

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ ПО ОСВОЕНИЮ
ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.08 НОМЕНКЛАТУРА И СИСТЕМАТИКА ПРОКАРИОТ

Направление подготовки (специальность) 06.04.01 Биология

Профиль образовательной программы Микробиология

Форма обучения очно-заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Тематическое содержание дисциплины.....	3
2.	Методические рекомендации по выполнению курсовой работы (проекта)....	7
3.	Методические рекомендации по выполнению индивидуальных домашних заданий (контрольных работ)	7

1. Тематическое содержание дисциплины

1.1. Тема 1: «Основы современной номенклатуры и систематики микроорганизмов»

1.1.1. Перечень и краткое содержание рассматриваемых вопросов:

1. Номенклатура микроорганизмов. Использование биологических молекул в систематике и классификации.

Название микроорганизмам присваиваются в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий Д. Берджи (1984).

В микробиологии, как и в биологии, для обозначения вида бактерий принята двойная (бинарная) номенклатура, предложенная еще в XVIII в. К. Линнеем.

Основной номенклатурной единицей является вид. В.Д. Тимаков (1973) дает ему следующее определение: «Вид - это совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходных по морфологическим и биологическим свойствам, обладающих наследственно закрепленной способностью вызывать в среде естественного обитания качественно определенные специфические процессы».

В микробиологии существует два различных подхода к систематике, обуславливающие два вида классификации.

В основе первого лежит идея создания естественной (филогенетической) классификации прокариот, то есть построения единой системы, объективно отражающей родственные отношения между разными группами и историю их эволюционного развития.

Второй подход к систематике преследует практические цели и служит для идентификации, то есть установления принадлежности микроорганизма к определенному виду. Это искусственная классификация (традиционная).

2. Хемотаксономическая систематика.

«Фингерпринтинг» используется для оценки общей степени сходства, и представляет собой общий срез какого-то класса соединений, содержащихся в клетке, без идентификации отдельных компонентов. Фингерпринтинг может применяться для идентификации штаммов и видов бактерий.

На уровне ДНК фингерпринтинг это: (1) ПДРФ-анализ, (2) RAPD-анализ, (3) риботипирование.

«Химический фингерпринтинг» (1) определение белкового состава клетки, (2) масс-спектрометрия продуктов пиролиза, (2) спектрофотометрия и инфракрасная фурье-спектроскопию (ИК-ФС).

Белковый состав. Применяется метод белковых профилей, когда электрофорезу подвергают растворимую фракцию белков. При этом клетки должны быть выращены в контролируемых условиях. Методы электрофореза белков: гелевый, двумерный, капиллярный.

Спектрофотометрия позволяет выявить спектр поглощения пигментами в видимой области. Применяется для изучения фотосинтезирующих бактерий и других пигментированных прокариот. ИК-ФС основан на выявлении максимумов поглощения веществ в инфракрасной области.

Пиролиз – разложение в инертной атмосфере под действием высоких температур или лазерного излучения. Например, при пиролизе расщепляются миколовые кислоты, что дает возможность изучения продуктов их расщепления методом газовой хроматографии. Другой путь анализа продуктов – масс-спектрометрия.

3. Идентификация видов и штаммов путем анализа их белковых профилей и

нуклеотидных последовательностей.

В биоинформатики, **анализ последовательности** представляет собой процесс подвергая ДНК, РНК или пептидную последовательность любой из широкого спектра аналитических методов, чтобы понять его особенности, функции, структуру или эволюцию.

Анализ последовательностей может быть использован, чтобы назначить функцию генов и белков при изучении сходства между сравниваемыми последовательностями.

В настоящее время существует множество инструментов и методов, которые обеспечивают сравнение последовательностей и анализирующие продукт выравнивания, чтобы понять его биологию.

Анализ последовательностей в молекулярной биологии включает в себя очень широкий спектр важных тем:

1. Сравнение последовательностей, чтобы найти сходство, часто сделать вывод, если они связаны между собой (гомологичны)
2. Определение внутренних особенностей последовательности, такие как активные сайты, посттрансляционная модификация сайты, гены-структуры, рамки считывания , распределение инtronов и экзонов и регуляторных элементы
3. Определение различий последовательности и вариации, такие как точечные мутации и одного нуклеотидного полиморфизма (SNP), для того, чтобы получить генетический маркер.
4. Выявление эволюции и генетического разнообразия последовательностей и организмов
5. Определение молекулярной структуры из последовательности в одиночку

В молекулярной биологии и генетики , тот же процесс называется просто «секвенирование».

4. Методы гибридизации ДНК и их характеристика.

Метод молекулярной гибридизации (ДНК-гибридизация, ДНК-зонды) широко применяется для диагностики инфекционных болезней, в генетике, криминалистике и т.д. Метод основан на уникальном свойстве генетического материала организма – молекулы ДНК –, состоящей из мононуклеотидов, образовывать двойную спираль с комплементарно соединенными азотистыми основаниями. Известно, что молекула ДНК представляет полимер, состоящий из четырех видов дезоксирибонуклеотидов (dAMP, dGMP, dTMP, dCMP), соединенных между собой 3'- и 5'-фосфодиэфирными связями дезоксирибоз. Молекула ДНК образует двойную спираль, при которой азотистые основания первой цепи строго комплементарно соединяются водородными связями с азотистыми основаниями второй цепи, при этом аденин соединяется с тимином, гуанин с цитозином.

В основе гибридизации лежит тот же принцип спаривания комплементарных оснований, который обеспечивает репликацию ДНК или ренатурацию молекул. Способность к гибридизации двух препаратов нуклеиновых кислот является строгим тестом на комплементарность их последовательностей.

- а) нативная молекула ДНК,
- б) денатурированная молекула ДНК,
- в) ренатурированная молекула ДНК.

Способы гибридизации

Гибридизацию можно осуществлять в растворе или на фильтре. При гибридизации молекул в растворе препараты смешивают и определяют образование двухцепочечных молекул при отжиге по изменению гиперхромного эффекта или же по количеству метки в двухцепочечной ДНК. Удобным для работы является метод гибридизации с использованием фильтров. При этом один из препаратов ДНК иммобилизуют на нитроцеллюлозных фильтрах, на которых молекула ДНК адсорбируется. Фильтры с адсорбированной одноцепочечной ДНК обрабатывают таким образом, чтобы предотвратить дальнейшую адсорбцию одноцепочечных молекул.

Фильтр с адсорбированной ДНК погружают в раствор, содержащий второй препарат денатурированной ДНК (ДНК-зонд). Связывание ДНК-зонда происходит только в том случае, если он имеет комплементарную последовательность с первоначально адсорбированной на фильтре молекулой ДНК.

Эффективность гибридизации определяют по количеству метки, оставшейся на фильтре. Метод является очень чувствительным и применяется для изучения структуры гена. При этом необходимо иметь меченные радиоактивным изотопом РНК или ДНК-зонды, идентификация которых с исследуемой молекулой регистрируется с помощью **радиоавтографии**. В качестве зонда используют клонированную **ДНК-копию**, т.е. меченую радиоактивным изотопом молекулу ДНК с известной последовательностью нуклеотидов.

1.2. Тема 2: «Генетические характеристики, используемый в номенклатуре и систематике микроорганизмов».

1.2.1 Перечень и краткое содержание рассматриваемых вопросов:

1. Геномные характеристики штаммов и видов

Наиболее простой способ создания организмов с желаемым комплексом генетически обусловленных признаков – это скрещивание организмов, принадлежащих к противоположным половым типам.

1. Парасексуальный цикл у грибов. В селекционной работе для гибридизации грибов используют вегетативную гибридизацию: генетический материал двух вегетативных клеток обменивается в результате клеточного слияния – парасексуального цикла.

2. Конъюгация у бактерий. Кроме гомологичной рекомбинации, в результате которой в хромосомах происходит обмен аналогичными генами, существуют другие формы рекомбинации генов, при которых к геному клетки добавляются новые гены.

Плазмида способна интегрироваться с определенной хромосомой хозяина.

Значение метода гибридизации:

- возможность объединения в одном организме (клетке) желаемых свойств двух или более штаммов или видов;
- использование рекомбинантов, отобранных среди второго поколения гибридов, с оригинальными свойствами, нехарактерными родительским клеткам;
- обогащение генома выращиваемого микроорганизма мутациями, полученными независимо у разных штаммов;
- возможность переноса в клетку микроорганизма генов, нехарактерных для данного вида, а также возможность увеличения численности уже существующих генов, тем самым

усиливая те свойства микроорганизма, за которые отвечает данный ген.

Генетическая инженерия – это рекомбинация *in vitro*, заключающаяся в конструировании организмов с заданными свойствами путем целенаправленных операций над молекулами или структурами, несущими генетическую информацию. При этом видовая принадлежность организмов не меняется, но появляются не свойственные им признаки.

Некоторые исследователи различают три уровня генетической инженерии:

- 1) генная – прямое манипулирование рекомбинантными ДНК, включающими отдельные гены;
- 2) хромосомная – манипуляции с большими группами генов или целыми хромосомами;
- 3) геномная – перенос всего или большей части генетического материала от одной клетки к другой.

Метод молекулярных, или генных, зондов (ДНК-зондов) основан на реакции гибридизации между фрагментом нуклеотидной последовательности (зондом), несущим наиболее специфический и консервативный для данного вида бактерий ген, с полимерной ДНК изучаемого микроорганизма.

Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) дает возможность проводить сопоставительный анализ последовательностей в различных молекулах ДНК и РНК.

2. Методы молекулярного типирования микроорганизмов на основе ПЦР.

Методы молекулярного типирования микроорганизмов на основе ПЦР

ПЦР широко используется не только для диагностики и идентификации, но и для субвидового типирования и анализа генетического родства (клональности) выделенных штаммов микроорганизмов, особенно при проведении эпидемиологических исследований. По сравнению с традиционными фенотипическими методами (био-, фаго- и серотипированием) генотипирование на основе ПЦР отличается универсальностью, более глубоким уровнем дифференциации, возможностью использования количественных методов для оценки идентичности штаммов и высокой воспроизводимостью. Описано много методов генотипирования, которые можно рассматривать как производные технологии ПЦР.

3. Алгоритмы построения филогенетических деревьев.

Самым простым подходом к построению филогенетических деревьев является применение алгоритмов иерархической кластеризации, используя в качестве меры расстояния результат выравнивания последовательностей.

Другим восходящим иерархическим алгоритмом является алгоритм присоединения соседей (*Neighboring joining, NJ*).

Алгоритм состоит из следующих шагов:

- 1) на основании матрицы расстояний рассчитывается Q-матрица;
- 2) ищется пара узлов (g, y), для которых значение Q матрицы ($Q(i,j)$) минимально, и эти два узла соединяются с вновь созданным узлом (являющимся их LCA);
- 3) расстояния от выделенных узлов (i, j) до нового (k) рассчитываются по формулам
- 4) выделенные узлы (i, j) в матрице расстояний заменяются на новый (k), и

расстояния до остальных узлов (i) заново рассчитываются по следующей формуле:

5) если в матрице расстояний остались всего два узла, то алгоритм завершен, иначе переходим к пункту 1.

Молекулярные модели эволюции. Первые эволюционные модели замен в полимерах оперировали отдельными остатками. При этом исторически при анализе последовательностей ДНК был в ходу теоретический подход:

- модель Джукса — Кантора, подразумевавшая одинаковые (равные) частоты замен нуклеотидов;
- двухфакторная модель Кимуры, полагавшая разные частоты для транзиций и трансверсий;
- более поздние попытки учитывать колонную структуру кодирования белков.

2. Методические рекомендации по выполнению курсовой работы (проекта)

Не предусмотрено РП

3. Методические рекомендации по выполнению индивидуальных домашних заданий (контрольных работ)

Не предусмотрено РП