



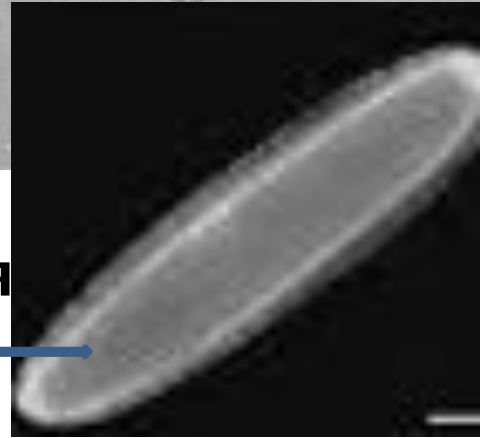
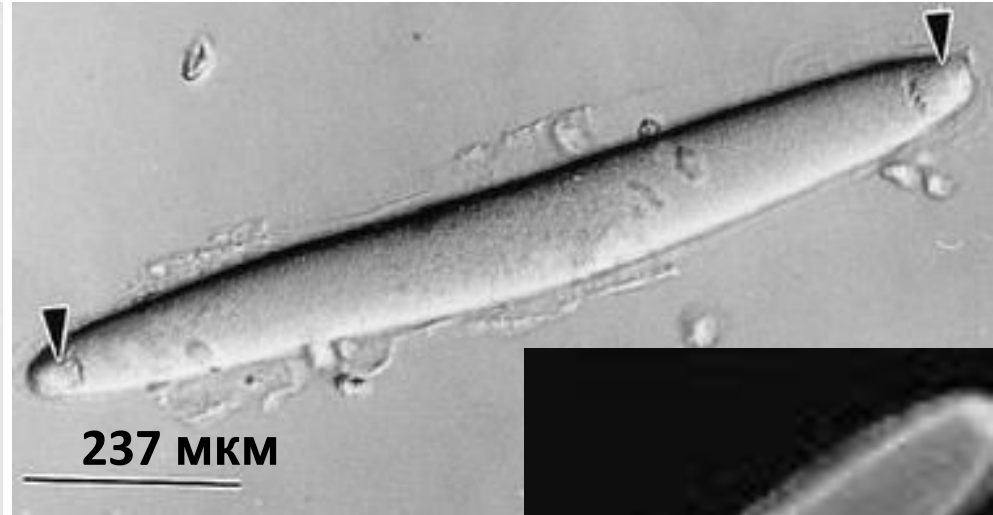
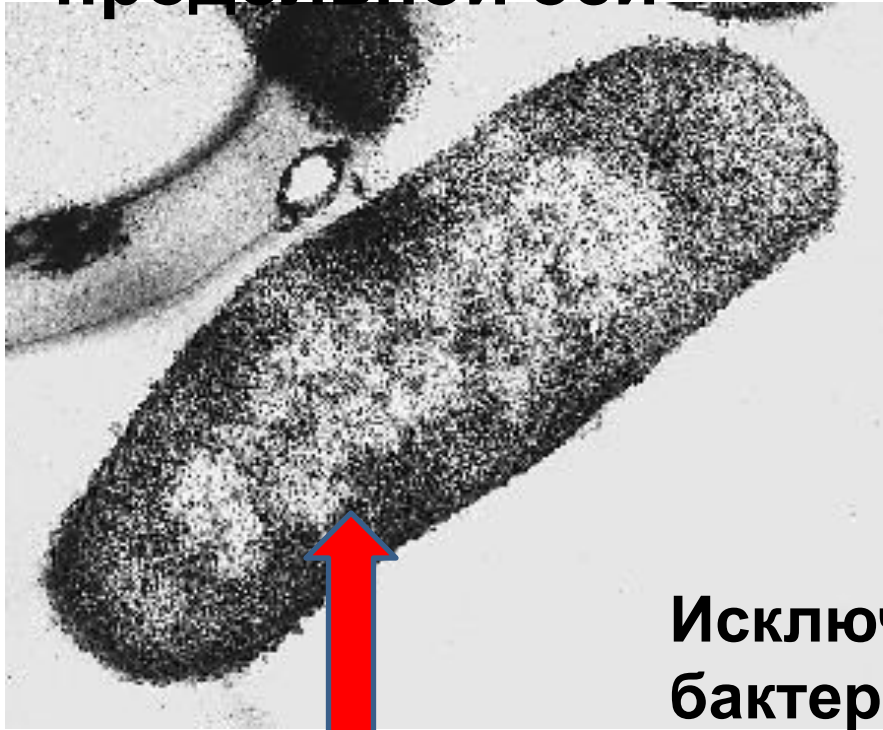
**Макс
Дельбрук**

**1943 г.
М. Дельбрук
и С. Лурия
заложили
основу
генетики
бактерий**



**Сальвадор
Лурия**

компактное тело, расположенное в центре
клетке и ориентированное вдоль ее
продольной оси

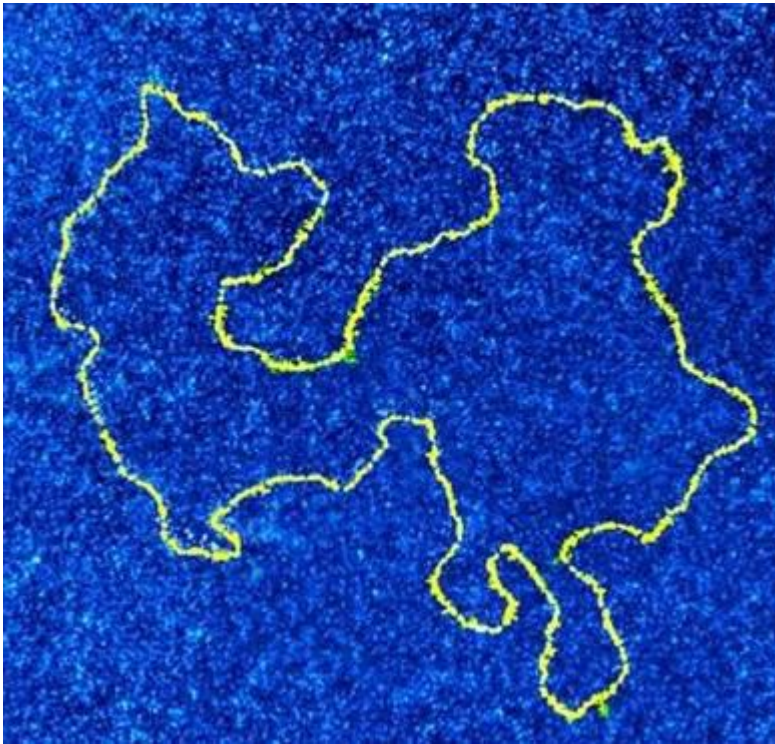


нуклеои

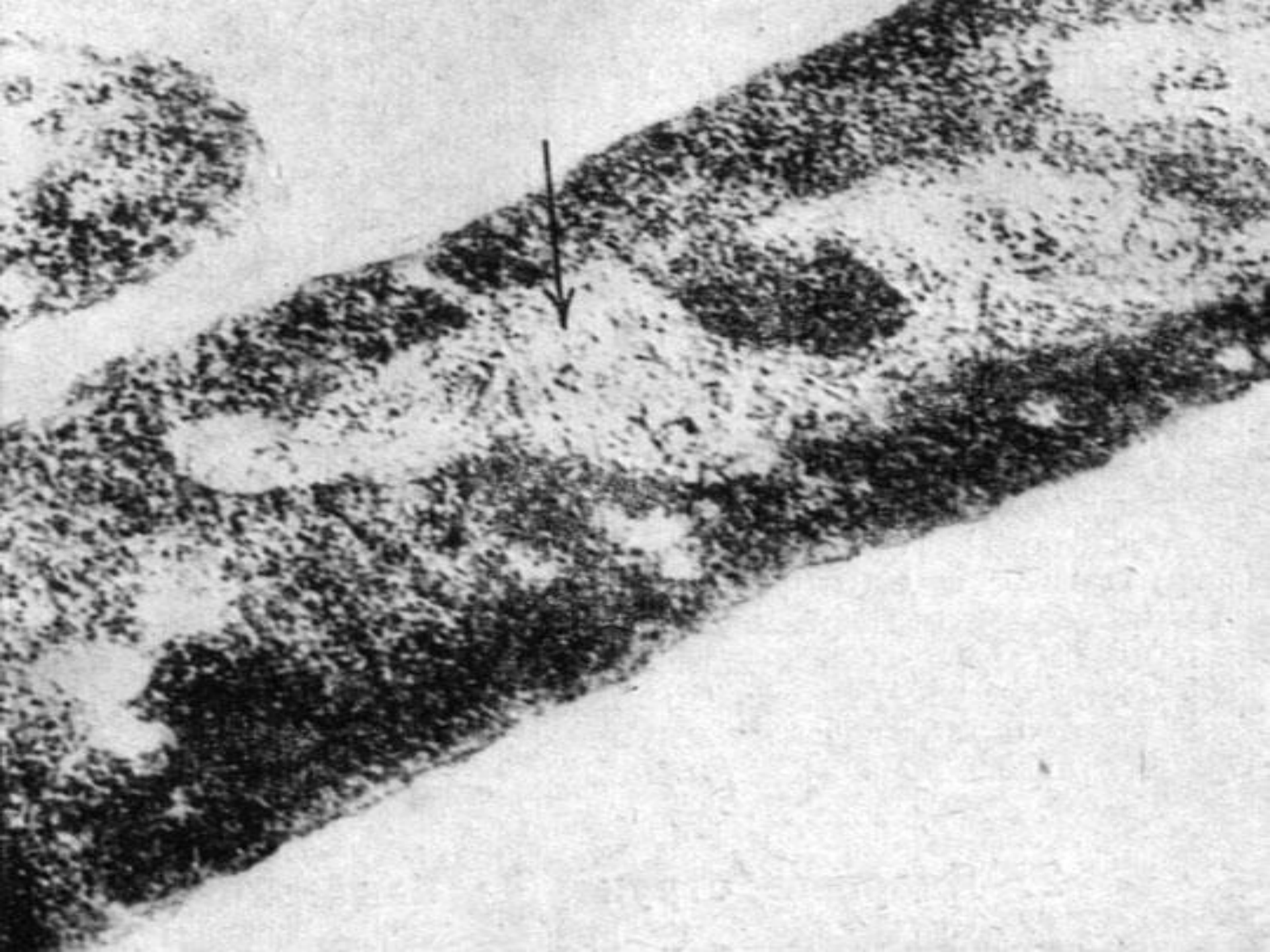
д

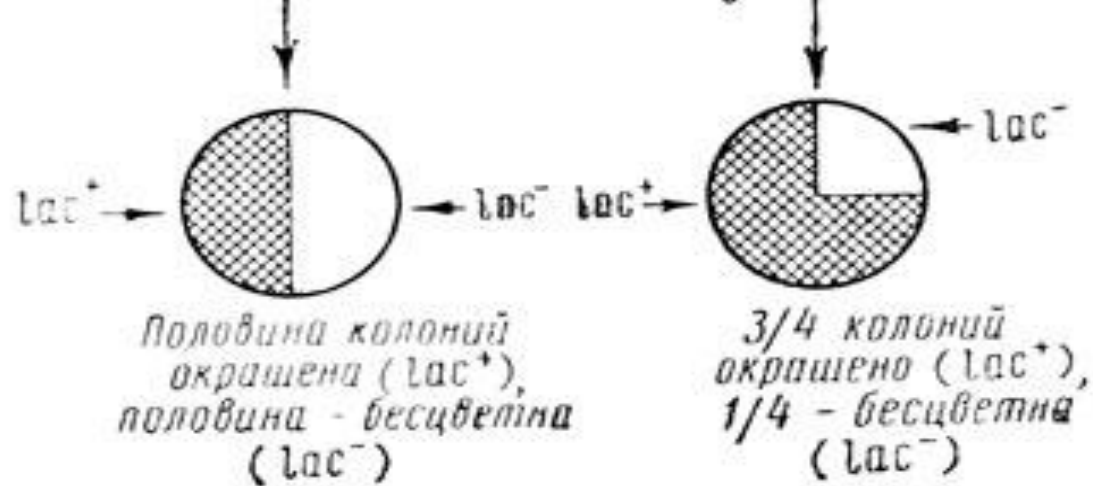
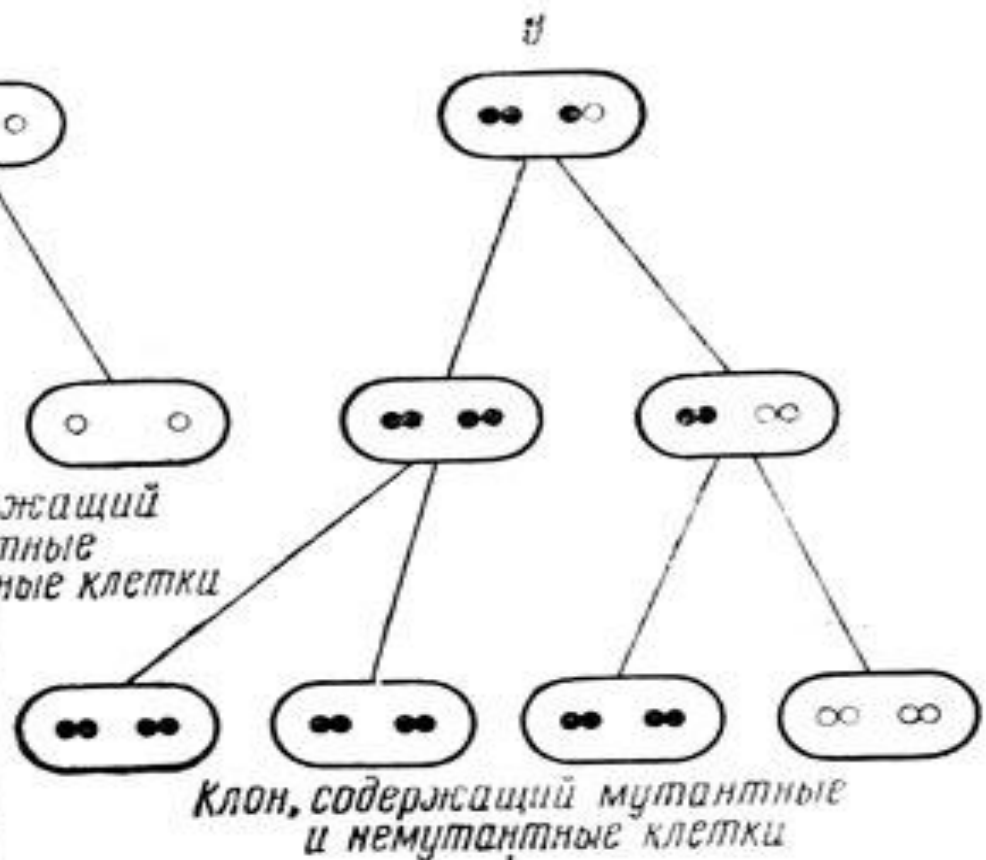
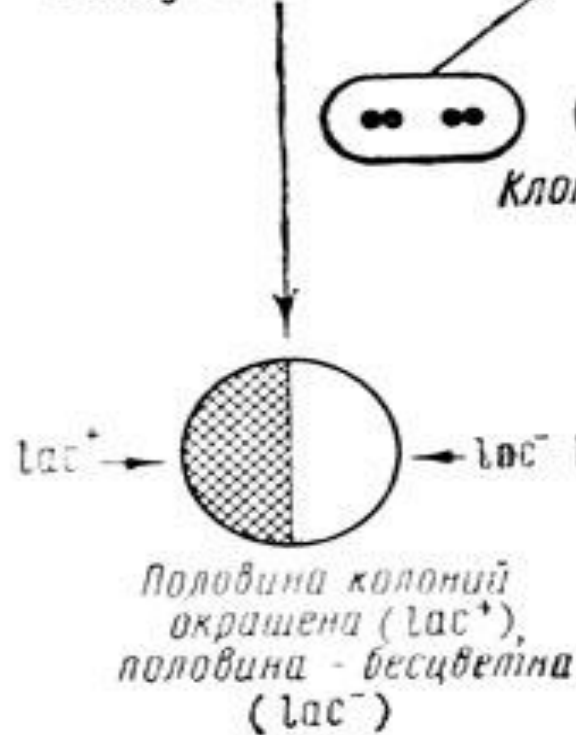
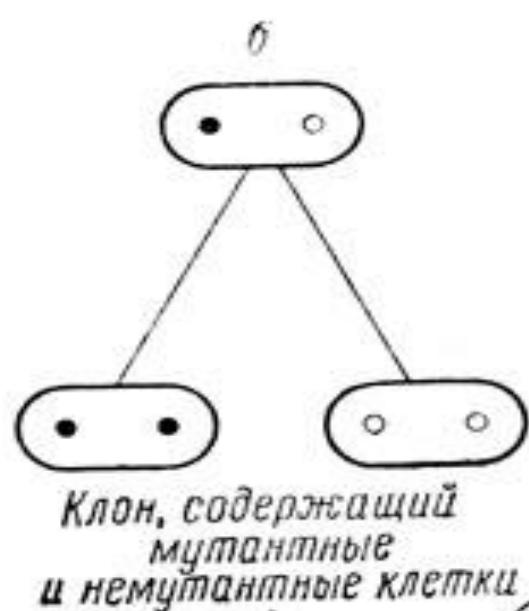
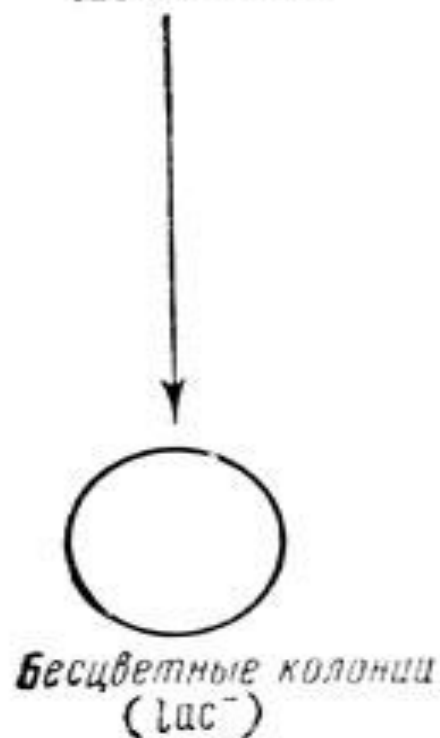
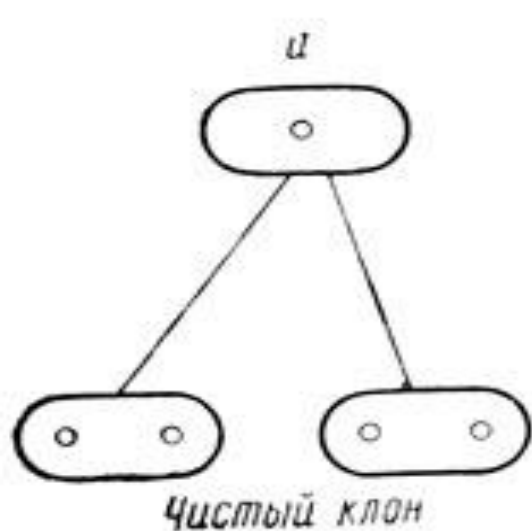
Исключение гигантская
бактерия
Epiploriscium fishelsoni, ее
хроматин образует узкий
ободок по периферии
клетки

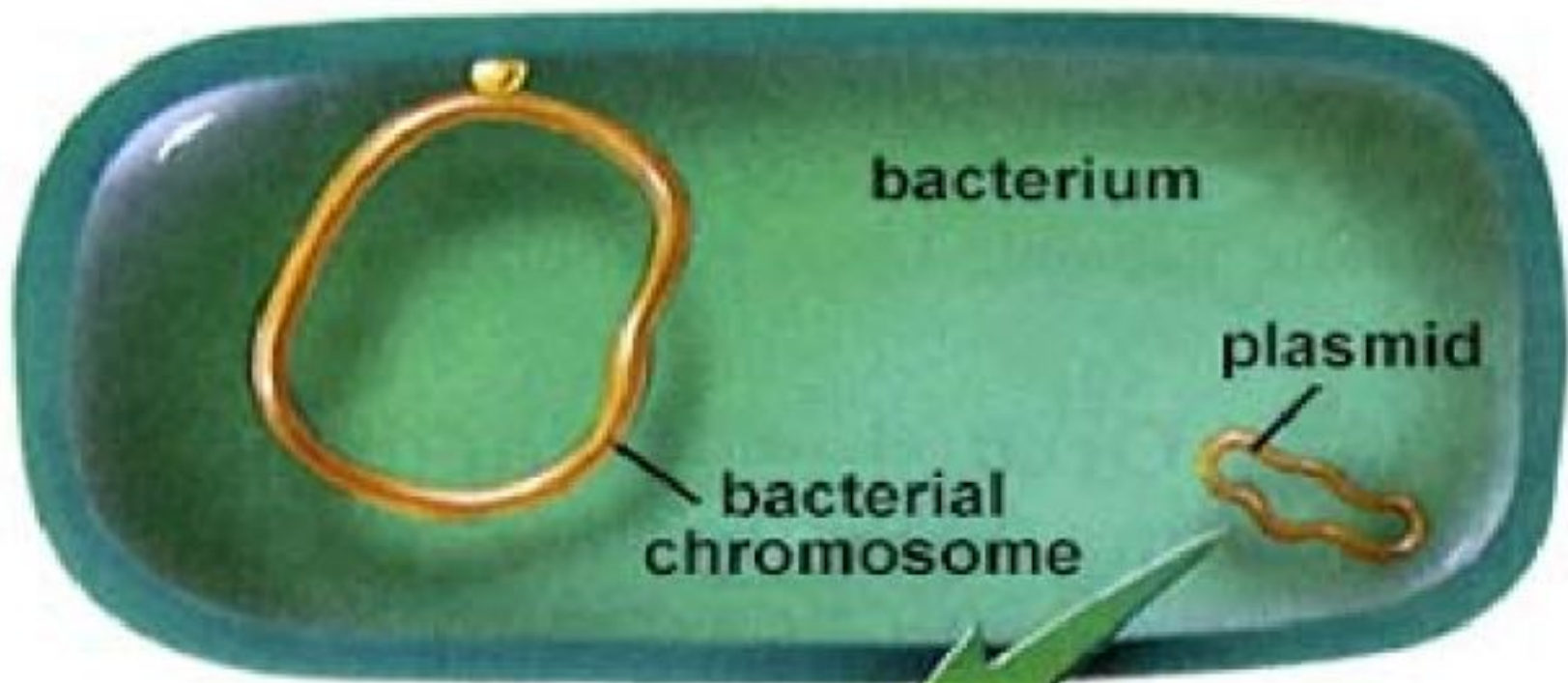
ДНК нуклеоида



**2 цепочечная
правозакрученная
ДНК (бактериальная
хромосома),
несущая
генетическую
информацию для
процессов,
обеспечивающих
жизнедеятельности
клетки**







1 μ m

ПЛАЗМИДЫ

Плазмиды образованы молекулами ДНК.

- **Регуляторные плазмиды** участвуют в компенсировании тех или иных дефектов метаболизма бактериальной клетки.
- **Кодирующие плазмиды** приносят в бактериальную клетку новую генетическую информацию, кодирующую новые, необычные свойства (например, устойчивость к антибиотикам)

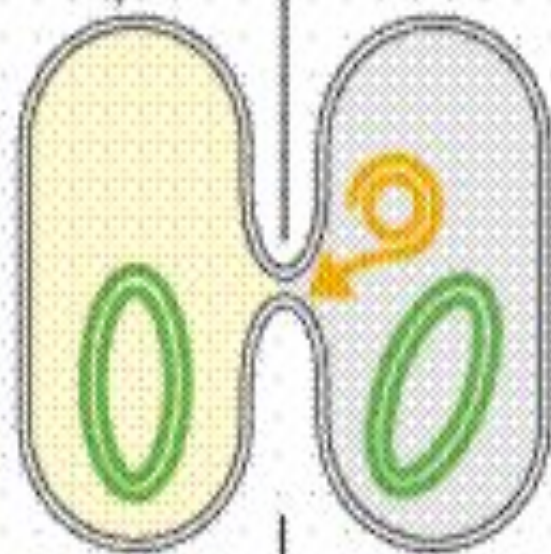
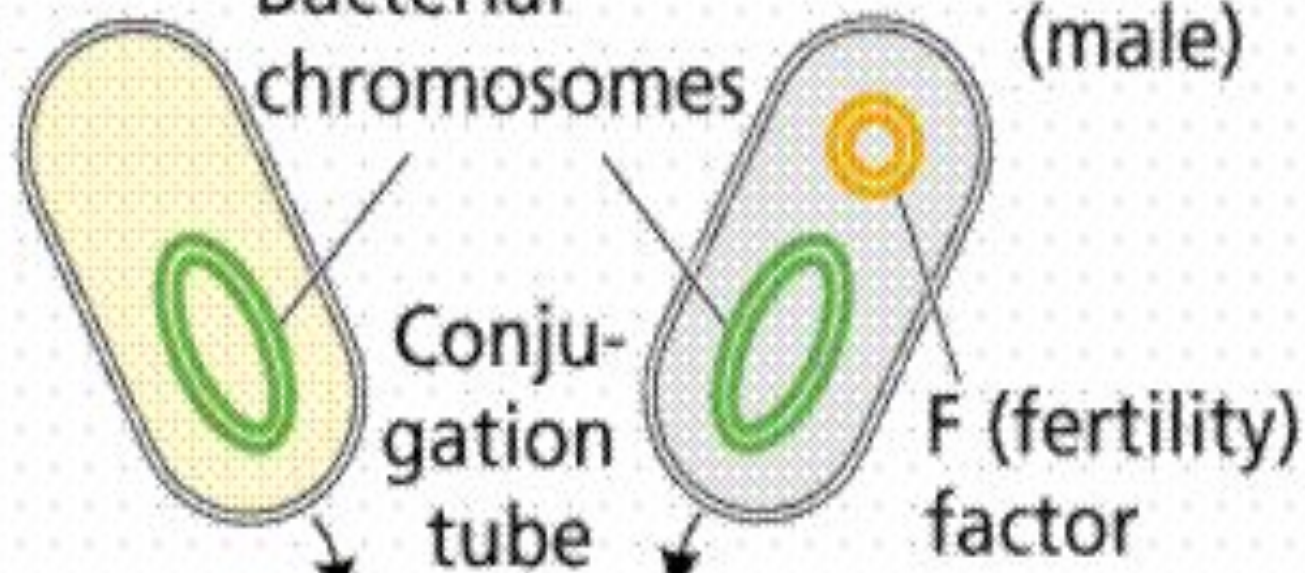
ГРУППЫ ПЛАЗМИД

- ***F-плазмиды*** контролируют синтез *F-пилей*, способствующих передачи генетического материала от бактерий-доноров (F+) к бактериям-реципиентам (F-) в процессе конъюгации
- ***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

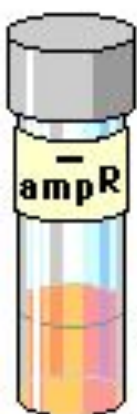
F^- *E. coli*
(female)

Bacterial
chromosomes

F^+ *E. coli*
(male)



Conjugating cells;
copy of F factor
transferred to F^- cell



Control 1
No amp^R plasmids added

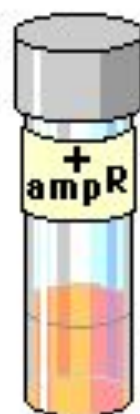


No ampicillin
in growth medium

Control 2
No amp^R plasmids added



Ampicillin
in growth medium

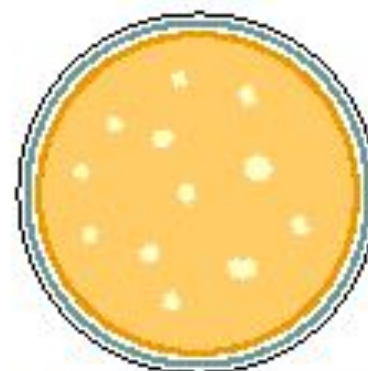


Experimental tube 1
amp^R plasmids added

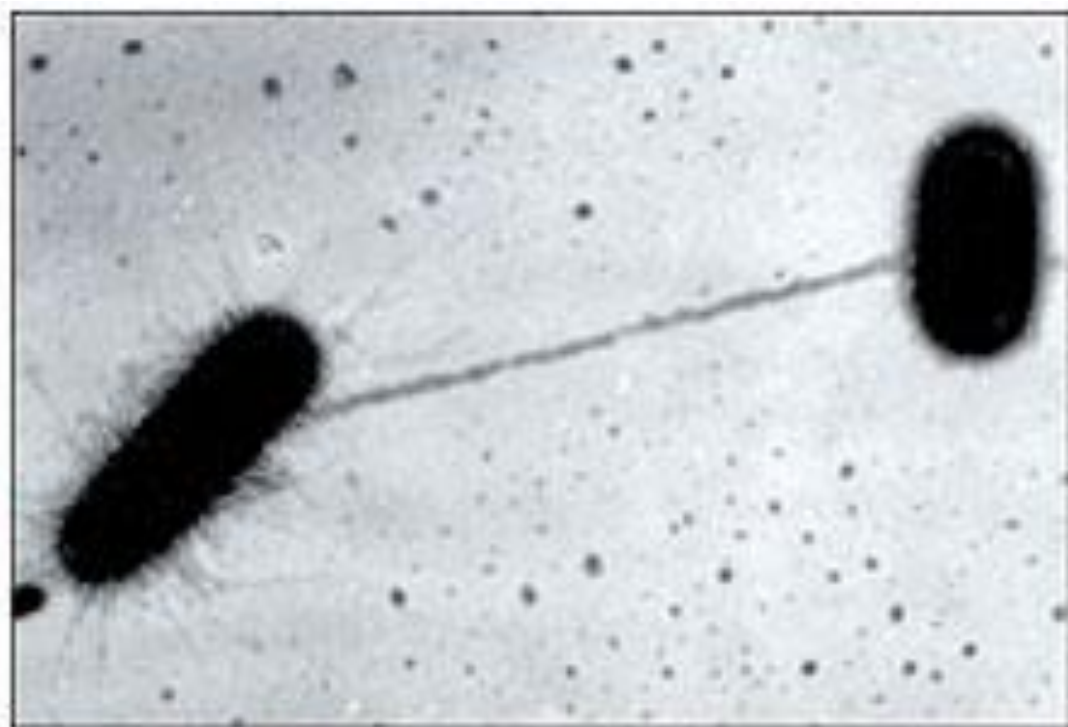
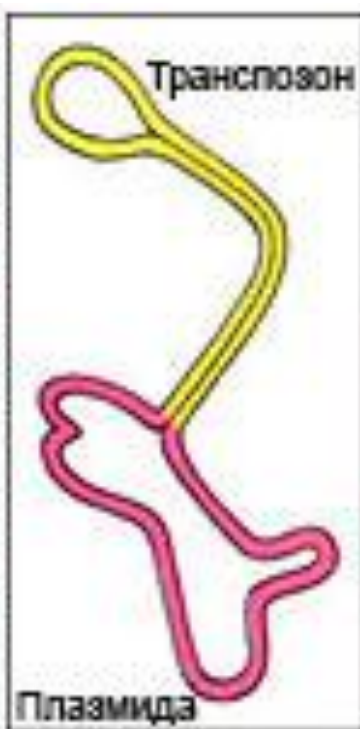


No ampicillin
in growth medium

Experimental tube 2
amp^R plasmids added



Ampicillin
in growth medium



Генотип	Фенотип	
	на среде, содержащей лактозу	на среде, не содержащей лактозу
lac^+	Фенотипическая изменчивость лактозо-положительный ↔ лактозо-отрицательный (2)	
lac^-	Генотипическая изменчивость лактозо-отрицательный ↔ лактозо-отрицательный (1)	

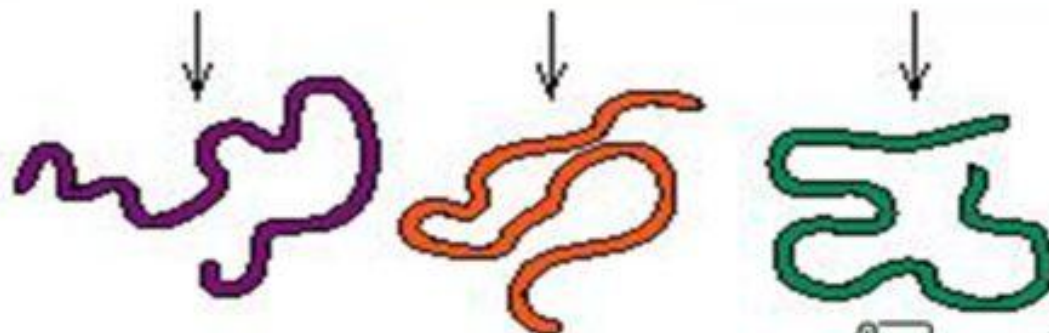
Строение лактозного оперона бактерии кишечной палочки (E.coli).


Промотор – область присоединения РНК-полимеразы, общий для всех трех генов

3 гена для белков одной цепочки химических реакций



мРНК



Три белка: галактозидаза, пермеаза и трансацетилаза,  MyShared
нужные для
переваривания лактозы синтезируются одновременно

Регуляция работы промоторов

Лактозный оперон Жакоб и Мано 1961 г.

Оперон – группа генов, находящихся под единой системой регуляции. Включает в себя гены и регуляторные элементы.

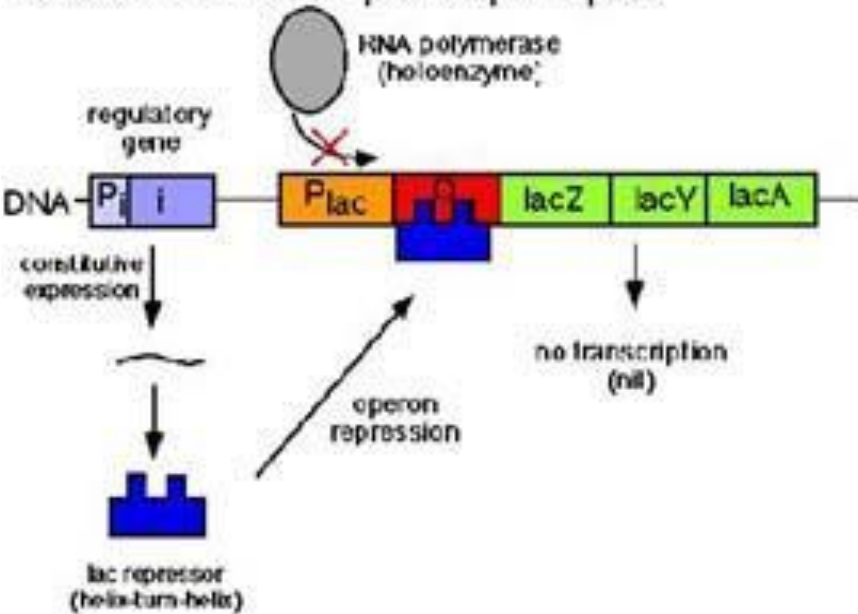


Индукцибельный оперон
Индукция x1000

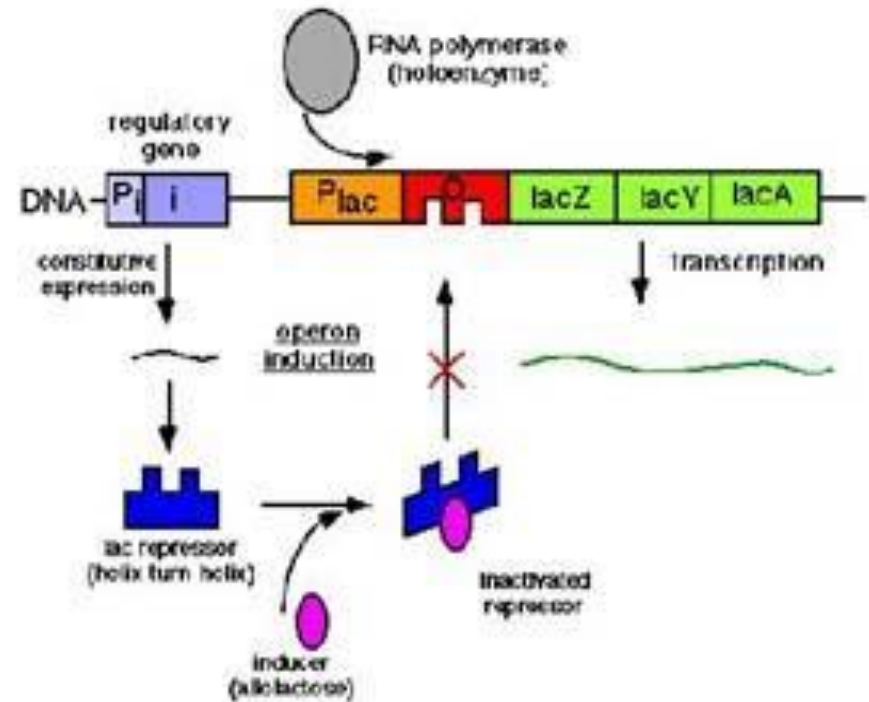
Регуляция активности генов: *lac*-оперон бактерии *E.coli*

гены метаболизма лактозы работают, когда лактоза есть в клетке

В отсутствии лактозы белок-репрессор связывается с оператором. РНК-полимераза не может начать транскрипцию

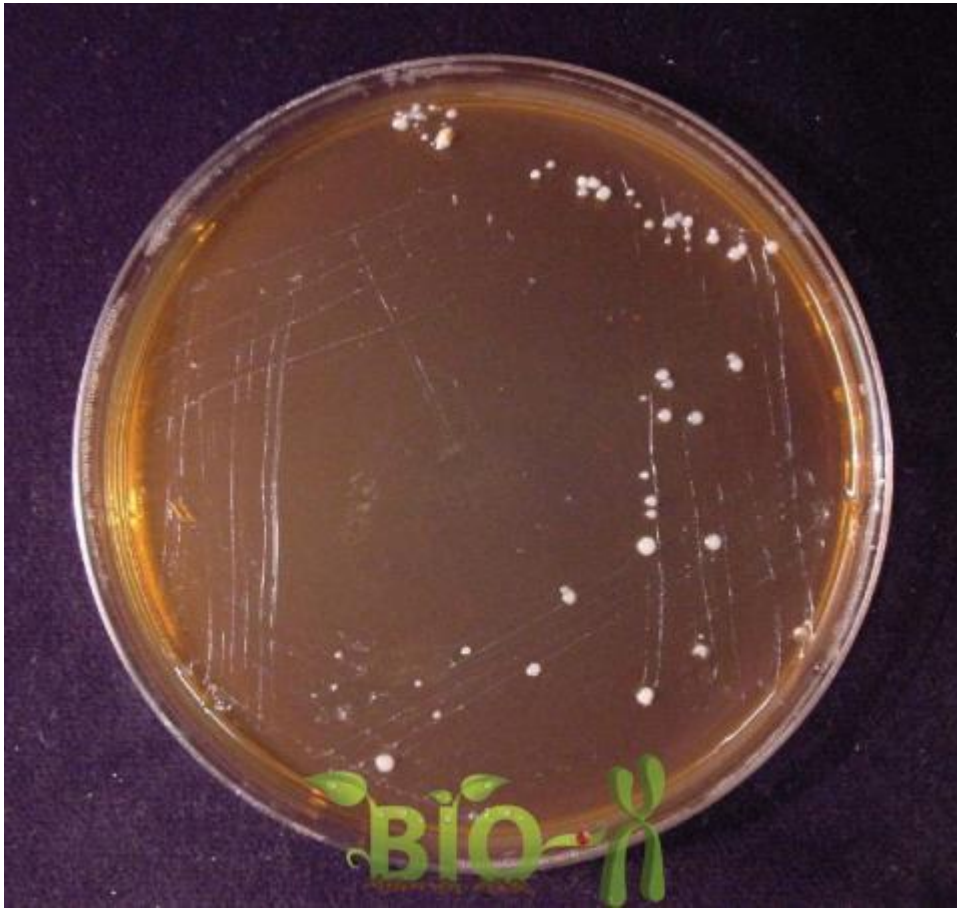


Лактоза инактивирует белок-репрессор и он теряет сродство к оперону. Транскрипция возможна.



Оперон - группа генов, транскрибируемых с одного промотора.

Ненаследственная (средовая, модификационная) изменчивость



Модификации выражаются в изменениях формы и размера микробной клетки, морфологии колоний, биохимических, патогенных признаков.



по характеру появления
мутации

спонтанные

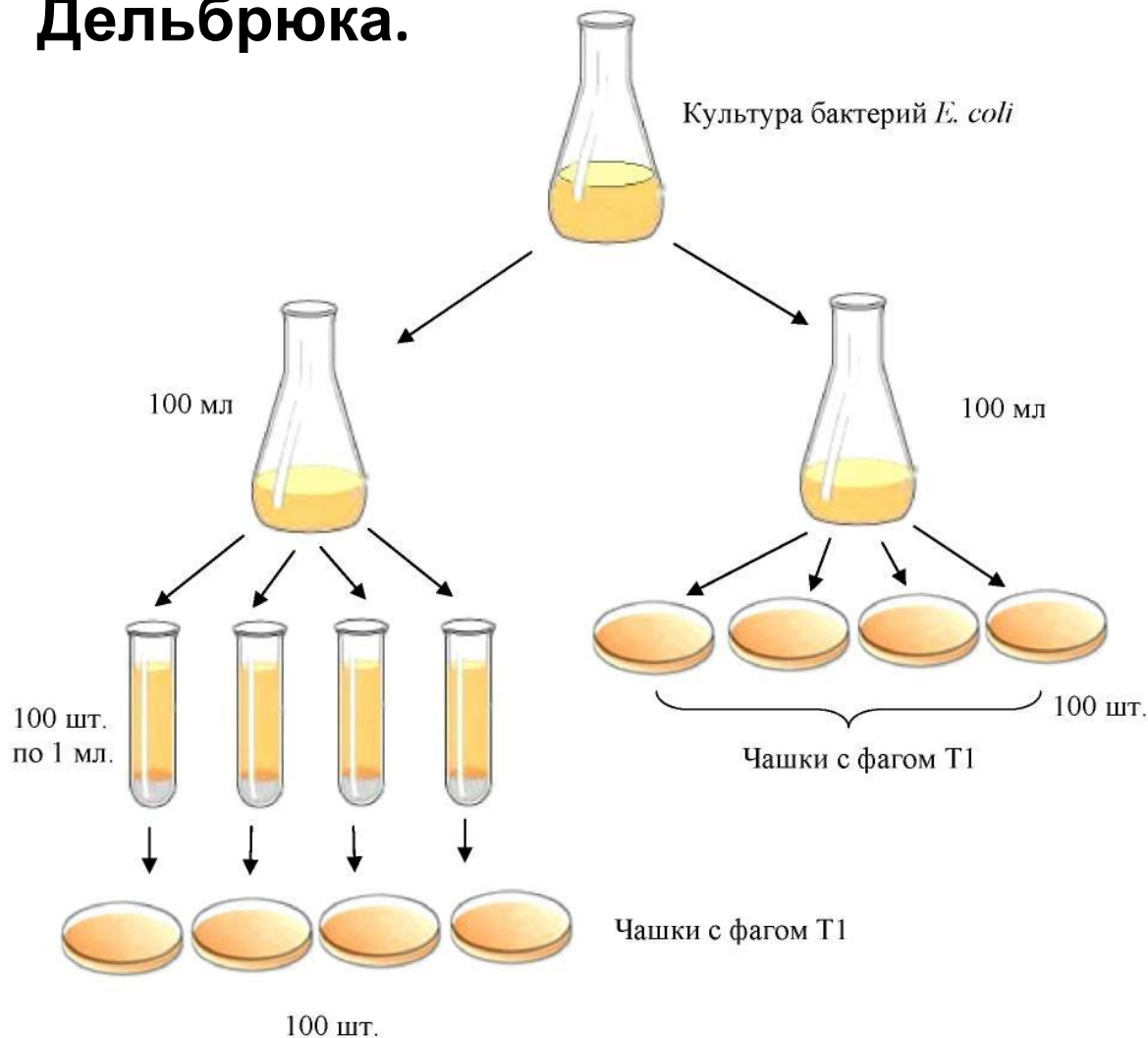
возникают
естественным
путем

индуцированные

возникают под
действием
искусственно
созданных мутагенных
факторов

Наследственная (генотипическая) изменчивость

Флуктуационный тест С. Лурия и М.
Дельбрюка.



Независимые культуры проявляют резкие колебания (флуктуации) в содержании устойчивых к фагу клеток, чем пробы, взятые из одной и той же культуры.

Непрямой отбор мутантов методом реплик



Бульонная культура *E. coli.*, чувствительная к фагу



Высев на чашку для образования сплошного роста



с фагом



без фага



совмещают и производят пересев с чашки без фага участка, который соответствовал участку фагоустойчивых колоний на чашке с фагом



с фагом



без фага



с фагом



без фага

Мутагенные факторы

Физические

- Все виды излучения (ионизирующее, ультрафиолетовое и др.)

Химические

- Различные химические вещества (соли тяжелых металлов, алкилирующие соединения, нитросоединения, некоторые кислоты и др.)

Биологические

- Вирусы, подвижные (мобильные) генетические элементы



Генные мутации

- Генные мутации выражаются в изменении структуры отдельных участков ДНК – отдельных нуклеотидных пар или небольшого числа нуклеотидных пар.
- Эти участки называются сайтами, или точками; поэтому генные мутации часто именуют точковыми мутациями.
- Генные, или точковые мутации – это и есть собственно мутации, или мутации в узком смысле слова.



Генные мутации

вот лес бук вяз дуб ивы тут был пал дым шел три дня

- Сдвиг рамки считывания:

*вот лес бук вяз **а** дуб ивы тут был пал дым шел три дня*

*вот лес бук вяз **а**ду бив ыту тбы лпа лды мше лтр идн я*

*вот лес бук вяз **д**би выт утб ыпп алд ымш елт рид ня*

- Замена оснований:

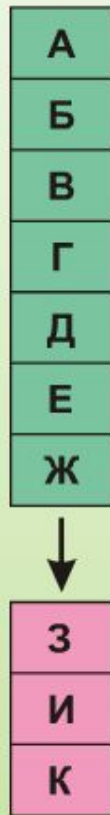
*вот лес бук **в**оз дуб ивы тут **б**ал пол дом **п**ел три дня*

*вот лес бук **в**ям дуб ивы тут был пал **р**ым шел три дня*

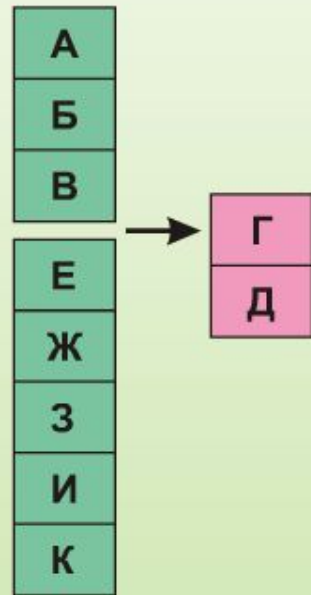
Нормальная
хромосома



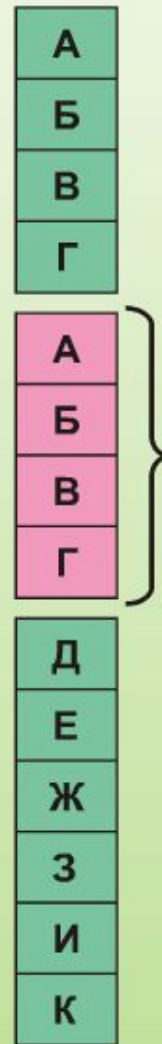
Утрата



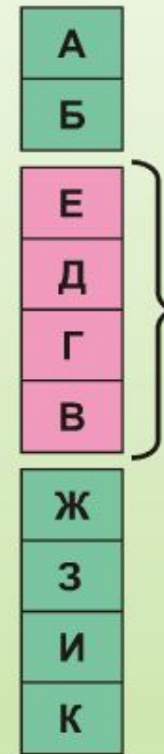
Делеция



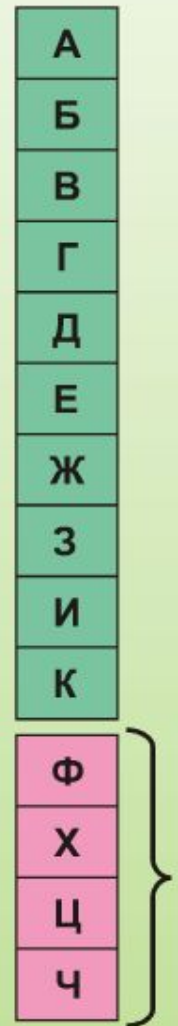
Дупликация



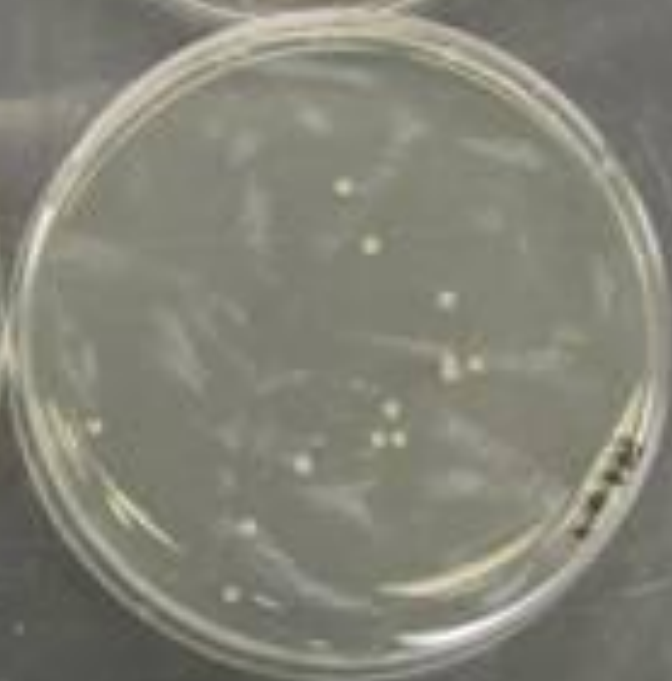
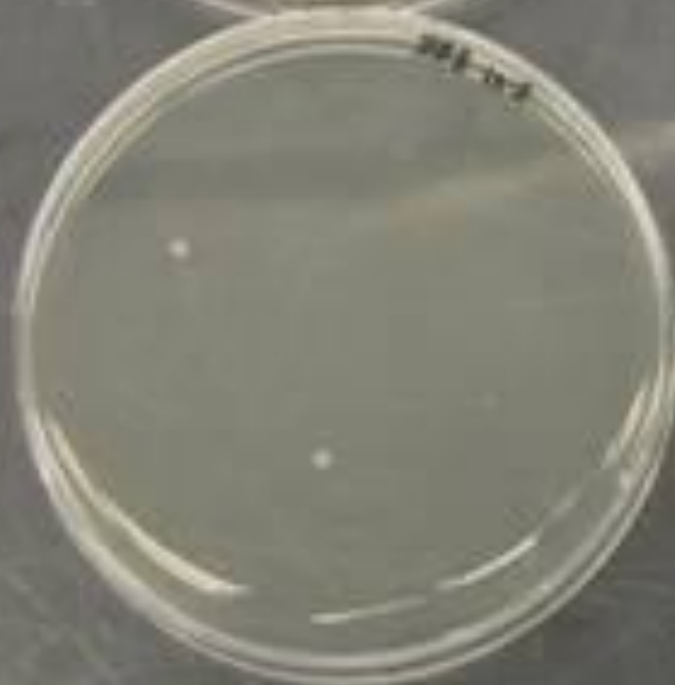
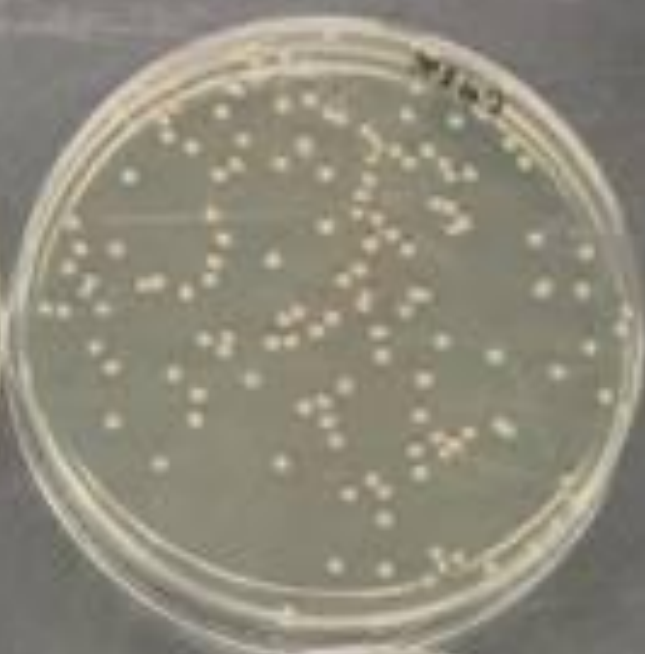
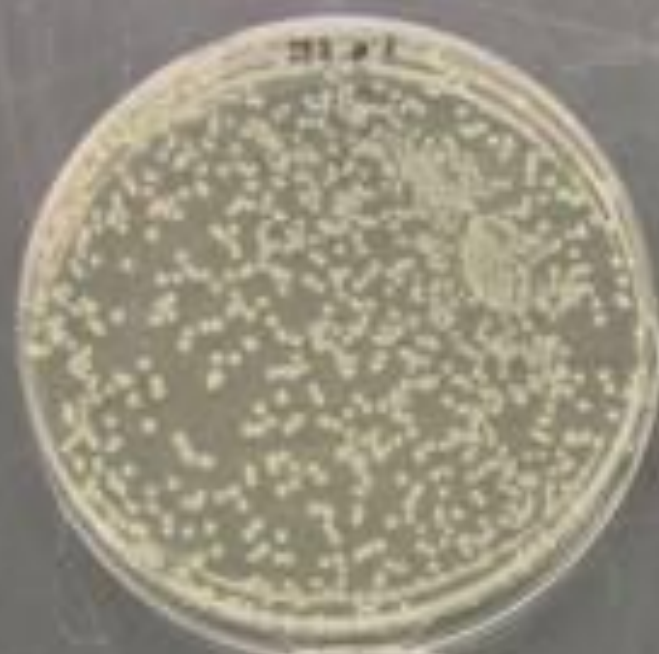
Инверсия

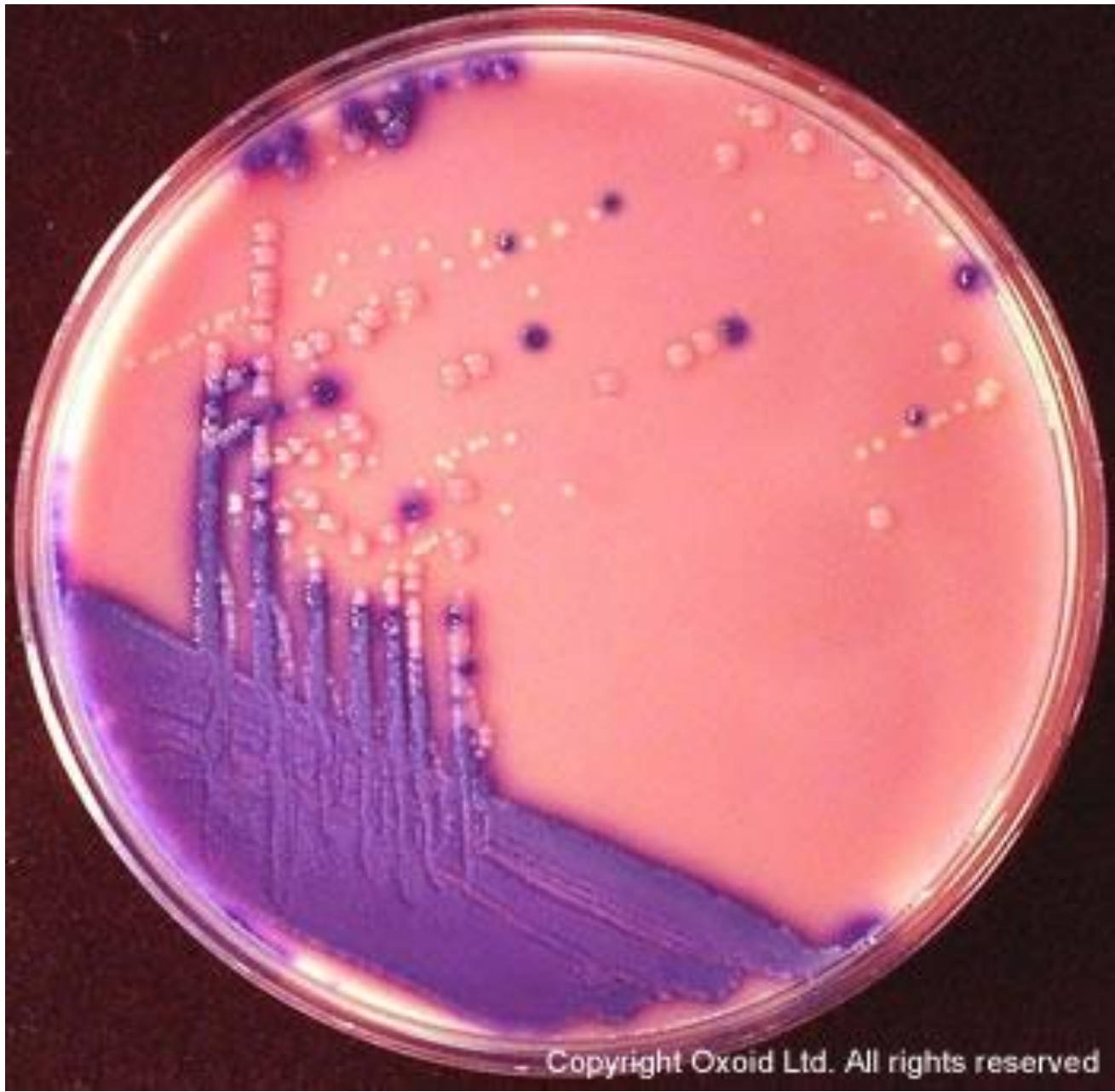


Транслокация



Виды хромосомных мутаций.





Copyright Oxoid Ltd. All rights reserved

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.

Общей особенностью процессов конъюгации, трансформации и трансдукции у бактерий является не добавление новых участков ДНК, а замещение уже имеющихся нуклеотидных последовательностей ДНК.

Рекомбинация

Законная

- Требует наличия протяженных комплементарных участков ДНК в рекомбинируемых молекулах
- Происходит только между близкородственными видами

Незаконная

- Не требует наличия протяженных комплементарных участков ДНК
- Происходит при участии Is-элементов, обеспечивающих быстрое встраивание в хромосому

Рекомбинация

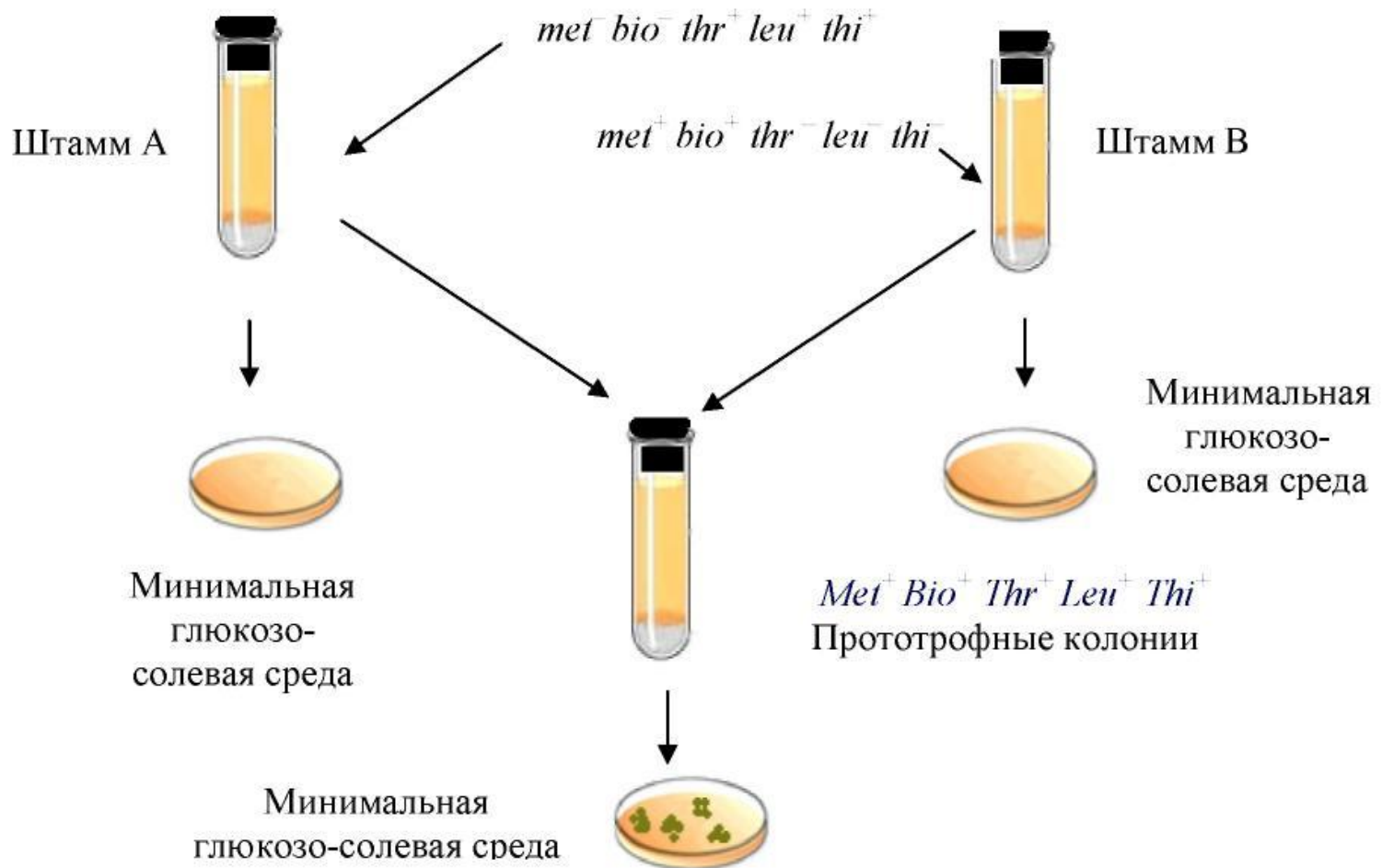
Законная

- Требует наличия протяженных комплементарных участков ДНК в рекомбинируемых молекулах
- Происходит только между близкородственными видами

Незаконная

- Не требует наличия протяженных комплементарных участков ДНК
- Происходит при участии Is-элементов, обеспечивающих быстрое встраивание в хромосому

В 1946 г. Ледеберг и Тейтум установили, что при совместном культивировании двух штаммов *Escherichia coli*, отличающихся несколькими признаками, возникают рекомбинанты - новые формы бактерий.





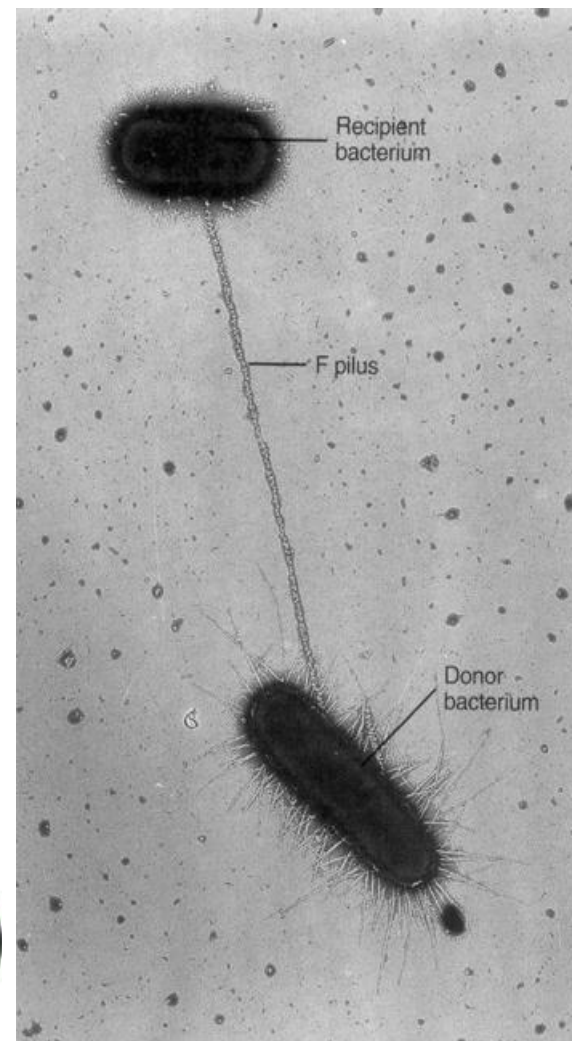
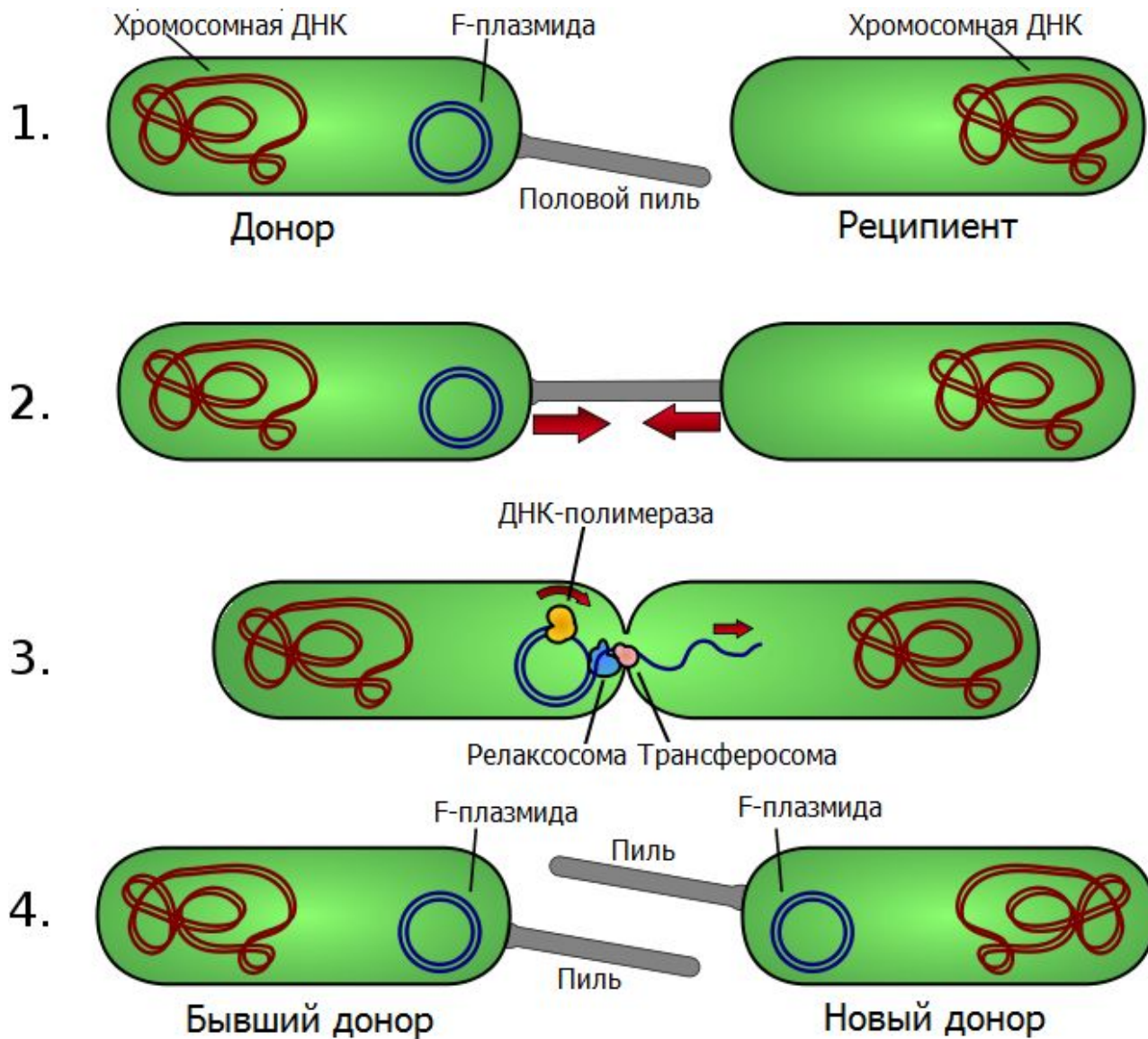
Конъюгация

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.

Конъюгация у бактерий



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 («мужские», содержат F-плазмиду)

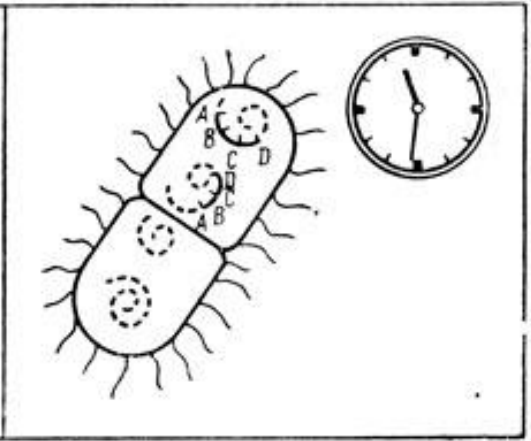
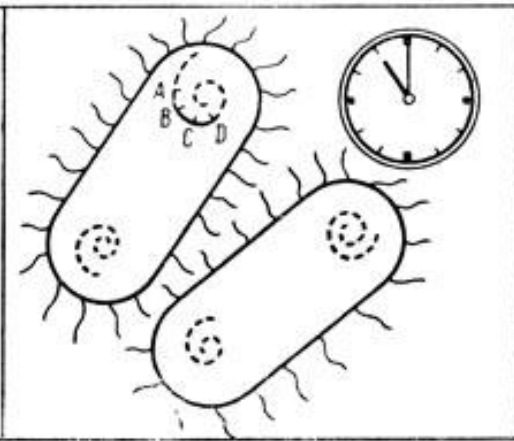
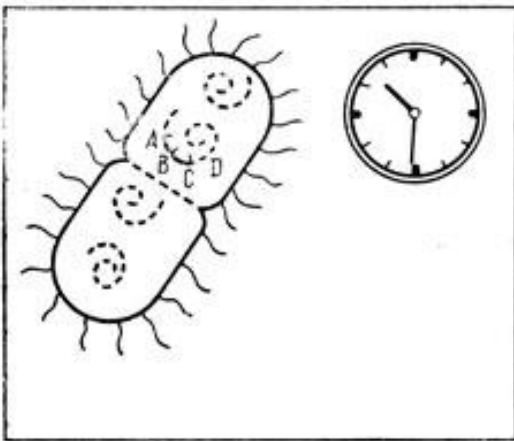
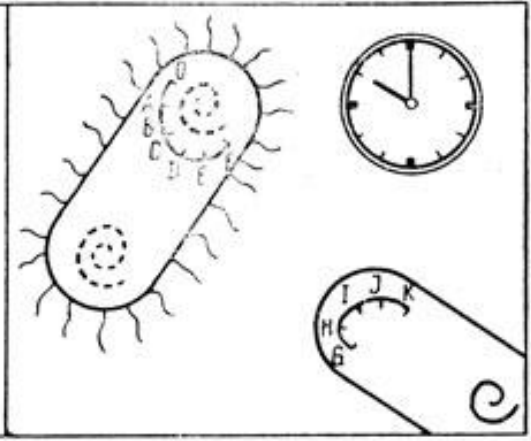
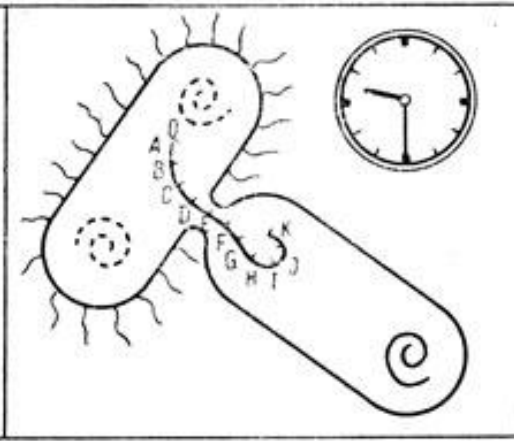
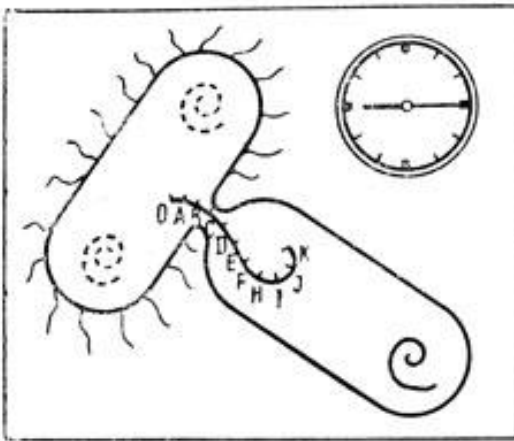
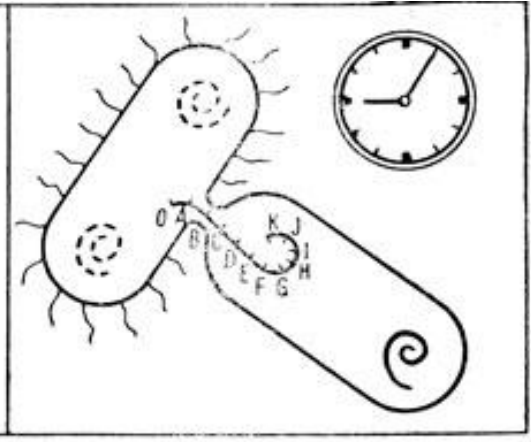
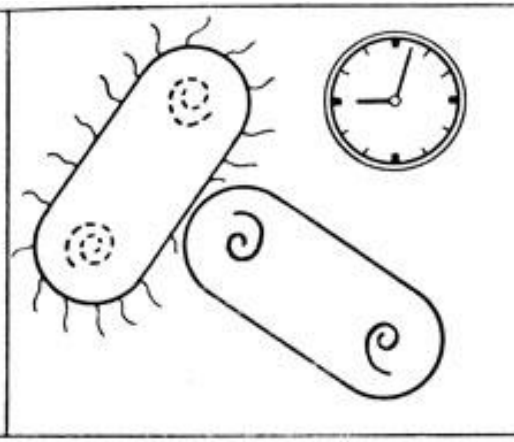
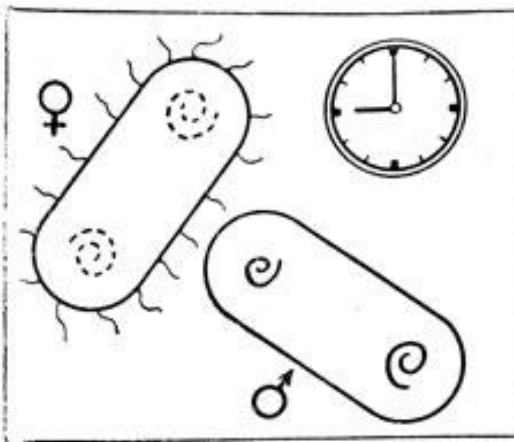
Реципиенты: F⁻ клетки («женские», не содержат F-плазмиду)

Основные этапы:

- *Прикрепление* клетки-донора к реципиентной клетке с помощью половых ворсинок
- *Образование* между обеими клетками конъюгационного *мостика*
- Разрыв и деспирализация одной из нитей ДНК, *проникновение* проксимального конца в клетку-реципиент через конъюгационный мостик
- *Достраивание* второй нити ДНК в клетке-реципиенте и восстановление ДНК-донора

Типы скрещивания:

1. Скрещивание F^+ x F^- : передается только F-плазмида, при этом F^- клетка становится F^+ -клеткой, приобретая плазмиду и свойства донора. Хромосомные гены не передаются.
2. Скрещивание Hfr x 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' x F^- : *(есть рекомбинанты)* происходит аналогично скрещиванию F^+ x F^- и реципиентная клетка превращается в донорную



Постановка опыта скрещивания Hfr x F⁻ по передаче локусов Pro, Thr, Leu

В опыт берут:

- ✓ Донор-штамм с генотипом Pro⁺, Thr⁺, Leu⁺, чувствительный к стрептомицину
- ✓ Реципиент-штамм с генотипом Pro⁻, Thr⁻, Leu⁻, резистентный к стрептомицину
- ✓ Селективную среду, содержащую стрептомицин

Последовательность действий:

1. В опытную пробирку вносят культуры донора и реципиента, инкубируют в течение 30 минут
2. Готовят разведения и высевают на селективную среду, инкубируют
3. Делают контрольные высевы культуры донорных и реципиентных клеток на чашки с селективной средой

Результаты опыта:

1. На контрольных чашках рост отсутствует
2. На опытной чашке вырастают рекомбинанты

С помощью данного опыта можно определить **частоту рекомбинаций** – *отношение числа выросших рекомбинантов к числу участвующих в опыте реципиентных клеток.*

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.

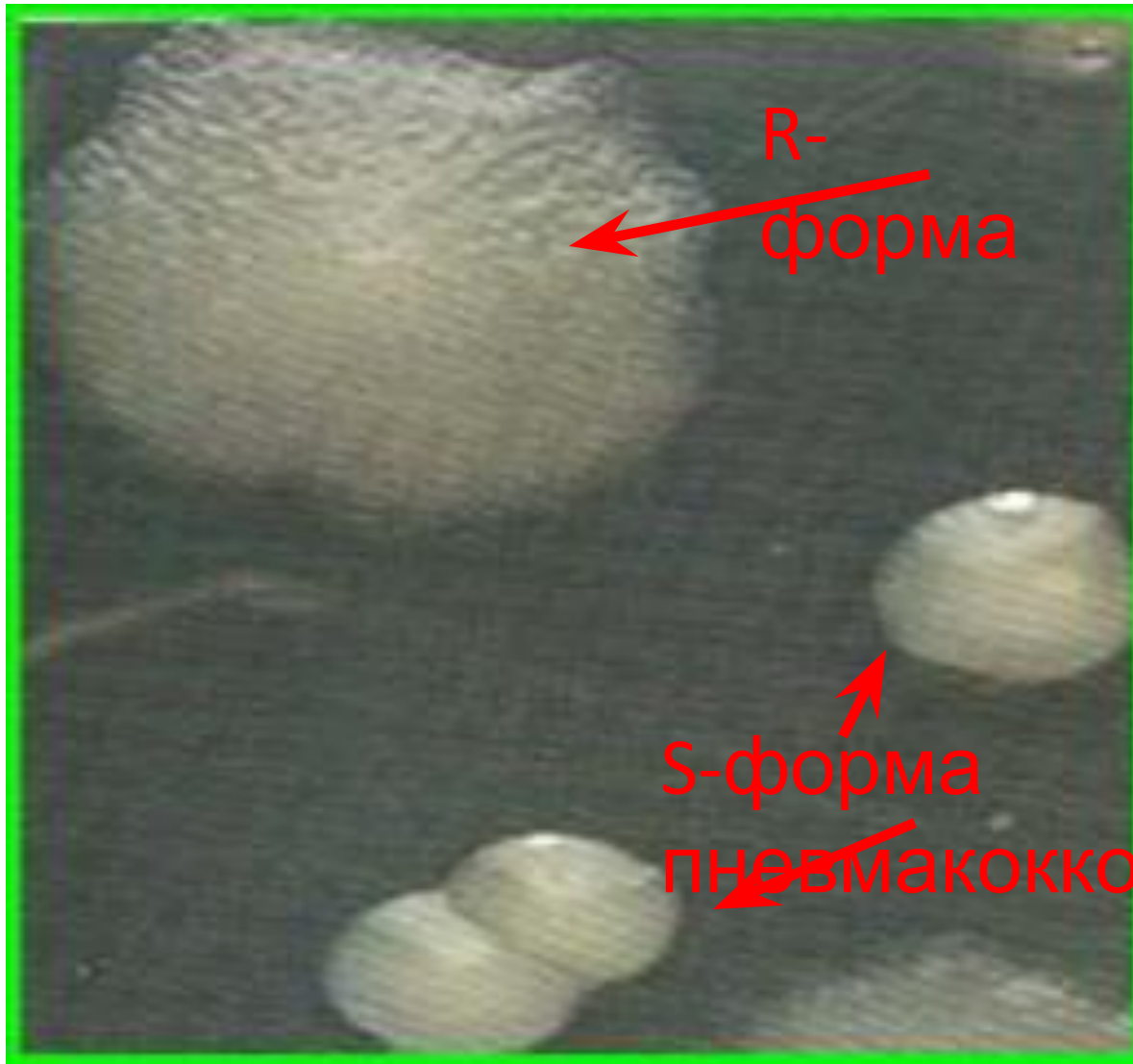
Griffith's experiments



Трансформация у бактерий



**Живой Штамм S из
крови мыши**



R-
форма

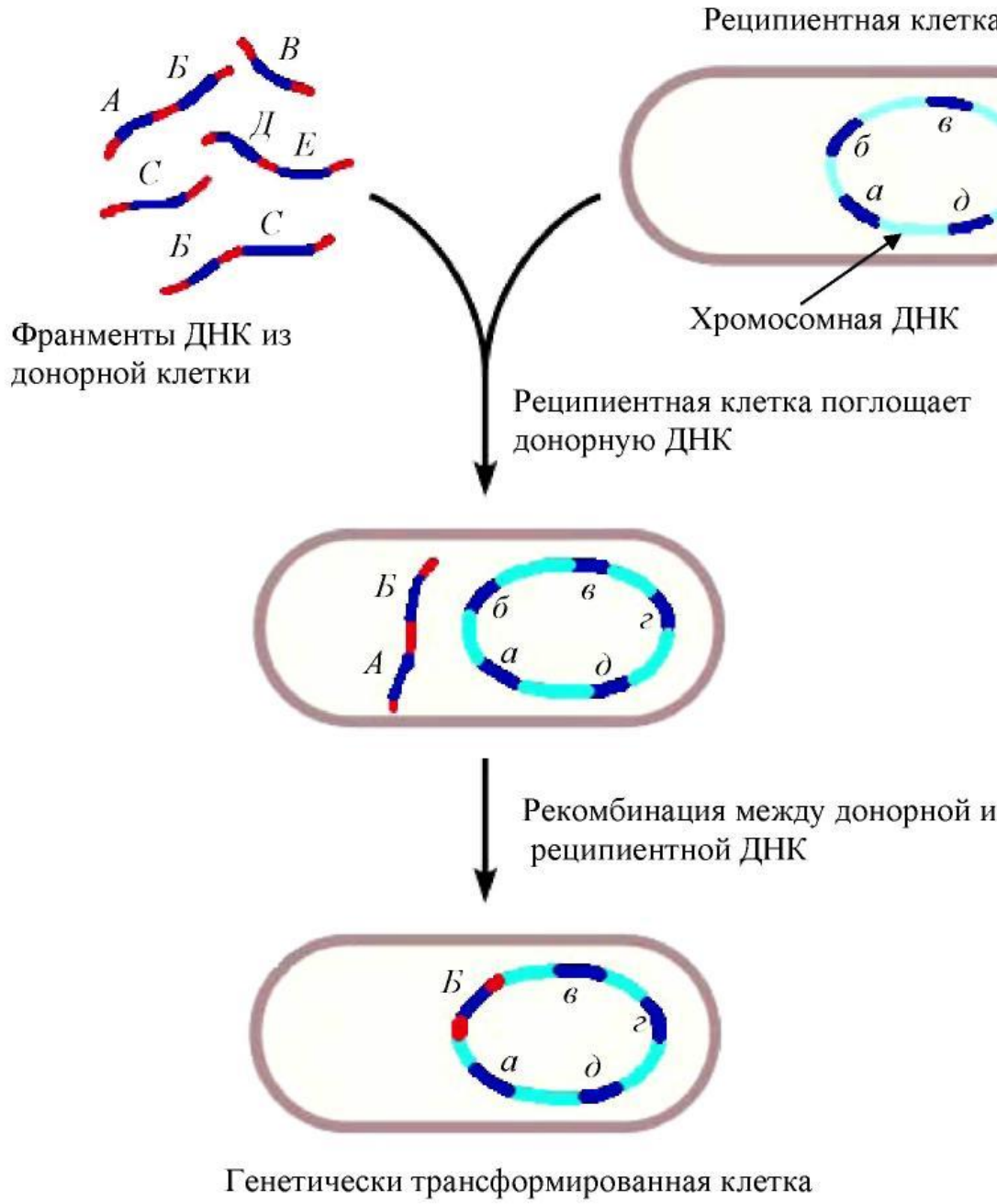
S-форма
пневмококков

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



В 1944 г. Эйвери, МакЛеод и МакКарти доказали, что изменение наследственных свойств клеток связано с переносом ДНК.

Генетически трансформированная клетка

Постановка опыта по передаче локуса устойчивости к стрептомицину

В опыт берут:

- ✓ ДНК стрептомицинустойчивого штамма
- ✓ Стрептомицинчувствительную культуру в компетентном состоянии
- ✓ Селективную среду, содержащую стрептомицин

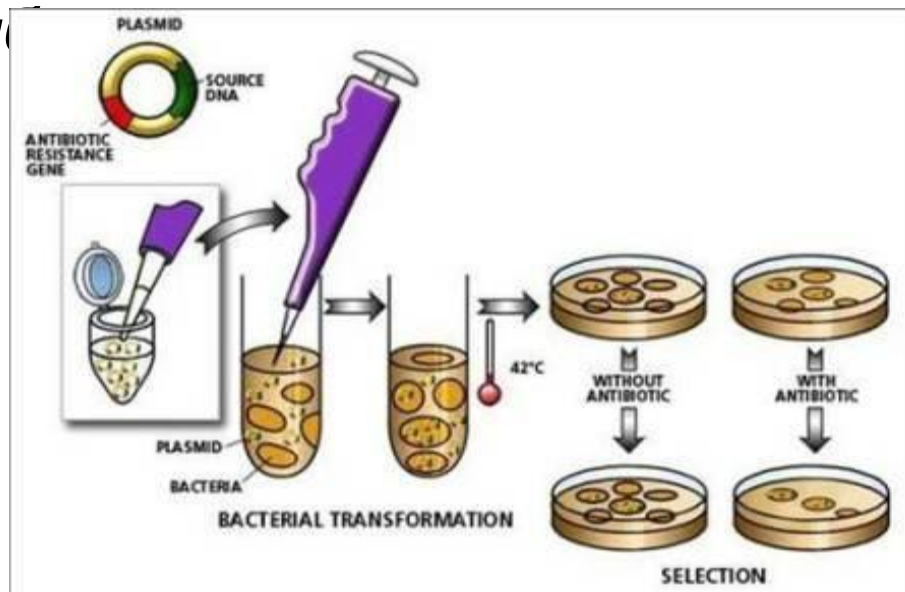
Последовательность действий:

1. Компетентные клетки реципиента соединяют с ДНК донора и инкубируют в течение 30 минут для контакта.
2. В пробирку вносят раствор фермента ДНК-азы для разрушения не проникшей в реципиентные клетки ДНК.
3. Полученную смесь высевают на чашки с селективной средой и инкубируют.
4. Делают контрольные высевы ДНК донора и культуры-реципиента на селективной среде

Результаты опыта:

1. В обоих контролях рост колоний отсутствует.
2. На опытных чашках вырастают колонии рекомбинантов, которые приобрели признак устойчивости к стрептомицину.

С помощью данного опыта можно определить **частоту трансформации** – отношение числа выросших рекомбинантных клеток.



Трансдукция

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

специфическая
неспецифическая

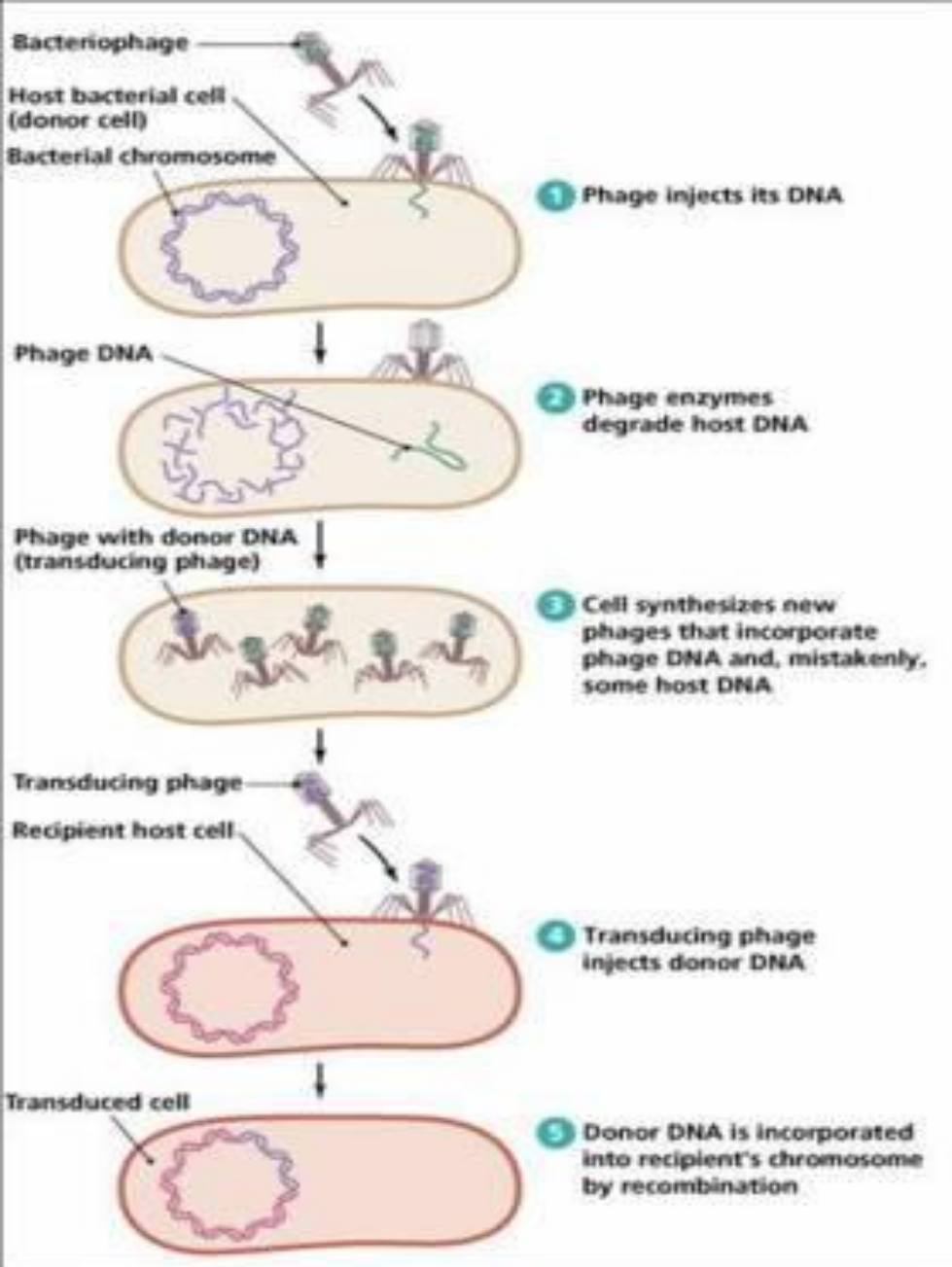
(локализованная)

(общая)

абортивная

Неспецифическая трансдукция:

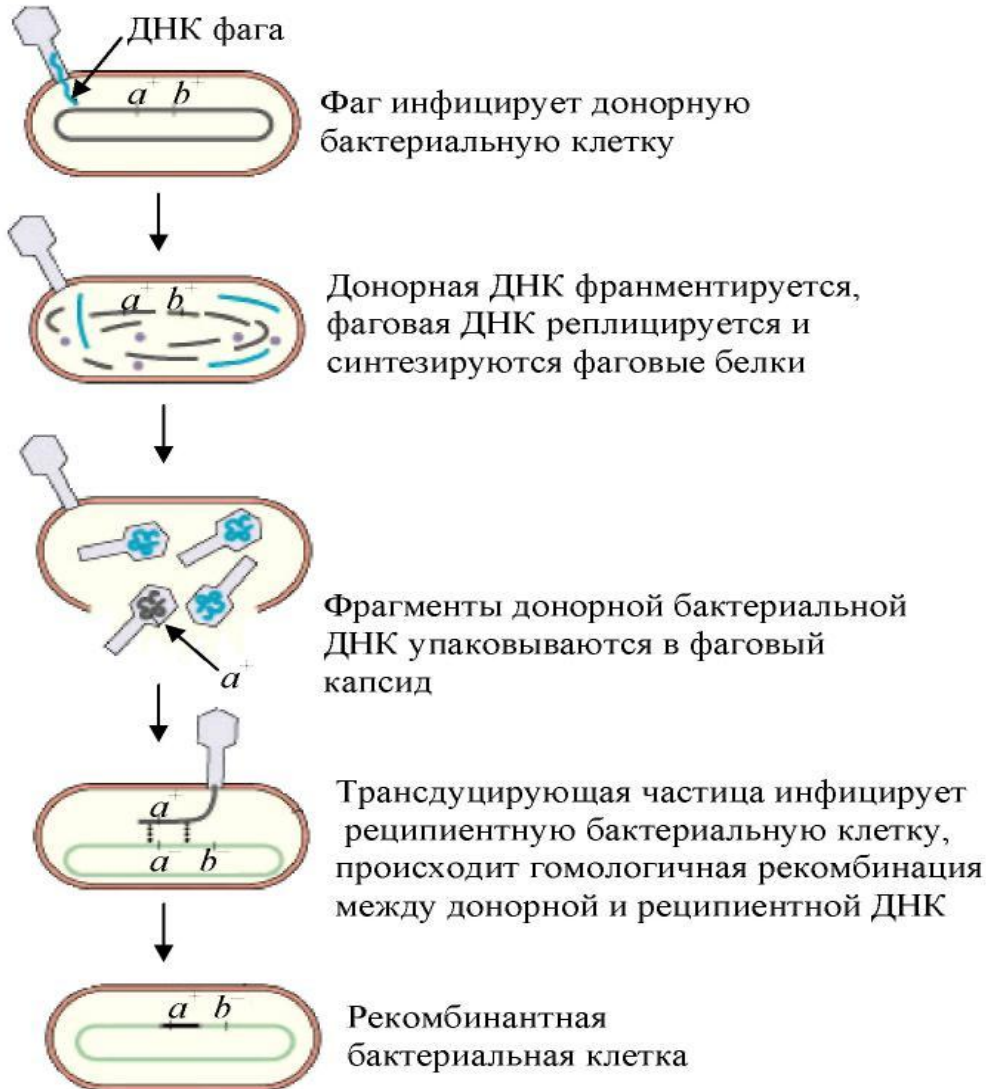
- бактериофаг переносит любые гены донора;
- неспецифическую трансдукцию осуществляют *вирулентные фаги*;
- включение ДНК клетки-реципиента (фиолетовая) при сборке фага носит случайный характер



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

Трансдукция у



Общая трансдукция

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*

Постановка опыта по передаче локуса

«gal+»

В опыт берут:

- ✓ Трансдуцирующий фаг, выделенный из «gal+» E.coli
- ✓ Бульонную культуру-реципиента E.coli «gal-»
- ✓ Среду ЭМС (селективная, дифференциально-диагностическая). «gal+» колонии – сине-черные; «gal-» колонии – неокрашенные.

Последовательность действий:

1. В опытную пробирку вносят культуру-реципиент и фаголизат трансдуцирующего фага, инкубируют в течение 30 минут
2. Из полученной смеси готовят разведения, делают высевы на чашки с ЭМС-средой, инкубируют
3. Делают контрольные высевы фаголизата и культуры-реципиента на чашки с ЭМС-средой

Результаты опыта:



1. В контроле культуры-реципиента выросли бесцветные «gal-» колонии
2. На опытной чашке: бесцветные «gal-» колонии культуры-реципиента и сине-черные «gal+» колонии рекомбинантов

С помощью данного опыта можно определить **частоту специфической трансдукции** – *отношение числа выросших рекомбинантов к числу участвующих в опыте реципиентных клеток.*

Ограниченная трансдукция.

