

---

# ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ

---

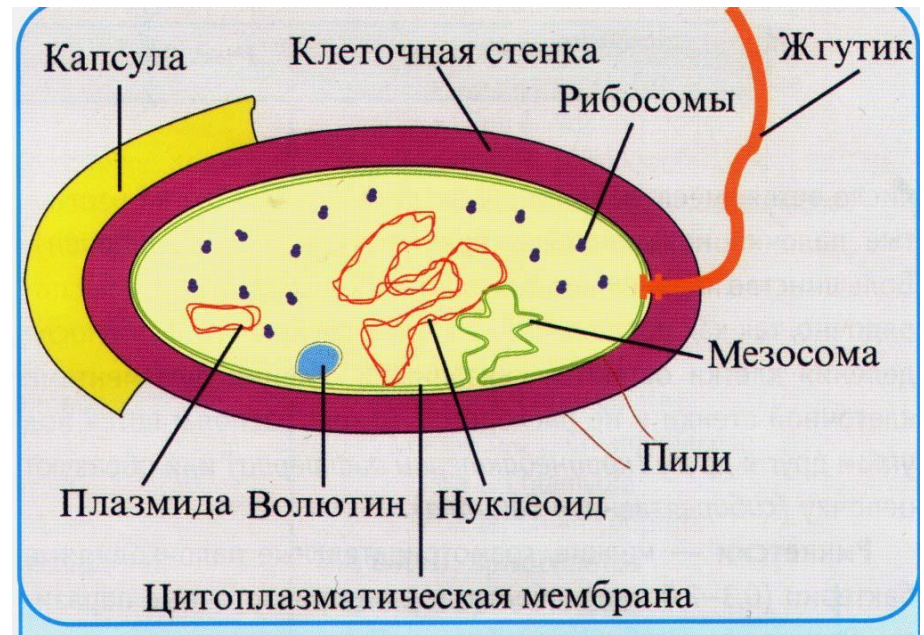
Карпова М.Р.

# Генетическая система бактерий

- **ДНК** – первичный генетический материал.
- **РНК** – вторичный генетический материал (транскрипция и трансляция генетической информации):
  - информационная, или матричная (мРНК);
  - транспортная (тРНК);
  - рибосомная (рРНК).
- У РНК-содержащих вирусов РНК является первичным генетическим материалом.

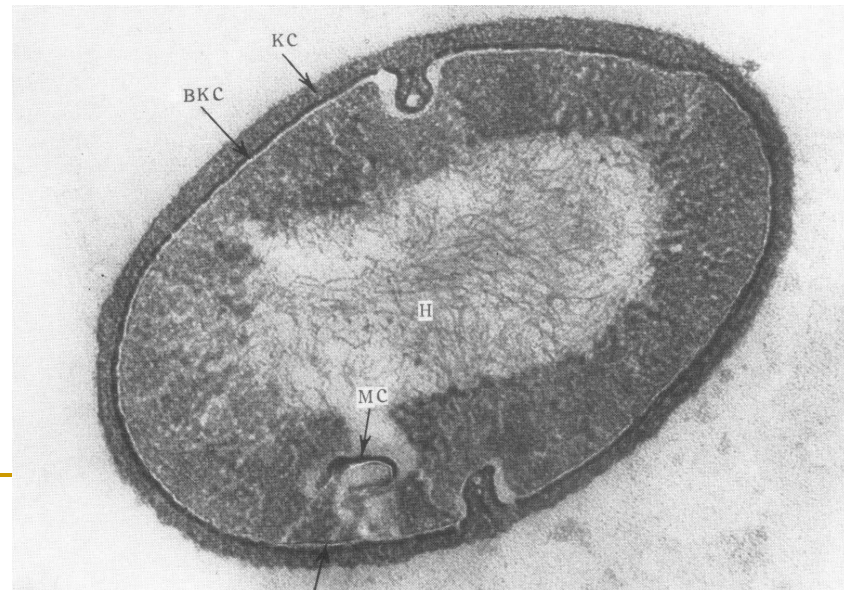
# Генетическая система бактерий

- Ядерные структуры:  
нуклеоид.
- Неядерные структуры:
  - плазмиды,
  - вставочные последовательности;
  - транспозоны.



# Ядерные структуры

- **Нуклеоид** – одна двунитевая ДНК кольцевой формы. Размеры – от  $3 \times 10^8$  до  $2,5 \times 10^9$  Д.
- Бактериальная хромосома содержит до 4000 отдельных генов.
- Совокупность всех генов называется **геномом**. Внешнее проявление генома называется **фенотипом**.
- Бактериальная клетка гаплоидна.



---

# Внеядерные структуры

Не являются жизненно необходимыми (не кодируют информацию о синтезе ферментов, участвующих в энергетическом метаболизме).

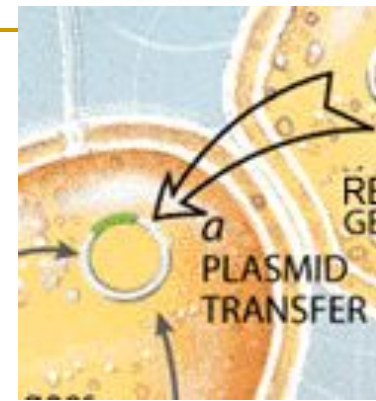
- Плазмиды;
  - транспозоны;
  - инсерционные (вставочные) последовательности.
-

# Плазмиды

- Плазмиды – двунитевые молекулы ДНК, от  $10^6$  до  $10^8$  Д, от 40 до 50 генов. Количество плазмид – от 1 до 200.
  - **кольцевые обособленные плазмиды;**
  - **интегрированные плазмиды.**
- **Функции:** регуляторные и кодирующие.
- **F-плазмиды** или F-факторы (от англ. *fertility* – плодovitость). **Hfr-плазмиды** или Hfr-факторы (от англ. *high frequency of recombinations* – высокая частота рекомбинаций).
- **R-плазмиды** или R-факторы (от англ. *resistance* – устойчивость).
- **Плазмиды патогенности** (Ent, Hly).
- **Col-плазмиды.**

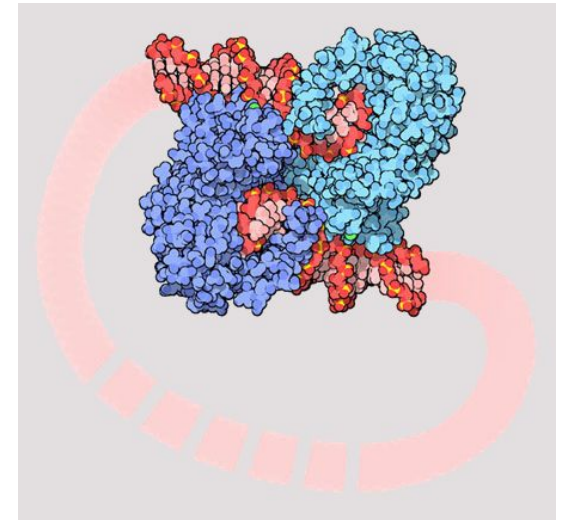
# Плазмиды

- **Конъюгативные плазмиды:** F- или R-плазмиды; крупные (25-150 млн Д), чаще у грамотрицательных палочек, 1-2 на клетку, репликация тесно связана с репликацией бактериальной хромосомы, содержат **tra- оперон**.
- **Неконъюгативные плазмиды:** небольшие, чаще у грамположительных кокков, но встречаются у грамотрицательных микроорганизмов (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*), могут присутствовать в больших количествах (более 30 на клетку).
- При наличии в бактерии одновременно конъюгативных и неконъюгативных плазмид – **мобилизация**.



- **Вставочные (инсерционные) подвижные генетические последовательности** в ДНК (**Is-элементы**) – участки ДНК, способные перемещаться из одного места локализации в другое, содержат только гены, необходимые для перемещения.
- **Функции Is-элементов:**

- координация взаимодействий плазмид, умеренных фагов, транспозонов и нуклеоида для обеспечения репродукции;
- регуляция активности генов: эффект промотора, включающего или выключающего транскрипцию соответствующих генов.



- На концах вставочной последовательности имеются **инвертированные повторы**, которые узнает **транспозаза**.



# Подвижные генетические элементы

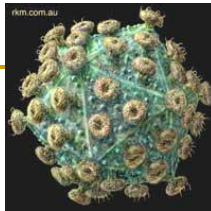
**Транспозоны (Tn)** – сегменты ДНК, состоящие из вставочных последовательностей и структурных генов, реплицируются только в составе бактериальной хромосомы.

Транспозоны способствуют распространению генов в популяции бактерий, что может привести к изменению биологических свойств популяции.



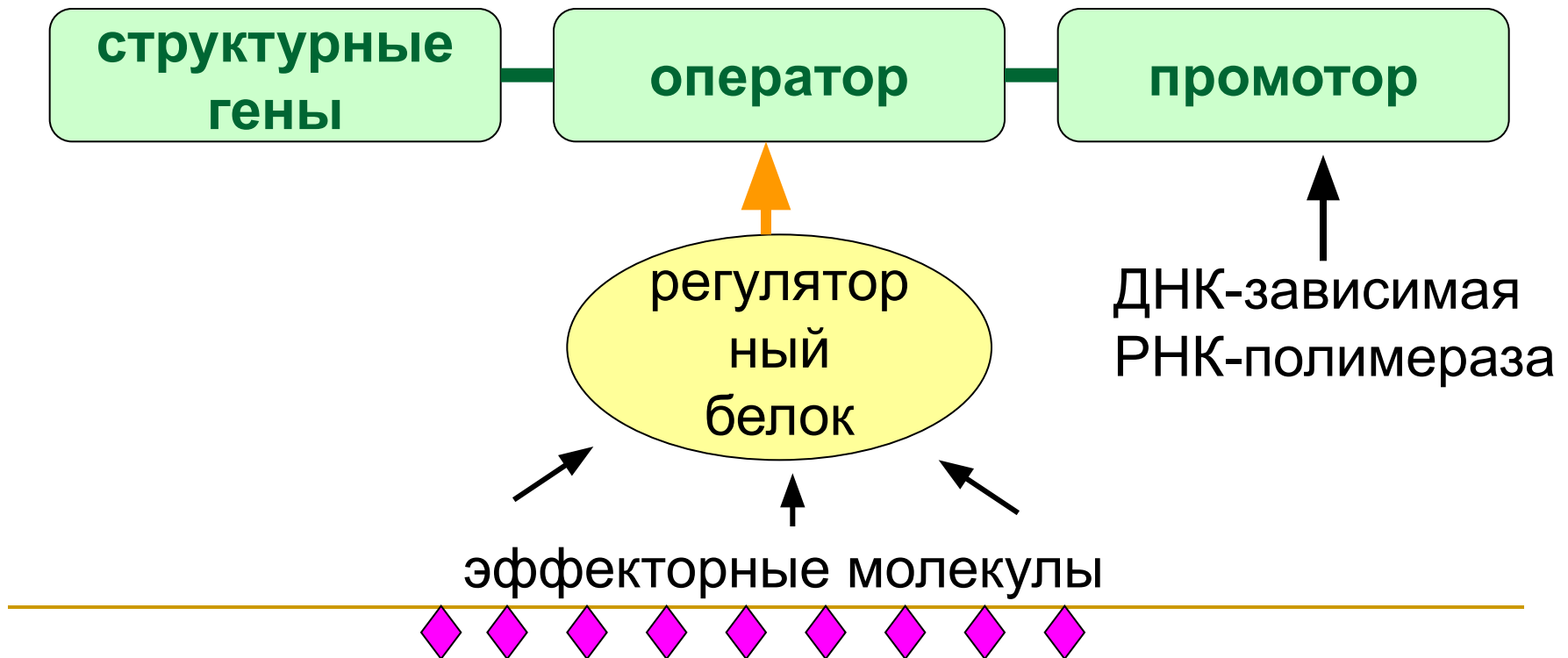
# Реализация генетической информации

- ДНК – носитель наследственной информации.
- Передачу записанной в ДНК информации к местам синтеза белка осуществляет **матричная** или **информационная РНК** (мРНК).
- мРНК синтезируется на одной из цепей ДНК – **транскрипция**.
- Перевод нуклеотидной последовательности в последовательность аминокислот – **трансляция**.

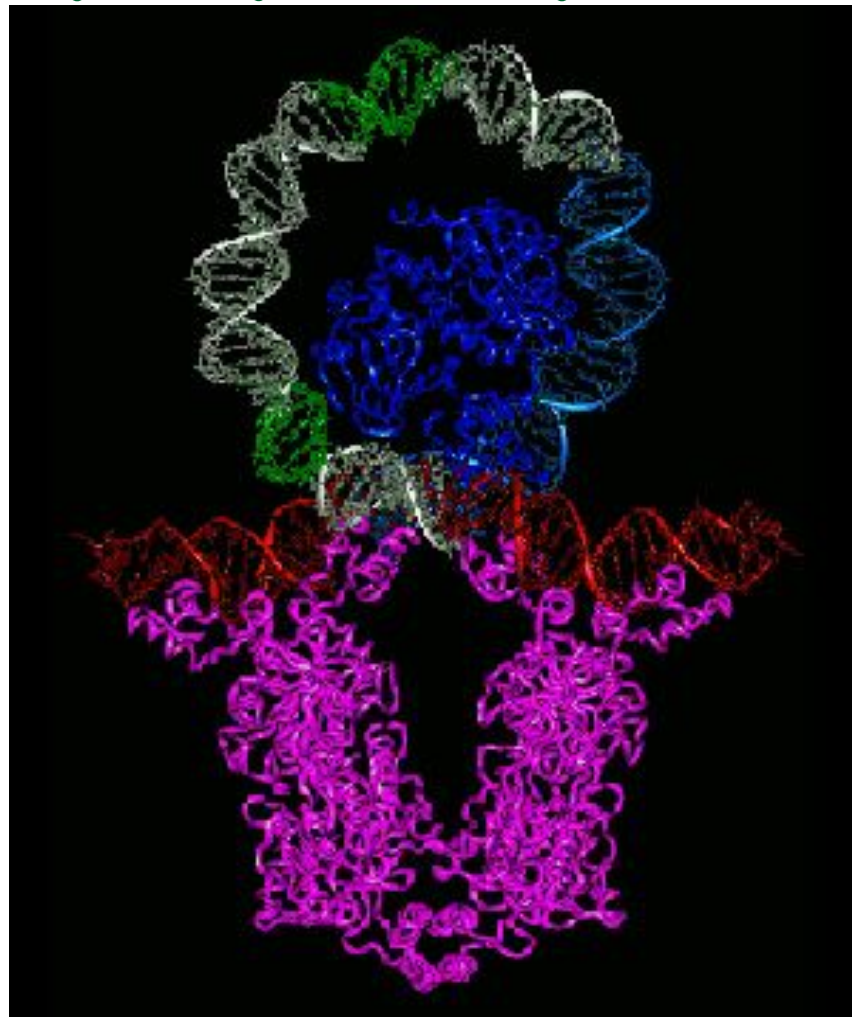


# Регуляция выражения генетической информации у бактерий

## оперон



# Работа регуляторного белка



# Перенос генетического материала бактерий

- **Генетическая рекомбинация** – взаимодействие между двумя геномами, которое приводит к образованию рекомбинаций ДНК и формированию дочернего генома, сочетающего гены обоих родителей.
- **Клетки-доноры и клетки-реципиенты.**
- **Рекомбинант:** генотип представлен в основном генотипом реципиента с включением фрагментов хромосомы донора.
- Рекомбинация: **гомологичная** и **сайт-специфическая.**
- Три механизма передачи генетического материала между бактериями: **конъюгация, трансдукция и трансформация.**

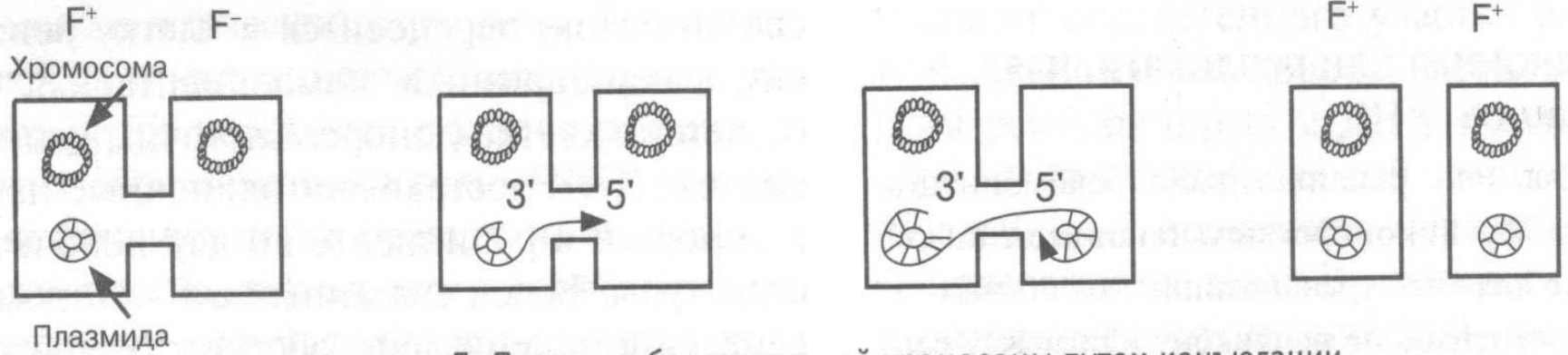
---

# Конъюгация

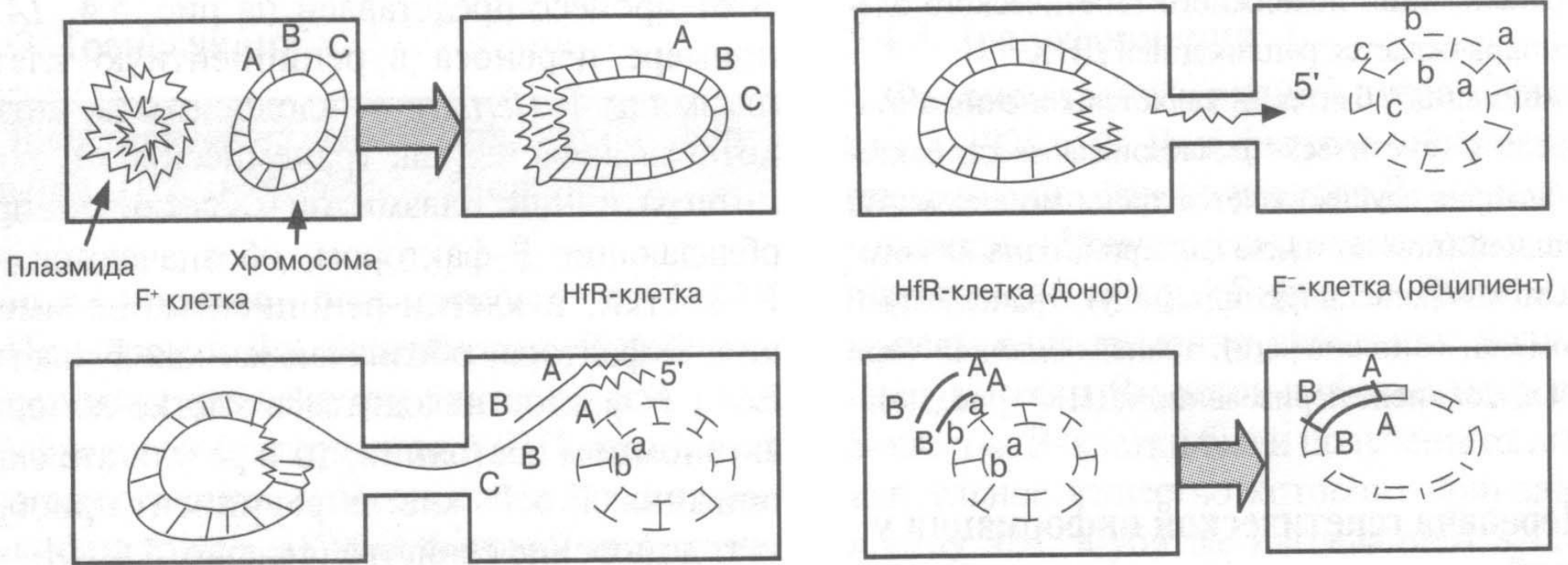
- **Конъюгация** – это перенос генетического материала путем прямого контакта между двумя клетками.
  - Обязательное условие – **трансмиссивная плаزمида** (F, R), обладающая **tra-опероном**.
  - **Биологическая значимость** – распространение резистентности бактерий к антибиотикам.
-

# 1. СХЕМА КОНЬЮГАЦИИ У БАКТЕРИЙ

## А. Передача F-фактора от F<sup>+</sup> клетки в F<sup>-</sup>



## Б. Передача бактериальной хромосомы путем конъюгации при включении F-фактора в хромосому бактерии



# Трансформация

- **Трансформация** – передача генетической информации через выделенную из клетки-донора ДНК. По происхождению ДНК может быть плазмидной либо хромосомной и нести гены, трансформирующие реципиента.
- Трансформация служит хорошим инструментом для **картирования хромосом**, поскольку трансформированные клетки включают различные фрагменты ДНК.
- Перенос экстрагированной ДНК является основным методом генной инженерии, используемым при конструировании рекомбинантных штаммов с заданным геномом.



# Схема трансформации

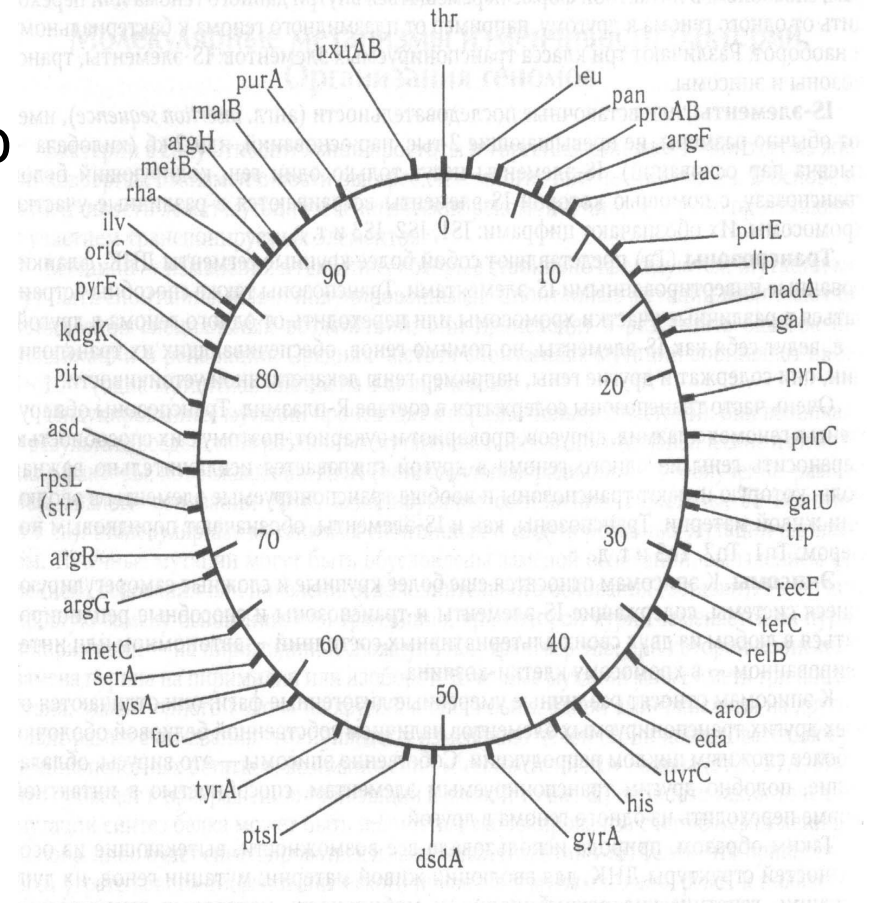
- Трансформирующей активностью обладает только двунитчатая высокоспирализованная ДНК.
- В клетку-реципиент проникает только одна нить ДНК, другая – в клеточной мембране подвергается деградации с освобождением энергии, необходимой для проникновения в клетку.
- Интеграция с хромосомой требует наличия гомологичных участков с трансформирующей ДНК.

## 3. СХЕМА ТРАНСФОРМАЦИИ



# Картирование хромосом

- Хромосома бактерий, как правило, имеет кольцевую форму. Исключение – *Vorrelia burgdorferi*, у нее хромосома линейная.
- Гены в хромосоме располагаются линейно и их последовательность можно установить.
- Это позволяет составлять хромосомные карты бактерий.



Сокращенная хромосомная карта E.coli

# Трансдукция

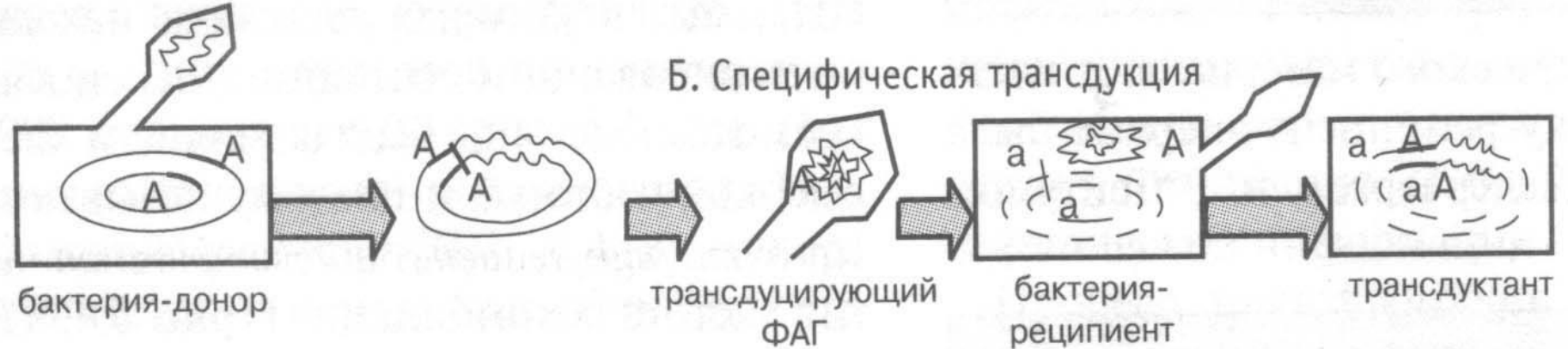
- **Трансдукция** – передача бактериальной ДНК посредством бактериофага.
  - **Общая (неспецифическая) трансдукция** – перенос вирулентным бактериофагом фрагмента любой части бактериальной хромосомы.
  - **Специфическая трансдукция** – перенос умеренным фагом определенного фрагмента ДНК (прилегающий к месту включения фаговой ДНК).
  - **Абортивная трансдукция** – внесенный фрагмент ДНК донора не встраивается в хромосому реципиента, а остается в цитоплазме и там самостоятельно функционирует.

# Схема трансдукции

## А. Неспецифическая трансдукция



## Б. Специфическая трансдукция



# Генетическая изменчивость бактерий

- **Генотипом** у бактерий называют совокупность индивидуальных генов клетки; **фенотип** – совокупность наблюдаемых признаков.
- Изменение бактериального генома могут происходить в результате мутаций и рекомбинаций.
- **Мутации** – это изменения в последовательности нуклеотидов ДНК, проявляющиеся наследственно закрепленной утратой или изменением какого-либо признака или группы признаков.
- Фенотипическим проявления мутаций: изменение морфологии бактерии, ауксотрофность, резистентность к антибиотикам, изменение чувствительности к температуре, снижение вирулентности (**аттенуация**).

# Мутации

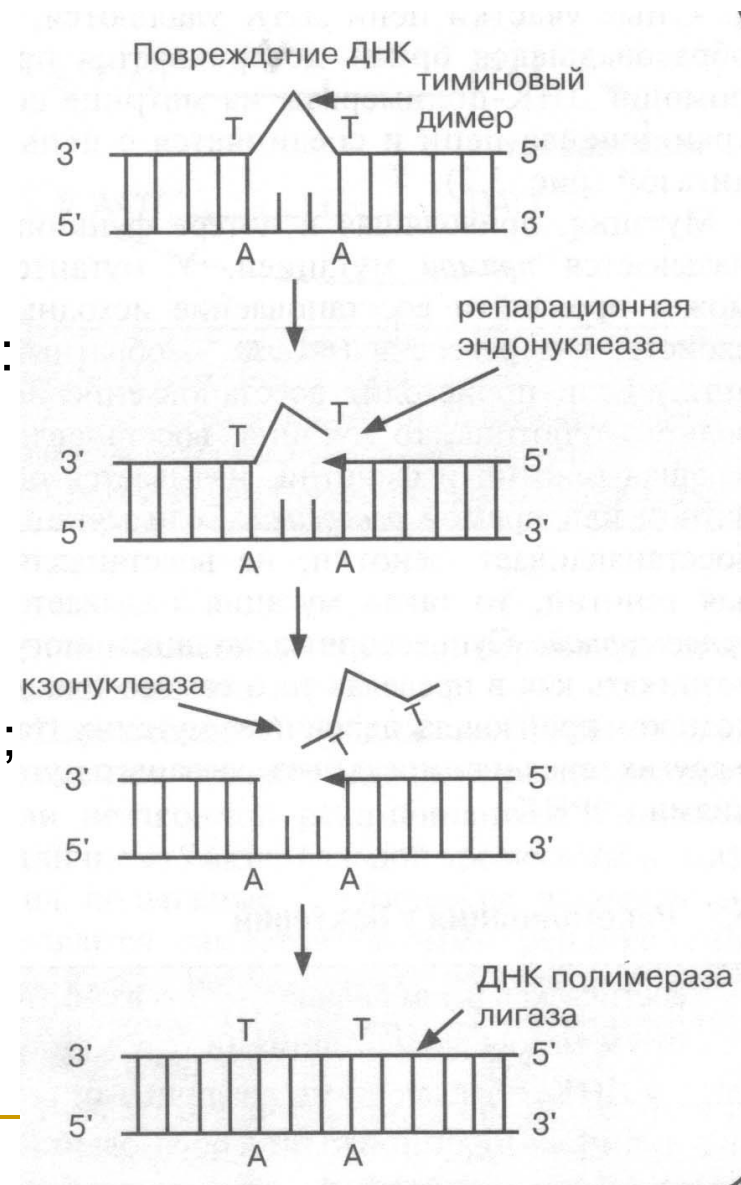
- По протяженности повреждений мутации бывают:
  - **точечными**, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов, (последствия: замена аминокислоты, сдвиг рамки считывания, возникновение бессмысленного кодона),
  - **протяженными** (абerrации).
- Мутации разделяют на:
  - **хромосомные** – изменение двух и более участков хромосомы,
  - **генные** – изменение гена или цистрона: **модификации** оснований, **делеции** (выпадение нескольких пар нуклеотидов), **транспозиции** (перемещение группы нуклеотидов в пределах хромосомы), **инсерция** (разрыв путем вставки посторонней ДНК), **дупликация** (добавление нуклеотидных пар) и деформации спирали ДНК.

# Мутации

- **Спонтанные** мутации (1 на  $10^6$ ):
  - точечные спонтанные мутации возникают из-за ошибок репликации ДНК;
  - спонтанные хромосомные aberrации возникают вследствие перемещения подвижных генетических элементов.
- **Индукцированные** мутации. **Мутагены**: физические, химические и биологические.
- **Молчащие** мутации.
- Обратная мутация (**реверсия**).
- Вторичная реверсия (супрессорная мутация); интрагенные и экстрагенные супрессорные мутации.
- Новый фенотип проявляется только тогда, когда измененный ген начнет функционировать.

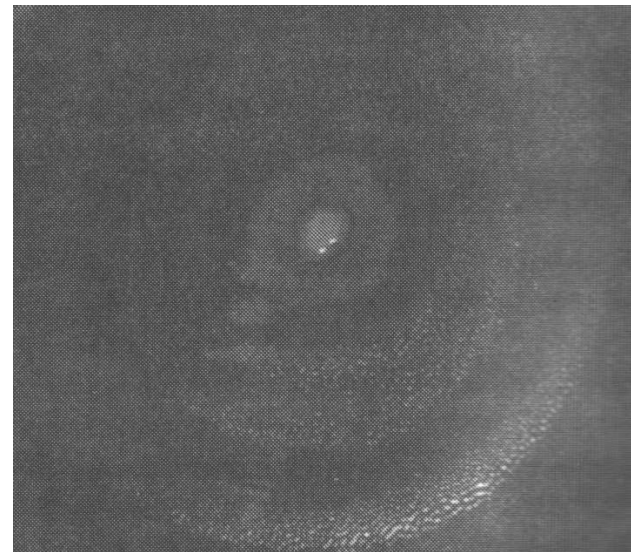
# Системы репарации бактерий

- Совокупность ферментов, катализирующих реакции коррекции повреждений ДНК, составляют **системы репарации** (световые и темновые). Известны три основных механизма коррекции дефектов ДНК:
  - непосредственная реверсия от поврежденной ДНК к исходной структуре;
  - эксцизия («выпадение») повреждений с последующим восстановлением исходной структуры;
  - активация механизмов, обеспечивающих устойчивость к повреждениям.





- **Временные, наследственно неослабленные изменения** закрепленные изменения называются **модификациями**.
- **Диссоциация микробов:**  $S \rightarrow R$ , сопровождаются изменениями биохимических, морфологических, антигенных и патогенных свойств возбудителей.
- **Условия модификации:**
  - 1) определенность;
  - 2) общность изменений в популяции;
  - 3) обратимость.



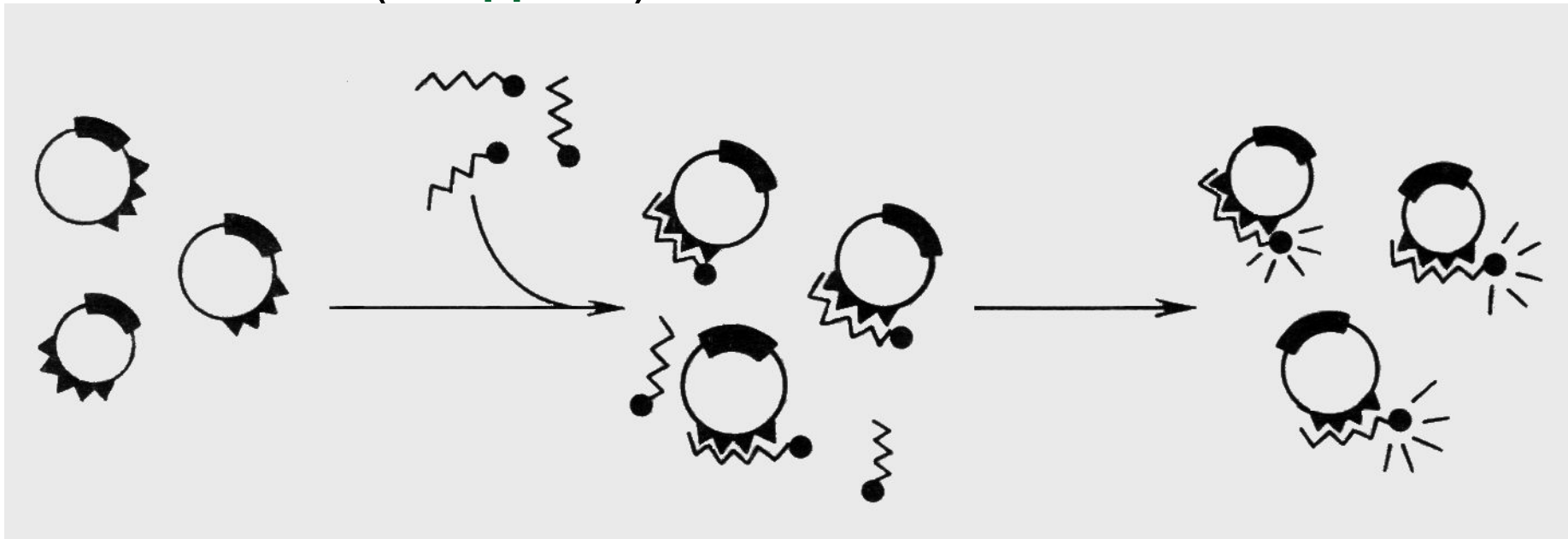
# Применение генетических методов в диагностике инфекционных заболеваний

- Маркер возбудителя – геном.
- Применение:
  - для диагностики вирусных и бактериальных инфекций;
  - для идентификации бактерий;
  - для определения точного таксономического положения микроорганизмов.

# Рестрикционный анализ

- **Рестриктазы** – ферменты, расщепляющие молекулы ДНК (разрывают фосфатные связи в определенных последовательностях нуклеотидов).
- В геноме конкретного вида микроорганизмов находится строго определенное число участков узнавания для определенной рестриктазы → **рестрикционная карта** вида.
- Генетическое родство микроорганизмов, принадлежность к определенному виду, мутации.
- Используется как начальный этап метода определения последовательности нуклеотидных пар (**секвенирования**) и метода молекулярной гибридизации.

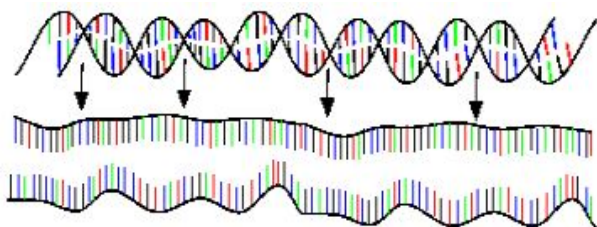
- ## Метод молекулярной гибридизации
- Основан на способности ДНК и РНК специфически соединяться (**гибридизироваться**) с комплементарными олигонуклеотидными фрагментами, искусственно синтезированными и мечеными ферментом, флюорохромом или изотопом (**зондами**).



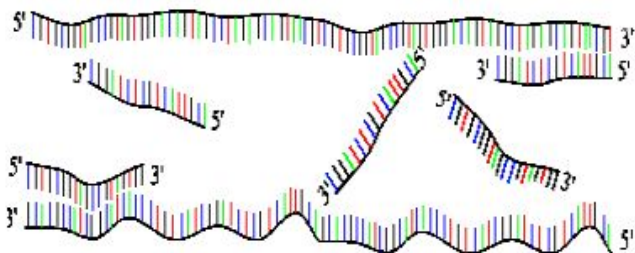
# Полимеразная цепная реакция

- **ПЦР** основана на многократном увеличении числа копий (**амплификации**) определенного участка ДНК, катализируемое ферментом ДНК-полимеразой.
- **Этапы:** подготовка исследуемой пробы (изоляция ДНК или РНК), собственно ПЦР и детекция продукта ПЦР (амплифицированной ДНК).
- При использовании РНК в качестве матриц для ПЦР – **ОТПЦР**.
- **Компоненты:**
  - 1) фермент ДНК-полимераза;
  - 2) пара олигонуклеотидных праймеров;
  - 3) набор нуклеотидов;
  - 4) копируемая ДНК;
  - 5) ионы  $Mg^{+2}$ .

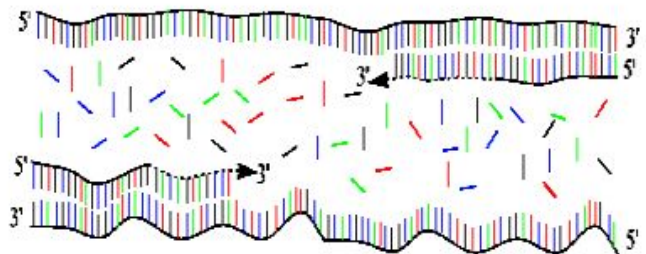
# Схема полимеразной цепной реакции



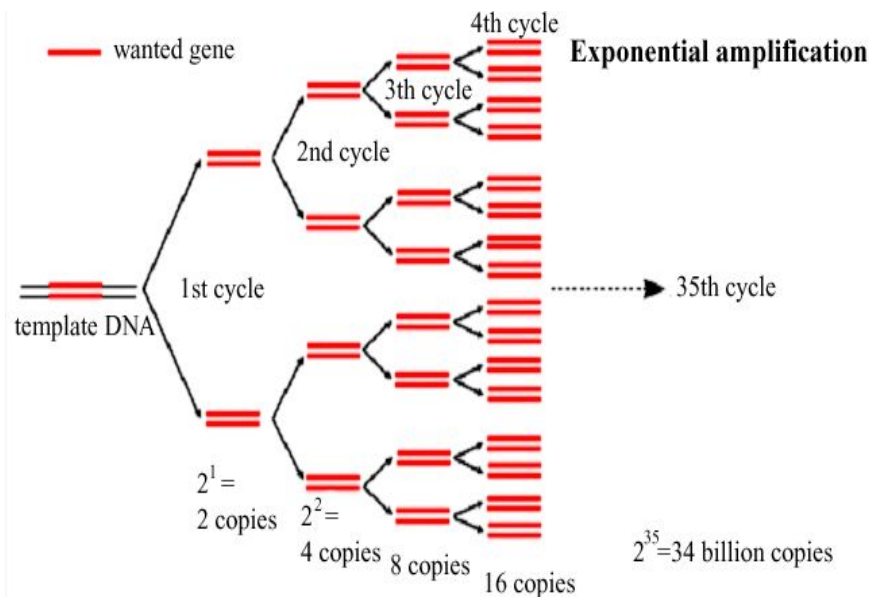
Этап 1: Денатурация  
1 минута 94°C



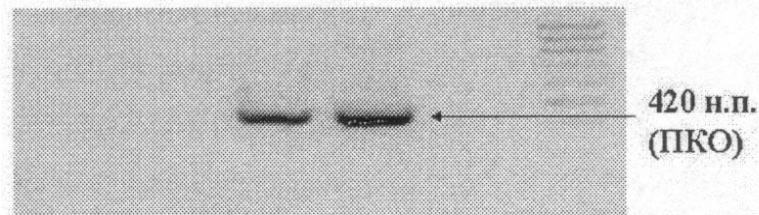
Этап 2: Отжиг праймеров  
45 секунд 54°C



Этап 3: Синтез цепи ДНК



Образец гель-электрофореза



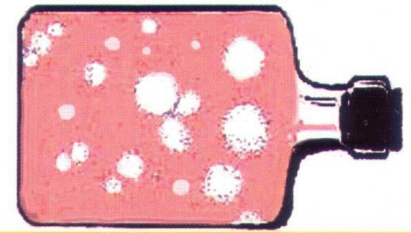
1 2 3 K<sup>+</sup> K<sup>-</sup> M

№ 1-3 – клинические образцы  
K<sup>+</sup> – положительный контрольный образец  
K<sup>-</sup> – отрицательный контрольный образец  
M – маркер длин фрагментов ДНК

# Особенности генетики вирусов

- Наследственная информация у вирусов может быть записана как на ДНК, так и на РНК.
- Скорость **спонтанного мутагенеза** в ДНК-геномах значительно ниже ( $10^{-8} - 10^{-11}$  на каждый включенный нуклеотид), чем у РНК-геномных ( $10^{-3} - 10^{-4}$  на каждый включенный нуклеотид).
- **Индукцированные мутации**: действующие *in vivo* и *in vitro*.

# Вирусные мутации



- По **фенотипическим** проявлениям:
  - Мутации, не имеющие фенотипического проявления.
  - Летальные мутации.
  - Условно летальные мутации.
  - Мутации, имеющие фенотипическое проявление.
- По изменению **генотипа**: точечные (локализующиеся в индивидуальных генах) и генные (затрагивающие более обширные участки генома).



# Взаимодействие вирусных геномов

- **Кооперативные взаимодействия:**
  - **Генетическая рекомбинация** чаще встречается у ДНК-содержащих вирусов или РНК-содержащих вирусов с фрагментированным геномом (вирус гриппа), происходит обмен между гомологичными участками вирусных геномов.
  - **Генетическая реактивация** – перераспределении генетического материала между геномами родственных вирусов с мутациями в разных генах.
  - **Комплементация** – один из вирусов, инфицирующих клетку, в результате мутации синтезирует нефункциональный белок. Немутантный вирус, синтезируя полноценный белок, восполняет отсутствие его у мутантного вируса.
  - **Фенотипическое смешивание** происходит при смешанном заражении чувствительной клетки двумя вирусами, когда часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам, при неизменном генотипе.

# Вирусная интерференция

- **Интерференция** вирусов – состояние невосприимчивости к вторичному заражению клетки, уже инфицированной вирусом.
- **Гетерологическая интерференция:** угнетение адсорбции путем блокирования или разрушения специфических рецепторов, ингибирование трансляции мРНК, индукция интерферона.
- **Гомологическая интерференция:** при высокой множественности инфицирования образуется много **дефектных вирусных частиц**. Циркуляция ДИ-частиц и коинфекция с полноценным вирусом вызывают вялотекущие, длительные формы инфекции.
- **Взаимодействие между вирусом и клеткой-хозяином:** вирусная **трансформация** клетки.