

ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Полимеразная цепная реакция

Комиссаров А.Г.

Врач-бактериолог

СПб ГБУЗ «Городская поликлиника №75»

Бактериологическая лаборатория

Генетика микроорганизмов

- Генетика- наука о законах наследственности и изменчивости организмов.
- Единица наследственности – ген
- 1 ген кодирует структуру 1 белка
- Ген- функциональный участок нуклеиновой кислоты.
- У всех живых организмов 2 типа нуклеиновых кислот : ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и РНК (рибонуклеиновая кислота).

ДНК

- ДНК – двухцепочечная молекула ,состоящая из из нуклеотидов.
- ДНК обеспечивает хранение генетической информации , ее воспроизведение в виде синтеза белка и передачу потомству.
- При делении материнской бактериальной клетки ДНК удваивается , в результате чего образуются 2 дочерних клетки идентичные материнской.
- ДНК обладает уникальным свойством к самовоспроизведению.

ДНК



ДНК

- Принцип строения ДНК универсален для всего живого, но у разных видов ДНК отличается по длине, по составу и последовательности оснований нуклеотидов.
- Функция: Хранение, воспроизведение и передача генетической информации.
- Вся генетическая информация уникальна и не повторяется.
- Реализация генетической информации в течение всей жизни клетки в виде синтеза белков.
- Перед синтезом белка двойная спираль ДНК раскручивается и ее нити расходятся, на одной из нитей ДНК (матричной) происходит синтез информационной РНК (транскрипция)

РНК (рибонуклеиновая кислота)

У бактерий и грибов 3 типа РНК:

- Информационная РНК - «информационный посредник» между ДНК нуклеоида и рибосомой.
- Транспортная РНК

В процессе синтеза белка доставляет аминокислоты к рибосомам согласно информации, записанной на информационной РНК.

- Рибосомальная РНК.

Входит в состав рибосом-органойдов, на которых происходит синтез белка из отдельных аминокислот по заданной иРНК матрице. (программе) - трансляция.

РНК (рибонуклеиновая кислота)

- У вирусов только геномная РНК в двух вариантах геномная +РНК и геномная - РНК
- +РНК является информационной РНК и напрямую участвует в синтезе белка.
- - РНК не является информационной РНК , на ее матрице синтезируется копия ДНК при помощи фермента обратной транскриптазы (ревертазы) .
- Для большинства вирусов РНК выполняет функцию хранения генетической информации взамен ДНК.

Особенности генетики микроорганизмов.

Особенности генетики бактерий:

- Отсутствие оформленного ядра

- 1 кольцевидно замкнутая ДНК – нуклеоид.
- Наличие внехромосомных ДНК – плазмид, несущих гены вирулентности, антибиотикорезистентности.
- Вся информация, записанная на ДНК уникальна и не повторяется, 90% генов находится в активном состоянии.
- У бактерий содержится 2 типа нуклеиновых кислот ДНК и РНК.

Схема реализации генетической информации.

- Схема реализации генетического кода:
- Ген (ДНК) -транскрипция-РНК -трансляция--белок (фермент/структурный белок) -----признак (пример.наличие жгутика ,токсина ,адгезинов)

Практическое применение

Уникальные свойства ДНК, а именно способность к репликации , денатурации и восстановлению своей исходной структуры , транскрипции и трансляции легли в основу разработок молекулярно-генетических методов диагностики заболеваний человека , в том числе инфекционного генеза.

Молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных

- Основаны на обнаружении нуклеиновых кислот (ДНК, геномной РНК, рибосомальной РНК) возбудителя (бактерий, вирусов, грибов, простейших) в пробе.
- Генетические методы:
 - 1) Гибридизационные
 - 2) Амплификационные методы:
 - ПЦР (полимеразная цепная реакция)
 - Лигазная реакция
 - Методы транскрипционно-опосредованной амплификации (NASBA ПЦР)

Молекулярно-генетические методы диагностики

- Основной и наиболее распространенный метод- ПЦР(Полимеразная цепная реакция)
- Основа реакции- способность ДНК к самопроизведению.
- Позволяет увеличить число копий искомого специфического участка ДНК бактерий и вирусов в миллионы раз с использованием фермента ДНК-полимеразы , нуклеотидов , праймеров , буфера и специального оборудования(амплификатора , термоциклера)

Метод ПЦР

Метод ПЦР

1. смыв с органов

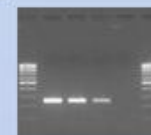


2. выделение ДНК

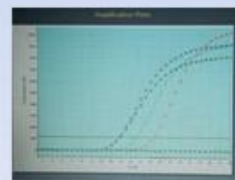


3. ПЦР

Стандартная ПЦР



ПЦР в режиме реального времени



Этапы ПЦР-анализа

- 1) Пробоподготовка исследуемого материала:
 - центрифугирование (кровь ,моча ,ликвор,фекалии)
 - гомогенизация
- 2) Экстракция нуклеиновых кислот (Нуклеовыделение) ДНК , РНК ,рибосомальной РНК:
 - Разрушение оболочек эпителиальных клеток , оболочек бактерий и вирусов ,удаление белков , ингибиторов ПЦР (белки , ДНК-аза) с последующим осаждением элюцией нуклеиновых кислот в раствор.

Методы нуклеовыделения

- - Термолизис (Экспресс-метод ,ведущий к потере части ДНК ,не подходит для выделения РНК)
- -Осаждение
- -Осаждение с магнитным штативом.
- При любом способе нуклеовыделение проводится в присутствии ВКО-внутреннего контрольного образца (ген глобина человека ,который добавляется в пробирку)
- Нуклеовыделение проводится в пробирках с применением хаотропных агентов , осадителей , отмывочных растворов и элюирующих растворов.
- Нуклеовыделение от 15 мин до 2 часов ,в зависимости от количества образцов и способа экстракции. Проводится вручную или автоматически (пр «EasyMaq»)

ПЦР-анализ. Компоненты ПЦР-смеси

- Компоненты реакции ПЦР:

1) Искомая ДНК образца (хромосомная, плазмидная), или РНК (геномная, рибосомальная),

2) Праймеры-олигонуклеотиды (10-30 азотистых оснований), содержащие комплементарную последовательность ДНК к границе специфического участка искомой ДНК.

При отсутствии такого участка праймер не прикрепится и ПЦР не начнется.

ПЦР-анализ. Компоненты ПЦР-смеси.

3) Термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза (TaqF)
Данный фермент выдерживает колебания высоких температур на всех этапах амплификации. Активный синтез копий ДНК при температуре 70-72°C

4) Смесь нуклеотидов с различными азотистыми основаниями. (А, Г, Ц, Т)

4) Нуклеотиды

Из нуклеотидов фермент ДНК-полимераза синтезирует копию ДНК.

5) Олигоуклеотиды-зонды, меченые флуорофорами (FAM, HEX и пр.) и гасителем. Только для варианта ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR)

6) Солевой буферный раствор. Содержит соли магния для работы полимеразы.

ПЦР-анализ. Компоненты ПЦР-смеси

7) Ревертаза (Обратная транскриптаза) – только для ПЦР-диагностики вирусных инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами.

РНК не амплифицируется. Для ее обнаружения необходимо провести процесс обратной транскрипции: на матрице РНК синтезируется копия ДНК (кДНК), которая потом используется для амплификации.

Обратная транскрипция проводится либо предварительно в пробирке после этапа нуклеовыделения, либо непосредственно в амплификаторе при 50°C после нуклеовыделения и сборки ПЦР-смеси.

Такая ПЦР называется – ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией)

8) Минеральное масло-используется для предотвращения испарения ПЦР-смеси во время амплификации.

ПЦР-анализ. Компоненты ПЦР-смеси

- Варианты ПЦР-смесей:
- - ПЦР-смеси ,которые необходимо готовить из ,как правило,замороженных компонентов при
- в отдельной стерильной микропробирке объемом 1,5-2 мл при каждой постановке ПЦР.
- - Полуготовые ПЦР-смеси в отдельных микропробирках объемом 0,2 ,0,5 мл.,раскапанные
- под воск ,которые требуют добавления смеси нуклеотидов на поверхность воска.
- - Готовые лиофильно высушенные реакционные смеси (ГРС) в стрипованных или отдель
- ныхмикропробирках – вся продукция ЗАО «ВекторБест» серии «РеалБест»

Проведение амплификации (собственно ПЦР)

- ПЦР проводится с использованием тонкостенных или толстостенных микропробирок с выпуклыми/плоскими крышками, изготовленных из ДНК-аза /РНК-аза free пластика.
- Смесь раскапывается в определенном объеме или отбирается необходимое количество микропробирок с готовой смесью и вносятся образцы с выделенной ДНК (РНК).
- Объём реакционной смеси составляет от 0,25 до 0,5 мкл.
- Обязательна постановка контрольных реакций ОКО и ПКО.

Этапы ПЦР-анализа

- Амплификация- многократное увеличение числа копий специфического участка ДНК.
- Амплификация проводится на специальных приборах-амплификаторах(термоциклерах) и амплификаторах с детекцией флуоресцентного сигнала.
- Данные приборы позволяют резко изменять температуру согласно протоколу исследования.
2 типа приборов:
 - а) Планшетного типа (CFX-96 , ICycler5)
 - б) Роторного типа (RotorGen)

Амплификатор роторного типа



Этапы ПЦР-амплификации

- Денатурация («плавление») ДНК (при 93°C - 95°C) 30 с. - 2 мин.
Расплетение двойной спирали и расхождение цепей.
- Присоединение специфических праймеров (отжиг) (62°C) 30 с. - 2 мин.
Праймеры должны быть комплементарны специфическому участку искомой ДНК. С места прикрепления праймера начнется синтез копии нити ДНК ферментом полимеразой.
- Синтез ДНК ДНК-полимеразой (72°C) - элонгация - 1 мин.
Достраивание дочерней нити ДНК по принципу комплементарности из присутствующих в реакционной смеси нуклеотидов с различными азотистыми основаниями.

Этапы ПЦР-амплификации

- 1-й цикл-удлинение участка дочерней цепи, начиная от праймера, происходит произвольно , т.к. используемая полимераза не способна синтезировать продолжительный участок. Образование побочных продуктов.
- 2-й цикл - в растворе образуются ограниченные участки-ампликоны
- Ампликон-специфический участок ДНК , ограниченный двумя праймерами.
- С 3-го цикла начинается копирование ампликонов , до тех пор пока не израсходуются компоненты реакции , в первую очередь нуклеотиды , полимераза и т.д.
- Увеличение ампликонов происходит в геометрической прогрессии: 2 ,4 ,8,16 и т.д.

Схема ПЦР- амплификации

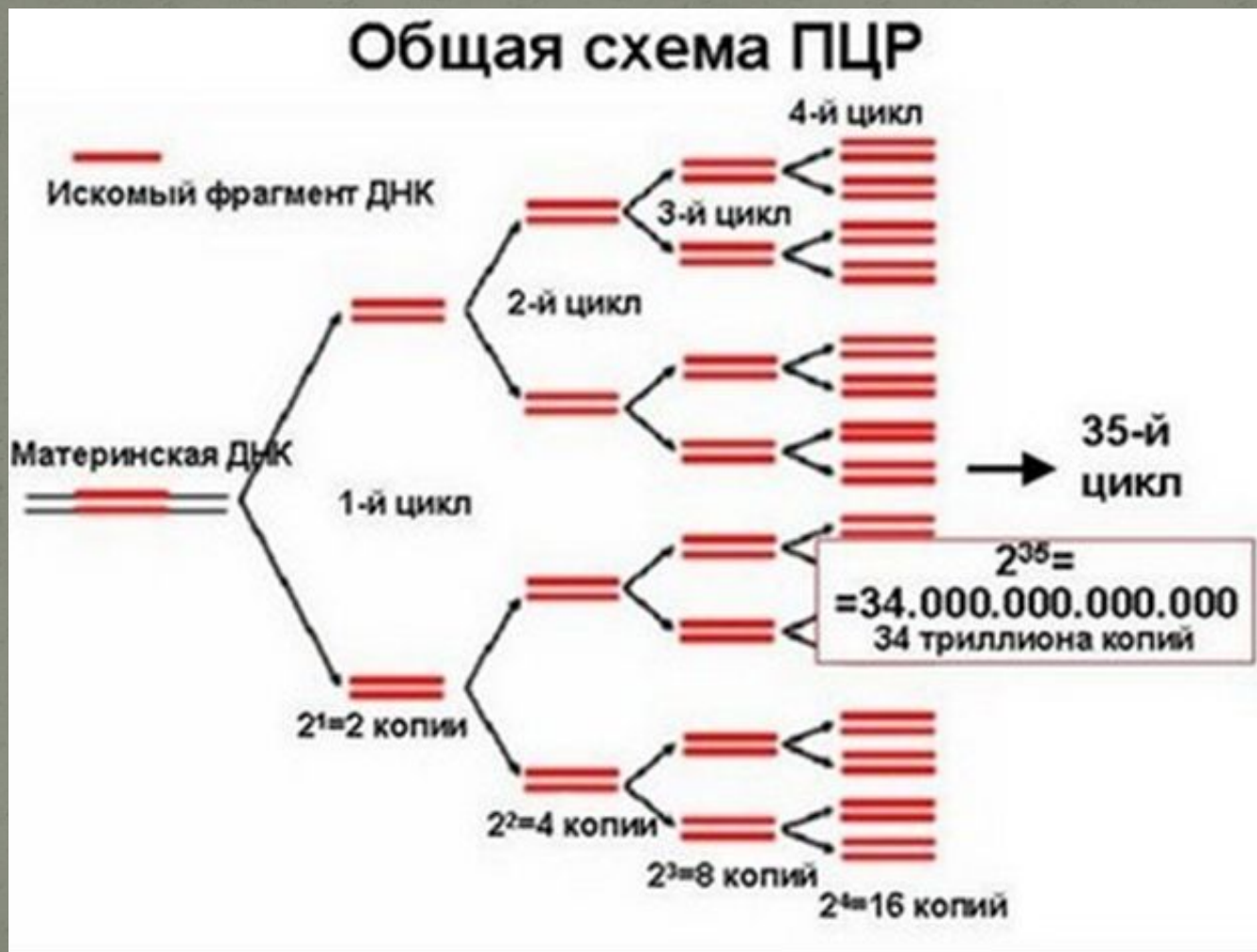
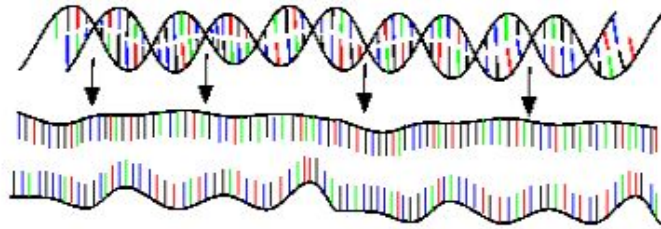
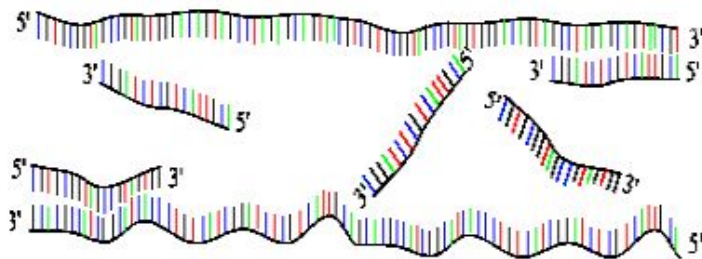


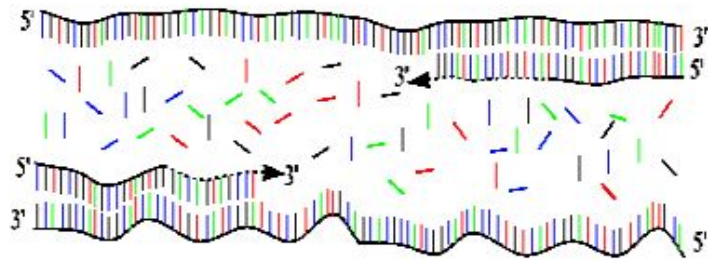
Схема амплификации



Этап 1: Денатурация
1 минута 94°C



Этап 2: Отжиг праймеров
45 секунд 54°C



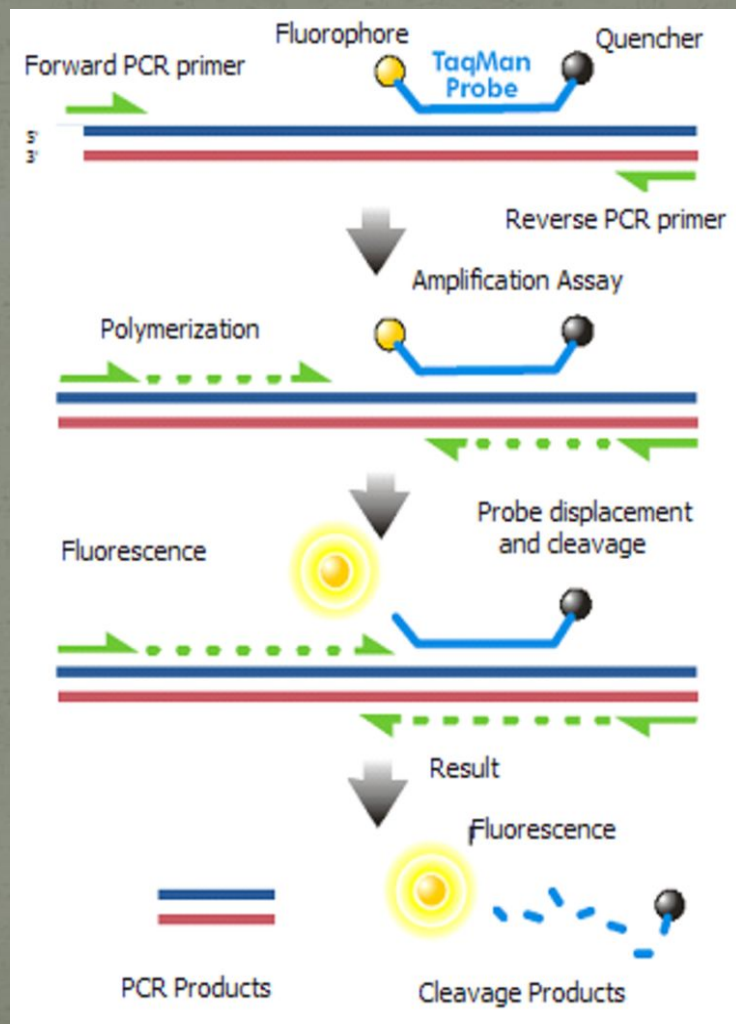
Этап 3: Синтез цепи ДНК

Детекция продуктов ПЦР

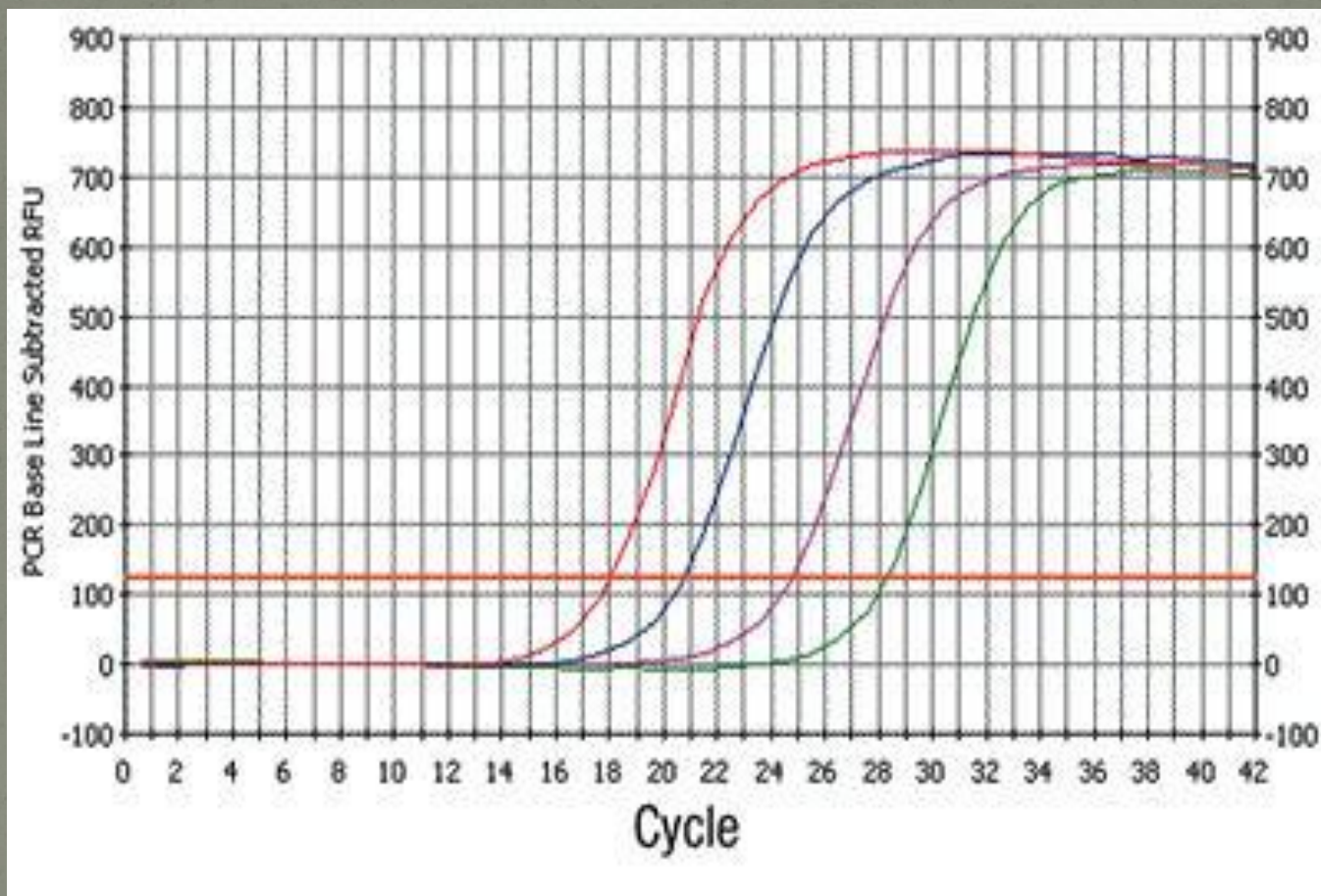
По способу детекции выделяют следующие варианты ПЦР:

1. ПЦР с детекцией методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле с применением интеркалирующих красителей (этиленбромид). Классический вариант ПЦР-анализа.
2. ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в реальном времени / по конечной точке.
- метод основан на количественной флуоресцентно-гибридационной детекции специфических продуктов амплификации, в которых специальные красители используются для наблюдения за развитием амплификации в реальном времени.
Используются термоциклеры (амплификаторы), совмещенные с детектором флуоресценции.

Принцип ПЦР в реальном времени



Результат ПЦР в реальном времени



Достоинства ПЦР-диагностики

Достоинства ПЦР-диагностики:

- Высокая чувствительность метода
- Возможность диагностики на ранних стадиях заболевания
- Исследование различного материала от больных (плазма/сыворотка крови; соскобы со слизистых оболочек, ликвор, мокрота, моча, эякулят, пунктаты)
- Выявление широкого спектра возбудителей, включая труднокультивируемые и некультивируемые бактерии, вирусы, простейшие.

Недостатки ПЦР-диагностики

- Высокая стоимость оборудования.
- Одновременная амплификация ДНК как живого , так и погибшего микроорганизма , элиминация возбудителя не ранее 4-8 недель.
- Возможность перекрестной реакции .
- Получение ложноотрицательных результатов при наличии ингибиторов ПЦР.
- Определенная техническая подготовка персонала.
- Вероятность контаминации:
 - А) Перекрестной контаминации от пробы к пробе , возникающая в процессе обработки образцов или при раскапывании реакционной смеси.
 - Б) Контаминация продуктами амплификации (ампликонами)



Основные методы диагностики инфекционных заболеваний

Комиссаров А.Г.

СПб ГБУЗ «Городская поликлиника №75» бактериологическая
лаборатория

инфекционных

заболеваний

- I. Методы, основанные на выявлении возбудителей инфекционных заболеваний (бактерий, вирусов, грибов) в исследуемом материале.
1. Культуральные методы – методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, основанный на выделении чистой культуры возбудителя на поверхности питательных сред или в культуре тканей. Культуральные методы – «золотой» стандарт лабораторной диагностики инфекционных заболеваний. Выделяют бактериологический, микологический и вирусологический методы. Вирусы и хламидии не растут на питательных средах. Для их выделения используют культуру тканей.

методы диагностики
инфекционных

заболеваний

2. Иммунологические методы поиска антигенов возбудителей в исследуемом материале.
 - а. Твердофазный иммуноферментный анализ(ИФА)
 - б. Иммунохроматография-бесприборный метод экспресс-диагностики (для диагностики ОКИ , легионеллеза ,лямблиоза)
3. Молекулярно-генетические методы (Молекулярно-биологические ,генетические)
ПЦР и ПЦР в «реальном времени».

инфекционных

заболеваний.

II. Методы ,основанные на выявлении иммунного ответа (серодиагностика ,инфекционная иммунодиагностика)

- метод диагностики инфекционных заболеваний, основанный на выявлении антител в крови к тому или иному возбудителю.

Лабораторная диагностика любых инфекционных заболеваний должна быть комплексной!

УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ

Комиссаров А.Г.

Учение об инфекции

- Инфекционный процесс – процесс взаимодействия микроорганизма и макроорганизма в определенных условиях окружающей среды, крайней степенью выраженности которого является инфекционное заболевание.

По источнику инфекции подразделяются:

- Антропонозы-источник заболевания только человек.
- Зоонозы – источник заболевания животные.
- Сапронозы – источник заболевания внешняя среда.

Механизмы передачи инфекции

- Фекально-оральный механизм
 - Пищевой путь
 - Водный путь
 - Контактнo-бытовой
- Аэрозольный механизм
 - Воздушно-капельный и воздушно-пылевой пути
- Трансмиссивный механизм
- Контактный
 - Гемоконтактный и половой пути

Понятие о патогенности.

- Патогенность – потенциальная способность данного вида микроорганизмов вызвать инфекционный процесс у определенного вида хозяев. Качественное понятие. Определяется генетически. Свойство вида.

По способности вызывать заболевания бактерии подразделяются на:

- Патогенные виды.
- Условно-патогенные виды.
- Непатогенные виды.

Понятие о вирулентности.

- Вирулентность – мера (степень) патогенности. Количественное понятие. Свойство не вида , а данного штамма микроорганизма.

По степени вирулентности различают:

- Высоковирулентные штаммы
- Низковирулентные штаммы
- Авирулентные штаммы

Стадии инфекционного процесса

- Адгезия – прикрепление к поверхности клеток слизистых оболочек.
- Колонизация – активное деление клеток с образованием биопленок.
- Инвазия – проникновение в подслизистую оболочку.
- Пенетрация и внутриклеточная инвазия для внутриклеточных бактерий.

Факторы вирулентности



Факторы вирулентности.

Инвазивность.

- Инвазивность – способность проникать в организм и распространяться в нем.
- Определяется:
 - Адгезией –прикрепление к слизистой оболочке за счет пилей общего типа , тейхоевых кислот , ЛПС.
 - Колонизацией (за счет жгутиков и различных ферментов
 - Факторами защиты от иммунитета
 - Ферментами вирулентности
 - Внутриклеточной локализацией некоторых бактерий (хламидии , риккетсии ,анаплазмы).

ЯДОВИТОСТЬ

- Ядовитость – способность к продукции экзотоксинов, либо наличие эндотоксина (липополисахарид клеточной стенки грамотрицательных бактерий).

Ядовитость определяется:

- Токсигенностью – способностью к продукции экзотоксинов (дифтерийная палочка, холерный вибрион, столбнячная палочка) Каждый токсин имеет мишень в организме хозяина, синтезируется при жизни.
- Токсичностью – наличием эндотоксина у всех Грамотрицательных бактерий, высвобождается при гибели.