

# Медицинская микробиология, вирусология, иммунология

---

Под редакцией  
академика РАН В.В. Зверева,  
профессора М.Н. Бойченко

Учебник  
В 2 томах

2-е издание, переработанное и дополненное

Министерство образования и науки РФ

Рекомендовано ФГАУ «Федеральный институт развития образования»  
в качестве учебника для использования в учебном процессе  
образовательных организаций, реализующих программы высшего  
образования по специальностям 31.05.01 «Лечебное дело»,  
31.05.02 «Педиатрия», 32.05.01 «Медико-профилактическое дело»



Москва  
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»  
2019

# Медицинская микробиология, вирусология, иммунология

---

Под редакцией  
академика РАН В.В. Зверева,  
профессора М.Н. Бойченко

Учебник  
ТОМ 1

2-е издание, переработанное и дополненное



Москва  
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»  
2019

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторский коллектив .....	11
Список сокращений и условных обозначений .....	12
<b>ЧАСТЬ I. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ .....</b>	<b>13</b>
<b>Глава 1. Введение в микробиологию и иммунологию (В.Н. Царев) .....</b>	<b>15</b>
1.1. Предмет «Медицинская микробиология» .....	15
1.2. Задачи и методы медицинской микробиологии .....	17
1.3. Открытие и изучение мира микробов .....	19
Задания для самоподготовки (самоконтроля) .....	24
<b>Глава 2. Морфология и классификация микробов .....</b>	<b>25</b>
2.1. Систематика и номенклатура микробов (Е.П. Пашков, Л.И. Петрова) .....	25
2.2. Классификация и морфология бактерий (Е.П. Пашков, А.С. Быков, М.Н. Бойченко) .....	25
2.2.1. Морфологические формы бактерий .....	28
2.2.2. Структура бактериальной клетки .....	30
2.2.3. Особенности строения спирохет, риккетсий, хламидий, актиномицет и микоплазм .....	40
2.3. Строение и классификация грибов (А.С. Быков) .....	44
2.4. Строение и классификация простейших (А.С. Быков) .....	48
2.5. Строение и классификация вирусов (А.С. Быков) .....	53
Задания для самоподготовки (самоконтроля) .....	59
<b>Глава 3. Физиология микробов .....</b>	<b>61</b>
3.1. Физиология бактерий (М.Н. Бойченко, В.В. Тец) .....	61
3.1.1. Питание бактерий .....	61
3.1.2. Ферменты бактерий .....	67
3.1.3. Энергетический метаболизм .....	68
3.1.4. Конструктивный метаболизм .....	73
3.1.5. Транспорт веществ .....	76
3.1.6. Регуляция метаболизма у бактерий .....	83
3.1.7. Морфогенез бактерий и их сообществ .....	84
3.1.8. Вторичный метаболизм .....	85
3.1.9. Отношение к факторам окружающей среды .....	86
3.1.10. Рост и размножение .....	91
3.1.11. Условия культивирования бактерий .....	97
3.1.12. Поведение бактерий в бактериальных сообществах .....	98

3.2. Физиология вирусов ( <i>В.В. Зверев, А.С. Быков</i> ) . . . . .	101
3.2.1. Продуктивный тип взаимодействия вируса с клеткой. . . . .	102
3.2.2. Программируемая клеточная смерть (апоптоз) . . . . .	108
3.2.3. Непродуктивные инфекции . . . . .	109
3.3. Культивирование вирусов . . . . .	111
3.4. Бактериофаги (вирусы бактерий). . . . .	116
Задания для самоподготовки (самоконтроля). . . . .	123
<b>Глава 4. Экология микробов — микроэкология.</b> . . . .	125
4.1. Распространение микробов ( <i>А.С. Быков, Е.П. Пашков</i> ) . . . . .	125
4.1.1. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе . . . . .	125
4.1.2. Микрофлора почвы . . . . .	126
4.1.3. Микрофлора воды . . . . .	127
4.1.4. Микрофлора воздуха . . . . .	128
4.1.5. Микрофлора бытовых и медицинских объектов . . . . .	129
4.2. Микрофлора организма человека ( <i>Л.И. Кафарская, А.С. Быков</i> ) . . . . .	129
4.3. Уничтожение микробов в окружающей среде ( <i>В.Б. Сбойчаков</i> ) . . . . .	143
4.3.1. Дезинфекция . . . . .	143
4.3.2. Стерилизация . . . . .	145
4.3.3. Асептика и антисептика . . . . .	148
4.4. Санитарная микробиология ( <i>В.Б. Сбойчаков</i> ) . . . . .	150
4.4.1. Санитарно-микробиологическое исследование воды . . . . .	159
4.4.2. Санитарно-микробиологическое исследование почвы . . . . .	163
4.4.3. Исследование микробной обсемененности воздушной среды . . . . .	166
4.4.4. Санитарно-микробиологический контроль объектов продовольственного назначения . . . . .	167
Задания для самоподготовки (самоконтроля). . . . .	178
<b>Глава 5. Генетика микробов (<i>М.Н. Бойченко</i>)</b> . . . . .	181
5.1. Строение генома бактерий . . . . .	181
5.1.1. Бактериальная хромосома . . . . .	181
5.1.2. Плазмиды бактерий . . . . .	182
5.1.3. Подвижные генетические элементы . . . . .	184
5.1.4. Интегроны . . . . .	185
5.1.5. Острова патогенности . . . . .	187
5.1.6. Системы регуляции экспрессии генома. Защита от чужеродной дезоксирибонуклеиновой кислоты . . . . .	187

5.2. Мутации у бактерий . . . . .	188
5.3. Рекомбинация у бактерий . . . . .	190
5.3.1. Гомологичная рекомбинация. . . . .	191
5.3.2. Сайт-специфическая рекомбинация . . . . .	191
5.3.3. Незаконная, или репликативная, рекомбинация. . . . .	191
5.4. Передача генетической информации у бактерий . . . . .	192
5.4.1. Конъюгация. . . . .	192
5.4.2. Трансдукция . . . . .	194
5.4.3. Трансформация . . . . .	195
5.5. Особенности генетики вирусов . . . . .	197
5.6. Применение генетических методов в диагностике инфекционных болезней . . . . .	198
5.6.1. Методы, используемые для внутривидовой идентификации бактерий . . . . .	198
5.6.2. Методы, используемые для обнаружения микроба без выделения его в чистую культуру . . . . .	200
5.7. Основы генетической инженерии . . . . .	204
Задания для самоподготовки (самоконтроля). . . . .	207

**Глава 6. Антимикробные химиотерапевтические препараты (Л.И. Кафарская, Н.В. Давыдова, Н.В. Хорошко) . . . . .** 209

6.1. Антимикробные химиотерапевтические препараты. . . . .	209
6.1.1. Антибиотики . . . . .	211
6.1.2. Синтетические антимикробные химиотерапевтические препараты. . . . .	218
6.2. Механизмы действия антимикробных химиотерапевтических препаратов, активных в отношении клеточных форм микроорганизмов. . . . .	220
6.2.1. Ингибиторы синтеза и функций клеточной стенки бактерий. . . . .	221
6.2.2. Ингибиторы синтеза белка у бактерий. . . . .	222
6.2.3. Ингибиторы синтеза и функций нуклеиновых кислот . . . . .	223
6.2.4. Ингибиторы синтеза и функций цитоплазматической мембраны. . . . .	223
6.2.5. Побочное воздействие на микроорганизмы . . . . .	224
6.3. Лекарственная устойчивость бактерий . . . . .	224
6.3.1. Природная устойчивость . . . . .	224
6.3.2. Приобретенная устойчивость. . . . .	224
6.3.3. Генетические основы приобретенной резистентности. . . . .	225

6.3.4. Реализация приобретенной устойчивости . . . . .	226
6.4. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам . . . . .	228
6.5. Осложнения антимикробной химиотерапии со стороны макроорганизма . . . . .	229
6.6. Противовирусные химиотерапевтические препараты . . . . .	231
Задания для самоподготовки (самоконтроля). . . . .	233
<b>Глава 7. Учение об инфекции (О.В. Бухарин) . . . . .</b>	<b>235</b>
7.1. Инфекция. Формы инфекционного процесса. . . . .	235
7.2. Движущие силы инфекционного процесса . . . . .	241
7.3. Роль возбудителя в инфекционном процессе и его основные биологические характеристики . . . . .	242
7.3.1. Факторы вирулентности . . . . .	244
7.3.2. Патогенетические факторы возбудителя при инфекции. . . . .	248
7.3.3. Генетика вирулентности бактерий . . . . .	254
7.4. Роль макроорганизма в инфекционном процессе. . . . .	257
7.4.1. Анатомо-физиологические барьеры организма при инфекции . . . . .	260
7.5. Роль внешней среды в инфекционном процессе . . . . .	263
Задания для самоподготовки (самоконтроля). . . . .	265
<b>ЧАСТЬ II. ОБЩАЯ ИММУНОЛОГИЯ . . . . .</b>	<b>267</b>
<b>Глава 8. Учение об иммунитете и факторы врожденного иммунитета (И.И. Долгушин, О.А. Свитич). . . . .</b>	<b>269</b>
8.1. Введение в иммунологию . . . . .	269
8.1.1. Основные этапы развития иммунологии . . . . .	269
8.1.2. Виды иммунитета . . . . .	272
8.2. Врожденный иммунитет . . . . .	276
8.2.1. Факторы врожденного иммунитета . . . . .	277
8.2.2. Гуморальные факторы врожденного иммунитета . . . . .	282
8.2.3. Рецепторы врожденного иммунитета . . . . .	290
8.2.4. Клетки врожденного иммунитета . . . . .	293
Задания для самоподготовки (самоконтроля). . . . .	301
<b>Глава 9. Антигены и иммунная система человека (Ю.В. Несвижский) . . . . .</b>	<b>303</b>
9.1. Антигены . . . . .	303
9.1.1. Общие сведения . . . . .	303
9.1.2. Свойства антигенов . . . . .	304
9.1.3. Классификация антигенов . . . . .	308

9.1.4. Антигены организма человека . . . . .	311
9.1.5. Антигены микробов . . . . .	318
9.1.6. Процессы, происходящие с антигеном в макроорганизме . . .	321
9.2. Иммунная система человека . . . . .	322
9.2.1. Структурно-функциональные элементы иммунной системы . . . . .	322
9.2.2. Организация функционирования иммунной системы . .	342
Задания для самоподготовки (самоконтроля). . . . .	352
<b>Глава 10. Основные формы иммунного реагирования (Ю.В. Несвижский) . .</b>	<b>355</b>
10.1. Антитела и антителообразование . . . . .	355
10.1.1. Природа антител . . . . .	355
10.1.2. Молекулярное строение антител . . . . .	356
10.1.3. Структурно-функциональные особенности иммуноглобулинов различных классов . . . . .	358
10.1.4. Антигенность антител . . . . .	363
10.1.5. Механизм взаимодействия антитела с антигеном . . . . .	364
10.1.6. Свойства антител . . . . .	365
10.1.7. Генетика иммуноглобулинов . . . . .	367
10.1.8. Динамика антителопродукции. . . . .	368
10.1.9. Теории разнообразия антител . . . . .	371
10.2. Иммунный фагоцитоз . . . . .	373
10.3. Опосредованный клетками киллинг . . . . .	373
10.3.1. Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность. . . . .	374
10.3.2. Антителонезависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность. . . . .	375
10.4. Реакции гиперчувствительности . . . . .	376
10.5. Иммунологическая память . . . . .	381
10.6. Иммунологическая толерантность. . . . .	382
Задания для самоподготовки (самоконтроля). . . . .	385
<b>Глава 11. Особенности иммунитета при различных локализациях и состояниях (Ю.В. Несвижский) . . . . .</b>	<b>387</b>
11.1. Особенности местного иммунитета. . . . .	387
11.1.1. Иммунитет кожи . . . . .	387
11.1.2. Иммунитет слизистых оболочек . . . . .	389
11.2. Особенности иммунитета при различных состояниях . . . . .	392
11.2.1. Особенности иммунитета при бактериальных инфекциях . . . . .	392

11.2.2. Особенности противовирусного иммунитета . . . . .	393
11.2.3. Особенности противогрибкового иммунитета . . . . .	394
11.2.4. Особенности иммунитета при протозойных инвазиях . . .	394
11.2.5. Особенности противоглистного иммунитета . . . . .	394
11.2.6. Трансплантационный иммунитет . . . . .	395
11.2.7. Иммунитет против новообразований . . . . .	396
11.2.8. Иммунология беременности . . . . .	397
11.3. Иммунный статус и его оценка. . . . .	397
11.4. Патология иммунной системы . . . . .	399
11.4.1. Иммунодефициты . . . . .	399
11.4.2. Аутоиммунные болезни. . . . .	402
11.4.3. Аллергические болезни . . . . .	402
11.4.4. Лимфопролиферативные заболевания. . . . .	406
11.5. Имунокоррекция . . . . .	406
Задания для самоподготовки (самоконтроля). . . . .	407
<b>Глава 12. Иммунодиагностические реакции (Ю.В. Несвижский) . . . . .</b>	<b>409</b>
12.1. Реакции антиген–антитело и их применение . . . . .	409
12.2. Реакция агглютинации. . . . .	410
12.3. Реакция преципитации . . . . .	412
12.4. Реакции с участием комплемента . . . . .	414
12.5. Реакции с использованием меченых антител или антигенов . . . . .	416
12.6. Реакция нейтрализации . . . . .	419
<b>Глава 13. Иммунопрофилактика и иммунотерапия (В.В. Зверев, Л.И. Петрова) . . . . .</b>	<b>421</b>
13.1. Сущность и место иммунопрофилактики и иммунотерапии в медицинской практике . . . . .	421
13.2. Иммунобиологические препараты. . . . .	422
13.2.1. Общая характеристика и классификация . . . . .	422
13.2.2. Вакцины. . . . .	423
13.2.3. Бактериофаги . . . . .	429
13.2.4. Пробиотики. . . . .	429
13.2.5. Иммунобиологические препараты на основе специфических антител. . . . .	429
Задания для самоподготовки (самоконтроля) (к главам 12, 13). . .	432
<b>Ответы к тестам . . . . .</b>	<b>434</b>
<b>Предметный указатель . . . . .</b>	<b>436</b>

# Глава 5

## ГЕНЕТИКА МИКРОБОВ

### 5.1. СТРОЕНИЕ ГЕНОМА БАКТЕРИЙ

Наследственная информация хранится у бактерий в форме последовательности нуклеотидов ДНК, которые определяют последовательность аминокислот в белке (строение ДНК изложено в разделе 3.1 и показано на рис. 3.1).

Каждому белку соответствует свой ген, то есть дискретный участок на ДНК, отличающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов.

Совокупность всех генов бактерий называется *геномом*. Размеры генома определяются количеством нуклеотидных пар оснований (н.п.). Геном бактерий имеет гаплоидный набор генов. Бактериальный геном состоит из генетических элементов, способных к самостоятельной репликации (воспроизведению), то есть репликонов. Репликонами являются бактериальная хромосома и плазмиды.

#### 5.1.1. Бактериальная хромосома

Бактериальная хромосома представлена одной двухцепочечной молекулой ДНК. Размеры бактериальной хромосомы у различных представителей домена *Procaryotae* варьируют. Например, у *E. coli* бактериальная хромосома содержит  $4,7 \times 10^6$  н.п. На ней располагается около 4300 генов. Для сравнения: размеры ДНК вирусов составляют порядка  $10^3$  н.п., дрожжей —  $10^7$  н.п., а суммарная длина хромосомных ДНК человека составляет  $3 \times 10^9$  н.п.

Бактериальная хромосома у *E. coli* представлена одной кольцевой молекулой ДНК. Одну кольцевую хромосому имеет также ряд других бактерий: *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*. Однако такое строение генома не является универсальным. У некоторых бактерий,

в частности у *V. cholerae*, *L. interrhogans*, *Brucella spp.*, имеется две кольцевых хромосомы. У ряда других бактерий (*B. burgdorferi*, *Streptomyces spp.*) обнаружены линейные хромосомы.

Бактериальная хромосома формирует компактный нуклеоид бактериальной клетки. Она кодирует жизненно важные для бактериальной клетки функции.

### 5.1.2. Плазмиды бактерий

**Плазмиды** представляют собой двухцепочечные молекулы ДНК размером от  $10^3$  до  $10^6$  н.п. Они могут быть кольцевой формой и линейными. Плазмиды кодируют не основные для жизнедеятельности бактериальной клетки функции, но придающие бактерии преимущества при попадании в неблагоприятные условия существования.

Среди фенотипических признаков, сообщаемых бактериальной клетке плазмидами, можно выделить следующие:

- устойчивость к антибиотикам;
- продукцию факторов патогенности;
- способность к синтезу антибиотических веществ;
- образование колицинов;
- расщепление сложных органических веществ;
- образование ферментов рестрикции и модификации. Репликация плазмид происходит независимо от хромосомы с участием того же набора ферментов, который осуществляет репликацию бактериальной хромосомы (см. раздел 3.1.7 и рис. 3.5).

Некоторые плазмиды находятся под строгим контролем. Это означает, что их репликация сопряжена с репликацией хромосомы так, что в каждой бактериальной клетке присутствует одна или, по крайней мере, несколько копий плазмид.

Число копий плазмид, находящихся под слабым контролем, может достигать от 10 до 200 на бактериальную клетку.

Для характеристики плазмидных репликаонов их принято разбивать на группы совместимости. Несовместимость плазмид связана с неспособностью двух плазмид стабильно сохраняться в одной и той же бактериальной клетке. Несовместимость свойственна тем плазмидам, которые обладают высоким сходством репликаонов, поддержание которых в клетке регулируется одним и тем же механизмом.

Плазмиды, которые могут обратимо встраиваться в бактериальную хромосому и функционировать в виде единого репликаона, называются «интегративные», или «эписомы».

Плазмиды, способные передаваться из одной клетки в другую, иногда даже принадлежащую иной таксономической единице, называются «трансмиссивные» («конъюгативные»). Трансмиссивность присуща лишь крупным плазмидам, имеющим *tra*-оперон, в который объединены гены, ответственные за перенос плазмиды. Эти гены кодируют половые пили, которые образуют мостик с клеткой, не содержащей трансмиссивную плазмиду, по которой плазмидная ДНК передается в новую клетку. Этот процесс называется *конъюгацией* (подробно он будет рассмотрен в разделе 5.4.1). Бактерии, несущие трансмиссивные плазмиды, чувствительны к «мужским» нитевидным бактериофагам.

Мелкие плазмиды, не несущие *tra*-гены, не могут передаваться сами по себе, но способны к передаче в присутствии трансмиссивных плазмид, используя их аппарат конъюгации. Такие плазмиды называют «мобилизуемые», а сам процесс — «мобилизация» нетрансмиссивной плазмиды.

Особое значение в медицинской микробиологии имеют плазмиды, обеспечивающие устойчивость бактерий к антибиотикам, которые получили название R-плазмид (от англ. *resistance* — противодействие), и плазмиды, обеспечивающие продукцию факторов патогенности, способствующих развитию инфекционного процесса в макроорганизме. R-плазмиды содержат гены, детерминирующие синтез ферментов, разрушающих антибактериальные препараты (например, антибиотики). В результате наличия такой плазмиды бактериальная клетка становится устойчивой (резистентной) к действию целой группы лекарственных веществ, а иногда и к нескольким препаратам. Многие R-плазмиды являются трансмиссивными, распространяясь в популяции бактерий, делая ее недоступной к воздействию антибактериальных препаратов. Бактериальные штаммы, несущие R-плазмиды, очень часто являются этиологическими агентами внутрибольничных инфекций.

Плазмиды, детерминирующие синтез факторов патогенности, в настоящее время обнаружены у многих бактерий, являющихся возбудителями инфекционных заболеваний человека. Патогенность возбудителей шигеллезов, иерсиниозов, чумы, сибирской язвы, иксодового боррелиоза, кишечных эшерихиозов связана с наличием у них и функционированием плазмид патогенности.

Некоторые бактериальные клетки содержат плазмиды, детерминирующие синтез бактерицидных по отношению к другим бактериям веществ. Например, некоторые *E. coli* владеют *Col*-плазмидой, определяющей синтез колицинов, обладающих микробоцидной активностью

по отношению к колиформным бактериям. Бактериальные клетки, несущие такие плазмиды, обладают преимуществами при заселении экологических ниш.

Плазмиды используются в практической деятельности человека, в частности в генной инженерии при конструировании специальных рекомбинантных бактериальных штаммов, вырабатывающих в большом количестве биологически активные вещества (см. гл. 6).

### 5.1.3. Подвижные генетические элементы

Подвижные генетические элементы обнаружены в составе бактериального генома как в бактериальной хромосоме, так и в плаزمидях. К подвижным генетическим элементам относятся:

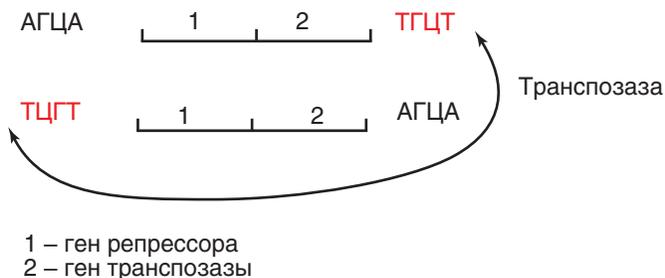
- вставочные последовательности;
- транспозоны.

**Вставочные (инсерционные) последовательности** — IS-элементы (от англ. *insertion sequences*) — это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного участка репликона в другой, а также между репликонами. IS-элементы имеют размеры 1000 н.п. и содержат лишь те гены, которые необходимы для их собственного перемещения — транспозиции: ген, кодирующий фермент транспозазу, обеспечивающую процесс исключения IS-элемента из ДНК и его интеграцию в новый локус, и ген, детерминирующий синтез репрессора, который регулирует весь процесс перемещения. Эти гены по флангам окружены *инвертированными повторами*, которые служат сайтами рекомбинации, сопровождающей перемещения вставочной последовательности при участии транспозиционных ферментов, в частности транспозаз.

Инвертированные повторы узнает фермент транспозазы (рис. 5.1), которая осуществляет одноцепочечные разрывы цепей ДНК, расположенных по обе стороны от подвижного элемента. Оригинальная копия IS-элемента остается на прежнем месте, а ее реплицированный дубликат перемещается на новый участок.

Перемещение подвижных генетических элементов принято называть репликативной или незаконной рекомбинацией. Однако, в отличие от бактериальной хромосомы и плазмид, подвижные генетические элементы не являются самостоятельными репликонами, так как их репликация — составной элемент репликации ДНК репликона, в составе которого они находятся.

IS-элементы различаются по размеру, типу и количеству инвертированных повторов.



**Рис. 5.1.** Схема строения IS-элемента: 1 — ген репрессора; 2 — ген транспозазы (стрелками указаны места разрывов)

**Транспозоны** — это сегменты ДНК, обладающие теми же свойствами, что и IS-элементы, но имеющие в своем составе структурные гены, то есть гены, обеспечивающие синтез молекул, обладающих специфическим биологическим свойством, например токсичностью, или обеспечивающих устойчивость к антибиотикам.

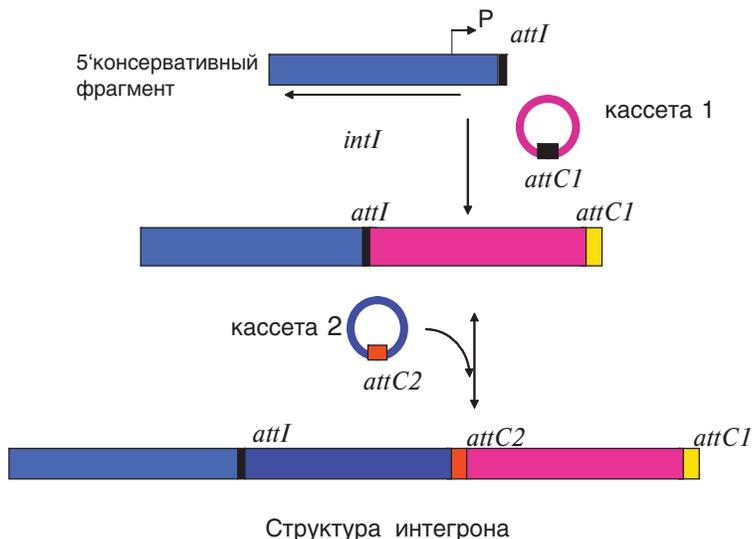
Перемещение подвижных генетических элементов по репликону или между репликонами вызывает:

- инактивацию генов тех участков ДНК, куда они, переместившись, встраиваются;
- образование повреждений генетического материала;
- слияние репликонов, то есть встраивание плазмиды в хромосому;
- распространение генов в популяции бактерий, что может приводить к изменению биологических свойств популяции, смене возбудителей инфекционных заболеваний, а также способствует эволюционным процессам среди микробов.

#### 5.1.4. Интегроны

Помимо плазмид и подвижных генетических элементов, у бактерий существует еще одна система, способствующая распространению генов, — система интегронов. **Интегроны** являются системой захвата малых элементов ДНК, называемых «генные кассеты», посредством сайт-специфической рекомбинации и их экспрессии.

Интегрон состоит из консервативного участка, расположенного на 5'-конце, который содержит ген, кодирующий фермент интегразу, сайт рекомбинации *att* и промотор Р (рис. 5.2).



**Рис. 5.2.** Строение интегрона: *attI* — сайт рекомбинации интегрона; *intI* — ген, кодирующий интегразу; P — промотор; *attC* — сайты рекомбинации кассет антибиотикорезистентности

Кассета может существовать в двух формах: линейной, когда кассета интегрирована в интегрон, и в виде маленькой кольцевой двухцепочечной ДНК. Кассеты имеют размеры от 260 до 1500 н.п. Они содержат преимущественно 1 ген антибиотикорезистентности и сайт рекомбинации, состоящий из 59 пар оснований, расположенный на 3'-конце.

Интеграна осуществляет рекомбинацию между участком 59 н.п. кассеты и участком *att* интегрона, включая гены кассеты в интегрон в такой ориентации, чтобы они могли экспрессироваться с промотора P интегрона. Интеграция кассет в интегрон является обратимым процессом. Интегроны могут располагаться как на хромосоме, так и на плаزمиде. Поэтому возможно перемещение кассет с одного интегрона на другой как в пределах одной бактериальной клетки, так и по популяции бактерий. Один интегрон может захватывать несколько кассет антибиотикорезистентности. Изменения бактериального генома, а следовательно, и свойств бактерий могут происходить в результате мутаций и рекомбинаций.

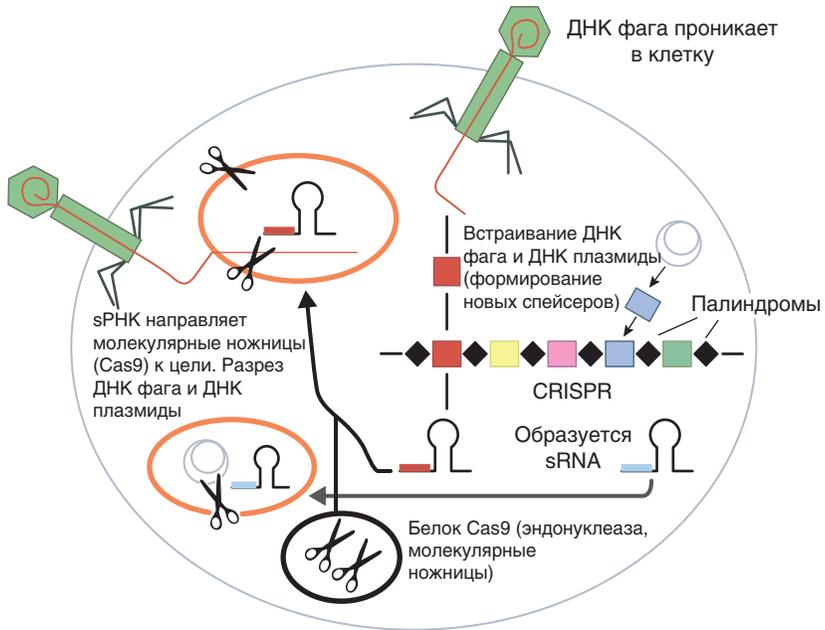
### 5.1.5. Острова патогенности

В геноме патогенных бактерий (см. гл. 7) имеются участки ДНК протяженностью не менее 10 000 пар нуклеотидов, которые отличаются от основного генома составом G–C-пар нуклеотидных оснований. Эти участки ответственны за синтез факторов патогенности, которые обеспечивают развитие патологического процесса в организме хозяина, поэтому были названы **островами патогенности**. Острова патогенности обычно по флангам имеют прямые повторы последовательностей ДНК или IS-элементы. Некоторые имеют в своем составе участки, характерные для сайтов интеграции, расположенных вблизи генов тРНК. Большинство островов патогенности локализовано на хромосоме бактерий (*Salmonella*), но также они могут находиться в составе плазмид (*Shigella*) и фаговых ДНК (*V. cholerae* O1, O139).

### 5.1.6. Системы регуляции экспрессии генома.

#### Защита от чужеродной дезоксирибонуклеиновой кислоты

Установлено, что в процессе регуляции генной активности принимают участие малые, длиной 50–200 нуклеотидов sРНК (от англ. *small* — маленький). Они реализуют свою регуляторную функцию или непосредственно связываются с комплементарной последовательностью иРНК, вызывая изменение ее вторичной структуры, способствуя тем самым процессу трансляции или связываясь с белком, обозначенным как Cas9, обладающим эндонуклеазной активностью. В последнем случае комплекс sРНК–Cas9 соединяется с комплементарным участком проникшей в клетку ДНК, уничтожая ее. Этим механизмом осуществляется так называемый *адаптивный иммунитет* бактериальной клетки, к повторному проникновению в нее умеренного фага, плазмиды или транспозонов. Реализация этого происходит с участием РНК–Cas9 через **CRISPR** (*clustered regularly interspaced short palindromic repeated*), короткие палиндромные повторы, которые разделены вставками, представляющие чужеродный генетический материал (ДНК умеренных фагов и плазмид). При повторном попадании в бактериальную клетку ДНК фага или плазмиды sРНК транскрибируются с **CRISPR**, соединяются с Cas9 и этим комплексом соединяются с комплементарным участком внедренной ДНК, разрушая ее (рис. 5.3).



**Рис. 5.3.** Иммуитет к повторному проникновению гомологичной плазмиды и умеренного бактериофага в бактериальную клетку с участием CRISPR (схема)

## 5.2. МУТАЦИИ У БАКТЕРИЙ

**Мутации** — это изменения в последовательности отдельных нуклеотидов ДНК, которые фенотипически ведут к таким проявлениям, как изменения морфологии бактериальной клетки, возникновение потребностей в факторах роста, например в аминокислотах, витаминах, то есть ауксотрофности, к устойчивости к антибиотикам, изменению чувствительности к температуре, снижению вирулентности (аттенуация) и т.д.

Мутация, приводящая к потере функции, называется прямой мутацией. У мутантов может произойти восстановление исходных свойств, то есть реверсия (от англ. *reverse* — обратный). Если происходит восстановление исходного генотипа, то мутация, восстанавливающая генотип и фенотип, называется обратной или прямой *реверсией*. Если мутация восстанавливает фенотип, не восстанавливая генотип, то такая мутация имеет название «супрессорная». Супрессорные мутации могут возникать

как в пределах того самого гена, в котором произошла первичная мутация, так и в других генах, или могут быть связаны с мутациями в тРНК.

По протяженности изменений повреждения ДНК различают мутации точечные, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов, и протяженные, или аберрации. В последнем случае могут наблюдаться выпадения нескольких пар нуклеотидов, которые называются «делеция», добавление нуклеотидных пар, то есть *дупликация*, перемещения фрагментов хромосомы, *транслокации* и перестановки нуклеотидных пар — *инверсии*.

Мутации могут быть:

- спонтанными, то есть возникающими самопроизвольно, без воздействия извне;
- индуцированными.

**Точечные спонтанные мутации** возникают в результате ошибок при репликации ДНК, что связано с таутомерным перемещением электронов в азотистых основаниях.

Тимин (Т), например, обычно находится в кетоформе, в которой он способен образовывать водородные связи с аденином (А). Однако если тимин во время спаривания оснований при репликации ДНК переходит в енольную форму, то он спаривается с гуанином. В результате в новой молекуле ДНК на месте, где раньше стояла пара А–Т, появляется пара Г–Ц.

Спонтанные хромосомные аберрации возникают вследствие перемещения подвижных генетических элементов.

**Индукцированные мутации** появляются под влиянием внешних факторов, которые называются «мутагены». Мутагены бывают физическими (ультрафиолетовые лучи,  $\gamma$ -радиация), химическими (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, азотистая кислота и ее аналоги и другие соединения) и биологическими — транспозоны.

Аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, например 2-аминопурин, 5-бромурацил, включаются в нуклеотиды, а следовательно, и в ДНК, но при этом они значительно чаще в силу таутомерных превращений спариваются с «неправильными» партнерами, в результате вызывая замену пурина другим пурином (А–Г) или пиримидина другим пиримидином (Т–Ц). Замена пурина другим пурином, а пиримидина другим пиримидином называется «транзигация».

Азотистая кислота и ее аналоги вызывают дезаминирование азотистых оснований, результатом чего являются ошибки при спаривании и,

как следствие, возникновение транзиции. Аденин в результате дезаминирования превращается в гипоксантин, который спаривается с цитозиним, что приводит к возникновению транзиции АТ–ГЦ. Гуанин же при дезаминировании превращается в ксантин, который по-прежнему спаривается с цитозиним; таким образом, дезаминирование гуанина не сопровождается мутацией.

Акридин и профлавин внедряются между соседними основаниями цепи ДНК, вдвое увеличивая расстояние между ними. Это пространственное изменение при репликации может привести как к утрате нуклеотида, так и к включению дополнительной нуклеотидной пары, что приводит к *сдвигу рамки считывания* тРНК. Начиная с того места, где произошло выпадение или включение нуклеотида, информация считывается неправильно.

Ультрафиолетовое облучение затрагивает преимущественно пиримидиновые основания, при этом два соседних остатка тимина ДНК могут оказаться ковалентно связанными.

На бактериях, подвергнутых ультрафиолетовому облучению, было показано, что повреждения, вызванные облучением в бактериальных ДНК, могут частично исправляться благодаря наличию *репарационных* систем. У различных бактерий имеется несколько типов репарационных систем. Один тип репарации протекает на свету, он связан с деятельностью фотореактивирующегося фермента, который расщепляет тиминовый димер. При темновой репарации дефектные участки цепи ДНК удаляются и образовавшаяся брешь достраивается с помощью ДНК-полимеразы на матрице сохранившейся цепи и соединяется с цепью лигазой.

### 5.3. РЕКОМБИНАЦИЯ У БАКТЕРИЙ

**Генетическая рекомбинация** — это взаимодействие между двумя ДНК, обладающими различными генотипами, которое приводит к образованию рекомбинантной ДНК, сочетающей гены обоих родителей.

Особенности рекомбинации у бактерий определяет отсутствие полового размножения и мейоза, в процессе которых у высших организмов происходят рекомбинация, гаплоидный набор генов. В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический материал, и клетки-реципиенты, которые воспринимают его. В клетку-реципиент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки-донора, что приводит к формированию неполной

зиготы — *мерозиготы*. В результате рекомбинации в мерозиготе образуется только один рекомбинант, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента, с включенным в него фрагментом хромосомы донора. Реципрокные рекомбинанты не образуются.

По молекулярному механизму генетическая рекомбинация у бактерий делится:

- на гомологичную;
- сайт-специфическую;
- незаконную.

### 5.3.1. Гомологичная рекомбинация

При **гомологичной рекомбинации** в процессе разрыва и воссоединения ДНК происходит обмен между участками ДНК, обладающими высокой степенью гомологии. Процесс гомологичной рекомбинации находится под контролем генов, объединенных в *REC*-систему, состоящую из генов *recA*, *B*, *C*, *D*. Продукты этих генов производят расплетание нитей ДНК и их переориентацию с образованием полухиазмы, структуры Холлидея, а также разрезают структуру Холлидея для завершения процесса рекомбинации.

### 5.3.2. Сайт-специфическая рекомбинация

Этот тип рекомбинации не зависит от функционирования генов *recA*, *B*, *C*, *D*, не требует протяжных участков гомологии ДНК, но для его протекания необходимы строго определенные последовательности ДНК и специальный ферментативный аппарат, специфичные для каждого конкретного случая. Примером этого типа рекомбинации является встраивание плазмиды в хромосому бактерий, которое происходит между идентичными IS-элементами хромосомы и плазмиды, интеграция ДНК фага лямбда в хромосому *E. coli*. Сайт-специфическая рекомбинация, происходящая в пределах одного репликона, участвует также в переключении активности генов. Например, у сальмонелл следствием этого процесса являются фазовые вариации жгутикового H-антигена.

### 5.3.3. Незаконная, или репликативная, рекомбинация

Незаконная, или репликативная, рекомбинация не зависит от функционирования генов *recA*, *B*, *C*, *D*. Примером ее является транспозиция

подвижных генетических элементов по репликону или между репликонами, при этом, как уже было отмечено в разделе 5.1.3, транспозиция подвижного генетического элемента сопровождается репликацией ДНК.

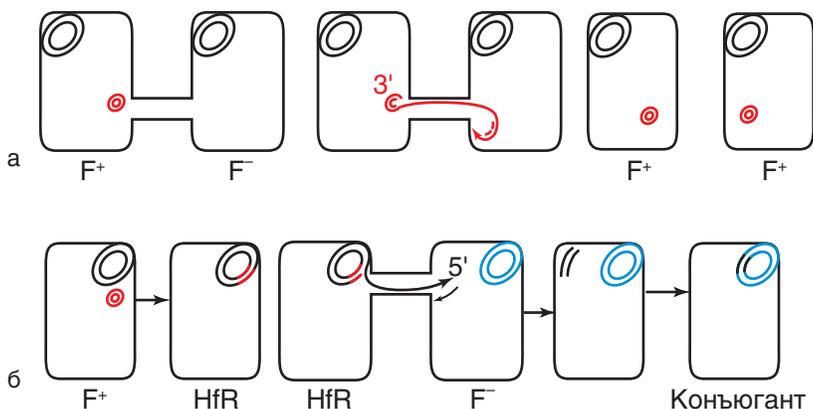
Рекомбинация является конечным этапом передачи генетического материала между бактериями, которая осуществляется тремя механизмами: конъюгацией (при контакте бактерий, одна из которых несет конъюгативную плазмиду), трансдукцией (с помощью бактериофага), трансформацией (с помощью высокополимеризованной ДНК).

## 5.4. ПЕРЕДАЧА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У БАКТЕРИЙ

### 5.4.1. Конъюгация

Передача генетического материала от клетки-донора в клетку-реципиент путем непосредственного контакта клеток называется «конъюгация», впервые она была обнаружена Дж. Ледербергом и Э. Тейтумом в 1946 г.

Необходимым условием для конъюгации является наличие в клетке-доноре трансмиссивной плазмиды. Трансмиссивные плазмиды кодируют секреторную систему IV типа (см. гл. 3), аппарат которой формирует пилу, образующую конъюгационную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по ней плазмидная ДНК передается в новую клетку. Механизм передачи плазмидной ДНК из клетки в клетку заключается в том, что специальный белок, кодируемый *tra*-опероном, узнает определенную последовательность в ДНК плазмиды (называемую от англ. *origin* — начало), вносит в эту последовательность одноцепочечный разрыв и ковалентно связывается с 5'-концом. Затем цепь ДНК, с которой связан белок, переносится в клетку-реципиент, а неразорванная комплементарная цепь остается в клетке-доноре. Клеточный аппарат синтеза ДНК достраивает одиночные цепи и в доноре, и в реципиенте до двухцепочечной структуры. Белок, связанный с 5'-концом перенесенной цепи, способствует замыканию плазмиды в реципиентной клетке в кольцо. Этот процесс представлен на рис. 5.4, на примере переноса в реципиентную клетку плазмиды F (от англ. *fertility* — плодovitость), которая является как трансмиссивной, так и интегративной плазмидой. Клетки-доноры, обладающие F-фактором, обозначаются



**Рис. 5.4.** Схема конъюгации у бактерий: а — передача F-плазмиды из F<sup>+</sup>- в F<sup>-</sup>-клетку; б — передача бактериальной хромосомы Hfr × F

как F<sup>+</sup>-клетки, а клетки-реципиенты, не имеющие F-фактора, обозначаются как F<sup>-</sup>-клетки. Если F-фактор находится в клетке-доноре в автономном состоянии, то в результате скрещивания F<sup>+</sup> × F<sup>-</sup> клетка-реципиент приобретает донорские свойства.

Если F-фактор или другая трансмиссивная плаزمида встраиваются в хромосому клетки-донора, то плазмиды и хромосома начинают функционировать в виде единого трансмиссивного репликона, что делает возможным перенос бактериальных генов в бесплазмидную клетку-реципиент, то есть происходит процесс конъюгации. Штаммы, в которых плазмиды находятся в интегрированном состоянии, переносят свои хромосомные гены бесплазмидным клеткам с высокой частотой и поэтому называются Hfr (от англ. *high frequency of recombination* — высокая частота рекомбинации) (см. рис. 5.4, б).

Процесс переноса хромосомных генов в случае скрещивания Hfr × F<sup>-</sup> всегда начинается с расщепления ДНК в одной и той же точке — в месте интеграции F-фактора или другой трансмиссивной плазмиды. Одна нить донорской ДНК передается через конъюгационный мостик в реципиентную клетку. Процесс сопровождается достраиванием комплементарной нити до образования двунитевой структуры. Перенос хромосомных генов при конъюгации всегда имеет одинаковую направленность, противоположную встроенной плазмиде. Сама трансмиссивная плазмиды передается последней. Переданная в реципиентную клетку и достроенная до двунитевой структуры нить ДНК донора рекомбинирует

с гомологичным участком реципиентной ДНК с образованием стабильной генетической структуры. Из-за хрупкости конъюгационного мостика половой фактор редко передается в клетку-реципиент, поэтому образовавшийся рекомбинант донорскими функциями, как правило, не обладает.

Вследствие направленности передачи генов конъюгация используется для картирования генома бактерий и построения генетической карты.

## 5.4.2. Трансдукция

**Трансдукцией** называют передачу бактериальной ДНК посредством бактериофага. Этот процесс был открыт в 1951 г. Н. Циндером и Дж. Ледербергом. В процессе репликации фага внутри бактерий (см. раздел 3.3) фрагмент бактериальной ДНК проникает в фаговую частицу и переносится в реципиентную бактерию во время фаговой инфекции.

Существует два типа трансдукции.

1. *Общая трансдукция* — перенос бактериофагом сегмента любой части бактериальной хромосомы, происходит вследствие того, что в процессе фаговой инфекции бактериальная ДНК фрагментируется, и фрагмент бактериальной ДНК того же размера, что и фаговая ДНК, проникает в фаговую головку, формируя дефектную фаговую частицу. Этот процесс происходит с частотой приблизительно 1 на 1000 фаговых частиц (рис. 5.5, а). При инфицировании клетки-реципиента дефектной фаговой частицей ДНК клетки-донора «впрыскивается» в нее и рекомбинирует гомологичной рекомбинацией с гомологичным участком хромосомы-реципиента с образованием стабильного рекомбинанта. Этим типом трансдукции обладают  $\beta$ -фаги.
2. *Специфическая трансдукция* наблюдается в том случае, когда фаговая ДНК интегрирует в бактериальную хромосому с образованием профага. В процессе исключения ДНК-фага из бактериальной хромосомы в результате случайного процесса захватывается прилегающий к месту включения фаговой ДНК фрагмент бактериальной хромосомы, становясь дефектным фагом (рис. 5.5, б). Поскольку большинство умеренных бактериофагов интегрирует в бактериальную хромосому в специфических участках, для таких бактериофагов характерен перенос в клетку-реципиент определенного участка бактериальной ДНК клетки-донора. ДНК дефектного фага

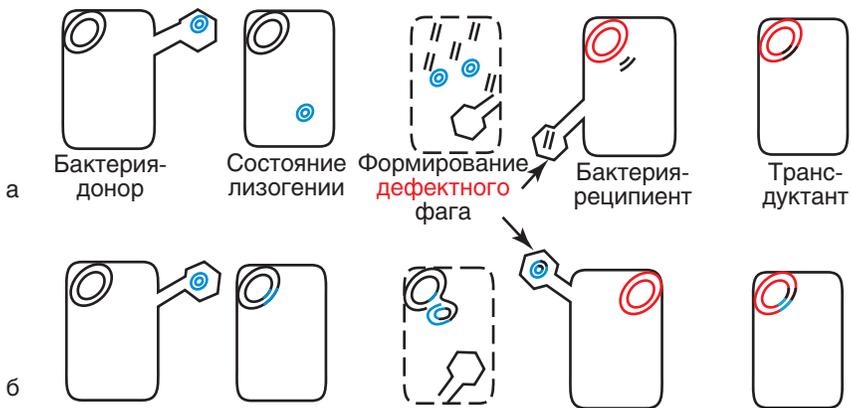


Рис. 5.5. Схема трандукции: а — неспецифическая (общая); б — специфическая

рекомбинирует с ДНК клетки-реципиента сайт-специфической рекомбинацией. Рекомбинант становится меродиплоидом по привнесённому гену. В частности, бактериофаг передает специфической трандукцией *gal-ген* у *E. coli*.

### 5.4.3. Трансформация

Феномен **трансформации** впервые был описан в 1928 г. Ф. Гриффитсом, обнаружившим превращение бескапсульного R-штамма пневмококков (*Streptococcus pneumoniae*) в штамм, образующий капсулу S-формы. Гриффитс ввел мышам одновременно небольшое количество авирулентных R-клеток и убитых нагреванием S-клеток. R-клетки были получены от штамма, капсульное вещество которого принадлежало к типу S II, а убитые нагреванием S-штаммы — к типу S III. Из крови погибших мышей были выделены вирулентные пневмококки с капсулой S III.

В 1944 г. О. Эвери, К. Мак-Леод, М. Мак-Карти установили природу трансформирующего фактора, показав, что ДНК, экстрагированная из инкапсулированных пневмококков, может трансформировать некапсулированные пневмококки в инкапсулированную форму. Таким образом, было доказано, что именно ДНК является носителем генетической информации.

Процесс трансформации может самопроизвольно происходить в природе у некоторых видов бактерий *B. subtilis*, *H. influenzae*,

*S. pneumoniae*, когда ДНК, выделенная из погибших клеток, захватывается реципиентными клетками. Процесс трансформации зависит от компетентности клетки-реципиента и состояния донорской трансформирующей ДНК.

*Компетентность* — это способность бактериальной клетки поглощать ДНК. Она зависит от присутствия особых белков в клеточной мембране, обладающих специфическим аффинитетом к ДНК. Состояние компетентности у грамположительных бактерий связано с определенными фазами кривой роста. Состояние компетентности у грамотрицательных бактерий приходится создавать искусственным путем, подвергая бактерии температурному или электрошоку.

Трансформирующей активностью обладает только двуниевая высокоспирализованная молекула ДНК. Это связано с тем, что в клетку-реципиент проникает только одна нить ДНК, тогда как другая — на клеточной мембране — подвергается деградации с высвобождением энергии, которая необходима для проникновения в клетку сохранившейся нити. Высокая молекулярная масса трансформирующей ДНК увеличивает шанс рекомбинации, так как внутри клетки трансформирующая нить ДНК подвергается воздействию эндонуклеаз. Интеграция с хромосомой требует наличия гомологичных с ней участков у трансформирующей ДНК. Рекомбинация происходит на одной нити, в результате чего образуется гетеродуплексная молекула, одна нить которой имеет генотип реципиента, а другая — рекомбинантный генотип. Рекомбинантные трансформанты формируются только после цикла репликации (рис. 5.6).

В настоящее время этот метод является основным методом генной инженерии, используемым при конструировании рекомбинантных штаммов с заданным геномом.

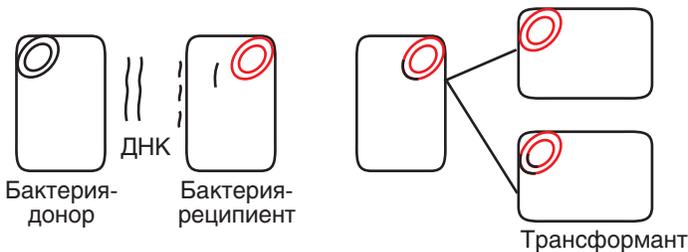


Рис. 5.6. Схема трансформации

## 5.5. ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИКИ ВИРУСОВ

Особенность строения вирусного генома заключается в том, что наследственная информация может быть записана как на ДНК, так и на РНК в зависимости от типа вируса.

Мутации у вирусов могут возникать спонтанно в процессе репликации нуклеиновой кислоты вируса, а также под влиянием тех же внешних факторов и мутагенов, что и у бактерий.

Фенотипически мутации вирусного генома проявляются изменениями антигенной структуры, неспособностью вызывать продуктивную инфекцию в чувствительной клетке, чувствительностью продуктивного цикла к температуре, а также изменением формы и размера бляшек, которые образуют вирусы в культуре клеток под агаровым покрытием (см. раздел 3.2).

Свойства вирусов могут изменяться при одновременном заражении несколькими вирусами чувствительной клетки, причем изменения свойств при таких условиях могут происходить в результате как обмена между материалами нуклеиновых кислот, принадлежащих разным вирусам (генетическая рекомбинация и генетическая реактивация), так и процессов, не сопровождаемых обменом генетического материала (комплементация и фенотипическое смешивание).

*Генетическая рекомбинация* встречается чаще у ДНК-содержащих вирусов. Среди РНК-содержащих вирусов она наблюдается у тех из них, которые обладают фрагментированным геномом, например у вируса гриппа. При рекомбинации происходит обмен между гомологичными участками генома.

*Генетическая реактивация* наблюдается между геномами родственных вирусов, имеющих мутации в разных генах. В результате перераспределения генетического материала формируется полноценный дочерний геном.

*Комплементация* встречается в том случае, когда один из двух вирусов, инфицирующих клетку, в результате мутации синтезирует нефункциональный белок. Немутантный вирус, синтезируя полноценный белок, восполняет его отсутствие у мутантного вируса.

*Фенотипическое смешивание* наблюдается в том случае, если при смешанном заражении чувствительной клетки двумя вирусами часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам, при сохранении неизменности генотипа.

## 5.6. ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Генетические методы применяются в практических целях как для обнаружения микроба в исследуемом материале без выделения чистой культуры, так и для определения таксономического положения микроба и проведения внутривидовой идентификации.

### 5.6.1. Методы, используемые для внутривидовой идентификации бактерий

Рестрикционный анализ основан на применении ферментов, носящих название «рестриктаз». Рестриктазы представляют собой эндонуклеазы, которые расщепляют молекулы ДНК, разрывая фосфатные связи не в произвольных местах, а в определенных последовательностях нуклеотидов. Особое значение для методов молекулярной генетики имеют рестриктазы, которые узнают последовательности, обладающие центральной симметрией и считывающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии, так называемыми *палиндромами*. Точка разрыва ДНК может или совпадать с осью симметрии, или быть сдвинута относительно нее.

В настоящее время из различных бактерий выделено и очищено более 175 различных рестриктаз, для которых известны сайты (участки) узнавания (рестрикции). Выявлено более 80 различных типов сайтов, в которых может происходить разрыв двойной спирали ДНК. В геноме конкретной таксономической единицы находится строго определенное (генетически задетерминированное) число участков узнавания для определенной рестриктазы. Если выделенную из конкретного микроба ДНК обработать определенной рестриктазой, то это приведет к образованию строго определенного количества фрагментов ДНК фиксированного размера. Размер каждого типа фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле: мелкие фрагменты перемещаются в геле быстрее, чем более крупные фрагменты, и длина их пробега больше. Гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют в ультрафиолетовом излучении. Таким способом можно получить рестрикционную карту определенного вида микробов.

Сопоставляя карты рестрикции ДНК, выделенных из различных штаммов, можно определить их генетическое родство, выявить

принадлежность к определенному виду или роду, а также обнаружить участки, подвергнутые мутациям. Этот метод используется также как начальный этап метода определения последовательности нуклеотидных пар (секвенирования) и метода молекулярной гибридизации.

**Определение плазмидного профиля бактерий.** Плазмидный профиль позволяет произвести внутривидовую идентификацию бактерий. Для этого из бактериальной клетки выделяют плазмидную ДНК, которую разделяют электрофорезом в агарозном геле для определения количества и размеров плазмид.

**Риботипирование.** Последовательность нуклеотидных оснований в оперонах, кодирующих рРНК, характеризуется наличием как консервативных участков, которые подверглись малым изменениям в процессе эволюции и имеют сходное строение у различных бактерий, так и переменных последовательностей, которые родо- и видоспецифичны и являются маркерами при генетической идентификации. Эти опероны представлены на бактериальной хромосоме в нескольких копиях. Фрагменты ДНК, полученные после обработки ее рестриктазами, содержат последовательности генов рРНК, которые могут быть обнаружены методом молекулярной гибридизации с меченой рРНК соответствующего вида бактерий. Количество и локализация копий оперонов рРНК и рестрикционный состав сайтов, как внутри рРНК-оперона, так и по его флангам, варьируют у различных видов бактерий. На основе этого свойства построен метод *риботипирования*, который позволяет производить мониторинг выделенных штаммов и определение их вида. В настоящее время риботипирование проводится в автоматическом режиме в специальных приборах.

**Мультилокусное секвенирование-типирование.** Метод генетического типирования, основанный на определении последовательности нуклеотидов в небольших фрагментах (500 н.п.) ряда генов, с последующим сравнением соответствующих последовательностей у разных микроорганизмов. Чаще анализу подвергаются «гены домашнего хозяйства», которые необходимы для протекания реакций основного метаболизма бактериальной клетки и, следовательно, присутствуют у всех бактерий. В силу своей исключительной важности они характеризуются низкой скоростью накопления мутаций.

Сравнение нуклеотидных последовательностей таких генов позволяет легко установить степень филогенетического родства между популяциями и систематизировать их.

### 5.6.2. Методы, используемые для обнаружения микроба без выделения его в чистую культуру

**Метод молекулярной гибридизации** позволяет выявить степень сходства различных ДНК. Применяется при идентификации микробов для определения их точного таксономического положения, а также для обнаружения микроба в исследуемом материале без его выделения в чистую культуру. Метод основан на способности двухцепочечной ДНК при повышенной температуре (90 °С) в щелочной среде денатурировать, то есть расплетаться на две нити, а при понижении температуры на 10 °С вновь восстанавливать исходную двухцепочечную структуру. Метод требует наличия молекулярного зонда.

*Зондом* называется одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, меченная радиоактивными нуклидами, ферментом, флюорохромным красителем, с которой сравнивают исследуемую ДНК.

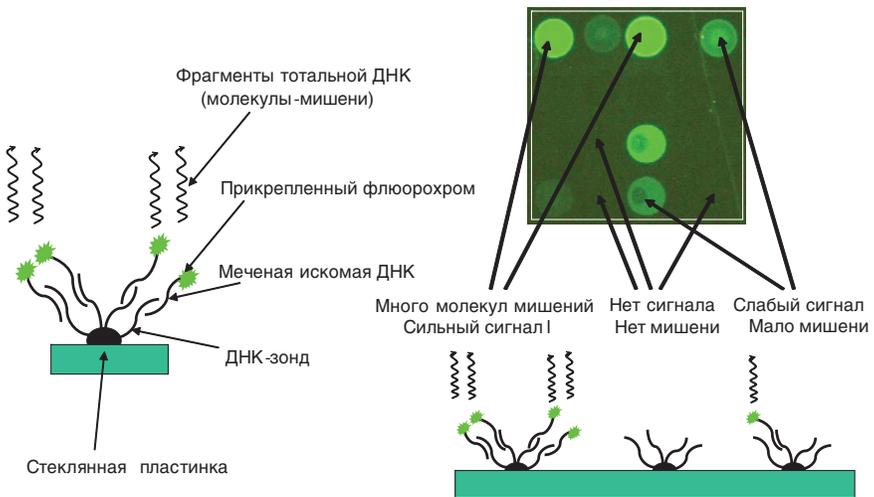
Для проведения молекулярной гибридизации исследуемую ДНК расплетают указанным выше способом, одну нить фиксируют на специальном фильтре, который затем помещают в раствор, содержащий зонд. Создаются условия, благоприятные для образования двойных спиралей. При наличии комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют между собой двойную спираль, факт которой фиксируют методами в зависимости от типа метки зонда: подсчетом радиоактивности, иммуоферментным анализом или денситометрией.

### Определение наличия микроба в исследуемом материале с помощью микрочипа

Микрочип представляет стеклянную пластинку, с которой связано от 100 до 1000 молекулярных ДНК-зондов, представляющих последовательность нуклеотидов, специфичных для данной таксономической единицы, локализованных в определенных участках (рис. 5.7).

Из исследуемого образца выделяют общую ДНК, которую можно амплифицировать по стабильной последовательности 16S РНК-гену. Выделенную ДНК метят флюорохромом или ферментом и обрабатывают ею микрочип, создавая условия для гибридизации. Отмывают несвязавшуюся ДНК, определяют локализацию молекулярных гибридов постановкой иммуоферментного анализа или денситометрией.

**Полимеразная цепная реакция** позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по наличию в нем ДНК микроба без выделения последнего в чистую культуру.



**Рис. 5.7** Принцип обнаружения специфической последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты с помощью микрочипа

Для проведения этой реакции из исследуемого материала выделяют ДНК, в которой определяют наличие специфичного для данного микроба гена. Обнаружение гена осуществляют его накоплением. Для этого необходимо иметь праймеры (затравки) комплементарного 3'-концам ДНК исходного гена. Накопление (амплификация) гена выполняют следующим образом. Выделенную из исследуемого материала ДНК нагревают. При этом ДНК распадается на две нити. Добавляют праймеры. Смесь ДНК и праймеров охлаждают. При этом праймеры при наличии в смеси ДНК искомого гена связываются с его комплементарными участками. Затем к смеси ДНК и праймера добавляют ДНК-полимеразу и нуклеотиды. Устанавливают температуру, оптимальную для функционирования ДНК-полимеразы. В этих условиях в случае комплементарности ДНК гена и праймера происходит присоединение нуклеотидов к 3'-концам праймеров, в результате чего синтезируются две копии гена. После этого цикл повторяется снова, при этом количество ДНК гена увеличивается каждый раз вдвое (рис. 5.8). Проводят реакцию в специальных приборах-амплификаторах. Результат оценивают последующей денситометрией амплифицированной ДНК или ее электрофорезом в полиакриламидном геле. Полимеразную цепную реакцию применяют для диагностики вирусных и бактериальных инфекций.

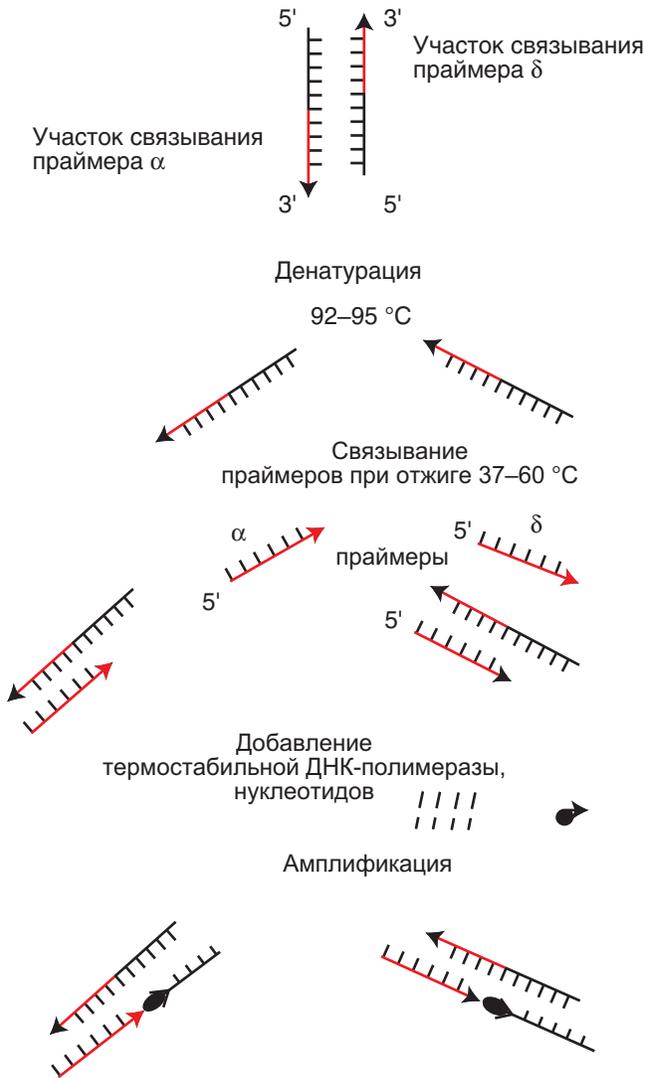


Рис. 5.8. Полимеразная цепная реакция (схема)

Для обнаружения РНК-содержащих вирусов используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), включающую предварительный этап синтеза комплементарной ДНК на матрице искомой РНК при помощи ОТ.

**Полимеразная цепная реакция в реальном времени** представляет ускоренный метод полимеразной цепной реакции, при котором амплификация и определение продукта амплификации проводится одновременно. Полимеразная цепная реакция в реальном времени позволяет провести полный анализ пробы в течение 20–60 мин и теоретически способна обнаружить даже одну молекулу ДНК или РНК в пробе. Для этой цели в амплификационную пробирку вводят дополнительный молекулярный зонд, комплементарный средней части амплифицируемого фрагмента. К концам этого зонда присоединены флуорофор и тушител. Когда флуорофор и тушител связаны с разными концами олигонуклеотидного зонда, тушител подавляет свечение флуорофора. Во время процесса амплификации, когда этот зонд связывается с амплифицированной цепью за счет 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы, флуоресцентная метка переходит в раствор, освобождаясь от соседства с тушителем, и генерирует флуоресцентный сигнал, усиливающийся в реальном времени пропорционально накоплению амплификата (рис. 5.9). Реакция проводится в автоматическом режиме.

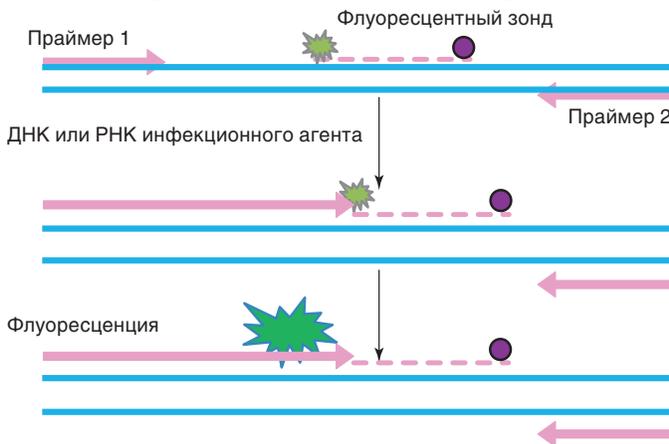


Рис. 5.9. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (схема)

**Опосредованная транскрипцией амплификация рРНК** используется для диагностики смешанных инфекций. Этот метод основан на обнаружении с помощью молекулярной гибридизации амплифицированных рРНК, специфичных для определенного вида бактерий. Исследование проводят в три этапа:

- 1) амплификация пула рРНК на матрице, выделенной из исследуемого материала ДНК с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы;

- 2) гибридизация накопленного пула рРНК с комплементарными видоспецифическими рРНК-олигонуклеотидами, меченными флюорохромом или ферментами;
- 3) определение продуктов гибридизации методами денситометрии, иммуноферментного анализа.

Реакцию проводят в автоматическом режиме в установках, в которых одномоментное определение рРНК, принадлежащих различным видам бактерий, достигается разделением амплифицированного пула рРНК на несколько проб, в которые вносят для гибридизации комплементарные видоспецифические рРНК-меченые олигонуклеотиды.

## 5.7. ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

**Генная инженерия** — технология получения рекомбинантных ДНК, содержащих ген, экспрессия которого приводит к синтезу полезного для нужд человека вещества. Генная инженерия является инструментом *биотехнологии* (от греч. *bios* — жизнь, *tesen* — искусство, *logos* — наука) — *области знаний, которая на основе изучения биотехнологических процессов, протекающих в живой клетке, использует эти процессы для получения полезных для человека веществ в промышленных условиях.*

С помощью биотехнологических процессов получают профилактические, лечебные и диагностические препараты, в том числе вакцины, антибиотики, лечебные сыворотки и иммуноглобулины, диагностические системы и др.

Генная инженерия является инструментом новейшей биотехнологии. Она позволяет непосредственно вмешиваться в генетический аппарат и служит для получения генетически модифицированного организма, обладающего желанными качествами.

Основу генной инженерии составляют результаты открытий, сделанных во второй половине XX в.

- Открытие ферментов *рестриктаз* (Смит Х., Натанс Д., Арбер В., 1970)
- Создание синтезатора гена, специального аппарата, снабженного ЭВМ, в память которой заложены программы синтеза различных нуклеотидных последовательностей.
- Разработка метода *секвенирования*, определения последовательности нуклеотидных оснований в гене (У. Гильберт, Ф. Сэнгер).

Методика получения рекомбинантных ДНК основана на использовании *рестриктаз* (см. раздел 5.6.1.1) 2-го типа, которые разрушают двойную спираль ДНК в районе *палиндромных последовательностей*. *Палиндромные последовательности обладают центральной симметрией и считываются одинаково в обе стороны от симметрии* (рис. 5.10).

Точка разрыва может совпадать с осью симметрии, а может быть сдвинута относительно ее, как в случае действия рестриктазы EcoR1. В результате действия такой рестриктазы образуются фрагменты, с комплементарными одноцепочечными концами, которые могут соединяться посредством водородных связей между комплементарными основаниями, после чего посредством фермента ДНК-лигазы происходит сшивка фрагментов с образованием ковалентных связей между соседними нуклеотидами. Причем сшиваться могут различные фрагменты ДНК. Если один из двух фрагментов ДНК, используемых при конструировании рекомбинантной молекулы ДНК, будет представлять самостоятельный репликон, например плазмиду, то таким образом можно встроить требуемый ген в плазмиду. При этом репликон (плазида) становится носителем, или *вектором*, для гена, если эту рекомбинантную плазмиду передать в бактериальную или дрожжевую клетку, в которой эта рекомбинантная плазида будет реплицироваться, размножая при этом встроенный в нее ген. Передача плазмиды в бактериальную или дрожжевую клетку осуществляется методом электропарации. Схема получения рекомбинантной плазмиды показана на рис. 5.11. Для клонирования чужеродных фрагментов ДНК в составе репликона Ф. Больваром и Р. Родригесом была специально сконструирована искусственная плазида рBR 322.

Для отбора клонов бактерий, несущих гибридную плазмиду, проводят идентификацию методом гибридизации зондом, несущим требуе-

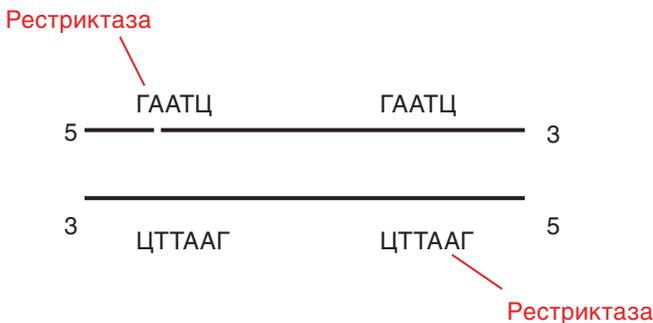


Рис. 5.10. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (схема)

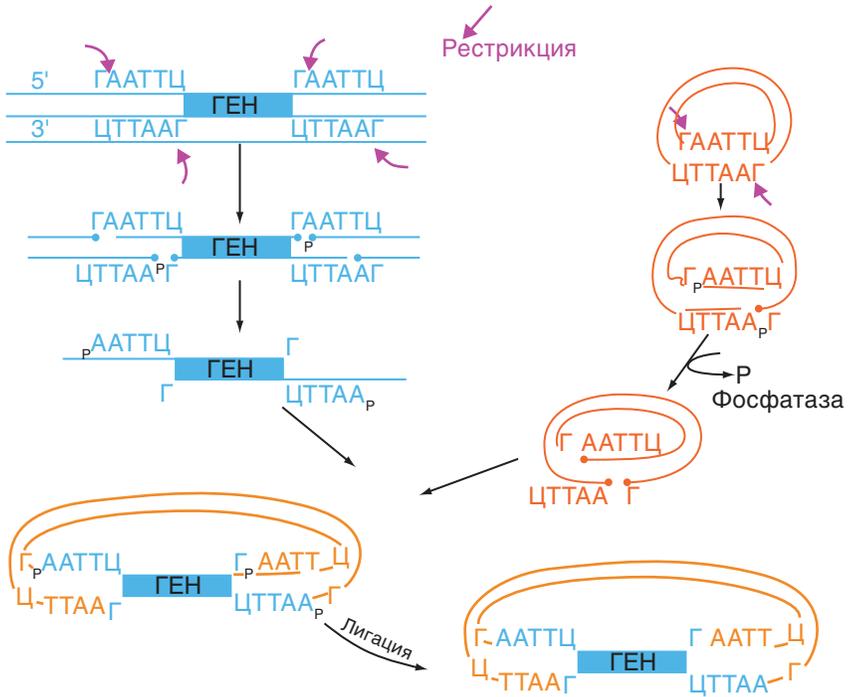
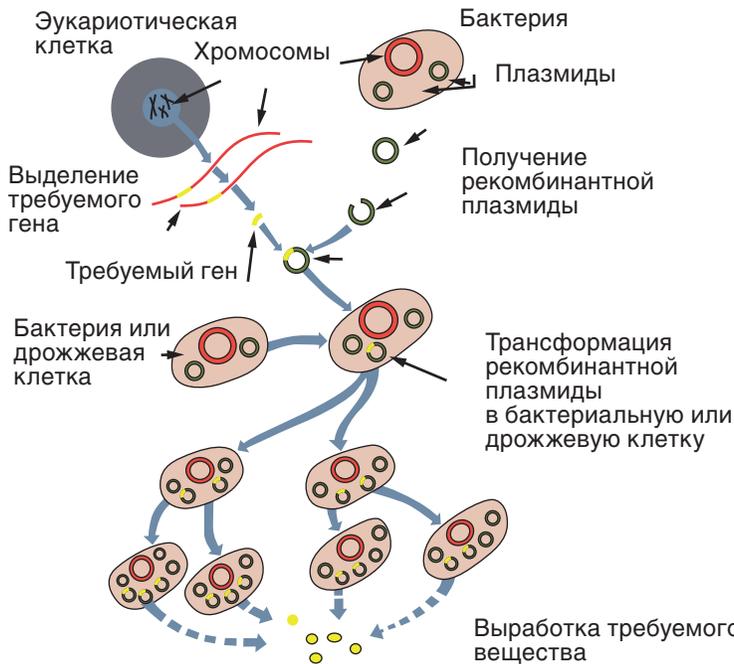


Рис. 5.11. Получение гибридной плазмиды (схема)

мый ген, или вводят в плазмиду генный маркер, например ген устойчивости к какому-то антибиотику. В этом случае клон бактериальных клеток, несущих рекомбинантную плазмиду, можно выделить на питательной среде, с добавлением антибиотика.

Определив методом секвенирования нуклеотидную последовательность генов, детерминирующих синтез требуемых для человека веществ, в настоящее время на основе этой последовательности нуклеотидов синтезируют искусственный ген, к концам которого присоединяют с помощью ферментов лигаз *линкеры* — синтетические фрагменты ДНК, несущие сайты рестрикции. Такая структура затем может быть встроена в плазмиду-вектор, которая будет передана в клетку для экспрессии продукта желанного гена.

Методы рекомбинантной ДНК открывают широкие перспективы в развитии медицины, ветеринарии и других отраслях народного хозяйства. В настоящее время получены рекомбинантные штаммы бактерий, продуцирующие инсулин, гормон роста, интерферон (ИФН) (схема их полу-



**Рис. 5.12.** Схема получения рекомбинантных инсулина и интерферона

чения на рис. 5.12). Методом рекомбинантной ДНК получены рекомбинантная вакцина против гепатита В (см. гл. 16) и рекомбинантная вакцина Gardasil для предупреждения развития рака шейки матки (см. гл. 16).

### Задания для самоподготовки (самоконтроля)

**А.** Назовите процесс, в котором принимает участие бактериофаг:

1. Конъюгация.
2. Трансформация.
3. Трансдукция.
4. Репарация.

**Б.** Назовите свойства плазмиды, необходимые для осуществления передачи хромосомы путем конъюгации:

1. Интегративность.
2. Гипермутабельность.
3. Трансмиссивность.
4. Суперспирализованность.

**В.** Назовите структуры, которые участвуют в распространении генов в популяции бактерий:

1. Плазмиды.
2. Интегрон.
3. Транспозон.
4. Репликон.

**Г.** Назовите ферменты, которые применяются в генной инженерии:

1. Рестриктазы.
2. Лигазы.
3. Протеазы.
4. ДНК-полимераза.

**Д.** При санитарно-бактериологическом контроле продукции молочного завода из образцов сметаны был высеян возбудитель дизентерии *Shigella flexneri*. Сразу же была проведена проверка сотрудников этого завода на бактерионосительство, во время которой от сотрудника К. был выделен возбудитель того же вида и серовара. Назовите метод, который можно использовать для внутривидовой идентификации выделенных культур, позволивший подтвердить или опровергнуть тот факт, что сотрудник К. был источником заражения продукции.