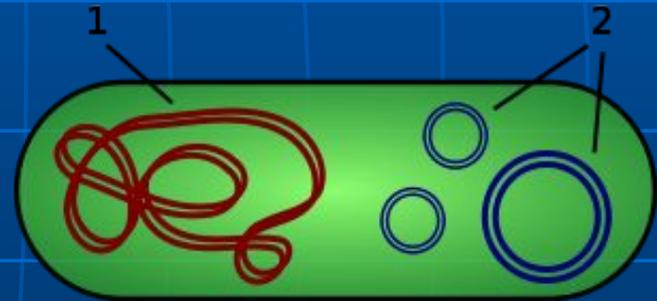


Генетика бактерий

Профессор М.Н.Бойченко

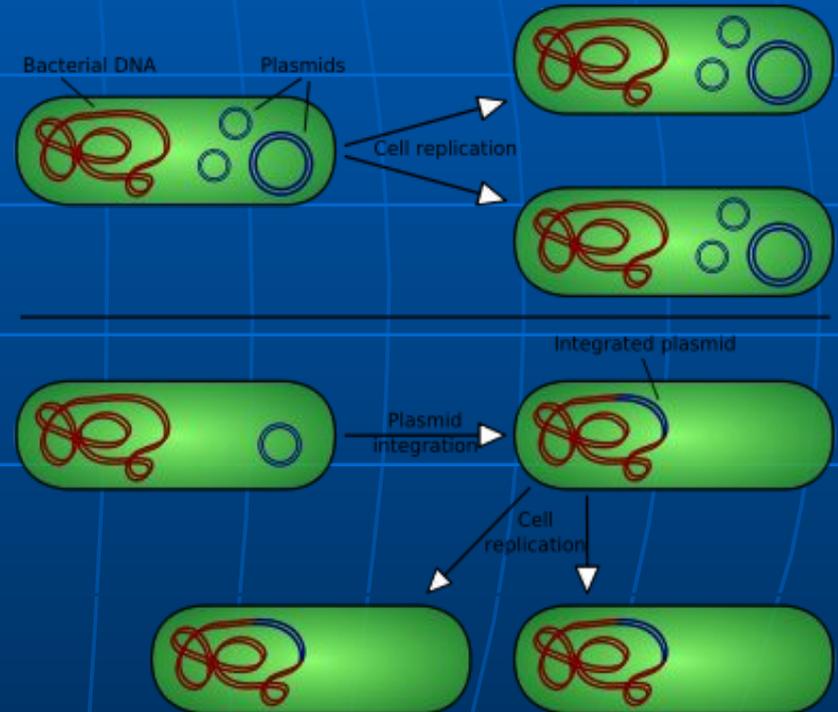
ПЛАЗМИДЫ

- Размеры плазмид от 1 до 200 kilobase (kbp).
- Количество плазмид в одной клетке от 1 до 1000 в зависимости от групп совместимости



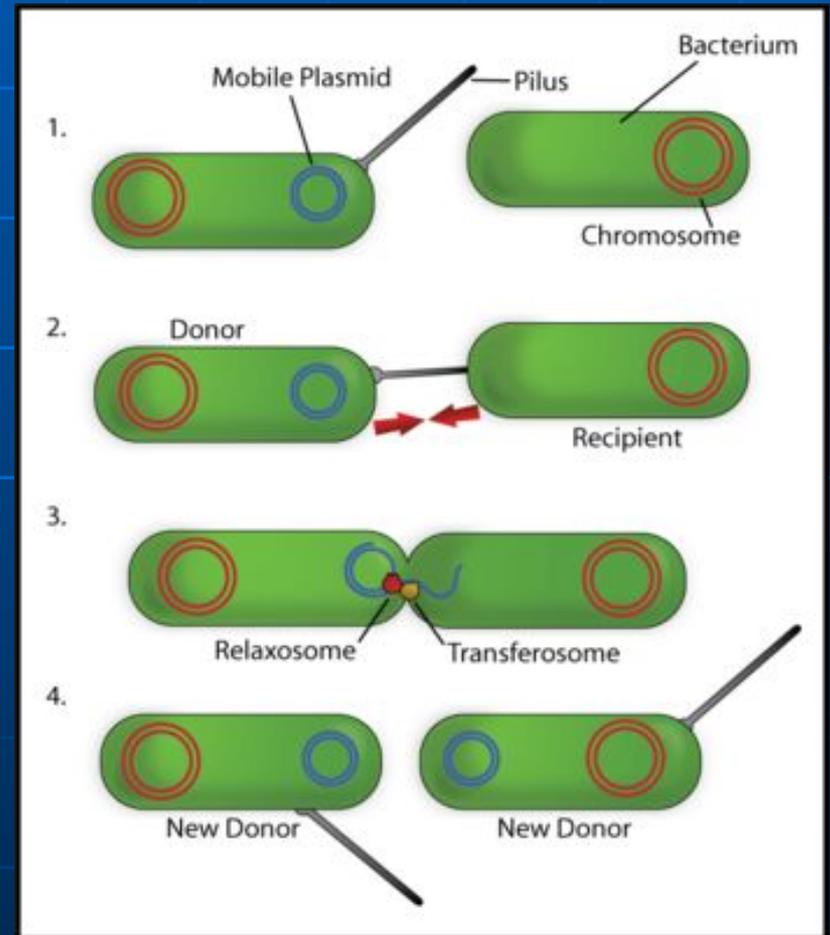
Типы плазмид

- Трансмиссивные
- Нетрансмиссивные
- Интегративные
- Неинтегративные
- Совместимые
- Несовместимые



Типы плазмид

- **Трасмиссивные плазмиды** обладают *tra*-опероном, который обеспечивает процесс конъюгации, т.е. передачу плазмиды из одной клетки в другую



Типы плазмид

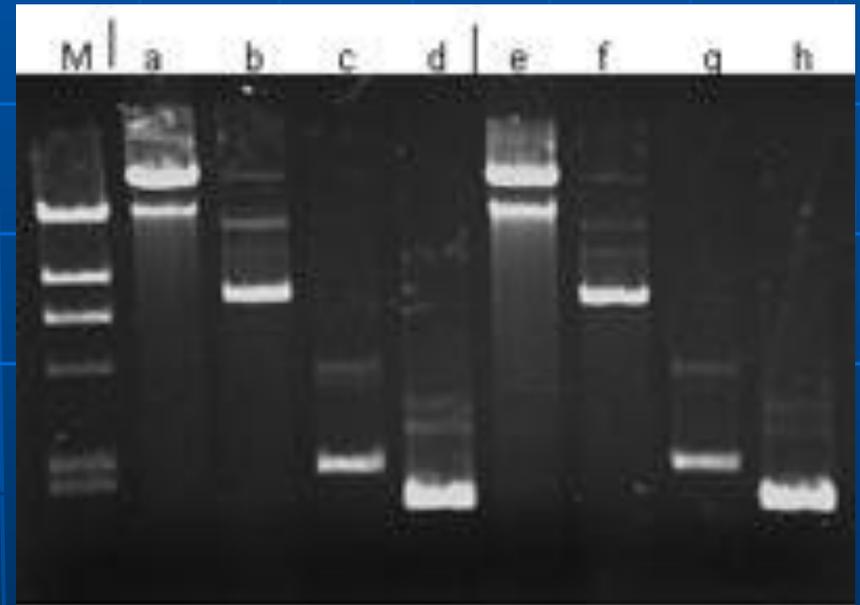
- *Fertility-F-плазмида* содержит tra-оперон. Обеспечивает процесс конъюгации
- *Resistance-(R) фактор*, содержит гены, обеспечивающие резистентность к антибиотикам.

Типы плазмид

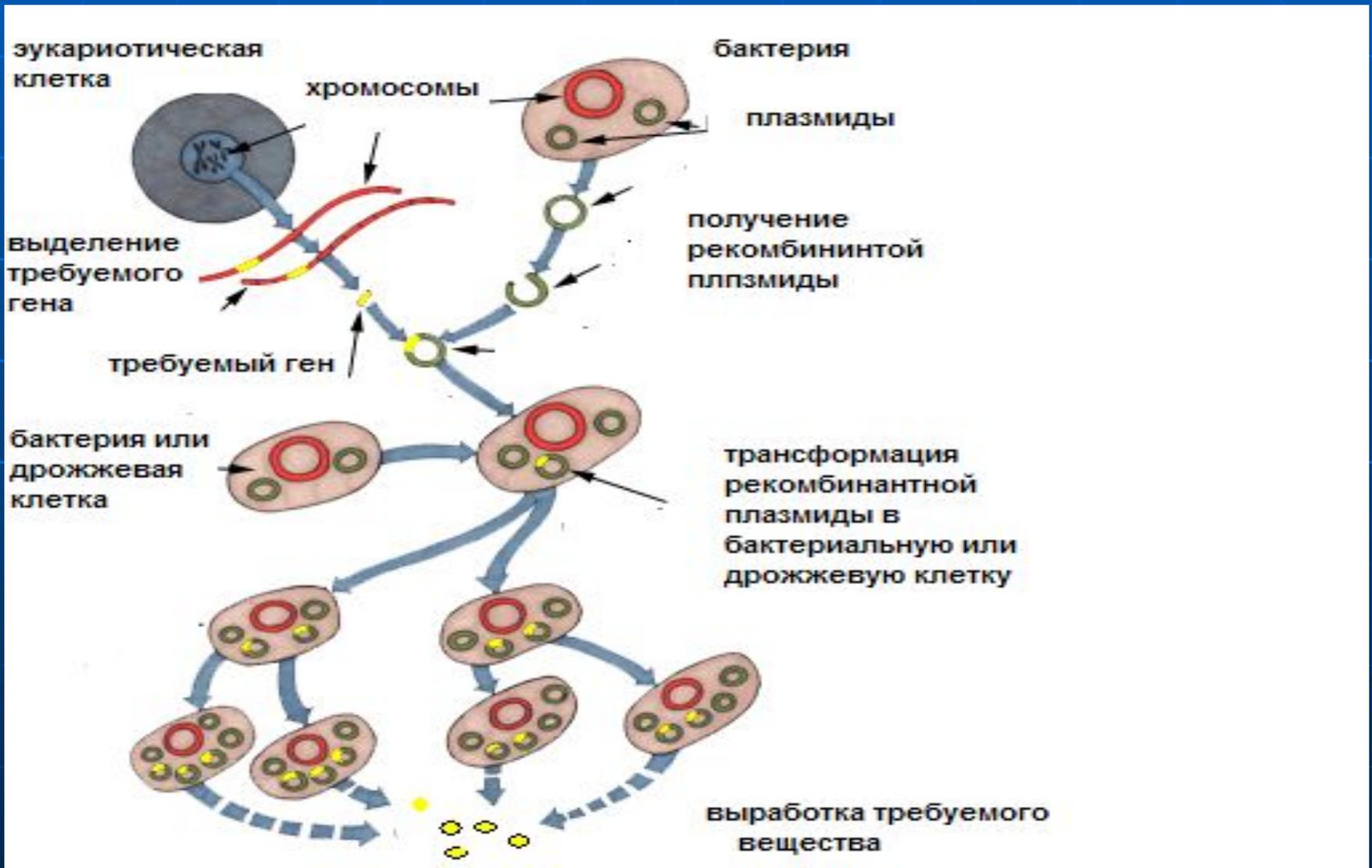
- *Col-плазмида, кодирующая синтез бактерицинов, которые убивают другие бактерии.*
- *Плазмиды вирулентности – кодируют факторы агрессии у патогенных микробов*

Определение плазмидного профиля бактерий.

- Плазмидный профиль позволяет произвести внутривидовую идентификацию бактерий. Для этого из бактериальной клетки выделяют плазмидную ДНК, которую разделяют электрофорезом в агарозном геле, для определения количества и размеров плазмид.



Использование плазмид



- Подвижные генетические элементы обнаружены в составе бактериального генома, как в бактериальной хромосоме, так и в плазмидах. К подвижным генетическим элементам относятся вставочные последовательности и транспозоны.

ПОДВИЖНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ

- Перемещение подвижных генетических элементов принято называть репликативной или незаконной рекомбинацией.
- В отличие от бактериальной хромосомы и плазмид подвижные генетические элементы не являются самостоятельными репликонами, так как их репликация — составной элемент репликации ДНК репликона, в составе которого они находятся.

■

IS-элементы

- IS-элементы имеют размеры - 1000 н. п. и содержат лишь те гены, которые необходимы для их собственного перемещения — транспозиции: ген, кодирующий фермент *транспозазу*, обеспечивающую процесс исключения IS-элемента из ДНК и его интеграцию в новый локус, и ген, детерминирующий синтез репрессора, который регулирует весь процесс перемещения

IS-элементы

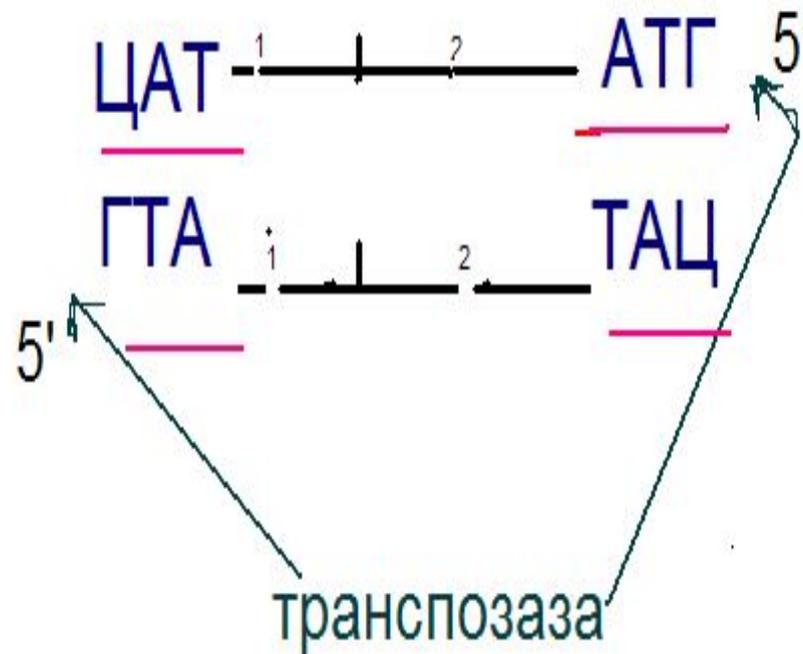
- Эти гены по флангам окружены *инвертированными повторами*, которые служат сайтами рекомбинации, сопровождающей перемещения вставочной последовательности при участии транспозиционных ферментов, в частности транспозаз.

-

IS-элементы

- **Инвертированные повторы** узнает **транспозаза**, она делает **одноцепочечные разрывы цепей ДНК**, расположенных по обе стороны от IS элемента. Оригинальная копия IS-элемента остается на прежнем месте, а ее реплицированный дубликат перемещается на **новый участок**.

СТРОЕНИЕ IS - ЭЛЕМЕНТА



Подвижные генетические элементы

- **Транспозоны — это сегменты ДНК, обладающие теми же свойствами, что и IS-элементы, но имеющие в своем составе структурные гены, например ген токсина, гены, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам.**

Геремещение подвижных генетических элементов по репликону или между репликонами, вызывает:

- **1. Инактивацию генов тех участков ДНК, куда они, переместившись, встраиваются.**
- **2. Образование повреждений генетического материала.**
- **3. Слияние репликонов, т. е. встраивание плазмиды в хромосому.**
- **4. Распространение генов в популяции бактерий, что может приводить к изменению биологических свойств популяции, смене возбудителей инфекционных заболеваний, а также способствует эволюционным процессам среди микробов.**

Защита бактерий от

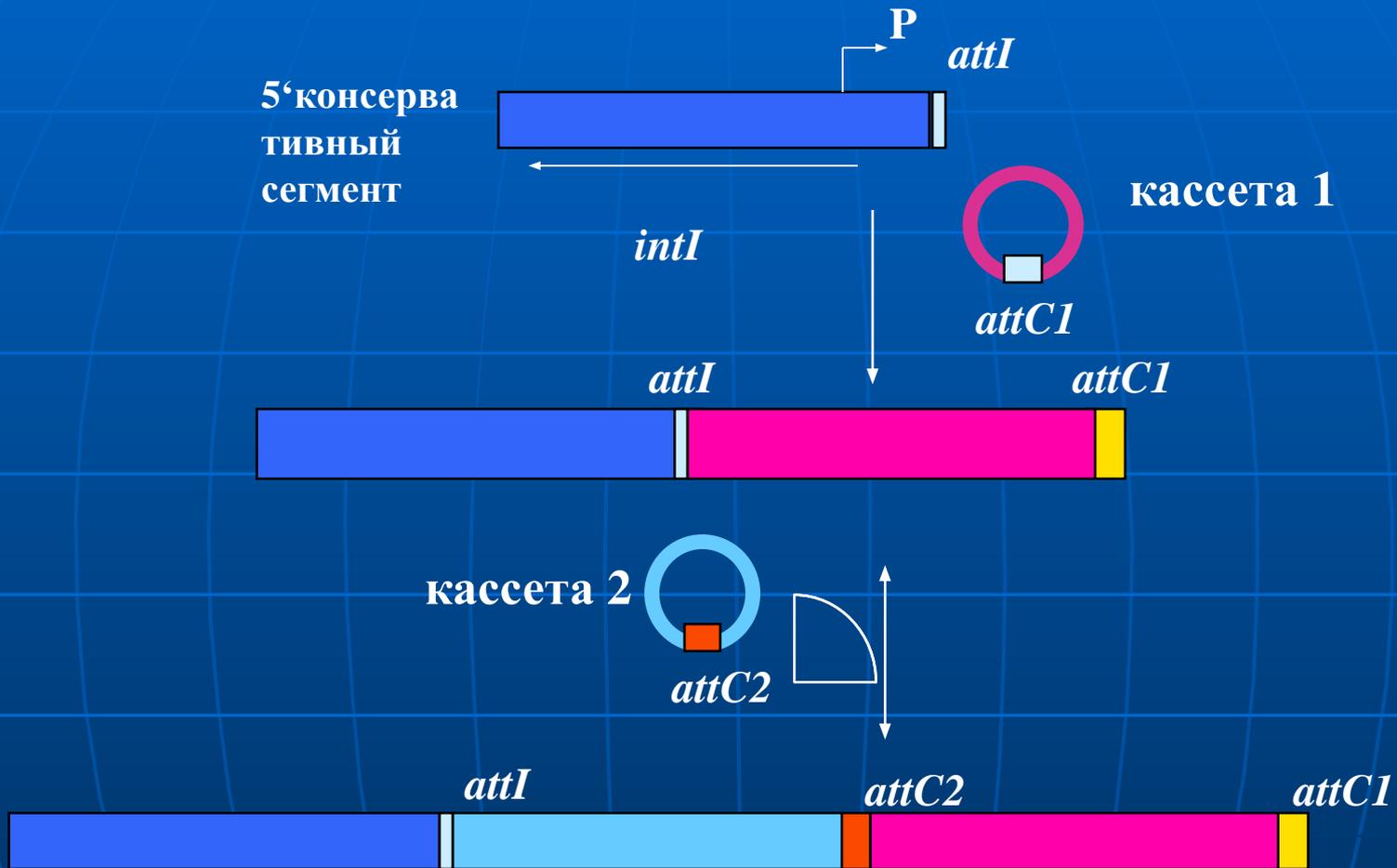
антибиотиков

осуществляется при помощи:

Плазмид

- **Транспозонов**

- **Интегронов**



Интегроны-система захвата и экспрессии генов
 которая состоит из гена *intI*, кодирующего интегразу,
 рекомбинационного сайта *attI* и промотора.

Интеграза через посредство сайт-специфической рекомбинации включает в интегрон или вырезает из него генные кассеты.

Мобильность генной кассеты составляет эффективную систему распространения генов резистентности к антибиотикам.

Кассеты могут существовать в виде свободных циркулярных молекул ДНК, но обычно они интегрированы в линейной форме в интегрон

Генная кассета экспрессируется в интегрене с общего промотера, локализованного на 5' консервативном участке интегнора.

Кассета



attC сайт

Кассеты состоят из одного гена и короткой последовательности, представляющей **сайт специфической рекомбинации**, который называется *attC site*, состоящий из 59 пар оснований « элемент 59-пар оснований »

Кассеты состоят из одного гена и короткой последовательности, представляющей сайт специфической рекомбинации, который называется *attC site*, состоящий из 59 пар оснований « элемент 59-пар оснований »

Изменения генома

- 1. Мутации
- 2. Рекомбинации

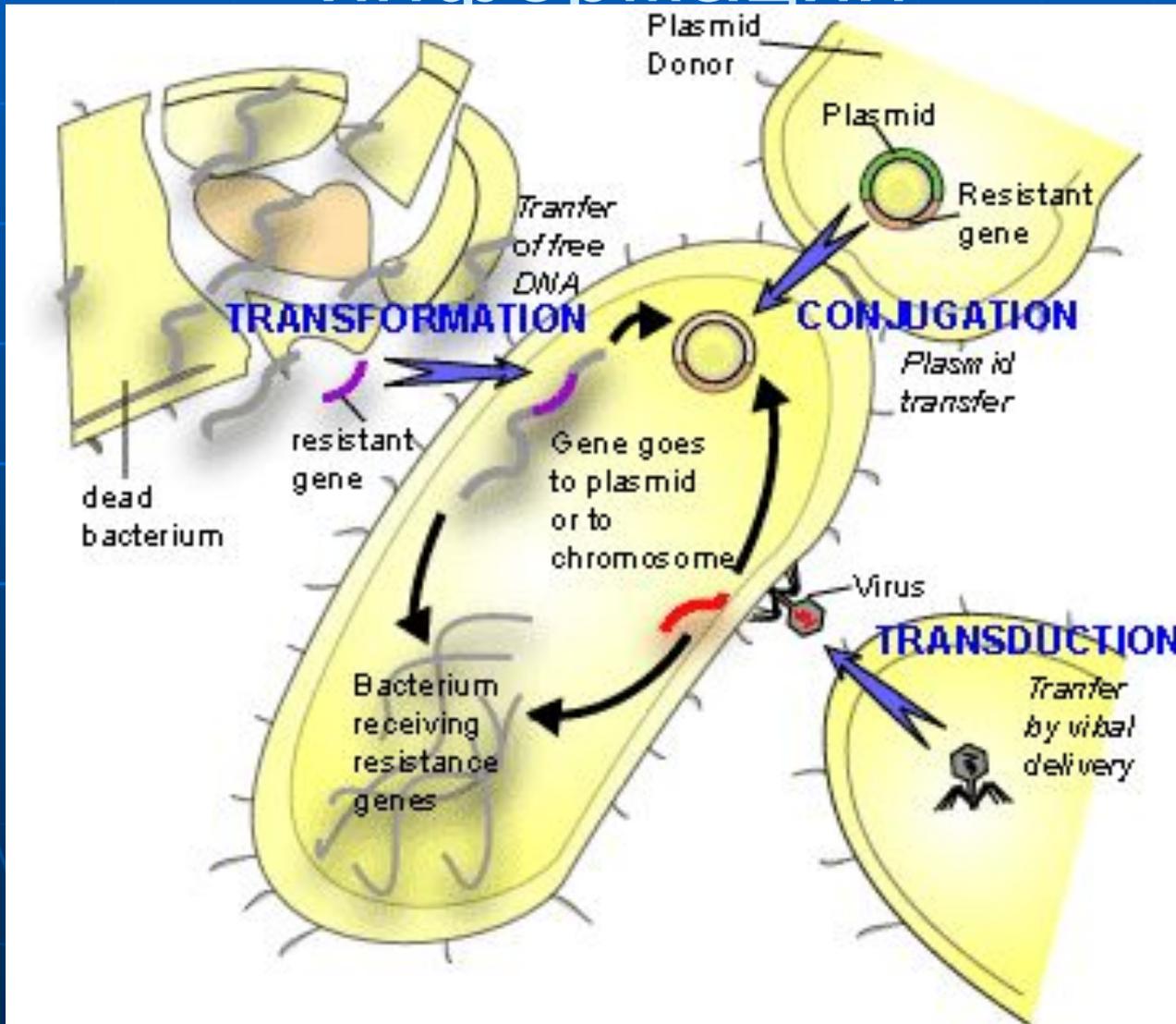
Рекомбинации У бактерий

гомологичная

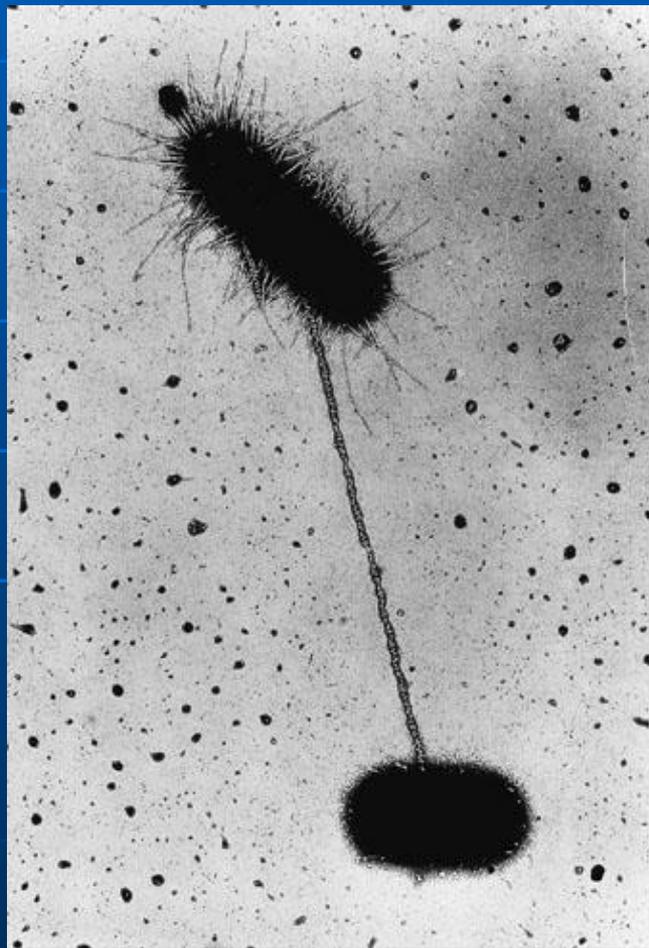
Сайт-
специфическая

незаконная

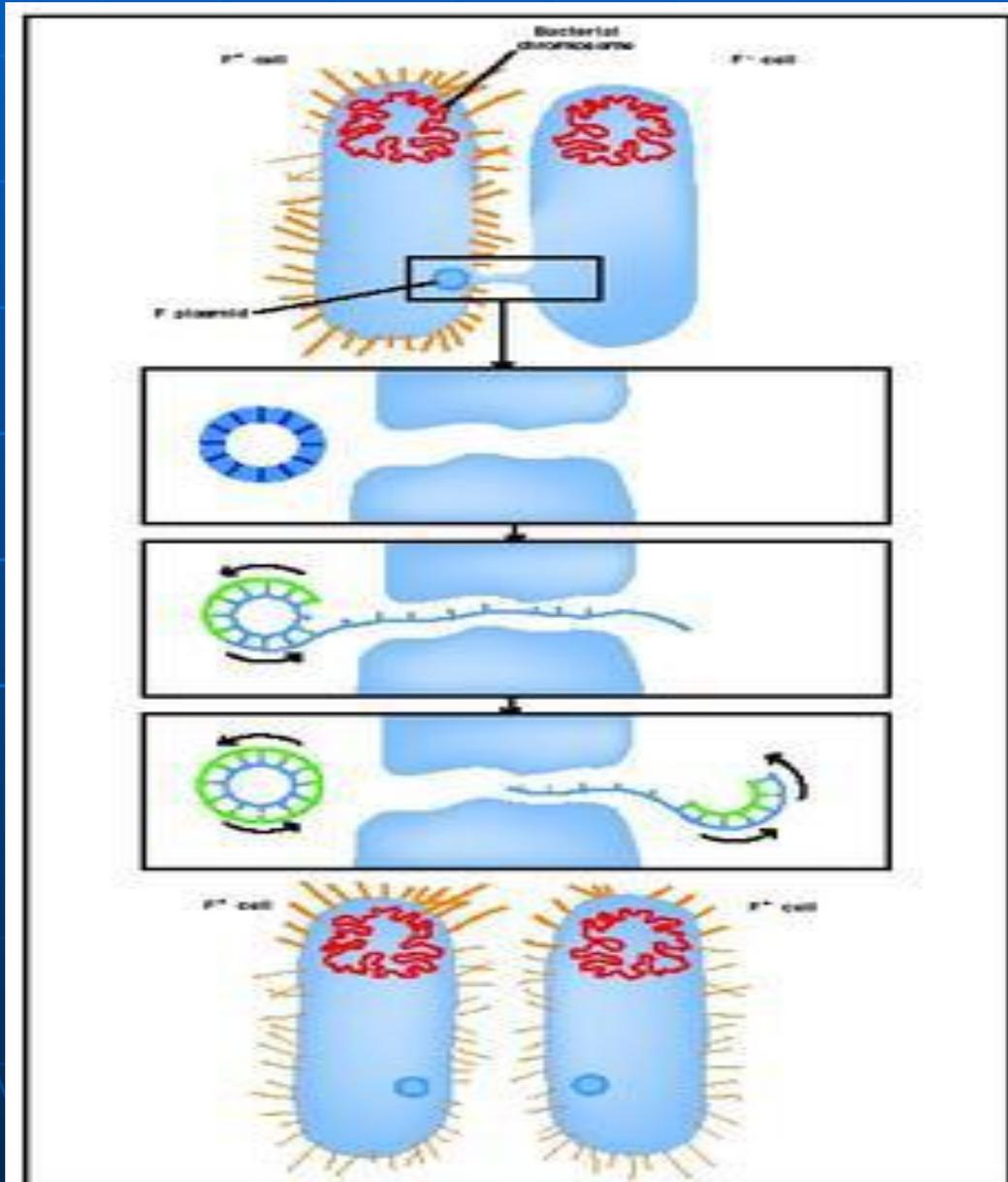
Передача генетической информации

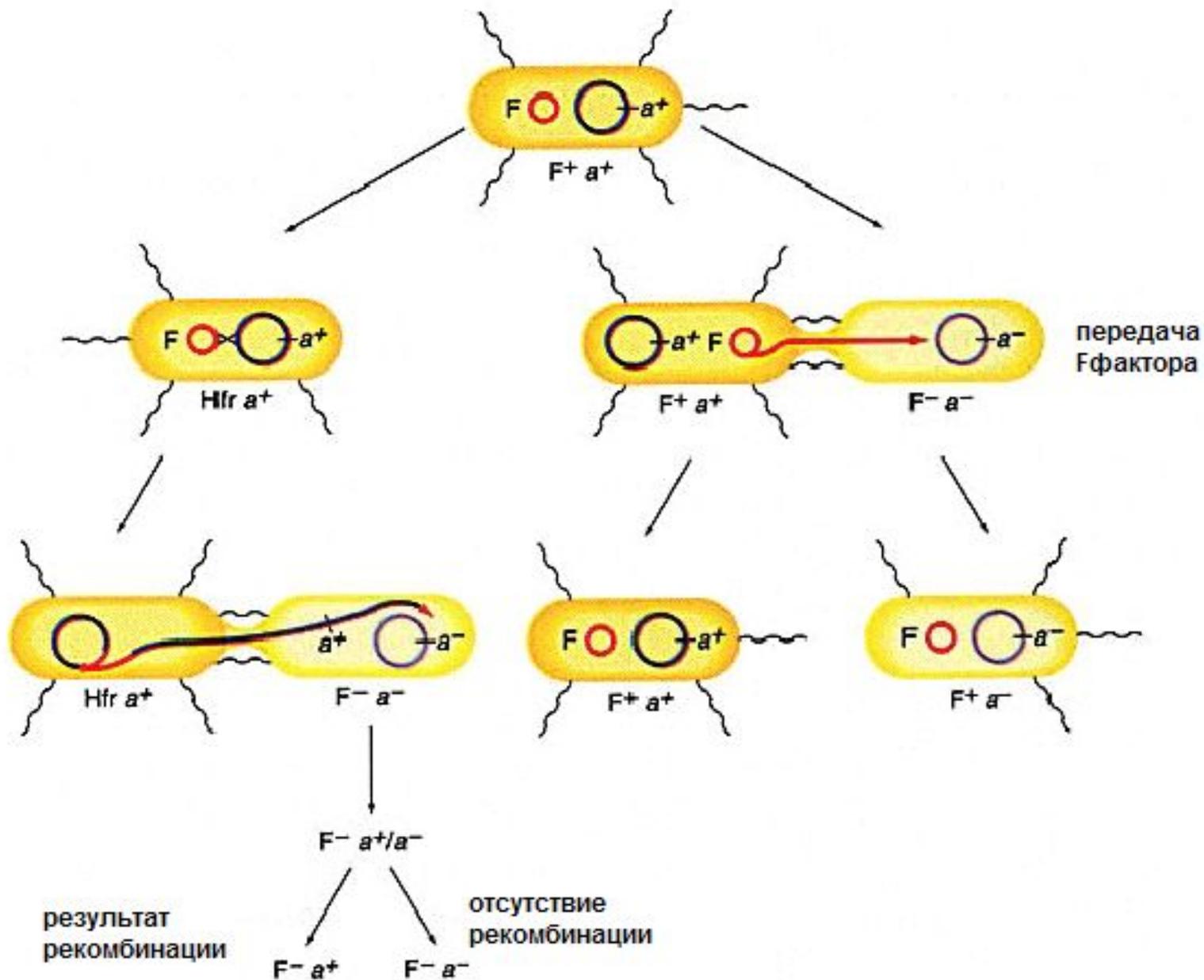


Конъюгация



F+ x F-





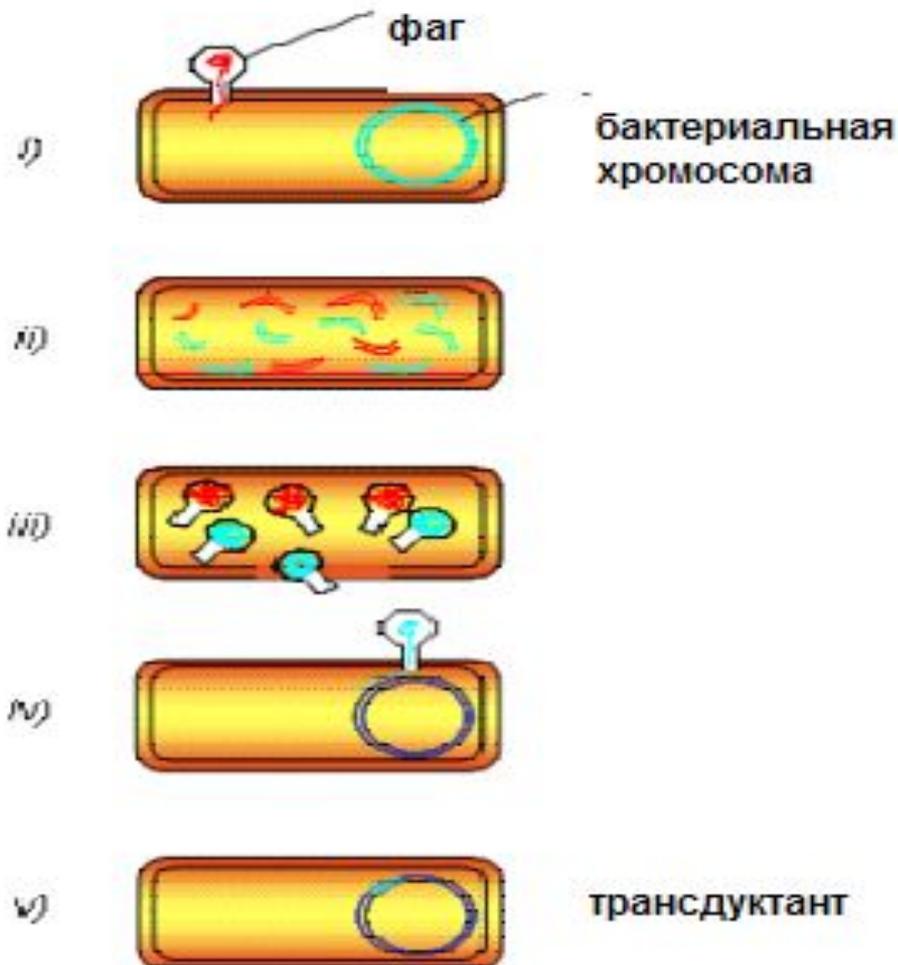
передача хромосомы при конъюгации

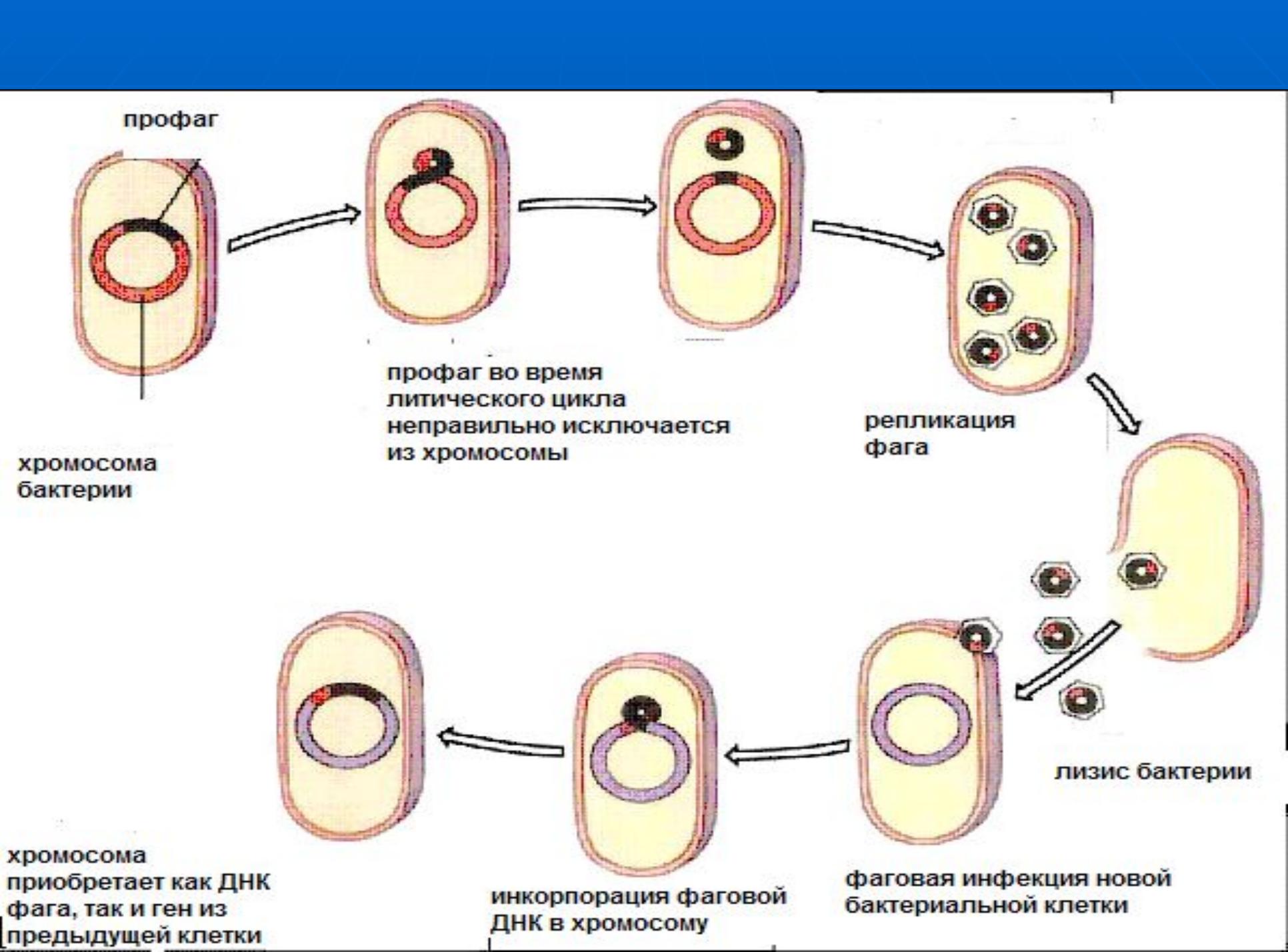
передача F фактора

результат рекомбинации

отсутствие рекомбинации

Общая трансдукция





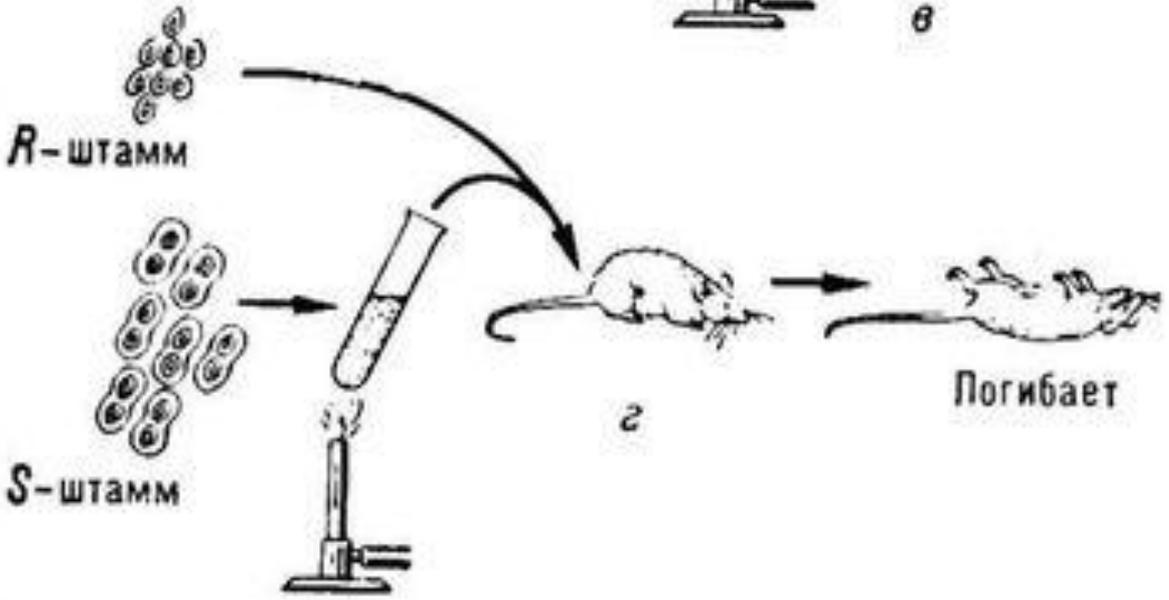
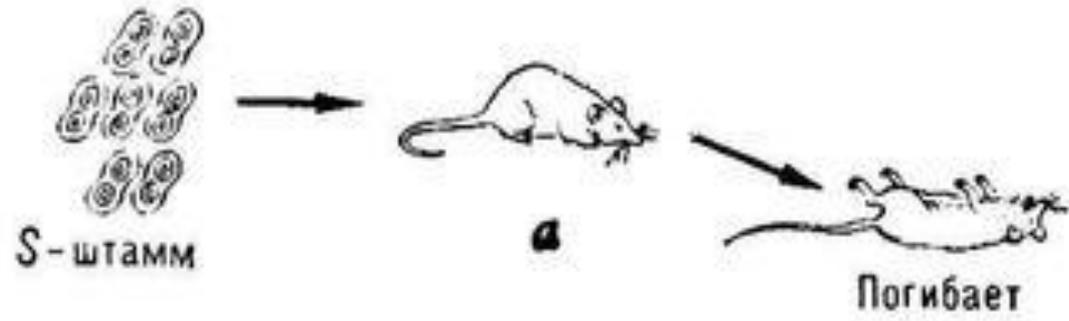
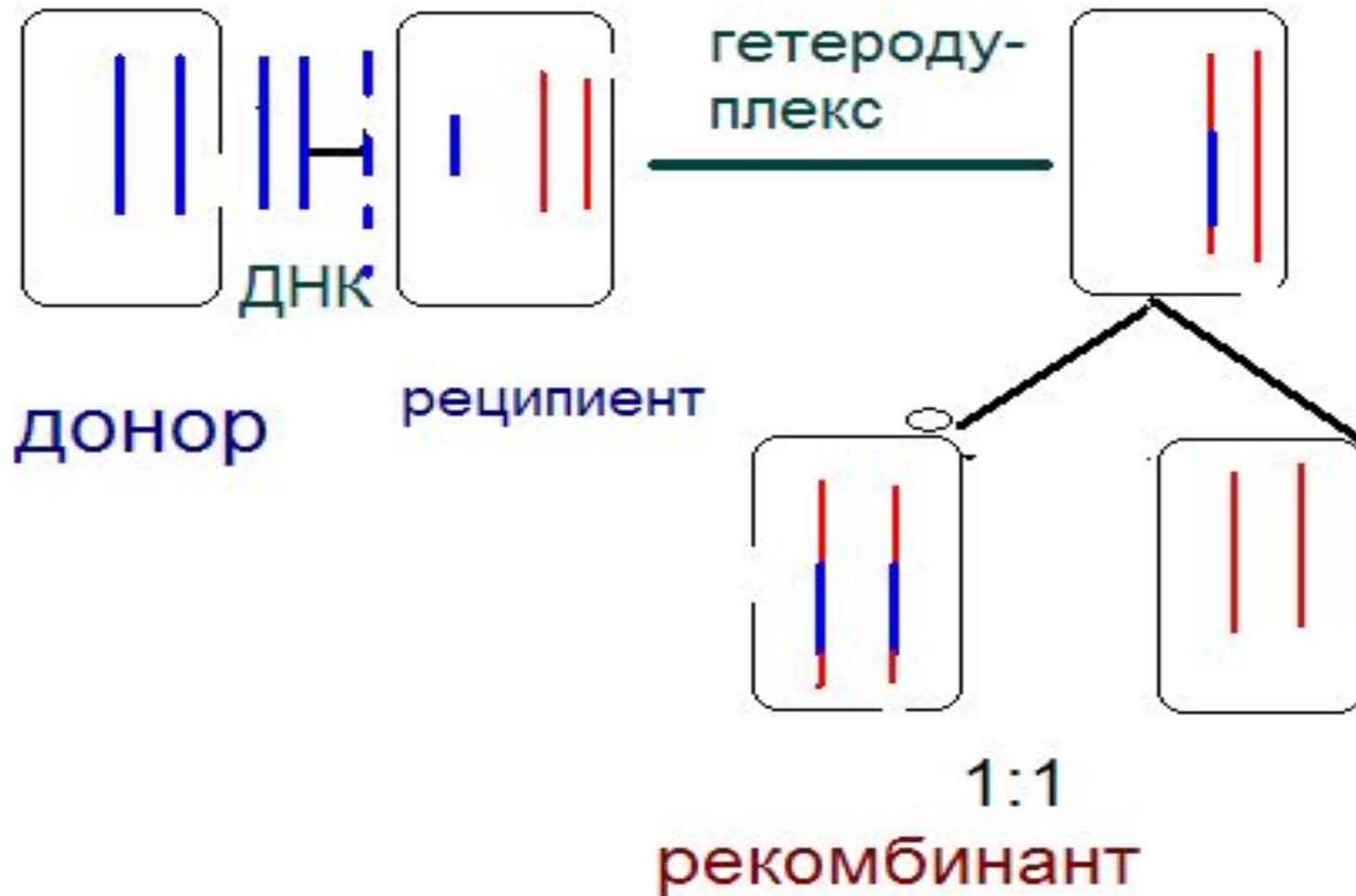


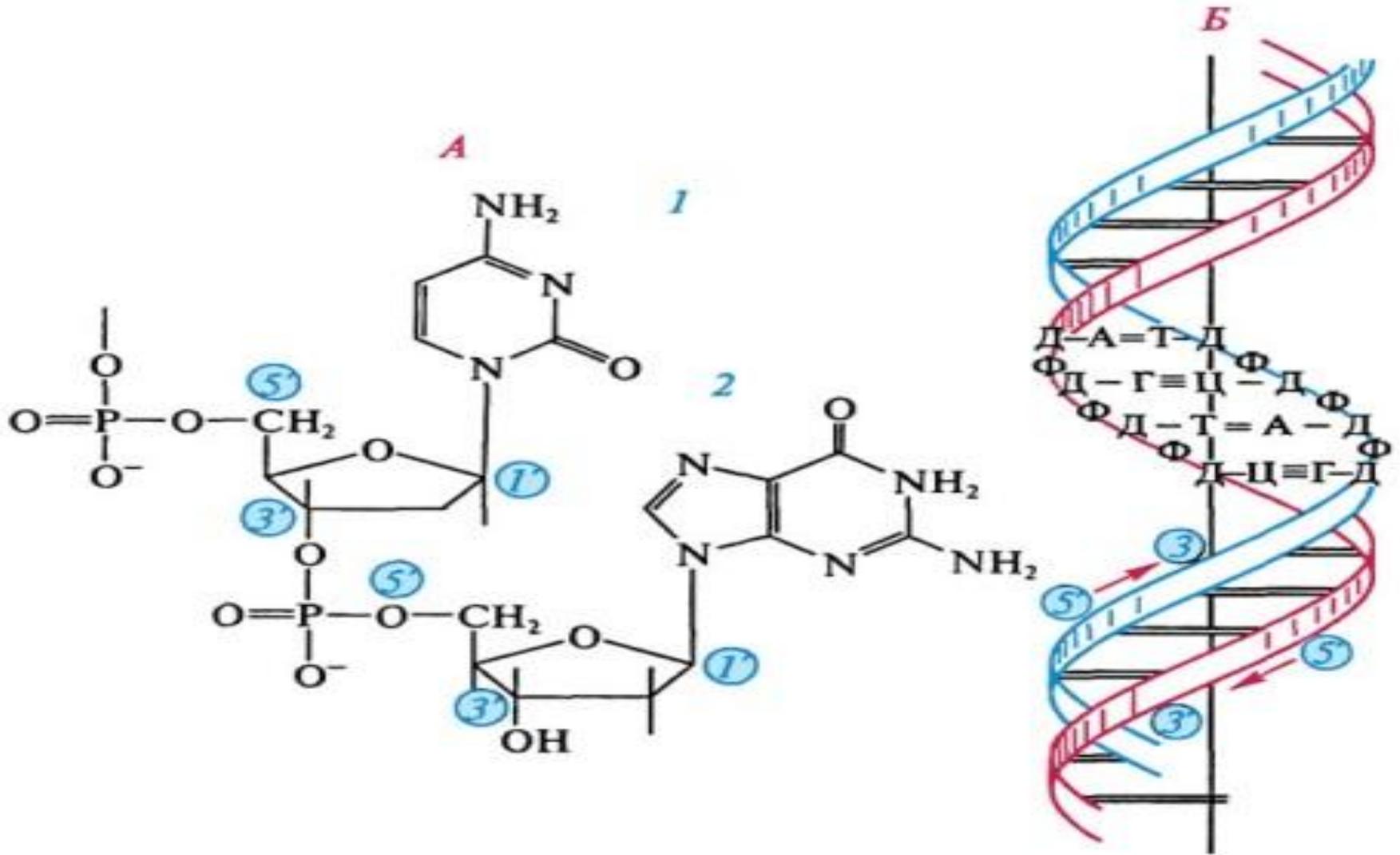
Схема трансформации



Молекулярные методы используемые в микробиологии

- 1. ПЦР
- 2. Микрочип
- 3. Риботипирование
- 4. Отпечатки пальцев
- 5. Плазмидный профиль
- 6. Мультилокусное секвенирование
- Идентификация микроба без выделения чистой культуры
- Внутривидовая идентификация

Строение ДНК



ПЦР

СИНТЕТИЧЕСКИЕ
«ЗАТРАВКИ»



ДВУХЦЕПОЧЕЧНАЯ
МОЛЕКУЛА ДНК ИЗ
ИССЛЕДУЕМОГО
ОБРАЗЦА



Молекула ДНК
распалась на две
цепочки. «Затравки»
прикрепились
к соответствующим
участкам ДНК



Идет синтез новых
цепочек ДНК



Получены две копии
участка ДНК
из исследуемого образца,
соответствующие
вирусной ДНК



Процедура повторяется 20—60 раз.
Получены миллионы копий ДНК вируса

амплификатор



Риботипирование

- Применяется для выявления у изучаемых штаммов различий в количестве рибосомальных оперонов, а также рестрикционного полиморфизма их нуклеотидных последовательностей

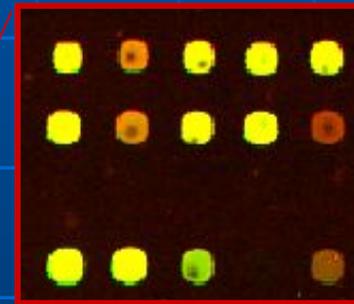
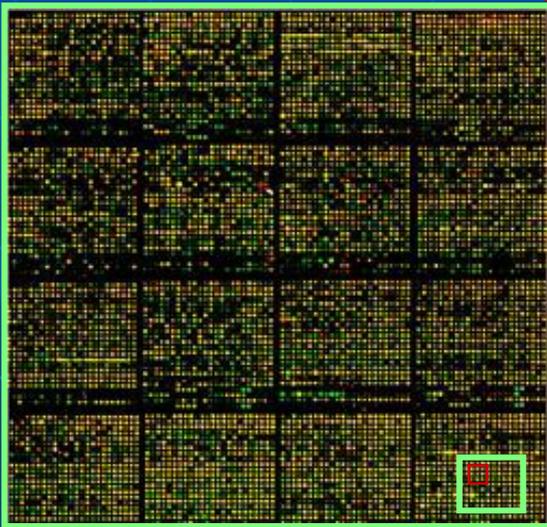
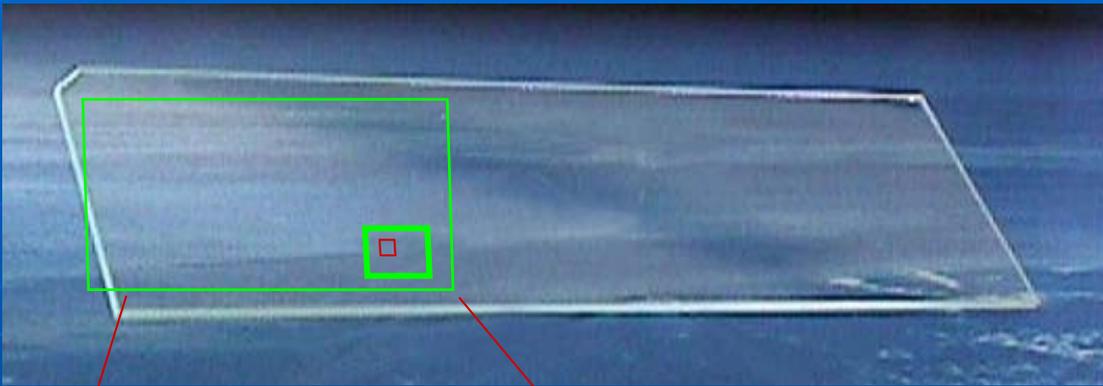
Риботипирование

- 1. Исследуемую ДНК подвергают рестрикции
- 2. Продукты рестрикции разделяют электрофорезом в полиакриламидном геле
- 3. Разделенные фрагменты наносят на мембрану и обрабатывают ДНК-зондами, кодирующими 16S и 23S
- РНК

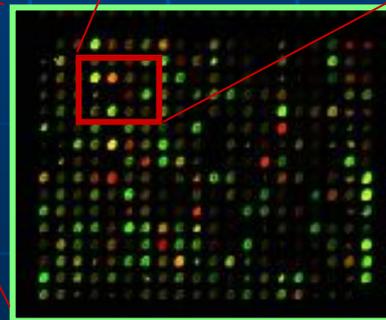
Риботипирование

- В результате гибридизации зонда с фрагментами ДНК, содержащими комплекс рРНК-оперонов (в бактериальной хромосоме имеются многочисленные опероны, содержащие гены 16S и 23S РНК) образуется профиль, содержащий до 10 полос, обладающий видовой и штаммовой специфичностью, который исследуется автоматически.

ДНК микрочип:
Стеклянная пластина,
к которой прикреплены
молекулярные зонды



↓ 100-200 μm



Методика

Общая ДНК



Специфический ПЦР продукт
(i.e., 16S рРНК ген)



Меченая флюорохромом мишень
(ДНК или РНК)

Олигонуклеотидный зонд
Длиной от 15 до 30 nt



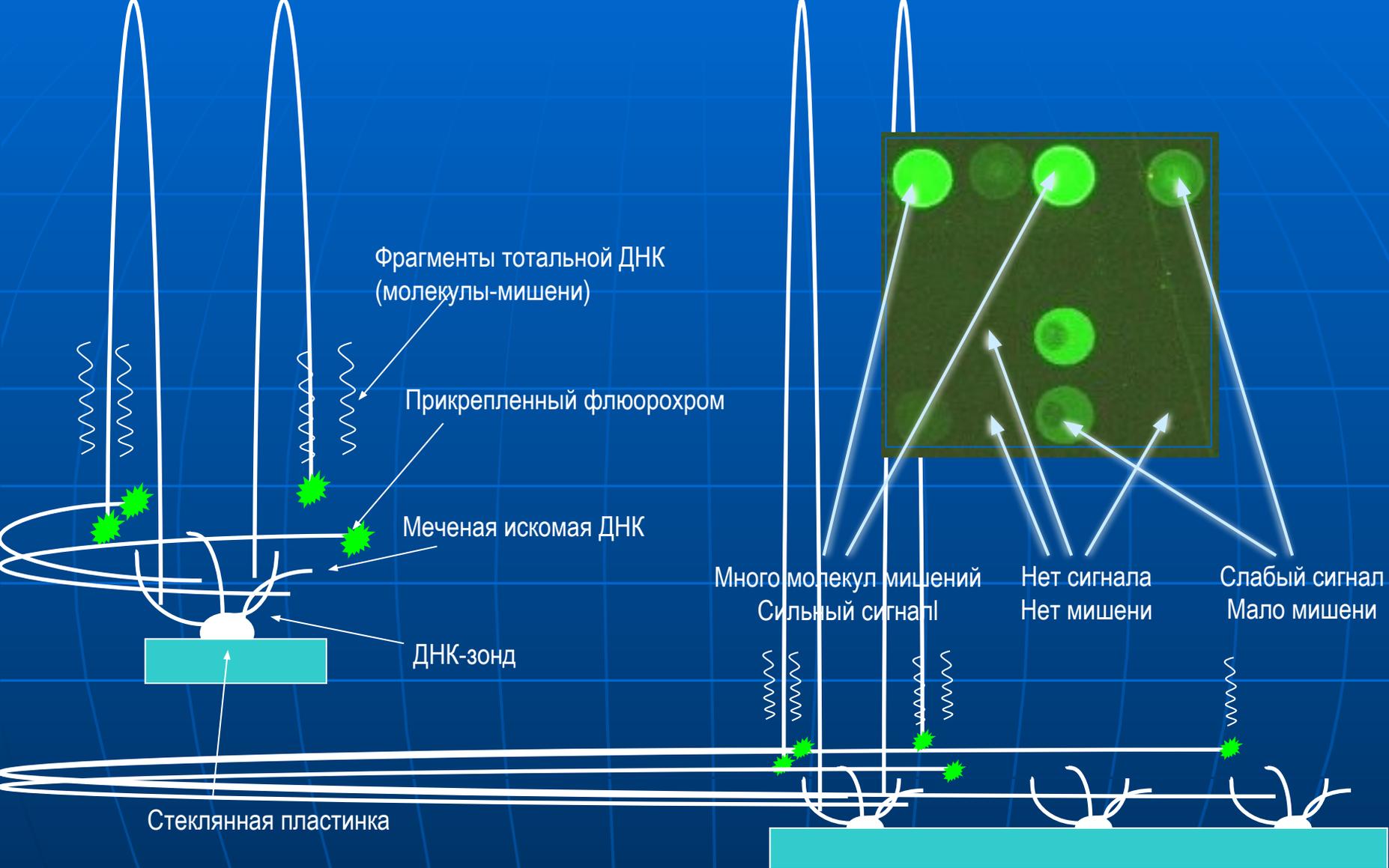
Микрочип с зондами



Гибридизация



Оценка результатов



Принцип обнаружения специфической последовательности ДНК при помощи микрочипа

ПЦР в реальном времени

- ПЦР в реальном времени позволяет провести полный анализ пробы в течение 20-60 мин и теоретически способен определить даже одну молекулу ДНК или РНК в пробе.



ПЦР в реальном времени

- . ПЦР в реальном времени использует зонд, несущий флуорофор и тушитель, комплементарный средней части амплифицируемого фрагмента. Когда флуорофор и тушитель связаны с олигонуклеотидным зондом, наблюдается лишь незначительная флуоресцентная эмиссия.

ПЦР в реальном времени

- Во время процесса амплификации за счет 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы флуоресцентная метка переходит в раствор, освобождаясь от соседства с тушителем, и генерирует флуоресцентный сигнал, усиливающийся в реальном времени пропорционально накоплению амплификата

ПЦР в реальном времени

праймер



отжиг



амплификация



выщепление
метки



амплификат



флюорофор



тушитель

Метод branched-DNA (bDNA) *амплификации*

- В основе этого метода амплификация вирусной РНК осуществляется последовательными шагами олигонуклеотидной гибридизации.
- Для этого используют серию первичных зондов и меченые ферментом вторичные зонды ДНК

Метод *branched-DNA (bDNA)* амплификации

- Первичные олигонуклеотидные зонды, специфичные для РНК (или ДНК) исследуемого образца, так называемых РНК- (ДНК) – мишеней, фиксируются на твердой поверхности лунок микротитрационного планшета. Это, так называемые «зонды захвата». Исследуемый образец (РНК-мишень) разводится, и разведения добавляют в титрационные лунки.

Метод *branched-DNA* (*bDNA*) амплификации

- Внесенные молекулы РНК(ДНК) гибридизируются с «зондами захвата». После этого вносят меченые ферментом ДНК-зонды. Добавляют хемилюминесцентный субстрат и измеряют интенсивность свечения, которая будет соответствовать количеству РНК-мишени в исследуемом образце.



Метод branched-DNA (bDNA) амплификации

- Количественное определение вирусной РНК проводят с использованием специальных референс-стандартов.

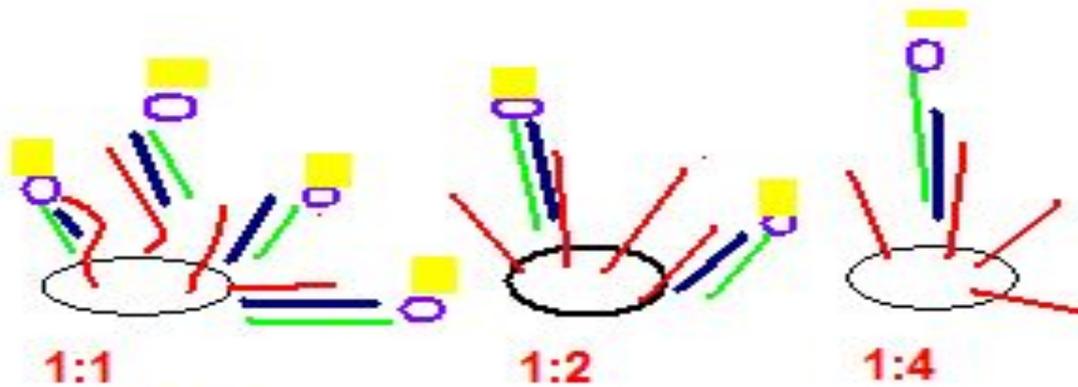
Метод *branched-DNA* (bDNA) амплификации

зонд захвата —————

искомая ДНК (РНК) —————

меченый ферментом зонд —————

флюоресцирующий субстрат ■



разведения
исследуемого
материала



величина сигнала

**Мультилокусное
секвенирование-типирование**
метод генетического типирования,
основанный на определении
последовательности нуклеотидов
небольших фрагментов (500н.п.) ряда
генов и последующем сравнении
соответствующих последовательностей у
разных организмов.

Мультилокусное секвенирование-типирование

- Чаще анализируют «гены домашнего хозяйства», которые являются необходимыми для протекания реакций основного метаболизма, а значит присутствуют у всех организмов. Они в силу своей исключительной важности, характеризуются низкой скоростью накопления мутаций

Мультилокусное секвенирование-типирование

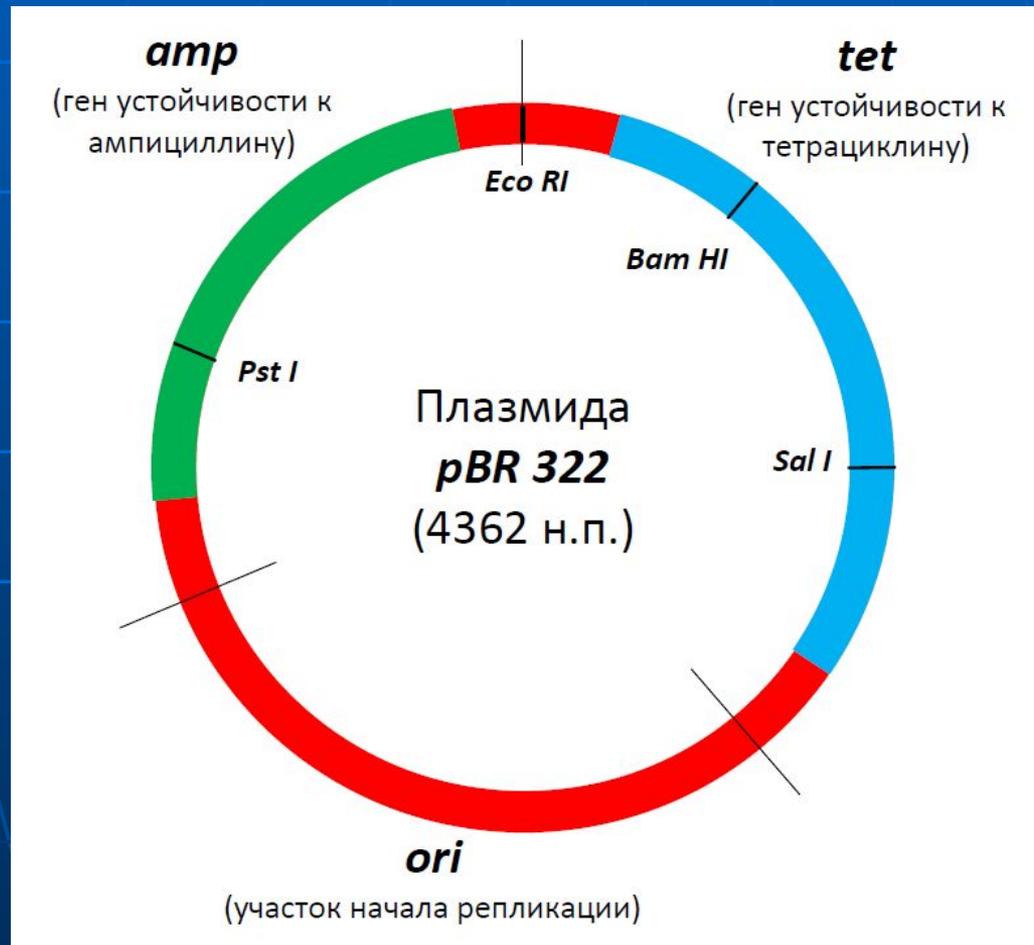
- Сравнение нуклеотидных последовательностей таких генов позволяет относительно легко устанавливать степень филогенетического родства между популяциями и систематизировать их. Чаще исследуют 7-8 локусов, что обеспечивает достаточную разрешающую способность метода

Мультилокусное секвенирование- типирование

этапы исследования

- 1. выделения ДНК из образца исследуемых микроорганизмов
- 2. амплификация участков определенных локусом ПЦР с использованием подходящих праймеров
- 3. анализ амплифицированных участков с помощью секвенаторами
- 4. сравнение с помощью специальных программ полученные результаты с имеющимися в базе данных

Плазмида pBR322



Получение рекомбинантных плазмид

