Кафедра медичної біології,
мікробіології, вірусології та імунології

ГЕНЕТИКА МІКРООРГАНІЗМІВ

Лектор доц. О.В.Покришко

План лекції

- Будова клітинного генетичного апарату.
- Позахромосомні елементи спадковості.
- Мутації.
- Рекомбінації.
- Основи генної інженерії. Молекулярні біотехнології.
- Генетика вірусів

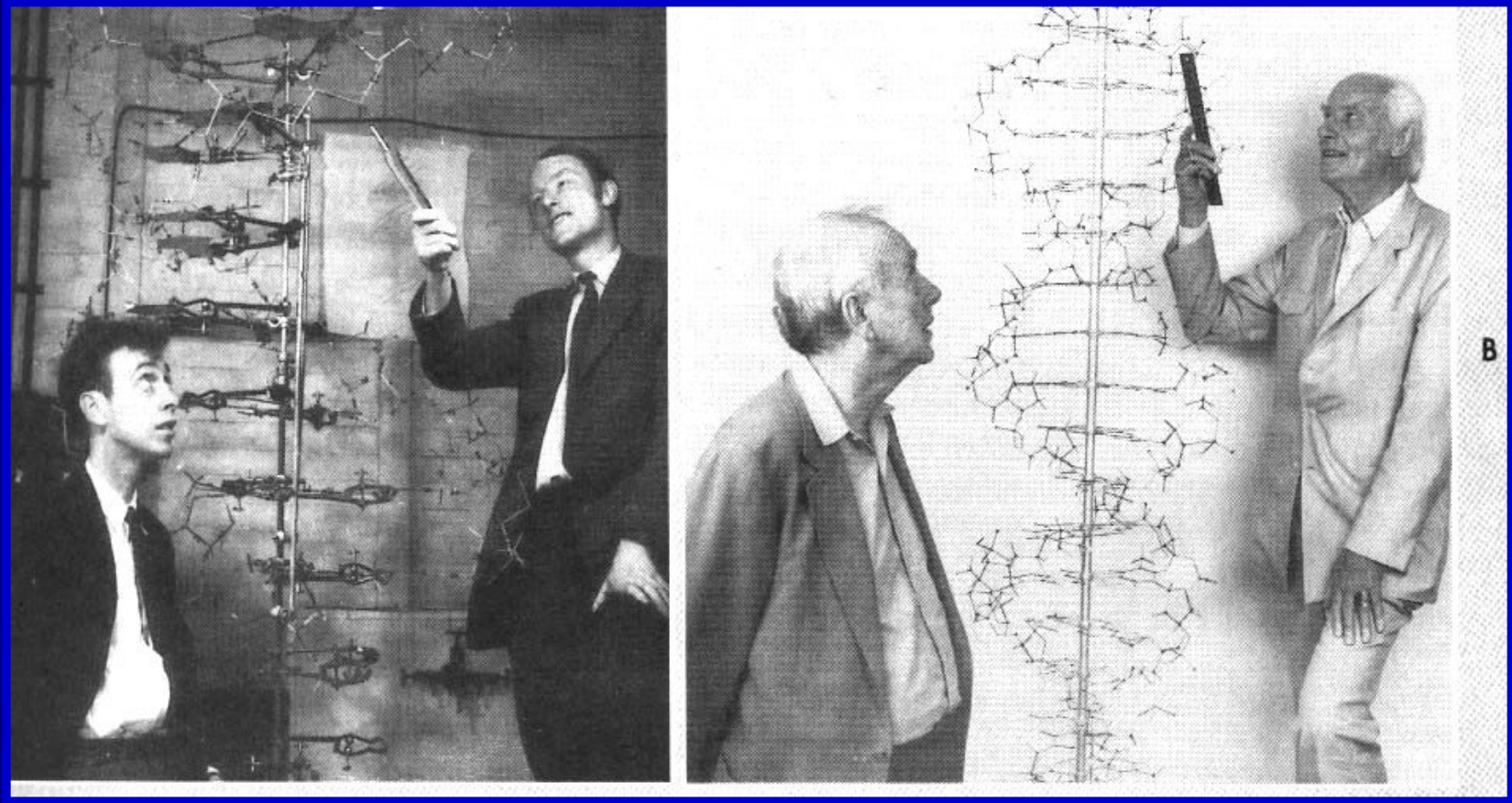
Історія розвитку молекулярної біотехнології

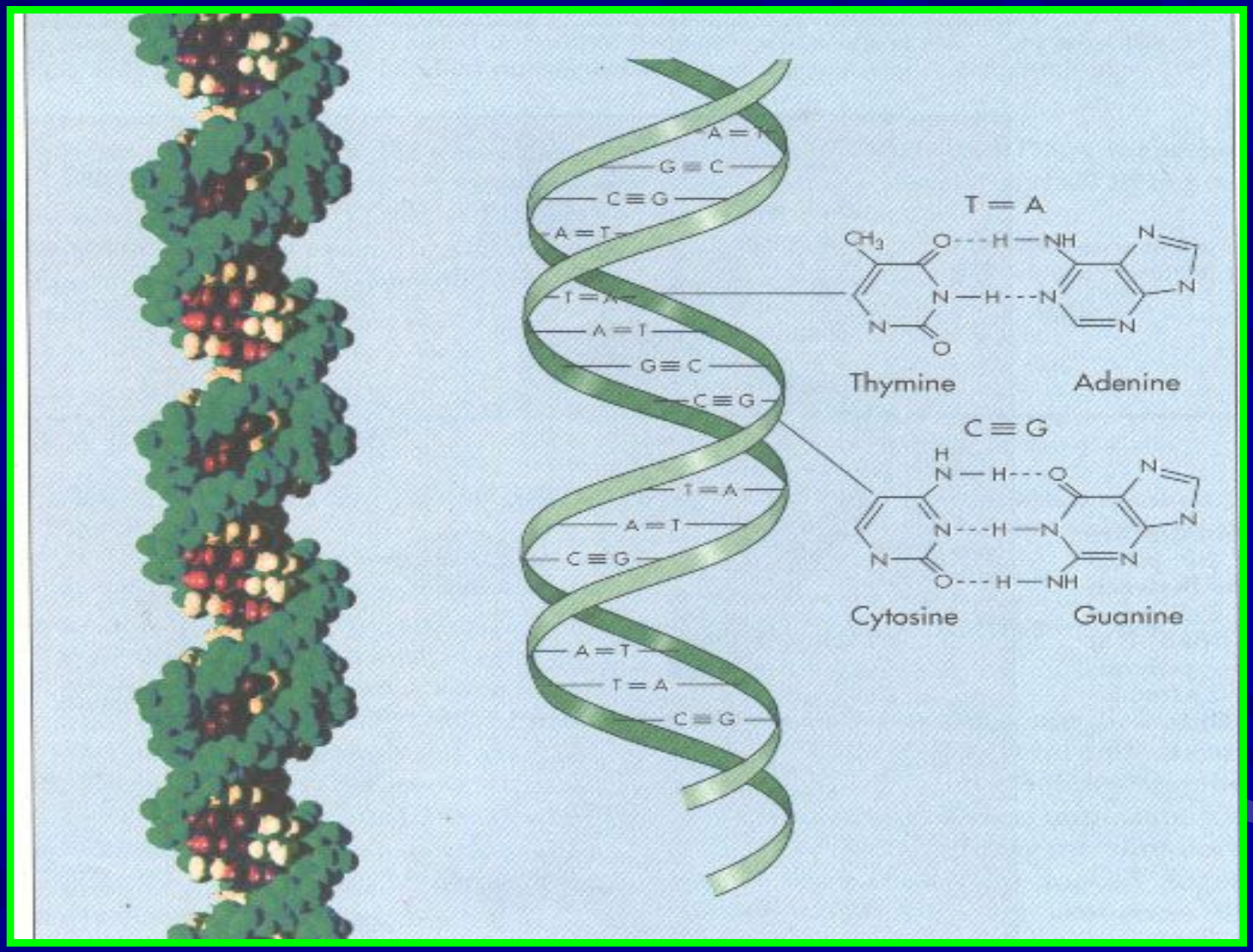
Рік	Подія
1917	Карл Ереки ввів термін “біотехнологіяі”
1944	Евері, МакЛеод, МакКарті довели, що генетичним матеріалом є ДНК
1953	Уотсон і Крик розшифрували структуру ДНК
1970	Виділена перша рестриктуюча ендонуклеаза
1973	Бойєр, Коен заклали основи технології рекомбінантних ДНК (гібрид фагу λ і E. coli)
1978	Отримано перший людський інсулін
1982	Перша вакцина для тварин
1988	Створено метод ПЛР

Історія розвитку молекулярної біотехнології

Рік	Подія
1990	Почато роботу над проектом “Геном людини”
1996	Продаж першого рекомбінантного білка еритропоетину перевищив 1 млрд доларів США
1996	Визначено генетичну послідовність всіх хромосом еукаріотичного організму Saccharomyces srevisiae
1997	Клоновано савця із соматичної клітини

F. Crick і J. Watson – відкривачі структури ДНК




A = T
G ≡ C
C ≡ G
A = T
T = A
A = T
G ≡ C
C ≡ G
T = A
A = T
C ≡ G
A = T
T = A
C ≡ G
T = A
Thymine
Adenine
C ≡ G
Cytosine
Guanine

Генетичний матеріал у бактерій представлений:

1. хромосомою
2. позахромосомними елементами спадковості:

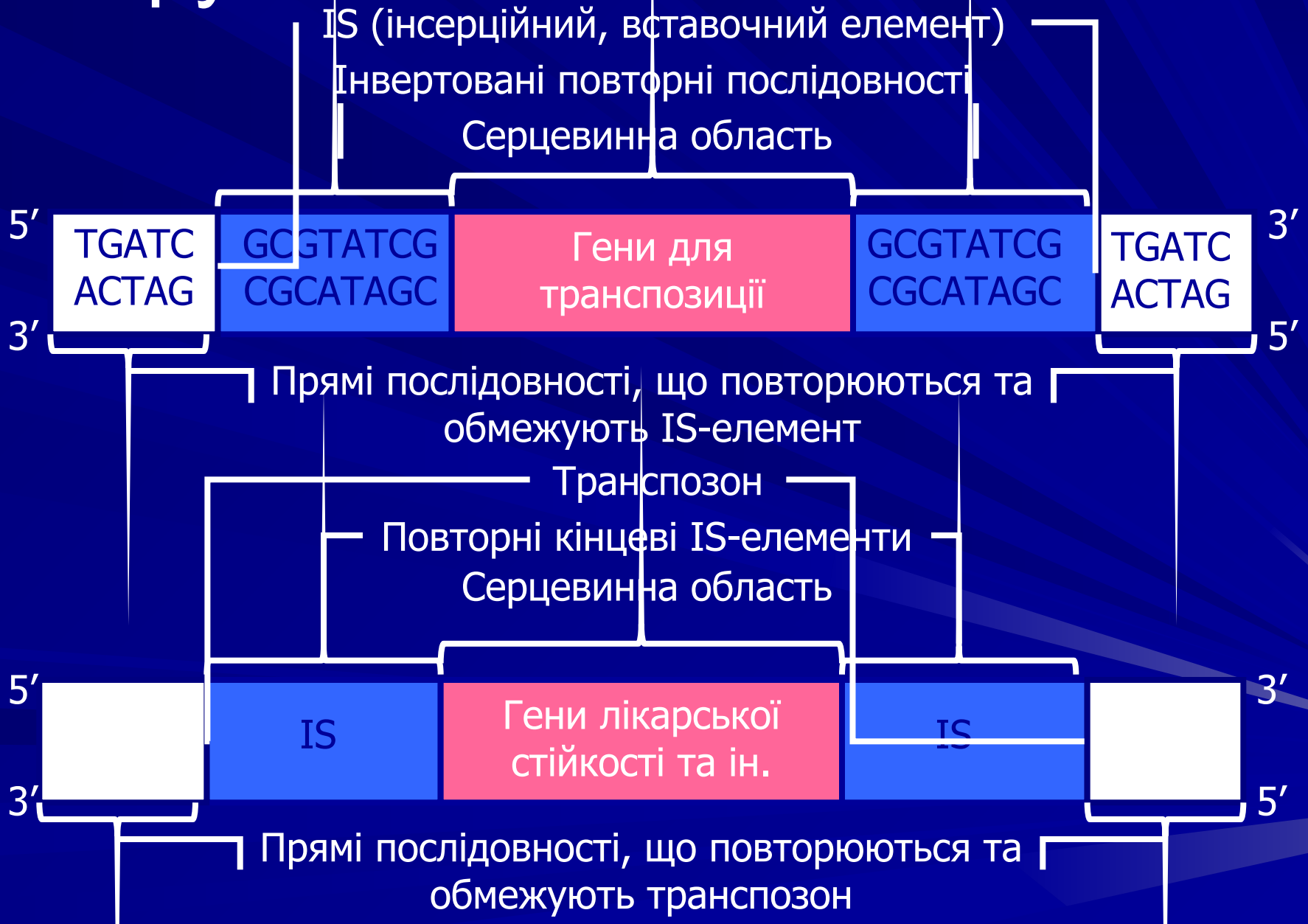
- плазмідами
- транспозонами
- IS-елементами

Плазміди можуть мати лінійну або кільцеву структуру, є необов‘язковими компонентами мікробної клітини; здатні до самостійної реплікації.

Транспозони – мігруючі гени, які мають здатність до переносу всередині клітини і одночасно містять гени резистентності до антибіотиків та іонів важких металів.

IS-елементи – мігруючі гени, які здатні до переносу всередині клітини з однієї ділянки ДНК на іншу.

Мігруючі генетичні елементи



Функції IS-елементів:

1. **Координуюча:** взаємодія транспозонів, плазмід, помірних фагів між собою та хромосомою бактерії, забезпечуючи їх реплікацію.
2. **Регуляторна:** викликають інактивацію генів, або служать промоторами (ділянки ДНК, які регулюють експресію клітинних генів).
3. **Індукують мутації** за типом делеції або інверсії

Функції транспозонів:

1. Регуляторна.
2. Кодуюча.
3. Індукують генні мутації за типом делеції або інверсії.
4. Включення їх в реплікон супроводжується аберраціями (структурними перебудовами) в ДНК цих репліконів; найчастіше проявляються інсерції, делеції, інверсії

Класифікація плазмід

За розміщенням в клітині:

позахромосомні

інтегровані

За типом передачі:

кон'югативні (трансмісивні, мають tra-ген)

некон'югативні

За ознаками, що обумовлюють певні властивості мікроорганізмів

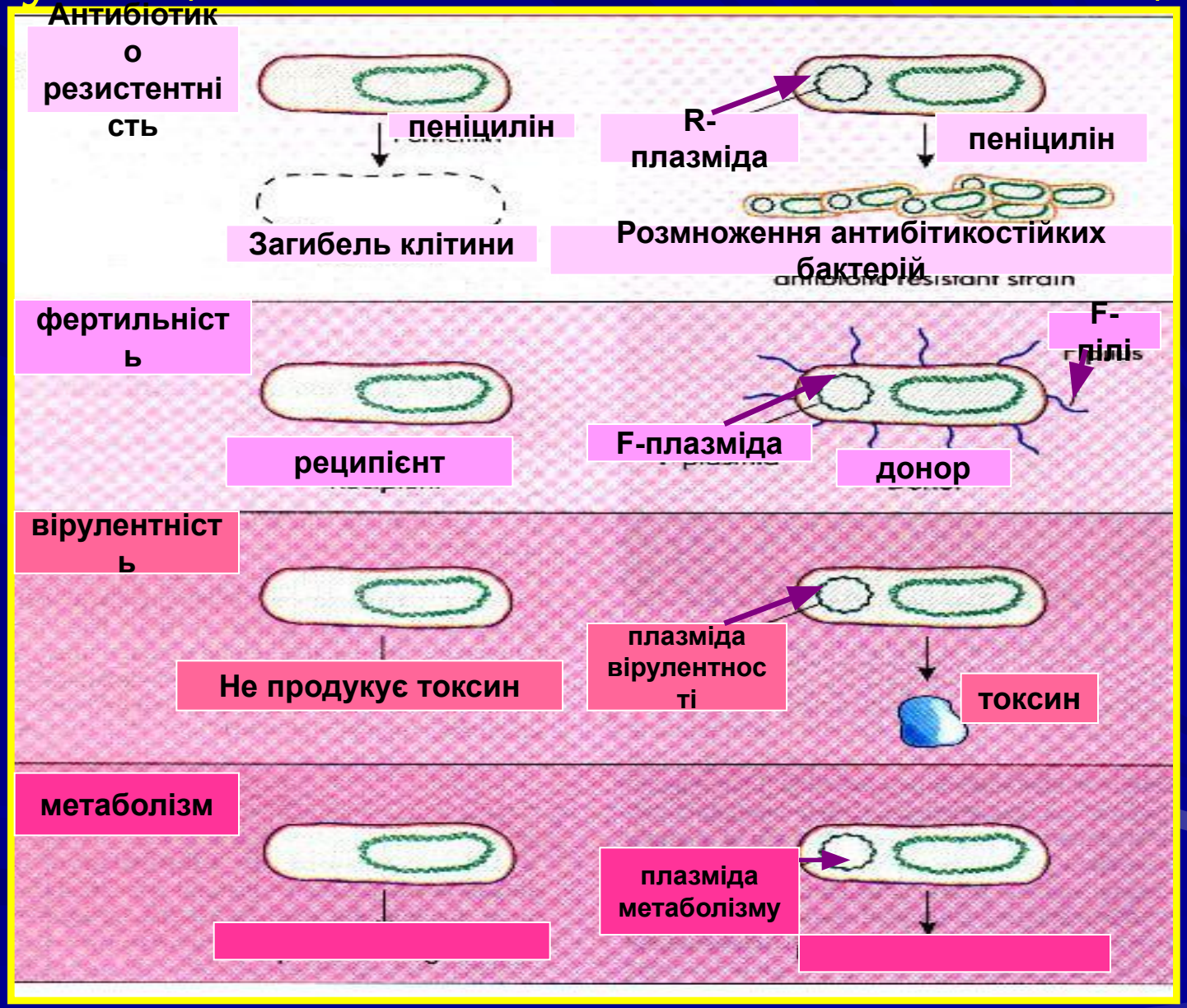
Види плазмід:

Col – продукція коліцинів
HLy – продукція гемолізинів
Tol – розщеплення толуолу, ксилолу
Ent – продукція ентеротоксину
Nif – зв'язування азоту в K. pneumoniae
Ti – утворення пухлин у рослин

Плазміди біодеградації:

Cam – розщеплення камфари
Oct – розщеплення октану
Sal – розщеплення саліцину

Функціональні властивості плазмід



Функції плазмід:

1. Регуляторна (якщо ген не здатний реплікуватись за рахунок втрати його частини, плазміди вносять власний реплікон).
2. Кодуюча.

Критерії плазмідної локалізації генів:

- ✔ високий темп втрати ознаки
- ✔ збільшення темпів втрати ознаки під впливом температури або хімічних сполук
- ✔ спільна втрата або набуття декількох ознак

Мутації

За походженням: спонтанні;
індуковані.

За локалізацією: нуклеоїдні;
цитоплазматичні.

За кількістю генів, що мутували: генні;
хромосомні.

За величиною: великі (хромосомні);
малі (точкові).

Хромосомні мутації:

- інверсія
- дуплікація
- делеція
- дислокація

Точкові мутації:

- **делеція**
- **інсерція** (вставка)

заміна:

- **транзиція** (пуринова основа на пуринову, піримідинова – на піримідинову)
- **трансверзія (**пуринова основа на піримідинову та навпаки)

Мутації

1. Пряма мутація
2. Зворотна (обернена) мутація або реверсія
3. Супресорна мутація (внутрішньогенна, позагенна). Веде до відновлення фенотипу, а не генотипу.
4. Плейотропна мутація (зміна 2-ох і більше властивостей клітини)
5. Нонсенс-мутація (робить кодон нісенітним – не кодує жодної амінокислоти)

Мутагенні фактори

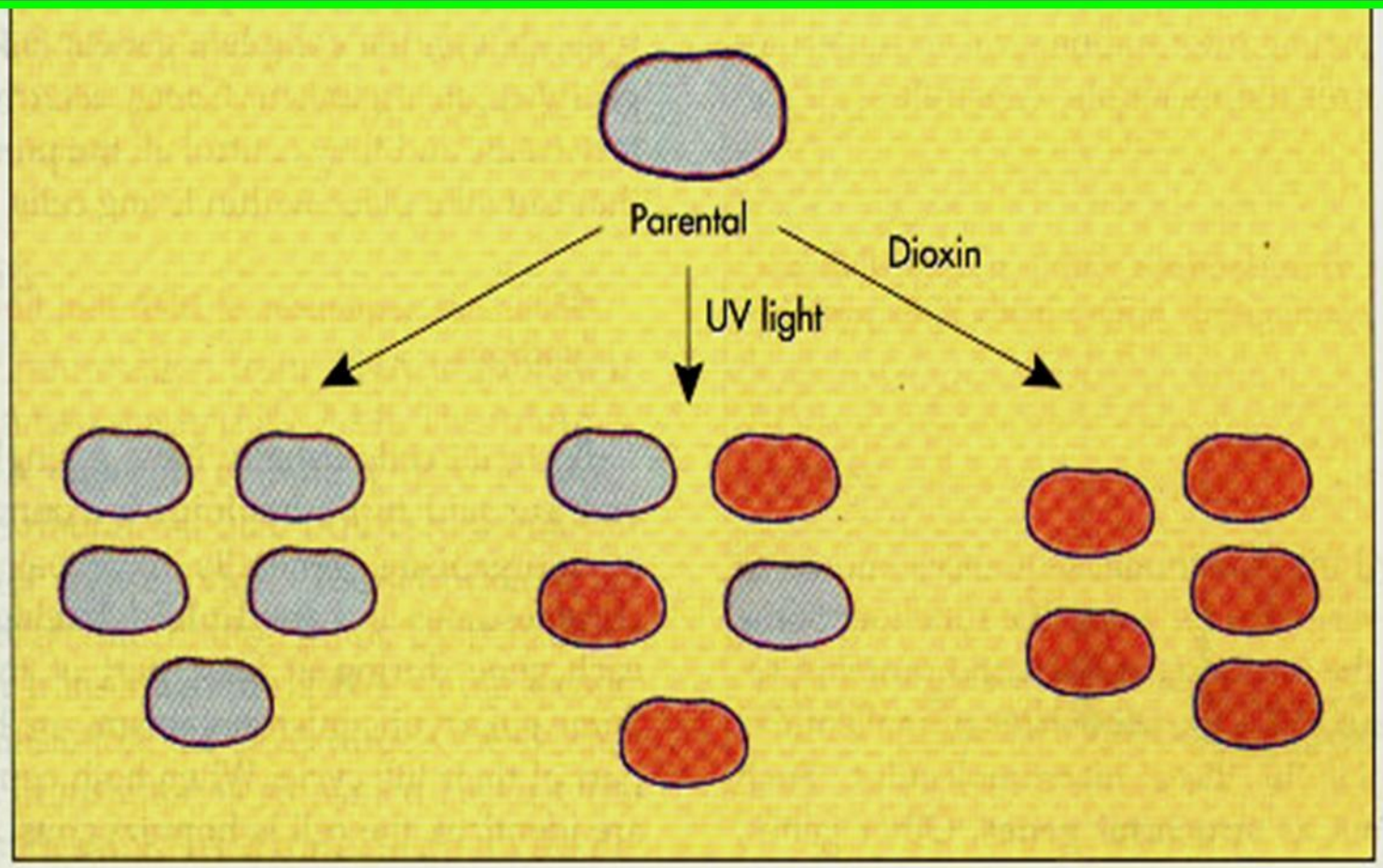
- **Фізичні:**
  1. УФО (λ-260 НМ) – найсильніша мутагенна дія – утворюються димери тиміну, заміна основ
  2. Іонізуюче опромінення (рентгенівське, гамма-промені) - руйнування ДНК, летальний ефект
- **Біологічні:** перекис водню

Мутагенні фактори

- **Хімічні:**

1. Азотиста кислота - дезамінує нуклеотиди
2. N-нітрозометилсечовина – супермутаген, канцероген
3. Етилметансульфонат
4. Акридини – комплекс з ДНК, інтеркаляція
5. Нітрозогуанідин
6. Аналоги основ (5-бромурацил, 2-амінопурин) – заміщення
7. Лікарські препарати (нітрофурани, деякі антибіотики

Дія різних мутагенів на бактерії



Деякі фізичні й хімічні фактори підвищують частоту мутацій. Ультрафіолетове випромінювання та діоксин є мутагенами й викликають утворення мутантів (червоний колір).

R і S форми колоній

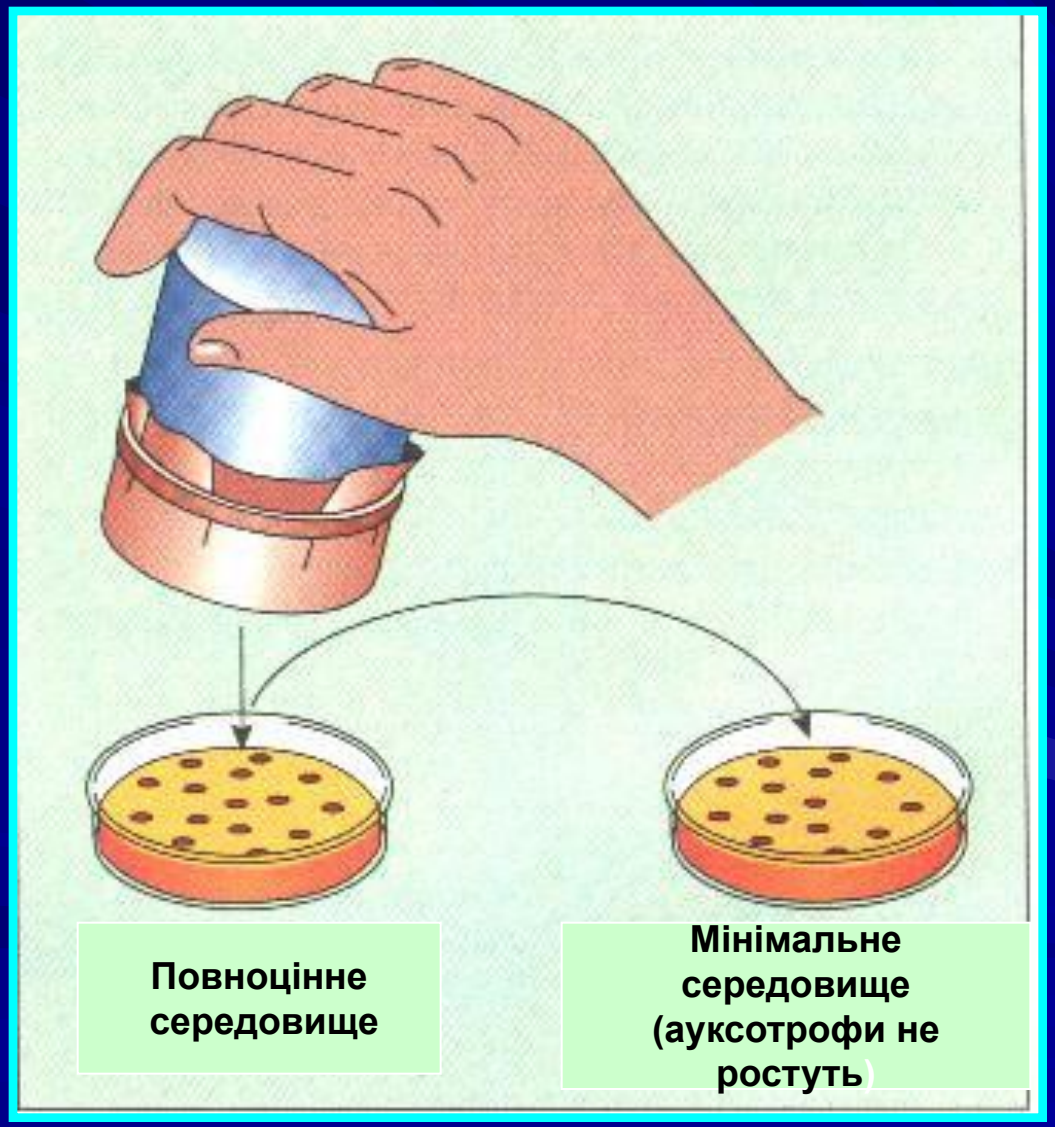
Властивості мікробів S-колоній:

- Клітини нормальної морфології
- Дифузне помутніння бульйону
- У рухомих видів є джгутики
- У капсульних варіантів є капсули
- Біохімічно більш активні
- Повноцінні в антигенному відношенні
- У патогенних видів – вірулентні
- Виділяються в гострому періоді хвороби
- Чутливі до бактеріофагів
- Менш чутливі до фагоцитозу

Методи виявлення мутантів

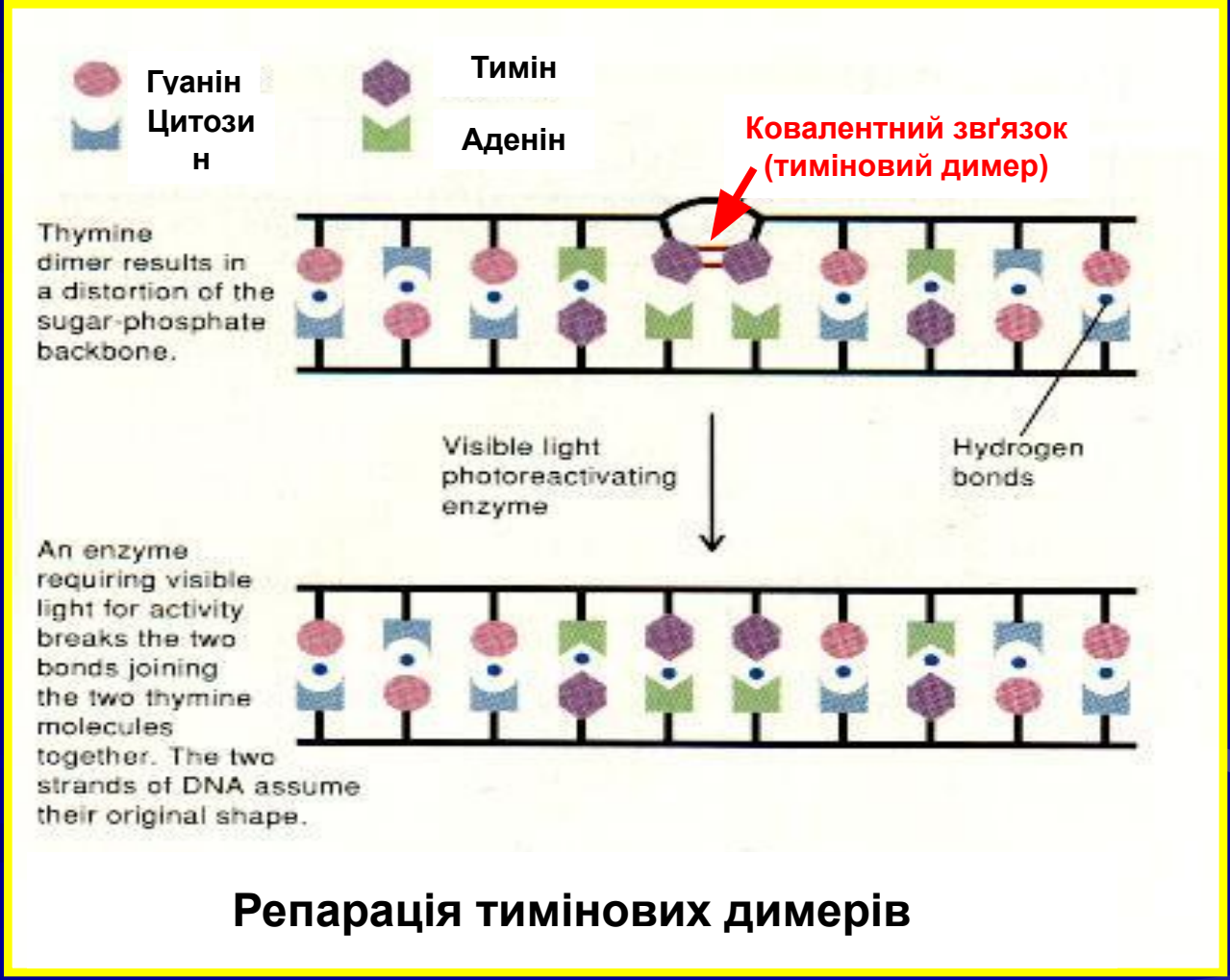
- За різницею в швидкості росту (посів на мінімальне середовище; мутанти виростають)
- Різна здатність до виживання
- Метод реплік Ледерберг

Метод реплік для виявлення ауксотрофних мутантів



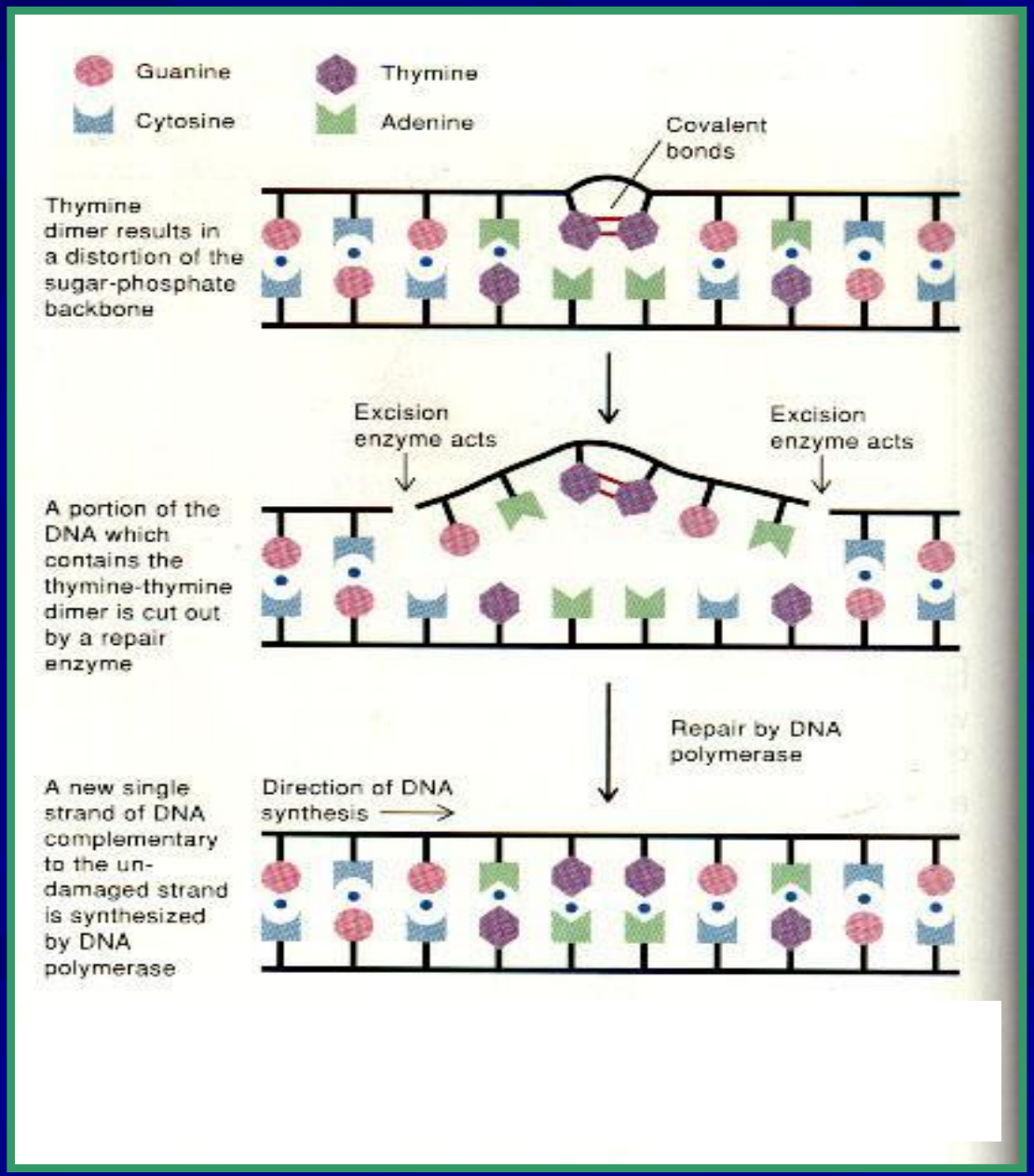
Світлова репарація –

розщеплення тимінових димерів у присутності світла.



Репарація тимінових димерів

Темнова репарація

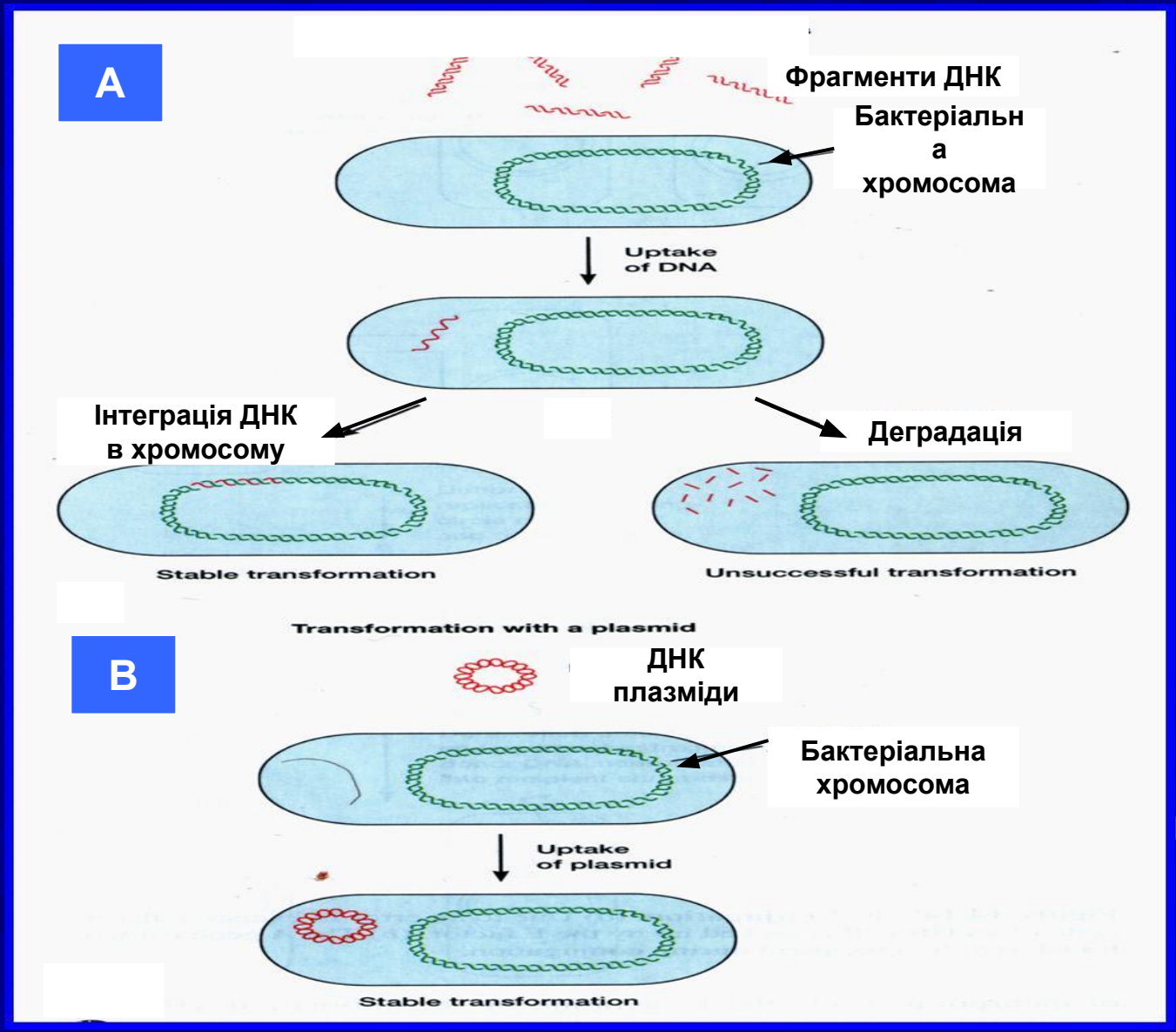


1. Деградація прилеглих до пошкодженої ділянок ДНК
2. Вирізання за допомогою рестриктаз пошкоджених ділянок
3. Відновлення видаленої ділянки за допомогою ферменту ДНК залежної ДНК-полімерази
4. Зшивання ДНК-лігазами

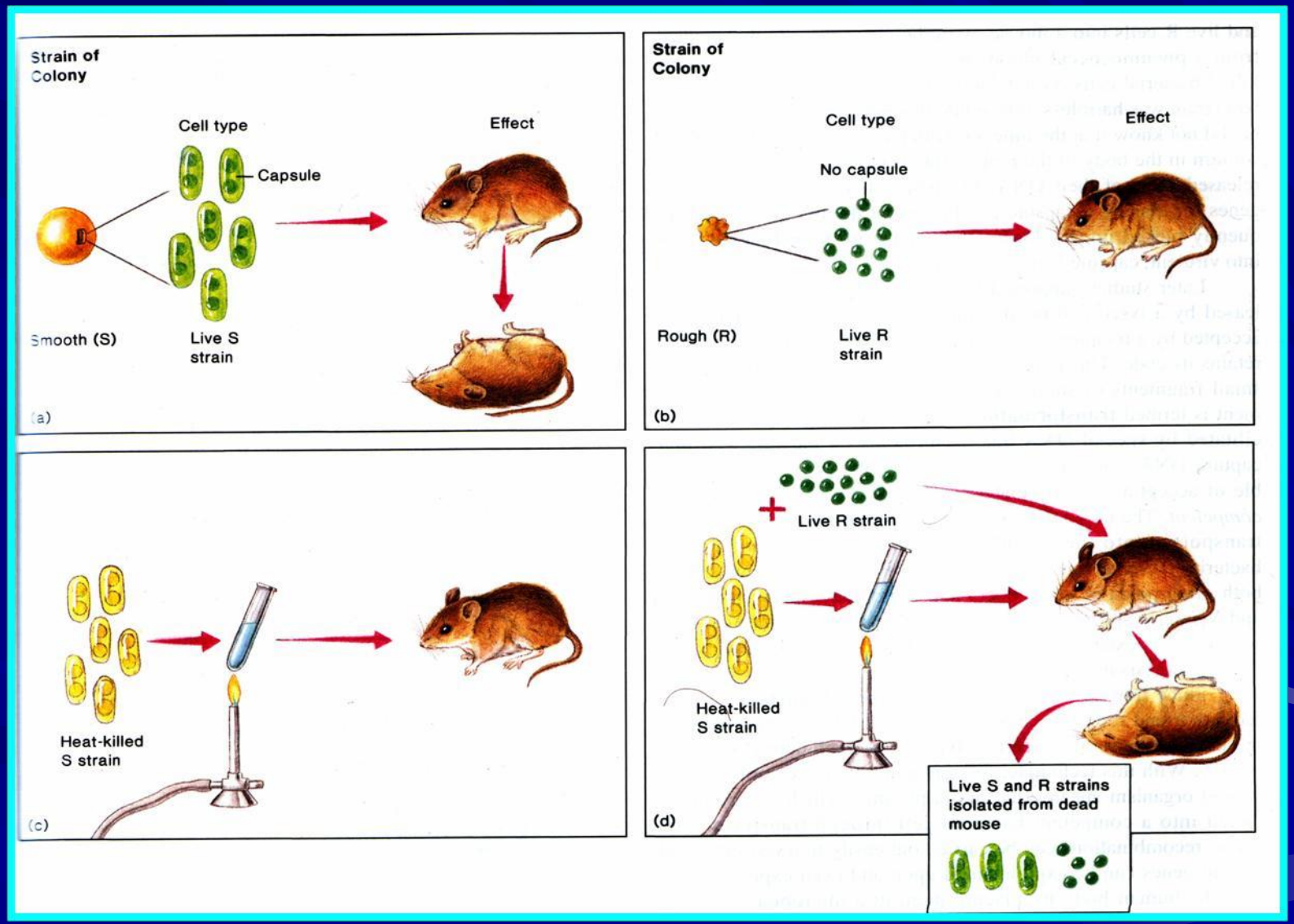
SOS-реактивація

При множинних ушкодженнях ділянки з мутаціями переводяться в неактивний стан, а їх роль виконує неушкоджена ділянка ДНК.

ТРАНСФОРМАЦІЯ



Трансформація (досліди Грифітса, 1928; Евері Мк Леода і Макарті, 1944)



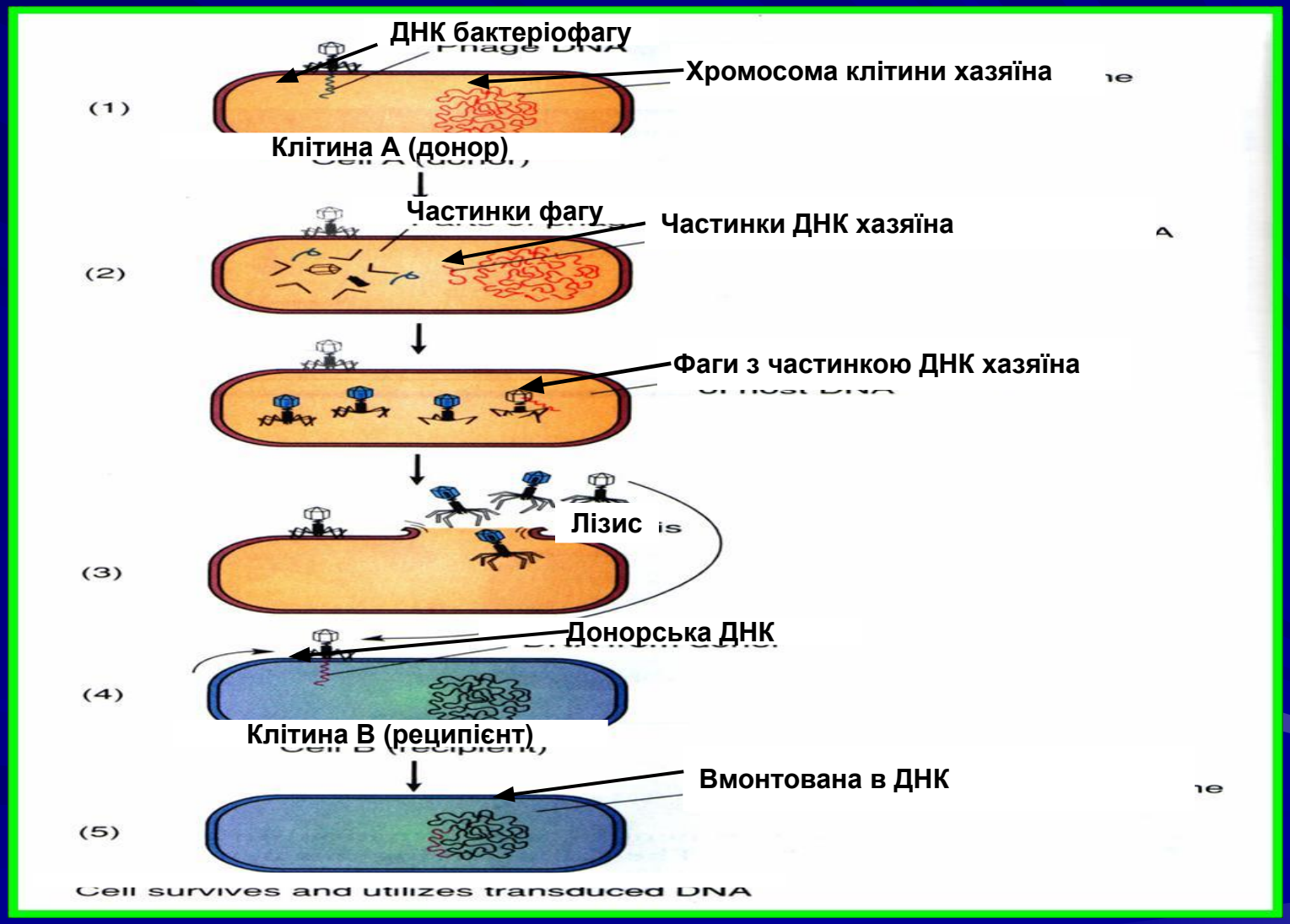
ТРАНСДУКЦІЯ

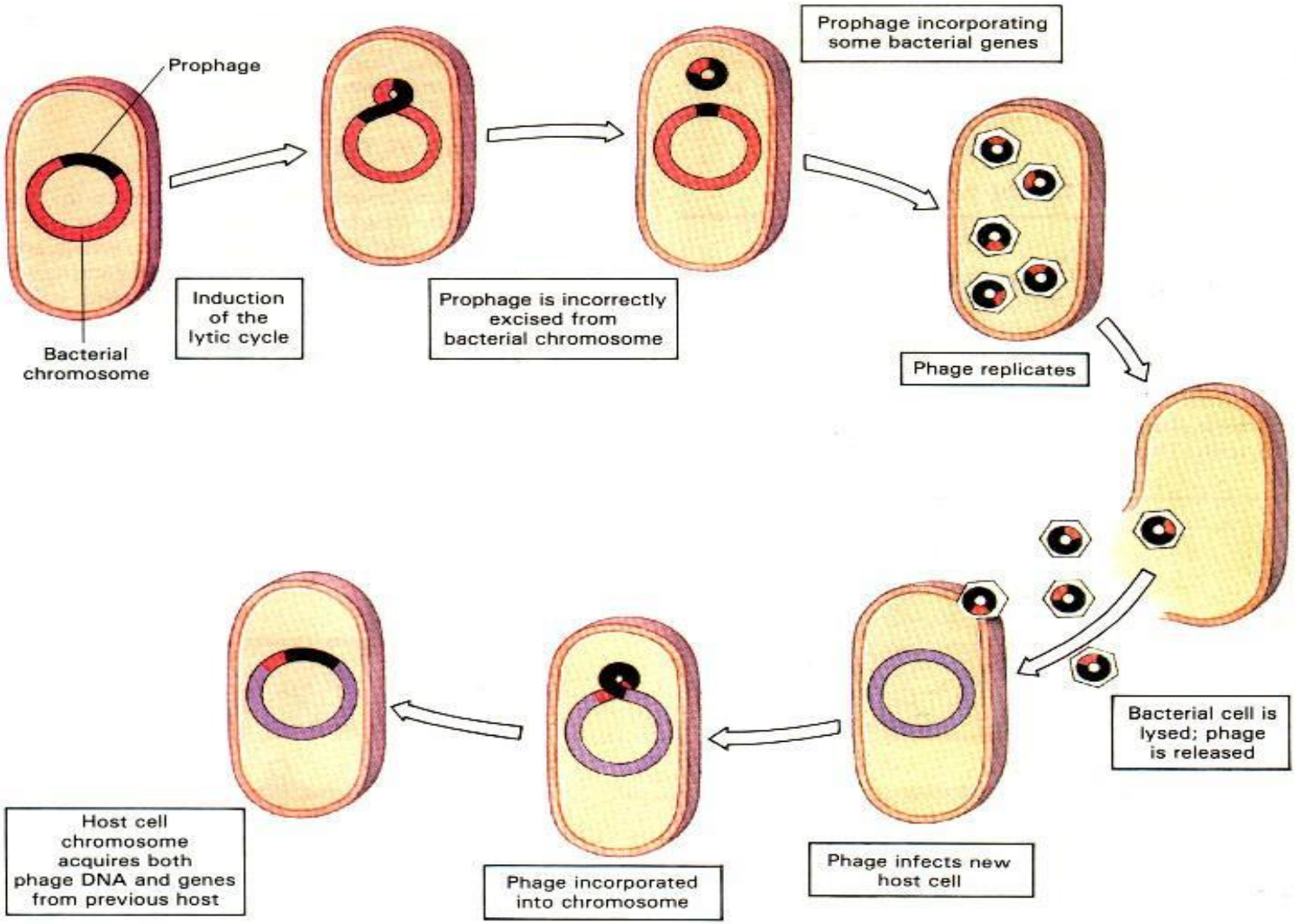
Викликають помірні, дефектні фаги.

Види:

- загальна (генералізована)
- специфічна
- абортивна

ТРАНСДУКЦІЯ (Ціндер і Ледерберг, 1952)





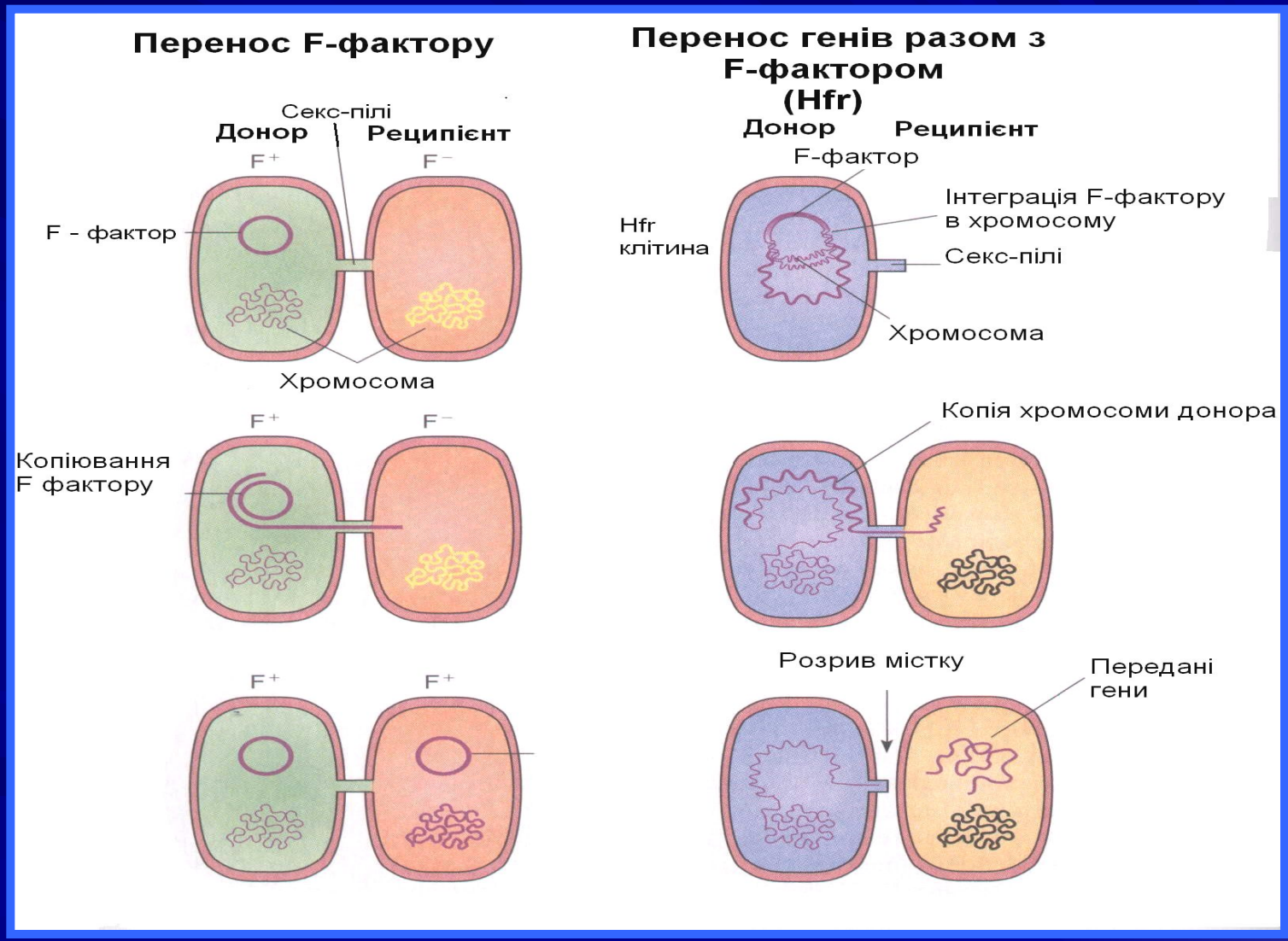
Спеціалізована трансдукція

ВІДМІННОСТІ ТРАНСДУКЦІЇ ТА ФАГОВОЇ КОНВЕРСІЇ

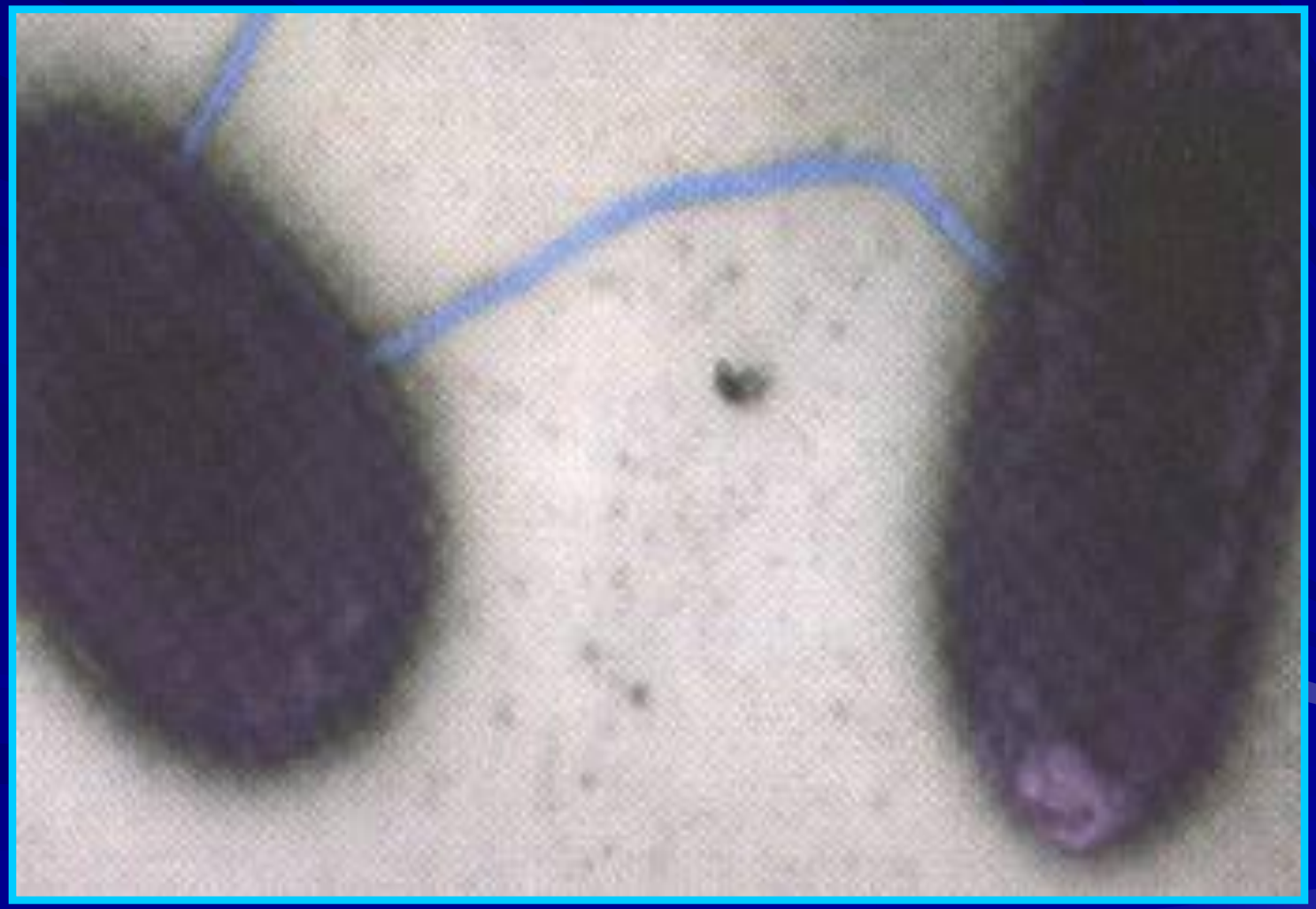
Трансдукція – перенос генетичної інформації з клітини в клітину за допомогою фагу

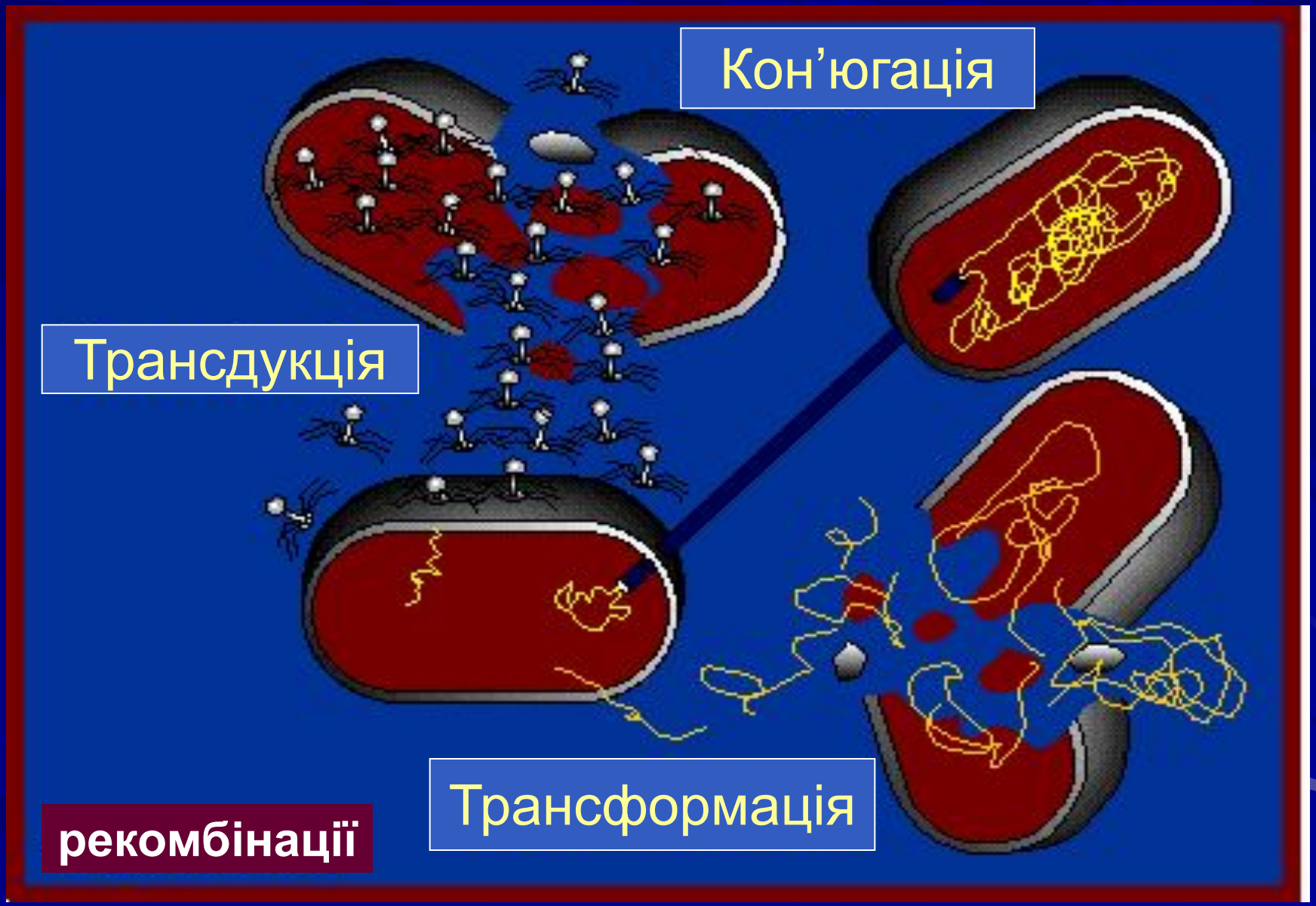
Фагова конверсія – експресія в клітині генів бактеріофагу (Corynebacterium diphtheriae, Clostridium botulinum, Staphylococcus spp., Salmonella spp.)

КОН'ЮГАЦІЯ та її механізм
(Ледерберг і Тейтум, 1946)



Кон’югація




Кон’югація
Трансдукція
Трансформація
рекомбінації

Молекулярна біологія
Мікробіологія
Біохімія
Генетика
Хімічна інженерія
Клітинна біологія
Молекулярна біотехнологія
Високоврожайні культури
Лікарські препарати
Вакцини
Діагностичні методи
Високопродуктивні сільськогосподарські тварини

ПРОДУЦЕНТИ, що найчастіше використовуються в біотехнології

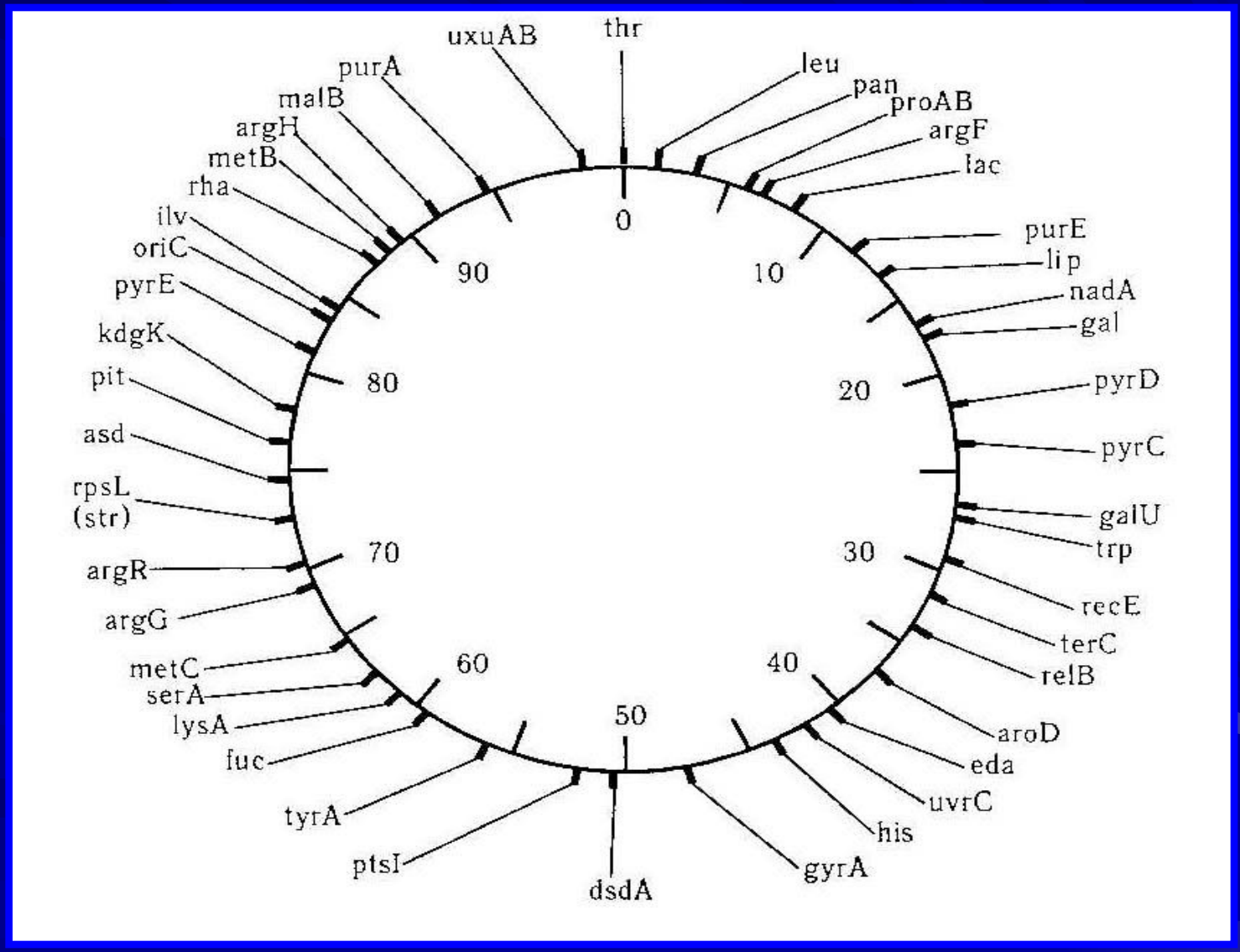
ЕУКАРІОТИ – дріжджі, плісняви, культури клітин тварин, людини та рослин

ПРОКАРІОТИ – кишкова паличка, аеробні бацили, псевдомонади, актиноміцети.

В ІМУНОБІОТЕХНОЛОГІЇ - використовують живі атенуйовані або вбиті збудники інфекційних захворювань, їх окремі компоненти або продукти їх життєдіяльності (в якості вакцинних препаратів).

Для одержання ІМУННИХ СИРОВАТОК використовують лабораторних тварин, донорську або плацентарну кров людини, гібридоми

Хромосомна карта E. coli



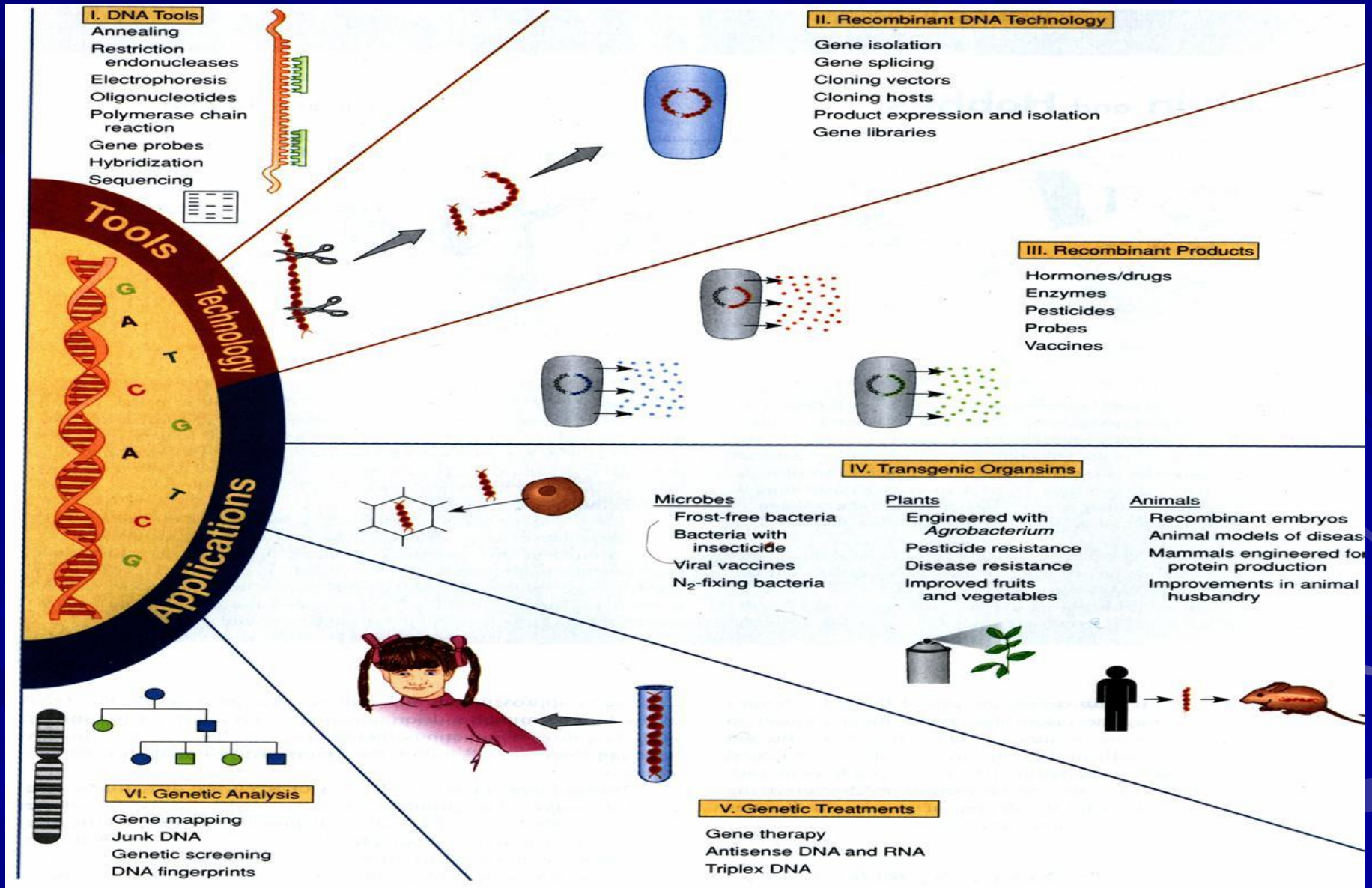
Переваги одноклітинних продуцентів:

- ✔ велика швидкість розмноження
- ✔ використання простих, дешевих субстратів
- ✔ можливість одержання "суперпродуцентів" шляхом генетичної селекції
- ✔ можливість промислового вирощування в великих об'ємах з використанням хемостатів, ферментерів, танків.

Біотехнологічні продукти мікроорганізмів - продуцентів

- самі клітини як джерело цільового продукту
- крупні молекули (ферменти, токсини, антигени, антитіла, пептидоглікани та ін.)
- низькомолекулярні метаболіти, необхідні для росту клітин (амінокислоти, вітаміни, нуклеотіди, органічні кислоти).
- антибіотики, алкалоїди, токсини, гормони

СФЕРИ ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ



Основні продукти, які отримують за допомогою біотехнології

У медицині	У ветеринарії та с/г	У харчовій промисловості	У хімічній промисловості та енергетиці
Антибіотики Вітаміни Амінокислоти Гормони Вакцини Компоненти крові Діагностичні препарати Нуклеїнові кислоти Протипухлинні агенти.	Кормовий білок Харчові антибіотики Вітаміни Гормони Вакцини Біологічні засоби захисту рослин Інсектициди	Амінокислоти Харчовий білок Ферменти	Ацетон Етилен Бутанол Біогаз Спирти

Деякі гормони людини, які продукуються рекомбінантними мікроорганізмами

Білок	Назва речовини
Інсулін	Гумулін, Новолін
Соматостатин	Протропін, Гуматроп
Інтерферон альфа	Роферон, Велферон
Інтерферон гамма	Актимун
Інтерферон бета	Фрон, Бетасерон
Інтерлейкін-2	Пролейкін
Фактор некрозу пухлин	-
Еритропоетин	Прокріт, Епоген
Гранулоцит колоніє-стимулюючий фактор	Філграстин, Ньюпоген
Плазміноген активатор	Актиліз

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ –

спрямована зміна геному продуцента в потрібному для людини напрямку:

пересадка в геном продуцента генів з інших організмів (людини, тварин, рослин),які кодують синтез потрібного людині продукту.

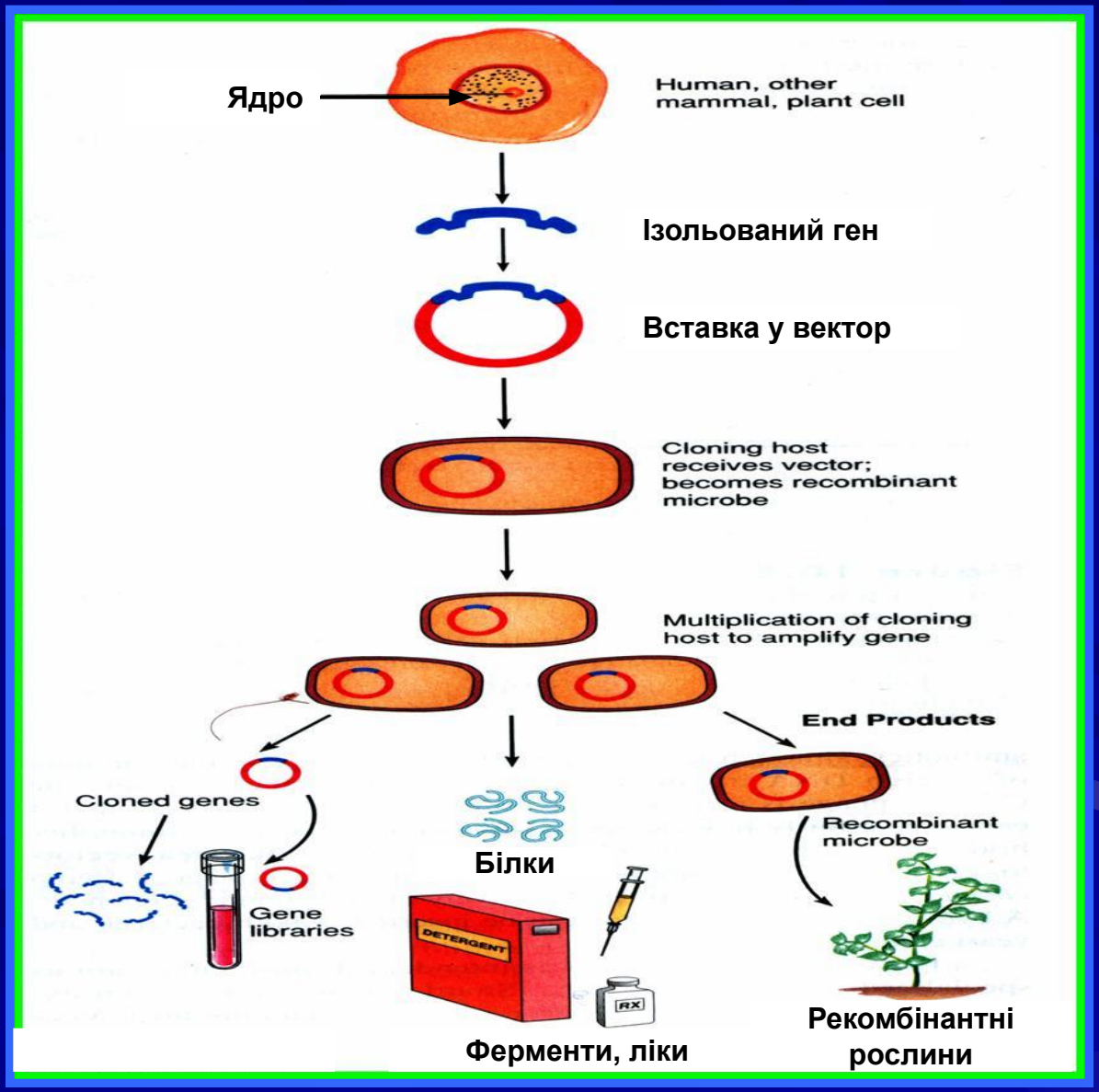
"ІНСТРУМЕНТИ" ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

- **ФЕРМЕНТИ** (рестриктази, лігази, зворотня транскріптаза)
- **ВЕКТОРИ** (плазміди, помірні бактеріофаги, космідиі, транспозони, віруси)

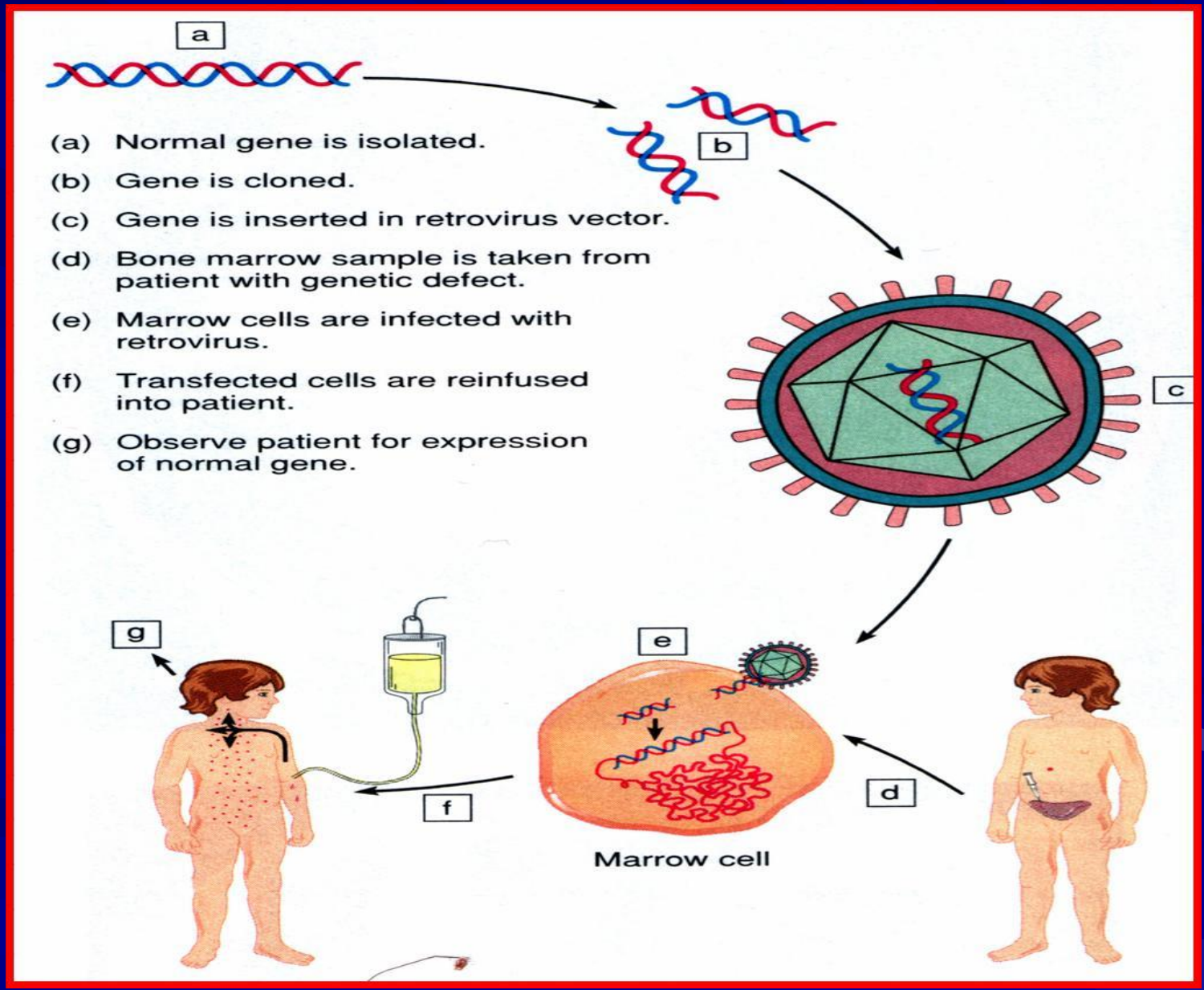
СХЕМА ГЕНЕТИЧНО - ІНЖЕНЕРНОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ

- визначення локалізації потрібного гену (сиквенс, генетичне мапування) - клонування (виділення) потрібного гену за допомогою рестриктакз
- можливий варіант виділення іРНК і комплементарний синтез потрібного гену за допомогою зворотньої транскріптази
- об'єднання ізольованого гену з геномом вектора за допомогою ферментів (рестріктаз, лігаз)
- введення рекомбінантного вектору в клітину-продуцент

БІОТЕХНОЛОГІЯ



ГЕНОТЕРАПІЯ



ГЕНЕТИКА ВІРУСІВ

Способи збільшення інформації:

- ✔ дворазове зчитування одієї іРНК з інших ініціюючих кодонів
- ✔ зсув рамки трансляції
- ✔ сплайсинг (вирізання інтронів)
- ✔ транскрипція з ділянок ДНК, що перекриваються

У вірусів можуть бути:

Модифікації (зміна складу білків капсиду, суперкапсиду під впливом клітин).

Мутації (розмір бляшок під агаровим покриттям, нейровірулентність для тварин, чутливість до дії хіміотерапевтичних агентів, ts-мутації – температурочутливі – вірус втрачає здатність розмножуватись при підвищених температурах.

Рекомбінації.

ВИДИ ГЕНЕТИЧНИХ РЕКОМБІНАЦІЙ У ВІРУСІВ

1. Рекомбінація: Обмін генами (міжгенна) та їх частинами (внутрішньогенна)

Схрещування близьких за властивостями вірусів при одночасному культивуванні.

Наприклад, віруси поліомієліту (збільшена і зменшена чутливість до гуанідіну, різна нейровірулентність), віруси грипу (різна нейровірулентність для мишей, але одна пневмотропність), гібридизація вірусів віспи кролика і вірусу вісповакцини

ВИДИ ГЕНЕТИЧНИХ РЕКОМБІНАЦІЙ У ВІРУСІВ

2. **Множинна реактивація:** вірусна інфекція викликається при зараженні віріонами з пошкодженим геномом, оскільки функцію цього гену виконує вірус, у якого ген не пошкоджено. Нащадки – неушкоджені віруси
3. **Пересортування генів:** між вірусами, що мають сегментовані геноми (віруси грипу людини, кочок, свиней, буньявіруси, аренавіруси, реовіруси). Гібридні форми називають реасортанти.

ВИДИ РЕКОМБІНАЦІЙ У ВІРУСІВ

4. **Гетерозиготність:** одночасній репродукції декількох віріонів, різних за спадковими властивостями, утворюються віріони, що містять певний геном одного із батьківських штамів і частину геному іншого вірусу (т.з. диплоїдні або поліплоїдні віруси). Таке об’єднання не спадкується, але дозволяє дати нащадків з різними властивостями.

Це віруси грипу, хвороби Ньюкасл

ВИДИ РЕКОМБІНАЦІЙ У ВІРУСІВ

5. Транскапсидація: частина чужерідного генетичного матерілау, заключеного всередині капсиду іншого вірусу, здатна переноситься в стабільній формі в чутливі до основного вірусу клітини.

Аденовіруси людини не розмножуються в клітинах мавп. Але при одночасному культивуванні аденовірусів та вірусів SV-40 під одним капсидом утворюється вірус, що містить геноми обидвох вірусів, який здатний розмножуватись у клітинах мавп.

ВИДИ РЕКОМБІНАЦІЙ У ВІРУСІВ

6. **Крос-реактивація (рятування маркера):** реактивація інактивованого геному неінактивованим (подібно до множинної реактивації)

ВИДИ НЕГЕНЕТИЧНОЇ ВЗАЄМОДІЇ ВІРУСІВ:

1. Фенотипове змішування
2. Негенетична реактивація
3. Комплементація
4. Стимуляція
5. Інтерференція