

Кафедра медицинской биологии,
микробиологии, вирусологии и иммунологии

***ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ И
ВИРУСОВ.***

***ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ
И ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ.***

Лектор ас. Е.В. Покрышко

План лекции

- Строение генетического аппарата клетки.
- Внехромосомные элементы наследственности.
- Мутации.
- Рекомбинации.
- Основы генной инженерии.
- Генетика вирусов.

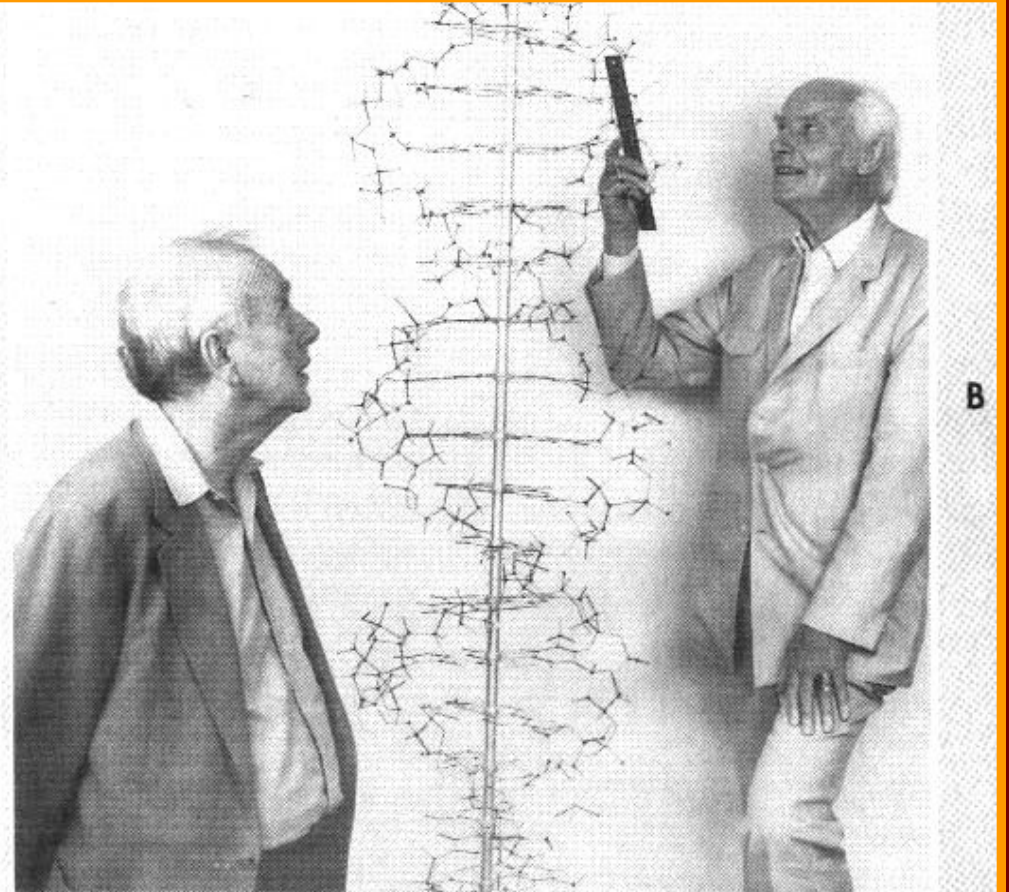
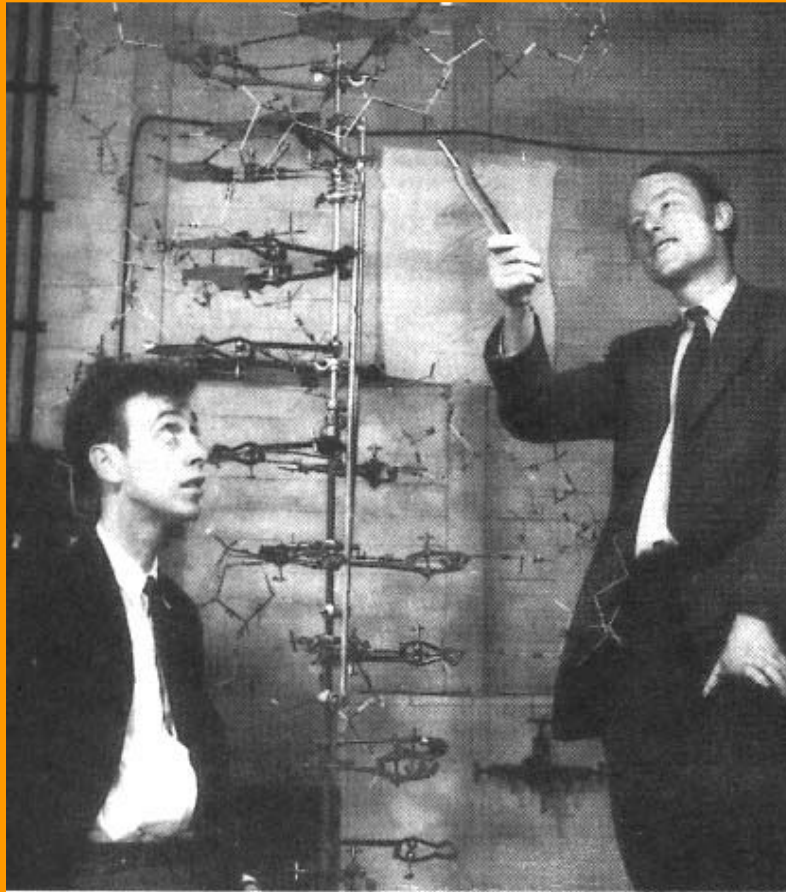
История развития молекулярной биотехнологии

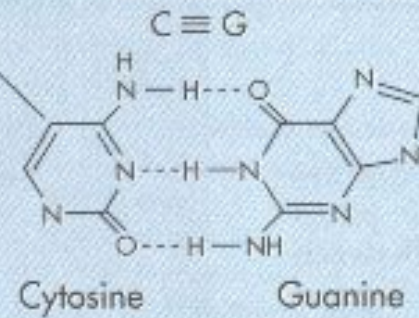
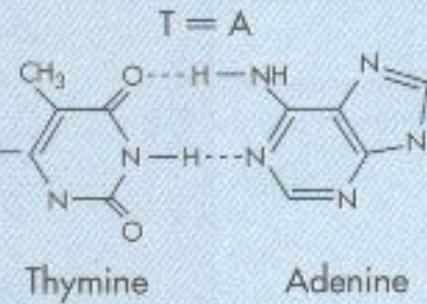
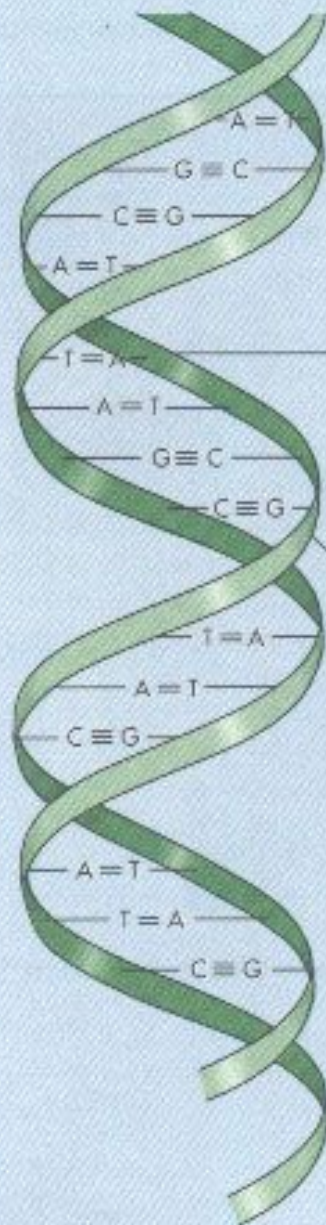
Год	Событие
1917	Карл Ереки ввёл термин "биотехнология"
1944	Евери, МакЛеод, МакКарти доказали, что генетическим материалом является ДНК
1953	Уотсон и Крик расшифровали структуру ДНК
1970	Выделена первая рестриктирующая эндонуклеаза
1973	Бойер, Коэн заложили основу технологии рекомбинантных ДНК (гибрид фага λ и <i>E. coli</i>)
1978	Получено первый человеческий инсулин
1982	Первая вакцина для животных
1988	Открыто метод ПЦР

История развития молекулярной биотехнологии

Год	Событие
1990	Начало работы над проектом "Геном человека"
1996	Продажа первого рекомбинантного белка эритропоэтина превысила 1 млрд долларов США
1996	Определено генетическую последовательность всех хромосом эукариотического организма <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1997	Клоновано млекопитающего из соматической клетки

F. Crick i J. Watson





Генетический материал бактерий представлен:

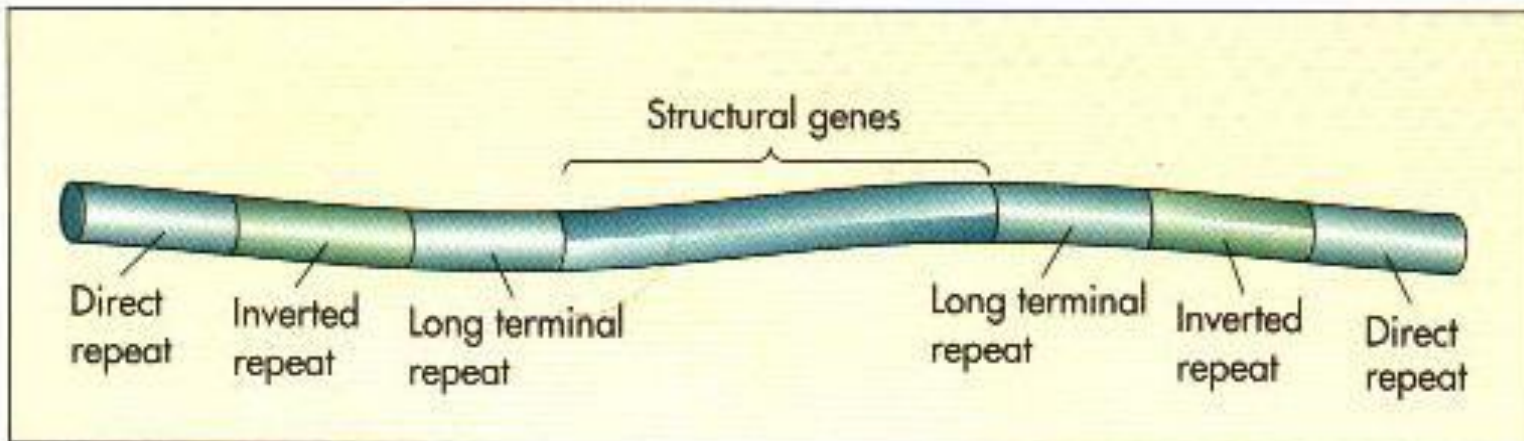
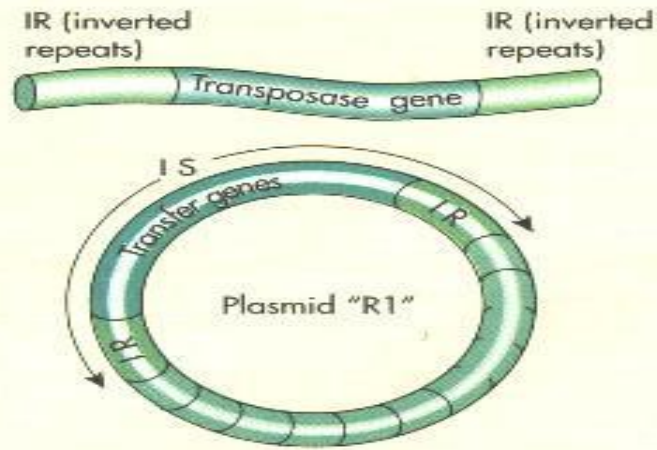
1. хромосомой (одна, замкнутая в кольцо)
2. внехромосомными элементами наследственности:
 - ✓ плазмидами
 - ✓ транспозонами
 - ✓ IS-элементами

Плазмиды – необязательные компоненты микробных клеток, могут иметь линейную или кольцевую структуру, и неспособны к самостоятельной репликации.

Транспозоны – мигрирующие элементы, имеют гены для переноса внутри клеток и одновременно содержат гены резистентности к антибиотикам, ионам тяжелых металлов.

IS-элементы – мигрирующие гены, которые способны на перенос внутри клеток и с одного участка ДНК на другой; **e-плазмиды** – обязательный компонент микробных клеток, в состав которых входит ДНК и РНК.

Транспозон и IS элемент



Транспозон содержит структурные гены и повторяющиеся участки

Функции IS-элементов

- 1. Координирующая: взаимодействие транспозонов, плазмид, умеренных фагов между собой и хромосомой бактерии, обеспечивая их репликацию.
- 2. Регуляторная: вызывают инактивацию генов, или служат промоторами (участки ДНК, которые регулируют экспрессию клеточных генов).
- 3. Индуцируют мутации по типу делеции или инверсии

Функции транспозонов

- 1. Регуляторная.
- 2. Кодирующая.
- 3. Индуцируют мутации.
- 4. Вызывают хромосомные aberrации.

Классификация плазмид

По размещению в клетке:

внехромосомные
интегрированные

По типу передачи:

конъюгативные

(трансмиссивные, имеют tra-ген)

неконъюгативные

По признакам, что обуславливают
определённые свойства
микроорганизмов

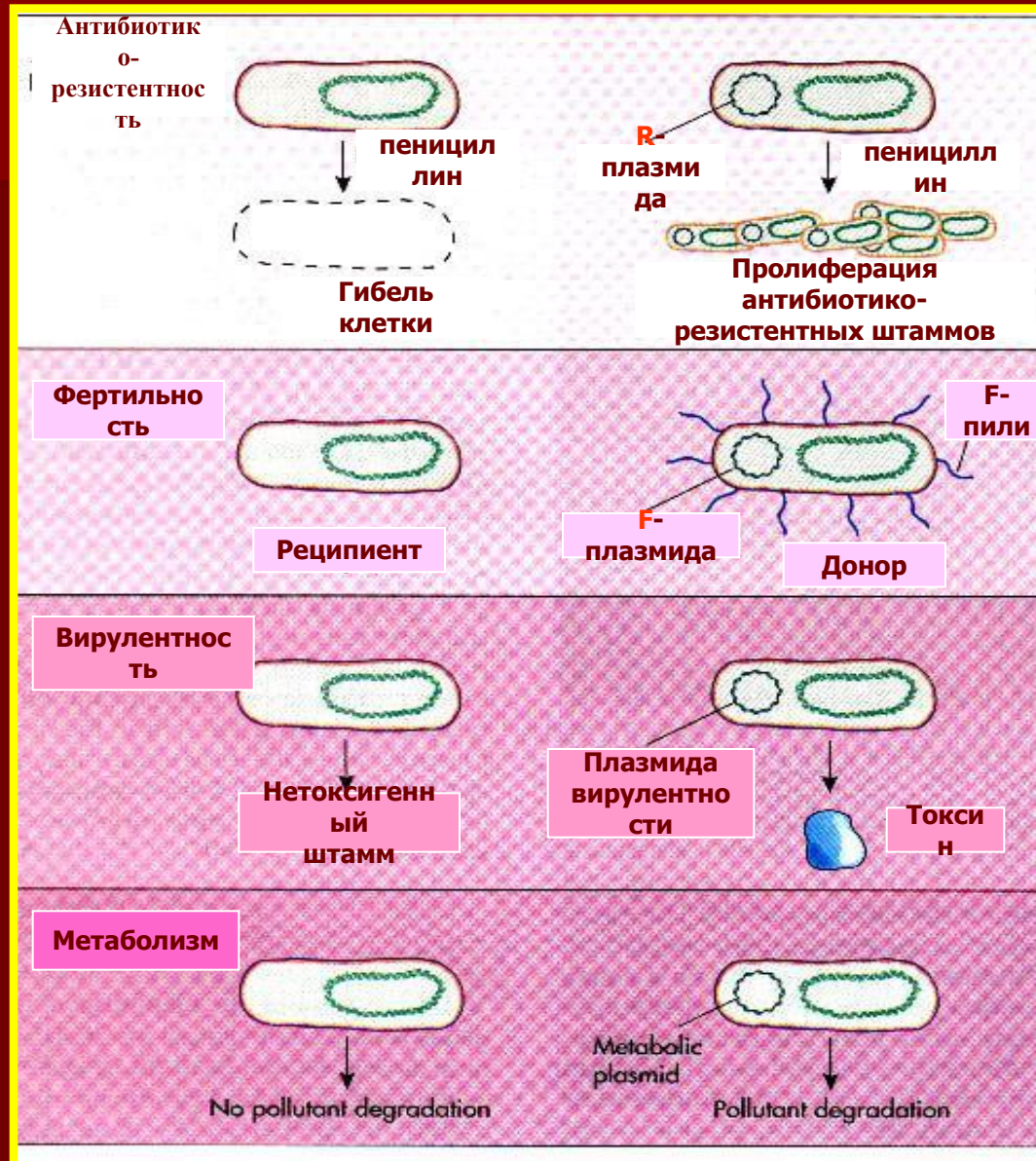
Виды плазмид

- Col – продукция колицинов
- Hly – продукция гемолизинов
- Tol – расщепление толлуола, ксилола
- Ent – продукция энтеротоксина
- Nif – связывание азота у *K. pneumoniae*
- Ti – образование опухолей у растений

Плазмиды деградации:

- Cam – расщепление камфоры
- Oct - расщепление октана
- Sal - расщепление салицина

Функциональные свойства плазмид



Функции плазмид

- 1. Регуляторная
- 2. Кодирующая.

Мутации

- По происхождению: спонтанные
индуцированные
- По локализации: нуклеоидные
цитоплазматические
- По количеству генов, которые мутировали:
генные
хромосомные
- По величине: большие (хромосомные)
малые (точковые)

Хромосомные мутации :

- Инверсия
- Дупликация
- Делеция
- Дислокация

Точковые мутации :

- ❑ **делеция**

- ❑ **инсерция** (вставка)

замена:

- ❑ **транзиция** (пуриновая основа – на пуриновую, пиримидиновая – на пиримидиновую)

- ❑ **трансверзия** (пуриновая основа – на пиримидиновую и наоборот)

Мутагенные факторы

Физические:

- 1.** УФО (λ -2600 А) – наиболее сильное мутагенное действие; образуются димеры тимина, смена основ
- 2.** Ионизирующее излучение (рентгеновское, гамма-лучи)

Мутагенные факторы

Химические:

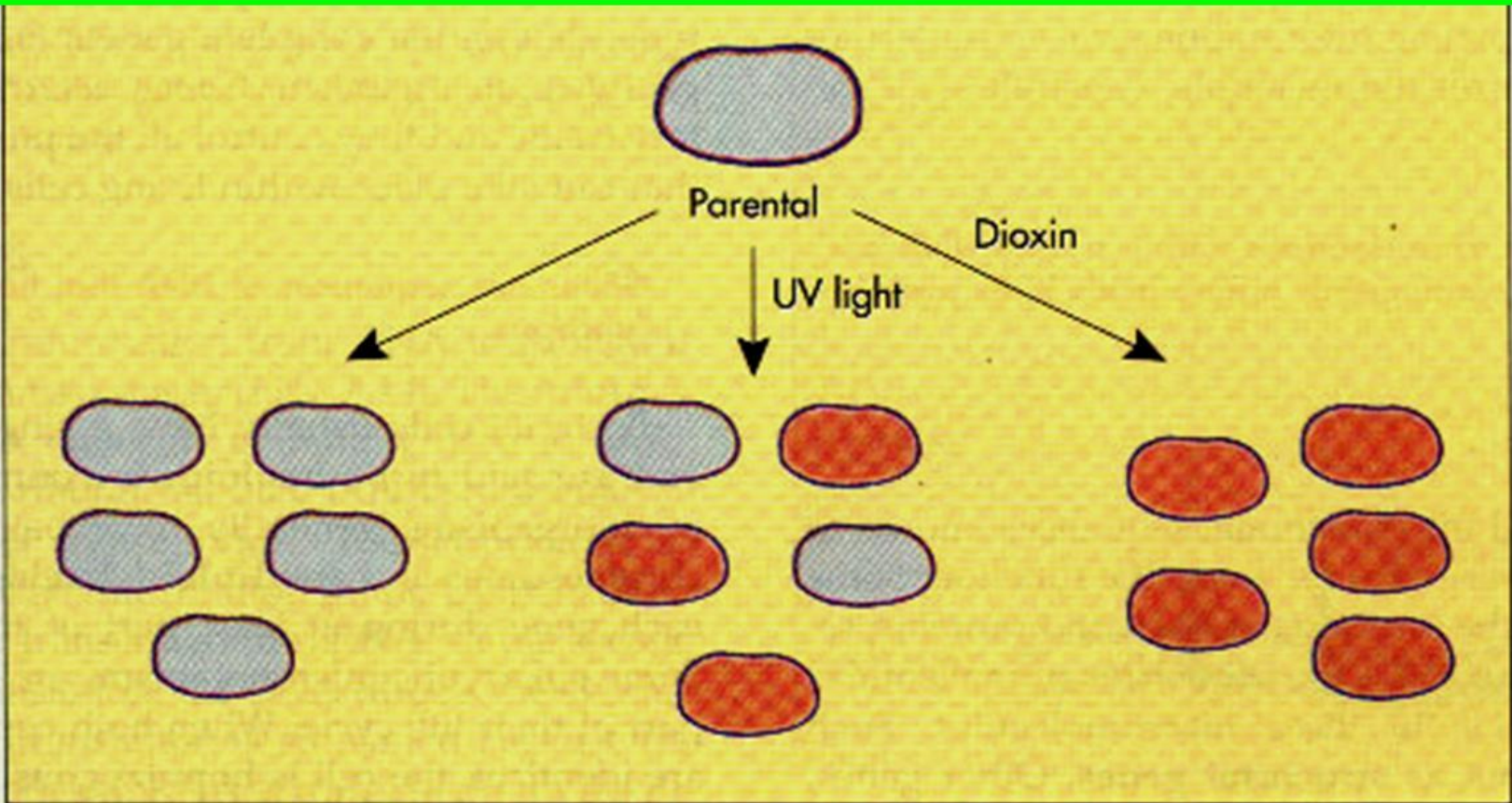
1. Азотистая кислота
2. N-нитрозометилмочевина – супермутаген, канцероген
3. Этилметансульфонат
4. Акридины
5. Нитрозогуанидин
6. Аналоги основ (5-бромурацил, 2-аминопурин)
7. Лекарственные препараты (нитрофураны, некоторые антибиотики)

Мутагенные факторы

Биологические:

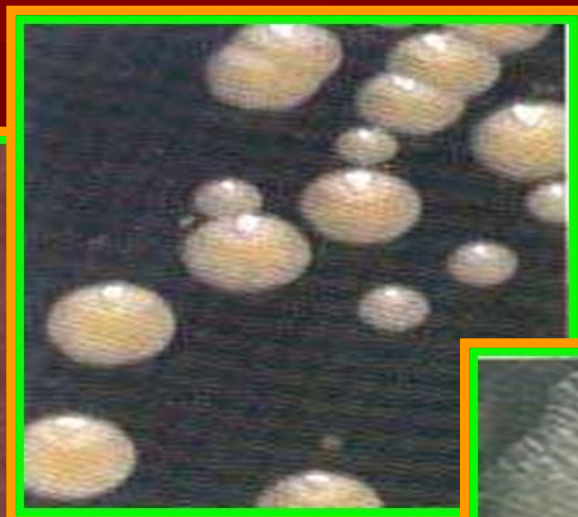
- ❑ перекись водорода
- ❑ антибиотики
- ❑ бактериофаги

Действие разных мутагенов на бактерии



Различные физические и химические факторы повышают частоту мутаций. Ультрафиолетовое излучение и диоксин являются мутагенами и вызывают образование мутантов (красные клетки)

R- и S- формы колоний



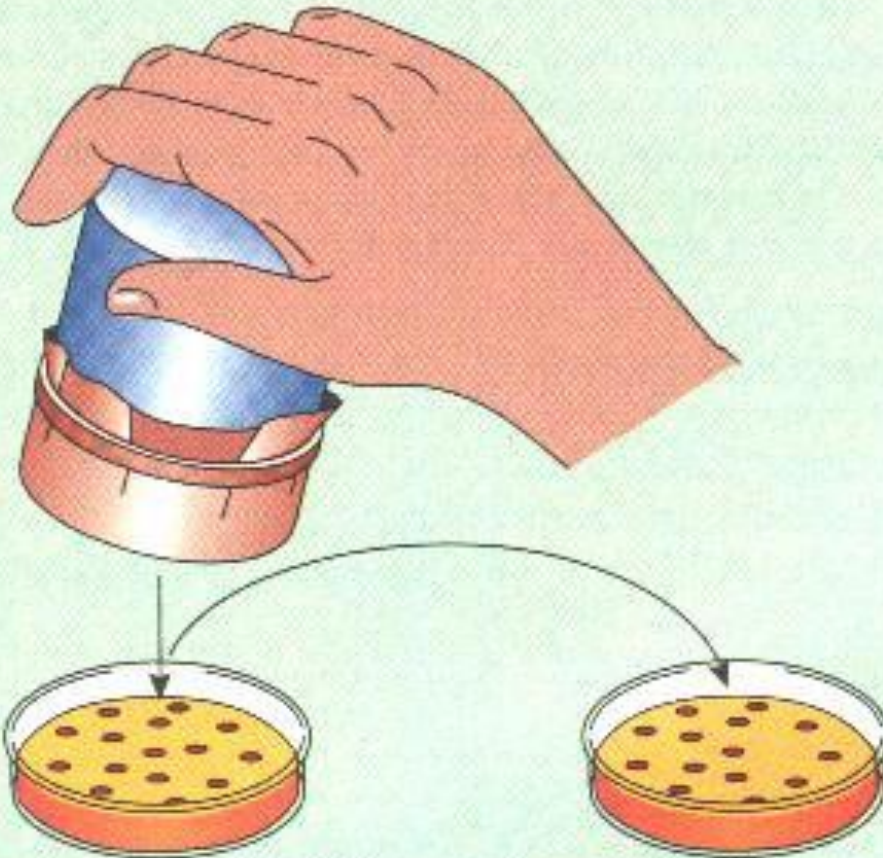
Свойства микробов S-колоний

- * Клетки нормальной морфологии
- * Диффузное помутнение бульона
- * У подвижных видов есть жгутики
- * У капсульных вариантов есть капсулы
- * Биохимически более активны
- * Полноценны в антигенном отношении
- * У патогенных видов – вирулентны
- * Выделяют в остром периоде заболевания
- * Чувствительны к бактериофагам
- * Менее чувствительны к фагоцитозу

Методы выявления мутантов

- По разнице скорости роста (посев на минимальную среду)
- Различная способность к выживанию
- Метод реплик Ледерберга

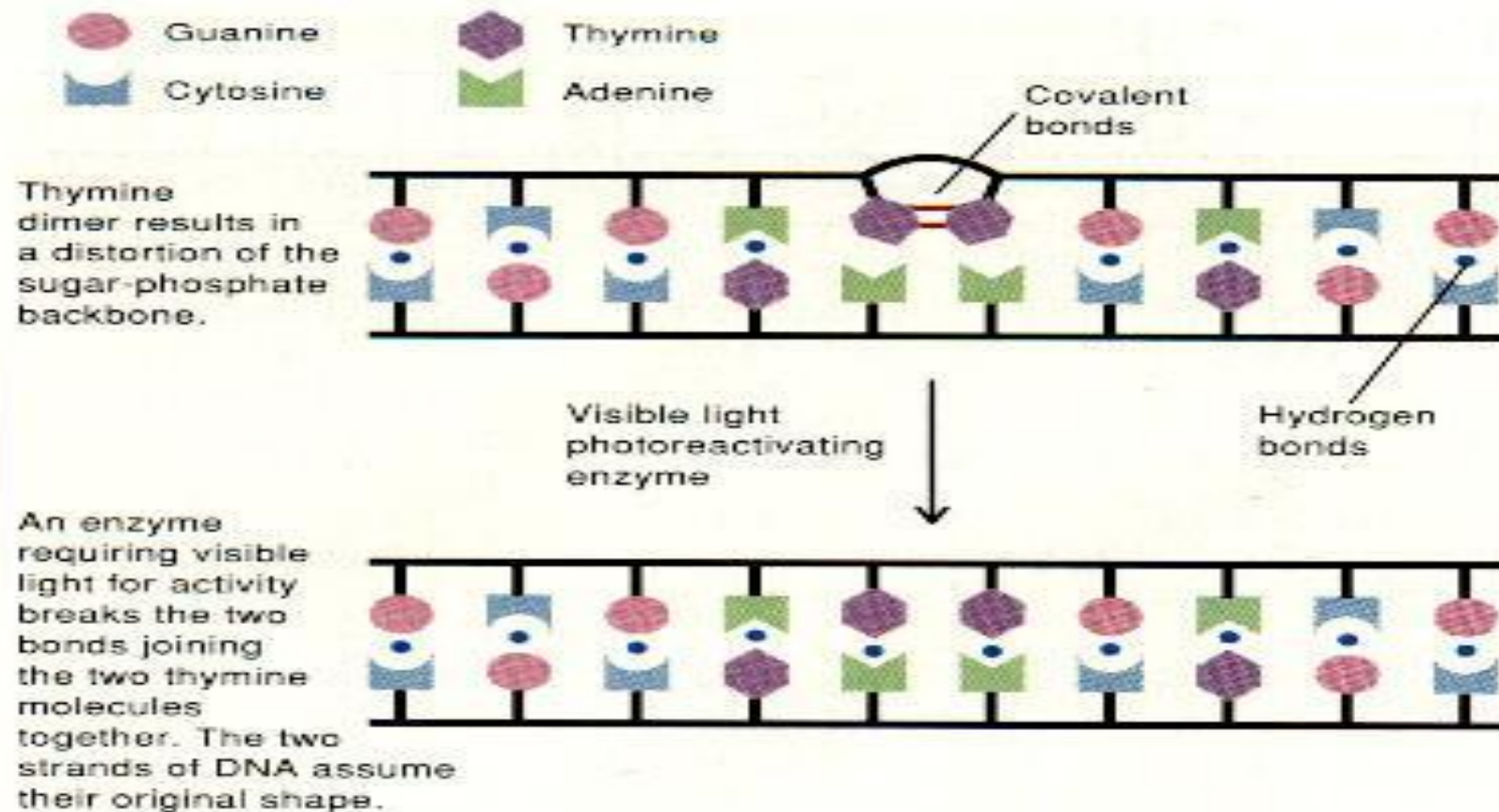
Метод реплик



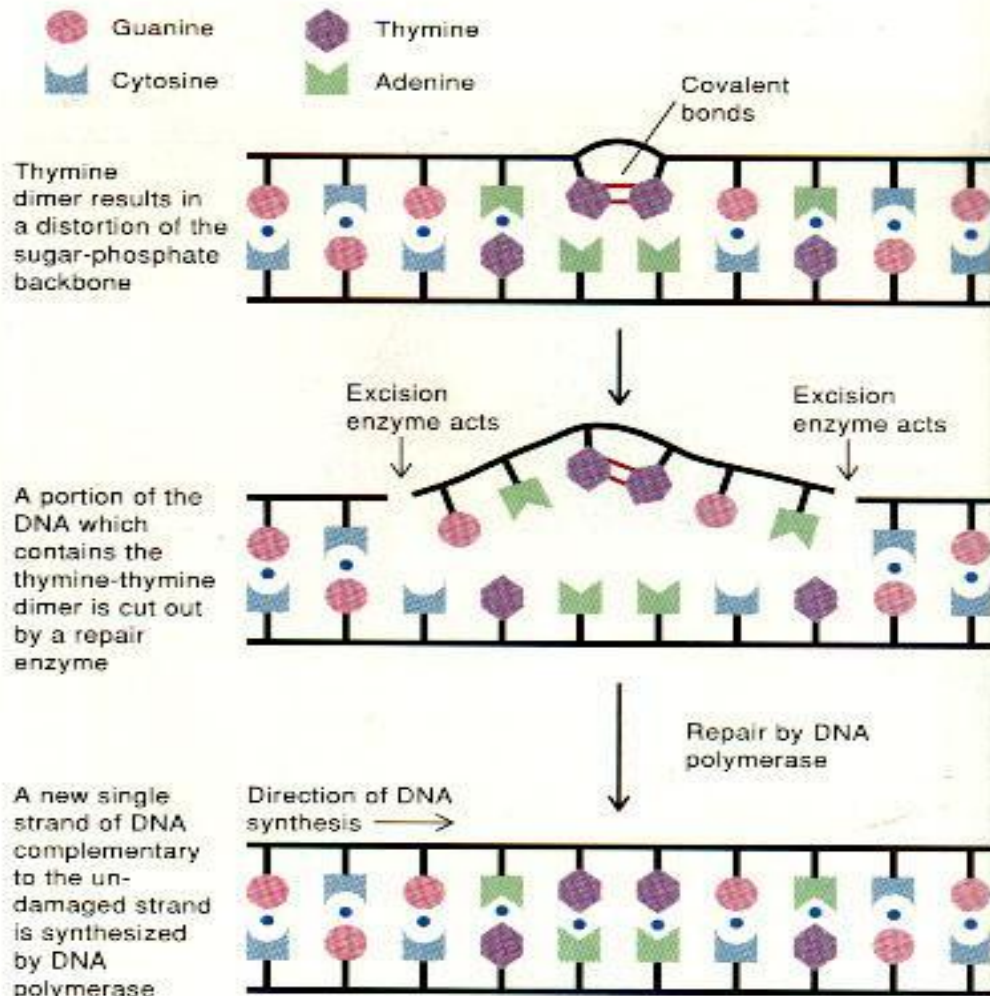
Полноценная среда

Минимальная среда
для обнаружения
ауксотрофов

Световая репарация - рассоединение тиминовых димеров ферментами в присутствии света



Темновая репарация



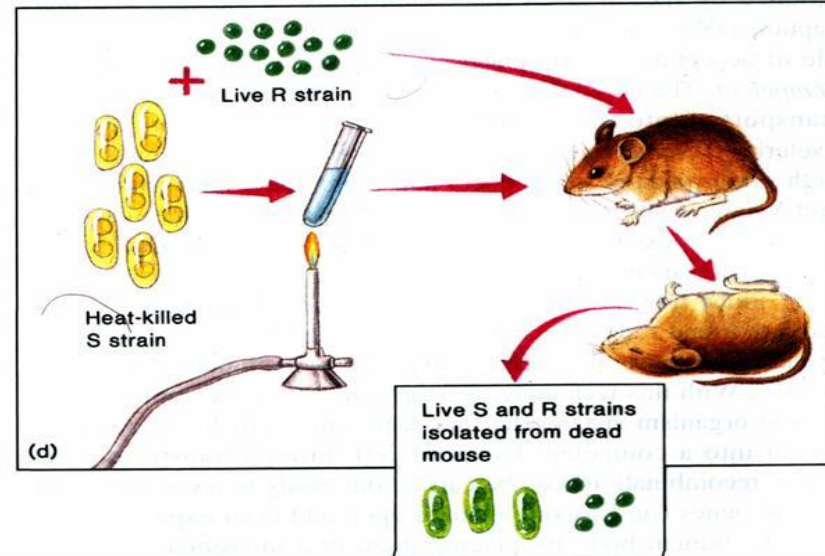
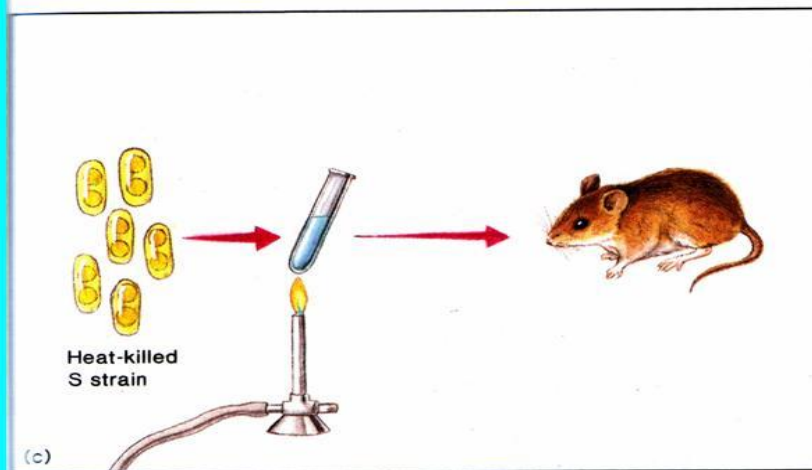
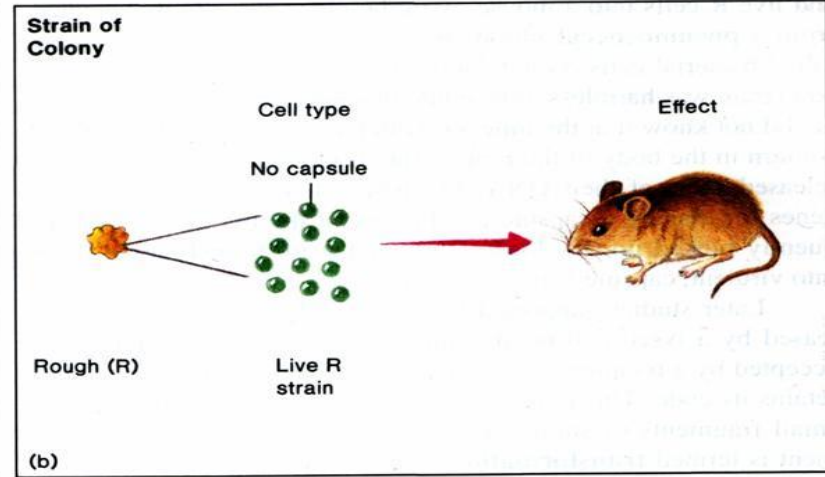
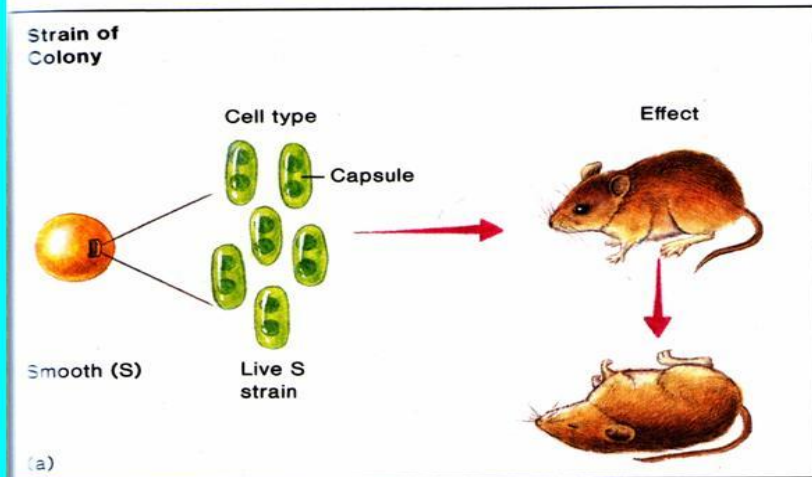
Dark, or excision, repair of a thymine dimer. The single strand of DNA containing the thymine dimer is removed and destroyed.

1. деградация прилегающих к поврежденному участку ДНК
2. вырезание при помощи *рестриктаз* поврежденных участков,
3. восстановление удаленного участка при помощи фермента *ДНК зависимой ДНК полимеразы*
4. сшивание *ДНК-лигазами*

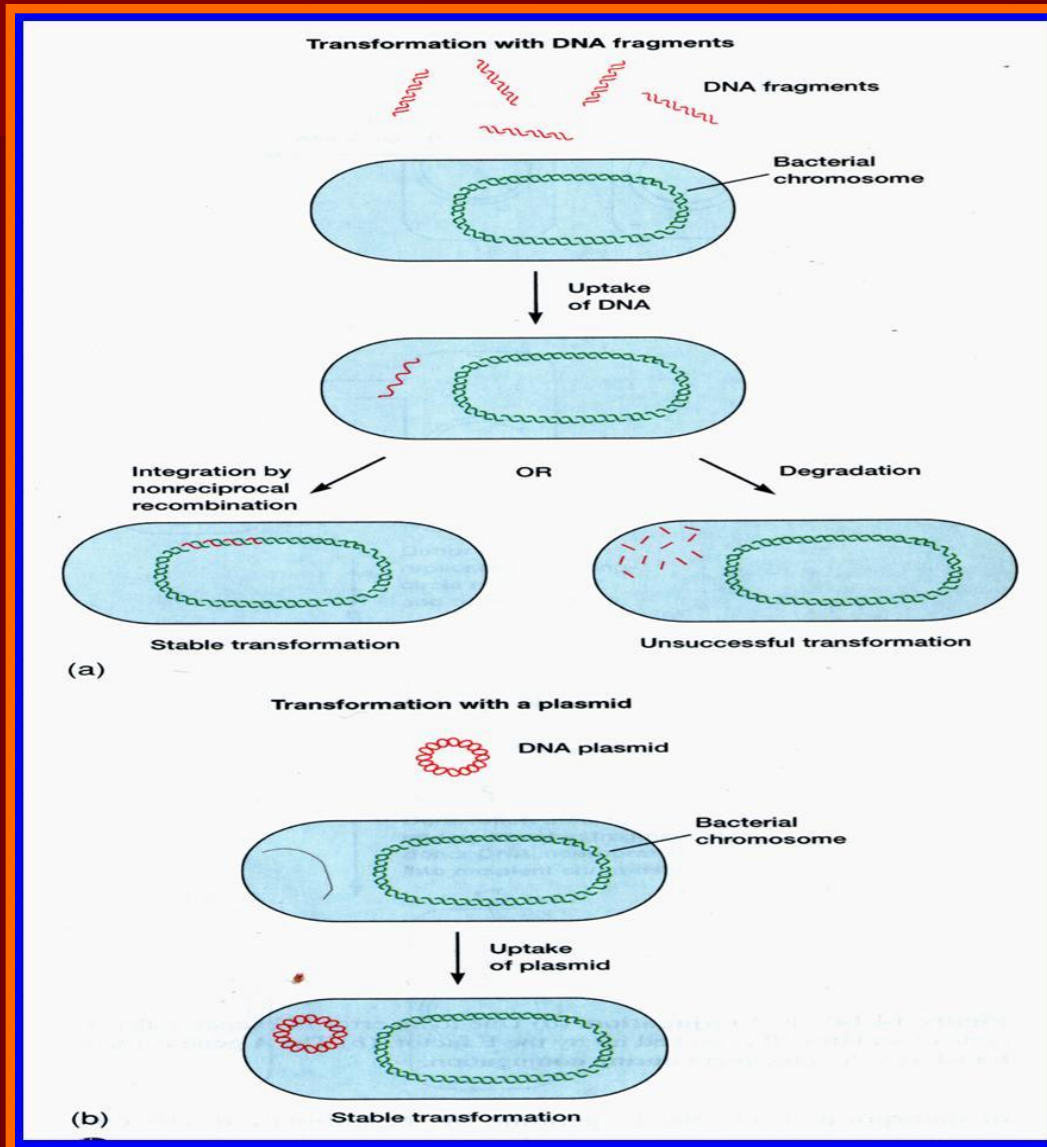
SOS-реактивация

При множественных повреждениях участки с мутациями переводятся в неактивное состояние, а их роль выполняет неповрежденный участок ДНК

Трансформация (опыты Гриффитса, 1928; Евери Мк Леода и Макарти, 1944)



ТРАНСФОРМАЦИЯ



ТРАНСДУКЦИЯ

(Циндер и Ледерберг, 1952)

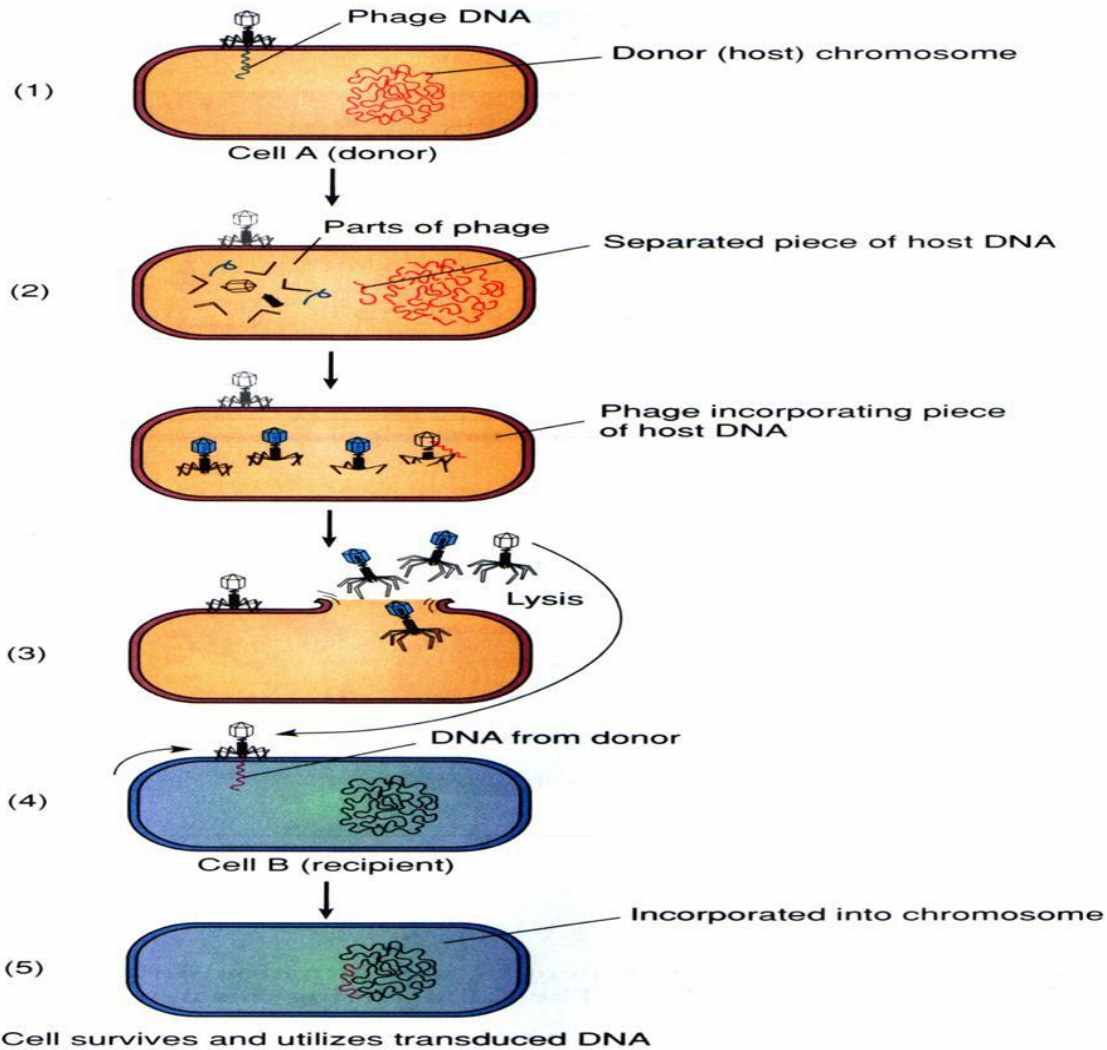
Виды:

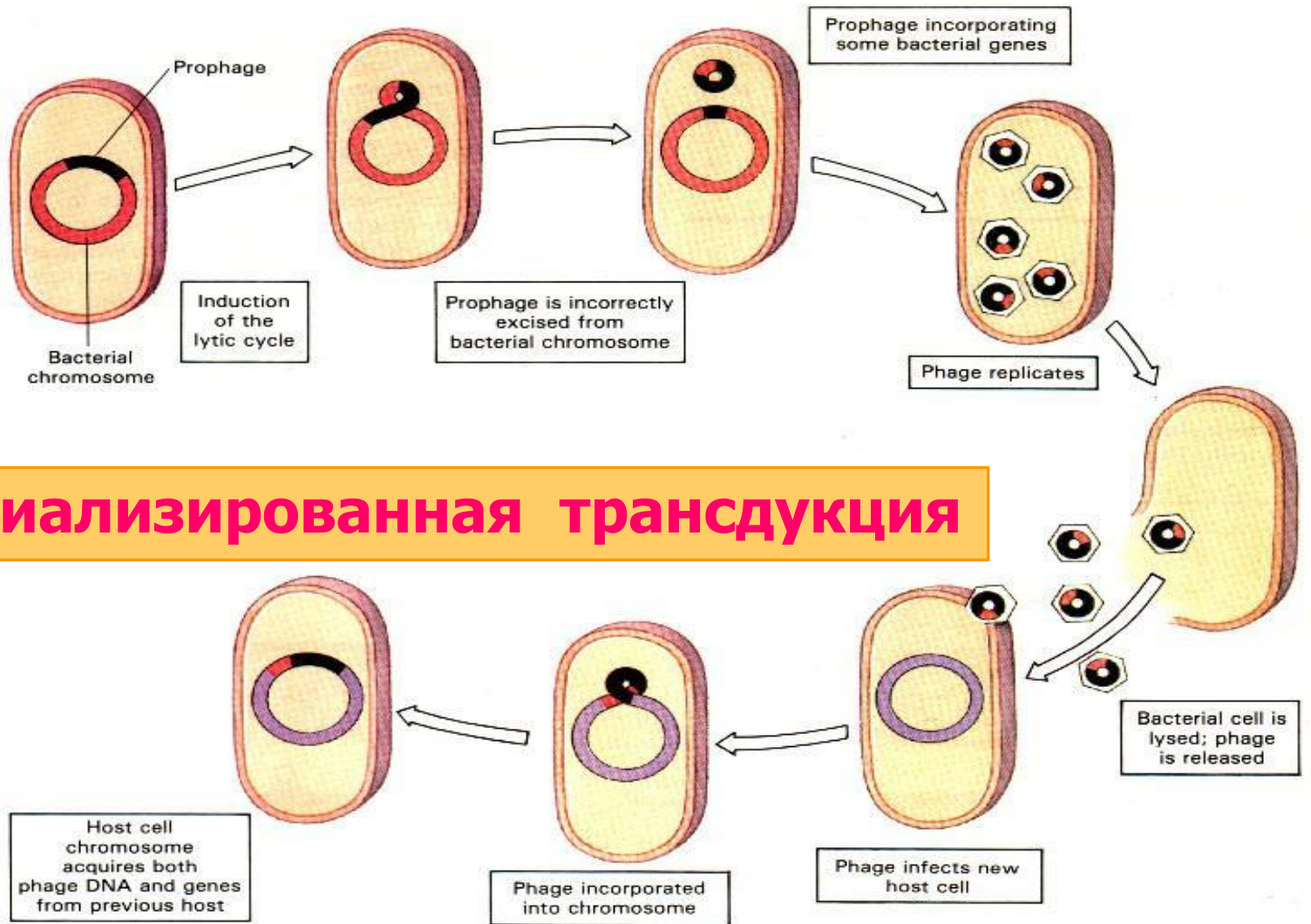
- ❑ **общая** (генерализированная)
- ❑ **специфическая**
- ❑ **абортивная**

Вызывают

умеренные, дефектные фаги

ТРАНСДУКЦИЯ





Специализированная трансдукция

FIGURE 8.4 Specialized transduction by lambda phage in *E. coli*. In this process, phage DNA always inserts itself into the bacterial host chromosome at a particular site. When the phage replicates, it takes bacterial genes from either side of the site and packages them along with its own DNA into new phages. Only genes adjacent to the insertion site are transduced, rather than genes from other parts of the bacterial chromosome. These genes may then be introduced into the phage's next host cell, where they will confer new genetic traits.

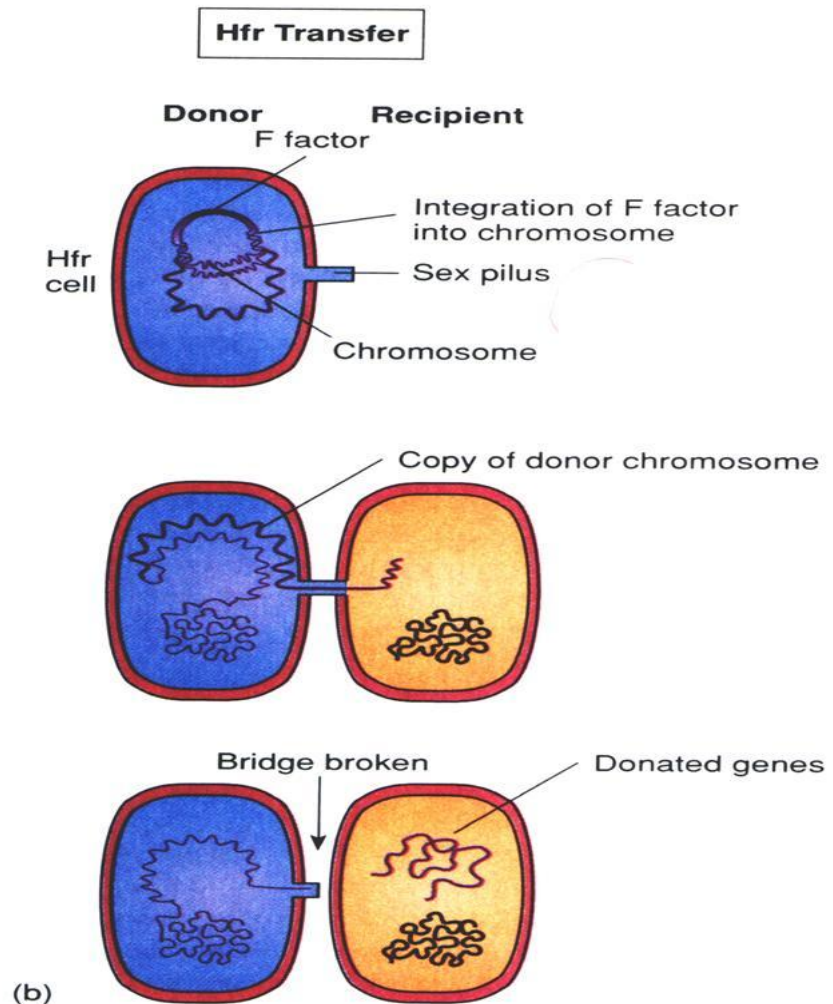
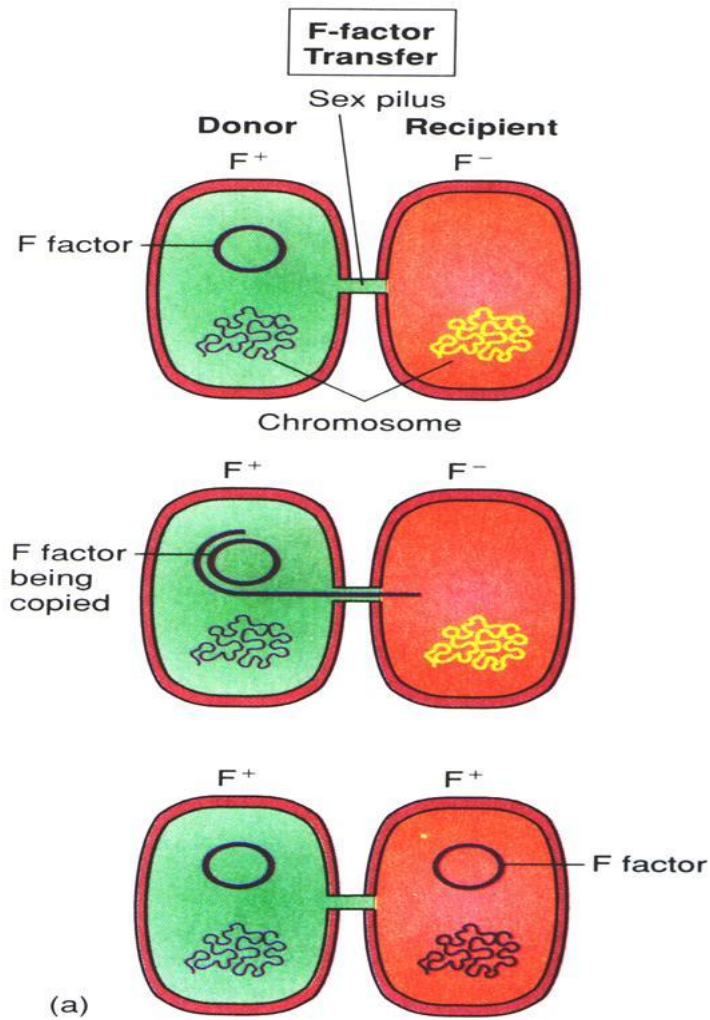
ОТЛИЧИЯ ТРАНСДУКЦИИ И ФАГОВОЙ КОНВЕРСИИ

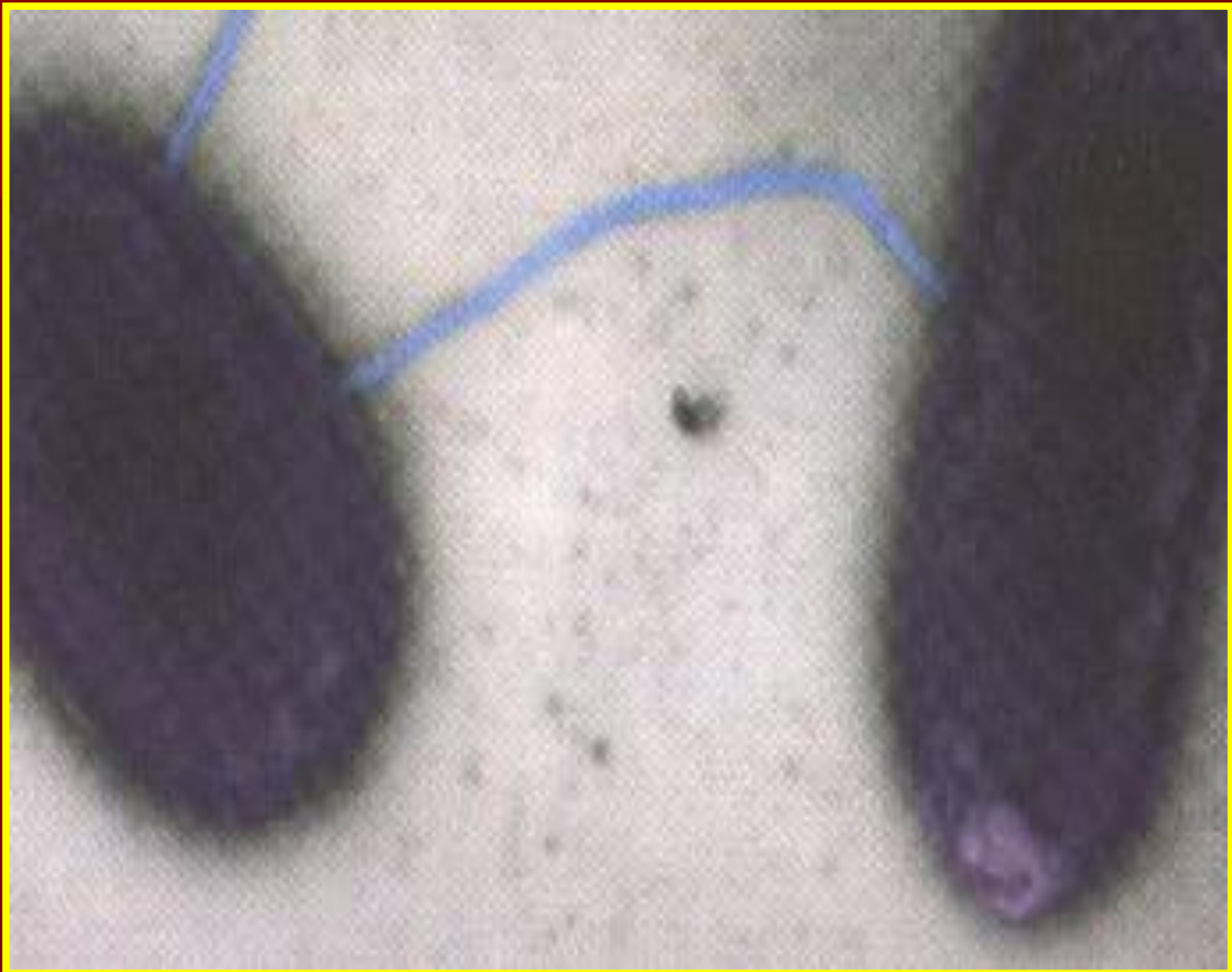
Трансдукция – перенос генетической информации из клетки в клетку при помощи фага

Фаговая конверсия - экспрессия в клетке генов бактериофага

(*Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp.)

КОНЪЮГАЦИЯ – (Ледерберг и Тейтум, 1946)





Конъюгация

Трансдукция

Трансформация

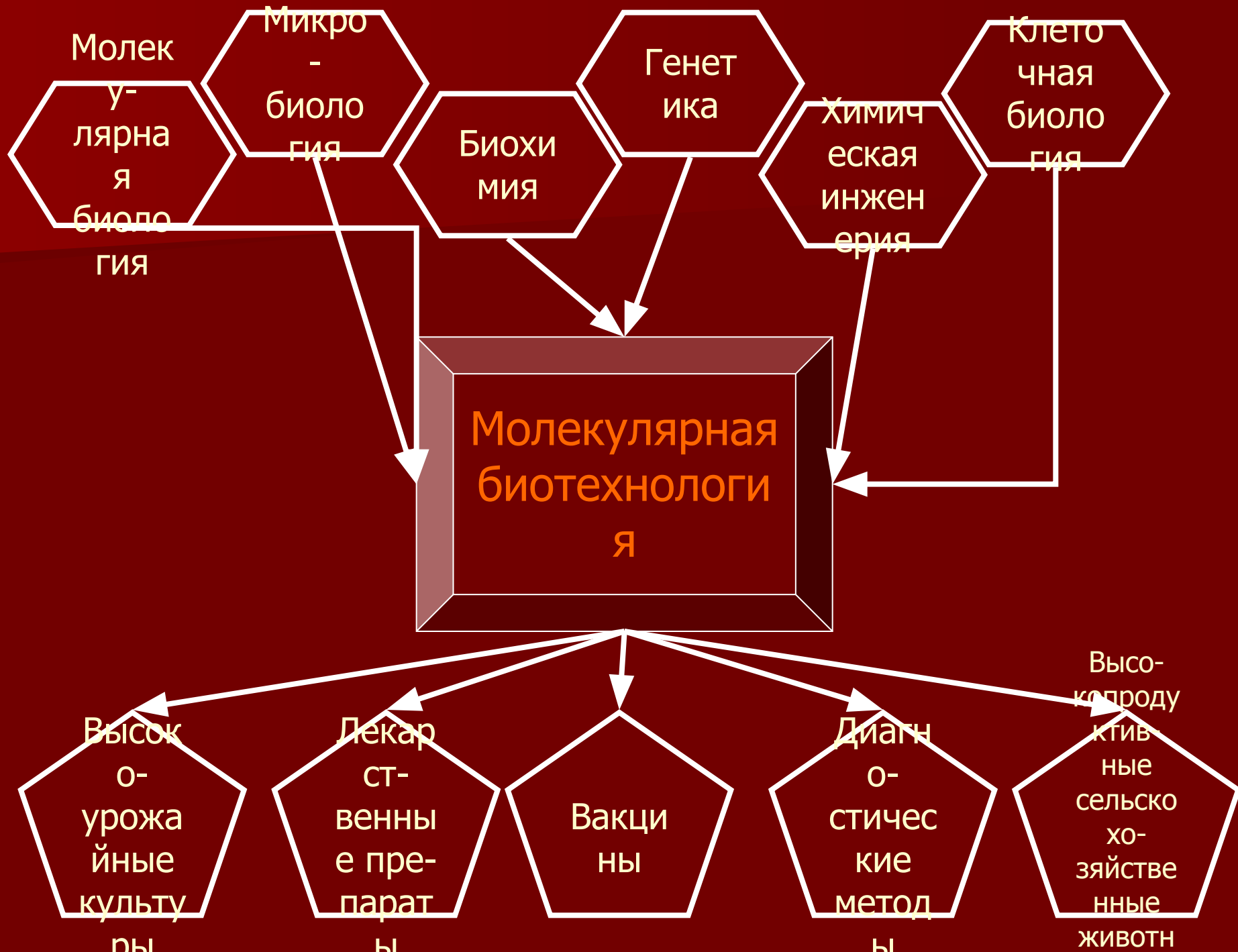
рекомбинации



Трансдукция – передача генетического материала от донора реципиенту при помощи бактериофага .

Трансформация – передача генетического материала от донора реципиенту при помощи изолированной ДНК.

Конъюгация - это передача генетического материала от бактерии-донора к бактерии-реципиенту путем непосредственного контакта.

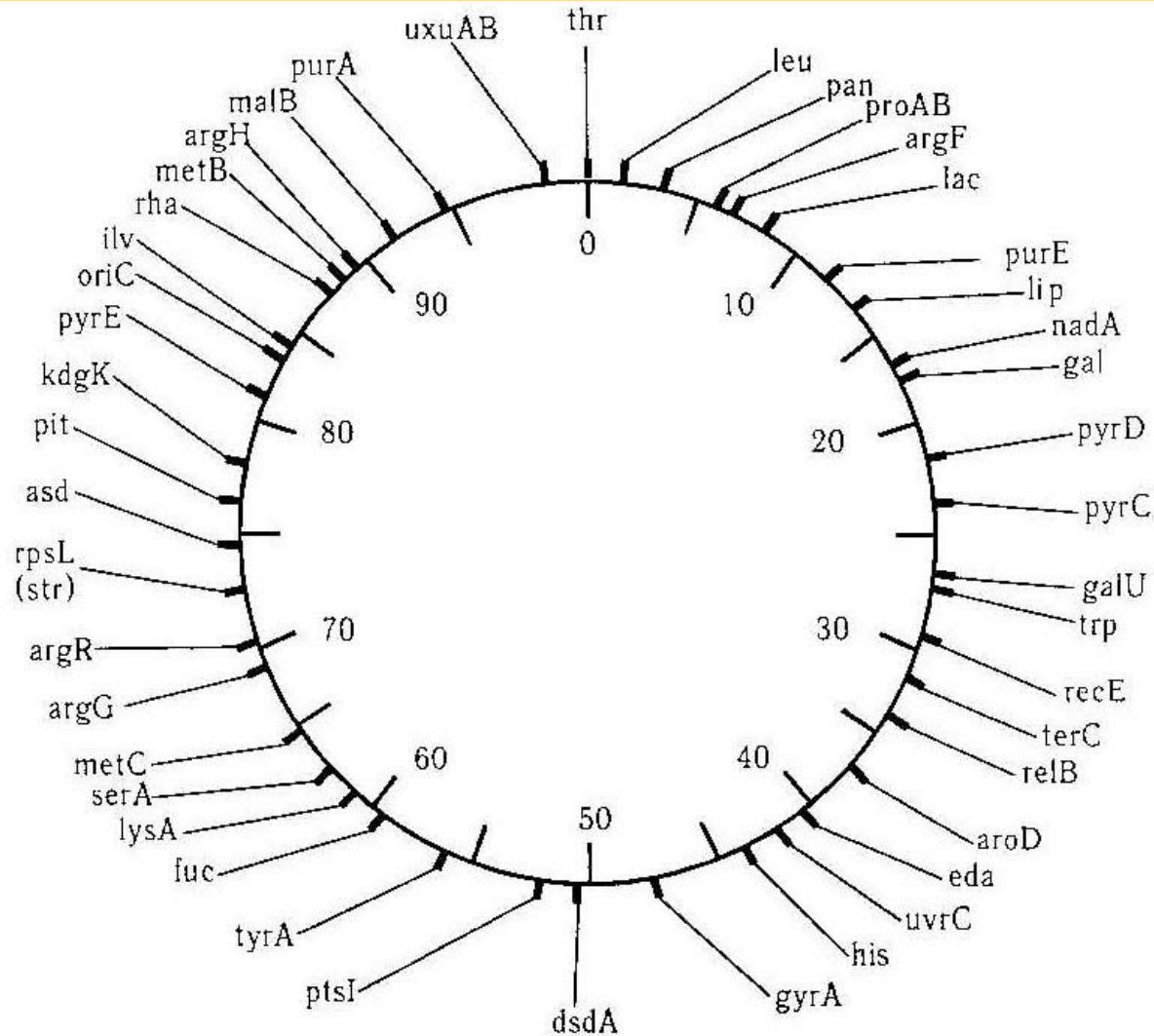


ПРОДУЦЕНТЫ, которые чаще всего используются в биотехнологии

ЭУКАРИОТЫ – дрожжи, плесневые грибы, культуры клеток животных, людей и растений

ПРОКАРИОТЫ – кишечная палочка, аэробные бациллы, псевдомонады, актиномицеты.

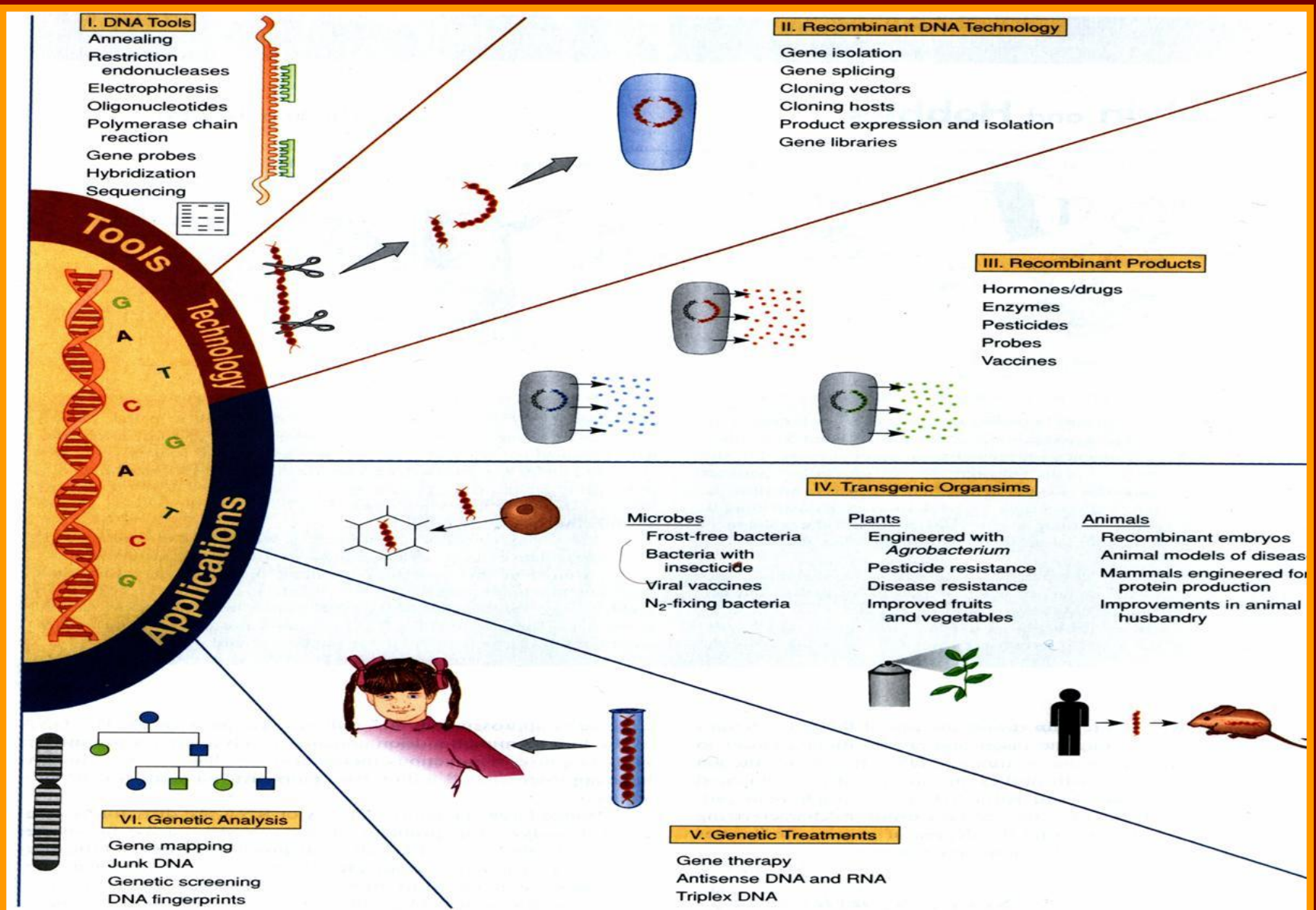
Хромосомная карта E. coli



Биотехнологические продукты микроорганизмов - продуцентов

- сами клетки как источник продукта
- крупные молекулы (ферменты, токсины, антигены, антитела, пептидогликаны и др.)
- низкомолекулярные метаболиты, необходимые для роста клеток (аминокислоты, витамины, нуклеотиды, органические кислоты).
- антибиотики, алкалоиды, токсины, гормоны

СФЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ



Основные продукты, которые получают при помощи биотехнологии

В медицине	В ветеринарии та с/х	В пищевой промышленности	В химической промышленности и энергетике
Антибиотики Витамины Аминокислоты Гормоны Вакцины Компоненты крови Диагностические препараты Нуклеиновые кислоты Противоопухолевые агенты.	Кормовый белок Пищевые антибиотики Витамины Гормоны Вакцины Биологические средства защиты растений Инсектициды	Амінокислоти Пищевой белок Ферменты	Ацетон Этилен Бутанол Биогаз Спирты

Некоторые гормоны человека, продуцируемые рекомбинантными микроорганизмами

Белок	Название препарата
Инсулин	Гумулин, Новолин
Соматостатин	Протропин, Гуматроп
Интерферон-альфа	Роферон, Велферон
Интерферон-гамма	Актимун
Интерферон-бета	Фрон, Бетасерон
Интерлейкин-2	Пролейкин
Фактор некроза опухолей	-
Эритропоэтин	Прокрит, Эпоген
Гранулоцит колоние-стимулирующий фактор	Филграстин, Ньюпоген
Плазминоген активатор	Актилиз

Генная инженерия —

направленное изменение генома продуцента в нужном для человека направлении:

пересадка в геном продуцента генов других организмов (человека, животного, растения), кодирующих синтез необходимого человеку продукта.

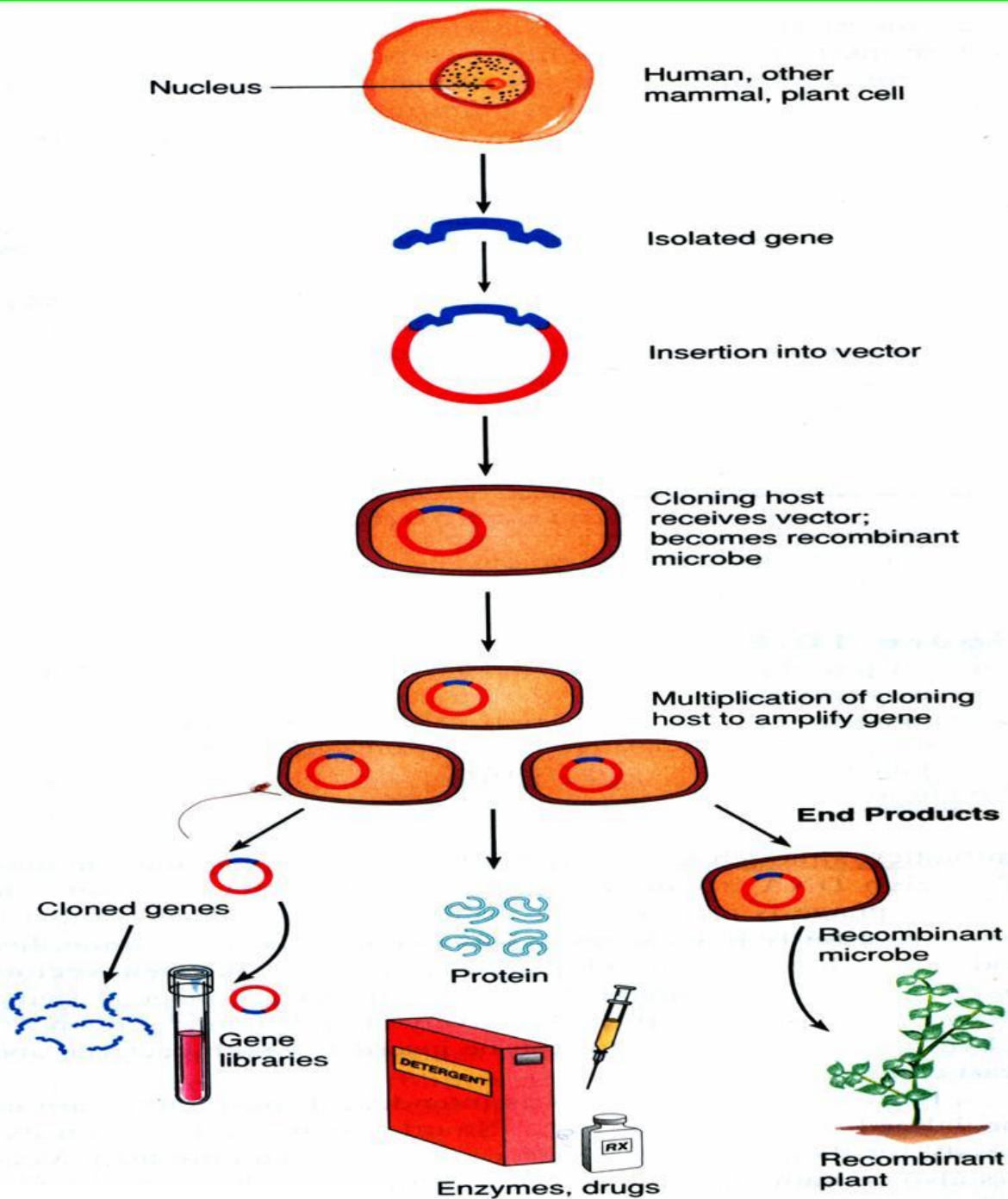
“ИНСТРУМЕНТЫ” ДЛЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

- ФЕРМЕНТЫ (рестриктазы, лигазы, обратная транскриптаза)
- ВЕКТОРЫ (плазмиды, умеренные бактериофаги, космиды, транспозоны, вирусы)

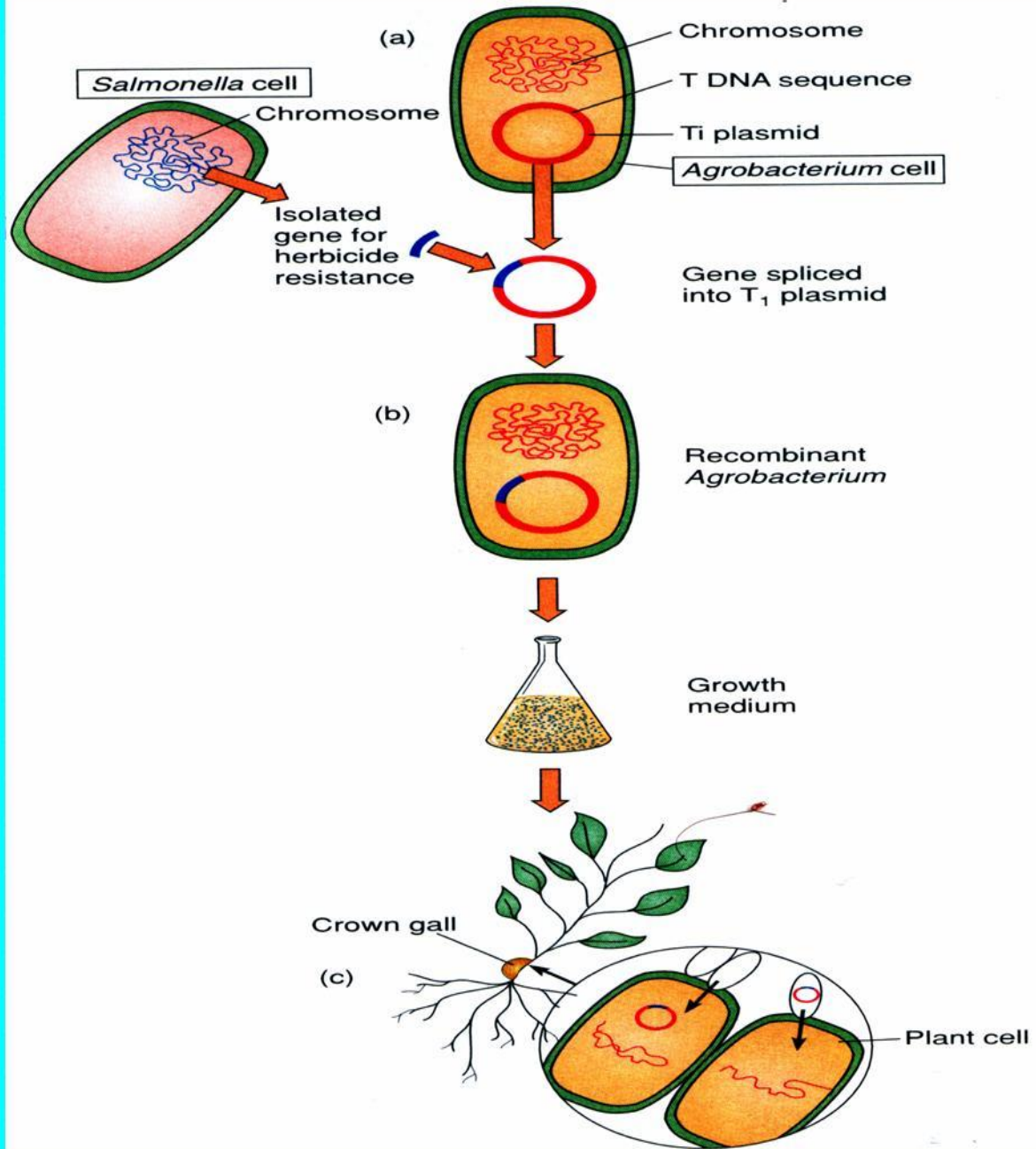
СХЕМА ГЕННО - ИНЖЕНЕРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

- ↓ определение локализации необходимого гена (сиквенс, генетическая карта) - клонирование (выделение) необходимого гена при помощи рестриктаз
- ↓ возможно выделение иРНК и комплементарный синтез необходимого гена при помощи обратной транскриптазы
- ↓ соединение изолированного гена с геномом вектора при помощи ферментов (рестриктаз, лигаз)
- ↓ введение рекомбинантного вектора в клетку-продуцент

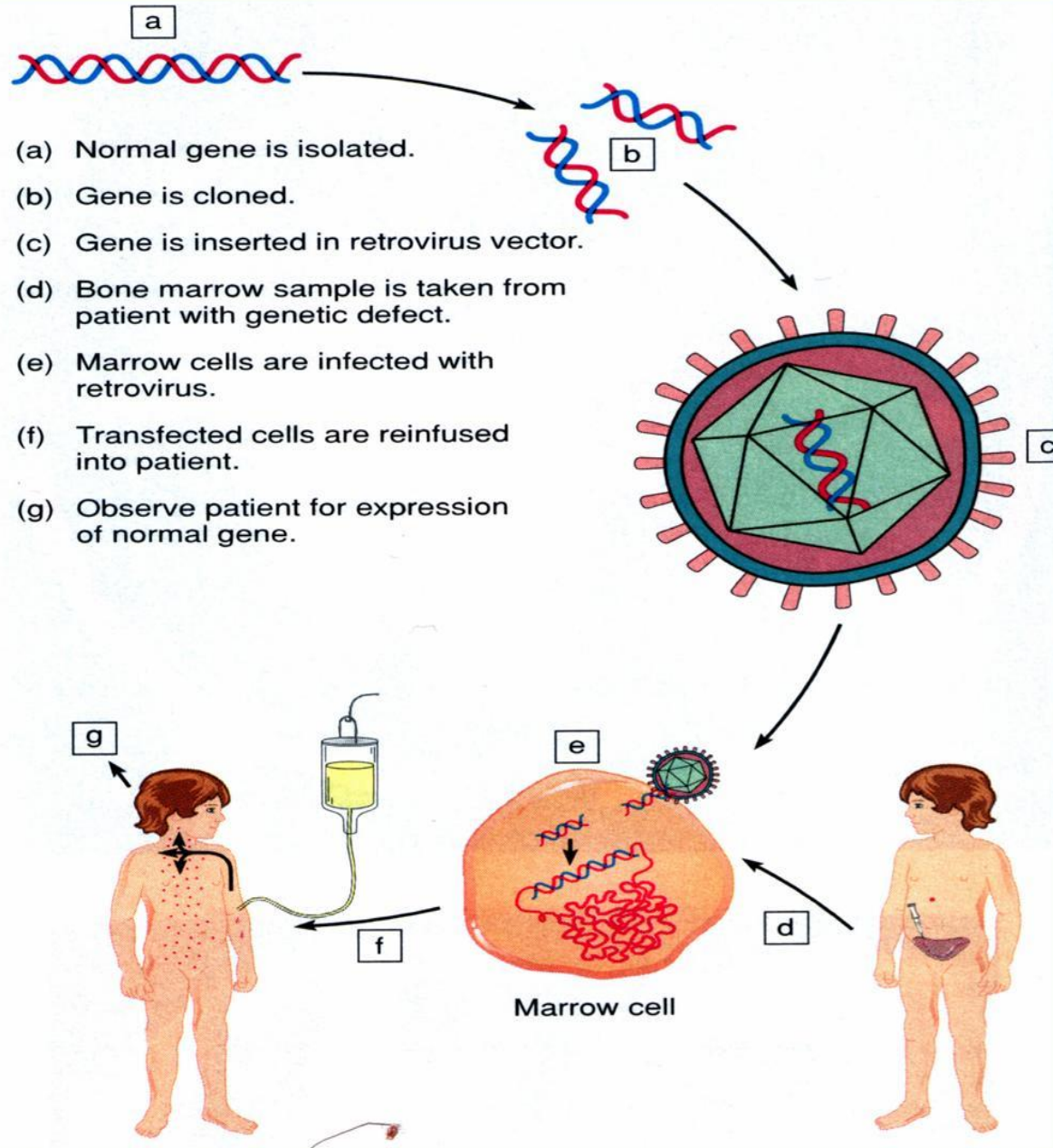
БИОТЕХНОЛОГИЯ



БИОТЕХНОЛОГИЯ



ГЕНОТЕРАПИЯ



ГЕНЕТИКА ВИРУСОВ

Способы увеличения информации:

- ⊙ двухразовое считывание одной иРНК с других иницилирующих кодонов
- ⊙ сдвиг рамки трансляции
- ⊙ сплайсинг (вырезание интронов)
- ⊙ транскрипция с участков ДНК, что перекрываются

У вирусов могут быть:

- **Модификации** (изменение состава белков капсида, суперкапсида под влиянием клеток)
- **Мутации** (размер бляшек под агаровым покрытием, нейровирулентность для животных, чувствительность к действию химиотерапевтических агентов, ts-мутации – температурочувствительные – вирус теряет способность размножаться при повышенной температуре)
- **Рекомбинации**

ВИДЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕКОМБИНАЦИЙ У ВИРУСОВ

1. РЕКОМБИНАЦИИ:

- **междугенная** – обмен генами
- **внутригенная** – обмен частями генов

ВИДЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕКОМБИНАЦИЙ У ВИРУСОВ

- 2. Множественная реактивация:** вирусная инфекция вызывается путём заражения вирионами с повреждённым геномом, так как функцию этого гена выполняет вирус, у которого ген не повреждён. Потомство – неповреждённые вирусы.
- 3. Пересортировка генов:** между вирусами, имеющими сегментированные геномы (вирусы гриппа человека, уток, свиней, буньявирусы, аренавирусы, реовирусы). Гибридные формы называют реасортанты.

ВИДЫ РЕКОМБИНАЦИЙ У ВИРУСОВ

4. Гетерозиготность: одновременной репродукции нескольких вирионов, разных по наследственным свойствам, образуются вирионы, которые содержат геном одного из родитеских штаммов и часть генома другого вируса (диплоидные или полиплоидные вирусы). Такое объединение не наследуется, но разрешает дать потомство с разными свойствами.

Это вирусы гриппа, болезни Ньюкасл.

ВИДЫ РЕКОМБИНАЦИЙ У ВИРУСОВ

5. Транскапсидация: часть чужеродного генетического материала, заключённого всередину капсида другого вируса, способна переноситься в стабильной форме в чувствительные к основному вирусу клетки.

Аденовирусы человека не размножаются в клетках обезьян. Но при одновременном культивировании аденовирусов и вирусов SV-40 под одним капсидом образуется вирус, содержащий геномы обоих вирусов, способный размножаться в клетках обезьян.

ВИДЫ РЕКОМБИНАЦИЙ У ВИРУСОВ

6. Кросс-реактивация (спасение маркера): реактивация инактивированного генома неинактивированным.

ВИДЫ НЕГЕНЕТИЧЕСКОГО ВЗАЕМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСОВ

- 1. Фенотипическое смешивание**
- 2. Негенетическая реактивация**
- 3. Комплементация**
- 4. Стимуляция**
- 5. Интерференция**