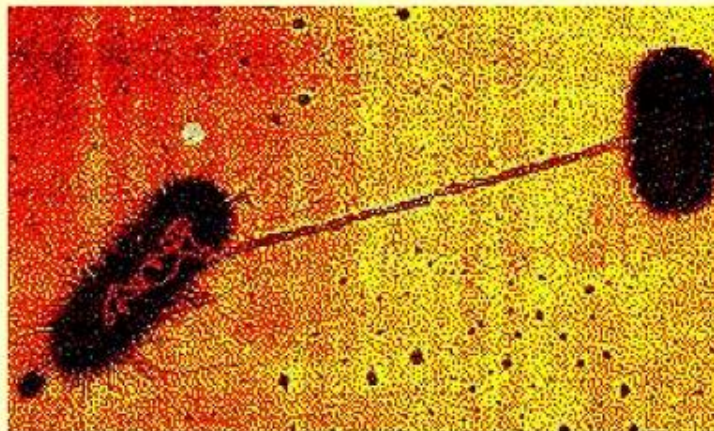
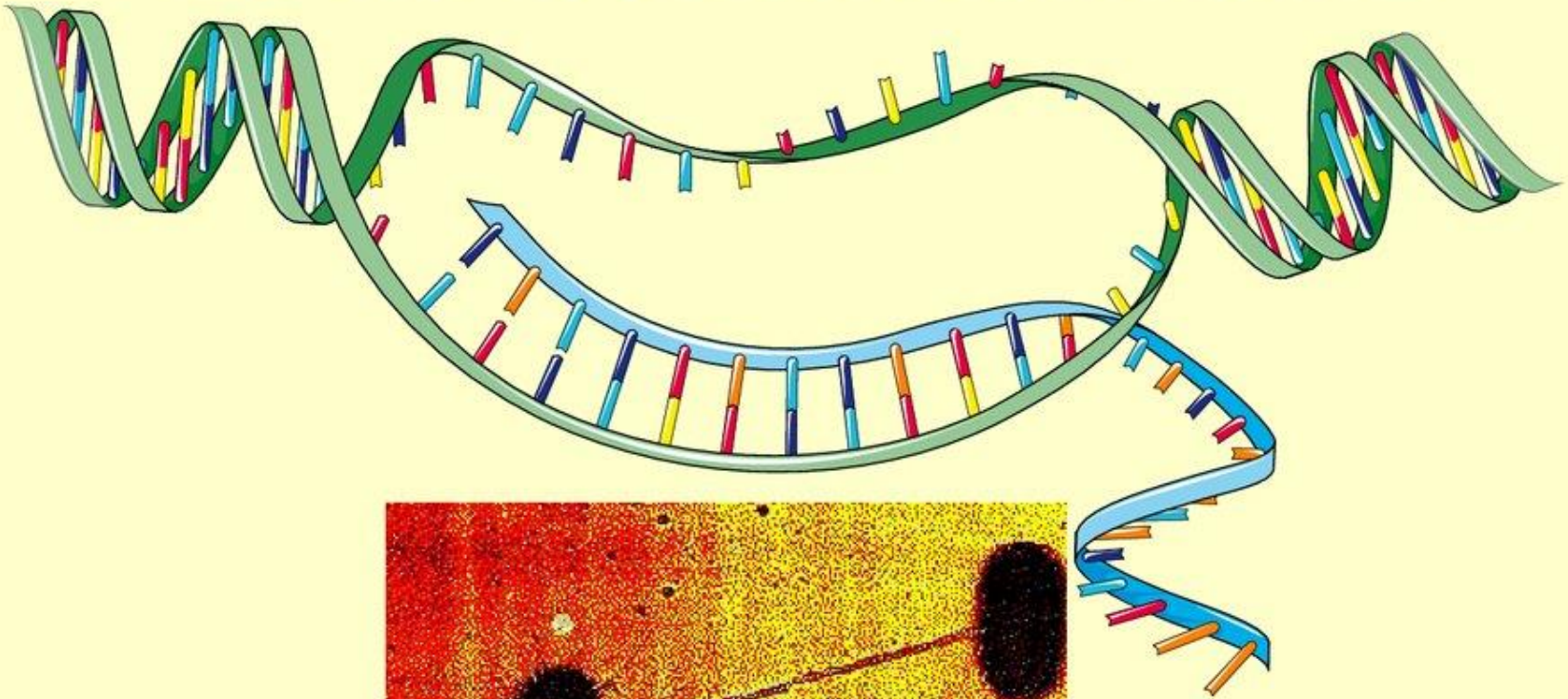


ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ



- Генетика – наука о наследственности и изменчивости живых организмов. В отличие от классической генетики, генетика бактерий – относительно молодая отрасль микробиологии, первые работы по которой появились в начале 1940-х годов.

- ***Генетический материал бактерий*** представлен 1 хромосомой. Это циркулярно замкнутая суперспирализованная нить ДНК, содержащая от 1 до 5 тыс генов, необходимых для поддержания жизнедеятельности и размножения бактерий, т.е. бактериальная клетка гаплоидна, а удвоение хромосомы всегда сопровождается её делением.

Организация генетического аппарата бактерий

1. Хромосомные элементы (двунитчатая кольцевая ДНК).
2. Внехромосомные элементы (плазмиды).
3. Мигрирующие элементы (IS-последовательности, транспозоны)

- **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 – это фрагменты ДНК, несущие от 40 до 50 генов, которые выполняют регуляторные и кодирующие функции. Свойства плазмид:

- Являются самостоятельными репликаонами
- Кодировать нежизненно важные функции, но являются самостоятельными органами адаптации к окружающей среде
- Формируют различные фенотипические признаки
- В клетке может находиться от 1 до нескольких плазмид, но их может не быть вообще
- Способны к трансмиссии

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 образованию F-пилей – F-плазида.
- расщепление сложных органических веществ;
- образование ферментов рестрикции и модификации.
- способность к синтезу антибиотических веществ

- Мигрирующие элементы
- *Вставочные (инсерционные) последовательности* - IS-элементы (от англ. insertion sequences) - это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного места в другое.
- Вставочные последовательности (IS-элементы) являются наиболее простым типом мигрирующих элементов, содержат от 800 до 1500 пар оснований. Они способны перемещаться как целое из одного участка локализации в другой и содержат только гены, необходимые для собственного перемещения.

- Транспозоны (Tn) включают от 2 до 25 тыс пар нуклеотидов, содержат фрагмент ДНК, несущий специфические гены и две вставочные последовательности. Транспозоны способны перемещаться. Но могут быть в свободном состоянии в виде кольцевой молекулы. Не способны самостоятельно реплицироваться, реплицируются только в составе хромосомы или плазмиды. Могут встраиваться в геном бактериофага.

Функции транспозонов и вставочных последовательностей:

- Координация взаимодействия плазмид, умеренных фагов между собой и бактериальной хромосомой.
- Регуляторные функции: включение и выключение генов при встраивании в хромосому.
- Способны вызывать мутации.

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

- Фенотипическая изменчивость- происходит под влиянием внешней среды, является адаптивной и не наследуются т.е. исчезают вскоре после прекращения действия вызвавшего его фактора.
- Генотипическая изменчивость – стойкое изменение свойств бактерий как результат изменения их генотипа. Эта форма изменчивости передается по наследству и является долговременной. Она может возникнуть вследствие мутаций или генетического обмена.

Мутации

- Спонтанные – это мутации, возникающие в популяции бактерий без экспериментального вмешательства.
- Индукцированные возникают при воздействии тех или иных факторов – мутагенных агентов (мутагенов- химические, физические, биологические агенты).

- По степени изменения генетической структуры различают следующие типы мутаций:
- *точечные* мутации, когда повреждение ограничивается одной парой нуклеотидов и
- *хромосомные* – крупные перестройки в отдельных фрагментах ДНК. Хромосомные мутации могут быть следующих типов: *делеция, дупликация, инверсия и транслокация.*

- Генетический обмен у бактерий

процесс передачи генетического материала у бактерий.

Основные пути осуществления:

-трансформация

-трансдукция

-конъюгация

Конечным этапом генетического обмена, который может быть как внутривидовым, так и межвидовым, является **рекомбинация**.

Рекомбинация

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

Трансформация

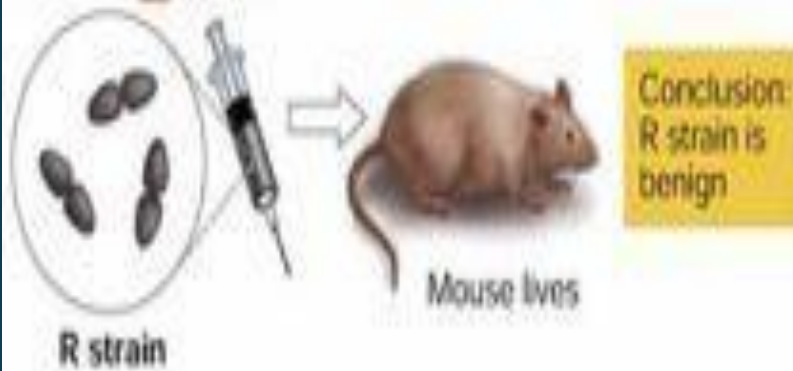
Передача генетического материала между бактериями при помощи фрагментов ДНК.

Впервые была воспроизведена Ф.Гриффитсом в 1928 г.

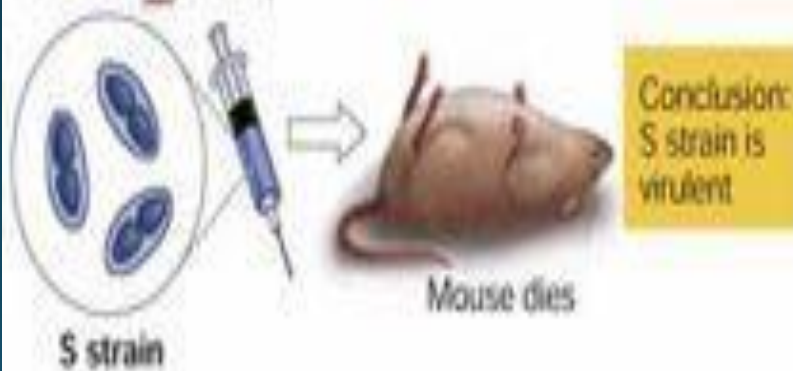
Он одновременно вводил в брюшную полость белых мышей авирулентные бескапсульные штаммы пневмококка и убитые капсульные варианты этих бактерий, в результате авирулентные штаммы приобрели вирулентность

Griffith's Streptococcus experiment

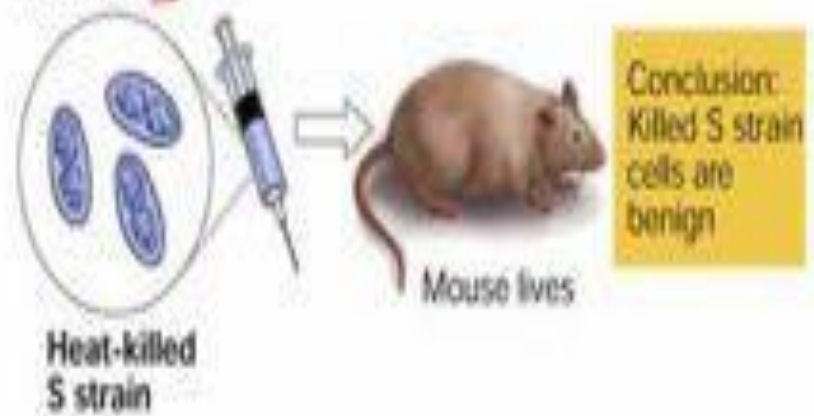
Treatment 1 (control)



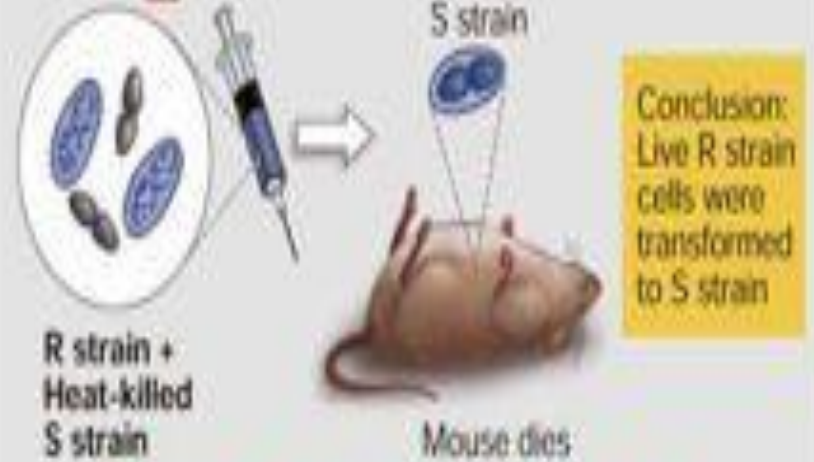
Treatment 2 (control)



Treatment 3



Treatment 4



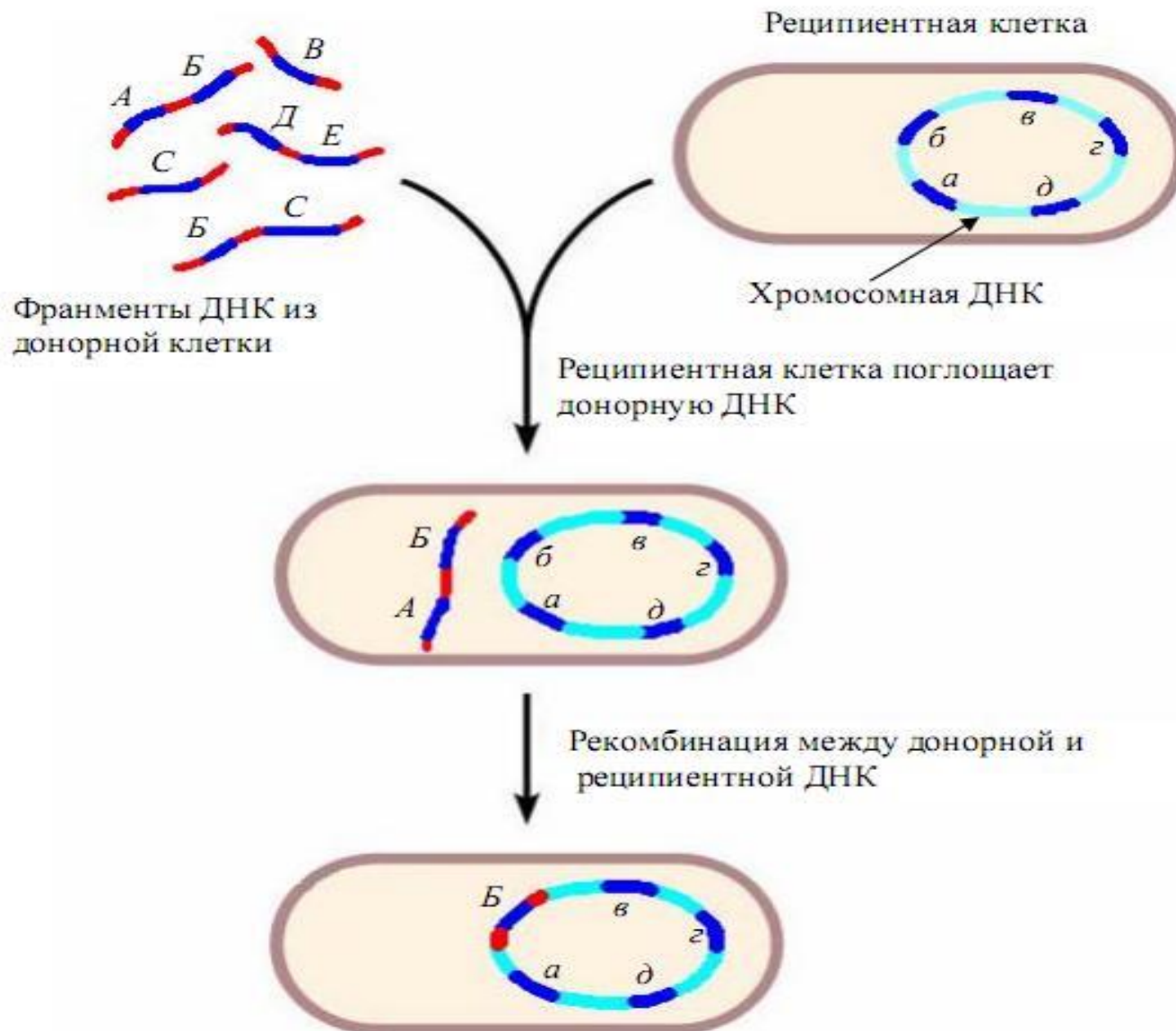
Transformation: R cells absorb genetic material of S cells

Условия, необходимые для успешной трансформации:

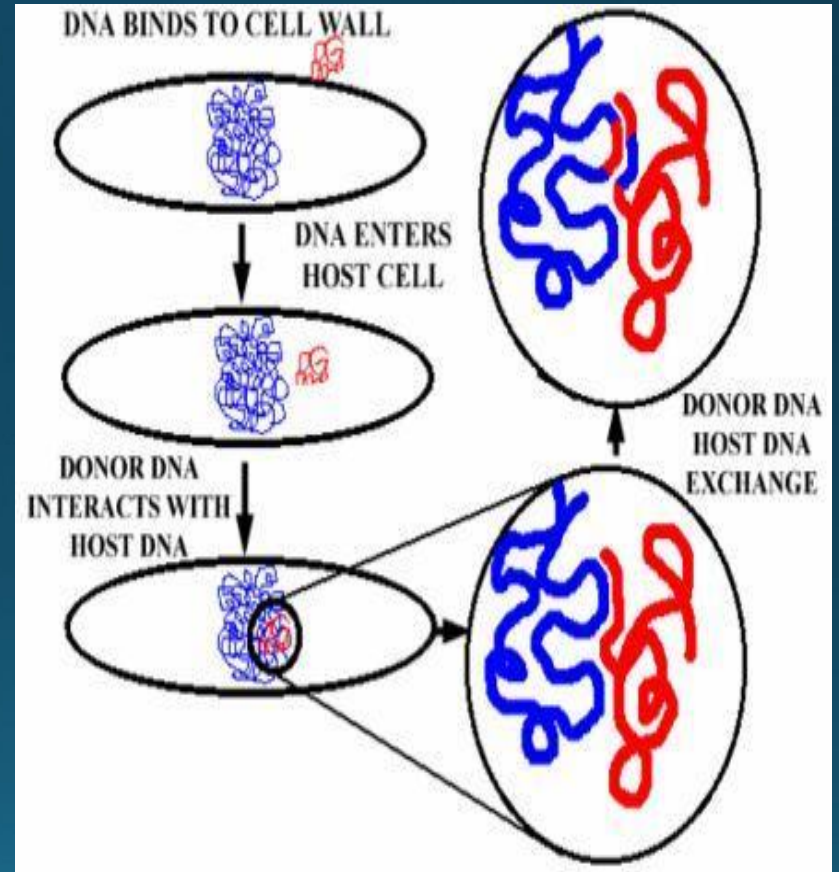
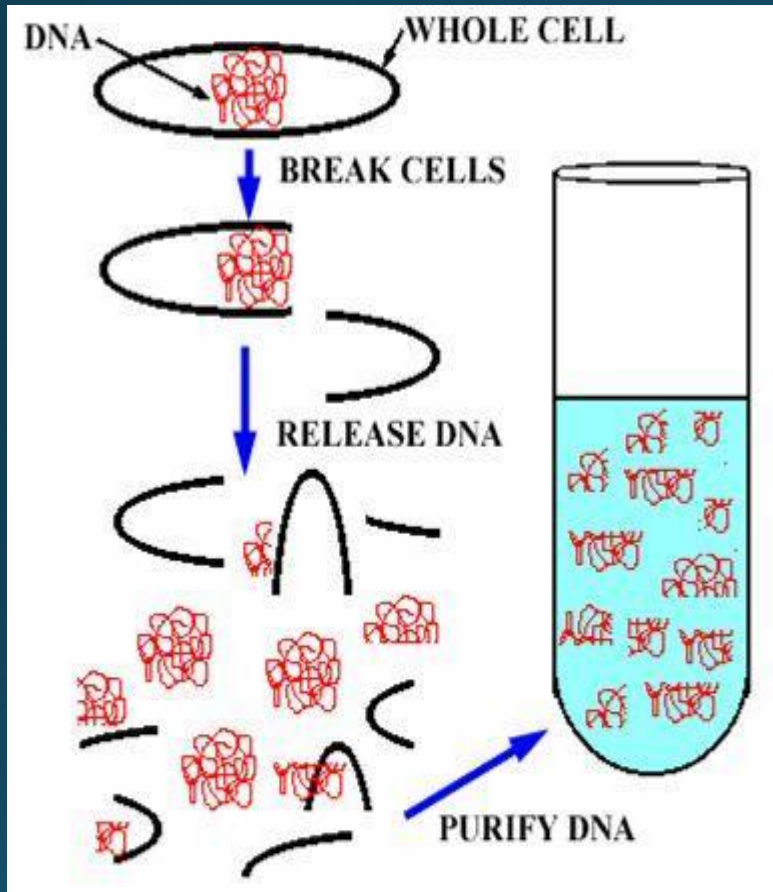
- ДНК донора должна быть выделена из бактериальной культуры того же вида, что и реципиент(или близкородственного)
- Участок трансформирующей ДНК должен сохранять двунитчатую суперспирализацию
- Концентрация ДНК не должна быть малой или избыточной, в обоих случаях количество рекомбинантов снижается
- 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



Механизм трансформации



Трансдукция

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

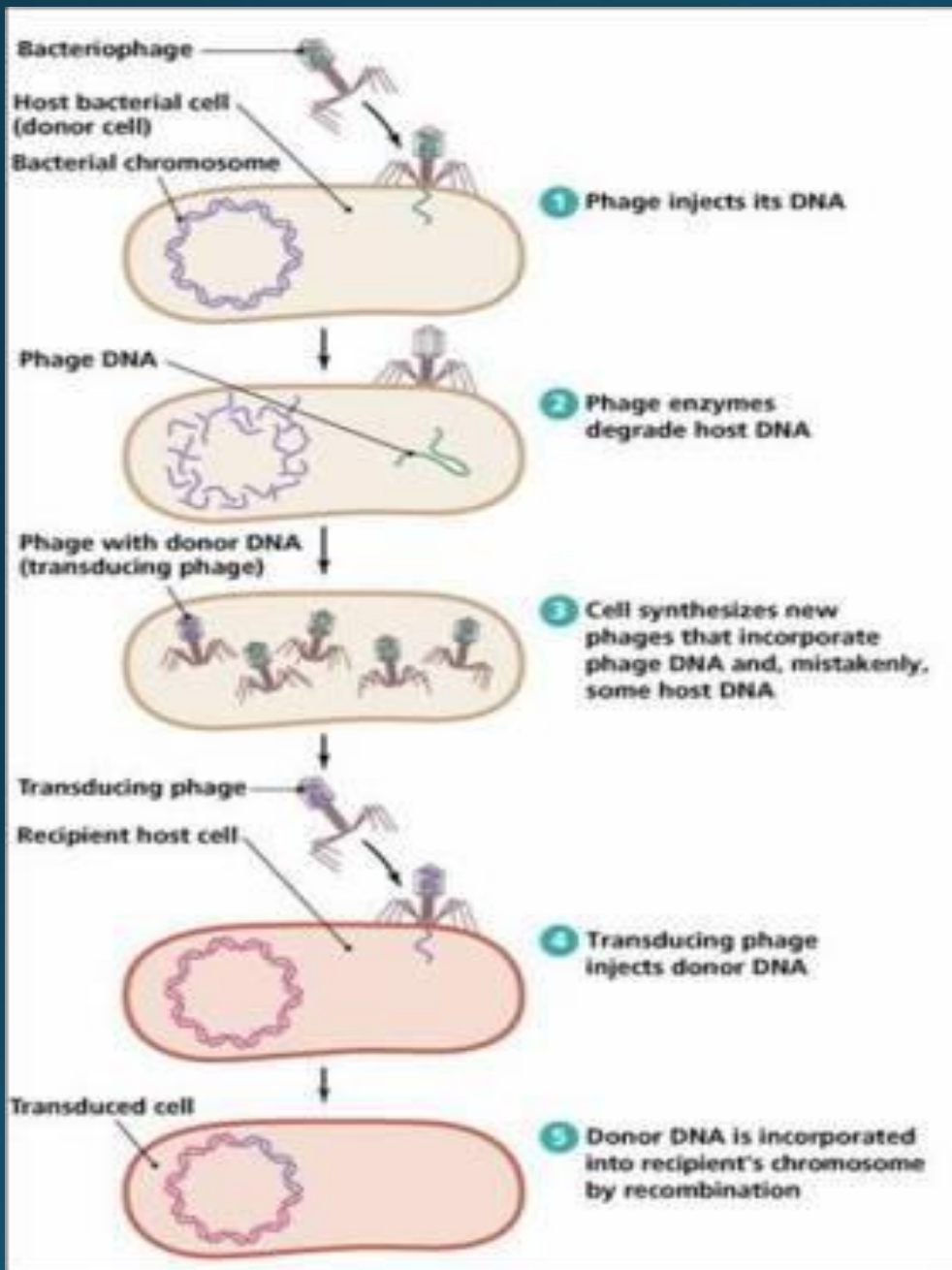
Была открыта в 1951 г. Циндером и Ледербергом.

Специфическая - локализованная

Неспецифическая – общая

Абортивная – не состоявшаяся

Неспецифическая трансдукция:



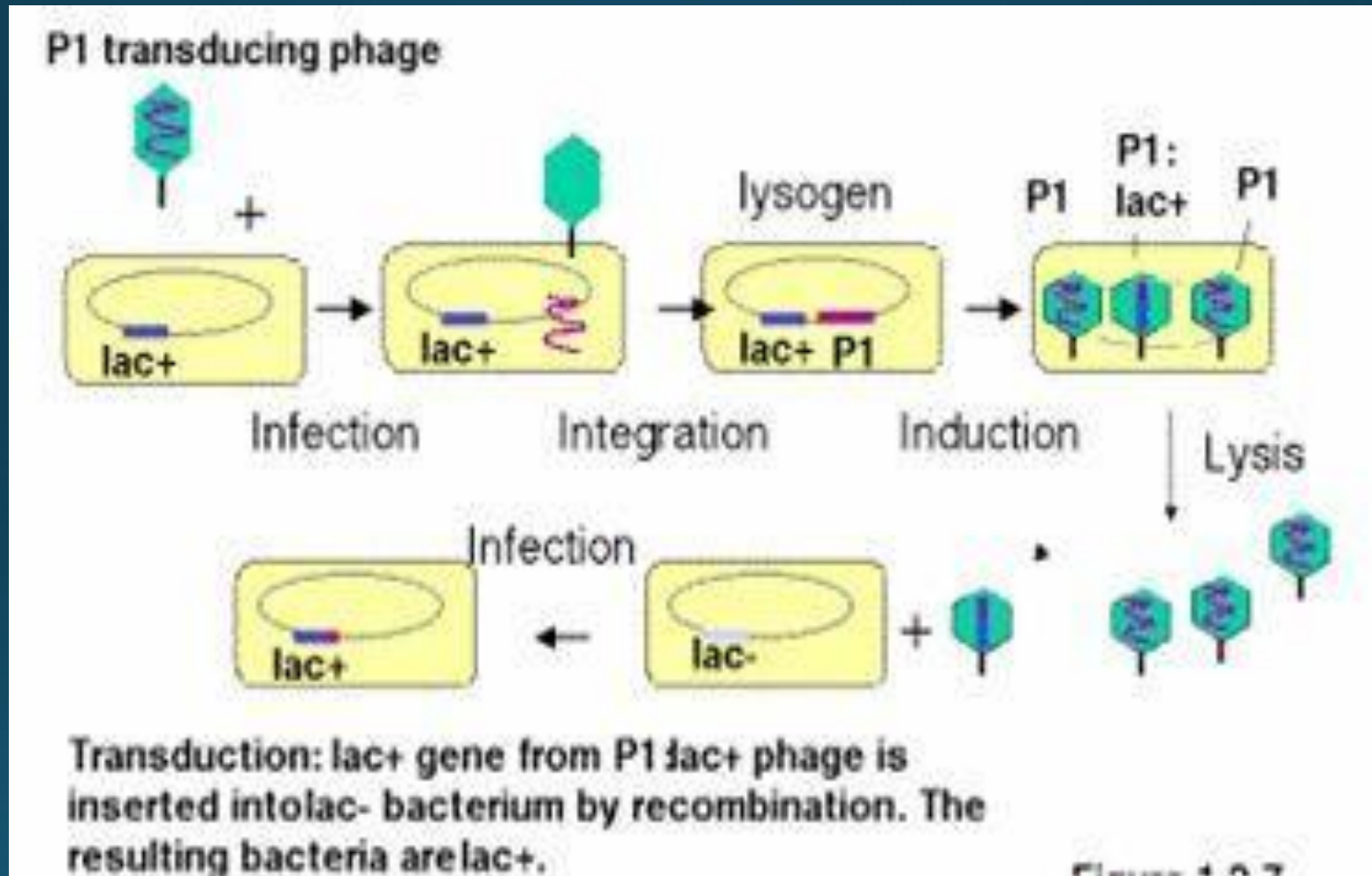
- бактериофаг переносит любые гены донора;
- неспецифическую трансдукцию осуществляют вирулентные фаги;
- включение ДНК клетки-реципиента (фиолетовая) при сборке фага носит случайный характер

Основные этапы:

- *Адгезия* 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, а следовательно, изменение ее свойств

Специфическая трансдукция

фаг переносит определенные гены от бактерии-донора к бактерии-реципиенту

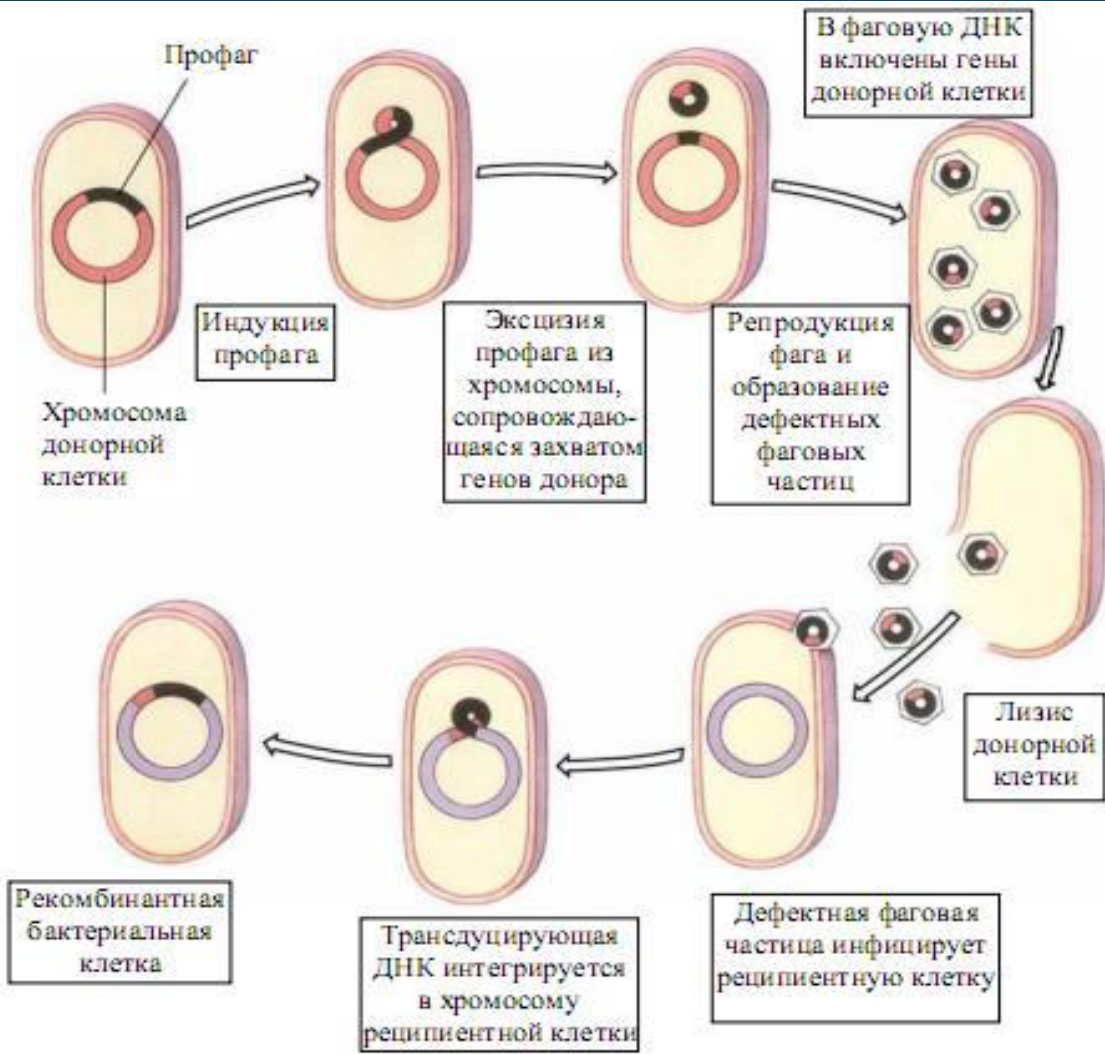


Перенос гена *lac+* с помощью фага P1

Основные этапы:

- *Интеграция ДНК умеренного бактериофага в определенный участок хромосомы клетки-донора*
- *Захват соседних бактериальных генов (например, «gal» или «bio») при выходе из хромосомы*
- *Формирование дефектного бактериофага (потерян фрагмент собственной ДНК фага, но захвачен фрагмент ДНК донора)*
- *Перенос захваченного фрагмента ДНК донора в клетку-реципиент*
- *Включение его в геном клетки-реципиента посредством рекомбинации*

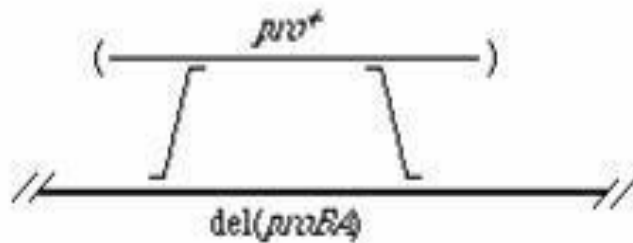
- Специфическая трансдукция



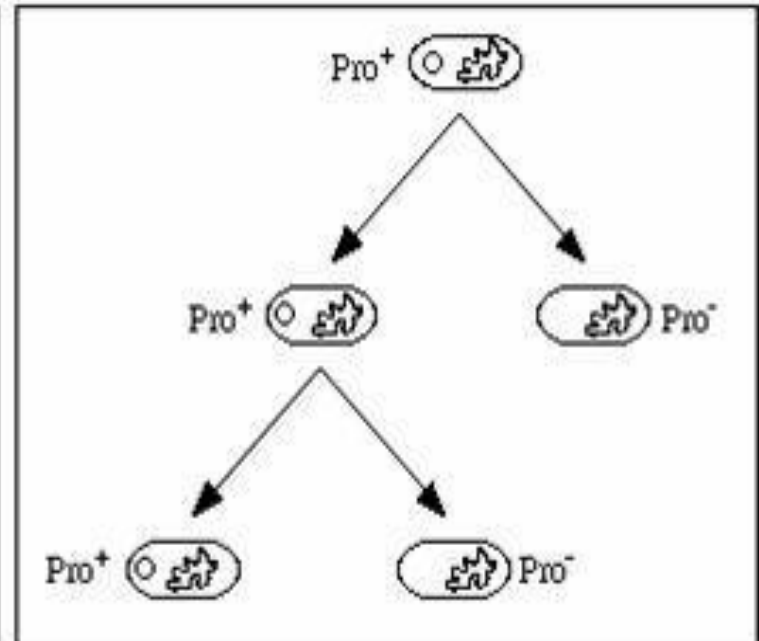
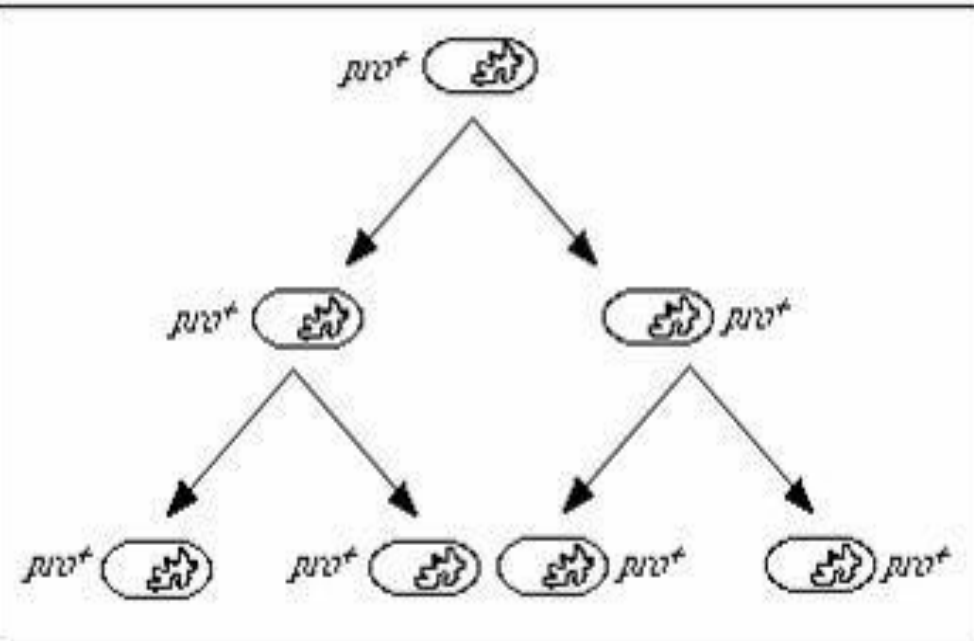
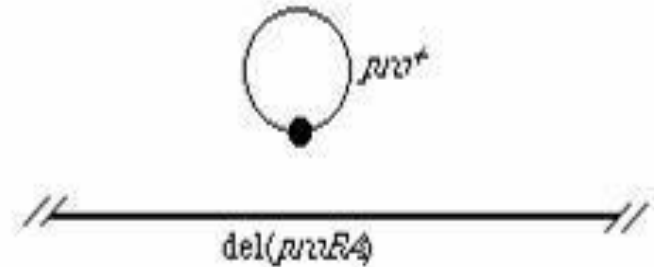
Абортивная трансдукция-

трансдукция, при которой перенесенный материал передается только одной из двух дочерних клеток.

(A) Transduction



(B) Abortive transduction



Основные этапы:

- *Формирование дефектного бактериофага, который содержит фрагменты собственной ДНК и ДНК донора*
- *Перенос дефектным бактериофагом включенной ДНК в клетку-реципиент*
- *Внесенный фагом фрагмент донорной ДНК не интегрируется в бактериальную хромосому и не реплицируется*
- *Однолинейное наследование донорного гена и в конечном итоге утрачивается в потомстве*

Конъюгация



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

Необходимое условие: наличие в клетке-доноре трансмиссивной плазмиды.

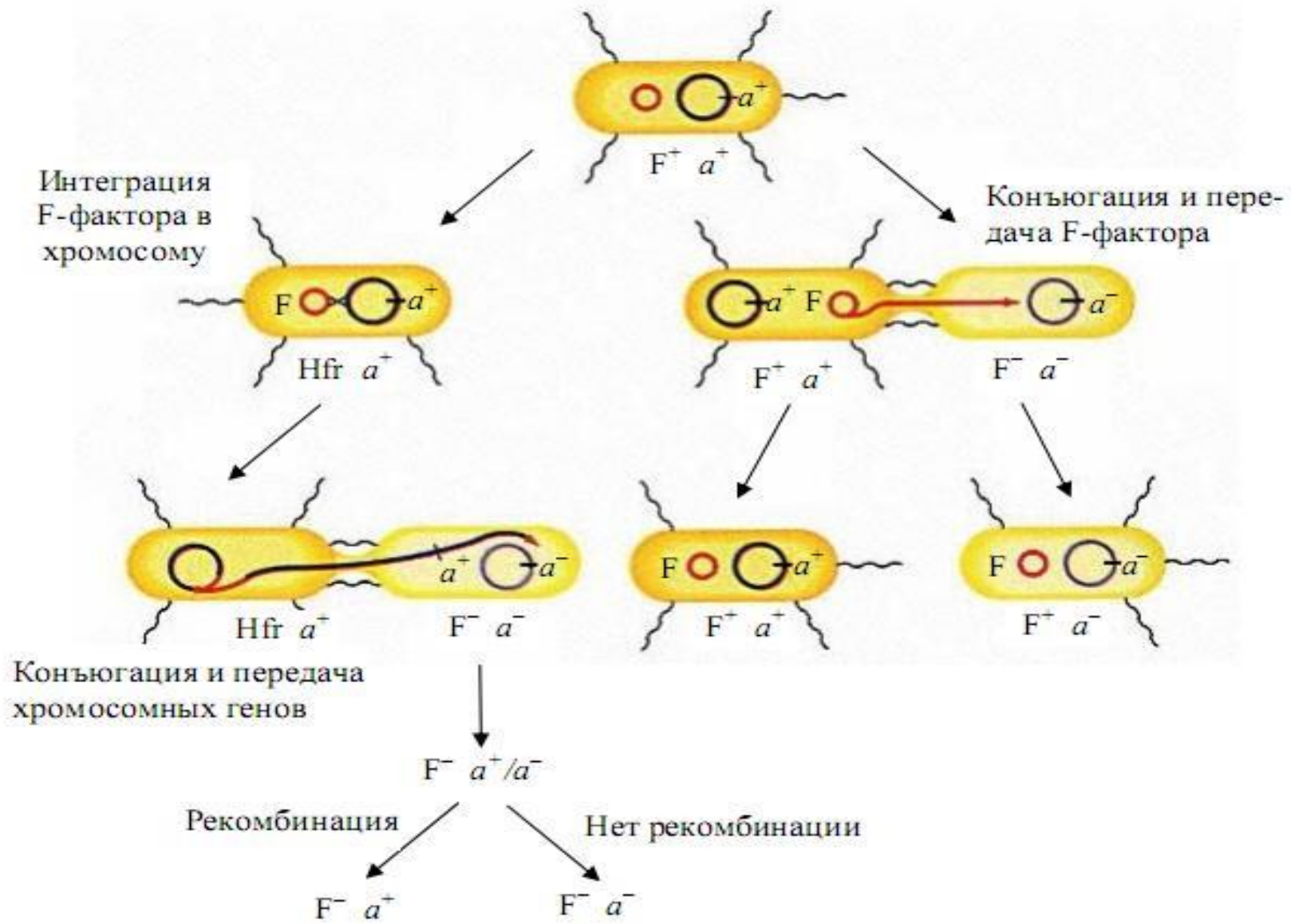
Процесс конъюгации у бактерий впервые был обнаружен Джошуа Ледербергом и Эдвардом Тейтумом в 1946 г.

Этот процесс контролируется **F-плазмидами** (F-факторами), которые, находясь в цитоплазме клетки, могут реплицироваться автономно (**F⁺-клетки**), а могут быть интегрированы в бактериальную хромосому, тогда это **Hfr-штаммы**

Выщепляясь из бактериальной хромосомы, могут захватывать часть бактериальных генов и становиться автономными, тогда образуется **F'-плазмида**

Доноры: **F⁺-клетки** (содержат F-плазмиду)

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



- Типы скрещивания

1. Скрещивание $F^+ \times F^-$: передается только F-плазмида, при этом F^- клетка становится F^+ -клеткой, приобретая плазмиду и свойства донора. Хромосомные гены не передаются.
2. Скрещивание $Hfr \times F^-$: *(есть рекомбинанты)* передаются бактериальные гены. Для проникновения всей хромосомной нити требуется много времени и, как правило, полный переход осуществляется редко, соответственно, гены, расположенные в той части хромосомы, которая не успела проникнуть в реципиентную клетку, не передаются вообще. Поэтому клетки-реципиенты при таком скрещивании, как правило, не становятся донорами
3. Скрещивание $F' \times F^-$: *(есть рекомбинанты)* происходит аналогично скрещиванию $F^+ \times F^-$ и реципиентная клетка превращается в донорную

- В опытах на бактериях была доказана роль ДНК в передаче наследственных признаков. Использование бактерий, вирусов, а затем и плазмид в качестве объектов молекулярно-биологических и генетических исследований привело к более глубокому пониманию фундаментальных процессов, лежащих в основе жизни. Выяснение принципов кодирования генетической информации в ДНК бактерий и установление универсальности генетического кода позволило лучше понимать молекулярно-генетические закономерности, свойственные более высоко организованным организмам.

- Расшифровка генома кишечной палочки сделало возможным конструирование и пересадку генов. К настоящему времени **генная инженерия** создала новые направления **биотехнологии**.
- Расшифрованы молекулярно-генетическая организация многих вирусов и механизмы их взаимодействия с клетками, установлены способность вирусной ДНК встраиваться в геном чувствительной клетки и основные механизмы вирусного канцерогенеза.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

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

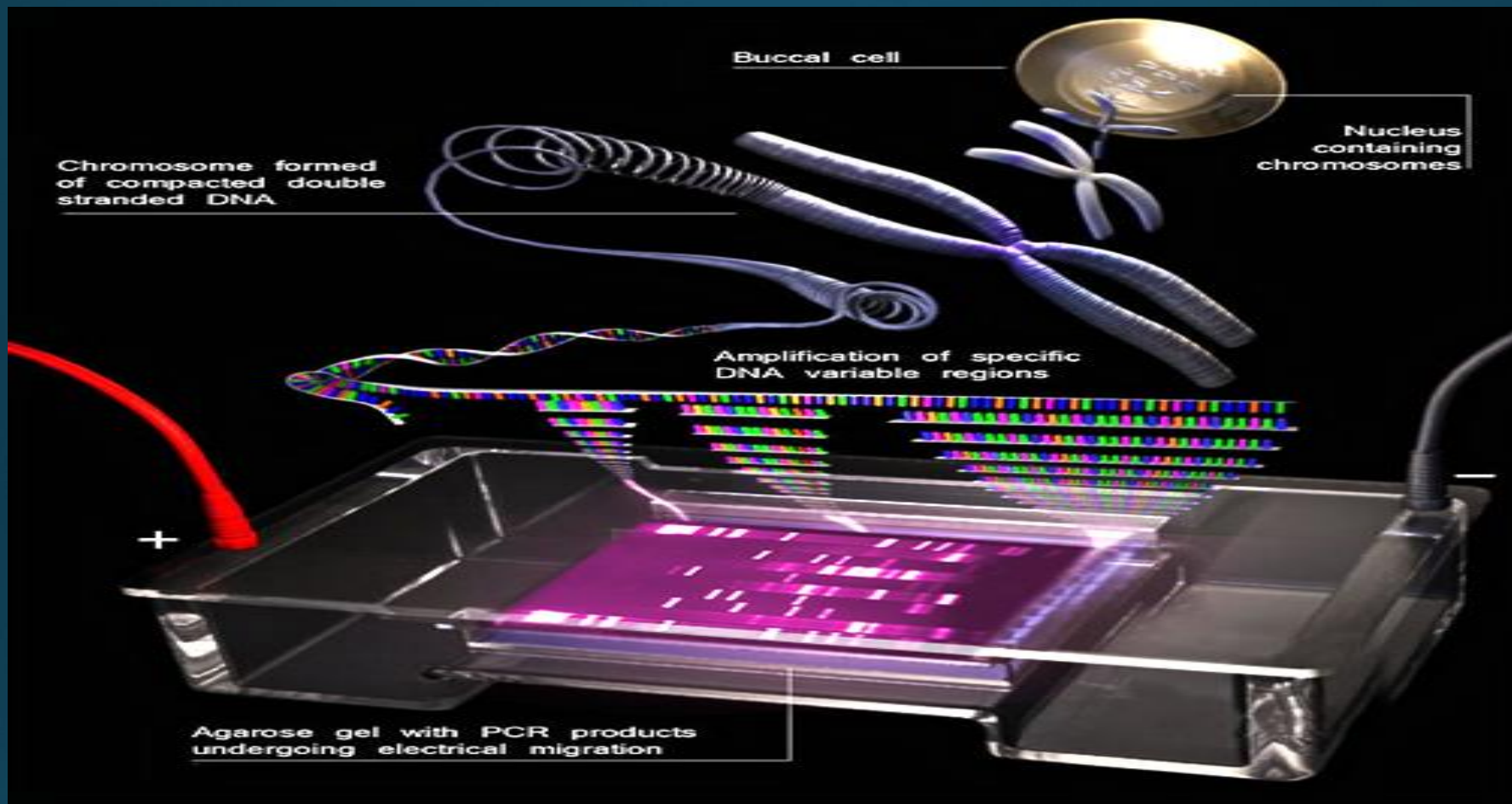
К таким методам относятся

- молекулярная гибридизация,
- детекция генов 16s рРНК
- полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR)
- полногеномное секвенирование.

ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЗОНДОВ)

- ✘ Основан на способности ДНК к денатурации и ренатурации. Денатурация – это расхождение цепей при нагревании до 80-100 град. Ренатурация – воссоединение цепей с помощью водородных связей при снижении температуры до 40-60 град (т.н. **отжиг**) и приобретение первоначальной структуры.
- ✘ Разъединенные цепи ДНК способны к гибридизации с фрагментами других односпиральных ДНК, имеющих комплементарные участки расположения нуклеотидов. К гибридизации комплементарных цепей способна также РНК, образуя комплексы ДНК-РНК, РНК-РНК.
- ✘ Необходимые для молекулярной гибридизации фрагменты ДНК или РНК, с помощью которых выявляют наличие в исследуемом материале комплементарных нитей нуклеиновой кислоты, называются *молекулярными зондами*.

- Имеются наборы молекулярных зондов для определения многих бактерий и вирусов. Такие наборы клонированных геномов составляют библиотеку или банк генов, они имеются в ряде стран, в т.ч. и в России.
- При постановке реакции молекулярной гибридизации зонды метят радиоактивной, флюоресцентной или биотиновой меткой, соединяют с исследуемым материалом, содержащим определяемую нуклеиновую кислоту, подвергшуюся денатурации. Если зонд комплементарен искомой цепи определяемой кислоты, происходит гибридизация в комплементарном участке.
- После отжига зонд оказывается включенным в ренатурированную нуклеиновую кислоту и может быть обнаружен по имеющейся метке.



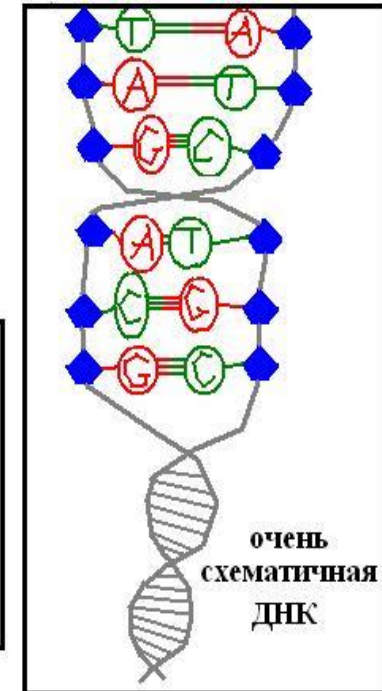
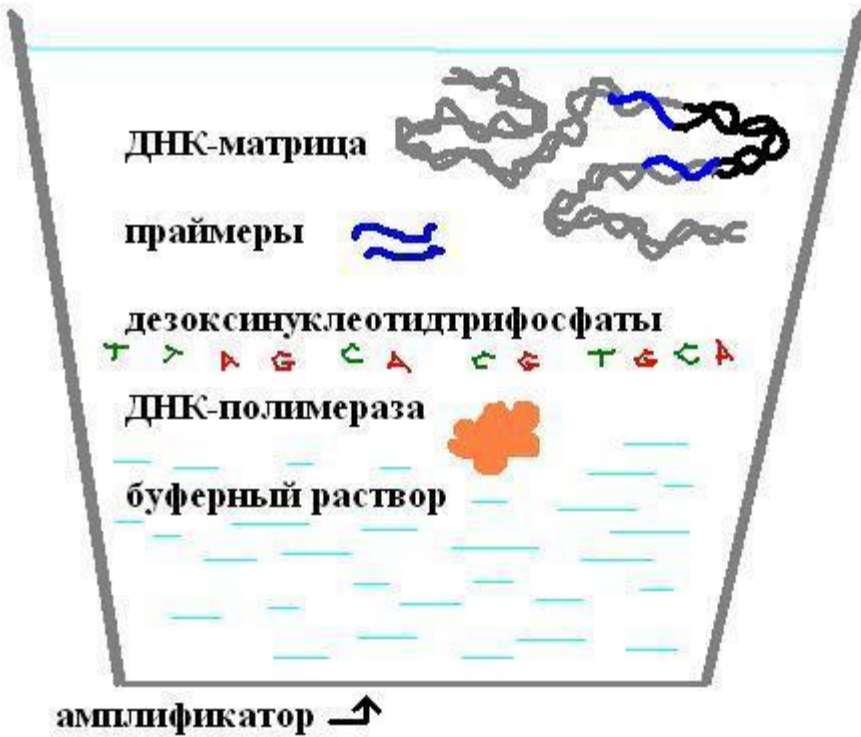
ПЦР

- Полимеразно-цепную реакцию (ПЦР, PCR) изобрел в 1983 году американский ученый Кэри Мюллис (Kary Mullis).
- Принцип метода заключается в удвоении (амплификации) участка ДНК, ограниченного праймерами, при помощи фермента ДНК-полимеразы.
- За каждый следующий цикл амплификации происходит удвоение как исходного участка ДНК, так и вновь синтезированных фрагментов (амплификатов).
- В результате этого число фрагментов растет в геометрической прогрессии (цепная реакция). После 30 - 40 циклов их число превышает несколько миллиардов, что делает возможным их обнаружение различными методами.

- Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:
- Определяемая ДНК (РНК) инфекционного агента в испытуемом биологическом материале.
- *Праймеры* двух типов (олигонуклеотиды) – короткие цепочки ДНК с нуклеотидной последовательностью, комплиментарной 3' концам каждой из двух цепей определяемой ДНК. Праймеры получают in vitro химическим синтезом.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК (достройку комплиментарных цепей).
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора.

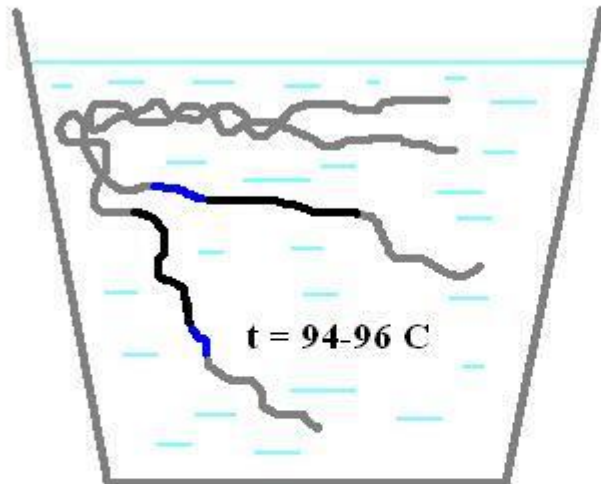
● Стадии ПЦР

- **1. Выделение нуклеиновых кислот.** На первом этапе выделяется вся ДНК или РНК из исследуемого материала.
- **2. Собственно ПЦР или амплификация.** В раствор, содержащий смесь нуклеотидов, ПЦР-буфер, полимеразу и праймеры добавляется ДНК, выделенная на первом этапе. Амплификацию проводят в три этапа: денатурация, отжиг, элонгация.
- Сначала реакционную смесь нагревают до $90-94^{\circ}\text{C}$, вызывая этим **Денатурацию** - расплетение цепей двунитевой ДНК. Затем температуру снижают до $50-70^{\circ}\text{C}$ и при этом начинается **присоединение (отжиг) праймеров**. Праймеры специфично (по принципу комплементарного спаривания) присоединяются к коротким участкам. Далее следует стадия **элонгации** (доставление праймеров), начиная с 3'-концов, путём комплементарного синтеза на матрицах одноцепочечных фрагментов ДНК.
- Затем цикл повторяется. Таким образом, при повторении этих циклов количество копий участка ДНК, находящегося между местами посадки праймеров, возрастает в геометрической прогрессии.
- **3. Учет результатов.** Накопленные продукты амплификации (большое число копий ДНК между местами посадки праймеров) можно выявить путем электрофореза в геле.

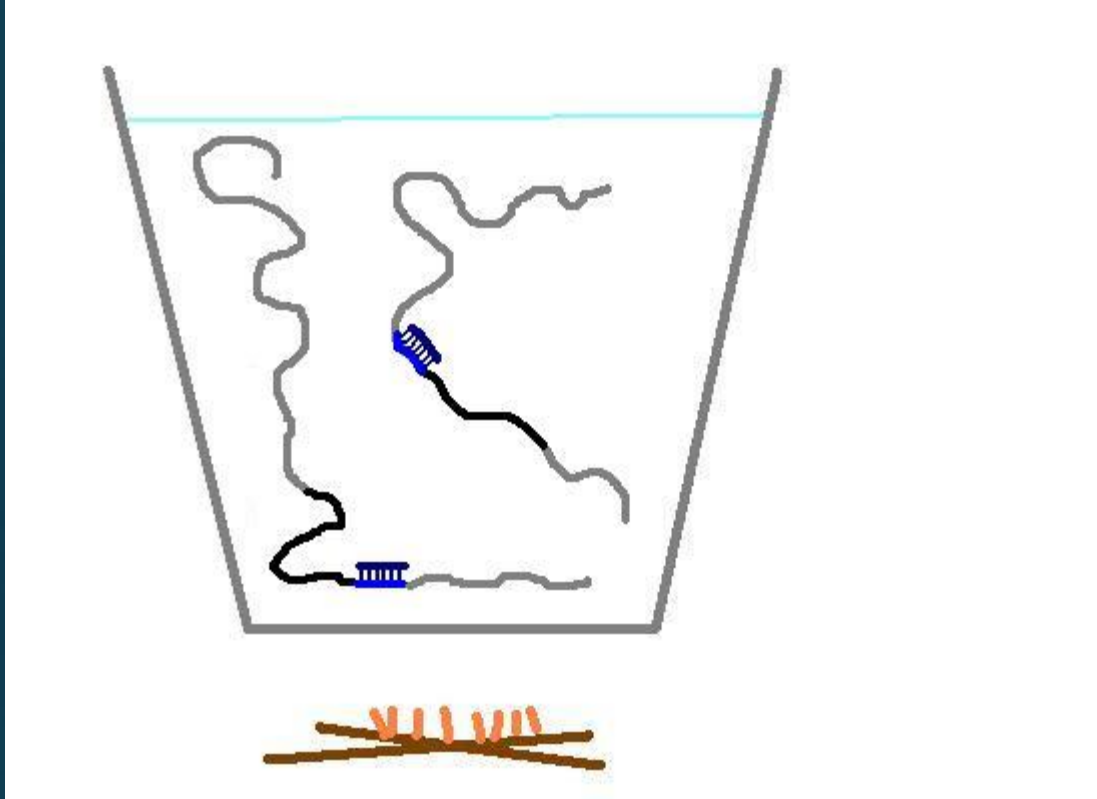


- Для того, чтобы выявить и размножить в имеющейся пробе именно ту последовательность ДНК, которая необходима, нужно знать нуклеотидные последовательности ее концов, для того, чтобы создать к ним комплементарные короткие (18-30 нуклеотидов) фрагменты - праймеры. На рисунке эти известные концы последовательности отмечены синим, а черным - тот фрагмент ДНК, который нужен.

Первая стадия - денатурация



Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись.

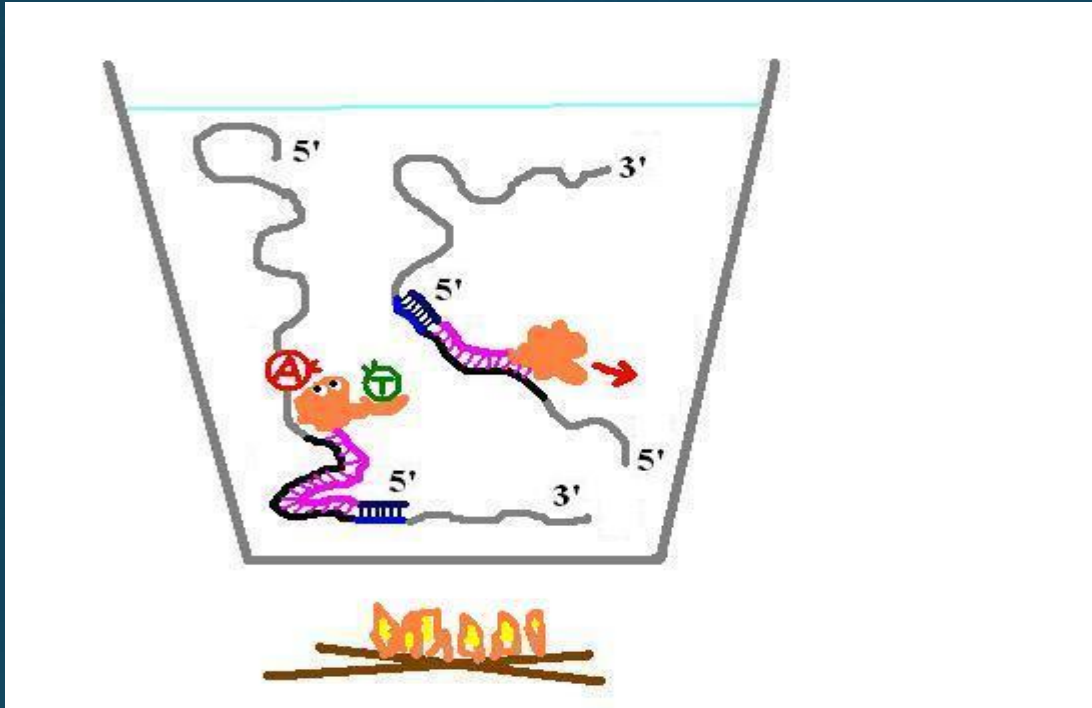


Вторая стадия - ОТЖИГ.

Температуру снижают, и праймеры соединяются. Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей с комплементарными им участками ДНК. Эта стадия называется *отжигом*. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5°C ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5—2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

Главный элемент PCR - это многократный тепловой цикл, при котором образец ДНК подвергается воздействию трёх различных температур.

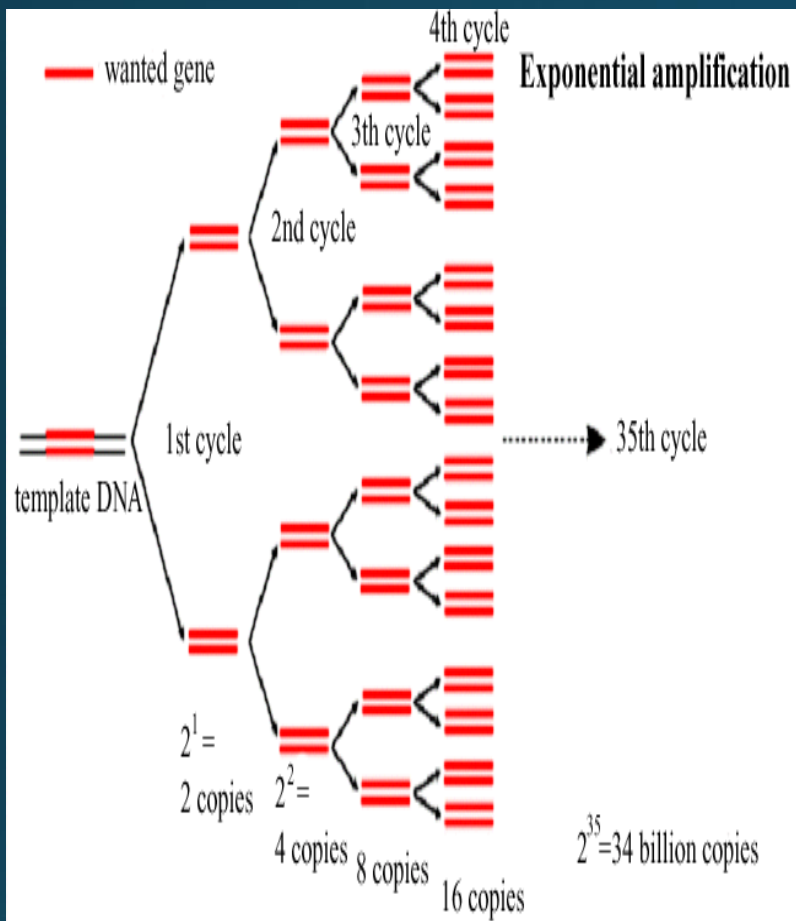
Третья стадия - элонгация



используемые
энзимы Taq и Pfu
активны при 72

Полимераза - это фермент, умеющий достраивать вторую цепь ДНК. Для того, чтобы начать это делать, ей нужен кусочек, где ДНК уже двуцепочечная, в этом качестве и выступает место взаимодействия ДНК с праймером. Полимераза всегда достраивает цепь от 5' к 3'-концу (эти названия связаны с ориентацией сахара дезоксирибозы в цепи; в обычной двуцепочечной ДНК цепи направлены противоположно друг другу:



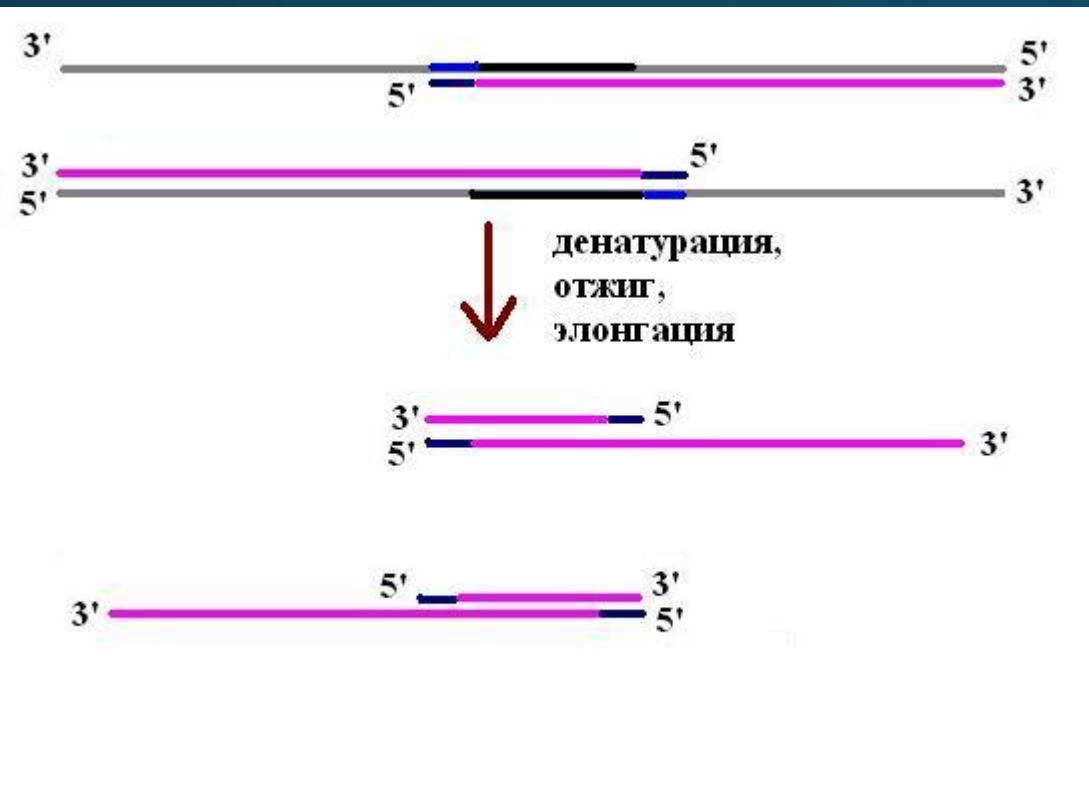


УСЛОВИЯ ПЦР (Андрей)

УСЛОВИЯ ПЦР

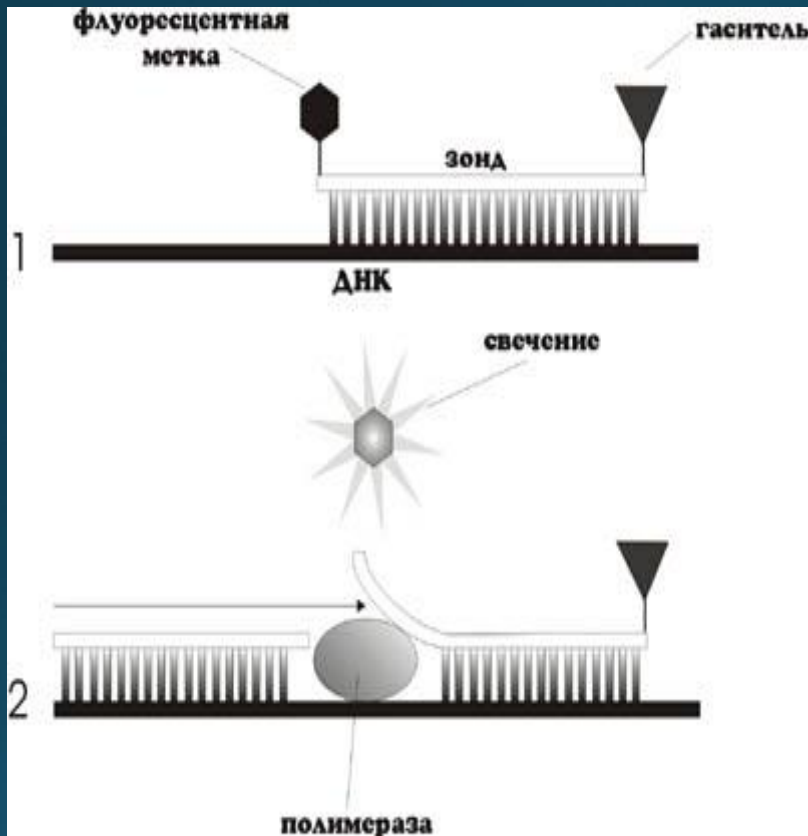
- Для процесса амплификации необходимо, чтобы структура праймеров была идентична (комплементарна) участку исходной ДНК. Если этого не происходит (отсутствует специфическая ДНК), то удвоения ДНК не происходит. Если в растворе не окажется ни одной молекулы ДНК с участком, комплементарным внесленным праймерам, то реакция ПЦР не пойдет, даже несмотря на то, что в растворе будет плавать миллион других молекул ДНК. Этим и обусловлена высокая специфичность метода ПЦР.

- Теперь в растворе есть четыре слишком длинных цепи ДНК. Две - те, которые были, и две построенные по праймерам. Но если повторить процесс ещё раз, то получится следующая картина:

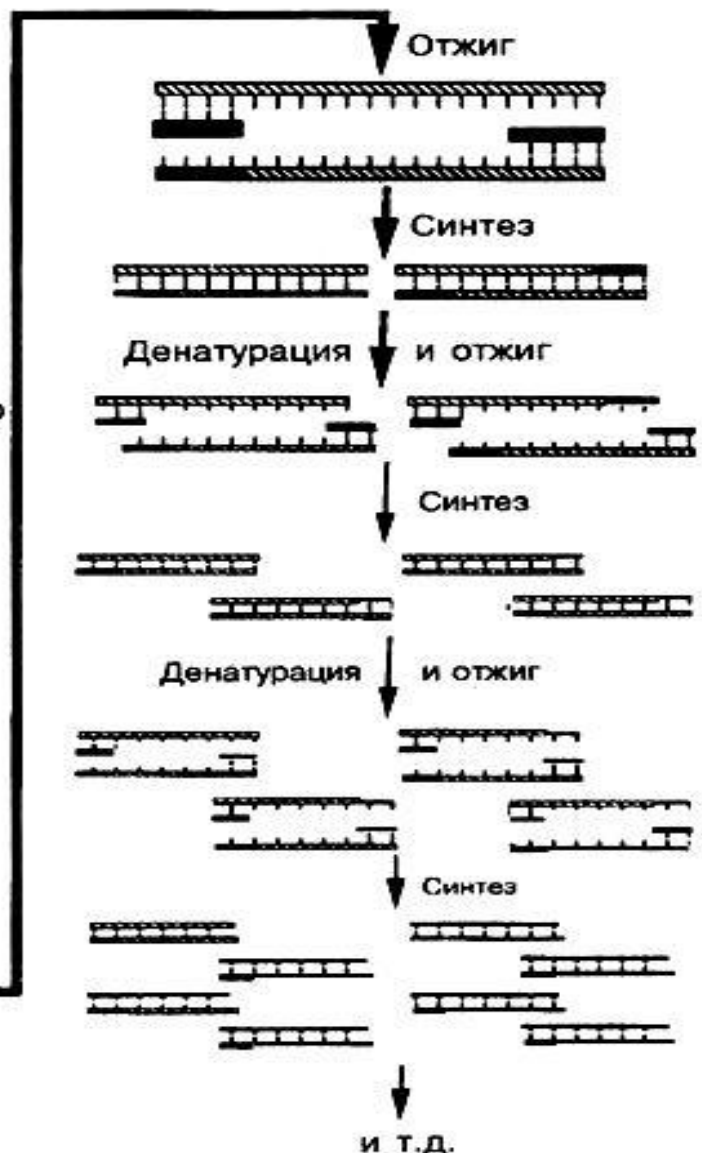
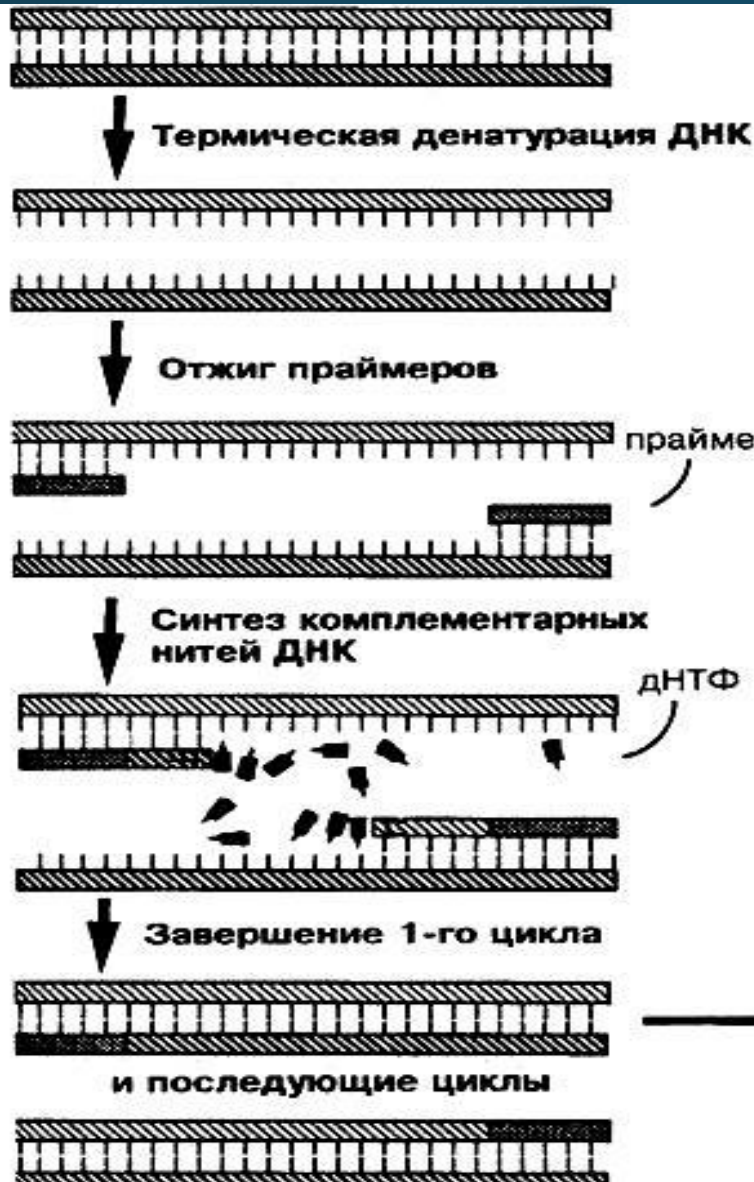


Если считать цепи условно бесконечными в обе стороны, то цепи, получаемые в первом цикле, бесконечны в одну сторону, а со второй ограничены праймером. Когда такие цепи будут взаимодействовать со вторым праймером, будут получаться кусочки, ограниченные с двух сторон. Всего в ПЦР проводят несколько десятков циклов, поэтому абсолютное большинство продукта реакции будет представлять собой короткие нужные последовательности, с которыми уже можно будет производить различные манипуляции, в простейшем случае - разгонять на хроматографе и сравнивать полученные полоски с теми, которые должны были бы получиться, если бы была уреаплазма или кто-то другой.

Четвертая стадия - детекция.

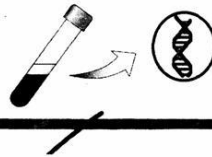


- В начале у нас был раствор с небольшим количеством длинных, полноценных клеточных молекул ДНК.
- В конце ПЦР мы имеем раствор с огромным количеством размноженных нужных участков, кусочков ДНК
- Раствор наносят на гель, к гелю прикладывают напряжение. За часок-другой кусочки молекул ДНК (они имеют заряд) перемещаются в геле на расстояние, пропорциональное их массе.
- Гель кладут под ультрафиолет и масса одинаковых кусочков ДНК начинает светиться в том месте геля, где собралась.
- Если собралась — значит в ДНК был участок, соответствующий праймеру, нужный «ген». Если ничего не светится, мутная полоска без четкого участка — значит, нужного участка в ДНК нет.

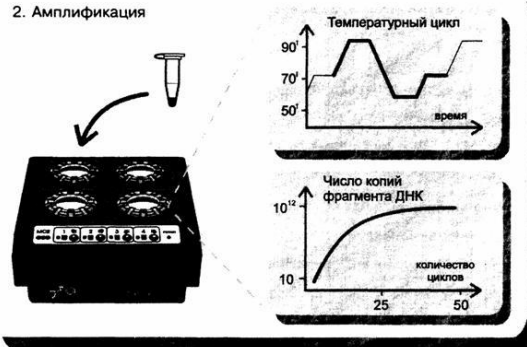


Стадии метода ПЦР

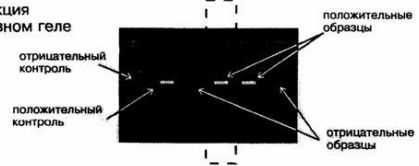
1. Выделение ДНК



2. Амплификация



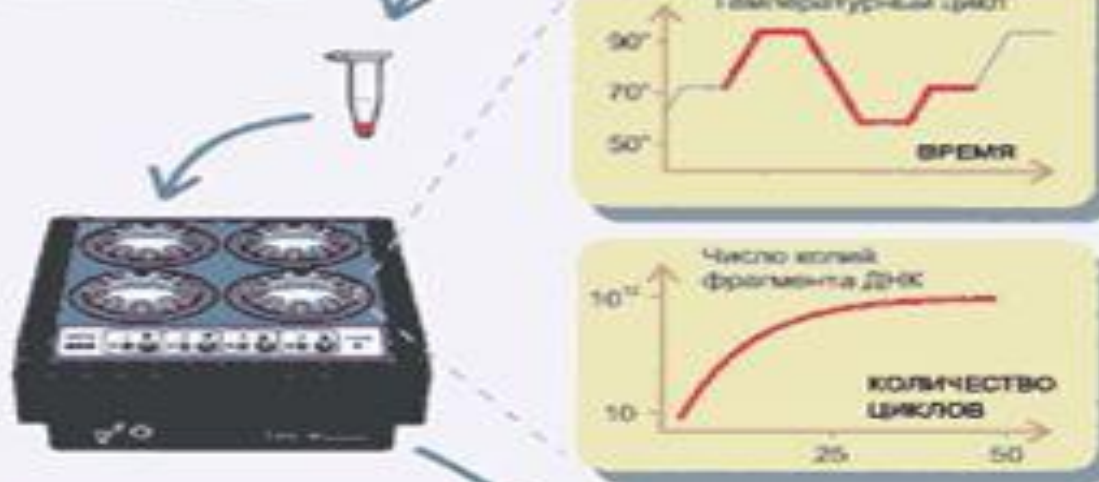
3. Детекция в агарозном геле



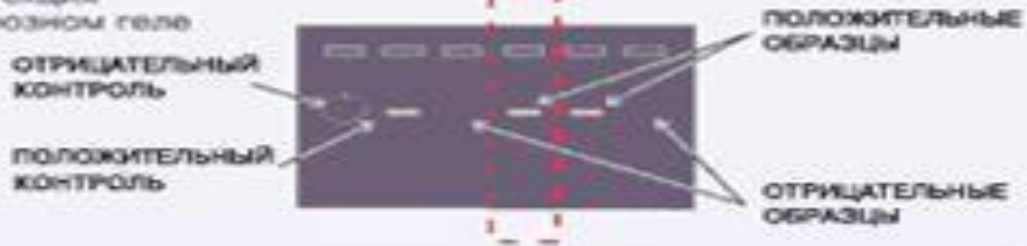
1. Выделение ДНК



2. Амплификация



3. Детекция в агарозном геле



- 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. ПЦР-РВ позволяет осуществлять количественную оценку содержания ДНК в исследуемом материале. Для постановки этого метода требуется специальный амплификатор со встроенным оптическим блоком, для регистрации флуоресцентного излучения исходящее от образца.

Секвенирование ДНК

Британский ученый Фредерик Сэнгер вместе с американским биохимиком Уолтером Гилбертом в 1977 году опубликовали метод, который позволяет выяснить последовательность строительных блоков в цепи ДНК.



ДНК-секвенирование

1. Производится ПЦР-амплификация фрагмента ДНК
2. К полученному продукту добавляют прямой или обратный праймер и ДНК-полимеразу.
3. В ходе реакции ДНК-полимеразы встраивает в растущую цепь ДНК терминирующий нуклеотид, который прекращает синтез после соответствующего нуклеотида.
4. Образуется большое число фрагментов ДНК, отличающихся по длине на один нуклеотид
5. Фрагменты ДНК движутся в тонком капилляре, заполненном полиакриламидным гелем, и разделяются в соответствии с их длиной.
6. Флуоресцентный сигнал от каждого терминирующего нуклеотида детектируется с помощью лазера и преобразуется в хроматограмму, где каждый нуклеотид представлен в виде пика соответствующего цвета (красный, синий, зеленый, черный).