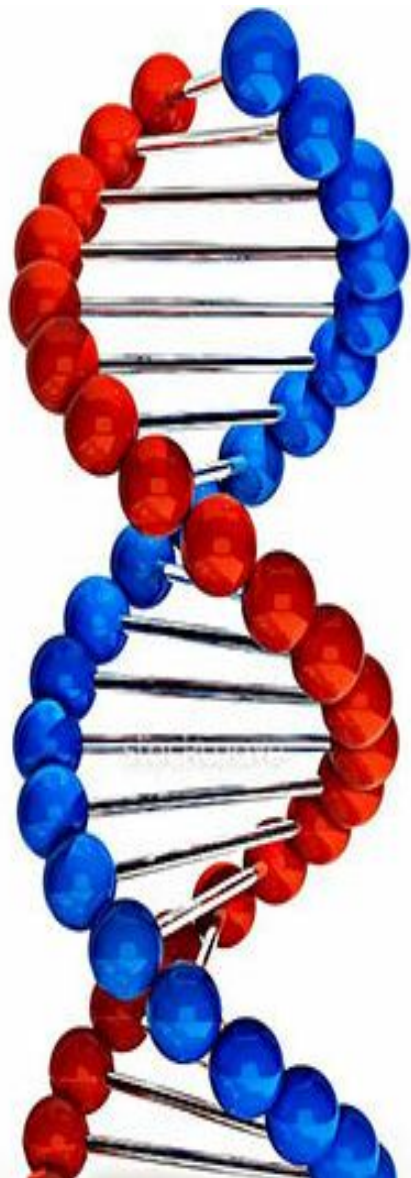


Генетика микроорганизмов



Старший преподаватель
Дрoнина Юлиа
Евгеньевна

Строение генома бактерии

Ген — участок ДНК, кодирующий определенный полипептид. Материальный носитель наследственности. Единица наследственной информации, способная к воспроизведению и расположенная в определенном участке хромосомы (локусе).

Геном (генотип) это совокупность всех генов бактерий.

Репликон — генетический элемент, способный к самовоспроизведению (репликации).

Бактериальный геном состоит из репликонов:

✓ *Бактериальной хромосомы*

✓ *Плазмиды*

- Размер генома определяется количеством нуклеотидных пар оснований.
- Определяет свойства и признаки бактериальной клетки.
- Передача генетической информации происходит как по вертикали, так и по горизонтали.

Геном бактериальной клетки.

Бактериальная хромосома.

- Двухцепочечная молекула ДНК.
- Имеет гаплоидный набор генов
- Формирует компактный нуклеоид клетки.
- Кодировать жизненно важные для бактериальной клетки функции.

Плазмиды

- Двухцепочечные молекулы ДНК.
- Кольцевой или линейной формы.
- Репликация независима от хромосомы.
- Кодировать функции, придающие бактерии преимущества при попадании в неблагоприятные условия.

Свойства плазмид.

Различают плазмиды:

- под *строгим контролем*, 1 или несколько копий плазмид на клетку, их репликация сопряжена с репликацией хромосомы.
- под *слабым контролем*, от 10 до 200 копий на клетку, репликация не сопряжена с хромосомой.

Совместимость - это способность 2х и более плазмид стабильно сосуществовать в 1 клетке.

Несовместимы плазмиды:

- с высоким сходством репликаонов
- с одним и тем же типом контроля репликации

Классификация плазмид.

- *Автономные* – существуют в цитоплазме бактерий, не связаны с репликацией хромосомы
- *Интегративные(эписомы)* – могут обратимо встраиваться в бактериальную хромосому и функционировать в виде единого репликона.

Классификация плазмид.

По наличию **tra-оперона**:

Трансмиссивные (конъюгативные) – крупные плазмиды

- способны передаваться из одной клетки в другую
- имеют гены, ответственные за перенос плазмиды (кодируют половые пили F-плазмиды)
- процесс их передачи называется конъюгацией
- *Мобилизуемые* – мелкие плазмиды
 - не способны к самостоятельной передаче (нет tra-генов)
 - передаются в присутствии трансмиссивных плазмид, используя их аппарат конъюгации.
 - процесс их передачи называется мобилизацией

R-плазмиды.

- ✓ Содержат гены, детерминирующие синтез ферментов, разрушающих антибактериальные препараты.
- ✓ Наличие таких плазмид ведет к устойчивости клетки к действию группы лекарственных веществ.
- ✓ Многие R-плазмиды являются трансмиссивными.
- ✓ Бактериальные штаммы несущие R-плазмиды, часто являются причиной внутрибольничных инфекций.

Фенотип бактерий.

Фенотип – проявление генотипа в конкретных условиях окружающей среды.

1. Является результатом взаимодействия между бактерией и окружающей средой.
2. Условия окружающей среды способствуют проявлению (экспрессии) генов или, наоборот, подавляют их функциональную активность. В зависимости от внешних условий (*in vivo* и *in vitro*) один и тот же генотип может проявляться различными фенотипами.
3. Смена фенотипа происходит без изменения генотипа.
4. Фенотип контролирует геном.

Фенотипические признаки, сообщаемые бактериальной клетке плазмидами:

- Устойчивость к антибиотикам (R-плазмиды).
- Продукция факторов патогенности (Ent-плазмида).
- Способность к синтезу антибиотических веществ.
- Образование колицинов (Col-плазмида).
- Расщепление сложных органических веществ.
- Образование ферментов рестрикции и модификации.

Подвижные генетические элементы.

- Отдельные участки ДНК, способные осуществлять собственный перенос (транспозицию) внутри генома.
- Распространяют в популяциях микроорганизмов устойчивость к физическим и химическим факторам, дают клеткам преимущества в виде дополнительных факторов патогенности и путей метаболизма.
- Могут преодолевать межклеточные, межвидовые и междоменные границы, перенося свой генетический «багаж».
- Перемещение подвижных генетических элементов называют *репликативной* (незаконной) рекомбинацией.

Подвижные генетические элементы.

Вставочные последовательности (*Insertion Sequences*) – участки ДНК, способные перемещаться из 1 участка репликона в другой и между репликонами.

- содержат только гены необходимые для их перемещения

Транспозоны – участки ДНК, способные к перемещению.

- имеют в своем составе структурные гены, определяющие фенотипически выраженные признаки (устойчивость к антибиотикам, токсинообразование)

Подвижные генетические элементы.

Структура инсерционной
последовательности (IS)



Структура транспозона (Tn)



При перемещении подвижных элементов происходит:

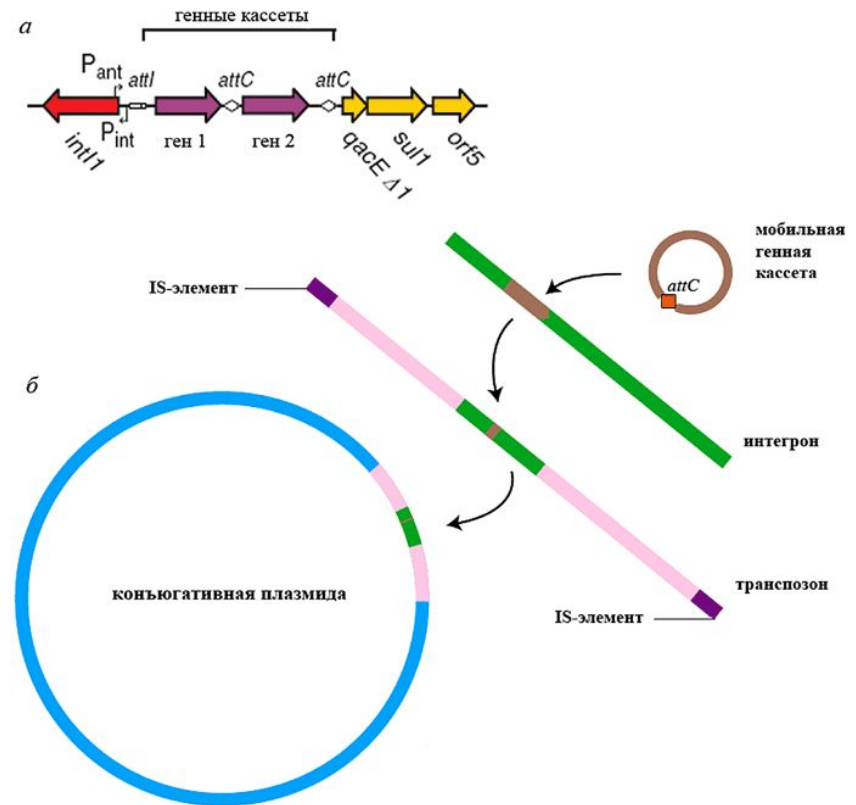
- регуляция активности генов бактериальной клетки (инактивация генов, в которые встроились)
- индукция мутаций типа делеций или инверсий (при перемещении) и дупликаций (при встраивании в хромосому)
- слияние репликонов (встраивание плазмиды в хромосому)
- распространение генов в популяции бактерий, ведущее к изменению биологических свойств популяции, смене возбудителей инфекционных заболеваний, эволюции микробов.

Горизонтальный перенос генов осуществляют:

- Плазмиды
- Вставочные последовательности
- Транспозоны
- Интегроны
- Острова патогенности

Интегроны.

- природные системы ГПГ, способные к захвату малых фрагментов чужеродной ДНК (генных кассет)
- могут располагаться и на хромосоме, и на плазмиде
- играют ключевую роль в распространении генов устойчивости к лекарственным препаратам и эволюции бактериальных геномов.



Острова патогенности.

- участки ДНК (содержат от одного до нескольких десятков генов)
- обнаруживаются только у патогенных бактерий
- кодируют синтез факторов патогенности
- непостоянны и могут быть утеряны
- Располагаются вблизи генов тРНК, по обоим концам имеют прямые повторы
- имеют мозаичное строение, так как их участки приобретены в разное время и от разных хозяев.



Изменчивость бактерий.

- **Ненаследственная:**

Модификации - фенотипические изменения, некоторых биохимических, физиологических и морфологических особенностей клеток, как ответная реакция на действие внешних факторов.

- ✓ не сопровождаются изменениями в генотипе
- ✓ возникают в популяции любого вида и проявляются довольно часто
- ✓ морфологические – приводящие к изменению формы, биохимические – приводящие к синтезу некоторых продуктов, чаще ферментов

- **Наследственная:**

- *Мутации*
- *Рекомбинации*

Мутации.

Изменения в последовательности отдельных нуклеотидов ДНК (первичной структуры), которые проявляются наследственно закрепленной утратой или изменением какого либо признака или группы признаков.

По происхождению:

- *спонтанные* (возникают самопроизвольно)
- *индуцированные* (возникают при воздействии мутагенов).

Мутагены бывают:

- Физические (УФ-лучи, гамма-радиация)
- Химические (азотистая кислота и ее аналоги)
- Биологические (транспозоны)

Мутации.

По протяженности изменений повреждения ДНК:

-точечные — изменение одного или нескольких нуклеотидов

-генные — изменение в пределах 1 гена

- хромосомные — захватывают несколько генов:

- ✓ делеции (выпадение нескольких пар нуклеотидов)
- ✓ инверсии (перестановки нуклеотидных пар)
- ✓ дупликации (добавление нуклеотидных пар)
- ✓ транслокации (перемещение фрагментов хромосомы).

Мутации.

Прямые мутации - приводящие к потере функции.

Мутанты могут восстанавливать исходные свойства, реверсировать.

- Если происходит восстановление исходного генотипа (восстанавливается генотип и фенотип) - обратная мутация.
- Если восстанавливается фенотип, без восстановления генотипа - супрессорная мутация.

Рекомбинация у бактерий.

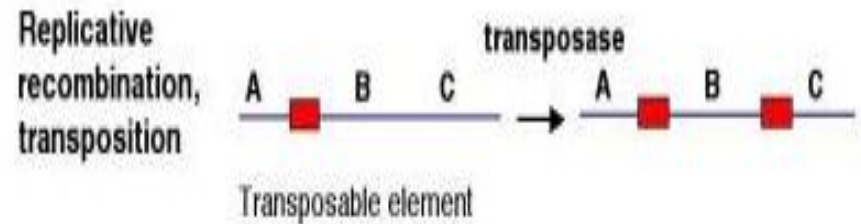
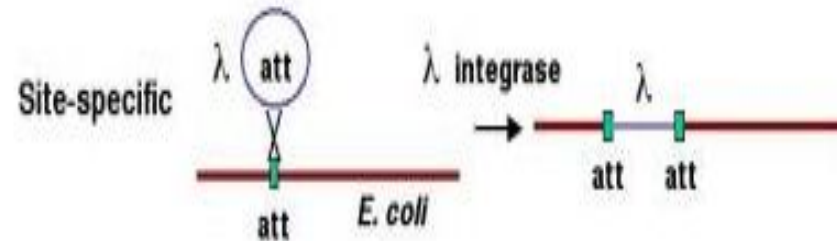
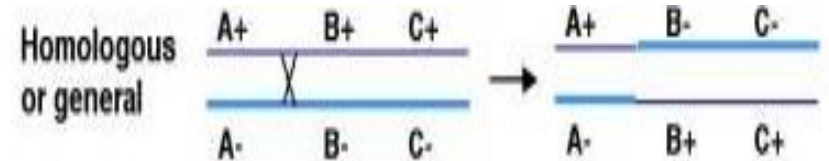
Взаимодействие между двумя ДНК, с разными генотипами, ведущее к образованию *рекомбинантной* ДНК, сочетающей гены обоих родителей.

Особенности рекомбинации у бактерий:

- отсутствие полового размножения и мейоза
- гаплоидный набор генов
- деление на клетки-доноры и клетки-реципиенты
- в результате формируется только 1 рекомбинант (содержит всю генетическую информацию реципиента и часть информации от донора)
- реципрокные рекомбинанты не образуются.

Рекомбинация по молекулярному механизму:

- *Гомологичная* - основана на спаривании комплементарных участков цепей ДНК, принадлежащих разным родительским молекулам ДНК с высокой степенью гомологии. В результате происходит обмен равными частями гомологичных молекул.
- *Сайтспецифическая* - происходит между специфическими последовательностями ДНК в пределах очень коротких участков генома, 15-30 нп, не требует высокой степени гомологии. Необходимо наличие специального ферментативного аппарата.
- *Незаконная или репликативная* - происходит при участии IS элементов, например транспозиция подвижных генетических элементов по репликону или между репликонами.



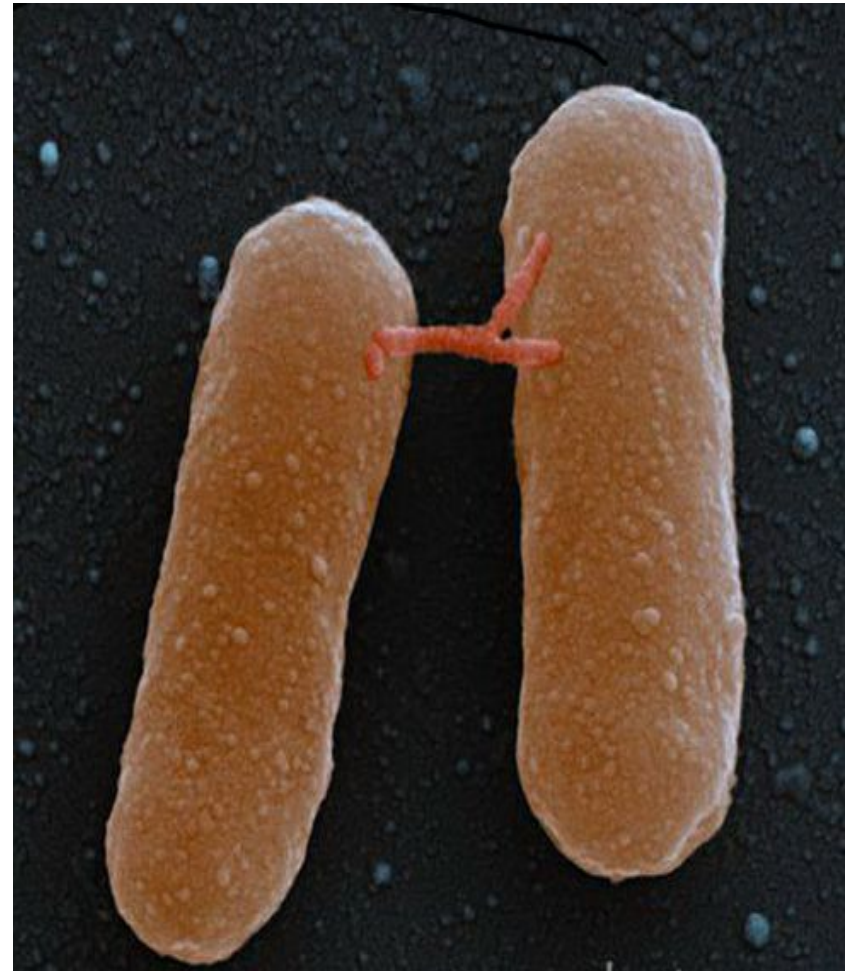
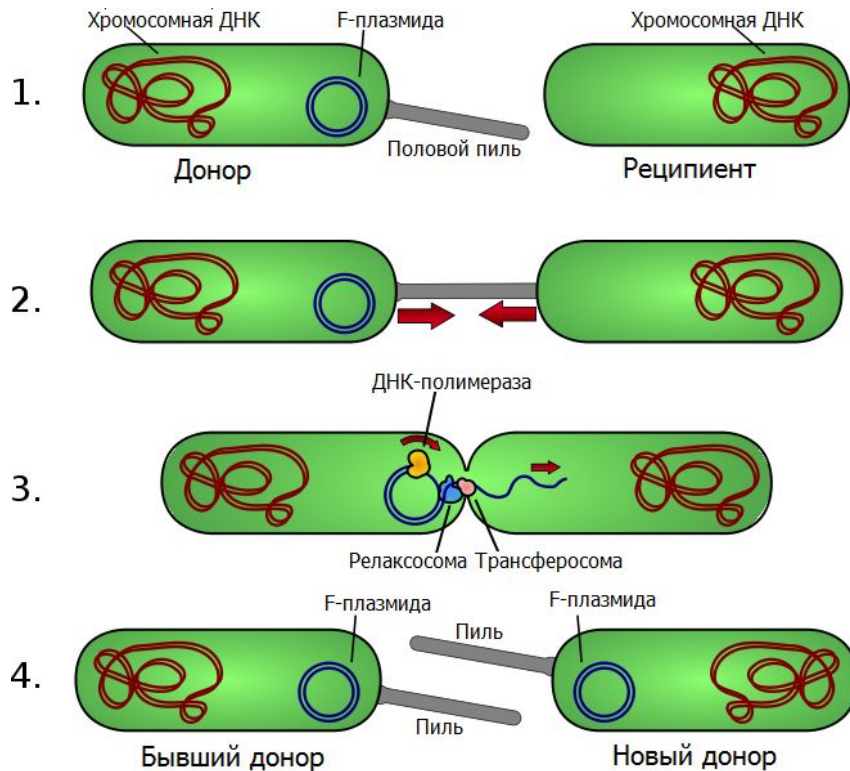
Механизмы рекомбинации у бактерий:

- 1. Конъюгация** - прямой перенос генетического материала (фрагмента ДНК) от клетки-донора в клетку-реципиент путем непосредственного контакта клеток.
- 2. Трансформация** - генетическое изменение клеток в результате включения в их геном экзогенной ДНК.
- 3. Трансдукция** - передача бактериальной ДНК посредством бактериофага.

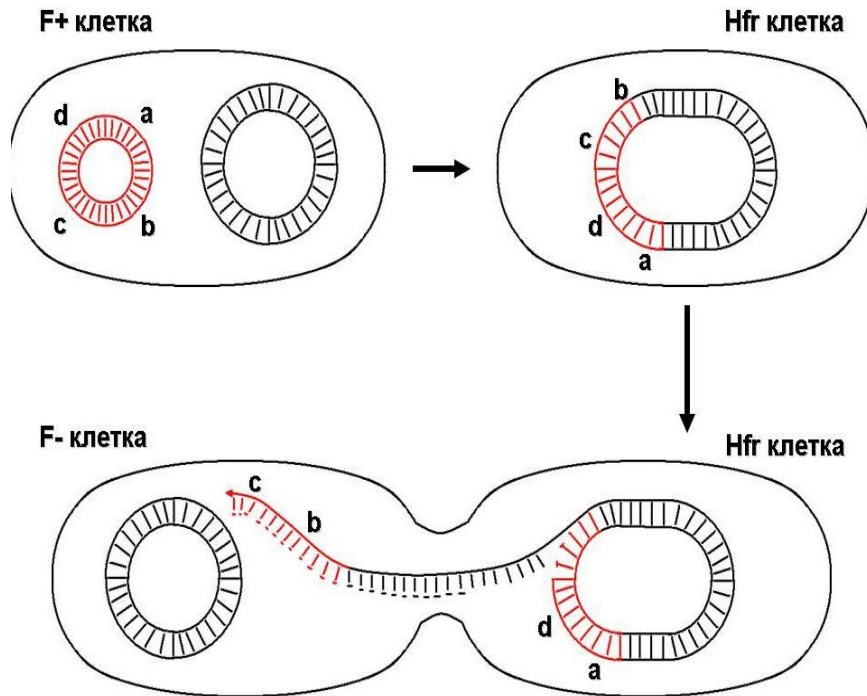
Конъюгация.

- Для реализации процесса необходим F-фактор – F-плазмида (плодовитости), она может быть как трансмиссивной, так и интегративной.
- F-плазмида кодирует половые пили и содержит ряд генов вовлеченных в процесс взаимодействия с F- клетками.
- Процесс передачи генетической информации однонаправленный: от доноров (F⁺), обладающих F-фактором, к реципиентам (F⁻).

Конъюгация (без интеграции).



Конъюгация (с интеграцией).



- F-фактор или другая трансмиссивная плаزمида встраивается в хромосому клетки-донора
- начинают функционировать как единый трансмиссивный репликон
- возможен перенос бактериальных генов в бесплазмидную клетку-реципиент- конъюгация
- штаммы бактерий, в которых плазмида находится в интегрированном состоянии, переносят свои хромосомные гены бесплазмидным клеткам с высокой частотой и называются Hfr.
- эффективность Hfr-конъюгации зависит от величины гомологии ДНК
- перенос негомологичного материала донора не приведет к его интеграции с ДНК реципиента.

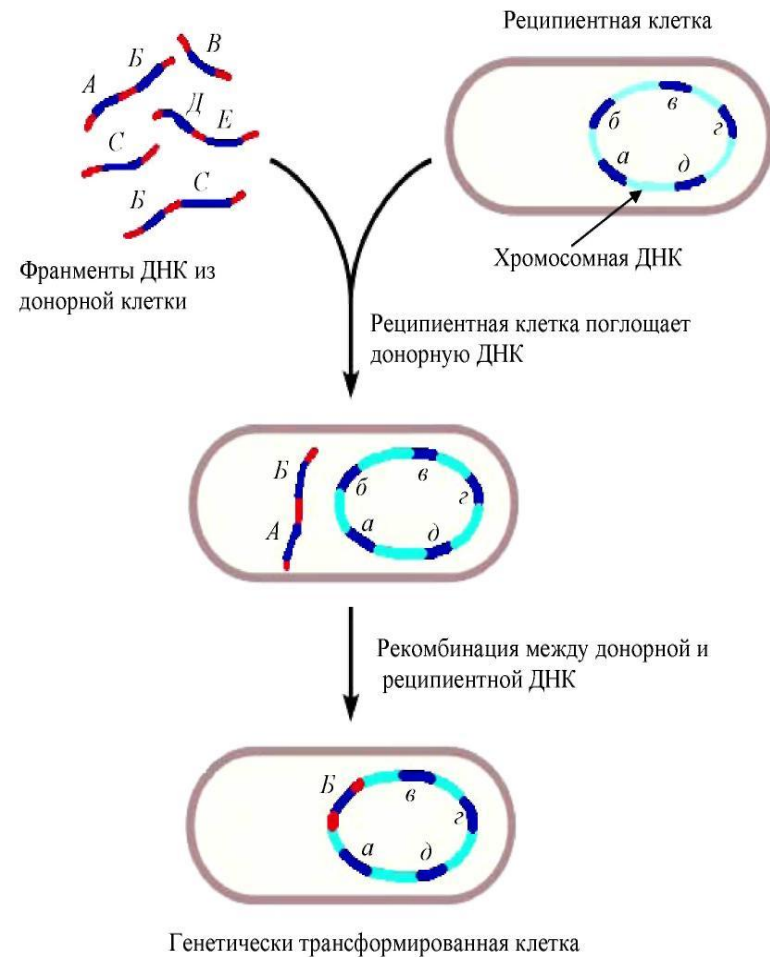
Трансформация.

Генетическое изменение клеток в результате включения в их геном экзогенной ДНК.

Условия необходимые для трансформации:

- Клетка-реципиент должна находиться в состоянии *компетентности* - быть способной поглощать ДНК
- Наличие двунитевой высокоспирализованной молекулы ДНК, выделенной при разрушении клеток.

Таким путем в популяции могут распространяться гены, кодирующие факторы вирулентности.



Трансдукция.

Передача бактериальной ДНК посредством бактериофага.

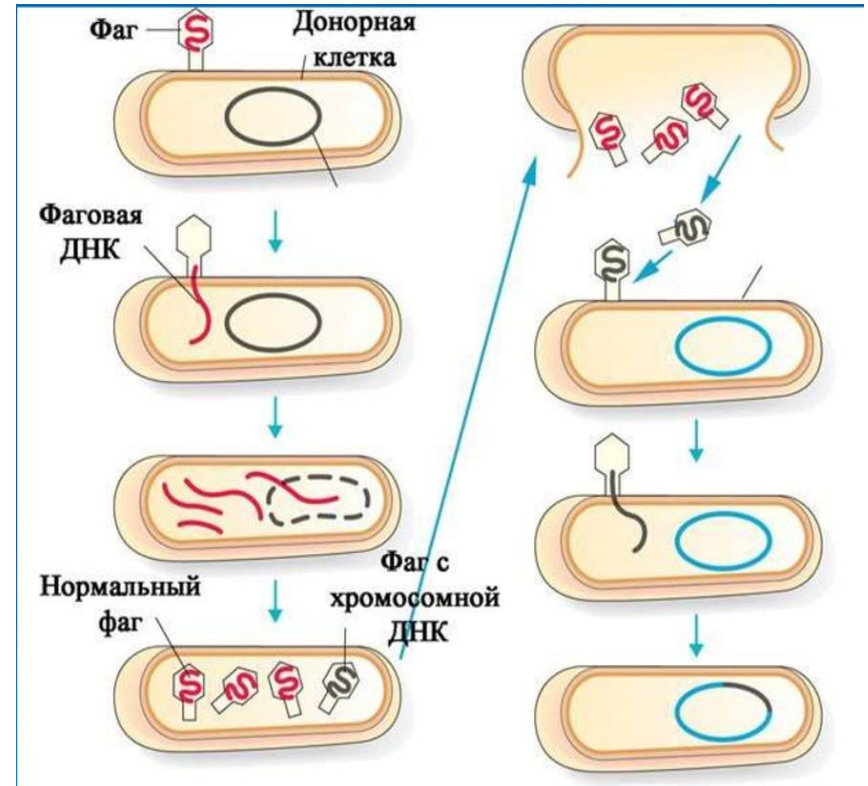
Типы трансдукции:

Общая – перенос вирулентным фагом фрагмента любой части хромосомы бактериальной хромосомы.

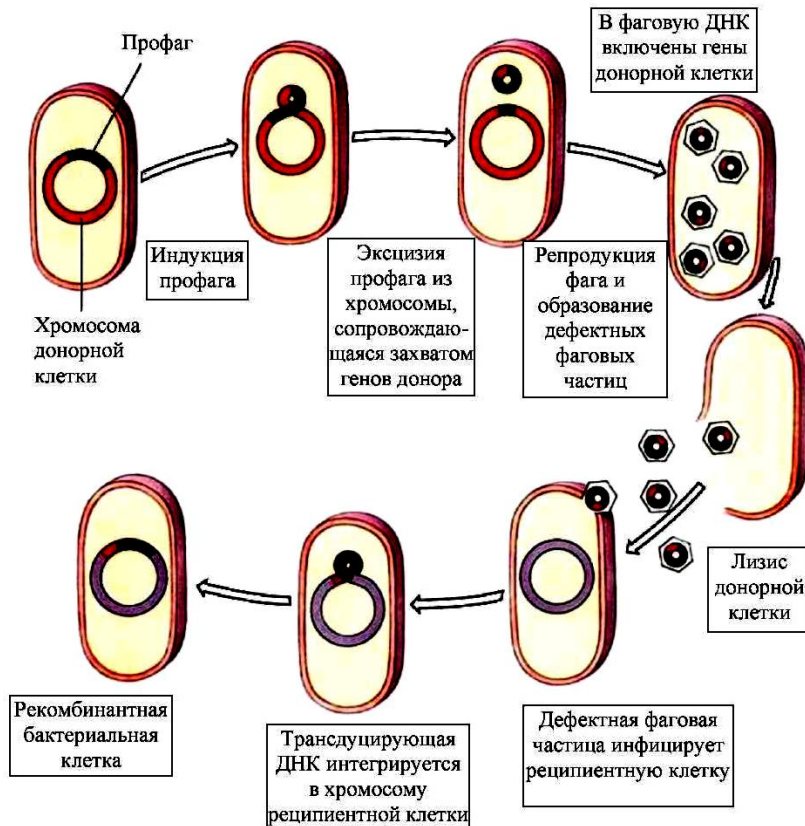
Специфическая – перенос умеренным фагом определенного фрагмента ДНК (прилегающего к месту включения фаговой ДНК).

Трансдукция общая.

- Фаг выступает «пассивным» переносчиком генетического материала бактерий, содержит только фрагменты бактериальной ДНК.
- Фаг теряет свой собственный фрагмент и становится дефектным из-за нехватки части генома.
- Привнесенный фагом фрагмент ДНК бактерии-донора включается в гомологичную область хромосомы бактерии-реципиента с образованием стабильного рекомбинанта.



Трансдукция специфическая.

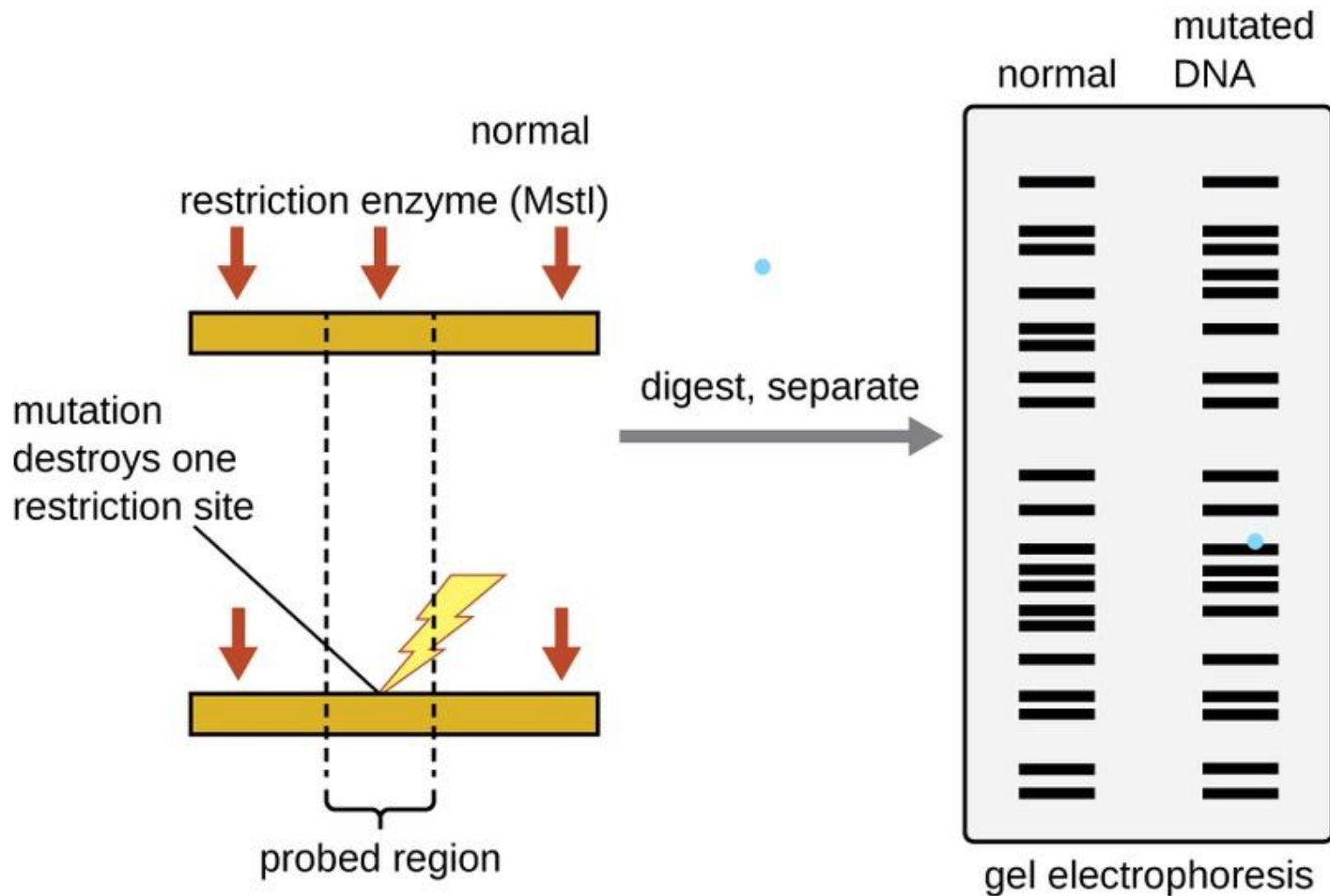


- Фаговая ДНК интегрирует в бактериальную хромосому с образованием профага
- Бактериофаг переносит строго определенные фрагменты ДНК, прилегающие к участку интеграции профага
- Фаг став частью хромосомы бактерии, при ее размножении передается по наследству потомкам.

Генетические методы исследования микробов.

- Методы для внутривидовой идентификации бактерий (с выделением чистой культуры):
 - ✓ рестрикционный анализ
 - ✓ определение плазмидного профиля бактерий
 - ✓ риботипирование
- Методы для обнаружения ДНК микроба в исследуемом материале(без выделения чистой культуры):
 - ✓ молекулярная гибридизация
 - ✓ определение микроба с помощью микрочипа;
 - ✓ полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР в реальном времени

Рестрикционный анализ.



CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats).

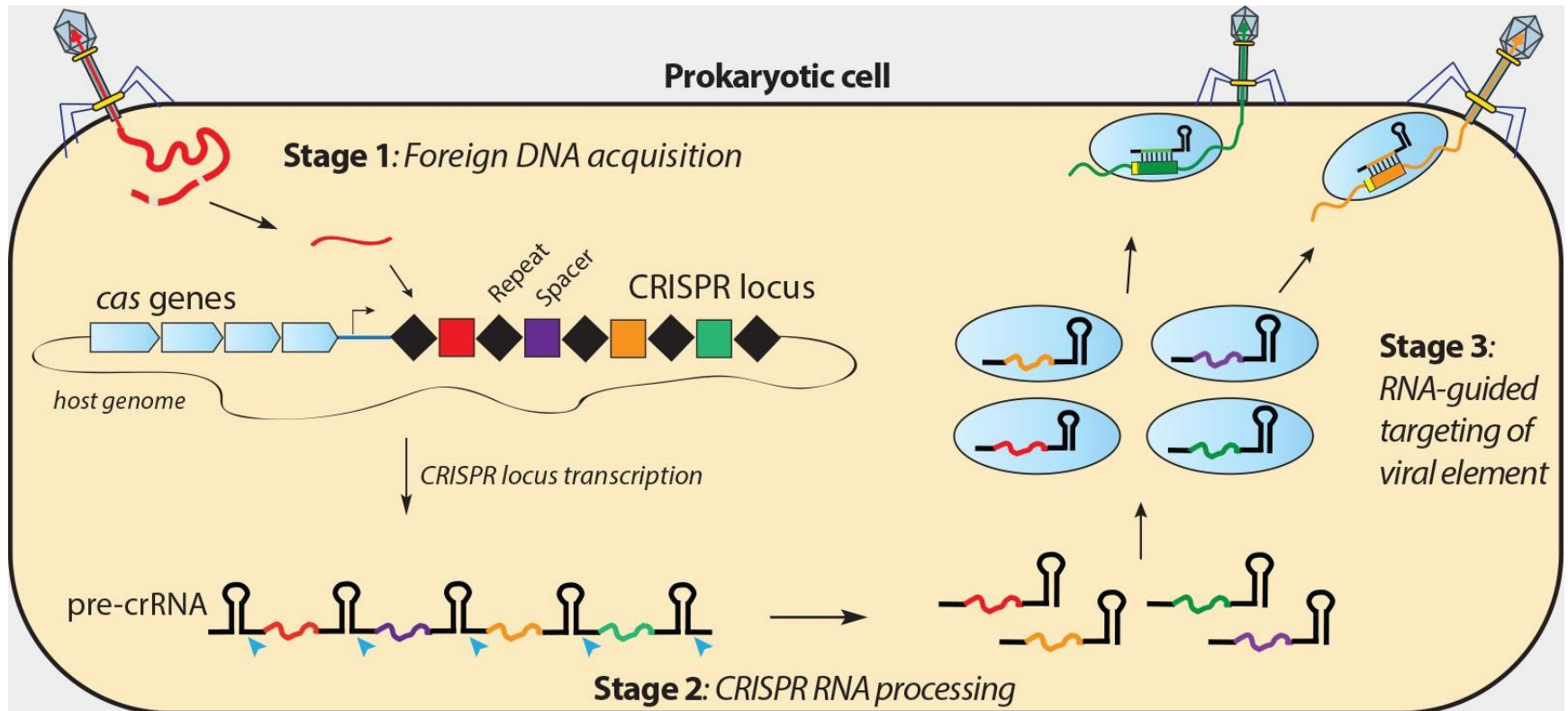
Новая технология редактирования геномов высших организмов, основанная на иммунной системе бактерий.

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – особые участки ДНК, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами – часть иммунной системы бактерий.

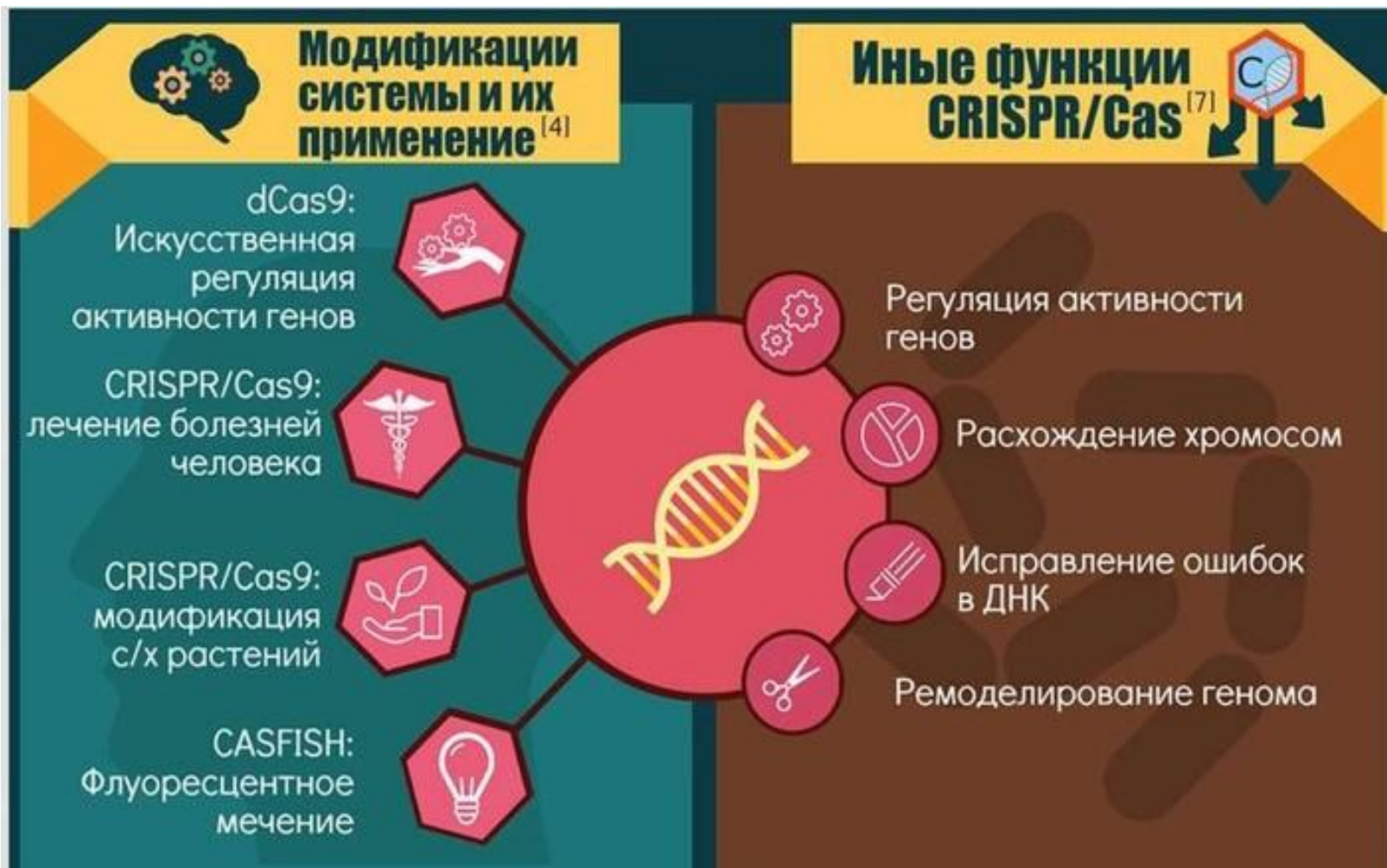
Спейсеры – отличные друг от друга фрагменты ДНК, располагаются между идентичными повторами, соответствуют участкам геномов вирусов, паразитирующих на данной бактерии.

Cas-белки – последовательности, ассоциированная с CRISPR РНК (несут фрагмент генетического материала вируса).

CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats).



CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats).



Благодарю за внимание!