ГБПОУ РО «РБМК»

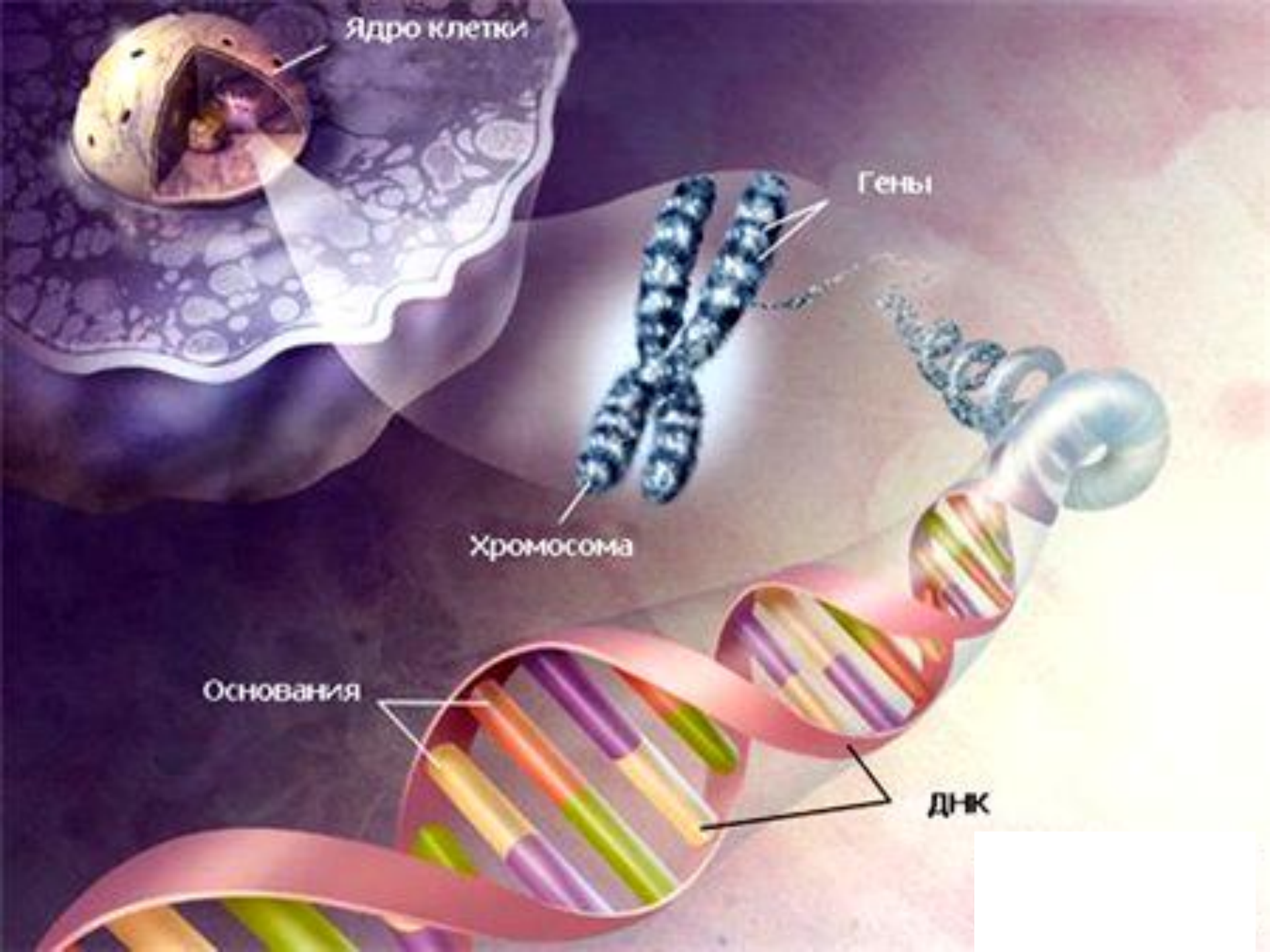
ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

УД «Микробиология и техника микробиологических исследований»
32.02.01 Медико-профилактическое дело
Подготовлено преподавателем

Строение генома бактерий

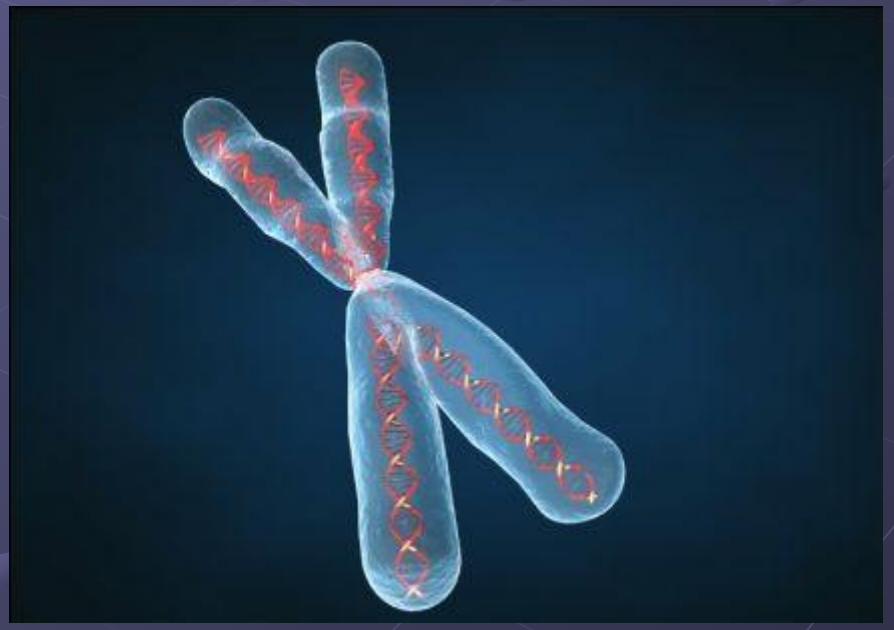
Бактериальный геном состоит из генетических элементов, способных к самостоятельной репликации, т. е. *репликонов*. Репликонами являются *бактериальная хромосома и плазмиды.*

Наследственная информация хранится у бактерий в форме последовательности нуклеотидов ДНК, которые определяют последовательность аминокислот в белке. Каждому белку соответствует свой ген, т. е. дискретный участок на ДНК, отличающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов.


Ядро клетки
Гены
Хромосома
Основания
ДНК

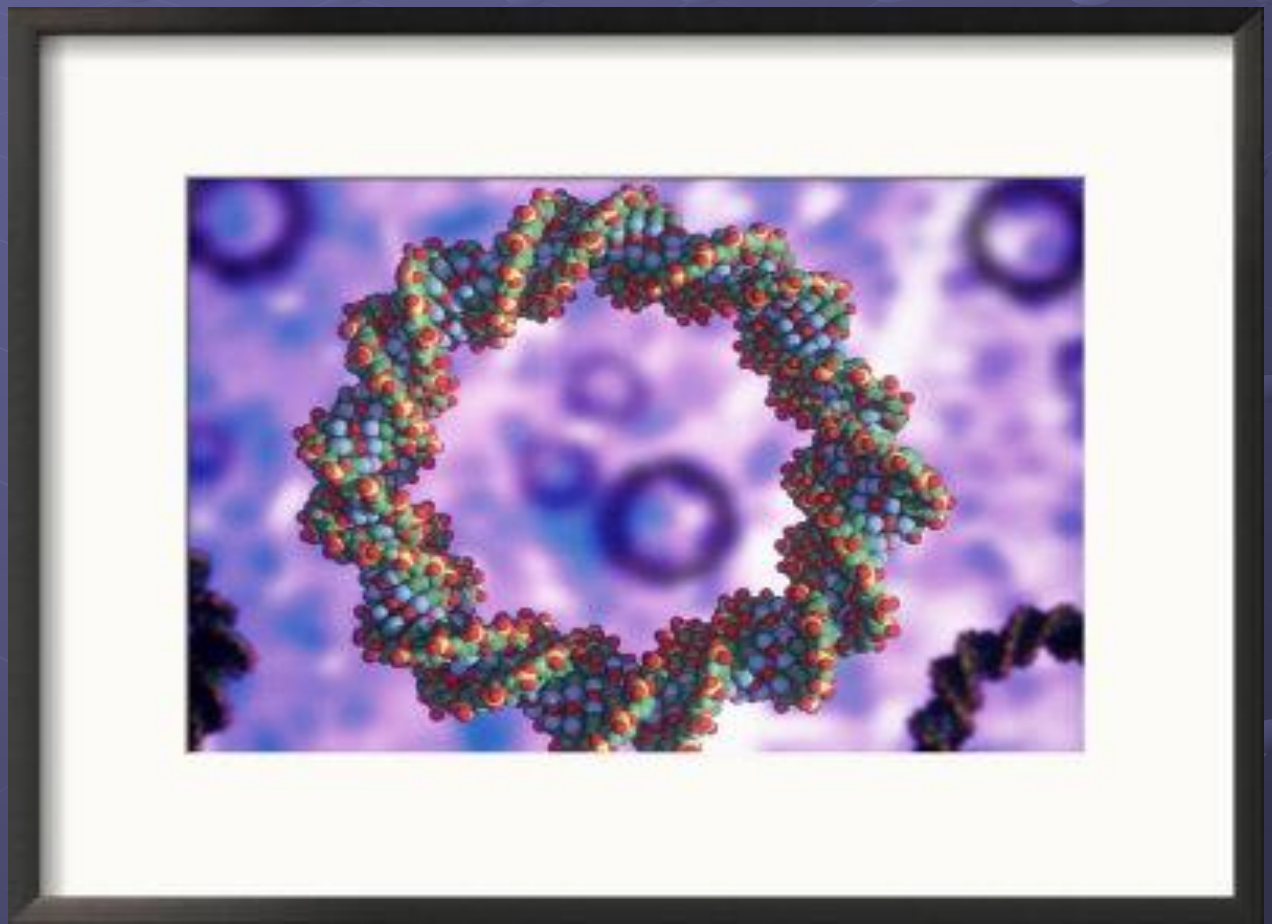
Бактериальная хромосома

Бактериальная хромосома представлена одной двухцепочечной молекулой ДНК кольцевой формы. Бактериальная хромосома формирует компактный нуклеоид бактериальной клетки. Бактериальная хромосома имеет гаплоидный набор генов. Она кодирует жизненно важные для бактериальной клетки функции



Плазмиды бактерий

Плазмиды представляют собой двухцепочечные молекулы ДНК размером от 10^3 до 10^6 н.п. Они кодируют не основные для жизнедеятельности бактериальной клетки функции, но придающие бактерии преимущества при попадании в неблагоприятные условия существования.



Среди фенотипических признаков, сообщаемых бактериальной клетке плазмидами, можно выделить следующие:

- устойчивость к антибиотикам;
- образование колицинов;
- продукция факторов патогенности;
- способность к синтезу антибиотических веществ;
- расщепление сложных органических веществ;
- образование ферментов рестрикции и модификации

Для характеристики плазмидных репликонов их принято разбивать на группы совместимости. ***Несовместимость*** плазмид связана с неспособностью двух плазмид стабильно сохраняться в одной и той же бактериальной клетке. Несовместимость свойственна тем плазмидам, которые обладают высоким сходством репликонов, поддержание которых в клетке регулируется одним и тем же механизмом.

Некоторые бактериальные плазмиды способны передаваться из одной клетки в другую, иногда даже принадлежащую иной таксономической единице. Такие плазмиды называются ***трансмиссивными*** (***конъюгативными,*** син.)

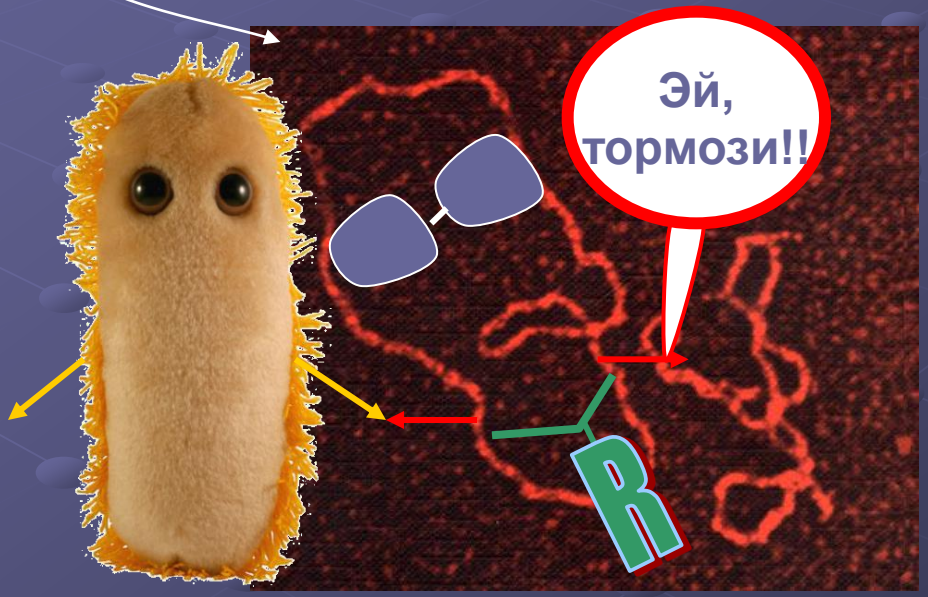
Трансмиссивность присуща лишь крупным плазмидам, имеющим **tra-оперон**, в который объединены гены, ответственные за перенос плазмиды.

Некоторые плазмиды могут обратимо встраиваться в бактериальную хромосому и функционировать в виде единого репликона. Такие плазмиды называются *интегративными* или *эписомами*.



Мелкие плазмиды, не несущие tra-гены, не могут передаваться сами по себе, но способны к передаче в присутствии трансмиссивных плазмид, используя их аппарат конъюгации. Такие плазмиды называются *мобилизуемыми*, а сам процесс — *мобилизацией* нетрансмиссивной плазмиды.

Особое значение в медицинской микробиологии имеют плазмиды, обеспечивающие устойчивость бактерий к антибиотикам, которые получили название ***R-плазмид***, и плазмиды, обеспечивающие продукцию факторов патогенности, способствующих развитию инфекционного процесса в макроорганизме.





R-плазмиды *(resistance* — противодействие, англ.) содержат гены, детерминирующие синтез ферментов, разрушающих антибактериальные препараты (например, антибиотики).

В результате наличия такой плазмиды бактериальная клетка становится устойчивой (резистентной) к действию целой группы лекарственных веществ.

Бактериальные штаммы, несущие R-плазмиды, очень часто являются этиологическими агентами внутрибольничных инфекций.

Плазмиды, детерминирующие синтез факторов патогенности, в настоящее время обнаружены у многих бактерий, являющихся возбудителями инфекционных заболеваний человека.

Первыми, этой группы плазмид были определены **Ent-плазмида**, определяющая синтез энтеротоксина, и **Hly-плазмида**, детерминирующая синтез гемолизина у

E. coli.

Некоторые *E. coli* владеют **Col-плазмидой**, определяющей синтез колицинов, обладающих микробоцидной активностью по отношению к колиформным бактериям. Бактериальные клетки, несущие такие плазмиды, обладают преимуществами при заселении экологических ниш.

Плазмиды используются в практической деятельности человека, в частности в генной инженерии, при конструировании специальных рекомбинантных бактериальных штаммов, вырабатывающих в больших количествах биологически активные вещества

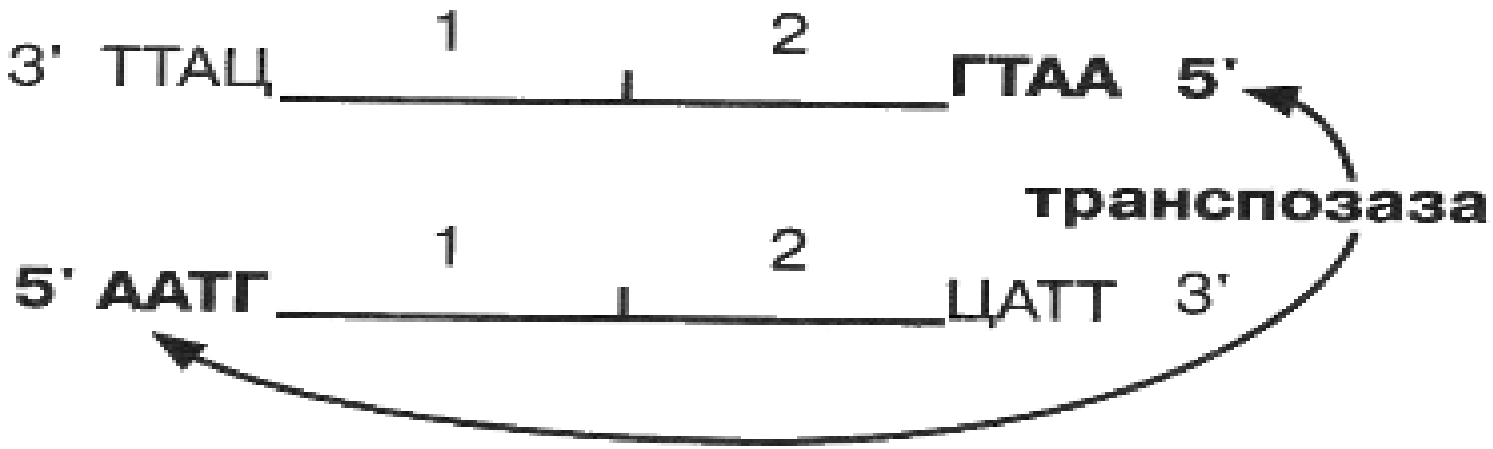
Подвижные генетические элементы

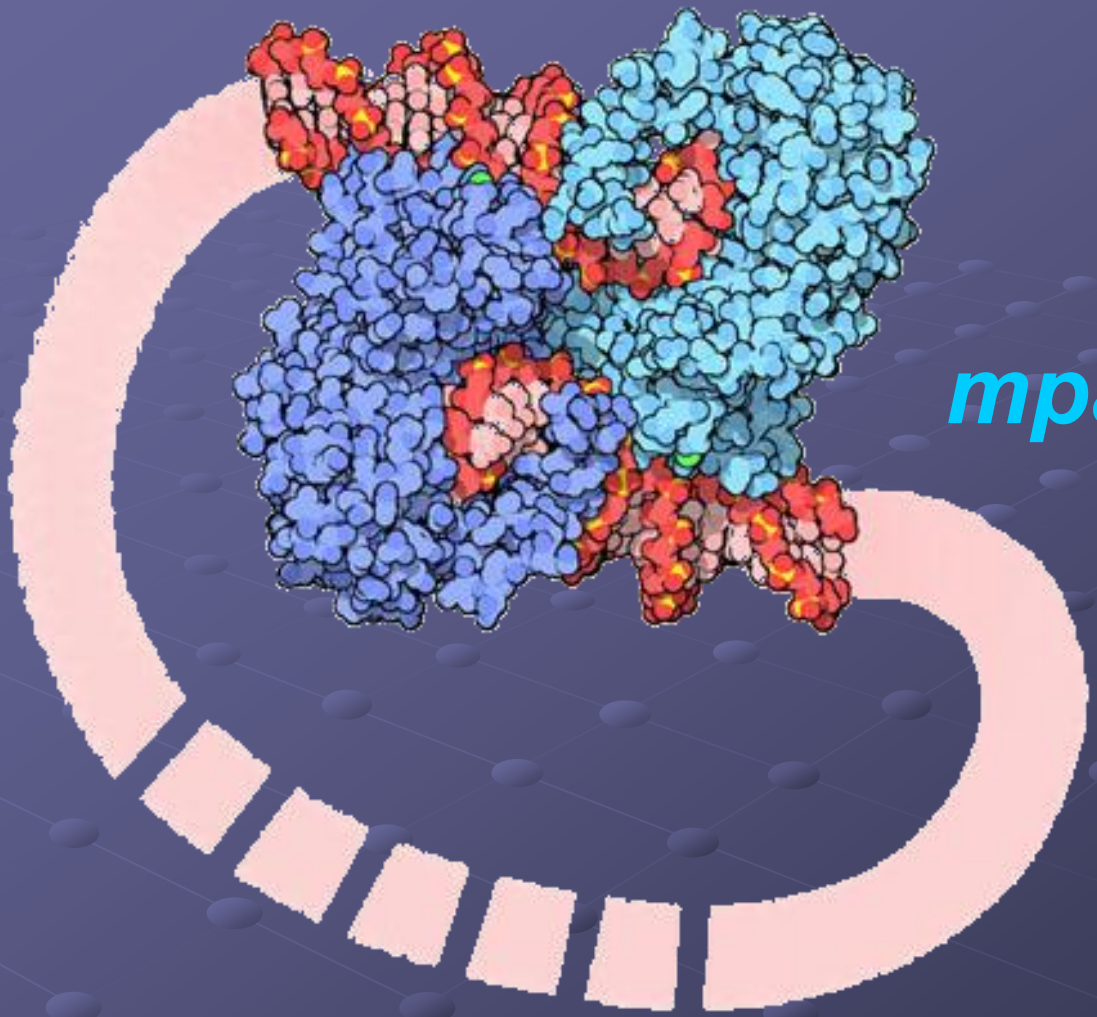
- В состав бактериального генома, как в бактериальную хромосому, так и в плазмиды, входят ***подвижные генетические элементы.*** К подвижным генетическим элементам относятся **вставочные последовательности (IS)** и **транспозоны.**

- **Вставочные *(инсерционные) последовательности* IS-элементы** *(insertion sequences,* англ.)— это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного участка репликона в другой, а также между репликонами.

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.

Отличительной особенностью IS-элементов является наличие на концах вставочной последовательности ***инвертированных повторов***. Эти инвертированные повторы узнает фермент ***транспозаза***. Транспозаза осуществляет одноцепочечные разрывы цепей ДНК, расположенных по обе стороны от подвижного элемента. Оригинальная копия IS-элемента остается на прежнем месте, а ее реплицированный дупликат перемещается на новый участок.

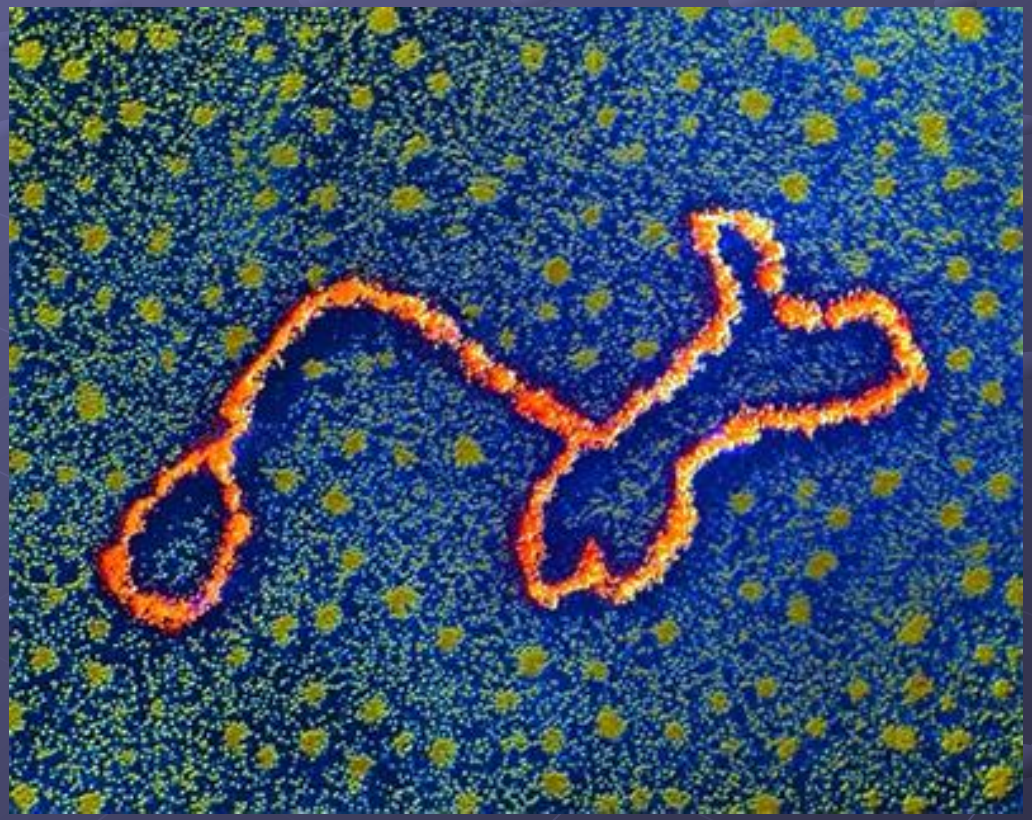




транспозаза

Перемещение подвижных генетических элементов принято называть ***репликативной или незаконной рекомбинацией.***

Транспозоны — это сегменты ДНК, обладающие теми же свойствами, что и IS-элементы, но имеющие структурные гены, т. е. гены, обеспечивающие синтез молекул, обладающих специфическим биологическим свойством, например токсичностью, или обеспечивающих устойчивость к



Перемещаясь по репликону или между репликонами, подвижные генетические элементы вызывают:

- 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.

- 5. Изменения бактериального генома, а следовательно, и свойств бактерий могут происходить в результате мутаций и рекомбинаций.

Мутации у бактерий

Мутации - это изменения в последовательности отдельных нуклеотидов ДНК, которые ведут к таким проявлениям, как изменения морфологии бактериальной клетки, возникновение потребностей в факторах роста, например в аминокислотах, витаминах, т.е. ауксотрофности; к устойчивости к антибиотикам, изменению чувствительности к температуре, снижению вирулентности (аттенуация) и

- **По локализации различают мутации:**
  - генные (точечные);
  - хромосомные;
  - **плазмидные.**
- **По происхождению мутации могут быть:**

  - спонтанными (мутаген неизвестен);

  - индуцированными (мутаген известен).

- **По протяженности изменений повреждения ДНК различают мутации**

- точечные, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов,
- и протяженные или аберрации.

В последнем случае могут наблюдаться выпадения нескольких пар нуклеотидов, которые называются ***делецией,*** добавление нуклеотидных пар, т. е. ***дупликации,*** перемещения фрагментов хромосомы, ***транслокации*** и перестановки нуклеотидных пар — ***инверсии***

Точечные спонтанные мутации возникают в результате возникновения ошибок при репликации ДНК, что связано с таутомерным перемещением электронов в азотистых основаниях.

- **Спонтанные хромосомные аберрации** возникают вследствие перемещения подвижных генетических элементов.

- **Индуцированные** мутации появляются под влиянием внешних факторов, которые называются *мутагенами.*
- Мутагены бывают:

  - физическими (УФ-лучи, гамма-радиация),

  -химическими (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, азотистая кислота и ее аналоги и другие соединения)

  - биологичекими — транспозоны.

Рекомбинация у бактерий

Рекомбинации – обмен генетическим материалом между двумя особями с появлением рекомбинантных особей с измененным генотипом.

По молекулярному механизму генетическая рекомбинация у бактерий делится на три вида:

- гомологичную,
- сайт-специфическую,
- незаконную.

Гомологичная рекомбинация

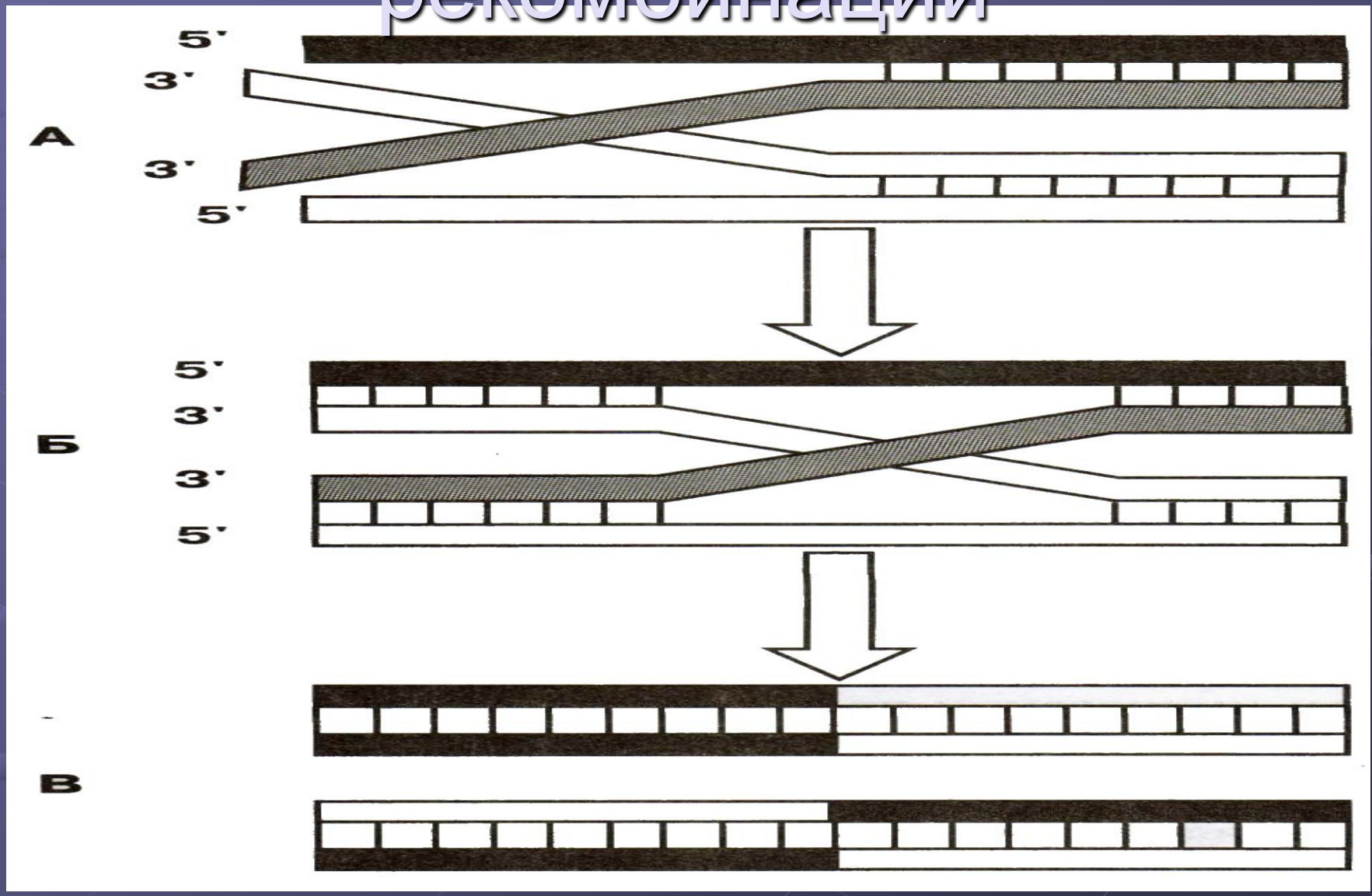
При гомологичной рекомбинации в процессе разрыва и воссоединения ДНК происходит обмен между участками ДНК, обладающими высокой степенью гомологии.

Гомологичная рекомбинация происходит через образование промежуточного соединения, крестообразной структуры Холидея или ***полухиазмы.*** В полухиазме осуществляется комплементарное спаривание между одноцепочечными участками, принадлежащими к разным родительским молекулам ДНК.

Процесс гомологичной рекомбинации находится под контролем генов, объединенных в ***REC-систему***, состоящую из генов ***recA,B,C,D***.

Продукты этих генов производят расплетание нитей ДНК и их переориентацию с образованием структуры Холидея, а также разрезают структуру Холидея для завершения процесса рекомбинации.

Схема гомологичной рекомбинации

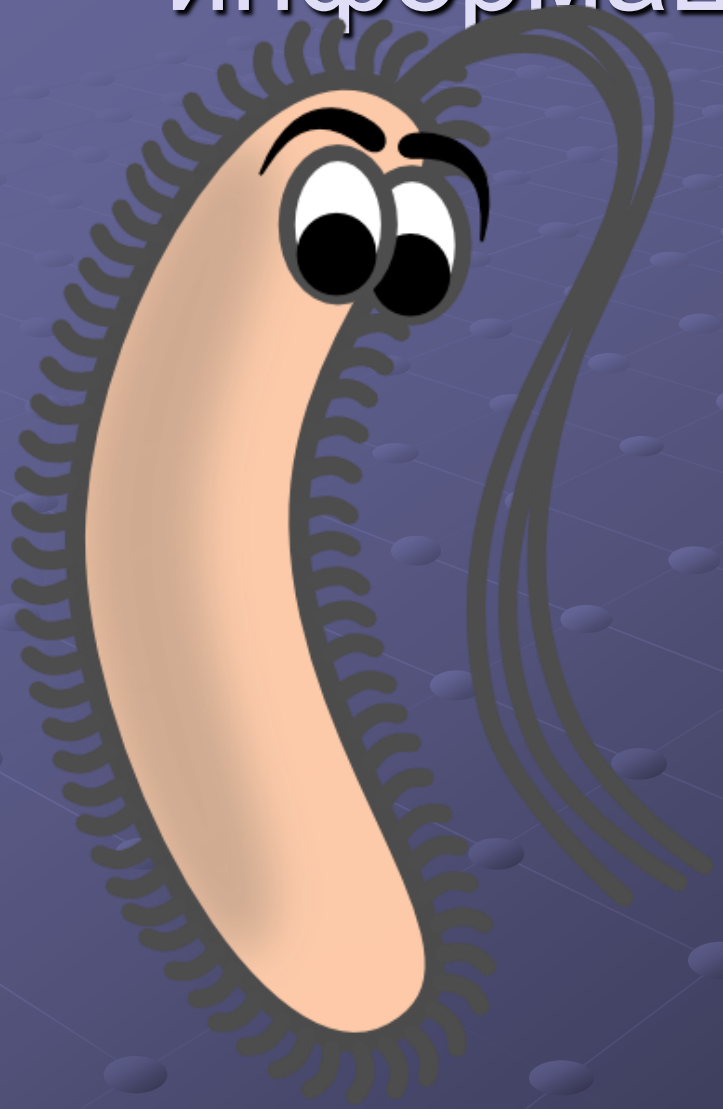


Незаконная или репликативная рекомбинация

Незаконная или репликативная рекомбинация не зависит от функционирования генов recA,B,C,D.

Примером ее является транспозиция подвижных генетических элементов по репликону или между репликонами, при этом, транспозиция подвижного генетического элемента сопровождается репликацией ДНК.

Передача генетической информации у бактерий



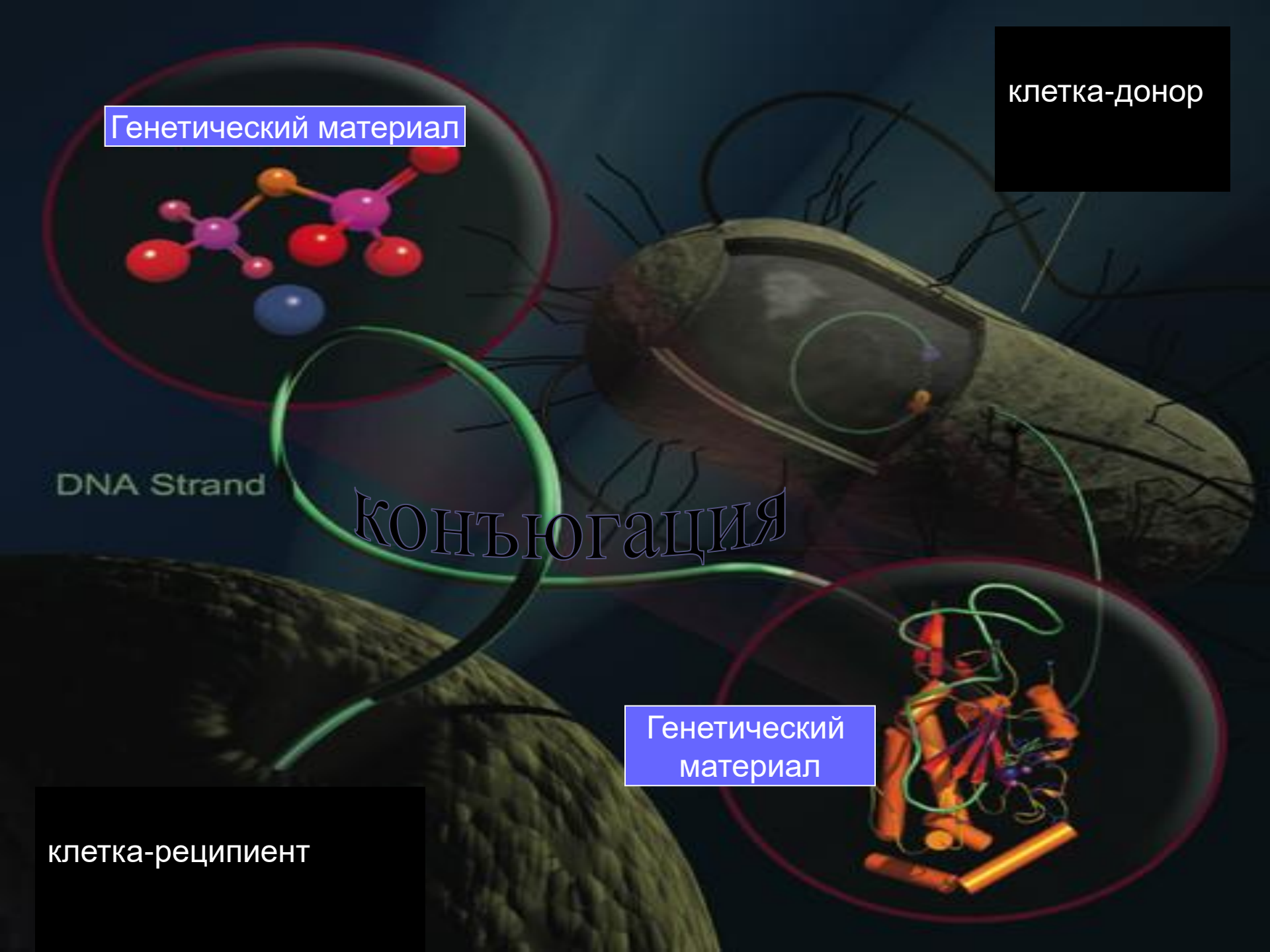
У бактерий существует несколько механизмов рекомбинаций:

- *трансформация;*
- *трансдукция;*
- *конъюгация.*

Конъюгация

- Передача генетического материала от клетки-донора в клетку-реципиент путем непосредственного контакта клеток называется ***коньюгаиией.***




клетка-донор
Генетический материал
DNA Strand
конъюгация
Генетический материал
клетка-реципиент

Необходимым условием для конъюгации является **наличие** в клетке-доноре **трансмиссивной плазмиды.**

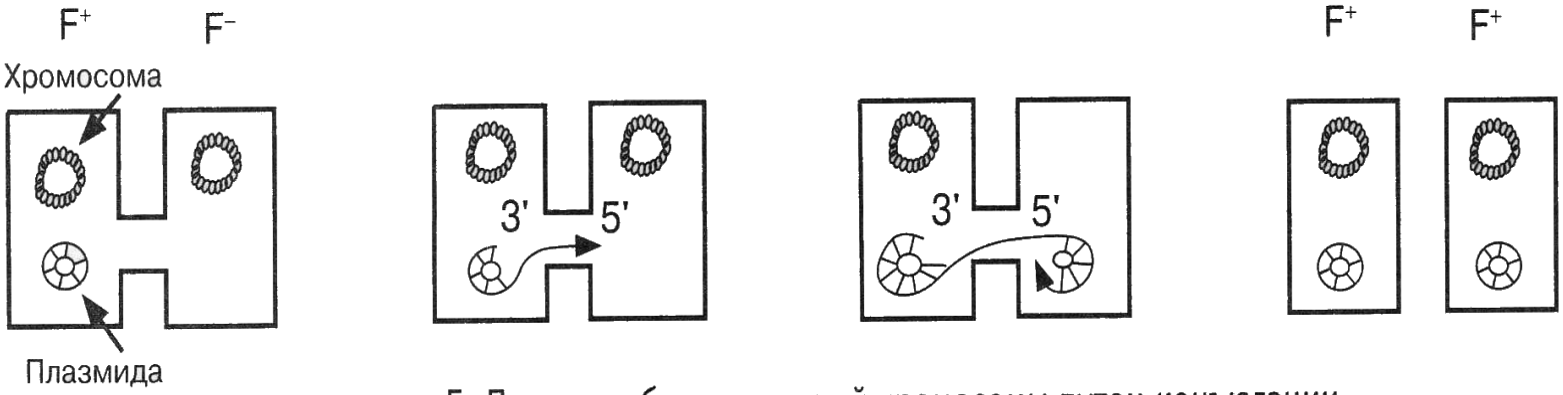
Трансмиссивные плазмиды кодируют половые пили, образующие конъюгационную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по которому плазмидная ДНК передается в новую клетку.

Вследствие хрупкости конъюгационного мостика половой фактор редко передается в клетку-реципиент, поэтому образовавшиеся рекомбинант донорскими функциями как правило не обладает.

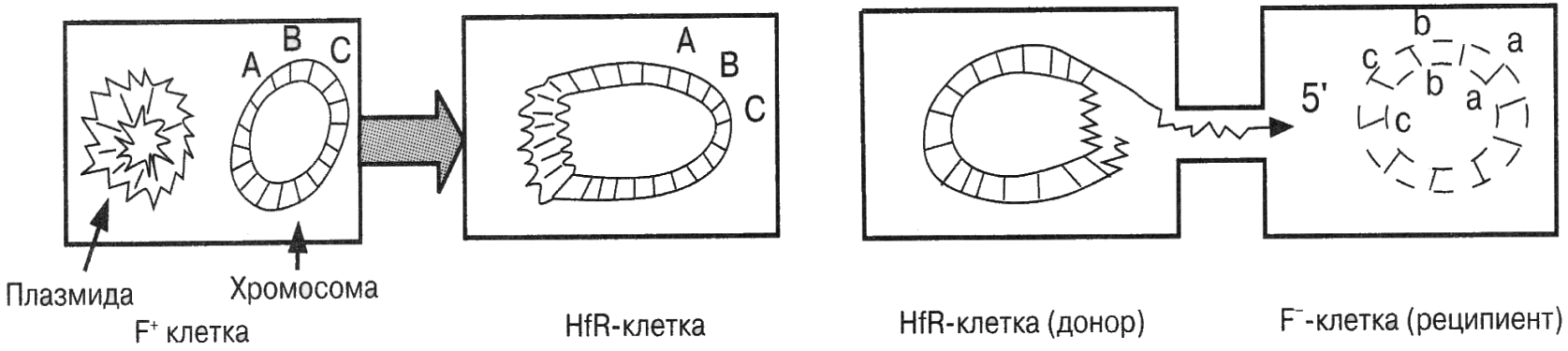
Вследствие направленности передачи генов конъюгация используется для картирования генома бактерий и построения генетической карты.

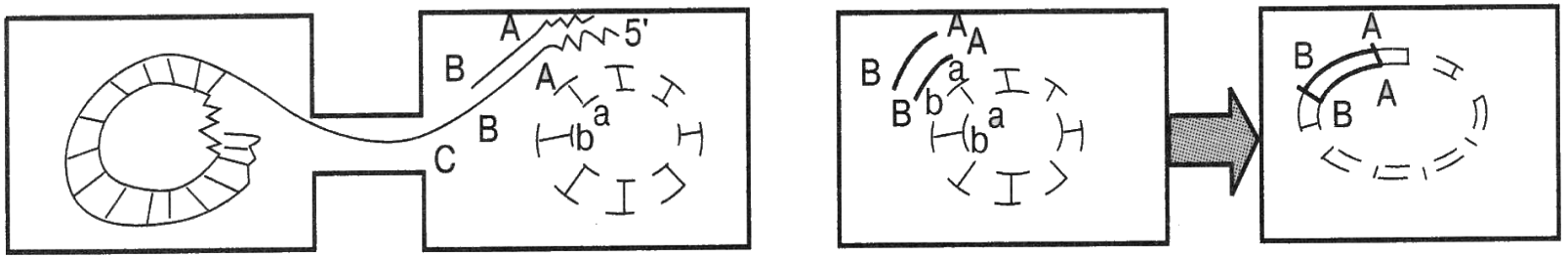
1. СХЕМА КОНЪЮГАЦИИ У БАКТЕРИЙ

А. Передача F-фактора от F^+ клетки в F'



Б. Передача бактериальной хромосомы путем конъюгации при включении F-фактора в хромосому бактерии





Трансдукция

Трансдукция – это передача генетической информации между бактериальными клетками с помощью умеренных трансдуцирующих фагов. Трансдуцирующие фаги могут переносить один ген или более.

Трансдукция бывает:

1) специфической (переносится всегда один и тот же ген, трансдуцирующий фаг всегда располагается в одном и том же месте);

2) неспецифической (передаются разные гены, локализация трансдуцирующего фага непостоянна).


трансдуцирующий фаг
гены

Трансформация

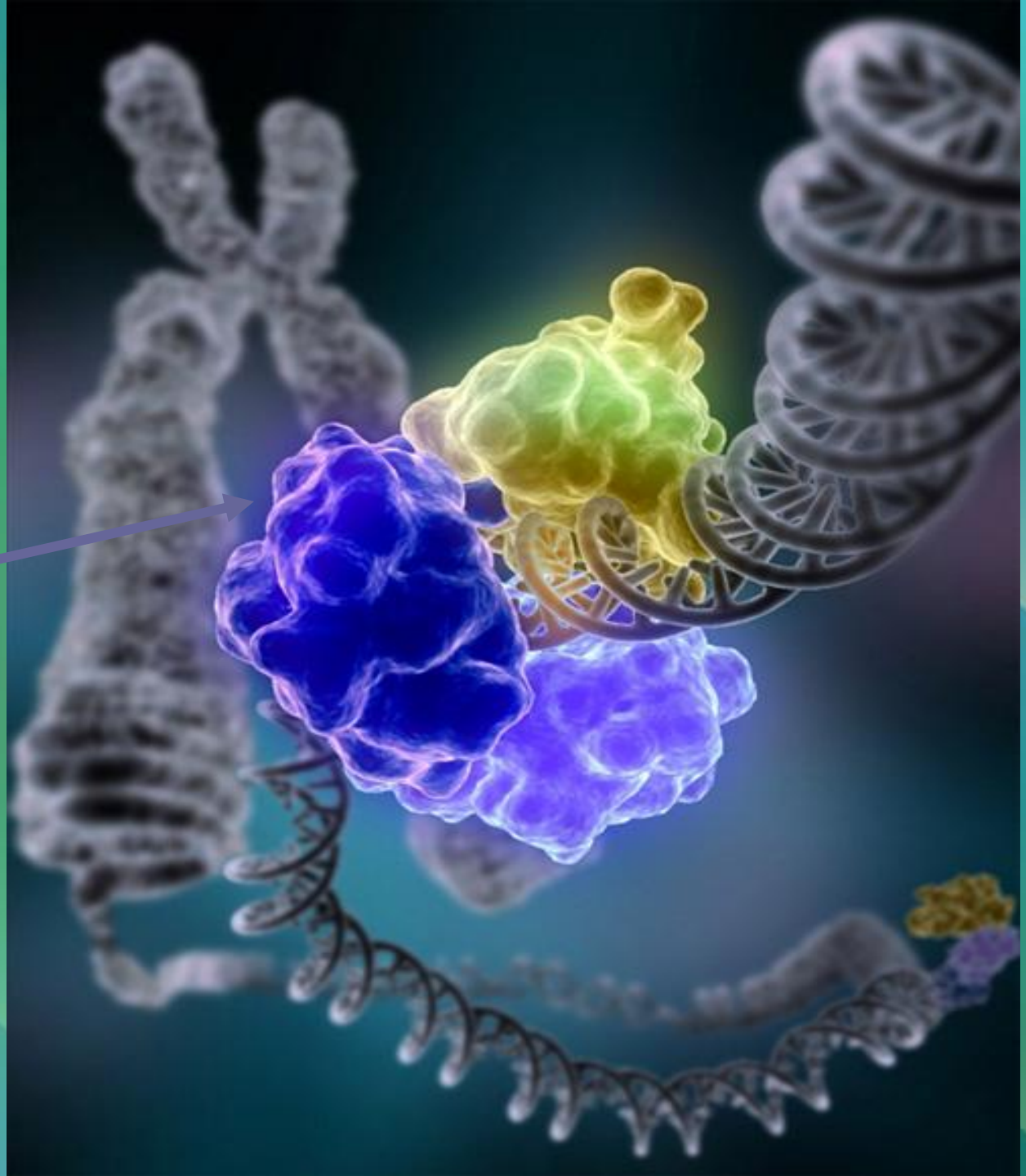
Трансформация – передача генетической информации в виде изолированных фрагментов ДНК при нахождении реципиентной клетки в среде, содержащей ДНК-донора. Для трансформации необходимо особое физиологическое состояние клетки-реципиента – **компетентность**. Фактор компетентности – белок, который вызывает повышение проницаемости клеточной стенки и цитоплазматической мембраны, поэтому фрагмент ДНК может проникать в такую клетку.

Применение генетических методов в диагностике инфекционных болезней

Рестрикционный анализ

Данный метод основан на применении ферментов, носящих название *рестриктаз.*

Рестриктазы представляют собой эндонуклеазы, которые расщепляют молекулы ДНК, разрывая фосфатные связи не в произвольных местах, а в определенных последовательностях нуклеотидов. Особое значение для методов молекулярной генетики имеют рестриктазы, которые узнают последовательности, обладающие центральной симметрией и считывающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии.


Рестриктаза

В настоящее время из различных бактерий выделено и очищено более 175 различных рестриктаз, для которых известны сайты (участки) узнавания (рестрикции). Выявлено более 80 различных типов сайтов, в которых может происходить разрыв двойной спирали ДНК.

В геноме конкретной таксономической единицы находится строго определенное (генетически задетерминированное) число участков узнавания для определенной

Если выделенную из конкретного микроба ДНК обработать определенной рестриктазой, то это приведет к образованию строго определенного количества фрагментов ДНК фиксированного размера.

Размер каждого типа фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле: мелкие фрагменты перемещаются в геле быстрее, чем более крупные фрагменты, длина их пробега больше. Гель окрашива-ют бромистым этидием и фотографируют в УФ-излучении. Таким образом можно получить рестрикционную карту определенного вида микробов.

Сопоставляя карты рестрикции ДНК, выделенных из различных штаммов, можно определить их генетическое родство, выявить принадлежность к определенному виду или ролу, а также обнаружить участки, подвергнутые мутациям.

Этот метод используется также как начальный этап метода определения последовательности нуклеотидных пар (секвенирования) и метода молекулярной гибридизации.

Метод молекулярной гибридизации

Позволяет выявить степень сходства различных ДНК. Применяется при идентификации микробов для определения их точного таксономического положения.

Метод основан на способности двухцепочечной ДНК при повышенной температуре (90 ˚С) в щелочной среде денатурировать, т. е. расплетаться на две нити, а при понижении температуры на 10 °С вновь восстанавливать исходную двухцепочечную структуру. Метод требует наличия молекулярного зонда.

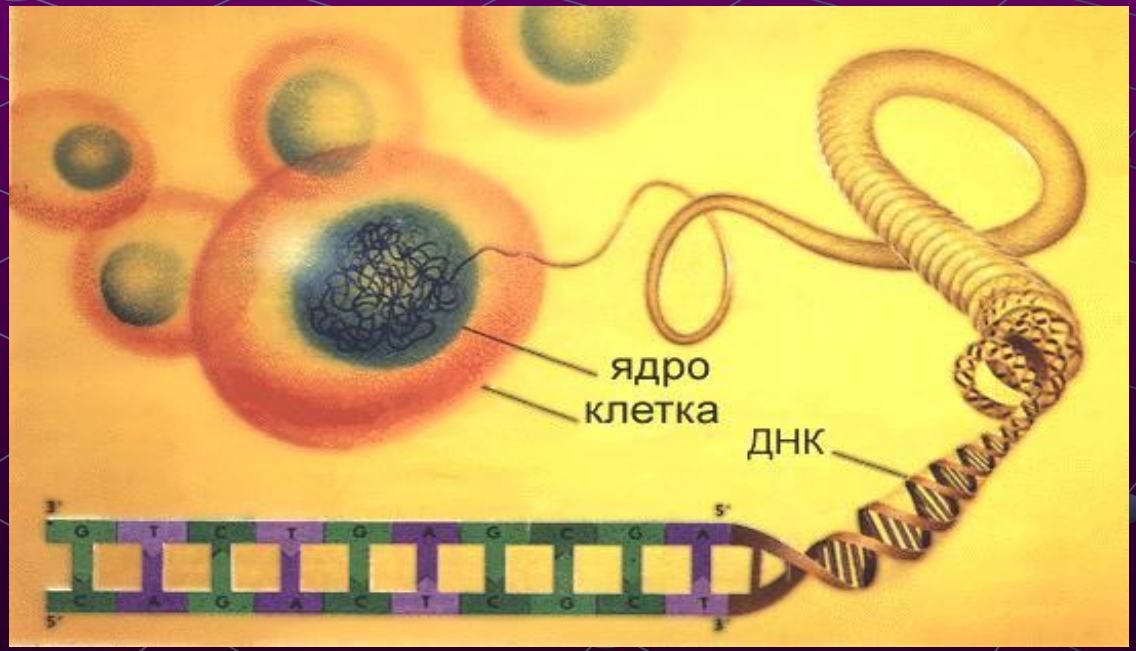
Зондом называется одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, меченная радиоактивнымм нуклидами, с которой сравнивают исследуемую ДНК.

Для проведения молекулярной гибридизации исследуемую ДНК расплетают указанным выше способом, одну нить фиксируют на специальном фильтре, который затем помещают в раствор, содержащий радиоактивный зонд. Создаются условия, благоприятные для образования двойных спиралей. В случае наличия комплементарности между зондом и исследуемой ДНК, они образуют между собой двойную спираль.

Полимеразная цепная реакция

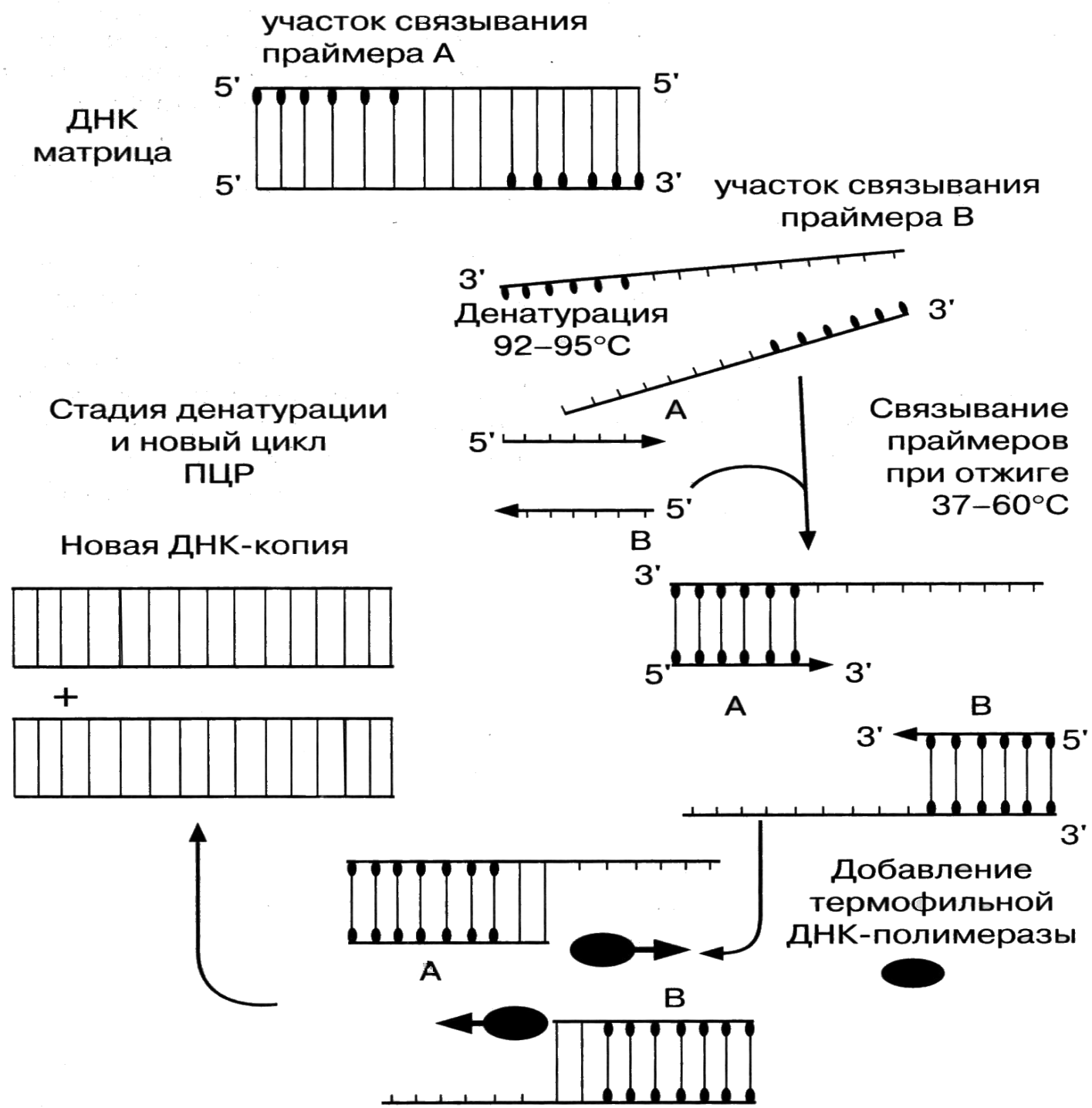
ПЦР позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по наличию в нем ДНК микроба без выделения последнего в чистую культуру.

Для проведения этой реакции из исследуемого материала выделяют ДНК, в которой определяют наличие специфичного для данного микроба гена. Обнаружение гена осуществляют его накоплением. Для этого необходимо иметь праймеры комплементарного 3'-концам ДНК исходного гена.



Накопление (амплификация) гена выполняется следующим образом. Выделенную из исследуемого материала ДНК нагревают. При этом ДНК распадается на 2 нити. Добавляют праймеры. Смесь ДНК и праймеров охлаждают. При этом праймеры, при наличии в смеси ДНК искомого гена, связываются с его комплементарными участками. Затем к смеси ДНК и праймера добавляют ДНК-полимеразу и нуклеотиды. Устанавливают температуру, оптимальную для функционирования ДНК-полимеразы.

В этих условиях, в случае комплементарности ДНК гена и праймера, происходит присоединение нуклеотидов к 3'-концам праймеров, в результате чего синтезируются две копии гена. После этого цикл повторяется снова, при этом количество ДНК гена будет увеличиваться каждый раз вдвое. Проводят реакцию в специальных приборах — амплификаторах. ПЦР применяется для диагностики вирусных и бактериальных инфекций.


участок связывания
праймера А
ДНК
матрица
5'
5'
5'
3'
участок связывания
праймера В
3'
Денатурация
92–95°C
3'
A
5'
5'
B
Связывание
праймеров
при отжиге
37–60°C
Стадия денатурации
и новый цикл
ПЦР
Новая ДНК-копия
+
3'
5'
3'
A
B
3'
5'
3'
Добавление
термофильной
ДНК-полимеразы
A
B

Риботипирование и опосредованная транскрипцией амплификация рибосомальной РНК

Последовательность нуклеотидных оснований в оперонах, кодирующих рРНК, отличается консервативностью, присущей каждому виду бактерий. Эти опероны представлены на бактериальной хромосоме в нескольких копиях.

Фрагменты ДНК, полученные после обработки ее рестриктазами, содержат последовательности генов рРНК, которые могут быть обнаружены методом молекулярной гибридизации с меченой рРНК соответствующего виды бактерий. Количество и локализация копий оперонов рРНК и рестрикционный состав сайтов как внутри рРНК-оперона, так и по его флангам варьируют у различных вида бактерий.

На основе этого свойства построен метод *риботипирования,* который позволяет производить мониторинг выделенных штаммов и определение их вида. В настоящее время риботипирование проводится в автоматическом режиме в специальных приборах.

Опосредованная транскрипцией амплификация рРНК используется для диагностики смешанных инфекций. Этот метод основан на обнаружении с помощью молекулярной гибридизации амплифицированных рРНК, специфичных для определенного вида бактерий. Исследование проводится в три этапа:

1. Амплификация пула рРНК на матрице, выделенной из исследуемого материала ДНК при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы.

2. Гибридизация накопленного пула рРНК с комплементарными видоспецифическим рРНК олигонуклеотидами, меченными флюорохромом или ферментами.

3. Определение продуктов гибридизации методами денситометрии, иммуноферментного анализа (ИФА).

Реакция проводится в автоматическом режиме в установках, в которых одномоментное определение рРНК, принадлежащих различным видам бактерий, достигается разделением амплифицированного пула рРНК на несколько проб, в которые вносятся комплементарные видоспецифическим рРНК меченые олигонуклеотиды для гибридизации.

- **СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**