

**ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет»
МЗ РФ**

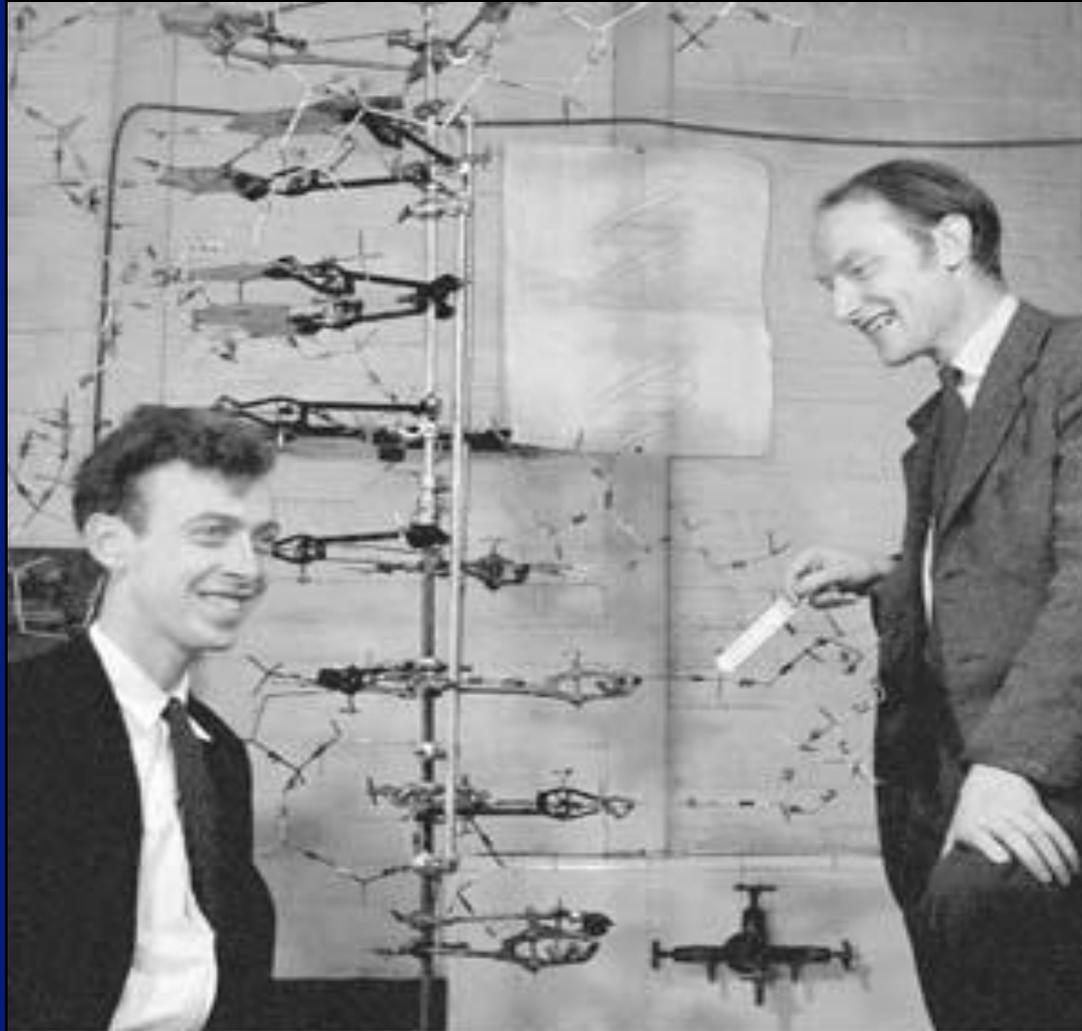
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

**Генетика микроорганизмов
Изменчивость в микробных
популяциях**

ИРКУТСК – 2016

Какое открытие, удостоенное нобелевской премии,
связано с именами

ДЖЕЙМС
УОТСОН



ФРЕНСИС
КРИК

Дайте определение: ГЕНОТИП, генофонд, фенотип

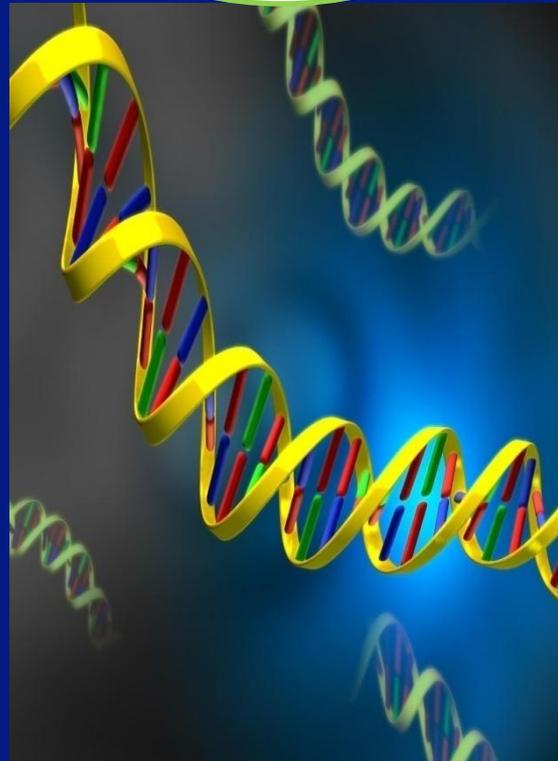
- ... - совокупность всех генных вариаций (аллелей) определенной популяции
- ... - совокупность генов данного организма
- ... - совокупность характеристик, присущих индивиду на определённой стадии развития

Материальная основа генетического аппарата прокариот?

РНК

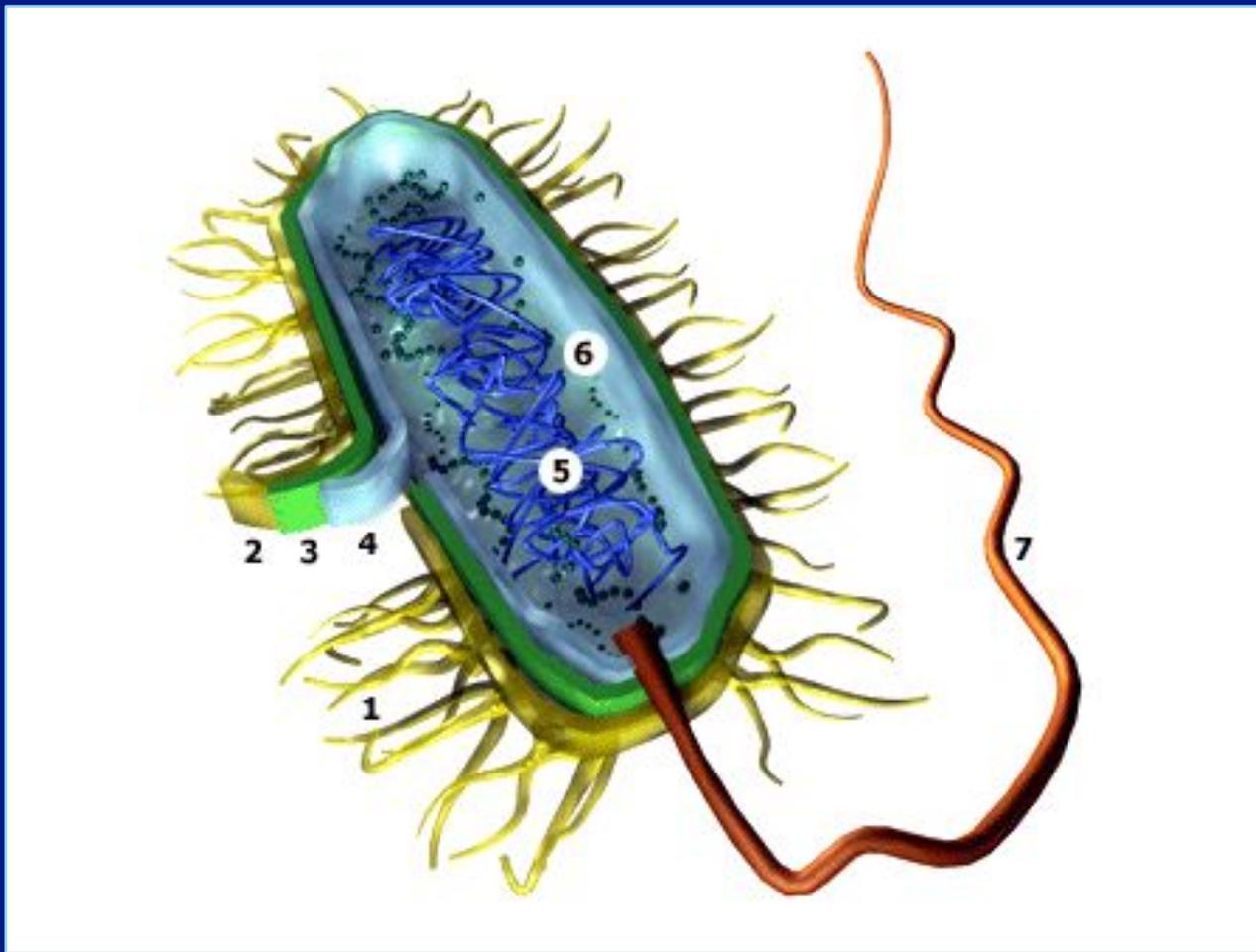


ДНК



БЕЛОК





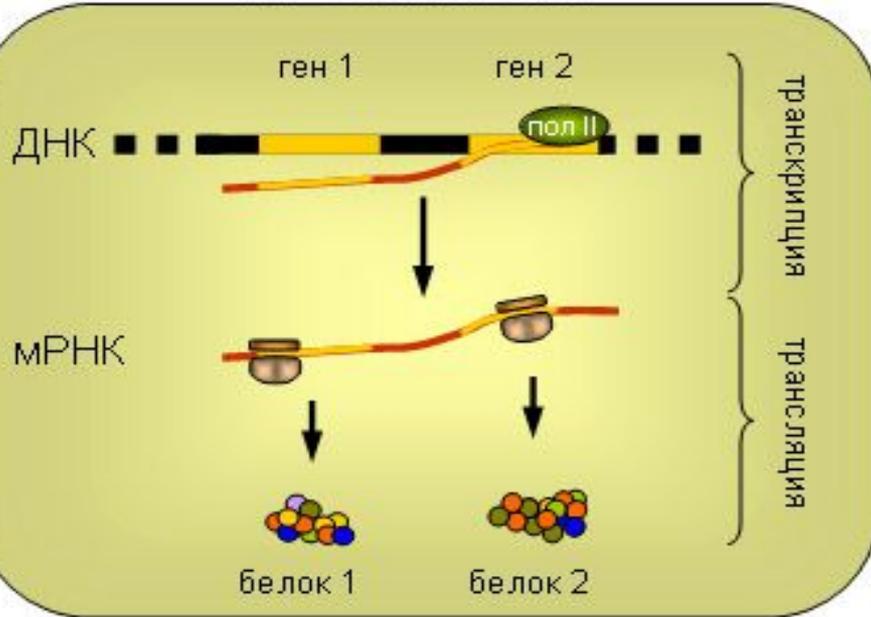
Где
сосредоточен
генетический
материал у
прокариот ?

Почему нельзя говорить о ядре прокариот?

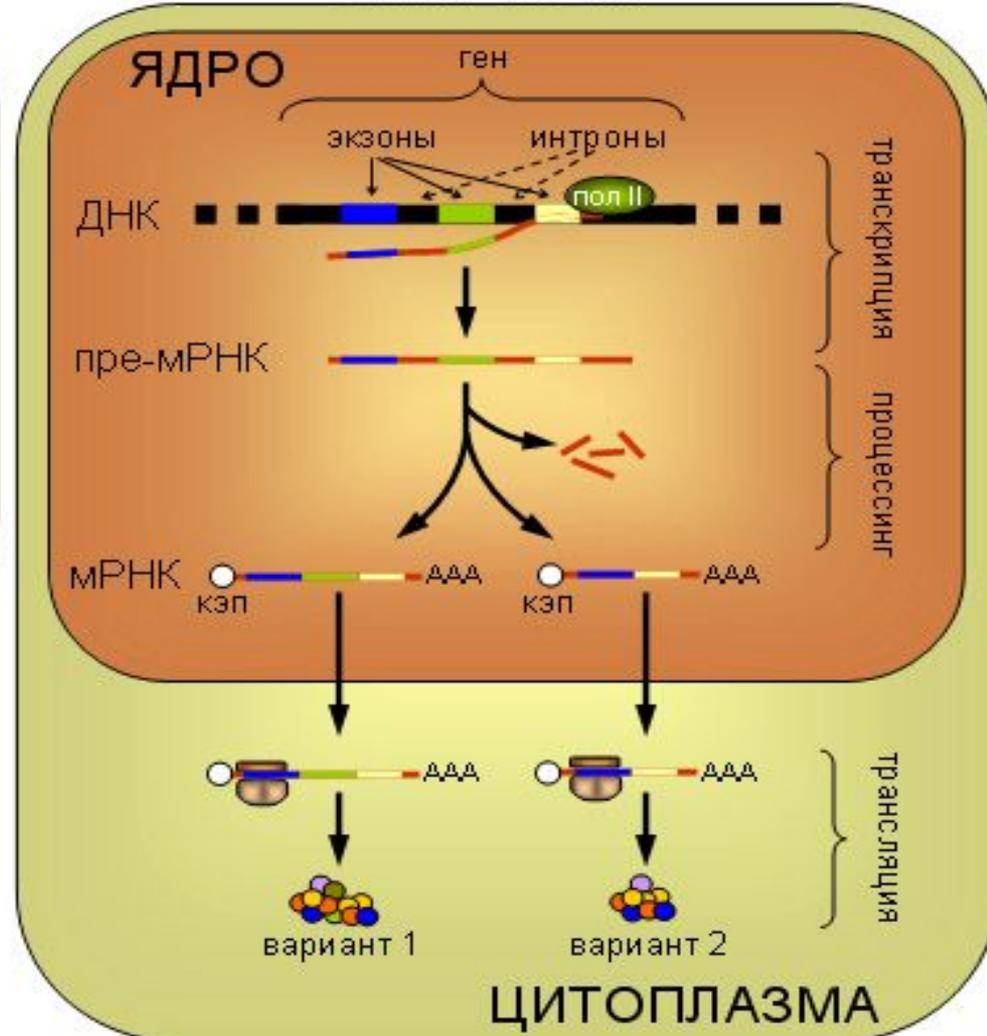
Как называется способ деления бактерий?

Чем отличается механизм реализации генетической информации у прокариот от эукариот?

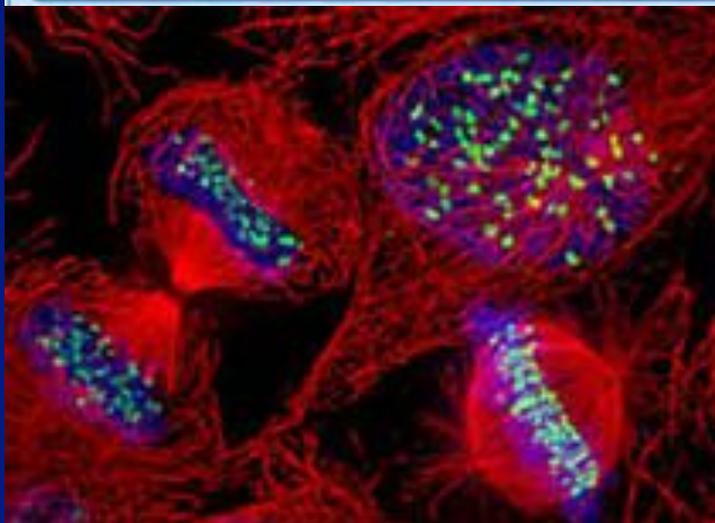
ПРОКАРИОТЫ



ЭУКАРИОТЫ



Какой молекулярно-генетический процесс лежит в основе наследственности ?



Какова роль основной группы ферментов, участвующих в процессе репликации?

**ДНК-
полимераза
?**

**ДНК-
геликаза
?**

**Праймаза
?**

**ДНК-
лигаза
?**

**Рестриктаза
?**

**ДНК-топо-
изомераза
?**

**в репликации участвуют следующие
основные группы ферментов**

ДНК-полимераза
катализирует процесс репликации дочерней ДНК на матрице

ДНК-геликаза
осуществляет расплетание двойной спирали ДНК

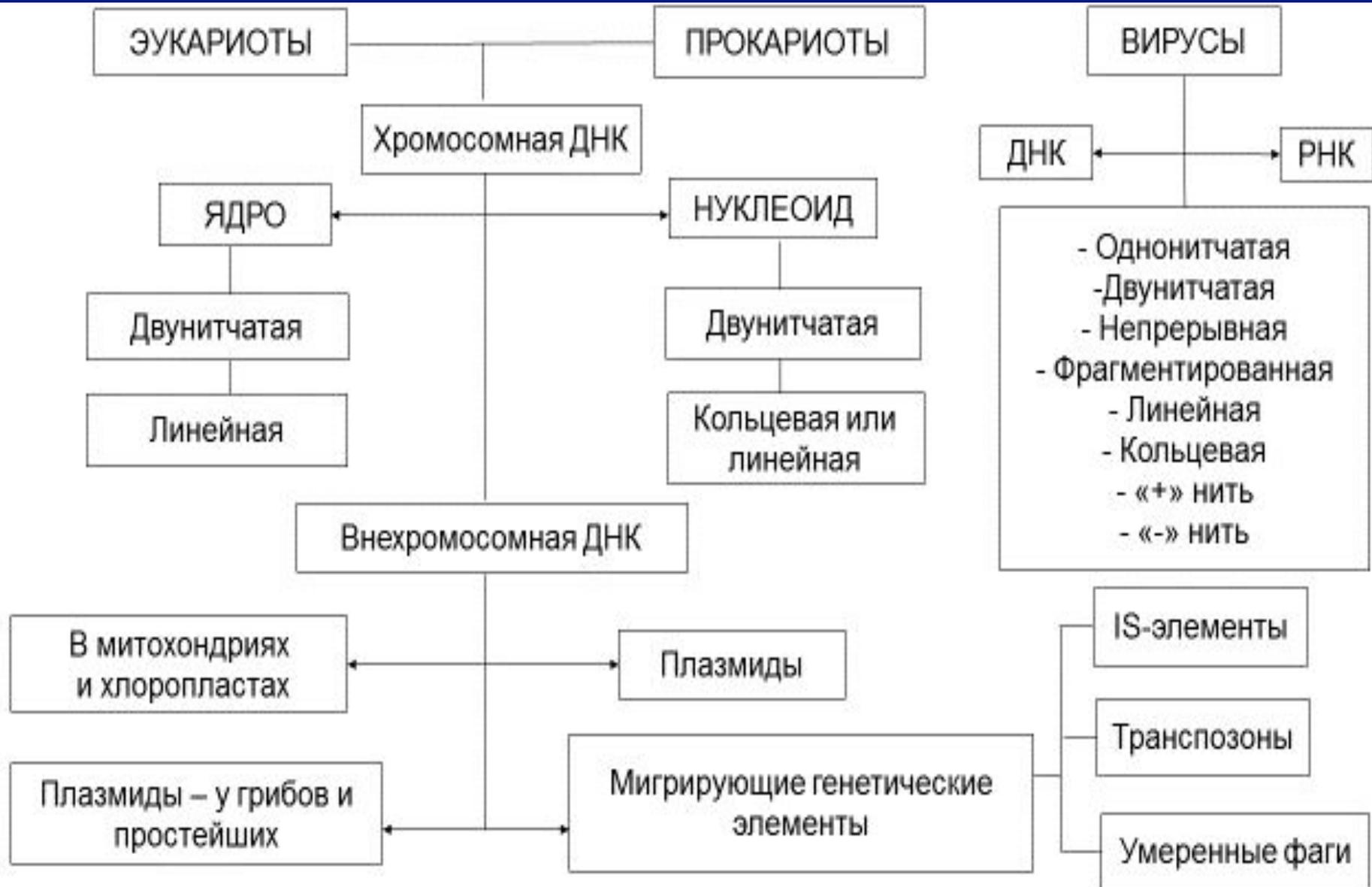
праймаза
служит для образования РНК-праймеров, необходимых для инициации синтеза ДНК в точке ori , а в дальнейшем - отстающей цепи

ДНК-лигаза
катализирует образование фосфодиэфирных связей

рестриктазы -
вырезают измененные участки ДНК, убирая нежелательные вставки

ДНК-топоизомеразы
изменяют степень спирализации и тип сверхспирали

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА МИКРООРГАНИЗМОВ

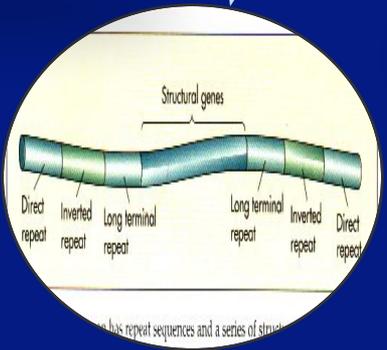
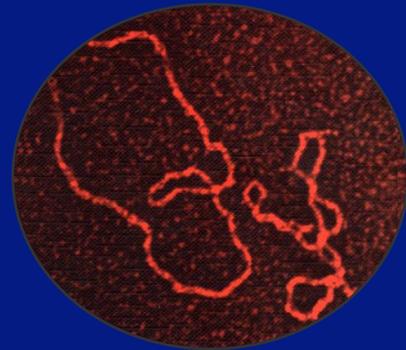
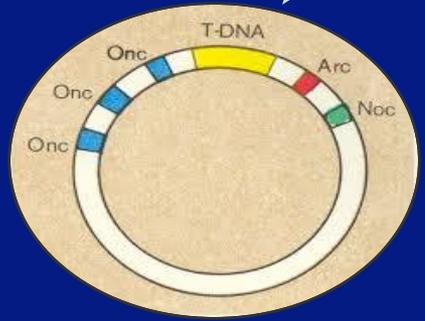
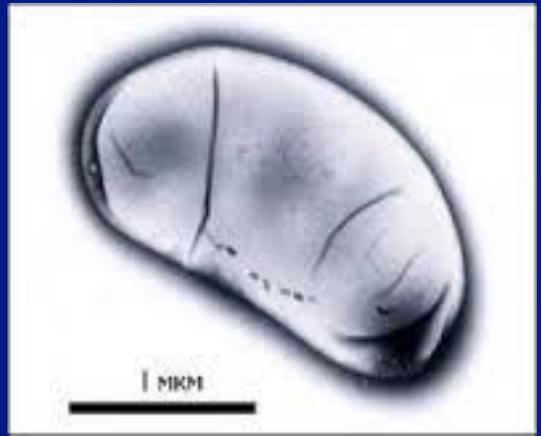


Перечислите структуры прокариот, содержащие ДНК. Обозначьте их свойства и функции.

Хромосомная

ДНК

Внехромосомная



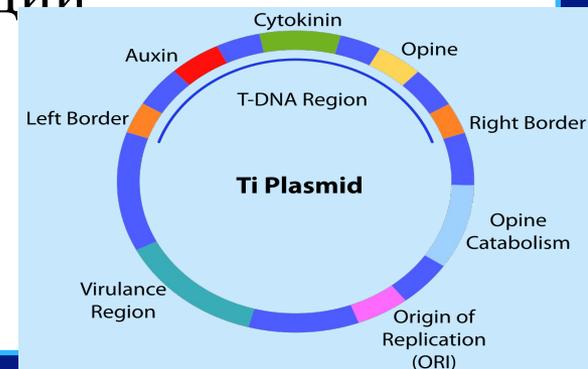
Виды плазмид

Плазмиды — фрагменты ДНК, несущие от 40 до 50 генов.

- *автономные* (не связанные с хромосомой бактерии, способны самостоятельно репродуцироваться; в клетке может присутствовать несколько их копий)

- *интегрированные*: встроенные в хромосому, репродуцируются одновременно с ней. Интеграция плазмид происходит при наличии гомологичных последовательностей ДНК, при которых возможна рекомбинация хромосомной и плазмидной ДНК (что сближает их с профагами).

• *Плазмиды* : трансмиссивные (например, F- или R-плазмиды), способные передаваться посредством конъюгации и нетрансмиссивные



- Плазмиды выполняют регуляторные или кодирующие функции
- ***Регуляторные***: участвуют в компенсировании тех или иных дефектов метаболизма бактериальной клетки посредством встраивания в повреждённый геном и восстановления его функций.
- ***Кодирующие***: приносят в бактериальную клетку новую генетическую информацию, кодирующую новые, необычные свойства (например, устойчивость к антибиотикам).

Группы плазмид

F-плазмиды

контролируют синтез F-пилей, способствующих контакту бактерий-доноров (F+) с бактериями-реципиентами (F-).

- могут быть автономными и интегрированными.

Встроенная в хромосому F-плазмида обеспечивает высокую частоту рекомбинации бактерий данного типа, поэтому их также обозначают как Hfr-плазмиды от англ. high frequency of recombinations, высокая частота рекомбинаций].

- ***R-плазмиды*** (от англ. resistance, устойчивость) кодируют устойчивость к лекарственным препаратам.
- ***Плазмиды патогенности*** контролируют вирулентные свойства бактерий и токсинообразование (плазмиды включают tox+-гены).
- ***Плазмиды бактериоциногении*** кодируют синтез бактериоцинов - белковых продуктов, вызывающих гибель бактерий того же или близких видов.

Скрытые плазмиды

не содержат генов, которые можно
было бы обнаружить по их
фенотипическому проявлению

Плазмиды биодеградации

- кодируют ферменты деградации природных (мочевина, углеводы) и неприродных (толуол, камфора, нафталин) соединений, необходимых для использования в качестве источников углерода или энергии, что обеспечивает им *селективные преимущества* перед другими бактериями данного вида. Патогенным бактериям подобные плазмиды придают преимущества перед представителями аутомикрофлоры

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

для диагностики инфекционных заболеваний человека:

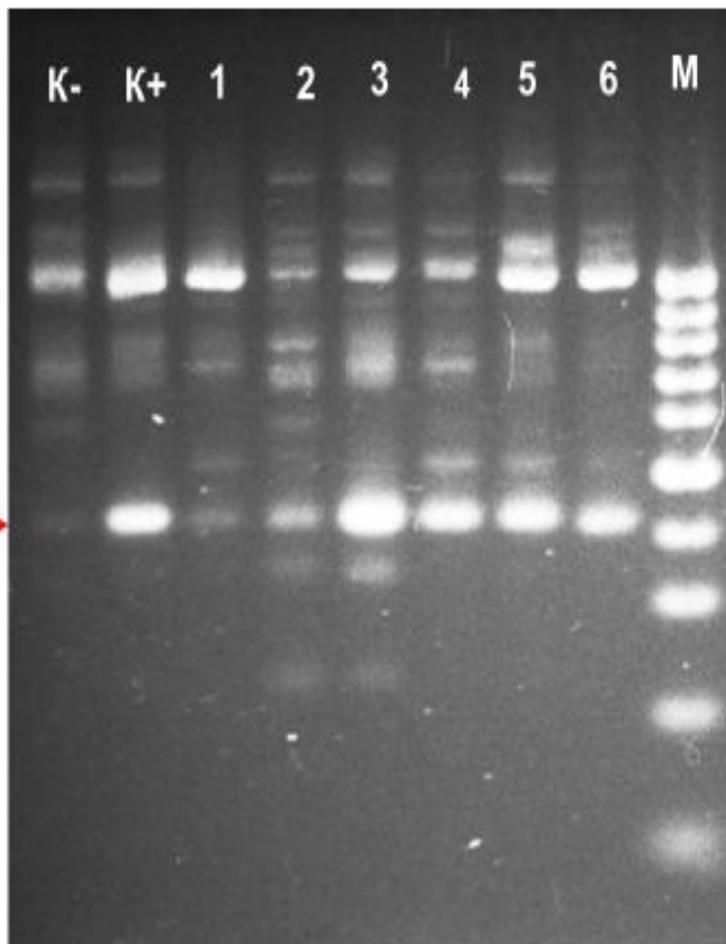
На основе достижений генетики микроорганизмов разработан высокоточный метод диагностики и идентификации микроорганизмов – **ПЦР-диагностика (полимеразная цепная реакция)**. В основе метода ПЦР лежит многократное удвоение какого-либо участка ДНК в условиях *in vitro*:

Каждый цикл ПЦР включает:

- а) этап денатурации** – раскручивание двунитевой ДНК, который обеспечивается высокой температурой - 95°C
- б) этап отжига** (присоединения) праймеров, который проходит в процессе инкубации реакционной смеси при температуре $55 - 65^{\circ}\text{C}$.
- в) этап элонгация или процесс полимеризации ДНК**, который начинается достраивание праймеров, начиная с 3'-конца, путем комплементарного синтеза на матрице одноцепочечных фрагментов ДНК, который осуществляется с помощью специального фермента – Taq-полимеразы (термоустойчивой ДНК-полимеразы) и нуклеотидов (в качестве строительного материала).

праймеры – короткие, длиной 15-30 азотистых оснований, одноцепочечные структуры ДНК, добавляющиеся в реакционную смесь из вне в избытке, обеспечивают специфическое присоединение только к определенным фрагментам ДНК (этим обеспечивается идентификация возбудителя инфекционного заболевания человека)

Детекция ПЦР-продукта проводят, разными способами, например, в агарозном геле с бромистым этидием под УФ-светом с длиной волны 310 нм. Регистрация результатов проводится визуально, с помощью фотографирования или сканирования видеосистемой.



1-6 — исследуемые образцы;

K⁻ — отрицательный контроль;

K⁺ — положительный контроль;

M — маркер молекулярного веса

Критерии учета и оценки –

наличие светящейся полосы желтого цвета на уровне полосы положительного контроля («K⁺») свидетельствует о положительном результате и наличии ДНК соответствующих микроорганизмов в исследуемом материале.

Критерии достоверности: о достоверности получаемого результата свидетельствуют результаты контролей «K⁺» и «K⁻». В пробе «K⁻» ДНК должна отсутствовать.

В пробе «K⁺» должна быть видна светящаяся полоса ДНК определенного размера. Наличие светящейся полосы желтого цвета в «K⁻» на уровне положительного контроля следует рассматривать как результат контаминации (загрязнения). В этом случае результаты анализа должны быть обязательно отменены. Наличие светящихся полос желтого цвета выше и ниже полосы «K⁺» могут быть результатом неспецифической амплификации, которые не должны быть приняты во внимание.

ПЦР-МЕТОД ДИАГНОСТИКИ

Преимущества

прямое определение возбудителей инфекционных заболеваний

высокая специфичность ПЦР-диагностики, то есть в исследуемом материале выделяется фрагмент ДНК, специфичный только конкретному возбудителю

позволяет диагностировать наличие долго растущих возбудителей
эффективен в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и
внутриклеточных паразитов

высокая чувствительность ПЦР – позволяет определить наличие возбудителя заболевания, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул НК
возбудителя

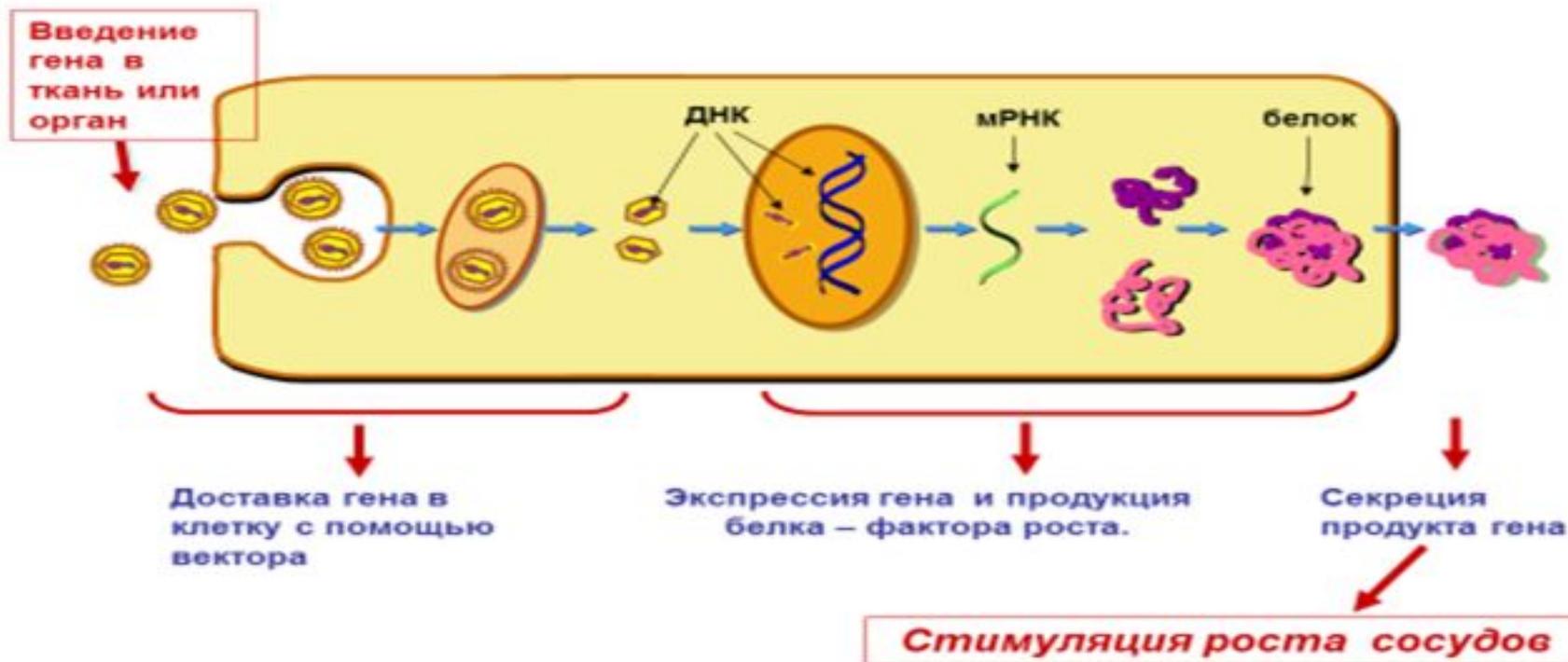
универсальность ПЦР-анализа – для ПЦР-исследования может применяться практически любые материалы, в том числе недоступные для исследования другими методами: слизь, моча, кровь, сыворотка, мокрота, эякулят, соскоб эпителиальных
клеток

экспрессность метода – автоматизированная ПЦР- амплификация позволяет провести полную ПЦР-диагностику за 4 – 5 часов

для лечения заболеваний человека на основе генотерапии:

Генотерапия – совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний:

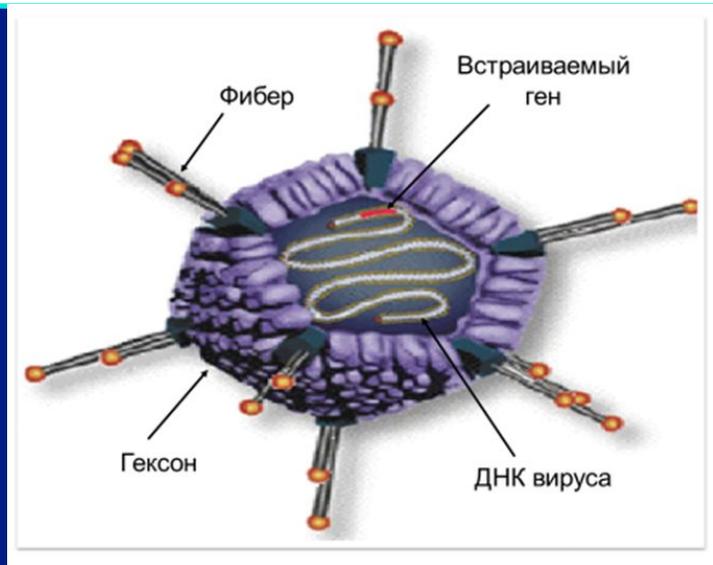
Общий принцип использования генотерапии на примере
лечения ишемии сосудов нижних конечностей



Это новая и бурно развивающаяся область, ориентированная на исправление дефектов, вызванных мутациями в структуре ДНК, или придания клеткам новых функций.

Для решения этой задачи на основе вирусов (**аденовирусов**) конструируются специальные векторы.

- он представляет собой физическую самособирающуюся частицу
- содержит deletированный геном вируса неспособный к его размножению
- обеспечивает доставку материала к строго определенному локусу в организме человека – месту реализации и экспрессию чужеродного генетического материала:



В настоящее время генную терапию рассматривают как потенциально универсальный подход к лечению широкого спектра заболеваний, начиная от наследственных - генетически детерминированных, и заканчивая инфекционными, например, генотерапия ВИЧ-инфекции.

для получения лекарственных препаратов,
таких как гормоны, метаболиты, вакцины,
препараты крови и т.д.

- В фармацевтических биотехнологиях используются методики, позволяющие создавать соединения, составляющие основу лекарственных препаратов (прежде всего, белки), зачастую идентичные естественным.

Инсулин оказался первым белком, полученным для коммерческих целей с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Этот метод позволяет получить человеческий инсулин высокой степени очистки, после введения которого, не возникает побочных реакций, таких как аллергия, инсулинорезистентность, липодистрофия.

Практическое значение данных о наследственности и изменчивости для создания живых вакцин



Молек

У-
лярна
я
биоло
гия

Биохи
мия

Генети
ка

Химиче
ская
инжене
рия

Клето
чная
биоло
гия

Микро
-
биоло
гия

**Молекулярная
биотехнология**

Высок
о-
урожа
йные
культу
ры

Лекар
ственны
е пре-
парат
ы

Вакци
ны

Диагн
о-
стичес
кие
метод
ы

Высо-
копроду
ктив-
ные
сельхоз
животн
ые

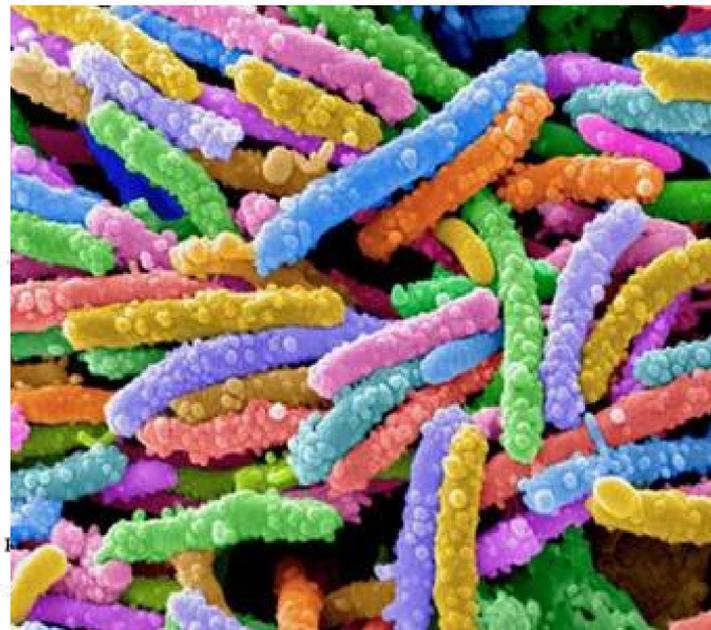
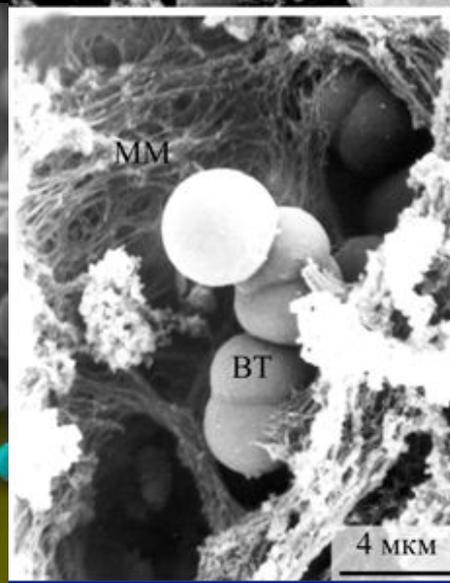
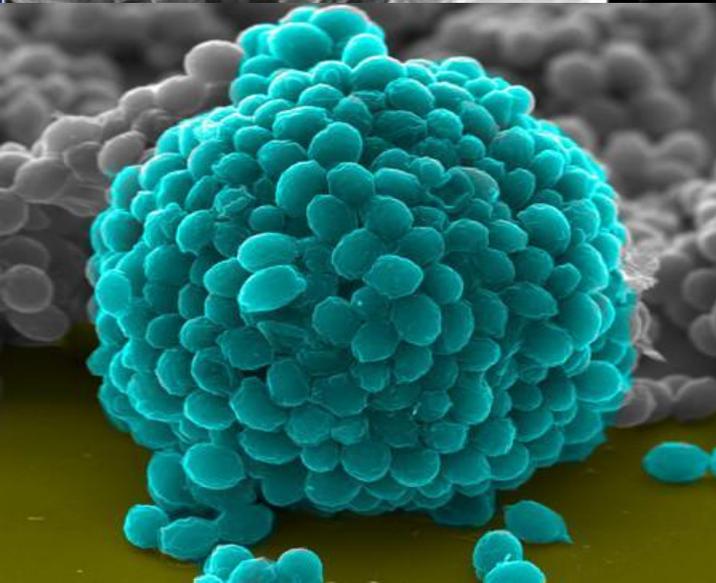
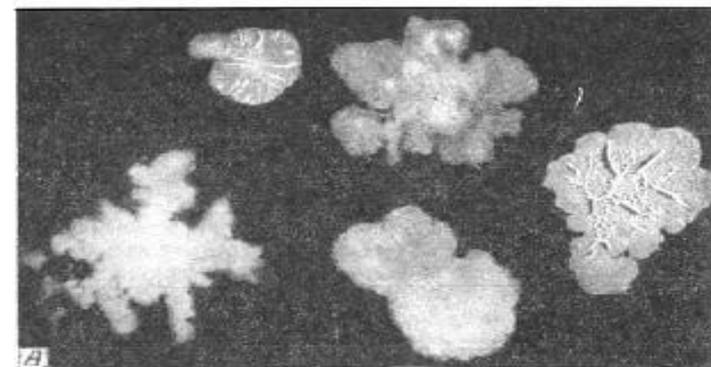
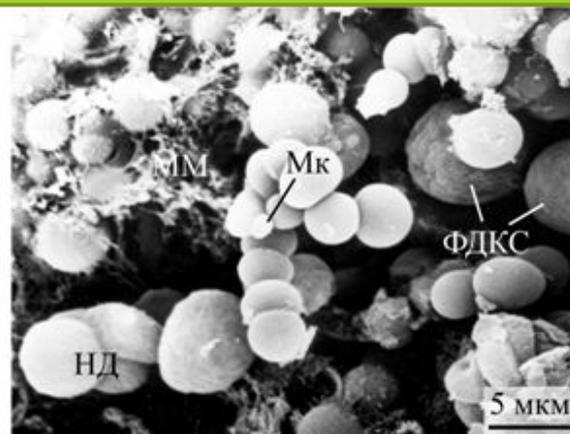
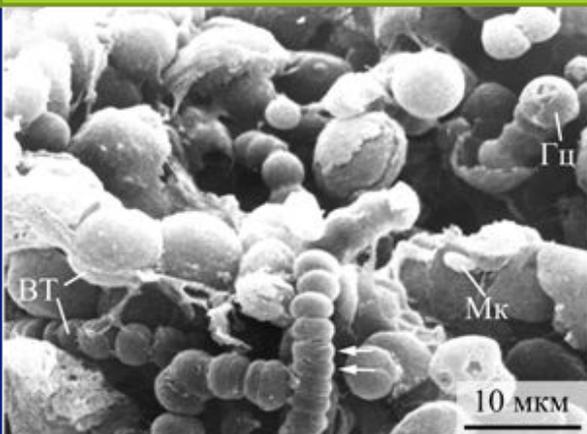
Перспективы развития молекулярной биотехнологии

Бактериальные биосенсоры – измерительное устройство, которое состоит из чувствительного биологического компонента (живые клетки микроорганизмов или животных), распознающего химическое или физическое воздействие, и связанного с ним преобразователя, который генерирует сигнал в ответ на анализ. Применение - в экологическом мониторинге

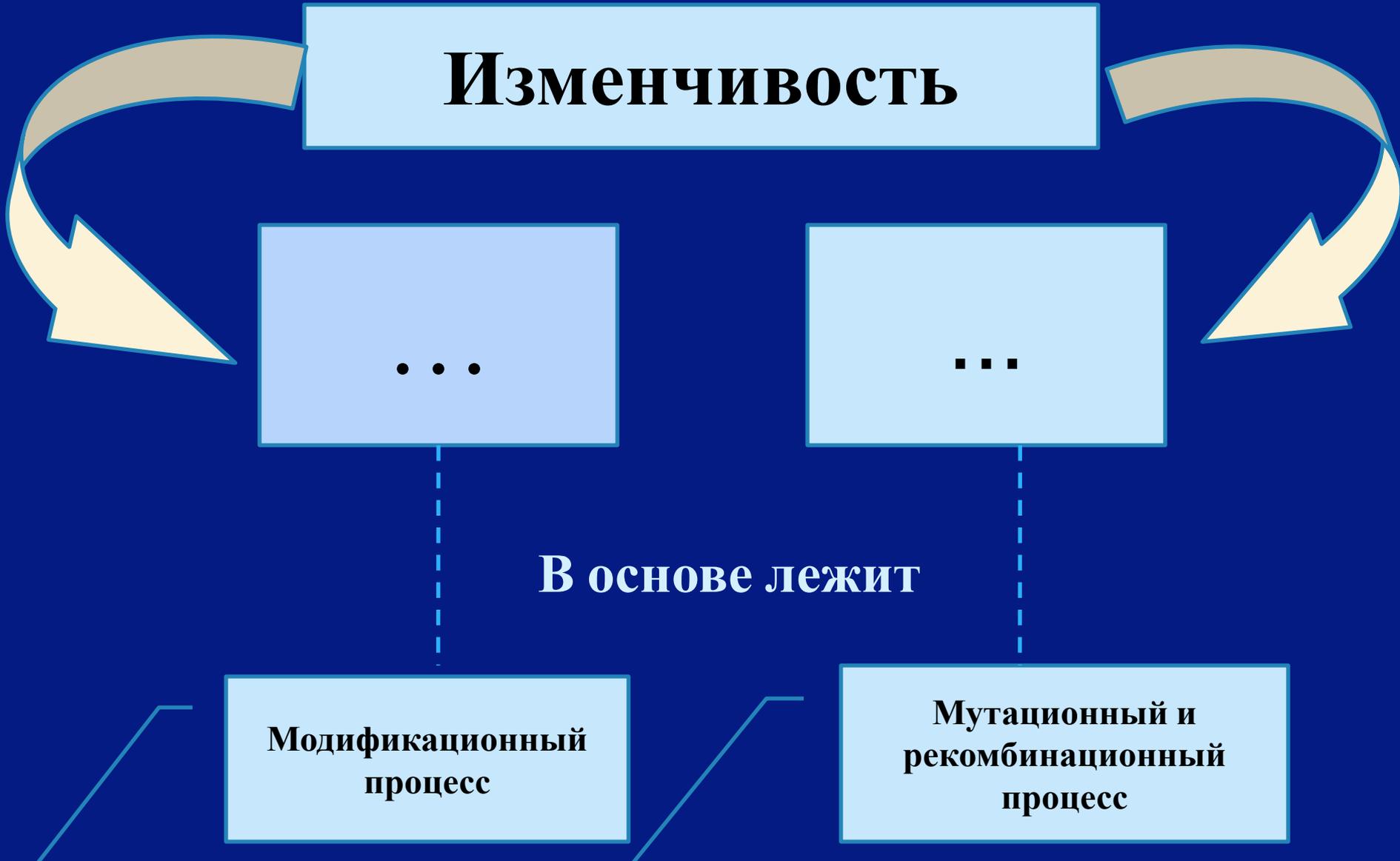
Микробиологическая биоконверсия отходов – предназначена для переработки сырьевых компонентов, не используемых в традиционном кормопроизводстве, в высококачественные углеводно-белковые кормовые добавки и комбикорма. Технология – экологически безопасная, не имеет сточных вод и выбросов.

Биодеградация веществ - процесс разложения различных компонентов в окружающей среде (химические вещества, предметы) под воздействием живых организмов — в первую очередь микроорганизмов.

Изменчивость – это свойство всех живых организмов приобретать в процессе индивидуального развития новые признаки



Назовите формы изменчивости, используя схему:



Источником генетической изменчивости, формирующей новые аллели в микробных популяциях, всегда является только мутация.

*А вот структурные перестройки внутри генома обеспечивает:
рекомбинация.*

Модификации

Это фенотипические изменения какого-либо признака или нескольких признаков микроорганизмов.

Модификации проявляются в изменении морфологических, биохимических и других признаков с последующей их реверсией к первоначальному фенотипу после устранения действия фактора, вызвавшего их образование.

**Рост ESCHERICHIA COLI
на среде ЭНДО**



**Рост ESCHERICHIA COLI
на МПА**



Модификационная изменчивость (разобрать примеры)



Определите вид изменчивости, ответ поясните

Лецитиназа 21°



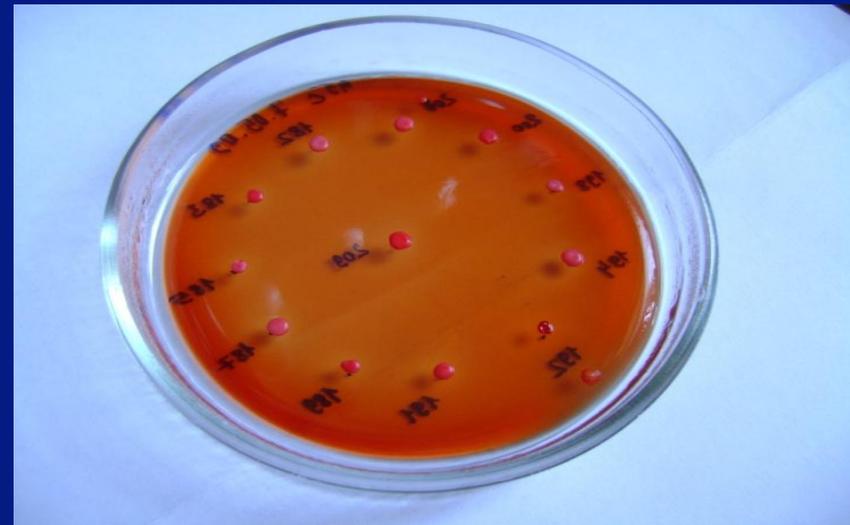
Дыхательная активность при 37°



Лецитиназа 37°



Дыхательная активность 45°

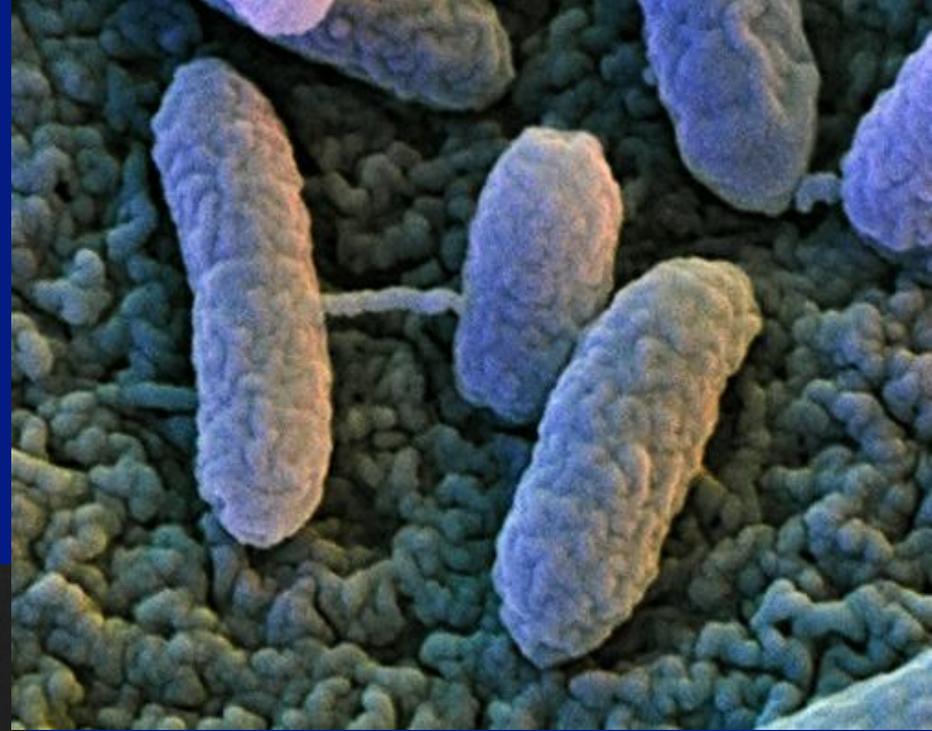


Генетическая рекомбинация это возникновение новых последовательностей в структуре ДНК в результате разрывов и восстановления ее молекул. В ее основе лежит кроссинговер.

Генетическая рекомбинация у прокариот
имеет свои отличительные признаки, что
связано:

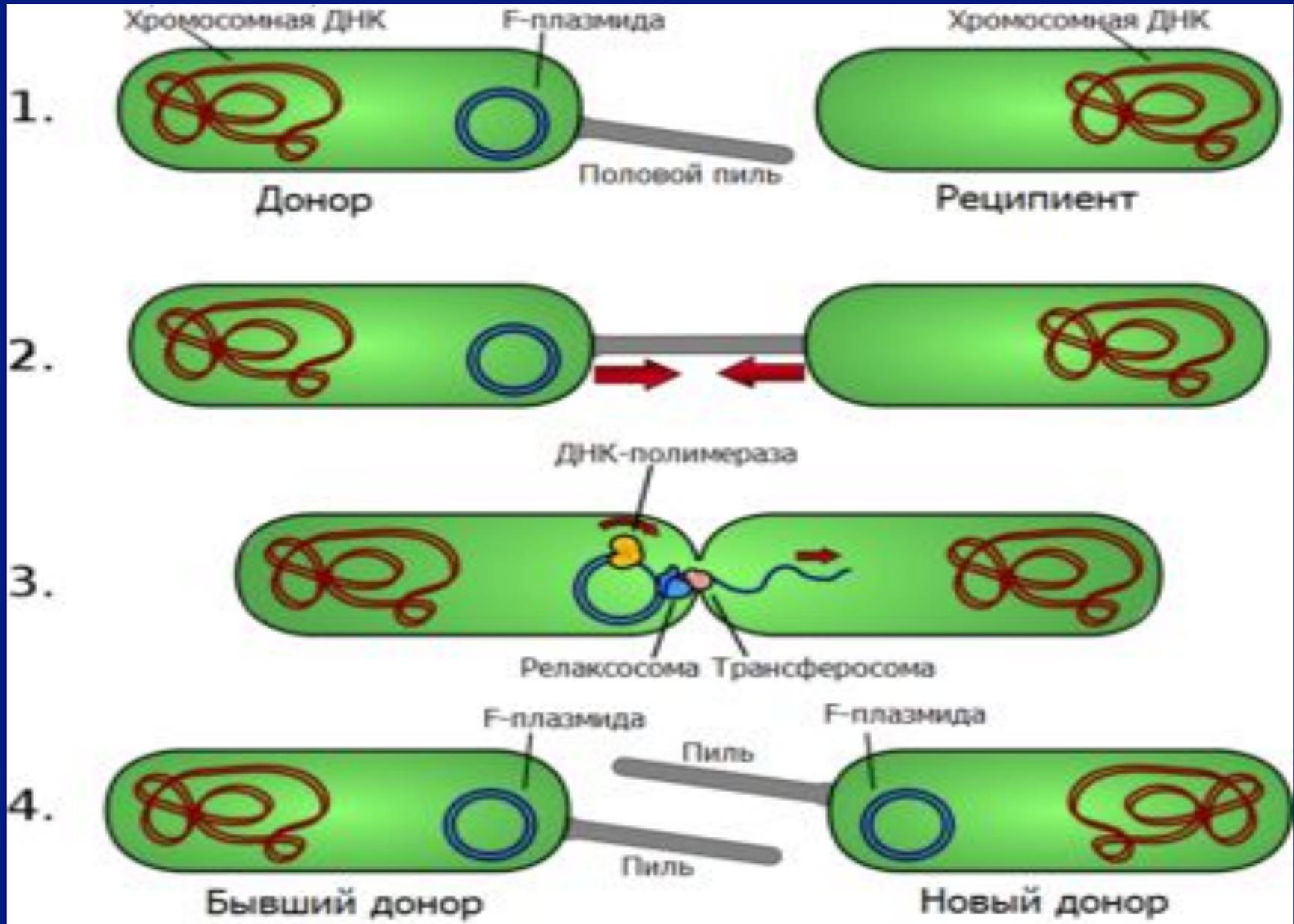
- с особенностями строения генетического аппарата
- с формой генетического обмена

**Какой процесс изображен
на микрофотографиях?**



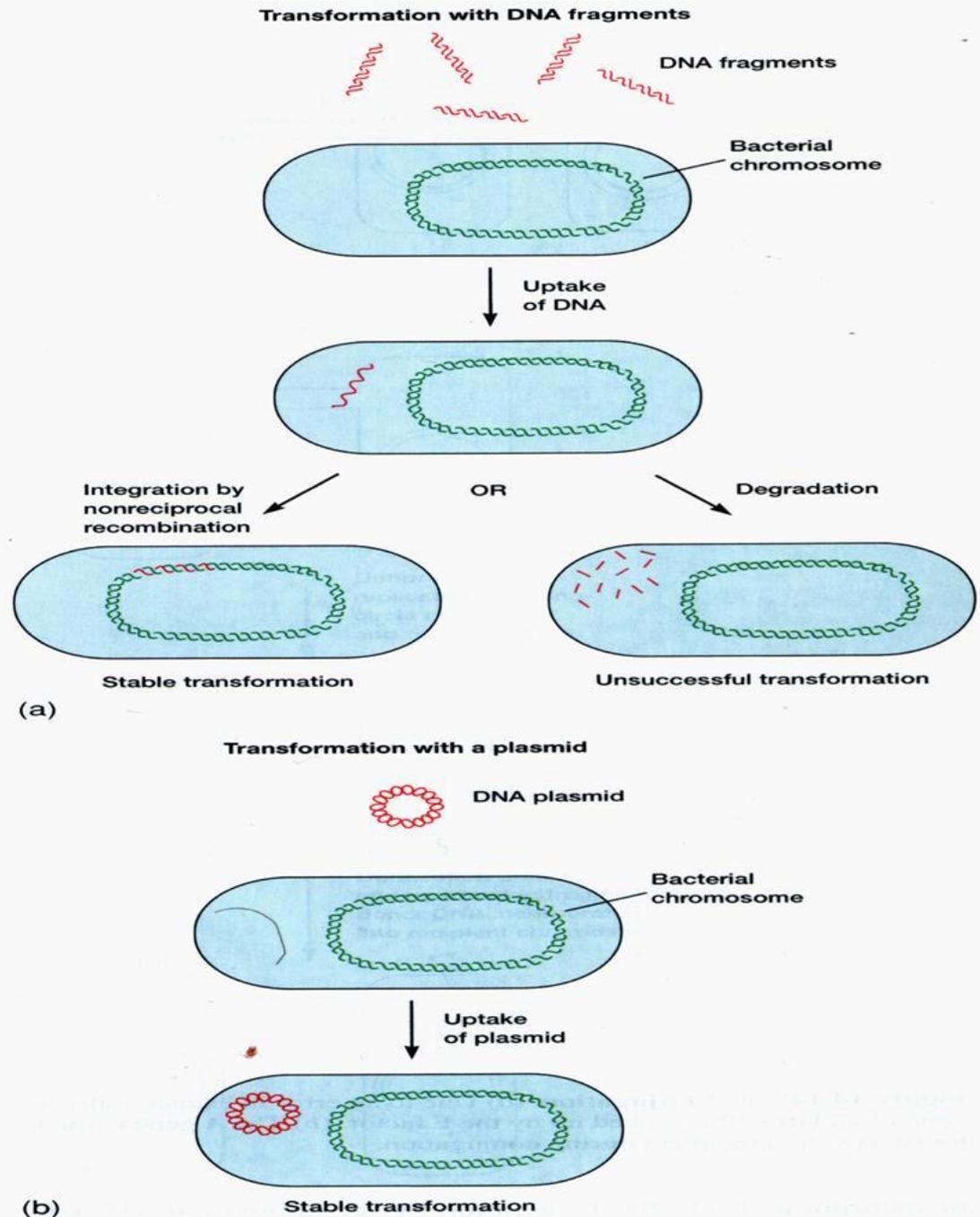
**Что лежит в
основе этого
процесса?**

Расскажите, пользуясь схемой, о конъюгации у *E. coli*



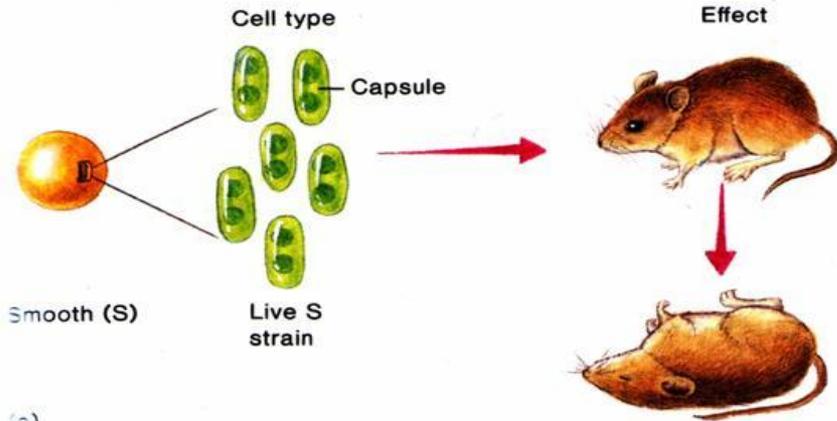
Трансформация - transformatio (лат.) -

преобразование, превращение:
это форма генетической
изменчивости,
при которой бактерия -
реципиент поглощает из
внешней среды трофическим
путем фрагменты
ДНК бактерии - донора
вследствие этого образуются
рекомбинантные бактерии,
обладающие отдельными
свойствами донорской клетки.



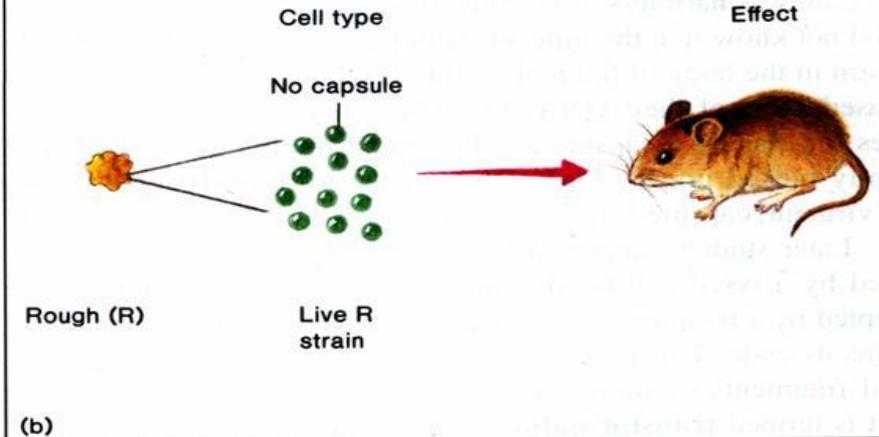
Что было открыто в опытах Гриффитса (1928)

Strain of Colony

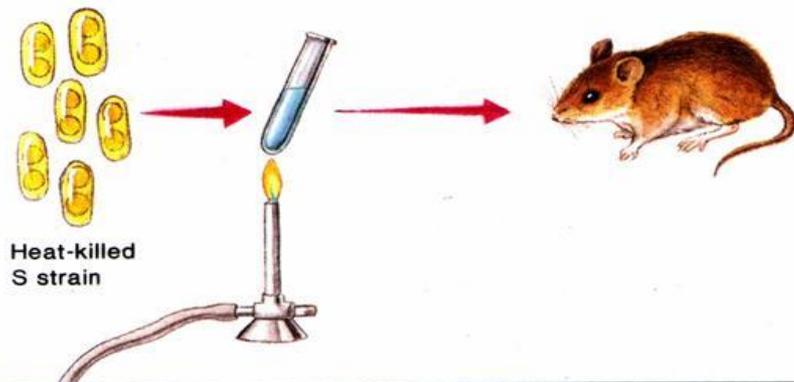


(a)

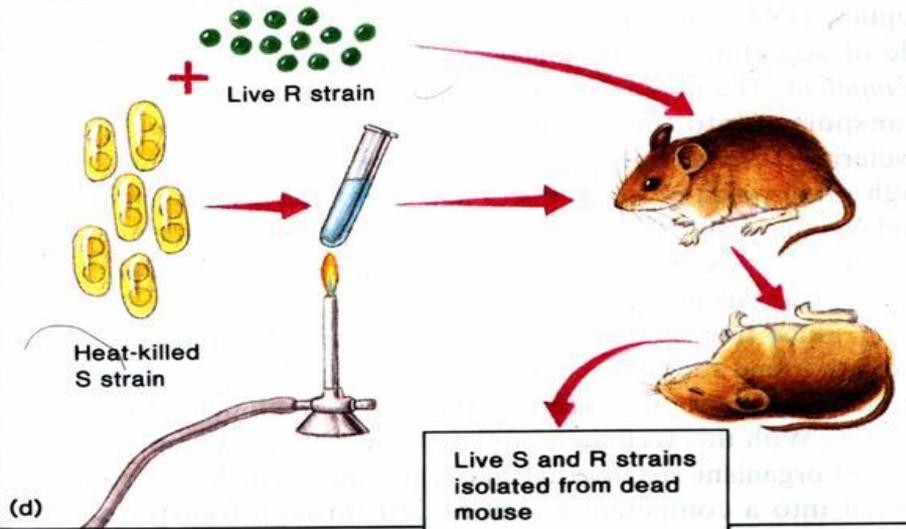
Strain of Colony



(b)



(c)



(d)

Что является трансформирующим фактором?



Ответить на поставленный вопрос Гриффит был не готов. И только 1944г.Эвери, Маклеод и Маккарти показали, что в *основе процесса трансформации лежит:*

- способность бактерий адсорбировать на своей поверхности фрагменты химических молекул, например ДНК, определенной длины
- адсорбированная молекула ДНК (фрагмент) проникает внутрь клетки путём активного транспорта
- фрагмент ДНК встраиваются в геном бактерии на основе кроссинговера
- новый фрагмент ДНК, интегрировавшийся в геном бактерии, начинает проявлять свое действие также, как и другие гены клетки-реципиента

Явление трансдукции было открыто американскими биофизиками Дж. Ледербергом и Н. Циндером в 1952 г. Какой механизм его обеспечивает? Прокомментируйте

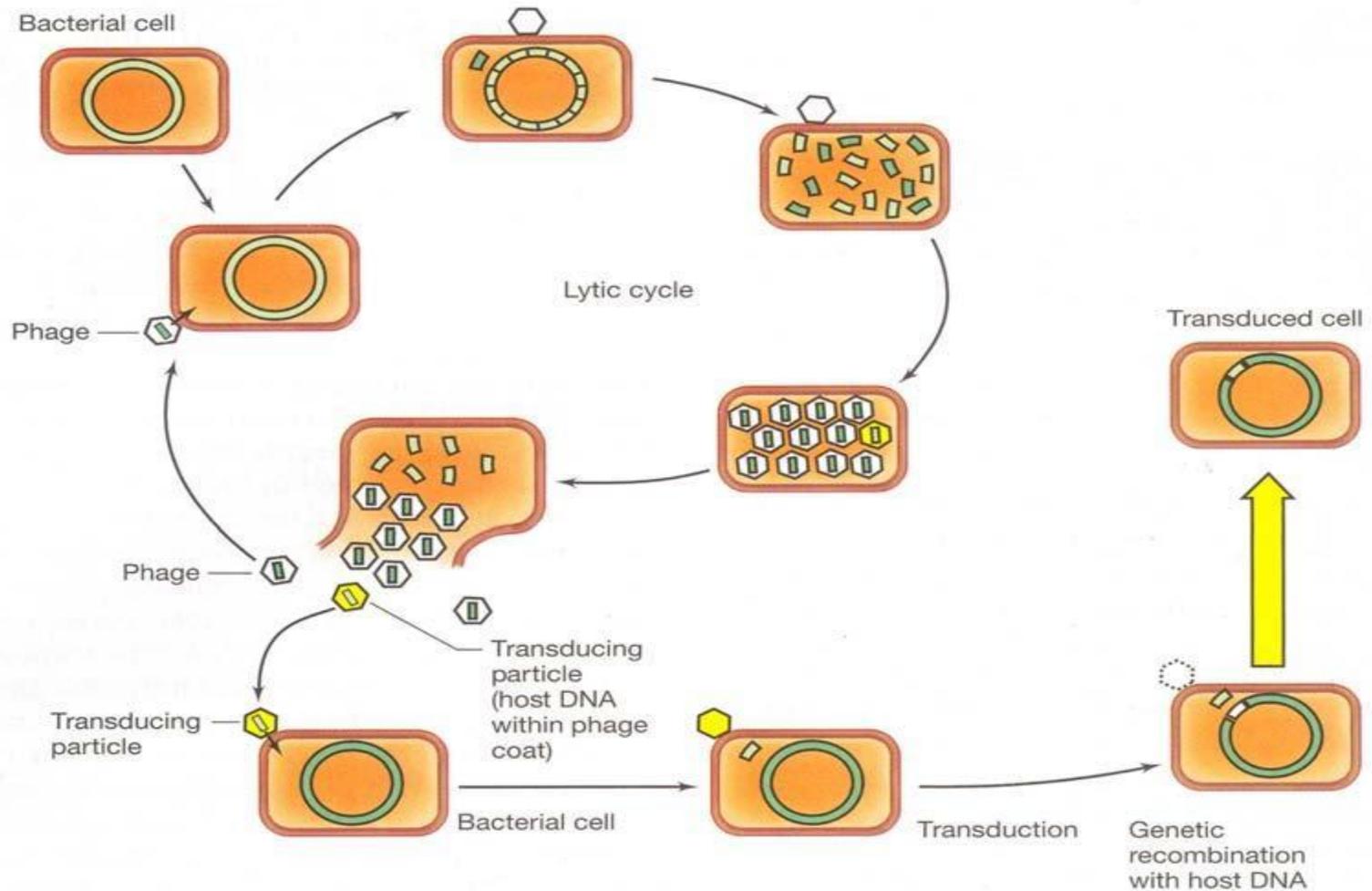


FIGURE 9.16 Generalized transduction: one possible mechanism by which virus (phage) particles containing host DNA can be formed.

ТРАНСДУКЦИЯ - transductio -
перемещение (лат): это перенос
генетической информации от бактерии-
донора к бактерии-реципиента с
помощью умеренного фага
(трансдуцирующих бактериофагов).

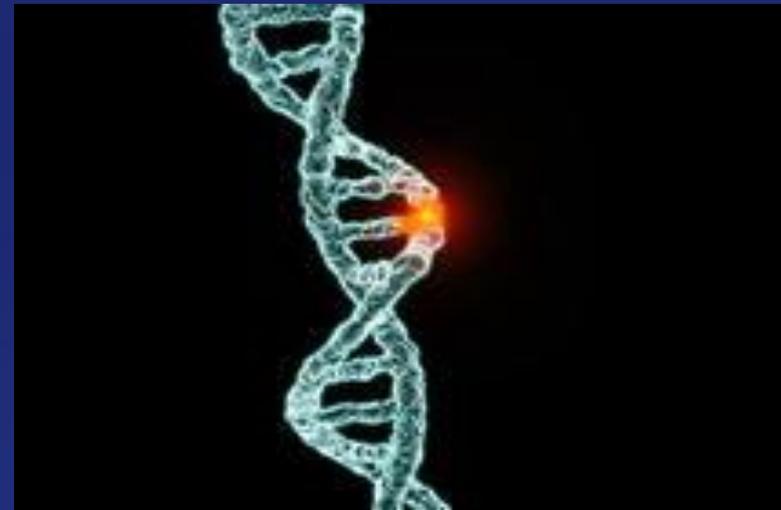
ОТЛИЧИЕ ТРАНСДУКЦИИ ОТ ФАГОВОЙ КОНВЕРСИИ?

? ... - перенос генетической информации из клетки в клетку при помощи бактериофага

? ... - экспрессия в клетке генов бактериофага

приведите примеры

Мутация – это ...



Мутагенные факторы

?...

окислители и восстановители;
- алкилирующие агенты и пестициды;
- некоторые пищевые добавки;
- продукты переработки нефти и органические растворители;
- лекарственные препараты

?...

ионизирующие излучения,
ультрафиолетовые лучи и
повышенная температура

?...

вирусы,
бактерии

Мутации
(по происхождению)

```
graph TD; A[Мутации (по происхождению)] --> B[спонтанные]; A --> C[индуцированные];
```

спонтанные

индуцированные