



ЛЕКЦИЯ №5

**ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ: МУТАЦИИ
И РЕКОМБИНАЦИИ.**

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
ПАТОГЕННОСТИ БАКТЕРИЙ.**

БИОТЕХНОЛОГИЯ

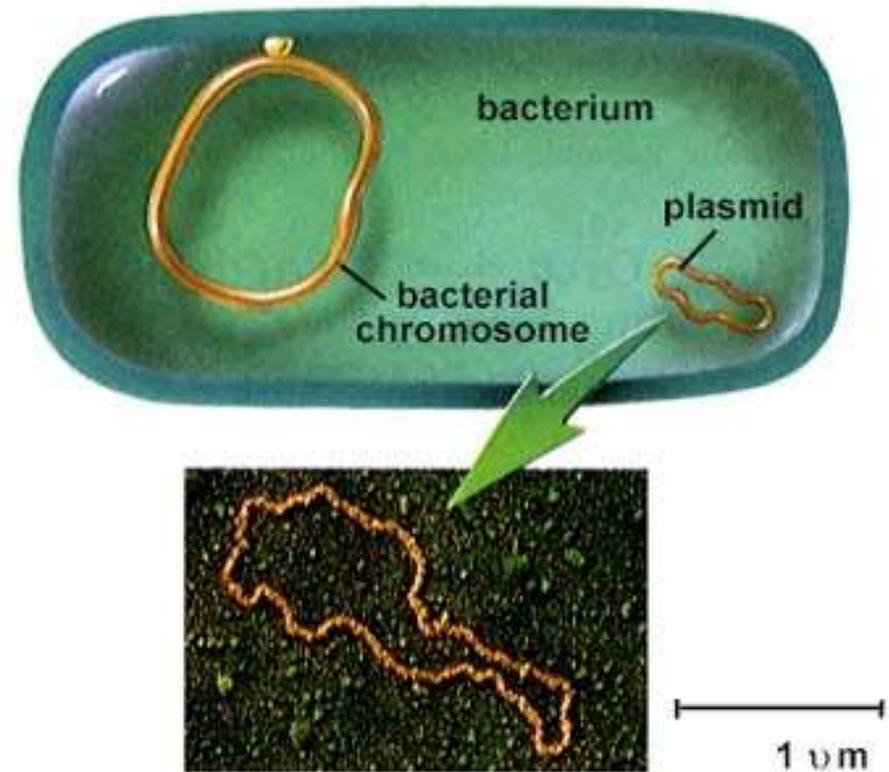
- **Генетика** – наука о наследственности и изменчивости живых организмов.

Генетика бактерий – относительно молодая отрасль микробиологии, первые работы по которой появились в начале 1940-х годов.



ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА БАКТЕРИЙ

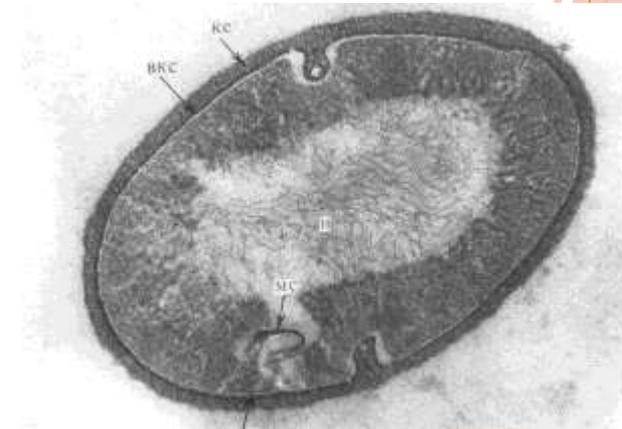
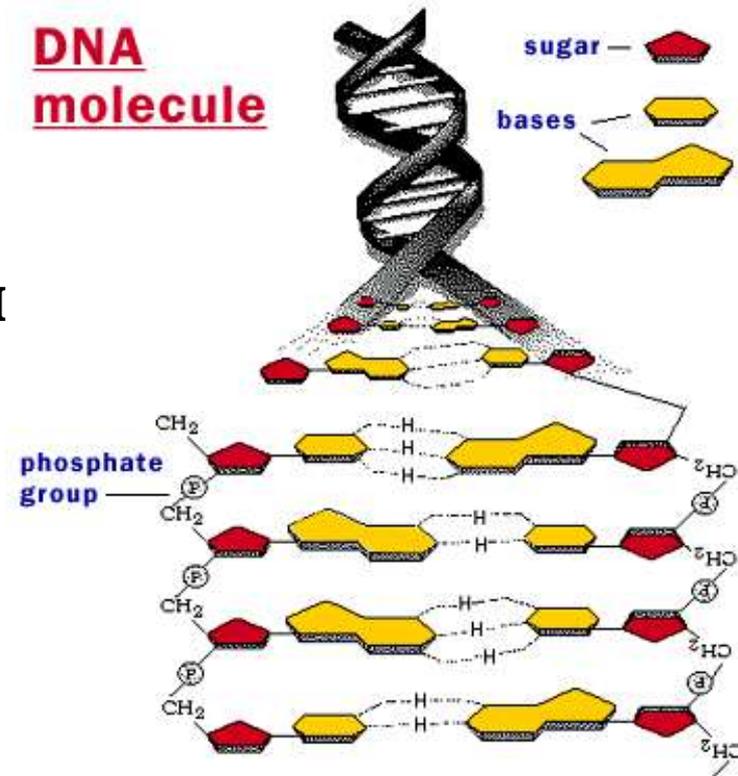
- Хромосомные элементы:
нуклеоид.
 - Нехромосомные элементы:
 - плазмиды,
 - вставочные последовательности;
 - транспозоны.
- *Не являются жизненно необходимыми.



- **Нуклеоид** – двунитевая молекула ДНК кольцевой формы.

- Бактериальная хромосома содержит до 4000 отдельных генов.

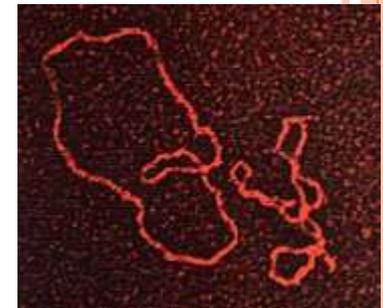
DNA molecule

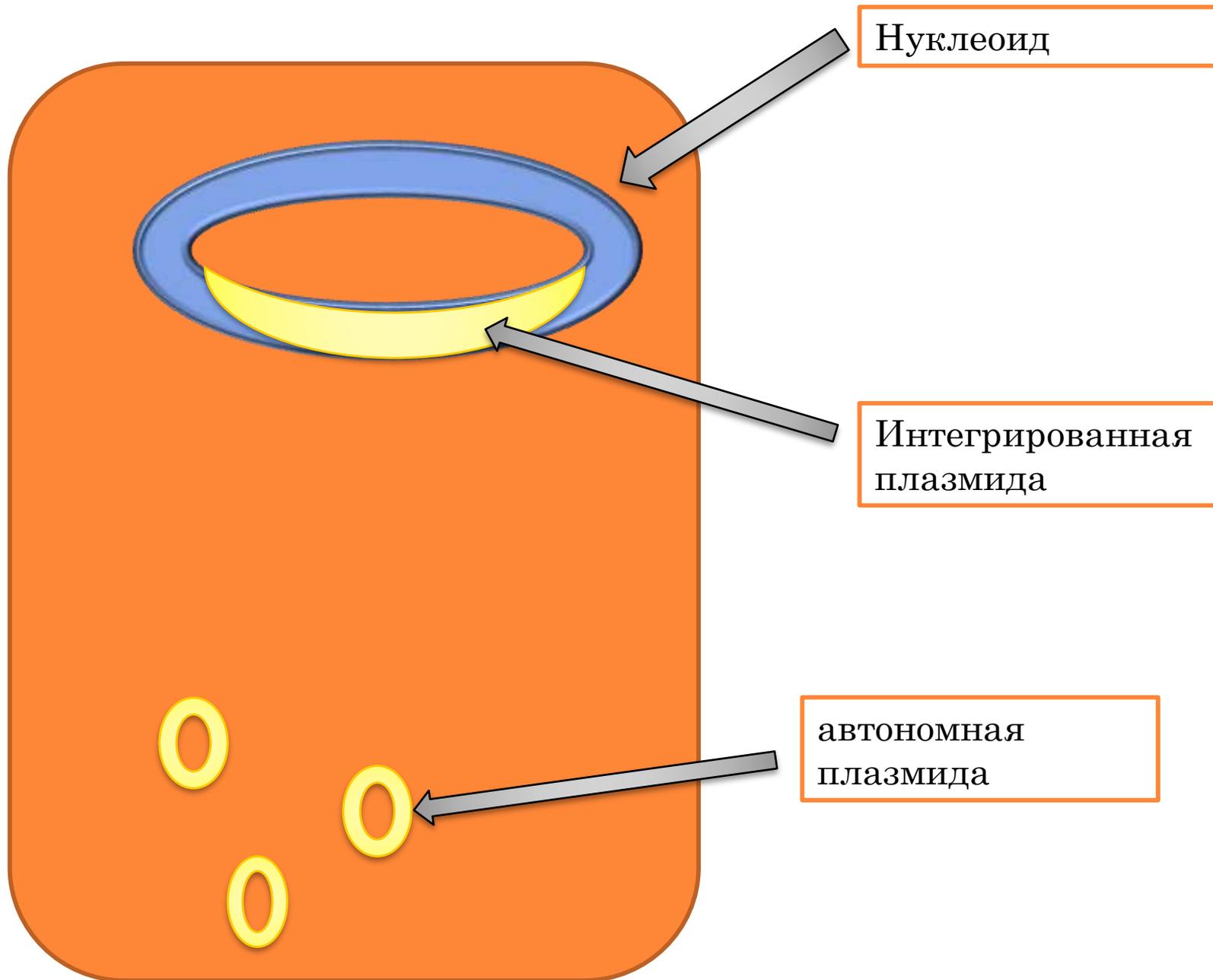


- **Плазмиды** - внехромосомные мобильные дополнительные генетические структуры бактерий, представляющие собой двухцепочечные молекулы ДНК.

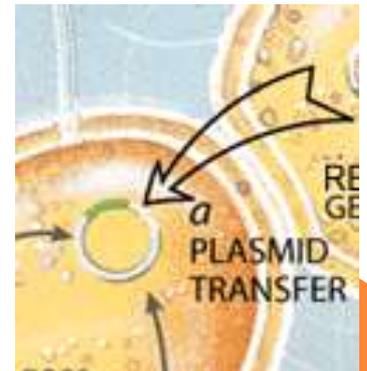
Они могут быть кольцевой формой и линейными.
Различают :

- **автономные плазмиды** копируются (реплицируются) самостоятельно и существуют в цитоплазме клетки.
- **интегрированные плазмиды** – встроенные в хромосому бактерии и реплицирующиеся вместе с ней.
- **Трансмиссивные** - (конъюгативные) способны переходить из одной бактерии в другую в процессе конъюгации и
- **Не трансмиссивные** плазмиды





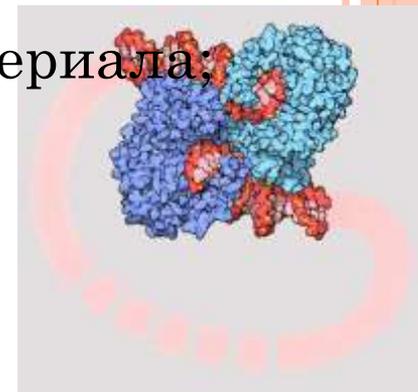
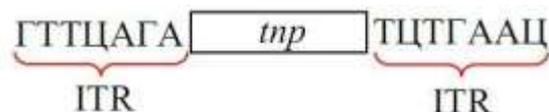
- Плазмиды кодируют не основные для жизнедеятельности бактериальной клетки функции, ***но придающие бактерии преимущества*** при попадании в неблагоприятные условия существования.



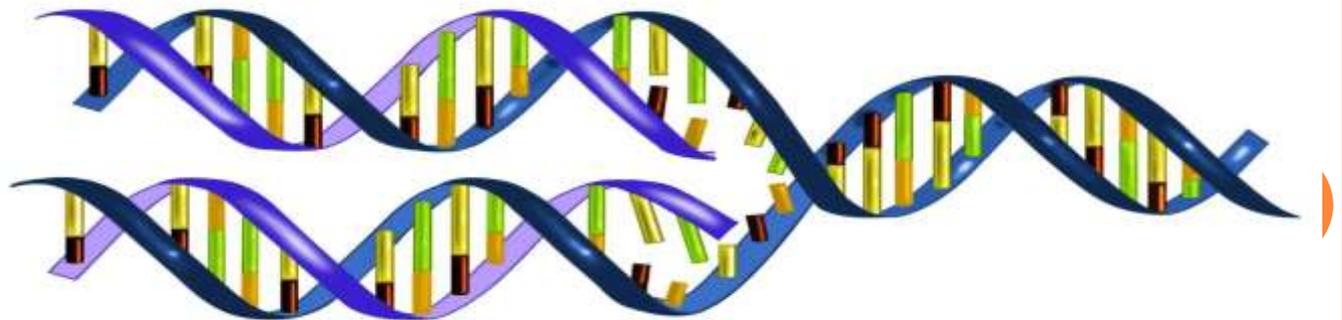
- **Фенотипические признаки, сообщаемые бактериальной клетке плазмидами.**
- • устойчивость к антибиотикам – **R-плазида**;
- • продукцию факторов патогенности **Ent-плазида**, **Hly-плазида**;
- • образование колицинов **Col- плазида**;
- способность бактерий к конъюгации и образование F-пилей – **F-плазида**.
- • расщепление сложных органических веществ;
- • образование ферментов рестрикции и модификации.
- • способность к синтезу антибиотических веществ



- Мигрирующие (подвижные) элементы
- **Вставочные (инсерционные) последовательности** - IS-элементы (от англ. insertion sequences) - это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного места в другое.
- **Транспозоны** – сложные перемещающиеся элементы. От IS-элементов они отличаются тем, что кроме генов, ответственных за передвижение, содержат структурные гены, отвечающие за проявление какого-либо фенотипа.
- **Перемещение подвижных генетических элементов по вызывает:**
 - инактивацию генов, регуляцию работы молчащих генов.
 - образование повреждений генетического материала;
 - встраивание плазмиды в хромосому;



- **Генотип** – совокупность регуляторных и структурных генов бактериальной клетки
- **Фенотип** - проявление закодированной в геноме бактерий совокупности морфологических признаков, физиологических функций и других свойств в конкретных условиях существования .



- Фенотипическая изменчивость - происходит под влиянием внешней среды
 - * адаптивная
 - * не наследуются.
- Генотипическая изменчивость – стойкое изменение свойств бактерий как результат изменения их генотипа.
 - * долговременная
 - * передается по наследству
 - * возникает вследствие мутаций или генетического обмена.



МУТАЦИИ



- По протяженности повреждений:
 - **точечные** – повреждения одной парой нуклеотидов,,
 - **протяженные** (абберации):
 - ◆ **хромосомные** – изменение двух и более участков хромосомы,
 - ◆ **генные** – изменение гена:
- *Делеции (выпадение нескольких пар нуклеотидов),
- *Транспозиции (перемещение группы нуклеотидов в пределах хромосомы),
- *Инсерция (разрыв путем вставки посторонней ДНК),
- *Дупликация (добавление нуклеотидных пар)



МУТАЦИИ

- **Спонтанные** мутации (1 на 10^6):
- **Индукцированные мутации.** Мутагены: физические, химические и биологические.
Новый фенотип проявляется только тогда, когда измененный ген начнет функционировать.



- Генетический обмен у бактерий

процесс передачи генетического материала у бактерий (внутри вида или между разными видами).

Основные пути осуществления:

-трансформация

-трансдукция

-конъюгация

Конечным этапом генетического обмена –

Рекомбинация - процесс взаимодействия между молекулами ДНК, приводящий к формированию новой рекомбинантной молекулы, несущей признаки от бактерии-донора и от бактерии-реципиента.



Трансформация

Передача генетического материала между бактериями при помощи свободных фрагментов ДНК.

Впервые была воспроизведена Ф.Гриффитсом в 1928 г.

Практическая значимость – основной метод генной инженерии

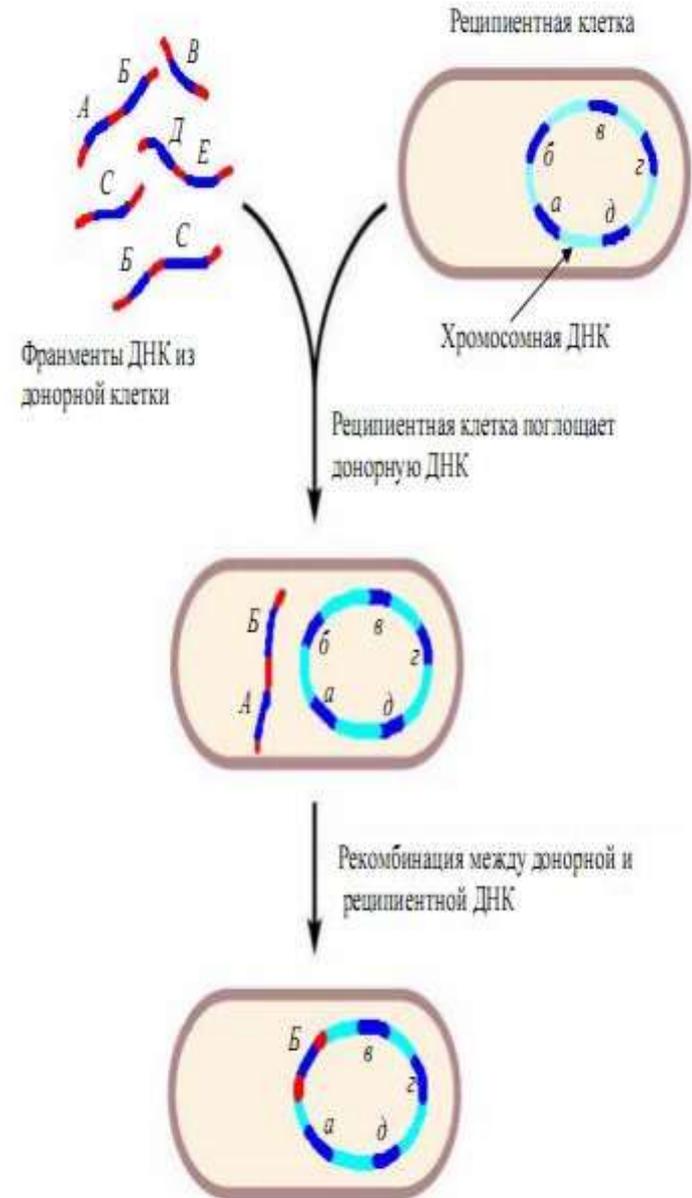


- Условия, необходимые для успешной трансформации:
- ДНК донора должна быть выделена из бактериальной культуры того же вида, что и реципиент(или близкородственного)
- Участок трансформирующей ДНК должен сохранять двунитчатую суперспирализацию
- Концентрация ДНК должна быть оптимальной
- Клетки-реципиенты должны быть компетентными, т.е. способными адсорбировать на своей поверхности ДНК донора и поглощать ее



Стадии трансформации

1. Адсорбция ДНК-донора на клетке-реципиенте
2. Проникновение ДНК внутрь клетки-реципиента
3. Соединение ДНК с гомологичным участком хромосомы реципиента с последующей рекомбинацией



Трансдукция

процесс переноса генетического материала от бактерии-донора к бактерии-реципиенту с помощью бактериофага

Специфическая - локализованная

Неспецифическая – общая

Абортивная – несостоявшаяся

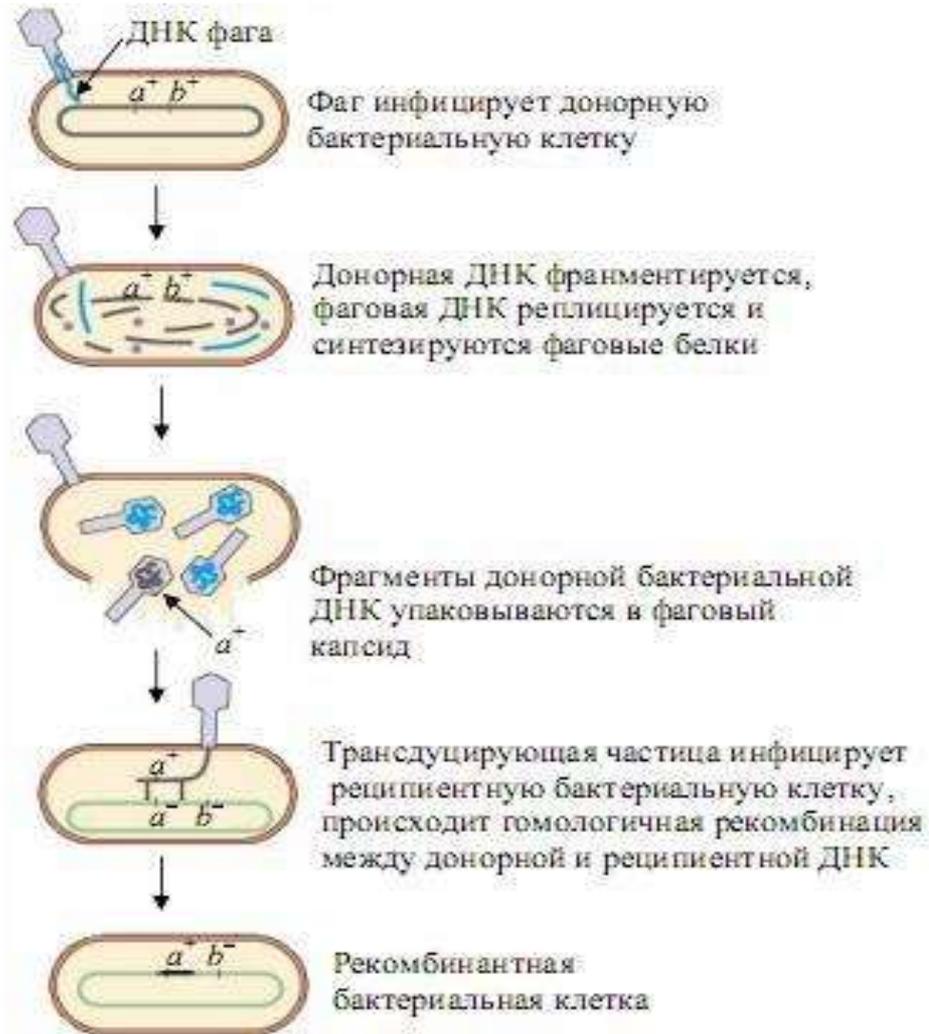
Биологическая значимость – перенос генов токсигенности



Неспецифическая трансдукция

- **Основные этапы**
- Адгезия вирулентного фага на поверхности бактерии-донора с последующим проникновением
- *Размножение* бактериофага внутри клетки
- Самосборка фаговых частиц и *образование дефектного бактериофага* (сохраняет инфекционные свойства и содержит какой-либо фрагмент ДНК бактерии донора)
- *Перенос* дефектным бактериофагом включенной ДНК в клетку-реципиент
- *Рекомбинация* и включение перенесенной ДНК в клетку-реципиент

Неспецифическая трансдукция

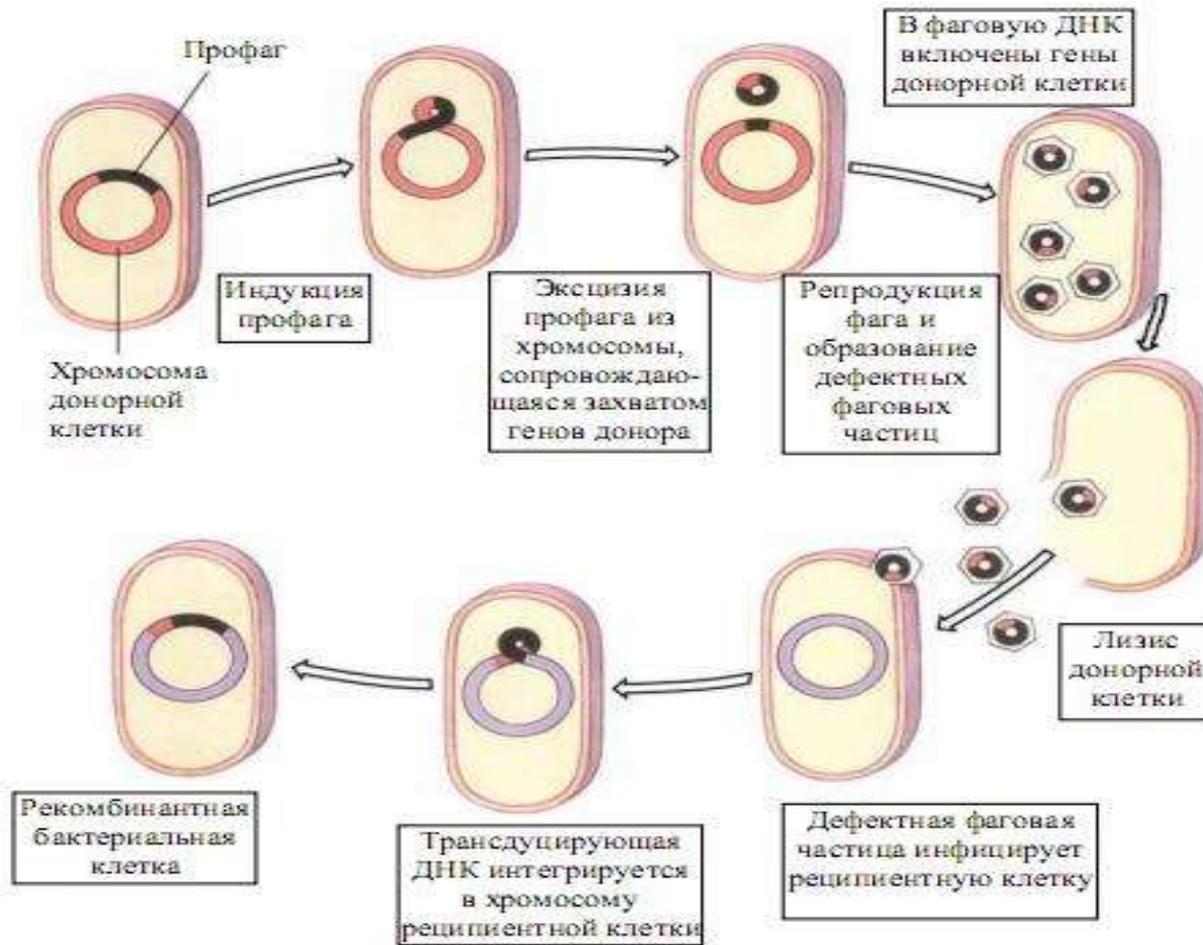


Специфическая трансдукция

- **Основные этапы**
 - *Интеграция ДНК умеренного бактериофага в определенный участок хромосомы клетки-донора*
 - *Захват соседних бактериальных генов при выходе из хромосомы*
 - *Формирование дефектного бактериофага*
 - *Перенос захваченного фрагмента ДНК донора в клетку-реципиент*
 - *Включение его в геном клетки-реципиента посредством рекомбинации*



○ Специфическая трансдукция

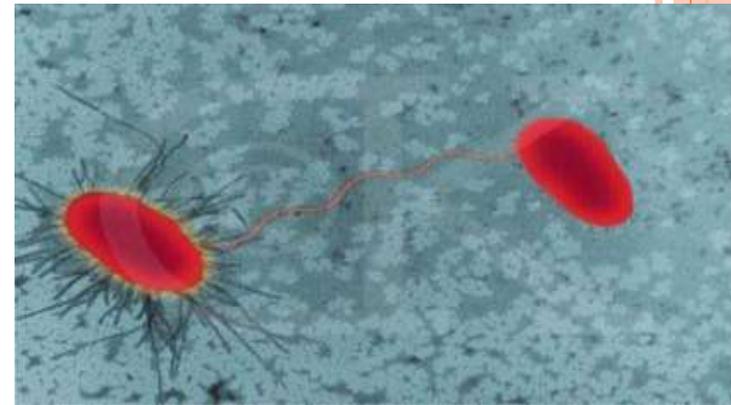


Абортивная трансдукция.

- ДНК донора не встраивается в хромосому реципиента, а остается в цитоплазме и там самостоятельно функционирует.
- Передается одной из дочерних клеток и затем теряется в потомстве.



КОНЪЮГАЦИЯ



форма обмена генетическим материалом между бактериями при их непосредственном клеточном контакте.

Необходимое условие : наличие в клетке-доноре трансмиссивной плазмиды.

Процесс конъюгации у бактерий впервые был обнаружен Джошуа Ледербергом и Эдвардом Тейтумом в 1946 г.

Биологическая значимость – распространение резистентности бактерий к антибиотикам



Клетка-донор содержит плазмиду.

Типы доноров:

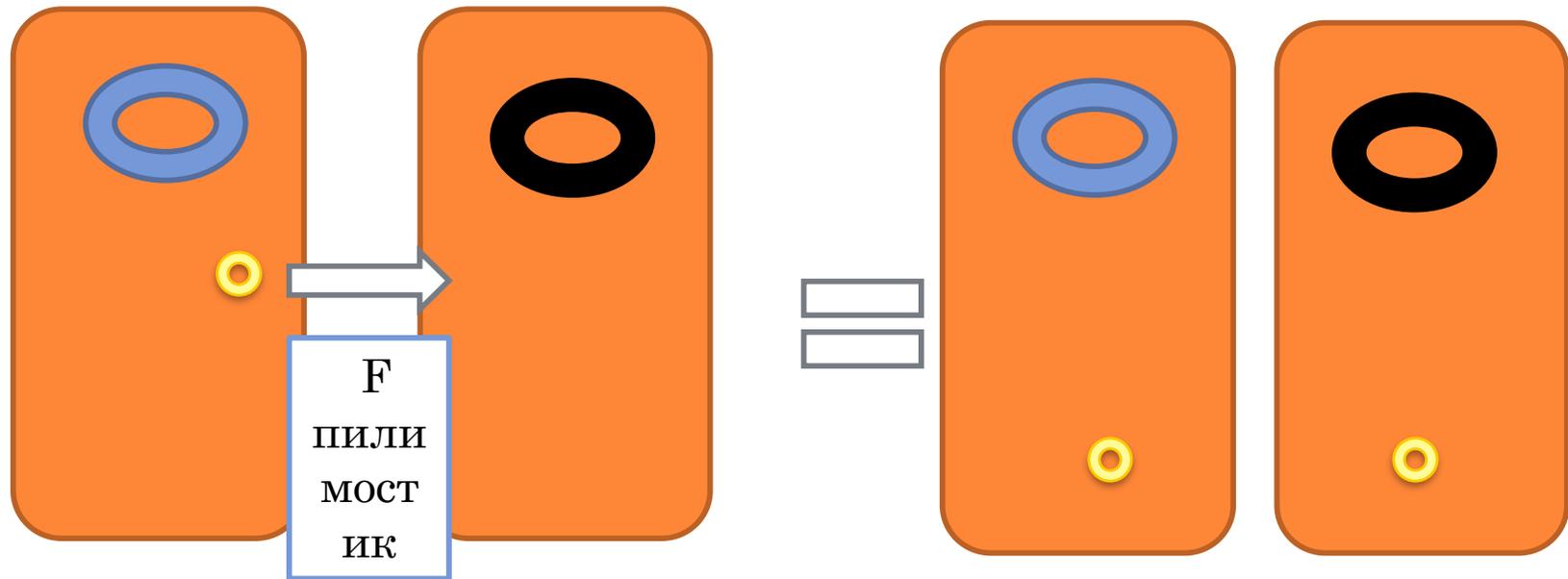
- **F⁺-клетки** - автономная плазида (в цитоплазме)
- **Hfr-клетки** – интегрированная плазида (в бактериальной хромосоме)
- **F' –донор** - выщепляясь из бактериальной хромосомы, плазмиды могут захватывать часть бактериальных генов и становиться автономными (**F'-плазида**)

Реципиенты: F⁻ клетки(не содержат F-плазмиду)



Донор F+

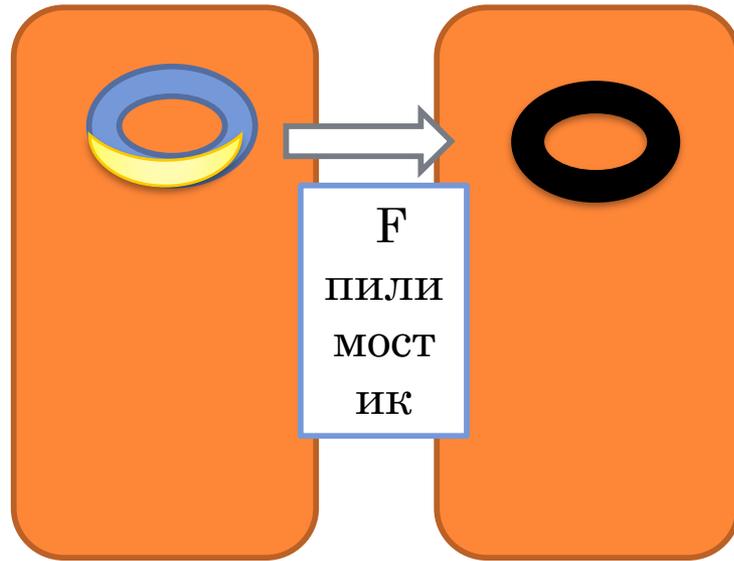
Реципиент F-



1. Скращивание F^+ x F^- : передается только F-плазмида, при этом F^- клетка становится F^+ -клеткой, приобретая плазмиду и свойства донора. Хромосомные гены не передаются.

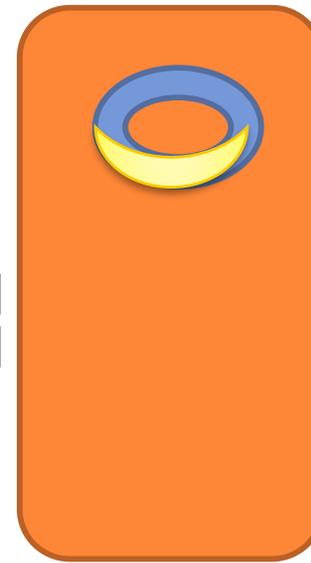
Донор HFR

Реципиент F-



HFR

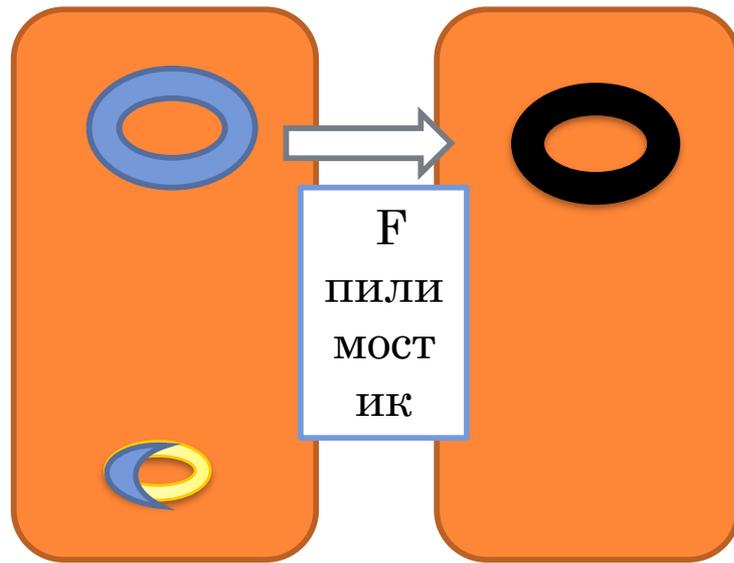
F-
рекомбинант



2. Скрещивание Hfr x F⁻ : Для проникновения всей хромосомной нити требуется много времени в клетку успевают проникнуть только гены хромосомы донора. Поэтому клетки-реципиенты не становятся донорами

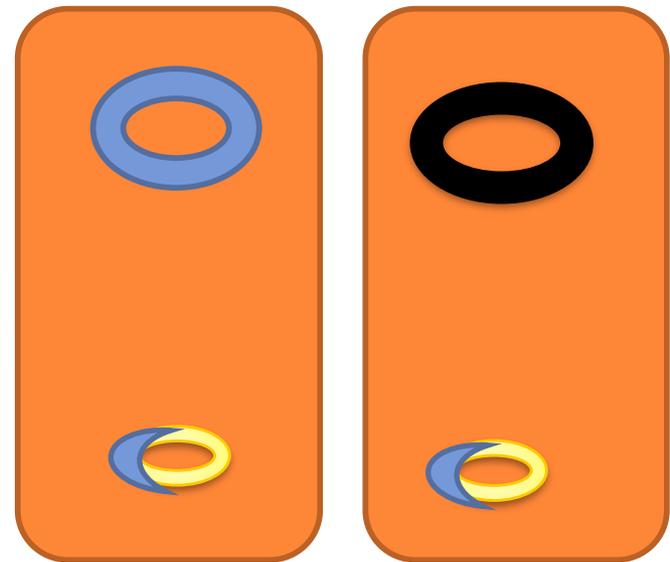
Донор F'

Реципиент F^-



F^+

F^+
рекомбинант



3. Скрещивание F' x F^- : (есть

рекомбинанты) происходит аналогично скрещиванию F^+ x F^- и реципиентная клетка превращается в донорную

Генетические основы патогенности

Патогенность – потенциальная способность микроорганизма вызывать инфекционный процесс

Гены, кодирующие факторы патогенности находятся в хромосоме, плаزمидах, транспозонах – «**острова патогенности**» (крупные участки), «**островки патогенности**» (мелкие участки)

- возможна передача в результате генетического обмена

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Под *молекулярно-генетическими методами* диагностики инфекционных заболеваний следует понимать методы, позволяющие обнаруживать ДНК или РНК возбудителя в исследуемом материале.

К таким методам относятся молекулярная гибридизация и полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR).

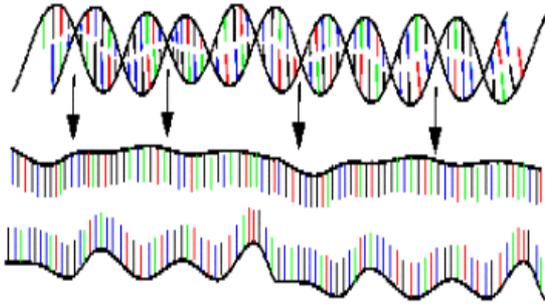
ПРИМЕНЕНИЕ

1. Диагностика инфекционных заболеваний.
 2. Диагностика наследственных заболеваний и предрасположенностей.
 3. Установление отцовства.
 4. Судебная медицина.
 5. Определение уровня экспрессии генов
 6. Как один из этапов - в методах чтения последовательностей, геной инженерии и синтетической биологии.
- 

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

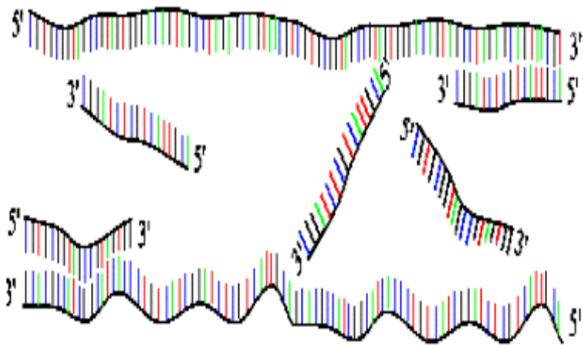
- Метод, позволяющий провести многократное увеличение количества определенных молекул ДНК в анализируемом образце.
- Метод обладает крайне высокой чувствительностью (позволяет засечь и размножить единичные молекулы ДНК).



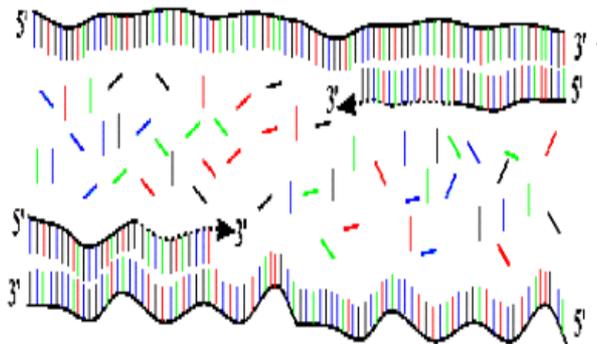


Этап 1: Денатурация
1 минута 94°C

- **Праймеры** (олигонуклеотиды) – короткие цепочки ДНК с нуклеотидной последовательностью, комплиментарной концам каждой из двух цепей определяемой ДНК..



Этап 2: Отжиг праймеров
45 секунд 54°C

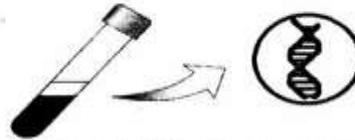


Этап 3: Синтез цепи ДНК



Стадии метода ПЦР

1. Выделение ДНК

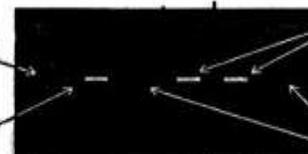


2. Амплификация



3. Детекция в агарозном геле

отрицательный контроль
положительный контроль

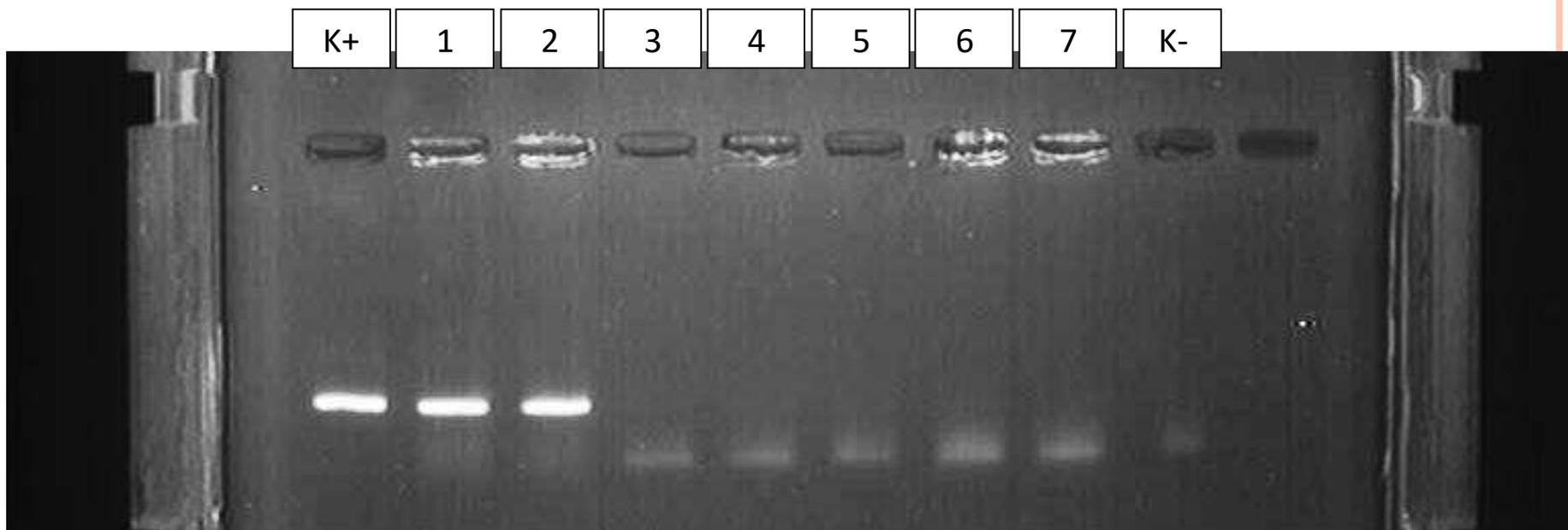


положительные образцы

отрицательные образцы

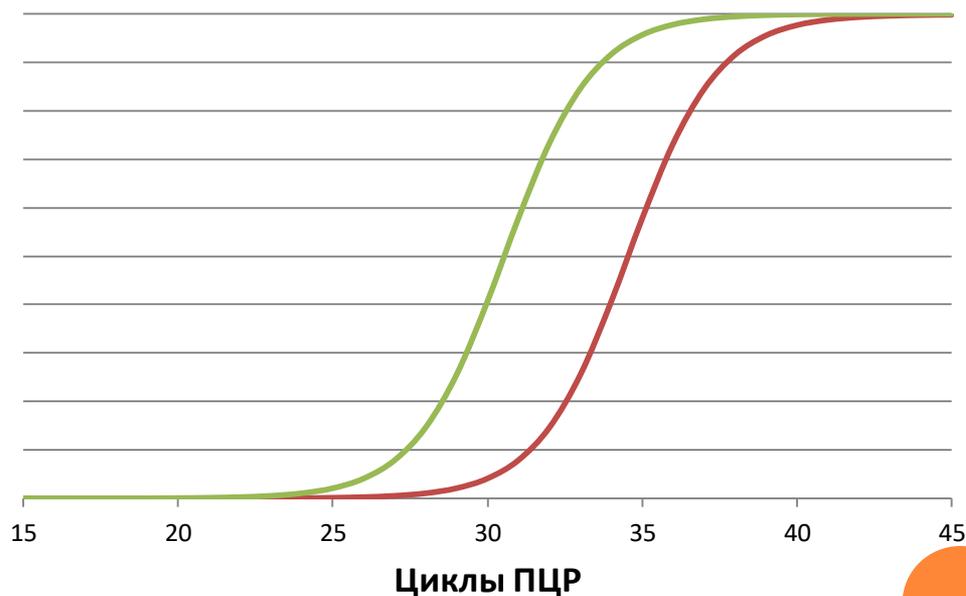


ПРИМЕР ВЫЯВЛЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТА ПЦР



- K+ – положительный контроль (заведомо присутствует искомая ДНК).
- 1-7 – исследуемые образцы (из них 1-2 – положительные, 3-7 – отрицательные).
- K- – отрицательный контроль (заведомо отсутствует искомая ДНК).

- ПЦР в режиме реального времени (real-time PCR, мониторинговая ПЦР, ПЦР-РВ) – это метод, при котором этапы амплификации ДНК мишени и детекция образующихся продуктов происходят одновременно в одной пробирке.
- количественную оценку содержания ДНК



- Генетическая (генная) инженерия,
- это конструирование *in vitro*
функционально активных
генетических структур
(рекомбинантных ДНК), или,
иначе, -со





**СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ!**