Қ. И. Сәтбаев атындағы
Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Лекция 6.

Бактериялардың генетикасы және ДНҚ клондау

BIO4291 МИКРООРГАНИЗМДЕР БИОТЕХНОЛОГИЯСЫ

Лектор: PhD Қамшыбаева Г.Қ.

Оқу нәтижелері

- бактерия ішіндегі ДНҚ қалай өзгеретінін көрсетіңіз;
- бактериялық гендердің берілуінің, бактериялық ДНҚ алмасу механизмдерінің және жұптасқан кресттердің маңыздылығын түсіндіріңіз;

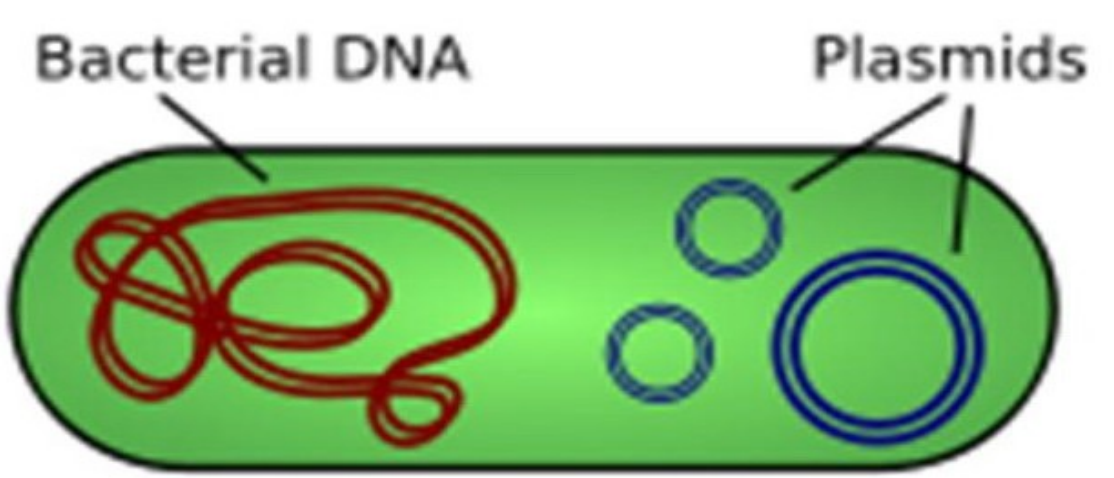
БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ГЕНЕТИКАЛЫҚ МАТЕРИАЛЫ

- **НУКЛЕОИД** – бір сақиналы тұйық хромосома, 4000 гендері бар, гаплоидты.
- **ПЛАЗМИДАЛАР** – хромосомадан тыс тұқым куалаушылық факторлары

ПЛАЗМИДАЛАР

Плазмидалар ДНҚ молекулалардан құралған.

- **Регуляторлы плазмидалар** **бактерия клетканың метаболизмнің әр түрлі кемшіліктерін компенсациясына қатысады.**
- **Кодтаушы плазмидалар** **бактериалды клеткаға жаңа генетикалық ақпаратты әкеледі (мысалы, антибиотиктерге тұрақтылығы)**



Бактериялардың генетикалық материалы

1. Хромосома
2. Хромосомадан тыс тұқым қуалаушылық элементтері:

- ✓ плазмидалар
- ✓ транспозондар
- ✓ IS-элементтер

Плазмидалар міндетті емес микробты клетканың компоненттері, сақиналы немесе сызықты құрылымы, өздік репликацияға қабілетті емес.

Транспозондар – миграциялайтын (жылжымалы) элементтер, клетка ішіндегі тасымалдау, антибиотикке, ауыр металл иондарына резистентті гендері бар.

IS-элементтер – миграциялайтын гендер, ДНҚ бір учаскісіден басқа учаскіге және клетка ішіндегі гендерді тасымалдау;

Плазмидалардың классификациясы

Клеткада орналасуы бойынша:

хромосомадан тыс

біріктілген (интеграцияланған)

Таралу түрі бойынша :

конъюгативті (трансмиссивті, tra-гені бар)

конъюгативті емес

Плазмида түрлері

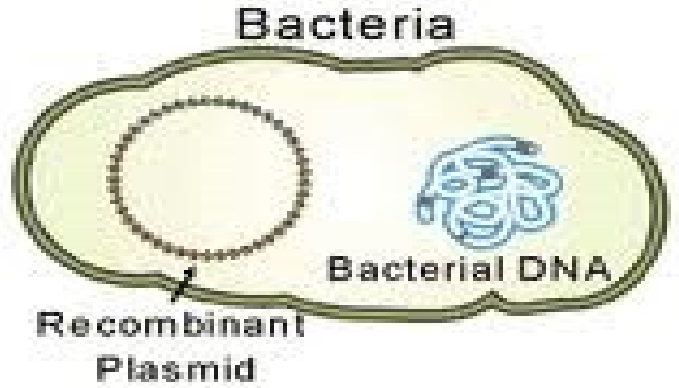
- **Col** –колицин өнімдейді
- **HLy** –гемолизин өнімдейді
- **Tol** –толуол, ксилол ыдыратады
- **Ent** –энтеротоксин өнімдейді
- **Nif** –азот байланыстырушы (K. pneumoniae)
- **Ti** – өсімдік ісіктеріне пайда болады

Деградацияның плазмидалары:

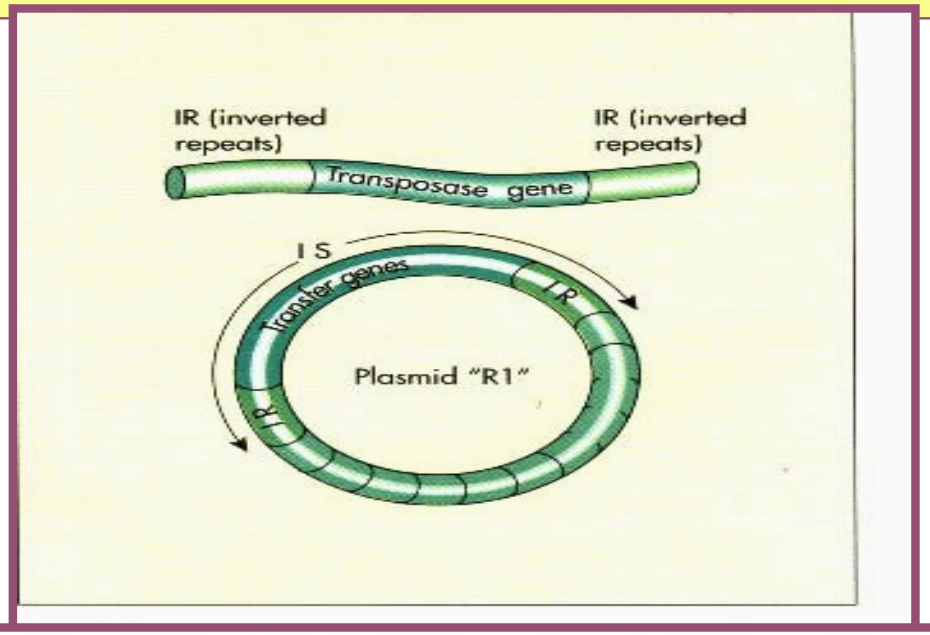
- **Cam** –камфораны ыдыратады
- **Oct** – октанды ыдыратады
- **Sal** – салицинді ыдыратады

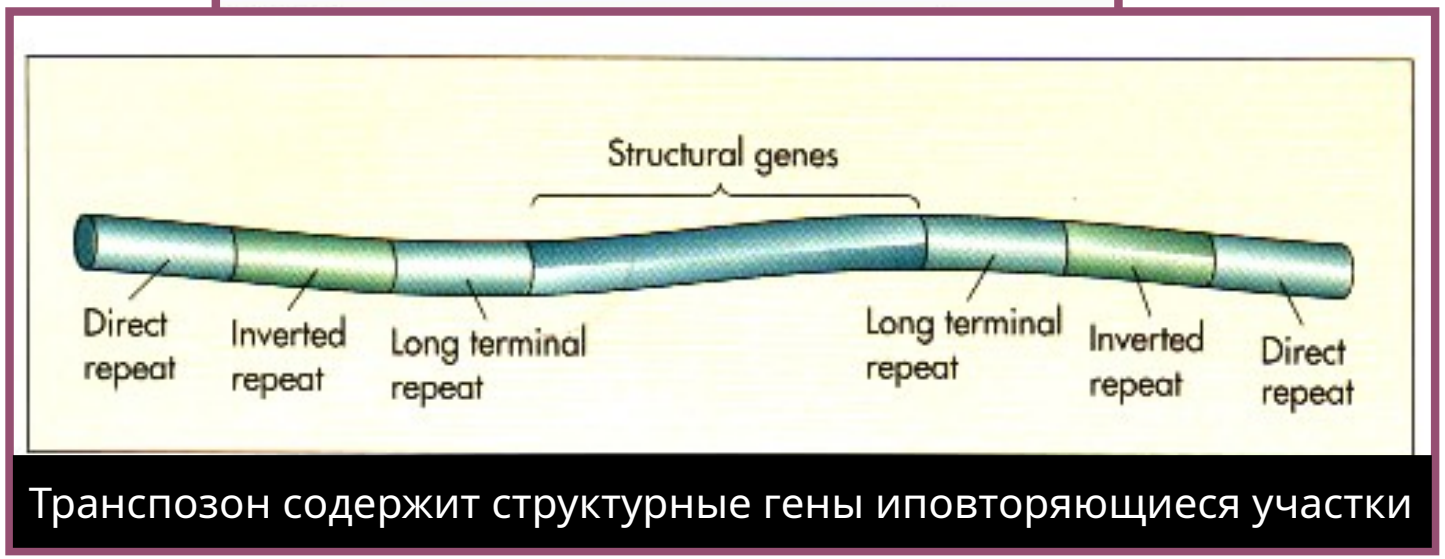
ПЛАЗМИДА ТОПТАРЫ

- ***F-плазмидалар - F-пили талшықтарының синтезін бақылайды*, конъюгация процессінде бактерия-донордан (F+) бактерия-реципиентке (F–) генетикалық материалды тасымалдайды**
- ***R-плазмидалар* (англ. *resistance*, тұрақтылық) дәрілік препараттарға тұрақтылығын кодтайды.**
- **П*атогенділік плазмидалар токсин пайда болуына* (tox+-гендері бар) және бактериялардың вирулентті қасиеттерін бақылайды**
- ***Бактериоциногенді бактериялар* бактериоцин синтезін кодтайды - белокты өнімдер, өз немесе жақын бактерия түрлерінің өлуіне себеп болады.**



Транспозон және IS элемент





Транспозон содержит структурные гены иповторяющиеся участки

IS-элементтердің қызметтері

- **1.Координациялайтын:** транспозондар, плазмидалар, орташа фагтар және хромосома арасында әрекеттесу, олардың репликациясын қамтамасыз ету.
- **2.Регуляторлы:** гендер инактивациясын тудырады, небесе промотор болады (ДНҚ учаскісі, клетка гендерінің экспрессиясын реттейді).
- 3. Делеция немесе инверсия типі бойынша мутацияны индукциялайды

Транспозон қызметтері

- 1. Регуляторлы
- 2. Кодтайтын
- 3. Мутация индукциялады
- 4.Хромосомды аберрацияларды тудырады

Генотип- гендердің бірлестігі.

Фенотип- жеке немесе біркелкі организмдер популяциясының генотипінде бар белгілердің іске асырылуы.

ФЕНОТИПТІК ӨЗГЕРГІШТІК

Фенотиптік модификациялар, генотиптері бірдей организмдердің өзара фенотиптік айырмашылығы

МОДИФИКАЦИЯЛАР – уақытша, тұқым қуаламайтын өзгерістер, бұл сыртқы ортаның әр түрлі әсерінен болады. Мысалы, микрорганизмдердің колонияларының морфологиялық түр өзгеруіне, олардың антигенді қасиеттеріне, вируленттілігіне әсер етуі мүмкін

- **БИОВАРЛАР**
- **СЕРОВАРЛАР**
- **ФАГОВАРЛАР**

БАКТЕРИЯ ДИССОЦИАЦИЯСЫ- бактерияның бір түрдегі колониясына морфологиясы өзгерген мутанттардың дамуына байланысты, әр түрлі өзгерістер кіреді



Қарапайым диссоциацияларды қатты қоректік орталарда қарауға болады.

Аркрайт (1921) осы колонияларға келесі атауларды ұсынды:

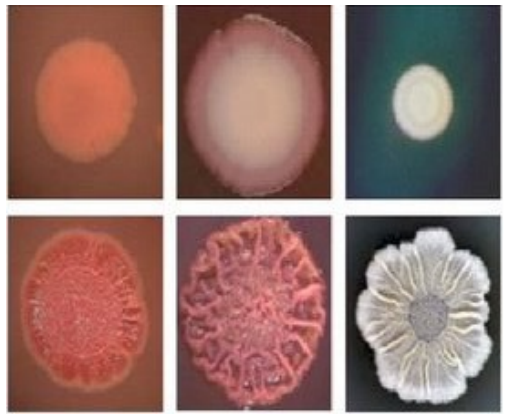
S - колонии [англ. smooth, тегіс]

R-колонии [англ rough, қыртысты, бұдырмақты]

M-колонии [mucoid, шырышты]

D-колонии [от англ. dwar қортық].

S - M- D- R-колонии



ГЕНОТИПТІК ӨЗГЕРГІШТІК

1. **МУТАЦИЯ – ұрпақтарға берілетін организмдердің белгілерінің және қасиеттерінің сыртқы ортаның әсерінен кенет өзгеруі**
- **спонтаннды және индукцияланған,**
- **генді (бір геннің өзгерістері) және хромосомалы (хромосоманың бір немесе екіден астам учаскілерінің өзгеруі).**

2. ГЕНЕТИКАЛЫҚ РЕКОМБИНАЦИЯЛАР – екі клетканың арасындағы генетикалық алмасудың нәтижесінде аралас тұқымның пайда болу процесі.

КОНЪЮГАЦИЯ — генетикалық материалдарының алмасуы

ТРАНСФОРМАЦИЯ — бактерия донорынан генетикалық ақпаратты бактерия реципиентке тасуы

ТРАНСДУКЦИЯ — фагтың көмегімен бактериялардың донор клеткасындағы гендерді (ДНҚ фрагменттері) реципиентке тасуы.

Мутациялар

Шығу тегі бойынша: спонтанды
индукцияланған
Локализация бойынша: нуклеоидті
цитоплазмалық
Мутацияланған гендер саны бойынша:
гендік
хромосомалық
Көлемі бойынша: үлкен (хромосомалық)
кішкентай (нүктелік)

Хромосомалық мутациялар :

- Инверсия
- Дупликация
- Делеция
- Дислокация

Нүктелік мутациялар :

- **делеция**
- **инсерция** (кірістірме)

алмастыру:

- **транзиция** (пурин –пуринге, пиримидин –пиримидинге)
- **трансверсия** (пурин –пиримидинге және және керісінше)

Мутагенді факторлары

Физикалық:

1. Ультракүлгін сәулелер (λ-2600 А) – ең күшті мутагенді әрекет жасайды; тимин димерлері пайда болады, негіздер алмастыру

2. Ионизациялаушы сәулелер (рентген, гамма-сәулелер)

Мутагенді факторы

Химиялық:

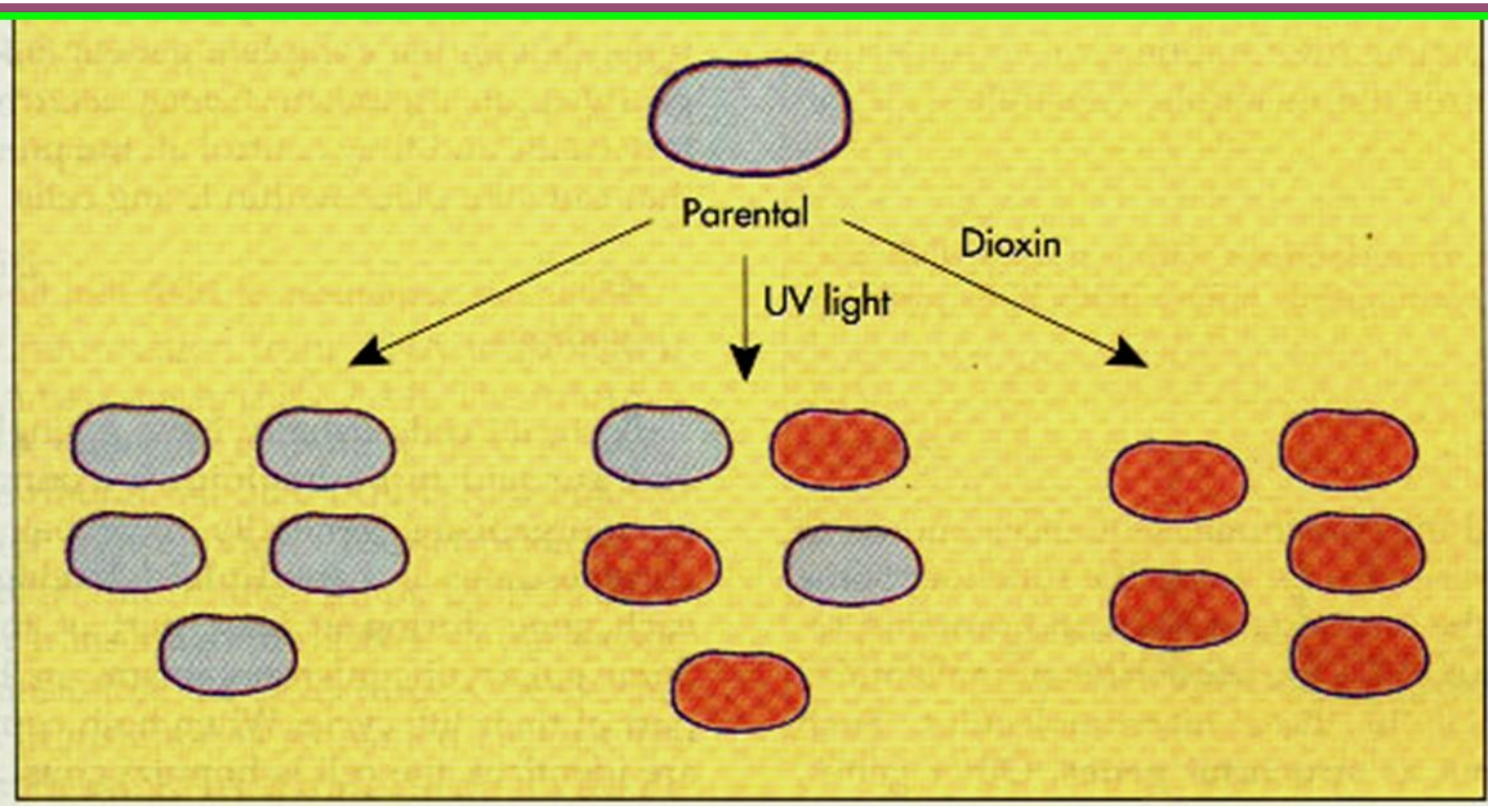
1. Азотты қышқыл
2. N-нитрозометилмочевина – супермутаген, канцероген
3. Этилметансульфонат
4. Акридин
5. Нитрозогуанидин
6. Негіздерінің аналогтары (5-бромурацил, 2-аминопурин)
7. Дәрі-дәрмектер (нитрофуран, антибиотиктер

Мутагенды факторлар

Биологиялық:

- Сутек тотығы
- антибиотиктер
- бактериофагтар

Әр түрлі мутагендердің бактерияларға әсері

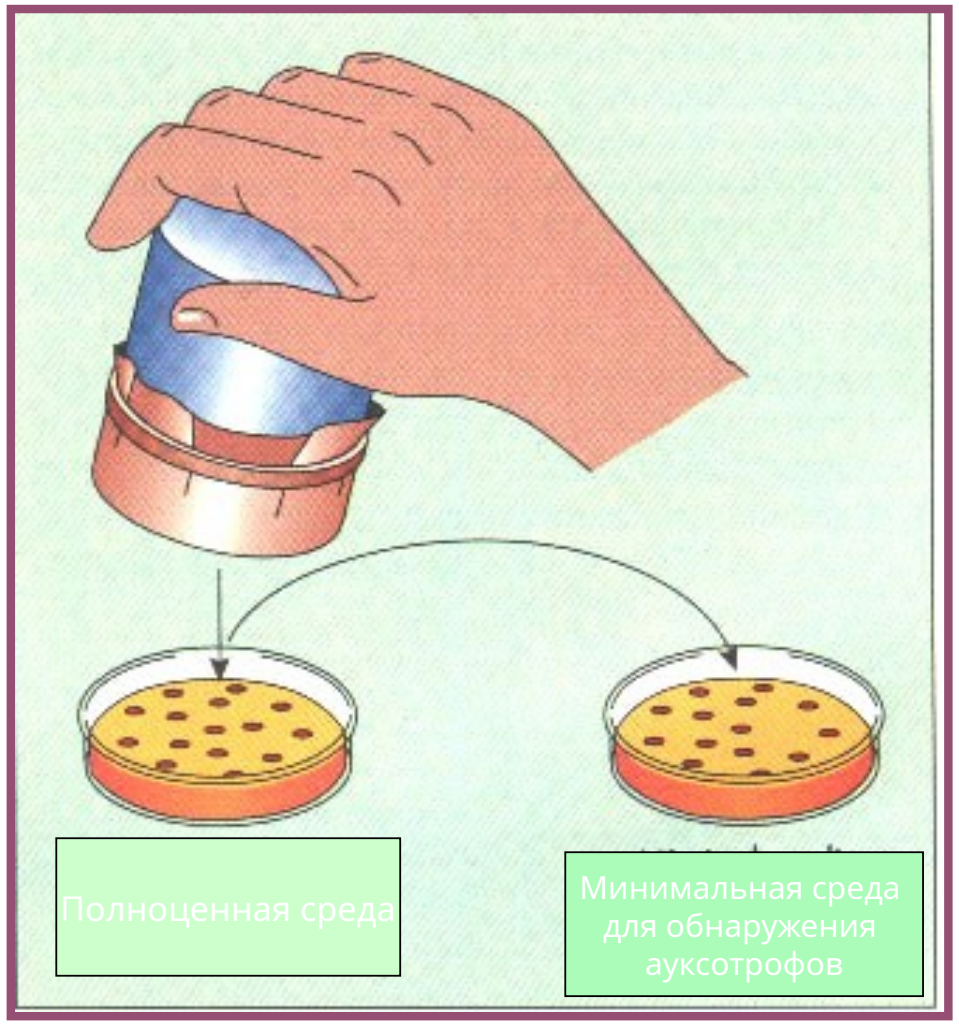


Әр тұрлі физикалық және химиялық факторлар мутация жиілігін жоғарлатады. Ультракүлгін сәулелер және диоксин мутантардың пайда болуына себеп болады (қызыл клеткалар)

Мутанттарды анықтау әдістері

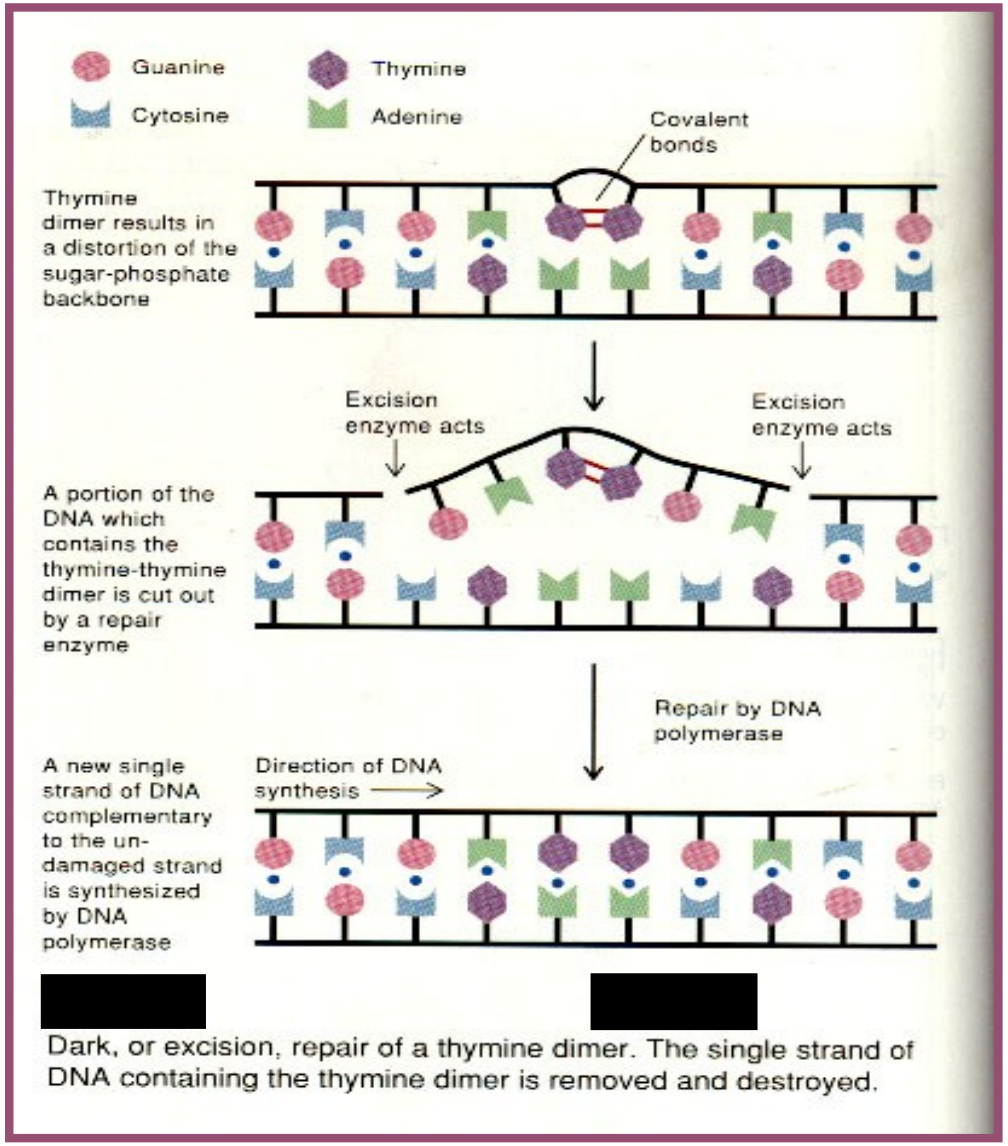
- Өсу жылдамдығының айырмашылығы бойынша (минималды ортаға егу)
- Тірі қалу әр тұрлі қабілеті бойынша
- Ледерберг әдісі (метод реплик)

Метод реплик



Жарық репарация – жарық қатысуымен тиминды димерлерді ферменттер арқылы ажырату

Қаранғылық репарация



Dark, or excision, repair of a thymine dimer. The single strand of DNA containing the thymine dimer is removed and destroyed.

1. Зақымдалған ДНҚ учаскісіне іргелес учаскілердің деградациясы

2. Рестриктаза арқылы зақымдалған учаскілерді үзу

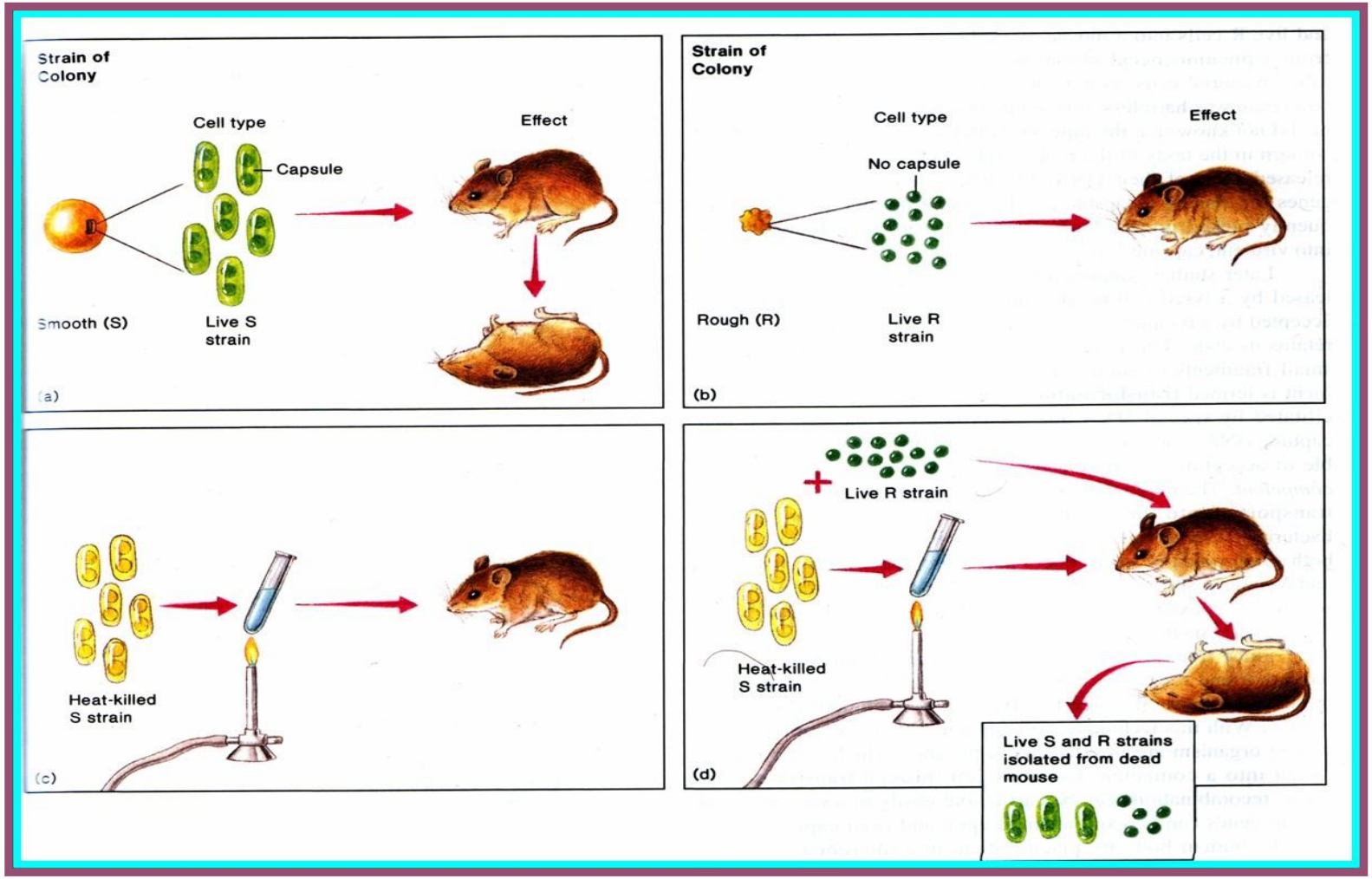
3. ДНҚ полимераза арқылы алыстағы учаскілерді қалпына келтіру

4. *ДНҚ- лигаза арқылы қалыптастыру*

SOS-реактивациясы

Көп зақым болғанда мутацияланған учаскілер активті емес жағдайға ауыстырылады, ал олардың рөлін ДНҚ зақымданбаған учаскісі орындайды

Трансформация (опыты Гриффитса, 1928; Евери Мк Леода и Макарти, 1944)



- **Трансформация** (көне лат. transformatio – айналу), генетикада – оқшауланған дезоксирибонуклеин қышқылының көмегімен генетикалық ақпаратты қандай да бір жасушаға ендіру процесі

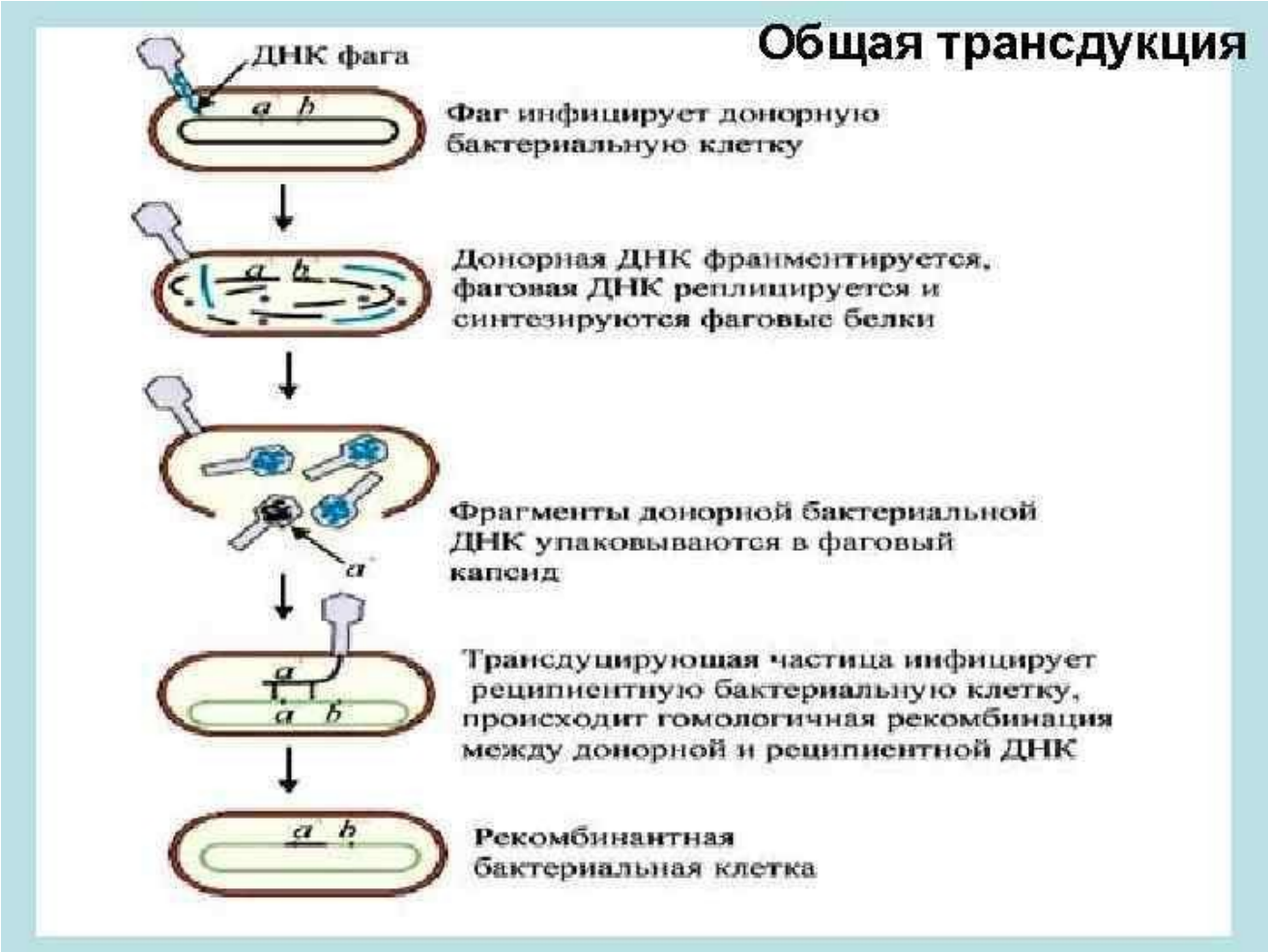
ТРАНСДУКЦИЯ
(Циндер и Ледерберг, 1952)

Виды:

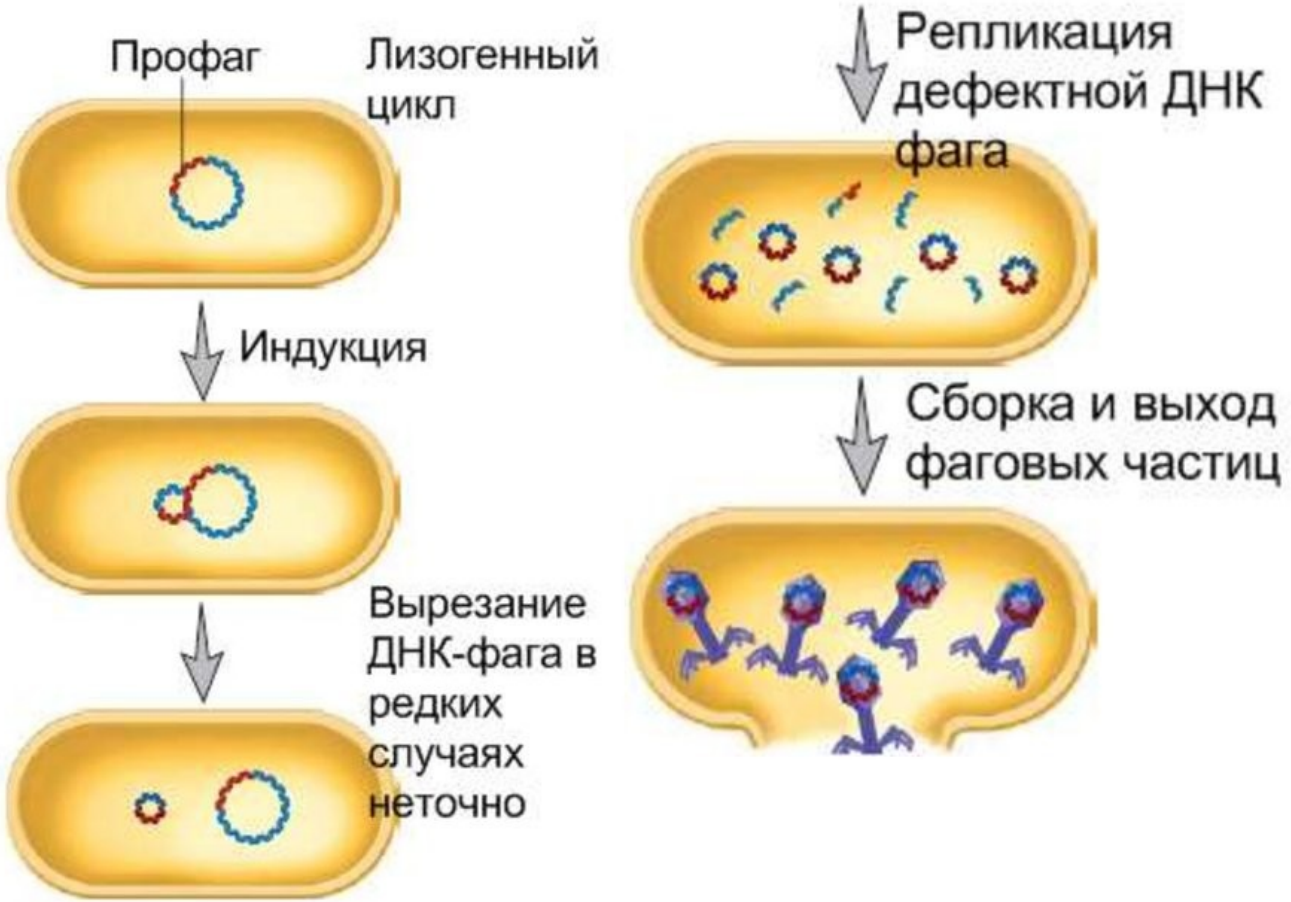
- **жалпы** (генерализированная)
- **спецификалық**
- **абортивті**

Орташа, дефекті фагтар

ТРАНСДУКЦИЯ



Специфическая трансдукция

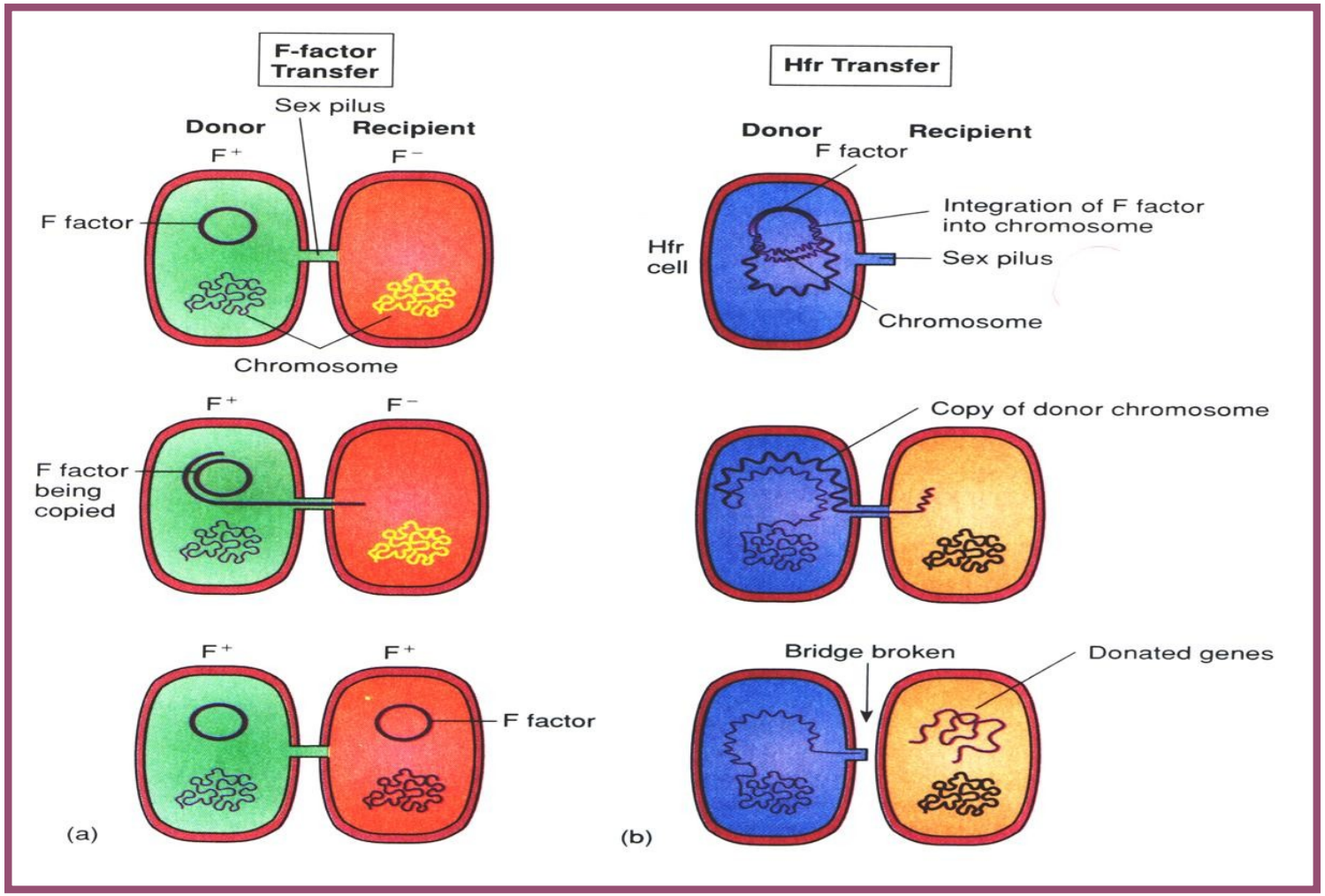


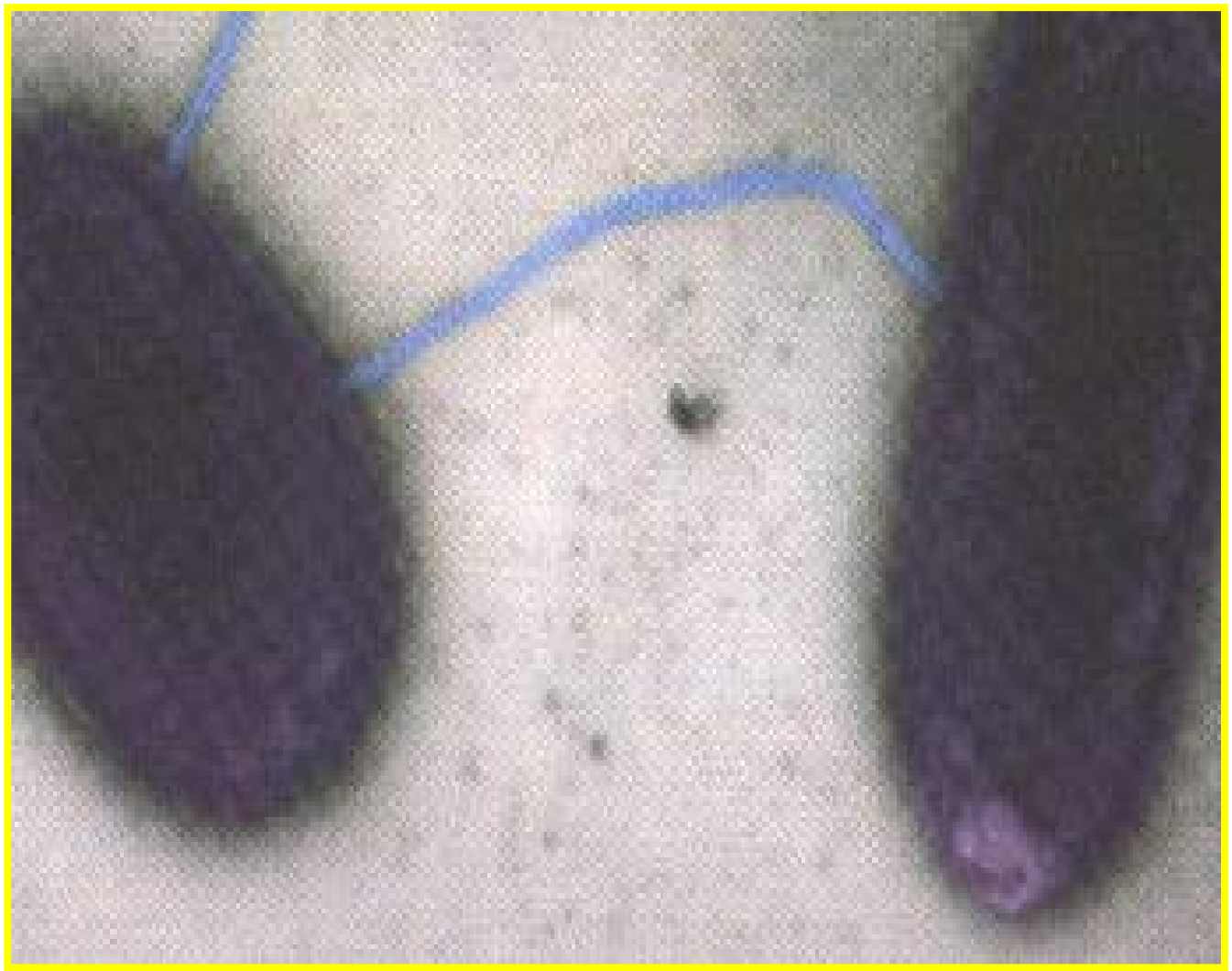
ТРАНСДУКЦИЯ және ФАГТЫ КОНВЕРСИЯНЫҢ АЙЫРМАШЫЛЫҚТАРЫ

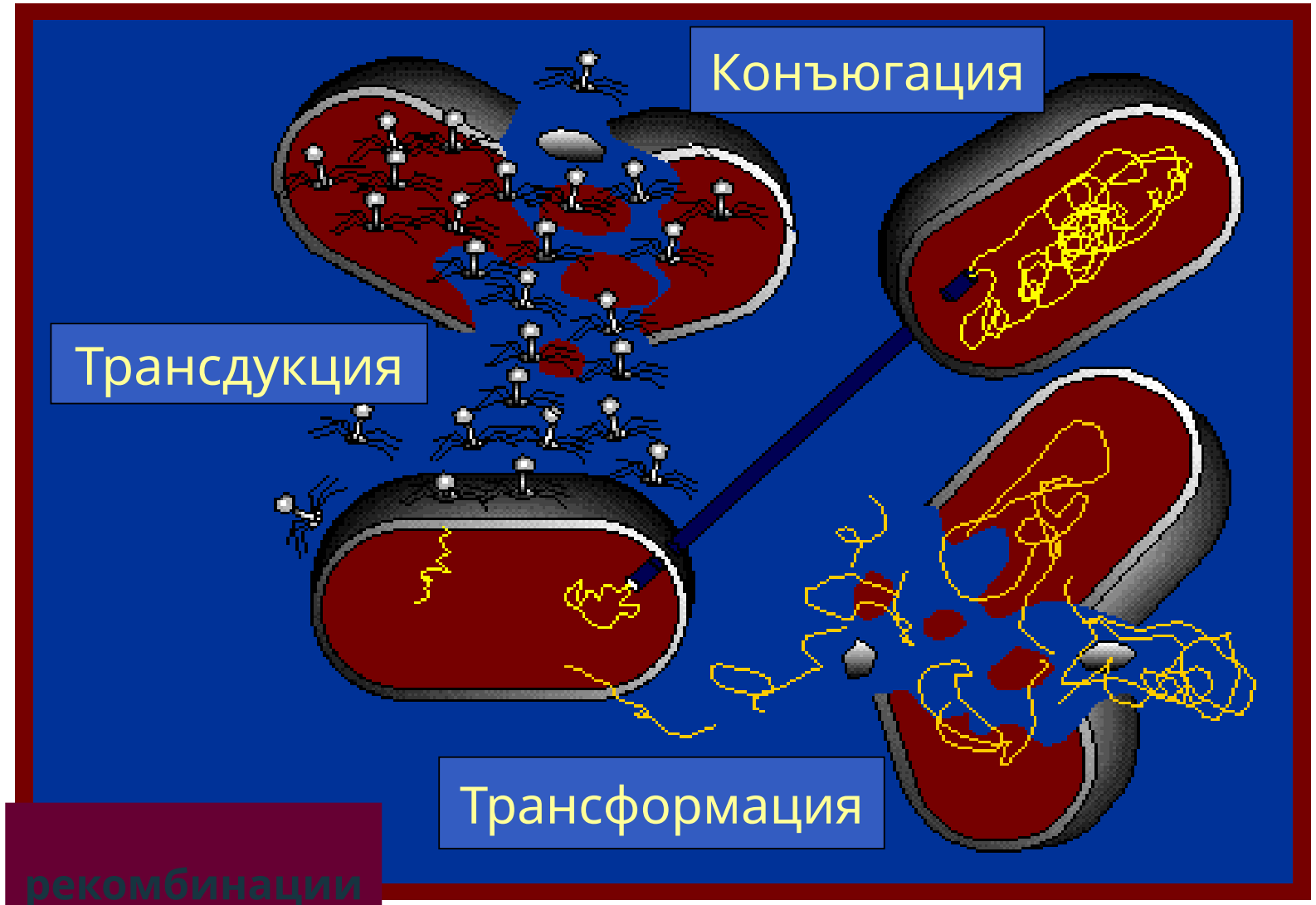
Трансдукция –фаг арқылы генетикалық ақпаратты бір клеткадан екінші клеткаға тасымалдау

Фагты конверсия - бактериофаг гендерінің клеткадағы экспрессиясы
(Corynebacterium diphtheriae, Clostridium botulinum, Staphylococcus spp., Salmonella spp.)

КОНЪЮГАЦИЯ – (Ледерберг и Тейтум, 1946)



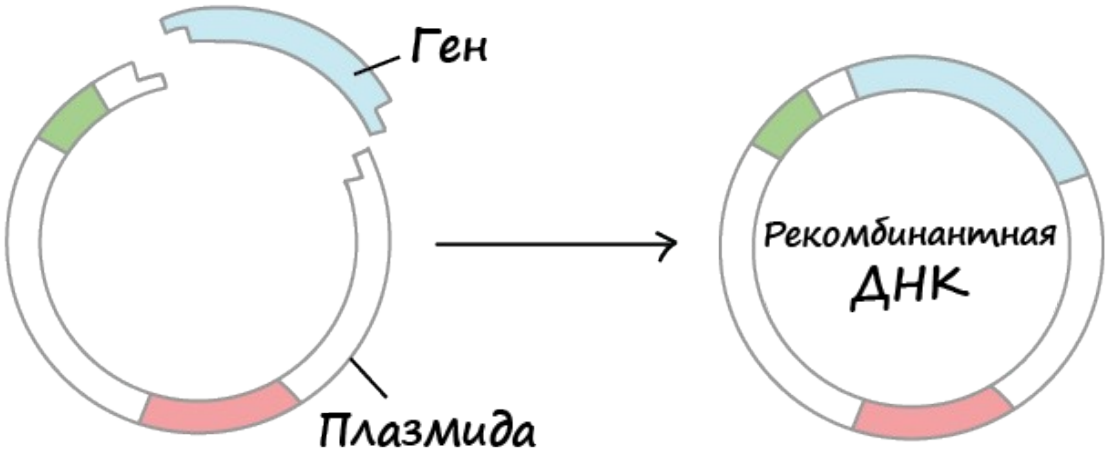




рекомбинации

ДНҚ -ны клондау - молекулалық биологияда бұл ДНҚ бөлігінің, мысалы, геннің көптеген ұқсас

Классикалық клондау экспериментінде мақсатты ген **плазмида** деп аталатын дөңгелек ДНҚ молекуласына енгізіледі. Плазмида бактерияға **трансформация** деп аталатын процесс арқылы енеді. Плазмиданы тасымалдайтын бактериялар антибиотиктер көмегімен таңдалады.

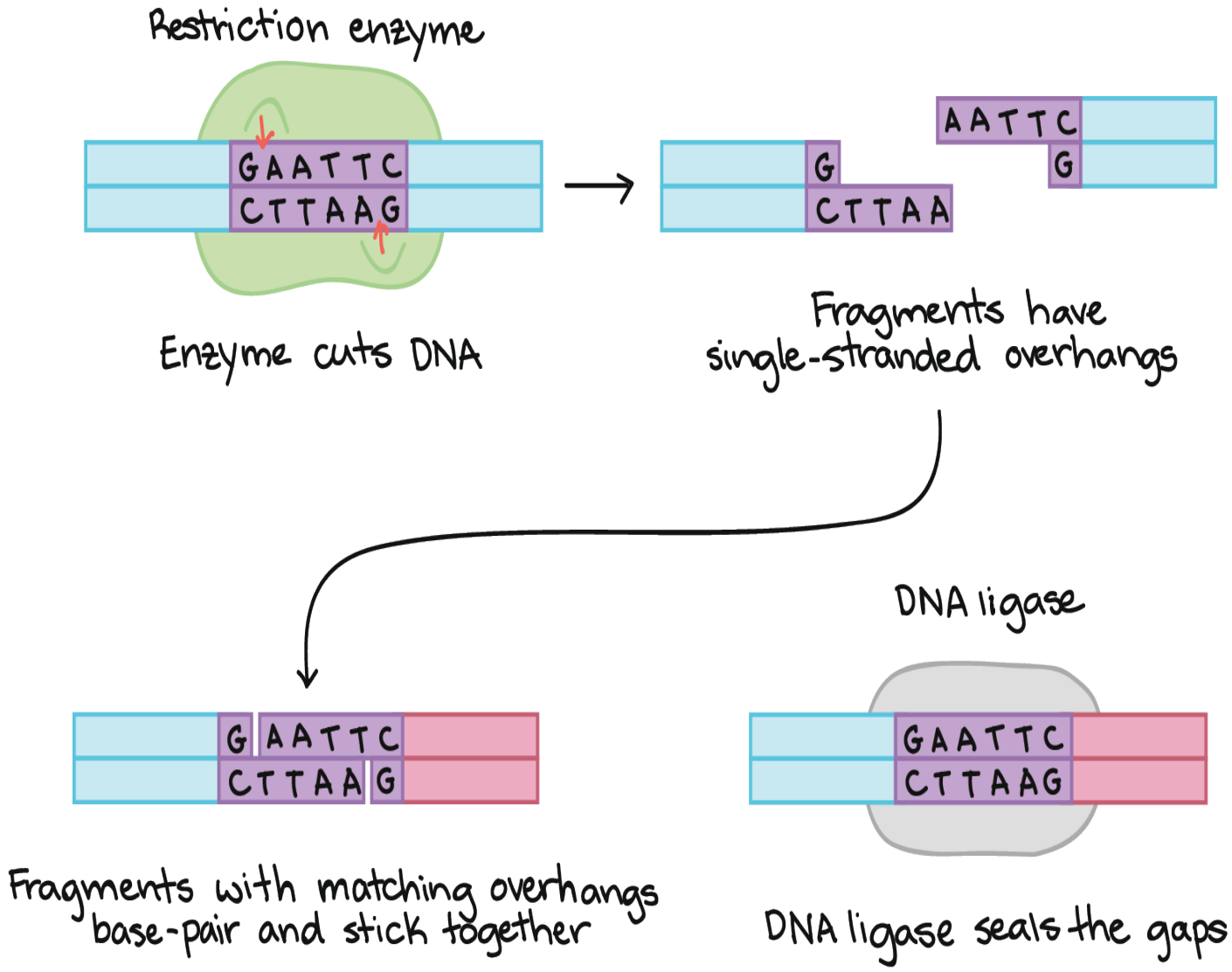

Ген
Плазмида
Рекомбинантная
ДНК

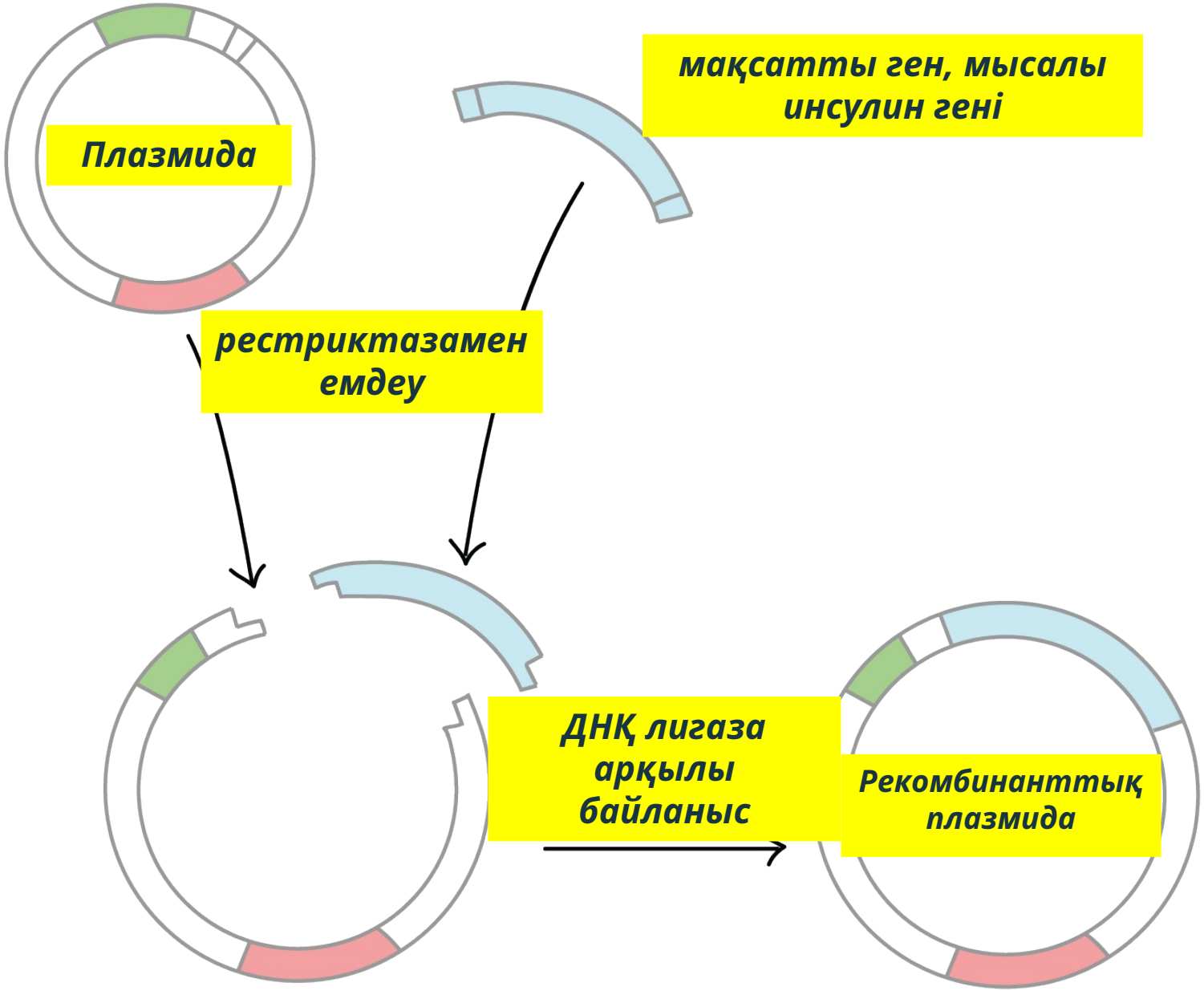
ДНҚ клондау қадамдары

- ДНҚ клондау көптеген мақсаттарда қолданылады. Мысал ретінде, бактерияларда ақуызды (адам инсулині сияқты) синтездеу үшін ДНҚ клондауын қалай қолдануға болатынын қарастырайық. Бұл процестің негізгі қадамдары келесідей:
- 1. **Плазмиданы «кесу»** және оған мақсатты генді «енгізу». Бұл процесс рестрикциялық ферменттерге (ДНҚ кесетін) және ДНҚ лигазасына (ДНҚ -ны біріктіретін) негізделген.
- 2. **Плазмиданың бактерияға ауысуы.** Антибиотиктер көмегімен құрамында плазмида бар бактериялар анықталады.
- 3. Плазмидаларды тасымалдайтын және оларды ақуыз өндіру үшін «фабрикалар» ретінде қолданатын көптеген бактериялар өсуде. **Ақуыздарды өндіру және тазарту.**

1. ДНҚ кесу және енгізу

- **Рестриктаза**-бұл ДНҚны кесетін фермент. Ол белгілі бір мақсатты реттілікті таниды және ДНҚ -ны бір жерде (учаскеде) кеседі. Көптеген рестрикциялық эндонуклеазалар қысқа бір тізбекті шығыңқылармен аяқталады. Егер екі молекуланың сәйкес келетін асып кетуі болса, оларды бір -бірін толықтыратын нуклеотидтермен байланыстыруға болады. Алайда, олар **ДНҚ лигазасы** бекітілмейінше ДНҚ -ның үздіксіз молекуласын түзе алмайды, бұл оларды бір ДНҚ молекуласына байланыстырады.

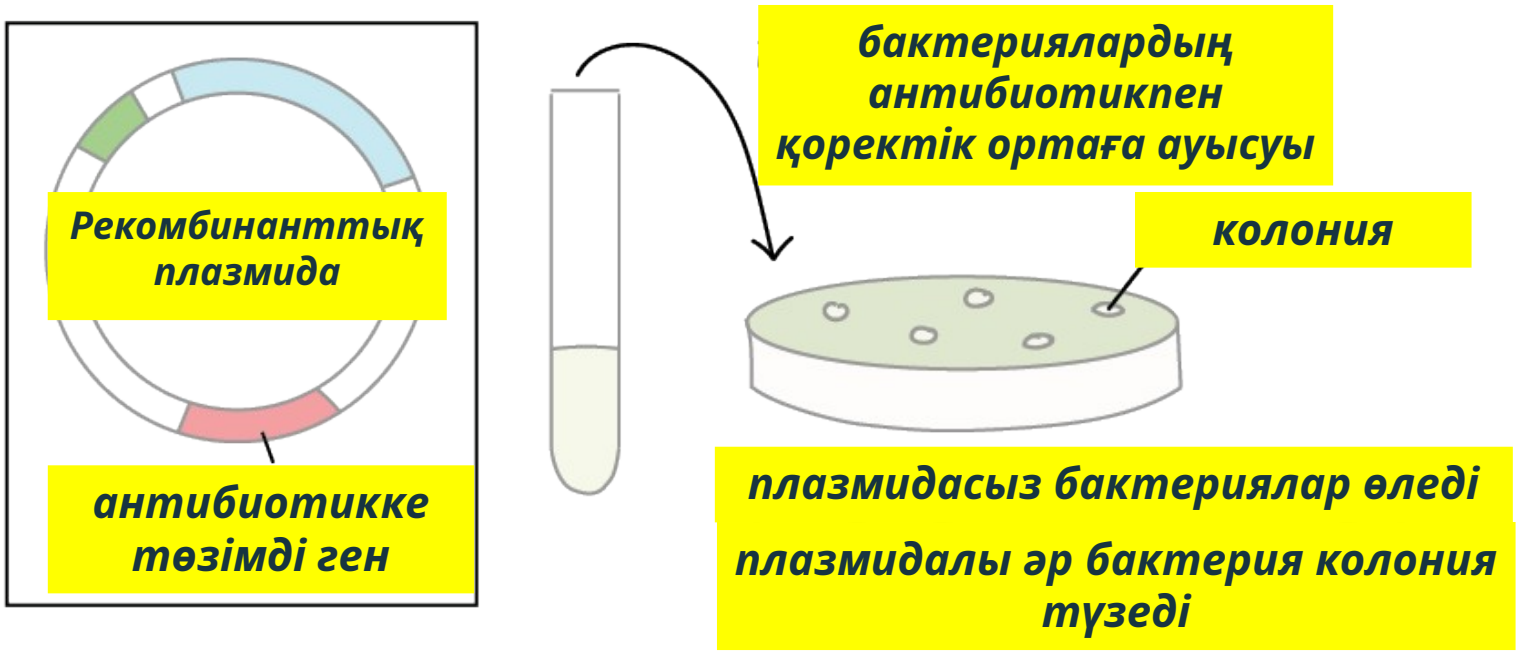

Restriction enzyme
GAATTC
CTTAAG
Enzyme cuts DNA
G
CTTAA
AATTC
G
Fragments have single-stranded overhangs
DNA ligase
G AATTC
CTTAA G
Fragments with matching overhangs base-pair and stick together
GAATTC
CTTAAG
DNA ligase seals the gaps


Плазмида
мақсатты ген, мысалы инсулин гені
рестриктазамен емдеу
ДНҚ лигаза арқылы байланыс
Рекомбинанттық плазмида

2. Бактериялардың трансформациясы және селекция

- Плазмидтер мен басқа ДНҚ бактерияларға енгізілуі мүмкін, мысалы, E. coli сияқты зиянсыз бактерия. Ол зертханаларда трансформация кезеңінде қолданылады. **Трансформация** кезінде арнайы дайындалған бактерия жасушалары соққы деп аталады (мысалы, күшті қыздыру), бұл оларды шетелдік ДНҚ сіңіруге итермелейді.


Байланыстыруға (лигирование) арналған фрагменттер
кейбір бактериялар плазмиданы ұстап алады
Жылу соққысы
Бактерия
кейбір бактериялар жоқ


Рекомбинанттық плазмида
антибиотикке төзімді ген
бактериялардың антибиотикпен қоректік ортаға ауысуы
колония
плазмидасыз бактериялар өледі
плазмидалы әр бактерия колония түзеді

3. Ақуыз өндірісі

