача генетического материала от донорской к реципиентной клетке с помощью дефектных бактериофагов.

Трансформация

- = способ передачи генетической информации путем внедрения свободной ДНК донора в бактерию-реципиент
- Трансформация эффективно происходит только между бактериями одного вида, имеющими разный генотип.

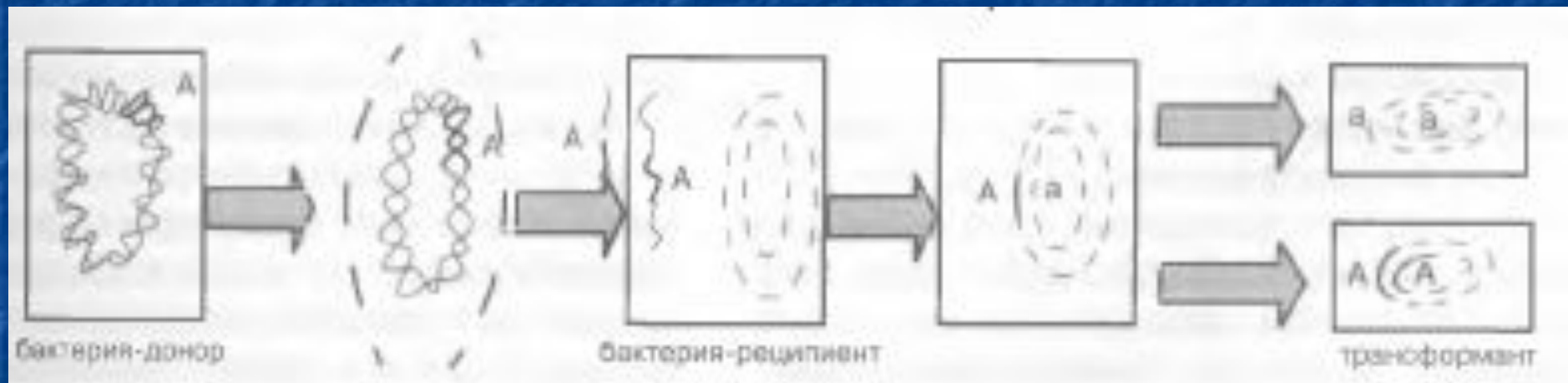
Трансформация

- Клетки, способные принимать донорскую ДНК, называются **компетентными**.
- Состояние компетентности возникает в период роста клетки и совпадает с **концом логарифмической фазы**.
- Трансформирующей активностью обладают **двунитевые фрагменты ДНК** с молекулярной массой не менее $0,5-1 \times 10^6$.

Процесс трансформации состоит из фаз:

- адсорбция ДНК донора на клетке-реципиенте,
- проникновение ДНК внутрь клетки-реципиента с последующей деспирализацией,
- соединение одной нити ДНК с гомологичным участком хромосомы реципиента.

Схема трансформации



Конъюгация

- — перенос генетического материала из клетки-донора в клетку реципиента при тесном контакте.
- Донорами генетического материала являются клетки, несущие F-плазмиду.
- Бактериальные клетки, не имеющие F-плазмиды, являются реципиентами.

Конъюгация

- 2 вида конъюгации:

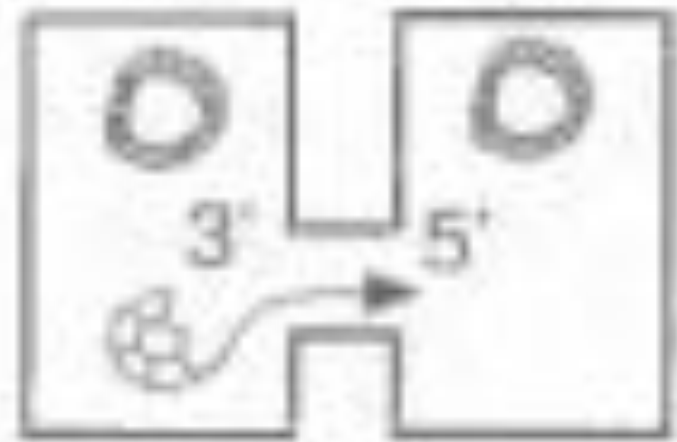
1. Если F-плазида автономна → бактерия наз-ся **F⁺**
штаммом

2. Если F-плазида интегрирована в ДНК →
Hfr – штамм

1 Если F-плазмида автономна:

- 1. Прикрепление клетки донора к реципиенту с помощью половых ворсинок.
- 2. Между клетками образуется конъюгационный мостик, через который из клетки-донора в клетку-реципиент передается F-плазмида:
 - 2.1. **tra-оперон** кодирует **белок**, который в **точке O** разрывает одну цепь плазмиды и ковалентно связывается с 5' концом,
 - 2.2. линейная цепь переносится в клетку-реципиент, кольцевая нить остается в клетке-доноре,

Схема конъюгации у бактерий (если F-плазмида автономна)



1 Если F-плазмида автономна:

2.3. белок способствует замыканию линейной нити в клетке-реципиенте,

2.4. одноцепочечные нити достраиваются до двухцепочечных в клетке-доноре и реципиенте.

- → реципиент становится донором!!!

Схема конъюгации у бактерий (если F-плазмида автономна)



2. Если F-плазмида встроена в хромосому бактерии = Hfr-штамм:

- Происходит разрыв одной нити ДНК при участии **эндонуклеазы** в точке O, расположенной в месте интеграции F-плазмиды.
- Проксимальный конец ДНК через конъюгационный мостик проникает в клетку-реципиент и сразу же достраивается до двунитевой структуры.
- Оставшаяся в клетке донора нить является матрицей для синтеза второй нити.
- передается не вся нить, а несколько генов, плазмида остается в донорской клетке → **реципиент остается реципиентом**

Образование Hfr-штамма

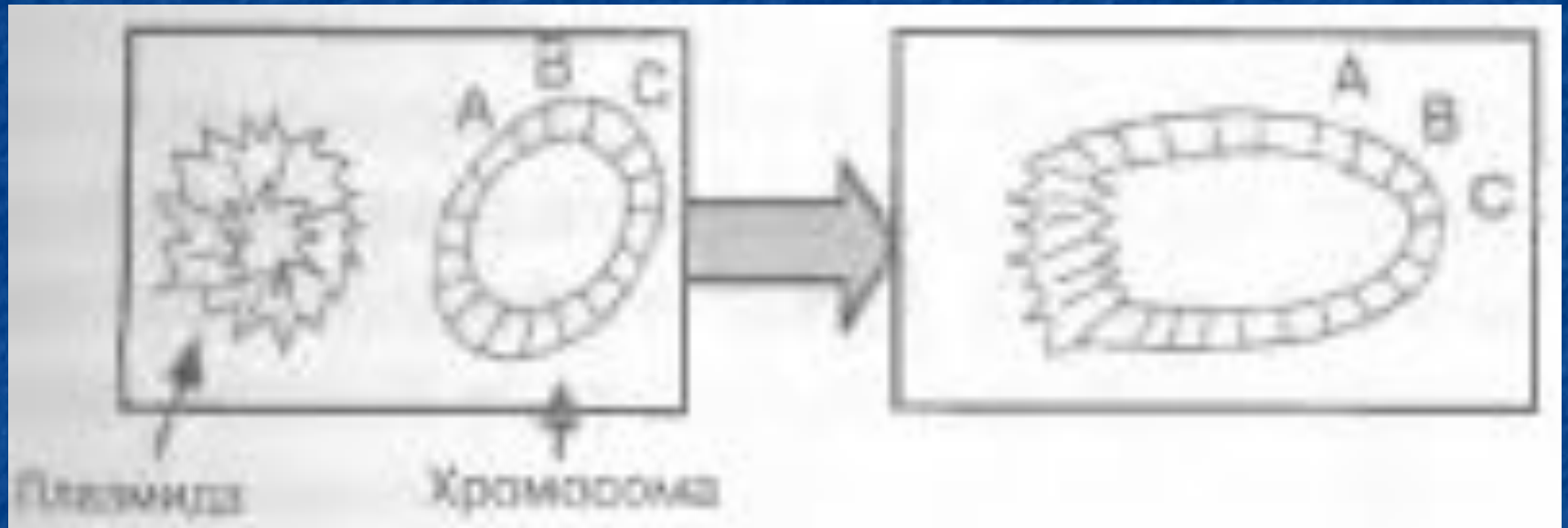
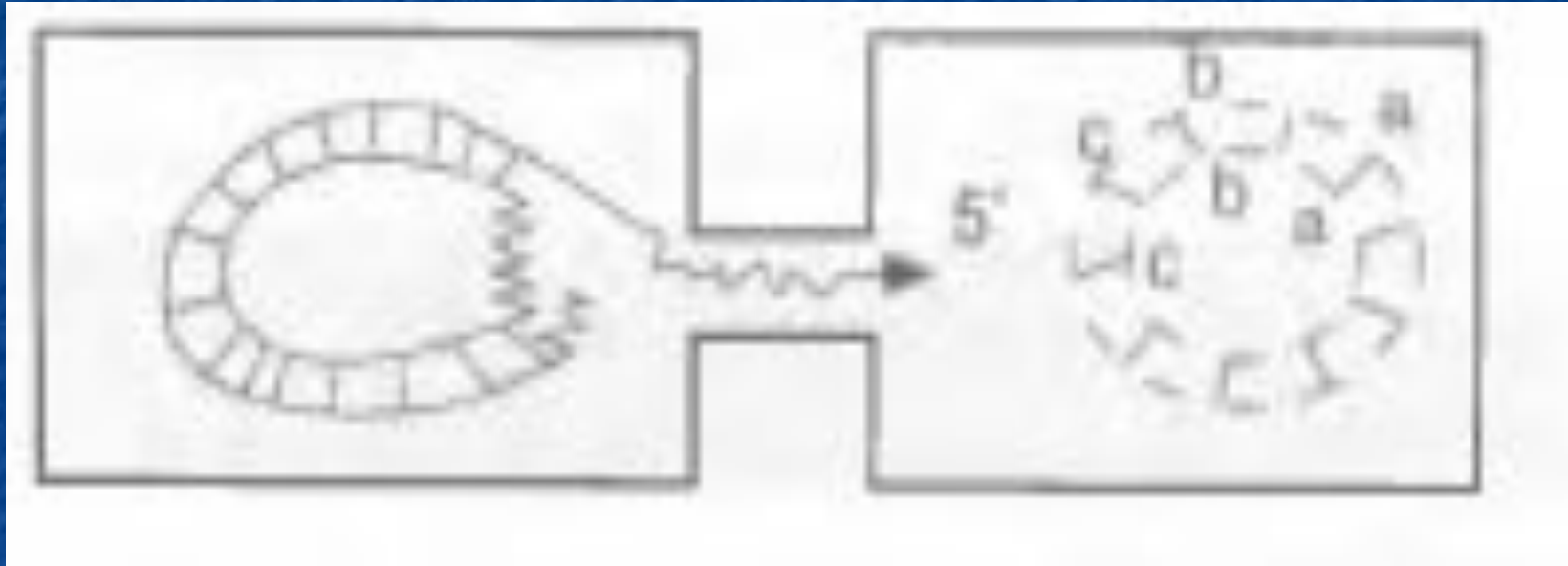
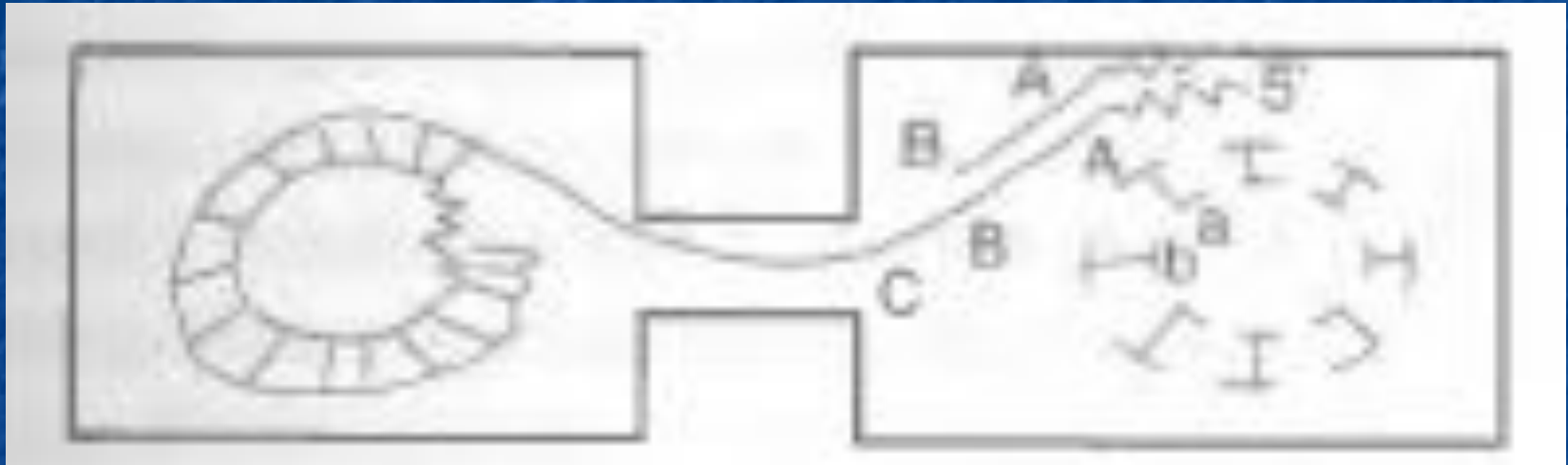


Схема конъюгации Hfr-штамма



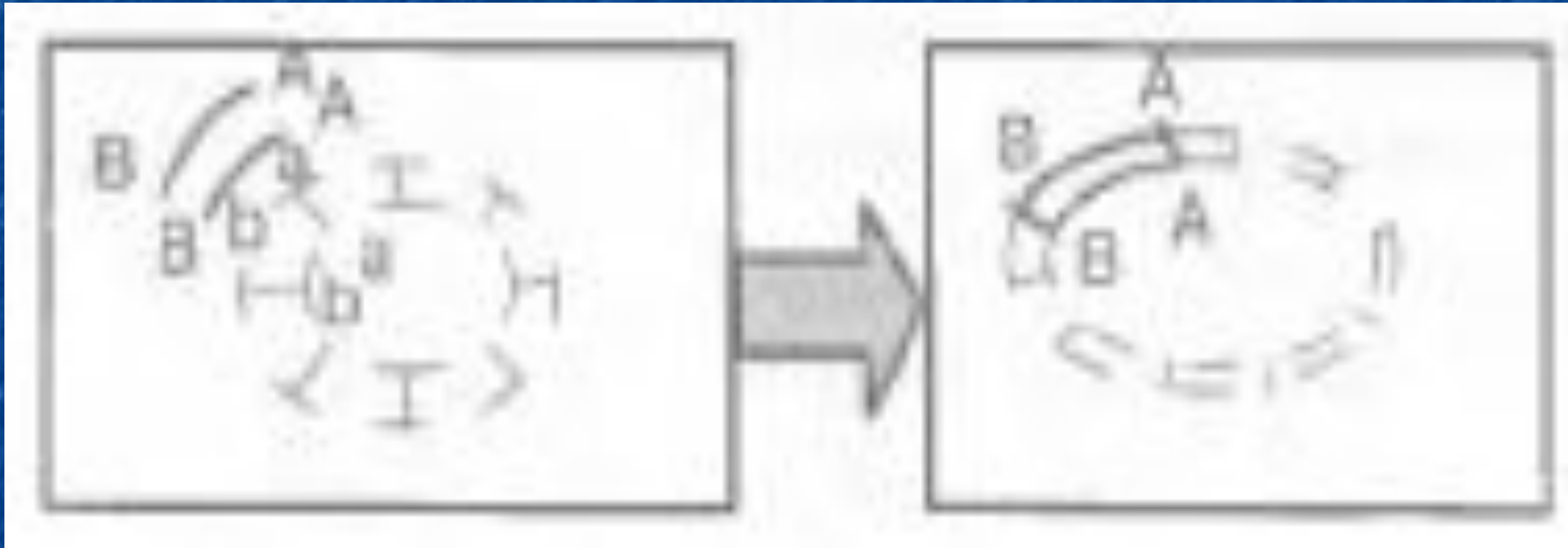
разрыв одной нити ДНК при участии **эндонуклеазы** в точке O, расположенной в месте интеграции F-плазмиды.

Схема конъюгации Hfr-штамма



Проксимальный конец ДНК через конъюгационный мостик проникает в клетку-реципиент и сразу же достраивается до двунитевой структуры.

Схема конъюгации Hfr-штамма



Двунитевой фрагмент ДНК встраивается в геном клетки-реципиента;

Плазмида осталась в клетке-доноре (Hfr-штамм)

Трансдукция

- – передача генетического материала от одной бактерии к другой при помощи фагов.
- Различают:
 - 1) общую = неспецифическую трансдукцию
 - 2) специфическую трансдукцию
 - 3) abortивную

Общая = неспецифическая трансдукция

- – когда в клетку–реципиент вместе с фаговой ДНК переносится **любой ген** донора.
- При репродукции фага в клетке любой случайный ген м.б. включен в состав фаговой частицы.
- Перенесенный фагом фрагмент ДНК бактерии-донора способен включаться в гомологичную область ДНК клетки-реципиента путем рекомбинации.
- **Трансдуцирующий фаг является только переносчиком** генетического материала от одних бактерий к другим, а сама фаговая ДНК не участвует в образовании рекомбинантов,

Специфическая трансдукция

- – фаг переносит **специфические гены** от бактерии-донора к бактерии-реципиенту:
- При выходе из ДНК лизогенной клетки-донора профаг включает расположенные рядом гены, а часть генов профага остается в хромосоме бактерии → образуется **дефектный трансдуцирующий фаг.**
- При взаимодействии трансдуцирующих фагов с клетками реципиентного штамма происходит **включение гена бактерии-донора вместе с ДНК дефектного фага в хромосому бактерии-реципиента.**

Абортивная трансдукция

- = принесенный фагом **фрагмент ДНК** бактерии-донора не включается в хромосому бактерии-реципиента, а **располагается в ее цитоплазме** и может в таком виде функционировать.
- Во время деления бактериальной клетки-рекомбинанта принесенный фрагмент ДНК донора передается только одной из дочерних клеток и со временем исчезает.

Генетическая рекомбинация

= обмен между гомологичными участками геномов двух вирусов,

– чаще встречается у ДНК-содержащих вирусов,

- среди РНК – у вирусов с фрагментированным геномом.

вирус 1 + вирус 2 \Rightarrow в одной клетке



Генетическая реактивация

= обмен между геномами родственных вирусов, у которых мутации произошли в разных генах → полноценный геном

вирус 1 + вирус 2 ⇒ в одной клетке



Комплементация = обмен, когда один из двух вирусов в результате мутации синтезирует неполноценный белок.

Немутантный вирус восполняет его отсутствие у мутанта, синтезируя полноценный белок.

Н-р, при культивировании аденовируса в клетках почек обезьян макака-резус аденовирус мог размножиться только в присутствии онкогенного вируса SV40

вирус 1 + вирус 2 \Rightarrow в одной клетке

вирус 1



белок



репродукция вируса 2

Фенотипическое смешивание

- при смешанном заражении двумя вирусами часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие обоим вирусам при неизменности генотипа
- Н-р, при заражении клеток вирусами полиомиелита и Коксаки часть потомства имеет РНК одного вириона заключенную в капсид другого

Фенотипическое смешивание

вирус 1 + вирус 2 \Rightarrow в одной клетке

вирус 1

вирус 2



ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Продукты, получаемые генно-инженерным способом с помощью рекомбинантных штаммов бактерий

- вакцины
- гормоны
- интерфероны
- ЦИТОКИНЫ

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Получение рекомбинантной вакцины для профилактики гепатита В

встраивание гена вируса гепатита В,
детерминирующего синтез HBs-Ag в геном
дрожжевой клетки



манифестация гена



синтез дрожжевой клеткой HBs-Ag



очистка HBs-Ag



вакцина, содержащая HBs-Ag, но не содержащая
вирусных частиц или их фрагментов

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

- процентное содержание Г+Ц в бактериальном геноме
- метод молекулярной гибридизации
- полимеразная цепная реакция (ПЦР)
- рестрикционный анализ

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ

Цель

Выявления степени сходства различных ДНК (при идентификации микроорганизмов – сравнение ДНК выделенного штамма с ДНК эталонного штамма)

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ

Принцип осуществления

исследуемая ДНК



нагрев в щелочной среде



расплетение на две отдельные нити



закрепление одной из них на специальном фильтре



помещение этого фильтра в р-р, содержащий радиоактивный зонд
(одноцепочечную молекулу ДНК эталонного штамма, меченную радиоактивным изотопом)



понижение температуры



+ - восстановление двойной спирали
- - двойная спираль не восстанавливается

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Цели

- обнаружение в патологическом материале конкретного вида микроорганизма без выделения чистой культуры
- идентификация микроорганизмов
- генотипирование микроорганизмов

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Принцип осуществления

патологический материал или штамм микроорганизма



выделение ДНК



нагрев



расплетение ДНК на две нити



добавление праймеров (участки ДНК, комплементарные 3'-концам искомого гена)



охлаждение



связывание праймеров с комплементарными участками искомого гена



ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Принцип осуществления



добавление ДНК-полимеразы и нуклеотидов



нуклеотиды присоединяются к 3'-концам праймеров



повторение циклов (30-80) – накопление
(амплификация) искомого гена



резкое нарастание (двукратное после каждого цикла)
количества искомого гена

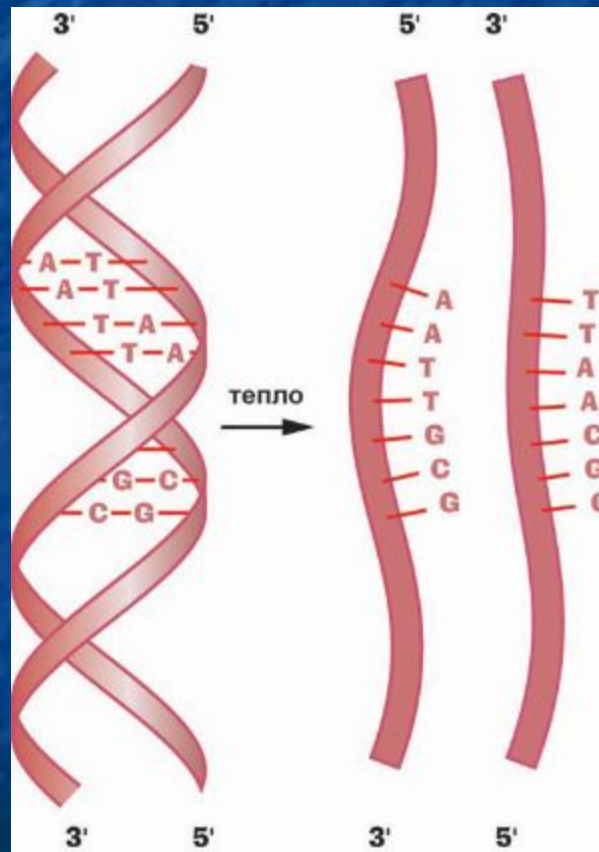


определение количества ДНК с помощью
электрофореза

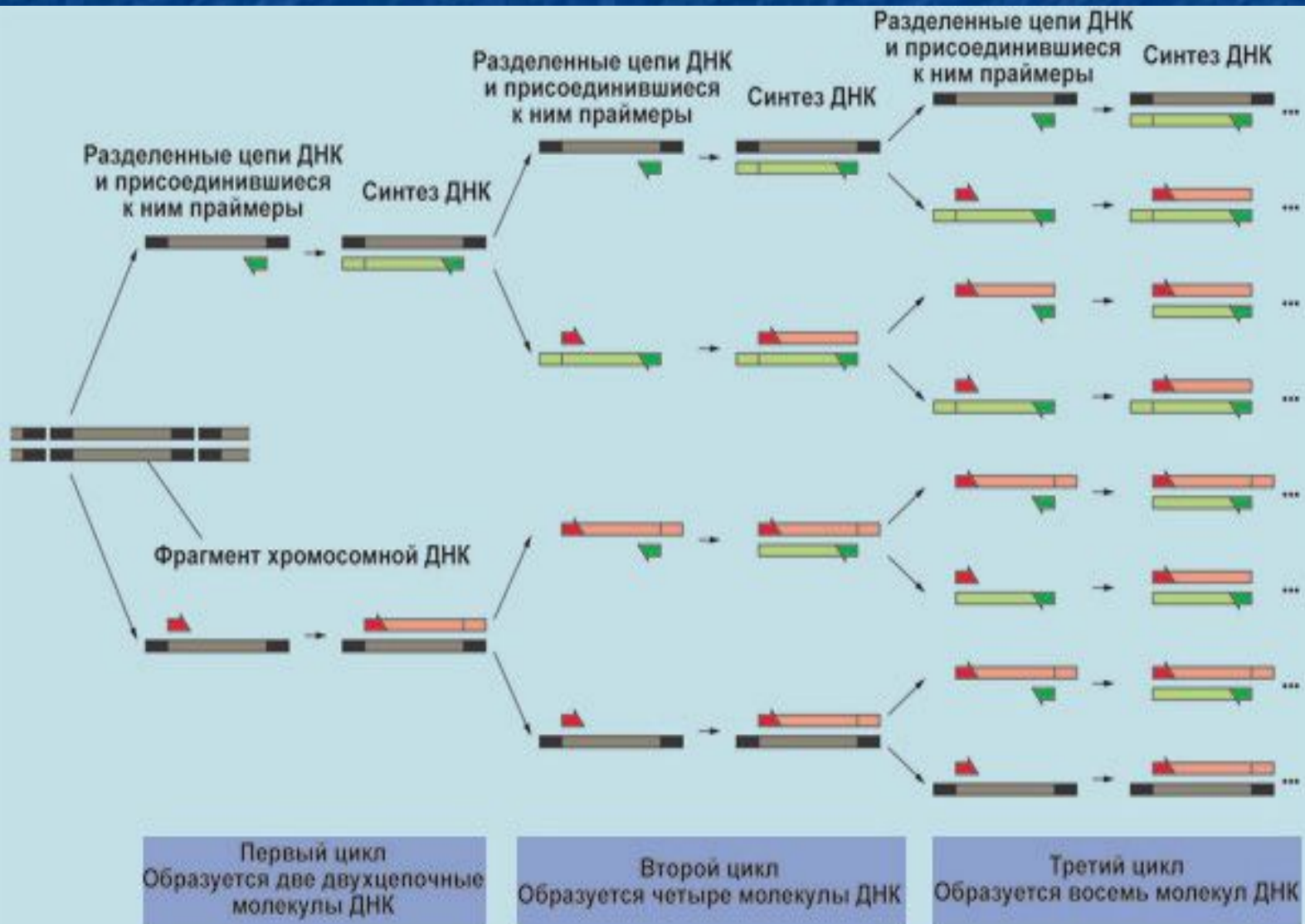
+ - количество ДНК увеличивается

– - количество ДНК не увеличивается

При нагревании две
комплементарные нити ДНК
расходятся – она плавится



ПЦР



Рестрикционный анализ

- Расщепление ДНК микроорганизмов на фрагменты при помощи **рестриктаз (эндонуклеаз)**,
- От бактерий выделено **175 рестриктаз**,
- Известно **80 сайтов**, где происходит разрыв,
- В ДНК микроорганизма содержится определенное количество **участков узнавания**,
- Под действием рестриктаз образуется конкретное количество фрагментов ДНК разного размера = **РЕСТРИКЦИОННАЯ КАРТА**

Схема рестрикционного анализа

