



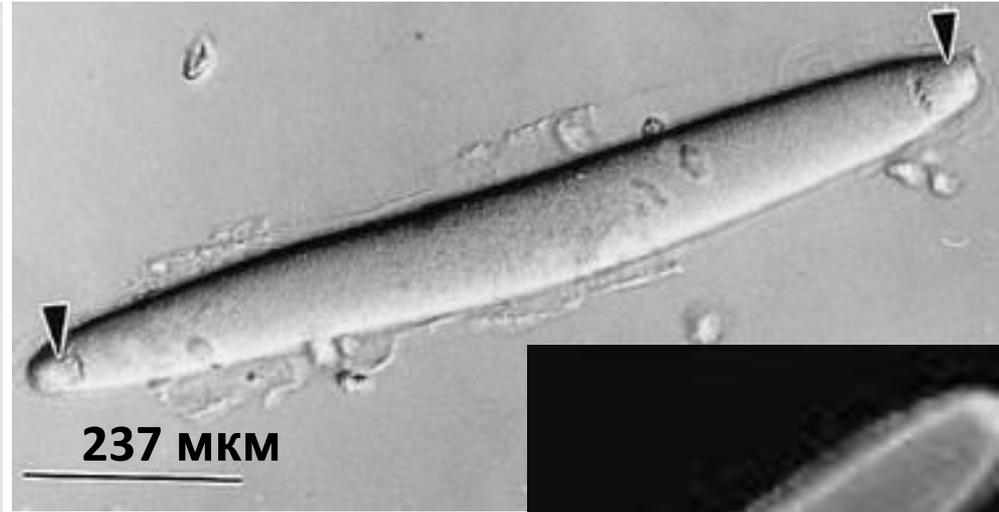
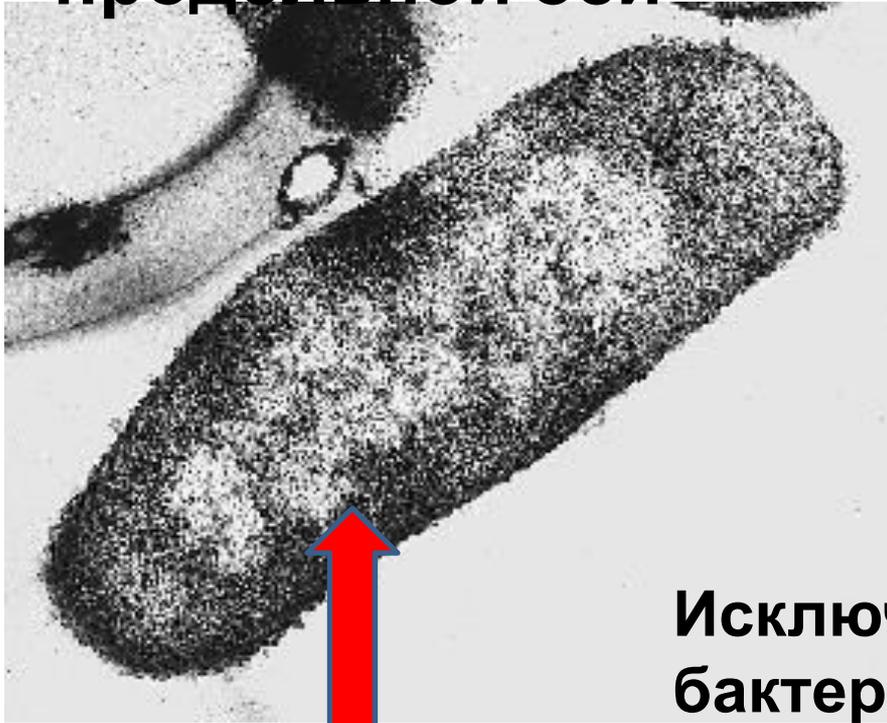
**Макс  
Дельбрук**

**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

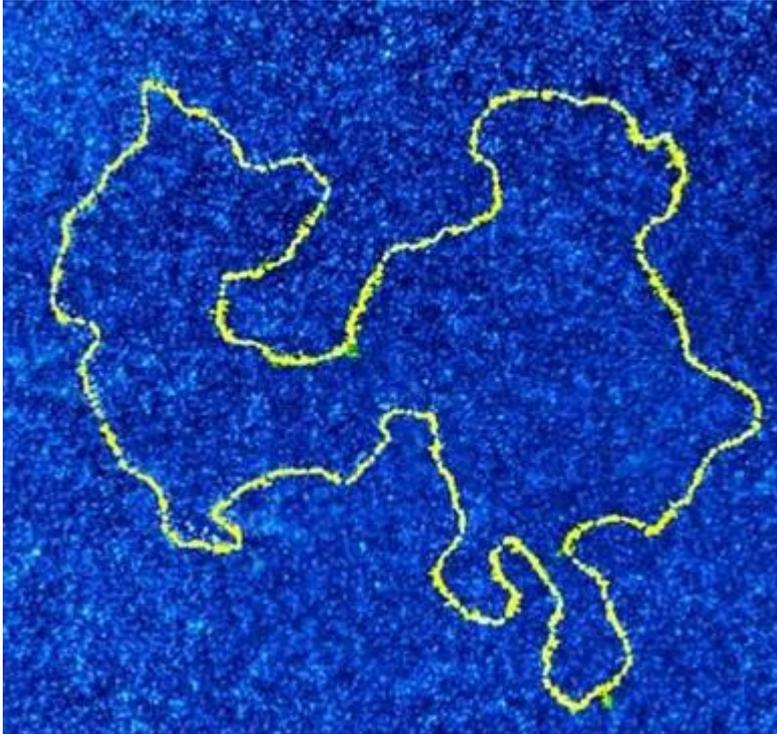


**нуклеои**

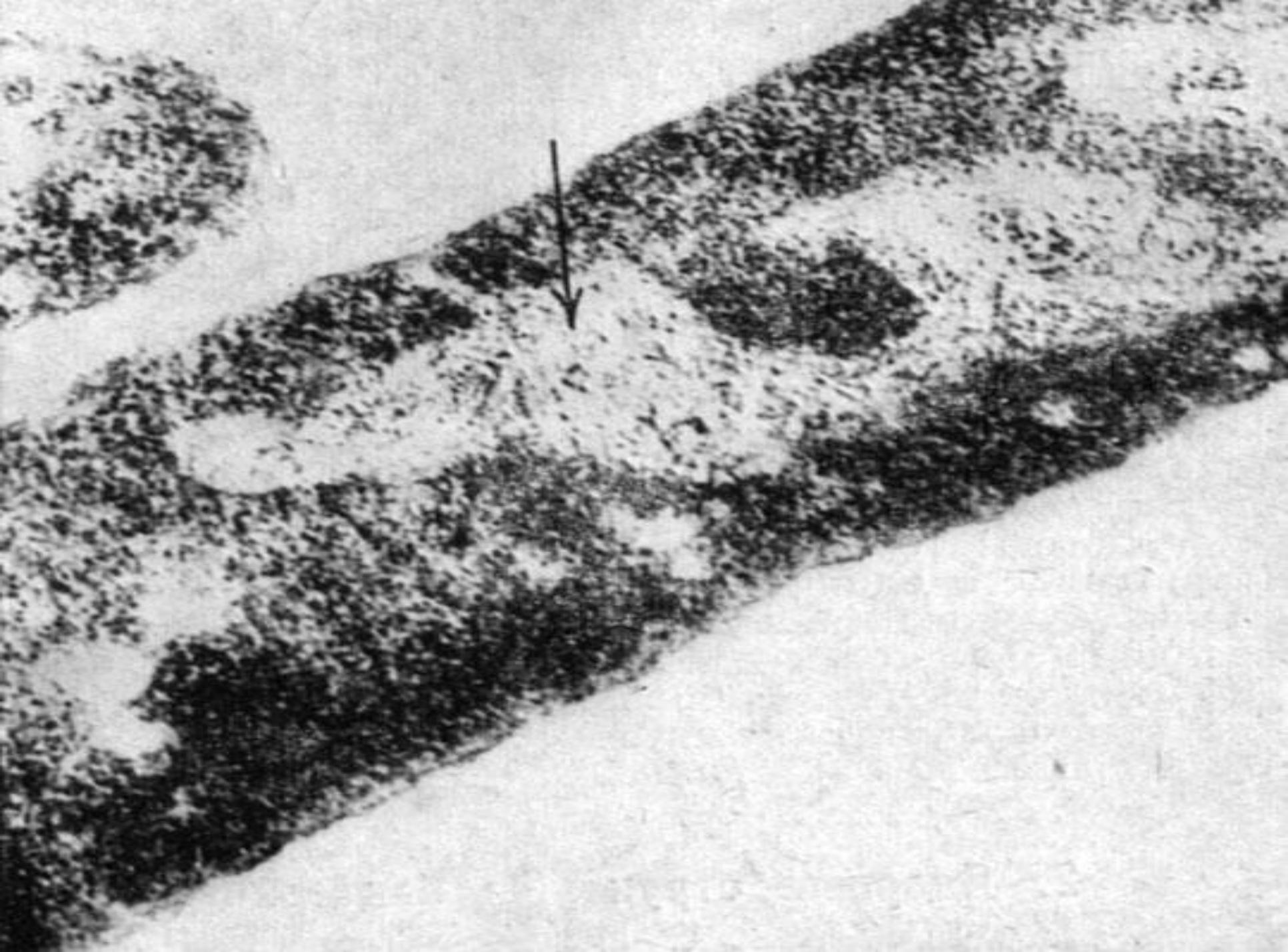
**д**

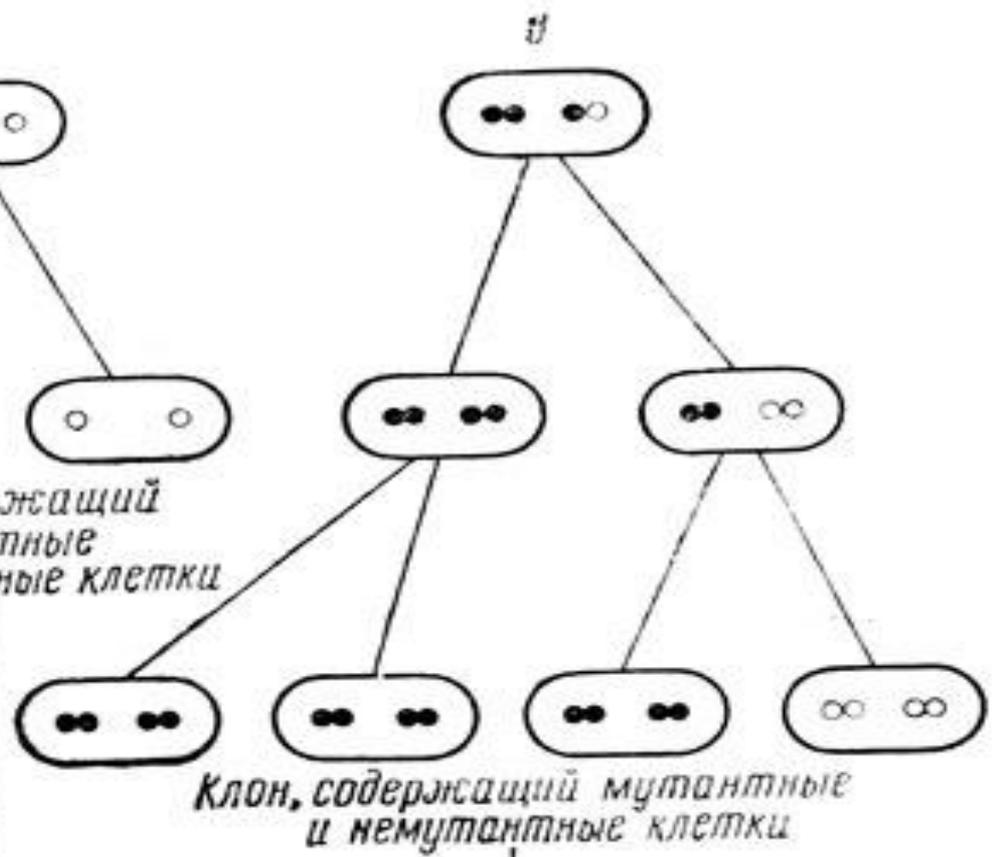
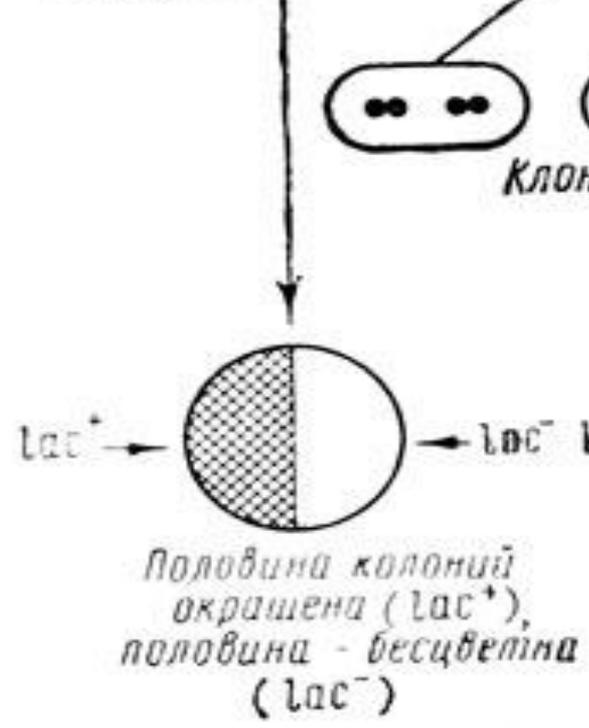
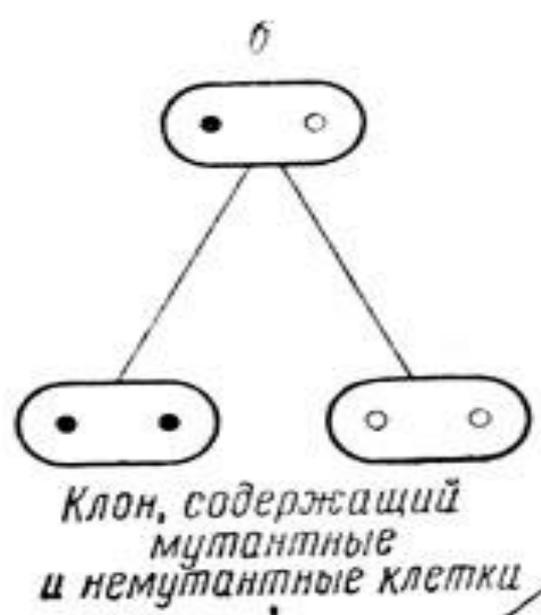
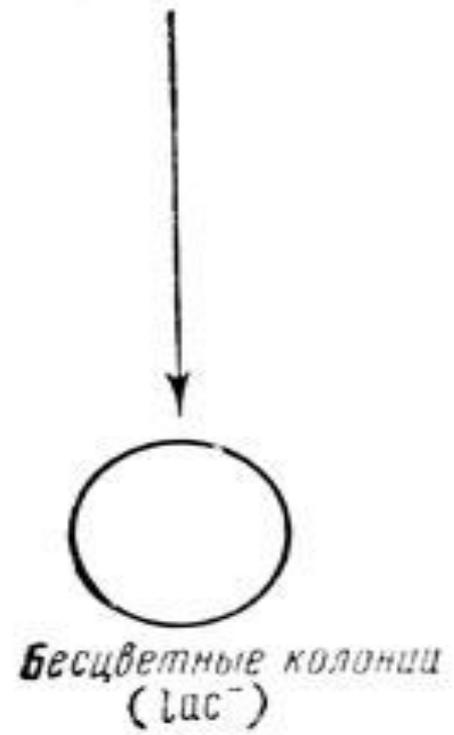
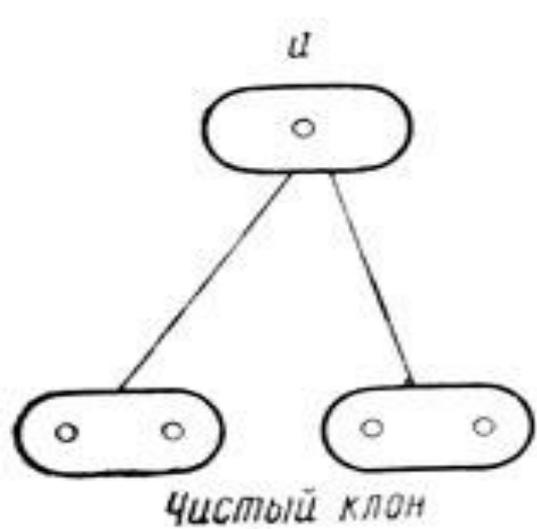
Исключение гигантская  
бактерия  
*Epiploriscium fishelsoni*, ее  
хроматин образует узкий  
ободок по периферии  
клетки

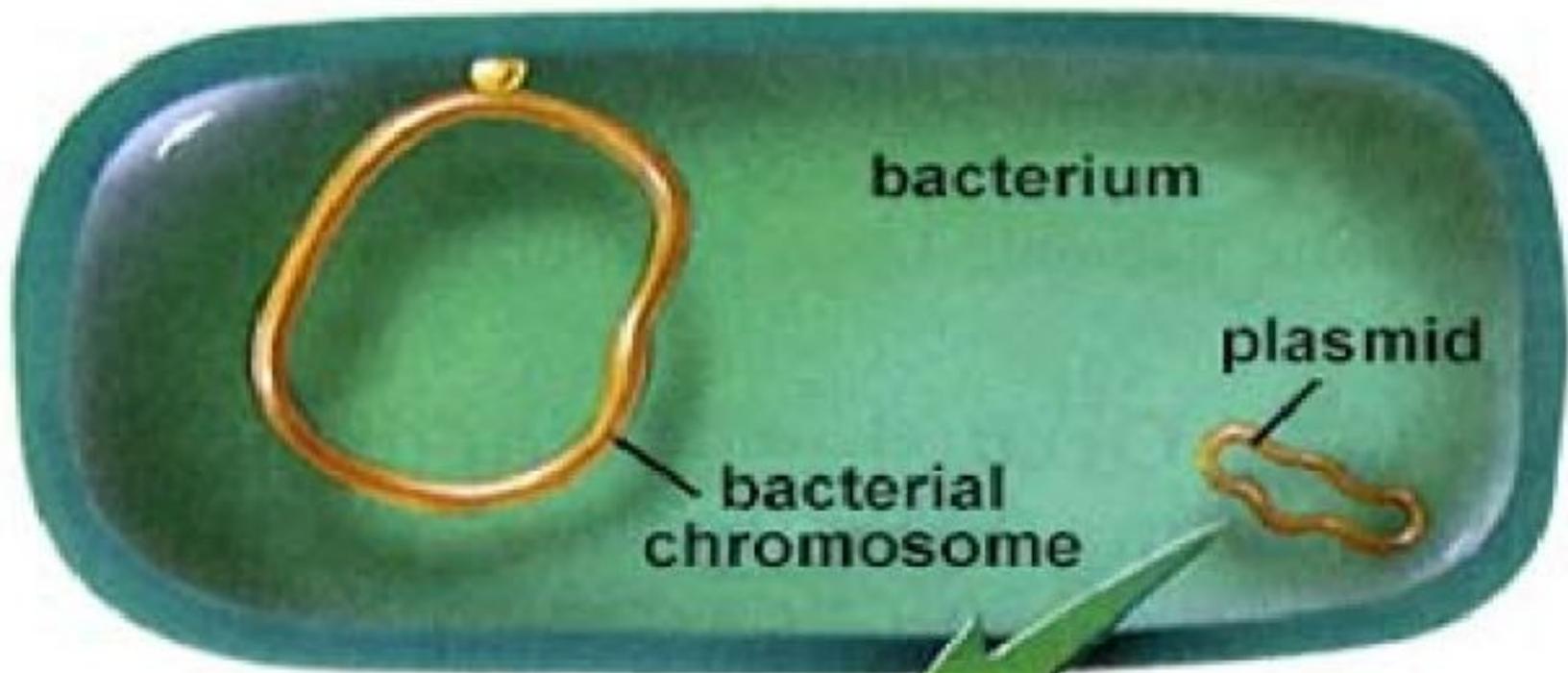
# ДНК нуклеоида



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







1  $\mu$ 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)

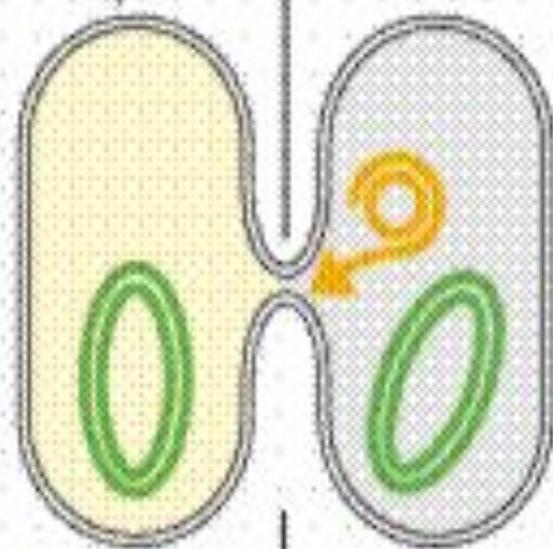
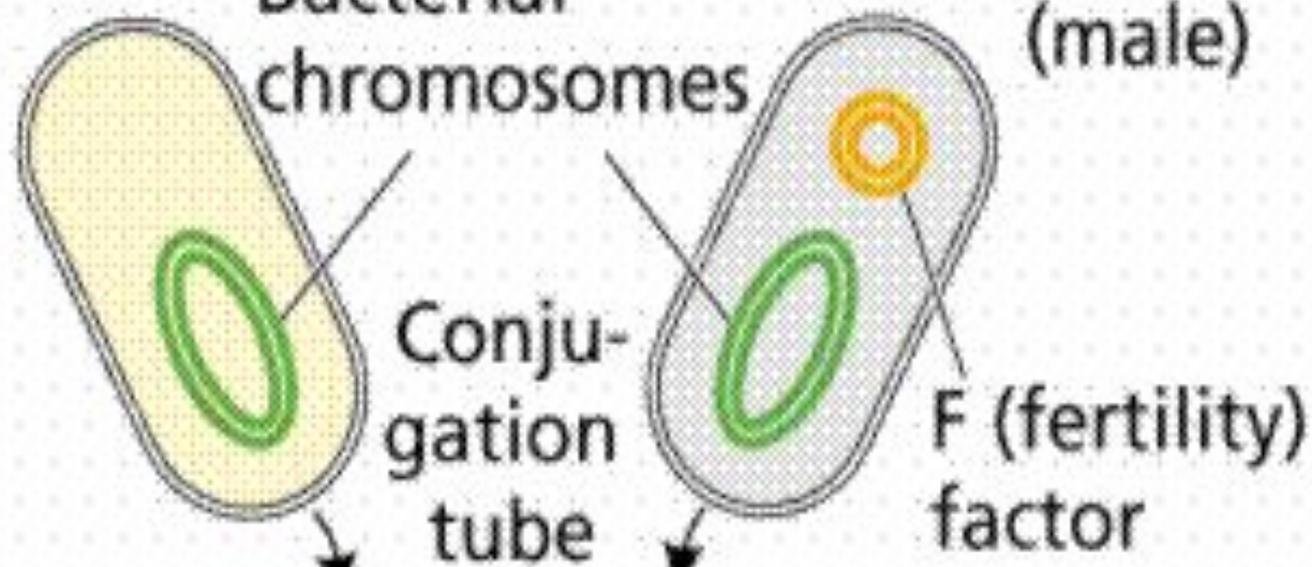
## ГРУППЫ ПЛАЗМИД

- ***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

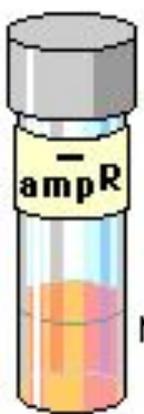
$F^-$  *E. coli*  
(female)

Bacterial  
chromosomes

$F^+$  *E. coli*  
(male)



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

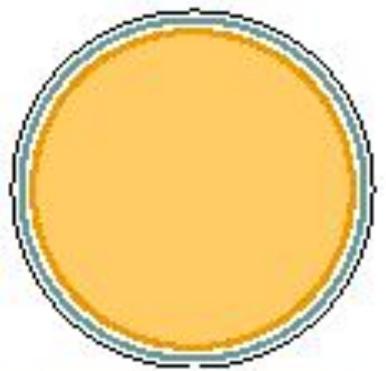


Control 1  
No amp<sup>R</sup> plasmids added

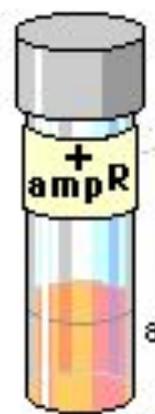


No ampicillin  
in growth medium

Control 2  
No amp<sup>R</sup> plasmids added



Ampicillin  
in growth medium

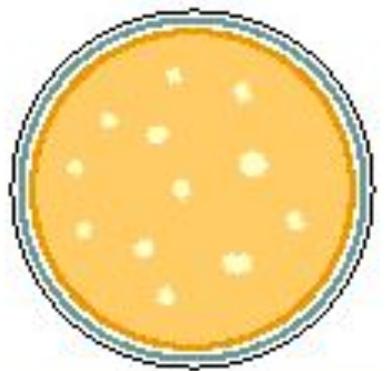


Experimental tube 1  
amp<sup>R</sup> plasmids added

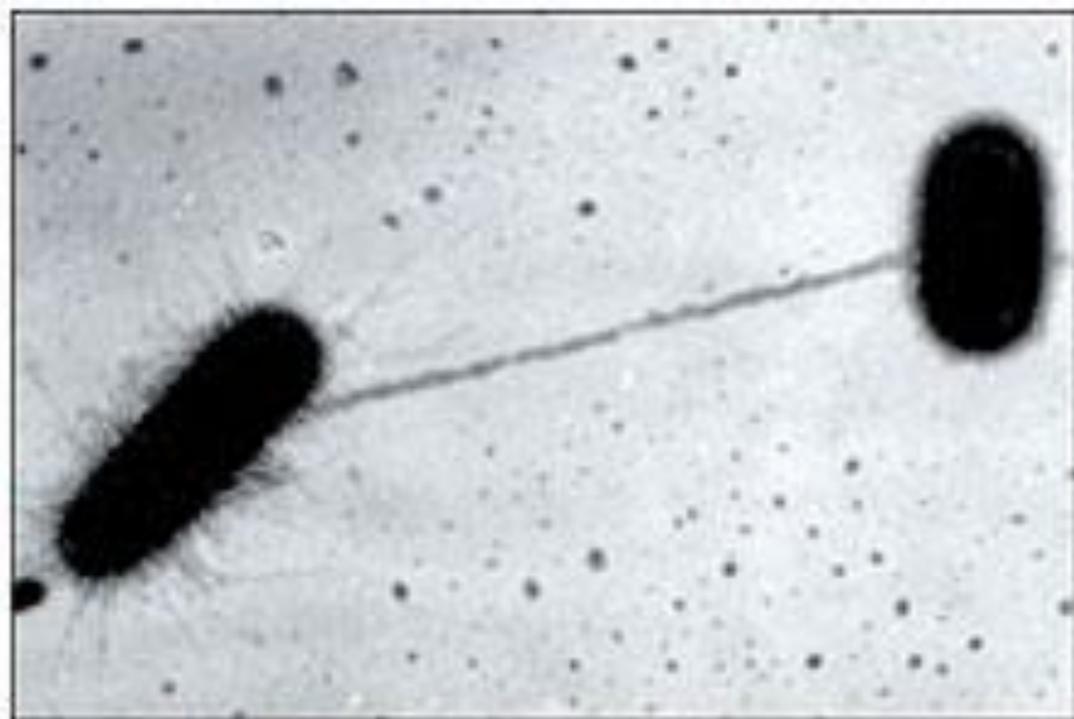
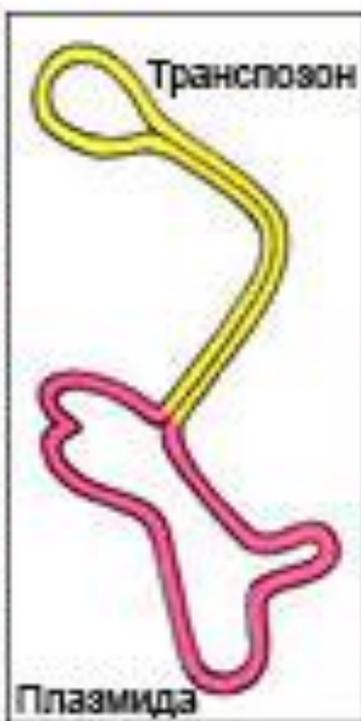


No ampicillin  
in growth medium

Experimental tube 2  
amp<sup>R</sup> plasmids added



Ampicillin  
in growth medium

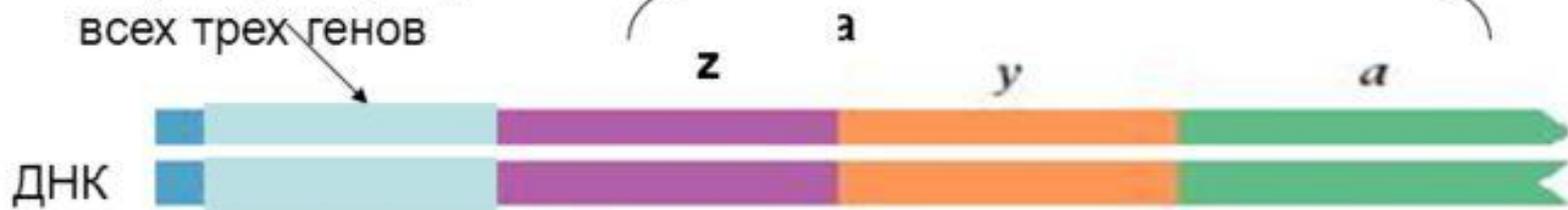


Генотип	Фенотип	
	на среде, содержащей лактозу	на среде, не содержащей лактозу
$lac^+$	Фенотипическая изменчивость лактозо-положительный ↔ лактозо-отрицательный (2)	
$lac^-$	Генотипическая изменчивость лактозо-отрицательный ↔ лактозо-отрицательный (1)	

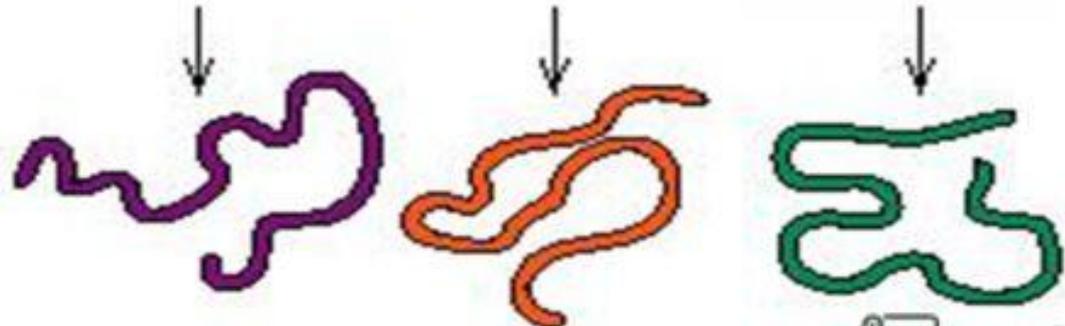
# Строение лактозного оперона бактерии кишечной палочки (E.coli).

**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.

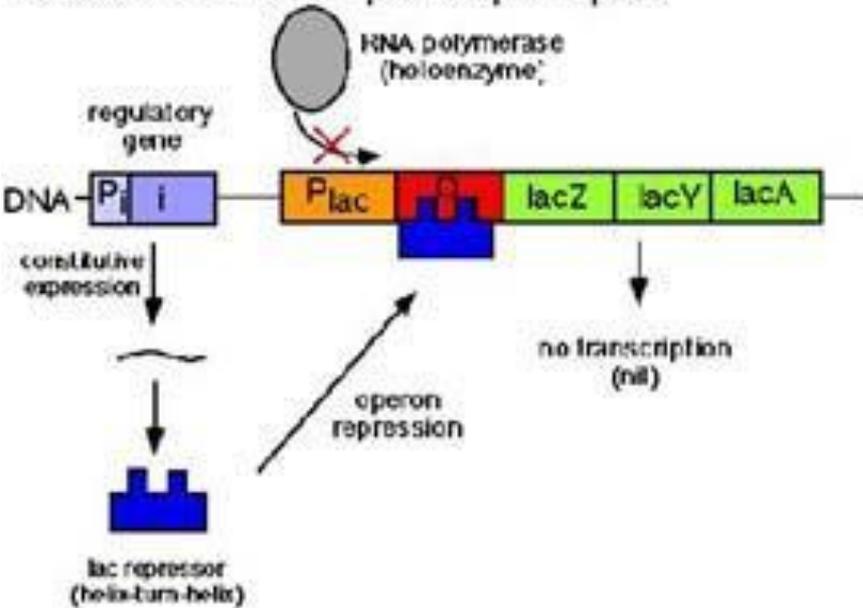


Индукцибельный оперон  
Индукция x1000

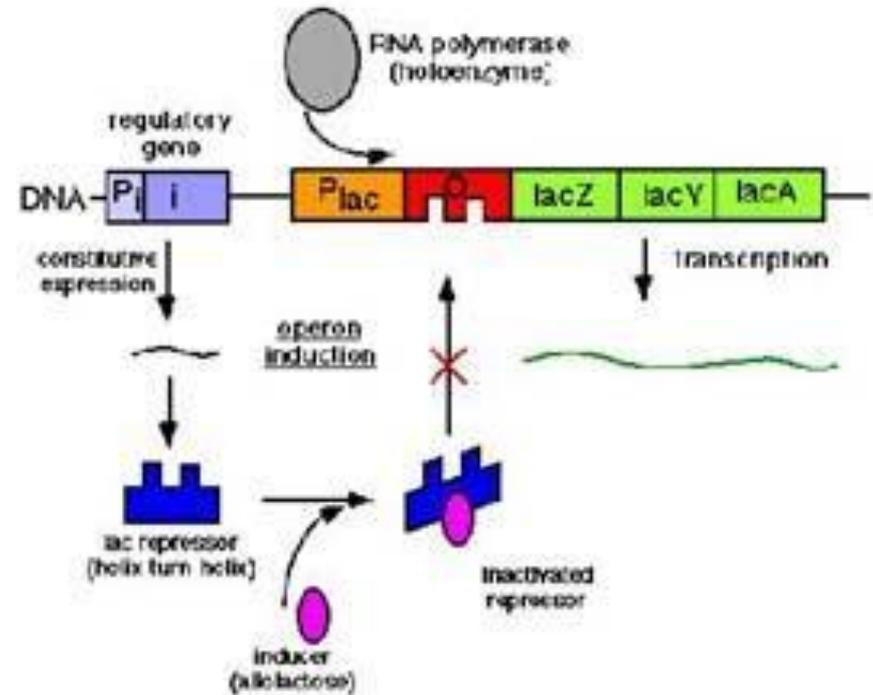
# Регуляция активности генов: *lac*-оперон бактерии *E.coli*

гены метаболизма лактозы работают, когда лактоза есть в клетке

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

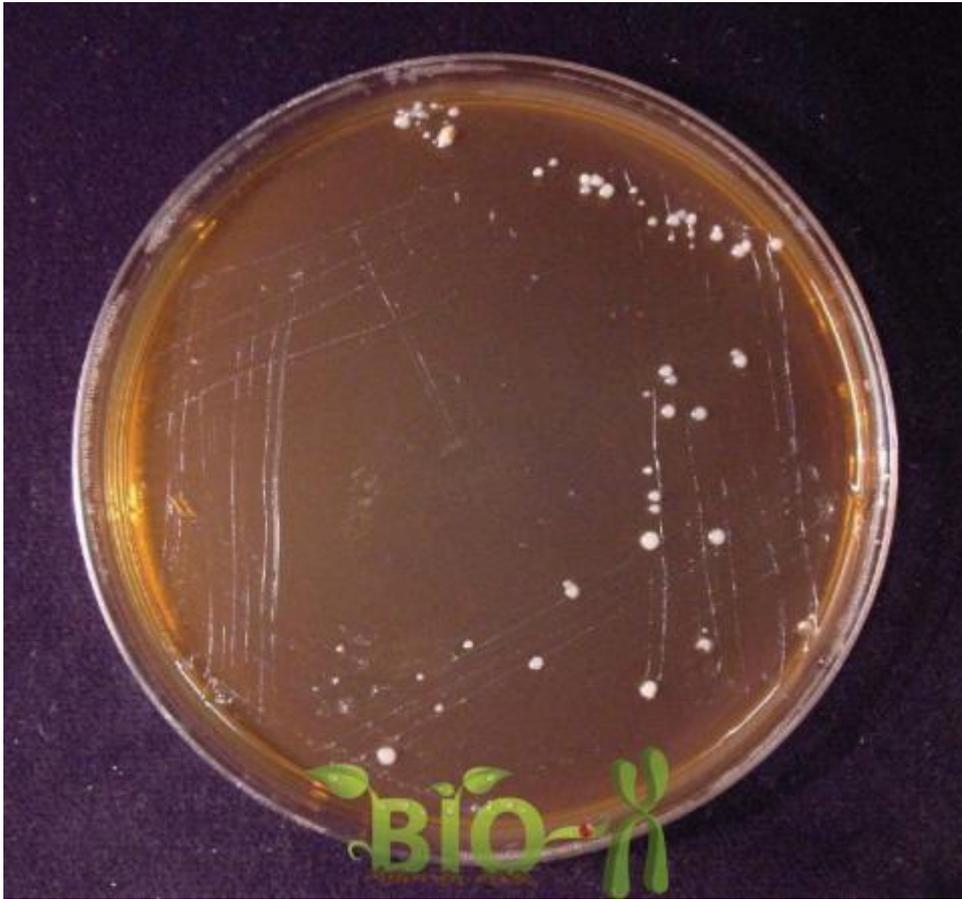


Лактоза инактивирует белок-репрессор и он теряет сродство к оперону. Транскрипция возможна.

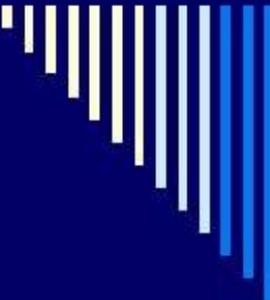


Оперон - группа генов, транскрибируемых с одного промотора.

# **Ненаследственная (средовая, модификационная) изменчивость**



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



по характеру появления  
мутации

**спонтанные**

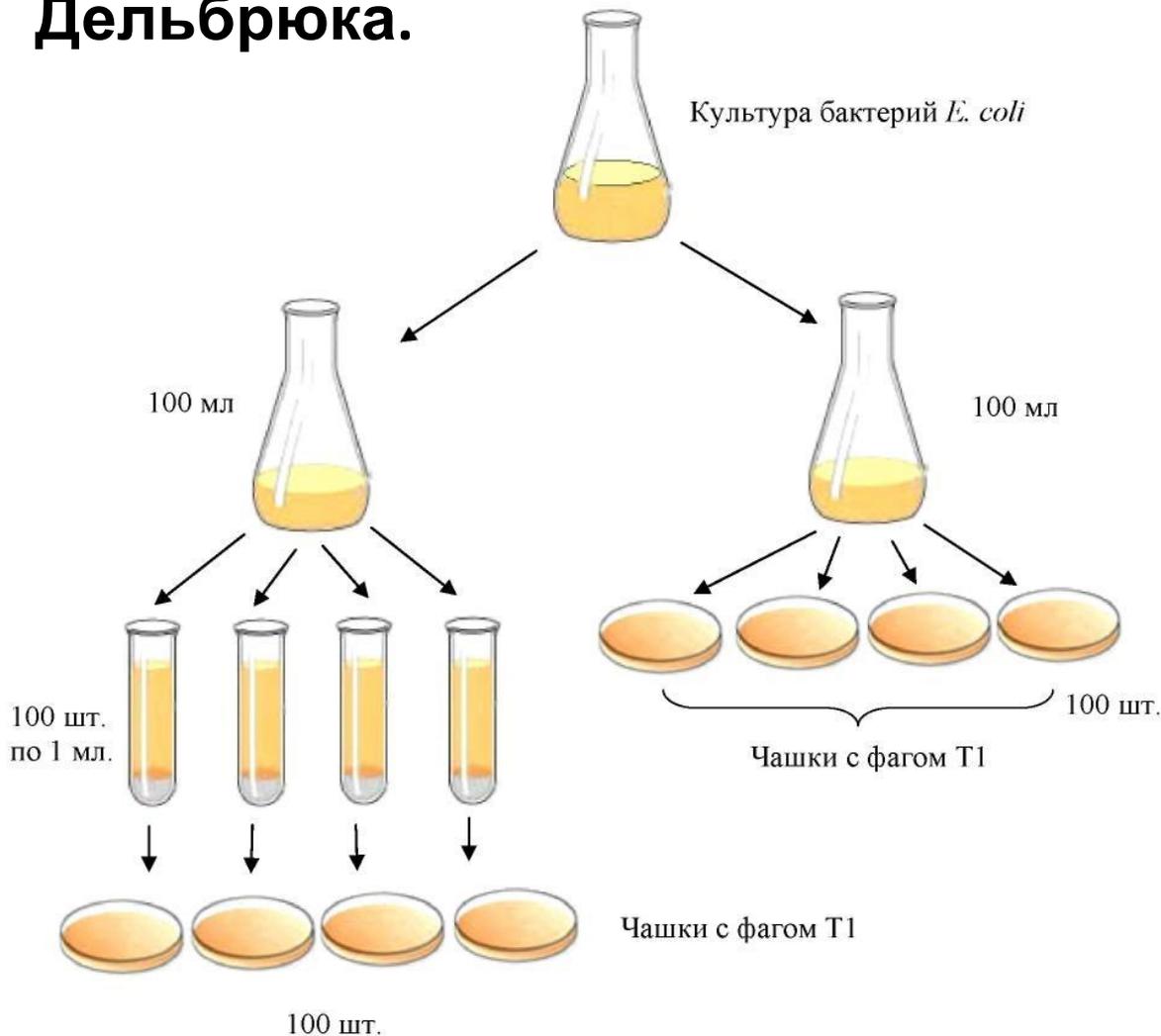
возникают  
естественным  
путем

**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 ылп алд ымш елт рид ня*

- Замена оснований:

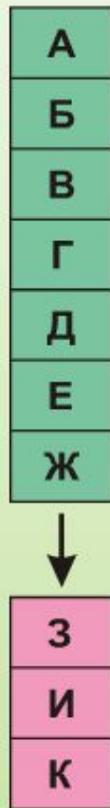
*вот лес бук **в**оз дуб ивы тут **б**ал пол дом **п**ел три дня*

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

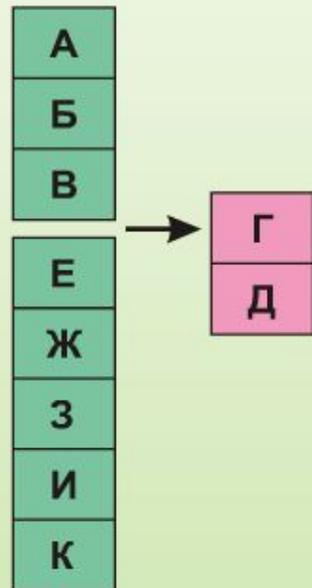
Нормальная  
хромосома



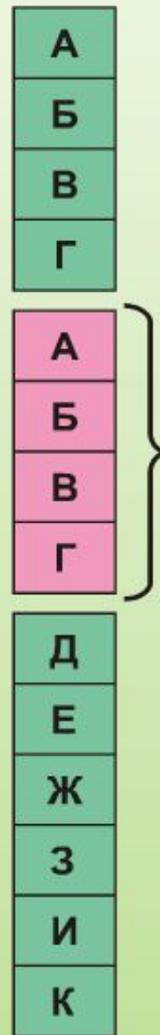
Утрата



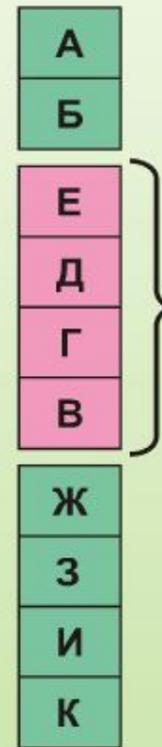
Делеция



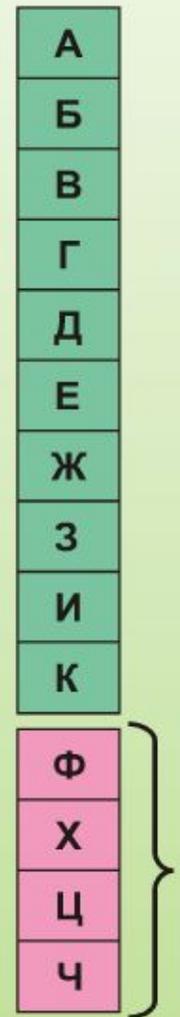
Дупликация



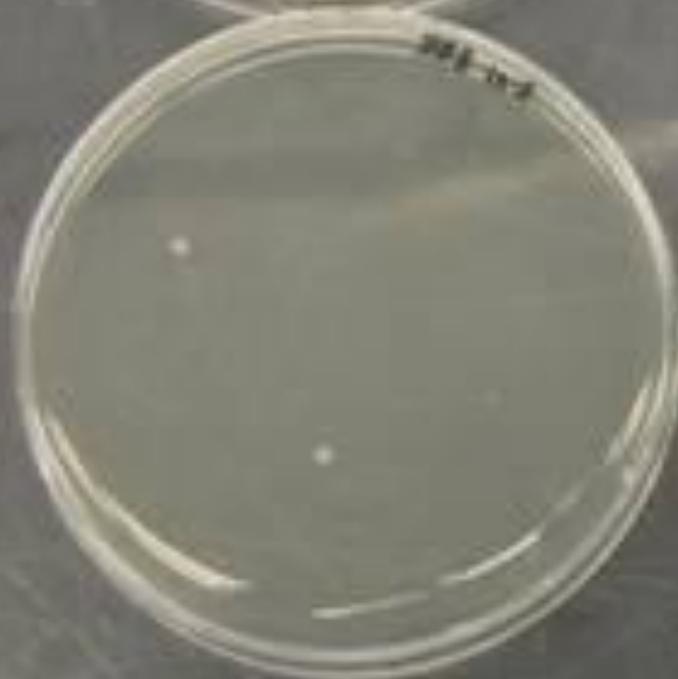
Инверсия

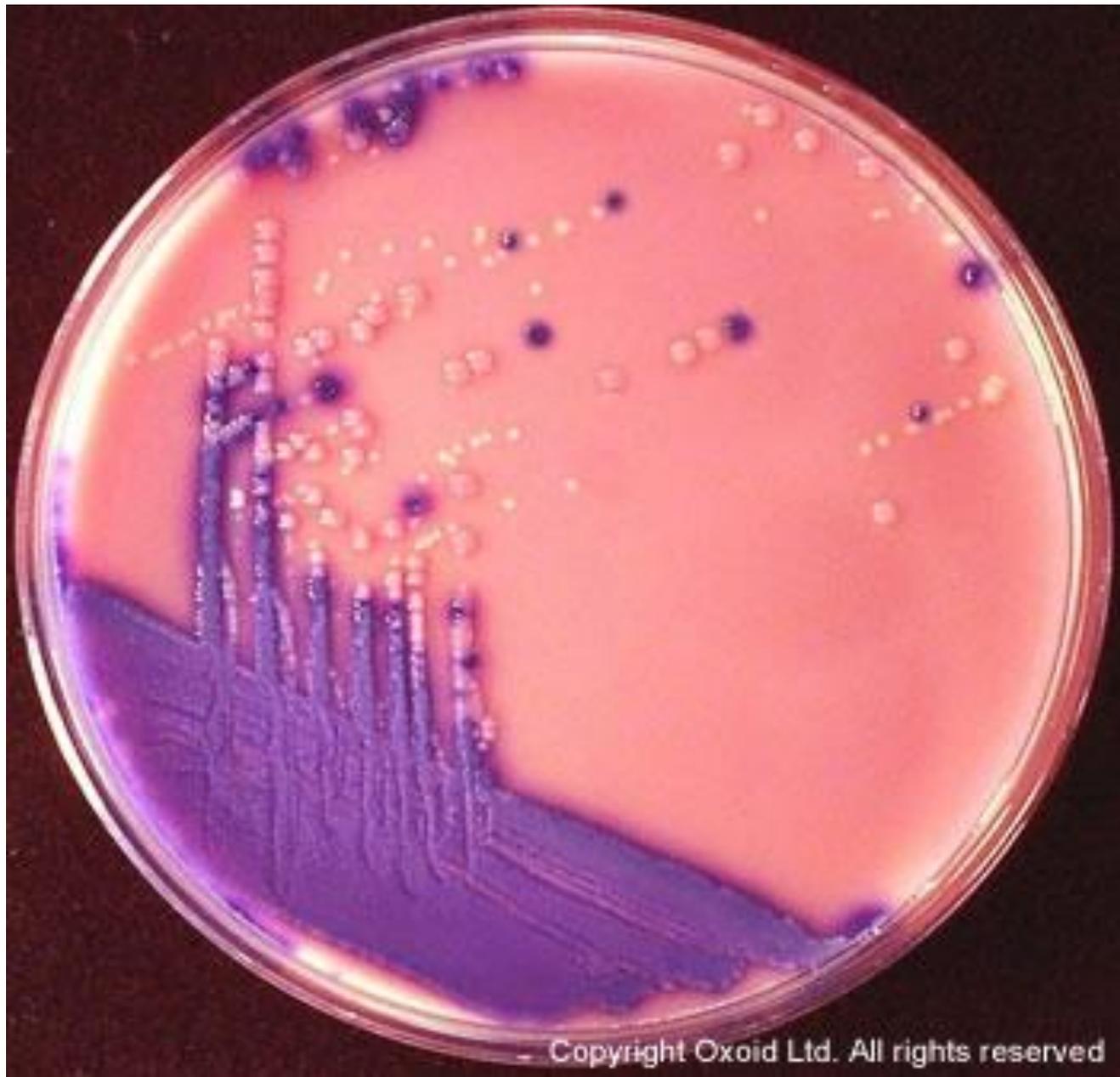


Транслокация



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

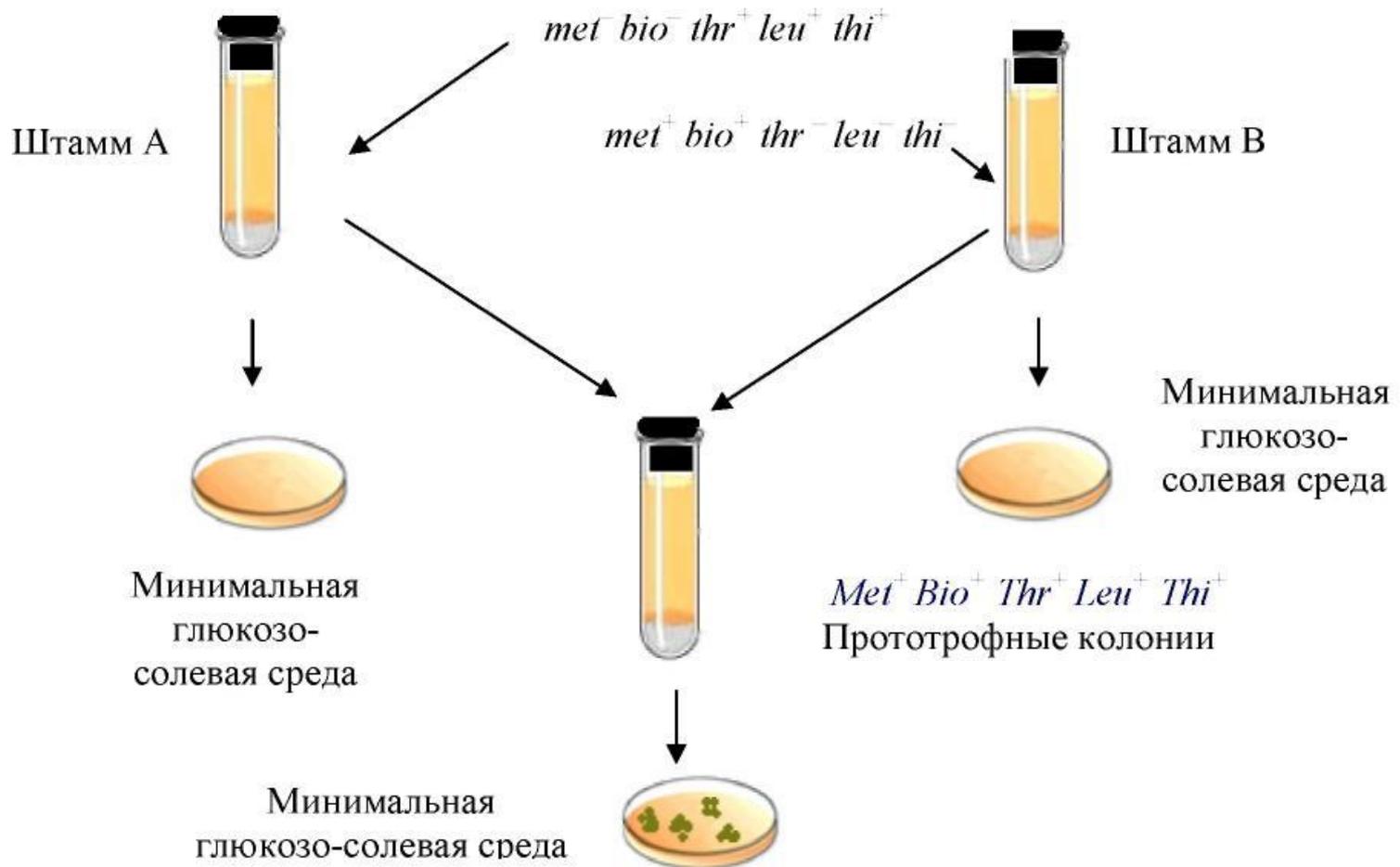
## Законная

- 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.





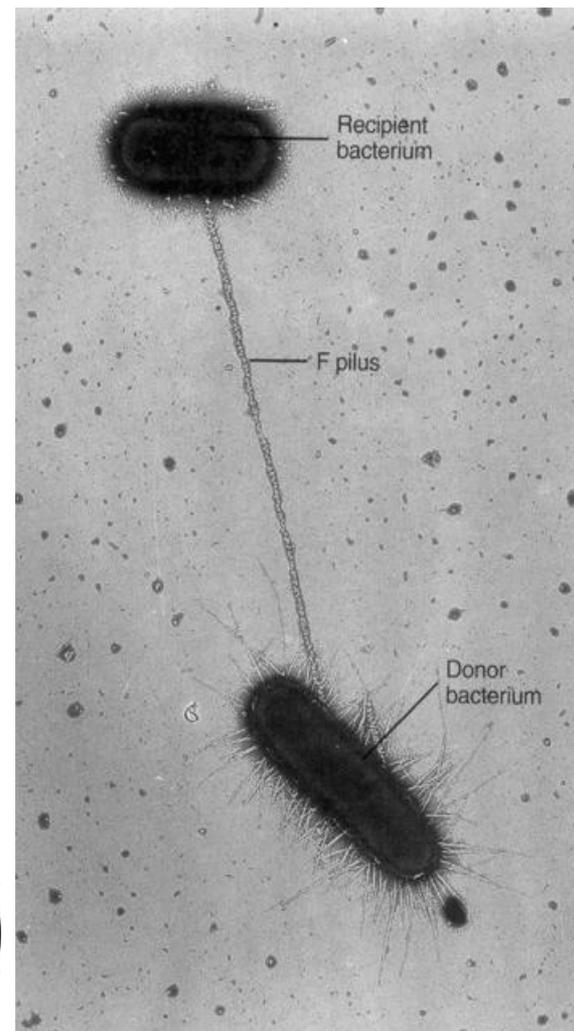
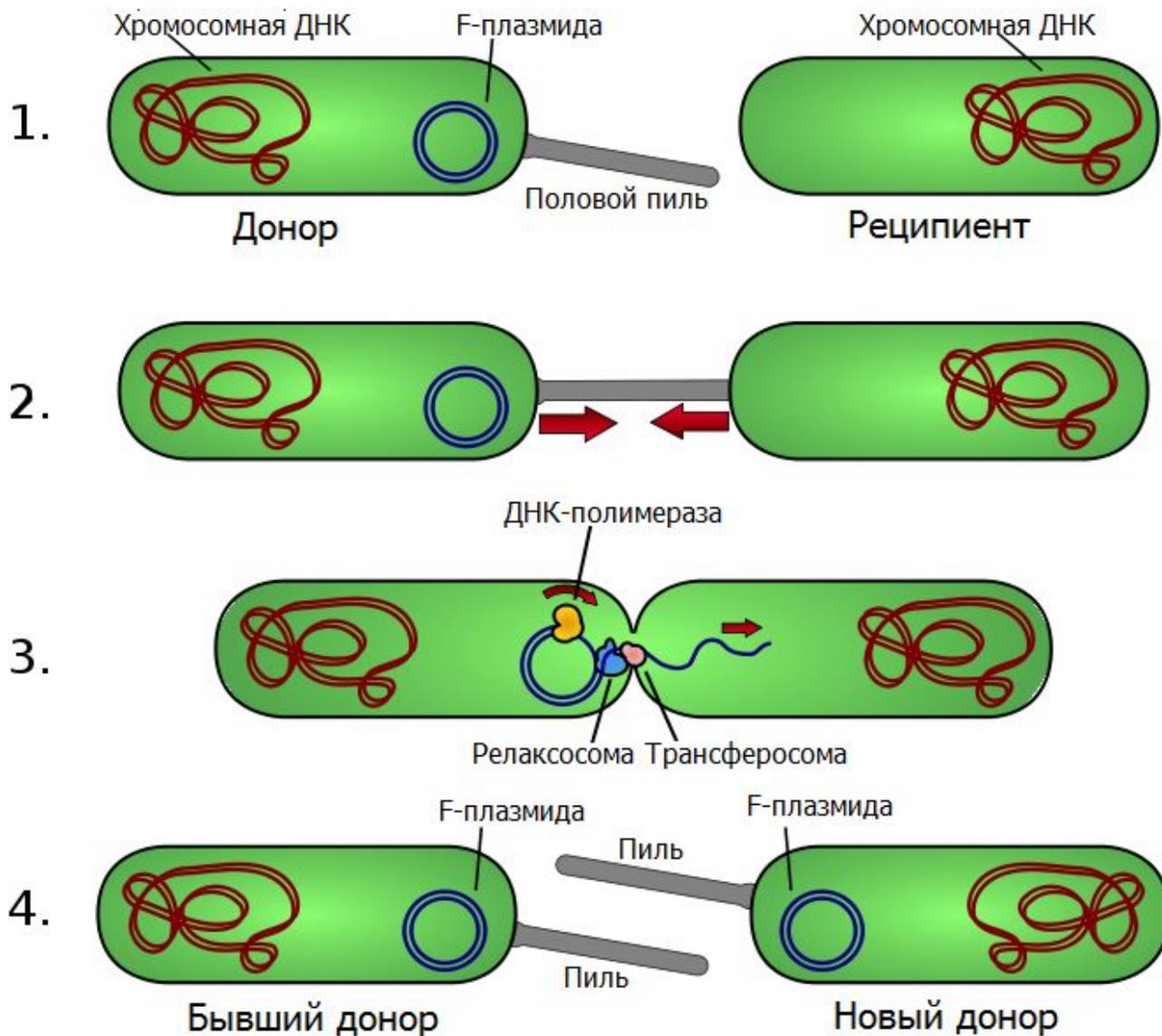
# Конъюгация

*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<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-клетки («мужские», содержат F-плазмиду )

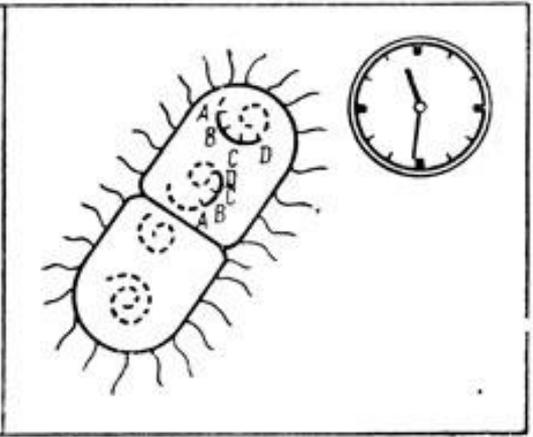
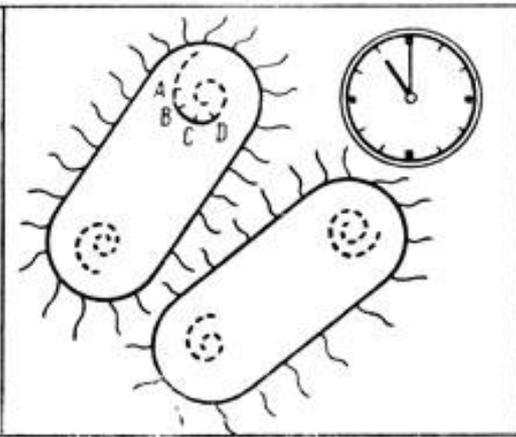
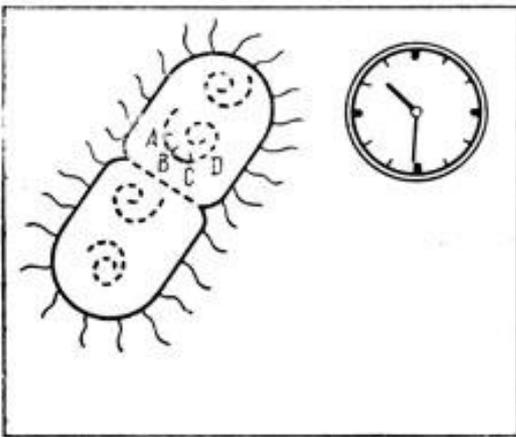
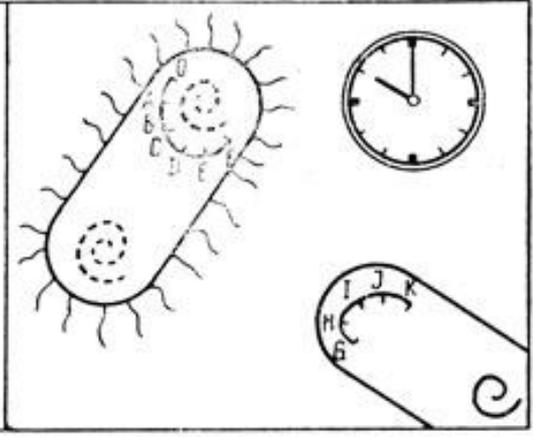
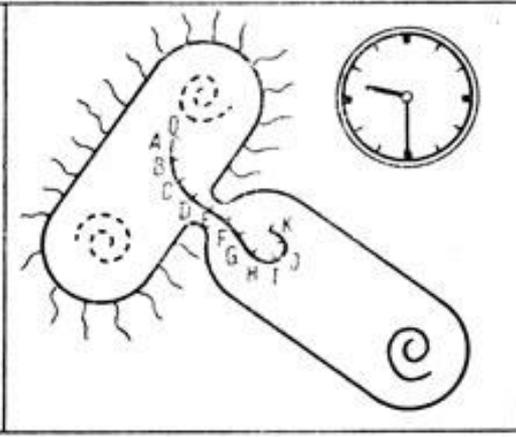
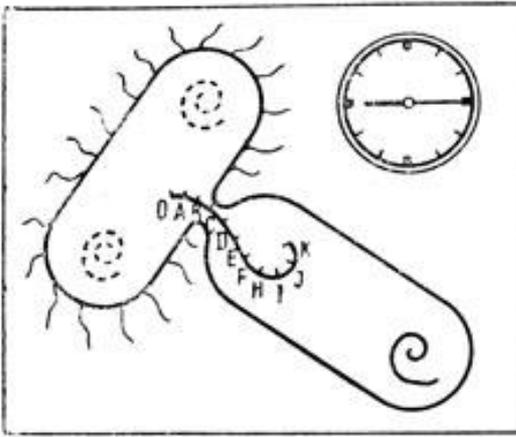
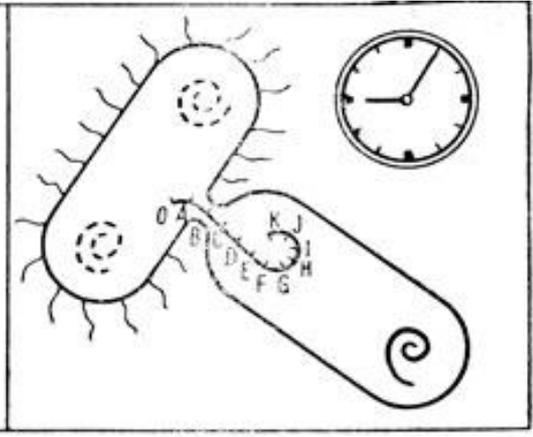
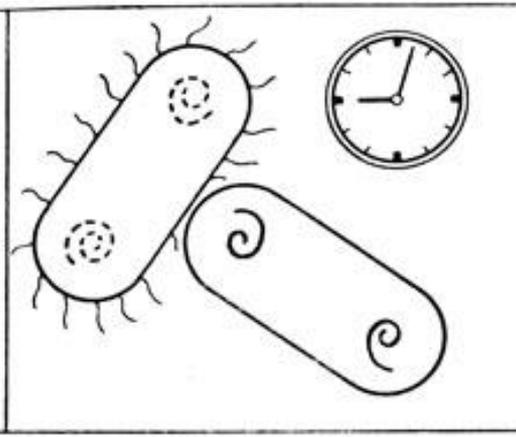
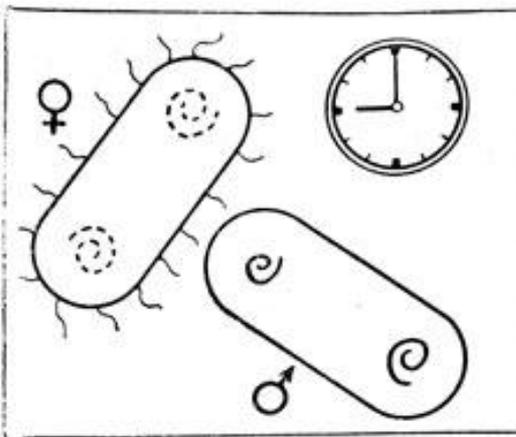
**Реципиенты**: F<sup>-</sup> клетки («женские», не содержат F-плазмиду )

# 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<sup>-</sup> по передаче локусов Pro, Thr, Leu

В опыт берут:

- ✓ Донор-штамм с генотипом Pro<sup>+</sup>, Thr<sup>+</sup>, Leu<sup>+</sup>, чувствительный к стрептомицину
- ✓ Реципиент-штамм с генотипом Pro<sup>-</sup>, Thr<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, 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.*

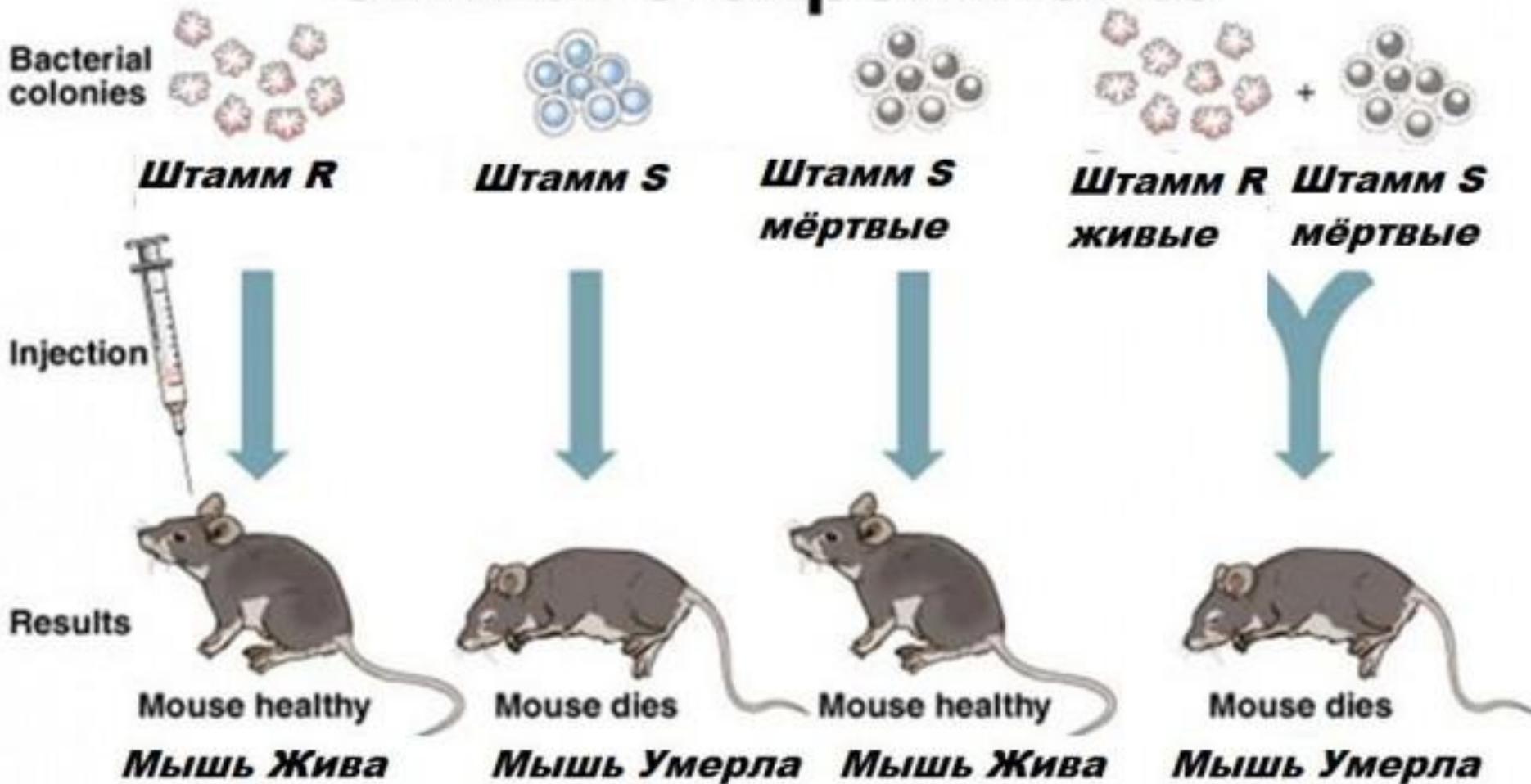
# Трансформация

*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.

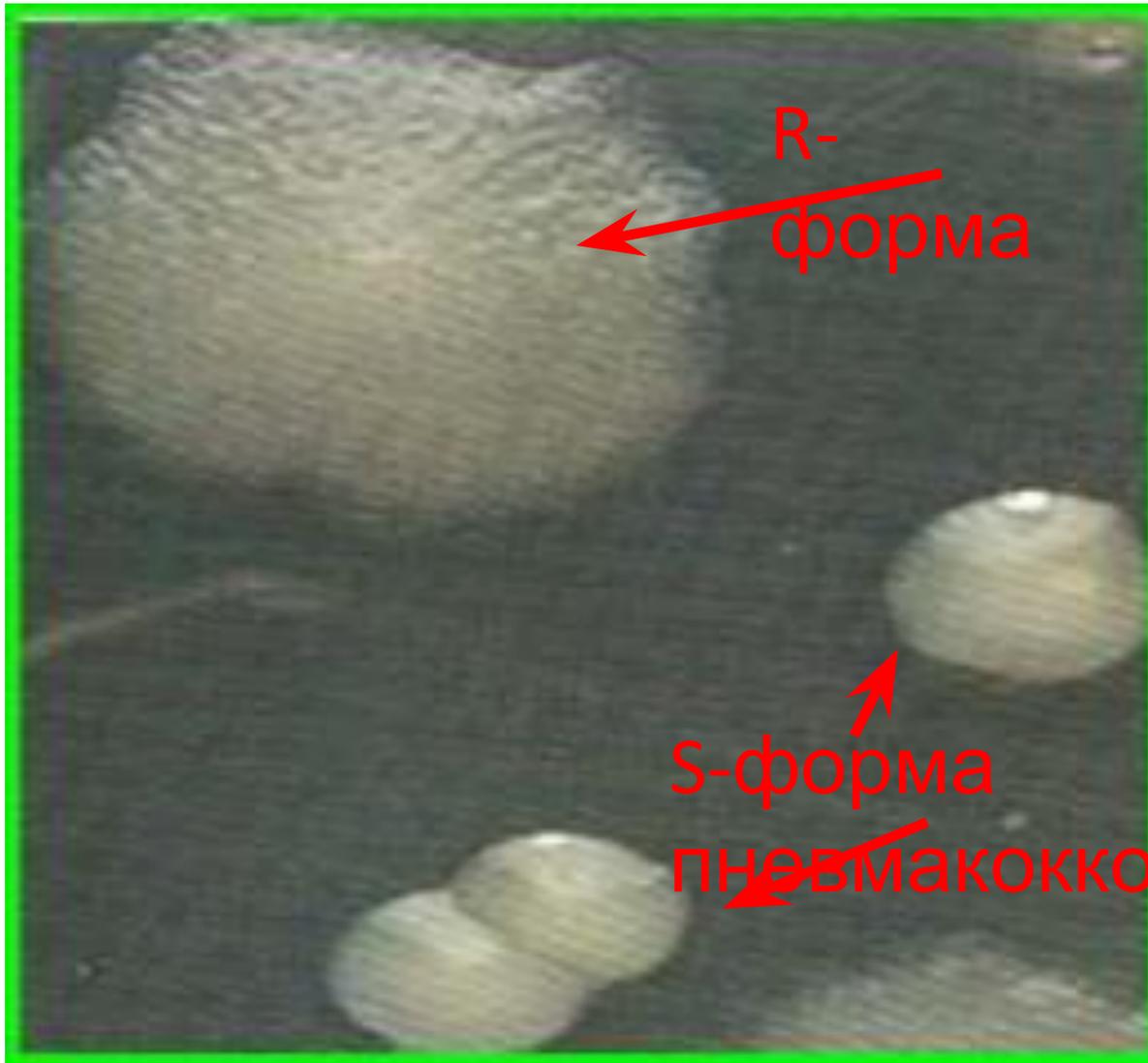
# Griffith's experiments



**Трансформация у бактерий**



**Живой Штамм S из  
крови мыши**



R-  
форма

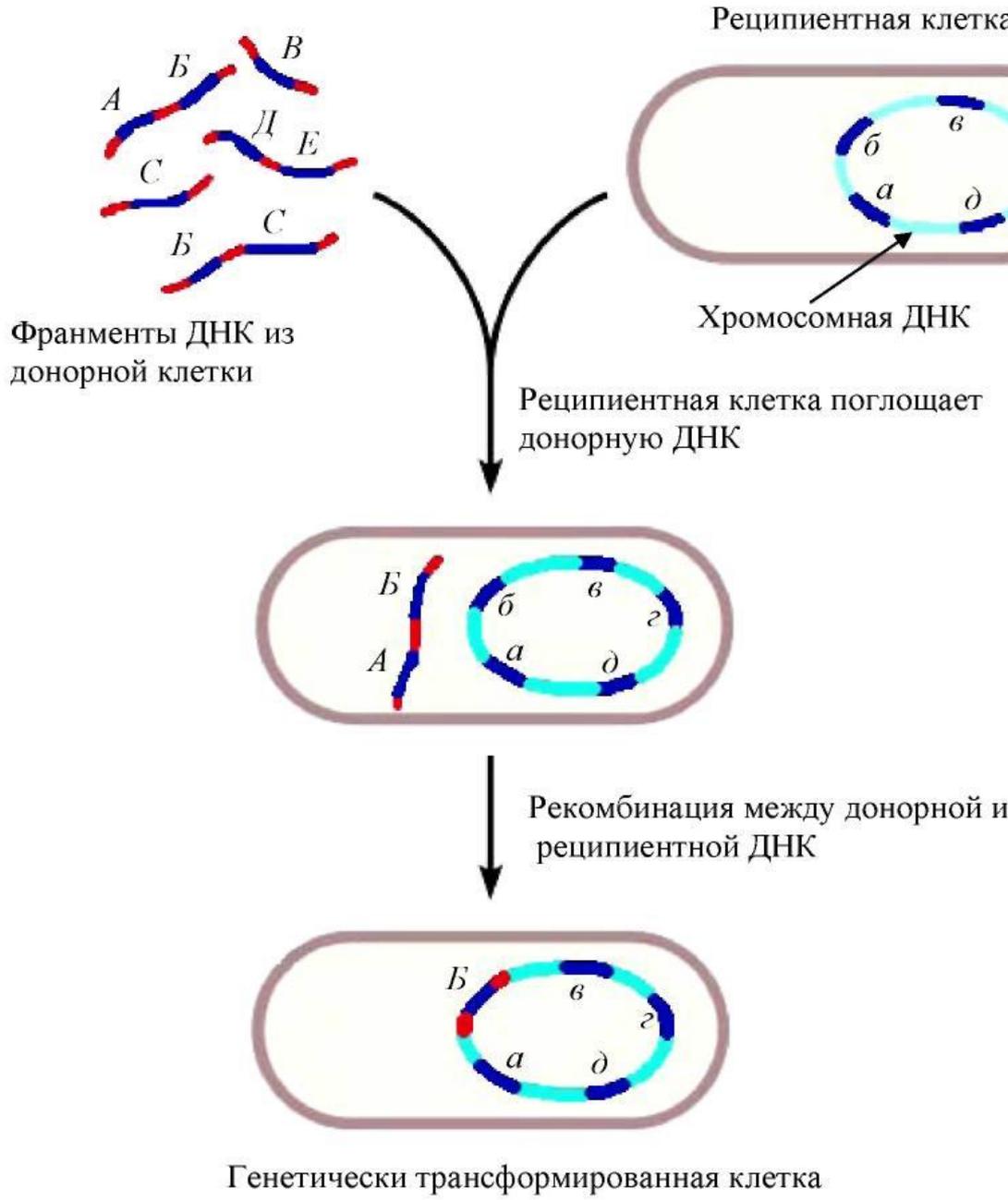
S-форма  
пневмококков

## 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.**

# Постановка опыта по передаче локуса устойчивости к стрептомицину

В опыт берут:

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

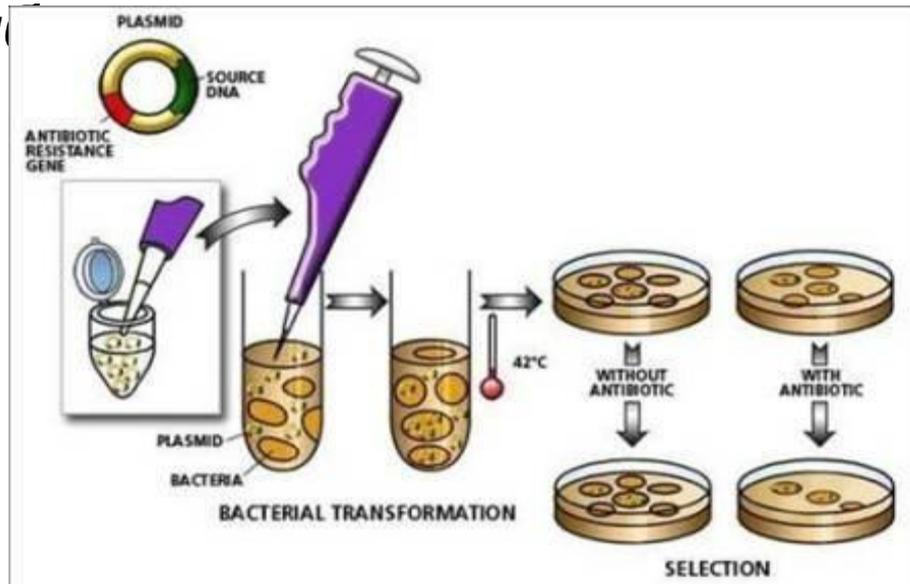
Последовательность действий:

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

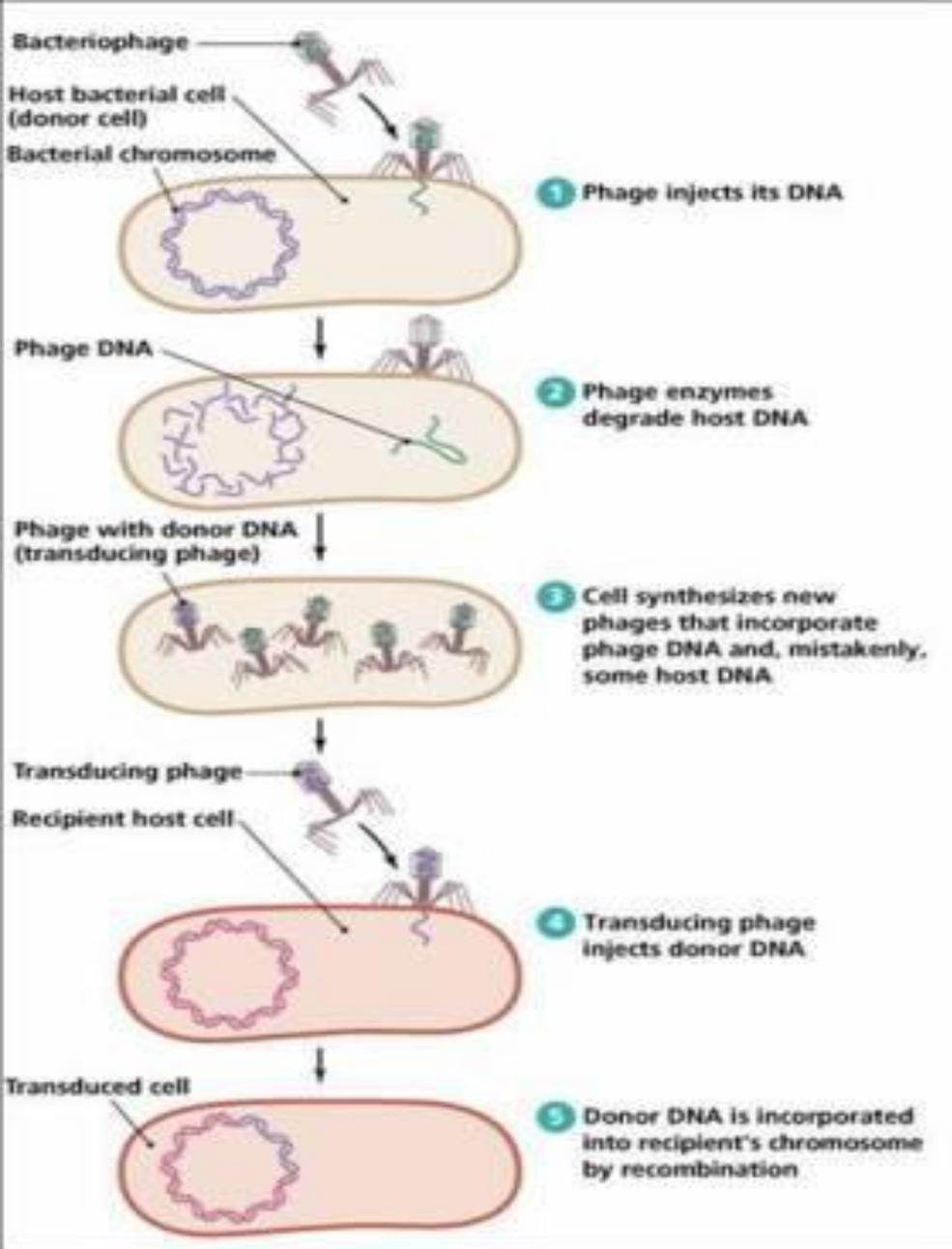
(локализованная)

(общая)

абортивная

# Неспецифическая трансдукция:

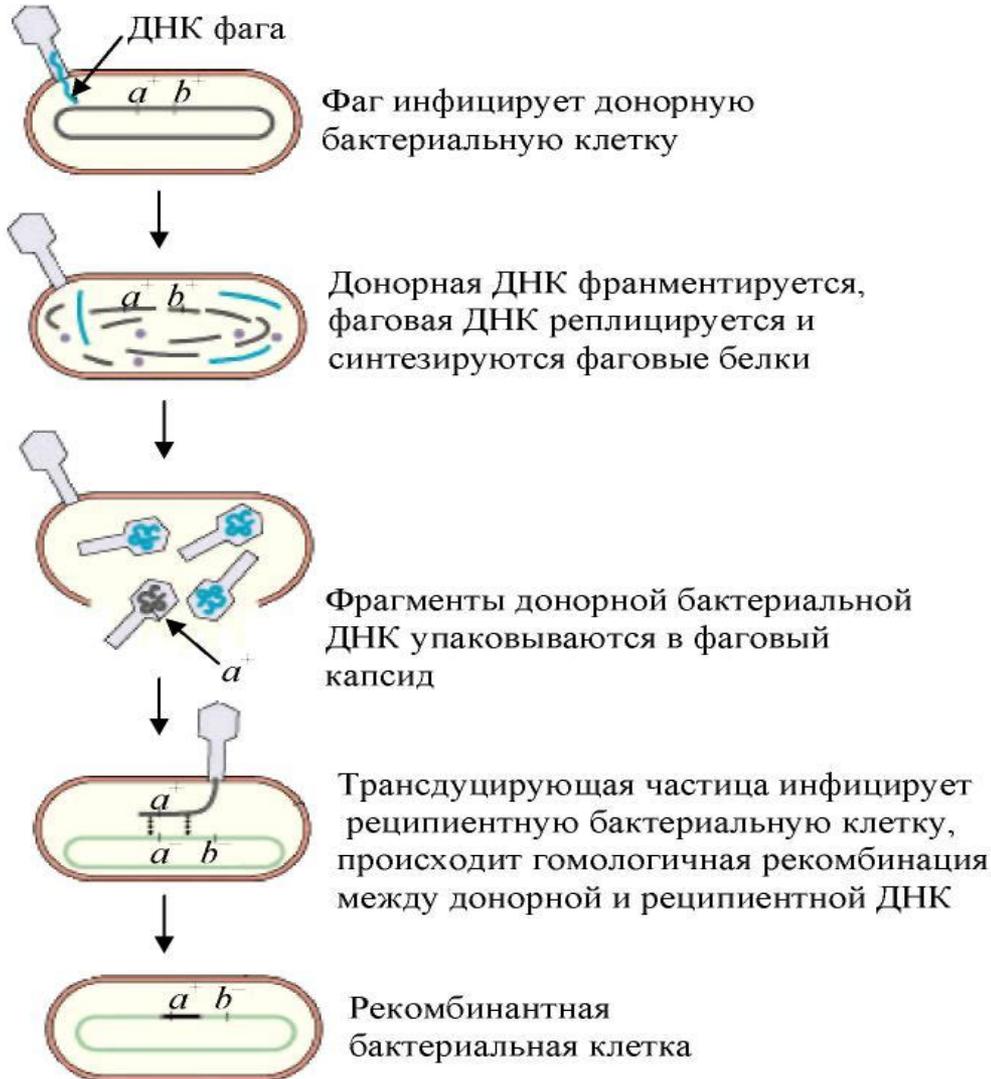
- бактериофаг переносит любые гены донора;
- неспецифическую трансдукцию осуществляют *вирулентные фаги*;
- включение ДНК клетки-реципиента (фиолетовая) при сборке фага носит случайный характер



# 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+»

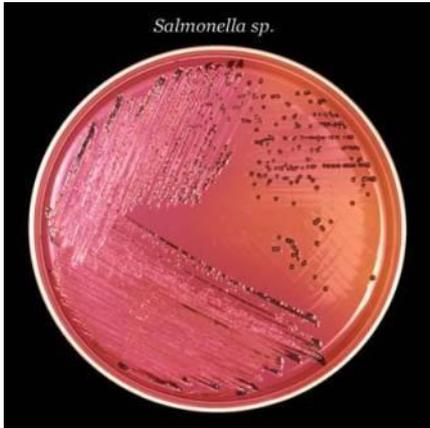
В опыт берут:

- ✓ 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.

